

原 著

フィブロネクチンフラグメントによるラット肝伊東細胞の活性化制御

加藤里奈^{1,2}、神谷貞浩^{1,2}、中村 洋²、片山 敬¹、深井文雄¹
 東京理科大学薬学部 臨床病態学研究室¹、薬品分析化学研究室²

Suppression of Hepatic Ito Cell Activation by the Anti-Adhesive Fibronectin Fragment

Rina KATO^{1,2}, Sadahiro KAMIYA^{1,2}, Hiroshi NAKAMURA², Takashi KATAYAMA¹ and Fumio FUKAI¹

¹Department of Patho-Physiology and ²Analytical Chemistry
 Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo

Received; 26 may, 1998. Accepted; 3 August, 1998.

Abstract : Hepatic Ito (stellate) cells represent the quiescent phenotype (i.e. many lipid droplets, low proliferative activity) in healthy liver. During chronic inflammation of the liver, Ito cells acquire the activated phenotype characterized by loss of lipid droplets, high proliferative ability, expressed α -smooth muscle (SM) actin, and highly increased production of fibrous extracellular matrix (ECM) proteins. Therefore, Ito cells have been considered to play a central role in pathogenesis of hepatic fibrosis. In order to explore endogenous factors to control the phenotypic activation of Ito cells, we established an in vitro culture system of Ito cells, in which primary and subcultured Ito cells represented typical properties of the quiescent and active phenotypes, respectively. Using these two types of cultured Ito cells, here we showed that a proteolytic fragment derived from the heparin-binding domain of FN (30kDa Hep2 fragment) was capable of suppressing the phenotypic activation of primary Ito cells, as judged by consumption of vitamin A-containing lipid droplets, low proliferative ability, and decreased expression of α -SM actin. Further study should be required to define effects of the Hep2 fragment on the production of fibrous ECM proteins by Ito cells.

key words : hepatic Ito (stellate) cells, hepatic fibrosis, fibronectin, fibronectin fragment, anti-adhesive factor

はじめに

肝伊東細胞は正常肝内ではビタミンAの貯蔵・分泌、あるいは類洞の血流調節に関与していると考えられているが、何らかの刺激に応じて筋線維芽細胞様に変化し、細胞外マトリックスを盛んに産生する活性化した形質になることから、肝線維化に深く関与するものと考えられている¹⁻³⁾。従って、線維化における主要な細胞外マトリックス産生細胞である伊東細胞の形質転換、すなわち活性化を制御することにより肝線維化を調節できる可能性が推測される。

本研究では、伊東細胞の形質転換制御因子を探索するために伊東細胞の in vitro モデル培養系を構築するとともに、これを用いてフィブロネクチン(FN)由来のフラグ

メントが伊東細胞の活性化を抑制する作用をもつ可能性を示す。

材料および 方法

材料

細胞分散用コラゲナーゼ は和光純薬から、Percoll は Pharmacia Biotech. からそれぞれ購入した。Eagle's minimum essential medium (EMEM) は (株) 日水製薬から、また fetal bovine serum (FBS) は JRH Biosciences から購入した。Cell counting kit は (株) 同仁化学研究所のものをを用いた。抗 α -smooth muscle (SM) actin マウス抗体は Sigma Chemical Co. 製を使用した。

伊東細胞の分離・精製

伊東細胞は妹尾・畑の方法⁴⁾に従い雄性 ウィスターラット (400-600g) から分離した。ビタミンAを含む細胞内油滴の存在及びデスミンの発現を指標として、分離伊東細胞の純度は90%以上であることを確認した。この分離伊東細胞を15% FBSを含むEMEMで3日間静置培

別冊請求先: 深井文雄 〒162-0826 東京都新宿区市ヶ谷船
 河原町12番地 東京理科大学薬学部臨床病態学研究室

Reprint requests to: Fumio Fukai, Department of Patho-Physiology,
 Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo,
 Ichigaya Funagawara-Machi 12, Shinjuku-Ku, Tokyo 162-0826,
 Japan. Tel: +81-3-3260-4271, Fax: +81-3-3268-3045 e-mail. fukai
 @ ps.kagu.sut.ac.jp

養したものを初代伊東細胞として、また、初代伊東細胞を同じメディウム条件下で14～18回継代培養したものを継代伊東細胞として用いた。細胞の剥離には0.25%トリプシン-0.025% EDTA・2Na / PBS (-) を使用した。これら2種の伊東細胞の活性化の有無を判断するため、ビタミンAを含む細胞内油滴の蓄積量と α -SM actinの発現を観察した。細胞内油滴の蓄積はOil red O法により、また α -SM actinの発現は抗 α -SM actin抗体を用いた間接蛍光抗体法によりそれぞれ検出した。なお、 α -SM actinの間接蛍光抗体法による検出は、相互に比較する細胞の写真撮影を露光時間を一定にして行った。

FNおよびそのフラグメントの精製

ヒト血漿性FNはMiekka等の方法⁵⁾に従い、ゼラチンアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。FNのヘパリン結合ドメイン2由来の反接着性30 kDaフラグメント(30K Hep2)は先に報告した方法^{6), 7)}に従って精製した。すなわち、血漿性FNのサーモリシン分解物から、150 kDaのフラグメント(細胞結合ドメインとヘパリン結合ドメイン2を含む)を精製し、これを更にキモトリプシンで分解した後、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーによって30K Hep2フラグメントを精製した。なお精製したこの30K Hep2フラグメントは4M尿素処理⁷⁾した後、PBS (-) に対して透析することにより尿素を除去してから実験に供した。

初代および継代伊東細胞に対する30K Hep2フラグメントの作用の解析

初代伊東細胞は5%FBSを含むEMEM中に、また継代伊東細胞(18代)は無血清のEMEM(0.1mg/mlレチノール含有)中に懸濁して、それぞれFNをコートしたカバーガラスの入った12wellプレートに播種し、細胞が伸展したことを確認した後に30K Hep2フラグメント添加あるいは無添加の各々のメディウムと交換した。一定期間培養後に細胞をホルマリン固定したのち、細胞内油滴及び α -SM actinの発現を前述の方法に従って観察した。

継代伊東細胞の増殖の測定

無血清のEMEM(0.1mg/mlレチノール含有)に懸濁した継代伊東細胞(16代, 9×10^3 cells /well)をFNコートした96wellプレートに播種し、16時間インキュベート後に種々の濃度の30K Hep2フラグメントを含むメディウムに交換した。この細胞をさらに27時間インキュベートした後に、Cell counting kitにより細胞増殖を評価した。

結 果

正常および活性化伊東細胞のモデル培養系

正常および活性化伊東細胞の形質を反映する伊東細胞のモデル培養系の構築を試みた。初代伊東細胞は、ビタミンAを含む多量の油滴を保持するとともに、活性化の最もよいマーカーである α -SM actinの発現はほとんど認められなかった(Figs. 1A, C)。正常伊東細胞に特徴的なこれらの形質は、伊東細胞を分離後少なくとも5日間は保たれていることが確認された。一方、初代伊東細胞を14～18回継代培養して得た継代伊東細胞は、油滴をほぼ完全に消失しているとともに、 α -SM actinを顕著に発現していた(Figs. 1B, D)。更に、初代および継代伊東細胞の増殖能を測定した結果、初代伊東細胞を5%FBS存在下に4日間培養した時、その細胞数にはほとんど変化がみられなかったのに対し、継代伊東細胞は同じ条件下で3倍に増殖していた。このように初代及び継代伊東細胞は、それぞれ正常及び活性化伊東細胞の形質を保持しており、伊東細胞の活性化制御因子を探索してゆくためのin vitro実験系に充分適用しうるものと考えられた。そこで、これら初代及び継代伊東細胞を用いて以下の検討を行った。

継代伊東細胞に対するフィブロネクチンフラグメントの作用

FNのプロテアーゼ分解物には様々な生物活性があることが報告されている⁶⁻¹²⁾。そこでまず、継代伊東細胞の増殖に対する種々FNフラグメントの作用を解析した。本実験では、メディウム条件を単純化するために無血清メディウムを用いた。継代伊東細胞は無血清メディウム中で弱いながらも増殖性が認められたが、この増殖に対してFNのヘパリン結合ドメイン2(Hep2)に由来する分子量30 kDaのフラグメントは用量依存的な増殖抑制作用を示した(Fig. 2)。他のドメインに由来するフラグメントはいずれも有意な抑制作用を示さなかった(データ省略)。

この30K Hep2フラグメントは、我々が先に反接着活性を有するフラグメントとして見出したものであるが^{7), 13)}、少なくとも15 μ g /ml以下の濃度では継代伊東細胞の接着に対して大きな影響を示さなかった。従って、この濃度範囲内での増殖抑制は伊東細胞の脱着を促進したことによる二次的効果に基づいたものではないと考えられ、30K Hep2フラグメントが伊東細胞の形質に何らかの変化を促した可能性が考えられた。そこで次に、30K Hep2フラグメントによる伊東細胞のその他の形質変化の有無を解析した。継代伊東細胞を30K Hep2フラグメント存在下に培養すると、培養1日目頃から細胞内に油滴様粒子の蓄積がみられるようになり、4日間培養後の細胞をOil red O染色したところ中性脂肪の蓄積が確認された(Fig. 3)。この結果から、活性化した形質を

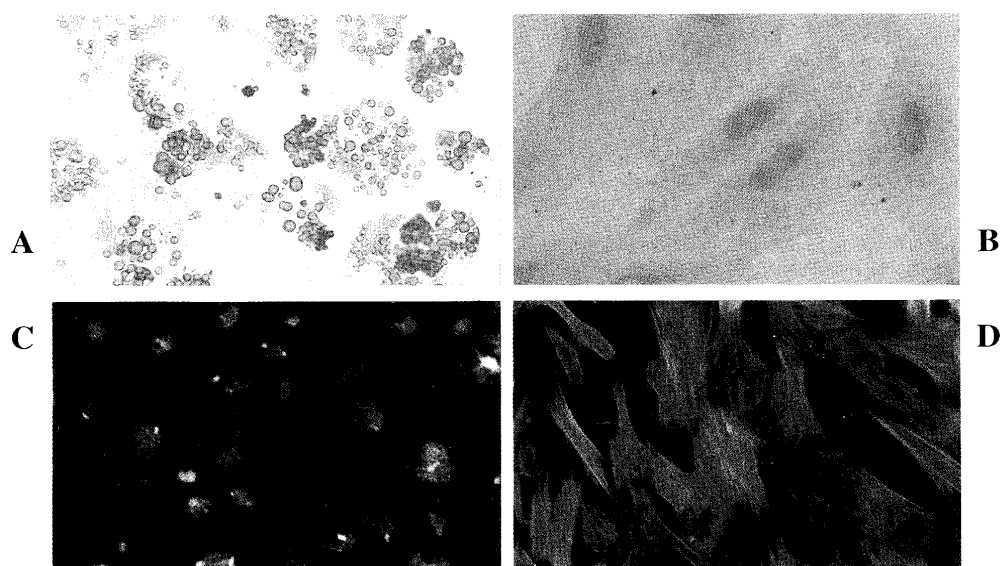


Fig. 1 Accumulation of lipid droplets and expression of α -SM actin in primary and subcultured Ito cells.
A and C : Primary Ito cells. B and D : Subcultured Ito cells in passage 16. A and B : Oil Red O staining (x100). C and D : Indirect immunofluorescence microscopy of α -SM actin (x33).

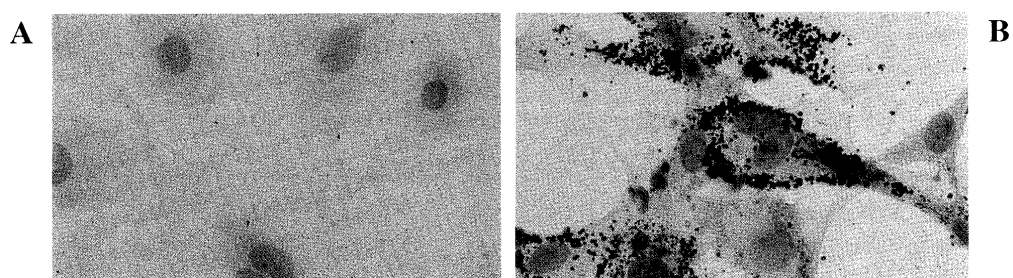


Fig. 3 Stimulation of lipid droplet accumulation in subcultured Ito cells by the Hep2 fragment.
Subcultured Ito cells in passage 18 were cultured for 4 days with the serum-free medium in the absence (A) or presence (B) of the Hep2 fragment (1mg/ml). Cells fixed with 4% formalin were stained with Oil Red O (x100).

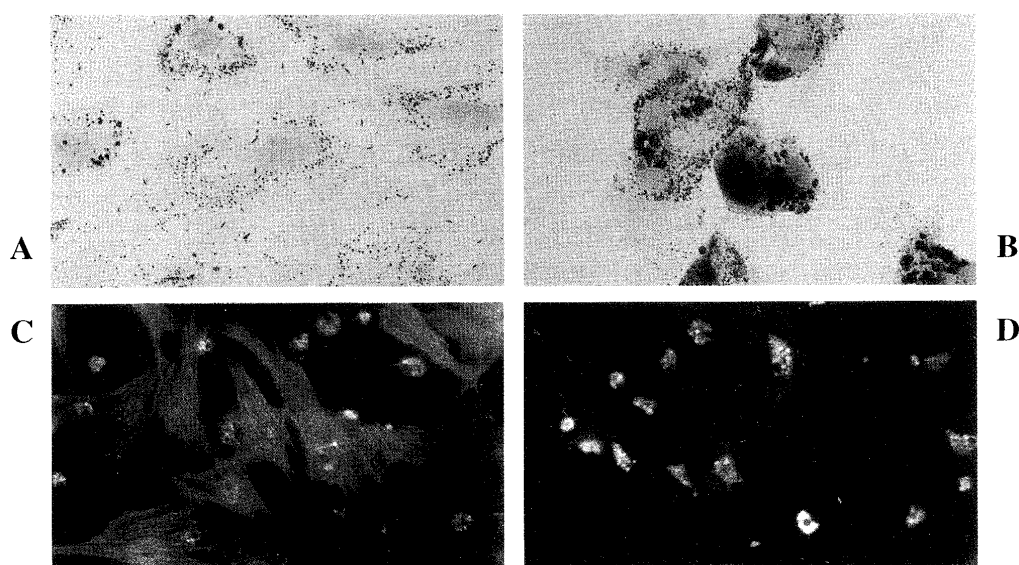


Fig. 4 Suppression of the activation of primary Ito cells by the Hep2 fragment.
Primary Ito cells were cultured for 8 days with the 5% FBS-containing medium in the absence (A and C) or presence (B and D) of the Hep2 fragment (50mg/ml). A and B : Oil Red O staining (x100). C and D : Indirect immunofluorescence microscopy of α -SM actin (x33).

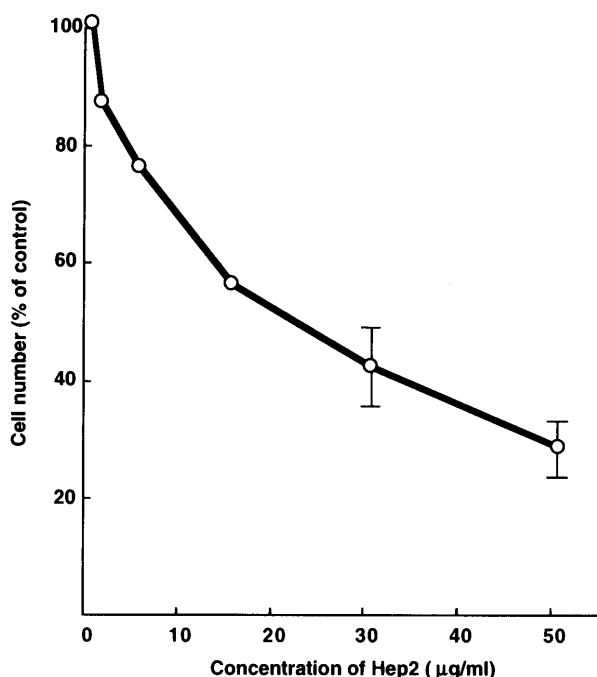


Fig. 2 Dose-dependent inhibition of subcultured Ito cell proliferation by the Hep2 fragment. Subcultured Ito cells in passage 16 were incubated at 37°C under the serum-free conditions with or without the Hep2 fragment at the indicated concentrations. After a 27 hr-incubation, the number of cells was counted. Data represent the mean $\pm$ S.E. of three determinants.

もつ継代伊東細胞が30K Hep2フラグメント存在下で培養することにより正常化したのではないかと推測された。しかしながら、形質転換を決定づける最も有効なマーカーである α -SM actinは継代伊東細胞を30K Hep2フラグメント存在下で培養しても変化はなく、依然として強く発現したままであった(データ省略)。このように既に活性化している継代伊東細胞を30K Hep2フラグメント存在下で培養すると、増殖抑制、細胞内油滴の蓄積が観察されるなど、活性化していない正常伊東細胞の形質の一部を示すようになることが示された。

初代伊東細胞の活性化に対する30K Hep2フラグメントの作用

初代伊東細胞は前述のように血清存在下での長期間培養、あるいは繰り返し継代培養により活性化する^{3), 14)}。初代伊東細胞の培養過程にみられるこの活性化に対する30K Hep2フラグメントの作用を解析した。初代伊東細胞をFNでコートしたディッシュ上に播種し、5%FBS存在下で培養すると経日的に油滴の減少が認められ、8日後には顕著な油滴の減少が観察された(Fig. 4A)。このように、血清含有メディウムによる培養過程において実際に伊東細胞の活性化が進行することが確認されたことから、この活性化に対する30K Hep2フラグメントの作用を観察すべく、上記の培養系に30K Hep2フラグメントを加えて初代伊東細胞を培養した。30K Hep2フラグメ

ントの作用は血清存在下ではその効果が減弱するため(未発表データ)、無血清メディウム中での前述の実験と比べ、高用量の30K Hep2フラグメントを使用した。その結果、30K Hep2フラグメント非存在下で観察される油滴の減少は抑えられ、30K Hep2フラグメント存在下では8日後でも多量の油滴が残存していた(Fig. 4B)。同じ条件下で培養した細胞の α -SM actinについて観察すると、30K Hep2フラグメント非存在下では8日後には既に顕著な α -SM actinの発現が認められたのに対し、30K Hep2フラグメント存在下では α -SM actinの発現は分離直後の初代伊東細胞と同じレベルに抑えられていた(Figs. 4C, D)。更に、上記の条件下における培養前後での伊東細胞の細胞数を比較したところ、30K Hep2フラグメント非存在下では約1.5倍に増殖していたのに対し、フラグメント存在下では細胞数にほとんど変化が見られなかった。以上の結果より、30K Hep2フラグメントは血清含有メディウムによる初代伊東細胞の培養過程での活性化を抑制する作用があることが示された。

考 察

正常および活性化伊東細胞の形質について、これまでに次のようなことが明らかにされている¹⁻³⁾。即ち、正常肝伊東細胞は、細胞内にビタミンAを含む油滴を豊富に有し、増殖及び細胞外マトリックス産生能をほとんど示さないquiescentな形質を保っているが、線維化肝内でみられる活性化伊東細胞は、油滴を消失しているとともに旺盛な増殖能と細胞外マトリックス産生能を獲得したactiveな形質へと変化している。またこの活性化伊東細胞は、正常時には見られない α -SM actinを強く発現しており、伊東細胞の活性化を識別するための最も有効なマーカーとされている。本研究で用いた初代および継代伊東細胞は少なくとも油滴の蓄積、 α -SM actinの発現および増殖という指標で評価する限り、それぞれ正常および活性化伊東細胞の形質をそれぞれよく反映していることが示された。しかしながら、伊東細胞の肝線維化との関わりを考慮した場合、コラーゲンを初めとした細胞外マトリックス産生能についてのデータが必須であり、今後の重要な課題であるといえる。

肝伊東細胞はディッセ腔内に位置し、実質細胞が産生・放出する血漿性FNに絶えずさらされている。一方、FNは炎症性プロテアーゼなどによる作用を受けやすく、容易に分解されてインタクトFNでは観察されない特異な生物作用を有するフラグメントを放出することが報告されている⁶⁻¹²⁾。今回、反接着作用を有することが明らかになっている30K Hep2フラグメントが伊東細胞の形質変化に及ぼす作用を解析したところ、継代伊東細胞の活性化した形質の一部を正常伊東細胞様へと変化させる

とともに、血清存在下での培養過程にみられる初代伊東細胞の活性化を抑制することが示された。現時点では、30K Hep2フラグメントがどのような作用機構を経て伊東細胞の活性化を抑制したのか不明であるが、我々は30K Hep2フラグメントには反接着作用以外にも様々な生物活性があることを確認している¹⁵⁾。FN分子のHep2ドメイン領域には反接着部位を含めていくつかの機能部位が見い出されており¹⁶⁻¹⁹⁾、FNの多彩な生理作用の一端がこの分子領域によって制御されていることが推測され興味深い。

伊東細胞に限らず、細胞の形質はその細胞をとりまく様々な因子によって制御されている。なかでもサイトカインは最も強力なエフェクターとして注目されている調節因子であり、伊東細胞の形質転換についてもTGF- β やPDGFが最も有力な制御因子として同定されている¹⁾。本研究で我々が行った観察は、*in vitro* という極めて単純化した環境下のものであることは言うまでもなく、今後、これらのサイトカインの影響下での検討はもとより、線維化の進展を決定づけるコラーゲンを初めとした細胞外マトリクス成分の産生に対するFNフラグメントの作用についても研究を進める必要があろう。

謝辞

本研究を遂行する上で最も基本的で重要な伊東細胞の分離法をご教授いただきました東京医科歯科大学・難治疾患研究所の畑隆一郎先生に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Geerts, A., Pieter, D.B., Hautekeete M.L., Niki, T., and Wisse, E. (1994) Fat-Storing (Ito) Cell Biology. In : Arias, I. M., Boyer, J. L., Fausto, N., Jakoby, W.B., Schachter, D., and Shafritz, D. A. (eds) *The Liver : Biology and Pathobiology*, Raven Press, New York, p. 819-838
- 2) Maher, J. J., and McGuire, R. F. (1990) Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis *in vivo*. *J. Clin. Invest.* **86**, 1641-1648
- 3) Rockey, D.C., Boyles, J.K., Gabbiani, G., and Friedman, S.L. (1992) Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation *in vivo* and *in culture*. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **24**, 193-203
- 4) 妹尾春樹, 畑隆一郎 (1993) *ÉaÉbÉgäÄëüëÖçÔñEÇÄrPóñ@ÄCConnective Tissue* **25**, 129-137
- 5) Miekka, S.I., Ingham, K.C., and Menache, D. (1982) Rapid methods for isolation of human plasma fibronectin. *Thromb. Res.* **27**, 1-14
- 6) Fukai, F., Iso, T., Sekiguchi, K., Miyatake, N., Tsugita, A., and Katayama, T. (1993) Amino-terminal fibronectin fragment stimulates the differentiation of ST-13 preadipocytes. *Biochemistry* **32**, 5746-5751
- 7) Fukai, F., Takahashi, H., Habu, Y., Kubushiro, N., and Katayama, T. (1995) Fibronectin harbors anti-cell adhesive activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**, 394-398
- 8) Wachtfogel, Y.T., Adams, W., Kucich, U., Weibbaum, G., Schapira, M., and Colman, R.W. (1988) Fibronectin degradation products containing the cytoadhesive tetrapeptides stimulate human neutrophil degranulation. *J. Clin. Invest.* **81**, 1310-1316
- 9) Werb, Z., Tremble, P.M., Behrendtsen, O., Crowley, E., and Damsky, C.H. (1989) Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. *J. Cell Biol.* **109**, 877-889
- 10) Homandberg, G.A., Meyers, R., and Xie, D.-L. (1992) Fibronectin fragments cause chondrolysis of bovine articular cartilage slice *in culture*. *J. Biol. Chem.* **267**, 3597-3604
- 11) Fukai, F., Suzuki, H., Suzuki, K., Tsugita, A., and Katayama, T. (1991) Rat plasma fibronectin contains two distinct chemotactic domains for fibroblastic cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 8807-8813
- 12) Fukai, F., Ohtaki, M., Fujii, N., Yajima, H., Ishii, T., Nisizawa, Y., Miyazaki, K., and Katayama, T. (1993) Release of biological activities from quiescent fibronectin by a conformational change and limited proteolysis by matrix metalloproteinases. *Biochemistry* **34**, 11453-11459
- 13) Fukai, F., Hasebe, S., Ueki, M., Mutoh, M., Ohgi, C., Takahashi, H., Takeda, K., and Katayama, T. (1996) Identification of the anti-adhesive site buried within the heparin-binding domain of fibronectin. *J. Biochem.* **121**, 189-192
- 14) Geerts, A., Vrijnsen, R., Rauterberg, J., Burt, A., Schellinck, P., and Wisse, E. (1989) *In vitro* differentiation of fat-storing cells parallels marked increase of collagen synthesis and secretion. *J. Hepatol.* **9**, 59-68
- 15) 深井文雄 (1997) 自律的機能制御分子としてのフィブロネクチン, *生体の科学* **48**, 295-300
- 16) Mould, A. P., Wheldon, L. A., Komoriya, A., Wayner, E. A., Yamada, K. M., and Humphries, M. J. (1990) Affinity chromatographic isolation of the melanoma adhesion receptor for the IIICS region of fibronectin and its identification as the integrin $\alpha 4 \beta 1$. *J. Biol. Chem.* **265**, 4020-4024
- 17) Komoriya, A., Green, L. J., Mervic, M., Yamada, S. S., Yamada, K. M., and Humphries, M. J. (1991) The minimal essential sequence for a major cell type-specific adhesion site (CS1) within the alternatively spliced type III connecting segment domain of fibronectin is leucine-aspartic acid-valine. *J. Biol. Chem.* **266**, 15075-15079
- 18) Mould, A. P., and Humphries, M. J. (1991) Identification of a novel recognition sequence for the integrin $\alpha 4 \beta 1$ in the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *EMBO J.* **10**, 4089-4095
- 19) McCarthy, J. B., Hagen, S. T., and Furcht, L. T. (1986) Human fibronectin contains distinct adhesion- and motility-promoting domains for metastatic melanoma cells. *J. Cell Biol.* **102**, 179-188