

10. 超音波分子イメージング装置に関する研究

分担研究者	伊藤貴司	アロカ（株）研究所	主幹研究員
分担研究者	射谷和徳	アロカ（株）研究所	主任研究員
分担研究者	宮坂好一	アロカ（株）研究所	主任研究員
分担研究者	小倉 玄	アロカ（株）研究所	課員
協力研究者	今野剛人	アロカ（株）研究所	研究員

研究要旨：本研究では、悪性度の高い癌に高頻度で発現する CD147 分子をターゲットとして、超音波診断法によってきわめて早期に悪性腫瘍を診断し、あわせて治療するシステムの開発を目指している。そのため、超音波の優れた造影剤であるマイクロ・ナノサイズの微小気泡に、抗 CD147 抗体を標識した分子プローブを開発する。悪性腫瘍に特異的に集積された分子プローブを、超音波によって高感度にイメージングするための要素技術を開発する。

A. 研究目的

マイクロ・ナノサイズの微小気泡は、気体が圧縮・膨張性が非常に高いため、超音波に対して優れた造影効果を有する。マイクロ・ナノサイズの微小気泡体に、癌の浸潤マーカーである CD147 を認識する分子をラベルした超音波用分子プローブを開発する。悪性腫瘍に特異的に集積した分子プローブを超音波で画像化することで良性／悪性の区別も含めた悪性腫瘍の超早期診断技術を開発する。18 年度では、生体適合性・安定性に優れたマイクロ・ナノサイズの微小気泡の生成、微小気泡の高感度検出技術、in vitro 及び in vivo でのバブル検出感度の評価技術を開発する。

B. 研究方法

18 年度は、主に 4 つの項目について検討を行う。

① マイクロバブルの音響特性の測定

1 μ m 以下のバブルを高効率で発生させるために技術改良を行う。具体的には、多孔質ガラスを利用した方法を検討する。

② 検出感度の基礎検討

新規開発した高性能な界面活性剤をベースに、その非線形振動特性を測定する。また、測定結果とシミュレーションによる解析を比較し、

非線形振動特性に係わるバブルのパラメータを明らかにする。

③ 超音波3次元ファントムの作製

ファントムに装着する超音波プローブと装着道具を準備する。

④ 超音波3次元ファントムによる検出感度実験

3次元ファントム内に配置されたマイクロバブルの検出感度の基礎検討を行う。

C. 研究成果

① マイクロバブルの音響特性の測定

生体適合性に優れたシクロアミロース修飾界面活性剤とタウリン誘導重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤の 2 種類の新規界面活性剤を用いて、多孔質ガラス方式や超音波分散方式によるバブル発生技術を開発した。多孔質ガラス方式 (図 1-1) では、タウリン誘導重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤を用いて、粒径 600 nm の単分散のバブルの生成を確認した (図 1-2)。

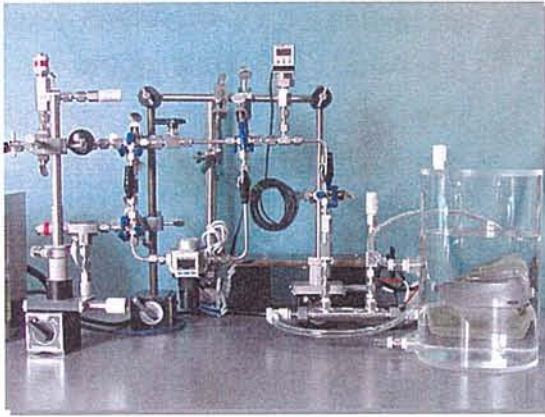


図 1-1 多孔質ガラスバブル発生装置

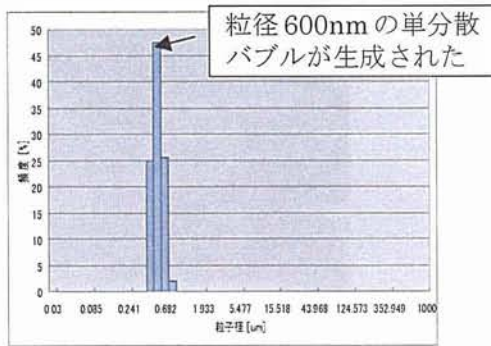


図 1-2 バブル粒径分布

また、チェンバー内にマイクロバブルを環流し、音圧、周波数、波形等の異なる種々の超音波を照射し、バブルから返ってくる反射エコーを受信してその音響特性を測定した。シクロアミロース修飾界面活性剤を用いたマイクロバブルでは、組織伝搬中に比べ、約 10 dB 高い非線形信号が検出され、非線形振動を利用した高感度画像化技術の実現が示唆された (図 2)。

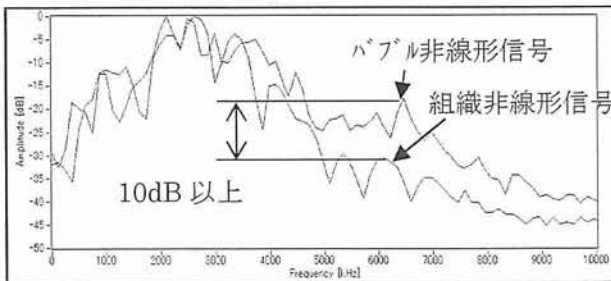
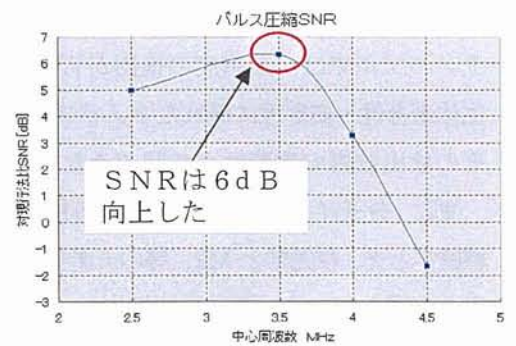


図 2 バブル非線形特性の測定

② 検出感度の基礎検討

レーダー技術で利用されている FMCW 法やパルス圧縮法等を応用した低音圧の長パルス信号を用いた検出方法の検討を進めた。組織伝搬中に発生する非線形振動の低音圧化による抑制効果を検証するために、KZK 方程式を用いた超音波ビームの伝搬シミュレータを作成し、17 年度に作成したバブル振動シミュレータと結合した。その結果、バブルで発生する信号 S と組織から反射するノイズ N を解析的に求めることが可能となった。

パルス圧縮法による検出感度のシミュレーション結果では、チャープ信号の中心周波数をバブル共振周波数に合わせると高い SNR が得られた。このことは、バブルの基本特性として、低音圧長パルス信号による非線形振動の検出方法では、粒径分布の均一性が重要であると示唆している。非線形振動特性に優れた均一バブルとパルス圧縮法とを組み合わせれば、従来法に比べ 6dB の検出感度向上が期待でき、また、1mm 以下の高い解像度が得られる (図 3)。



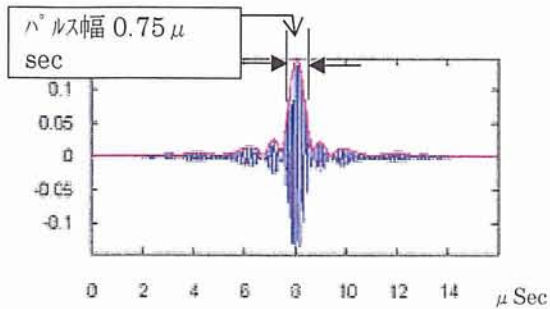


図3 シミュレーションによる検出感度/解像度評価

超音波やナノ粒子を利用した分子イメージング技術の技術動向を調査するために、ハワイで開催された国際分子イメージング学会 (SMI) に参加した。超音波とバブルの組合せは、ドラッグ・デリバリー・システムや遺伝子治療等の治療応用が可能であり、将来の臨床において、その重要性・独自性がより高まるとの見解が示された。また、海外においても、生体内での動態特性に優れているナノサイズの粒子を利用したイメージング技術の研究が進んでいるが、超音波技術で報告されたナノ粒子は、収縮性に優れた液体を内包したもので、気体を内包したバブルではなかった。気体は液体に比べ、その収縮性が3桁以上高く超音波に対して強く反応するため、ナノバブルでは、高感度の検出が可能となる。生体適合性・安定性に優れたナノバブルの生成とその検出技術の重要性が確認できた。

更に、分子イメージング技術の応用において、核医学と光、核医学とMR、等のモダリティー間の融合が進んでいる。超音波技術では、バブルとの組合せによって効果的に超音波の熱及び振動エネルギーを供給できるという特徴があり、他の技術との組合せが期待される。光技術との融合を目指した画像形成方法について、特許を出願した。

③ 超音波3次元ファントムの作製

RFB (ラジアル・フロー・バイリアクター) 内の $1 \mu\text{m}$ 以下の小さいバブルの非線形信号の

検出を目的として、中心周波数 15MHz の振動子を組み込んだ高周波用超音波プローブを試作した。また、超音波プローブをRFBに装着するためのアダプターを作製した。

④ 超音波3次元ファントムによる検出感度実験

RFB 内に市販のマイクロバブルを環流し、超音波診断装置でその動態を観察した (図4)。

また、15MHz の高周波用超音波プローブを用いて、担癌マウスの腫瘍を観察した (図5)。

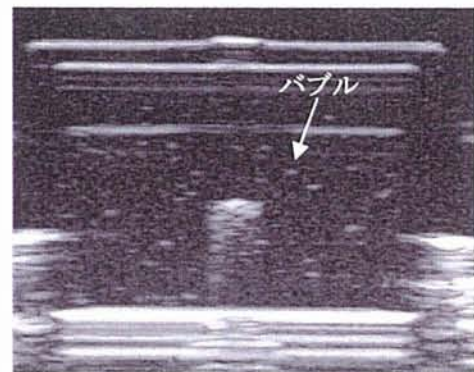


図4 RFB 内のバブルの観察

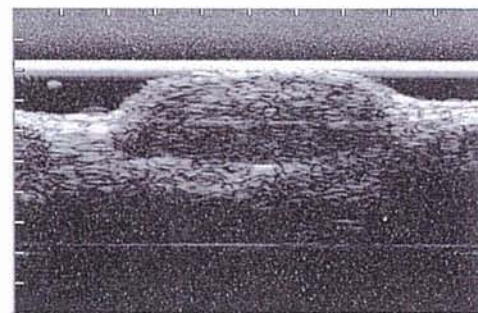


図5 高周波プローブによる腫瘍の観察

D. 考察

多孔質ガラス方式によるバブル発生方法では、ガラスの細孔径によって生成されるバブルの直径が制御される。ナノ微細加工技術を応用し、人工的により微細な孔を作製することで、500nm 以下のバブルの生成が期待される。

低音圧長パルスを利用することで、検出感度の向上が期待される。そのためにも、単分散の

バブルの生成が重要である。

超音波とバブルの組合せ技術は、将来DDS等への治療応用への展開が見込まれる。

E. 結論

マイクロ・ナノサイズの微小気泡の生成、微小気泡の高感度検出技術、in vitro 及び in vivo でのバブル検出感度の評価技術等の基礎検討を完了した。

19年度では、マイクロ・ナノバブルに抗CD147抗体を標識した分子プローブと、小動物用高感度画像化実験装置を試作する。In vitro 3次元腫瘍モデルや担癌動物を用いて、超音波分子イメージング技術による悪性腫瘍の早期診断技術について評価する。

F. 健康危険情報

総括報告書にまとめて記載。

G. 研究発表

1. 発表

1-1) 射谷和徳、伊藤貴司、今野剛人 “ラベル化造影剤を用いた超音波によるがんの超早期診断システムの研究開発に係る先導研究” 第1回 ナノバイオテクノロジー連携群 成果報告会
平成18年12月21日

H. 知的財産権の出願状況

1. 特許取得

1-1) 射谷和徳・伊藤貴司・今野剛人・特願2006-135178・気泡検出装置・アロカ株式会社
1-2) 射谷和徳・大川清・松浦知和・阿部正彦・特願2006-333792・画像形成システム・アロカ株式会社

1.1. 分子イメージング用マイクロバブル材料である界面活性剤の 生体への影響に関する研究

分担研究者 日下部守昭 (財)動物繁殖研究所 主席研究員

研究要旨：静脈内に投与したマイクロバブルは、癌組織に取り込まれその造影剤として機能するが、やがて崩壊して血液内にその成分が溶解する。しかし、マイクロバブルの主成分である界面活性剤自体が直ぐに代謝される訳ではない。そこでマイクロバブル投与後、代謝されるまでの間に界面活性剤が生体にどのような影響を及ぼすのかを、マウス静脈内にシクロアミロース修飾界面活性剤、重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤及びその他の界面活性剤を投与し、定期的な血清生化学検査及び病理組織観察を行って活性剤の影響を解析した。

A. 研究目的

シクロアミロースとジェミニ型界面活性剤はその生体親和性から新たなマイクロバブル材料として期待されている。シクロアミロースラウレートは高い親水性、優れた表面張力低下能を有する上に高い生分解性を持っている。一方、ジェミニ型界面活性剤は通常の一鎖一親水基型の界面活性剤二分子がスペーサーにより親水基もしくはその近傍で連結された構造を有する界面活性剤であり、通常の界面活性剤に比べて界面活性能が格段に優れ、少量の添加で優れた機能性を持っている。これらの界面活性剤は共に分子イメージング用マイクロバブル材料として有望な性質を有している。

本年度の研究目的は、マイクロバブル作成の材料として検討されているシクロアミロース修飾界面活性剤と重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤PBS(-)を投与した際の生体への影響を検証することである。そのために、これらの界面活性剤をマウス

静脈内に投与し、定期的な血清生化学検査及び病理組織観察によって影響を解析することである。

B. 研究方法

投与用界面活性剤 (括弧内は、投与量)

- ① シクロアミロース修飾界面活性剤
(200 μ L/マウス)
PBS(-)に0.005 mol/L濃度に溶解
- ② タウリン誘導重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤 (200 μ L/マウス)
PBS(-)で0.0008 mol/L濃度に溶解
- ③ SDS水溶液 (200 μ L/マウス)
蒸留水に0.032 mol/L濃度に溶解
- ④ シクロアミロース修飾界面活性剤
(200 μ L/マウス)
PBS(-)で0.00008 mol/L濃度に溶解
- ⑤ シクロアミロース修飾界面活性剤
(30%グリセリン) (200 μ L/マウス)
PBS(-)で0.00008 mol/L濃度に溶解
- ⑥ 重合性ジェミニ型陽イオン界面活性剤
(雄100 μ L/マウス・雌50 μ L/マウス)
PBS(-)で0.002 mol/Lに溶解

採血：ジエチルエーテル麻酔下で、尾静脈から100 μ Lを採血した。採血直後から血液は遮光箱中、常温で1~2時間静置後、4 $^{\circ}$ Cに設定した冷却遠心機にて3000rpmで15分間遠心し、血清を採取した。採取した血清は、使用時まで-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。

測定法：本研究で血清生化学検査に使用した測定キットはヒト用に作られたものであるため、マウスの血清を測定するに当たり、採取できる血清量に合わせてスケールダウンする必要がある。そのため、マウスに影響を与えない1回の採血量を100 μ Lとし、そこから得られる血清量はおよそ40 μ Lであるので、この血清量で全ての検査が出来るよう、1回の測定当たりのサンプル量を各々1 μ Lで出来るよう各キットを調整した。以下に測定法を簡単に述べる。まず、イオン交換水で各キットの標準液を段階希釈し、各キットで指定された発色方法に従い発色させ、分光光度計で測定した。測定した標準液の吸光度を用いてスタンダードカーブを作成した。次に、-80 $^{\circ}$ Cから取り出した血清を遮光し解凍した。各サンプルを同様に反応させた後、その吸光度を測定し、その値から標準曲線から作成した計算式に当てはめ各サンプルの濃度を求めた。

臓器重量測定：マウスをエーテル麻酔し、体重を測定後、尾静脈から採血した。その後、腋下動脈を切断してマウスを失血死させた。その後、肺、肝臓、脾臓、心臓、腎臓を剖出し秤量した。

組織観察：各臓器は、秤量後、剃刀で切れ目をいれて、0.1MNaリン酸緩衝液(pH7.2)で緩衝した4%パラホルムアルデヒド固定液にて

浸漬固定した。固定後、トリミング、リンス、アルコール脱水を行い、ポリエステルワックスに包埋した。4 μ mで薄切した。切片は、ヘマトキシリン・エオジン染色後、顕微鏡にて観察した。

C. 研究結果：

1) 各界面活性剤投与後のマウスの反応

- ・ SDS (200 μ L) : 個体は元気であった。
- ・ 低濃度シクロアミロース (200 μ L) : 外見に目立った異常は認められず、元気に動き回る。
- ・ 低濃度シクロアミロース+グリセロール (200 μ L) : 投与後すぐにかんりの昏睡状態に陥る。(10分以上) 途中、顔に風を送ると反応はするが、意識が戻ってきてからも回復までに時間がかかる。♂6匹中1匹、♀5匹中1匹がそのまま失禁して死亡した。翌日、残りの個体自体は元気に動き回る。
- ・ 重合性ジェミニ型陽イオン界面活性剤：
雄 (200 μ L) 投与個体は、投与後、直ぐに回復し、5~10分程度動き回るが、しばらくしてから昏睡状態に入り、10分以上一息があるが血色を失っていき突発的な行動とともに死亡した。5匹中5匹が死亡。
雄 (100 μ L) 投与個体は、30分程度大きく肩でゆっくりと息をし、意識はあるものうづくまったままの個体が2/5匹であった。その後、徐々に呼吸が安定し1時間程度で回復をみた。残りの個体は別段と変化がなく、投与直後から動き回っていた。
雌 (200 μ L) 投与個体は、雄ほど回復せず、すぐに昏睡状態となって死亡した。
雌 (100 μ L) 投与個体は、5分程度動き回ったが、しばらくしてから昏睡状態に入り、5分程度で血色を失っていき死亡した。
雌 (50 μ L) 投与個体は、しばらくうづくまったが、5分程度で回復し、元気に動き回る。

PBS：投与後、個体の回復は早い。すぐに動き始め、目立った症状も認められない。外見に目立った異常は認められず、元気に動き回る。

2) 高濃度シクロアミロース投与群では、その有意な変動の見られる時期に雌雄差が見られた。雄では、コレステロール、尿素窒素、総ビリルビン及び直接ビリルビンの値に見られるように、投与3日目で急性の反応が観察でき、雌の反応よりも早期に起こることが観察できた。雌のこれらの値は、上昇傾向は見られるものの統計的には有意ではなかった。また、雌の間接ビリルビンの反応は投与初期に上昇しており、溶血によるものと考えられる。コレステロール、グルコースとアルブミンは、雌で14日目に有意な変化が見られた後、21日目には全て正常値へと回復していた。しかし、78日目でも、雄のアルブミン値の有意な下降及び雌の尿素窒素値の有意な上昇が観察された。

一方、78日目に剖検したところ、これらのマウスの体重、腎臓、肝臓、肺、脾臓及び心臓の相対重量に有意な差はなかった。また、各組織には、顕著な変化が観察できなかった。

以上の結果から、本界面活性剤による生体への影響は低いものと考ええる。

3) 低濃度シクロアミロース投与では、雌における影響は殆ど観察できなかった。雄では、尿素窒素（上昇）、アルブミン（上昇）、間接ビリルビン（上昇）、コレステロール（下降）及びグルコース（下降）における有意な値の変動が見られるものの、雌では有意な変動は殆ど観察できなかった。溶血と思われる間接ビリルビンの上昇も雄で見られ

ただけであった。

一方、63日目に剖検したところ、雄の肺の相対重量が有意に ($p < 0.0213$) 減少していたが、その他の臓器の相対重量には有意差を検出しなかった。また、各組織には、顕著な病変は見られないものの、肝臓で、空砲を持つ肝細胞が散見できた。以上の結果から、本界面活性剤による生体への影響は低いものと考ええる。

4) 低濃度シクロアミロース (30%グリセリン) は、マイクロバブルの持続の為に30%グリセリンを調合したものである。この界面活性剤の投与直後、マウスは、エーテル麻酔からの覚醒が遅く、数匹がそのまま死亡した。しかし、雄のグルコース値の7日目までの有意な下降、14日目におけるアルブミン値の上昇以外には、特に変化は見られなかった。雌でも7日目の尿素窒素の上昇以外は、特に変化は観察できなかった。

一方、63日目に剖検したところ、雄の腎臓の相対重量が減少していた ($p < 0.0054$)。また、組織解析では、肝臓において空砲を持つ肝細胞が散見されるものの、その数は極めて少なかった。また、一部個体で肺の動脈周囲に出血を観察した。以上の結果から、本界面活性剤の毒性は、低いものと思われるが、投与直後のマウスへの影響から更なる検査を行う必要があると考ええる。

5) タウリン誘導重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤投与では、投与後マウスの死亡はなかった。雌の総ビリルビンが7日目に有意になる他は、雄では、14日目にグルコース、総合及び直接ビリルビンに有意な上昇が見られ、雌では、アルブミン（上昇）、グルコース（上昇）、コレステロール（上昇）、尿素窒素（下降）に有意な変動が

見られた。しかし、雌雄とも有意な変動が観察できたのは、14日目以降であった。21日目の雄の尿素窒素（上昇）及びアルブミン（下降）は、有意に変動していたが、雄のその他の測定値と雌の全ての測定値は、21日目では正常値であった。更に、78日目に雄のアルブミンの有意な下降が見られるものの全体的にはほぼ対照群との差が見られない程度まで回復した。一方、78日目に剖検したところ、これらのマウスの体重、腎臓、肝臓、肺、脾臓及び心臓の相対重量に有意な差は検出出来なかった。また、各組織には、顕著な変化が観察できなかつた。以上の結果から、本界面活性剤による生体への影響は低いものと考ええる。

- 6) 重合性ジェミニ型陽イオン界面活性剤投与では、雌雄マウス共に麻酔から覚めることなく死亡してしまった。そのため投与量を、重合性ジェミニ陰イオン界面活性剤の4分の1とした。対照群に比べて有意に値の変動が合ったものは、7日目の雄のグルコース（下降）とコレステロール（下降）、と14日目の雌雄のアルブミン（上昇）と雌の尿素窒素の上昇のみであり、その他は、影響が見られなかった。一方、63日目に剖検したところ、各臓器の相対重量には差が見られず、組織においては、肝臓に空砲をもつ肝細胞が見られるもののその数は少なかった。しかし、雌の肺の動脈周囲における出血が全てに観察できた。以上の結果から、本界面活性剤は生体への影響が大変大きなものであると思われた。今回の組織への影響が軽かったのは、投与量が少なかったからであると考えられた。組織像と生化学データの乖離が存在するため、臨床応用は難しいと考える。

- 7) SDS水溶液は、対照として投与した。この界面活性剤投与では、マウスの死亡はなかった。この界面活性剤による影響にも、明確な雌雄差が観察できた。雌では、14日目にグルコースの下降が見られるものの、そのほかの値には何も影響がなかった。しかし、雄では、グルコースの下降、アルブミン、尿素窒素、総合、直接及び間接ビリルビンの有意な上昇が7日目と14日目に見られた。一方、63日目に剖検したところ、雄の肝臓の相対重量の増加が見られた ($p < 0.0002$) 他、雌の脾臓の相対重量が有意に増加していた ($p < 0.0035$)。また、組織解析では、雄の殆どの肝細胞は空砲を持っていた。また、雄の腎臓の髄質にリンパ様細胞の浸潤が観察できた。雌の肝臓でも空砲を持った肝細胞が見られるが、それらは限局して見られた。また、腎臓における浸潤像も一部に見られるだけであった。以上の結果から、本界面活性剤の生体への影響はかなり強いものであると考えられた。

D. 考察

- 1) 全ての界面活性剤は、バブルの形成効率や、安定性などを指標に選択されたものであるが、シクロアミロース修飾界面活性剤とタウリン誘導重合性ジェミニ型陰イオン界面活性剤は、投与後、2週間に影響を示すものの、21日以後はほぼ正常値に戻ることが示され。生体への影響が比較的軽いものであると考えられる。しかし、バブルの長期安定のためのグリセリンの添加は、結果として血液生化学データへの影響は少ないものの、投与時の生体反応に問題があるので、その詳細を検討する必要があると考える。重合性

ジェミニ型陰イオン界面活性剤の方は、毒性が低いと考えられるが、重合性ジェミニ型陽イオン界面活性剤の方は、投与直後の生体への影響から、慎重な検証が必要と考える。

2) 本実験より、血液生化学データと病理組織学観察との間で相反する実態が存在することが分かった。例えば、陽イオン性ジェミニ投与の雌の肺に見られた出血は、臨床的には重篤な症状を呈すると推測できるが、生化学データからは、さほど影響したようには思えないのである。重合性ジェミニ型陽イオン界面活性剤の様な現象を引き起こす薬剤の使用については、投与濃度、投与時間や投与方法など、更に詳細にその手順を検証する必要があると考える。

3) 本実験における採血においては、特に絶食などをさせていないため、グルコースなどの値への影響があったと思われる。検査値の変動を考える際、採血時に、空腹時でなかったことを考慮する必要があると考える。

倫理面への配慮

本研究は現在までのところ、動物実験による本プロジェクトに使用予定の界面活性剤の生体毒性の検証が目的である。動物を用いた実験は全て全身麻酔下に行っており苦痛を伴うものではない。本研究における動物実験は財)動物繁殖研究所の動物実験指針に則って行われた。

E. 結論

本年度行った実験より、重篤な症状を呈しなかったシクロアミロース修飾界面活性剤とタウリン誘導重合性ジェミニ型陰イオン

界面活性剤は、濃度や投与法を検討することによって、本研究の目的とするマイクロバブルの材料として使用できると考える。

F. 健康危惧情報

現在までのところ、本研究は人間を対象としたものではないため、健康に対する害は生じない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yonezawa S, Yoshizaki N, Kageyama T, Takahashi T, Sano M, Tokita Y, Masaki S, Inaguma Y, Hanai A, Sakurai N, Yoshiki A, Kusakabe M, Moriyama A, Nakayama A. : Fates of Cdh23/CDH23 with mutations affecting the cytoplasmic region, Hum Mutat. (2006) 27 (1) : 88-97
- 2) Sousa KM, Mira H, Hall AC, Jansson-sjostrand L, Kusakabe M, Arenas E: Microarray analyses support a role for Nurrl in resistance to oxidative stress and neuronal differentiation in neural stem cells. Stem Cells, 2007 Feb;25(2):511-9. Epub 2006 Oct 12

2. 学会発表

- 1) 山本昌美、塚本徹哉、平田暁大、酒井洋樹、目下部守昭、立松正衛(2006)、「MNU誘発マウス胃病変における性差と系統差—3系統のマウスとキメラマウスを用いた解析」第22回日本毒性病理学会、鹿児島、1月
- 2) 南條 博、小林實貴夫、吉成由樹、高橋正人、吉田誠、川村公一、山内美佐、杉田暁大、小松正代、目下部守昭、増田弘毅 (2006)、フィジカルトレーニングによる骨髄由来細胞の局在、第95回日本病理学会総会、東京(日本

病理学会雑誌 第 96 卷 第 1 号
P318)、 5 月

- 3) Nanjo H, Kobayashi M, Yoshinari Y, Takahashi M, Yoshida M, Kawamura K, Kusakabe M and Masuda H. (2006), Systemic organ distribution of bone marrow-derived cells in mice. XIVth Internal vascular biology meeting, Netherlands (Vascular pharmacology P82) June
 - 4) 目下部守昭、橋本尚詞、磯西成治、井上循、松葉恭一、安田允、石川博 (2006)、卵巣癌のシスプラチン耐性に関与する遺伝子の解析、第 65 回日本癌学会総会、横浜、9 月
- H. 知的財産権出願・登録状況
なし

Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

特になし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Masaki T, <u>Matsuura T</u> , <u>Ohkawa K</u> , Miyamura T, Okazaki I, Watanabe T, Suzuki T	All- <i>trans</i> retinoic acid down-regulates human albumin gene expression through the induction of C/EBP beta-LIP.	<i>Biochemical J.</i>	397	345-353	2006
Minami J, Takada K, Aoki K, Shimada Y, Okawa Y, Usui N, <u>Ohkawa K</u>	Purification and characterization of C-terminal truncated forms of histone H2A in monocytic THP-1 cells.	<i>Int J Biochem Cell Biol.</i>	39(1)	171-180	2007
Kanai H, Marushima H, Kimura N, Iwaki T, Saito M, Maehashi H, Shimizu K, Muto M, Masaki T, <u>Ohkawa K</u> , Yokoyama K, Nakayama M, Harada T, Hano H, Hataba Y, Fukuda T, Nakamura M, Totsuka N, Ishikawa S, Unemura Y, Ishii Y, Yanaga K, <u>Matsuura T</u>	Extracorporeal bioartificial liver using the radial-flow bioreactor in treatment of fatal experimental hepatic encephalopathy.	<i>Artificial Organs</i>	31	148-151	2007
Kosuge M, Takizawa H, Maehashi H, <u>Matsuura T</u> , <u>Matsufuji S</u>	A comprehensive gene expression analysis of human hepatocellular carcinoma cell lines as components of a bioartificial liver using a radial flow bioreactor.	<i>Liver Int.</i>	27(1)	101-108	2007
<u>M. Aizawa</u> , H. Ueno, K. Itatani and I. Okada.	Synthesis of calcium-deficient apatite fibres by a homogeneous precipitation method and their characterizations	<i>J. Eur. Ceram. Soc.</i>	26	501-507	2006
A. Miyazaki and <u>M. Aizawa</u>	Adhesion, Proliferation and Morphology of Osteoblasts Cultured on Apatite Ceramics with Preferred Orientation to a -plane	<i>Key Engineer. Mater</i>	309-311	109-112	2006

T. Ohno and <u>M. Aizawa</u>	Effect of the Concentrations of the Starting Solution on the Syntheses and Powder Properties of Hollow Tricalcium-phosphate Microspheres by Ultrasonic Spray-pyrolysis Technique	<i>Key Engineer. Mater</i>	309-311	235-238	2006
<u>M. Aizawa</u> , N. Patel, A.E. Porter, S.M. Best and W. Bonfield	Syntheses of Silicon-containing Apatite Fibres by a Homogeneous Precipitation Method and Their Characterization	<i>Key Engineer. Mater</i>	309-311	1129-1132	2006
H. Morisue, M. Matsumoto, K. Chiba, H. Matsumoto, Y. Toyama, <u>M. Aizawa</u> , N. Kanzawa, T.J. Fujimi, H. Uchida, I. Okada	A novel hydroxyapatite fiber mesh as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances bone union in rat posterolateral fusion model	<i>Spine</i>	31	1194-200	2006
<u>M. Aizawa</u> , H. Uchida, I. Okada, T.J. Fujimi, N. Kanzawa, M. Matsumoto, H. Morisue and Y. Toyama	Development of Apatite Fiber Scaffolds Promoting Hard-tissue Regeneration and Their Application to Biomedical Devices	<i>Archives of BioCeramics Research</i>	6	9-12	2006
M. Honda, T.J. Fujimi, N. Kanzawa, K. Izawa, T. Tsuchiya, <u>M. Aizawa</u>	Osteogenic Differentiation in a Three-dimensional Apatite-fiber Scaffolds	<i>Archives of BioCeramics Research</i>	6	171-174	2006
S. Izumi, M. Honda, N. Kanzawa, T.J. Fujimi, H. Uchida, T. Tsuchiya, H. Morisue, M. Matsumoto, <u>M. Aizawa</u> ,	Apatite-fiber Scaffold Provides Three-dimensional Culture Environment for Osteoblast-like cells	<i>Archives of BioCeramics Research</i>	6	175-178	2006
Y. Tanaka, H. Morisue, M. Matsumoto, Y. Toyama and <u>M. Aizawa</u>	Development of Porous Ceramics with Well-controlled Pore Sizes Created From Single-crystal Apatite Fibers and Its Biological Evaluation	<i>Archives of BioCeramics Research</i>	6	200-203	2006
N. Onaya, T. Ohno, Pak-kon. Choi and <u>M. Aizawa</u>	Effect of ultrasonic vibration frequency on the particle size of hydroxyapatite microspheres synthesized by ultrasonic spray-pyrolysis	<i>Archives of BioCeramics Research</i>	6	204-207	2006
H. Yamamoto and <u>M. Aizawa</u>	Synthesis of Plate-shaped Apatite with Preferred Orientation to c-Plane Using Enzyme Reaction of Urea with Urease	<i>Archives of BioCeramics Research</i>	6	212-215	2006

A.Yoshikawa, Y.Horiguchi, K.Oribe, and <u>M.Aizawa</u>	Mechanical Property of Apatite Cement Hardened by Chelating-effect of Inositol Phosphate	<i>Archives of BioCeramics Research</i>	6	216-219	2006
A.Hiramoto, <u>T.Matsuura</u> and <u>M.Aizawa</u>	Three-dimensional Cell Culture of Hepatocyte Using Apatite-fiber Scaffold and Application to a Radial-flow Bioreactor	<i>Archives of BioCeramics Research</i>	6	220-223	2006
A.Miyazaki, N.Kanzawa and <u>M.Aizawa</u>	Adhesion, Proliferation and Differentiation of Osteoblasts Cultured on Apatite Ceramics with Preferred Orientation to α -plane	<i>Archives of BioCeramics Research</i>	6	224-227	2006
H.Tanabe, A.Ohuchi, T.Nakamura, <u>M.Aizawa</u>	Release profiles of calcium and phosphate ions from the β -tricalcium phosphate fiber scaffolds in the HEPES buffer solutions	<i>Archives of BioCeramics Research</i>	6	236-239	2006
Saito M, <u>Matsuura T</u> , Masaki T, Maehashi H, Shimizu K, Hataba Y, Iwahori T, Suzuki T, Braet F	Reconstruction of liver organoid using a bioreactor	<i>World J Gastroenterol</i>	12	1881-1888	2006
<u>Masahiko Abe</u> , Kazuyuki Tsubone, Takaaki Koike, <u>Koji Tsuchiya</u> , Takahiro Ohkubo, <u>Hideki Sakai</u>	Polymerizable Cationic Gemini Surfactant	<i>Langmuir</i>	22(20)	8293-8297	2006
Yonezawa S, Yoshizaki N, Kageyama T, Takahashi T, Sano M, Tokita Y, Masaki S, Inaguma Y, Hanai A, Sakurai N, Yoshiki A, <u>Kusakabe M</u> , Moriyama A, Nakayama A	Fates of Cdh23/CDH23 with mutations affecting the cytoplasmic region	<i>Hum Mutat.</i>	27(1)	88-97	2006
Sousa KM, Mira H, Hall AC, Jansson-sjostrand L, <u>Kusakabe M</u> , Arenas E	Microarray analyses support a role for Nurr1 in resistance to oxidative stress and neuronal differentiation in neural stem cells	<i>Stem Cells</i>	25(2)	511-519	2007
Braet F, Nagatsuma K, Saito M, Soon L, Wisse E, <u>Matsuura T</u>	The hepatic sinusoidal endothelial lining and colorectal liver metastasis	<i>World J Gastroenterol</i>	13(6)	821-825	2007

Ueda K, <u>Yamada K</u> , Urashima M, <u>Ishibashi Y</u> , Shirai M, Nikaido T, Takahashi H, Okamoto A, Saito M, Yasuda M, <u>Ohkawa K</u> , Tanaka T	Association of extracellular matrix metalloproteinase inducer in endometrial carcinoma with patient outcomes and clinicopathogenesis using monoclonal antibody 12C3.	<i>Oncol Rep</i>	17	731-5	2007
Mamori S, Nagatsuma K, <u>Matsuura T</u> , <u>Ohkawa K</u> , Hano H, Fukunaga M, Matsushima M, Masui Y, Fushiya N, Onoda H, Searashi Y, Takagi I, <u>Tajiri H</u>	Useful detection of CD147 (EMMPRIN) for pathological diagnosis of early hepatocellular carcinoma (HCC) in needle biopsy samples	<i>World J Gastroenterol</i>	<i>in press</i>		2007
今津博雄、 <u>田尻久雄</u>	感染性膵壊死、膵膿瘍に対す るEUSガイド下ドレナージ術	胆と膵	27	55-60	2006
<u>山田恭輔</u> 、上田和、石塚康夫、 岡本愛光、安田允、田中忠夫	卵巣癌の新しい予後因子と バイオマーカー	産婦人科の実 際	55(13)	2195-2200	2006

IV 研究成果の刊行物・別刷

• All-trans retinoic acid down-regulates human albumin gene expression through the induction of C/EBP- β LIP	101
Biochem.J.(2006)397,345-353	
• Purification and characterization of C-terminal truncated forms of histone H2A in monocytic THP-1 cells	110
The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 39(2007)171-180	
• Extracorporeal Bioartificial Liver Using the Radial-flow Bioreactor in Treatment of Fatal Experimental Hepatic Encephalopathy	120
Artificial Organs 31(2):148-151,2007	
• A comprehensive gene expression analysis of human hepatocellular carcinoma cell lines as components of abioartificial liver using a radial flow bioreactor	124
Liver International 27(2007)101-108	
• Syntheses of calcium-deficient apatite fibres by a homogeneous precipitation method and their characterizations	132
Journal of the European Ceramic Society 26(2006)501-507	
• Syntheses of silicon-containing apatite fibres by a homogeneous precipitation method and their characterizations	139
Key Engineer. Mater 309-311(2006)1129-1132	
• DEVELOPMENT OF APATITE-FIBER SCAFFOLDS PROMOTING HARD-TISSUE REGENERATION AND THEIR APPLICATION TO BIOMEDICAL DEVICES	143
Archives of BioCeramics Research 6(2006)9-12	
• OSTEOGENIC DIFFERENTIATION IN A THREE-DIMENSIONAL APATITE-FIBER SCAFFOLD	147
Archives of BioCeramics Research 6(2006)171-174	
• APATITE-FIBER SCAFFOLD PROVIDES THREE-DEMENSIONAL CULTURE ENVIRONMENT FOR OSTEOBLAST-LIKE CELLS	151
Archives of BioCeramics Research 6(2006)175-178	
• DEVELOPMENT OF POROUS CERAMICS WITH WELL-CONTROLLED PORE SIZES CREATED FROM SINGLE-CRYSTAL APATITE FIBERS AND ITS BIOLOGICAL EVALUATION	155
Archives of BioCeramics Research 6(2006)200-203	
• THREE-DEMENSIONAL CELL CULTURE OF HEPATOCYTES USING APATITE SCAFFOLD AND APPLICATION TO A RADIAL-FLOW BIOREACTOR	159
Archives of BioCeramics Research 6(2006)220-223	
• Polymerizable Cationic Gemini Surfactant	163
Langmuir 2006, 22, 8293-8297	
• The hepatic sinusoidal endothelial lining and colorectal liver metastases	168
World J Gastroenterol 2007 February 14;13(6):821-825	
• 感染性膵壊死・膵膿瘍に対するEUSガイド下ドレナージ術	173
胆と膵 Vol. 27(1) p.55~60, 2006	
• プロテインチップによる新しい予後因子やバイオマーカー探索	179
産婦人科の実際 第55巻 第13号 (2006年12月1日発行)	

All-*trans* retinoic acid down-regulates human albumin gene expression through the induction of C/EBP β -LIP

Takahiro MASAKI*†‡, Tomokazu MATSUURA§, Kiyoshi OHKAWA†, Tatsuo MIYAMURA*, Isao OKAZAKI‡, Tetsu WATANABE‡ and Tetsuro SUZUKI*¹

*Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, Japan, †Department of Biochemistry, The Jikei University School of Medicine, Tokyo 105-8461, Japan, ‡Department of Community Health, Tokai University School of Medicine, Kanagawa 259-1193, Japan, and §Department of Laboratory Medicine, The Jikei University School of Medicine, Tokyo 105-8461, Japan

ATRA (all-*trans* retinoic acid), which is a major bioactive metabolite of vitamin A and a potent regulator of development and differentiation, mediates down-regulation of the human albumin gene. However, the mechanism of ATRA-mediated down-regulation is not well understood. In the present study, deletion analysis and luciferase assays demonstrate that ATRA causes a marked decrease in the activity of the albumin promoter, the region between nt -367 and -167 from the transcription start site, where C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein)-binding sites are tightly packed, is indispensable for ATRA-mediated down-regulation. ChIP (chromatin immunoprecipitation) assays revealed that *in vivo* binding of C/EBP α to the region markedly decreases upon incubation with ATRA, whereas ATRA treatment marginally increases the recruitment of C/EBP β . We found that ATRA has the ability to differentially and directly induce expression of a truncated isoform of C/EBP β , which is an

LIP (liver-enriched transcriptional inhibitory protein) that lacks a transactivation domain, and to increase the binding activity of C/EBP β -LIP to its response element. Overexpression of C/EBP β -LIP negatively regulates the endogenous expression of albumin, as well as the activity of the albumin promoter induced by C/EBP transactivators such as C/EBP α and full-length C/EBP β . In conclusion, we propose a novel model for down-regulation of the albumin gene, in which ATRA triggers an increase in the translation of C/EBP β -LIP that antagonizes C/EBP transactivators by interacting with their binding sites in the albumin promoter.

Key words: all-*trans* retinoic acid (ATRA), liver-enriched transcription factor, CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP), dominant-negative factor, FLC-4 cell, liver-enriched transcriptional inhibitory protein (LIP).

INTRODUCTION

Serum albumin is the most abundant and characteristic protein that is produced by the mature liver; albumin functions as a transporter of various substances and is a prime regulator of colloid osmotic pressure [1]. Albumin is exclusively synthesized in the liver, approx. 200 mg/kg per day [2], leading to its high steady-state concentration in plasma (35–50 g/l in humans). It has been reported that the albumin level in plasma is decreased as a result of reduced albumin synthesis in clinical disorders such as liver disease [2], infectious disease [3], and cancer [4]. Serum albumin can be used as a reliable indicator for the prognosis and severity of these diseases [5,6]. Therefore it is probable that albumin synthesis is regulated accurately and dramatically in a variety of physiological and pathophysiological conditions.

Albumin synthesis is regulated mainly at the transcriptional level through tissue-specific transcription factors such as HNF (hepatocyte nuclear factor)-1 and C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) [7,8]. The transcription of the albumin gene is down-regulated by a number of factors, including cytokines [9–11], vitamins [12–14], colloid osmotic pressure [15,16] and amino acid limitation [17]. ATRA (all-*trans* retinoic acid), a major bioactive metabolite of vitamin A, plays a crucial role in hepatocyte differentiation, proliferation and apoptosis [18,19]. ATRA has been shown to down-regulate albumin gene expression in rat hepatocytes [20] and human hepatoma cell lines [12,13].

In animal experiments, it has been reported that a decrease in serum albumin concentration is observed after the administration of ATRA to rodents [21]. Furthermore, in clinical studies of fenretinide (4-hydroxyphenyl-retinamide), a synthetic derivative of ATRA that possesses inhibitory activity against various types of malignant cells [22–24], administration of the drug caused hypoalbuminemia as an adverse effect [25]. Nevertheless, little is known about the ATRA-mediated down-regulation of albumin expression either in experimental or clinical research fields.

In the present study, we have examined the molecular mechanism by which ATRA down-regulates albumin expression in human HCC (hepatocellular carcinoma) cells, with special attention to the transcription factors involved. We present evidence that ATRA preferentially induces the expression of a truncated isoform of C/EBP β : 20 kDa LIP (liver-enriched transcriptional inhibitory protein). We also present evidence that C/EBP β -LIP functions as an antagonist of C/EBP transactivators in the expression of the albumin gene.

EXPERIMENTAL

Plasmids

The promoter fragment of the human albumin gene between nt -1867 and +39 was obtained by PCR amplification using the genomic DNA of human HCC FLC-4 cells [26,27] as a

Abbreviations used: ATRA, all-*trans* retinoic acid; C/EBP, CCAAT/enhancer-binding protein; C/EBP β -FL, C/EBP β -full-length; ChIP, chromatin immunoprecipitation; CUG-BP1, CUG triplet-repeat binding protein 1; DR, direct repeat; eIF, eukaryotic translation initiation factor; EMSA, electrophoretic mobility-shift assay; HCC, hepatocellular carcinoma; HNF, hepatocyte nuclear factor; LAP, liver-enriched transcriptional activator protein; LIP, liver-enriched transcriptional inhibitory protein; RARE, retinoic acid response element; RT, reverse transcriptase.

¹ To whom correspondence should be addressed (email tesuzuki@nih.go.jp).

template; the forward primer (5'-GGCTAGCCTGGACTAATA-TTATTCTTTTCATTG-3') and the reverse primer (5'-CCTC-GAGGTGTGCCAAAGGCGTGTGGGGTT-3') contain restriction sites for *NheI* and *XhoI* respectively at the 5' end. After PCR amplification, the 1.9 kb product was digested with *NheI* and *XhoI* and it was then ligated into the pGL3-Basic vector (Promega, Madison, WI, U.S.A.) to produce pAL1.9-LUC. A series of human albumin promoter 5' end-deletion constructs were created by PCR amplification using the above reverse primer and the following forward primers: 1456 bp construct (nt -1417 to +39), 5'-GGCTAGCCAGTACCCATTCTGAAGAAG-3'; 806 bp construct (nt -767 to +39), 5'-GGCTAGCCCTCA-TTTGGGTCCATTTTCC-3'; 606 bp construct (nt -567 to +39), 5'-GGCTAGCCAGCTTTTTTCAGACAGAATGG-3'; 406 bp construct (nt -367 to +39), 5'-GGCTAGCCTATTAGTTGG-TTAGTAAT-3' and 206 bp construct (nt -167 to +39), 5'-GG-CTAGCCCAGATGGTAAATATACACAA-3'. Each *NheI/XhoI* fragment was inserted into the pGL3-Basic vector, to yield pAL1.4-LUC, pAL0.8-LUC, pAL0.6-LUC, pAL0.4-LUC or pAL0.2-LUC. To create expression plasmids for C/EBP α , C/EBP β -FL (C/EBP β -full-length) and C/EBP β -LIP, the corresponding sequences were amplified by PCR using pCMV-C/EBP α and pCMV-C/EBP β , which were provided by Dr G. J. Darlington (Department of Pathology, Baylor College of Medicine, Houston, TX, U.S.A.), as templates and primers containing an *EcoRI* site at the 5' ends. Each *EcoRI* fragment was cloned into the *EcoRI* site of the pCAGGS vector [28].

Cell culture and treatment with ATRA

FLC-4 cells were maintained in ASF104 serum-free medium (Ajinomoto, Tokyo, Japan) without any supplements, at 37 °C in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere. In experiments using ATRA, FLC-4 cells were cultured in ASF104 serum-free medium with or without 1–1000 nmol/l ATRA (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.). For transient transfection experiments, FLC-4 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 10% foetal bovine serum.

ELISA

Albumin levels in culture medium were measured using a human albumin ELISA quantification kit (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, U.S.A.) according to the manufacturer's instructions.

RNA isolation and real-time RT (reverse transcriptase)-PCR

Total RNA was extracted from FLC-4 cells using the RNeasy mini kit (QIAGEN, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's protocol. Quantitative real-time RT-PCR analysis was performed using the ABI Prism 7700 Sequence Detector (PerkinElmer Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) as described previously [29]. The standard curve was created using serially diluted total RNA obtained from FLC-4 cultures. The amount of target gene expression was calculated from the standard curve, and its quantitative normalization in each sample was carried out using β -actin (PerkinElmer Applied Biosystems) as an internal control. The following primers and fluorescent dual-labelled probes were used: albumin forward primer, 5'-CGATTTTCTT-TTTAGGGCAGTAGC-3'; albumin reverse primer, 5'-TGGAAA-CTTCTGCAAACACTCAGC-3'; albumin probe, 5'-CGCCTGAG-CCAGAGATTTCCCA-3'; HNF-1 α forward primer, 5'-AGCG-GGAGGTGGTTCGATAC-3'; HNF-1 α reverse primer, 5'-CATG-GGAGTGCCTTGTG-3'; HNF-1 α probe, 5'-TCAACCAG-

TCCCACCTGTCCCAACA-3'; HNF-1 β forward primer, 5'-AG-CCCAGTTTCCCTTCTATGC-3'; HNF-1 β reverse primer, 5'-TCCTCTTCGGTGGTTCCTTGT-3'; HNF-1 β probe, 5'-CACAATGCCTCTCCCACGATGTCAAG-3'; C/EBP α forward primer, 5'-CAACGTGGAGACGCAGCA-3'; C/EBP α reverse primer, 5'-GCTCAGCTGTTCCACCCG-3'; C/EBP α probe, 5'-CTGACCAGTGACAATGACCCGCTGC-3'; C/EBP β forward primer, 5'-GCCCTCGCAGGTCAAGAG-3'; C/EBP β reverse primer, 5'-TGGCAGCGCGATGT-3' and C/EBP β probe, 5'-CAAGCACAGCGACGAGTACAAGATCCG-3'.

Plasmid transfection and luciferase assay

For the expression of luciferase reporter plasmids in FLC-4 cells, 1×10^5 cells per 22 mm well were seeded and cultured overnight. The adherent cells were transfected with 5 µg of plasmid DNA using TransIT-LT1 transfection reagent (Mirus, Madison, WI, U.S.A.) according to the manufacturer's instructions. After the transfection, the cells were incubated with the fresh medium in the presence or absence of 100 nmol/l ATRA for 48 h, followed by determination of the luciferase activity in cells by using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) according to the manufacturer's instructions. For co-expression with C/EBPs, FLC-4 cells were seeded at 2×10^5 cells per 22 mm well on the day before transfection. The cells were transfected with C/EBP expression vectors and the luciferase reporter, pAL1.9-LUC, using TransIT-LT1 transfection reagent, and were cultured for an additional 48 h before the luciferase assay. The total amount of transfected DNA was kept constant by the addition of an empty vector. The pRL-CMV vector (Promega) was used as an internal control for the luciferase assay. To examine the effect of C/EBPs on endogenous albumin expression, FLC-4 cells were seeded at 2×10^5 cells per 22 mm well and cultured overnight. The adherent cells were transfected with C/EBP expression vectors and/or an empty vector using TransIT-LT1 transfection reagent. One day later, the culture medium was changed and the cells were incubated for a further 48 h. After harvesting the medium, the amount of secreted albumin was measured by ELISA.

Western blotting

The proteins were transferred on to a PVDF membrane (Immobilon; Millipore, Bedford, MA, U.S.A.) after separation by SDS/PAGE (12.5 or 15% gels). After blocking, the membrane was probed with a rabbit polyclonal anti-C/EBP α antibody (sc-61; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.), a rabbit polyclonal anti-C/EBP β antibody (sc-150; Santa Cruz Biotechnology), or a mouse monoclonal anti- β -actin antibody (Sigma), followed by incubation with a peroxidase-conjugated secondary antibody and visualization with a SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, U.S.A.). The amount of protein signal was quantified by densitometric analysis (Cool Saver AE-6955; ATTO, Tokyo, Japan).

ChIP (chromatin immunoprecipitation) assay

ChIP assays were performed using the protocol for the ChIP assay kit (Upstate, Lake Placid, NY, U.S.A.). Briefly, FLC-4 cells in 100 mm dishes were grown to 70% confluency with or without ATRA treatment for 48 h. The chromatin from formaldehyde-fixed FLC-4 cells was sonicated and immunoprecipitated using the rabbit polyclonal anti-C/EBP α or anti-C/EBP β antibodies. The chromatin immunoprecipitate was analysed by PCR (33 cycles) with the following primer pairs (F1/R1 and F2/R2) for two different regions of the albumin gene: the region from nt -414

to -188 containing four potential binding sites for C/EBP, F1 (5'-GCAATTTGGGACTTAACTCTTTCAGTA-3') and R1 (5'-CCTGTGCAATGTATTAAAGTTGTGTAACA-3'); and the region from nt -876 to -638 without binding sites for C/EBP, F2 (5'-CAGGGATGGAAAGAATCCTATGCC-3') and R2 (5'-CCATGTCCCATTCCTGCTGT-3').

EMSA (electrophoretic mobility-shift assay)

Nuclear proteins were extracted from FLC-4 cells that were treated with or without 100 nmol/l ATRA for 48 h, or that transiently expressed the LIP protein, using NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction reagents (Pierce Biotechnology). A LightShift Chemiluminescent EMSA kit (Pierce Biotechnology) was used to verify the DNA binding of C/EBP β -LIP to potential C/EBP-responsive sequences in the region from nt -414 to -188 of the albumin gene. Nuclear protein (4 μ g) was incubated with the double-stranded biotinylated oligonucleotide that contained the C/EBP-binding site (5'-GTAAAATTTGATAAGATGTT-3') for 20 min at room temperature. For competition or supershift assay, a 50-fold molar excess of unlabelled wild-type or mutant oligonucleotides (5'-GTAAAACTGATACAATGTT-3'), or 1 μ g of the monoclonal anti-C/EBP β antibody (sc-7962 X; Santa Cruz Biotechnology) was incubated with nuclear extracts for 30 min before the addition of labelled oligonucleotides. Reaction mixtures were then separated on a 6% native polyacrylamide gel, and shifted bands that corresponded to protein-DNA complexes were captured by a horse radish peroxidase-based detection system.

Statistical analysis

Student's *t* test was used to evaluate the statistical difference between groups. All *P* values were obtained using a two-tailed statistical analysis, and *P* < 0.05 was considered statistically significant. Results are means \pm S.D.

RESULTS

Down-regulation of albumin secretion and gene expression by ATRA

Among the established human HCC cell lines, FLC-4 is known to have relatively well-preserved liver cell functions, such as albumin synthesis, enzyme activity and drug metabolism [26,27]. When FLC-4 cells were incubated in the presence of ATRA for 48 h, the albumin level in the culture medium was significantly decreased in a dose-dependent manner; the inhibitory effect of ATRA at concentrations of 1, 10, 100 and 1000 nmol/l on albumin production was 37.04 \pm 3.60%, 50.04 \pm 3.27%, 59.96 \pm 4.71% and 65.74 \pm 0.74% respectively (Figure 1A). After treatment with 1000 nmol/l ATRA, the growth rate of FLC-4 cells was only slightly (approx. 30%) inhibited, and the cells exhibited no morphological changes (results not shown). To address the mechanism of down-regulation of albumin synthesis by ATRA, the mRNA level of albumin in the cells treated with ATRA for 24 h was examined. As shown in Figure 1(B), consistent with the level of the secreted protein, cellular albumin mRNA expression was inhibited significantly and dose-dependently by ATRA. A 61.95% decrease in the albumin mRNA level was observed in the presence of 100 nmol/l ATRA, demonstrating that albumin synthesis is down-regulated by ATRA via a reduction in the level of mRNA, which is presumably caused by a decrease in transcriptional activity of the albumin gene and/or albumin mRNA stability.

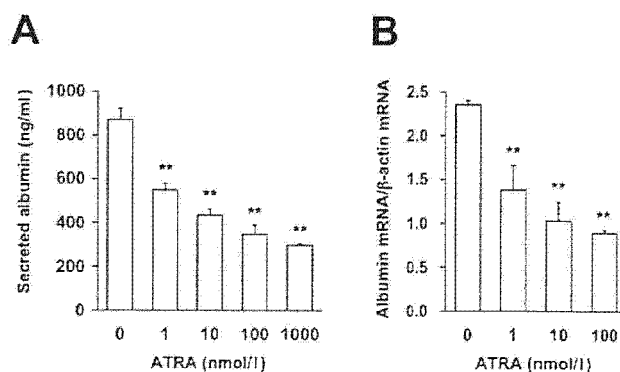


Figure 1 Effect of ATRA treatment on albumin secretion and mRNA expression in FLC-4 cells

(A) The culture medium was collected 48 h after the addition of ATRA. Albumin levels in the medium were quantified by ELISA. ***P* < 0.01 compared with no ATRA treatment. (B) The cells were harvested after incubation with ATRA for 24 h. Albumin mRNA levels were measured by quantitative RT-PCR analysis. Albumin mRNA levels were normalized to β -actin mRNA levels. ***P* < 0.01 compared with control cells without ATRA treatment.

Identification of the 5' end flanking region of the albumin gene responsible for its transcriptional down-regulation by ATRA

It is well known that the effect of ATRA on the transactivation of target gene expression is mediated by retinoic acid receptors and retinoid X-receptors that bind DNA as a heterodimer [30,31]. These nuclear receptors are ligand-dependent transcription factors that bind RAREs (retinoic acid response elements) consisting of two AGGTCA sites usually arranged as DRs (direct repeats) [30,31]. The RAREs found on ATRA-regulated genes are made up of DR motifs with a spacing of 2 (DR2) or 5 nt (DR5) [31]. However, neither the consensus sequence of RAREs nor RARE-like sequences were identified in the 5' end flanking region of the human albumin gene by sequence analysis with a computer search program, TFSEARCH (Searching Transcription Factor Binding Sites; <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>). One can hypothesize that the ATRA-mediated transcriptional regulation of the albumin gene is a secondary response to retinoic acid in human liver cells.

To identify the region responsible for the down-regulation of albumin gene expression by ATRA, a reporter plasmid, pAL1.9-LUC, containing a 1.9 kb fragment of the albumin 5' end flanking sequence linked to a firefly luciferase gene was constructed (Figure 2B) and transfected into FLC-4 cells. The reporter luciferase assay demonstrated that the activity of the albumin promoter from pAL1.9-LUC was markedly decreased to 30.78% after treatment with ATRA (Figure 2B). This inhibitory effect correlated well with the inhibition of albumin mRNA expression (as shown in Figure 1B), suggesting that the 5' end 1.9 kb flanking sequence of the albumin gene is involved in transcriptional down-regulation of albumin expression by ATRA. To define an ATRA-responsive element within the 1.9 kb fragment, a series of 5' end-deletion constructs fused with the luciferase gene were created (Figure 2B). As shown in Figure 2(B), deletions that extended to nt -367 (pAL0.4-LUC) resulted in basal promoter activities and an inhibitory effect of ATRA on promoter activity that are comparable with those observed in the cells transfected with pAL1.9-LUC. By contrast, a further deletion up to nt -167, pAL0.2-LUC, yielded a marked decrease in the basal promoter activity, as well as in the inhibitory effect of ATRA on the promoter activity. These results suggest that the region from nt -367 to -167 contains a putative element responsible for