

組織線維化を促進する膜タンパク質、代謝関連分子の機能解明

瀧澤, 宣郎

<https://hdl.handle.net/2324/7363736>

出版情報 : Kyushu University, 2024, 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)



1章 組織線維化を促進する膜タンパク質の機能解明

【序論】

線維化とは、炎症などを起点として、組織に過剰なコラーゲンが蓄積した状態である。線維化した組織は、可塑性を失うことで、最終的には機能不全に陥る。例えば、心筋梗塞（Myocardial Infarction: MI）後に線維化が進行すると心臓は心不全へと、特発性肺線維症により線維化した肺は重篤な呼吸器障害へと、代謝異常関連脂肪肝炎（Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis: MASH）により線維化した肝臓は、肝硬変や肝がんになる。そのため、線維化は先進国の全死亡原因の約 45%を占めている。しかしながら、この線維化に対する決定的な治療薬はほぼ存在しない。

線維化を実行する細胞は、通常の組織に存在せず、線維化した組織にのみ出現し、過剰なコラーゲンを産生する筋線維芽細胞である。筋線維芽細胞は炎症時にマクロファージなどから分泌される TGF- β などの刺激を受けた様々な細胞（主に常在性の線維芽細胞）が分化することで生じる。

今回、線維化した心臓において発現が大きく増加する膜タンパク質として、オーファン G タンパク質共役型受容体 GPRC5B を同定した。本章では、GPRC5B の線維化における機能解明を目的とした。

【方法】

心筋梗塞（Myocardial Infarction: MI）モデルマウスの作製

8-10 週齢の雄性マウスを人工呼吸下で開胸し、心臓の左冠動脈前下行枝を結紮することで心臓の線維化を誘導した。

ブレオマイシン（bleomycin: BLM）誘導性肺線維症モデルマウスの作製

6-8 週齢の雌性マウスの気管支から、BLM を肺に直接、単回投与することで肺の線維化を誘導した。

代謝機能障害関連脂肪肝炎（MASH）モデルマウスの作製

6-8 週齢の雄性マウスにコリン欠乏メチオニン減量高脂肪食(CDAHFD)を給餌することで肝臓の線維化を誘導した。

筋線維芽細胞の単離

線維化を誘導した組織をコラゲナーゼで処理し、筋線維芽細胞を含む細胞を単離した。その後、赤血球を除去し、プラスチックプレートで一晩培養した。接着した細胞は、Accutase を用いて剥がし、抗 CD45 Microbeads で 20 分間反応させた後、LS カラムを使用して磁気細胞分離を行った。そして、CD45 陰性の細胞群を筋線維芽細胞として実験に使用した。

【結果】

1. GPRC5B は心臓、肺、肝臓の線維化時に発現増加する

まず、GPRC5B が線維化に関与するか調べるために、MI 後 3 日目の心臓、BLM 処置後 7 日目の肺、CDAHFD を 10 週間給餌したマウスの肝臓における *Gprc5b* の発現を調べた。その結果、線維化した心臓、肺、肝臓全ての臓器で *Gprc5b* の発現が増加した（図 1）。このことから、GPRC5B が線維化に関与する可能性が考えられた。

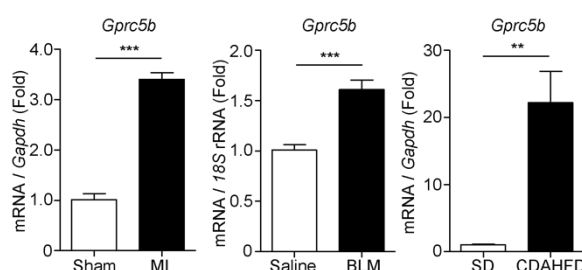


図 1. *Gprc5b* は心臓、肺、肝臓の線維化病態時に発現増加する

2. *Gprc5b* は線維化した心臓で筋線維芽細胞に発現する

次に、線維化した心臓における *Gprc5b* の発現細胞を調べた。MI 後 7 日目の心臓切片を用いた *in situ* hybridization 法により、*Gprc5b* の mRNA を検出した。その結果、*Gprc5b* のシグナルは血球系細胞のマーカーである CD45 のシグナルとは全くマージせず、筋線維芽細胞のマーカーである α -SMA のシグナルと強くマージしていた (図 2)。このことから、*Gprc5b* は線維化した心臓で筋線維芽細胞に発現することが明らかとなった。

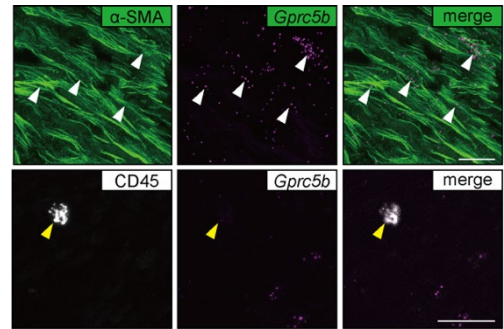


図 2. *Gprc5b* は線維化した心臓で筋線維芽細胞に発現する

3. *Gprc5b* は心臓の筋線維芽細胞でコラーゲン産生を促進する

最後に、筋線維芽細胞において GPRC5B がコラーゲン発現に与える影響を調べた。線維化した心臓から単離した筋線維芽細胞において *Gprc5b* をノックダウンし、コラーゲンの発現量を測定した。その結果、*Gprc5b* をノックダウンすることで、*Col1a1*、*Col1a2*、*Col3a1* の発現が有意に減少した (図 3)。このことから、心臓の筋線維芽細胞において *Gprc5b* がコラーゲン発現を促進することが明らかとなった。

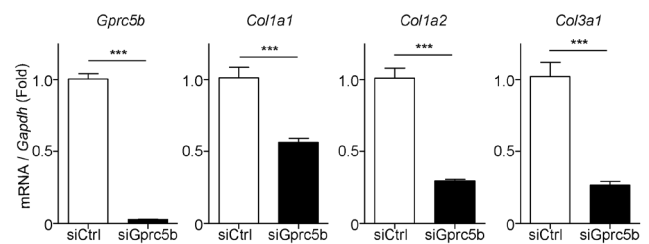


図 3. *Gprc5b* は心臓の筋線維芽細胞のコラーゲン発現を促進する

【まとめ】

本研究において、心臓、肺、肝臓において線維化病態時に発現する膜タンパク質として GPRC5B を同定した。さらに、心臓において GPRC5B が筋線維芽細胞に発現し、コラーゲンの発現を促進していることが明らかとなった。また、肺でも GPRC5B は筋線維芽細胞に発現し、コラーゲン発現を促進していた。

2章 組織線維化を促進する代謝関連分子の機能解明

【序論】

線維化を担う筋線維芽細胞は、その分化に伴って過剰にコラーゲン産生能を獲得するだけでなく、増殖能も上昇する。筋線維芽細胞がこのような特徴を獲得するためには、コラーゲン合成や細胞増殖に必要なエネルギーや構成成分が分化に伴って増加する必要がある。一方で我々は、筋線維芽細胞への物理的刺激の有無によって筋線維芽細胞の分化、脱分化状態を自在に制御する手法を見出している。そこで本研究では、この手法を用いること等により、分化に伴って筋線維芽細胞で発現量が増加する代謝関連分子を探索した。その結果、そのような分子として分岐鎖アミノ酸転移酵素 BCAT1 を同定した。

【結果】

1. *Bcat1* は線維化した心臓で筋線維芽細胞に特異的に発現する

私は、線維化した心臓における *Bcat1* の発現細胞を同定するために、Sham あるいは MI 後 3、7 日目の心臓の間質細胞の scRNA-Seq 公共データ (EMTAB-7376) を解析した。その結果、線維化した心臓で *Bcat1* は筋線維芽細胞に特異的に発現することが明らかになった (図 4)。

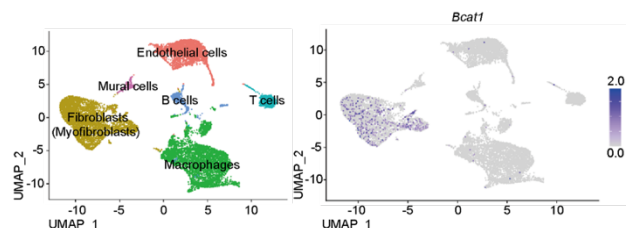


図 4. 線維化した心臓で *Bcat1* は筋線維芽細胞に特異的に発現する

2. BCAT1 はプロリン合成、翻訳酵素の発現を介してコラーゲンのタンパク質発現を促進する

次に、筋線維芽細胞における BCAT1 の機能を調べるために、①MI 後 3、7 日目の(筋)線維芽細胞を用いた scRNA-seq 解析および、②筋線維芽細胞において BCAT1 を KD した時の RNA-seq 解析を行った。その結果、BCAT1 が「プロリン合成酵素 ALDH18A1、PYCR1」、「プロリン翻訳酵素 EPRS」(右図)の発現を促進することを見出した。実際、筋線維芽細胞で *Bcat1* を KD すると、ALDH18A1、PYCR1、EPRS のタンパク質発現は減少した(図 5A)。筋線維芽細胞において、これら分子を KD すると、コラーゲンのアミノ酸配列にプロリンが約 20%と豊富に含まれるため、コラーゲンのタンパク質発現は顕著に減少した(データ未記載)。この結果に対応し、これら

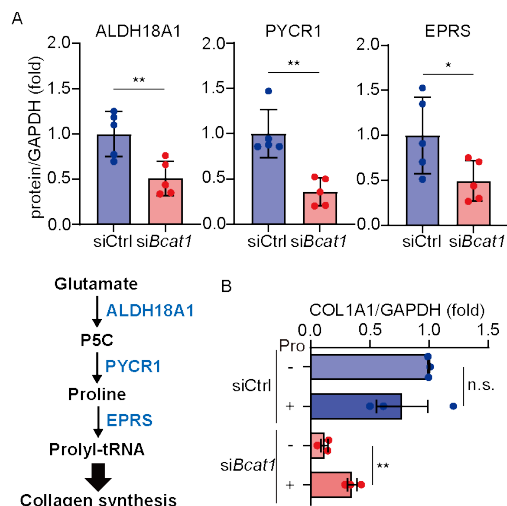


図 5. BCAT1 はプロリン合成、翻訳酵素の発現を介してコラーゲンタンパク質発現を促進する

プロリン合成、翻訳酵素の上流分子として同定した BCAT1 を筋線維芽細胞においてノックダウンした結果、COL1A1 のタンパク質発現が減少した。興味深いことに、その発現減少は培地へのプロリン添加によって回復した(図 5B)。これらの結果から、心臓の筋線維芽細胞において BCAT1 はプロリン合成、翻訳酵素の発現を介してコラーゲンのタンパク質発現を促進することが明らかとなった。

3. BCAT1 は SMAD3 のリン酸化を介してプロリン合成、翻訳酵素の発現を促進する

BCAT1 がプロリン合成、翻訳酵素の発現を誘導するメカニズムを調べるために、筋線維芽細胞の分化に重要な TGF- β /SMAD シグナルに着目した。心臓の筋線維芽細胞において *Bcat1* をノックダウンしたところ、TGF- β /SMAD シグナルに重要な SMAD3 のリン酸化が抑制されていた(図 6A)。さらに、心臓の筋線維芽細胞に SMAD3 のリン酸化阻害剤である SIS3 を処置したところ、プロリン合成、翻訳酵素の発現が減少し、その減少は *Bcat1* をノックダウンすると減弱された(図 6B)。これらの結果から、心臓の筋線維芽細胞において BCAT1 は SMAD3 をリン酸化することで、プロリン合成、翻訳酵素の転写を活性化することが明らかとなった。

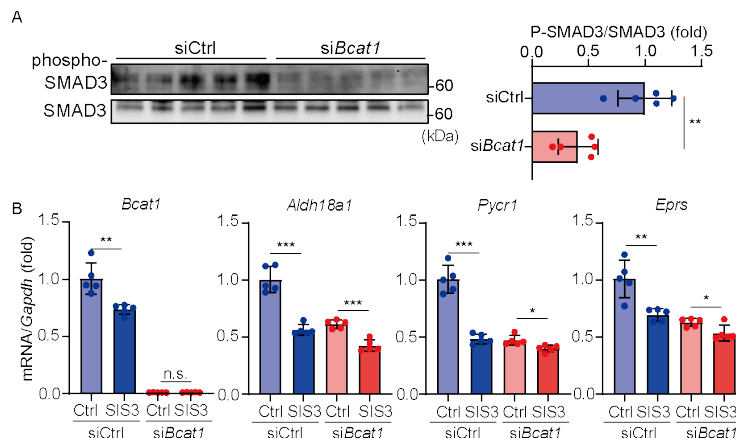


図 6. BCAT1 は SMAD3 のリン酸化を介してプロリン合成、翻訳酵素の発現を促進する

4. BCAT1 は HDAC5 のリン酸化を介して SMAD3 のリン酸化を促進する

次に、BCAT1 が SMAD3 のリン酸化を促進するメカニズムを調べるために、筋線維芽細胞で *Bcat1* をノックダウンしてリン酸化プロテオミクス解析を行い、リン酸化量が減少しているタンパク質を網羅的に探索した。その結果、

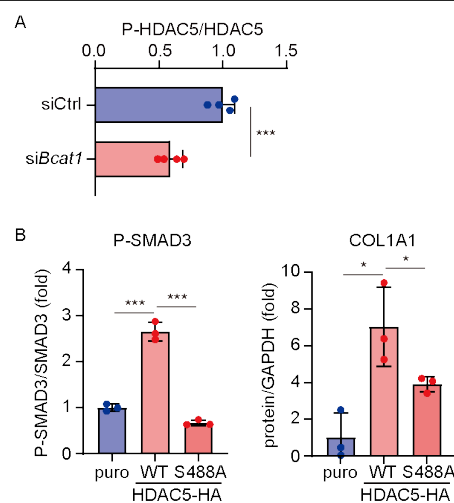


図 7. BCAT1 は HDAC5 の S488 のリン酸化を介して SMAD3 のリン酸化を促進する

SMAD3 のリン酸化を促進するとの報告があるタンパク質として HDAC5 を見出した。実際に、心臓の筋線維芽細胞において *Bcat1* をノックダウンするとリン酸化プロテオミクス解析により検出された HDAC5 の S488 のリン酸化量が有意に減少した (図 7A)。さらに、心臓の筋線維芽細胞において HDAC5 を過剰発現すると SMAD3 のリン酸化およびコラーゲンのタンパク質発現は増加したが、HDAC5 の S488A 変異体を過剰発現させるとその増加の程度は有意に減弱した (図 7B)。これらの結果から、心臓の筋線維芽細胞において BCAT1 は HDAC5 の S488 をリン酸化することで SMAD3 のリン酸化を促進していることが明らかとなった。

5. *Bcat1* KO マウスで心臓のコラーゲンの蓄積、心機能が改善する

マウス個体レベルでの BCAT1 の機能を調べるため、*Bcat1*-KO マウスを作製し、MI 処置を行った。その結果、*Bcat1*-KO マウス心臓の梗塞部位におけるプロリン合成、翻訳酵素、COL1A1 のタンパク質発現、SMAD3、HDAC5 のリン酸化量が有意に減少していた (図 8)。この結果に対応し、MI 後 28 日目の KO マウスの心臓において線維化の減弱および心機能の有意な改善が認められた。

6. BCAT1 の酵素活性阻害剤により心臓のコラーゲンの蓄積、心機能が改善する

最後に、BCAT1 の酵素活性阻害剤、ERG240 が心臓の線維化に与える影響を調べた。MI 後翌日から 10 日間 ERG240 をマウス腹腔に投与したところ、MI 後の心臓におけるコラーゲンの蓄積量は減少し (図 9A)、心機能が有意に改善した (図 9B)。

【まとめ】

本研究において、BCAT1 が線維化した心臓の筋線維芽細胞に特異的に発現し、HDAC5 のリン酸化を介して SMAD3 のリン酸化を促進することを初めて明らかにした。リン酸化された SMAD3 は、プロリン合成酵素である ALDH18A1、PYCR1、プロリン翻訳酵素である EPRS の転写を活性化することで、プロリンを豊富に含むコラーゲンタンパク質の発現を促進し、心臓の線維化、心機能を悪化させた。さらに、BCAT1 の酵素活性阻害剤の投与により、MI 後の心臓の線維化、心機能が改善することも明らかにした。本研究成果は、筋線維芽細胞の代謝に関与する遺伝子 BCAT1 が線維化の増悪に関与することを見出した新しい知見である。

【主な発表論文】

1. Takizawa N, et al., *Biochem Biophys Res Commun.* (2021) 561:180-186.
2. Hironaka T, Takizawa N, et al., *J Biol Chem.* (2023) 299(3): 102934
3. Horii Y, ..., Takizawa N, et al., *Nat Commun.* (2023) 14(1): 550

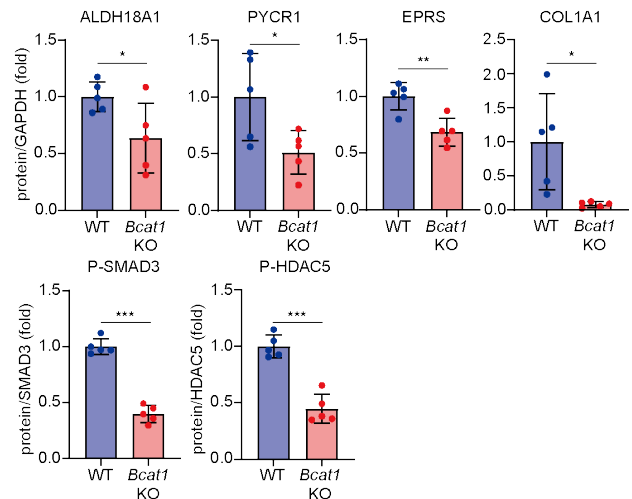


図 8. 心筋梗塞後の心臓の線維化領域でも、*Bcat1*-KO により下流遺伝子の発現が減少する

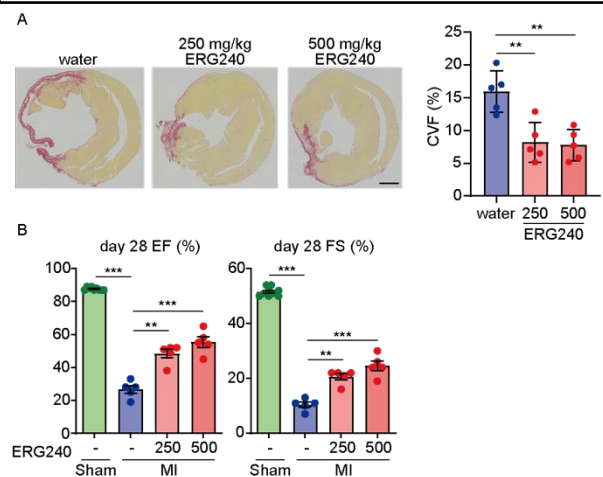


図 9. BCAT1 の阻害剤により心筋梗塞後の心臓の線維化、心機能が改善する