

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670147

研究課題名(和文) 弾性線維再生の研究

研究課題名(英文) Regeneration of Elastic Fiber

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：体の組織の伸縮性を担うのは弾性線維という細胞外線維であり、老化に伴う弾性線維の劣化が皮膚のたるみ、肺気腫、動脈中膜の硬化などの直接原因となる。弾性線維のターンオーバーは非常に遅いため、弾性線維の再生はチャレンジングな課題である。これまで申請者は弾性線維の形成に必須の分泌タンパクを同定してきただけでなく、それらのうちで細胞培養に加えると弾性線維形成を強力に誘導するものを見出した。本研究では、細胞外マトリックスの力学的特性を評価する系を確立し、これら弾性線維形成促進因子を組み合わせて、in vitro、in vivoでの弾性線維再生に必要な条件を見出すことを目指した。

研究成果の概要(英文)：Elastic fiber is an extracellular matrix component that plays a key role in tissue elasticity. Degradation of elastic fibers directly causes skin looseness, emphysema, and arteriosclerosis. The turnover rate of elastic fiber is extremely slow, and there have been no method to regenerate elastic fibers so far. We have identified several proteins that play crucial roles in elastogenesis, and notably one of them could induce elastogenesis in cell culture. In this study, we engineered an assay system to measure mechanical characteristics of the extracellular matrix produced by cultured cells in order to analyze how elastogenic factors affect the elasticity of the matrix, with the goal of finding optimal condition for elastic fiber regeneration.

研究分野：細胞外マトリックス医学

キーワード：細胞外マトリックス

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線維である。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。

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 (*J Biol Chem* 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 (*Nature* 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てたるみ、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。

Fibulin-5 を手がかりにして、我々は **Fibulin-5** 近縁分子 **Fibulin-4**、**Fibulin-5** 結合タンパク **LTBP-2** などが弾性線維形成プロセス (=エラスチンのマイクロフィブリルに沿った沈着とクロスリンク) をオーガナイズする機構を細胞培養系と遺伝子改変マウスを用いて明らかにしてきた (*Mol Cell Biol* 2006, *EMBO J* 2007, *J Cell Biol* 2007, *Proc Natl Acad Sci USA* 2009)。さらに最近 **Fibulin-5** 結合タンパク **LTBP-4** が細胞培養系において **Fibulin-5** とともに強い弾性線維形成誘導活性を持つことを見出し (特許出願済、*Proc Natl Acad Sci USA* 2013)、弾性線維再生を目指す本研究の提案に至った。

2. 研究の目的

弾性線維のターンオーバーは非常に遅いため、弾性線維の再生はチャレンジングな課題である。これまで我々は弾性線維の形成に必須の分泌タンパクを同定してきただけでなく、それらのうちで細胞培養に加えると弾性線維形成を強力に誘導するものを見出した。本研究では、細胞外マトリックスの力学的特性を評価する系を確立し、これら弾性線維形成促進因子を組み合わせて、*in vitro*、*in vivo* での弾性線維再生に必要な条件を見出すことを目指す。

(1) 細胞培養で作られる細胞外マトリックスの弾性測定系開発

ヒト線維芽細胞培養で作られた弾性線維の定量は、これまで①抗エラスチン抗体で蛍光免疫染色された線維のイメージング解析 (*ArrayScan*)、②放射性ラベルされた **Valine** 存在下で培養して作られた弾性線維 (アルカリ不溶画分) の定量、を行ってきたが、これらは弾性線維の機能を測定しているわけではない。本研究では、細胞培養で作られた弾性線維の力学的特性を測定

する方法を開発する。

(2) 弾性線維形成抑制因子としての **EGFL7** の評価

最近、**EGFL7** という分泌タンパク質の過剰発現マウスが弾性線維形成不全をおこすことが報告された。**EGFL7** はエラスチン mRNA 発現を抑制するとされ、**EGFL7** 受容体の存在が想定される。これが正しければ抗 **EGFL7** 抗体などにより **EGFL7** の機能を阻害することが弾性線維再生法として有望であるため、**EGFL7** の機能を評価し、もし弾性線維形成抑制因子としての作用が確認できれば、機能阻害抗体を作成する。

(3) 薬剤誘導性 **Fibulin-5**、**LTBP-4** 過剰発現マウスの作成と解析

分泌タンパク質 **Fibulin-5** と **LTBP-4** が生体内において弾性線維形成に必須であること、*in vitro* (細胞培養系) においてリコンビナント **Fibulin-5** と **LTBP-4** が弾性線維形成を促進することを我々は報告してきた。しかしこれらのタンパク質を過剰に産生すると弾性線維も過剰に形成されるのかどうかは不明である。弾性線維形成因子による生体内での弾性線維再生の可能性を探るために、タモキシフェンで **Fibulin-5**、**LTBP-4** の発現が誘導されるマウスを作成し、その弾性線維形成を解析する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養で作られる細胞外マトリックスの弾性測定系開発

ヒト線維芽細胞培養を温度によって接着性の変わるセルシード社のプレートに蒔く。細胞外マトリックスが作られる期間 (2 週間) 培養し、アクチノマイシン D によって細胞のアクチン重合を阻害した後、温度を下げて細胞マトリックス (+細胞) シートを作成する。シート中心部に磁性ビーズを置いて下から電磁石によって力を加える。力に応じたビーズの上下方向の変位量をレーザー測距計にて計測する。

(2) 弾性線維形成抑制因子としての **EGFL7** の評価

ヒト皮膚線維芽細胞で **EGFL7** の発現を確認した後、**siRNA** でその発現をなくしたときの弾性線維形成を抗エラスチン抗体、抗 **Fibulin-5** 抗体などで調べる。

(3) 薬剤誘導性 **Fibulin-5**、**LTBP-4** 過剰発現マウスの作成と解析

Rosa26 locus に **CAG promoter-loxP-stuffer-poly A-loxP-cDNA-poly A** (cDNA は **Fibulin-5** または **LTBP-4**) をノックインしたマウスを作成し、これに全身で **CreERT2** (タモキシフェン誘導 **Cre**) が発現するマウスを掛け合わせ、タモキシフェン投与によって **Fibulin-5** または **LTBP-4** が過剰発現するマウスを作る。弾性線維の

過形成がおこるかどうか、組織切片の **Elastica van Gieson** 染色、組織のデスモン量測定などにより評価する。

4. 研究成果

(1) 細胞培養で作られる細胞外マトリックスの弾性測定系開発

ヒト線維芽細胞培養において作られた細胞外マトリックスを細胞とともにシートとして取り出し（温度によって接着性の変わるプレートを使用）、シートに載せた磁気ビーズに磁界を加えて動かし、加えた力とレーザー計測したビーズの変位量のグラフから弾性・粘弾性を定量できる装置を作成した。装置作成と計測は連携研究者の影島の協力を得て行った。

(2) 弾性線維形成抑制因子としての **EGFL7** の評価

ヒト線維芽細胞培養において **EGFL7** のノックダウンを行い、**EGFL7 mRNA** のノックダウン効率が 90%以上であることを確認した。しかしその後の 2 週間の培養で形成された細胞外マトリックスを調べたところ、弾性線維形成を促進することはなかった。従って、**EGFL7** がヒト皮膚線維芽細胞で弾性線維形成を抑制しているとは考えられず、**EGFL7** を標的とした弾性線維再生療法は効果が期待できないと思われた。

(3) 薬剤誘導性 **Fibulin-5**、**LTBP-4** 過剰発現マウスの作成と解析

Fibulin-5 or **LTBP-4** の過剰発現を薬剤誘導できるマウスを作成し、タモキシフェン投与によってこれらタンパク質の発現が数倍に増えることを確認した。しかしこれらのマウスにおいて弾性線維の過剰形成は認めない。弾性線維の形成には上限を決めるシステムが備わっていることを伺わせた。**Stuffer** として用いた **hrGFP** に毒性があるためか、タモキシフェンによる誘導以前に雌のマウスが死亡することが多かったため、現在 **stuffer** を **stop codon x 3** フレームだけに置き換えたマウスを作成している。また、**Fibulin-5** と **LTBP-4** の両方を過剰発現するマウスを作成して解析を続ける予定である。

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. Fanhchaksai K, Okada F, Nagai N, Pothacharoen P, Kongtawelert P, Hatano S, Makino S, Nakamura T, Watanabe H: Host stromal versican is essential for cancer-associated fibroblast function to inhibit cancer growth. *Int J Cancer* 138:630-41, 2016. doi: 10.1002/ijc.29804.

2. Nakasaki M, Hwang Y, Xie Y, Kataria S, Gund R, Hajam EY, Samuel R, George R, Danda D, M J P, Nakamura T, Shen Z, Briggs S, Varghese S, Jamora C: The matrix protein Fibulin-5 is at the interface of tissue stiffness and inflammation in fibrosis. *Nat Commun* 6:8574, 2015. doi: 10.1038/ncomms9574.
3. Noda K, Nakamura T, Komatsu Y: Fibulin-5 deficiency causes developmental defect of premaxillary bone in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 466:585-91, 2015. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.089.
4. Aya R, Ishiko T, Noda K, Yamawaki S, Sakamoto Y, Tomihata K, Katayama Y, Yoshikawa K, Kubota H, Nakamura T, Naitoh M, Suzuki S: Regeneration of elastic fibers by three-dimensional culture on a collagen scaffold and the addition of latent TGF- β binding protein 4 to improve elastic matrix deposition. *Biomaterials* 72:29-37, 2015. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.08.036.
5. Bultmann-Mellin I, Conradi A, Maul AC, Dinger K, Wempe F, Wohl AP, Imhof T, Wunderlich FT, Bunck AC, Nakamura T, Koli K, Bloch W, Ghanem A, Heinz A, von Melchner H, Sengle G, Sterner-Kock A: Modeling autosomal recessive cutis laxa type 1C (ARCL1C) in mice reveals distinct functions of Ltp-4 isoforms. *Dis Model Mech* 8:403-415, 2015. doi: 10.1242/dmm.018960.
6. Endo T, Nakamura J, Sato Y, Asada M, Yamada R, Takase M, Takaori K, Oguchi A, Iguchi T, Higashi AY, Ohbayashi T, Nakamura T, Muso E, Kimura T, Yanagita M. Exploring the origin and limitations of kidney regeneration. *J Pathol* 236:251-263, 2015. doi: 10.1002/path.4514.
7. Inoue T, Ohbayashi T, Fujikawa Y, Yoshida H, Akama TO, Noda K, Horiguchi M, Kameyama K, Hata Y, Takahashi K, Kusumoto K, Nakamura T: Latent TGF β binding protein-2 is essential for the development of ciliary zonule microfibrils. *Hum Mol Genet* 23:5672-82, 2014. doi: 10.1093/hmg/ddu283.
8. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Nakazeki F, Ide Y, Koyama S, Sowa N, Yahagi N, Shimano H, Nakamura T, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K: MicroRNA-33b knock-in

mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (*Srebf1*) exhibit reduced HDL-C *in vivo*. *Sci Rep* 4:5312, 2014. doi: 10.1038/srep05312.

9. Yokoyama U, Minamisawa S, Shioda A, Ishiwata R, Jin MH, Masuda M, Asou T, Sugimoto Y, Aoki H, Nakamura T, Ishikawa Y: Prostaglandin E2 inhibits elastogenesis in the ductus arteriosus via EP4 signaling. *Circulation* 129:487-96, 2014. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.004726.

[学会発表] (計 9 件)

1. 中邨智之: 「TGFβ に依存しない LTBP の機能」 第 12 回日本エラスチン研究会 口頭発表 (アルカディア市ヶ谷、東京、2015 年 12 月 4 日)
2. 中邨智之: 「弾性線維形成因子が関与する多臓器疾患」 第 35 回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会 特別講演 (ホテルエルセラーン大阪、大阪、2015 年 11 月 7 日)
3. Nakamura, T.: TGFβ-independent role of LTBPs in microfibril and elastic fiber assembly, and molecular function of Fibulin-4. Invited talk at Gordon Research Conference on Elastin and Elastic Fiber (July 26 - 31, 2015, University of New England, Biddeford, U.S.A.).
4. 中邨智之: 「動脈の硬さを規定する細胞外マトリックス」 第 47 回日本動脈硬化学会学術集会 Featured Session 動脈硬化研究の新機軸 (仙台国際センター、仙台、2015 年 7 月 9 日)
5. 吉田秀之、藤川雄介、井上唯史、赤間智也、中邨智之: 「LTBP-2 と LTBP-4 は弾性線維形成において重複する機能を有する」 第 47 回日本結合組織学会学術集会 ポスター (アルカディア市ヶ谷、東京、2015 年 5 月 15,16 日)
6. 中邨智之: 「生体の伸縮性を生み出すしくみ ~弾性線維の形成と再生の分子機構~」 東北大学加齢医学研究所招待講演 (東北大学、仙台、2014 年 12 月 16 日)
7. 中邨智之: 「動脈弾性板形成の分子機構」 第 51 回血管研究会 特別講演 (東京医科歯科大学、東京、2014 年 10 月 30 日)
8. 中邨智之: 「生体の伸縮性を生み出すしくみ ~弾性線維の形成と再生の分子機構~」 第 65 回日本皮膚科学会中部支

部学術大会 特別講演 (大阪国際会議場、大阪、2014 年 10 月 25 日)

9. 中邨智之: 「弾性線維の形成と再生の分子機構」 佐島シンポジウム 特別講演 (京都大学、京都、2014 年 10 月 10 日)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 2 件)

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: 特許第 5839814 号

取得年月日: 2015 年 11 月 20 日

国内外の別: 国内

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: 特許第 5769379 号

取得年月日: 2015 年 7 月 3 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www3.kmu.ac.jp/pharmac/>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

影島 賢巳 (KAGESHIMA, Masami)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90251355

楠本 健司 (KUSUMOTO, Kenji)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号: 20161630