

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07042

研究課題名(和文)臓器線維症と癌関連線維化におけるアクリン結合蛋白Girdinの役割

研究課題名(英文)Roles of Girdin in organ fibrosis and cancer associated fibrosis

研究代表者

浅井 直也 (Asai, Naoya)

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：80273233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：臓器線維症と癌間質線維化における線維化の分子機序を調べるため、細胞運動を制御するGirdin遺伝子と間葉系幹細胞マーカーのMeflin遺伝子に着目して研究を進めた。Girdinのリン酸化部位に変異を導入したGirdin S1416AとGirdin Y1764/1798Fの変異マウスにて、臓器線維化モデルおよび癌間質線維化による解析を行ったが、有意な差はなかった。Meflin欠損マウスにて強皮症に類似した皮膚線維症の発症を見出した。腎臓において、Meflin陽性細胞はレニン産生細胞への分化と腎間質線維化に関わり、Meflin陽性細胞の存在がIgA腎症の予後不良因子となることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、Meflin欠損マウスにはヒト疾患の強皮症に類似した皮膚線維症の病態が生じることが判明したことから、疾患モデルとしての有効利用が期待される。腎臓においてMeflin陽性細胞は血圧を制御するレニン産生細胞への分化を介して腎性高血圧へ関与すること、Meflin陽性細胞の数がIgA腎症の予後不良因子となるとともに、腎間質線維症への関与することから、Meflin遺伝子が腎疾患における新たな治療ターゲットとなる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Fibrosis can affect any organs and cancers, which lead poor prognosis in patients. To reveal mechanisms of fibrosis, we studied on Girdin and Meflin. With two mutant mice of Girdin S1416A and Girdin Y1764/1798F, we checked the importance of Girdin phosphorylation in fibrosis. Both Girdin mutant mice showed no significant impact of fibrotic status in organ fibrosis models in lung, liver and cancers. Meflin is a novel mesenchymal stem cell marker, and Meflin deficient mice show skin fibrosis, which is similar to systemic sclerosis in humans. By lineage trace experiment, we identified new subpopulation of kidney mesenchymal cells, which express Meflin and can differentiate into renin producing cells. Meflin-positive mesenchymal cells in kidney have important roles in kidney fibrosis, and patients of IgA nephropathy with many Meflin-positive cells show poor prognosis.

研究分野：実験病理学

キーワード：臓器線維症 癌関連線維芽細胞 間葉系幹細胞 遺伝子改変動物 細胞運動

1. 研究開始当初の背景

線維化は、傷害組織の修復ステップであるが、過剰な細胞外基質の蓄積により正常組織の機能障害・破壊が起こる。肺・肝・腎・心などの実質臓器の線維化は臓器線維症と呼ばれ、患者 QOL の低下と生命予後に関わる慢性疾患である。線維化の原因として、慢性炎症や感染、虚血による組織傷害に加え、癌の周囲間質における癌関連線維芽細胞(CAF)による線維化がある。線維化に関わる線維芽細胞の起源は多様で、局所の線維芽細胞、上皮細胞からの移行(EMT)、骨髄・末梢血の間葉系幹細胞(MSC)、perivascular fibroblast、膵臓の星細胞、肝臓の伊東細胞などが知られるが、障害部位へと遊走する細胞運動に関する分子機構には不明な点が多い。

申請者らは、セリン・スレオニンキナーゼ Akt の新規基質としてアクチン結合蛋白 Girdin を同定し、機能解析を進めてきた。Girdin は Akt によるリン酸化、EGF receptor や Src によるチロシンリン酸化で機能制御を受け(図1)、血管新生、神経新生、癌の浸潤における細胞運動を

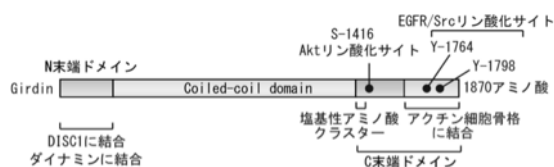


図1 Girdinの構造

制御するとともに、癌間質の CAF と損傷部の修復に働く線維芽細胞にも発現を示し、Akt リン酸化部位の変異マウス Girdin S1416A では癌間質の CAF の減少と腫瘍増殖抑制が見られた。また、「肝線維化において Girdin が重要な役割を示す」と海外から報告された。これらから、臓器線維症および癌関連線維化において、Girdin が重要な機能分子として作用していると想定された。

また我々は、MSC のマーカーおよびその未分化性維持に必要な分子として新規 GPI アンカー型膜分子 Meflin を同定し、肺線維化モデルでの線維芽細胞巣およびヒト膵癌・乳癌・大腸癌の CAF での発現を確認している。個体レベルでの機能解析を行う際に tamoxifen 誘導性 CreERT2 の Meflin 遺伝子座へのノックインマウス (Meflin-CreERT2 マウス) を用いることで、線維化症の解析において MSC 由来の線維芽細胞に特異的な知見を得ることが可能となる。

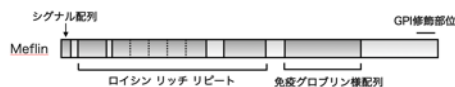


図2 Meflinの構造

2. 研究の目的

「臓器線維症と癌関連線維化において Girdin が重要な共通機能分子である」との仮説の検証を本研究の目的とした。Girdin はアクチン骨格の制御を介して細胞運動に機能する分子であることから、線維化病巣に線維芽細胞が集積する際の細胞運動への Girdin の役割について解析した。また、線維化における間葉系幹細胞 (MSC) の役割を調べるために、特異性の高い MSC マーカーである Meflin を用いての実験を行う過程において、Meflin 変異マウスに皮膚線維症が生じることを見出したことから、Meflin 遺伝子自体にも注目して線維化症の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) Girdin 変異マウスにおける、臓器線維化と癌線維化モデルでの解析

2 系統の Girdin リン酸化部位変異マウスを作製して解析を行う。使用した変異マウスの一つは Akt によるリン酸化修飾部位 S1416 の変異マウス Girdin S1416A で、血管新生の障害や神経機能の異常を示す。もう一つの変異マウスは EGFR と Src によるリン酸化修飾部位 Y1764 と Y1798 の重複変異マウス Girdin Y1764/1798F で、PI3K/Akt シグナル伝達を制御する。

臓器線維症として、ブレオマイシンの経気管投与による肺線維症モデル、四塩化炭素腹腔内投与における肝線維化モデル、皮膚の損傷治療モデルおよびブレオマイシン皮下接種による強皮症類似の皮膚線維化モデルを用いた。また、癌による線維化モデルとして培養腫瘍細胞の皮下移植モデルを用いた。変異マウスと野生型での線維化の比較を行ない、線維化組織における、Girdin のリン酸化動態を調べた。

(2) Meflin 変異マウスにおける皮膚線維化と癌線維化の解析

本研（究を遂行する過程において、Meflin 欠損マウスが皮膚線維症を発症することを見出したことから、Meflin 遺伝子による線維化病態への関与について解析を行うこととした。Meflin 変異マウスにおける皮膚線維化の発症過程を調べるとともに、既知のブレオマイシン皮下接種による皮膚線維症モデルと比較した。また、癌間質における線維化について調べた。

(3) Meflin 陽性細胞の lineage trace と腎間質線維症に着目した解析

Meflin-CreERT2 マウスを用いての MSC 特異的な Girdin ノックアウトのための予備実験として、レポーターマウスとの交配による lineage trace を行ったところ、腎臓糸球体の血管極に局在する Meflin 陽性を見出したことから、腎臓における Meflin の機能解析と腎間質線維化症との関連を調べた。

4. 研究成果

(1) Girdin 変異マウスにおける、臓器線維化と癌線維化モデルでの解析

肺線維症モデルおよび癌間質における幼弱な線維化巣の線維芽細胞には Girdin の発現が強く誘導されるとともに、S1416 残基および Y1764, 1798 残基がリン酸化されていた。2 系統のリン酸化部位変異マウスを用いて、各種の線維化モデルにて線維化の程度を比較したが、個体間での表現型の差が大きかったために評価は難しく、有意な結果は得られなかった。また、Meflin-CreERT2 マウスを用いたコンディショナルノックアウトの系でも評価を試みたが、線維芽細胞でのノックアウト効率が低かったため信頼できるデータを得ることが難しかった。同研究において、期待されたデータは十分に得られなかったが、Meflin-CreERT2 マウスを扱う過程で、Meflin 欠損マウスのホモに皮膚の線維化症が生じていることを見出し、Meflin に関する以下の研究を進めるキッカケを得ることとなった。

(2) Meflin 変異マウスにおける皮膚線維化と癌線維化の解析

Meflin 欠損マウスのホモの皮膚を経時的に調べたところ、出生時では野生型と差がなく、2 週齢より真皮での線維化が始まり、8 週齢まで線維化の進行があった（図 3）。線維化の程度はブレオマイシン皮下接種とほぼ同等であり、Meflin 欠損とブレオマイシン接種との重複では、より強い線維化が生じた。ブレオマイシン接種による皮膚線維症モデルはヒト強皮症との表現型の類似が知られ、ブレオマイシン接種のプロトコールによっては皮膚だけではなく腸管などにも線維化を起こすことが出来る。Meflin 欠損マウスの全

身を調べたが、皮膚以外の臓器には線維化は生じていなかった。Meflin は発生過程における間質細胞の未分化性の維持に働くと考えられ、Meflin 欠損マウスには骨細胞への分化促進によって骨肥厚が生じる。今回、新たに見出された皮膚線維化についても線維細胞への分化促進が発症機序と考えられた。

癌間質線維化における Meflin の機能を調べるため、間質の線維化の誘導能が強い CMT93 細胞（マウス大腸癌細胞株）を皮下移植したところ、Meflin 欠損マウスでは癌間質に強い線維化が誘導された（図 4）。我々の研究グループ内での

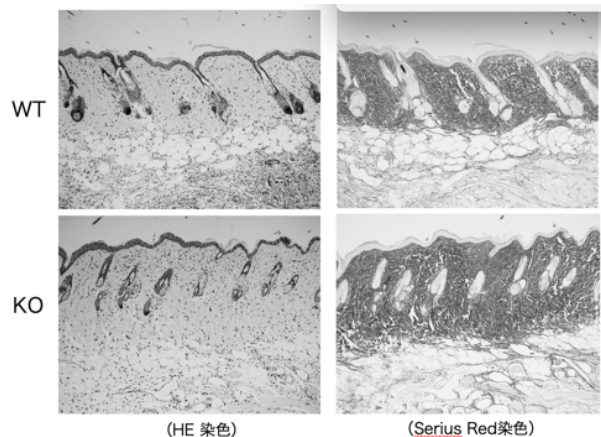


図 3 Meflin 欠損マウスにおける皮膚線維症

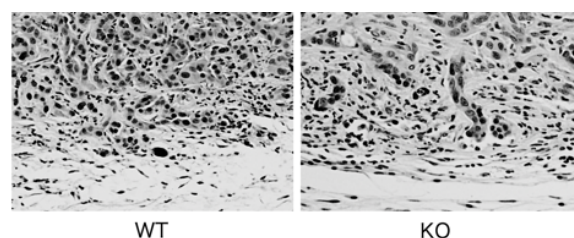


図 4 Meflin 欠損マウスにおける癌間質の線維化

別プロジェクトによるデータでは、膵癌を自然発症する KPC 発癌マウスモデルの系にて Meflin を欠損させると、発生する膵癌が間質増生を伴った低分化な組織型を示して予後不良となる (Mizutani et.al. Cancer Res. 2019)。これらのデータは、癌間質での線維化における Meflin の役割を示すと考えられた。

3) Meflin 陽性細胞の lineage trace と腎間質線維症に着目した解析
tdTomato 蛍光タンパクレポーターマウスと、Meflin-CreERT2 ノックインマウスを組み合わせた lineage trace にて、未熟な Meflin 陽性細胞から骨・軟骨細胞、白色・褐色脂肪細胞、筋細胞、筋線維芽細胞への分化が示され、Meflin が特異性の高い間葉系幹細胞マーカーであることが確認された。興味深いことに、腎臓での Meflin 陽性細胞の一部は糸球体血管極に分布しており、レニン産生細胞への分化能を有していた。

また、腎間質線維化モデルにおいて、Meflin 陽性細胞は線維芽細胞の発生母体となり、線維化に重要であることが分かった。ジフテリア毒素と Meflin-DTR ノックインマウスを組み合わせた実験系にて Meflin 陽性細胞を除去すると腎間質線維化は抑えられた。また、ヒト患者の腎生検での検体において、Meflin 陽性細胞のスコアが高い患者では IgA 腎症の予後は不良であった (図 5)。従って、腎間質線維化症において Meflin 陽性細胞は線維化を起こす細胞の発生母体として重要であると考えられた (Minatoguchi e.al. submitting)。

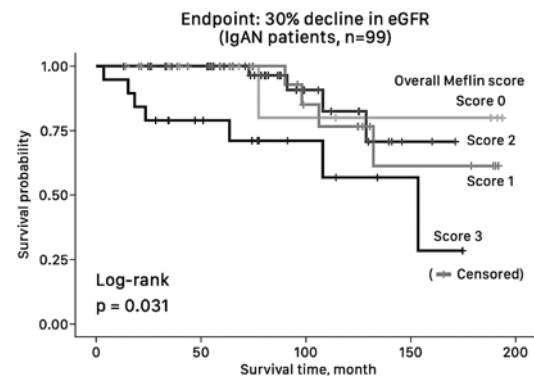


図 5 Meflin発現スコアが高い IgA腎症の患者は予後不良

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mizutani Y, Kobayashi H, Iida T, Asai N, Masamune A, Hara A, Yamaguchi J, Wang T, Woods SL, Worthley D, Shimamura T, Fujishiro M, Hirooka Y, Enomoto A, Takahashi M. et al.	4. 巻 79
2. 論文標題 Meflin-Positive Cancer-Associated Fibroblasts Inhibit Pancreatic Carcinogenesis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 5367-5381
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-19-0454.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hara A, Kobayashi H, Asai N, Saito S, Higuchi T, Kato K, Okumura T, Bando YK, Takefuji M, Mizutani Y, Miyai Y, Saito S, Maruyama S, Maeda K, Ouchi N, Nagasaka A, Miyata T, Mii S, Kioka N, Worthley DL, Murohara T, Takahashi M, Enomoto A.	4. 巻 125
2. 論文標題 Roles of the Mesenchymal Stromal/Stem Cell Marker Meflin in Cardiac Tissue Repair and the Development of Diastolic Dysfunction.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circ. Res.	6. 最初と最後の頁 414-430
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCRESAHA.119.314806.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi H, Gieniec KA, Wright JA, Wang T, Asai N, Mizutani Y, Iida T, Ando R, Suzuki N, Lannagan TRM, Ng JQ, Enomoto A, Takahashi M, Worthley DL, Woods SL.	4. 巻 160
2. 論文標題 The Balance of Stromal BMP Signaling Mediated by GREM1 and ISLR Drives Colorectal Carcinogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1224-1239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1053/j.gastro.2020.11.011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hara A, Kato K, Ishihara T, Kobayashi H, Asai N, Mii S, Shiraki Y, Miyai Y, Ando R, Mizutani Y, Iida T, Takefuji M, Murohara T, Takahashi M, Enomoto A.	4. 巻 -
2. 論文標題 Meflin defines mesenchymal stem cells and/or their early progenitors with multilineage differentiation capacity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes Cells.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12855.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学医学部 腫瘍病理学・分子病理学分野
<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/patho2/>

6. 研究組織

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
オーストラリア	University of Adelaide		