

肝再生におけるクッパー細胞の機械刺激伝達の意義

日本医科大学大学院医学研究科 分子遺伝医学分野

酒井 真志人

1. 研究の背景

組織マクロファージは全ての臓器に存在し、組織恒常性の維持に重要な役割を担っている。組織マクロファージの形質は、組織環境におけるシグナルによって誘導されることが明らかとなってきた。転写因子PU. 1, C/EBP, AP-1は、マクロファージの分化を決定づける系統決定的転写因子として知られているが、組織マクロファージは、さらに環境に応答して組織特異的な転写因子を発現する。これらの環境シグナル応答性の転写因子が、PU. 1などの系統決定的転写因子と共に組織マクロファージ特異的なエンハンサーを形成することで、マクロファージは組織特異的な遺伝子発現と機能を獲得する。

肝臓の組織マクロファージであるクッパー細胞は肝類洞内皮細胞上に存在し、自然免疫や鉄代謝、腸管由来のリポ多糖 (LPS) の解毒に重要な役割を果たす。クッパー細胞は出生後も自己複製によって維持されるが、細菌感染などにより脱落すると、循環中の単球が肝類洞に生着して、自己複製能を持ち、クッパー細胞に近い遺伝子発現を示す単球由来の肝臓マクロファージへと分化する。クッパー細胞や単球由来の肝臓マクロファージは、肝類洞内皮細胞上のNotchリガンドDLL4によるNotch-RBPJシグナルの活性化と、肝星細胞由来のBMP9によるSMADシグナルの活性化によって、組織特異的な機能を獲得する。しかし、肝類洞における力学的環境がクッパー細胞の形質に与える影響は十分に明らかとなっていない。

2. 研究の目的

生体内において、細胞は常に様々な機械刺激を受けている。代表的なものとしては、血流によるせん断応力や細胞外マトリックス (ECM) による接触刺激が挙げられる。生体内における機械刺激は、それを受容した細胞の形態や分化・増殖の機構を変化させ、組織や臓器の構造・機能に影響を及ぼす。生体は様々な機械刺激に応答した適応と修復によりその機能を維持しており、その破綻は臓器障害・疾患発症に繋がる。そのため、クッパー細胞の機械刺激受容が肝臓の適応と修復に及ぼす影響の解明は、疾患の治療標的を提供し得る重要な研究課題である。

PIEZO1は細胞膜の張力変化に応じて陽イオンを透過させる機械刺激受容体であり、クッパー細胞とその他の肝類洞壁構成細胞である類洞内皮細胞、肝星細胞に発現している (図1A)。また、申請者は、機械刺激受容体として機能することが予想されているTransmembrane channel-like (TMC) ファミリー分子がクッパー細胞に高発現していることを見出した。特にTMCファミリー分子であるTMC3は、組織マクロファージの中でもクッパー細胞に特異的に発現していた (図1B)。

本研究では、マクロファージ様細胞株における機械刺激受容体候補分子TMC3の機能解析を実施した。また、生体内のクッパー細胞におけるPIEZO1を介した機械刺激伝達の病態生理学的意義を、肝切除後肝再生およびうっ血性肝障害モデルを用いて解析した。

3. 研究の方法

(1) マクロファージの機械刺激伝達におけるTMC3の機能解析

TMC3は組織マクロファージにおいてクッパー細胞に特異的に発現するが、内耳有毛細胞における機械刺激

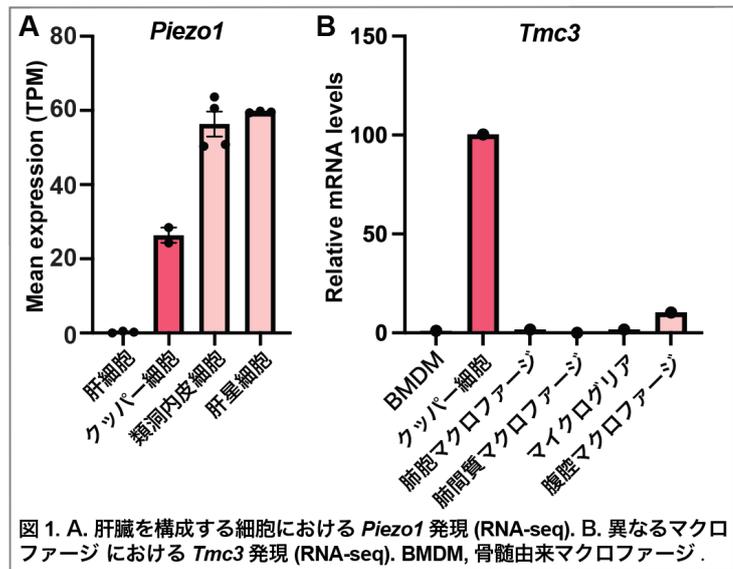


図 1. A. 肝臓を構成する細胞における *Piezo1* 発現 (RNA-seq). B. 異なるマクロファージにおける *Tmc3* 発現 (RNA-seq). BMDM, 骨髄由来マクロファージ.

受容体と考えられているTMC1、TMC2と異なり、その機能は明らかとなっていない。そこで、マクロファージ様細胞株であるRAW264.7細胞にレンチウイルスベクターを用いてTMC3を強発現し、流路中でシェアストレスの増加が細胞内Ca濃度に与える影響を、カルシウム感受性蛍光タンパク質を用いたイメージングによって測定した。また、TMC3の強発現が定常状態およびシェアストレス負荷時の遺伝子発現に与える影響をRNA-seqによって検討した。

(2) 肝部分切除後の肝再生におけるクッパー細胞のPIEZ01の役割の解析

肝切除は、急性・一過性の門脈圧亢進症モデルと考えることができる。実際、マウスでは、70%肝切除後、肝類洞の血流速度は約3倍に増加し類洞壁へのシェアストレスが増大する。そこで、クッパー細胞特異的Piezo1欠損マウスを用いて、肝切除後肝再生におけるクッパー細胞のPIEZ01の役割を解析した。まず、Piezo1 floxマウスをクッパー細胞特異的CreマウスであるClec4f-Cre-tdTomatoマウスと交配することで、Piezo1 flox/flox; Clec4f-cre-tdTomato⁺/−マウス(KC-Piezo1 KO)とそのコントロールであるPiezo1 flox/flox; Clec4f-cre-tdTomato[−]/−マウスを作製した。これらのマウスを用いて70%肝切除を行い、肝切除12時間後の肝臓から肝組織とクッパー細胞を採取して、RNA-seqによる遺伝子発現解析を実施した。また、クッパー細胞におけるPIEZ01欠損が肝再生速度に与える影響を経時的な肝重量/体重比の測定によって評価した。

(3) うっ血性肝障害におけるクッパー細胞のPIEZ01の役割の解析

慢性心不全や先天性心疾患に対するフォンタン手術により中心静脈圧が上昇すると、慢性のうっ血により肝線維化が生じ、重度になると肝硬変に進行する。うっ血性肝障害では、肝類洞圧が長期的に上昇し、クッパー細胞に対する機械刺激は増加する。そこで、うっ血性肝障害におけるクッパー細胞のPIEZ01の病態生理学的意義を検討した。具体的には、KC-Piezo1 KOとそのコントロールマウスを用いて、下大静脈を70%結紮することによりうっ血性肝障害を誘導するpIVCL(partial inferior vena cava ligation)を実施し、1週間後の肝臓から肝組織とクッパー細胞を採取して、RNA-seqによる遺伝子発現解析を実施した。

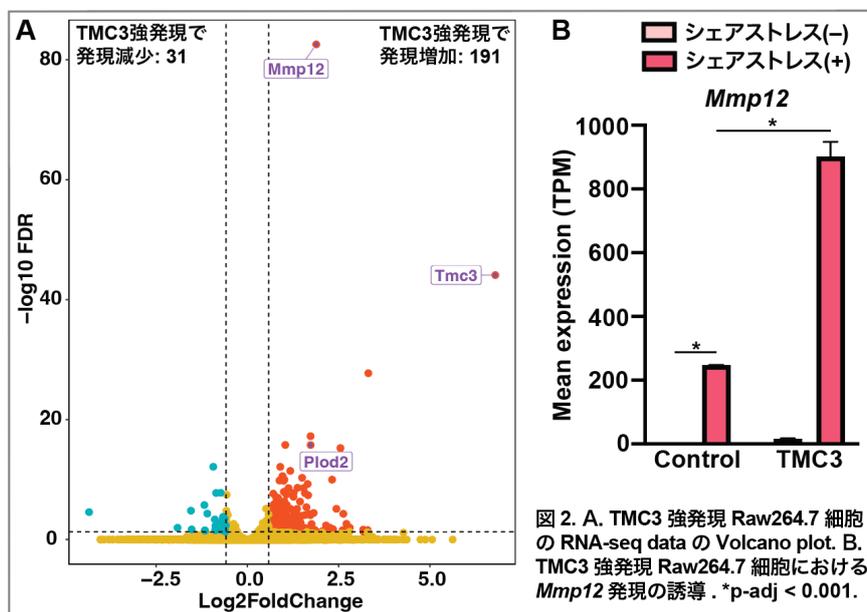


図2. A. TMC3強発現Raw264.7細胞のRNA-seq dataのVolcano plot. B. TMC3強発現Raw264.7細胞におけるMmp12発現の誘導. *p-adj < 0.001.

4. 研究成果

(1) マクロファージの機械刺激伝達におけるTMC3の機能解析

上述のTMC3強発現細胞株とコントロール株に対し、カルシウム感受性蛍光タンパク質GCaMP6sを発現させた。これらの細胞株を、血管を模した微小流路内に播種し、培養液を循環させることで細胞へシェアストレスを加え、その際の細胞内カルシウム濃度の変化を観察した。その結果、培養液の流れに応じて細胞内カルシウム濃度が上昇する様子が観察できたが、TMC3強発現細胞株とコントロール株のカルシウム応答に差はみられなかった。

次に、TMC3強発現マクロファージ細胞株とそのコントロール株を、微小流路内に播種し、培養液を循環させることによりシェアストレスを1時間加えた後、細胞を回収してRNA-seqによる遺伝子発現解析を実施した。その結果、222遺伝子の発現変動が検出された(p-adj < 0.05, fold change > 1.5) (図2A)。TMC3の強発現により発現が誘導される遺伝子には、ECMの分解や炎症応答に関与するMmp12 (Matrix metalloproteinase-12)や、コラーゲン分子の架橋に関与するPlod2 (Procollagen-Lysine, 2-Oxoglutarate 5-Dioxygenase 2)が含まれていた。これらの遺伝子の発現はシェアストレス負荷によって誘導され、TMC3強発現によってさらに増加した(図2B)。これらの結果から、TMC3は細胞内カルシウム濃度の上昇とは異なるメカニズムで、シェアストレスに対するマクロファージの応答に寄与することが示唆された。

(2) 肝部分切除後の肝再生におけるクッパー細胞のPIEZ01の役割の解析

KC-Piezo1 KOおよびそのコントロールマウスを用いて70%肝切除を実施し、RNA-seqにより、12時間後の肝臓とクッパー細胞の遺伝子発現解析を実施した。その結果、クッパー細胞におけるPIEZO1欠損は、70%肝切除12時間後の肝臓の遺伝子発現に影響を与えないことが明らかとなった(図3A)。次に、70%肝切除の72時間後、168時間後に肝重量/体重比を測定することで、KC-Piezo1 KOおよびそのコントロールマウスの肝再生速度を比較した。その結果、クッパー細胞におけるPIEZO1欠損は、70%肝切除後の肝再生速度に影響を与えないことが明らかとなった(図3B)。

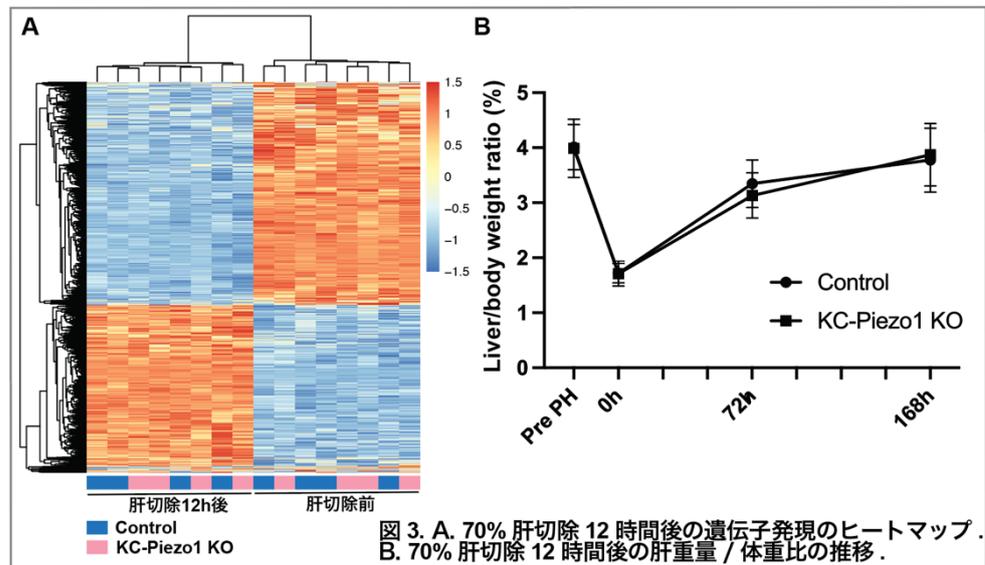


図3. A. 70%肝切除12時間後の遺伝子発現のヒートマップ. B. 70%肝切除12時間後の肝重量/体重比の推移.

(3) うっ血性肝障害におけるクッパー細胞のPIEZO1の役割の解析

KC-Piezo1 KOおよびそのコントロールマウスを用いてpIVCLを実施し、RNA-seqにより、1週間後の肝臓の遺伝子発現解析を実施した。その結果、KC-Piezo1 KOの肝臓では、1139遺伝子の発現が減少、441遺伝子の発現が増加していた(p-adj < 0.05, fold change > 2) (図4A)。KC-Piezo1 KOの肝臓で発現が減少する遺伝子群のGene Ontology (GO) 解析を実施したところ、クッパー細胞におけるPIEZO1の欠損により、*Col1a1*、*Col1a2*、*Col3a1*といったECM生成に関連する遺伝子の発現が減少していることが明らかとなった(図4B, C)。また、*Ccl2*を含む複数のケモカインの発現が減少しており、実際、pIVCLにより増加する肝臓中の単球由来のCD11b高発現マクロファージの数は、KC-Piezo1 KOで減少していた。

次にpIVCL1週間後の肝臓よりクッパー細胞を分取して、RNA-seqによる遺伝子発現解析を実施した。その結果、KC-Piezo1 KOのクッパー細胞では、236遺伝子の発現が減少、120遺伝子の発現が増加していた(p-adj < 0.05, fold change > 2)。KC-Piezo1 KOのクッパー細胞で発現が減少する遺伝子群のGene Ontology (GO) 解析を実施したところ、細胞増殖およびECM生成に関連する遺伝子の発現が減少していることが明らかとなった(図4D)。実際、PIEZO1欠損クッパー細胞では線維化促進性因子であるOsteopontinをコードする*Spp1*等の線維化に関連する遺伝子の発現が強く抑制されていた(図4E)。

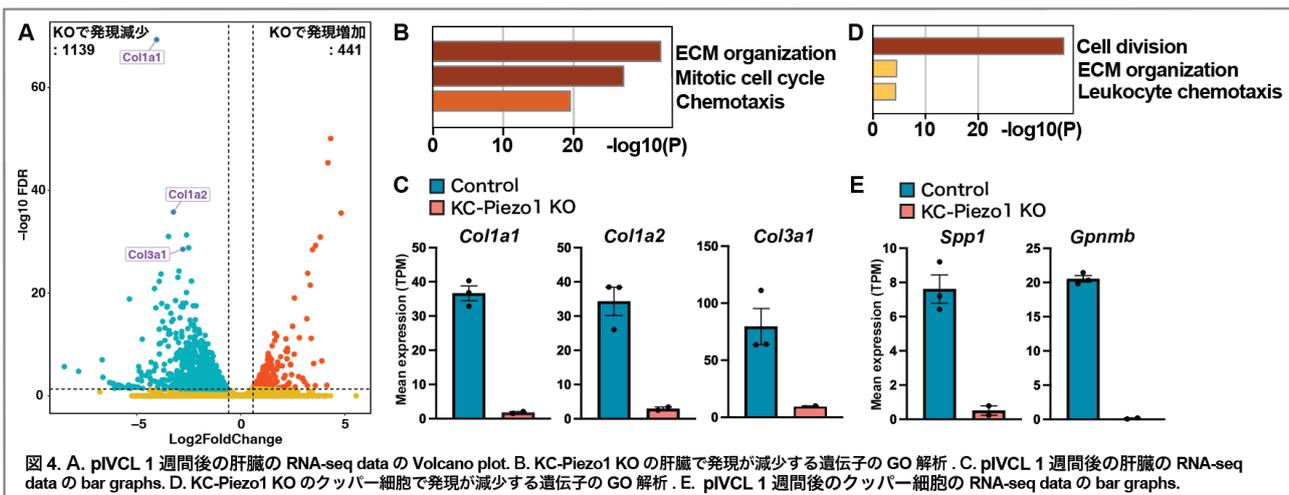


図4. A. pIVCL 1週間後の肝臓のRNA-seq dataのVolcano plot. B. KC-Piezo1 KOの肝臓で発現が減少する遺伝子のGO解析. C. pIVCL 1週間後の肝臓のRNA-seq dataのbar graphs. D. KC-Piezo1 KOのクッパー細胞で発現が減少する遺伝子のGO解析. E. pIVCL 1週間後のクッパー細胞のRNA-seq dataのbar graphs.

以上の結果から、クッパー細胞におけるPIEZO1の欠損により、早期のうっ血性肝障害モデルにおける線維化関連遺伝子の発現誘導が強く抑制されることが明らかとなった。また、クッパー細胞におけるPIEZO1を介した機械刺激受容は、線維化促進性因子の発現誘導を介して、肝星細胞を活性化させる可能性が示唆された。今後、クッパー細胞における機械刺激受容が、うっ血性肝障害における長期的な肝線維化の進展に与える影響を検討していく。