

論文の内容の要旨

論文題目

肝線維化と再生における Semaphorin 3E の役割 (Role of Semaphorin 3E in liver fibrosis and regeneration)

氏名 谷貝 知樹

肝臓は栄養素の代謝、貯蔵、アルコール薬物の解毒等の生命活動に必須な機能を担う生体にとって最も重要な臓器の一つである。肝臓は肝小葉と呼ばれる六角柱ないし多角柱の構造単位から構成されており、その角には門脈、胆管、肝動脈の肝三つ組みが門脈域を形成する。門脈域からは肝細胞が放射状に並んでおり、その間を「類洞」と呼ばれる肝臓特異的な毛細血管が走り、肝小葉の中心を流れる中心静脈に向かって血液を運んでいる。類洞は類洞内皮細胞（LSEC）とそれを裏打ちする肝星細胞（HSC）から構成され、これら細胞種は肝細胞へ取り込まれる物質のフィルタリングや血液中ヒアルロン酸の取り込み、ビタミンAの保持等、生体の恒常性の維持に不可欠な肝機能の一部を担っている。一般に、ウイルスや薬物等によって肝炎が起きると細胞死が誘導され、肝臓の広範囲で組織壊死が起きるとともに、炎症によりHSCが活性化する。活性化したHSCは壊死により欠損した組織を補完するためにコラーゲンを分泌し、肝再生を促進する。しかし、肝炎が慢性化すると活性化HSCはコラーゲンを分泌し続け、これが蓄積して線維化が進行する。この肝線維化は健全な組織構造を傷害し、肝硬変や肝癌といった重篤な肝疾患へと発展させる。私の所属する研究室ではこのような肝再生および肝炎の慢性化にいたる分子メカニズムを解明するため、マウス慢性肝炎モデルにおいて発現量の変動する遺伝子をcDNAマイクロアレイにより網羅的に解析し、分泌タンパク質であるSemaphorin 3E (Sema3e)が慢性肝炎下で高発現する可能性が示されていた。そこで私はこの分子の肝炎における機能の解析を行った。

Semaphorin ファミリー分子は脊椎動物において 3 型から 7 型まで 5 つのクラスがあり、各クラス毎に膜タンパク質や分泌タンパク質の違いがあるとともに、複数のサブクラスが存在する。分泌型である 3 型セマフォリンファミリーに属する **Sema3e** は、膜タンパク質である **Plexin D1 (Plxnd1)** に対してリガンドとして機能し、個体発生において血管新生を抑制的に制御することが知られている。私は、これら **Sema3e** の既知の機能に着目し、肝臓特異的な毛細血管である類洞の再生を観察することにした。これまでの肝再生の研究では肝炎における類洞の再生については不明な点が多く残されていたため、当研究室で同定された **LSEC** 特異的表面抗原、**Stabilin 2 (Stab2)** に対する免疫組織化学染色法 (IHC) により肝炎誘導後に経時的に類洞の再生を観察した。マウスの腹腔内に四塩化炭素 (**CCl₄**) を投与すると中心静脈周囲に広範に肝細胞死が誘導された。**CCl₄** 投与後 24 時間から 48 時間にかけて **LSEC** が退縮する様子が観察され、72 時間後からは正常時と同じように中心静脈から放射状に配置された。すなわち、**CCl₄** による肝傷害では、投与後 24 時間から 48 時間の間に何らかのシグナルにより類洞の形態が大きく変化することが示された。さらに **CCl₄** を投与後、定量的 RT-PCR による経時的な **Sema3e** の発現量および肝傷害のマーカーである血清中の **ALT** の濃度を測定すると、**Sema3e** は投与後 24 時間から劇的に発現量が増加し、肝再生が始まるタイミングに合わせて急激に発現量が減少することが明らかとなった (Fig. 1A, B)。これらの結果から、**Sema3e** は肝障害／肝再生のごく初期において何らかの機能を有することが示唆された。次に **Sema3e** の発現細胞の同定を行った。**CCl₄** 投与後 24 時間の肝臓に対し抗 **Sema3e** 抗体を用いた IHC を行ったところ、中心静脈周囲の肝細胞が強く発現していることが明らかとなった (Fig. 1C)。さらに、マウス肝臓から灌流法により肝細胞を分離した後、活性酸素種の一つである過酸化水素を加えた培地で初代培養すると、経時的に **Sema3e** の発現量が増加することが明らかとなった (Fig. 1D)。これらの結果から、肝傷害時に **Sema3e** を発現するのは傷害を受けた肝細胞であり、その誘導は酸化ストレスであることが示唆された。次に、**Sema3e** の受容体である **Plxnd1** を発現している細胞の同定を試みた。**Sema3e** が類洞の再生や炎症反応に関わる可能性を考え、灌流法で肝臓から分離した細胞をセルソーターを用いて **LSEC** と **CD45** 陽性

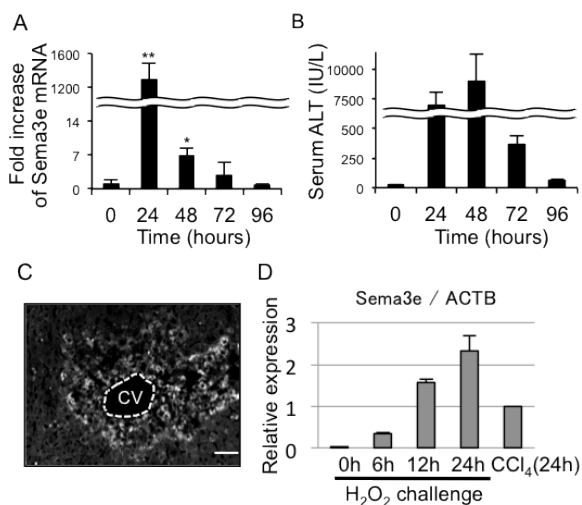


Figure 1. Sema3eは肝炎下で傷害を受けた肝細胞が発現する (A) CCl₄投与後の肝臓における経時的なSema3eの発現 (B) CCl₄投与後の経時的なALT値 (C) CCl₄投与後24時間のSema3eのIHC (D) 肝細胞をH₂O₂含有培地で初代培養した時の経時的なSema3eの発現変化

血液細胞を分離し、定量的 RT-PCR により *Plxnd1* の発現量を解析した。その結果、*Plxnd1* は正常肝および CCl_4 投与後 24 時間のいずれにおいても他の細胞種と比較して LSEC で顕著に高発現していることが明らかとなった。さらに正常肝から分離した LSEC を初代培養し、培地に *Sema3e* を添加したところ LSEC の仮足が有意に退縮した (Fig. 2A)。これらの結果から、肝細胞から分泌される *Sema3e* はパラクラインによって LSEC の運動能に影響を与える可能性が示された。肝傷害後の *Sema3e* の発現は一過的であることから、実際に *in vivo* でもこのような働きがあるのか確認するため、生体の肝細胞で特異的かつ持続的に目的遺伝子を発現させることが出来る Hydrodynamic tail-vein injection (HTVi) 法を用いた解析を行った。HTVi 法により *Sema3e* の発現ベクターを肝細胞に導入し 3 日後、 CCl_4 を投与し傷害と再生を誘導した。 CCl_4 投与から 72 時間後に IHC により再生された中心静脈周囲の類洞を観察すると、*Sema3e* を持続的に発現させることで、類洞の再生が顕著に乱れることが明らかとなった。さらに中心静脈周囲の類洞の密度を定量すると、*Sema3e* を強制発現させた個体群ではコントロール群と比較して有意に減少していた。このように、*in vivo* においても肝細胞が発現する *Sema3e* は類洞の再生に対して抑制的に機能することが明らかとなった。正常状態において LSEC は HSC の活性化を抑制することが報告されていることから、私はこの *Sema3e* の強制発現による類洞構造の乱れは HSC の活性化を反映しているのではないかと考えた。HTVi 法により持続的に *Sema3e* を発現し、 CCl_4 により傷害と再生を誘導した 72 時間後の肝臓切片に対して抗 *Stab2* 抗体と、HSC のマーカーとして知られる *p75NTR* に対する抗体を用いて IHC の二重染色を行った。その結果、*Sema3e* を強制発現させなかったコントロール群では、類洞が中心静脈から放射状に再生し HSC が LSEC を裏打ちする正常な類洞再生が見られたが、*Sema3e* を強制発現させた個体群では類洞の構造が乱れ、LSEC を裏打ちしてない HSC が多数確認された (Fig. 2B)。さらにウエスタンブロット法により HSC の活性化マーカーである α -SMA の発現量を調べたところ、やはり *Sema3e* 強制発現群で HSC が活性化していることが明らかとなった。一方、 CCl_4 を投与せず溶媒のみを

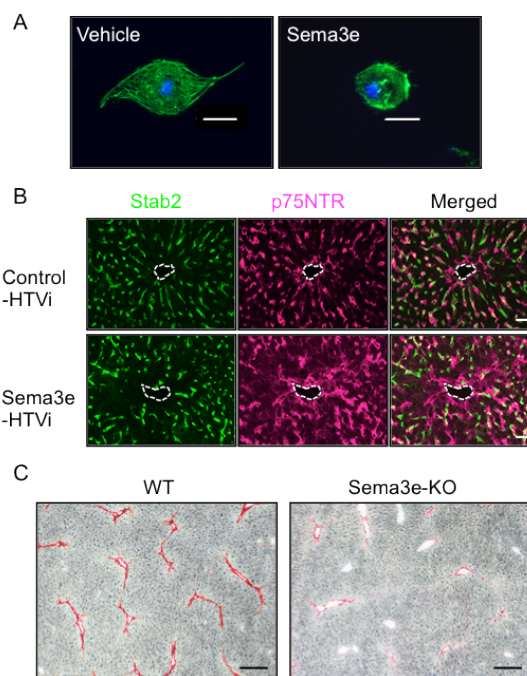


Figure 2. *in vitro*および*in vivo*における*Sema3e*の機能解析 (A)LSECを初代培養し、*Sema3e*を添加すると仮足が退縮する (B)*Sema3e*を持続的に発現させると類洞の再生が乱れ、HSCが活性化する (C)*Sema3e*が発現し続けるような慢性肝炎モデルでは、*Sema3e*-KOマウスは線維化の軽減が見られる

投与した群では、**Sema3e** の強制発現の有無に関わらず **HSC** の活性化は見られなかったことから、**HSC** の活性化は **Sema3e** の直接的な作用によるものではないことが示唆された。**HSC** の活性化は肝再生の初期においてコラーゲンを分泌し再生の足場を形成することで肝再生を促進するが、長期的に活性化し続けるとコラーゲンが蓄積し続け肝線維化の増悪化を引き起こす。したがって、私はこのような **Sema3e** の持続的な発現に起因する間接的な **HSC** の活性化は、慢性肝炎に伴う肝線維化に関与するのではないかと考えた。これを証明するため、**Sema3e** ノックアウトマウス (**KO**) を用いた実験を行った。マウスに **CCl₄** を頻回投与し、中心静脈周囲で持続的に **Sema3e** が発現するような条件のもとで、傷害と再生を繰り返した。その結果、野生型マウスでは中心静脈周囲で顕著にコラーゲン線維の蓄積が見られたのに対し、**Sema3e-KO** マウスではその蓄積が軽減された (**Fig. 2C**)。実際にコラーゲンに含まれるアミノ酸であるヒドロキシプロリンの含有量を定量すると、**Sema3-KO** マウスでは野生型と比較して有意に減少していることが明らかとなった。

以上の結果から、急性肝傷害下では **Sema3e** は傷害を受けた肝細胞から分泌され、類洞の再生を一過的に抑制することで **HSC** の活性化を補助し肝再生を促進する一方で、慢性肝傷害下では **HSC** を持続的に活性化し肝線維化を増悪化するリスクファクターであることが明らかとなった (**Fig. 3**)。

本研究では、肝臓の病態において 3 型セマフォリンファミリー分子が重要な機能を果たすことを初めて明らかにした。また、これまでオートクラインで機能すると考えられていた **Sema3e** が、肝臓を構成する複数の細胞種で交わされるパラクラインで機能することを明らかにした。さらに、これまで **VEGF** 等の血管新生を促進する因子の分泌バランスが崩れることで肝線維化が進行することは報告されていたが、**Sema3e** のような血管新生を抑制する因子のバランスも肝再生に重要であることを示した。**Sema3e-KO** マウスは肝線維化の顕著な減弱が見られたことから、**Sema3e** または **Plxnd1** は肝線維化の治療標的としても有望であると考えられた。

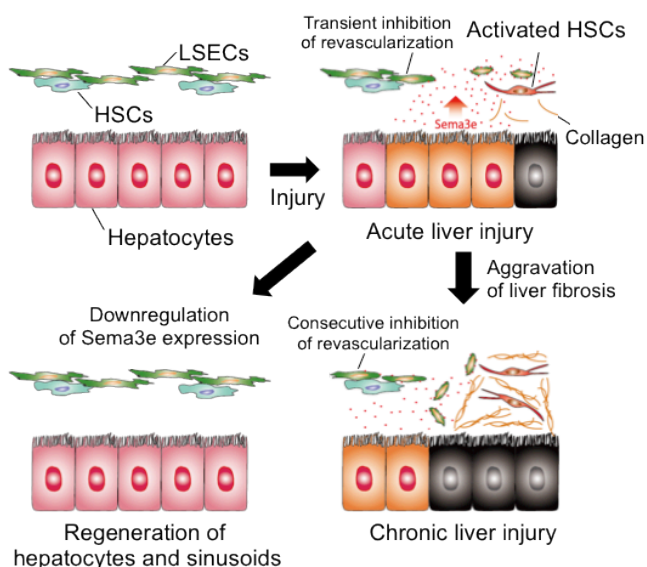


Figure 3. 肝再生および肝線維化におけるSema3eの機能の模式図