

E3 ユビキチン化酵素を標的とした組織線維化の制御

島根大学医学部 生命科学講座 腫瘍生物学
松崎 有未

1. はじめに

心筋梗塞、肺線維症、腎硬化症、肝硬変など生命必須の臓器の重篤な慢性炎症疾患の終末像である組織破壊と線維化は不可逆的な変化であるため、依然として患者の QOL に関わる重大な問題として残されており、線維化の制御が難治性疾患根絶のブレークスルーとなると考えられる (Medzhitov R. Nature 2008)。関節リウマチ (RA) は慢性炎症を基礎とする代表的な線維病態を示す難治疾患の 1 つであり、多段階の病的プロセスが相互作用し時空間的に多様な病態を呈しながら進行する。

我々はこれまでに、RA 滑膜細胞より E3 ユビキチン化酵素であるシノビオリンを同定した (Genes Dev. 2003)。また近年、滑膜細胞で過剰発現する E3 ユビキチン化酵素シノビオリンが可溶性小胞体基質および p53 を選択的にユビキチン化すること、これらの活性を介して関節症の発症に関与することを明らかにしている。

RA 滑膜細胞はサイトカイン・細胞外基質・プロテアーゼなど多くのタンパク質を過剰分泌することが知られており、RA 滑膜細胞に過剰発現したシノビオリンが可溶性小胞体基質および p53 を選択的にユビキチン化することでその分解を促進し、分泌タンパク質の産生を増加させることが病態形成の要因となっていると考えられる (J. Cell. Biol. 2010)。またシノビオリン遺伝子欠損 (syno^{-/-}) マウスは肝臓でのアポトーシスの亢進により胎生致死となることことから、肝臓がシノビオリンに対して感受性の高い臓器であることも示されている (J. Biol. Chem. 2005)。

またシノビオリンはコラーゲン type I をユビキチン化標的分子とすること、肝臓の線維化に重要な役割を示すことから、これまで全く異なる病態と考えられていた両疾患に共通の発症機序が存在することが示唆されており、シノビオリンの発現や機能を制御することで、関節リウマチや肝線維症に代表される線維化疾患に対する治療につながる可能性が考えられる。そこで本研究ではユビキチン化阻害剤を用い、慢性炎症モデル動物における組織線維化の制御の可否について検討を行うことを目的とし、初年度は慢性炎症を誘発後に組織線維化を起こすモデル動物の作製とその評価を行った。

2. 方法

フローサイトメトリーを用いた間葉系幹細胞の分離

間葉系幹細胞 (MSC) は通常、付着培養法により分離されるが、我々は培養を経ずにフローサイトメトリーにより直接 MSC を分離する手法を開発した。培養分離で得た MSC と直接分離した新鮮 MSC の大きな違いは、前者が経静脈移植後ただちに肺毛細血管にトラップされ血液循環に入らないのに対し、後者は骨髓を始めとする全身の臓器に遊走・生着することにある (Morikawa JEM 2009)。

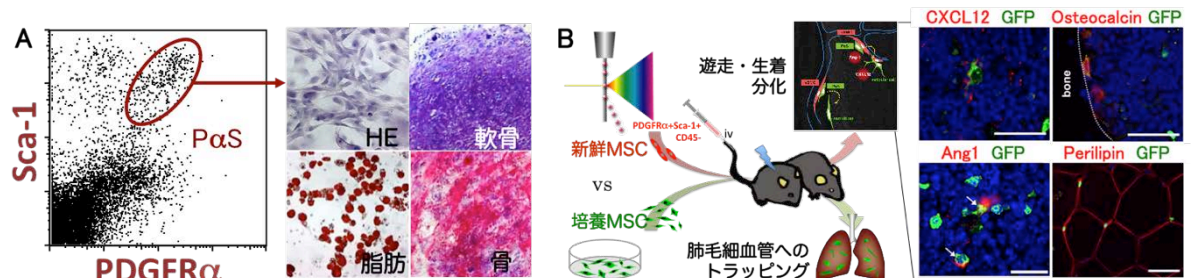


図 1A: マウス MSC は PDGFRα Sca-1 共陽性分画 (PαS) に含まれており、線維芽細胞様の増殖と多分化能を示す。B: PαS 細胞は経静脈投与後、全身各組織に遊走・生着するが、培養 MSC は大部分が肺毛細血管に捕捉される。

組織線維化動物モデルの作製

ドナーを B10.D2、ホストを BALB/c とする MHC 一致・マイナー抗原 (mHA) 不一致骨髓移植モデルは、移植後 8 週で全身各組織の線維化、血中 IL-6 濃度の上昇、自己免疫疾患様の T 細胞動態 (Treg 数の減少、Th17 の増加) を示すなど、ヒト慢性 GVHD に最も近い動物モデルとされている (Zhang et al J. Immunol 2002)。このモデルをベースとし、我々はドナー骨髓より HSC と MSC を別々に分離後に混合移植する改

変型 cGVHD モデルを確立した（下図上段）。元のモデルである B10D.2 の全骨髄を BALB/c に移植した場合とほぼ同様の組織線維化病変を引き起こすことを確認している（下図下段）。

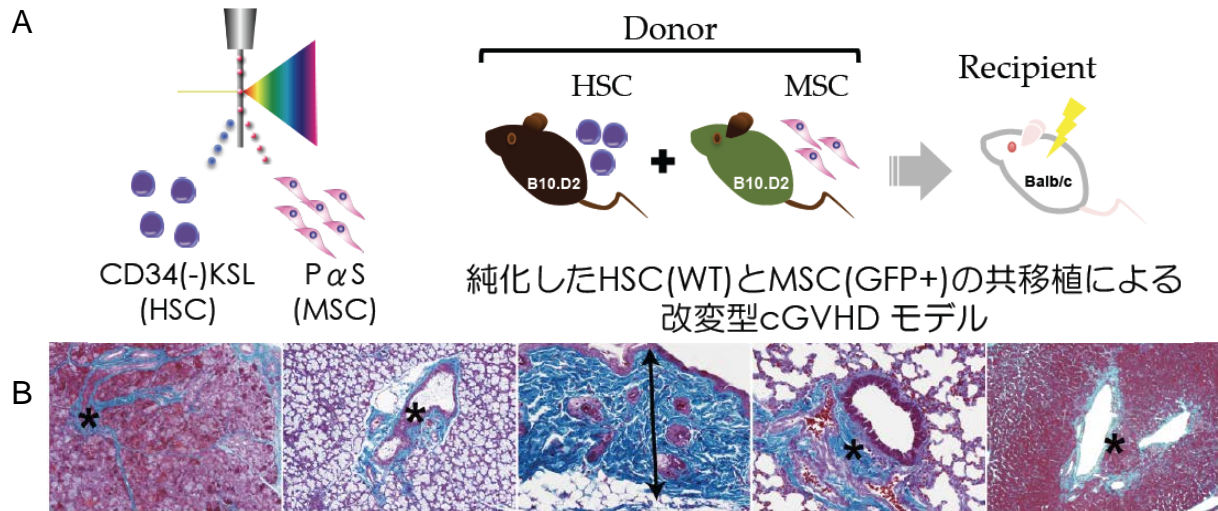


図 2A: 改変型線維化病変マウスモデル。ドナーB10D.2 より図 1 の手法で分離した MSC(PαS)を同様に分離した HSC と混合し、レシピエントである BALB/c へ経静脈的に移植する。B: 経静脈投与 8 週後のマロニー染色組織像。全骨髄移植を行った場合と同様に組織線維化が認められる。*: 線維化部位。

3. 研究成果

移植後MSC由来細胞の線維化部位への集積

移植された MSC は GFP でマーキングされているため、その後の動態をトレースすることが可能である。組織学的検討をおこなったところ、組織線維化部位の微小管周辺に移植された MSC 由来細胞が集積しており、その大部分の細胞は活性型 fibroblast のマーカーである HSP47 を発現していた（図 3A）。組織線維化の程度と HSP 陽性細胞の頻度には正の相関が認められた（図 3B）。組織繊維芽細胞の大部分は GFP を発現しており（図 3C）、骨髄由来の MSC は発症時に骨髄から遊走後、繊維芽細胞に変化し、組織線維化に寄与することが示唆された。

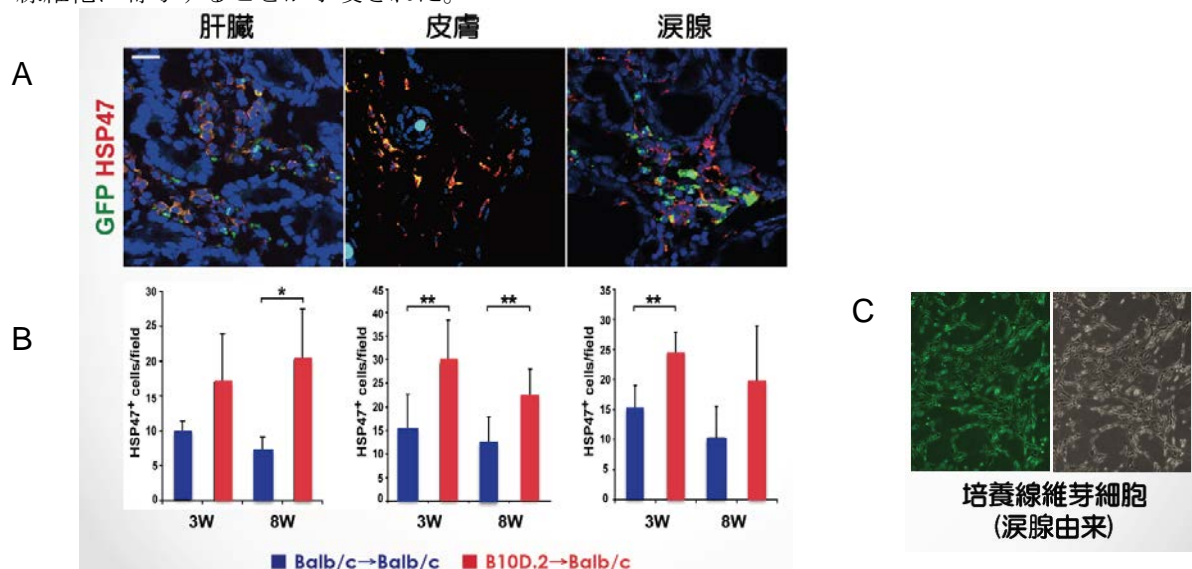


図 3A: 移植後 8 週の組織像。肝門脈周囲等、組織微小管周辺に GFP 陽性細胞の集積が見られ、大部分の細胞が活性化繊維芽細胞マーカーである HSP47 (赤) を共発現していた。B: 組織中の HSP47 陽性細胞数の定量化データ。BALB/c 同士の移植と比較し、B10D.2 → BALB/c では HSP 陽性細胞数の有意な増加が見られる。C: 涙腺組織を 2 週間培養して得た繊維芽細胞はほぼ全てが GFP 陽性であり、移植 MSC 由来であることが確認された。

移植後MSCの末梢動態

移植後ホストの末梢血を定期的に採取し、ドナーMSC由来細胞のキメリズムを調べたところ、移植後3週で末梢血中への遊走が見られ、病態が完成する8週後の直前をピークに徐々に減少していった(図4)。

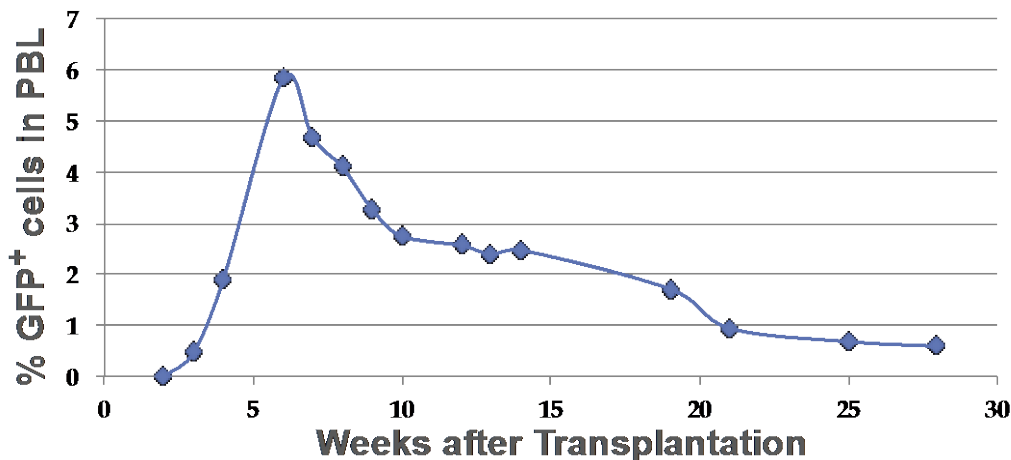


図4: 移植後末梢血中の GFP 陽性細胞頻度の経時変化。ホスト末梢血から採取した単核細胞を FACS で解析し、GFP 陽性細胞の頻度(%)を縦軸にプロットした図である。末梢血中への遊走は組織線維化が始まる移植3週後に一致しており、組織線維化における骨髄 MSC 由来細胞の関与が強く示唆される。また移植前の MSC は CD45 陰性、MHC Class II 陰性であったが、移植後の細胞は CD45 陽性、MHC Class II 陽性に転じており、in vitro 解析により MSC 由来の子孫細胞が抗原提示機能を持つことが明らかになった(投稿準備中)。

4. 考察 まとめ

我々はこれまでの研究により、移植された MSC は最初に骨髄に生着し、骨髄内で造血支持細胞(hematopoietic stromal cells)と骨・脂肪などの間葉系細胞に分化することをすでに報告している(Morikawa JEM 2009)。これらはすべてドナー・ホスト共に C57BL/6 を用いた syngeneic 移植モデルによる知見であったが、今回行ったマイナー抗原不一致 MSC 移植によって初めて、移植された MSC は骨髄生着後、一部が表現型を大きく変えて末梢血中へ遊走し、抗原提示細胞として機能することが明らかになった。また、末梢血中の MSC 由来細胞は抗原提示細胞として T 細胞の活性化を誘導すると共に、自身も T 細胞からの刺激によって活性化し、組織中の線維芽細胞へ寄与することなども確認できている。

さらに、本報告書では詳細な記載を差し控えたが、MSC 由来の抗原提示細胞は Class II を介して Naïve T 細胞と直接活性化し、主として Th17 陽性の炎症性 T 細胞への転換を誘導することが明らかになっており、自己免疫疾患の発症にも関わる可能性が示唆されている(Ogawa et al. eLife, in press)。

本知見は、これまで全く知られていなかった骨髄内に存在する間葉系幹細胞の新たな機能、特に免疫・炎症反応における細胞機能が存在することを示唆しており、今後さらに詳細な研究を展開していきたいと考えている。また現在、確立した組織線維化モデルへの E3 ユビキチン化酵素阻害剤投与による組織線維化阻害についての検討を同時に行っている。

5. 発表論文、参考文献

1. Matsuzaki Y, Mabuchi Y, Okano H. Leptin Receptor Makes Its Mark on MSCs. *Cell Stem Cell*. 15(2): 112-114, 2014.
2. Ariki R, Morikawa S, Mabuchi Y, Suzuki S, Nakatake M, Yoshioka K, Hidano S, Nakauchi H, Matsuzaki Y, Nakamura T, Goitsuka R. Homeodomain transcription factor meis1 is a critical regulator of adult bone marrow hematopoiesis. *PLoS One*. 9(2): e87646, 2014.
3. Yoshida T, Ozawa Y, Suzuki K, Yuki K, Ohyama M, Akamatsu W, Matsuzaki Y, Shimmura S, Mitani K, Tsubota K, Okano H. The use of induced pluripotent stem cells to reveal pathogenic gene mutations and explore treatments for retinitis pigmentosa. *Mol Brain*. 7: 45, 2014.
4. Mabuchi Y, Morikawa S, Harada S; Niibe K, Suzuki S, Renault-Mihara F, Houlihan DD, Akazawa C, Okano H, Matsuzaki Y. LNGFR⁺Thy-1⁺Vcam-1^{hi} cells reveal functionally distinct subpopulations in mesenchymal stem cells. *Stem Cell Reports* 1(2): 152-165, 2013.
5. 松崎有未、馬渕洋、岡野栄之: ヒト間葉系幹細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体並びにこれを用いたヒト間葉系幹細胞の分離及び/または品質評価を行う方法 (P113114 国内優先)