

京都大学	博士（医学）	氏名	野田和男
論文題目	Latent TGF-β binding protein 4 promotes elastic fiber assembly by interacting with fibulin-5 (Latent TGF- β binding protein 4 は fibulin-5 との相互作用を介して弾性線維の形成を促進する)		
(論文内容の要旨) <p>弾性線維は組織の弾性を担う細胞外マトリックスである。炎症や加齢によって弾性線維の劣化が起こると肺気腫や動脈硬化、皮膚のたるみが生じる。</p> <p>弾性線維が形成されるメカニズムは、まずマイクロフィブリルを足場として elastin タンパク質が沈着し、沈着した elastin が架橋されて弾性線維が形成される。しかしこの形成過程における分子メカニズムは十分には解明されていない。</p> <p>これまでの報告で、fibulin-5 タンパク質が弾性線維形成に必須であり、その機能として、elastin をマイクロフィブリル上へ沈着させる役割があることが知られていた。</p> <p>本研究では、<i>Fbln5</i> (fibulin-5 のコード遺伝子) ノックアウトマウスと <i>Ltbp4</i> (latent TGF-β binding protein 4: LTBP-4 のコード遺伝子) ノックアウトマウスの表現型がともに肺気腫、大動脈の蛇行、皮膚のたるみを呈し非常に類似していることを見出し、LTBP-4 が弾性線維形成において果たす役割を fibulin-5 との相互作用に着目して解析を行った。</p> <p>まず fibulin-5 と LTBP-4 が直接結合するかどうかを Solid phase binding assay にて検討したところ、これらが直接結合することが分かった。</p> <p>次に、LTBP-4 が弾性線維形成において果たす分子機序を解明するため、ヒト真皮線維芽細胞を 10%血清入り培養液で 2 週間培養し、elastin の免疫染色を行った。siRNA を用いて <i>LTBP4</i> をノックダウンすると、elastin の線状沈着が消失した。<i>LTBP4</i> をノックダウンした細胞の培養液にリコンビナント LTBP-4 タンパク質を添加すると elastin の線状沈着は回復した。添加するリコンビナント LTBP-4 の量を増加させると、それに従って elastin 沈着量が増加した。以上の結果から LTBP-4 は elastin がマイクロフィブリル上に線状に沈着するのを促進する働きがあると考えられた。</p> <p>続いて、fibulin-5 の免疫染色を行った。<i>LTBP4</i> ノックダウンでは fibulin-5 の線状沈着が消失し、リコンビナント LTBP-4 の添加で fibulin-5 の線状沈着は促進された。リコンビナント fibulin-5 を添加すると fibulin-5 の沈着は点状となった。またマウスの組織において fibulin-5 の免疫染色を行ったところ、野生型マウスでは fibulin-5 は線状に存在していたが、<i>Ltbp4</i> ノックアウトマウスでは fibulin-5 が点状に存在していることが分かった。</p> <p>最後に、elastin、fibulin-5、LTBP-4 の相互作用関係を検討するため、それぞれのリコンビナントタンパク質を用いて Solid phase binding assay を行った。elastin を固相化し LTBP-4 を反応させ、これらの結合が fibulin-5 の有無に依存するかどうか実験したところ、fibulin-5 の存在下でのみ elastin と LTBP-4 の結合が示された。</p>			

<p>以上の結果から、弾性線維形成における LTBP-4 の役割は以下の通りである。すなわち、LTBP-4 は、elastin と fibulin-5 の複合体がマイクロフィブリル上に線状に沈着する過程に必要で、その沈着は LTBP-4 と fibulin-5 の直接結合によって行われる。</p> <p>本研究では LTBP-4 の弾性線維形成における作用機序を解明するとともに、LTBP-4 が弾性線維の形成促進作用を持つことも見いだした。この結果は弾性線維の劣化が原因で起こる病態を改善する治療につながる可能性がある。</p> <p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>弾性線維は組織の弾性を担う細胞外マトリックスである。弾性線維形成における分子メカニズムは十分には解明されていない。本研究では、LTBP-4 の弾性線維形成における機能解明を行った。</p> <p>まず Solid phase binding assay にて LTBP-4 が fibulin-5 と直接結合することを示した。次に、ヒト真皮線維芽細胞培養において、リコンビナント LTBP-4 を添加すると、elastin および fibulin-5 の線状沈着が促進されることを見出した。続いて、ヒト真皮線維芽細胞培養で <i>LTBP4</i> をノックダウンした場合、elastin および fibulin-5 の沈着が消失することを示した。また <i>Ltbp4</i> ノックアウトマウスの組織において、fibulin-5 が点状に沈着していることが分かった。最後に、Solid phase binding assay にて elastin は fibulin-5 の存在下でのみ LTBP-4 と結合することを示した。</p> <p>以上の結果から、LTBP-4 は elastin と fibulin-5 の複合体がマイクロフィブリル上に線状に沈着する過程に必要で、その沈着は LTBP-4 と fibulin-5 の直接結合によることを明らかにした。</p> <p>以上の研究は弾性線維の形成機構の解明に貢献し、発生生物学研究分野の発展に寄与すると共に、タンパク質を用いた弾性線維の再生医療の開発に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 25 年 4 月 22 日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。</p>

要旨公開可能日： 年 月 日以降