

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06909

研究課題名(和文) ANPの組織繊維化抑制作用の機序解明と肺線維症治療への応用

研究課題名(英文) Suppression of tissue fibrosis by ANP and treatment for pulmonary fibrosis

研究代表者

三浦 浩一 (Miura, Koichi)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：20360349

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)：不死化内皮細胞SVECにANP受容体を安定発現させ、シグナル伝達経路の解析を行った。その結果、(1) ANPによるHippo経路の活性化に、セリンスレオニンキナーゼであるPAK4が必須であることを見出した。(2) ANP刺激により発現量が変動する遺伝子を解析したところ、組織繊維化に関するCTGFだけでなく、CXCL10等の炎症関連因子の発現も強く抑制されることを見出した。(3) ANP受容体に結合するタンパク質の同定を行い、細胞骨格制御因子であるFilaminAを同定した。さらに、FilaminAがANP刺激によりリン酸化されること、また、Hippo経路の活性化に重要であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ANPは心臓から分泌されるホルモンであり、その利尿作用により急性心不全の治療薬として臨床の現場で使用されている。一方Hippo経路の活性化は炎症や組織繊維化の抑制に関与すると考えられている。今回のANPによるHippo経路の活性化機構の解析はANPが急性心不全以外に抗炎症、抗繊維化治療薬として応用可能なことを示唆するものである。さらにANPの下流のシグナル分子であるPAK4やfilaminA等も新たなドラッグターゲットになりうると考えられる。またGC-Aを安定に発現させたSVEC細胞は極めて強くHippo経路を活性化するので、ANPに変わる低分子量化合物のスクリーニングに応用可能と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated ANP signalling using mouse immortalized endothelial cells (SVEC) stably expressing GC-A receptor. We found, (1) PAK4, a serine/threonine kinase, is important for Hippo pathway activation by ANP, (2) Expression of genes involved in inflammation (i.e., CXCL10) were strongly suppressed in addition to those involved in fibrosis (i.e., CTGF), (3) FilaminA, an actin-binding protein, binds to GC-A and is phosphorylated by ANP stimulation, (4) FilaminA is also required for activation of Hippo pathway by ANP.

研究分野：薬理学 細胞生物学

キーワード：ナトリウム利尿ペプチド Hippo経路 組織繊維化 YAP PAK4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心房性ナトリウム利尿ペプチド(Atrial Natriuretic Peptide; ANP)は、膜型グアニル酸シクラーゼ GC-A 受容体を介して cGMP 産生を誘導することで心血管系の恒常性を維持する心臓ホルモンであり、急性心不全の治療薬として臨床応用されている。ANP は全身の循環動態(血圧や体液量)を変えない用量にて抗炎症・抗線維化作用を有するが、その詳細な分子機構はいまだ不明な点が多く、心血管領域以外での臨床応用は行われていない。

2. 研究の目的

申請者は ANP の抗線維化作用を研究する過程で、ANP が Hippo/YAP 経路を活性化し、組織繊維化に関わる分子(CTGF)の発現を抑制することを見出した。そこで本研究では、(1)ANP による Hippo 経路関連因子のリン酸化や細胞内局在性の変化を詳細に検討する。(2) ANP により発現量が変動する遺伝子を同定する。(3)ANP 受容体である GC-A と相互作用する分子を同定する。以上の検討により、ANP が心不全だけでなく、組織繊維化および炎症の治療にも応用可能であることを示す。

なお、当初の計画では ANP によるエクソソーム解析や人に投与した場合の抗繊維化、抗炎症作用なども検討予定であったが、担当する研究分担者 2 名が一身上の都合により辞退したため、検討は行うことはできなかった。

3. 研究の方法

- (1) マウス不死化内皮細胞(SVEC)にレトロウイルスを用いて ANP 受容体(GC-A)を安定に発現させ、ANP 刺激時の細胞内シグナル分子(LATS1/2 や YAP 等)のリン酸化を Western blot で検討する。
- (2) ANP 刺激時の YAP の核内から細胞質への移行を間接蛍光抗体法にて検討する。
- (3) GC-A と相互作用する新たな細胞内因子を質量分析器により同定する。
- (4) 発現抑制または過剰発現等により、ANP シグナルの下流の分子が Hippo 経路の活性化に与える影響を検討する。
- (5) マイクロアレイを用いて、ANP によって発現量が変動する遺伝子を同定する。

4. 研究成果

2018 年度

不死化内皮細胞 SVEC にレトロウイルスを用いて ANP 受容体を安定発現させ、ANP の細胞内シグナル伝達経路の解析を行った。

その結果、(1) ANP が組織繊維化抑制に関わる Hippo 経路を活性化すること、すなわち LATS1/2 や YAP のリン酸化を顕著に促進することを見出した。またこれに付随して YAP の核外移行や YAP の標的分子である CTGF や Cyr61 の発現抑制も観察された。(2) ANP 刺激前後に発現量が変動する遺伝子をマイクロアレイにより解析し、KEGG データベース等を用いて pathway 解析を行ったところ、Hippo 経路だけでなく、組織繊維化と深く関連する炎症関連因子の発現変動が観察された。(3) 質量分析機を用い、ANP 受容体に結合するタンパク質を同定した。(4) ANP の下流シグナル分子である PAK4 と Hippo 経路の関連を解析したところ、PAK4 の発現抑制によって ANP による Hippo 経路の活性化が阻害されること、反対に PAK4 の活性型変異体の過剰発現により Hippo 経路が活性化されることを見出した。

2019 年度

昨年度に引き続き、ANP 受容体を安定に発現させた不死化内皮細胞(SVEC/GC-A)を用いて ANP の細胞内シグナル伝達経路の解析を行った。これまでに、(1)組織繊維化の抑制に関与する Hippo 経路が ANP により活性化されること、(2)セリン/スレオニンキナーゼ PAK4 が Hippo 経路の活性化に関与すること、および(3)ANP により CXCL10 等の炎症関連遺伝子の発現が強く抑制されることを明らかにした。しかしながらその後の検討により、PAK4 の発現抑制だけでは完全に ANP

依存的な Hippo 経路の活性化が抑制されなかったことから、他にも重要な制御因子の存在が示唆された。そこで本年度は質量分析機を用い、ANP 受容体に結合するタンパク質の同定をさらに継続するとともに、ANP 刺激により RXXS モチーフがリン酸化されるタンパク質の同定も行い、ANP と Hippo 経路をリンクする因子の同定を試みた。その結果、興味深いことにいずれの解析にも共通して、FilaminA/B/C、Myosin-9/10/14 や Talin-1 などの細胞骨格制御分子が同定された。このことは ANP 依存的にこれらの分子が GC-A と相互作用し、かつ RXXS モチーフがリン酸化されることを示す。実際にウェスタンブロットによって ANP 刺激による FilaminA のリン酸化および GC-A との相互作用が確認された。Hippo 経路は細胞骨格の再編成とそれに伴う細胞の形態変化により活性が制御されることから、ANP による Hippo 経路の活性化にこれらの細胞骨格制御因子が関与する可能性が考えられるため、今後さらに検討を進める予定である。

2020 年度

昨年度同定した新たな GC-A 結合タンパク質である FilaminA/B/C、Myosin-9/10/14 および Talin-1 の ANP シグナルにおける機能解析をすすめた。まず ANP による Hippo 経路の活性化にこれらの因子が関与するか否か、siRNA を用いて検討したところ、マウス不死化血管内皮細胞において FilaminA 発現抑制により Hippo 経路の活性化(Lats1/2 のリン酸化)が 60%程度抑制された。また、PAK4 と FilaminA を同時に発現抑制しても Hippo 経路の抑制効果は増強されなかったことから PAK4 と FilaminA は機能的に同一のシグナル伝達経路に位置するものと考えられた。そこで ANP 刺激時の PAK4 と FilaminA の相互作用を免疫沈降法を用いて検討したところ、ANP 依存的に FilaminA と PAK4 が相互作用することが明らかとなった。次に細胞の形態変化における FilaminA の発現抑制の効果を検討した。我々はすでに GC-A を安定に発現するマウス不死化血管内皮細胞(SVEC/GC-A)を ANP で刺激すると、刺激前の形質膜の blebbing が刺激後速やかに消失し、葉状仮足(ラメリポディア)の形成を伴う細胞の進展(cell spreading)が起きることを報告している。この形態変化における FilaminA 発現抑制の効果を検討したところ、siFilaminA は ANP による cell spreading を顕著に抑制した。以上の検討から ANP シグナルにおいてアクチン結合タンパク質である FilaminA が PAK4 と共に重要な役割を担うことが明らかとなった。これらの新しい知見は ANP が組織繊維化を抑制するメカニズムの解明に寄与すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 三浦浩一 野尻崇 宮里幹也 寒川賢治 |
| 2. 発表標題 Activation of the Hippo pathway and suppression of CTGF expression by Atrial Natriuretic Peptide in endothelial cells |
| 3. 学会等名 日本生化学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 三浦浩一 野尻崇 宮里幹也 寒川賢治 |
| 2. 発表標題 Activation of the Hippo pathway and suppression of CTGF expression by Atrial Natriuretic Peptide in endothelial cells |
| 3. 学会等名 日本分子生物学会 |
| 4. 発表年 2018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 | 錦織 充広 (Nishigori Mitsuhiro) (00633645) | 福岡大学・理学部・助教 (37111) | |
| 研究分担者 | 野尻 崇 (Nojiri Takashi) (50570553) | 国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長 (84404) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 | 熊添 基文 (Kumazoe Motofumi) (70737212) | 九州大学・農学研究院・学術研究員 (17102) | |

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 |
|---------|---------|
| | |