

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460268

研究課題名(和文) 中間径フィラメント蛋白シネミンの機能解明のための形態学的・分子細胞生物学的研究

研究課題名(英文) Morphological and Molecular Cell Biological Study on an Intermediate filament protein, synemin.

研究代表者

依藤 宏 (Yorifuji, Hiroshi)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00158544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：中間径フィラメント蛋白の一つであるシネミンについて、その機能の解明を目指し、骨格筋と肝臓で分子細胞生物学的解析をおこなった。骨格筋では筋の分化に関与するアクチニン3(ACTN3)との関係を調べた。免疫沈降法と共発現の形態学的観察から両者間の結合が明らかになった。シネミン欠損マウスではACTN3の発現増強と筋持久力低下が認められるが、その機序解明が今後の課題である。肝臓ではシネミンは星細胞に局在している。星細胞は実験的肝線維化への寄与が知られており、今回の研究でシネミン欠損マウスでは肝線維化が抑制される事が明らかになった。今後、シネミンの発現制御により肝線維化の予防や治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：To reveal the functions of intermediate filament protein, synemin, we studied skeletal muscles and liver. In skeletal muscles, the interaction between actinin 3 (ACTN3) and synemin was studied using immunoprecipitation and fluorescence microscope. Co-precipitation and co-localization of these proteins were found. Whereas mice lacking ACTN3 showed improvement of endurance, those lacking synemin showed its decline. We are now studying the mechanisms of the latter. In the liver, synemin is expressed in stellate cells. In experimental fibrosis models of the liver, synemin knockout mice showed the reduction of fibrosis compared with that of the wild type animals. This might lead to the prevention and/or treatment of fibrosis in human liver.

研究分野：解剖学、細胞生物学

キーワード：シネミン 中間径フィラメント 骨格筋 肝臓 線維化

1. 研究開始当初の背景

(1)シネミンは細胞骨格の中間径フィラメントを形成するファミリー蛋白の一つである。中間径フィラメントは主に細胞形態の形成・維持に働くが、単体でフィラメントを形成できないシネミンの機能については未だ不明な点が多い。我々の研究室ではシネミンのノックアウトマウスを作成、表現型解析し、主に速筋に負荷のかかる下り坂トレッドミル走負荷において持久力の低下が認められ、ヒラメ筋でタイプ Ⅱ型(遅筋)の筋線維の割合が増加していることを明らかにしてきた。

(2)またデスミンやGFAPなどの中間径フィラメント形成蛋白の一部は肝臓の星細胞に多く発現していることが知られており、損傷を受け肝星細胞から筋線維芽細胞に分化する際、その発現量が劇的に変化することが知られている。シネミンは分化前の肝星細胞に発現していることが知られているが、その機能は明らかではなく、肝線維化における動態も不明であった。

2. 研究の目的

(1)本研究の目的は、中間径フィラメント蛋白のシネミンについて、骨格筋において分子細胞生物学的解析を行うことで生体内での機能及び筋線維の構成変化の分子メカニズムを明らかにすることである。

(2)さらにシネミンノックアウトマウスを用い、肝臓の星細胞での生理的機能を解析する。シネミンは肝臓において局在についての研究はなされているが、その機能についてはまだ全く分かっていない。

3. 研究の方法

(1)骨格筋について
ヒラメ筋で遅筋の割合が増加していたことから筋線維の分化に関係する分子であるACTN3の発現量を調べた。ヒラメ筋を用い、western blottingを行うことで定量した。ま

た、シネミンと遅筋と速筋の分化に関わるACTN3の関係を調べるため、免疫沈降を行い共精製出来るかを確認した。さらに、細胞内の局在を調べるためにシネミン全長にGFPを結合させたものとACTN3にRFPを結合させたものを作製した。筋線維芽株C2C12にそれらを共発現させてそれぞれの局在を観察した。

(2)肝臓について

シネミンは肝臓の星細胞に発現していることが知られている。星細胞は肝臓が損傷するとすぐに筋線維芽細胞に分化、増殖をし、コラーゲンを主成分とする細胞外マトリクスを産生する。それにより肝臓の修復を助けるが、肝炎の様な慢性的な炎症によって肝臓の線維化及び肝硬変を引き起こす原因ともなる。肝臓は四塩化炭素を取り込ませると肝細胞死を引き起こし擬似的に急性及び慢性の肝炎を起こすことが出来ること知られている。急性肝炎は多量の四塩化炭素を投与後1,2,3日後にそれぞれ肝臓を摘出しwestern blotting、免疫染色などを行った。慢性肝炎に関しては週に2回、6週間にわたって少量の四塩化炭素を投与した後、炎症が完全に治まる1週間後に摘出し、マッソントリクローム染色を行った。

4. 研究成果

(1)骨格筋について
まず、ヒラメ筋を用い、骨格筋線維の分化に関係する分子であるACTN3の発現量を比較した。
ACTN3はシネミンノックアウトマウスにおいて野生型のマウスより発現量が増加していることが分かった。次にシネミンとACTN3の直接的な関係性を調べるためにそれぞれの抗体を用い、免疫沈降を行った。それぞれの抗体でシネミン及びACTN3が共精製出来たことから、この2つのタンパク質は直接または間接的に結合し、複合体を形成している可能性が示唆された(Fig.1)。

Lysate IP

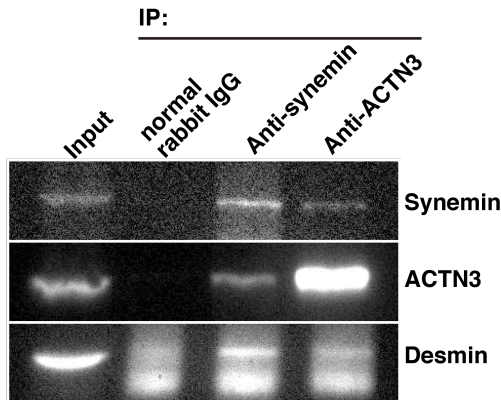


Fig.1 シネミン及び ACTN3 抗体による免疫沈降

さらにシネミンに GFP、ACTN3 に RFP を結合したプラスミドを作製して、筋芽細胞 C2C12 に共発現したところ、それぞれ細胞体にドット状の局在を示し、よく共局在をしていることが分かった。シネミンは中間径フィラメントファミリー蛋白であるが繊維状にならなかったのは、シネミン単体ではフィラメント構造をとれず、過剰発現された ACTN3 に結合したためだと考えられる。これらのことによりシネミンと ACTN3 は複合体を作り、筋線維の分化に関係していると考えられる。ACTN3 は欠損することで持久力が上がると考えられているが、まだ不明な点が多い。シネミンの研究によって骨格筋の線維構成についての知見が増え、スポーツ医学の発展に寄与することが期待される。

(2) 肝臓について

まず、肝臓の星細胞の筋線維芽細胞の分化能を調べるために四塩化炭素を投与し急性肝炎を起こさせて、関連タンパクの発現量変化を観察した。コントロールおよび投与後 1, 2, 3 日後の肝臓を摘出し、western blotting で定量したところ、シネミンノックアウトが野生型に比べ 3 日目において、筋線維芽細胞のマーカである α -smooth muscle actin (α -SMA) の発現量が顕著に減少していることが分かった。また、星細胞のマーカである GFAP もコントロールにおいて減少傾向がみられた。さらに細胞外マトリクスの主成分

であるコラーゲン I も 3 日目において減少傾向が見られた。このことにより肝臓の星細胞で何らかの異常があることが示唆された。次に線維化を見るためにコラーゲン I の局在を蛍光免疫染色で調べた。コラーゲン I は 0 日目に当たるコントロールではほとんど発現はなく差は見られなかったが、3 日目はシネミンノックアウトで野生型よりも産生量が減少していることが分かった。つぎにコラーゲン I の減少による肝臓の線維化の影響を調べるために四塩化炭素を用い慢性肝炎を起こし、マッソントリクローム染色で肝臓の線維化の状態を観察した。野生型では肝小葉に沿って青く染まり肝臓が線維化していることが確認出来たが、シネミンノックアウトでは少し青く染まっているものの野生型に比べ顕著に線維構造が減少していることが分かった (Fig.2)。

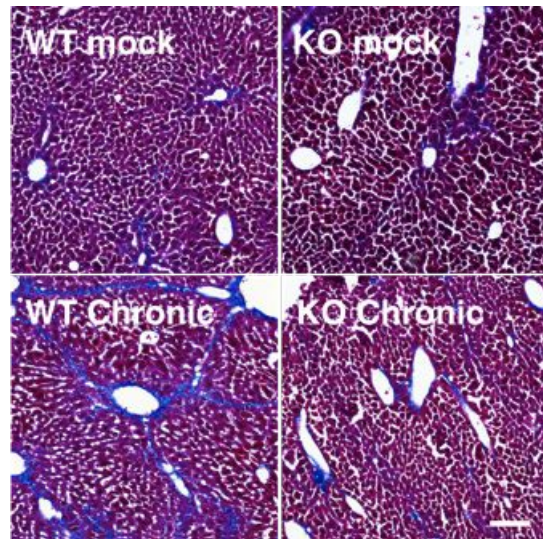


Fig.2 肝臓線維化におけるシネミン欠損の影響

これらのことよりシネミンの欠損が肝臓の線維化に影響を及ぼすことが分かった。星細胞は肝臓が損傷を受けると分化、増殖、細胞外マトリクスの産生を行う事からシネミンはそのいずれかに関与していることが示唆された (Fig.3)。肝臓の線維化は肝硬変さらには肝癌に発展することが多く、確立された治療法もまだ無い。シネミンの制御により肝臓の線維化の予防や治療に応用されるこ

とが期待される。

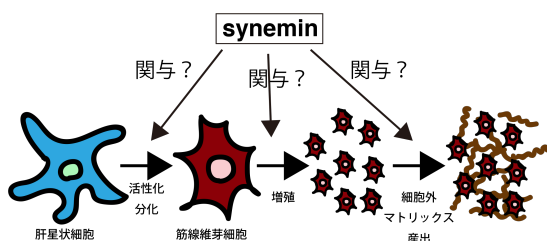


Fig.3 肝臓の星細胞におけるシネミンの役割

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

Astrid Feinisa Khairani, Yuki Tajika, Maiko Takahashi, Hitoshi Ueno, Tohru Murakami, Arifin Soenggono, & Hiroshi Yorifuji: Filamentous structures in skeletal muscle: anchors for the subsarcolemmal space. Medical Molecular Morphology, 査読有, vol.48, 2015, pp.1-12, DOI:10.1007/s00795-014-0070-3

Yuki Tajika, Maiko Takahashi, Hitoshi Ueno, Tohru Murakami & Hiroshi Yorifuji: Organization of organelles and VAMP-associated vesicular transport systems in differentiating skeletal muscle cells. Anat Sci Int, 査読有, vol. 90, 2015, pp.33-39, DOI:10.1007/s12565-014-0266-6

Kobayashi R, Iizuka H, Nishinome, M, Iizuka, Y, Yorifuji, H, & Takagishi, K: A cadaveric study of the cervical nerve roots and spinal segments. Europ Spine J., 査読有, vol.24, 2015, pp.2828-2831, DOI:10.1007/s00586-015-4070-3

Hosogai M, Shima N, Nakatani Y, Inoue T, Iso T, Yokoo H, Yorifuji H, Akiyama H, Kishi S & Isomura H: Analysis of human cytomegalovirus replication in primary cultured human corneal endothelial cells. British J Ophthalmology, 査読有, vol. 99, 2015, pp.1583-1590, DOI:10.1136/bjophthalmol-2014-306486

Tajika Y, Takahashi M, Khairani A F, Ueno H, Murakami T & Yorifuji H: Vesicular transport system in myotubes: ultrastructural study and signposting with vesicle-associated membrane proteins. Histochem Cell Biol, 査読有, vol.141, 2014, pp.441-454, DOI:10.1007/s00418-013-1164-z

Murakami T, Tajika Y, Ueno H, Awata S, Hirasawa S, Sugimoto M, Kominato Y, Tsushima Y, Endo K & Yorifuji H: An Integrated Teaching Method of Gross Anatomy and Computed Tomography Radiology. Anat Sci Educ, 査読有, vol.7, 2014, pp.438-454, DOI:10.1002/ase.1430

Kogure K, Kojima I, Kuwano H, Matsuzaki T, Yorifuji H, Takata K & Makuuchi M: Reconfirmation of the anatomy of the left triangular ligament and the appendix fibrosa hepatis in human livers, and its implication in abdominal surgery. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 査読有, vol.21, 2014, pp.856-863, DOI: 10.1002/jhbp.144

Iriuchishima T, Ryu K, Aizawa S, Yorifuji H, Ohyama T & Fu F H: Anterior cruciate ligament deterioration correlates with patella osteoarthritis. International Orthopaedics (SICOT), 査読有, vol.38, 2014, pp.741-746, DOI:10.1007/s00264-013-2141-9

Iriuchishima T, Ryu K, Yorifuji H, Aizawa S & FH Fu: Commonly used ACL autograft areas do not correlate with the size of the ACL footprint or the femoral condyle. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 査読有, vol.22, 2014, pp.1573-1579, DOI: 10.1007/s00167-013-2595-8

Iriuchishima T, Yorifuji H, Aizawa S, Tajika Y, Murakami T & Fu F H: Evaluation of ACL mid-substance cross-sectional area for reconstructed autograft selection. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 査読有, vol.22, 2014, pp. 207-213, DOI: 10.1007/s00167-012-2356-0

[学会発表] (計 7 件、他 6 件、総計 13 件)

上野仁之、多鹿友喜、村上徹、池澤麻衣子、依藤宏: 四塩化炭素による急性肝炎の誘発における中間径フィラメント synemin 欠損の影響. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2017.3.30 長崎大学坂本キャンパス (長崎)

多鹿友喜、村上徹、池澤麻衣子、上野仁之、依藤宏: 胎生期マウスの 2D および 3D 形態解析. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2017.3.30 長崎大学坂本キャンパス (長崎)

上野仁之、佐藤真人、池澤麻衣子、多鹿友喜、村上徹、依藤宏: 中間径フィラメント Synemin の欠損による骨格筋の変化. 第 121

回日本解剖学会総会・全国学術集会.
2016.3.30 ビッグパレットふくしま(福島県
郡山市)

村上徹、多鹿友喜、上野仁之、池澤麻衣
子、依藤宏: Visible Fish Danio rerio. 第 121
回日本解剖学会総会・全国学術集会.
2016.3.30 ビッグパレットふくしま(福島県
郡山市)

Tajika Y, Murakami T, Takahashi M,
Ueno H, Yorifuji H: Serial block-face
imaging system for both 3D morphology
and section histology. 2015 American
Society for Cell Biology Annual Meeting.
2015.12.15 San Diego (USA)

Ueno H, Sato M, Takahashi M, Tajika Y,
Murakami T, & Yorifuji H: Molecular
genetics of type IV intermediate filament,
synemin. The 120th Annual Meeting of the
Japanese Association of Anatomists and
the 92nd Annual Meeting of the
Physiological Society of Japan 2015
2015.3.22 Kobe International Conference
Center and Exhibition Hall (Kobe)

Takahashi M, Tajika Y, Ueno H,
Murakami T, Yorifuji H: The expression
and localization of VAMP5 protein in the
kidney. The 120th Annual Meeting of the
Japanese Association of Anatomists and
the 92nd Annual Meeting of the
Physiological Society of Japan 2015
2015.3.22 Kobe International Conference
Center and Exhibition Hall (Kobe)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

依藤 宏 (YORIFUJI, Hiroshi)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 00158544

(2) 研究分担者

上野 仁之 (UENO, Hitoshi)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 30586251

多鹿 友喜 (TAJIKI Yuki)
群馬大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 90400738

村上 徹 (MURAKAMI Tohru)
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 10239494