

平成 21 年 5 月 6 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591318

研究課題名（和文）新しい表皮接着因子デルマトポンチンの機能解明と治療応用方法の開発

研究課題名（英文）Characterization of a novel epidermal cell adhesion protein dermatopontin and a development of therapeutic application

研究代表者

岡本 修 (OKAMOTO OSAMU)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：40284799

研究成果の概要：細胞外マトリックスのデルマトポンチン（DP）と呼ばれる分子の細胞接着部位がアミノ末端付近のループ構造の一部を構成するペプチド（DP-4）で、これに対するレセプターはヘパラン硫酸プロテオグリカンであることが判明した。このうち、シンデカンを同定した。DP-4 をマウス創傷に塗布すると対照に比べて新生表皮の延長距離が長いことと、DP が創傷局所で発現することを確認した。DP 強発現細胞の培養上清からの DP の単離のための方法を決定した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,300,000	690,000	2,990,000
20年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科臨床医学・皮膚科学

キーワード：デルマトポンチン

1. 研究開始当初の背景

真皮細胞外マトリックス成分の分析の過程で、低分子量分画中に分子量 22kDa の蛋白質が豊富に含まれることを見出した（図1）。そしてこの

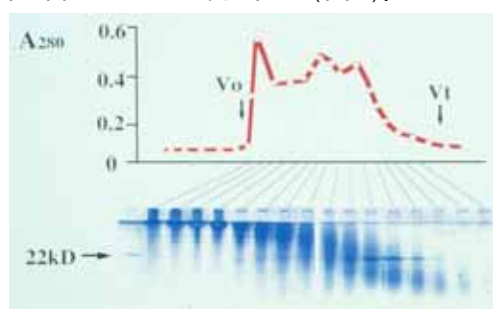


図1 真皮抽出物のゲルろ過パターン

蛋白質を精製すると、これはデルマトポンチン（DP）と呼ばれる、機能の未解明な成分であった。コラーゲン以外の単一な蛋白質としては DP の真皮内での含量はかなり大量と考えられた。このため DP が真皮内において重要な役割を担っていると考え、DP の機能解明の一環として細胞接着能を検討したところ、従来知られていた線維芽細胞の他に、表皮細胞の強力な接着能を有することを見出した。また、DP はコラーゲンと相互作用してその高次構造を改変することが報告されていたが、我々が単離した DP もコラーゲンと結合することを確認した。

2. 研究の目的

(1) DP の表皮細胞接着の細胞接着ドメイン、

レセプターを同定し、細胞接着機能の詳細を明らかにするとともにその生物学的意義を解明する。

(2) DP とコラーゲンとの相互作用のプロファイルを解明することにより細胞外マトリックスの高次構造形成メカニズムを理解し、線維化という異常な高次構造の解消を目指す。

3. 研究の方法

(1) DP の細胞接着プロファイルの検討 - - DP をマイクロタイターウェルに固相化して HaCaT 細胞を播種して細胞接着実験を行う。この実験系に EDTA、ヘパリン、抗インテグリン抗体を加えて接着阻害活性を見る。ならびに DP の全長をカバーする十数残基のペプチドを 16 種類合成し、これらのペプチドによる細胞接着活性、DP への細胞接着阻害活性を検討する。

(2) インテグリンの同定 - - DP を CNBr 活性化ゲルに固相化してアフィニティーカラムを作成し、HaCaT 細胞の抽出液をカラムに供して結合した分画のインテグリン分子種をウエスタンブロットで検出し、同定する。

(3) 非インテグリンレセプターの検討 - - DP の細胞接着ドメインの 1 つである DP-4 ペプチドをマイクロタイターウェルに固相化してビオチン化ヘパリンとの相互作用を検討する。リンパ球由来の ARH-77 細胞にシンデカンを強制発現させ、この細胞を用いて DP-4 への細胞接着をコントロール細胞と比較する。

(4) 創傷における DP の発現の検討 - - マウス背部にパンチブレードで筋膜に達する円形の創を作成し、一定期間経過後に創を切除して固定し、³⁵S 標識マウス DP の RNA プローブを用いて in situ hybridization を行い、創傷治癒の各過程における DP の発現を比較する。

(5) 細胞接着性ペプチドによる創傷治癒活性の検討 - - マウス背部にパンチブレードで筋膜に達する円形の創を 2 ヶ所作成し、一方に DP-4 ペプチド溶液 (2 mg/ml)、他方に PBS を滴下する。6 日目に創を切除して顕微鏡下に新生表皮の延長距離を測定する。

(6) コラーゲンと DP の相互作用の詳細の検討 - - マイクロタイターウェルにコラーゲンを固相化して DP とインキュベートし、ELISA 法にて結合した DP を検出する。この系に EDTA、各種イオンを添加し結合の変化を検討する。平衡透析法を用いて DP とイオンを相互作用させ、ピリジルアゾレゾルシノールで結合したイオンを定量する。この結果をスカッチャードプロットで解析する。

(7) リコンビナント DP の産生 - - pCEP-Pu に組み込んだ DP を 293-EBNA にトランスフェクションし、培養上清を硫酸沈殿にて濃縮し、因イオン交換、逆相カラムを用いて DP を単離した。pCOLD 発現系を用いて大腸菌に DP をトランスフェクションし、発現したヒスチジンタグ付き DP を

ニッケルセファロースカラムを用いて単離した。

研究成果

(1) DP の細胞接着活性の詳細の検討と (2) インテグリンの同定

DP は濃度依存性に表皮細胞である HaCaT 細胞の接着活性を示した (図 2)。この細胞

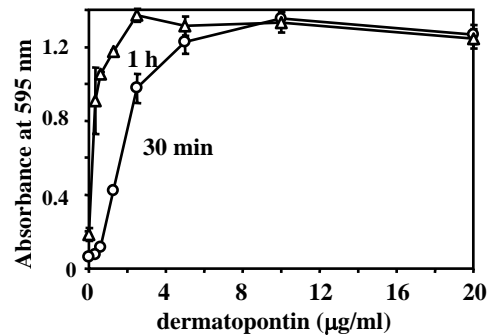


図 2 HaCaT 細胞の DP への接着プロファイル

胞接着は EDTA で阻害されたが、ヘパリンによる阻害はわずかであった。前者の結果からイン

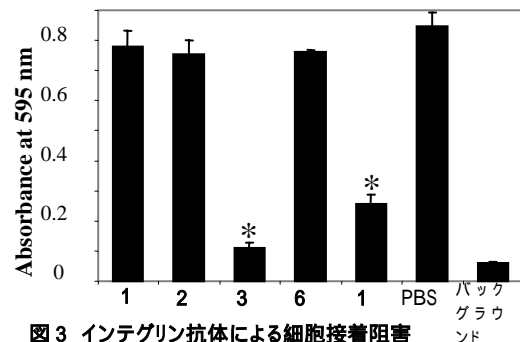


図 3 インテグリン抗体による細胞接着阻害

テグリンの関与を想起し、抗インテグリン抗体を用いて細胞接着阻害実験をすると、抗 3、1 抗体にて細胞接着が阻害され (図 3)、3、1 インテグリンが接着に関与していると考えられた。確認のため、HaCaT 細胞の抽出物を DP アフィニティーカラムに供すと、溶出された分画に 3 と 1 インテグリンが検出された (図 4、レーン 2-4)。しかし BSA を固相化したコントロールカラムの分画からは検出されなかった (図 4、レーン

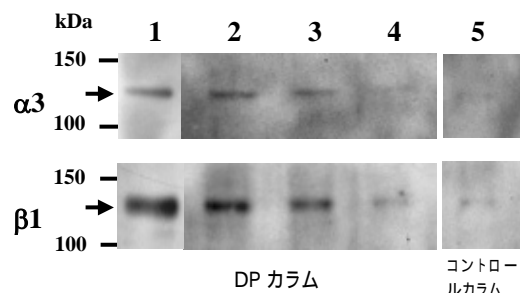


図 4 DP アフィニティーカラム溶出分画のインテグリンの検出

5)。

DP の細胞接着ドメインを同定するため、16 個のペプチドを作成し、HaCaT 細胞の DP への接着の阻害を検討したところ、DP-4 と名づけた

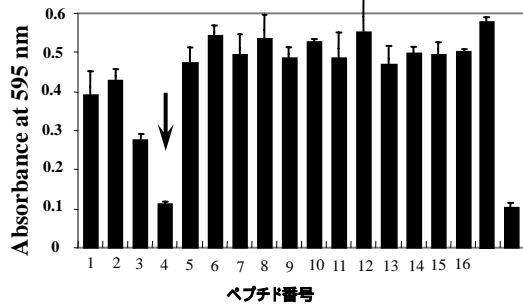


図 5 合成ペプチドによる DP への細胞接着阻害

ペプチドが最も強い細胞接着阻害を示した(図 5)。DP-4 ペプチドは DP のアミノ末端に近いループ構造の一部で、そのアミノ酸配列は PHGQVVAVRS である。このペプチドはそれ自体強い細胞接着活性を示す一方、DP-4 と一部オーバーラップする DP-5 ペプチドは全く細胞接着活性を持たず、DP-4 の特異的な活性が確認された(図 6)。このように DP-4 は DP の細胞接

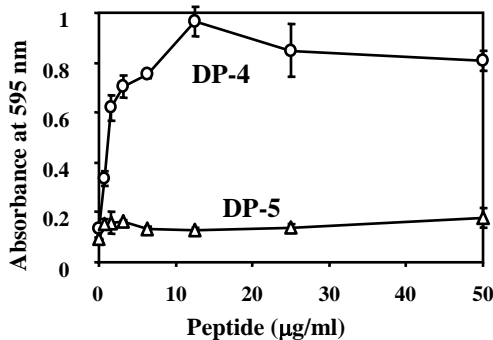


図 6 DP-4 ペプチドの細胞接着プロファイル

着ドメインであると同定されたが、DP-4 による細胞接着活性は抗インテグリン抗体で阻害を受けず、インテグリン結合部位ではないと考えられた。インテグリン結合ドメインはまだ不明である。

(3) 非インテグリンレセプターの検討

DP とは異なり、DP-4 への細胞接着はヘパ

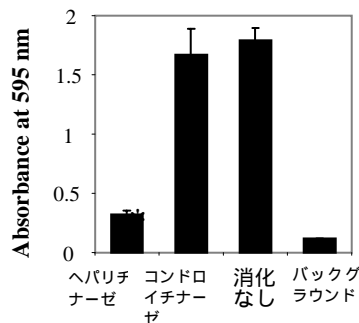


図 7 酵素消化による DP-4 への接着阻害

リンで強く阻害された。ならびに、細胞をヘパリチナーゼ消化すると DP-4 への接着能が消失すること(図 7)、DP-4 がヘパリンを結合すること

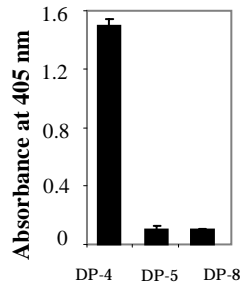


図 8 DP-4 とヘパリンの結合

(図 8) から、DP-4 のレセプターがヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)であることが想起された。HSPG タイプのレセプターとして細胞膜上に最も豊富な分子種はシンデカンであるため、シンデカンを強制発現させた ARH-77 細胞を用いて対照の細胞と DP-4 への細胞接着を比較した(図 9)。シンデカン1発現細胞は対照細胞と比較して有意差をもって DP-4 に接着した(図 9、パネル左半分)。一方、DP-5 に対しては双方の

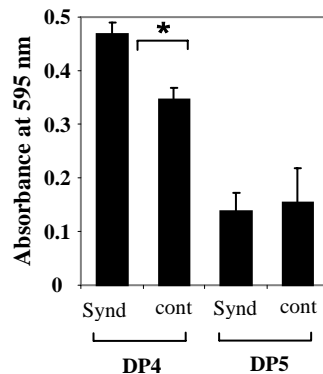


図 9 シンデカン強制発現細胞の DP-4 への接着

細胞ともに接着は認められなかった(図 9、パネル右半分)。この結果から HSPG タイプのレセプターのうちシンデカンが細胞接着に関与しており、接着は DP-4 特異的であることが示された。ただし、対象細胞も

DP-4 への細胞接着を示すことから、シンデカン以外の HSPG タイプのレセプターの存在も示唆されたが、まだその分子種は不明である。

(4) 創傷における DP の発現の検討

マウス創傷の in situ hybridization により、創傷治癒の各過程で DP の発現を経時的に観察した。

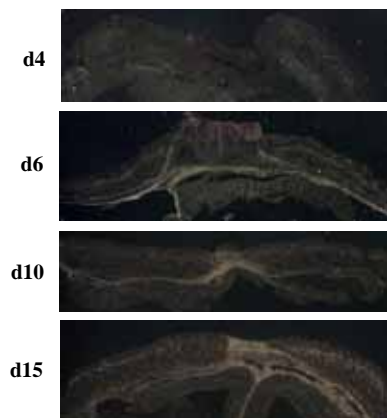


図 10 in situ hybridization による創傷における DP 発現

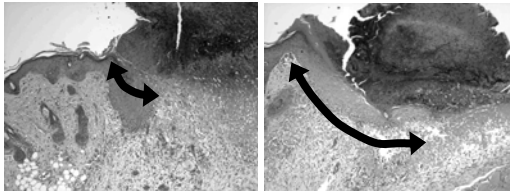
DP の発現は 4 日目には明らかには認められず、6 日目より筋膜と、それから創傷辺縁に向かって带状に延長する結合組織にその発現が確認された(図

10、白色の部分)。以後、筋膜での発現は減弱し、代わって創傷直下に形成した線維化部位に

主な発現の場が遷移し、20日目付近まで発現が持続した。

(5) 細胞接着性ペプチドによる創傷治癒活性の検討

DP-4 ペプチドが DP の細胞接着ドメインの 1 つと同等されたため、このペプチドによる創傷治療の可能性を検討した。DP-4 を塗布したマウス



PBS 塗布 DP-4 塗布

図 11 DP-4 ペプチドによる創傷治癒促進効果

創部で新生した表皮の延長距離は統計上有差をもって対照のそれよりも長かった(図 11、両側矢印)。次いで、市販されている創傷治癒促進剤であるトラフェルミンと創傷治癒促進活性を

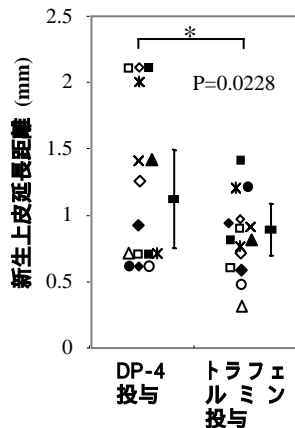


図 12 DP-4 とトラフェルミンの創傷治癒促進能の比較

比較すると、有差を持って DP-4 を塗布した群の新生表皮延長距離がトラフェルミン塗布群よりも長かった(図 12)。このように DP-4 は少なくともトラフェルミンと同等か、それ以上の創傷治癒促進能を有するという結果が得られた。

(6) コラーゲンと DP の相互作用の詳細の検討

我々の系でも DP は I 型コラーゲンと濃度依存性に相互作用するが、この相互作用は EDTA により濃度依存性に抑制されることが判明した(図 13)。この結果から、両者が相互作用する上で 2

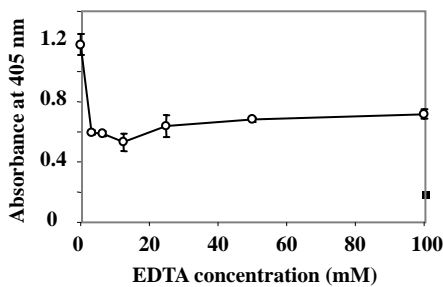


図 13 EDTA はコラーゲンと DP の相互作用を阻害する

価の陽イオンが存在することが好ましいということが示唆されるため、各種のイオンが DP とコラーゲンの相互作用に及ぼす影響を ELISA で検討したところ、銅と亜鉛イオンで相互作用が増強さ

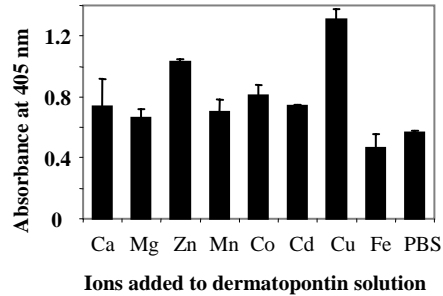


図 14 各種二価陽イオンによるコラーゲンと DP の相互作用の増強効果

れた(図 14)。銅と亜鉛イオンに着目し、DP とこれらイオンの相互作用を平衡透析法を用いて行い、スキャッチャードプロットで解析すると、DP1 分子は銅 4 原子(図 15)と、同様に亜鉛 8 原子と

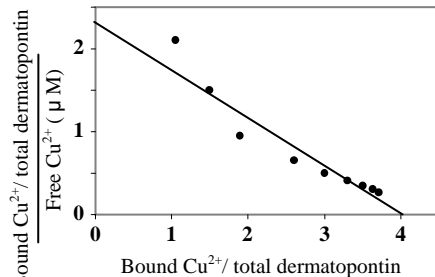


図 15 DP と銅イオンの相互作用のスキャッチャードプロット

結合するという結果が得られた。しかしこれらの値は分子量 22kDa の DP が結合できる原子数としては多すぎる印象があるため、リコンビナント DP を用いた再検が必要と考えられる。イオンとの結合がさらに確認されれば、細胞外マトリックスは銅や亜鉛などの微量元素の生体内での貯蔵組織となり、従来にない機能発現となる。

(7) リコンビナント DP の産生

293 EBNA の系においてリコンビナント DP の発現が最大で、リコンビナント DP は 60% 硫酸でほとんどが沈殿した。この 60% 硫酸分画を 0.5M 尿素存在下で DEAE 陰イオン交換カラムに供すと、溶出されたリコンビナント DP が他の蛋白質から良好に分離されることが判明した(図 16 囲みの部分)。このリコンビナント DP を含む分画を



図 16 リコンビナント DP の陰イオン交換カラムによる分離

C18 逆相カラムに供すと、リコンビナント DP の精製と濃縮が同時に行われたと考えられる電気泳動のパターンが得られた(図 17、囲みの部分)。

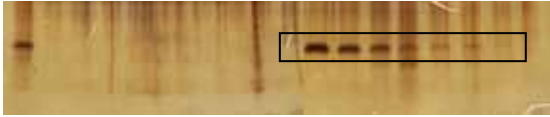


図17 リコンビナントDPの逆相カラムによる分離濃縮

大腸菌によるリコンビナント DP の発現については pCOLD 発現系を用いた。この発現系でもリコンビナント DP は封入体となったが、6M 尿素で可溶化され、ニッケルセファロースカラムでかな

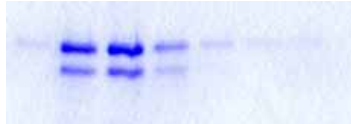


図18 大腸菌リコンビナントDPのニッケルセファロースカラムによる分離

りの純度で精製が可能であった(図18)。この2本のバンドのうち低分子量のもの

はリコンビナント DP のカルボキシ末端側の一部が欠失した部分分解産物と考えられた。リコンビナント DP の単離を目指し、このフラクションを6M 尿素存在下で DEAE 陰イオン交換カラムに供すと、低分子量の部分分解産物とリコンビナント DP の分離が可能であった(図19)。

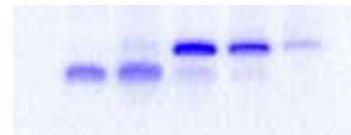


図19 大腸菌リコンビナントDPの陰イオン交換カラムによる分離

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 1件)

1. 岡本修、藤原作平 真皮細胞外マトリックス蛋白質デルマトポンチンは強力な表皮細胞接着活性を持つ 大分大学医工学センター年報 4, 40 - 43, 2008 査読なし

[学会発表](計 2件)

1. 岡本修、藤原作平、住吉秀明、松尾哲孝、吉岡秀克、高橋直哉、保住健太郎、野水基義 細胞外マトリックス蛋白質デルマトポンチンは表皮細胞接着活性を持つ 第39回日本結合組織学会 2008,5月30日,東京

2. 岡本修、藤原作平 細胞外マトリックス成分による高次構造の形成

[産業財産権]

出願状況(計 1件)
ペプチド製創傷治癒促進剤
発明者 岡本修
権利者 岡本修
番号 304028726
H20.1.7 出願
国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡本 修 (OKAMOTO Osamu)
大分大学・医学部
講師
研究者番号: 40284799

(2)研究分担者

住吉 秀明 (SUMIYOSHI Hideaki)
大分大学・医学部
助教
研究者番号: 60343357

藤原作平 (FUJIWARA Sakuhei)

大分大学・医学部
教授
研究者番号: 90181411