

らガス分子の細胞内ならびに局所挙動や酸化ストレス応答への関与がわかってきた。一方、臨床サンプルを用いた解析から、サイトグロビンが種々のがん組織でプロモーター領域の遺伝子メチル化を伴って発現抑制されることから、そのがん抑制遺伝子としての機能が注目されてい

る。以上の知見を基に、今後サイトグロビンの組織局在性という特徴と病態との関連性解析が、更に進展することを期待したい。それらの研究を通じて、グロビタンパク質群にまつわる新たな分子パラダイムが展開されることが楽しみである。

#### ■文 献

- 1) Kristensen DB, et al: Proteome analysis of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* **32**: 268–277, 2000.
- 2) Kawada N, et al: Characterization of a stellate cell activation-associated protein(STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. *J Biol Chem* **276**: 25318–25323, 2001.
- 3) Trent JT 3rd, et al: A ubiquitously expressed human hexacoordinate hemoglobin. *J Biol Chem* **277**: 19538–19545, 2002.
- 4) Burmester T, et al: Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Mol Biol Evol* **19**: 416–421, 2002.
- 5) Asahina K, et al: Characterization of human stellate cell activation-associated protein and its expression in human liver. *Biochim Biophys Acta* **1577**: 471–475, 2002.
- 6) Nakatani K, et al: Cytoglobin/STAP, its unique localization in splanchnic fibroblast-like cells and function in organ fibrogenesis. *Lab Invest* **84**: 91–101, 2004.
- 7) Schmidt M, et al: Cytoglobin is a respiratory protein in connective tissue and neurons, which is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* **279**: 8063–8069, 2004.
- 8) Sugimoto H, et al: Structural basis of human cytoglobin for ligand binding. *J Mol Biol* **339**: 873–885, 2004.
- 9) Pesce A, et al: Neuroglobin and cytoglobin. Fresh blood for the vertebrate globin family. *EMBO Rep* **3**: 1146–1151, 2002.
- 10) Makino M, et al: Crystal structure of the carbon monoxide complex of human cytoglobin. *Proteins* **79**: 1143–1153, 2011.
- 11) Halligan KE, et al: Cytoglobin is expressed in the vasculature and regulates cell respiration and proliferation via nitric oxide dioxygenation. *J Biol Chem* **284**: 8539–8547, 2009.
- 12) Li H, et al: Characterization of the mechanism and magnitude of cytoglobin-mediated nitrite reduction and nitric oxide generation under anaerobic conditions. *J Biol Chem* **287**: 36623–36633, 2012.
- 13) Fordel E, et al: Cytoglobin expression is upregulated in all tissues upon hypoxia: an in vitro and in vivo study by quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* **319**: 342–348, 2004.
- 14) Bosselut N, et al: Distinct proteomic features of two fibrogenic liver cell populations: hepatic stellate cells and portal myofibroblasts. *Proteomics* **10**: 1017–1028, 2010.
- 15) Xu R, et al: Cytoglobin overexpression protects against damage-induced fibrosis. *Mol Ther* **13**: 1093–1100, 2006.
- 16) Mimura I, et al: Cytoglobin, a novel globin, plays an antifibrotic role in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **299**: F1120–F1133, 2010.
- 17) Nishi H, et al: Cytoglobin, a novel member of the globin family, protects kidney fibroblasts against oxidative stress under ischemic conditions. *Am J Pathol* **178**: 128–139, 2011.
- 18) McDonald FE, et al: Down-regulation of the cytoglobin gene, located on 17q25, in tylosis with oesophageal cancer(TOC): evidence for trans-allele repression. *Hum Mol Genet* **15**: 1271–1277, 2006.
- 19) Shivapurkar N, et al: Cytoglobin, the newest member of the globin family, functions as a tumor suppressor gene. *Cancer Res* **68**: 7448–7456, 2008.
- 20) Thuy le TT, et al: Promotion of liver and lung tumorigenesis in DEN-treated cytoglobin-deficient mice. *Am J Pathol* **179**: 1050–1060, 2011.

## 肝線維化と星細胞

大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科学

河田 則文

Norifumi Kawada

(教授)

### はじめに

肝臓は実質細胞と非実質細胞で構成される。前者は肝細胞であり、アルブミンを主とする蛋白質の合成、胆汁酸合成、アンモニアや薬物代謝など生体の恒常性維持に主要な働きを行う。また、B型やC型肝炎ウイルスの感染や過剰な脂肪蓄積により障害を受けると、alanine aminotransferase (ALT) を放出しながら細胞死に陥る。一方、非実質細胞は肝細胞索に並走する類洞を構成する細胞群、門脈や中心静脈の血管構成細胞群ならびに胆管を構成する細胞群などからなる。類洞構成細胞の研究の先駆者の1人はKarl Wilhelm von Kupfferであり、肝臓固有のマクロファージであるKupffer細胞の名前の由来である。1876年にKupffer博士が見出したもうひとつの細胞が“sternzellen”であり、これが後にfat-storing cell, Ito cell, lipocyte, stellate cellなどと呼ばれた星細胞である<sup>1)</sup>。星細胞は細胞質にビタミンA豊富な脂肪顆粒を貯蔵することが特徴であるが、肝細胞の生理的環境を整える役割

を果たしつつ、肝細胞に障害が生じると多機能性に、免疫・炎症・線維化、さらには発がんに至るまで微小環境の監視塔となることがわかってきた。本稿では、肝線維化と星細胞に焦点を絞り言及したい。

### 星細胞の活性化と線維化

肝炎ウイルス感染やアルコール摂取、脂肪沈着などで肝細胞が壊死して脱落すると、局所に微小な出血が生じ、血小板凝集とフィブリン形成で一時的に傷が塞がれる。障害肝細胞、類洞内皮細胞や血小板からはケモカイン、transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), platelet-derived growth factors (PDGFs)などのメディエーターが産生される。これらに呼応して、末梢血中の好酸球、好中球、リンパ球、マクロファージなどがインターロイキン1 (interleukin-1 ; IL-1), IL-6, IL-8, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) やマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinases ; MMPs) などの生理活性物質を産生しつつ炎症局所に集積する。さらに肝類洞に存在する星細胞、類洞内皮細胞やKupffer

細胞が活性化して一過性の局所炎症を増幅させる(図1)。星細胞は生理的状況ではデスミンやglial fibrillary acidic protein陽性のビタミンA貯蔵細胞であるが、炎症時には $\alpha$ -平滑筋アクチン( $\alpha$ -smooth muscle actin ;  $\alpha$ -SMA)に代表されるマーカーを発現するようになり、筋線維芽細胞(myofibroblast ; MFB)様の細胞へと形質を変え、TGF- $\beta$ の産生・活性化を介したI型、IV型コラーゲン産生、vascular endothelial cell growth factors (VEGFs)の産生、tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs)の分泌を行う。これにより炎症局所に基底膜様構造を構築し、肝細胞再生の土台を作り、血管新生をとめないながら組織修復を行う。これが急性肝炎のように炎症が一過性で終焉した場合のシナリオである。しかしながら、ウイルス感染や脂肪性肝炎などの炎症が慢性化してしまうと、activator protein-1 (AP-1) や c-Jun N-terminal kinase (JNK) などの転写因子の持続活性化とともに星細胞も持続活性化し、MFB様の細胞としてTGF- $\beta$ の産生・活性化とそれを介するTIMP-1過剰産生が生じ、TIMP-1とMMPs

Surgery Frontier 20(3) : 72-75, 2013

# What's New in SURGERY FRONTIER

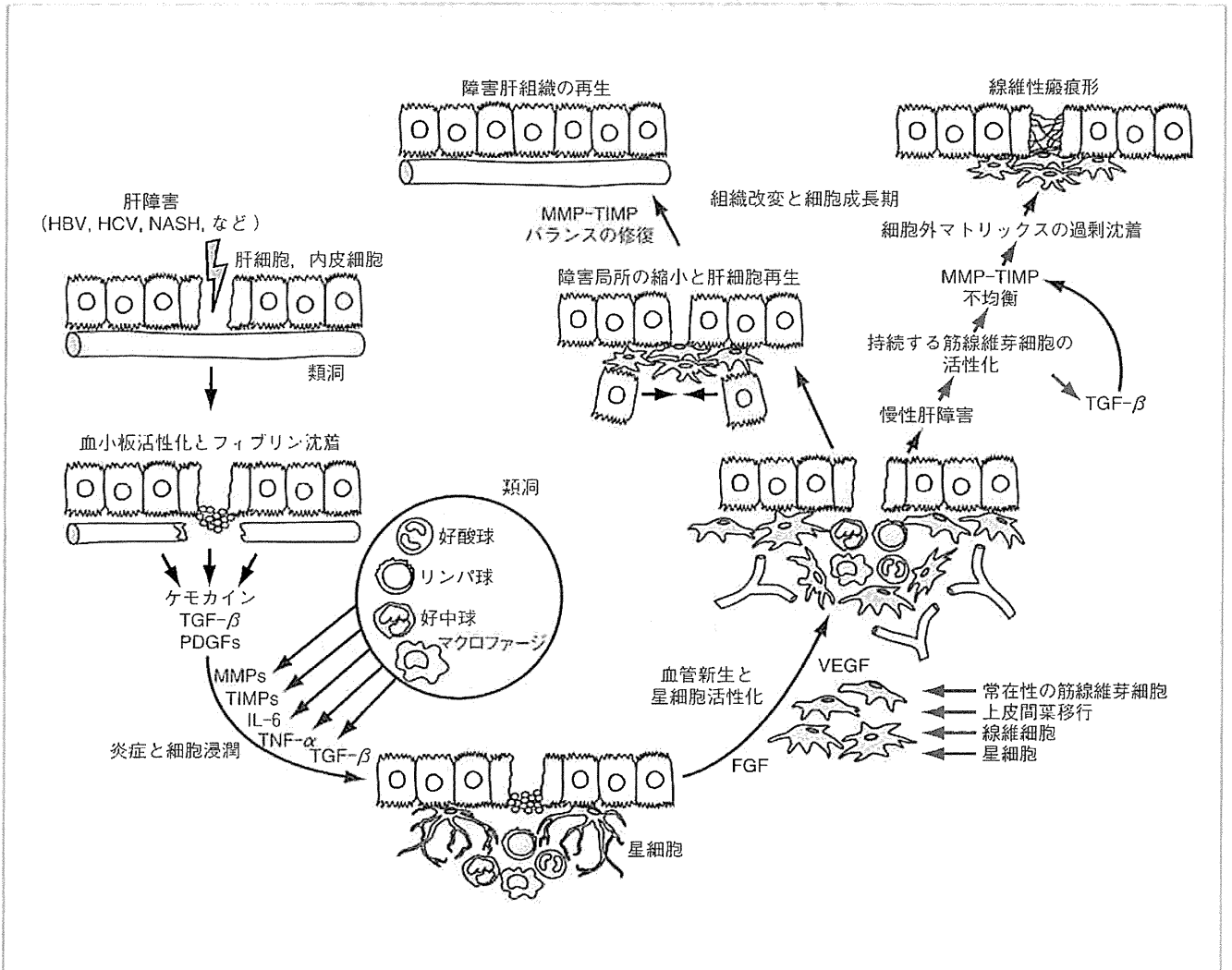


図1 肝障害による筋線維芽細胞の活性化が肝線維化のメカニズムを示す模式図

との相対的アンバランスが生じて組織にI型コラーゲンが蓄積することになる。また、MFBはnuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) や phosphoinositide 3-kinase-Akt 経路の活性化により細胞死抵抗性となり、新生血管の構築をともしながら線維性隔壁を構成して瘢痕形成を行う。また、MFB化した星

細胞は monocyte chemotactic protein-1, macrophage inflammatory protein, CC chemokine receptor などの発現、抗原提示、toll-like receptor 4 (TLR4) や CD14 の発現をともしながら、 $O_2$ 、nitric oxide などの活性酸素種を産生させ、局所炎症を持続させる

(図2) <sup>24,25)</sup>

## 活性化星細胞以外の MFB の線維化への関与

上述したように、星細胞が肝の線維化に関与することは確定されたが、星細胞以外の細胞群の関与が最近注目さ

# What's New in SURGERY FRONTIER

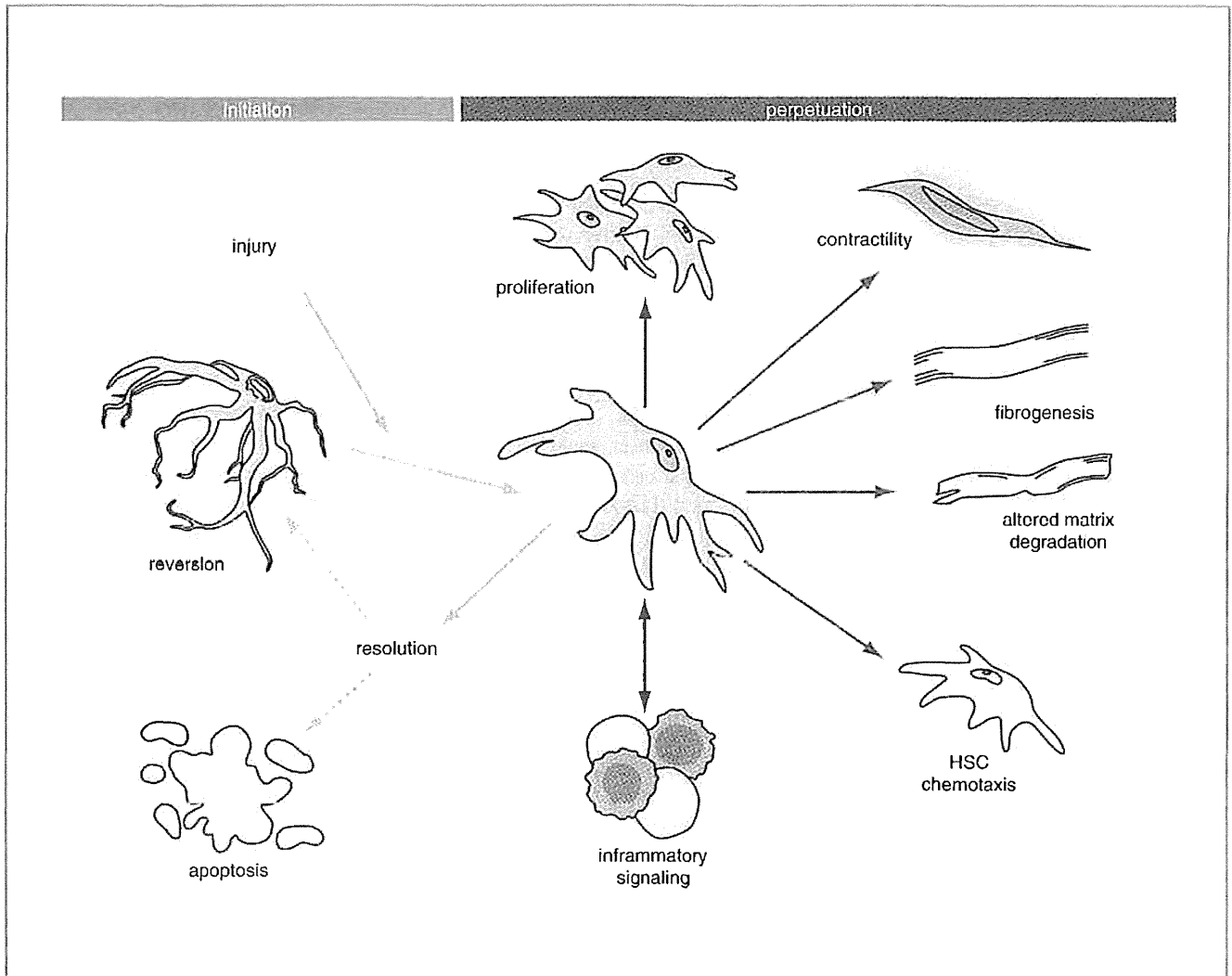


図2 星細胞の活性化とそれにともなう細胞機能の変化を示す模式図

れている。これらの細胞は  $\alpha$ -SMA が陽性であることからすべて活性化星細胞由来の MFB であると議論されてきたが、細胞表面マーカーの詳細な検討から、星細胞とは異なる細胞が含まれることが示されてきた。ひとつは門脈域に存在する線維芽細胞 (portal fibroblast) である。この細胞は活性化

すると  $\alpha$ -SMA 陽性となるが、星細胞が発現しない fibulin-2 や Thy-1 を発現することから区別される<sup>1)</sup>。慢性炎症時には肝細胞や胆管細胞のような上皮細胞が epithelial-mesenchymal transition により MFB に変化することが示唆されたが、遺伝子ラベルによる cell trace 法により、肝臓では生じて

いないことが示された<sup>2)</sup>。循環血液中の線維細胞 (fibrocyte) も肝臓に接着して MFB 化するが、ごく少数であるとされる。これらに加えて、最近のトピックは、肝臓を覆う皮膜に派生する中皮細胞由来の MFB が線維化に関与すると示されたことである。すなわち、マウス肝臓から glycoprotein M6a

## What's New in SURGERY FRONTIER

(GPM6A) をマーカーに分離した中皮細胞は mesothelial-mesenchymal transition により、条件次第で MFB や星細胞に形質を変える。肝表面にみられる凹凸の結節性線維化は中皮由来の MFB による可能性が示唆されたわけできわめて興味深い<sup>6)</sup>。

### おわりに

以上、肝臓の線維化における星細胞とそれに類する細胞群について概説した。本領域は、1985年に Scott Friedman 博士が星細胞のコラーゲン産生能を証明して以来急テンポで研究が進んだ。しかしながら、臓器線維化

のメカニズム解析は依然として広がりを見せている。研究成果による抗線維化治療法の開発が待たれる。

### 文献

- 1) Wake K : Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. *Int Rev Cytol* 66 : 303-353, 1980
- 2) Friedman SL : Hepatic stellate cells : protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 88 : 125-172, 2008
- 3) Wynn TA : Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 117 : 524-529, 2007
- 4) Dranoff JA, Wells RG : Portal fibroblasts : Underappreciated mediators of biliary fibrosis. *Hepatology* 51 : 1438-1444, 2010
- 5) Scholten D, Osterreicher CH, Scholten A, et al : Genetic labeling does not detect epithelial-to-mesenchymal transition of cholangiocytes in liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 139 : 987-998, 2010
- 6) Li Y, Wang J, Asahina K : Mesothelial cells give rise to hepatic stellate cells and myofibroblasts via mesothelial-mesenchymal transition in liver injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 110 : 2324-2329, 2013

5

## 肝線維化機序研究の進歩

河田 則文\*

Key words: 星細胞, 筋線維芽細胞, 細胞外マトリックス, 成長因子, 発がん

### 要旨

肝線維化は肝炎ウイルス感染, アルコール多飲, 脂肪肝など病因のいかんを問わず慢性的に経過する炎症と肝細胞障害により惹起される。障害を受けた肝細胞や類洞壁細胞が産生するメディエーターによりディッセ腔に存在する星細胞が活性化され, 筋線維芽細胞(myofibroblast)様の細胞へと形質を変化させ, 組織局所に I 型コラーゲンを主体とする細胞外マトリックス物質を沈着させることを概略とする。星細胞活性化の分子機構は最近 20 年の研究で大きく解明され, エピジェネティックな側面も解析されつつある。近年, 肝発がん母地として線維化を理解する動きが急展開している。抗肝線維化治療戦略も含め発展が期待される研究分野である。

### I. 肝線維化のメカニズム(図)

#### この項のポイント

- 障害を受けた肝細胞や類洞内皮細胞等から産生されるメディエーターにより, 星細胞が活性化されて筋線維芽細胞様の細胞へと形質を変え, 組織各所に細胞外マトリックス物質を過剰沈着させることが, 肝線維化の概略である。

肝炎ウイルス感染やアルコール過剰摂取, 脂肪沈着などで肝細胞が壊死・脱落すると, 局所

に微小出血が生じ, 血小板凝集とフィブリン形成で一時的に傷が塞がれる。障害肝細胞, 類洞内皮細胞や血小板からはケモカイン, transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), platelet-derived growth factor (PDGF) などのメディエーターが産生される。これらに呼応して, 末梢血中の好酸球, 好中球, リンパ球, マクロファージなどがインターロイキン 1 (interleukin 1; IL-1), IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) やマトリックスメタロプロテアーゼ(matrix metalloproteinase; MMP) などの生理活性物質を産生しつつ炎症局所に集積する。さらに肝類洞に存在する星細胞, 類洞内皮細胞や Kupffer 細胞が活性化して一過性の局所炎症を増幅させる<sup>1)</sup>。

#### 1. 星細胞の活性化

星細胞はビタミン A を貯蔵しており, 生理的状況では類洞を 3 次元的に細胞突起で包囲した肝組織特異的 pericyte(周皮細胞)といえるが, 炎症時には  $\alpha$ -平滑筋アクチンに代表される分子マーカーを発現するようになり筋線維芽細胞(myofibroblast; MFB)様の細胞へと形質を変える。この活性化星細胞は, TGF- $\beta$  の産生と活性化を介した I 型, IV 型コラーゲン産生,

\*大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科学  
(〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町 1-4-3)

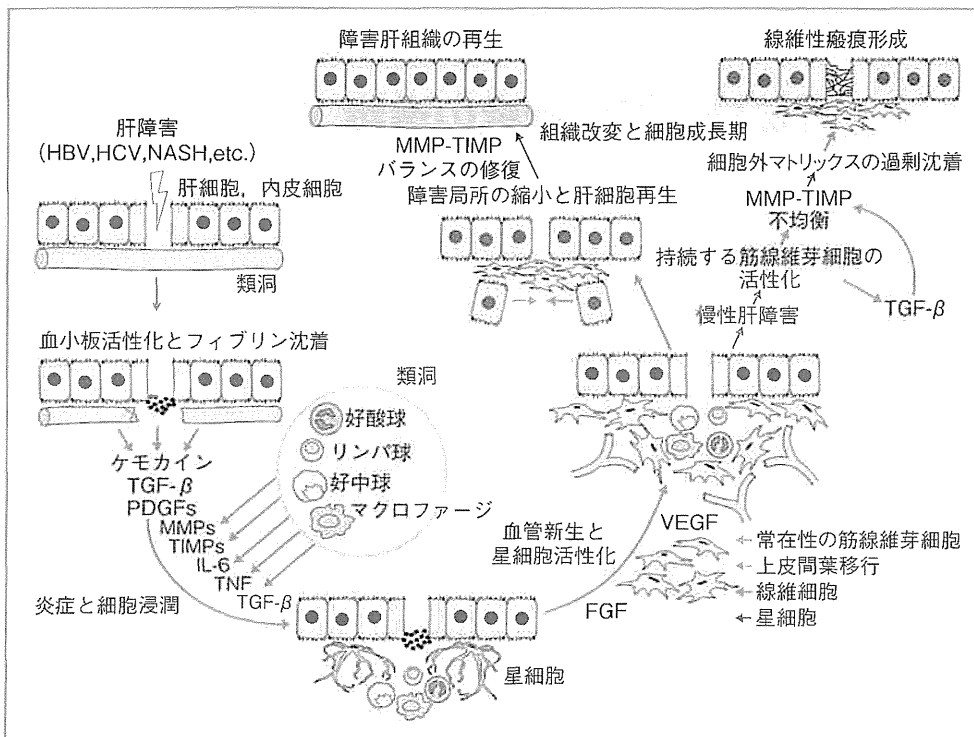


図 肝障害と治癒過程並びに線維化が生じるメカニズムを示す模式図

vascular endothelial cell growth factor (VEGF) の産生, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP) の分泌を行う。これにより炎症局所に基底膜様構造を構築し, 肝細胞再生の土台を作り, 血管新生を伴いながら組織修復を行う。これが急性肝炎のように炎症が一過性で終焉した場合のシナリオである<sup>2)</sup>。

しかしながら, 肝炎ウイルス感染や脂肪性肝炎のように炎症が慢性化してしまうと, activator protein 1 (AP-1) や c-Jun N-terminal kinase (JNK) などの転写因子の持続活性化とともに星細胞も持続活性化し, MFB 様の細胞として TGF- $\beta$  の産生・活性化とそれを介する TIMP-1 過剰産生が生じ, TIMP-1 と MMPs との相対的アンバランスが生じて組織に I 型コラーゲンが蓄積する。また, MFB は nuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) や phosphoinositide 3-kin-

ase-Akt 経路の活性化により細胞死抵抗性となり, 新生血管の構築を伴いながら線維性隔壁を構成して瘢痕形成を行う。また, MFB 化した星細胞は macrophage chemotactic protein (MCP), macrophage inflammatory protein (MIP), CC や CXC などのケモカイン産生, 抗原提示, toll-like receptor 4 (TLR4), TLR2, TLR9 や CD14 の発現を伴った腸内細菌叢由来産物(エンドトキシン, 細菌 DNA, ペプチドグリカン, さらには宿主 DNA) への高反応性を介して, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, nitric oxide などの活性酸素種を産生させ, 局所炎症を持続させる。

## 2. 星細胞以外の線維化への関与

星細胞以外にも門脈域 MFB が線維化反応に参加する。MFB には星細胞由来と門脈域線維芽細胞由来の 2 種類が存在する。近年この 2 者

は、前者が desmin, reelin, プロテアーゼ P100, サイトグロビン, alpha-2 macroglobin や synaptophysin を, 後者が IL-6, fibulin-2, Thy-1 (THYmocyte differentiation antigen 1), elastin や coillin を高発現することで区別できるとの報告がなされてきた。また, 中皮由来の MFB の関与や, 少ないながらも線維細胞, 骨髄由来の細胞群らが線維性隔壁構成に加わる。これらが同時進行して組織硬度が増し, 組織が改築していく。肝臓においては, 上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition ; EMT) による上皮由来細胞の線維化反応への関与は否定的である<sup>3)</sup>。

### 3. 星細胞に関する最新の知見

星細胞の活性化にまつわる最新情報として, 星細胞内の脂質代謝が挙げられる。上述したように静止期星細胞はレチニールエステル, トリグリセリド, コレステロールや脂肪酸を含有する脂肪滴を有し, 脂質生成系の遺伝子である acetyl CoA carboxylase, fatty acid synthase や fatty acid binding proteins を発現し, また, 脂質生成系転写因子である SREBP-1c, C/EBP, LXR $\alpha$  や PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) を発現するが, これらは活性化とともに発現減少, 低下する。すなわち, 脂質代謝系にリプログラミングが生じる。一方, オートファジーによる脂質貪食が星細胞の活性化に関わる可能性も示唆されている。

また, エピジェネティックな星細胞制御についても近年議論されている。その一つは microRNA (miRNA) である。miRNA は non-coding RNA の一つであり, 21~23 塩基長の小さな RNA でそれ自体は mRNA にはならない。しかしながら, mRNA の 3'-UTR 領域に結合することで mRNA から蛋白質への翻訳や mRNA の安定性に関与する。miRNA 自体も転

写因子 RNA ポリメラーゼ II で発現制御される。星細胞も多様な miRNA を発現することが報告されている。筆者らは, miR-29b が星細胞のコラーゲン発現に重要であること, 並びに miR-221/222 の発現はヒトの線維化ステージときわめてよく相関することを報告した<sup>4)</sup>。標的となる遺伝子の解析は困難なところでもあるが, miRNA による星細胞制御は興味深いテーマである。一方, DNA のメチル化による遺伝子発現制御も興味をもたれるところである。星細胞の活性化とともに DNA-methyl binding protein (MeCP2) が発現し, それに伴い抗線維化因子である I $\kappa$ B $\alpha$  や PPAR $\gamma$  の発現が抑制され, コラーゲン, TIMP-1, TGF- $\beta$  の発現が増強する。また, 線維化を生じた雄マウスから生まれたマウスは, 線維化歴のないマウスから生まれたマウスとは異なる線維化応答を示すことが報告された。このように線維化に関与する DNA メチル化やヒストンアセチル化が雄の精子を介して子孫に伝承することが示されたことは興味深い<sup>5)</sup>。

## II. 肝線維化の可逆性

●線維化の可逆性が判明したが, どの程度の線維化が可逆的であるかどうかは, まだ議論の余地がある。

1970 年代までは線維化は病態の終末像であり可逆性はないと考えられてきた。しかしながら C 型慢性肝炎・肝硬変でインターフェロン療法により C 型肝炎ウイルスが排除されたり, B 型慢性肝炎・肝硬変で核酸アナログ製剤により B 型肝炎ウイルス量が制御されるようになってくると, 組織病理学的に線維化のステージが後退(改善)することがわかった。すなわち, ヒトの線維化は可逆的である。動物モデルにおいても, 肝臓毒を投与して誘導した線維形成は肝臓



毒投与の中止とともに速やかに改善することが確認され、このプロセスは TIMP-1 の発現低下による MMPs の機能回復に由来することが示された。

星細胞の機能としては下記のような側面が関与する。

### 1. アポトーシス

四塩化炭素投与ラット線維化モデルにおいて、8 週間後に四塩化炭素投与を中止すると急速に TIMP-1 発現が低下し、これはアポトーシスによる活性化星細胞数の減少を伴うことが報告された。TIMP-1 は活性化星細胞の生存に関係する。また、活性化星細胞に発現する NF $\kappa$ B は抗アポトーシス因子であり、NF $\kappa$ B 阻害剤は活性化星細胞にアポトーシスを誘導させ線維化を改善させる。

### 2. 星細胞の老化

老化 (senescent) 星細胞は増殖能の低下、MMP 発現の上昇、ECM (細胞外マトリックス) 蛋白発現低下により総じて組織線維化の改善に寄与する。また、老化星細胞は NK 細胞により排除される。

### 3. 活性化状態から静止状態への逆戻り

近年の cell tracking 研究に基づくと、活性化星細胞は、肝障害の終焉とともに静止期星細胞へと逆戻りができることが示された。しかしながら、脱活性化した星細胞は静止期星細胞とまったく同じ性質を示すとは言い切れず、再度炎症刺激が生じた際により活性化されやすいブライミング状態にあることが推測された<sup>6)</sup>。

ところで、どの程度の線維化が可逆的であるかどうかはまだ議論の余地がある。臨床的に F1, 2 程度の線維化は治療により原因が取り除かれると消失することが期待されるが、F3, 4

まで進行した症例での線維の完全消失は困難かもしれない。この理由としては、たとえば I 型コラーゲン線維の架橋形成により MMP 作用が及びにくくなっていることが推測される。コラーゲン線維の架橋形成にはトランスグルタミナーゼやリジロキシダーゼが寄与する<sup>7)</sup>。非常に興味深いことに lysyl oxidase-like-2 (LOXL2) の阻害が抗線維化的に作用することが動物モデルで示されており、抗 LOXL2 抗体による抗線維化療法が NASH (非アルコール性脂肪肝炎) 患者に対して臨床試験中である。

## III. 肝線維化と発がん

この項のポイント

● 筆者らは、サイトグロビンというグロビン蛋白を発見し、サイトグロビンが肝発がん過程に深く関与することを見出した。

近年、線維化肝という微小環境の肝発がんへの関与が着目されている。それらには細胞外マトリックスによるインテグリンシグナルの増強、活性化星細胞と肝細胞相互間のシグナル伝達、間質硬度の上昇、細胞外マトリックスに付着する成長因子の遊離、NK 細胞による腫瘍監視機構の破綻などが含まれる<sup>8)</sup>。

### 1. 星細胞や MFB の関与

星細胞は hepatocyte growth factor, IL-6 や Wnt シグナルを産生し肝細胞の増殖に至適な条件を提示する。MFB も同様に PDGF や TGF- $\beta$  依存性メカニズムによってがん化した肝細胞の成長や遊走を支援する。また、活性化星細胞は angiopoietin 1 を産生することで腫瘍増殖に必要な血管新生を誘導する。一方、腫瘍からの hedgehog シグナルは MFB の活性化や線維化の維持に重要である。また、星細胞は(がん)幹細胞に対して“niche”として機能することが示唆されており、そのパラクリン分子の性

質の解析が待たれるところである。

## 2. サイトグロビンの関与

ところで筆者らは、サイトグロビンという哺乳類第4番目のグロビン蛋白をラット星細胞から見出した。このグロビン蛋白は、3次元立体構造やガス分子への解離定数などの性質はほぼミオグロビンと同等である。サイトグロビンは抗酸化機能としてペルオキシダーゼ活性や過酸化脂質の産生を抑制することができる。筆者らはその欠損マウスを用いた解析により、サイトグロビンが肝細胞の発がん過程に深く関与することを見出した。すなわち、サイトグロビン欠損により肝臓は易発がん性を呈するため、どのような分子機構が介在するのか、解析を進めているところである<sup>9)</sup>。

## 3. 細胞外マトリックスと成長因子

一方、肝硬変の際に組織に沈着する細胞外マトリックスは成長因子をその受け手となる細胞から、いわば、隔離しており、状況に応じて成長因子を隔離から解き放してシグナル分子として機能させている<sup>10)</sup>。もともとこのような細胞外マトリックスによる成長因子“隔離”の研究は fibroblast growth factor (FGF) において追究されてきたが、FGF も含めて TGF, bone morphogenic protein (BMP), Wnt やインターロイキン類も同様の挙動を示す。このプロセスのなかで MMPs は重要な役割を果たす。すなわち、MMP が成長因子を細胞外マトリックスから遊離させてリガンドとして働かせる一方で、MMP は成長因子受容体をそのプロテアーゼ活性により細胞表面から遊離させ、細胞を成長因子不応性にもさせてしまう。一方、TGF- $\beta$  は線維化促進因子として重要であるが、細胞外マトリックスに“隔離”されていた TGF- $\beta$  の過剰遊離は腫瘍の増殖を抑制し、アポトーシス

に陥らせる可能性もある。このように、細胞外マトリックスと成長因子間の相互作用はきわめて複雑であり、状況に応じた制御がなされるため、実験で得られた事実の解釈は慎重に行うことが重要である<sup>11)</sup>。

## IV. 肝線維化治療法開発の現状

### この項のポイント

- 高齢者の線維化進行例、あるいはウイルスが関与しないアルコール性肝障害や NASH を改善させる治療法の開発が急務である。
- 非侵襲的かつ反復して線維化度を判定できるバイオマーカーの開発も重要である。

C 型や B 型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法の進歩は顕著であり、両疾患ともに多数の症例においてウイルスの消失や制御が可能になってきた。したがって、早期発見・早期治療を念頭におけば線維化の改善と肝機能の維持、さらには発がん抑制が達成される。しかしながら、高齢者の線維化進行例やウイルスが関与しないアルコール性肝障害や NASH においては、線維化の進行を抑制する、あるいは、改善する治療法の開発は急務である。マウスやラットの肝線維化は肝障害後の回復速度が速いため治療効果の判定が容易であるが、ヒトの場合は数年にわたる臨床試験が必要であることが治療法開発にとっての壁となっている。また、非侵襲的かつ反復して線維化度を判定するバイオマーカーの開発を進めることも重要である。以下、最近の抗線維化治療法開発について概説する。

### 1. 既存薬

コルヒチン、IL-10、ホスファチジルコリン、ビタミン E、漢方薬などは動物実験での有効性が数多く報告されてきたが、臨床的エビデンスに欠けている。PPAR $\gamma$  リガンドの星細胞活性化抑制作用が期待されたが、farglitazar を用い

たC型慢性肝炎による抗線維化作用は確認されなかった。シリマリンは抗酸化作用により細胞保護的、抗線維化的効果をもつと予想されるが一定の臨床効果は報告されておらず、HCV肝炎やNASHに対する臨床試験の結果を待たざるをえない。それらのなかで、ウルソデオキシコール酸は種々の肝障害において肝細胞保護的に作用する薬剤であるが、とくに原発性胆汁性肝硬変においては抗線維化作用が期待できる薬剤である<sup>12)</sup>。

## 2. 新しい抗線維化治療法のターゲット

### 1) 腸内細菌叢

近年の多数の研究成果は、腸内細菌叢由来の物質が肝臓の炎症、線維化やさらには発がんに寄与することを示している。リポポリサッカライド受容体であるTLR4の活性化は星細胞からのケモカインの遊離を促すのみならず、TGF- $\beta$ の擬似受容体であるBambi(BMP and activin membrane bound inhibitor)を低下させ、これにより星細胞のTGF- $\beta$ 感受性を増強させる。また、腸内細菌叢の変化が肝線維化に関与することも報告された<sup>13)</sup>。

### 2) microRNA

前述したようにmiRNAは星細胞の機能を制御するnon-coding RNAである。miR-29bがコラーゲン産生を抑制するため、核酸創薬の標的となりうる<sup>14)</sup>。

### 3) LOXL2

コラーゲンやエラスチンに架橋形成を行う際に重要で銅依存性の細胞外酵素であるため、LOXL2の阻害は抗線維化的に作用することが期待される。

### 4) nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

酸化ストレス応答で活性化される種々の遺伝子を転写調節するため、抗線維化作用を併せも

つと期待される。

## おわりに

肝線維化研究は最近の20年間で大きく進歩した。星細胞の機能解析が果たしてきた役割は大きい。本細胞の特異機能解析ですらまだ道半ばという段階である。すなわち、なぜに星細胞にビタミンAが貯蔵されるのか、星細胞活性化の真のトリガーは何なのか、発がん機構への関与はどうか、など疑問点は尽きない。また、抗線維化治療法開発のためには、線維化を評価するために肝生検というゴールドスタンダードに変わりうるバイオマーカー開発が必須である。肝細胞の機能維持、さらには発がん予防という観点から、肝線維化研究による肝硬変治療法開発は成し遂げなければならない医学的テーマである。

## 文 献

- 1) Wynn, T. A. and Ramalingam, T. R.: Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat. Med.* 18; 1028-1040, 2012
- 2) Kawada, N.: Evolution of hepatic fibrosis research. *Hepatology Res.* 41; 199-208, 2011
- 3) Friedman, S. L.: Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7; 425-436, 2010
- 4) Ogawa, T., Enomoto, M., Fujii, H., et al.: MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis. *Gut* 61; 1600-1609, 2012
- 5) Zeybel, M., Hardy, T., Wong, Y. K., et al.: Multigenerational epigenetic adaptation of the hepatic wound-healing response. *Nat. Med.* 18; 1369-1377, 2012
- 6) Troeger, J. S., Mederacke, I., Gwak, G. Y., et al.: Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice. *Gastroenterology* 143; 1073-1083, 2012
- 7) Barry-Hamilton, V., Spangler, R., Marshall, D., et

- al. : Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic micro-environment. *Nat. Med.* 16 ; 1009-1017, 2010
- 8) El-Serag, H. B. : Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 142 ; 1264-1273. e1, 2012
  - 9) Thuy le, T. T., Morita, T., Yoshida, K., et al. : Promotion of liver and lung tumorigenesis in DEN-treated cytoglobin-deficient mice. *Am. J. Pathol.* 179 ; 1050-1060, 2011
  - 10) Schrader, J., Gordon-Walker, T. T., Aucott, R. L., et al. : Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 53 ; 1192-1205, 2011
  - 11) Seki, E., Brenner, D. A. and Karin, M. : A liver full of JNK : signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches. *Gastroenterology* 143 ; 307-320, 2012
  - 12) Rockey, D. C. : Translating an understanding of the pathogenesis of hepatic fibrosis to novel therapies. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 11 ; 224-231, 2013
  - 13) Dapito, D. H., Mencin, A., Gwak, G. Y., et al. : Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. *Cancer Cell* 21 ; 504-516, 2012
  - 14) Sekiya, Y., Ogawa, T., Yoshizato, K., et al. : Suppression of hepatic stellate cell activation by microRNA-29b. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412 ; 74-79, 2011

## Summary

### Molecular Research on Liver Fibrosis

Norifumi Kawada\*

Liver fibrosis occurs along with chronic inflammation and hepatocyte damage caused by various etiologies, including viral hepatitis infection, alcohol abuse, and steatohepatitis. Hepatic stellate cells become activated when exposed to bioactive mediators released from injured hepatocytes and sinusoidal cells consisting of Kupffer cells, endothelial cells, and immune cells. They then undergo a phenotypic transition from vitamin A-storing quiescent cells into myofibroblast-like cells. These synthesize extracellular matrix materials including type I collagen. The molecular mechanism of stellate cell activation has evolved over the past 2 decades. Research has uncovered the epigenetic aspects of these mechanisms. Research on liver fibrosis has attracted researchers' attention to the relationship between hepatocarcinogenesis and the development of therapeutic strategies for treatment of chronic liver disease.

*Key words* : stellate cell, myofibroblast, extracellular matrix, growth factor, carcinogenesis

\**Department of Hepatology, Graduate School of Medicine, Osaka City University, 1-4-3 Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka-shi, Osaka 545-8585, Japan*

# 【総論 サイトグロビン研究の現況】

Current situation of cytoglobin research

河田 則文

Norifumi Kawada

Key words

グロビン, 酸素, 星細胞,  
臓器線維症, 発がん

要 約

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。著者らは肝星細胞の活性化に関わる分子群を調べる過程で, 2001年当時のデータベースに登録されていない蛋白質をラットからクローニングし, Stellate cell-Associated Protein (STAP) と命名した [NCBI Accession No. NM\_130744, *Rattus norvegicus* cytoglobin (Cygb)]。その後, ヒト及びマウスからもクローニングされ, 現在では Cygb と呼ばれている。グロビン蛋白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, パルオキシダーゼ様の活性を持つことが判っている。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 Cygb の組織発現とその発現調節機構, また, 最近話題となっている Cygb の発がんへの関与について論じたい。

## 1. サイトグロビンの生体内分布

ヒトを含む脊椎動物ではヘモグロビン (Hemoglobin, Hb), ミオグロビン (Myoglobin, Mb), ニューログロビン (Neuroglobin, 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。Ngb は中枢並びに末梢の神経組織や眼の網膜に発現する。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判っていた。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り。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, 活性化と共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) であることが判った<sup>2)</sup>。星細胞も含めてこれらの細胞はビタミン A 貯蔵能を持つことが興味深い。さらに Cygb は軟骨細胞, 骨芽細胞や骨細胞にも発現する<sup>3)</sup>。これら全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。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。

## 2. 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

大阪市立大学大学院医学研究科 肝胆膵病態内科学  
Department of Hepatology, Graduate School of Medicine, Osaka City University  
〒545-8585 大阪府大阪市阿倍野区旭町1-4-3 TEL: 06-6645-3811

養した際に星細胞の活性化とともに発現増加する蛋白質として 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。

Fodel E 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) 配列を持つことから示された<sup>4)</sup>。

Guo らは BEAS-2B 細胞と HeLa 細胞を低酸素 (1% O<sub>2</sub>) に暴露すると 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 -141 と -448 の 2 箇所に HIF-1 結合領域が、また、-144 にエリスロポエチン (Erythropoietin, EPO) 結合領域が存在し、これらは何れも低酸素による 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 の存在する Sp1 結合領域は低酸素による CYGB 発現には寄与しなかった。

さらに 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得ることを示した。

### 3. サイトグロビンの発がんへの関与

サイトグロビンと肝がんについては別稿に述べられているのでそれ以外の臓器発がんについて述べる。

#### (1) 口腔内癌とサイトグロビン

サイトグロビン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, cytoglobin, 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癌部において cytoglobin (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、この結果、著者らは、cytoglobin 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。

#### (2) 食道癌とサイトグロビン

2006 年に MacRonald らは食道がんのチロシス [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 遺伝子についてコントロールと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 のような癌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、サイトグロビン mRNA 発現が約 70% にまで低下することを報告した。TOC においてはサイトグロビン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>5)</sup>。

#### (3) 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。

#### (4) 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サイトグロビン発現低下は 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サイトグロビン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 (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。サイトグロビンが腫瘍抑制的であるとすると、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、サイトグロビン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>6)</sup>。

#### (5) 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、前立腺癌には低下することを免疫組織学的に示した。

## 6. 今後の展望

ラット肝臓の類洞壁を構成する星細胞から見出された Cytgb に関する研究が広がりを見せている。血管周皮細胞特異的なグロビンとして、微小環境での酸素局所センサーとしての機能が推測され、低酸素が関与する発がんへの関与が注目される。今後の展開が楽しみである。

## 文 献

- 1) Kawada N, Kristensen DB, Asahina K, *et al.* Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. *J Biol Chem.* 2001;276:25318-23.
- 2) Nakatani K, Okuyama H, Shimahara Y, *et al.* Cytoglobin/STAP, its unique localization in splanchnic fibroblast-like cells and function in organ fibrogenesis. *Lab Invest.* 2004;84:91-101.
- 3) Schmidt M, Gerlach F, Avivi A, *et al.* Cytoglobin is a respiratory protein in connective tissue and neurons, which is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem.* 2004;279:8063-9.
- 4) Fordel E, Geuens E, Dewilde S, *et al.* Cytoglobin expression is upregulated in all tissues upon hypoxia: an in vitro and in vivo study by quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;319:342-8.
- 5) McRonald FE, Liloglou T, Xinarianos G, *et al.* Down-regulation of the cytoglobin gene, located on 17q25, in tylosis with oesophageal cancer (TOC) : evidence for trans-allele repression. *Hum Mol Genet.* 2006;15:1271-7.
- 6) Shivapurkar N, Stastny V, Okumura N, *et al.* Cytoglobin, the newest member of the globin family, functions as a tumor suppressor gene. *Cancer Res.* 2008;68:7448-56.

☆

☆

☆

## 【 肝臓とサイトグロビン 】

Characterization of cytoglobin in the liver

元山 宏行・Le Thi Thanh Thuy・河田 則文

Hiroyuki Motoyama

Le Thi Thanh Thuy

Norifumi Kawada

## Key words

肝線維化, 星細胞,  
筋線維芽細胞, Cytoglobin

## 要 約

Cytoglobin (Cygb) は組織 pericyte 特異的に発現する哺乳類第 4 番目のグロビンである。肝臓では傍細胞洞に存在する星細胞に発現する。Cygb は Myoglobin (Mb) と同様、酸素 ( $O_2$ ) や一酸化窒素 (Nitric Oxide, NO) などのガス分子と結合可能な構造をしており、肝臓においても  $O_2$  の貯蔵と運搬を担っていると考えられる。これまでの種々の報告から、低酸素状態に応じて細胞内での Cygb 発現が亢進することが知られており、Cygb は酸素センサーとしての機能を持つと推測される。最近、Cygb が NO Dioxygenase (NOD) 活性を持つことが注目されている。一方、Cygb の過剰発現は酸化ストレスから星細胞を保護し、procollagen-1, Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 (TIMP-1) 遺伝子発現を低下させて肝線維化を抑制することが知られている。また Cygb を欠損させたマウスにジエチルニトロサミン (N, N-diethylnitrosamine: DEN) を投与して発がん誘導すると Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) や TGF- $\beta$  の発現と酸化ストレスのマーカーである nitro-tyrosine が増加し易発癌性になる。これらの事実から、Cygb の肝線維化、肝発がんなど肝疾患病態への関連の解析が期待される。

## はじめに

肝星細胞は肝細胞洞壁に存在し、多様な肝病態と深く関係している。肝臓に肝炎ウイルス感染やアルコール

多飲などで“障害”が加わると、肝実質細胞壊死が生じ、マクロファージや好中球が浸潤し“炎症”が惹起される。これに応じて Disse 腔や門脈周囲に存在する星細胞が活性化し、自ら Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) などのサイトカインを産生し、蛋白分解酵素 (Matrix Metalloproteinase, MMP) を多量に分泌して正常組織を破壊する。さらに、細胞外マトリックス (Extracellular Matrix, ECM) 物質を過剰に産生してそれらが局所に蓄積することで線維化を進展させる。このような星細胞活性化に応じた分子変動を調べる研究過程で、河田らは初代培養肝星細胞を用いてプロテオミクスによる網羅的分子解析を行った。解析の結果、星細胞の活性化に伴い発現変動する 21 kDa の蛋白質をクローニングし、星細胞活性化関連タンパク: Stellate cell Activation-associated Protein (STAP) と命名したり。この蛋白質のちに Neuroglobin (Ngb), Myoglobin (Mb), Hemoglobin (Hb) と並ぶグロビンスーパーファミリーに属する蛋白であることが明らかとなり、組織特異的に発現する哺乳類第 4 番目のグロビンとして Cytoglobin (Cygb) と名称が統一された<sup>1)</sup>。

Cygb は、X 線結晶構造解析から 2 つのヒスチジンのイミダゾール基がヘムを両側から挟み込むように 6 配位しており、酸素 ( $O_2$ ) や一酸化窒素 (Nitric Oxide, NO) などのガス分子と結合可能である。またペルオキシダーゼ様活性をもつことが分かっている。その他、がん組織での発現解析がすすんでおり、Cygb ががん抑制遺伝子としての機能を有するのではないかと議論されている。本稿では肝臓での Cygb 発現と機能解析の現状について概説する。

大阪市立大学大学院医学研究科 肝胆膵病態内科学

Department of Hepatology, Graduate School of Medicine, Osaka City University

〒 545-8585 大阪府大阪市阿倍野区旭町 1-4-3 TEL: 06-6645-3811



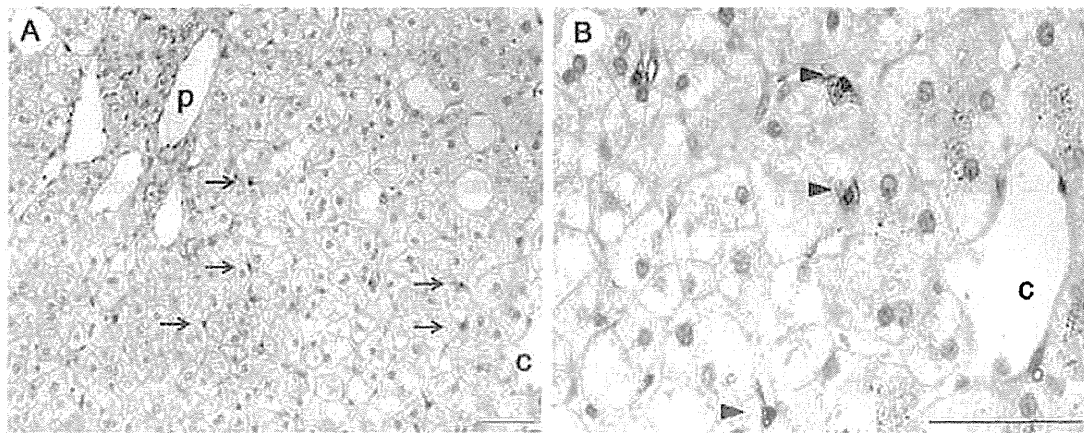


図1 正常ヒト肝組織でのCYGBの局在

(A) 正常肝臓組織では傍類洞に存在する。(矢印) Bar: 100  $\mu$ m  
 (B) 脂肪滴を含む星細胞の細胞質内に存在する(矢頭) p: 門脈, c: 中心静脈, Bar: 20  $\mu$ m

## 1. 肝臓でのサイトグロビンの局在

Cygb は脊椎動物の脳, 心臓, 肺, 腎臓, 消化管, 脾臓など様々な臓器に普遍的に発現する<sup>3)</sup>。肝臓では傍類洞の星細胞に特異的に発現する(図1)。肝細胞, 内皮細胞や Kupffer 細胞での発現は認めない。Bosselutらは Cygb が特異的な星細胞マーカーであり, 星細胞と portal myofibroblast を区別する有用なマーカーになると報告した<sup>4)</sup>。肝星細胞も含めて, 肝臓以外の臓器での Cygb 発現細胞はいずれも vitamin A 貯蔵能を有している。これらの細胞は内臓組織に存在する毛細血管周皮細胞としての pericyte であり, 微小循環調節をおこなったり, コラーゲン線維を産生できることが共通機能であるが, それらが Cygb の分子機能と関与するかについては明らかにされていない。

## 2. 肝臓でのサイトグロビンの機能

### 1) サイトグロビンとガス分子

Hb は赤血球に存在し  $O_2$  を運搬している。Mb は心筋や骨格筋などに存在し  $O_2$  を細胞内に貯蔵したりミトコンドリアへ運搬している。Ngb は中枢ならびに末梢の神経組織に発現していると報告されている。Cygb をコードする 190 アミノ酸配列は古典的グロビンをコードする 140 ~ 150 アミノ酸配列の両端に新規配列が添加されたもので, 中央部分の globin fold を規定す

る配列はほぼ共通している。また, その立体構造は古典的グロビンとは異なり, ヘム鉄原子の 6 配位がヒスチジンのイミダゾール基で占有されている。

しかしながら Cygb は Mb と同様に  $O_2$  や NO などのガス分子と結合可能であり, 生理的状态では  $O_2$  の貯蔵と組織局所への運搬を担っていると考えられる。低酸素刺激を加えた培養細胞や生体内組織では Cygb の発現が亢進することから Cygb 遺伝子は低酸素で活性化される転写因子で発現調節されるのではないかと議論されている。Fordelらは Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) ヘテロ欠損マウスにおいて Cygb 発現が抑制されることを報告し<sup>5)</sup>, Guoらは Cygb 遺伝子プロモーター領域に転写調節活性をもつ低酸素応答部位 Hypoxia Response Element (HRE) を 2 つ同定し報告している<sup>6)</sup>。

### 2) サイトグロビンと NO 代謝

NO は, 血管内皮細胞から産生され, 主として血管平滑筋細胞の収縮を調節しており, また, 血管透過性調節作用, 血小板凝集抑制作用, 白血球接着抑制作用, 活性酸素産生抑制作用, 活性酸素不活化作用, 活性酸素による脂質酸化抑制作用などが知られている。NO による血管拡張作用の機序は, NO がグアニレートシクラーゼを活性化し, 細胞内での環状グアノシン酸 (cGMP) 濃度が上昇してプロテインキナーゼ G を活性化することに由来する。これにより細胞内から細胞外へと  $Ca^{2+}$  が流出して血管平滑筋が弛緩する。即

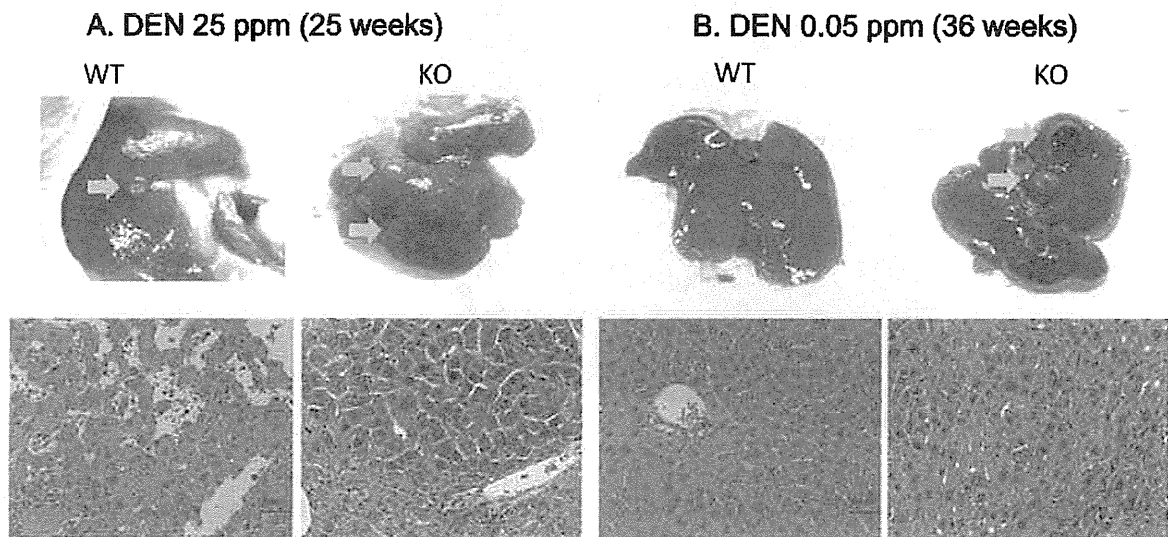


図2 Cygb KO マウス肝腫瘍の病理像

(A) DEN 25 ppm (25 weeks) 投与群  
 (B) DEN 0.05 ppm (36 weeks) 投与群のいずれにおいても肝内に肝細胞癌を確認した。  
 (矢印) Bar : 50  $\mu$  m

ち局所の NO 濃度は微小循環調節に寄与する。肝臓において星細胞は類洞を取り囲むように配置する毛細血管 pericyte であり、アクチンとミオシンが高発現している。活性化して細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が増加すると、カルモジュリン依存性にミオシン軽鎖がリン酸化され、アクチンフィラメントとミオシンフィラメントが相互作用し、星細胞収縮が惹起される。Hb や Mb は NO に対して二原子酸素添加 (dioxygenation) させることがわかっている。近年、Cygb にも同様の機能があり Cygb- NO dioxygenase (NOD) 活性はアスコルビン酸、チトクローム b5 の存在下で高いという報告がある<sup>7)</sup>。

従って、星細胞に発現する Cygb は NO 代謝の調節を通じて類洞微小循環を制御する可能性がある。

### 3) サイトグロビンと酸化ストレス

Xu らは 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、50  $\mu$  M ferric nitrilotriacetate と 20  $\mu$  M arachidonic acid (Fe/AA) を用いた酸化ストレスに暴露した。その結果、酸化ストレスマーカーである Malondialdehyde (MDA) と 4-Hydroxy-2-Nonenal (4-HNE) が減少し、Cygb の過剰発現は酸化ストレスから星細胞を保護することを示した。

また、TGF- $\beta$  と Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1

(TIMP-1) の発現低下がみられ、転写因子である AP-1 や NF- $\kappa$ B の活性化制御が観察された。一方、彼らは rAAV-2 を経門脈的に肝臓のデスミン陽性細胞に過剰発現させた状態で、四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>; 0.5ml/kg)、総胆管結紮によって肝障害、線維形成を誘導した。Cygb 過剰発現状態では両線維化モデルともに著明な AST の低下を認め、procollagen-1, TGF- $\beta$ 1, TIMP-1 遺伝子発現が低下し、肝線維化が抑制された。以上のことから Cygb を過剰発現させると酸化ストレスのみならず、肝星細胞の活性化を抑制して線維形成が阻害されることが判明した<sup>8)</sup>。

### 4) サイトグロビンと肝癌

著者らは作成した Cygb ノックアウトマウス (Cygb KO) を用いて肝癌と Cygb の関連について検討した。このマウスに対して肝癌誘発剤であるジエチルニトロサミン (N, N-Diethylnitrosamine : DEN) をそれぞれ 25 週間 (25 ppm), 36 週間 (0.05 ppm) 飲水投与しマウスに発がん誘導した。その結果、25 週間 (25 ppm) 投与群では野生型の発癌率は 44.4 % であったのに対し、Cygb KO マウスは 100 % の発癌であった。36 週間 (0.05 ppm) 投与した群では野生型は発癌しなかったが、Cygb KO マウスは 57.1 % の発癌率であった (図2)。Cygb KO マウスは星細胞マーカーである Cellular

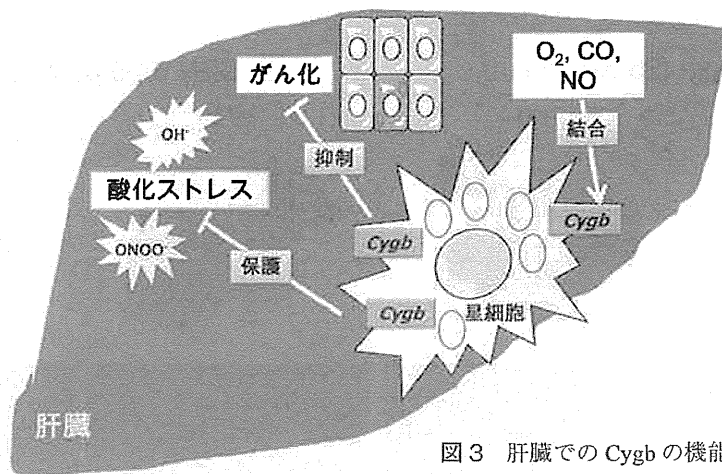


図3 肝臓での Cygb の機能

Retinol Binding Protein-1 (CRBP-1) や desmin が陽性であり Cygb 欠損状態であっても星細胞は存在している。

また Sirius red 染色では肝細胞周囲に pericellular fibrosis を認め、Akt の活性化、IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  や TGF- $\beta$  の発現上昇が観察された。癌関連遺伝子 (cyclin D2, p53, Pak1, Src, Cdkn2a, Cebpa) の発現も上昇した。Cygb は peroxidase 活性を有し peroxynitrite の形成を軽減させることで、細胞を酸化ストレスによる障害から保護するが、Cygb KO マウスでは酸化ストレスのマーカーである nitro-tyrosine が増加した<sup>9)</sup>。

以上の結果から本マウスモデルを通じて Cygb の発がん抑制への関与が示唆され、さらなる解析が待たれるところである。

### おわりに

Cygb はユビキタスに各臓器に発現しているが、各臓器での機能はまだ解析途上である。Cygb は脊椎動物第4番目のグロビンであり、ガス分子の貯蔵や輸送、NO代謝、抗酸化ストレス作用、癌抑制遺伝子としての機能を持つ事が明らかとなってきた。今後、さらに肝臓特異的に線維化、発がんなどの病態への関連の解析が期待される。

### 文献

1) Kawada N, Kristensen DB, Asahina K, *et al.* Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. *J Biol Chem.* 2001; 276:25318-25323.

2) Burmester T, Ebner B, Weich B, *et al.* Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Mol Biol Evol.* 2002; 19:416-421.

3) Nakatani K, Okuyama H, Shimahara Y, *et al.* Cytoglobin/STAP, its unique localization in splanchnic fibroblast-like cells and function in organ fibrogenesis. *Lab Invest.* 2004; 84:91-101.

4) Bosselut N, Housset C, Marcelo P, *et al.* Distinct proteomic features of two fibrogenic liver cell populations: hepatic stellate cells and portal myofibroblasts. *PROTEOMICS.* 2010; 10:1017-1028

5) Fordel E, Geuens E, Dewilde S, *et al.* Cytoglobin expression is upregulated in all tissue upon hypoxia: an in vitro and in vivo study by quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 319: 342-8

6) Guo X, Philipsen S, Tan-Un KC, *et al.* Study of the hypoxia-dependent regulation of human CYGB gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 364: 145-50.

7) Gardner AM, Cook MR, Gardner PR. Nitric-oxide Dioxxygenase Function of Human Cytoglobin with Cellular Reductants and in Rat Hepatocytes. *J Biol Chem.* 2010 Jul 30;285 (31) :23850-7

8) Xu, R., Harrison, P.M., Chen, M., *et al.* Cytoglobin overexpression protects against damage-induced fibrosis. *Mol. Ther.*, 13, 1093-1100.

9) Thuy le, T.T., Morita, T., Yoshida, K., *et al.* Promotion of liver and lung tumorigenesis in DEN-treated cytoglobin-deficient mice. *Am. J. Pathol.*, 179, 1050-1060.

### < 細胞 ニュース >

#### 第42回日本免疫学会学術集会のお知らせ

開催年月日：2013年12月11日(水)～13日(金)

代表者：清野 宏 (東京大学教授)

開催地：千葉市美浜区

会場：幕張メッセ

事務局連絡先：第42回日本免疫学会学術集会事務局

TEL：03-3511-9795

FAX：03-3511-9788

常設事務局 URL：<http://www.jsi-men-eki.org/>

開催案内 URL：[http://www.jsi-men-eki.org/jsi42/index\\_jp.html](http://www.jsi-men-eki.org/jsi42/index_jp.html)

E-mail：[conf-jsi@s4.dion.ne.jp](mailto:conf-jsi@s4.dion.ne.jp)

## 【 哺乳類第4番目のグロビン, サイトグロビンの発見 】

Discovery of cytoglobin, the fourth mammalian globin

吉里 勝利<sup>1)</sup>・河田 則文<sup>2)</sup>

Katsutoshi Yoshizato

Norifumi Kawada

Key words

cytoglobin, globin family, hepatic stellate cells, fibrogenesis

## 要 約

私たちは、肝臓星細胞の活性化に関するタンパク質を探索する研究を通じて新しいヘム蛋白「星細胞活性化関連蛋白 (STAP)」を2001年に発見した。STAPはその後の構造解析によって、新しいグロビン蛋白であることが分かり、ドイツの研究者が2002年に提案したサイトグロビン (cytoglobin [Cygb]) を世界共通名とすることになった。グロビンはヘモグロビンやミオグロビンに代表される様に酸素結合能を持つヘム蛋白質である。私達は、「グロビン蛋白としてのCygbが障害ストレス下での肝臓病発症とどのように関係しているのか」の問題意識を持ちながらCygbの研究を展開している。

本稿では、生命活動におけるグロビンの役割を概観しながら、Cygbの発見に至った経緯と私達が考えているCygbの機能に関する考えを紹介したい。

## 1. グロビンとは何か

グロビンは酸素の運搬と貯蔵に関わるヘム含有タンパク質 (ヘムタンパク質) であり、6個あるいは8個のアルファ-ヘリックスドメイン ( $\alpha$ -helical domain) の二次構造を持ち、これらがグロビンフォールドを形成することをその構造的特徴としている。多細胞生物 (植物と動物) のみならず、単細胞真核生物、古細菌、及び真性細菌にまで生物界に広く分布している。この事は、グロビンが生命の起源時から存在し、従って、生物の生存にとって必須な蛋白である事を示している。ヘモ

グロビン (Hb) とミオグロビン (Mb) はグロビンの代表的タンパク質であり、謂わば、グロビン、あるいはタンパク質全体の標準モデルタンパク質として最も良く研究されてきた。このことは、立体構造が最初に明らかにされたタンパク質がミオグロビンである事を考えると了解される。HbとMbは、8個の $\alpha$ -helical domainを持っており、その内の3つずつが互いにサンドイッチ様に重なり合ってコンパクトに折れ畳まれているような形をしており、これはthree-over-three (3/3)  $\alpha$ -helical globin fold (3/3globin-fold) 構造と呼ばれ、グロビン構造の基本的モチーフである。1970年代まではグロビン蛋白として、Hb, Mb, およびマメ科植物の共生ヘモグロビン [Symbiotic Hemoglobin (SHb), あるいはマメ科植物の英語名 legume の意味を込めて legHb とも呼ばれる] の3種しか知られていなかった。その後、ゲノム解析の手法を取り入れた研究が進み、現在では、グロビンに分類される蛋白の種類数はおよそ700に達する。

私たちはこのグロビン蛋白に分類されるサイトグロビン (cytoglobin [Cygb]) の発見に関与した<sup>1)</sup>。

本稿では、その発見の経緯と、このサイトグロビンの機能に関する私たちの考えを述べたい。

## 2. 生命の起源

Cygbは発見後未だ12年と日が浅くその機能は不明なことが多い。グロビン一般の機能を理解しておくことは、Cygbの機能を推定する際、役に立つと思われる。リボソームRNAの塩基配列情報を取り入れた生物の系統発生研究の成果<sup>2)</sup>が契機となって、現在、生

1) 広島大学名誉教授, 大阪市立大学客員教授, (株)フェニックスバイオ 学術顧問

2) 大阪市立大学大学院医学研究科 肝胆臓病態内科学教授

Professor Emeritus of Hiroshima University, Guest professor of Osaka City University, Academic advisor of PhoenixBio Co., Ltd.<sup>1)</sup>Professor of Department of Hepatology, Graduate School of Medicine, Osaka City University<sup>2)</sup>