

氏名（本籍）	里 史 明	（神奈川県）
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	甲 第107号	
学位授与年月日	平成18年3月15日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者	
学位論文の題名	<i>in vitro</i> エラスチン繊維形成の生化学的解析	

論文審査委員	主 査	教 授	瀬 山 義 幸
	副 査	教 授	福 井 哲 也
	副 査	教 授	辻 勉

## 論文内容の要旨

### 序

弾性繊維は、皮膚、動脈、肺、靭帯などの軟部組織において、弾性の保持に大きく寄与する。弾性繊維は、複数の成分が集合、結合している“機能複合体”であり、その主要成分であるエラスチンは、微細繊維（マイクロフィブリル繊維；フィブリリンや microfibril-associated glycoprotein、フィビュリンなどから成る）とネットワークを形成することで弾性繊維を構築する。

エラスチン繊維形成の詳細な機序は未だ不明であるが、次に示すような複雑な過程を経て、繊維を形成すると考えられている。まず 1)エラスチンは、分子量約 68 kDa の可溶性トロポエラスチンとして細胞外に分泌される。2)単量体のトロポエラスチン分子同士が自己集合し多量化する。3)その多量体がマイクロフィブリルと分子間相互作用する。4)リジルオキシダーゼによりトロポエラスチン分子間で架橋形成しエラスチン繊維となる。

エラスチン繊維の研究の多くは、内因的にエラスチン繊維を構築する初代培養細胞が用いられてきたが、近年、他の弾性繊維関連成分を発現しトロポエラスチンを発現しない細胞にエラスチン遺伝子を導入し、エラスチン繊維を再構築するモデルが報告された。しかし、これらのモデルでは、細胞のエラスチン繊維形成能の保持や不安定な遺伝子導入率が問題となり、構造の異なるトロポエラスチン分子が構築するエラスチン繊維を比較定量することは困難であると考えた。そこで本研究では、他の弾性繊維関連成分を発現しトロポエラスチンを発現しないヒト網膜色素上皮細胞（ARPE-19 細胞）に大腸菌組換えトロポエ

ラスチンを一定量添加しエラスチン繊維を再構築する新たな *in vitro* モデルを確立することと、このモデルを用い大動脈弁上狭窄症や皮膚弛緩症で見られる遺伝子変異したエラスチン繊維やオルタネイティブスプライシングによるエラスチン繊維の特性を生化学的に解析することを目的とした。

#### *in vitro* エラスチン繊維再構築モデルの確立

ARPE-19 細胞の弾性繊維関連成分遺伝子の発現を RT-PCR で確認した結果、ARPE-19 細胞はトロポエラスチン mRNA を発現せず、他の弾性繊維関連成分の mRNA を発現することがわかった。このことから、ARPE-19 細胞は本モデルに適した細胞であることがわかった。次に大腸菌組換えヒトトロポエラスチン (HTE) 及びウシトロポエラスチン (BTE) を ARPE-19 細胞に添加し培養後、抗トロポエラスチン抗体と抗フィブリリン-1 抗体で二重蛍光免疫染色を行った。その結果、添加 HTE または BTE 濃度依存的、かつ経時的にエラスチン繊維の増加を確認した。さらに、構築したエラスチン繊維中に含まれるデスモシン量も同様にトロポエラスチン添加濃度依存的、経時的に増加した。また、ELISA によるエラスチン繊維の半定量も同様に濃度依存的なエラスチン繊維の増加が認められた。尚、トロポエラスチンの添加により ARPE-19 細胞の弾性繊維関連成分の mRNA 発現に変化は見られなかった。

次に、リジルオキシダーゼの阻害薬である  $\beta$ -アミノプロピオニトリル ( $\beta$ -APN) を BTE と同時に処理した。その結果、エラスチン繊維とデスモシンは、ほとんど検出されなかった。このことから構築したエラスチン繊維は、リジルオキシダーゼにより架橋を形成したと判断した。また、 $\beta$ -APN 処理によりマイクロフィブリルへの沈着も阻害されたことから、トロポエラスチンのマイクロフィブリルへの沈着にもリジルオキシダーゼの関与が考えられた。

構築したエラスチン繊維を RIPA buffer で可溶化しウエスタンブロット法を用い解析した結果、1 つは、分子量 68 kDa に検出された BTE の単量体、もう 1 つは濃縮ゲルと分離ゲルの間に検出された高分子で、この高分子は、還元条件下で消失することからトロポエラスチンとマイクロフィブリルとの複合体であると考えられた。さらに分離ゲルに入り込めない巨大分子も検出され、この巨大分子は  $\beta$ -APN 存在下では検出されないことから架橋したエラスチン繊維であると推測した。

以上より、他の弾性繊維関連成分を発現し、トロポエラスチンを発現しない APRE-19 細胞に、大腸菌組換えトロポエラスチンを添加しエラスチン繊維を再

構築できるモデルを確立した。

### C 末端領域変異トロポエラスチンが構築するエラスチン繊維の生化学的解析

皮膚弛緩症は、エラスチン遺伝子の変異により引き起こされることが知られており、エラスチン遺伝子エクソン 32 のフレームシフト変異によりエラスチン繊維に異常が見られることが報告されている。本研究では、皮膚弛緩症で見られる変異トロポエラスチン(fmTE)と正常トロポエラスチン(nTE)を作製し、fmTE が構築したエラスチン繊維を生化学的に解析し、nTE が構築したエラスチン繊維と比較した。

ARPE-19 細胞に fmTE 及び nTE を添加し、8 日間培養後、蛍光免疫染色及び ELISA を行った。その結果、nTE と比較し fmTE では、マイクロフィブリルへの沈着量が約 50%低下した。さらに fmTE が構築したエラスチン繊維中に含まれるデスモシン量をシャーレ内の全タンパク量で補正した場合、nTE に比較し約 20%の減少が認められたが、沈着したトロポエラスチン量で補正した場合、約 50%の増加が認められた。このことから fmTE では、nTE に比較し架橋を形成しやすいことが示唆された。

次に、各トロポエラスチンとマイクロフィブリルタンパクとの相互作用を Solid phase binding assay 法または、免疫沈降法を用いて解析した。マイクロフィブリルタンパクは、フィビュリン-5 とフィブリリン-1 の N 末端部分配列 (PET) を用いた。Solid phase binding assay 法の結果、fmTE とフィビュリン-5 または PET との結合は、nTE のそれに比べ約 70%または約 30%減少した。また同様に免疫沈降法においても fmTE とフィビュリン-5 との結合は低下した。これらの結果は、fmTE のマイクロフィブリルへの沈着能力が低下していることを示している。

トロポエラスチンは水溶液中で温度の上昇に伴い自己集合する特性を有し、この自己集合を介してトロポエラスチン分子間の架橋が形成されると考えられている。トロポエラスチンの自己集合は、水溶液の温度を 15°C から 45°C に経時的に上昇させた時の濁度強度を測定することで解析する事ができる。各トロポエラスチンの自己集合を検討した結果、nTE は自己集合開始温度が 33°C 付近であるのに対し fmTE では 25°C 付近であった。この結果は、fmTE が nTE より自己集合しやすいことを示し、このことが分子間架橋を形成しやすい要因である可能性が示唆された。

以上より、確立した *in vitro* エラスチン繊維再構築モデルを用い、構造の異

なるトロポエラスチン分子が構築したエラスチン繊維を生化学的に解析することが可能であると考えた。また皮膚弛緩症で見られるようなトロポエラスチン C 末端領域の変異が、マイクロフィブリルとの相互作用だけでなく、トロポエラスチンの自己集合にも影響を与えることが示唆された。

#### エラスチン遺伝子オルタネイティブスプライシング産物の特性

単一の遺伝子として知られるエラスチンは、オルタネイティブスプライシングによりその分子の多様性を持つことが知られている。しかし、それら分子の特性はあまり知られていない。そこで本研究では、ヒト皮膚においてオルタネイティブスプライシングが確認されているエクソン 26A 欠損 ( $\Delta 26A$ ) とエクソン 32 欠損 ( $\Delta 32$ ) トロポエラスチン、さらに正常ヒトトロポエラスチン(HTE)を作製し、これらが構築する繊維を *in vitro* モデルで解析し、さらにそれらが構築したエラスチン繊維のエラスターゼに対する分解抵抗性を検討した。

各トロポエラスチンを ARPE-19 細胞に添加し培養後、蛍光免疫染色及び ELISA を行った結果、観察されるエラスチン繊維量に変化は認められなかった。次に各トロポエラスチンが構築した繊維中に含有するデスモシンを定量したところ HTE に比較し  $\Delta 26A$  では有意に増加し、 $\Delta 32$  では減少した。また、フィブリン-5 と PET との結合も、同様に  $\Delta 26A$  で有意に増加し、 $\Delta 32$  で減少した。各トロポエラスチンの自己集合開始温度は、 $\Delta 26A$  と  $\Delta 32$  で HTE に比較し若干上昇した。 $\Delta 26A$  において自己集合が低下するにもかかわらず架橋量が増加した。トロポエラスチンの分子間架橋形成は自己集合を介すことが知られており、この自己集合はトロポエラスチンの分子量と正の相関を示す。またトロポエラスチンの自己集合は、マイクロフィブリルとの結合によって促進されることが報告されている。 $\Delta 26A$  はマイクロフィブリルとの結合が高いため、自己集合が亢進し架橋形成量が増加したと考えられた。一方、 $\Delta 32$  は、HTE に比較しマイクロフィブリルとの結合が低下していることから、構築するエラスチン繊維量に含まれる架橋量も低下したと考えられる。

次に各トロポエラスチンを添加し構築したエラスチン繊維をブタ臍由来エラスターゼにより分解後、その繊維中に含まれるデスモシン量を定量した。その結果、 $\Delta 26A$  は、他のトロポエラスチンに比較しエラスターゼに対し分解抵抗性を示した。

以上のことより、 $\Delta 26A$  は、マイクロフィブリルと相互作用が強く、エラスターゼに対する分解抵抗性を持つことを明らかとした。また本モデルはエラス

チン繊維分解のモデルとしても有用であった。

#### まとめ

内因性のトロポエラスチンを発現せず、他の弾性繊維関連成分を発現するヒト網膜色素上皮細胞を用い、組換えトロポエラスチンを添加することでエラスチン繊維を構築することが可能となった。また、構造の異なるトロポエラスチン分子が構築する繊維を生化学的に解析することも可能にした。以上のことより本研究は、エラスチン繊維形成機序の解明のみならず、出生前診断や遺伝子診断で判明した変異トロポエラスチンが構築する繊維を生化学的に解析することで、慢性疾患の予防法、遺伝子治療や充填療法などの治療法の確立に大きく寄与すると思われる。

## 論文審査の結果の要旨

エラスチン繊維は血管や肺や皮膚などの組織に存在し特有の弾性機能を果たしている。この繊維の弾性が加齢や疾患で失われると、動脈硬化をはじめ組織機能障害をきたす。この繊維は主に蛋白質のエラスチンと糖タンパク質のフィブリリンから構成されており、エラスチンの前駆体であるトロポエラスチンとフィブリリンは、それぞれ細胞外に分泌され相互作用をすると共に、リジルオキシダーゼによりトロポエラスチンのリジン残基は分子間架橋され、特有な架橋成分のデスモシンを有するエラスチン繊維を形成すると推定されている。しかし、エラスチン繊維の形成過程を生化学的に検討可能な系がなく、その機構が検討されていない。

そこで、本論文では、トロポエラスチンを発現せず、他のエラスチン繊維成分を発現しているヒト網膜色素上皮細胞（ARPE-19細胞）に大腸菌組換えトロポエラスチンを添加することでエラスチン繊維を再構築する新たな*in vitro*モデルを確立した。即ち、大腸菌組換えトロポエラスチンを作成、精製後、ARPE-19細胞の培地に添加して培養することにより、経時的かつ、添加トロポエラスチン量に比例した定量的なエラスチン繊維形成を確認した。また、トロポエラスチン分子間に架橋形成させる酵素のリジルオキシダーゼに対する阻害剤である、 $\beta$ -アミノプロピオニトリル存在下ではエラスチン繊維は形成しないことも確認した。これらの基礎的検討により新たに*in vitro*でのエラスチン繊維形成モデルを確立した。トロポエラスチンに対応する遺伝子は一種類であるが、m-RNAのオルタナティブスプライシングにより多様な調節が可能となる。しかし、異常なスプライシング生成物も認められ、これによるエラスチン繊維異常も推測される。そこで、エクソン26A欠損体（ $\Delta$ 26A）やエクソン32欠損体（ $\Delta$ 32）及び先天的エラスチン遺伝子異常疾患である皮膚弛緩症で認められる変異トロポエラスチン（fmTE）をそれぞれ遺伝子組換えにより作成した。これらを上記*in vitro*エラスチン繊維形成モデルを用い構築させたエラスチン繊維について、正常トロポエラスチンの構築したエラスチン繊維と比較検討した。その結果、 $\Delta$ 26Aと $\Delta$ 32の構築したエラスチン繊維量は正常と差が少ないが、fmTEが構築したエラスチン繊維量は減少していることが蛍光免疫測定法で認められた。

また、これらの異なるトロポエラスチンによるエラスチン繊維形成過程について、トロポエラスチン同士の自己集合やトロポエラスチンとマイクロフィブリルの相互作用およびデスモシン形成について生化学的に検討した。その結果、

△ 26A のトロポエラスチンではマイクロフィブリルとの相互作用が増加すること、これが構築したエラスチン繊維はデスモシンなどの架橋形成が増加し、エラスターゼで比較的分解されにくいことが認められた。△ 32 のトロポエラスチンではマイクロフィブリルとの相互作用、自己集合能、架橋（デスモシン）形成の低下が認められた。さらに、fmTE では、自己集合能は促進するがマイクロフィブリルとの相互作用が低下する異常があることを明らかにした。これら、生化学的検討から、△ 26A、△ 32 及び fmTE は、正常のトロポエラスチンが形成するエラスチン繊維とは質的に異なっており、このことが弾性機能などの機能的の異なるエラスチン繊維を形成することが推測された。

以上のように、本論文は新しい知見を含み、特にエラスチン繊維の形成機構や遺伝子異常によるエラスチン繊維異常の検討可能な新たなエラスチン繊維構築モデルの開発は高く評価され意義深く、これを用いた応用も可能と期待される。従って、本論文は博士(薬学)の学位論文に十分値するものと判定した。