<原 著>

ラット肝過形成結節および肝細胞癌における cellular retinoid-binding protein, F-type の出現とその経時的変動

森脇 久隆 武藤 泰敏 二ノ宮三生
清水 勝 高橋善弥太*

要 旨：ラット肝細胞癌発生過程における組織内ビタミンA含量および細胞内レチノイド結合蛋白濃度の経時的変動を観察した。組織内ビタミンA含量は、前癌状態である過形成結節ですでに低下が始まり、肝細胞癌の完成により局所的ビタミンA欠乏状態は一層進行した。細胞内レチノイド結合蛋白のうち onco-fetal protein とみなされる cellular retinoid-binding protein, F-type ; CRBP (F) と cellular retinoic acid-binding protein ; CRABP は肝細胞癌のみでなく過形成結節においても出現し、その濃度はいずれも過形成結節の方が有意に高値であり、かつ全経過を通じて CRBP (F) の方が CRABP よりはるかに高濃度であった。レチノイドによる発癌の化学予防には、組織における CRBP (F) や CRABP などのレセプターの存在が必要条件であると考えられる。

索引用語： 肝過形成結節 局所的ビタミンA欠乏 cellular retinoid-binding protein (CRBP) レチノイド 化学予防

はじめに

1926年、Fujimaki¹⁾によりビタミンA欠乏ラットに胃癌が発生しやすいことが見出されて以来、個体側のビタミンA代謝性因子が発癌に関与することが知られてきた。さらに、1967年、Saffioti ら²⁾はベンツォピレン誘発性肺癌(扁平上皮癌)の発生がビタミンAエステルとの投与により有意に抑制されることを認めた。以後、各種のビタミンA誘導体(レチノイドと総称される)、特に合成レチノイドを用いた発癌の化学予防(Chemoprevention)が注目を集め、これらのレチノイドはすでに、マウス・ラットの皮膚乳頭腫および皮膚癌、マウス・ラットの膀胱癌、乳癌、ラットの気道腫瘍、軟骨肉腫、ハムスターの前胃腫瘍等の実験的腫瘍の発生を抑制することが知られ³⁻⁵⁾、ヒトの皮膚基底細胞癌・膀胱癌にも有効であったとの報告⁶⁾もみられる。

一方、細胞内レチノイド結合蛋白(cellular retinoid-binding protein; CRBP, cellular retinoic acid-binding

protein; CRABP, cellular retinoid-binding protein, F-type; CRBP (F))の研究から、レチノイドによる発癌の化学予防において、CRABP, CRBP (F)の占める役割が注目されるようになってきた。CRABP, CRBP (F)はいずれも onco-fetal protein の性格を有し^{6,7)}、特に CRBP (F)は最初にサカナ眼上清中に見出され⁸⁾、系統発生的にも CRABP よりさらに古い蛋白と考えられている。レチノイドによる発癌の化学予防に際しては、腫瘍組織内に CRABP が存在することが必要条件であり⁹⁾、かつレチノイドの CRABP に対する結合性と腫瘍抑制効果とがよく併行すること⁴⁾から、CRABP や CRBP (F)は腫瘍組織においてレチノイドに対するレセプターとして働くと考えられている。

さて、肝細胞癌とレチノイドとの関係については、まず、ヒト肝細胞癌において、癌部のビタミンA含量が非癌部に比べ著減していること^{7,10)}、癌部に CRABP¹¹⁾、CRBP (F)^{7,10)}が出現することが知られた。さらにラット肝過形成結節における CRABP, CRBP (F)の存在も認められており¹⁰⁾、肝細胞癌とレチノイドとの関係が注目されつつある。本研究では、ラット肝細胞癌発生過程

* 岐阜大学第1内科

における組織内ビタミンA含量と細胞内レチノイド結合蛋白濃度の経時的変動を観察したので報告する。

実験材料および方法

1) ラット肝過形成結節ならびに肝細胞癌の作製

Solt & Farber¹²⁾の方法に従って、雄性フィッシャー系成熟ラット(約200g, 日本チャールズ・リバー KK)を用いて肝過形成結節および肝細胞癌を作製した。オリエンタル MF 食による飼育下で、実験第1日に diethylnitrosamine (DEN, 東京化成工業 KK) 200mg/kg を腹腔内投与し、第2～8週には0.02% 2-fluorenyl acetamide (2FAA, 和光純薬工業 KK) 含有食を投与した。また第22日には70%肝切除を行なった。以上の方法により、第8～10週に肝過形成結節、第30週に肝細胞癌の出現を認めた。組織中のビタミンA, CRBP, CRABP, CRBP (F) の定量は DEN 投与後第21日、25日(70%肝切除3日後)、8, 9, 10週および30週に各々4匹ずつで行ない、対照群としては無処置ラット6匹を用いた。なお肝摘出は、腹部大動脈より脱血し、さらに門脈より生理食塩水を用いて肝の灌流を行なった後に施行し、摘出肝は直ちに密閉容器に移し、-80°C, 暗所に保存した。

2) 組織内ビタミンA定量

組織中の総ビタミンA量は、Ames ら¹³⁾の方法に従って diethyl ether (林純薬工業 KK) によって抽出したのち、Dugan ら¹⁴⁾の trifluoro-acetic acid (TFA, 半井化学薬品 KK) 法を用いて定量した。

3) 細胞内レチノイド結合蛋白の定量

各組織における細胞内レチノイド結合蛋白の定量は Muto & Omori^{7,10)}に準じて、ゲル濾過を用いた competitive binding assay により施行した。すなわち各組織から、TKM 緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH 7.6, 25mM KCl, 5mM MgCl₂) を用いて33%ホモジネートを作製し、2°C, 105,000g で60分間遠心し、cytosol を採取した。各400μl の cytosol に、最終濃度200nM となるように all-trans [15-³H] retinol (³H-VA, 2.66 Ci/mmol; New England Nuclear, Boston, MA) あるいは all-trans [11, 12-³H] retinoic acid (³H-RA, 11.1 Ci/mmol; Hoffman-LaRoche, Nutley, NJ) を加え4°C, 暗所に16時間 incubate した。また ³H-VA あるいは ³H-RA に対する competitor としては、それぞれ200倍モル過剰(最終濃度40μM)の all-trans retinol (cold VA; Sigma Chemical Co. St Louis, Mo.) または all-trans retinoic

Fig. 1 Time course of changes in content of vitamin A in rat liver hyperplastic nodules and hepatocellular carcinoma induced by DEN, 2FAA and 70% hepatectomy.

Hyperplastic nodules and hepatocellular carcinoma were induced in Fischer-strain male rats (8 weeks old, 200g) by the method of Solt and Farber¹²⁾. In this procedure, hyperplastic nodules of the liver were induced during 8th-10th week after DEN administration and hepatocellular carcinoma was induced at the 30th week. Vitamin A in each tissues was extracted by the method of Ames et al¹³⁾ and measured by trifluoroacetic acid method according to Dugan et al¹⁴⁾.
 ▨ ; hyperplastic nodules ■ ; hepatocellular carcinoma
 ▤ ; surrounding tissue

Table 1. Time course of changes in contents of vitamin A in rat liver hyperplastic nodules and hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine (DEN), 2-fluorenyl acetamide (2FAA) and 70% hepatectomy.

	Days after DEN administration	n	Vitamin A ($\mu\text{g/g}$)
Control	-	6	39.6 $\pm$ 11.5
Before hepatectomy	21 days	4	30.6 $\pm$ 3.8
3 days after hepatectomy	25 days	4	32.5 $\pm$ 4.1
Hyperplastic nodules	8 weeks	4	5.1 $\pm$ 2.5**
"	9 weeks	4	5.9 $\pm$ 2.5**
"	10 weeks	4	3.8 $\pm$ 0.3***
Hepatocellular carcinoma	30 weeks	4	0.2 $\pm$ 0.3***
Surrounding tissue	30 weeks	4	17.8 $\pm$ 2.5*,a)

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$; statistical significances of vitamin A were obtained as compared with those in controls.

a) $p<0.01$; statistical significance of vitamin A was obtained as compared with those in cancerous tissues.

Fig. 2 Demonstration of CRBP, CRABP and CRBP (F) in the cytosols of rat liver hyperplastic nodules (9 weeks after DEN administration).

Each 400 μl of cytosol was incubated at 4°C for 16 hours in the dark with 4 μl of ^3H -retinol (A) or ^3H -retinoic acid (B) to give a final concentration of 200nM (●—●). Displacement of the radioactivity was done by adding a 200-fold molar excess of unlabeled retinol (○—○) or retinoic acid (x—x). After incubation, each sample was subjected to the gel-filtration of Sephadex G-75(1 $\times$ 90cm). Each fraction of 1.5ml was collected at a flow rate of 15ml/hr.

acid (cold RA; Hoffman-LaRoche, Nutley, NJ) を添加した. incubation 終了後, 各 cytosol から Sephadex G-75 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) カラムクロマトグラフィー (1×90cm) により CRBP, CRABP, CRBP (F) を分離した. Fig. 1 に示すように, 分子量15,000付近に ^3H -VA または ^3H -RA に特異的な結合を示す low capacity のピークが出現するが, このピークのうち, cold VA または cold RA によって置換される総放射活性量から, それぞれ相応する CRBP, CRABP および CRBP (F) の量を算出し, pmole/g 単位で表現した.

結 果

1) ラット肝細胞癌発生過程における肝内ビタミン A 含量の経時的変動

DEN 投与後, 肝過形成結節を経て肝細胞癌が完成するまでの各時点における肝内ビタミン A 含量を Table 1, Fig. 2 に示す. なお無処置ラット肝ビタミン A 含量は $39.6 \pm 11.5 \mu\text{g/g}$ であった. DEN 投与後第21日および25日の肝ビタミン A 含量はそれぞれ 30.6 ± 3.8 , $32.5 \pm 4.1 \mu\text{g/g}$ であり, 無処置群との間に有意の差は認めら

れなかった. 肝過形成結節においては第8週 5.1 ± 2.5 , 第9週 5.9 ± 2.5 , 第10週 $3.8 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$ といずれも無処置群および第21, 25日に比し有意に低値であった ($P < 0.01$). なお第8~10週の各週の間には有意の差は認められなかった. 次に, 肝細胞癌におけるビタミン A 含量は $0.15 \pm 0.26 \mu\text{g/g}$ と, 非癌部の 17.8 ± 2.5 に比べて著減を示した ($P < 0.01$). また非癌部のビタミン A 含量は無処置群および第21・25日より有意に低値であり ($P < 0.05$), 一方, 過形成結節よりは有意に高値であった ($P < 0.05$).

2) ラット肝細胞癌発生過程における肝組織内 CRBP, CRABP, CRBP (F) 濃度の経時的変動

肝組織内 CRBP, CRABP, CRBP (F) 濃度の経時的変動を Table 2, Fig. 3 に示す. なお, 無処置群では CRABP, CRBP (F) は検出されず, CRBP は $119.7 \pm 16.3 \text{ pmole/g}$ であった.

CRBPはDEN 投与後第21日 108.4 ± 12.1 , 第25日 129.3 ± 8.9 , 第8週 111.4 ± 11.1 , 第9週 122.5 ± 16.0 , 第10週 $103.7 \pm 11.3 \text{ pmole/g}$ であり, 過形成結節の時期までは, 無処置群に比し有意の変動は認められなかった. 一方, 肝細胞癌完成後は癌部 34.9 ± 2.8 , 非癌部 41.3 ± 3.9

Table 2. Time course of changes in contents of cellular retinol-binding protein (CRBP), cellular retinoic acid-binding protein (CRABP) and cellular [retinoid-binding protein, F-type (CRBP(F)) in rat liver hyperplastic nodules and hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine (DEN), 2-fluorenyl acetamide (2FAA) and 70% hepatectomy.

	Days after DEN administration	n	CRBP	CRABP (pmoles/g)	CRBP(F)
Control	-	6	119.7 ± 16.3	-	-
Before hepatectomy	21 days	4	108.4 ± 12.1	-	-
3 days after hepatectomy	25 days	4	129.3 ± 8.9	0.2 ± 0.3	6.5 ± 2.1
Hyperplastic nodules	8 weeks	4	111.4 ± 11.1	7.0 ± 1.5	37.2 ± 3.2
"	9 weeks	4	122.5 ± 16.0	$1.9 \pm 0.6^*$	42.0 ± 4.0
"	10 weeks	4	103.7 ± 11.3	$1.1 \pm 0.2^*$	$48.7 \pm 2.4^*$
Hepatocellular carcinoma	30 weeks	4	$34.9 \pm 2.8^{**}$	$0.2 \pm 0.2^{**}$	$18.4 \pm 4.5^*$
"	30 weeks	4	$41.3 \pm 3.9^{**}, a)$	-	-

-; not detectable

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; statistical significances of CRBP, CRABP and CRBP(F) were obtained as compared with those in controls (CRBP) and hyperplastic nodules at 8th week (CRBP, CRABP and CRBP(F)).

a) $p < 0.05$; statistical significance of CRBP was obtained as compared with those in cancerous tissue.

Fig. 3 Time course of changes in CRBP, CRABP and CRBP (F) levels in rat liver hyperplastic nodules and hepatocellular carcinoma.

□ ; CRBP ■ ; CRABP ▨ ; CRBP (F)

pmole/g といずれも無処置群より有意に低値であり ($P < 0.01$), また癌部の方が非癌部より一層低値であった ($P < 0.05$).

CRABP は DEN 投与後第25日 (70%肝切除3日後) に 0.2 ± 0.3 pmole/g と低濃度の出現を認めたが, 第28日には消失した. CRABP は再び肝過形成結節に出現し (第8週 7.0 ± 1.5 , 第9週 1.6 ± 0.9 , 第10週 1.1 ± 0.2), 第8週において第9, 10週より有意に高値であり ($P < 0.05$), 第8, 9, 10週の順に低下する傾向が認められた. 肝細胞癌完成後は癌部にのみ CRABP が検出され (0.2 ± 0.2 pmole/g), 肝過形成結節より有意に低値であった (第8週に対し $P < 0.01$, 第9, 10週に対し $P < 0.05$).

CRBP (F) は CRABP と同じく, 70%肝切除後3日目に一過性に認められた (6.5 ± 2.1 pmole/g) のち, 肝過形成結節に再び出現した (第8週 37.2 ± 3.2 , 第9週 42.0 ± 4.0 , 第10週 48.7 ± 2.4 pmole/g). 第10週の CRBP (F) 濃度は第8週より有意に高く ($P < 0.05$), 第8, 9, 10週の順に高値となる傾向が認められた. また肝細胞癌完成後は, CRBP (F) は癌部にのみ検出され (18.4 ± 4.5 pmole/g), その濃度は過形成結節のいずれの時期よりも有意に低値であった ($P < 0.05$).

さらに, 肝過形成結節, 肝細胞癌のいずれの時期においても, CRBP (F) の方が CRABP よりも有意に高濃度であった (第8週 $P < 0.05$, 第9, 10, 30週 $P < 0.01$).

考 案

今回の研究に用いたラット肝細胞癌発生過程においては, 肝細胞癌の完成に先立って, まず肝過形成結節が出現する. 肝過形成結節は ATP ase 活性の欠落, Glucose-6-phosphatase 活性の低下, γ -glutamyl transpeptidase 活性の上昇などの酵素学的な偏倚を示し, 肝細胞癌の前癌性変化と考えられている¹⁵⁻¹⁷. 本研究では特に前癌状態から肝細胞癌への推移の過程における組織内ビタミンA含量, 細胞内レチノイド結合蛋白濃度の変動に焦点を合わせ, 肝細胞癌のみならず, 前癌状態である肝過形成結節においても局所的ビタミンA低下状態が認められ, かつ CRABP, CRBP (F) が肝細胞癌完成後よりもむしろ過形成結節に高濃度に出現することを明らかにした.

癌組織に局所的ビタミンA欠乏状態が生じることは, すでにヒト肝細胞癌^{7,10}, 白ネズミ空腸粘液腺癌¹⁸について知られている. 本研究で作製した実験的ラット肝細胞癌においても, ヒト肝細胞癌と同様に局所的ビタミンA欠乏状態が存在することが知られ, さらに前癌状態である肝過形成結節でも, すでにビタミンA低下状態が出現しており, 肝細胞癌発生過程の比較的早期から組織内ビタミンA含量の低下が始まり, 肝細胞癌の完成とともに, 一層ビタミンA欠乏が進行するという成績が得られた. 肝過形成結節および肝細胞癌において局所的ビタミンA欠乏状態が生じる機序はいまだ明らかでなく, 細胞膜透過性の変化や癌組織におけるビタミンA異化の亢進などの関与が推察される.

細胞内レチノイド結合蛋白のうち CRBP は過形成結節までは有意の変化を示さないが、肝細胞癌の完成に伴って癌部、非癌部とも有意に低下し、しかも癌部がより一層の低値を示した。ヒト肝細胞癌においても癌部の CRBP 濃度が非癌部のそれより低いことが知られており^{7,10)}、実験的ラット肝細胞癌でもヒトにおけると同様の成績が得られた。またラット肝細胞癌 (DAB 肝癌) の CRBP は肝過形成結節 (2FAA 過形成結節) より低いという成績⁷⁾があるが、同一の肝細胞癌発生過程における CRBP の変動に関する報告はない。肝細胞癌の完成に伴って、癌部のみでなく非癌部でも CRBP が低下することに関しては、局所的なビタミンA欠乏が関与すると考えられるが、その機序の詳細は不明である。

CRABP および CRBP (F) がともに肝切除後、一過性に出現することは Omori ら¹⁰⁾の再生肝の成績と一致するものであった。また、肝細胞癌に CRABP, CRBP (F) が出現することはヒトの肝細胞癌と同様であるが、さらに前癌状態である過形成結節において肝細胞癌より有意に高濃度に存在することが認められた。CRABP が前癌状態でより高値であることは、Tashiro ら²⁰⁾によりウサギ皮膚 Shope 乳頭腫から皮膚癌への発癌過程で、前癌状態である乳頭腫の CRABP 濃度が皮膚癌より高値であることが知られ、さらにレチノイド (trimethyl methoxyphenyl analog) の抗腫瘍効果は、乳頭腫の段階で投与を開始した方が、皮膚癌完成後より一層大きいと報告されている。本研究の肝細胞癌発生過程においても同様に CRABP が前癌状態の過形成結節により高濃度に出現し、さらに CRBP (F) も CRABP と同じく肝細胞癌より過形成結節に高値であった。この事実は、CRABP や CRBP (F) をレセプターとして、レチノイドによる肝細胞癌の化学予防を試みるに際して、その投与時期を決定する上で示唆に富む成績と思われる。

結 語

1) Solt & Farber の方法によるラット肝細胞癌発生過程において、肝過形成結節、肝細胞癌はともに局所的ビタミンA低下ないし欠乏状態にある。

2) 肝過形成結節、肝細胞癌の両者に CRABP, CRBP (F) が出現するが、ともに前癌状態である過形成結節で有意に高く、また、いずれの時期においても癌胎児性蛋白とみなされる CRBP (F) の方が高濃度であった。

文 献

- 1) Fujimaki Y: Formation of gastric carcinoma in albino rats fed on deficient diet. *J Cancer Res*

10: 469—477, 1926

- 2) Saffioti U, Montesano R, Sellakumar AR, et al: Experimental cancer of the lung. Inhibition by vitamin A of the induction of tracheobronchial squamous metaplasia and squamous cell tumors. *Cancer* 20: 857—864, 1967
- 3) Mayer H, Bollag W, Hänni R, et al: Retinoids, a new class of compounds with prophylactic and therapeutic activities in oncology and dermatology. *Experientia* 34: 1105—1119, 1978
- 4) Trown PW, Palleroni AV, Bohoslawec O, et al: Relationship between binding affinities to cellular retinoic acid-binding protein and in vivo and in vitro properties for 18 retinoids. *Cancer Res* 40: 212—240, 1980
- 5) Sporn MB, Newton DL: Chemoprevention of cancer with retinoids. *Federal Proc* 38: 2528—2534, 1979
- 6) 武藤泰敏, 四童子好広: 細胞内ビタミンA結合蛋白, *化学* 33: 667—670, 1977
- 7) Muto Y, Omori M, Sugawara K: Demonstration of a novel cellular retinol-binding protein, F-type, in hepatocellular carcinoma. *Gann* 70: 215—222, 1979
- 8) Shidoji Y, Muto Y: Comparative studies on binding proteins specific for retinol in serum and cytosol of young yellow tails *Seriala Quinquerodiata*. *Comp Biochem Physiol* 61B: 315—319, 1978
- 9) Ong DE, Chytil F: Presence of cellular retinol and retinoic acid-binding proteins in experimental tumors. *Cancer Lett* 2: 25—30, 1976
- 10) Muto Y, Omori M: A novel cellular retinoid-binding protein, F-type, in hepatocellular carcinoma. *Ann N Y Acad Sci* 35: 91—103, 1981
- 11) 武藤泰敏, 四童子好広, 大森正英, 他: 原発性肝癌における cytosol retinoic acid-binding protein (c-RABP) の出現, *肝臓* 18: 370, 1977
- 12) Solt D, Farber E: New principle for analysis of chemical carcinogenesis. *Nature* 263: 701—703, 1976

- 13) Ames SR, Risley HA, Harris PL: Simplified procedure for extraction and determination of vitamin A in liver. *Anal Chem* 26: 1378—1381, 1954
- 14) Dugan RE, Frigerio NA, Siebert JM: Colorimetric determination of vitamin A and its derivatives with trifluoroacetic acid. *Anal Chem* 36: 114—117, 1964
- 15) 沖田 極, 児玉隆浩, 野田健一, 他: <特集> 原発性肝癌をめぐる諸問題, 前癌性病変の検討. 癌と化学療法 6 : 421—432, 1979
- 16) Newberne PM: Experimental hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res* 36: 2573—2578, 1976
- 17) Kitagawa T, Pitot H: The regulation of serine dehydratase and glucose-6-phosphatase in hyperplastic nodules of rat liver during diethylnitrosamine and N-2-fluorenyl acetamide feeding. *Cancer Res* 35: 1075—1084, 1975
- 18) Sundaresan PR, DeLuca LM: Vitamin A contents of rat intestinal epithelium and jejunal mucinous adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 58: 1643—1645, 1977
- 19) Omori M, Muto Y, Nagao T: Cellular retinoid-binding proteins in regenerating rat liver. Demonstration of a novel cellular retinoid-binding protein. *J Lipid Res* 22: 899—904, 1981
- 20) Tashiro S, Tokuda H, Rattanapanone N, et al: Cellular retinoic acid-binding protein in virus induced papilloma (Shope) of rabbit skin. *Cancer Res* 41: 1483—1487, 1981

Time course of changes in cellular retinoid-binding proteins in liver hyperplastic nodules and hepatocellular carcinoma experimentally induced in rats

Hisataka MORIWAKI, Yasutoshi MUTO, Mitsuo NINOMIYA,
Masaru SHIMIZU and Yoshiyata TAKAHASHI*

Time course of changes in vitamin A as well as its specific binding proteins: cellular retinoid-binding protein; CRBP, cellular retinoic acid-binding protein; CRABP and cellular retinoid-binding protein, F-type; CRBP (F) was investigated in tissues of rat liver hyperplastic nodules (HN) and hepatocellular carcinoma (HCC) which were produced according to the method of Solt and Farber. The following results were obtained:

1. Tissue vitamin A content was found to be significantly decreased in HN and almost deficient in HCC, as compared with normal and non-cancerous surrounding tissue.
2. CRBP levels in HCC were greatly reduced and significantly lower than those in surrounding tissues. In contrast, CRABP and CRBP (F) were newly appeared in both tissues of HN and HCC, in particular, the latter being always in larger amounts than the former. In addition, the present study has revealed that CRBP (F), assumed to be a new onco-fetal protein, is particularly increased in HN which is a precancerous state of HCC.

These results strongly suggest that experimental cancer chemoprevention with synthetic retinoids may be achieved through the presence of cellular retinoid receptors, particularly CRBP (F).

* First Department of Internal Medicine, Gifu University School of Medicine (Gifu)