

## サイトカインによる肝星細胞の細胞外マトリックス 発現調節に関する研究

井上, 麻美

<https://hdl.handle.net/2324/1654686>

---

出版情報：九州大学, 2015, 博士（システム生命科学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏 名 : 井上 麻美

論 文 名 : サイトカインによる肝星細胞の細胞外マトリックス発現調節に関する研究

区 分 : 甲

## 論 文 内 容 の 要 旨

肝臓は、生体構成成分の代謝系の大部分を担い、生命の恒常性を維持している。この多彩な生命現象は、肝細胞を筆頭に、肝在住のマクロファージであるクッパー細胞、血管内皮細胞、肝星細胞などの非肝実質細胞と呼ばれる様々な細胞の相互作用により織り成される。肝臓に唯一存在する間葉系の細胞である肝星細胞は、肝障害時に線維芽細胞様を呈する活性化型の肝星細胞へと形質転換し、細胞外マトリックスの産生と分解を制御することで、肝再生の中心的な役割を担っている。肝炎ウイルスや肥満による慢性的な炎症に起因する、細胞外マトリックスの過剰な蓄積は、肝線維化症を経て肝硬変へと移行する。一方で、肝線維化症・肝硬変に対する臨床的に有効な治療方法は、未だ存在しないのが現状である。

肝硬変の原因に成り得る細胞外マトリックスは、クッパー細胞や、肝星細胞自身の分泌する TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 等の炎症性サイトカインにより制御されている。この様に生体内では、複数のサイトカインによって細胞外マトリックスの産生を制御しているが、これまでに複合的なサイトカインの影響については十分な解明がなされていない。そこで、本研究では、複合的なサイトカインによる肝星細胞の細胞外マトリックス発現調節機構の解明を目的とし、ヒト肝癌患者由来の初代培養肝星細胞 (primary hepatic stellate cell: pHSC) 及び不死化細胞株である LX-2 細胞を用いて、その影響を解析した。

まず、ヒト肝癌患者由来の初代培養肝星細胞を用いて、肝線維化に関わる複数のサイトカインに対する応答を、肝線維化マーカー遺伝子による定量的 PCR を用いて評価した。暴露したサイトカインは、これまでに肝線維化症との関連が報告されている interleukin-6 (IL-6), IL-1  $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), platelet-derived growth factor (PDGF), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 及び transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) の 5 種類である。肝線維化マーカーとして、細胞外マトリックスの主要な構成成分である I 型コラーゲンの分解酵素 matrix metalloproteinase-1 (MMP1) を用いた。

その結果、単独のサイトカイン刺激では、IL-1 $\alpha$  でのみ MMP1 遺伝子の発現が 3 倍程度に上昇したが、その他のサイトカインはわずかな応答に留まった。そこで、複合的なサイトカイン刺激に対する影響を解析した結果、複数サイトカインの同時刺激により、MMP1 遺伝子の発現が相乗的に誘導された。そこで、原因因子を特定した結果、TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\alpha$  の共刺激が MMP1 遺伝子の発現を相乗的に誘導することを明らかにした。また、これらのサイトカイン同時刺激によって  $\alpha$ -SMA の発現が減少することを新たに見出した。特に  $\alpha$ -SMA は、タンパク質レベルでも、その発現がサイトカインの同時刺激によって抑制されることを確認した。これより、複合的なサイトカイン TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\alpha$  が、抗線維化誘導因子としての役割を担う可能性が示唆された。

そのため、DNA マイクロアレイを用いて、これらサイトカインによって誘導される遺伝子を網羅的に解析した。その結果、サイトカインの共刺激によって、特徴的に発現変動する遺伝子が同定

された。次に、TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\alpha$  下流に存在するシグナル伝達経路を解析するため、マイクロアレイデータを解析した結果、TNF- $\alpha$  受容体スーパーファミリー遺伝子の発現が IL-1 受容体と比較して、大きく変動することを明らかにした。

さらに、線維化を抑制するシグナル伝達経路を明らかにするため、サイトカイン受容体下流に存在する MAPK 経路の p38 $\alpha$ /B、JNK1/2、ERK1/2 を阻害剤により阻害した。その結果、p38 及び ERK1/2 を阻害することにより、MMP1 遺伝子の相乗的な発現誘導が阻害された。以上より、サイトカイン同時刺激は、MAPK 経路の p38、ERK1/2 の活性化を介し、肝星細胞の抗線維化活性を惹起すること明らかとした。

次に、これら2つの複合的なサイトカインが、生体の線維化したマウスにおいても有効かを解析するため、四塩化炭素により誘導した肝硬変モデルマウス及び急性肝炎モデルマウスを作成し、サイトカイン投与を行った。その影響は、線維化マーカーの遺伝子である MMP13 及び  $\alpha$ -SMA の発現を qPCR にて定量することにより解析した。その結果、齧歯類において、MMP1 と同等の機能が報告されている MMP13 の相乗的な発現上昇は確認できなかった。しかしながら、 $\alpha$ -SMA 遺伝子の発現は、肝星細胞と同様に減少することを明らかにした。そこで、抗  $\alpha$ -SMA 抗体を用いた免疫抗体染色により、タンパク質レベルでの影響を解析した。その結果、サイトカイン同時投与を行った健康なマウスの肝臓での発現レベルとほぼ同等の発現量にまで減少することを明らかにした。これらの結果は、複合的なサイトカイン、TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\alpha$  は、実際に線維化した肝硬変モデルマウスにおいても、 $\alpha$ -SMA の発現抑制を介し、抗線維化を誘導する可能性を示唆していた。さらに、肝再生の観点から、肝細胞の細胞分裂を細胞分裂の S 期に発現する抗 PCNA 抗体を用いた免疫組織染色にて解析した結果、肝硬変モデルマウスでは、慢性的な炎症により肝細胞の盛んな分裂が見られたが、サイトカイン同時投与を行ったマウスでは、その発現が減少していた。さらに、ヘマトキシリン・エオシンによる組織染色像と比較した結果、サイトカイン同時投与を行ったマウスでは、正常なマウスの組織像に類似した像を示しており、慢性的な肝障害による盛んな細胞分裂の繰り返しがサイトカイン刺激により抑制された可能性を示唆していた。

以上、本論文では、TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\alpha$  の複合的なサイトカイン刺激が、肝星細胞において抗線維化を誘導することを *in vitro* で見出し、実際の線維化した肝臓でも抗線維化を誘導する可能性を *in vivo* においても見出した。これらの結果は、肝星細胞の複合的なサイトカインによる細胞外マトリックス発現調節及び肝再生へ向けた重要な知見を含んでおり、肝星細胞下流の両サイトカインのクロストークポイントを明らかにできれば肝硬変の新たな薬剤標的と成り得ることが期待される。