

学 位 論 文 の 要 旨

学 位 の 種 類	博 士	氏 名	今 井 浩 二
学 位 論 文 題 目 Resistance to Toxicity of the Hepatic Carcinogen in DRH Rats and Transfer of the Resistance to Donryu Rats by Bone Marrow cell Transplantation (DRH ラットの肝化学発癌耐性メカニズムの解析と骨髓幹細胞肝内移植による Donryu ラットへの肝細胞毒性耐性の移入) 共著者名 本望 聡、山本 雅大、吉江 真澄、玉川 進、 徳差 良彦、柳沼 裕二、小川 勝洋 未公表 研 究 目 的 癌は癌関連遺伝子変異の多段階的集積によると考えられているが、ヒト肝癌では慢性肝炎や肝硬変を背景として発生することや、化学発癌物質による動物肝発癌モデルにおいても慢性肝障害を伴うことから、肝発癌では持続的な肝障害による再生刺激が肝発癌プロモーターとして働くと考えられる。したがって、肝障害因子に対する肝細胞の感受性は同時に肝発癌に対するリスクを決定する大きな要因となる。 DRH/Sea ラットは、クローズドコロニー Donryu ラットに 3'-Me-DAB により肝癌を誘発した際に、肝発癌耐性のものを選択し、兄妹交配を 20 代以上繰り返す事によって得られたもので、親系の Donryu ラットに比較して約 10 倍肝発癌耐性を示す。しかし、この遺伝性肝発癌耐性については現在まで複数の遺伝子座が関係するとされているが、詳しいメカニズムは不明である。 本研究では第一に DRH ラットの発癌耐性が、肝細胞そのものが癌化しにくいことによるのか、それとも肝細胞が発癌剤の肝毒性に対して耐性であることによるのかを明らかにするために DRH と Donryu ラットの前癌細胞を分離し、肝発癌剤処理を行ったそれぞれの肝内に相互に移植することにより検討した。さら			

に、DRH の肝発癌耐性にどのような遺伝子が関わるかを明らかにするために肝障害作用を有する 2-AAF を慢性的に投与した後、cDNA array 法を用いて DRH ラットと Donryu ラットの肝における遺伝子発現の違いを検討した。また、近年骨髓中の骨髓幹細胞は肝内に移植するとオーバル細胞をへて肝細胞にまで分化することが報告されていることから、肝障害を受けた Donryu ラットの肝内に DRH ラット骨髓細胞を移植することにより DRH の発癌耐性を発癌感受性の Donryu の体内に移入できるか否か検討した。

材 料・方 法

肝発癌処理：生後 5 週齢の雄性 DRH 及び Donryu ラットに diethylnitrosamine (DEN) を 200 $\mu\text{g/g}$ 体重 腹腔内投与し、2 週間後から 0.03 % 2-acetylaminofluorene (2-AAF) 含有食を与え、その 1 週間後に 2/3 部分肝切除を行った (Solt & Farber 法)。部分肝切除の約 1 ヶ月後にコラゲナーゼ還流法により肝細胞を分離し、細胞浮遊液を作成した。

肝内移植：5 週齢 DRH 及び Donryu ラットに移植の 1 週間前より 0.03 % 2-AAF 含有食を与え、エーテル麻酔下で開腹し、移植直前に 2/3 部分肝切除を行った。肝細胞浮遊液、骨髓細胞、または両者を混合したものを腸間膜静脈より、肝細胞は 1 匹当たり 10^6 個または 10^5 個、骨髓細胞は 10^7 個移植した。

組織及び免疫染色：移植後 12 日目に開腹し、4 % パラホルムアルデヒド液にて肝を還流固定し、パラフィン包埋後、連続切片を作成した。組織切片は HE 染色後、オーバル細胞の増殖の程度を、正常肝とほぼ変わらない grade I から最も増殖の程度の高い III までの 3 段階に分類した。また、抗 GST-P 抗体による免疫染色を行い、Histofine kit を用いて ABC 法にて 1 次抗体の反応を検出した。プレバレートはデジタルカメラで撮影し、image tool (UTHSCSA) ソフトウェアを用いて GST-P 陽性前癌結節の単位面積当たりの個数と大きさを測定した。

リンパ球混合反応：雄性 DRH 及び Donryu ラットの脾細胞を、Lympholyte-Rat (CEDARLANE) を用いて精製した後、一方に X 線を 3300 rad 照射したのち、他方と混合し、RPMI1640 液にて培養した。これらの培養液に 4 日目に ^3H -thymidine (0.5 μCi) を加えて 5 日目にグラスフィルターにて回収し、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。

cDNA Array：0.03 % 2-AAF 含有食及び通常飼料を摂取した雄性 DRH 及び Donryu ラットの肝組織より RNA を抽出して cDNA を作成した。cDNA array メンブランは 1176 種類の遺伝子をスポットした Clontech 社の Atlas Rat Toxicology 1.2 cDNA expression array を用いた。cDNA をメンブランに hybridization 後、densitometer を用いてメンブラン上の各スポットを数値化し、DRH と Donryu ラットで遺伝子発現を比較した。

PCR 及び In situ hybridization：移植後 15 日目の肝組織から Genomic DNA を抽出し、Y 染色体のマーカーである SRY の primer を用いて PCR を行った。また、PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) を用いて PCR により SRY の DIG 標識 DNA Probe を作成し、組織切片を 95℃ 5 分加熱後、42℃ で 2 時間 hybridization し、Anti DIG-AP 抗体を反応させ、BCIP / NBT にて発色し、検出した。

結果

組織適合性の検討：リンパ球混合反応では DRH ラット同士、または Donryu ラット同士の組み合わせの対照群にくらべ、DRH と Donryu の組み合わせでは約 2 倍の高い反応が見られた。この結果より移植直後から犠牲死に至るまでの期間、免疫抑制剤 FK506（藤沢）を $0.2 \mu\text{g/g}$ 体重連日投与した。

移植後生存率：肝細胞単独移植では、recipient の Donryu ラットは移植後 Donryu 肝細胞、DRH/Sea 肝細胞移植群合わせて 13 日目までに 20 匹中 13 匹が死亡した。これに対して、DRH ラットの死亡数は 20 匹中 5 匹であった。一方、肝細胞・骨髄細胞同時移植したラットでは、Donryu の骨髄細胞を移植された群、DRH の骨髄細胞を移植された群で、死亡したものは移植後 15 日目までにともに 9 匹中 1 匹のみであった。

オーバル細胞の増殖：オーバル細胞の増殖は、肝細胞のみを移植した Donryu 群では grade I が 0/20 匹、grade II が 1/20 匹、grade III が 19/20 匹であったのに対して、DRH 群では grade I が 16/20 匹、grade II が 4/20 匹、grade III が 0/20 匹であった。肝細胞・骨髄細胞同時移植を行った Donryu ラットのうち、Donryu 骨髄細胞を移植した群では grade I が 0/9 匹、grade II が 3/9 匹、grade III が 6/9 匹であった。一方、DRH 骨髄細胞を移植した群では grade I が 0/9 匹、grade II が 5/9 匹、grade III が 4/9 匹であった。

細胞の生着：雄性 DRH 及び Donryu の肝細胞、骨髄細胞単独または同時移植を行った雌性 Donryu ラット肝では、移植後 15 日目で PCR により SRY の band が確認された。また、In situ hybridization により donor 由来の肝細胞及び骨髄細胞が生着し、骨髄細胞は肝細胞に分化していることが確認された。

移植前癌結節の数と大きさ：肝細胞単独移植では、GST-P 陽性結節の数は、①Donryu から Donryu 群では $30.7 \pm 12.7/\text{cm}^2$ 、②Donryu から DRH 群では $31.7 \pm 12.1/\text{cm}^2$ 、③DRH から Donryu 群では $23.6 \pm 6.8/\text{cm}^2$ 、④DRH から DRH 群では $29.9 \pm 12.1/\text{cm}^2$ と、各群で有意差は認められなかった。一方、結節の大きさについては①群 $137.7 \pm 88.5 \text{ mm}^2$ 、②群 $21.8 \pm 30.9 \text{ mm}^2$ 、③群 $113.5 \pm 70.2 \text{ mm}^2$ 、④群 $39.4 \pm 37.0 \text{ mm}^2$ で、recipient が Donryu である場合は有意に大きく、DRH である場合は小さかったが、donor についてはいずれであっても有意差は見られなかった。肝細胞・骨髄細胞同時移植した Donryu ラットでは、結節数は①Donryu 骨髄細胞移植群 $42.0 \pm 13.3/\text{cm}^2$ 、②DRH 骨髄細胞移植群 $44.5 \pm 15.6/\text{cm}^2$ で有意差は認められなかった。結節の大きさは①群 $94.7 \pm 125 \text{ mm}^2$ 、②群 $62.5 \pm 135 \text{ mm}^2$ で有意差は認められなかったが、オーバル細胞の増殖の grade で分けて解析すると grade III では①群 $91.3 \pm 104 \text{ mm}^2$ に対し②群 $79.4 \pm 150 \text{ mm}^2$ だったが、grade II では①群 $104.2 \pm 176 \text{ mm}^2$ に対し②群 $44.8 \pm 118 \text{ mm}^2$ で有意差を認めた。

遺伝子発現の比較：1176 の遺伝子のうち、0.03 % 2-AAF 含有食を与えた Donryu でバックグラウンドの 10 以上の高い発現を認めた遺伝子は 88、DRH ラットでは 116 で、そのうち双方でともに発現していたものは 74 であった。また、Donryu で DRH の 3 倍以上発現が認められたものは metallothionein 1 (MTs1) の 1 個であり、反対に DRH で Donryu ラットの 3 倍以上発現が認められたものは 16 で、その中には microsomal UDP-glucuronosyltransferase 1-3 (UDPGT)、catalase、cytochrome P450; 21-hydroxylase (CPY21)、thioredoxin peroxidase 2 (TDPX2) 等が含まれていた。

考 案

本研究では肝発癌耐性 DRH ラットと、その親系である Donryu ラットとを比較することによりその耐性のメカニズムを解析した。まず、Solt & Faber 法で処理した DRH/Sea 及び Donru ラットの肝内に、DRH 及び Donryu ラットの前癌肝細胞を相互に移植することにより検討したところ、Donryu ラットの肝組織環境に移植された DRH ラットの前癌肝細胞は、Donryu の前癌肝細胞と同様にプロモーションを受けて選択的増殖したのに対し、DRH の組織環境に移植された Donryu ラットの前癌肝細胞は DRH の前癌肝細胞と同様に、ほとんどがコロニーを形成しなかった。また、Solt & Faber 処理及び肝細胞移植を行った recipient の Donryu ラットでは高い死亡率を示し、移植後 12 日目までに 65% (13/20) が死亡し、肝組織は強い肝障害に伴うオール細胞の増殖が高度にみられたのに対して、recipient の DRH ラットでは死亡率は 25% (5/20) でオール細胞の増殖の程度も軽度であった。したがって、DRH の前癌肝細胞は Donryu の肝内では Donryu の前癌肝細胞と同様に振る舞い、Donryu の前癌肝細胞は、DRH の肝内では DRH の前癌肝細胞と同様に振る舞うことが明らかになった。すなわち、DRH の発癌耐性は cell autonomy によるものではなく、肝細胞が 2-AAF の毒性に耐性であるために選択的増殖が起こりにくいことによると考えられた。

cDNA Array では、2-AAF 非処理では遺伝子発現の有意な差は見られなかったが、2-AAF 処理後、UDPGT、CPY21、catalase、TDPX2 等の発現が DRH ラットで有意に高かった。この結果より DRH では薬物代謝や、ストレス応答遺伝子に Donryu との発現の違いがある可能性が示唆された。

一方、発癌感受性の高い Donryu に発癌耐性の DRH の骨髓細胞を移植し、Donryu に DRH の組織環境を移入できるか否かを検討した。骨髓細胞は肝細胞と比較して細胞のサイズが小さいため、肝細胞の 10 倍の細胞数を一度に移植することができ、細胞の生着率も肝細胞に比較してかなり高いとの報告がある。オール細胞の増殖の程度については Donryu 骨髓細胞移植群で grade I、II、III の比は 0%、33%、67%であったのに対して、DRH 骨髓細胞移植群では 0%、56%、44%で有意に grade III の割合が低かった。一方、結節の大きさはオール細胞の増殖の強い grade III では Donryu 骨髓細胞、DRH 骨髓細胞移植群で差は見られなかったが、grade II では有意に DRH/Sea 骨髓細胞移植群で小さかった。これは、そのような個体では DRH の骨髓幹細胞がオール細胞をへて肝細胞に分化し、肝組織環境が DRH のものに近づいたためと考えられた。

結 論

1. DRH ラット肝化学発癌耐性は肝発癌物質の毒性に耐性であるために、肝障害が起こりにくく、したがって、前癌細胞の選択的増殖が起こりにくいことによる。
2. DRH ラットの肝細胞毒性耐性を骨髄幹細胞移植により肝障害を受けた Donryu ラットに移入できる可能性が示唆された。

引用文献

1. Yokota K, Ogawa K, Mori M, Nagase S. Cancer Res 1988 Jan 15;48(2):387-92
2. Yan Y, Zeng ZZ, Higashi S, Denda A, Konishi Y, Onishi S, Ueno H, Higashi K, Hiai H. Carcinogenesis 2002 Jan;23(1):189-96
3. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Science 1999 May 14;284(5417):1168-70

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 井 浩 二
審査委員長 葛西 真一 審査委員 片桐 一 審査委員 高 後 裕 審査委員 小川 隆洋			
学 位 論 文 題 目 Resistance to Toxicity of the Hepatic Carcinogen in DRH Rats and Transfer of the Resistance to Donryu Rats by Bone Marrow Cell Transplantation (DRH ラットの肝化学発癌耐性メカニズムの解析と骨髓幹細胞肝内移植による Donryu ラットへの肝細胞毒性耐性の移入)			
ヒト肝癌は、慢性肝炎や肝硬変を背景として発生することや、化学発癌物質による動物肝発癌モデルにおいても慢性肝障害を伴うことから、肝発癌では持続的な肝障害とそれに伴う再生刺激が肝発癌プロモーターとして働くと考えられる。したがって、肝障害因子に対する肝細胞の感受性は同時に肝発癌に対するリスクを決定する大きな要因となる。 DRH ラットは、親系の Donryu ラットに比較して約 10 倍肝発癌耐性を示す。しかし、この遺伝性肝発癌耐性については現在まで複数の遺伝子座が関係するとされているが、詳しいメカニズムは不明である。 本研究では第一に DRH ラットの発癌耐性が、肝細胞そのものが癌化しにくいことによるのか、それとも肝細胞が発癌剤の肝毒性に対して耐性であることによるのかを明らかにするために DRH と Donryu ラットの前癌細胞を分離し、肝発癌剤処理を行ったそれぞれの肝内に相互に移植することにより検討し、その耐性が肝毒性に対する耐性によることを明らかにした。さらに、DRH の肝発癌耐性にどのような遺伝子が関わるかを明らかにするために肝障害作用を有する 2-AAF を慢性的に投与した後、cDNA array 法を用いて DRH ラットと Donryu ラットの肝における遺伝子発現の違いを検討し、ストレス応答遺伝子や、薬物代謝関連遺伝子の発現に差が見られることを明らかにした。また、近年骨髓中の骨髓幹細胞は肝内に移植するとオーバル細胞をへて肝細胞にまで分化することが報告され			

ていることから、肝障害を受けた Donryu ラットの肝内に DRH ラット骨髄細胞を移植することにより DRH の発癌耐性を発癌感受性の Donryu の体内に移入できるか否か検討し、統計的有意差はないものの DRH の骨髄細胞を移植された個体では、腫瘍の増大が抑制される傾向があることを明らかにした。

本論文では以上のことから、DRH ラットの肝発癌耐性は、肝毒性に対する耐性であり、その耐性にはストレス応答や薬物代謝に関連する複数の遺伝子が関係している可能性を明らかにした。さらに、その肝毒性に対する耐性を骨髄幹細胞移植により発癌感受性のラットに移入できる可能性を明らかにし、肝発癌のメカニズムに関する新知見をもたらした。

論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。以上の結果から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位に値すると判定した。