

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2006～2009

課題番号：18108003

研究課題名(和文) 酵母で量産したヒト型ラミニンによる再生医療の新展開

研究課題名(英文) Development of regenerative medicine by the human laminins
mass-produced by yeast

研究代表者：

新美 友章 (NIIMI TOMOAKI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教

研究者番号：30377791

研究成果の概要(和文)：成熟脂肪細胞が分泌するラミニン-411 およびその部分構造がヘパリン結合性増殖因子と競合的に細胞膜表面受容体であるシンデカンに結合することにより、FGF-2の増殖刺激を遮断し、近隣の間葉系幹細胞の脂肪分化を抑制するというモデルを提唱した。また、再生医療に応用可能なラミニンの量産系構築には、トリパノゾーマ原虫である *Leishmania tarentolae* のタンパク質発現系が有用であることを示した。

研究成果の概要(英文)：We proposed a model in which the cryptic $\alpha 4$ LG4-5 fragment derived from laminin-411 inhibits *de novo* adipogenesis by modulating the effect of FGF-2 through syndecans. The establishment of a mass-production system for recombinant laminins using non-pathogenic *Leishmania tarentolae* will be useful for cell biology and tissue engineering applications.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	19,500,000	5,850,000	25,350,000
2007年度	17,600,000	5,280,000	22,880,000
2008年度	19,300,000	5,790,000	25,090,000
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
総計	61,400,000	18,420,000	79,820,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：細胞培養

1. 研究開始当初の背景

再生医学の強化のために多くの国家予算が投入され高水準の研究成果が挙げられているが、これらの研究は移植に用いる幹細胞を重視し、細胞外マトリックスの視点を欠落している。動物組織は細胞だけで形成されているのではなく、細胞と細胞外マトリックスの相互作用で構築されている。特に再生医療の至近標的である間葉系組織では、組織特異的な細胞外マトリックス分子が作る網目構造

の中に細胞が浮かんでいるのが実像である。我々は、マウス EHS 腫瘍から可溶化したマトリゲルと呼ばれる基底膜成分(ラミニン-111が主成分)をマウス皮下に注入すると、内在性幹細胞が活性化して、骨、筋肉、軟骨や脂肪を新生させることを発見し、幹細胞を移植しなくても細胞外マトリックスを注入するだけで内在性幹細胞の遊走、増殖と分化を制御して組織再建を操作できることを示した。そこで本研究では、幹細胞の増殖、分

化、遊走に強く作用するヒト型ラミニンの機能構造を明らかにし、酵母系で量産してその効果と安全性の評価を試みた。

2. 研究の目的

15種類以上存在するラミニンの中で、我々は間葉系細胞が産生するラミニン-411 ($\alpha\beta\gamma 1$)に注目して研究を進めてきた。そこで間葉系幹細胞に作用するラミニンの機能構造を明らかにし、再生医療に応用することを目的に、おもに以下の3点の研究テーマを設定した。

(1) 脂肪新生を抑制するラミニン $\alpha 4$ 鎖G領域断片の作用機構の解明、(2) 医薬応用を見据えたラミニン量産系の構築、(3) 脂肪組織由来幹細胞の再生医療への臨床応用

3. 研究の方法

(1) マトリゲルと線維芽細胞増殖因子(FGF)-2をマウス皮下に注射して脂肪新生を誘導する系において、ラミニン $\alpha 4$ 鎖のG領域断片が脂肪新生を抑制する分子メカニズムを生化学的手法にて解析した。

(2) ヒト型ラミニンの量産系を構築するため、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) の発現系、無細胞タンパク質合成系を用いて、ラミニン鎖会合機構を解析した。また、トリパノソーマ原虫 (*Leishmania tarentolae*) の発現系を用いて、ラミニン量産系の構築を試みた。

(3) 脂肪組織由来幹細胞の骨粗鬆症治療への臨床応用を目指し、小型動物用骨塩量測定装置を用いて基礎的研究を行った。

4. 研究成果

(1) ラミニン $\alpha 4$ 鎖G領域の脂肪新生抑制効果は、G領域全体(LG1-5)を加えた場合よりもその部分構造であるLG4-5領域で顕著であり、脂肪細胞が分泌するラミニン-411から $\alpha 4$ 鎖のG領域が切断されて、脂肪前駆細胞または血管内皮細胞に働きかけて脂肪新生を抑制するというメカニズムが示唆された。その活性中心はLG4モジュールの中にあり、その受容体であるシンデカン-2および-4の抗体をこの系に添加すると同じく脂肪新生が抑制されることを見出した(図1)。これらの結果より、「脂肪分化に伴って発現するラミニン $\alpha 4$ 鎖から切断されるLG4-5領域が、ヘパリン結合性増殖因子と競合的にシンデカンに結合して、成熟脂肪細胞の近隣の幹細胞を増殖刺激から遮断している。」というモデルを提唱した。

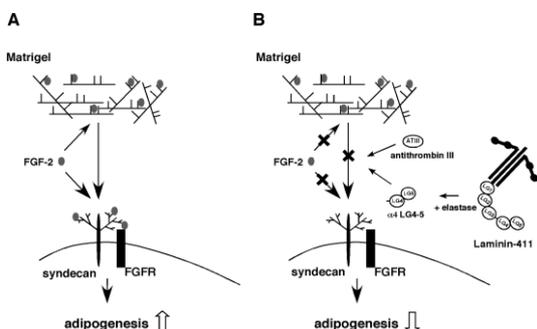


図1 ラミニン $\alpha 4$ 鎖LG4-5ドメインの脂肪新生抑制モデル

(2) (株) 島津製作所との共同研究により、昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系を用いて、短腕領域を欠失したヒト型ラミニン-332 ($\alpha\beta\gamma 2$)の各構成鎖を共発現し、ジスルフィド結合で安定化された三量体である「ミニ・ラミニン」の合成に成功した。

一方、酵母発現系でのラミニンの量産系構築は困難であったため、原生生物である *L. tarentolae* のタンパク質発現系を採用した。*L. tarentolae* は原生動物のキネトプラスト目に属し、翻訳後修飾も哺乳動物のそれに近いことが知られていることから、まず最小サイズのラミニンであるヒト・ラミニン-332の量産系構築を試みた。ヒト・ラミニン-332を構成するラミニン $\alpha 3$ 、 $\beta 3$ および $\gamma 2$ 鎖遺伝子の全長 cDNA をそれぞれ異なる選択マーカーをもつ発現ベクターに挿入し、順次、*L. tarentolae* 細胞に導入して安定形質導入株を単離した。この細胞株におけるラミニン各鎖のタンパク質の発現を解析したところ、培地中に $\alpha 3$ - $\beta 3$ - $\gamma 2$ 三量体が分泌されていることを確認した。 $\alpha 3$ 鎖に付加したFLAGタグを利用して、アフィニティー精製を行ったところ、培地 1 Lあたり 550 μg の収量が得られ、これは動物細胞発現系で得られる収量とほぼ同等であった。細胞接着活性を指標にして、動物細胞から精製したラミニンと活性を比較したところ、同等の活性を保持していた。これらの結果から、*L. tarentolae* のタンパク質発現系が、ラミニンの大量生産に有用であることを示した。

(3) 骨粗鬆症モデルマウスとして知られる OCIF (osteoclastogenesis inhibitory factor) / OPG (osteoprotegerin) ノックアウトマウスに、同じ遺伝的背景を持つマウスの脂肪組織から採取して体外培養した間葉系幹細胞を尾静脈注入したところ、低下していた骨密度が上昇する傾向が観察された。また別の骨粗

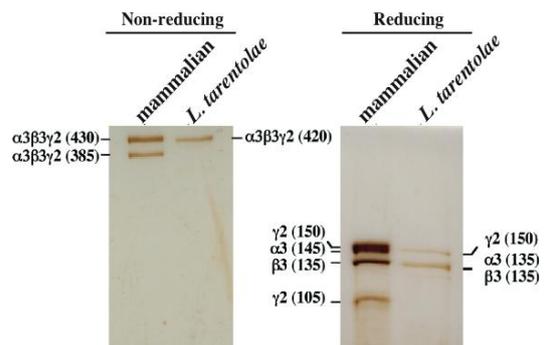


図2 *L. tarentolae* 細胞 (上) とラミニン-332の発現及び精製 (下)

鬆症モデルである卵巣摘出マウスでも同様の傾向が見られた。これには投与した幹細胞が実際に骨細胞に分化した結果である場合と、幹細胞が骨芽細胞を活性化（破骨細胞の分化抑制）した場合が考えられるが、詳細なメカニズムはまだ分かっていない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- 1) Santamato, A., Fransvea, E., Dituri, F., Caligiuri, A., Quaranta, M., Niimi, T., Pinzani, M., Antonaci, S., and Giannelli, G. Hepatic stellate cells stimulate HCC cell migration via laminin-5 production. *Clin. Sci.* 査読有, 121, 159-168 (2011)
- 2) Phan, H.-P., Sugino, M., and Niimi, T. The production of recombinant human laminin-332 in a *Leishmania tarentolae* expression system. *Protein Expr. Purif.* 査読有, 68, 79-84 (2009)
- 3) Iwashima, S., Ozaki, T., Maruyama, S., Saka, Y., Kobori, M., Omae, K., Yamaguchi, H., Niimi, T., Toriyama, K., Kamei, Y., Torii, S., Murohara, T., Yuzawa, Y., Kitagawa, Y., and Matsuo, S. Novel Culture System of Mesenchymal Stromal Cells from Human Subcutaneous Adipose Tissue. *Stem Cells Dev.* 査読有, 18, 533-543 (2009)
- 4) Phan, H.-P., Ezure, T., Ito, M., Kadowaki, T., Kitagawa, Y., and Niimi, T. Expression and chain assembly of human laminin-332 in an insect cell-free translation system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有, 72, 1847-1852 (2008)
- 5) Yamashita, H., Goto, C., Tajima, R., Koparal, A. T., Kobori, M., Ohki, Y., Shitara, K., Narita, R., Toriyama, K., Torii, S., Niimi, T., and Kitagawa, Y. Cryptic fragment $\alpha 4$ LG4-5 derived from laminin $\alpha 4$ chain inhibits de novo adipogenesis by modulating the effect of fibroblast growth factor-2. *Dev. Growth Diff.* 査読有, 50, 97-107 (2008)
- 6) Yukawa, H., Noguchi, H., Oishi, K., Miyazaki, T., Kitagawa, Y., Inoue, M., Hasegawa, M., and Hayashi, S. Recombinant sendai virus-mediated gene transfer to adipose tissue-derived stem cells (ASCs). *Cell Transplant.* 査読有, 17, 43-50 (2008)
- 7) Oishi, K., Noguchi, H., Yukawa, H., Miyazaki, T., Kato, R., Kitagawa, Y., Ueda, M., and Hayashi, S. Cryopreservation of mouse adipose tissue-derived stem/progenitor cells. *Cell Transplant.* 査読有, 17, 35-41 (2008)
- 8) Niimi, T., Hayashi, Y., Sekiguchi, K., and Kitagawa, Y. The Sp family of transcription

factors regulates the human laminin $\alpha 1$ gene in JAR choriocarcinoma cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 査読有, 1759, 573-579 (2006)

- 9) 宮崎隆道, 北川泰雄 脂肪組織由来幹細胞のマクロファージ様挙動. 再生医療, 査読無, 5, 497-501 (2006)
- 10) 北川泰雄, 小堀雅登, 鳥山和宏, 亀井譲, 鳥居修平 脂肪組織由来幹細胞発見の経緯と臨床応用について. 形成外科, 査読無, 49, 1087-1104 (2006)

[学会発表] (計 14 件)

- 1) Niimi, T. Development of mass production system on the basement membrane protein laminin. International symposium 2010 for Healthcare, May. 2010, Woosuk University, Jeonju, Korea
- 2) 山崎浩志, 坂洋祐, 丸山彰一, 新美友章 骨粗鬆症モデルマウスにおける脂肪由来幹細胞を用いた再生治療の検討. 第 32 回日本分子生物学会年会, 平成 21 年 12 月, パシフィコ横浜
- 3) Sugino, M., Phan, H.-P., and Niimi, T. The production and purification of recombinant human laminin-332 in *Leishmania tarentolae* expression system. 第 8 回環太平洋結合組織学会シンポジウム・第 41 回日本結合組織学会学術大会・第 56 回マトリックス研究会大会 合同学術集会, 平成 21 年 6 月, 湘南国際村センター
- 4) 杉野麻梨沙, Phan Phuong Hoang, 新美友章 *Leishmania tarentolae* 発現系を用いた基底膜蛋白質の生産. 日本農芸化学会 2009 年度大会, 平成 21 年 3 月, 福岡国際会議場
- 5) Phan Phuong Hoang, 江連徹, 伊東昌章, 門脇辰彦, 新美友章 無細胞蛋白質合成系を用いたラミニン鎖会合におけるジスルフィド結合様式の解析. BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会), 平成 20 年 12 月, 神戸国際会議場
- 6) Phan Phuong Hoang, 江連徹, 伊東昌章, 門脇辰彦, 北川泰雄, 新美友章 無細胞蛋白質合成系を用いたラミニンサブユニット会合機構の解析. 第 40 回日本結合組織学会学術大会・第 55 回マトリックス研究会大会 合同学術集会), 平成 20 年 5 月, 駒場エミナース
- 7) 今泉正恭, 北川泰雄 骨粗鬆症モデルマウスへの脂肪組織由来幹細胞の尾静脈注入による骨密度上昇. 日本農芸化学会 2007 年度大会, 平成 19 年 3 月, 東京大学
- 8) 北川泰雄 脂肪組織由来自家幹細胞の臨床応用の可能性. 第 19 回代用臓器・再生医学研究会, 平成 19 年 2 月, 北海道大学
- 9) Toriyama, K., Omae, K., Yamaguchi, H.,

Imaizumi, M., Yamauchi, Y., Kamei, Y., Torii, S., and Kitagawa, Y. Selective expansion of mesenchymal stem cells by culturing stromal vascular fraction obtained from human omentum in low serum medium. The 4th Meeting of International Fat Applied Technology Society, Oct. 2006, Baton Rouge USA

10) Miyazaki, T., Toriyama, K., Torii, S., and Kitagawa, Y. Macrophage-like behavior of adipose-derived stem cells in co-culture with adipocytes and their debris. The 4th Meeting of International Fat Applied Technology Society, Oct. 2006, Baton Rouge USA

11) Imaizumi, M., Takamatsu, S., Fuseya, A., Miyazaki, T., and Kitagawa, Y. Transient increase of bone mineral density by tail vein injection of adipose-derived mesenchymal stem cells into OPG/OCIF-deficient mice as a model of osteoporosis. The 4th Meeting of International Fat Applied Technology Society, Oct. 2006, Baton Rouge USA

12) Miyazaki, T., Yamauchi, Y., Toriyama, K., Torii, S., and Kitagawa, Y. *De novo* adipogenesis at the site of injection of alginate in combination with fibroblast growth factor-2 and heparin. The 4th Meeting of International Fat Applied Technology Society, Oct. 2006, Baton Rouge USA

13) 竹ノ内和貴, 後藤千絵, 山下泰恒, 田島理恵, Ayse Tanse Koparal, 小堀雅登, 大木裕司, 設楽研也, 鳥山和宏, 鳥居修平, 北川泰雄 ラミン α 4 鎖の断片はラミン α 8 から切断され線維芽細胞増殖の作用を制御する. 日本農芸化学会中部支部第 147 回例会, 平成 18 年 10 月, 名古屋大学

14) 北川泰雄 Adipose-derived stem cells with multiple potential of differentiation. 第 11 回アディポサイエンス研究会シンポジウム, 平成 18 年 8 月, 千里阪急ホテル

[図書] (計 2 件)

1) Niimi, T. Recombinant protein production in the eukaryotic protozoan parasite *Leishmania tarentolae*: A review. *Methods in Molecular Biology*. (Lorence, A. ed.) Humana Press, NJ, USA, in press

2) Sugino, M. and Niimi, T. Expression of multi-subunit proteins in *Leishmania tarentolae*. *Methods in Molecular Biology*. (Lorence, A. ed.) Humana Press, NJ, USA, in press

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ラミン α コイルドコイル(LCC)ドメインヘテロ多量体を含むタンパク質会合体の調製方法

発明者: 新美友章, 門脇辰彦, ファン・ホアング・フオング、伊東昌章、江連徹

権利者: 島津製作所、名古屋大学

種類: 特許

番号: 特願 2008-55649

出願年月日: 平成 20 年 3 月 6 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 泰雄 (KITAGAWA YASUO) (H18)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号: 50101168

新美 友章 (NIIMI TOMOAKI) (H19→H21)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
研究者番号: 30377791

(2) 研究分担者

鳥居 修平 (TORII SHUHEI) (H18→H20)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 60115607

新美 友章 (NIIMI TOMOAKI) (H18)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
研究者番号: 30377791

門脇 辰彦 (KADOWAKI TATSUHIKO) (H21)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号: 90313973

(3) 連携研究者

なし