

ラット肝前がん病変 GST-P 発現肝細胞の相同性について

Heterogeneity of hepatocytes expressing GST-P, a rat preneoplastic alteration

中根汎^{1,2)}

指導教員 梅村隆志^{1,2)} 研究協力者 石井雄二²⁾, 高須伸二²⁾

1) ヤマザキ動物看護大学 動物看護学部 動物看護学科 動物病理学研究室

2) 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

キーワード : *diethylnitrosamine*、Furan、GST-P、Sox9、ラット肝臓

1 背景

Furan 類はラット肝前がん病変として知られる glutathione-S-transferase placental form (GST-P) 陽性細胞巣の数・面積ともに短期間で顕著に増加させることから、遺伝毒性発がん物質の特徴を有している。しかし、レポーター遺伝子導入動物を用いた実験では、主に点突然変異を検出する *gpt* アッセイならびに欠失突然変異を検出する *Spi* アッセイのいずれにおいても陰性の結果となった。そこで遺伝毒性物質の diethylnitrosamine (DEN) 誘発 GST-P 陽性巣と Furan 誘発 GST-P 陽性巣の細胞動態を比較した。その結果、DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巣は休薬後に増加する一方、furan 誘発では休薬後に減少し、なかでも大型の GST-P 陽性細胞巣が減少していることが明らかとなり、両陽性巣は生物学的に異なる可能性が考えられた。そこで本研究では、furan 誘発と DEN 誘発の GST-P 陽性細胞巣の休薬後の異なる挙動に寄与した遺伝子群の探索を目的に、それぞれの GST-P 陽性細胞巣について網羅的遺伝子発現解析により、その分子レベルの差異を検証した。また、Furan 誘発陽性巣において特異的に発現した遺伝子群の中から候補遺伝子を絞り込み、免疫染色により、その染色局在性について検討した。

2 実験方法

6 週齢の雄性 F344 ラットに Furan を 8 mg/kg 体重/日の用量で 1 日 1 回、週 5 日間の頻度で 13 週間強制経口投与、あるいは DEN を 10 ppm の濃度で 13 週間飲水投与した。投与終了後、肝臓を摘出し GST-P 陽性細胞巣ならびに GST-P 陰性領域をレーザーマイクロダイセクション法にて採取し、その切片から抽出した mRNA をもちいて、網羅的遺伝子発現解析を行った。また、その採取方法の妥当性を確認するため、網羅的遺伝子発現解析で使用した mRNA 用いて、リアルタイム PCR 法により *Gstpl* の発現を検討した。GST-P 陽性部位と Sox9

陽性部位の照合は、連続切片を使用し、肉眼的にて比較検証した。GST-P 発現部位における Sox9 の発現の有無を検証するにあたり、Furan 及び DEN の 13 週間投与試験の検体の中から、対照群、Furan あるいは DEN 投与群、それぞれの休薬後群のラット肝を各 5 検体ずつ選出し、計 30 検体に対してそれぞれ GST-P および Sox9 を 1 次抗体とした免疫染色を行なった。GST-P 陽性細胞巣 1 個あたりの Sox9 の発現比率の解析は各検体から最大 10 個の GST-P 陽性巣を無作為に抽出した。Sox9 が 10%未満染まる検体を弱陽性とし、10%以上染まるものを陽性、まったく染まらなかつたものを陰性と判断した。

3 結果

網羅的遺伝子発現解析の結果、*Gstpl* の上昇は Furan および DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巣に共通しており、試料採取方法の妥当性を確認した。また、DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巣のみで上昇が認められた遺伝子としては、Mors2、Cdh23 ならびに Secisbp2l など、Furan 誘発 GST-P 陽性細胞巣のみで上昇が認められた遺伝として Collao、Sox9 ならびに Fblnl などが認められた。これらの候補遺伝子の中から肝臓での重要な機能に着目し、Sox9 を選択し、免疫染色を実施した。GST-P 陰性領域における Sox9 の発現は DEN 及び Furan 投与群のいずれに関しても既存の正常胆管上皮細胞では陽性を示したが、正常肝細胞では陰性であり、Sox9 免疫染色の妥当性が確認された。Furan 誘発 GST-P 陽性巣では、投与後の GST-P 陽性巣の一部に Sox9 陽性細胞が混在していた(図 1)。一方、DEN 誘発 GST-P 陽性巣では Sox9 陽性の細胞は認められなかった。また、休薬後の GST-P 陽性巣ではいずれの投与においても Sox9 陽性細胞は認められなかった。GST-P 陽性細胞巣における Sox9 陽性の比率は、Furan 13 週間投与後の検体で、GST-P 陽性細胞巣 29 個中 Sox9 の発現は 5 個認められた(表 1)。

4 考察

Furan 誘発 GST-P 陽性巣と DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巣の網羅的遺伝子発現解析の結果、それぞれに上昇する遺伝子が認められ、Furan 誘発と DEN 誘発の GST-P 陽性細胞巣には異なる遺伝子発現を示す細胞群が存在することが示され、両陽性巣は分子病理学的には異なる病変である可能性が示された。網羅的遺伝子発現解析の結果から候補遺伝子を選択するため、各遺伝子の既知情報を探り、胆管上皮細胞のマーカーであり、様々な細胞や臓器の発生に重要な転写因子として報告されている Sox9 遺伝子に注目した。Sox9 遺伝子は肝臓において、胎生期では胆管の発生の制御を担い、生体では肝細胞や胆管細胞の持続的な供給に関与しているとする報告があり、肝臓における Sox9 遺伝子の機能は重要であると考えられている。そこで Sox9 が休薬後の細胞動態を規定する分子の可能性を考え、Sox9 の免疫染色を実施して、GST-P 陽性巣ごとの Sox9 陽性細胞の局在を検索した。その結果、Furan 13 週間投与後の GST-P 陽性細胞巣の一部で Sox9 を発現した細胞が認められ、休薬後には消失した。また、DEN 13 週間投与後および休薬後では一切認められなかつたことから、Sox9 遺伝子は Furan 誘発 GST-P 陽性細胞巣が DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巣とは異なる挙動を示した原因遺伝子群の 1 つであることが推測された。今後は、Furan 誘発 GST-P 陽性細胞巣の休薬後の消失は比較的大型の GST-P 陽性巣に認められた事実があることから、Sox9 遺伝子を発現している GST-P 陽性巣のサイズを測定し、Sox9 陽性細胞が存在する GST-P 陽性巣が消失していく事実を確認する予定である。

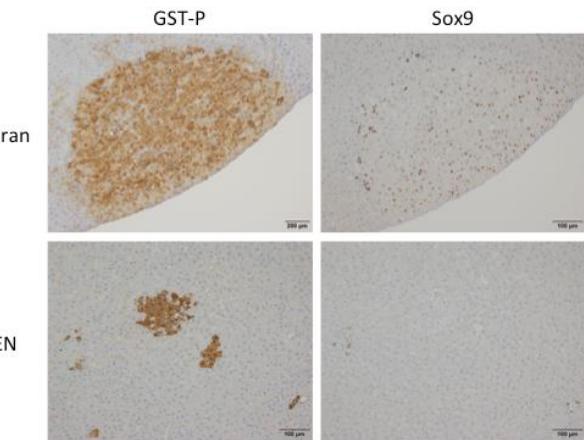


図 1 : GST-P 及び Sox9 免疫染色

Treatment	Examined No. of GST-P foci	Number (ratio) of GST-P positive foci with Sox9 expression		
		-	±	+
13 weeks				
Furan	29	24 (83)	3 (10)	2 (7)
DEN	50	50 (100)	0 (0)	0 (0)
13 + 7 weeks				
Furan	7	7 (100)	0 (0)	0 (0)
DEN	50	50 (100)	0 (0)	0 (0)

(-), Negative; (±), 0-10%, (+), 10%-100%

表 1 : GST-P 陽性細胞巣における Sox9 の発現比率

