

不死化ヒト肝星細胞モデルを用いた IFN γ 及び rapamycin による肝線維化抑制効果

柴田 憲邦

interferon γ (IFN γ) と rapamycin (Rapa) による抗肝線維化効果を検討するためヒト肝星細胞を不死化した培養細胞 (TWNT-4細胞) を用いて基礎的検討をおこなった。TWNT-4細胞はヒト肝星細胞 LI 90細胞に human telomerase reverse transcriptase (hTERT) を導入することによって作成した。TWNT-4は platelet derived growth factor β receptor (PDGF- β R), α -smooth muscle actin (α -SMA), collagen type 1 (α 1) を発現しており活性化肝星細胞の形態を呈する。肝星細胞を抑制する事が知られている IFN γ を 1000 U/ml 以上の濃度で 24 時間曝露しても collagen type 1 (α 1) の発現はほとんど低下しなかった。しかしながら IFN γ を 100 U/ml の低濃度でも 14 日間曝露すると collagen type 1 (α 1) の産生は RNA 及び蛋白レベルで低下した。免疫抑制剤である Rapa も 1-10 ng/ml の範囲で用量依存的に collagen type 1 (α 1) の産生の抑制がみられた。さらに IFN γ 10 U/ml と Rapa 0, 1 ng/ml の極めて低い濃度を併用して 14 日間曝露すると単独群と変わらず collagen type 1 (α 1) の抑制が認められた。すなわち IFN γ と Rapa の併用では各々の毒性を無視できる低濃度でも collagen type 1 (α 1) の抑制を認める事が明らかとなった。さらに IFN γ と Rapa は肝星細胞の活性化マーカーである PDGF- β R と α -SMA を抑制する事、培養細胞上清中への transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) 分泌を抑える事を示した。アデノウイルスベクターを用いて TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) を TWNT-4細胞に形質導入することによりアポトーシスに陥らせることができた。これらの実験結果から IFN γ と Rapa は活性化肝星細胞に作用して肝線維化を抑制し、TRAIL はアポトーシスの誘導をもたらす可能性が明らかとなった。今後これらの薬剤を用いて肝硬変における抗肝線維化治療への臨床応用が期待される。

(平成14年8月28日受理)

Antifibrosis Effect of Interferon γ (IFN γ) and Rapamycin (Rapa) in Immortal Human Hepatic Stellate Cells

Norikuni SHIBATA

To examine the antifibrosis effect of interferon γ (IFN γ) and Rapa an immortalized human hepatic stellate cell line, TWNT-4, was established by introducing human telomerase reverse transcriptase (hTERT) into LI 90 cells. The TWNT-4 cells were confirmed to express platelet-derived growth factor β receptor (PDGF- β R) and α -smooth muscle actin (α -SMA) by immunostaining. Interferon γ (IFN γ), which is known to inhibit human hepatic stellate cell activation,

could not inhibit collagen type 1 ($\alpha 1$) under a condition of 24 hour incubation at more than 1000 U/ml concentration. Incubation of IFN γ at a low concentration of 100 U/ml, for 14 days, however, inhibit collagen type 1 ($\alpha 1$) production in both RNA and protein levels. An immunosuppressive agent Rapa, also inhibited collagen type 1 ($\alpha 1$) production proportionally at a concentration of 1 to 10 ng/ml. When both IFN γ and Rapa were added to the incubation medium for 14 days at the one tenth of the usual concentration of each drug, collagen type 1 ($\alpha 1$) expression was equally inhibited. IFN γ and Rapa also inhibited production of TGF- $\beta 1$ hepatic stellate cell PDGF- βR , and α -SMA. apoptosis of TWNT-4 cells occurred as a result of adenovirus-mediated TRAIL cDNA transfer. These results confirmed that IFN γ and Rapa inhibit collagen expression in hepatic stellate cells, resulting in an antifibrosis effect. Therefore these drugs could have a clinical application for the prevention of fibrosis in liver cirrhosis. (Accepted on August 28, 2002) *Kawasaki Igakkaishi* 28 (3) : 185-197, 2002

Key Words ① TWNT-4 cell ② Interferony ③ Rapamycin
④ Antifibrosis effect

緒 言

肝線維化は肝の類洞壁細胞の一つである肝星細胞が主たる役割を担っている^{1)~5)}。肝星細胞は、正常肝においては静止期にあり、その胞体にビタミンAを有する脂肪滴を大量に含有している⁶⁾。また、内側に位置する肝類洞内皮細胞を保持し、肝類洞の立体的構造の形成を担っている。持続する肝の炎症に伴い、肝星細胞は筋線維芽細胞 (myofibroblast) へと形質転換し、脂肪滴を失うと同時に増殖能・細胞外マトリックス (I, III型コラーゲン, フィブロネクチンなど) 産生能を亢進させる⁷⁾。このような肝星細胞の活性化には、transforming growth factor β (TGF- β) platelet-derived growth factor (PDGF) などのサイトカインが深く関与していることが知られている^{8)~10)}。したがって、活性化肝星

細胞の抑制は肝線維化の予防・治療において重要な戦略的目標と言える。

ヒト肝星細胞を初代培養により得ても無制限に増殖し続けることは不可能である。このため初代培養ヒト肝星細胞への特異的遺伝子導入により不死化細胞を得ることが必要となる。今回LI 90ヒト肝星細胞 (村上らにより樹立¹¹⁾) にレトロウイルスベクターを用いて形質導入を試み不死化肝星細胞 TWNT-4細胞を得る事を試みた。この細胞は platelet derived growth factor β receptor (PDGF- βR) と α -SMA を発現している。不死化した肝星細胞 TWNT-4細胞を用いて TGF- $\beta 1$ と PDGF により collagen type 1 ($\alpha 1$) の発現にどのような影響があるか検討した。さらに TWNT-4細胞に IFN γ および免疫抑制剤 Rapa による肝星細胞抑制を介したコラーゲン産生に及ぼす影響について遺伝子レベル及び蛋白レベルで検討を行った。さらにアデノウイルスベクターを用いて TRAIL を形質導入することにより TWNT-4細胞を積極的にアポトーシスに誘導できるか否か検討したので併せて報告する。

材料と方法

1. 不死化ヒト肝星細胞 TWNT-4細胞の培養

Table 1. 肝線維化抑制の戦略

Prevention of fibrogenesis

- 1) Inactivation of hepatic stellate cells (HSCs)
- 2) Prevention of HSC proliferation
- 3) Prevention of extracellular matrix production by HSCs
- 4) Induction of HSC apoptosis

Facilitation of fibrolysis

- 1) Facilitation of Kupffer cell proliferation

TWNT-4細胞は一对の loxP 配列間に hTERT と hygromycin 耐性遺伝子と自殺遺伝子である herpes simplex virus-thymidine kinase とを同時にコードするレトロウイルスベクター SSR#69 をヒト肝星細胞 LI 90細胞 (population doubling level ; PDL 130前後で replicative senescence になる東北年金病院病理部村上一宏先生, 東京慈恵医科大学内科松浦知和先生より供与された) に形質導入することにより樹立された細胞である¹¹⁾。培養液は Dulbecco's Modified Eagle Medium (以下, DMEM) に10% fetal calf serum (以下 FCS) を加えたものを用い, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂条件下で培養した。培養細胞は倒立型位相差顕微鏡にて定期的に注意深く観察し, 3日毎に新鮮な培養液に交換した。

2. TWNT-4細胞の位相差顕微鏡像

TWNT-4細胞を1wellあたり 5×10^5 個ずつ 6-well の dish に播種し, 経時的に観察し, 80%コンフルエントになった段階で hills-and-valley sign を呈するか否か細胞形態を観察した。

3. TWNT-4細胞の green fluorescent protein (GFP) 発現

不死化細胞の識別マーカーとして導入した GFP 陽性細胞をフローサイトメーター (FACS-can, Becton Dickinson, Mountain View, CA) で確認した。

4. TWNT-4細胞の platelet derived growth factor β receptor (PDGF- β R) と α -smooth muscle actin (α -SMA) の免疫染色

肝星細胞の特徴的な形質である PDGF- β R と α -SMA を TWNT-4細胞が発現するかどうか抗 PDGF- β R rabbit polyclonal IgG 抗体 (UPSTATE, LakePlacid USA) と抗 α -SMA mouse monoclonal IgG 抗体 (DAKO, Kyoto Japan) を用いて以下のように免疫染色をおこなった。6-well plate の各 well 上に滅菌済みカバーガラスを敷き, TWNT-4細胞をその上に播種した。細胞生着後, 培養上清を吸引し, phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後 4% paraformaldehyde を加えて室温で30分静置させた後, 同様に PBS で洗浄後100%エタノールで 4 $^{\circ}$ C 30分固定した。

同様に PBS で洗浄後 blocking solution (10% skim milk, 10% FBS, 0.1% sodium azide, 0.1% TritonX in PBS) で室温, 30分 blocking した。抗 PDGF- β R 抗体と抗 α -SMA 抗体を使用して一次抗体反応 (37 $^{\circ}$ C, 1時間) を行い, ついで二次抗体反応を行った。カバーガラスごと Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA) に浸し蛍光顕微鏡 (Model Axiophot FL, Carl Zeiss, Inc., Oberkochen, Germany) で観察を行った。

5. platelet derived growth factor (PDGF), transforming growth factor (TGF- β) および IFN γ 刺激による collagen type 1 (α 1) の遺伝子発現の変化

PDGF (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) と TGF- β 1 (Wako, Osaka, Japan) でコラーゲン発現が刺激され IFN γ (Roche, Tokyo Japan) で抑制されるかどうか以下の実験をした。T 75の dish に80%コンフルエンスになった段階で PDGF と TGF- β 1はそれぞれ 5 ng/ml, 25 ng/ml 濃度で, IFN γ は1000 U/ml, 10000 U/ml の濃度で培養液へ加えた。24時間の刺激後, 細胞を回収し総 RNA を抽出し collagen type 1 (α 1) の遺伝子発現レベルの変化を RT-PCR 法にて検討した。

6. IFN γ の14日間投与による collagen type 1 (α 1) の遺伝子発現の変化

100 U/ml の IFN γ を培養液へ加え, 14日間当該培養を施行した後, 細胞を回収し総 RNA を抽出し Collagen type 1 (α 1) と hepato growth factor (HGF) を RT-PCR 法にて遺伝子発現を検討した。また同様な培養を施行し, 蛋白を抽出した後 Collagen type 1 (α 1) の蛋白発現量を Western Blot にて解析した。

7. Rapa の14日間投与による collagen type 1 (α 1) の遺伝子発現の変化

Rapa を1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml の濃度で培養液へ加え培養を施行した。14日間の Rapa 刺激後, 細胞を回収し総 RNA を抽出し Collagen type 1 (α 1) の遺伝子発現を RT-PCR 法にて検討した。

8. IFN γ と Rapa 単独14日間投与による PDGF- β R と α -SMA 発現の変化

IFN γ は100 U/mlの濃度で、Rapaは1 ng/mlの濃度で培養液へ加え14日間培養を施行した。それぞれ14日間の刺激後、抗 α -SMA抗体と抗PDGF- β R抗体を用い免疫染色にて比較検討した。

9. IFN γ と Rapa 単独14日間投与後の培地中 TGF- β 1の測定

IFN γ は100 U/ml、の濃度で、Rapaは1 ng/ml、の濃度で培養液に加えた。14日間の刺激後、それぞれ10% DMEMへ培養液を変えて24時間後ELISA法にて培養液へ分泌されたTGF- β 1量をRandD社製ELISAキットで測定した。

10. 低濃度 IFN γ と Rapa 併用14日間投与後の collagen type 1 (α 1) の遺伝子発現の変化

単独投与のIFN γ は100 U/ml、の濃度で、Rapaは1 ng/mlの濃度で培養液に加えた。併用投与はIFN γ は10 U/mlの濃度で、Rapaは0.1 ng/mlの濃度で加えた。14日間、培養を施行した後、細胞を回収しtotalRNAを抽出しCollagen type 1 (α 1)をRT-PCR法にて遺伝子発現を検討した。さらに培養細胞から、蛋白を抽出した後Collagen type 1 (α 1)と α -SMAの蛋白発現量をWestern Blotにて解析した。

11. collagen type 1 (α 1) と α -SMA の Western Blot

培養後上清を吸引し、phosphate buffered saline (PBS)で3回洗浄後、ラバーポリスマンで細胞をdishより剥離した。細胞をcell lysis bufferで溶解後、protein sampleを1レーンあたり30 μ gに調整し12% SDS-PAGEで電気泳動した。これをニトロセルロース膜(Amersham, Tokyo, Japan)へ転写した後、スキムミルクでブロッキングを行い、続いて抗Collagen type 1 (α 1)goat polyclonal IgG抗体(Santa Cruz Biotechnology, California, USA)を使用し一次抗体反応をしてhorseradish peroxidase標識抗マウスIgG抗体(1:2000)(MBL, Nagoya, Japan)を使用し二次抗体反応を行った。ECL detection kit(Amersham, Tokyo, Japan)を使用し発色

を行った。尚内因性コントロールとしてhuman β -actinとTubulinを用いた。

12. TRAIL 発現に伴う apoptosis の誘導

6-well plateの各well上に滅菌済みカバーガラスを敷き、TWNT-4細胞を1wellあたり 5×10^5 個播種した。GTプロモター下にTRAILcDNAを発現する組み替えアデノウイルスベクターAd/GT-TRAIL, Ad/PGK-GV-16はJA Roth先生, Bingliang Fang先生(University of Texas MD.Anderson Cancer Center, Huston, TX, USA)より供与を受けた。このベクターを各種multiplicity of infection (MOI 1, 5, 10, 25, 50, 100)でTWNT-4細胞に感染させた。apoptosis誘導効果は、Hoechst核染色とFACS解析で検討した。

13. Hoechst 核染色

Ad/GT-TRAIL, Ad/PGK-GV-16 (MOI 1, 5, 10, 25, 50, 100)感染72時間後にPBSで3回洗浄後、トリプシン処理にて細胞を剥離回収した。1000 rpm 5分間の遠心後、細胞をペレットにして、1%グルタルアルデヒド溶液1mlを加え細胞を浮遊させ一晩固定する。4 $^{\circ}$ C, 1000 rpm 5分間の遠心後、上清を除去、細胞をPBS 300 μ lに浮遊させる。細胞浮遊液10 μ lにヘキスト33342溶液を2 μ l添加する。一滴をスライドグラスにのせカバーグラスをかけて蛍光顕微鏡で観察した。コントロールとしてAd/GT-LacZ, Ad/PGK-GV-16を使用した。

14. 細胞周期の解析

Ad/GT-TRAIL, Ad/PGK-GV-16 (MOI 1, 5, 10, 25, 50, 100)感染72時間後にPBSで3回洗浄後、トリプシン処理にて細胞を剥離回収した。1000 rpm 5分間の遠心後、細胞を1mlのPBSにて懸濁し、冷100% ethanol 3mlを攪拌しながら1滴ずつ添加し最終濃度75% ethanolにて細胞固定を行った。エタノール添加後4 $^{\circ}$ C 30分間静置後、再度1000 rpm 5分間の遠心操作を行うことで細胞を回収した。細胞を1mlのPBSにて懸濁後、Rnase 10 μ lを加え37 $^{\circ}$ Cで20分間インキュベーションした。続いてヨウ化プロピジウム溶液(PI)(Wako社)を1ml

加え、最終濃度を50 μ g/ml に調整し4 $^{\circ}$ C 10分間暗所でDNAの染色を行った。50 μ m のナイロンメッシュでサンプルを濾過後、cell sorter (FACScan, Becton Dickinson, Mountain View, CA) にて細胞周期の解析を行った。コントロールとして Ad/GT-LacZ, Ad/PKG-GV-16を使用した。

結 果

1. TWNT-4細胞の生物学的特性

80%コンフルエンスになった TWNT-4細胞の位相差顕微鏡像 (Fig. 1-A) を示す。培養細胞は紡錘形を示し hills-and-valley 様の配列を示している。またこの培養細胞が、hTERT による不死化を獲得している事が GFP の FACS 解析により明らかである (Fig. 1-B)。さらに PDGF- β R (Fig. 1-C) 及び α -SMA (Fig. 1-D) の発現が免疫染色により確認された。

2. PDGF, TGF- β , IFN γ 刺激による collagen

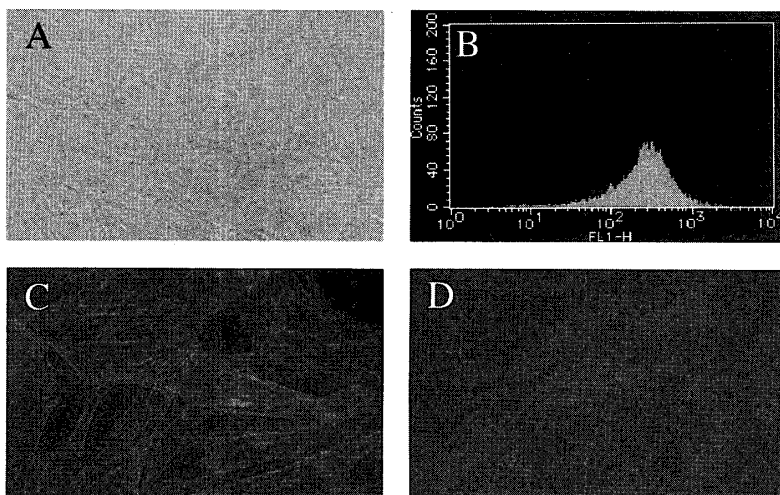


Fig. 1. TWNT-4細胞

- 光顕像では形態的には紡錘形でコンフルエントでは典型的な hills-and-valley 徴候を呈した。(×100)
- フローサイトメーターで均一に GFP を発現していた。
- 肝星細胞の活性化マーカーである α -SMA の発現を免疫染色で認めた。(×400)
- 肝星細胞の活性化マーカーである PDGF- β R の発現を免疫染色で認めた。(×400)

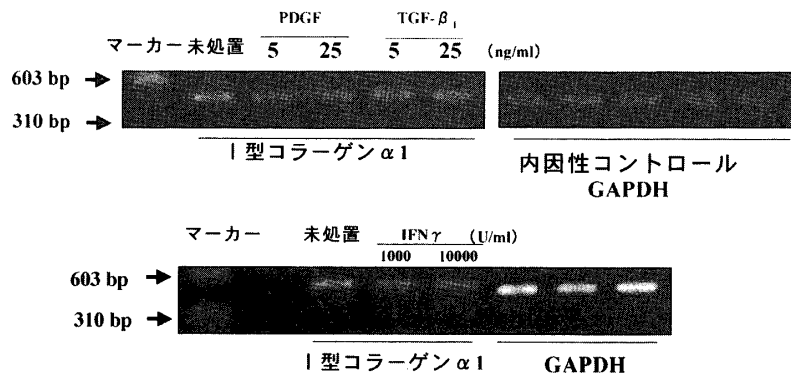


Fig. 2. PDGF, TGF- β , IFN γ 刺激による Collagen type 1 (α 1) の遺伝子発現の変化

Fig. 2 上段 細胞を PDGF と TGF- β で刺激し、Collagen type 1 (α 1) の遺伝子発現レベルの変化を RT-PCR 法にて検討したところ、未処置の細胞に比べて PDGF と TGF- β の刺激ではほとんど変化がみられなかった。

Fig. 2 下段 IFN γ で24時間の抑制した後、同様に Collagen type 1 (α 1) の遺伝子発現レベルの変化を RT-PCR 法にて検討したところ、IFN γ の刺激ではわずかに10000 U/ml で抑制がみられるのみであった。

type 1 (α 1) の遺伝子発現の変化

PDGF と TGF- β の各々 5 ng/ml および25 ng/ml の濃度による刺激を行った結果、Collagen type 1 (α 1) の遺伝子発現レベルでは未治療の細胞に比べてほとんど変化がみられなかった (Fig. 2 上段)。また IFN γ を1000 U/ml 及び 10000 U/ml で刺激したが、わずかながらの collagen type 1 (α 1) の抑制がみられるのみであった (Fig. 2 下段)。

3. IFN γ の14日間投与による collagen type 1 (α 1) の遺伝子発現の変化

Collagen type 1 (α 1) と heparin binding EGF growth factor (HGF) で未治療の細胞に比べて Collagen type 1 (α 1) は IFN γ 添加により抑制され HGF は発現が増強した (Fig. 3 上段)。また蛋白を抽出した後 Collagen type 1 (α 1) の蛋白発現量を Western Blot にて解析したところ IFN γ 100 U/ml の低用量でも未処置の細胞に比べて時間の経過とともに抑制された (Fig. 3 下段)。

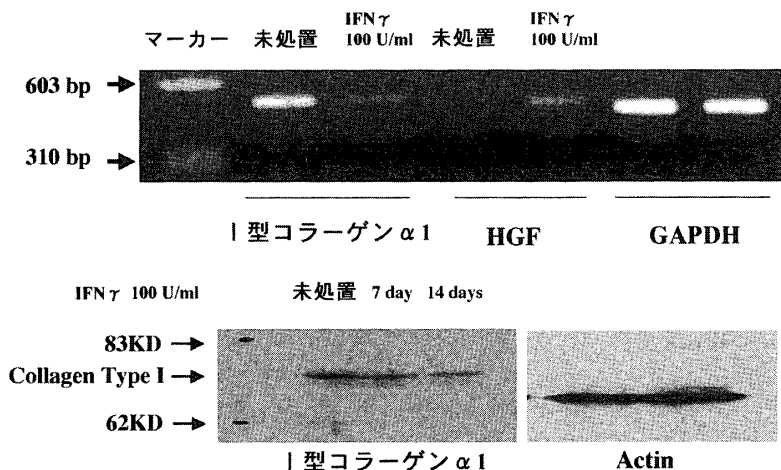


Fig. 3. IFN γ の14日間投与による Collagen type 1 (α 1) と HGF の遺伝子発現の変化

Fig. 3. 上段 TWNT-4細胞が T 75の dish に80%コンフルエンスになった段階で100 U/mlの IFN γ を mediumへ加え、14日間培養を施行した後、細胞を回収し totalRNA を抽出し Collagen type 1 (α 1) と hepato growth factor (HGF) を RT-PCR 法にて遺伝子発現を検討した。未処置の細胞に比べて Collagen type 1 (α 1) は抑制され HGF は発現が増強した。

Fig. 3 下段 TWNT-4細胞が T 75の dish に80%コンフルエンスになった段階で100 U/mlの IFN γ を培養液へ加え、14日間培養後、蛋白を抽出し、Collagen type 1 (α 1) の蛋白発現量を Western Blot にて解析した。蛋白レベルでも未処置の細胞に比べて時間の経過とともに Collagen type 1 (α 1) は抑制された。

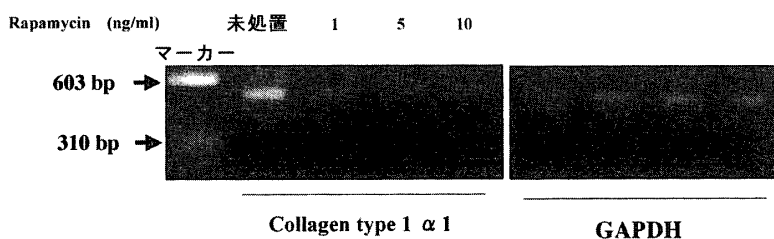


Fig. 4. Rapa の14日間投与による Collagen type 1 (α 1) の遺伝子発現の変化

Rapa を 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml の濃度で培養液へ加え培養を施行した。14日間の Rapa 刺激後、細胞を回収し totalRNA を抽出し Collagen type 1 (α 1) の遺伝子発現を RT-PCR 法にて検討した。Collagen type 1 (α 1) の遺伝子発現は未処置の細胞に比べて用量依存的に抑制された。

4. rapamycin の14日間投与による collagen type 1 (α 1) の遺伝子発現の変化

Rapa を 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml の3種類の濃度により14日間 Rapa 刺激をおこなった。その後、Collagen type 1 (α 1) の遺伝子発現は未処置の細胞に比べて用量依存的に抑制された (Fig. 4)。

5. IFN γ と Rapa の14日間投与による PDGF- β

R と α -SMA 発現の変化

IFN γ 処置の細胞 (Fig. 5 中) では PDGF- β R と α -SMA は未処置の細胞 (Fig. 5 左端) に比してその発現が抑制された。また Rapa 処置 (Fig. 5 右端) の場合も IFN γ と同様に抑制がみられた。

6. 培地中 TGF- β 1の測定

IFN γ と Rapa の併用投与後14日目の培地中

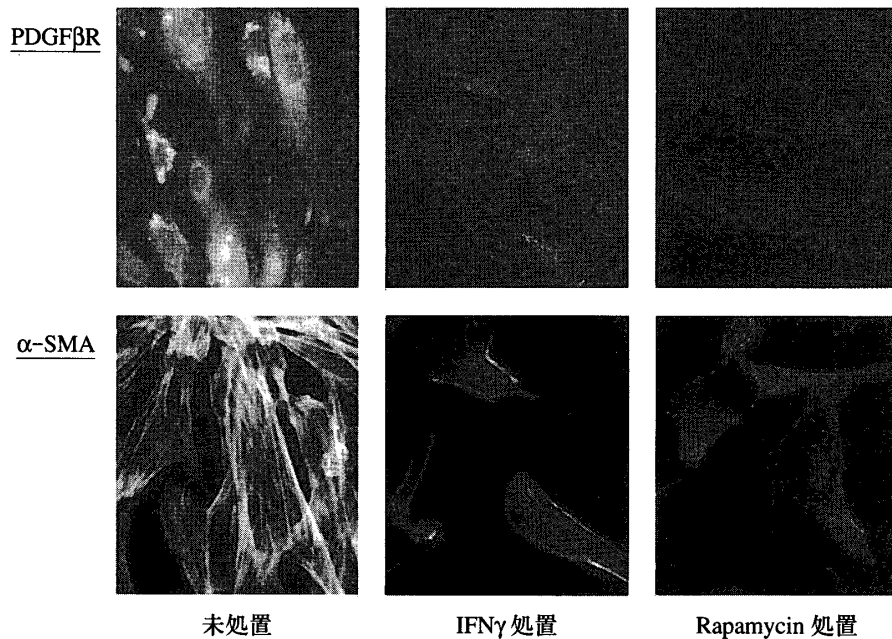


Fig. 5. IFN γ と Rapa の14日間投与による PDGF- β R と α -SMA 発現の変化

IFN γ は100 U/ml の濃度で、Rapa は1 ng/ml の濃度で培養液へ加え14日間培養を施行した。それぞれ14日間の刺激後、抗 α -SMA 抗体 (DAKO 社製) と抗 PDGF- β R 抗体 (アップステイト社製) を用いて、発現の変化を免疫染色にて比較検討した。PDGF- β R の発現は未処置の細胞 (Fig. 5 左端) に比べて IFN γ 処置の細胞 (Fig. 5 中) と Rapa 処置の細胞 (Fig. 5 右端) は抑制された。 α -SMA の発現でも同様に未処置の細胞 (Fig. 5 左端) に比べて IFN γ 処置の細胞 (Fig. 5 中) と Rapa 処置の細胞 (Fig. 5 右端) は抑制された。

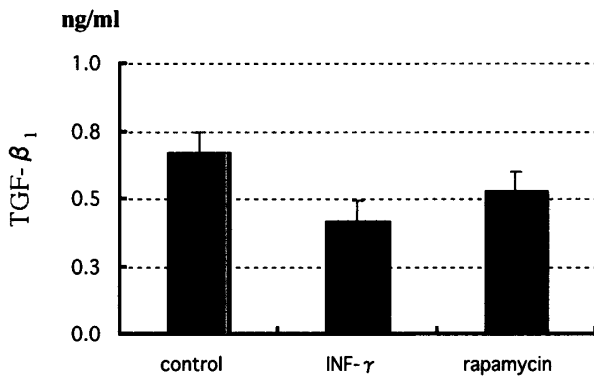


Fig. 6. IFN γ と Rapa の14日間投与後の培地中 TGF- β_1 の測定

TWNT-4細胞が T75 の dish に80%コンフルエンスになった段階で IFN γ は100 U/ml の濃度で、Rapa は1 ng/ml の濃度で培養液へ加えた。14日間の刺激後、それぞれ10% DMEM へ培養液を変えて24時間後 ELISA 法にて培養液へ分泌された TGF- β_1 の量を RandD 社製 ELISA キットで測定した。未処置群は平均0.673 ng/ml、IFN γ 処置群は平均0.42 ng/ml、Rapa 処置群は平均0.527 ng/ml であった。

TGF- β_1 は未処置群では平均0.67 ng/ml、IFN γ 処置群は平均0.42 ng/ml、Rapa 処置群は平均

0.52 ng/ml であった。IFN γ 処置群において低値を示した (Fig. 6)。

7. 低濃度 IFN γ と Rapa 併用で14日間投与後の collagen type 1 (α_1) の遺伝子発現の変化

IFN γ 100 U/ml および Rapa 1 ng/ml の単独処置群は Collagen type 1 (α_1) の発現を抑制した。また IFN γ および Rapa の併用群では各々の濃度が十分の一の低濃度であったが単独群と同様に抑制された (Fig. 7 上段)。さらに Collagen type 1 (α_1) の蛋白レベルの解析によっても、Collagen type 1 (α_1) は併用群においてとそれぞれの単独群と同程度抑制された (Fig. 7 下段)。

8. Ad/GT-TRAIL, Ad/PGK-GV-16 感染によるアポトーシスの誘導

TWNT-4 細胞に Ad/GT-TRAIL, Ad/PGK-GV-16 (MOI 1, 5, 10, 25, 50, 100) 感染72時間後、倒立型位相差顕微鏡にて細胞形態の変化を観察した。LacZ 群 (Fig. 8-A) に比し

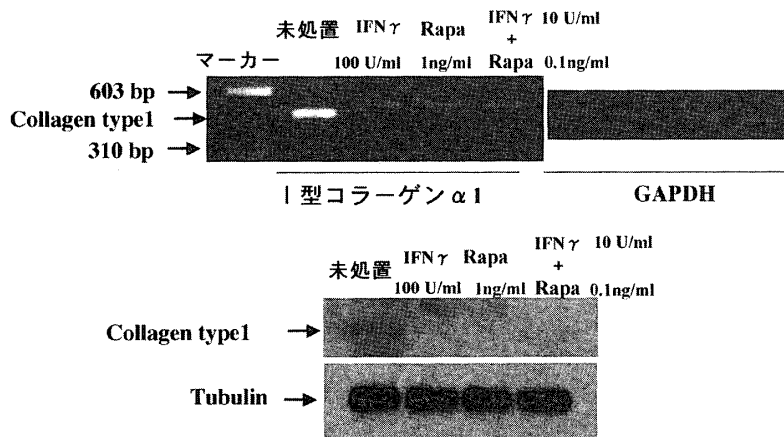


Fig. 7. 低濃度 IFN γ と Rapa 併用で14日間投与後の Collagen type 1 (α 1) の遺伝子発現の変化

Fig. 7 上段 単独投与の IFN γ は100 U/ml の濃度で, Rapa は1 ng/ml の濃度で培養液へ加えた. 併用投与は IFN γ は10 U/ml の濃度で, Rapa は0.1 ng/ml の濃度で培養液へ加えた. 14日間, 当該培養を施行した後, 細胞を回収し total RNA を抽出し Collagen type 1 (α 1) を RT-PCR 法にて遺伝子発現を検討した. IFN γ と Rapa の併用群とそれぞれの単独群は未処置群に比べて同程度抑制された.

Fig. 7 下段 また同様な培養を施行し, 蛋白を抽出した後 Collagen type 1 (α 1) と α -SMA の蛋白発現量を Western Blot にて解析した. Collagen type 1 (α 1) の蛋白は併用群もそれぞれの単独群も未処置群に比べて同程度抑制された.

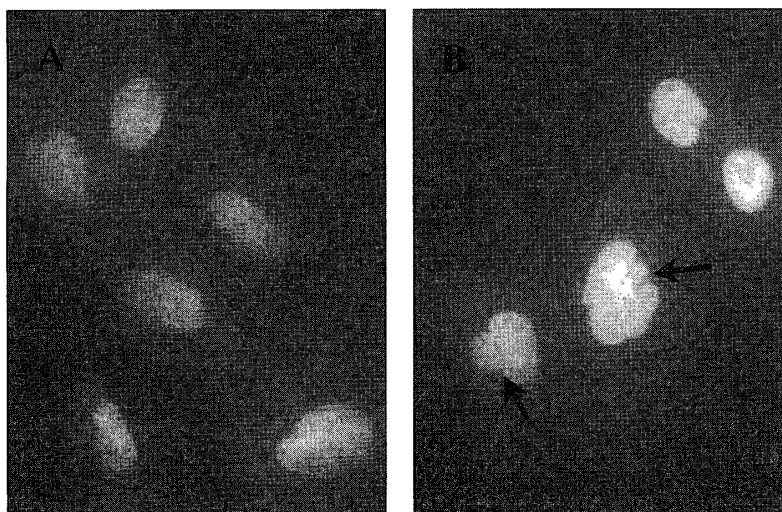


Fig. 8. Ad/GT-TRAIL, Ad/PGK-GV-16感染による apoptosis の誘導

A LacZ 感染細胞 6-well plate の各 well 上に滅菌済みカバーガラスを敷き, TWNT-4細胞を1 well あたり 5×10^5 個播種した.

Ad/GT-LacZ, Ad/PGK-GV-16 (MOI 1, 5, 10, 25, 50, 100) を感染させ72時間後 Hoechst 核染色をおこなった.

B TRAIL 感染細胞 上記と同様に Ad/GT-TRAIL, Ad/PGK-GV-16 (MOI 1, 5, 10, 25, 50, 100) を72時間感染させ Hoechst 核染色をおこなった. A では認められなかったクロマチンの凝集がみられた.

て TRAIL 発現 TWNT-4細胞は細胞密度は減少し, 胞体の膨化を認めさらに Hoechst 核染色にてクロマチン凝集 (Fig. 8-B 矢印) としてと

れていない現状を鑑みると肝星細胞を直接のターゲットとして2)~5)に挙げた新たなアプローチの開発が必要である. 現在の抗線維化療法と

らえることができた. 当該アポトーシス誘導効果は, MOI 10から認められた. また, FACS 解析でもこのアポトーシス誘導効果は, アポトーシス細胞の増加として確認された (Fig. 9 矢印).

考 察

肝線維化過程において肝星細胞は細胞外マトリックス産生により中心的役割を果たしている^{1)~5)}.

肝星細胞による過剰なマトリックス合成は肝硬変への進展に重要な要素となっている. したがって肝星細胞を抑制する事は肝硬変における抗線維化療法に有用となる.

肝星細胞の過剰なマトリックス合成を抑制するには以下のようなアプローチが考えられる. すなわち 1) 肝炎の原因を除去し炎症を鎮静化させることで二次的に肝星細胞の活性化を抑制する, 2) 肝星細胞に直接作用し活性化を抑制する, 3) 肝星細胞での細胞外マトリックス合成を選択的に阻害する, 4) 肝星細胞のマトリックス分解能を亢進させる, 5) 過剰に増殖した肝星細胞にアポトーシスを誘導してその数を減少させることである. この中で, 現在臨床で広く行われているのは, 1) のウイルス肝炎の原因の除去を目標とした interferon (IFN) 治療であるが, 本邦の肝硬変患者の約9割において IFN のウイルス除去効果は十分ではない. また, 肝硬変に対する IFN 療法は保険診療が認めら

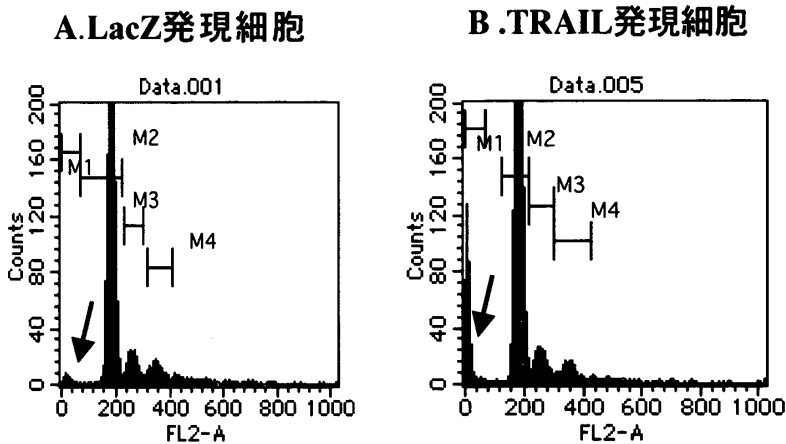


Fig. 9. 細胞周期の解析

- A Ad/GT-LacZ, Ad/PGK-GV-16感染
B Ad/GT-TRAIL, Ad/PGK-GV-16感染

Ad/GT-TRAIL, Ad/PGK-GV-16 (MOI 1, 5, 10, 25, 50, 100) 感染72時間後に cell sorter (FACScan, Becton Dickinson, Mountain View, CA) にて細胞周期の解析を行った。コントロールとして Ad/GT-LacZ, Ad/PGK-GV-16を使用した。TRAIL 発現細胞はコントロールに比べてアポトーシス細胞が10%増えていた。

して考えられる戦略を **Table 1** にまとめた^{12)~28)}が、いずれも具体的な成果は挙げられていない。その一因として、こうした治療法の有効性を判定できる信頼できるヒト由来の肝星細胞が利用可能でないからである。取り扱いの容易なヒト肝星細胞株を樹立することは当該研究を推進する上で極めて有用であると言えるが、ヒト肝星細胞の初代培養は、分裂回数が少ない、他種類の細胞がコンタミネーションしてくる頻度が高い、継代による形態学的・機能学的な発現系が変化するなどの欠点がある。代替として長期継代のできる齧歯類などといった他の動物由来の肝星細胞が基礎研究に使われているが、ヒトの疾患との関連性がしばしば問題となっている。細胞分裂の停止 (crisis) のメカニズムに関してはテロメア短縮が染色体の不安定になる第二の臨界点を越えたとき起こると考えられており^{28), 29)}、これらの事より初代ヒト培養細胞が増殖崩壊を越えて無制限に増殖し続けることができる頻度は極めて低いと考えられている^{30)~32)}。初代ヒト培養細胞への特異的遺伝子の導入や発現により、老化期 (first senescence crisis) をバイパスすることで細胞集団倍加レベル (PDL; population doubling level) を延長

させることができ、不死化細胞の作成も可能となってきた。simian virus 40 large T 抗原 (SV 40 T) を使用した細胞の in vitro での自然な不死化はおよそ 3.3×10^{-7} と報告されており、それは内因的なテロメラーゼ活性の自然発現によるものと考えられている³²⁾。これまで SV 40 T 導入 HEK 細胞や SV 40 T もしくは Ras 遺伝子導入ヒト膀胱細胞および線維芽細胞にテロメラーゼ活性を発現させることにより細胞崩壊から逃れることが可能であったという報告がある^{33)~35)}。ヒト細胞にヒトテロ

メラーゼ逆転写サブユニット (hTERT) を効果的に発現させることができれば、劇的な寿命延長ないしは不死化が可能と考えられる。そこで、今回、我々は、村上らが樹立した LI 90 肝星様細胞に hTERT をレトロウイルスベクターを用いて形質導入を試みた。LI 90 細胞は、増殖が緩徐で PDL 30 前後で replicative senescence を認めた。hTERT 導入にて樹立された TWNT-4 細胞は PDL 200 以上継代しても crisis を認めず、RT-PCR 法にて hTERT 遺伝子の発現、Trap アッセイにてテロメラーゼ活性が陽性で不死化株と考えられた。また、TWNT-4 細胞は活性化肝星細胞の性格を呈していた。すなわち免疫染色 (**Fig. 5**) で PDGF- β R と α -SMA 発現を認めている。そこで、当該細胞を抗線維化のモデルとして検討した。まず、肝星細胞の活性化因子である PDGF や TGF- β 1 で collagen type 1 (α 1) の発現が増加するか検討した結果、遺伝子レベルではほとんど発現に変化は認めなかった。そこで我々は TWNT-4 細胞の形態より、当該細胞がすでに in vitro の培養環境で最大限に活性化されているため刺激しても変化がないものと判断した。次に、活性化抑制因子である IFN γ で collagen type 1 (α 1) の発現が減少するか検討した。しかし IFN γ 1000 U/ml 及び

10000 U/ml の高濃度でも24時間曝露ではわずかな変化しか認めなかった。このことから我々の細胞ではIFN γ が24時間曝露では十分なコラーゲン発現の抑制効果は示さないことが明らかとなった。そこで曝露時間を1日から14日間と延長した。IFN γ 使用量は100 U/ml と常用量の十分の一から検討してみた。その結果 collagen type 1 ($\alpha 1$) の発現は遺伝子レベルでも蛋白レベルでも抑制が確認された。

次に、FK 506や cyclosporine にかわる有効な免疫抑制剤として現在欧米で臨床応用されており、かつ肝星細胞の増殖抑制効果が報告されている Rapa に注目した¹⁹⁾。近年マクロライド系抗生物質である Rapa が細胞増殖の転写後制御機構を解明する分子薬理学的プローブとして基礎化学的分野ばかりでなく、医学臨床面でも Rapa 及びその誘導体が新しい抗癌剤として臨床試験が始まっている^{35)~42)}。Rapa は最初イースター島土壌より抽出された細菌 *Streptomyces hygroscopicus* によって産生される抗真菌物質として発見された。その後の研究にて Rapa は抗原刺激をうけて活性化された T 細胞の G 1 細胞周期進行を特異的に阻害することで免疫抑制効果を発揮する事が示された。腫瘍細胞では B 細胞リンパ腫細胞株や小細胞癌細胞株の増殖を抑制する事が示され、さらにヒト肺癌細胞株では増殖抑制と共にサイクリン D 1 の発現を抑制することが報告されている。また、Rapa が単独でヒト横紋筋肉腫細胞株に p 53 非依存性アポトーシスを誘導できることが示されている。Rapa は生体内では FKBP 12 といわれるイムノフィリンと総称される細胞内受容体タンパク質と複合体を形成する。rapamycin-FKBP 12 複合体はその生体内標的タンパク質 mammalian target of rapamycin (mTOR) に結合し、そのプロテインキナーゼ能を抑制し、増殖関連遺伝子の発現を翻訳レベルで抑制することによって機能している。この mTOR は、細胞周期進行、細胞周期チェックポイント、DNA 修復再構成など、細胞の増殖と生存に重要な機能を担うタンパク質であることが判明している。Rapa は、

四塩化炭素障害ラットモデルで肝線維化を抑制する効果があることが Jianliang Zhu¹⁹⁾ によって示されている。すなわち、当該モデルで FK 506 投与にて肝臓での炎症、肝線維化所見が認められるとともにコラーゲン、TGF- β の mRNA レベルでの発現が増強しているが、Rapa 投与ラットではこうした変化が軽微であることが観察されている。Rapa を培養液に加えてコラーゲン産生能に変化がみられるかどうか検討した。

Figure 4 に示したように 1 から 10 ng/ml の濃度で IFN γ と同じように Collagen type 1 ($\alpha 1$) の遺伝子発現を抑制するという結果が得られた。さらに IFN γ 及び Rapa を同様に十分の一濃度で両者の単独曝露による PDGF- β R と α -SMA と TGF- β 1 の抑制効果について検討した。IFN γ と Rapa は Figure 5 と Figure 6 に示すようにコラーゲンの遺伝子だけでなく肝星細胞の活性化マーカーの蛋白発現と上清中に分泌される肝星細胞を活性化するサイトカインも抑制した。さらに Figure 7 に示すように IFN γ と Rapa を各々単独投与の場合の 10 分の 1 の量を投与した場合も単独投与と同様の効果が得られた。

以上の結果から従来より抗肝線維化剤として知られていた IFN γ と Rapa はそれぞれ単独投与でも 14 日間の曝露で TWNT-4 細胞のコラーゲン産生能を抑制する事が確認された。今回の検討で IFN γ と Rapa の両者を少量で併用した場合も十分なコラーゲン産生抑制効果を認め、両薬剤が抗肝線維化剤として副作用を心配せずに十分な効果を得ることのできる臨床応用への可能性が示された。

さらに、こうした活性化抑制効果を期待する手段とは別に活性化した肝星細胞を積極的にアポトーシスに導いて、その数を減らすことで肝線維化を治療しようとする試みもある^{42)~44)}。我々は、TNF ファミリーに属する分子としてクローニングされた TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) の cDNA⁴⁵⁾ をアデノウイルスベクターを用いて形質導入することにより TWNT-4 細胞のアポトーシス効果を検討した。

Hoechst 核染色にて MOI 依存的に核のクロマチン凝集がみられた。また Flow cytometry でアポトーシス細胞の増加を確認した。将来的には非ウイルスベクターをもちいた遺伝子治療との併用も検討したい。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御高閲を賜りました川崎医科大学内科学消化器 I 教室 山本晋一郎教授に深甚なる謝意を捧げます。また研究を遂行するにあたり具体的に手技の御指導をいただいた岡山大学大学院医歯学総合研究科・消化器・腫瘍外科 田中紀章教授および小林直哉先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Milani S, Bissell DM, Friedman SL : In situ hybridization for procollagen types I , III and IV mRNA in normal and fibrotic rat liver : Evidence for predominant expression in nonparenchymal liver cells. *Hepatology* 10 : 84 - 92, 1989
- 2) Ogata I, Mochida S, Tomiya T, Fujiwara K : Minor contribution of hepatocytes to collagen production in normal and early fibrotic rat livers. *Hepatology* 14 : 351 - 367, 1991
- 3) Bachem MG, Meyer D, Melchior R, Sell KM, Gressner AM : Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblastlike cells. A potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis. *J Clin Invest* 89 : 19 - 27, 1992
- 4) Friedman SL : The cellular basis of hepatic fibrosis : Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 328 : 1828 - 1835, 1993
- 5) Hautekeete ML, Geerts A : The hepatic stellate (Ito) cell : its role in human liver disease. *Virchows Arch* 430 : 195 - 207, 1997
- 6) Blomhoff R, Rasmussen M, Nilsson A, Norum KR, Berg T, Blaner WS, Kato M, Mertz JR, Goodman DS, Eriksson U : Hepatic retinol metabolism. Distribution of retinoids, enzymes, and binding proteins in isolated rat liver cells. *J Biol Chem* 260 : 13560 - 13565, 1985
- 7) Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ : Transforming growth factor β modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* 6 : 1899 - 1904, 1987
- 8) Pinzani M, Gesukado L, Sabbah GM : Effects of platelet derived growth factor and other polypeptide mitogen on DNA synthesis and growth of rat liver fat storing cells. *J Clin Invest* 84 : 1786 - 1793, 1989
- 9) Ikeda H, Nagoshi S, Fujiwara K : Activated rat stellate cells express c-met and respond to hepatocyte growth factor to proliferate and stimulate transforming growth factor beta 1 expression. *Hepatology* 24 : 460, 1996
- 10) Inao M, Mochida S, Ikeda H, Awaya A, Fujiwara K : Effects of neurotropic pyrimidine heterocyclic compound, MS -430, on cultured hepatic parenchymal and stellate cells. *Life Sciences* 61 : 273 - 282, 1997
- 11) Murakami K, Abe T, Miyazawa M, Yamaguti M, Masuda T, Matsuura T, Nagamori S, Takeuti K, Kyougoku M : Establishment of a new Human Cell Line, LI 90, Exhibiting Characteristics of Hepatic Ito (Fat-Storing) Cell. *Laboratory Investigation* 72 : 731 - 739, 1995
- 12) Shimizu I, Mizobuti Y, Yasuda M, Shiba M, Ma YR, Horie T, Liu F, Ito S : Inhibitory effect of oestradiol on activation of rat hepatic stellate cells in vivo and in vitro. *Gut* 44 : 127 - 136, 1999
- 13) Okuno M, Akita K, Moriwaki H, Kawada N, Ikeda K, Kaneda K, Suzuki Y, Kojima S : Prevention of rat hepatic fibrosis by the protease inhibitor, camostat mesilate, via reduced generation of active TGF- β . *Gastroenterology* 120 : 1784 - 1800, 2001
- 14) Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshiji J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H : Angiotensin- II type I receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rat. *Hepatology* 34 : 745 - 750, 2001

- 15) Marra F, Efsen E, Romanelli RG, Caligiuri A, Pastacaldi S, Batignani G, Bonacchi A, Caporale R, Laffi G, Pinzani M, Gentilini P : Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulate profibrogenic and pro-inflammatory actions in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 119 : 466 - 478, 2000
- 16) Di Sario A, Bendia E, Svegliati Baroni G, Ridolfi F, Bolognini L, Feliciangeli G, Jezequel AM, Orlandi F, Benedetti A : Intracellular pathways mediating Na⁺/H⁺ exchange activation by platelet-derived growth factor in rat hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 16 : 1155 - 1166, 1999
- 17) Benedetti A, Di Sario A, Casini A, Ridolfi F, Bendia E, Pigni P, Tonnini C, D'Ambrosio L, Feliciangeli G, Macarri G, Svegliati-Baroni G : Inhibition of the NA(+)/H(+) exchanger reduces rat hepatic stellate cell activity and liver fibrosis : an in vitro and in vivo study. *Gastroenterology* 120 : 545 - 556, 2001
- 18) Failli P, DeFranco RM, Caligiuri A : Nitrovasodilators inhibit platelet-derived growth factor-induced proliferation and migration of activated human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 119 : 479 - 492, 2000
- 19) Zhu J, Wu J, Frizell E, Liu S, Bashey R, Rubin R, Norton P, Zern M : Rapamycin Inhibits hepatic stellate cell proliferation in vitro and limits fibrogenesis in an in vivo model of liver fibrosis. *Gastroenterology* 117 : 1198 - 1204, 1999
- 20) Sugawara H, Ueno T, Torimura T : Inhibitory effect of OPC-15161, a component of fungus *thielavia minor*, on proliferation and extracellular matrix production of rat cultured hepatic stellate cells. *J Cell Physiol* 174 : 398 - 406, 1998
- 21) Kahari VM, Chen YQ, Su MW, Ramirez F, Uitto J : Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma suppress the activation of human type 1 collagen gene expression by transforming growth factor-beta 1. Evidence for two distinct mechanisms of inhibition at the transcriptional and posttranscriptional levels. *J Clin Invest* 86 : 1489 - 1495, 1990
- 22) Rockey DC, Maher JJ, Jarnagin WR, Gabbiani G, Friedman SL : Inhibition of rat hepatic ipocyte activation in culture by interferon-gamma. *Hepatology* 16 : 776 - 784, 1992
- 23) Baroni GS, D'Ambrosio L, Curto P, Casini A, Mancini R, Jezequel AM, Benedetti A : Interferon gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis. *Hepatology* 23 : 1189 - 1199, 1996
- 24) Sakaida I, Uchida K, Matsumura Y, Okita K : Interferon gamma treatment prevents procollagen gene expression without affecting transforming growth factor beta 1 expression in pig serum-induced rat liver fibrosis in vivo. *J Hepatol* 28 : 471 - 479, 1998
- 25) Hellemans K, Grinko I, Rombouts K : All-trans and 9-cis retinoic acid alter rat hepatic stellate cell phenotype differentially. *Gut* 45 : 134 - 142, 1999
- 26) You H, Wang B, Wang T : Proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells and effect of compound 861 on liver fibrosis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 8 : 78 - 80, 2000
- 27) Fischer R, Schmitt M, Bode JG : Expression of the peripheral-type benzodiazepine receptor and apoptosis induction in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 120 : 1285 - 1288, 2001
- 28) Wright MC, Issa R, Smart DE, Trim N, Murray GI, Primrose JN, Arthur MJ, Iredale JP, Mann DA : Gliotoxin stimulates the apoptosis of human and rat hepatic stellate cells and enhances the resolution of liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 121 : 685 - 698, 2001
- 29) Shay JW, Pereira-Smith OM, Wright WE : A role for both RB and p 53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res* 196 : 33 - 39, 1991
- 30) Harley CB : Telomere loss : mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 256 : 271 - 282, 1991
- 31) Hiyama E, Hiyama K, Yokohama T, Ichikawa T, Matsuura Y : Length of telomeric repeats in neuroblastoma : Correlation with prognosis and other biological characteristics. *Cancer Res* 53 : 159 - 164, 1992
- 32) Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW : Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 11 : 1921 - 1929, 1992
- 33) Shiratani Y, Hiyama K, Ishioka S, Inyaku K, Awaya Y : Alteration in length of telomeric repeats in lung cancer. *Lung*

Cancer 11 : 29 – 41, 1994

- 34) Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD : Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266 : 2011 – 2015, 1994
- 35) Collins K, Kobayashi R, Greider CW : Purification of tetrahymena telomerase and cloning of genes encoding the two protein components of the enzyme. *Cell* 81 : 677 – 686, 1995
- 36) Rbollo A, Rebollo A, Merida I, Gomez J, Pitton C, Silva A, Martinez C, Garcia A : Differential effect of rapamycin and cyclosporin A in prolifera ; Differential effect of rapamycin and cyclosporin A in proliferation in a murine T cell line expressing either intermediate or high affinity receptor for IL-2. *Cytokine* 7 : 277 – 286, 1995
- 37) Shi Y, Frankel A, Radvanyi LG, Penn LZ, Miller RG, Mills GB : Rapamycin enhances apoptosis and increase sensitivity to cisplatin in vitro. *Cancer Res* 55 : 1982 – 1988, 1995
- 38) Hosoi H, Dilling MB, Shikata T, Liu LN, Shu L, Ashmun RA, Germain GS, Abraham RT, Houghton PJ : Rapamycin causes poorly reversible inhibition of mTOR and induces p 53-independent apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Res* 59 : 886 – 894, 1999
- 39) Brunn GJ, Hudson CC, Sekulic A, Williams JM, Hosoi H, Houghton PJ, Lawrence JC Jr, Abraham RT : Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science* 277 : 99 – 101, 1997
- 40) Hosoi H, Dilling MB, Liu LN, Danks MK, Shikata T, Sekulic A, Abraham RT, Lawrence JC Jr, Houghton PJ : Studies on the mechanism of resistance to rapamycin in human cancer cells. *Mol Pharmacology* 54 : 815 – 824, 1998
- 41) Sabers CJ, Martin MM, Brunn GJ, Williams JM, Dumont FJ, Wiederrecht G, Abraham RT : Isolation of a protein target of the FKBP 12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem* 270 : 815 – 822, 1995
- 42) Gressner AM : The up-and-down of hepatic stellate cells in tissue injury : apoptosis restores cellular homeostasis. *Gastroenterology* 120 : 1285 – 1288, 2001
- 43) Issa R, Williams E, Tirm N : Apoptosis of hepatic stellate cells : involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut* 48 : 548 – 557, 2001
- 44) Tirm N, Morgan S, Evans M : Hepatic stellate cells express the low affinity nerve growth factor receptor p 75 and undergo apoptosis in respons to nerve growth factor stimulation. *Am J Pathol* 156 : 1235 – 1243, 2000
- 45) Kagawa S, Chao H, Jian Gu, Parericia Koch, Suk-Joo, Jack A Roth, Steven A Curley, L Clifton Stephens, Bingliang Fang : Antitumor Activity and Bystander Effect of the Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) Gene. *Cancer Res* 61 : 3330 – 3338, 2001