

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02167

研究課題名(和文)細胞外基質の硬さによる細胞機能制御の分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of regulation of cellular functions by extracellular matrix stiffness

研究代表者

木岡 紀幸 (Kioka, Noriyuki)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：90234179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲンなどの細胞外基質の硬さが細胞の分化方向性を制御する。本研究では、申請者が線維芽細胞で硬さの感知と遊走に關与することを明らかにしてきたピンキュリン-SORBS3/1軸に着目し、SORBS3/1の間葉系幹細胞の分化への関与について検討した。間葉系幹細胞においてSORBS3とSORBS1は転写因子YAPの硬さに応答した核局在の制御に寄与することを示し、特にSORBS1は硬さに応じた脂肪細胞への分化に必要であることを示した。またSORBS3内に第2のピンキュリン結合部位を同定するとともにその重要性を示すなど生化学的な解析も進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外基質の硬さは間葉系幹細胞の脂肪細胞や骨芽細胞への分化制御に深く関与している。このため、今回の研究成果は間葉系幹細胞を利用した再生医療を進展させるための重要な知見を提供する。また組織の硬さはがんの悪性化にも関わっているため、本研究はがんの悪性化の仕組みの解明にも貢献できる。

研究成果の概要(英文)：The stiffness of extracellular matrix such as collagen regulates the cell differentiation. In this study, we investigated the involvement of the vinculin-SORBS3/1 axis. We found that both SORBS3 and SORBS1 regulate the nuclear localization of YAP in a manner dependent on the stiffness in mesenchymal stem cells. In addition, the results also showed the involvement of SORBS1 in stiffness-dependent regulation into adipocyte differentiation. We also identified a second vinculin-binding site in SORBS3 and demonstrated its importance using biochemical analysis.

研究分野：応用分子細胞生物学

キーワード：細胞外マトリックス コラーゲン 細胞接着 間葉系幹細胞 接着斑

1. 研究開始当初の背景

ヒトの組織は、細胞とそれを取り巻く細胞外基質(コラーゲンなど)から成る。細胞外基質により組織の硬さが決まり、脂肪組織のように軟らかい(0.1~2,3kPa)ものから筋(~10kPa)や石灰化前骨組織(30~50kPa)、さらには成熟骨(105kPa)のように様々な硬さの組織がある。また、加齢により骨の硬さは変化し、肥満やがんで脂肪組織やがん周辺組織が硬化する。

間葉系幹細胞は細胞外基質が石灰化前骨組織と同程度に硬い(~40kPa)と骨芽細胞へ、脂肪組織と同程度の軟らかさ(~2kPa)だと脂肪細胞へ分化しやすくなる(図1)。また硬い細胞外基質によってがんの悪性化が進行し、がんの転移に必要な細胞遊走も促進する。骨芽細胞や脂肪細胞分化の制御のためには、細胞外基質の硬さを感知(メカノセンス)して、それを細胞機能調節につなぐ(メカノトランスダクション)仕組みの解明が必要である。

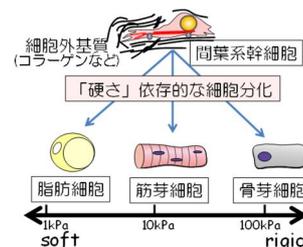


図1 細胞外基質の硬さによる細胞分化制御

細胞外基質と細胞との接着領域にはタンパク質複合体-接着斑(図2)-が形成される。私たちは接着斑局在タンパク質ピンキュリンと別の接着斑タンパク質ピネキシン α (SORBS3)、またはそのファミリータンパク質CAP(SORBS1)の複合体が繊維芽細胞における細胞外基質の硬さを感知するメカノセンサーとして働き、硬さによる繊維芽細胞の遊走の調節に必要なことを示してきた。ピンキュリンはアクチンにより引っ張られ、細胞外基質の硬さに応じて構造変化を起こし、SORBS3 または SORBS1 の結合がこの構造変化を安定化させる。

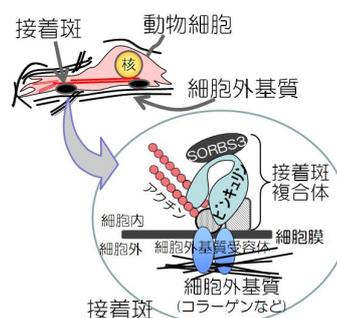


図2 接着斑の模式図

これまでのメカノセンサーの研究は、細胞形態や細胞遊走を指標としているものが多く、細胞分化過程で働くメカノセンサーについては、分化制御の複雑さから解析が遅れていた。私たちは、ピンキュリンが細胞外基質の硬さに依存した間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化(至適硬さが軟らかい)の調節に必要なこと、およびその過程で転写共役因子YAP/TAZの活性が調節されることを示した。しかし、SORBS3 や SORBS1 の脂肪細胞分化への関与および間葉系幹細胞の骨芽細胞分化へのピンキュリン-SORBS3/1 軸の関与は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、これまで私たちが解析してきたピンキュリン-SORBS3/1 軸に焦点をあて、間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化の際の硬さ感知への関与を明らかにするとともに、至適硬さが硬い骨芽細胞への分化への影響を明らかにする。またピンキュリンと SORBS3/1 の相互作用の詳細を比較し、ピンキュリンと SORBS1/3 の親和性が細胞の細胞外基質の硬さ応答に重要であるという仮説の検証するための基盤を築く。

3. 研究の方法

レンチウイルスベクターによる shRNA の導入で SORBS3 と SORBS1 の発現を抑制した間葉系幹細胞を作成した。さらに発現抑制細胞に SORBS3 または SORBS1 の遺伝子を再発現させた細胞を作成した。また、細胞外基質の硬さによる脂肪細胞分化の調節の際に働く転写共役因子YAP/TAZを調節する経路(メカノトランスダクション)を調べるために、SORBS3 または SORBS1 の発現を抑制した間葉系幹細胞を用い、プロテオームを利用して網羅的に探索を行った。ピンキュリンとの結合配列で多くみられる両親媒性ヘリックスに着目し、SORBS3 に2つ存在する両親媒性ヘリックスに様々な点変異を導入した。作成した変異体を用いてピンキュリンとの結合を共沈降実験で評価した。また結合の意義を明らかにするために、ピンキュリンの構造変化を評価できるピンキュリン FRET プローブを用いて変異体がピンキュリンの構造変化に与える影響を評価した。また変異体 SORBS3 と野生型 SORBS3 の発現が、異なる硬さの培養基板上で YAP/TAZ の核局在に与える影響を調べた。硬さの異なるゲルはこれまでに報告しているようにアクリルアミドを用いて作成した。

4. 研究成果

(1) 間葉系幹細胞の脂肪細胞/骨芽細胞分化に与える SORBS3 と SORBS1 の影響 分化への影響

SORBS3 と SORBS1 の硬さへの応答と間葉系幹細胞の細胞分化に与える影響を調べるために、まずレンチウイルスを用いて SORBS3、SORBS1 の発現を抑制/再発現した間葉系幹細胞株を作成した。SORBS3、SORBS1 と結合して硬さのセンサーとして働くピンキュリンは、細胞外基質が硬いと構造変化を起こし細胞骨格と強く結合することで界面活性剤を含む CSK 緩衝液に不溶性となる。この挙動に与える SORBS3 と SORBS1 の発現抑制効果を調べたところ、いずれのタンパク質を発現抑制してもピンキュリンの CSK 緩衝液不溶性が低下した。さらに、これらの発現抑制が細胞外基質の硬さに応じて核局在が亢進する YAP/TAZ の核局在に与える影響を調べたところ、軟らかい細胞外基質上では影響は見られないのに対し、硬い細胞外基質上では核局在の亢進がみられず、硬い硬さによる核局在の亢進が大きく低下した。このことから、間葉系幹細胞においても SORBS3 と SORBS1 は細胞外基質の硬さの感知と応答に寄与していることがわかった。

さらにこれらの細胞の脂肪細胞分化と骨芽細胞分化への影響を調べたところ、SORBS1 の発現抑制はピンキュリンの発現抑制と同じく、硬い培養基板上での脂肪細胞の分化を特に促進した。野生型の間葉系幹細胞は、硬い細胞外基質上に比べ軟らかい細胞外基質上で脂肪細胞に分化しやすいが、SORBS1 発現抑制細胞では硬さによる影響が低下していた。このことから、SORBS1 はピンキュリンと同様に硬い細胞外基質上での挙動に必要であることがわかった。同様に骨芽細胞分化を調べたところ、骨芽細胞への分化は SORBS1 の発現抑制により低下した。このことから SORBS1 は脂肪細胞、骨芽細胞どちらの細胞への分化にも関与していることがわかった。また、興味深いことに SORBS3 発現抑制細胞は、ピンキュリンや SORBS1 の発現抑制細胞とは逆に脂肪細胞の分化を抑制し、骨芽細胞への分化を促進した。SORBS3 は硬さ感知とは独立して分化に関わるシグナルの調節に関与していることが示唆された。

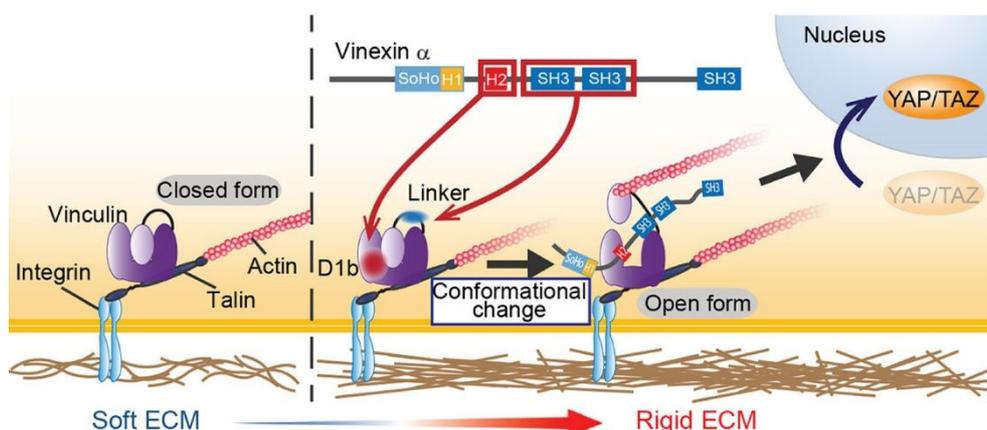
下流経路の探索

SORBS3 と SORBS1 の下流で調節されているシグナル経路を探索するために、野生型の間葉系幹細胞株と上記で作成した SORBS3 発現抑制細胞および SORBS1 発現抑制細胞からタンパク質を抽出し、リン酸化プロテオームを行った。得られた結果からキノーム解析を行い、活性が変化しているキナーゼを推測した。SORBS3 発現抑制細胞と SORBS1 発現抑制細胞で同じ方向で活性が変化しているキナーゼの候補と逆方向に活性が調節されているキナーゼの候補が得られた。しかし、ウエスタンブロッティングで各キナーゼの活性化(リン酸化)を調べたが有意な変化は見られず、今後条件を検討して解析を続けることにした。

(2) ピンキュリン-SORBS3 相互作用の解析

SORBS3 内の第 2 のピンキュリン結合領域の同定

ピンキュリンと SORBS3/1 の親和性の違いが細胞の細胞外基質の硬さ応答に重要であるという仮説を検証するための基盤として、SORBS3 とピンキュリンとの相互作用について詳細な検討を行った。これまでの研究から SORBS3 の SH3 ドメインがピンキュリンとの主要な相互作用部位であることはわかっていたが、転写バリエーションの解析からそれ以外の領域も相互作用に関与することが示唆されていた。本研究では、ピンキュリンとの結合配列で多くみられる両親媒性ヘリックスに着目し、SORBS3 に 2 つ存在する両親媒性ヘリックスに様々な点変異を導入した変異体を作成した。この変異体の解析から、H2 両親媒性ヘリックスがピンキュリンとの高親和性の結合に必須であることを明らかにした。また、ピンキュリンが CSK 緩衝液不溶性、つまり構造変化を起こして細胞骨格と強く結合する変化に与える SORBS3 の効果を検討したところ、野生



型の SORBS3 はピンキュリンの CSK 緩衝液不溶性を促進したが、H2 ヘリックスに変異を持つ SORBS3 変異体では硬い細胞外基質上での CSK 緩衝液不溶性への効果は大きく抑制された。さらに、硬さによって核局在が変化する YAP/TAZ の核局在に与える影響をしらべたところ、H2 ヘリックス変異体では硬さによる YAP/TAZ の核局在変化は抑制された。これらの結果から、H2 ヘリックスを介した SORBS3 のピンキュリンへの結合が細胞外基質の硬さ応答に重要であることが明らかになった。

ピンキュリン-SORBS3/1 の結合によるピンキュリンの構造変化

H2 領域を介した SORBS3 のピンキュリンとの結合の意義を明らかにするために、SORBS3 を大腸菌で発現、精製し、ピンキュリンの構造変化を評価できるピンキュリン FRET プローブを用いて H2 変異体の影響を評価した。その結果、H2 変異により SORBS3 によるピンキュリンの構造変化が抑制されることがわかった。また生体内で SORBS3 も SORBS1 も複数のキナーゼによってリン酸化を受けるなど翻訳後修飾が重要な役割を果たしていると考えられているので、SORBS3 と SORBS1 の動物細胞での発現、精製系も構築した。この系を用いて調整した SORBS3 と SORBS1 タンパク質を用いてピンキュリンとの複合体が形成される条件について検討をすすめた。ピンキュリンと親和性の評価、ピンキュリンの構造変化の詳細については解析を継続する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Takata Kyoko, Goto Tsuyoshi, Kuroda Mito, Kimura Yasuhisa, Harada Ichiro, Ueda Kazumitsu, Kawada Teruo, Kioka Noriyuki | 4. 巻 532 |
| 2. 論文標題 Stiffness of the extracellular matrix regulates differentiation into beige adipocytes | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 205 ~ 210 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.08.032 | 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 Okamoto Yusuke, Tomioka Maiko, Ogasawara Fumihiko, Nagaiwa Kota, Kimura Yasuhisa, Kioka Noriyuki, Ueda Kazumitsu | 4. 巻 84 |
| 2. 論文標題 C-terminal of ABCA1 separately regulates cholesterol floppase activity and cholesterol efflux activity | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry | 6. 最初と最後の頁 764 ~ 773 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1700775 | 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 Ito Shiho, Kioka Noriyuki, Ueda Kazumitsu | 4. 巻 83 |
| 2. 論文標題 Cell migration is negatively modulated by ABCA1 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry | 6. 最初と最後の頁 463 ~ 471 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2018.1547105 | 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 Hino Naoya, Ichikawa Takafumi, Kimura Yasuhisa, Matsuda Michiyuki, Ueda Kazumitsu, Kioka Noriyuki | 4. 巻 132 |
| 2. 論文標題 An amphipathic helix of vinexin is necessary for a substrate stiffness-dependent conformational change in vinculin | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Cell Science | 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) 10.1242/jcs.217349 | 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48件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 木岡紀幸 |
| 2. 発表標題 細胞外マトリックスの硬さと細胞遊走、分化の制御メカニズム |
| 3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 立花大、柴原正和、大町朋弘、箕浦広大、木村泰久、木岡紀幸 |
| 2. 発表標題 接着斑の細胞膜脂質の単離手法の確立と細胞内張力の影響の検討 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会 関西・中部支部 2019年度合同神戸大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Noriyuki Kioka, Kodai Minoura, Tomohiro Omachi, Takafumi Ichikawa, Yasuhisa Kimura, Nozomu Kono, Yuta Shimanaka, Toshihide Kobayashi, Hiroyuki Arai, Kazumitsu Ueda |
| 2. 発表標題 Analysis on the lipid composition of plasma membrane in cell-ECM adhesion region |
| 3. 学会等名 Gordon Research Conference "Cell Contact and Adhesion"（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 高橋真助、黒田美都、阿部雄一、木村泰久、木岡紀幸 |
| 2. 発表標題 ピネキシンファミリータンパク質が間葉系幹細胞の分化を調節する分子基盤の解明 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会 関西・中部支部 2019年度合同神戸大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 立花大、柴原正和、大町朋弘、箕浦広大、木村泰久、植田和光、木岡紀幸 |
| 2. 発表標題 接着斑細胞膜の単離手法の確立とピンキュリンの接着斑細胞膜への影響 |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 柴原正和、阿部雄一、木村泰久、木岡紀幸 |
| 2. 発表標題 ピネキシン / CAP依存的に接着斑に局在するタンパク質の単離と解析 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 倉田淳代、木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸 |
| 2. 発表標題 がん細胞に対するコラーゲンペプチドの効果 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 立花大、柴原正和、阿部雄一、木村泰久、植田和光、木岡紀幸 |
| 2. 発表標題 細胞外マトリックスの硬さ感知機構の解明を目指した接着斑プロテオーム |
| 3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 木岡紀幸 |
| 2. 発表標題 接着斑を介した細胞外マトリックスの硬さによる細胞機能の制御 |
| 3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 倉田淳代, 高橋真助, 阿部雄一, 植田和光, 木村泰久, 木岡紀幸 |
| 2. 発表標題 SORBSファミリータンパク質が間葉系幹細胞の分化を調節するシグナル経路の探索 |
| 3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 増元亮裕, 木村泰久, 木岡紀幸 |
| 2. 発表標題 光誘導性二量体化及び化学誘導性二量体化を用いた接着斑へのタンパク質の一過的局在化システム |
| 3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 鎌田一希, 木村泰久, 木岡紀幸 |
| 2. 発表標題 接着斑タンパク質ピネキシン は相分離に関与するか？ |
| 3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 柴原正和、立花大、阿部雄一、木村泰久、植田和光、木岡紀幸 |
| 2. 発表標題 硬さ感知・応答に関する新規接着斑タンパク質の探索を目指したプロテオーム解析 |
| 3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 田辺修平、柴原正和、立花大、木村泰久、木岡紀幸 |
| 2. 発表標題 細胞の細胞外マトリックスの硬さ感知に関与する新規タンパク質の同定 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 立花大、箕浦広大、長尾耕治郎、木村泰久、植田和光、木岡紀幸 |
| 2. 発表標題 接着斑細胞膜とGPMV法で単離した細胞膜の脂質組成の比較 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 倉田淳代、木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸 |
| 2. 発表標題 がん細胞の増殖と遊走に対するコラーゲンペプチドの効果 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 増元亮裕、木村泰久、木岡紀幸 |
| 2. 発表標題 化学誘導性二量体化を用いた PIP5K の接着斑一過的局在化システムの開発 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 田辺修平、柴原正和、立花大、木村泰久、木岡紀幸 |
| 2. 発表標題 細胞の細胞外マトリックスの硬さ感知に関与する新規タンパク質の同定 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 伊藤志帆、木岡紀幸、植田和光 |
| 2. 発表標題 ABCA1による脂質分布の変化が細胞遊走に与える影響 |
| 3. 学会等名 第60回日本脂質生化学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 柴原正和、箕浦広大、市川尚文、木村泰久、植田和光、木岡紀幸 |
| 2. 発表標題 超音波処理を用いた接着斑単離法の確立 |
| 3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会 第51回日本発生生物学会 合同大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Shiho Ito, Noriyuki Kioka, Kazumitsu Ueda |
| 2. 発表標題 The role of ABCA1 in the regulation of cell migration |
| 3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会 第52回日本発生生物学会 合同大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 柴原正和、箕浦広大、市川尚文、木村泰久、植田和光、木岡紀幸 |
| 2. 発表標題 超音波処理を用いた接着斑の単離 |
| 3. 学会等名 第91回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名 木岡 紀幸 |
| 2. 発表標題 膜領域としての接着斑細胞膜 |
| 3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Naoya Hino, Takafumi Ichikawa, Yasuhisa Kimura, Kazumitsu Ueda, Noriyuki Kioka |
| 2. 発表標題 An amphipathic helix of vinexin alpha is necessary for extracellular matrix stiffness-dependent conformational change in vinculin |
| 3. 学会等名 2018 ASCB EMBO Annual Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 柴原正和、木村泰久、植田和光、木岡紀幸 |
| 2. 発表標題 超音波法によるヒト間葉系幹細胞の接着斑単離とその最適化 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会 2019年度大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 高橋真助、黒田美都、阿部雄一、木岡紀幸 |
| 2. 発表標題 ピネキシンファミリータンパク質がYAPの核局在を引き起こす分子基盤の解明 |
| 3. 学会等名 第4回 メカノバイオロジー学会 学術大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| <p>京都大学農学研究科細胞生化学ホームページ http://www.biochemistry.kais.kyoto-u.ac.jp/</p> |
|--|

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 |
|-------|--|-----------------------------------|----|
| 連携研究者 | 木村 泰久 (Kimura Yasuhisa) (10415143) | 京都大学・農学研究科・准教授 (14301) | |

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