

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博士	氏名	今村 恵美
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Resistance to Cellular Stress in Tissue Culture and Differential Gene Expressions in Newborn and Neoplastic Hepatocytes in Comparison with Adult Hepatocytes in B6C3F1 Mice (培養条件下での新生児マウス肝細胞と肝腫瘍細胞の細胞ストレスに対する抵抗性、および成熟マウス肝細胞との遺伝子発現の違い)</p> <p>共著者名 本望 聡、吉江 真澄、柳沼 裕二、葛西 眞一、小川 勝洋</p> <p>未公表</p> <p>研 究 目 的</p> <p>生体から分離した細胞を培養条件下に曝すことは、細胞にとって強いストレスである。肝細胞は肝組織内では高い分裂能を有するが、培養条件下ではストレスに対して極めて弱い。我々は以前に初代培養条件下で正常成熟マウスの肝細胞と肝腫瘍細胞を比較したところ、正常成熟マウスは急速に細胞老化に陥って短期間で死滅するのに対して、肝腫瘍細胞は老化を示さず比較的長期間にわたって増殖を維持することを報告した。培養条件下におけるマウス細胞の老化は細胞に対するストレスを感知するメカニズムが存在して老化のプログラムを活性化し、様々な遺伝子発現を誘導することにより、細胞増殖を停止させるとともに特異な形質変化を起こさせるためとされている。また、このような細胞老化のメカニズムには、細胞周期を制御する遺伝子が深く関わっていることが知られている。今回、細胞同士が接触しない程度の低密度でかつ増殖因子を添加した培養条件下で初代培養を行ったところ、成熟マウス肝細胞は急速に細胞老化形態を示したのに対して、新生児肝細胞と肝腫瘍細胞は老化形質を示さず、比較的長期間増殖能を維持することが明らかになった。本研究ではこのような相違点を明らかにするために、成熟マウス、新生児マウスの肝細胞と肝腫瘍細胞について細胞周期調節遺伝子の発現状態の違いを <i>in vivo</i> と <i>in vitro</i> で比較した。さらに cDNA array 法を用いて、それぞれの遺伝子発現プロファイルを検討した。</p>			

材 料・方 法

正常肝および肝癌組織：胎生 20 日から生後 13 ヶ月間の様々な雄性 B6C3F₁ マウスから肝組織を摘出して材料とした。肝腫瘍は、生後 2 週令のマウスの腹腔内に diethylnitrosamine (DEN) を体重 g 当たり 5 μ g 投与して、その後正常条件で飼育することにより誘発した。

初代培養：正常肝細胞は生後 10 日および 13 ヶ月令のマウスからコラゲナーゼ灌流法により分離した。同様に肝腫瘍細胞は 10~14 ヶ月令の DEN 処置マウスから分離した。分離細胞は Percoll 法によりさらに生細胞を精製して、増殖因子(EGF、インスリン、トランスフェリン)添加または非添加の無血清 Williams' E 液にて培養した。培養細胞は経時的にデジタルカメラで撮影して形態変化を比較するとともに、MTT 法にて生細胞数の変化を測定した。

Western blotting：20 日目胎児から 13 ヶ月令の様々な年齢のマウスの肝組織および肝腫瘍組織から総蛋白を抽出して 10~15% polyacrylamide gel により電気泳動後、ニトロセルロース膜に blot した。さらにニトロセルロース膜に抗 cyclin D、cyclin E、cdk2、cdk4、p27^{Kip1}、p53、 α -Tubulin に対する抗体を 1 次抗体として反応させ、ECL kit を用いて反応を検出した。

免疫染色：肝組織を 4%ホルムアルデヒド PBS 液にて灌流固定後、パラフィン包埋し、連続切片を作製した。免疫染色は抗 cyclin D、cyclin E、cdk2、cdk4、p27^{Kip1} 抗体を一次抗体として ABC 法にて行った。また、一部のマウスには屠殺する 1 時間前に BrdU 50 μ g/体重 g を腹腔内投与して、抗 BrdU 抗体を用いて免疫染色を行い、S 期細胞を測定した。

cDNA array：生後 10 日および 13 ヶ月令のマウスの肝組織および肝腫瘍から total RNA を抽出し、reverse transcriptase および ³²P-dATP を用いて標識 cDNA を作製した。これらを Clontech 社の 1186 種類の遺伝子をスポットしたメンブランに hybridize し、メンブラン上の各遺伝子の発現を densitometer を用いて数値化した。

成 績

初代培養での細胞形態と増殖能：13 ヶ月令の正常肝細胞を増殖因子添加、無血清の Williams' E 液に細胞同士が接触しない程度の低密度 (10⁴ 個 /cm³) で初代培養したところ、細胞は dish に生着後に大きく広がり多核を示した。細胞の平均長径は培養 2 日目に培養開始時の 4.5 倍となったが、その後はネクロシスやアポトーシスによる細胞死に至り、培養 3 日目には生細胞数が培養開始時に比べて 50% に低下した。しかし、高密度 (10⁵ 個/cm³) で培養した場合および増殖因子非添加の条件下では細胞の広がり軽度であった。一方、生後 10 日令の正常肝細胞および肝腫瘍細胞では、増殖因子添加、低密度条件下でも細胞の広がり軽度で、培養 3 日目の生細胞数はそれぞれ、培養開始時に比べて 140%、80% であった。

in vivo における細胞周期調節遺伝子の発現：発生・成長過程の様々な段階の正常肝組織と肝腫瘍

組織について細胞周期調節遺伝子の発現を比較した。正常な胎児から新生児にかけて Western blotting で cyclin E、cdk2、cdk4 が強く発現していたが、生後 3 週目以降は発現が低下していた。cyclin D は生後 1、2 週で弱い発現が見られたが、3 週目以降には発現は消失していた。一方、p27^{Kip1} は胎児から成熟肝まで全てに発現が見られたが、新生児肝では成熟肝に比べて発現度が亢進していた。肝腫瘍組織では新生児肝と同様に cyclin D、cyclin E、cdk2、cdk4、p27^{Kip1} の発現が亢進していた。また、免疫染色では、胎児から新生児にかけての正常肝と肝腫瘍組織における BrdU の標識率は 10% 程度であったが、cyclin E と p27^{Kip1} は 47-72% の核で陽性であった。

in vitro における細胞周期調節遺伝子の発現：培養後 48 時間で、cyclin E、cdk2、cdk4 の発現強度は、成熟肝細胞、新生児肝細胞、肝腫瘍細胞でほぼ同等であった。また、cyclin D は新生児肝細胞、肝腫瘍細胞では発現していたが、成熟肝細胞では発現が見られなかった。一方、p27^{Kip1} と p53 は成熟肝細胞で発現が亢進していたが、新生児肝細胞、肝腫瘍細胞では低かった。cyclin B は新生児肝細胞で最も強く、正常肝細胞と肝腫瘍細胞ではそれより弱くほぼ同等であった。

in vivo と in vitro における遺伝子発現プロファイリング：生後 10 日および 13 ヶ月令マウスおよび肝腫瘍の初代培養 2 日目の細胞およびそれぞれの新鮮な組織について cDNA array を行い、肝腫瘍と正常 10 日および 13 ヶ月令肝の間での、遺伝子発現プロファイルと比較した。1186 種類の遺伝子のうち、発現のシグナル強度の最高値が 10 以上で 3 倍以上の差があった遺伝子数は、初代培養細胞、新鮮な組織ともに 109 であった。このうち、肝腫瘍組織では、ephrinB1、IGFBP1 などの発現が特異的に亢進しており、13 ヶ月令マウス肝では clusterin などが特に上昇していた。

考 案

齧歯類の細胞はヒトの細胞に比べてストレスに対する感受性が高く、培養条件下に曝すと早期に老化することが知られている。本研究では成熟マウス肝細胞は特にその感受性が高く、細胞同士が接触しない程度の低密度でかつ増殖因子を添加した培養条件下に初代培養を行うと、急速に細胞老化に陥って短時間で死滅することが明らかになった。しかし、新生児肝細胞や肝腫瘍細胞では同培養条件下で老化形態を認めず、比較的長期間にわたって増殖能を維持した。このような違いのメカニズムを明らかにするために細胞周期を調節する遺伝子の発現を調べるとともに、cDNA array により遺伝子発現プロファイルと比較したところ、細胞増殖を正と負に調節する因子の発現バランスの違いによると考えられた。

細胞老化に伴う増殖停止には、細胞周期の G1 期に発現する遺伝子が深く関わっている可能性が考えられる。細胞周期調節遺伝子の発現を比較したところ、cyclin D、cyclin E、cdk2、cdk4 は胎児、新生児肝および肝腫瘍で発現していたが、生後 3 週目以降は発現が低下した。一方、p27^{Kip1} は胎児から成熟肝まで全てに発現が見られ、また肝腫瘍でも高発現していた。また、免疫染色では、胎児から新生児にかけての正常肝と肝腫瘍組織における BrdU の標識率は 10% 程度であったが、cyclin E と p27^{Kip1} は 47-72% の核で陽性であった。cyclin E は G1 後期から S 期前半に発現し、G1-S 期の進行に重要な働きを持つが、その後は ubiquitin-proteasome pathway により分解消失することが知られている。一方、p27^{Kip1} は cdk2-cyclin

E に結合し、cdk2 活性を抑制する。したがって、新生児肝細胞、肝腫瘍細胞では p27^{Kip1} の高発現が cdk2-cyclin E を抑制しており、過剰な G1 後期から S 期への進行を抑制している可能性があり、このことが cyclin E の核標識率と BrdU による S 期細胞の標識率の大きな違いを生む原因と考えられた。

in vitro では、培養後 48 時間で cyclin E、cdk2、cdk4 の発現強度は、成熟肝細胞、新生児肝細胞、肝腫瘍細胞ではほぼ同等であり、また、cyclin D は新生児肝細胞、肝腫瘍細胞では発現していたが、成熟肝細胞では発現が見られなかった。これに対して p27^{Kip1}、p53 は成熟肝細胞で強く発現しており、新生児肝細胞、肝腫瘍細胞では低かった。p27^{Kip1} は増殖刺激によって発現が低下することが知られており、これは cdk2-cyclin E の活性化と関係すると考えられている。また、p53 は細胞ストレスによって活性化し、様々な遺伝子の転写活性を高めることにより細胞増殖を抑制するとともにアポトーシスを誘導する。したがって、培養条件下に曝すことにより、新生児肝細胞、肝腫瘍細胞では増殖促進に関連する因子の発現が亢進するのに対して成熟肝細胞は促進因子の発現は弱く、抑制因子の発現が亢進しており、少なくともこの違いが培養条件下での両者の反応の違いに関係しているものと考えられた。

さらに、広く遺伝子発現のプロファイルを比較するため、肝腫瘍、若年、成熟マウス肝細胞の初代培養細胞と新鮮な肝腫瘍および正常肝組織のそれぞれについて cDNA array を行ったところ、多数の遺伝子に発現の違いが見られた。その中で、肝腫瘍組織では ephrinB1、IGFBP1 などの発現が強く、成熟肝では clusterin などの発現が強かった。これらの遺伝子も培養条件下における正常肝細胞と肝腫瘍細胞のストレス感受性・耐性に関わっている可能性が考えられるが、詳しいメカニズムについては今後の課題である。

結 論

- 1) 新生児肝細胞および肝腫瘍細胞は正常成熟肝細胞に比べ培養条件下でのストレスに耐性である。
- 2) このようなストレスに対する耐性は細胞増殖を負に制御する因子に対して正に制御する因子が高発現しているためと考えられる。


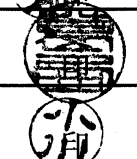

引 用 文 献

- 1) Sherr CJ and DePinho RA : Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? Cell 102:407-410, 2000
- 2) Mathon NF and Lloyd A. Cell senescence and cancer. Nat. Rev.1:203-213, 2001

参 考 論 文

Obata M, Imamura E, Yoshida Y, Goto J, Kishibe K, Yasuda A and Ogawa K : Resistance of primary cultured mouse hepatic tumor cells to cellular senescence despite expression of p16^{ink4a}, p19^{Arf}, p53, and p21^{Waf1/Cip1}. Mol. Carcinog. 32:9-18, 2001

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	今村 恵美
審査委員長 片桐 一  審査委員 葛西 真一  審査委員 小川 隆洋 			
学位論文題目 Resistance to cellular stress in tissue culture and differential gene expression in newborn and neoplastic hepatocytes in comparison with adult hepatocytes in B6C3F1 mice (培養条件下での新生児マウス肝細胞と肝腫瘍細胞の細胞ストレスに対する抵抗性、および成熟マウス肝細胞との遺伝子発現の違い)			
<p>正常細胞は試験管内では無限に増殖することができず、その点は樹立された癌細胞株と異なる大きな違いの一つである。試験管内で寿命に達した細胞は細胞老化と呼ばれる大きく広がった特徴的な形態と特異な遺伝子発現を示す。正常細胞が試験管内で存続できない理由は、ヒト細胞では主にテロメア喪失が原因になるのに対して、げっ歯類の細胞では培養下でのストレスが原因になると考えられている。</p> <p>本学位論文提出者は成熟マウス肝細胞は培養開始後、急速に細胞老化に陥り短期間に死滅するのに対して、肝腫瘍細胞は老化形態を示さず比較的長期間生き延びることを発見した。本論文では著者は幼児マウス肝細胞、成熟マウス肝細胞および肝腫瘍細胞を様々な条件下で初代培養し、細胞形態、増殖能を比較した。さらに、<i>in vivo</i>, <i>in vitro</i>における細胞周期調節蛋白の発現および cDNA array による遺伝子発現プロファイルを検討した。</p> <p>その結果、成熟マウス肝細胞は増殖因子存在下、低密度の条件下で細胞質が大きく伸展して増殖停止したのに対して、幼児肝細胞、肝癌細胞では</p>			

そのような形態を示さず、細胞数が増加した。細胞周期蛋白については、*in vivo* で新生児・幼児肝細胞、肝腫瘍細胞では cyclin D, cyclin E, cdk4, cdk2, p27^{Kip1} が高発現していたのに対して、成熟肝細胞では p27^{Kip1} 以外の発現は低下していた。また、培養後は成熟肝細胞では p53 が強く誘導されたが、幼児肝細胞、肝腫瘍細胞ではその発現は弱かった。一方、cDNA array による解析では成熟肝細胞、幼児肝細胞、肝腫瘍細胞のそれぞれに特徴的な遺伝子発現が見られた。これらのうち IGFBP1, ephrin B1, XIAP については蛋白レベルで新生児・幼児肝細胞、肝腫瘍細胞に高発現していることが確認された。以上の結果はマウス肝細胞のストレス高感受性のメカニズムの一端を明らかにしたものであり、また、肝発癌メカニズムを理解する上で重要な示唆を与えるもので、その学術的意義は大きい。当該論文提出者については諮問審査においても明確な回答が得られ、関連分野について十分な知識を有していることが明らかになった。よって本審査委員会は本論文は学位論文として価値があるものと判定した。