

機関番号：34417

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390086

研究課題名（和文） 弾性線維形成の分子機構の研究

研究課題名（英文） Molecular mechanism of elastic fiber assembly.

研究代表者

中邨智之 (TOMOYUKI NAKAMURA)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：20362527

研究成果の概要（和文）：

弾性線維は、伸び縮みする臓器・組織（動脈・肺・皮膚など）に多くあって、その弾性を担う細胞外線維である。老化による動脈中膜の硬化、肺気腫、皮膚のたるみなどは弾性線維の劣化・断裂によるものであり、弾性線維再生に向けて弾性線維形成機構の解明は重要な課題である。これまでに弾性線維形成に必須の分泌タンパク質 Fibulin-5 を発見し、その機能を報告してきた。本研究では、Fibulin-5 近縁分子である Fibulin-4 のコンディショナルノックアウトマウスを作成し、平滑筋特異的 Fibulin-4 欠損が動脈弾性板の形成不全と大動脈瘤を来すことを見出した。Fibulin-4 はリシルオキシダーゼおよびトロポエラスチンと結合してこれらを橋渡しする役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Elastic fiber is abundant in elastic tissues such as arteries, lungs and skin, and provides elasticity to these tissues. Aging-associated elastic fiber degeneration or fragmentation causes arteriosclerosis, emphysema and loose skin. It is important to uncover the molecular mechanism of elastogenesis for the future elastic fiber regeneration therapy. We previously reported that a secreted protein Fibulin-5 is essential for elastic fiber assembly. In this study, we studied the role for Fibulin-4, a member of the same protein family, in elastogenesis. Smooth muscle-specific knockout of the mouse Fbln4 gene resulted in degenerated elastic laminae in aortae and aneurysm. We also found that Fibulin-4 directly interacts with lysyl oxidase and tropoelastin, thereby tethering the enzyme to its substrate.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医科学一般・生体分子医学

キーワード：細胞外マトリックス 弾性線維

1. 研究開始当初の背景

弾性線維は、伸び縮みする組織（動脈・肺・皮膚など）に多くあって、その弾性を担う細

胞外線維である。特に動脈では、脈圧を吸収するために弾性線維は弾性板という構造を作り重量の半分を占めている。老化によって

心疾患の予後悪化因子となる動脈中膜硬化がおこるが、その多くは弾性線維の劣化・断裂が原因である。高齢者の主要疾患である肺気腫も弾性線維の劣化・断裂が直接原因であると考えられてきているため、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。しかしそのために必要な弾性線維形成の分子メカニズムの理解は遅れている。弾性線維はエラスチンタンパクがマイクロフィブリルに沿って線維状にクロスリンクされることでできるが、それがどのようなプロセスを経ておこるのか、ほとんどわかっていない。

我々はマウス発生期心臓より Fibulin-5 (別名 DANCE) という分泌タンパクをクローニングし (Nakamura T et al, *J Biol Chem* 274:22476-83, 1999)、その遺伝子欠損マウスを作成したところ、全身の弾性線維がばらばらになっていることを見出した (Nakamura T et al, *Nature* 415:171-75, 2002)。Fibulin-5 遺伝子欠損マウスの表現型はヒトの老化に非常に類似しており、皮膚は弾性が消失したのみ、肺気腫を来し、動脈は硬化して蛇行していた。これは弾性線維の形成異常によるものであり、Fibulin-5 は弾性線維の形成に必須のタンパクであるといえる。

また我々は初めて無血清線維芽細胞培養での弾性線維形成系を作成し、Fibulin-5 が強力な弾性線維形成誘導活性を持つことを見出した (Hirai M et al, *J Cell Biol* 176:1061-71, 2007)。Fibulin-5 はシグナル分子としてではなく、エラスチンやマイクロフィブリルをオーガナイズするオーガナイザーとして働いていると考えられた。これらのデータは Fibulin-5 が弾性線維再生にむけて重要な標的分子であることを示すと同時に、この弾性線維形成系を用いて他の弾性線維形成制御分子を同定することが可能になった。

一方、Fibulin-5 によく似たファミリー分子である Fibulin-4 の遺伝子欠損マウスは、弾性線維がほとんどできず、生後すぐに動脈破裂のため死亡することが申請者の参加する共同研究により明らかとなった (McLaughlin PJ et al, *Mol Cell Biol* 26:1700-9, 2006)。すなわち、Fibulin-4 は Fibulin-5 とは別のメカニズムによって弾性線維形成 (および動脈の形成) に必須の働きをしていると考えられる。Fibulin-5 と Fibulin-4 の作用様式の違いを明らかにすることは弾性線維形成の分子機構の理解を大きく前進させることにつながる。

2. 研究の目的

弾性線維形成に必須の 2 つの分子、Fibulin-4, 5 の働きの違いを *in vivo*, *in vitro* 両面から明らかにすることを目的とする。また、Fibulin-5 に結合することを前に報告し

た分子 LTBP-2 の生体内での役割も研究する。この目的のため、具体的には以下の研究項目を設定した。

(1) 生体内での Fibulin-4 の機能は何か

弾性線維は生後数週間でも最も発達・成熟するが、Fibulin-4 遺伝子欠損マウスは生後すぐに死亡するため、Fibulin-4 の弾性線維形成における役割はまだ解明できていない。また、動脈が破裂するという表現型からは、Fibulin-4 が弾性線維だけでなく他の線維の形成にも関与していることが予想される。この問題を、Fibulin-4 コンディショナルノックアウトマウスを用いて研究する。

(2) Fibulin-5 と Fibulin-4 の結合分子の違い、新規結合分子の同定とその機能の研究

Fibulin-5 と Fibulin-4 はドメイン構造が同じファミリー分子であるが、それぞれの遺伝子欠損マウスの表現型からは、どちらも弾性線維形成に必須であり、なおかつ作用機序が異なっていると考えられる。この理由を、結合分子の違いから探求する。既知の弾性線維構成分子との結合の違いを調べるだけでなく、Fibulin-5 と Fibulin-4 それぞれに結合する分子を同定し、その弾性線維形成における機能を調べる。

(3) Fibulin-5 結合タンパク LTBP-2 の生体内での機能

最近、我々は LTBP-2 という分泌タンパクが Fibulin-5 に結合し、Fibulin-5 のマイクロフィブリルへの沈着を調節していることを見出した (Hirai M et al, *EMBO J* 26:3283-95, 2007)。LTBP-2 遺伝子欠損マウスは発生初期に致死であるため、生体内での弾性線維形成における役割は不明である。LTBP-2 コンディショナルノックアウトマウスを用いて、LTBP-2 の生体内における役割を研究する。

3. 研究の方法

(1) Fibulin-4 コンディショナルノックアウトマウスの作成と解析

マウス *Fbln4* 遺伝子の exon 2 を loxP 配列ではさんだ flox コンストラクトを作成し、ES 細胞での相同組換え、キメラマウス作成を経て *Fbln4* flox マウスを得た。このマウスを平滑筋特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Sm22-Cre マウスと掛け合わせ、平滑筋特異的に *Fbln4* 遺伝子を欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作成した。

マウスの解析は、動脈造影の他、Elastic van Gieson 染色による光学顕微鏡観察、タンニン酸染色による透過電子顕微鏡観察によって弾性線維の形成の度合い、弾性線維の性状の評価を行った。さらに摘出大動脈について内圧-外径曲線を調べることにより、大動脈のコンプライアンスを評価した。

(2) Fibulin-4, 5 に結合する分子の探索

弾性線維形成に関与する、あるいは弾性線

維と共局在する分子をクローニングし、293T細胞で発現させたこれらの分子と Fibulin-4, 5の結合を *in vitro binding assay* により調べた。結合する分子については、その結合ドメインを詳しく調べた。

(3) LTBP-2 コンディショナルノックアウトマウスの作成

過去に LTBP-2 ノックアウトマウスが exon 1 を除去して *pgk-neo* を挿入することにより作成され、早期胎生致死であると報告されている。同じ exon 1 を *flox* ではさんだ LTBP-2 *flox* マウスを作成し、いろいろな Cre マウスと掛け合わせてコンディショナルノックアウトマウスを作成した。

4. 研究成果

Fibulin-4 発現量による表現型の違い

Fibulin-4 *flox/flox*, *Sm22-Cre(+)*, *flox/null*, *Cre(+)*の大動脈における Fibulin-4 mRNA 量はそれぞれ野生型の 18.5%と 8.4%であった。50%の発現量 (+/*null*) では表現型を認めなかった。18.5%の発現量では生下時は大動脈の弾性板は正常であるが、生後14日目以降は弾性板の形成異常を来した。成体での大動脈硬化を認めた。さらに 8.4%の発現量では、生下時より大動脈弾性板の形成異常を認めた。成体では大動脈が硬いだけでなく、全例で上行大動脈瘤を発症した。すなわち、胎生期における Fibulin-4 の最低必要量は野生型の 8.4%と 18.5%の間であり、生後の最低必要量は野生型の 18.5%と 50%の間にあるということになる。

また、Fibulin-5 遺伝子欠損マウスでは同様に大動脈の硬化を来すものの大動脈瘤を来さないことから、Fibulin-4 は弾性線維形成以外の役割があるものと考えられた。

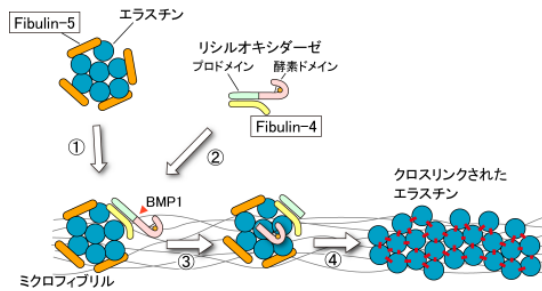
Fibulin-4 とリシルオキシダーゼの結合

弾性線維形成に必要な因子のうち、エラスチンをクロスリンクする酵素であるリシルオキシダーゼが Fibulin-4 と特異的に結合し、Fibulin-5 とは結合しないことを見出した。Fibulin-4 のアミノ末端ドメインとリシルオキシダーゼのアミノ末端側にあるプロペプチドがこの結合に必要な十分であった。Fibulin-4 はトロポエラスチンとも結合し、細胞培養において作られる細胞外マトリックスでも、Fibulin-4 とエラスチンとリシルオキシダーゼは共局在していた。

Fibulin-4 の弾性線維形成における役割

トロポエラスチンを固相化したマイクロタイタープレートに全長リシルオキシダーゼを入れてもほとんど結合しなかった。しかしそこにリコンビナント Fibulin-4 タンパク質を共存させておくとリシルオキシダーゼはトロポエラスチンに結合した。すなわち、Fibulin-4 はトロポエラスチンとリシルオキシダーゼの両方に結合することにより、両者

の橋渡しをする（言いかえると、基質であるトロポエラスチンにリシルオキシダーゼ酵素をリクルートする）役割があると考えられた。（下図）。



LTBP-2 遺伝子欠損マウスは胎生期致死ではない

LTBP-2 *flox* マウスを生殖細胞に Cre を発現するマウスと掛け合わせるにより、全身で LTBP-2 を欠損するマウスを作成した。以前の報告とは異なり、これらのマウスは問題なく生まれ、成長した。RT-PCR および Western blot により LTBP-2 の発現が無くなっていることは確認できたので、以前の報告には何か問題があったのではないかと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

1. Otani H, Yoshioka K, Nishikawa H, Inagaki C, Nakamura T: Involvement of Protein Kinase C and RhoA in Protease-Activated Receptor 1-Mediated F-Actin Reorganization and Cell Growth in Rat Cardiomyocytes. *J Pharmacol Sci* 115:135-43, 2011. 査読有

2. Ohara H, Akatsuka S, Nagai H, Liu Y, Jiang L, Okazaki Y, Yamashita Y, Nakamura T, Toyokuni S: Stage-specific roles of fibulin-5 during oxidative stress-induced renal carcinogenesis in rats. *Free Radic Res* 45:211-20, 2011. 査読有

3. Horie T, Ono K, Horiguchi M, Nishi H, Nakamura T, Nagao K, Kinoshita M, Kuwabara Y, Marusawa H, Iwanaga Y, Hasegawa K, Yokode M, Kimura T, Kita T: MicroRNA-33 encoded by an intron of *Srebp2* regulates HDL in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:17321-6, 2010. 査読有

4. Lu J, Gong D, Choong SY, Xu H, Chan YK,

Chen X, Fitzpatrick S, Glyn-Jones S, Zhang S, Nakamura T, Ruggiero K, Obolonkin V, Poppitt SD, Phillips AR, Cooper GJ: Copper(II)-selective chelation improves function and antioxidant defences in cardiovascular tissues of rats as a model of diabetes: comparisons between triethylenetetramine and three less copper-selective transition-metal- targeted treatments. *Diabetologia* 53:1217-26, 2010. 査読有

5. 中邨智之:「血管の老化と細胞外マトリックス」*血管医学* 11 (2), 149-154, 2010年 査読無

6. Horiguchi M, Inoue T, Ohbayashi T, Hirai M, Noda K, Marmorstein LY, Yabe D, Takagi K, Akama TO, Kita T, Kimura T, Nakamura T: Fibulin-4 conducts proper elastogenesis via interaction with cross-linking enzyme lysyl oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:19029-34, 2009. 査読有

7. Ikeda M, Naitoh M, Kubota H, Ishiko T, Yoshikawa K, Yamawaki S, Kurokawa M, Utani A, Nakamura T, Nagata K, Suzuki S: Elastic fiber assembly is disrupted by excessive accumulation of chondroitin sulfate in the human dermal fibrotic disease, keloid. *Biochem Biophys Res Commun* 390:1221-8, 2009. 査読有

8. Xiong ZM, Kitagawa K, Nishiuchi Y, Kimura T, Nakamura T, Inagaki C: Acetyl-Ile-Gly-Leu protects neurons from A β (1-42) induced toxicity in vitro and in V337M human tau-expressing mice. *Life Sci* 84(5-6):132-8, 2009. 査読有

9. 中邨智之:「弾性線維形成におけるファイブリン (fibulin) ファミリータンパク質の役割」*生化学* 81 (1), 38-42, 2009年 査読無

[学会発表] (計 18 件)

1. 井上唯史、大林徹也、堀口真仁、赤間智也、中邨智之: The role of LTBP-2 in eye development. BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会、第 83 回日本生化学会) (神戸、神戸国際会議場、2010 年 12 月 10 日)

2. 塩田亜樹、横山詩子、加藤優子、麻生俊英、青木浩樹、中邨智之、南沢亨、石川義弘:「ブ

ロスタグランディンE受容体EP4シグナルによる弾性線維形成の制御」BMB2010 (第33回日本分子生物学会、第83回日本生化学会) (神戸、神戸国際会議場、2010年12月8日)

3. 野田和男、高木恭子、井上唯史、赤間智也、鈴木茂彦、中邨智之:「弾性線維形成におけるLTBP4の役割」BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会、第 83 回日本生化学会) (神戸、神戸国際会議場、2010 年 12 月 8 日)

4. 中邨智之: The essential role for LTBP-4 in elastic fiber assembly. 第 8 回 日本エラスチン研究会 (東京、アルカディア市ヶ谷、2010 年 12 月 4 日)

5. Nakamura, T.: The roles for LTBP2 and 4 in the extracellular matrix assembly. Les Treilles Meeting / Extracellular Matrix as a Structural Mediator of Morphological and Homeostatic Information (October 4 – 8, 2010, Tourtour, France).

6. Nakamura, T.: The role of LTBP2 in the development of ciliary zonule. ELASTIN 2010 (The 6th European Elastin Meeting) (June 28 - July 2, 2010, Maratea, Italy).

7. Horiguchi, M., Hirai, M., Kita, T., Kimura, T., Nakamura, T.: The role of fibulins in elastogenesis. 第 74 回日本循環器学会学術集会 (京都、京都国際会館、2010 年 3 月 5 日)

8. 中邨智之: The role of elastic fibers in keeping the compliance of cardiovascular system: Can we regenerate them? 第 74 回日本循環器学会学術集会 トピック (京都、京都国際会館、2010 年 3 月 5 日)

9. 中邨智之:「血管弾性を生み出す弾性板の形成機構」*Vascular Protection Update* ～基礎から臨床への応用～ (東京、アルカディア市ヶ谷、2010 年 2 月 24 日)

10. 堀口真仁、井上唯史、野田和男、中邨智之:「マウス大動脈の弾性線維形成におけるFibulinの役割」第 82 回日本生化学会 (神戸、神戸国際会議場、2009 年 10 月 22 日)

11. 井上唯史、大林徹也、赤間智也、中邨智之:「LTBP-2 遺伝子欠損マウスは緑内障を発症する」第 82 回日本生化学会(神戸、神戸国際会議場、2009 年 10 月 24 日)

12. 赤間智也、北山和子、福田道子、中邨智之:「斑状角膜ジストロフィータイプ II に見られる変異型硫酸転移酵素のケラタン硫酸合成活性の測定」第 82 回日本生化学会(神戸、神戸国際会議場、2009 年 10 月 24 日)

13. 中邨智之:「血管の伸縮性を生み出すしくみ」脳血管シンポジウム(東京、コクヨホール、2009 年 9 月 12 日)

14. Nakamura, T.: What conditional knockout mice tell us: Fibulin-4 and LTBP2. Gordon Research Conference on Elastin and Elastic Fiber (July 26 - 31, 2009, Biddeford, U.S.A.).

15. Horiguchi, M., Inoue, T., Ohbayashi, T., Hirai, M., Noda, K., Marmorstein, L.Y., Akama, T.O., Kita, T., Kimura, T., Nakamura, T.: The role of FIBULINs in elastogenesis. Poster at Gordon Research Conference on Elastin and Elastic Fiber (July 26 - 31, 2009, Biddeford, U.S.A.).

16. 赤間智也、中邨智之:「弾性線維形成における DANCE/fibulin-5 の役割」光老化研究会(大阪、梅田スカイビル、2009 年 7 月 25 日)

17. Akama, T., Nakamura, T.: Essential role of b3GnT7 for efficient KS-GAG production in cultured cells. 8th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium (June 4 - 7, 2009, Yokosuka, Shonan Village Center, Japan).

18. Horiguchi, M., Inoue, T., Noda, K., Nakamura, T.: The role of fibulins in elastic fiber assembly of mouse aorta. 8th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium (June 4 - 7, 2009, Yokosuka, Shonan Village Center, Japan).

[図書] (計 1 件)

中邨智之:「大動脈疾患をきたす遺伝子改変動物」 series モデル動物利用マニュアル 疾患モデルの作成と利用 - 循環器疾患 p161-165 (484 頁中) (株) エル・アイ・シー、2010 年

[産業財産権]
○出願状況 (計 5 件)

1. 名称:弾性線維の再生方法およびスクリーニング方法
発明者:中邨智之、高木恭子、高山喜好
権利者:関西医科大学、ロート製薬株式会社
種類:特許
番号:13/015,871
出願年月日:2011 年 1 月 28 日
国内外の別:国外(米国)

2. 名称:DANCE タンパク質含有組織再生用基材
発明者:坂元悠紀、松田晶二郎、鈴木茂彦、内藤素子、石河利広、中邨智之
権利者:グンゼ株式会社、京都大学、関西医科大学
種類:特許
番号:特願 2010-61551
出願年月日:2010 年 3 月 17 日
国内外の別:国内

3. 名称:DANCE タンパク質含有徐放基材及び該徐放基材の製造方法
発明者:坂元悠紀、松田晶二郎、鈴木茂彦、内藤素子、石河利広、中邨智之
権利者:グンゼ株式会社、京都大学、関西医科大学
種類:特許
番号:特願 2010-61517
出願年月日:2010 年 3 月 17 日
国内外の別:国内

4. 名称:DANCE タンパク質溶液
発明者:鈴木茂彦、内藤素子、中邨智之、坂元悠紀、松田晶二郎
権利者:グンゼ株式会社、京都大学、関西医科大学
種類:特許
番号:特願 2010-61468
出願年月日:2010 年 3 月 17 日
国内外の別:国内

5. 名称:弾性線維再生剤、弾性線維の再生方法およびスクリーニング方法
発明者:中邨智之、高木恭子、高山喜好
権利者:関西医科大学、ロート製薬株式会社
種類:特許
番号:特願 2009-173172
出願年月日:2009 年 7 月 24 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 1 件）

名称：切断型 DANCE、DANCE 複合体、及びこれらを用いる方法

発明者：中邨智之、平井希俊

権利者：京都大学

種類：特許

番号：特許第 4452840 号

取得年月日：2010 年 2 月 12 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

中邨智之 (TOMOYUKI NAKAMURA)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：20362527