

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03383

研究課題名(和文)筋線維芽細胞に特異的に発現する線維化促進分子の機能解析とその創薬応用への基盤構築

研究課題名(英文)Functional analysis of fibrosis-promoting molecules specifically expressed in myofibroblasts and laying the foundations for their drug discovery applications.

研究代表者

仲矢 道雄(Michio, Nakaya)

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：80464387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：近年増加している非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は、脂肪の過剰な蓄積による炎症を起因として線維化が亢進している病態である。線維化した組織は硬化により機能低下し、最終的には肝硬変や肝癌など重篤な病態へと至る。しかしながら現在、NASHの決定的な治療薬は存在していない。そこで我々は、線維化を標的としたNASH治療法の創生に繋がる標的分子を探索した。その結果、ある線維化促進タンパク質は、線維化病態時にのみ発現し、かつ線維化の実行細胞である筋線維芽細胞に特異的に発現することが明らかとなった。また、このタンパク質のノックアウトマウスにおいては、NASH時の肝臓の線維化が有意に軽減した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、新たに肝臓の線維化を促進するタンパク質を同定することができた。同定したタンパク質は、マウスおよびヒト共に線維化した肝臓において、活性化した肝星細胞に特異的に発現する。また、正常時の肝臓にはほとんど発現しない。従って、このタンパク質は、非アルコール性脂肪肝炎時やウイルス感染時などの肝臓の線維化治療の標的分子になる可能性が考えられる。今後はこのタンパク質がコラーゲンなどの産生を促進するメカニズムを詳細に解析する予定である。

研究成果の概要(英文)：Non-alcoholic steatohepatitis (NASH), which has been on the rise in recent years, is a condition of increased fibrosis resulting from inflammation caused by excessive fat accumulation. Fibrosis leads to loss of function due to hardening and eventually to serious conditions such as cirrhosis and liver cancer. However, there is currently no definitive treatment for NASH. We therefore looked for targets that could lead to the development of fibrosis-targeted NASH therapies.

We found a protein that promote fibrosis is only expressed during fibrosis and is specifically expressed in myofibroblasts, the cells responsible for fibrosis. In addition, fibrosis of the liver during NASH was significantly reduced in knockout mice of this protein.

研究分野：分子生物学、薬理学、生化学

キーワード：筋線維芽細胞 線維化

1. 研究開始当初の背景

組織における過剰な線維化は、組織を硬くすること等により、各種臓器の機能を大きく低下させる。従って、線維化の制御は、心筋梗塞後の心臓や喫煙による肺線維症、慢性腎不全、さらには脂肪肝等、患者数の多い、実に様々な病気において極めて重要な課題となっている。しかしながら、未だ決定的な線維化制御法は無く、線維化に対する画期的な治療法、治療薬の確立が望まれている。

組織の線維化は、コラーゲン等を産生する筋線維芽細胞という細胞群によって実行される。筋線維芽細胞は、組織が正常な時には存在せず、炎症を契機にして、主として常在性の線維芽細胞が分化する事により生じる。しかしながら、筋線維芽細胞による線維化因子の過剰産生の分子メカニズムは未だ多くの点が謎に包まれている

我々は、あるタンパク質 (FPP: Fibrosis Promoting Protein) が、筋線維芽細胞による線維化因子の産生を促進する、重要な分子であることを明らかにした。FPP の生体内における発現を *in situ hybridization* により調べた所、興味深いことに正常なマウス組織 (心臓、肝臓、肺) には全く発現せず、線維化した組織の筋線維芽細胞に特異的に発現していることが明らかとなった。

以上のことから、FPP は、 α SMA やコラーゲン等の線維化因子の産生を促進する重要な機能を持つと考えられる。しかしながら、そのメカニズムは全く明らかになっていない。

2. 研究の目的

このような学術的背景を踏まえ、本研究では、FPP が非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 時の肝臓の線維化に関与するかをマウス個体レベルで検証する。

3. 研究の方法

肝臓線維化モデルマウスの作製

超高脂肪コリン欠乏メチオニン減量食 (CDAHFD) を 10 週間給餌することで NASH モデルマウスを、四塩化炭素 (CCl₄) を腹腔内に 4 週間投与することで四塩化炭素誘導肝障害モデルマウスを作製した。

肝臓の線維化を実行する筋線維芽細胞の単離

肝臓線維化モデルマウスから肝臓を摘出し、酵素処理後、低速遠心分離と磁気細胞分離法を用いて筋線維芽細胞を単離した。

4. 研究成果

(1) FPP は線維化した肝臓において筋線維芽細胞に特異的に発現する。

NASH モデルマウスの肝臓を用いた RNA-seq により、正常時の肝臓には全く発現せず、線維化時に顕著に発現増加する FPP を見出した。そこで、線維化マウス肝臓における FPP の発現細胞を *in situ hybridization* で検討した。その結果、FPP は正常時の肝臓には発現しておらず、NASH 線維化時に筋線維芽細胞 (Desmin 陽性の活性化した星細胞) でのみ確認された [図 2]。さらに、四塩化炭素により線維化を誘導した肝臓から、酵素処理と磁気細胞分離法を用いて肝細胞、血球系細

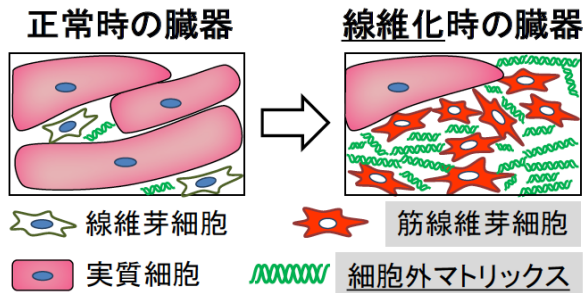


図 1. 筋線維芽細胞による線維化

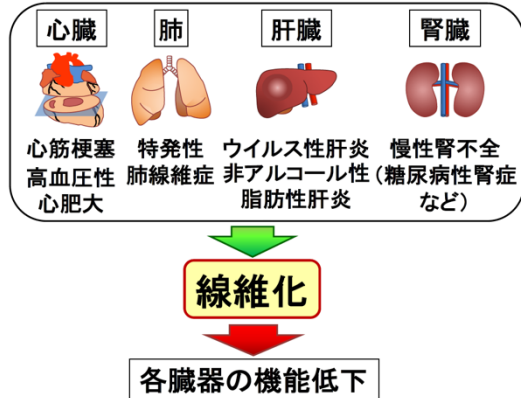
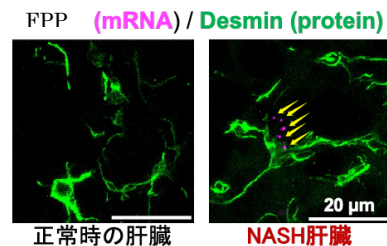


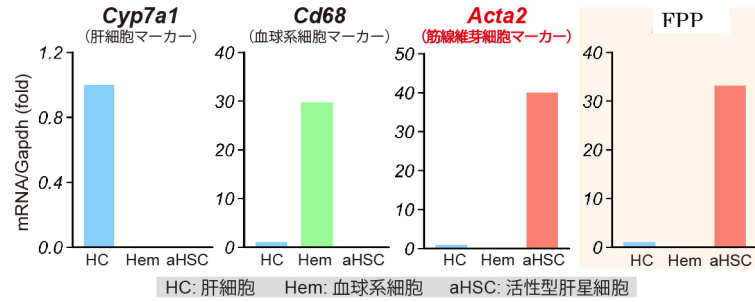
図 2. 各種組織の疾患と線維化



[図 2] FPP 発現細胞の同定

胞、筋線維芽細胞(活性型肝星細胞)を分取し、各画分における *FPP* の発現量を qPCR を用いて測定した。その結果、*FPP* は筋線維芽細胞画分に特異的に発現していた[図3]。

以上の結果から、*FPP* は正常な肝臓には発現せず、線維化病態時に出現する筋線維芽細胞に特異的に発現することが明らかとなった。

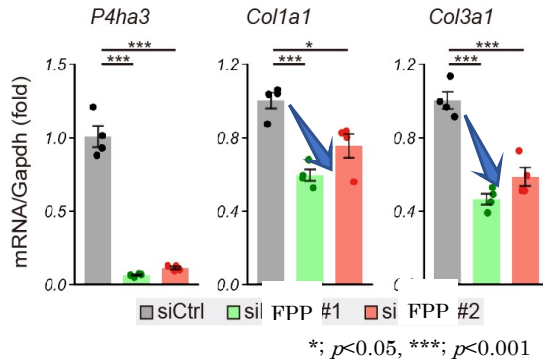


[図3] 線維化した肝臓細胞画分における *FPP* の発現

(2) *FPP* は筋線維芽細胞において線維化を促進する。

次に、*FPP* が線維化に影響を与えるかについて検討した。NASH モデルマウス肝臓から単離した筋線維芽細胞において、siRNA により *FPP* をノックダウンし、qPCR を用いて線維化関連因子の発現量を測定した。その結果、*FPP* のノックダウンによって *Col1a1* や *Col3a1* といった線維化関連因子の有意な減少が認められた[図4]。

このことから、*FPP* は筋線維芽細胞において、線維化関連因子の発現を促進することが明らかとなった。



[図4] *FPP* ノックダウンによる線維化関連因子の発現抑制

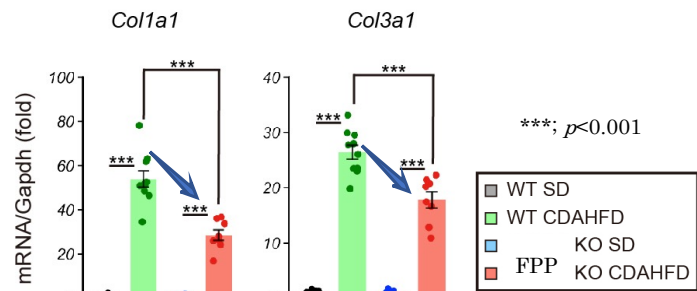
(3) *FPP* 欠損マウスにおいて NASH 線維化病態は改善する。

最後に、*FPP* の生体内における線維化への寄与を明らかにするため、*FPP* 欠損 (KO) マウスを作製し、NASH モデルにおける肝臓の線維化および病態を野生型 (WT) マウスと比較した。

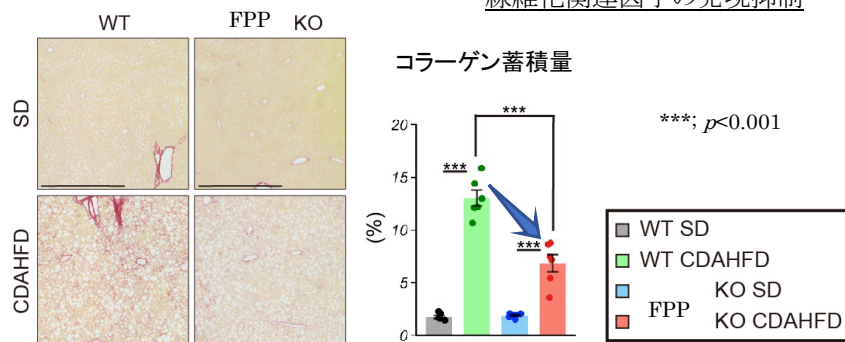
NASH を誘導した WT および KO マウス肝臓における線維化関連因子の発現量を qPCR で測定した。その結果、WT マウスと比較し、*FPP* KO マウスで *Col1a1* や *Col3a1* といった線維化関連因子の有意な減少が認められた[図5]。

さらに、コラーゲンを赤く染める Picrosirius Red 染色により、コラーゲンの蓄積量を定量した。その結果、*FPP* KO マウスの肝臓におけるコラーゲンの蓄積量は、WT マウスと比較して有意に減少していた[図6]。

以上の結果から、*FPP* は生体内においても、NASH 時の肝臓の線維化および病態を悪化させる分子であることが明らかとなった。



[図5] *FPP* ノックアウトによる線維化関連因子の発現抑制



[図6] ピクロシリウスレッド染色による線維化した肝臓の病理組織評価

【まとめ】

本研究により、肝臓において *FPP* は、線維化病態時のみ発現し、かつ線維化の実行細胞である筋線維芽細胞に特異的に発現することが明らかとなった。また、*FPP* KO マウスを用いた実験により、NASH 病態時の肝臓において、*FPP* は線維化関連因子の発現を促進し、線維化病態を悪化させる分子であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Akiomi Nagasaka, Tsuyoshi Terawaki, Makoto Noda, Miyuki Takashima, Mika Fujino, Yuto Yamauchi, Shigeki Arawaka, Takeo Kato, and Michio Nakaya	4. 巻 13(2)
2. 論文標題 GRK5-mediated inflammation and fibrosis exert cardioprotective effects during the acute phase of myocardial infarction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 380-391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13551	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takanori Hironaka, Noburo Takizawa, Yuto Yamauchi, Yuma Horii, and Michio Nakaya	4. 巻 299(3)
2. 論文標題 The well-developed actin cytoskeleton and Cthrc1 expression by actin-binding protein drebrin in myofibroblasts promote cardiac and hepatic fibrosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem	6. 最初と最後の頁 102934
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.102934	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yuma Horii, Shoichi Matsuda, Chikashi Toyota, Takumi Morinaga, Takeo Nakaya, Soken Tsuchiya, Masaki Ohmuraya, Takanori Hironaka, Ryo Yoshiki, Kotaro Kasai, Yuto Yamauchi, Noburo Takizawa, Akiomi Nagasaka, Akira Tanaka, Hidetaka Kosako, and Michio Nakaya	4. 巻 14(1)
2. 論文標題 VGLL3 is a mechanosensitive protein that promotes cardiac fibrosis through liquid-liquid phase separation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-36189-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takizawa Noburo, Hironaka Takanori, Mae Kyosuke, Ueno Tomoyuki, Horii Yuma, Nagasaka Akiomi, Nakaya Michio	4. 巻 561
2. 論文標題 GPRC5B promotes collagen production in myofibroblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 180 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.05.035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kasai Kotaro, Horii Yuma, Hironaka Takanori, Mae Kyosuke, Ueno Tomoyuki, Nagasaka Akiomi, Nakaya Michio	4. 巻 4
2. 論文標題 Increased Expression of Heparan Sulfate 6-O-Sulfotransferase-2 Promotes Collagen Production in Cardiac Myofibroblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 85 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpbreports.4.3_85	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Yuya, Matsunaga Naoya, Nakao Takaharu, Hamamura Kengo, Kondo Hideaki, Ide Tomomi, Tsutsui Hiroyuki, Tsuruta Akito, Kurogi Masayuki, Nakaya Michio, Kurose Hitoshi, Koyanagi Satoru, Ohdo Shigehiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Alteration of circadian machinery in monocytes underlies chronic kidney disease-associated cardiac inflammation and fibrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-23050-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hironaka T, Ueno T, Mae K, Yoshimura C, Morinaga T, Horii Y, Nagasaka A, Kurose H, Nakaya M.	4. 巻 529(2)
2. 論文標題 Drebrin is induced during myofibroblast differentiation and enhances the production of fibrosis-related genes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 224-230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.110	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakaya T, Kamiya K, Nakaya M, Tsuji K, Niki T, Ohtsuki M, Tanaka A	4. 巻 99(29)
2. 論文標題 Myofibroblast phagocytic cutaneous mucinosis: phagocytosis of mucinous substances by myofibroblasts in a distinctive cutaneous mucinosis: A case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medicine (Baltimore).	6. 最初と最後の頁 e20867
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.0000000000020867	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 Horii Y, Nakaya M, Ohara H, Nishihara H, Watari K, Nagasaka A, Nakaya T, Sugiura Y, Okuno T, Koga T, Tanaka A, Yokomizo T, Kurose H.	4. 巻 34(6)
2. 論文標題 Leukotriene B 4 receptor 1 exacerbates inflammation following myocardial infarction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 8749-8763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202000041R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshimura C, Nagasaka A, Kurose H, Nakaya M.	4. 巻 168(1)
2. 論文標題 Efferocytosis during myocardial infarction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biochem.	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計10件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Michio Nakaya
2. 発表標題 Identification of a mechanosensitive protein that promotes cardiac fibrosis
3. 学会等名 International symposium on mechanobiology for Human Health (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 仲矢道雄
2. 発表標題 機械的刺激を感知する新規線維化促進分子の同定
3. 学会等名 2022年度徳島大学先端酵素学研究所共同利用・共同研究拠点成果報告会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 仲矢道雄
2. 発表標題 新規線維化促進因子の同定
3. 学会等名 第三回細胞死コロキウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仲矢道雄
2. 発表標題 新規線維化促進因子の同定
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仲矢道雄
2. 発表標題 機械的刺激による組織の線維化
3. 学会等名 日本機械学会第34回バイオエンジニアリング講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仲矢道雄
2. 発表標題 新規線維化促進因子の同定
3. 学会等名 第54回日本結合組織学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仲矢道雄
2. 発表標題 新規線維化因子の探索
3. 学会等名 第二回細胞死コロキウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仲矢道雄
2. 発表標題 細胞死を起点とした線維化研究
3. 学会等名 日本Cell Death学会第29回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仲矢道雄
2. 発表標題 細胞死を起点とした組織線維化研究
3. 学会等名 第一回細胞死コロキウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 仲矢道雄、黒瀬等
2. 発表標題 筋線維芽細胞のマーカ－受容体の探索
3. 学会等名 第52回日本結合組織学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 末次春菜, 吉岡啓佑, 仲矢道雄	4. 発行年 2023年
2. 出版社 日本生化学会	5. 総ページ数 4
3. 書名 生化学 in press 「機械的刺激による筋線維芽細胞の性質変化」	

1. 著者名 山内佑斗, 堀井雄真, 仲矢道雄	4. 発行年 2022年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 7
3. 書名 「筋線維芽細胞と線維化」 臨床免疫・アレルギー科	

1. 著者名 仲矢道雄, 堀井雄真, 黒瀬等	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 6
3. 書名 実験医学 増刊号「Fibrosis」 「死細胞貪食と線維化」 p88-93	

1. 著者名 廣中貴則, 瀧澤宣郎, 黒瀬等, 仲矢道雄	4. 発行年 2020年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 7
3. 書名 脳神経内科 「G蛋白質共役受容体キナーゼの生理機能」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学薬学研究院疾患制御学分野
https://chudoku.phar.kyushu-u.ac.jp
九州大学薬学研究院薬効安全性学分野
https://chudoku.phar.kyushu-u.ac.jp

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	小迫 英尊 (Kosako Hidetaka) (10291171)	徳島大学・先端酵素学研究所・教授 (16101)	

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