

論文の内容の要旨

論文題目 : Characterization of hepatoblastomas in B6C3F1 mice induced by a combination of diethylnitrosamine and sodium phenobarbital to focus on their pathogenesis

ジエチルニトロソアミンおよびフェノバルビタール投与により B6C3F1 マウスに誘発した肝芽腫の生物学的特性ならびにその発生に関する研究

氏 名 : 坂入 鉄也

肝芽腫は、肝臓にみられる小児癌で、ヒトでは胎児型、胎芽型、未分化型などの亜型に分類される。動物では幾つかの種で報告があり、特に実験動物では、老齢マウスに自然発生性に認められることが知られている。マウス肝芽腫は、ある系統に実験的に誘発することが可能であるため、誘発された肝芽腫を対象としてこれまでに様々な検討が試みられてきた。しかしながら、マウスの肝芽腫は、ヒトのそれと異なり亜型に欠け、組織学的、免疫組織学的に非常に未分化な性質を示すため、その由来については未だ特定されていない。

本研究では、diethylnitrosamine (DEN) および sodium phenobarbital (PB) 投与により B6C3F1 マウスに肝芽腫を誘発し、病理組織学的、免疫組織学的ならびに分子生物学的手法を用いて、その生物学的特性を検索することにより、マウス肝芽腫の由来について解明することを試みた。

第一章 マウス肝芽腫の誘発ならびに免疫組織学的検索

6週齢の B6C3F1 マウスに DEN を 80 mg/kg の用量で単回投与した後、PB を 0 あるいは 500 ppm の濃度で 50 週間混餌投与した。通常の方法で肝臓の HE 染色標本を作製し、組織検査を実施するとともに、免疫組織学的手法を用いた解析を行った。

肝臓腫瘍は、PB 投与群のみに認められ、肝細胞腺腫、肝細胞癌、肝芽腫の発生頻度は、それぞれ 81, 62, 62% であった。また、肝芽腫の約半数は、組織標本上で肝細胞腺腫あるいは肝細胞癌に内包または接してみられた。肝芽腫は、成書に記述の通り、主として不整形の核と好塩基性の乏しい細胞質を有する紡錘形細胞で構成されており、血管周囲性に放射状あるいは同心円状に配列し、偽ロゼット様を呈していた。免疫組織学的検索の結果、肝芽腫の TGF- α 陽性率および PCNA 陽性率はそれぞれ 29.2%, 22.2% であり、肝細胞癌（それぞれ 12.7%, 14.5%）と比較して有意に高かった。また、肝細胞癌のごく一部は、細胞質が TGF- α 陽性を示したのに対し、肝芽腫はすべて核に陽性像がみられた。

一方、肝芽腫は cytokeratin (CK) に対して免疫組織学的に陰性であったが、*in situ* hybridization により、CK18 mRNA の発現が確認された。免疫組織学的検索の結果、肝芽腫は、肝細胞マーカーである albumin, α -fetoprotein, vimentin のいずれに対しても陰性であったが、一部の細胞は S-100 タンパク陽性であった。また、肝芽腫は c-kit, thy-1 が陽性であったのに対し、CD34 は陰性であった。

病理組織学的に約半数の肝芽腫が他の肝細胞由来腫瘍に併発している点、肝細胞由来腫瘍と同じく PB のプロモーション作用を受けている点から、マウス肝芽腫が肝細胞系細胞に由来する可能性が考えられた。また、肝芽腫が肝細胞癌に比べ、高い増殖活性を有することは、肝芽腫の悪性度の高さを示すものであると考えられた。なお、肝芽腫では TGF- α が核に局在しており、その現象が細胞増殖活性の高さに関与している可能性が示唆された。一方、肝芽腫が幹細胞マーカーである c-kit および thy-1 に陽性を示したことは、本腫瘍細胞が非常に未分化な性質を有することを示すものと考えられた。さらに、一部の細胞が間葉系細胞マーカーである S-100 タンパクに陽性を示したことは、肝芽腫の多分化能を示していると考えられた。

第二章 マウス肝芽腫由来細胞株の樹立ならびにその分子生物学的特性の検索

細胞株の樹立

腫瘍の生物学的特性について、より詳細な検索を進めるためには、株化細胞を用いた *in vitro* 実験系が有用であるが、これまでに、マウス肝芽腫由来細胞株の樹立に関する報告例はない。そこで、第一章で述べた薬剤誘発性肝芽腫より細胞株を樹立し、その生物学的特性を検索した。

肝芽腫結節を Dulbecco's modified Eagle medium (D-MEM) 中で細切し、37°C に加温した dispase 溶液中で 30 分間インキュベートした後、低速遠心により細胞を回収した。得られた細胞は、collagen type I コートディッシュ中で 2 ヶ月間培養後、コロニーを数回継代し、上皮様の単層培養細胞を得た。

樹立した細胞株 (MHB-2) は、紡錘形あるいは多角形の単層細胞で、超微形態学的に小型のミトコンドリアと豊富な遊離リボソームを有していた。MHB-2 は HGF 添加により増殖が有意に亢進し、その受容体である *c-met* mRNA を発現していることが RT-PCR 法により確認された。しかし、MHB-2 を免疫不全マウスに移植したが、造腫瘍性は示さなかった。また、MHB-2 に対して *keratin*, *albumin*, α -fetoprotein に対する免疫組織学的検索を行ったが、いずれも陰性であった。

MHB-2 細胞株の樹立に成功したことは、マウス肝芽腫に関する検討を進めていく上で非常に有意義であると考えられた。一方、MHB-2 細胞が外的因子によってのみ増殖亢進を示したことから、本細胞は完全な自己増殖能を有しないと考えられた。

分子生物学的特性の検索

第一章に示した結果から、マウス肝芽腫が肝細胞系細胞に由来する可能性がある一方で、幹細胞より発生した可能性も示唆された。そこで、これらの仮説を検証し、その起源に関する考察を深めることを目的として、RT-PCR 法により主として肝細胞の分化に関わる遺伝子の MHB-2 細胞株における発現を確認した。

MHB-2 細胞は、未分化細胞マーカーである *c-kit*, *CD34*, *thy-1*, 成熟肝細胞マーカーである *albumin* ならびに *CK18* および *19* を発現していたが、幼若肝細胞マーカーである α -fetoprotein ならびに成熟肝細胞マーカーである *glucose-6-phosphatase* および *tyrosine aminotransferase* の発現は認められなかった。なお、発現が認められた遺伝子のうち、*CD34* および *albumin* の発現

量はわずかであった。

幼若肝細胞マーカーである α -fetoprotein mRNA を発現せず、一方でわずかに albumin mRNA を発現する本腫瘍は、脱分化した肝細胞というよりもむしろ肝前駆細胞様の特徴を示すものと考えられた。一方、MHB-2 が CK18, 19 をともに発現していることは、胆管系の特徴を有するものであると考えられた。

本考察に対するさらなる傍証を得るために、MHB-2 細胞について、肝細胞および胆管上皮細胞の分化形成に関わると報告されている liver enriched transcription factors (LETfs) の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。その結果、C/EBP α , FoxA2, HNF1 α , HNF4 α および HNF6 mRNA の発現量は、正常肝細胞および肝細胞腫瘍由来細胞株である Hepa 1-6 に比べて著しく少なかったのに対し、HNF-1 β mRNA の発現量は正常肝細胞の約 8 倍を示した。また、MITO+ Serum Extender 添加培地を用いた通常の培養条件をコントロールとした場合、MITO+ Serum Extender 非添加培地を用いて Matrigel™ 中で MHB-2 細胞を 1 日間培養すると、HNF1 β および HNF6 mRNA の発現量がそれぞれコントロール値の約 2 倍、約 17 倍に増加した。

胆管の分化・形成には、HNF6 \rightarrow HNF1 β カスケードが関与しているとの報告があることから、通常条件下における HNF-1 β mRNA の顕著な発現、および分化促進条件下での HNF-1 β , HNF6 mRNA の発現量増加は、MHB-2 細胞が胆管系への分化能を有することを示唆するものであると考えられた。なお、本結果は、先に示した MHB-2 細胞が有する肝前駆細胞様あるいは胆管系の特徴を裏付けるものであった。

マウス肝芽腫が肝細胞由来腫瘍に併発して認められ、PB のプロモーション作用に対して感受性を有することは、本腫瘍が肝細胞に由来することを示唆するものである。しかしながら、本腫瘍のタンパク質ならびに遺伝子発現に関する本研究結果から、本腫瘍が肝細胞というよりもむしろ肝前駆細胞あるいは胆管系の特徴を有することが明らかになった。他方、本腫瘍は組織学的に胆管上皮様の特徴に欠けており、胆管系腫瘍とは明確に区別される。以上のことから、マウス肝芽腫は肝細胞と胆管上皮細胞のどちらへも分化可能な肝前駆細胞に由来する可能性が高いと結論づけられた。