

## 研究課題別評価

1. 研究課題名: 弾性線維の形成と再生の分子機構

2. 研究者氏名: 中邨 智之

3. 研究の狙い:

加齢に伴って体中の組織の弾性は失われていく。このことは単に「体が硬くなる」とか皮膚がたるむといった問題だけではなく、肺気腫や動脈中膜の硬化・大動脈瘤といった高齢者の主要疾患の原因にもなっている。組織の弾性を担っているのは弾性線維という細胞外線維であり、弾性線維の劣化・分解が上記疾患の直接原因である。しかし弾性線維のターンオーバーは非常に遅く、弾性線維が劣化・分解しても弾性線維が再生されることはない。弾性線維の再生の研究には弾性線維の形成機構の解明が不可欠であるが、弾性線維形成の分子メカニズムについて知られていることは少ない。弾性線維はマイクロフィブリルという線維のまわりにエラスチンタンパクが沈着・クロスリンクされてできるとされている。しかしマイクロフィブリルの主要構成タンパクであるフィブリリン 1, 2 をはじめ、数種類のタンパクが弾性線維と共存すると報告されているが、それぞれの役割は不明である。

私は DANCE (Developmental Arteries and Neural Crest EGF-like、別名 fibulin-5) と名付けたインテグリンリガンドをクローニングし、その遺伝子欠損マウスを作成したところ、全身の弾性線維形成異常を来していることを見出した。このため DANCE 遺伝子欠損マウスは人の老化に非常によく似ており、皮膚はたるみ、肺気腫を来し、動脈は硬化・蛇行していた。このマウスでは弾性線維分解酵素の亢進はなかったため、DANCE は弾性線維形成に必須の分泌タンパクであるといえる。

エラスチン、クロスリンク酵素を除いて弾性線維形成に必須であることが証明されているのは DANCE だけであるため、DANCE を手がかりに弾性線維形成の分子メカニズムの解明に近づくことをさきがけ研究の目的とした。

4. 研究結果

1) DANCE と会合するタンパクの同定

DANCE がなぜ弾性線維形成に必要とされるのかを探るため、DANCE 結合タンパクを同定した。まず、DANCE のアミノ末端ドメインで DANCE どうしが結合すること、DANCE 中央ドメインでマイクロフィブリル構成タンパクである LTBP-2 (latent TGF $\beta$ -binding protein 2) と結合すること、DANCE カルボキシル末端でエラスチンクロスリンク酵素である LOXL1,2,3,4 (lysyl oxidase-like 1,2,3,4) と結合することを明らかにした。これにより、DANCE はマイクロフィブリル上にエラスチンクロスリンク酵素をつなぎとめ、もってマイクロフィブリル上でエラスチンの沈着・クロスリンクがおこるのを助けていると考えられた。アフィニティー精製と質量分析によってさらに2つの DANCE 結合タンパクを同定したが、その意義については現在研究中である。

2) DANCE のプロテアーゼによる切断

DANCE はアミノ末端にカルシウム結合性 EGF 様モチーフをひとつ、カルボキシル末端に fibulin ファミリーに共通する fibulin ドメイン、中央部にカルシウム結合性 EGF 様モチーフが5つならんだドメインを持っている。アミノ末端ドメインはインテグリン結合ドメインであり、DANCE どうしが結合するためのドメインでもあるが、この部分がプロテアーゼによって切断を受けることを培養細胞・生体内の両方で見出した。ヒト皮膚サンプルでは、加齢によって DANCE 量が減少し、特に全長型はほとんど無くなることがわかった。

3) DANCE を用いた弾性線維再生系の開発と応用

ヒト線維芽細胞は血清を加えて培養すると2週間後には弾性線維ができ、抗エラスチン抗体で観察することができる。しかし無血清で培養すると弾性線維は形成されない。血清中には無数のタンパクが含まれるため、何が弾性線維形成に必要なのかは細胞培養系ではわからず、弾性線維研究を滞らせる一因となっていた。今回の研究において、無血清培養でもリコンビナント DANCE を加えると弾性線維形成が強く誘導されることを発見した。この系は無血清で弾性線維形成を再現できる点で他に類のないものである。

この系を用いて、DANCE のインテグリン結合作用が弾性線維形成に必要かどうかを検討した。インテグリン結合モチーフに変異を入れてインテグリンと結合できなくした DANCE タンパクを入れると正常型 DANCE と同様に弾性線維形成が誘導された。従って、DANCE とインテグリンとの結合は弾性線維形成には必須ではないと考えられる。しかし、上記のアミノ末端ドメイン切断型 DANCE には活性がなかった。すなわち、DANCE アミノ末端ドメインはインテグリン結合以外の重要な作用を持っていると考えられる。プロテアーゼによる DANCE アミノ末端の切断は、活性型から不活性型への変化であるといえる。

DANCE には強力な弾性線維再生誘導作用があるということがわかったため、弾性のある人工皮膚作成への応用を目指して、線維芽細胞の3次元培養においても DANCE が弾性線維形成を促進できるかを検討中である。

## 5. 自己評価

はじめの計画では、弾性線維形成をみる良い *in vitro* の系がないことから、DANCE のはたらきのメカニズムを *in vivo* で明らかにする予定であった。すなわち、さまざまな DANCE 変異体のトランスジェニックマウスを作成し、それらを DANCE ノックアウトマウスと掛け合わせて表現型がレスキューできるかどうかを定性的・定量的に評価するという実験を考えていた。しかし実際にいくつもトランスジェニックマウスを作成して DANCE ノックアウトマウスと掛け合わせたところ、全長 DANCE トランスジェニックですらほとんどレスキューすることができなかった。これは、トランスジェニックマウスに使用した SM22 プロモーターが弱く、DANCE が十分発現しなかったことによる。この反省を生かし、DANCE 変異体のノックインマウスを現在作成中である。

しかし結果的には、無血清細胞培養系において DANCE が弾性線維形成誘導活性を持つことを発見したため、この系を用いて DANCE による弾性線維形成誘導メカニズムを研究することが可能になり、上記のマウスの実験がうまくいかなかったことを代償することができた。さらにこの系ではマウスを作成するよりもはるかに早く結果を得ることができるため、今後の研究が大きくスピードアップすると期待している。

## 6. 研究総括の見解

本研究は従来あまり取り上げられなかった組織の柔軟性の維持に不可欠な弾性線維の重要性に着目し、肺気腫、動脈硬化症等の高齢者疾患の克服のための臨床応用を目指す独創性の高い研究である。

本研究が自身が発見した弾性線維の形成に不可欠な分泌タンパク質 DANCE の結合タンパク質と結合ドメインを同定することから研究を進めた。残念ながら、各種の DANCE トランスジェニックマウス作成の試みからは有意義な成果が生まれなかったが、無血清細胞培養系に DANCE タンパク質を添加することで、弾性線維の形成が可能であることを見出した成果の意義は重大であり、研究目的は十分達成されたと評価できる。今後、前記無血清細胞培養系を活用し、DANCE の機能解析を進めることで、臨床応用への道が拓かれることを期待する。

## 7. 主な論文等

論文・総説

Chen, Q., McLaughlin, P.J., Horiguchi, M., Starcher, B.C., Stanton, J.B., Broekelmann, T.J., Marmorstein, A.D., McKay, B., Mecham, R., Nakamura, T., Marmorstein, L.Y.: Targeted disruption of Fibulin-4 abolishes elastogenesis and causes perinatal lethality in mice. *Mol Cell Biol* *in press*.

中邨智之: Signal Sequence Trap. Heart View 増刊号「これからの臨床医に必要な分子生物学」Vol. 7 No. 12, 52-53, (2003)

#### 口頭発表

・ Hirai, M., Ohbayashi, T., Kita, T., Nakamura, T.: Latent TGF- $\beta$  binding protein-2 (LTBP-2) interacts with DANCE, suggesting a novel mechanism of elastogenesis. COE Genomic Analysis of Disease Model Animals with Multiple Genetic Alterations. The 1st Symposium (October 28, 2004, Kyoto).

・ 平井希俊、大林徹也、堀口真仁、北 徹、中邨智之: 「DANCE は LTBP-2 と結合し、弾性線維を形成する」 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸、2004 年 12 月 8-11 日)

・ Hirai, M., Ohbayashi, T., Horiguchi, M., Kita, T., Nakamura, T.: Latent TGF- $\beta$  binding protein-2 (LTBP-2) interacts with DANCE, suggesting a novel mechanism of elastogenesis. 第 69 回日本循環器学会総会学術集会 (横浜、2005 年 3 月 19-21 日)

・ Hirai, M., Ohbayashi, T., Horiguchi, M., Kita, T., Nakamura, T.: Latent TGF- $\beta$  binding protein-2 (LTBP-2) interacts with DANCE, suggesting a novel mechanism of elastogenesis. 第 58 回日本細胞生物学会大会 (大宮、2005 年 6 月 15-17 日)

#### 招待講演

・ Nakamura, T.: Molecular mechanisms of elastic fiber organization by DANCE/fibulin-5. Gordon Conference on Elastin and Elastic Fiber (July 31, 2005, New Hampshire, U. S. A.).

・ 中邨智之: 「血管機能と弾性線維」 第 1 回安曇野循環器フォーラム (長野、2004 年 8 月 17 日)

・ 中邨智之: 「弾性線維形成と再生の分子機構」 第 1 2 回皮膚創傷治癒フォーラム (東京、2005 年 6 月 11 日)

#### 特許出願

発明の名称: DANCE またはその発現を増強する因子による弾性線維再生の方法

発明者: 中邨智之、平井希俊

国内出願日: 2005 年 2 月 7 日 出願番号: 特願 2005-030864

発明の名称: 切断型 DANCE、DANCE 複合体、及びこれらを用いる方法

発明者: 中邨智之

国内出願日: 2004 年 3 月 29 日 出願番号: 特願 2004-096685

国際出願日: 2005 年 3 月 4 日 国際出願番号: PCT/JP2005/004274