<原 著>

ヒト肝細胞癌由来培養細胞 (PLC/PRF/5) における
Asialoglycoprotein レセプターの検討田中 延善 加登 康洋 小林 健一 服部 信*
J.A. Summerfield H.C. Thomas**

要 旨：ヒト肝細胞癌由来培養株 (PLC/PRF/5) を用いて, Asialoorosomucoid (ASOR) および Agalactoorosomucoid (AGOR) レセプターの検討を *in vivo*, *in vitro* の系で行った. *in vivo* の検討では, PLC/PRF/5細胞を移植し腫瘍を作成したヌードマウスに, ^{125}I -ASOR ($1\mu\text{g}$) あるいは ^{125}I -AGOR ($1\mu\text{g}$) をエーテル麻酔下に静注した. 10分後の腫瘍への取込みは, 投与量の $0.5\pm 0.2\%$ と極めて低く, さらに肝への血行遮断による ligand の肝取込み阻止によっても腫瘍への取込みは増加しなかった. 一方, *in vitro* の検討では, PLC/PRF/5の monolayer cell culture を用い, ^{125}I -ASOR, ^{125}I -AGOR の特異的結合をそれぞれに特異的に拮抗する galactose, mannose にて評価したところ, ^{125}I -ASOR の結合率は 13.6% と低く, ^{125}I -AGOR では特異的結合はみられなかった. 以上より, PLC/PRF/5細胞では, ASOR レセプターが極めて低下していることが明らかとなった.

索引用語： Alexander 細胞 (PLC/PRF/5) 糖蛋白レセプター Asialoorosomucoid (ASOR) Agalactoorosomucoid (AGOR)

はじめに

癌化により細胞構造とりわけ細胞膜に変化をきたすことが明らかにされ, さらに細胞膜レセプター状態の変化も報告されている. すなわち, 癌化において細胞膜の変化が重要な要因となりうる可能性が推測されている.

肝細胞における糖蛋白レセプターに関する研究では, 再生肝^{1,2)}あるいは化学発癌による肝細胞癌においてその膜レセプターが減少しているとの報告³⁾もあり, さらにヒト肝細胞癌由来培養細胞株 (Hep G2) においては, 著明な膜レセプターの増加が報告⁴⁾されている.

通常, 肝細胞には galactose-N-acetyl galactosamine レセプターをみとめるが, mannose N-acetyl glucosamine レセプターはみられない. しかし, 近年, ラット肝細胞に mannose N-acetyl glucosamine と特異的に結合するレクチンの存在⁵⁾が報告されているなど, 肝細胞に mannose N-acetyl glucosamine 結合因子の存在する可能性もある.

そこで, 今回ヒト肝細胞癌由来培養細胞である HBsAg 産生 PLC/PRF/5株⁶⁻⁸⁾における galactose N-acetyl galactosamine レセプターおよび mannose N-acetyl glucosamine レセプターを, それぞれ Asialoorosomucoid (ASOR) と Agalactoorosomucoid (AGOR) を用いて検討した. このように癌化に伴う膜レセプターの変化を明らかにすることは, 癌細胞の特異性や癌化の機序を解明するうえで重要と考えられる.

材 料

Alexander らにより確立されたヒト肝細胞癌由来培養細胞株 (PLC/PRF/5) は, 10%胎児ウシ血清 (Gibco) を含む Eagle's minimum essential medium (MEM) (Gibco) にて培養し, 維持したもので, Thomas 教授 (Royal Free Hospital of London University) より提供を受けた.

雄性ヌードマウス (BALB-C: Chester Beatty Institute) は, 24~31g のものを用いた.

Asialoorosomucoid (ASOR) および Agalactoorosomucoid (AGOR) は, ヒト orosomucoid (Sigma) を neuraminidase 処理にて ASOR を, さらに β -D-galactosidase 処理にて AGOR を作製したものを

* 金沢大学医学部第1内科

** Royal Free Hospital of London University

<昭和59年5月21日>

いた。

ASOR と AGOR の ^{125}I による標識は, solidphase enzymobead system⁹⁾により行い, その specific activity は $10\sim 15\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ であった。そして, それぞれ生理食塩水にて, $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調整した。

方 法

I. In vivo

ヌードマウスを ^{60}Co にて 450rad の照射を行い, 48 時間後 PLC/PRF/5 細胞 (10^7 cells in phosphate buffered saline) をヌードマウスの背部皮下に移植した。そして, 4~6 週後に実験を行った。

ヌードマウスをエーテル麻酔し, 頸静脈より ^{125}I -ASOR ($1\mu\text{g}/0.1\text{ml}$) あるいは ^{125}I -AGOR ($1\mu\text{g}/0.1\text{ml}$) を投与した。10 分後, 脱血にて屠殺し, 血液採取, 肝臓, 腎, 脾, 肺および腫瘍を摘出した。そして, 血液と各臓器における放射能活性を γ -カウンターにて測定し, 投与 ^{125}I -ASOR および ^{125}I -AGOR の取込み率を算出した。さらに, いくつかの担癌ヌードマウスで, 門脈と肝動脈を結紮した後, 同様の実験を行った。

II. In vitro

PLC/PRF/5 細胞 (1×10^6 個) を, 径 6cm のカルチャーディッシュ (Sterilin) にて, 10% 胎児ウシ血清 (Gibco) を含む MEM を用いて 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 下にて培養し, monolayer cell culture を作製した。24 時間後, 培養液を除去し, グルコースを含まない Hank's 液 (3ml) にて 2 回洗浄した。そして, ^{125}I -ASOR あるいは ^{125}I -AGOR を $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度にてディッシュへ添加し, さらに 37°C で 20 分間, 培養した。培養後, ディッシュを氷冷 Hank's 液 (3ml) にて 2 回洗浄し, 非結合 ^{125}I -ASOR (^{125}I -AGOR) を除去した。さらに, Trypsin ($0.05\text{g}/100\text{ml}$) + EDTA (10mM) 液にて細胞をディッシュより採取して, その放射能活性を γ -カウンターにて測定し, ^{125}I -ASOR (^{125}I -AGOR) の細胞への取込み率を検討した。

^{125}I -ASOR および ^{125}I -AGOR それぞれの結合の特異性を検討するため, ^{125}I -ASOR 添加群には, galactose (56mM) を, ^{125}I -AGOR 添加群には, mannose (56mM) を添加した。

なお, いずれも double (2dishes) にて検討を行った。

成 績

I. In vivo

担癌ヌードマウスの体重は, $25.8\pm 1.2\text{g}$ ($n=9$) で, 正常ヌードマウスの $28.8\pm 1.2\text{g}$ ($n=6$) に比し有意 ($p<0.05$) に低く, このことは担癌状態が原因と考え

Fig. 1 The accumulation of ^{125}I -ASOR in organ of athymic mice, 10min. after injection.

られた。

1) ^{125}I -ASOR の臓器内取込み (Fig. 1)

投与10分後 ^{125}I -ASOR の全投与量のうち, 正常ヌードマウスの肝には $90.4\pm 2.4\%$ ($n=3$) が取込まれ, 一方, 担癌ヌードマウスの肝には $86.9\pm 2.9\%$ ($n=3$) が取込まれた。腫瘍組織中への取込みは, $0.5\pm 0.2\%$ にすぎなかった。また, 腎, 脾, 肺などの他臓器への取込みは, いずれも 0.7% 以下で, 正常ヌードマウスおよび担癌ヌードマウス間に差はみられなかった。

^{125}I -ASOR の血中濃度を高めるため, 門脈および肝動脈を結紮し肝への血流を阻止したところ, 肝への取込みは黒カラムで示すごとく $1.6\pm 0.3\%$ ($n=4$) と激

Fig. 2 The accumulation of ^{125}I -AGOR in organ of athymic mice, 10min. after injection.

Table 1 The specific uptake of ^{125}I -ASOR or ^{125}I -AGOR on PLC/PRF/5 cell in cell culture.

	^{125}I -ASOR		^{125}I -AGOR	
	cpm	%	cpm	%
control	14914	100	13215	100
+galactose(56mM)	12771	86.3	N.D.	
+mannose(56mM)	N.D.		14487	109

N.D.=Not Done

減し、 ^{125}I -ASORの血中濃度は約50倍に増加した。しかし、高血中濃度の維持にもかかわらず腫瘍組織中への取込みは、 $0.6 \pm 0.2\%$ と増加はみられず、他臓器も同様であった。

2) ^{125}I -AGORの臓器内取込み (Fig. 2)

^{125}I -AGOR全投与量のうち、正常ヌードマウスの肝へは $86.9 \pm 2.9\%$ ($n=3$)が取込まれ、一方、担癌ヌードマウスの肝へは $70.4 \pm 2.7\%$ ($n=3$)が取込まれた。担癌ヌードマウス肝への取込み率は、正常群に比し低く、その差は有意であった ($p < 0.025$)。また、腫瘍組織への取込みは $0.5 \pm 0.1\%$ と低かった。腎、脾、肺などの各臓器への取込みも5%以下と低値で、正常ヌードマウスと担癌ヌードマウス間には差はみられなかった。

II. In vitro (Table 1)

1) ^{125}I -ASORの特異的結合は、13.7%と極めて低く、PLC/PRF/5細胞におけるASORレセプターの著明な低下が示唆された。

2) ^{125}I -AGORのPLC/PRF/5細胞に対する特異的結合がみられなかったことより、PLC/PRF/5細胞には、AGORレセプターはないと考えられた。

考 察

癌細胞が正常細胞に比し、その構造あるいは細胞膜状態の点で異っていることが、これまで種々報告されている。特に、細胞膜レセプターを用いた研究では、これまでホルモン¹⁰⁻¹²⁾や糖蛋白^{3,4,13,14)}などに対する膜レセプターの癌化に伴う変化が検討されている。そこで、今回ヒト肝細胞癌由来培養を用いて糖蛋白レセプターの検討を行い、肝細胞癌における細胞膜の変化を明らかにした。

PLC/PRF/5細胞株は、Alexanderらにより確立されたHBsAg陽性肝細胞癌由来の培養細胞株であり、HBsAgおよびAFP産生能を有している。このように、PLC/PRF/5細胞は、明らかに肝細胞の性格を有しており、肝細胞由来の癌細胞である。

今回の検討で、PLC/PRF/5細胞におけるASORの特異的な取込みは極めて低いことが明らかになった。

In vivoの検討にて、 ^{125}I -ASORの肝臓への取込みを阻止し、 ^{125}I -ASORの血中濃度を高めるため肝への血行を遮断したところ、 ^{125}I -ASOR血中濃度は、非遮断群に比し50倍にまで上昇した。しかし、腫瘍への ^{125}I -ASOR取込み増加はみられなかった。このことより、 ^{125}I -ASORの腫瘍との結合は特異的でないと考えられた。

In vitroの検討にて、 ^{125}I -ASORのPLC/PRF/5培養細胞への取込みを検討したところ、galactoseによる ^{125}I -ASOR取込み阻止率は明らかに低かった。このように ^{125}I -ASORとPLC/PRF/5細胞との特異的結合が著明に低いことより、PLC/PRF/5細胞では、ASOR即ちgalactose-N-acetylgalactosamineレセプターが低下していることが明らかとなった。

通常、正常ヒト肝細胞は、ASORレセプターを有し、それはreceptor mediated endocytosis systemによっている。そしてヒト肝細胞由来であるPLC/PRF/5細胞においてASORレセプターが低下していることは、癌化による変化特に膜レセプター状態の変化を考えるうえで興味深い。

これまで、癌細胞における糖蛋白レセプター、特にgalactose N-acetyl galactosamineレセプターに関する研究がいくつか報告されている。Stockertらは、N-2-acetyl amino fluorenceを用いて作製した実験肝細胞癌において、細胞膜上の糖蛋白と反応するhepatic binding protein (HBP)が減少していることを報告している。Schwartyら⁴⁾は、ヒト肝細胞癌由来培養細胞株(Hep G-2)におけるgalactose N-acetyl galactosamineレセプターを検討し、同膜レセプターが著明に増加していることを明らかにした。このように、個々の癌細胞によってその膜レセプターの状態が異っている可能性が示唆されている。一方、ラットを用いた再生肝の実験では、ラット再生肝のgalactose N-acetyl galactosamineレセプター減少が報告されている。

これまで、細胞膜は流動的なものと考えられており、細胞が癌化した場合や再生時のものでは膜の状態が変化していると思われる。さらに、adrenocortical carcinomaにおける検討で¹⁵⁾、adenyl cyclase activityがACTHのみならず、epinephrine, TSH, LH, FSHなどにも反応するということからレセプターの特異性の消失あるいは、multiple specific receptor theoryが定

証されている。すなわち、癌化によりこれまでみられなかった結合能が出現してきたということである。

通常、AGOR (mannose N-acetyl glucosamine) レセプターは、sinusoidal 細胞に存在し肝実質細胞には存在しない。また、AGOR レセプターは ASOR レセプターと同様に、receptor mediated endocytosis system によっており、その動態についての報告もいくつかみられる^{9,16)}。一方、最近ラット肝細胞中において mannose N-acetyl glucosamine 結合レクチンの存在が明らかにされている⁵⁾。

今回の in vivo および in vitro の検討から、PLC/PRF/5細胞には、AGOR 即ち mannose N-acetyl glucosamine レセプターが存在しないことが明らかになった。

一方、In vivo の実験で腫瘍の存在が¹²⁵I-AGOR の肝臓への取込みを有意に抑制することにより、2つの可能性が考えられる。第1に、腫瘍が AGOR 様物質を産生しており、¹²⁵I-AGOR の肝臓への取込みを抑制している。第2に、腫瘍が AGOR 結合物質 (レクチン様) を分泌し、血中に¹²⁵I-AGOR 複合体を形成して¹²⁵I-AGOR の肝臓への取込みを抑制している。これらの可能性につき、さらに検索する予定である。

ま と め

① PLC/PRF/5細胞株 (ヒト肝細胞癌由来培養細胞) を用いて、肝細胞癌におけるレセプターの検討を行った。

② PLC/PRF/5細胞では、ASOR レセプターが著明に低下していた。

③ PLC/PRF/5細胞では、AGOR レセプターが欠失していた。

④ PLC/PRF/5細胞は、AGOR の肝臓への取込みを抑制する何らかの物質を産生している可能性があった。

文 献

- 1) Howard DJ, Stockert RJ, Morell AG, et al: Asialoglycoprotein receptors in hepatic regeneration. *J Biol Chem* 257: 2856—2858, 1982
- 2) Gärtner U, Stockert RJ, Morell AG, et al: Modulation of the transport of bilirubin and asialoorosomucoid during liver regeneration. *Hepatology* 1: 99—106, 1981
- 3) Stockert RJ, Becker FF: Diminished hepatic binding protein for desialylated glycoproteins during chemical hepatocarcinogenesis. *Cancer*

Res 40: 3632—3634, 1980

- 4) Schwartz AL, Fridovich SE, Knowles BB, et al: Characterization of the asialoglycoprotein receptor in a continuous hepatoma line. *J Biol Chem* 256: 8878—8881, 1981
- 5) Maynard Y, Bænzige JU: Characterization of a monnose and N-acetylglucosamine-specific lectin present in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 257: 3788—3794, 1982
- 6) Chakraborty PR, Ruiz-Opazo N, Shouval D, et al: Identification of integrated hepatitis B virus DNA and expression of viral RNA in an HBsAg producing human hepatocellular carcinoma cell line. *Nature* 286: 531—533, 1980
- 7) Shouval D, Reid LM, Chakraborty PR, et al: Tumorigenicity in nude mice of a human hepatoma cell line containing hepatitis B virus DNA. *Cancer Res* 41: 1342—1350, 1981
- 8) Alexander J, Macnab G, Saunders R: Studies on in vitro production of hepatitis B surface antigen by a human cell line. *Perspectives in virology* 10: 103—120, 1978
- 9) Summerfield JA, Vergalla J, Jones E, et al: Modulation of a glycoprotein recognition system on rat hepatic endothelial cells by glucose and diabetes mellitus. *J Clin Invest* 69: 1337—1347, 1982
- 10) Capeau J, Picard J: The influence of glycosidase and lectins on insulin binding to Zajdela hepatoma cells. *FEBS Letters* 118: 25—30, 1980
- 11) Pezzino V, Vigneri R, Siperstein MD, et al: Insulin and glucagon receptors in Morris hepatomas of varying growth rates. *Cancer Res* 39: 1443—1446, 1979
- 12) Sasaki T, Makita A, Nakagawa S: Insulin receptors in AH-66 ascites hepatoma cells and liver of tumorbearing rats. *Gann* 69: 813—818, 1978
- 13) Tauber R, Reutter W: Turnover of plasma membrane protein and glycoproteins in normal and regenerating liver and Morris hepatoma 7777. *European J of Cell Biol* 26: 35—42, 1981
- 14) Schwartz AL, Fridovich SE, Lodish HF: Kinetics of internalization and recycling of the asialoglycoprotein receptor in a hepatoma cell line. *J Biol Chem* 257: 4230—4237, 1982

- 15) Ney RL, Hochella NJ, Grahame-Smith DG, et al: Abnormal regulation of Adenosine 3',5'-monophosphate and corticosterone formation in an adrenocortical carcinoma. *J Clin Invest* 48 : 1733—1739, 1969
- 16) Tanaka N, Leaning M, Summerfield JA: Modulation of exocytosis of glycoproteins in rat hepatic sinusoidal cells. *Liver* 4 : 76, 1984

Asialoglycoprotein receptor in human hepatoma cells (PLC/PRF/5)

Nobuyoshi TANAKA, Yasuhiro KATO, Kenichi KOBAYASHI, Nobu HATTORI*,
J.A. SUMMERFIELD** and H.C. THOMAS**

We investigated the receptor to Asialoorosomucoid (ASOR) and Agalactorosomucoid (AGOR) on the PLC/PRF/5 cell line. In vivo assay, the athymic mice with tumors which were made by inoculation of the PLC/PRF/5 cells received via the jugular vein 1 μ g of 125 I-ASOR or 125 I-AGOR. 10 min after injection the accumulation of 125 I-ASOR or 125 I-AGOR in the tumor remained only 0.5% of the injected radioactivity. Then, the liver was isolated from the circulation by ligating the portal vein and hepatic artery to increase the ligand concentration in the circulation. And then, the blood concentration of radioactivity was 50 times higher than that in normal athymic mice. There was no enhanced accumulation in the tumor. In monolayer cell culture, the specific uptake of 125 I-ASOR and 125 I-AGOR on the cells was examined. It was found that the specific uptake of 125 I-ASOR was very low (13.7% of total radioactivity bound by the cells) and that of 125 I-AGOR was absent. From these results, it appeared that the receptor to ASOR on PLC/PRF/5 cell line was very low.

* The First Department of Internal Medicine, Kanazawa University Medical School (Kanazawa)

** Academic Department of Medicine, Royal Free Hospital (London)