

機械的刺激による筋線維芽細胞の性質変化

末次 春菜, 吉岡 啓佑, 仲矢 道雄

1. はじめに

線維化とは、組織においてコラーゲン等の細胞外マトリックス (ECM) タンパク質が過剰に沈着した状態である¹⁾。組織の損傷時においては、線維化は損傷部位を速やかに補填できるという点から人体にとって有益である。一方で、慢性的な炎症や老化時の過剰な線維化は組織の機能不全を引き起こす¹⁾。実際、線維化は先進国の全死亡原因の約45%に関与すると報告されている¹⁾。しかしながら、線維化に対する決定的な治療薬は存在せず、新たな治療法の創出が求められている。

線維化は、筋線維芽細胞という細胞群が組織において過剰にECMタンパク質を産生することによって誘導される。この筋線維芽細胞は、正常な組織には存在せず、主として組織に常在する線維芽細胞が炎症等を契機に分化することによって生じる²⁾。この筋線維芽細胞への分化のトリガーとなるのは、炎症部位に集積するマクロファージなどの免疫細胞から分泌されるtransforming growth factor β (TGF β)等の液性因子である²⁾。これらTGF β 等の液性因子の刺激により分化した筋線維芽細胞はコラーゲンを過剰に産生し、その結果、コラーゲンの蓄積により組織は硬くなる。実際に、ラット心臓の正常時の硬さはおおよそ10kPaであるが、線維化するとその硬さはおおよそ50kPaになることが報告されている³⁾。

筋線維芽細胞は、周囲の硬い組織による機械的刺激を、インテグリン等の受容体を介して認識する⁴⁾。筋線維芽細胞が硬さを認識すると、その下流でRho/Rho-associated protein kinase (Rho/ROCK) シグナルが活性化し、GアクチンからFアクチンへの重合が促進される。アクチン重合

はコラーゲン等のECMタンパク質の発現を促進することが報告されている。このように、ECMタンパク質の蓄積による組織の硬化は、筋線維芽細胞によるECMタンパク質産生をさらに促進し、硬さを介したポジティブフィードバックループを形成すると考えられる⁴⁾ (図1)。しかしながら、このポジティブフィードバックループの分子メカニズムの詳細は明らかになっていない。そこで本稿では、機械的刺激による筋線維芽細胞の性質の変化について、筆者らの報告⁵⁾も交えて紹介したい。

2. YAPを介した機械的刺激による筋線維芽細胞のコラーゲン等ECMタンパク質の産生促進

細胞周囲の硬さによる機械的刺激を細胞内に伝える主たる分子の一つとして、転写共役因子であるYes-associated protein (YAP)があげられる。YAPは、細胞周囲から機械的刺激を受けると、細胞質から核へと移行することが知られている^{2,4)}。このYAPの核移行は、large tumour suppressor (LATS)によるYAPのリン酸化やangiomin (AMOT)によるYAPとの結合によって制御されると考えられている^{6,7)}。定常状態では、YAPはLATSによりリン酸化され、14-3-3タンパク質と結合して細胞質に滞留している。ところが、細胞が機械的刺激を受容すると、GアクチンからFアクチンへの重合促進、あるいはfocal adhesion kinase (FAK)やproto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (SRC)の活性化の誘導によってLATSのキナーゼ活性が抑制される。その結果、YAPは脱リン酸化されて核へ移行する⁶⁾。

機械的刺激により核移行したYAPは、DNAとの結合ドメインを有さないため、TEA domain transcription factor (TEAD)やSMAD、 β -カテニンなどの転写調節因子と相互作用することにより、ECMタンパク質の転写を促進すると考えられている⁴⁾。

実際にこれまでYAPが肺や肝臓、腎臓、皮膚の線維芽細胞において、コラーゲン産生を促進することが報告されている^{2,4)}。さらにYAPとTEADの相互作用を阻害する低分子、verteporfinは、腎臓や肝臓の線維化モデルにおいて有効な効果を示した^{2,4)}。その一方でYAPは正常時のさまざまな組織に広く発現し、それら組織で重要な役割を果たす。したがって、YAPを線維化治療の標的とするには、筋線維芽細胞において選択的にYAPの核移行を阻害する工夫が必

九州大学大学院薬学研究院疾患制御学分野 (〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出3-1-1)

Alteration of myofibroblast characteristics by mechanical stimulation

Haruna Suetsugu, Keisuke Yoshioka and Michio Nakaya (Department of Disease Control, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950370

© 2023 公益社団法人日本生化学会

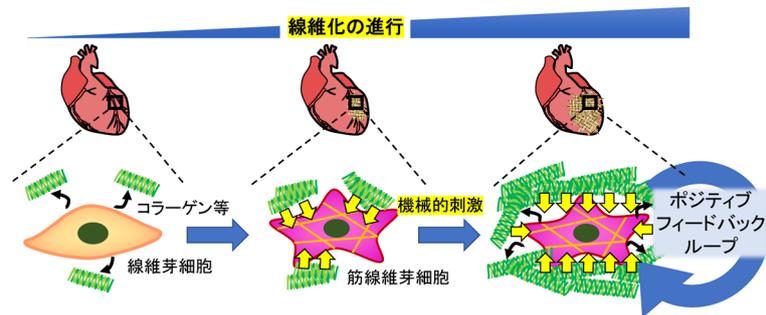


図1 機械的刺激を介した筋線維芽細胞による細胞外マトリックス (ECM) タンパク質産生のポジティブフィードバック。コラーゲン等ECMタンパク質の産生が増加すると、筋線維芽細胞の周囲にECMが蓄積する。その結果、細胞周囲の硬さが増加し、機械的刺激により筋線維芽細胞内でさらにコラーゲンなどのECMタンパク質の産生が促進される。

要であると考えられ、この点は今後解決すべき課題である。

3. MRTF/SRFを介した機械的刺激による筋線維芽細胞のコラーゲン等ECMタンパク質の産生促進

YAPの他に機械的刺激により核移行する分子として、転写共役因子であるmyocardin-related transcription factor (MRTF)が知られている。定常状態時においてMRTFは細胞質でGアクチンと結合している。しかしながら、細胞が機械的刺激を感知し、GアクチンがFアクチンへと重合すると、MRTFとGアクチンとの結合は失われ、MRTFは核内へ移行する⁴⁾。核移行したMRTFは、転写因子であるserum response factor (SRF)と相互作用してECMタンパク質の転写を促進する⁴⁾。MRTFとSRFはECMタンパク質の転写のみならず、TGF β シグナルを抑制するSmad7などのmRNAを分解するmiR-21の発現を促進することにより、結果として筋線維芽細胞においてコラーゲン等のECMタンパク質の産生を促進する⁸⁾。

実際、MRTF-Aのノックアウト (KO) マウスの心臓、皮膚、肺では、線維化が有意に減弱している^{2,9)}。また、MRTFの阻害剤の処置により、肺線維症が改善されることも示されている²⁾。これらの結果からMRTFが線維化の治療標的となる可能性がある。

4. VGLL3を介した機械的刺激による筋線維芽細胞のコラーゲン等ECMタンパク質の産生促進

我々は心筋梗塞時に筋線維芽細胞が死細胞を貪食することを見いだした¹⁰⁾。その研究の過程で偶然にも、筋線維芽細胞を硬いプレートから低吸着プレートに移し、浮遊状態で数日間培養する (機械的刺激をOFFにする) だけで、筋線維芽細胞が脱分化することも見いだした⁵⁾。さらにこの脱分化した筋線維芽細胞を再び硬いプレートにまきなおして、接着した状態で培養する (機械的刺激をONにす

る) だけで、筋線維芽細胞へと再分化した。我々はこれら3種の細胞に発現する遺伝子を比較すれば、機械的刺激による筋線維芽細胞の分化に関与する新たな分子を同定できるのではないかと考えた。そこで遺伝子発現比較を行ったところ、vestigial-like family member 3 (VGLL3) という分子が、筋線維芽細胞、および再分化した筋線維芽細胞に多く発現し、脱分化した筋線維芽細胞には発現しないことを見いだした。

そこで次に、マウスの組織に線維化を誘導し、VGLL3の発現が増加するかを検討した。心筋梗塞モデル処置によって心臓に線維化を誘導したところ、VGLL3は、コラーゲン等のECMタンパク質と類似した発現上昇プロファイルを示した。さらに免疫組織染色により、VGLL3が線維化したマウス心臓において筋線維芽細胞に特異的に発現することを見いだした。興味深いことにVGLL3の筋線維芽細胞特異的な発現は、心筋梗塞罹患患者の線維化心臓においても認められた。また、線維化マウス心臓から単離した筋線維芽細胞においてVGLL3をノックダウンすると、コラーゲンの発現が有意に低下した。これらの結果から、VGLL3は心臓の線維化時において、筋線維芽細胞に特異的に発現し、線維化を促進する分子であることが明らかとなった。

前述のように、YAPやMRTFは機械的刺激により核移行する^{2,4)}。そこで、転写共役因子であるVGLL3も機械的刺激により核移行するかを検討した。筋線維芽細胞を正常組織の硬さを模した1kPaのプレート上で培養したところ、VGLL3は細胞質に局在した。一方で、線維化した組織の硬さを模した50kPaのプレート上で培養すると、VGLL3は核に局在した。以上の結果から、VGLL3は機械的刺激により核移行する分子であることが明らかとなった。この核移行は、latrunculin A (アクチン重合阻害剤)、C3 (Rho阻害剤)、Y27632 (ROCK阻害剤)、BTT-3033 (インテグリン β 1阻害剤)の処置により阻害された。したがって、機械的刺激はインテグリン β 1により感知され、Rho/ROCKを介したアクチン重合が生じることでVGLL3が核移行す

ることが明らかとなった。

*in vivo*においてもVGLL3が線維化に関与しているのかを調べるため、VGLL3 KOマウスを作製して実験を行った。野生型 (WT) マウスおよびVGLL3 KOマウスに心筋梗塞モデル処置を施して心臓の線維化を誘導したところ、心筋梗塞モデル処置7日後の梗塞領域でのコラーゲンの発現上昇が、WTマウスと比較してVGLL3 KOマウスで有意に減少していた。また、心筋梗塞モデル処置28日後の心臓の線維化の程度および心機能低下も、KOマウスで有意に軽減していた。これらの結果から、VGLL3が*in vivo*においても線維化に関与していることが明らかとなった。

VGLL3の線維化促進の分子メカニズムを明らかにするため、VGLL3と結合する分子を質量分析により網羅的に解析した。その結果、意外なことにVGLL3はnon-POU domain containing octamer binding protein (NONO) 等多くのRNA結合タンパク質と結合していた。均一の液体が二つの液相に分離する液-液相分離と呼ばれる現象により、RNA結合タンパク質は核酸などと相互作用し、液滴を形成する¹¹⁾。そこでVGLL3の細胞内での局在を詳細に検討したところ、VGLL3は核内で特定の場所に集積し、液-液相分離する可能性が考えられた。これを確かめるため、1,6-hexanediol処置およびFRAP (fluorescence recovery after photobleaching) 実験を行った。その結果、1,6-hexanediol処置によりVGLL3-EGFPの輝点は消失し、また、FRAP実験ではレーザー照射により消光したVGLL3-EGFPの輝点が速やかに復活した。これらの結果からVGLL3は液-液

相分離すると考えられた。液-液相分離するタンパク質のアミノ酸配列内には、特定の立体構造を形成しない天然変性領域 (intrinsically disordered regions : IDRs) が存在する¹²⁾。予測サイトによりVGLL3のIDRを調べたところ、グルタミン酸リッチなドメインが存在した。そこで、このドメインの欠損体を作製したところ、その過剰発現細胞では、核内で輝点形成がみられなくなった。興味深いことに野生型のVGLL3をNIH3T3細胞に過剰発現させるとコラーゲンの発現が促進されるが、このIDRドメイン欠損体は、コラーゲンの発現が促進されなかった。したがって、VGLL3の液-液相分離および線維化の促進機構にはIDRドメインが必要であることが明らかとなった。

上述の質量分析解析によりVGLL3の結合分子候補として同定された複数のRNA結合タンパク質をそれぞれノックダウンし、コラーゲンの発現量を調べた。その結果、Ewing sarcoma breakpoint region 1 (EWSR1) をノックダウンすると、VGLL3のノックダウン時と同じく、コラーゲンの発現量が減少した。また、EWSR1とVGLL3との結合、および核内での共局在も確認できた。興味深いことにこのEWSR1とVGLL3は、NONOとも共局在した。これまでNONOが含まれる凝集体としては、長鎖ノンコーディングRNAのNEAT1がその構成骨格となる核内構造体、パラスペクルが有名である。そこで我々は、VGLL3とNEAT1との共局在を検討した。しかしながら、VGLL3とNEAT1との共局在はあまり認められず、VGLL3とEWSR1はパラスペクルでないNONO凝集体に存在すると考えられる。EWSR1

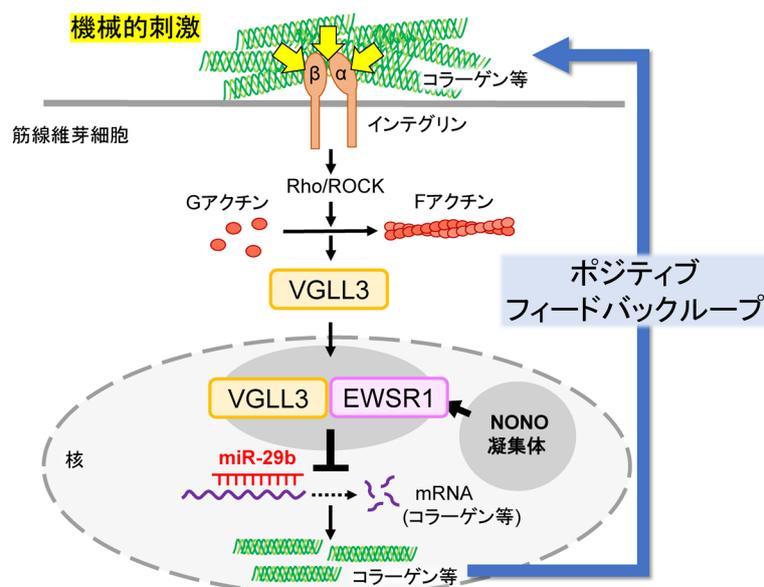


図2 機械的刺激によるVGLL3を介したECMタンパク質産生の分子機構
ECMからの機械的刺激により、VGLL3は核内へ移行する。核内では、VGLL3はEWSR1と相互作用し、液-液相分離する。VGLL3とEWSR1の複合体は、コラーゲン等のmRNAの分解を担うmiR-29bの発現を阻害することでECMタンパク質産生を促進する。

はコラーゲンのmRNA分解を担うmiR-29bの発現を抑制するとの報告がある¹³⁾。そこで、筋線維芽細胞でEWSR1およびVGLL3をノックダウンしたところ、いずれの場合も有意なmiR-29bの発現減少が認められた。

以上の結果より、我々はVGLL3が機械的刺激により核移行し、NONO凝集体上でEWSR1と結合してコラーゲン等のmRNAの分解を行うmiR-29bの発現を抑制することで、コラーゲン等の発現量を増加させることを見いだした(図2)。すなわち、筋線維芽細胞における、硬さを介したコラーゲン産生のポジティブフィードバックループをVGLL3が促進することが明らかとなった。

5. おわりに

近年の研究から機械的刺激による筋線維芽細胞のコラーゲン産生増加の分子メカニズムは、次第に明らかになりつつある。組織においては線維化が進行するにつれ、筋線維芽細胞は、その周囲から強い機械的刺激を受けるようになる。したがって、慢性疾患の線維化治療において機械的刺激による筋線維芽細胞のコラーゲン産生の分子メカニズムは、格好の創薬標的となると考えられる。今後のさらなる解析によって、YAP, MRTF, VGLL3以外の分子を介する新しい経路も明らかにされ、それら経路を標的とした新たな線維化治療法開発へ展開されることにも期待したい。

本稿では、機械的刺激による筋線維芽細胞のECMタンパク質の産生について紹介した。一方で機械的刺激は、筋線維芽細胞においてECMタンパク質の産生以外にも代謝変容¹⁴⁾や細胞骨格形成¹⁵⁾など、さまざまな機能に影響を与える可能性が示されつつある。これらの変化も慢性疾患の病態進行に寄与している可能性が考えられ、今後の解析が待たれる。

文 献

- 1) Henderson, N.C., Rieder, F., & Wynn, T.A. (2020) Fibrosis: from mechanisms to medicines. *Nature*, **587**, 555–566.
- 2) Schuster, R., Younesi, F., Ezzo, M., & Hinz, B. (2023) The role of myofibroblasts in physiological and pathological tissue repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **15**, a041231.
- 3) Berry, M.F., Engler, A.J., Woo, Y.J., Pirolli, T.J., Bish, L.T., Jayasankar, V., Morine, K.J., Gardner, T.J., Discher, D.E., & Sweeney, H.L. (2006) Mesenchymal stem cell injection after

myocardial infarction improves myocardial compliance. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **290**, H2196–H2203.

- 4) Tschumperlin, D.J., Ligresti, G., Hilscher, M.B., & Shah, V.H. (2018) Mechanosensing and fibrosis. *J. Clin. Invest.*, **128**, 74–84.
- 5) Horii, Y., Matsuda, S., Toyota, C., Morinaga, T., Nakaya, T., Tsuchiya, S., Ohmuraya, M., Hironaka, T., Yoshiki, R., Kasai, K., et al. (2023) VGLL3 is a mechanosensitive protein that promotes cardiac fibrosis through liquid–liquid phase separation. *Nat. Commun.*, **14**, 550.
- 6) Dasgupta, I. & McCollum, D. (2019) Control of cellular responses to mechanical cues through YAP/TAZ regulation. *J. Biol. Chem.*, **294**, 17693–17706.
- 7) Kumari, N., Jaynes, P.W., Saei, A., Iyengar, P.V., Richard, J.L.C., & Eichhorn, P.J.A. (2017) The roles of ubiquitin modifying enzymes in neoplastic disease. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, **1868**, 456–483.
- 8) Liu, G., Friggeri, A., Yang, Y., Milosevic, J., Ding, Q., Thanickal, V.J., Kaminski, N., & Abraham, E. (2010) miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J. Exp. Med.*, **207**, 1589–1597.
- 9) Small, E.M., Thatcher, J.E., Sutherland, L.B., Kinoshita, H., Gerard, R.D., Richardson, J.A., Dimairo, J.M., Sadek, H., Kuwahara, K., & Olson, E.N. (2010) Myocardin-related transcription factor-a controls myofibroblast activation and fibrosis in response to myocardial infarction. *Circ. Res.*, **107**, 294–304.
- 10) Nakaya, M., Watari, K., Tajima, M., Nakaya, T., Matsuda, S., Ohara, H., Nishihara, H., Yamaguchi, H., Hashimoto, A., Nishida, M., et al. (2017) Cardiac myofibroblast engulfment of dead cells facilitates recovery after myocardial infarction. *J. Clin. Invest.*, **127**, 383–401.
- 11) Lin, Y., Protter, D.S.W., Rosen, M.K., & Parker, R. (2015) Formation and maturation of phase-separated liquid droplets by RNA-binding proteins. *Mol. Cell*, **60**, 208–219.
- 12) Strom, A.R., Emelyanov, A.V., Mir, M., Fyodorov, D.V., Darzacq, X., & Karpen, G.H. (2017) Phase separation drives heterochromatin domain formation. *Nature*, **547**, 241–245.
- 13) Lee, J., Nguyen, P.T., Shim, H.S., Hyeon, S.J., Im, H., Choi, M.H., Chung, S., Kowall, N.W., Lee, S.B., & Ryu, H. (2019) EWSR1, a multifunctional protein, regulates cellular function and aging via genetic and epigenetic pathways. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1865**, 1938–1945.
- 14) Tian, G. & Ren, T. (2023) Mechanical stress regulates the mechanotransduction and metabolism of cardiac fibroblasts in fibrotic cardiac diseases. *Eur. J. Cell Biol.*, **102**, 151288.
- 15) Hironaka, T., Takizawa, N., Yamauchi, Y., Horii, Y., & Nakaya, M. (2023) The well-developed actin cytoskeleton and Cthrc1 expression by actin-binding protein drebrin in myofibroblasts promote cardiac and hepatic fibrosis. *J. Biol. Chem.*, **299**, 102934.

著者寸描

●仲矢 道雄 (なかや みちお)

九州大学大学院薬学研究院疾患制御学分野 准教授。博士(医学)。

■略歴 1977年大阪府に生る。2000年東京大学理学部卒業。06年大阪大学大学院医学系研究科博士課程修了。07年九州大

学薬学研究院薬効安全性分野助教、12年同分野准教授を経て、21年九州大学薬学研究院疾患制御学分野准教授。

■研究テーマと抱負 線維化および筋線維芽細胞に関する研究。

■ウェブサイト <http://chudoku.phar.kyushu-u.ac.jp>

■趣味 サイクリング。