

コラーゲン分泌阻害剤ケミカルスクリーニング法の樹立

飯塚 美桜 (筑波大学 生物学類)

指導教員：高橋 智 (筑波大学 医学医療系)

【背景・目的】

線維化とは組織にコラーゲンが過剰に蓄積する現象を指す。コラーゲンの蓄積は組織の構造を破壊し、臓器の機能を障害する。線維化を伴う疾患として間質性肺炎や肝硬変、慢性腎臓病などが知られているが、線維化の詳細な発症メカニズムは未だ解明されていない。それ以前にコラーゲンの分泌機構についても詳細は不明なままである。日本では現在、ピルフェニドンとニンテダニブが抗線維化薬として認可されている。しかしこれらは線維化の進行を遅らせるのみで組織を正常に戻すことはできず、臓器の機能を回復する方法は現時点では臓器移植しかない。線維化のメカニズムが未解明であることや効果的な抗線維化薬が見つかっていない理由として、コラーゲンの観察が困難であることが挙げられる。従来の方法では組織や培養細胞を固定し染色する必要があり、生細胞での経時的な観察はできなかった。

そこで当研究室では、コラーゲン分泌および線維形成を経時的に観察するためにV型コラーゲンにGFPを付加した新規コラーゲンプローブ(以下、CoIVG)を開発した。またプローブ遺伝子をマウスMC3T3-E1細胞およびBalb3T3細胞に導入し安定発現株を樹立している。これら細胞株は、通常培養ではV型コラーゲンが細胞内に蓄積し、線維は形成されなかったが、我々は特殊な培養方法である“分泌誘導培養”へ切り替えることでコラーゲンの分泌を誘導できることを見出した。現在ではこの培養方法によるコラーゲンの分泌から線維形成までの可視化に成功している。

本研究では、MC3T3-E1細胞CoIVG株およびBalb3T3細胞CoIVG株を用いて、効率よくコラーゲンの分泌阻害剤をスクリーニングする評価系の樹立を目的とし、既存の抗線維化薬の添加実験よりコラーゲンの分泌阻害現象のイメージングを試みた。

【材料・方法】

細胞

本研究ではあらかじめCoIVGを安定発現している2種類の細胞株を用いた。

A) MC3T3-E1細胞CoIVG株(MCCoIVG)

マウス頭蓋冠由来骨芽細胞にCoIVGを導入した細胞株。

B) Balb3T3細胞CoIVG株(BalbCoIVG)

マウス胎仔由来線維芽細胞にCoIVGを導入した細胞株。

通常培養

MCCoIVGは、10%牛胎仔血清を含む α MEM培地、BalbCoIVGは、10%牛胎仔血清を含むMEM培地で、いずれも37°C、5%CO₂条件下で培養した。

分泌誘導培養

馴化培地は、MCCoIVGを25mL組織培養用ベントキャップタイプフラスコ(Falcon®)に播種して α MEM培地を満たし、37°C、5%CO₂の条件下で3週間培養したものを回収した。

MCCoIVGおよびBalbCoIVGがconfluentになった24-well plateから培地を除去し、各wellに α MEMまたはMEM培地を1.5mL、馴化培地を1.5mL加えて合計が3mLになるようにし

た。そして、37°C、12%O₂、5%CO₂条件下で培養した。分泌誘導培養へ切り替えた日をDay 0とした。

抗線維化薬

抗線維化作用をもつことが確認されている以下の3種類の薬剤を用いた。分泌誘導培養に切り替える際に培地に添加した。

・ピルフェニドン (Pirfenidone)

特発性肺線維症の治療薬である。TGF- β 産生阻害効果をもつ抗線維化薬である。

・ベルテポルフィン (Verteporfin)

Hippoシグナル経路におけるYAP阻害剤である。YAPはTGF- β シグナル伝達を制御することが知られている。

・ミノキシジル (Minoxidil)

コラーゲンの架橋に必要なリシルヒドロキシラーゼ1、2および3の阻害剤である。

細胞の撮影

撮影は両細胞株ともDay 0から約1か月間行った。蛍光顕微鏡撮影には、OLYMPUS IX73を用いた。緑色蛍光フィルターは、U-FGFP (OLYMPUS)、Ex: 470/20、Em: 518/45を使用した。

【結果】

コラーゲン分泌阻害効果

1. ピルフェニドン (Pirfenidone) 添加実験

100 μ g/mL、300 μ g/mLの2種類の濃度で実験した。MCCoIVGでは、300 μ g/mLにおいてのみ最終撮影日 (Day 28) までコラーゲン線維は観察されなかった。BalbCoIVG株では、無添加と同日にすべてのwellで線維形成の開始が観察されたが、薬剤を添加したwellでは線維の成長はあまり見られなかった。

2. ベルテポルフィン (Verteporfin) 添加実験

0.3 μ Mから10 μ Mまでの4段階の濃度で実験した。MCCoIVGでは、無添加ではDay 15にコラーゲン線維が観察され線維形成の開始および成長も観察されたが、薬剤を添加したwellでは最終撮影日 (Day 28) までコラーゲン線維は観察されなかった。BalbCoIVGでは、無添加と比較して7日遅れて線維形成の開始が観察されたが、線維の成長はあまり見られなかった。

3. ミノキシジル (Minoxidil) 添加実験

0.1 μ Mから10 μ Mまでは両細胞株において添加の効果が見られなかったが、MCCoIVGでは100 μ Mにおいてのみ最終撮影日 (Day 21) までコラーゲン線維は観察されなかった。BalbCoIVGでは、無添加と比較して3日遅れてコラーゲン線維が観察された。線維の成長は無添加と比較するとやや少なかった。

【考察・今後の展望】

結果より、コラーゲン分泌の有無またはその遅延、線維の成長の程度を観察することで薬剤のコラーゲン分泌阻害効果の評価が可能であることがわかった。今後は、ケミカルライブラリーから抗線維化薬を探索する実験を行う予定である。