

# 博士論文

論文題目 肝線維化におけるコラーゲン分泌機構の解析

氏名 福島 慎一

## 目次

略語一覽／表記法	3
1. 序論	5
2. 実験方法	8
3. 実験結果	23
4. 考察	30
5. 図表	35
6. 参考文献	51
7. 謝辞	56

## 略語一覽

BSA	: bovine serum albumin
cDNA	: complementary DNA
DEPC	: Diethylpyrocarbonate
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
EDTA	: ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
ER	: endoplasmic reticulum
FBS	: fetal bovine serum
EGTA	: ethylene glycol tetraacetic acid
GTP	: guanosine 5' -triphosphate
HEPES	: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IB	: immunoblot
mAb	: monoclonal antibody
pAb	: polyclonal antibody
PBS	: phosphate-buffered saline
PCR	: polymerase chain reaction
POD	: peroxidase
rpm	: round per minite
SDS-PAGE	: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TBS	: tris-buffered saline
tris	: tris(hydroxymethyl)aminomethane
v/v	: volume per volume
w/v	: weight per volume

## 表記法

あるベクターに目的の cDNA 断片を組み込んだプラスミドの表記を、プラスミドの名前の後にハイフンで cDNA の名前を結んで記すことにする。例えば pFLAG-CMV5 ベクターに Sec23a の野生型を組み込んだプラスミドは pFLAG-CMV5-Sec23a/WT と記すことにする。

また、各種のバッファー等の組成は最終濃度で示すものとする。

# 1. 序論

---

---

肝線維化は肝において I 型コラーゲンを主とした細胞外基質が過剰に蓄積することで生じ、肝機能に障害が出た状態である (Bataller & Brenner, 2005; Friedman, 2008b)。線維化の発症はウイルス、アルコール、脂肪などによる肝細胞の慢性的な炎症が原因となり、傷害肝細胞から transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、Interleukin (IL-6)をはじめとするサイトカインが放出されると、肝類洞血管を取り巻く肝星細胞を刺激して活性化を引き起こすことが知られている (Hernandez-Gea & Friedman, 2011; Tsukamoto, 1999) (図 1)。この活性化過程において、肝星細胞はビタミン A 貯蔵細胞から筋繊維芽様細胞へと形態が変化し、脂肪滴の減少、細胞増殖能の増加、ストレスファイバーである  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)の発現量の上昇、小胞体の肥大化および細胞外基質である I 型、III 型コラーゲンの分泌などの様々な変化が生じることが報告されている (Atzori, Poli, & Perra, 2009; Friedman, 2008a)。以上のことから、肝星細胞は肝線維化の治療の標的として重要な細胞であると考えられている。肝星細胞は活性化に伴い、小胞体の肥大化と I 型、III 型コラーゲンの分泌という変化を起こすことから、その小胞体からの分泌動態を大きく変えている可能性が考えられる。しかしながら、現在までに肝星細胞の活性化に伴う分泌関連因子の動態変化に着目した研究は少なく、その解析により線維化を防ぐための新たな知見を得られると考えた。

小胞体からゴルジ体へのタンパク質の分泌は coat protein complex II (COPII) 被覆小胞によっておこなわれ、その小胞の直径は 60–90 nm である (Brandizzi & Barlowe, 2013; Miller & Schekman, 2013; Stagg et al., 2006) (図 2A)。しかし、コラーゲンは全長 300 nm 程の巨大分子であり、通常の小胞に入れられないために特殊な機構が働くと考えられている (Fromme & Schekman, 2005; Malhotra & Erlmann, 2011) (図 2B)。当研究室では先に、VII 型コラーゲンの小胞体からの分泌を特異的に補助する積み荷受容体として cTAGE5/TANGO1 複合体を単離・同定し、本複合体が COPII 被覆因子と協調することでコラーゲン分泌を担うことを明らかにしてきた (Saito et al., 2009; Saito et al., 2011; Saito et al.,

2014)。同じ巨大分子である I 型コラーゲンも特殊な分泌機構を有する可能性が考えられるが、その詳細は明らかにされていない。そこで本研究では、活性化に伴い I 型コラーゲンを多量に分泌する肝星細胞に着目し、小胞体における輸送タンパク質の変化と分泌関連因子の発現動態の関連性を解析した。

## 2. 実験方法

---

---

## 2.1 ラット初代肝星細胞の単離・培養

ラット肝臓より Patrick Maschmeyer 氏のコラゲナーゼ灌流法 (Maschmeyer, Flach, & Winau, 2011)を参考にして肝星細胞を単離した。試薬は以下のように調製した。

### SC1 buffer (1L スケール)

EGTA 190 mg, Glucose 900 mg, 1M HEPES 10 ml, KCl 400 mg,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  303.6 mg, NaCl 8 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  88.2 mg,  $\text{NaHCO}_3$  350 mg, Phenol Red 6 mg を double distilled water (DDW)に溶かして 1L にメスアップした後、bottle top filter 0.22  $\mu\text{m}$  (Corning)で滅菌した。

### SC2 buffer (1L スケール)

$\text{CaCl}_2$  423 mg, 1M HEPES 10 ml, KCl 400 mg,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  303.6 mg, NaCl 8 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  88.2 mg,  $\text{NaHCO}_3$  350 mg, Phenol Red 6 mg を double distilled water (DDW)に溶かして 1L にメスアップした後、bottle top filter 0.22  $\mu\text{m}$  (Corning)で滅菌した。

### GBSS-A buffer (1L スケール)

KCl 370 mg,  $\text{CaCl}_2$  170 mg, KCl 370 mg, Glucose 991 mg,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  30 mg,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  210 mg,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  70 mg,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  151 mg,  $\text{NaHCO}_3$  227 mg, Phenol Red 6 mg を double distilled water (DDW)に溶かして 1L にメスアップした後、bottle top filter 0.22  $\mu\text{m}$  (Corning)で滅菌した。

### GBSS-B buffer (1L スケール)

$\text{CaCl}_2$  170 mg, KCl 370 mg, Glucose 991 mg, KCl 370 mg,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  30 mg,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  210 mg,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  70 mg,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  151 mg, NaCl 8 g,  $\text{NaHCO}_3$  227 mg, Phenol Red 6 mg を double distilled water (DDW)に溶かして 1L にメスアップした後、bottle top filter 0.22  $\mu\text{m}$

(Corning)で滅菌した。

#### DNaseI 溶液

GBSS-B buffer 3 ml に DNaseI (SIGMA) 6 mg を溶かして、Acrodisc 32 mm Syringe Filter with 0.2  $\mu$  m Super Membrane (PALL)で滅菌した。

#### Histodenz 溶液

GBSS-A buffer 28 ml に Histodenz (SIGMA) 8 g を溶かして、Acrodisc 32 mm Syringe Filter with 0.2  $\mu$  m Super Membrane (PALL)で滅菌した。

ラットは Wister 雄ラット、体重 200~300g (日本クレア)を用いた。pentobarbital (共立製薬)を腹腔内投与し、麻酔した。クーリンベンチ内で開腹を行い、門脈にペリスタポンプ (ATTO) のチューブをつないだ 20G $\times$ 1.1/2"注射針 (TERUMO)を差し込み、縫合糸で固定した。肝臓の下大静脈を切断し、流速 8.33 ml/min で 37°Cの湯浴に入れ温めた SC1 buffer を 100ml 灌流した。その後、アクチナーゼ E (科研ファルマ) 50 mg, コラゲナーゼ P (Roche) 42.5 mg を溶かした SC2 buffer 100 ml を 37°Cの湯浴に入れ温めて流速 8.33 ml/min で灌流した。灌流後の肝臓を 10 cm dish に移し、20 ml の SC2 buffer で洗い、再び 35 ml の SC2 buffer を入れてハサミで細かくした。その後、オートクレーブ滅菌した三角フラスコに移してアクチナーゼ E 25 mg, コラゲナーゼ P 42.5 mg を溶かした SC2 buffer 25 ml と DNaseI 溶液 0.5 ml を入れた。三角フラスコを 37°Cの湯浴に入れ温めながら、攪拌を 20 分間おこなった。攪拌後、組織懸濁液 60 ml を cell strainer 70  $\mu$  m (BD Falcon)で濾過し、50 ml チューブ 3 本に 20 ml ずつ入れた。各チューブに 30 ml SC2 buffer を入れ、600G, 10 分遠心した。各チューブの沈殿物を吸わないように 10ml になるまで液をアスピレートして、各チューブに 150  $\mu$  l の DNaseI 溶液を入れて、ピペットで沈殿をよく溶かした。チューブ 3 本 10ml を 2 本 15ml になるように液を移して、各チューブに GBSS-B を 35 ml 入れて、600G, 10 分遠心した。各

チューブの沈殿物を吸わないように 8 ml になるまで液をアスピレートし、各チューブに 150  $\mu$ l の DNase 溶液を入れて、ピペットで沈殿をよく溶かした。チューブ2本 8 ml を1本 16 ml にして、GBSS-B を 20 ml 足して全量 36 ml にした。さらに、Histodenz 溶液を 14 ml 足して全量 50ml にした後、転倒混和を 5 回おこない、ピペットでよく混ぜた。その後、10 ml ずつ 15 ml チューブ 5 本に移して、ピペットマンで各チューブに 750  $\mu$ l $\times$ 2 の GBSS-B を静かに重層し、1500G, 15 分遠心した。重層した界面付近の白い懸濁の部分をピペットで吸い取り、50 ml チューブに移した。その後、全量が 50 ml になるように GBSS-B buffer を加えて、600G, 10 分遠心した。遠心後の沈殿した細胞を吸わないようにアスピレートし、熱非働化 (56 $^{\circ}$ C, 30 分間) した 10% (v/v) FBS (JRH BIOSCIENCES), 0.6 mg/ml L-Glutamine, 10%(w/v) 炭酸水素ナトリウム 8 ml 程度、抗生物質として 0.1 g/L 硫酸ストレプトマイシン (明治製菓)、10 万単位/L ペニシリン G カリウム (明治製菓)を含む DMEM(日水製菓)で懸濁し、 $3 \times 10^5$  cells/ml をとして 6 cm dish(IWAKI)に 4 ml および 6 well dish(IWAKI)に 2 ml 入れて 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 濃度の条件で培養した。3 時間後にメディアウムで 5 回洗い、再び 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 濃度の条件で培養した。その後、メディアウムは 1 日毎に交換し、実験に応じた日数の培養をおこなった。

## 2.2 ラット初代培養肝星細胞の total RNA の回収

6 cm dish および 6 well dish で培養したラット肝星細胞に 1 ml の RNAiso plus (Takara)を加え、細胞を剥がして溶液を 1.5 ml チューブに移した。5 分静置後、200  $\mu$ l の chloroform を加えて、よく混和して 5 分静置した。その後、12,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心した。上層 650  $\mu$ l 程を新しい 1.5 ml チューブに移し、750  $\mu$ l の 2-propanol を加えて、よく混和して 10 分間静置した。その後、12,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心し、RNA を沈殿させた。上清を取り除いた後に冷やした 75 % ethanol を 100  $\mu$ l 入れて 12,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心した。上清を取り除いた後に RNA の沈殿を DEPC 処理水 (ナカライテスク) 15  $\mu$ l 程に溶解した。その

後、濃度を Nao Vue (GE)による吸光度測定で定量した。

### 2.3 ラット初代培養肝星細胞のタンパク質の回収

6 cm dish および 6 well dish で培養したラット肝星細胞に対して PBS と 4 × Leammli sample buffer (200 mM Tris-HCl (pH 6.8), 40% (v/v) glycerol, 8% (w/v) SDS, 20% (v/v) β-mercaptoethanol, 0.08% (w/v) Bromophenol blue) を 3:1 で混ぜた 1 × Leammli sample buffer を 160 μl 加えて 1.5 ml チューブに回収し、沸騰水で 5 分間煮沸したものをウェスタンブロット用のサンプルとした。また、培養上清は 650 μl を 1.5 ml チューブに回収し、2倍濃縮の 40% 硫酸アンモニウム 650 μl を加えて、4°C で一晩置いた。その後、10,000 g, 4°C で 30 分間遠心して上清を取り除き、沈殿を 1 × Leammli sample buffer 50 μl で溶かしたものをウェスタンブロット用のサンプルとした。

### 2.4 ラット初代培養における発現抑制実験

1.5 ml チューブに 250 μl の Opti-MEM (Invitrogen) を入れ、siRNA を 80 pmol を加えた。別の 1.5 ml チューブにも 250 μl の Opti-MEM を入れ、5 μl の Lipofectamine RNAi-MAX (Invitrogen) を加えて室温で 5 分間静置した。その後、これらを混ぜ合わせて室温で 20 分間静置した。この間に肝星細胞を単離後 2 日間培養した 6well dish のメディアウムを除き、新しく 2 ml の抗生物質の入っていない培養メディアウムを加えた。20 分後に siRNA 混合液を添加し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 濃度の条件で培養した。その後、24 時間後に抗生物質の入った培養メディアウムに交換し、再び 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 濃度の条件で培養した。そして、72 時間の培養後に細胞を回収した。使用した siRNA の配列は以下の通りである。

Sec23a RNAi#1 (Invitrogen)

GCCAGGCACGUUUCUUCUUUCAA

UUUGAAAGAAGGAAACGUGCCUGGC

Sec23a RNAi#2 (Invitrogen)

CCACUACAACCUUAGCCAUAUAUUU

AAUAUAUGGCUAAGGUUGUAGUGG

ネガティブコントロールとして stealth RNAi negative control medium GC duplex (#1) (Life technologies)を使用した。

## 2.5 LX-2 細胞培養

LX-2 細胞は熱非働化 (56°C, 30 分間) した 10% (v/v) FBS (JRH BIOSCIENCES), 0.6 mg/ml L-Glutamine, 10%(w/v) 炭酸水素ナトリウム 8 ml 程度を含む DMEM(日水製薬)中で、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 濃度の条件で培養し、トリプシン(DIFCO)処理により細胞をシャーレ表面からはがして継代培養した。

## 2.6 TGF-β 1 刺激実験

LX-2 細胞を 30,000~40,000 cells/ml になるように培養メデイウムに希釈したものを 6well dish に 2 ml 入れた。その後、24 時間 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 濃度の条件で培養した後に細胞を 2 ml の 0.5% (v/v) FBS, 0.6 mg/ml L-Glutamine, 10%(w/v) 炭酸水素ナトリウム 8 ml 程度を含む DMEM(starvation 用 DMEM)で 2 回洗い、starvation 用 DMEMを 2 ml 入れて、再び 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 濃度の条件で 24 時間培養した。Recombinant Human TGF-β 1 (R&D systems)を 1 mg/ml BSA/4 mM HCl/DDWに溶かして 20 μg/mlにしたものを原液として0.5% (v/v) FBS, 0.6 mg/ml L-Glutamine, 10%(w/v) 炭酸水素ナトリウム 8 ml 程度を含む DMEMに希釈して、0.3 ng/ml もしくは 1.0 ng/ml の TGF-β 1 溶液に調整した。なお、0 ng/ml の TGF-β 1 溶液

は starvation 用 DMEM を用いた。細胞にこの TGF- $\beta$ 1 溶液を 2 ml ずつ入れ、さらに 72 時間 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 濃度の条件で培養した後に細胞の回収を行った。RNA およびタンパク質の回収は先述の 2.2 と 2.3 の項と同様である。

## 2.7 LX-2 細胞における発現抑制実験

6well dish に 500  $\mu$ l の Opti-MEM (Invitrogen) を入れ、siRNA を 80 pmol 加えた。その後、5  $\mu$ l の Lipofectamine RNAi-MAX (Invitrogen) を入れて混ぜ合わせ、20 分間静置した。この間に培養していた LX-2 細胞をトリプシン処理により、はがした。そして、培養メディアウムに細胞が 30,000 ~ 40,000 cells/ml になるように希釈した。20 分後、siRNA-Lipofectamine RNAi-MAX 溶液の入った dish に細胞を希釈したメディアウムを 2 ml を加え、37°C で 24 時間培養した後アッセイに用いた。使用した siRNA の配列は以下の通りである。

Sec23a RNAi#1 (Invitrogen)

GGGUGAUUCUUUCAAUACUCCUUA

UAAGGAAGUAUUGAAAGAAUCACCC

Sec23a RNAi#2 (Invitrogen)

GCGUGGUCCUCAGAUGCCUUUGAUA

UAUCAAAGGCAUCUGAGGACCACGC

Sec23b RNAi#1 (Invitrogen)

GCUGCAA AUGGUCACUGCAUUGAUA

UAUCAAUGCAGUGACCAUUUGCAGC

Sec23b RNAi#2 (Invitrogen)

CAGCAGCAUUCUAGCUGACAGAAUU

AAUUCUGUCAGCUAGAAUGCUGCUG

Sec24d RNAi#1 (Invitrogen)

GAGCAUACCAGAGACAGCUGGUCAU

AUGACCAGCUGUCUCUGGUAUGCUC

Sec24d RNAi#2 (Invitrogen)

CAGCUCUCAGCUAGCUGAUCUUUUAU

AUAAAGAUCAGCUAGCUGAGAGCUG

BBF2H7 RNAi (SIGMA)

GAGUCUUGUUCAACUGAGATT

UCUCAGUUGAACAAGACUCTT

Sar1a RNAi#1 (SIGMA)

GAACAGAUGCAAUCAGUGATT

UCACUGAUUGCAUCUGUUCTT

Sar1a RNAi#2 (SIGMA)

CCAGUAUAUUGACUGAUGUTT

ACAUCAGUCAAUUACUGGTT

Sar1b RNAi#1 (SIGMA)

GCAUAACUUGAAUUCAAUATT

UAUUGAAUUCAGUUAUGCTT

Sar1b RNAi#2 (SIGMA)

CUACCUUCCUGCUAUCAAUTT

AUUGAUAGCAGGAAGGUAGTT

Invitrogen の siRNA のネガティブコントロールとして stealth RNAi negative control medium GC duplex (#1) (Life technologies)を使用した。また、SIGMA の siRNA のネガティブコントロ

ールとして以下の配列を使用した。

Control RNAi (SIGMA)

AAUUCUCCGAACGUGUCACGUTT

ACGUGACACGUUCGGAGAAUUTT

## 2.8 LX-2 細胞への遺伝子導入

LX-2 細胞を 30,000~40,000 cells/ml になるように培養メディウムに希釈したものを 6well dish に 2 ml 入れた。その後、24 時間 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 濃度の条件で培養した。1.0 μg のプラスミド DNA 及び 3.0 μl の Lipofectamine 2000 (Invitrogen) をそれぞれ 250 μl の Opti-MEM (Invitrogen) で希釈した後室温で 5 分間静置し、これらを混ぜ合わせて更に室温で 20 分間静置した。この間に dish のメディウムを除き、新しく 2 ml の培養メディウムを加えた。20 分後、DNA 混合溶液を加え、37°C で 72 時間培養した後に細胞を回収した。

## 2.9 定量的リアルタイム PCR

cDNA は 500 ng total RNA をテンプレートとして、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて、プロトコルに従い、逆転写反応を行うことで調整した。合成した cDNA を用いて THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) により、PCR 用反応液を調製して StepOne Plus (Applied Biosystems) を使用して反応を行なった。なお、反応に用いたプライマーの配列は以下の通りである。

ラット用プライマー

$\beta$ -actin(+): CCCGCGAGTACAACCTTCT

$\beta$ -actin(-):CGTCATCCATGGCGAACT  
Collagen1a2(+):CCTGGAGAACCTGGTCTCAT  
Collagen1a2(-):GGCCAACATTTCCAGGAG  
 $\alpha$ -SMA(+):TGCCATGTATGTGGCTATTCA  
 $\alpha$ -SMA(-):ACCAGTTGTACGTCCAGAAGC  
TANGO1(+):AGCCGATGAAAAGGTGGTT  
TANGO1(-):TCAATTCGCCGCTTGTAAGT  
cTAGE5(+):GGGACTTCCCTGGACCAC  
cTAGE5(-):CCCTTGGTGC GTACACAGT  
Sar1a(+):GGGCAAACCACAGGAAAG  
Sar1a(-):CACTGCACATGAACACTTCCA  
Sar1b(+):CAGCACGTCCCAACTACA  
Sar1b(-):AAACGTCATGCCAGCAATAGT  
Sec12(+):TCGGATAGACCCCAAGACTG  
Sec12(-):CACCCGCTGATCTGCTCTA  
Sec23a(+):GGAGATGAAGTGCTGCCCTA  
Sec23a(-):TTGAAAGAGTCACCCATTACCAT  
Sec23b(+):CTGGTCAACCTCAGGAGCA  
Sec23b(-):TCTTGTGAACGGGCTGTAGA  
Sec24a(+):GACAGTATTCCGATTTGGCTTC  
Sec24a(-):TGTGCTGATGGTGGTACGAG  
Sec24b(+):TCAGCTTCCGATGATGAGG  
Sec24b(-):GCGCTGCTTGTGGTAGAAG  
Sec24c(+):GCCTTGACGTTAGGAACGAA  
Sec24c(-):CATCCCCGATTTGATCTCAC

Sec24d(+):GACCGTGCTGAAGAGGCTAC  
Sec24d(-):GAAACCAACTCGAATTGCAGA  
Sec13(+):GTGACTGGGTTTCGAGACGTT  
Sec13(-):GGCGTCATCACAAGTCCAA  
Sec31(+):AGCCTGTCCCTCTGACACAC  
Sec31(-):AACGTTGCCATGCATTATGA  
mBet3(+):TTTCGGGAAACTGCTGATG  
mBet3(-):CCAGTTGGTGATGCTTGGGA  
CK1  $\delta$  (+):GGCTCCTTCGGAGACATCTA  
CK1  $\delta$  (-):TGAGGATGTTTGGTTTTGACA  
PCTAIRE(+):AGGGTCGCAATCGGATCT  
PCTAIRE(-):CCTTTAGTGCAAATATGGAAGTAGTG  
PP6(+):CGCAGGTGTACGGATTTTATG  
PP6(-):TGAGCATGTCAAAAACCTTTGGT  
USP10(+):GGTGGCAAGAGAGTCTGTCC  
USP10(-):GTCACTCTACGGCTGACTTCAA  
p125(+):TGCTTGA CTCTCTGAATCTTGAA  
p125(-):CCGTGCCTAGAACCACATTC  
Dynactin1(+):GCCAATCCCAGATCCAAG  
Dynactin1(-):TTGAAGCAGAAGAATCAGGAG

#### ヒト用プライマー

$\beta$ -actin(+): CCAACCGCGAGAAGATGA  
 $\beta$ -actin(-): CCAGAGGCGTACAGGGATAG  
Collagen1a1(+):GGGATTCCCTGGACCTAAAG

Collagen1a1(-):GGAACACCTCGCTCTCCA  
 $\alpha$ -SMA(+):GTTTCCGCTGCCAGAGA  
 $\alpha$ -SMA(-):TGGTGCCCCCTGATAGGA  
Sec23a(+):ATCCGAGTGACCACCATTG  
Sec23a(-):AGCCGGGCCATAAGAATG  
Sec23b(+):CATGATCCAGCCCATTCTCTA  
Sec23b(-):AATGCTGCTGCTATCCAAGAG  
Sec24a(+):GGTTTCTTTTCAGTCAGCACTCT  
Sec24a(-):GCAAACACAAAGTATGAACACGA  
Sec24b(+):CCAGTTGAGCCTGTGACCTC  
Sec24b(-):TGGTTATTAACATATTCACCATACTGC  
Sec24c(+):GCCTTGACGTTAGGAACGAA  
Sec24c(-):AGCCAGCATTGAGATTATCTCC  
Sec24d(+):TGCCATCTTTTGCACATATCA  
Sec24d(-):GAGTTGTTGAGAGTATGGGTTTCC

## 2.10 ウェスタンブロッティング法

Mini-PROTEAN III (Bio-Rad) を用いてサンプルを SDS-PAGE で分離した。電気泳動はサンプルがスタッキングされるまで 60 V の電圧でおこない、その後は 150 V の電圧でおこなった。その後、immobilon メンブレン (millipore) に Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) を用いて 12 V, 45 分間ブロットを行った。ブロット後、一次抗体で抗 Sec23a 抗体、抗 Sec23b 抗体、抗 BBF2H7 抗体、抗 Sar1b 抗体、抗 phospho-Smad2 抗体を用いるメンブレンは 5% スキムミルク(日本生活協同組合連合会)/2.5% FBS/0.2% Tween-20/TBS 中に浸し、それ以外の抗体を用いるメンブレンは blocking one (ナカライテスク) 中に浸して室

温 30 分間振盪した後、一次抗体溶液中に 4°C で終夜振盪した。なお、一次抗体溶液は目的の蛋白質に対する抗体を blocking one (ナカライテスク) で希釈して用いた。メンブレンを 0.2% Tween-20/TBS で 10 分間の洗浄を 4 回行った後、二次抗体溶液中で 1 時間振盪し、0.2% Tween-20/TBS で 10 分間の洗浄を 4 回行った。二次抗体溶液は一次抗体を認識する POD が結合した抗体を終濃度 1  $\mu$ g/ml になるように 0.2% Tween-20/TBS で希釈したものをを用いた。メンブレンを洗浄した後に immobilon western (millipore) のルミノール・ペルオキシド溶液に約 30 秒間浸し、メンブレン表面での化学発光を LAS-4000 システム (FujiFilm) を用いて検出した。それぞれの抗体は以下の濃度で用いた。なお、モノクローナル抗体は clone number、ポリクローナル抗体は catalog number を記した。

抗 FLAG 抗体 (mouse mAb, M2, SIGMA)	1 $\mu$ g/ml
抗 c-myc 抗体 (mouse, mAb, 9E10, SIGMA)	1 $\mu$ g/ml
抗 $\beta$ -actin 抗体 (mouse mAb, C4, Chemicon)	1/1000
抗 $\alpha$ -SMA 抗体 (rabbit pAb, ab5694, Abcam)	1/1000
抗 I 型 collagen 抗体 (mouse mAb, SP1.D8, DSHB)	1/1000
抗 Sec23a 抗体 (rabbit pAb)	1/1000
抗 Sec23b 抗体 (rabbit pAb)	1/1000
抗 Sec24d 抗体 (rabbit pAb)	1/1000
抗 cTAGE5 抗体 (rabbit pAb)	1/1000
抗 BBF2H7 抗体 (rabbit pAb, HPA015068, Atlas Antibodies)	1/500
抗 Sar1a 抗体 (mouse mAb, 3G5, Novus Biological)	1/1000
抗 Sar1b 抗体 (goat pAb, PAB7320, Abnova)	1/5000
抗 Smad2 抗体 (rabbit mAb, D43B4, Cell Signaling)	1/1000
抗 phospho-Smad2 抗体 (rabbit mAb, 138D4, Cell Signaling)	1/1000

抗 Sec23a 抗体および抗 Sec23b 抗体は Bin Zhang 氏より分譲して頂いたものを使用した。

抗 cTAGE5 抗体は当研究室で作製したものをを用いた。

### 2.11 免疫染色法

6 cm dish および 6 well dish にオートクレーブ滅菌したカバーガラス (MATSUNAMI)を入れ、単離したラット肝星細胞または LX-2 細胞を培養した。実験に応じた日数培養した後にカバーガラスを 24-well plate (IWAKI)に移し、PBS で洗浄した。 $-30^{\circ}\text{C}$ で冷やしたメタノール (WAKO)を加えて、細胞を $-30^{\circ}\text{C}$ で 6 分間冷却して固定を行った。その後、PBS で洗浄し、5% BSA/0.1% Triton X-100/PBS 溶液を入れて、15 分間室温で静置した。その後、5% BSA/0.1% Triton X-100/PBS に一次抗体を希釈したもので室温 1 時間静置した。その後、PBS で洗浄を行い、Alexa Fluor 488/568 標識抗体 (Life technologies)溶液で暗所で室温 1 時間静置した。PBS で希釈した diamidino-2-phenylindole(DAPI)を加えて暗所で 5 分間静置した。その後、PBS で 3 回洗浄して、スライドガラス (武藤化学株式会社)に封入剤 Immunon PermaFluor (SHANDON)で封入した。用いた抗体と希釈濃度は以下の通りである。

抗 $\alpha$ -SMA-FITC 抗体 (mouse mAb, 1A4, SIGMA)	1/200
抗 Sec23a 抗体 (rabbit pAb)	1/200

### 2.12 顕微鏡観察

共焦点顕微鏡 LSM-700 (Carl Zeiss)を用いて観察を行なった。

### 2.13 コラーゲンの定量

TGF- $\beta$  1 による刺激を行った 6well dish 内の LX-2 細胞の培養上清 2 ml を 15 ml チューブ(Corning)に回収し、1,000 rpm、 $4^{\circ}\text{C}$ で 5 分間遠心した。その後、500  $\mu$ l を 1.5 ml Protein

LoBind チューブ (SIGMA)に入れた。コラーゲンの定量には Sircol Soluble Collagen Assay Kit (Biocolor)を用いた。チューブに回収した 500  $\mu$ l の上清に 100  $\mu$ l の Isolation & Concentration Reagent を入れて混合し、4°Cで一晩置いた。その後、12,000 rpm, 4°Cで 10 分間遠心した後に、上清を取り除いた。チューブに Sircol Dye Reagent を 500  $\mu$ l 入れて、30 分間振盪した後、12,000 rpm, 4°Cで 10 分間遠心して上清を除いた。その後、Acid-Salt Wash Reagent 375  $\mu$ l を入れて、12,000 rpm, 4°Cで 10 分間遠心して上清を除いた。沈殿に Alkali Reagent 125  $\mu$ l を入れてよく混合し、5 分間静置した後に 555 nm の吸光度を測定して各サンプルのコラーゲン量を定量した。定量に使用した検量線は Kit 内の Reference Reagent で希釈系列を調製して作成した。

### 3. 実験結果

---

---

## 肝星細胞の活性化に伴い、Sec23a と Sec24d の発現が特異的に上昇する

肝星細胞の活性化過程における COPII 関連因子の転写量の変化を定量することを目的として、ラット肝臓から肝星細胞を単離し、初代培養を行なった。初代培養肝星細胞は単離直後においてビタミン A 貯蔵細胞として脂肪滴を有する細胞であるが、シャーレ上で培養していくと 10 日から 14 日程で筋繊維芽様細胞へと分化してコラーゲンを分泌することが知られており、肝線維化の研究においてよく用いられる手法である (Maschmeyer et al., 2011)。雄性 Wister ラットより単離した肝星細胞の培養 1 日目と培養 10 日目の細胞の mRNA を抽出し、リアルタイム PCR による検討を行った結果、培養 10 日目において I 型コラーゲンおよび肝星細胞分化マーカーである  $\alpha$ -SMA の発現量が上昇しており、肝星細胞の活性化を確認した。この系を用いて、活性化肝星細胞の COPII 関連因子の転写量を定量したところ、コートタンパク質 Sec23 および Sec24 のアイソフォームの中で Sec23a と Sec24d の発現量が特異的に上昇していた (図 3)。その一方で、他の COPII 関連因子の発現量は減少していた。また、VII 型コラーゲン積み荷受容体である cTAGE5/TANGO1 の発現も減少していた。

## 既知の Sec23 相互作用因子の発現量は Sec23a と異なり、肝星細胞の活性化時に上昇しない

肝星細胞の活性化時に発現が上昇した Sec23a は COPII 小胞の内側の被覆コートを形成する働きほかに、細胞質側でプロテインキナーゼやユビキチンリガーゼなどの様々な因子と相互作用することで COPII 小胞による輸送を制御していることが知られている (Fromme, Orci, & Schekman, 2008; Lord et al., 2011)。そこで、これらの Sec23 相互作用因子が肝星細胞活性化時に Sec23a と同様に発現量が上昇するかを検討した。ラット初代培養肝星細胞の培養 1 日目と 10 日目で比較した結果、既知の Sec23 相互作用因子の発現

量は上昇しなかった (図 4)。

#### 肝星細胞の活性化に伴う Sec23a のタンパク量は mRNA 量と同様に発現が上昇している

次に、これまでの検討で見られた肝星細胞活性化時の COPII 関連因子の転写量の変化が細胞内のタンパク質の発現に影響を与えているかを定量した。そこで、ラット初代培養肝星細胞の培養 1 日目、6 日目、10 日目の細胞を回収し、ウェスタンブロッティング法による解析を行った。その結果、肝星細胞分化マーカーである  $\alpha$ -SMA の発現が増加した培養 6 日目において、Sec23a のタンパク量が上昇していた (図 5A)。このとき、Sec12 および cTAGE5 のタンパク量は減少していた。さらに、免疫染色法を用いた検討においても、同様に肝星細胞活性化に伴う Sec23a の発現量の上昇が観察された (図 5B)。

#### Sec23a の発現は肝星細胞の活性化に必要である

発現が上昇した Sec23a が肝星細胞の活性化に必要であるかを検討するために、初代培養肝星細胞内の Sec23a 発現抑制を行い、活性化への影響を調べた。培養 2 日目の細胞に Sec23a の siRNA 導入を行った結果、培養 6 日目において肝星細胞分化マーカーである  $\alpha$ -SMA の転写量およびタンパク質の量が有意に減少していた (図 6)。また、I 型コラーゲンの転写量および培養上清中に分泌された量も減少していた。以上から、Sec23a の発現は肝星細胞の活性化に必要であると考えられる。

## 肝星細胞における TGF- $\beta$ 1 刺激は Sec23a および Sec24d の発現量を上昇させる

初代培養の実験系では様々な環境要因によって肝星細胞の活性化が引き起こされる (Herrmann, Gressner, & Weiskirchen, 2007) ため、Sec23a、Sec24d がどのようなシグナル経路によって発現が上昇し、活性化へ影響しているかを検討することが難しいと考えられた。そこで、ヒト由来の培養株化された肝星細胞であり、肝線維化の研究において広く用いられている LX-2 細胞 (Xu et al., 2005) を用いて、シグナル経路の検討を行うことにした。肝臓の炎症においては種々のサイトカインが肝実質細胞やクッパー細胞などから分泌されることが知られているが、その中でも transforming growth factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$  1) は肝星細胞の活性化において重要なメディエーターの一つであると考えられており、LX-2 細胞に対して TGF- $\beta$  1 刺激を行うことにより肝線維化時の活性化を模倣できることが知られている (Gressner & Weiskirchen, 2006)。そこで、LX-2 細胞に TGF- $\beta$  1 を添加した際に、Sec23a、Sec24d の発現の上昇が見られるかを検討した。その結果、Sec23a、Sec24d の転写量およびタンパク量は TGF- $\beta$  1 の濃度に依存してそれぞれのアイソフォームに特異的に発現を上昇させた (図 7)。したがって、この系を用いることで Sec23a および Sec24d の解析を行うことにした。

## TGF- $\beta$ 1 刺激による肝星細胞の活性化において Sec23a および Sec24d の発現は必要である

TGF- $\beta$  1 刺激によって、発現量が上昇した Sec23a、Sec24d と変化が見られなかった Sec23b において肝星細胞の活性化に与える影響が異なるかを検討した。LX-2 細胞において Sec23a、Sec23b、Sec24d の発現抑制を行った後に、TGF- $\beta$  1 を添加して肝星細胞分化マーカー  $\alpha$ -SMA の発現および分泌されたコラーゲン量を指標に解析を行った。その結果、Sec23a および Sec24d の発現抑制時には活性化が減弱されたが、Sec23b の発現抑制では

活性化に大きな変化は見られなかった (図 8)。したがって、Sec23a および Sec24d は TGF- $\beta$  1 による肝星細胞の活性化に重要であることが示唆される。次に、Sec23a および Sec24d を LX-2 細胞に過剰発現させた際に活性化が引き起こされるかを検討した。その結果、Sec23a、Sec24d を単独または共発現させても  $\alpha$ -SMA の増加は見られず、Sec23a と Sec24d の発現量の上昇のみでは肝星細胞の活性化は起こらないことがわかった (図 9)。また、発現抑制時に分泌されたコラーゲン量を定量した結果、初代培養肝星細胞での結果と異なり、Sec23a 発現抑制時においてコラーゲンの分泌量に顕著な変化が見られなかった (図 10)。また、Sec23b および Sec24d を発現抑制した際にも、分泌されたコラーゲン量に変化はなかった。以上のことから、Sec23a および Sec24d は肝星細胞の活性化に寄与するが、コラーゲンの分泌には関与していない可能性が考えられる。

#### 肝星細胞において転写因子 BBF2H7 は Sec23a の発現制御に働き、活性化に関与する可能性がある

TGF- $\beta$  1 刺激がどのような機構で Sec23a の発現量の上昇させるかを検討した。骨細胞において小胞体膜貫通タンパク質 BBF2H7 が小胞体ストレスを感知し、細胞質側のドメインが切断されて転写因子として働き、Sec23a が増加させることが知られている (A. Saito et al., 2009)。そこで、肝星細胞においても BBF2H7 による転写調節機構が働きうるのかを検討した。LX-2 細胞に対して BBF2H7 の発現抑制を行ない、TGF- $\beta$  1 刺激への影響を見たところ、Sec23a のタンパク量が減少し、 $\alpha$ -SMA の発現が減少していた (図 11)。以上の結果より、肝星細胞においても転写因子 BBF2H7 は Sec23a の発現制御に働き、活性化に関与している可能性がある。

## Sec23a および Sec24d は COPII 小胞依存的な分泌を介して肝星細胞に活性化に關与する

次に、肝星細胞における Sec23a、Sec24d の発現量の増加がどのような機構で  $\alpha$ -SMA の発現量を上昇させるのかを検討した。Sec23、Sec24 にはいくつかのアイソフォームが存在するが、これらはそれぞれ積み荷タンパク質との結合親和性が異なっており、アイソフォームに特異的なタンパク質輸送を行なうことが近年、報告されている (Lord, Ferro-novick, & Miller, 2013; Wendeler, Paccaud, & Hauri, 2007)。そこで、Sec23a/Sec24d がアイソフォーム特異的な輸送を行なうことで肝星細胞を活性化するのか、全く未知の機能が働くのかを検討した。低分子量 G タンパク質 Sar1 が COPII 小胞の形成を制御すること (Aridor et al., 2001; Bielli et al., 2005) から、LX-2 細胞において Sar1 発現抑制によりタンパク質の輸送を止めた際に活性化にどのような影響を与えるかを調べた。その結果、Sar1 の二つのアイソフォーム a と b の発現抑制によって TGF- $\beta$  1 による  $\alpha$ -SMA の上昇が抑えられたことから、COPII 小胞依存的なタンパク質の分泌が肝星細胞の活性化に必要であると考えられる (図 12)。以上のことから、Sec23a/24d 特異的に輸送されるタンパク質が肝星細胞を活性化することが示唆された。

## Sec23a 特異的に輸送される活性化因子は膜タンパク質である可能性が考えられる

さらに、Sec23a 特異的に輸送される肝星細胞の活性化因子が細胞膜上に運ばれる受容体などの膜タンパク質なのかもしれないもしくは細胞外に分泌されるサイトカインやコラーゲンのような可溶性タンパク質なのかを検討することにした。そこで、Sec23a 発現抑制した細胞に対して、control 処理群の細胞の培養上清を添加したときに活性化が起こるかを調べた。その結果、control 処理群の細胞に control 処理群の上清を加えたときには活性化は起こるが、Sec23a 発現抑制細胞に control 処理群の上清を添加しても活性化は起こらなかった (図 13)。したがって、Sec23a 特異的に輸送される活性化因子は細胞膜側に存在する未同定の

膜タンパク質である可能性が示唆された。

#### Sec23a、Sec24d の発現は TGF 受容体下流の Smad のリン酸化には影響しない

また、Sec23a/Sec24d 特異的に輸送される活性化因子が膜タンパク質であることから、Sec23a、Sec24d 発現抑制によって TGF 受容体の細胞膜への輸送が抑えられ、TGF- $\beta$ 1 による刺激が阻害された可能性が考えられた。TGF 受容体の下流においてシグナル伝達分子である Smad のリン酸化が起こり、リン酸化 Smad が複合体を形成して核内に移行して肝星細胞を活性化させる因子の発現制御を行なうことが知られている (Derynck, Zhang, & Feng, 1998; Liu et al., 2003)。そこで、Smad2 のリン酸化を指標に Sec23 の影響を調べたことにした。その結果、Sec23a、Sec23b および Sec24d の発現抑制においても Smad2 のリン酸化が起こることがわかり、Sec23a および Sec24d は TGF 受容体下流の Smad には影響しないと考えられる (図 14)。以上のことから、Sec23a、Sec24d 発現抑制による活性化の減弱は TGF 受容体への輸送に影響したことによるものではないと考えられる

## 4. 考察

---

---

本研究において、私は以下のことを見出した。

- (1) 肝星細胞活性化に伴い、Sec23a および Sec24d が特異的に発現上昇していることを見出し、活性化に関与することを示した。
- (2) 肝星細胞活性化に伴い、他の COPII 因子とⅦ型コラーゲンの積み荷受容体である cTAGE5/TAGNO1 の量が低下していることを明らかにした。
- (3) 肝星細胞において転写因子 BBF2H7 が Sec23a の発現制御に働き、活性化に関与している可能性が示唆された。
- (4) Sec23a/Sec24d の発現上昇は COPII 小胞による未同定の膜タンパク質の分泌を亢進することで肝星細胞の活性化を起こしている可能性を示した。

#### 肝星細胞におけるコラーゲンの分泌

本研究では、活性化に伴い I 型コラーゲンを多量に分泌する肝星細胞に着目し、その活性化過程における分泌関連因子の発現動態の変化の解析を行なった。ラット初代培養細胞において活性化に伴って顕著に上昇した Sec23a の発現抑制により、活性化および分泌されたコラーゲン量が減少する結果が得られた (図 6)。しかし、ヒト由来の培養株化された肝星細胞である LX-2 細胞においては Sec23a の発現抑制によって活性化が抑えられる一方で分泌されたコラーゲン量に変化は見られなかった (図 8、10)。以上の結果から、活性化肝星細胞において観察される分化マーカー  $\alpha$ -SMA の上昇とコラーゲンの分泌亢進の二つを区別する必要があると考えられる。 $\alpha$ -SMA とコラーゲンは共に肝線維化の指標として重要であるが、その発現量上昇の分子機構において異なるシグナル伝達経路が介在しており、コラーゲン分泌亢進に先んじて分化が起こる可能性が考えられている (Lindert et al., 2005)。また、初代培養での検討において Sec23a 発現抑制細胞ではコラーゲンの転写

量レベルでの減少が観察されている（図 6）。したがって、初代培養肝星細胞におけるコラーゲン分泌に対する Sec23a の影響は分化初期段階での減弱が間接的に寄与したものである可能性が高いと考える。

LX-2 細胞を用いた検討では Sec23a の他に Sec23b および Sec24d の発現抑制においてもコラーゲンの分泌量に変化がないことが示された（図 6）。このことは小胞体からのコラーゲンの分泌において Sec23/Sec24 アイソフォームが特異的に制御されていない可能性を示唆している。また、VII 型コラーゲンの分泌において、cTAGE5 は COPII 小胞形成を制御する低分子量 G タンパク質 Sar1 のグアニンヌクレオチド交換因子 Sec12 を ER exit site に集積させることで、その分泌を制御することが考えられている（K. Saito et al., 2014）。今回の検討では肝星細胞の活性化において Sec12 および cTAGE5/TANGO1 の発現が低下していることを見出した（図 3）。したがって、I 型コラーゲンの分泌には VII 型コラーゲンとは異なる機構が働いている可能性が考えられる。

COPII 小胞による分泌において Sec12 の発現量はコラーゲン以外のタンパク質全般の輸送においても重要であることが知られている（Weissman, Plutner, & Balch, 2001）。しかし、活性化に伴って Sec12 が減少した肝星細胞は一般的にコラーゲン以外の細胞外基質や TGFをはじめとする種々のリガンドおよびその受容体の発現を上昇させ、小胞体からのタンパク質分泌が亢進している（Atzori et al., 2009）。以上のことから、肝星細胞において COPII 小胞に依存しない輸送機構が働いている可能性を排除できず、I 型コラーゲンはそのような機構を介して分泌されるかもしれないため、さらなる検討が必要であると考えられる。

### 活性化肝星細胞における Sec23a/Sec24d の発現量の上昇

いくつか存在するアイソフォーム中で Sec23a と Sec24d が肝星細胞で特異的に上昇したこと（図 3）および近年、これらのアイソフォームに特異的なタンパク質輸送が報告されているこ

とから (Lord, Ferro-novick, & Miller, 2013; Wendeler, Paccaud, & Hauri, 2007)、本研究では Sec23a/Sec24d 特異的な輸送が亢進すると推測した。哺乳細胞において Sec23 は二つのアイソフォーム a と b が存在するが、アミノ酸配列上において両者の相同性は非常に高く、全長約 700 アミノ酸残基中 30 残基程しか違いがないことが知られている (Paccaud et al., 1996)。また、これらのアイソフォームの発現パターンが各臓器・細胞毎に異なることおよび Sec23a の変異が頭蓋骨形成不全症の原因となり、Sec23b の変異が赤血球形成障害を起こす congenital dyserythropoietic anemia type II (CDAII) の患者に多いことから、a と b の機能はリダンダントであると考えられている (Jensen & Schekman, 2011; Tao et al., 2012)。LX-2 細胞において Sec23a と Sec23b の発現抑制時では肝星細胞の活性化に与える影響は a において顕著であった (図 8)。また、Sec23a 発現抑制時には Sec23b が通常に比べて非常に多く発現しているにも関わらず、活性化が戻らないことから、a と b で異なる機能を有する可能性が存在する。しかし、肝星細胞における a と b の発現量の違いはわかっておらず、今後は細胞内のタンパク量を比較することで機能と発現のどちらに起因するものかを検討したい。

また、本研究において、Sec23a/Sec24d の発現上昇は COPII 小胞による未同定の膜タンパク質の分泌を亢進することで肝星細胞の活性化を起こしている可能性を示した。星細胞の分化には成長因子、サイトカイン、ケモカイン、酸化ストレス、細胞外基質などの細胞外に存在する因子とそれらに対する受容体との相互関係が重要であること (Pinzani, Ph, Marra, & Ph, 2001) から、Sec23a/Sec24d が関与する膜タンパク質としてこのような受容体である可能性が高い。今回の検討では TGF- $\beta$ 1 を刺激として用いたことから、TGF 受容体下流の Smad のリン酸化に対する Sec23a、Sec24d の影響を調べたが、変化が見られなかったため、TGF 受容体の分泌には関与しない可能性が示された (図 14)。今後はシグナルを網羅的に解析することによって、Sec23a/Sec24d がどのような受容体に影響を与えるのかを検討していきたい。

## 本研究の意義

Sec23a/Sec24d および Sar1 の発現が肝星細胞の活性化に関与するという今回の知見は肝線維化時に重要な働きを担う肝星細胞の分化過程の研究において、COPII 小胞による輸送制御の必要性を新たに示している。また、本研究の結果から肝星細胞において TGF- $\beta$ 1 刺激を介して Sec23a/Sec24d の発現が上昇し、未同定の膜タンパク質の輸送が行なわれることで分化が促進されるというモデルが考えられる (図 15)。正常時に比べ、活性化肝星細胞では小胞体内腔においてコラーゲンを含む様々なタンパク質の合成と分泌が亢進するため、COPII 関連因子の全体の発現が上昇することが当初、予想された。しかし、活性化に伴って COPII 小胞の内側被覆コートを形成する Sec23a/Sec24d のみが上昇し、他の因子が減少していたことは興味深く、特定のタンパク質の分泌において Sec23/24 のアイソフォームの発現量が律速になりうる可能性が考えられる。

また、肝星細胞内の Sec23a の発現を制御する因子として BBF2H7 が介在する可能性が示唆された。BBF2H7 は小胞体ストレス応答におけるトランスデューサーとして同定され、そのノックアウトマウスの解析により発生段階の軟骨細胞において転写因子として Sec23 を増加させて I 型コラーゲン分泌を促すことが報告されている (A. Saito et al., 2009; Kondo et al., 2007)。I 型コラーゲンの分泌という点において肝星細胞と軟骨細胞には何らかの類似性があると考えられるが、本研究の結果から肝星細胞において Sec23a の発現抑制が I 型コラーゲンの輸送に関与しない可能性があり、軟骨細胞と同じ働きを有するのかは不明である。また、今回の検討では TGF- $\beta$ 1 刺激がどのように BBF2H7 を制御するかを明らかにしていないため、肝星細胞の活性化に直接的に関与しているかは検討が必要である。また、肝障害を引き起こすとされる脂肪や酸化ストレスによって、肝星細胞に小胞体ストレスが発生することが報告されている (Hernández-Gea et al., 2013; Wang, Wei, & Pagliassotti, 2006) ため、本研究において小胞体ストレスとの関連性についても検討を進めていきたいと考えている。

## 5. 図表

---

---

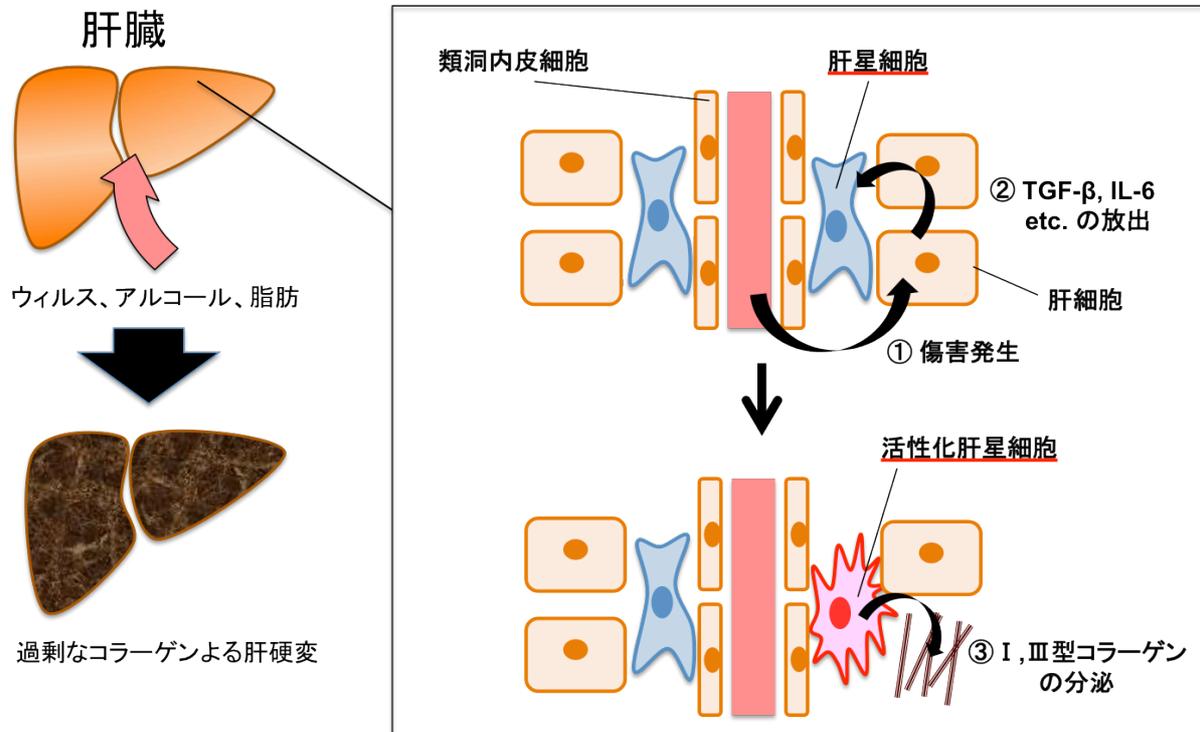


図1. 肝線維化には慢性的な炎症による肝星細胞の活性化が関与している

肝硬変は肝臓に I 型、III 型コラーゲンを主とした細胞外基質が過剰に沈着することにより、肝機能に障害を起こした状態である。類洞周囲に存在する肝星細胞は炎症性サイトカインにより活性化し、コラーゲンを多量に分泌することから、肝硬変において重要な役割を担っている。

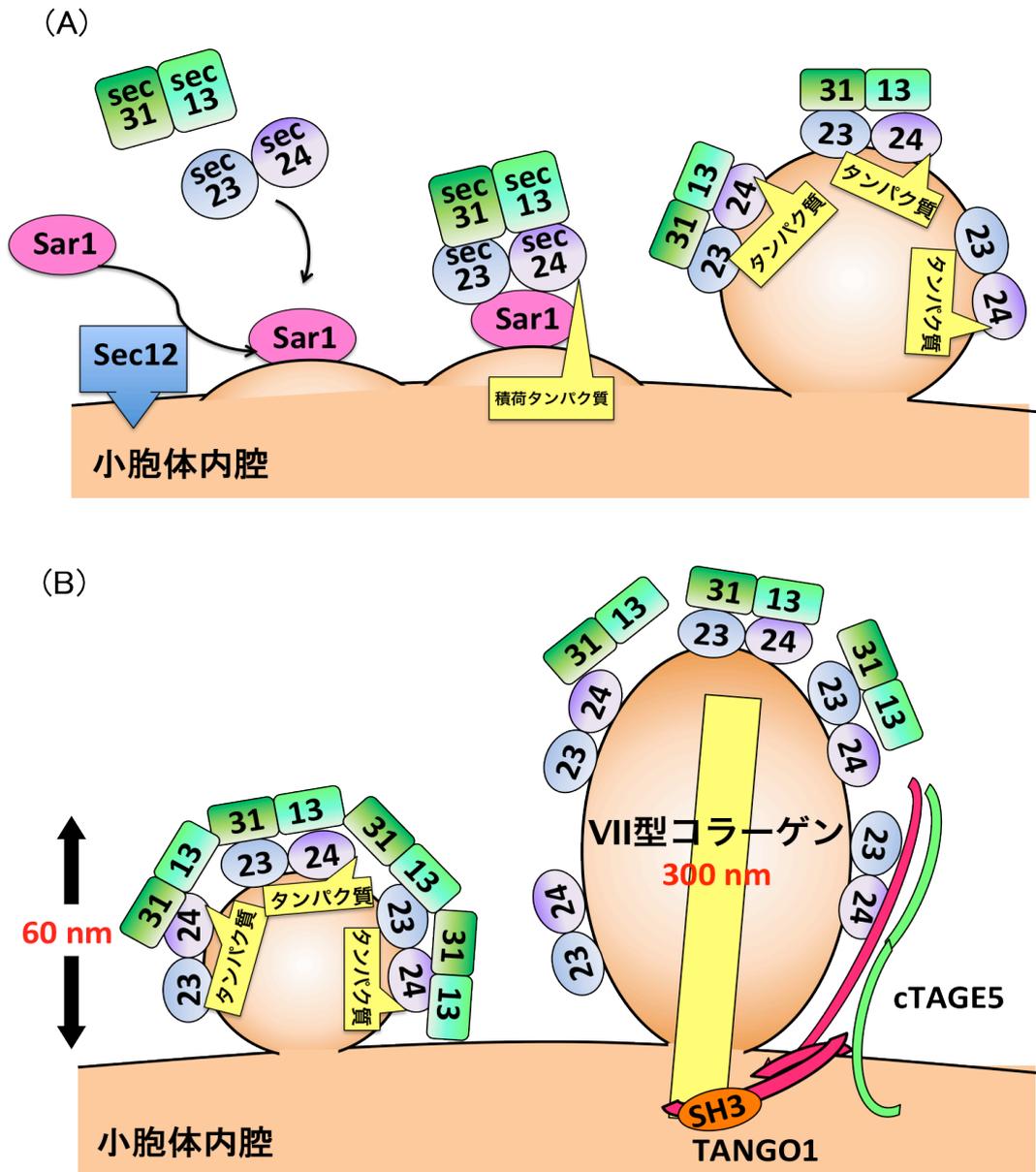


図2. 小胞体からゴルジ体へのタンパク質の輸送は COPII 被覆小胞によって行なわれる

(A) 小胞体で合成されたタンパク質は小胞体上の ER exit site で形成された COPII 被覆小胞に積み込まれ、ゴルジ体へと運ばれる。COPII 被覆小胞は低分子量 G タンパク質 Sar1 の活性化により sec23/24 複合体がリクルートされ、さらにその外側に sec13/31 複合体が結合することで形成される。

(B) 通常の COPII 被覆小胞の大きさは 60-90 nm であるが、巨大なコラーゲン分子は長さが 300 nm 程あり、収まらないと考えられる。cTAGE5/TANGO1 複合体は VII 型コラーゲンを選択的に積み込む、積荷受容体として働くと考えられる。

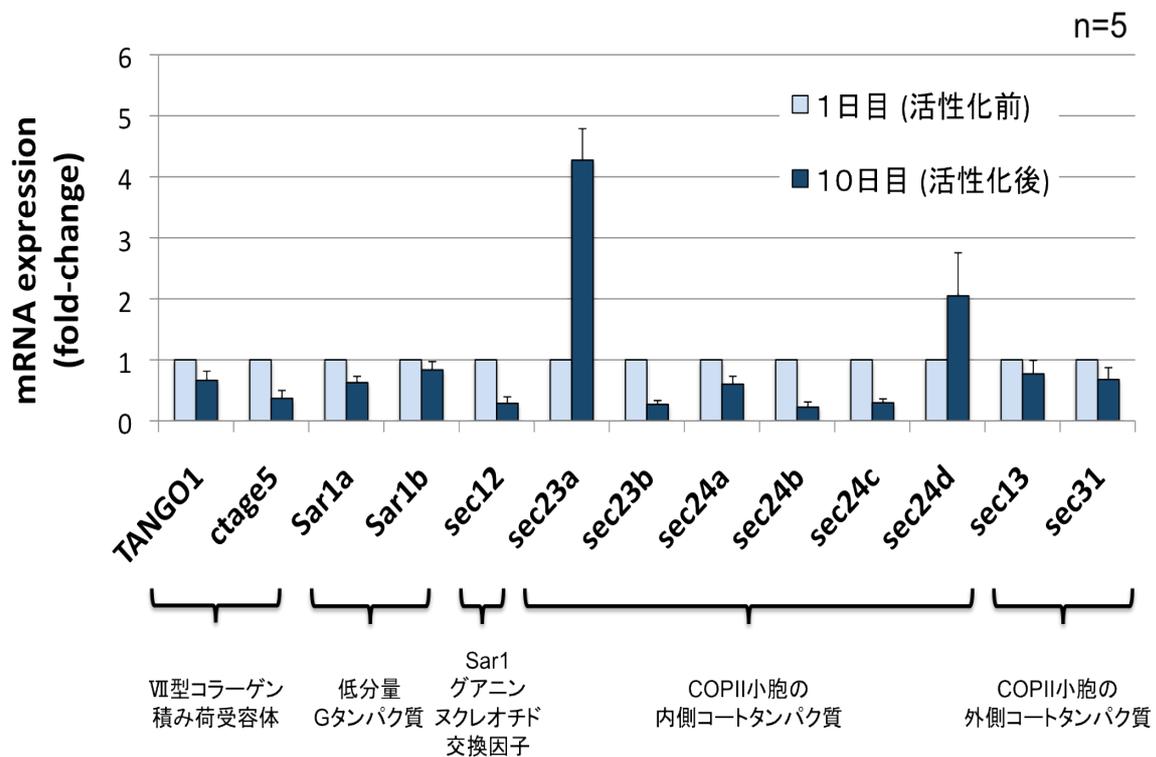


図 3. 初代培養肝星細胞の活性化に伴い、Sec23aSec24d の発現が特異的に増加する

ラット肝臓から単離した肝星細胞をシャーレ上で 1 日間培養したもの(活性化前)と 10 日間培養したもの(活性化後)の mRNA を抽出し、各因子の転写量をリアルタイム PCR によって定量した。[平均値±標準誤差]をグラフに表した。(n=5)

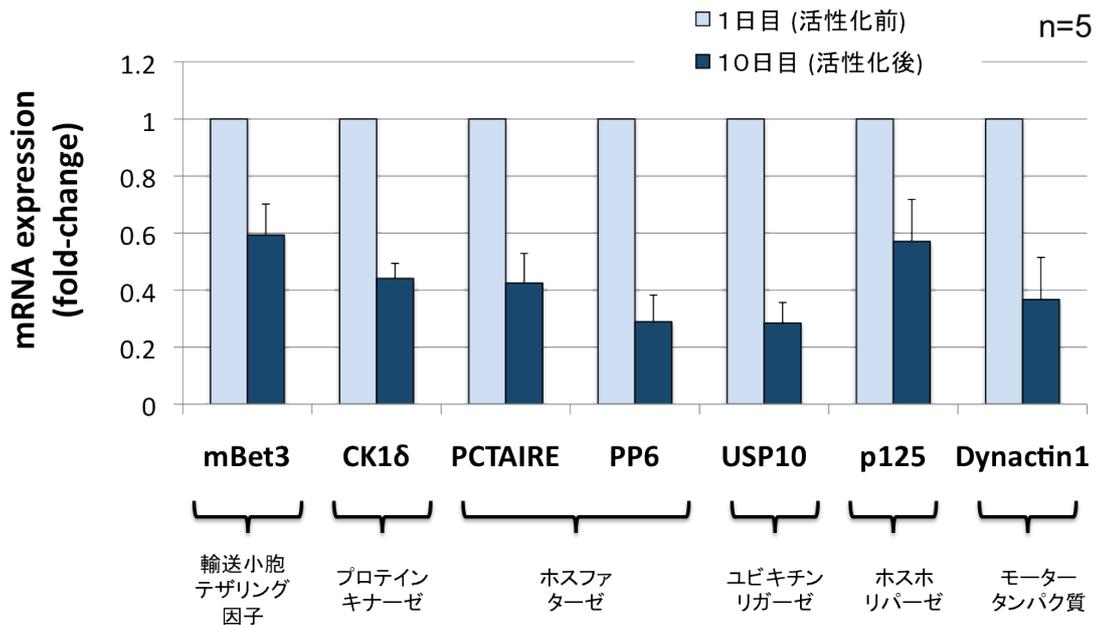


図 4. 既知の Sec23a 相互作用因子の発現量は Sec23a と異なり、活性化時に上昇しない

ラット初代培養肝星細胞における Sec23a 相互作用因子の転写量をリアルタイム PCR によって定量した。[平均値±標準誤差]をグラフに表した。(n=5)

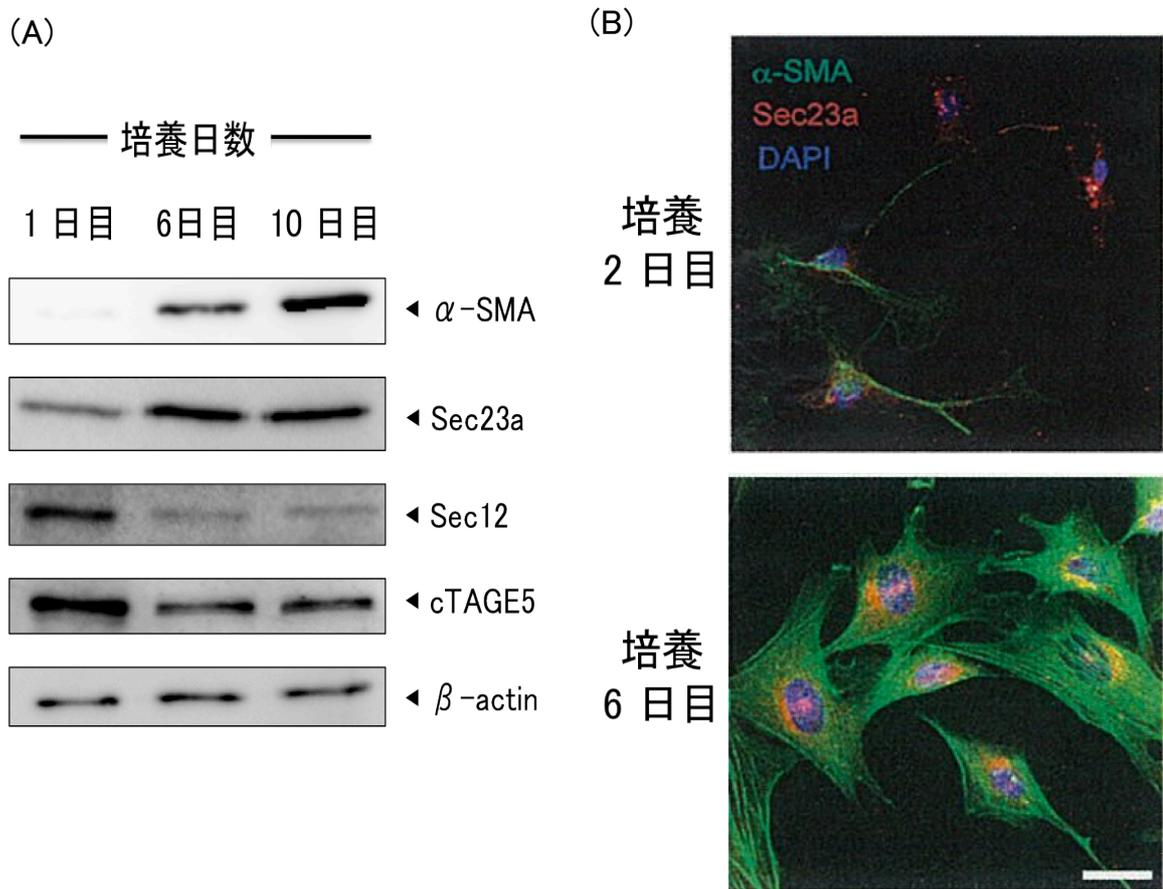


図 5. 肝星細胞の活性化に伴う Sec23a のタンパク量は mRNA 量と同様に上昇している

(A) ラット肝星細胞を単離後から 1 日、6 日、10 日培養したものに対し、ウェスタンブロットを行なった。

(B) 同様に、単離後 2 日目と 6 日目のものに対し、Sec23a および  $\alpha$ -SMA を免疫染色を行い、共焦点顕微鏡による観察を行なった。

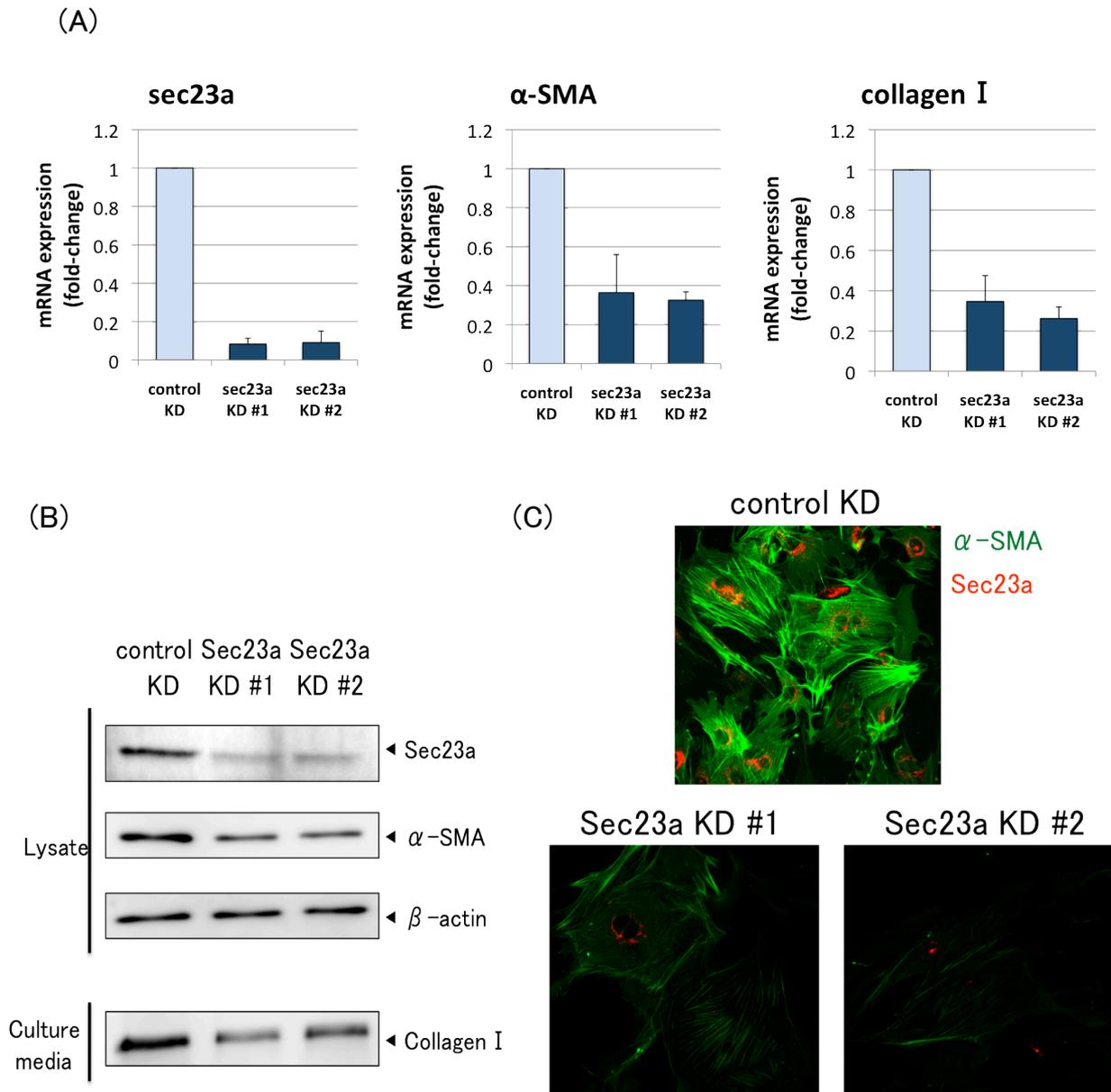


図 6. ラット初代培養肝星細胞において Sec23a の発現は活性化に必要な

- (A) ラット肝星細胞を単離後 2 日目に control および Sec23a siRNA を導入し、その 4 日後の mRNA 量を定量した。[平均値±標準誤差]をグラフに表した。(n=3)
- (B) 同様に、siRNA 導入後の肝星細胞に対し、ウェスタンブロットを行なった。
- (C) 同様に、siRNA 導入後の肝星細胞に対し、免疫染色および共焦点顕微鏡による観察を行なった。

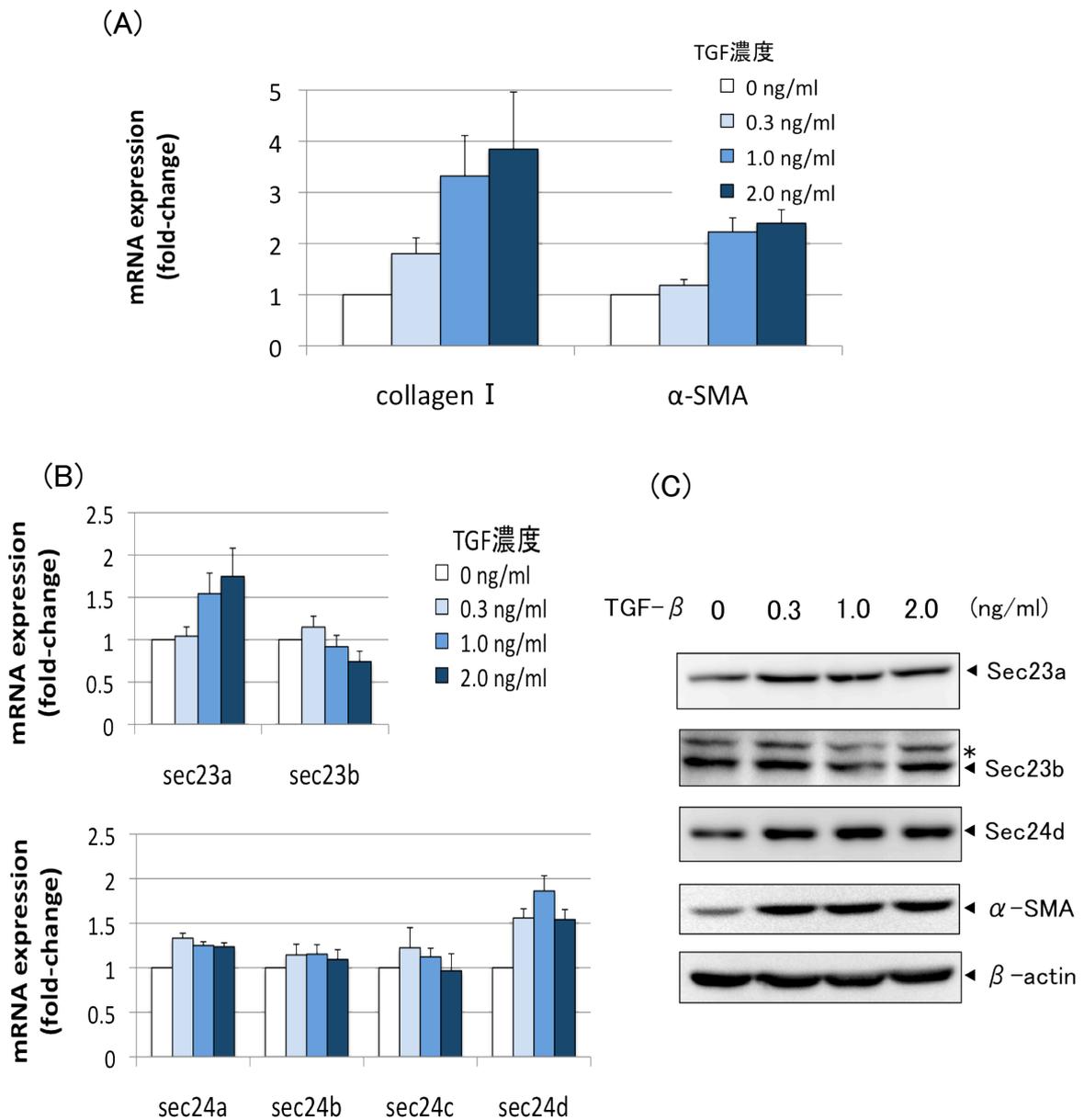


図 7. LX-2 細胞への TGF- $\beta$  1 刺激は初代培養系と同様に Sec23a と Sec24d を増加させる

(A) ヒト由来の培養株化された肝星細胞である LX-2 細胞に対して、TGF- $\beta$  1 刺激を与えた時の I 型コラーゲンおよび  $\alpha$ -SMA の転写量の変化を定量した。[平均値 ± 標準誤差]をグラフに表した。(n=3)

(B) LX-2 細胞に対して、TGF- $\beta$  1 刺激を行なった時の Sec23 および Sec24 アイソフォームの転写量の変化を定量した。[平均値 ± 標準誤差]をグラフに表した。(n=3)

(C) 同様に、TGF- $\beta$  1 刺激時の LX-2 細胞に対し、ウェスタンブロットを行なった。

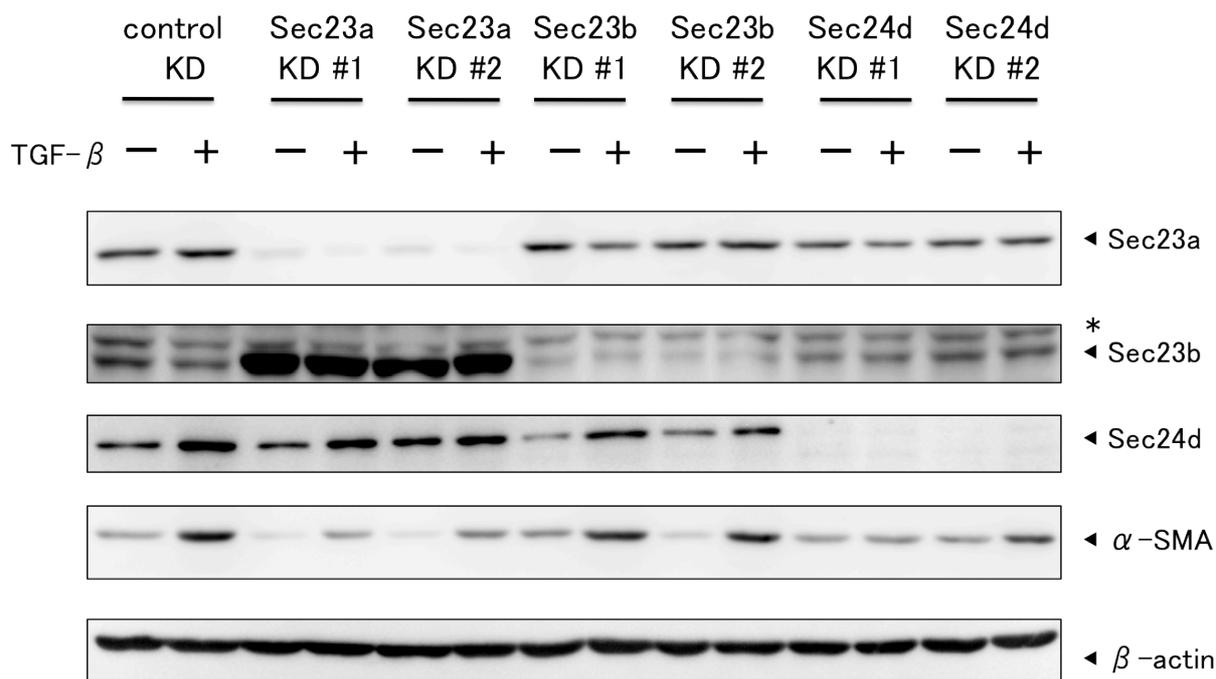


図 8. TGF- $\beta$  1 刺激による肝星細胞の活性化において Sec23a および Sec24d が必要である

LX-2 細胞に対して control、Sec23a、sec23b、Sec24d の siRNA を導入し、TGF- $\beta$  1 刺激を与えた後に、ウェスタンブロットを行なった。

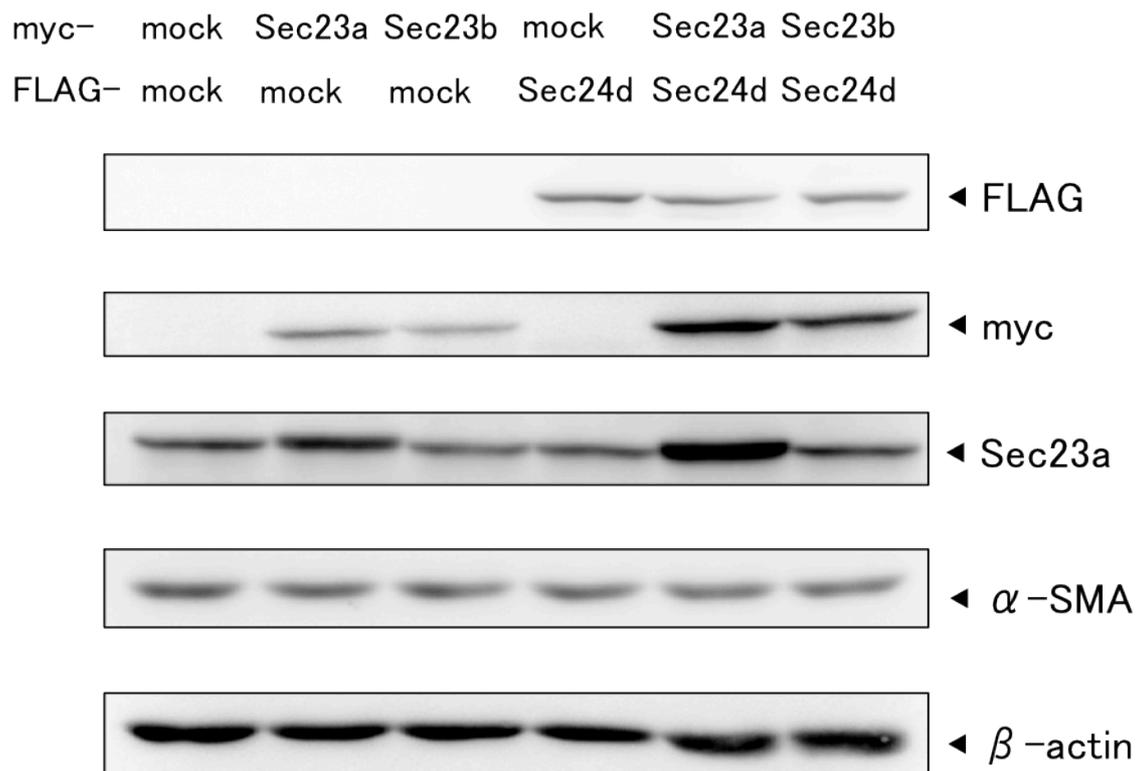


図 9. Sec23a と Sec24d の発現量の上昇のみでは肝星細胞は活性化されない

LX-2 細胞に対して myc-Sec23a、Sec23b および FLAG-Sec24d を発現させ、ウェスタンブロットを行なった。

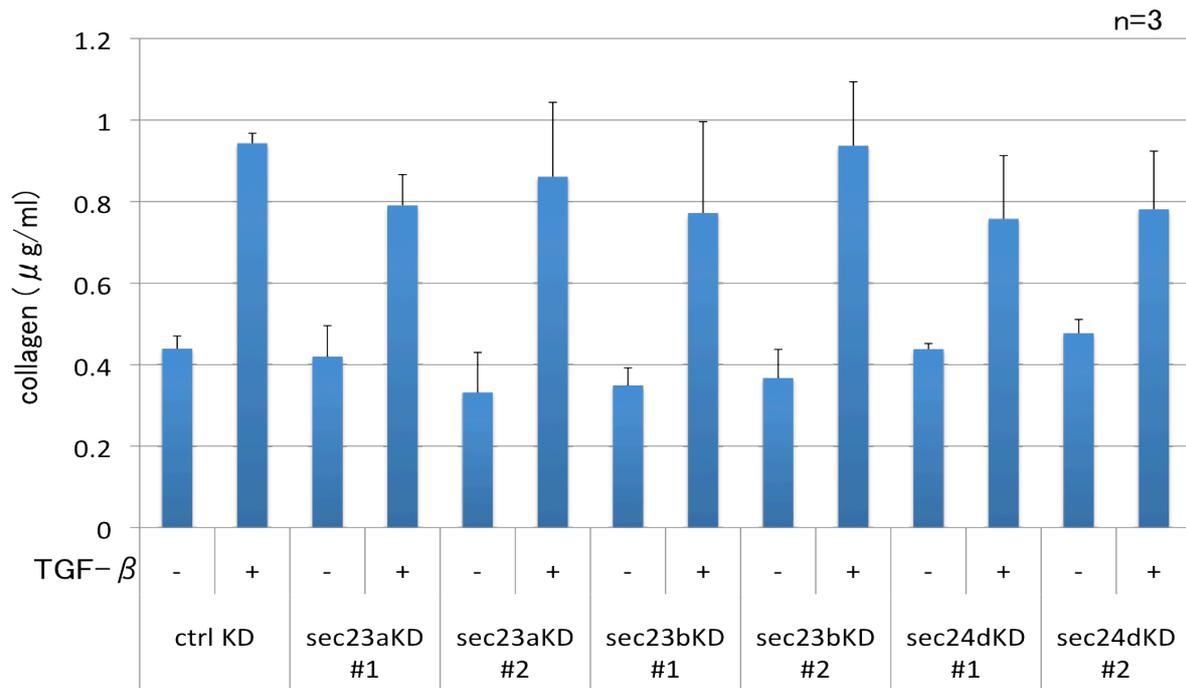


図 10. TGF-β1 刺激によるコラーゲンの分泌に Sec23a、Sec23b、Sec24d の発現は影響しない

LX-2 細胞に対して contorl、Sec23a、sec23b、Sec24d の siRNA を導入し、TGF-β1 刺激を与えた後に、培養上清を回収して分泌されたコラーゲン量を定量した。[平均値±標準誤差]をグラフに表した。(n=3)

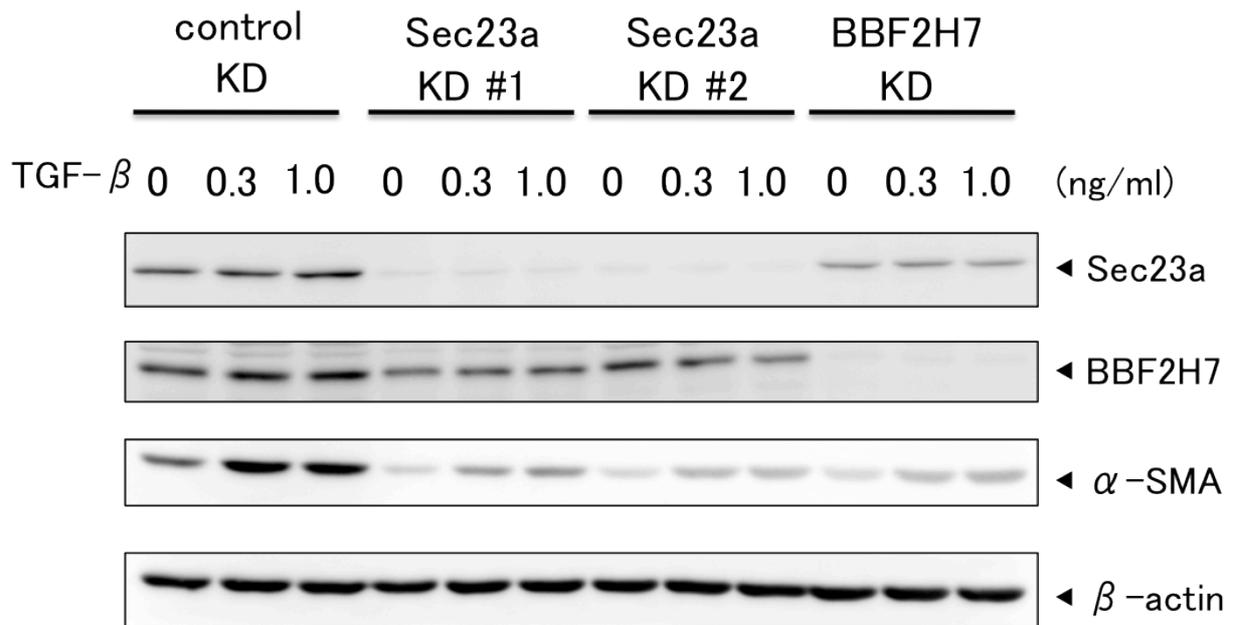


図 11. 肝星細胞において転写因子 BBF2H7 は Sec23a の発現制御に働き、活性化に関与する可能性がある

LX-2 細胞に対して control、Sec23a、BBF2H7 の siRNA を導入し、TGF- $\beta$  1 刺激を与えた後に、ウェスタンブロットを行なった。

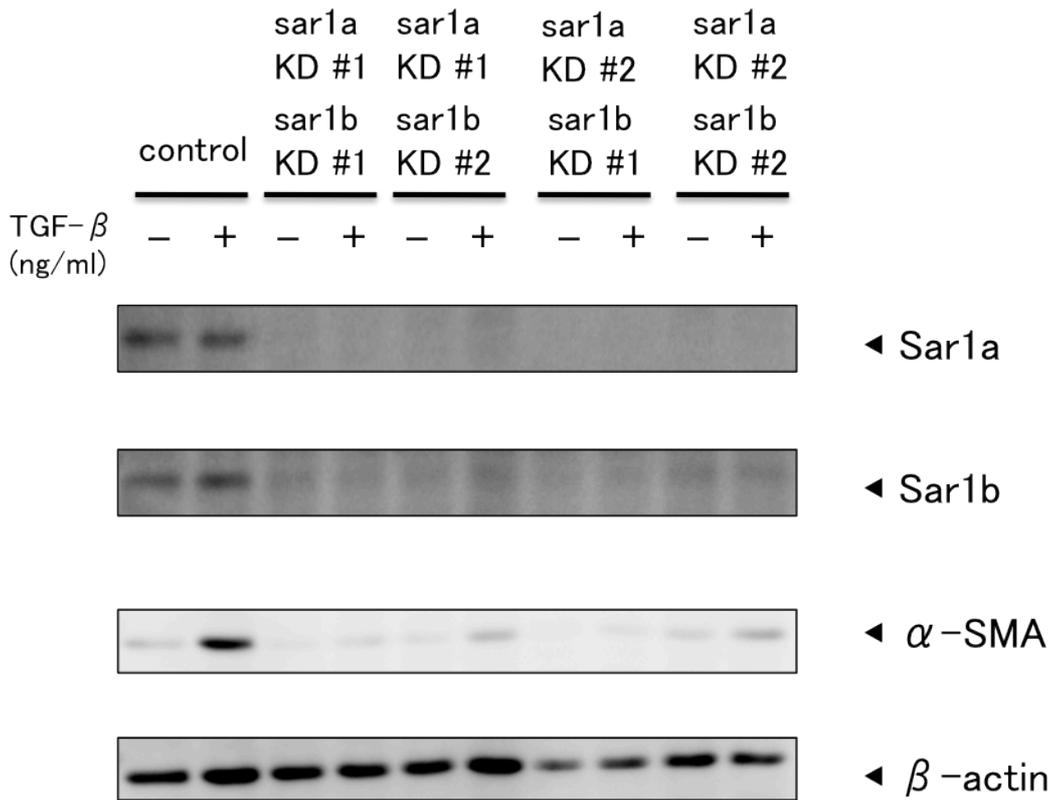


図 12. COPII 小胞形成を制御する低分子量 G タンパク質 Sar1 の発現は肝星細胞の活性化に必要である

LX-2 細胞に対して control、Sar1a および Sar1b の siRNA を導入し、TGF- $\beta$  1 刺激を与えた後に、ウェスタンブロットを行なった。

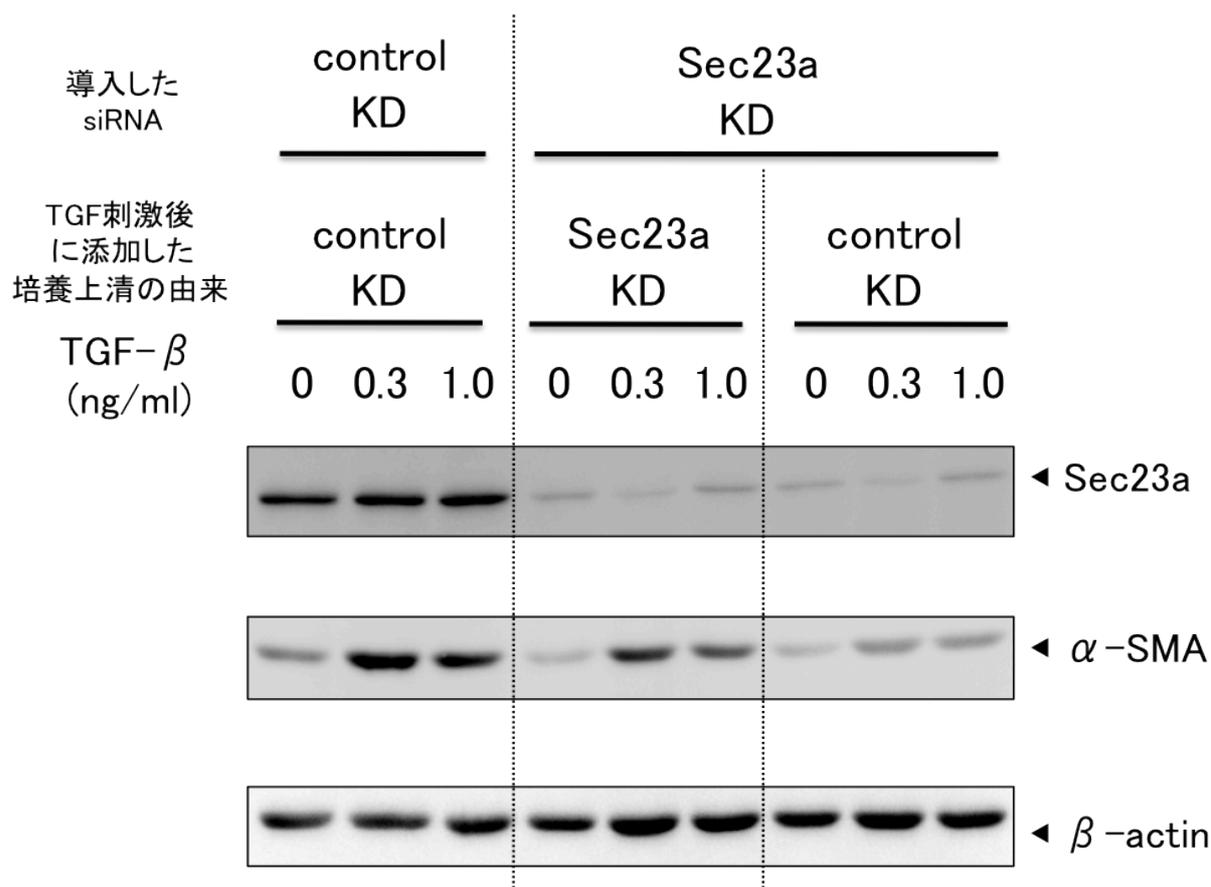


図 13. Sec23a 特異的に輸送される活性化因子は膜タンパク質である可能性がある

Sec23a 発現抑制した細胞に対して、control 処理群の細胞の培養上清を添加したときに活性化が起こるかを検討した。

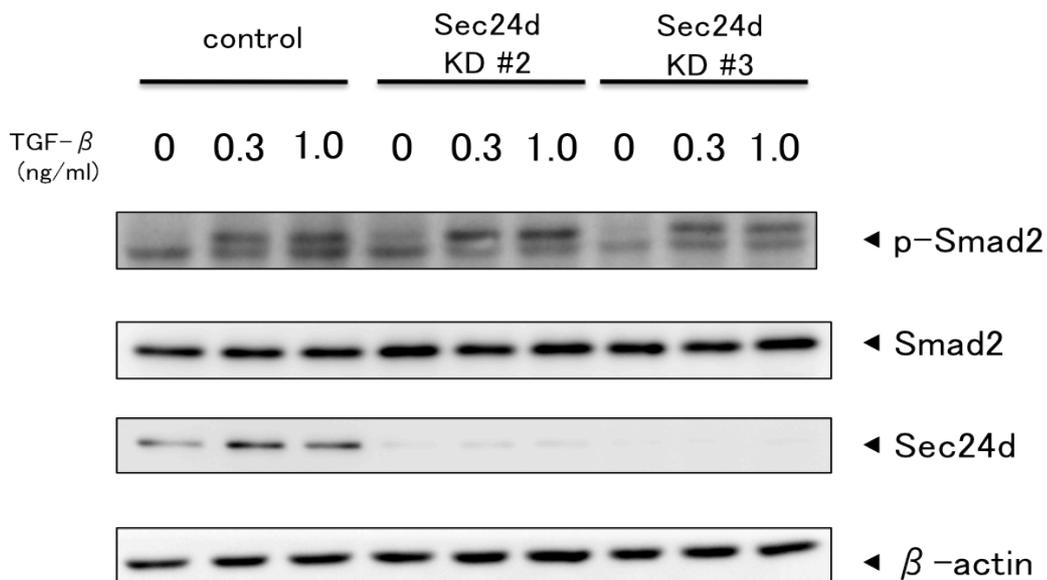
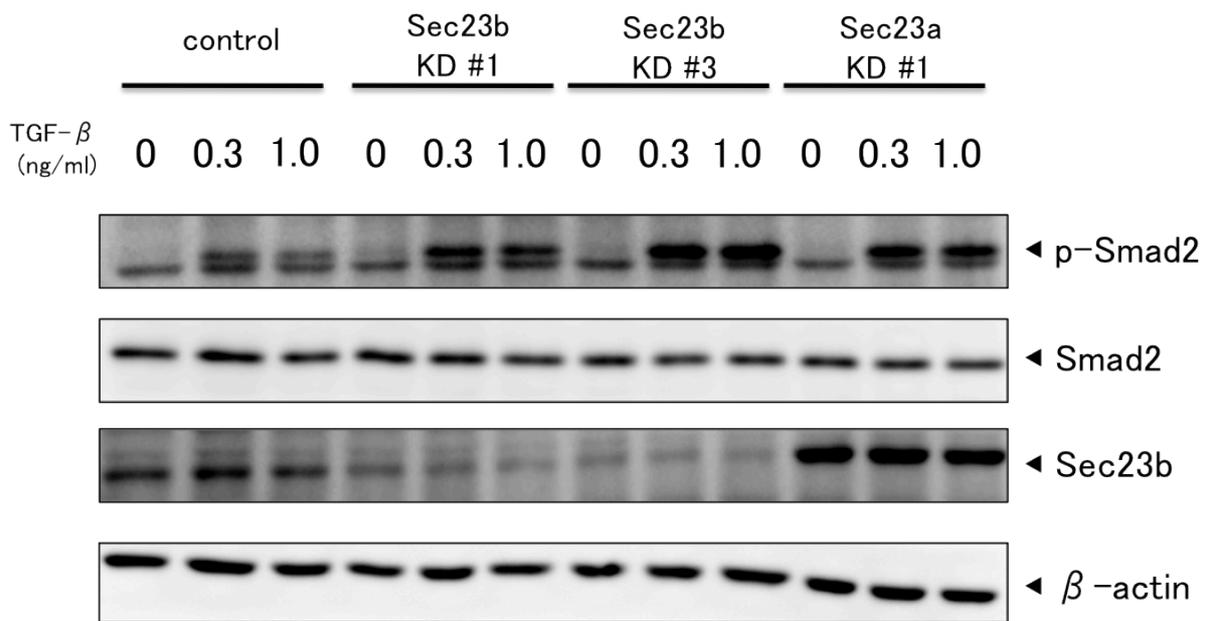


図 14. Sec23a、Sec23b、Sec24d の発現は Smad のリン酸化には影響しない

LX-2 細胞に対して control、Sec23a、sec23b、Sec24d の siRNA を導入し、TGF- $\beta$  1 刺激を与えた後に、ウェスタンブロットを行なった。

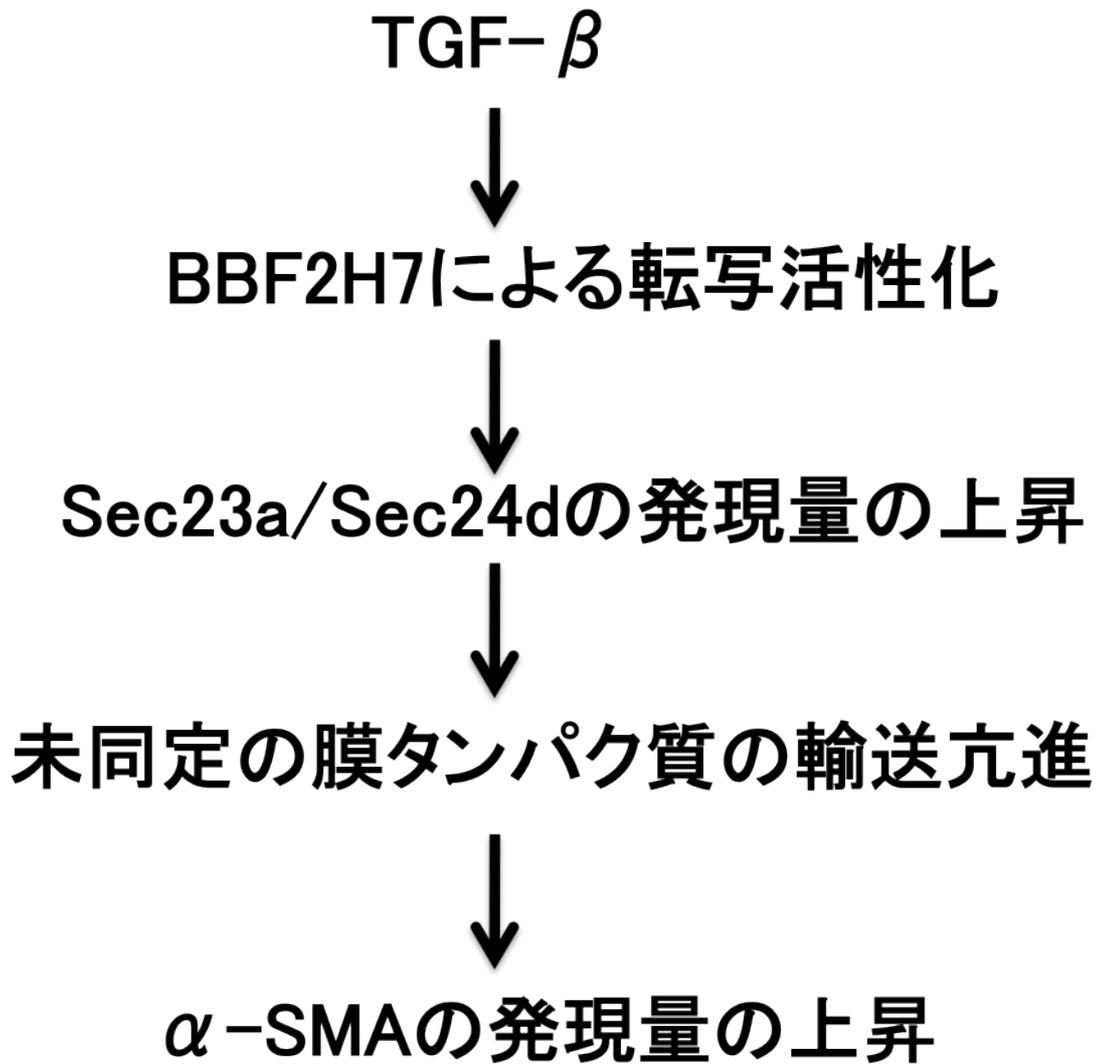


図 15. Sec23a/Sec24d 依存的な肝星細胞活性化モデル

## 6. 参考文献

---

---

- Aridor, M., Fish, K. N., Bannykh, S., Weissman, J., Roberts, T. H., Lippincott-schwartz, J., & Balch, W. E. (2001). The Sar1 GTPase Coordinates Biosynthetic Cargo Selection with Endoplasmic Reticulum Export Site Assembly 7, *152*(1).
- Atzori, L., Poli, G., & Perra, A. (2009). Hepatic stellate cell: a star cell in the liver. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *41*(8–9), 1639–42. doi:10.1016/j.biocel.2009.03.001
- Bataller, R., & Brenner, D. A. (2005). Science in medicine Liver fibrosis, *115*(2). doi:10.1172/JCI200524282.The
- Bielli, A., Haney, C. J., Gabreski, G., Watkins, S. C., Bannykh, S. I., & Aridor, M. (2005). Regulation of Sar1 NH2 terminus by GTP binding and hydrolysis promotes membrane deformation to control COPII vesicle fission. *The Journal of Cell Biology*, *171*(6), 919–24. doi:10.1083/jcb.200509095
- Brandizzi, F., & Barlowe, C. (2013). Organization of the ER–Golgi interface for membrane traffic control. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *14*(6), 382–92. doi:10.1038/nrm3588
- Derynck, R., Zhang, Y., & Feng, X. (1998). Smads: Transcriptional Activators of TGF- $\beta$  Responses, *95*, 737–740.
- Friedman, S. L. (2008a). Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver, 125–172. doi:10.1152/physrev.00013.2007.
- Friedman, S. L. (2008b). Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*, *134*(6), 1655–69. doi:10.1053/j.gastro.2008.03.003
- Fromme, J. C., Orci, L., & Schekman, R. (2008). Coordination of COPII vesicle trafficking by Sec23. *Trends in Cell Biology*, *18*(7), 330–6. doi:10.1016/j.tcb.2008.04.006
- Fromme, J. C., & Schekman, R. (2005). COPII-coated vesicles: flexible enough for large cargo? *Current Opinion in Cell Biology*, *17*(4), 345–52. doi:10.1016/j.ceb.2005.06.004
- Gressner, A. M., & Weiskirchen, R. (2006). Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF- $\beta$  as major players and therapeutic targets.

- Hernandez-Gea, V., & Friedman, S. L. (2011). Pathogenesis of liver fibrosis. *Annual Review of Pathology*, 6, 425–56. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130246
- Hernández-Gea, V., Hilscher, M., Rozenfeld, R., Lim, M. P., Nieto, N., Werner, S., ... Friedman, S. L. (2013). Endoplasmic reticulum stress induces fibrogenic activity in hepatic stellate cells through autophagy. *Journal of Hepatology*, 59(1), 98–104. doi:10.1016/j.jhep.2013.02.016
- Herrmann, J., Gressner, A. M., & Weiskirchen, R. (2007). Immortal hepatic stellate cell lines: useful tools to study hepatic stellate cell biology and function? *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 11(4), 704–22. doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00060.x
- Jensen, D., & Schekman, R. (2011). COPII-mediated vesicle formation at a glance. *Journal of Cell Science*, 124(Pt 1), 1–4. doi:10.1242/jcs.069773
- Kondo, S., Saito, A., Hino, S.-I., Murakami, T., Ogata, M., Kanemoto, S., ... Imaizumi, K. (2007). BBF2H7, a novel transmembrane bZIP transcription factor, is a new type of endoplasmic reticulum stress transducer. *Molecular and Cellular Biology*, 27(5), 1716–29. doi:10.1128/MCB.01552-06
- Lindert, S., Wickert, L., Sawitza, I., Wiercinska, E., Gressner, A. M., Dooley, S., & Breitkopf, K. (2005). Transdifferentiation-dependent expression of alpha-SMA in hepatic stellate cells does not involve TGF-beta pathways leading to coinduction of collagen type I and thrombospondin-2. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 24(3), 198–207. doi:10.1016/j.matbio.2005.03.003
- Liu, C., Gaça, M. D. a, Swenson, E. S., Vellucci, V. F., Reiss, M., & Wells, R. G. (2003). Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor-beta (TGF-beta) in quiescent and activated hepatic stellate cells. Constitutive nuclear localization of Smads in activated cells is TGF-beta-independent. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(13), 11721–8. doi:10.1074/jbc.M207728200
- Lord, C., Bhandari, D., Menon, S., Ghassemian, M., Nycz, D., Hay, J., ... Ferro-Novick, S. (2011). Sequential interactions with Sec23 control the direction of vesicle traffic. *Nature*, 473(7346), 181–6. doi:10.1038/nature09969
- Lord, C., Ferro-novick, S., & Miller, E. A. (2013). The Highly Conserved COPII Coat Complex Sorts Cargo from the Endoplasmic Reticulum and Targets It to the Golgi, 1–14.

- Malhotra, V., & Erlmann, P. (2011). Protein export at the ER: loading big collagens into COPII carriers. *The EMBO Journal*, *30*(17), 3475–80. doi:10.1038/emboj.2011.255
- Maschmeyer, P., Flach, M., & Winau, F. (2011). Seven Steps to Stellate Cells, (May), 1–6. doi:10.3791/2710
- Miller, E. a, & Schekman, R. (2013). COPII – a flexible vesicle formation system. *Current Opinion in Cell Biology*, *25*(4), 420–7. doi:10.1016/j.ceb.2013.04.005
- Paccaud, J., Reith, W., Carpentier, A. J., Amherdt, M., Schekman, R., & Orci, L. (1996). Cloning and Functional Characterization of Mammalian Homologues of the COPII Component Sec23, *7*(October), 1535–1546.
- Pinzani, M., Ph, D., Marra, F., & Ph, D. (2001). Cytokine Receptors and Signaling in Hepatic Stellate Cells, *21*(3), 397–416.
- Saito, A., Hino, S., Murakami, T., Kanemoto, S., Kondo, S., Saitoh, M., ... Imaizumi, K. (2009). Regulation of endoplasmic reticulum stress response by a BBF2H7-mediated Sec23a pathway is essential for chondrogenesis. *Nature Cell Biology*, *11*(10), 1197–204. doi:10.1038/ncb1962
- Saito, K., Chen, M., Bard, F., Chen, S., Zhou, H., Woodley, D., ... Malhotra, V. (2009). TANGO1 facilitates cargo loading at endoplasmic reticulum exit sites. *Cell*, *136*(5), 891–902. doi:10.1016/j.cell.2008.12.025
- Saito, K., Yamashiro, K., Ichikawa, Y., Erlmann, P., Kontani, K., Malhotra, V., & Katada, T. (2011). cTAGE5 mediates collagen secretion through interaction with TANGO1 at endoplasmic reticulum exit sites. *Molecular Biology of the Cell*, *22*(13), 2301–8. doi:10.1091/mbc.E11-02-0143
- Saito, K., Yamashiro, K., Shimazu, N., Tanabe, T., Kontani, K., & Katada, T. (2014). Concentration of Sec12 at ER exit sites via interaction with cTAGE5 is required for collagen export. *The Journal of Cell Biology*, *206*(6), 751–62. doi:10.1083/jcb.201312062
- Stagg, S. M., Gürkan, C., Fowler, D. M., LaPointe, P., Foss, T. R., Potter, C. S., ... Balch, W. E. (2006). Structure of the Sec13/31 COPII coat cage. *Nature*, *439*(7073), 234–8. doi:10.1038/nature04339

- Tao, J., Zhu, M., Wang, H., Afelik, S., Vasievich, M. P., Chen, X.-W., ... Zhang, B. (2012). SEC23B is required for the maintenance of murine professional secretory tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(29), E2001–9. doi:10.1073/pnas.1209207109
- Tsukamoto, H. (1999). Cytokine Regulation of Hepatic Stellate Cells in Liver Fibrosis, *23*(5).
- Wang, D., Wei, Y., & Pagliassotti, M. J. (2006). Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology*, *147*(2), 943–51. doi:10.1210/en.2005-0570
- Weissman, J. T., Plutner, H., & Balch, W. E. (2001). The Mammalian Guanine Nucleotide Exchange Factor mSec12 is Essential for Activation of the Sar1 GTPase Directing Endoplasmic Reticulum Export, 465–475.
- Wendeler, M. W., Paccaud, J.-P., & Hauri, H.-P. (2007). Role of Sec24 isoforms in selective export of membrane proteins from the endoplasmic reticulum. *EMBO Reports*, *8*(3), 258–64. doi:10.1038/sj.embor.7400893
- Xu, L., Hui, a Y., Albanis, E., Arthur, M. J., O' Byrne, S. M., Blaner, W. S., ... Eng, F. J. (2005). Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut*, *54*(1), 142–51. doi:10.1136/gut.2004.042127

# 7. 謝辭

---

---

研究する場として最高の環境を与えて下さり、また、終始温かく見守って下さった堅田利明先生に心から感謝いたします。

博士課程に入り、至らぬ私に研究の考え方をはじめとして、培ってきた研究指針を指導して下さいました齋藤康太先生に大変感謝いたします。折に触れて、私の研究の至らぬ点をご指摘して下さいました紺谷圀二先生、福山征光先生に深く感謝いたします。また、修士課程においてお世話になった梶保博昭先生に深く感謝します。

また、経済的及び精神的に大学院での研究を支えてくれた両親、妹に深く感謝いたします。

研究生活においてわからない点を丁寧に教えて下さった先輩方、お昼やくだらな話に付き合ってくれた後輩たち、実験の合間に明るい笑顔で元気を下さった高橋恵子様、私たちの研究を支えて下さった宇賀英子様には深く感謝いたします。

2015年1月9日