

活性化肝星細胞における DNA 修復機構の解明

大阪市立大学大学院医学研究科 肝胆腸病態内科学

翁 良徳

1. 諸言

肝線維化は肝炎ウイルスの慢性感染やアルコール多飲、肥満による脂肪肝炎などが原因で生じ、肝星細胞 (Hepatic stellate cell : HSC) から産生されるコラーゲンを主体とする細胞外マトリックス物質が肝実質内に蓄積する病態である。原因が除去されず、進行すると肝硬変や肝癌に至る。私たちが発見した Cytoglobin (CYGB) は哺乳類第 4 番目のグロビタンパク質であり、肝臓では HSC でのみ発現し¹⁾、他のグロビン同様に酸素 (O₂) や一酸化窒素 (NO) などのガス分子と結合して生体内ガスのリザーバーとなること²⁾、³⁾ やペルオキシダーゼ活性を持ち、活性酸素種スカベンジャーとして機能する。さらに CYGB 欠損マウスは肝炎症・線維化反応を増強し、延いては肝癌を自然発症する⁴⁾。

近年、私たちは肝線維化を伴うヒト非アルコール性脂肪肝炎の病態進展において、HSC 活性化誘導因子である Transforming growth factor-β (TGF-β) が HSC を活性化させると共に、TGF-β-Smad2 経路を介して CYGB 発現を抑制することを見出した。さらに、CYGB 発現が減少した活性化 HSC では酸化的 DNA 損傷が蓄積したことから、HSC における CYGB は DNA 損傷から細胞を保護する役割があることを報告した (図 1)⁵⁾。本研究は、活性化 HSC における DNA 損傷の生理学的意義および、肝がん発症への関与を調べることを目的とする。

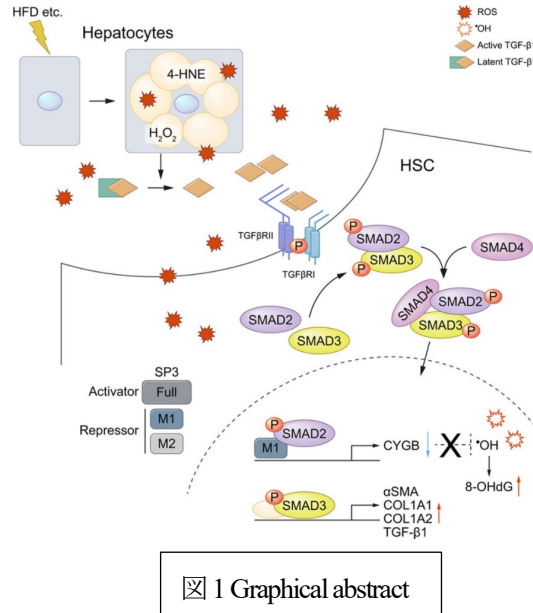


図 1 Graphical abstract

2. 方法

2.1 活性化 HSC における poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 1 の作用機序の解析

DNA が損傷されると最初に、DNA 修復酵素の一つである PARP1 が DNA 損傷部位に集積し poly (ADP-ribose) (PAR) を合成することで塩基除去修復を促進し、最終的に DNA 損傷は修復される。ヒト HSC は TGF-β 刺激により活性化 HSC へ誘導後、過酸化水素 (Hydrogen peroxide : H₂O₂) に暴露すると DNA 損傷 (DNA 損傷マーカー、8-OHdG の蓄積) を引き起こす。そこで、TGF-β/H₂O₂ 共処理と H₂O₂ 単独

処理を比較して活性化 HSC の DNA 損傷修復における PAR 合成過程を調べ、活性化 HSC における PARP1 の作用機構の解明を試みた。

2.2 活性化 HSC における酸化 DNA 損傷の生理学的意義の検討

Migration や Invasion アッセイ、増殖アッセイを用いて、活性化 HSC から分泌される因子が肝癌細胞株 (Huh7) の浸潤や遊走能および細胞増殖へ影響を及ぼすか検証した。また、H₂O₂ 暴露後、活性化 HSC が分泌するタンパク質の探索を行った。

2.3 DNA 損傷後、特異的に修復される DNA 領域の網羅的解析

PARP1 抗体を用いてクロマチン免疫沈降 (Chromatin immunoprecipitation : ChIP) を行い ChIP-seq 法により、活性化 HSC で特異的に修復される DNA 領域を同定した。

3.結果

3.1 活性化 HSC における poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)1 の作用機序の解析

ヒト HSC を TGF-β1 (2 ng/mL) で 48 時間刺激後、PARP1 の活性を調べた。その結果、TGF-β1 未処理と比較して、活性化 HSC で有意に PARP1 の活性が低下していることを見出した (図 2)。DNA 損傷部位に PARP1 が集積し合成された PAR は酵素により加水分解される。そこで、活性化 HSC における PAR の加水分解に関連する酵素⁹⁾の発現変動を RT-PCR 解

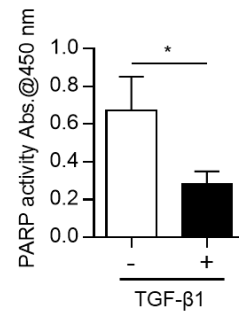
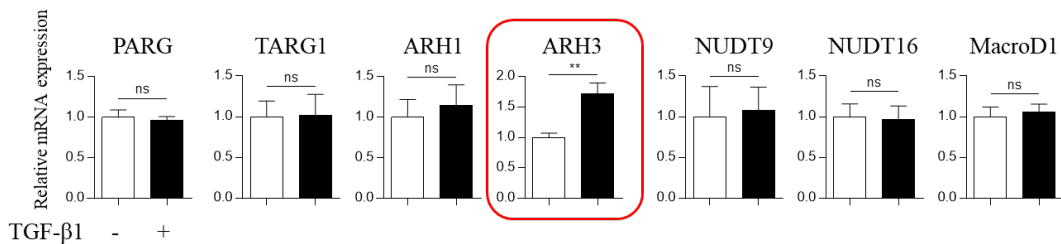


図 2 活性化 HSC における PARP1 活性



析により調べた結果、TGF-β1 は ARH3 発現を誘導することが分かった (図 3)。

図 3 PAR polymer の加水分解に関連する酵素の発現変動

そこで活性化HSCにおけるARH3発現の意義を調べるため、ヒトHSCをTGF- β 1で活性化させ、経時的にH₂O₂ (320 μ M)で酸化ストレスを与え、western blot解析によりARH3とPARの発現変動を調べた。TGF- β 1未処理のヒトHSCではH₂O₂刺激後、PARP1の活性を示すPARの発現誘導が認められた。一方、TGF- β 1処理した活性化HSC

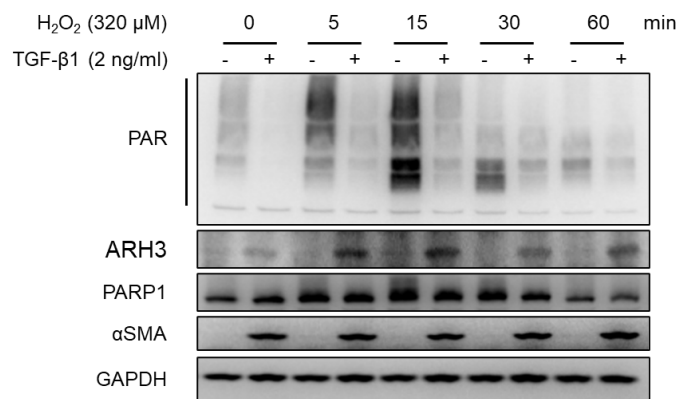


図4 活性化HSCにおけるPARとARH3の発現変動

ではH₂O₂で刺激してもPARの発現は誘導されず、ARH3発現が増加した(図4)。これらの結果から、TGF- β 1によりARH3の発現が誘導されPARが過剰に分解されることでPARP1の活性が低下し、それを介して活性化HSCでDNA損傷が蓄積することが示唆された。

3.2 活性化HSCにおける酸化的DNA損傷の生理学的意義の検討

次に、Migrationアッセイ、増殖アッセイを用いて、活性化HSCから分泌される因子が肝癌細胞株(Huh7)の遊走能および細胞増殖へ影響を及ぼすか検証した。ヒトHSCをTGF- β 1単独、H₂O₂単独、TGF- β 1/H₂O₂共処理で刺激後、培養液を交換した。翌日、各処理群の培養液を用いてHuh7を培養した。CCK8により細胞増殖を評価したところ、TGF- β 1/H₂O₂共処理の培養が最もHuh7の細胞増殖を促進した(図5)。同時にMigrationアッセイによりHuh7の遊走能を検証した結果、TGF- β 1/H₂O₂共処理の培養が最もHuh7の細胞遊走を誘導した(図6)。

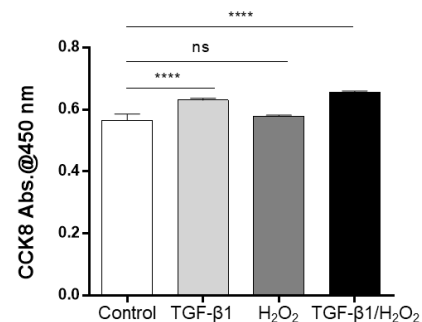


図5 Huh7の細胞増殖

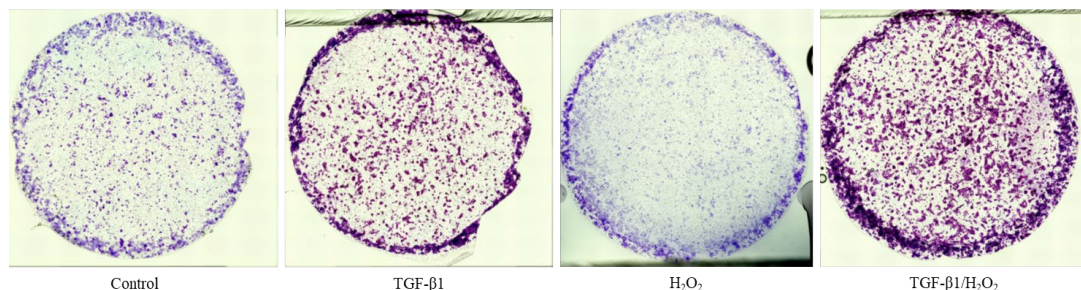


図6 Huh7の細胞遊走能

活性化 HSC から回収した培養液中に、Huh7 の細胞増殖や細胞遊走を誘導する分泌因子の存在が示唆されたため抗体アレイ解析により分泌因子を探索した。その結果、いくつかの候補となる因子を見出した。現在、再現性の確認を行っており、特異的な因子を同定するため詳細な解析を行っている。

3.3 DNA 損傷後、特異的に修復される DNA 領域の網羅的解析

これまでの結果から、活性化 HSC では TGF- β 1 が ARH3 発現を誘導するため PARP1 依存的 DNA 修復が不完全となり DNA 損傷が誘導されることが示唆されたことから (図 2、3、4)、活性化 HSC における特異的 DNA 損傷領域の存在を検証した。方法として TGF- β 1/H₂O₂ 共処理と TGF- β 1 または H₂O₂ 単独処理後、PARP1 抗体を用いたクロマチン免疫沈降後の DNA を用いた ChIP-seq を行った。試料となるヒト HSC 細胞株は遺伝子背景の異なる 2 つのロットを用いて ChIP-seq を行い、共通する部位や遺伝子を選出しており、再現性の確認のため今後さらに詳細な検証実験を繰り返し行う。また、同時に採取した mRNA によるオミクス解析を行う予定である。

4.考察

活性化 HSC では TGF- β 1 が ARH3 発現を誘導するため PARP1 の活性が低下し、DNA 修復が不完全となり DNA 損傷が誘導されることが示唆された。今後、ARH3 をノックダウンした HSC を作製し、活性化 HSC における ARH3 の生理学的意義を検証する。

また、DNA 損傷が蓄積した活性化 HSC が分泌する因子は肝癌細胞株の細胞増殖や細胞遊走を促進することが示唆された。現在、特異的な分泌因子の特定と活性化 HSC における PARP1 依存的 DNA 損傷修復機構の生理学的意義を解明することが求められる。

5.結語

活性化 HSC における酸化的 DNA 損傷の蓄積は PARP1 活性の低下に起因し、活性化 HSC 由来の分泌因子は肝癌細胞の増殖・遊走能を促進することが示唆された。

6.文献

1) Norifumi Kawada, Dan Bach Kristensen, Kinji Asahina, Kazuki Nakatani, Yukiko Minamiyama, Shuichi Seki 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(27): 25318-23.

2) Hitomi Sawai, Norifumi Kawada, Katsutoshi Yoshizato, Hiroshi Nakajima, Shigetoshi Aono, Yoshitsugu Shiro. Characterization of the heme environmental structure of cytoglobin, a fourth globin in humans. *Biochemistry.* 2003; 42(17): 5133-42.

3) Hitomi Sawai, Masatomo Makino, Yasuhisa Mizutani, Takehiro Ohta, Hiroshi Sugimoto, Tadayuki Uno et al. Structural characterization of the proximal and distal histidine environment of cytoglobin and neuroglobin. *Biochemistry.* 2005; 44(40): 13257-65.

- 4) Le Thi Thanh Thuy, Tuong Thi Van Thuy, Yoshinari Matsumoto, Hoang Hai, Yoshihiro Ikura, Katsutoshi Yoshizato et al. Absence of cytoglobin promotes multiple organ abnormalities in aged mice. *Sci Rep.* 2016; 6, 24990.
- 5) Yoshinori Okina, Misako Sato-Matsubara, Tsutomu Matsubara, Atsuko Daikoku, Lisa Longato, Krista Rombouts et al. TGF-beta1-driven reduction of cytoglobin leads to oxidative DNA damage in stellate cells during non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* 2020; 73(4): 882-895.
- 6) Chao Liu, Aditi Vyas, Muzaffer A. Kassab, Anup K. Singh, Xiaochun Yu. The role of poly ADP-ribosylation in the first wave of DNA damage response. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45(14): 8129–8141.