

論 文 内 容 要 旨

Periostin promotes hepatic fibrosis in mice by
modulating hepatic stellate cell activation via αv
integrin interaction

(ペリオスチンはインテグリン αv との相互作用を介し肝星細胞を活性化することで肝線維化を促進する)

Journal of Gastroenterology, in press.

主指導教員：田妻 進 教授
(広島大学病院 総合診療医学)
副指導教員：松尾 裕彰 教授
(広島大学病院 病院薬剤学)
副指導教員：菅野 啓司 講師
(広島大学病院 総合診療医学)

杉山 晶子

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

さまざまな慢性肝疾患の終末像である肝硬変症は、肝線維化が高度に進展することで肝の生理機能を維持できなくなった病態を指す。我が国も含め、アジアを中心としたウイルス性肝炎の罹患率は未だに高い状況下にあるとともに、欧米諸国では肥満を背景とした非アルコール性脂肪性肝炎（non-alcoholic steatohepatitis: NASH）の罹患率の増加が認められており、今や肝線維化の病態解明とその治療開発は急務の課題となっている。

ペリオスチンは細胞外マトリックス蛋白である。細胞外マトリックスは組織の構造維持のほか、細胞の増殖や遊走、分化など様々な生理機能に寄与している。その中でペリオスチンは肺や心臓の線維化や皮膚の創傷治癒に重要な役割を果たしていることが知られており、肝臓においては硬化性変化を伴うことの多い肝内胆管癌での発現亢進が報告されている。しかし、ペリオスチンの肝線維化への寄与と役割、そして、その詳細なメカニズムは未だ明らかになっていない。

本研究では肝線維化におけるペリオスチンの役割を解明するため、野生型およびペリオスチン欠損マウスを用い、両群において肝線維化モデルを作製し線維形成を比較解析するとともに、肝線維化で中心的な役割を担う肝星細胞に対するペリオスチンの影響とその機能の解明を中心に検討を行った。

まず、肝線維化モデルマウスにおけるペリオスチンの発現性について調査した。その結果、肝細胞障害性肝線維化モデル（四塩化炭素 腹腔内投与; CCl₄）と、胆汁うっ滞性肝線維化モデル（総胆管結紮; BDL）の両群において、転写及び翻訳レベルでペリオスチンの発現誘導が観察された。

そこで、ペリオスチンが肝臓においても線維化を進展させる因子であると考え、肝星細胞活性化におけるペリオスチンの生理機能とそのメカニズムを解明することを目的とし、*in vitro* の検討を行った。SD ラットより単離した初代培養肝星細胞、及び、ヒト不死化肝星細胞株（LX2）の両者において、ペリオスチンの発現は肝星細胞の活性化に伴い、経時的に上昇した。また逆に、LX2 に対し siRNA による内因性ペリオスチンの発現抑制を行うと、活性化・線維化マーカーである α SMA、Collagen1a1 (Col1a1) の有意な発現低下が認められた。以上の結果は、肝星細胞の活性化に対するペリオスチンの関与を強く示唆した。

次に、ペリオスチンが肝星細胞の遊走能・接着能へ与える影響について検討するため、LX2 に対し外因性にペリオスチンを作用させ検討を行った。まず、Scratch assay、Migration assay の 2 種の遊走能試験を実施したところ、ペリオスチンによる肝星細胞の遊走能亢進作用が確認された。また、ペリオスチンは濃度依存性に LX2 の細胞接着能を亢進し、この変化に伴い、 α SMA、Coll1a1 および、内因性ペリオスチンの著明な発現誘導が認められた。以上より、ペリオスチンはオートクライン機構により肝星細胞の活性化維持・増幅と遊走能の亢進に寄与している可能性が示唆された。

ペリオスチンはインテグリンのリガンドとして報告されているが、インテグリンのどのサブユニットが肝星細胞において線維化を制御しているかは必ずしも一致した見解は得られていない。そこで、ペリオスチン受容体として報告されているインテグリンのうち α v β 3、 α 5 β 1、 α v β 5 の中和抗体および siRNA による α v インテグリン阻害や発現抑制を行い、細胞接着能、活性化・

線維化マーカーへの影響を解析した。その結果、 $\alpha v\beta 5$ の中和抗体の使用により有意な接着能の低下を認め、さらに $\alpha v\beta 3$ 中和抗体の併用により相加的な接着阻害効果を認めた。また LX2 におけるインテグリン αv の発現抑制は、ペリオスチンへの細胞接着を抑制し、 α SMA、Col1a1、TIMP1 (Tissue inhibitor of metalloproteinase 1) の有意な発現低下を認めた。このことより、ペリオスチン-インテグリン αv 相互作用が肝星細胞の活性化・線維産生機能の制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

最後に、肝線維化におけるペリオスチン発現の必要性を確認するため、ペリオスチン欠損マウスに対し CCl₄、TAA (thioacetamide)、DDC (3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine) を投与し、肝線維化の減弱が認められるか野生型マウス群と比較することで検討を行った。病態の異なるマウス肝線維化モデルである、慢性肝細胞障害性モデル (CCl₄・TAA) および胆汁うっ滞性肝障害性モデル (DDC) の全ての群において、野生型マウスではペリオスチンの発現誘導とコラーゲンの蓄積を伴う高度な肝線維化進展が認められた。一方、ペリオスチン欠損マウスでは肝線維化は軽度にとどまり Col1a1、TIMP1、 α SMA の発現が抑制された。また、DDC 投与群においては、野生型と比較し胆管上皮細胞のマーカーである CK19 の有意な発現抑制が認められ、組織上でも明らかな胆管増生の減少が観察された。

以上の結果より、ペリオスチンは肝線維化病態時に発現誘導され、インテグリン αv を介し肝星細胞の活性化・遊走能・線維産生能を亢進させることで、肝線維化の進展に寄与していることが明らかになった。従って、ペリオスチン-インテグリンシグナルは肝硬変の治療戦略上のターゲットとなりうると考えられる。