

令和元年6月20日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09353

研究課題名(和文) 組織線維化に寄与する架橋修飾因子の網羅的解析および線維化抑制剤の開発

研究課題名(英文) Global identification of the substrates of protein crosslinking enzyme and the development of preventive drug in tissue fibrosis

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では肝線維化への関与は報告されているが、作用機序の詳細が明らかでなかったタンパク質架橋酵素トランスグルタミナーゼによる翻訳後修飾反応に焦点を当てた。架橋酵素のファミリー間でのアイソザイム特異的な活性の検出や網羅的な基質タンパク質の同定を経て、作用機序の解明の足掛かりとなる架橋活性の分布や候補基質タンパク質の同定及び性状解析に関する情報を提供することが出来た。さらに架橋酵素の阻害剤を用いて動物モデルにおける肝線維化の病態抑制効果を明らかにした。これらの結果は、病態進展の機序に直接関与する可能性のある薬剤標的タンパク質選択の礎となり、今後の肝疾患の新たな診断、治療、予防法の開発に貢献できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの疾患は単に発現したタンパク質量の変化により引き起こされるものではなく、多くの翻訳後修飾反応を含む様々な制御因子の破綻によって誘導される。本研究では、タンパク質間にイソペプチド結合を形成することによりタンパク質の機能を変化させる翻訳後修飾反応の一つに着目し、この反応が肝硬変のような臓器が硬化する慢性疾患で見られることを明らかにした。またこの修飾反応の阻害は上記の慢性疾患を緩和することも明らかにした。これらの結果は今後の同疾患の新たな予防・治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The transglutaminase (TG) family comprises eight isozymes that catalyze the crosslinking reaction between glutamine and lysine residues and contribute to the fibrotic diseases in several tissues. Despite the evidence implicating TG2 as a key enzyme in fibrosis, the causative role and involvement of the other isozymes have not yet been fully elucidated. Therefore, here we clarified the distributions and activities of TG isozymes, and identified the isozyme-specific substrates for both TG1 and TG2 using each substrate peptide. The possible substrates for each TG were successfully identified and these included keratin 18, a biomarker for hepatic injury, which was accumulated in the fibrotic liver. Our findings suggest that each TG was independently activated in a different tissue area during fibrotic induction, and played a potential role in the functional modification of keratin 18, which are relevant to liver fibrosis progression.

研究分野：分子細胞病態学

キーワード：架橋酵素 肝線維化 肝硬変 サイトケラチン 架橋 基質探索 質量分析 線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 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に存在する。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、皮膚形成、死細胞除去を始め多彩な生命現象に関与する (FASEB J 21:2627,2007)。一方、異常なレベルの架橋形成は種々の疾患 (肝腎疾患、神経変性疾患、糖尿病、癌、自己免疫疾患など) の原因となる (Physiol Rev 89:991,2009)。

このような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、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、また、肝硬変・肝癌に繋がるアルコール・非アルコール性脂肪性肝炎や HCV 感染患者の肝臓では TGase の顕著な活性上昇が観察されるなど、多くの論文で肝疾患の増悪への関与が示されている。これらの研究は線維形成の安定化に寄与する細胞外 TGase を対象にしたものが多く、細胞内 TGase やその基質タンパク質の架橋による機能変換など、線維症治療標的となる明確な基質の同定や有効な抑制剤は未だ知られておらず、詳細な解析が重要視されている。

(2) 申請者はこれまで、肝障害により活性上昇した TGase が転写因子 Sp1 を架橋・不活性化し、細胞死を誘導することを細胞・動物モデル・疾患患者組織を用いて解明してきた。この過程で、肝炎患者の線維化領域でも転写因子群が架橋修飾されることを見出すと共に、Sp1 以外の未同定因子も複合体形成に関わることが明らかになり、多くの TGase 基質タンパク質の架橋による機能変換が肝疾患の増悪に関わることが予測されていた。

さらに、申請者が独自開発した TGase アイソザイムを区別して活性を検出する基質ペプチドを用いた新技術により、TGase の活性上昇は線維形成が見られる細胞外領域のみならず、広範囲の肝組織の細胞内領域でも観察され、肝臓で発現する 2 種の TGase アイソザイム間で活性化の分布や時期が異なることが分かった。さらに同技術を基に、基質タンパク質の網羅的同定法を開発した。このようなアイソザイムを区別した TGase の活性検出や基質同定法の確立は、タンパク質架橋修飾に関わる組織線維化の全容解明のための足掛かりとなり、今後新たな線維化抑制剤の開発に発展することが期待される。

2. 研究の目的

慢性肝疾患において肝線維化の抑制は重要な治療標的であるが、現在まで有効な治療法は確立されていない。申請者はこれまで組織線維化の増悪に関わるタンパク質架橋化酵素 TGase において、病態進行の経時的な活性分布および基質タンパク質の一部を明らかにし、また新規に探索した同酵素の阻害剤の線維化抑制効果を見出してきた。

本研究は、これを発展させ、「(1) 組織線維化に伴い架橋修飾される基質タンパク質群の網羅的同定および解析」を分子レベル、細胞レベル、動物・ヒト組織において行い、線維化の病態形成に関する包括的理解を深めると共に、(2) トランスグルタミナーゼおよび標的基質タンパク質の制御方法の探索により、組織線維化抑制剤を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 組織線維化に伴い架橋される基質タンパク質の網羅的同定および疾患増悪への影響

胆管結紮処置により肝線維化を誘導したマウスの肝組織抽出液と TGase の基質ペプチドとを反応させ、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する。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。

先行研究において既にサイトケラチンが線維化肝のみで架橋修飾されることを見出しており、同タンパク質の架橋による機能変換について解析を進めると共に、新たな候補基質タンパク質の同定・解析を進めた。

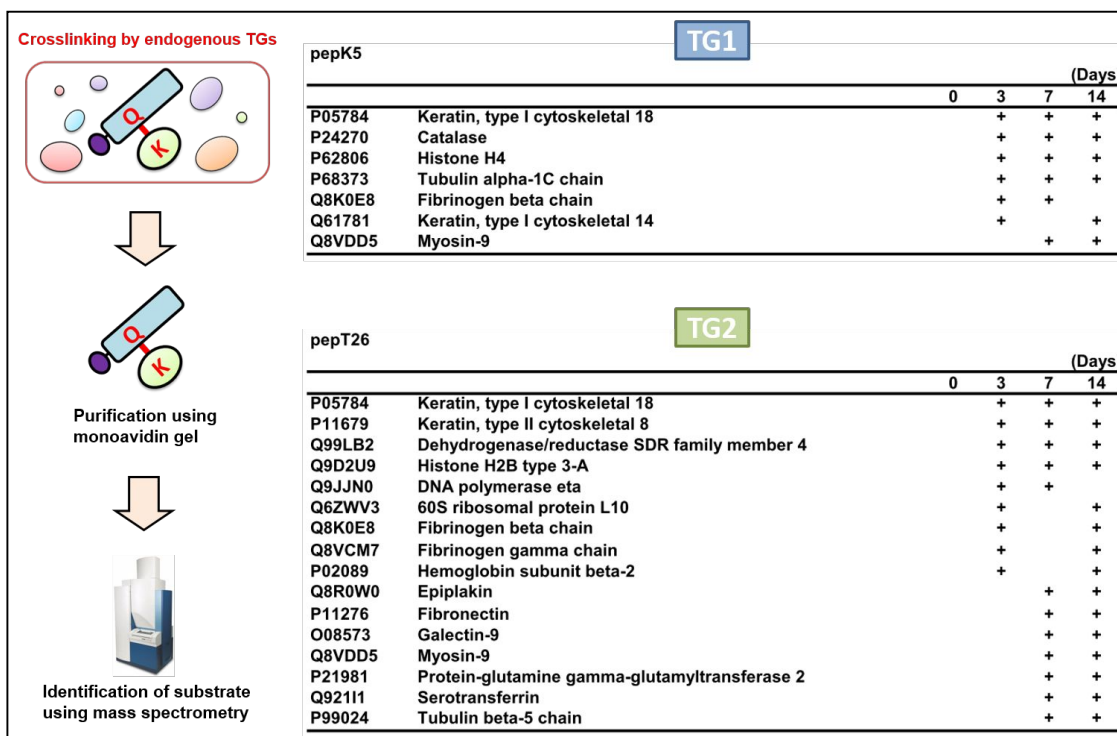
(2) 肝線維化の新規制御抑制剤の開発

TGase 阻害剤および基質タンパク質の機能制御薬を肝線維化モデルマウスに投与し、線維化の病態進展への影響を確認する。過去に制御薬剤の報告がなければ、化合物ライブラリーからのケミカル並びに *In Silico* スクリーニングや中和抗体の作製を行い、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探ることを計画した。TGase の阻害剤と知られている 2 種の低分子化合物について、有用性を調べるため、上記の胆管結紮による肝線維化モデルマウスに経口投与し、コラーゲンの主成分であるハイドロキシプロリン量および各種線維化マーカー、コラーゲンを特異的な組織染色法により評価した。

4. 研究成果

(1) 胆管結紮処置により肝線維化を誘導したマウスでは、TGase アイソザイムのうち主に表皮に局在する TG1 とコピキタスに存在する TG2 の発現・活性上昇が結紮処置後の時間依存的 (3、7、14 日後) に見られたことから、これらの TGase アイソザイムと特異的に反応する TGase の基質ペプチド (TG1: pepK5, TG2: pepT26) を用いて、TGase の基質となり架橋されるタンパク質の網羅的同定を行った。上記ペプチドにビオチン標識を行い、組織抽出液との反応後にモノ

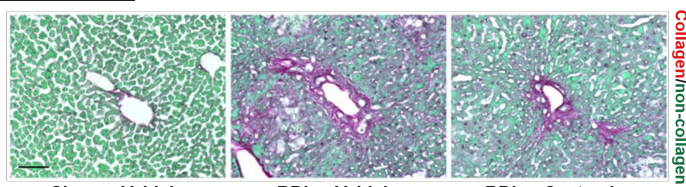
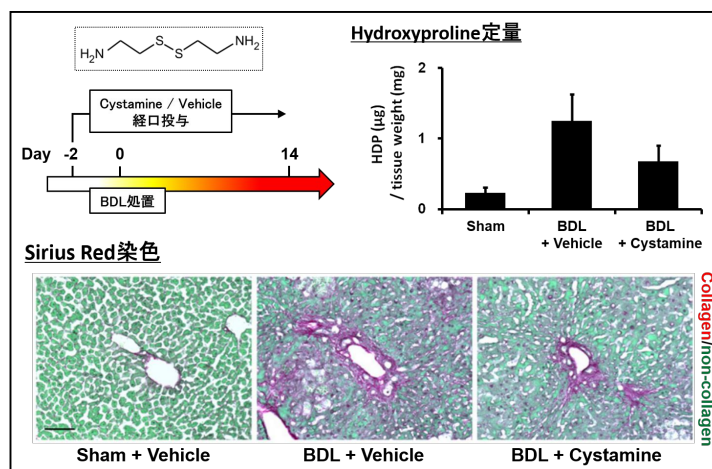
アビジンゲルを用いてビオチン化タンパク質を精製した。得られた画分をトリプシン消化し、質量分析により基質候補タンパク質を網羅的同定した。TG1 および TG2 により架橋されたそれぞれの候補基質タンパク質のうち、胆管結紮後の経時的な2種以上の線維化肝において基質候補として同定されたタンパク質のリストを以下に示す（下図参照）。



(2) 先行研究で見出していたサイトケラチン 18 (K18) やサイトケラチン 8 (K8) は、上記の実験でも同様にすべての経時的な線維化肝において、候補基質タンパク質として同定されている。線維化肝での経時的な発現量を調べたところ、これらの候補タンパク質は有意な発現上昇が見られると共に、障害肝組織で観察されるマロリー小体を含む凝集塊において、高分子量域にこれらの抗体のシグナルが見られたことから、K18 や K8 が TGase の基質となり架橋され重合した結果、凝集塊の産生に寄与していることが予想された。また、線維化肝での TG1 および TG2 との局在について免疫染色により検証したところ、TG2 と K18 および K8 では共局在は見られないものの、TG1 と K18 および K8 については、共局在することが示唆された。

(3) さらに上記の K18 および K8 の TGase の基質としての反応性を確認するため、組換えタンパク質の作製を行った。大腸菌を用いてそれぞれの組換えタンパク質作製・精製し、TG1 および TG2 による上記基質ペプチドとの架橋反応性について評価したところ、K18 および K8 は TG1 および TG2 の両方によって共に架橋され、高分子量へのバンドシフトも確認された。また、一級アミンであるビオチン化ペンチルアミン (BPA) との架橋反応においても K18 および K8 の架橋体が確認されたことから、これらはグルタミン残基側とリジン残基側の両方の基質になることが示唆される。

(4) 肝線維化の新規制御法の探索のため、上記の肝線維化モデルにおいて2種のTG2の活性阻害剤を投与し、線維化の誘導程度の違いを評価した。架橋反応を競合的に阻害する一級アミンを持つシスタミンを経口投与し、コントロールとの比較検討を行ったところ、肝線維化の程度を有意に抑制する結果が得られた（右図）。もう一方の阻害剤についても抑制傾向が観察されたが、明確な有意差は見られなかった。



Sham + Vehicle BDL + Vehicle BDL + Cystamine

Collagen/non-collagen

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

Tatsukawa H, Otsu R, Tani Y, Wakita R, Hitomi K.: Isozyme-specific comprehensive characterization of transglutaminase-crosslinked substrates in kidney fibrosis. *Sci Rep*, 8(1): 7306 (16 pages) (2018). 査読有

Ito Y, Tatsukawa H, Yamaguchi H, Takahashi K, Hitomi K, and Yuzawa Y. Detection and Identification of Potential Transglutaminase 2 Substrates in the Mouse Renal Glomeruli. *Arch Biochem Biophys*, 660: 11-19 (2018). 査読有

Mizíková I, Pfeffer T, Nardiello C, Surate Solaligue DE, Steenbock H, Tatsukawa H, Silva DM, Vadász I, Herold S, Pease RJ, Iismaa SE, Hitomi K, Seeger W, Brinckmann J, and Morty RE. Targeting transglutaminase 2 partially restores extracellular matrix structure but not alveolar architecture in experimental bronchopulmonary dysplasia. *FEBS J*, 285(16): 3056-76 (2018). 査読有

Qin XY, Suzuki H, Honda M, Okada H, Kaneko S, Inoue I, Ebisui E, Hashimoto K, Carninci P, Kanki K, Tatsukawa H, Ishibashi N, Masaki T, Matsuura T, Kagechika H, Toriguchi K, Hatano E, Shirakami Y, Shiota G, Shimizu M, Moriwaki H, Kojima S.: Prevention of hepatocellular carcinoma by targeting MYCN-positive liver cancer stem cells with acyclic retinoid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(19):4969-74 (2018). 査読有

Tatsukawa H, Tani Y, Otsu R, Nakagawa H, Hitomi K.: Global identification and analysis of isozyme-specific possible substrates crosslinked by transglutaminases using their substrate peptides in mouse liver fibrosis. *Sci Rep*, 7:45049 (14 pages) (2017). 査読有

辰川 英樹, 人見 清隆, 組織の線維化に伴い架橋される基質タンパク質群の網羅的同定・解析, *日本応用酵素協会誌*, 52: 1-10 (2017). 査読なし

Horimizu R, Ogawa R, Watanabe Y, Tatsukawa H, Kinoshita M, Hashimoto H, Hitomi K: Biochemical characterization of a medaka (*Oryzias latipes*) orthologue for mammalian Factor XIII and establishment of a gene-edited mutant. *FEBS J*, 284(17): 2843-55 (2017). 査読有

Tatsukawa H, Liu HH, Oba S, Kamiya N, Nakanishi Y, and Hitomi K: FRET-based detection of isozyme-specific activities of transglutaminases. *Amino Acids*, 49(3):615-23 (2017). 査読有

Tatsukawa H, Furutani Y, Hitomi K, and Kojima S: Transglutaminase 2 has opposing roles in the regulation of cellular functions as well as cell growth and death. *Cell Death Dis*, 7: e2244 (12 pages) (2016). 査読有

〔学会発表〕(計8件)

辰川 英樹, 劉 紅紅, 大庭 将太, 人見 清隆, 日本生化学会中部支部例会・シンポジウム (三重大) 2016年5月

辰川 英樹, 大津 里紗, 谷 優治, 人見 清隆, 肝線維化に伴い架橋される基質タンパク質の網羅的同定および解析 第89回日本生化学会大会(仙台)2016年9月 (口頭発表)

Tatsukawa H, Tani Y, Hitomi K, Comprehensive approach to identification and analysis of crosslinked substrate in liver fibrosis. Gordon Research Conference - Transglutaminase in Human Disease Processes (Spain) 2016年7月

Tatsukawa H, Nakagawa H, Hitomi K, Global identification and analysis of isozyme-specific substrates crosslinked by transglutaminases in mouse liver fibrosis, 68th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD the liver meeting), Washington DC, USA (2017)

【招待講演】辰川 英樹, Global identification and analysis of isozyme-specific substrates crosslinked by transglutaminase in mouse fibrosis model. 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) ワークショップ, 微生物からヒトに至るトランスグルタ

ミネラーゼ遺伝子ファミリーの多彩な機能, 神戸, 2017年12月 (口頭発表)

【招待講演】Tatsukawa H, Isozyme-Specific Global Identification and Analysis of Transglutaminase Substrates in Fibrotic Diseases. Gordon Research Conference on Transglutaminases in Human Disease Processes (ゴードン国際会議), Switzerland, 2018年6月 (招待講演 口頭発表)

【招待講演】辰川 英樹、人見 清隆, 腎線維化において活性化するタンパク質架橋化酵素の役割りと基質タンパク質群の網羅的同定・解析 第9回分子腎臓フォーラム 東京 2018年9月 (招待講演 口頭発表)

辰川 英樹、人見 清隆, Isozyme-specific identification and characterization of substrates crosslinked by transglutaminases in liver fibrosis. The 13th International Symposium on ALPD and Cirrhosis 京都 2018年9月

〔図書〕(計1件)

Hitomi K and Tatsukawa H: Transglutaminase : Multiple Functional Modifiers and Targets for New Drug Discovery - Preferred Substrate Structure of Transglutaminases. Springer (2015)

〔その他〕

ホームページ等

研究室 HP: http://www.ps.nagoya-u.ac.jp/lab_pages/biochemistry/newpage2.html

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 人見 清隆

ローマ字氏名: (HITOMI, kiyotaka)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。