

助成番号 26-2-49

肝線維化に伴う肝星細胞の形態変化に対する三次元的構造解析

大阪市立大学医学研究科 機能細胞形態学講座

湯浅 秀人

1. 諸言

指定難病である自己免疫性肝炎、原発性胆汁性胆管炎、胆道閉鎖症ないし先天性肝線維症において、肝線維化は共通の所見であり、その後肝硬変に至る可能性があるため、その改善が重要である。肝線維化は責任細胞である肝星細胞が活性化を経て形質転換し、線維を産生することにより引き起こされる。従来、肝星細胞の活性化の起因にはトランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor : TGF) - β を始めとするサイトカインの液性因子が関わりとされており、肝線維化の改善薬の開発研究もこの液性因子に着目して行われてきたが、未だ優れた治療薬の開発にはいたれていない¹⁾。したがって、今後肝線維化治療の改善のためには、液性因子だけでなく肝星細胞の活性化の全容についての基礎的な知見を見直す必要があると思われる。近年では肝星細胞の活性化に関わる新たな因子の存在が示唆され始めた。すなわち肝星細胞の活性化にミトコンドリアの活性²⁾や小胞体ストレス³⁾、オートファジー³⁾といった細胞小器官に深く関わる因子が関与することが報告されてきている。従って肝星細胞は活性化の過程でその細胞小器官に大きな変化が起こる可能性が想定される。しかし、これらの現象は組織内において評価することが難しいため、これらの報告は培養条件下によるものが大半であり、肝臓組織内の変化を実際に反映しているかどうかについては不明な点が多く残されている。一方、これらの細胞小器官の変化には一般的に形態的变化が伴うことが知られており、形態的变化であれば組織内においても観察可能である。そこで本研究では肝臓内における肝星細胞の活性化に伴う肝星細胞の変化を形態的視点から解析した。

2. 方法

2.1 実験動物

10 週齢から 15 週齢の C57BL/6 マウスを超微形態学的解析に 6 匹ないし免疫組織化学的解析に 18 匹用いて実験を行った。

2.2 透過型電子顕微鏡を用いた超微形態学的解析

マウスを四塩化炭素未投与群、四塩化炭素を投与後 12 時間群に分けた。マウス肝臓を 2% パラフォルムアルデヒド 2.5% グルタルアルデヒド水溶液で灌流固定した後、同固定液で 24 時間の浸漬固定を行った。緩衝液で洗浄した後、還元オスミウム、チオカルボヒドライド、オスミウムに順次反応させた。蒸留水で洗浄後、4% 酢酸ウランおよびアスパラギン酸鉛で電子染色を行い、樹脂包埋を行った。70 μm 厚の超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡 (Talos F200) を用いて観察を行った。

2.3 免疫組織化学的解析

マウスを各 3 匹ずつ四塩化炭素未投与群、四塩化炭素を投与後 1 日群、2 日群、4 日群、1 週間群および 2 週間群に分けた。マウス肝臓を 4% パラフォルムアルデヒド水溶液で灌流固定した後、同固定液で 24 時間浸漬固定を行い、パラフィンブロックに包埋した。その後、4 μm 厚の薄切切片を作製し、酵素抗体間接法を用いて、 αSMA の免疫組織化学的染色を行った。

3. 結果

3.1 正常肝の肝星細胞の超微形態について

正常肝の肝星細胞は肝細胞間およびいくつかの類洞内皮細胞に向かって細胞突起を有して

未発表の生データを使用しているため、図の一部は公表できません

図1. 正常肝の肝星細胞の超微形態ないし立体構築

おり、細胞周囲には細かい微小突起を有していた。細胞体部の細胞質内には核、ミトコンドリア、小胞体、小胞、ゴルジ装置ないし大型の脂肪滴がみとめられた。細胞体の細胞質内の大部分は脂肪滴に占められており、核が脂肪滴によって大きく湾曲していた。ゴルジ装置は核周囲に密集して存在しており、周囲には小胞も多くみとめられた。小胞体は細胞質全体に多くみとめられた。正常肝の肝星細胞を立体構築したところ、肝星細胞が面する細胞の種類により、細胞膜ないしその直下の細胞小器官の構成に違いがあることが明らかになった (図 1)。

未発表の生データを使用しているため、図の一部は公表できません

図2. 障害肝の肝星細胞の超微形態ないし立体構築

3.2 障害肝の肝星細胞の微細形態について

四塩化炭素投与後 12 時間では肝細胞のグリコーゲンが消失しており、細胞質内には脂肪滴が形成されていた。また正常時にみとめられなかった、膜様構造の形成がみとめられた。クッパー細胞の細胞質内にも変性した細胞塊を取り込んだと思われる塊がみとめられた。肝星細胞は正常肝の肝星細胞と比較して、その細胞小器官の微細構造に変化がみとめられた (図 2)。

3.3 四塩化炭素投与による肝星細胞の活性化

肝星細胞は活性化すると α SMA を発現することから肝星細胞活性化マーカーとして用いら

未発表の生データを使用しているため、図の一部は公表できません

図 3. 四塩化炭素投与マウスにおける肝星細胞活性化マーカー (α SMA) 発現の経時的変化。

れている。そこで本研究の形態変化と従来定義されている肝星細胞の活性化を時系列的に評価するために、 α SMA の免疫組織学的染色を行った。本研究モデルでは四塩化炭素投与後 1 日目では、正常肝臓と同様に α SMA 陽性細胞は中心静脈および門脈周囲の血管周囲のみ存在し、その間の領域である肝小葉ではみとめられなかった (図 3)。投与後 2 日目時点で α SMA 陽性細胞が肝小葉部に出現し (図 3)、投与後 4 日目では投与後 2 日目時よりも α SMA 陽性細胞が CV 周囲に集積した (図 3)。その後、 α SMA 陽性細胞は投与後 7 日目では CV 周囲に少数存在する程度であり、投与後 2 週間では正常肝臓と変わらなくなった (図 3)。

4. 考察

われわれはこれまでに肝臓内において肝星細胞が微小突起を介して肝細胞に接着することにより、肝星細胞の活性化が抑制されることを報告してきた⁴⁾。そのため肝星細胞の微小突起は生体内における活性化抑制因子であることが示された。しかしながらこの微小突起についてはまるで研究されていない。本研究では肝星細胞は微小突起を介した接着を介して肝細胞の方向を認識し、肝細胞と効率的な膜輸送を介した物質の輸送または受け取りをしている可能性が考えられた。

肝星細胞の活性化は従来、TGF- β に代表されるサイトカインの刺激により誘導され、 α SMA を発現する筋線維芽細胞様の形質へと転換するとともに、コラーゲンの発現が促進するとされている¹⁾。本研究で確認された肝星細胞の形態的变化は肝星細胞の活性化マーカーである α SMA の発現に先んじて起こる活性化の初期変化である可能性が示された。一方で小胞体ストレスやミトコンドリアの形態変化については本研究では見出されなかったため、これまでに報告されていたこれらの因子の肝星細胞活性化への影響はさらに活性化が進んだ後に生じる可能性が考えられた。

5. 結語

肝星細胞の微小突起は肝星細胞が肝細胞との相互作用のために形成されるものであり、この微小突起を介した接着により細胞内の極性が決定されることが示唆された。肝星細胞活性化時には従来の活性化の指標とされている α SMA の発現よりも先に形態的变化が起こることが示された。

6. 文献

- 1) Dewidar B, Meyer C, Dooley S, Meindl-Beinker N. TGF- β in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis—Updated 2019. *Cells*. 2019; 8(11): 1419.
- 2) Gajendiran P, Vega LI, Itoh K, Sesaki H, Vakili MR, Lavasanifar A et al. Elevated mitochondrial activity distinguishes fibrogenic hepatic stellate cells and sensitizes for selective inhibition by

mitotropic doxorubicin. *J Cell Mol Med.* 2018; 22(4): 2210-2219.

3) Hernández-Gea V, Hilscher M, Rozenfeld R, Lim MP, Nieto N, Werner S et al. Endoplasmic reticulum stress induces fibrogenic activity in hepatic stellate cells through autophagy. *J Hepatol.* 2013; 59(1): 98-104.

4) Urushima H, Yuasa H, Matsubara T, Kuroda N, Hara Y, Inoue K et al. Activation of Hepatic Stellate Cells Requires Dissociation of E-Cadherin-Containing Adherens Junctions with Hepatocytes. *Am J Pathol.* 2021; 191(3): 438-453.

5) Desai RA, Gao L, Raghavan S, Liu WF, Chen CS. Cell polarity triggered by cell-cell adhesion via E-cadherin. *J Cell Sci.* 2009; 122(Pt 7): 905-911.