

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19361

研究課題名（和文）弾性線維の再生技術の開発

研究課題名（英文）Development of Elastic Fiber Regeneration Method

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、弾性線維を再生する方法は知られていない。本研究では、ヒト皮膚線維芽細胞を用いた弾性線維アッセイ系とsiRNAライブラリーを用いて、弾性線維再生薬の標的分子候補を探索し、数十個の標的分子候補を同定した。

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、これまでにない弾性線維再生薬の標的となりうる候補分子を複数見いだした。

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 there is no known method to regenerate elastic fibers. In this study, we searched for candidate target molecules for elastic fiber regenerative agents using an elastic fiber assay system with human skin fibroblasts and an siRNA library, and identified dozens of candidate target molecules.

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

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

加齢に伴って体中の組織の伸縮性が失われることにより、皮膚のたるみだけでなく、動脈中膜硬化や肺気腫などの重要な老化関連疾患がひきおこされる。これらは弾性線維という伸縮性をもつ細胞外マトリックスの分解・劣化が直接原因であるため、弾性線維の分解・劣化予防と再生は高齢化社会における重要な課題である。一般に弾性線維のターンオーバーは極めて遅く、特に加齢組織では弾性線維の再生はおこらない。弾性線維の再生を目指すためには、弾性線維の形成機構を知る必要がある。

弾性線維形成には、マイクロフィブリル線維束形成 エラスチンのマイクロフィブリルへの沈着 エラスチンどうしの架橋 といったプロセスがある。我々は、このプロセスに必須の分泌タンパク質 Fibulin-5 を同定した (Nature 2002, J Cell Biol 2007) のを皮切りに、LTBP-2 (プロセス)、LTBP-4 (プロセス)、Fibulin-4 (プロセス) といった各プロセスに必須の分泌タンパク質、すなわち弾性線維形成因子を同定・機能解明してきた (EMBO J 2007, Proc Natl Acad Sci USA 2009, 2013, Hum Mol Genet 2014, Sci Rep 2017, Sci Adv 2020 など) しかしこれら分子量の大きなタンパク質そのものは医薬として適しておらず、弾性線維再生を目的とした小分子・抗体医薬の標的となるような分子でもない(タンパク質どうしの結合を阻害すると逆に弾性線維形成が低下するため)。

### 2. 研究の目的

Fibulin-5 は偶然発見された分子であり、他の弾性線維形成因子も Fibulin-5 のファミリー分子であったり Fibulin-5 への結合をもとに同定してきたので、弾性線維形成に影響する分子は他にもあると想定される。また分子量の大きなリコンビナントタンパク質そのものを医薬とするのはハードルが高い。本研究では、オリジナルの弾性線維形成評価系と siRNA ライブラリーによるスクリーニングを用いて、発現抑制が弾性線維形成に影響する遺伝子を網羅的に検索・同定し、その遺伝子産物(タンパク質)の機能を明らかにすることを目的とする。特に発現抑制が弾性線維形成を促進するタンパク質は弾性線維再生のための標的分子となることが期待できる。

### 3. 研究の方法

ヒト皮膚線維芽細胞を 96 well プレートで培養し、弾性線維を形成できる条件をまず決定した。またこの細胞に Thermo 社の siRNA を用いて効率よく遺伝子ノックダウンができることを確認した。1万強の遺伝子に対する siRNA ライブラリーである Thermo 社 Silencer Select Druggable Genome siRNA library + Extension Set を用いてスクリーニングを開始した。弾性線維を形成させた後、抗エラスチン抗体で染色し、蛍光イメージングにより「発現抑制が弾性線維形成に影響を与える」遺伝子を探索した。蛍光イメージングによるハイコンテツスクリーニング (ArrayScan VTI) およびキーエンスオールインワン顕微鏡 BZ-X810 を用いた定量的他、肉眼による線維の形状観察も行った。

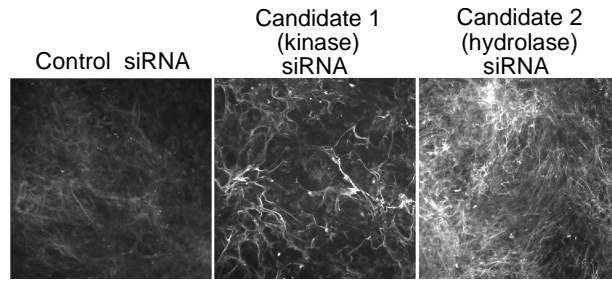
発現抑制により弾性線維形成が増えた遺伝子については、順次 24 well プレートサイズで低血清・高血清の異なる条件下でヒト皮膚線維芽細胞のノックダウン実験を行い、同様の結果が再現されるかどうかを確認した。

### 4. 研究成果

1万強の "Druggable Genome" 遺伝子それぞれに3種類 (A, B, C) の siRNA が設定されているが、現在 A セットのスクリーニングがほぼ終了したところである。弾性線維再生薬の標的分子候補として、「発現抑制が弾性線維形成を促進する」分子が最も注目されるところであるが、これまでに約 40 個のそのような標的分子候補を見いだした。うち 2 例を図に示す。

siRNA によるノックダウン実験では一般にオフターゲット効果がみられるため、同じ遺伝子に対する複数の siRNA で同じ結果が得られること、標的遺伝子の cDNA 過剰発現などにより siRNA ノックダウンの効果がキャンセルされることを確認する必要がある (レスキュー実験)。これが

ら B, C セットの siRNA を用いたスクリーニングを行い、複数セットの siRNA で弾性線維形成促進がおこるかどうかを調べる予定である。また標的遺伝子の cDNA をクローニングし、レスキュー実験の準備を行っている。市販の阻害薬、遮断薬がある標的分子候補に対してはこれらで弾性線維形成が促進されるかどうか、細胞培養で確認する。



図．培養での ECM 形成アッセイ（抗エラスチン抗体での蛍光免疫染色）．ノックダウンすると弾性線維が著明に増える遺伝子（弾性線維形成抑制因子の候補）2 例を示す．形成される弾性線維の性状（太さ・密度）は異なる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyawaki Norihisa, Toyota Toshiaki, Higasa Koichiro, Nakamura Tomoyuki, Furukawa Yutaka	4. 巻 27
2. 論文標題 Successful pregnancy and delivery in a young-onset hypertrophic cardiomyopathy patient with a novel doublet-base substitution in the MYH7 gene	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology Cases	6. 最初と最後の頁 8~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jccase.2022.09.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Terajima Masahiko, Taga Yuki, Nakamura Tomoyuki, Guo Hou-Fu, Kayashima Yukako, Maeda-Smithies Nobuyo, Parag-Sharma Kshitij, Kim Jeong Seon, Amelio Antonio L., Mizuno Kazunori, Kurie Jonathan M., Yamauchi Mitsuo	4. 巻 12
2. 論文標題 Lysyl hydroxylase 2 mediated collagen post-translational modifications and functional outcomes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-18165-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Makino T, Kagoyama K, Murabe C, Nakamura T, Shimizu T	4. 巻 101
2. 論文標題 Association of Development of Solar Elastosis with Increased Expression of Fibrillin-1, LTBP-2 and Fibulin-4 in Combination with Decreased Expression of LTBP-4	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Dermato Venereologica	6. 最初と最後の頁 adv00372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2340/00015555-3738	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中邨智之
2. 発表標題 ECM架橋の新たな調節機構 -Lysyl Oxidase活性化におけるFibulin-4の役割-
3. 学会等名 第95回日本生化学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中邨智之
2. 発表標題 弾性線維の形成と再生の分子メカニズム –弾性線維形成タンパク質の役割と加齢皮膚での変化–
3. 学会等名 第73回日本皮膚科学会中部支部学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中邨智之
2. 発表標題 皮膚老化に伴う弾性線維再生能喪失のしくみ –弾性線維形成因子のはたらきと加齢による発現変化–
3. 学会等名 第22回日本抗加齢医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022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
---------	---------