

肝臓星細胞の細胞生物学*

妹尾春樹

秋田大学医学部解剖学第二講座

(平成6年12月15日受付, 平成6年12月16日掲載決定)

Cell Biology of the Perisinusoidal Stellate Cells

Haruki Senoo

*Second Department of Anatomy, Akita University School of
Medicine, Akita 010, Japan.*

Abstract : Stellate cells (vitamin A-storing cells, lipocytes, fat-storing cells, Ito cells) exist in the perisinusoidal space of the hepatic lobule, and store 80% of retinoids in the whole body as retinyl palmitate in lipid droplets in the cytoplasm.

Under physiological conditions, these cells play key roles in the control of retinoid homeostasis ; they express specific receptors for retinol-binding protein (RBP), a binding protein specific for retinol, on their cell surface, and take up the complex of retinol and RBP by receptor-mediated endocytosis.

However, under pathological conditions such as liver cirrhosis, these cells lose retinoids, and synthesize a large amount of extracellular matrix (ECM) components including collagen, proteoglycan and adhesive glycoproteins. The morphology of these cells also changes from the star-shaped stellate cells to that of fibroblasts or myofibroblasts.

The three-dimensional structure of ECM components reversibly regulates the morphology, proliferation, and functions of the stellate cells.

Key words : perisinusoidal stellate cells, retinoids, retinol-binding protein, extracellular matrix

1. 緒言

レチノイドはビタミンAとその関連化合物の総称であり、視物質としての活性を持つだけでなく、細胞の増殖・分化、形態形成、発癌などに対して多彩な生物学的活性を持つことが明らかになってきた¹⁾。

血漿中のレチノイド濃度は厳密に制御されており、この恒常性を維持する系の中心的役割を果しているのが、肝臓にある星細胞(ビタミンA貯蔵細胞、脂肪摂取細胞、伊東細胞とも呼ばれる)である²⁻⁴⁾。

2. 星細胞とその仲間

肝臓は多数の小葉構造を単位として構築されている⁵⁾(Fig. 1)。各小葉は実質細胞と非実質細胞からなっている。非実質細胞には、類洞を形成する内皮細胞、全身の単球—マクロファージ系に属するクッパー細胞、ナチュラルキラー活性を持つピット細胞、および生体のレチノイド総量の約80%を細胞質内の脂質滴に主としてレチニルパルミテートとして貯蔵する星細胞がある。

星細胞は類洞周囲腔(いわゆるディッセ腔)、即ち肝臓における毛細血管周囲腔に存在する。ところで、全身の毛細血管とその前後の細い血管の外表面を被って

* 平成6年12月14日第35回秋田医学会における特別講演要旨

(2)

肝臓星細胞の細胞生物学

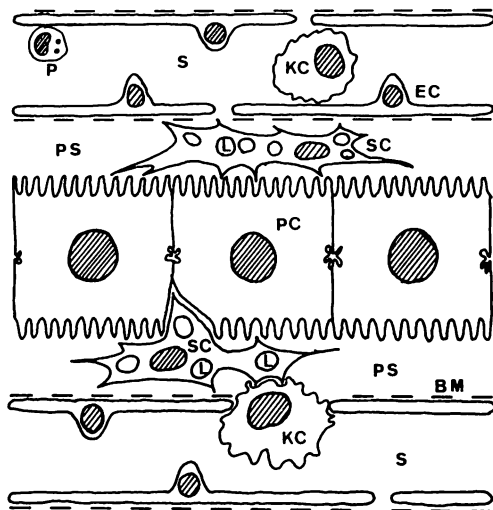


Fig. 1. Structure of a hepatic lobule. Hepatic cords of the lobule consist of parenchymal cells (PC). Endothelial cells (EC) form a thin lining of the sinusoids (S). Kupfer cells (KC) are tissue macrophages and belong to the monocyte-macrophage cell lineage. Pit cells (p) have natural killer activity. Stellate cells (SC) lie in the perisinusoidal space (PS) of Disse and store 80% of retinoids of the whole body as retinyl palmitate in lipid droplets (L) in the cytoplasm. BM, basement membrane components.

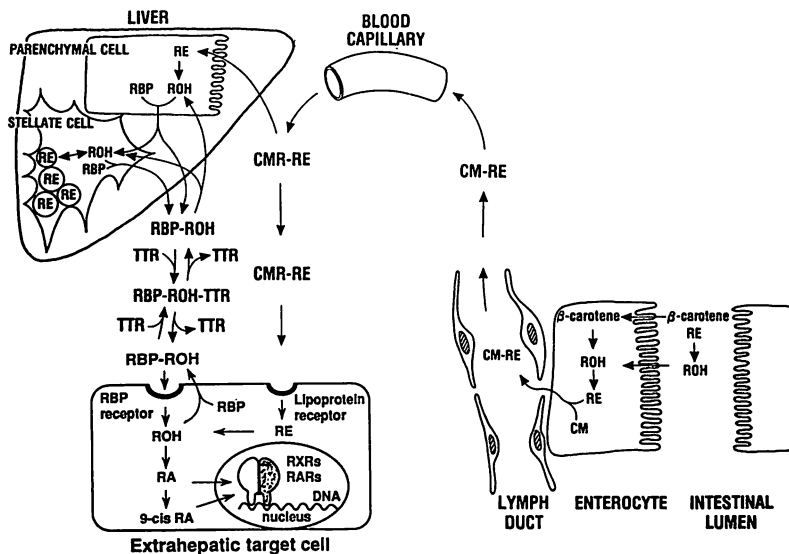


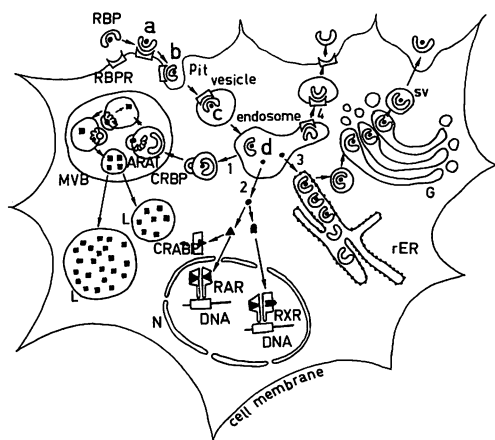
Fig. 2. Major pathway for retinoid transport in the body. Dietary retinyl esters (RE) are hydrolyzed to retinol (ROH) in the intestinal lumen before absorption by enterocytes, and carotenoids are absorbed and then partially converted to retinol in the enterocytes. In the enterocytes, retinol reacts with fatty acids to form esters before incorporation into chylomicrons (CM). These CM then reach the general circulation by way of the intestinal lymph, and chylomicron remnants (CMR) are formed in blood capillaries. The CMR, which contain almost all the absorbed retinol, are mainly cleared by the liver parenchymal cells and also to some extent, by cells in other organs. In liver parenchymal cells, retinyl esters are rapidly hydrolyzed to retinol, which then binds to the retinol-binding protein (RBP). The retinol-RBP complex is then secreted and transported into hepatic stellate cells, which store retinoids mainly as retinyl palmitate and secrete retinol-RBP directly into the blood. Most retinol-RBP in the bloodstream is reversibly complexed with transthyretin (TTR). The uncomplexed retinol-RBP is presumably taken up by a variety of cells by cell surface receptors specific for RBP. (RA, retinoic acid; RARs, retinoic acid receptor; RXRs, retinoid X receptor)

3. レチノイドのホメオスタシス

ヒトをはじめ動物は自身ではレチノイドを生合成できない。このため食物からレチノイドを摂取している (Fig. 2)。

小腸上皮細胞から吸収されると、レチノイドはレチノールの形になっている。この小腸上皮細胞内でレチノールは長鎖脂肪酸とエステルを作り、キロミクロン中に組み込まれる。

キロミクロンは毛細血管中でトリアシルグリセロールを失って小型化し、キロミクロンレムナントとなる。このキロミクロンレムナント・レチニルエステル複合体は肝実質細胞に取り込まれる。そして、レチニルエステルはレチノールとなる。レチノールは特異的キャリアータンパク質であるレチノール結合タンパク質 (retinol-binding protein, RBP, 分子量 21,000, 生理的血漿中濃度は 30~60 $\mu\text{g/ml}$) と結合して、パラクリン輸送によって星細胞に運ばれ、そこで貯蔵される。そこから必要に応じて血漿中に分泌される。日によって摂取するレチノイド量に変動があるにもかかわらず、血漿中レチノイド量 (レチノールとして 2 μM , 血漿中では RBP と結合している) が一定に保たれるのは、このような巧みな制御機構があるためである。



●, Retinol; ■, retinyl palmitate; ▲, all-trans-retinoic acid; ▲, 9-cis-retinoic acid; ○, retinol-binding protein; □, specific receptor for RBP (RBPR); □, cellular retinol-binding protein; □, cellular retinoic acid-binding protein; ▲, Acyl CoA: retinol acyl transferase (ARAT); ▼, nuclear retinoic acid receptor (RAR), which binds all-trans-retinoic acid; ▼, nuclear retinoid receptor (RXR), which binds 9-cis-retinoic acid; □, retinoic acid responsive element.

Fig. 3. Uptake and storage of retinol and retinoid-binding protein (RBP) by stellate cells. A complex of retinol and RBP circulates in the blood. The complex binds specifically to the receptor expressed on the cell surface of stellate cells (a), and then reaches the endosomes (d) through pits (b) and vesicles (c). From the endosomes, retinol can take three pathways: (1) retinol binds a cellular retinol-binding protein (CRBP, MW 14,000-17,500) and is esterified with palmitic acid in multivesicular bodies (MVB) and stored in lipid droplets; (2) retinol is oxidized to retinoic acid, which then either binds with a cellular retinoic acid-binding protein (CRABP, MW 16,000) or is transported and binds with nuclear retinoic acid receptors (RAR for all-trans-retinoic acid and 9-cis-retinoic acid, RXR for 9-cis-retinoic acid); (3) retinol is transported from the endosomes to rough-surfaced endoplasmic reticulum (rER), binds with RBP, and is then secreted to the outside of the cell through the Golgi apparatus (G) and secretory vesicles (sv). RBP and its receptors are recycled and reutilized (4).

いるのは周皮細胞 (pericytes) である。そこで、星細胞は周皮細胞の仲間であり、中枢神経系のアストロサイトや腎臓のメサンギウム細胞も仲間と言える。

4. 星細胞によるレチノールの取り込み機構

肝実質細胞から分泌された、あるいは血漿中にあるレチノール・RBP 複合体を星細胞はどのようなメカニズムで取り込むのか。細胞の形態と抗原活性をともに良く保存する凍結免疫電顕法によって調べた⁹⁻¹¹⁾ (Fig. 3)。この実験では実験動物としてラットを用い、内因性ラット RBP には反応せず、ヒト RBP に特異的に反応するヒツジ IgG 抗体、およびプロテインA-コロイド金を用いることで、外因性のヒト RBP がラットの細胞に取り込まれる経路を電顕上でコロイド金粒子として追跡することができる。こうして、星細胞表面には RBP に対する特異的受容体が発現していて、レチノール・RBP 複合体はその受容体を介したエンドサイトーシスによって取り込まれることが明らかとなった。

更に、最近、レチノール・RBP 複合体を細胞内に取り込む方法は一つだけでなく、caveola 構造を持つ potocytosis など複数の経路が存在することを示すことができた¹²⁾。

(4)

肝臓星細胞の細胞生物学

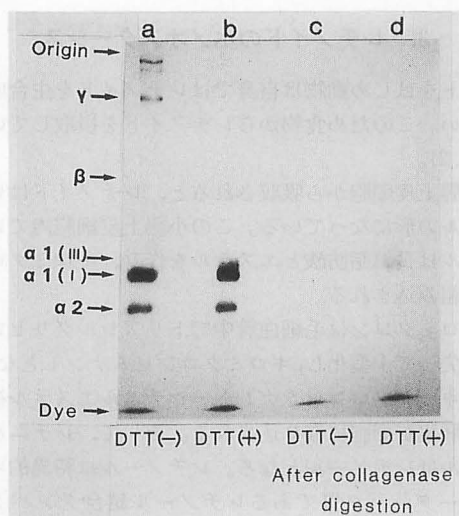


Fig. 4. Fluorescence autoradiogram of [^3H] proline-labeled proteins. Stellate cells at confluency in the secondary passage were cultured in a medium containing [^3H] proline for 18h. Collagenous proteins were partially purified from the cell layer and medium with pepsin digestion after precipitation with ammonium sulfate. SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis was performed before (a,b) or after (c, d) treatment with purified bacterial collagenase, and processed for fluorescence autoradiography. Lanes b and d: Samples reduced with dithiothreitol (DTT) before electrophoresis. Arrows indicate the migration positions of carrier rat collagen chains.

5. 星細胞によるコラーゲンの合成

上述のように、星細胞は生理的条件下では生体のレチノイド総量の80%を細胞質内の脂質滴内に貯蔵している。しかし、肝硬変等の病的条件下では、貯蔵しているレチニルパルミテート含有脂質滴を失い、盛んに分裂する。この時は、細胞の形が星型から線維芽細胞様あるいはmyofibroblasts様に変化し^{13,14)}、細胞周囲に多数のコラーゲン線維が観察される。

そこで、実際に星細胞はどのような分子種のコラーゲンをどのような割合で合成するのか、正常ラット肝臓から星細胞を単離して調べた¹⁵⁻¹⁸⁾。すると、初代培養2日目ではコラーゲン合成活性は低く、わずかなIV型コラーゲン(基底膜に存在するコラーゲン)を合成

するのみであった。ところが、初代培養8日目および継代培養すると、細胞が合成する全タンパク質の約10%がコラーゲンであり、しかもI型(88.2%)、III型(10.4%)、およびわずかなIV型(1.4%)を合成していた(Fig. 4)。即ち、星細胞は実際に肝硬変時に肝臓に増加するのと同じ型のコラーゲンを合成していた。

6. 細胞外マトリックス三次元構造による星細胞の形態・増殖・機能の可逆的制御

星細胞はコラーゲンを含む細胞外マトリックス(extracellular matrix, ECM)を合成・分泌する。

近年、コラーゲンやプロチオグリカン等のECMは細胞の形態・増殖・機能、組織形成、さらに発癌や癌転移などを制御する極めて動的な分子であることが徐々に明らかになってきた¹⁹⁾。

そこで、ECMによる星細胞機能の制御機構を調べる目的で、星細胞を単離して、無血清培地あるいは10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地で培養した。この際に、細胞はポリスチレン培養皿上に直接か、あるいはI型コラーゲンで被覆した培養皿上に播種した。すると、星細胞はポリスチレン上でよりもI型コラーゲン上ではるかに良く増殖し、コラーゲンの合成活性も高かった²⁰⁾。さらに詳細に調べるために、細胞を基底膜成分ゲル上に播種したところ、細胞は互に集まって網細工様構造をとり、ほとんど増殖せず、コラーゲン合成活性も極めて低かった^{21,22)}。また、細胞をI型コラーゲンのゲルの上に播種しても網細工様構造をとった。一方、I型コラーゲンゲルの中に埋め込んで培養すると、細胞は細長い突起を伸ばして、*in vivo*における形態に酷似していた。次に、細胞を上記の各細胞外基質に播種して3日後に酵素処理して、基質から分離し、再び各々の細胞外基質に播種しなおすと、各々新しい細胞外基質に応じて、細胞の形態・増殖率・コラーゲン合成活性が変化した²³⁾。このように、星細胞の形態・増殖・機能はECMの種類とその三次元構造によって、可逆的に制御されている。

7. ECMによる星細胞制御のメカニズム

ECMはどのようなメカニズムによって星細胞を制御するのであろうか。ECMに対する細胞の接着機構を介して制御するに違いない。

細胞は焦点接触(focal contacts)など種々の接着装

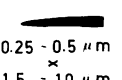






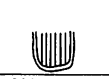
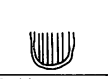

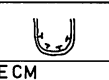
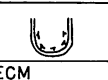



	name	bird's-eye view	longitudinal section	transverse section	main component	integrin
a	focal contact	 0.25 - 0.5 μm \times 1.5 - 10 μm	 ECM	 ECM	F-actin talin α -actinin vinculin	$\alpha_5 \beta_1$ $\alpha_6 \beta_1$ $\alpha_3 \beta_1$
b	podosome	 ϕ 200 - 400 nm	 ECM	 ECM	F-actin talin α -actinin vinculin	$\alpha \beta_2$ $\alpha \beta_3$
c	point contact 1	 ϕ 90 - 200 nm	 ECM	 ECM	F-actin talin α -actinin vinculin	$\alpha \beta_1$
d	point contact 2	 ϕ 90 - 200 nm	 ECM	 ECM	clathrin	$\alpha_1 \beta_1$
e	hemi-desmosome	 ϕ 400 nm	 ECM	 ECM	intermediate filament pempfigoid antigen	$\alpha_6 \beta_4$

Fig. 5. Cellular devices for adhesion to extracellular matrix. Bird's eye view showing areas of cell membrane attachment to the surface of extracellular substrates. Solid lines and points in longitudinal and transverse sections indicate actin stress fibers converging on the cellular devices. Broken lines in these sections indicate intermediate filaments. T, clathrin localized in point contacts ; ECM, extracellular matrix.

置によって細胞外基質に付着する^{15,24,25)}(Fig. 5)。これらの接装置の中では、分子レベルでの構築の解析は焦点接触で最も進んでいる。この場所にはECMに対する特異的受容体であるインテグリン (integrins) が細胞膜を貫いて存在している。インテグリンは細胞外ドメインでECMと結合し、細胞内ドメインでF-アクチンからなる張力線維とつながっている。焦点接触には複雑なタンパク質複合体が局在していて、インテグリンと張力線維をつなげている。これらのタンパク質のそれぞれの機能に関しては不明の点が多いが、ECMから細胞内への接着シグナルのトランスダクションに関与していると推測される。また、焦点接触にはタンパク質のリン酸化酵素、即ち、C-キナーゼ、焦点接触キナーゼ (pp 125^{fak}), pp 60^{c-src}などが局在している。

しかし、先述のように、ECMの三次元構造が星細胞の構造と機能を可逆的に制御している (Fig. 6) のであり、インテグリンを介する以外の三次元構造を認識する接着シグナルのトランスダクション機構の存在が推測される。

8. 結 語

近年、レチノイドには核内に特異的受容体が発見され、それら受容体はリガンド依存性の転写制御因子であることが判明した。レチノイドが正常に機能を発揮するには、生体における制御システムが不可欠であり、その制御システムは肝臓の星細胞を中心として構成されている。そして、この細胞の機能はECMの三次元構造によって可逆的に制御される。レチノイドもECMも種々の細胞機能を制御している。それらの分子の関連性を中心として、この細胞の形態と機能を分子レベルで一層明らかにすることにより、生命現象の理解がさらに増すとともに、新しい人工肝臓の設計などの応用への発展も期待される。

(6)

肝臓星細胞の細胞生物学

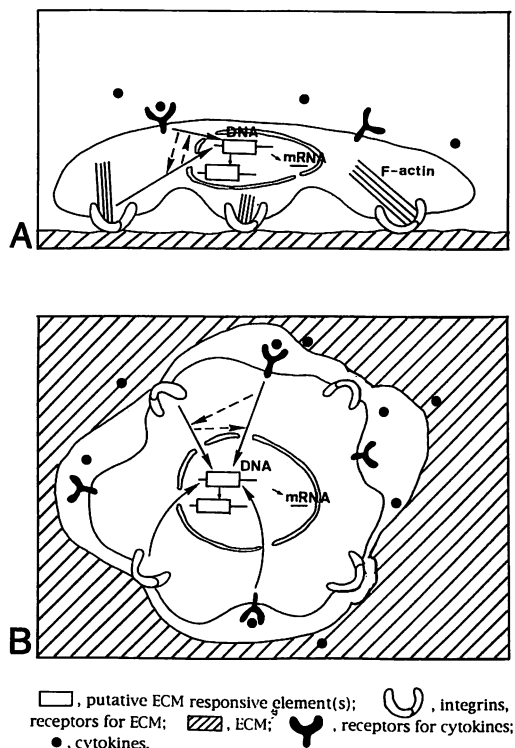


Fig. 6. Signal transduction from the outside to the inside of the stellate cells (sc) with special reference to the three-dimensional structure of ECM. The ECM has a three-dimensional architecture; the structure and functions of the stellate cells differ according to whether the cells are inoculated onto (A) or into (B) the same ECM. Solid lines show transmitting pathways from receptors for ECM or for cytokines to the putative ECM responsive element(s) of various genes. Cross-talking of the pathways is indicated by dashed lines.

文 献

- 1) 妹尾春樹 (1994) レチノイドと細胞外マトリックスの細胞生物学. 病態生理 13 : 168-175
- 2) 和気健二郎, 妹尾春樹, 金田研二, 段千恵子 (1983) 類洞細胞. 臨床科学 19 : 821-831
- 3) 妹尾春樹 (1985) 類洞壁細胞. 肝硬変をめぐる新しい知見—肝腺維化をめぐる—. ライフサイエンス社, 東京, pp 19-29
- 4) 妹尾春樹 (1994) 星細胞 (ビタミンA貯蔵細胞) の細胞生物学. ビタミン 68 : 501-513
- 5) 妹尾春樹 (1991) レチノイドの細胞取り込み機構の新展開. 実験医学 9 : 1372-1376
- 6) Senoo H, Stang E, Nilsson A, Kindberg GM, Berg T, Roos N, Norum KR, Blomhoff R (1990) Internalization of retinol-binding protein in parenchymal and stellate cells of the rat liver. J Lipid Res 31 : 1229-1239
- 7) Senoo H, Stang E, Kindberg GM, Berg T, Norum KR, Blomhoff R (1989) Uptake of retinol-binding protein in liver cells. Cells of the Hepatic Sinusoid 2 : 29-32
- 8) 妹尾春樹 (1989) レチノール結合蛋白の受容体. 細胞 21 : 468-472
- 9) Blomhoff R, Senoo H, Smeland S, Bjerknes T, Norum KR (1992) Cellular uptake of vitamin A. J Nutr Sci Vitaminol 38 : 327-330
- 10) Senoo H, Smeland S, Stang E, Berg T, Roos N, Norum KR, Blomhoff R (1993) Stellate cells take up retinol-binding protein. Cells of the Hepatic Sinusoid 4 : 423-425
- 11) Senoo H, Smeland S, Malaba L, Bjerknes T, Stang E, Berg T, Roos N, Norum KR, Blomhoff R (1993) Transfer of retinol-binding protein from human hepatoma HepG2 cells to cocultured rat stellate cells. Proc Natl Acad Sci USA 90 : 3616-3620
- 12) Malaba L, Smeland S, Senoo H, Norum KR, Berg T, Blomhoff R, Kindberg GM Retinol-binding protein and asialo-orosomucoid are taken up by different pathways in liver cells. J Biol Chem (in press)
- 13) Senoo H, Kaneda K, Wake K (1982) Suppression of experimental hepatic fibrosis by administration of vitamin A. In: Knook DL, Wisse E (eds) Sinusoidal Liver Cells. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, pp 217-222
- 14) Senoo H, Wake K (1985) Suppression of experimental hepatic fibrosis by administration of vitamin A. Lab Invest 53 : 182-194
- 15) 妹尾春樹, 畑隆一郎 (1993) 組織構築と細胞外マトリックス系—細胞外マトリックスへの細胞接着装置—. Tiss Cult Res Commun 12 : 237-245
- 16) Senoo H, Hata R, Nagai Y, Wake K (1984)

- Stellate cells (vitamin A-storing cells) are the primary site of collagen synthesis in nonparenchymal cells in the liver. *Biomed Res* **5** : 451-458
- 17) Senoo H, Hata R, Nagai Y, Wake, K (1986) Assembly and metabolism of collagen in the liver. *Cells of the Hepatic Sinusoid* **1** : 227-232
 - 18) 妹尾春樹, 畑隆一郎 (1993) 肝臓星細胞の単離法. *Connect Tiss* **25** : 129-137
 - 19) Senoo H, Hata R (1994) Extracellular matrix regulates cell morphology, proliferation, and tissue formaton. *Acta Anat Nippon* **69** : 719-733
 - 20) Senoo H, Hata R, Wake K, Nagai Y (1991) Isolation and serum free culture of stellate cells. *Cells of the Hepatic Sinusoid* **3** : 259-262
 - 21) Senoo H, Hata R (1994) Extracellular matrix regulates and L-ascorbic acid 2-phoshate further modulates morphology, cell proliferation, and collagen synthesis of perisinusoidal stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* **200** : 999-1006
 - 22) Senoo H, Hata R Regulation of morphology, proliferation, and collagen metabolism of perisinusoidal stellate cells by extracellular matrix. *Cells of the Hepatic Sinusoid* **5** : in press.
 - 23) Senoo H, Imai K, Sato M, Kojima N, Hata R Morphology, proliferation, and collagen metabolism of the perisinusoidal stellate cells are regulated reversibly by three-dimensional structure of extracellular matrix. *Hepatology* (submitted)
 - 24) 妹尾春樹 (1992) 細胞接着分子. 長沢俊彦 (監修), 腎臓学 Key Notes. 東京医学社, 東京, pp 36-38
 - 25) 妹尾春樹, 畑隆一郎 (1994) 細胞外基質とその受容体. *腎と透析* **37** : 1067-1074