

令和元年6月7日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15749

研究課題名（和文）bFGFとの結合を介するLTBP-2の創傷治癒における機能的役割の解明

研究課題名（英文）Role of LTBP-2 in wound healing

研究代表者

野田 和男（NODA, Kazuo）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50633161

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：皮膚のキズあとが目立つのは、キズが治る過程の異常反応と考えられる。皮膚のキズと同様な反応が肺や心臓、肝臓、腎臓に起こると、臓器不全になる。これらの病態は「線維化」と呼ばれるが、その原因はわかっていない。本研究では、「線維化」に関わる可能性がある分子として、LTBP-2分子に着目して研究を行なった。LTBP-2分子を持つマウスとLTBP-2分子を持たないマウスを使って、炎症反応を起こしたりキズを作って治り具合を比較検討した結果、LTBP-2の有無によって「線維化」の程度に大きな差を認めないことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚などの臓器を構成するタンパク質は多数あるが、その全ての分子の機能が分かっている訳ではない。病気の原因となる分子の欠損や異常を見つける方法の一つとして、ある特定の分子の機能を研究する必要がある。本研究で着目したLTBP-2分子は、最近の報告では「線維化」病態に関わる可能性が示唆されている。今回は皮膚における線維化モデルについて検討したが、明らかな機能を見出すことができなかった。皮膚以外の臓器についても検討すれば、病気の原因や治療標的であることが発見できるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：Keloid or hypertrophic scar of the skin is due to abnormal wound healing process. When abnormal wound healing occurs in vital organs, such as lung, heart, liver, and kidney, the organs lose their function. The pathological condition of abnormal wound healing is called fibrosis, which is not ameliorated by today's medicine. In this study, we focus on LTBP-2, which are reported to be involved in fibrosis. We analyzed the function of LTBP-2 in wound healing or inflammation using Ltbp2 knockout mice, and found that LTBP-2 does not make a significant difference in fibrosis formation.

研究分野：形成外科学

キーワード：創傷治癒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 肺や心臓、腎臓のような組織の線維化は臓器の機能低下を引き起こし、治療が困難な疾患の原因となっている。組織の線維化は炎症や創傷治癒反応に引き続いて起こる真皮マトリクスの過形成である。形成される真皮マトリクスの大部分はコラーゲンであるが、それだけでなくファイブロネクチンやマイクロフィブリルも再形成される。マイクロフィブリルを構成する fibrillin-LTBP ファミリーのタンパク質は発生過程において TGF- β や BMP などの増殖因子を制御することが知られているが、線維化疾患における病態への関わりは知られていない。
- (2) 細胞外マトリクス分子である Latent TGF- β binding protein (LTBP) 分子(LTBP-1~4)は、「不活性型 TGF- β 分子と結合し、TGF- β シグナルをコントロールする」役割と、「細胞外マトリクスの構成成分」としての役割の 2 つの異なった役割がある。しかしながら LTBP-2 分子は不活性型 TGF- β との結合能がない。最近、LTBP-2 が bFGF と強力に結合することが報告された(Menz et al, PLoS One, 2015)。bFGF の投与が肉芽形成・血管新生を促進することは周知であるが、内因性の bFGF がどのように創傷治癒に関わっているのか、また bFGF との相互作用を持つ LTBP-2 が創傷治癒や組織修復時に果たす役割は知られていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、bFGF との相互作用を介する LTBP-2 の創傷治癒における機能的役割を解明することである。細胞外マトリクス形成に必須のタンパク質 LTBP-2 が内因性 bFGF の活性を阻害し、創傷治癒反応を阻害している、あるいは炎症性線維化反応を亢進しているのではないかという仮説を検証する。本研究により、創傷治癒阻害因子の発見、過剰な癒痕形成の抑制因子の発見の可能性がある。

3. 研究の方法

- (1) LTBP-2 欠損マウスを用いて、炎症惹起剤の腹腔内投与による腹腔内線維化モデルあるいは真皮内投与による皮膚線維化モデル、また皮膚欠損・創傷治癒モデルを作製し、LTBP-2 が線維化組織形成を促進しているのか、抑制しているのかを明らかにする。
- (2) マウス胎児線維芽細胞を採取・培養し、線維化に関わる分子の発現、または細胞外マトリクスの形成について、LTBP-2 の有無によって差があるのかどうかを検証する。差を認められた場合には、LTBP-2 欠損細胞においてレスキュー実験を行い、差を認められた表現型の回復が見られるかどうかを検証する。

4. 研究成果

- (1) まず、野生型マウスと LTBP-2 欠損マウスの腹腔内に完全フロイントアジュバントを投与して炎症を起こすモデルを作製した。適切な炎症反応を起こす投与量、投与間隔、投与回数についての検討を行った。7 週齢の雌の場合 2 週間隔で 1 回 200ul \times 2 回投与、7 週齢の雄の場合 2 週間隔で 1 回 300ul \times 3 回投与で肉眼的な腹腔内臓器の癒着が十分見られることがわかった。脾臓または肝臓の組織切片を作製しマッソントリクローム染色を行ったところ、脾臓および肝臓の周囲にコラーゲンからなる線維化組織が形成されていることを確認した。しかし、炎症反応や線維化の程度が一定しなかった。この理由は完全フロイントアジュバント中に懸濁しているマイコバクテリア死菌の投与量依存的に炎症反応が起こるので、死菌の懸濁具合により投与される死菌量が一定しなかったためと考えられた。そこで、野生型マウスと LTBP-2 欠損マウスの腹腔内に、十分に懸濁した完全フロイントアジュバントを投与して炎症を起こすモデルを作製した。抗原としてウシ血清アルブミンを用いた。横隔膜の線維化の程度を肉眼的に観察したが、野生型マウスと LTBP-2 欠損マウスでは差が見られなかった。次に、頭部、背部および耳介真皮内に完全フロイントアジュバントの注入を行い真皮炎症モデルの作製を試みた。しかし、マイコバクテリア死菌の懸濁具合により投与される死菌量が一定しなかったため、炎症の惹起の程度にばらつきが見られた。そこで、十分に懸濁した完全フロイントアジュバントの注入に変更したが、ミセルがそのまま残存し炎症反応が起こりにくかった。
- (2) LTBP-2 の機能解析のための *in vitro* 実験系を確立した。野生型マウス胎児を胎生 13.5 日齢で採取しマウス胎児線維芽細胞を採取・培養した。このマウス胎児線維芽細胞を不死化するためヒトテロメラーゼ逆転写酵素遺伝子を導入した後クローン化した。Ltp2 遺伝子

の発現抑制はsiRNAを用いて行い、qPCRにて遺伝子発現が抑制されていることを確認した。またLTBP-2欠損マウスの胎児を胎生13.5日齢で採取しマウス胎児線維芽細胞を採取・培養した。レスキュー実験を行うため、リコンビナントLTBP-2タンパク質の作製、およびLtp2遺伝子発現レンチウイルスの作製を行った。Ltp2遺伝子の発現抑制、およびLtp2遺伝子発現レンチウイルスの導入による、I型およびIII型コラーゲン遺伝子発現の測定を行なったが、コントロールsiRNAによる発現抑制と比較して、変化を認めなかった。そこで、野生型マウス胎児線維芽細胞とLTBP-2欠損マウス胎児線維芽細胞、およびLtp2遺伝子発現レンチウイルスを導入した細胞とでI型およびIII型コラーゲン遺伝子発現の測定を行なったが、変化を認めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

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

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

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

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

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

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

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

Fujikawa Y, Yoshida H, Inoue T, Ohbayashi T, Noda K, von Melchner H, Iwasaka T, Shiojima I, Akama TO, Nakamura T: Latent TGF-β binding protein 2 and 4 have essential overlapping functions in microfibril development. *Sci Rep* 7:43714, 2017. doi: 10.1038/srep43714. 査読有

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

〔学会発表〕(計14件)

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)

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)

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）

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）

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）

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 8th TAKAO international symposium (Oct 6 - 8, 2017, Matsue, Shimane, Japan).

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.).

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）

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).

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).

Nakamura, T.: Molecular mechanism of elastic fiber assembly. The 17th 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）

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）

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）

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）

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：弾性繊維組織再生基材及び弾性線維組織再生基材の製造方法

発明者：鈴木茂彦、野田和男、綾梨乃、平嗣良、中邨智之

権利者：京都大学、グンゼ株式会社、関西医科大学

種類：特許

番号：特願 2017-1703971、特開 2019-42280

出願年：2017年

国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://keisei.kuhp.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：中邨 智之

ローマ字氏名：NAKAMURA Tomoyuki

所属研究機関名： 関西医科大学

部局名：薬理学講座

職名：教授

研究者番号(8桁): 20362527

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。