

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860500

研究課題名(和文) タンパク質架橋化酵素を標的とした肝線維化の病態機序の解明および制御法の開発

研究課題名(英文) Analysis of mechanism and development of regulation approach in liver fibrosis via transglutaminase

研究代表者

辰川 英樹 (Tatsukawa, Hideki)

名古屋大学・創薬科学研究科・助教

研究者番号：10565253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：肝線維症の病態進展に伴うタンパク質架橋化酵素(TG)による架橋反応の存在と基質の機能解明を目指し、肝線維化動物モデルを用いて評価した。蛍光活性染色法により、線維化肝でのTG1およびTG2の活性に対する組織分布を明らかにし、細胞種の特特定を行った。また、線維化を誘導した肝組織抽出液とビオチン標識した各TGアイソザイム選択的な基質ペプチドを反応させ、アビジン精製後にトリプシン消化を行い、質量分析を用いて解析した結果、CK18が線維化の進行に伴い架橋される新規基質タンパク質であることを見出した。さらに、CK18はTG1/TG2活性と一部共局在することも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Transglutaminase is a family of enzymes that catalyzes cross-linking reactions among proteins and has been thought to contribute to the fibrotic diseases via crosslinking-mediated stabilization of ECMs and activation of TGF-beta in several tissues such as liver, kidney and lung. Despite these accumulating evidences to implicate transglutaminase as a key enzyme in the fibrosis process, a causative role for the enzyme still has not been established. We demonstrated that both TG1 and TG2 activities were enhanced in mouse liver fibrosis by bile duct ligation (BDL). To elucidate the detail mechanism by which transglutaminase contributes to the diseases, we identified the several proteins incorporated with biotinylated substrate peptides for TG1 and TG2. Among the identified several substrates, we found that cytokeratin 18 (CK18) was one of crosslinked proteins by both TG1 and TG2 only in mouse liver after the BDL surgery.

研究分野：分子細胞病態学

キーワード：トランスグルタミナーゼ タンパク質架橋化酵 肝線維化 肝硬変 サイトケラチン18

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内外で特定のタンパク質間に架橋形成を生じ、機能・性状変換を伴う現象が幅広い生物で見出されている。この反応はトランスグルタミナーゼ (TGase) と呼ばれる酵素群により行われ、血液凝固(フィブリン架橋)、皮膚形成(ケラチン等の架橋)、死細胞除去を始め多彩な生命現象に關与する(Lorand, FASEB J 2007)。一方、異常なレベルや部位での蛋白質架橋形成は、種々の疾患(肝腎疾患、神経変性疾患、糖尿病、癌、血栓形成、自己免疫疾患など)の原因となる(Iismaa, Physiol Rev 2009)。

この様なタンパク質間の架橋反応を行う機能から、肝疾患での過剰な線維形成・蓄積に寄与することが示唆されており、(Am J Pathol 272:G281,1997) 実際に肝硬変患者の肝臓ではグルタミン-リジン間のイソペプチド結合の含有量が多く、特に組織のリモデリングが亢進する炎症部位に有意に認められる(J Hepatol 35:367,2001)。また、肝硬変・肝癌の発症に繋がるアルコール性脂肪性肝炎(Gastroenterol 136:1783,2009)やメタボリックシンドロームの一例である非アルコール性脂肪性肝炎(J cell Physiol 227:1130,2012; FEBS J 278:4756,2011)、HCV感染(Am J Pathol 162:1293,2003)患者の肝臓ではTGaseの顕著な活性上昇が見られており、さらに動物モデルにおけるTGase阻害剤の投与は肝線維化の程度を軽減する(World J Gastroenterol 13:4328,2007)など、数多くの論文で肝疾患の増悪への關与が示されている。

これらに反して、同酵素が肝線維化に影響しないという論文(Gastroenterol 140:1642,2011)が近年報告されたが、同論文では8種存在するアイソザイムのうちの一つの組織型TGase(TGase 2)の遺伝子欠損マウスを用いた検証のみであり、他のアイソザイムの解析が不十分である。

### 2. 研究の目的

本研究は、肝線維化の増悪ならびに線維形成の安定化・蓄積への關与が示唆されるタンパク質架橋化酵素トランスグルタミナーゼについて、「(1)肝線維化に伴うトランスグルタミナーゼ活性上昇の時期と分布、肝組織の細胞種の特定」を行い、「(2)架橋形成反応の標的基質タンパク質の探索と肝線維症に対する作用機構」を分子レベル、細胞レベル、動物モデル・ヒト肝組織において明らかにすることにより、肝線維化の病態形成に關する理解を深め、「(3)その制御方法を探索することによって、新たな肝線維化の治療・予防法の開発に繋げることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 病態進展に伴う経時的な TGase の架橋

### 活性及び局在分布の解析

胆管結紮処置による肝線維化誘発動物モデルを用いて、肝線維化進行過程におけるTGase活性の経時的变化・組織や細胞分布を明らかにし、肝線維化マーカーとの比較により、線維化の病態進展との相関性を評価した。

遺伝子発現やタンパク質量については、RT-PCR やウエスタンブロットおよび免疫染色において確認した。活性については当研究室で開発した高反応性の基質ペプチドを利用した生組織でのTGaseの各アイソザイムの活性染色により、線維化の進展に伴うTGase活性の変化量や肝組織の領域について調べた。同様に線維化に伴う同酵素の活性上昇と肝線維化マーカー(コラーゲン及びヒドロキシプロリン量、 $\alpha$ SMA)との比較を行い、線維化と病態進展との相関性を解析した。

### (2) 病態進展特異的に架橋される基質の同定及び肝線維化への影響

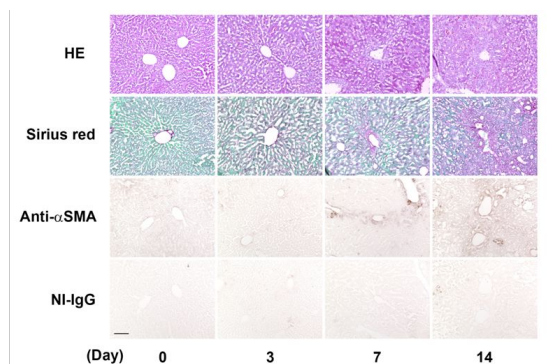
架橋活性変化の程度や組織領域の特定に伴い架橋される基質を同定した。肝線維化を誘導したマウスの組織抽出液と標識した基質とを反応させ、共沈する基質タンパク質について質量分析を用いて同定した。標的基質の同定の後、同基質の肝線維化の増悪に対する影響を確認するため、線維化に伴う発現量変化や局在領域について動物モデルや肝線維化患者の生検後の組織切片を用いて明らかにした後、発現亢進及び抑制における肝線維形成・蓄積への影響について、細胞・動物レベルで検証した。

### (3) 肝線維化の新規制御法の探索

標的基質の制御法について探索する。TG活性阻害剤を幾つかの肝線維化モデルに投与し、線維化の病態進展への影響を確認する。線維化抑制のための有望な制御方法について探索し、創薬的なシーズとしての可能性を示す。

### 4. 研究成果

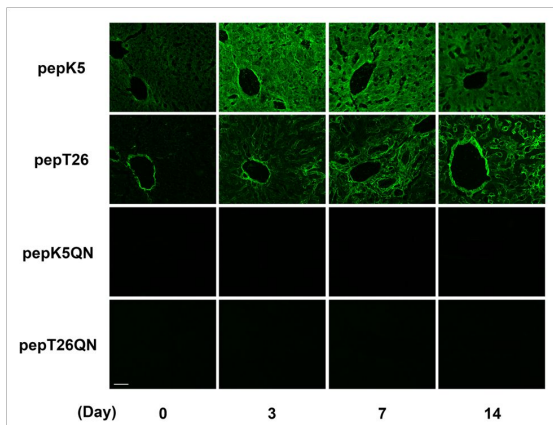
(1) 胆管結紮処置による肝線維化誘発動物モデルでは、術後1週間程度で有意に肝線維化マーカーの上昇を伴う線維化が誘導された(図1)。この条件において、すべてのTGアイソザイムの遺伝子発現量を検討したところ、TG1およびTG2のみ発現が確認された。



### 図1 胆管結紮処置による肝線維化の評価

胆管結紮処置 3、7、14 日後の肝臓を摘出・切片化し、ヘマトキシリン・エオシン、Sirius red および  $\alpha$ SMA の染色を行った。NI-IgG は未免疫のウサギ血清からの IgG 分画。Scale bar: 100  $\mu$ m

タンパク質架橋化酵素の各アイソザイムを区別して反応する基質ペプチドを用いて、胆管結紮処置による肝線維化の進展に伴う同酵素の活性上昇の程度や組織分布を解析した。線維化に伴い TGase アイソザイムのうち TG1 および TG2 において発現上昇が見られ、TG1 活性は術後 3 日目から肝臓全体に広範囲に上昇するのに対し、TG2 活性は術後 3 日目では血管周辺で強く見られ、その後線維化の進行に伴い肝臓全体で上昇が認められた(図2)。



### 図2 TG1 および TG2 活性分布の評価

アイソザイム特異的に反応する FITC 標識ペプチド (TG1: pepK5, TG2: pepT26) と未固定の凍結切片 (胆管結紮処置 3、7、14) を反応させ、それぞれの酵素活性の局在分布について評価した。pepK5QN および pepT26QN については、それぞれの基質ペプチドのグルタミン残基をアスパラギン残基に置き換えたもの。Scale bar: 50  $\mu$ m

これらの TG1 および TG2 の活性と線維化のマーカーとして知られる  $\alpha$ SMA との蛍光染色を行ったところ、肝細胞および肝星細胞では TG1 活性の上昇が見られるのに対し、TG2 活性はほとんど見られなかった。コラーゲン 1A1 に対する共染色において、TG1 活性はほとんど共局在が見られないのに対し、TG2 活性との共局在は多くの部位で観察された。また、後述する肝線維化の形成過程に関わる新規基質タンパク質 Cytokeratin-18 (CK18) に対する抗体を用いて、TG1 および TG2 活性と共染色を行ったところ、CK18 は TG1 活性と共局在し、TG2 活性との共局在はほとんど観察されなかった。

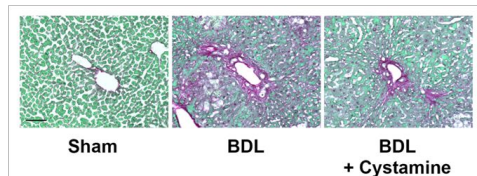
(2) ビオチン標識した基質ペプチドを用いて、肝線維化の進展に伴い架橋形成に参画するタンパク質を解析した。正常及び線維化を

誘導した肝臓抽出液 (胆管結紮処置 3、7、14 日後) とビオチンを付けた各 TG アイソザイム選択的な基質ペプチドを反応させ、候補基質タンパク質に取り込まれたビオチン化ペプチドの量を WB にて解析した。その結果、線維化に伴い基質ペプチドを取り込んだタンパク質の量および数が増加することが分かり、それらの増加は線維化の進行と関連することが分かった。

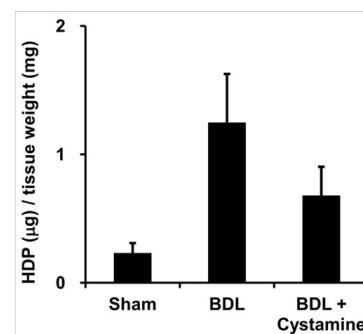
さらにこれらのサンプルにおいて、アビジン精製後にトリプシン消化を行い、質量分析を用いた網羅的同定を行った。その結果、TG1 および TG2 依存的に 40 個程度のタンパク質が同定され、中でもアルコールおよび非アルコール性脂肪性肝炎のマーカーとして知られる CK18 が線維化の進行に伴い架橋される基質であることが分かった。CK18 は細胞死に関わることがすでに報告されているため、肝線維化誘導時の肝細胞死の誘導機構に寄与することが示唆される。

(3) 胆管結紮処置したマウスにおいて、TG 阻害剤であるシスタミン投与の検討を行った。シスタミンは飲水と混合 (900 mg/L) して 2 週間持続投与し、線維化進行の評価については Sirius red およびハイドロキシプロリン量の測定により行った。結果として、胆管結紮処置したマウスにおけるシスタミン投与は、Sirius red 染色の陽性領域および HDP 量の有意な減少を示した (図3)。

### A



### B



### 図3 シスタミン投与による線維化の抑制

シスタミン投与した胆管結紮処置 14 日後の肝臓を用いて、Sirius red 染色 (A) およびハイドロキシプロリン量 (B) によりコラーゲン量の評価を行った。Scale bar: 100  $\mu$ m

これらの結果から、胆管結紮処置により誘導される線維化では TG2 のみならず、TG1 も共に異なる肝臓の領域で活性化され、それぞれの標的基質が架橋修飾されると共に新たな機能変換が起こり、このことが肝線維化の病態進行に寄与していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

1. Molecular mechanism by which acyclic retinoid induces nuclear localization of transglutaminase 2 in human hepatocellular carcinoma cells. Shrestha R, Tatsukawa H, Shrestha R, Ishibashi N, Matsuura T, Kagechika H, Kose S, Hitomi K, Imamoto N, Kojima S. Cell Death Dis, 査読有, (2016) in press.
2. Distribution of transglutaminase family members in mouse whole body sections. Tatsukawa H, Abe N, Ohashi S, Hitomi K. Biochem Biophys Res Commun, 査読有, (2015) in press (DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.10.001).
3. Early response as shown by enhancement of transglutaminase 1 expression after cisplatin-induced acute kidney injury. Furukawa K, Yamane M, Tatsukawa H, Hitomi K. Arch Biochem Biophys, 査読有, 586: 27-32 (2015).

[学会発表](計 5件)

1. 大津 里紗、谷 優治、辰川 英樹、人見 清隆：腎臓線維化組織において活況修飾されるタンパク質群の網羅的解析 BMB2015 (日本生化学会・分子生物学会合同大会)(神戸) 2015年12月
2. 大津 里紗、谷 優治、脇田峻資、辰川 英樹、人見 清隆：腎臓の線維化進行に伴うタンパク質架橋化酵素の役割 2015年度日本農芸化学会中部・関西支部合同大会(富山県立大) 2015年9月
3. 辰川 英樹、谷 優治、人見 清隆：腎臓線維症の病態形成における架橋化反応の役割 第87回日本生化学会大会(京都) 2014年10月
4. 辰川 英樹 : Detections of Isozyme-specific activity and Substrate for Transglutaminase in Animal Models for Fibrotic Disease. The 2nd Tokai Nephrology & Immunology Forum(名古屋)2014年10月(招待講演)
5. Tatsukawa H, Tani Y, Hitomi K : Detections of Isozyme-specific activity and Substrate for Transglutaminase in Animal Models for Fibrotic Disease. Gordon Research Conference - Transglutaminase in Human Disease Processes (Barga(Italy)) 2014年6月

[図書](計 1件)

Transglutaminase : Multiple Functional Modifiers and Targets for New Drug Discovery - Preferred Substrate Structure of Transglutaminases. Hitomi K and Tatsukawa H. Springer, 査読無, (2016年3月) in press.

[その他]

ホームページ等

<http://www.ps.nagoya-u.ac.jp/research/organization05/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

辰川 英樹 (TATSUKAWA HIDEKI)

名古屋大学大学院・創薬科学研究科・助教  
研究者番号：10565253

### (2)研究分担者

該当なし

### (3)連携研究者

該当なし