

助成番号 25-2-5

肝線維化を伴う難治疾患と肝星細胞における protein X の関連

大阪市立大学大学院医学研究科 機能細胞形態学講座

宇留島 隼人

1.緒言

指定難病である自己免疫性肝炎、原発性胆汁性胆管炎、胆道閉鎖症、および小児慢性特定疾患である先天性肝線維症や肝硬変症において、肝線維化およびその進展型である肝硬変が共通の所見であり、線維化進展状況の監視および線維化改善が重要である。肝線維化の責任細胞は、線維（コラーゲン）を産生する活性化肝星細胞であるため、肝星細胞の活性抑制を目的とした肝線維化改善薬の開発研究が盛んに行われているが未だ有効な薬剤はない。申請者の所属する研究室では、正常肝における非活性肝星細胞には protein X は発現していないが、障害肝における活性化肝星細胞に protein X が発現してくることを発見した。肝星細胞だけでなく線維芽細胞にも protein X が発現することが近年明らかになったことから、活性化肝星細胞における protein X 発現の生理学的意義の解明は肝線維化を伴う疾患だけでなく、特発性肺線維症などの他の臓器線維症の病態解明にも寄与する可能性がある。そこで本研究では肝星細胞活性化における protein X 発現と線維産生との関連性を解析し、新規肝線維化治療薬の開発に直結する基礎データを構築することを目的とする。

また、protein X は分泌タンパクである。肝線維化の診断は肝生検が最も正確であるが、数日の入院が必要なほど侵襲度が高いため繰り返し実施することが困難であり、低侵襲性の肝線維化診断マーカーが求められている。そこで肝線維化と血清 protein X 値の相関を調べ血清 protein X 値の新規肝線維化マーカーとしての有用性を検討することも目的とする。

2.方法

計画1 活性化肝星細胞における protein X 発現の意義の解析

マウス由来初代培養肝星細胞を活性化させ protein X を発現させた。siRNA を用いて protein X をノックダウンし、対照群とともに遺伝子発現をマイクロアレイで網羅的に解析し、protein X のノックダウンによって変動する遺伝子を抽出しウエスタンブロットや PCR 法で protein X 関連遺伝子を同定した。同定された protein X 関連遺伝子を元に、活性化肝星細胞における protein X 発現の生理的意義を解析した。

計画2 血清 protein X 値の肝炎活動性マーカーあるいは線維化マーカーとしての有用性検討

申請者の所属講座は大阪市立大学肝胆臓病態内科学の河田則文教授を初めとする研究者と共同研究を数多く行っており、様々なステージの肝線維化患者のサンプルを使用できるアドバンテージがある。肝線維化の評価が可能な NASH あるいはウイルス性肝炎患者の血清中の protein X 発現を測定し、肝線維化と血清 protein X 値の相関を調べた。

3.結果

1.活性化肝星細胞における protein X 発現の意義

マウスより肝星細胞を単離し培養すると自然に活性化することが知られている。そこで経時的な protein X の発現を解析したところ培養開始 4 日目頃から protein X の発現が増強されることがわかった (右上図)。

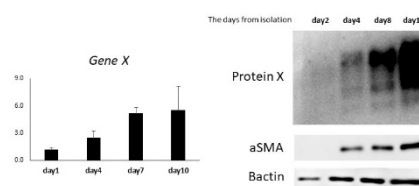
次にマウスに四塩化炭素を投与し肝障害を起こし経時的に血清、肝臓タンパクを回収し解析を行ったところ、肝炎の極期である 4 日目に肝臓中の protein X 発現が増大し、炎症が収束する 7 日目には protein X 発現も再び減少することが明らかになった。肝臓における protein X 発現の局在を免疫染色にて確認したところ肝細胞では発現せず、肝星細胞と思われる領域に protein X 陽性反応が確認できた。また肝臓中 protein X 発現に対応して血清中 protein X 発現も増加した (右下図)。これらのことから肝星細胞における protein X は肝炎活動性に応じて発現が増減すること、および肝星細胞に protein X 発現増加に応じて血清中へ分泌される protein X も増えることが示唆される。

そこで protein X が十分に発現している培養 10 日目の肝星細胞の protein X 遺伝子をノックダウンして野生型との遺伝子発現を比較した。肝細胞の再生に重要な Hepatocyte Growth Factor (HGF) の発現が protein X ノックダウンによって変化した。またタンパクレベルではコラーゲンの産生に重要である Heat Shock Protein (HSP) 47 の発現が protein X ノックダウンによって減少することも明らかとなった。

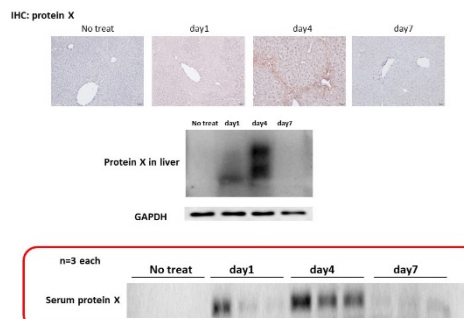
現在 protein X ノックアウトマウスの作成を開始しており、今後さらに詳細な解析を行う予定である。

2.血清 protein X 値の肝炎活動性マーカーあるいは肝線維化マーカーとしての有用性

Protein X expression in mouse HSC during spontaneous activation

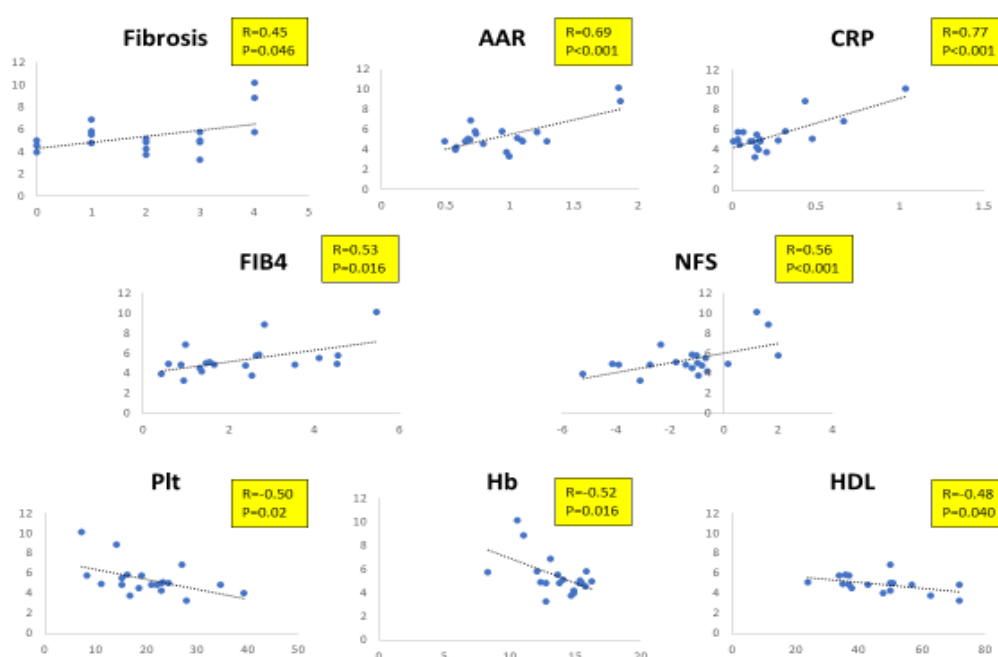


Serum levels of protein X has a possibility as a novel hepatitis activity marker



大阪市立大学肝胆臓内科病態学の協力のもと、NAFLD Activity Score (NAS) が 0~7 までの 20 名の患者血清を用いてウェスタンブロットを行い、そのバンドを数値化して生検サンプルの病理像および各種血清パラメーターとの相関を解析した。血清 protein X 値は生検サンプル試料における線維化スコアと有意に相関していることが明らかとなった。また AAR や CRP などの血清肝炎パラメーターと強い相関が見られた。さらに現在臨床で汎用されている FIB4 index や APRI といった肝線維化スコアとも有意な正の相関が見られ、また線維化が進行すれば減少することが知られている血小板とは負の相関が見られた（下図）。

NAS score 0~7 vs protein X (N=20)



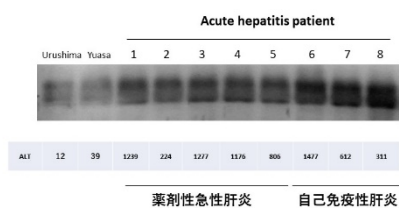
4.考察

肝障害時において発現が増強する protein X の生理学的意義はノックアウトマウスを用いた詳細な検討が必要であるが、RNA 干渉法を用いた解析ではコラーゲン産生に関わる因子に変化が見られたため、線維化に関わっていることが示唆される。

また患者血清中 protein X は有用な肝線維化マーカーであることが示唆された。現在はウェスタンブロットによる解析を行っている。今後 ELISA 系を構築し、より簡便に血中 protein X を測定することが求められる。

われわれは指定難病の一つである自己免疫性肝炎患者においても血清 **protein X** が上昇することを確認している（右図）。この研究をさらに発展させることで、先天性肝線維症などの他の線維化をきたす指定難病においても侵襲性の高い肝生検に代わって **protein X** が肝炎活動性・肝線維化マーカーとして使用し病勢を正確に判断することが期待できる。

Serum levels of protein X in acute hepatitis patients



5.結語

肝星細胞が活性時に血中に分泌する **protein X** は様々な肝線維化疾患における低侵襲性の肝線維化マーカーとなることが示唆された。