<原 著>

四塩化炭素肝細胞傷害時の修復過程における フィブロネクチンの産生動態 —特に細胞性フィブロネクチン mRNA の発現—

竹内 司 石渡 俊行 工藤 光洋 浅野 伍朗*

要 旨：四塩化炭素投与ラットを用い、肝細胞傷害後の修復過程におけるフィブロネクチン (FN) の産生動態についてそのアイソフォームに着目し、免疫組織化学的および分子病理学的に検討した。血漿型フィブロネクチンを産生、分泌していると考えられている肝臓において、細胞性フィブロネクチンは肝細胞、非実質細胞の両方で産生されており、類洞壁や門脈域に存在していることが確認された。傷害肝においてその産生は7日、14日で著しく増加しており、21日、28日には線維化巣内の非実質細胞とその周囲の肝細胞に豊富な局在を示した。また、対照肝、傷害肝を通してそのアイソフォームパターンはED-A+ED-Bであり変化しなかった。以上、細胞性フィブロネクチンが正常肝組織において類洞壁の構築や細胞の移動、増殖などに寄与していると共に、肝細胞傷害後の線維化に強く関与していることが示唆された。

索引用語： 肝線維化 四塩化炭素 細胞性フィブロネクチン
選択的スプライシング *in situ* hybridization

緒 言

肝細胞傷害後の肝修復過程において細胞外基質が重要な役割を果たしていることが知られている¹⁻⁴⁾。肝修復の一つの形である線維化の初期にフィブロネクチンがコラーゲンに先立って増加することは興味深い事実である¹⁾⁵⁾。近年フィブロネクチンは選択的スプライシングにより1つの遺伝子から複数のアイソフォームがつくられることが報告され、そのうちED-A (extra domain A)をもつフィブロネクチンを細胞性フィブロネクチンといい血漿型フィブロネクチンと区別するようになった。肝線維化に関係するフィブロネクチンのアイソフォームとその産生動態を検討する目的でここにラット四塩化炭素肝傷害モデルを用いて、細胞性フィブロネクチンの mRNA の発現と局在を観察、検討した。

材 料

ウィスター系雄性ラット体重150gに50%四塩化炭素/オリーブ油混合液を0.15ml/100g体重の割合で週2回腹腔内に投与し、投与開始から3, 7, 14, 21,

28日後に屠殺し肝組織を採取した。対照として同系雄性ラットにオリーブ油0.15ml/100g体重を投与し、その肝組織を用いた。

方 法

1. 光学顕微鏡的観察

採取された肝組織は10%ホルマリン液にて固定し、型のごとく脱水包埋後2.5μmの切片を作成しヘマトキシリンエオジン、アザンマロリー染色を施行した。

2. 免疫組織化学的観察

組織の一部は4%パラホルムアルヒド液にて4～6時間固定後、20%蔗糖溶液に浸漬しOCT compoundに包埋した後-70℃で凍結し5μmの切片を作成した。フィブロネクチンは抗ヒト血漿フィブロネクチンポリクローナル抗体 (DAKO 社) を用い酵素抗体間接法によりまた細胞性フィブロネクチンは抗細胞性フィブロネクチンモノクローナル抗体 (BIOHIT 社) を用いて酵素抗体 ABC 法により各々の局在を光学顕微鏡により観察した。

Tsukasa TAKEUCHI, Toshiyuki ISHIWATA, Mitsuhiro KUDO, Goro ASANO*

*日本医科大学病理学教室

<受付日1994年1月18日>

3. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

(1) 総 RNA の抽出

新鮮肝組織300mgをISOGEN(株式会社ニッポンジーン) 3mlに入れ、ヒスコロンマイクロホモジェナイザーを用いてホモジェナイズした後、クロロホルムをいれ水相を分離しイソプロパノール沈殿後、エタノールにて洗浄し乾燥したものを再蒸留水に溶解し総RNA溶液とした。

(2) mRNA の精製

PolyAtract mRNA isolation system (Promega社)を用い、(1)で抽出した総RNA 1mgをbiotinylated-oligo(dT)と streptavidin paramagnetic particlesによってmRNAに精製した。

(3) cDNA の合成

cDNA synthesis kit (Boehringer Mannheim社)を用い、(2)で精製したmRNAをAMV reversetranscriptaseにより逆転写しcDNAを合成した。

(4) Polymerase Chain Reaction

以下に示すようなprimerを合成し、(3)で合成したcDNAをtemplateとしてTaq polymeraseにより95°C 1分、55°C 1分、72°C 2分を1 cycleとして40 cycleの反応を行った。ED-A primerは5'-ACATTGATCGCCCTAAAGGA-3', 5'-CTGTGGACTGGGTTCCTAA-3'であり、ED-B primerは5'-AGGTGCCCCAACTC ACTGACCTAA-3', 5'-CCGTTTGTGTGTCAGTGTAA-3'の構造である。

4. Dot blot hybridization

(1) 組織からの総 RNA の抽出は3(1)と同様に行った。

(2) Oligonucleotide probe の作成

サイクロンプラス DNA 合成機(ミリポア社)を用い5'GGGGCTGGCTCTCCATATCATCGTGAAGGCAACCACACTGACTGT-3'で示されるED-A領域の46merを選択し一本鎖 oligonucleotide (antisense 鎖)を合成し3'tailing kit (Boehringer Mannheim社)を用いジゴキシゲニン-dUTPを3'末端にラベルした。

(3) Hybridization の実施

総 RNA 溶液を positive charge のナイロン膜上に1 μ l ずつプロットする。そのナイロン膜を乾燥した後、短波長の紫外線を約33,000 μ J/cm²照射しRNAを固定する。42°C 1時間 prehybridizationを行った後、(2)で合成したジゴキシゲニン標識オリゴヌクレオチドプローブを約100ng/mlの濃度で42°C 16時間 hybridiza-

tionを行った。

(4) 洗浄とシグナルの検出

2×SSC/0.1%SDSで5分4回、1×SSC/0.1%SDSで5分2回洗浄した後、nucleic acid detection kit (Boehringer Mannheim社)を用い、CSPD (Tropix社)を発光基質としてX線フィルムに感光することによりシグナルを検出した。

5. In Situ Hybridization

4%パラフォルムアルデヒド液で固定した凍結組織を用いて以下の手法で行った。

(1) 前処置

1 μ g/ml proteinase Kにて37°C、15分間反応させた後、4%パラフォルムアルデヒド液で後固定する。

(2) Hybridization の実施

Dot blot hybridizationで用いたものと同じ oligonucleotide probe (antisense 鎖)とそれに相補的な sense probeを使って、42°Cで約16時間 hybridizationを行った。

(3) 洗浄と検出

2×SSCにて30分2回、1×SSCにて15分2回洗浄した後、nucleic acid detection kitを用いNBT/BCIP溶液を発色基質としてシグナルを検出した。

成 績

1. 酵素抗体法によるフィブロネクチン、細胞性フィブロネクチンの局在

対照群、四塩化炭素傷害各群においてフィブロネクチンと細胞性フィブロネクチンはともにほぼ同様の局在を示した。対照群においては両者共に、主に類洞壁に沿って局在し肝細胞には一部に細胞性フィブロネクチンが認められるのみであった (Fig. 1A)。四塩化炭素投与開始3日後には、中心静脈周囲により豊富な局在が認められ、特に肝細胞に強い局在を認めた (Fig. 1B, C)。7~14日において小葉内の類洞壁に沿ってみられる反応産物の局在には部位によって差異が認められ、21日には主に中心静脈領域より伸展する細い線維に沿って豊富な局在がみられた。さらに、28日後にはbridgingを形成する線維化巣内により豊富な局在を認めた。また21日~28日後には類洞壁に沿ってみられると同時に肝細胞にも僅かな局在がみられた (Fig. 1D)。

2. RT-PCR 法によるフィブロネクチンのアイソフォームパターン

対照群を含む各群において目的とする270bp付近にED-AmRNAの発現が認められた (Fig. 2A)。一方

Fig. 1 Immunohistochemical staining of cellular fibronectin (cFN).

(A) In normal rat liver, positive staining of cFN is observed along sinusoidal wall and in some hepatocytes (×100). (B) After 3 days of CCl_4 treatment, deposition of cFN is prominent around central veins, (×50). (C) Positive staining of cFN is observed in hepatocytes around central veins of after 3 days of CCl_4 treatment (×200). (D) After 28 days of CCl_4 treatment, strong staining of cFN is observed in bridging fibrosis (×100).

ED-BmRNA の発現はすべての群において認められなかった (Fig. 2B).

3. Dot blot hybridization による細胞性フィブロネクチンの発現の半定量

細胞性フィブロネクチンは、対照群と四塩化炭素投与 3 日後の肝臓ではほぼ類似の発現を示していたが、7 日、14 日後には有意に mRNA の発現増加が認められた。そして 28 日後には対照群と同様の発現を示した (Fig. 3)。

4. In Situ Hybridization による mRNA の発現

対照群において ED-AmRNA は肝細胞、非実質細胞でも認められたが、センスプローブでは陽性シグナルは検出されなかった (Fig. 4A, B)。四塩化炭素傷害 3 日後には他の肝小葉内に比較し中心静脈周囲の肝細胞および非実質細胞により強い発現が認められた (Fig. 4C)。1, 2 週後においては中心静脈周囲の肝細胞、非実質細胞に強い発現を認める他、小葉内の肝細胞にも対照群に比べ強い発現を認めた。21, 28 日後には線維化巣内の非実質細胞と共に線維化周囲の肝細胞にも強い発現が認められたが、センスプローブでは発現は認められなかった (Fig. 5A, B)。

考 察

フィブロネクチンは細胞の接着、伸展、増殖に関与し組織の修復に重要な役割を果していることが知られている。生体内ではさまざまな細胞によってフィブロネクチンが産生されていることが過去に諸家によって報告されており^{6,7)}、特に肝細胞では血漿型フィブロネクチンが産生されているといわれている。これに関して Tamkun ら⁸⁾は *in vitro* における肝細胞の血漿型フィブロネクチンの合成、分泌を報告している。しかし、*in vivo* における正常の肝細胞のフィブロネクチンの合成についての直接の証明は、Clement ら²⁾のヒト正常肝組織における免疫組織化学的検討に限られている。反対に免疫組織化学的検討においては肝細胞では陽性所見を認めないとする報告も多数みられる^{9,10)}。

また近年フィブロネクチンには 3 つの選択的スプライシング領域があり数種類のアイソフォームが存在することが解明された^{11,12)} (Fig. 6)。そのうち、ED-A 領域を有するものが細胞性フィブロネクチン (cFN) とよばれ血漿型フィブロネクチン (pFN) とは性質や機能に差異がみられることが注目されている。cFN は不溶性の細胞外基質に組み込まれ組織構築に寄与し、また *in vitro* においては cFN のみがコラーゲンゲルを収縮させることなどが報告されている¹³⁾。しかし cFN が傷害組織においてその修復に寄与しているかどうかを検討したものは少ない。Glukhova ら¹⁴⁾はヒ

Fig. 2 Reverse transcription-polymerase chain reaction for ED-A and ED-B region of fibronectin (FN) mRNA.

(A) PCR product for ED-A region of FN mRNA is electrophoretically separated by 2% agarose gel. A band of each lane near about 270bp shows that ED-A region of FNmRNAs are existed in both normal and CCl₄ treated rat livers. (B) No band of each lane shows that ED-B region of FNmRNAs are not existed in both normal and CCl₄ treated rat livers.

Lane a : normal liver, Lane b : 3days CCl₄ treated liver, Lane c : 7days CCl₄ treated liver, Lane d : 28days CCl₄ treated liver

Fig. 3 Dot blot hybridization analysis of RNA from normal and CCl₄ treated rat liver. In 7days and 14days CCl₄ treated liver, cFN (ED-A+FN) mRNAs are markedly increased.

C : normal liver, 3 : 3days CCl₄ treated liver, 7 : 7 days CCl₄ treated liver, 14 : 14 days CCl₄ treated liver, 28 : 28 days CCl₄ treated liver.

内膜内に cFN が局在していることを報告している。ここに著者らはラット四塩化炭素肝障害モデルを用い、肝組織での傷害後の修復過程における cFN の産生動態につき免疫組織化学的、分子病理学的手法を用いて検討した。

正常ラット肝では免疫組織化学的検討において、cFN は門脈域の脈管と胆管の基底膜と類洞に沿って局在すると共に、一部の肝細胞内にも陽性所見を認めた。これを mRNA レベルで検討したところ、RT-PCR 法では ED-A⁺mRNA が検出されたが ED-B⁺mRNA は検出されなかった。この結果よりラットの正常肝においては cFNmRNA の発現がみられ、そのアイソフォームパターンは ED-A⁺ED-B⁻mRNA であることがわかった。また、*in situ* hybridization 法により肝細胞と非実質細胞の両者に mRNA の発現を認めた。正常肝組織における cFN の mRNA の発現についてはこれまでに Oyama ら¹⁵⁾によって、nuclease S1 protection assay によるヒト肝組織を用いた検討で示されている。しかしその発現細胞に関する報告はこれまでになく、著者らの観察では肝細胞と非実質細胞の両者にその局在が確認された。この結果は正常肝組織においても類洞壁の構築や肝細胞と類洞壁細胞の接着、

ト血管とラット大動脈のバルーン障害モデルを用いて、免疫組織化学的に atheroma plaque 内や肥厚した

Fig. 4 *in situ* hybridization for cFN (ED-A+FN) mRNA on rat liver sections.

(A) In normal liver, positive signals are expressed in hepatocytes and non-parenchymal cells (antisense probe) ($\times 100$). (B) No signals are detected by sense probe ($\times 100$). (C) In 3days CCl_4 treated liver, positive signals are most prominent in hepatocytes and non-parenchymal cells localized around central veins ($\times 300$).

増殖など、その機能維持に肝細胞も関与している可能性が示唆される。

次に、四塩化炭素投与ラット肝におけるcFNの免疫組織化学的検討であるが、3日後には他の肝小葉内

Fig. 5 *in situ* hybridization for cFN (ED-A+FN) mRNA on rat liver sections.

(A) After 28 days of CCl_4 treatment, positive signals are prominent in non-parenchymal cells localized in bridging fibrosis and hepatocytes around fibrosis (antisense probe) ($\times 100$). (B) No signals are detected by sense probe ($\times 100$).

Fig. 6 Schematic diagram of FN structure and variants. FNs are large glycoproteins which consist of two subunits with molecular weight of about 250,000 connected by disulfide bonds near the carboxyl terminus. The FN gene can give rise to multiple different mRNAs by alternative splicing of three regions (ED-A, ED-B and IIIICS). Only cFN has ED-A domain.

に比較して中心静脈周囲により豊富な局在がみられ、特に肝細胞にも強い局在がみられたことは、四塩化炭素投与による小葉内の肝細胞壊死に対し中心静脈周囲の非実質細胞とともに肝細胞もその修復のためにcFNを合成、分泌していることが示唆される。そして7日から14日後において小葉内の類洞に沿ってみられる反応産物の局在に差がみられ、投与後21日には中心静脈領域より伸展する細い線維と線維化巣により豊富なcFNの局在がみられるようになった。

そして、cFNの発現をdot blot hybridization法により確認した結果では、対照肝に比較し四塩化炭素投与後7日、14日にはcFN mRNAの著しい増加が認められたが28日後には対照肝に類似していた。この結果は肝細胞傷害後の修復過程の比較的初期の7~14日目にcFNのmRNAが増加し、細胞の移動、増殖などの修復機序に関与していることを示唆している。

また、cFN mRNAの局在を*in situ* hybridization法を用いて検討したところ、前述したようにこの蛋白レベルでの局在とほぼ一致する結果であった。以上より、四塩化炭素投与による肝細胞傷害後に、肝細胞と非実質細胞にcFNの合成がみられるが21日以降においては主に線維化巣内の非実質細胞においてcFNの合成が促進していた。このcFNを産生している線維化巣内の非実質細胞については線維芽細胞、伊東細胞などが考えられるが今後さらに電子顕微鏡レベルでの検討が必要と思われる。

次に発現しているcFNのアイソフォームパターンは傷害各群においてED-A+ED-B mRNAであった。すなわちED-Bドメインは正常肝組織においても、また肝細胞傷害後の線維化過程のいずれの群においてもスプライシングされ出現することはなかった。また、ED-Bドメインはoncofetal domainとよばれ胎児組織や悪性腫瘍のFNに認められるとの報告がなされてきた^{16,17)}。しかし、Constantら^{18,19)}は、*in situ* hybridization法を用いて成熟ラットの皮膚の創傷治癒過程において正常では認めなかったED-A+ED-B+FN mRNAの発現を創底部の細胞に証明している。そして創傷治癒過程における細胞の移動、増殖に、より適したFNのアイソフォームを産生するために選択的スプライシングがおこる可能性があると考えられている。著者らも成熟ラットの大動脈、ヒト滑膜組織などにおいてもED-B+FN mRNAの発現がみられることを確認しており、組織特異性があるという可能性も示唆される²⁰⁾。

肝細胞傷害後の修復機構のより詳細な解明のためには、今後FNの選択的スプライシングの調節機序の検討とともに、分解系酵素の産生やFN receptorの発現動態などの検索が必要と思われる。

結 語

ラット四塩化炭素肝傷害モデルを用い免疫組織化学的および分子病理学的手法にて細胞性フィブロネクチンの産生動態を検討し、以下の結論を得た。

(1) 肝細胞傷害後比較的早期に中心静脈周囲の肝細胞と非実質細胞にフィブロネクチンの産生がみられ、mRNAは7~14日後にその発現が著明であった。

(2) 線維化の進展に伴い主として線維化巣の非実質細胞にcFNの産生が確認された。

(3) 細胞性フィブロネクチンのアイソフォームパターンのED-A+ED-B mRNAは対照肝、傷害肝のいずれにおいても変化を認めなかった。

(4) 血漿型フィブロネクチンを主として産生している肝組織において、肝細胞傷害後の細胞性フィブロネクチンの産生が確認され、修復機序に重要な役割を果たしていることが示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導を賜りました日本医科大学第3内科、野村武夫教授に深甚なる謝辞を表すると共に、研究の機会を頂いた小林正文教授、黒田 肇助教授に深謝いたします。また、試料作成等に御協力頂いた日本医科大学病理学教室、川原清子技術員、藤井雄文技術員に感謝いたします。さらに志し半ばにして急逝された故間 武雄講師に追悼の意を表すると共に深謝いたします。

なお、本論文の要旨の一部は、第33回日本組織細胞化学会総会(1992年)、第25回日本結合組織学会総会(1993年)、第29回日本肝臓学会総会(1993年)にて発表した。

文 献

- 1) Martinez-Hernandez A: The hepatic extracellular matrix. II. Electron immunohistochemical studies in rats with CCl₄-induced cirrhosis. *Lab Invest* 53: 166-186, 1985
- 2) Clement B, Grimaud JA, Campion JP, et al: Cell types involved in collagen and fibronectin production in normal and fibrotic human liver. *Hepatology* 6: 225-234, 1986
- 3) Takahara T, Kojima T, Miyabayashi C, et al: Collagen production in fat-storing cells after carbon tetrachloride intoxication in the rat. Immunoelectron microscopic observation of Type I, Type III collagens, and prolyl hydroxy-

- lase. *Lab Invest* 59 : 509—521, 1988
- 4) 山田裕之, 間 武雄, 田口克司, 他 : ヒト障害肝組織におけるプロリン水酸化酵素, プロコラーゲン mRNA の発現. *肝臓* 32 : 358—365, 1991
  - 5) 田口克司 : アルコール障害肝における類洞変化—特にフィブロネクチンの産生と血管増生の関連について—. *肝臓* 28 : 439—446, 1987
  - 6) Ramadori G, Rieder H, Knittel Th, et al : Fat storing cells (FSC) of rat liver synthesize and secrete fibronectin. *J Hepatol* 4 : 190—197, 1987
  - 7) Ishiwata T, Aida T, Yokoyama M, et al : Fibronectin biosynthesis in endothelial regeneration after intimal injury. *Exp Mol Pathol* 60 : 1—11, 1994
  - 8) Tamkun JW, Hynes RO : Plasma fibronectin is synthesized and secreted by hepatocytes. *J Biol Chem* 258 : 4641—4647, 1983
  - 9) Martinez-Hernandez A : The hepatic extracellular matrix. I. Electron immunochemical studies in normal rat liver. *Lab Invest* 51 : 57—74, 1984
  - 10) 高橋 達, 安部毅彦, 檜森昌門, 他 : フィブロネクチン. *肝胆膵* 18 : 379—387, 1989
  - 11) Kornblihtt AR, Vibe-Pedersen K, Baralle FE : Human fibronectin : Molecular cloning evidence for two mRNA species differing by an internal segment coding for a structural domain. *EMBO J* 3 : 221—226, 1984
  - 12) Schwarzbauer JE, Patel RS, Fonda D, et al : Multiple sites of alternative splicing of the rat fibronectin gene transcript. *EMBO J* 6 : 2573—2580, 1987
  - 13) Asaga H, Kikuchi S, Yoshizato K : Collagen gel contraction by fibroblasts requires cellular fibronectin but not plasma fibronectin. *Exp Cell Res* 193 : 167—174, 1991
  - 14) Glukhova MA, Frid MG, Shekhonin BV, et al : Expression of Extra Domain A fibronectin sequence in vascular smooth muscle cells is phenotype dependent. *J Cell Biol* 109 : 357—366, 1989
  - 15) Oyama F, Murata Y, Suganuma N, et al : Patterns of alternative splicing of fibronectin pre-mRNA in human adult and fetal tissues. *Biochemistry* 28 : 1428—1434, 1989
  - 16) Zardi L, Carnemolla B, Siri A, et al : Transformed human cells produce a new fibronectin isoform by preferential alternative splicing of a previously unobserved exon. *EMBO J* 6 : 2337—2342, 1987
  - 17) Carnemolla B, Balza E, Siri A, et al : A tumor-associated fibronectin isoform generated by alternative splicing of messenger RNA precursors. *J Cell Biol* 108 : 1139—1148, 1989
  - 18) French-Constant C, Van De Water L, Dvorak HF, et al : Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound healing in the adult rat. *J Cell Biol* 109 : 903—914, 1989
  - 19) Brown LF, Dubin D, Lavigne L, et al : Macrophages and fibroblasts express embryonic fibronectins during cutaneous wound healing. *Am J Pathol* 142 : 793—801, 1993
  - 20) 石渡俊行, 横山宗伯, 浅野伍朗 : 血管内膜損傷後における細胞外基質の産生動態. *動脈硬化* 21 : 205, 1993

Production of fibronectin during repairing process after carbon tetrachloride-induced liver damage —Expression of cellular fibronectin mRNA—

Tsukasa TAKEUCHI, Toshiyuki ISHIWATA, Mitsuhiro KUDO and Goro ASANO*

Production and localization of cellular fibronectin (cFN) during repairing process after liver damage (CCl₄-treated rats) was investigated by immunohistochemical and molecular pathological techniques. cFN was produced by hepatocytes and non-parenchymal cells in normal liver. According to dot blot hybridization and *in situ* hybridization, cFN mRNA was strongly increased in 7 days' and 14 days' CCl₄-treated livers. In addition, cFN was localized in non-parenchymal cells in fibrotic lesion and hepatocytes around it. These results suggest that cFN may play an important role in the construction of sinusoidal wall and cell-to-cell interactions in normal liver and is associated with fibrosis after liver damage.

---

* Department of Pathology, Nippon Medical School (Tokyo)