

弾性線維形成に必須の LTBP-4 の役割

中邨 智之

1. はじめに

脊椎動物の組織に伸縮性（弾性）を与えているのは弾性線維という細胞外マトリックスである。特に肺、動脈、皮膚などでは伸縮性がその機能に重要であり、これらの組織には弾性線維が多く含まれている。弾性線維は加齢とともに劣化するだけでなく、紫外線や喫煙刺激によってマクロファージや好中球から誘導されるエラストラーゼによる分解を受ける。このことが肺気腫、皮膚のたるみ、動脈中膜の硬化といった老化に伴う疾患や表現型の直接原因となる。

弾性線維のターンオーバーは非常に遅く、弾性線維を再生することは困難と考えられてきた。しかしそれは弾性線維形成の分子機構が理解されれば克服可能な問題かもしれない。筆者らは弾性線維形成に必須の Fibulin-5 という分泌タンパク質の発見を糸口にして、弾性線維形成の分子機構を研究してきた。最近、LTBP-4 という分泌タンパク質が Fibulin-5 と協調して弾性線維形成を行う仕組みを見いだしたので紹介する¹⁾。

2. Fibulin-5 はエラスチンの沈着を促進する

筆者が弾性線維研究を始めたきっかけは、機能未知のままクローニングした Fibulin-5（別名 DANCE）²⁾ という分泌タンパク質のノックアウトマウス (*Fbln5* ノックアウトマウス) を作製したところ、全身の弾性線維形成不全を起こすことがわかったことである。このマウスは肺気腫、皮膚のたるみ、動脈の硬化と蛇行といった、ヒトの老化のような表現型を示した³⁾。

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 (Fibrillin-1, 2 のホモポリマー) に沈着し、リシルオキシダーゼという酵素によって架橋を受けることでできる。エラスチンはコアセルベーションという凝集を起こす性質が

知られており、37°C 付近で凝集・不溶化するが冷やすとまた溶解する。この性質がエラスチンを沈着させる際に意味があると考えられてきた⁴⁾。では Fibulin-5 は凝集・沈着・架橋といった弾性線維形成のプロセスのどこに作用しているのだろうか。

ヒト皮膚線維芽細胞を無血清で培養するとマイクロフィブリルは形成されるがエラスチンはほとんど沈着しない。ここにリコンビナント Fibulin-5 を加えておくと、エラスチンなどの発現量を変えないままエラスチンのマイクロフィブリル上への沈着を著明に促進した。Fibulin-5 はエラスチンと結合し、またエラスチンのコアセルベーションを促進することもわかった⁵⁾。したがって、Fibulin-5 の役割はエラスチンの凝集と沈着を促進することであると考えられる。しかし Fibulin-5 がどのようにしてエラスチンをマイクロフィブリルにリクルートしているのか、そのメカニズムは不明であった。

3. LTBP-4 は弾性線維形成に必要である

マイクロフィブリルに共局在することが知られているタンパク質に LTBP (latent TGFβ-binding protein) ファミリーがある。LTBP-1~4 までの四つのファミリーメンバーがあり、LTBP-1 と 3 は潜在型 TGFβ [切断されたプロペプチド (latency associated peptide : LAP) と成熟 TGFβ (transforming growth factor β) の複合体] を結合してその貯蔵所として働くことが知られている。しかし LTBP-4 はわずかしかな潜在型 TGFβ を結合せず、LTBP-2 はまったく結合しない⁶⁾。したがって、少なくとも LTBP-2 と 4 には TGFβ の貯蔵所としてではない別の働きがあると予想された。

遺伝子ノックアウトマウスの表現型から、LTBP ファミリーの中で LTBP-4 のみが弾性線維形成に関わることが示唆された。*Ltbp4* ノックアウトマウスは弾性線維が断片化していること、肺気腫になることが報告されたのである⁷⁾。*Ltbp4* ノックアウトマウスの弾性線維を電子顕微鏡で観察すると、マイクロフィブリルの束の中にエラスチンが入り込めず、マイクロフィブリルの束の外で塊を作っており、*Fbln5* ノックアウトマウスの弾性線維と同じ特徴を示していた。

関西医科大学薬理学講座 (〒573-1010 大阪府枚方市新町 2-5-1)

The essential role of LTBP-4 in elastic fiber assembly
Tomoyuki Nakamura (Department of Pharmacology, Kansai Medical University, 2-5-1 Shinmachi, Hirakata, Osaka 573-1010, Japan)

4. LTBP-4 は弾性線維形成を促進する

LTBP-4 の弾性線維形成における作用を調べるため、ヒト皮膚線維芽細胞培養での弾性線維形成系を用いた。この系ではウシ胎仔血清存在下でマイクロフィブリルの網目構造が形成され、その一部にエラスチンが沈着・架橋して弾性線維となる。この弾性線維上で LTBP-4 はほぼ完全にエラスチンと共局在することが蛍光免疫染色で確認された。

LTBP4 を siRNA でノックダウンすると LTBP-4 だけでなくエラスチンも染まらなくなったが、マイクロフィブリルの形成には影響がなかった。リコンビナント LTBP-4 を添加すると、エラスチンの沈着が回復するだけでなく、驚いたことにほとんどのマイクロフィブリルにエラスチンが沈着して元よりはるかに多くの弾性線維が形成された (図 1)。

LTBP4 ノックダウンやリコンビナント LTBP-4 によって弾性線維のコンポーネント (エラスチンや Fibrillin) の発現が変わるわけではなかったため、LTBP-4 はエラスチンをマイクロフィブリルに沈着させる過程で必須の働きをしているものと考えられた。

5. LTBP-4 の弾性線維形成能は TGFβ に依存しない

筆者らはリコンビナント LTBP-4 を 293T 細胞株の培養上清から精製したので、LTBP-4 には少ないとはいえ 293T 細胞由来の TGFβ が結合しているはずである。TGFβ には弾性線維を含む細胞外マトリックスを増やす作用があるとされているので、LTBP-4 の弾性線維形成能に TGFβ が関与しているのかどうかを知る必要がある。

肺上皮細胞株における PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) プロモーター活性化を指標にした TGFβ バイオアッセイで調べるとリコンビナント LTBP-4 42 μmol に

TGFβ 52 pmol が結合していた。これを取り除くため、TGFβ を含まない LAP (empty LAP: eLAP) を LTBP-4 発現 293T 細胞株に強制発現させた。eLAP がドミナントネガティブとして働いて TGFβ-LAP を LTBP-4 から取り除くことを期待したのである (図 2A)。その培養上清から精製したリコンビナント LTBP-4 (LTBP-4 eLAP) には期待とおり TGFβ が検出されなかった。

ヒト皮膚線維芽細胞培養で LTBP4 をノックダウンし、リコンビナント LTBP-4 または LTBP-4 eLAP を培養上清に加えたところ、いずれも同じレベルで弾性線維形成を促進した (図 2B)。これに対して、TGFβ を加えても弾性線

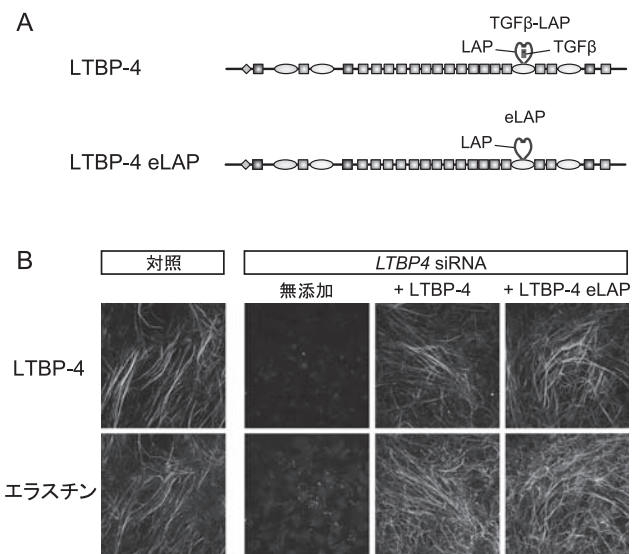


図 2 LTBP-4 の弾性線維形成能は結合する TGFβ に依存しない (A) TGFβ を含まないプロペプチド (eLAP) を強制発現させることにより、LTBP-4 から TGFβ を除くことができる。 (B) リコンビナント LTBP-4 と LTBP-4 eLAP は同等の弾性線維形成能を持っている (抗 LTBP-4 抗体と抗エラスチン抗体による蛍光免疫染色)。

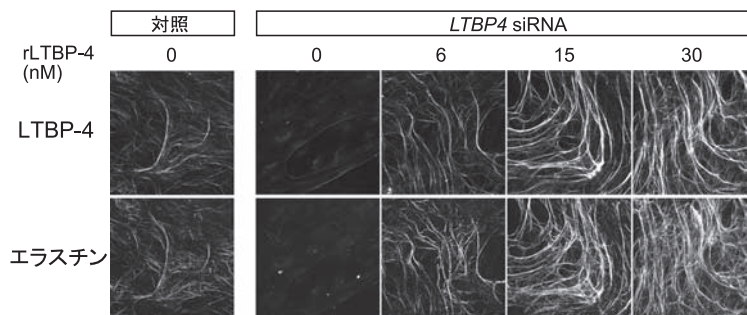


図 1 LTBP-4 の弾性線維形成促進作用
ヒト皮膚線維芽細胞培養において LTBP-4 はエラスチンと共局在する (抗 LTBP-4 抗体と抗エラスチン抗体による蛍光免疫染色)。LTBP4 を siRNA でノックダウンすると LTBP-4 のみならずエラスチンの沈着も消失する。リコンビナント LTBP-4 を培地に添加すると、弾性線維形成が復活するだけでなく元よりはるかに多くの弾性線維が作られる。

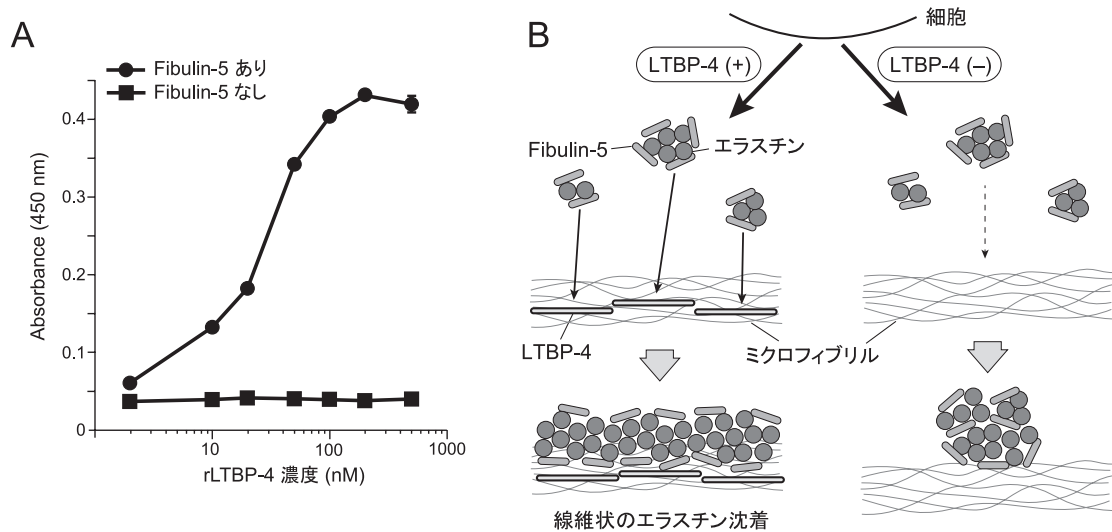


図3 LTBP-4はFibulin-5を介してエラスチンのミクロフィブリル上への沈着を促進する

(A) エラスチンに対するLTBP-4の固相結合アッセイ。LTBP-4はエラスチンに結合できないが、Fibulin-5存在下で結合できるようになる。(B) 弾性線維形成におけるLTBP-4とFibulin-5の役割(モデル)。Fibulin-5はエラスチンの凝集を促進するとともに、ミクロフィブリル上にあるLTBP-4にエラスチンをリクルートする。ミクロフィブリルに沈着した後、さらにエラスチンの凝集が進み、太い弾性線維が形成される。LTBP-4がない、あるいは不足すると、Fibulin-5はエラスチンをミクロフィブリル上に効率よくリクルートできない。

維形成は回復しなかった。したがって、LTBP-4の弾性線維形成能は結合しているTGF β に依存するものではなく、LTBP-4そのものの機能であるといえる。

6. LTBP-4はFibulin-5沈着のための足場となる

上述のように、*Ltbp4*ノックアウトマウスと*Fbln5*ノックアウトマウスの表現型はよく似ている。しかも、LTBP-4もFibulin-5もエラスチンがミクロフィブリルに沈着する際に必要らしい。両因子の関係はどうなっているのだろうか。

まず、両者が特異的に直接結合することがわかった。両者は固相結合アッセイでも免疫沈降でもよく結合した。結合ドメインを調べたところ、LTBP-4のアミノ末端ドメインの中の4-Cys repeatと呼ばれるドメインとFibulin-5のカルボキシル末端ドメインが結合に関わっていた。蛍光免疫染色で両者を同時染色すると、組織においても細胞培養で作る弾性線維においても両者はほぼ完全に共局在していた。

次に、siRNAを用いてヒト皮膚線維芽細胞培養で両者をノックダウンしてみた。*FBLN5*をノックダウンしてもLTBP-4の局在は影響を受けなかったが、*LTBP4*をノックダウンするとFibulin-5のミクロフィブリル上への沈着が消失した。ここにリコンビナントFibulin-5を加えてみたが、線維状に沈着せずに塊状の沈着となった。つまり、LTBP-4はFibulin-5がミクロフィブリル上に沈着するための足場となっていると考えることができる。ちなみに

*Ltbp4*ノックアウトマウスの肺や皮膚においてもFibulin-5の塊状の沈着が認められることから、生体内においてもLTBP-4はFibulin-5がミクロフィブリル上に沈着するための足場として機能すると考えられる。

7. LTBP-4はFibulin-5を介してエラスチンをミクロフィブリルにリクルートする

最後に、エラスチンの沈着のメカニズムを検討した。エラスチンを固相化したプレートを用いて固相結合アッセイを行ったところ、Fibulin-5はエラスチンと非常によく結合したが、LTBP-4はまったく結合しなかった。しかしFibulin-5の存在下ではLTBP-4は固相化したエラスチンによく結合した(図3A)。

Fibulin-5はLTBP-4と直接結合するわけであるから、次のようなモデルを考えることができる(図3B)。1) Fibulin-5はエラスチンと結合し、小さな凝集体を作る。2) LTBP-4はミクロフィブリル上であって、Fibulin-5をリクルートする。3) Fibulin-5と一緒にミクロフィブリル上に沈着したエラスチンは、さらにその場で凝集し太い弾性線維を形成する。もしLTBP-4がなければ、Fibulin-5はエラスチンを連れていく場所が見つからずに塊状の凝集体を作るのであろう。

8. おわりに

LTBP-4が見つかったことにより、Fibulin-5がどのようにしてエラスチンをマイクロフィブリルに沈着させるのか、という問題はとりあえず解決した。しかしエラスチンをリシロキシダーゼが架橋するときのメカニズムについてはまだわかっていないことが多く、次の課題と考えている。

ヒトにおいても *LTBP4* あるいは *FBLN5* のホモ変異が *cutis laxa* (皮膚弛緩症) という疾患の原因となることが報告されている^{8,9)}。遺伝子の変異はなくても、肺気腫、動脈中膜硬化、皮膚のたるみといった弾性線維機能不全が原因となる老化関連疾患や老化現象については、これら弾性線維形成因子の多寡が影響している可能性もあり、臨床検体を用いた研究を進めているところである。

今のところ、生体内で弾性線維を再生する方法はない。しかしヒト皮膚線維芽細胞の培養でリコンビナントLTBP-4が強い弾性線維形成促進作用を示したことは大きな前進である。もし加齢個体で弾性線維が再生されない理由がLTBP-4などの弾性線維形成因子の不足であるなら、それを補うことによる弾性線維再生療法も可能になるのではないかと考えている。

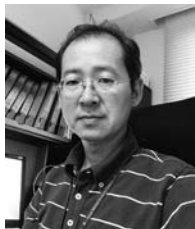
1) Noda, K., Dabovic, B., Takagi, K., Inoue, T., Horiguchi, M., Hirai, M., Fujikawa, Y., Akama, T.O., Kusumoto, K.,

Zilberberg, L., Sakai, L.Y., Koli, K., Naitoh, M., Melchner, von, H., Suzuki, S., Rifkin, D.B., & Nakamura, T. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 2852–2857.

- 2) Nakamura, T., Ruiz-Lozano, P., Lindner, V., Yabe, D., Taniwaki, M., Furukawa, Y., Kobuke, K., Tashiro, K., Lu, Z., Andon, N.L., Schaub, R., Matsumori, A., Sasayama, S., Chien, K.R., & Honjo, T. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 22476–22483.
- 3) Nakamura, T., Lozano, P.R., Ikeda, Y., Iwanaga, Y., Hinek, A., Minamisawa, S., Cheng, C.-F., Kobuke, K., Dalton, N., Takada, Y., Tashiro, K., Ross, J., Jr., Honjo, T., & Chien, K.R. (2002) *Nature*, 415, 171–175.
- 4) Wagenseil, J.E. & Mecham, R.P. (2007) *Birth Defects Res. C Embryo Today*, 81, 229–240.
- 5) Hirai, M., Ohbayashi, T., Horiguchi, M., Okawa, K., Hagiwara, A., Chien, K.R., Kita, T., & Nakamura, T. (2007) *J. Cell Biol.*, 176, 1061–1071.
- 6) Koli, K., Saharinen, J., Hyytiäinen, M., Penttinen, C., & Keski-Oja, J. (2001) *Microsc. Res. Tech.*, 52, 354–362.
- 7) Sterner-Kock, A., Thorey, I.S., Koli, K., Wempe, F., Otte, J., Bangsow, T., Kuhlmeier, K., Kirchner, T., Jin, S., Keski-Oja, J., & Melchner, von, H. (2002) *Genes Dev.*, 16, 2264–2273.
- 8) Urban, Z., Huchtagowder, V., Schürmann, N., Todorovic, V., Zilberberg, L., Choi, J., Sens, C., Brown, C.W., Clark, R.D., Holland, K.E., Marble, M., Sakai, L.Y., Dabovic, B., Rifkin, D.B., & Davis, E.C. (2009) *Am. J. Hum. Genet.*, 85, 593–605.
- 9) Hu, Q., Loeys, B.L., Coucke, P.J., De Paepe, A., Mecham, R.P., Choi, J., Davis, E.C., & Urban, Z. (2006) *Hum. Mol. Genet.*, 15, 3379–3386.

著者寸描

●中邨智之 (なかむら ともゆき)



関西医科大学薬理学講座教授。医学博士。

■略歴 1989年京大医学部卒業。内科研修の後、97年京大大学院博士課程修了(本庶佑研究室)。UCSD (Ken Chien Lab) 留学の後、2002年さきがけ研究員、03年京大先端領域融合医学研究機構助教授。07年より現職。

■研究テーマと抱負 細胞外マトリックスを修復する医療、「マトリックス創薬」を目指したい。

■ウェブサイト <http://www.3.kmu.ac.jp/pharmac/>