

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02960

研究課題名(和文) リジルオキシダーゼの酵素活性化分子を標的とした線維化抑制治療の開発

研究課題名(英文) Development of fibrosis suppression therapies targeting enzyme-activating molecules for lysyl oxidase

研究代表者

野田 和男 (Noda, Kazuo)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：50633161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：Fibulin-4が真皮において発現低下した成獣マウスを作製した。そのマウス背部皮膚を採取し、真皮の表現型解析を行なった。真皮Fibulin-4発現低下マウスの背部皮膚では正常マウス背部皮膚に比べて弾性線維およびコラーゲン線維の形成不全の傾向を認め、真皮の厚さが減少していた。正常真皮の発生過程では、Fibulin-4発現低下がコラーゲン線維の低形成ももたらす可能性を示すことができたが、創傷治癒過程におけるFibulin-4発現抑制が線維化を抑制するかどうかについては更なる研究が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異常なコラーゲン線維形成の原因の一つと考えられる線維化を抑制するために、コラーゲン架橋酵素LOXの酵素活性を制御するための治療標的分子として、Fibulin-4が候補となりうる可能性を示唆する結果が得られた。LOXの酵素活性化を阻害する分子として、古くからアミノプロピオニトリル(BAPN)が知られてが、BAPNには神経毒性などの副作用があるため臨床使用することは難しい。そこで、LOXの酵素活性化に必須の分子Fibulin-4を標的としてLOXの機能を阻害することができれば、線維化治療の標的分子になりうる。線維化病変に対する治療薬は少ないので、治療薬ができればその社会的意義は大きいと思われる。

研究成果の概要(英文)：Adult mice with reduced expression of Fibulin-4 in the dermis were generated. The back skin of these mice was harvested for phenotypic analysis of the dermis. The back skin of mice with reduced dermal Fibulin-4 expression showed a tendency towards defective formation of elastic and collagen fibres and reduced dermal thickness compared to normal mouse back skin. Although we were able to show that reduced Fibulin-4 expression results in the hypoplasia of collagen fibres during normal dermal development, further studies are needed to determine whether the suppression of Fibulin-4 expression during wound healing suppresses fibrosis.

研究分野：結合組織

キーワード：Fibulin-4 コラーゲンクロスリンク 線維化

1. 研究開始当初の背景

弾性線維の形成メカニズムについて研究をするなかで、Fibulin-4 というタンパク質が弾性線維の形成に必須であることが報告された(McLaughlin, Nakamura et al., Mol Cell Biol, 2006)。

Fibulin-4 欠損マウスは動脈破裂・横隔膜破裂のために生後すぐ死亡する。そこで弾性線維形成における Fibulin-4 の機能を解析するため、平滑筋細胞特異的 Fibulin-4 欠損マウスを作製したところ、Fibulin-4 が大動脈弾性板の形成に必須であること、さらに Fibulin-4 の機能は、リジルオキシダーゼ(LOX)というエラスチン架橋酵素との相互作用を介したエラスチンの架橋形成促進であることを見出した(Horiguchi, Noda, Nakamura et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2009)。

Fibulin-4 欠損マウスの表現型は LOX 欠損マウスの表現型と同じである。LOX はエラスチンだけでなくコラーゲンの架橋酵素でもあることから、LOX 欠損マウスだけでなく Fibulin-4 欠損マウスにおいても弾性線維の形成不全だけでなく、コラーゲン線維の形成不全をきたしていると考えられる。これらの知見から「Fibulin-4 の作用は、LOX を介したエラスチンの架橋促進だけでなく、LOX 分子自体の酵素活性を制御するのではないか」と仮説を立てた。

その仮説を検証するために、野生型および Fibulin-4 を欠損した線維芽細胞が産生する LOX を精製し、それらの酵素活性を測定したところ Fibulin-4 欠損細胞から精製した LOX は、野生型細胞から精製した LOX に比べて酵素活性が低下していることを見出した。他のデータと合わせて、「Fibulin-4 は LOX の機能活性化に必須の分子である」ことを報告した (Noda, Nakamura et al., Sci Adv, 2020)。

コラーゲン線維の形成には、LOX によるコラーゲン 3 重らせん分子の架橋が必要である。肥厚性瘢痕やケロイドでは真皮線維芽細胞からのコラーゲンの産生が過剰となり、また LOX 遺伝子の発現も亢進しているため、通常のコラーゲン線維よりも多くの架橋が形成された結果、異常なコラーゲン線維が形成されると考えられる。この過剰に架橋された異常なコラーゲン線維は、通常の創傷治癒の成熟過程で起こる細胞外基質のリモデリングにおいて、コラーゲン分解酵素に対する抵抗性が高くなるため、肥厚性瘢痕やケロイドでは異常なコラーゲン線維が分解されず硬い組織のまま残存し続ける。

LOX の酵素活性化を阻害する分子として、古くから アミノプロピオニトリル(BAPN)が知られており、ヒトの瘢痕治療に用いられた報告がある(Peacock, Ann Surg, 1981)。しかし BAPN には神経毒性などの副作用があるため臨床使用することは難しい。そこで、LOX の酵素活性化に必須の分子 Fibulin-4 を標的として、LOX の機能を阻害することができれば、肥厚性瘢痕やケロイドの新規治療薬の開発が可能ではないかと着想した。

本研究課題は、「肥厚性瘢痕やケロイドにおいて、異常なコラーゲン線維形成の原因の一つと考えられる線維化を抑制するために、コラーゲン架橋酵素 LOX の酵素活性を制御するための治療標的分子として Fibulin-4 が候補となるかどうか？」という問いに答えるために計画した。

2. 研究の目的

肥厚性瘢痕やケロイドでは真皮線維芽細胞からのコラーゲンの産生が過剰となり、さらに通常のコラーゲン線維よりも多くの架橋が形成された結果、異常なコラーゲン線維が形成されると考えられる。コラーゲン線維の架橋には LOX が重要であり、その LOX の活性化には Fibulin-4 が必須の分子であるが、LOX や Fibulin-4 が真皮の線維化や創傷治癒過程で果たす役割は解明されていない。本研究の目的は、創傷治癒過程において Fibulin-4 の果たす役割を明らかにし、真皮の線維化を制御する分子であるかどうかを検証することである。

3. 研究の方法

まず培養細胞を用いた *in vitro* の実験系で、コラーゲン分子の架橋の有無によるコラーゲン線維形成への影響を評価する実験系を確立する。具体的には、野生型線維芽細胞、Fibulin-4 ノックアウト線維芽細胞をカバーガラス上で培養後、I型およびIII型コラーゲンの免疫染色を行い、コラーゲン線維の形成を評価する。

次に生体内において、Fibulin-4 がコラーゲン線維形成において果たす役割を検証する。しかしながら、Fibulin-4 欠損マウスは、出生直後に横隔膜の断裂のため死亡してしまう。そこで真皮コラーゲンの形成における Fibulin-4 の役割を解析するために、真皮線維芽細胞特異的に Fibulin-4 が欠損したマウスを作製する必要がある。そのために、それぞれの遺伝子領域に組換え酵素認識配列を挿入したマウス (floxed マウス) と組織特異的組換え酵素を発現するマウス (Cre マウス) を交配させる。その結果、出生直後に死亡せず、Fibulin-4 が真皮線維芽細胞において欠損した成獣マウスを作製することが可能である。具体的には、Fbln4 floxed マウスと真皮を含む間葉系組織特異的組換え酵素発現マウス P0-Cre マウスを交配させて、真皮線維芽細胞において Fibulin-4 が欠損したマウスを作製する。そして、野生型マウスおよび Fibulin-4 欠損マウスの背部皮膚を採取し、表現型を解析する。具体的には、皮膚断面 (真皮層) の厚さの測定、弾性線維形成の比較 (パラフィン切片での弾性線維染色、電子顕微鏡像)、コラーゲン線維の直径の比較 (電子顕微鏡像) である。

4. 研究成果

まず、培養細胞を用いた *in vitro* の実験を行った。野生型線維芽細胞と Fibulin-4 ノックアウト線維芽細胞との比較で、I型またはIII型コラーゲン線維の形成程度の差を認めるかどうか、複数の条件で検討したが、いずれの条件でも差を認めることはなかった。

次に、Fibulin-4 が真皮において発現低下した成獣マウスを作製した。そのマウス背部皮膚を採取し、真皮の表現型解析を行なった。真皮 Fibulin-4 発現低下マウスの背部皮膚では正常マウス背部皮膚に比べて真皮層の厚さが減少していた。弾性線維の形成を評価した結果、真皮 Fibulin-4 発現低下マウスの背部皮膚では正常マウス背部皮膚に比べて若干の低形成を認めた (弾性線維染色および電子顕微鏡像いずれも)。コラーゲン線維断面の直径の計測では、真皮 Fibulin-4 発現低下マウスにおいて直径の縮小傾向が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Noda Kazuo, Kitagawa Kaori, Miki Takao, Horiguchi Masahito, Akama Tomoya O., Taniguchi Takako, Taniguchi Hisaaki, Takahashi Kazuaki, Ogra Yasumitsu, Mecham Robert P., Terajima Masahiko, Yamauchi Mitsuo, Nakamura Tomoyuki	4. 巻 6
2. 論文標題 A matricellular protein fibulin-4 is essential for the activation of lysyl oxidase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabc1404 ~ 1404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abc1404	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

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 野田和男、森本尚樹、中邨智之
2. 発表標題 マウス真皮形成におけるFibulin-4の役割
3. 学会等名 第30回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野田和男、中邨智之
2. 発表標題 マウス真皮形成におけるFibulin-4の役割
3. 学会等名 第54回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野田和男、森本尚樹、中邨智之
2. 発表標題 マウス真皮形成におけるFibulin-4の役割
3. 学会等名 第31回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野田和男、北川香織、三木貴雄、堀口真仁、赤間智也、谷口貴子、谷口寿章、高橋一聡、小椋康光、寺嶋雅彦、山内三男、Robert Mecham、中邨智之
2. 発表標題 リジロオキシダーゼの酵素活性化におけるFibulin-4の役割
3. 学会等名 第29回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野田和男、北川香織、三木貴雄、赤間智也、山内三男、Robert Mecham、森本尚樹、中邨智之
2. 発表標題 Fibulin-4欠損によりリジロオキシダーゼの酵素活性は低下する
3. 学会等名 第28回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuo Noda, Kaori Kitagawa, Takao Miki, Tomoya O. Akama, Mitsuo Yamauchi, Robert P. Mecham, Tomoyuki Nakamura
2. 発表標題 Enzyme activity of lysyl oxidase in Fbln4 deficiency
3. 学会等名 The 2nd Congress of The Asia Pacific Society for Scar Medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野田和男、北川香織、三木貴雄、堀口真仁、赤間智也、谷口貴子、谷口寿章、小椋康光、Robert Mecham、山内三男、中邨智之
2. 発表標題 Fibulin-4はリジロオキシダーゼの酵素活性化に必須の分子である
3. 学会等名 第4回エラスチン・関連分子研究会
4. 発表年 2019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
研究 分担 者	中邨 智之 (Nakamura Tomoyuki) (20362527)	関西医科大学・医学部・教授 (34417)	

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
---------	---------