

p21 によるヒト肝細胞株での分化誘導療法の開発

國枝 武美

近年、肝不全に対する肝補助療法として肝細胞移植や肝機能の中心を担う部分に生物学的素材を用いたバイオ人工肝臓の開発が望まれている。肝細胞療法に使用する細胞はより高い分化肝機能が維持されていることが重要であると考えられる。p21WAF1はcyclin-dependent kinase (CDK) inhibitorであり、特にG1期における細胞周期停止を誘導する事が知られている。また、p21を強制発現させる事で様々な細胞株で分化誘導が示されている。本研究ではSV40T抗原ヒト不死化肝細胞株NKNT-3におけるp21の分化誘導能を検討した。NKNT-3にp21発現アデノウイルスベクター(AdCMVp21, CMVのエンハンサー及びプロモーター下流にp21がインサートされている)およびTAT proteinとp21のfusion protein (pTAT-p21)を用いて、p21の形質導入をおこなった。細胞形態、細胞周期、アルブミン発現、薬物代謝酵素であるcytochrome P450関連酵素(CYP)発現に及ぼす効果を検討した。免疫染色およびWestern blottingによってAdCMVp21およびpTAT-p21による効果的なp21の発現がNKNT-3細胞に認められた。p21形質導入後の細胞は細胞密度は減少し、胞体の増大を認めN/C比の低下が認められた。細胞周期解析ではG1 arrestの状態となった。また、アルブミンおよびCYP3A4, CYP2C9の発現増強が認められた。ヒト不死化肝細胞(NKNT-3)にp21を過剰発現させることにより分化機能誘導が可能であることが示唆された。

(平成14年8月29日受理)

p21 Transduction Augments Differentiated Phenotypes in Immortalized Human Hepatocytes

Takemi KUNIEDA

Recently, there has been great expectation regarding the use of cell therapies such as hepatocyte transplantation and bioartificial livers to treat patients with liver failure. Improvement of differentiated cellular functions is of fundamental importance in hepatocyte-based biological therapies. The molecule of p21, known as WAF1, is a potent cyclin-dependent kinase inhibitor which regulates the transition from the G1 phase to the S phase in a cell cycle. Investigators have demonstrated that p21 transduction induces cellular differentiation in various cell lines. We used SV40Tag-immortalized human NKNT-3 hepatocytes in this study. A replication-deficient adenovirus vector, Ad5CMVp21, expressing a p21 gene under the control of the CMV promoter, was used to achieve efficient p21 delivery. A pTAT-p21 fusion protein was also utilized for transduction in NKNT-3 cells. Morphological alteration, cell-cycle progression, and protein expression of albumin, CYP3A4, and CYP2C9 were analyzed in the p21-transduced NKNT-3

cells. Immunofluorescent staining and Western blotting analysis for p21 showed efficient p21 transduction in the NKNT-3 cells using Ad5CMVp21 or pTAT-p21. Under cell cycle analysis, transduction of p21 caused G1-arrest in NKNT-3 cells, leading to differentiated hepatic phenotypes including a decreased N-C (nucleo-cytoplasmic) ratio, decreased cell density, and enhanced protein expression of albumin, CYP3A4, and CYP2C9. In the results presented here, we show that exogenous expression of p21 augmented cellular differentiation in immortalized human NKNT-3 cells. (Accepted on August 28, 2002) *Kawasaki Igakkaishi* 28(3): 165-174, 2002

Key Words ① p21 ② Immortalized human hepatocyte ③ Differentiation
④ TAT protein

はじめに

本邦では、平成9年に臓器移植法案が可決され脳死ドナーからの臓器提供が許可された。臓器移植は難病治療の解決策として期待されているがドナー不足は深刻であり、今後解消される見込みもない。末期臓器不全に対する臓器置換は医療として熟成しつつある一方で、移植用臓器の供給に限界があることを明らかにしたと言える。臓器移植は、遺伝子組み換え等の手法で拒絶反応が制御可能となり、免疫拒絶が無視できるようになっても、圧倒的なドナー不足から本質的な解決には至らない。臓器移植に伴うウイルスなどの感染の危険性の問題もあり、人工的な組織・臓器の形成が求められている。すなわち、医学、工学、生命科学の協力によって生命機能の回復、維持、改善を可能にする組織あるいは臓器の代替品の開発を目的とした再生医学である。細胞を三次元培養し、組織を再現する tissue engineering は単に高度先端医療への貢献が期待されるだけでなく、これまでにない型の最先端技術として他の技術領域への反響も大きい。こうした再生医療を実践する上での細胞のソースとして、取り扱いの容易なヒト細胞株の樹立・分化誘導療法の開発が望まれている。細胞の増殖と分化形質の発現は逆相関にあり、細胞の株化にて取り扱いを容易にする反面、分化形質の低下がおこる。そこで、必要な細胞数まで増殖させた後に細胞周期を調節することで分化形質を誘導・増強させたのちに細胞療法に

利用するとは価値のある戦略である。こうした細胞周期調節分子としてサイクリン依存性キナーゼ (cyclin dependent kinase: Cdk) の活性を阻害する蛋白質としてクローニングされた p21Cip1¹⁾ に注目した。そこで、今回、不死化ヒト肝細胞 NKNT-3 を材料に p21cDNA 発現アデノウイルスベクター AdCMVp21 および11個のアミノ酸 (Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg) から構成される Human immunodeficiency virus (HIV) 由来蛋白質 (TAT protein)^{2),3)} と p21 の fusion protein である pTAT-p21 を用いて NKNT-3 に p21 を形質導入することで細胞周期を調節し、分化誘導に関する検討を行ったので報告する。

材料と方法

1) 細胞株と培養条件

実験には小林らが樹立した不死化ヒト肝細胞 NKNT-3⁴⁾ を使用した。NKNT-3 細胞は一对の loxP 配列間に simian virus40 large T 抗原 (SV40 Tag) と hygromycin 耐性遺伝子と自殺遺伝子である herpes simplex virus-thymidine kinase の三種の遺伝子をあわせ持つレトロウイルスベクター SSR#69 をヒト成人肝細胞に形質導入することにより樹立された可逆性不死化ヒト肝細胞株である。NKNT-3 細胞は、数個の核小体を有する大きな核を持ち、細胞内顆粒に富み、いわゆる肝臓実質細胞の形態学的特徴を有している。また、アルブミン、asialoglycoprotein receptor (ASGPR), bilirubin-uridine diphosphatase-

glucuronosyltransferase (Bil-UGT), glutamine synthetase (GS), glutathione-S-transferase π (GST- π), human blood coagulation factor X (HBCF-X) などの分化肝遺伝子の発現が認められている。培養液は中林らが開発した無血清培地 ISE-RPMI⁵⁾を用い、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。培養細胞は倒立型位相差顕微鏡にて定期的に注意深く観察し、3日毎に新鮮な培養液に交換した。

2) p21 発現アデノウイルスベクター (AdCMV p21) による NKNT-3 への p21 導入

CMV プロモーター下に p21cDNA を発現する組み換えアデノウイルスベクター AdCMVp21^{6),7)} および同プロモーター下に E.coli LacZcDNA を発現する組み換えアデノウイルスベクター AdCMVLacZ は JA Roth 博士 (University of Texas MD, Anderson Cancer Center, Huston, TX, USA) より供与を受けた。AdCMVp21 を multiplicity of infection (MOI) 10 となるように NKNT-3 培養上清に添加後、15分間隔で培養容器を振とうし、1時間の感染を行った。1時間後に新鮮な培養液に交換し、約48時間培養後に以下の実験に使用した。当実験施行前に同力価の AdCMVLacZ を感染させることで NKNT-3 に効率的な遺伝子導入が可能なことと同力価でのアデノウイルスの細胞障害性が極めて少ない事を確認した。

3) pTAT-GST (glutathioneS-transferase) および pTAT-p21 expression vector の作製と精製

pTAT-GST および pTAT-p21 は Nagahara ら⁸⁾ の方法に準じ、岡山大学細胞生物学教室、阪口政清先生に作製して頂き、供与を受けた。すなわち、pTAT-HA prokaryote expression vector の XhoI と EcoRI site に human wild type p21 の PCR fragment を挿入し、大腸菌で増殖させた後ニッケルキレートカラムを用いて蛋白を精製、大量生産し実験に使用した。

4) pTAT-p21 transduction による細胞障害性の検討

MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (SIGMA) のテトラゾリウム環は生細胞のミトコンドリアにあるコハク酸デヒドロゲナーゼにより開裂し暗青色のホルマザン色素を生成する⁹⁾。当該反応を利用し pTAT-p21 の NKNT-3 細胞障害性を検討した。6 well-plate (Becton Dickinson) に NKNT-3 細胞を 1×10^6 cells/well の密度とし、pTAT-p21 を各 well に 0 μ g/ml, 2.5 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml の濃度で添加した。24時間培養後、MTT 試薬を培養上清中に 1 mg/well 添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で5時間の incubation を行ったのち、MTT 添加培養上清を吸引除去し、1 ml の 0.04N HCL 添加イソプロパノールを加え10分間の incubation を行い呈色させた。肉眼的に呈色強度を比較し同時に、吸光度計 (Labsystems, Multiskan MS ライフサイエンスインターナショナル) を使用し波長 540 nm での吸光度を測定した。また、pTAT-p21 添加24時間後に倒立型位相差顕微鏡で形態学的検討を行った。

5) AdCMVp21 感染後の p21 発現の検討

a) Western blotting 法による p21 発現

NKNT-3 に AdCMVp21 (MOI 10) 感染48時間後に培養上清を吸引し、phosphate buffered saline (PBS) で3回洗浄後、細胞を機械的に dish より剥離回収した。細胞を cell lysis buffer で溶解後、protein sample を1レーンあたり 30 μ g に調整し12% SDS-PAGE で電気泳動した。これをニトロセルロース膜へ (Amersham, Japan) トランスファーした後、スキムミルクでブロッキングを行い、続いてウサギ抗ヒト p21/WAF1 抗体 (1:100) (Santa Cruz Biotechnology) を使用し1次抗体反応、horseradish peroxydase 標識抗マウス IgG 抗体 (1:2000) (MBL, Nagoya, Japan) を使用し2次抗体反応を行った。ECL detection kit (Amersham) を使用し発色を行った。また、internal control として human β -actin を

用いた。当該手技は、阪口ら¹⁰⁾の手法に準じた。

b) p21 の免疫蛍光染色

6-well plates の各 well 上に滅菌済みカバーガラスを敷き、NKNT-3 細胞をその上に播種した。AdCMVp21 (MOI 10) 感染後48時間また、pTAT-p21 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) transduction 後24時間目に培養上清を吸引し、PBS 洗浄後、4% paraformaldehyde in PBS で室温、30分間静置させ、同様に PBS で洗浄後、4℃、30分 100% ethanol にて細胞固定を行った。同様に PBS で洗浄後 blocking solution (10% skim milk, 10% FBS, 0.1% sodium azide, and 0.1% TritonX-100 in PBS) 室温、30分で blocking 後、マウス抗ヒト p21/WAF1 抗体 (1:100) (Santa Cruz Biotechnology) を使用し 1次抗体反応 (37℃, 1時間)、ついで2次抗体反応を行った。サンプルを Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA) に浸し蛍光顕微鏡 (Model Axiophot FL, Carl Zeiss, Inc., Oberkochen, Germany) で p21 の発現を検討した。

6) pTAT-p21 による NKNT-3 への p21 導入

pTAT-p21 は N 末端に 6-Histidine (6-His) Tag を有すること⁸⁾を利用し、NKNT-3 への p21 導入効率を抗 6-Histidine 抗体 (Amersham Pharmacia, Bromma, Sweden) を用いた Western blotting 法にて検討した。pTAT-p21 (2.5, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 添加 3 時間後に PBS で洗浄し、細胞を dish より剥離回収した。細胞を cell lysis buffer で溶解後、protein sample を 1 レーンあたり 30 μg に調整し 12% SDS-PAGE で電気泳動した。当該手順は上記 p21 Western blotting 法に準じた。

7) 細胞周期の解析

AdCMVp21 (MOI 10) 感染48時間後また、pTAT-p21 (5, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) transduction 24時間後に PBS で 3 回洗浄後、トリプシン処理にて細胞を剥離回収した。1000 rpm 5 分間の遠心後、細胞を 1 ml の PBS にて懸濁し、冷100%

ethanol 3 ml を攪拌しながら 1 滴ずつ添加し最終濃度70% ethanol にて細胞固定を行った。エタノール添加後 4℃30分間静置後、再度 1000 rpm 5 分間の遠心操作を行うことで細胞を回収した。細胞を 1 ml の PBS にて懸濁後、RNase 10 μl を加え37℃で20分間インキュベーションした。続いてヨウ化プロピジウム溶液 (PI) (Wako 社) を 1 ml 加え、最終濃度を 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整し 4℃10分間暗所で DNA の染色を行った。50 μm のナイロンメッシュでサンプルを濾過後、フローサイトメーター (FACS Calibar, Becton Dickinson, Mountain View, CA) にて細胞周期の解析を行った。コントロールとして AdCMVLacZ および pTAT-GST を使用した。

8) アルブミンの免疫蛍光染色

AdCMVp21 (MOI 10) 感染48時間後また、pTAT-p21 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) transduction 24時間後にヒトアルブミン免疫染色を行った。実験手順は上記 p21 免疫染色に準じた。1次抗体にはウサギ抗ヒトアルブミン抗体 (DAKO) を使用し、2次抗体には TRITC 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (SIGMA) を使用した。コントロール実験として AdCMVLacZ および pTAT-GST を使用した。

9) Western blotting 法による cytochrome p450 関連酵素 (CYP) 3A4 と CYP2C9 発現の検討

実験手順は p21 Western blotting 法に準じた。1次抗体反応にはマウス抗ヒト CYP3A4 および CYP2C9 抗体 (1:100) (Daiichi Pure Chemicals Inc. Ltd., Tokyo, Japan) を使用した。

結 果

(1) 細胞形態

NKNT-3 細胞に AdCMVp21 (MOI 10) 感染後、倒立型位相差顕微鏡にて細胞形態の変化を観察した (Fig. 1)。AdCMVp21 (MOI 10) 感染後 NKNT-3 細胞の細胞密度は減少し、胞体の増大を認め N/C 比の低下が認められた (Fig. 1-B)。10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の pTAT-p21 添加後にも同様の

変化が認められた (Fig. 1-C). 当該変化は、分化細胞の特徴に一致するものであった。

(2) pTAT-p21 transduction による細胞障害性

pTAT-p21 非添加および 2.5, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 添加では MTT-assay により NKNT-3 細胞は暗青色を呈した (Fig. 2-A, B, C, D). 一方, pTAT-p21 高濃度添加 (25, 50 $\mu\text{g/ml}$) では, 細胞は剥離し全く呈色反応が認められなかった (Fig. 2-E, F). 当該結果から, 高濃度 pTAT-p21 ($\geq 25 \mu\text{g/ml}$) では細胞障害性が強いことが判明した。

(3) pTAT-p21 導入後の外因性 p21 の発現

pTAT-p21 は N 末端に 6-Histidine (6-His) Tag を有することから, 抗 6-Histidine 抗体を使用し Western blotting 法にて間接的に外因性 p21 の細胞内発現を検討した. 用量依存性に Histidine の蛋白発現が認められた (Fig. 3). これは, pTAT-p21 により NKNT-3 細胞に効果的に pTAT-p21 を形質導入できることを示した。

(4) AdCMVp21 感染後 NKNT-3 における p21 発現と局在

AdCMVp21 (MOI 10) 感染48時間後に施行した Western blotting 法では AdCMVp21 非感染細胞と比べ, 感染後細胞に p21 蛋白の強いバンド発現がみられた (Fig. 4-A). また, p21 の免疫染色では, 核内に強い p21 の発現が認められた (Fig. 4-B). pTAT-p21 でも同様の結果を認めた。

(5) NKNT-3 での p21 発現後の細胞周期の変化

AdCMVp21 (MOI 10) 感染後, NKNT-3 細胞は S 期が減少し, G0/G1 期の増加がみられた (Fig. 5). また, pTAT-p21 添加後にも同様に用量依存性 (5, 10 $\mu\text{g/ml}$) に S 期が減少し, G0/G1 期の増加がみられ G1-arrest の状態となった (Fig. 6-C, D). コントロールでの AdCMVLacZ

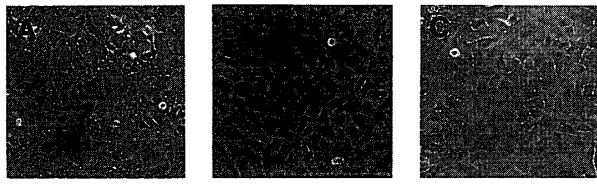
や pTAT-GST 導入細胞ではこの様な変化は認められなかった (Fig. 6-B).

(6) p21 導入後 NKNT-3 細胞におけるアルブミン, CYP3A4, CYP2C9 発現

p21 形質導入後 NKNT-3 細胞におけるアルブミン発現を免疫蛍光染色で検討した. 未処理 NKNT-3 細胞では細胞質に薄く蛍光発色が認められた (Fig. 7-A). 一方, AdCMVp21 (MOI 10) 感染後および 10 $\mu\text{g/ml}$ の pTAT-p21 添加後 NKNT-3 細胞では共にアルブミンの発現増強が認められた (Fig. 7-B, C). さらに, CYP3A4 と CYP2C9 の蛋白発現を Western blotting 法で検討したところ, 未処理 NKNT-3 細胞に比べ p21 形質導入後 NKNT-3 細胞では CYP3A4 と CYP2C9 ともに蛋白レベルでの発現増強が認められた (Fig. 8).

考 察

肝疾患の新たな治療として肝細胞移植, バイオ人工肝臓などの細胞療法に近年期待が寄せられている. 一方で, 機能を維持させた状態での初代ヒト肝細胞の長期間培養は現在の細胞培養技術を駆使しても困難であり, 深刻なドナー臓器の不足から細胞の供給源であるヒトの臓器・組織の利用には限界がある. こうした現状から, 肝癌由来の細胞株や異種 (初代分離ブタ肝細胞など) 細胞を細胞療法やバイオ人工肝臓に使用する試みがなされてきた^{11), 12)}. しかしながら, 腫瘍性や感染症 (ブタ内因性レトロウイルス) などの問題が指摘されている^{13)~15)}. こうした問題を解決するために, 正常ヒト肝細胞にウイルス由来の癌遺伝子である SV40T 抗原などを導入することで, 取り扱いの容易な分化機能を有する細胞株を樹立しようとする試みがある⁴⁾. こうした細胞は, 無限増殖能を持つことから必要時に大量の細胞を提供可能である. 一方で, 1) 継代と共に分化形質が低下する, 2) chromosome の不安定性の増加から malignant formation が誘導される可能性などの問題点もある. こうした



(Magnification × 100)

Fig. 1. Morphological appearance after p21 transduction
After p21 transduction, decreased cell-density with a lower nuclear-to-cytoplasmic (N/C) ratio and enlargement of the size were occurred in p21-transduced NKNT-3 cells. (A ; unmodified NKNT-3, B ; NKNT-3 treated with AdCMVp21, C ; NKNT-3 treated with 10 µg/ml pTAT-p21, magnification x 100).

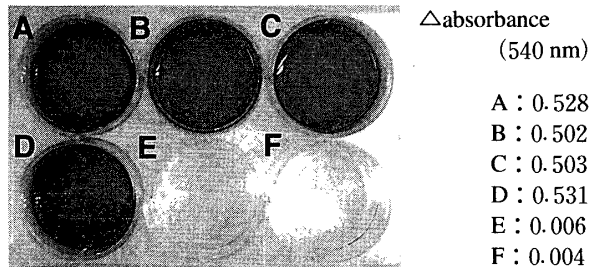


Fig. 2. MTT-cytotoxicity assay of pTAT-p21 transduction
pTAT-p21-induced cellular damage was occurred in dose-dependent manner. Transduction of NKNT-3 cells with pTAT-p21 of 2.5 to 10 µg/ml showed no abnormalities in MTT-uptake, whereas treatment with ≥ 25 µg/ml pTAT-p21 severely damaged cells. NKNT-3 was transduced with TAT/p21 of 0 µg/ml (A), 2.5 µg/ml (B), 5 µg/ml (C), 10 µg/ml (D), 25 µg/ml (E), and 50 µg/ml (F).

問題点を解決するために、SV40T 抗原にて不死化されたヒト肝細胞株 NKNT-3 を材料に細胞周期調節分子である p21 を発現させることで分化形質の誘導、増強を本研究では検討した。SV40T 抗原は p53 および retinoblastoma (Rb) の経路を抑制することが知られており、細胞周期を正の方向に向かわせ強制的に増殖の方向へと誘導させる。そこで今回、注目したのが p53 の下流に位置し細胞周期を調節している遺伝子である p21 である。p21 は、1993年にはじめ

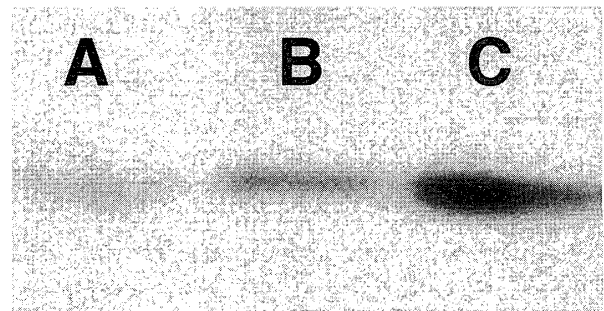


Fig. 3. Detection of exogenously transduced pTAT-p21
Uptake of pTAT-p21 by NKNT-3 cells was detected by Western blotting analysis by means of a mouse anti-6Histidine antibody. Intensity of the band for 6-His increased in a dose-dependent manner of pTAT-p21 used (A ; 2.5 µg/ml pTAT-p21, B ; 5 µg/ml, C ; 10 µg/ml). These findings demonstrated the efficient transduction of NKNT-3 cells with pTAT-p21.

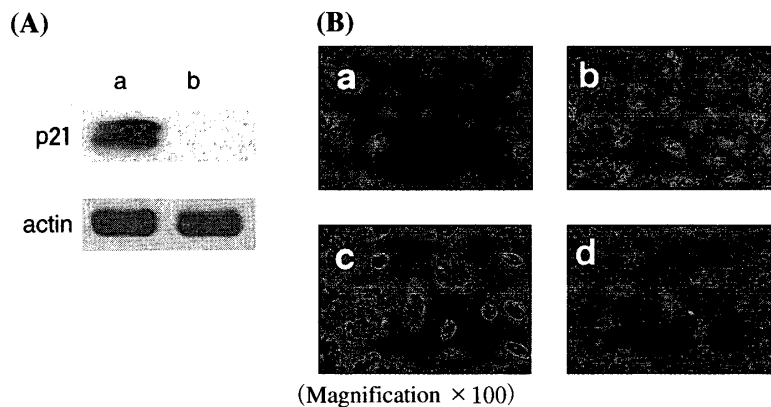


Fig. 4. p21 expression by Western blotting analysis and immunofluorescent study
(A) Bands for p21 were detected in NKNT-3 cells treated with Ad5CMVp21 (a ; Ad5CMVp21-transduced NKNT-3, b ; untransduced NKNT-3).
(B) Much more intense expression of p21 was observed in the nucleus of Ad5CMVp21-transduced NKNT-3 cells compared to unmodified counterparts (a ; untransduced NKNT-3, b ; Hoechst staining for a, c ; Ad5CMVp21-transduced NKNT-3, d ; Hoechst staining for c, magnification x 100).

て p53 により誘導される WAF1 (wild type p53 activated factor) 遺伝子が同定され¹⁶⁾、また同じ頃にサイクリン依存性キナーゼ (cyclin dependent kinase : Cdk) の活性を阻害するタンパク質として p21Cip1 がクローニングされた¹⁾。これらが同一分子であることから、p53 の Cdk 阻害タンパク質 p21WAF1/Cip1 を介した細胞周期の調節機構が明らかになった。また、p21 は同時期に senescent cell-derived inhibitor1 (sdi1) としても同定されており¹⁷⁾、細胞の分化/老化にも関与していると推測される。p21 は Cdk 複合体に結合することで活性を抑えその結果 Rb のリン酸化を抑制し転写因子 E2F の機能を抑制することで G1/S 停止に関与する。現在、p21 ファミリーとして p21 (Waf1), p27 (Kip)¹⁸⁾, p57 (Kip2)¹⁹⁾ が知られており、これらは、N 末端に、相同性を有し、その部分で Cdk/cyclin 複合体と結合して幅広く活性を抑制する。また、p21 は DNA ポリメラーゼの複製活性を促進する proliferating cell nuclear antigen (PCNA) も抑制することが知られている^{20), 21)}

(Fig. 9)。未分化腫瘍に比べ高分化型肺非小細胞癌ではより p21 の発現増強が見られたとする報告²²⁾や、monoblastic cell line において p21 の過剰発現により分化が誘導されたとする報告²³⁾もある。また、食道癌細胞株にアデノウイルスベクターを用い p21Cip1/sdi1 を遺伝子導入することにより扁平上皮細胞の分化マーカーの指標の 1 つである involucrin 蛋白質の発現レベルが著明に増強したとする報告²⁴⁾もある。これらの報告は不死化ヒト肝細胞においても癌細胞と同様に p21 が分化機能への影響をあたえることを示唆した。しかしながら、これ

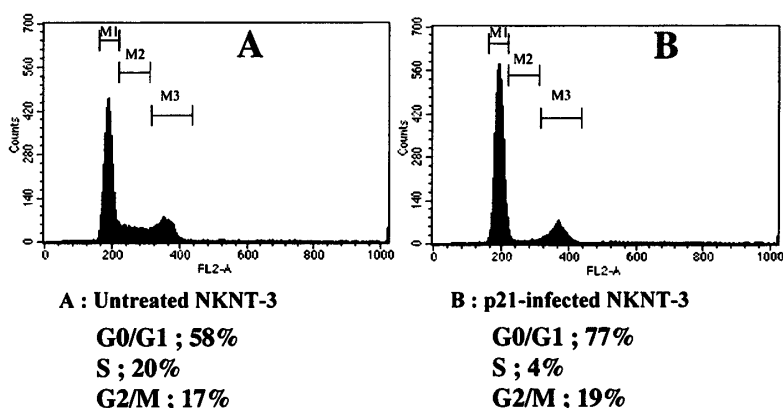


Fig. 5. Cell cycle analysis in treated AdCMVp21. Remarkable G0/G1 arrest was occurred in NKNT-3 cells treated with AdCMVp21.

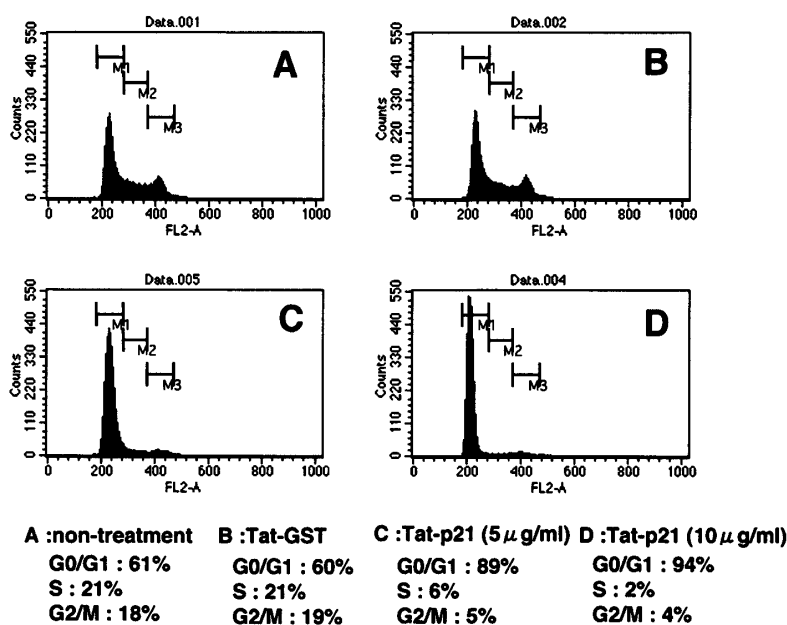


Fig. 6. Cell cycle analysis in treated pTAT-p21. Remarkable G0/G1 arrest was occurred in NKNT-3 cells treated with pTAT-p21 of 5 and 10 μg/ml.

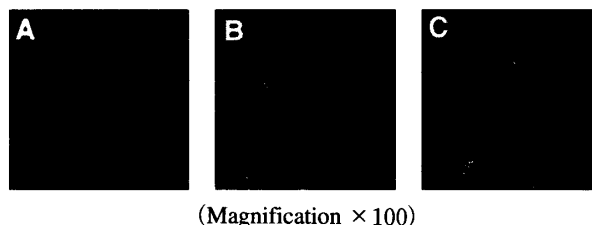


Fig. 7. Albumin expression after p21 transduction. Treatment of NKNT-3 cells with 10MOI AdCMVp21, pTAT-p21 of 10 μg/ml, increased albumin expression (A ; untransduced NKNT-3, B ; AdCMVp21-infected NKNT-3, C ; pTAT-p21-transduced NKNT-3).

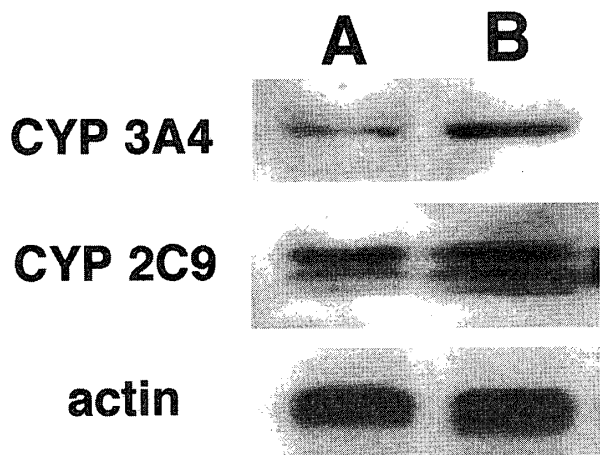


Fig. 8. Western blotting analysis for CYP 3A4 and CYP 2C9. Protein expression of CYP 3A4 and CYP 2C9 increased in NKNT-3 cells after adenoviral p21 transduction. Similar results were observed in pTAT-p21-transduced NKNT-3 cells (data not shown) (A; NKNT-3, B; AdCMVp21-infected NKNT-3).

まで、不死化ヒト細胞における p21 の効果については検討されていない。そこで、本研究では、p21 が不死化ヒト肝細胞株 NKNT-3 において細胞形態、細胞周期、アルブミン発現、薬物代謝酵素である cytochrome P450 関連酵素 (CYP) 発現に及ぼす効果を検討した。最初に組み換えアデノウイルスベクター AdCMVp21 を使用し NKNT-3 に p21 の導入を行った。MOI 10 にて効果的な p21 の形質導入が可能であり、蛋白質レベルでのアルブミンおよび CYP3A4, CYP2C9 の発現増強が認められた。こうした遺伝子療法は種々の癌種をふくむ疾病、先天性代謝異常および細胞療法において有望な治療法の一つであると考えられるが、高い標的効率の条件および比較的大分子蛋白質発現においてはまだ十分とはいえない。近年、PTD (protein transduction domain) 関連ペプチドとそのタンパク質は培養液中に添加することにより、比較的容易に目的とした蛋白質を細胞内に導入することが可能であることが報告されている^{2), 3), 8), 25)}。また、in vivo において TAT 蛋白と β -galactosidase 蛋白 (120-kD) との融合蛋白 (TAT- β -Gal) をマウス腹腔内に投与し脳を含む全身臓器に TAT-

β -Gal を認めたとする報告もある²⁶⁾。そこで、次に HIV 由来の TAT 蛋白と p21 蛋白との融合蛋白 (pTAT-p21) を作製し、NKNT-3 細胞に p21 蛋白質を導入する蛋白療法 (protein therapy) を検討した。蛋白療法の利点として、1) 短時間に導入した蛋白の機能発現が期待できる (15分~24時間)、2) 添加する蛋白量を調節することで細胞内濃度を正確にコントロールできる、3) 酵母を除いたあらゆる細胞に応用可能である、4) 細胞に均一に蛋白を導入可能であることが挙げられている。事実、pTAT-p21 は濃度依存性 (2.5~10 μ g/ml) に短時間で NKNT-3 細胞内に効率的に導入することができた。アデノウイルスベクターを利用する場合、遺伝子レベルでの導入であるため蛋白発現は、蛋白質をそのまま導入する蛋白療法に比べ当然遅いことが予想される。一般的にアデノウイルスベクターによる遺伝子導入はそのピークが感染後 48~72 時間目、蛋白療法では 3~24 時間目に検討されていることから、今回の検討では AdCMVp21 感染 48 時間後、pTAT-p21 添加 24 時間後に細胞周期解析を施行した。G0/G1 期の細胞数割合は pTAT-p21 添加群が AdCMVp21 感染より増加、G2-M 期の細胞数の割合は逆に AdCMVp21 感染群で増加していた。当該データは、pTAT-p21 蛋白療法では p21 の作用がより迅速に出現することを示す。pTAT-p21 導入後の NKNT-3 は AdCMVp21 を用いた時と同様な形態変化をきたし、G0/G1 停止を呈した。また、機能的にもアルブミン、CYP3A4, CYP2C9 の発現増強が

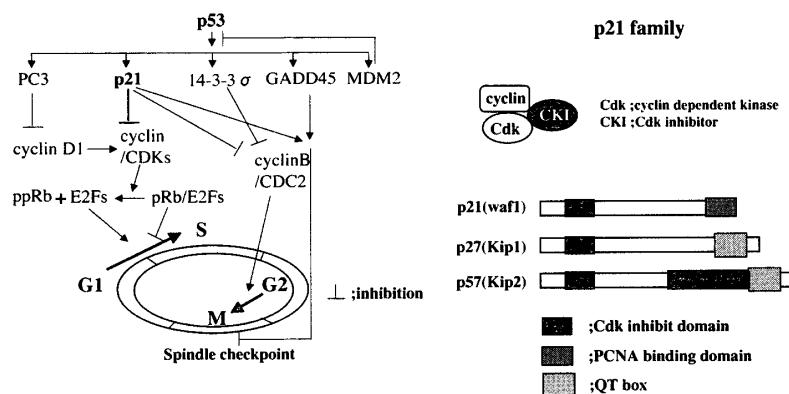


Fig. 9. Schematic drawing representing cell cycle regulation by p53 and its associated molecules

認められた。しかしながら、高濃度添加においては細胞障害性が認められた。TAT融合蛋白が細胞内に搬入される機序として、TAT蛋白がマイナス電荷を帯びており細胞膜での電荷の差により細胞膜に歪みをきたし細胞内に入るものと推測されている^{2), 27), 28)}。高濃度添加では細胞膜の安定性が極めて低下するために細胞障害性が強く認められたと推測される。こうした細胞障害は、融合蛋白のさらなる精製化にてある程度乗り越えることができることが現在判明している。TAT蛋白を用いた蛋白療法は、導入効率が良いで、短時間で目的蛋白を細胞内に導入できることから細胞療法や癌治療などにおける遺伝子治療とは異なる新しい手法として期待できるものである。

ヒト不死化肝細胞にp21を形質導入する事により、アルブミンおよびCYP3A4, CYP2C9の

発現増強が認められた。p21を過剰発現させることにより分化形質の誘導が可能であった。これらの結果は種々のcell-lineにおいてp21形質導入が分化機能誘導に有効な手段となり得る可能性を示唆している。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御親切なる御指導と御校閲を賜りました川崎医科大学内科学（消化器I）教室、山本晋一郎教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を遂行するに当たり、細胞を提供して頂き、直接御指導頂きました、岡山大学大学院医歯学総合研究科・消化器・腫瘍外科学の田中紀章先生、小林直哉先生、および、pTAT-p21を作製してくださいました岡山大学細胞生物学教室の阪口政清先生に厚く御礼を申し上げます。

文 献

- 1) Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ : The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinase. *Cell* 75 ; 805 - 816, 1993
- 2) Green M, Loewenstein PM : Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus Tat trans-activator protein. *Cell* 55 : 1179 - 1188, 1988
- 3) Frankel AD, Pabo CO : Cellular uptake of the Tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55 : 1189 - 1193, 1988
- 4) Kobayashi N, Fujiwara T, Westerman KA, Inoue Y, Sakaguchi M, Noguchi M, Miyazaki M, Cai j, Tanaka N, Fox II, Leboulch P : Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes. *Science* 287 : 1258 - 1262, 2000
- 5) Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J : Groth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 42 : 3858 - 3863, 1982
- 6) Estham JA, Hall SJ, Sehgal I, Wang J, Timme TL, Yang G, Connell CL, Elledge SJ, Zhang WW, Harper JW, Thompson TC : In vivo gene therapy with p53 or p21 adenovirus for prostate cancer. *Cancer Res* 55 : 5151 - 5155, 1995
- 7) Kagawa S, Fujiwara T, Hizuta A, Yasuda T, Zhang WW, Roth JA, Tanaka N : p53 expression overcome p21 WAF1/CIP1-mediated G1 arrest and induces apoptosis in human cancer cells. *Oncogene* 15 : 1903 - 1909, 1997
- 8) Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Snyder EL, Ho A, Latham DG, Lissy NA, Becker-Hapak M, Ezhovsky SA, Dowdy SF : Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells : TAT-p27Kip1 induced cell migration. *Nat Med* 4 : 1449 - 1452, 1998
- 9) Carmichael J, DeGraff WG, Grazdar AF, Minna JD, Mitchell JB : Evaluation of a tetrazolium-based automated colorimetric assay. *Cancer Res* 47 : 936 - 42, 1987
- 10) Sakaguchi M, Miyazaki M, Inoue Y, Tsuji T, Kouchi H, Tanaka T, Yamada H, Namba M : Relationship between contact inhibition and intranuclear S100C of normal human fibroblasts. *J Cell Biol* 149 : 1193 - 1206, 2000

- 11) Wang L, Sun J, Mears D, Horvat M, Sheil AG : Comparison of porcine hepatocytes with human hepatoma (C3A) cells for use in a bioartificial liver support system. *Cell Transplant* 7 : 459 – 468, 1998
- 12) Ellis AJ, Hughes RD, Wendon JA, Dunne J, Langley PG, Kelly JH, Gislason GT, Sussman NL, Williams R : Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Hepatology* 24 : 1446 – 1451, 1996
- 13) Sussman NL, Kelly JH : Artificial liver : a forthcoming attraction. *Hepatology* 17 : 1163 – 1164, 1993
- 14) Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA : Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med* 3 : 282 – 286, 1997
- 15) Paradis K, Langford G, Long Z, Heneline W, Sandstrom P, Switzer WM, Chapman LE, Lockey C, Oniona D, The Xen 111 study group, Otto E : Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. *Science* 285 : 1236 – 1241, 1999
- 16) El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B : WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75 : 817 – 825, 1993
- 17) Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereria SM, Smith JR : Cloning of senescent cell-derived inhibitor of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* 211 : 90 – 98, 1994
- 18) Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A : p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8 : 9 – 22, 1994
- 19) Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, Harper JW, Elledge SJ : p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 9 : 650 – 662, 1995
- 20) Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B : The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature (London)* 369 : 574 – 578, 1994
- 21) Nakanishi M, Robetorye RS, Adami GR, Pereira SM, Smith JR : Identification of the active region of the DNA synthesis inhibitory gene p21^{Sdi1/CIP1/WAF1}. *EMBO J* 14 : 555 – 563, 1995
- 22) Marchetti A, Doglioni C, Barbareschi M, Buttitta F, Pellegrini S, Bertacca G, Chella A, Merlo G, Angeletti CA, Dalla PP, Bevilacqua G : p21 RNA, and protein expression in non-small cell lung carcinomas : evidence of p53-independent expression and association with tumoral differentiation. *Oncogene* 12 : 1319 – 1324, 1996
- 23) Liu M, Lee MH, Cohen M, Bommakanti M, Freedman LP : Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev* 10 : 142 – 153, 1995
- 24) Kadowaki Y, Fujiwara T, Fukazawa T, Shao J, Yasuda T, Itoshima T, Kagawa S, Hudson LG, Roth JA, Tanaka N : Induction of differentiation-dependent apoptosis in human esophageal squamous cell carcinoma by adenovirus-mediated p21^{Sdi1} gene transfer. *Clin Cancer Res* 5 : 4233 – 4241, 1999
- 25) Vives E, Brodin P, Lebleu B : A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* 272 : 16010 – 16017, 1997
- 26) Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy ST : In vivo protein transduction : Delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285 : 1569 – 1572, 1999
- 27) Elliott G, Hara P : Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 88 : 223 – 233, 1997
- 28) Schwarze SR, Hruska KA, Dowdy ST : Protein transduction : unrestricted delivery into all cells. *Cell Biol* 10 : 290 – 295, 2000