

報告書

平成13年度 丸木記念特別奨学研究費A 研究実績報告書

肝壊死, 再生, 線維化および発癌の病態連繋におけるオステオポンチンの意義
— トランスジェニックマウスを用いた検討 —

受賞者 持田 智 (埼玉医科大学消化器・肝臓内科学教室)

共同研究者 松井 淳*, 稲生 実枝*, 内木 佳代子*,

名越 澄子*, 藤原 研司*

はじめに

オステオポンチンはRGD配列を有する細胞外マトリックスであるが, マクロファージに対してはケモカインとして作用する^{1,2)}. 従来, 肝はオステオポンチンを発現しない臓器とされてきたが²⁾, 筆者らはラット障害肝では活性化したクッパー細胞, マクロファージ及び星細胞にその発現が認められることを見出した^{3,4)}. また, マウスではオステオポンチン遺伝子に多型性が認められ⁵⁾, その発現が異なるalleleの系を用いた実験から, マクロファージの肝浸潤に際して本因子はMCP-1やMIP-1 α など他のケモカインより重要な働きをしていることを証明した. 一方, オステオポンチンはTh1免疫応答の開始に必須であることがAshkarらによって報告され, 本因子はサイトカイン及びケモカインのネットワークにおいて中心的役割を担うことが明らかになった⁶⁾.

劇症肝炎や肝移植後肝不全に特徴的な広汎肝壊死の成立には, 活性化したクッパー細胞や浸潤肝マクロファージの惹起する類洞内凝固及びこれに起因する微小循環障害が関与する⁷⁻¹⁰⁾. 筆者らは, その対策として肝類洞を標的とした抗凝固療法を確立し¹¹⁻¹³⁾, その臨床応用に努めてきた. この一連の研究の過程で, マクロファージの肝浸潤や活性化にはオステオポンチンの発現と, これに引き続くTh1系の免疫応答が重要であることを証明した. また, Th1系の免疫応答は劇症肝炎のみならず, 慢性肝炎や肝硬変の進展にも寄与することが報告されている. 従って, オステオポンチンは肝壊死, 線維化の病態連繋においてサイトカイン, ケモカイン・ネットワークの中核として機能していると推定される. また, 肝硬変の再生結節内の肝細胞や高分化型肝細胞癌もオステオポンチンを発現することか

*埼玉医科大学消化器・肝臓内科学教室

ら, オステオポンチンが肝再生や肝発癌の過程も調節している可能性が示唆される.

そこで, 肝病態の成立におけるオステオポンチンの役割をより明確にするために, 筆者らは本因子を過剰発現するトランスジェニック・マウスを確立した¹⁴⁾. このマウスの自然経過と各種肝病態を誘導した際の経過を評価することにより, 肝壊死, 線維化, 再生及び肝発癌の病態連繋におけるオステオポンチンの意義を検討した.

1. トランスジェニック・マウスの作成とその病態

マウス・オステオポンチンの全長cDNAをcloningし, これをhuman serum amyloid P component (hSAP) promoterを有する発現vector (PLG1-hSAP) に入れた. これをB6マウスの受精卵にmicroinjectionし, 仮親の卵管に移植したところ52匹を出産した. マウスOsteopontin-DNAの遺伝子配列からprimerを設定, 尾から抽出したDNAでPCRを行った. 52匹中6匹でオステオポンチン-DNAが検出された. この6系統をB6と掛合せヘテロのF1を得たが, 4系統がトランスジェニックであり, そのうち3系統で継代繁殖が可能であった.

トランスジェニック・マウスの各臓器homogenateでオステオポンチン発現をWestern blot法で検討したところ, 肝で顕著な発現が認められ, 生理的に本因子を発現している腎より強度であった. オステオポンチンの肝濃度(平均[最低~最大])をELISAにより測定したところ, トランスジェニック・マウスでは1,139 ng/g liver [34 ~ 15,600] であり, 生理的にオステオポンチン発現が高度である腎の約10倍高値であった. 血漿オステオポンチン濃度 (ng/mL: 平均[最低~最大]) は対照 (3,001 [1,525 ~ 5,375]) に比してトランスジェニック・マウス (7,890 [1,150 ~ 55,000]) が有意に高値

であり、特に肝の発現が高度であった系統は何れも10,000以上を示した。また、肝におけるオステオポンチンの発現細胞を、単離細胞と用いたWestern blot法と免疫組織染色で検討したところ、非実質細胞ではなく、肝細胞に発現が認められた。

肝を顕微鏡観察したところ、トランスジェニック・マウスは12週令より門脈域にリンパ球が浸潤し、48週令ではリンパ濾胞を形成した。また、24週令以降のマウスでは肝小葉に巣状壊死が観察された。免疫組織染色を行ったところ、浸潤リンパ球はCD4陰性、CD8及びMHC class IIが陽性であり、活性化CTLに相当することが判明した。また、MHC class IIの染色性はKupffer細胞でも増強しており、同様に活性化していると考えられた。血清中の抗核抗体を蛍光抗体法で評価したところ、12週令のトランスジェニック・マウスは50%で陽性であり、本マウスは自己免疫性肝炎のモデルになると考えられた。なお、本トランスジェニック・マウスでは病変も肝外病変も出現することが明らかとなった。脾とリンパ節は腫大し、肺、唾液腺、腎には多数のCTL浸潤が観察された。これらの臓器はC型慢性肝炎でもしばしば肝外病変が見られることから、その成立機序を検討する際にも有用なモデルになる可能性がある。

II. トランスジェニック・マウスにおける広汎肝壊死の誘発

肝組織を用いてDNA microarrayによる解析を行ったところ、IL-18などTh1系cytokine及びIL-10などTh2系cytokineのmRNA発現は、トランスジェニック・マウスと対照で差異が認められなかった。しかし、トランスジェニック・マウスはconcanavalin Aを静注した際の血清IFN- γ 濃度上昇が対照に比して高度であった一方で、IL-10濃度上昇が軽度であり、より広汎な肝壊死が惹起された。また、トランスジェニック・マウスでは、雌は雄に比してIFN- γ 上昇や肝障害が高度であり、IL-10上昇が軽度であった。従って、本トランスジェニック・マウスではconcanavalin-A投与後にはTh1/Th2免疫応答が破綻し、広汎肝壊死が成立すると思われた¹⁵⁾。

一方、DNA microarrayによる解析では、トランスジェニック・マウスの肝はcalpain発現が対照の30%まで低下していたが、metallothionein発現が3倍増強していた。また、GDP dissociation inhibitorやglutathione S-transferaseの発現も2倍以上増強していた。このため、四塩化炭素を投与した際に出現する肝障害はトランスジェニック・マウスが対照マウスに比して軽度であり、本マウスはTh1免疫応答と細胞防御系との関連を研究する際にも有用と考えられた。

III. ヒト・オステオポンチン遺伝子の解析

Th1系の免疫応答はC型慢性肝炎の発症に関与するが、インターフェロン治療によってウイルスが排除される際にも重要な役割を果たしている。肝細胞にオステオポンチンを過剰発現するトランスジェニック・マウスの病態を考慮すると、ヒトにおける肝炎の発症やインターフェロン治療の有効性も、肝におけるオステオポンチン発現を介して遺伝的に制御されている可能性がある。そこで、先ず、インターフェロン治療を実施していないC型慢性肝炎患者20例を対象に、direct sequencing法によりオステオポンチン遺伝子のpromoter領域の塩基配列を解析し、nt -155, -443, -616, -1,748の4ヶ所にSNPsを見出した¹⁶⁾。次いで、同様にIFN未施行のC型慢性肝炎患者156例を対象にinvader法でこれらSNPsのalleleを同定し、全176例で各SNPsと肝炎活動性との関連を検討した。nt -155, -616, -1,748の3SNPsは、D'値および r^2 値が0.937以上であり、強い連鎖不均衡を呈していた。一方、nt -443のSNPに関しては肝炎活動性と関連があり、血清ALT値が2年間以上にわたって正常値の症例はT/Tが13%、C/Tが75%であったのに対して、80 IU/L以上に上昇した症例ではT/Tが44%、C/Tが40%であった。このSNPは登録されていない新たなものであり、肝炎活動性を規定している可能性がある(工業所有権出願番号:P2003332067)¹⁶⁾。

更に、インターフェロン治療を実施したC型慢性肝炎76例を対象に、上記SNPsと治療効果との関連を検討した。nt -1,748のalleleがG/A、G/Gの症例では治癒率が82%であり、Aの症例における43%に比して有意に高率であった。Genotype 1b、高ウイルス量の難治性症例に限定してもこの差異は認められた。また、nt -443がT/Tの症例は治癒率が86%であり、C/T、C/Cの症例における53%より有意に高率であった。1b、高ウイルス量でも同様であった。なお、nt -1,748がG/A、G/G、nt -443がT/Tの両者を満たす症例は全例が治癒し、両SNPsの組み合わせによる治療効果の予測はpositive predictive valueが100%であった。

まとめ

肝細胞にオステオポンチンを過剰発現するトランスジェニックマウスは肝炎を自然発症し、抗核抗体が陽性であることから、自己免疫性肝炎のモデルになると考えられた。本マウスでは免疫応答がTh1優位にシフトしており、concanavalin-Aを投与すると対照マウスに比して広汎な肝壊死が誘発される。一方、ヒトでもオステオポンチン遺伝子のpromoter領域にSNPsが認められ、肝炎の活動性やインターフェロン治療の効果と関連していた。肝におけるオステオポンチンの発現はpromoter SNPsにより遺伝的に制御されており、こ

れが肝炎の発症やインターフェロン治療の効果を規定している可能性がある。

文 献

1. Butler WT. The nature and significance of osteopontin. *Connective Tissue Research* 23: 123-136, 1989.
2. Uede T, Katagiri Y, Iizuka J, et al. Osteopontin, a coordinator of host defense system: A cytokine or an extracellular adhesive protein? *Microbiol. Immunol* 41: 641-648, 1997.
3. Kawashima R, Mochida S, Matsui A, et al. Expression of osteopontin in Kupffer cells and hepatic macrophages and stellate cells in rat liver after carbon tetrachloride intoxication: A possible factor for macrophage migration into hepatic necrotic areas. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 527-531, 1999.
4. Wang YH, Mochida S, Kawashima R, et al. Increased expression of osteopontin in activated Kupffer cells and hepatic macrophages during macrophage migration in *Propionibacterium acnes*-treated rat liver. *J Gastroenterol* 35: 696-701, 2000.
5. Singh RP, Ratarca R, Schwartz J, et al. Definition of a specific interaction between the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) protein and murine macrophages in vitro and its effect upon macrophages in vivo. *J Exp Med* 171: 1931-1942, 1990.
6. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, et al. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* 287: 860-864, 2000.
7. Arai M, Mochida S, Ohno A, et al. Sinusoidal endothelial cell damage by activated hepatic macrophages in rat liver necrosis. *Gastroenterology* 104:1466-1471, 1993.
8. Arai M, Mochida S, Ohno A, et al. Blood coagulation equilibrium in rat liver micro-circulation as evaluated by endothelial cell thrombomodulin and macrophage tissue factor. *Thromb Res* 80: 113-123, 1995.
9. Mochida S, Ohno A, Arai M, et al. Role of adhesion molecules in the development of massive hepatic necrosis in rats. *Hepatology* 23: 320-328, 1996.
10. Mochida S, Arai M, Ohno A, et al. Deranged blood coagulation equilibrium as a factor of massive liver necrosis following endotoxin administration in partially hepatectomized rats. *Hepatology* 29: 1532-1540, 1999.
11. Arai M, Mochida S, Ohno A, et al. Blood coagulation equilibrium in rat liver micro-circulation as evaluated by endothelial cell thrombomodulin and macrophage tissue factor. *Thromb Res* 80: 113-123, 1995.
12. Yamanobe F, Mochida S, Ohno A, et al. Recombinant human tissue factor pathway inhibitor as a possible anticoagulant targeting hepatic sinusoidal walls. *Thromb Res* 85: 493-501, 1997.
13. Arai M, Mochida S, Ohno A, et al. Selective bowel decontamination of recipients for prevention against liver injury following orthotopic liver transplantation: Evaluation with rat models. *Hepatology* 27: 123-127, 1998.
14. Mochida S, Yamamoto T, Mimura S, et al. Transgenic mice expressing osteopontin in hepatocytes as a model of autoimmune hepatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 317: 114-120, 2004.
15. Mimura S, Mochida S, Inao M, et al. Imbalance of Th1 and Th2 immune reactions may provoke massive liver necrosis in osteopontin transgenic mice. *J Gastroenterology* (in press).
16. Mochida S, Hashimoto M, Matsui A, et al. Genetic polymorphisms in promoter region of osteopontin gene may be a marker reflecting hepatitis activity in chronic hepatitis C Patients. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 1079-1085, 2004.