

200619037A

厚生労働科学研究費補助金

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 18 年度 総括研究報告書

主任研究者 中邨 智之

平成 19 (2007) 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

### 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 | 10 |
|---------------------------------|----|

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 | 14 |
|--------------------------------|----|

北 徹

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| 3. 慢性閉塞性肺疾患と DANCE 遺伝子・蛋白の関係の研究 | 18 |
|---------------------------------|----|

室 繁郎

|                     |    |
|---------------------|----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 23 |
|---------------------|----|

|                 |    |
|-----------------|----|
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | 24 |
|-----------------|----|

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 がどのようにして弾性線維形成に寄与しているのかその分子メカニズムを調べることによって 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、リコンビナント DANCE が無血清でも弾性線維形成を促進することができることを証明し発表した。その分子機序として、DANCE がエラスチンタンパクを結合してそのコアセルベーションを促進する作用があること、DANCE によってクロスリンクされた成熟した弾性線維の形成が促進されること、DANCE はクロスリンク酵素をリクルートしてきて結合することによりこの作用を発揮しているらしいこと、などを明らかにした。

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

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。本課題では、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 がどのようにして弾性線維形成に寄与しているのかその分子メカニズムを調べることによって 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。

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

今期は、DANCE が弾性線維再生薬のターゲットになりうるかどうかを評価するため、DANCE タンパクがどのようにして弾性線維形成に寄与しているのかその分子メカニズムの一端を明らかにした。

## B. 研究方法

### 1. 細胞培養

293T 細胞と京都大学医学部附属病院形成外科より提供を受けたヒト皮膚線維芽細胞は DMEM, 10%FBS で 5%CO<sub>2</sub>, 37°C の環境で培養した。

### 2. プラスミド

pEF6/V5 (Invitrogen) の V5-His tag のかわりに FLAG tag または Myc tag をつけたプラスミド (pEF6/FLAG と pEF6/Myc) を作成し、DANCE (fibulin-5) 全長または ΔN1 (nt 247-399 欠損)、ΔN2 (nt 247-504 欠損)、ΔM (nt 505-1110 欠損)、ΔC (nt 1114-1512 欠損) DANCE を pEF6/FLAG にサブクローニングした。同様にヒト LOX, LOXL1, 2, 3, 4 の cDNA を pEF6/Myc にサブクローニングした。

### 3. タンパク精製

pEF6/V5 の V5-His tag のかわりに FLAG-His tag をつけたプラスミドを作成し、その中にタグとフレームをあわせて全長 DANCE または変異 DANCE cDNA をサブクローニングした。これらを 293T 細胞にトランスフェクションし、Blasticidin で選択した安定発現株の中から高発現株を得た。この DANCE 高発現 293T 細胞株の無血清細胞上清から Ni-NTA アガロースビーズを用いて分泌されたリコンビナント DANCE を精製した。200mM イミダゾールで elute されたリコンビナントタンパクは脱塩カラムでイミダゾールを除去して培養に用いた。

ヒトトロポエラスチン cDNA はヒト皮膚線維芽細胞培養から RT-PCR を用いてクローニングし、シークエンスによって ELNc という最も長い splice variant であることを確認した。この cDNA を pTrcHis ベクター (Invitrogen) にサブクローニングし、大腸菌で発現させ、Ni-NTA カラムを用いて精製した。

### 4. 弾性線維形成アッセイ系

ヒト皮膚線維芽細胞はカバーガラスの上にコンフルエントになるようにまいて、2日後にリコンビナントタンパク入りの無血清培地 (DMEM/F12) にメディアウム交換した。10日後に細胞を 100%エタノールで固定し、2%BSA でブロッキングした。1次抗体は抗 FLAG M2 モノクローナル抗体 (Sigma)、抗エラスチンポリクローナル抗体 (Elastin Products Company)、抗 DANCE モノクローナル抗体、抗ヒトフィブリリン1ポリクローナル抗体を用いた。2次抗体は Alexa 488, 546, 647 でラベルされた抗ウサギ IgG または抗マウス IgG を用いた。DAPI による核染色の後、コンフォーカル顕微鏡 (LSM510 META, Zeiss または FV-1000, Olympus) で鏡検、データ取得を行った。抗 DANCE モノクローナル抗体は、DANCE 遺伝子欠損マウスをリコンビナント DANCE タンパクで免疫することにより作成した。

### 5. コアセルベーションアッセイ

可溶性のリコンビナントトロポエラスチンタンパク溶液とリコンビナント DANCE タンパク溶液は氷上で混合し、8チャンネルの石英キュベットに移して 440nm の光で光散乱 (濁度) を測定した。実験は循環恒温槽からの水で温度を調節できる吸光度計 (UV-1650、島津製作所) で行った。

### 6. 免疫沈降実験

293T細胞にFLAGタグまたはMycタグを付けたタンパク発現プラスミドをトランスフェクションし、培養上清を混合して抗FLAG-M2アフィニティーゲルで免疫沈降した。沈降物はSDS-PAGEで展開し、PVDF膜に転写して抗Mycモノクローナル抗体、抗FLAG M2モノクローナル抗体でバンドを検出した。

(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

### 1. DANCEは弾性線維の形成を促進する

弾性線維形成におけるDANCEの寄与を明らかにするため、ヒト皮膚線維芽細胞を用いてin vitroアッセイ系を作成した。この細胞は10%血清存在下で10日以上培養すると、抗エラスチン抗体で染まる弾性線維が形成されるが、無血清で培養すると弾性線維が形成されない。細胞培養における弾性線維形成には血清が必須であることがこれまでに報告されているが、血清には多数の既知・未知因子が含まれているため何が弾性線維形成に重要なのかを知ることが困難であった。ところが驚いたことに、無血清培地にリコンビナントDANCEタンパクを添加しておくと、豊富に弾性線維が形成されていた(図1)。できる弾性線維の量は加えるDANCEタンパク量に依存していた。加えたDANCEタンパクはエラスチンと共局在していた。DANCEタンパク添加によって弾性線維構成成分の発現量に変化があるかどうかをマイクロアレイやqPCRで検討したが、エラスチンやフィブ

リン1, 2をはじめとする弾性線維構成成分の遺伝子発現に変化はなかった。つまり無血清培養においても弾性線維構成成分は十分量発現されているが、DANCEタンパクを加えるまでは弾性線維としてオーガナイズされないということが言える。すなわちDANCEは遺伝子発現を変えるシグナル分子ではなく、弾性線維構成成分のアセンブルを促進するオーガナイザー分子であると考えられた。

### 2. DANCEはトロポエラスチンのコアセルベーションを促進する

エラスチンの単量体であるトロポエラスチンは、生理的温度でコアセルベーションという相転移を起こして自己凝集することが知られている。トロポエラスチンのコアセルベーションはトロポエラスチンのクロスリンクの前におこる重要なステップであると位置づけられている。DANCEはトロポエラスチンと直接結合することが知られているため、我々はDANCEがトロポエラスチンのコアセルベーションに影響するかどうかを検討した。精製したリコンビナントトロポエラスチンタンパク溶液は、35-40°Cでコアセルベーションをおこして濁ってくる。トロポエラスチンタンパク溶液に少量のDANCEタンパクを加えておくと、コアセルベーションのおこる温度が低下した(図2)。すなわち、DANCEはトロポエラスチンのコアセルベーションを促進すると考えられた。

### 3. DANCEによって形成誘導された弾性線維は成熟した弾性線維である

機能的な弾性線維形成のためには、トロポエラスチンの線維状の沈着とコアセルベーションだけではなく、分子間のクロスリ

ンクが必要である。上記データは DANCE がマイクロフィブリルに沈着してトロポエラスチンの沈着・凝集を促進していることを示しているが、これらトロポエラスチンがクロスリンクして成熟した弾性線維となっているかどうかは不明である。これを調べるため、 $\beta$ -aminopropionitrile (BAPN) という LOX (リシルオキシダーゼ阻害薬) を培地中に加えてみた。LOX ファミリーはトロポエラスチンのクロスリンク酵素である。培地中に BAPN を加えて LOX 活性を阻害したところ、DANCE の線維状沈着は阻害されなかったが、エラスチンは沈着しなかった (図 3)。すなわち、DANCE タンパクによって線維状に沈着するエラスチンはクロスリンクされており、DANCE タンパクが形成を誘導する弾性線維は成熟した弾性線維であると考えられた。

#### 4. LOXL1, 2, 4 は DANCE と結合する

成熟した弾性線維形成のためには、エラスチンは LOX ファミリー酵素によってクロスリンクされる必要がある。現在5つの LOX ファミリーが知られている: LOX, LOXL1, LOXL2, LOXL3, LOXL4。LOX 遺伝子欠損マウス、LOXL1 遺伝子欠損マウスは弾性線維の形成異常がおこることが最近報告された。DANCE がこれら LOX ファミリーと結合するかどうかを免疫沈降実験で調べた。LOXL1, 2, 4 は DANCE と結合し、C 末端を欠損させた DANCE では結合が非常に弱くなったので、DANCE の C 末端と特異的に結合しているものと考えられた (図 4)。

#### D. 考察

我々は DANCE が弾性線維形成のオーガナイザー活性を持つことを初めて見だし

た (図 5)。無血清細胞培養において弾性線維形成に成功したのは我々が初めてである。血清中にはサイトカインや増殖因子をはじめとする多数の既知・未知因子が含まれているため、これまで弾性線維形成の研究を細胞培養で行うことには大きな困難が伴った。我々の無血清弾性線維形成アッセイ系は、細胞が産生する因子と加えるリコンビナントタンパクだけで構成されており、今後このアッセイ系を用いて弾性線維研究が大きく進むことが期待される。血清中には DANCE もかなりの高濃度で含まれていることを最近見いだしたが、血清中 DANCE が弾性線維に寄与していた可能性もある。我々は DANCE 遺伝子欠損マウスが弾性線維形成異常を来すことから、DANCE が弾性線維形成に必須であることをすでに報告しているが、今回の知見は DANCE が単に弾性線維構成成分というだけではなく弾性線維形成をオーガナイズできる重要な分子であることを示唆している。弾性線維再生薬の開発を考えると、DANCE は標的分子として大きな可能性をもっているといえる。

#### E. 結論

DANCE/fibulin-5 は強力な弾性線維形成誘導因子であり、単に弾性線維構成成分というだけではなく弾性線維形成をオーガナイズできる重要な分子である。その分子メカニズムは、トロポエラスチンとの結合とコアセルベーションの促進、LOX ファミリー酵素との結合によるクロスリンクの促進であると考えられる。

#### F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Hirai M, Ohbayashi T, Horiguchi M, Okawa K, Hagiwara A, Kita T, Chien KR, Nakamura T. Fibulin-5/DANCE has an elastogenic organizer activity that is abrogated by proteolytic cleavage *in vivo*. *J Cell Biol* 176:1061-1071, 2007.

Lotery AJ, Baas D, Ridley C, Jones RP, Klaver CC, Stone E, Nakamura T, Luff A, Griffiths H, Wang T, Bergen AA, Trump D: Reduced secretion of fibulin 5 in age-related macular degeneration and cutis laxa. *Hum Mutat* 27:568-74, 2006.

### 2. 学会発表

Nakamura, T., Hirai, M., Ohbayashi, T., Horiguchi, M.: DANCE/fibulin-5 has an elastogenic activity which is inactivated by aging-associated proteolytic cleavage. Invited talk at The 4th European Meeting on Elastin (July 9 - 12, 2006, Lyon, France).

Nakamura, T., Hirai, M., Ohbayashi, T., Horiguchi, M.: Latent TGF- $\beta$  binding protein 2 is a DANCE/fibulin-5 binding protein that regulates elastic fiber assembly. The 4th European Meeting on Elastin (July 9 - 12, 2006, Lyon, France).

Hirai, M., Ohbayashi, T., Horiguchi, M., Kita, T., Nakamura, T.: DANCE promotes elastic fiber development, an implication for future aging therapies. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry

and Molecular Biology, and 11th FAOBMB Congress (June 18 - 23, 2006, Kyoto).

中邨智之:「弾性線維形成の分子機構」第35回かなえ医薬振興財団研究助成贈呈式記念講演(招待講演)(東京、2007年2月23日)

中邨智之:「弾性線維形成におけるDANCE/fibulin-5の役割」第4回エラスチン研究会学術集会(招待講演)(東京、2006年12月8-9日)

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

特許公開 (EPC)

出願番号: 05720545. 2

出願日: 2005年3月4日

公開番号: 1762610

公開日: 2007年3月14日

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、平井希俊

出願人: 京都大学

特許公開 (PCT)

出願番号: PCT/JP2006/301372

出願日: 2006年1月23日

公開番号: W02006/082763

公開日: 2006年8月10日

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

出願人: 京都大学

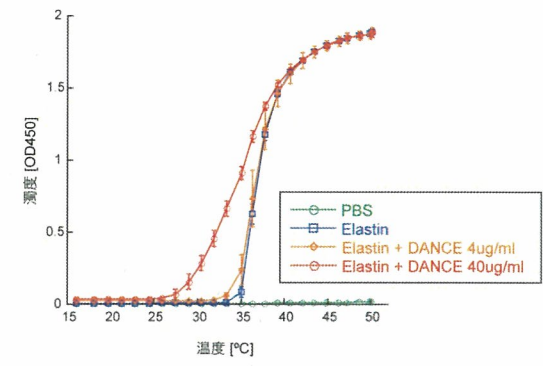
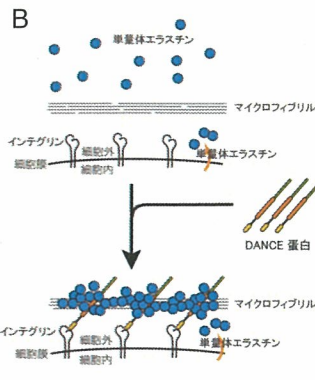
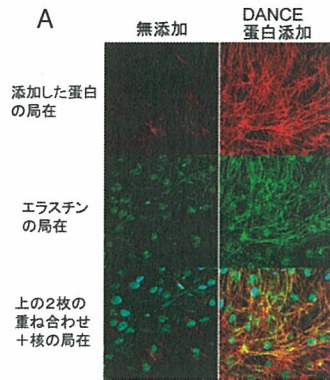


図1. A. 線維芽細胞培養にリコンビナント DANCE タンパク (赤)を加えると無血清でも弾性線維形成(緑)が誘導される。B. 無血清でもエラスチンやマイクロフィブリルは十分量発現しているが、DANCE を加えてはじめて弾性線維としてオーガナイズされる。

図2. コアセルベーションアッセイ。リコンビナント単量体エラスチン溶液は温度を上げていくと36°C付近でコアセルベーションをおこして濁る。これに DANCE 蛋白を混ぜておくとより低い温度でコアセルベーションがおこる。

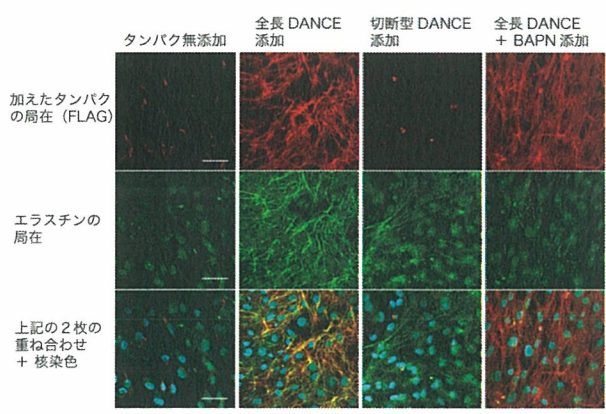
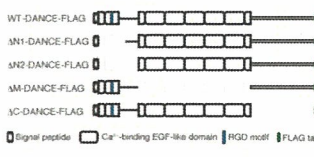


図3. 全長 DANCE と同時に BAPN を添加すると DANCE はマイクロフィブリル上に局在するがエラスチンはマイクロフィブリル上には沈着できない。また、切断型 DANCE には弾性線維形成誘導活性がない。全長 DANCE をヒト線維芽細胞無血清培養に加えると抗エラスチン抗体で染まる弾性線維ができるが、切断型 DANCE を加えても弾性線維はできない。

**[免疫沈降実験]**

FLAGタグをつけたDANCE (WT)とその deletion mutant ( $\Delta N1$ ,  $\Delta N2$ ,  $\Delta M$ ,  $\Delta C$ )、およびMycタグをつけたLysyl Oxidase酵素ファミリー蛋白 (LO, LOXL1 - 4)が結合するかどうかを免疫沈降実験で調べた。



**[LOXL2の例]**

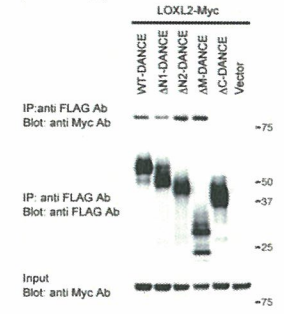


図4. DANCE は5つのクロスリンク酵素 (Lysyl Oxidase 酵素ファミリー) のうち LOXL1, 2, 4 と結合する。Lysyl Oxidase 酵素ファミリーには Lysyl Oxidase (LO), Lysyl Oxidase-Like 1 (LOXL1), LOXL2, LOXL3, LOXL4 の5つが知られている。全長 DANCE および各ドメインを欠く deletion mutant と Lysyl Oxidase 酵素ファミリーをそれぞれ293T 細胞に発現させ、in vitro binding assayにて結合を調べた。ここでは LOXL2 と DANCE の結合が DANCE の C 末端欠損でなくなることを示す。



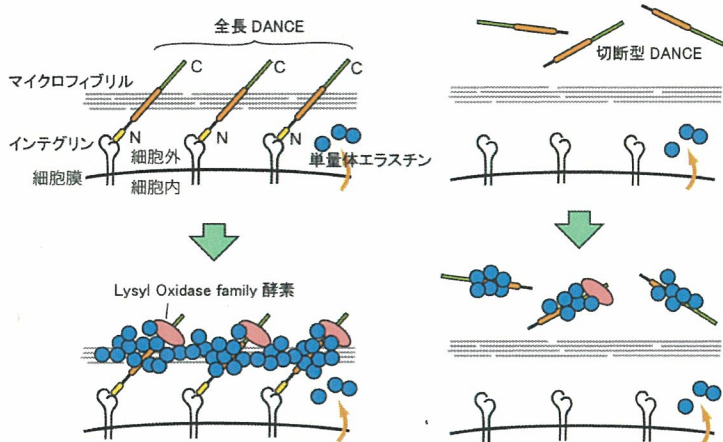


図5. DANCE が弾性線維形成を誘導するメカニズム(Line-DANCE モデル)。全長 DANCE はまずマイクロフィブリル上にならび、単量体エラスチンを結合してそのコアセルベーションを促進し、最後に C 末につけたクロスリンク酵素でそのクロスリンクが効率よく行われるようにする。これにより、線維の伸び縮みが可能になる。これに対して切断型 DANCE はマイクロフィブリル上にならぶことができず、従ってエラスチンの線維状沈着とクロスリンクに寄与することができない。

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

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、動脈硬化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ず、粥状硬化病変も認めなかった。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

動脈硬化は心筋梗塞・狭心症・脳血管障害・閉塞性動脈硬化症など多岐にわたる老化関連疾患の原因であり、その発症予防が健康寿命を伸ばすために極めて重要であることは論を待たない。粥状動脈硬化の発症機序としては、過剰の脂質をとりこんだマクロファージ等の炎症細胞が血管壁でサイトカインを分泌し、血管壁のリモデリングを誘発するというシナリオが広く受け入れられている。一方、血管側にもリモデリングを抑制する機構があり、動脈硬化進行に対して防御的にはたらいっている。例えば動脈中膜弾性板を作って血管弾性を担っているエラスチンは強力な血管平滑筋増殖抑制因子でもある。また血管壁にある ecSOD（分泌型活性酸素分解酵素）は NO と反応してこれを消去してしまう活性酸素を減らす役割を果たしている。しかし血管壁のリモデリング抑制機構についてはわかっていないことも多く、未知の因子が関わっている可能性がある。

我々は、発生期の血管に多く発現するイ

ンテグリンリガンド、DANCE（別名 fibulin-5）をクローニングし、その機能を明らかにしてきた。DANCE 遺伝子欠損マウスを作成したところ、動脈の硬化と蛇行、肺気腫、皮膚のたるみなどを来し、ヒトの老化に非常に似ていた。このマウスでは全身の弾性線維形成不全をみることから、DANCE は弾性線維の形成に必須のタンパクであることがわかった。しかし発生期において弾性線維形成に果たす役割だけではなく、最近では以下のように動脈疾患における DANCE の役割が注目されつつある。

1) DANCE は粥状動脈硬化モデルマウス病変部やラット血管内皮傷害モデルでの新生内膜において強く発現誘導を受ける。

2) DANCE は血管平滑筋の異常なリモデリングを抑制している。DANCE 遺伝子欠損マウスの頸動脈を結紮すると、新生内膜の異常な増生と中膜の菲薄化がおこることが報告された。また、DANCE 遺伝子欠損マウスの動脈平滑筋細胞は野生型と比べて増殖速度が速いことも観察された。

3) DANCE は ecSOD を血管壁に留めておくア

ンカー蛋白としてはたらくという報告もある。ecSOD と DANCE は直接結合し、DANCE 遺伝子欠損マウスでは血管壁の ecSOD が大幅に減少して活性酸素量が増大していた。

4) 低酸素によるマウス肺高血圧モデルにおいて DANCE の肺血管での発現が増加する。

以上のような知見から、DANCE が動脈リモデリング調節蛋白であり、動脈硬化などの動脈疾患において疾患進行に拮抗的に働いているのではないかという仮説を立てた。本研究では、マウスを用いてこの仮説を検証することを目的とする。

## B. 研究方法

### DANCE, ApoEダブルノックアウトマウスの作成

DANCE ノックアウトマウスは C57BL/6 系統にバッククロスした。同じく C57BL/6 系統の ApoE ノックアウトマウスと掛け合わせ、DANCE, ApoEダブルノックアウトマウスを作成した。

### 大動脈粥状硬化病変の検出

各遺伝子型マウスは8週目より18週間高脂肪食を摂取させた。それぞれのマウスを屠殺して血液と大動脈を採取した。血液からは血中コレステロール、中性脂肪、CRPなどを測定した。採取した大動脈は展開してOil Red-O染色し、Oil Red-Oで染まる粥状硬化病変の大きさを比較した。

#### (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, ApoEダブルノックアウトマウスの作成

ApoEノックアウトマウスは動脈粥状硬化モデルマウスとして確立されており、一方DANCEノックアウトマウスは弾性線維形成以上によって動脈中膜硬化を来している。さらにDANCEは粥状硬化病変部において発現が誘導される。ApoEノックアウトマウスのバックグラウンドでDANCE遺伝子の有無が動脈粥状硬化病変にどのように影響するかをみるため、ApoEホモ変異マウスとDANCEヘテロ変異マウスを掛け合わせ、その結果得られたダブルヘテロマウス同士を掛け合わせてApoE, DANCEのダブルホモ変異マウスを得た。これらをコントロール遺伝子型マウス(ApoEホモ変異型/DANCE野生型、ApoE野生型/DANCEホモ変異型、ApoE野生型/DANCE野生型)とともに高脂肪食にて飼育した。

### 大動脈粥状硬化病変の比較

ApoEノックアウトマウスの動脈硬化病変はバックグラウンド系統と高脂肪食を摂取した期間に大きく依存している。C57BL/6Jのバックグラウンド系統では、18週の高脂肪食摂取によって広範囲の大動脈粥状硬化病変が生ずると報告されている。しかし意外なことに、我々のApoEノックアウトマウスは18週の高脂肪食摂取によっても比較的小さな大動脈粥状硬化病変が見られるのみであった。C57BL/6系統の中にもサブタイプがあり、動物実験施設が購入していたC57BL/6がC57BL/6JではなくC57BL/6Crというサブタイプであったことが判明した。この系統を用いたApoEノックアウトマウスの大動脈粥状硬化病変に

ついで報告は一報だけ見つかかり、我々の知見と同様に、C57BL/6J と比較して18週目の動脈粥状硬化病変は軽微であるとされていた。

同じバックグラウンド系統で littermate である ApoE, DANCEダブルノックアウトマウスでは、ApoEノックアウトマウスと比較してはるかに大きな粥状硬化病変を大動脈弓部に認めた。Littermateの野生型、DANCEノックアウトマウスでは全く大動脈粥状硬化病変を認めなかった。

#### D. 考察

マウスバックグラウンド系統が C57BL/6J ではなく C57BL/6Cr であったため ApoE 単独ノックアウトマウスでは予想外に動脈粥状硬化病変が少なかったが、これが幸いして ApoE, DANCEダブルノックアウトマウスでの広範囲の粥状硬化病変との差がはっきりした。今回は18週目のみの比較であったが、今後は他の週齢での比較とともに、C57BL/6J のバックグラウンドでどうなのかを検討していきたい。

ApoE, DANCEダブルノックアウトマウスでは ApoE 単独ノックアウトマウスよりも粥状硬化病変が広範囲であったことは、DANCEの存在が動脈粥状硬化病変の進展に抑制的に働いていることを示唆している。DANCE遺伝子欠損マウスの頸動脈を結紮すると、新生内膜の異常な増生と中膜の菲薄化がおこること、DANCE遺伝子欠損マウスの動脈平滑筋細胞は野生型と比べて増殖速度が速いことが報告されているが、これらと今回の結果を考え合わせると、DANCEが動脈リモデリングの抑制因子であるという可能性が強くなった。また、最近DANCEは ecSOD を血管壁に留めておくアンカー蛋白としてはた

らくという報告もされたが、活性酸素が動脈粥状硬化病変の進展に重要な働きをしているという見方もあるので、DANCEがないことが血管壁の酸化ストレスを増大して動脈粥状硬化病変を悪化させたとも考えられる。今後、これらの両面から機序に関する研究を進めたい。

#### E. 結論

現段階では18週目しか観察していないこと、バックグラウンド系統がマイナーな C57BL/6Cr であったこと、サンプル数がまだ少ないことなどから、予備実験の結果に止まる。しかし結果の意味するところは大きく、今後この結果がより大規模な実験で確認されれば、DANCEの欠如は ApoE ノックアウトマウスの大動脈粥状硬化病変を悪化させる方向に働くといえる。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

論文発表

Ozasa N, Morimoto T, Furukawa Y, Shizuta S, Nishiyama K, Kita T, Kimura T. Effects of ICD implantation on quality-adjusted life years in patients with congestive heart failure. *Int J Cardiol.* 2007 Mar 15.

Abe M, Kimura T, Furukawa Y, Tadamura E, Kita T. Coronary Buerger's disease with a peripheral arterial aneurysm. *Eur Heart J.* 2006 Oct 12.

Nishiyama K, Tadamura E, Kanao E, Shizuta S, Furukawa Y, Nakagawa Y, Kimura T, Kita T. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia

/cardiomyopathy assessed with 64-slice computed tomography. Eur Heart J. 2006 Nov;27(22):2666.

Hoshino K, Kimura T, De Grand AM, Yoneyama R, Kawase Y, Houser S, Ly HQ, Kushibiki T, Furukawa Y, Ono K, Tabata Y, Frangioni JV, Kita T, Hajjar RJ, Hayase M. Three catheter-based strategies for cardiac delivery of therapeutic gelatin microspheres. Gene Ther. 2006 Sep;13(18):1320-7.

Setoyama T, Furukawa Y, Abe M, Nakagawa Y, Kita T, Kimura T. Acute pleuropericarditis after coronary stenting: a case report. Circ J. 2006 Mar;70(3):358-61.

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)  
特になし。

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

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。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。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、血清中に比較的高濃度で DANCE タンパクが循環していることをつきとめた。この ELISA を用いて、動脈疾患患者血清中 DANCE 濃度を測定した。

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。

本研究の目的は、ヒトの疾患、特に動脈硬化病変において DANCE の役割を探ることにある。しかしヒトで得られるのは血液など採取が容易なサンプルに限られる。DANCE タンパクが血中を循環しているかどうかは知られていなかったため、高感度 DANCE 測定 ELISA を作成して血中に

DANCE があるかどうかを調べることからはじめた。

## B. 研究方法

### 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。切断部位特異的 DANCE モノクローナル抗体に関しては、切断型 DANCE を精製してエドマン分解によって切断部位を決定し、切断部位アミノ酸配列を持ったペプチドをマウスに免疫することによって作成した。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。スタンダード DANCE タンパクは、DANCE 安定発現 293T 細胞株より分泌されたものを精製し、段階希釈して用いた。

### ヒト血清中 DANCE の検出

まず 30 歳から 42 歳の健常人血清を用いて血清中全 DANCE 濃度、切断型 DANCE

濃度を決定した。

次に京都大学医学部付属病院循環器内科にて採取した、抗血小板薬を服用している動脈疾患患者 400 名分の血清について DANCE 濃度を測定した。

(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. 結果

### 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。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ン得た。

このようにして得た抗 DANCE モノクローナル抗体 2 種類を組み合わせてできた ELISA は、1ng/ml 以上の DANCE 濃度を検出できた。また、DANCE 切断部位に対するモノクローナル抗体と上記抗 DANCE モノクローナル抗体を組み合わせると、切断型 DANCE にしか反応しない ELISA ができた。感度は 1-2ng/ml であった。

#### ヒト血清中 DANCE の検出

30 歳から 42 歳の健常人血清を用いて血清中 DANCE 濃度を測定したところ、全 DANCE 濃度は 100-200ng/ml であり、切断型 DANCE は検出限界以下であった。

次に京都大学医学部付属病院循環器内科にて採取した患者血清 400 名分について測定を行った。血中 DANCE 濃度は 100-300ng/ml で、切断型 DANCE は検出限界前後が多かったが、10 名ほどは切断型 DANCE が異常高値 (10ng/ml 以上) を示した。

#### D. 考察

今回、ヒト血清中に比較的高濃度で DANCE タンパクが循環していることを見いだした意義は大きく、今後いろいろな疾患で血清 DANCE タンパクを測定することにより、血清 DANCE 濃度が疾患マーカーとなりうる可能性がある。循環器内科の患者血清における疾患と血清 DANCE 濃度の関連については現在解析中である。

特に興味深いのは、一部の患者で切断型 DANCE が非常に高値となったことである。組織のウエスタンブロットなどでは全長 DANCE の半分量ぐらい切断型 DANCE が検出されるので、1) 切断型 DANCE は循環血流には入りにくい、2) 切断部位が *in vivo* では細胞培養とは異なっている、3)

切断された後で少し削り込まれるために切断面特異的な抗体では認識されなくなる、などの可能性が考えられる。3) の場合は、血清中切断型 DANCE 異常高値の患者では切断されて間もない DANCE が多くあることになり、疾患の活動性を表している可能性がある。今後、患者のフォローアップを通じて切断型 DANCE 高値の持つ意味を検討していきたい。また、血中の DANCE はどの組織から産生されたものに由来するのか、についても明らかにしていきたい。

#### E. 結論

全 DANCE 濃度及び切断型 DANCE 濃度を高感度で検出できる ELISA の作成に成功した。この ELISA を用い、ヒト血液中には比較的高濃度で DANCE が循環していることが明らかとなった。一部患者では切断型 DANCE 濃度が異常高値であり、疾患活動度との関係が注目される。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

論文発表

Nishi E, Hiraoka Y, Yoshida K, Okawa K, Kita T. Nardilysin enhances ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor through activation of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *J Biol Chem* 281(41):31164-72, 2006.

Eto H, Miyata M, Kume N, Minami M, Itabe H, Orihara K, Hamasaki S, Biro S, Otsuji Y, Kita T, Tei C. Expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in smooth muscle cells after vascular injury. *BBRC*. 341(2):591-598, 2006.



Hosokawa R, Kambara N, Ohba M, Mukai T, Ogawa M, Motomura H, Kume N, Saji H, Kita T, Nohara R. A catheter-based intravascular radiation detector of vulnerable plaques. J Nucl

Med 47(5):863-7, 2006.

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)  
特になし。

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

慢性閉塞性肺疾患患者と DANCE 遺伝子・タンパクの関係の研究  
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 及びそのファミリーである fibulin-4 の遺伝的多型もしくは変異、さらに血清 DANCE 濃度と COPD の発症との関連を研究した。

### 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

京都大学医学部附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、被験者の個人情報管理には十分注意した。

## C. 研究結果

現在までに、京都大学医学部附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約 100 名より採血を行った。その約 60 名について採取した患者血液より精製したゲノム DNA より DANCE 遺伝子それぞれのエクソンを 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法にて遺伝子配列の同定を行った。アミノ酸変異を伴う DANCE 遺伝子変異についてはこれまでに加齢性黄斑変性症の患者 402 人中 7 人に見られたとの報告(Stone EM et al, N Eng J Med 351:346-53,2004)があるが、それらの遺伝子変異はこれまでに解析を終了した COPD 患者では認められなかった。一方、同じ DANCE(Fibulin5)と同じ Fibulin family に属する Fibulin4 についても、その 11 個のエクソンについて同様の方法で検討している。現在までに約 90 名について解析を行ったが、加齢性黄斑変性症の患者で報告されているアミノ酸変異を伴う Fibulin4 遺伝子変異は COPD 患者では認められなかった。今後は、これまでに報告されていないものを含め、他の遺伝子変異・欠失などについて解析を行うと共に、閉塞性障害を認めない喫煙歴のある人をコントロールとして解析を行うことで、疾患との関連を検討していく予定である。

ヒト血清中の DANCE 蛋白濃度は肺胞・気道のリモデリングと関係するという仮説のもとに、COPD 症例と、非 COPD 症例において検討した。しかしながら、血清 DANCE 蛋白濃度は COPD 群と非 COPD 群、喫煙者と非喫煙者でいずれも有意差は認めなかった。また、DANCE 蛋白濃度と、肺活量・努力肺活量・一秒量・一秒率・残気量・拡散能など、各種呼吸機

能とDANCE血清蛋白濃度は、いずれも有意な相関を認めなかった。以上のことから、現時点では血清DANCE蛋白濃度がヒト肺における破壊・リモデリングなどを反映するという証左は得られていない。

#### 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 遺伝子変異が見つかっている (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  
英文発表論文

1 Matsumoto, H., Niimi, A., Takemura, M., Ueda, T., Tabuena, R., Yamaguchi, M., Matsuoka, H., Hirai, T., Muro, S., Ito, Y., Mio, T., Chin, K., Nishiyama, H., Mishima, M. et al. (2006). "Prognosis of cough variant asthma: a retrospective analysis." J Asthma 43(2): 131-5.

2 Ohara, T., Hirai, T., Sato, S., Sato, A., Nishioka, M., Muro, S., Mishima, M. (2006). "Comparison of airway dimensions in different anatomic locations on chest CT in patients with COPD." Respirology 11(5): 579-85.

3 Takemura, M., Matsumoto, H., Niimi, A., Ueda, T., Matsuoka, H., Yamaguchi, M., Jinnai, M., Muro, S., Hirai, T., Ito, Y., Nakamura, T., Mio, T., Chin, K., Mishima, M. (2006). "High sensitivity C-reactive protein in asthma." Eur Respir J 27(5): 908-12.

4 Ueda, T., Niimi, A., Matsumoto, H., Takemura, M., Hirai, T., Yamaguchi, M., Matsuoka, H., Jinnai, M., Muro, S., Chin, K., Mishima, M. (2006). "Role of small airways in asthma: investigation using high-resolution computed tomography." J Allergy Clin Immunol 118(5): 1019-25.

海外学会発表

1. Thioredoxin Prevents Cigarette Smoke Induced Oxidative Stress and Apoptosis, A. Sato, MD, Y. Hoshino, MD, PhD, H. Nakamura, MD, PhD, M. Narita, PhD, S. Muro, MD, PhD, M. Mishima, MD, PhD, J. Yodoi, MD, PhD, Kyoto, Japan, May 24, 2006

2. Regulation of Connective Tissue Growth Factor Gene Expression by Lipopolysaccharide