

学位論文題名

ヒト肝癌細胞株におけるアルドラーゼアイソザイムの
蛋白量および RNA 発現の検討

— 肝癌細胞株の分化誘導の試みも含めて

学位論文内容の要旨

はじめに

肝臓の癌化にともない肝組織のアルドラーゼ(ALD)アイソザイムパターンはALD-BからALD-Aへ変化することが酵素学的方法と電気泳動法による分析とで報告されてきた。今回、肝細胞の癌化におけるALDアイソザイム変化の意義を検討するために肝組織(胎児肝,新生児肝,成人肝),肝癌組織や肝癌細胞株(HepG2, PLC/PRF/5)のALD-A, ALD-BをRIA法を用い定量的に測定した。さらに肝癌細胞株の分化誘導を試み, ALDアイソザイムの蛋白量, mRNAの発現さらに α -フェトプロテイン(AFP)量, アルブミン量も検索して比較検討した。

1. 肝組織(胎児肝,新生児肝,成人肝)および肝癌組織

対象は成人肝10例,胎児肝1例,新生児肝1例,肝癌死亡の4例で組織は全例剖検例から得た。

2. 細胞培養

肝癌細胞株HepG2, PLC/PRF/5を用いHepG2は 1×10^6 個/シャーレ, PLC/PRF/5は 1.5×10^5 個/シャーレ,培養液はDMEM+10%FBS 5ml, 37°C, 5%CO₂存在下で培養した。

3. 培養方法,検体および薬剤

薬剤の入った培養液をday3まで24時間毎に交換し細胞,培養上清を回収した。薬剤処理しない培養はHepG2ではday10, PLC/PRF/5ではday5まで行った。細胞を超音波破碎後遠心し細胞質分画を得て測定に供し,3回実験を行った。トリパンブルー色素排除法にて生細胞数を算定した。添加する薬剤はDMSO 2%, HGF10ng/ml, TGF- β 1100pM, TPA100nMを使用した。

4. RIA法

Penhoetらの方法を改変し,ヒトALD-A,ヒトALD-Bを精製,ニワトリ(白色レグホン雌)に免疫して,抗血清を得た。浅香らの方法に従いALD-Aは二抗体法で,ALD-Bはサンドイッチ法で測定した。RIA法はA,Bサブユニットに特異的でありALD-Aは6-800ng/ml,ALD-Bは3-200ng/mlまで測定可能だった。

5. AFPおよびアルブミン測定

培養上清のAFP,アルブミンは市販の測定EIAキットを用いた。

6. ノーザン法

肝癌細胞株からAGPC法で抽出したtotal RNA 20 μ gをホルムアルデヒド法で電気泳動を行い、キャピラリー法にてナイロン膜にブロッティング、その後、真空下80°C 2時間加熱し、RNAをナイロン膜に固定した。

ニクトランスレーション法でプローブを³²Pで標識、ハイブリダイゼーション(42°C 16時間)を行い洗浄後、X線フィルムに暴露した。

ALD-Aのプローブは3'末端側のHinfI-AluI断片(220bp)、ALD-Bのプローブは3'末端側のHaeIII-DdeI断片(410bp)、内部標準として β -アクチンを用いた。

結果

1. 胎児肝ではALD-A量がALD-Bの約1.1倍多くみられたが新生児肝ではALD-B量がALD-Aの約2.9倍と含有量が逆転し、成人肝組織ではALD-B量はALD-Aの約17.5倍であった。肝癌組織ではALD-A量はALD-Bの約7.8倍含有されていた。肝癌細胞株のALD-A量は肝癌組織とほぼ同量含有されていたがALD-B量はPLC/PRF/5では測定感度以下、HepG2ではALD-Aの1/189と極めて低値であった。

HepG2におけるALD-A mRNAはday1からday5と増強したがday10ではday5とほぼ同程度の発現を示した。ALD-B mRNAの発現はday5以降に認め、day10でもday5とほぼ同様であった。PLC/PRF/5におけるALD-A mRNAはday5まで検討を行なったが、発現は漸増していた。ALD-B mRNAの発現は認められなかった。

2. ALD-A量はHepG2のday1ではHGF群、TGF- β 1群、TPA群では低下、day2ではDMSO群、HGF群、TGF- β 1群で低下、day3になるとDMSO群では低下していた。PLC/PRF/5ではday1でTGF- β 1群のみ低値を示したがday3になるとTGF- β 1群、DMSO群ともコントロールとほぼ同様のALD-A量を示した。

ALD-A mRNAはHepG2のHGF群のday1、DMSO群のday1、day3で発現の低下はわずかであったが、TGF- β 1群、TPA群ではday1で低下する傾向を示した。PLC/PRF/5におけるALD-A mRNAの発現は、DMSO群、TGF- β 1群でday1で低下する傾向を示した。

3. ALD-Bの発現がみられたHepG2において薬剤処理による影響を検討した。day1ではHGF群、TPA群でALD-B量は低値を示し、day3ではDMSO群が低値を示した。ALD-BのmRNAは薬剤処理した後も変化は認められず、発現を検出することはできなかった。

4. AFP量、アルブミン量はHepG2、PLC/PRF/5ともに薬剤処理群においてもday1からday3と経過するにつれて増加したが、コントロールに比較すると低値を示した。

5. 薬剤処理により細胞数はコントロールより低値を示す群が多かった。

考案

今回の研究ではヒトALD-A、Bに特異的なRIA法を用い肝組織、肝癌組織、肝癌細胞株のALD-A、Bのアイソザイム量の定量を行ない、それぞれの組織のALDアイソザイムパターンは従来の方法を用いた分析と同様の結果であったが、ALDアイソザイム変化を蛋白量で定量的に確認することができた。

肝癌組織、肝癌細胞株のALDアイソザイムパターンは胎児肝のそれと類似しておりALDアイソザイムの脱分化現象として説明され、癌胎児性蛋白質の性格を示していると考えら

れた。

肝癌細胞株を用い薬剤処理による分化誘導をALDアイソザイム、培養上清中のAFP量、アルブミン量をマーカーとしてその変動について検討したがALD-A,B蛋白量、mRNAともに薬剤処理群で低値、発現の抑制を示し、AFP量、アルブミン量も低下し今回検討したマーカーからは分化を誘導することはできなかったと思われた。

結語

1)胎児肝ではALD-A量が多く、新生児肝ではALD-B量が次第に増加し、成人肝組織ではALD-B量が優位となった(ALD-BはALD-Aの約17.5倍)。肝癌組織、肝癌細胞株ではALD-A量が多く、ALD-B量は低値又は測定限界以下であった。

2)HepG2,PLC/PRF/5を用いて分化誘導を試みたが培養上清中のAFP量、アルブミン量は抑制され、細胞のALD-A,B量不変ないし低値、mRNAではALD-Aの低下がみられたがALD-Bでは明らかな変化は不明であった。

以上の結果から、成人肝組織ではALD-Bが優位に発現し、肝癌組織、肝癌細胞株ではALD-Aが優位に発現することがALDアイソザイムの蛋白量およびmRNAより明らかとなった。肝癌細胞株の分化誘導はALDアイソザイムの変動パターンからは認められなかった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 崎 保

副 査 教 授 西 信 三

副 査 教 授 内 野 純 一

学 位 論 文 題 名

ヒト肝癌細胞株におけるアルドラーゼアイソザイムの

蛋白量および RNA 発現の検討

— 肝癌細胞株の分化誘導の試みも含めて

研究目的

本研究では、肝細胞の癌化におけるアルドラーゼ (ALD) アイソザイム変化の持つ意義を検討するために肝組織、肝癌組織、肝癌細胞株のALD-A,BをRIA法を用い定量的に測定した。さらに肝癌細胞株の分化誘導を試みALD-A,B蛋白量,mRNAの発現さらに α -フェトプロテイン(AFP)量,アルブミン量も検討した。

材料および方法

- 1) 肝組織および肝癌組織：胎児肝1例,新生児肝1例,成人肝10例,肝癌組織4例を用いた。
- 2) 細胞培養：肝癌細胞株HepG2,PLC/PRF/5をDMEM+10%FBS 5ml,37℃,5%CO₂存在下で培養した。薬剤の入った培養液をday3まで24時間毎に交換し細胞,培養上清を回収した。肝癌細胞株は超音波破碎後,遠心し上清を得,肝組織,肝癌組織は0.05MTris-HCl,5mMEDTA,pH7.5の緩衝液を加えてホモジネートし,遠心後,上清を得てそれぞれ検体として用いた。
- 3) 薬剤：Dimethyl sulfoxide2%,Hepatocyte growth factor10ng/ml,Transforming growth factor- β 1100pM,TPA100nMを使用した。
- 4) RIA法：ALD-Aは二抗体法で,ALD-Bはサンドイッチ法で測定した。RIA法はA,Bサブユニットに特異的でありALD-Aは6-800ng/ml,ALD-Bは3-200ng/mlまで測定可能であった。
- 5) ノーザン法：肝癌細胞株からtotal RNAを抽出しナイロン膜に転写固定した。³²Pで標識したプローブでハイブリダイゼーションを行い洗浄後,X線フィルムに暴露した。ALD-AのプローブはHinfI-AluI断片(220bp),ALD-BのプローブはHaeIII-DdeI

断片(410bp),内部標準として β -アクチンを用いた.

- 6) 培養上清中のAFP量およびアルブミン量の測定:市販のEIAキットを用いて測定した.
- 7) 生細胞数:トリパンブルー色素排除法にて生細胞数を算定した.

結果

- 1) 胎児肝ではALD-A量が多いが新生児肝ではALD-B量が多くなり,成人肝組織ではALD-B量はALD-A量の約17.5倍であった.肝癌組織ではALD-A量はALD-B量の約7.8倍,含有されていた.HepG2,PLC/PRF/5はALD-A量が多くALD-B量はPLC/PRF/5では測定感度以下,HepG2では低値であった.
- 2) HepG2におけるALD-A mRNA発現はday5まで経時的に増強した.ALD-B mRNAの発現はday5以降に明瞭となった.PLC/PRF/5におけるALD-A mRNA発現はHepG2と同様であり,ALD-B mRNAは発現が認められなかった.
- 3) HepG2,PLC/PRF/5の薬剤処理群ではALD-A量,ALD-B量およびALD-A mRNAの発現が低下する群が多く,ALD-B mRNAの発現は認められなかった.
- 4) AFP量,アルブミン量は薬剤処理群においてday3まで経時的に増加したが,コントロールに比較すると低値を示した.
- 5) 薬剤処理により細胞数はコントロールより低値を示す群が多かった.

考案及び結語

- 1) 胎児肝ではALD-A量が多く,新生児肝ではALD-B量が次第に増加し,成人肝組織ではALD-B量が優位となった.肝癌組織,肝癌細胞株ではALD-A量が多く,ALD-B量は低値又は測定限界以下であった.
- 2) HepG2,PLC/PRF/5を用いて分化誘導を試みた結果,培養上清中のAFP量,アルブミン量および,細胞のALD-A,B含有量の低下が認められた.同時に検討した,ALD-A mRNA発現は低下したがALD-B mRNA発現は認められなかった.

以上の結果から,成人肝組織ではALD-Bが優位に発現し,肝癌組織,肝癌細胞株ではALD-Aが優位に発現することがALDアイソザイムの蛋白量およびmRNAより明らかとなった.肝癌細胞株の分化誘導はALDアイソザイムパターンからは認められなかった.

以上より本研究は博士(医学)の学位論文として妥当なものと判断される.