

-日中医学協会助成事業-

肝線維化における TGF- β 誘導分子 Hic-5 の機能解析

研究者氏名 助教 雷 小峰

日本所属機関 昭和大学医学部生化学講座

中国研究者氏名 教授 李 波

中国所属機関 瀘州医学院附属病院肝胆外科

<要旨>

肝線維化は、主に HBV, HCV 感染やアルコールの過剰摂取、肥満による脂肪肝などが原因で発症し、肝臓内にコラーゲンなどの細胞外基質が過剰に蓄積する。進行すると、肝硬変や肝がんになり、死に至る場合がある。線維症と TGF- β 1 が密接に関与することがよく知られているが、その詳細なメカニズムがまだ解明されていない。我々は TGF- β 1 誘導性分子である Hydrogen Peroxide-inducible Clone 5 (Hic-5, 別名 transforming growth factor beta 1 induced transcript 1 (TGF- β 1I1)) に着目し肝線維化の発症機序解析を行った。ヒト肝線維化の進行に伴って Hic-5 が高発現し、Hic-5 陽性細胞として活性型肝星状細胞を同定した。さらに、肝臓線維化マウスモデルでは Hic-5 の欠損により肝臓線維症が顕著に抑制された。単離したマウス肝星状細胞では Hic-5 の欠損により細胞の活性化およびコラーゲン産生が制御された。今後、Hic-5 を標的分子として肝線維化の解析を行い、細胞内における Hic-5 の働きについてメカニズムを解明する必要がある。

<Key Words>

肝線維化、肝星状細胞、TGF- β 1、Hic-5

<本文>

緒言

Hic-5 は 1994 年に過酸化水素および TGF- β 1 に応答し発現誘導される遺伝子としてクローニングされた¹。その後この遺伝子は細胞外マトリックス (ECM) と細胞の接着点にある細胞接着斑タンパク質であることがわかった。近年我々は Hic-5 欠損マウスを作製し生体内における役割を検討したところ、動脈硬化、動脈瘤や癌などの疾患に関与していることが明らかとなった²。さらに癩痕形成³、糸球体硬化症⁴といった組織の線維化を伴う病態への関与が報告されている。線維化は臓器内にコラーゲン性細胞外マトリックスが筋線維芽細胞により過剰に蓄積する疾患である。肝炎ウイルスなどの原因で肝線維化が進行すると、肝硬変や肝がん

になり、死に至る場合がある。肝臓での筋線維芽細胞の主な供給源は肝臓星状細胞（HSC）であると考えられている。トランスフォーミング増殖因子-β1（TGF-β1）は線維化を促進するサイトカインで、潜在型 TGF-β1 は筋線維芽細胞を活性化しコラーゲン産生を促進する。我々は TGF-β1 誘導性分子である Hic-5 に着目し肝線維化の発症機序を解析した。

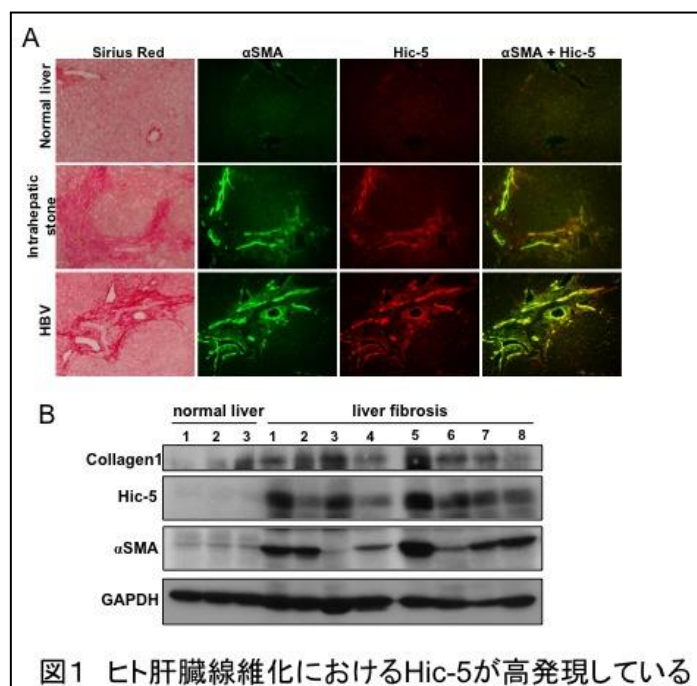
研究対象と方法

方法： I. ヒト肝臓線維化の組織解析： 蛍光免疫染色や免疫電子顕微鏡法によりヒト肝線維化組織にて Hic-5 の発現細胞の同定や発現量変化に関して非線維化組織と比較して検討する。さらに、肝線維化進行度と Hic-5 の発現量を定量的に解析することで、臨床症状と予後への Hic-5 の関与を検討する。 II. 肝線維化モデルマウスの作製と解析： 方法： 胆管結紮 (BDL) 2 週間或は四塩化炭素 (CC14) 投与 4 週間による肝線維化モデルを作製しマッソントリクローム染色及びウェスタンブロットを用いて線維化程度を評価する。 III. 肝線維症発症抑制メカニズムに関する組織学的解析： 発症メカニズムの解析には早期線維化病変（術後 3、5、7 日）を用い肝細胞損傷度、活性化した肝星細胞量を調べる。肝線維化の発症における TGF-β 上昇、活性酸素種の増加及びその下流でのコラーゲン産生が主因の一つとして知られている。そこで、病変組織切片と DCFH-DA を用いて組織内活性酸素産生量を、また免疫染色法で TGF-β 及びコラーゲン量を検討する。 IV. 肝線維症発症抑制メカニズムに関する細胞生物学、分子生物学的解析： マウス病変の組織学的解析で確認された変化を、マウスより分離した初代培養細胞（肝星細胞、マクロファージ）を用いて、細胞レベルの TGF-β や活性酸素種の産生能、コラーゲン合成量を上述方法で検討する。Hic-5 は直接核内へ移行し遺伝子発現を誘導することが証明されている。このことから、核での機能を介したメカニズムを想定に入れ実験を行う。

結果

I. ヒト肝臓線維化の組織解析

蛍光免疫染色（図 1 A）および western blot 法（図 1 B）により正常肝臓と比べたところ、ヒト肝線維化組織では Hic-5 が高発現していることがわかった。さらに、Hic-5 の発現パターンは活性化した肝星細胞のマーカーである α-SMA と一致していることが判明した。



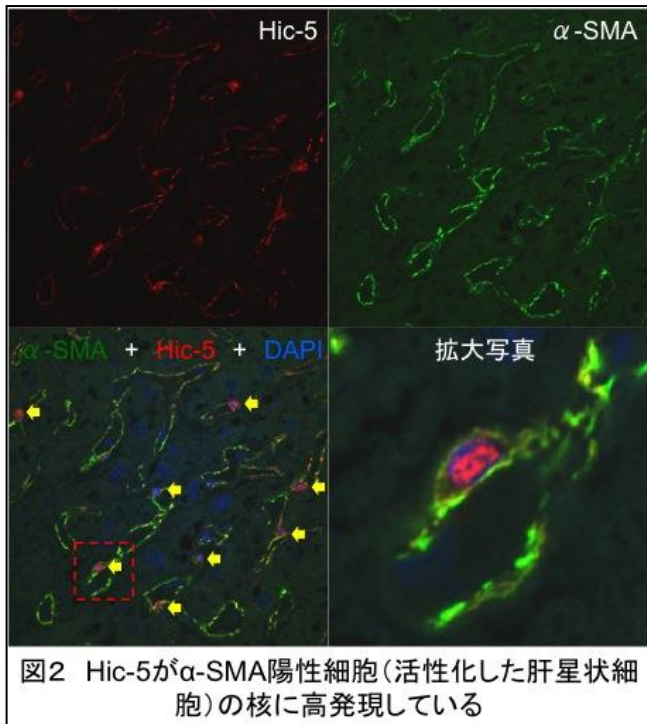


図2 Hic-5が α -SMA陽性細胞(活性化した肝星状細胞)の核に高発現している

興味深いことに、ヒト肝臓内の活性化された肝星状細胞 (α -SMA 陽性細胞、図2 Green) では Hic-5 の発現は細胞質だけでなく、細胞核にも高発現している (図2, Red; 黄色矢印)。Hic-5 が細胞質局在する α -SMA と違って活性化型肝星状細胞の細胞核内に働いていることが示されている。

II. 肝線維化モデルマウスの作製と解析：胆管結紮(BDL)2週間或は四塩化炭素(CC14)投与4週間による肝線維化モデルを作製し、組織評価および線維化マーカーを検討したところ、野生型マウスと比較して Hic-5 の欠損マウスでは顕著に肝線

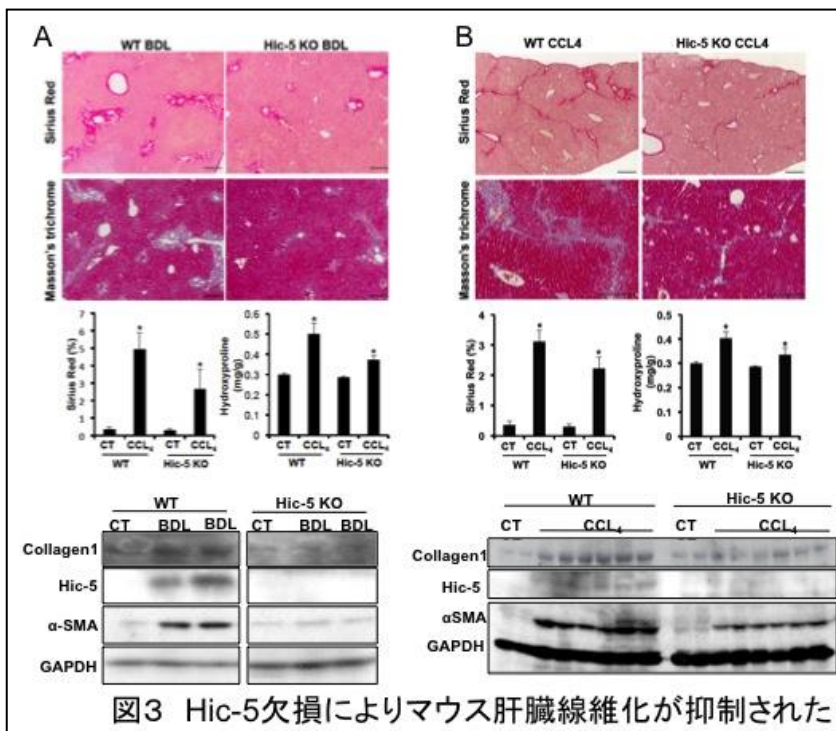


図3 Hic-5欠損によりマウス肝臓線維化が抑制された

ウスでは顕著に肝線維化が抑制されることが判明した (図3)。Hic-5 の欠損マウスではコラーゲン1の産生や α -SMA の発現が減少していた。さらに、マウス肝臓組織評価したところ、ヒト肝臓組織と同様に Hic-5 が α -SMA 陽性の肝臓星状細胞に同定した。さらに、線維化に関連する遺伝子を調べたところ、

Hic-5 が ECM 産生を制御する遺伝子を抑制したが、肝臓線維化に上昇した TGF- β 1 の発現に影響しなかった (図4)。つまり、Hic-5 が TGF- β 1 の下流として核に移動して直接 ECM の産生を制御している可能性が高いと考えられる。

そこで、我々はマウス肝臓星状細胞を単離し *in vitro* で細胞実験を進めている (図5)。

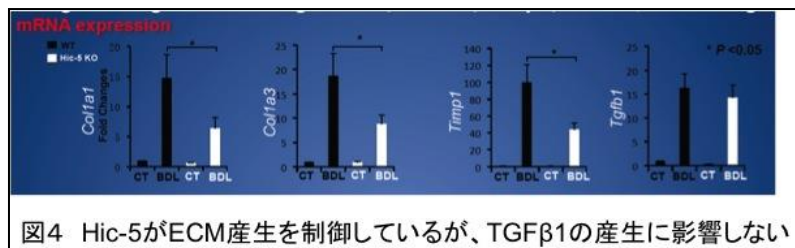


図4 Hic-5がECM産生を制御しているが、TGFβ1の産生に影響しない

考察

我々は肝臓線維化の過程で TGF-β 誘導分子として肝星状細胞の活性を制御する Hic-5 の機能を解明し、特に核に移行する現象が判明した。 Hic-5 の核内での機能として、遺伝子発現誘導機構への関与している報告や他の臓器線維化に Hic-5 と関与していることから、Hic-5 が TGF-β 1 の下流として核に移動して直接 ECM の産生の制御する可能性が高いと考えられる。現在細胞内制御のメカニズムを解析している。今後、Hic-5 が高特異性を持つ標的分子とした臓器線維化治療法の発案が可能になると考える。

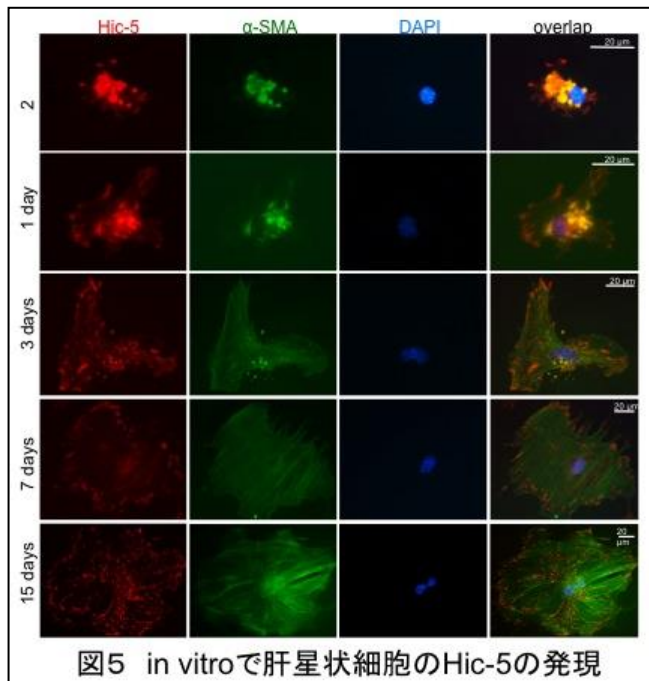


図5 *in vitro*で肝星状細胞のHic-5の発現

参考文献

1. Shibanuma M, Mashimo J, Kuroki T, Nose K. Characterization of the TGF beta 1-inducible hic-5 gene that encodes a putative novel zinc finger protein and its possible involvement in cellular senescence. **J Biol Chem.** 1994
2. Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Arita S, Miyauchi A, Miyazaki T, Miyazaki A. Hydrogen peroxide-inducible clone 5 (Hic-5) as a potential therapeutic target for vascular and other disorders. **J Atheroscler Thromb.** 2012
3. Inui S, Shono F, Noguchi F, Nakajima T, Hosokawa K, Itami S. In vitro and in vivo evidence of pathogenic roles of Hic-5/ARA55 in keloids through Smad pathway and profibrotic transcription. **J Dermatol Sci.** 2010
4. Hornigold N, Craven RA, Keen JN, Johnson T, Banks RE, Mooney AF. Upregulation of Hic-5 in glomerulosclerosis and its regulation of mesangial cell apoptosis. **Kidney Int.** 2010