

(別紙様式1)

アルブミン遺伝子プロモーターを結合した

癌遺伝子による肝発癌

(02454164)

平成4年度科学研究費補助金(一般研究B)研究成果報告書

平成5年3月

研究代表者 小川勝洋

(旭川医科大学医学部教授)

は し が き

研究組織

- 研究代表者： 小 川 勝 洋 （旭川医科大学医学部教授）
- 研究分担者： 西 川 祐 司 （旭川医科大学医学部助手）
- 研究分担者： 太 田 知 明 （旭川医科大学医学部助手）

研究経費

平成2年度	2, 5 0 0	千円
平成3年度	4 0 0	千円
平成4年度	4 0 0	千円
計	3, 3 0 0	千円

研究発表

(1) 学会誌等

小川勝洋

無アルブミンラット肝臓内へのアルブミン産生肝細胞の移植、病態生理 8: 601-603, 1989

小川勝洋、太田知明、稲垣光裕、西川祐司

モザイク動物の肝研究への応用、肝臓病学の進歩 17: 1-8, 1991

Mitsuhiro Inagaki & Katsuhiko Ogawa

High sensitivity of neonatal rat hepatocytes to retroviral-mediated gene transfer and their transplantation into the spleen of adult rat. Cell Struct. Funct. 16: 283-288, 1991

Mitsuhiro Inagaki & Katsuhiko Ogawa

Retroviral-mediated gene transfer to neonatal rat hepatocytes and intra-splenic transplantation of the transduced hepatocytes. Transpl. Proc. 24: 2969-2970, 1992

小川勝洋、福田郁江

実験肝発癌、肝疾患研究の進歩 VII 7: 145-157, 1992

I. Otsu, H. Ikebukuro, T. Hoshi, K. Ogawa, M. Mito & M. Nozawa

Long-term effects of fetal liver transplantation in congenitally albumin-deficient rats. Transpl. Proc. 24: 2962-2963, 1992

小川勝洋

総説：化学肝発癌機序の分子生物学的研究の動向、日本臨床 51: 134-141, 1993

Katsuhiko Ogawa, Tomoaki Ohta, Mitsuhiro Inagaki & Sumi Nagase

Identification of F344 rat hepatocytes transplanted within the liver of congenic analbuminemic rats by the polymerase chain reaction. Transplantation (in press)

Yuji Nishikawa, Tomoaki Ohta, Katsuhiko Ogawa & Sumi Nagase

Disappearance of the glutathione S-transferase placental form expressed in the cultured rat hepatocytes by intrahepatic and intrasplenic transplantation. (submitted)

Tomoaki Ohta, Katsuhiro Ogawa & Sumi Nagase
Increase of serum albumin by intrahepatic transplantation of hyperplastic hepatic nodule cells of F344 rats does not correct quantitative abnormalities of serum proteins in analbuminemic rats. (submitted)

Tomoaki Ohta, Katsuhiro Ogawa & Sumi Nagase
Influence of the genetic background of analbuminemic rats on hepatic changes after carcinogenic treatments. (submitted)

Tomoaki Ohta, Katsuhiro Ogawa & Sumi Nagase
Increase of Albumin mRNA by repeated intrahepatic transplantation of F344 rat hepatocytes in congenic analbuminemic rats. (submitted)

(2) 口頭発表

小川勝洋、酒井博司、福田郁江、西川祐司、徳差良彦、長瀬すみ
F344 肝増生結節細胞の無アルブミンラット肝内への移植
第49回日本癌学会総会 1990. 9.3-5 (札幌)

稲垣光裕、齊藤義徳、小川勝洋
分離肝細胞への bacterial β -galactosidase gene (β -gal) 遺伝子の導入と
cytochemical staining による遺伝子発現の判定
第23回北海道病理談話会 1990.9.22 (札幌)

西川祐司、太田知明、小川勝洋
初代培養によりグルタチオンS-トランスフェラーゼP型を発現させたラット肝細胞の脾内及び肝内移植
第50回日本癌学会総会 1991.9.10-12 (東京)

小川勝洋、稲垣光裕、長瀬すみ
F344 congenic 無アルブミンラット肝内への正常 F344 肝細胞の移植
第80回日本病理学会総会 1991.4.3-4 (大阪)

稲垣光裕、西川祐司、小川勝洋
レトロウィルスベクターを用いた新生児ラット分離肝細胞への遺伝子導入、及び遺伝子導入肝細胞の脾内移植
第80回日本病理学会総会 1991.4.3-4 (大阪)

稲垣光裕、西川祐司、小川勝洋

レトロウィルスベクターによる新生児ラット分離肝細胞への遺伝子導入及び脾臓内移植

第7回初代培養肝細胞研究会 1991.6.7-8 (札幌)

西川祐司、太田知明、小川勝洋

脾臓内移植再生肝細胞の胆管形成能について

第24回北海道病理談話会 1991.9.22 (旭川)

太田知明、西川祐司、小川勝洋

無アルブミンラット(NAR)肝内への F344 ラット肝過形成結節細胞の移植による肝発癌

第24回北海道病理談話会 1991.9.22 (旭川)

太田知明、西川祐司、小川勝洋、長瀬すみ

F344 congenic 無アルブミンラット肝内への F344 ラット過形成結節細胞の移植

第81回日本病理学会総会 1992.5.14-16 (仙台)

西川祐司、太田知明、小川勝洋

GST-P 発現初代ラット肝細胞の脾臓内及び肝臓内移植

第8回初代培養肝細胞研究会 1992.6.19-20 (東京)

西川祐司、小川勝洋

増殖因子によるコラーゲンゲル内培養肝細胞の樹枝状形態形成の促進

第15回日本分子生物学会年会 1992.12.7-10 (京都)

太田知明、小川勝洋

F344 congenic 無アルブミンラット肝内への F344 ラット肝細胞の移植による正常アルブミン mRNA の検出

第25回北海道病理談話会 1992.9.5 (札幌)

Tomoaki Ohta, Katsuhiko Ogawa, Mitsuhiro Inagaki & Sumi Nagase

Elevation of albumin mRNA and serum albumin level after transplantation of F344 rat hepatocytes within the liver of congenic analbuminemic rats

Organ and Cell Transplants 1992.7.20 (Cambridge, MA, USA)

太田知明、小川勝洋、長瀬すみ

F344 congenic 無アルブミンラット肝内への F344 ラット肝細胞の移植と RT-PCR 法を用いた正常ラットアルブミン mRNA の検出

第 8 2 回日本病理学会総会 1993. 4. 6-8 (東京)

西川祐司、角浜孝行、小川勝洋

不死化マウス肝細胞のコラーゲンゲル内三次元形態形成における成長因子の影響

第 8 2 回日本病理学会総会 1993. 4. 6-8 (東京)

角浜孝行、徳光正行、西川祐司、小川勝洋

ヒト活性型 c-H-ras により形質転換したマウス肝細胞株の特性

第 8 2 回日本病理学会総会 1993. 4. 6-8 (東京)

斉藤義徳、小川勝洋

ラット肝癌細胞への正常 p53 遺伝子の導入と apoptosis の発現

第 8 2 回日本病理学会総会 1993. 4. 6-8 (東京)

Katsuhiro Ogawa & Yoshinori Saito

Apoptosis induced by the wild type p53 gene in rat hepatocellular carcinoma cell lines.

Am. Assoc. Cancer Res. 1993. 5. 19-22 (Orland, FL, USA)

研 究 成 果

[研究目的]

発癌は癌遺伝子、癌抑制遺伝子などの複数の癌関連遺伝子の異常が細胞内に集積する結果と考えられている。しかし、発癌の initiation, promotion, progression の各段階に、どの遺伝子のどのような変化が関連しているのかについては、多くの癌について未だほとんど判っていない。ラット、マウスの化学肝発癌モデルは多段階発癌の遺伝子解析に有効なモデルであり、多くの研究に利用されている。一方、従来 of 肝発癌実験では動物に発癌剤の処置を行い、それによって生ずる前癌病変及び癌について、遺伝子異常を含む様々の変化が調べられてきたが、最近では、トランスジェニックマウスのように逆に正常細胞に異常遺伝子を導入したり、遺伝子を過剰発現させることにより、肝癌を誘発し、肝発癌における遺伝子の働きを解析しようとする試みが行われている。本研究は正常動物から分離した肝細胞に *in vitro* で癌遺伝子を導入したのち、それを再び生体内に戻し、肝癌を誘発するモデルを作製することを目的とした。従来 of *in vivo* の肝発癌モデルでは、肝細胞内に取り込まれた化学物質が代謝過程で活性化されて特定の遺伝物質を修飾し、それによって肝細胞を癌化すると考えられているが、もしそのような遺伝子が明らかになった場合に、逆に正常の肝細胞にその遺伝子を導入して癌化できるか否かが問題となる。しかし、現在では肝細胞を長期培養することは難しく、トランスフェクション法による *in vitro* の肝発癌実験は未だ困難であるため、本実験では *in vivo* と *in vitro* のシャトルモデルを作製することを試みた。この方法は、従来 of *in vivo* 肝発癌モデルと相補し合うことにより、発癌遺伝子の解析に有用な手段となることが期待できる。しかし、この方法を確立するためには、① 肝細胞への外来遺伝子の導入及びその発現効率をいかに向上させるか、② *in vitro* で遺伝子操作した肝細胞をいかにして回収し、再び生体環境に戻すか、など技術的に困難な問題を多く残している。本研究ではこれらを克服するために、以下の点について実験を行った。

[研究計画・方法]

1) アルブミン遺伝子プロモーターのクローニングと癌遺伝子発現ベクターの作製

肝細胞でアルブミンや $\alpha 1$ -アンチトリプシン遺伝子などが強く発現しているのは、これらの遺伝子の調節領域に肝細胞特異的な転写因子が働くため、最近そのプロモーター領域の構造が明らかにされている。また、トランスジェニックマウスの実験ではアルブミン遺伝子のプロモーターを *ras* 遺伝子や *myc* 遺伝子上流に組み込むことにより、肝細胞特異的にこれらの遺伝子を発現しうることが報告されている。そこで癌遺伝子を肝細胞に導入後、効率よく発現させるために、ラットアルブミン遺伝子プロモーターをクローニングして、これを上流に付加した癌遺伝子発現ベクターの作製を試みた。方法はラット genomic DNA を鋳型としてアルブミン遺伝子の調節領域を PCR 法にて増幅し、これをプラスミドにクローニングしたのち、さらにアデノウィルス E1A の上流に挿入した。

2) レトロウィルス法による分離肝細胞への遺伝子導入

外来遺伝子を導入する方法としては電気穿孔法、リポソーム法、デキストラン法、レト

ロウィルス法など、様々の方法が報告されているが、この中で導入遺伝子の持続的発現が最も期待できるのはレトロウィルス法である。そこで β -galactosidase (β -gal) 遺伝子をレポーター遺伝子として MMTV-LTR, Thymidine Kinase プロモーターを含む pMNSM-Tk-lacZ vector を作製し、これを packaging cell line である Psi2 細胞に transfect し、ecotropic virus に封入した。次にこのウィルスを amphotropic virus の packaging cell line である PA317 細胞に感染させ、その培養上清中に産生された β -gal 遺伝子封入ウィルス粒子を分離肝細胞に感染させた。この系を用いてラットの年齢、立体培養と単層培養、培養開始後の時間などの条件について感染効率を比較検討した。

3) 分離肝細胞の肝内移植

肝内に分離肝細胞を移植できるか否かについては最近まで報告はなかったが、Gunn ラットの脾内に正常ラットの肝細胞を移植したのち、脾臓を摘出して、黄疸が悪化しないことや、HBs 抗原を導入したトランシジェニックマウスの肝細胞を syngenic mice の脾内に移植すると肝臓内に HBs 抗原陽性肝細胞が出現することが報告されており、肝内に分離肝細胞を移植できる可能性が考えられる。我々は、移植肝細胞を宿主肝細胞と区別するために F344 ラットと F344 congenic 無アルブミンラット (NAR) の組み合わせを用いて肝内肝細胞移植を行った。すなわち、F344 ラットの分離肝細胞を NAR の門脈内に注入し、その後、様々の期間に宿主を屠殺して肝内のアルブミン陽性肝細胞の数、アルブミン mRNA の量、血清アルブミン値をマーカーとして生着率を検討した。アルブミン mRNA の定量については reverse transcriptase-PCR 法により、微量の mRNA を増幅し、NAR 肝細胞にわずかに存在する異常 albumin mRNA を内部対照として定量化した。

4) 培養肝細胞の移植及び移植後の形質変化

培養肝細胞を回収して再び生体内に戻すことができるか否か、さらにそのような細胞は移植後どのような形態及び機能を示すかについて検討した。この目的には培養細胞の回収を容易にするためにスフェロイド培養法を用いた。すなわち肝細胞を疎水性プラスチックディッシュで培養すると、細胞は一時的にはプラスチック面に付着するが、次第にはがれるとともに凝集してスフェロイドを形成する。これらのスフェロイドは培養液中に浮遊しているか、きわめて緩くシャーレに付着しているために容易に回収することができる。そこで F344 ラット肝細胞をスフェロイド培養し、それらを NAR の肝内または脾内に移植した。一方、培養肝細胞は正常肝細胞とは様々の遺伝子の発現が異なっているため、そのような培養に伴う遺伝子発現の変化が、移植により正常に回復するか否かを検討した。これには培養後、著明に mRNA が上昇する glutathione s-transferase placental form (GST-P) と逆に低下する cytochrome p450 をマーカーとして検討した。

5) 遺伝子導入肝細胞の移植

外来遺伝子を in vitro で導入した肝細胞が移植後、生体内でもその遺伝子の発現を維持できるか否かについて検討した。初めの実験では前記の pMNSM-Tk-lacZ を導入した新生児ラット肝細胞のスフェロイドを同系成熟ラットの脾内に移植し、 β -gal の組織化学染色により、遺伝子発現を検討した。次に、C3H マウスの正常肝細胞を培養中に出現した不死

化肝細胞に EJ-ras 遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子をリポフェクション法で導入し、これを C3H マウスの皮下及び肝内に移植し、腫瘍の形成及び導入遺伝子の発現を検討した。

[結果]

1) アルブミン遺伝子プロモーターのクローニングと癌遺伝子発現ベクターの作製

外来遺伝子としてアデノウィルス E1A を選んだ理由は、正常肝細胞に存在しないこととこの働きにより培養肝細胞の増殖性や寿命に何らかの変化が起こることを期待したためである。まず、pUC18 プラスミドに E1A のコード領域を組み込んだもの (pUCE1A) を作製し、これを基本的なコンストラクトとした。次に、アルブミン遺伝子の肝特異的発現に重要であるとされるプロモーター領域を含む約 470 bp の断片を PCR で増幅し、pUCE1A に挿入した (pAlbE1A)。なお、Dideoxy 法により塩基配列を調べたところ、プロモーター領域塩基配列は既に報告されている配列に一致した。トランスフェクションは、MMTV-LTR が E1A の上流に挿入されたもの (pLTRE1A) を陽性対照とし、pUCE1A を陰性対照として用いた。成熟 F344 ラット分離肝細胞に、電気穿孔法により各コンストラクトを導入し、コラーゲン塗布プラスチックディッシュ上で培養した。12 時間から 24 時間後、培養肝細胞から mRNA を精製し、ノザンハイブリダイゼーションにより E1A の発現を検討したところ、E1A mRNA の発現は、プロモーターを含まない pUCE1A ではみられなかったが、pAlbE1A と pLTRE1A の両方で認められ、アルブミン遺伝子プロモーターが初代培養肝細胞において有効に働くことが確認された。しかし、初代培養肝細胞における pAlbE1A の発現は一過性のものに過ぎないため、G418 選択が可能な不死化肝細胞を使用するなどの工夫が必要と考えられた。

2) 肝細胞への transfection

amphotropic virus に封入した pMNSM-Tk-lacZ を成熟及び新生児ラット単層培養肝細胞に導入したところ、24 時間後から β -gal 染色陽性細胞が見られた。 β -gal 陽性細胞の出現頻度は新生児細胞の方が約 100 倍高い頻度を示した。一方、スフェロイド培養肝細胞についても同様に β -gal 陽性細胞の出現が見られたが、その頻度は単層培養の約半数であった。単層培養で 1 日後より 24 時間ウィルス含有培養上清で培養した後、正常培養液で養ったところ、 β -gal 陽性細胞は徐々に減少したが 7 日目でも残存していた。一方、肝細胞の DNA 合成能と感染効率との相関を調べるために BrdU で S 期細胞を標識後、抗 BrdU 抗体の免疫染色を行ったところ β -gal 陽性細胞出現率と S 期細胞数との間には明らかな相関は見られなかった。

3) 分離肝細胞の移植

肝細胞を肝内に移植した場合には、移植細胞と host 肝細胞との区別は組織学的には困難であるため、アルブミンを欠損する無アルブミンラット肝内に、同系の正常ラット肝細胞を移植し、アルブミン染色を用いて移植細胞の運命を追跡した。この移植系では、host 中の血清のアルブミン濃度の上昇も認められ、移植効果の判定に有効であった。移植効率は、1 匹当たり 2×10^6 個の肝細胞を移植した場合に最も高く、それ以上を注入すると死亡することが明らかになった。また、移植を 1 週おきに繰り返すと、移植回数を重ねる毎

に移植細胞数が増加する傾向が認められた。また、無アルブミンラット肝細胞に存在する微量の異常アルブミン mRNA と正常ラットのアルブミン mRNA は、exon の欠損の有無により RT-PCR 法で区別することが可能であり、移植された正常ラットに由来するアルブミン mRNA が host 肝内に存在していることが明らかとなった。以上より、肝細胞は同系のラット肝内に移植可能なことが証明された。

4) 培養肝細胞の移植

肝に移植された肝細胞スフェロイドは、移植後2日頃では凝集塊として門脈内に付着していたが、その後次第に小葉間結合織内に取り込まれ小葉内に移行する像が観察された。一方、脾に移植されたスフェロイドは、初めは赤脾髄内の凝集塊としてみられるが、移植後5日目頃には赤脾髄内に拡散し、肝細胞索様の構造を示した。以上より、培養肝細胞を肝内、脾内に移植することが可能であることが明らかになった。

移植された肝細胞は、肝内移植及び脾内移植いずれの場合においても、ほぼ正常の形態を示し、アルブミン産生が保たれていた。しかし、正常肝細胞では発現していないが、初代培養により発現が誘導される GST-P 及び逆に発現が低下する cytochrome p450 について移植後の発現を検討した結果、GST-P は脾内移植より肝内移植において速やかに消失し、逆に cytochrome p450 は上昇するすることが判明し、肝細胞の正常な表現型の維持のためには肝内移植が望ましいことが示唆された。

5) 遺伝子導入肝細胞の移植

pMNSM-Tk-lacZ を含むレトロウィルスベクターを感染させた新生児ラットのスフェロイドを感染後3日目に回収し、6～8週の同系ラットの脾内に注入した。注入後1日から2日目では移植スフェロイドは中心部が壊死に陥り、周辺部の細胞のみが生存していた。 β -gal 染色ではその中に陽性細胞が認められたが、移植後7日目では全く認められなかった。

一方、C3H マウスの正常肝細胞を無血清 William's E 培地で培養したところ、大部分は死滅したが、2週目頃よりコロニーが現れ、さらに培養を続けることにより不死化細胞を得ることができた。この細胞はアルブミン産生など、肝細胞の特徴を保持していた。この細胞に活性化 H-ras 遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子をリポフェクションにて導入し、G 418 で select したところ、21 個の形質転換クローンを得ることができた。これらの細胞については導入遺伝子が組み込まれていることが PCR 法で確認された。これらの細胞を C3H マウスの皮下に移植したところ、2週後に腫瘍の形成が見られ、低分化型肝癌の組織像を呈したが、門脈内に注入しても肝での腫瘍形成は見られなかった。

[総括と反省]

本研究は生体から分離した肝細胞に癌遺伝子を導入後、肝内に移植することにより、その働きを解析するモデルを確立することを目指した。しかし、この方法には乗り越えなければならないハードルとして、① 分離肝細胞にいかにして外来遺伝子を効率よく導入できるか、② 導入した遺伝子を安定に発現する細胞を移植に必要な細胞数を得ることができるか、③ その細胞を培養から回収して肝内に移植できるか、④ 移植した肝細胞は導入遺伝

子以外の働きは正常肝細胞に近い形質をとるかなどである。

我々はそれぞれの問題点に分けて実験を行ったが、第一の問題に関して様々の遺伝子導入法を試みたにも関わらず、多くの分離肝細胞について遺伝子発現は一時的であり、また、*in vitro* で持続発現する細胞を選択し、増殖させることは困難であった。また、一時的に発現する肝細胞を生体内に移植しても、生着効率がきわめて低く、この方法では *in vivo* での持続発現は期待が薄かった。今後、この点を解決するために、正常の肝細胞に近い形質を持つ不死化肝細胞を用いて、*in vitro* で遺伝子を安定に発現する細胞を選択・増殖させる方法が考えられる。現在、我々は、C3H マウスから樹立した自然不死化肝細胞がこの目的に合致すると考え、実験を進めている。

次に *in vitro* で培養した肝細胞を肝内に戻すことについては、spheroid 培養系と congenic 無アルブミンラットを用いた実験からある程度可能であることが明らかになり、また、そのような移植細胞は肝内で正常の機能を回復することが明らかになった。本研究の目指すシャトルモデルは肝発癌実験のみならず、先天代謝異常などの遺伝子治療の実験モデルにも応用可能と考えられ、今後さらなる改良を加え、検討を続けていきたいと考えている。