

論文の内容の要旨

論文題目：肝星細胞に発現する I 型プロコラーゲン C 端プロテイナーゼエンハンサーのクローニングとその意義

氏 名：松井 淳

肝線維化は B 型および C 型ウイルス性肝炎やアルコール性肝障害等あらゆる慢性肝疾患に生ずる病態であり、コラーゲンを主体とする細胞外マトリックスの異常増生を特徴とする。これが進展して肝硬変になると、肝構築の変化に伴う血流障害等から肝不全に至るばかりでなく、近年増加している C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変からの肝細胞癌の発生母体にもなる。従って、肝線維化機序の解明とその対策は肝臓病学における最も重要な課題の一つである。

肝における細胞外マトリックスの主たる産生細胞は肝星細胞である。本細胞は鍍金法により肝類銅の周囲に黒く染色される星細胞“Sternzellen”として初めて記載された。そこでは星細胞は貪食能を有するとして、肝に固有のマクロファージである Kupffer 細胞と同一細胞とみなされ、Kupffer 細胞が脂肪変性したものと考えられた。1951 年、伊東により初めて Kupffer 細胞とは別の細胞として報告された。伊東は、細胞質に多量の脂肪滴を有する類洞壁細胞を Disse 腔内に観察し、脂肪を蓄積する細胞として、“fat-storing cell”と命名した。本細胞はその業績により、近年まで伊東細胞と呼ばれてきたが、現在は国際的に“hepatic stellate cells” (肝星細胞) と呼ばれている。

正常肝では星細胞は静止期 (quiescent stage) にある。静止期の星細胞は、多量

のビタミン A を含む円形ないし紡鐘形をした細胞本体を有しており，細胞質から伸び出した突起を形成している。これらの突起は，さらに側面から細い多数の突起を出すことにより，類洞を取り囲むようにして内皮細胞を裏打ちして，類洞の立体構造を保持している。星細胞を単離してプラスチック表面で培養すると，脂肪滴が消失するとともに，平滑筋 α アクチン発現が増強し，筋線維芽細胞様に形質転換する。この過程は星細胞の活性化 (activation) と呼ばれ，旺盛な増殖能，遊走能や細胞外マトリックスの産生能を獲得するとともに，収縮能が亢進する。障害肝や硬変肝の星細胞は，生体内でも同様に活性化しており，盛んに増殖して細胞外マトリックスを大量に産生する一方で，収縮して類洞抵抗を増大させることにより，門脈圧亢進の発症要因となると推定されている。慢性肝疾患，特にウイルス性では，最初に門脈域において筋線維芽細胞が浸潤炎症細胞により活性化し，線維化をきたすとされている。この筋線維芽細胞の由来に関しては星細胞との異同が議論となっている。星細胞が遊走・活性化したものであるとの意見がある一方で，近年の報告では両者は別個のものであり，もともと門脈域に存在する固有の筋線維芽細胞との考えを支持するものも多い。この門脈域の線維化に引き続き，門脈域近傍の類洞内星細胞から順次活性化し，次第に中心静脈方向へと線維化が進行，小葉構造の改築が完成するとされている。

肝星細胞の活性化は種々のサイトカインおよび増殖因子により調節されている。肝壊死巣では Kupffer 細胞が活性化し，多数のマクロファージが浸潤する。これら細胞の産生するサイトカイン，障害肝細胞に由来する reactive oxygen intermediates (ROI) や類洞内皮細胞が産生するフィブロネクチンの作用により，静止期の星細胞は transforming growth factor- β (TGF- β) や platelet-derived growth factor (PDGF) に対する受容体の発現が亢進した状態 (transitional stage) に移行すると推定されている。次いで，この星細胞は Kupffer 細胞，マクロファージおよび血小板に由来する TGF- β や PDGF が paracrine 的作用を受け，筋線維芽細胞様に形質転換する。また，活性化した星細胞は自ら TGF- β や basic fibroblast growth factor (bFGF) を産生するようになり，autocrine 的にも活性化を維持する機能を獲得すると考えられている。

肝星細胞が活性化すると，増殖能，細胞外マトリックスの産生能および平滑筋 α アクチン発現による収縮能がすべて亢進するとされる。しかし，肝星細胞の活性化に関与する各種増殖調節因子が，これら 3 機能に及ぼす影響は，必ずし

も一律ではない。PDGF, bFGF は、主として活性化星細胞の増殖を促進する。一方、TGF- β は活性化星細胞における細胞外マトリックス産生を促進するとともに、matrix metalloproteinase の合成を抑制し、更に tissue inhibitor of metalloproteinase 発現を誘導することにより、細胞外マトリックス沈着を促進させる。TGF- β は濃度によっては肝星細胞の増殖を逆に抑制する。また、PDGF などの増殖促進因子は活性化星細胞の TGF- β 発現を増強させるとともに、S 期に入った細胞では平滑筋 α アクチンの発現を一過性に低下させる。このため、活性化星細胞の機能には autocrine 的ないし paracrine 的に作用している各種因子が複雑に関与していることが想定されるが、その全体像は未だ明確ではない。

本研究は肝星細胞の形質転換を調節する蛋白を知る目的で、本細胞に発現する蛋白のクローニングを行い、これら蛋白の肝星細胞の活性化機構における役割を明らかにすることを目指した。

まず、抗星細胞抗体を作製した。星細胞としては、新しいマーカーを見出す目的から、種々の分化段階の星細胞を含んでいると考えられる株化星細胞を使用した。ウサギで作製した抗星細胞血清を用いて、星細胞株の発現 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、2 クローンを選別した。このうちの 1 クローンにおいて 1,404 bp の読み取り枠を含む 1,530 bp の塩基配列を決定した。

得られた cDNA は、I 型プロコラーゲン C 端プロテイナーゼエンハンサー (Type I procollagen C-proteinase enhancer protein; PCPE) としてクローニングされたヒトおよびマウス cDNA と高いホモロジーを示し、ラットの PCPE と推定された。PCPE 蛋白は皮膚や尾などの細胞外マトリックス成分に富む臓器に高度に発現することが報告されており、I 型プロコラーゲン C 端プロテイナーゼの活性を亢進することにより、プロコラーゲンからコラーゲンへのプロセッシングを促進するとされている蛋白である。本蛋白は N 側に蛋白間の相互作用に関与する CUB ドメインを 2 個有しており、これを介して I 型プロコラーゲン C 端プロテイナーゼに作用し、その活性を亢進する可能性があるかと推定される。PCPE 蛋白は、本実験において RNA 結合ドメインに特異的な consensus motif RNP-1 および RNP-2 を有していることが見出されたことから、RNA 結合蛋白としての機能も有していると考えられた。

次に、ラット単離細胞および肝における PCPE 発現を検討した。PCPE mRNA は、単離直後の肝実質細胞、類洞内皮細胞、Kupffer 細胞には認められず、星細胞に発現していた。本蛋白の mRNA は培養線維芽細胞に強く発現していたが、

星細胞を培養して活性化すると発現が増強し、線維芽細胞と同等となった。培養星細胞における本蛋白の発現の変動は蛋白レベルでも確認された。*In vivo* における検討では、正常肝では PCPE mRNA は検出感度以下であったが、四塩化炭素投与による線維肝では発現を認め、*in vitro* の成績と合致した。

RNA 結合蛋白は転写後の遺伝子産物の制御に重要な役割を担うことが知られており、Pre-mRNA から mRNA の産生、mRNA の核から細胞質への輸送、mRNA の翻訳や安定性を制御すると報告されている。そこで、PCPE 蛋白の RNA 結合蛋白としての作用点を明らかにするために、PCPE mRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた抑制実験を行った。アンチセンスオリゴヌクレオチド添加群では星細胞におけるコラーゲンおよび非コラーゲン蛋白合成が、対照群である同濃度のナンセンス添加群に比して、大幅に低下した。RNA 発現に対する影響を検討したところ、アクチノマイシン D 非添加の条件では、星細胞における総 RNA 量発現は、アンチセンス添加群と対照群とで差は見られなかったが、アクチノマイシン D の存在下では総 RNA 量の半減期は、アンチセンス添加群で対照群よりも有意に短縮していた。従って、PCPE 蛋白は RNA の安定化作用をも有していると考えられた。

また、星細胞が活性化して筋線維芽細胞様に形質転換する際、RNA 含量や蛋白合成が大幅に増加するが、PCPE 蛋白発現も増強することから、本蛋白は RNA 制御を介して星細胞の形質転換に関与する可能性があると考えられた。更に、肝星細胞で PCPE 蛋白を抑制すると、コラーゲンのみならず非コラーゲン蛋白産生も著明に低下した。これらから PCPE の RNA 結合蛋白としての作用点は、RNA 安定化以外にも存在することが示唆された。

以上から、肝星細胞の形質転換過程における PCPE の RNA 結合蛋白としての作用機序を今後更に明確にすることによって、同細胞の活性化を制御する機構を見出し得ることが期待される。肝線維化治療学へ向けた第一歩と位置づけられよう。