

コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の
欠損は、肝星細胞(HSCs)の小胞体ストレス
介在性アポトーシスを引き起こす

川崎 邦人

目次

1. 要旨	4 頁
2. 略語集	7 頁
3. 序論	10 頁
3-1. 肝硬変と HSCs	
3-2. タンパク質のフォールディング	
3-3. コラーゲンの生合成と Hsp47	
3-4. Hsp47 欠損とコラーゲンの成熟異常	
3-5. 肝硬変治療における Hsp47 制御	
3-6. 小胞体ストレスとアポトーシス	
3-7. オートファジー	
3-8. 本研究について	
4. 結果	22 頁
4-1. 肝星細胞の単離・活性化	
4-2. Cre-loxP システムによる Hsp47 のノックアウト(KO)	
4-3. Hsp47 KO HSCs における I 型コラーゲンおよび I 型プロコラーゲン	
4-4. Hsp47 KO HSCs における小胞体ストレスとアポトーシス	
4-5. オートファジー阻害下における Hsp47 KO HSCs での I 型コラーゲンの細胞内蓄積と、オートファジーマーカータンパク質 LC3, p62 の蓄積	
4-6. オートファジー阻害下における Hsp47 KO HSCs での小胞体ストレスとアポトーシス	
5. 考察	46 頁
5-1. Cre-loxP システムを用いた Hsp47 のノックアウト	
5-2. Hsp47 KO と I 型コラーゲン	
5-3. オートファジー阻害下における Hsp47 KO HSCs での小胞体ストレスとアポトーシス	
5-4. 本研究の意義	
6. 実験材料と方法	52 頁
6-1. 試薬および合成オリゴ核酸	
6-2. マウスの飼育方法および遺伝子型解析	

6-3.	Hepatic stellate cells (HSCs)の単離, および培養	
6-4.	アデノウイルスの調整および感染	
6-5.	イムノブロット	
6-6.	RT-PCR と定量的リアルタイム PCR	
6-7.	イムノステイニング	
6-8.	カスパーゼ 3 活性の検出	
6-9.	統計処理	
6-10.	抗体	
7.	謝辞	61 頁
8.	引用文献	64 頁

1.要旨

ウイルスやアルコールなどによる肝臓における慢性的な炎症は、細胞外マトリックスの過剰な蓄積として特徴づけられる肝線維化を引き起こし、肝臓の機能障害および門脈圧亢進などを招く。肝線維症における主な細胞外マトリックスはコラーゲンであり、中でもⅠ型コラーゲンが最も多く産生され、蓄積する。

コラーゲンは、哺乳類の個体において全タンパク質の約3割を占めるタンパク質であり、小胞体内で立体構造を形成する。コラーゲン分子は3本のポリペプチド鎖からなり、それぞれのポリペプチド鎖はグリシンと他の二つのアミノ酸が連続して配置される、(グリシン-X-Y)_n という特徴的なアミノ酸配列を有する。この特徴的な配列からなる領域において、コラーゲン分子内の3本のポリペプチド鎖は、小胞体内で3重らせん構造を形成する。3重らせん構造は、コラーゲン分子が結合組織としての機能を発揮するために重要な構造である。Heat Shock Protein 47 (Hsp47)は、小胞体に存在するコラーゲン特異的分子シャペロンである。Hsp47は、小胞体内でコラーゲン分子の3重らせん構造に結合することで、3重らせん構造の形成および安定性に寄与している。

全身におけるHsp47遺伝子欠損マウスは、基底膜の形成不全により胎生致死となる。一方、軟骨特異的なHsp47遺伝子欠損マウスは、そのほとんどが呼吸不全により出生時に致死となるか、または生後二時間以内に全個体が死亡する。また一部は胎生致死となる。これらのマウスの細胞では、コラーゲンが正常にフォールディングされず、ミスフォールドしたコラーゲンが小胞体内に蓄積している。

線維化の際、コラーゲン産生細胞では、コラーゲンの発現とともにHsp47の発現も上昇しており、線維化疾患の進行におけるコラーゲン産生の上昇に、Hsp47は寄与していると考えられる。実際、腸、腎臓、肝臓、および脾臓などの線維化において、Hsp47の抑制により線維化が抑えられることが報告されている。肝線維化における主要なコラーゲン産生細胞は、活性化した肝星細胞(Hepatic stellate cells; HSCs)である。HSCsは、正常な肝臓ではコラーゲンを産生せず、ビタミンA貯蔵細胞としてディッセ腔に存在する。HSCsは、肝線維化の際、炎症によって産生されたベータ型のTransforming growth factor (TGF-β)などの炎症性サイトカインによって、筋線維芽細胞様の細胞へと活性化され、コラーゲンを産生する。肝線維化の際、HSCsにおけるsiRNAを用いたHsp47の抑制によって、肝線維化が抑えられることが報告されている。この際、HSCsはアポトーシスを示すが、その詳細な分子メカニズムは明らかにされていない。線維化疾患の治療ターゲットとしてHsp47を考える際、HSCsにおけるHsp47の抑制が、HSCsにおけるアポトー

シスをどのように誘導するのかに関する分子メカニズムは、きわめて重要である。本研究では、この機構を明らかにすることを目的に研究を行った。

Hsp47 floxed マウスから HSCs を単離した。単離した HSCs は、ディッシュに播種することによって、自発的に活性化した。活性化した HSCs にアデノウイルスベクターを用いて Cre リコンビナーゼを導入し、*Hsp47* 遺伝子を欠損させた。*Hsp47* 欠損により、細胞外の I 型コラーゲンが減少した。一方、*Hsp47* 欠損により細胞内に I 型プロコラーゲンが蓄積し、その一部が界面活性剤不溶性の凝集体を作っていることが示された。この I 型コラーゲンの蓄積は小胞体に見られ、*Hsp47* 欠損によるコラーゲンの蓄積はオートファジーを阻害することでより増加した。*Hsp47* を欠損した HSCs において、オートファジーを阻害した場合には、小胞体ストレスマーカーである Immunoglobulin heavy chain-binding protein (BiP) および 94 kDa glucose-regulated protein (Grp94) の蓄積が観察され、CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) タンパク質の誘導が観察され、さらにカスパーゼ 3 の活性化によるアポトーシスの増加も確認された。

以上の研究により、活性型 HSCs における *Hsp47* の欠損は、オートファジー阻害下において、小胞体ストレスを惹起し、小胞体ストレス経路のアポトーシスを誘導されることが分かった。この知見により、線維化疾患の治療では、*Hsp47* の抑制とともに、オートファジーを阻害することが有効であることが分かった。

2.略語集

本文中にまたは図表中に多く現れる略語について，以下に正式名称を示す．

- Hsp47 ; heat shock protein 47
- HSCs ; hepatic stellate cells
- ER ; endoplasmic reticulum
- PDI ; protein disulfide isomerase
- ERAD ; ER-associated degradation
- BiP ; immunoglobulin heavy chain-binding protein
- Grp94 ; 94 kDa glucose-regulated protein
- Cre ; causes recombination or cyclization recombinase
- CHOP ; CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein
- XBP-1 ; X-box binding protein 1
- PERK ; protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
- IRE-1 ; inositol-requiring kinase 1
- ATF6 ; activating transcription factor 6
- RT-PCR ; reverse transcription polymerase chain reaction
- UPR ; unfolded protein response
- MOI ; multiplicity of infection
- CQ ; chloroquine
- 3-MA ; 3-methyladenine
- WT ; wild type
- KO ; knock out
- KD ; knock down
- DMEM ; Dulbecco's modified Eagle's medium
- DNA ; deoxyribonucleic acid
- RNA ; ribonucleic acid
- EDTA ; ethylenediaminetetraacetic acid
- EGTA ; etylene glycol tetraacetic acid
- FBS ; fetal bovine serum
- PBS ; phosphate buffered saline
- GBSS ; Gey's balanced salt solution

- SDS-PAGE ; sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis
- PCR ; polymerase chain reaction
- α -SMA ; alpha-smooth muscle actin
- GAPDH ; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

3.序論

3-1. 肝硬変と HSCs

ウイルスまたはアルコールなどによる，肝臓における慢性的な炎症は，過剰な細胞外マトリックスの蓄積という結果を招く．肝臓で過剰な細胞外マトリックス(Extracellular matrix; ECM)が蓄積すると，肝臓の機能障害を引き起こし，これを肝線維化と呼ぶ(Friedman,S.L., 2008-1). 肝線維化は，さらに進行すると肝硬変と呼ばれるが、日本では，肝線維化のステージは F0～F4 の 5 段階に分類され，線維の束で丸い結束が作られるステージ F4 が，肝硬変と呼ばれる．

肝臓は，体積で最も大きな臓器であり，肝臓の主要機能を担う肝細胞は，実質細胞と呼ばれ，その他の細胞は非実質細胞と呼ばれる．ウイルスやアルコールなどにより，炎症がおこる際，肝臓では様々な変化が生じる．図 1 は，肝臓において炎症が起こった際の，種々の細胞の変化を示している．炎症により，肝細胞の微絨毛は減少し，肝臓のマクロファージ(貪食細胞)の一種であるクッパー細胞は活性化される．また，類洞内皮細胞は，正常な肝臓では約 120 nm 程の孔を有しているが，炎症によってその孔は消失する．活性化したクッパー細胞または他の好中球および白血球などは，炎症性のサイトカイン(ベータ型の Transforming growth factor (TGF- β)など)を産生し，炎症性サイトカインによって肝星細胞(Hepatic stellate cells; HSCs)が活性化され，ECM が産生される．これら一連の反応は，肝臓を障害から守るための反応であり，創傷治癒としての側面があり，一過的な炎症の場合には，産生された ECM はマトリックスメタロプロテアーゼ(Matrix metalloproteinase; MMP)によって分解される．しかし，慢性的な炎症では，MMP による分解よりも，ECM の産生が上回り，結果として，線維化を引き起こす．

HSCs は，正常な肝臓ではコラーゲンはほとんど発現せず，ビタミン A 貯蔵細胞として存在し，体内の 80%ほどのビタミン A を貯蔵しており，類洞の周囲を囲うように存在する(Wake,K 1980). HSCs は TGF- β 等の刺激により， α -Smooth muscle actin (α -SMA)を産生する筋線維芽細胞様に形質転換し，コラーゲン産生細胞へと姿を変える(Friedman, S.L. 2008-2).

肝線維化の際に産生される細胞外マトリックスとしては，I 型コラーゲン，III 型コラーゲン，ファイブロネクチン，およびビトロネクチンなどが挙げられるが，これらの中でも I 型コラーゲンが最も多く産生されている．

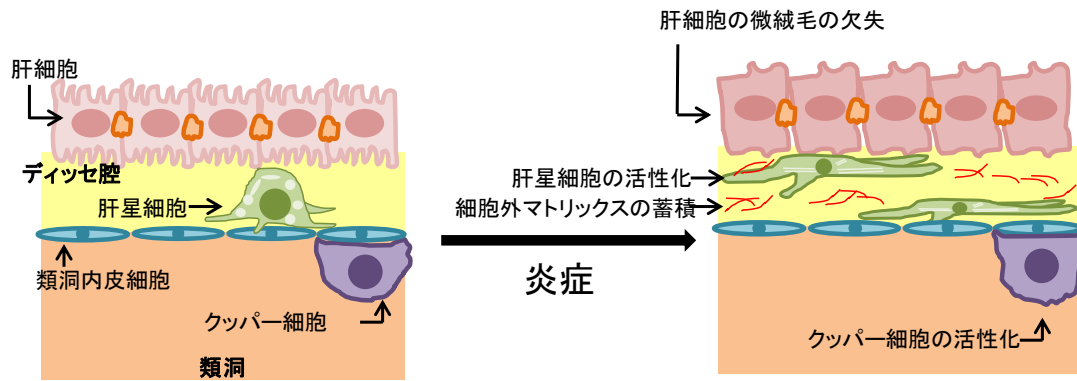


図1 肝臓において炎症が起こった際の、種々の細胞の変化

肝臓で炎症がおこると、①肝細胞の微絨毛は減少し、②類洞内皮細胞では、孔の消失が生じ、③クッパー細胞は活性化され、炎症性サイトカインを放出し、④炎症性サイトカインによって肝星細胞(HSCs)が活性化され、ECMが産生され、蓄積する(実験医学, Vol.29, No.13(8月号), 2011のp2075概念図1より改変).

3-2. タンパク質のフォールディング

コラーゲンに限らず、すべてのタンパク質は、アミノ酸がペプチド結合により直鎖状に繋がった重合体(ポリペプチド)から構成されている。タンパク質は、独自の立体構造(ネイティブ構造)を取ることによって、初めて生体内で機能を発揮することが可能となる。タンパク質は、一本のポリペプチド鎖のみで立体構造体形成し機能を発揮するもの、二本以上のポリペプチド鎖が一つの立体構造を形成し機能を発揮するもの(コラーゲンはこれに相当する)、および二つ以上の立体構造が合わさり、立体構造の複合体となって機能を発揮するものがある。ポリペプチド鎖が立体構造を取る過程は、タンパク質の折りたたみ、またはフォールディングと呼ばれ、ポリペプチド鎖は、熱力学的に最も安定な状態を取るように、フォールディングされる。従来、タンパク質の立体構造は、アミノ酸配列によって、一義的に決まると考えられ、これはアンフィンセンのドグマと呼ばれている(Anfinsen, C.B., 1973)。アンフィンセンは、タンパク質の一種であるリボヌクレアーゼ A が、試験管内で高濃度の尿素により変性させられた後、尿素が取り除かれると再び立体構造をとり活性を示すようになる(換言すれば機能を発揮する)ことから、タンパク質は 1 次構造が高次構造を規定するという上記ドグマを提唱した。

しかしながら、実際の細胞内では、正しくフォールディングされ、正しい立体構造を有するタンパク質のみではなく、正しくない立体構造を有するタンパク質も存在する。タンパク質が、正しくない立体構造を有する(換言すればミスフォールドされる)理由は、フォールディングの過程で失敗するか、または正しくフォールディングされたタンパク質が様々なストレス(熱または金属など)によって変性した結果である。リボヌクレアーゼ A 以外にも、試験管内で正しい立体構造を取りうるタンパク質は存在する。しかし、それらタンパク質が全て、細胞内で同様に正しい立体構造を取ることができるものではない。タンパク質が正しい立体構造を取ることができない(換言すれば、ミスフォールドタンパク質となる)主たる原因は、フォールディング過程におけるポリペプチド鎖同士の非特異的な結合の結果生じるタンパク質の凝集、である。細胞内では、非常に高濃度のタンパク質が存在する(Goodsell, D.S., 1991)。したがって、試験管内より、タンパク質がフォールディングの過程で凝集となりうる確率は極めて高い。

細胞は、ポリペプチド鎖同士の非特異的な結合を防ぐため、分子シャペロン群を有することにより、タンパク質の正しいフォールディングを達成している。分子シャペロンは、

フォールディング途中の、または変性した、ポリペプチド鎖への結合を介して、当該ポリペプチド鎖を他のポリペプチド鎖から隔離するか、または当該ポリペプチド鎖と他のポリペプチド鎖との相互作用を阻害することによって、タンパク質の正しいフォールディングを助けている。(Hartl, F.U. 1996; Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. 2002; Bukau, B. et al., 2006; Benyair, R. et al., 2011)

3-3. コラーゲンの生合成と Hsp47

コラーゲンは、哺乳類の個体において、合成されるタンパク質の約 30%を占める。現在までに 29 の型が報告されており、それぞれの型はローマ数字によって示される。29 のコラーゲンファミリーは、その構造的特徴(分子構造または超分子会合様式など)によって幾つかのグループに分けられる。たとえば、線維性コラーゲン、シート状構造を形成する基底膜コラーゲン、線維性コラーゲンと結合する Fibril-associated collagens with interrupted triple helices (FACIT)コラーゲン、膜貫通型コラーゲン、ネットワーク形成コラーゲン、Protein with multiple triple-helix domain and interruptions (MULTIPLEXIN)、ビーズ状線維形成型コラーゲン、係留線維の主要成分である長鎖コラーゲン等に分類されている(Vuorio, E. and de Crombrughe, B. 1990; Van der Rest, M. and Garrone, R. 1991; Prockop, D.J. and Kivirikko, K.I. 1995; Hubert, T. et al., 2009)。

コラーゲン分子は、 α 鎖と呼ばれる 3 本のポリペプチド鎖から構成され、小胞体内でフォールディングされる。 α 鎖は、グリシンと他の 2 つのアミノ酸からなる 3 つのアミノ酸が連続して配置される((グリシン-Xaa-Yaa) $_n$, Xaa および Yaa は任意のアミノ酸)ことによる特徴的なアミノ酸配列からなる領域(3 重らせん領域)を有し、この領域が 3 重らせん構造を形成する。 α 鎖は、3 重らせん領域以外の領域も有する。I 型コラーゲンは特に研究の進んでいるコラーゲンであり、本稿でも、I 型コラーゲンを研究対象としている。I 型コラーゲン分子は、2 本の $\alpha 1$ 鎖、および 1 本の $\alpha 2$ 鎖から構成される。I 型コラーゲン分子はまた、アミノ末端(N 末端)側から、N プロペプチド領域、テロペプチド領域、3 重らせん領域、テロペプチド領域、および C プロペプチド領域を有し、カルボキシ末端(C 末端)側となる。ここで、テロペプチド領域は、N または C プロペプチド領域と、3 重らせん領域の間に存在する、非 3 重らせん形成領域である。また、N プロペプチド領域および C プロ

ペプチド領域は、細胞から分泌される際、または分泌された後に、N-プロテアーゼおよびC-プロテアーゼによって、それぞれ切断される(Dombrowski, K.E. and Prockop, D.J. 1998; Li, S.W. et al., 1996). 細胞外に分泌されたコラーゲンの3重らせん領域は、架橋され、コラーゲン線維を形成する(Hulmes, D.J. 2002). したがって、細胞内で合成されるコラーゲンと細胞外に分泌されたコラーゲンは、異なり、細胞内で合成されるコラーゲンをプロコラーゲンと呼ぶ. I型プロコラーゲン分子は、小胞体内で、次の順序によってフォールディングされる; ① α 鎖は、翻訳と同時に粗面小胞体(rough endoplasmic reticulum; rER)の内腔に挿入される; ②グリシン-Xaa-Yaa 繰り返し配列内の、Yaa の位置に存在するプロリン残基は、主には Prolyl-4-hydroxylase (P4H)、一部は Prolyl-3-hydroxylase (P3H)により水酸化され、ヒドロキシプロリンとなり、リジン残基は Lysyl hydroxylase により、ヒドロキシリジンとなる. また、Protein disulfide isomerase (PDI)等の働きにより2本の $\alpha 1$ 鎖、および1本の $\alpha 2$ 鎖、のC-プロペプチド領域間で、システイン残基を介したジスルフィド結合が形成され、会合する; ③C末端からN末端方向に向けて、ジッパーを閉じる要領で3重らせんが形成される(図2) (Bächinger, H.P. et al., 1980; Engel, J. and Prockop, D.J. 1991; 野田, 1967; Walmsley, A. R. et al., 1999; Smith, T. et al., 1995; Vranka, J.A. et al., 2004; Ishikawa, Y. et al., 2009). また、②および③の過程で、糖鎖付加などの修飾もうける. I型プロコラーゲン分子の生合成過程では、①～③の間に様々な分子シャペロンが関わっている. たとえば, Immunoglobulin heavy chain-binding protein (BiP/Grp78), 94 kDa glucose-regulated protein (Grp94), PDI, および Heat shock protein 47 (Hsp47)などである(Chessler, S. D. and Byers, P. H., 1993; Ferreira, L. R. et al., 1994; Lamande, S. R. et al., 1995; Wilson, R. et al., 1998; Nagata, K. 2003). これら分子シャペロンにおいて、Hsp47は、コラーゲン特異的な分子シャペロンである、という点で他の分子シャペロンと異なる.

Hsp47は、コラーゲン結合タンパク質として同定され、その後の解析から、コラーゲン特異的分子シャペロンとして機能することが示されてきた(Nagata, K. et al., 1986; Satoh, M. et al., 1996). Hsp47は、小胞体内において、正しくフォールディングした3重らせん構造を介して一過性にコラーゲンと結合し、pHに依存してシスゴルジに到達するまでにコラーゲンから解離すると考えられている(Tasab, M., et al., 2000; Saga, S. et al., 1987; Nataga, K. 1996; Widmer, C. et al., 2012).

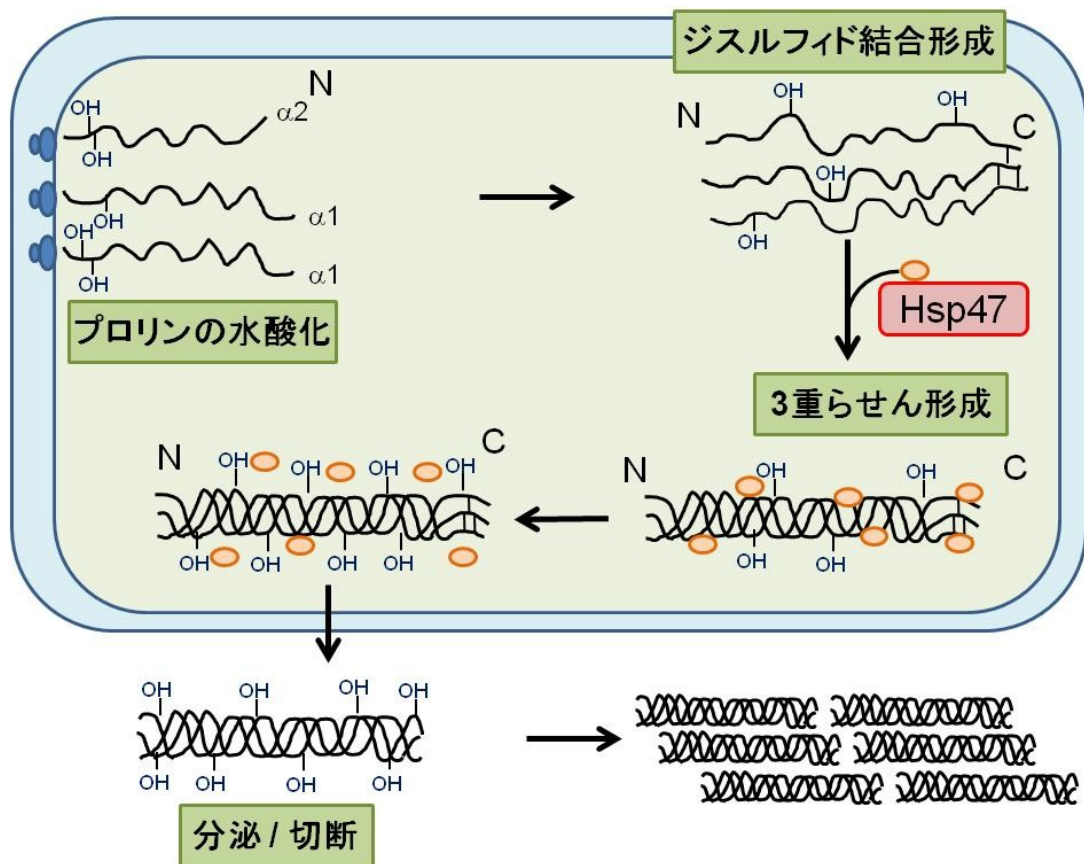


図2 細胞内におけるI型プロコラーゲンの生合成

2種類のプロコラーゲン($\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖)が翻訳されながら小胞体にC末端まで挿入され、P4H、P3HまたはLysyl hydroxylaseによりYaaの位置のプロリンが水酸化された後、2本の $\alpha 1$ 鎖と1本の $\alpha 2$ 鎖がC末のCプロペプチド部分のシステインによるジスルフィド結合を介し3量体を形成する。その後、C末端側からN末端側にジッパーが閉まるように(Gly-Xaa-Yaa)繰り返し配列が3重らせん構造を形成していく。コラーゲン特異的分子シャペロンHsp47によって3重らせん構造が安定化されたプロコラーゲンは分泌経路に乗って細胞外へ分泌される。細胞表面でプロペプチド領域が特異的なペプチダーゼにより切断され、細胞外でコラーゲン同士がクロスリンクしコラーゲン線維を形成する。

3-4. Hsp47 欠損とコラーゲンの成熟異常

コラーゲンが成体に必須のタンパク質であると同様に、Hsp47 も成体に必須の分子シャペロンである。全身における Hsp47 遺伝子欠損マウスは、基底膜の形成不全により胎生致死となる。一方、軟骨特異的な Hsp47 遺伝子欠損マウスは、そのほとんどが呼吸不全により出生時に致死となるか、または生後二時間以内に全個体が死亡する。また一部は胎生致死となる。(Nagai, N. et al., 2000; Marutani, T. et al., 2004; Matsuoka, Y. et al., 2004; Masago, Y. et al., 2012).

Hsp47 KO マウスから単離、株化した Hsp47 KO 細胞を用いた研究により、以下のことが報告されている：①Hsp47 KO 細胞では I 型コラーゲン分子は正しい 3 重らせん構造が形成されていないこと②Hsp47 KO 細胞からの I 型コラーゲン分子の分泌は遅延しており、分泌された I 型コラーゲン分子はプロテアーゼ感受性であること③Hsp47 は N プロペプチドの切断に必要なフォールディング状態を作り出すために必要であり、Hsp47 KO 細胞から分泌された I 型コラーゲン分子には本来切断させているはずの N プロペプチドが残されていること④Hsp47 KO 細胞では、I 型プロコラーゲンは小体内で凝集体を形成していること(Nagai, N. et al., 2000; Matsuoka, Y. et al., 2004; Ishida, Y. et al., 2006; Masago, Y. et al., 2012).

また、Hsp47 KO 細胞において、小胞体に蓄積したミスフォールドされたコラーゲンは、凝集体を形成しているために、オートファジーによって分解されることが報告されている(Ishida Y. et al., 2009).

以上のように、Hsp47 は、小胞体におけるコラーゲン分子の正常なフォールディングおよび細胞からのコラーゲン分子の正常な分泌に必須であることが示唆されている。

3-5. 肝硬変治療における Hsp47 制御

Hsp47 はコラーゲンの生合成に必須なタンパク質であることから、Hsp47 の発現量とコラーゲンの発現量は相関関係にある(Clarke, E.P. et al., 1993; Nagata, K. 1996). 肝線維化の過程においても結合組織の充填すなわちコラーゲンの産生に伴い、Hsp47 の発現量が増大することが報告されている(Masuda, H. et al., 1994; Naitoh, M. et al., 2001). 線維

化においてコラーゲンの産生を誘導する炎症性サイトカイン TGF- β が, Hsp47 の発現を制御することが報告されている(Nakai, A. et al., 1992).

慢性的な線維化疾患において, 組織線維化の進行を抑えるうえで, コラーゲンの産生を抑えることは重要であり, Hsp47 の発現量を抑えることでコラーゲンの産生を抑えることができるかと期待できる. 実際, いくつかの研究グループから, Hsp47 の発現量を抑えることによって様々な組織の線維化を改善することができるという報告がなされている(Sunamoto, M et al., 1998; Sato, Y. et al., 2008; Kitamura, H. et al., 2011; Ishiwatari, H. et al., 2013; Honzawa, Y. et al., 2014). これらの中で, 佐藤らは, Hsp47 のノックダウンによる肝線維化の改善の際には, HSCs がアポトーシスで細胞死を起こすことが報告している(Sato, Y. et al., 2008). しかしながら, アポトーシスを引き起こす分子メカニズムについては明らかにされていない.

3-6. 小胞体ストレスとアポトーシス

小胞体におけるミスフォールドタンパク質の蓄積は, 小胞体ストレスを引き起こし, Unfolded protein response (UPR)を引き起こす(Walter, P., and Ron, D., 2011). 線虫以降の後生動物では, 3 つの小胞体膜貫通センサータンパク質(PKR-like endoplasmic reticulum kinase(PERK), Activating transcription factor 6(ATF6), および Inositol requiring 1(IRE-1))が報告されている(Harding, H. P., et al., 1999; Haze, K. et al., 1999; Cox, J.S. et al., 1993, Mori, K. et al., 1993). 3 つのセンサータンパク質には, BiP が結合しており, 小胞体内でミスフォールドされたタンパク質が増加するに伴い, BiP がセンサータンパク質から解離することによって, センサータンパク質は活性化される. 3 つのセンサータンパク質は, それぞれ, 別々の経路を経て, 小胞体ストレスを緩和し, 細胞が生存するために機能する.

PERK は, BiP の解離による, 2 量体化によって活性化される. 活性化された PERK は, 翻訳開始因子 2 (eukaryotic translation initiation factor 2:eIF2)の α サブユニット(eIF2 α)をリン酸化することにより, タンパク質の翻訳抑制を行う. これにより, 小胞体に流入するタンパク質は抑制され, 小胞体へのそれ以上の負荷を抑制するとともに, 小胞体ストレスに対処する時間および空間を確保している. また, 逆説的ではあるが, eIF2 α による翻

訳抑制とともに、転写遺伝子 Activating transcription factor 4 (ATF4)の発現が増加する。ATF4 はアミノ酸代謝に関与する遺伝子および酸化ストレスに対抗するための遺伝子の転写を誘導する。

IRE-1 もまた、BiP の解離による、2 量体化によって活性化される。活性化された IRE-1 は自身をリン酸化することにより、mRNA 切断(スプライシング)活性を有する。IRE-1 によって切断される mRNA は XBP-1(X box binding protein 1)である。スプライシングされた mRNA から翻訳された XBP-1(S)は、核に移行した後、小胞体関連分解に関わる遺伝子群を誘導する UPR(unfolded protein response elemnt), および小胞体に局在する分子シャペロン群を誘導する ERSE(endoplasmic reticulum stress-response elemnt)に結合し、それらの下流の遺伝子群を誘導する。

ATF6 は、BiP の解離により、小胞体膜内で切断される。切断された細胞質ゾル側の断片(p50)は、核内に移行し、ERSE に結合し、小胞体分子シャペロンを中心とした下流の遺伝子群を誘導する。

UPR が誘導されてなお、小胞体ストレスが改善されない場合には、最終手段として CHOP が誘導され、アポトーシスが引き起こされる(Gotoh, T. et al., 2006)。CHOP は、3 つのセンサータンパク質いずれの下流でも誘導されうるが、CHOP の誘導に最も寄与しているのは、PERK 経路の下流にある ATF4 である。

3-7. オートファジー

オートファジーとは、「自食作用」として定義されるタンパク質分解機構として発見され、哺乳動物のオートファジーは、大きく 3 つに分類される：ミクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジー、およびマクロオートファジーである(Klionsky, D.J. et al., 2007; Mizushima, N. et al., 2008; Mizushima, N. et al., 2002)。また近年、これらに加えて、老朽化した、または損傷したミトコンドリアを分解するためのマイトファジー(Chen, Y., and Dorn, G.W., 2013; Koyano, F. et al., 2014)、および、小胞体内のミスフォールドされたタンパク質を分解するための ER ファジー(Ishida, Y. et al., 2009; Tanida, I. 2011)が報告されている。オートファジーに関わる因子は、オートファジー関連遺伝子(Autophagy related gene; Atg)と呼ばれる。

オートファジーの働きは多岐に及ぶ。栄養飢餓状態において、細胞内のタンパク質や細胞小器官を分解することによってアミノ酸プールを増やす働きは、細胞のリサイクリングシステムとして重要であり、生理的にも新生児の誕生時において重要な役割を担っている(Kuma, A. et al., 2004)。また、損傷した細胞内小器官もしくはタンパク質、またはミスfoldしたタンパク質を分解、除去することも重要な働きの一つであり、オートファジーの異常によって、癌、神経変性疾患、生活習慣病などの種々の病気が引き起こされることが報告されている(Komatsu, M. et al., 2005; Mizushima, N., and Komatsu, M., 2011)。

肝線維化の際にHSCsが活性化するときにも、オートファジーは重要な役割を担っている。HSCsが活性化する際には、コラーゲンをはじめとして多くのタンパク質を産生し、増殖することが必要である。HSCsの活性化のためには多くの栄養が必要であることが考えられ、リポファジー(Singh, R. et al., 2009)と呼ばれるオートファジーによって、ビタミンAを含む脂肪滴を分解することによって、HSCsが活性化の際の栄養を得ていることを示唆する報告がある(Thoen, L. F. et al., 2011)。事実、オートファジー関連遺伝子であるAtg7をHSCs特異的に欠損させることによって、線維化が抑えられるという報告がなされている(Hernandez-Gea, V. et al., 2012)。

3-8. 本研究について

我々は以前、Hsp47 KO マウスのマウス胚性線維芽細胞(Mouse embryonic fibroblasts; MEFs)では、Hsp47 欠損によってコラーゲンが界面活性剤不溶性凝集体を形成し、それによって小胞体ストレスが引き起こされ、アポトーシスへと導かれることを報告した(Ishida, Y. et al., 2009)。しかし、HSCs で Hsp47 の抑制がアポトーシスを引き起こすメカニズムは明らかになっていない。したがって、我々は、肝線維化において、Hsp47 欠損により、HSCs においてどのようにアポトーシスが誘導されるのか、その分子メカニズムについて、解明することを目的とした。特に、我々の従前の研究に基づき、小胞体ストレスに着目して研究を行った。

Hsp47 の発現量を抑えることで、線維化の原因物質であるコラーゲンの産生を抑えることができるだけでなく、コラーゲン産生細胞の死滅を導くことができる。ゆえに、線維化の治療におけるターゲットとしての Hsp47 の価値は大きく、HSCs 内における、Hsp47

欠損によるアポトーシスの分子メカニズムを解明することは、線維化治療のさらなる発展に貢献するものと期待される。

4.結果

4-1. 肝星細胞の単離・活性化

肝線維化の際に肝臓内で活発にコラーゲンを産生するのは主に活性型の肝星細胞 (Hepatic stellate cells ; HSCs) である。ゆえに、肝線維化における Hsp47 の抑制も活性型 HSCs を標的としたものとなる。実際に、Hsp47 の siRNA を HSCs に特異的に到達させることにより、肝線維化が著しく緩和された、という報告が他のグループからなされている (Sato, Y. et al., 2008)。この報告の中では Hsp47 の siRNA によって HSCs がアポトーシスに至ることも述べられており、そのことが肝線維化の劇的な緩和に繋がっていると考えられる。しかしながら、Hsp47 の抑制が HSCs へアポトーシスを誘導する分子メカニズムについては明らかにされておらず、これを明らかにすることは Hsp47 を用いた肝線維化の治療戦略を考えるうえで重要な知見になる。そこで我々は、*Hsp47* floxed マウスの肝臓から HSCs を単離し、活性化させた HSCs にアデノウイルスベクターを用いて Cre リコンビナーゼを導入することにより、活性型 HSCs で Hsp47 をノックアウトし(換言すれば、Hsp47 を欠損させ)、アポトーシスに至る分子メカニズムを解明することとした。

初めに HSCs の単離を行った。肝臓をプロナーゼ E/コラゲナーゼタイプ I を含む細胞分散液で還流し、肝臓から細胞を単離した。還流後の細胞懸濁液は肝臓の実質細胞である肝細胞と、非実質細胞である HSCs, クッパー細胞, 類洞内皮細胞等から構成される。まず、非実質細胞よりも著しく大きい肝細胞を低速(30 g)の遠心操作により取り除いた。静止期の HSCs は脂肪滴を多く蓄積させており、他の非実質細胞よりも密度が低いため、OPTIPREP を用いた密度勾配遠心分離によって他の非実質細胞と分離することが可能である。図 3A に、単離した HSCs の単離 1 日後(1 day)と、単離 7 日後(7 days)の形態学的変化を示す。単離 1 日後の 40 倍(x40)の写真において、黒矢印で指示されているような細胞がいくつか観察された。同じ単離 1 日後の 200 倍(x200)の写真ではこれらの細胞が無数の突起を伸ばしており、「星」のような形をしているのが観察できた。この星のような細胞の形は HSCs の特徴的な形状であり、得られた細胞が HSCs である可能性が推察された。また、200 倍の写真で観察すると、これらの細胞は核の周りの細胞質に小さな丸い構造物をいくつも持っていることが観察された。これは静止期の HSCs が細胞内に溜め込んでいるビタミン A を含む脂肪滴だと考えられたため、脂質を選択的に染色する Oil red O 染色を行ったところ、先ほど確認された核近傍の丸い構造物が赤く染色されていることが示さ

れた(図 3B). このことから、この構造物は脂肪滴であることが示唆され、単離された細胞が HSCs であることが強く示唆された. HSCs はディッシュ上で培養することにより、自然に活性化し、活性型 HSCs となることがすでに報告されている(Friedman, S. L., 2008-2). 図 3A の右の列には単離 7 日後の細胞の形態を示している. 単離 7 日後の細胞の形は単離 1 日後と比べて細胞が著しく横に広がり大きくなっているのが観察できた. また、単離 1 日後の細胞で観察された脂肪滴がほとんど観察されなくなった. HSCs は活性化すると筋線維芽細胞様の細胞に分化することが知られている. 筋線維芽細胞のマーカータンパク質として α -SMA があり、活性化した HSCs では発現しているが静止期の HSCs では発現していないことが報告されており、肝線維化における HSCs の活性化をモニターするうえで有用なマーカータンパク質として用いられている. そこで、単離した細胞を 1% NP-40 を含む Lysis buffer で可溶化し、20,000g で遠心分離して得られた上清を SDS-PAGE に供し、 α -SMA の発現量を解析した(図 3C). コントロールとして β -アクチンを用いた. 図 3C の右側 2 レーンに示すように、単離直後(0day)の HSCs では α -SMA はほとんど検出されないが、培養 7 日後(換言すれば単離 7 日後)の HSCs では α -SMA の発現が観察された. 左側 2 レーンには野生型および Hsp47 KO マウスのマウス胚性線維芽細胞(Mouse embryonic fibroblasts; MEFs)を用いた、 α -SMA および Hsp47 の結果を示している. MEFs では α -SMA の発現が観察された. これらのことから、単離直後の細胞にはほとんど線維芽細胞は含まれていないことが推察された. また、Hsp47 の発現も確認したところ、単離直後の HSCs ではわずかに検出される程度であるが、培養 7 日後の HSCs では有意な発現の上昇が認められた. 以上の結果から、単離された細胞は HSCs であることが強く示唆され、さらに HSCs はディッシュ上で培養することにより、筋線維芽細胞様に活性化されたことが確認された.

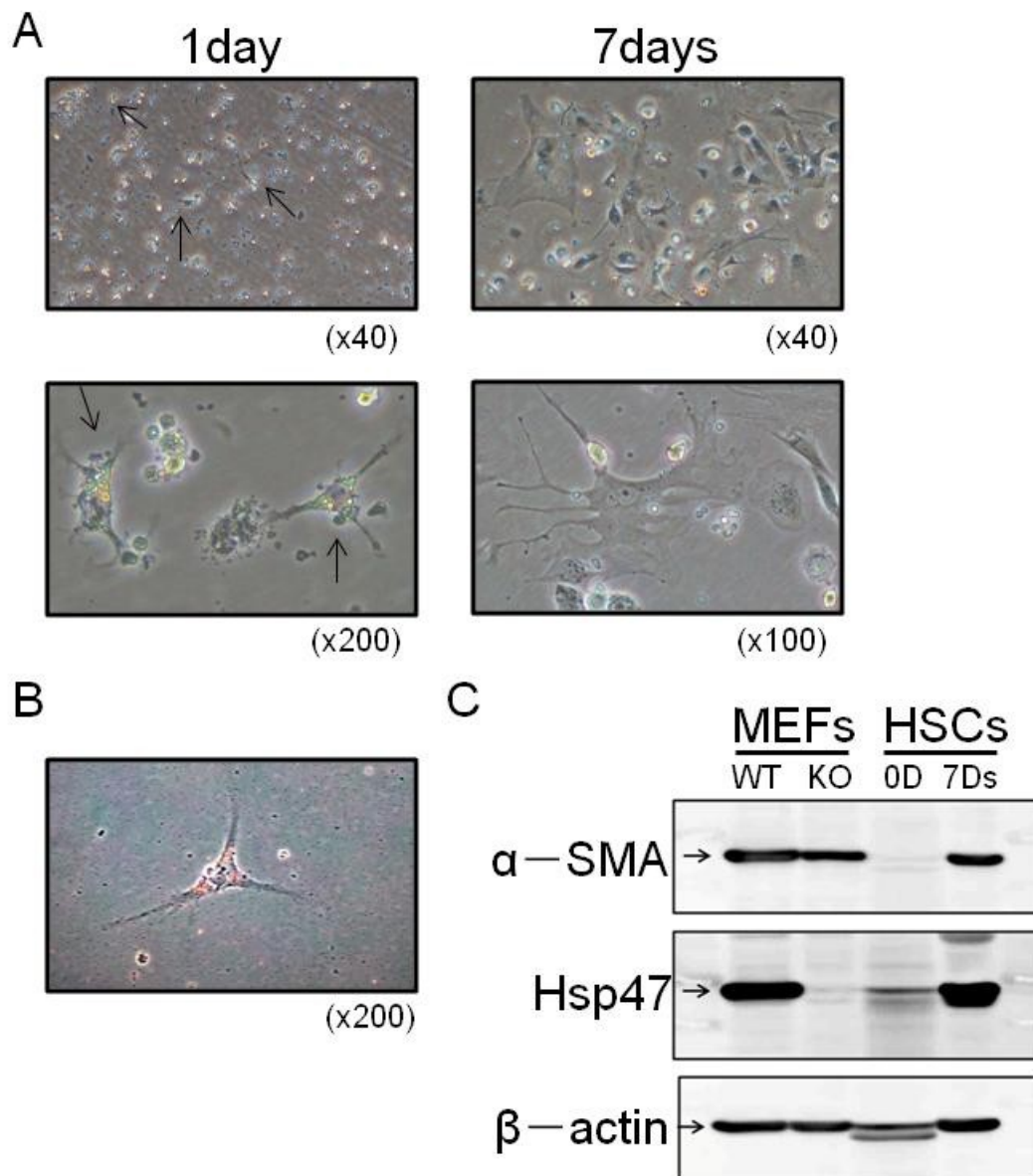


図3 マウスから単離された HSCs とその活性化.

(A)単離した HSCs の活性化に伴う形態学的変化および Oil red O 染色.

マウスから単離された HSCs をディッシュに播種した. 培養 1 日後(1 day)および培養 7 日後(7 days)に細胞を位相差顕微鏡で観察し, 記載した倍率で撮影した. 矢印は HSCs を示している.

(B)単離 1 日後の HSCs に含まれる脂肪滴の Oil red O 染色.

Hsp47 floxed マウスから単離された HSCs をディッシュに播種した. 培養 1 日後に Oil red O で染色し, 位相差顕微鏡で観察, 撮影した.

(C) 単離した HSCs の活性化に伴う α-SMA および Hsp47 の発現上昇.

Hsp47 floxed マウスから単離された HSCs をディッシュに播種した. 播種直後(0D)および培養 7 日後(7Ds)に細胞を回収後 Lysis buffer で可溶化し, 界面活性剤可溶性画分を SDS-PAGE に供した. それぞれのタンパク質に特異的な抗体を用いて免疫染色した. β-actin は全タンパク質のコントロールとして用いた.

次に、HSCs の活性化の過程を継時的に観察した。図 4 に示したのは、単離直後から 16 日後まで 4 日おきに 4 回細胞を回収し、RNA を抽出した後 Hsp47, α -SMA (ACAT2), Colla2(Coll1a2), BiP(Grp78)それぞれの遺伝子の発現を qRT-PCR によって解析し、 β -actin で標準化した結果である。

Hsp47 の発現は 4 日目でピークを示した後緩やかに減少し、12~16 日目で 0 日目に比べて約 4 倍の発現量で安定する。I 型コラーゲン α 2 鎖の発現は 8 日目まで急激に上昇し続け、12~16 日後に 0 日目に比べて約 500 倍の発現量で安定することが確認できた。 α -SMA の発現は、単離から 8 日後に約 400 倍の発現量でピークを迎えた後下降するが、単離から 16 日後でも約 100 倍の発現量を保っている。以上のことから HSCs は、先に Hsp47 の発現がピーク達した後、単離後 8 日目までの間に I 型コラーゲンや α -SMA の発現が活性化されることが明らかとなった。さらに、8 日後に発現が減少するタンパク質もあるが、Hsp47 や Colla2 の発現が 12~16 日目で安定することから、活性型 HSCs としての性質は 16 日目以降に安定することが推察できた。さらに、HSCs が単離直後の静止期の状態から活性化に至るまでコラーゲンの発現が著しく上昇していることから、小胞体に負荷がかかっている可能性を想定し、小胞体ストレスのマーカータンパク質である BiP(Grp78) の発現を Hsp47 などと同様に解析したが、12~16 日目にかけて、わずかに発現が上昇したことを除き、ほとんど変化はなかった。特に、筋線維芽細胞としての活性化の過程でタンパク質の発現が大きく変動する 0~8 日目にかけて BiP が誘導されなかったことは驚くべきことであった。BiP の発現上昇が見られなかったことから、活性化の過程において小胞体ストレスは惹起されていないと考えられた。

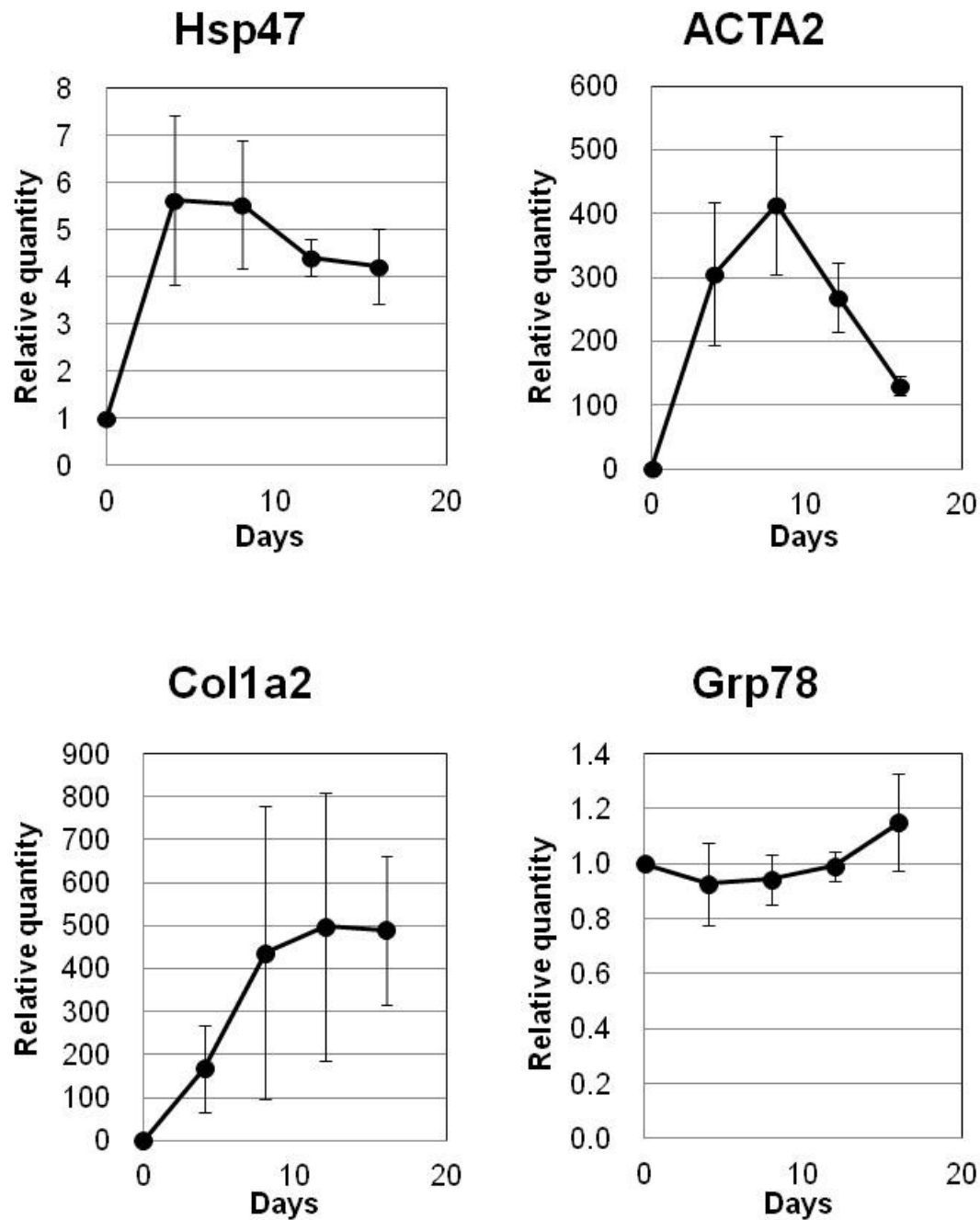


図4 マウスから単離された HSCs の活性化に伴う種々の遺伝子の発現変化.

マウスから HSCs を単離し, 単離直後, 培養 4, 8, 12, 16 日後に HSCs を回収, RNA を抽出した. Hsp47, Col1a2(Col1a2, I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖), ACTA2(α -SMA)そして Grp78(BiP)についてそれらの発現量を qRT-PCR で解析した. β -actin を同様に解析し, 内部標準コントロールとして用い, 標準化した. 単離直後(0 日)を 1 として, 各々相対値をグラフにして示した. 16 日目は 2 回, 0, 4, 8, 12 日目は 3 回独立して行い, それらの平均値を折れ線グラフで示し, 標準偏差をエラーバーで示した.

単離された HSCs の培養下における自発的な活性化は、線維症における生体内での HSCs の活性化を模していると考えられているが、実際にどれほど生体内の活性化を模しているのか、培養下で活性化させた HSCs は生体内で活性化させた HSCs 同等に、Hsp47 および I 型コラーゲンの発現が活性化されているのかは不明であった。そこで、Hsp47 と I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖を基準に、生体内での活性化と培養下での活性化の度合いの違いを検証した。生体内で HSCs を活性化させるために、四塩化炭素(CCl_4)をマウスに投与した。 CCl_4 は、ラットまたはマウスなどの実験動物を用いた肝線維化の研究において、肝線維化を引き起こす薬剤として一般的に用いられている。四塩化炭素は、肝細胞に対して毒性があり、肝炎を生じさせることによって、肝線維化を引き起こす。

CCl_4 を 2 日おきに 8 回投与(計 16 日)したマウスについて、8 回目の投与から 1 日後(17 日後)に HSCs を単離し、生体内で活性化された HSCs とした。投与 0 日目のマウスからも HSCs を単離し、これをコントロールとした。一方、何も投与していないマウスから HSCs を単離し、培養下で 17 日間培養し、これを培養下で活性化した HSCs とした。単離直後の HSCs をコントロールとした。図 5 に示すように、培養下で活性化させた HSCs は生体内で活性化した HSCs に比べて、Hsp47 については約 2.3 倍、I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖については約 15 倍もそれぞれの発現が高いとの結果が示された。このことから、培養下で活性化させた HSCs は生体内で活性化した HSCs よりも線維芽細胞としてより活性化されていることが推察できた。

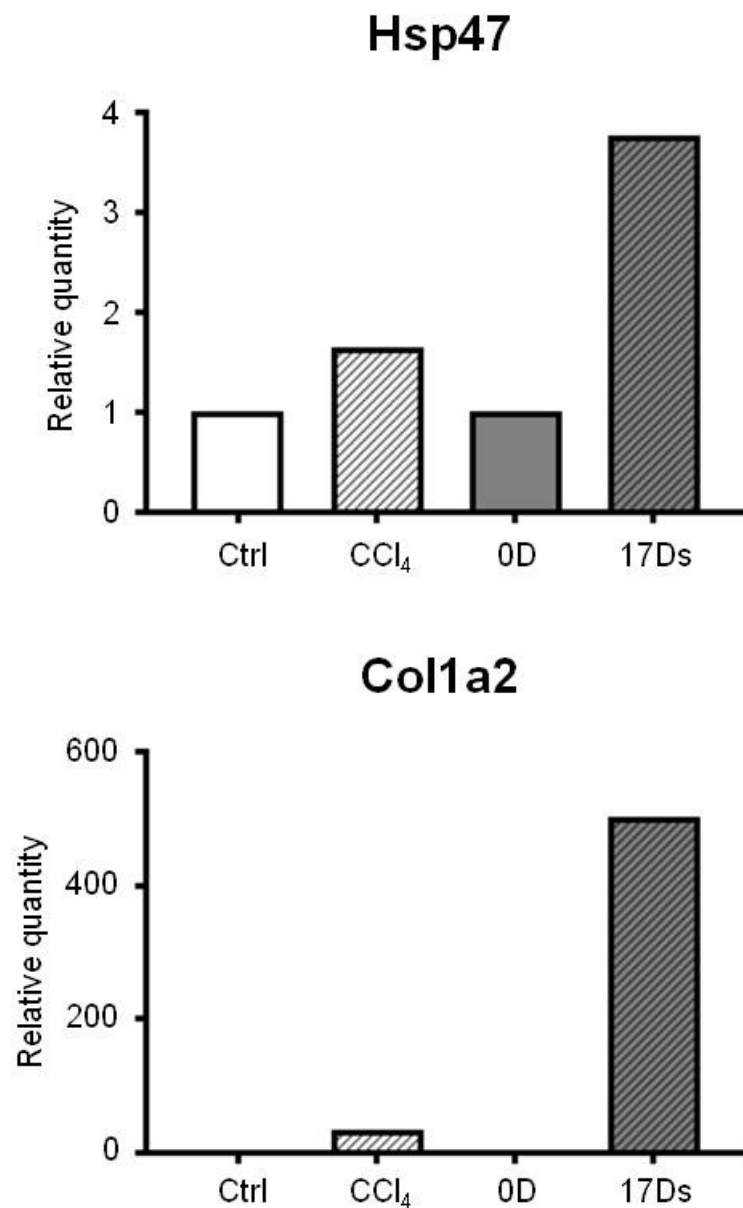


図5 生体内および培養下における活性化 HSCs の Hsp47, I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖の発現量

In vitro としての HSCs は, マウスから単離した直後の HSCs(0D)または単離後 17 日間培養し活性化させた HSCs(17Ds)から RNA を抽出し, Hsp47 または Col1a2 (Col1a2)について qRT-PCR を行った. *In vivo* としての HSCs は, マウスに四塩化炭素(CCl₄)を 2 日おきに 8 回(16 日間)投与しその翌日(17 日目)に単離した HSCs(CCl₄), または CCl₄を投与していないマウスから単離した HSCs(Ctrl), からそれぞれ RNA を抽出し, Hsp47 または Col1a2 について qRT-PCR を行った. β -actin を用いて標準化した.

4-2. Cre-loxP システムによる Hsp47 のノックアウト(KO)

活性型 HSCs における Hsp47 の役割を解明するため、Cre-loxP システムを用いて活性型 HSCs で Hsp47 のノックアウト(KO)を行った。以前我々は *Hsp47* floxed マウスを作成し、軟骨特異的 Cre マウスと交配させることで、Hsp47 が軟骨特異的に KO されることを確認している(Masago, Y et al. 2012)。今回、この *Hsp47* floxed マウスから HSCs を単離し、培養下で活性化した活性型 HSCs にアデノウイルスベクターを用いて Cre リコンビナーゼを導入し、Hsp47 をノックアウトした。Hsp47 の mRNA 発現量を、半定量的 RT-PCR で解析したところ、mRNA は感染から 4 日目以降で検出限界以下となった(図 6A)。より正確な KO 効率を算出するため、定量的 RT-PCR を行ったところ、感染 4 日目で相対的な発現量は 10%以下を示した(図 6B)。次に、タンパク質レベルでの Hsp47 の KO 効率を測定するため、抗 Hsp47 抗体を用いてウエスタンブロットを行ったところ、4 日目では約 40% 存在し、8 日目以降に 20%以下に減少した(図 6C)。感染 4 日目で Hsp47 の mRNA 量が 10%以下になることから、この時点で 90%以上の細胞で KO されていることが確認できた。感染 4 日目で Hsp47 のタンパク質量が 40%と mRNA に比べて高い値を示しているのは、Hsp47 のタンパク質の半減期が約 48 時間であるためであると推察される。感染 8 日目で Hsp47 のタンパク質量が 20%以下になることから、Cre リコンビナーゼの導入から 8 日目において、80%以上の細胞で Hsp47 が KO され、さらにタンパク質レベルでもほとんど存在しないことが示唆された(図 6D)。また、これら Hsp47 の mRNA 量、タンパク質量ともに、8 日目から 12 日目まで維持されていることから、KO されていない細胞が増殖し、置き換わるなどの現象もないことも推察できる。今後の Hsp47 KO 下におけるコラーゲンやアポトーシスの解析は、Cre リコンビナーゼの導入から 12 日目以降に行うこととした。

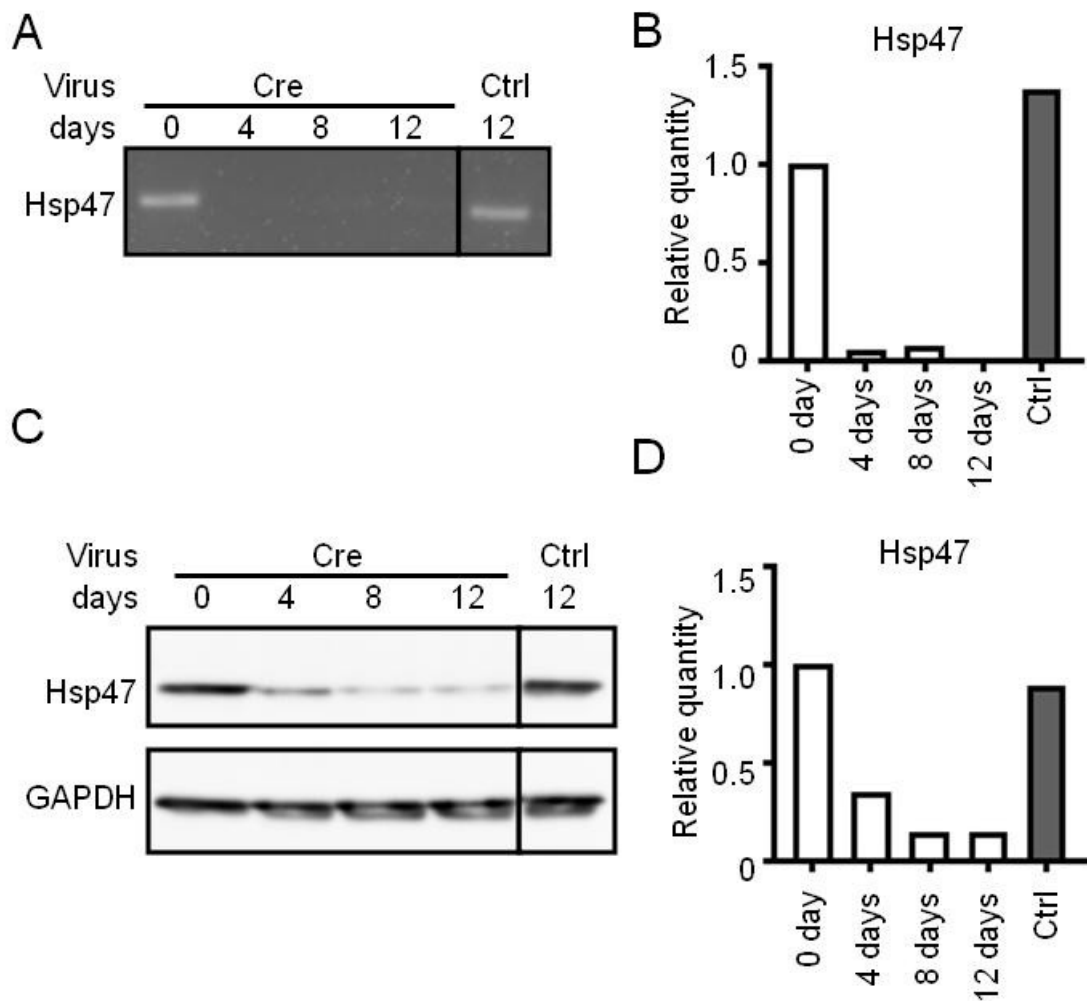


図6 活性型 HSCs への、アデノウイルスベクターを用いた Cre リコンビナーゼの導入による、Hsp47 遺伝子のノックアウト。

(A) Cre リコンビナーゼ導入下における半定量的 RT-PCR による Hsp47 mRNA の解析。

Hsp47 floxed マウスから HSCs を単離し、培養下で活性化させた。活性型 HSCs にコントロールアデノウイルス(AdControl ; Ctrl と図示)または、Cre リコンビナーゼを含むアデノウイルス(AdCre ; Cre と図示)を感染させた。感染から、図に示した日数後に HSCs を回収し、RNA を抽出した。Hsp47 特異的なプライマーを用いて半定量的 RT-PCR を行った。2%アガロースゲルに泳動した後、エチジウムブロマイドで染色した。

(B) Cre リコンビナーゼ導入下における定量的 RT-PCR による Hsp47 mRNA の解析。

(A) で使用した RNA を用いて、Hsp47 特異的なプライマーを用いて定量的 RT-PCR を行った。

(C) Cre リコンビナーゼ導入下における Hsp47 タンパク質の解析。

Hsp47 floxed マウスから HSCs を単離し、培養下で活性化させた。活性化 HSCs に AdControl または、AdCre を 17MOI で感染させた。感染から、図に示した日数後に HSCs を Lysis buffer で回収し、SDS-PAGE に供した。Hsp47 特異的な抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

(D) Cre リコンビナーゼ導入下における Hsp47 タンパク質の解析。

(C) を定量し、グラフに示した。

4-3. Hsp47 KO HSCs における I 型コラーゲンおよび I 型プロコラーゲン

次に, Hsp47 をノックアウトした活性型 HSCs(以後, Hsp47 KO HSCs と称する)における I 型コラーゲンを解析した. 細胞を固定後, 界面活性剤を用いた細胞膜透過処理を行うことなく, 抗 I 型コラーゲン抗体で免疫染色を行うことにより, 細胞外コラーゲンの沈着を観察した(図 7A). コントロールアデノウイルスを感染させた活性型 HSCs(Ctrl)では細胞外に I 型コラーゲン(緑)が沈着していることが確認できる. コントロール HSCs と異なり, Cre リコンビナーゼ含有アデノウイルスを感染させた活性型 HSCs(Cre)では, I 型コラーゲンのシグナルはほとんど確認されなかった. このことから, Hsp47 KO HSCs は細胞外基質にコラーゲンが含まれないことが示され, Hsp47 の発現抑制が線維化の抑制に寄与することが *In vitro* で示唆された. 次に, I 型プロコラーゲンの細胞内の蓄積量をウェスタンブロットで確認したところ, Cre リコンビナーゼを導入した活性型 HSCs では, コントロール HSCs に対して I 型プロコラーゲンの有意な蓄積が界面活性剤可溶性画分で確認された(図 7B, C). さらに, わずかではあるが, 界面活性剤不溶性画分に I 型プロコラーゲンが確認でき, 界面活性剤不溶性画分の I 型プロコラーゲンは, Hsp47 KO HSCs でコントロールに比べて増加していた. これらの結果から, Hsp47 KO HSCs では, I 型コラーゲンが細胞外基質には含まれず, 細胞内に蓄積することが示された. そこで次に, I 型コラーゲンが細胞内のどのコンパートメント(細胞内小器官)に含まれるか同定するため, 界面活性剤を用いた細胞膜透過処理を行なった後, 免疫染色を行った. その結果より, コントロール HSCs (Control)では I 型コラーゲンは小胞体のマーカータンパク質である PDI とはほとんど一致せず, シスゴルジのマーカータンパク質である GM130 との共局在を示した. 一方, Cre リコンビナーゼを導入した活性型 HSCs (Cre)では, I 型コラーゲンは GM130 だけでなく, PDI と共局在することが確認された(図 7D). これらの結果から Hsp47 KO HSCs では, I 型コラーゲンは細胞外基質には含まれず, 小胞体に蓄積し, それらの一部は界面活性剤不溶性の凝集体を形成すると結論付けた.

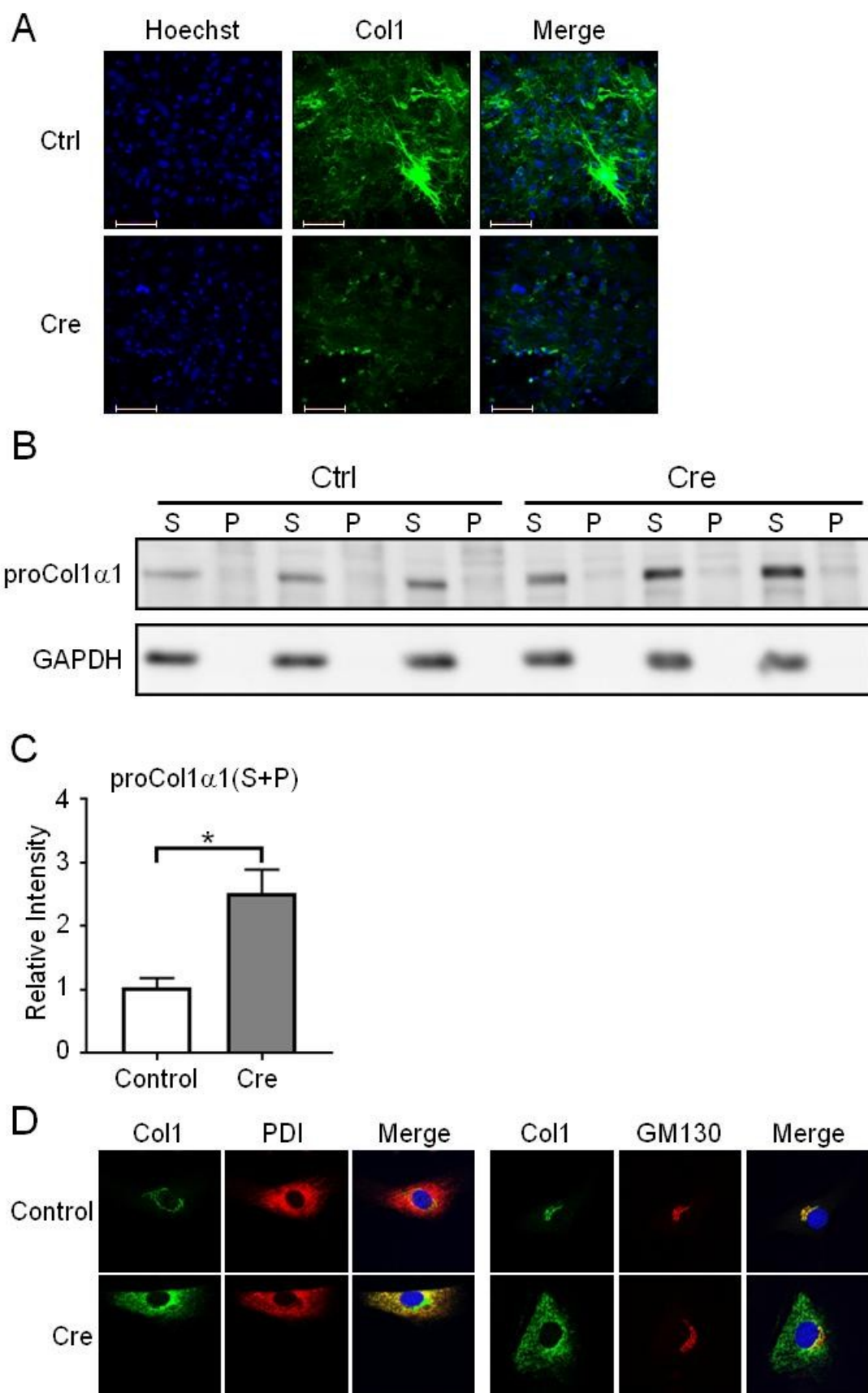


図 7 Hsp47 KO HSCs におけるコラーゲンの挙動の変化

(A) Hsp47 KO HSCs における細胞外 I 型コラーゲン

Hsp47 floxed マウスから HSCs を単離し、培養下で活性化させた。活性化 HSCs に AdControl (Ctrl) または AdCre (Cre) を感染させた。感染から 12 日後に細胞外のコラーゲンを抗 I 型コラーゲン抗体を用いて染色した(緑)。細胞の核を Hoechst33342 を用いて対比染色した(青)。バーは 100 μ m を示している。

(B) Hsp47 KO HSCs における細胞内の I 型プロコラーゲン

Hsp47 floxed マウスから HSCs を単離し、培養下で活性化させた。活性化 HSCs に AdControl (Ctrl) または AdCre (Cre) を感染させた。感染から 13 日後に細胞を回収し、lysis buffer で可溶化し、SDS-PAGE に供した。抗 I 型コラーゲン抗体を用いて、ウエスタンブロットを行った。

(C) Hsp47 KO HSCs における細胞内の I 型プロコラーゲン

(B) を定量し、GAPDH で標準化して示した。4 回独立して実験を行い、その平均値と標準誤差を示した。
*, $P < 0.05$

(D) Hsp47 KO HSCs における細胞内の I 型プロコラーゲンの局在

Hsp47 floxed マウスから HSCs を単離し、培養下で活性化させた。活性化 HSCs に AdControl (Control) または AdCre (Cre) を感染させた。感染から 12 日後に細胞内の I 型コラーゲンを抗 I 型コラーゲン抗体を用いて染色した(緑)。PDI, GM130 を両者に特異的な抗体を用いてそれぞれ染色した(赤)。細胞の核を Hoechst33342 を用いて対比染色した(青)。

4-4. Hsp47 KO HSCs における小胞体ストレスとアポトーシス

以前、我々の研究室では Hsp47 KO MEFs では Hsp47 ノックアウトにより、I 型コラーゲンが細胞内に蓄積し、界面活性剤不溶性の凝集体を形成することで小胞体ストレスを引き起こし、さらに細胞がアポトーシスに至ることを示している。そこで次に我々は、Hsp47 KO HSCs においても、Hsp47 KO MEFs と同様のことが起こっているのではないかと仮定し、小胞体ストレスとアポトーシスを解析した。

Hsp47 の発現量は、Cre リコンビナーゼを導入した活性型 HSCs (Hsp47 KO HSCs ; Cre) で著しく減少しており、Hsp47 のノックアウトが確認できた(図 8A, B)。小胞体ストレスマーカータンパク質として、BiP(Grp78)と Grp94 を、小胞体ストレス依存的なアポトーシスマーカータンパク質として CHOP をウエスタンブロットにより検出したが、コントロール HSCs (Ctrl) と Hsp47 KO HSCs は同様の値を示した。また、小胞体ストレス時におこる UPR の経路の一つに、XBP-1 のスプライシングがある。そこで、XBP-1 のスプライスフォームを RT-PCR によって検出した(図 8C)。小胞体ストレスを起こすことが知られているタプシガルジン(TG)を処理すると XBP-1 のスプライスフォームが検出されるが、Hsp47 KO HSCs ではコントロール HSCs 同様に、スプライスフォームは検出されなかった。これらのことから、Hsp47 KO HSCs では小胞体ストレスとアポトーシスは起こっていないと推察された。

この結果は、以前我々が MEFs を用いて出した結果とまったく異なるものである。以前の結果と異なる結果となった原因は以下の 2 点と考えた。一つは I 型コラーゲンの発現量の差である。予備的な実験から、MEFs に比べ、活性化された HSCs の I 型コラーゲンの発現量は mRNA では約 25%、細胞内のタンパク質量では約 50%ほどであることを確認した。この発現量の違いのため、Hsp47 ノックアウトにより細胞内に蓄積する界面活性剤不溶性のコラーゲンの凝集体も減少し、小胞体ストレス、およびアポトーシスが検出されなかったものと考えられる。もうひとつ大きな原因として考えられるのが、オートファジー活性の違いである。以前の研究で、我々は界面活性剤不溶性となった I 型コラーゲンがオートファジーで分解されることを発表している(Ishida, Y., 2009)。したがって、オートファジーの活性は界面活性剤不溶性のコラーゲンの量に影響を与え、小胞体ストレスやアポトーシスにも影響を与えることが推測される。

近年の研究で、HSCs では HSCs の活性化に伴いオートファジーが活性化することが報

告されている(Thoen, L. F. et al., 2011). したがって, HSCs では MEFs よりもオートファジーがより活性化されていることが考えられ, それにより界面活性剤不溶性コラーゲンが分解されていると推測できる.

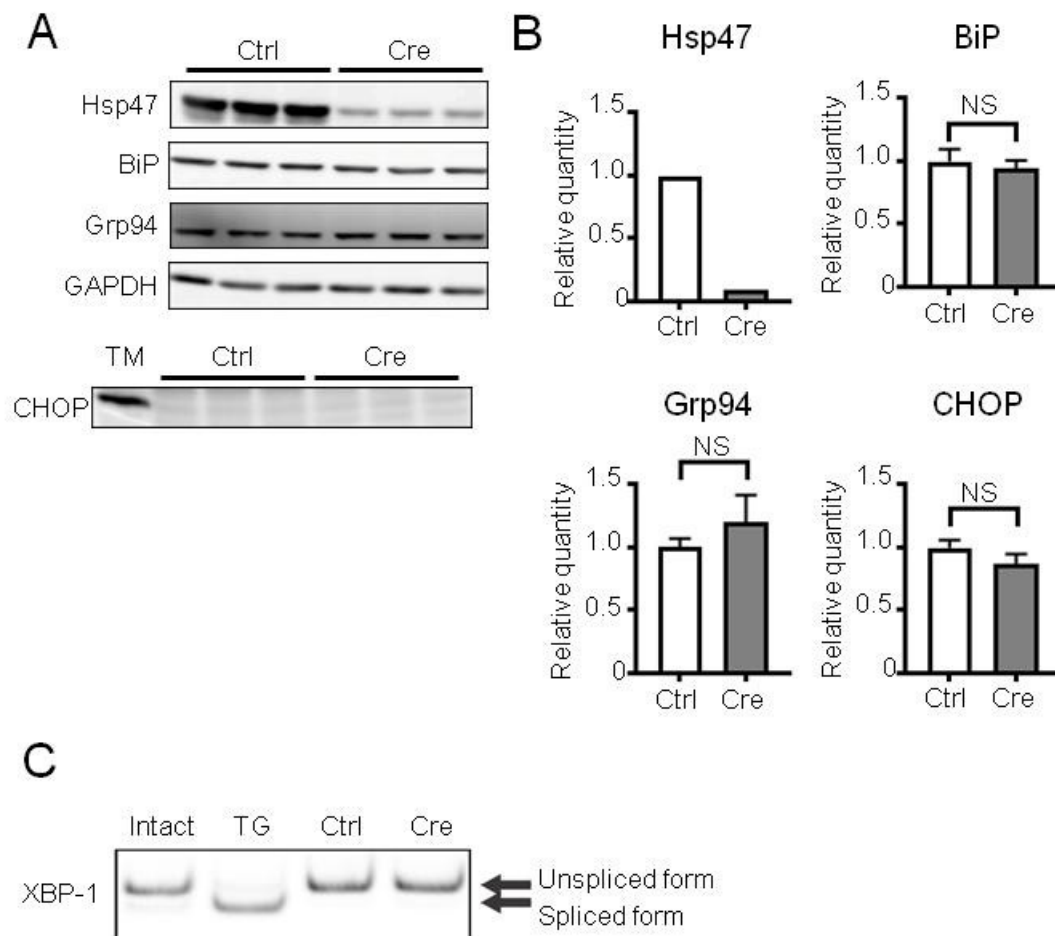


図8 Hsp47 KO HSCsにおける小胞体ストレスとアポトーシス

(A) Hsp47 KO HSCs における小胞体ストレスとアポトーシス

Hsp47 floxed マウスから HSCs を単離し、培養下で活性化させた。活性化 HSCs に AdControl または AdCre を感染させた。感染から 13 日後に細胞を回収し、lysis buffer で可溶化し、SDS-PAGE に供した。それぞれ図に示したタンパク質に特異的な抗体を用いて、ウェスタンブロットを行った。ツニカマイシン (TM) 処理のサンプルは、CHOP のポジティブコントロールとして用いた。

(B) Hsp47 KO HSCs における小胞体ストレスとアポトーシス

(A) を定量し、GAPDH で標準化して示した。4 回独立して実験を行い、その平均値と標準誤差を示した。NS ; not significance.

(C) Hsp47 KO HSCs における XBP-1 のスプライシング

Hsp47 floxed マウスから HSCs を単離し、培養下で活性化させた。活性化 HSCs に AdControl または AdCre を感染させた。感染から 13 日後に細胞を回収し、RNA を抽出した。XBP-1 のアンスプライシングフォームとスプライシングフォームの両者を増幅できるプライマーを用いて半定量的 RT-PCR を行った。タプシガルジン(TG)は XBP-1 スプライシングフォームのポジティブコントロールとして用いた。

4-5. オートファジー阻害下における Hsp47 KO HSCs での I 型コラーゲンの細胞内蓄積と、オートファジーマーカータンパク質 LC3, p62 の蓄積

以上のことから、オートファジー阻害剤を用いてオートファジーを阻害することにより小胞体ストレスとアポトーシスを誘導できるのではないかと考えた。オートファジー経路の最終細胞内小器官はリソソームであり、そこで基質の分解が行われる。今回、われわれはリソソームの酸性化を阻害する薬剤であるクロロキン(CQ)を用いることで、オートファジーを阻害することとした。CQ を処理すると、Hsp47 KO HSCs では I 型プロコラーゲンの顕著な細胞内蓄積が見られた(図 9A, B)。これは活性型 HSCs ではオートファジーの活性が高いため、正常なコラーゲンもオートファジーで分解されていることを示唆する結果と考えた。一方、コントロール細胞でも CQ 処理によりコラーゲンの蓄積が見られ、その量は CQ 未処理の Hsp47 KO HSCs とほぼ等量であった。次に、Hsp47 KO HSCs でオートファジーの阻害により界面活性剤不溶性画分での I 型プロコラーゲンの蓄積を調べた。I 型プロコラーゲンの蓄積は、界面活性剤不溶性画分においてわずかに増加が見られたものの、その蓄積はおもに可溶性画分で認められた(図 9A)。別のオートファジー阻害剤である 3-MA の効果も検討した。3-MA はオートファゴソーム形成に必要な PI3K を阻害することにより、オートファジーの初期段階を阻害する。図 9C に示すように、3-MA 処理下においても、Hsp47 KO HSCs で I 型プロコラーゲンの細胞内の蓄積を認め、さらに CQ 処理と比べて界面活性剤不溶性画分におけるコラーゲンの増加を認めた。これはミスフォールドした I 型プロコラーゲンが小胞体からオートファゴソームで隔離されることを阻害することによって、小胞体により多く蓄積しているためであると考えた。さらに、CQ 処理下の活性型 HSCs において、オートファジーの活性化のマーカータンパク質である LC3-II と p62 をそれぞれウエスタンブロットにより解析した。LC3 は合成されたのち、Atg4 により C 末端が切断され、LC3-I フォームとなる。その後、オートファジーの過程で、ホスファチジルエタノールアミンが結合することにより、LC3-I から LC3-II フォームへと変わる。これらのことより、一般的に、LC3-II の量はオートファジーの活性を表していると考えられている。図 9D に示すように、活性型 HSCs の LC3 はその大部分が LC3-II フォームである。

図 10 は WT または Atg5 KO MEFs での LC3 を通常状態および血清飢餓状態で比べた

ものである。Atg5 KO MEFs は LC3-II フォームを作ることができないため、すべて LC3-I フォームとして検出された。WT MEFs の LC3 は通常状態では、LC3-I と LC3-II がほぼ等量存在したが、血清飢餓状態ではオートファジーが活性化され、LC3-II フォームの量が増加した。しかし、血清飢餓状態であっても、依然として LC3-I フォームは検出された。一方、活性型 HSCs では LC3-I フォームはほとんど検出されなかった(図 9D)。このことから、活性型 HSCs ではオートファジーが著しく高い活性で保たれていることが推察される。CQ 処理下の活性型 HSCs において、界面活性剤不溶性画分で p62 が有意に蓄積したことから、CQ 処理によってオートファジーが阻害されたことが確認された(図 9D, E)。さらに、界面活性剤可溶性画分の LC3-II, p62 の蓄積を定量すると、コントロール HSCs では、非処理(NT)および CQ 処理後(CQ)において、統計的に有意な蓄積は認められなかったが、Hsp47 KO HSCs では、NT および CQ において、両タンパク質ともに統計的に有意な増加が認められた。このことから、Hsp47 KO HSCs ではコントロール HSCs よりもオートファジーがより活性化されていることが推察できる。このことは、Hsp47 KO MEFs では、WT MEFs よりオートファジーが活性化されているという、石田らによる以前の我々の結果とも一致している(Ishida, Y et al., 2009)。

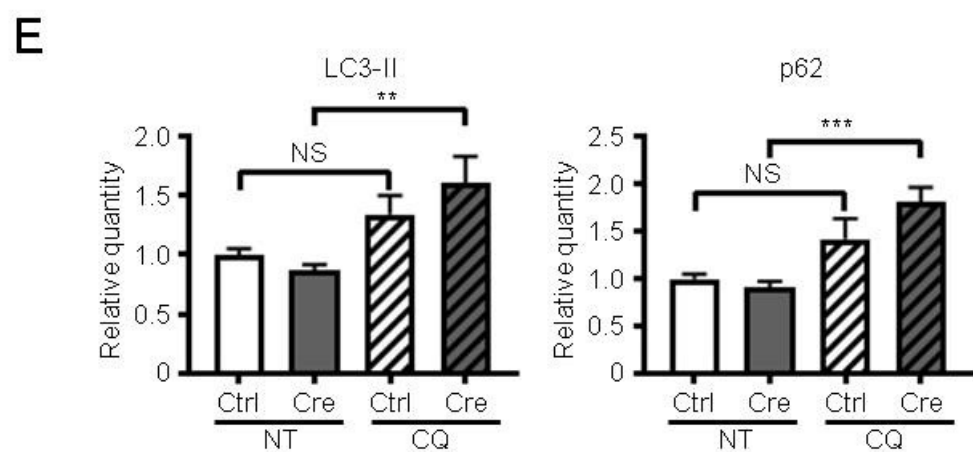
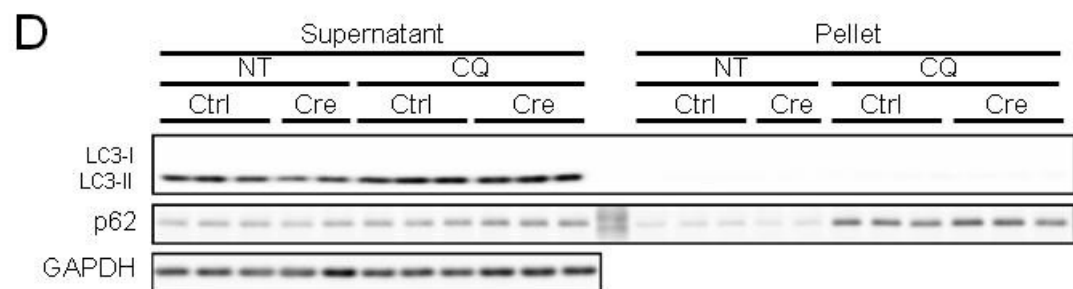
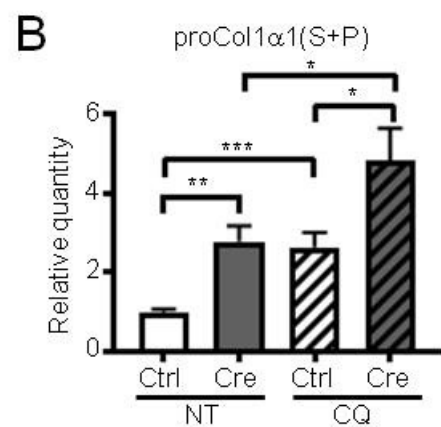
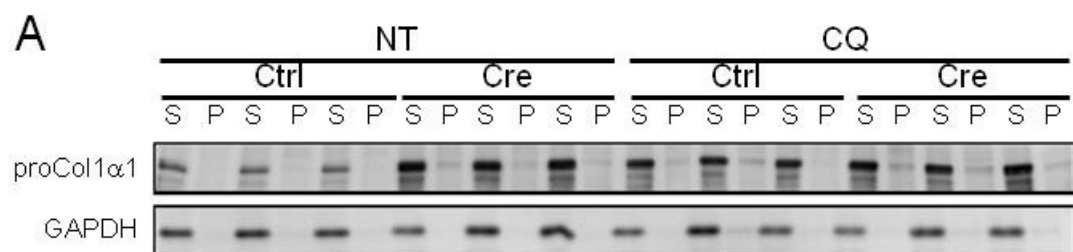


図9 オートファジー阻害下における Hsp47 KO HSCs での I 型コラーゲンの細胞内蓄積と、オートファジーマーカータンパク質 LC3, p62 の蓄積

(A) オートファジー阻害下における I 型プロコラーゲンの細胞内の蓄積

Hsp47 floxed マウスから HSCs を単離し、培養下で活性化させた。活性化 HSCs に AdControl または AdCre を感染させた。感染から 12 日後に CQ を処理した。24 h 後に細胞を回収し、lysis buffer で可溶化し、SDS-PAGE に供した。抗 I 型コラーゲン抗体を用いて、ウエスタンブロットを行った。

(B) オートファジー阻害下における I 型プロコラーゲンの細胞内の蓄積

(A) を定量し、GAPDH で標準化して示した。8 回独立して実験を行い、その平均値と標準誤差を示した。

* ; $P < 0.05$, ** ; $P < 0.01$, *** ; $P < 0.005$.

(C) オートファジー阻害下における I 型プロコラーゲンの細胞内の蓄積

Hsp47 floxed マウスから HSCs を単離し、培養下で活性化させた。活性化 HSCs に AdControl または AdCre を感染させた。感染から 12 日後に 3-MA を処理した。24 h 後に細胞を回収し、lysis buffer で可溶化し、SDS-PAGE に供した。抗 I 型コラーゲン抗体を用いて、ウエスタンブロットを行った。

(D) オートファジー阻害下における LC3-II と p62 の蓄積

Hsp47 floxed マウスから HSCs を単離し、培養下で活性化させた。活性化 HSCs に AdControl または AdCre を感染させた。感染から 12 日後に CQ を処理した。24 h 後に細胞を回収し、lysis buffer で可溶化し、SDS-PAGE に供した。抗 LC3 抗体または抗 p62 抗体を用いて、ウエスタンブロットを行った。

(E) オートファジー阻害下における LC3-II と p62 の蓄積

(D) を定量し、GAPDH で標準化して示した。9 回独立して実験を行い、その平均値と標準誤差を示した。

** ; $P < 0.01$, *** ; $P < 0.005$, NS ; not significance.

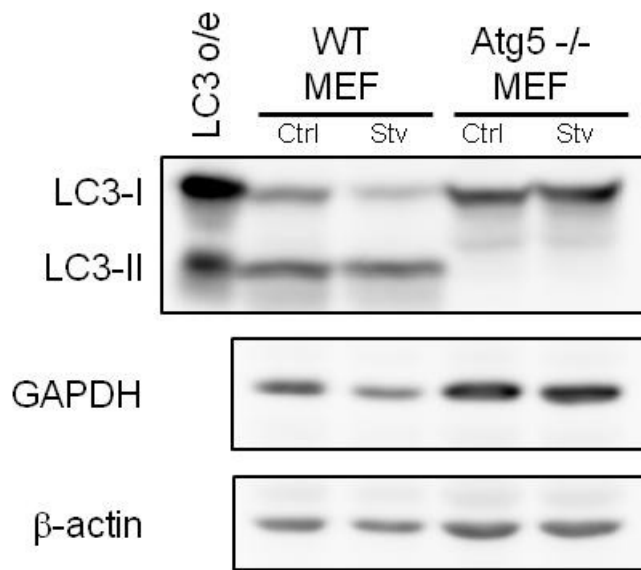
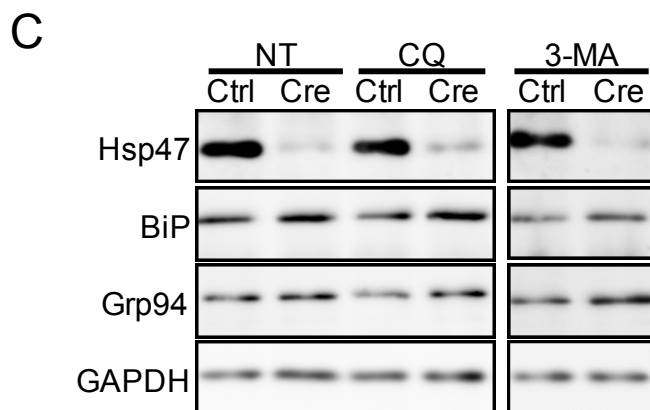
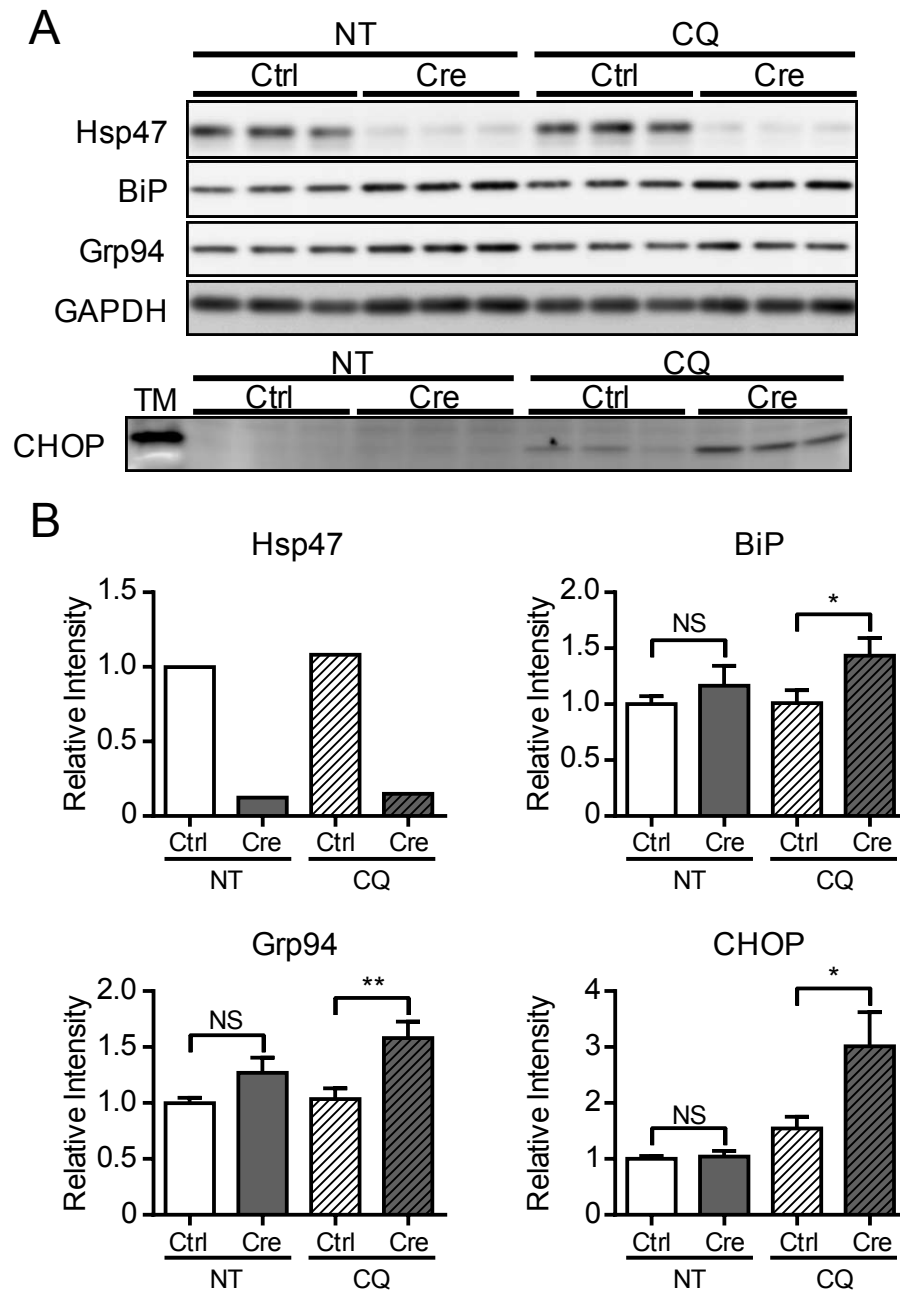


図 10 WT および Atg5 KO MEFs における通常状態または血清飢餓状態の LC3

WT および Atg5 KO MEFs を 2 時間, 10%FBS を含む DMEM で培養するか(Ctrl), または FBS を含まない DMEM で培養し血清飢餓状態とした(Stv). 細胞を回収後 lysis buffer で可溶化し, SDS-PAGE に供した. それぞれのタンパク質に特異的な抗体を用いて, ウェスタンブロットを行った. LC3 過剰発現細胞の細胞可溶化液(LC3o/e)をポジティブコントロールとして用いた.

4-6. オートファジー阻害下における Hsp47 KO HSCs での小胞体ストレスとアポトーシス

オートファジー阻害剤を用いることで、Hsp47 KO HSCs でより多くの I 型コラーゲンの蓄積が観察されたため、オートファジー阻害下の Hsp47 KO HSCs において小胞体ストレスとアポトーシスを調べた(図 11). CQ 処理を行った Hsp47 KO HSCs においてコントロール HSCs と比べて BiP と Grp94 が有意に増加していた(図 11A, B). さらに、CQ 処理を行った Hsp47 KO HSCs では CHOP の発現も著しく上昇していることが示された(図 11A, B). これらのことから、CQ 処理によって、Hsp47KO HSCs では小胞体ストレスが惹起され、それにより小胞体ストレス依存的なアポトーシスが起きていることが推察された. オートファジー阻害剤として 3-MA を用いた場合においても、CQ 処理と同様に、Hsp47 KO HSCs において BiP, Grp94 の増加が認められた(図 11C). 次に我々は、アポトーシスの実行因子であるカスパーゼ 3 活性化を観察することとした. カスパーゼ 3 活性化は通常状態においても Hsp47 KO HSCs で有意な増加を認め、さらにオートファジー阻害下においても Hsp47 KO HSCs でコントロール HSCs に比べて有意な増加と確認できた(図 11D, E). このことから、オートファジー阻害下の Hsp47 KO HSCs では確かにアポトーシスが起きていることが示された.



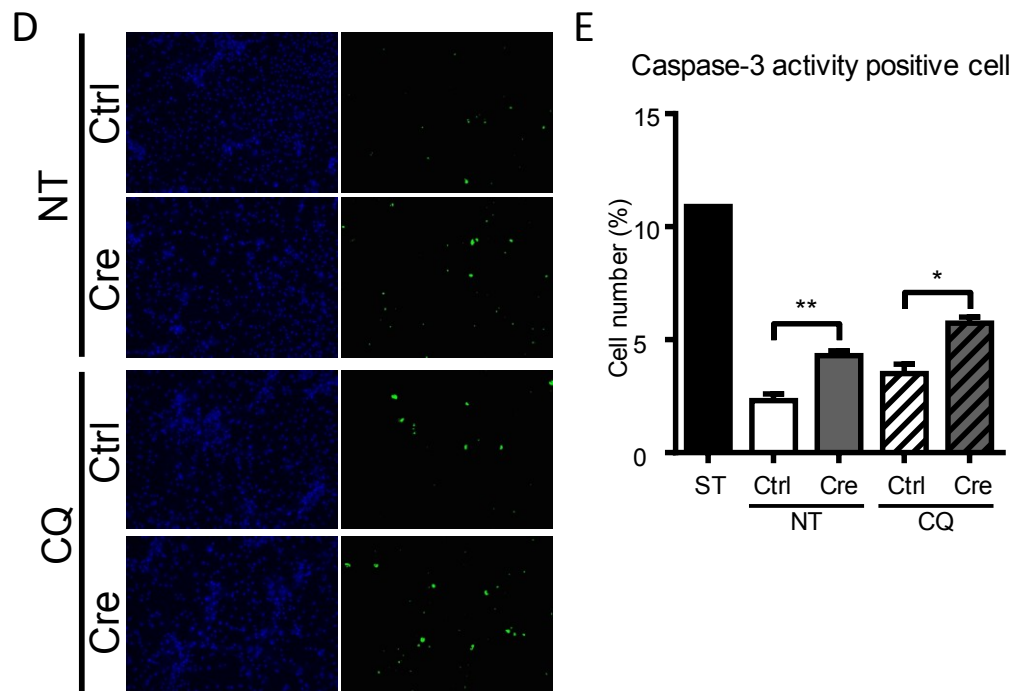


図 11 オートファジー阻害下における Hsp47 KO HSCs での小胞体ストレスとアポトーシス

(A)オートファジー阻害下における Hsp47 KO HSCs での小胞体ストレスとアポトーシス

Hsp47 floxed マウスから HSCs を単離し，培養下で活性化させた．活性化 HSCs に AdControl または AdCre を感染させた．感染から 12 日後に CQ を処理した．24 h 後に細胞を回収し，lysis buffer で可溶化し，SDS-PAGE に供した．それぞれのタンパク質に特異的な抗体を用いて，ウェスタンブロットを行った．

(B) オートファジー阻害下における Hsp47 KO HSCs での小胞体ストレスとアポトーシス

(A)を定量し，GAPDH で標準化して示した．9 回独立して実験を行い，その平均値と標準誤差を示した．

* ; $P < 0.05$, ** ; $P < 0.01$, *** ; $P < 0.005$.

(C) オートファジー阻害下における Hsp47 KO HSCs での小胞体ストレス

Hsp47 floxed マウスから HSCs を単離し，培養下で活性化させた．活性化 HSCs に AdControl または AdCre を感染させた．感染から 12 日後に 3-MA を処理した．24 h 後に細胞を回収し，lysis buffer で可溶化し，SDS-PAGE に供した．それぞれのタンパク質に特異的な抗体を用いて，ウェスタンブロットを行った．

(D)オートファジー阻害下における Hsp47 KO HSCs での Caspase-3 の活性化

Hsp47 floxed マウスから HSCs を単離し，培養下で活性化させた．活性化 HSCs に AdControl または AdCre を感染させた．感染から 12 日後に CQ を処理した．24 h 後にカスパーゼ 3 アッセイを行い，キーエンス社の BZ-X710 を用いて画像を取得した．

(E)オートファジー阻害下における Hsp47 KO HSCs での Caspase-3 の活性化

(D)で得られた画像について，キーエンス社の画像解析ソフトを用いてカスパーゼ 3 ポジティブ細胞を定量し，グラフで示した．3 回独立して実験を行い，その平均値と標準誤差を示した．* ; $P < 0.05$, ** ; $P < 0.01$.

5. 考察

5-1. Cre-loxP システムを用いた Hsp47 のノックアウト

図 6 に示したように我々は HSCs で Hsp47 をノックアウトすることに成功した。Hsp47 のタンパク質を解析したウエスタンブロットの結果より、Hsp47 のノックアウト効率が 80%以上であると示唆されるが、これはすべての細胞で 80%、Hsp47 の発現が抑えられたのではなく、80%の細胞で約 100% Hsp47 の発現が抑えられていることを示していると考えられる。このことがノックダウンの系と大きく異なることの一つである。

コラーゲンの正しい生合成にどれほどの Hsp47 が必要なのか正確に述べることはできないが、Hsp47 ヘテロマウスは WT と比べ Hsp47 発現量が 50%であり、WT と同様の表現系を示すことから、少なくとも 50%の発現量でもコラーゲンの正しい生合成には十分であることが推測される。Hsp47 はシャペロンであり、コラーゲンの生合成の中でコラーゲンが 3 重らせんを形成するときに一時的に結合することが重要であることから、50%よりも少ない量でも働きうることが考えられる。したがって、Hsp47 の役割を研究する上で、1 細胞内の Hsp47 の発現量を限りなく 0 に抑えることは重要であり、その点において本研究で用いた Cre-loxP システムによる Hsp47 ノックアウトは有用な系である。

5-2. Hsp47 KO と I 型コラーゲン

Hsp47 ノックアウト下における I 型コラーゲンの状態を図 7 に示したが、細胞外マトリックスに I 型コラーゲンは含まれず、さらに細胞内の蓄積が観察された。しかし、これは必ずしも Hsp47 ノックアウト下の細胞で I 型コラーゲンが細胞外に分泌されないことを示しているのではない。我々は以前に、Hsp47 KO MEFs で I 型コラーゲンが細胞外に分泌されることを、ラジオアイソトープを用いた実験で示している(Ishida, Y. et al., 2006)。しかし、Hsp47 KO MEFs では、野生型と比べ、I 型コラーゲンが合成されてから、分泌されるまでの時間が長く、さらに分泌されたコラーゲンをトリプシン処理すると野生型は分解されないのに対して、Hsp47 KO MEFs の I 型コラーゲンはトリプシン処理に感受性があり、分解される。これらの結果より、Hsp47 KO HSCs では I 型コラーゲンは正しく 3 重らせん構造へとフォールディングできないため、分泌が遅れるだけでなく、分泌されたコラーゲンも細胞外に存在するプロテアーゼによる分解によって、細胞外マトリックスへ

の蓄積を抑制されていることが強く示唆される。

5-3. オートファジー阻害下における Hsp47 KO HSCs での小胞体ストレスとアポトーシス

図 9 において、クロロキン処理により、オートファジー経路の分解を阻害すると、興味深いことにコントロール細胞、AdCre 感染細胞、両細胞で I 型プロコラーゲンの蓄積が観察された。このことは過去の知見(Ishida, Y. et al., 2009)と異なる結果である。図 9D および図 10 の結果より、HSCs は MEFs よりもオートファジーの活性が高いことが示唆され、そのため、ミスフォールドしていない正常な I 型プロコラーゲンもオートファジー経路に巻き込まれて分解されている可能性が高いと考えられる。しかし注目すべきは、小胞体ストレスが AdCre 感染細胞でのみ観察される点である。このことは、コントロール細胞で増加した I 型プロコラーゲンは性質が正しい物性を備えており、小胞体に負荷を与えるものではないが、AdCre 感染細胞で増加した I 型プロコラーゲンはミスフォールドしているため、小胞体に負荷を与えるコラーゲンであるということを強く示唆する結果である。その結果、AdCre 感染細胞でのみ小胞体ストレスが引き起こされ、小胞体ストレス反応性アポトーシス誘導タンパク質である CHOP の誘導が観察された。

以前に石田らは、Mov13 細胞系を用いて、コラーゲンのミスフォールディングと分解について興味深い観察を行っていた(Ishida, Y et al., 2009)。Mov13 細胞は、I 型コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖を欠損した細胞である。Mov13 細胞では、合成される $\alpha 2$ 鎖は、 $\alpha 1$ 鎖と 3 重らせんを形成できないので、リソソームへ運ばれて分解される(これはオートファジー経路ではない)。Mov13 細胞に $\alpha 1$ 鎖を遺伝子的に導入すると、発現した $\alpha 1$ 鎖と細胞が本来持っている $\alpha 2$ 鎖が 3 重らせんを形成して、正常に分泌される。導入する $\alpha 1$ 鎖に変異を入れ、3 本鎖は作るが、3 重らせんを形成できないようにしてやると、これは小胞体関連分解(ERAD)では分解できず、オートファジーによって分解された。一方で、導入する $\alpha 1$ 鎖に、3 本鎖を作れないように変異を入れて導入すると、導入された $\alpha 1$ 鎖は一本のポリペプチドのまま ERAD で分解された。このように、いったん 3 本鎖を作り、かつミスフォールディングする状況では、これらのプロコラーゲンはオートファジーによって分解を受けるのである。本研究によって示したように、Hsp47 を KO した HSCs では、3 本鎖を形成する

が、3重らせんは形成できない。これは先の研究と同様オートファジーによる分解を受ける。従って、オートファジーを阻害することによって、プロコラーゲンの分解が阻害され、小胞体ストレス、さらにアポトーシスを引き起こすということになったのである。

図 12 に我々のモデルを示す。Hsp47 KO HSCs では細胞内、特に小胞体にミスフォールドした I 型プロコラーゲンが蓄積し、その一部は界面活性剤不溶性画分の凝集体を形成している。これらのミスフォールドプロコラーゲンは、通常はオートファジーによって分解されている。しかし、オートファジーを阻害するとそれらミスフォールドタンパク質はより細胞内に蓄積することとなる。そして、蓄積した I 型プロコラーゲンにより、小胞体ストレスが引き起こされ、最終的にはアポトーシスへと至る。

5-4. 本研究の意義

本論文における我々の一連の結果は、Hsp47 ノックアウトにより、HSCs におけるコラーゲン生合成が阻害されるため、細胞外マトリックスへのコラーゲンの沈着が抑えられること、さらにはオートファジー阻害剤を併用することにより、HSCs そのものをアポトーシスへと導く可能性があることを示唆するものである。これまでの研究で、HSCs の活性化を誘導する TGF- β のシグナル伝達経路の阻害等によって HSCs がコラーゲンを産生しなくなり、肝線維化が治療されるという結果がいくつか報告されている(Yata, Y. et al., 2002; Marquez-Aguirre, A. et al., 2009)。また、肝線維化が改善される場合、HSCs の運命は約半分がアポトーシスとなり、残り半分はもとの(換言すれば静止期の)HSCs に戻ると報告されている(Kisseleva, T. et al., 2012)。この文献の中で、一度活性化した後元に戻った HSCs は、その後の刺激によりもともとある HSCs よりも容易に活性化することが報告されている。すなわち、コラーゲンの産生を止めただけでは、危険因子を体内にとどめたままとなり、治療として十分ではない。

我々が本研究で示したように Hsp47 ノックアウトでは、コラーゲンの産生を抑えることができたが ER ストレスは観察されなかった(図 8)。活性化した HSCs はいずれアポトーシスを示すか、または元の HSCs に戻ると考えられる。一方、オートファジーの阻害によって HSCs の活性化が抑制され、肝線維化が抑えられるという報告がある(Thoen, L. F. et al., 2011; Hernandez-Gea, V. et al., 2012)。しかしながら、オートファジーの阻害によって、

HSCs がアポトーシスに至ることは確認されていない。オートファジー阻害の場合には、Hsp47 の阻害時のように細胞内にストレスとなりうるものが産生されないため、Hsp47 阻害時よりも多く、活性化した HSCs が元の HSCs に戻ることが考えられる。したがって、Hsp47、またはオートファジー、それぞれ単独の阻害の場合には、コラーゲンの細胞外での沈着を抑える効果が期待できるが、活性型 HSCs の速やかな除去には不十分である。また、活性型から非活性型の HSCs に戻る場合には、Kisseleva, T らの報告と合わせて考えると、非活性型に戻された HSCs は、危険因子といえるだろう。

以上のことを考えると、Hsp47 ノックアウト、オートファジー阻害いずれも単独では線維化の治療において非常に優れているとは言い難い。しかし、我々は今回、その両者を組み合わせることによって、コラーゲンの細胞外の沈着を抑えるだけでなく活性型 HSCs でのアポトーシスの誘導を観察することができた。これは治療後のことを考えたときに、一度活性化した後元に戻った HSCs、危険因子であるこの HSCs をより多く除去するために非常に重要な意味を持っていると考えられる。

TGF- β によって誘導されるコラーゲンが、オートファジーの阻害によって、腎臓組織に蓄積するとともに、マウスメサングウム細胞(MMC)の細胞内にも蓄積する例も報告されている(Kim, S.I., 2012)。これは、線維化の過程で生じたコラーゲンが、MMP 等のプロテアーゼのみでなく、オートファジーによっても分解されていることを示唆しており、肝線維化において、Hsp47 の阻害と同様に、オートファジーを阻害することの重要性が示されている。一方で、オートファジーが成体にとって必要なことも知られている。たとえば、肝細胞におけるオートファジーの阻害は、肝細胞を腫瘍(ただし、良性腫瘍)へと導くことが報告されている(Takamura, A. et al., 2011)。したがって、肝線維化における Hsp47 およびオートファジーの阻害は、HSCs 特異的に行われることが重要である。

本研究の成果により肝線維化の治療において Hsp47 が治療戦略上重要な分子であり、さらにオートファジーを制御することが肝線維化の治療において重要な意義を持つことが示唆された。

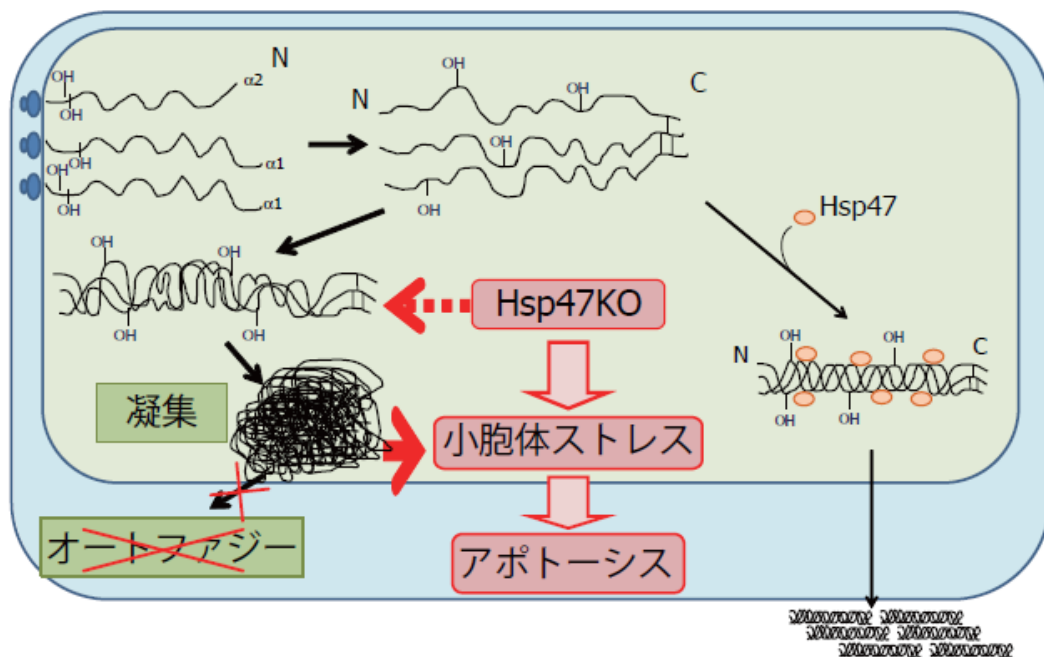


図 12 活性型 HSCs における Hsp47 欠損による小胞体ストレス依存的アポトーシスのモデル

6.実験材料と方法

6-1. 試薬および合成オリゴ核酸

特記したものを除き、試薬は和光純薬工業、ナカライテスク、もしくはシグマアルドリッチ社製の試薬を用いた。また、合成オリゴ DNA は、Invitrogen に合成を依頼した。また溶媒として水を用いる場合は Elix 水(メルクミリポア CO., ダルムシュタット, ドイツ)を用いた。

6-2. マウスの飼育方法および遺伝子型解析

Hsp47 floxed マウスは我々の研究室の OB である真砂らによって作製された(Masago, Y et al., 2012)。マウスを使用したすべての実験は京都産業大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

マウスは個体識別のため、耳にパンチングにより穴をあけた。その際の耳片を使用して、遺伝子型の解析を行った。具体的には、以下の通りである。耳片に Lysis buffer (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2% SDS, 0.1 mg/ml proteinase K) 100 μ l を加え、55°C で 4 時間〜一晩、反応させる。数十分おきにタッピングまたはヴォルテックスなどで攪拌すると 4 時間ほどで完全に溶解できるが、一晩放置して溶解させてもよい。溶解させた DNA サンプルを用いて PCR を行った。PCR は、Ampdirect pluce (島津製作所, Kyoto, Japan)を用いて、製品付属のプロトコールに従って行った。

使用したプライマーの配列は以下の通りである。

マウス *Hsp47* floxed ;

(フォワード) 5'-GAGTGGGCTGAGCCCTCTCAAGAAAATCC -3',

(リバース) 5'-CTTCGGTCAGGCCAGTCCTGCCAGATG -3'.

上記配列は、*Hsp47* intron5 に挿入された loxP 配列および制限酵素認識部位を含む約 100 bp を挟み込むようにして設計されており、かつ、フォワードおよびリバースともに、野生型 allele に存在する配列より設計している。上記プライマーを用いた PCR によって、*Hsp47* floxed allele は約 450 bp のバンドとして、*Hsp47* 野生型 allele は約 350 bp のバンドとして検出される。

6-3. Hepatic stellate cells (HSCs)の単離, および培養

Hepatic stellate cells (HSCs)は *Hsp47^{lox/lox}* マウスから Radaeva らの方法(Radaeva, S et al., 2007)を改良した方法で単離した. 具体的な方法を以下に記載する. 以下, 用いた器具および緩衝液等は, すべて滅菌済みのものを使用した.

(マウスから肝臓組織の取得)・・・以下の操作は, マウス室で行った. マウスに 10 倍希釈したソムノペンチル(共立製薬株式会社)をマウスの体重に対して 10 μ l/g で投与した. 麻酔下のマウスの腹を切り開き, 下大静脈および肝門脈を露出させた. 肝門脈に, 翼竜針を用いて 0.5 mM の EGTA を含む GBSS(-)緩衝液を注入し, 翼竜針をクリップまたはピンセットなどで保持した. 注入は, 10 ml/分の流速で行った. 注入後直ちに横隔膜を切り開き, 肝臓直上の胸部大静脈を血管クリップで止めた後, 下大静脈を切断し, 緩衝液を排出させた. 5 分間, 0.5 mM の EGTA を含む GBSS(-)を還流させた後, EGTA を含まない GBSS(-)をさらに 5 分間還流させることにより肝臓内の血液成分を取り除いた. その後 0.02%(w/v)のコラゲナーゼ I 型(和光純薬株式会社, 大阪, 日本), 0.04%(w/v)のプロナーゼ E(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社, インディアナポリス, インディアナ州, アメリカ合衆国), および 0.25%の DNase I(メルク CO., ダルムシュタット, ドイツ)を含む GBSS(+)緩衝液(以下, 酵素液と称する)を流速 7 ml/分で 10 分還流させ, 細胞間接着を酵素で破壊した. すべての緩衝液は, 還流中にウォーターバスで 37°C に加温しながら用いられ, 送液はペリスタポンプを用いて一定の速度で行われた. 酵素液の還流後, 肝臓を切り出し, 胆嚢を除去した. 回収した肝臓は, 酵素液中に保存した.

(肝臓組織から, HSCs の単離)・・・以下の操作は, クリーンベンチ内で行った. 回収した肝臓を, フェザー社のスカルペル(No.10)を用いて, ガラスディッシュ上で, 酵素液中で細かく細断し, ピペッティングの後に BD 社のセルストレーナー(100 μ m)に通し, 細胞懸濁液を得た. 細胞懸濁液を, (i)室温下, 30 g で 5 分遠心分離し(実質細胞の除去のため), (ii)得られた上清を 4°C 下, 400 g で 10 分遠心分離により HSCs を含むペレットを得た. 得られたペレットを 1% BSA および 0.25% DNase I を含む GBSS(-) (GBSS(+BSA) と称する)で懸濁し, 上記(i)および(ii)の操作を繰り返した. 得られたペレットを(GBSS(+BSA))を用いて 15%に調整した OPTIPREP で再懸濁した. 15 ml ファルコンチューブに

GBSS(+BSA)を 5 ml 入れ、その下に 11.5%OPTIPREP を加え、さらにその下に細胞を懸濁した 15%OPTIPREP を加えた。11.5%OPTIPREP、または細胞を懸濁した 15%OPTIPREP は、ロングパスツールピペット等を使用して、下から静かに注いだ。細胞を含む 15 ml ファルコンチューブを 1400 g, 17 分遠心分離した。HSCs は、11.5%OPTIPREP と GBSS(+BSA)の境界面に HSCs からなる細胞層を得ることができる。HSCs を回収後、もう一度 OPTIPREP による分画操作を行った。ただし、2 度目の分画では 11.5%OPTIPREP の代わりに 10%OPTIPREP を用いた。得られた HSCs は 10%Fetal bovine serum(FBS)を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)(Sigma 社製、カタログ番号 D6046)で再懸濁し、ディッシュに播種し、5% CO₂ 存在下の 37°C インキュベーターで培養した。

6-4. アデノウイルスの調整および感染

アデノウイルスの調整および感染は、P2 レベルの実験室内で行った。

(アデノウイルスの調整)・・・CAG プロモータ下に Cre リコンビナーゼ遺伝子をもつアデノウイルス(AdCre)、またはネオ遺伝子を持つアデノウイルス(AdControl)は大阪市立大学の池田教授より分与して頂いた(Kinoshita, K et al., 2007)。アデノウイルスを 293 細胞に感染させることで増殖させ、Adeno-X Maxi Purification Kit (タカラバイオ Inc., 滋賀, 日本)を用いて製品付属のプロトコールに基づいて精製した。精製後のアデノウイルスの力価は Adeno-X Rapid Titer Kit (タカラバイオ Inc., 滋賀, 日本)を用いて製品付属のプロトコールに基づいて測定した。精製後のアデノウイルスは、1 ml、または 50 μ l に分注し、液体窒素で急速冷凍した後、-80°C にて保存した。分注後の凍結融解は、3 回までとした。アデノウイルスの力価は、以下のとおりであった：AdControl は 2.13×10^9 ifu/ml ; AdCre は 1.625×10^9 ifu/ml。ここで、ifu は、感染ユニット(infection unit)である。

(アデノウイルスの感染)・・・単離後 17~30 日培養後の HSCs を 6 cm ディッシュ(BD ファルコン社製)に $8 \sim 9 \times 10^5$ cells/ディッシュとなるように播種し、5% CO₂ 存在下の 37°C インキュベーターで培養した。播種の翌日、ディッシュから培養液を取り除き、アデノウイ

ウイルスを加えた培養液を、1 ml ずつ、ディッシュに加えた。アデノウイルスは、17, 20 または 25 MOI となるように加え、感染を開始した。ここで MOI は、感染多重度(Multiplicity of Infection)である。ウイルスを含む培養液が細胞全体に行き渡るよう、15 分後、30 分後、および 45 分後に、ディッシュを前後左右に静かにゆすった。感染から 1 時間後、3 ml の培養液を加えた(合計 4 ml)。感染後の HSCs は 136 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で L-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩 n 水和物(アスコルビン酸) (和光純薬株式会社, 大阪, 日本) を添加した培養液で培養した。細胞は、5% CO₂ 存在下の 37°C インキュベーターで培養した。感染から 3 日後、および 6 日後に、培養液の交換を行い、感染から 8 日目にイムノブロットまたはイムノステイニングに供した。

6-5. イムノブロット

アデノウイルス感染後 8 日目の HSCs をトリプシンではがし、24 well プレートに 2×10^5 cells/ディッシュとなるように播種し、136 $\mu\text{g/ml}$ のアスコルビン酸、および 1 ng/ml の TGF- β を添加した培養液で培養した。播種から 4 日後(ウイルス感染から 12 日後)、HSCs の培養液を 20 μM クロロキン(CQ)または 10 mM 3-メチルアデニン(3-MA) (共にシグマアルドリッチ, セントルイス, ミズーリ州, アメリカ合衆国)を含む培養液(アスコルビン酸, TGF- β も含有)に交換し、24 時間培養した。コントロールは培養液の交換のみ行った。24 時間後(ウイルス感染から 13 日後)、培養液を取り除き、PBS で 1 回洗浄し、1 well あたり 140 μl の Lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 5.0 mM EDTA, 1%(v/v) octylphenoxypolyethoxyethanol (NP-40), プロテアーゼ阻害剤(1 $\mu\text{g/ml}$ ロイペプチンおよびペプスタチン A (共にシグマアルドリッチ, セントルイス, ミズーリ州, アメリカ合衆国))を加え、シリコンゴムを用いて細胞を回収した。回収した細胞が固まりになっている場合には、ピペッティングによって、できる限り細胞塊をほぐした。その後、可溶化のため氷上で 20 分間インキュベーションした。その後、4°C 下で 20,000 g, 20 分遠心分離し、上清とペレットに分けた。ペレット画分に 140 μl または 28 μl の Lysis Buffer を加えたのち、上清、ペレット画分それぞれに 5 倍濃縮の Laemli buffer (250 mM Tris-HCl (pH 6.7), 10% SDS, 50% グリセロール, 0.005% ブロムフェノールブルー)および 1 M DTT をそれぞれ 1/5, または 1/10 倍量加えて SDS-PAGE サンプルとした。SDS-PAGE は Laemli

らの方法に従って行った(Laemmli, U.K., 1970). 泳動用のゲルの%は, I 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖の検出には 7%を, CHOP, LC3 の検出には 15%を, それ以外の検出には 10%を用いた. SDS-PAGE 後, タンパク質を PVDF 膜(メルクミリポア CO., ダルムシュタット, ドイツ)に転写した. CHOP, LC3 の検出にはポワサイズ 0.2 μm の PVDF 膜を, それ以外の検出にはポワサイズ 0.45 μm の PVDF 膜をそれぞれ用いた. 転写後の膜をブロッッキングワン(ナカライテスク, 京都, 日本)を用いてブロッッキングし, それぞれ特異的な一次抗体を用いて抗原抗体反応させた. 一次抗体の反応は, 4°Cで一晩, または 37°Cで 1 時間反応させて行った. 抗体の詳細は後に記載する. 二次抗体には HRP 標識された抗体を用いた. 二次抗体の反応は, 37°Cで 1 時間反応させて行った. 検出には ECL western blotting detection reagent または ECL prime western blotting detection reagent (GE ヘルスケアバイオサイエンス, ピスカタウェイ, ニュージャージー州)を用い, シグナルを LAS-3000 system (富士フイルム, 東京, 日本)を使用して検出した.

6-6. RT-PCR と定量的リアルタイム PCR

HSCs からの Total RNA の抽出は RNeasy Mini Kit (キアゲン, ヒルデン, ドイツ)を用いて製品付属のプロトコールに基づいて行った. mRNA から cDNA への逆転写は SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for RT-PCR and qRT-PCR (ライフテクノロジーズ, カールスバッド, カリフォルニア州, アメリカ合衆国)を用いて, 製品付属のプロトコールに基づいて行った. RT-PCR は TAKARA LA taq (タカラバイオ Inc., 滋賀, 日本)を用いて製品付属のプロトコールに基づいて行った. 使用したプライマーの配列は次の通りである.

マウス Hsp47 ;

(フォワード) 5'-AAGATGCAGAAGAAGGCTGTCG -3',

(リバース) 5'-CTGTGACACCCCTGAATTTGGT -3'.

マウス XBP-1 ;

(フォワード) 5'-TGAGAACCAGGAGTTAAGAACACGC -3',

(リバース) 5'-TTCTGGGTAGACCTCTGGGAGTTCC -3'.

定量的リアルタイム RT-PCR はファストスタートユニバーサルプローブマスター(Rox)

(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社, インディアナポリス, インディアナ州, アメリカ合衆国)を用いて製品付属のプロトコールに基づいて行い, 装置は Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System (アプライドバイオシステムズ, フォスター, カリフォルニア州, アメリカ合衆国)を用いた. プライマーとプローブはアッセイデザインセンター(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社, インディアナポリス, インディアナ州, アメリカ合衆国)を利用して設計した.

マウス Hsp47 ;

(フォワード) 5'-GAAGGCTGTCGCCATCTC -3'

(リバース) 5'-TCCTGCCAGATGTTTCTGC -3'

(プローブ) 5'-TGGTGGAG -3'.

コントロールとしてのハウスキーピング遺伝子として β -actin または GAPDH を用いた. β -actin のプライマーとプローブはアッセイデザインセンターを利用して設計した.

マウス β -actin ;

(フォワード) 5'-CTAAGGCCAACCGTGAAAAG -3'

(リバース) 5'-ACCAGAGGCATACAGGGACA -3'

(プローブ) 5'-CCAGGCTG -3'.

GAPDH は UPL ユニバーサルプローブライブラリー, マウス GAPD 遺伝子アッセイ(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社, インディアナポリス, インディアナ州, アメリカ合衆国)を用いて行った.

6-7. イムノステイニング

アデノウイルス感染後 8 日目の HSCs をトリプシンではがし, ポリ L リジンでコートされたカバーガラスを入れた 3.5 cm ディッシュに播種し, 136 μ g/ml のアスコルビン酸添加した培養液で培養した. 播種から 4 日後, 石田らの方法に従って, イムノステイニングを行った(Ishida Y. et al., 2006). 具体的には, 細胞を 0.25%コラゲナーゼタイプ I を用いて 3 分間 37°C で処理(コラゲナーゼ処理)し, 細胞外のコラーゲンを除去した後, 4%パラホルムアルデヒドを用いて 37°C で 20 分間処理し固定した. その後 0.1%Triton X-100 を室温で 5 分間処理することで膜透過処理をした. 細胞外コラーゲン解析の際はコラゲナーゼ処

理と膜透過処理は行わなかった。HSCs はその後ブロッキング液(2%ゴート血清, 20%グリセロール in PBS)を用いて室温で 30 分間, ブロッキング処理をしたのち, 特異的な抗体を用いて免疫染色を行った。その後, Alexafluor 488 標識抗ラビット IgG 抗体または Alexafluor 546 標識抗マウス IgG 抗体を用いて免疫染色を行った。抗体の詳細は後に記載する。一次抗体および二次抗体の希釈は, ブロッキングバッファーを用いて行った。核の対比染色には Hoechst33342 を用いた。画像の取得は LSM-700 顕微鏡(ツァイス, ジェナ, ドイツ)を用いて行った。同一ロット内の画像取得は, 抗体ごとに, 露光時間を一定にして行った。

6-8. カスパーゼ 3 活性の検出

カスパーゼ 3 活性は NucView488 Caspase-3 Assay Kit (Biotium, ヘイワード, カリフォルニア州, アメリカ合衆国)を用いて製品付属のプロトコールに基づいて行われた。カスパーゼ 3 活性のシグナルは BZ-X710 顕微鏡(キーエンス, 大阪, 日本)を用いて取得された。同一ロット内の画像取得は露光時間を一定にして行った。

6-9. 統計処理

イムノブロットおよびカスパーゼ 3 活性シグナルの定量データは平均値を示し, エラーバーは標準誤差を示している。2 グループ間の有意差検定は独立両側スチューデント t 検定により行われた。すべての定量値は少なくとも 3 回の独立した試行から得られた。イムノブロットのシグナルの定量は Multi GaugeVer.3.0 ソフトウェア(富士フィルム, 東京, 日本)により行われた。カスパーゼ 3 活性シグナルの定量は BZ-X 解析ソフト(キーエンス, 大阪, 日本)により行われた。

画像処理は, フォトショップを用いて, 明るさおよびコントラストのみを適宜変更した。抗体の種類に関わらず, 同一ロット内の画像については, 同じ条件で処理を行った。

6-10. 抗体

実験に使用した抗体は以下のとおりである.

(抗体名・・・販売元, カタログナンバー, 使用希釈倍率.)

(イムノプロット)

抗 α -SMA 抗体・・・シグマアルドリッチ, A5228, 1/1000

抗 BiP/Grp78 抗体・・・BD トランスダクションラボラトリーズ, 610979, 1/1000

抗 β -actin 抗体・・・メルクミリポア CO., MAB1501, 1/5000

抗 CHOP 抗体・・・サンタクルツバイオテクノロジー, sc-793, 1/200

抗 I 型コラーゲン抗体・・・メルクミリポア CO., AB-765P, 1/1000

抗 GAPDH 抗体・・・ハイテスト, 5G4MAb6C5, 1/5000

抗 Grp94 抗体・・・ENZO ライフサイエス, ADI-SPA-850, 1/1000

抗 Hsp47 抗体・・・ENZO ライフサイエス, ADI-SPA-470, 1/1000

抗 LC3 抗体・・・MBL, M186-3, 1/1000

抗 p62 抗体・・・MBL, PM045, 1/1000

抗ラビット IgG HRP 標識抗体・・・ライフテクノロジーズ, 65-6120, 1/1000

抗ラット IgG HRP 標識抗体・・・ライフテクノロジーズ, 62-9520, 1/1000

抗マウス IgG HRP 標識抗体・・・ライフテクノロジーズ, 62-6520, 1/3000

(イムノステイニング)

抗 I 型コラーゲン抗体・・・メルクミリポア CO., AB-765P, 1/40

抗 GM-130 抗体・・・BD トランスダクションラボラトリーズ, 610822, 1/200

抗 PDI 抗体・・・ENZO ライフサイエス, ADI-SPA-891, 1/200

抗ラビット IgG Alexa488 標識抗体・・・ライフテクノロジーズ, A11034, 1/300

抗マウス IgG Alexa546 標識抗体・・・ライフテクノロジーズ, A11030, 1/300

7.謝辞

本研究は、京都大学再生医科学研究所、細胞機能調節学分野、ならびに京都産業大学、総合生命科学部の永田和宏教授のもと、多くの方々のご指導とご協力を受け、行うことができたものです。

永田和宏教授には、ディスカッションや研究の遂行を通して、サイエンスの楽しみ方や研究のまとめ方を学ばせて頂きました。Hsp47 の発見から続く、Hsp47 研究の歴史ある永田研究室で、Hsp47 の研究に関われたことは、私の大きな喜びでした。また、実験環境、英語でのセミナー環境を含め、十分な研究環境を整えて頂きまして、心から感謝申し上げます。そして、国際会議への出席、国内学会での発表の機会を与えて頂きまして、感謝いたしております。Collagen Gordon Conference での経験は、大きな財産となっております。また、いかなる時も、格別の理解を示して頂き、暖かく支援を続けてくださいました。最後まで研究を続けることができ、誠に感謝いたしております。

細川暢子准教授には、セミナーなどを通じての論文の読み方や、実験に対する研究者としての基本的な姿勢を教えて頂きました。また、博士論文の提出の際に手続きでお手数をおかけ致しましたが、快く主査を引き受けて頂き、感謝しています。

潮田亮助教には、研究の遂行に際して、様々な場面でディスカッションして頂き、適切な方向へ導いて頂きました。また、研究面だけでなく、精神的な面でも相談に乗って頂き、支えて頂きました。大変感謝いたしております。

大阪市立大学の池田一雄博士には、本研究の重要な実験材料である、アデノウイルスベクターを快くご提供いただきました。深く感謝申し上げます。

本研究の礎にもなった過去の研究を行った永田研究室の諸先輩方、中でも石田義人博士に、感謝致します。また、同時期に Hsp47 の研究を共に行った伊藤進也博士には、研究のディスカッションを始め、日々の生活でも様々な話をさせて頂き、多くの会話を通して充実した研究室生活を送ることができ、大変感謝しております。

寶関淳博士、森戸大介博士、平山尚志郎博士、新木和孝博士、北村朗博士、中村純治博

士をはじめ、永田研究室の多くの先輩方には、実験手技、実験に向かう姿勢、実験の組み立て方、結果の解釈、およびプレゼンテーションの仕方などを学ばせて頂きました。また中村博士には、マウスの実験手技に関しても多くの事柄を御教示頂きました。感謝申し上げます。

山本洋平博士には、オートファジーに関して、実験方法または結果の解釈などを快くアドバイス頂きました。感謝申し上げます。

同期の杉浦仁美博士、萩原誠智博士、真砂有作博士には、様々な面において忌憚なく議論させて頂き、感謝いたしております。また、真砂博士には研究面でもディスカッションさせて頂き感謝しております。

秘書の石田玉美さん、研究補助員の福田泰子さんを含め、多くのラボの皆さんにも日ごろから色々とお世話になりました。深く感謝致します。

最後に、精神的にも経済的にも長い間、支えてくれた家族に心から感謝致します。

8.引用文献

Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223-230

Bächinger, H.P., Bruckner, P., Timpl, R., Prockop, D.J., Engel, J. (1980) Folding mechanism of the triple helix in type-III collagen and type-III pN-collagen. Role of disulfide bridges and peptide bond isomerization. *Eur. J. Biochem.* 106, 619-632

Benyair, R., Ron, E., Lederkremer, G.Z. (2011) Protein quality control, retention, and degradation at the endoplasmic reticulum. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 292, 197-280

Bukau, B., Weissman, J., Horwich, A. (2006) Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 125, 443-451

Chen, Y., and Dorn, G.W. (2013) PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science* 340, 471-475

Chessler, S. D., and Byers, P. H. (1993) BiP binds type I procollagen pro alpha chains with mutations in the carboxyl-terminal propeptide synthesized by cells from patients with osteogenesis imperfecta. *J. Biol. Chem.* 268, 18226-18233

Cox, J. S., Shamu, C. E., and Walter, P. (1993) Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* 73, 1197-1206

Dombrowski, K.E., and Prockop, D.J. (1988) Cleavage of type I and type II procollagens by type I/II procollagen N-proteinase. Correlation of kinetic constants with the predicted conformations of procollagen substrates. *J. Biol. Chem.* 263, 16545-16552

Engel J, Prockop DJ. (1991) The zipper-like folding of collagen triple helices and the effects of mutations that disrupt the zipper. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 20, 137-152

Ferreira, L. R., Norris, K., Smith, T., Hebert, C., and Sauk, J. J. (1994) Association of Hsp47, Grp78, and Grp94 with procollagen supports the successive or coupled action of molecular chaperones. *J. Cell. Biochem.* 56, 518-526

Fitzgerald, J., Lamande, S. R., and Bateman, J. F. (1999) Proteasomal degradation of unassembled mutant type I collagen pro- $\alpha 1(I)$ chains. *J. Biol. Chem.* 274, 27392-27398

Friedman, S. L. (2008-1) Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 134, 1655-1669

Friedman, S. L. (2008-2) Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol. Rev.* 88, 125-172

Goodsell, D.S. (1991) Inside a living cell. *Trends. Biochem. Sci.* 16, 203-206

Gotoh, T., and Mori, M. (2006) Nitric oxide and endoplasmic reticulum stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1439-1446

Harding, H. P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397, 271-274

Hartl, F.U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-579

Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-1858

Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1999) Mammalian

transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* 10, 3787-3799

Hernandez-Gea, V., Ghiassi-Nejad, Z., Rozenfeld, R., Gordon, R., Fiel, M. I., Yue, Z., Czaja, M. J., and Friedman, S. L. (2012) Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. *Gastroenterology* 142, 938-946

Honzawa, Y., Nakase, H., Shiokawa, M., Yoshino, T., Imaeda, H., Matsuura, M., Kodama, Y., Ikeuchi, H., Andoh, A., Sakai, Y., Nagata, K., and Chiba, T. (2014) Involvement of interleukin-17A-induced expression of heat shock protein 47 in intestinal fibrosis in Crohn's disease. *Gut* 63, 1902-1912

Hubert, T., Grimal, S., Carroll, P., Fichard-Carroll, A. (2009) Collagens in the developing and diseased nervous system. *Cell Mol. Life Sci.* 66, 1223-1238

Hulmes, D.J. (2002) Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. *J. Struct. Biol.* 137, 2-10

Ishida, Y., Kubota, H., Yamamoto, A., Kitamura, A., Bachinger, H. P., and Nagata, K. (2006) Type I collagen in Hsp47-null cells is aggregated in endoplasmic reticulum and deficient in Npropeptide processing and fibrillogenesis. *Mol. Biol. Cell* 17, 2346-2355

Ishida, Y., Yamamoto, A., Kitamura, A., Lamande, S. R., Yoshimori, T., Bateman, J. F., Kubota, H., and Nagata, K. (2009) Autophagic elimination of misfolded procollagen aggregates in the endoplasmic reticulum as a means of cell protection. *Mol. Biol. Cell* 20, 2744-2754

Ishikawa, Y., Wirz, J., Vranka, J. A., Nagata, K., and Bachinger, H. P. (2009) Biochemical characterization of the prolyl 3-hydroxylase 1.cartilage-associated

protein.cyclophilin B complex. *J. Biol. Chem.* 284, 17641-17647

Ishiwatari, H., Sato, Y., Murase, K., Yoneda, A., Fujita, R., Nishita, H., Birukawa, N. K., Hayashi, T., Sato, T., Miyanishi, K., Takimoto, R., Kobune, M., Ota, S., Kimura, Y., Hirata, K., Kato, J., and Niitsu, Y. (2013) Treatment of pancreatic fibrosis with siRNA against a collagenspecific chaperone in vitamin A-coupled liposomes. *Gut* 62, 1328-1339

Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19, 5720-5728

Kisseleva, T., Cong, M., Paik, Y., Scholten, D., Jiang, C., Benner, C., Iwaisako, K., Moore-Morris, T., Scott, B., Tsukamoto, H., Evans, S. M., Dillmann, W., Glass, C. K., and Brenner, D. A. (2012) Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 9448-9453

Kim, S.I., Na, H.J., Ding, Y., Wang, Z., Lee, S.J., Choi, M.E.. (2012) Autophagy promotes intracellular degradation of type I collagen induced by transforming growth factor (TGF)- β 1. *J. Biol. Chem.* 287, 11677-11688

Kinoshita, K., Iimuro, Y., Fujimoto, J., Inagaki, Y., Namikawa, K., Kiyama, H., Nakajima, Y., Otagawa, K., Kawada, N., Friedman, S. L., and Ikeda, K. (2007) Targeted and regulable expression of transgenes in hepatic stellate cells and myofibroblasts in culture and in vivo using an adenoviral Cre/loxP system to antagonise hepatic fibrosis. *Gut* 56, 396-404

Kitamura, H., Yamamoto, S., Nakase, H., Matsuura, M., Honzawa, Y., Matsumura, K., Takeda, Y., Uza, N., Nagata, K., and Chiba, T. (2011) Role of heat shock protein 47 in intestinal fibrosis of experimental colitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404, 599-604

Klionsky, D.J., Abdalla, F.C., Abeliovich, H., Abraham, R.T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme, L., Agnello, M., Agostinis, P., et al., (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445-544

Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, J., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K., Chiba, T. (2005) Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J. Cell Biol.* 169, 425-434

Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., Kimura, Y., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Hirokawa, T., Endo, T., Fon, E.A., Trempe, J.F., Saeki, Y., Tanaka, K., Matsuda, N. (2014) Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* 510, 162-166

Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhisa, T., Mizushima, N. (2004) The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432, 1032-1036

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

Lamande, S. R., and Bateman, J. F. (1993) A type I collagen reporter gene construct for protein engineering studies. Functional equivalence of transfected reporter COL1A1 and endogenous gene products during biosynthesis and in vitro extracellular matrix accumulation. *Biochem. J.* 293 (Pt 2), 387-394

Lamande, S. R., Chessler, S. D., Golub, S. B., Byers, P. H., Chan, D., Cole, W. G., Sillence, D. O., and Bateman, J. F. (1995) Endoplasmic reticulum-mediated quality control of type I collagen production by cells from osteogenesis imperfecta patients with

mutations in the pro alpha 1 (I) chain carboxyl-terminal propeptide which impair subunit assembly. *J. Biol. Chem.* 270, 8642-8649

Li, S.W., Sieron, A.L., Fertala, A., Hojima, Y., Arnold, W.V., Prockop, D.J. (1996) The C-proteinase that processes procollagens to fibrillar collagens is identical to the protein previously identified as bone morphogenic protein-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5127-5130

Marquez-Aguirre, A., Sandoval-Rodriguez, A., Gonzalez-Cuevas, J., Bueno-Topete, M., Navarro-Partida, J., Arellano-Olivera, I., Lucano-Landeros, S., Armendariz-Borunda, J. (2009) Adenoviral delivery of dominant-negative transforming growth factor beta type II receptor up-regulates transcriptional repressor SKI-like oncogene, decreases matrix metalloproteinase 2 in hepatic stellate cell and prevents liver fibrosis in rats. *J. Gene Med.* 11, 207-219

Marutani, T., Yamamoto, A., Nagai, N., Kubota, H., and Nagata, K. (2004) Accumulation of type IV collagen in dilated ER leads to apoptosis in Hsp47-knockout mouse embryos via induction of CHOP. *J. Cell Sci.* 117, 5913-5922

Masago, Y., Hosoya, A., Kawasaki, K., Kawano, S., Nasu, A., Toguchida, J., Fujita, K., Nakamura, H., Kondoh, G., and Nagata, K. (2012) The molecular chaperone Hsp47 is essential for cartilage and endochondral bone formation. *J. Cell Sci.* 125, 1118-1128

Masuda, H., Fukumoto, M., Hirayoshi, K., and Nagata, K. (1994) Coexpression of the collagen-binding stress protein HSP47 gene and the alpha 1(I) and alpha 1(III) collagen genes in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *J. Clin. Invest.* 94, 2481-2488

Matsuoka, Y., Kubota, H., Adachi, E., Nagai, N., Marutani, T., Hosokawa, N., and Nagata, K. (2004) Insufficient folding of type IV collagen and formation of abnormal basement membranelike structure in embryoid bodies derived from Hsp47-null

embryonic stem cells. *Mol. Biol. Cell* 15, 4467-4475

Mehtani, S., Gong, Q., Panella, J., Subbiah, S., Peffley, D. M., and Frankfater, A. (1998) In vivo expression of an alternatively spliced human tumor message that encodes a truncated form of cathepsin B. Subcellular distribution of the truncated enzyme in COS cells. *J. Biol. Chem.* 273, 13236-13244

Mizushima, N., and Komatsu, M. (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147, 728-741

Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., Klionsky, D.J. (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069-1075

Mizushima, N., Ohsumi, Y., Yoshimori, T. (2002) Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct. Funct.* 27, 421-429

Mori, K., Ma, W., Gething, M. J., and Sambrook, J. (1993) A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell* 74, 743-756

Nagai, N., Hosokawa, M., Itohara, S., Adachi, E., Matsushita, T., Hosokawa, N., and Nagata, K. (2000) Embryonic lethality of molecular chaperone hsp47 knockout mice is associated with defects in collagen biosynthesis. *J. Cell Biol.* 150, 1499-1506

Nagata, K. (1996) Hsp47: a collagen-specific molecular chaperone. *Trends Biochem. Sci.* 21, 22-26

Nagata, K. (2003) HSP47 as a collagen-specific molecular chaperone: function and expression in normal mouse development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 14, 275-282

- Nagata, K., Saga, S., and Yamada, K. M. (1986) A major collagen-binding protein of chick embryo fibroblasts is a novel heat shock protein. *J. Cell Biol.* 103, 223-229
- Nakai, A., Satoh, M., Hirayoshi, K., and Nagata, K. (1992) Involvement of the stress protein HSP47 in procollagen processing in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 117, 903-914
- Naitoh, M., Hosokawa, N., Kubota, H., Tanaka, T., Shirane, H., Sawada, M., Nishimura, Y., and Nagata, K. (2001) Upregulation of HSP47 and collagen type III in the dermal fibrotic disease, keloid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 1316-1322
- Perez, F., Pernet-Gallay, K., Nizak, C., Goodson, H. V., Kreis, T. E., and Goud, B. (2002) CLIPR-59, a new trans-Golgi/TGN cytoplasmic linker protein belonging to the CLIP-170 family. *J. Cell Biol.* 156, 631-642
- Prockop, D.J., and Kivirikko, K.I. (1995) Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 403-434
- Radaeva, S., Wang, L., Radaev, S., Jeong, W. I., Park, O., and Gao, B. (2007) Retinoic acid signaling sensitizes hepatic stellate cells to NK cell killing via upregulation of NK cell activating ligand RAE1. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293, G809-816
- Saga, S., Nagata, K., Chen, W. T., and Yamada, K. M. (1987) pH-dependent function, purification, and intracellular location of a major collagen-binding glycoprotein. *J. Cell Biol.* 105, 517-527
- Sato, Y., Murase, K., Kato, J., Kobune, M., Sato, T., Kawano, Y., Takimoto, R., Takada, K., Miyanishi, K., Matsunaga, T., Takayama, T., and Niitsu, Y. (2008) Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. *Nat. Biotechnol.* 26, 431-442

Satoh, M., Hirayoshi, K., Yokota, S., Hosokawa, N., Nagata, K. (1996) Intracellular interaction of collagen-specific stress protein HSP47 with newly synthesized procollagen. *J. Cell Biol.* 133, 469-483

Seglen, P. O., and Gordon, P. B. (1982) 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 1889-1892

Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., Czaja, M.J. (2009) Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458, 1131-1135

Smith, T., Ferreira, L. R., Hebert, C., Norris, K., and Sauk, J. J. (1995) Hsp47 and cyclophilin B traverse the endoplasmic reticulum with procollagen into pre-Golgi intermediate vesicles. A role for Hsp47 and cyclophilin B in the export of procollagen from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 270, 18323-18328

Steinman, R. M., Mellman, I. S., Muller, W. A., and Cohn, Z. A. (1983) Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J. Cell Biol.* 96, 1-27

Sunamoto, M., Kuze, K., Tsuji, H., Ohishi, N., Yagi, K., Nagata, K., Kita, T., and Doi, T. (1998) Antisense oligonucleotides against collagen-binding stress protein HSP47 suppress collagen accumulation in experimental glomerulonephritis. *Lab. Invest.* 78, 967-972

Takamura, A., Komatsu, M., Hara, T., Sakamoto, A., Kishi, C., Waguri, S., Eishi, Y., Hino, O., Tanaka, K., Mizushima, N. (2011) Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev.* 25, 795-800

Tanida, I. (2011) Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy.

Antioxid Redox Signal 14, 2201-2214

Tasab, M., Batten, M. R., and Bulleid, N. J. (2000) Hsp47: a molecular chaperone that interacts with and stabilizes correctly-folded procollagen. *EMBO J.* 19, 2204-2211

Thoen, L. F., Guimaraes, E. L., Dolle, L., Mannaerts, I., Najimi, M., Sokal, E., and van Grunsven, L. A. (2011) A role for autophagy during hepatic stellate cell activation. *J. Hepatol.* 55, 1353-1360

van der Rest, M., and Garrone, R. (1991) Collagen family of proteins. *FASEB J.* 5, 2814-2823

Vranka, J. A., Sakai, L. Y., and Bachinger, H. P. (2004) Prolyl 3-hydroxylase 1, enzyme characterization and identification of a novel family of enzymes. *J. Biol. Chem.* 279, 23615-23621

Vuorio, E., and de Crombrughe, B. (1990) The family of collagen genes. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 837-872

Wake, K. (1980) Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. *Int. Rev. Cytol.* 66, 303-353

Walmsley, A. R., Batten, M. R., Lad, U., and Bulleid, N. J. (1999) Intracellular retention of procollagen within the endoplasmic reticulum is mediated by prolyl 4-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 274, 14884-14892

Walter, P., and Ron, D. (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334, 1081-1086

Widmer, C., Gebauer, J. M., Brunstein, E., Rosenbaum, S., Zaucke, F., Drögemüller, C., Leeb, T. & Baumann, U. (2012) Molecular basis for the action of the collagen-specific chaperone Hsp47/SERPINH1 and its structure-specific client recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 13243-7

Wilson, R., Lees, J. F., and Bulleid, N. J. (1998) Protein disulfide isomerase acts as a molecular chaperone during the assembly of procollagen. *J. Biol. Chem.* 273, 9637-9643

Yata, Y., Gotwals, P., Kotliansky, V., Rockey, D.C. (2002) Dose-dependent inhibition of hepatic fibrosis in mice by a TGF- β soluble receptor: implications for antifibrotic therapy. *Hepatology* 35, 1022-1030

野田 晴彦：コラーゲンの生合成，蛋白質核酸酵素. 12, pp238-240, 共立出版，東京，1967