

HHStcC細胞を継続的に培養すると老化することが観察された。今後、モデルとして評価される必要があるが、ヒト肝線維化の分子機序の理解を促進すると推察された。

#### E. 研究発表

今回の研究内容についてはなし

#### F. 知的財産権の出願

今回の研究内容についてはなし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服政策研究事業）

分担研究報告書（平成 25 年度）

肝星細胞脱活性化剤開発による肝硬変の肝機能改善と肝発がん予防

研究分担者：祝迫恵子 京都大学大学院医学研究科 特定講師

分担研究課題：薬剤効果検討に用いる初代培養肝星細胞の分離法について

研究要旨：肝線維症は、肝臓において活性化した肝星細胞が産生するコラーゲンを主とした細胞外基質 (ECM) の蓄積であり、この病態反応は、ほぼ全ての原因による慢性肝炎に共通である。慢性肝炎の終末像は肝硬変、肝がんであり、治療は肝移植を除けば対症療法のみである。肝線維化の進行を阻止し、肝機能改善と肝発がんを予防する治療戦略として、本研究では肝星細胞の脱活性化剤開発を目標としている。分担者は、線維化モデル動物を用いた基礎的な解析を基に活性化星細胞の脱活性化のための治療標的の検索を行う。

## A. 研究目的

慢性肝炎病態では組織の傷害と修復反応が繰り返されている。持続的な修復反応の一つに、筋線維芽細胞による細胞外マトリクス (extra cellular matrix: ECM) の産生・沈着があるが、肝内での過剰な ECM 沈着には、肝実質細胞の絶対数の減少が伴い、肝機能低下をもたらす。さらに近年、詳細は不明なもの、ECM 沈着が細胞癌化を促進する可能性も示されている。これらに加え、肝線維化・肝硬変が進行して重篤な肝機能不全に陥ると、現在のところ肝臓機能を人工的に代替する医療は完成されていないため、肝移植しか治療の手立てがない。このため、肝硬変の進行を食い止めることは、患者の QOL を考える上でも、医療経済学的にも大きな意義をもつ。

肝星細胞は、慢性肝障害に応じて活性化され、コラーゲンを主体とした ECM を盛んに分泌して組織の線維性瘢痕変性を導く。このように肝星細胞は、肝傷害時に増殖してコラーゲンを産生することから、慢性肝炎における肝線維化の

責任細胞と目されている。しかし、広範の研究にもかかわらず、活性化した星細胞を静止期の星細胞に“脱活性化”する有効な薬剤は見出されていないのが現状である。

そこで、線維化モデルマウスを用いた基礎的な解析を基に、活性化星細胞の“脱活性化”を誘導するメカニズムの検討を行う。

## B. 研究方法

本研究では、C57B/6 マウスを用いて、2 種類の肝線維化モデルを作成した。四塩化炭素による肝線維化は、コーンオイルにより 4 倍希釈した四塩化炭素  $2 \mu\text{l/body weight g}$  を 3 日毎に計 12 回経口投与、Bile duct ligation モデルは、全身麻酔下に開腹し、総胆管を結紮切離して 3 週間飼育した。

線維化刺激を加えた個体から各々採取した活性化星細胞の評価と正常肝から分離した静止期の星細胞との性状比較解析を行った。

遺伝子組換え動物の扱いは、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の

確保に関する法律」と、その関係法令に従い、適切な拡散防止措置を講じて行うこととした。具体的には、京都大学組換え DNA 実験安全管理委員会の承認を経て、「京都大学組換え DNA 実験安全管理規程」と「京都大学組換え DNA 実験安全管理規程施行細則」に沿って実施する。動物実験は、京都大学医学系研究科・動物実験委員会の承認を経て、「京都大学における動物実験の実施に関する規程」と「京都大学大学院医学研究科・医学部における動物実験の実施に関する規程」に沿って行うものとした。

### C. 研究結果

C57B/6 マウスを用いて、四塩化炭素投与、bile duct ligation を行い、肝線維化を作成した。Collagenase 2-step 灌流法およびナイコデントによる密度勾配遠心法にて、肝星細胞を採取した。四塩化炭素投与モデルでは、従来の腹腔内投与では腹膜炎を誘発する為、門脈へのカニューレーション時に周囲の腸間膜から出血をきたすことがあったが、今回のモデルでは経口投与としたため、腹膜炎所見がなく開腹時の手術操作性が改善された。また、総胆管結紮モデルにおいても、膵管合流部より十分に距離を取って肝門部側で総胆管を二重結紮、切離とするなどの工夫を加え、門脈血流の障害や膵炎などの合併症を回避した。

Collagenase 2-step 灌流法およびナイコデントによる密度勾配遠心法による星細胞の分離は、星細胞がビタミン A を含有した油滴を持っているため細胞密度が小さいことに基づいて行われている。ところが、線維化刺激を受けた肝臓内では、TGF- $\beta$ 1 などの刺激を受けて活性化した星細胞が、ビタミン A を含む油滴を放

出するといわれている。そのため、今回、線維化刺激を加えた個体から肝星細胞を分離するにあたっては、ナイコデントの濃度を 8.3% から 10% に上げて分離を行い、さらに星細胞以外の分画（クッパー細胞、類洞内皮細胞）と肝星細胞の分画を各々採取して、純度を RT-PCR により検討した（図 1）。

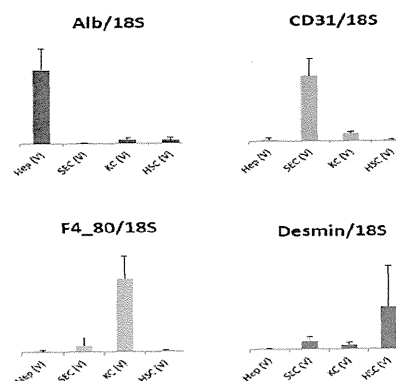


図 1 四塩化炭素投与による線維肝から分離した細胞分画の純度. Hep: 肝細胞、SEC: 類洞内皮細胞、KC: クッパー細胞、HSC: 肝星細胞。Alb (アルブミン)、CD31、F4\_80、Desmin は各々肝細胞、類洞内皮細胞、クッパー細胞、肝星細胞に特異的に発現することから純度の指標として用いた。この結果から、分画間の純度は保たれており、活性化して油滴を放出した星細胞分画も高い純度で分離され、他の分画へコンタミネーションは、限定的であると考えられた。

### D. 考察

肝星細胞は活性化する際、ビタミン A を含有する細胞内の油滴を放出するといわれているが、他の分画と比較してやはり密度は小さく、Collagenase 2-step 灌流法およびナイコデントによる密度勾配遠心法によって高い純度で分離できることが確認できた。

これまで、肝硬変治療薬の多くは肝星細胞の活性化を抑制することを研究が進められてき

たが、臨床的に有効な薬剤は皆無と言わざるをえないのが現状である。今回の我々の“脱活性化”のコンセプトを検証するためには、in vivo で活性化した肝星細胞を分離して詳細な検討を重ねる必要がある。今回、活性化肝星細胞を高い純度で分離することができたので、今後、これらの細胞に対する薬剤の反応性をはじめとする検討を進める。

#### E. 結論

活性化した肝星細胞を Collagenase 2-step 灌流法およびナイコデンツによる密度勾配遠心法によって高い純度で分離できることが確認できた。

#### F. 健康危険情報

特に無し。

#### G. 研究発表

論文発表

1. Koyama Y, Taura K, Hatano E, Tanabe K, Yamamoto G, Nakamura K, Yamanaka K, Kitamura K, Narita M, Nagata H, Yanagida A, Iida T, Iwaisako K, Fujinawa H, Uemoto S. Effects of oral intake of hydrogen water on liver fibrogenesis in mice. *Hepatology Research*, 2013 (in press)
2. Saito S, Hata K, Iwaisako K, Yanagida A, Takeiri M, Tanaka H, Kageyama S, Hirao H, Ikeda K, Asagiri M, Uemoto S. Cilostazol attenuates hepatic stellate cell activation and protects mice against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. *Hepatology Research*,

2013 (in press).

学会発表

1. Kanta Jobara, Toshimi Kaido, Kosuke Endo, Yoichiro Uchida, Keiko Iwaisako, Akihiro Kawashima, Hajime Sasaki, Shinji Uemoto. Whey-hydrolyzed peptide-enriched immunomodulating diet prevents progression of liver fibrosis/cirrhosis in rats. 48th Congress of European Surgical Research. 2013.5 Turkey (Istanbul)
2. 祝迫 恵子、木下 正彦、濱野 玄弥、野沢 彰紀、西岡 孝芳、浦田 順久、坂田 親治、竹村 茂一、久保 正二 胆汁鬱滞時に誘導されるコラーゲン産生細胞の解析 と抗線維化治療標的の探索. 2013.7 第68回日本消化器外科学会 (宮崎)

#### H. 知的財産研の出願・登録状況

特記すべきことなし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

分担研究報告書（平成25年度）

肝星細胞脱活性化剤開発による肝硬変の肝機能改善と肝発がん予防

研究分担者：Le Thuy 大阪市立大学大学院医学研究科 特任助教

分担研究課題：サイトグロビンの発がんへの寄与の in vivo 解析

研究要旨：サイトグロビン (cytoglobin, Cygb) は当研究室でラット肝星細胞からクローニングした哺乳類第4番目のグロビンである。Cygb<sup>-/-</sup>マウスに diethylnitrosamine (DEN) を投与したところ、マウス肝組織はサイトカインの上昇、高度の線維化を伴って易発がん性を示すことを報告し、Cygb が肝の炎症・線維化と発がんに深く寄与することを提示した。本研究では、ヒトの非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) モデルとして汎用されるコリン欠乏アミノ酸置換食 (CDAA) マウスモデルを用いて、1) NASH 病態形成への Cygb の関与をモデルで明らかにする、2) Cygb 欠損による炎症反応増幅のメカニズムを明らかにする、3) Cygb の肝内酸化ストレス応答への関与を明らかにする、ことで星細胞に発現する Cygb の肝臓における線維化や炎症反応への関与について in vivo で明らかにする。

#### A. 研究目的

我々の研究グループではラット肝星細胞に発現する蛋白質を 2D-PAGE とマスマスペクトロメトリーを用いて網羅的解析した結果 (Hepatology 2000;32:268)、21 kDa の新しい蛋白質を同定し、その遺伝子を *stap* (stellate cell activation associated protein) と報告した (J Biol Chem 2001;276:25318, Accession number NM\_130744)。本蛋白質のアミノ酸配列はミオグロビン (myoglobin, Mb) と約 30% の相同性があり、細胞質内に存在することから現在ではサイトグロビン (cytoglobin, Cygb) と呼ばれている。リコンビナント Cygb を作製して結晶化し、その 3 次元立体構造を決定したところ 8 つのヘリックス構造からなり、1 分子のヘムを含有することが判り、Mb、ヘモグロビン (Hb)、ニューログロビン (Ngb) に次いで哺乳類 4 番目のグロビンであると判明した (J Mol Biol 2004;339:873; Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2006;62:671)。Cygb は静止期の

星細胞にも発現し、星細胞の活性化とともに誘導を受けること、また、チオアセトアミドによる肝線維化モデルでは肝組織における Cygb 発現が増加することを観察した (J Biol Chem 2001;276:25318)。一方、ラット全身の免疫染色により Cygb は肝星細胞に高発現するのみでなく、膵臓、消化管や腎臓など内蔵諸臓器に存在する pericyte (ビタミン A 貯蔵細胞) にも発現することを見出してきた (Lab Invest 2004;84:91)。

Cygb は Mb に非常に類似した解離定数を保ちながら酸素、一酸化窒素 (NO) や一酸化炭素 (CO) などのガス分子と結合して生体内ガスのリザーバーとなること (Biochemistry 2003;42:5133) や、Cygb がペルオキシダーゼ活性で過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を分解 (J Biol Chem 2001;276:25318) して細胞内酸化ストレス代謝を調節すること、その NO ジオキシゲナーゼ活性により NO がら亜硝酸塩への代謝に関わることが報告された (J Biol Chem

2010;285:23850)。しかしながら、Cygb がどのように肝病態へ関わるのかについては不明な点が多い。

このようなこれまでの研究を背景として、我々は Cygb の生体内における役割を明らかにする目的で Cygb ノックアウトマウス (Cygb<sup>-/-</sup>) を作製した。Cygb<sup>-/-</sup>マウス自体は正常に生まれたが、ジエチルニトロサミン (diethylnitrosamine, DEN) を投与すると、Cygb<sup>-/-</sup>は野生型に比較して増強した肝線維化反応を伴いながら易発がん性を呈すること、さらに、その過程に酸化ストレスの亢進状態が関与することを最近観察した (Am J Pathol 2011;179:1050)。即ち、Cygb の欠損は、DEN 処理下の肝臓において炎症・酸化ストレス・線維化反応を有意に増強させていた。

上記の肝がん誘発物質 DEN を用いた Cygb<sup>-/-</sup>マウスで得られた炎症・酸化ストレス・線維化反応、さらには易発がん性に関する知見をよりヒトの肝病態に近いモデルを用いながら詳細に検討するために、本研究では、1) 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の病態形成、特に、炎症・酸化ストレス・線維化反応、への Cygb の関与をマウスモデルで明らかにする、2) 星細胞における Cygb 発現の意義を肝細胞との相互作用の観点から検証する、ことを目的とする。

## B. 研究方法

平成 25 年度は野生型ならびに Cygb<sup>-/-</sup>マウスにヒトの病態に似たマウス NASH モデルを作製し、Cygb 欠損による肝臓の組織変化ならびに分子変動を詳細に検討した。

(1)マウス NASH モデル：マウス NASH モデルとしてコリン欠乏アミノ酸置換食

(choline-deficient L-amino acid-defined diet, CDAA) を用いた。コントロールとしてはコリンを含有する choline-sufficient L-amino acid-defined diet (CSAA) 投与群を作製した。各種の染色にて炎症反応や線維化反応などのマウス肝組織の変化、浸潤炎症細胞の同定を行うと同時に、肝における分子変動を種々のアレイ (cDNA array、microRNA アレイ、サイトカインアレイ) などで解析した。

(a)組織学的検討：予備的な実験で当方の研究室でマウスに NASH が誘導できるか、また、Cygb<sup>-/-</sup>マウスが CDAA 投与に致死的でないかを 8 週間投与で検討した。HE 染色で野生型と Cygb<sup>-/-</sup>マウス伴に脂肪肝を生じることが確認できた。この段階で炎症細胞浸潤は Cygb<sup>-/-</sup>マウスで増強していること、シリウスレッド染色でコラーゲンの沈着が亢進していることを既に見出している。この結果を受けて、浸潤細胞が、好中球、マクロファージ、リンパ球の何れであるのか、またそのサブセットについて各種免疫染色ならびに、肝臓から分離した細胞の FACS 分析により詳細に検討する。

(b)炎症に関わる分子群の変動：上記の予備的検討により Cygb<sup>-/-</sup>マウスでは CDAA 投与により炎症や線維化反応が増強した NASH が形成されると推測されたためこのメカニズムを詳細に検討するために、以下の項目を調べた。

①炎症性サイトカインの発現プロファイル：炎症反応に主要な役割りを果たすサイトカインとして interleukin (IL)-1, 6, 8, 18、tumor necrosis factor  $\alpha$ 、transforming growth factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) やケモカイン (Ccl-2, 3, 4, 5, Cxcl-1, 2) の発現を野生型ならびに Cygb<sup>-/-</sup>マウスで調べた。

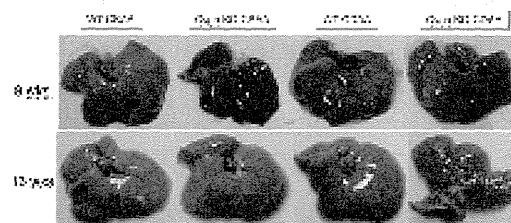
②線維化関連遺伝子：NASH では線維化が惹起されることが特徴である。そのため、以下の分子変動について RT-PCR や immunoblot で検討を加えた。Collagen 1a1, collagen III, fibronectin, transforming growth factor  $\beta$ , connective tissue growth factor, tissue inhibitor of matrix proteinase 1, 2, matrix metalloproteinase 2, 9, 13 など。星細胞活性化との関連で  $\alpha$ -smooth muscle actin や desmin 発現も観察する。

③酸化ストレス関連遺伝子：Cygb は Mb などの他のグロビンと同様、ガスキャリアーとして機能すると同時に活性酸素ラジカル種のスカベンジャーにもなり得る。このため、Cygb 欠損により各種抗酸化・活性酸素代謝酵素群が変動する可能性がある。PCR アレイを用いて網羅的に解析を行い、どの分子変動が顕著になるかを見極め、NASH 病態における Cygb 関与の解明に繋げる。同時に、NO や CO の代謝にも変動が生じる可能性があるため、nitric oxide synthetases (NOSs) や hemeoxygenases (HO-1, 2) の発現も解析した。

### C. 研究結果

(1) CDAA モデルにおける Cygb の関与  
野生型ならびに Cygb<sup>-/-</sup>マウスに CDAA あるいは CSAA を与えてヒトの NASH に近いモデル動物を作製した。

CDAA 投与後 16 週間までの観察では野生型に比較して Cygb<sup>-/-</sup>マウスで炎症ならびに線維化反応の増強が観察された。32 週間まで観察を継続したところ、次の図に示すように、Cygb<sup>-/-</sup>マウスでは肝臓が萎縮しており高度の線維化が生じていると同時に、100%のマウスで腫瘍形



成が確認された。興味深い事に、腫瘍形成に抵抗性であるメスマウスでも同様の結果であった。以上から、Cygb<sup>-/-</sup>マウスは CDAA モデルにおいても易発がん性を呈することが改めて確認された。

Cygb<sup>-/-</sup>マウス肝では CDAA 投与後、IL-1, IL-6, ケモカイン mRNA 発現が上昇していた。また、細胞周期関連遺伝子である Cyclin D1, cJun, cFos mRNA 発現も上昇していた。さらに興味深い事に Cygb<sup>-/-</sup>マウス肝では DHE 染色が陽性で活性酸素 ( $O_2^-$ ) が組織で高発現していること、nitric oxide synthase や heme oxygenase-1 のようなフリーラジカル産生系が up-regulate されていること、また、活性酸素酵素系である myeloperoxidase の過剰発現があることが判明した。即ち、Cygb<sup>-/-</sup>マウス肝ではラジカル反応が強く生じている事が示され、Cygb の存在が肝臓を生理的状況を維持するのに不可欠である事が示された。これらの結果から、抗酸化剤である N-アセチルチステイン (NAC) が CDAA 投与による腫瘍の形成を阻止できるかどうか、などの検討を行っている。

(2) 星細胞の機能における Cygb 存在の意義  
Cygb は静止期の星細胞にも発現が見られるため、Cygb の有無により星細胞機能に差が生じるかどうかについて、野生型ならびに Cygb<sup>-/-</sup>マウス肝臓から初代培養星細胞を分離してその機能比較を行った。その結果、Cygb<sup>-/-</sup>マウス由来の星細胞では活性酸素産生が亢進してい

ることが判明した。また、*Cygb*<sup>-/-</sup>マウス由来の星細胞では、IL-1 やケモカインの mRNA 発現が有意に増強していた。以上のことから、*Cygb*<sup>-/-</sup>マウス由来の星細胞はプライミングを受けており、易刺激性であることが判明した。

#### D. 考察

最近、*Cygb* の発がんへの寄与に関して多様な臓器で報告されている。例えば、肺がんにおける *Cygb* の関与に関しては、プロモーター領域のメチル化やヘテロ接合体の欠損による *Cygb* 発現低下は non-small cell lung cancer (NSCLC) において報告された。即ち、54%の肺癌においては近接する非腫瘍部に比して明らかに低レベルの *Cygb* mRNA 発現が観察され ( $p < 0.001$ )、プロモーター領域のメチル化の程度と *Cygb* 発現が逆相関することが示された。また、*Cygb* mRNA 発現の低下と腫瘍の分化度とに相関が見られ低分化型でより低発現であることが示された (Fisher's exact,  $P = 0.033$ )。同様の知見は head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) や乳癌でも観察された。

Shivapurkar らは NSCLC 30 症例の組織を調べたところ、CYGB 遺伝子のメチル化が 63%で検出され、近隣の非腫瘍部 (18%) に比較して有意に高いことを示した。同様の結果は乳癌、膀胱癌、大腸がん、白血病で観察された。NCI-H661 肺癌細胞株を CYGB shRNA で処理すると細胞増殖が促され、逆に、NCI-H2228 細胞に CYGB を過剰発現させると細胞増殖は抑制され、collagen 1A1, PRPF40A, UCP2, death-associated proteins kinase 1 (DAK1), PYD and CARD domain containing (PYCARD) や DNA-methyltransferase 1 (DNMT1) などがんの

形質維持に必要な遺伝子発現を低下させることが示された。

*Cygb* が腫瘍抑制的であるとする、その効果はグロビンとしてのスカベンジャー効果からがん誘発性物質に由来する酸化ストレスやニトロソ化ストレスを低減し細胞を DNA、蛋白質、さらには膜レベルで保護することが推測される。一方、*Cygb* が発現低下することで、局所炎症や微小環境に変化が生じて、その結果として組織の線維化が生じ無秩序な上皮-間葉相互作用を惹起する。また、慢性的な炎症反応は p53 や MAP キナーゼカスケードに影響して最終的に血管新生、細胞浸潤や DNA 損傷に関与すると想定される。

#### E. 結論

肝星細胞の活性化制御に関して *Cygb* が重要な因子であることが明らかとなってきた。*Cygb* 欠損は肝臓を易発がん性にさせる事が明らかとなった。*Cygb* の発現量を星細胞特異的に変動させ、星細胞をビタミン A 貯蔵型に分化させることが肝細胞再生の素地形成にも繋がらう。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Cytoglobin is expressed in hepatic stellate cells, but not in myofibroblasts, in normal and fibrotic human liver. Motoyama H, Komiya T, Thuy le TT, Tamori A, Enomoto M, Morikawa H, Iwai S, Uchida-Kobayashi S, Fujii H, Hagihara A, Kawamura E, Murakami Y,



- Yoshizato K, Kawada N. Lab Invest. 2014;94:192-207.
2. Relationship between inosine triphosphate genotype and outcome of extended therapy in hepatitis C virus patients with a late viral response to pegylated-interferon and ribavirin. Hai H, Tamori A, Enomoto M, Morikawa H, Uchida-Kobayashi S, Fujii H, Hagihara A, Kawamura E, Thuy le TT, Tanaka Y, Kawada N. J Gastroenterol Hepatol. 2014;29:201-7.
1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。

#### 学会発表

1. Thuy Le, Suoh M, Matsumoto Y, Hirano Y, Motoyama H, Hai H, Tuong T, Urajara Y, Yoshizato K, Kawada N. Progression from NASH to liver cancer in the absent of cytoglobin. International Society for Hepatic Sinusoidal Research, 17<sup>th</sup> International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid. 2013, September 23-25, Osaka, Japan
2. Accelerated liver cancer development in Cytoglobin-deficient mice treated with chemicals/diet via the priming of stellate cells and activation of local fibrosis, inflammation, and oxidative stress. Le TT, Matsumoto Y, Hai H, Yoshizato K, Kawada N. AASLD-The Liver Meeting 2013, November 2-5, Washington DC, USA

#### G. 知的所得権の取得状況

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
河田則文	サイトグロビン研究の現状と展望	日本臨床	71	927-935	2013
河田則文	肝線維化と星細胞	Surgery Frontier	20	72-75	2013
河田則文	肝線維化機序研究の進歩	臨床消化器科	29	421-427	2014
河田則文	サイトグロビン研究の現状	細胞	45	598-600	2013
元山宏行、Le Thi Thanh Thuy、河田則文	肝臓とサイトグロビン	細胞	45	609-612	2013
吉里勝利、河田則文	哺乳類第4番目のグロビン、サイトグロビンの発見	細胞	45	601-604	2013
河田則文	肝硬変 第2章 病理・病態生理 病因	最新医学社 2014 (別冊)		31-38	2014
Motoyama H, Komiyama T, Thuy le TT, Tamori A, Eaton M, Morikawa H, Iwai S, Uchida-Kobayashi S, Fujii H, Hagiwara A, Kawamura E, Murakami Y, Yoshizato K, Kawada N.	Cytoglobin is expressed in hepatic stellate cells, but not in myofibroblasts, in normal and fibrotic human liver.	Lab Invest	94	192-207	2014
Nagamoto Y., Takayama K., Tashiro K., Tateno C., Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Ikeda K., Tanaka Y., Mizuguchi H.	Efficient engraftment of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells in uPA/SCID mice by overexpression of FNK, a Bcl-2L mutant gene.	Cell Transplantation			2014
Saito S, Hata K, Iwaisako K, Yanagida A, Takei M, Tanaka H, Kageyama S, Hirao H, Ikeda K, Asagiri M, Uemoto S.	Cilostazol attenuates hepatic stellate cell activation and protects mice against carbontetrachloride-induced liver fibrosis.	Hepatol Res.			2014

Y-h Taguchi, Murakami Y.	Principal Component Analysis Based Feature Extraction Approach to Identify Circulating microRNA Biomarkers.	PLoS ONE		doi: 10.1371	2013
Murakami Y, Tamori A, Itami S, Tanahashi T, Toyoda H, Tanaka M, Wu W, Brojini N, Kaneoka Y, Maeda A, Kumada T, Kawada N, Kubo S and Kuroda M.	The expression level of miR-18b in hepatocellular carcinoma is associated with the grade of malignancy and prognosis BMC Cancer.	BMC Cancer		13:99	2013
Toyoda H, Kumada T, Kiriyama T, Tanigawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tada Y, and Murakami Y.	Higher Hepatic Gene Expression and Serum Levels of Matrix Metalloproteinase-2 are Associated with Steatohepatitis in Non-alcoholic Fatty Liver Diseases.	Biomarkers	18	82-87	2013
松本佳也、伊丹沙織、村上善基	ウイルス感染と分泌型microRNA	肝疾患 review 2014			2014
村上善基、河田則文、棚橋俊仁、田口善弘	エクソソーム中マイクロRNAを利用した慢性肝疾患診断法の開発	肝胆膵	67巻1号		2013
仲谷和記、池田一雄	肝星細胞研究の変遷とその成果	日本医事新報	4660号.	66-67	2013
Koyama Y, Taura K, Hatano E, Tanabe K, Yamamoto G, Nakamura K, Yamanaka K, Kitamura K, Narita M, Nagata H, Yanagida A, Iida T, Iwaisako K, Fujinawa H, Uemoto S.	Effects of oral intake of hydrogen water on liver fibrogenesis in mice.	Hepatology Research			2013
Hai H, Tamori A, Enomoto M, Morikawa H, Uchida-Kobayashi S, Fujii H, Hagihara A, Kawamura E, Thuy le TT, Tanaka Y, Kawada N.	Relationship between inosine triphosphatase genotype and outcome of extended therapy in hepatitis C virus patients with a late viral response to pegylated-interferon and ribavirin.	J Gastroenterol Hepatol.	29	201-207	2014

日本臨牀 第71巻・第5号（平成25年5月号）別刷

## サイトグロビン研究の現況と展望

河田則文

# サイトグロビン研究の現況と展望

Current situation and future prospect of cytoglobin research

河田則文

## Abstract

Cytoglobin was originally discovered from cultured rat hepatic stellate cells by using proteomics analysis in our laboratory in 2001. Cytoglobin is a hexacoordinate globin that is different from the traditional pentacoordinate globins like myoglobin and hemoglobin. Human cytoglobin has about 25 % amino acid identity with vertebrate myoglobin and hemoglobin, and 16 % with human neuroglobin that is another type of globin present specifically in the nervous system. Besides its function as O<sub>2</sub>, carbon monoxide, and nitric oxide-binding molecule, cytoglobin exhibits antioxidative properties under hypoxic condition. Recent analyses using clinical samples have indicated that cytoglobin may be a tumor suppressor gene because cytoglobin mRNA expression in cancer tissues is down-regulated through hypermethylation of cytoglobin gene promoter. In this review, the history of cytoglobin research, its current status and future prospects will be discussed.

**Key words:** pericyte, gas-binding protein, nitric oxide, cancer, methylation

## はじめに

サイトグロビン(cytoglobin: Cygb)はヘモグロビン, ミオグロビン, ニューログロビンに続く哺乳類第4番目のグロビンである。著者らは肝臓の線維化過程に主要な役割を果たす星細胞の活性化にかかわる分子群を調べる過程で, 2001年当時のデータベースには登録されていないタンパク質をラットからクローニングし, stellate cell activation-associated protein (STAP) と命名した。その後, ヒトおよびマウスからもクローニングされ, そのグロビタンパクとしての機能から現在ではCygbと呼ばれている。グロビタンパクとしての共通機能として, 酸素(O<sub>2</sub>), 一酸化炭素(carbon monoxide: CO)や一酸化窒素(nitric oxide: NO)などガス結合体

として機能する。また, ペルオキシダーゼ様の活性をもつことがわかっている。最近, ヒトのがん組織に発現する遺伝子解析により, プロモーター領域のメチル化によるCYGB遺伝子の発現低下が生じているとの報告が蓄積されており, CYGBががん抑制遺伝子ではないかと議論されるようになってきた。

本稿ではこのようなCygb研究の現状と今後の展望について論じたい。

## 1. サイトグロビンの発見

### 1) Stellate cell activation-associated protein の発見

著者はラット肝臓の線維化にかかわる星細胞(以前は伊東細胞とも呼ばれていた)に発現するタンパク質を網羅的に解析する研究を元広島大

Norifumi Kawada: Department of Hepatology, Graduate School of Medicine, Osaka City University 大阪市立大学大学院医学研究科 肝胆臓病態内科学

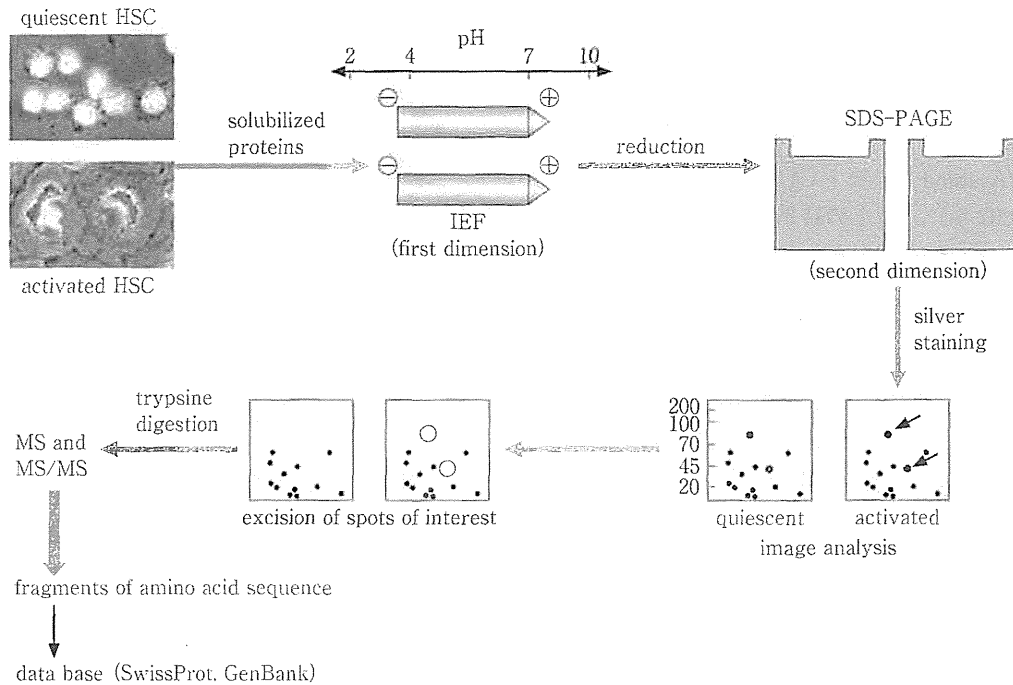


図1 二次元電気泳動を用いた星細胞に発現するタンパク質の網羅的解析を示す模式図

学大学院理学研究科 吉里勝利先生(現在, 同名 誉教授)との共同研究で開始した。すなわち, 静止期星細胞(ビタミンA貯蔵型)と活性化星細胞(コラーゲン産生型)からタンパク質溶液を作製し, 二次元電気泳動で9-18%のアクリルアミド濃度勾配ゲル上にタンパク質を展開した後 silver stainingで染色した。各々のタンパク質スポットを切り出してトリプシン消化後, ペプチド断片をマスマスペクトロメトリーで解析した(図1)<sup>1)</sup>。この研究過程で等電点電気泳動 pI 6, 分子量 21kDa のタンパク質が活性化星細胞で発現上昇していることを見いだした。トリプシン処理して得られたペプチド断片は PGDME(I/L)ER と ANCEDDVGVA であった。SwissProt や GenBank などの公共データベース上でこの2つのアミノ酸断片をもつタンパク質をサーチしたが, 当時はヒットするものがなかった。そこで得られた情報を基として cDNA クローニングを行ったところ 570 bp の遺伝子産物で 190 のアミノ酸から構成され, 予想される分子量は 21,496 の新タンパク質であることがわかった [NCBI

accession No. NM\_130744, *Rattus norvegicus* cytoglobin (Cygb)]。これらの事実から当時は STAP と命名した (2001 年)<sup>2)</sup>。リコンビナント Cygb を作製し, その性質を調べたところ, 吸収スペクトラにおいて 415 nm と 531 nm にピークがみられ, ハイドロサルファイトの存在下では 427, 531, 560 nm に吸収ピークがみられたため, Cygb はヘムタンパクであることがわかった。更に Cygb はペルオキシダーゼ様の活性を所持していた。

## 2) Histoglobin, cytoglobin の発見

2002 年に, アイオワ大学の Trent と Hargrove はグロビンドメインをもつヒト遺伝子をクローニングした結果, histoglobin を見いだした。アミノ酸組成上ヘモグロビン (hemoglobin: Hb) とは 30% 未満の相同性があり, 神経系に発現するニューログロビン (neuroglobin: Ngb) とは異なり多様な臓器に mRNA 発現がみられると報告した<sup>3)</sup>。Burmester らは *Drosophila* グロビンのアミノ酸配列情報を基とする BLAST 解析でヒトとマウスの新しいグロビンをクローニングしてサ

イトグロビン(cytoglobin: Cygb)と命名した(2002年)。彼らもCYGB mRNAがヒトの多様な臓器に発現することを見だし、STAPはCYGBのラットでのホモログであると提唱した<sup>4)</sup>。AsahinaらもヒトCYGBをクローニングした(2002年)<sup>5)</sup>。以上の結果、ヒト、マウス、ラットのCygbが同定された。

## 2. サイトグロビンの生体内分布

ヒトを含む脊椎動物ではHb, ミオグロビン(myoglobin: Mb), NgbとCygbの4つのグロビンの存在が明らかとなった。すなわち、Hbは赤血球に存在し酸素(O<sub>2</sub>)の全身への運搬に寄与する。Mbは心筋や骨格筋などに存在し、O<sub>2</sub>の細胞内貯蔵やミトコンドリアへの拡散に寄与することやNOの代謝に関与することが想定されている。Ngbは中枢ならびに末梢の神経組織や眼の網膜に発現するグロビンである。脳での発現には差があるとされており、視床下核に高発現し、海馬と小脳では発現が低い。また、下垂体、副腎や精巣のような内分泌臓器での発現も報告されている。

Cygbは多数の臓器に発現することが当初からわかっていた。上述したように著者らはラット肝臓の星細胞からCygbをクローニングした。ラットの肝臓においては傍類洞に存在する星細胞に特異的に発現し、活性化とともに線維化肝の線維性隔壁部に高発現する。肝細胞、内皮細胞やKupffer細胞での発現はみられない。ヒト肝臓でも星細胞に特異的に発現している。肝臓以外の臓器では、膵臓、脾臓、腎臓、消化管などに発現しているが、免疫電子顕微鏡を用いた詳細な検討の結果、ラットにおけるCygb発現細胞は毛細血管の周皮細胞(pericyte)であることがわかった<sup>6)</sup>。星細胞も含めてこれらの細胞はビタミンA貯蔵能をもつことが興味深い。更にCygbは軟骨細胞、骨芽細胞や骨細胞にも発現する<sup>7)</sup>。これらすべての細胞に共通する特徴としてコラーゲン線維を産生できることであるが、Cygbのコラーゲン産生への関与についてはまだ明らかでない。GeuensらはCygbが細胞核に存在するグロビンであると報告したが、使



図2 サイトグロビンの立体構造  
(Wikipediaより)

用した抗体の特性ではないかと考えられている。また、最近、Kugelstadtらは、ニワトリを用いた研究から、CygbがNgbと同様、目の組織にも発現すること、また、ニワトリの目にはマウスCygbとアミノ酸配列上35%の相同性をもつeye-globin(GbE)が存在すると報告した。

## 3. サイトグロビンの構造と機能

### 1) サイトグロビンの立体構造

アミノ酸配列上、ヒトCYGBは190アミノ酸残基で構成され、150アミノ酸残基で構成される脊椎動物MbやHbに比べて分子量が大きい。それぞれ25%、16%の相同性がある。また、ヒト、マウス、ラットなどの哺乳類ではCygbのアミノ酸配列は90%以上で保存されている。CYGBが結晶化され、その3次元立体構造が明らかにされたが、それは8つのヘリックスから構成されるthree-over-three  $\alpha$ -helical sandwich構造をしており、Mb構造と一致することが明らかとなった(図2)<sup>8)</sup>。また、結晶化したCYGBはCys38(B2)とCys83(E9)のCys-Cys結合により二量体を形成する。CYGBの構造的な特徴はヘムを含有することであるが、その特徴としてHis111(F8)とHis81(E7)のイミダズール基が第5、6の軸リガンドとしてヘム鉄に結合していることが挙げられる。すなわち、CygbとNgbはビス-ヒスチジル6配位グロビンであ

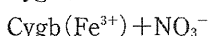
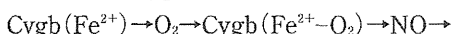
り、5配位グロビンであるMbやHbとは明らかに異なる。系統的解析に基づく原始グロビンから約8億年前にNgbが出現し、約6億年前にMbとHbが出現したと解析される。その後、Mbが筋細胞に分布し、Cygbがpericyteに分布するようになったと考えられている<sup>9)</sup>。

#### 2) サイトグロビンのガス結合能

Mbと同様にCygbはO<sub>2</sub>、COなどのガス分子と結合でき、その解離定数はほぼ同等である。上述したように、Cygbのヘム鉄は6配位されているため、ガス分子がヘム鉄に結合するためにはHis111(F8)あるいはHis81(E7)のどちらかが移動してヘムポケットを形成する必要がある。結晶構造解析などの結果をあわせると、タンパク質の構造変化を伴ってHis81(E7)の方がヘム鉄から離れることでヘムポケットの形態変化が生じることが示された<sup>10)</sup>。このようなCygb立体構造の変化はガス分子の結合に留まらず、オレイン酸がFe<sup>2+</sup>-Cygbに結合する際にも生じ、ヘム鉄の6配位は5配位へと変化して脂質結合空間を生じ、脂質酸化に関与する。

#### 3) サイトグロビンのNO代謝への関与

最近、CygbがNgbと同様に、NO dioxygenase(NOD)活性をもつことが注目されている。NOは毛細血管のトーンスを調節する重要なメッセンジャーであり、L-アルギニンからNO合成酵素によってL-シトルリンとともに産生される。NOは細胞内可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化させ、グアノシン三リン酸(GTP)の高エネルギーリン酸結合部位の切断により生成した環状グアノシン三リン酸(サイクリックGMP: cGMP)はプロテインキナーゼGを活性化する。これによりCa<sup>2+</sup>の細胞内流入は抑制され、ミオシン軽鎖キナーゼが作動できなくなり血管平滑筋は弛緩する。したがってNO濃度の局所調節は微小循環維持に重要である。NOはoxy-Hbやoxy-Mbによって二原子酸素添加(dioxygenation)されることが知られている。最近の研究からCygbにも同様の作用が認められ、



反応を誘導する<sup>11)</sup>。CygbのNOD活性はアスコ

ルビン酸とチトクロムb5の存在で高まる。肝臓の星細胞のような毛細血管pericyteはアクチン-ミオシン系のタンパク質が発現しており、また、活性化すると $\alpha$ -平滑筋アクチンが誘導されて筋線維芽様細胞(myofibroblast)へと形質を変え、細胞の収縮性を増す。これらの細胞においてCygbが発現する意義づけとして興味深い。

一方、最近のLiらの解析によると、極めて低い酸素状態においては、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>からCygbによりNOが産生され、細胞内細胞内グアニル酸シクラーゼが活性化される<sup>12)</sup>。このように、細胞周辺の酸素環境によりCygbとNO代謝との関係は変化するため病態ごとの意義づけが必要である。

#### 4. サイトグロビン遺伝子の発現調節

著者らはラット肝臓から分離した肝星細胞を初代培養した際に星細胞の活性化とともに発現増加するタンパク質としてCygbを発見したが、Cygbの遺伝子発現のメカニズムの詳細は不明であった。

Fordelらは脳、筋肉、肝臓、心臓におけるCygb遺伝子発現が、低酸素下に誘導されることを報告した。このプロセスを調節するのはhypoxia inducible factor-1(HIF-1)でありHIF-1(+/-)knockoutマウスで影響されること、また、HIF-1の制御下にあるvascular endothelial growth factor(VEGF)の発現様式と酷似すること、また、Cygbのプロモーター領域がhypoxia response element(HRE)配列をもつことから示された<sup>13)</sup>。これに対して、LiらはSprague-Dawleyラットを2週間の間10%低酸素状態で飼育すると脳皮質のNgbは発現増加するが、Cygbは変化しないことを観察した。

GuoらはBEAS-2B細胞とHeLa細胞を低酸素(1% O<sub>2</sub>)に曝露するとCYGB mRNA発現がそれぞれ1.7倍(3時間)、1.6倍(6時間)上昇することを観察した。これに対してVEGF発現は経時的に増強した。解析の結果、ヒトCYGB遺伝子の5'-UTR領域には-448と-141の2カ所にHIF-1結合領域が、また、-144にエリスロポエチン(erythropoietin: EPO)結合領域が存在



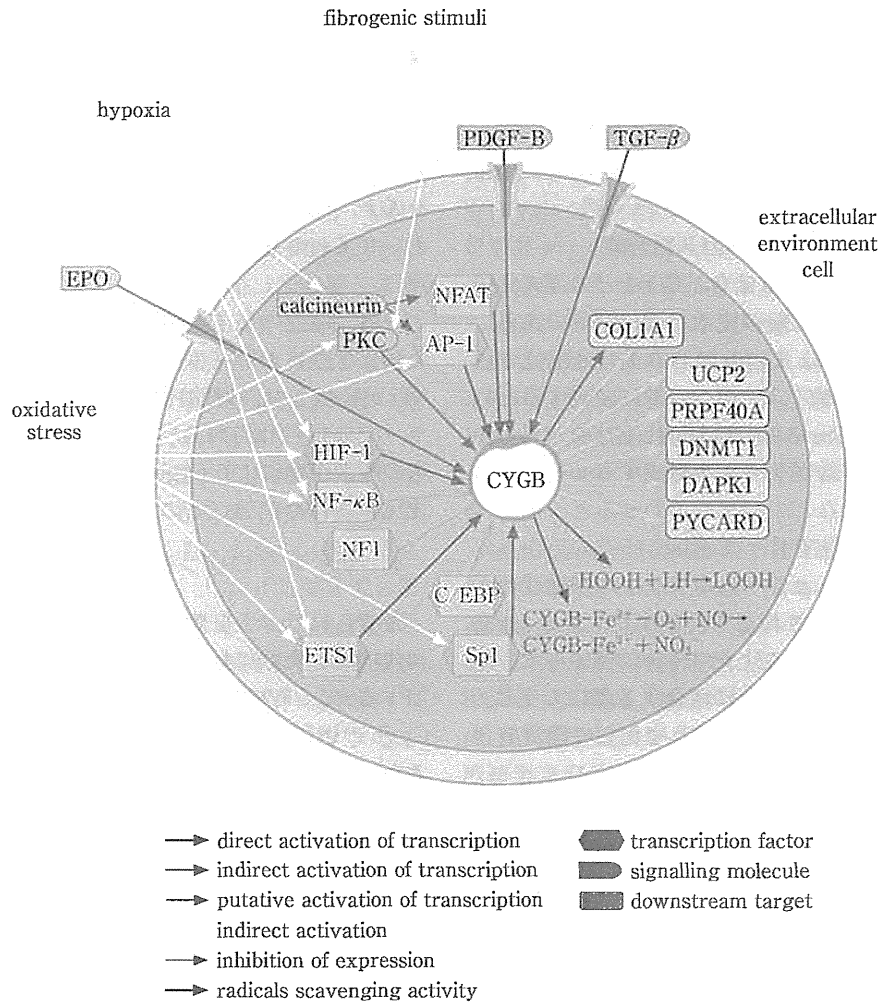


図3 サイトグロビンを中心とする分子間の相互作用図

し、これらはいずれも低酸素によるCYGBの転写に重要であることが示された。-1008に存在するc-Ets-1サイトや-400, -230, -210に存在するSp1結合領域は、低酸素によるCYGB発現には寄与しなかった。

更にSinghらは低酸素状態の心筋細胞においてカルシニューリン依存性の転写因子であるnuclear factor of activated T cell(NFAT)とactivator protein(AP-1)の重要性を示した。カルシニューリンはCa<sup>2+</sup>-カルモジュリンで活性化される重要なホスファターゼであり、心臓の成長/リモデリング、肥大、アポトーシスなどに関係する。解析の結果、低酸素下の心筋細胞

においてはカルシニューリン依存性にAP-1がCygb遺伝子発現を調節し、NFATは同時にCygbのプロモーター領域に結合するか、あるいは、AP-1に結合して遺伝子発現を調節していることを示した(図3)。

### 5. サイトグロビンの病態への関与 ならびにサイトグロビンとがん

#### 1) サイトグロビンと細胞・臓器障害

##### a. 神経系組織とサイトグロビン

FordelらはヒトSH-SY5Y神経芽細胞腫細胞を300μMの過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)に曝露してアポトーシスを誘導したところ、CYGBを過剰発現

させた場合、細胞死を有意に回避させた。Liらは神経細胞N2a細胞を250  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に曝露するとNgbは誘導されないが、Cygbが誘導されることを観察した。この反応は低酸素、カニン酸、高濃度Ca<sup>2+</sup>、高浸透圧、熱ショックでは誘導されず、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>特異的であった。更にsiRNAを用いてN2a細胞のCygbレベルを73.1%低下させると500  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4時間曝露による細胞死が有意に増強された。以上の結果からCygbはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による神経系細胞障害に対して保護的に作用すると結論した。一方、Beltran-Parrazalらは低濃度の一酸化炭素(25 ppm)吸入は脳におけるCygbタンパク発現を変化させることを報告した。

#### b. 脾臓とサイトグロビン

2005年にStagnerらはCygbの過剰発現が脾 $\beta$ 細胞を低酸素や免疫学的拒絶反応による細胞障害から回避させることを初めて報告した。彼らは2009年にラットから分離した脾島にCYGB cDNAをトランスフェクションさせて解析した結果、10%の低酸素培養下で脾島の生存率が上昇し、また、グルコース刺激によるインスリン分泌がコントロールと比較して増加することを観察した。以上のことからCYGBの過剰発現は脾島を低酸素から保護することを示した。

#### c. 肝臓とサイトグロビン

著者らはラット初代培養星細胞からCygbを単離したが、Bosselutらは星細胞と肝臓内胆管断片から成長させたportal myofibroblastに発現するタンパク質の差を二次元電気泳動で検討した結果として、Cygbが星細胞特異的のマーカであることを示し、星細胞とportal myofibroblastの異同に利用できると報告した<sup>14)</sup>。

XuらはCygbの過剰発現が肝臓保護的に作用することを初めて報告した。すなわち、recombinant adeno-associated virus-2(rAAV-2)によってラットCygbをラット星細胞に過剰発現させたところ、酸化ストレスから細胞を保護するのみでなく、TIMP-1とtransforming growth factor  $\beta$ (TGF- $\beta$ )の発現低下がみられ、転写因子AP-1やNF- $\kappa$ Bの活性化制御が観察された。このウイルスを経門脈的に肝臓に投与してデス

ミン陽性細胞に過剰発現させた条件で四塩化炭素を8週間投与、あるいは、総胆管を21日間結紮して線維化を誘導したところ、Cygb過剰発現は両モデルでASTの低下を伴いつつ、組織線維化を抑制し、procollagen 1, TGF- $\beta$ 1, TIMP-1遺伝子発現を低下させた。以上の結果、Cygb過剰発現は組織を酸化ストレスから保護すると同時に、星細胞の活性化を制御する可能性があることを示唆した<sup>15)</sup>。

Heらはチオアセトアミドを用いてラット肝臓に誘導した線維化モデルにおいて、作製したリコンビナントCygbを10 mg/kgあるいは5 mg/kgで投与したところ、10 mg/kg群で有意に血清中AST、ヒアルロン酸、ラミニン、I型コラーゲンやヒドロキシプロリン濃度が低下することを報告した。

Forbelらはマウス個体を7%酸素濃度に48時間置いた後21%酸素に戻す実験を行った。その結果、肝臓では低酸素に48時間曝露することでVEGFと共にCygbの遺伝子発現が約3倍に上昇することを報告した。この間にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の組織濃度も肝臓では18-35 pmolにまで上昇したことから、両者の相関を示唆した。

#### d. 腎臓とサイトグロビン

Kidaらはラット尿管結紮(unilateral ureteral obstruction: UUO)による腎線維化モデルを作製し、Cygb発現を検討した。UUO施行3日後よりCygb mRNA発現が上昇し、免疫組織染色でも尿細管間質にCygb陽性像が増強した。Cygb陽性細胞の一部は $\alpha$ -SMAあるいはfibulin-2陽性であることを観察した。

Mimuraらはラット腎線維化(remnant kidney: RK)モデルを用いてCygbが線維化とともに発現上昇することを確認し、この発現にHIF-1が関係することを示した<sup>16)</sup>。

Nishiらは腎臓の阻血-再灌流(ischemia-reperfusion: I/R)モデルでのCygbの役割について検討した。I/Rを誘導すると10-24時間後にかけてCygbのmRNAならびにタンパク発現が有意に上昇した。作製したCygb-TgラットにI/Rを誘導すると血清中のBUNやクレアチニン上昇は抑制され、4-hydroxynonenalや

nitrotyrosineのような酸化ストレス産物の産生も低下した。Cygb-Tgラット腎臓から分離培養した線維芽細胞はH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による細胞障害から回避され、Cygbがラジカスカベンジャーとして機能することを示唆した<sup>17)</sup>。

## 2) サイトグロビンと発がん

### a. 口腔内癌とサイトグロビン

CYGBの発現が変化することが多臓器のがん組織で報告されてきた。2006年にShawらは口腔内の扁平上皮癌組織からDNAを抽出し、p16, RARb, E-cadherin, CYGB, cyclin A1 遺伝子のCpG豊富なプロモーター領域をターゲットとして検討した。その結果、プロモーター領域のメチル化は正常組織部と比較してがん部においてCYGB(p=0.002)を含む3つの遺伝子で検出された。遺伝子のメチル化はmRNA発現を抑制するため、著者らは、CYGBはがん組織で低下するがん抑制遺伝子として働くのではないかと推測した。

### b. 食道癌とサイトグロビン

2006年にMcRonaldらは食道癌のチロース(tylosis with oesophageal cancer: TOC)について、ヒト17番染色体の17q25領域に存在するFLJ22341遺伝子とCYGB遺伝子について正常組織ならびに逆流性食道炎組織と比較して検討した。17番染色体はBRCA1, septin, DMC1のようながん抑制遺伝子が存在することでも知られている。その結果、FLJ22341遺伝子は発現に差がないが、CYGB mRNA発現が約70%にまで低下することを報告した。TOCにおいてはCYGB遺伝子自体に変異はみられないことから、プロモーター領域のメチル化やヘテロ接合体の欠損(loss of heterozygosity: LOH)が関与することが想定されている<sup>18)</sup>。

### c. 頭頸部癌とサイトグロビン

Shawらは頭頸部の37腫瘍を解析した結果、CYGB mRNA発現はHIF-1A mRNA発現と有意に相関し(Spearman相関係数0.558, p<0.01)、プロモーターのメチル化に影響されることを示した。また、CYGB発現は腫瘍の周辺組織への浸潤やリンパ節転移とも関係することから、腫瘍の動態との関連を示唆した。

### d. 肺癌とサイトグロビン

プロモーター領域のメチル化やヘテロ接合体の欠損によるCYGB発現低下はnon-small cell lung cancer(NSCLC)において報告された。すなわち、54%の肺癌においては近接する非腫瘍部に比して明らかに低レベルのCYGB mRNA発現が観察され(p<0.001)、プロモーター領域のメチル化の程度とCYGB発現が逆相関することが示された。また、CYGB mRNA発現の低下と腫瘍の分化度とに相関がみられ低分化型でより低発現であることが示された(Fisher's exact, p=0.033)。同様の知見はhead and neck squamous cell carcinoma(HNSCC)や乳癌でも観察された。

ShivapurkarらはNSCLC 30症例の組織を調べたところ、CYGB遺伝子のメチル化が63%で検出され、近隣の非腫瘍部(18%)に比較して有意に高いことを示した。同様の結果は、乳癌、膀胱癌、大腸癌、白血病で観察された。NCI-H661肺癌細胞株をCYGB shRNAで処理すると細胞増殖が促され、逆に、NCI-H2228細胞にCYGBを過剰発現させると細胞増殖は抑制され、collagen 1A1, PRPF40A, UCP2, death-associated protein kinase 1(DAPK), PYD and CARD domain containing(PYCARD)やDNA-methyltransferase 1(DNMT1)などがんの形質維持に必要な遺伝子発現を低下させることが示された。CYGBが腫瘍抑制的であるメカニズムについては、グロビンとしてのスカベンジャー効果からがん誘発性物質に由来する酸化ストレスやニトロソ化ストレスを低減し細胞をDNA, タンパク質、更には膜レベルで保護することが推測される。一方、CYGBが発現低下することで、局所炎症や微小環境に変化が生じて、その結果として組織の線維化が生じ無秩序な上皮-間葉相互作用を惹起する。また、慢性的な炎症反応はp53やMAPキナーゼカスケードに影響して最終的に血管新生、細胞浸潤やDNA損傷に関与すると想定される<sup>19)</sup>。

### e. 肝癌とサイトグロビン

著者らは独自に作製したサイトグロビンノックアウトマウス(Cygb KO)を用いて肝発癌に

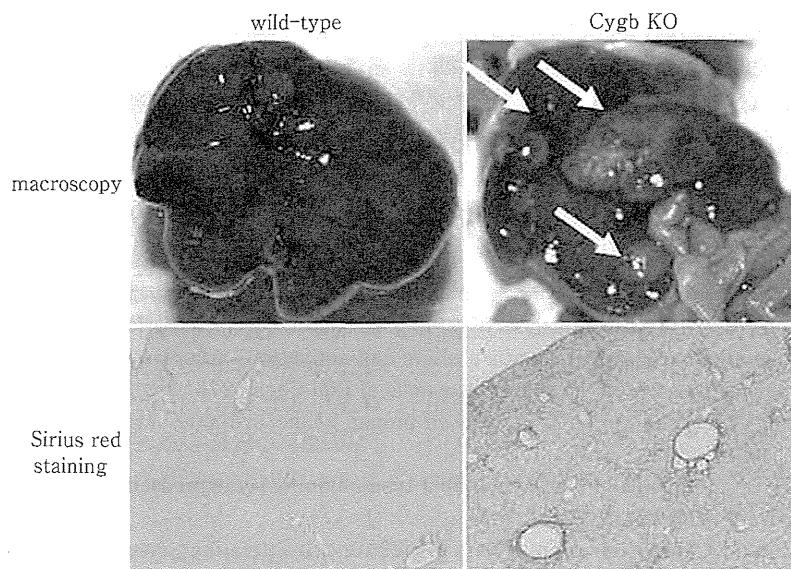


図4 サイトグロビンノックアウトマウスにおける肝癌の発生  
 サイトグロビンノックアウトマウスではDEN投与によりコラーゲンの沈着が  
 増強し、腫瘍(矢印)が多発することが判明した。

対する Cygb の関与について検討した。マウスの第11番染色体上の Cygb 遺伝子の Exon 1 をネオマイシン耐性遺伝子で入れ替えターゲティングベクターを作製して遺伝子を欠損させた。このマウスに肝癌発がん剤として汎用されているジエチルニトロソアミン (diethylnitrosoamine: DEN) を飲水に混ぜて 25 (25 ppm) あるいは 36 (0.05 ppm) 週間飼育して犠牲死させた。その結果、25 ppm DEN を 25 週間投与した群では野生型では 44.4% のがん発生であったが、Cygb KO マウスでは 100% で発がんしていた。0.05 ppm DEN という極めて低濃度を 36 週間投与した場合には、野生型ではがんは生じなかったが、Cygb KO マウスでは 57.1% で発がんしていた。また、DEN はマウスに肝癌を誘発することが知られているが、Cygb KO マウスでは肺癌も生じることが判明した。解析の結果、Cygb KO では cellular retinol bonding protein-1 や desmin 陽性細胞が存在することから Cygb が欠損しても星細胞は存在すること、シリウス赤染色を行うと、Cygb KO マウスでは肝細胞の周囲に顕著な pericellular fibrosis が生じて、interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor  $\alpha$  や

TGF- $\beta$  の発現が上昇していた。更に、NO の活性型産物であるパーオキシナイトライト (ONOO<sup>-</sup>) が強発現していた。以上の結果から、Cygb KO は DEN による肝発がんに対して易発がん性であることを示した (図4)<sup>20)</sup>。

#### f. 前立腺癌とサイトグロビン

Basu らは前立腺癌細胞株 PC-3 に、ストレス応答性分子であり、酸化ストレスから細胞保護的に作用する、lens epithelium-derived growth factor of 75 kDa (LEDGF/p75) を過剰発現させると albumin, phosphoinositide-binding protein, superoxide dismutase 3, thyroid peroxidase に加えて CYGB が誘導されることを確認した。この病態生理学的意義については不明である。Mogal らはヒトの萎縮した前立腺組織で CYGB が発現増強し、前立腺癌では低下することを免疫組織学的に示した。

## 6. 今後の展望

サイトグロビンが発見されて12年が経過した。そのタンパク質分子としての特徴が明らかにされ、哺乳類第4番目のグロビンであることが示された。組織の pericyte に発現することか