

図 2. 部分肝切除に伴う肝再生

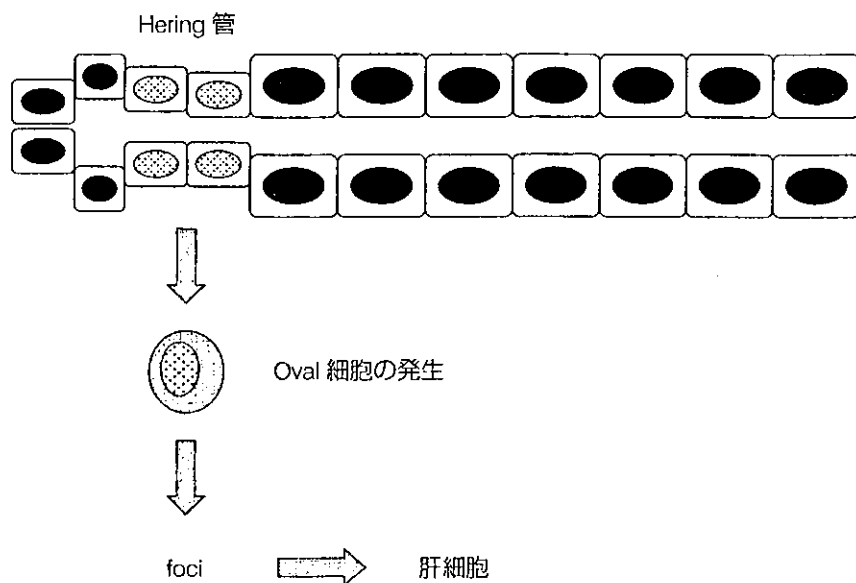


図 3. Oval 細胞発生を通じた肝再生 (AAF/PH モデル)

は肝細胞の再生は起こらないため、胆管のすぐそばの Hering 管より oval 細胞が発生し basophilic hepatocyte の foci を経て肝細胞に分化するモデルである¹⁾(図 3)。これらの実験結果は、部分肝切除に伴う肝再生と、oval 細胞の発生を経た肝細胞の再生は機序が異なることを示す。すなわち、肝臓の再生において、病態の違いによりその再生におもに関与する細胞は異なることになる。一方で Petersen ら²⁾は、骨髄移植後、アセトアミノフルレン・四塩化炭素障害 (CCI 4) したモデルにおいて骨髄細胞由来の oval 細胞があらわれることを報告している。アセトアミノフルレン・

CCI 4 モデルはもともと oval 細胞の発生モデルであり、この条件において骨髄細胞は oval 細胞の表現型を経て肝細胞への分化が誘導される可能性を示した。

3. GFP/CCI 4 モデルの開発

われわれは骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の研究を推進するにあたり、どのような状態において骨髄細胞は肝細胞に分化するかという問題を解決するためには新たな *in vivo* モデルの開発が必要だと考えた。この分化転換に関与する微小環境のことを“Niche”とよぶが、ここにはさまざまなシ

グナル、転写因子、細胞外マトリックスなどが関与し制御されていると考えられている(図4)。過去の報告では血球幹細胞が肝細胞に分化し、その結果肝臓の機能を代償したことについては、チロシン血漿突然変異マウス(FAH欠損マウス)に対し、 β -ガラクトシダーゼ(β gal)陽性の血球幹細胞の投与により、移植した β gal陽性細胞が肝臓にクラスターをつくって定着し、肝臓の機能がうまく代償されることが報告されていた⁹⁾。しかしながら、このモデルは非常に特殊なチロシン血症モデルであり、われわれが日常の現場でみる肝炎、肝硬変モデル病態は異なる。また、FAHモデルでみられる移植細胞のクラスターをわれわれは実際の臨床の現場においてはほとんどみることはない。最近になり、このモデルにおける骨髄細胞の肝細胞への分化は細胞融合により起こるという報告がなされ、骨髄細胞の分化転換に対して否定的な見解が述べられているが¹⁰⁾¹¹⁾、米国国立公衆衛生研究所(NIH)などでおこなわれた人における、男性ドナーから女性レシピエントへの骨髄移植後の類粘膜の採取を通じた細胞融合の検討では、細胞融合については認められていないと報告されている¹²⁾。

一方で、われわれは「自己骨髄細胞を用いた肝

臓再生療法」をおこなう可能性のある対象患者は「持続的な肝障害のある肝硬変患者」と考えた。このため、より臨床に近い病態のレシピエントを作成すべくCCl₄の持続投与し(肝硬変マウス)作成した、GFPTgマウス¹³⁾のGFP陽性骨髄細胞を投与することで、その投与したGFP陽性骨髄細胞の肝細胞への分化転換の有無、過程を評価した。われわれの開発したモデルを“GFP/CCl₄モデル”と名づけた。図5にGFP/CCl₄モデルの概略を示すが、まず4週間ほどCCl₄投与により持続肝障害を起こし肝硬変状態にしたレシピエントマウスに、GFP標識した陽性骨髄細胞を尾静脈より投与して骨髄細胞の肝細胞への分化転換について評価した。過去の移植実験においては骨髄細胞の分化については、骨髄細胞投与後は肝障害を止めて評価している。しかしながら、われわれが臨床でみる患者は「持続的な肝障害のある患者」であり、この持続的なCCl₄の投与により肝障害を続けることが骨髄細胞の肝細胞への分化においては必須と考えられた。実際の結果であるが、図6¹⁴⁾のように肝障害がない状態では骨髄細胞は肝臓には遊走されなかったが、CCl₄での持続肝障害状態で投与した骨髄細胞は投与後1日目から門脈周囲に定着し、持続肝障害下の特殊なNicheにおいて

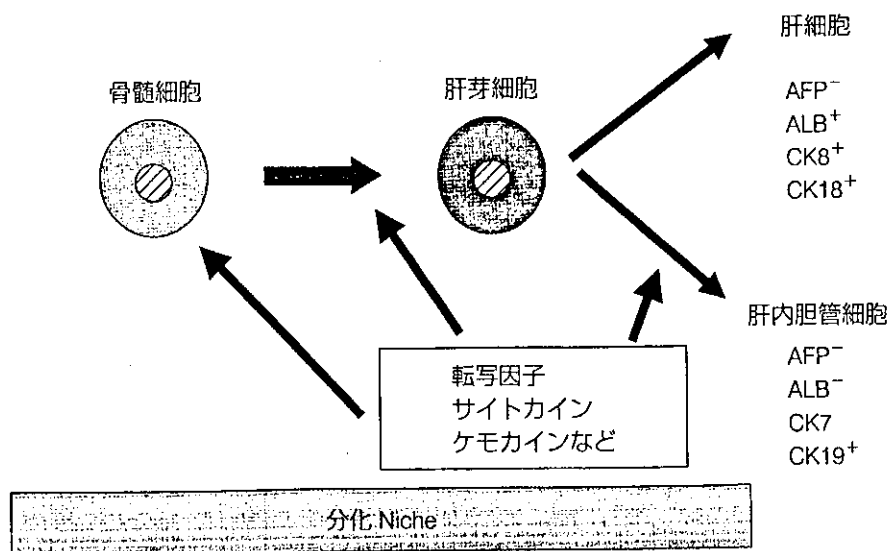


図4. 骨髄細胞の肝細胞への分化転換

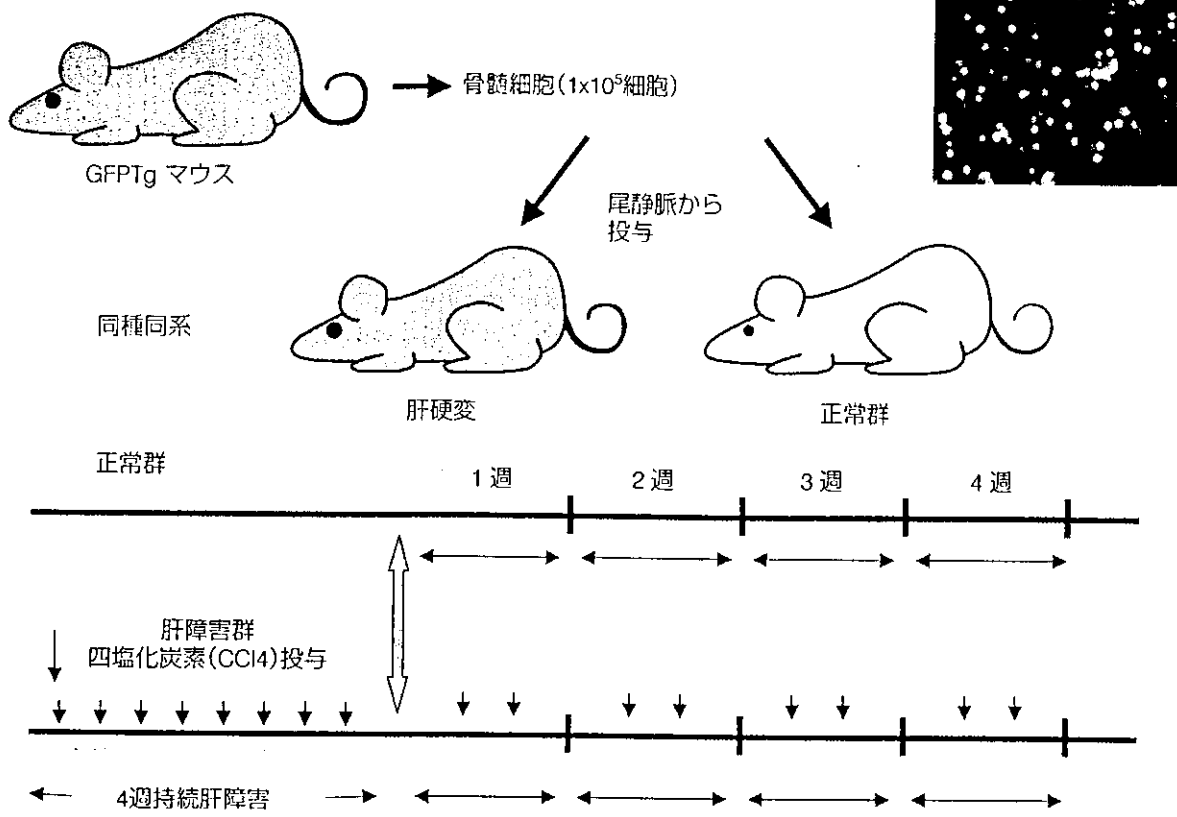


図 5. GFP/CCl₄ モデルの概略

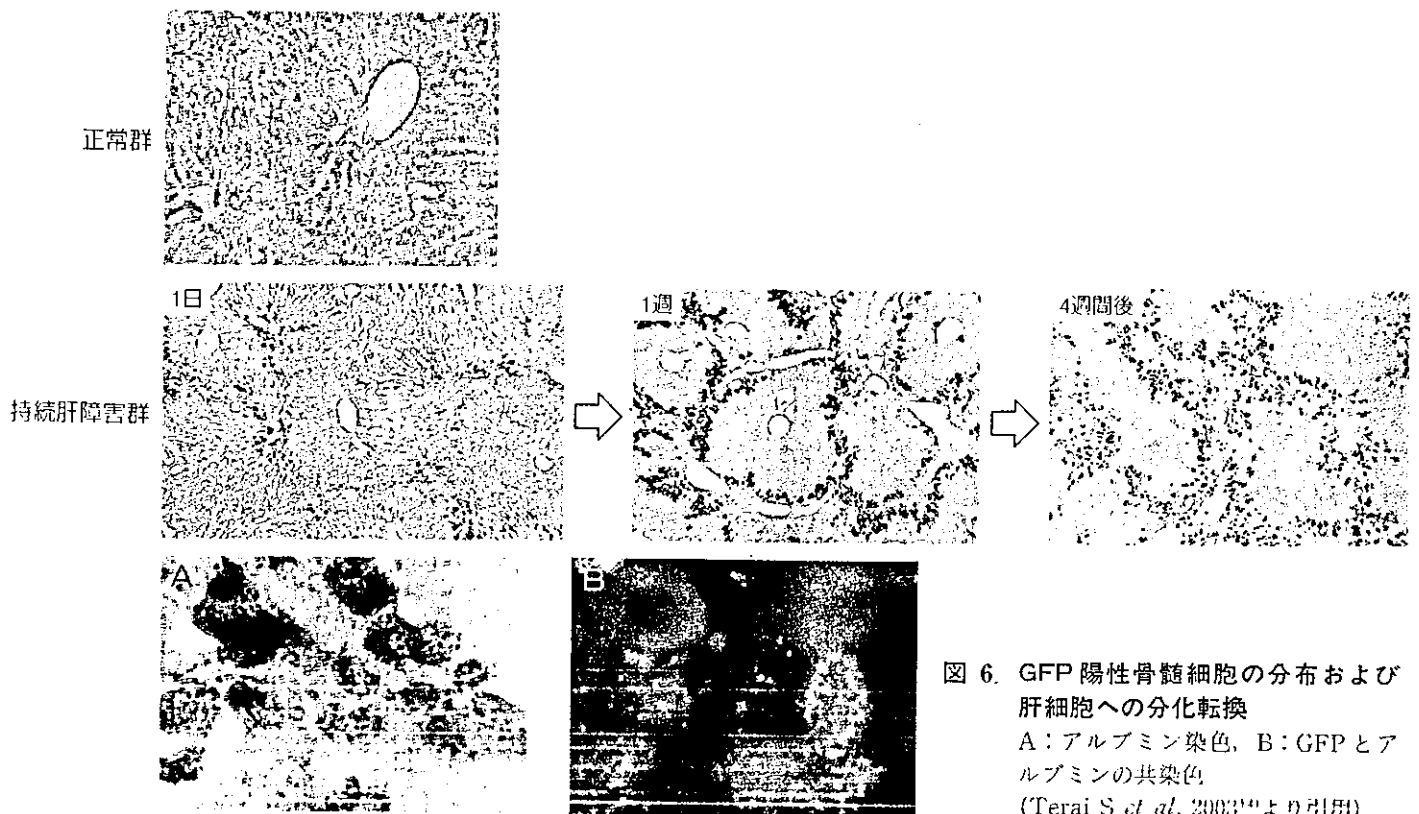
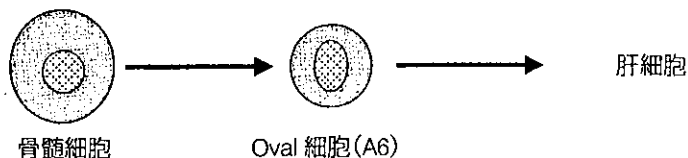


図 6. GFP 陽性骨髄細胞の分布および肝細胞への分化転換
A: アルブミン染色, B: GFP とアルブミンの共染色
(Terai S *et al.*, 2003¹⁴⁾より引用)

モデル1



モデル2

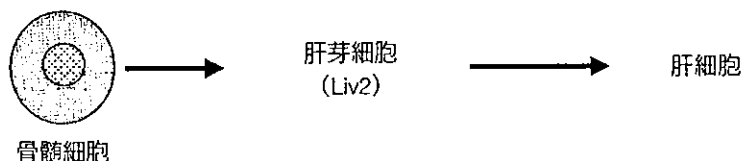


図 7. 骨髓細胞の肝細胞への分化転換の経路

骨髓細胞から肝芽細胞に分化転換し、最後は機能的な肝細胞索構造をつくりアルブミン産生の肝細胞へ分化転換することが明らかになった。実際に肝機能も代償していた¹⁴⁾。次に、分化転換機序についての評価であるが、骨髓細胞は図7に示すように oval 細胞の表現型を経るのか、それとも肝芽細胞の表現型を経るのかを明らかにすることが重要と考えられた。共同研究者の仁科博史博士らは、肝発生を分子レベルで解析することを目的として、胎児肝特異的な分子マーカーを単離すべく、胎生期 11.5 日 (E 11.5) のマウス肝を抗原にして複数のモノクローナル抗体を作製した。Liv 2 と命名した抗体は、マウス発生期に出現する肝幹細胞である肝芽細胞を特異的に認識する¹⁵⁾。この Liv 2 抗体で染色してみると、骨髓細胞は Liv 2 陽性の肝芽細胞に分化していることが明らかになった。一方、マウスの oval 細胞の特異抗体である A 6 抗体¹⁶⁾の染色をおこなうも骨髓細胞は A 6 陽性 oval 細胞の表現型はとらないことが明らかになり、GFP/CCI 4 モデルにおいては投与した骨髓細胞が oval 細胞の表現型をへることはなく、発生段階と同様に肝芽細胞の表現型をへながら肝細胞に分化することが明らかになった¹⁴⁾。Liv 2 抗体を用い、肝形成不全となる SEK 1, MKK 7, c-Jun ノックアウトマウスや血液幹細胞を欠損する

AML 1 ノックアウトマウスの解析をおこなった結果、炎症性シグナルの SEK 1, MKK 7 → SAPK/JNK → c-Jun シグナル系が肝芽細胞の自己複製と生存維持に必須の役割を果たしていることが明らかになっており¹⁵⁾、GFP/CCI 4 モデルにおける骨髓細胞の分化転換に炎症性シグナルが重要なことは、炎症性シグナルが肝発生に重要なことと共通機構がはたしている可能性を示す。現在、分化制御機構については DNA チップや増殖因子の解析を通じておこなっており、これらの結果は骨髓細胞がまず幼弱化するステップが重要と考えられるデータを得ている(大森, 石川投稿中)。また、このモデルにおいて実際に肝不全状態が骨髓細胞の投与により改善したことについては、血清のアルブミンの値は有意差をもって改善し、また 3 ヶ月以上みた生存率も有意に改善していた。これらの結果は、持続肝障害のある肝硬変状態においては骨髓細胞は肝臓再生に有用な細胞源になる可能性を示すとともに、肝臓再生をうまく誘導するにはレシピエントの状態が重要なことを示した。

4. 骨髓中に存在する肝臓再生に有用な細胞群

一方で肝細胞へ可塑性があると考えられる細胞としては、骨髓中の細胞は大きく 3 つあり、①血

球幹細胞 (hematopoietic stem cell : HSC)¹⁷⁾,
 ② 間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell :
 MSC)¹⁸⁾, また最近幹細胞として注目されている
 ③ side population cell (SP 細胞)¹⁹⁾があげられる
 が, 実際に骨髄中にどの分画に肝幹細胞が存在し
 ているかについては明らかになっていない. この
 理由としては, 従来血球系の解析のツールとして
 解析された抗体を用いており, 肝臓の臓器として
 の特性を考慮して解析したものではないことがあ
 げられると考える. この状況を打破するにはやはり
 肝発生について注目したアプローチが必要と考
 えられる. 前述で肝臓の発生の特徴として胎児肝
 は造血の場であるということあげたが, そこで,
 われわれは胎児肝の造血時期である E 11.5 日
 のマウス胎児肝を抗原とし, 新規マウスモノクロー
 ナル抗体の Liv 8 抗体を作成し骨髄中の肝幹細胞
 の同定を目的に以下の研究をおこなった²⁰⁾. Liv 8
 陽性細胞は全骨髄細胞中約 30% 存在し CD 45 陽
 性細胞分画を含んでいた. E 11.5 日の胎児肝では
 Liv 8 陽性細胞の存在を確認するも, 造血能がない
 AML 1 ノックアウトマウスの胎児肝では
 Liv 8 陽性細胞の存在は確認できなかった. Liv 8
 抗体は血球前駆細胞を大きく認識する抗体である

ことを示すため, そこで, GFP/CCl₄ モデルを用
 い, GFPTg マウスから分離した骨髄細胞を
 AutoMACS を使用し, Liv 8 抗体で全骨髄細胞を
 Liv 8 陰性骨髄細胞集団と Liv 8 陽性骨髄細胞集
 団に分離しそれぞれを CCl₄ 投与にて肝硬変状態
 にしたレシピエントマウスの尾静脈よりこれらの
 細胞群を投与する (図 8). 免疫組織化学染色, 蛍
 光二重染色にて Liv 8 陽性, 陰性細胞群の肝細胞
 への分化転換の有無, また血清アルブミン値の改
 善について評価した結果, また肝細胞への分化転
 換についての評価の結果より, Liv 8 陰性分画に
 肝臓再生に有用な細胞群が存在する可能性が明ら
 かになった (図 9). 骨髄間葉細胞を HGF, 線維芽
 細胞成長因子 (fibroblast growth factor : FGF)
 を加え培養することにより, 非常に可塑性に富む
 骨髄間葉系幹細胞由来の multipotent adult pro-
 genitor cells (MAPC) の樹立に成功したとする
 報告もあることより, 骨髄細胞中の肝幹細胞は間
 葉系幹細胞群に含まれる可能性が高いのではない
 かと推測された²¹⁾.

5. 今後の課題

今回われわれは GFP/CCl₄ モデルを開発する

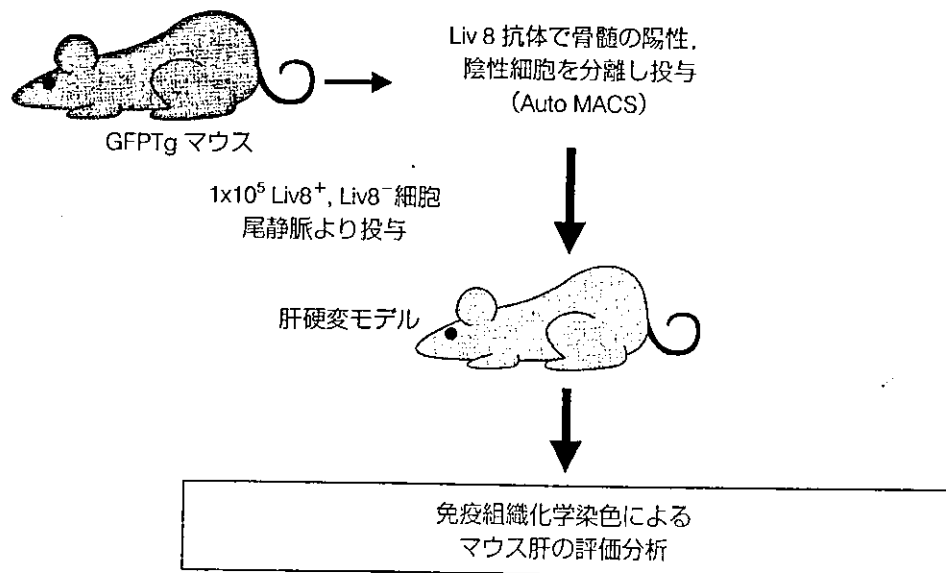


図 8. 実験プロトコル

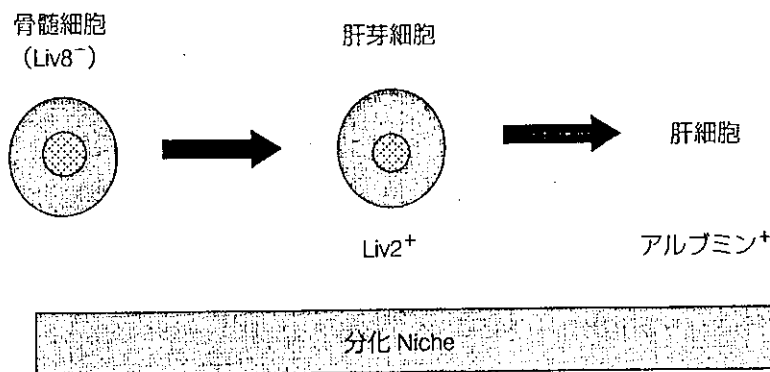


図 9. GFP/CCI4 モデルにおける骨髄細胞の肝細胞への分化転換

ことにより、持続肝障害下において、投与した骨髄細胞が効率よく肝臓に遊走定着し、幼弱化しながら肝芽細胞のなり肝細胞になることが明らかになったが、①なぜ投与した細胞は効率よく障害を起こした肝臓に遊走されたか？、②移植した細胞の運命は？、また③移植した細胞が分化することで周囲の肝臓への影響はどうか？など今後解明していかなければならない課題がある。これらを解明できれば将来さらに効率的な肝臓再生療法の開発につながると考えられる。

おわりに

すでに自己骨髄細胞を用いた下肢および血管再生療法はすでに臨床応用がおこなわれており、良好な成績をあげている²²⁾²³⁾。また、骨髄移植は血液疾患の治療に多くの施設で応用されており、骨髄採取のそのものについては確立されている。われわれの基礎的な検討では骨髄細胞の投与により肝機能の改善が確認され、また生存率も改善していた。これらの結果は肝不全（非代償性肝硬変症）などに対する「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法」の臨床開発の可能性を強く示す結果であった。われわれはすでに報道されたように、2003年11月14日より、（自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法）Phase I 臨床研究を開始した。まずは、安全性を評価する臨床研究になるが、この「基礎から臨床」・臨床から基礎研究というトランスレーショナルリサーチを推進することで、次世代にス

タンダードになる肝臓再生療法を開発したいと考えている。

文献

- 1) Grisham JW, Thorgeirsson SS : In : *Liver stem cells*, academic press, Manchester, 1997, pp. 233-282
- 2) Mitaka T, Sato F, Mizuguchi T *et al* : Reconstruction of hepatic organoid by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells. *Hepatology* 29 : 111-125, 1999
- 3) Yasui O, Miura N, Terada K *et al* : Isolation of oval cells from Long-Evans Cinnamon rats and their transformation into hepatocytes *in vivo* in the rat liver. *Hepatology* 25 : 329-334, 1997
- 4) Suzuki A, Zheng Y, Kondo R *et al* : Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver. *Hepatology* 32 : 1230-1239, 2000
- 5) Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R *et al* : Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32 : 11-16, 2000
- 6) Okamoto R, Yajima T, Yamazaki M *et al* : Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat Med* 8 : 1011-1017, 2002
- 7) Sell S : Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology* 33 : 738-750, 2001
- 8) Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD *et al* : Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284 : 1168-1170, 1999

- 9) Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M *et al* : Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* **6** : 1229-1234, 2000
- 10) Wang X, Willenbring H, Akkari Y *et al* : Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* **422** : 897-901, 2003
- 11) Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW : Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* **422** : 901-904, 2003
- 12) Tran SD, Pillemer SR, Dutra A *et al* : Differentiation of human bone marrow-derived cells into buccal epithelial cells *in vivo* : a molecular analytical study. *Lancet* **361** : 1084-1088, 2003
- 13) Okabe M, Ikawa M, Kominami K *et al* : 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* **407** : 313-319, 1997
- 14) Terai S, Sakaida I, Yamamoto N *et al* : An *in vivo* model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem* **134** : 551-558, 2003
- 15) Watanabe T, Nakagawa K, Ohata S *et al* : SEK1/MKK4-Mediated SAPK/JNK signaling participates in embryonic hepatoblast proliferation via a pathway different from NF- κ B-induced anti-apoptosis. *Dev Biol* **250** : 332-347, 2002
- 16) Factor VM, Radaeva SA, Thorgeirsson SS : Origin and fate of oval cells in dipin-induced hepatocarcinogenesis in the mouse. *Am J Pathol* **145** : 409-422, 1994
- 17) Krause DS, Theise ND, Collector MI *et al* : Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* **105** : 369-377, 2001
- 18) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC *et al* : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284** : 143-147, 1999
- 19) Uchida N, Fujisaki T, Eaves AC *et al* : Transplantable hematopoietic stem cells in human fetal liver have a CD34⁺ side population (SP) phenotype. *J Clin Invest* **108** : 1071-1077, 2001
- 20) Yamamoto N, Terai S, Ohata S *et al* : A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv8, is useful for cell therapy to repair damaged liver. *Biochem Biophys Res Commun* **313** : 1110-1118, 2004
- 21) Schwartz RE, Reyes M, Koodie L *et al* : Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* **109** : 1291-1302, 2002
- 22) Hamano K, Li TS, Kobayashi T *et al* : Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell implantation. *Ann Thorac Surg* **73** : 1210-1215, 2002
- 23) Stamm C, Westphal B, Kleine HD *et al* : Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* **361** : 45-46, 2003

肝硬変治療の新たなストラテジー —自己骨髄細胞移植による肝臓再生療法—

寺井崇二* 坂井田功* 沖田 極*

骨髄細胞移植による非代償性肝硬変症に対する治療の有用性を検討するため、われわれは GFP/CCl₄モデルを開発しその有効性について検討してきた。その結果、持続炎症の存在する肝硬変状態において、末梢静脈より投与した骨髄細胞は効率よく肝臓へ遊走され、肝芽細胞への表現型を経てアルブミン陽性の肝細胞へ分化するとともに、この分化過程において肝線維化抑制効果があることが明らかになった。また骨髄細胞移植により肝機能、生存率が改善しており、これらの結果は、肝硬変症の治療の1つとして自己骨髄細胞移植の有効性を示す結果であった。本稿では、過去にわれわれがおこなった基礎的検討について概説する。

はじめに

B型、C型肝炎ウイルスの蔓延により肝疾患は増えつづけ、現在肝疾患をベースとした肝細胞癌による癌死は年間の癌死の第3位を占めるようになってきた。肝細胞癌の背景にある病変は肝硬変症であるため、肝癌の効率的な治療、生存率の向上のためにはいかに肝不全を制御するかが重要な問題になる。わが国においては末期肝不全患者に対してはすでに生体肝移植がおこなわれているがドナーの不足、外科的侵襲など克服すべき課題は多い。われわれは新たな肝不全(肝硬変)に対する

治療として「自己骨髄細胞移植による肝臓再生療法」の開発をめざし研究を進めてきたのでここに紹介する。

1. 骨髄細胞の肝細胞への分化の可塑性の発見

肝臓は肝細胞、星細胞、Kupffer細胞、Pit細胞、内皮細胞より構成されており代謝、蛋白合成、解毒など多機能をつかさどっている臓器である。2000年に骨髄細胞の肝細胞への分化の可塑性についての女性レシピエントに男性ドナーからの骨髄移植後の剖検例において、骨髄細胞が肝細胞に分化することが報告された¹⁾。これはY染色体陽性細胞の存在の有無を肝、胆管細胞にて検討したものであり、ヒトにおける骨髄細胞の肝細胞への分化の可塑性を証明した報告である。この発見は何らかの機序により骨髄細胞は肝細胞へと分化する可能性があることを示すものであり、肝臓に分化する細胞群が骨髄中に存在することが予測された。また骨髄細胞の腸管への分化についても報告され、骨髄中には、さまざま臓器に分化する細

(キーワード)

骨髄細胞
肝幹細胞
肝再生
細胞療法
Oval cell
Niche
肝硬変症

* TERAI Shuji, SAKAIDA Isao, OKITA Kiwamu/山口大学 医学部先端分子応用医科学講座消化器病態内科学

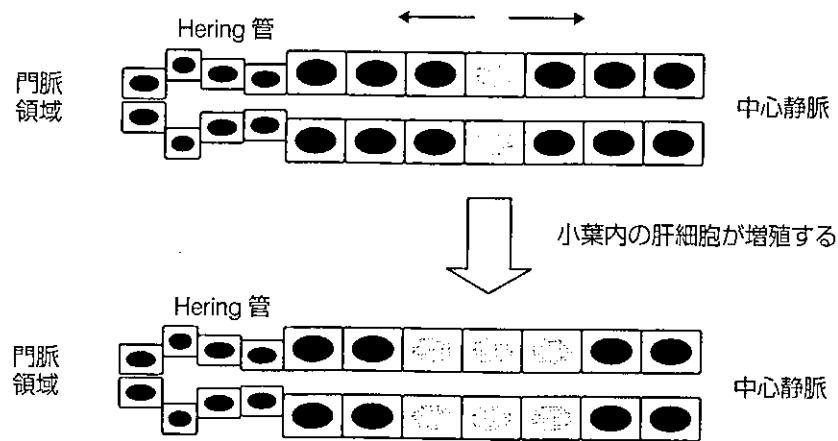


図 1. 部分肝切除に伴う肝再生

胞群が存在することが明らかになった²⁾。

2. 肝再生(部分肝切除による肝再生とOval細胞の発生と経た肝再生の違い)

ここで一步はなれて肝再生という現象について考えてみる。肝臓は再生する臓器として知られており、実際に肝切除後には肝再生が起こる。図1に示したようにラットの部分肝切除により肝小葉内に存在する肝細胞が肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor: HGF)などの増殖因子の誘導により増殖し肝再生が起こると考えられている³⁾。一方で肝幹細胞の1つであるOval細胞の有名なモデルとしてはアセトアミノフルレン(acetylaminofluorene: AAF)投与に部分肝切除(partial hepatectomy: PH)を加えたAAF/PHモデルがあるが、このモデルはAAFの投与により肝細胞の増殖が起こらない状態で肝切除をおこなうことで、肝細胞の再生は起こらないためHering管由来で卵円形の形のOval細胞が発生し好塩基性肝細胞のFociを経て肝細胞に分化が観察できる⁴⁾(図2)。このようなラット動物実験モデルを用いた治験は、部分肝切除による肝再生と、Oval細胞の発生を経た肝細胞の再生は機序、関与細胞が異なることを示す。すなわち肝臓の再生において、病態の違いによりその再生におもに関与

する細胞は肝細胞かあるいはOval細胞と肝臓の病態により異なることを示す。

3. GFP/CCl₄モデルの開発

われわれは骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の研究を推進するにあたり、どのような状態において骨髄細胞は肝細胞に分化するかという問題を解決したいと考えた。このためには新たな*in vivo*モデルの開発が必要だと考えた。この分化に関与する微小環境“Niche”は、さまざまな炎症、免疫的なシグナル、転写因子、細胞外マトリックスなどが関与し制御されていると考えられる。血球幹細胞が肝細胞に分化しその結果、肝臓の機能を代償したことについては、チロシン血漿突然変異マウス(FAH欠損マウス)に対し、 β -ガラクトシダーゼ(β -galactosidase: β -gal)陽性の血球幹細胞の投与により、移植した β -gal陽性細胞が肝臓に細胞塊をつくり定着し、肝臓の機能がうまく代償されることが、報告されていた⁵⁾。しかしながらこのモデルは非常に特殊なチロシン血症モデルであり、われわれが日常の現場でみる肝炎、肝硬変モデル病態は異なる。またFAHモデルでみられる移植細胞の細胞塊をわれわれは実際のヒトの肝臓の病理像においてはほとんどみることはない。一方でわれわれが実際に再生療法をおこない救命したいと考える対象患者は持続的な肝障害がつづい

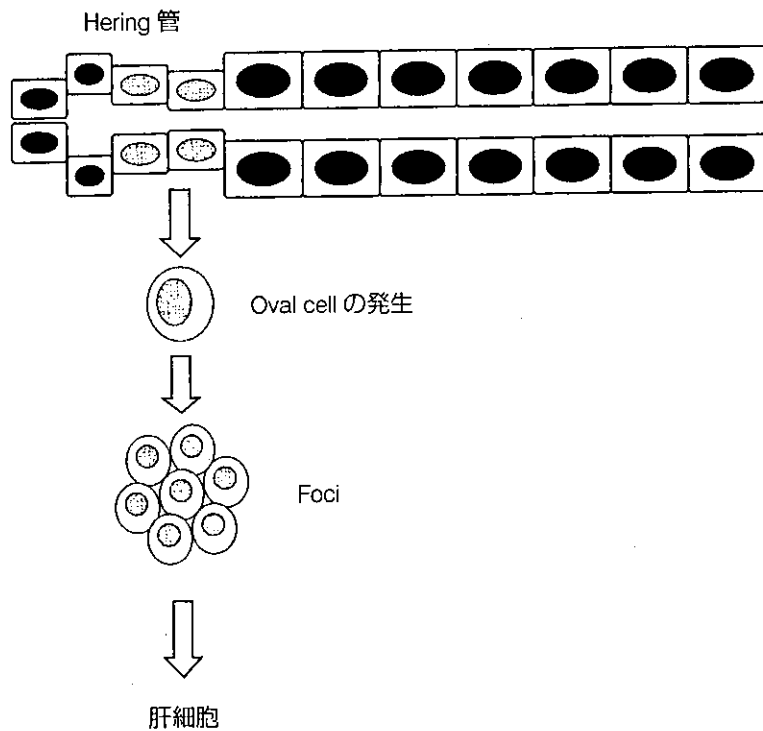


図 2. Oval cell 発生をつうじた肝再生 (AAF/PH モデル)

ている肝硬変患者(非代償性肝硬変症)が対象になる。われわれは持続的な肝障害がつづく肝硬変症患者を対して、果たして骨髄細胞を用いた肝臓再生療法をおこなうことが有用であるか評価したいと考えた。このために、まずレシピエントモデルを四塩化炭素(CCl₄)の持続投与によりつくった肝硬変マウスとし、GFPTg マウス⁶⁾から GFP 陽性骨髄細胞を投与することで投与した GFP 陽性骨髄細胞の肝細胞への分化の有無またその過程を評価した。最終的にわれわれの開発したモデルは“GFP/CCl₄モデル”と名づけた。図 3 に GFP/CCl₄モデルの概略を示すが、まず 4 週間ほど CCl₄投与により持続肝障害を起こし肝硬変状態にしたレシピエントマウスに、GFP 標識した陽性骨髄細胞(非培養, ヘテロな細胞集団)を尾静脈より投与して骨髄細胞の肝細胞への分化について評価した。過去の移植実験においては骨髄細胞の分化については、骨髄細胞投与後は肝障害を止めて評価している。しかしながらわれわれが臨床でみる患者は持続的に肝障害がつづく患者であるため CCl₄投与は骨髄細胞移植後もつづけ GFP 陽性骨髄細胞

の定着について評価した。結果は、図 4 のように肝障害がない状態では骨髄細胞は肝臓には遊走されなかったが、CCl₄での持続肝障害状態で投与した骨髄細胞は投与後 1 日目から門脈周囲に定着し、持続肝障害下の特殊な Niche において骨髄細胞から肝芽細胞に分化し、最後は機能的な肝細胞索構造をつくりアルブミン産生の肝細胞へ分化することが明らかになった。実際に肝機能も代償していた⁷⁻⁹⁾。つぎに分化機序についての評価であるが、骨髄細胞は図 5 に示すように Oval cell の表現型を経るのか、それとも肝芽細胞の表現型を経るのかを明らかにすることが重要と考えられた。共同研究者の仁科博史博士らは肝発生を分子レベルで解析することを目的として、過去に知られているアルファフェトプロテイン以外の胎児肝特異的な分子マーカーを単離する目的で、胎生期 11.5 日 (E 11.5) のマウス肝を抗原にして複数のモノクローナル抗体を作製した。Liv 2 と命名した抗体は、マウス発生期に出現する肝幹細胞である肝芽細胞を特異的に認識する¹⁰⁾。この Liv 2 抗体で染色してみると骨髄細胞は Liv 2 陽性の肝芽細胞に

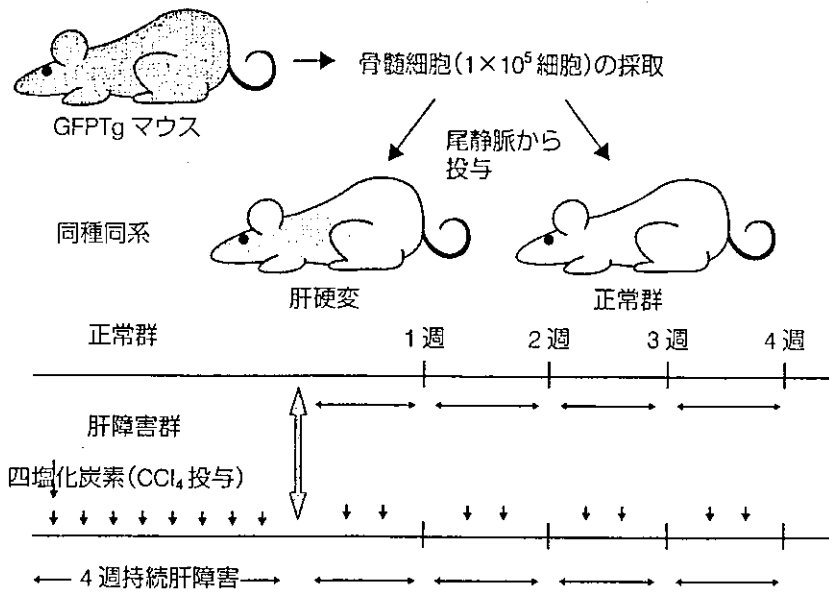


図 3. GFP/CCl₄モデル

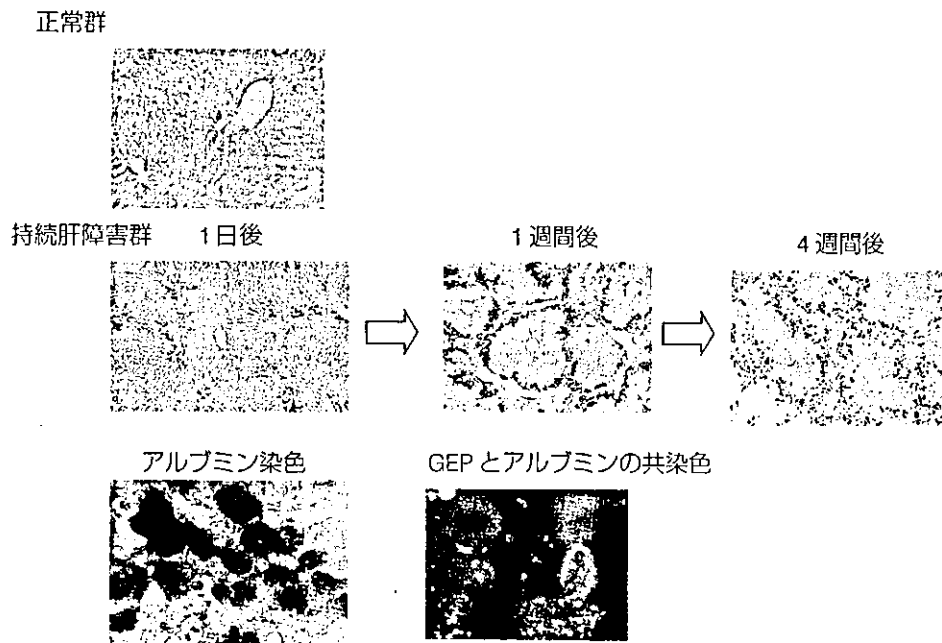


図 4. GFP 陽性骨髄細胞の分布および肝細胞への分化

分化していることが明らかになった。一方マウスの Oval 細胞の特異抗体である A 6 抗体¹¹⁾の染色をおこなうも骨髄細胞は A 6 陽性 Oval 細胞の表現型はとらないことが明らかになり、GFP/CCl₄モデルにおいては投与した骨髄細胞が Oval 細胞

の表現型を経ることはなく、発生段階と同様に肝芽細胞の表現型を経ながら肝細胞に分化することが明らかになった⁷⁾。Liv 2 抗体を用い肝形成不全となる SEK 1, MKK 7, c-Jun ノックアウトマウスや血液幹細胞を欠損する AML 1 ノックアウト

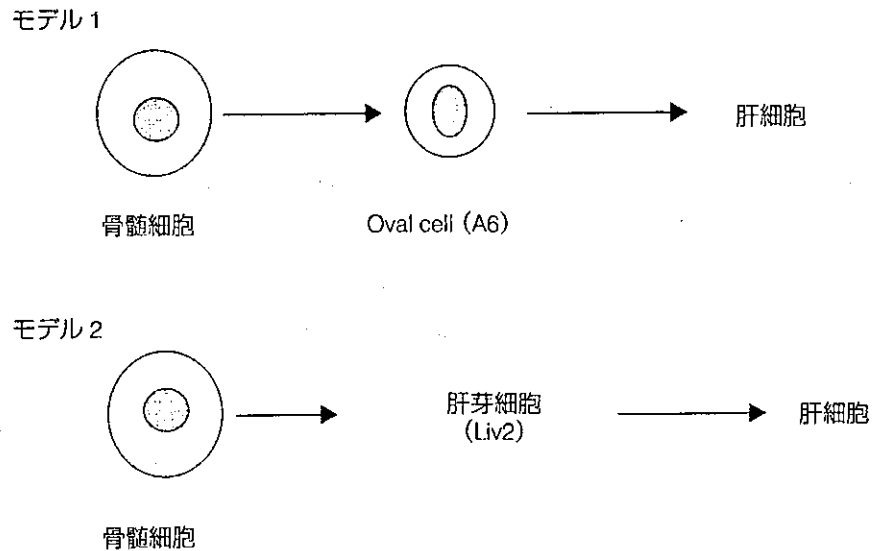


図 5. 骨髓細胞の肝細胞への分化の経路

マウスの解析をおこなった結果、炎症性シグナルの SEK 1, MKK 7 → SAPK/JNK → c-Jun シグナル系が肝芽細胞の自己複製と生存維持に必須の役割を果たしていることが明らかになっており¹⁰⁾, GFP/CCl₄モデルにおける骨髓細胞の分化転換に炎症性シグナルが重要なことは、炎症性シグナルが肝発生に重要なことと、共通機構がはたらいている可能性が考えられた。現在、分化制御機構については DNA-Chip や増殖因子の解析をつうじておこなっており、これらの結果は骨髓細胞がまず幼弱化するステップが重要と考えられるデータを得ている(大森, 石川未発表データ)。またこのモデルにおいて実際に肝不全状態が骨髓細胞の投与により改善されたのであるが、血清のアルブミンの値は有意差をもって改善し、また3ヵ月以上みた生存率も有意に改善していた。これらの結果は持続肝障害がつづく肝硬変状態において骨髓細胞は肝臓再生に有用な細胞源になる可能性を示した。

4. 骨髓中に存在する肝臓再生に有用な細胞群

一方で肝細胞へ可塑性があると考えられる候補細胞としては、骨髓中の細胞は大きく3つ、血球幹細胞(hematopoietic stem cell: HSC)¹²⁾, 間葉

系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)¹³⁾また最近幹細胞として注目されている SP 細胞(side population cell)¹⁴⁾があげられるが、実際に骨髓中にどの分画に幹細胞がするかは非常に混乱している。血球系マーカーをどこまで使い分画を評価するかの問題もあるが非常に混乱している。われわれは従来の手法とは違う方法、すなわち肝発生について注目したアプローチをおこなうこととした。肝臓の発生の特徴として胎児肝は造血の場であるということがあげられる。そこでわれわれは胎児期の造血時期である E 11.5 日のマウス胎児肝を抗原とし新規マウスモノクローナル抗体 Liv 8 抗体を作成し骨髓中の肝幹細胞の同定を目的に以下の研究をおこなった¹⁵⁾。Liv 8 陽性細胞は全骨髓細胞中約 30%存在し CD 45 陽性細胞分画を含んでいた。E 11.5 日の胎児肝では Liv 8 陽性細胞の存在を確認するも、造血能がない AML 1 KO マウスの胎児肝では Liv 8 陽性細胞の存在は確認できなかった。これらの結果は、Liv 8 抗体は血球前駆細胞を大きく認識する抗体であることを示す。そこで GFP/CCl₄モデルを用い、GFPTg マウスから分離した骨髓細胞を AutoMACS を使用し、Liv 8 抗体で全骨髓細胞を Liv 8(-)骨髓細胞集団と Liv 8(+)骨髓細胞集団に分離しそれぞれを

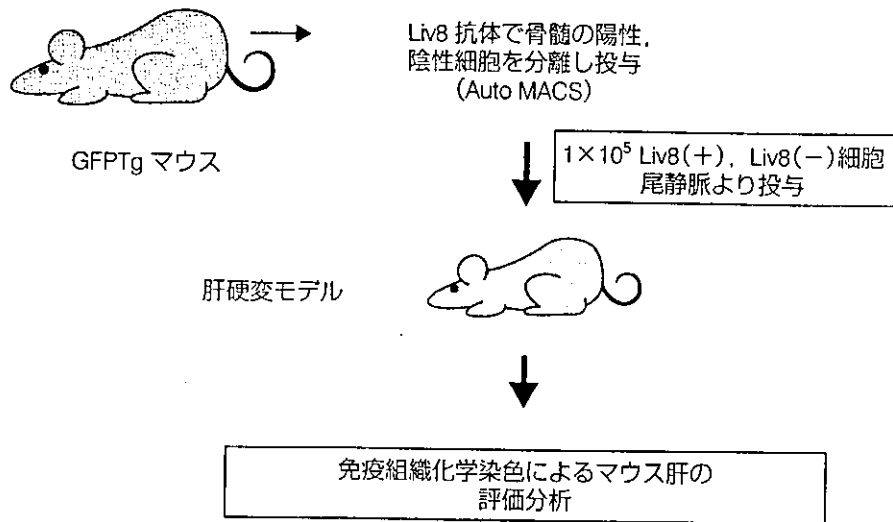


図 6. 実験プロトコール

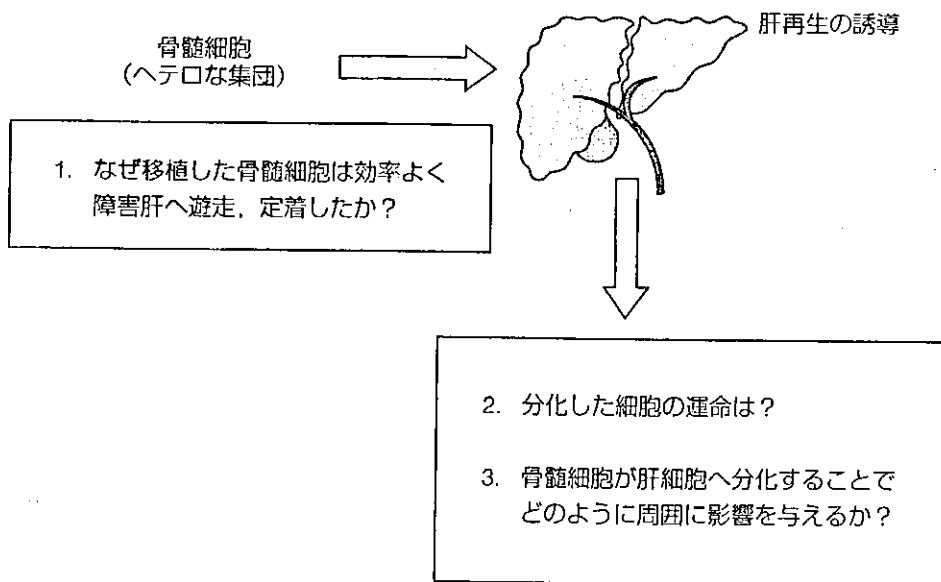


図 7. 今後の課題

CCl₄投与にて肝硬変状態にしたレシピエントマウスの尾静脈よりこれらの細胞群を投与し免疫染色、蛍光二重染色にて Liv 8 陽性、陰性細胞群のアルブミン陽性肝細胞への分化の有無、また血清アルブミン値の改善について評価した(図 6)。その結果肝細胞への分化転換についての評価の結果より、Liv 8 陰性分画に肝臓再生に有用な細胞群が存在する可能性が明らかになった。現在 Liv 8 抗体の認識する抗原については同定をめざしている。

今後の解析によりさらに骨髄中の肝疾患の治療に有用な細胞群を評価していきたいと考える。

5. 肝線維化との関連

われわれが対象とする疾患は肝硬変症の患者である。肝硬変症というのは持続的な肝障害の進行にともない、肝線維化が進行する病態である。今回われわれは GFP/CCl₄モデルにおける肝線維化との関連についてもシリウスレッド染色にて評価

した。その結果、肝線維化については持続的な炎症の存在下であるにもかかわらず、肝線維化は有意に改善していた¹⁶⁾。つまり CCl₄ 投与による持続炎症下において、骨髄細胞はアルブミン陽性肝細胞に分化するとともに、線維化改善という面において有用性を示すデータが得られている。今後はこの機序の解明をおこなっていく必要があると考える。

6. 今後の課題

今回われわれは GFP/CCl₄ モデルを開発することにより、持続肝障害下において投与した骨髄細胞が効率よく肝臓に遊走定着し、幼弱化しながら肝芽細胞のなり肝細胞になることが明らかになったが、①なぜ投与した細胞は効率よく障害を起こした肝臓に遊走されたか？ ②また移植した細胞の運命は？ ③また移植した細胞が分化することで周囲の肝臓への影響はどうか？(図7)など今後さまざまなことについて解明していかなければならない。これらを解明できれば将来さらに効率的な肝臓再生療法の開発につながると考えられる。

7. 臨床への応用

骨髄細胞移植を用いた下肢および血管再生療法はすでに臨床応用がおこなわれており良好な成績をあげている¹⁷⁾¹⁸⁾。また血液疾患の治療に骨髄移植は過去20年以上の経験があり、多くの施設で応用されており、骨髄採取のそのものについては確立されている。われわれの基礎的な検討では骨髄細胞の投与により肝機能の改善が確認され、また肝線維化生存率も改善していた。これらの結果は肝不全(非代償性肝硬変症)などに対する『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法』の臨床開発の可能性を強く示す結果であった。われわれは2003年11月14日より、(自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法)第I相臨床研究を開始した。まずは安全性を評価する臨床研究になるが、この(基礎から臨床)、(臨床から基礎研究)というトランスレーショナルリサーチを推進することで、次世代のスタンダー

ドになる肝臓再生療法を開発したいと考えている。

おわりに

われわれの臨床研究は現時点(2004年9月)においては6例の患者に施行している。今後さらに慎重に臨床研究、基礎研究を進めていき、多くの肝硬変、肝不全患者に役立つ治療法を開発したいと考えている。

本稿の発表する機会を与えて頂いた大阪大学大学院医学系研究科分子組織再生分野の松本邦夫先生に紙面を借り深謝いたします。

文 献

- 1) Theise, ND. *et al.*: Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* **32**: 11-16, 2000
- 2) Okamoto, R. *et al.*: Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat. Med.* **8**: 1011-1017, 2002
- 3) Sell, S.: Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology* **33**: 738-750, 2001
- 4) Grisham, JW. *et al.*: Liver stem cells. In: *Stem Cell*, ACADEMIC PRESS INC, Manchester, 1997, pp. 233-282
- 5) Lagasse, E. *et al.*: Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat. Med.* **6**: 1229-1234, 2000
- 6) Okabe, M. *et al.*: 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* **407**: 313-319, 1997
- 7) Terai, S. *et al.*: An *in vivo* model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J. Biochem. (Tokyo)* **134**: 551-558, 2003
- 8) McTaggart, RA. *et al.*: An uncomfortable silence em leader while we all search for a better reporter gene in adult stem cell biology. *Hepatology* **39**: 1143-1146, 2004
- 9) 寺井崇二ほか: 骨髄細胞から肝細胞への分化転換の制御機構の解析とその臨床応用—自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の基礎的検討—。 *G. I. Research* **12**: 117-125, 2004

- 10) Watanabe, T. *et al.* : SEK 1/MKK 4-mediated SAPK/JNK signaling participates in embryonic hepatoblast proliferation via a pathway different from NF-kappaB-induced anti-apoptosis. *Dev. Biol.* **250** : 332-347, 2002
- 11) Factor, VM. *et al.* : Origin and fate of oval cells in dipin-induced hepatocarcinogenesis in the mouse. *Am. J. Pathol.* **145** : 409-422, 1994
- 12) Krause, DS. *et al.* : Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* **105** : 369-377, 2001
- 13) Pittenger, MF. *et al.* : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284** : 143-147, 1999
- 14) Uchida, N. *et al.* : Transplantable hematopoietic stem cells in human fetal liver have a CD 34(+)side population(SP) phenotype. *J. Clin. Invest.* **108** : 1071-1077, 2001
- 15) Yamamoto, N. *et al.* : A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv 8, is useful for cell therapy to repair damaged liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313** : 1110-1118, 2004
- 16) Sakaida, I. *et al.* : Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* (in press)
- 17) Hamano, K. *et al.* : Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell implantation. *Ann. Thorac. Surg.* **73** : 1210-1215, 2002
- 18) Stamm, C. *et al.* : Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* **361** : 45-46, 2003

Down-regulation of matrix-invasive potential of human liver cancer cells by type I interferon and a histone deacetylase inhibitor sodium butyrate

FUMIHIKO KANEKO^{1,2}, HIDETSUGU SAITO¹, YOSHIMASA SAITO¹, KANJI WAKABAYASHI¹, NOBUHIRO NAKAMOTO¹, SHINICHIRO TADA¹, HIDEKAZU SUZUKI¹, SATOSHI TSUNEMATSU², NAOKI KUMAGAI² and HIROMASA ISHII¹

¹Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582; ²Liver Center, Department of Internal Medicine, Kitasato Institute Hospital, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8642, Japan

Received November 3, 2003; Accepted December 17, 2003

Abstract. We have demonstrated anti-proliferation and anti-metastasis effects of both interferon- α and a histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, on human liver cancer cell lines. In this study, invasive ability of human liver cancer cell lines through the matrix-coated membrane was examined and inhibitory effect of interferon- α and sodium butyrate was investigated. Among six human liver cancer cell lines, HLE and HLF showed high invasive ability using the Matrigel invasion assay. This invasion ability was significantly inhibited by pretreatment of the cells with 1000 IU/ml of interferon- α or 2 mM of sodium butyrate. Gelatin zymography and the matrix metalloproteinase-2 and -9 activity assay showed that these two cell lines produce active- and pro-matrix metalloproteinase-2 and -9, and their activity was significantly reduced by pretreatment with both agents. Real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction showed decrease in matrix metalloproteinase-1 mRNA levels by pretreatment with both agents, but mRNA levels of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and -2 were differently modulated by interferon- α and sodium butyrate. These results suggest that interferon- α and sodium butyrate reduce a chance of invasion and metastasis of human liver cancer cells by inhibiting matrix metalloproteinase activity, although its inhibitor is differently regulated.

Introduction

Human hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the malignant tumors prevalent world-wide. The number of patients with HCC is still increasing in Japan, especially that caused by chronic hepatitis C virus (HCV) infection. The incidence of HCC is higher in patients with chronic hepatitis C than in those with chronic hepatitis B and non-B, non-C including alcoholic (1). Epidemiological data suggest that there is a close correlation between duration of chronic HCV infection and incidence of hepatocarcinogenesis. HCV is a ribonucleic acid (RNA) virus that is not reverse transcribed to deoxy nucleic acid (DNA), and this virus does not invade into the nuclei and never achieve integration to host DNA. This virus by itself does not explain the molecular mechanism of hepatocarcinogenesis in chronic HCV infection. Genomic instability caused by HCV-related chronic inflammation may be the most important event in HCV-related carcinogenesis (2), because it takes a long time for development of HCC after initial infection of HCV and recent studies revealed that the relationship between duration of the infection, fibrosis of the liver, and HCC occurrence rate is very close (3,4), and moreover elimination of HCV resulted in reduction of HCC occurrence rate after then (5). Thus, the liver with chronic HCV infection is considered to be in a hypercarcinogenic state, the state in which genes are prone to mutation (6).

In such a hypercarcinogenic state, HCC develops all around the liver whether or not multiple HCC develops at the same time or at the different time, resulting in frequent recurrence of HCC after hepatic resection has occurred in the different regions (4). Since the high-risk situation of HCC development has been defined and we closely followed up the patients by the ultra sound and other diagnostic examinations, we can detect small HCC, <2 cm diameter. These observations, that the frequent recurrence of HCC and the detection of small HCC, lead hepatologists to treat HCC with local ablation modalities, such as percutaneous ethanol injection, microwave coagulation therapy, and radio

Correspondence to: Dr Hidetsugu Saito, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan
E-mail: hsaito@sc.itc.keio.ac.jp

Key words: invasion, matrix metalloproteinase, hepatocellular carcinoma, type I interferon, sodium butyrate

frequency ablation (7), unless liver transplantation is indicated. In advanced cases, transarterial chemo-embolization (TACE) is another effective therapeutic modality (8,9). These various therapeutic procedures have decreased death rate of this disease, but it is still insufficient and we have no sufficiently effective therapy for its metastasis to other organs. Recently chemo-adjuvant therapy using type I interferon (IFN) has been introduced and is shown to be effective in advanced cases (10-12). However, the contribution of this treatment to life expansion is still under investigation (13).

We have studied the chemopreventive effect of differentiation inducers for human HCC cells (14). Among them, type I IFN and sodium butyrate, one of histone deacetylase (HDAC) inhibitors, were the most effective agents (15). Type I IFN can induce apoptosis of human HCC cells (16), and if the cell is not sensitive for apoptosis (17), cell cycle arrest is induced by IFN, resulting in reduction of cell proliferation and decrease in malignant phenotypes, probably according to the genomic polymorphisms (18,19). On the other hand, butyrate is a 4-carbon short fatty acid, which is a fermented product, and an HDAC inhibitor, which changes genomic transcription epigenetically. Recent studies showed that epigenetic changes such as DNA methylation in CpG islands of some oncogenes and histone acetylation are important in hepatocarcinogenesis (20).

These two agents, IFN and butyrate, similarly reduced HCC cell proliferation with increase in albumin production and decrease in α -fetoprotein production (15,21). These also similarly reduced *c-myc* expression (22,23), telomerase activity (24), and a metastasis potential of HCC cells by increasing expression of cell-cell adhesion molecules E-cadherin and β -catenin (25). Thus, these two agents may affect another malignant potential of HCC, invasion ability, but little is known about this characteristic so far. It was demonstrated that human HCC cells require matrix metalloproteinases (MMP) activity for migration and invasion (26). In the present study, to investigate the effect of type I IFN and sodium butyrate on invasive potential of human HCC cells, the matrix-coated gel invasion assay was performed and effect of IFN and butyrate on the production of MMP-1, -2 and -9 or tissue inhibitor of MMP (TIMP)-1 and 2 from HCC cells were examined. Thus, we investigated possible chemopreventive effect of the agent and its mechanisms in human HCC.

Materials and methods

Cells. Human HCC cell lines, HLE, HLF (27), HepG2, PLC/PRF/5, HCC-T (28) and HCC-M (29) were used in this study as described elsewhere (30). HCC-T and HCC-M were cultured in RPMI-1640 (Nissui Seiyaku, Tokyo, Japan) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY), 100 IU/ml of penicillin (Gibco) and 100 μ g/ml of streptomycin (Gibco). HLE, HLF, HepG2 and PLC/PRF/5 were cultured in Eagle's modified essential medium (Nissui Seiyaku) supplemented with the same agents. These cells were cultured at 37°C in the 5% CO₂ incubator and the medium was changed every two days.

Detection of apoptosis. To confirm that the treated cells were not dead, we observed morphologic aspect of the cell and further performed terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) assay in the same experimental condition. The procedure of TUNEL assay has already been described (31).

Cell mobility assay. Since cell mobility is concerned to cancer cell invasion and metastasis, we tried to quantitatively measure the cell mobility and evaluate the effect of IFN- α and sodium butyrate using an inverted phase-contrast microscope (Nikon TMD300, Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a digital time-lapse image analyzing system (Aquacosmos, version 2.0, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan). The image of the cell was digitally recorded before the application of the test drug (0 h) and every 30 min after the start of the test drug for 2 days under the cell culture conditions. Collected 97 digital images were analyzed by a digital image analyzer.

Matrigel invasion assay. *In vitro* invasive potential of cancer cells was assayed using the Biocoat Matrigel Invasion Chamber (32) (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA). Human HCC cells (5×10^4) were seeded onto the upper chamber of double-structured matrix gel chamber with 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan) and the conditioned culture supernatant of NIH/3T3 cells, which was obtained from serum-free culture, was added to the lower chamber as a chemo-attractant. In this assay system, the cancer cells dissolve the matrix gel consisting of laminin, collagen type IV, heparan sulfate, proteoglycan, entactin and invade into 8 μ m small holes, and appear on the lower surface of the membrane. The cells were cultured in this matrix gel chamber at 37°C for 24 h in a CO₂ incubator and were fixed with 100% methanol and Giemsa stained. The cells on the upper portion of the matrix membrane were wiped off with cotton tips and cells on the other side of this membrane were observed by a phase-contrast microscopy. Number of invaded cells was counted in randomly selected 5 observation fields in a membrane at 100-fold magnification.

Treatment of HCC cell lines with IFN- α and sodium butyrate. Cancer cells were cultured in culture disks with natural IFN- α (Sumiferon®, Sumitomo Pharmaceutical Co., Osaka, Japan) at 1×10^2 IU/ml and 1×10^3 IU/ml or 2 mM of sodium butyrate (Sigma-Aldrich Japan) for 7 days. The medium was changed every 2 days. We selected the dose of sodium butyrate according to our preliminary experiments, which showed that 2 mM concentration of sodium butyrate induced HCC cells to significant reduction of their proliferation without inducing apoptosis. In some cell lines, increase in albumin production and reduction of α -fetoprotein production was induced in this concentration.

Gelatin zymography. HLE and HLF cells were cultured as described above with and without IFN or sodium butyrate for 7 days until the culture disk became confluent. The cells were recovered and washed 3 times with PBS and further cultured in serum-free medium for 48 h, and then the culture supernatant was obtained. The culture supernatant was concentrated with Centricon-10 (Millipore Co., Billerica,

MA) to 10-fold concentration, and this concentrated medium was used as the conditioned medium. The protein concentration in each medium was determined using the Bio-Rad DC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Gelatinase activity in the conditioned medium was assessed by gelatin zymography following the methods described elsewhere (33). The conditioned medium which contained equal amounts of protein (10 µg) and the same volume of sample buffer (0.3 M Tris-HCl pH 6.8, 40% glycerol, 2% (w/v) SDS, 0.1% bromophenol blue) was mixed and incubated at 37°C for 30 min. The sample was electrophoresed on 9% SDS polyacrylamid gel containing 1% gelatin at 4°C at 30 mA. The gel was washed with 2.5% Triton X-100 twice and was incubated at 37°C for 15-18 h in TNC (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl, 10 mM CaCl₂) and was stained with Coomassie brilliant blue-R, followed by destaining with 5% isopropanol and 8% acetic acid.

Matrix metalloproteinase -2, and -9 activity assay. To investigate the mechanism of matrigel invasion and the effect of IFN and sodium butyrate, active form of MMP-2 and 9 was measured by the matrix metalloproteinase-2, and -9 activity assay system (34) (Amersham Bioscience Corp., Piscataway, NJ). The culture supernatant was obtained according to the procedure described above and was diluted 10-fold. This conditioned supernatant was applied to the measurement system. The procedure was achieved according to the instructions supplied by the manufacturer. The assay uses the pro-form of a detection enzyme that can be activated by capturing active MMP-2 or -9 and changes into an active detection enzyme. The MMP-activated detection enzyme was quantitatively measured using a specific chromogenic peptide substrate. The resultant color was read at 405 nm in a microtiter plate spectrophotometer. The concentration of active MMP-2 or -9 in the conditioned medium was determined by interpolation from a standard curve.

Effect of IFN and butyrate on the expression of MMP-1 and TIMP-1, -2. RNA was extracted from cancer cells with a modified acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method using Isogen (Nippon gene Co., Tokyo, Japan).

cDNA was synthesized from 5 µg of mRNA using ProSTAR™ First-Strand RT-PCR Kit (Stratagene, La Jolla, CA). The procedure was achieved according to the instructions supplied by the manufacturer. cDNA was labeled with SYBR Green during PCR (1 µl cDNA, 2X SYBR Green PCR Master Mix, each 5 pmol/µl of forward and backward primers; total 50 µl). PCR was performed and the products were detected using ABI PRISM 7700 detection system (Applied Biosystem, Foster City, CA). Reaction started at 50°C for 2 min and at 95°C for 10 min, and then 95°C 15 sec and 60°C 1 min for 40 cycles. A human fibrosarcoma-derived cell line HT-1080 was used as a calibration sample, and expression of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA was used as an internal control. The primers used in this study were as follows: MMP-1 (35): forward, 5-CGG-TTT-TTC-AAA-GGG-AAT-AAG-TAC-T-3 (1092-2016); reverse, 5-TCA-GAA-AGA-GCA-GCA-TCGA-TATG-3 (1219-1197); TIMP-1 (36): forward, 5-TGC-CGC-

ATC-GCC-GAG-AT-3 (14-30); reverse, 5-ATG-GTG-GGT-TCT-CTG-GTG-3 (64-47); TIMP-2 (36): forward, 5-CAC-CAG-GCC-AAG-TTC-TTC-3 (858- 875); reverse, 5-CGG-TAC-CAC-GCA-CAG-GA-3 (916-900); GAPDH: forward, 5-GAA-GGT-GAA-GGT-CGG-AGT-C-3; reverse, 5-GAA-GAT-GGT-GAT-GGG-ATT-TC-3.

Statistical analysis. The data were expressed as mean ± SD. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney's U test and p<0.05 was estimated to be significant.

Results

Morphological change of HLE and HLF treated with natural IFN-α and sodium butyrate. As the result of treatment with natural IFN-α and sodium butyrate, the shape and size of HLE and HLF cells were changed. With treatment of IFN-α 1000 U/ml for 7 days, the size of the cells became slightly larger and round-shaped, although hardly changed at 100 U/ml of IFN-α. On the other hand, with treatment of 2 mM sodium butyrate, the size of the cells became larger than that stimulated by IFN-α, especially nuclear size of each cell became larger (Fig. 1). The shape of HLF changed similarly with those of HLE. Apoptosis seemed not to occur in these cells during 7-day culture morphologically and TUNEL assay confirmed that apoptosis was not detected in this culture condition.

Mobility of the HCC cells. The mobility of HCC cells was quantitatively analyzed by digital image analyzer described in Materials and methods. In 2-day culture, HCC cells did not move enough in the observation field for evaluation of the effect of IFN-α and sodium butyrate by this system (data not shown). Therefore, invasion ability of HCC cells should be assayed by other procedures such as the Matrigel assay.

Effect of natural IFN-α and sodium butyrate on the Matrigel invasion activity of human HCC cells. Invasion activity through Matrigel of six human HCC cell lines was examined using Matrigel invasion assay. Invasion activity of HLE and HLF was high but that of other cell lines was very low (HLE, 160±38; HLF, 126±16; HCC-T, 4±2; HCC-M, 13±3; HepG2, 8±7; PLC/PRF/5, 7±6; the number indicated the number of cells invaded into Matrigel, went through small holes, and appeared on the other side of membrane) (Fig. 2). From this result, following experiments were performed using HLE and HLF. These two cell lines were treated with 100 IU/ml and 1000 IU/ml of IFN-α and 2 mM of sodium butyrate for 7 days, and the treated cells were applied on the Matrigel invasion assay. Although 100 IU/ml of IFN-α did not affect invasive ability of two human HCC cells, 1000 IU/ml of IFN-α and 2 mM of sodium butyrate significantly decreased invasive activity of these cell lines [HLE: control vs. IFN-treatment (1000 IU/ml), p=0.0018; control vs. SB-treatment, p=0.0041; HLF: control vs. IFN-treatment (1000 IU/ml), p=0.0070; control vs. SB-treatment, p=0.0022; Mann-Whitney's U test] (Fig. 3).

Effect of natural IFN-α and sodium butyrate on MMP-2 and -9 enzymic activities of human HCC cells. Gelatin zymography

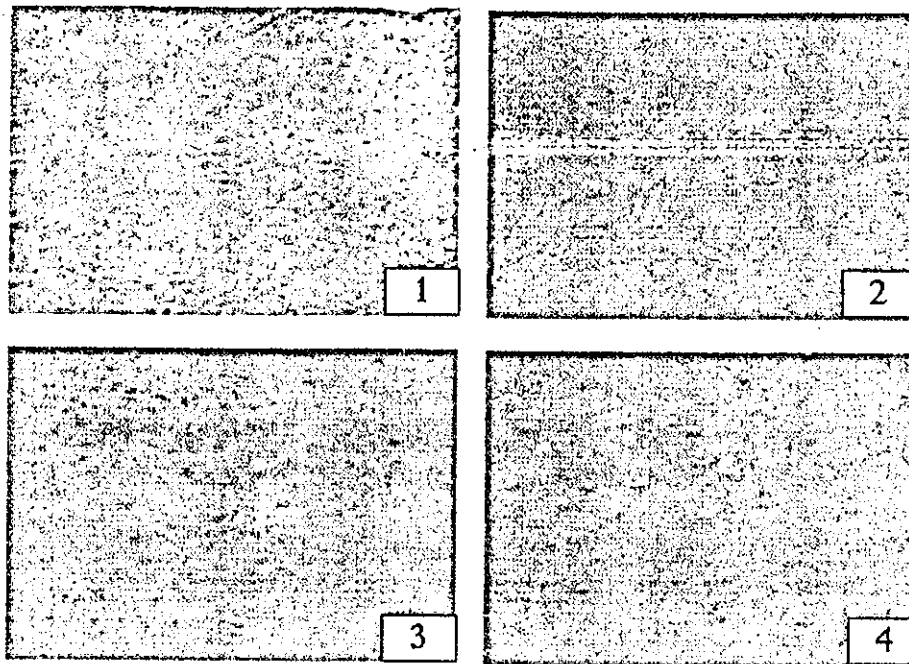


Figure 1. Morphologic change of HLE cells treated with natural IFN- α and sodium butyrate. As the result of treatment with natural IFN- α and sodium butyrate, the shape and size of HLE cells were changed. With the treatment of 1000 IU/ml of IFN- α for 7 days, the size of HLE cell became slightly larger and the morphology was round-shaped, although it hardly changed with 100 IU/ml of IFN- α . The treatment of HLE cells with 2 mM sodium butyrate changed the shape of cells more than that stimulated by IFN- α . Nucleic size of HLE cells became larger. 1, Control; 2, Cells treated with 100 IU/ml of IFN- α for 7 days; 3, Cells treated with 1000 IU/ml of IFN- α for 7 days; 4, Cells treated with 2 mM of sodium butyrate for 7 days. Original magnification $\times 100$.

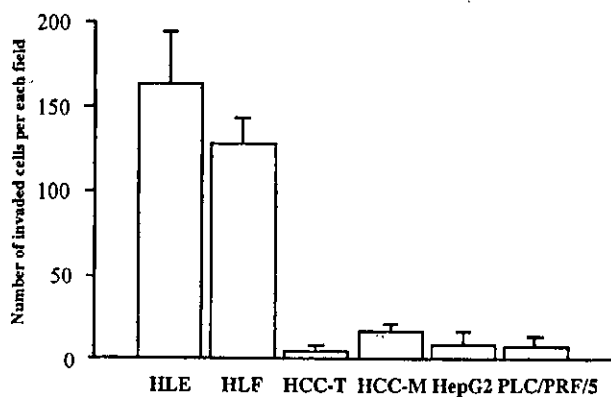


Figure 2. The morphometric analysis of the number of cells invaded from the upper-side chamber to the lower-side chamber in six human HCC cell lines. Invasion through Matrigel of HLE, HLF, HCC-T, HCC-M, HepG2 and PLC/PRF/5 was assayed using the Biocoat Matrigel Invasion Chamber. The cancer cells invade into the Matrigel, and appear on the lower surface of the Matrigel membrane. The number of invaded cells was counted in randomly selected 5 fields in every experiment ($n=5$).

showed that pro-MMP-2 and 9, and active MMP-2 and -9 were detected in the culture supernatants of both HLE and HLF. In HLE cells, production of MMP-2 was higher than that of MMP-9, and HLF produced much more MMP-9 than MMP-2. The culture supernatants of HLE and HLF treated with IFN- α (1000 IU/ml) and sodium butyrate (2 mM) for

7 days showed significant reduction of pro- and active-MMPs production in both cell lines. Especially MMP-2 activity almost disappeared by gelatin zymography in both cell lines (Fig. 4).

Effect of natural IFN- α and sodium butyrate on MMP-2 and -9 activities. Effect of agents on MMP activity was further examined using the MMP activity assay, which can detect active-form of MMP-2 and MMP-9. Active MMP-2 levels in HLE and HLF were 1.3 ± 0.2 ng/ml and 0.5 ± 0.2 ng/ml, respectively, in their control culture conditions. Active MMP-9 levels in HLE and HLF were 0.7 ± 0.3 ng/ml and 1.2 ± 0.3 ng/ml, respectively, in their control culture conditions. These levels almost disappeared by treatment with both IFN- α and sodium butyrate (Fig. 5).

Real-time quantitative RT-PCR assay. Effect of IFN- α and sodium butyrate on transcription of the MMP family and its counterpart, TIMP-1 and -2 was examined by real-time RT-PCR. The production of MMP-1 that dissolves type I collagen and promotes cancer cell invasion into its surrounding tissue was more or less inhibited by both agents. The mRNA levels of MMP-1 were slightly decreased by stimulation with 1000 IU/ml of IFN- α , and were significantly reduced by treatment with 2 mM of sodium butyrate. On the other hand, the agents variously changed the production of TIMP that inhibits MMP activity. The mRNA levels of TIMP-1 and TIMP-2, which are counterpart enzymes of MMP, were significantly increased by IFN- α ($p < 0.01$, Mann-Whitney's U test) and slightly decreased by sodium butyrate (Fig. 6).

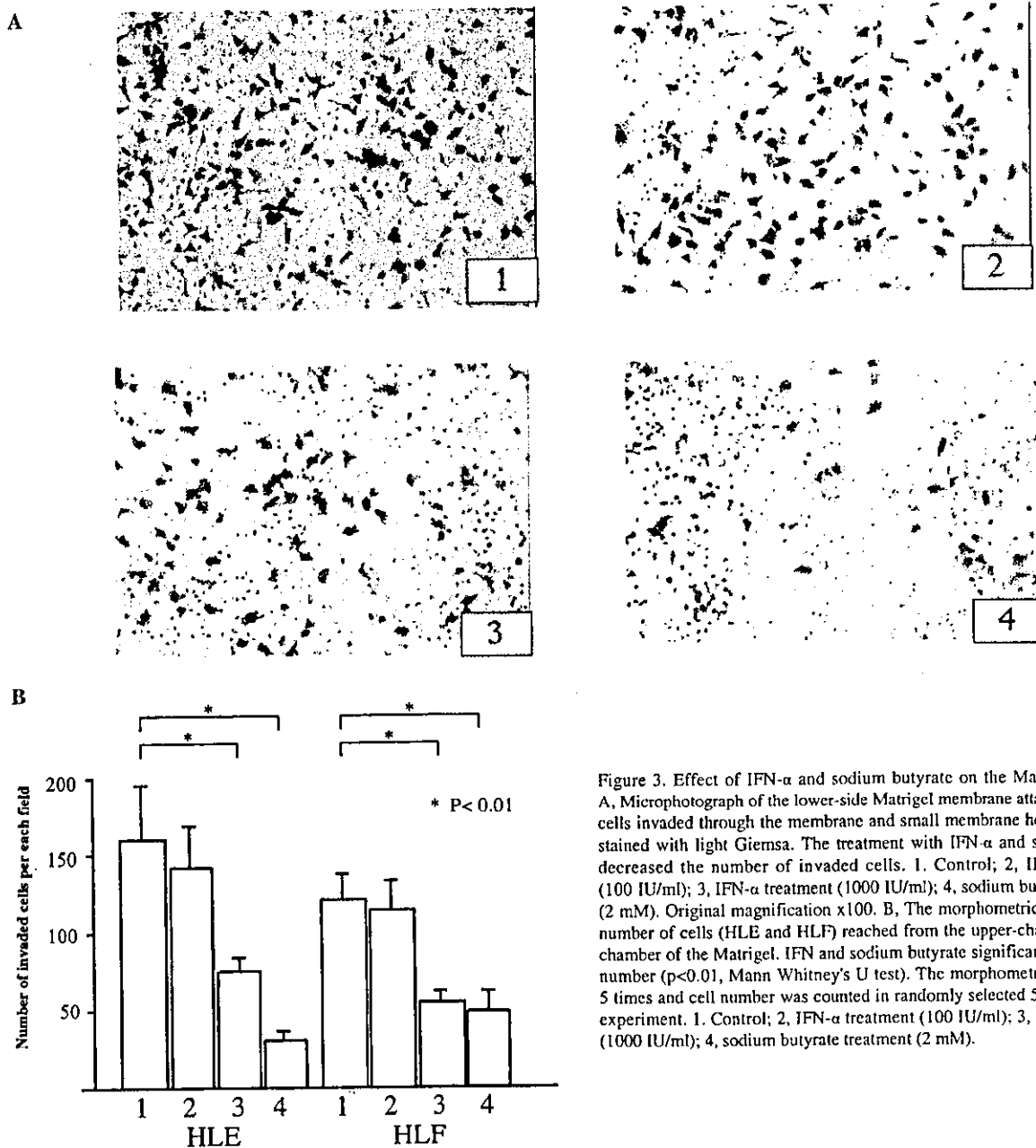


Figure 3. Effect of IFN- α and sodium butyrate on the Matrigel invasion. **A.** Microphotograph of the lower-side Matrigel membrane attached with HLE cells invaded through the membrane and small membrane holes. Cells were stained with light Giemsa. The treatment with IFN- α and sodium butyrate decreased the number of invaded cells. 1. Control; 2, IFN- α treatment (100 IU/ml); 3, IFN- α treatment (1000 IU/ml); 4, sodium butyrate treatment (2 mM). Original magnification $\times 100$. **B.** The morphometric analysis of the number of cells (HLE and HLF) reached from the upper-chamber to lower-chamber of the Matrigel. IFN and sodium butyrate significantly reduced the number ($p < 0.01$, Mann Whitney's U test). The morphometry was achieved 5 times and cell number was counted in randomly selected 5 fields in every experiment. 1. Control; 2, IFN- α treatment (100 IU/ml); 3, IFN- α treatment (1000 IU/ml); 4, sodium butyrate treatment (2 mM).

Discussion

This study demonstrated that both IFN- α and sodium butyrate are potent inhibitors of malignancy of human HCC, especially of cellular invasive activity. Type I IFN has various anti-cancer activities, such as anti-proliferative activity, immunomodulatory activity, and anti-angiogenic activity (37), in addition to anti-viral activity, and it has been clinically used in patients with renal cell carcinoma, multiple myeloma, chronic myelocytic leukemia, and hairy cell leukemia. Anti-malignant effect of IFN has been also reported in HCC. IFN induces apoptosis of human HCC cells (16), in case HCC cells are not resistant to apoptotic stimulation. Anti-apoptotic Bcl-2 family proteins may play an important role in this resistance (17,31,38,39). In this study, apoptosis was not

induced and various aspects induced by IFN- α and sodium butyrate were confirmed not to be affected by apoptosis. *In vitro* studies demonstrated its anti-proliferative activity by inducing apoptosis or cell-cycle S-phase arrest. This cell-cycle arrest is considered to be due to p21/WAF1 induction and inhibition of cyclin A and B, which sequentially reduces cdk2 and cdc2 activities (30,40,41). Type I IFN was also demonstrated to inhibit angiogenesis of tumor vessels in nude mouse models (42,43). In addition, our previous studies demonstrated that IFN has an anti-metastasis effect by increasing cell-cell adhesion formed by E-cadherin and β -catenin (25). Furthermore, telomerase activity was reduced and the present study demonstrated that IFN inhibits cancer cell invasion and metastasis by reducing MMP production of HCC cells. These observations confirm the