

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：27101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04797

研究課題名（和文）ヒト筋線維芽細胞の平滑筋細胞形質転換にかかる分子機構の解析と形質転換要素の同定

研究課題名（英文）Analysis of the molecular mechanisms involved in the transformation of human myofibroblasts into smooth muscle cells

研究代表者

木原 隆典（Kihara, Takanori）

北九州市立大学・国際環境工学部・准教授

研究者番号：90436535

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：架橋IV型コラーゲンゲル、I型コラーゲンゲルを用いて筋線維芽細胞の平滑筋細胞形質転換機構について解析した。コラーゲンゲルの物理シグナルにより細胞増殖が抑制されること、IV型コラーゲンの化学シグナルにより細胞伸長・ネットワーク形成が誘導されること、PI3Kシグナルが細胞伸長に重要であることを明らかにした。さらにI型コラーゲンゲル上でヒト筋線維芽細胞の増殖抑制、細胞のネットワーク形成の誘導に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、これまで不明であった筋線維芽細胞の平滑筋細胞形質転換過程において、細胞外マトリックス環境からどのようなシグナルが細胞に入り、またどのような細胞内シグナル伝達経路がその過程で働いているかを明らかにしたものである。本研究成果は、器官の線維化・硬化を引き起こす筋線維芽細胞の間質細胞への形質転換を誘導する方法の開発に資するものであり、将来的に慢性炎症疾患治療の開発に貢献する。

研究成果の概要（英文）：I analyzed the mechanisms of myofibroblast transformation into smooth muscle cells using cross-linked type IV collagen gel and type I collagen gel. The physical signal from the collagen gel inhibited the proliferation of myofibroblasts, and the chemical signal from type IV collagen induced cell elongation and network formation. In particular, PI3K signaling induced by type IV collagen gel was important for cell elongation and network formation. Furthermore, I succeeded in inhibiting the proliferation of human myofibroblasts and inducing cell network formation on the type I collagen gel.

研究分野：組織細胞工学

キーワード：筋線維芽細胞 平滑筋細胞 コラーゲンゲル IV型コラーゲン I型コラーゲン PI3K 細胞ネットワーク形成

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

我々の体は、障害が生じると炎症反応を引き起こし器官の修復を行う。多くの器官で障害時の修復を担うのは筋線維芽細胞であり、筋線維芽細胞は増殖と線維性コラーゲンの分泌、損傷部位の収縮を行うことで器官を修復する。筋線維芽細胞の起源は器官内外の間質細胞であり、間質細胞が形質転換することで生じる。筋線維芽細胞は器官の修復が完了すると再び間質細胞へと形質転換し消失する。一方で、慢性的な炎症により器官が修復されず炎症反応が繰り返し引き起こされると、筋線維芽細胞は活性を維持し、増殖と線維性コラーゲンの産生を繰り返す。その結果、器官の線維化・硬化が生じる。そのため器官の線維化・硬化を抑制するには、筋線維芽細胞の増殖・線維性コラーゲン産生を抑える必要があり、筋線維芽細胞を間質細胞へと形質転換する方法の開発が期待されている。

2. 研究の目的

平滑筋細胞を生体外で培養すると、筋線維芽細胞へと形質転換し増殖する。筋線維芽細胞となった平滑筋細胞を細胞培養系で再び平滑筋細胞へと形質転換させることは難しい。このことが筋線維芽細胞の形質制御機構の解明を困難としている。しかしながら、筋線維芽細胞の培養に IV 型コラーゲンのゲル器材を用いることで平滑筋細胞へと形質転換できることが報告されており、実際に研究代表者も架橋 IV 型コラーゲンゲルでニワトリ胚砂嚢由来筋線維芽細胞の形質転換に成功している。本研究は、こうした器材を用いた筋線維芽細胞形質転換培養系を用い、筋線維芽細胞が平滑筋細胞へと転換する際の分子機構を解明し、転換に必要な要素を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)筋線維芽細胞

細胞はニワトリ胚砂嚢平滑筋細胞とヒト大動脈血管平滑筋細胞を細胞培養系で増殖させ、筋線維芽細胞へと形質転換したものをを用いた。砂嚢平滑筋細胞はニワトリ胚砂嚢からコラーゲナーゼ処理により採取した。ヒト血管平滑筋細胞は市販されているものを購入しを用いた。ヒト血管平滑筋細胞の培養は市販されている平滑筋細胞用増殖培地を用いた。

(2)培養器材

筋線維芽細胞の培養器材として、I 型コラーゲンゲルと IV 型コラーゲンゲルを用いた。I 型コラーゲンゲルは I 型コラーゲン溶液を生理的環境下でゲル化させることで作製した。IV 型コラーゲンゲルは IV 型コラーゲン溶液をアルデヒドで化学架橋しゲル化させて作製した。

(3)平滑筋細胞の形質評価

平滑筋細胞の形質の特長は、増殖停止、細胞同士が連結した細胞ネットワーク形成、さらに平滑筋細胞特異的タンパク質である SM-MHC や Calponin などの発現、さらに筋収縮能を持つことである。本研究は筋線維芽細胞から平滑筋細胞への形質転換評価として、細胞増殖、細胞連結ネットワーク長、平滑筋細胞特異的タンパク質の免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1)架橋 IV 型コラーゲンゲル上での筋線維芽細胞の形質転換誘導

架橋 IV 型コラーゲンゲルを用いて、ニワトリ胚砂嚢平滑筋細胞由来筋線維芽細胞の平滑筋細胞形質転換培養系を確立した。架橋 IV 型コラーゲンゲル上で筋線維芽細胞を培養することで、一部細胞で増殖の停止、細胞の伸長、ネットワーク形成が見られた。架橋 IV 型コラーゲンゲルから誘導されるシグナル伝達系を調べるため、各種阻害剤を添加し細胞の形質転換を評価したところ、PI3K 阻害剤で細胞は伸長しなくなり、細胞数の減少も見られた(図1)。一方で、MAPK 阻害剤を添加したところ、細胞がより伸長することが

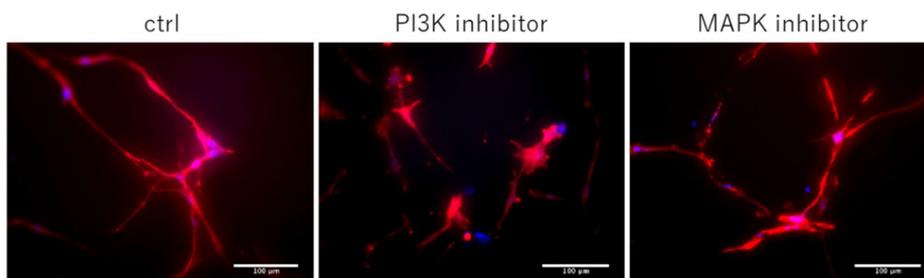


図1 架橋IV型コラーゲンゲル上で培養したニワトリ由来筋線維芽細胞の形態。PI3K阻害剤では細胞伸長が抑制され、MAPK阻害剤では逆に細胞がより伸長する。

わかった。以上より、架橋 IV 型コラーゲンゲル上の筋線維芽細胞には MAPK および PI3K シグナルが働いていること、その中でも PI3K シグナルが平滑筋細胞への形質転換を引き起こしていること、MAPK シグナルを阻害することでより平滑筋細胞への形質転換が誘導されることが明らかとなった。

(2) 架橋 IV 型コラーゲンゲルによる化学シグナルと物理シグナル

架橋 IV 型コラーゲンゲルによるニワトリ筋線維芽細胞形質転換培養系を用いて、IV 型コラーゲンによる化学シグナルと架橋コラーゲンゲルによる物理シグナルが形質転換の要素としてどのように働いているか検討を行った。

IV 型コラーゲンによる化学シグナルの効果を検討するため、IV 型コラーゲンをどのように受容するか検討を行った。その結果、グリコサミノグリカンの添加により、架橋 IV 型コラーゲンゲル上での筋線維芽細胞の細胞伸長・ネットワーク形成が抑制された。また平滑筋細胞特異的タンパク質の発現も消失した。一方で、グリコサミノグリカンの添加によって細胞が増殖するなどの効果はみられなかった。このことは、架橋 IV 型コラーゲンゲル上での IV 型コラーゲンシグナルの受容にはプロテオグリカンが働いていること、さらにこのシグナルによって細胞伸長・ネットワーク形成、平滑筋細胞特異的遺伝子の発現が誘導されており、細胞増殖抑制には作用しないことがわかった。

次に、架橋 IV 型コラーゲンゲルの物理シグナルの効果を調べるため、架橋 IV 型コラーゲンゲルの物性測定を行った。その結果、架橋 IV 型コラーゲンゲルは同濃度の I 型コラーゲンゲルと同程度の弾性率であることがわかった。

I 型コラーゲンゲルも架橋 IV 型コラーゲンと同様の弾性率を持つことから、I 型コラーゲンゲルを用いて架橋 IV 型コラーゲンゲルの物理シグナルの効果を検証した。I 型コラーゲンゲル上でニワトリ筋線維芽細胞を培養したところ、細胞増殖の抑制が見られた。さらにここに、IV 型コラーゲンを添加して疑似的に IV 型コラーゲンの化学シグナルを細胞に与えたところ、細胞の伸長が誘導された (図 2)。このことから、架橋 IV 型コラーゲンゲルの物理シグナルは細胞増殖抑制に対して強い効果を持ち、細胞伸長にも一定程度の作用を持つことがわかった。また IV 型コラーゲンの化学シグナルが細胞伸長に働いていることも確認できた。一方で、I 型コラーゲンゲル上で IV 型コラーゲンを添加しても平滑筋細胞特異的タンパク質は観察されなかった。このことから、I 型コラーゲンゲル + IV 型コラーゲンでは架橋 IV 型コラーゲンゲルの効果を完全に模倣することができないこと、平滑筋細胞特異的遺伝子の発現は、IV 型コラーゲンの化学シグナル以外の要素も必要であることが明らかとなった。

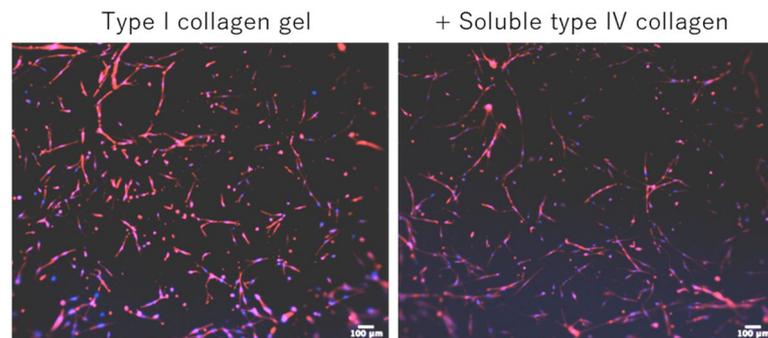


図2 ニワトリ由来筋線維芽細胞に対する可溶性IV型コラーゲンの効果。I型コラーゲンゲル上で培養し、そこに可溶性IV型コラーゲンを添加した。IV型コラーゲンの添加により細胞が伸長する。

(3) ヒト筋線維芽細胞の平滑筋細胞形質転換誘導

ヒト大動脈血管平滑筋細胞由来筋線維芽細胞の平滑筋細胞形質転換誘導を行った。これまでの結果から、I 型コラーゲンゲルが架橋 IV 型コラーゲンゲルと似た物性効果を持ち、筋線維芽細胞の増殖抑制に働くこと、IV 型コラーゲンの化学シグナルが筋線維芽細胞の伸長に効果を持つことがわかっている。そのためこれら I 型コラーゲンゲルと IV 型コラーゲンによる効果について、ヒト筋線維芽細胞を用いて検証した。

ヒト筋線維芽細胞は I 型コラーゲンゲル上で増殖が抑制され、さらに一定程度の細胞伸長が見られた。I 型コラーゲンゲル上で細胞内に PI3K シグナルが誘導されているか確認するため PI3K 阻害剤を加えたところ、I 型コラーゲンゲルによる細胞伸長は完全に抑制された。このことから I 型コラーゲンゲル上でヒト筋線維芽細胞には PI3K シグナルが働き細胞伸長が誘導されていることがわかった。さらに、I 型コラーゲンゲル上で MAPK 阻害剤を添加したところ、細胞伸長の誘導と細胞のネットワーク形成が見られた。このことから、I 型コラーゲンゲル上では架橋 IV 型コラーゲンゲル上よりも MAPK シグナルが強く働いていること、MAPK シグナルを阻害することでヒト筋線維芽細胞が細胞ネットワークを形成し、形質転換誘導が生じることがわかった。

そこで、I 型コラーゲンゲル上で MAPK 阻害剤を加え、さらに IV 型コラーゲンを添加して IV 型コラーゲンの化学シグナルを細胞に与えた。その結果、細胞同士が連結し長大な細胞ネットワークが形成された (図 3)。このことから、ヒト筋線維芽細胞は I 型コラーゲンゲルの物理シグナルを与えたうえで、MAPK シグナルの阻害と IV 型コラーゲンの化学シグナルを与えることで平滑筋細胞への形質転換の誘導が進むことがわかった。一方で、平滑筋細胞特異的タンパク質は確

認められず、これらの培養条件に加え、平滑筋細胞への形質転換には平滑筋細胞特異的遺伝子の発現を誘導する要素がさらに必要であることがわかった。

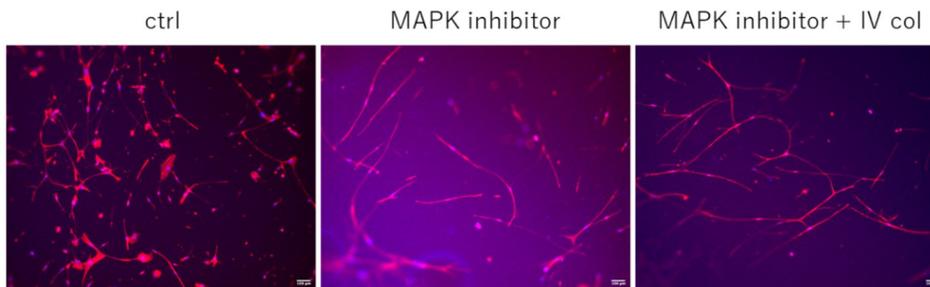


図3 I型コラーゲンゲル上におけるヒト由来筋線維芽細胞の形態。MAPK阻害剤にさらにIV型コラーゲンを加えることで細胞伸長・ネットワーク形成が誘導される。

(4)まとめ

本研究は、ニワトリ胚砂囊平滑筋細胞由来筋線維芽細胞、ヒト血管平滑筋細胞由来筋線維芽細胞を用い、筋線維芽細胞の平滑筋細胞形質転換の誘導とその分子機構の解析を行った。筋線維芽細胞をコラーゲンゲル上で培養すると、物理シグナルにより細胞増殖が抑制される。またIV型コラーゲンの化学シグナルが細胞表面のプロテオグリカンを介して細胞内に入り、それによって細胞伸長・ネットワーク形成が誘導されることがわかった。また細胞内のシグナル伝達経路に目を向けると、MAPKとPI3Kが働いており、PI3Kが細胞伸長に特に重要であること、MAPKは阻害することでより細胞伸長が生じることがわかった。本研究成果は、生体内の筋線維芽細胞を間質細胞である平滑筋細胞への形質転換において、ゲル環境の物理シグナル、IV型コラーゲンの化学シグナル、細胞内のPI3KとMAPKのシグナル伝達の調節が有効であることを示している。今後は、平滑筋細胞特異的遺伝子の発現誘導を引き起こす要素の同定を進めることで、生体内で活性化された筋線維芽細胞の平滑筋細胞・間質細胞への形質転換誘導が可能になると期待される。

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 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 木原隆典, 立花宏一	4. 巻 48
2. 論文標題 機械的物性から読み取る白血球接着	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 46-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Phan Thi Kieu Trang, Do Thi Ly, Tachibana Kouichi, Kihara Takanori	4. 巻 35
2. 論文標題 Alpha-mangostin dephosphorylates ERM to induce adhesion and decrease surface stiffness in KG-1 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 189 ~ 198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-021-00651-8	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 該当する

1. 著者名 Kihara Takanori, Matsumoto Teru, Nakahashi Yoshihito, Tachibana Kouichi	4. 巻 34
2. 論文標題 Mechanical stiffness softening and cell adhesion are coordinately regulated by ERM dephosphorylation in KG-1 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 1709 ~ 1716
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-021-00584-2	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16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 清水駿介, 樋室堯也, 森田亜希, 木原隆典
2. 発表標題 I型コラーゲン基質上での平滑筋細胞の収縮型形質転換誘導の試み
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 木原隆典, 山中由晶
2. 発表標題 分子拡散解析から細胞外マトリックス構築過程を探る
3. 学会等名 第55回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Do TL, Isoda T, Yamamoto N, Tachibana K, Kihara T
2. 発表標題 Cell stiffness as a potential marker for SARS-CoV-2 infection
3. 学会等名 Biosensors 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Do TL, Isoda T, Yamamoto N, Tachibana K, Kihara T
2. 発表標題 SARS-CoV-2 Spike RBD reducing cellular stiffness appears as an important event for viral infection
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 瀬戸口桃香, Do TL, 立花宏一, 木原隆典
2. 発表標題 白血球接着を誘導する細胞表面シアロムチンの拡散運動性変化
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山中由晶, 木原隆典
2. 発表標題 分子拡散解析から線維芽細胞によるECM構築過程を探索
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩田百恵子, 林田大, 木原隆典
2. 発表標題 シミュレーションとリン酸挙動の定量評価による骨芽細胞の石灰化組織形成過程の解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 木原隆典, 森田亜希, 清水駿介, 樋室亮也
2. 発表標題 増殖型平滑筋細胞の収縮型形質転換時におけるシグナル伝達解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山中由晶, 木原隆典
2. 発表標題 分子拡散解析を利用した線維芽細胞によるコラーゲン線維濃縮過程の解析
3. 学会等名 第54回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 瀬戸口桃香, Do Thi Ly, 立花宏一, 木原隆典
2. 発表標題 白血球接着時における表面分子の拡散運動性解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Do TL, Kihara T, Isoda T, Yamamoto N, Tachibana K
2. 発表標題 SARS-CoV-2 Spike protein induced a reduction of cellular stiffness
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林田大, 柏谷康介, 木原隆典
2. 発表標題 細胞の石灰化をモデルとした骨石灰化形成における化学的要素と生物的要素の検討
3. 学会等名 第54回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 樋室亮也, 森田亜希, 木原隆典
2. 発表標題 IV型コラーゲンを利用した平滑筋細胞の収縮型形質転換機構の解析
3. 学会等名 つくば医工連携フォーラム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木原隆典, 森田亜希, 樋室亮也
2. 発表標題 平滑筋細胞におけるIV型コラーゲンシグナルの解析
3. 学会等名 第53回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 城元祥嗣, 木原隆典
2. 発表標題 分子拡散を指標とした核小体物理環境の評価
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Do TL, Phan TKT, Tachibana K, Kihara T
2. 発表標題 Alpha-mangostin dephosphorylates ERM and initiates an initial response of leukocytes activation
3. 学会等名 Cell Bio Virtual 2021, an online ASCB EMBO meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>北九州市立大学 国際環境工学部 木原研究室 HP https://takanori-kihara.jimdofree.com/</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
---------	---------