

200500337A

厚生労働科学研究研究費補助金

長寿科学総合研究事業

弾性線維形成因子 DANCE を標的とした老化関連疾患の予防・治療法開発の研究

平成17年度 総括研究報告書

主任研究者 中邨 智之

平成18（2006）年4月

## 目 次

### I. 総括研究報告

弾性線維形成因子DANCEを標的とした老化関連疾患の予防・治療法開発の研究 1

中邨智之

(資料) 日経新聞記事 平成17年7月4日朝刊

### II. 分担研究報告

1. 動脈瘤・動脈硬化における DANCE の役割に関する研究 ----- 7

古川 裕

2. ヒトDANCE血清濃度と動脈疾患の関係に関する研究 ----- 11

北 徹

3. 慢性閉塞性肺疾患患者のDANCE遺伝子多型検索に関する研究 ----- 14

室 繁郎

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 17

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 18

弾性線維形成因子 DANCE を標的とした老化関連疾患の予防・治療法開発の研究

主任研究者 中邨 智之

京都大学医学研究科 先端領域融合医学研究機構 助教授

## 研究要旨

加齢による弾性線維の劣化は体中の組織の弾性低下を招き、皮膚のたるみ以外に肺気腫や動脈中膜の硬化・断裂の原因となっている。我々は弾性線維形成に必須の分泌タンパク DANCE (別名 fibulin-5) を見出した。本研究では、老化関連疾患の中でも特に弾性線維の断裂が病因とされる肺気腫・大動脈瘤について DANCE の関与を明らかにするとともに、DANCE が疾患の予防もしくは治療のターゲットになりうるかを研究する。今期は、老化によって皮膚組織 DANCE が切断を受けること、切断された DANCE には弾性線維再生能がないことを明らかにし、ヒト DANCE 測定のための高感度 ELISA の作成を行った。また、DANCE の近縁分子である fibulin-4 が生体内で弾性線維形成に必須の役割をしていることが fibulin-4 遺伝子欠損マウスの解析から明らかになった。

## 分担研究者

北 徹 京都大学・循環器内科学 教授  
古川 裕 京都大学・循環器内科学 助手  
室 繁郎 京都大学・呼吸器内科学 助手

マウスの表現型はヒトの老化に非常に類似しており、皮膚は弾性が無くたるみ、肺気腫をきたし、動脈は蛇行して硬化していた。この結果は、DANCE 欠損による弾性線維形成不全だけで老化の症状の多くを引き起こせることを示しているが、老化の表現型や老化関連疾患に DANCE の変化・減少が関与しているかどうかという研究はまだない。本研究では、老化関連疾患、特に弾性線維の断裂が病因とされる肺気腫・大動脈瘤について DANCE の関与を明らかにするとともに、DANCE タンパクによる疾患の予防、弾性線維の再生技術確立を目指す。今期は、老化によって皮膚組織 DANCE が切断を受けること、切断された DANCE には弾性線維再生能がないことを明らかにし、ヒト DANCE 測定のための高感度 ELISA の作成を行った。

## A. 研究目的

加齢に伴って体中の組織の弾性は失われていく。これは、弾性線維という細胞外線維の劣化・断裂による。このことが引き起こすのは単に「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い。高齢者の主要疾患である肺気腫や動脈中膜の硬化・大動脈瘤、さらに最近では加齢黄斑変性症なども弾性線維の劣化・断裂が直接原因であると考えられてきているため、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。しかし弾性線維形成の機序が不明のため、弾性線維の劣化予防と再生についての研究はほとんどされていない。我々は弾性線維形成に必須の分泌タンパク、DANCE (別名 fibulin-5) を見出した。DANCE 遺伝子欠損

## B. 研究方法

### 1. 組織中 DANCE の加齢による変化

4ヶ月齢と20ヶ月齢の C57BL/6J マウス、

および C57BL/6J 系統にバッククロスした DANCE 遺伝子欠損マウスを屠殺後、胸部大動脈と背中 of 皮膚を取り出してその一部を凍結粉碎し、6 M 尿素で組織ライセートを作成した後、PBS で透析した。ウエスタンブロットには抗マウス DANCE ポリクローナル抗体を用いた。

## 2. 細胞培養における DANCE 切断の検出と切断端のアミノ酸配列決定

シグナルペプチドの下流に FLAG タグを付けた DANCE 発現ベクターを 293T 細胞にトランスフェクションし、無血清培地に替えて 48 時間後に培養上清を SDS-PAGE で展開し、抗 FLAG 抗体または抗 DANCE ポリクローナル抗体でウエスタンブロットを行った。

また、カルボキシル末端に 6xHis タグを付けたヒト DANCE 安定発現株細胞を作成し、その培養上清から Ni-NTA カラムで DANCE を精製し、SDS-PAGE で展開してクーマジー染色を行った。切断型 DANCE のバンドを切り出し、エドマン分解によって切断端のアミノ酸配列を決定した。

## 3. DANCE 依存的弾性線維形成アッセイ系における切断型 DANCE の活性検定

DANCE 依存的弾性線維形成アッセイ系 (未発表) において、リコンビナント DANCE は弾性線維再生能を持つ。プレプロトリプシンのシグナルペプチドと FLAG タグを付加した切断型 DANCE の安定発現株細胞を作成し、その培養上清から切断型 DANCE を精製して弾性線維形成アッセイを行った。抗エラスチン抗体で弾性線維の形成を、抗 FLAG 抗体で入れたリコンビナントタンパクの局在を、それぞれ蛍光免疫染色で確認した。

## 4. 抗ヒト DANCE モノクローナル抗体の作成

精製したリコンビナントヒト DANCE タンパクを Balb/c 系統マウスもしくは Balb/c 系統に掛け合わせた DANCE 遺伝子欠損マウスに免疫し、脾細胞をミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを作成した。ハイブリドーマをスクリーニングして高力価抗 DANCE 抗体を産生するクローンを得た。また、切断部配列ペプチドを抗原にして、同様に DANCE 切断部認識抗体産生クローンを得た。

## 5. DANCE 測定 ELISA、切断型 DANCE 測定 ELISA の作成

抗 DANCE ペプチドポリクローナル抗体の組み合わせ、または上記抗 DANCE モノクローナル抗体を組み合わせる DANCE 測定サンドイッチ ELISA を作成した。1 つの抗体をタンパク吸着プレート (Maxisorp) に固相化し、別の抗体をビオチン化して検出抗体とし、ストレプトアビジン-HRP を用いて検出を行った。

## 6. リコンビナント fibulin-4 の作成とエラスチンとの結合アッセイ

シグナルペプチドの下流に FLAG-6xHis タグをつけた fibulin-4 の安定発現株細胞を作成し、その培養上清から Ni-NTA カラムを用いてリコンビナント fibulin-4 タンパクを精製した。ヒトエラスチンリコンビナントタンパクは大腸菌に発現させて精製した。固相结合アッセイは、タンパク吸着プレート (Maxisorp) にエラスチンを固相化し、さまざまな濃度のリコンビナント fibulin-4 を加えて結合させ、洗浄後に残った結合 fibulin-4 を抗 FLAG 抗体と 2 次抗体で検出した。

(倫理面への配慮)

ヒト血中 DANCE 濃度の測定は、京都大学医学部の倫理委員会での承認を得た上で、インフォームドコンセントを書面で得た被験者

のみを対象に行った。同研究では、被験者から静脈血約10 mlを採取する以外に被験者に侵襲を与えない。また、サンプルのデータベース登録時には患者名は登録されず、データはグループ間での平均値・標準偏差など統計上の処理後のものだけが公表され、個人別のデータの公表は行わないなど、被験者の個人情報の管理には十分注意した。

マウスを用いる実験は、苦痛負荷は含まず、手術・屠殺は麻酔下に施行した。動物実験計画はすべて京都大学医学部動物実験委員会の承認を得て行った。

## C. 研究結果

### 1. 組織中 DANCE の加齢による変化

抗マウス DANCE 抗体を用いたウェスタンブロットにより、4ヶ月齢のマウス大動脈組織には多くの DANCE タンパクが検出された。20ヶ月齢のマウス大動脈組織からも DANCE タンパクが検出されたが、量は4ヶ月齢のものとは比べて約半分であった。

次に、皮膚組織内 DANCE を調べた。4ヶ月齢マウスの皮膚には約55 kD の全長 DANCE が多く含まれていたが、10ヶ月齢マウスの皮膚では全長 DANCE が著明に減少しており、約45 kD のバンドが増強していた。ヒトの皮膚組織でも加齢によって DANCE タンパクの切断と減少がともに起こっていることを確認した。

### 2. 細胞培養における DANCE 切断の検出と切断端のアミノ酸配列決定

シグナルペプチドの下流に FLAG タグを付けた DANCE コンストラクトを293T細胞に発現させ、培養上清を SDS-PAGE で展開し、抗 FLAG 抗体および抗 DANCE ポリクローナル抗体を用いてウェスタンブロットを行った。抗 DANCE 抗体では老化マウス皮膚と同様に2本のバンドが検出されたが、抗

FLAG 抗体では約55 kD のバンドのみが検出された。これはアミノ末端ドメイン約10 kD が切断・分解をうけていることが原因と考えられたため、プロテアーゼ阻害剤が DANCE の切断を阻害できるかどうかを検討した。システインプロテアーゼ阻害剤 E64 では切断が阻害されなかったが、セリンプロテアーゼ阻害剤であるアプロチニンではほぼ完全に DANCE 切断が阻害された。すなわち、DANCE はセリンプロテアーゼによってアミノ末端ドメインが切断されることが明らかになった。

次に、カルボキシル末端末端に6xHis タグをつけたリコンビナント DANCE タンパクを精製し、SDS-PAGE で展開、クーマジューブルーで染色し、約45 kD のバンドを切り出してエドマン分解により切断部位のアミノ酸配列を決定した。この情報に基づき、はじめからアミノ末端ドメインを欠く切断型 DANCE の発現コンストラクト、安定発現株細胞を作成して、リコンビナント切断型 DANCE タンパクを精製した。

### 3. DANCE 依存的弾性線維形成アッセイ系における切断型 DANCE の活性検定

我々の開発した DANCE 依存的弾性線維形成アッセイ系（論文準備中）では、リコンビナント DANCE タンパクを培地中に入れておくと10日後には抗エラスチン抗体で染色される弾性線維ができる。このとき加えたリコンビナント DANCE タンパクは弾性線維上に局在する。この系に全長 DANCE のかわりにリコンビナント切断型 DANCE タンパクを加えておくと、弾性線維は形成されず、加えたリコンビナントが線維状に並ぶこともなかった。すなわち、切断型 DANCE には弾性線維再生能がないと考えられた。

### 4. 抗ヒト DANCE モノクローナル抗体の作

成

ポリクローナル抗 DANCE 抗体を用いて DANCE 測定 ELISA 系の作成を試みたが、感度が十分上がらなかった。このため、抗 DANCE モノクローナル抗体を作成した。定法に従って Balb/c 系統のマウスにヒト DANCE タンパクを免疫する方法を行ったが力価が上昇しなかった。これは、DANCE はアミノ酸配列が種間で非常に保存された分泌タンパクであるので野生型マウスが DANCE タンパクに対して免疫寛容になっているためと考えられた。そこで Balb/c にバッククロスした DANCE 遺伝子欠損マウスに DANCE タンパクを免疫したところ、非常に高力価の血清が得られた。このマウス脾細胞からハイブリドーマを樹立し、数クローンの高力価モノクローナル抗体を得た。これとは別に、DANCE 切断部ペプチドを Balb/c 系統マウスに免疫して DANCE 切断部位を認識するモノクローナル抗体を数クローン得た。

#### 5. DANCE 測定 ELISA、切断型 DANCE 測定 ELISA の作成

上記のモノクローナル抗体を組み合わせるとサンドイッチ ELISA を作成したところ、高感度（検出限界 50pg/ml）に DANCE を検出することができた。さらに、抗体の組み合わせによって、全長と切断型 DANCE を両方含むようなタンパクは高感度に検出するが、全長 DANCE だけだと非常に低感度になる興味深い ELISA ができた。この ELISA は切断型 DANCE を特異的に検出することができると考えられる（検出限界約 80pg/ml）。

#### 6. リコンビナント fibulin-4 の作成とエラスチンとの結合アッセイ

fibulin-4 は DANCE (= fibulin-5) と同じドメイン構造を持ち、アミノ酸配列にして 50% 前後の相同性をもつ、非常に似通った近

縁分子である。アリゾナ大との共同研究により、fibulin-4 遺伝子欠損マウスは弾性線維がほとんど形成されず、大動脈の破裂により生後 1 日以内に死亡することがわかった。DANCE はカルシウム依存的にエラスチンと結合するので、fibulin-4 も同様の性質があるかどうかを調べた。エラスチンを固相化した上にリコンビナント fibulin-4 を添加すると、fibulin-4 は強くエラスチンと結合した。この結合は EDTA 存在下でほぼ完全になくなったので、カルシウム依存的結合と考えられた。

#### D. 考察

加齢によって皮膚組織中 DANCE の大部分は 10 kD ほど小さな分子量のものになっていた。この低分子型 DANCE は細胞培養でも観察され、セリンプロテアーゼ阻害剤でなくなることから、切断型 DANCE であると考えられる。すなわち、DANCE は加齢によって切断を受ける。DANCE の切断が弾性線維形成において持つ意味は、今回の研究で明らかとなった。全長 DANCE が弾性線維再生能を持つのにに対して、切断型 DANCE は全く弾性線維再生能がなかったのである。したがって、DANCE の切断は DANCE の弾性線維再生生活性の不活化であるということができる。

ヒトの加齢や老化関連疾患で DANCE の量、切断の有無を調べることは、弾性線維再生能を測定することに近いと考えられるため、非常に重要である。このために DANCE 測定系が待たれていたが、ようやく DANCE を高感度に測定できる ELISA ができた。さらに、切断型 DANCE を特異的に測定するという困難なテーマにも挑戦し、切断型 DANCE 特異的 ELISA を作ることに成功した。今後、ヒト血清を用いて基礎データを採集する予定である。

DANCE 遺伝子欠損マウスで弾性線維がばらばらになっていることから、DANCE 近縁分子は DANCE の機能を補うことができない、

すなわち同じ機能を持たないと考えられる。  
したがって fibulin-4 遺伝子欠損マウスが弾性線維形成不全を示すことは予想外であった。  
今後は DANCE だけでなくその近縁分子を含めた解析が重要になると考えられる。

#### E. 結論

少なくともマウス皮膚では老化によって DANCE の切断、すなわち DANCE の弾性線維再生能の不活化がおこる。

新たに作成した ELISA によって DANCE および切断型 DANCE の高感度測定が可能になった。

DANCE だけでなく DANCE 近縁分子である fibulin-4 も弾性線維形成に必須であり、弾性線維形成過程において DANCE と fibulin-4 は互いに別々の寄与をしている。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

McLaughlin PJ, Chen Q, Horiguchi M, Starcher BC, Stanton JB, Broekelmann TJ, Marmorstein AD, McKay B, Mecham R, Nakamura T, Marmorstein LY: Targeted disruption of fibulin-4 abolishes elastogenesis and causes perinatal lethality in mice. *Mol Cell Biol* 26:1700-9, 2006.

##### 2. 学会発表

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

中邨智之:「弾性線維の形成と再生の分子機構」第12回皮膚創傷治癒フォーラム(招待講演)(東京、2005年6月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58回日本細胞生物学会大会(大宮、2005年6月15-17日)

Hirai, M., Ohbayashi, T., Horiguchi, M., Kita, T., Nakamura, T.: DANCE promotes elastic fiber development. An implication for future aging therapies. 第70回日本循環器学会学術集会(名古屋、2006年3月24-26日)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

特許出願

国内出願番号: 特願 2005-030864 国内出願日: 平成17年2月7日

国際出願番号: PCT/JP2006/301372 国際出願日: 平成18年1月23日

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

出願人: 京都大学

# 肌の張り保つたんぱく

## 京大、弾性線維の再生に道

京都大学の中邨智之・教授は肌の張りなど皮膚の弾力を保つのに欠か

せないたんぱく質を発見した。このたんぱく質がないネズミを人工的に作

ったところ、皮膚がたるんで、元に戻らなくなった。肌の弾力を取り戻す

「じわとり薬」などの開発につながりそうだ。

京大チームはネズミにある「DANCE」というたんぱく質の遺伝子の働きを止めると、皮膚が延びることを突き止めた。動脈も硬くなってい

た。このたんぱく質が体内で作られなくなると、皮膚や血管などに弾力を与える弾性線維がうまくできなくなる可能性があるという。

ケガの治療に移植用の皮膚を再生する取り組みが進んでいるか、現在は弾性線維を作ることができず、傷を覆つにどま

っている。弾性線維を再生することができれば、張りのある皮膚を移植することが可能になる。中邨助教は「老化に



ると同時に、現在は難いとされる弾性線維の生にも乗り出す。



厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

動脈瘤・動脈硬化における DANCE の役割に関する研究

分担研究者 古川 裕 京都大学医学研究科循環器内科学 助手

## 研究要旨

現在までに動脈瘤の進行を止める方法はなく、径の拡大を放置すると破裂の危険が高くなるため、動脈瘤の発症機序の解明が待たれている。真性動脈瘤の大部分は動脈粥状硬化に伴って起こるものであり、動脈中膜の弾性板破壊を特徴としている。分泌タンパク DANCE は弾性線維・弾性板の形成に必須であるだけでなく、動脈粥状硬化巣でも発現上昇が認められており、動脈瘤の発症機序に何らかの関わりがある可能性がある。DANCE 遺伝子の単独欠損では動脈板がばらばらになっており動脈の硬化や蛇行は見られるものの、動脈径の増大は見られなかった。DANCE 遺伝子欠損マウスと ApoE 遺伝子欠損マウスの掛け合わせで動脈粥状硬化の悪化や動脈瘤の発生がないかを検討している。

### A. 研究目的

大動脈瘤はその拡大を放置すると破裂し致命的となる。米国では腹部大動脈瘤が近年顕著な増加を示しており、1年間に約 15,000 人が腹部大動脈瘤の破裂により死亡しているとされている。わが国における大動脈瘤の発症頻度や大動脈瘤による死亡数などの詳しい疫学調査結果はないが、近年、社会の高齢化・生活習慣の欧米化とともに他の動脈硬化性疾患同様、増加傾向にあることは間違いない。特に、腹部大動脈瘤に関しては、高齢がその危険因子の一つであることから、高齢化社会での有病率の増加とともにその重要性を増している。動脈瘤の薬物治療は降圧剤で進行の遅延を期待するしかなく、動脈瘤の発症機序の解明が待たれている。真性動脈瘤の大部分は動脈粥状硬化に伴って起こるものであり、動脈中膜の弾性板破壊を特徴としている。分泌タンパク DANCE は動脈粥状硬化巣に発現が増加するインテグリンリガンドであるが、最近 DANCE の遺伝子欠損マウスは動脈中膜

弾性板がばらばらになっており、動脈の硬化と蛇行を伴うことが明らかとなった。本研究では、DANCE 遺伝子欠損マウスを用いて大動脈瘤・動脈硬化における DANCE の役割を明らかにすることを目的とする。

### B. 研究方法

#### マウス大動脈内圧-外径曲線の作成 (図 1)

胸部大動脈を摘出し、その枝を全て結紮し、第 3 枝遠位部で大動脈を結紮した。取り出した大動脈の遠位端にカニューレを挿入し、カニューレの反対側は注射器と圧トランスデューサーにつないだ。注射器で大動脈内圧を変化させながら、エッジ検出装置（キーエンス CV-2000）を用いて第 1 肋間動脈分枝部よりやや近位の大動脈外径を測定し、内圧と外径の関係をグラフにプロットした。

#### DANCE、ApoE 両遺伝子欠損マウスの作成

DANCE 遺伝子欠損マウスは C57BL/6J 系統に 10 回以上バッククロスした。同じく

C57BL/6J 系統の ApoE 遺伝子欠損マウスと掛け合わせ、DANCE、ApoE 両遺伝子欠損マウスを作成した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いる実験は、苦痛負荷は含まず、手術・屠殺は麻酔下に施行した。動物実験計画はすべて京都大学医学部動物実験委員会の承認を得て行った。

### C. 研究結果

#### DANCE 遺伝子欠損マウスの大動脈の生理学的解析 (図 2)

DANCE 遺伝子欠損マウス大動脈の内圧-外径曲線は野生型マウスと比べて明らかに傾きが大きく、特に生理的血压変動範囲 (約 50 - 140 mmHg) においてその傾向が顕著であった。これは血管のコンプライアンス低下と言い換えることができる。しかし DANCE 遺伝子欠損マウスの大動脈径は野生型マウス大動脈と比べてむしろやや小さかった。加齢によって血管径が変わることも考えられるため、4ヶ月齢および20ヶ月齢の DANCE 遺伝子欠損マウス、野生型マウスの大動脈について同様の解析を行い比較した。DANCE 遺伝子欠損マウスも野生型マウスも加齢に伴って大動脈径の増大を認めたが、DANCE 遺伝子欠損マウスが特に顕著というわけではなく、DANCE 遺伝子欠損によって中膜動脈板がばらばらになってもそれだけでは動脈瘤は惹起されないと結論した。興味深いことに、20ヶ月齢はマウスとしては高齢であるにもかかわらず、野生型であっても動脈のコンプライアンス低下はおこっていなかった。

#### DANCE、ApoE 両遺伝子欠損マウスの作成

ApoE 遺伝子欠損マウスは動脈粥状硬化モデルマウスであり、低頻度ではあるが動脈瘤を認めることもある。一方、DANCE 遺伝子欠

損マウスは弾性板が最初から破壊されている。弾性板の破壊+粥状硬化が動脈瘤発症に十分であるかどうかを調べるため、ApoE 遺伝子欠損マウスと DANCE 遺伝子欠損マウスを掛け合わせ、DANCE と ApoE の両遺伝子欠損マウスを作成した。現在、高脂肪食を投与して飼育中である。

### D. 考察

大動脈瘤は中膜弾性板の破壊像が特徴とされ、中膜弾性板の破壊は瘤の形成と動脈径増大に直接的寄与があると考えられてきた。しかし DANCE 遺伝子欠損マウスでは中膜弾性板がばらばらに壊れているにもかかわらず動脈瘤の形成や動脈径の増大は認めなかった。このことは、中膜弾性板の破壊だけでは動脈瘤は形成され得ないということを示している。一方、DANCE 遺伝子欠損マウスの大動脈コンプライアンスが著明に低下していたことから、中膜弾性板が動脈の弾性を担っていることは明らかである。これらのことより、中膜弾性板の主な役割は血管弾性であり、動脈の強度を規定するのは他の細胞外マトリックス (コラーゲンなど) であると考えられる。今後、DANCE と ApoE 両遺伝子欠損マウスの解析によって中膜弾性板の破壊+動脈粥状硬化で動脈瘤が惹起されるかどうかを検討していきたい。また、野生型マウスは老化によっても動脈のコンプライアンスが低下しないことが今回わかったが、このことはマウスをモデルとして血管老化の研究をすることの妥当性に疑問を呈するものである。加齢による血管コンプライアンス低下を来す別のモデル動物が血管老化研究に適当であると考えられる。

### E. 結論

DANCE 遺伝子欠損による動脈中膜弾性板の形成不全だけでは大動脈瘤はおこらない。

加齢によっても大動脈瘤がおこることはなかった。コラーゲン線維の破壊など別の要因が大動脈瘤発症には必須であると考えられる。また、野生型マウスは老化によっても動脈が硬くならないので、マウスを用いた血管老化研究には注意が必要である。

**F. 健康危険情報**

特になし。

**G. 研究発表**

特になし。

**H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)**

特になし。

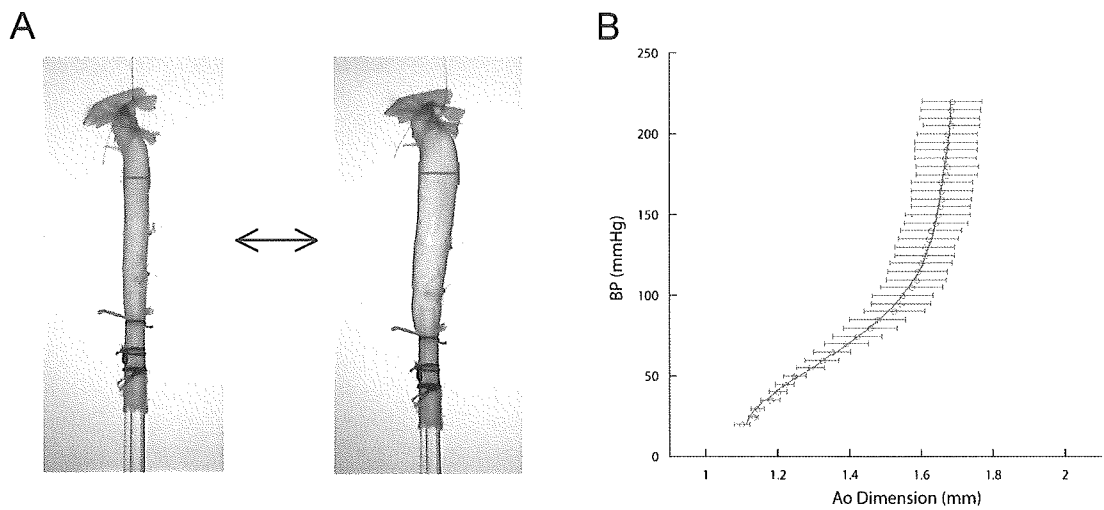


図1. マウス大動脈内圧-外径関係の測定法。A. 大動脈のセットアップと外径の測定位置（赤線）。遠位端に挿入したカニューレより圧を加え、内圧と同時にその時の外径をエッジ検出器により測定する。B. 野生型マウスの大動脈内圧-外径曲線の一例。生理的血压変動範囲（約50-120mmHg）における曲線の傾きが血管の硬さを表し、硬いほど傾きが大きくなる。

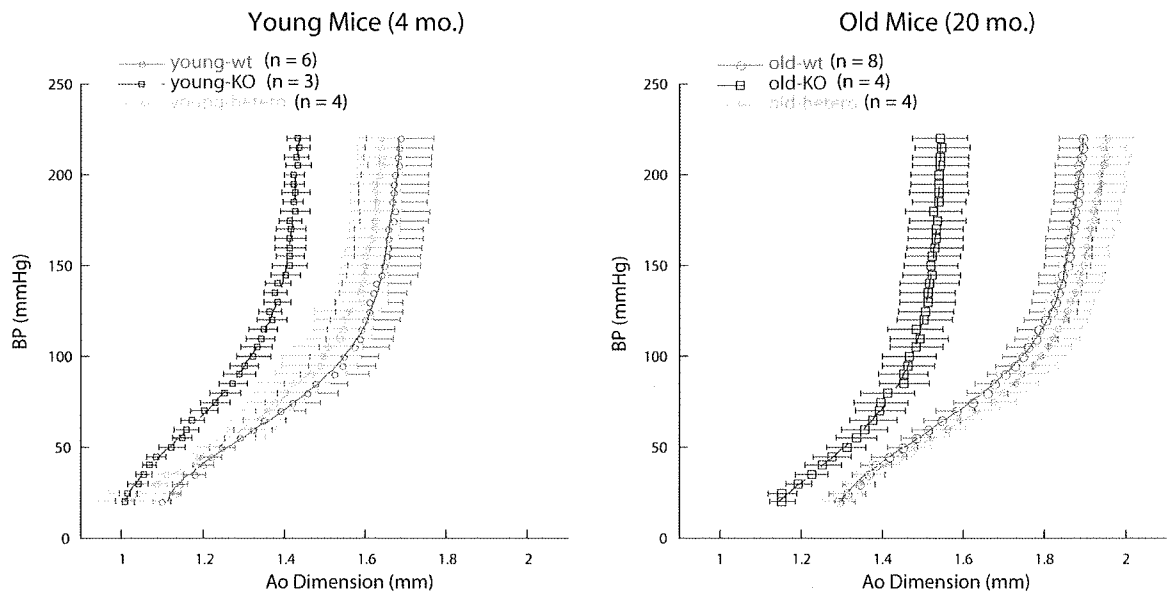


図2. 野生型マウスおよびDANCE遺伝子欠損マウスの加齢による大動脈の力学的特性の変化。DANCE遺伝子欠損マウスの大動脈は明らかに硬い。いずれのマウス大動脈も加齢によって外径は大きくなるが硬くはならない。

ヒト DANCE 血清濃度と動脈疾患の関係に関する研究

分担研究者 北 徹 京都大学医学研究科循環器内科学 教授

## 研究要旨

これまでの DANCE 遺伝子欠損マウスを使った研究、および細胞培養における DANCE を用いた弾性線維再生の研究から、DANCE が弾性線維形成のオーガナイザーとも呼べる働きをする分泌タンパクであり、組織中の全長 DANCE 量は組織の弾性線維再生能を反映していると考えられることができる。加齢によって動脈は硬くなるが、これには内膜の病変である粥状硬化やカルシウム沈着に加えて中膜弾性板の機能低下が関与している。マウスを用いた研究では加齢によって大動脈中 DANCE タンパク量は半減していた。マウスよりもはるかに長い寿命を持つヒトの血管において加齢による DANCE タンパク量の変化と動脈疾患の関係を調べるため、DANCE を高感度に測定するための ELISA を作成し、動脈疾患患者血清を集めている。

### A. 研究目的

血管が金属の管や土管と最も異なるのは、弾性があり伸展性（コンプライアンス）が大きいという点である。この性質のため、収縮期に大きな圧がかかるときは動脈経が広がり動脈長が伸び、拡張期に圧が下がると元に戻る。その結果、脈圧（収縮期圧と拡張期圧の差）は小さく保たれる。ところが、老化とともに動脈の伸展性は低下し、硬くなっていくため、脈圧は大きくなる。臨床的に脈圧の増大は非常に大きな問題で、高血圧患者においては脈圧（収縮期圧ではなく）の大きい人ほど冠動脈疾患のリスクが高いこと、心不全の予後が悪いことなどが Framingham study その他の大規模な調査でわかっている。脈圧の増大には動脈粥状硬化やカルシウム沈着だけではなく中膜弾性板の劣化が関与していると考えられる。中膜弾性板の破綻を来すモデルには DANCE 遺伝子欠損マウスがある。このマウスの動脈コンプライアンスは低く、脈圧は高い。これまでの DANCE 遺伝子欠損マウス

を使った研究、および細胞培養における DANCE を用いた弾性線維再生の研究から、DANCE が弾性線維形成のオーガナイザーとも呼べる働きをする分泌タンパクであり、組織中の全長 DANCE 量は組織の弾性線維再生能を反映していると考えられることができる。本研究では、加齢に伴う動脈の硬化と血清 DANCE 量の相関を調べることを第一の目的とする。

また、DANCE は動脈粥状硬化巣において発現の増加が認められるなど、動脈硬化を基盤にした動脈疾患においても血清 DANCE 量に変化をもたらす可能性がある。動脈疾患と血清 DANCE 量の相関を調べるのが第二の目的である。

### B. 研究方法

ヒト DANCE タンパク測定 ELISA の作成と検定

DANCE ペプチドを 6 種類作成し、KLH コンジュゲートした後ウサギを免疫し、抗

DANCE ポリクローナル抗体を作成した。抗体は抗原ペプチドカラムを用いて精製した。抗 DANCE モノクローナル抗体は、293T 細胞で発現させたヒトリコンビナント DANCE タンパクを精製し、Balb/c 系統にバッククロスした DANCE 遺伝子欠損マウスに免疫して作成した。定法に従って脾細胞よりハイブリドーマを作成し、DANCE を特異的に認識する高力価モノクローナル抗体を得た。ハイブリドーマ細胞をヌードマウスに接種し、腹水をプロテイン A 精製して高濃度の抗体を得た。抗 DANCE ペプチドポリクローナル抗体の組み合わせ、または抗 DANCE モノクローナル抗体を組み合わせ、DANCE 測定サンドイッチ ELISA を作成した。1つの抗体をタンパク吸着プレート (Maxisorp) に固相化し、別の抗体をビオチン化して検出抗体とし、ストレプトアビジン-HRP を用いて検出を行った。

#### マウス血清中 DANCE の検出

野生型マウス、DANCE 遺伝子欠損マウスより血清を採取し、プロテイン G ビーズでプレクリアーした後、プロテイン G ビーズに固相化した抗 DANCE モノクローナル抗体で免疫沈降をおこなった。沈降物は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で展開し、PVDF メンブレンにプロットして抗マウス DANCE ポリクローナル抗体でウエスタンブロットを行った。

#### (倫理面への配慮)

ヒト血中 DANCE 濃度の測定は、京都大学医学部の倫理委員会での承認を得た上で、インフォームドコンセントを書面で得た被験者のみを対象に行った。同研究では、被験者から静脈血約 10 ml を採取する以外に被験者に侵襲を与えない。また、サンプルのデータベース登録時には患者名は登録されず、データはグループ間での平均値・標準偏差など統

計上の処理後のものだけが公表され、個人別のデータの公表は行わないなど、被験者の個人情報の管理には十分注意した。

マウスを用いる実験は、苦痛負荷は含まず、手術・屠殺は麻酔下に施行した。動物実験計画はすべて京都大学医学部動物実験委員会の承認を得て行った。

### C. 研究結果

#### ヒト DANCE タンパク測定 ELISA の作成と検定

ポリクローナル抗 DANCE 抗体を用いて DANCE 測定 ELISA 系の作成を試みたが、感度が十分上がらなかった。このため、抗 DANCE モノクローナル抗体を作成した。定法に従って Balb/c 系統のマウスにヒト DANCE タンパクを免疫する方法を行ったが力価が上昇しなかった。これは、DANCE はアミノ酸配列が種間で非常に保存された分泌タンパクであるので野生型マウスが DANCE タンパクに対して免疫寛容になっているためと考えられた。そこで Balb/c にバッククロスした DANCE 遺伝子欠損マウスに DANCE タンパクを免疫したところ、非常に高力価の血清が得られた。このマウス脾細胞からハイブリドーマを樹立し、数クローンの高力価モノクローナル抗体を得た。これとは別に、DANCE 切断部ペプチドを Balb/c 系統マウスに免疫して DANCE 切断部位を認識するモノクローナル抗体を数クローン得た。

上記のモノクローナル抗体を組み合わせ、サンドイッチ ELISA を作成したところ、高感度 (検出限界 50pg/ml) に DANCE を検出することができた。さらに、抗体の組み合わせによって、全長と切断型 DANCE を両方含むようなタンパクは高感度に検出するが、全長 DANCE だけだと非常に低感度になる興味深い ELISA ができた。この ELISA は切断型 DANCE を特異的に検出することができると

考えられる（検出限界約 80pg/ml）。

#### マウス血清中 DANCE の検出

血清中に DANCE タンパクがなければ上記の ELISA も用途が限られたものになってしまう。血清中に DANCE タンパクがあるかどうかを確認するため、DANCE に対する 2 種類の抗体を用いて免疫沈降-ウエスタンブロットを行った。ヒト血清では正しいネガティブコントロールが存在しないため、DANCE 遺伝子欠損マウスの血清をネガティブコントロールとし、野生型マウスの血清中 DANCE を調べた。その結果、正しい DANCE の分子量（55 kD）の高さに野生型マウスにだけバンドが検出され、血清中に DANCE タンパクが存在することが明らかとなった。

#### D. 考察

血清中に DANCE タンパクが存在することが確認されたことの意義は大きく、患者血清を用いた DANCE タンパク量測定という実験デザインが実行可能であることを意味する。同時に DANCE タンパク量測定 ELISA も完成した。今後健常人の年齢別血清 DANCE 正

常値を決定し、各動脈疾患における血清 DANCE 量の測定を行う予定である。特に切断型 DANCE 量も測定可能になったので、興味深い結果が得られると期待している。

#### E. 結論

血清中に DANCE タンパクは一定量存在する。

血清中 DANCE タンパク量および切断型 DANCE タンパク量を測定できる ELISA ができた。

今後、健常人及び動脈疾患患者の血清中 DANCE タンパク量、切断型 DANCE タンパク量を測定し、加齢または動脈疾患との関連を明らかにする予定である。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

特になし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

特になし。

慢性閉塞性肺疾患患者の DANCE 遺伝子多型検索に関する研究

分担研究者 室 繁郎 京都大学医学研究科呼吸器内科学 助手

## 研究要旨

慢性閉塞性肺疾患（COPD）は発症数・死亡数とも年々増加傾向にあり、発症すると根本治療はない。COPD の発症機序として、喫煙などにより活性化されたプロテアーゼが弾性線維を破壊するという説が有力である。弾性線維の形成には DANCE という分泌タンパクが必須であり、DANCE の量が弾性線維再生能を反映する可能性が考えられている。喫煙が COPD の発症の引き金を引くことに異論はないが、COPD を発症するのは喫煙者の 15-20% であり、遺伝的因子の存在が強く示唆されている。弾性線維再生能は COPD 発症を抑制する要因であると考えられるため、本研究では DANCE の遺伝的多型もしくは変異と COPD の発症との関連を研究する。

### A. 研究目的

慢性閉塞性肺疾患（COPD）は肺気腫と慢性気管支炎を包括する概念であり、近年では、肺の慢性炎症性疾患であり、炎症性粒子に慢性曝露されることにより惹起される細気道炎症が病態の本態であると考えられるようになり、呼吸生理学的には呼気の気流閉塞を特徴とする。合衆国の死亡原因の 4 位であり、死亡率は年々増加しつつある。また、本邦においても、潜在患者数は 540 万人であり、死亡数増加のみならず、寝たきり、介護の面から将来に向かって医療経済を圧迫する主な疾患である。根本的治療はなく、COPD の気腫病変に対しての外科的処置は、一過性の症状改善にとどまり、予後の改善は見られない。疫学的に喫煙との関連は十分に証明されているものの、非喫煙者にも発症し、治療法に確立したものはない。喫煙者の中でも 15-20% のみが COPD を発症することから、COPD の発症感受性には遺伝的因子が関与していることが強く推測されている。COPD の発症機序としては、喫煙などにより好中球エラスターゼ、MMP-9、MMP-12 などのプロテアーゼ

が活性化され、肺胞の弾性線維を破壊するという説が有力である。実際、これらのプロテアーゼ遺伝子を欠損するマウスは喫煙暴露によって肺気腫になりにくいことが報告されており、逆にプロテアーゼ阻害タンパクである  $\alpha 1$  アンチトリプシン欠損症の患者は喫煙により肺気腫になりやすいことが知られている。また、弾性線維形成に異常がある DANCE 遺伝子欠損マウスは肺胞の伸展性低下から肺胞壁の破壊すなわち肺気腫を来す。主任研究者らの研究より DANCE は弾性線維の形成・再生に必須の因子であることが示されていることから、DANCE 遺伝子の多型や変異が弾性線維再生能を反映し、肺気腫になりやすさを規定している可能性があると考えた。本研究では、肺気腫患者の DANCE 遺伝子多型・変異を検索することを目的とする。

### B. 研究方法

#### 患者よりの血液採取

京都大学医学部付属病院呼吸器内科に通院中の COPD 患者のうち、書面で同意の得られた患者より採血を行った。この研究は、TIMP



や MMP など複数の遺伝子多型と COPD の関連を調べる研究の一部として行った。

#### プライマーデザイン、PCR ダイレクトシーケンス

DANCE 遺伝子多型にどのようなものがあるかは知られておらず、また遺伝子変異を見つけることも目的としているため、全エクソンをシーケンスする方法を採用した。DANCE 遺伝子は 11 個のエクソンがあるが、これらをそれぞれ増幅できるような PCR プライマーセットをデザインした。患者血液よりゲノム DNA を精製し (QIAamp, QIAGEN)、各エクソンを PCR 増幅してゲル電気泳動し、ゲルから精製した PCR 産物をダイレクトシーケンスした。

(倫理面への配慮)

ヒト血中 DANCE 濃度の測定は、京都大学医学部の倫理委員会での承認を得た上で、インフォームドコンセントを書面で得た被験者のみを対象に行った。同研究では、被験者から静脈血約 10 ml を採取する以外に被験者に侵襲を与えない。また、サンプルのデータベース登録時には患者名は登録されず、データはグループ間での平均値・標準偏差など統計上の処理後のものだけが公表され、個人別のデータの公表は行わないなど、被験者の個人情報の管理には十分注意した。

#### C. 研究結果

現在までに約 70 名の COPD 患者より同意を得て採血を行った。うち 30 名のシーケンスを終えたところであり、まだ解析中であるが現在のところ DANCE 遺伝子変異は見つからない。

#### D. 考察

最近、加齢黄斑変性症 400 人中 7 人にアミ

ノ酸変異を伴う DANCE 遺伝子変異が見つまっている (Stone EM et al, N Eng J Med 351:346-53,2004)。網膜の外側にはブルッフ膜という弾性線維層があり、DANCE 変異によりブルッフ膜に何らかの異常が生じるのが加齢黄斑変性症の原因になっているのではないかと考えられている。DANCE 遺伝子変異のホモ変異体患者は若年より皮膚のたるみと肺気腫があったという報告があるが、ヘテロ変異は加齢によってはじめて生じる老化関連疾患の危険因子となっている可能性がある。特に肺気腫は弾性線維の破壊が原因とすると弾性線維再生能は発症に大きな影響を与えると考えられ、DANCE 遺伝子変異の検索には重要な意義がある。今後患者数を増やし、解析を続ける予定である。

#### E. 結論

弾性線維が破壊されて生じる肺気腫の発症に DANCE 遺伝子多型・変異が関わる可能性があり、COPD 患者の DANCE 遺伝子解析を続けている。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ito I, Nagai S, Handa T, Muro S, Hirai T, Tsukino M, Mishima M. Matrix metalloproteinase-9 promoter polymorphism associated with upper lung dominant emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 172:1378-1382, 2005

##### 2. 学会発表

Michiyoshi Nishioka, Emiko Ogawa, Toyohiro Hirai, Shigeo Muro, and Michiaki Mishima. Regulation of Connective Tissue Growth Factor Gene by Lipopolysaccharide in Bronchial Epithelial Cells. European Respiratory Society, 15th congress,

Copenhagen, Denmark, 2005/09/22

Sato S, T Hirai, Muro S, Ohara T, Mishima M. Time course of Airway resistance after inhaled bronchodilator in patients with COPD. International Conference of American Thoracic Society / American Lung Association (May 24, 2005, San Diego), 2005.

Muro S, Sato S, Nishioka Y, Ohara t, Sato A, Ogawa E, Hirai T, Hajiro T, Mishima M, Horstman DH, Snapper JR, Nakano Y. Airway wall thickening assessed by CT correlates with the responsiveness to bronchodilators in COPD patients. International Conference of American

Thoracic Society / American Lung Association (May 24, 2005, San Diego), 2005.

Sato A, Hoshino Y, Hara T, Muro S, Nakamura H, Yodoi J and Mishima M. Thioredoxin ameliorates cigarette smoke-induced local and systemic inflammation in mice. International Conference of American Thoracic Society / American Lung Association (May 24, 2005, San Diego), 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)  
特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

McLaughlin PJ, Chen Q, Horiguchi M, Starcher BC, Stanton JB, Broekelmann TJ, Marmorstein AD, McKay B, Mecham R, Nakamura T, Marmorstein LY: Targeted disruption of fibulin-4 abolishes elastogenesis and causes perinatal lethality in mice. *Mol Cell Biol* 26:1700-9, 2006.

Ito I, Nagai S, Handa T, Muro S, Hirai T, Tsukino M, Mishima M. Matrix metalloproteinase-9 promoter polymorphism associated with upper lung dominant emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 172:1378-82, 2005.

## Targeted Disruption of Fibulin-4 Abolishes Elastogenesis and Causes Perinatal Lethality in Mice

Precious J. McLaughlin,<sup>1†</sup> Qiuyun Chen,<sup>1†</sup> Masahito Horiguchi,<sup>2</sup> Barry C. Starcher,<sup>3</sup> J. Brett Stanton,<sup>1</sup> Thomas J. Broekelmann,<sup>4</sup> Alan D. Marmorstein,<sup>1,5</sup> Brian McKay,<sup>1,6</sup> Robert Mecham,<sup>4</sup> Tomoyuki Nakamura,<sup>2</sup> and Lihua Y. Marmorstein<sup>1,6,7\*</sup>

Department of Ophthalmology and Vision Science,<sup>1</sup> Optical Sciences Center,<sup>5</sup> Department of Cell Biology and Anatomy,<sup>6</sup> and Department of Physiology,<sup>7</sup> University of Arizona, Tucson, Arizona; Horizontal Medical Research Organization, Kyoto University School of Medicine, Kyoto, Japan<sup>2</sup>; Department of Biochemistry, University of Texas Health Center at Tyler, Texas<sup>3</sup>; and Department of Cell Biology and Physiology, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri<sup>4</sup>

Received 20 October 2005/Returned for modification 27 November 2005/Accepted 5 December 2005

Elastic fibers provide tissues with elasticity which is critical to the function of arteries, lungs, skin, and other dynamic organs. Loss of elasticity is a major contributing factor in aging and diseases. However, the mechanism of elastic fiber development and assembly is poorly understood. Here, we show that lack of fibulin-4, an extracellular matrix molecule, abolishes elastogenesis. *fibulin-4*<sup>-/-</sup> mice generated by gene targeting exhibited severe lung and vascular defects including emphysema, artery tortuosity, irregularity, aneurysm, rupture, and resulting hemorrhages. All the homozygous mice died perinatally. The earliest abnormality noted was a uniformly narrowing of the descending aorta in *fibulin-4*<sup>-/-</sup> embryos at embryonic day 12.5 (E12.5). Aorta tortuosity and irregularity became noticeable at E15.5. Histological analysis demonstrated that *fibulin-4*<sup>-/-</sup> mice do not develop intact elastic fibers but contain irregular elastin aggregates. Electron microscopy revealed that the elastin aggregates are highly unusual in that they contain evenly distributed rod-like filaments, in contrast to the amorphous appearance of normal elastic fibers. Desmosine analysis indicated that elastin cross-links in *fibulin-4*<sup>-/-</sup> tissues were largely diminished. However, expression of tropoelastin or lysyl oxidase mRNA was unaffected in *fibulin-4*<sup>-/-</sup> mice. In addition, fibulin-4 strongly interacts with tropoelastin and colocalizes with elastic fibers in culture. These results demonstrate that fibulin-4 plays an irreplaceable role in elastogenesis.

Elastic fibers with morphologically distinct architectures are present in the extracellular matrix (ECM) to accommodate elastic requirements and mechanical stresses imposed on different tissues. They are particularly abundant in elastic tissues such as large blood vessels, lung, and skin. Loss of elasticity is a major contributing factor in aging and a myriad of pathological conditions including emphysema, artery diseases, and cutis laxa (39, 41, 44). Elastic fibers undergo irreversible structural and compositional changes with age and in some pathological conditions (41). Regardless of morphology, all elastic fibers consist of cross-linked elastin, fibrillin-rich microfibrils, and several associated molecules (23, 37, 38, 46). Elastin endows the fiber with the characteristic property of elastic recoil. It is chemically inert, extremely hydrophobic, and insoluble under most conditions. Monomeric elastin, called tropoelastin, is secreted from the cell as a soluble protein. Isolated and purified tropoelastin has been shown to exhibit a great tendency to aggregate (coacervation) in physiological solution and at temperatures in the physiological range, giving rise to supramolecular structures very similar to those found in natural elastic fibers (4, 5, 11). This self-aggregation property of tropoelastin is thought to contribute to elastic fiber assembly in vivo. However, self-aggregation alone is insufficient to explain the effi-

ciency of the assembly process and the variable form of elastic fibers in different tissues.

The formation of elastic fibers has been proposed to require the deposition of tropoelastin on a preexisting scaffold, cross-linking of tropoelastin monomers by lysyl oxidase (LOX) family enzymes, and organization of the resulting insoluble elastin matrix into mature fibers (37). Fibrillin-rich microfibrils are thought to provide the scaffold for the deposition of elastin. Unexpectedly, normal elastic fiber assembly was found to occur in *fibrillin-1* or *fibrillin-2* mutant mice (2, 9, 42, 43). Therefore, the molecular mechanism of elastic fiber assembly remains elusive.

A significant insight into elastogenesis comes from two recent studies of *fibulin-5*<sup>-/-</sup> mice. These mice exhibit disrupted and disorganized elastic fibers throughout the body, indicating that fibulin-5 (also known as DANCE or EVEC) plays an important role in elastic fiber formation (40, 56). *fibulin-5*<sup>-/-</sup> mice grow to adulthood without lethality but have loose skin, vascular abnormalities, and emphysematous lungs. Fibulin-5 has an RGD motif and interacts with cell surface integrins and elastin. Thus, it has been proposed to promote elastic fiber formation by linking elastic fibers to cells (40, 56).

Fibulin-5 belongs to the fibulin family of six known ECM proteins that share tandem arrays of calcium-binding epidermal growth factor domains and a characteristic carboxyl-terminal fibulin domain (1, 10, 15, 52). Although little is known about the functions of fibulins, mutations of individual members have been associated with several diseases. A single mutation of an arginine to tryptophan in fibulin-3 (also known as

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Ophthalmology and Vision Science, University of Arizona, 655 N. Alvernon Way, Suite 108, Tucson, AZ 85711. Phone: (520) 626-0447. Fax: (520) 626-0457. E-mail: Lmarmorstein@eyes.arizona.edu.

† P.J.M. and Q.C. contributed equally to this work.