

トランスジェニックマウスを用いた
Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1)の
肝線維化過程における役割の解析

奈良県立医科大学第3内科学教室

宮本 洋二

THE ROLE OF TISSUE INHIBITOR OF METALLOPROTEINASE (TIMP-1)
ON LIVER FIBROGENESIS IN A TRANSGENIC MOUSE MODEL

YOJI MIYAMOTO

Third Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received August 18, 2000

Abstract: Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) has been shown to be increased in liver fibrosis development, however, the direct role of TIMP-1 has not been defined. To elucidate the role of TIMP-1 in liver fibrogenesis, we developed liver-targeted TIMP-1 transgenic mice under the control of albumin promoter/enhancer. A model of CCl₄-induced hepatic fibrosis was used to assess the extent of fibrosis development in TIMP-1 transgenic (TIMP-Tg) mice and control hybrid (Cont) mice. Without any treatment, overexpression of TIMP-1 in the liver did not induce liver fibrosis. After four-week treatment with CCl₄, however, TIMP-Tg-mice revealed a seven-fold increase in liver fibrosis compared to the Cont-mice by densitometric analysis. The hepatic collagen and hydroxyproline content and serum fibrosis markers, such as 7S-collagen, P-III-N-P, were also significantly increased in the TIMP-Tg-mice. Furthermore, immunohistochemical analysis showed that collagen-I and collagen-IV accumulations were markedly increased along the sinusoidal lining in the liver of the TIMP-Tg-mice with a pattern similar to that of α -smooth muscle actin (α -SMA) positive cells. Activated hepatic stellate cells (HSC) from TIMP-Tg-mice displayed markedly increased RNA expression of pro-collagen-I and collagen-IV in response to exogenous recombinant TIMP-1 (rTIMP-1). These results suggest that TIMP-1 does not by itself result in liver fibrogenesis, but strongly promotes liver fibrosis development through HSC stimulation.

(奈医誌. J. Nara Med. Ass. 50, 354~368, 2000)

Key words : TIMP-1, transgenic mouse, liver fibrosis, MMP

緒 言

肝においては、門脈域内や肝静脈内膜下に生理的に少量の線維性組織が存在し、肝小葉内でも、肝細胞周囲で類洞内皮下に細網線維が存在している。また肝内の胆管

系にも固有の線維性組織が分布しており、これらの線維性組織は、肝全体および肝内構成成分の形態維持および生理機能に重要な役割を果たしていると考えられる¹⁾。肝線維化あるいは線維症は、これら生理的バランスに破綻が生じて肝内に過剰なあるいは異常な膠原線維が沈着

し、病態を形成していく現象である²⁾。一方で、肝線維化は壊死により脱落した肝組織を修復する際に生じる代償反応でもあり、欠損した空間を細胞外マトリックスで補うとともに、毛細血管の増生を介して残存した肝構成細胞を養い、これらが増殖するための基盤を提供していると考えられている。従って肝障害の修復過程では肝線維化は必須の随伴現象であり、壊死および炎症が終息すると細胞外マトリックスは吸収され、肝類洞が再構築される。しかし慢性肝炎などのように肝障害が持続する病態では、肝線維化は不可逆的に進行すると考えられる。その場合は、肝類洞壁の改築から血流障害が惹起され、門脈圧亢進症をきたすとともに、最終的に肝不全につながる²⁾。即ち、肝線維化過程においては細胞外マトリックス(ECM)の増加が特徴であり、細胞外マトリックスの合成と分解の不均衡の結果、線維化が生じると考えられている³⁻⁷⁾。近年、肝線維化のメカニズムの解析が進むにつれ、細胞外マトリックス分解酵素である Matrix metalloproteinase(MMP)とその阻害酵素である Tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP)のバランスの破綻がECM再構成や肝線維化に重要な役割をはたすことが報告されている³⁻⁷⁾。細胞外マトリックス分解酵素は、その分解酵素である collagenase 群, gelatinase 群, stromelysin 群およびその他の4群に分類されるが、それらを総称して MMP と呼ぶ²³⁾。一方、MMPのインヒビターである TIMP は MMP と化学量論的に1対1で非共有結合してその活性化を特異的に阻害する。TIMPには現在のところ TIMP-1 から TIMP-4 までの4つのアイソフォームが知られている。肝ではこれまでのところ、TIMP-1 と TIMP-2 の存在が知られているが、TIMP-1 は量的にも多く、肝における病態形成にはより重要な働きをするとされている⁸⁻¹⁰⁾。TIMP-1 は、実験的肝線維化モデルならびにヒト標本において肝線維化の進展に伴いその発現が増強することがこれまでに報告されている¹¹⁻²¹⁾。また血中 TIMP-1 レベルが肝線維化の程度と相関することも示され、TIMP-1 が肝線維化マーカーとなり得る可能性も示唆されている^{12,13)}。さらに、実験的肝線維化モデルにおける線維化の改善過程において、TIMP-1 の発現が著明に減少することも明らかにされている¹⁹⁾。以上のように、TIMP-1 が肝線維化過程において重要な役割を果たしていることが示唆されてきたものの、これまで肝線維化過程における TIMP-1 の直接的な役割については十分な検討がなされていない。

今回我々は、アルブミンプロモーター制御下に肝において特異的に TIMP-1 を発現するトランスジェニック(TIMP-Tg)マウスを確立し、このマウスを用いて、四塩

化炭素(CCl₄)投与肝線維化過程に及ぼす TIMP-1 の直接的役割を検討するとともに、TIMP-1 トランスジェニックマウスでの活性化肝星細胞における、TIMP-1 のコラーゲン合成への影響について検討した。

実験方法

1) TIMP-Tg マウスの作成

アルブミンプロモーター・エンハンサー制御下に hTIMP-1 を肝特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製した。Fig. 1A に今回のトランスジェニックマウスの導入遺伝子構造を示す。今回導入した TIMP-1 は cDNA であるので、その発現をより安定させるため β -globin intron, SV-40 poly A region を挿入している。全長 3.7 Kb の発現遺伝子を定法に従って、(C57BL/6/CBA)ハイブリッドマウスの胚に注入した²⁴⁻²⁶⁾。トランスジェニックマウスの確認は偽妊娠母より生まれた全てのマウスの尾の一部を切断後、genomic DNA を抽出し、導入遺伝子の特異的配列部分をプローブとして Southern Blot 法により行った。Messenger RNA(mRNA)発現については各臓器より mRNA を抽出して Northern Blot により同様のプローブを用いて検討した。hTIMP-1 の蛋白発現は ELISA kit(Amercham Pharmacia Biotech, NJ, USA)により測定した。対照マウスには、TIMP-1 トランスジェニックマウスと同様の遺伝的背景をもつ F1 ハイブリッドマウス(C57BL6/CBA)を用いた²⁶⁻²⁸⁾。

2) 実験的肝線維症の作成

各々7匹の6週齢オス TIMP-Tg マウスおよび対照マウスに、CCl₄(2 ml/kg/BW)を週2回の割合で腹腔内に投与し、4週後にマウスを屠殺し比較検討した。

3) 肝線維化の解析

i) 組織、免疫組織学的検討

ホルマリン固定後、パラフィン包埋した肝の5ミクロン厚の標本切片に、ヘマトキシリン-エオジン(HE)染色、アザン・マロリ(A-M)染色を行ない、Fuji-BAS2000 イメージアナライザーによる肝線維化の定量解析を行った。また、連続切片を用いて、細胞外マトリックスの構成主要成分であるコラーゲン I, IV ならびに活性化肝星細胞の指標である α -平滑筋アクチン(α -SMA)の免疫組織染色を行い比較検討した。さらに、これらの染色域についても、定量解析を加えた。

ii) 血中マーカー

TIMP-Tg マウスと対照マウスの血清において総ビリルビン、アルブミン、ALT、AST、TBA を測定し比較検討を行った。さらに肝線維化を反映する血清マーカー

ーである7S-コラーゲン, P-III-N-P, ヒアルロン酸についても測定, 検討を行った.

iii) 肝内ハイドロキシプロリン, コラーゲン

肝内ハイドロキシプロリンの測定はKivirikkoの変法によって行った²⁹⁾. 20 mgの肝凍結切片を1.2 kgf/cm²の圧のもと, オートクレーブを用いて110°Cで24時間, 6M-HClにてhydrolyzeした後, 4°C, 5分間, 2000 rpmにて遠心分離を行った. 2 mlの上清を50 mlの1% phenolphthaleinと混合し, 8N-KOHを加え, pH 7-8の総量を5 mlとする溶液2 mlに2 gのKClと0.5 M-bovate buffer(pH 8.2)1 mlを加え, 室温で15分間, さらに0°Cで15分間攪拌した. その後0.5 M-chloramineT溶液を加え, 再び0°Cで60分間攪拌した後, 2 mlの3.0 M-sodium thiosulfateを加え, 120°Cで30分間 incubationを行い, 3 mlのtolueneを加えて20分間

攪拌した. それらを4°C, 2000 rpmで遠心分離し, 2 mlの上清に0.8 mlのEhrich's solutionを加え, 30分間室温に放置した後, 560 nmにて吸光度を測定した.

肝内コラーゲン量は, 肝組織を4°Cで0.5 M-acetic acidにてhomogenizeし, そのhomogenateを2分間, freeze-thawing, sonicationにより分解した. acid extractionの後, クロスリンクしたコラーゲンからなる不溶性コラーゲンの成分を可溶性gelatinに変化させるため, 80°Cで60分間加熱した. これらをSircol collagen assay kit(Bicolor, Belfast, Northern Ireland)を用いて測定した.

4) 肝線維化過程におけるMMP, TIMP-1の変動の解析

TIMP-Tg群, 対照群の各6匹のマウスより採取した肝標本のプールにてMMP-2, MMP-9, およびTIMP-

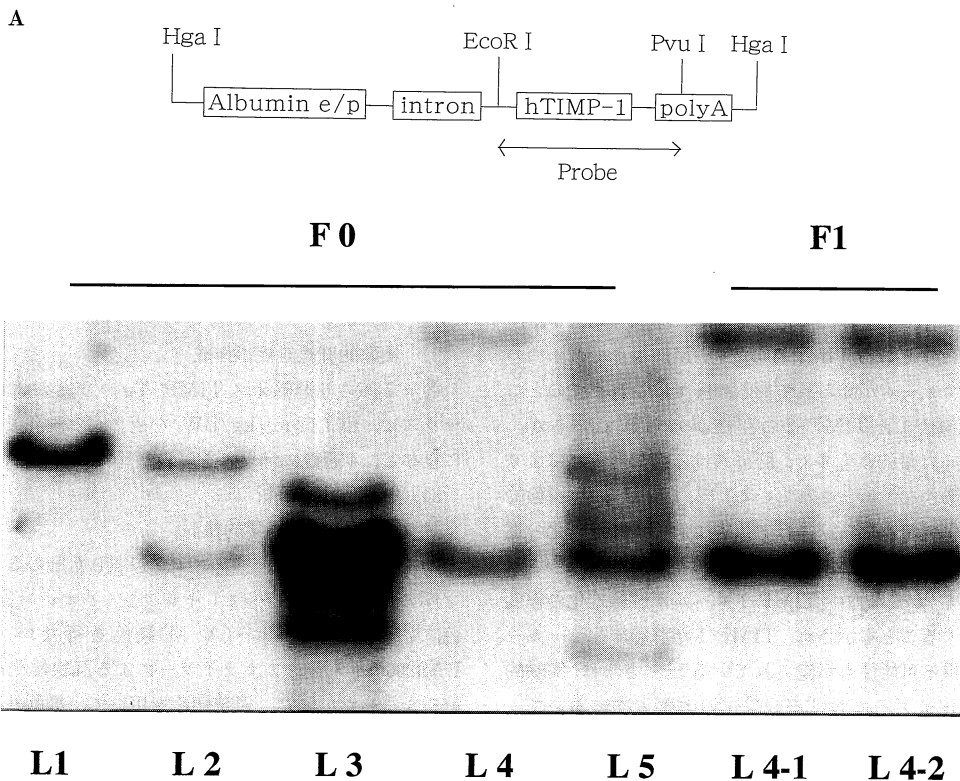


Fig. 1. (A) Schematic representation of the 3.7 Kb albumin enhancer/promoter driven transgene construct. The construct was released from the expression vector by restriction digestion with Hga I. The EcoR I and Pvu-I restriction-sites are shown and denote the extent of the 930 bp fragment used as the transgene probe. e/p: enhancer/promoter (B) Integration of transgene into genomic DNA in five separate founders (F0) and transmission to two F1 generation mice. L1-5: founder line number 1-5.

1 の測定を行った。これら MMP 量の測定は BIOTRAK 社製 ELISA キットを使用し行った。TIMP-1 活性の測定は、MMP 阻害活性を指標として、reverse zymography にて行った^{30,31)}。

5) 活性化肝星細胞に対する TIMP の影響の解析

活性化肝星細胞は CCl₄ 処置をおこなった TIMP-Tg マウスおよび対照マウスの肝より、pronase/ collagenase perfusion によって採取し、density centrifugation によって分離した³²⁾。肝星細胞の活性化は Western blot analysis による α -SMA の発現により確認した。細胞は 35 mm plastic dish 上で、10 % fetal bovine 血清加 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用いて培養した後、500 ng/ml の recombinant hTIMP-1 (rTIMP-1) を添加して、さらに 24 時間培養し、プロ(α 1)コラーゲン I、(α 2)コラーゲン IV の遺伝子特異的プライマーを用いた半定量的 RT-PCR によりコラーゲン産生の解析を行った。さらに、TIMP-Tg マウスおよび対照マウスの肝星細胞におけるそれぞれの遺伝子産物の生成量を Fuji-BAS2000 image analysing system を用いて、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内因性コントロールとして半定量した。

6) 統計処理

統計学的検討として 2 群間の検定は Student-t、多群間の検定には Mann-Whitney 検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありをした。

結 果

1) トランジェニックマウスの樹立

Fig. 1A に示した導入遺伝子を定法に従いマウス胚に注入し、5 系統の founder マウスを得た。(Fig. 1B) これらのうち最も RNA の発現が高かった L4 系について主要臓器における発現を検討したところ、TIMP-1 を含む導入遺伝子は主要臓器のうち肝臓においてのみ強い RNA 発現を認めた (Fig. 2)。導入遺伝子の最終産物である TIMP-1 の蛋白量について ELISA にて検討したところ、生後 1 年半に至るまで肝内、循環血漿中に極めて高いレベルの蛋白産生を認めた。hTIMP-1 の肝における濃度は、6 週齢で 623.2 ± 120.4 ng/ml、30 週齢で 684.6 ± 145.4 ng/ml (血中レベルは 6 週齢で 486.6 ± 134.7 mg/ml、30 週齢で 548.8 ± 163.6 ng/ml) であった (Fig. 3A)。肝における TIMP-1 の生物学的活性を reverse zymography により測定したところ、TIMP-Tg マウスでは、対照マウスと比較して 3.4 倍の TIMP-1 の

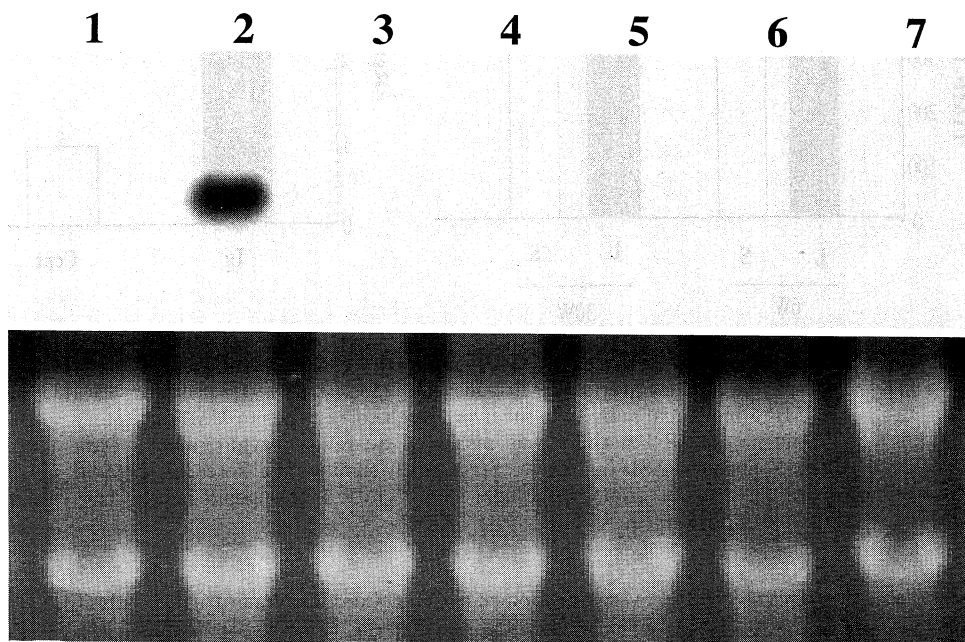


Fig. 2. Multiple tissue Northern blot analysis of RNA from TIMP-Tg mice derived from a founder: brain (lane 1), liver (lane 2), stomach (lane 3), kidney (lane 4), small intestine (lane 5), spleen (lane 6), and salivary gland (lane 7). GAPDH was used as an internal control.

生物学的活性の増加を認めた(Fig. 3B).

2) TIMP-1の肝線維化に対する影響

i) 組織学的検討

TIMP-Tg マウスは無処理では生後1年半に至るまで肝の線維化を含め主要臓器に目立った組織学的な変化を生じなかった. しかし CCl₄ 投与により肝線維化を誘発したところ, TIMP-Tg マウスは対照マウスに比し著明な肝線維の増生を認めた. 即ち, 対照マウスにおいては4週間の CCl₄ 投与にてわずかな線維性成分の増加を認めるのみであったが, TIMP-Tg マウスでは一部結節化を伴った著明な肝線維増生を認めた(Fig. 4). イメー

ジアナライザーによる線維化面積の定量では, TIMP-Tg マウスは対照マウスに比し約7倍の線維増生を示していた(Table 1). これらの結果から, TIMP-1の強発現そのものは肝線維化を引き起こすものではないが, いったん肝に障害が起こり, 肝線維化が始まると, TIMP-1は肝線維化過程に強い促進作用を有するということが示された. なお両群間で, マウスの体重, 肝重量は実験期間中, 差を認めなかった.

ii) 血中マーカー

一般生化学検査のうち, CCl₄ 投与後の血中AST, ALT 値については, TIMP-Tg マウスと対照マウスの

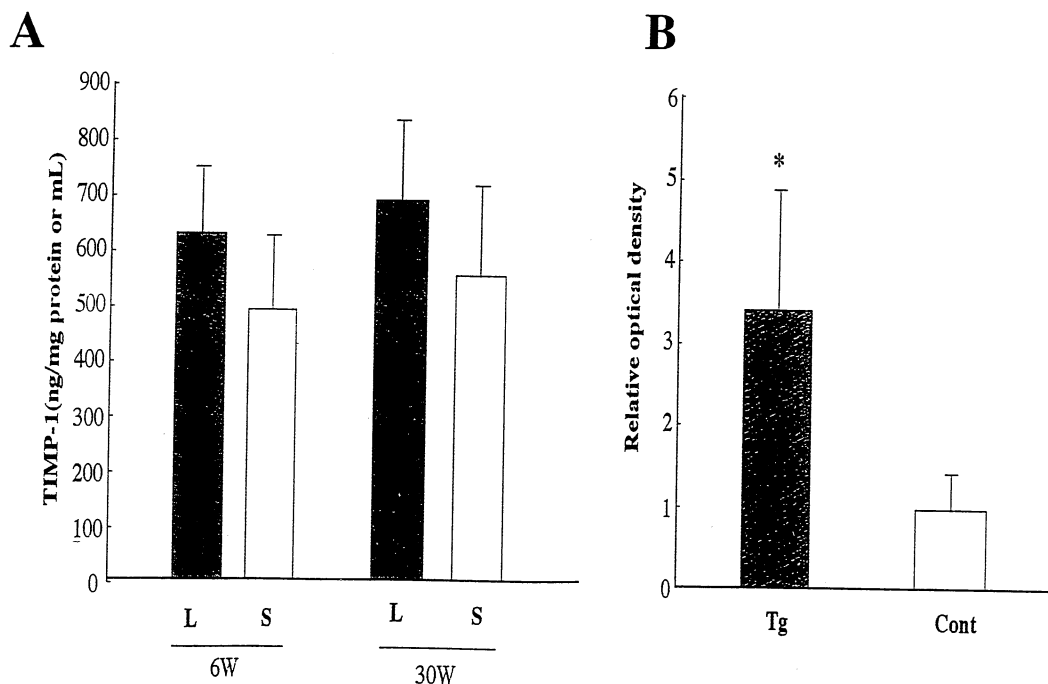
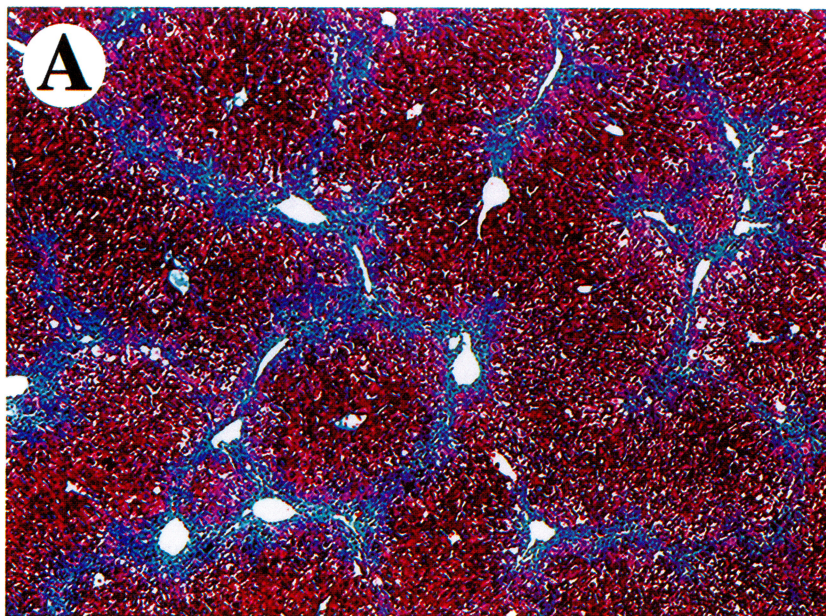


Fig. 3. (A): Plasma and liver concentration of TIMP-1 at the ages of 6 and 30 weeks old in the homozygous TIMP-1 transgenic mice. L: liver, S: serum. (B): TIMP-1 biological activity in the liver, which corresponds to MMP inhibitory activity. TIMP-1 activity was measured by reverse zymography. Data represents mean \pm SD (n=6). *: Statistically significant difference compared with the control group (p<0.01). Tg: TIMP-1 transgenic mice, Cont: Control hybrid mice.

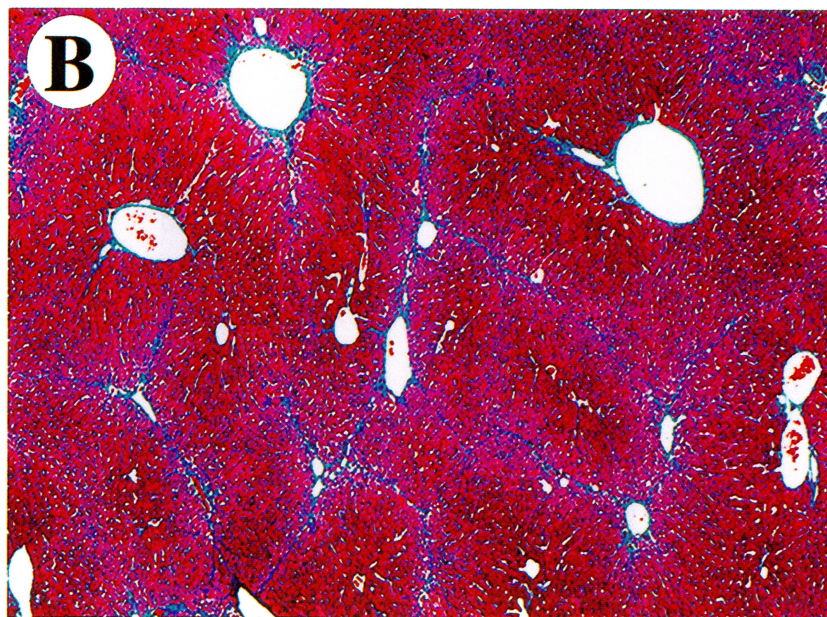
Table 1. Effect of TIMP-1 overexpression on liver functions in animals treated with CCl₄

	ALT (U/L)	AST (U/L)	Total bilirubin (mg/dL)	Albumin (g/dL)	Total bile acid (μ mol/L)
TIMP-Tg ^a	260.7 \pm 45.7	391.3 \pm 37.5	1.4 \pm 0.2	3.8 \pm 0.4	113.9 \pm 25.1
Cont ^a	247.7 \pm 37.1	407.1 \pm 22.4	1.4 \pm 0.3	4.1 \pm 0.4	128.4 \pm 30.7

a. The results are expressed as means \pm SD (n=7) from TIMP-1 transgenic mice (TIMP-Tg) and control mice (Cont).



Tg



Cont

Fig. 4. Histological features of TIMP-transgenic-mouse (A) and the control mouse (B) with CCl_4 -treatment for four weeks. (Azan-Mallory staining: magnification $\times 40$)

両群間で、差を認めなかった。また、他の肝機能を反映するパラメーターも同様に両群間で差を認めなかった (Table 1)。一方、肝線維化マーカーである 7S-コラーゲン

Table 3. Pro-collagen-I and collagen-IV gene expression in activated hepatic stellate cells

rTIMP-1 ^b	TIMP-Tg ^a		Cont ^a	
	(-)	(+)	(-)	(+)
Pro-collagen-I	1.09 ^c	2.96	1.01	1.14
Collagen-IV	0.36	0.93	0.32	0.39

a. Activated hepatic stellate cells isolated from TIMP-1 transgenic mice (TIMP-Tg) and control mice (Cont).

b. rTIMP : 500 ng/ml of recombinant human TIMP-1.

c. Gene expression presented after normalization with the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase internal control.

ン、P-III-N-P、ヒアルロン酸濃度は、TIMP-Tg マウスにおいて有意に高値を示していた。なお、CCl₄ 投与を加えなかった TIMP-Tg マウスにおいては、これらのパラメーターに異常値を認めなかった (Table 2)。

iii) 肝内ヒドロキシプロリン、コラーゲン量

肝における線維化の進展を反映するとされる肝内ヒドロキシプロリン量は、対照マウスに比し TIMP-Tg マウスにおいて有意に高値を示した (Table 2)。同様に肝内の総コラーゲン量も、TIMP-Tg マウスにおいて対照マウスに比し有意に高値を示していた (Table 2)。

iv) MMP, TIMP 活性

今回、細胞外マトリックスの主要な分解酵素である MMP-2, MMP-9 の変動について検討を行った。MMP-2 に関しては、TIMP-Tg マウスと対照マウスの両群と

Table 2. Effect of TIMP-1 overexpression on various fibrosis markers in animals treated with CCl₄

	Liver			Serum		
	Fibrosis area (mm ² liver)	Hydroxyproline (mg/g wet liver)	Collagen (mg/g wet liver)	P-III-N-P (ng/mL)	7S-collagen (ng/mL)	Hyarulonic acid (ng/mL)
TIMP-Tg ^a	0.21±0.03 ^b	278.4±86.3 ^b	378.6±92.2 ^c	40.4±0.03 ^b	183.9±23.5 ^b	181.9±27.5 ^b
Cont ^a	0.03±0.01	42.4±14.1	299.6±40.1	4.43±0.65	40.6±8.0	33.5±6.2

a. The results are expressed as means±SD (n=7) from TIMP-1 transgenic (TIMP-Tg) and control (Cont) mice.

b, c. Statistically significant difference as compared with the Cont-mice. (b : p<0.01 and c : p<0.05, respectively)

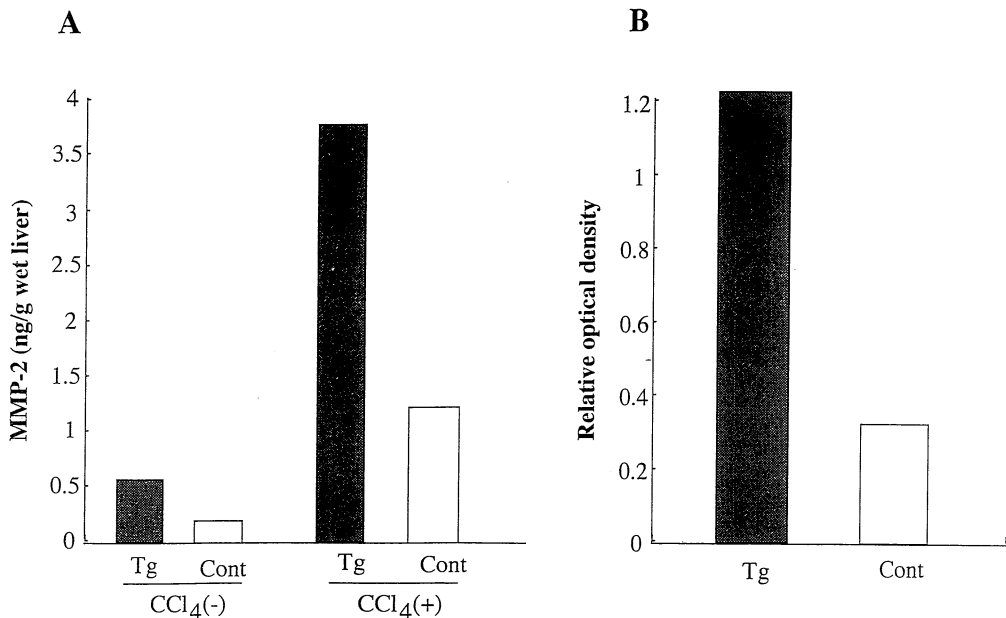


Fig. 5. (A) : MMP-2 protein expression level in the liver. The MMP-2 levels were measured by ELISA. (B) : TIMP-1 activity in the liver measured by reverse zymography. Tg : TIMP-1 transgenic mice, Cont : Control hybrid mice. CCl₄ (-) and (+) : without or with CCl₄-treatment.

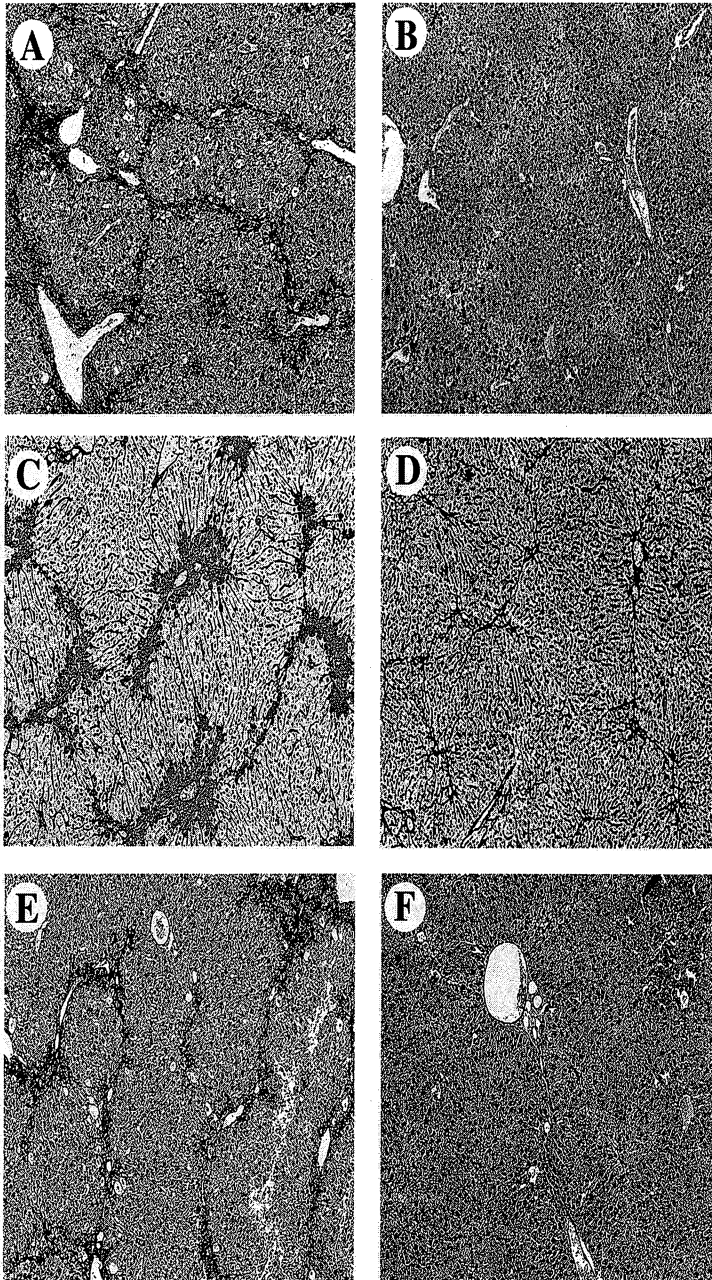


Fig. 6. Immunohistochemical analysis of collagen-I, collagen-IV, and α -smooth muscle actin (α -SMA). The expression of collagen-I, IV, and α -SMA in the TIMP-1 transgenic mice are shown in (A), (C), (E), respectively. In control mice, collagen-I, IV, and α -SMA were expressed in (B), (D), and (F), respectively. Original magnifications: $\times 40$.

もに、肝線維化過程において、上昇が認められた(Fig. 5A). なお TIMP-Tg マウスの MMP-2 の発現レベルは、CCl₄ 投与の有無にかかわらず、対照マウスより高値を示していた。

これに対して、reverse zymography によって測定し

た MMP 阻害活性を指標とした TIMP-1 の生物学的活性も TIMP-Tg マウスで高値であり、対照マウスの 3~4 倍を示していた(Fig. 5B).

なお MMP-9 に関しては、本研究では TIMP-Tg マウスと対照マウスの両群において、統計学的に有意差を認

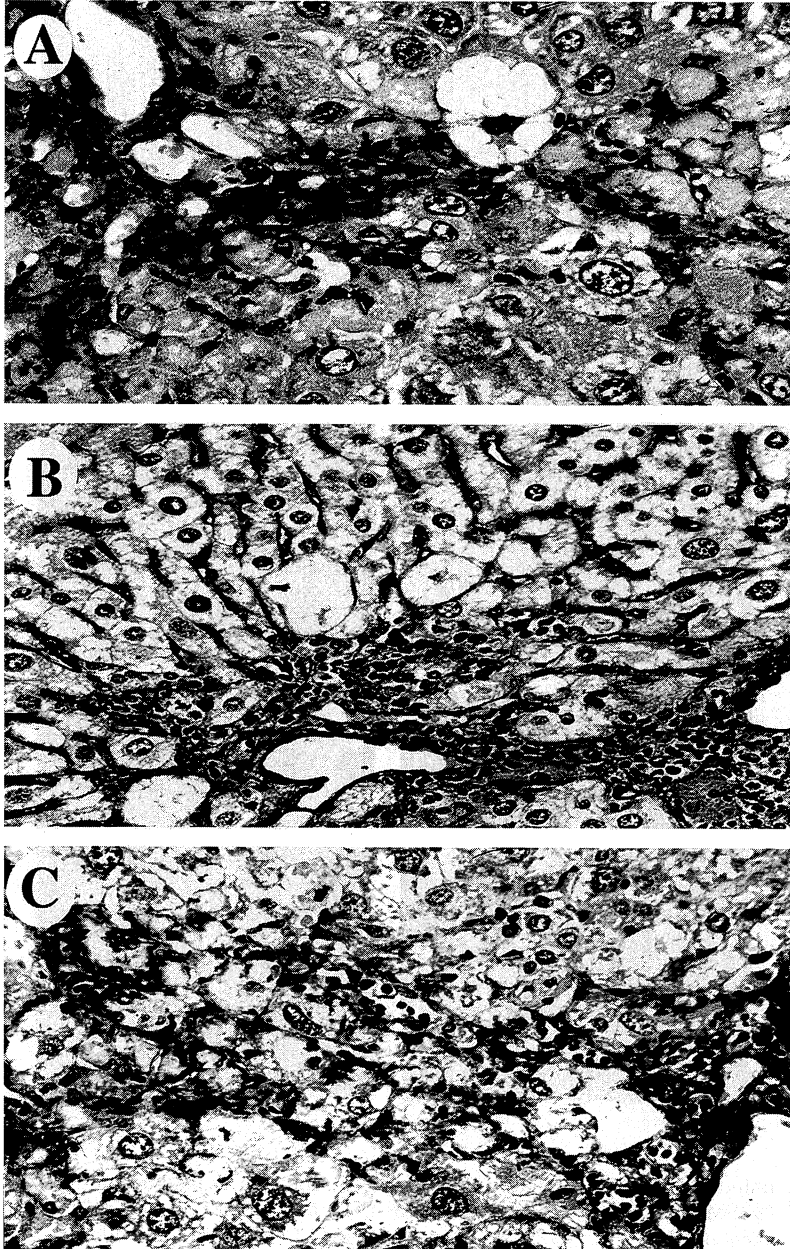


Fig. 7. Localization of collagen- I, IV, and α -SMA in CCl₄-treated liver. (A : collagen- I, B : collagen-IV, C : α -SMA). Original magnifications : $\times 200$.

めなかった。

v) 免疫組織学的検討

次に著者は、どのような細胞外マトリックスが、TIMP-1 によって促進される肝線維化過程において蓄積するのかを調べるために、免疫組織学的検討を行った。間質性コラーゲンの主成分であるコラーゲン I，そして基底膜の主要な構成成分であるコラーゲンIVについて検討したところ、コラーゲン I，コラーゲンIVの蓄積をしめす免疫染色陽性部位は、対照マウスに比し TIMP-Tg マウスで著明に増加していた(Fig. 6)。また、活性化肝星細胞の指標である α -SMA の免疫染色を行ったところ、TIMP-Tg マウスでは、コラーゲン I，コラーゲンIVの局在に極めて類似したパターンで陽性域が認められた。さらに、強拡大像(Fig. 7)において、これらのマーカーの陽性細胞は肝細胞ではなく、主として類洞細胞壁に沿って存在していることが示された。即ち、TIMP-1 の高発現状態においては、活性化肝星細胞においてこれらの細胞外マトリックスの産生が亢進していることが示唆された。

3) CCl_4 投与時の活性化肝星細胞に対する TIMP の

影響の解析

高濃度 TIMP-1 存在下における細胞外マトリックス産生のメカニズムを検討するために、 CCl_4 処置した TIMP-Tg マウスから分離した活性化肝星細胞を用いて実験を行った。TIMP-Tg マウスから分離した活性化肝星細胞の培養液中に 500 ng/ml の rTIMP-1 を添加すると、プロコラーゲン I mRNA，コラーゲンIV mRNA 発現の著明な増強を認めた。一方、対照マウスより分離された活性化肝細胞に rTIMP-1 処置を加えても、これらのコラーゲン生成の増加は認められなかった(Fig. 8)。イメージアナライザーによる半定量的解析において TIMP-Tg マウスでは、rTIMP-1 刺激後の肝星細胞のプロコラーゲン I，コラーゲンIV合成は、対照マウスに比し、各々 2.7 倍，2.6 倍の増加を示していた(Table 3)。なお、 CCl_4 非投与時の非活性化肝星細胞においては TIMP-Tg マウス，対照マウスのいずれにおいても、これらコラーゲンの増加反応は認められなかった。

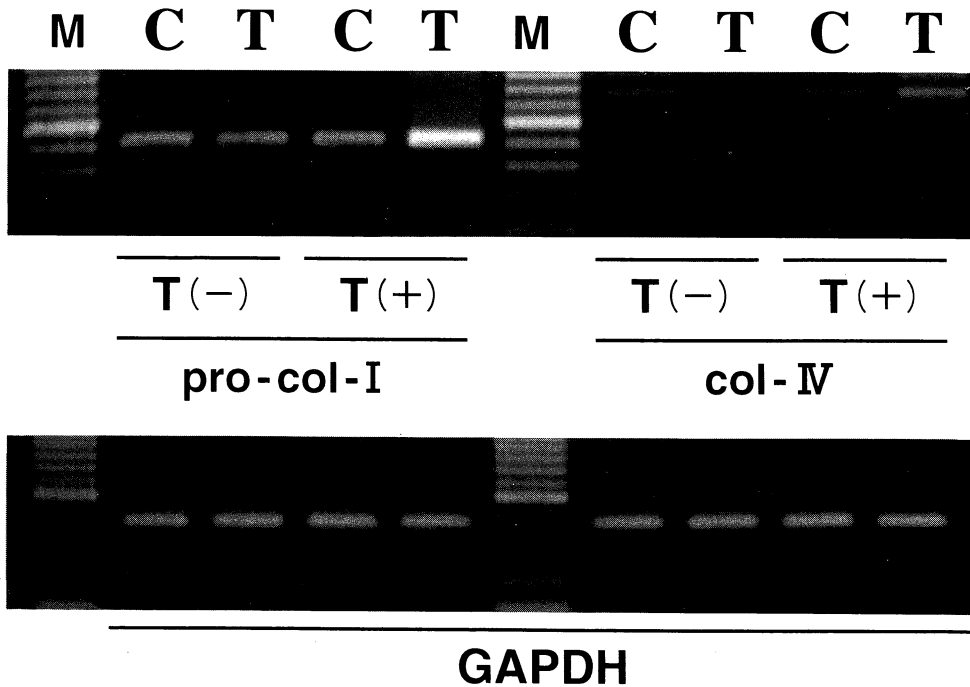


Fig. 8. RNA expression of pro-(α 1) collagen- I and (α 2)-collagen-IV in the activated hepatic stellate cells (Ac-HSC) from TIMP-1 transgenic and control mice. T : Ac-HSC from TIMP-1 transgenic mice. C : Ac-HSC from control mice. T (-) and T (+): in the absence or presence of 500 ng/mL of recombinant TIMP-1. GAPDH was used as an internal control.

考 察

肝線維化は、コラーゲンを中心とした細胞外マトリックス (ECM) が肝臓に異常に沈着した病的状態である。肝線維化は ECM の合成と分解のアンバランス、すなわち、ECM の合成亢進とともにその分解の絶対的または相対的低下によって成立すると考えられており、ECM の分解酵素である MMP ならびにその阻害酵素である TIMP が ECM の再構成に極めて重要な役割を果たしていることが報告されている³⁻⁷⁾。このうち TIMP-1 の発現は、実験的肝線維化モデルならびにヒト標本における肝線維化過程において著明に増強することが報告されている⁸⁻¹³⁾。肝内及び血清 TIMP-1 レベルは肝組織における線維化の程度、7S-コラーゲン、P-III-N-P などの一般的な血清肝線維化マーカーともよく相関し、肝線維化の指標となり得ることも示唆されている¹¹⁻¹⁹⁾。さらに、ラットの可逆的肝線維化モデルにおいて、細胞外マトリックス分解による線維化の改善は TIMP-1 発現の著明な減少と密接に関連していることが示されている¹⁹⁾。これらの報告は間接的ではあるが、TIMP-1 が肝線維化過程において極めて重要な役割をはたすことを示唆している。しかしながら生体の肝線維化過程における TIMP-1 の直接的役割については解析法の困難さもあり、未だ明らかにされていなかった。一般に、ある蛋白質の生体内での役割を明らかにするためにはトランスジェニックマウスあるいはノックアウトマウスによる検討が最も有用とされており、これまでに様々なモデルが開発されている。TIMP-1 に関しては、内因性プロモーター (H 2) を用いたトランスジェニックマウスがカナダの 1 施設より報告されている^{33,34)}。しかしこのマウスにおける TIMP-1 発現は、いわゆる臓器非特異的発現であり、肝における TIMP-1 の発現そのものはそれほど強くない。また近年、TIMP-1 のノックアウトマウスによる検討が報告されたが、生体では他の TIMP-2 や TIMP-3 などの TIMP ファミリーが TIMP-1 の欠如を代償するため、TIMP-1 単独の影響を検討することは困難であった³⁵⁾。今回我々は、アルブミンプロモーター制御下に肝において特異的に TIMP-1 を発現するトランスジェニック (TIMP-Tg) マウスを作成し、肝微小環境において TIMP-1 の持続的な高値を達成した。文献的な比較ではあるが、今回の我々のモデルマウスでは肝 TIMP-1 発現レベルが、以前に報告された H 2 プロモーターマウスの数十倍に達しており、肝疾患における TIMP-1 の生体内での役割を解析するのに最適のモデルと考えられる。肝線維化過程における TIMP-1 の産生細胞に関してはい

まだ議論の分かれる所であるが、最近の研究より TIMP-1 は肝細胞ではなく主として肝星細胞において産生されることが示唆されている^{8,10)}。この点で、我々の開発した TIMP-Tg マウスは、アルブミンプロモーターを用いており TIMP-1 を肝細胞において強発現するため、実際の生物学的環境とは若干異なる可能性がないわけではない。しかし、TIMP-1 はその構造の N 末端にいわゆる分泌アミノ酸配列を有しており⁹⁾、今回のモデルは TIMP-1 産生細胞が異なっているにしても、肝局所の微細環境下において高い TIMP-1 レベルを達成できた点では実際の生物学的環境に近似し得るものであると考えられる。

今回 CCl₄ 処置による肝線維化促進過程において、TIMP-1 が強い肝線維化促進作用を示すことが明らかとなったが、CCl₄ 投与後の AST、ALT は TIMP-Tg マウスと対照マウスの間で差がなく、今回観察された線維化促進は肝細胞障害による二次的な現象ではなく、TIMP-1 の直接的な線維化作用によることが示唆された。

ところで、肝線維化過程において TIMP-1 が MMP 活性と密接に関連していることはよく知られており、実験的肝線維化モデルおよびヒト肝疾患標本においても MMP-2 を始めとする MMP の増加が報告されている^{15,17)}。今回、MMP-2、MMP-9 について検討した結果、TIMP-Tg マウスにおいて MMP-2 の上昇が認められたが、これは、導入遺伝子による極めて高い TIMP-1 濃度に反応した、恒常性を保つための生物学的なフィードバックメカニズムが働いているためと考えられる。一方、reverse zymography では TIMP-Tg マウスの MMP 阻害活性も高値であり、これは TIMP-1 の強発現がフィードバックによる MMP の増加を凌いだ結果であると考えられた。

以上のように、MMP 活性の阻害による ECM 分解系の抑制が、CCl₄ 処置時の TIMP-1 の肝線維化促進メカニズムの重要な部分をなすものと考えられる。しかし、この分解系の抑制のみで今回の TIMP-1 の肝線維化における促進作用をすべて説明することは困難である。すなわち、上述したように、TIMP-1 マウスは無処置では肝の線維化などの変化を生じず、CCl₄ 処置という線維化の刺激が加わることにより初めて著明な線維化の促進作用を示したが、この現象は、TIMP-1 上昇と MMP 低下による分解系の抑制という passive fibrosis だけでは説明できず、ECM の産生亢進などのいわゆる positive fibrosis の存在を前提としなければならない。

現在 TIMP-1 は、MMP 阻害物質としての作用以外にも種々の生物学的作用を有する多機能蛋白質として認識

されつつある⁶⁾。ちなみに、赤芽球系前駆細胞の増殖と分化を促進する erythroid potentiating activity (EPA) は発見後の核酸配列の解析により TIMP-1 と同一物質であることが判明している⁶⁾。さらにそれ以外にも TIMP-1 は肝癌細胞を含む様々な細胞に対しても増殖促進活性を示すことも明らかにされている⁶⁾。その他、カタプシン L との協調作用によるステロイド生成刺激³⁶⁾、血管新生の抑制^{37,38)}、細胞骨格構造を変化させ得る作用³⁹⁾などがこれまでに報告されており、さらに最近ではいくつかの細胞においてアポトーシス阻害に働くことが知られている⁴⁰⁻⁴²⁾。これらの作用のうちいくつかは MMP 阻害作用とは独立したものであることも報告されている³⁶⁻⁴¹⁾。しかし、TIMP-1 と肝星細胞動態との関連、特に高濃度の TIMP-1 存在下での肝星細胞の生物学的な動態についてはこれまで検討がなされていない。

最近の研究において、肝星細胞が肝線維化過程に重要な役割をすることが明らかになっている^{3,8,10)}。正常肝においては肝星細胞は静止期にあり、胞体はビタミン A を含有した脂肪滴に富み、多数の突起で類洞内皮細胞を外側から取り囲むことにより、類洞の立体構造を保持している。傷害肝においては脂肪滴が消失し、 α -SMA が増強し筋線維芽細胞様に変換する。この過程を活性化と呼ぶが、この活性化の初期において肝星細胞はマトリックスを分解する MMP を産生する。肝星細胞が完全に活性化されると、著明に増加した TIMP-1 によって全体としてのマトリックスの分解が低下する。また、活性化された肝星細胞は、多量のコラーゲン I, III, IV 等を合成する。これらの相互作用により、結果として、肝における線維化が促進されると考えられている³⁻⁷⁾。

本研究で筆者は、CCl₄ 投与 TIMP-Tg マウスから分離した活性化肝星細胞が 500 ng/ml という高濃度の外因性の rTIMP-1 に反応してプロコラーゲン I, IV 合成の著明な増加を示すことを見いだした。一方、興味深いことに、対照マウスから採取した肝星細胞は同一条件においてもプロコラーゲン合成の増加を示さなかった。即ち、TIMP-Tg マウスから分離した活性化肝星細胞は、持続的な高濃度の TIMP-1 存在下でいわゆる感作を受け、その受容体あるいは細胞内情報伝達機構に変化を生じている可能性が考えられた。TIMP-1 の受容体に関しては、世界中でこれまでに精力的な研究が行われているものの未だ同定されておらず、結合方式や細胞内伝達の詳細な解析は現時点では困難であるが、TIMP-1 は scleroderma fibroblast の autocrine factor であることも報告されており⁴³⁾、肝星細胞に対して、paracrine だけでなく autocrine factor として働く可能性も考えられ

る。また我々は、以前にラット乳癌細胞に TIMP-1 遺伝子を導入して内因性に TIMP-1 を増加させることによって、転写の段階より基底膜成分である IV 型コラーゲンとラミニンが著明に増加することを報告している⁴⁴⁾。TIMP-1 は他の TIMP ファミリーの TIMP-2 や TIMP-3 とは異なり核内へ移行し、転写因子様の作用を示すことがいくつかの細胞で報告されている^{45,46)}。TIMP-Tg マウスにおける長期間にわたる高濃度の TIMP-1 の存在が核内 TIMP-1 濃度を高め、コラーゲンの転写を促進させたのかもしれない。

一方で、アポトーシスという観点から考えると、実験的肝線維化モデルにおける肝線維化改善過程において TIMP-1 の発現の低下に伴って肝星細胞のアポトーシスの増加が認められている¹⁹⁾。先に述べたように TIMP-1 は抗アポトーシス作用を有することが報告されており⁴⁰⁻⁴²⁾、高レベルの TIMP-1 が活性化肝星細胞のアポトーシス阻害し活性化状態を保つことにより、結果としてコラーゲンの産生を増強させ肝線維化を促進させた可能性もある。これら MMP 阻害作用以外の TIMP-1 の肝線維化過程に及ぼす役割については今後さらに検討していくべきであると思われる。

結 論

- 1) TIMP-Tg マウスでは、CCl₄ 4 週投与後、対照マウスと比較して、約 7 倍の著明な線維増生を認めた。この際、肝内ハイドロキシプロリンおよびコラーゲン量も、TIMP-Tg マウスにおいて有意に増加していた。
- 2) CCl₄ 投与後 TIMP-Tg マウスでは、肝線維化の血清学的指標である 7S-コラーゲン、P-III-N-P、ヒアルロン酸が対照マウスと比較して有意に増加していた。一方、CCl₄ 投与による肝機能障害の程度は両群間で差をみとめなかった。
- 3) 免疫組織学検討において、TIMP-Tg マウスの類洞壁に、コラーゲン I、コラーゲン IV の著明な増加を認め、それらの存在部位は活性化肝星細胞の分布と極めて類似していた。
- 4) TIMP-Tg マウスより分離した活性化肝星細胞は、高濃度 TIMP-1 存在下で、プロコラーゲン I、コラーゲン IV mRNA の著明な発現増加を示した。一方対照マウスより分離した活性化肝星細胞ではこれらの増加反応は認めなかった。

以上のことより、TIMP-1 が肝線維化過程において極めて強い直接的促進作用を有することが示された。この作用は、TIMP-1 が肝線維化においてイニシエーターと

して線維化を誘発するのではなく、肝線維化刺激因子の存在下において働き、強力な促進作用を示すものと考えられた。TIMP-1はMMPというコラーゲン分解系を抑制するとともに、活性化肝星細胞によるコラーゲン産生を増加させ、これらの作用があいまって肝線維化促進に働くことが示された。

(本論文の要旨の一部は、第3回日本肝臓学会大会、第33回日本肝臓学会西部会、第86回日本消化器病学会総会、第36回日本肝臓学会総会において発表した。

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました福井 博教授に深甚の謝意を捧げるとともに、御校閲、御助言をいただきました腫瘍病理学教室小西陽一教授ならびに第1外科学教室中野博重教授に深謝いたします。さらに、本研究の遂行にあたり常に御指導、御助力をいただきました吉治仁志博士に感謝いたします。また、終始、御協力いただきました第3内科学教室の諸兄に感謝の意を表します。)

文 献

- 1) MacSween, R. N. M. and Scothorn, R. J. : Pathology of the liver 3rd ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, p1-49, 1994.
- 2) 中野雅行 : 肝線維化の形態学. 肝臓病学 Basic science, 医学書院, 東京, p670-678, 1998.
- 3) Olaso, E. and Friedman, S. L. : Molecular regulation of hepatic fibrogenesis, *J. Hepatol.* **29** : 836-47, 1998.
- 4) Arthur, M. J. : Degradation of matrix proteins in liver fibrosis. *Pathol. Res. Pract.* **190** : 825-33, 1994.
- 5) Matrisian, L. M. : Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet.* **6** : 121-5, 1990.
- 6) Gomez, D. E., Alonso, D. F., Yoshiji, H. and Thorgeirsson, U. P. : Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell Biol.* **74** : 111-22, 1997.
- 7) Woessner, J. F., Jr. : Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *Faseb J.* **5** : 2145-54, 1991.
- 8) Iredale, J. P. : Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29** : 43-54, 1997.
- 9) Nakatsukasa, H., Ashida, K., Higashi, T., Ohguchi, S., Tsuboi, S., Hino, N., Nouse, K., Urabe, Y., Kinugasa, N., Yoshida, K., Uematsu, S., Ishizaki, M., Kobayashi, Y. and Tsuji, T. : Cellular distribution of transcripts for tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology* **24** : 82-8, 1996.
- 10) Arthur, M. J., Mann, D. A. and Iredale, J. P. : Tissue inhibitors of metalloproteinases, hepatic stellate cells and liver fibrosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **13 Suppl** : S33-8, 1998.
- 11) Kossakowska, A. E., Edwards, D. R., Lee, S. S., Urbanski, L. S., Stabber, A. L., Zhang, C. L., Phillips, B. W., Zhang, Y. and Urbanski, S. J. : Altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental biliary fibrosis. *Am. J. Pathol.* **153** : 1895-902, 1998.
- 12) Benyon, R. C., Iredale, J. P., Goddard, S., Winwood, P. J. and Arthur, M. J. : Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology* **110** : 821-31, 1996.
- 13) Muraaki, Y., Ikuta, Y., Idobe, Y., Kitamura, Y. and Kawasaki, H. : Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the liver of patients with chronic liver disease. *J. Hepatol.* **26** : 1213-9, 1997.
- 14) Iredale, J. P., Benyon, R. C., Arthur, M. J., Ferris, W. F., Alcolado, R., Winwood, P. J., Clark, N. and Murphy, G. : Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver infury and fibrosis. *Hepatology* **24** : 176-84, 1996.
- 15) Herbst, H., Wege, T., Milani, S., Pellegrini, G., Orzechowski, H. D., Bechstein, W. O., Neuhaus, P., Gressner, A. M. and Schuppan, D. : Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. *Am. J. Pathol.* **150** : 1647-59, 1997.
- 16) Iredale, J. P., Goddard, S., Murphy, G., Benyon, R. C. and Arthur, M. J. : Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and interstitial collagenase expression in autoimmune chronic active hepati-

- tis and activated human hepatic lipocytes. *Clin. Sci. (Colch)*. **89**: 75-81, 1995.
- 17) **Takahara, T., Furui, K., Funaki, J., Nakayama, Y., Itoh, H., Miyabayashi, C., Sato, H., Seiki, M., Ooshima, A. and Watanabe, A.** : Increased expression of matrix metalloproteinase-II in experimental liver fibrosis in rats. *Hepatology* **21**: 787-95, 1995.
- 18) **Murawaki, Y., Yamamoto, H., Kawasaki, H. and Shima, H.** : Serum tissue inhibitor of metalloproteinases in patients with chronic liver disease and with hepatocellular carcinoma. *Clin. Chim. Acta*. **218**: 47-58, 1993.
- 19) **Iredale, J. P., Benyon, R. C., Pickering, J., McCullen, M., Northrop, M., Pawley, S., Hovell, C. and Arthur, M. J.** : Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J. Clin. Invest.* **102**: 538-49, 1998.
- 20) **Kasahara, A., Hayashi, N., Mochizuki, K., Oshita, M., Katayama, K., Kato, M., Masuzawa, M., Yoshihara, H., Naito, M., Miyamoto, T., Inoue, A., Asai, A., Hijioka, T., Fusamoto, H. and Kamada, T.** : Circulating matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as serum markers of fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Relationship to interferon response. *J. Hepatol.* **26**: 574-83, 1997.
- 21) **Milani, S., Hergst, H., Schuppan, D., Grappone, C., Pellegrini, G., Pinzani, M., Casini, A., Calabro, A., Ciancio, G., Stefanini, F. and et al.** : Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver. *Am. J. Pathol.* **144**: 528-37, 1994.
- 22) **Iredale, J. P., Murphy, G., Hembry, R. M., Friedman, S. L. and Arthur, M. J.** : Human hepatic lipocytes synthesize tissue inhibitor of metalloproteinases-1. Implications for regulation of matrix degradation in liver. *J Clin Invest.* **90** : 282-7, 1992.
- 23) **Benyon, R. C., Ctvell, C. J., Da Caca, M., Jones, E. H., Iredale, J. P., and Arthur, M. J.** : Progelatinase A is produced and activated by rat hepatic stellate cells and promotes their proliferation. *Hepatology*. **30** : 977-86, 1999.
- 24) **Yoshiji, H., Harris, S. R., Raso, E., Gomez, D. E., Lindsay, C. K., Shibuya, M., Sinba, C. C., and Thorgeirsson, U. P.** : Matnmary carcinoma cells over-expressing tissue inhibitor of metalloproteinases-1 show enhanced vascular endothelial growth factor expression. *Int J Cancer*, **75** : 81-7, 1998.
- 25) **Pinkert, C. A., Ornitz, D. M., Brinster, R. L., and Palmiter, R. D.** : An albumin enhancer located 10 kb upstream lunctions along with its promoter to direct efficient, liver-specific expression in transgenic mice. *Genes Dev.* **1** : 268-76, 1987.
- 26) **Sanderson, N., Factor, V., Nagy, P., Kopp, J., Kondaiah, P., Wakefield, L., Roberts, A. B., Sporn, M. B., and Thbtmgeirsson, S. S.** : Hepatic expression of mature transforming growth factor beta I in transgenic mice results in muluple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92** : 2572-6, 1995.
- 27) **Factor, V. M., Jensen, M. R., and Thorgeirsson, S. S.** : Coexpression of C-myc and transforming growth factor alfa in the liver promotes early replicative senescence and diminishcs regenerative capacity after partial hepatectomy in transgenic mice. *Hepatology.* **26** : 1434-43, 1997.
- 28) **Factor, V. M., Kao, C. Y., Santoni-Rugiu, E., Woitach, J. T., Jensen, M. M., and Thorgeirsson, S. S.** : Constitutive expression of mature transforming growth factor betal in the liver accelerates hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Cancer Res.* **57** : 2089-95, 1997.
- 29) **Sakaida, I., Hironaka, K., Uchida, K., Suzuki, C., Kayano, K., and Okita, K.** : Fibrosis accelerates the development of enzyme-altered lesions in the rat lives. *Hepatology.* **28** : 1247-52, 1998.
- 30) **Greene, J., Wang, M., Liu, Y. E., Raymond, L. A., Rosen, C., and Shi, Y. E.** : Molecular cloning and characterization of cuman tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem.* **271** : 30375-80, 1996.
- 31) **Oliver, G. W., Leferson, J. D., Stetler-Stevenson, W. G., and Kleiner, D. E.** : Quantitative reverse zymography : analysis of picogram

- amounts of metalloproteinase inhibitors using gelatinase A and B reverse zymograms. *Anal Biochem.* **244** : 161-6, 1997.
- 32) Shimizu, I., Ma, Y. R., Mizobuchi, Y., Liu, F., Miura, T., Nakai, Y., Yasuda, M., Shiba, M., Horie, T., Amagaya, S., Kawada, N., Hori, and Ito, S. : Effects of Sho-saiko-to, a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats [see comments]. *Hepatology* **29** : 149-60, 1999.
- 33) Martin, D. C., Sanchez-Sweatman, O. H., Ho, A. T., Inderdeo, D. S., Tsao, M. S. and Khokha, R. : Transgenic TIMP-1 inhibits simian virus 40 T antigen - induced hepatocarcinogenesis by impairment of hepatocellular proliferation and tumor angiogenesis. *Lab. Invest.* **79** : 225-34, 1999.
- 34) Martin, D. C., Ruther, U., Sanchez-Sweatman, O. H., Orr, F. W. and Khokha, R. : Incubation of SV 40 T antigen-induced hepatocellular carcinoma in TIMP-1 transgenic mice. *Oncogene* **13** : 569-76, 1996.
- 35) Soloway, P. D., Alexander, C. M., Werb, Z. and Jaenisch, R. : Targeted mutagenesis of Timp-1 reveals that lung tumor invasion is influenced by Timp-1 genotype of the tumor but not by that of the host. *Oncogene* **13** : 2307-14, 1996.
- 36) Boujrad, N., Ogwuegbu, S. O., Garnier, M., Lee, C. H., Martin, B. M. and Pakadopoulos, V. : Identification of a stimulator of steroid hormone synthesis isolated from testis [published erratum appears in *Science* 1995 Oct 20 ; 270 (5235) : 365]. *Science* **268** : 1609-12, 1995.
- 37) Moses, M. A. and Langer, R. : A metalloproteinase inhibitor as an inhibitor of neovascularization. *J. Cell Biochem.* **47** : 230-5, 1991.
- 38) Thorgeirsson, U. P., Yoshiji, H., Sinha, C. C. and Gomez, D. E. : Breast cancer ; tumor neovasculation and the effects of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) on angiogenesis. *In Vivo.* **10** : 137-44, 1996.
- 39) Agrez, M. V., Meldrum, C. J., Sim, A. T., Aebersold, R. H., Clark, I. M., Cawston, T. E. and Burns, G. F. : A fibroblast elongation factor purified from colon carcinoma cells shares sequence identity with TIMP-1. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **206** : 590-600, 1995.
- 40) Guedez, L., Stetler-Stevenson, W. G., Wolff, L., Wang, J., Fukushima, P., Mansoor, A. and Stetler-Stevenson, M. : In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J. Clin. Invest.* **102** : 2002-10, 1998.
- 41) Li, G., Fridman, R. and Kim, H. R. : Tissue inhibitor of metalloproteinase -1 inhibits apoptosis of human breast epithelial cells. *Cancer Res.* **59** : 6267-75, 1999.
- 42) Guedez, L., Courtemanch, L. and Stetler-Stevenson, M. : Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) induces differentiation and an antiapoptotic phenotype in germinal center B cells. *Blood* **92** : 1342-9, 1998.
- 43) Kikuchi, K., Padono, T., Furue, M. and Tamaki, K. : Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) may be an autocrine growth factor in scleroderma fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **108** : 281-4, 1997.
- 44) Yoshiji, H., Buck, T. B., Harris, S. R., Ritter, L. M., Lindsay, C. K. and Thorgeirsson, U. P. : Stimulatory effect of endogenous tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) overexpression on type IV collagen and laminin gene expression in rat mammary carcinoma cells. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **247** : 605-9, 1998.
- 45) Zhao, W. Q., Li, H., Yamashita, K., Guo, X. K., Hoshino, T., Yoshida, S., Shinya, T. and Hayakawa, T. : Cell cycle-associated accumulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in the nuclei of human gingival fibroblasts. *J. Cell Sci.* **111** : 1147-53, 1998.
- 46) Ritter, L. M., Garfield, S. H. and Thorgeirsson, U. P. : Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) binds to the cell surface and translocates to the nucleus of human MCF-7 breast carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257** : 494-9, 1999.