

Fig. 4. HHM inhibits the transcriptional activation of hepatic nuclear factor (*HNF-4*). Luciferase assay. HepG2 cells were transiently cotransfected with 1.5 μ g pGL3-HNF-4 E-box, 75 ng of pRL-TK, together with indicated expression vector encoding *HHM*, Δ *HHM*(1-149), *Id2*, and control pcDNA-*FLAG*. The combination of transfected plasmids (in μ g) is shown in the lower portion. HHM efficiently suppressed HNF-4 promoter-induced luciferase gene activation. Neither Δ HHM(1-149) nor *Id2* suppressed luciferase gene activation

selectively expressed in the pancreas require E-box sites for proper expression [15,16]. The α and β cells express both HEB and E2A and heterodimerize to a class II protein BETA2/NeuroD [15]. Targeted deletion of BETA2/NeuroD in mice results in severe diabetes and death at 3–5 days of age, indicating that the BETA2/NeuroD gene is critical for the normal development of several specialized cell types arising from gut endoderm [16]. A number of the HNFs that harbor E-boxes are sequentially expressed during liver development and following activation of liver stem cells in adult liver (Fig. 4). The early hepatoblasts derived from the gut endoderm are bipotential progenitors capable of differentiating into both bile epithelial cells and hepatocytes. The hepatoblasts undergo distinct phases of differentiation as they progress along the hepatocytic lineage, and each transition is characterized by the appearance of regulatory transcription factors [25]. Similarly, during activation and differentiation of the stem cells in adult rat liver via the hepatocyte lineage, a set of transcription factors are sequentially expressed (Fig. 5) [26,27]. For example, at the early stage of stem cell activation both the small and large bile ducts start to express HNF-1 α and - β , HNF-3 α , and C/EBP- α and - β , but not HNF-4. At the later stages these transcription factors are also highly expressed in the proliferating oval cells, the early progenitors from the stem cell compartment. However, HNF-4 is first observed when the oval cells differentiate morphologically and functionally into hepatocytes and form basophilic foci [25,26]. The observation that HHM is transiently expressed during stem cell-driven

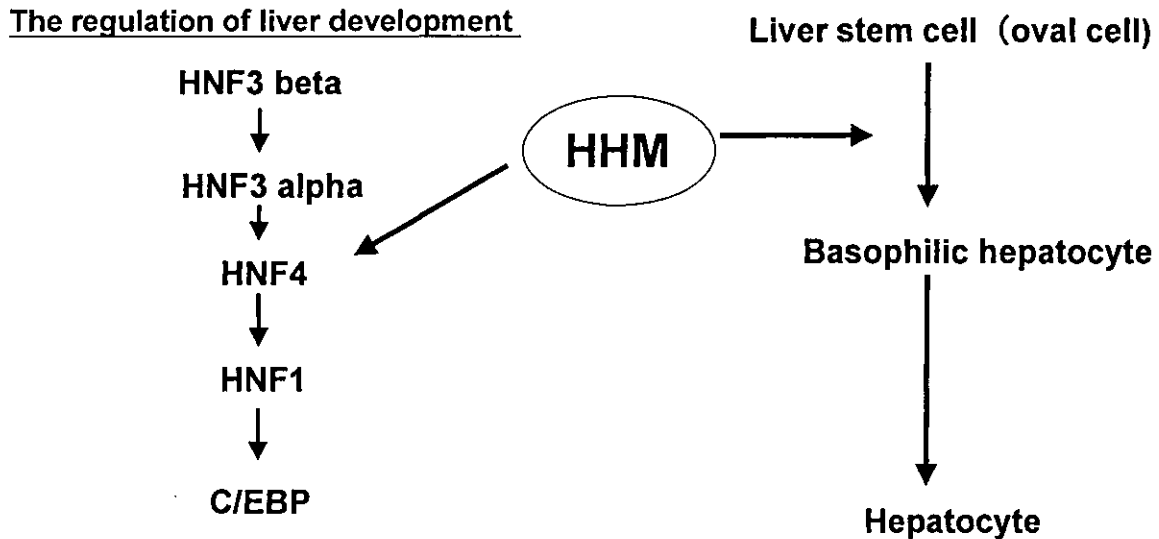
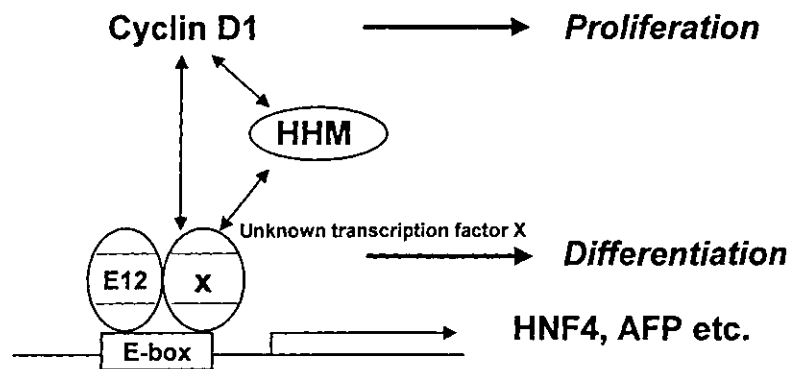


Fig. 5. Function of HHM. Schematic illustration of the function of HHM. HNFs and C/EBP regulate liver development. Especially, HHM might regulate HNF-4. HHM might have an important role at the time when liver stem cells (oval cells) differentiate into basophilic hepatocytes

regeneration of the liver at the stage at which the early basophilic foci of hepatocytes start to appear is of potential interest. HHM might control the regulation of this stage. We also analyzed how HHM regulates the luciferase gene activation induced by the HNF-4 promoter [24]. We used the HNF-4 promoter, which is sufficient to induce liver-specific gene expression in HepG2 cells [24]. Two E-boxes are present in this promoter region of HNF-4. Interestingly, HHM suppressed luciferase gene activation induced by HNF-4 promoter (see Fig. 4). However, Id2 and Δ HHM (1-149) could not suppress the luciferase gene activation induced by HNF-4. We cannot address the molecular mechanism showing why HHM but not Id2 only suppressed luciferase activity, but this result demonstrated that HHM is involved in the regulation of HNF-4. That the HHM transcripts are specifically located over the basophilic foci and that HHM regulates transcriptional activity of HNF-4 demonstrated the important role of HHM in liver development (see Fig. 5).

On the other hand, two other groups independently identified the same gene with HHM; they called the genes, *DIP1* and *GCIP* [28,29]. *DIP1* was identified by the yeast two-hybrid screen using cyclin D_1 as a bait protein. *GCIP* was also identified as an interacting protein with Grap2, which is a novel adaptor protein identified as a Gab-1 docking protein by the yeast two-hybrid screen. The precise function of this protein, HHM/*GCIP*/*DIP1*, has not yet been identified. As shown in Fig. 6, HHM might act as a transcriptional regulatory protein that might interact with cyclin D_1 or an unknown liver-specific bHLH transcription factor. Now, we are analyzing the *in vivo* function of HHM in the regulatory mechanism for proliferation and differentiation by analyzing interacting protein with HHM.

Cell Cycle Regulation**Growth Factor**

HGF, SCF, TGF-beta, EGF

Fig. 6. HHM regulates cell proliferation and differentiation by binding with various proteins. HHM might interact with cyclin D₁. The HHM–cyclin D₁ heterodimer might regulate cell proliferation. On the other hand, HHM might also interact with an unknown transcription factor X and regulate a liver-specific gene such as HNF-4 or alpha-fetoprotein. HHM could act as the regulator of differentiation. Several kinds of growth factors such as hepatocyte growth factor, stem cell factor, transforming growth factor-beta, and epidermal growth factor might modulate the function of HHM

References

1. Olson EN, Klein WH (1994) bHLH factors in muscle development: deadlines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes Dev* 8:1-8
2. Massari ME, Murre C (2000) Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* 20:429-440
3. Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, et al (1989) Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58:537-544
4. Henthom PS, Stewart CC, Kadesch T, Puck JM (1991) The gene encoding human TFE3, a transcription factor that binds the immunoglobulin heavy-chain enhancer, maps to Xp11.22. *Genomics* 11:374-378
5. Zhao GQ, Zhao Q, Zhou X, Mattei MG, de Crombrughe B (1993) TFEC, a basic helix-loop-helix protein, forms heterodimers with TFE3 and inhibits TFE3-dependent transcription activation. *Mol Cell Biol* 13:4505-4512
6. Ayer DE, Kretzner L, Eisenman RN (1993) Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* 72:211-222
7. Blackwood EM, Eisenman RN (1991) Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 251:1211-1217
8. Ellis HM, Spann DR, Posakony JW (1990) Extramacrochaetae, a negative regulator of sensory organ development in *Drosophila*, defines a new class of helix-loop-helix proteins. *Cell* 61:27-38
9. Norton JD, Deed RW, Craggs G, Sablitzky F (1998) Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation. *Trends Cell Biol* 8:58-65

10. Klambt C, Knust E, Tietze K, Campos-Ortega JA (1989) Closely related transcripts encoded by the neurogenic gene complex enhancer of split of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J* 8:203–210
11. Rushlow CA, Hogan A, Pinchin SM, Howe KM, Lardelli M, Ish-Horowicz D (1989) The *Drosophila* hairy protein acts in both segmentation and bristle patterning and shows homology to *N-myc*. *EMBO J* 8:3095–3103
12. Crews ST (1998) Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev* 12:607–620
13. Hwang SY, Oh B, Fuchtbauer A, Fuchtbauer EM, Johnson KR, Solter D, et al (1997) Maid: a maternally transcribed novel gene encoding a potential negative regulator of bHLH proteins in the mouse egg and zygote. *Dev Dyn* 209:217–226
14. German MS, Blonar MA, Nelson C, Moss LG, Rutter WJ (1991) Two related helix-loop-helix proteins participate in separate cell-specific complexes that bind the insulin enhancer. *Mol Endocrinol* 5:292–299
15. Shieh SY, Tsai MJ (1991) Cell-specific and ubiquitous factors are responsible for the enhancer activity of the rat insulin II gene. *J Biol Chem* 266:16708–16714
16. Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB, et al (1997) Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* 11:2323–2334
17. Sakai M, Morinaga T, Urano Y, Watanabe K, Wegmann TG, Tamaoki T (1985) The human alpha-fetoprotein gene. Sequence organization and the 5' flanking region. *J Biol Chem* 260:5055–5060
18. Nakabayashi H, Hashimoto T, Miyao Y, Tjong KK, Chan J, Tamaoki T (1991) A position-dependent silencer plays a major role in repressing alpha-feto-protein expression in human hepatoma. *Mol Cell Biol* 11:5885–5893
19. Bernier D, Thomassin H, Allard D, Guertin M, Hamel D, Blaquiére M, et al (1993) Functional analysis of developmentally regulated chromatin-hypersensitive domains carrying the alpha 1-fetoprotein gene promoter and the albumin/alpha 1-fetoprotein intergenic enhancer. *Mol Cell Biol* 13:1619–1633
20. Rastegar M, Szpirer C, Rousseau GG, Lemaigre FP (1998) Hepatocyte nuclear factor 6: organization and chromosomal assignment of the rat gene and characterization of its promoter. *Biochem J* 334:565–569
21. Taraviras S, Monaghan AP, Schutz G, Kelsey G (1994) Characterization of the mouse HNF-4 gene and its expression during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 48:67–79
22. Terai S, Aoki H, Ashida K, Thorgeirsson SS (2000) Human homologue of Maid: a dominant inhibitory helix-loop-helix protein associated with liver specific gene expression. *Hepatology* 32:357–366
23. Golding M, Sarraf CE, Lalani EN, Anilkumar TV, Edwards RJ, Nagy P, et al (1995) Oval cell differentiation into hepatocytes in the acetylaminofluorene-treated regenerating rat liver. *Hepatology* 22:1243–1253
24. Zhong W, Mirkovitch J, Darnell JE Jr (1994) Tissue-specific regulation of mouse hepatocyte nuclear factor 4 expression. *Mol Cell Biol* 14:7276–7284
25. Grisham JW, Thorgeirsson SS (1997) Liver stem cells. In: Potten CS (ed) *Stem cells*. Academic Press, London, pp 233–282
26. Zaret K (1998) Early liver differentiation: genetic potentiation and multilevel growth control. *Curr Opin Genet Dev* 8:526–531
27. Nagy P, Bisgaard HC, Thorgeirsson SS (1994) Expression of hepatic transcription factors during liver development and oval cell differentiation. *J Cell Biol* 126:223–233
28. Yao Y, Doki Y, Jiang W, Imoto M, Venkatraj VS, Warburton D, Santella RM, Lu B, Yan L, Sun XH, Su T, Luo J, Weinstein IB (2000) Cloning and characterization of DIP1, a novel protein that is related to the Id family of proteins. *Exp Cell Res* 257(1):22–32
29. Xia C, Bao Z, Tabassam F, Ma W, Qiu M, Hua S, Liu M (2000) GCIP, a novel human grap2 and cyclin D interacting protein, regulates E2F-mediated transcriptional activity. *J Biol Chem* 275(27):20942–20948

Annual Review 2003

消化器

編集 | 戸田剛太郎 東京慈恵会医科大学教授
税所 宏光 千葉大学教授
寺野 彰 獨協医科大学教授
幕内 雅敏 東京大学教授

中外医学社

6. 肝細胞癌の病態と診断

山口大学医学部消化器病態内科学 高見 太郎

同 消化器病態内科学 寺井 崇二

同 消化器病態内科学 山崎 隆弘

同 講師 坂井田 功

同 教授 沖田 極

key words hepatocellular carcinoma, carcinogenesis, comparative genomic hybridization (CGH), DNA-chip, transgenic mice model, choline deficient L-amino acid defined diet (CDA) rat model

動 向

第15回全国原発性肝癌追跡調査報告¹⁾によると、1998～1999年の2年間で原発性肝癌は18,843例の新規登録があり、そのうちの94.92%が肝細胞癌であった。肝細胞癌の成因は、16.8%がHBs抗原陽性、72.3%がHCV抗体陽性であり、肝炎ウイルスの持続感染と肝発癌には深い関係があることは周知の事実である。一方で、慢性肝炎に伴う持続肝障害、肝の線維化は肝発癌と密接な関係があることが明らかになっている^{2,3)}。本稿では、最近まで報告された知見を中心に、肝発癌のメカニズムを論じたい。

A. これまでに報告された遺伝子異常

まずは大きく染色体異常をみる方法である comparative genomic hybridization (CGH) 法を用いた変化について述べる。

LOH (loss of heterozygosity) はヘテロ接合性の消失といわれ、2倍体染色体の相同染色体において、一方が欠失や点変異によりホモ結合体となった状態である。そのためLOHがあると、残った相同染色体の遺伝子異常が容易に発現型として

現れることになり、肝細胞癌で認められるLOHは癌抑制遺伝子の欠失を反映していると考えられる。肝細胞癌の全染色体遺伝子異常の解析をCGH法により行った結果、肝硬変から早期肝細胞癌(直径2cm以下、高分化型肝細胞癌)の過程では、4q, 8p, 10q, 16q, 17pの欠失と1q, 8q24の増幅が認められ、これらは発癌早期に関与すると考えられた。さらに進行肝細胞癌に進展する過程で、13q13-14の欠失や11q13の増幅が相加されることが明らかになった⁴⁾。また1p, 4q, 5q, 6q, 8p, 9p, 10q, 11p, 13q, 16p, 16q, 17p, 20q, 22qにはLOHが認められたとの報告もある⁵⁻⁷⁾。このうち13qにはRb遺伝子が、17q領域にはp53遺伝子があり、これら癌抑制遺伝子の関与が示唆される。

一方、個々の遺伝子レベルの異常としては、CDH1, TP53, IGF2R (M6P), RB1, CDKN2A (p16^{INK4A}), PTEN, DLC1, TP73, EXT1, MLH1, THRB, THRA, E2F4, CTNNB1がそれぞれ独立した研究により報告されている⁸⁾。さらには近年、DNA-chipを用いた肝細胞癌の遺伝子プロファイリングにより遺伝子レベルの異常を網羅的に捉える研究が行われている。金沢大学の

Shirota, KanekoらによるDNA-chipを用いた肝細胞癌の遺伝子異常の解析では, cytoplasmic dynein light chain (hdcl1), hepatoma-derived growth factor, ribosomal protein L6, human glutathione S-transferase, ras homolog gene family; member B (rhoB), c-myc transcription factor (puf)などの発現増強が, plasminogen, cytochrome P450, subfamily IIC, human intercrine- α (hIRH), GRO2 oncogeneなどの発現低下が認められた⁹⁾. さらに金沢大学のYamashitaらによるserial analysis of gene expression (SAGE)による解析では, IFN- γ やextracellular matrix proteinのglypican 3などの発現増加が報告されている¹⁰⁾.

しかし肝発癌に関与する決定的な遺伝子はいまだ明らかにはなっていないのが現状である.

B. 動物モデルによる肝発癌機構の解析

一方, 肝発癌機構の研究はトランスジェニックモデルや化学発癌モデルを通し行われてきた. ここではトランスジェニックモデルや化学発癌モデルからみた肝発癌機構について概説したい.

1. トランスジェニックマウスモデル

主なものには, HBs抗原, HBV X (HBX), α -1-anti-trypsin, urokinase-type plasminogen activator (uPA), SV40 Tag, c-Harvey-ras, Cyclin D1, transforming growth factor- α (TGF- α), hepatocyte growth factor (HGF), c-myc/TGF- α , Bcl-2/TGF- α , HCVコア蛋白などを遺伝子導入した動物モデルがある.

a) c-myc/TGF- α トランスジェニックマウスモデル

ヒト肝細胞癌症例において, c-mycおよびTGF- α 両者の発現亢進が報告されており, c-mycおよびTGF- α 両者を遺伝子導入したマウスでは,

c-myc単独に比べ肝細胞癌の発生率が高い^{11,12)}. c-mycにより誘導されるアポトーシスはTGF- α により抑制され細胞増殖は亢進し, DNA障害の蓄積やTGF- β の誘導により肝細胞癌の発生が認められる.

b) HBXトランスジェニックマウスモデル

HBVにより各種蛋白が産生されるが, なかでもHBX蛋白と肝発癌との関与が注目されている¹³⁻¹⁵⁾. このX蛋白はp53遺伝子と結合しこれを不活化する, あるいはHBX蛋白そのものがトランス活性化作用¹⁶⁾により転写活性化機能を有する. 標的となるエレメントには, HIV-long terminal repeat (LTR)のNF(κ)B様配列¹⁷⁾, SV40エンハンサーのAP-1, AP-2配列¹⁶⁾などが報告されている. さらにはカスパーゼ3活性を抑制しアポトーシスを抑えるなど¹⁸⁾, HBV感染が直接肝発癌に関与する可能性が示唆される.

c) HCVコア遺伝子導入トランスジェニックマウスモデル

HCVコア蛋白質は転写調節能をもち, insulin-like growth factor-2 (IGF-2)やc-mycのプロモーターを活性化し, p53やp21のプロモーターを抑制するなどの報告がある. さらにはNF(κ)BやAP-1を活性化することも報告されている¹⁹⁾. MoriyaらはHCVコア遺伝子導入トランスジェニックマウスにおいて, 肝炎という炎症なしに高頻度の肝発癌が認められることを報告した²⁰⁾. 一方でこのモデルではヒトC型慢性肝炎の組織学的特徴の一つである脂肪化 steatosisが認められ, 肝炎という炎症なしに活性酸素 reactive oxygen species (ROS)の産生が増加している. 現在この部分については活性酸素, ラジカル産生などに関する研究が進められている.

2. 化学発癌モデル

我々が長年解析してきたコリン欠乏アミノ酸置換食 choline deficient L-amino acid defined diet

(CDAA) モデルは, peri-ductal にラットの肝幹細胞と考えられている卵円型細胞 oval cell が出現し, これが増殖し前癌性病変をつくり, 肝細胞癌へと進展する, 肝壊死～再生～発癌過程を評価しうる動物実験モデルである. この実験モデルでは, 酸化ストレスすなわちラジカルによる DNA 障害の指標である 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) の増加が認められている²¹⁾. 同様にヒト慢性肝炎や肝硬変の肝組織中でも 8-OH-dG の増加が認められ²²⁾, 酸化ストレスの肝発癌への関与が示唆されるなど, このモデルの知見はヒト肝発癌メカニズムの解明において非常に有用と考えられる. さらに我々は, この実験系において肝線維化を抑制することで肝発癌過程を遅延させ得ることを明らかにした²³⁾.

むすび

以上, これまでの肝発癌研究について, ヒトの組織を用いた遺伝子解析, 各種モデルを用いた解析結果の代表的なものを紹介した. 一方で癌の起源は, 自己複製の制御を失った幹細胞すなわち癌幹細胞であるという概念が紹介され注目されている²⁴⁾. 幹細胞と癌幹細胞とでは, 細胞増殖にかかわるシグナル伝達経路自体は同じものと考えられており, この点で臓器の発生分化と発癌過程とは共通の制御機構が存在するのではないかと考えられている. したがって今後, 癌幹細胞の制御機構の解明には, 幹細胞の発生分化制御機構の解析が重要になってくるのではないかと考えられる. 我々の教室では, 肝幹細胞の発生分化および肝発癌に関与すると考えられるヒト新規 helix-loop-helix 型転写制御分子, human homologue of Maid (HHM) をクローニングし²⁵⁾, その機能解析を進めている. これまでの解析では卵円型細胞 oval cell から肝細胞への分化とともに HHM の発現は増加し, 肝臓特異的転写因子である HNF4 (hepatic nuclear factor4) のプロモーター活性を

抑制するなど, 肝幹細胞の発生分化制御分子として機能していると考えられた. また最近の知見では CDAA 食モデルの前癌性病変部および肝細胞癌部に HHM の発現を認めるなど肝発癌への関与が示唆されている.

これまでも肝細胞癌の遺伝子異常や, 肝発癌に関与する遺伝子群は数多く報告されているが, 肝発癌機構は未知な部分が多いのが現状である. 今回報告した以外にも DNA-chip を用いた解析により肝発癌に関与すると考えられる新規遺伝子がいくつか全国学会などで報告されており, 今後の研究が期待される. またポストゲノム時代といわれる今日, 今後は肝細胞癌のプロテオミクスや, 幹細胞からみたアプローチも期待できる.

文献

- 1) 日本肝癌研究会. 第15回全国原発性肝癌追跡調査報告 (1998～1999). 2002.
- 2) Ikeda K, et al. Disease progression and hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic viral hepatitis: a prospective observation of 2215 patients. *J Hepatol* 1998; 28: 930-8.
- 3) Yoshida H, et al. Interferon therapy prolonged life expectantly among chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology* 2002; 123: 483-91.
- 4) Kusano N, et al. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization in hepatocellular carcinomas: their relationship to clinicopathological features. *Hepatology* 1999; 29: 1858-62.
- 5) Sheu JC, et al. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Br J Cancer* 1999; 80: 468-76.
- 6) Piao Z, et al. Deletion mapping of chromosome 16q in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 1999; 80: 850-4.
- 7) Nagai H, et al. Comprehensive allelotyping of human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1997; 14: 2927-33.
- 8) Snorri S, Thorgeirsson & Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nature Genetics* 2002; 31: 339-46.
- 9) Shirota Y, et al. Identification of differentially

- expressed genes in hepatocellular carcinoma with cDNA microarrays. *Hepatology* 2001; 33: 832-40.
- 10) Yamashita T, et al. Serial analysis of gene expression in chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282: 647-54.
 - 11) Santoni-Rugiu E, et al. Evolution of neoplastic development in the liver of transgenic mice *c-myc* and transforming growth factor- α . *Am J Pathology* 1996; 149: 407-28.
 - 12) Santoni-Rugiu E, et al. Disruption of the pRb/E2F pathway and inhibition of apoptosis are major oncogenic events in liver constitutively expression *c-myc* and transforming growth factor α . *Cancer Res* 1998; 58: 123-34.
 - 13) Kim CM, et al. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 1991; 351: 317-20.
 - 14) Koike K, et al. High-level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology* 1994; 19: 810-9.
 - 15) Paterlini P, et al. Selective accumulation of the X transcript of hepatitis B virus in patients negative for hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1995; 21: 313-21.
 - 16) Twu JS, et al. Transcriptional transactivating function of hepatitis B virus. *J Virol* 1987; 61: 3353-448.
 - 17) Seto E, et al. Trans-activation of the human immunodeficiency virus long terminal repeat by hepatitis B virus X protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 85: 8286-90.
 - 18) Gottlob K, et al. The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase3 activity. *J Biol Chem* 1997; 273: 33347-53.
 - 19) Kato N, et al. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000; 32: 405-12.
 - 20) Moriya K, et al. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nature Med* 1998; 4: 1065-7.
 - 21) Nakae D, et al. Different role of 8-hydroxydeoxyguanosine formation and 2-thiobarbituric acid-reacting substance generation in the early phase of liver carcinogenesis induced by a choline deficient L-amino acid defined diet in rats. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85: 497-505.
 - 22) Shimada R, et al. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in human livers with chronic hepatitis. *Cancer Res* 1994; 54: 3171-2.
 - 23) Sakaida I, et al. Prevention of fibrosis reduces enzyme-altered lesions in the rat liver. *Carcinogenesis* 1994; 15: 2201-6.
 - 24) Tannishtha R, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-11.
 - 25) Terai S, et al. Human homologue of Maid: A dominant inhibitory helix-loop-helix protein associated with liver-specific gene expression. *Hepatology* 2000; 32: 357-66.



テーマ◇これからの肝発癌研究をどう考えるか

■セッション I : 遺伝子「DNA チップを用いた遺伝子発現パターン」-①

肝発癌に関与する転写制御分子 HHM

寺井 崇二¹⁾・坂井田 功²⁾・高見 太郎²⁾・内田 耕一¹⁾・白橋 齊²⁾

山本 直樹²⁾・大森 薫²⁾・川口浩太郎²⁾・宮本 康嗣¹⁾・沖田 極²⁾

山口大学医学部先端分子応用医科学講座 1) 生体防御機能学 2) 消化器病態内科学

Key words : 肝幹細胞, 肝発癌, HLH 型転写制御分子, HHM

はじめに

過去の化学発癌研究も含め、多くの肝発癌の研究が行われてきたが、いまだ肝発癌機構の解明はなされていない。われわれは肝発癌制御機構の理解には、肝幹細胞から肝細胞への分化過程の理解が必須であると考えている。肝幹細胞は、肝臓内の Hering 管および骨髄中に存在しており肝細胞、胆管細胞、膵臓細胞、小腸細胞に分化すると考えられている¹⁾(図 1)。われわれは、この肝幹細胞の転写制御機構を解明し、それを肝発癌機構の解読に応用したいと考え以下の研究を行った。

MyoD は 1987 年 Weintraub らによりク

ローニングされた分子で、筋肉細胞の発生分化において、一つのマスター遺伝子である MyoD の強制発現により細胞系譜が支配される²⁾。MyoD は bHLH (basic Helix-Loop-Helix) と呼ばれる核蛋白で、basic 領域にて CANNTG よりなる E-box と結合する。HLH 型転写因子は、七つのクラスに分類される。さまざまな組織に ubiquitous に発現する E 12 などのクラス I 型、組織特異的な発現をするマスター遺伝子と考えられる MyoD などの II 型、Myc ファミリーの III 型、Myc の制御蛋白の Mad などの IV 型、basic 領域を欠き dominant inhibitory 機能を発揮する V 型、Hairy などの VI 型、bHLH-PAS 型の VII 型に分けられる³⁾。筋肉においては

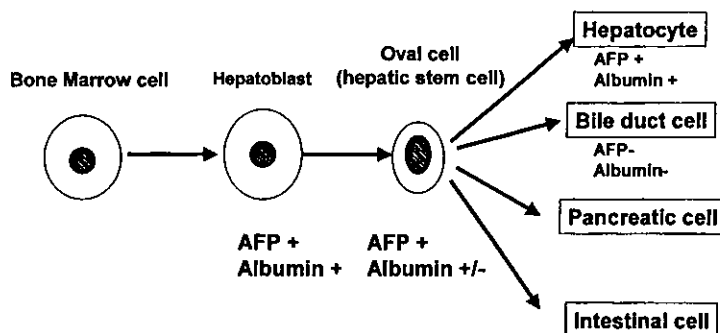


図 1 Lineage of hepatic stem cell

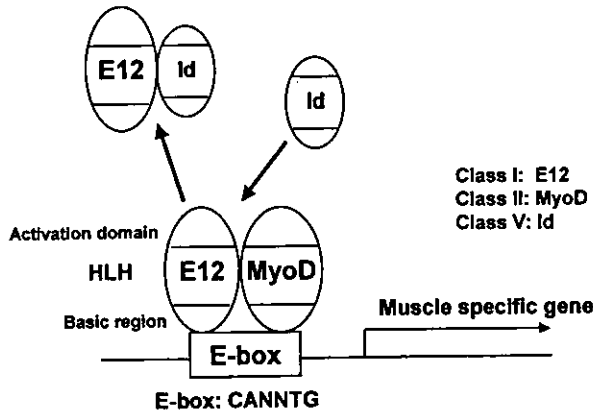


図2 The regulation of muscle cell differentiation by HLH transcription factor (E12/MyoD and Id)

ubiquitousな発現をするE12などのI型のHLH型転写因子と、組織特異的なII型のMyoDのHLH型転写因子とがhetero-dimerを形成し、筋肉特異的遺伝子群の上流に存在するCANNTGよりなるE-boxと呼ばれるcis-elementにて結合することにより、筋肉細胞の発生分化に関与する遺伝子群の発現制御を行う。一方、basic領域のないHLH型転写制御分子のId (Inhibitor of Differentiation) 群は現在までに4種類知られている。このId群は、basic領域を欠くためE-boxとは結合できず、HLH領域で、E12と結合することで、E12/MyoDのhetero-dimerの形成を阻害し、分化のinhibitorとして働く(図2)。肝臓において肝臓特

異的bHLH型転写因子は同定されていないが、肝臓特異的遺伝子のAlpha-fetoproteinや、その制御に関与するHepatic nuclear factor (HNF) 群のプロモーターやエンハンサーにE-boxが存在していることより、肝臓の発生・分化・増殖の制御機構に関与するMyoDと同様な肝臓のMaster geneの存在を推測し、その同定を目的とし以下の実験を行った³⁾⁴⁾。

I. 方法

1. Yeast Two Hybrid Screen

Yeast Two Hybrid Screen法にてI型のHLH型蛋白E12のHLH領域をbait蛋白とし、preyとしてヒト胎児肝cDNA library (クロンテック社)でスクリーニングした。

2. 5' Rapid Amplification of cDNA

クロンテック社のMarathone-ready human fetal liver cDNAを使い、5' Rapid Amplification of cDNA法を用い全長を決定、その後Blast searchにてホモロジーの検索を行った。

3. 遺伝子発現プロファイリング

ヒト組織における、HHMの発現をクロンテック社のMultiple Tissue Expression Arrayを用いて解析した。プローベとしては、HHMの150から360のアミノ酸残基に対応する部分をcDNAプローベとして使用した。

4. 実験モデル

1) 肝幹細胞から肝細胞への分化過程をみるモデル：ラット2アセチルアミノフルレン・部

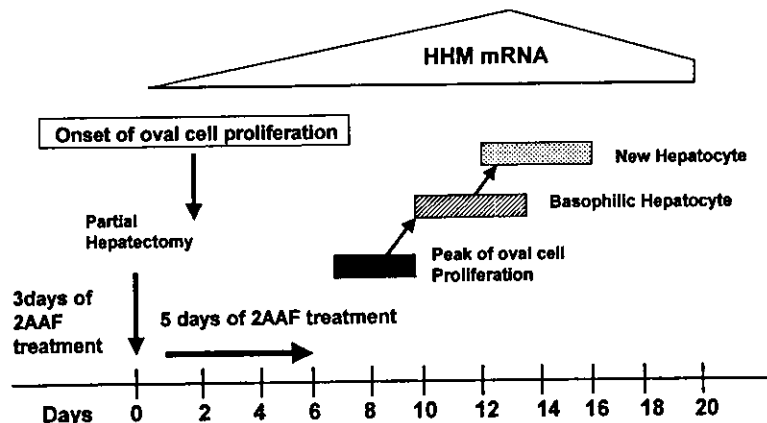


図3 HHM mRNA expression and AAF/PH model

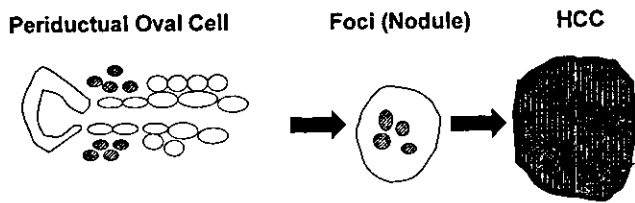
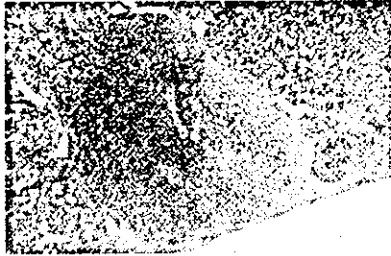


図 4 Choline Deficient Amino Acid (CDAA) Model



A : HHM mRNA expression at foci in CDAA rat model



B : HHM expression in human HCC

図 6

分肝切除 (AAF/PH) モデルを用いた (図 3)。

2) 肝再生モデル: ラット部分肝切除モデルを使用した。

3) 肝発癌モデル: ラットコリン欠乏アミノ酸置換食ラットを使用した (図 4)。

5. Luciferase Assay

pGL 3 - HNF 4 (-363 から +48 bp : Genbank accession number, S 74519) を, pcDNA-HHM-FLAG, pcDNA-ΔHHM (1-149)-FLAG, pcDNA-Id 2-FLAG, pcDNA-FLAG など, HepG 2 細胞に共発現させ, HNF 4 のプロモーターにより誘導される転写活性の変化 (ルシフェラーゼ活性) の変化について検討した。

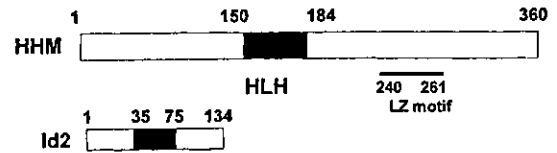


図 5 Human Homologue of Maid (HHM)

6. 細胞周期に対する影響の解析

HHM を発現するアデノウイルス (Ad-HHM) を作成し, HepG 2 細胞に感染させ, HHM の細胞周期に対する影響について, フローサイトメーター (FACS) にて解析した。

7. ヒト肝癌組織における HHM 蛋白の発現の検討

HHM の 347 番目から 360 番目のアミノ酸を認識する Anti-HHM ポリクローナル抗体を作成しヒト肝癌における HHM 蛋白の発現を検討した。

II. 結 果

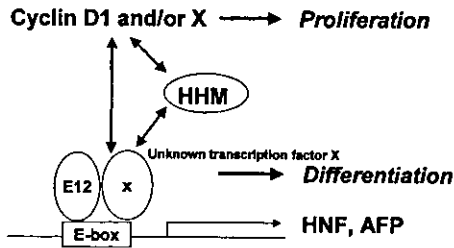
1. HHM の同定および発現

360 個のアミノ酸より構成される HLH 型蛋白で, leucine-zipper motif を持つ, 新規の遺伝子 human homologue of Maid (HHM) をクローニングした (図 5)。HHM は basic 領域を欠いており, 新規の dominant inhibitory HLH 型転写制御分子と考えられた。遺伝子プロファイリングの結果, HHM は胎児肝において成人肝に比べ発現量が高かった。

2. 部分肝切除および AAF/PH モデルにおける HHM の発現

肝幹細胞のラットの一つのモデル (卵円形の oval cell の発生から basophilic hepatocyte の foci を経て肝細胞への分化の観察モデル) のラット 2 アセチルアミノフルレン/部分肝切除 (2 AAF/PH) モデルにおいて basophilic hepatocyte の foci に特異的な HHM mRNA の高発現を *in situ* hybridization にて確認した。一方部分肝切除モデルにおいてはその発現は 24 時間から 36 時間に 1.6 から 1.8 倍の増加を認めた⁴⁾。ラット化学発癌モデルにおいても, foci 部に一致し HHM mRNA の発現を確認し

Cell Cycle Regulation



Growth Factor

HGF, SCF, TGF-beta, EGF

図7 Regulation of proliferation & differentiation by HHM

えた (図6-A)。

3. HHMによるHNF4のプロモーターにより誘導されるルシフェラーゼ活性の変化の検討

肝臓特異的転写因子HNF4は肝幹細胞より肝細胞への分化段階において発現増加をし、肝臓の分化促進因子として作用することが知られている。そのHNF4のプロモーターを解析したところ、肝臓特異的発現に関与する部分の(-363+48 bp)にE-boxを認めたため、肝臓におけるHHMの機能を解析するためpGL3-HNF4(-363+48)を作成し、ルシフェラーゼアッセイを行った。ルシフェラーゼ解析の結果、HHMは特異的にHNF4のプロモーターに対する阻害能を有することが明らかになった⁴⁾⁵⁾。

4. HHMの細胞周期における影響の検討

HHMの発現により細胞周期のS期をおよそ5%増加させた。

5. ヒト肝細胞癌におけるHHM蛋白の発現の検討

HHM抗体を用いて、ヒト肝細胞癌のHHM蛋白の発現を検討したところ、HHMの発現の増加を確認した(図6-B)。

結 論

新規 dominant inhibitory 型 HLH 転写制御分子HHMを同定した。HHMは、その機能においては不明な部分は多いが、さまざまな分子

* * *

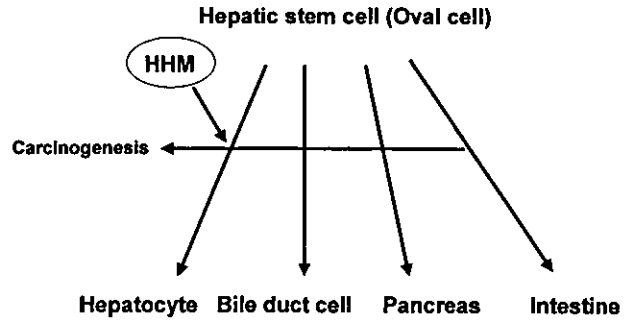


図8 HHM regulate liver carcinogenesis

と結合することにより、肝幹細胞の発生・分化・増殖および肝癌の発生を制御していると考えられた(図7)。肝再生時での発現上昇はあまり顕著でなく、むしろ肝幹細胞を誘導する肝細胞への分化モデルにおいて、foci部に一致し発現量が増加していた。また化学発癌モデルのコリン欠乏アミノ酸置換食ラットモデルでのfoci部および実際にヒト肝細胞癌症例に対する染色にて高率に陽性細胞の存在を確認しえた。これらの結果は、肝発癌過程におけるHHMの重要な意味を示す(図8)。今後さらにその制御機構について明らかにしていきたい。

文 献

- 1) Grisham JW, Thorgeisson SS: Liver stem cells, pp 233-282, Academic Press Inc, Manchester, 1997.
- 2) Davis RL, Weintraub H, Lassar AB: Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. Cell 51: 987-1000, 1987.
- 3) Massari ME, Murre C: Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. Mol Cell Biol 20: 429-440, 2000.
- 4) Terai S, Aoki H, Ashida K, Thorgeisson SS: Human homologue of Maid: A dominant inhibitory helix-loop-helix protein associated with liver-specific gene expression. Hepatology 32: 357-366, 2000.
- 5) Zong W, Mirkovitch J, Darnell JE Jr: Tissue-specific regulation of mouse hepatocyte nuclear factor 4 expression. Mol Cell Biol 14: 7276-7284, 1994.

シンポジウム

再生・増殖・分子の 分子生物学

(司会) 沖田 極 (山口大学第1内科)
小林健一 (金沢大学消化器内科)
佐田通夫 (久留米大学第2内科)
林 直諒 (東京女子医科大学消化器内科)
千葉 勉 (京都大学消化器内科)
日比紀文 (慶應義塾大学内科)

骨髓細胞を用いた肝臓再生療法の開発を目指して

山本 直樹* 寺井 崇二* 大森 薫*
高見 太郎* 坂井田 功* 沖田 極*

1 はじめに

過去のラットを用いた実験系において、肝臓内に存在する卵円形の細胞 (oval cell) が、肝幹細胞と考えられており、その肝幹細胞は肝臓細胞、胆管細胞、膵臓細胞、小腸細胞に分化することが S.Thorgeirsson, Grisham JW らの研究により示されている¹⁾。最近になり骨髓中にも肝幹細胞群が存在し、肝細胞の分化する可能性が報告されてきた^{2,3)}。最近では骨髓中に ES 細胞と同様な多分化能を持つ細胞が存在する可能性が示されている⁴⁾。

また、臨床面では、Korbing らが、実際の骨髓移植した患者で移植した骨髓細胞が肝臓や腸・皮膚などに遊走し、それぞれ分化する可能性があることを報告している⁵⁾。われわれは、骨髓細胞が肝臓再生療法に開発においてあらたな細胞供給源になると考え、特に自己骨髓細胞を用いた肝臓再生療法の臨床開発目的として、まず骨髓細胞から肝細胞への分化評価モデル開発を始めた^{6,7)}。

2 方法

C57BL6/ Tg14 (act-EGFP) OsbY01 より GFP 陽性骨髓細胞を取り出し、二つの同種同系マウス群の尾静脈から静注する。一つは、あらかじめ四塩化炭素を持続的に4週間腹腔内投与し、持続的肝障害を引き起こしているマウス群、もう一つは正常なマウス群とした(図1)。投与後から1週間ご

とに投与したマウスの肝臓を摘出し、切片を蛍光顕微鏡および免疫染色で、GFP 陽性細胞の肝臓内での存在の有無および増殖の検討をした。細胞を肝幹細胞マーカーである c-kit, CD34, 幹細胞から肝細胞に分化を制御している転写制御因子の Hepatic Nuclear factor 4 (HNF4), 肝細胞マーカーである Alb, AFP, 胆管細胞マーカーである CK-7, CK-19 などの抗体を使用し骨髓細胞の肝細胞への分化を免疫染色・蛍光二重染色などで検討・評価した。

3 結果

1. GFP

1週間後より GFP 陽性細胞は発現しており、段々と増加し、4週間後には全面積の25%を占めているほどになった。細胞は徐々に門脈周囲から肝小葉内に入り込み、増殖していくのがわかった(図2)。

2. CD34 & c-kit

免疫染色、蛍光染色の結果では、明らかに1週間後から発現し徐々に増加、GFP 陽性細胞と同様な結果・局在を示した。蛍光染色では、GFP と CD34, GFP と c-kit 共陽性細胞が増加していく様子がわかった。

3. Alb & AFP

肝細胞の指標となる Alb, AFP の蛍光染色、免疫染色でも明らかに1週間後より発現し徐々に細胞数が増加を呈していた。蛍光染色では、GFP と Alb, GFP と AFP 共陽性細胞が増加していく様子がわかった。

*山口大学医学部消化器内科学教室

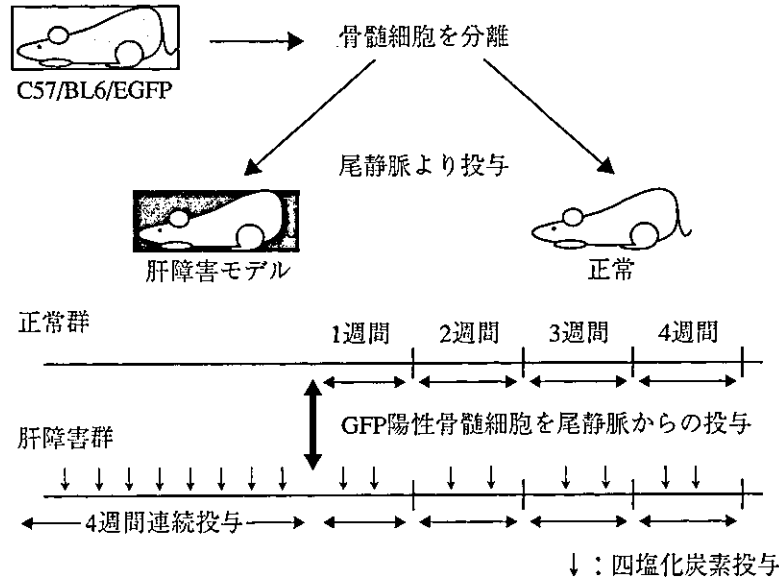


図1 プロトコール

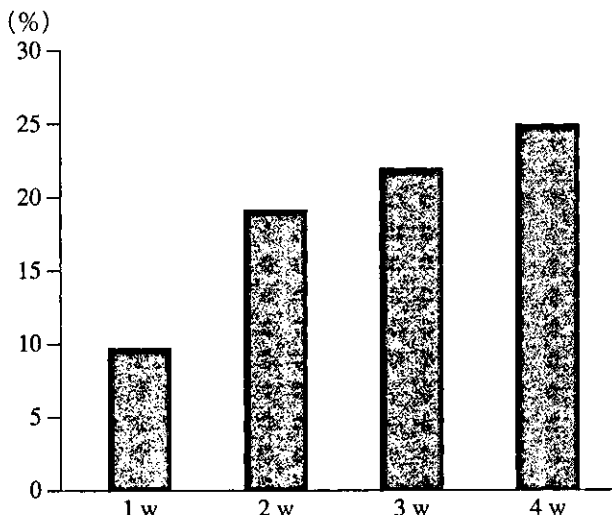


図2 GFP陽性細胞の肝臓内での比率

骨髄細胞投与後より、徐々にGFP陽性細胞が増加している。4週間後には、約25%まで増加している。

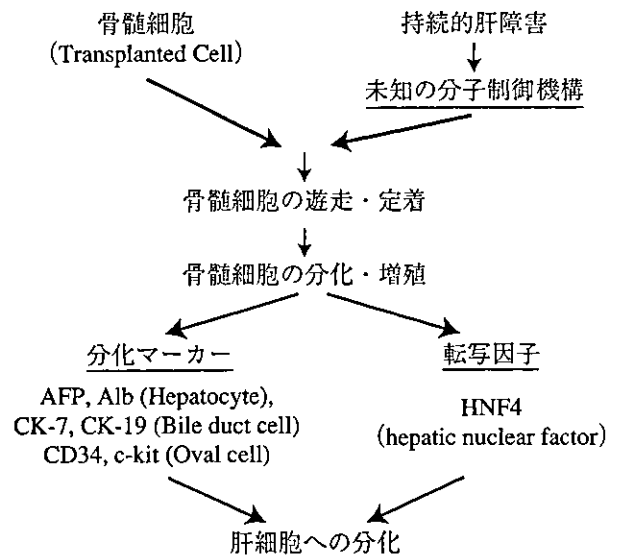


図3 まとめ

持続的肝障害のような特殊な環境において、投与した骨髄細胞が何らかのシグナルなどで肝臓へ遊走し、分化・増殖しながら、肝細胞・胆管細胞などになっていく。

4. HNF4

肝幹細胞から、肝細胞への分化の過程で増加する転写因子HNF4の免疫染色、蛍光染色もGFP染色結果同様に発現が増加していた。

5. CK-7 & CK-19

胆管細胞マーカーであるCK-7, CK-19の免疫染色と蛍光染色では、GFP染色など他の抗体での染色と違い、初期の段階では他の場合より発現増加を認めるが、経時的に見ていくと、徐々に発現

が低下していった。

4 考察

今回われわれが開発したGFP・CCl4modelでは、持続肝障害のみ、投与した骨髄細胞が肝臓に遊走していたことがわかった。この特殊な微小環境(ニッチ)内にて、投与した骨髄細胞が何らかのシグナルなどで肝臓へ遊走し、分化・増殖しな

がら、肝細胞・胆管細胞などになっていくと考えられた(図3).

5 結論

今回われわれは自己骨髄細胞を使った再生療法の臨床開発を行うために、*in vivo*モデルとして、GFPマウスを使った骨髄細胞の分化・増殖評価モデルを開発した。このモデルを通じて持続的な肝障害時のみに骨髄細胞から肝細胞・胆管細胞への分化・増殖を確認することができた。今後、われわれは、この開発したモデルの解析を通じ、実際の臨床応用可能な再生医療に役立つ幹細胞の同定、および骨髄細胞を分化・誘導するシステムを明らかにしていきたいと考えている。

文献

- 1) Grisham JW, Thorgeirsson SS : Liver stem cells. Stem Cells, ed. CS Potten. 1997, Manchester: ACADEMIC PRESS INC, pp233-282
- 2) Petersen BE et al : Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. Science 284 : 1168-1170, 1999
- 3) Theise ND et al : Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. Hepatology 31 : 235-240, 2000
- 4) Jiang Y et al : Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature, 2002
- 5) Martin Korbng et al : Hepatocytes and Epithelial Cells of Donor Origin in Recipients of Peripheral Blood Stem Cells. The New England Journal of Medicine 346 (10) March 7, 2002
- 6) Terai S, Yamamoto N, Sakaida I et al : Bone marrow cell could differentiated into Hepatocyte in the specific condition. In Submission
- 7) Terai S, Yamamoto N, Sakaida I et al : Development of new regenerative model: transplanted GFP positive bone marrow cell migrated into damaged area and differentiated into hepatocyte. Hepatology 34 (4) 235A, 2001
- 8) 寺井 崇二, 沖田 極 : 骨髄細胞の遊走・分化・増殖評価モデル動物およびその利用法. 特願2001-271240号

討論

【沖田（司会）】難しい話を短時間にさせていただいたので、どの程度ご理解いただけたかわかりませんが、ご質問ありますか。

【児玉（京都大・消内）】たくさんだったのでfollowできない部分もあったかと思いますが、2点おうかがいしたい点があります。1点は骨髄細胞を全部、ソーティングなしに移植されていると思いますが、上皮系以外のlineageに分化した細胞が例えば内皮細胞であるとか、間葉系の細胞にいった、そういう検索をされているかどうかということが1点と、もう1点は自己の骨髄から分化してくる細胞もあると思いますが、Liv2などがpositiveでGFPがnegativeというような集団が移植細胞とどんなバランスで再生してきたのか、その2点をうかがいたいのですが。

【山本】上皮細胞マーカーとかに関しては、今回の系では検討していないので、どれくらいの割合で分化しているのか、そこは検討していないのでわかりません。Liv2の先ほどのご指摘は確かに自分の自己骨髄細胞のLiv2 positiveで検出している可能性はあると思いますが、GFPの免疫染色の結果と検討すると全部は一致していません。骨髄細胞の中にもLiv2 positiveの細胞集団もありますし、割合の検討は今回はしていません。

【児玉】先生のご印象としては、かなりのものがLiv2 positiveなものはGFP positiveである、移植細胞からきているものがほとんどではないかということですか。

【山本】ほとんどではないかと考えました。

【児玉】ありがとうございました。

【立石（東京大・消内）】今回の骨髄から採られた細胞で移植した細胞数はいくつですか。

【山本】この系は1回投与しかしていません。1回あたり1~2×10の5乗個ぐらいしか1回投与していません。

【立石】10の5乗オーダーから障害肝で、20%を超えるくらい分化して増殖してくるというのはかなりの率ではないかと思います。骨髄という中胚葉由来の集合体みたいなところから内胚葉系の細胞になっていくうえで、それだけ効率よく分化が変わっていくということに関してはもともと骨髄に中胚葉の性質のない細胞があるのか、それとも中胚葉の性質を持っていながらも何かのシグナルで分化が脱分化されて分化の転換が起きていくのか、どちらが考えられるのでしょうか。

【山本】どうしてGFPのこの結果が得られたのかということに関しては現在解析している最中なのですが、あくまでも推測ですが、何らかのシグナルが関係はしているとは思いますが、最終的には1カ月経って25%増えたという理由に関してはまだわかっていません。

【沖田】いままで骨髄細胞といっていますが、むしろ骨髄由来細胞というふうにご理解いただけたらよろしいのだらうと思います。この細胞入れてhepatocyteに変わっていくという報告はあまりないんですね。部分肝切除したラットに入れますとほとんどがendothelに変わってしまうというデータがあるんですね。ところが、肝障害モデルでは先生がおっしゃった通り20%入っていった。つまり肝細胞の方に分化していったということなんですね。肝障害をまず起こしていたということがうまく肝臓にとどまり肝細胞化したと考えられます。bone marrow由来細胞ですから、おっしゃる通りbone marrow細胞ではなくて、ひよっとしたら違った細胞、間葉系の細胞の可能性も残されているということはあると思います。

【坪内（宮崎医大・2内）】大変興味深いお仕事だと思います。今の沖田先生のお話とも関連しますが、先生が使われた肝障害モデルは、基本的に肝再生が障害されているモデルというように理解してよろしいのでしょうか。といいますのは従来は通常のhepatectomyとかsingle doseの四塩化炭素肝障害などでは基本的にはmature hepatocyteが主に分裂増殖すると考えられています。したがって先生のモデルで骨髄細胞を投与しないような状態ではoval cellの出現がどうかとか、あるいは通常のhepatectomyなんかで同じようなことをされていたらそういった成績も教えていただければと思います。

【山本】hepatectomyのノベルは今回僕たちは検討していないのでどういう結果になるのかは解りません。マウスは1回四塩化炭素を投与すると2~3日でトランスとかも改善してしまうというのを気を付けてわれわれは2日間隔で絶えず四塩化炭素を投与し続けたので、もともとあるhepatocyteが改善したとは…。

【沖田】寺井先生、答えてください。

【寺井（山口大・消内）】共同研究者ですが、いまの坪内先生の質問についてですが、CC14今回、ずーっと投与しています。まだ公表していないデータの中でアレルなんかやってみると分化をinduceするようなfactorがかなり動いていることが解ってきたので、ある細胞群を採ってくると骨髄細胞、普段の状態だ

ったら分化しないものがある状態のところ肝臓にいくと非常に分化しやすいというようなシグナルがでていて、それで上手くいったのではないかとということが一番考えています。過去の文献等ではCC14を短期間投与したモデルしかなくて、長期にやったというのはあまりないんですね。その時の挙動というのは一体どうなっているのかということがよく解らないんですが、次のときに具体的にオープンできる時が来ると思いますが、かなり面白い現象が起こっていることは間違いないと思います。

【坪内】基本的に mature hepatocyte が分裂増殖して、それでも足りなければ oval cell が分裂増殖して、それでも足りないときに骨髄細胞が導入されると一般的には考えられるのではないかと思います。たくさんの細胞が骨髄細胞由来になっていますので、内因性のもも加えますと、ほとんど骨髄に由来するという可能性があるのです、その辺を明確にしていればと思います。ありがとうございます。

【沖田】従来どれくらい bone marrow cell が肝に入っていくかという確実なデータがなかったのですが、われわれのところ初めて20%程度は入るという数字であげることができたということですね。

【中西（広島大・1内）】1つ最初に確認をさせてください。先生のところのモデルは四塩化炭素を打ち続けて transfer されているわけですが、入れた後は打っていないんですか四塩化炭素を。

【山本】入れた後も持続で…。

【中西】同じ dose で、ずーっと。いま見せていただいたのは4週目までで、打ち続けておられるということですね。坪内先生のご質問ともダブルかもしれませんが、この場合骨髄から得られた細胞が非常に増えているわけで、例えばこれを止めた後とか、骨髄由来の分化した細胞群がどうなるかというのが興味があって、これからの再生を考えた場合どれくらい入れたらいいか。どういうところでこの細胞はストップするのだろうか。自己肝と極端に言えば入れ替わってしまうのではないかとというようなことも考えられるわけですが、いまのところの感触で、これは炎症を止めるといろんな増殖活性も落ちるし、transfer した肝細胞はあまり増殖をしなくなるというようなデータなんでしょうか。

【山本】その件を現在継続してやっているところで、結果はもう少し検討する必要があるのですが、またキツチと詰めましたらご報告したいと思います。

【沖田】おそらく中西先生のお話の通りになっていく

のだろうと思いますが、これからエビデンスを出していきたいということです。

【中西】入れられた細胞に関しては非常に多い細胞群がなっているので、実際に驚くような数だと思います。

【柿沼（東京医歯大・消内）】聞き落としていたら申し訳ありませんが、教えていただきたいんですが、末梢血もしくは骨髄の中で GFP トランスジェニック マウスドナー由来の細胞がどれくらい混じっていたかということもご検討なさっていたら教えていただきたい。この系だとおそらく骨髄移植の系ではなくて、radiation とかされていたらしゃらないと考えますので、普通に考えると骨髄や末梢血には生着していないのではないかと思います…。

【沖田】他臓器にということですか。

【柿沼】骨髄に生着してから肝臓へくるのか。それとも骨髄に生着しなくても…。

【沖田】していないと思います。

【柿沼】生着しなくても肝臓へ直接くる potential の系だと考えてよろしいですか。

【沖田】そう思います。

【柿沼】ありがとうございました。

【原田（久留米大・2内）】1つは、他臓器でどれだけ GFP 陽性細胞が出ているかということ、もう1つは肝細胞マーカーとの GFP の signal をマージで見ている仕事で黄色にならないグリーン単色の細胞が小葉内にかかなりの量ありますが、あれらの細胞は何だと考えていらっしゃいますか。

【山本】蛍光染色で画像をとるときに、肝臓という臓器は非常に自家蛍光が強くて緑だけのところは正直に申しますと自家蛍光で緑に光っているだけの細胞もあると思います。

【原田】自家蛍光は顕微鏡の感度を調節すれば十分 off にできると思います。

【寺井】具体的にお答えします。まず免疫染色でやりました。門脈の方からきまして小葉の中に広がっています。確かに染まっていない部分もありますけど、その辺については具体的に細かく、染まっていない細胞が具体的にどうものかということについては見えないので、それについてはお答えできない。

positive positive でいっていると、ある程度分化の lineage をみますけど、1つ忘れていけないのは分化の lineage というのがすべての細胞が同じように、同じ比率で進んでいくわけじゃなくて、あるものの段階は primitive な初期の段階のものが存在しているけど、だんだん maturation していくといういくつかの段階が