

抗コネクシン 32, 26 抗体を用いた  
ラット肝 Gap Junction の免疫組織化学的研究

—特に発生・再生・発癌過程における変化について—

坂本 裕史<sup>1)</sup> 小山田 正人<sup>2)</sup> 榎本 克彦<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 札幌医科大学附属病院病理部 (部長 森 道夫 教授)

<sup>2)</sup> 札幌医科大学病理学第2講座 (主任 森 道夫 教授)

Immunohistochemical Studies of Gap Junction in the Rat Liver  
with Anti-CX26 and Anti-CX32 Antibodies

— Distributional Changes of CX32 and CX26 in the Rat Liver in the Developmental,  
Regenerating and Hepatocarcinogenic Stages. —

Hirofumi SAKAMOTO<sup>1)</sup>, Masahito OYAMADA<sup>2)</sup> and Katsuhiko ENOMOTO<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> *Division of Pathology, Sapporo Medical College Hospital*

(Chief : Prof. M. MORI)

<sup>2)</sup> *Department of Pathology (Section 2), Sapporo Medical College*

(Chief : Prof. M. MORI)

**ABSTRACT** Gap junctions are channels through which ions and small molecules are directly exchanged between adjacent cells, and consist of connexon. Connexon is composed of 6 connexin (CX) molecules, of which CX32 and CX26 have been isolated from the rat liver. To study distributional changes of CX32 and CX26 in rat hepatocytes in the developmental, regenerating and carcinogenic processes, we performed immunohistochemical analysis using a new polyclonal antibody, anti-CX26 antibody, and an antibody which we reported on previously, anti-CX32 antibody, both raised against synthetic peptides of the intracytoplasmic domain.

With liver maturation, the CX32-positive-spots (CX32-PS) remained evenly distributed throughout the acinus of the liver and increased in number. However the CX26-PS, which were sparsely distributed in the embryonic stage, became localized specifically in the periportal area without an increase in number. Thus, we suppose that the alteration of localization of CX26 might be associated with maturation of the liver.

In rat livers regenerating after partial hepatectomy, changes in the number of CX26-PS were similar to those of CX32-PS. This result suggests that these CXs might be controlled by the same mechanism.

In preneoplastic lesions induced by the method of Solt and Farber, the number of CX32-PS decreased, whereas the number of CX26-PS increased in about half of the lesions. In hepatocellular carcinomas, the numbers of both CX26- and CX32-PS decreased. These results suggest that the expression of CX32 and CX26 might be regulated differently during hepatocarcinogenesis.

CX32 and CX26 mostly showed similar patterns in the immunofluorescent study. In preneoplastic lesions, however, the two CXs showed obvious differences in their numbers. The significance of the quantitative changes of gap junctions during hepatocarcinogenesis has yet to be investigated.

(Received March 18, 1992 and accepted March 28, 1992)

**Key words:** Gap junction, Anti-connexin 26 antibody, Perinatal liver, Regenerating liver, Hepatocarcinogenesis

## 1 緒 言

細胞間接着装置の一つである gap junction (GJ)は、隣り合う細胞間に直径約 2 nm の交通路を形成している。それゆえ GJ は分子量 1,000~1,500 以下の物質やイオンの直接交換を可能にし<sup>1)</sup>、細胞増殖のシグナルである cAMP やカルシウムの伝達にも関与することから<sup>2,3)</sup>、細胞増殖の制御に重要な役割りを果たすと考えられている<sup>4)</sup>。この交通路(コネクソン)は、コネクソン(CX)と呼ばれる蛋白質の 6 量体から構成されている。現在、ラットの CX として、CX26, CX32, CX43, CX46 などの cDNA がクローニングされており<sup>5)</sup>、CX ファミリーを形成している。

ラットの肝細胞には、26-29 kd の CX32<sup>6)</sup> と、21 kd の CX26 が同定されているが<sup>7)</sup>、前者が主要蛋白で、CX26 は蛋白量としてその 10%以下と報告されている<sup>7)</sup>。CX26 と CX32 が同じ GJ plaque 内(数 100~1,000 個の GJ の集合した領域)に共存することが確認されているが<sup>8)</sup>、これらが共通のコネクソンを形成しているかどうかについては、現在まだ明らかにされていない。ラット肝の GJ に関するこれまでの研究は、ほとんど CX32 についてであり、CX26 に関する報告は極めて少ない<sup>8)</sup>。CX26 と CX32 のアミノ酸配列には、64%という高い homology が認められるが<sup>9)</sup>、homology を有するのは主に膜貫通部分と細胞外ドメインで、細胞質ドメインのアミノ酸配列には差異が大きい。GJ 交通路の開閉は細胞質ドメインが担っていると考えられ<sup>10)</sup>、両者の開閉機構が異なっている可能性もある。最近 Xenopus の oocyte pair では、CX26 から形成される GJ が、CX32 から形成される GJ と異なる電気抵抗を示すことが報告されている<sup>11)</sup>。しかし現在のところ、*in vivo* の肝細胞で、CX32 と CX26 のそれぞれの機能を検討する方法は見出されていない。

そこで今回は、CX26 の細胞質ドメインの合成ペプチドを用いて CX26 に対する抗体を作製し、GJ が変化する各種の条件下での CX26 の消長を免疫組織化学的に検索し、当教室で既に作製した抗 CX32 抗体<sup>12)</sup>による免疫組織化学の結果と比較検討を行った。まず、ラット肝の発生過程に伴う CX32 と CX26 の変化について検討を行い、次に、部分肝切除後の再生過程、化学発

癌物質による肝の前癌病変から肝癌に至る肝病変について検討した。

## 2 実験方法

### 2.1 抗 GJ 抗体

抗 CX26 抗体は、以下の方法にて作製した。Zhang and Nicholson<sup>9)</sup>によって一次構造が決定されているラット CX26 の細胞質ドメインの、17 個のアミノ酸残基に相当するペプチドを合成した(東レリサーチに依頼)。Carrier として bovine thyroglobulin (Sigma T 1001) を結合させた合成ペプチド 200  $\mu$ g を、完全 Freund アジュバント (DIFCO Laboratories) とエマルジョン化し、New Zealand White rabbit の背部に皮下投与し、1 週間後に追加した。その 1 週間後に、合成ペプチド 200  $\mu$ g と不完全アジュバント (DIFCO) をエマルジョン化し、投与した。その後 2 週間毎に 3 回追加免疫し、抗 CX 26 ウサギ血清を得、Protein A カラム (Ampure<sup>TM</sup> PA Kit, Amersham) で IgG 分画に精製した。

抗体の特異性を Western blot 法で確認した。8 週齢の雄の ICR マウス(日本クレア) 50 匹の肝を用い、Tsukita and Tsukita<sup>13)</sup>の変法で肝細胞膜を分離した。摘出した肝を鉄で細切し、氷冷した 2  $\mu$ g/ml leupeptin 添加 1 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 7.5) (以下緩衝液)で 30 分間処理した。ホモジナイザーで破碎後ガーゼで濾過し、緩衝液を加え、1,500 $\times$ g・10 分間遠心した。沈渣に緩衝液とシヨ糖液を加え、48%シヨ糖液とし、これに 43%シヨ糖液を重ねて 100,000 $\times$ g・60 分間遠心し、界面から肝細胞膜分画を得た。それを Laemmli's buffer で溶解し、12.5% SDS polyacrylamide gel (第一化学)を用いて電気泳動した後、nitrocellulose 膜 (Bio-Rad) に転写した。非特異的の反応を防ぐため、phosphate buffered saline (PBS)で 3%に調整した fetal bovine albumin で 4 $^{\circ}$ C 12 時間反応させた後、100 倍に希釈した抗 CX26 抗体を、室温で 1 時間反応させた。二次抗体として、peroxidase 結合ブタ抗ウサギ抗体 (DAKO) を、室温で 1 時間反応させ、0.015% 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.05 M Tris HCl buffer (pH 7.6) で発色させた。

抗CX32抗体は、当教室で作製し、既に報告している抗CX32ポリクローナル抗体を用いた<sup>12)</sup>。また、愛媛大学医学部臨床検査医学講座竹田晃博士より供与を受けた抗CX32モノクローナル抗体(6-3G11)を、重染色に用いた<sup>14)</sup>。

## 2・2 正常ラット肝

8週齢の雄のF344ラット(日本チャールス・リバー)をエーテル麻酔下で開腹し、冷PBSで灌流脱血後に肝を摘出し、液体窒素で凍結後、 $-70^{\circ}\text{C}$ に保存した。

## 2・3 胎仔、および新生仔ラット肝

出産1~2日前の胎仔と、生後0~1日、6~7日、13~14日、20~21日目のF344ラットから肝を摘出した。屠殺1時間前にbromodeoxyuridine (BrdU) (Amersham)1 ml/100 g体重を腹腔内投与し、DNA合成期の肝細胞を標識した。ただし胎仔の場合は、母体の腹腔内に同量のBrdUの投与を行った。

## 2・4 ラット再生肝

8週齢の雄のF344ラットに、Higgins and Andersonの方法<sup>15)</sup>に準じた2/3の部分肝切除(PH)を行った。コントロールとしてsham operationを施したラットを用いた。PHの6, 12, 16, 24, 36, 48, 72, 96, 168時間後に、各群3匹づつ、上記と同様の方法でBrdUを投与し、肝を摘出した。

## 2・5 実験肝癌の誘導

Solt and Farberの方法<sup>16)</sup>により、肝癌を誘導した。8週齢のF344ラットに、diethylnitrosamine (DEN) 200 mg/kg体重を腹腔内投与し、その2週間後から、0.02%2-acetylaminofluorene (AAF)を含む飼料(オリエンタル酵母工業)を自由摂取させ、AAF食開始1週間後に、2/3のPHを行った。その後1週間目から正常飼料を与え、DEN投与から5週間目、5ヶ月目、12ヶ月目の時点の肝を摘出した。肝組織から3枚の連続凍結切片を作製し、うち2枚はCX32とCX26の免疫組織化学を行ったあと、肝前癌病変のマーカーであるglutathione S-transferase placental form (GST-P)<sup>17)</sup>を、弘前大学医学部生化学第二講座、佐藤清美教授より供与されたウサギ抗GST-P抗体を用いて検索した。残りの1枚はhematoxylin & eosin染色(H & E)を行い、組織学的検索に供した。Hyperplastic fociは周囲組織への圧排像を示さないGST-P陽性の肝細胞集団、hyperplastic nodulesは周囲への圧排像を示す肝細胞集団と定義した。

## 2・6 間接蛍光抗体法

### 2・6・1 CXの免疫組織化学と結果の定量化

3~4  $\mu\text{m}$ の肝凍結切片を、 $-20^{\circ}\text{C}$ のアセトンで20分

間固定し、100倍希釈の抗CX32抗体または200倍希釈の抗CX26抗体を、室温で2時間反応させた。PBSで洗浄後、50倍に希釈したFITC標識ブタ抗ウサギ抗体(DAKO)を室温で1時間反応させ、蛍光顕微鏡(Microphoto EPI-FL, Nikon)で観察、写真撮影した。それぞれの切片について、200倍で門脈と中心静脈を含む5視野を撮影し、陽性スポットの数を、画像解析装置LA-555 PIAS (PIAS)で測定して、平方mmあたりのGJ数を算出した。

### 2・6・2 二重免疫組織化学

#### 2・6・2・1 CX32とCX26の重染色

同一肝細胞におけるCX32とCX26の関係を明らかにするために抗CX32モノクローナル抗体(6-3G11)と抗CX26抗体を混合し、室温で2時間反応させた。PBSで洗浄後、50倍希釈のFITC標識ブタ抗ウサギ抗体(DAKO)、TRITC標識ウサギ抗マウス抗体(DAKO)の順に反応させた。

#### 2・6・2・2 CXとBrdUの重染色

増殖している肝細胞におけるCXの発現を解析するため、各抗CX抗体と抗BrdUモノクローナル抗体(DAKO)の二重染色を行った。ただしこれらの切片は、BrdU抗体と反応させるため、2N HClで30分間前処置したあとに免疫反応を行った。また、CXとBrdUを同時に観察可能にするため、TRITC標識ウサギ抗マウス抗体、FITC標識ブタ抗ウサギ抗体の順に反応させた。

#### 2・6・2・3 CXとGST-Pの重染色

前癌細胞におけるCXの発現を解析するために、CXとGST-Pを同時に染色した。各抗CX抗体をFITC標識ブタ抗ウサギ抗体で標識後、抗GST-P抗体をTRITC標識ブタ抗ウサギ抗体で標識した。

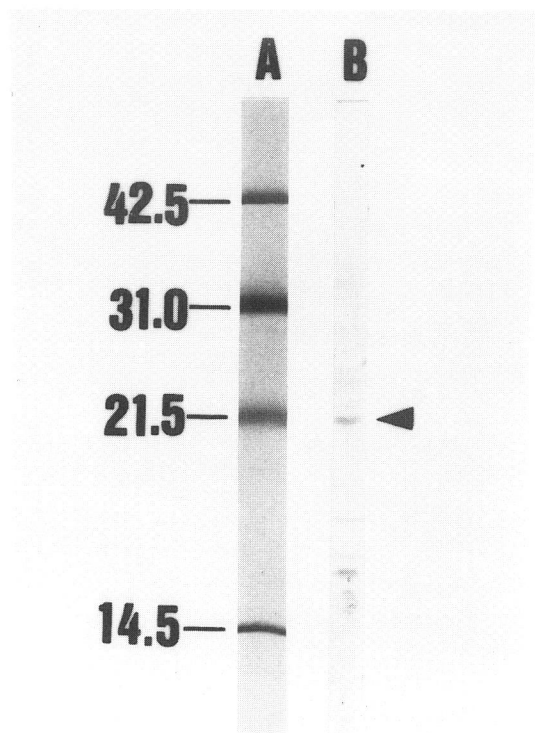
## 2・7 BrdUで標識された肝細胞の測定

CXの数を測定するのと同じ視野で、BrdU陽性細胞数をLA-555 PIASで測定し、平方mmあたりに換算した。

## 3 結 果

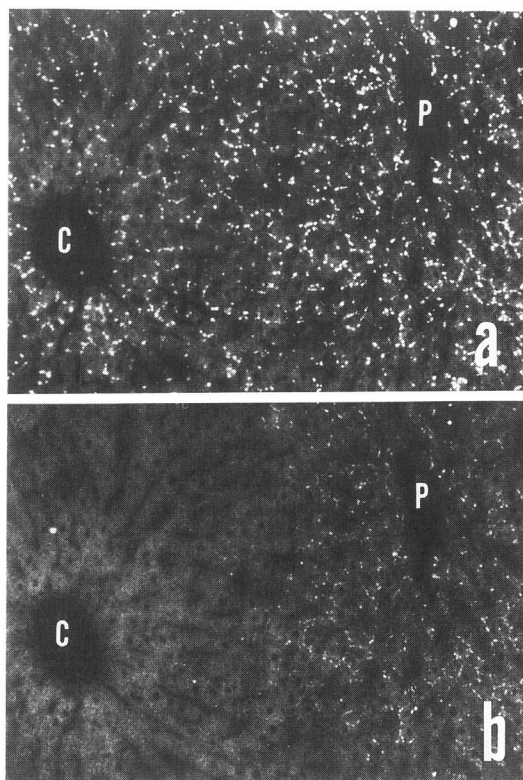
### 3・1 抗CX26抗体の特異性

今回、CX26の細胞質ドメインの合成ペプチドを用いて作製した抗体は、マウス肝細胞膜分画を用いたWestern blotの結果、報告されているCX26の分子量<sup>7)</sup>に一致する21KD付近に、主要なbandが認められた(Fig. 1)。CX32に相当する26KD付近にはbandが認められないことから、この抗体がCX32とは交差反応しないことが確かめられた。21KD以下にも数本のうすいband



**Fig. 1** Western blot analysis of hepatocyte membrane fraction with anti-CX26 antibody. Lane A: Molecular markers stained with Coomassie Blue. Lane B: Hepatocyte membrane fraction treated with anti-CX26 antibody. The arrowhead at 21 kD indicates the main band, which corresponds to the reported molecular weight of CX26.

が認められたが、一部のものはCX26蛋白の分解産物と考えられた。抗CX32モノクローナル抗体(6-3G11)と抗CX26抗体を用いて正常ラット肝の二重染色を行うと、CX32、26とも、肝細胞の細胞膜に点状に認められたが、類洞面には存在しなかった。対照として2次抗体だけを用いた場合は、陽性蛍光は認められなかった。CX32は、小葉を構成するすべての肝細胞に様に陽性スポットが認められたのに対して、CX26は、主として門脈周囲の肝細胞に存在し、中心静脈に向かって減少し、中心静脈周囲の肝細胞にはほとんど存在しないという領域依存性が認められた(Fig. 2)。このようなCX26の小葉内分布は、これまでの報告と一致し<sup>8)</sup>、我々の作製した抗CX26抗体の特異性が支持された。また小葉周辺部の肝細胞では、CX32とCX26が同一の肝細胞の、同じ位置に認められたことから、これらのCXが、同じGJ plaqueに局在することが示唆された。

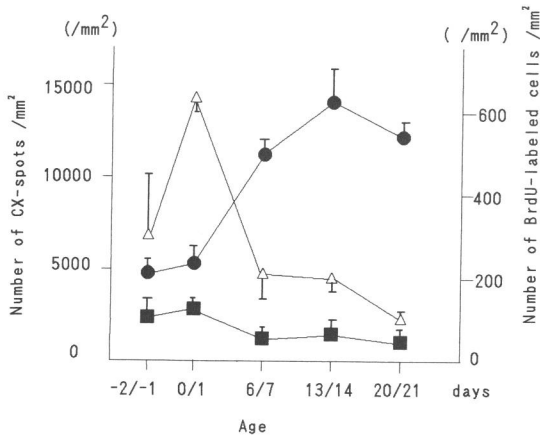


**Fig. 2** Indirect immunofluorescent localization of CX32 (a) and CX26 (b) in normal rat liver. P: portal vein. C: central vein. X180.

正常成熟ラット肝のCX32とCX26の陽性スポット数を測定すると、CX32は $14396.9 \pm 1678.3/\text{mm}^2$  (mean  $\pm$  standard deviation), CX26は $4430.9 \pm 745.9/\text{mm}^2$ であった。

### 3・2 胎仔、および新生仔肝

出生1~2日前から生後20~21日目までのラット肝について、BrdUで標識された増殖肝細胞の数と、CXの発現の関係を検討した(Fig. 3)。胎仔肝では、BrdUで標識される肝細胞が、生後0~1日目の肝よりも低く、標準偏差が大きかった。これはBrdUが母体に投与されたためと考えられた。胎仔肝のCXは、32、26とも成熟ラット肝に比べると少なかったが、CX32はCX26より多かった。胎仔肝のCX26は、成熟ラット肝にみられた門脈中心の領域依存性を示さず、CX26は小葉全体にまばらに、散在性に認められた。BrdUの標識は生後0~1日目から減少し、それと逆にCX32は増加し、生後3~14日目ではほぼ成熟のラットと同等になった(Fig. 4 Ia and IIa)。一方CX26は、BrdUの標識の減少に伴う増加を示さず、その局在が、散在性から門脈領域

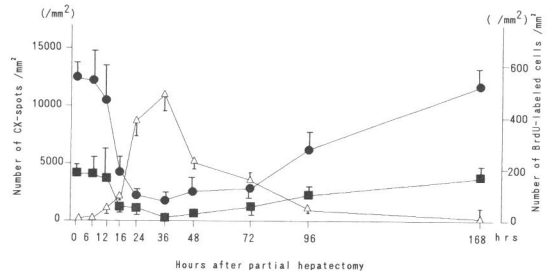


**Fig. 3** Changes in the number of CX32-positive spots (●), CX26-positive spots(■) and BrdU-labeled hepatocytes(△) during the perinatal period of rat liver. Vertical bars show S. D.

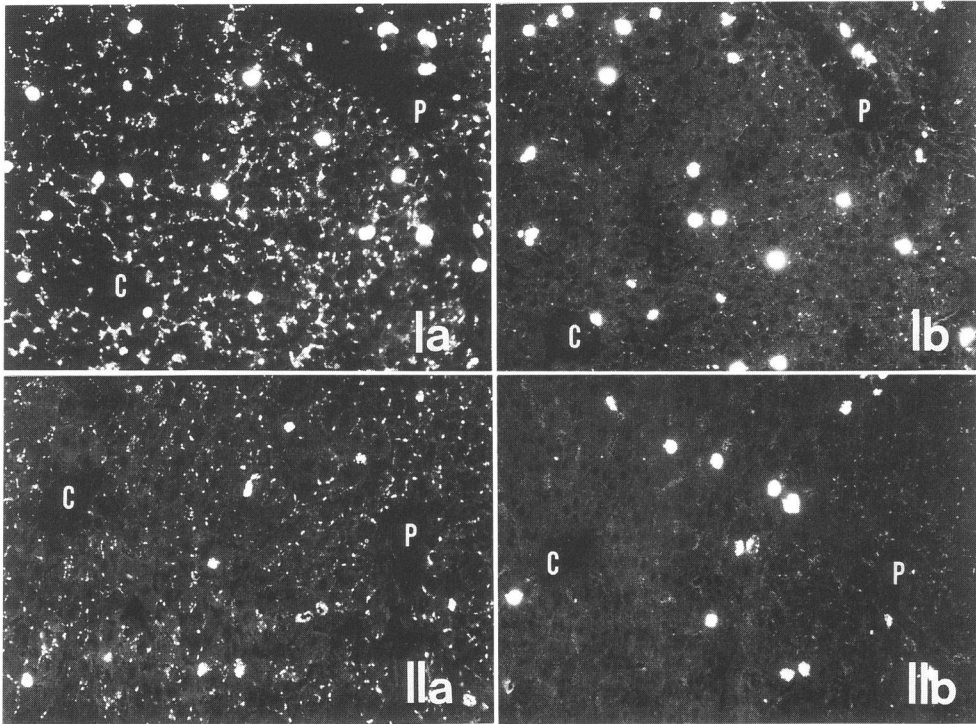
へと、生後20~21日目に変化した (Fig. 4 Ib and IIb).

**3・3 再生肝**

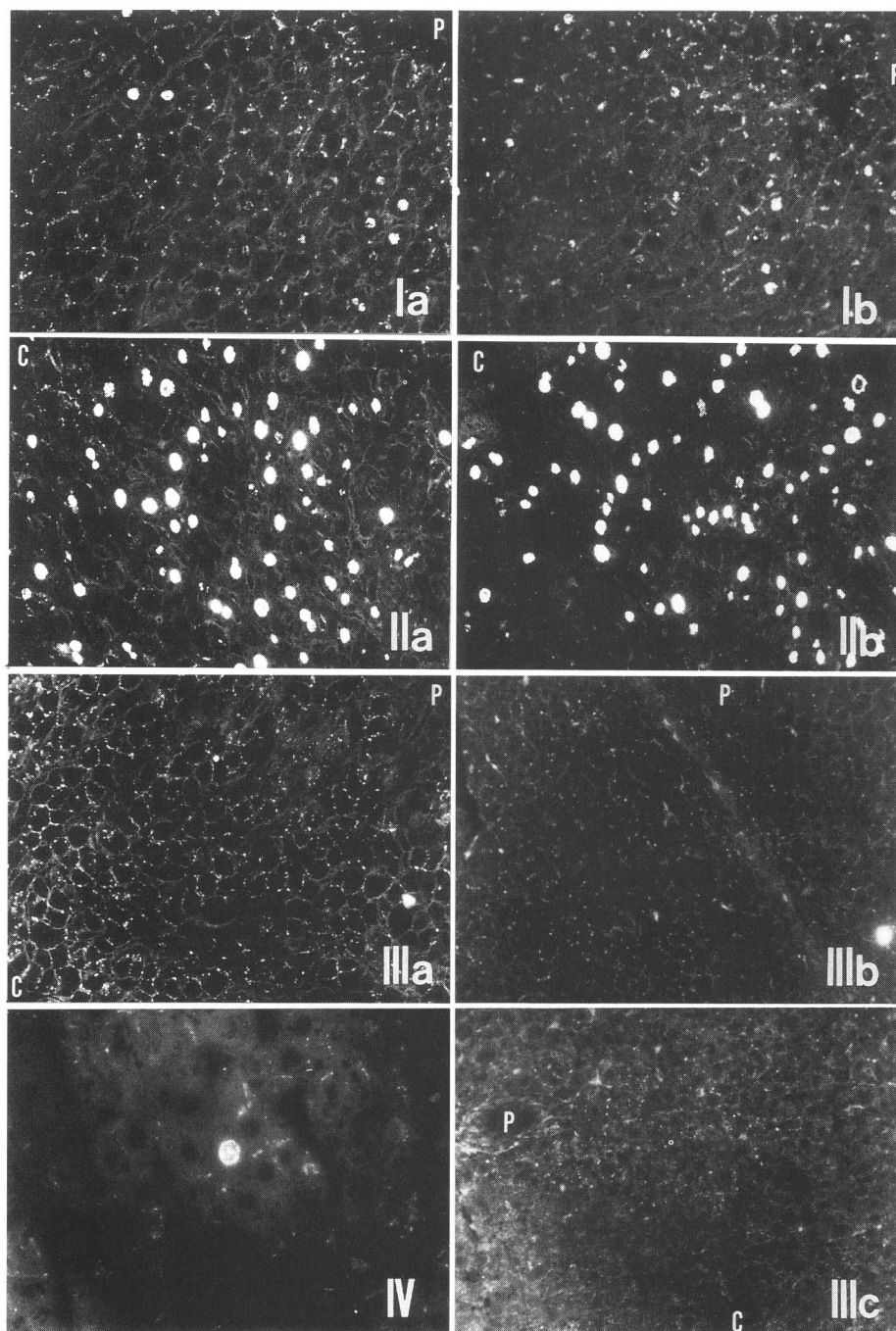
PH後の再生過程では、CX32とCX26はほぼ同様の変化を示した(Fig. 5)。両者とも術後16時間目から急激に減少し、36時間で最低になり、その後徐々に増加し、7日目まで正常肝とほぼ同等に回復した。ただし、術後36時間目では、CX26はほぼ完全に消失した (Fig. 6 IIb)のに対し、CX32は小葉の大半で減少したが、中



**Fig. 5** Changes in the number of CX32-positive spots (●), CX26-positive spots(■) and BrdU-labeled hepatocytes(△) in regenerating livers after PH. The vertical bars show S. D.



**Fig. 4** Double immunofluorescent microphotographs of neonatal rat livers with anti-CX32 or anti-CX26, and anti-BrdU antibodies in serial sections. CX32-positive spots and BrdU-labeled hepatocytes in 13/14-day-old rat liver(Ia) and 20/21-day-old rat liver(IIa) are shown. CX26-positive spots and BrdU-labeled hepatocytes in 13/14-day-old rat liver(Ib) and 20/21-day-old rat liver(IIb) are shown. P: portal vein. C: central vein. X180.



**Fig. 6** Double immunofluorescent microphotographs of regenerating rat livers after PH with anti-CX32 or anti-CX26 and anti-BrdU antibodies in serial sections. CX32-positive spots and BrdU-labeled hepatocytes in regenerating rat livers 16hrs(Ia), 36hrs(IIa) and 96hrs(IIIa) after PH are shown. CX26-positive spots and BrdU-labeled hepatocytes in regenerating rat livers 16hrs(Ib), 36hrs(IIb) and 96hrs(IIIb and IIIc) after PH are shown. X180. IV: CX32-positive spots and BrdU-labeled hepatocytes in regenerating rat liver 24 hrs after PH. X360. P: portal vein. C: central vein.



IIa). 回復時には, CX32 と CX26 は共に小葉内に散在性に出現し, 徐々に増加した (Fig. 6 IIIa and IIIb). CX26 の領域依存性は, 術後 96 時間目頃から明瞭になった (Fig. 6 IIIc). なお, Sham operation を行ったラット肝の CX には変化は認められなかった.

BrdU の標識は CX の数と逆相関を示した. PH 後 16 時間目頃から, 門脈周囲の肝細胞が BrdU 陽性になり (Fig. 6 Ia and Ib), 標識が最高となる 36 時間目では, ほぼ小葉全体の肝細胞が陽性になった (Fig. 6 IIa and IIb). 個々の肝細胞についてみると, BrdU で標識された肝細胞に CX32 や CX26 を認めることは稀であった (Fig. 6 IV) が, BrdU に標識されない肝細胞でも, CX の数の減少が認められた.

### 3・4 実験肝癌

Solt and Farber 法によって肝癌を誘導し, 前癌病変, 肝癌における CX の変化を検索した (Fig. 7). ラット肝における CX 数の正常範囲は, 有意水準 5% の棄却限界法で決定した. CX32 の正常範囲は, 平均値の 77.2% (11,107.5/mm<sup>2</sup>) 以上, 122.8% (17,686.3/mm<sup>2</sup>) 以下であり, CX26 の正常範囲は, 67.0% (2,968.9/mm<sup>2</sup>) 以上, 133.0% (5,892.9/mm<sup>2</sup>) 以下

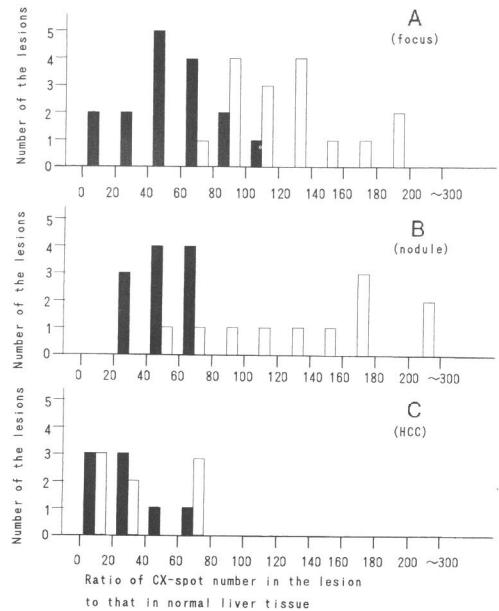


Fig. 7 Distribution rate of CX-positive spots in each hyperplastic focus (A), nodule (B) and hepatocellular carcinoma (C). Closed column, CX32; open column, CX26.

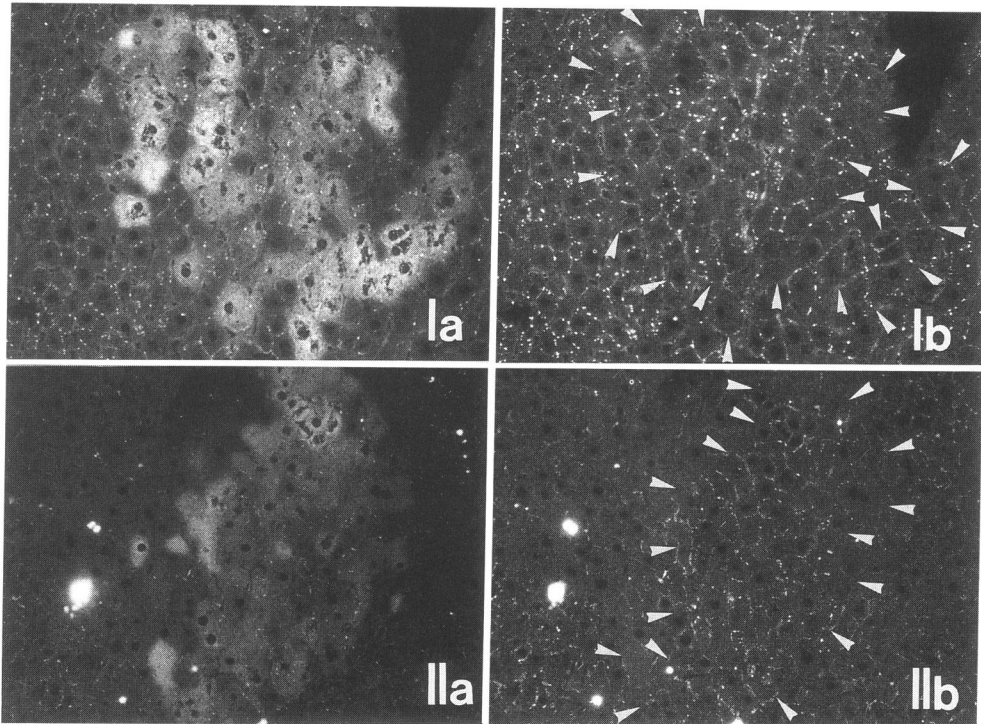
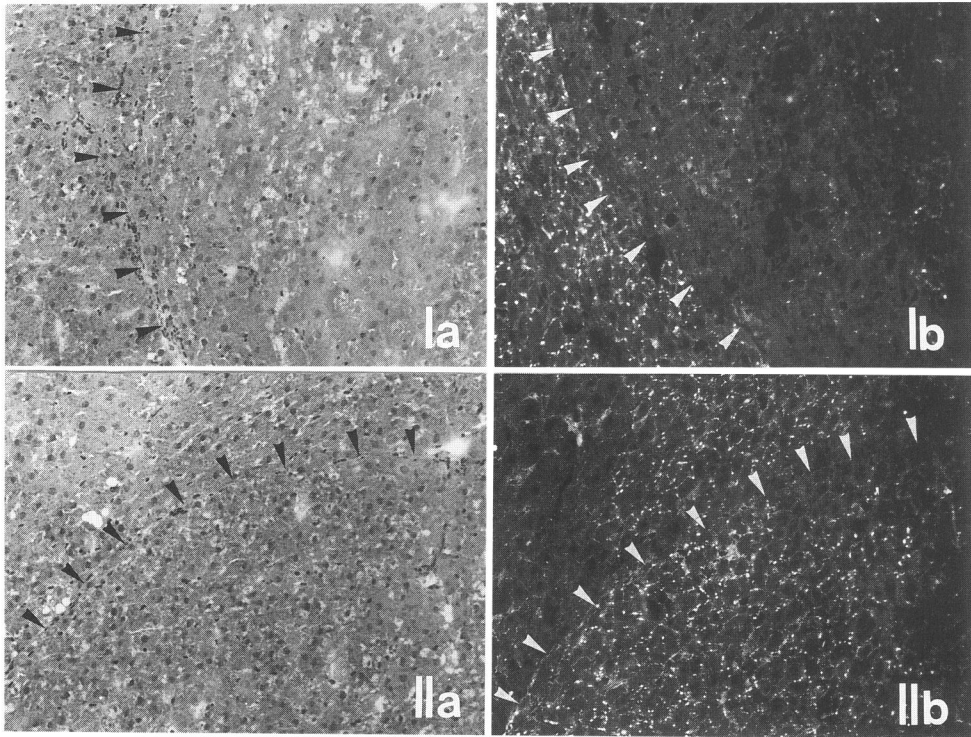


Fig. 8 Double immunofluorescent microphotographs of preneoplastic foci with anti-CX32 (Ib) or anti-CX26 (IIb) and anti-GST-P antibodies (Ia and IIa). GST-P positive areas are surrounded by arrowheads. CX32-positive spots decreased in the lesion (Ib) and CX26-positive spots significantly increased in the lesion (IIb). X180.



**Fig. 9** Immunofluorescent microphotographs of hyperplastic nodules with anti-CX32 antibody(Ib) and anti-CX26 antibody. Corresponding H & E stained sections are shown in Ia and IIa. Arrowheads indicate the area of nodules. CX32-positive spots markedly decreased in the lesion(Ib) and CX26-positive spots increased in the lesion(IIb). X180.

であった。

DEN 投与後 5 週目の肝について、GST-P 陽性の hyperplastic foci を調べると、16 個の foci 中 13 個 (81.3%) で CX32 が減少していた (Fig. 8 Ib)。一方 CX26 は、16 個中 1 個 (6.1%) で減少しているだけであり、逆に CX26 の増加したものが 16 個中 7 個 (43.8%) 認められた (Fig. 8 IIb)。DEN 投与後 5 ヶ月の nodules では、CX32 は 11 個すべてで減少していた (Fig. 9 Ib)。CX26 の減少をみたのは 11 個中 2 個 (18.2%) であり、7 個 (63.4%) ではむしろ増加していた (Fig. 9 IIb)。CX26 の減少をみた foci と nodules では、CX32 も減少していた。DEN 投与後 12 ヶ月目にみられた肝癌では、8 個のすべてにおいて、CX32、CX26 が共に減少していた (Fig. 10)。

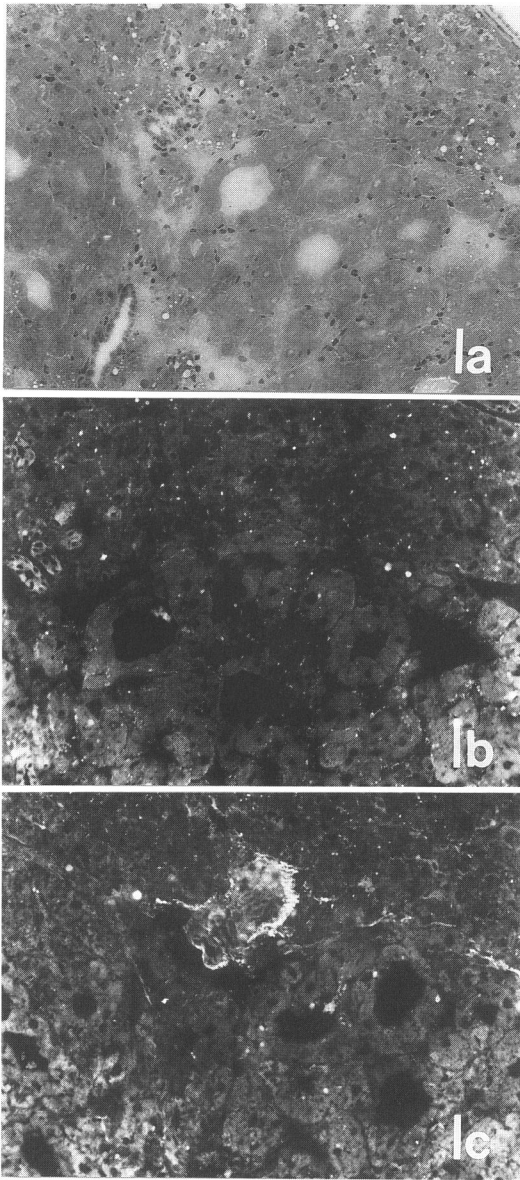
#### 4 考 察

今回 CX26 の細胞質ドメインの合成ペプチドを抗原として作製した抗体は、Western blot 法と免疫組織化学の結果から、肝の GJ を構成する CX26 と特異的に反応することが確かめられた。すなわち、前者では CX26

に一致する 21 KD にバンドが認められ、後者では正常ラット肝で小葉周辺部の肝細胞に局限した発現が認められた。そこでラット肝の発生、再生、発癌過程について免疫組織化学的な検索を行い、CX32 の発現と比較検討した。

8 週齢の正常ラット肝では、CX26 は門脈領域の肝細胞に局限して存在するため、肝小葉全体で平均すると、陽性スポットの数は CX32 の約 3 分の 1 であり、個々のスポットも小さく蛍光も弱かった。CX32 が CX26 より多数存在するという傾向は胎仔期から認められたが、CX32 が肝の成熟 (増殖期の肝細胞の減少) にしたがって増加するのは対照的に、CX26 は胎仔肝ではびまん性に散在しており、生後も数の増加がほとんど認められず、門脈領域への局在が次第に明瞭になった。このような局在変化の意義は明かではないが、CX26 では門脈領域への局在が、ラット肝の成熟を表現していると考えられた。肝の成熟に伴う小葉内局在は、glucose 6-phosphatase, phosphoenolpyruvate carboxykinase などの糖新生に関わる酵素などにもみられ、生後 2 週間前後で門脈域に局在することが知られている<sup>18)</sup>。





**Fig. 10** Immunofluorescent microphotographs of hepatocellular carcinomas with anti-CX32 antibody (Ib) and anti-CX26 antibody (Ic) in serial sections. Corresponding H & E stained section is shown in Ia. X180.

一方、CX26の門脈域への局在は、部分肝切除後の再生肝において、一度ほぼ消失したCX26の再出現の過程でも認められた。新生仔肝と再生肝では、肝細胞の増殖態度に違いがあることが指摘されているが<sup>19)</sup>、肝が成熟に向かう段階でCX26の小葉局在が明瞭になることは、共通して認められた。

GJは、細胞間接着装置として働くだけでなく、隣接

細胞間の小分子・イオンの交通を可能にしている。このようなGJを介した細胞間コミュニケーションは、臓器や組織を構成する多くの細胞が、統一のとれた組織として機能するのに役立っていると考えられる。成熟個体では、肝細胞はほとんど休止期にある。肝臓の恒常状態を破壊することなく、ある肝細胞が増殖期に入るためには、一時的に周囲の細胞から隔離されることが必要と考えられる。これまでPH後の再生肝では、電気生理学的方法とdye-coupling法で確かめられる細胞間コミュニケーション能の低下<sup>20)</sup>や、電顕的に認められるGJ plaqueの数と大きさの減少<sup>21)</sup>、CX32蛋白の減少<sup>21)</sup>が報告されている。CX32mRNAの減少は術後早期からみられ、術後10時間目では正常の10%に減少するが、DNA合成が最高に達する術後20時間目には25%とやや回復すること<sup>22)</sup>が知られている。したがって、mRNAの減少は、DNA合成期に先立って起こり、GJ蛋白の合成が低下する結果、周囲の細胞とのコミュニケーションを失って隔離され、引き続き分裂期に入ることが示唆される。しかし肝細胞の細胞周期とGJの関係を、細胞個々のレベルで検索した報告は少なく、僅かにDermietzel *et al.*の部分肝切除後の肝細胞、増殖因子を加えた培養肝細胞での報告をみるだけである<sup>23)</sup>。彼らはCX32抗体と抗BrdU抗体を用いた重染色から、S期の肝細胞に特異的なCX32の消失が起こると報告している。確かにFig. 5のグラフでは、BrdU陽性細胞とCX32の数は逆相関を示し、この考えが正しいようにみえる。しかしCX32の減少は、Fig. 6 Iaに示すように、部分肝切除後12、16時間目で小葉を構成するすべての肝細胞に均等に起こり、さらにその中に出現するBrdU陽性細胞では完全に消失するという、2つの出来事の加算である。即ち増殖に向かう肝細胞では、G<sub>1</sub>期からすでにGJの数が減少し、隣接する肝細胞とのコミュニケーション能が低下しており、S期またはその直前(G<sub>1</sub>, S transition)に完全に周囲から隔離されるという可能性が示唆された。

2/3部分肝切除後の肝細胞は、epidermal growth factor (EGF) や hepatocyte growth factor (HGF) など、他の細胞や臓器で産生され、血流を介して肝に運ばれる増殖因子の影響を受けてG<sub>0</sub>期を脱し、小葉を構成するすべての肝細胞が1ないし2回分裂して、失われた肝を補うとされている。他の細胞系では、種々の増殖因子が細胞間コミュニケーションを減少させることが知られており<sup>24)</sup>、G<sub>1</sub>期におけるCX32の減少には、増殖因子の関与が考えられる。

再生肝におけるCX26は、DNA合成が最高になる術

再生肝におけるCX26は、DNA合成が最高になる術後36時間目でほぼ完全に消失し、回復時に門脈域への局在を示す点で、CX32と異なるが、その消長は、CX32と著明な差異を認めなかったことから、CX26の発現は、CX32と同じ様に調節されているものと考えられる。

増殖時に、休止期の細胞群からの隔離が起こるとすれば、このようなGJの減少は、癌化の過程でもみられる筈で、イニシエーションを受けた細胞が、プロモーションを受けてclonalに増殖する場合にも起こることが予想される。実験肝発癌のプロモーターであるphenobarbital (PB)を投与すると、GJの数と大きさが減少すること<sup>25)</sup>、CX32mRNA量が減少することが報告されている<sup>26)</sup>。また、化学発癌の過程では、前癌病変でもCX32mRNAの低下<sup>22,27)</sup>や、CX32の減少が報告されている<sup>28)</sup>。Dye-couplingによる検索では、前癌病変や癌組織での細胞間コミュニケーションの低下も確かめられている<sup>29)</sup>。このようにCX32の減少に関しては、プロモーションの段階から肝癌に至るまで、すでに多くの報告がある。しかし、CX26について検討した報告はみられない。今回の実験で、CX32は、これまでの報告のとおり、fociからnodulesになるに従って減少し、肝癌で最小を示すという結果が得られた。しかしCX26は、これと著しく異なった消長を示し、半数近くのfociではむしろ増加を示した。Nodulesでもこの傾向がみられ、63.4%のnodulesではCX26の増加が認められた。CX26は肝癌になって初めて、すべての病巣で減少を示した。以上の結果から、前癌病変では、CXの発現にheterogeneityがあることから、個々の病変の細胞間コミュニケーションにもheterogeneityがあることが考えられた。癌では、CX32とCX26の両者ともに減少することから、癌細胞における細胞間コミュニケーションは低下している可能性が示唆された。

現在まで、前癌病変や癌におけるGJ蛋白発現の変化の機構についてはほとんど分かっていない。前癌病変や癌では増殖期にある細胞の割合が多いことから<sup>30)</sup>、GJが減少する原因の一つと考えられる。しかし、CX32の減少がみられるにもかかわらず、CX26の増加を示す前癌病変が多いという今回の実験結果は、細胞増殖のみでは前癌細胞のGJの変化を説明し得ず、CX32と26の発現や分解が異なった機構で調節されている可能性が示唆された。

両者の調節の機序は不明であるが、CX32の減少は肝の前癌病変の良いマーカーとなり、CX26の減少は、前癌病変と肝癌を鑑別する指標になることが示唆された。このようなCX32とCX26の発現の解離が、われわれ

が用いたSolt and Farberモデルだけにみられるものかどうか、他の実験肝発癌モデルでの検討を進めている。

今回の研究から、これまでほとんど検討されていない肝のCX26について、幾つかの新しい知見が得られた。CX32とCX26は、同一の肝細胞のGJ plaqueに共存するものと考えられ、多くの場合に類似した消長を示すことから、相互に共同して細胞間コミュニケーションを調節している可能性が示唆され、CX32とCX26の相互関係からGJの生物学的な機能が研究される必要性が示された。一方、前癌病変のあるものでは、CX32とCX26が相反する消長を示したことから、発癌過程におけるGJの変化の意義の再検討が必要と考えられた。

## 5 要 約

1. CX26蛋白の肝細胞における変化を検討するため、ラットCX26の細胞質ドメインに相当するペプチドを合成し、抗CX26抗体を作製した。
2. CX26抗体と、既に作製した抗CX32抗体を用いて、ラット肝の発生・再生・癌化過程におけるCX32と26の発現について組織化学的な比較検討を行い、次のような結果を得た。
3. 肝の発生過程でみると、CX32は小葉内に一様な分布を示し、成熟に伴って次第にその数を増すのに対し、CX26は胎仔期はびまん性に存在し、肝の成熟に伴って門脈域への局在を示した。
4. 部分肝切除後の再生過程では、CX32、CX26ともDNA合成に先立って減少し、S期に消失するという2段階の変化を示した。
5. 癌化過程でみると、CX32は前癌病変で常に減少するのに対して、前癌病変の中にはCX26が増加するものがみられ、CX32とCX26は異なった消長を示した。

## 謝 辞

本研究の機会を与えて頂きました内科学第1講座、谷内昭教授兼学長、ならびに御指導、御校閲頂きました病理学第2講座 森道夫教授に深謝いたします。また、CX32抗体を提供して下さった愛媛大学医学部臨床検査医学講座、竹田晃博士、GST-P抗体を提供して下さった弘前大学医学部生化学第2講座、佐藤清美教授と、われわれが作製したCX26抗体の特異性のチェックのためにCX26抗体を提供して下さった九州大学医学部解剖学第2講座、柴田洋三郎教授に深謝いたし

ます。また御助言、御協力頂きました澤田典均講師をはじめ病理学第2講座の諸先生に感謝いたします。

本研究の一部は厚生省がん研究助成金 2-24 (榎本)、科学技術庁、科学技術振興調整費 (森) の援助を受けた。

## 文 献

- Furshpan EJ, Potter DD. Low-resistance junctions between cells in embryos and tissue culture. *Curr Top Dev Biol* 1968, 3: 95-127.
- Lawrence TS, Beers WH, Gilula NB. Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication. *Nature* 1978, 272: 501-506.
- Saez JC, Connor JA, Spray DC, Bennet MVL. Hepatic gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1, 4, 5-trisphosphate, and to calcium inos. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86: 2708-2712.
- Loewenstein WR. Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim Biophys Acta* 1979, 560: 1-65.
- Willecke K, Hennemann H, Dahl E, Jungbluth S, Heynkes R. The diversity of connexin genes encoding gap junctional proteins. *Eur J Cell Biol* 1991, 56: 1-7.
- Hertzberg EL, Gilula NB. Isolation and characterization of gap junctions from rat liver. *J Biol Chem* 1979, 254: 2138-2147.
- Nicholson BJ, Dermietzel R, Teplow D, Traub O, Willecke K, Revel JP. Two homologous protein components of hepatic gap junctions. *Nature* 1987, 329: 732-734.
- Traub O, Look J, Dermietzel R, Brummer F, Hulser D, Willecke K. Comparative characterization of the 21-kD and 26-kD gap junction proteins in murine liver and cultured hepatocytes. *J Cell Biol* 1989, 108: 1039-1051.
- Zhang JL, Nicholson BJ. Sequence and tissue distribution of a second protein of hepatic gap junctions, CXN26, as deduced from its cDNA. *J Cell Biol* 1989, 109: 3391-3401.
- Zampighi G, Unwin PNT. Two forms of isolated gap junctions. *J Mol Biol* 1979, 135: 451-464.
- Barrio LC, Suchyna T, Bargiello T, Xu LX, Roginski RS, Bennett MVL, Nicholson BJ. Gap junctions formed by connexins 26 and 32 alone and in combination are differently affected by applied voltage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88: 8410-8414.
- 中島康雄, 鐘 雲, 榎本克彦. 合成ペプチドによる抗コネクシン 32 抗体の作製とそれを用いた肝細胞 gap junction の研究. *札幌医誌* 1991, 60: 523-533.
- Tsukita S, Tsukita S. Isolation of cell-to cell adherens junctions from rat liver. *J Cell Biol* 1989, 108: 31-41.
- Takeda A, Kanoh M, Shimazu T, Takeuchi N. Monoclonal antibodies recognizing different epitopes of the 27-kDa gap junction protein from rat liver. *J Biochem* 1988, 104: 901-907.
- Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. *Arch Pathol* 1931, 12: 186-202.
- Solt D, Farber E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature* 1976, 263: 701-703.
- Satoh K, Kitahara A, Soma Y, Inaba Y, Hatayama I, Sato K. Purification, induction, and distribution of placental glutathione transferase: a new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983, 82: 3964-3968.
- Andersen B, Zierz S, Jungermann K. Perinatal development of the distributions of phosphoenol pyruvate carboxykinase and succinate dehydrogenase in rat liver parenchyma. *Eur J Cell Biol* 1983, 30: 126-131.
- 森 道夫. 肝再生における形態. 関東肝臓集談会運営委員会編. 肝再生(第1回関東肝臓集談会講演集). 東京, 1984, 49-62.
- Meyer DJ, Yancey B, Revel JP. Intercellular communication in normal and regenerating rat liver: a quantitative analysis. *J Cell Biol* 1981, 91: 505-523.
- Yancey SB, Easter D, Revel JP. Cytological changes in gap junctions during liver regeneration. *J Ultrastruct Res* 1979, 67: 229-242.
- Beer DG, Neveu MJ, Paul DL, Rapp UR, Pitot HC. Expression of the c-raf protooncogene,  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase, and gap junction protein in rat liver neoplasms. *Cancer Res* 1988, 48: 1610-1617.
- Dermietzel R, Yancey SB, Traub O, Willecke K, Revel JP. Major loss of the 28-kD protein of gap junction in proliferating hepatocytes. *J Cell Biol* 1987, 105: 1925-1934.
- Maldonado PE, Rose B, Loewenstein WR. Growth factors modulate junctional cell-to-cell communication. *J Membr Biol* 1988, 106: 203-

- 210.
25. Sugie S, Mori H, Takahashi M. Effect of in vivo exposure to the liver tumor promoters phenobarbital or DDT on the gap junctions of rat hepatocytes: a quantitative freeze-fracture analysis. *Carcinogenesis* 1987, 8: 45-51.
26. Mesnil M, Fitzgerald DJ, Yamasaki H. Phenobarbital specifically reduces gap junction protein mRNA level in rat liver. *Mol Carcinog* 1988, 1: 79-82.
27. Fitzgerald DJ, Mesnil M, Oyamada M, Tsuda H, Ito N, Yamasaki H. Changes in gap junction protein (Connexin 32) gene expression during rat liver carcinogenesis. *J Cell Biochem* 1989, 41: 97-102.
28. Janssen-Timmen U, Traub O, Dermietzel R, Rabes HM, Willecke K. Reduced number of gap junctions in rat hepatocarcinomas detected by monoclonal antibody. *Carcinogenesis* 1986, 7: 1475-1482.
29. Krutovskikh VA, Oyamada M, Yamasaki H. Sequential changes of gap junctional intercellular communications during multistage rat liver carcinogenesis: direct measurement of communication in vivo. *Carcinogenesis* 1991, 12: 1701-1706.
30. Rotstein J, Sarma DSR, Farber E. Sequential alterations in growth control and cell dynamics of rat hepatocytes in early precancerous steps in hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 1986, 46: 2377-2385.
- 

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学附属病院病理部 坂本裕史