

2020年度（第45回）学術研究振興資金 学術研究報告

| | | | |
|-----------|----------------------|-------|-------------|
| 学 校 名 | 関 西 医 科 大 学 | 研究所名等 | 共 同 研 究 |
| 研 究 課 題 | 弾性線維の再生技術の開発 | | 研究分野 医 学 |
| キ ー ワ ー ド | ①細胞外マトリックス ②弾性線維 ③再生 | | |

○研究代表者

| 氏 名 | 所 属 | 職 名 | 役 割 分 担 |
|---------|-------|-----|---------|
| 中 邨 智 之 | 医 学 部 | 教 授 | 研究の統括 |

○研究分担者

| 氏 名 | 所 属 | 職 名 | 役 割 分 担 |
|---------|-------|-------|--------------------|
| 赤 間 智 也 | 医 学 部 | 准 教 授 | 遺伝子改変マウスの作成と解析 |
| 平 井 希 俊 | 医 学 部 | 講 師 | 培養細胞の遺伝子改変と解析 |
| 三 木 貴 雄 | 医 学 部 | 講 師 | リコンビナントタンパク質の作成と解析 |
| 楠 本 健 司 | 医 学 部 | 教 授 | 皮膚組織の採集 |
| 塩 島 一 朗 | 医 学 部 | 教 授 | 培養組織弾性線維の解析 |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

弾性線維の再生技術の開発

1. 研究の目的

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、高齢者の重要疾患である肺気腫も弾性線維の劣化・分解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（図1）。しかし弾性線維のターンオーバーは極めて遅く、加齢組織では新たな弾性線維形成は起こらないため、弾性線維の再生は困難と考えられてきた。

弾性線維形成には、①マイクロフィブリル線維束形成 ②エラスチンの凝集 ③エラスチンのマイクロフィブリルへの沈着 ④エラスチン同士の架橋 といったプロセスがあることがわかりつつある。研究代表者らは、②③のプロセスに必須の分泌タンパク質 **Fibulin-5** を同定した (*Nature* 2002, *J Cell Biol* 2007) のを皮切りに、**LTBP-2** (プロセス①)、**LTBP-4** (プロセス③)、**Fibulin-4** (プロセス④) といった弾性線維形成因子を同定・機能解明してきた (*EMBO J* 2007, *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 2013, *Hum Mol Genet* 2014, *Sci Rep* 2017 など)。ここにきてこれらがつながり、弾性線維形成機構の全容が姿を現しつつある。

本研究では、これら弾性線維形成因子の中で加齢組織において不足するものを見出し、弾性線維の再生に必要な条件を明らかにすることを目指す。本年度は、エラスチンの架橋とコラーゲンの架橋を行う重要な酵素であるリシルオキシダーゼ (LOX) の活性に Fibulin-4 がどのように関わるのかを研究した。LOX 欠損マウスと Fibulin-4 欠損マウスはともに弾性線維形成不全・膠原線維脆弱化のために生後すぐ大動脈破裂、横隔膜破裂をおこして死亡することから、Fibulin-4 は LOX の機能に関わることが想定されていたが、その分子メカニズムはわかっていなかった。我々は Fibulin-4 欠損マウスや Fibulin-4 欠損細胞が作る LOX 分子は SDS-PAGE での流れ方がやや遅くかつ活性が著しく低いこと、それが翻訳後修飾の差によることを見出していた。それがどのような翻訳後修飾であるのか、またその差が Fibulin-4 の有無で生じるメカニズムの解明を目指した。

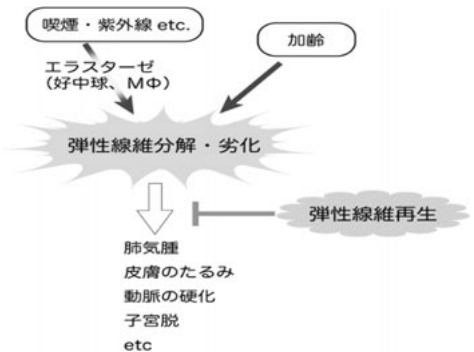


図1. 弾性線維の分解と劣化が多くの老化関連疾患の直接原因となる。

2. 研究の計画

(1) LOX の LTQ (Lysine Tyrosyl Quinone) 形成における Fibulin-4 の役割

LOX前駆体は銅イオン依存的に細胞内架橋LTQ (Lysine Tyrosyl Quinone)を形成し、これが活性中心となる。Fibulin-4がLTQ形成に必要なかどうかを検証した。

①精製LOXのニトロブルーテトラゾリウム(NBT)染色：野生型MEF細胞、Fbln4 KO MEF細胞が分泌するLOXを精製し、SDS-PAGEの後メンブレンに転写し、キノン構造を持つタンパク質を染めるNBTで染色した。

②精製LOXの質量分析によるLTQ含有ペプチドの定量：野生型MEF細胞、Fbln4 KO MEF細胞が分泌するLOXを精製し、フェニルヒドラジンでラベルしたものをtrypsin/Lys-C, AspNで分解し、オービトラップ質量分析機でLTQ含有ペプチドの定量を行った。

(2) LOX 前駆体への銅イオン取り込みにおける Fibulin-4 の役割

①精製LOXに含まれる銅イオンの定量：野生型MEF細胞、Fbln4 KO MEF細胞が分泌するLOXを精製し、含有する銅イオンをICP-MSにより定量した。

②銅イオントランスポーターATP7AとFibulin-4の相互作用：ATP7AとFibulin-4を293T細胞

に発現させ、これらが結合するかどうかを免疫沈降実験により確認した。

(3) 分泌されたFibulin-4が細胞内でLOXを活性化できるしくみの解明

同じ細胞の小胞体内に作られたLOX前駆体とFibulin-4がゴルジ体で会合すると当初より想定していたが、意外なことに細胞外のFibulin-4もLOX活性化 (LTQ形成) に寄与できることが判明した。そのしくみを解明するため、ラベルした細胞外Fibulin-4がエンドサイトーシスされてゴルジ体に逆輸送されるかどうかを観察する。

3. 研究の成果

(1) LOX の LTQ (Lysine Tyrosyl Quinone) 形成における Fibulin-4 の役割

① Fbln4 KO MEF細胞が分泌するLOXはNBTで染まらず、キノン構造を持たない、すなわちLTQの形成がないことが示唆された。

② 質量分析により、Fbln4 KO MEF細胞が分泌するLOXはLTQをほとんど含有していないことが定量的に示された。すなわち、Fibulin-4はLOX前駆体がLTQを形成するために必須であることが明らかとなった。

(2) LOX 前駆体への銅イオン取り込みにおける Fibulin-4 の役割

① ICP-MSにより精製LOXに含まれる銅イオンを定量したところ、Fbln4 KO MEF細胞由来LOXは銅イオンの含量が著しく低かった。LOX前駆体がLTQを形成するためには銅イオンを取り込む必要があるが、Fibulin-4はLOX前駆体の銅イオン取り込みに必須であることが示された。

② LOX前駆体の銅イオン取り込みとLTQ形成はゴルジ体でおこなうことが知られている。ゴルジ体での銅イオントランスポーターATP7AとFibulin-4が結合し、またFibulin-4とLOX前駆体が結合したことから、Fibulin-4がATP7AとLOX前駆体の橋渡しをしていることが示唆された。

(3) 分泌されたFibulin-4が細胞内でLOXを活性化できるしくみの解明

細胞外Fibulin-4がエンドサイトーシスされてゴルジ体に逆輸送され、ゴルジ体でLOX前駆体のLTQ形成を促進することを明らかにした。

4. 研究の反省・考察

弾性線維の形成にはFibulin-4が必須であることはFbln4 KO マウスの表現型などから明らかであったが、その機能はこれまで謎であった。本研究課題では弾性線維の再生を本来の目的とするが、そのためにFibulin-4の機能解明は避けて通ることができない問題であり、今回の研究成果の意義は大きい。

今回の研究結果から、Fibulin-4はゴルジ体においてLOX前駆体と銅イオントランスポーターATP7Aに結合し、ATP7AからLOX前駆体への銅イオン受け渡しを促進していることが明らかとなった(図2)。Fbln4 KO マウスとLOX KO マウスの表現型がほぼ同じであること、いずれのマウスにおいてもエラスチンの架橋だけでなくコラーゲンの架橋も低下することから、これが生体内におけるFibulin-4の主要な機能であると考えられる。

同じ細胞で作られたFibulin-4とLOX前駆体を含む小胞体がゴルジ体で出会う(図2A)とすると、分泌タンパク質であるFibulin-4が分泌される前にその主な働きを終えていることになり、意外性のある機構である。しかし一旦分泌されたFibulin-4がエンドサイトーシスによってとりこまれ、ゴルジ体まで逆輸送されるという知見(図2B)はさらに意外性が高い。酵素の活性化を調節する機構としてはこれまでに例のないものである。LOX活性化に必要な細胞外Fibulin-4濃度は非常に低く、血清で検出されるFibulin-

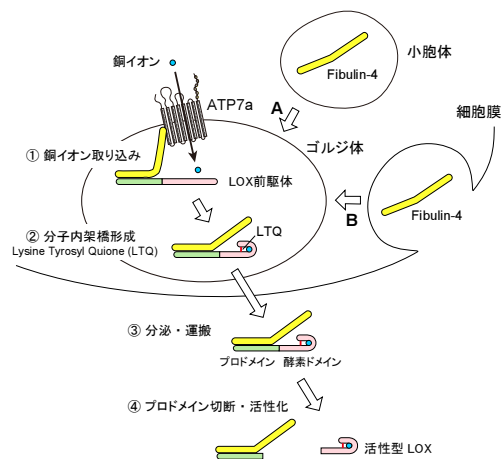


図2. Fibulin-4によるLOX活性化機構。Fibulin-4はゴルジ体の中でLOX前駆体と結合し、銅イオンがトランスポーターATP7aからLOX前駆体に受け渡されるようにする。銅イオンが結合したLOXは活性中心となる分子内架橋Lysine Tyrosyl Quinone (LTQ)を形成する。外部から加えたFibulin-4でもLOX活性化をおこせるため、Fibulin-4は同じ細胞の小胞体(A)のみならず細胞外から(B)も供給されると考えられる。

4 濃度に近いことから、血中を循環する Fibulin-4 が全身で LOX 活性化に利用されている可能性もある。これまでに我々は Fibulin-5 が高濃度で血中循環していることを見出しているが、「弾性線維（を含む細胞外マトリックス）はこれらのような血中を循環する分子ツールによって組み立てられている」という新たなパラダイムに発展することも考えられる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Noda K, Kitagawa K, Miki T, Horiguchi M, Akama TO, Taniguchi T, Taniguchi H, Takahashi K, Ogra Y, Mecham RP, Terajima M, Yamauchi Y, Nakamura T: A matricellular protein fibulin-4 is essential for the activation of lysyl oxidase. *Science Advances* 6(48):eabc1404, 2020.

② Kinoshita Y, Ikeda T, Kushima H, Fujita M, Nakamura T, Nabeshima K, Ishii H: Serum latent transforming growth factor- β binding protein 4 as a novel biomarker for idiopathic pleuroparenchymal fibroelastosis. *Respiratory Medicine* 171:106077, 2020.

③ Koyama S, Horie T, Nishino T, Baba O, Sowa N, Miyasaka Y, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Nishi H, Nakashima Y, Nakazeki F, Ide Y, Kimura M, Tsuji S, Ruiz Rodriguez R, Xu S, Yamasaki T, Otani C, Watanabe T, Nakamura T, Hasegawa K, Kimura T, Ono K. Identification of Differential Roles of MicroRNA-33a and -33b During Atherosclerosis Progression With Genetically Modified Mice. *Journal of American Heart Association* 8(13):e012609, 2019.

(2) 口頭発表

① 中邨智之：「循環器病学基礎研究の歴史をたどる ～ 生理学から分子生物学へ～」第84回日本循環器学会学術集会 会長特別企画 基礎研究のすすめ（オンライン、2020年7月30日）

(3) 出版物

① Nakamura T, Bornstein P: Matricellular Proteins. Book Chapter in *Reference Module in Biomedical Sciences* 2020. doi: 10.1016/b978-0-08-102723-3.00009-3.