

〔総 説〕

臍線維化における臍星細胞機能研究の新しい展開

大西 洋英*

要 旨：臍星細胞 (PSC) が慢性臍炎等における臍線維化において中心的役割を担っていることが明らかにされて後、臍線維化の根本的治療法の開発を目的として PSC 機能の分子細胞学的研究が精力的に推進され、ここ数年で PSC 機能の分子機序が次々と明らかになっている。特に本邦における研究はその飛躍的進歩に多大な貢献をしてきた。本稿においては、本邦の新進の研究者により臍線維化治療法の開発をなされることを願い、ここ最近明らかにされた PSC 機能制御の分子機序の報告を中心に概説し、それらが臍線維化治療法の標的になり得る可能性を紹介したい。

索引用語：臍星細胞 臍線維化 活性化 遊走能 貪食能

はじめに

臍臓における Vitamin A 貯留細胞の存在が Watari¹⁾や Ikejiri²⁾らにより報告され、Apte³⁾や Bachem⁴⁾らによりその細胞が臍星細胞 (PSCs: pancreatic stellate cells) として単離・培養されて後、PSC が慢性臍炎等における臍線維化の主役であることが多くの研究によって明らかにされてきた。PSC は正常臍においては Vitamin A を含有する油滴を有する静止細胞として臍腺房周囲に存在するが、アルコール等により臍に炎症が生じると、各種インターロイキンや TGF- β 等のサイトカイン刺激等により PSC は α -smooth muscle actin (α -SMA) を発現する筋線維芽細胞様に形態、機能共に変化し(活性化)、高い増殖能を獲得し、更に臍傷害部位に遊走しコラーゲンやファイブロネクチンなどの細胞外基質を放出することにより臍線維化を発症・進展させる。この PSC の機能の解明には本邦の研究者達が大きな貢献をしており、PSC の 活 性 化 に は p38MAP kinase⁵⁾、Rho kinase⁶⁾、TGF- β ファミリー刺激伝達蛋白である Smad2 等が促進的に働くこと⁷⁾、PPAR- γ が PSC の細胞周期に深く関与しその活性化と増殖を制御

していること^{8,9)}などが本邦から報告されてきた。更に最近、この PSC の活性化および増殖の新しい分子機序、ならびにその遊走能の分子機序、更には PSC の新しい機能としての貪食能などが報告され、PSC の機能解明を主軸とした臍線維化研究は大きく進んだ新しい展開をみせており、本稿ではその最新の知見を我々の報告も含め紹介する。

PSC 活性化における Cyclooxygenase-2 発現とその機能

Cyclooxygenase (Cox) はアラキドン酸からのプロスタグランジンの生合成を触媒する律速酵素であり、Cox-1、Cox-2 の 2 種類のアイソフォームが存在する。Cox-1 は恒常的にほとんどの細胞に発現されており多様な生理的機能を有する。一方 Cox-2 は種々の炎症性刺激等に応答してその発現が惹起され、各種臓器および組織の炎症の発症・進展に促進的に機能することが知られている。近年、慢性臍炎患者の臍組織において Cox-2 が強く発現していることが報告され¹⁰⁾、慢性臍炎および臍線維化への Cox-2 の関与が推測されてきたがそのメカニズム等は不明であった。そこで我々は、Cox-2 が臍線維化の細胞生物学的機序の主役たる PSC の機能制御に関わっているのではないかと仮説をたて検討した。その結果、単離直後の静止期 PSC には Cox-2 の発現が認められなかった

*秋田大学医学部内科学講座消化器内科学分野

<受理日：平成 20 年 2 月 5 日>

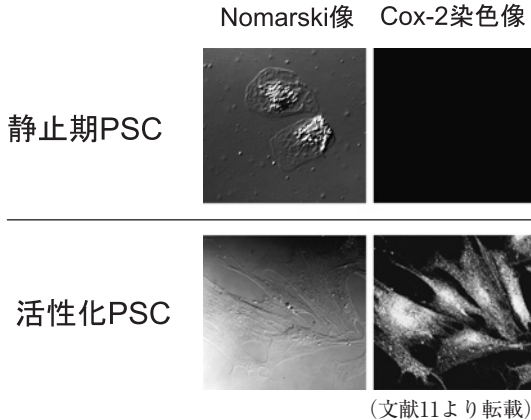


Fig. 1 PSCにおけるCox-2の発現. ラット腭より単離直後の静止期PSCと継代培養により活性化したPSCにおけるCox-2発現を抗Cox-2抗体を用いた蛍光免疫染色法にて検討した.

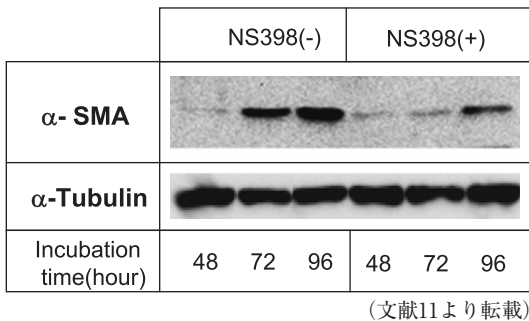


Fig. 2 Cox-2 活性抑制薬 NS-398 の PSC 活性化に対する作用. 静止期 PSC を NS-398 存在下および非存在下で培養し, western blot 法にて調べた α -SMA 発現量を PSC 活性化の指標として検討した. 内因性コントロールとして α -tubulin の western blot を行った.

が, 継代培養により活性化された PSC には Cox-2 の強い発現が認められた (Fig. 1). また, PSC 活性化サイトカインである TGF- β_1 , IL-1 β , および IL-6 刺激は PSC における Cox-2 発現を惹起し, Cox-2 活性を増強した¹¹⁾. 更に Cox-2 活性抑制薬である NS-398 はラット腭より単離直後の静止期 PSC の培養による活性化 (Fig. 2), および TGF- β_1 , IL-1 β , および IL-6 刺激による PSC 活性化の促進を共に抑制した. これらの結果より,

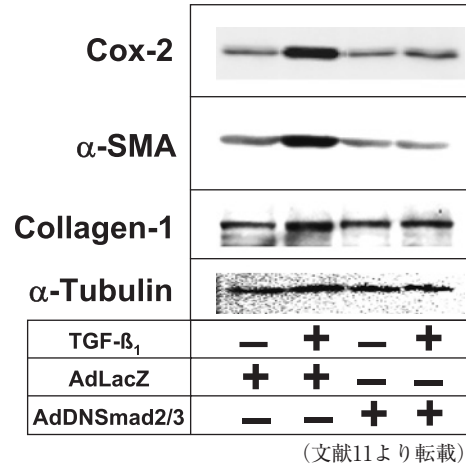


Fig. 3 TGF- β_1 による PSC の Cox-2, α -SMA, Collagen-1 発現増強に対する Dominant-negative Smad2/3 の作用. アデノウイルスベクター (AdDNsmad2/3) を用いて Dominant-negative Smad2/3 を PSC に発現させ, その Cox-2, α -SMA, Collagen-1 発現に対する作用を western blot 法にて検討した. β -galactosidase 発現アデノウイルスベクター (AdLacZ) をコントロールとして用いた.

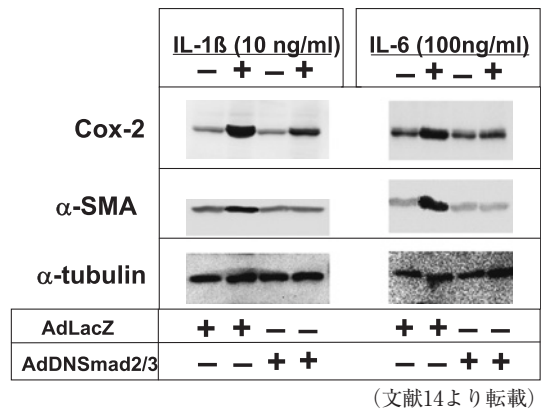
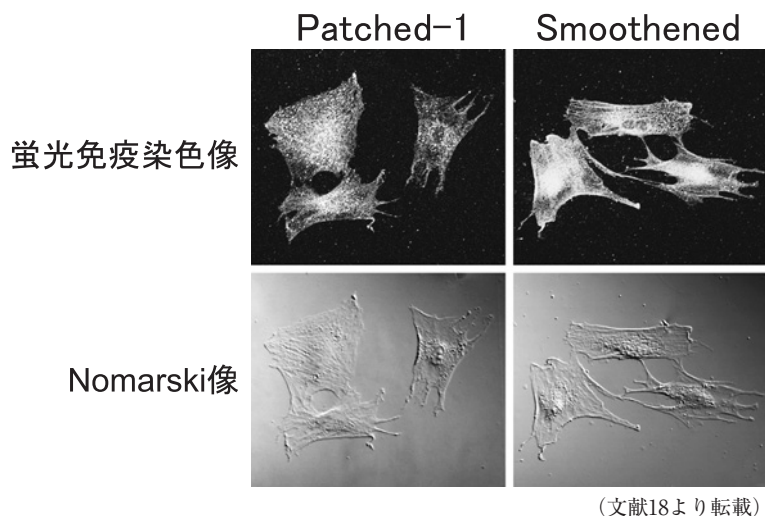


Fig. 4 IL-1 β および IL-6 による PSC の Cox-2, α -SMA 発現増強に対する Dominant-negative Smad2/3 の作用. アデノウイルスベクター (AdDNsmad2/3) を用いて Dominant-negative Smad2/3 を PSC に発現させ, IL-1 β および IL-6 の Cox-2, α -SMA 発現増強作用に対するその効果を検討した. β -galactosidase 発現アデノウイルスベクター (AdLacZ) をコントロールとして用いた.



(文献18より転載)

Fig. 5 活性化PSCにおけるIhh受容体システム構成蛋白Patched-1とSmoothedの発現. 継代培養により活性化したPSCにおけるPatched-1とSmoothedの発現を各々に特異的な抗体を用いた蛍光免疫染色法にて検討した.

Cox-2はPSCの活性化開始, および各種サイトカインによる活性化促進に不可欠であることが明らかとなった.

次に我々は, PSC活性化機構の中心的役割を果たすことが明らかになったCox-2の発現調節機構を検討した. その目的でまず代表的PSC活性化サイトカインであるTGF- β_1 によるCox-2発現増強作用の刺激伝達経路を検討した. Fig. 3に示す如くDominant-negative Smad2/3の強制発現はTGF- β_1 のCox-2発現増強作用およびPSC活性化促進作用を抑制した. これよりTGF- β_1 はSmad2/3依存性経路を介してCox-2発現を増強することでPSCの活性化を促進すると考えられた. 更に興味深いことには, Dominant-negative Smad2/3の強制発現はIL-1 β およびIL-6によるCox-2発現増強をも阻害した (Fig. 4). このことは, IL-1 β およびIL-6がSmad2/3経路を介してCox-2発現を増強することを示唆する. しかし, Smad蛋白はTGF- β ファミリー特異的な細胞内情報伝達分子であり, interleukinがSmad蛋白を直接介してその作用を発揮するとは考えにくい. そこで我々はこのDominant-negative Smad2/3

強制発現の結果より, IL-1 β およびIL-6はオートクリンTGF- β_1 の分泌を増強することで間接的にSmad2/3蛋白を介してCox-2の発現を増強するのではないかと考察した. IL-1 β , IL-6は共にPSCのオートクリンTGF- β_1 の分泌を増強することが知られている^{12,13}. 実際, 抗TGF- β_1 中和抗体はIL-1 β およびIL-6のCox-2発現増強作用を抑制した¹¹. これより, IL-1 β およびIL-6はTGF- β_1 との間に存在するオートクリンループを介して間接的にSmad2/3依存性経路を介してCox-2発現を増強すると考えられた.

Protease-Activated Receptor-2 (PAR2) ならびにConnective Growth Factor (CCN2)による活性化PSCの増殖促進 およびCollagen産生増強機構

最近, 本邦および米国にて共に既知の機構と異なる新しい活性化PSCの増殖促進機構が発見された. その一つが本邦のMasamuneらにより報告されたPAR-2を介した機構である¹⁴. PAR-2は広く多臓器に発現を認めるG protein-coupled receptorであり, そのリガンドは睪外分泌腺にて産

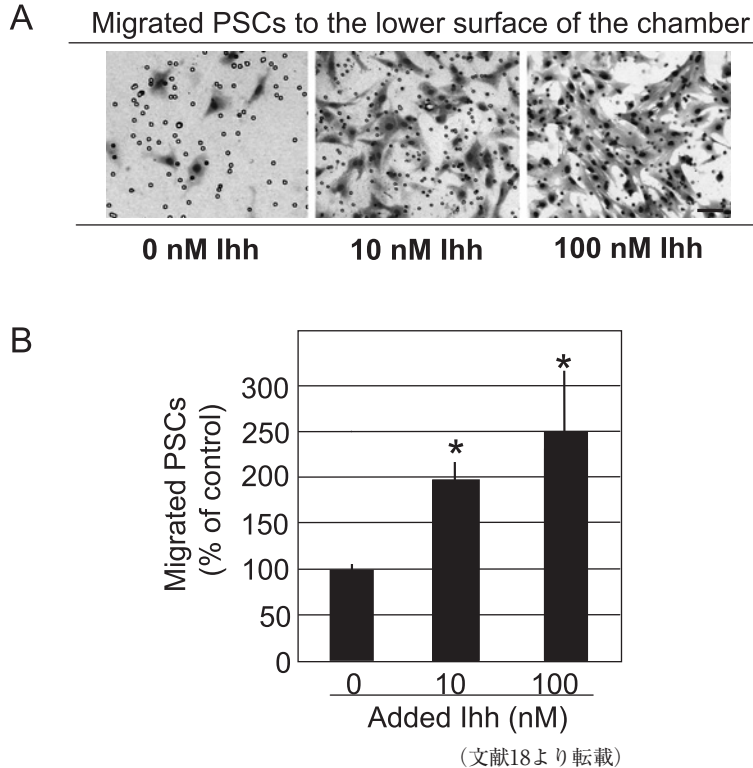


Fig. 6 Ihh の活性化 PSC の遊走能に対する効果. A : Matrigel 膜チャンバーを用いて、様々な濃度の Ihh 刺激下で膜表面から Matrigel を融解して膜裏面に到達する活性化 PSC を数えることにより検討した.
B : A の独立した 3 回の実験の平均 $\pm$ 標準誤差を示す (他の棒グラフも同様).

* $P < 0.05$ vs. Control.

生・分泌される消化酵素であるトリプシンやマスト細胞より放出されるトリプターゼである。その事実と PAR-2 が特に膵臓において強く発現していることより、膵腺房細胞内でトリプシンが活性化されて生じる膵の自己消化により惹起される急性膵炎の発症・進展に PAR-2 が深く関与していると考えられてきた。更に、PAR-2 が各種臓器の炎症反応において促進的に機能していることより、Masamune らはこの PAR-2 が膵の持続的炎症の結果生じる膵線維化にも関与しているのではないかとの仮説のもと、PAR-2 の PSC 機能制御における役割を検討した¹⁴⁾。その結果、PAR-2 は静止期の PSC には発現せず活性化 PSC に強く発現し、トリプシンやトリプターゼはその発現し

た PAR-2 を介して、一方では MAP kinase の一つである extracellular signal-regulated kinase を活性化することにより PSC の増殖を促進し、他方では同じく MAP kinase である p38 や c-Jun N-terminal kinase を介して PSC のコラーゲン産生を増強させることを明らかにした。この知見は、PAR-2 が PSC の増殖とコラーゲン産生を促進することにより膵線維化に促進的に働いていることを示唆するのみでなく、急性膵炎発症の主要原因であるトリプシンが同じく慢性膵炎の象徴的病理像である膵線維化にも貢献していることを初めて明らかにしたものであり、急性膵炎から慢性膵炎に至る分子病理学的理解に大きく貢献したと考えられる。

Table 1 PSC 遊走能の Checkboard Assay

Ihh concentrations	Upper chambers		
	0nM	10nM	100nM
Lower chambers			
0nM	100.0 ± 4.7	167.3 ± 3.9	213.7 ± 22.0
10nM	110.0 ± 22.9	148.3 ± 41.9	214.9 ± 22.6
100nM	246.7 ± 27.1	211.7 ± 40.0	216.0 ± 18.4
			(% of control)

Matrigel 膜で隔壁された上, 下チャンバー内の培養液に, 各々に示した濃度の Ihh を添加し, 上部チャンバー Matrigel 膜上に撒かれた PSC が 24 時間の Ihh 刺激により Matrigel 膜の裏側に移動した数をコントロールと比較した.

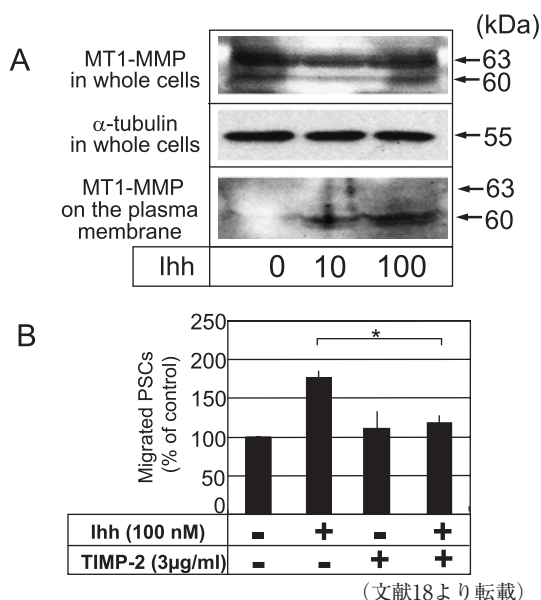


Fig. 7 Ihh は活性化 PSC 細胞膜上の MT1-MMP 量を増加させることにより, PSC の遊走能を増強する. A: 各濃度の Ihh にて活性化 PSC を 24 時間刺激後, 細胞粗分画 (上パネル), ならびに Biotinylation 法にて得られた細胞表面蛋白分画 (下パネル) に存在する MT1-MMP 量を Western blot にて測定した. 内因性コントロールとして細胞粗分画の α -tubulin 量を Western blot にて測定した (中パネル). B: 100nM Ihh 刺激による活性化 PSC 遊走促進作用に対する, MT1-MMP 機能抑制蛋白である TIMP-2 の効果を Matrigel 膜チャンバーを用いて検討した. * $P < 0.05$

遺伝子ファミリーに属する成長因子であり, 代表的 pro-fibrogenic サイトカインである TGF- β 刺激の下流にて細胞と細胞外基質との相互作用を制御することにより細胞機能をコントロールすることが知られている. さらには, 各種臓器の線維化疾患において TGF- β とともにその線維化部位に過剰発現していることが知られており, CCN2 は細胞外基質との相互作用を通じた細胞外メカニズムにより TGF- β 刺激の臓器線維化促進作用を媒介すると考えられている. これらの知見より, Gao らは CCN2 が PSC の機能を制御することにより臍線維化に関与している可能性を考え CCN2 の PSC に対する作用を検討した¹⁵⁾. その結果, CCN2 は PAR-2 と同様に静止期 PSC では発現せず活性化 PSC にて強く発現していることを見いだした. 更にその活性化 PSC より分泌される CCN2 は, integrin $\alpha_5\beta_1$ と heparan sulfate proteoglycan の両者を受容体としてオートクリン, パラクリン作用をもって活性化 PSC の増殖を促進することを示した. この CCN2 の活性化 PSC 増殖促進作用の分子メカニズムは未だ不明であり今後の解明が待たれるが, 本研究で Gao らが初めて明らかにした, integrin $\alpha_5\beta_1$ が CCN2 の受容体として機能するという知見は, integrin と細胞外基質を介した細胞外分子メカニズムにより PSC 機能を制御している興味深いこと実を示し, 臍線維化に留まらず各種臓器線維化研究において非常に意義深いものである.

また, Gao らにより報告された CCN2 による PSC 機能制御機構も非常に興味深い. CCN2 は Connective tissue growth factor と呼ばれ CCN

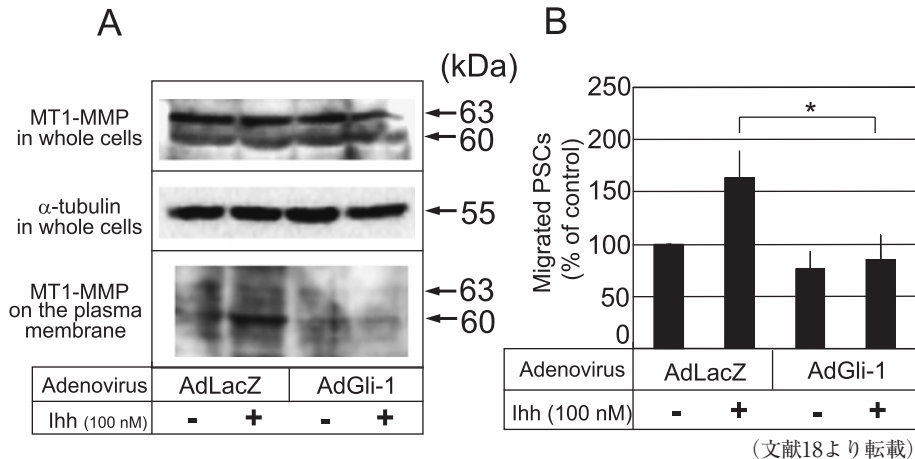


Fig. 8 転写因子 Gli-1 は, Ihh 刺激の細胞膜上 MT1-MMP 増加作用を抑制することにより, Ihh の PSC 遊走促進作用を減弱する. 活性化 PSC に Gli-1 発現アデノウイルス (AdGli-1) またはコントロールウイルス (AdLacZ) を感染させた 24 時間後, 100nM Ihh にて更に 24 時間刺激したのち図 A, B 各々の測定を行った. A: 細胞粗分画 (上パネル), ならびに Biotinylation 法にて得られた細胞表面蛋白分画 (下パネル) に存在する MT1-MMP 量を Western blot にて測定した. 内因性コントロールとして細胞粗分画の α -tubulin 量を Western blot にて測定した (中パネル). B: Ihh 刺激の活性化 PSC 遊走促進作用に対する, Gli-1 蛋白過剰発現の効果を Matrigel 膜チャンバーを用いて検討した. *P < 0.05

Indian Hedgehog (Ihh) による腭星細胞の遊走能の制御とその腭線維化における役割

前述の如く, PSC は活性化すると遊走能を獲得し, 傷害を受けた腭組織に移動し, その部位において細胞外基質を放出することにより腭線維化を促進する. Phillips らは, 活性化 PSC が遊走能を有することを初めて明らかにした彼らの報告において¹⁶⁾, PSC の強力な増殖促進成長因子である platelet derived growth factor (PDGF) が Chemotactic 効果 (PDGF の濃度の高い方向に遊走させる作用) により活性化 PSC の遊走を促進することを報告している. そこで我々は, PDGF 以外に活性化 PSC の遊走能制御する因子の探索とそのメカニズムの解明を試みた. その過程で我々は Ihh に着目し研究を行った. Ihh は Sonic Hedgehog, Desert Hedgehog とともに Hedgehog ファミリーを形成する分泌ペプチドであり, 各種の臓器発生や細胞増殖, 細胞分化に多様な生理的作用を有する. 正常腭において Ihh はランゲルハンス島に発現しインスリン産生に機能している. 一方,

慢性腭炎組織においては, その病理学的特徴の一つであるいわゆる tubular complex を形成している傷害腭組織に Ihh は強く発現しており, Ihh の慢性腭炎進展への関与が推測されていた¹⁷⁾. そこで我々は, Ihh の活性化 PSC 機能への影響を検討したところ, Fig. 5 に示すように Ihh 受容体システムの構成蛋白である Patched-1 と Smoothened が活性化 PSC に発現していることが明らかとなった¹⁸⁾. しかし, Ihh は PSC の主な機能である活性化, 増殖能, コラーゲン産生などには影響を与えなかった. 一方, Ihh は活性化 PSC の遊走能を容量依存的に増強させ (Fig. 6), その作用機序は PDGF と異なり, Chemotactic 作用のみでなく細胞遊走能を直接増強する Chemokinetic 作用も有していた (Table 1). 我々は更に Ihh の PSC 遊走能増強作用の分子メカニズムを検討した. 細胞が遊走するには, その細胞を取り囲む細胞外基質を主成分とする組織を分解して遊走する為のスペースを作り出す必要がある. その細胞周囲の細胞外基質を分解する主役を演じるのは細胞膜上に存在する Membrane-type-1 matrix metalloproteinase

(MT1-MMP) である。MT1-MMP は正常細胞の遊走、更には癌細胞の浸潤においてもその取り囲む細胞外基質を分解して細胞遊走において促進的に機能する。そこで我々は Ihh の活性化PSCにおけるMT1-MMPに対する作用を検討したところ、Ihh 刺激は活性化PSCの細胞膜上のMT1-MMP量を増加させること、更にはMT1-MMP阻害蛋白であるTIMP-2存在下ではIhhは活性化PSCの遊走能を増強させないことを示した(Fig. 7)。これらよりIhhは活性化PSCの細胞膜上のMT1-MMP量を増加させることによりその遊走能を増強することが明らかとなった。ところで、Ihh 刺激はHedgehogファミリーに特有の細胞内情報伝達蛋白である転写因子Gli-1を介して伝達され、その作用が発揮される。そこでGli-1を過剰発現するアデノウィルス並びにGli-1の発現を抑制するsiRNAを用いてIhhの活性化PSC遊走能増強作用におけるGli-1の機能を検討したところ、驚いたことにGli-1の発現を増強するとIhhによる活性化PSC細胞膜上のMT1-MMP増量作用および遊走能増強作用は減弱され(Fig. 8)、Gli-1発現を抑制すると全く反対の結果が得られた。これは、他の細胞システムと異なり活性化PSCではGli-1はIhh刺激に対し抑制的に働いていることを意味するものである。よって、如何なる分子機構がIhh刺激を活性化PSCにおいて促進的に媒介しているかは今後解明すべき課題である。

活性化膵星細胞の新しい機能：貪食能について

ごく最近、活性化膵星細胞が貪食能を有することがShimizuらの研究により明らかにされた¹⁹⁾。Shimizuらは慢性膵炎モデル動物であるWBN/Kobラット膵において、その炎症部に色素を貪食する活性化PSCが存在することを形態学的に証明した。更に、その活性化PSCは急性膵炎においてはアポトーシスを生じた細胞や好中球を貪食することを示し、その貪食能はCD36をレセプターとしたPPAR- γ のtransactivationにより増強され、pro-fibrogenicサイトカインであるTGF- β により抑制されることを明らかにした。この知見は、PSCが慢性膵炎における膵線維化を進展させ

る悪役であるだけでなく、膵炎症において好中球や炎症組織の傷害された細胞を貪食することにより膵炎症の広がりや抑制するという膵炎症治療機転にも役割を演じている可能性を初めて示唆するものであり、今後のPSC機能研究に大きな意識改革を促す重要な成果である。

おわりに

現在、今回紹介した報告に留まらず、PSCをターゲットとした膵線維化メカニズムの解明が精力的に進められている。これら研究の最終目標はこれまで治療不能と考えられてきた膵線維化の治療法を見いだすことである。PSCの活性化、増殖、遊走、細胞外基質の放出等の抑制法、更には活性化PSCの静止期細胞への転換法、また活性化PSCのアポトーシス誘導法などがその治療法の候補になりうると考えられている。その標的分子としては今回紹介したCox-2, PAR-2, CNN2, PPAR- γ 等が有力な候補であり、今後これら分子を標的とした膵線維化治療法の開発が期待される。

文 献

- 1) Watari N, Hotta Y, Mabuchi Y. Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration. *Okajimas Folio Anat Jpn* 1982; 58: 837-58.
- 2) Ikejiri N. The vitamin A-storing cells in the human and rat pancreas. *Kurume Med J* 1990; 37: 67-81.
- 3) Apte MV, Haber PS, Applegate TL, et al. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut* 1998; 43: 128-33.
- 4) Bachem MG, Schneider E, Gross H, et al. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* 1998; 115: 421-32.
- 5) Masamune A, Satoh M, Kikuta K, Sakai Y, Satoh A, Shimosegawa T. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase blocks activation of rat pancreatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304: 8-14.
- 6) Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Satoh K, Shimosegawa T. Rho kinase inhibitors block activation of pancreatic stellate cells. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 1292-302.
- 7) Ohnishi H, Miyata T, Yasuda H, et al. Distinct roles of Smad2-, Smad3-, and ERK-dependent pathways in transforming growth factor-beta1 regulation of pan-

- creatic stellate cellular functions. *J Biol Chem* 2004; 279: 8873–8.
- 8) Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Sakai Y, Satoh A, Shimosegawa T. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor- γ block activation of pancreatic stellate cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 141–7.
- 9) Shimizu K, Shiratori K, Hayashi N, Kobayashi M, Fujiwara T, Horikoshi H. Thiazolidinedione derivatives as novel therapeutic agents to prevent the development of chronic pancreatitis. *Pancreas* 2002; 24: 184–90.
- 10) Koliopanos A, Friess H, Kleeff J, Roggo A, Zimmermann A, Büchler MW. Cyclooxygenase 2 expression in chronic pancreatitis: correlation with stage of the disease and diabetes mellitus. *Digestion* 2001; 64: 240–7.
- 11) Aoki H, Ohnishi H, Hama K, et al. Cyclooxygenase-2 is required for activated pancreatic stellate cells to respond to proinflammatory cytokines. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C259–68.
- 12) Aoki H, Ohnishi H, Hama K, et al. Autocrine loop between TGF- β 1 and IL-1 β through Smad3- and ERK-dependent pathways in rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: C1100–8.
- 13) Aoki H, Ohnishi H, Hama K, et al. Existence of autocrine loop between interleukin-6 and transforming growth factor- β 1 in activated rat pancreatic stellate cells. *J Cell Biochem* 2006; 99: 221–8.
- 14) Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Suzuki N, Shimosegawa T. Protease-activated receptor-2-mediated proliferation and collagen production of rat pancreatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312: 651–8.
- 15) Gao R, Brigstock DR. Connective tissue growth factor (CCN2) in rat pancreatic stellate cell function: integrin α 5 β 1 as a novel CCN2 receptor. *Gastroenterology* 2005; 129: 1019–30.
- 16) Phillips PA, Wu MJ, Kumar RK, et al. Cell migration: a novel aspect of pancreatic stellate cell biology. *Gut* 2003; 52: 677–82.
- 17) Kaye H, Kleeff J, Keleg S, Büchler MW, Friess H. Distribution of Indian hedgehog and its receptors patched and smoothened in human chronic pancreatitis. *J Endocrinol* 2003; 178: 467–78.
- 18) Shinozaki S, Ohnishi H, Hama K, et al. Indian Hedgehog promotes the migration of rat activated pancreatic stellate cells by increasing membrane type-1 matrix metalloproteinase on the plasma membrane. *J Cell Physiol* (in press).
- 19) Shimizu K, Kobayashi M, Tahara J, Shiratori K. Cytokines and peroxisome proliferator-activated receptor γ ligand regulate phagocytosis by pancreatic stellate cells. *Gastroenterology* 2005; 128: 2105–18.

Novel aspects of the research on the pancreatic stellate cellular participation in pancreatic fibrosis

Hirohide OHNISHI*

Key words: Pancreatic stellate cells, Pancreatic fibrosis, Activation, Migration, Phagocytosis

After the identification and isolation of pancreatic stellate cells (PSCs), a number of studies on their functions have shown that PSCs play central roles in pancreatic fibrogenesis in patients with chronic pancreatitis. In chronic pancreatitis tissue, PSCs are activated, proliferate, and migrate to the injured regions of the pancreas, where they secrete various extracellular matrices resulting in pancreatic fibrosis. The specific molecules involved in these PSC functions have been identified. In this review, recent reports on the molecular mechanism of PSC functional controls and the possibility that these molecules can be the targets for the treatment of pancreatic fibrosis will be presented.

* Division of Gastroenterology, Akita University Faculty of Medicine (Akita)