

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11657

研究課題名(和文) 肝星細胞におけるレチノイン酸受容体の役割の解明と肝線維化治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of retinoic acid receptors in hepatic stellate cells and its application to treatment for liver fibrosis

研究代表者

目崎 喜弘 (MEZAKI, Yoshihiro)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：40431621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝星細胞はビタミンA貯蔵細胞であると同時に、肝線維化の責任細胞でもある。アルコール摂取やウイルス感染などの刺激によって肝星細胞は活性化し、ビタミンA脂質滴を失うと共に、線維化の原因となるコラーゲンを過剰に合成する細胞に変化する。この際、ビタミンAの生理作用発現を担うレチノイン酸受容体が、活性化肝星細胞の細胞質においてスペckル状に分布するが、このレチノイン酸受容体と共局在する細胞小器官を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルコール性肝炎やウイルス性肝炎においては、肝線維化、肝硬変、肝癌と病態が進行していくが、線維化した臓器を回復させる有効な治療法はまだまだ開発されていない。肝線維化の責任細胞である肝星細胞において、ビタミンAの生理作用を司るレチノイン酸受容体と局在を共にする細胞小器官を見出した。これらの知見を元に、レチノイン酸受容体の機能を調節することで、肝線維化を制御する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hepatic stellate cells are vitamin A-storing cells and responsible for liver fibrosis. Alcohol consumption or viral infection activate hepatic stellate cells, leading to the loss of vitamin A and transdifferentiation of the cell into collagen-producing myofibroblast-like cells. In activated hepatic stellate cells, retinoic acid receptor showed speckled distribution within the cytosol. We identified an organelle that colocalized with the retinoic acid receptor.

研究分野：分子細胞生物学

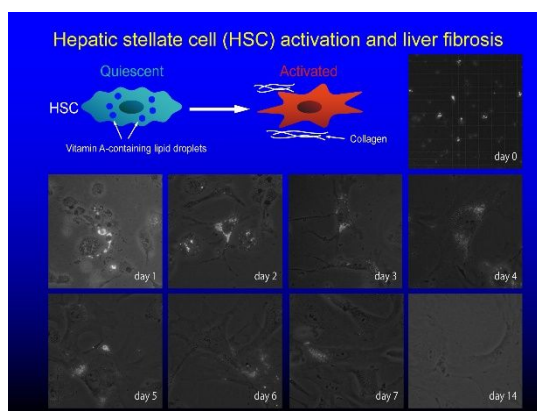
キーワード：ビタミンA 肝星細胞 肝線維化 免疫組織化学 ラット レチノイン酸受容体 クッパー細胞 肝類洞 内皮細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

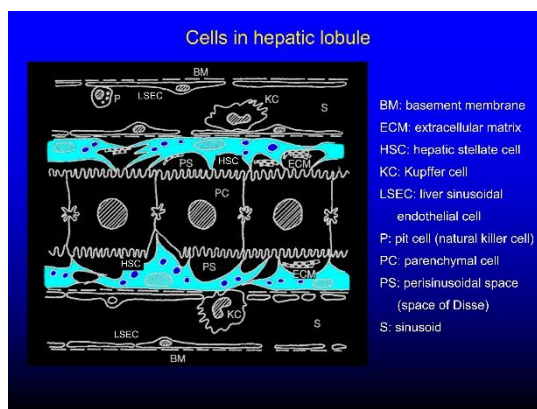
1. 研究開始当初の背景

(1) ビタミン A は網膜において視物質として機能するのみでなく、細胞の増殖、分化、組織形成、あるいは癌細胞の増殖抑制、分化誘導など広範な生命現象に参与する。生体のビタミン A の大部分は、肝臓の非実質細胞のひとつである肝星細胞 (HSC) に貯蔵されている。HSC はビタミン A 貯蔵細胞であると同時に、肝線維化の責任細胞でもある。アルコール摂取やウイルス感染などの刺激により、HSC はビタミン A 脂質滴を失いながら活性化し、肝線維化の原因となるコラーゲンを過剰に分泌するようになる。一方、細胞内に取り込まれたレチノールは、レチノールからレチノイン酸へと酸化され、核内のレチノイン酸受容体 (RAR) に結合して標的遺伝子の転写を活性化する。



(2) HSC の活性化に伴ってビタミン A 脂質滴が消失するとともに RAR の mRNA が減少することから、HSC 活性化の過程でレチノイドシグナルは減弱すると考えられてきた。ラット HSC を単離し、ポリスチレンディッシュ上で培養することで自発的な活性化を誘導し、RAR の発現を調べたところ、mRNA の発現が HSC の活性化に伴って減少することを確認する一方で、タンパク質の発現は、逆に増加することを見出した。レチノイン酸応答配列で駆動するレポーターアッセイをラット HSC 初代培養系に適用したところ、静止期の HSC はレチノイン酸に応答せず、活性化した後のみレチノイン酸に応答した。これにより、活性化 HSC において、レチノイドシグナルは減弱するのではなく、逆に獲得されるものであることが明らかとなった。このとき、活性化 HSC において、RAR タンパク質は細胞質に speckle 状に局在した。

(3) HSC の生化学・分子生物学的な解析には、純度の高い HSC の単離が必要となる。肝臓をコラーゲン分解酵素で処理して細胞をばらばらにし、密度勾配遠心法で、ビタミン A 脂質滴を含む比重の小さい HSC を単離する方法が用いられている。単離した HSC の純度はビタミン A の自家蛍光で判断するが、肝臓を構成する細胞には貪食能を持つものがあり、HSC 単離の過程で、HSC やその細胞質断片を貪食した細胞も HSC とみなしてしまう危険性が指摘されている。肝臓の貪食細胞は、クッパー細胞 (KC)、肝類洞内皮細胞 (LSEC) HSC である。KC は類洞内腔に存在しており、HSC は類洞周囲腔 (ディッセ腔) に存在している。また、類洞の壁を構成する LSEC には、その薄い細胞質に直径 100 nm 程度の穴 (fenestration、篩板状小孔) が開いている。



2. 研究の目的

肝臓の貪食細胞を標識し、純度の高い HSC を単離するための指標とする。また、活性化 HSC において、RAR タンパク質と共局在する細胞小器官の探索を行う。

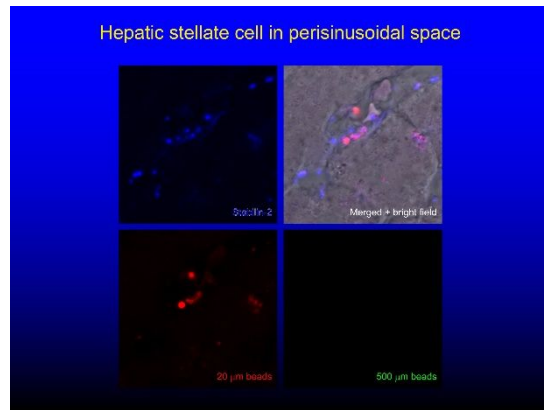
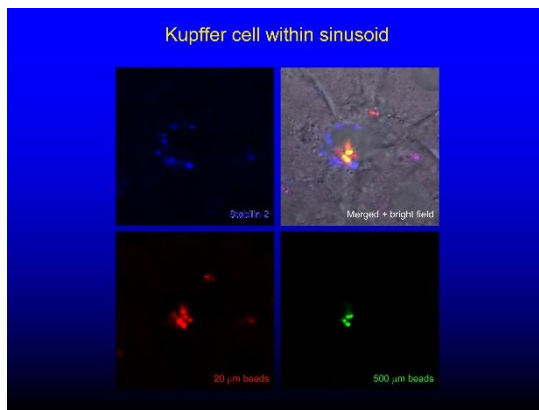
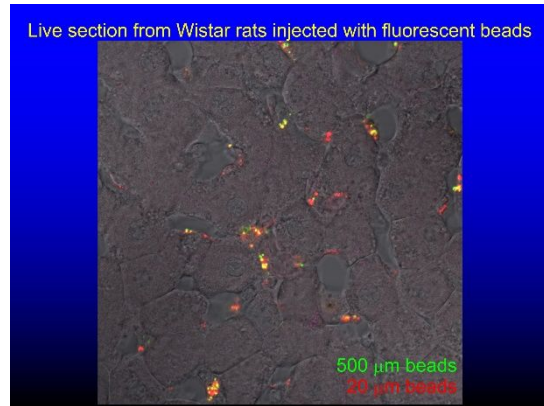
3. 研究の方法

(1) ラット尾静脈から直径 20 nm および 500 nm の蛍光ビーズを注入し、ホルマリン固定後、肝臓を取り出して凍結切片を作成し、蛍光シグナルを観察した。また、得られた凍結切片を用いて免疫組織化学染色を行い、蛍光ビーズのシグナルと重ね合わせて評価した。用いた抗体は、抗アルブミン抗体、抗 stabilin-2 抗体、抗 F4/80 抗体、抗 CD68 抗体、抗レシチン：レチノールアシルトランスフェラーゼ (LRAT) 抗体、抗 desmin 抗体、抗細胞内レチノール結合タンパク質 I (CRBP I) 抗体である。抗アルブミン抗体は肝実質細胞、抗 stabilin-2 抗体は LSEC、抗 F4/80 抗体と抗 CD68 抗体は KC、抗 LRAT 抗体、抗 desmin 抗体と抗 CRBP I 抗体は HSC のマーカーである。

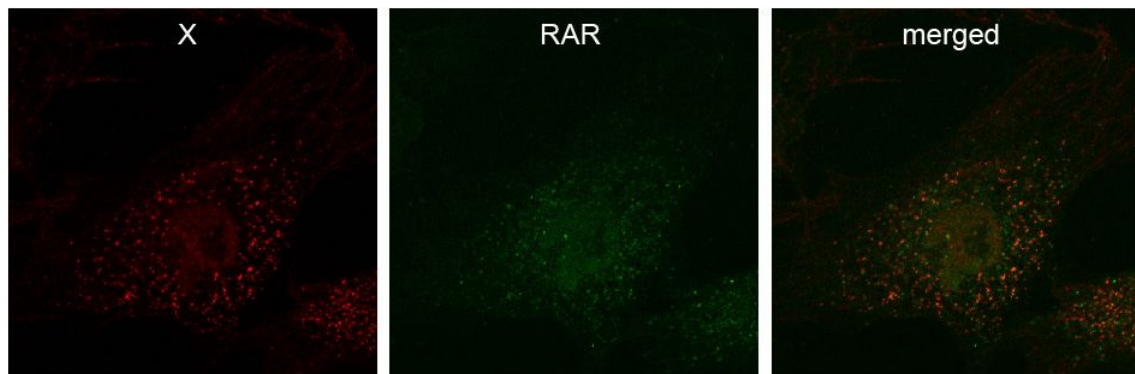
(2) ラット HSC 初代培養細胞を単離し、RAR タンパク質とさまざまな細胞小器官を蛍光標識し、それらの蛍光シグナルの共局在を評価した。

4. 研究成果

(1) ラット尾静脈から蛍光ビーズを注入して凍結切片を観察したところ、直径 20nm の蛍光ビーズが特異的に集積する部位、直径 500nm の蛍光ビーズが特異的に集積する部位、両者が共局在する部位があることを確認した。免疫組織化学染色により肝臓の細胞を染め分けて観察したところ、直径 20 nm の蛍光ビーズは、類洞内腔の KC に取り込まれるとともに、類洞周囲腔に存在する HSC にも取り込まれることが明らかとなった。一方、直径 500 nm の蛍光ビーズは、類洞内腔にとどまり、KC にのみ取り込まれた。興味深いことに、HSC や KC とともに、肝小葉内で盛んな貪食能を持つ細胞として知られている LSEC は、径の大きい蛍光ビーズも径の小さい蛍光ビーズも全く取り込まなかった。LSEC の異物貪食は、受容体介在型のエンドサイトーシスによって行われていることが知られており、今回用いた蛍光ビーズを取り込まない原因と考えられた。肝類洞内皮細胞の fenestration を通過する大きさの蛍光ビーズと通過しない大きさの蛍光ビーズを用いることにより、肝星細胞とクッパー細胞を異なる蛍光で標識することが可能となった。



(2) 活性化HSCの細胞質にスペckル状に局在するRARと共局在する細胞小器官の探索を進めた。これまでにミトコンドリア、エンドソーム、リソソームとの共局在が見られないことを確認していたが、さらに他の細胞小器官との共局在を探索したところ、RARと共局在する細胞小器官を見いだした。現在その生理的意義を探索中である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 目崎喜弘	4. 巻 97
2. 論文標題 肝類洞壁細胞によって制御されるビタミン A の輸送と貯蔵 .	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ビタミン	6. 最初と最後の頁 271-274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 目崎喜弘	4. 巻 98
2. 論文標題 短腸モデル動物における腸管順応とビタミンA .	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 ビタミン	6. 最初と最後の頁 74-75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 目崎喜弘	4. 巻 97
2. 論文標題 胆汁酸合成の律速酵素CYP7A1の構造生物学的知見 .	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ビタミン	6. 最初と最後の頁 21-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Morii Mayako, Hebiguchi Taku, Watanabe Ryo, Yoshino Hiroaki, Mezaki Yoshihiro	4. 巻 40
2. 論文標題 Cloning and Characterization of Cyp7a1 and Cyp27a1 Genes from the Non-Parasitic Japanese Lamprey Lethenteron reissneri	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 208-218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs220072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 目崎喜弘	4. 巻 95
2. 論文標題 レチニルエステルを加水分解する酵素に関する最近の知見.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ビタミン	6. 最初と最後の頁 504-508
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 目崎喜弘
2. 発表標題 短腸モデルラットにおけるビタミンA および脂質代謝の変動と生理的意義
3. 学会等名 日本ビタミン学会第75回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 目崎喜弘
2. 発表標題 肝星細胞におけるレチノイン酸受容体発現とレチノイン酸合成の機能的相関
3. 学会等名 日本レチノイド研究会第34回学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 目崎喜弘
2. 発表標題 ビタミンA貯蔵と輸送のメカニズム 病態制御および生物進化の視点から
3. 学会等名 日本ビタミン学会第74回大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 目崎喜弘
2. 発表標題 活性化した肝星細胞（ビタミンA貯蔵細胞）において細胞質にspeckle状に発現するレチノイン酸受容体 と共局在する細胞小器官の探索
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 目崎喜弘
2. 発表標題 ヤツメウナギの胆汁酸代謝から考えるタンパク質の分子進化
3. 学会等名 第375回脂溶性ビタミン総合研究委員会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 目崎喜弘
2. 発表標題 生体におけるビタミンA 貯蔵の調節とその生理的意義
3. 学会等名 第370回脂溶性ビタミン総合研究委員会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本ビタミン学会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 672
3. 書名 ビタミン・バイオフィクター総合事典	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------