

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06913

研究課題名（和文）結合組織の恒常性を維持する新規メカニズムの解明と応用

研究課題名（英文）Investigation of a novel mechanisms for maintaining homeostasis in connective tissue

研究代表者

森田 強（Morita, Tsuyoshi）

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：80403195

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）：アルコールの過剰摂取やウイルスへの感染が原因で引き起こされる肝炎では、コラーゲンなどが肝臓に異常に蓄積することで肝線維化すなわち肝硬変が引き起こされ、さらに肝臓癌へと進行すると最悪に至る。本研究では、この肝線維化過程におけるthymosin-4タンパク質の役割を、thymosin-4遺伝子を改変したマウスを用いて解析した。その結果、thymosin-4は障害を受けた肝臓の修復を促進するタンパク質であり、thymosin-4が欠損すると肝硬変への進行がより重篤化することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでもthymosin-4が組織の線維化を抑制するという報告はあったが、そのメカニズムはほとんど明らかにされていなかった。本研究では、thymosin-4の遺伝子改変マウスを用いることで、内因性のthymosin-4が確かに肝臓の線維化を抑制していることを明確に示した。またその過程で、これまでに考えられてきた作用機序とは異なる新たなthymosin-4の働きを示すことができた。本研究成果により、肝硬変の発症メカニズムがより深く理解され、また、将来的にはthymosin-4をターゲットとした治療薬の開発にもつながると期待している。

研究成果の概要（英文）：Excessive consumption of alcohol and infection with hepatic virus can cause hepatitis. Chronic hepatitis progresses to liver fibrosis, or cirrhosis, due to abnormal accumulation of collagen and other substances in the liver, and further to liver cancer, which leads to death at worst. In this study, we analyzed the role of thymosin-4 protein in the process of liver fibrosis using thymosin-4 gene transgenic mice. The results showed that thymosin-4 is a protein that augments repair of the damaged liver, and that the progression to cirrhosis is more severe in the thymosin-4-null mice.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：肝炎 線維化 結合組織

1. 研究開始当初の背景

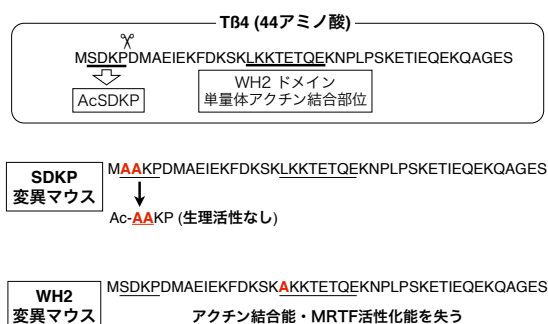
生活様式の変化に伴い、心筋症や肝硬変、腎障害、間質性肺炎など臓器の線維化を伴う疾患が先進国の死因に占める割合は年々上昇している。慢性炎症臓器ではコラーゲンなど線維性結合組織の異常な蓄積がしばしば観察され、その結果臓器の硬化性変性による機能障害、機能不全に至る。本来、損傷組織の正常な修復・再生過程の一環として線維芽細胞の活性化に伴う結合組織の合成亢進が生じるが、これが炎症の慢性化などにより過度に進行した結果が線維化であると考えられる。しかし、この結合組織の恒常性破綻がいかんして引き起こされるのかはあまり理解されていない。これまで私は、線維芽細胞の活性化において中心的な役割を果たす転写因子である **myocardin-related transcription factor (MRTF)** の解析を精力的に行ってきたが、その過程で **thymosin-β4 (TB4)** タンパク質が **MRTF** の活性を促進する制御因子であることを見出した。しかし、これまで **TB4** は線維芽細胞の活性をむしろ抑制する因子であることが報告されている。**TB4** は細胞内においてアクチンタンパク質と結合することで細胞骨格の制御に関わる一方、細胞外にも分泌され生理活性ペプチドとしての機能も果たすことが知られていた。私は、線維芽細胞に対する **TB4** 効果の二面性が、この作用部位の違いに起因するのではないかと考え、本研究課題の着想に至った。**TB4** はその作用部位の多様さにより線維芽細胞の活性化に対して促進的/抑制的な相反する効果を持ち合わせており、両者のバランスが破綻することにより損傷組織の恒常性が保てなくなり組織の線維化が引き起こされるものと考えている。

2. 研究の目的

上述のように、**TB4** はその作用部位の違いにより線維芽細胞に対して多面的な効果を発揮するものと考えられ、それらのバランスが結合組織の恒常性に重要な役割を果たしていると考えられる。本研究では、細胞内外における **TB4** の機能を欠損させた3種類の **TB4** 遺伝子改変マウスを作成し、それらのマウスにおける肝線維化過程を詳細に観察することで、結合組織の恒常性維持における **TB4** の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

これまで研究から、**MRTF** は単量体アクチンと結合することで核移行が阻害され転写因子としての活性を失うことが知られている。**TB4** は **MRTF** と単量体アクチンとの結合を競合的に阻害することで **MRTF** の核移行を促進し、線維芽細胞の活性化を引き起こす。一方で、細胞外へと分泌された **TB4** は、複数のペプチダーゼによるプロセッシングを受け、**N** 末端がアセチル化された4アミノ酸から成る生理活性ペプチド **Ac-SDKP** として作用する(右図参照)。そこで、**Ac-SDKP** が生じる **N** 末端の2アミノ酸 (**Ser²-Arp³**) を **Ala** へと置換したマウス (**S2AD3A** マウス) と、**TB4** と単量体アクチンとの結合部位である **WH2** ドメイン内のアミノ酸 (**Leu¹⁷**) を **Ala** へと置換したマウス (**L17A** マウス)、そして **TB4** ノックアウトマウスの3系統の遺伝子改変マウスを **CRISPR-Cas9** システムにより作成した。**S2AD3A** マウスでは細胞外における **Ac-SDKP** 産生能が完全に消失しているが、細胞内におけるアクチン細胞骨格制御因子としての機能は正常である。一方、**L17A** マウスでは **TB4** とアクチンとの結合能が失われているため **TB4** による **MRTF** の活性化が引き起こされないが、細胞外における **Ac-SDKP** の産生は妨げられていない。これらマウスに加えて **TB4** の完全欠損マウス (**KO** マウス) を作成した。以上3系統のマウスに四塩化炭素を投与することで慢性肝炎モデルを作成し、組織線維化の度合いを比較した。



4. 研究成果

(1) 通常飼育環境下における各種遺伝子改変マウスの表現系

CRISPR-Cas9 システムにより作成した上記3種のマウスは、どれもほぼメンデルの法則

に従って仔マウスを出産し、胎児発生過程における特徴的な表現系は観察されなかった。しかし、KO および S2AD3A マウスでは出生後 1~2 日以内に多くの新生児マウスが死亡もしくは食殺される傾向があり、S2AD3A マウスではその傾向が特に顕著であった。この特徴は新生児マウスの遺伝子型には依存せず、母マウスの変異がホモ接合である場合のみ見られることから、育児放棄や授乳異常に原因があるものと思われる。

これら 3 系統のマウスから皮膚線維芽細胞を単離し、初代培養を行ったところ、野生型および S2AD3A マウス由来の線維芽細胞と比較して、KO および L17A マウス由来の線維芽細胞では lamellipodia の進展が著しく減弱していた。TB4 は細胞質における単量体アクチンの量的な維持に必要であり、KO および L17A マウス由来の線維芽細胞細胞では外縁部における単量体アクチンの欠乏により lamellipodia でのアクチン重合が十分に行えないものと考えられる。

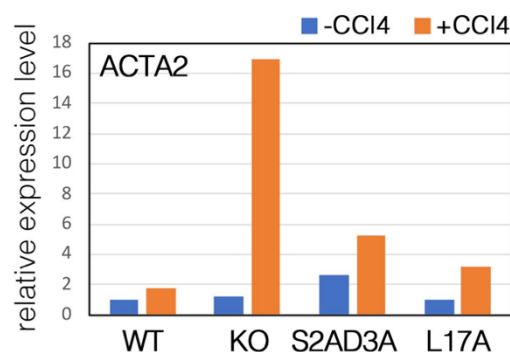
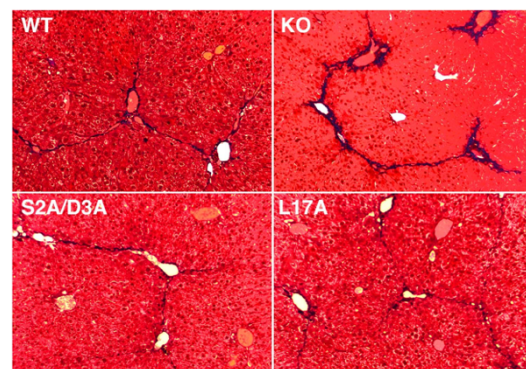
これらマウスの最も目立った特性として、直腸脱の自然発症が挙げられる。3 種全ての雌マウスにおいて、生後 2 ヶ月から半年の間に直腸脱が頻発したが、雄マウスではほとんど見られなかった。特に雌の S2AD3A マウスではその傾向が顕著で、生後半年までに 10~20%ほどのマウスで直腸脱が観察された(右図)。これらのマウスはおそらく大腸炎を発症しており、直腸脱に加え大腸の短縮や脾臓、肝臓の肥大など大腸炎の典型的な症状が観察された。



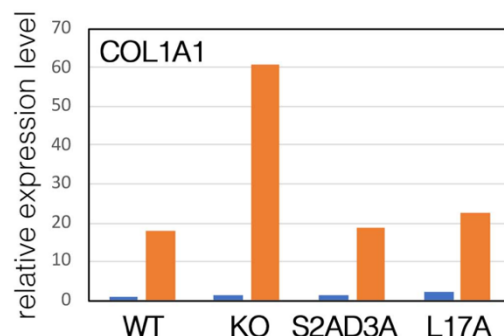
以上のように、通常の飼育環境下においては、特に S2AD3A マウスにおいて興味深い表現系が観察され、それらは雌マウスにおいて特に顕著であった。これは、TB4 遺伝子が X 染色体上にコードされていることに関係しているのかもしれない。また、TB4 は特に免疫系の細胞において発現の高い遺伝子であることから、今回観察された大腸炎の自然発症は、これらマウスの免疫系の異常に起因するものと考えている。これらの事柄は、今後さらなる検討が必要である。

(2) 四塩化炭素による肝炎発症モデルの検討

以上のように、雌マウスにおいて大腸炎の自然発症が見られたことから、肝炎発症モデルではその影響をできるだけ排除するために雄のマウスを用いることとした。6~8 週齢の上記 3 系統および野生型 C57BL/6J マウスに四塩化炭素 (CCl₄) を週に 2 回、8 週間にわたり腹腔内投与し、その後の肝線維化の進行を肝組織切片のマッソントリクローム染色により検討した。その結果、KO マウスでは線維化の有意な亢進が観察されたが、予想外にも S2AD3A および L17A マウスでは野生型マウスと変わらない程度の線維化しか引き起こされていなかった(右上図)。さらに、これらの肝組織から RNA を抽出し、様々な肝線維化関連遺伝子の発現を比較したところ、組織染色像と一致して KO マウスでのみ活性化線維芽細胞のマーカー遺伝子である alpha smooth muscle actin (ACTA2) や collagen type 1A1(COL1A1) 遺伝子の発現亢進が確認された(右下図)。これらの結果から、TB4 は肝線維化に対して抑制的な働きを有しているものの、それは当初予想したような細胞内単量体アクチンとの結合や細胞外における Ac-SDKP へのプロセッシングを介したものではない可能性が非常に高い。



以上のように、今回私が作成した 3 系統のマウスが、TB4 の多様な役割を解析するうえで非常に有用であることが確認できた。一方で、肝線維化における解析では、当初の予想に反してアクチンとの結合や Ac-SDKP としての機能とは独立した TB4 の働きが見出された。今後、さらなる詳細な解析を通じて結合組織の恒常性における TB4 の機能を解明していきたい。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Morita Tsuyoshi、Hayashi Ken'ichiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Tumor Progression Is Mediated by Thymosin- 4 through a TGF /MRTF Signaling Axis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 880-893
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1541-7786.MCR-17-0715	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 森田強	4. 巻 58(12)
2. 論文標題 ムーンライティングタンパク質サイモシン 4の多彩な機能	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 649-651
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1271/kagakutoseibutsu.58.649	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 森田強、茂里康、多中良栄	4. 巻 99(2)
2. 論文標題 ケラチンおよびコラーゲンの簡易サンプリング法 身近な試料を用いたSDS-PAGE	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 90-91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34565/seibutsukogaku.99.2_90	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森田強
2. 発表標題 肝線維化における thymosin- 4の役割
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田強
2. 発表標題 ACTR5は筋分化および横紋筋肉腫の形成を抑制する
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 林謙一郎、森田強	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 141
3. 書名 実験医学 2018年4月号（分担執筆，範囲：細胞骨格による転写制御 -アクチンダイナミクスによる転写調節と細胞機能-）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究内容：森田 強 http://www.wakayama-med.ac.jp/med/lasbiology1/morita/blog.html</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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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