

学位論文（要約）

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

平成 25 年 12 月博士（理学）

申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

谷貝 知樹

目次	
略語	2
要旨 (Abstract)	3
第一章 序論	7
第二章 材料と方法	11
第三章 結果	16
第四章 考察	24
第五章 結論	28
参考文献	29
図および表	35
謝辞	60

略語

ACTB	Actin-beta
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
α-SMA	Alpha-smooth muscle actin
CV	中心静脈
DDC	3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-collidine
ECM	Extracellular matrix
H&E	Hematoxylin and Eosin
HTVi	Hydrodynamic tail-vein injection
IHC	免疫組織化学
LSEC	類洞内皮細胞
NPC	Non-parenchymal cell
PBS	Phosphate-buffered saline
PHx	Partial hepatectomy
PI	Propidium iodide
p75NTR	p75 low-affinity neurotrophic growth factor receptor
ROS	Reactive oxygen species
Sema3e	Semaphorin 3E
Stab2	Stabilin 2
TGFβ	Transforming growth factor beta
VEGF	血管内皮増殖因子

要旨

肝炎の慢性化に伴って引き起こされる肝線維化は、壊死した肝臓組織の欠損部分を補う一方で、進行すると肝機能の低下を引き起こし、肝硬変や肝癌といった重篤な肝疾患に進行する病態の一つである。しかしながら、肝線維化の進行や再生の分子メカニズムには不明な点が多く残されている。私はこれを解明するため、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網羅的に解析し、血管新生を抑制的に制御する **Semaphorin 3E**

(**Sema3e**) の発現量が増加することを見出した。肝臓には「類洞」と呼ばれる肝臓特異的な毛細血管が存在し、類洞内皮細胞とそれを裏打ちする肝星細胞から構成される。肝線維化は肝星細胞が活性化し線維を分泌することに起因している。私は、マウス肝傷害モデルを用いて **Sema3e** が肝再生および肝線維化に与える影響を解明することを目的とした。

Sema3e の発現を詳しく解析すると、その発現量は肝傷害の程度と相関があり、発現細胞は壊死巣周囲の肝細胞であることが明らかになった。また、**Sema3e** の受容体である **Plexin D1** は類洞内皮細胞で発現しており、実際に **Sema3e** は *in vitro* で類洞内皮細胞に対して仮足の退縮を促し、移動性に影響を与えることで類洞の再生を抑制することを示唆した。正常な類洞では類洞内皮細胞は肝星細胞の活性化を抑制していることから、類洞の再生抑制は肝星細胞の活性化に関連すると考えられた。そこで、*in vivo* で肝臓特異的に **Sema3e** を過剰発現させたのち、四塩化炭素投与により傷害と再生を誘導した。その結果、コントロール群と比較して類洞は正常に再生せず、類洞が再生していない部位では肝星細胞が活性化している様子が観察出来た。一方、四塩化炭素を長期間断続的に投与し、継続的に **Sema3e** が発現するような条件下で傷害・再生の繰り返しを誘導したところ、**Sema3e** ノックアウトマウスでは野生型に比べて肝線維化が進行しないことが明らかになった。以

上の結果から、**Sema3e** は肝傷害後の類洞の再生を抑制し、線維化を進行させる制御因子であることが示された。

Abstract

Liver fibrosis is caused by the excessive accumulation of collagen in chronic hepatitis, and dysregulation of hepatic stellate cells (HSCs) in the sinusoid is responsible for the production of collagen. Previously, we compared the gene expression profiles between normal liver and injured liver by microarray and found that Semaphorin 3E (Sema3e) was upregulated in the chronic hepatitis model. Although Sema3e, a secretory protein of the Semaphorin family, is known as a negative regulator of vascularization in development, the roles of Sema3e in hepatitis remain unknown. To address the issue, I first examined Sema3e expression in two distinct acute hepatitis models induced by Concanavalin-A or carbon tetrachloride (CCl₄). Quantitative RT-PCR and immunohistochemical analysis revealed that Sema3e was transiently induced in hepatocytes within necrotic area after liver injury. By contrast, Plexin D1, the specific receptor for Sema3e was predominantly expressed in liver sinusoidal endothelial cells (LSECs), suggesting that Sema3e secreted by damaged hepatocytes affects LSECs in a paracrine manner during liver regeneration. To examine the effect of Sema3e on LSECs, I performed primary culture of LSECs and found that the addition of Sema3e retracted filopodia of LSECs. Furthermore, forced expression of Sema3e in the liver by the hydrodynamic tail vein injection method induced the contraction of LSECs during regeneration after liver injury, resulting in the disruption of sinusoid structures. As LSECs were reported to regulate HSC activation, I hypothesized that sustained expression of Sema3e was involved in HSC activation. In fact, Western blotting of α -smooth muscle actin, an HSC activation marker, demonstrated activation of HSCs in livers expressing Sema3e compared to control. Conversely, liver fibrosis induced by

repeated administration of CCl₄ was ameliorated in Sema3e-knockout mice compared to wild-type mice. These results suggest that Sema3e is a novel regulator for liver fibrosis by modifying the mobility and/or functions of LSECs in the injured liver.

第一章 序論

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、肝動脈といった脈管が走る。これらは肝三つ組みと呼ばれ、これらが存在する場所は門脈域として知られている。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 (Figure 1-1)。類洞は類洞内皮細胞とそれを裏打ちする肝星細胞から構成されている。これら細胞種は類洞壁細胞と呼ばれ、血中から肝細胞へ取り込まれる物質のフィルタリングや血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。一方で、病態時には類洞壁細胞は正常時とは異なる挙動を示す。ウイルスや薬物等によって肝炎が起きると肝細胞の細胞死が誘導され、肝臓の広範囲で組織壊死が起きるとともに、肝臓内において免疫反応が惹起される。肝臓内に集簇した免疫系細胞は炎症性サイトカインを分泌するが、特にマクロファージが分泌する $TGF\beta$ は肝星細胞を強力に活性化することが知られている¹。肝星細胞は活性化すると筋線維芽細胞様の形態をとり、コラーゲンを分泌する²。このコラーゲンは肝再生初期における組織形態の安定性の確保や、肝細胞が再生するための足場となることで肝再生に寄与する³。しかし一方で、肝炎が慢性化し、肝星細胞が活性化し続けるとコラーゲンは分泌され続け、線維として肝臓内に蓄積する。これらは肝臓内における正常な組織構造を破壊することで血流の循環や代謝を妨げ、肝機能の低下や肝線維化を引き起こす (Figure 1-2)。肝線維化が進行するとさらにコラーゲン線維が蓄積し、著しく肝機能が低下する肝硬変を引き起こし、しばしば肝癌へと移行する⁴。肝臓

は再生力が強く、肝炎はその多くが自然治癒することが知られている一方で、慢性化によりこのような重篤な肝疾患へと発展する。急性肝炎から肝再生へと向かうのか、あるいは慢性化するのかといった分岐の鍵となる分子メカニズムには不明な点が多く残されていることから、私たちはこの鍵となる分子メカニズムを解明することを目的として cDNA マイクロアレイを用いてマウス慢性肝炎モデルにおいて高発現する遺伝子を網羅的に解析した^{5,6}。その結果、セマフォリンファミリー遺伝子群に属する **Semaphorin 3E (Sema3e)** がマウス慢性肝炎モデルにおいて高発現する候補分子として確認された (**Table 1**)。

セマフォリンファミリーは脊椎動物において 3 型から 7 型までのクラスがあることが知られ、それぞれ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 (**Figure 1-3**)。一般にセマフォリンファミリー分子は個体発生における神経軸索の伸長や血管新生に対して抑制的に機能することで、それらのガイダンスに寄与することが知られている^{7,8}。また、一部のセマフォリンは免疫系細胞の移動性に影響を与えて炎症反応に関与することが報告された⁹。セマフォリンシグナルを細胞内に伝達する受容体としては **Neuropilin** ファミリーや **Plexin** ファミリーが知られている¹⁰。これらはいずれも一回膜貫通型タンパク質であり、各セマフォリン分子に対応した受容体が存在する。分泌型セマフォリンである 3 型セマフォリンに属する **Sema3e** は **Plexin D1** に対するリガンドとして機能し、血管内皮細胞の移動性に対して抑制的な制御を行うことが近年明らかとなった。具体的には、**Plexin D1** は **Sema3e** が結合するとインテグリン関連因子である **R-Ras** の不活性化や **Arf6** の活性化等を介してインテグリンの細胞外マトリックスへの結合を抑制する¹¹。さらに、**Sema3e/Plexin D1** シグナルは血管内皮細胞の移動性を促進する **VEGF** シグナルをフィードバック機構により抑制することも明らかとなった¹²。これらは **Sema3e** が他のセマフォリンファミリー分子と同様に血管内皮細胞に対して直接的に働きかけることで血管

新生を抑制的に制御することを示している。またこのことは、**Sema3e** ノックアウトマウスは胎児期において脊索の配列に異常が生じる¹³ ことから支持される。さらに近年、個体の発生過程のみならず、病態の進行時においても **Sema3e** が血管新生に関わり、重要な機能を果たすことが明らかとなっている。マウスを用いた虚血性網膜症モデルでは、**Sema3e/Plexin D1** が異常な血管新生を選択的に抑制することで回復を促すことが報告された¹⁴。これらの報告は他の臓器や病態においても **Sema3e** が病態の進行あるいは回復に対して重要な機能を持つことを示唆しているが、肝臓におけるセマフォリンファミリー分子の存在および機能は不明な点が多く残されている。

近年、肝臓を構成する細胞種間のパラクラインによる相互作用が注目を集めている。例えば、正常状態において肝星細胞が分泌する **VEGF** は、類洞内皮細胞の恒常性維持に貢献し、肝線維化へとつながる類洞の変性・変質化を抑制する¹⁵。一方で、類洞内皮細胞が分泌する一酸化窒素は肝星細胞の活性化を抑制し、正常な類洞環境の維持に寄与している¹⁶。さらに、肝再生時には類洞内皮細胞や活性化肝星細胞は肝細胞増殖因子を分泌し、肝再生を促す¹⁷。このように、肝細胞-類洞内皮細胞-肝星細胞の間では相互依存的にシグナルを伝え合うことで肝臓における恒常性維持を行っていることが明らかとなってきた。さらに、病態下におけるこれら細胞間相互作用に関しては新たな概念も報告されている。傷害を受けた細胞がその後の組織再生のために、死ぬ直前に特定の分子を放出する「**Dying message**」の存在である。Liらは皮膚や肝臓の再生において、傷害を受けた細胞のアポトーシス誘導因子 **Caspase 3, 7** が組織修復を促すプロスタグランジン **E₂**の放出を誘導することを報告した¹⁸。また、マウス急性肝炎モデルにおいて酸化ストレスを受けた肝細胞はアポトーシスやネクローシスを起こす前に **IL-11** を産生することで健常な肝細胞の増殖を促すことも明らかとなった¹⁹。これらの結果は、病態時では正常時とは異なる特異的な細胞間の相互作

用が存在することを示している。

本研究では、急性肝炎下で酸化ストレスを受けた肝細胞が **Sema3e** を分泌し、類洞の再生を一過的に抑制、肝星細胞を活性化し肝再生に寄与する一方で、慢性肝炎下では **Sema3e** が発現し続け、類洞の再生抑制や肝星細胞の活性化が持続し肝線維化を増悪化することを明らかにした。

第二章 材料と方法

動物（マウス）

実験に使われた C57BL/6 野生型マウスは日本クレアから購入した。また、Sema3e-KO マウスはシンシナティ小児病院医療センターの吉田博士¹³より提供して頂いた。このマウスを比較実験に用いる際には同腹仔の野生型を使用した。すべての動物実験は東京大学の実験動物指針に従って行われた。

CCl₄ 投与による急性肝傷害と肝線維化の誘導

急性肝傷害はマウスの腹腔内に CCl₄ を一回投与することで誘導した。CCl₄（和光純薬工業）はコーン油（和光純薬工業）に 20% となるよう希釈した後、マウスに対して 1 ml CCl₄/kg 体重となるように注射した。肝線維化は同量の CCl₄ を週に 2 回の頻度で 4 週間投与することで誘導した。その後、CCl₄ を最後に投与してから 3 日後に肝臓を単離した。

免疫組織化学（IHC）染色、H&E 染色およびシリウスレッド染色

摘出した肝臓を液体窒素で凍結し、クリオスタットにより 8 μm に薄切することで凍結切片を作成した。切片は IHC 染色のためにザンボニ固定液を用いて 10 分間固定した。固定した切片は PBS に溶解した 5% スキムミルクでブロッキングした後、同じ溶液に一次抗体を加えたものでインキュベートした。二次抗体には Alexa Fluor 488 または Alexa Fluor 555 標識二次抗体を使用し観察を行った。使用した抗体は Table 2 に記した通りである。観察画像は Observer Z1 with AxioCam HRc（Zeiss）を用いて撮影した。Figure 2-1 の H&E 染色は IHC 染色の後に行った。観察後、カバーガラスを十分な PBS に浸しながら取り除き、へ

マトキシリン（武藤化学）およびエオシン（和光純薬工業）により染色した。シリウスレッド染色にはブアン固定液（Sigma-Aldrich）を用いて切片を固定した。ワイゲルト鉄ヘマトキシリン（和光純薬工業）により核を染色後、Direct Red 80（Sigma-Aldrich）を飽和ピクリン酸液（武藤化学）に溶解したものでコラーゲン線維を染色した。

逆転写反応および定量的 RT-PCR

マウス肝臓および分離した細胞の Total RNA は TRIzol reagent（Invitrogen）を用いて抽出した。cDNA への逆転写反応は High-capacity cDNA Reverse-Transcription Kit および Random primer（Applied Biosystems）を用いた。Real-time RT-PCR は LightCycler 480 システムおよび Universal Probe Library（Roche Diagnostics）によりおこなった。また、標準化コントロールとして Universal Probe Library に含まれる mouse ACTB gene assay を用いた。プライマーの配列およびプローブ番号は Table 3 に示す通りである。また、“Sema3e” プライマーは Sema3e の定量的 RT-PCR で使用し、“Sema3e vector” プライマーは Sema3e 発現ベクターの作製に使用された。

細胞分離

肝臓構成細胞の細胞懸濁液の調整は既報の手法²⁰に修正を加えて行った。簡潔に記述すると、肝臓を Liver perfusion medium（Life Technologies）で前処理した後、0.5 g/L collagenase-YAKULT（Yakult）および 50 mg/L DNase I（Sigma-Aldrich）を溶解した灌流液で酵素処理した。酵素処理した肝臓を培地中で攪拌した後、70 μ m Cell strainer（BD Falcon）を通して夾雑物を取り除き、500 rpm で 1 分間遠心し肝細胞を分離した。分離した肝細胞は Percoll（GE Healthcare Life Sciences）を用いた濃度勾配遠心法によりさらに

生細胞のみに分離した。肝細胞分離後の上清は 700 rpm 2 分間の遠心を 3 から 4 回繰り返して、その上清を取り続けることで肝細胞以外の非実質細胞画分の懸濁液を得た。非実質細胞画分懸濁液は 1200 rpm 5 分間の遠心で沈殿させた後、再懸濁し抗 FcR 抗体を用いてブロッキングした。次に蛍光標識またはビオチン標識された一次抗体と反応させ、さらに必要に応じて APC-conjugated streptavidin (BD Biosciences) と反応させた。細胞の sorting は Moflo XDP (Beckman-Coulter) または anti-APC microbeads で細胞を標識して autoMACS pro (Miltenyi Biotec) で行った。死細胞の選別には propidium iodide 染色を用いた。

肝細胞または LSEC の初代培養

灌流法および Percoll によって分離された肝細胞は Type I collagen-coated six-well dishes (BD Biosciences) 上で 5×10^5 /well の密度で初代培養した。培地には William's Medium E 培地 (Sigma-Aldrich) に 10% fetal bovine serum (JRH) を加えたものを使用した。播種から 3 時間後、プレートに接着しなかった肝細胞を洗い流したものを H₂O₂ または CCl₄ 添加 0 時間後として培養を開始した。H₂O₂ は 0.2 mM、CCl₄ は 1.0 mM の濃度で培地に添加された。逆転写反応に用いた Total RNA は H₂O₂ または CCl₄ 添加開始後 0、6、12、24 時間後の肝細胞から抽出した。autoMACS Pro によって分離された LSEC は Collagen type I-C (新田ゼラチン) でコーティングしたプレート上で DMEM/Ham's F12 (Sigma-Aldrich) を用いて培養した。播種から 12 時間後、500 ng/ml の濃度となるように recombinant mouse Semaphorin 3E (R&D Systems) を培地に添加した。添加から 30 分後、LSEC を Alexa Fluor 488 Phalloidin (Life technologies) を用いて IHC と同様の手順で染色し、形態を観察した。

*In vivo*における肝細胞での Sema3e の強制発現

In vivo における肝細胞で Sema3e を持続的に発現させるため Hydrodynamic tail-vein injection (HTVi) 法を用いた。まず、pLIVE vector (Mirus Bio) に Sema3e の cDNA 配列を組み込んだ発現ベクターを作成し、その発現ベクターを TransIT-EE Hydrodynamic Delivery solution (Mirus Bio) に溶解した。その溶解液を体重の 10 分の 1 量、8 週齢の野生型マウスの尾静脈から短時間で急速に注射することで、発現ベクターをマウスの肝細胞内に導入した。発現ベクター作製に使用したプライマーは Table 3 に記述した。

IHC およびシリウスレッド染色した肝臓切片の定量的解析

Figure 2-10 の血管密度は、IHC 染色において中心静脈周囲を撮影した視野の Stab2 陽性領域の面積を定量することで決定した。1 匹あたり 4 箇所を撮影し、解析ソフトウェア ImageJ を用いて解析した。計算に用いた実質領域の面積は視野面積から管腔面積を減算した値を使用した。Figure 2-16 の線維化の定量も同様に、ImageJ で算出したシリウスレッド陽性のコラーゲン領域の面積を実質領域の面積で除算することで定量した。

血清アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) および血清アルブミン濃度、肝臓内のヒドロキシプロリン量の測定

Figure 2-2 の血清 ALT 濃度および Figure 2-11 の血清アルブミン濃度の測定はオリエンタル酵母株式会社に委託された。また、Figure 2-14 の血清 ALT 濃度の測定にはトランスアミンナーゼ C II テストワコー (和光純薬工業) を用いた。Figure 2-16 のヒドロキシプロリンの定量は Reddy らの手法²¹に従った。

統計的解析

2 群間の統計的解析は Student's *t* 検定で行った。また、Figure 2-7 の複数細胞種間の遺伝子発現解析では Tukey の多重比較検定により解析を行った。有意水準は 0.05 とし、*p* 値がこれを下回ることをもって帰無仮説を棄却した。

第三章 結果

マウス急性肝炎モデルにおける類洞の再生の経時的観察

マウス腹腔内に四塩化炭素 (CCl_4) を投与すると消化管から血液中に取り込まれ肝臓において代謝される。 CCl_4 は中心静脈周囲の肝細胞が発現するシトクロム P450 によって代謝され、その際活性酸素が生成される²²。この活性酸素は中心静脈周囲に広範な壊死を誘導することから、 CCl_4 投与は同様な病態を示すアルコール性および薬物性肝炎を模倣したマウス肝炎モデルとして知られる。これまで CCl_4 投与急性肝炎モデルでは類洞の再生に着目した報告は無かったことから、まず私は CCl_4 投与により中心静脈周囲に傷害を与えたのち、経時的に類洞の再生を観察した。筆者の所属研究室では、これまでにスカベンジャー受容体の一つである **Stabilin2 (Stab2)** が LSEC 特異的に発現することを発見し、そのモノクローナル抗体を作製することで、IHC 染色法やフローサイトメトリーにより他の血管内皮細胞と区別して染色・分離する手法を確立している^{23,24}。H&E 染色および抗 **Stab2** 抗体による IHC 染色の結果、正常状態 (CCl_4 投与後 0 時間) では中心静脈から類洞が放射状、高密度に伸長している様子が確認できた (**Figure 2-1 A, B**)。一方で、24 時間および 48 時間後の H&E 染色では中心静脈周囲の肝細胞の変性が確認された。24 時間後では類洞構造が乱れ、壊死巣内の多くの LSEC が退縮している様子が観察出来た (**Figure 2-1 C, D**)。これは 24 時間後において LSEC が外的要因により変化をしていることを示唆している。また、48 時間後には壊死巣はより顕著になり、類洞構造の乱れが持続することが明らかとなった (**Figure 2-1 E, F**)。その後、壊死巣は 72 時間後から減少する様子が観察され (**Figure 2-1 G, H**)、96 時間後には肝細胞の変性はほぼなくなる一方で免疫系細胞と思われる細胞集団が中

心静脈周囲に集簇し、変性した肝細胞を除去している様子が観察された (Figure 2-1 I, J)。

また、LSEC もこの段階においては元の配置に戻り、形態も正常なものとなっていた。これらの結果から、 CCl_4 投与モデルにおける類洞の再生は 72 時間後にほぼ完了することが示唆された。

傷害を受けた肝細胞は Sema3e を発現する

CCl_4 投与 24 時間後から 48 時間後にかけて顕著な LSEC の退縮・脱落が観察されたことから、この時間帯において LSEC に影響する因子の存在が示唆された。cDNA マイクロアレイ解析により慢性肝炎下で Sema3e が発現している可能性が示されていたため、 CCl_4 投与モデルにおけるその経時的な発現変化を定量的 RT-PCR により詳細に解析した。同時に、肝障害マーカーとして知られる血清中のアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) の濃度も測定した。その結果、Sema3e の発現量は正常肝では非常に低いのに対し、 CCl_4 投与後 24 時間では劇的に上昇することが明らかとなった。興味深いことに、Sema3e の発現は 48 時間後には急激に減少し、72 時間後には正常肝に近いレベルまで減少した。一方で、血清中 ALT 濃度は 24 時間後から 48 時間後まで非常に高いレベルを維持し、72 時間後に急激な減少を見せた (Figure 2-2 A, B)。これらの結果から、Sema3e の発現上昇は肝細胞が傷害を受けることで引き起こされ、傷害を受けた肝細胞がすべて死ぬことでその発現が減少することが示唆された。したがって私は、 CCl_4 投与による酸化ストレスが肝細胞に傷害を与え、Sema3e の発現を引き起こしていると考えた。この仮説を検証するため、私は CCl_4 投与 24 時間後の肝臓の組織切片を作成し、抗 Sema3e 抗体を用いた IHC 染色により Sema3e の発現を観察した。その結果、予期した通り傷害を受けている中心静脈周囲の肝細胞の壊死巣において非常に強い Sema3e のシグナルを認めた (Figure 2-3)。さらに私は、Sema3e を発

現している細胞が肝細胞であることを確認するため、灌流法により正常肝から肝細胞を分離し初代培養を行った。培養液中には活性酸素種である過酸化水素 (H_2O_2) または CCl_4 を添加し、肝細胞に対して酸化ストレスを与え、経時的な形態変化と **Sema3e** の発現を解析した。その結果、初代培養肝細胞は H_2O_2 処理の時間経過とともに徐々に変性してゆく様子が観察された (Figure 2-4 A)。また、**Sema3e** の発現も時間経過とともに上昇したことから (Figure 2-4 B)、肝細胞に対する酸化ストレスが **Sema3e** 発現を誘導することが明らかとなった。さらに、これまでの *in vivo* での実験と同様に培養液中に CCl_4 を添加すると、添加後 6 時間から肝細胞の変性が始まり、24 時間後まで変性が進むことが明らかとなった (Figure 2-5 A)。**Sema3e** の発現量も 6 時間後から非常に高いレベルを維持したことから (Figure 2-5 B)、 CCl_4 による酸化ストレスは H_2O_2 と同様に **Sema3e** を強力に発現誘導することが示された。一方で、**Sema3e** は免疫系細胞において発現するとの報告²⁵があったことから、私は正常肝および CCl_4 投与後 24 時間の肝臓からセルソーターを用いて CD45 陽性の血球系細胞を分離し、**Sema3e** の発現を定量的 RT-PCR により解析した。その結果、**Sema3e** は CD45 陽性血液細胞では傷害の程度に関わらずほとんど発現しないことが明らかとなった (Figure 2-6 A)。さらに、肝細胞が酸化ストレスを受けない肝再生モデルである 70%部分肝切除においても、**Sema3e** の発現は非常に低いレベルで維持されることが明らかとなった (Figure 2-6 B)。これらの結果は、*in vitro* および *in vivo* の両方で肝細胞が酸化ストレスによって **Sema3e** を発現することを示している。

Sema3e は LSEC の仮足を退縮させる

次に私は、傷害肝において **Sema3e** の影響を受ける細胞を特定するため、セルソーターにより正常肝および傷害肝からそれぞれ細胞種を分離し、**Sema3e** の受容体である Plexin

D1 の発現量を定量的 RT-PCR により解析した。その結果、Plexin D1 は傷害の有無に関わらず主に LSEC に発現していることが明らかとなった (Figure 2-7)。このことは傷害を受けた肝細胞から分泌された Sema3e はパラクラインによって LSEC に影響を与えている可能性を示す。これまでに血管内皮細胞株を用いた実験では、Sema3e は伸長突起を忌避させ、細胞の移動性を抑制することが報告されている。しかし、LSEC に対する影響は解析された例は無い。そこで次に私はセルソーターにより LSEC を分離し、初代培養を行うことで Sema3e の LSEC に対する影響を *in vitro* で解析した。その結果、他の血管内皮細胞株を用いた実験^{11, 14}と同様に、Sema3e は LSEC の仮足を有意に退縮させることが明らかとなった (Figure 2-8)。この結果は Sema3 が他の血管内皮細胞と同様に LSEC に対しても退縮を誘導し、移動性を抑制する可能性を示す。したがって肝傷害時における Sema3e の発現は、LSEC の退縮を促すことにより血管新生に対して抑制的に機能する可能性が考えられた。

Sema3e の継続的な発現は正常な類洞の再生を阻害する

In vivo においても Sema3e が LSEC の仮足の退縮を促すとすれば、傷害を受けた肝細胞が一過的に Sema3e を発現するために Figure 2-1 C,D のように LSEC が退縮している可能性が考えられる。このことは Sema3e の発現が急激に減少するタイミングで類洞の再生が促され、LSEC の配置が正常な状態に戻ることから支持される。そこで私は *in vivo* での Sema3e の機能を解析するため、生体の肝細胞へ発現ベクターを導入する手法として知られる Hydrodynamic tail-vein injection (HTVi) 法を用いて、持続的な Sema3e の肝細胞での発現を再現した。私はまず、Sema3e 発現ベクターもしくはコントロールベクターを HTVi 法により野生型マウスの肝細胞へ導入し 3 日後、それぞれのマウスに対して CCl₄ または溶媒のみを投与した。さらにその 3 日後、肝臓を回収し定量的 RT-PCR および IHC 染色によ

り、Sema3e の発現および類洞の変化を解析した (Figure 2-9 A)。その結果、HTVi 法による Sema3e の強力な発現は CCl₄ 投与の有無によらず、維持されていることが確認された (Figure 2-9 B)。回収した肝臓切片に対し抗 Stab2 抗体を用いて IHC 染色し、類洞の血管密度を定量すると、Sema3e を強制発現させた肝臓ではコントロール群と比較して CCl₄ による傷害を導入しなくても類洞の密度が減少する傾向が見られた。しかし、CCl₄ 投与により傷害と再生を誘導した個体群において類洞密度を定量すると、有意に減少していた。その切片を観察すると、確かに中心静脈周囲の類洞はコントロール群では中心静脈から放射状に類洞が再生しているのに対し、Sema3e を強制発現させた個体群では著しく類洞が退縮している様子が観察された (Figure 2-10)。これらの結果から、*in vivo* において、持続的な Sema3e の発現は類洞の再生に対して抑制的な影響を持つことが示された。

In vivo において Sema3e による類洞再生の抑制は肝星細胞の活性化を促進する

次に私は、Sema3e の持続的な発現により類洞の構造が乱れることで肝細胞が影響を受ける可能性を考慮し、Sema3e を強制発現させた後、CCl₄ 投与により傷害と再生を誘導した肝臓切片を H&E 染色により確認した。その結果、CCl₄ 投与後の肝再生において中心静脈周囲の肝細胞の形態に差は見られなかった (Figure 2-11 A)。また、肝機能の指標である血清中のアルブミン濃度も、Sema3e 強制発現群とコントロール群では有意な差は見られなかった (Figure 2-11 B)。これらの結果から、少なくとも Sema3e の発現は短期的には肝細胞の増殖に対して直接的な影響は無いことが示された。さらに、LSEC とともに類洞壁を構成する肝星細胞の状態を解析した。先行研究から、肝星細胞は p75 neurotrophic growth factor receptor (p75NTR) を発現することが知られており^{26,27}、抗 Stab2 抗体と抗 p75NTR 抗体を同時に用いた IHC 染色により LSEC と肝星細胞の位置関係を観察することが可能で

ある。Sema3e を強制発現させた後、CCl₄ 投与 3 日後の類洞の再生を観察したところ、コントロール群では肝星細胞が LSEC を裏打ちし、正常な再生が見られた。しかし、Sema3e 強制発現群では類洞構造の乱れから、LSEC を裏打ちしていない伸長した肝星細胞が多数確認された (Figure 2-12)。LSEC と肝星細胞は類洞壁において相互に制御し合い、一過的に活性化した肝星細胞は肝再生初期の創傷治癒に貢献する。したがって私は、Sema3e の強制発現により LSEC を裏打ちしなくなった肝星細胞の活性化は延長するのではないかと考えた。そこで、ウエスタンブロット法により肝星細胞の活性化マーカーである α -SMA の発現量を解析したところ、Sema3e 強制発現群ではコントロール群と比較して活性化した肝星細胞が多いことが明らかとなった。対照的に、溶媒のみを投与し肝傷害を誘導しなかった個体群では、Sema3e の発現の有無に関わらず肝星細胞の活性は見られなかった (Figure 2-13)。このことは、Sema3e が直接的に肝星細胞を活性化するのではないことを示唆している。つまり、Sema3e は傷害からの類洞の再生時においてのみ LSEC を介して肝星細胞を活性化していると考えられる。したがってこれらの結果は、傷害を受けた肝細胞が一過的に発現する Sema3e は間接的に肝星細胞を活性化することで肝再生の初期に創傷治癒を促すことを示している。

Sema3e の持続的発現は肝線維化を増悪化する

慢性肝炎等で肝細胞が長期間傷害を受け、Sema3e を持続的に発現し続けると類洞の再生は繰り返されることになる。Sema3e の持続的な発現が間接的に肝星細胞を活性化することを踏まえると、慢性肝炎下で Sema3e の発現が常態化することは肝星細胞が活性化し続け、肝線維化が増悪化する可能性があると考えられた。そこで私は、Sema3e ノックアウト (KO) マウスを用いた実験を行うことにした。まず、CCl₄ 投与後の経時的な肝細胞の

傷害を野生型と **Sema3e-KO** マウスにおいて比較した。その結果、両者ともに肝細胞傷害の指標である ALT は 24 時間後から 48 時間後にかけて飛躍的に増加し 72 時間後から減少することが明らかとなった (Figure 2-14)。最大値もほぼ同じことから、少なくとも **Sema3e-KO** マウスは **CCl₄** 投与モデルにおいて、野生型マウスと同等の肝細胞傷害を受けることが分かった。次に **CCl₄** 投与後 24 時間の中心静脈周囲の LSEC と肝星細胞の形態を観察した。その結果、野生型マウスでは顕著に LSEC の退縮が見られたのに対し、**Sema3e-KO** マウスではその退縮は軽減していた。さらに、**Sema3e-KO** マウスではほぼすべての肝星細胞が LSEC と隣接していたのに対し、野生型マウスでは多くの肝星細胞が LSEC を裏打ちしていなかった (Figure 2-15)。これらの結果は、**Sema3e** の強制発現のみではなく、**Sema3e** の欠損もまた類洞の再生および肝星細胞の活性化に影響を与えることを示唆している。次に私は、肝線維化に対する **Sema3e** の影響を解析した。野生型と **Sema3e-KO** マウスに対し **CCl₄** を週に 2 回の頻度で 4 週間投与し、中心静脈周囲で持続的に **Sema3e** が発現し続けるような条件のもとで傷害と再生を反復させ肝線維化を誘導した (Figure 2-16 A)。投与終了後の肝臓切片に対し、コラーゲンを染色するシリウスレッド染色を行った結果、野生型マウスでは中心静脈周囲に明瞭なコラーゲン線維の蓄積が観察された。一方で、私が予想した通り **Sema3e-KO** マウスではコラーゲンの蓄積は顕著に軽減していた (Figure 2-16 B)。このコラーゲン線維の蓄積を定量化すると確かに有意に **Sema3e-KO** マウスでは軽減していた (Figure 2-16 C)。また実際に、コラーゲンに含まれるヒドロキシプロリン量を定量すると **Sema3e-KO** マウスでは野生型マウスと比較して有意に含有量が減少していた (Figure 2-16 D)。このことは **Sema3e** の欠損が肝線維化の減弱に寄与したことを示しており、言い換えれば、慢性肝炎に伴う **Sema3e** の持続的な発現は肝線維化の増悪化因子であることが示された。実際に、IHC 染色によりコラーゲン線維と

LSEC の様子を観察すると、野生型マウスではコラーゲン線維の周囲の LSEC が退縮し、類洞構造を維持していない様子が観察された。一方で、**Sema3e-KO** マウスの類洞は野生型と比較して顕著に拡張しており、コラーゲン線維周囲の LSEC も伸長している様子が観察された (Figure 2-17)。また、F-actin とコラーゲン線維に対して IHC 染色を行うと、肝細胞に関しては野生型と **Sema3e-KO** マウスで大きさや形に差は無いことが分かった (Figure 2-18)。これらの結果から、**Sema3e-KO** マウスでは LSEC が **Sema3e** による退縮を受けないことで伸長・移動し肝星細胞の活性化を早期に抑制していることが示唆された。

第四章 考察

本研究において私は **Sema3e** が類洞の再生および肝線維化の増悪化に対して重要な機能を持っていることを示した。

類洞の再生について

マウスに **CCl₄** を腹腔内投与する肝傷害モデルは肝臓病学研究においては広く一般的に使用されている。しかしながら **CCl₄** 自体はシトクロム **P450** を持つ中心静脈周囲の肝細胞で代謝され活性酸素種となるため、肝細胞の傷害は解析されてきたが類洞の傷害および再生には議論の余地があった。本研究では **LSEC** 特異的マーカーである **Stab2** に対する抗体を使用することで類洞を可視化し、**CCl₄** 傷害により中心静脈周囲の **LSEC** が退縮している様子が観察された。**Sema3e-KO** マウスではこの退縮は比較的緩やかであることから、**LSEC** を退縮させているのは **Sema3e** のシグナルであることが示唆された。一方で、肝細胞内では活性酸素種が産生されていることから **LSEC** の退縮はそのような細胞障害性の外因物質によるものである可能性も考えられる。しかし、少なくとも本研究では **CCl₄** 投与モデルにおいて中心静脈周囲では肝細胞のみならず類洞も傷害を受け、再生されることが明らかとなった。

Sema3e の発現細胞について

近年セマフォリンシグナルは様々な機能を持つことが明らかとなってきたが、その中でも **3** 型セマフォリンの持つ血管新生を制御する機能はもっとも良く知られているものの一つである。特に **Sema3e** は血管内皮先端細胞の延伸を抑制し、発生における血管新生

のガイダンスに影響を与えることが知られている。しかしながら、これまで **Sema3e** を含め 3 型セマフォリンファミリーの肝臓病における関与を解析した例は無く、その機能は不明なままであった。一方で近年、**Sema3e** とその受容体である **Plexin D1** がマクロファージに発現し、アテローム性動脈硬化症においてプラーク内のマクロファージの保持に重要な役割を果たしていることが報告された²⁵。本研究では肝炎下におけるマクロファージが **Sema3e** の主要な発現細胞である可能性を考慮し、**CD45** 陽性血球系細胞の **Sema3e** と **Plexin D1** の mRNA レベルを解析したが、正常肝および **CCl₄** 誘導急性傷害肝のいずれにおいても両者の発現は確認されなかった。このことは、少なくとも肝臓病においてマクロファージは **Sema3e** の主要な産生細胞ではないことを示している。肝臓は他の臓器には見られない特異的な免疫寛容機構を持つことが知られており、このような機能が働くことで他の組織・病態とは異なる細胞間相互作用を生み出している可能性が考えられた。

また本研究において、**Sema3e** が肝細胞において酸化ストレス依存的に発現上昇することが明らかになった。*In vitro* における肝細胞の初代培養実験において **H₂O₂** および **CCl₄** のいずれにおいても **Sema3e** の発現は *in vivo* におけるピークを上回ることから、肝傷害時の **Sema3e** の主要な供給源は傷害を受けた肝細胞であると考えられる。しかしながら **CCl₄** 添加時には **H₂O₂** 添加時には見られない短時間での **Sema3e** の発現上昇が見られたことから、**CCl₄** を分解するシトクローム **P450** 等の代謝シグナルが直接 **Sema3e** の発現を誘導している可能性が考えられた。これまでに癌抑制遺伝子の一つである **p53** の **binding element** が **Sema3e** プロモーター領域に含まれており、**p53** が **Sema3e** の発現を誘導することが示されているが²⁸、本研究での **CCl₄** 添加による **Sema3e** の発現誘導はさらに高発現量を示すことからこの可能性を支持している。

Sema3e シグナルの作用機序について

これまで 3 型セマフォリンは血管新生時にオートクラインによって機能すると考えられていたが、本研究により **Sema3e** がパラクラインによって機能することが明らかとなり、肝細胞 – LSEC – 肝星細胞 の間の新たな相互作用が明らかとなった。**Sema3e/Plexin D1** シグナルは血管新生を促進する **VEGF/VEGFR2** シグナルに対してフィードバック機能により反作用的に機能することが報告されている¹²。また、**VEGFR1** は **VEGFR2** と同様に広く血管内皮細胞に発現する受容体であるが、**VEGF** と強く結合することで **VEGFR2** へのシグナルを減らす **Decoy Receptor** としての機能を持つ²⁹。このように **VEGFR1** と **VEGFR2** はリガンドである **VEGF** を奪い合う形式でシグナル強度が調節されているが、近年、**VEGFR1** シグナルは類洞内皮細胞に作用することで、肝細胞の増殖を促進することが報告された³⁰。つまり本研究の結果は、**Sema3e** がフィードバック機構により **VEGF/VEGFR2** シグナルを抑制することで **VEGF/VEGFR1** シグナルを間接的に促進し、肝細胞の増殖増殖に関与する可能性を示している。

LSEC と肝線維化の関わりについて

これまでの研究で、線維化した肝臓では **LSEC** が有窓構造などその特徴を失い通常の血管内皮細胞へと分化する「類洞の毛細血管化」が観察されていた。この毛細血管化した類洞は肝星細胞の活性化を抑制せず、むしろ活性化することが報告されていたことから、血管新生を抑制することで肝線維化が抑制出来る可能性が指摘されていた。しかし、本研究では **LSEC** 特異的なマーカーである **Stab2** に着目することで、傷害時における **LSEC** は必ずしも血管内皮細胞化するわけではなく、退縮およびその後類洞が再構築されることが明らかとなった。つまり血管新生を強力に抑制した場合、肝星細胞の活性化を抑制すべき

LSEC の再構築も阻害してしまう可能性があり、肝線維化治療に対して逆効果である可能性が考えられた。肝線維化が軽減していた **Sema3e-KO** マウスでは、LSEC がコラーゲン線維の周囲に伸長していたこともこの可能性を支持している。

肝臓の恒常性維持における血管新生について

肝臓には大量の血液が流入し類洞を通ることから、血管新生の促進因子と抑制因子の健全なバランスは恒常性の維持に不可欠であると考えられる。例えば、類洞の再生を促進する因子として最も良く知られる **VEGF** は肝傷害後一過的に発現上昇する³¹。一方で、肝炎の慢性化に伴う **VEGF** の持続的な発現は、異常な血管構造の構築を促進し、肝線維化を増悪化する³²。このように血管新生を促進する因子であってもその分泌バランスが崩れると病態の進行に直結することが報告されている。本研究では血管新生抑制因子として知られる **Sema3e** の分泌バランスも類洞環境の恒常性の維持に重要であることを示した。このことは、**Sema3e** が傷害を受けた肝細胞から分泌されることで不要不急な血管新生を抑制し、バランスを取ることで肝星細胞の活性化を助け、肝再生を促進している可能性を示している。したがって、**Sema3e** は肝傷害時における主要な血管新生抑制因子であり、持続的な **Sema3e** の発現は肝線維化に対する増悪化因子であることが示唆された。さらにこのことは、**Sema3e** または **Plexin D1** は肝線維化や肝硬変における治療標的として有望である可能性も示している。

第五章 結論

本研究の結果により、肝再生および肝線維化において **Semaphorin 3E (Sema3e)** は類洞の再生に深く関わることで病態の進行に影響を及ぼすことが明らかとなった (**Figure 3**)。具体的には、**Sema3e** は肝傷害時に酸化ストレスを受けた肝細胞において発現し、パラクライン様式で傷害部位の **LSEC** の再配置を一過的に抑制することが明らかとなった。またこの **Sema3e** の発現は慢性肝炎下では持続することで類洞の再生を阻害し、肝星細胞の活性化を促す要因となることが明らかとなった。これまで **Semaphorin 3** 型ファミリーが肝臓病において生理的な機能を担うことは報告されていないため、本研究が初の報告となる。また、肝線維化において血管新生促進因子の過剰分泌が病態を進行させることは知られているが、血管新生抑制因子の過剰分泌でも病態が進行することが明らかとなり、その分泌バランスが肝臓の恒常性の維持に重要であることが本研究により明らかとなった。

参考文献

1. Moreira RK: Hepatic stellate cells and liver fibrosis. Arch Pathol Lab Med 2007, 131:1728-1734.
2. Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Bissell DM: Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. Proc Natl Acad Sci U S A 1985, 82:8681-8685.
3. Raghow R: The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. FASEB J 1994, 8:823-831.
4. Zhang DY, Friedman SL: Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis. Hepatology 2012, 56:769-775.
5. Okabe M, Tsukahara Y, Tanaka M, Suzuki K, Saito S, Kamiya Y, Tsujimura T, Nakamura K, Miyajima A: Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver. Development 2009, 136:1951-1960.

6. Inagaki FF, Tanaka M, Inagaki NF, Yagai T, Sato Y, Sekiguchi K, Oyaizu N, Kokudo N, Miyajima A: Nephronectin is upregulated in acute and chronic hepatitis and aggravates liver injury by recruiting CD4 positive cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013, 430:751-756.
7. Yazdani U, Terman JR: The semaphorins. *Genome Biol* 2006, 7:211.
8. Zhou Y, Gunput RA, Pasterkamp RJ: Semaphorin signaling: progress made and promises ahead. *Trends Biochem Sci* 2008, 33:161-170.
9. Kumanogoh A, Kikutani H: Immunological functions of the neuropilins and plexins as receptors for semaphorins. *Nat Rev Immunol* 2013, 13:802-814.
10. Gu C, Giraudo E: The role of semaphorins and their receptors in vascular development and cancer. *Exp Cell Res* 2013, 319:1306-1316.
11. Sakurai A, Gavard J, Annas-Linhares Y, Basile JR, Amornphimoltham P, Palmby TR, Yagi H, Zhang F, Randazzo PA, Li X, Weigert R, Gutkind JS: Semaphorin 3E initiates antiangiogenic signaling through plexin D1 by regulating Arf6 and R-Ras. *Mol Cell Biol* 2010, 30:3086-3098.

12. Kim J, Oh WJ, Gaiano N, Yoshida Y, Gu C: Semaphorin 3E-Plexin-D1 signaling regulates VEGF function in developmental angiogenesis via a feedback mechanism. *Genes Dev* 2011, 25:1399-1411.
13. Gu C, Yoshida Y, Livet J, Reimert DV, Mann F, Merte J, Henderson CE, Jessell TM, Kolodkin AL, Ginty DD: Semaphorin 3E and plexin-D1 control vascular pattern independently of neuropilins. *Science* 2005, 307:265-268.
14. Fukushima Y, Okada M, Kataoka H, Hirashima M, Yoshida Y, Mann F, Gomi F, Nishida K, Nishikawa S, Uemura A: Sema3E-PlexinD1 signaling selectively suppresses disoriented angiogenesis in ischemic retinopathy in mice. *J Clin Invest* 2011, 121:1974-1985.
15. DeLeve LD, Wang X, Hu L, McCuskey MK, McCuskey RS: Rat liver sinusoidal endothelial cell phenotype is maintained by paracrine and autocrine regulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004, 287:G757-763.
16. Deleve LD, Wang X, Guo Y: Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence. *Hepatology* 2008, 48:920-930.
17. Taub R: Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, 5:836-847.

18. Li F, Huang Q, Chen J, Peng Y, Roop DR, Bedford JS, Li CY: Apoptotic cells activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration. *Sci Signal* 2010, 3:ra13.
19. Nishina T, Komazawa-Sakon S, Yanaka S, Piao X, Zheng DM, Piao JH, Kojima Y, Yamashina S, Sano E, Putoczki T, Doi T, Ueno T, Ezaki J, Ushio H, Ernst M, Tsumoto K, Okumura K, Nakano H: Interleukin-11 links oxidative stress and compensatory proliferation. *Sci Signal* 2012, 5:ra5.
20. Takase HM, Itoh T, Ino S, Wang T, Koji T, Akira S, Takikawa Y, Miyajima A: FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes Dev* 2013, 27:169-181.
21. Reddy GK, Enwemeka CS: A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin Biochem* 1996, 29:225-229.
22. Weddle CC, Hornbrook KR, McCay PB: Lipid peroxidation and alteration of membrane lipids in isolated hepatocytes exposed to carbon tetrachloride. *J Biol Chem* 1976, 251:4973-4978.

23. Nonaka H, Tanaka M, Suzuki K, Miyajima A: Development of murine hepatic sinusoidal endothelial cells characterized by the expression of hyaluronan receptors. *Dev Dyn* 2007, 236:2258-2267.
24. Nonaka H, Sugano S, Miyajima A: Serial analysis of gene expression in sinusoidal endothelial cells from normal and injured mouse liver. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 324:15-24.
25. Wanschel A, Seibert T, Hewing B, Ramkhelawon B, Ray TD, van Gils JM, Rayner KJ, Feig JE, O'Brien ER, Fisher EA, Moore KJ: Neuroimmune guidance cue Semaphorin 3E is expressed in atherosclerotic plaques and regulates macrophage retention. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013, 33:886-893.
26. Suzuki K, Tanaka M, Watanabe N, Saito S, Nonaka H, Miyajima A: p75 Neurotrophin receptor is a marker for precursors of stellate cells and portal fibroblasts in mouse fetal liver. *Gastroenterology* 2008, 135:270-281 e273.
27. Passino MA, Adams RA, Sikorski SL, Akassoglou K: Regulation of hepatic stellate cell differentiation by the neurotrophin receptor p75NTR. *Science* 2007, 315:1853-1856.

28. Moriya J, Minamino T, Tateno K, Okada S, Uemura A, Shimizu I, Yokoyama M, Nojima A, Okada M, Koga H, Komuro I: Inhibition of semaphorin as a novel strategy for therapeutic angiogenesis. *Circ Res* 2010, 106:391-398.
29. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N: Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 1994, 269:25646-25654.
30. LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, Hillan KJ, Ferrara N: Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 2003, 299:890-893.
31. Ishikawa K, Mochida S, Mashiba S, Inao M, Matsui A, Ikeda H, Ohno A, Shibuya M, Fujiwara K: Expressions of vascular endothelial growth factor in nonparenchymal as well as parenchymal cells in rat liver after necrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 254:587-593.
32. Valfre di Bonzo L, Novo E, Cannito S, Busletta C, Paternostro C, Povero D, Parola M: Angiogenesis and liver fibrogenesis. *Histol Histopathol* 2009, 24:1323-1341.

Table 1. マウス正常肝臓および慢性肝炎肝臓における cDNA マイクロアレイ結果
DDC を 4 週間投与することでマウスに慢性肝炎を誘導し、肝臓の細胞で正常時と比較して相対的に高発現している遺伝子の候補をリストアップした。その結果、**Semaphorin 3E** はリストの上位に位置しており肝炎下において高発現する可能性が示された。

インターネット公表に関する同意が得られなかったため非公表

Table 2. 本研究において使用した抗体一覧

インターネット公表に関する同意が得られなかったため非公表

Table 3. 本研究において使用したプライマー一覧

インターネット公表に関する同意が得られなかったため非公表

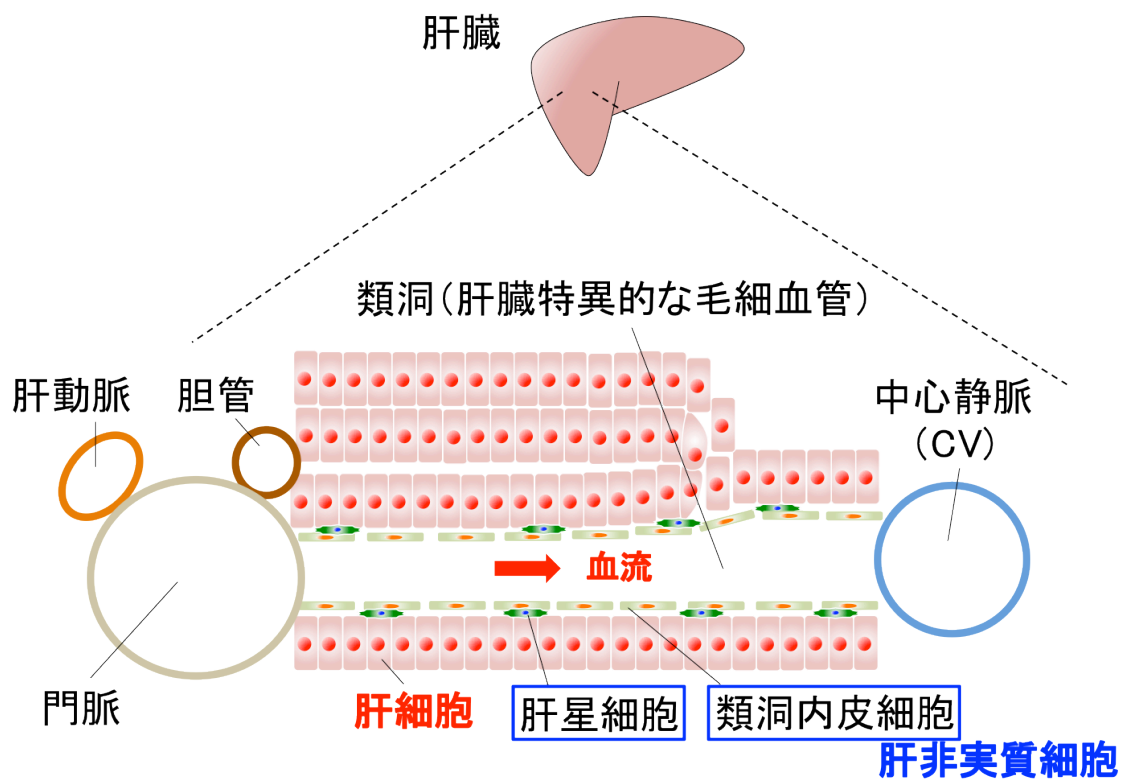


Figure 1-1. 肝臓の構造

肝臓は肝小葉と呼ばれる構造単位から構成されている。肝小葉の角には門脈、胆管、肝動脈の3つの脈管が走り門脈域を形成する。門脈域からは中心静脈へ向かって血液が流れるが、その血液は類洞を通して流れる。類洞は肝臓特異的な毛細血管として知られ、類洞内皮細胞（LSEC）や肝星細胞といった肝非実質細胞から構成され、一部の肝機能を担っている。また肝臓の代謝機能の多くは肝細胞によって行われているが、類洞は血流から肝細胞への物質の供給を調節する役割も担っている。

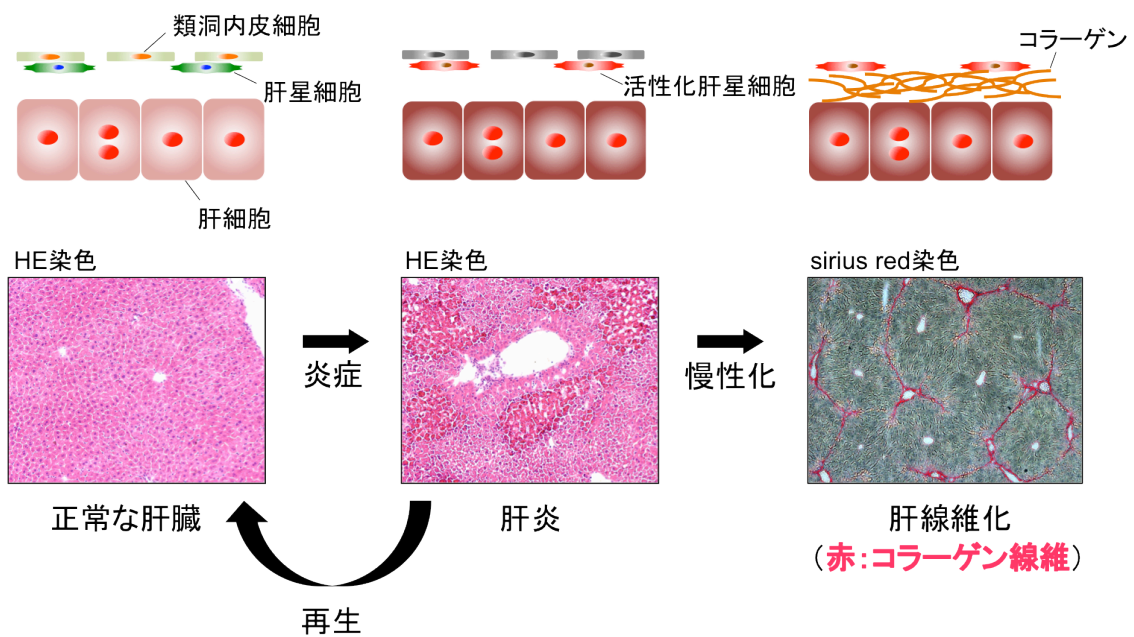


Figure 1-2. 正常時と病態時における肝臓の模式図

正常な肝臓では類洞は類洞内皮細胞（LSEC）とそれを裏打ちする肝星細胞から構成されている。しかし、ウイルスや薬物等によって肝炎がお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、炎症の刺激により肝星細胞が活性化する。活性化した肝星細胞は増殖因子やコラーゲン等を分泌し、肝再生を促す。しかし肝炎が慢性化すると壊死して欠損した組織を補完するために、活性化した肝星細胞はコラーゲン線維を分泌し続ける。このコラーゲンが蓄積すると肝線維化し、健全な組織の構造を破壊、肝硬変や肝癌といった重篤な肝障害へと発展する。

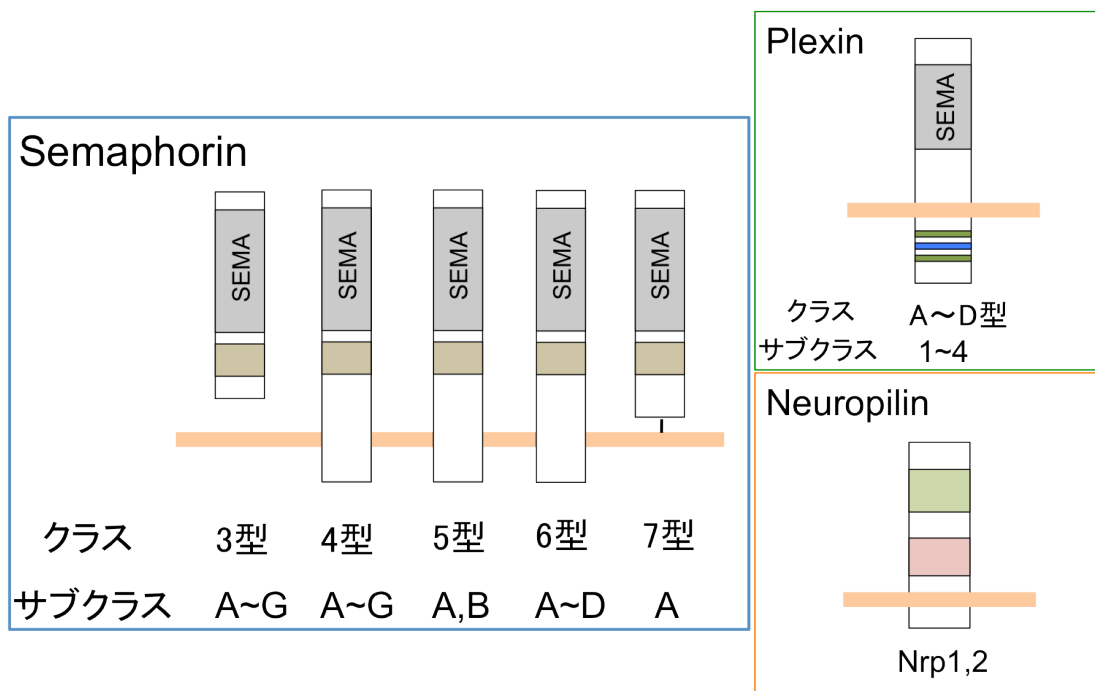


Figure 1-3. 脊椎動物における Semaphorin ファミリー分子とその受容体ファミリー分子

セマフォリンは脊椎動物において3型から7型までの5つのクラスがあることが知られている。各クラスごとに膜蛋白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。セマフォリンは細胞膜タンパク質である Plexin や Neuropilin に対してリガンドとして機能することが知られているが、分泌型セマフォリンである Sema3e は Plexin D1 に対する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。

インターネット公表に関する同意が得られなかったため非公表

Figure 2-1. CCl₄ 投与後の肝臓切片に対する経時的な H&E および IHC 染色

CCl₄ により傷害を受ける中心静脈周囲の形態的变化を H&E 染色で、類洞の変化を Stab2 に対する IHC 染色により観察した。(A, B)正常肝 (C, D)投与後 24 時間 (E, F)投与後 48 時間 (G, H)投与後 72 時間 (I, J)投与後 96 時間。傷害による壊死巣内部の類洞は 24 時間から 48 時間にかけて退縮・脱落し、72 時間後から再生する様子が観察された。Bars = 50 μ m

インターネット公表に関する同意が得られなかったため非公表

Figure 2-2. CCl₄ 投与後の経時的な Sema3e mRNA の発現量および血清中 ALT 濃度の変化

(A)CCl₄ 投与後の Sema3e mRNA の発現量の経時的变化を定量的 RT-PCR により解析した。(B)CCl₄ 投与後の血清中 ALT 濃度の経時的变化。肝傷害時の Sema3e は肝傷害の初期に劇的に高発現し、肝再生時には急激に発現量が減少することから、Sema3e は肝再生の初期において何らかの機能を有していることが予測された。**P* < 0.05, ***P* < 0.01.

インターネット公表に関する同意が得られなかったため非公表

Figure 2-3. CCl₄ 投与 24 時間後の Sema3e に対する IHC 染色像

CCl₄ 投与後 24 時間の肝臓切片に対して抗 Sema3e 抗体で IHC 染色を行ったところ、Sema3e は傷害を受けた中心静脈周囲の実質域で発現している様子が観察された。この発現はアイソタイプコントロールと比較することで、死細胞が非特異的に反応している擬陽性では無いことが確認された。CV: Central Vein (中心静脈)

インターネット公表に関する同意が得られなかったため非公表

Figure 2-4. 初代培養した肝細胞に対する H_2O_2 の影響および **Sema3e** の発現変化
(A) 培地に対する H_2O_2 添加による肝細胞の形態的变化 (B) H_2O_2 添加による **Sema3e** の発現量変化。 *In vitro* で初代培養した肝細胞の培地に H_2O_2 を添加し酸化ストレスを与えると、経時的に肝細胞の形態は崩れ **Sema3e** の発現量が増加することが明らかとなった。 Bars = 100 μ m

インターネット公表に関する同意が得られなかったため非公表

Figure 2-5. 初代培養した肝細胞に対する CCl_4 の影響および **Sema3e** の発現変化
(A) 培地に対する CCl_4 添加による肝細胞の形態的变化 (B) CCl_4 添加による **Sema3e** の発現量変化。 *In vitro* で初代培養した肝細胞の培地に CCl_4 を添加し酸化ストレスを与えると、 H_2O_2 刺激と同様に経時的に肝細胞の形態は崩れ **Sema3e** の発現量が増加した。
Bars = 100 μm

インターネット公表に関する同意が得られなかったため非公表

Figure 2-6. Sema3e の発現量解析

(A)正常肝および CCl₄ 投与後 24 時間における CD45⁺血球画分における Sema3e の発現量 (B)部分肝切除 (PHx)後の経時的な Sema3e の発現量。CCl₄ 投与により Sema3e を発現するのは血球細胞ではないことが明らかとなった。また、PHx では Sema3e の発現は誘導されないことから、肝臓の再生が Sema3e の発現を誘導する訳ではないことが明らかとなった。

インターネット公表に関する同意が得られなかったため非公表

Figure 2-7. 各肝臓構成細胞の Plexin D1 の発現量

セルソーターにより細胞種毎に分離後、定量的 RT-PCR により Plexin D1 の発現量を解析した。Plexin D1 は正常肝および CCl₄ 投与急性傷害肝のいずれにおいても LSEC で高発現することが明らかとなった。*** $P < 0.001$.

インターネット公表に関する同意が得られなかったため非公表

Figure 2-8. 初代培養した LSEC に対する SEMA3E の影響の解析

(A) *in vitro* で LSEC を初代培養し、SEMA3E を培地に添加後、F-actin を染色し形態の変化を観察した (B) 仮足が退縮した LSEC の割合を定量的に解析した。LSEC は SEMA3E のシグナルにより仮足が有意に退縮し、運動能が低下する可能性が示された。

Bars = 20 μ m. *** $P < 0.001$

インターネット公表に関する同意が得られなかったため非公表

Figure 2-9. *in vivo* における肝細胞での Sema3e の強制発現

(A)実験の模式図 (B)HTViにより誘導した Sema3e の発現は CCl₄投与による傷害や肝再生後も高い発現量を維持することが明らかとなった。したがって HTVi 法により、類洞再生時における持続的な肝細胞内での Sema3e の発現がどのような影響を与えるのか解析することが可能であることが分かった。*** $P < 0.001$.

インターネット公表に関する同意が得られなかったため非公表

Figure 2-10. Sema3e の強制発現による類洞再生への影響

(A)Sema3eを強制発現後、CCl₄投与72時間後に回収した肝臓切片のStab2に対するIHC染色像 (B)Stab2陽性の面積を定量し、血管密度を算出した。*In vivo*において傷害後も持続的にSema3eを強制発現させ続けることで、類洞の再生が顕著に乱れることが明らかとなった。Bars = 50 μm. ***P* < 0.01.

インターネット公表に関する同意が得られなかったため非公表

Figure 2-11. Sema3e の強制発現による肝細胞への影響

(A) Sema3e を強制発現後、CCl₄ 投与 72 時間後に回収した肝臓切片の H&E 染色像および(B)その血清アルブミン濃度。Sema3e の強制発現による肝細胞自体への傷害および再生の程度に差は見られなかった。Bars = 50μm.

インターネット公表に関する同意が得られなかったため非公表

Figure 2-12. 持続的な **Sema3e** の強制発現による類洞再生の乱れと肝星細胞の活性化
Sema3e を強制発現させた肝臓に対し **LSEC** を抗 **Stab2** 抗体で、肝星細胞を抗 **p75NTR**
抗体で **IHC** 染色した。**Sema3e** を持続的に発現させ続けると、**CCl₄** 傷害からの類洞の再
生は乱れ、**LSEC** と肝星細胞の正常な再配置が阻害される様子が観察された。Bars =
50µm.

インターネット公表に関する同意が得られなかったため非公表

Figure 2-13. Sema3e の強制発現による肝星細胞の活性化

Sema3e を持続的に強制発現させ、 CCl_4 により傷害と再生を誘導した肝臓では類洞の構造が乱れ、肝星細胞の活性化マーカーである $\alpha\text{-SMA}$ のタンパク量が増加することが明らかとなった。また、溶媒のみを投与した個体群では Sema3e の発現の有無に関わらず $\alpha\text{-SMA}$ のタンパク量は非常に少なかったため、Sema3e 自体は肝星細胞を活性化しないことが示唆された。

インターネット公表に関する同意が得られなかったため非公表

Figure 2-14. CCl₄ 投与後の野生型および Sema3e ノックアウト(KO)マウスの肝傷害の比較
CCl₄ を投与後、経時的に野生型および Sema3e-KO マウスの血液を採取し、血清 ALT 濃度を解析したところ、Sema3e-KO マウスの肝傷害の程度は野生型と比較して差はないことが明らかとなった。

インターネット公表に関する同意が得られなかったため非公表

Figure 2-15. CCl₄ 投与後 24 時間の野生型および Sema3e-KO マウスの類洞構造
野生型マウスまたは Sema3e-KO マウスに対し CCl₄ を投与し 24 時間後の肝臓を抗 Stab2 抗体および抗 p75NTR 抗体を用いて IHC 染色した。野生型マウスでは肝星細胞に比して顕著に LSEC が退縮するのに対し、Sema3e-KO マウスでは LSEC の退縮は限られ、肝星細胞との接着は維持されている様子が観察された。Bars = 50µm.

インターネット公表に関する同意が得られなかったため非公表

Figure 2-16. 野生型または Sema3e-KO マウスに対する CCl₄ 頻回投与による肝線維化の誘導

(A)実験の模式図 (B)CCl₄ を頻回投与したマウス肝臓の組織切片に対するシリウスレッド染色像および (C)そのシリウスレッド陽性の線維面積の定量化 (D)CCl₄ を頻回投与したマウス肝臓中に含まれるヒドロキシプロリン量。Sema3e-KO マウスでは野生型マウスと比較して CCl₄ 誘導による肝線維化が軽減することが明らかとなった。Bars = 50μm. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

インターネット公表に関する同意が得られなかったため非公表

Figure 2-17. 肝線維化を誘導した野生型または **Sema3e-KO** マウス肝臓の蓄積した線維と類洞構造

LSEC を抗 **Stab2** 抗体で、線維を抗 **Collagen** 抗体で IHC 染色した。**Sema3e-KO** マウスでは野生型と比較して類洞の顕著な拡張とともに線維の蓄積の軽減が見られる。また、特に線維周辺の LSEC(矢頭)は野生型では退縮しているのに対し、**Sema3e-KO** では比較的に伸長している様子が観察された。

インターネット公表に関する同意が得られなかったため非公表

Figure 2-18. 肝線維化を誘導した野生型または **Sema3e-KO** マウス肝臓の蓄積した線維と肝細胞の形態

F-actin を **Phalloidin** で、線維を抗 **Collagen** 抗体で **IHC** 染色した。野生型マウスでは **Sema3e-KO** マウスと比較して線維の蓄積が進んでいるが、線維周辺の肝細胞の形態には両者に顕著な差は見られず、**Sema3e** の有無による肝細胞の傷害自体には差は無いと考えられた。

インターネット公表に関する同意が得られなかったため非公表

Figure 3. 本研究により明らかとなった肝線維化および再生における **Sema3e** の役割の模式図

肝細胞が酸化ストレスを受けると、**Sema3e** を発現・分泌する。**Sema3e** は LSEC を退縮させ移動を抑制し、類洞の再生を一過的に抑制する。その結果、肝星細胞は一過的に活性化しコラーゲン等を分泌することで肝再生を促進するが、肝細胞が慢性的に傷害を受けると **Sema3e** は発現し続け類洞の再生を抑制し続ける。その結果、肝星細胞は活性化し続けコラーゲン線維の蓄積が続き肝線維化が進行することが明らかとなった。

謝辞

本研究は、東京大学分子細胞生物学研究所 発生・再生研究分野 宮島研究室において行われました。本研究を遂行するにあたり、5年間に渡り終始ご指導下さいました宮島 篤教授に深く御礼を申し上げます。また本研究を遂行するにあたり、多くの実験指導や助言を下さいました、東京大学分子細胞生物学研究所 幹細胞制御研究分野 田中 稔准教授に深く感謝いたします。

研究を進めるにあたり助言や実験材料の提供をして頂きました伊藤 暢講師、榎本 豊助教、木戸 丈友特任助教および発生・再生研究分野の皆様に感謝申し上げます。

また、本研究を遂行するために不可欠であった **Sema3e-KO** マウスを快く提供下さいました、シンシナティ小児病院 吉田 富 **assistant professor** に感謝申し上げます。そしてその便宜をはかって下さった、大阪大学免疫学フロンティア研究センター 熊ノ郷 淳教授および 菊谷 仁教授に感謝申し上げます。

最後に、私の研究生生活を暖かく見守り、励ましてくれた家族に心から感謝致します。