

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：32650
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2021
課題番号：20K18488
研究課題名(和文) IQGAP1が細胞外マトリックスリモデリングを制御する

研究課題名(英文) IQGAP1 regulates extracellular matrix remodeling

研究代表者

中島 啓 (Nakajima, Kei)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：20733463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞骨格の制御に関わることが知られている細胞内タンパク質であるIQGAP1が、線維芽細胞の接着を介してコラーゲンの生成と分解(細胞外マトリックスリモデリング)に影響を与えることを、分子生物学的に示すことを目的とした。
IQGAP1の発現を低下した線維芽細胞では、細胞伸展突起の数が減少し、遊走能が低下することが考えられた。さらに、コラーゲンの貪食能、分解能が低下することが示された。このことから、IQGAP1が細胞外マトリックスリモデリングに影響を与えることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コラーゲンは体内で最も多いタンパク質であり、その生成と分解(細胞外マトリックスリモデリング)は、様々な分子の相互作用により制御されている。細胞外マトリックスリモデリングの不均衡は、歯科においても歯肉増殖症や歯の骨性癒着をはじめとした種々の疾患の原因となっている。本研究では、細胞骨格の制御に関わることが知られている細胞内タンパク質であるIQGAP1が、コラーゲンのリモデリングにも影響を与えることが示唆された。それにより、歯肉増殖症のような線維増生性病変における分子標的治療法・予防法の確立へと発展させることが可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：An intracellular protein IQGAP1 is known to be involved in the regulation of the cytoskeleton. The purpose of this study was to investigate IQGAP1 affects collagen production and degradation (extracellular matrix remodeling) via fibroblast adhesion.

In fibroblast with knockdown of IQGAP1, the number of cell protrusions was reduced and migration ability was thought to be decreased. Furthermore, the phagocytosis and degradation of collagen were shown to be decreased in the knockdown cells. These results suggests that IQGAP1 affects extracellular matrix remodeling.

研究分野：口腔病理学

キーワード：線維芽細胞 コラーゲン 歯周組織 small GTPase

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

コラーゲンはヒトの生体内で最も多いタンパク質であり、細胞外マトリックス (ECM) の主要な成分である。歯科領域では、歯根膜や歯肉結合組織の主成分はコラーゲンであり、その生成と分解 (ECM リモデリング) は組織中の線維芽細胞が主体となって行なわれる。ECM リモデリングの不均衡は、組織の創傷治癒不全を引き起こす他、歯肉増殖症や歯・顎関節の骨性癒着 (強直) に代表される疾患も招く。これらの疾患の治療および予防のためには、ECM リモデリングのメカニズム解明が必須である。

ECM リモデリングにおいて線維芽細胞は、貪食および酵素によるコラーゲンの分解を行うためインテグリンを介してコラーゲンに接着し、仮足形成など細胞形態を変化させる必要がある。仮足を伴う細胞の伸展には細胞骨格、特にアクチンフィラメントの重合と脱重合が必要であり、それらはゲルソリンなどのアクチン結合タンパク質、Rac や cdc42 などの低分子量 G タンパク質が制御していることが明らかとなっているが、それぞれの分子の相関については未だ不明な点も多い。

2. 研究の目的

これまでの研究から、線維芽細胞においてアクチン結合型タンパク質である IQGAP1 が、ゲルソリンファミリーの一つである Flightless I (FliI) と結合し、協調して cdc42 の制御を行うことを示してきた。本研究では IQGAP1 が、線維芽細胞の ECM への接着と細胞伸展を制御してコラーゲンの貪食・分解に影響を与えることを分子生物学的に明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 線維芽細胞における IQGAP1 の発現と局在

線維芽細胞に IQGAP1 が発現しているかどうかを明らかにするため、野生型および IQGAP1 ノックアウトマウスより樹立した胎児由来線維芽細胞を用いて Western blotting を行った。また、発現する IQGAP1 の局在を示すため、蛍光免疫染色を実施した。細胞試料としては、ヒト歯肉線維芽細胞も合わせて使用した。

(2) IQGAP1 の有無による細胞伸展および仮足形成の評価

IQGAP1 が、線維芽細胞における細胞伸展および仮足形成に影響があるかどうかを明らかにするため、経時的に細胞の観察を行った。細胞は時間ごとに固定し、F-アクチンを染色後に顕微鏡にて観察した。

(3) コラーゲン貪食能の評価

IQGAP1 が、線維芽細胞のコラーゲン貪食能に影響を与えるかどうかを明らかにするため、FITC 標識の I 型コラーゲンをコーティングしたビーズを用いた貪食実験を行った。

(4) コラーゲン分解能の評価

IQGAP1 のコラーゲン分解に対する影響を明らかにするため、I 型コラーゲンゲルに IQGAP1 野生型およびノックアウト細胞を播種し、コラーゲン分解能を免疫組織化学的に計測した。

4. 研究成果

(1) 線維芽細胞における IQGAP1 の発現と局在

Western blotting にてヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) では、IQGAP1 の発現が認められた。胎児由来線維芽細胞では、野生型にて発現を認めるが、ノックアウトした細胞では IQGAP1 の発現が観察されないことを確認した。HGF を用いた免疫蛍光染色において、IQGAP1 の発現は細胞質全体に観察されたが、特に Vinculin の発現した細胞接着部において強く認められた。(図 1)

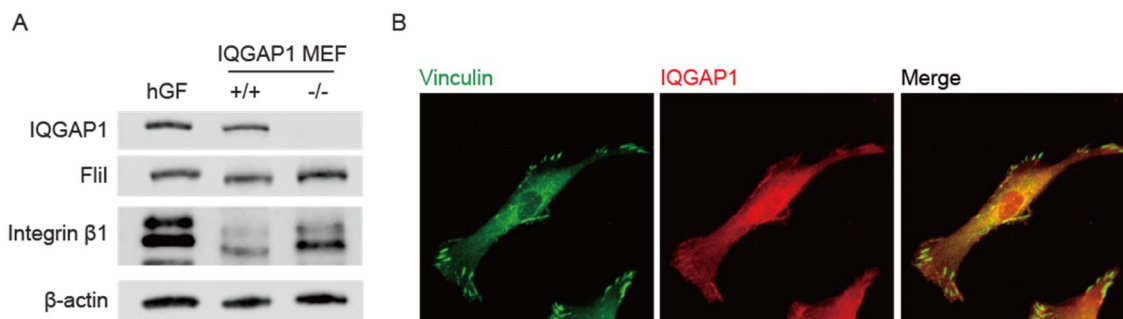


図 1: 線維芽細胞を用いた IQGAP1 の発現と局在
(A) Western blotting、(B) 免疫蛍光染色

2) IQGAP1 の有無による細胞伸展および仮足形成の評価

胎児由来線維芽細胞にて、細胞伸展突起を計測したところ、野生型に比較して IQGAP1 をノックアウトした細胞では伸展突起の数に有意な減少を認めた。IQGAP1 は、線維芽細胞の遊走に正の影響を与えていることが示唆された。(図 2)

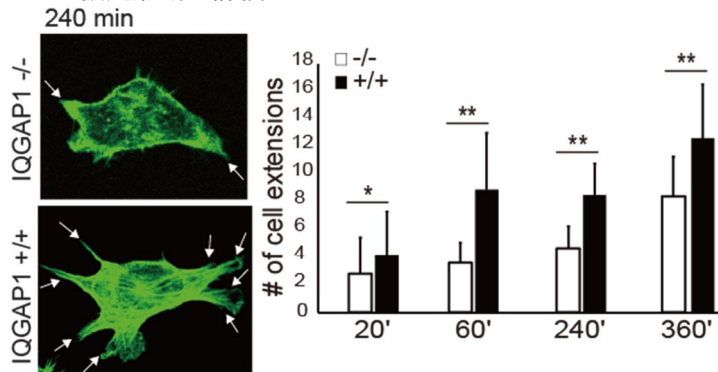


図 2 : IQGAP1 の有無による細胞伸展の評価

(3) コラーゲン貪食能の評価

FITC コラーゲンにてコーティングしたビーズを用いた貪食実験では、IQGAP1 をノックアウトした線維芽細胞において細胞内に取り込んだビーズ数が有意に減少した。IQGAP1 は線維芽細胞によるコラーゲンの貪食に必要であることが示唆された。(図 3)

(4) コラーゲン分解能の評価

コラーゲングル上に播種した線維芽細胞において、コラーゲン分解能を評価した。MMP によって切断された I 型コラーゲン 3/4 フラグメントの抗体を用いて検出したところ、IQGAP1 をノックアウト細胞で分解されたコラーゲンの発現減少が認められた。IQGAP1 は MMP を介したコラーゲンの分解能にも影響を与えることが示唆された。(図 3)

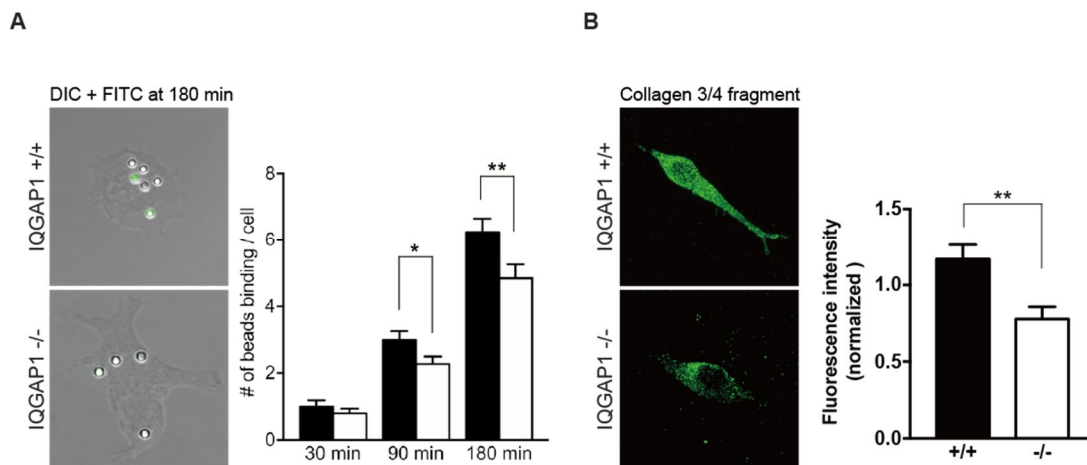


図 3 : IQGAP1 の有無によるコラーゲン貪食能 (A) および分解能 (B) の評価

これらの結果より、IQGAP1 は線維芽細胞における接着、遊走に必要であり、さらにコラーゲンの貪食や分解にも影響を与えることが考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Arora P. D., Nakajima K., Nanda A., Plaha A., Wilde A., Sacks D. B., McCulloch C. A.	4. 巻 31
2. 論文標題 Flightless anchors IQGAP1 and R-ras to mediate cell extension formation and matrix remodeling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 1595 ~ 1610
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.e19-10-0554	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 該当する
1. 著者名 Kei Nakajima, Yoshihiko Akashi, Masami Sumi, Takatoshi Chujo, Katsutoshi Kokubun, Kenichi Matsuzaka	4. 巻 12
2. 論文標題 A novel model demonstrates the successful repair of alveolar cleft defects by tooth germ transplants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本口腔検査学会雑誌	6. 最初と最後の頁 46 ~ 52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakajima Kei, Arora Pamela D., Plaha Ajay, McCulloch Christopher A.	4. 巻 236
2. 論文標題 Role of the small GTPase activating protein IQGAP1 in collagen phagocytosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 1270 ~ 1280
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcp.29933	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nemoto Atsushi, Akashi Yoshihiko, Nakajima Kei, Kokubun Katsutoshi, Sasaki Kenichi, Inoue Takashi, Matsuzaka Kenichi	4. 巻 33
2. 論文標題 The effects of recombinant human basic fibroblast growth factor on nerve regeneration in a partial defect inferior alveolar nerve model in rabbits	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 348 ~ 353
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajoms.2020.12.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akashi Yoshihiko, Nemoto Atsushi, Nakajima Kei, Kokubun Katsutoshi, Murakami Satoshi, Inoue Takashi, Matsuzaka Kenichi	4. 巻 7
2. 論文標題 The effect of fibroblast growth factor 7 on human dental pulp stem cells for differentiation to <scp>AQP5</scp> positive and <scp>SMA</scp> positive cells <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Dental Research	6. 最初と最後の頁 344 ~ 353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cre2.423	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Nakajima, K, Arora, PD, McCulloch, CA
2. 発表標題 Role of IQGAP1- Flightless I interaction in collagen remodeling by fibroblast.
3. 学会等名 62th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------