

論 文 要 旨

Latent TGF- β binding protein 2 and 4 have essential overlapping functions in microfibril development

(LTBP-2とLTBP-4はミクロフィブリル形成において重複する重要な機能をもつ)

関西医科大学内科学第二講座
(指導：塩島 一郎 教授)

藤川 雄介

【はじめに】

マイクロフィブリルはFibrillin -1, 2から構成される細胞外マトリックスであり、トロポエラスチンと結合して弾性線維を形成する。また水晶体を支持する毛様小帯（チン氏帯）のようにマイクロフィブリルだけでできている組織もある。マイクロフィブリル上に共局在することが知られる分泌タンパク質にLTBPs (Latent TGF- β binding proteins)がある。4つあるLTBPsの中でもLTBP-1, 3はTGF- β を細胞外マトリックス中に蓄える作用があるが、LTBP-2はTGF- β と結合せず、LTBP-4もごくわずかしきTGF- β と結合していない。よってLTBP-2とLTBP-4にはTGF- β 非依存的な機能があると考えられる。*Ltbp2*ノックアウトマウスが毛様小帯マイクロフィブリルの形成不全により水晶体脱臼を発症することから、LTBP-2がマイクロフィブリルの形成に必須の役割をもつことを我々は以前報告した。一方、LTBP-4はマイクロフィブリルにエラスチンを沈着させるのに必須であることを我々は報告したが、マイクロフィブリルそのものの形成における役割は知られていない。

LTBP-2は肺や動脈に多く発現しているにも関わらず*Ltbp2*ノックアウトマウスでは水晶体脱臼以外に表現型がなく、眼以外の組織では他のLTBPが代償している可能性が考えられた。本研究では、眼以外の組織においてLTBP-4がマイクロフィブリル形成におけるLTBP-2の役割を代償しているという仮説を検証した。*Ltbp2/4S*ダブルノックアウトマウスを作成し、表現型を解析した。さらにLTBP-4がLTBP-2欠損を代償できるか*in vivo*, *in vitro*の両面から検討した。

【方法】

*Ltbp2/4S*ダブルノックアウトマウスの作製と表現型解析

遺伝子組み換えにより作製した*Ltbp2*^{-/-}マウスと*Ltbp4S*^{-/-}マウスの掛け合わせにより*Ltbp2/4S*ダブルノックアウト (DKO) マウスを作成し、その表現型を解析した。

肺組織における弾性線維関連遺伝子の発現量解析

野生型、*Ltbp2*^{-/-}マウス、*Ltbp4S*^{-/-}マウス、*Ltbp2/4S* DKOマウスの肺組織の弾性線維構成タンパク質 (Eln, Fbn1,2など) や弾性線維分解酵素 (Mmp9,12など) の mRNAの発現レベルを計測、解析した。

マイクロフィブリル形成におけるLTBP-2, LTBP-4Sの機能解析

野生型、*Ltbp2*^{-/-}マウス、*Ltbp4S*^{-/-}マウス、*Ltbp2/4S* DKOマウス各々のマウス胎児線維芽細胞(MEFs)を採取し培養を行い、マイクロフィブリル形成を*in vitro*で解析した。LTBP-2タンパク質、LTBP-4タンパク質を加えることでマイクロフィブリル形成が回復するかを検討した。

LTBP-4過剰発現マウスの作成および毛様小帯の解析

Ltbp2^{-/-}マウスに*Ltbp4S*を過剰発現させたマウスを作成し、毛様小帯におけるマイクロフィブリルの形成を解析した。

【結果】

Ltbp2, *4S*単独ノックアウトマウスは生後4週までほとんどの個体が生存していたが、*Ltbp2/4S* DKOマウスは出生数は正常であるものの生後4週目までに約半数が死亡した。*Ltbp4S*^{-/-}と*Ltbp2/4S* DKOマウスで肺気腫が認められたが、DKOマウスの方がはるかに重篤であった。肺組織を電子顕微鏡で観察すると*Ltbp2/4S* DKOマウス組織では弾性線維が細かく断片化していた。

週齢別に肺組織における弾性線維関連遺伝子発現量を測定したところ、新生児期 (P0.5) では各群とも遺伝子発現に大きな差はなかったが、生存率が減少し始める3週齢になると*Ltbp2/4S* DKOマウスでは*Eln*, *Fbn1*や*Fbn2* など弾性線維形成遺伝子の発現がむしろ増加していた。さらに8週齢になると弾性線維形成遺伝子発現が有意に減少し代わりに*Mmp12* (マクロファージエラスターゼ) の発現量が増加していた。

各遺伝子型のマウスからマウスMEFを採取し無血清下で培養したところ*Ltbp2*^{-/-}群と*Ltbp4S*^{-/-}群ではマイクロフィブリル形成の軽度減少、*Ltbp2/4S* DKO群では高度のマイクロフィブリル形成不全が認められた。*Ltbp2/4S* DKOのMEFにリコンビナントLTBP-2またはLTBP-4を加えるとマイクロフィブリルの線維形成が回復した。

*Ltbp4S*を*Rosa26*遺伝子座にノックインしてLTBP-4を全身で過剰発現するマウスを作成し、*Ltbp2*^{-/-}と掛け合わせたところ、*Ltbp2*^{-/-};*Ltbp4S* KIマウスでは毛様小帯の形成が回復していた。LTBP-4はマイクロフィブリルと共局在していた。

【考察】

今回、マイクロフィブリル形成においてLTBP-2とLTBP-4が重複する機能を持ち互いに代償できるという仮説を検証するため*Ltbp2/4S* DKOマウスを作成し、肺と眼において*in vivo*での代償機構を、MEFを用いての培養で*in vitro*での代償機構をそれぞれ示すことができた。肺組織において適切なマイクロフィブリル線維形成(とそれに引き続く弾性線維形成)には、少なくともLTBP-2, LTBP-4いずれか一方が必要であると考えられた。

最近、*Ltbp2*^{-/-}マウスの毛様小帯マイクロフィブリルは一旦形成された後に断片化することがわかり、LTBP-2は頑強なマイクロフィブリルの構造形成に必要であると考えられる。今回の研究から、LTBP-4も同様の機能があると考えられる。

本研究では肺と眼におけるマイクロフィブリル形成でLTBP-2, 4が互いに重複する機能を持つことを示したが、*Ltbp2/4S* DKOマウスと*Ltbp4S*^{-/-}マウスの動脈では弾性線維の形成不全は同程度であった。組織によってマイクロフィブリル形成の分子機構がどう違うのかを見いだすことが今後の課題である。