

論文内容の要旨

論文題目

The role of Thy1⁺ cells in fibrogenesis during mouse chronic liver injury

(マウス慢性肝障害時の線維質形成における Thy1⁺ 細胞の役割)

氏 名 勝又 廉

【研究背景・目的】

肝臓は生体の恒常性維持のためにタンパク質合成、糖代謝、解毒など多様な生理的機能を担う臓器である。また、肝臓内に流入する血液には栄養素の他に、薬剤や毒物など様々な物質が含まれており、肝臓は常に障害の危険に曝されている。肝臓は非常に高い再生力を持つことで知られており、こうした組織障害に対して修復と再生を促すことで常に応答している。一般的に、組織障害からの修復は、一時的にコラーゲンなどの線維質を損傷箇所で産生することを伴う。しかし、障害が慢性化し、障害による刺激が持続すると、コラーゲンの過剰な産生と蓄積が起こる。これが肝臓においては、組織の線維化による肝線維化または肝硬変などの病態への進行につながると考えられている。現在に至るまで、肝線維化に対する根本的な治療法はなく、病因を除去することによって組織障害による線維化刺激を消失させる対症療法が中心となっている。一方で、病因が明確で除去可能な肝炎ウイルス、アルコール、薬物などと違い、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）をはじめとする、病因が明確でなく除去が困難な病態に起因する肝線維化については有効な治療法が存在しない。つまり、肝線維化の発症機構を細胞・分子レベルで解明することが、有効な治療戦略を構築する上で重要となる。よって、本研究ではマ

ウスモデルを用いて肝線維化に関わる細胞種を同定し、病態の発症メカニズムを解明することを目指した。

【本研究のアプローチ】

肝線維化において、コラーゲンなどの線維質の産生源は、肝障害時に肝星細胞（Hepatic Stellate Cells: 以下、HSCs）や門脈域線維芽細胞（Portal Fibroblasts: 以下、PFs）などの間葉系細胞が活性化されて生じる、筋線維芽細胞（Myofibroblasts: 以下、MFs）であると考えられている。HSCs については細胞内でのビタミン A の貯蔵を指標とした密度遠心による単離法が早くに確立され、*in vitro* での詳細な解析が行われてきた。このため、肝線維化における HSCs の関与や重要性、活性化機構に関してはすでに多くの知見が得られている。一方で、肝線維化への PFs の関与の実態については未だに議論が続いており、不明なままである。その要因の一つとして、PFs を明確に定義する特異的な分子マーカーが明らかになっておらず、単離法も確立されていないため、その解析が遅れていることが挙げられる。

近年、肝臓の各種構成細胞をそれぞれ標識する細胞表面マーカーとそれらに対する抗体が次々と報告・作製され、フローサイトメーターを用いて細胞を分類・分取することで、各細胞種の詳細な性状解析を行うことが可能となりつつある。本研究では、これまで特異的な細胞表面マーカーが不明であった PFs に対して、表面抗原 CD90 (Thymus cell antigen-1: 以下、Thy1) を新たに同定し、これを発現する細胞種の詳細な解析を行った。

【研究結果】

マウス肝組織中での Thy1 発現細胞の分布を組織免疫染色法にて観察した結果、門脈周囲での Thy1 の強い染色が認められた他に、実質域にも多数の Thy1 発現細胞が点在していることが観察された。これらの細胞は、その存在領域によって

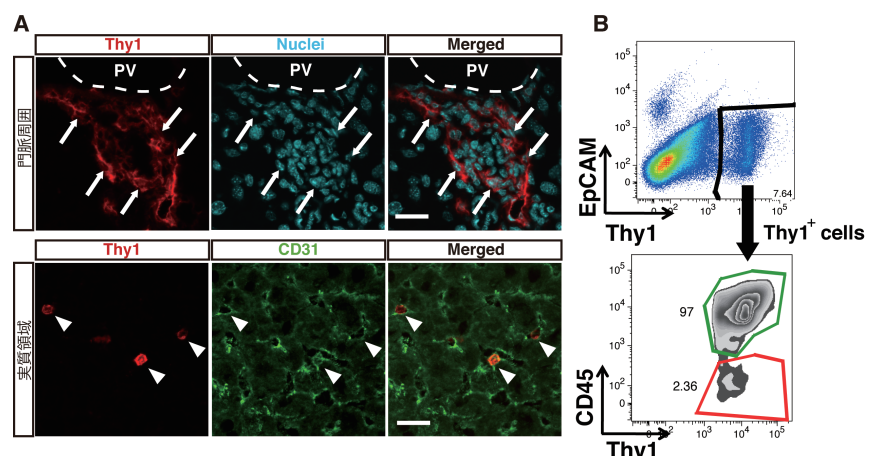


Figure 1. (A) 肝組織中の Thy1 発現細胞の分布。上図、門脈周囲に存在する扁平な Thy1 発現細胞(矢印)。下図、肝実質域の CD31 発現類洞内皮細胞の内腔に存在する球状な Thy1 発現細胞(矢印型)。(B) Thy1 発現細胞はフローサイトメーター上で、CD45 の発現を指標に 2 種類に大別される。

細胞形態が異なっていたことから、Thy1 単独による細胞種の定義は困難であると考えられた (Figure 1A)。そこで、FACS 解析により、マウス肝組織中に存在する Thy1 発現細胞は、血球系細胞の表面マーカーである CD45 の発現を指標に、Thy1⁺ CD45⁺ の T 細胞、Thy1⁺ CD45⁻ の間葉系細胞の二種類に分類できた (Figure 1B)。また、肝実質域に点在していた Thy1 発現細胞は CD45⁺ であったのに対して、門脈周囲の Thy1 発現細胞は CD45⁻ であった。更に、門脈周囲に存在する Thy1 発現細胞は、PFs が発現すると従来考えられていた分子マーカーを発現することが免疫染色法により観察された。これらのことから、細胞表面マーカーである Thy1 と CD45 の発現を指標に PFs を単離することが可能となった。

マウス肝臓内で Thy1 を発現する PFs (以下、Thy1⁺ 細胞) を、マーカーの発現を指標に単離し、その詳細な解析を行った。Thy1⁺ 細胞の *in vitro* での初代培養系を構築し観察したところ、Thy1⁺ 細胞はコラーゲン産生能が高い MFs 様の性質を示した。また、同様に肝障害時に活性化され、MFs 様に変化することで知られる HSCs を単離し培養したところ、Thy1⁺ 細胞と HSCs はビタミン A の貯蔵について顕著な違いが観察された。Thy1⁺ 細胞はビタミン A の貯蔵が認められなかったのに対して、HSCs は明らかなビタミン A の貯蔵が認められた。また、FACS 解析の結果、ビタミン A の自家蛍光と Thy1 の発現は排他的であり、Thy1⁺ 細胞と HSCs はフローサイトメーター上で区別

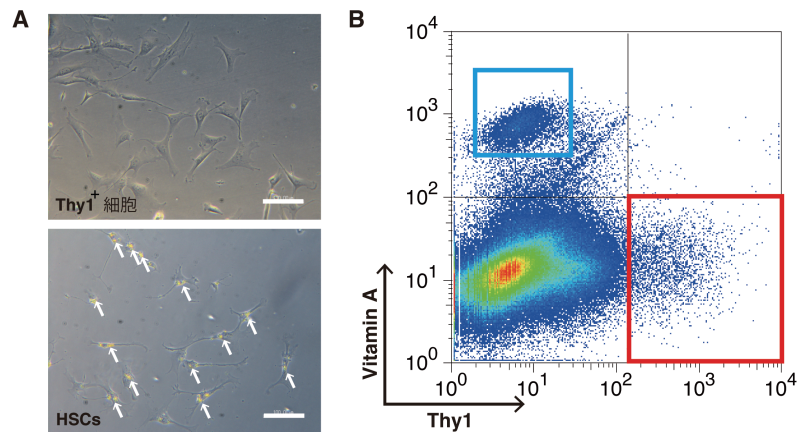


Figure 2. (A) Thy1⁺ 細胞と HSCs はビタミン A の貯蔵 (矢印) について、顕著な違いが認められる。(B) Thy1 発現細胞とビタミン A 貯蔵細胞は互いに異なる細胞種である。

することが可能な別種の細胞であった。これにより、PFs と HSCs をそれぞれ、Thy1 の発現とビタミン A の貯蔵を指標として解析することが可能となった。加えて、Thy1⁺ 細胞と HSCs との間で遺伝子発現プロファイルを比較した結果、両者は高いコラーゲン産生能を有する一方で、従来用いられていた PFs や HSCs の分子マーカーの発現を指標に明確に区別できる別種の細胞であった。また、マウス肝臓内での局在について組織免疫染色法により観察したところ、Thy1⁺ 細胞は門脈域に存在するのに対して、HSCs は肝臓の実質域に存在しており、組織学的にもその局在が異なっていた。

次に、肝障害時での線維質形成における Thy1⁺ 細胞と HSCs の役割について検討を行った。その結果、興味深いことに、病因の異なる種々の慢性肝障害モデルをマウスに適用して肝線維化を誘導した際に、Thy1⁺ 細胞と HSCs による応答は、障害に依って異なることが見出された。

門脈付近で炎症や線維の蓄積が起こる胆汁うっ滞性肝障害モデルにおいては、門脈域に存在する Thy1^+ 細胞が線維形成に重要な役割を担うのに対して、肝臓の実質域で炎症や線維の蓄積が起こる薬剤性肝障害モデルにおいては、実質域に存在する HSCs が線維の産生を主に担っていた。すなわち、肝障害の種類により、異なる細胞種が、その存在領域と障害領域に対応するように線維産生に寄与していることが明らかとなった (Figure 3)。

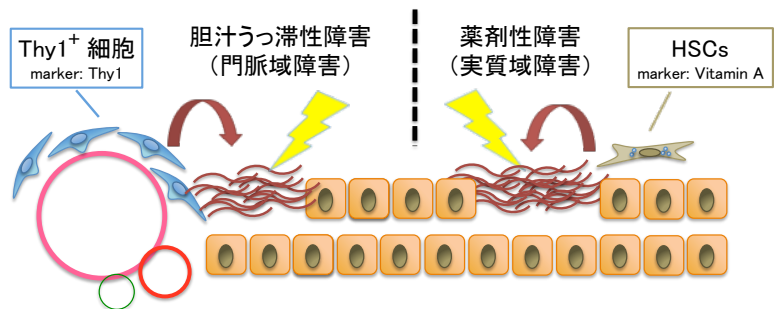


Figure 3. 各種肝障害時における Thy1^+ 細胞と HSCs による線維質形成

【結論・考察】

本研究により、これまで確たるマーカーが存在しなかった PFs を、細胞表面抗原である Thy1 を指標に単離し解析することで、慢性肝障害時における線維形成への各細胞種の役割が初めて明らかとなった。肝臓の障害領域と線維産生細胞の存在領域が対応していることから、肝障害時には損傷箇所の近傍に存在する細胞種が線維産生を行うことで、速やかな組織の修復・再生を促していると考えられる。今後は、肝障害時にこうした線維産生細胞をそれぞれ活性化する因子の探索を行い、慢性肝障害時における線維化発症メカニズムの全容を明らかにしたい。