

New Insights in Molecular Mechanism  
under Progression of Liver Fibrosis

March 2014

Kotaro Sakata

# 主 論 文 要 旨

報告番号	㊦ 乙 第	号	氏 名	坂田 幸太郎
主 論 文 題 目： New Insights in Molecular Mechanism under Progression of Liver Fibrosis (肝線維症進展の新しい分子機構解明)				
(内容の要旨) 肝線維症は、コラーゲンをはじめとする細胞外基質の過剰な蓄積により引き起こされ、肝硬変や肝臓へと進展する病態である。C型肝炎ウイルス (HCV) の感染や血管新生は肝線維症を促進することが知られているが、その分子機構については不明な点が残されている。そこで本研究では、線維化誘導サイトカインである TGF- $\beta$ に着目し、肝線維症進展の新しい分子機構について解析を行った。				
<b>(1) HCV NS3 プロテアーゼの TGF-<math>\beta</math> I 型受容体結合・活性化を介した肝線維化促進機構</b> 近年、ウイルスが宿主タンパク質を模倣し、細胞機能をハイジャックする現象が報告されている。本研究では、HCV の非構造タンパク質の一つである NS3 プロテアーゼが TGF- $\beta$ 2 の抗原性ならびに生物活性を有していることの発見に端を発し、NS3 の TGF- $\beta$ 疑似活性が肝線維化を促進しているのではないかという作業仮説を立て、検証を行った。TGF- $\beta$ 応答性リンフェラーゼ発現細胞において、組換え NS3 タンパク質は TGF- $\beta$ I 型受容体を介して TGF- $\beta$ 疑似活性を発現した。また C 型肝炎患者において高い血中濃度を示す腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) が TGF- $\beta$ I 型受容体の発現を亢進することにより、肝細胞における NS3 感受性が誘導された。続いて HCV 感染肝臓細胞株において、ウイルス由来の NS3 が細胞表面において TGF- $\beta$ I 型受容体と相互作用することを示した。さらに、NS3 と TGF- $\beta$ I 型受容体のドッキングシミュレーションを行い、予測結合サイトに対する抗 NS3 抗体を作製し、同抗体が HCV 感染ヒト肝臓細胞移植キメラマウスにおける肝線維化進展を抑制することを示した。これらの結果より、HCV NS3 プロテアーゼは TGF- $\beta$ を模倣し、その I 型受容体と結合して下流のシグナルを活性化させ、肝線維症の進展に寄与していることが示唆された。				
<b>(2) 新生血管由来潜在型 TGF-<math>\beta</math>を介した肝線維化促進機構</b> 肝疾患の進展過程においては線維化と血管新生が並行して起こる。マウスに VEGF を投与し血管新生を誘発させたところ、内皮細胞の指標である CD31 の発現亢進に加えてコラーゲンを多量に産生する活性型肝星細胞の指標である $\alpha$ -SMA の発現亢進、コラーゲンを構成する特徴的アミノ酸であるヒドロキシプロリン含量が増加した。活性化していない初代培養肝星細胞 (HSCs) に VEGF を処理しても $\alpha$ -SMA は亢進しなかったが、初代培養肝臓内皮細胞 (LSECs) の培養上清を HSCs に処理すると、 $\alpha$ -SMA の発現が亢進し、その効果は TGF- $\beta$ 1 中和抗体により抑制された。さらに LSECs の培養上清中には潜在型の TGF- $\beta$ が多量に含まれており、それらが HSCs の細胞表面において活性化され多量の活性型 TGF- $\beta$ を生じることを見出した。これらの結果より、新生血管は潜在型 TGF- $\beta$ を供給することにより、肝線維症促進に寄与していることが示唆された。				

## SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

School Science and Technology	Student Identification Number	SURNAME, First name SAKATA, Kotaro
Title New Insights in Molecular Mechanism under Progression of Liver Fibrosis		
<p>Abstract</p> <p>Liver fibrosis is caused by excessive accumulation of extracellular matrix proteins such as collagen. Advanced liver fibrosis leads to cirrhosis, liver failure, and hepatocellular carcinoma. Hepatitis C virus (HCV) infection and angiogenesis are causes of liver fibrosis, although the underlying mechanisms remain to be elucidated. In this thesis, the author documented the molecular mechanism, by which HCV infection and angiogenesis enhanced liver fibrosis, by focusing on transforming growth factor (TGF)-<math>\beta</math>, the most fibrogenic cytokine.</p> <p><b>(1) HCV NS3 protease enhances liver fibrosis via binding to and activating TGF-<math>\beta</math> type I receptor</b></p> <p>Viruses sometimes mimic host proteins and hijack the host cell machinery. In this chapter, starting from the discovery that HCV non-structural protein 3 (NS3) protease possesses the antigenicity and bioactivity of TGF-<math>\beta</math>2, the author explored the working hypothesis that NS3 protease promoted liver fibrosis via TGF-<math>\beta</math> mimetic activity. Recombinant NS3 protease showed the antigenicity in TGF-<math>\beta</math>2 ELISA. It exerted bioactivity of TGF-<math>\beta</math>2 in (CAGA)<sub>9</sub>-Luc CCL64 cells as well as in human hepatic cell lines via binding to TGF-<math>\beta</math> type I receptor (T<math>\beta</math>RI). Tumor necrosis factor (TNF)-<math>\alpha</math> facilitated this mechanism by stimulating the expression of T<math>\beta</math>RI thus facilitating interaction with NS3 protease on the surface of HCV-infected cells. An anti-NS3 antibody made against computationally predicted binding sites for T<math>\beta</math>RI blocked the TGF-<math>\beta</math> mimetic activities of NS3 in vitro and attenuated liver fibrosis in HCV-infected chimeric mice. These data suggest that HCV NS3 protease mimics TGF-<math>\beta</math>2 and functions, at least in part, via directly binding to and activating T<math>\beta</math>RI, thereby enhancing liver fibrosis.</p> <p><b>(2) Neovessel formation enhances liver fibrosis via providing with latent TGF-<math>\beta</math> to HSCs</b></p> <p>Hepatic fibrosis and angiogenesis occur in parallel during the progression of liver diseases. In addition to increased hepatic levels of CD31, a marker of endothelial cells, vascular endothelial growth factor (VEGF)-treated mice showed increased hepatic levels of <math>\alpha</math>-smooth muscle actin (<math>\alpha</math>-SMA), a marker of activated hepatic stellate cells (HSCs), and hepatic hydroxyproline contents. Although cultured HSCs did not show an increase in <math>\alpha</math>-SMA expression when incubated with VEGF, then expressed increased levels of <math>\alpha</math>-SMA when incubated with conditioned medium (CM) from liver sinusoidal endothelial cells (LSECs), which was blocked by the inclusion of neutralizing anti-TGF-<math>\beta</math>1 antibodies. Indeed, LSEC CM included a huge amount of latent TGF-<math>\beta</math>, which was activated on the surface of HSCs. These data suggest that angiogenesis may accelerate liver fibrosis via providing with latent TGF-<math>\beta</math> from increased number of LSECs.</p>		