

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：32676

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791181

研究課題名(和文)新規の弾性線維形成因子の探索と弾性線維再生への応用

研究課題名(英文)Exploration of the new components for elastic fiber assembly

研究代表者

里 史明(Fumiaki, Sato)

星薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：10468580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：組織の柔軟性に寄与する弾性線維を構成する新たな因子を探索するため、紫外線によって引き起こされる日光弾性線維症で認める弾性線維の異常沈着に着目し、紫外線照射による胎児期と成人期の遺伝子発現変動を解析した。紫外線照射により、弾性線維の成熟に必須であるリジロキシダーゼ活性に關与する遺伝子群の変動を認めたことから、リジロキシダーゼの弾性線維形成に対する機能を詳細に検討した。その結果、弾性線維形成初期に細胞表面上に存在するリジロキシダーゼの細胞膜からの遊離が弾性線維形成に非常に重要であることが明らかとなった。今後、この細胞膜からの遊離を促進させる因子の探索が弾性線維再生に有益となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To investigate the new components for elastic fiber assembly, we focused on the solar elastosis, of which characterization is observed the abnormal elastic fiber in adult dermis. First, we assess the mRNA expression between the dermal fibroblast from neonatal and adult after UV radiation. Because RT-qPCR showed the difference in mRNA expression which related to lysyl oxidase, we clarified the function of lysyl oxidase in elastogenesis. Lysyl oxidase is known to cross-linker between tropoelastin or collagen molecules, resulting in maturation of elastic fibers or collagen fibers. We found that lysyl oxidase affects the deposition of tropoelastin onto microfibril fibers and localizes on the cell surface in early stage of elastic fiber assembly. Further, the release of lysyl oxidase from the cell surface was delayed in adult dermal fibroblast, resulting in abnormal assembly of elastic fiber. These data suggests that the release of lysyl oxidase is key step of elastogenesis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：光老化 日光弾性線維症 弾性線維 リジロキシダーゼ

1. 研究開始当初の背景

組織の柔軟性の低下は、シワやたるみ、動脈瘤や動脈硬化など老化と深く関わる疾患の要因になる。このことから、組織の柔軟性を担う弾性線維の保護/再生はアンチエイジングとして期待され、美容・医療的な面からも高齢者の QOL を高めることが期待される。しかしながら、弾性線維の再生研究は、その形成機序が複雑であるため遅れており、新たなブレークスルーが必要と考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、弾性線維の異常沈着が認められる日光弾性線維症に着目し、新規の弾性線維形成促進因子の特定とその機能を明らかとすることで、弾性線維の形成機序の解明を目指し、同時に弾性線維再生への応用につなげることである。

3. 研究の方法

1) 紫外線暴露時における遺伝子発現差異の解析

紫外線照射における胎児と成人由来皮膚線維芽細胞の遺伝子発現差異を DNA チップを用い解析した(受託解析)。

差異遺伝子を定量 PCR で確認し、その発現差異を確定した。

上記より得られた差異遺伝子中にリジロオキシダーゼ活性に影響を与える因子が数種存在したため、リジロオキシダーゼ活性/発現変動が弾性線維に与える影響を検討するため以下の実験を行った。

3) 弾性線維形成に対するリジロオキシダーゼ(LOX)の解析

LOX shRNA を皮膚線維芽細胞(NHDF-neo)に導入し、その弾性線維形成を蛍光免疫染色にて解析した。

LOX 過剰発現細胞を作製し、弾性線維形成を促進するか否かを蛍光免疫染色にて検討した。

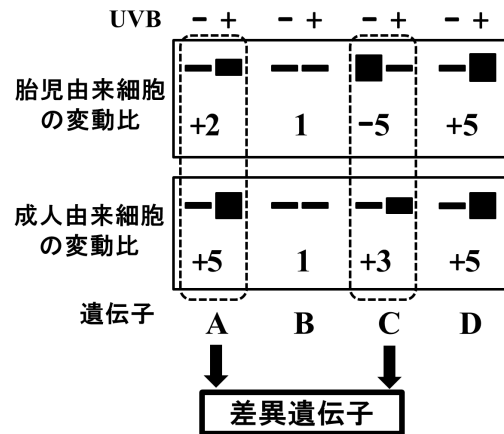
弾性線維形成初期における LOX の局在を検討するため、蛍光免疫染色、FACS 並びに生化学的手法を用いて、細胞膜局在を検討した。

加齢に伴う LOX 局在変動とそれ変動が弾性線維形成に与える影響を胎児由来細胞と成人由来細胞を用いて組織学的、生化学的に解析した。

4. 研究成果

1) 紫外線暴露による遺伝子発現差異の解析

紫外線照射・未照射時の胎児由来細胞と成人由来細胞の遺伝子発現を DNA チップを用い解析し(受託解析)、図 1 に従い 9 の差異遺伝子を抽出した。



抽出した 9 の差異遺伝子に対し、qPCR を用い紫外線照射における遺伝子発現変動を解析した(図 2)

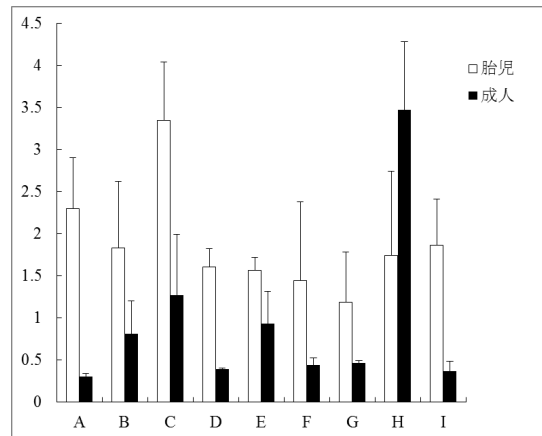


図 2 差異遺伝子の確定

紫外線未照射時の遺伝子発現を 1 とし、紫外線照射 48 時間後の遺伝子発現をグラフ化した。

確定した差異遺伝子の内数種が、リジロオキシダーゼ活性調節に関与する報告があったこと、研究代表者所属施設で LOX 活性阻害剤が弾性線維形成を阻害することを見出していたことから、LOX 遺伝子に対する shRNA を作製し、皮膚線維芽細胞の LOX 遺伝子発現を抑制した。比較対象として、LOX のファミリー遺伝子の一つである LOXL1 も同様に遺伝子発現抑制を行った。LOX 並びに LOXL1 に対する shRNA を 2 種類作製し、NHDF-neo に導入後、qPCR、ウエスタンブロット法を用いて、遺伝子発現抑制を確認した(図 3A, B)。それぞれの shRNA 安定発現細胞を培養後、抗エラスチン抗体による免疫染色を行った結果、LOX 遺

図 1 差異遺伝子の判定

伝子発現抑制細胞でのみ弾性線維形成の抑制を認めた(図 3C)。尚、これら shRNA 導入による他の LOX ファミリー遺伝子に変動は認められなかった。

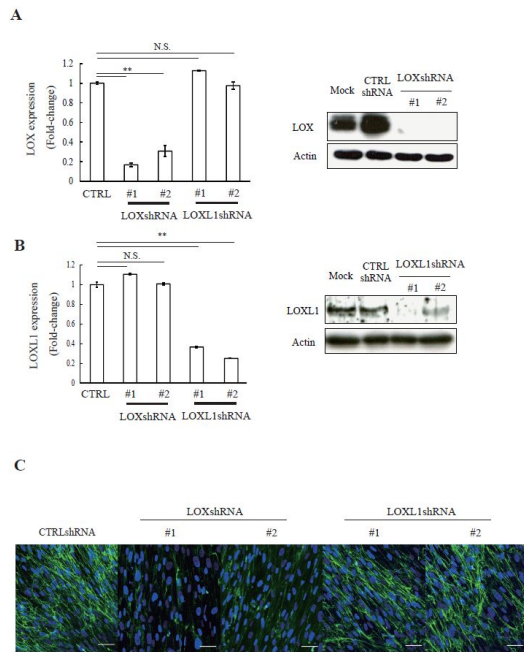


図 3 LOX 遺伝子発現抑制細胞の弾性線維形成

次に、LOX 並びに LOXL1 過剰発現細胞を作製し、弾性線維形成を同様に評価した結果、LOX 過剰発現細胞でのみ弾性線維形成の促進が認められた(図 4A,B)。導入した HA タグ付加 LOX または LOXL1 が弾性線維と共局在することも併せて確認した(図 4C)。これらの結果から、LOX は弾性線維形成を促進することが明らかとなった。

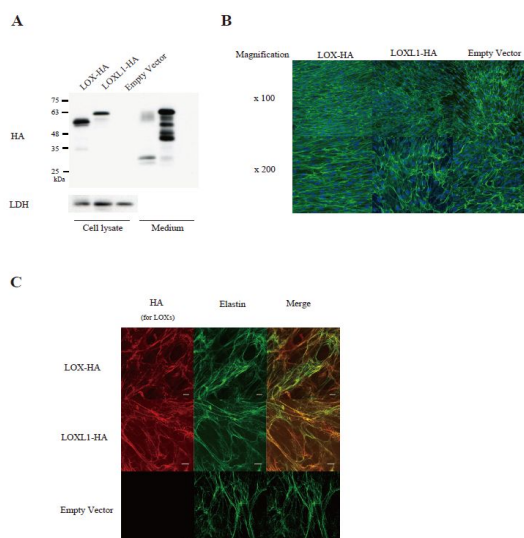


図 4 LOX 過剰発現細胞の弾性線維形成

さらに、この過剰発現細胞に V5 タグを付加したリコンビナントトロポエラスチン(エラスチン前駆体)を添加し、48 時間培養した後、抗 V5 抗体でトロポエラスチンの微細線維への沈着を観察した結果、LOX はトロポエラスチンの沈着を亢進させた(図 5)。これまでの研究から、LOX により架橋され形成されるデスモシン(架橋アミノ酸)は、リコンビナントを添加し、96 時間で検出されることが明らかとなっていることから、本結果は、LOX がトロポエラスチンの沈着にも関与していることを示唆している。

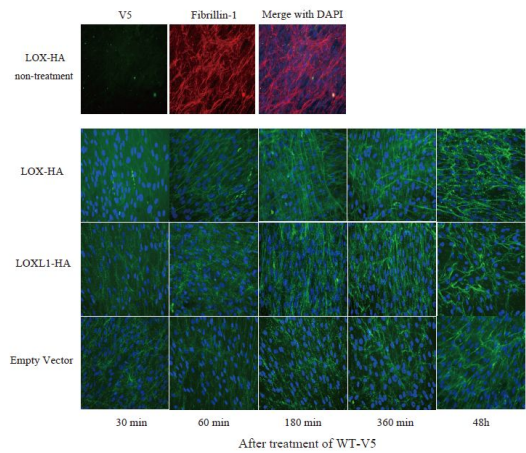


図 5 LOX はトロポエラスチン沈着を促進する。

次に、LOX の沈着促進作用に酵素活性が必須であるか否かを検討した。LOX は、細胞外で procollagen C-peptidase (BMP1 など)によってプロセッシングを受け、Pro 体と活性化体へと変換される。そこで、LOX のプロセッシング部位の変異体並びに酵素活性に必須である銅イオンと結合するヒスチジン 3ヶ所に変異を入れた LOX(LOX-NC, LOX-ED)を作製した(図 6A)。作製した変異体を NHDF-neo に導入後、細胞画分、マトリックス画分、培養上清に分画し、ウエスタンブロットを行った結果、LOX の活性化体は培養上清中のみ検出され、細胞画分とマトリックス画分には主に全長 LOX を検出した。このことから、弾性線維上には活性化体 LOX ではなく、全長 LOX が局在していることが推察された。実際に、シグナルペプチド直下に V5 タグを挿入した LOX-HA(V5-LOX-HA)を導入した NHDF-neo の蛍光免疫染色からも、弾性線維上に V5 抗体陽性 LOX 並びに HA 抗体陽性 LOX を同時に検出することから LOX は弾性線維に沈着した後にプロセッシングを受けると考えられた。予想通り LOX-NC はプロセッシングを受けず、培養上清中においてもほとんど活性化体を検出できなかった。次に、LOX-ED の酵素活性を Amplex-Red を用い測定した。LOX と ED の活性化体部位のみのリコンビナント LOX(aLOX、

aED)の酵素活性を測定した結果、aED ではその酵素活性が約 1/5 に減少していた(図 6C)。NC 並びに ED を導入した NHDF-neo を用いてトロポエラスチン沈着を検討した結果、酵素活性が減少している ED では沈着促進作用は認められなかった(図 6C)。実際に、LOX-HA 過剰発現細胞に活性阻害剤である BAPN は、濃度依存的に弾性線維形成を阻害した(図 6D)。

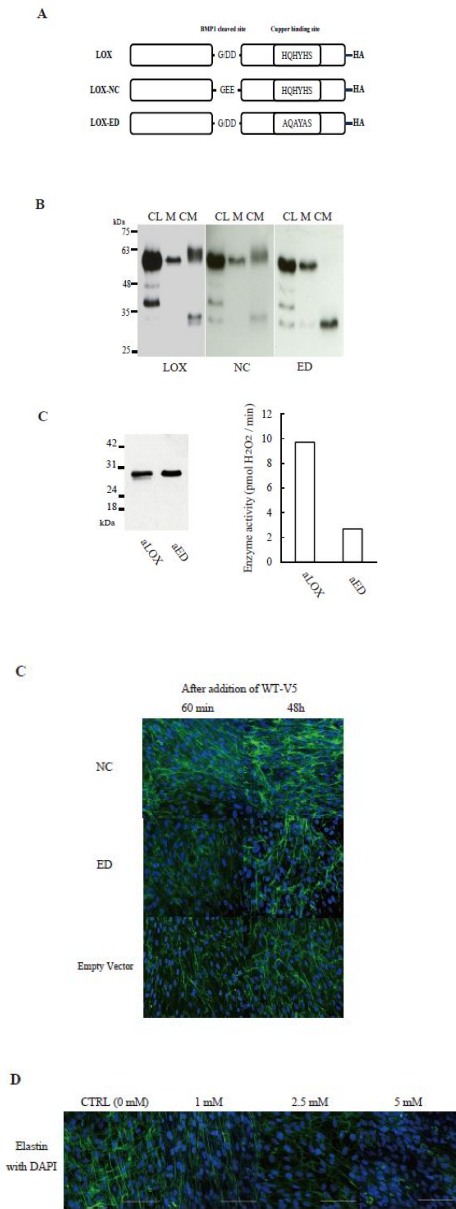


図 6 トロポエラスチン沈着には LOX 活性が必須である

これまでの報告から、トロポエラスチンが細胞表面上で凝集した後に、微細線維に沈着することが報告されている。これらの報告から、LOX が細胞膜上においてトロポエラスチンを凝集させ、沈着を促進していると予想し、以下の実験を行った。そこで、まず LOX の細胞膜局在を検討した。細胞表面タンパクをビオチン化したのち、アビジンカラムを用い、細胞表面タンパクを抽出し、ウエスタンブロット法にて LOX を検出した結果、膜画分において LOX のバンドを検出した(図 7A)。これは細胞密度が低い状態で顕著であった。また同様に、蛍光免疫染色の結果も同様に LOX は細胞膜上に観察された(図 7B、C)。また、トロポエラスチン抗体との二重蛍光免疫染色から、細胞表面上において LOX はトロポエラスチンと共局在することが明らかとなった(図 7D)。

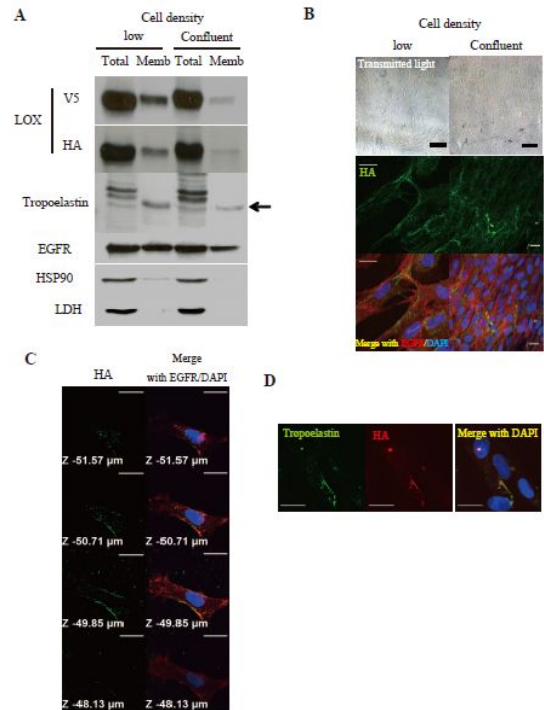


図 7 細胞膜上で LOX はトロポエラスチンと共局在する

内在性 LOX を用いても細胞膜上に局在する結果が得られ、さらに FACS 解析から細胞密度が低い状態の時に細胞膜への局在が多いことが明らかとなった(図 8)。

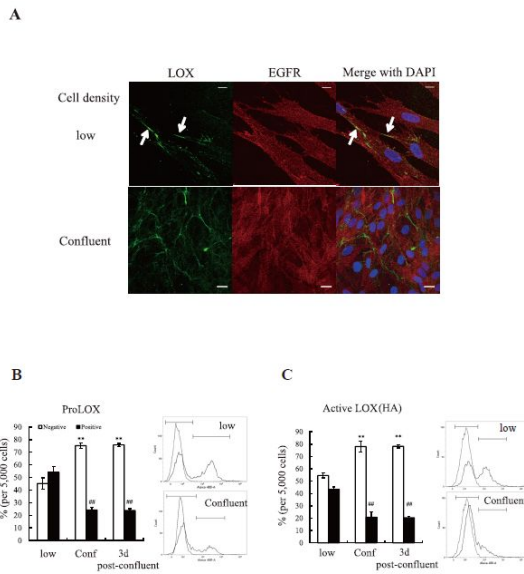


図 8 細胞密度の違いによる LOX の局在変動

光老化による弾性線維の異常沈着が老齢にのみ認められることから、加齢に伴いこの LOX の局在が変動するかどうかを成人由来細胞 (NHDF-Ad) で検討した結果、NHDF-Ad でも細胞膜上での局在が観察されたが、胎児期と比較し、細胞密度が高くなって細胞膜からの局在が低下しなかった(図 9A, B)。この局在変動が弾性線維形成にもたらす影響を蛍光免疫染色で検討した結果、NHDF-Ad では弾性線維形成速度の低下と細胞表面上に集積するような線維束の太い弾性線維像を認めた(図 9C)。Neo と比較して NHDF-Ad の弾性線維構成成分の遺伝子発現に顕著な低下は認められないことから(図 9D)、この弾性線維形成の遅延や形態の違いが細胞膜からの LOX 遊離低下に起因すると考えられた。

以上のことから、細胞膜からの LOX 遊離を促進することが弾性線維形成を促進させると考えられ、LOX 膜結合タンパクの同定と遊離因子を特定することが弾性線維再生に有益であると思われる。

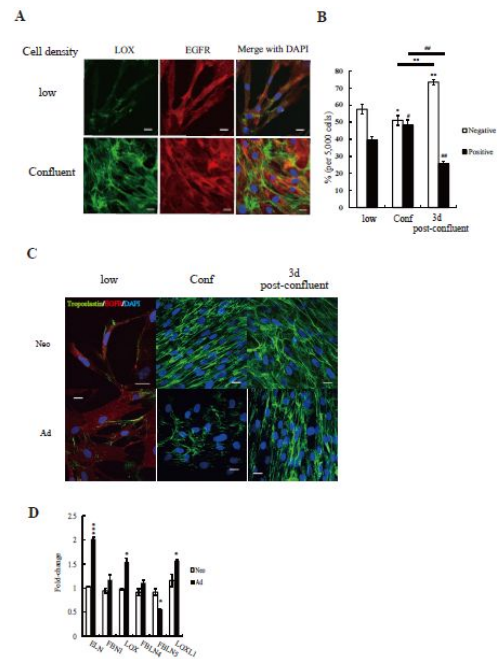


図 9 加齢による LOX 膜局在変動と弾性線維形成

## 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4件)

1. Nonaka R, Sato F, Wachi H. Domain 36 of tropoelastin in elastic fiber formation. **Biol.Pharm.Bull.** 37(4):698-702. (2014)
2. Azechi T, Sato F, Sudo R, Wachi H: 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, facilitates inorganic phosphorus-induced mineralization of vascular smooth muscle cells. **J Atheroscler Thromb.** *in press.*
3. Azechi T, Kanehira D, Kobayashi T, Sudo R, Nishimura A, Sato F, Wachi H. Trichostatin A, an HDAC class I/II inhibitor, promotes Pi-induced vascular calcification via up-regulation of the expression of alkaline phosphatase. **J Atheroscler**

**Thromb.**20(6):538-47.(2013)

4. Matsui H, Sato E, Sato S, Koike M, Taruno Y, Saiki S, Funayama M, Ito H, Taniguchi Y, Uemura N, Toyoda A, Sakaki Y, Takeda S, Uchiyama Y, Hattori N, Takahashi R. ATP13A2 deficiency induces a decrease in cathepsin D activity, fingerprint-like inclusion body formation, and selective degeneration of dopaminergic neurons. **FEBS Lett.** 2;587(9):1316-25 (2013)

〔学会発表〕(計5件)

西村 章子、里 史明、輪千 浩史、  
第10回日本エラスチン研究会、東京、  
2012年12月

畦地 拓哉、磯川 桂太郎、山崎 洋  
介、湯口眞紀、里 史明、輪千 浩史、第  
10回日本エラスチン研究会、東京、  
2012年12月

須藤 涼、里 史明、輪千 浩史、第  
10回日本エラスチン研究会、東京、  
2012年12月

里 史明、第45回日本結合組織学会  
学術大会/第60回マトリックス研究会  
大会合同学術大会、和歌山、2013年6  
月

Sato E.; Gordon Research Conference  
on Elastin, Elastic fibers & Microfibrils.,  
USA, 2013

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

里 史明 (SATO FUMIAKI)  
星薬科大学・薬学部・講師  
研究者番号：10468580