

最先端・次世代研究開発支援プログラム  
事後評価書

研究課題名	生体組織の伸縮性を生み出す仕組みの研究
研究機関・部局・職名	関西医科大学・医学部・教授
氏名	中邨 智之

## 【研究目的】

我々の体の組織の中でも肺や動脈、皮膚などは弾性(引き延ばしても元に戻る性質)に富み、伸び縮みすることによって機能を発揮する。組織の弾性を担うのは弾性線維という細胞外線維であり、上記の組織には弾性線維が特に多く含まれる。加齢によって弾性線維の劣化・断裂がおこり、組織が伸び縮みできなくなることが肺気腫、動脈中膜の硬化、皮膚のたるみなどの直接的な原因となるため、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。

弾性線維はエラスチンタンパク質がマイクロフィブリルという線維の上に沈着し、リシノキシダーゼという酵素によって互いにクロスリンクされることでできるが、このプロセスがどのように進むかについてはよくわかっておらず、弾性線維を再生する技術も存在しない。

我々はマウス発生期心臓より Fibulin-5 (別名 DANCE) という分泌タンパク質をクローニングし (Nakamura T et al, *J Biol Chem* 274: 22476-83, 1999)、その遺伝子欠損マウスを作成したところ、全身の弾性線維がばらばらになっていることを見出した (Nakamura T et al, *Nature* 415:171-75, 2002)。Fibulin-5 遺伝子欠損マウスの表現型はヒトの老化に非常に類似しており、皮膚は弾性が消失してたるみ、肺気腫を来し、動脈は硬化して蛇行していた。これは弾性線維の形成異常によるものであり、Fibulin-5 は弾性線維の形成に必須のタンパク質であるといえる。また我々は初めて無血清線維芽細胞培養での弾性線維形成系を作成し、Fibulin-5 が強力な弾性線維形成誘導活性を持つことを見出した (Hirai M et al, *J Cell Biol* 176:1061-71, 2007)。Fibulin-5 はシグナル分子としてではなく、エラスチンやマイクロフィブリルを細胞外で集めて組み立てるオーガナイザーとして働いていると考えられた。また、弾性線維が作られる発生期・成長期を過ぎてからも Fibulin-5 は発現し続けていること、老化して弾性が低下したマウスの皮膚にある Fibulin-5 は不活性な切断型が大半となっていたことから、弾性線維の維持・再生にも Fibulin-5 が重要な働きをしている可能性がある。

一方、Fibulin-5 によく似たファミリー分子である Fibulin-4 の遺伝子欠損マウスは、弾性線維がほとんどできないだけでなく、生後すぐに動脈と横隔膜の破裂により死亡することが明らかとなった (McLaughlin PJ et al, *Mol Cell Biol* 26:1700-9, 2006)。平滑筋特異的 Fibulin-4 コンディショナルノックアウトマウスを作成したところ、動脈の硬さは Fibulin-5 遺伝子欠損マウスと同等だが上行大動脈瘤を発症することがわかった (Horiguchi M et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 106:19029-34,

2009)。これらは Fibulin-4, 5 が別々のメカニズムによって弾性線維形成に必須の役割を果たしていることを示唆している。さらに最近 LTBP-4 (latent TGF  $\beta$ -binding protein 4) 遺伝子欠損マウスの弾性線維形成異常が報告された。

エラスチン、ミクロフィブリル、リシルオキシダーゼが弾性線維を構成する主役と考えられてきたが、以上のようにこれらを会合させオーガナイズする Fibulin-4, 5, LTBP-4 のような分子が必須であることがわかってきたため、その作用機序を明らかにすることが弾性線維形成の分子機構を理解する鍵であるといえる。

この目的のため以下の研究項目を実施する。

#### 1) Fibulin-4 の機能の解明

Fibulin-4 遺伝子欠損マウスとリシルオキシダーゼ (LOX) 欠損マウスはともに横隔膜と動脈の破裂により生後すぐ致死となり、ほぼ同じ表現型を示す。Fibulin-4 遺伝子欠損マウスでの LOX 活性を調べるとともに、LOX の酵素活性部位形成への Fibulin-4 の関与を生化学的解析により明らかにする。

#### 2) Fibulin-5 と LTBP-4 の作用機序の解明

Fibulin-5 はエラスチンをミクロフィブリルまでリクルートする働きがあることを申請者は報告した。LTBP-4 と Fibulin-5 は直接相互作用するため、この相互作用が弾性線維形成に重要である可能性が高い。その機序をリコンビナントタンパク質と線維芽細胞培養での弾性線維形成系を用いて明らかにする。

#### 3) 弾性線維維持・再生における Fibulin-5 の役割の研究

成長期を過ぎても発現している Fibulin-5 が弾性線維の維持・再生に必要であるという仮説を検証するため、成体になってから Fibulin-5 を欠損させることができる薬剤誘導性コンディショナルノックアウトマウスを作成する。上記仮説が正しければ、Fibulin-5 を増やすことが組織弾性喪失による老化関連疾患の治療となりうる。

#### 4) 弾性線維再生技術の開発

リコンビナント Fibulin-5、LTBP-4 タンパク質を用いて生体内・あるいは人工皮膚などにおける弾性線維再生を試みる。また新たな弾性線維形成因子を加えて弾性線維再生カクテルの改良を行う。

### 【総合評価】

	特に優れた成果が得られている
○	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

### 【所見】

#### ① 総合所見

本研究課題は Fibulin-5 の同定結果を基盤とし、弾性線維の形成過程の解明を目的とするもので、独創性の高い研究である。同時に、我が国を代表する弾性線維の研究と言える。弾性線維の形成・再生のメカニズムを明らかにし、弾性線維を再生する技

術を開発することによって、加齢や喫煙・紫外線による弾性線維の劣化・断裂が直接原因となる肺気腫、動脈瘤、皮膚のたるみなどの予防・治療に役立てるという研究には、新規性があり、ライフイノベーションの推進にも期待できるテーマである。一部の研究項目にやや遅れが見られるが、Fibulin-4 の生体内での機能解明、LTBP-4 の弾性線維形成における機能解明等、重要な成果が得られている。しかし、弾性線維の維持・再生に関する研究は予備的データが集積しつつある段階にあり、また再生技術の開発についての道筋は理解できるが、成果の達成度は高くなく、今後の研究の発展に委ねられている。期待されるヒト肺気腫の病態解明、喫煙との関係などは、まずは疾患モデル動物での解析が必要であり、当初の研究目的に向け、補助事業期間終了後も含めた研究の進展に期待する。

研究費の執行に関しては、大型研究費である利点を研究員の雇用、機器の購入等で十分に活用できていない部分が見られた。総合すると、一見地味な研究ではあるが、NEXT プログラムとして十分な成果を挙げていると言えるだろう。

## ② 目的の達成状況

・ 所期の目的が

(全て達成された ・ 一部達成された ・ 達成されなかった)

生体を構成する重要な線維は、膠原線維と弾性線維であるが、膠原線維の形成については今まで多くの知見が得られていたが、弾性線維の形成機構については十分な解明がなされていなかった。本研究課題、研究代表者の Fibulin-5 の同定を基盤とする研究で、弾性線維の形成過程の解明を目的とし、独創性の高い研究である。LTBP-4 が Fibulin-5 を介してエラスチンをマイクロフィブリルにリクルートすることを明らかにした点や、LTBP-4 と Fibulin-5 の相互作用の実態を把握することによって弾性線維形成のモデルを提出できたことは大きな成果といえる。また、研究当初の計画には記載されていなかった LTBP-2 に関する研究も順調に進展した。一方、一部の研究項目にやや遅れが見られたこと、弾性線維の維持再生における Fibulin-5 の役割の検討用の遺伝子改変マウスの作製が首尾良く進まなかった点は残念ではある。総合的に判断して、ほぼ順調に進捗したと考えられる。

弾性線維維持・再生における Fibulin-5 の役割という研究課題で、Fibulin-5 遺伝子座に薬剤耐性 Cre リコンビナーゼを挿入したマウスの作製を計画しているが、現在 ES 細胞の樹立を行い、キメラマウスを作製し、解析している段階である。補助事業期間内に、再生における Fibulin-5 の機能を解析できなかったことは残念である。しかし、方法は明確であり、補助事業期間終了後も研究が継続されることを期待したい。

## ③ 研究の成果

・ これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が  
(ある ・ ない)

・ ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が  
(創出された ・ 創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が (□ある ・ ■ない)

弾性線維は動脈硬化、肺気腫をはじめとして、種々の老化関連疾患に係わる重要な細胞外マトリックスである。しかし、弾性線維の形成機構、再生に関しては全くと行ってよいほど知見の蓄積がないのが現状である。本研究課題によりマイクロフィブリルへのエラスチンの沈着が、Fibulin-5 と LTBP-4 により制御されていることが解明された。また、LTBP-2 等の他の関連因子の役割の個体レベルにおける解明など、弾性線維に関連して広範な解析結果が得られつつある。これらの成果は組織構築を理解する上で重要な知見であり、先進性・優位性があると考えられる。実験系の吟味が必要であるが、今後、個体レベルでの弾性線維の再生機構の開発のブレークスルーとなり得る研究成果である。

弾性線維の形成機構の解明により、人為的に組織を改変できる可能性があり、今後の再生医療等に応用可能な成果と考えられる。薬剤誘導性 Fibulin-5 過剰発現マウスおよび薬剤誘導 LTBP-4 過剰発現マウスは、再生医療への応用を考えた時に重要なモデルであり、補助事業期間終了後も研究が継続されることを期待したい。

当初の目的に則した研究成果が得られているが、当初の目的の他の特記すべき研究成果は得られていない。

#### ④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が  
(■見込まれる ・ □見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が  
(□見込まれる ・ ■見込まれない)

細胞外マトリックスの線維成分の中では、コラーゲン線維の組み立てられ方の手順や病態との関連に関する研究業績は蓄積している。しかし、弾性線維に関しては、組み立てや維持・再生に関与する分子を含めまだよく知られていない。本研究課題の成果の一部に、細胞培養系で人為的に弾性線維の量を変えることに成功しており、再生医療等の関連分野の進展に寄与できる可能性がある。また、Fibulin-5, 4 の欠損マウスなどをモデル動物とした老化研究は、マトリックスバイオロジーをはじめ、呼吸器学、循環器学、形成外科学の発展に寄与すると考えられる。

本研究課題は、加齢や喫煙・紫外線による弾性線維の劣化・断裂が直接原因となる肺気腫、動脈瘤、皮膚のたるみなどの予防・治療に役立てるということを目指しており、応用技術開発ができれば、超高齢化社会となった我が国の社会的、経済的課題の解決への貢献が見込まれる。補助事業期間後も含めた研究の進展に期待する。

#### ⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (■行われた ・ □行われなかった)

研究計画は目的達成のために適切に設定されているが、研究項目が多かったこと、予算規模も大型であったこと、予算の執行が遅れぎみであったことから、研究開始当初から研究員の増員を行うべきであったと考える。十分なマンパワーがあれば、更に

良い成果が得られた可能性がある。

査読のある論文への発表は適切であるが、現在得られている知見を早く論文化することを期待する。専門家向けおよび一般人向け会議発表などは適切に行っている。2011年と2012年に受験者向けのオープンキャンパスの中で、高校生と保護者に研究内容を紹介し、パネル展示をして対話の機会をもっている。今後、図書の執筆や新聞等のメディアに向けての発信の取り組み、高齢者に向けての対話などについても検討してほしい。