

# Cell Lineage-specific Regulatory Mechanisms Control Pro $\alpha$ 2(I) Collagen Gene Expression in Parenchymal Hepatocytes and Liver Stellate Cells

|       |   |
|-------|---|
| メタデータ | 言語: jpn<br>出版者:<br>公開日: 2017-10-04<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者:<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/2297/9292">http://hdl.handle.net/2297/9292</a>               |

## 肝実質細胞および星細胞におけるプロ $\alpha 2(I)$ コラーゲン 遺伝子の細胞特異的転写調節機構に関する研究

金沢大学医学部医学科内科学第一講座 (主任: 小林健一教授)

根 本 朋 幸

肝星細胞 (liver stellate cells, LSC) は肝における主要なコラーゲン産生細胞と考えられている。これに対し、肝実質細胞によるコラーゲン産生の生理的および病理的意義については未だ一定の見解が得られていない。著者らはこれまでに、ヒト皮膚線維芽細胞 (CF37) や LSC クローン (CFSC-2G) における  $\alpha 2(I)$  コラーゲン遺伝子 (gene coding for the  $\alpha 2$  chain of type I collagen molecule, COL1A2) 転写に必須な上流塩基配列を同定するとともに、同配列がトランスフォーミング成長因子ベータ (transforming growth factor-beta, TGF- $\beta$ ) による転写促進を伝達する TGF- $\beta$  作用領域 (TGF- $\beta$ -responsive element, TbRE) を含んでいることを明らかにした。本研究では、肝実質細胞および間葉系細胞において COL1A2 転写に対する共通の調節機構が存在するか否かを明らかにするために、I 型コラーゲン産生性のヒト肝細胞癌由来細胞株 HuH7 およびラット初代培養肝細胞を用いてトランスフェクションアッセイおよび核タンパク DNA 結合アッセイを行った。トランスフェクションアッセイの結果、HuH7 においては CF37 および CFSC-2G で認められた -313 から -183 塩基間の強いエンハンサー活性は検出されなかった。HuH7 および CF37 から得られた核タンパク抽出液を用いて -378 から -183 塩基をプローブとした DNase I フットプリンティングアッセイを行うと、両者は同一のタンパク結合パターンを示した。しかしながら、ゲルシフトアッセイでは TbRE および近接する負のシスエレメントに結合する核タンパク複合体は両細胞間で異なる泳動パターンを示した。さらに、ラット初代培養肝細胞に COL1A2 プロモーター断片をトランスフェクションしたところ、HuH7 と同様に -313 から -183 塩基間のエンハンサー活性は欠如していた。CF37 や CFSC-2G とは異なり、TGF- $\beta$  を添加しても肝実質細胞における COL1A2 転写活性は促進されなかった。これらの結果より、肝実質細胞における COL1A2 発現の相対的低下および TGF- $\beta$  反応性の欠如が、少なくとも一部においては、TbRE を含むプロモーター領域に結合する核タンパクの細胞特異的修飾に基づく可能性が示唆された。

**Key words** COL1A2, transcription, TGF- $\beta$ , primary culture of rat hepatocyte, liver fibrosis

I 型コラーゲンは、線維肝における主要な細胞外基質の成分で<sup>1)</sup>、2本の  $\alpha 1$  鎖と 1本の  $\alpha 2$  鎖より構成されるヘテロ 3 量体である<sup>2)</sup>。コラーゲン発現の調節は、肝における種々の生理的・病理的過程において重要な働きを演じ、 $\alpha 1$  鎖および  $\alpha 2$  鎖をコードする遺伝子、すなわち  $\alpha 1(I)$  コラーゲン遺伝子 (gene coding for the alpha 1 chain of type I collagen molecule, COL1A1) と  $\alpha 2(I)$  コラーゲン遺伝子 (gene coding for the alpha 2 chain of type I collagen molecule, COL1A2) の転写レベルに大きく依存する<sup>3)</sup>。肝星細胞 (liver stellate cells, LSC) は正常肝および線維肝において I 型コラーゲンを産生する主要細胞であることが明らかにされてきているが<sup>3-5)</sup>、実質細胞である肝細胞が肝線維化の過程で I 型コラーゲン産生に果たす意義については、未だ一致した見解が得られていない。ラット初代培養肝細胞においても I 型コラーゲンの産生が明らかとなっているが<sup>6-8)</sup>、この現象は単に不適当なインビトロの培養条件に対する適応を示しているに過ぎないとも考えられる。加えて、

肝実質細胞におけるコラーゲン遺伝子発現の分子生物学的調節機構に関しては全く明らかにされていない。この点の解明は肝線維化過程の理解に役立ち、ひいてはコラーゲン遺伝子発現の抑制が、少なくとも部分的に肝線維化の防止に寄与すると考えられる。

これまで皮膚線維芽細胞や伊東細胞といった間葉系細胞において、COL1A2 の転写開始点の上流 -378 から -183 塩基間に転写に必須のプロモーター領域が同定された<sup>9,10)</sup>。しかも、-313 から -183 塩基間は COL1A2 発現においてトランスフォーミング成長因子ベータ (transforming growth factor-beta, TGF- $\beta$ ) による転写促進を媒介し<sup>11)</sup>、著者らはこの領域を TGF- $\beta$  作用領域 (TGF- $\beta$ -responsive element, TbRE) と名付けた。TGF- $\beta$  はトランスにはたらく普遍的な転写促進因子であるスペシフィシティプロテイン 1 (specificity protein 1, Sp1) と TbRE に結合する未知の核タンパクとの相互作用を修飾することにより、COL1A2 転写を正に調節している<sup>12)</sup>。さらに、未知のリプレッ

平成9年1月10日受付, 平成9年2月3日受理

Abbreviations: CAT, chloramphenicol acetyltransferase; COL1A1 and COL1A2, genes coding for the  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  chains of type I collagen molecule, respectively; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DTT, dithiothreitol; FCS, fetal calf serum; LSC, liver stellate cells; PBS, phosphate-buffered saline; PMSF, phenylmethylsulphonyl fluoride; Sp1, specificity protein 1; TbRE, transforming growth factor beta-responsive element; TGF- $\beta$ , transforming growth factor-beta

サータンパクがTbREの直ぐ上流、-330から-297塩基間に結合し<sup>10</sup>、COL1A2転写に対する腫瘍壊死因子アルファの抑制作用は、TbREおよびこのシスエレメントを介することも明らかにされた<sup>11</sup>。

本研究では、肝実質細胞においても間葉系細胞と同様の転写調節機構が存在するか否かを明らかにするために、ヒト肝細胞癌由来細胞株とラット初代培養肝細胞を用いて、トランスフェクションアッセイおよび核タンパクDNA結合アッセイを行った。

## 材料および方法

### I. 細胞培養

#### 1. 使用培養細胞

ヒト肝細胞癌由来細胞株HuH7<sup>12</sup>および初代培養ヒト胎児皮膚線維芽細胞CF37<sup>13</sup>は、10%胎児仔血清 (fetal calf serum, FCS) (Gibco Laboratories, Grand Island, USA) 添加ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) (Gibco Laboratories) を用いて37°C、5% CO<sub>2</sub>の存在下で60mmプラスチック培養皿 (Corning Glass Works, Corning, USA) 上に培養した。HuH7においては、COL1A1およびCOL1A2より転写されたmRNAが検出されることが既に明らかとなっている<sup>13</sup>。CF37におけるCOL1A2転写機構については、著者らによりこれまでに詳細な検討がなされてきた<sup>9</sup>。

CFSC-2Gは四塩化炭素誘発ラット硬変肝由来の伊東細胞株で<sup>14</sup>、10% FCSおよび非必須アミノ酸 (Gibco BRL, Gaithersburg, USA) 添加DMEMを用いて培養し、初代培養肝細胞との厳密な比較のため同様に60mm I型コラーゲンコート培養皿 (Corning Glass Works) を用いた。

ヒトT細胞性白血病由来細胞株Jurkat<sup>15</sup>は10% FCS添加RPMI 1640 (Gibco BRL) 培地で37°C、5% CO<sub>2</sub>の存在下で浮遊培養した。

以上の細胞は、いずれも国立金沢病院稲垣豊博士より供与された。

#### 2. ラット初代肝細胞培養

ラット初代培養肝細胞は、200ないし300gのウイスター系雄性ラット (日本クレア, 東京) を使用し、コラゲナーゼ灌流法<sup>16</sup>の変法を用いて分離した。すなわち、麻酔薬としてネブタール (ダイナボット, 大阪) 0.1ml/kgを腹腔内に投与した後腹部正中切開し、下大静脈に21Gカニューレを刺入・固定した。門脈本幹を切開し、37°Cに加温したリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH 7.4) (Gibco BRL) 200mlを用いて7ml/分の速度で前灌流を行った。前灌流の後に0.05% IV型コラゲナーゼ (Sigma, St. Louis, USA)、0.005% トリプシンインヒビター1S (Sigma) および0.0005% II型DNase I (Sigma) を添加したDMEM 200mlを用いて、同様に37°C、7ml/分の速度で灌流した。細胞浮遊液を、600rpm、4°C、1分間遠心し、上清を取り除き、DMEM 40mlを加えて細胞を洗浄し、同様の操作を3回施行して、細胞を回収した。得られた肝細胞は、10% FCS添加DMEMを用い37°C、5% CO<sub>2</sub>の存在下で前述の60mm I型コラーゲンコート培養皿上に培養した。

### II. プラスミドの構築

COL1A2のプロモーター領域の転写開始部位上流の-3500塩基から+58塩基にわたる領域を種々の長さで切断し、その下流にクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ

(chloramphenicol acetyltransferase, CAT) 遺伝子を連結した導入DNAを作製した<sup>17,18</sup>。また、陰性対照としてpBLCAT3<sup>19</sup>、陽性対照としてSV40プロモーター領域をpBLCAT3遺伝子に連結したpSVCAT3<sup>19</sup>、内部対照としてSV40プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を連結したpSVXP1を用いた<sup>20</sup>。以上のプラスミドは、国立金沢病院稲垣豊博士より分与された。

### III. プラスミドの大量調整

上記のプラスミドで形質転換した大腸菌JM109株 (宝酒造, 大津) をLB培地 [トリプトン (Difco laboratory, Detroit, USA) 10g/l, 酵母エキス (Difco laboratory) 5g/l, 塩化ナトリウム 10g/l, 5N 水酸化ナトリウム 0.7ml/l] を用いて37°C、24時間振盪培養した。培養終了後6000rpm、4°C、10分間の遠心により集菌した。菌体を10mlの溶液I [50mM グルコース、25mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM EDTA] に穏やかに懸濁後、リゾチーム 10mg (Sigma) を加え、5分間水中に静置した後、20mlの溶液II (0.2N 水酸化ナトリウム、1% SDS) を加えて穏やかに攪拌し水中に静置した。10分後、15mlの溶液III [3M 酢酸ナトリウム (pH 4.6)] を加え攪拌し、10分間水中に静置した。8000rpm、4°C、10分間遠心し、上清を濾過した後、0.6倍量のイソプロパノールを加え15分間室温で静置した。8000rpm、室温、15分間遠心し、沈殿を70%エタノールで洗浄し、再び9500rpm、4°C、10分遠心し乾燥後、6.75mlのTris-EDTA (TE) [10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA] に溶解し、7.125gの塩化セシウム、20μlの臭化エチジウム溶液 (10mg/ml) を加え、オプティシールチューブ (Optiseal tube) (ベックマンジャパン, 東京) に注入した。ベックマンタイプ80Tiアングルローター (ベックマンジャパン) を用い、20°C、55000rpm、18時間超遠心し、プラスミドのバンドを21G針付き注射器で回収し、さらに塩化セシウム溶液 (塩化セシウム 8.33g, TE 7.9ml)、20μlの臭化エチジウム溶液を加え、オプティシールチューブに注入し、再度超遠心し、プラスミドを回収した。ブタノール抽出後DNAをエタノール沈殿し、滅菌蒸留水を用いて1μg/μlの濃度に調製した。

### IV. トランスフェクション

#### 1. リン酸カルシウム共沈法

細胞はトリプシン処理後、約 $1.0 \times 10^6$ 個/mlの密度で37°C、24時間培養後、Boastらによるリン酸カルシウム共沈法を用いて遺伝子導入を行った<sup>17</sup>。すなわち、種々の長さのプロモーター断片の下流にCAT遺伝子を組み込んだプラスミド10μgと内部対照のpSVXP1 1.5μgを0.25M塩化カルシウム250μlに混合した後、50mlチューブ内で1mlピペットを用いて泡立てた250μlの2×HEPES緩衝生理食塩水 [280mM塩化ナトリウム、50mM HEPES, 1.5mMリン酸二ナトリウム (pH 7.05)] 内に滴下し、室温で30分静置した後、上記培養細胞に加え、37°C、5% CO<sub>2</sub>の存在下で5時間培養した。培養上清を取り除いた後15%グリセロール添加DMEM 0.7mlを加え、105秒間のグリセロール・ショックを行った。PBSで3回洗浄後、0.1% FCS添加DMEM 2.5mlを加え、さらに48時間培養した。

一部の実験では、グリセロール・ショック後のCFSC-2Gに2ng/mlの濃度のTGF-β (Collaborative Biomedical Products, Bedford, USA) を添加し、48時間刺激した。対照の細胞は同じ時間を未刺激のまま取り扱った。

#### 2. リポフェクション法

初代培養肝細胞は、約 $1.0 \times 10^6$ 個/mlの密度で37°C、30時間

培養後、リポフェクテン (Gibco Laboratories) を用いて遺伝子導入を行った<sup>21)22)</sup>。すなわち、CAT遺伝子を組み込んだプラスミド4  $\mu\text{g}$ と内部対照のpSVXP1 1  $\mu\text{g}$ をOpti MEM (Gibco Laboratories) 250  $\mu\text{l}$ に混合し、リポフェクテン30  $\mu\text{l}$ をOpti MEM 250  $\mu\text{l}$ に加え室温で45分静置した溶液と混合した後、15分静置し、さらにOpti MEM 500  $\mu\text{l}$ を加えた後、Opti MEM 2.5mlに置き換えて培養した細胞に加え、37°C、5% CO<sub>2</sub>の存在下で4時間培養した。培養上清を0.1% FCS添加 DMEMに置き換え、さらに36時間培養した。TGF- $\beta$ 刺激はCFSC-2Gと同様に行った。

#### V. CATアッセイ<sup>23)</sup>

IVのごとく遺伝子導入した細胞をTEN [40mM Tris-HCl (pH 8.0), 150mM 塩化ナトリウム, 1mM EDTA] 1mlを用いて回収した後、3000rpm, 4°C, 5分間遠心し、沈殿に氷冷した0.25M Tris-HCl (pH 8.0)を50  $\mu\text{l}$ 加えて攪拌し、ドライアイス・エタノール槽と37°C恒温槽を用いて、凍結融解を3回繰り返し細胞を破壊した。13000rpm, 4°C, 5分間遠心して得た上清10  $\mu\text{l}$ に、1M Tris-HCl (pH 7.8) 25  $\mu\text{l}$ , 4mM アセチルCoA (acetylcoenzyme A) (Sigma) 20  $\mu\text{l}$ , <sup>14</sup>C-クロラムフェニコール [D-threo-(dichloroacetyl)-1, 2-<sup>14</sup>C]chloramphenicol] (DuPont, California, USA) 4  $\mu\text{l}$ , 蒸留水41  $\mu\text{l}$ を加え37°C, 60分間インキュベートした。酢酸エチル500  $\mu\text{l}$ を加え振盪し、13000rpm, 室温, 5分間遠心し、上層を回収し真空乾燥させた後、酢酸エチル 20  $\mu\text{l}$ を加え、シリカゲル薄層プレート (Merck, Darmstadt, Germany) にスポットし、クロロホルム・メタノール (19:1) 混合液を溶媒として展開した。イメージアナライザーBAS1000 (富士フイルム, 東京) を用いてアセチル化されたクロラムフェニコールの比率を定量化した。初代培養肝細胞を用いた場合は、20  $\mu\text{l}$ の細胞抽出液を用いて同様の測定を行った。

#### VI. ルシフェラーゼアッセイ<sup>24)</sup>

ルシフェラーゼアッセイはルシフェラーゼアッセイシステム (luciferase assay system) (Promega, Madison, USA) を用いて行った。すなわち、Vのごとく得られた細胞抽出液5  $\mu\text{l}$ にルシフェラーゼ緩衝液25  $\mu\text{l}$ を加え、ルミネッセンスリーダーBLR-301 (アロカ, 東京) を用いて60秒間のルシフェラーゼ活性を測定した。初代培養肝細胞を用いた場合は、20  $\mu\text{l}$ の細胞抽出液を50  $\mu\text{l}$ のルシフェラーゼ緩衝液に加えて測定した。

#### VII. 核タンパク抽出液の調製

核タンパク抽出液の調製は、Morrisら<sup>25)</sup>の方法を改変して行った<sup>26)</sup>。すなわち、細胞を150mm培養皿10枚に培養し、回収した細胞を氷冷したPBSで3回洗浄した後、1500rpm, 5分間遠心し、上清を取り除き、ホモジナイザー緩衝液 [320mM スクロース, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5mM 塩化マグネシウム, 1mM ビス (2-アミノエチル) エチレンジアミン四酢酸 (O, O'-Bis (2-aminoethyl) ethyleneglycol-N, N, N'-N'-tetraacetic acid) (和光純薬, 大阪), 1mM スペルミジン (spermidine) (和光純薬), 1mM ジチオトレイトール (dithiothreitol, DTT) (和光純薬), 0.5mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド (phenylmethylsulphonyl fluoride, PMSF) (和光純薬)] 10mlを加えて懸濁した。3000rpm, 5分間遠心し、上清を取り除き、ホモジナイザー緩衝液10mlを加え懸濁後、ホモジナイザー (40ml, Weaton, USA) を用いてホモジナイズした。ホモジナイザー緩衝液で3回洗浄後、透析緩衝液 [20mM HEPES (pH 7.9),

100mM 塩化カリウム, 0.2mM EDTA, 20% グリセロール, 1mM DTT, 0.5mM PMSF] 10mlで数回洗浄し、0.1倍量の4M 硫酸アンモニウムを加え、4°C 30分間振盪した後、37000rpm, 4°C, 45分間超遠心した。得られた上清1mlに対し、0.3gの硫酸アンモニウムを加え、10000rpm, 4°C, 10分遠心し、得られた沈殿を透析緩衝液100  $\mu\text{l}$ に溶解し、核タンパク抽出液を調製した。タンパク濃度の測定は、Bradford法<sup>26)</sup>を用いて行った。

#### VIII. DNase I フットプリンティングアッセイ<sup>27)28)</sup>

DNAプローブとして、COL1A2の転写開始部位の上流-378から-183塩基断片を用いた。DNAの末端標識は、DNAプラスミド20ng, 50mM Tris-HCl (pH 7.6), 10mM 塩化マグネシウム, 5mM DTT, 0.1mM スペルミジン, 0.1mM EDTA, 100  $\mu\text{Ci}$   $\gamma$ -<sup>32</sup>P-アデノシン三リン酸 (アマシヤム・ジャパン, 東京), 20単位 T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (Sigma) を含む反応液50  $\mu\text{l}$ を37°C, 1時間反応して行い、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により標識DNAを分離精製した。

20  $\mu\text{g}$ の核タンパクに10 $\times$ 結合緩衝液 [40% グリセロール, 10mM EDTA, 20mM DTT, 100mM Tris-HCl (pH 7.5)] 2.5  $\mu\text{l}$ , 80mM 塩化ナトリウム, 1  $\mu\text{g}$  ポリ dI-dC (Sigma)を加えた反応液24  $\mu\text{l}$ を5分間氷上に静置した後、1  $\mu\text{l}$ の<sup>32</sup>P末端標識DNAプローブ (比活性10000cpm/ $\mu\text{l}$ )を加えて、さらに30分間氷上で静置した。その後、0.5単位/ $\mu\text{l}$ に調製したDNase I (ペーリンガーマンハイム山之内, 東京) と25 $\times$ 塩化マグネシウム・塩化カルシウム溶液 (125mM 塩化マグネシウム, 62.5mM 塩化カルシウム) 1  $\mu\text{l}$ を加えて攪拌後、室温で1分間反応させた。0.5mM EDTA 3  $\mu\text{l}$ を加えて反応を中止後、3M オキサリ酢酸ナトリウム 33  $\mu\text{l}$ , 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  tRNA (Sigma) 2  $\mu\text{l}$ および滅菌蒸留水270  $\mu\text{l}$ を加え、エタノール沈殿後、滅菌蒸留水に溶解し、80% ホルムアミドの存在下に熱変性させた後、7M 尿素含有5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。その後ゲルを乾燥し、オートラジオグラフィに供した。

#### IX. ゲルシフトアッセイ<sup>29)30)</sup>

DNAプローブとして、COL1A2のプロモーター領域の-330から-297塩基間 (ボックス5A), -313から-286塩基間 (ボックス3A) および-313から-255塩基間 (ボックス3A+B) をそれぞれ用い、上記と同様の方法で<sup>32</sup>P末端標識した。

5  $\mu\text{g}$ の核タンパクに10 $\times$ 結合緩衝液2.5  $\mu\text{l}$ , 80mM 塩化ナトリウム, 3  $\mu\text{g}$  ポリ dI-dCを加えた反応液24  $\mu\text{l}$ を5分間氷上に静置し、1  $\mu\text{l}$ の<sup>32</sup>P末端標識DNAプローブ (比活性10000cpm/ $\mu\text{l}$ )を加えて、さらに30分間氷上で静置後、5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、オートラジオグラフィにより解析を行った。

#### X. 統計処理

統計学的数値は平均±標準偏差で表した。各群間での統計的有意差の検定はStudent *t*テストもしくはMann-Whitney Uテストを用いて行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

## 成 績

### I. ヒト肝細胞癌由来細胞株におけるCOL1A2プロモーター断片の転写誘導活性

肝実質細胞におけるCOL1A2プロモーター領域のエンハンサー活性を明らかにするため、COL1A2プロモーター領域を上流より削った種々のDNA断片をCAT遺伝子に連結し、I型コラーゲンを産生するヒト肝細胞癌由来細胞株HuH7にトランスフ

クションを行った。HuH7では、SV40プロモーターを有するpSVCAT3プラスミドのCAT活性を100として比較した場合、-3.5COL1A2プロモーター断片の転写活性は3.6%と低値であった(図1)。また、-3500から-772塩基間の欠失はHuH7におけるCOL1A2転写を低下させ、さらに-378まで削った断片ではその転写活性の低下は回復した(図1)。一方、-378から-183塩基間の欠失はCOL1A2の転写に影響を与えず、-378断

片、-313断片、-183断片のCAT活性には差異を認めなかった(図1)。-108断片は、陰性対照のpBLCAT3をトランスフェクションした場合と同様に1%以下の低いプロモーター活性しか示さなかった(図1)。

II. ヒト肝細胞癌由来細胞株に存在する核転写因子の性状

1. 核タンパク結合部位

HuH7の核内に存在する転写因子と-378から-183塩基配列と

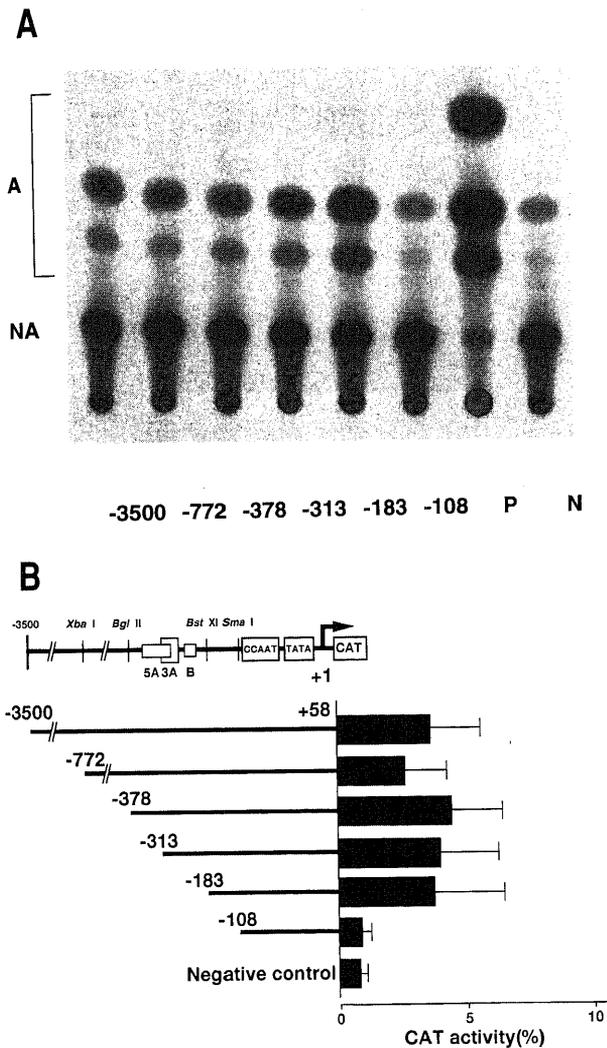


Fig. 1. Functional mapping of the upstream sequence essential for COL1A2 transcription in a type I collagen-producing hepatoma cell line. Different lengths of COL1A2 upstream sequence which had the same 3' end, +58 relative to the transcription start site, were linked to the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter gene, and the enzyme activity was determined after transfection into HuH7 cells. In panel A is shown a representative CAT assay film. On the top of panel B is the restriction map of the -3.5 kilobase COL1A2 promoter with relative positions of Box 5A, Box 3A and Box B. Activity of each construct was normalized against the co-transfected SV40 early promoter-driven luciferase construct, pSVXP1. The values are mean  $\pm$  SD obtained from five independent tests and expressed relative to that of an SV40 early promoter-driven CAT plasmid, pSVCAT3 (P). A, acetylated; NA, non-acetylated chloramphenicol. N, negative control (pBLCAT3).

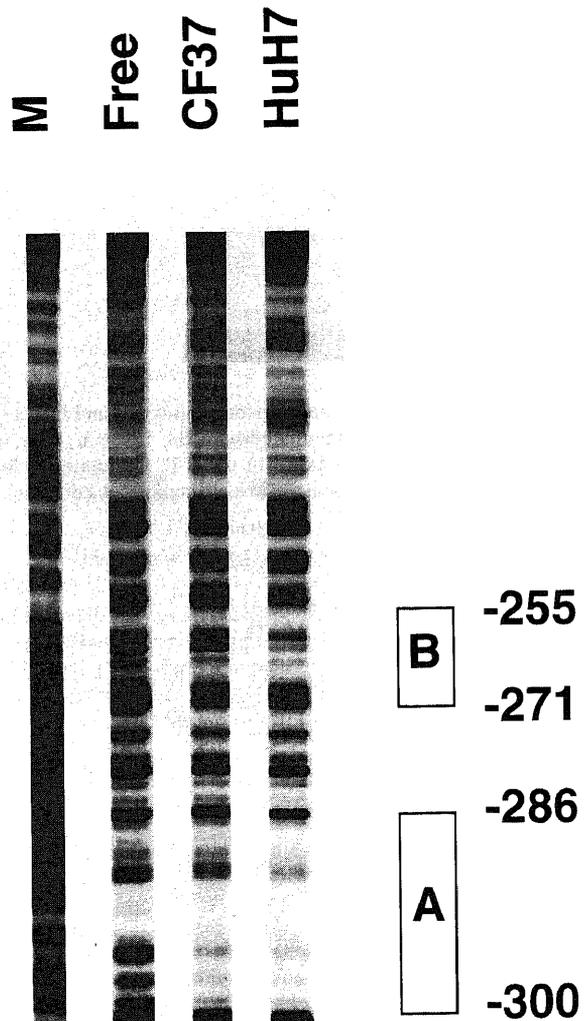


Fig. 2. DNase I footprinting analyses of the -378 to -183 region of COL1A2 upstream sequence incubated with CF37 and HuH7 nuclear extracts. Labeled DNA fragment incubated either without (Free) or with nuclear extracts prepared from CF37 or HuH7 cells were subjected to DNase I digestion and subsequent denatured polyacrylamide gel electrophoresis. The G sequencing reaction is shown in the left lane (M). The two protected regions are indicated by open boxes with the nucleotide positions at their boundaries.

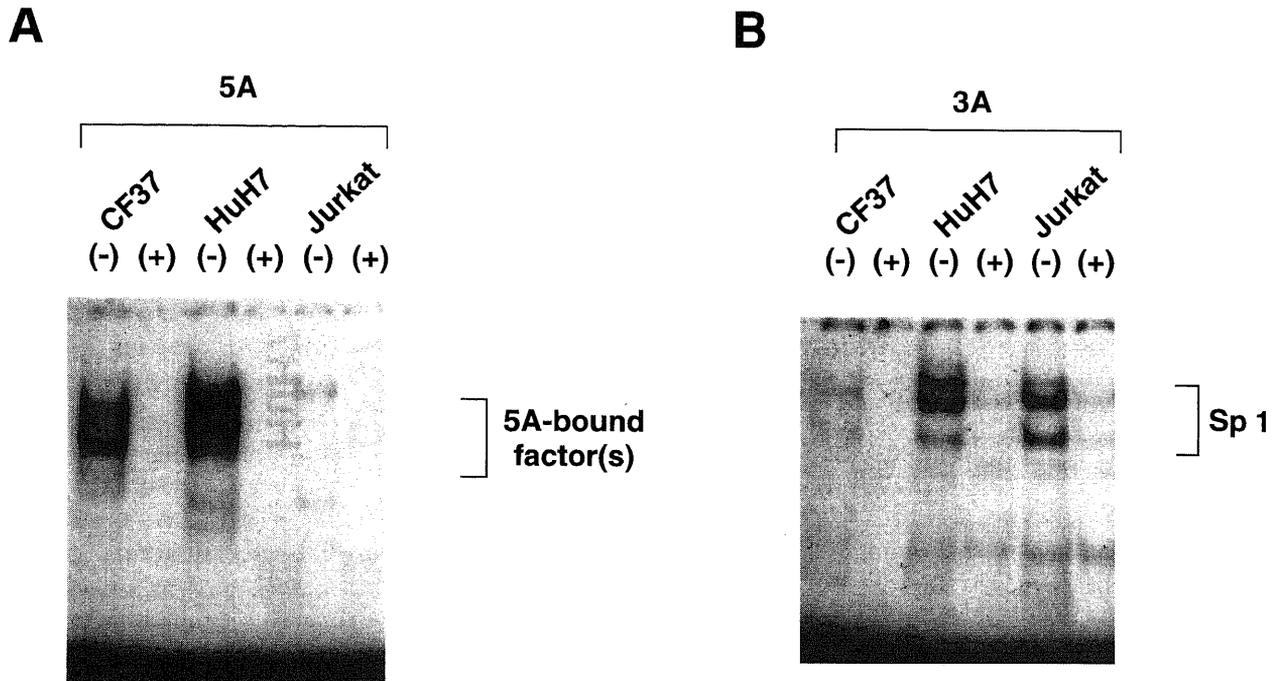


Fig. 3. Gel mobility shift analyses of the Box 5A- and Box 3A-bound nuclear factors. In panel A, nuclear extracts prepared from different cellular sources were incubated with the Box 5A probe in the absence (-) or presence (+) of 100-fold molar excess of unlabeled homologous oligonucleotide. In panel B, the same nuclear extracts were incubated with the Box 3A probe. On the sides of the autoradiograms are shown the protein complexes corresponding to Sp1 and unknown nuclear factor (s) bound to the Box 5A sequence.

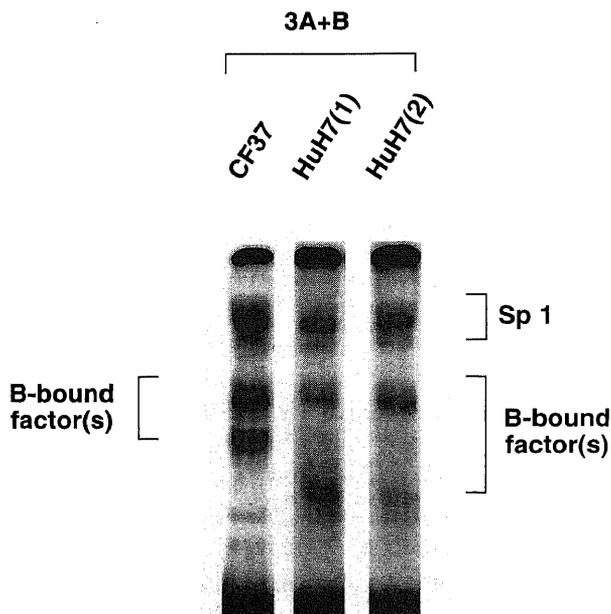


Fig. 4. Gel mobility shift analyses of the multimeric protein complex bound to the 3A+B region. Nuclear extracts prepared from CF37 human skin fibroblasts (left lane) and the two different preparations of HuH7 nuclear extracts (middle and right lanes) were incubated with the end-labeled 3A+B fragment. On the sides of the autoradiogram are shown the protein complexes corresponding to Sp1 and unknown nuclear factor (s) bound to the Box B sequence.

の相互作用を検出するために、同領域をプローブとしてDNase I フットプリンティングアッセイを行った。対照としてCF37核タンパク抽出液を用いた。DNase Iで消化されたDNA断片のゲル電気泳動パターンは、HuH7とCF37とで差異を認めなかった(図2)。すなわち、COL1A2プロモーターの-330から-286塩基間(ボックスA)には強いタンパク結合領域が同定され、-271から-255塩基間(ボックスB)にも弱いタンパク結合が認められた(図2)。

## 2. 核タンパクの性状

HuH7を用いたプロモーター領域の解析では、上述の如く-378から-183塩基間にエンハンサー活性ならびにリプレッサー活性が見出せなかったため、ボックス5A、ボックス3Aならびにボックス3A+Bをプローブとして、ゲルシフトアッセイにより結合タンパクの解析を行った。

HuH7から得られた核タンパク抽出液と5Aプローブとのゲルシフトパターンは、CF37を用いて得られたパターンと異なっており(図3A)、HuH7とCF37では、異なる核転写因子もしくは異なる修飾を受けたタンパク複合体がそれぞれボックス5Aに結合していることが示唆された。さらに、コラーゲン非産生性のJurkatから得られた核タンパクはHuH7およびCF37のいずれとも異なるゲルシフトパターンを示した(図3A)。未標識5Aを100倍量加えると、すべての細胞で核タンパクとの結合が抑制され(図3A)、5Aの塩基配列と核タンパクとの結合の特異性が示された。

次に、ボックス3AをプローブとしたゲルシフトパターンはCF37、HuH7およびJurkatとも共通の泳動パターンを示した

(図3B). 未標識3Aの過剰の添加でタンパクとの結合は5A同様に抑制された。

さらに、3A+Bプローブを用いての検討では、HuH7およびCF37から得られた核タンパクはSp1に相当する共通の泳動パターンを示したが、ボックスB結合タンパクのゲルシフトパターンには差異がみられた(図4)。同様の結果は、複数回精製したHuH7核タンパク抽出液を用いても得られたため(図4)、HuH7で検出されたタンパク複合体がCF37に存在するボックスB結合タンパクの部分的分解の表れである可能性は否定的と考えられた。

Ⅲ. ラット初代培養肝細胞におけるCOL12A転写調節とTGF-βに対する反応性

HuH7にみられたCOL1A2の転写調節機構が、肝実質細胞に

普遍的なものであるか、癌化に伴う二次的な変化であるかを明らかにするために、ラット初代培養肝細胞を用いてCOL12A転写調節とTGF-βに対する反応性をLSCクローンであるCFSC-2Gと比較検討した。ヒト肝細胞癌由来細胞株HuH7で得られた結果と同様に、ラット初代培養肝細胞へトランスフェクションした場合、-378 COL1A2プロモーター断片は1.74%、-313断片は1.76%、-183断片は2.27%と、いずれも低いCAT活性を示すとともに、3者間のCAT活性に差異を認めなかった(図5)。これに対して同様にI型コラーゲンコート培養皿で培養したCFSC-2Gでは、-378断片および-313断片は-183断片に比べ高いCAT活性を示した(図6)。

TGF-βを2ng/mlの濃度で培養液に加えたところ、CFSC-2Gでは-378COL1A2プロモーター断片および-313COL1A2プロモ-

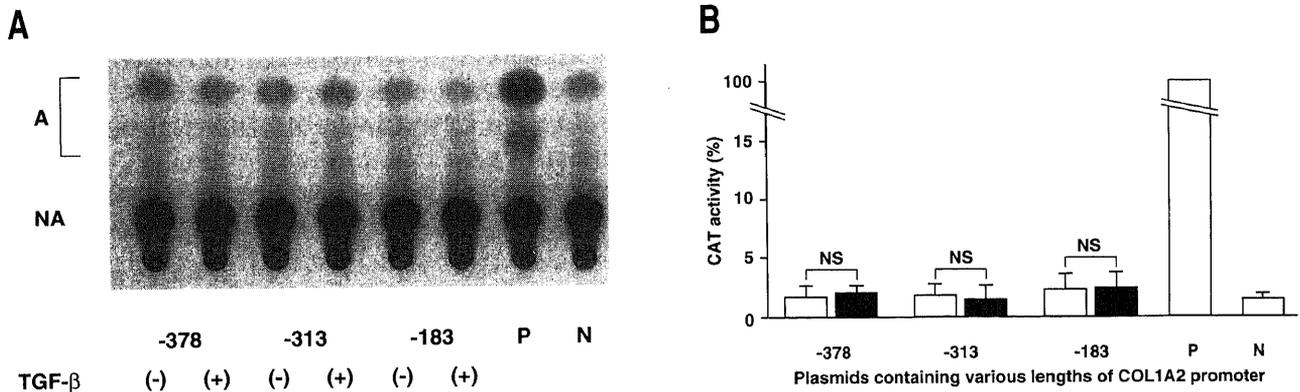


Fig. 5. Effect of TGF-β treatment on COL1A2 transcription in primary culture of hepatocytes. Transcriptional activity of different lengths of COL1A2 upstream sequence linked to the CAT reporter gene was determined after transfection into primary culture of hepatocytes untreated (-) or treated (+) with 2 ng/ml of TGF-β. A representative CAT assay film is shown in panel A. In panel B, activity of each construct was normalized against the co-transfected pSVXP1 plasmid. The values are mean ± SD obtained from five independent tests and expressed relative to that of pSVCAT3 transfectants (P). NS, not significant. N, negative control (pBLCAT3). □, untreated; ■, TGF-β-treated.

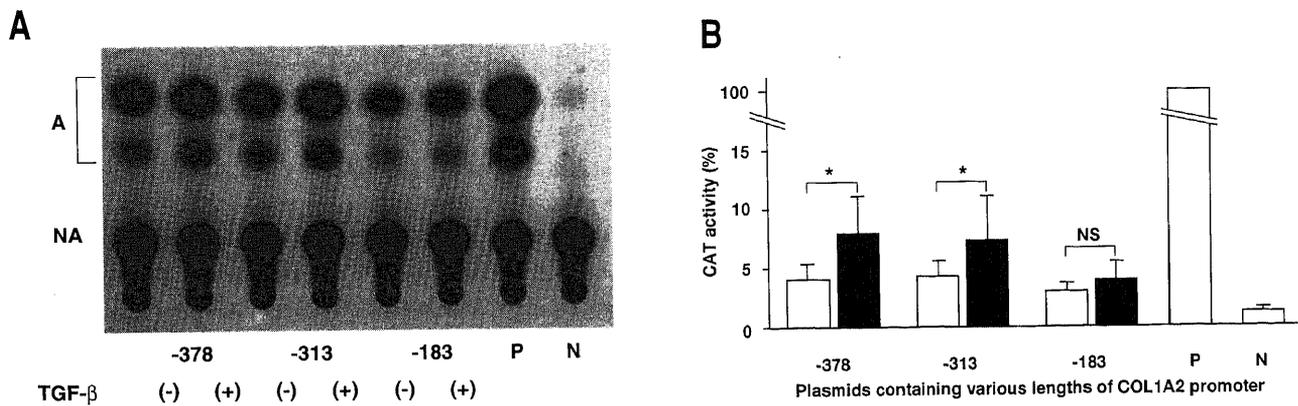


Fig. 6. Effect of TGF-β treatment on COL1A2 transcription in an LSC clone. Transcriptional activity of the same chimeric constructs shown in Fig. 5 was determined after transfection into an LSC clone, CFSC-2G, plated on type I collagen-coated dishes and untreated (-) or treated (+) with 2 ng/ml of TGF-β. A representative CAT assay film is shown in panel A. In panel B, activity of each construct was normalized against the co-transfected pSVXP1 plasmid. The values are mean ± SD obtained from six independent tests and expressed relative to that of pSVCAT3 transfectants (P). The asterisk means that the value in TGF-β-treated cells is significantly higher than in untreated transfectants. NS, not significant. N, negative control (pBLCAT3). □, untreated; ■, TGF-β-treated.

ター断片のCAT活性の有意な増加を認めた(図6)のに対して、初代培養肝細胞では、CAT活性の増加は認められなかった(図5)。-183 COL1A2 プロモーター断片は、初代培養肝細胞およびCFSC-2GいずれにおいてもTGF- $\beta$ に対して反応を示さなかった(図5, 6)。

### 考 察

近年の研究により、LSCが線維肝におけるI型コラーゲンの主要産生細胞であること<sup>51,27,28)</sup>、またTGF- $\beta$ が肝の線維化過程におけるLSCのコラーゲン遺伝子発現に重要な役割を演じていること<sup>29-32)</sup>が次第に明らかとなってきた。これに対して、実質細胞である肝細胞によるコラーゲン産生の生理的および病理的意義については、必ずしも一致した見解が得られていない<sup>33)</sup>。初期の研究では、初代培養肝細胞がI型コラーゲンを産生すると言われていた<sup>61-63)</sup>。しかしながら、この所見はコラーゲン産生が肝実質細胞に混入したわずかなLSCに由来する可能性<sup>34)</sup>に加え、不適当なインビトロの培養条件に適合するための現象に過ぎないのかもしれない。

インビトロラベリング法を用いた以前の検討によれば、正常肝および線維肝における新生コラーゲンの大部分は肝実質細胞由来であるとされていた<sup>35,36)</sup>。しかしながら、最近の改良された方法では、このことは否定され、むしろLSCに由来することが示されている<sup>37)</sup>。さらに、近年の分子生物学的手法の発達により局所でのコラーゲン遺伝子発現を検出することが可能になった。正常および線維化肝組織におけるコラーゲン遺伝子転写産物が主に間葉系細胞に検出され、肝実質細胞ではほとんど検出されないか検出されても極めてわずかであることが一連の実験で明らかにされた<sup>51,28,33,39)</sup>。最近では、COL1A1<sup>40)</sup>およびCOL1A2(稲垣ら、投稿中)のプロモーター遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスに四塩化炭素を投与した肝線維化モデルで、間葉系細胞にのみトランスジーンの発現を認め、肝実質細胞には認められなかったことが報告されている。

これまで著者らは、COL1A2の基礎転写に必須で、TGF- $\beta$ による遺伝子発現の促進にも重要な上流領域を、間葉系細胞である皮膚線維芽細胞<sup>9)</sup>およびLSC<sup>10)</sup>を用いて同定した。しかしながら、肝実質細胞におけるコラーゲン遺伝子発現の分子生物学的調節機構は、全く解明されていなかった。本研究は、肝実質細胞と間葉系細胞におけるI型コラーゲン遺伝子の発現の相違を規定する調節機構を明らかにすることを目的に行われた。

初めに、ヒト肝細胞癌由来細胞株HuH7におけるCOL1A2転写を解析した。HuH7はCOL1A2 mRNAを発現するが、その発現量はヒト皮膚線維芽細胞に比べ極めて少ないことが示されている<sup>10)</sup>。初代培養ヒト皮膚線維芽細胞を用いたCATアッセイの結果<sup>17)</sup>とは異なり、-3.5COL1A2/CATの転写活性はSV40プロモーター連結CATプラスミドの活性の4%以下と低値であった。COL1A2プロモーターの-313から+58塩基間の領域は、初代培養ヒト皮膚線維芽細胞<sup>9,11)</sup>LSC<sup>10)</sup>といった間葉系細胞におけるCOL1A2転写に必須であり、高いエンハンサー活性を有することが示されている。このうち-313から-183塩基間を欠損すると、これら間葉系細胞におけるCOL1A2転写活性は著明に低下する<sup>9,11)</sup>。COL1A2の上流領域を種々の長さで切断した一連のCAT遺伝子連結プラスミドを用いて検討したトランスフェクションアッセイの結果、HuH7においては-313から-183塩基間の強いエンハンサー活性が欠如しており、間葉系細胞を用いて得

られた結果とは明らかに異なるものであった。さらに間葉系細胞にみられたリプレッサーの結合部位<sup>10)</sup>、すなわち-378から-313塩基間を欠失しても、HuH7細胞におけるCOL1A2の転写活性には変化を認めなかった。

次いで、これらHuH7におけるCOL1A2プロモーター活性測定の結果が、単に肝細胞の癌化に伴う二次的な現象を示している可能性を否定するために、ラット初代培養肝細胞を用いて同様にCOL1A2転写を解析した。ラット初代培養肝細胞へCOL1A2プロモーター断片をトランスフェクションしたところ、HuH7で得られた結果と一致して-313から-183塩基間のエンハンサー活性および-330から-297塩基間のリプレッサー活性が欠如していた。さらに重要なことは、間葉系細胞とは異なり、肝実質細胞ではTGF- $\beta$ 添加によるCOL1A2転写の促進を認めなかった。今回の実験に供した初代培養における肝実質細胞の比率は95%以上であるが、それでも混入した少数のLSCがTGF- $\beta$ に反応する可能性も考慮すべきである。LSCの混入は肝細胞を用いた実験結果を過小評価する可能性が考えられるが、それにもかかわらず、初代培養細胞にトランスフェクションされたCOL1A2プロモーター断片はTGF- $\beta$ に反応を示さなかった。したがって、肝実質細胞と間葉系細胞ではCOL1A2転写機構の調節は異なっているものと考えられた。

以上のCOL1A2プロモーター領域の転写活性の解析と並行して、各種細胞の核タンパク抽出液を用いて、COL1A2プロモーター領域に結合するタンパクの性状について検討した。CF37の核タンパク抽出物を用いた詳細な検討により、ボックスAはさらに2つの互いに重複する亜領域、ボックス5A(-330から-297塩基間)とボックス3A(-313から-286塩基間)から構成されることが明らかにされている<sup>9)</sup>。CF37においては、ボックス5Aは未知のリプレッサータンパク結合部位であり、一方、ボックス3Aは普遍的な核転写因子であるSp1と結合することが示された<sup>9)</sup>。さらに、未知の核転写因子がボックスBに結合し、Sp1との相互作用により、COL1A2遺伝子発現における基礎転写とTGF- $\beta$ による転写促進の媒介に重要であることが見だされている<sup>9)</sup>。DNase Iフットプリンティングアッセイにおいて、HuH7およびCF37の核タンパク抽出液は-378から-183塩基間で同様のタンパク結合パターンを示した。一方、ゲルシフトアッセイでは、ボックス3Aに結合するタンパク複合体は、CF37、HuH7およびJurkatとも共通で、Sp1との結合を示しているものと考えられた<sup>9)</sup>のに対して、ボックス5AおよびボックスBに結合するタンパク複合体はいずれも異なる泳動パターンを示した。しかも、ヒトT細胞性白血病由来細胞株からの核タンパク抽出液と5Aプローブとの結合パターンはHuH7およびCF37のいずれとも異なっていた。このボックス5A結合タンパク複合体は、組織もしくは細胞種特異性を示すことが明らかとなっており<sup>10)</sup>、各種ヒト細胞を用いた本研究においてもボックス5A結合タンパクの細胞特異性が明らかとなった。

以上より、ボックス5AおよびボックスB結合タンパクの細胞特異的修飾がこれらの領域に存在するリプレッサー活性やエンハンサー活性を不活化し、肝実質細胞と間葉系細胞におけるI型コラーゲン遺伝子の発現の差異の一因になっている可能性が考えられた。

### 結 論

ヒト肝細胞癌由来細胞株HuH7およびラット初代培養肝細胞

を用いて、プロ  $\alpha 2$  (I) コラーゲン遺伝子の転写調節機構を解析し、以下の結論を得た。

1. COL1A2のプロモーター領域を種々の長さに切断しCAT遺伝子に連結したプラスミドをヒト肝細胞癌由来細胞株HuH7にトランスフェクションした結果、-378から-183塩基間のエンハンサー活性や-330から-297領域に局在するリプレッサー活性は認められなかった。

2. HuH7およびヒト胎児皮膚由来線維芽細胞CF37から得られた核タンパク抽出液を用いたゲルシフトアッセイでは、TbREおよびその近傍の負のシスエレメントに結合するタンパク複合体はいずれも異なる泳動パターンを示した。

3. ラット初代培養肝細胞にCOL1A2上流領域をトランスフェクションした結果、-313から-183塩基間のエンハンサー活性が欠如し、TGF- $\beta$ 刺激に対する転写活性の亢進も認められなかった。

以上の実験結果から、肝実質細胞と間葉系細胞においてはCOL1A2の分子生物学的な転写調節機構が異なること、また肝実質細胞におけるCOL1A2の発現の相対的低下とTGF- $\beta$ に対する反応性の欠如が、少なくとも一部には、TbREを含むプロモーター領域に結合する核タンパクの細胞特異的修飾に基づく可能性が考えられた。

#### 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御検閲を賜りました恩師金沢大学第1内科小林健一教授に深甚なる感謝を表します。また、本研究遂行に際し、御指導頂きました金沢大学第1内科金子周一助教授に心から謝意を表します。終始直接の御指導を賜りました国立金沢病院稲垣豊博士に心から深く感謝します。さらに御協力と御援助を頂いた第1内科第2研究室の諸先生方および研究協力員の皆様に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は第31回日本肝臓学会総会(1995年、福岡)、ならびに第32回日本肝臓学会総会(1996年、神戸)において発表した。

#### 文 献

- 1) Diegelmann RF, Lindblad WJ, Cohen IK. Fibrogenic processes during tissue repair. *In* ME Nimni (ed). Collagen: Biochemistry and Biomechanics. Vol II, p 113-131, CRC Press, Boca Raton, 1988
- 2) Ramirez F, Di Liberto M. Complex and diversified regulatory programs control the expression of vertebrate collagen genes. *FASEB J* 4: 1616-1623, 1990
- 3) Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Bissell DM. Hepatic lipocytes: The principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8681-8685, 1985
- 4) Mak KM, Lieber CS. Lipocytes and transitional cells in alcoholic liver disease: a morphometric study. *Hepatology* 8: 1027-1033, 1988
- 5) Milani S, Herbst H, Schuppan D, Hahn EG, Stein H. *In situ* hybridization for procollagen types I, III and IV mRNA in normal and fibrotic rat liver: evidence for predominant expression in nonparenchymal liver cells. *Hepatology* 10: 84-92, 1989
- 6) Tseng SCG, Lee PC, Eells PF, Bissell DM, Smuckler EA, Stern R. Collagen production by rat hepatocytes and sinusoidal cells in primary monolayer culture. *Hepatology* 2:13-18, 1982
- 7) Diegelmann RF, Guzelian PS, Gay R, Gay S. Collagen formation by the hepatocyte in primary monolayer culture and *in vivo*. *Science* 219: 1343-1345, 1983
- 8) Tseng SCG, Smuckler EA, Stern R. Types of collagen synthesized by normal rat liver hepatocytes in primary culture. *Hepatology* 3:955-963, 1983
- 9) Inagaki Y, Truter S, Ramirez F. Transforming Growth Factor- $\beta$  stimulates  $\alpha 2$  (I) collagen gene expression through a *cis*-acting element that contains an Sp1 binding site. *J Biol Chem* 269: 14828-14834, 1994
- 10) Inagaki Y, Truter S, Greenwel P, Rojkind M, Unoura M, Kobayashi K, Ramirez F. Regulation of the  $\alpha 2$  (I) collagen gene transcription in fat-storing cells derived from a cirrhotic liver. *Hepatology* 22: 573-579, 1995
- 11) Inagaki Y, Truter S, Tanaka S, Di Liberto M, Ramirez F. Overlapping pathways mediate the opposing actions of tumor necrosis factor- $\alpha$  and transforming growth factor- $\beta$  on  $\alpha 2$  (I) collagen gene transcription. *J Biol Chem* 270: 3353-3358, 1995
- 12) Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T Sato J. Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 42: 3858-3863, 1982
- 13) Inagaki Y, Tsunokawa Y, Sakamoto H, Hirohashi S, Kobayashi K, Hattori N, Ramirez F, Terada M, Sugimura T. Presence of different types of procollagen messenger RNAs in human hepatoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 148: 869-875, 1987
- 14) Greenwel P, Schwartz M, Rosas M, Peyrol S, Grimaud JA, Rojkind M. Characterization of fat-storing cell lines derived from normal and CCl<sub>4</sub>-cirrhotic livers. Differences in the production of interleukin-6. *Lab Invest* 65: 644-53, 1991
- 15) Gillis S, Watson J. Biochemical characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. *J Exp Med* 152: 1709-1719, 1980
- 16) Summerfield JA, Vergalla J, Jones EA. Modulation of a glycoprotein recognition system on rat hepatic endothelial cells by glucose and diabetes mellitus. *J Clin Invest* 69: 1337-1347, 1982
- 17) Boast S, Su M, Ramirez F, Sanchez M, Avvedimento EV. Functional analysis of *cis*-acting DNA sequences controlling transcription of the human type I collagen genes. *J Biol Chem* 265: 13351-13356, 1990
- 18) Luckow B, Schütz G. CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements. *Nucleic Acids Res* 15: 5490, 1987
- 19) Gorman CM, Moffat LF, Howard BH. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2: 1044-1051, 1982
- 20) Nordeen SK. Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *BioTechniques* 6: 454-457, 1988
- 21) Ponder KP, Dunbar RP, Wilson DR, Darlington GJ, Woo S. Evaluation of relative promoter strength in primary hepatocytes using optimized lipofection. *Hum Gene Ther* 2: 41-52, 1991
- 22) Jarnagin WR, Debs RJ, Wang S-S, Bissell DM. Cationic lipid-mediated transfection of liver cells in primary culture.

Nucleic Acids Res 20: 4205-4211, 1992

23) de Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 7: 725-737, 1987

24) Morris GF, Price DH, Marzluff WF. Synthesis of U1 RNA in a DNA-dependent system from sea urchin embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 3674-3678, 1986

25) Truter S, Di Liberto M, Inagaki Y, Ramirez F. Identification of an upstream regulatory region essential for cell type-specific transcription of the pro- $\alpha 2$  (V) collagen gene (COL5A2). *J Biol Chem* 267: 25389-25395, 1992

26) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976

27) Takahara T, Kojima T, Miyabayashi C, Inoue K, Sasaki H, Muragaki Y, Ooshima A. Collagen production in fat-storing cells after carbon tetrachloride intoxication in the rat. Immunoelectron microscopic observation of type I, type III collagens, and prolylhydroxylase. *Lab Invest* 59: 509-521, 1988

28) Maher JJ, McGuire RF. Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis in vivo. *J Clin Invest* 86: 1641-1648, 1990

29) Czaja MJ, Weiner FR, Flanders KC, Giambone M-A, Wind R, Biempica L, Zern MA. In vitro and vivo association of transforming growth factor- $\beta 1$  with hepatic fibrosis. *J Cell Biol* 108: 2477-2482, 1989

30) Matsuoka M, Pham N-T, Tsukamoto H. Differential effects of interleukin-1 $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ , and transforming growth factor  $\beta 1$  on cell proliferation and collagen formation by cultured fat-storing cells. *Liver* 9: 71-78, 1989

31) Nakatsukasa H, Nagy P, Evarts RP, Hsia C-C, Marsden E, Thorgeirsson SS. Cellular distribution of transforming growth factor- $\beta 1$  and procollagen type I, III and IV transcripts in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *J Clin Invest* 85: 1833-

1843, 1990

32) Armendariz-Borunda J, Katayama K, Seyer JM. Transcriptional mechanisms of type I collagen gene expression are differentially regulated by interleukin-1 $\beta$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ , and transforming growth factor  $\beta$  in Ito cells. *J Biol Chem* 267: 14316-14321, 1992

33) Fridman SL. Cellular sources of collagen and regulation of collagen production in liver. *Seminars Liver Dis* 10: 20-29, 1990

34) Maher JJ, Bissell DM, Friedman SL, Roll FJ. Collagen measured in primary cultures of normal rat hepatocytes derives from lipocytes within the monolayer. *J Clin Invest* 82: 450-459, 1988

35) Chojkier M. Hepatocyte collagen production in vivo in normal rats. *J Clin Invest* 78: 450-459, 1986

36) Chojkier M, Lyche KD, Filip M. Increased production of collagen in vivo by hepatocytes and nonparenchymal cells in rats with carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. *Hepatology* 8: 808-814, 1988

37) Ogata I, Mochida S, Tomiya T, Fujiwara K. Minor contribution of hepatocytes to collagen production in normal and early fibrotic rat livers. *Hepatology* 14: 361-367, 1991

38) Milani S, Herbst H, Schuppan D, Surrenti C, Riecken EO, Stein H. Cellular localization of type I, III and IV procollagen gene transcripts in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol* 137: 59-70, 1990

39) Milani S, Herbst H, Schuppan D, Kim KY, Riecken EO, Stein H. Procollagen expression by nonparenchymal rat liver cells in experimental biliary fibrosis. *Gastroenterology* 98: 175-184, 1990

40) Houglum K, Buck M, Alcorn J, Contreras S, Bornstein P, Chojkier M. Two different *cis*-acting regulatory regions direct cell-specific transcription of the collagen  $\alpha 1$  (I) gene in hepatic stellate cells and in skin and tendon fibroblasts. *J Clin Invest* 96: 2269-2276, 1995

**Cell Lineage-specific Regulatory Mechanisms Control Pro  $\alpha 2$  ( I ) Collagen Gene Expression in Parenchymal Hepatocytes and Liver Stellate Cells** Tomoyuki Nemoto, Department of Internal Medicine ( I ), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — J. Juzen Med Soc., **106**, 170 — 179 (1997)

**Key words** COL1A2, transcription, TGF- $\beta$ , primary culture of rat hepatocyte, liver fibrosis

#### Abstract

While liver stellate cells (LSC) are considered to be the major source of collagen in fibrotic liver, physiopathological significance of collagen production by parenchymal hepatocytes is still controversial. We have previously shown that the -378 to -183 upstream sequence of  $\alpha 2$  ( I ) collagen gene (COL1A2) is essential for basal transcription and contains the TGF- $\beta$ -responsive element (TbRE) that mediates the stimulatory effect of the growth factor on gene expression in skin fibroblasts (CF37) and an LSC clone (CFSC-2G). In order to determine whether common regulatory mechanisms control COL1A2 transcription in both parenchymal and mesenchymal cells, cell transfection and DNA binding assays were performed using a collagen-producing human hepatoma cell line (HuH7) and primary culture of rat hepatocytes. Cell transfection assays indicated that the strong enhancer activity observed between -313 and -183 in CF37 and CFSC-2G was not detected in HuH7. Although similar protein binding patterns were recognized in footprinting analyses of the -378 to -183 region using HuH7 and CF37 nuclear extracts, gel mobility shift analyses indicated that different sizes of nuclear factors bind to the TbRE and the neighboring negatively *cis*-acting element. In addition, COL1A2 upstream sequence transfected into primary culture of rat hepatocytes also lacked the enhancer activity between -313 and -185, and, unlike in CF37 or CFSC-2G, TGF- $\beta$  treatment did not stimulate gene transcription in parenchymal hepatocytes. Altogether, these results indicated that relatively low levels of COL1A2 expression and loss of TGF- $\beta$ -responsiveness in parenchymal hepatocytes are caused, at least in part, by cell lineage-specific modifications of the nuclear proteins that bind to the upstream sequence including the TbRE.