

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月7日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05145

研究課題名(和文) 弾性線維の形成と再生の分子機構

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

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) 13,500,000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の生体内でのはたらきを分子レベルで研究し、弾性線維再生の基盤となる知見を得た。

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が、その理由はわかっていない。本研究は、弾性線維がどのようにして作られるのか、そのしくみの一端を明らかにしたものであり、弾性線維再生に必要な基盤的知識となるものである。

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 adult tissues. In this study, we analyzed molecular function of Fibulin-4 and 5, and LTBP-2 and 4, which we have identified as elastogenic proteins, and obtained findings that may lead to elastic fiber regenerative therapy.

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、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)マイ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マイ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。これら弾性線維形成タンパク質の機能を明らかにすることが、弾性線維形成を理解し、その再生を可能にするものと期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究では、主にマイクロフィブリルの形成に弾性線維形成タンパク質がどのように寄与しているのかを明らかにした。これまでに、分泌タンパク質 LTBP-2 (Latent TGF $\beta$ -binding protein 2) の遺伝子欠損マウスを作成し、マイクロフィブリルだけでできている構造体である毛様小帯(目で水晶体を引っ張っている線維の束)が壊れて水晶体脱臼がおこることを我々は報告した(Hum Mol Genet 2014)。しかし、マイクロフィブリルは全身の弾性線維に存在し、LTBP-2は全身のマイクロフィブリルと共同存在しているにも関わらず、なぜ眼にしか表現型があらわれないのかは謎であった。LTBPファミリーは4つあるが、これらのうちどれかがLTBP-2の欠損を補っている、という仮説を検証した。

### 3. 研究の方法

眼ではLTBP-2の欠損を代償できなかったわけであるから、他の組織では発現している眼では発現していないLTBPファミリーメンバーが候補となる。このようなファミリーメンバーをRT-PCRで探し、LTBP-4が候補分子となった。

Ltbp2/4ダブルノックアウト(DKO)マウスを作成し、WTマウス、Ltbp2 KOマウス、Ltbp4 KOマウスと表現型の比較を行った。組織のHE染色に加え、透過電顕、抗Fibrillin-1蛍光免疫染色によりマイクロフィブリル、弾性線維の形成を評価した。

上記マウスからMEF(mouse embryonic fibroblast)細胞を採取・培養し、マイクロフィブリル形成能を評価した。またリコンビナントLTBP-2、LTBP-4がこれらの細胞培養においてマイクロフィブリル形成にどのような影響を与えるかを評価した。

マイクロフィブリル形成においてLTBP-4がLTBP-2と同様の機能を持つのであれば、眼においてもLTBP-4を発現させればLTBP-2欠損を代償できるはずである。そこで、LTBP-4を全身で過剰発現するマウス(CAGプロモーター下にLtbp4 cDNAを発現するコンストラクトをRosa26遺伝子座にノックインしたマウス)を作成し、Ltbp2 KOマウスと掛け合わせ、毛様小帯の形成を比較した。

### 4. 研究成果

Ltbp2/4 DKOマウスは、生後4週間でおよそ半数が死亡したが、Ltbp2 KOマウス、Ltbp4 KOマウスはおよそ10%前後の死亡であり、有意に死亡率が高かった。解剖により、Ltbp2/4 DKOマウスは重度の肺気腫を来していることがわかった。Ltbp2は肺に表現型はなかった。Ltbp4 KOマウスも肺気腫を来したが、その程度はLtbp2/4 DKOより軽く、肺においてはLTBP-2と4が互いに代償できる何らかの機能があることが示唆された。透過電顕により、Ltbp4 KOマウス肺ではマイクロフィブリル上へのエラスチンの沈着異常を認めたが、Ltbp2/4 DKOマウス肺ではそのような像は認めず、より細かく破断した弾性線維を認めた。肺の抗Fibrillin-1抗体による蛍光免疫染色でも、細かく分断されたマイクロフィブリルを認めた。

WTマウス、Ltbp2 KOマウス、Ltbp4 KOマウス、Ltbp2/4 DKOマウスそれぞれからMEFを採取・培養し、抗Fibrillin-1抗体、抗LTBP-2抗体、抗LTBP-4抗体を用いてマイクロフィブリルの蛍光免疫染色を行った。Ltbp2/4 DKO MEFは明らかにマイクロフィブリル形成能が悪く、培地中にリコンビナントLTBP-2またはLTBP-4を添加しておくことでマイクロフィブリル形成能が回復した。従って、マイクロフィブリル形成においてLTBP-2、4のいずれかが必要であることが考えられた。

そこで、Ltbp2 KOマウスの眼に異所性にLTBP-4を発現させたときに、毛様小帯の形成が回復するかどうかを検証した。Ltbp2 KOマウスに全身でLTBP-4を過剰発現するマウスを掛け合わせ、生後8週目に毛様小帯が壊れているかどうかを調べたところ、Ltbp2 KOマウスではほぼ完全に毛様小帯が壊れていたが、LTBP-4過剰発現により毛様小帯は相当程度壊れずに残っていた。

以上より、マイクロフィブリルの形成にはLTBP-2と4が互いにオーバーラップする役割を持っていると考えられた。それがどういう役割であるのかは今後の研究を待つ必要がある。また、肺以外の組織においてLTBP-2と4の両方が無くても弾性線維が形成されたことについても、その理由は明らかになっていない。

本研究の成果は、*Scientific Reports* 7:43714, 2017 に発表された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

### 欧文

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, Alejandro 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- $\beta$  binding protein 2 and 4 have essential overlapping functions in microfibril development. *Sci Rep* 7:43714, 2017. doi: 10.1038/srep43714. 査読有
7. Kageshima M, Maruyama T, Akama T, Nakamura T: Novel magnetic indenter for rheological analysis of thin biological sheet for regenerative medicine. *Rev Sci Instrum* 87:074302, 2016. doi: 10.1063/1.4959268. 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14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 8<sup>th</sup> 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 TGFβ 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).
4. Nakamura T: Latent TGFβ-binding protein 2 is essential for the stable structure of ciliary zonule microfibrils. Invited talk at ISER2016 (XXII Biennial Meeting of the International Society for Eye Research, September 25 – 29, 2016, Keio Plaza Hotel, Tokyo).

#### 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)
7. Nakamura T: Molecular mechanism of elastic fiber assembly. The 17<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Photoaging Research 第 17 回光老化研究会 Educational Lecture (神戸臨床研究情報センター、2016 年 8 月 20 日)
8. 中邨智之: 「マイクロフィブリルと弾性線維の形成機構」第 48 回日本結合組織学会学術大会 シンポジウム(長崎大学、2016 年 6 月 24 日~25 日)
9. 中邨智之: 「弾性線維の形成と再生の分子機構 ~弾性線維と皮膚疾患の関わり~」第 115 回日本皮膚科学会総会 シンポジウム(京都国際会館、2016 年 6 月 3 日~5 日)
10. 中邨智之: 「毛様小帯マイクロフィブリルの形成における LTBP-2 の役割」第 120 回 日本眼科学会総会 シンポジウム(仙台国際センター、仙台、2016 年 4 月 7~10 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)

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。