

令和元年6月7日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19534

研究課題名（和文）弾性線維再生技術の開発

研究課題名（英文）Regeneration of elastic fibers

研究代表者

中邨 智之（NAKAMURA, Tomoyuki）

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：20362527

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：弾性線維は、皮膚・動脈・肺など伸び縮みする組織に多くあって、その伸縮性を担う細胞外マトリックスである。加齢に伴う弾性線維の劣化が皮膚のたるみ・動脈の硬化・肺気腫などの原因となるが、弾性線維が再生されることはないとされている。本研究では、我々が弾性線維形成に関与することを見出した分泌タンパク質Fibulin-4, 5, LTBP-2, 4を手がかりに、加齢組織で弾性線維が再生されない理由を調べ、また培養細胞での弾性線維形成の評価系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化に伴って私達の体は伸縮性を失ってゆく。皮膚はたるみ、動脈は硬くなり、肺が縮みにくくなって呼吸機能が低下する。これらは、伸縮性を担う弾性線維が劣化・断裂していくことに起因する。弾性線維のターンオーバーは極めて遅く、成長期を過ぎると弾性線維は再生されないとされる。本研究では、なぜ弾性線維が再生されないのか、その理由の一端を明らかにし、弾性線維再生に必要な基盤的知識を提供する。

研究成果の概要（英文）：Tissue elasticity in organs such as skin, arteries, and lungs is conferred by an extracellular matrix named elastic fiber. Aging-associated deterioration of elastic fibers causes loose skin, arteriosclerosis, and emphysema, while elastic fibers do not regenerate in aged tissues. In this study, we explored the reason why elastic fiber regeneration does not occur by analyzing the expression of Fibulin-4 and 5, and LTBP-2 and 4, which we have identified as elastogenic proteins, in aged tissues. We also developed an in vitro assay system for elastogenesis.

研究分野：病態分子医学

キーワード：細胞外マトリックス 弾性線維 再生 老化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

弾性線維は、伸び縮みする組織(皮膚・動脈・肺など)に多くあって、その伸縮性を担う細胞外マトリックスである。皮膚のたるみだけでなく、心疾患予後悪化因子である動脈中膜硬化、高齢者の主要疾患である肺気腫も弾性線維の劣化・断裂が直接原因と考えられているため、弾性線維の劣化予防と再生は高齢化社会における極めて重要な課題である。弾性線維のターンオーバーは極めて遅いが、なぜ弾性線維の再生は困難なのか、その理由は明らかでない。

弾性線維形成には(1)ミクロフィブリルという線維の束が形成され、(2)エラスチンタンパク質がミクロフィブリルに沈着し、(3)エラスチンどうしが架橋される、というプロセスがある。我々はそれぞれのプロセスに必要な分泌タンパク質(弾性線維形成タンパク質)を見出し、報告してきた(*J Cell Biol* 176:1061-1071, 2007; *EMBO J* 26:3283-3295, 2007; *Proc Natl Acad Sci USA* 106:19029-34, 2009; *Proc Natl Acad Sci USA* 110:2852-7, 2013; *Hum Mol Genet* 23:5672-82, 2014 など)。加齢に伴い弾性線維再生能を失う理由がこれら弾性線維形成タンパク質の発現低下によるものなのかはわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では、加齢に伴い弾性線維再生能を失う理由を明らかにすることを第一の目的とした。これまで我々は Fibulin-4, 5, LTBP-2, 4 といった弾性線維の組み立てに必要な分泌タンパク質(弾性線維形成タンパク質)を同定し、それらの機能を研究してきた。その過程で、これら弾性線維形成タンパク質を蛍光免疫染色で検出できる抗体を作成した。これらの抗体を用いて、さまざまな年齢・部位(露光部、非露光部)のヒト皮膚組織の蛍光免疫染色を行い、加齢に伴って失われる因子を特定する。特に、露光部の加齢皮膚に特徴的なエラスチンの塊、日光弾性線維症では正常弾性線維と比べて何が異なるのかを調べる。

また、弾性線維再生の条件を調べるため、培養細胞が作る細胞外マトリックスの力学的特性を調べる装置を考案した。この装置を用いて、野生型、および弾性線維形成タンパク質欠損マウス由来細胞に細胞外マトリックスを作らせ、その力学的特性の違いを調べる。

3. 研究の方法

富山大皮膚科において、露光部と非露光部の皮膚手術の際の余剰皮膚組織を採集し、無固定で OCT コンパウンドに包埋、凍結した。関西医科大学薬理学講座において凍結切片を作成し、メタノール固定の後、蛍光免疫染色を行った。抗体は、抗エラスチン抗体、抗 Fibrillin-1 抗体(以上市販抗体)、抗 Fibulin-4 抗体、抗 Fibulin-5 抗体、抗 LTBP-2 抗体、抗 LTBP-4 抗体(以上自作)を用いた。

野生型、および Fibulin-4 遺伝子欠損マウスの胎仔線維芽細胞(MEF)を作成し、それらをコンフルエント状態で 7 日、10 日、14 日間培養した。細胞をサイトカラシン処理してアクチン重合の影響をなくし、細胞+細胞外マトリックスシートを取り出した。シート上に鉄ビーズを乗せ、下から電磁石で引っ張ったときのビーズ移動量を距離センサーで測定し、加えた力と移動量から、シートの力学的特性を計測した(図)。

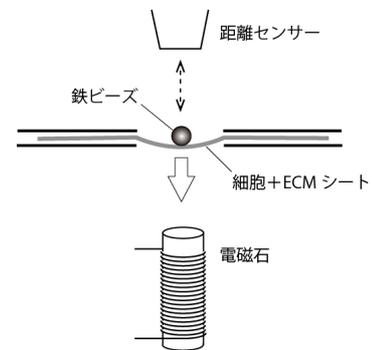


図. 細胞+ECM シートの力学的特性をマクロに測定する装置の原理。

4. 研究成果

若年(14歳腕、21歳眼瞼)に加えて、加齢皮膚14例の解析がこれまでに終わっている。加齢皮膚の内訳は、日光弾性線維症でないもの6例(非露光部3例、露光部3例)、日光弾性線維症8例である。

抗エラスチン抗体で染色される弾性線維は、加齢組織でも真皮に十分存在したが、露光部ではフラグメンテーションを認めた。弾性線維形成タンパク質は、エラスチンと共同在するものもあったが、加齢とともにほとんど染まらなくなるものもあった。

日光弾性線維症のサンプルでは、真皮浅層に抗エラスチン抗体で強く染まる組織を認めた。弾性線維形成タンパク質は、エラスチンと共同在するものもあったが、加齢で失われる因子は日光弾性線維症においても発現が増えることはなかった。

細胞+細胞外マトリックスシートの力学的特性測定では、サイトカラシンの有無で明らかな違いを認め、細胞自身の張力の影響を取り除くことが重要であることがわかった。コラーゲンとエラスチンの架橋酵素 LOX の阻害薬である アミノプロピオニトリル存在下でのデータをコントロールとして、野生型、Fibulin-4 遺伝子欠損 MEF のデータを採集し、現在解析中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

1. Mori H, Yamada H, Toyama K, Takahashi K, Akama T, Inoue T, Nakamura T: Developmental and age-related changes to the elastic lamina of Bruch's membrane in mice. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 257(2):289-301, 2019. doi: 10.1007/s00417-018-4184-5. 査読有
2. Yamashiro Y, Thang BQ, Shin SJ, Lino CA, Nakamura T, Kim J, Sugiyama K, Tokunaga C, Sakamoto H, Osaka M, Davis EC, Wagenseil JE, Hiramatsu Y, Yanagisawa H: Role of Thrombospondin-1 in Mechanotransduction and Development of Thoracic Aortic Aneurysm in Mouse and Humans. *Circ Res* 31;123(6):660-672, 2018. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313105. 査読有
3. Nakamura T: Roles of short fibulins, a family of matricellular proteins, in lung matrix assembly and disease. *Matrix Biol* 73C:21-33, 2018. doi: 10.1016/j.matbio.2018.02.003. 査読有
4. Bultmann-Mellin I, Dinger K, Debuschewitz C, Loewe KMA, Melcher Y, Plum MTW, Appel S, Rapp G, Willenborg S, Schauss AC, Jüngst C, Krüger M, Dressler S, Nakamura T, Wempe F, Alejandre Alcázar MA, Sterner-Kock A: Role of LTBP-4 in alveolarization, angiogenesis and fibrosis in lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 313(4):L687-L698, 2017. doi: 10.1152/ajplung.00031.2017. 査読有
5. Nishiga M, Horie T, Kuwabara Y, Nagao K, Baba O, Nakao T, Nishino T, Hakuno D, Nakashima Y, Nishi H, Nakazeki F, Ide Y, Koyama S, Kimura M, Hanada R, Nakamura T, Inada T, Hasegawa K, Conway SJ, Kita T, Kimura T, Ono K: MicroRNA-33 Controls Adaptive Fibrotic Response in the Remodeling Heart by Preserving Lipid Raft Cholesterol. *Circ Res* 120(5):835-847, 2017. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309528. 査読有
6. Fujikawa Y, Yoshida H, Inoue T, Ohbayashi T, Noda K, von Melchner H, Iwasaka T, Shiojima I, Akama TO, Nakamura T: Latent TGF- β binding protein 2 and 4 have essential overlapping functions in microfibril development. *Sci Rep* 7:43714, 2017. doi: 10.1038/srep43714. 査読有

和文

1. 中邨智之:「生体の伸縮性を生み出す仕組み - 弾性線維形成の分子機構 -」日本香粧品学会誌 43(1): 14-17, 2019年 査読無
2. 中邨智之:「生体組織の伸縮性を生み出すしくみ ~弾性線維形成の分子機構とその破綻による多臓器疾患~」加齢皮膚医学セミナー 13(1): 56, 2018年 査読無

〔学会発表〕(計9件)

国際学会

1. Nakamura T, Kitagawa K, Noda K, Yamauchi M, Ogra Y, Taniguchi H, Mecham P.R.: Fibulin-4, a matricellular protein, is essential for the activity of lysyl oxidase, a key enzyme for cross-linking collagens and elastin. Poster presentation at the 8th TAKAO international symposium (Oct 6 – 8, 2017, Matsue, Shimane, Japan).
2. Nakamura T: Essential function of Fibulin-4 in lysyl oxidase activation. Invited talk at Gordon Research Conference on Elastin and Elastic Fiber (July 30 – Aug 3, 2017, Biddeford, U.S.A.).
3. Nakamura T: Latent TGF β binding protein-2 is essential for the stable structure of ciliary zonule microfibrils. Invited talk at Wakayama Medical University International Symposium: Cataract surgery in exfoliation syndrome (Apr 4, 2017, Wakayama, Japan).

国内学会

1. 中邨智之: Roles of Fibulin-4 and 5 in arterial stiffness and aneurysm. 第83回日本循環器学会学術集会 会長特別企画 Special Session 9 遺伝性大動脈瘤・解離の分子医学 招待講演(パ

シフィコ横浜、横浜、2019年3月29-31日)

2. 中邨智之:「弾性線維再生能はなぜ失われるのか? 加齢皮膚と日光弾性線維症における弾性線維形成因子の発現」エラスチン・関連分子研究会第3回学術集会(東京ベイ有明ワシントンホテル、東京、2018年12月1日)
3. 中邨智之:「生体の伸縮性を生み出すしくみ ~弾性線維形成の分子機構~」日本化粧品学会 第43回教育セミナー 招待講演(ヤクルトホール、東京、2018年11月2日)
4. 中邨智之:「弾性線維形成の分子機構」第50回日本結合組織学会学術大会 シンポジウム「基礎と臨床の融合」 招待講演(福岡大学、2018年6月29日)
5. 中邨智之:「弾性線維形成の分子機構 ~弾性線維形成分子と多臓器疾患~」エラスチン・関連分子研究会 第2回学術集会 特別講演(新宿ワシントンホテル、2017年12月2日)
6. 中邨智之:「生体組織の伸縮性を生み出すしくみ ~弾性線維形成の分子機構とその破綻による多臓器疾患~」第13回加齢皮膚医学研究会 特別講演(コラッセ福島、2017年4月29日)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ: <http://www3.kmu.ac.jp/pharmac/>

6. 研究組織

(1)研究分担者
該当無し

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 赤間 智也

ローマ字氏名: (AKAMA, Tomoya)

研究協力者氏名: 影島 賢巳

ローマ字氏名: (KAGESHIMA, Masami)

研究協力者氏名: 清水 忠道

ローマ字氏名: (SHIMIZU, Tadamichi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。