

令和 3 年 5 月 8 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08280

研究課題名(和文) 弾性線維再生因子の探索と弾性線維再生への応用

研究課題名(英文) The exploration of novel genes for elastogenesis and application to regeneration of elastic fibers

研究代表者

里 史明(SATO, FUMIAKI)

星薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：10468580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、老齢の特徴である「弾性線維の質的・量的な変化」により変動する遺伝子を網羅的に解析し、弾性線維再生を可能とする因子の特定を目指した。その結果、「弾性線維の質的・量的な変動」によって、16遺伝子の変動が認められた。その中でWntシグナルに関連する遺伝子を複数認めたことから、弾性線維形成におけるWntシグナルの関与について検討した結果、加齢により増加する内在性Wnt阻害因子DKK2が弾性線維の足場となる微細繊維の形成を抑制することが明らかとなった。一方、微細繊維の構成因子の発現には影響をなかったことから、Wnt刺激により弾性線維形成を促進する因子が誘導される可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

弾性線維の減少は、しわやたるみ、呼吸機能の低下、血圧の上昇のみならず、動脈瘤や肺気腫などの生命が脅かされる事態を招く。これら疾患の予防・治療の有効な手段となり得るため、弾性線維の再生法の確立が望まれている。本研究から、老化に伴う弾性線維の質的・量的な変動自体が弾性線維再生を負に制御していることが明らかとなり、細胞のみならず細胞外環境の維持も生体にとって重要なことであることがわかった。また、加齢により弾性線維再生が不全となる機構として発生に重要なWntシグナルの抑制が関与することから、Wntシグナルを刺激することで組織の柔軟性を回復できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the genes that altered by the qualitative and quantitative modification of elastic fiber in fibroblasts, resulting in we obtained 16 fluctuated genes. We focused on the genes related to Wnt signaling, which is essential for development during the embryonic period, from the 16 genes. DKK2, an intrinsic inhibitor of Wnt, was reduced the formation of elastic and microfibril fibers without decreasing the expression of constituent molecules. These results suggest that a novel factor promoting elastic fiber formation is induced through the Wnt signal.

研究分野：細胞外マトリックス

キーワード：弾性線維 老化 Wntシグナル 皮膚線維芽細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

組織の柔軟性に寄与する弾性線維の半減期は非常に長く、胎児期までに形成された後、加齢に伴い減少していき、自然に再生されることはない。この減少は、皮膚のしわやたるみ、肺泡機能の低下、血管壁の脆弱化を招き、最終的に肺気腫、慢性閉塞性肺疾患(COPD)や動脈瘤の原因となるため、弾性線維の再生は、これらに対する有効な予防・治療手段になる。さらに、呼吸機能の改善や血圧の正常化など生活の質の向上も期待できるため、その再生法が渴望されている。しかしながら、弾性線維の形成機序は未だ不明な点が多く、弾性線維の人工的な再生は困難を極めている。一方、組織に存在する細胞による再生も考えられるが、現在までに有効な因子・手段の発見には至っていない。実際に、弾性線維が欠失あるいは減少した環境下に存在する細胞は、組織の再生を促すサイトカインである TGF- $\beta$  に対する細胞応答性が低下していることが報告されている。しかしながら、この弾性線維の減少と細胞応答性の低下との関連性は明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

これまでに申請者は、独自に開発した弾性線維コート培養皿を用いた研究から、弾性線維が減少した環境下で培養した胎児由来細胞は、TGF- $\beta$  に対する応答性が低下すること、また、弾性線維関連遺伝子の発現が胎児由来とほとんど変わらないにも関わらず、弾性線維形成能力の低下している老齢由来細胞を弾性線維上で培養すると、その弾性線維形成能力が回復することを見出している。これらのことは、“弾性線維の質的・量的な変化”が細胞機能を変動させ、弾性線維形成を制御している可能性を示唆しているとともに、これまで弾性線維形成に対し注目されてこなかった新たな因子の存在を示唆している。つまり、弾性線維の質的・量的な変化に伴う細胞機能の変動メカニズムを解明することは、弾性線維再生を可能とする新たな因子を発見することに繋がると考えた。本研究の目的は、「弾性線維の質的・量的な変動」により細胞機能の変動を解析し、弾性線維再生を可能とする新規の因子を特定することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 弾性線維コート及び分解弾性線維コートディッシュを用いた複製老化細胞の作製

エラスチン遺伝子を安定発現したヒト網膜色素上皮細胞 (ARPE-ELN) を任意のディッシュに播種し、コンフルエント後 14 日間培養した。その後、脱細胞化処理を行うことで弾性線維コートディッシュ (EF) を得た。分解弾性線維コート (DF) の作製は、14 日間培養後の ARPE-ELN に 0.5U/mL のブタ膵臓由来エラスターゼを 3 時間処理することにより作製した。EF または DF に、集団倍加数 (PDL 20) の肺線維芽細胞を播種し、PDL が 55 を超えるまでコートディッシュ上で培養を続けた。PDL55 以上に達した細胞を EF-55 ならびに DF-55 とした。

#### (2) 差異遺伝子の抽出と同定

EF-55 および DF-55 の遺伝子発現を比較するため、両細胞をポリスチレンディッシュ上に播種し、サブコンフルエントに達した後に total RNA を抽出した。また、TGF- $\beta$  を処置した EF-55 ならびに DF-55 の total RNA も同時に採取した。各細胞の遺伝子発現は、採取した RNA を用い DNA アレイにて網羅的に検出し、各群間 (EF-55、EF-55-TGF、DF-55、DF-55-TGF) の発現変動を解析した。TGF- $\beta$  処置・未処置の群間で同様の変動がみられた遺伝子に関して、定量 PCR で発現変動を確認した。

#### (3) 加齢による Wnt シグナル関連遺伝子の変動解析と DKK 処理による弾性線維形成

胎児由来および老齢由来皮膚線維芽細胞の total RNA を抽出し、Wnt シグナル関連遺伝子を定量 PCR で解析した。また、両細胞に DKK1 及び DKK2 のリコンビナントタンパク質を添加した細

胞の弾性線維形成を蛍光免疫染色により観察し、その線維量を ELISA 法を用いて半定量した。また、DKK 処理時における各細胞の弾性線維関連遺伝子の発現を定量 PCR 法で解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 「弾性線維の質的・量的な変動」に伴う遺伝子発現変動

EF-55 ならびに DF-55 における差異遺伝子は、356 遺伝子であった(増加遺伝子 236、減少遺伝子 393, DF-55/EF-55)。一方、TGF- $\beta$  処理時における差異遺伝子は、644 遺伝子であった(増加遺伝子 386、減少遺伝子 258、DF-55-TGF/EF-55-TGF)。両差異遺伝子において、DF-55 で有意に発現が増加する遺伝子は 35 遺伝子であり、有意に発現抑制された遺伝子は 24 遺伝子であった。さらにこれらの遺伝子のうち、細胞外に分泌または、細胞膜に局在するタンパク質をコートする遺伝子を抽出し、これらの遺伝子発現を定量 PCR で確認した。その結果、Wnt シグナル関連遺伝子 (DKK1、Wnt5B)、細胞膜タンパク質 (ITGA5、MCAM)、細胞外マトリックス (COL8A1、PXDN、TNC、BGN、SEMA3C) で差異が確認された(図 1)

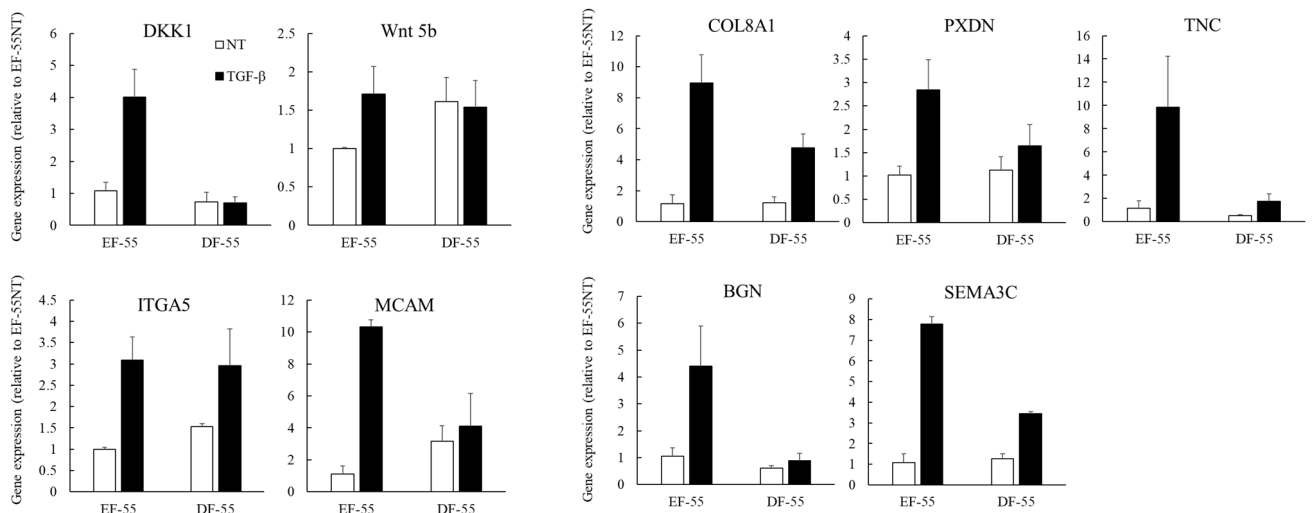


図 1 弾性線維の質的・量的な変動に伴う遺伝子発現変動

##### (2) 皮膚線維芽細胞における加齢による Wnt シグナル関連遺伝子発現

次に、胎児由来と老齢由来皮膚線維芽細胞の Wnt シグナル関連遺伝子の発現を定量 PCR で解析した。その結果、老齢由来細胞 (Ad) では、胎児由来細胞 (Neo) と比較し、内在性 Wnt 阻害タンパク質である DKK2 および Wnt 結合タンパク質である SFRP2 が顕著に亢進していた。

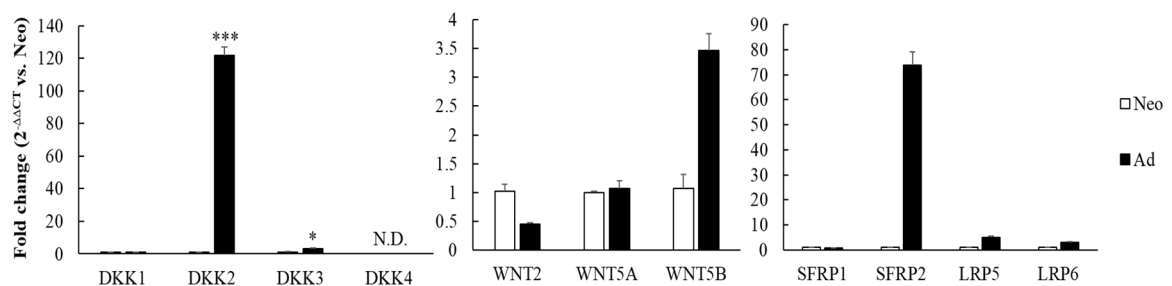


図 2 皮膚線維芽細胞における加齢による Wnt シグナル関連遺伝子発現

##### (3) 胎児由来細胞における DKK1 および DKK2 の弾性線維形成への関与 (図 3)

胎児由来皮膚線維芽細胞における DKK の弾性線維形成への関与を検討するため、外因的に DKK1

および DKK2 を添加した時の弾性線維形成を検討した。まず、DKK 添加による  $\beta$ -カテニンの核移行をウエスタンブロット法を用いて検討した結果、DKK1 および DKK2 添加により、 $\beta$ -カテニンの核移行が有意に抑制された(A)。次に、弾性線維を抗 tropoelastin 抗体による蛍光免疫染色で観察したところ、DKK の添加により微細繊維の減少が認められた(B)。ELISA による半定量の結果も同様に DKK 添加濃度依存的に微細繊維の減少が認められた(C)。尚、DKK 添加による細胞毒性は、添加 6 日間で認められなかった(D)。

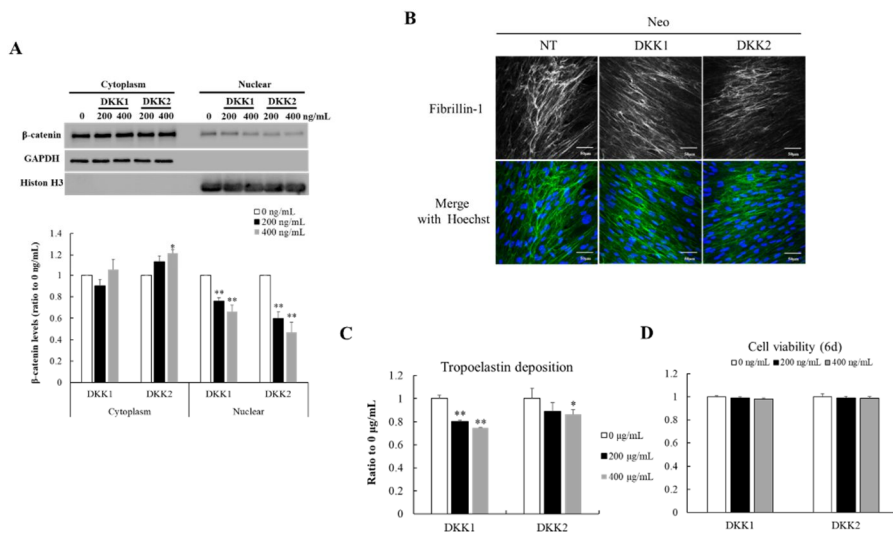


図 3 胎児由来細胞における DKK1 および DKK2 の弾性線維形成への関与

(4) 老齢由来細胞における DKK1 および DKK2 の弾性線維形成への関与 (図 4)

(3)と同様に老齢由来皮膚線維芽細胞における DKK の弾性線維形成への関与を検討した。老齢由来細胞では、DKK1 および DKK2 添加による  $\beta$ -カテニンの核移行の抑制は認められなかった(A)。ELISA の結果から、DKK1 処置により弾性線維の減少が濃度依存的に観察されたが、DKK2 処置では高濃度時のみでその減少が認められた(C)。尚、DKK 添加による細胞毒性は、添加 6 日間で認められなかった(D)。

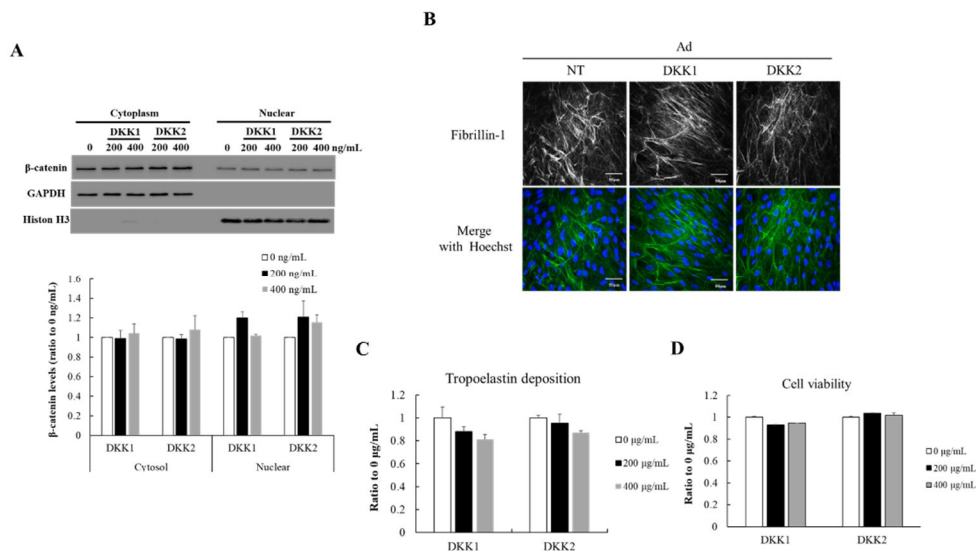


図 4 老齢由来細胞における DKK1 および DKK2 の弾性線維形成への関与

(5) DKK による弾性線維構成遺伝子発現

DKK 処置による弾性線維形成の低下の要因を検討するため、DKK 処理時における遺伝子発現を定量 PCR 法で解析した。胎児由来、老齢由来細胞共に DKK 添加による弾性線維関連遺伝子発現の低下は認められなかった。

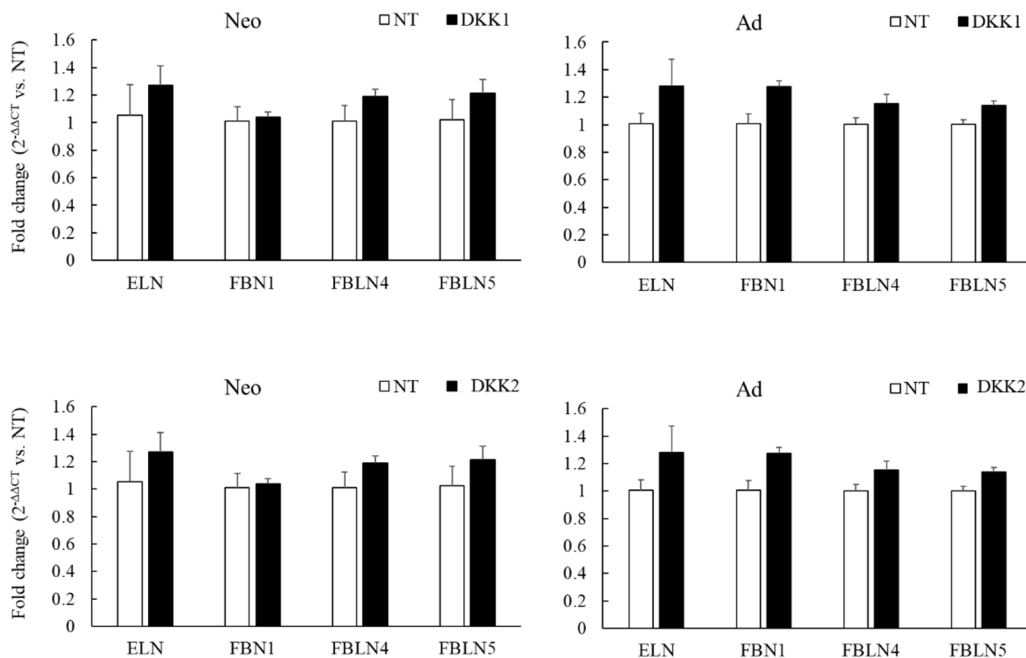


図 5 DKK による弾性線維構成遺伝子発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高田優毅、岩坪由香、田島楓、相良 篤信、堀内 正子、湯本哲郎、里史明
2. 発表標題 弾性線維形成におけるCOL8A1の役割
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩坪由香、飯塚二葉、田島楓、高田優毅、相良 篤信、堀内 正子、湯本哲郎、里史明
2. 発表標題 弾性線維形成におけるWntシグナルの関与
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩坪由香、田島楓、酒井寛泰、湯本哲郎、里史明
2. 発表標題 弾性線維の崩壊による細胞応答性の変動
3. 学会等名 第41回日本分子生物学学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩坪由香、安藤祐介、田島楓、酒井寛泰、湯本哲郎、里史明
2. 発表標題 弾性線維分解に伴う肺線維芽細胞の細胞応答性の変動解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田島楓、安藤祐介、兼平暖、酒井寛泰、湯本哲郎、里史明
2. 発表標題 乳がん細胞浸潤におけるCol8a1の役割
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------