

論文の内容の要旨

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

【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る病態である。線維化は慢性的な炎症により傷害肝細胞から IL-6、TGF- β をはじめとするサイトカインが放出されることにより引き起こされる。肝類洞血管を取り巻く肝星細胞は、通常ビタミン A 貯蔵細胞として機能するが、サイトカイン刺激により、筋繊維芽様細胞へと分化し、

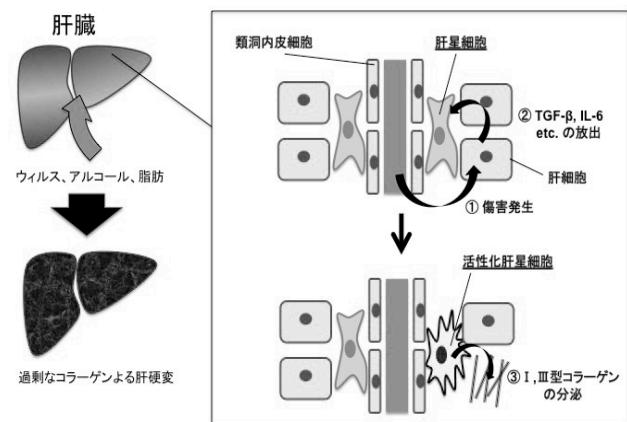


図 1. 肝線維化における肝星細胞の活性化

コラーゲンを分泌する (図 1)。肝線維化の主な原因として、肝星細胞が過剰にコラーゲンを分泌する

ことが挙げられる。肝線維化に伴い、星細胞はその分泌動態を大きく変化させていることが考えられるが、この点に着目した研究は少ないのが現状である。

一方、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。しかし、コラーゲンは全長 300 nm 程の巨大分子であり、通常の小胞に入れないために、コラーゲンの分泌には特殊な機構が働くことが考えられる。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。

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。

【結果】

1. ラット初代培養肝星細胞の活性化に伴う分泌関連因子の発現動態の解析

まず、肝星細胞の活性化に伴う分泌関連因子の転写量の変化を調べるために成体のラット肝からコラーゲナーゼ灌流と密度勾配遠心法を用いることで肝星細胞を単離した。この初代培養肝星細胞は単離直後ではそのほとんどがビタミン A 貯蔵細胞であるが、培養下において自発的な活性化が起こり、10 日程で筋繊維芽様細胞へと分化する。活性化前 (培養 1 日目) と活性化後 (培養 10 日目) の各因子の転写量をリアルタイム PCR で定量した

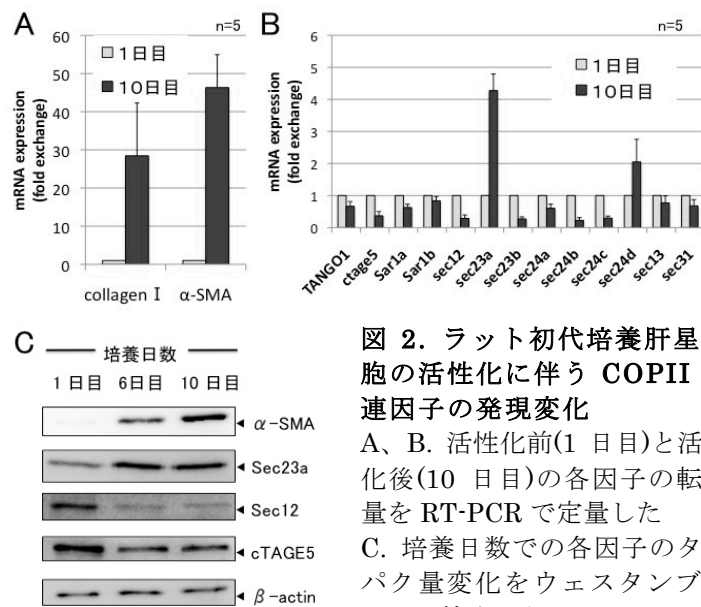


図 2. ラット初代培養肝星細胞の活性化に伴う COPII 関連因子の発現変化

A、B. 活性化前(1 日目)と活性化後(10 日目)の各因子の転写量を RT-PCR で定量した

C. 培養日数での各因子のタンパク量変化をウェスタンブロットで検出した

(図 2 A, B)。その結果、Sec23a および Sec24d の発現量が特異的に増加したのに対し、他の COPII 因子群の発現は低下していた。また、ウェスタンブロットによるタンパク質の定量でも同様に Sec23a と Sec24d は増加していた (図 2C)。

2. ラット初代培養肝星細胞の活性化に対する Sec23a 発現抑制の検討

次に、Sec23a の発現上昇が肝線維化に必要であるかを検討するためにラット初代培養肝星細胞に対

して Sec23a のノックダウンを試みた。Sec23a がノックダウンされた細胞では肝星細胞活性化マーカーである α -SMA が有意に低下した (図 3)。また、培養上清中に分泌された I 型コラーゲンの量も減少していた。以上から、Sec23a の発現抑制は肝星細胞の活性化を減弱させることが明らかとなった。

3. ヒト肝星細胞株 LX-2 を用いた活性化過程における Sec23、Sec24 の解析

肝星細胞の活性化に対する Sec23 および Sec24 の影響を詳細に解析するため、ヒト由来の培養肝星

細胞 LX-2 を用いて更なる解析をおこなった。LX-2 に TGF- β を添加することで肝線維化時の活性化過程を模倣できることが知られている。そこで、LX-2 を TGF- β で刺激し、Sec23 および Sec24 の各アイソフォームの転写量の変化およびタンパク量を定量した (図 4)。その結果、初代培養肝細胞と同様に Sec23a と Sec24d が特異的に増加した。つづいて TGF 刺激による肝星細胞の活性化に対する Sec23 アイソフォームの

寄与を検討した。その結果、Sec23a の発現抑制においては、初代培養系と同様に活性化は抑制されたが、Sec23b 発現抑制では顕著な変化は認められなかった (図 5A,B)。さらに、Sec24d の発現抑制においても活性化が抑制された (図 5C,D)。

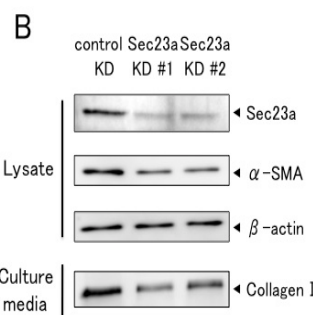
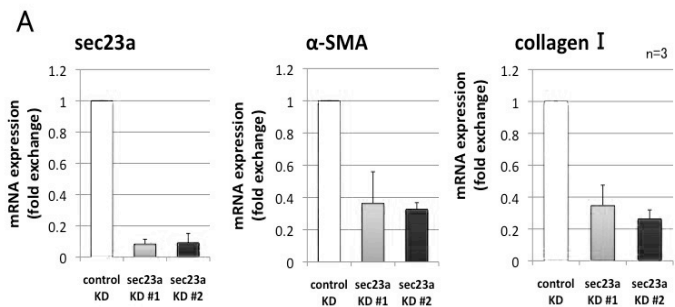


図 3. ラット初代培養肝星細胞での Sec23a 発現抑制による活性化遅延

A. 肝星細胞の Sec23a 抑制時の α -SMA と collagen I の転写量
B. 肝星細胞の sec23a 抑制時の細胞内の α -SMA と上清に分泌された collagen I のタンパク量

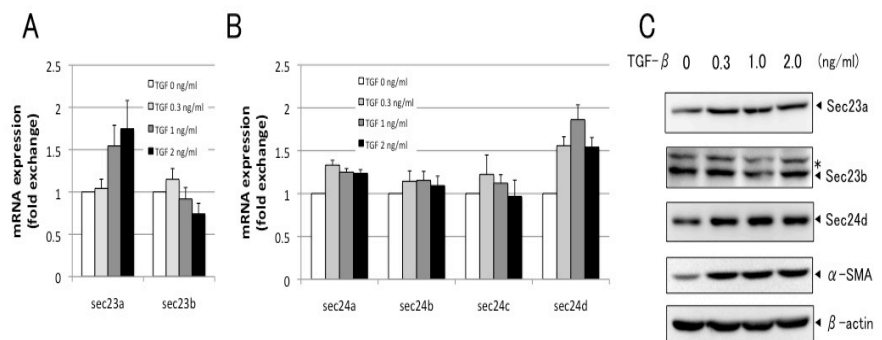


図 4. ヒト肝星細胞 LX-2 における TGF- β 刺激時の Sec23a、Sec24d の発現変動

A,B. TGF 刺激時の Sec23、Sec24 の mRNA 量の変化

C. TGF 刺激時の Sec23a、Sec23b、Sec24d のタンパク量の変化

4. 肝星細胞活性化に対する Sec23a 転写因子 BBF2H7 発現抑制の影響

ヒトの遺伝病をはじめとした知見から既に発生過程における Sec23a の機能不全により骨形成が阻害されることが明らかとなっている。この際コラーゲンの分泌不全もあわせて認められることから、骨形成と肝線維化の過程が類似している可能性を考えた。骨形成においては BBF2H7 という小胞体膜貫通タンパク質が小胞体ストレスを感知し切断されることで転写因子としてはたらき、Sec23a の転写量を増加させることが知られている。そこで、この機構が肝星細胞でも働いているかを LX-2 細胞で BBF2H7 をノックダウンすることで検討した。その結果、BBF2H7 のノックダウンで Sec23a が低下し、肝星細胞の活性化が抑制された (図 6)。

【まとめと考察】

本研究の結果により、I 型コラーゲンの分泌が亢進している活性化肝星細胞では VII 型コラーゲンの積み荷受容体である cTAGE5/TAGNO1 が発現減少することが明らかとなった。このことから、I 型コラーゲンは VII 型コラーゲンとは異なる分泌機構が働いている可能性が考えられる。また、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(GEF)である Sec12 の発現量は低下する一方で、COPII コートタンパク質のサブタイプの中で Sec23a および Sec24d の発現が有意に増加していたことは興味深い。さらに、Sec23a および Sec24d のノックダウンに伴い肝線維化マーカーの発現量が顕著に低下したことから、Sec23a、Sec24d の発現が肝線維化に関与する可能性が考えられる。現在までに肝星細胞の活性化過程の研究においてその分泌動態に着目した研究は少なく、以上の結果は分泌因子の抑制で肝線維化を抑えたという点で新しいものである。今後、Sec23a と Sec24d がどのように肝星細胞の活性化過程を制御するのか、さらなる検討が必要である。

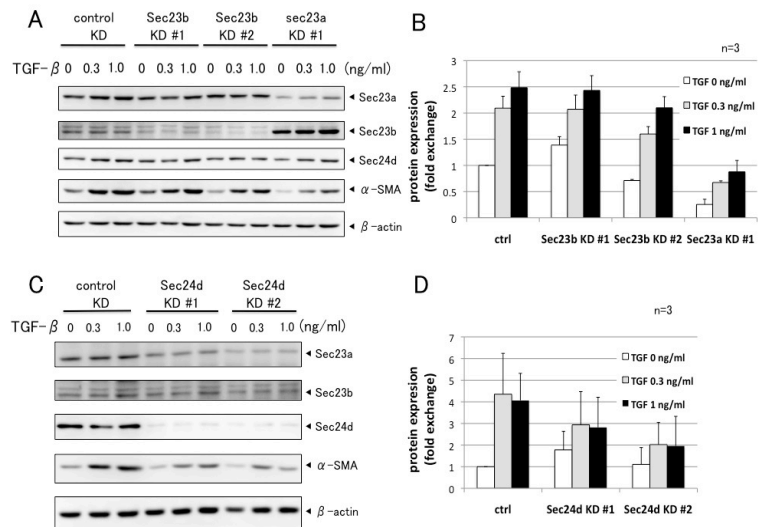


図 5. ヒト肝星細胞活性化に対する Sec23b および Sec2d 発現抑制の影響

A,B. Sec23b 発現抑制時の α-SMA 量の変化
C,D. Sec24d 発現抑制時の α-SMA 量の変化

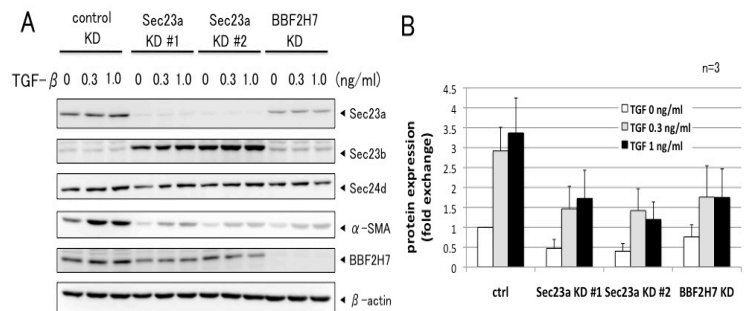


図 6. ヒト肝星細胞活性化に対する Sec23a および Sec23a 転写因子 BBF2H7 発現抑制の影響

A. Sec23a、BBF2H7 発現抑制時の各因子のタンパク量変化
B. α-SMA 量の変化