急性および慢性ラット肝障害の肝星細胞における TGF- β シグナル伝達機構に関する検討

田 橋 賢 也

(内科学第三講座)

Differential Regulation of TGF- β Signal in Hepatic Stellate Cells between Acute and Chronic Rat Liver Injury

Yoshiya TAHASHI

はじめに

TGF- β (Transforming Growth Factor-beta) は、さまざまな細胞外マトリックス (ECM) の産生を促し、細胞の分化、増殖、移動、接着を調節することにより組織の修復過程において重要な役割を果たしている。肝臓においては、急性肝炎後には TGF- β の発現が亢進し、肝組織の再構築に深く関与している。その際特記すべきは、このような創傷治癒過程における ECM の産生は厳密に制御され、TGF- β による ECM の蓄積は一過性で終了することである。したがって、通常は急性の肝障害で肝線維化はきたさない。しかし、肝炎ウイルス感染などの慢性的な障害因子が存在すれば、TGF- β の持続的な高い発現を伴って肝線維化は進行し、小葉構造の改築が加わることで慢性肝疾患の終焉像としての肝硬変に至る。急性肝疾患における一過性の ECM 産生には、活性化星細胞 (HSC) が中心的な役割を果たすことが知られている。一方、慢性肝疾患においては、活性化した HSC は形質転換して筋線維芽細胞様 (MFB) となる。ところが、MFB は活性化 HSC と異なり、持続的に ECM を産生することで肝線維化の発症・進展に重要な役割を演じるようになる。これらの現象を TGF- β シグナル伝達の視点から考察すれば、急性肝障害後の活性化 HSC においてはシグナル伝達の制御機構が働くのに対し、慢性肝疾患における MFB ではこの制御機構が働かなくなるために TGF- β のシグナルが恒常的に伝達されているので

はないかと推測される。

目 的

我々が日常診療において経験する急性・慢性肝疾患のこのような病態の違いは、これまで組織標本や動物モデルを用いて数多く報告されてきた。しかしながら、生体内での HSC 活性化の制御機構、ならびに HSC から MFB への形質転換がどのような分子機構によって生じるかについては不明な点が多い。そこで今回、急性肝障害後の肝再構築過程での活性化 HSC と、慢性肝障害に伴う肝線維化過程での MFB における TGF- β シグナル伝達の相違を、その主要なシグナル伝達因子である Smad2 および抑制型 Smad7 の役割に重点をおいて解析し、HSC 活性化の制御機構および MFB への形質転換による肝線維化機構について検討した。

方 法

急性肝炎モデルとして Wistar 雄性ラット 200 g に CCl₄/オリーブ油 (1:1) 0.50 ml/100 g.BW. を 1 回胃内投与し 0, 24, 36, 48, 72 hr 後、全肝採取、あるいは collagenase 灌流及び Nycodenz 比重遠心法にて肝細胞と HSC に分離した。また、慢性肝炎モデルは、Wistar 雄性ラット 60-75 g に CCl₄/オリーブ油 (1:7) 0.15 ml を週 3 回腹腔内投与にて作成し、投与後 3 週目と 6 週目のラットを用いた。得られた組織あるいは細胞から mRNA を抽出後、TGF- β_1 , Smad7 および線維化の指標としての標的

遺伝子である Plasminogen activator inhibitor type I (PAI-I), pro- $\alpha 2(1)$ Collagen (COL1A2) の発現の推移を Northern blot にて検討した。同様に Smad2, 7 蛋白の発現, およびリン酸化 Smad2 を Western blot にて確認した。続いて初代培養 HSC 及びそこから継代を繰り返すことで不死化した α -SMA 陽性 MFB に対する外因性 TGF- β_1 による Smad2, 7 蛋白の発現, およびリン酸化 Smad2 を解析した。さらに TGF- β のシグナル伝達を解析するために, まず野生型 I 型受容体 T β RI (WT), Smad2, 7 および構成的活性型 I 型受容体 T β RI (T204D) と不活型 I 型受容体 T β RI (K232R), 不活型 Smad2 (3S-A) を作成し, 発現ベクター pcDNA3 に組み込んだ。これらベクターを PAI-I の転写領域を組み込んだルシフェラーゼベクターである p3TP-Lux とともに培養細胞に遺伝子導入し, 転写活性を測定した。

結 果

(1) 急性肝炎モデルにおいて, TGF- β_1 , Smad7, PAI-I, COL1A2 mRNA はいずれも肝細胞においてはほとんど認められなかったが, HSC において 36 hr より発現が認められ, 72 hr で COL1A2 はピークを示しその他は減少していた (Fig. 1-A)。急性肝障害の肝細胞と HSC における Smad2, 7 蛋白の発現および Smad2 のリン酸化を Western blot にて検討したところ, Smad2 蛋白の経時的な発現変化は認められなかったが, HSC において 24 hr から 36 hr 後に Smad2 の強いリン酸化が認められ 48 hr より減少していた。一方 Smad7 は HSC においてそれより遅れて 36 hr から 72 hr にかけて発現の増加が認められた (Fig. 1-B)。つまり Smad7 の発現により Smad2 のリン酸化が 72 hr 後には抑制され, TGF- β のシグナルが阻害された可能性が示唆された。急性肝障害 36 hr 後の HSC を培養して抗 TGF- β 中和抗体で処理すると, Smad2 のリン酸化は抑制された (Fig. 1-C)。つまり急性肝障害の HSC では, TGF- β のオートクラインによるシグナル伝達により Smad2 がリン酸化されていると考えられた。

(2) 慢性肝炎モデルにおいて, TGF- β_1 , PAI-I, COL1A2 mRNA はいずれも 3 週後より MFB において発現が増加し, 6 週まで持続していた。一方 Smad7 は急性モデルとは異なり, mRNA の発現の増加は認められなかった (Fig. 2-A)。

Western blot による蛋白レベルにおける検討でも

やはり急性モデルとは異なり, Smad7 蛋白の発現増加は認められず, α -SMA 陽性 MFB におけるリン酸化は 3 週から 6 週まで持続的であった (Fig. 2-B)。つまり慢性モデルでは Smad7 の発現の増加が認められないために, Smad2 が恒常的にリン酸化され線維化のシグナルが常に伝達されている可能性が示唆された。慢性肝障害 3 週後の MFB を培養して抗 TGF- β 中和抗体で処理すると, Smad2 のリン酸化は抑制された (Fig. 2-C)。つまり MFB でも HSC と同様に, TGF- β のオートクラインによるシグナル伝達により Smad2 がリン酸化されていると考えられた。

(3) HSC と MFB のシグナル伝達の相違をさらに詳細に検討するために培養細胞を用いて解析を行った。野生型の I 型受容体 T β RI (WT), Smad2, 7 および構成的活性型 I 型受容体 T β RI (T204D) と不活型 I 型受容体 T β RI (K232R), Smad2 の C 末端の SSXS モチーフのセリンをアラニンに置換し, リン酸化を不能とした不活型 Smad2 (3S-A) を作成し発現ベクターの pcDNA3 に組み込んだ。これらを PAI-I のプロモーター領域を含んだルシフェラーゼベクターである p3TP-Lux と共に HSC に遺伝子導入し, 転写活性を測定した。PAI-I のルシフェラーゼ活性は TGF- β の添加で増加し, 中和抗体で無添加に比べやや低下傾向を示した。T β RI (K232R) 導入でやや低下傾向を示し, T β RI (T204D) および T β RI (T204D) と Smad2 の導入で強く刺激されたが, Smad2 (3S-A) の導入により抑制された (Fig. 3-A)。つまり TGF- β は Smad2 の活性化により直接的に PAI-I の転写活性を調節していると考えられた。Smad7 の遺伝子導入による検討においては, Smad7 のみの導入にて転写活性は約 40% に低下し, T β RI (T204D) によって活性化された PAI-I のルシフェラーゼ活性は smad7 の導入により約 37% に低下した (Fig. 3-B)。また, 外因性 TGF- β_1 により活性化された場合においても, Smad2 でやや上昇したが Smad2 (3S-A), Smad7 の導入で抑制された (Fig. 3-C)。つまり Smad7 が TGF- β による PAI-I の転写活性を直接的に抑制していると考えられ, ラットを用いた動物モデルでの現象論を裏付ける結果となった。

(4) 次に慢性肝障害に対応して MFB の培養細胞を用いた検討を行った。HSC と比較した MFB の TGF- β_1 mRNA の発現を Northern blot で調べた

Fig. 1. In acute liver injury, endogenous TGF- β -mediated Smad 7 in the activated HSCs might terminate the fibrotic signal by phosphorylated Smad 2.

- (A) Temporal changes in the expression of TGF- β_1 , Smad 7, PAI-1 and COL1A2 mRNAs in hepatocytes (H) and HSCs (S) after acute intoxication with CCl₄. Hepatocytes and HSCs were obtained from the normal rat livers and injured livers at the indicated times after CCl₄ administration. Aliquots of 2 μ g of poly (A) RNA extracted from hepatocytes or HSCs were applied into each lane, and blots were hybridized with ³²P-labeled random-primed cDNA probes for TGF- β_1 , Smad 7, PAI-1 or COL1A2. The expression of GAPDH is shown as an internal control in the lower panel.
- (B) Smad 7 might prevent the autocrine TGF- β -mediated phosphorylation of Smad 2 in the activated HSCs after acute liver injury. The expression of phosphorylated Smad 2, Smad 2 and Smad 7 in hepatocytes (H) and HSCs (S) after acute intoxication with CCl₄ were analyzed by immunoblot analyses. Hepatocytes and HSCs were obtained from normal rat livers and injured livers at the indicated times after CCl₄ administration. Aliquots of cell lysates were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies against phosphorylated Smad 2, Smad 2 and Smad 7.
- (C) Blockage of autocrine TGF- β signal by neutralizing anti-TGF- β antibody treatment results in decrease in Smad 2 phosphorylation in HSCs isolated from injured liver. HSCs isolated from the injured liver after CCl₄ administration were treated with or without 5 μ g/ml anti-TGF- β antibody. Aliquots of cell lysates were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies against phosphorylated Smad 2 and Smad 2.

Fig. 2. Under a low level of Smad 7 throughout chronic liver injury, the constitutive phosphorylation of Smad 2 by endogenous TGF- β is observed in MFBS.

- (A) Temporal changes in the expression of TGF- β_1 , Smad7, PAI-1 and COL1A2 mRNAs in hepatocytes (H) and MFBS (M) following chronic intoxication with CCl₄. Hepatocytes and MFBS were obtained from normal rat livers and injured livers at 36 hr after last treatment of CCl₄ at 3 and 6 weeks. Aliquots of 2 μ g of poly (A) RNA extracted from hepatocytes or MFBS were applied to each lane, and the blots were hybridized with ³²P-labeled random-primed cDNA probes for TGF- β_1 , Smad 7, PAI-1 or COL1A2. The expression of GAPDH is shown as an internal control in the lower panel.
- (B) Temporal changes in the expression of phosphorylated Smad 2, Smad 2, Smad 7 and α SMA in hepatocytes (H) and MFBS (M) following chronic intoxication with CCl₄ were analyzed by immunoblot analyses. Hepatocytes and MFBS were obtained from normal rat livers and injured livers at 36 hr after last treatment of CCl₄ at 3 and 6 weeks. Aliquots of cell lysates were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies against phosphorylated Smad 2, Smad 2, Smad 7 and α SMA. α SMA is used as a marker of HSC activation in the lower panel.
- (C) Blockage of autocrine TGF- β signal by neutralizing anti-TGF- β antibody treatment results in decrease in Smad 2 phosphorylation in MFBS isolated from chronically injured liver. MFBS isolated from chronically injured liver were treated with or without 5 μ g/ml anti-TGF- β antibody. Aliquots of cell lysates were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies against phosphorylated Smad 2 and Smad 2.

Fig. 3. Smad 7 inhibits TGF-β signal requiring Smad 2 phosphorylation by the activated TGF-β receptor in primary cultured HSCs.

(A) Phosphorylation of Smad 2 by the activated receptor is necessary for TGF-β signaling in primary cultured HSCs. Primary cultured HSCs were transfected with p3TP-Lux alone or together with the indicated combinations of TβRI (K232R), TβRIWT, TβRI (T204D), Smad 2WT or Smad 2 (3S-A). The cells were incubated overnight in the absence or presence of 200 pM TGF-β₁ or 5 μg/ml anti TGF-β antibody, and the relative luciferase activity was measured in cell lysates. The luciferase activity was normalized to the Renilla luciferase activity and is expressed as the mean±SD (n=4) from a representative experiment.

(B) Smad 7 inhibits the transcriptional response of the 3TP promoter by the activated TβRI in primary cultured HSCs. Primary cultured HSCs were transfected with p3TP-Lux alone or together with the activated TβRI (T204D) in the absence or presence of Smad 7. The cells were cultured overnight, and the relative luciferase activities were measured in the cell lysates. The luciferase activity was normalized to the Renilla luciferase activity and is expressed as the mean±SD (n=4) from a representative experiment.

(C) Smad 2 (3S-A) or Smad 7 inhibits the transcriptional response of the 3TP promoter to exogenous TGF-β₁ in primary cultured HSCs. Primary cultured HSCs were transfected with p3TP-Lux alone or together with Smad 2WT, Smad 2 (3S-A) or Smad 7. The cells were cultured overnight in the absence or presence of 200 pM TGF-β₁, and the relative luciferase activities were measured in the cell lysates. The luciferase activity is normalized to the Renilla luciferase activity and is expressed as the mean±SD (n=4) from a representative experiment.

Fig. 4. (continued)

Fig. 4. Under a low level of Smad 7, TGF-β receptor activated by endogenous TGF-β can constitutively phosphorylate Smad 2 and stimulate 3TP promoter in the cultured MFBs.

- (A) Rat cultured MFBs highly express TGF-β₁. Aliquots of 2 μg of poly (A) RNA extracted from primary cultured HSCs or cultured MFBs were applied into each lane, and blots were hybridized with ³²P-labeled random-primed cDNA probes for TGF-β₁. The expression of GAPDH is shown as an internal control in the lower panel.
- (B) TGF-β cannot induce Smad 7 expression, and highly phosphorylated Smad 2 is subsequently observed in the cultured MFBs. The cultured MFBs were treated with 200 pM TGF-β₁ or 5 μg/ml neutralizing TGF-β antibody. Aliquots of cell lysates at the indicated times after TGF-β₁ stimulation were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies against phosphorylated Smad 2, Smad 2 and Smad 7.
- (C) Phosphorylation of Smad 2 by the activated receptor is necessary for autocrine TGF-β signaling in the cultured MFBs. The cultured MFBs were transfected with p3TP-Lux alone or together with the indicated combinations of TβRI (K232R), TβRIWT, TβRI (T204D), Smad 2WT or Smad 2 (3S-A). The cells were incubated overnight in the absence or presence of 200 pM TGF-β₁ or 5 μg/ml neutralizing TGF-β antibody, and the relative luciferase activity was measured in cell lysates. The luciferase activity was normalized to the Renilla luciferase activity and is expressed as the mean±SD (n=4) from a representative experiment.
- (D) Exogenous Smad 7 can inhibit the transcriptional response of the 3TP promoter by the activated TβRI. The cultured MFBs were transfected with p3TP-Lux alone or together with the activated TβRI (T204D) in the absence or presence of Smad 7. The cells were cultured overnight, and the relative luciferase activities were measured in the cell lysates. The luciferase activity is normalized to the Renilla luciferase activity and is expressed as the mean±SD (n=4) from a representative experiment.
- (E) Smad 2 (3S-A) or Smad 7 inhibits the transcriptional response of the 3TP promoter to exogenous TGF-β₁ in cultured MFBs. MFBs were transfected with p3TP-Lux alone or together with Smad 2WT, Smad 2 (3S-A) or Smad 7. The cells were cultured overnight in the absence or presence of 200 pM TGF-β₁, and the relative luciferase activities were measured in the cell lysates. The luciferase activity is normalized to the Renilla luciferase activity and is expressed as the mean±SD (n=4) from a representative experiment.

ところ、動物モデルでの結果同様 MFB で TGF-β の強い発現を認めた (Fig. 4-A). TGF-β₁ を添加した際の Smad2, 7 蛋白の発現および Smad2 のリン酸化を western blot にて調べたところ、Smad2 の経時的な変化は認められなかったが、TGF-β₁ の添加前よりリン酸化されており、添加により多少の増強が認められたがほとんど変化はなく、中和抗体により抑制された。一方、Smad7 は HSC とは異なり発現の増加が認められなかった (Fig. 4-

B). つまり MFB においては TGF-β のオートクラインの刺激によって Smad7 のインダクションがかからないために、持続的に Smad2 がリン酸化されているのではないかと考えられた。MFB においてもと高活性を示す PAI-I のルシフェラーゼ活性は TGF-β によりさらに増加し、中和抗体により約 50% に減少した。TβRI (T204D) や Smad2 を同時に導入した場合には約 1.4 から 1.5 倍に上昇し、TβRI (K232R) あるいは Smad2 (3S-A) の導入で約

50%に減少した (Fig. 4-C). つまり MFB においても TGF- β のシグナル伝達には Smad2 の活性化が直接的に必要であると考えられた. 次に MFB における Smad7 の反応性を調べた. もともと高活性を示す PAI-I のルシフェラーゼ活性は, T204D でさらに刺激された場合においても Smad7 の導入により 50%以下に減少した (Fig. 4-D). 外因性 TGF- β_1 による反応を調べた場合でもやはり Smad2 (3S-A) 同様 Smad7 の導入にて PAI-I の活性は抑制された (Fig. 4-E). つまり MFB においては TGF- β のオートクラインシグナル伝達により Smad7 の発現は誘導されないものの, 強制的な導入により HSC と同様シグナル伝達を抑制し得ると考えられた.

考 察

TGF- β は ECM 産生や細胞増殖の調節など多彩な機能を有する. 創傷治癒など生理的条件下でこれらの多彩な機能を発揮するためには, TGF- β の活性化から Smad による標的遺伝子の転写活性に至るシグナル伝達の各過程において, 標的となる細胞に特異的でかつ厳密な正と負の制御機構が必要となる. 今回我々は, 急性肝炎後の肝組織の再構築過程において, 活性化した HSC のオートクライン TGF- β シグナルにより誘導された Smad7 が, HSC による ECM の過度の蓄積を抑え, 線維化シグナルを一過性に終息させる分子であることを報告した. これら一連の過程において, TGF- β シグナル伝達は ECM 産生を介して生理的に働くことにより, 創傷治癒にとって重要な役割を担っていると考えられる (Fig. 5-A). しかし慢性肝障害において形質転換した MFB では, 何らかの理由により Smad7 の誘導が起こらなくなり, Smad2 を介した TGF- β シグナルが恒常的に伝達されるようになる. この場合の TGF- β シグナルは, MFB 周囲の ECM を持続的に蓄積させ線維化を進行させることからいわば病的なシグナルであると言える (Fig. 5-B).

急性肝障害後の肝再構築過程に認められる生理的な TGF- β シグナルと, 慢性肝障害における線維化に関わる病的なシグナル伝達制御機構の違いを理解することは, 線維化機構の解明のみならずその治療法の開発および副作用を予測する上で必要不可欠であると考えられた.

(A) Acute liver injury

(B) Chronic liver injury

Fig. 5. Differential regulation of autocrine TGF- β signal between HSCs during acute liver injury and MFBs during chronic liver injury.

- (A) In the absence of endogenous TGF- β_1 ($T\beta_1$), Smad 7 and PAI-1 are not induced in normal HSCs. In the presence of endogenous TGF- β_1 at 24–48 hr after single CCl_4 administration, the activated $T\beta RI$ phosphorylates Smad 2. The phosphorylated Smad 2 dissociate from the receptor, bind to Smad 4, and then enter the nucleus. The activated Smads complexes bind to target promoters including PAI-1 gene. However, the signal simultaneously activates Smad 7 promoter. At 72 hr after CCl_4 administration, Smad 7 protein induced by TGF- β signal terminates Smad 2 activation. As a result, during acute liver injury, this negative feedback mechanism of autocrine TGF- β signal results in a transient ECM production in the activated HSCs, which may thus contribute to tissue repair.
- (B) In the chronic injured liver, MFBs also produce TGF- β and activate their TGF- β receptors in an autocrine fashion. In the presence of low level antagonistic Smad 7, Smad 2 phosphorylation can be constantly mediated by the activated TGF- β receptor, and promotes stable ECM production such as PAI-1. As a result, during chronic liver injury, this constitutive autocrine TGF- β signal results in ECM accumulation by MFBs, which may eventually develop into accelerated liver fibrosis.