

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08183

研究課題名(和文)異種細胞間の細胞接着装置の恒常性維持機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of homeostatic mechanisms of cell adhesion apparatus between heterologous cells

研究代表者

三浦 綾子 (Miura, Ayako)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：70710903

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)：多細胞生物における細胞どうしの相互作用は、さまざまな細胞接着装置によって担われている。これらの細胞間接着装置はいずれも、アクチン細胞骨格によって裏打ちされ、力学的シグナルを介した細胞間コミュニケーションの確立に寄与している。本研究では、様々な異種細胞間の細胞間コミュニケーションのシグナル伝達機構の詳細な解析を行った。この異種細胞間の細胞間コミュニケーションは極めて多彩であると考えられているが、共通した分子基盤の理解はさまざまな疾患の病態解明と新規治療法の創出につながる事が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異なるタイプの細胞間相互作用は、免疫細胞やがん細胞の遊走・浸潤などの際にみられるが、これらの相互作用は相互コミュニケーションを目的としたものではないと考えられてきた。ところが最近、この異なるタイプの細胞間接着においても、積極的な細胞間コミュニケーションが生じている例が明らかとなってきた。しかしながら、その確立機構や生理的意義には依然不明な点が多く残っていた。本研究では、異種細胞間における接着装置形成・維持に重要なシグナル伝達機構の一部分を明らかにすることができた。今後さらに、本研究を発展させることで臨床応用につながる可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Cell-cell interactions in multicellular organisms were carried out by a variety of cell-cell adhesion apparatuses. All of these cell-cell adhesion apparatuses were lined by the actin cytoskeleton, which contributes to the establishment of cell-cell communication via mechanical signals. In the present study, we analyzed in detail the signaling mechanisms of intercellular communication between various heterologous cells. This intercellular communication between heterogeneous cells is considered to be extremely diverse, and understanding the common molecular basis is expected to lead to the elucidation of the pathogenesis of various diseases and the creation of novel therapeutic methods.

研究分野：薬理学

キーワード：Formin アクチン ペプチド

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物における細胞どうしの相互作用は、さまざまな細胞接着装置によって担われている。これらの細胞間接着装置はいずれも、アクチン細胞骨格によって裏打ちされ、力学的シグナルを介した細胞間コミュニケーションの確立に寄与しているが、基本的に同じタイプの細胞どうしの間に形成され、同種細胞の協調的運動に関わっている。

一方で、異なるタイプの細胞間の相互作用は、免疫細胞やがん細胞の遊走・浸潤などの際にみられるが、これらの相互作用は協調的というよりもむしろ対峙的な意味合いをもち、相互コミュニケーションを目的としたものではないと考えられてきた。ところが最近、この異なるタイプの細胞間接着においても、積極的な細胞間コミュニケーションが生じている例が明らかとなってきた。しかしながら、その確立機構や生理的意義には依然不明な点が多い。

本研究では、異種細胞間における接着装置形成・維持に極めて重要なシグナル伝達機構を明らかにすることを目的とする。異種細胞間の細胞間コミュニケーションは極めて多彩だが、共通した分子基盤の理解はさまざまな疾患の病態解明と新規治療法の創出につながることを期待される。

今回、以下の3つのテーマで細胞間コミュニケーションのシグナル伝達機構を解析した。

- (1) アクチン重合促進因子である Formin の中の Fhod1 に着目し、組織において発現の高かった肺と肺泡マクロファージの細胞間コミュニケーションのシグナル伝達機構を詳細に解析する。
- (2) 急性呼吸促迫症候群(acute respiratory distress syndrome, ARDS) において重要な役割を果たしていると考えられている炎症細胞は、好中球と肺泡マクロファージである。肺泡マクロファージは活性化した好中球によって活性化され、サイトカインを産生し、ARDS の線維化に関与していると報告されている。今回、ARDS の線維化過程における線維芽細胞及び筋線維芽細胞の核内 LOXL2 阻害の重要性に着目した検討を行う。
- (3) 膵島は、 α 細胞、 β 細胞、 δ 細胞、 ϵ 細胞、PP 細胞の5つの細胞と膵島内に栄養を運ぶ血管により構成される。この5つの細胞は個々の機能を有しているが相互に細胞間コミュニケーションをとり、機能を維持していると考えられている。今回、膵 β 細胞機能を制御する新規ペプチド NERP-4 とその結合蛋白質アミノ酸トランスポーターSNAT2 のシグナル伝達機構および機能解析を行う。

2. 研究の目的

本研究では、異種細胞間における接着装置形成・維持に極めて重要なシグナル伝達機構を明らかにすることを目的とする。今回、以下の3つのテーマで細胞間コミュニケーションの詳細なシグナル伝達機構を解析し、細胞間コミュニケーションの共通した分子基盤の理解を得たいと考えた。

- (1) 肺組織および肺泡マクロファージにおける Fhod1 の発現および、肺泡マクロファージの走化性物質刺激による遊走メカニズムの解析
脊椎動物には15種類の Formin ファミリー分子が存在するが、その中の Fhod サブファミリーには Fhod1 と Fhod3 の2つが存在する。これまで我々は、Fhod3 が、心筋サルコメア内のアクチン線維形成を担うこと(Taniguchi et al., *JBC* 2009)、さらに、出生後の心臓においても、心機能の維持並びに負荷への肥大応答に必要であることを明らかにした(Matsuyama et al., *PNAS* 2018 他)。一方で、Fhod1 は、ユビキタスに発現しており、ROCK kinase の下流で Fhod1 が活性化されて、アクチン線維形成に必要であることを報告している(Takeya and Sumimoto., *JCS* 2003, Takeya et al., *EMBO J* 2008)。中でも、Fhod1 は肺組織に高発現していることを見出しており(Sanematsu et al., *Cytoskeleton* 2019)、特殊な機能形態を持つ肺組織は、Fhod1 が肺上皮細胞の細胞骨格形成機構に重要ではないかと考えた。今回我々は、さらに解析を進め、肺組織だけではなく肺泡マクロファージにおいても Fhod1 が発現していたため肺と肺泡マクロファージの細胞間コミュニケーションに着目し、詳細に解析したいと考えた。
- (2) プレオマイシン(BLM)誘発肺障害マウスのLOXL2の発現制御およびARDS患者の気管支肺泡洗浄液(BALF)解析
重篤な呼吸不全を呈する ARDS は死亡率約 40% に及ぶ症候群である (Bellani et al., *J. Am. Med. Assoc* 2016)。現在、有効な治療薬はなく、ARDS の病態メカニズムにおいて線維化は重要な予後不良因子の一つである。筋線維芽細胞は、 α -SMA(α -smooth muscle actin)を発現する細胞と定義され、線維性疾患の進行に不可欠な細胞種であり、強固な細胞外マトリックスの形成に関与する (Rockey et al., *N. Engl. J. Med.* 2015)。Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2)は銅依存性アミノキシダーゼであり、リジン残基の酸化的脱アミノ反応を介してコラーゲンとエラスチンを架橋し、細胞外マトリックス(ECM)を成熟させ、線維化を進展させる (Rowbottom et al., *J. Med. Chem* 2017)。さらに、LOXL2 は細胞内で転写調節にも関わる。しかしながら、肺線維症に対する LOXL2 モノクロー

ナル抗体 (AB0023)を用いた第2相試験において臨床的効果が認められなかったことは、LOXL2の細胞外酵素活性を標的とするだけでは線維化の進展防止には不十分である可能性を示唆した(Muir et al., *Hepatology* 2019)。

今回我々は、C57BL/6J マウスとマウス肺線維芽細胞株である Mlg2908 (CCL-206TM)細胞、及び ARDS 患者の気管支肺泡洗浄液(BALF)サンプルを用いて、ARDS 病態メカニズムにおける LOXL2 の役割を詳細に解析したいと考えた。

(3) 膵β細胞保護作用をもつ新規内因性ペプチドNERP-4の同定と糖尿病モデルマウスを用いたNERP-4治療効果の検討

世界中の糖尿病患者数は、生活習慣と社会環境の変化に伴い、急速に増加している。糖尿病は治癒することなく、治療を開始しないと、網膜症・腎症・神経障害などの合併症を引き起こす。さらに、糖尿病患者は、虚血性心疾患、脳卒中などの心血管疾患の発症や進展を促進することも知られている。よって、糖尿病患者のQOLを著しく低下させ、経済的負担が大きくなり、今後の高齢化に従って患者数は増大すると予測できる。高脂肪食や過食が続くと、インスリンを産生分泌する膵臓のβ細胞で糖脂毒性による酸化ストレスや小胞体ストレスが亢進し、ミトコンドリア機能障害から膵β細胞機能不全が生じる。

膵β細胞においてアミノ酸(グルタミン、アラニン、アルギニンなど)は、インスリン分泌を促進することが報告されている(Newsholme P et al., *Biochem. Soc. Trans.* 2007)。低グルタミン血症や分子鎖アミノ酸(バリン、ロイシン、イソロイシン)高血症は、糖尿病の発症リスクとなり、アミノ酸異常は糖尿病の病因にも深く関与することが示唆されている。しかし、アミノ酸異常が糖尿病の病因となる詳細な分子機序は分かっていない。

今回我々は、膵β細胞保護作用をもつ新規内因性ペプチドNeuroendocrine regulatory peptide-4 (NERP-4)を同定し、膵島における機能および作用機序を詳細に検討したいと考えた。

3. 研究の方法

(1) 肺組織および肺泡マクロファージにおける Fhod1 の発現および、肺泡マクロファージの走化性物質刺激による遊走メカニズムの解析

Fhod1 遺伝子座に LacZ 遺伝子を挿入した Fhod1 欠損マウスと野生型(コントロール(CTRL))マウスを用いて Fhod1 の機能解析を行った。Fhod1 の発現を確認するため、CTRL マウスおよび Fhod1 欠損マウスの肺組織を摘出し、ホモジナイザーで破砕、蛋白質抽出を行い、ウサギ抗 Fhod1 抗体を用いて、イムノプロットを行った。さらに、肺組織中の Fhod1 発現細胞を検出するために、X-gal 染色を行った。

また、BALF を回収し、フローサイトメトリー(FACS)を用いて、肺泡マクロファージの割合を確認した。93%以上の細胞が肺泡マクロファージであったため、BALF を肺泡マクロファージ分画とし、蛋白質抽出を行い、ウサギ抗 Fhod1 抗体を用いて、イムノプロットを行った。

細胞の形態を免疫染色にて確認するために、CTRL マウスおよび Fhod1 欠損マウスの BALF を肺泡マクロファージ分画として、ガラスボトム dish に播種し、5時間培養後に走化性物質を添加し、F-アクチン(Phalloidin)染色を行った。

さらに、スライドガラスに播種した肺泡マクロファージおよび、肺組織切片をマクロファージマーカーである抗 F4/80 抗体にて DAB 染色し、2%OsO₄にて増感し、低真空走査顕微鏡(低真空 SEM)を用いて、細胞のサイズ、表面形態を観察した。

(2) ブレオマイシン(BLM)誘発肺障害マウスの LOXL2 の発現制御および ARDS 患者の BALF 解析

BLM 誘発肺傷害マウスの炎症期 (BLM 気管内投与後7日目)と線維化期 (BLM 気管内投与後14日目)における LOXL2 の発現を全肺の mRNA、タンパク発現レベルで解析した。さらに、BALF 中の LOXL2 濃度の測定および、BLM 誘発肺傷害マウスの肺組織および、BLM 誘発肺傷害マウスから単離培養した肺線維芽細胞における LOXL2 の局在を蛍光免疫染色法にて解析した。

また、TGF-β1 刺激下の Mlg2908 細胞株における LOXL2 の発現解析を行った。Mlg2908 細胞株で siRNA による LOXL2 の発現抑制を行い、TGF-β1 誘導性の FMT、コラーゲン産生、細胞内アクチンストレスファイバー形成、proto-myofibroblast マーカー、TGFβ-1 /pSmad2 /Snail シグナル活性を解析した。

さらに、ARDS 患者群を high-resolution computed tomography (HRCT) の所見により 滲出期、増殖期、線維化期に分類し、ARDS 患者群とコントロール群の BALF 中の LOXL2 濃度を比較した。

(3) 膵β細胞保護作用をもつ新規内因性ペプチドNERP-4の発見と糖尿病モデルマウスを用いたNERP-4治療効果の検討

アポエクオリンマウスの膵臓組織を用いて、細胞内 Ca²⁺ 増加活性のある新規生理活性ペプチド NERP-4 を見出し、NERP-4 の機能解析を行った。NERP-4 は、ヒト、ラット、マウス間でアミノ酸配列が完全保存された、19 アミノ酸中にプロリンを8つ含むペプチドである。膵β細胞における NERP-4 の意義を解析し、創薬・臨床応用への発展を目指した。

今回、膵β細胞由来MIN6-K8細胞、単離マウスおよびヒト膵島、肥満糖尿病モデルの*db/db*マウスを用い、*in vitro*、*in vivo*におけるNERP-4の内因性機能を解析した。

4. 研究成果

(1) 肺組織および肺泡マクロファージにおける Fhod1 の発現および、肺泡マクロファージの走化性物質刺激による遊走メカニズムの解析

我々の研究室にて作製した Fhod1 特異的抗体を用いて、CTRL マウスの肺と肺泡マクロファージに Fhod1 が発現していることをイムノプロットにて検出した。一方、Fhod1 欠損マウスには Fhod1 は発現していなかった。次に、Fhod1 の発現細胞の探索を X-gal 染色法を用いて行い、Fhod1 欠損マウスの肺組織中の肺上皮細胞および肺泡マクロファージにシグナルを検出した。

さらに、Fhod1 欠損マウスの肺泡マクロファージの細胞骨格に着目した形態的特徴を確認するために、Phalloidin 染色を行った。CTRL マウスと Fhod1 欠損マウスの肺泡マクロファージの5時間培養後の Phalloidin 染色像は、形態的に差はなく、丸型や、やや楕円型をしており、細胞接着面にドット状のポドソームが形成されていた。一方、走化性物質添加3分後の形態を比較すると CTRL マウスの肺泡マクロファージでは、Phalloidin が一方向に強く偏る polarization した細胞が多く存在した。しかしながら、Fhod1 欠損マウスの肺泡マクロファージは、polarization した細胞が有意に少なかった。

また、長時間の培養後の細胞の Spreading レベルを比較したところ、Fhod1 欠損マウスの肺泡マクロファージは Spreading レベルが CTRL マウスよりも低値であった。

CTRL マウスと Fhod1 欠損マウスの肺泡マクロファージおよび、肺組織切片に抗 F4/80 抗体にて DAB 染色し、2%OsO₄にて増感し、低真空走査顕微鏡(低真空 SEM)を用いて、細胞のサイズ、表面形態を観察した。15分培養後および20時間培養後の肺泡マクロファージの形態は、CTRL マウスと Fhod1 欠損マウス間で有意な差は見られなかった。しかしながら、低真空 SEMにて肺組織中の肺泡マクロファージ像は、観察が困難であり、さらなる条件検討が必要であった。

今後、肺泡マクロファージにおけるアクチン細胞骨格形成メカニズムに着目した、細胞運動や遊走に関する詳細なメカニズムを検討していく。

(2) プレオマイシン(BLM)誘発肺障害マウスのLOXL2の発現制御およびARDS患者のBALF解析

BLM 誘発肺傷害マウスの炎症期 (BLM 気管内投与後7日目)と線維化期 (BLM 気管内投与後14日目)におけるLOXL2 の発現は全肺のmRNA、タンパク発現レベルで線維化期に亢進し、BALF中のLOXL2濃度も上昇していた。二重蛍光免疫染色法においてBLM 誘発肺傷害マウスの線維化期のLOXL2 発現亢進は線維芽細胞と筋線維芽細胞の核に局在していた。線維化期のBLM 誘発肺傷害マウスから単離培養した肺線維芽細胞においても細胞質と比較して核内でLOXL2 の発現が亢進していた。同様に、TGF-β1 刺激下のMlg2908 細胞株においても、核内でLOXL2 の発現が亢進していた。siRNAによるLOXL2 の発現抑制は、TGF-β1 誘導性のFMT、コラーゲン産生、細胞内アクチンストレスファイバー形成、proto-myofibroblast マーカーの発現を抑制し、TGF-β1/pSmad2/Snail シグナル活性を阻害した。また、BLM 誘発肺傷害マウスの線維化期において、筋線維芽細胞の核でSnailの発現が亢進していた。ARDS患者群 (n=33)のBALF中のLOXL2濃度は、コントロール群(n=7)と比較し高値であった。また、ARDS 患者群をhigh-resolution computed tomography (HRCT)の所見により滲出期 (コンソリデーション、すりガラス状影)、増殖期 (コンソリデーション、すりガラス状影、牽引性気管支拡張)、線維化期 (コンソリデーション、すりガラス状影、牽引性気管支拡張、粗大網状影)に分類しBALF中のLOXL2濃度を比較したところ、特に増殖期と線維化期に上昇していた。

以上より、線維芽細胞における核内LOXL2 の発現亢進は、筋線維芽細胞の分化への細胞運命を決定付けることで肺傷害後の線維化形成を促進することが示された。

ARDSにおける細胞間コミュニケーションでは、線維芽細胞が細胞外LOXL2を介してECMを成熟させるだけでなく、細胞内LOXL2が自身の筋線維芽細胞への分化を促進する結果、肺泡上皮細胞へのメカニカルストレスを通じた細胞間コミュニケーションを確立している可能性が示唆された。

(3) 膵β細胞保護作用をもつ新規内因性ペプチドNERP-4の発見と糖尿病モデルマウスを用いたNERP-4治療効果の検討

膵β細胞でグラニン蛋白質VGFから産生される19アミノ酸の新規ペプチドneuroendocrine regulatory peptide-4 (NERP-4)を同定した。NERP-4は、膵β細胞のミトコンドリア内ATP産生から細胞内Ca²⁺上昇を介して、インスリン分泌を亢進した。NERP-4は、インスリンと同じ分泌顆粒中に存在し、グルコース刺激で分泌されてオートクリンとして作用した。NERP-4が結合する膜蛋白質をLRC-TriCEPS法で探索し、アミノ酸トランスポーター・SNAT2を同定した。NERP-4は、SNAT2のポジティブアロステリックモジュレーターとして、グルタミンやアラニンの取り込みを増加した。

肥満糖尿病モデルの*db/db*マウスの膵島では、NERP-4の発現量が低下しており、*db/db*マウスにNERP-4を2週間投与すると、インスリンの産生分泌が増加し耐糖能が改善した。NERP-4投与群とSaline投与群の*db/db*マウスの膵島の透過電子顕微鏡像を比較すると、NERP-4投与群はβ細胞

における小胞体ストレスが軽減しており、 α 細胞、 β 細胞、 δ 細胞の形態が保持されていた。一方、Saline投与群は β 細胞における小胞体ストレスが亢進しており、細胞形態の崩壊、個々の細胞接着装置形成不全が見られ、糖脂肪毒性による細胞障害によるものであると示唆された。5つの細胞群で構成される膵島における細胞間コミュニケーションは膵島の形態維持において重要で、特に β 細胞間の同調した適切なインスリン分泌の維持が必要不可欠であると考えられた。

今回、NERP-4がアミノ酸取込みを増加し、ミトコンドリアのATP産生を増やすとともに、グルタミン代謝物のグルタチオン産生が増加し抗酸化作用を示すことを明らかにした。今後、さらにNERP-4とSNAT2の結合部位を解析すること、糖尿病患者における血中NERP-4濃度を解析していく予定である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Matsuo Ayako, Tanida Ryota, Yanagi Shigehisa, Tsubouchi Hironobu, Miura Ayako, Shigekusa Takafumi, Matsumoto Nobuhiro, Nakazato Masamitsu	4. 巻 892
2. 論文標題 Significance of nuclear LOXL2 inhibition in fibroblasts and myofibroblasts in the fibrotic process of acute respiratory distress syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 173754 - 173754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2020.173754	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 Zhang Weidong*, Miura Ayako*, Abu Saleh Md Moin, Shimizu Koichiro, Mita Yuichiro, Tanida Ryota, Hirako Satoshi, Shioda Seiji, Gmyr Valery, Kerr-Conte Julie, Pattou Francois, Jin Chunhuan, Kanai Yoshikatsu, Sasaki Kazuki, Minamino Naoto, Sakoda Hideyuki, Nakazato Masamitsu *These authors contributed equally.	4. 巻 14
2. 論文標題 The NERP-4-SNAT2 axis regulates pancreatic α -cell maintenance and function	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	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） 10.1038/s41467-023-43976-8	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

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三浦 綾子, 實松 史幸, 武谷 立
2. 発表標題 アクチン核化重合因子Fhod1の肺胞マクロファージにおける役割
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松尾彩子, 谷田亮太, 柳 重久, 坪内拡張, 三浦綾子, 重草貴文, 松元信弘, 中里雅光, 宮崎泰可
2. 発表標題 ARDS線維化過程におけるfibroblast/myofibroblastの核内LOXL2阻害の意義
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦綾子、實松史幸、武谷立
2. 発表標題 Forminファミリータンパク質Fhod1による肺胞マクロファージの方向性細胞運動の制御
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三浦綾子、實松史幸、武谷立
2. 発表標題 遊走する肺胞マクロファージのアクチン細胞骨格制御におけるERMタンパク質の役割
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	武谷 立 (Takeya Ryu) (50335981)	宮崎大学・医学部・教授 (17601)	

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