

繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG 1 蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明

国立成育医療センター 消化器科医長 香坂隆夫

JAG1 遺伝子はアラジール症候群（肺動脈狭窄と肝内胆管形成不全が二大症状）の責任遺伝子であるが、心奇形疾患と肝疾患の単独症状のみの患者で検討し、新生児肝炎や胆道閉鎖症、劇症肝炎に JAG1 遺伝子の missense mutation 異常を見出し、肝疾患により関連している結果を得た。肝障害における JAG1 遺伝子の役割を明らかにするため、NF κ B 系と Notch-JAG1 pathway との関連を調べた。In vitro の系で TNF α の刺激による肝細胞株（Huh7）の IL-8, IL-6 産生系を検討し、IL-8 産生に JAG1 遺伝子、蛋白が抑制的に働いていることを見出し、さらに Notch-JAG1 pathway は NF κ B 系を介して調節因子として働いているという結果を得た。

アラジール症候群を含め慢性肝障害は、肝繊維症、肝硬変へ進展する。本症に限らず、臓器障害は臓器が繊維化の後、臓器不全に進展する。この機序を解明するために、線維細胞と炎症性細胞の相互関係を検討した。今回は 線維細胞の放出する因子の THP-1 に対する作用を検討し、結果として、MTT 法による増殖分化、IL-8 の産生亢進、THP-1 細胞自身の CD14、CD11b の発現増強の効果を確認した。この効果は臓器間の相違は顕著でなく、JAG1 遺伝子およびその産物の影響が認められた。

分担研究者

株式会社 ユーエムエー

多々納 俊雄

A. 研究目的

JAG1 遺伝子は、アラジール症候群（AGS）の責任遺伝子であることが証明され、この症候群は肝内胆道障害と肺動脈狭窄が二大症状である。肝疾患のみと肺動脈狭窄のみの患者について調査を行い、肺動脈狭窄には JAG1 遺伝子異常が認められず、胆道閉鎖症や劇症肝炎、乳児期、新生児期の肝疾患において 10% に異常遺伝子を見出した。

本疾患でも成人例では、肝細胞障害が持続

する。AGS の JAG1 遺伝子異常が胎生期以降も肝障害の持続に対する役割について検討するため、in vitro の系における JAG1 遺伝子の炎症系に対する効果について検討した。

さらに、臓器が繊維化の後さらに臓器不全にいたる進展機序に関する検討した。繊維細胞自身が増殖により、炎症を促す物質を産生し、新たな免疫反応を引き起こす機序を想定した。これらの臓器障害の進展の機序を明らかとするためには、線維細胞と炎症性細胞の相互関係を知る必要がある。 繊維芽細胞の産生する

macrophage 活性化因子を同定し、この物質が炎症-繊維化の機序での役割について検討した。さらにこの繊維細胞の放出する増殖因子の制御機序の解明を通して、炎症臓器の繊維化の進展を阻止する方向性を見極める。その抑制、調節の機構の一つとして、Notch-JAG1 pathway の生後における働き、特に NF κ B との関連を追及した。臨床的な検討からJAGの変異や欠損が AGS や胆道閉鎖症において、重篤例-繊維化進行例に見られることより、繊維化の抑制におけるJAG1 遺伝子、蛋白の役割の解明は末期臓器障害の予後改善に重要と考えられる。

肝硬変症や腎硬化症など臓器繊維化へ移行した時点では、対症的保存療法以外に積極的な治療方法がないのが現状である。繊維化進行の機序解明と治療により、移植や透析など患者への負担の大きい治療への移行を遅らせることを目標とする。さらに JAG1 遺伝子異常と疾患との臨床調査では、テーラーメイド医療に役立つ結果を得ることを目的とする。

B. 研究方法および対象

1. 研究材料

線維細胞として、ACHN、Hucct1、Huh7、KMST 細胞、3T3 細胞は東北大学加齢研究所、細胞工学センターより譲渡されたものを使用した。また、ヒトのサンプルとしては、口腔粘胞の培養細胞、腫瘍摘出部分の肝線維細胞、腎線維細胞はそれぞれ腫瘍摘出の際に得られたサンプルを継代培養されていたものを用いた。

2. 検体の処理

検体はエタノールで注出後、沈殿して溶解

し、DNA を得た

3. JAG 遺伝子の作成および導入、

JAG1 蛋白、JAG2 蛋白の作成、遺伝子導入、JAG mutant 遺伝子の作成では JAG 蛋白の C 末端に Flag-tag をつけたものを作成した。HUCCT1、Huh7、3T3 細胞、KMST 細胞に JAG1 遺伝子、JAG2 遺伝子を導入した。その詳細はすでに発表した方法に準じて行った。

3. MTT、WST-1 の方法

MTT 法 (WST-1) による THP-1 細胞の刺激実験では、上記の条件で培養した上清を 5×10^5 の THP-1 培養液に添加して 100μ l となるように調節した。上清 50μ l を用いて、IL-8 の測定を行った。IL-8 測定系は、ELISA 法を用いた。各種臓器の線維細胞の検討においては 0.014% neutral red 液を各 well に 100μ l 入れ、培養後、培養液を除去し、吸光度計で 570nm の吸光度を測定した。THP-1 細胞については、FACS analysis により、CD14、CD11b の変化を調べた。

4. TNF α で刺激実験

ACHN、Hucct1、Huh7 に対して TNF α で刺激したときの細胞増殖能を評価した。Notch の発現、刺激に対する反応 JAG1 mutant 蛋白の効果について antiFlagIgG を固定し、3T3 mutant の上清を添加して mutant 蛋白が固相に固定される条件下でおこなった。

上清を用いて、IL-8 の測定を行った。IL-8 測定系は、ELISA 法を用いた。

ルシフェラーゼアッセイ、NF - κ B gel shift assay についてはすでに発表した方法に準じて行った。

倫理面への配慮

患者の検体を研究目的に使用するに当たり、国立小児病院の倫理委員会の許可を得た。さらに小児であることも考慮し、代諾者への説明だけでなく、小児にもわかりやすい文章を作成し、今の段階では意義は明確でないこと、将来の機序解明に役立つ可能性のあることから、研究に協力してほしい旨を伝え書面で了解を得た。現在、成育医療センターでは、ウィルス特異的 T 細胞に対する研究に引き継がれ、検体の採取をお願いしている。これに関しては成育医療センターの倫理委員会の許可を得ている。

C. 研究結果

1. 肺動脈狭窄と新生児期発症の肝炎における JAG 1 遺伝子異常の分布の比較

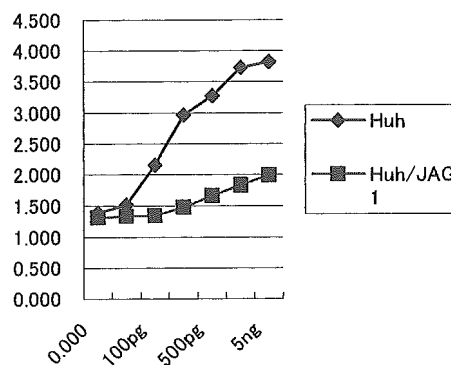
心疾患と肝疾患において、JAG 1 遺伝子異常を調べた。その結果では、肺動脈狭窄例 23 例では異常例なく、胆道閉鎖症に JAG 1 の異常が 10% 存在することより、肝疾患に対するスクリーニングを 3 年間にわたり遂行した。JAG1 遺伝子異常が胆道閉鎖症で 10%、新生児肝炎でも 10%、劇症肝炎では 5% に見出されることを臨床検体によって確認した。とくに胆道閉鎖症においては重症例に偏位していることを見出した。

2. 各種細胞における TNF α の効果

TNF α は肝炎においては一次的な炎症性サイトカインであり、アポトーシスの誘導など、劇症肝炎などで中心的な役割を果たす。ACHN、HUCCT1、Huh7 に対して TNF α で刺激したときの細胞増殖能を評価した結果、その細胞も増殖能の変化を認めず、

同時に刺激したときの IL8 産生は、各細胞とも TNF α の濃度に比例して、IL8 産生が増加した。Huh7、Huh7/JAG1 細胞を TNF α で刺激したときの細胞増殖結果は Huh7 の細胞増殖は 0→1.0 ng/ml まで漸増が観察され Huh7/JAG1 の細胞増殖は 0→0.25ng/mL で漸増し、0.25→5.0ng/ml で低下した。ELISA での IL8 産生増強効果では、IL8 産生は 24 時間では TNF α の濃度に比例して上昇する (図 1)。

図 1. The different IL-8 production between Huh7 and Huh7/JAG1 under the condition of TNF stimulation



3. 各種細胞における JAG1 蛋白の添加による効果

ACHN、Hucct1、Huh7 に対して TNF α (1.0 ng/ml) で刺激と同時に JAG 蛋白 (JAG1、JAG2、JAG1+JAG2) を添加することで細胞増殖能、IL8 産生能がどのように変化するかを評価した。JAG 1 蛋白を固相に固定化した well にこれらの細胞および TNF α を添加して上清中への IL8 の産生および細胞の活性化を比較した。各種細胞の細胞増殖能の結果は、ACHN では JAG1、JAG2、JAG1+JAG2 を加えることで増加傾

向を示したが有意ではなく、HUCCT1、Huh7 では変化が認められなかった。

IL8 産生能の評価では、JAG1 蛋白はどの細胞においても TNF α の刺激下において 40-80%程度の IL8 産生抑制することが示された。JAG2 に関しては細胞の種類により相違が認められた。JAG1 の添加は TNF α 250 p g ~ 500 p g ではっきりした差が認められた。この変化は 1×10^6 あたりの細胞数で比較すると明らかで、TNF α の刺激はアボトース系よりも NF- κ B 系に強く関連しており、JAG1 はこの作用を抑制することが示された。

4. JAG 蛋白および JAG1 遺伝子導入による Huh7 細胞の変化

TNF α による効果が顕著で、JAG1 に特異的な抑制が認められる点より Huh7 細胞を用いて実験をおこなった。

TNF α で刺激により Huh7 の細胞増殖能、IL8 産生能の増加が認められるが、JAG 蛋白を添加することによる変化を検討した。結果は、細胞増殖能は変化しなかったが、IL8 産生能は JAG1 蛋白添加で明らかに抑制された。JAG1 導入した細胞は TNF α に対して IL8 産生の増加が著しく低かった。

5 JAG1 蛋白、JAG1 遺伝子導入による細胞内伝達機構の変化

Huh7 の細胞内伝達機構の変化を NF κ B の変化、ルシフェラーゼアッセイによって検討した。ルシフェラーゼアッセイでは時間経過とともに、JAG1 の抑制効果が認められた。一方、遺伝子導入した Huh7 細胞を用いた系での検討では p52 と p65 の変化

について検討した。NF κ B は p50-p52-p65 の complex であるが活性化によってこの複合体が解離する。Huh7 における TNF α 刺激下での、JAG1 蛋白の添加による NF κ B 活性の変化を、ゲルシフトアッセイ (Electrophoretic mobility shift assay) で検討した。その結果、TNF α 刺激による p50 の発現、JAG1 蛋白の添加による p50 の発現抑制が観察された。

JAG1 mutant 遺伝子による効果は、コントロール、polymorphism、AGS に認められた mutant の三種類で検討した。この中で蛋白の変化しないことが知られている 3071 (最もよく認められる polymorphism) は抑制効果が認められないが、DSL region の 592、CR region の 3221 は wild のものに比し、効果は低いものの産生抑制が認められた。以上より、肝炎において見出された missense mutation は JAG の炎症作用が不十分であることが示された。

6. 線維(芽)細胞の THP-1 に対する作用

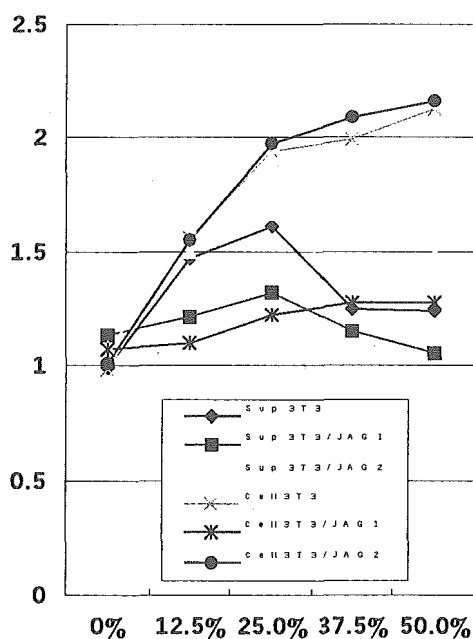
THP-1 の活性化増殖作用;線維細胞の培養上清の添加のもとで、THP-1 細胞培養は 1.5倍から2倍の MTT 法による吸光度の増加が認められた。WST-1 法では、THP-1 細胞培養の結果は、線維細胞の培養上清に比例して増大は認められなかったが、これは細胞の活性化と増殖に両因子に関連し、THP-1 の活性化の結果、ATHP-1 に変化し、増殖と活性化が止まるためと考えられた。サイトカインの産生能の変化に対する検討; IL-1、IL-6、TNF α 、IL-8 の産生系では、IL-8 の産生がもつとも顕著な変化が認められた。IL-8 の産生亢進は、線維細胞の培養上清の量的依存性に増大が認められた。

THP-1 の細胞に対する効果;以上のことにより、増殖よりも活性化された状態への移行が強いことが示唆された。FACS analysis によって、CD11bの出現が認められた。これらの作用は、Toll like receptor を介する LPS、IgG の凝集による FC receptor でも認められた。さらに THP-1 の成熟型とされる ATHP-1 では、CD11bの発見が始めから認められ、かつ上記の3種の刺激に対しても変化がない。

7. JAG 遺伝子の線維細胞に対する物質

JAG1 遺伝子の線維細胞への導入によって、培養上清に THP1 を活性化する因子の産生は抑制されてしまうが、JAG2 遺伝子導入細胞では無変化であった。また JAG 蛋白の効果でも THP1 の培養系に加えても影響はなく、3T3側に添加したときのみ限定的な有効性が認められた(図2)。

図 2. The different dose dependent increase of cell proliferation (MTT) according to co culture with cells and supernatan



以上のことより、THP-1 を活性化する因子は線維細胞の産生系で、JAG1 の pathway の調節を受けていることが示された。

D. 考察

臨床調査では JAG1 遺伝子が AGS の責任遺伝子であることを確認し、その遺伝子異常が胆道閉鎖症や新生児肝炎、劇性肝炎にも認められていることを示した。JAG1 遺伝子が AGS の責任遺伝子であることは、数カ所の施設から報告され既知の事実である。さらに我々は、肺動脈狭窄 25 例には異常が認められず、胆道閉鎖症や劇性肝炎において 10% に異常遺伝子を見出し、胆道閉鎖症においては重症例、予後不良例に有意に多く、炎症の持続、繊維化の亢進と関連していることを示した。JAG1 遺伝子異常は肺動脈狭窄の患者の患者に見いだされたとの報告はあるものの、今回の比較研究では肝疾患例により関連していると考えられた。遺伝子異常変異は、肝炎、胆道閉鎖症に認められた missense mutation と AGS の異常の主流をなす deletion の相違があった。このため missense mutation の働きについて検討し、IL-8 の産生調節作用では、その抑制が半減していることを確認し、他の報告と同様 missense mutation の働きは wild type と異なることを立証できた。

JAG1 遺伝子の機序解析の検討では TNF α で刺激した時の細胞増殖能、IL8 産生能の低下によりその機能を知ること

ができる。TNF α は肝炎においては一次的な炎症性サイトカインであり、種々の免疫担当細胞によって放出され、臨床的には劇症肝炎などで中心的な役割を果たす。その機序としては血管系、細胞系への働きによって炎症を亢進させ、それ自身アポトーシスを誘導するが今回の実験においては炎症系への働きについて検討した。Huh7, HUCCT1はそれぞれ肝細胞、胆管細胞由来の確立した細胞株であるが、両者ともTNF α に反応してIL8産生の亢進を示した。なお、他の細胞HepG3やG2などは細胞数の変動、サイトカインの反応の程度は低く、結局TNF α 反応性の高いHuh7を選んで実験をおこなった。その結果、この現象はNotch-JAG1 pathwayを介したJAG1のNF- κ Bの活性化抑制作用によることを明らかにした。

さらにJAG1遺伝子のTHP-1細胞による効果を検討のため、3T3細胞にJAG1遺伝子を導入しその作用を検討中に、3T3細胞の培養液中にTHP-1細胞を活性化する因子の存在を見出した。基礎的検討では多くの繊維細胞樹立株がTHP-1の増殖および分化を誘導する蛋白を放出していること、この因子がJAG1遺伝子導入、およびJAG1蛋白により抑制される現象を見出した。繊維細胞の培養液の作用は、ATHP-1には、何ら影響を与えないことより、分化成熟過程にあるmacrophageに対して、増殖、分化などの影響を与えると考えられた。

これらのin vitroの結果から線維細

胞はTHP-1を活性化する因子を放出していることが示された。様々な肝障害性の機序が生じたときにJAG欠損者では、サイトカインの調節が十分でなく、炎症が持続する機序が想定され、持続する肝障害を引き起こすと考えられる。なぜ肝炎に密接に関連するかについては、今後、肝内のJAG蛋白の発現や免疫担当細胞のJAG欠損による働きの相違などから、検討する必要がある。

この因子は、肝臓、腎臓、皮膚の繊維芽細胞からも放出されており、JAG1蛋白の制御を受けている点でも共通であった。繊維芽細胞の産生するTHP-1活性化因子としては、fibronectinと血清中に含まれる因子やCD137の報告があるが、これらの因子との異同を検討し、異なるものであることを確認した。

今後の研究の方向性としてはMacrophage活性化因子の同定とJAG1の制御機構の解明を通して臓器繊維化への進展を防ぐ臨床に役立つ方向に進めて行きたい。

E. 結論

繊維化を主体とする病変特に末期臓器不全-肝硬変-腎硬化症などの病勢に関与する因子について臨床基礎の両面から検討した。とくに繊維細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1遺伝子との相互関連を検討した。

JAG1遺伝子異常は胆道閉鎖症や劇症肝炎、新生児期の肝炎に認められ、肺動脈狭窄などの心疾患よりは肝疾患に異常が認められることを見出し、JAG1遺伝子の肝疾患における役割について検討した。

肝細胞を用いたサイトカイン産生の *in vitro* の結果では、JAG1 遺伝子およびその蛋白質は、TNF α の刺激による IL-8、IL-6 の産生亢進を抑制していた。この作用は NF- κ B の活性化抑制によるものであった。線維細胞の放出する液性因子の THP-1 に対する作用を検討し、増殖分化、IL-8 の産生亢進、THP-1 細胞自身の CD14、CD11b の発現増強の効果を確認した。この繊維細胞の放出する macrophage 活性化因子の産生は JAG1 遺伝子およびその産物の調節を受けていると考えられた。臓器間の線維細胞の相違は顕著でなく、末期臓器不全の免疫反応の経過を説明する機序と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kano H, Ito Y, Matsuoka K, Nakajima T, Iwata T, Kohsaka T, Saito H, Abe J. Critical role of T cell migration in bacterial superantigen-mediated shock in mice. *Clin Immunol.* 2004 Feb;110(2):159-71.

2: Nakamura A, Imaizumi A, Yanagawa Y, Kohsaka T, Johns EJ., beta(2)-Adrenoceptor activation attenuates endotoxin-induced acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Feb;15(2):316-25.

3: Donadini R, Wahlberg M, Kohsaka T, Ito Y, Fields BA. Related Articles, Links Crystallization and preliminary X-ray analysis of *Yersinia pseudotuberculosis*

-derived mitogen.

Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2003 Jul;59(Pt 7):1330-2. Epub 2003 Jun 27.

4: Nakamura A, Imaizumi A, Yanagawa Y, Niimi R, Kohsaka T, Johns EJ.

Beta2-adrenoceptor activation inhibits Shiga toxin2-induced apoptosis of renal tubular epithelial cells.

Biochem Pharmacol. 2003 Jul 15;66(2):343-53.

5: Abe J, Kano H, Nogami H, Matsumoto S, Baba K, Saito H, Kohsaka T. Pathogenic role of a superantigen in *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Adv Exp Med Biol.* 2003;529:459-61

6: Kano H, Ito Y, Matsuoka K, Iwata T, Saito H, Kohsaka T, Abe J. Role of T cells and gamma interferon in *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen (YPM)-induced toxicity in mice. *Adv Exp Med Biol.* 2003;529:137-9.

7: Nakamura A, Imaizumi A, Yanagawa Y, Niimi R, Kohsaka T. Suppression of tumor necrosis factor-alpha by beta2-adrenoceptor activation: role of mitogen-activated protein kinases in renal mesangial cells. *Inflamm Res.* 2003 Jan;52(1):26-31.

2. 学会発表

2004年東京(第31回日本小児栄養消化器肝臓病学会)、2004年9月18日

胆道閉鎖症におけるウイルス感染の意義

田川 学、肥沼 幸、香坂隆夫

2004 年東京（第 31 回日本小児栄養消化器
肝臓病学会）、2004 年 9 月 18 日

胆道閉鎖症術後の妊娠 7 例の臨床経過とそ
の検討

肥沼 幸、田川 学、黒田達夫、村島温子、
北川道弘、香坂隆夫