

2021年度（第46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	
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弾性繊維 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

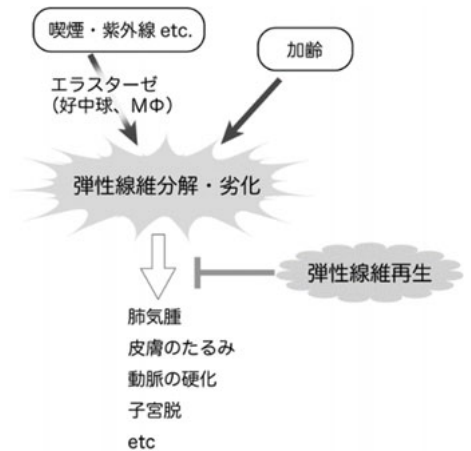
○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
赤 間 智 也	医 学 部	准 教 授	CRISPRiスクリーニング
平 井 希 俊	医 学 部	講 師	弾性繊維定量評価法の開発
三 木 貴 雄	医 学 部	講 師	遺伝子改変マウスの作成
覚 道 奈 津 子	医 学 部	教 授	皮膚組織の採集
塩 島 一 朗	医 学 部	教 授	培養組織弾性繊維の解析

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おこらないため、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ミクロフィブリル線維束形成 ②エラスチンの凝集 ③エラスチンのミクロフィブリルへの沈着 ④エラスチンどうしの架橋 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。前年度までに、Fibulin-4 がエラスチン架橋酵素リシルオキシダーゼ (LOX) の活性化に必須であることを明らかにした。しかし LOX の活性化が Fibulin-4 のすべての機能であるのかどうかは不明である。特に、Fibulin-4 の平滑筋特異的コンディショナルノックアウトマウス (Fbln4 SMKO) は上行大動脈瘤の疾患モデルとして用いられ、その疾患発症機序や薬物治療標的について多くの研究がされてきた。これまでに、Fibulin-4 が不足すると血管平滑筋細胞のメカニカルストレス感知機構に異常が生じること、アンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACE) やアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) によって大動脈瘤発症が予防できることなどが報告されている。これらが LOX 活性化不全に伴うエラスチンやコラーゲンの架橋不足によるものか、あるいは Fibulin-4 の別の機能を反映しているのかが次の重要な課題である。本年度は、LOX の平滑筋特異的コンディショナルノックアウトマウス (Lox SMKO) を作成して Fbln4 SMKO と表現型を比較することを目指した。

次に、新たな弾性線維形成因子、弾性線維形成抑制因子の同定を目指して siRNA ライブラリーを用いた網羅的スクリーニングの系を構築することを目指した。もし弾性線維形成と同時に膠原線維 (コラーゲン線維) の形成も評価できれば、両者を別々にコントロールする機構の解明と「望ましい細胞外マトリックスの作り分け」技術に発展する可能性がある。そのため、線維芽細胞培養の弾性線維形成および膠原線維形成のための最適条件を検討した。

さらに、ヒト加齢皮膚と日光弾性線維症皮膚を用いた加齢皮膚の弾性線維形成タンパク質の変化についての研究をまとめ、出版した。

2. 研究の計画

(1) LOX の平滑筋特異的コンディショナルノックアウトマウス (Lox SMKO) の作製と解析

①Lox floxマウスの作製：定法に則り、Lox遺伝子の1つのエクソンの上流と下流にLoxP配列を挿入したプラスミドコンストラクトを作製し、ES細胞にエレクトロポレーションで導入する。薬物選択の後、相同組換えをおこしたクローンをPCRを用いて選択し、マウス胚にインジェクションしてキメラマウスを作製する。野生型マウスと交配してLox floxヘテロ

マウスになるものを選ぶ。

②Lox SMKOマウスの作製：Fbln4 floxマウスとSM22-Cre Tgマウス（平滑筋細胞にCreリコンビナーゼを発現するマウス）を掛け合わせたFbln4 SMKOマウスが上行大動脈瘤モデルマウスとして使われてきた。Lox floxマウスをSM22-Cre Tgマウスと掛け合わせ、Lox flox/flox, Cre(+)マウスおよびLox flox/ Δ , Cre(+)マウスを作製する。

③Lox SMKOとFbln4 SMKOの表現型の比較：Lox SMKOにもFbln4 SMKOと同じく上行大動脈瘤が生じるのかどうかを調べる。さらに、電子顕微鏡を用いて動脈弾性板の形成を両者で比較する。RNAseq解析により両者および野生型マウス大動脈の遺伝子発現の違いを比較検討する。

④分子標的の検討：もしLox SMKOマウスでも上行大動脈瘤が生じる場合は、Fbln4 SMKOマウスで報告されているのと同様にアンジオテンシン変換酵素阻害薬（ACE）やアンジオテンシンII受容体拮抗薬（ARB）によって大動脈瘤発症が予防できるかどうかを調べる。

(2) 弾性線維形成因子、弾性線維形成抑制因子の網羅的スクリーニング

①ヒト皮膚線維芽細胞の96穴プレートにおける弾性線維形成条件、膠原線維形成条件の検討：培地の種類、血清濃度、培養期間をさまざまに設定し、抗エラスチン抗体と抗コラーゲンtype 1抗体を用いて弾性線維と膠原線維それぞれの形成条件を探る。

②遺伝子ノックダウン条件の検討と抗体の作製：ノックダウンすると弾性線維が形成されなくなることを以前見出したLTBP-4遺伝子のsiRNAを用いて、96穴プレートでのノックダウン条件を検討する。またsiRNAライブラリーは1万種類以上の遺伝子についてそれぞれ3つのsiRNAから構成されているので、大量の抗体を必要とする。抗エラスチン抗体はメーカーから大ロットで購入できたが、抗コラーゲンtype 1抗体はメーカーが納品した大ロットのものが低タイターであったため、新たにラットコラーゲンtype 1をニワトリに免疫し、抗原カラムを用いて抗体を精製した。

(3) ヒト加齢皮膚と日光弾性線維症皮膚における弾性線維形成因子発現データの解析とまとめ

昨年度までに若年皮膚5例、加齢皮膚18例、日光弾性線維症皮膚8例のサンプルを用いてFibulin-4, 5, LTBP2, 4, Fibrillin-1, エラスチン、コラーゲンtype 1の蛍光免疫染色を行った。染色のパターンからカテゴライズし、弾性線維形成因子の発現の変化の法則性を探った。

3. 研究の成果

(1) LOX の平滑筋特異的コンディショナルノックアウトマウス (Lox SMKO) の作製と解析

相同組換えで生じたLox floxアレルが生殖系列に入ったヘテロマウスを得た。このマウスとSM22-Cre Tgマウスを掛け合わせ、Lox flox/flox, Cre(+)マウスおよびLox flox/null, Cre(+)マウスを得た。

Lox SMKOマウスはFbln4 SMKOマウスと同様、上行大動脈瘤を来した。Fbln4 SMKOはFbln4の片側アレルをnullにしないと大動脈瘤にならなかったが、Lox SMKOはflox/floxでもflox/nullでも大動脈瘤を発症した。

Lox SMKO, Fbln4 SMKO, WTマウスそれぞれの大動脈における遺伝子発現の変化については、いくつかの週齢について現在検討中である。

薬物投与による大動脈瘤発症予防についても現在検討中である。

(2) 弾性線維形成因子、弾性線維形成抑制因子の網羅的スクリーニング

ヒト皮膚線維芽細胞の96穴プレートにおける最適な弾性線維形成条件、膠原線維形成条件はそれぞれ異なることが明らかとなった。1回のスクリーニングで96穴プレート300枚以上を染色する必要があるため一度で二重染色をする予定であったが、別々のスクリーニングを行うこととした。

新たに作成したニワトリ抗コラーゲンtype 1抗体は市販の抗コラーゲンtype 1モノクローナル抗体と同じ染色パターンを示し、十分にスクリーニングに用いることができることがわかった。

(3) ヒト加齢皮膚と日光弾性線維症皮膚における弾性線維形成因子発現データの解析とまとめ

加齢に伴いいずれの弾性線維形成因子も減少傾向にあるが、Fibrillin-1は比較的保たれていた。一貫してLTBP-4が最も減少しており、ほとんど検出されないサンプルも多かった。日光弾性線維症ではエラスチン、Fibrillin-1、LTBP-2、Fibulin-4が増加しており、Fibulin-5が増えるタイプ（5例）と減少するタイプ（3例）の2つに分類できることが明らかとなった。すべての日光弾性線維症の症例でLTBP-4の染色が消失していた。

4. 研究の反省・考察

(1) LOXの平滑筋特異的コンディショナルノックアウトマウス (Lox SMKO) の作製と解析

Lox SMKOマウスでもFbln4 SMKOマウスと同様に上行大動脈瘤ができたことは、Fbln4 SMKOマウスの大動脈瘤が局所のLOX活性低下を介している可能性を示唆しており、LOX活性化以外にFibulin-4の機能があるかどうかはまだ結論づけられない。RNAseqによる網羅的な遺伝子発現解析、同じ薬物による発症予防が可能かどうかを調べることで、結論を出す予定である。

(2) 弾性線維形成因子、弾性線維形成抑制因子の網羅的スクリーニング

siRNAライブラリーは購入済であるが、条件検討と大量の抗体の準備に時間がかかったためスクリーニングを期間内に行うことができなかった。しかし今は準備が整ってスクリーニングを開始するところである。

(3) ヒト加齢皮膚と日光弾性線維症皮膚における弾性線維形成因子発現データの解析とまとめ

データをまとめた結果、加齢皮膚での弾性線維再生能消失の原因の1つはLTBP-4の発現減少であること、日光弾性線維症で正常な弾性線維が作られずに異常なエラスチンの沈着になることの原因の1つはやはりLTBP-4の消失であることが考えられた。この成果は***Acta Derm Venereol* 101(1):adv00372, 2021**に発表した。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Makino T*, Kagoyama K, Murabe C, Nakamura T*, Shimizu T. Association of Development of Solar Elastosis with Increased Expression of Fibrillin-1, LTBP-2 and Fibulin-4 in Combination with Decreased Expression of LTBP-4. ***Acta Derm Venereol* 101(1):adv00372, 2021.** doi: 10.2340/00015555-3738. (*は責任著者)

(2) 口頭発表

該当なし

(3) 出版物

該当なし