

研究題目 線維化促進分泌蛋白質を介したシグナル伝達経路の解明

研究組織

研究代表者：仲矢道雄（九州大学 大学院薬学研究院）
 共同研究者：小迫英尊（徳島大学 先端酵素学研究所）
 研究分担者：笠井康太郎（九州大学 大学院薬学研究院）
 研究分担者：瀧澤宣郎（九州大学 大学院薬学研究院）
 研究分担者：山内佑斗（九州大学 大学院薬学研究院）

【1】研究の概要

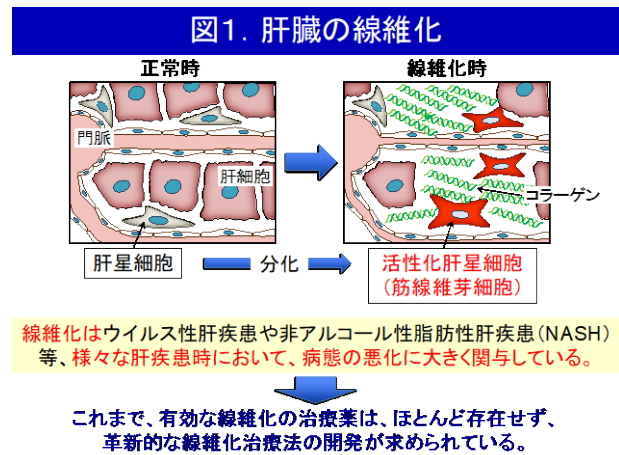
[1-1] 本研究の目的・概要

線維化は、コラーゲン等を産生する筋線維芽細胞（活性化星細胞）によって実行される。筋線維芽細胞は正常な組織には存在せず、炎症を契機に主に常在性の線維芽細胞（星細胞）が分化する事により生じる。

ウイルス性肝疾患や非アルコール性脂肪肝炎（NASH）、あるいはそれらによって引き起こされる肝硬変において、線維化は病態の悪化に大きく関与しており、その制御法の確立が求められている。しかしながら、これまで線維化に対する決定的な治療薬は存在しない。その主たる原因は、適切な治療標的分子が同定されていないことにある。従って、線維化治療の標的となりうる分子の同定が喫緊の課題となっている。

申請者は、肝臓をはじめ、心臓、肺等、様々な組織における筋線維芽細胞の分化、機能を組織横断的に研究している[J. Clin. Invest. 2017, FASEB J. 2020, Nat. Commun. 2023]。そしてこれまで、筋線維芽細胞が線維化病態時にのみ出現することに着目し、線維化組織において筋線維芽細胞に特異的に発現し、かつ線維化を促進する分子に狙いを定め、創薬標的候補となる分子群を探索してきた[J. Biol. Chem. 2023, Nat. Commun. 2023]。

その結果、筋線維芽細胞において線維化を促進する分泌蛋白質（FPSP: Fibrosis-promoting secreted protein）を新たに見出した。FPSP のノックアウト（KO）マウスを作製したところ、この KO マウスにおいて NASH 時の肝線維化（図 1）が軽減することを見出した。そこで本研究では、「FPSP 受容体の同定とその受容体を介した FPSP の線維化促進機序の解明」を行う。



[1-2] 研究の方法・経過

以下の 2 テーマ(a), (b)について研究を進めた。

(a) FPSP 受容体の BioID 法による同定

線維化した組織から単離した筋線維芽細胞で FPSP をノックダウンするとコラーゲン産生が大きく減少することを見出している。従って、FPSP は筋線維芽細胞自身の細胞膜上の受容体に作用すると考えられる。

そこでこの FPSP 受容体の同定を試みた。FPSP-BioID の融合蛋白質を作成し、筋線維芽細胞に添加した。その後、ビオチンを添加して、FPSP 近傍の蛋白質をビオチン化し、質量分析によりビオチン化された受容体候補分子を探索した（次ページ図 2）。

(b) FPSP の線維化促進機序の解明

線維化マウス心臓から単離した筋線維芽細胞において FPSP の有無により、発現量変化する遺伝子をリン酸化量および総タンパク質量が変化する蛋白質を TMT 標識法を用いた質量分析により同定した。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

上記 (a)の実験に関しては、まず、細胞染色実験によりビオチン化反応のビオチンの添加濃度、反応時間の条件検討を行った。

その後、この検討結果を基に筋線維芽細胞において FPSP-BioID の融合蛋白質を用いたビオチン化反応を行い、質量分析解析を行った。解析を行ったところ、想定したよりも検出できたビオチン化ペプチド数が少なかった。そこで現在は、ビオチンの濃度、反応時間を変更し、ビオチン化反応を十分に行わせたサンプルを作成し、現在再度、質量分析解析を行っている。

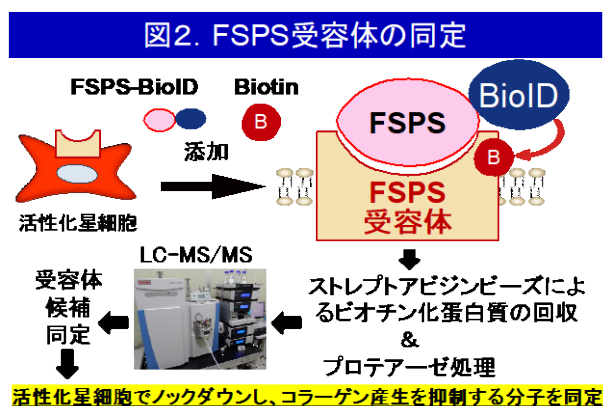
(b)の実験に関しては、質量分析解析の結果、いくつかのタンパク質のリン酸化量が FPSP をノックダウンすることによって大きく減少することを見出した。

これらタンパク質の中には、全プロテオーム解析により FPSP のノックダウンによりリン酸化量のみならず、タンパク質量が減少するものと変化しないものがあった。

現在、文献を調べることで等により、FPSP を介した線維化促進シグナルに関与するタンパク質の絞り込みを行っている。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

(a)の実験に関しては今後、質量分析によりビオチン化された受容体候補群を同定後、それぞれの分子を活性化星細胞においてノックダウンし、コラーゲン産生が抑制される受容体を同定する予定である。



(b)の実験に関しては、FPSP を介した線維化促進シグナルに関与するタンパク質の絞り込みを行った後、NASH を誘導した FPSP KO マウスの肝臓において実際に着目したタンパク質のリン

酸化量が減弱しているかを検討する予定である。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

該当なし

[3-2] 学会発表

1) 仲矢道雄

「新規線維化促進因子の探索」

Heart Failure Front Line

オンライン、2023 年 9 月 28 日（特別講演）

2) 仲矢道雄

「新規線維化促進因子の同定」

第 96 回日本生化学会大会

福岡、2023 年 11 月 1 日（シンポジウム）

[3-3] 成果資料等

仲矢道雄

「For Future 先端技術 (98) 九州大学 臓器の線維化促すたんぱく質」

日刊工業新聞 2023 年 8 月 28 日

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

FPSP は、データベースを調べた限り、生体内の主たる正常組織にはほぼ発現していない。従って、FPSP は革新的な線維化治療の開発に繋がる格好の標的分子となる。

そのような背景から FPSP の中和抗体を取得し、その投与による肝線維化治療効果が認められれば、それら成果は新しい線維化治療法の基盤となると期待される。