九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

線維化を促進する転写共役因子の機能解析

堀井, 雄真

https://hdl.handle.net/2324/4784546

出版情報：Kyushu University, 2021, 博士（創薬科学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

KYUSHU UNIVERSITY

（様式９－３）

氏　　名	堀井　雄真
論　文　名	線維化を促進する転写共役因子の機能解析
論文調査委員	主　査　九州大学　　准教授　仲矢　道雄 副　査　九州大学　　教授　　田中　嘉孝 副　査　九州大学　　教授　　津田　誠 副　査　九州大学　　教授　　小柳　悟

論文審査の結果の要旨

令和 4 年 2 月 2 日（水）に主査および副査の計 4 名で堀井雄真氏の論文審査を行った。本論文では、線維化を促進する転写共役因子の機能解析に関する研究を行った。

線維化とは、組織にコラーゲンなどの細胞外マトリックス蛋白質が過剰に産生され、蓄積した状態であり、これら細胞外マトリックス蛋白質は筋線維芽細胞という細胞群によって産生される。筋線維芽細胞は、炎症や老化などによって主として組織に常在する線維芽細胞が分化することにより生じる。コラーゲンなどの細胞外マトリックス蛋白質は、弾性力の強い線維であるため、線維化した組織は硬化する。そしてこの組織の硬化は、筋線維芽細胞に対して機械的な刺激を与え、筋線維芽細胞の分化状態の維持に寄与する。そのため、組織の硬化は筋線維芽細胞による細胞外マトリックスの産生を促進し、更なる線維化を誘導する。我々は、線維化を促進する新規分子を探索し、転写共役因子として知られてきた Vestigial like family member 3 (VGLL3)が線維化を促進する可能性を見出した。本研究では、VGLL3 の線維化における機能を解明することを目的に研究を行なった。

初めに、心筋梗塞処置後の線維化したマウス心臓における VGLL3 の発現細胞を検討した。その結果、VGLL3 は線維化マウス心臓において筋線維芽細胞に強く発現しており、その他の血球系細胞や心筋細胞等には発現しないことを見出した。次に、実際に VGLL3 が線維化関連因子の発現を促進する分子であるかを検討した。線維化マウス心臓から筋線維芽細胞を単離し、VGLL3 のノックダウンを行い、線維化関連因子の発現を測定した結果、コラーゲンなどの線維化関連因子の発現が有意に抑制された。以上の結果から、VGLL3 は線維化したマウス心臓の筋線維芽細胞において線維化関連因子の産生を促進する分子であることが明らかになった。

細胞はインテグリンなどの受容体を介してコラーゲン繊維等による細胞外の硬さ（機械的刺激）を感知し、細胞内にシグナルを伝え、細胞骨格の形成および線維化因子の産生を促進する。これまで、VGLL3 と同じく、転写共役因子として知られた YAP や MRTF-A は機械的刺激によって核移行することが知られている。このことから、VGLL3 も機械的刺激を感知して核移行するのではないかと考えた。そこで、筋線維芽細胞を正常な組織の硬さを模した柔らかい（1kPa）プレート、あるいは線維化した組織の硬さを模した硬い（50kPa）プレートで培養し、VGLL3 の細胞内局在を検討した。その結果、VGLL3 は硬いプレートで培養すると核に局在する一方、柔らかいプレートで培養すると細胞質に局在した。従って、VGLL3 は機械的刺激によって核移行することが明らかになった。

次に、線維化を促進する VGLL3 の下流分子を同定するため、質量分析計を用いて VGLL3 と相互作用する分子を網羅的に探索した。その結果、VGLL3 は意外にも多くの RNA 結合蛋白質と相互作用することが明らかとなった。そして、これら RNA 結合蛋白質の中には、液-液相分離によって形成される核内非膜オルガネラの一つであるパラスペックルの構成分子が多く含まれていた。そこで、

パラスペックルのマーカー分子として知られる RNA 結合蛋白質、NONO と VGLL3 との共染色を行ったところ、VGLL3 と NONO の局在がほぼ完全に一致した。すなわち、VGLL3 は核内でパラスペックルに取り込まれる分子であることが明らかになった。また、興味深いことに VGLL3 のアミノ酸配列を精査すると、特定の 3 次元構造を持たない天然変性領域が存在していた。そこで、この天然変性領域に変異を入れたところ、VGLL3 の液-液相分離が認められなくなった。すなわち、この天然変性領域が VGLL3 の液-液相分離、およびパラスペックルの局在に重要な領域であることが明らかとなった。さらに、パラスペックルにて VGLL3 と同じく線維化を促進する分子を、質量分析によって同定した VGLL3 と相互作用する RNA 結合蛋白質の中で探索した結果、線維化因子の産生を促進する EWSR1 を見出した。さらに VGLL3 と EWSR1 は、コラーゲン mRNA を分解する miR-29b の産生を抑制することで、コラーゲンの発現を促進することが明らかとなった。

最後に、VGLL3 の生体における線維化への寄与を明らかにするために VGLL3 ノックアウト(KO)マウスを用いた検討を行なった。その結果、VGLL3 KO マウスにおいては野生型マウスの場合と比較して、心筋梗塞後の心臓の線維化、および心機能低下が有意に抑制された。また、この結果と一致して VGLL3 KO マウスの心筋梗塞後の心臓においては、miR-29b の発現が増加していた。以上の結果から、VGLL3 は心臓において miR-29b の産生を抑制することで、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と考えられた。さらに、VGLL3 の筋線維芽細胞特異的発現は、マウスのみならず、心筋梗塞を発症した患者の心臓においても認められた。また、心臓だけでなく、肝臓の線維化病態時においても VGLL3 の発現は有意に増加することを見出した。

本研究により、VGLL3 は機械的刺激を感知して核移行し、パラスペックルにて EWSR1 と相互作用し、miR-29b の産生を抑制することでコラーゲンの発現を促進することを初めて明らかにした。コラーゲン線維は、機械的刺激を生成することで、筋線維芽細胞によるコラーゲン産生を促進し、線維化のポジティブフィードバックループを形成している。本研究成果は、機械的刺激による線維化の増悪に VGLL3 が関与していることを示した新しい知見である。

これらのことから、申請者は博士（創薬科学）の学位を取得するにふさわしいと判断した。