

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592111

研究課題名（和文）臓器線維化における細胞骨格タンパク質の役割解明とその応用

研究課題名（英文）Roles of cytoskeletal proteins in organic fibrosis and their application of therapy in fibrotic diseases

研究代表者

吉田 浩二（YOSHIDA KOJI）

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：60230736

研究成果の概要（和文）：transgelin をノックダウンした筋線維芽細胞は活性化が抑制された。また、TGF- $\beta$  でヒト肺線維芽細胞を刺激したとき、インテグリン  $\alpha 11$  (ITGA11) の発現が著明に亢進した。calcium and integrin binding protein 1 (CIB1) は ITGA11 の細胞内ドメインと結合した。TGF- $\beta$  処理した肺線維芽細胞およびブレオマイシンにより肺線維症を起こしたマウスの肺組織において CIB1 の発現が増加する傾向が見られたことから、CIB1 が線維化に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Activation of myofibroblasts was inhibited when the expression of transgelin was knocked down. When human lung fibroblasts were stimulated by TGF- $\beta$ , the integrin  $\alpha 11$  (ITGA11) expression was markedly increased. Calcium and integrin binding protein 1 (CIB1) bound to the intracellular domain of ITGA11. The expression of CIB1 increased in human lung fibroblasts treated with TGF- $\beta$  and in bleomycin-treated mice pulmonary tissues. These results suggest that CIB1 may be involved in the fibrosis.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：線維化、線維芽細胞、transgelin、integrin  $\alpha 11$ 、CIB1

## 1. 研究開始当初の背景

さまざまな刺激により線維芽細胞が活性化されて筋線維芽細胞となり、細胞外マトリックス成分を活発に合成・分泌するようになり、組織の線維化が進展し臓器レベルでの線維症が発症する。我々は活性化した筋線維芽細胞において、transgelin (Tag1n) の発現が亢進することを見出していた。Tag1n は SM22 $\alpha$  と呼ばれ、平滑筋細胞に特異的かつ高濃度

に存在する分子量 22,000 のアクチン結合タンパク質である。Tag1n は各種脊椎動物（ヒト、ラット、マウス、ウシ）の主に平滑筋細胞に広く分布し、細胞内に豊富に存在するタンパク質のひとつであり、アクチンと結合することが明らかにされている。進化学的に高度に保存されていることや細胞内に比較的豊富に存在することから、生体における Tag1n の重要性が示唆されるにもかかわらず、

その機能についてはよくわかっていない。我々は以前にヒト肺線維芽細胞 MRC-5 を TGF- $\beta$  で刺激すると  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) や Tagln の発現が亢進することを見出した。Tagln と SMA はともに筋線維芽細胞のマーカーであるが、Tagln が細胞形態や SMA の発現にどのような影響をもつかは知られていない。

また、インテグリンを介する細胞外マトリックスと細胞骨格の相互作用が筋線維芽細胞の分化を促進するという報告もある。インテグリン  $\alpha$  11 (ITGA11) は線維芽細胞上のコラーゲンレセプターであり、線維化に関わっていると推測されるが、その機能については不明な点が多い。TGF- $\beta$  処理による ITGA11 の挙動や ITGA11 の細胞内ドメインと相互作用するタンパク質の存在などについてもよくわかっていない。

## 2. 研究の目的

創傷治癒や臓器線維化における細胞骨格タンパク質の役割を解明し、細胞骨格タンパク質である Tagln やアクチンを標的とした線維症治療への応用を図る。そのための基礎的知見を得るために、培養細胞を用いて細胞骨格タンパク質を強制発現あるいはノックダウンした場合の効果解析する。また、細胞骨格タンパク質や ITGA11 の細胞内ドメインと相互作用するタンパク質を同定し、それらタンパク質の創傷治癒や臓器線維化における役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) Tagln 遺伝子のノックダウン

Tagln mRNA を標的とした shRNA プラスミドベクターを MRC-5 細胞にトランスフェクションして 48 時間後から細胞を TGF- $\beta$  (1 ng/ml) を含む培地に交換した。細胞形態は経時的に観察し、TGF- $\beta$  刺激開始 48 時間後に細胞を回収し、western blot 法で種々のタンパク質の発現を解析した。

### (2) TGF- $\beta$ 処理による ITGA11 の変動

MRC-5 細胞を血清非存在下で 24 時間培養後、培地内の TGF- $\beta$  濃度を変化させ、48 時間後に cell lysate を回収し、抗 ITGA11 抗体で Western blot 解析を行った。

### (3) ITGA11 と相互作用するタンパク質の探索

ITGA11 の細胞内ドメインを bait として、ヒト肺線維芽細胞 cDNA library に対して酵母 two-hybrid 法によるスクリーニングを行い、ITGA11 と相互作用するタンパク質を明らかにし、そのタンパク質の線維化に及ぼす影響を解析した。

また、そのタンパク質と様々な integrin  $\alpha$  との相互作用についても検討した。

## 4. 研究成果

### (1) Tagln 遺伝子ノックダウンが肺線維芽細胞 MRC-5 に及ぼす効果

Tagln shRNA プラスミドベクターをトランスフェクションした細胞では形態に顕著な変化が見られた (図 1)。

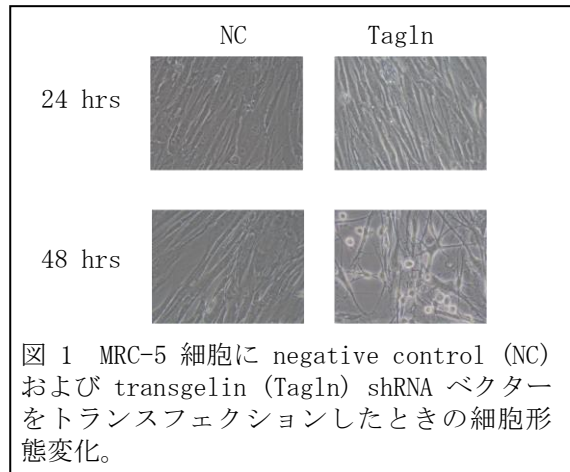


図 1 MRC-5 細胞に negative control (NC) および transgelin (Tagln) shRNA ベクターをトランスフェクションしたときの細胞形態変化。

また、Tagln ノックダウン処理した細胞を TGF- $\beta$  刺激した場合は、SMA、fibronectin の誘導発現が減少した。filamin の発現には Tagln ノックダウン処理はほとんど影響しなかった (図 2)。これらの結果から Tagln は筋線維芽細胞の活性化に関与することが示唆された。

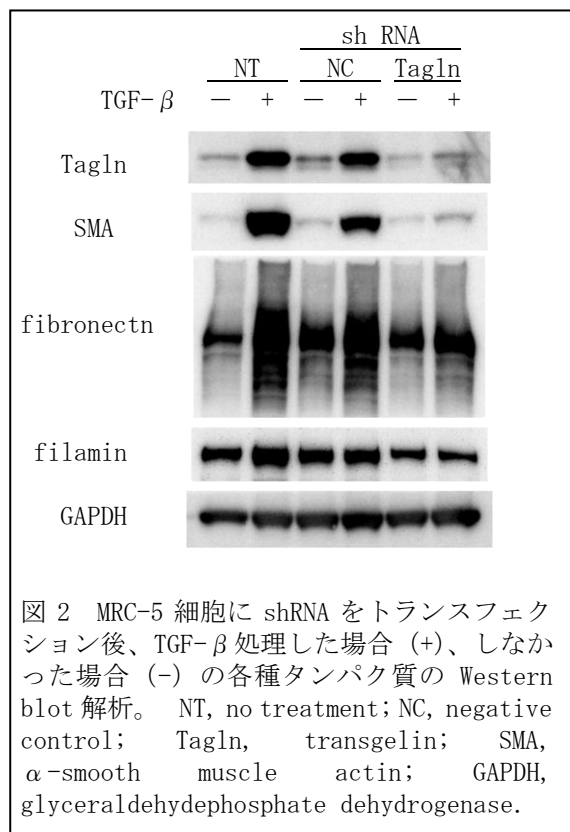


図 2 MRC-5 細胞に shRNA をトランスフェクション後、TGF- $\beta$  処理した場合 (+)、しなかった場合 (-) の各種タンパク質の Western blot 解析。NT, no treatment; NC, negative control; Tagln, transgelin; SMA,  $\alpha$ -smooth muscle actin; GAPDH, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase.

(2) TGF- $\beta$  処理による ITGA11 の挙動  
MRC-5細胞を TGF- $\beta$  処理すると濃度依存的に ITGA11 の発現が亢進した (図 3)。

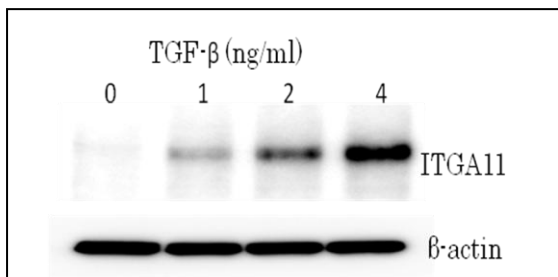


図 3 TGF- $\beta$  処理した MRC-5 細胞における ITGA11 の Western blot 解析。

(3) ITGA11 と相互作用するタンパク質の探索  
ITGA11 の細胞内ドメインを bait として、ヒト肺線維芽細胞 cDNA library に対して酵母 two-hybrid 法を行ったところ、calcium and integrin binding protein 1 (CIB1) が prey タンパク質のひとつとして同定された (図 4)。

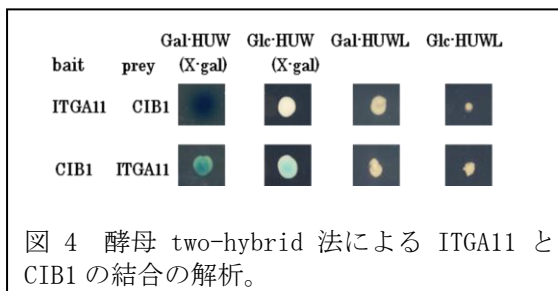


図 4 酵母 two-hybrid 法による ITGA11 と CIB1 の結合の解析。

さらに、ITGA11 との結合に必要な CIB1 の領域を決定した。CIB1 の C 末側で 2 か所の EF-hand motif を含む部分が必須であることがわかった (図 5)。

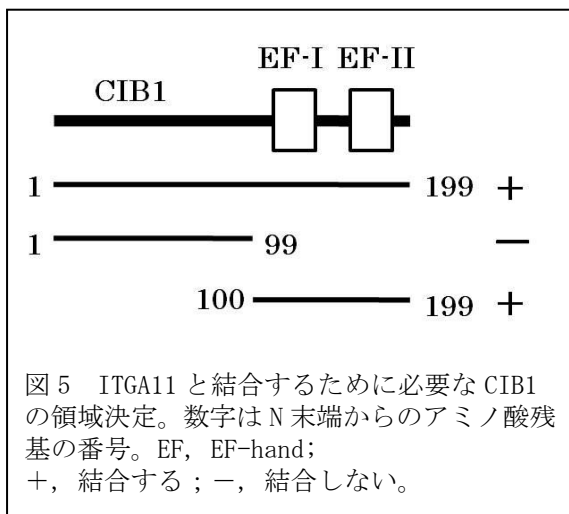


図 5 ITGA11 と結合するために必要な CIB1 の領域決定。数字は N 末端からのアミノ酸残基の番号。EF, EF-hand; +, 結合する; -, 結合しない。

次に ITGA11 と CIB1 をそれぞれ培養細胞内で発現させて免疫沈降法を行い、ITGA11 と CIB1 は全長タンパク質同士でも結合することが確認された (図 6)。

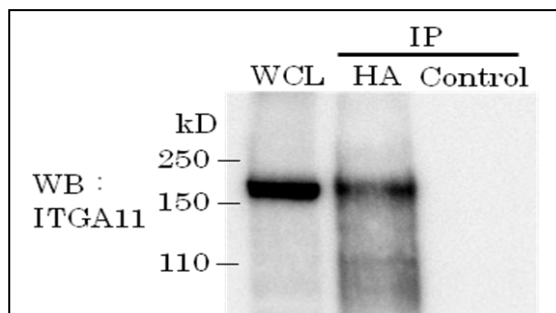


図 6 ITGA11 と CIB1 の免疫沈降実験。HA-tag を付加した CIB1 と Flag-tag を付加した ITGA11 を COS-7 細胞で強発現させた。Normal rabbit IgG を negative control として用いた。IP, immunoprecipitation;

WB, Western blotting.

また、CIB1 は integrin  $\alpha$  IIb と結合することが報告されているので、種々の integrin  $\alpha$  と CIB1 の結合について酵母 two-hybrid 法を用いて検討したところ、CIB1 は ITGAIIb、ITGA11 のみならず、ITGA1 とも結合することが判明した。(表 1)。

integrin (bait)	interaction
$\alpha$ IIb	+
$\alpha$ 11	+
$\alpha$ 10	-
$\alpha$ 1	+
$\alpha$ 2	-
$\alpha$ 5	-

表 1 CIB1 と integrin  $\alpha$  の相互作用

#### (4) 線維化と CIB1 の関係

TGF- $\beta$  処理した肺線維芽細胞およびブレオマイシンにより肺線維症を起こしたマウスの肺組織での CIB1 の発現をウエスタンブロット (図 7) および免疫組織染色により検討したところ、いずれにおいても CIB1 の発現が増加する傾向が見られたことから、CIB1 が線維化に関与している可能性が示唆された。

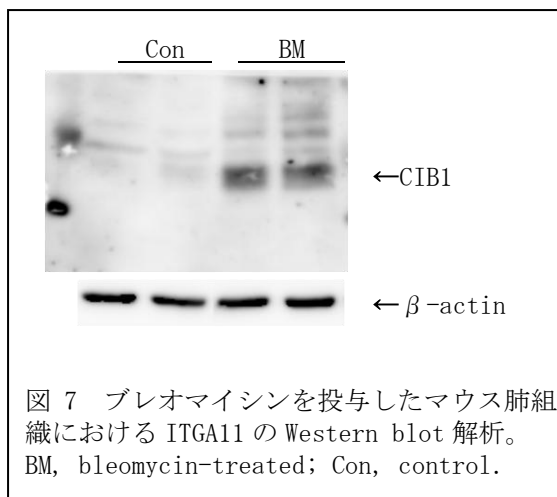


図 7 ブレオマイシンを投与したマウス肺組織における ITGA11 の Western blot 解析。BM, bleomycin-treated; Con, control.

#### 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 2 件)

- ① Sugioka K, Yoshida K, Kodama A, Mishima H, Abe K, Munakata H, Shimomura Y. Connective Tissue Growth Factor Cooperates with Fibronectin in Enhancing Attachment and Migration of Corneal Epithelial Cells, *Tohoku J Exp Med.* 査読有, 222, 45-50, 2010.
- ② Honda E, Yoshida K, Munakata H. Transforming growth factor- $\beta$  upregulates the expression of integrin and related proteins in MRC-5 human myofibroblasts, *Tohoku J Exp Med.* 査読有, 220, 319-327, 2010.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 吉田浩二. インテグリン  $\alpha 11$  と calcium and integrin binding protein 1 の相互作用. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会, 2010 年 12 月 10 日, 神戸市.
- ② 杉岡孝二. 角膜上皮細胞の伸長、接着に対する connective tissue growth factor と fibronectin の相互作用. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会, 2010 年 12 月 7 日, 神戸市.
- ③ 朴 雅美. 肺線維化における heat shock protein 27 の役割. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会, 2010 年 12 月 7 日, 神戸市.

- ④ 本田映子. TGF- $\beta$  による筋線維芽細胞 (MRC-5) の活性化に伴う発現変化. 第 31 回日本分子生物学会合同年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 2008 年 12 月 12 日, 神戸市.

- ⑤ 吉田浩二. transgelin ノックダウンが肺線維芽細胞 MRC-5 に及ぼす効果. 第 31 回日本分子生物学会合同年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 2008 年 12 月 10 日, 神戸市.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

吉田 浩二 (YOSHIDA KOJI)  
近畿大学・医学部・准教授  
研究者番号: 60230736

##### (2) 研究分担者

斉藤 昭夫 (SAITO AKIO)  
近畿大学・医学部・講師  
研究者番号: 40153788

萩原 智 (HAGIHARA SATORU)  
近畿大学・医学部・講師  
研究者番号: 40460852

##### (3) 連携研究者

なし