

2024 年度年次報告書

加齢による生体変容の基盤的な理解

2023 年度採択研究代表者

辰川 英樹

名古屋大学 大学院創薬科学研究科

助教

細胞外基質の架橋変容から生じる組織硬化の分子基盤の解明

研究成果の概要

本研究では、加齢により誘導される ECM の質の変化が加齢性の疾患(特に臓器が硬化する線維化)の増悪に関わる仮説を検証する。架橋酵素 TG2 や LOX の発現や活性が加齢により増加することから、これらの酵素による ECM の修飾に着目し、ECM の架橋修飾される基質や程度が変動することが、更なる線維化の増悪に繋がる新規分子機構を見出す。2024 年度(第二年次)には、LOX により架橋修飾される基質や修飾残基の解析法の最適化を目指した。

【加齢により TG2 活性が増加する組織や臓器の特定、ECM 架橋修飾の性状解析】

加齢マウスに UUO 処置を行い、腎線維化を誘導したところ、20%程度のマウスは依然として死亡するものの、解析に足りうる十分な腎組織サンプルを回収することができた。結紮をしていない対側の腎臓に肥大が見られたことから、UUO モデルでは未処置の片側の腎臓が機能を代償することにより病態が軽減されると考えられる。このため、コントロールとしてはこの未処置の対側の腎臓を使用せず、別に偽手術の腎臓をコントロールのサンプルとして回収することにした。以前のプレオマイシン投与モデルは投与方法の簡便さにおける利点はあるものの、薬剤の有効濃度域が狭く、個体差が大きい欠点があった。しかしながら、尿管結紮により線維化を誘導する UUO モデルでは、尿管結紮により確実に線維化が誘導されるため、個体差が少ない利点がある。実際に腎線維化を誘導し、腎組織中の線維化の指標であるコラーゲン量を Sirius red により染色し、赤色の呈色程度を定量測定したところ、加齢による腎線維化の悪化が確認された

さらに、同サンプルにおいて、TG2 活性についても評価を行った。これまでと同様な手法でグルタミン残基とリジン残基を架橋修飾する TG2 に対して、リジン残基側のアミン基を模したビオチン標識プローブを未固定の凍結組織切片上で反応させ、TG2 の架橋活性を観察・定量解析した。その結果、マウスの加齢に伴い TG2 活性が増加し、1年齢程度で活性が飽和することが分かった(図 3, 4)。TG2 活性の定量結果のバラつきは解析手法に基づくものというよりは、加齢による表現型の個体差そのものの起因することが示唆された。

【線維化組織において、LOX により架橋される修飾残基の網羅的解析】

ECM の架橋修飾に関わる TG2 以外の酵素としてリシルオキシダーゼ(LOX)の存在が知られる。TG2 を標的とした解析と同様に、LOX により認識されて基質標的タンパク質と架橋修飾されるプローブ¹⁾を利用して、架橋される基質の同定法を開発した。LOX はコラーゲンやエラスチンのリジンやヒドロキシリジンの側鎖を酸化してアリジン(反応性の高いセミアルデヒド)に変換する働きを持つ。この際にビオチン標識ヒドラジド(BHZ)を添加することにより、BHZ がアリジンと反応して取り込まれるため、標的ペプチドが特異的にビオチン化される。若齢マウスを用いてプレオマイシン投与による肺線維化モデルを作製し、LOX 活性の検出のための BHZ を未固定の組織切片に加えて、インキュベーションして内在性の LOX により架橋される基質のビオチン標識を試みたところ、期待通り肺線維化において増加するシグナルが確認された。

【代表的な原著論文情報】

- 1) Wang H, Poe A, Pak L, Nandakumar K, Jandu S, Steppan J, Löser R, Santhanam L.: An *in situ* activity assay for lysyl oxidases. Commun Biol. 4: 840 (2021)