

線維芽細胞の収縮と筋線維芽細胞

Contraction of Fibroblasts, and Myofibroblasts

伊奈 啓輔, 北村 裕和, 藤倉 義久

Keisuke Ina, Hirokazu Kitamura and Yoshihisa Fujikura

^a大分大学医学部生体分子構造機能制御講座構造解析分野

要旨 糖尿病性腎症の尿細管間質に出現する筋線維芽細胞は、活性型線維芽細胞とも呼ばれ線維等の細胞外基質の蓄積すなわち線維化をもたらす。また、その形態的特徴から細胞の収縮については線維化組織の収縮を来たすと考えられ、線維芽細胞と平滑筋細胞の中間に位置付けられてきた。筋線維芽細胞の由来は、TGF- β 1 の作用を受け線維芽細胞等の特定の細胞が α 平滑筋アクチン (α SMA) 等を発現する分化転換によることが示されてきた。筋線維芽細胞の最大の形態的特徴である α SMA の発現の意義について、腎線維芽細胞を用いた *in vitro* 培養系で検討した。結果、収縮には α SMA の発現は必ずしも必要ではなく α SMA が発現していない線維芽細胞もストレスファイバーを形成し収縮を起し、 α SMA が発現している場合収縮は増強することが示唆された。また、 α SMA 発現の細胞内シグナル経路と収縮の細胞内シグナル経路は異なり別の事象と考えられた。

キーワード：線維芽細胞, 筋線維芽細胞, α 平滑筋アクチン, 線維化, 糖尿病性腎症

1. はじめに

糖尿病は、40 歳以上の国民の 10 人に 1 人が罹患している。糖尿病の合併症の腎症を発症すると、放置すれば腎不全から死に至る。わが国では、腎不全で血液透析を行っている患者の原因疾患のうち、最も多いのは糖尿病である。年々増加の一途を辿っている。この腎症の予防、治療法を開発することを目的に、腎症発症メカニズムの解明を研究テーマとしてきた。

糖尿病性腎症の病理組織像は、糸球体硬化症と尿細管間質の線維化である。このうち間質の線維化は、その程度が腎機能低下の程度とよく相関することが指摘されて¹⁾以来、注目されるようになった。この間質の線維化が生じるメカニズムとして、腎の炎症から腎内に線維化誘発サイトカインの TGF- β 1 の発現が亢進し、その作用を受け特定の細胞が筋線維芽細胞に分化転換することが大変重要であると考えられた。すなわち活性型線維芽細胞とも呼ばれる筋線維芽細胞は、TGF- β 1 の作用を受け細胞外基質の産生分泌の亢進を来とし、一方では細胞外基質の消化を抑制する PAI-1, TIMP の産生を亢進し、細胞外基質特にコラーゲン線維の蓄積を起し線維化をもたらすとす、多くの報告がなされてきた²⁾。

ところが、筋線維芽細胞の最大の特徴である α 平滑筋アクチン (α SMA) の発現の意義については、 α SMA により細

胞が収縮し、細胞とコラーゲン等の線維性細胞外基質との連結を介して線維化組織全体の収縮を来たすのであろうと考えられてきたものの詳細は明らかにされていない。

また、筋線維芽細胞の由来については線維芽細胞なのか、上皮細胞なのか、あるいは骨髄細胞 (circulating fibrocyte)²⁾ なのかという問題がある。

本稿では線維芽細胞からの筋線維芽細胞への分化転換における α SMA の発現の意義について検討し、考察を加える。

2. 自然発症糖尿病動物の KKAY マウスの腎尿細管間質の線維化と筋線維芽細胞の出現

2 型糖尿病モデル動物の KKAY マウスは、糖尿病発症 10 週においてヒトの糖尿病性腎症の II ~ III 期に相当する腎症を呈する。蛋白尿は有意に増加し、組織像は尿細管間質の線維化を来している。この時期、尿細管上皮細胞や間質細胞に TGF- β 1 が検出される。また、間質の血管以外の部分に α SMA 陽性細胞が認められる。腎臓の大きさはコントロールに比し差はない。このように、糖尿病動物では腎間質に線維化が生じ、腎の細胞内に TGF- β 1 が発現し、間質に α SMA 陽性の筋線維芽細胞が出現していた (図 1)³⁾。

我々は、この筋線維芽細胞の由来を間質の線維芽細胞と考え、次に *in vitro* の細胞培養系を用いて腎線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化転換を試みた。

3. 線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化転換

ここで、筋線維芽細胞の定義をしておかなければならない。線維化、肉芽組織だけではなく様々な分野で筋線維芽細胞は

^a 〒 879-5593 大分県由布市挾間町医大ヶ丘 1-1
TEL: 097-586-5631; FAX: 097-586-5632
E-mail: kina@med.oita-u.ac.jp
2008 年 2 月 14 日受付

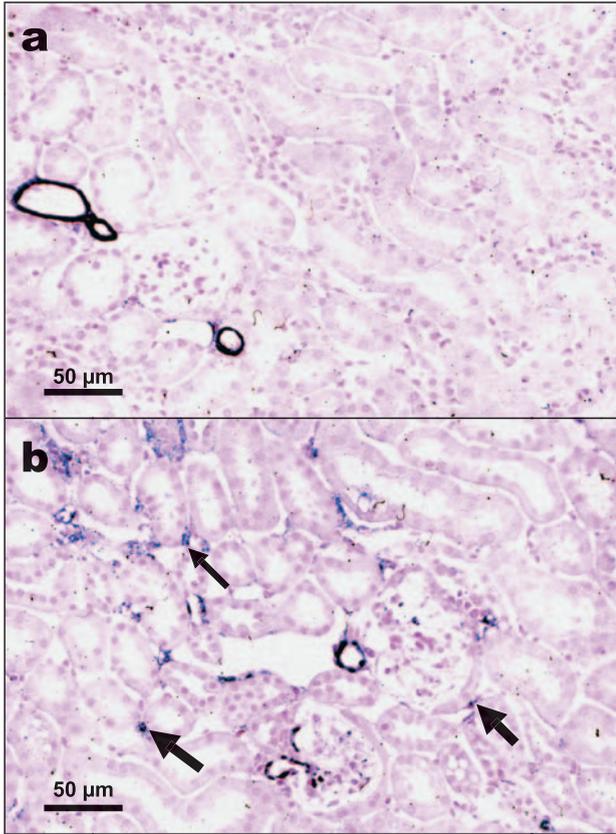


図1 腎の α SMAに対する免疫組織化学染色 (IgG-gold-silver法). (a) C57BL正常マウス 尿管間質の血管平滑筋細胞のみが陽性に染色されている. (b) KKAY自然発症糖尿病マウス 尿管間質に血管平滑筋以外に陽性の細胞(矢印)が存在している. 筋線維芽細胞と考えられた. (文献3のFigure 4を改変)

登場するが、「結局、この細胞は何なのか」ということをよく耳にする。大変わかりにくい細胞である。歴史から見ていくと理解の助けになるかもしれない。

1971年に、Gabbianiらはラットの皮膚創傷肉芽組織の中に、*modified fibroblast* が出現すると透過型電顕所見のみで論じているのが筋線維芽細胞の最初の報告である⁴⁾。その微細構造の特徴は、本来の線維芽細胞に見られる発達した粗面小胞体、多くのミトコンドリアに加えて、以下の3つの構造物の存在が挙げられている。(1)「fibrillar system」として、細胞の長軸に平行に走る線維束が存在し、その細胞膜直下の部分と束のところどころには電子密度の高い部分を有するとし後のストレスファイバーに相当する構造物を示している。また、(2)「nuclear deformation」として、核が深いしわを形成したりアコーディオン様の浅いしわを形成しているとし、この核の変化は、ヒスタミン等により収縮した平滑筋細胞、心筋細胞、内皮細胞に見られる形態変化であり、細胞収縮を意味するとしている。さらに、(3)「surface differentiations」として、この細胞と細胞外基質(基底膜様物質)のつながり、細胞間の接着斑による結合を指摘している。いずれも、細胞が収縮し組織の収縮を来すことを示唆している。このように

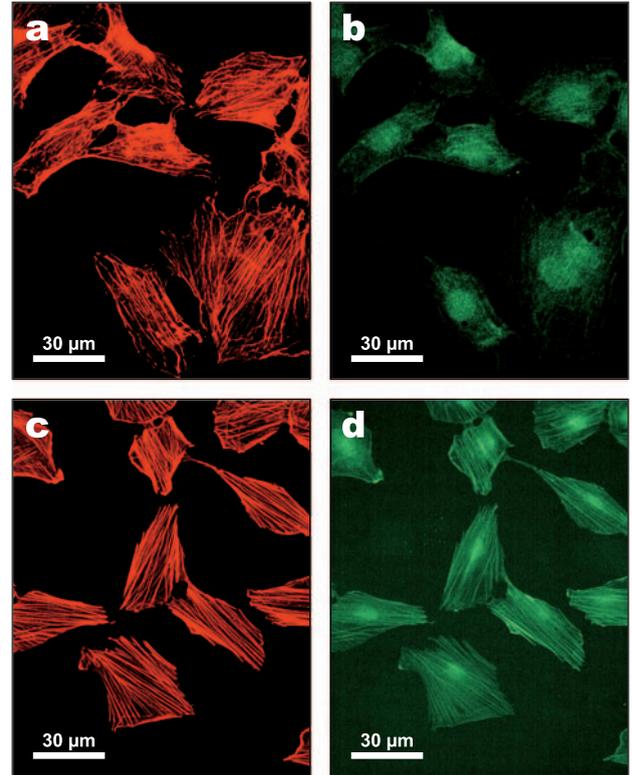


図2 NRK49F細胞の単層培養でのストレスファイバー. (a, c) ファロイジン-ローダミン蛍光染色 (b, d) α SMAに対する免疫蛍光染色 (a, b) コントロール培地 ストレスファイバーはファロイジン陽性であるが α SMA陰性である. 従って線維芽細胞と考えられる. (c, d) TGF- β 1添加培地 ストレスファイバーはファロイジン, α SMAともに陽性である. 従って筋線維芽細胞と考えられる.

modified fibroblast (筋線維芽細胞)は、機能的には線維芽細胞のコラーゲン等の細胞外基質産生能と収縮能を有し、線維芽細胞と平滑筋細胞の中間型であると述べている。この時点では、筋線維芽細胞という言葉は使われていない。また、アクチンについての言及もない。まだアクチンは1種類しか知られていなかった時代である。 α SMAという名称は当然出てこない。 α SMAが同定されたのは1978年頃であり、それまではストレスファイバーが筋線維芽細胞の大きな特徴と考えられていたようである。今では通常の線維芽細胞もストレスファイバーを形成することが知られている。このように α SMAにより構成されたストレスファイバーが筋線維芽細胞の形態的な主な特徴とされるのに少し時間を要した。 α SMAが筋線維芽細胞の条件の1つに挙げられるようになってからも、細胞骨格の表現型としてアクチンフィラメントと中間径フィラメントの各種組み合わせの中に α SMAが陰性のものも含めている場合があり混乱を引き起こしているようである。一方、1998年Schürchらは、電顕の特徴としては、①ストレスファイバー、②fibronexus(細胞と細胞外基質との付着部位, focal adhesionと思われる)、③細胞間結合として接着帯とギャップ結合、④発達した粗面小胞体、⑤核のくぼ

み, ⑥飲み込み小胞, ⑦細胞周囲が部分的に基底膜におおわれている, を挙げている⁵⁾. この後 2004 年には, α SMA により形成されたストレスファイバーと細胞—細胞外基質のつながりを筋線維芽細胞の形態学的な定義として挙げられるに至った⁶⁾. ストレスファイバーの形成は, 細胞と細胞外基質とのつながりと密接に関係していると考えられるからか, 最近では血管以外で間質に α SMA のストレスファイバーを有する細胞を筋線維芽細胞と呼ぶのが通例になっている. もっと簡略化し, 肉芽組織や線維化組織に出現している α SMA 陽性細胞を筋線維芽細胞としている報告も多々見られる⁷⁾. ところで今では, 肉芽組織などで筋線維芽細胞 myofibroblast に形質転換する前に protomyofibroblast という前駆細胞が存在することが指摘されている⁸⁾. この細胞は, α SMA 陰性のストレスファイバーを形成し, 機能的には migration をする, とされている. この細胞が前出の α SMA 陰性の筋線維芽細胞といわれたものかもしれない.

以上をふまえて, ラット腎線維芽細胞 NRK49F 細胞を *in vitro* で単層培養し α SMA 陽性のストレスファイバーが検出された細胞を筋線維芽細胞と呼ぶこととした. 糖尿病動物の実験で示唆されたように, TGF- β 1 を 2 日間作用させるとこの線維芽細胞は筋線維芽細胞へと分化転換した. TGF- β 1 を作用させないコントロール群では, α SMA 陽性ストレスファイバーを有する細胞はほとんど認められなかった. サブタイプの如何を問わず全ての線維性アクチンを染め出すファロイジン—ローダミン染色を行うと, コントロール群も TGF- β 1 作用群もほぼ同様にストレスファイバーが染め出された. TGF- β 1 作用群では, ストレスファイバーのほぼ 100% が α SMA 陽性のものから陽性率がさほど高くないものまで様々存在した (図 2).

4. 線維化組織の収縮

次に, 肉芽組織や線維化組織の *in vitro* モデルとされている I 型コラーゲンゲルを用いた実験系により組織の収縮について検討した. ゲルの上に NRK49F 細胞を乗せ, あるいは中に入れ (FPCL), FPCL を培養液中に浮遊させ, その収縮度を測定した. 単層培養の場合と同じ濃度で同じ時間 TGF- β 1 を作用させたところ, コントロール群に比し著明に FPCL は収縮した. 収縮した FPCL にアクチン脱重合剤のサイトカラシン D を作用させると FPCL は弛緩した. このとき細胞は星形あるいは紡錘形から円形化し, ファロイジン—ローダミン染色ではストレスファイバーが消失していた⁹⁾. 続いてサイトカラシン D を除去すると, FPCL は再度収縮していった. 細胞の形態も元の形に戻っていった. これらのことからサイトカラシン D は可逆的にアクチンを脱重合することにより収縮を抑制し, 細胞収縮にはアクチンのストレスファイバー形成が必要であることが示された (図 3).

5. α SMA 発現の細胞内シグナリング経路

TGF- β 1 の細胞内シグナリングは, Smad 経路を介して行

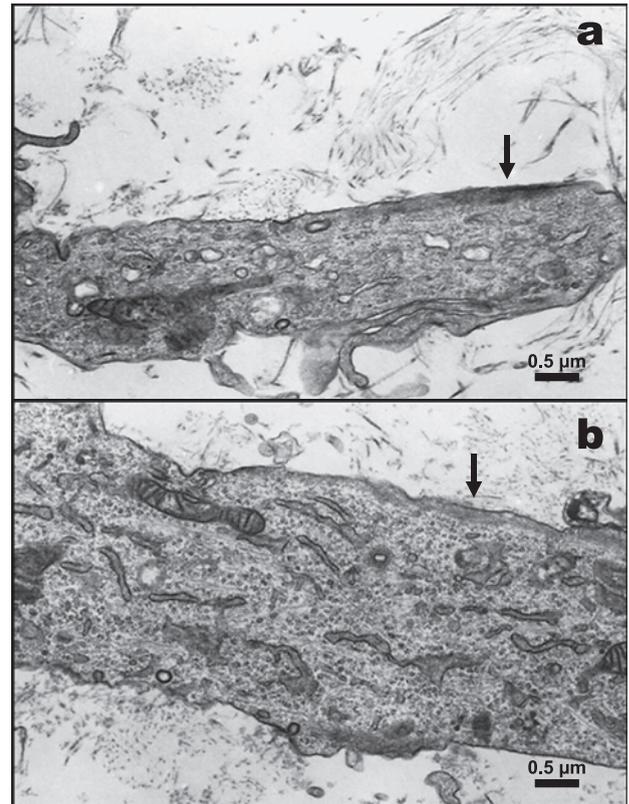


図 3 FPCL 内の細胞の透過電顕像. (a) コントロール培地 (b) TGF- β 1 添加培地 ともに同様にストレスファイバー (矢印) が示されている. (文献 9 の Figure 3 を改変)

われることはよく知られている. 即ち, TGF- β 1 II 型受容体に TGF- β 1 が結合し I 型受容体をリン酸化し活性化して, Smad2/3 のリン酸化から, Smad4 を動員し complex を形成して核内に移行し転写因子として DNA に結合し, 形質を発現する. しかし, 他のシグナル経路も存在することが知られている. 我々は, α SMA 発現に関する経路として, p38MAP キナーゼ, p44/42MAP キナーゼ, PI3 キナーゼ, Rho キナーゼの各経路について調べた. P38MAP キナーゼ阻害剤 SB203580 を TGF- β 1 とともに作用させたところ, α SMA 陽性のストレスファイバーを有する細胞数は TGF- β 1 単独作用群に比しおよそ半減していた. P44/42MAP キナーゼ阻害剤 PD98059, PI3 キナーゼ阻害剤 Wortmannin, Rho キナーゼ阻害剤 Y27632 あるいは hydroxyfasudil を作用させた群は, α SMA の発現に変化を認めなかった. また, TGF- β 1 と同時に TGF- β 1 受容体阻害剤 TRB を作用させた場合, ストレスファイバーを形成する α SMA の発現はほぼ完全に抑制されることを確認した. 以上のことは, α SMA の発現には少なくとも TGF- β 1 受容体の活性化を介し p38MAP キナーゼ経路が関与していることを示唆している.

6. FPCL 収縮の細胞内シグナリング経路

まず, TGF- β 1 とともに TRB を作用させることにより収縮がほぼ完全に抑制されることを確認した. 次に, 上述の各

経路の TGF- β 1 誘発 FPCL 収縮への関与について検討した。Y27632 あるいは hydroxyfasudil により約 50% の収縮抑制が認められ、SB203580 でも同程度の収縮抑制効果がみられた。Hydroxyfasudil と SB203580 の併用ではほぼ 100% 収縮は抑制された。PD98059 及び Wortmannin は効果なかった。TGF- β 1 による FPCL の収縮には、Rho キナーゼ経路と p38MAP キナーゼ経路が関与していることが示唆された。クロストークを含めたこれらの詳細な機序は不明である。Rho キナーゼ活性化からアクチン-ミオシンの相互作用による収縮に至る経路は以下のように考えられた。Rho キナーゼはミオシン軽鎖のリン酸化を促進することが知られているが、Y27632 を用いて調べたところ支持する結果が得られた。さらに、ミオシン ATPase 阻害剤 BDM を投与することにより収縮は抑制されることが示された。以上から、Rho キナーゼが活性化されると、ミオシン軽鎖のリン酸化が亢進し、ミオシン ATPase が活性化され、アクチン-ミオシン相互作用による収縮が起こるのではないかと考えられた⁹⁾。

一方、コントロール培地による収縮の細胞内シグナリングも TGF- β 1 受容体の活性化を介し、Rho キナーゼ経路と p38MAP キナーゼ経路が関与していることが示唆された。これは、線維化状態の FPCL でコラーゲン線維等の細胞外基質が細胞を刺激し、TGF- β 1 を分泌促進させ autocrine 作用により TGF- β 1 受容体が活性化され細胞内経路へとシグナル伝達されていったものと考えられた。

7. α SMA の発現と収縮の関係

In vitro の以上の結果をまとめてみると、以下のようになる。

α SMA が発現していない線維芽細胞もストレスファイバーを形成し、細胞の収縮ひいては組織の収縮をもたらす。収縮にはストレスファイバーの形成が必要であり、 α SMA の発現は必ずしも必要ではない。 α SMA 発現の細胞内シグナリングは、p38MAP キナーゼ経路が関与し、Rho キナーゼ経路はほとんど関与していない。収縮のシグナリングは、p38MAP キナーゼ経路と Rho キナーゼ経路が関与している。 α SMA の

発現と収縮は別の事象と考える必要がある。 α SMA が発現すると収縮が増強する、と考えられた。

8. 糖尿病性腎症における腎線維化組織の収縮の意味

α SMA 発現の有無にかかわらず、TGF- β 1 は線維化組織の収縮をもたらすことが示されたわけであるが、この収縮は糖尿病性腎症では腎線維化から腎不全に至る際の腎萎縮に相当すると考えられた。

結論としては、線維化組織の収縮には α SMA の発現（筋線維芽細胞）が絶対条件とはならないと考えられた。

それでは、他に α SMA 発現の意義は何であろうか。形態的な最大の特徴である α SMA の発現と機能的最大の特徴の線維蓄積との直接の関連を考えることも可能かもしれない。サイトカラシン D を作用させることによりコラーゲン産生分泌能が抑制されるとする報告がある¹⁰⁾。これらは今後の検討課題である。

文 献

- 1) Lane, P.H., Steffes, M.W., Fioretto, P. and Mauer, S.M.: *Kidney Int.*, **43**, 661-667 (1993)
- 2) Simonson, M.S.: *Kidney Int.*, **71**, 846-854 (2007)
- 3) Ina, K., Kitamura, H., Tatsukawa, S., Takayama, T., Fujikura, Y. and Shimada, T.: *Med. Electron Microsc.*, **35**, 87-95 (2002)
- 4) Gabbiani, G., Ryan, G. and Majno, G.: *Experientia*, **27**, 549-550 (1971)
- 5) Schürch, W., Seemayer, T.A. and Gabbiani, G.: *Am. J. Surg. Pathol.*, **22**, 141-147 (1998)
- 6) Chaponnier, C. and Gabbiani, G.: *J. Pathol.*, **204**, 386-395 (2004)
- 7) Roson, M.I., Cavallero, S., Penna, S.D., Cao, G., Gorzalczy, S., Pandolfo, M., Kuprewicz, A., Canessa, O., Toblli, J.E. and Fernandez, B.E.: *Kidney Int.*, **70**, 1439-1446 (2006)
- 8) Hinz, B., Pittet, P., Smith-Clerc, J., Chaponnier, C. and Meister, J.-J.: *Mol. Biol. Cell*, **15**, 4310-4320 (2004)
- 9) Ina, K., Kitamura, H., Tatsukawa, S., Miyazaki, T., Abe, H. and Fujikura, Y.: *Virchows Arch.*, **451**, 911-921 (2007)
- 10) Hubchak, S.C., Runyan, C.E., Kreisberg, J.I. and Schnaper, H.W.: *J. Am. Soc. Nephrol.*, **14**, 1969-1980 (2003)