モザイク動物の肝発癌研究への応用

小川勝洋 旭川医科大学病理学第1講座

辻 哲 横田欽一 池田 健 森 道夫 札幌医科大学病理学第2講座

UTILIZATION OF MOSAIC ANIMALS FOR THE STUDIES OF HEPATIC CARCINOGENESIS

Katsuhiro Ogawa Department of Pathology, Asahikawa Medical College

Satoru Tsuji, Kin-ichi Yokota, Tatsuru Ikeda, and Michio Mori Department of Pathology, Sapporo Medical College

Abstract: Properties of hyperplastic hepatic nodules, presumptive preneoplastic lesions of hepatocellular carcinomas, were investigated in mosaic rodents of which livers comprise two genetically-different lineages of cells. In the first experiment, we explored the monoclonality of hyperplastic nodules induced by DEN and phenobarbital in female C3H $\times$ spf-ash F1 mice of which livers are composed of hepatocytes with and without ornithine carbamyl transferase (OCT) activity. Simultaneous staining for OCT and γ -glutamyltranspeptidase activities demonstrated that the nodules were composed entirely of one or the other of 2 lineages, representing their monoclonality. The second experiment was carried out to investigate the phenotypic reversion of early hyperplastic nodules by using transplantation system between analbuminemic rats (NAR) and SD $\times$ NAR F1 rats. Hyperplastic nodule cells isolated from NAR were transplanted into the liver of SD $\times$ NAR F1 rats of which livers are positive for albumin. In those recipient mosaic rats, hyperplastic nodules were virtually negative for albumin and the surrounding nonhyperplastic nodule cells were positive. It became clear that, although hyperplastic nodules express biochemical markers during administration of promoting stimuli, they revert to become phenotypically normal after removal of the stimuli. (*J Toxicol Pathol* 1: 61~66, 1988)

Key words: Mosaic animal, Hyperplastic hepatic nodule, Hepatocellular carcinoma

序 文

最近、発癌過程の研究に、先天的または人工的に作られた遺伝異常動物を利用する試みが行われている。これらの中には、トランスジェニックマウスや、先天代謝異常動物などが含まれるが、我々は最近、モザイク動物を肝発癌実験に用いる研究を進めている。モザイク動物とは、個体を構成する細胞が、遺伝的に異なる2種類以上の細胞から構成される動物であり、これらのうちある種のものであれば、2種類の細胞を遺伝マーカーを利用して

区別することが可能である。我々は、このような動物を利用し、肝の前癌病変と考えられている増生結節の性質について、1) その clonality および、2) プロモーションと発現形質との関係について検討した。

腫瘍細胞の clonality は、ヒトの腫瘍で Fialkow のグループ¹⁾により、X-linked isozyme marker をもとに生化学的に広く研究されており、ほとんどの腫瘍が monoclonal origin であることが示されている。一方、動物の腫瘍については、X-linked 酵素や集合キメラでの allo-specific membrane antigen などをマーカーとして、いくつかの腫瘍 monoclonality が証明されている²⁾。一方、肝発癌では、一個の増生結節が、一個の initiated cell の増殖によって形成されることを示唆されてきたが、

Accepted for publication: December 1, 1987

Mailing address: Katsuhiro Ogawa, Department of Pathology, Asahikawa Medical College, 4-5-3-11, Nishikagura, Asahikawa 078, Japan.

すべての結節が monoclonal であるか否かは議論がある。今回我々は, urea cycle 酵素の1つである ornithine carbamyl transferase (OCT) の活性を遺伝的に欠損した sparse fur with abnormal skin and hair (spf-ash) マウス³と, C3H マウスの F1 hybrid を用いることにより, 組織化学的方法で増生結節の clonality を検討した。

一方, 初期の増生結節は, 発癌物質やプロモーターの投与を中止すると多くのものでは, マーカーが次第に消失し, 形態学的にも正常の肝に類似して, 結節の特徴が失われることが知られている⁴⁻⁶。そのような結節が, 発癌過程でどのような意義をもつのかを調べるためには, 従来の生化学的マーカーはこの目的には不十分である。我々は, 無アルブミンラット (NAR)⁷と, 正常のアルブミン産生能を有するラットとの間で肝細胞の肝内移植系を確立し, 増生結節がアルブミン陰性で, 非結節部がアルブミン陽性になるという人工的なモザイクラットを作製し, アルブミン陰性をマーカーとして移植結節の運命を追跡した⁸⁻¹⁰。

方 法

1. C3H×spf-ash F1 マウスによる前癌肝細胞の clonality の検討

OCT は carbamyl phosphate からリン酸基を遊離して, ornithine に carbamyl group を転移し, citrulline を合成する酵素である。この酵素は X-linked であるため, spf-ash と正常マウスの間に生まれた F1 hybrid のうち, 雌の heterozygote では, X 染色体の不活化により個々の肝細胞は X^p か X^m のいずれか一方のみが発現し, OCT 活性の発現に関しては陽性か陰性かのどちらかになる。また, この酵素は, carbamyl phosphate から遊離するリン酸基を利用したフォスファターゼ反応により, 容易に染め出すことが可能である¹¹。そこで, spf-ash マウスの雄と C3H の雌の交配による F1 の雌に, 生後1週間以内に DEN を腹腔内投与し, 3週目から 0.05% phenobarbital 食を連続投与して増生結節を誘発し, 3ヵ月から1年にわたる各時期に屠殺した。肝組織をアセトン固定, パラフィン包埋し, 水谷の方法により carbamyl phosphate を基質として OCT 活性の染色を行い, 続いて同じ切片を用いて, 増生結節のマーカーである

GGT の染色を行った。

2. SD×NAR F1 の肝内への NAR 増生結節の移植

NAR の無アルブミン血症は劣性遺伝性であるため, SD×NAR F1 ラットでは, すべての肝細胞がアルブミン産生能を示す。そこで NAR を donor とし, SD×NAR F1 を recipient として, 分離した増生結節細胞を経門脈的に肝内に移植した。このような動物では, アルブミンの有無によって, donor 由来の増生結節が検出できる。donor の NAR には Solt-Farber 法¹²により増生結節を誘発し, 6週目にコラゲナーゼを還流して肝細胞を分離した。recipient の SD×NAR F1 には, 移植の1週間前から 0.02% 2-AAF 食を2週間投与した。2-AAF 投与開始1週目に 2/3 部分肝切除を行ったのち, 腸間膜静脈から 2×10^6 個の分離細胞を注入した。recipient を移植後2週, 8週, 9ヵ月目に屠殺し, 肝を PLP 還流固定・パラフィン包埋後, 連続切片を作製し, アルブミン, GST-P, epoxide hydrolase (EH), GGT の免疫染色を行った。

結 果

1. C3H×spf-ash F1 マウスの前癌肝細胞

正常の C3H マウスの肝組織では, OCT 活性は肝小葉の周辺部で強く, 中心部に弱い傾向が見られたが, すべての細胞に陽性であった (図 1a)。一方, spf-ash マウスでは, すべての肝細胞が OCT 陰性で, 陽性細胞は全く認められなかった。これに対して C3H×spf-ash F1 マウスでは, 陽性細胞と陰性細胞が混在してモザイクを示していた (図 1b)。

DEN-phenobarbital 処置群では, 種々の大きさの GGT 陽性巣が見られ, 小さなものは1個の細胞からなり, 大きなものでは数百個の細胞からなっていた。OCT と GGT の二重染色では GGT は細胞膜に赤色に染まり, OCT は細胞質に褐色に染まるため, 両者は明瞭に区別することが出来た。GGT 陽性の area は, 大きさに関係なく, 検索したすべての結節で, OCT は陽性か陰性かのいずれかであり, 陽性細胞と陰性細胞の両方からなるモザイク状の結節は全く認められなかった (図 2a, b)。また, OCT 陽性結節と陰性結節の割合はほぼ 1:1 であり, 未処置動物の陽性細胞と陰性細胞の割合

図1. 正常 C3H マウス (a) と正常 C3H×spf-ash F1 雌マウス (b) の肝 OCT 活性染色。

図2. C3H×spf-ash F1 雌マウスに誘発した OCT 陽性増生巣 (a) と OCT 陰性増生巣 (b)。OCT-GGT 二重染色。

と一致した。

2. NAR×SD F1の肝内へのNAR増生結節細胞の移植

正常のSD, F344 ラットに誘発した増生結節や肝癌では、種々の程度にアルブミンが陽性で、発

癌過程で肝細胞のアルブミン産生能の消失が起こらないことが確認された。したがって、上記の移植実験で recipient にみられたアルブミン陰性の結節は donor に由来したものと判定された。

移植後2週目では recipient の肝内に多数の結節がみられ (90 個/cm²), アルブミン染色はすべて

図3. NAR増生結節細胞の肝内移植後2週目のSD×NAR FIの肝。アルブミン染色(a)とGST-P(b)染色。

図4. NAR増生結節細胞の肝内移植後、8週目のSD×NAR FIラットの肝。アルブミン染色(a)とGST-P染色(b)。

が陰性で、donor originであった(図3a)。連続切片を用いて生化学マーカーについて検索したところ、アルブミン陰性結節のうち98%がGST-P陽性(図3b)、94%がEH陽性、60%がGGT陽性で、3つのマーカーが同時に発現していたものは59%であった。移植後8週目では、アルブミン陰性結

節の単位面積当たりの数は2週目とほとんど同じであったが(図4a)、GST-P陽性のものは43%(図4b)、EH陽性のものは43%、GGT陽性のものは22%で、3つが同時に陽性のものは18%に過ぎなかった。9カ月後では、アルブミン陰性結節は増大したがいに癒合し、正確な数の測定は困難で

あったが、マーカーの発現は8週目とほぼ同様であった。

アルブミン陰性結節の形態は、2週目では周囲圧排性で塩基好性を示したが、8週、9カ月目では、大部分は正常肝とほぼ同じ組織像を示し、細胞質が好酸性ないしは空胞状で、周囲圧排性を示すものは少数であった。

考 察

1. 増生結節の clonality

肝増生結節が monoclonal origin であることは以前から示唆されていた。例えば、GST-P などの増生結節のマーカーを持つ細胞が1個の単位で見つかること¹³や、³H-thymidine で組織を標識したのち、発ガン物質を投与して増生結節を誘発すると、増生結節の標識が次第に希釈されること¹⁴が報告されている。また生化学的には、X-linked の酵素マーカーを持つモザイク動物の結節では、大部分がアイソザイムの一方のみを発現することが示されている。本実験では、C3H×spf-ash F1 マウスを用いて DEN による initiation と、phenobarbital による promotion の組み合わせにより誘発した増生結節の clonality を組織化学的に検討した。もし、増生結節が複数の細胞を起源として発生するとすれば、このようなモザイク組織では、陽性細胞と陰性細胞の両者からなるモザイク結節が存在するはずである。しかし、そのような結節が全く観察されなかったことは、各増生結節が monoclonal 起源であることを示している。

従来の生化学的方法による clonality の検索では、ある程度の量の純粋な腫瘍組織を必要とし、さらに腫瘍組織中に含まれる血液や間質の成分が alloenzyme や alloantigen の解析の障害になる。我々の示した組織化学的方法では結節のマーカーと遺伝マーカーの同時染色が可能であり、顕微鏡レベルの微小な病変についても、clonality の検索が可能であった。

2. 増生結節の表現形質の正常化

SD×NAR F1 に移植した細胞は、NAR の結節細胞と周囲の正常肝細胞との混合であるが、移植後2週目では、大部分の結節は生化学的マーカー

を示していた。すなわち、この系で recipient に生着したものは、donor の結節細胞のみで、NAR 由来の正常細胞は生着し得なかったことを示している。8週目になると半数以上の recipient の結節はいずれの生化学マーカーも示さず、形態学的にもほとんど正常であった。このことは、いったん生着した結節細胞は、プロモーションの影響のある間は生化学マーカーを発現するが、その刺激がなくなると、形質が正常化することを示している。すなわち、結節は一見退縮したかにみえるが、正常に近い形に形質変化したことがわかる。これまで同様の現象は、生化学的マーカーを用いて調べられてきたが、今回の観察のように完全にマーカーを失うものがあると、それらはとらえることの出来ない現象であった。このようにモザイク動物を利用することにより、結節細胞の *in vivo* での形質変化を正確に追跡することが可能である。

本実験に用いた結節細胞の肝内移植は、Laishes ら¹⁵により報告されたモデルを改良したものである。彼らが用いた同系動物同士の移植では、マーカーは従来の生化学マーカーを用いるため、結節の運命を追跡する意味では通常の発癌実験と変わらない。Hunt ら¹⁶は、Wistar/Furth または F344 を donor とし、Wistar/Furth×F344 F1 を recipient として、allo-specific membrane antigen を遺伝マーカーに用い、移植細胞を証明した。我々のモデルはアルブミンを遺伝マーカーとするため、Hunt ら¹⁶が凍結切片での蛍光抗体法を用いるのに対して、PLP 還流固定・パラフィン包埋材料を用いることが出来、広い範囲の検索が可能で、しかも従来の生化学的マーカーとの対比が容易であるなど、多くの利点がある。

近年、疾患モデルとして、種々の遺伝異常をもつ動物の系が確立されている。これらの動物は、それぞれの特性を生かすことにより、発癌研究にも有効に利用することが出来る。本小論では、NAR または spf マウスと正常とのモザイク動物を肝化学発ガン過程の研究に応用した著者らの最近の成績を紹介した。

文 献

1. Fialkow, PJ: Clonal origin of human tumors. *Biochim Biophys Acta* 458: 283-321, 1976.

2. Iannaccone, PM, Weinberg, WC, and Deamant, FFD: On the clonal origin of tumors: a review of experimental models. *Int J Cancer* **39**: 778-784, 1987.
3. DeMars, R, LeVan, SL, Trend, BL, and Russell, LB: Abnormal ornithine carbamoyltransferase in mice having the sparse-fur mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**: 1693-1697, 1976.
4. Enomoto, K and Farber, E: Kinetics of phenotypic maturation of remodeling of hyperplastic nodules during liver carcinogenesis. *Cancer Res* **42**: 2330-2335, 1982.
5. Ogawa, K, Solt, D, and Farber, E: Phenotypic diversity as an early property of putative preneoplastic hepatocyte populations in liver carcinogenesis. *Cancer Res* **40**: 725-733, 1980.
6. Tatematsu, M, Nagamine, Y, and Farber, E: Redifferentiation as a basis for remodeling of carcinogen-induced hepatocyte nodules to normal appearing liver. *Cancer Res* **43**: 5049-5048, 1983.
7. Nagase, S, Shimamune, K, and Shumiya, S: Albumin-deficient rat mutant. *Science* **205**: 590-591, 1979.
8. Ogawa, K, Yokota, K, Tsuji, S, Takasaka, H, Mori, M, and Nagase, S: Transfer of albumin-negative hyperplastic nodule cells to the albumin-positive livers of analbuminemic×SD hybrid rats. *Proc Am Assoc Cancer Res* **28**: 165, 1987.
9. Yokota, K, Ogawa, K, Mori, M, and Nagase, S: Transplantation of putative preneoplastic hepatocytes of analbuminemic rats in the livers of Sprague-Dawley×albuminemic hybrid rats. *Jpn J Cancer Res* **78**: 109-112, 1987.
10. 横田 欽一, 小川勝洋: 遺伝的マーカーによるラット肝化学発癌過程の解析. *札幌医学雑誌* **56**: 263-274, 1987.
11. Williams, ED, Wareham, KA, and Howell, S: Direct evidence for single cell origin of mouse liver tumors. *Br J Cancer* **47**: 723-726, 1983.
12. Solt, D and Farber, E: New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature* **236**: 701-703, 1976.
13. Moore, MA, Nakamura, T, and Ito, N: Immunohistochemically demonstrated glucose-6-phosphate dehydrogenase, γ -glutamyl transpeptidase, ornithine decarboxylase and glutathione S-transferase enzymes: absence of direct correlation with cell proliferation in rat liver putative preneoplastic lesions. *Carcinogenesis* **7**: 1419-1424, 1986.
14. Scherer, E and Hoffmann, M: Probable clonal genesis of cellular islands induced in rat liver by diethylnitrosamine. *Eur J Cancer* **7**: 369-371, 1971.
15. Laishes, BA and Farber, E: Transfer of viable putative preneoplastic hepatocytes to the livers of syngeneic host rats. *JNCI* **61**: 507-512, 1978.
16. Hunt, JM, Buckley, MT, Onnink, PA, Rolfe, PB, and Laishes, BA: Liver cell membrane alloantigens as cellular marker in genotypic mosaic rat livers undergoing chemically induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* **42**: 227-236, 1982.