

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591648

研究課題名(和文) デルマトポンチンにより活性化されたフィブロネクチンは抗腫瘍活性を持つのか

研究課題名(英文) Does fibronectin activated by dermatopontin have anti-tumor activity?

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：我々はデルマトポンチン(DP)がフィブロネクチンと結合し、これを活性化することを明らかにした(Kato, J. Biol. Chem. 2011, 岡本 Aesthetic Dermatol. 2011)。DPにより活性化されたフィブロネクチンを、メラノーマの腫瘍塊に投与すると、腫瘍内の血管数が有意に減少した。

我々はDPがフィブリノーゲンと結合することを見出した。DP存在下でフィブリンを形成させると、フィブリンの生成速度は亢進し、フィブリンの直径は太くなった。このフィブリン線維は血管内皮細胞の接着と接着細胞の伸展を増強した(Wu, J. Invest. Dermatol. 2014)。

研究成果の概要(英文)：We found that dermatopontin interacts with fibronectin and activates it (Kato, J. Biol. Chem. 2011, Okamoto, Aesthetic Dermatol. 2011). The activated fibronectin decreased the number of vessels in melanoma tumor inoculated on the back of mice.

We also found that dermatopontin interacts with fibrinogen. Dermatopontin accelerated fibrin fibril formation and the diameters of newly-formed fibrin fibrils became greater than those formed under normal condition. The fibrin fibrils enhanced human umbilical vein endothelial cell adhesion and the cell spreading (Wu, J. Invest. Dermatol. 2014).

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：創傷治癒

キーワード：細胞外マトリックス

1. 研究開始当初の背景

デルマトポンチン(DP)という真皮細胞外マトリックス蛋白質は、DP-4と名づけたペプチドを介してフィブロネクチンと結合し、他にフィブリンにも結合する。このうちフィブロネクチンに DP は活性化して線維を形成させる。しかしフィブリンと DP との結合の詳細や、DP により活性化されたフィブロネクチンの機能、さらに DP の活性ペプチドがフィブロネクチンやフィブリンに及ぼす影響の詳細は不明である。

2. 研究の目的

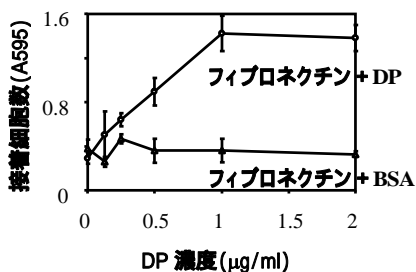
DP や DP の活性ペプチドがフィブロネクチン、フィブリンの生物活性に及ぼす影響を明らかにする。活性化フィブロネクチンは抗腫瘍作用が知られているため、DP により活性化されたフィブロネクチンに関しては特にこの作用を検討する。

3. 研究の方法

合成ペプチドを使って DP のフィブリンとの結合部位を明らかにするとともにフィブロネクチン、フィブリンの DP との結合部位も解明する。DP や、同定された DP の機能ペプチドを用いて、これらがフィブロネクチンやフィブリンの生物活性に及ぼす影響を解明する。

4. 研究成果

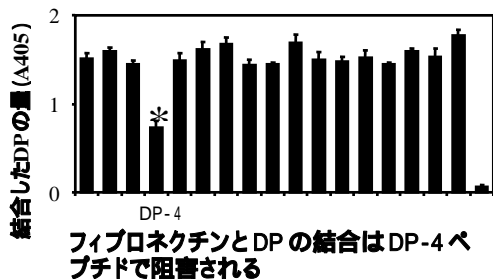
DP によって活性化したフィブロネクチンは線維芽細胞の接着を濃度依存性に増強した(下図)。



DPはフィブロネクチンの細胞接着を増強する

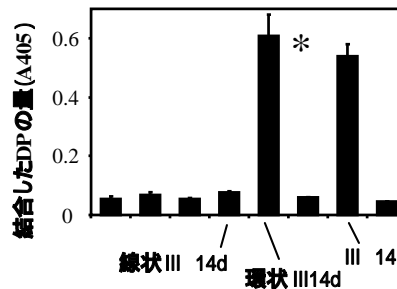
この細胞接着にあずかる細胞膜レセプターは 5 1インテグリンであった。(Kato, et al., J. Biol. Chem. 2011)

DP の部分ペプチドを作成し、DP とフィブロネクチンとの結合を阻害すると、DP-4 と名づけたペプチド (PHGQVVAVRS) のみが阻害活性を持っていた(下図)。この DP-4 ペプチドはフィブロネクチンと直接結合し、フィブロネクチンとの結合部位と同定された (data not shown)。



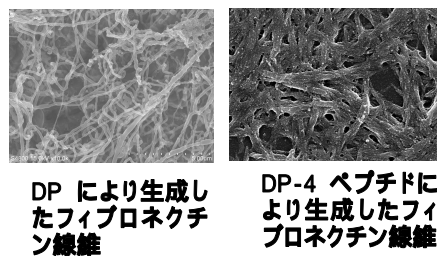
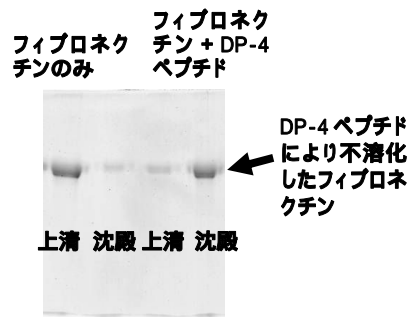
フィブロネクチンとDPの結合はDP-4ペプチドで阻害される

一方、フィブロネクチンの DP との結合部位は 14 番目のタイプ III リピード(III14)の前半の 30 残基程度(III14d)の部分と同定された。そして結合のために III14d は環状構造をとることが必要であった(環状 III14d) (下図)。



DP-4 ペプチドとフィブロネクチンのタイプ III リピード 14 番の環状ペプチドが結合する

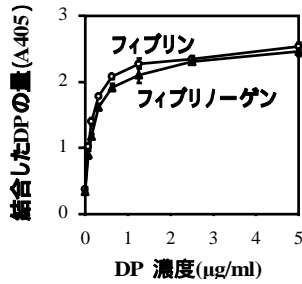
DP-4 ペプチドはフィブロネクチンを不溶化し、不溶化したフィブロネクチンは短く直線的な線維を形成していたが、この線維は DP により形成したフィブロネクチン線維とは形態的に異なっていた(下図)。



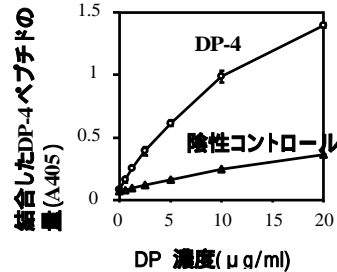
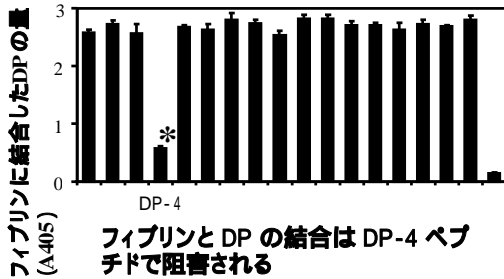
この線維は線維芽細胞の細胞接着を増強した。これらの結果を現在 Journal of Dermatological Science に投稿中である (Kato A, Okamoto O, et al. リバイス中)。

我々は DP がフィブロネクチンだけでなく、フィブリンノーゲン、フィブリンにも結合することを見出した(次項上図)。この結合はフィブロネクチンの場合と同じく DP-4 ペプチドペプチドで強力に阻害された(次項中図)。DP-4 ペプチドはフィブリンに直接結合し(次項下図)、このペプチドがフィブロネクチンだけでなくフィブリンとの結合部

位であることが示された。

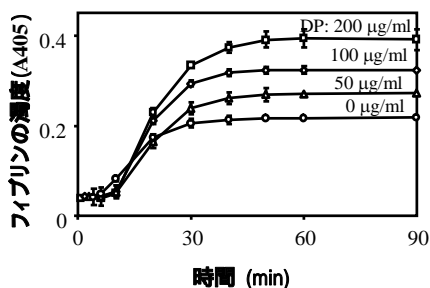


DP はフィブリン、フィブリノーゲンと結合する

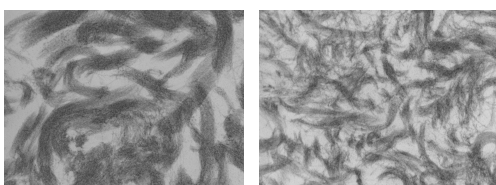


DP-4ペプチドはフィブリンと直接結合する

DP がフィブリノーゲンと結合しても溶液の濁度は変わらず、DP によりフィブリノーゲンは線維を形成しない。しかしこの溶液にトロンピンを加えてフィブリンを形成させると、濁度は加えた DP の濃度に依存性に増強し、DP がフィブリンの線維形成を促進した(下図上パネル)。そして DP 存在下で形成したフィブリンは、対照に比べて直径が太くなった(下図下パネル)。

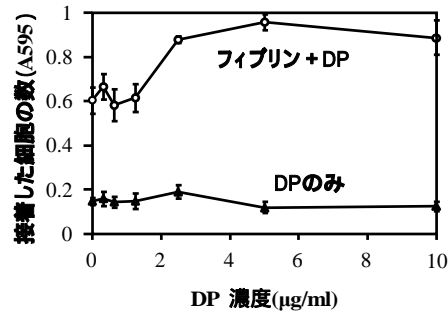


DP はフィブリンの線維形成を促進する



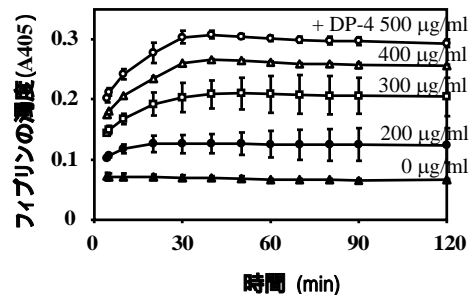
DPは径の太いフィブリンの生成を促進する。

DP によって高次構造が修飾されたフィブリン線維は血管内皮細胞の接着を増強し、細胞質の伸長も同じく増強した(下図)(Wu, et al., J. Invest. Dermatol. 2014)。

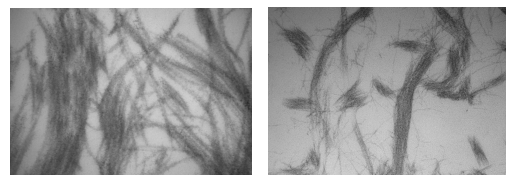


DP はフィブリンへの血管内皮細胞の接着を増強する

これまでの検討で DP-4 ペプチドがフィブロネクチンだけでなくフィブリンとも結合する活性部位であることが明らかとなった。このため、我々はフィブロネクチンの場合と同じく、DP-4 ペプチドによるフィブリン/フィブリノーゲンの生物活性への影響を検討した。



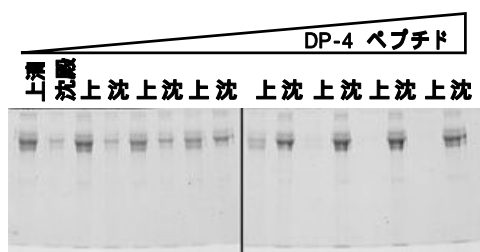
DP-4ペプチドはフィブリノーゲンの線維形成を促進する。



DP-4ペプチドで生成したフィブリノーゲン線維は直線的でフィブリン線維よりも細い。

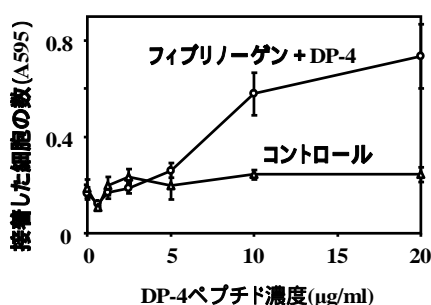
DP-4 ペプチドとフィブリノーゲンを混合しただけで溶液は白濁し、その濁度は加えた DP-4 ペプチドの濃度に依存性に増強した(上図上パネル)。この懸濁物を遠心して沈殿を電子顕微鏡で観察すると、線維が生成しており(上図下パネル)、電気泳動でこの線維はフィブリノーゲンであると同定された。DP-4 ペプチドにより生成したフィブリノーゲン線維はフィブリン線維に比べて径が細く、直線的であった(上図下パネル)。一方 DP-4 ペプチドはトロンピン存在下でのフィブリン形成には影響を及ぼさなかった(data not shown)。

フィブリノーゲンは混合した DP-4 ペプチドの濃度に依存性に沈殿となった(下図上パネル)。そしてフィブリノーゲン線維は混合した DP-4 ペプチドの濃度に依存性に血管内皮細胞の細胞接着能を増強した(下図下パネル)。



フィブリノーゲン + DP-4ペ

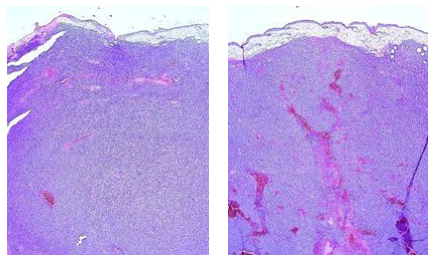
フィブリノーゲンはDP-4ペプチド濃度に依存性に沈殿(沈)になる。



DP-4ペプチドによって生成したフィブリノーゲン線維は細胞接着能が増強する。

これらの結果を我々は現在 Journal of Dermatological Science に投稿中である(Wu W, Okamoto O, et al. リバイス中)。

活性化されたフィブロネクチンは抗腫瘍作用を持つことが知られている。このため我々は DP-4 ペプチドで活性化されたフィブロネクチンの抗腫瘍作用を検討した。マウス背部に接種したメラノーマの腫瘍に活性化フィブロネクチンを反復投与したところ、メラノーマ腫瘍中の血管数が減少していることが明らかとなったが、現在再現性の検討中である(下図)。

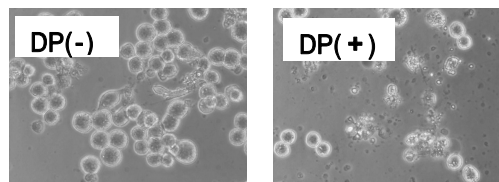


活性化フィブロネクチンを投与したメラノーマ組織、血管(赤い部分)が少ない。

PBSを投与したメラノーマ組織、血管(赤い部分)が多い。

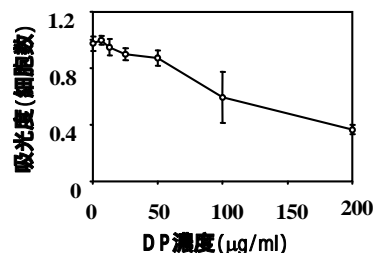
DP 自体にも抗白血病作用のあることが示唆されている。そこで、多発性骨髄腫由来の培養細胞に DP を加えると、骨髄腫細胞は明らかな壊死

を起こし、その細胞数は加えた DP の濃度に依存性に減少した(下図)。現在、この現象が起きる際の遺伝子の発現の変化を検討中である。



DPなしの対照。細胞は円形で一部紡錘形のものも

DP添加。円形の細胞は少なく、壊死した細胞の破片が多い。



細胞数はDPの濃度依存性にバックグラウンド程度まで減少する。

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3件)

1. Wu W, Okamoto O, Kato A, Matsuo N, Nomizu M, Yoshioka H, Fujiwara S. Dermatopontin regulates fibrin formation and its biological activity. *Journal of Investigative Dermatology* 134, 256-263, 2014

2. Kato A, Okamoto O, Ishikawa K, Sumiyoshi H, Matsuo N, Yoshioka H, Nomizu M, Shimada T, and Fujiwara S: Dermatopontin Interacts with Fibronectin, Promotes Fibronectin Fibril Formation, and Enhances Cell Adhesion. *The Journal of Biological Chemistry* 286(17), 14861-14869, 2011.

3. 真皮細胞外マトリックス蛋白質デルマトポンチンの分子生物学。 岡本修, 加藤愛子, 藤原作平: *Aesthet Dermatol*, 21(4), 303-317, 2011.

(学会発表) (計9件)

1. デルマトポンチンはフィブリン形成に影響し、その生物活性を修飾する 呉 偉民, 岡本 修, 加藤 愛子, 松尾 哲孝, 吉岡 秀克, 野水 基義, 藤原 作平: 第43回日本創傷治療学会. 2013年11月14日, 大分県日出町.

2. デルマトポンチンの活性ペプチドはフィブリノーゲンに線維を形成させ、その生物活性を修飾する 呉 偉民, 岡本 修, 加藤 愛子, 松尾 哲孝, 吉岡 秀克, 野水 基義, 藤原 作平: 第22回日本形成外科学会基礎学術集会. 2013

年11月8日, 新潟市.

3. An active peptide of dermatopontin affects fibrinogen structure and its biological function. Weimin Wu, Osamu Okamoto, Aiko Kato, Noritaka Matsuo, Hidekatsu Yoshioka, Motoyoshi Nomizu, Sakuhei Fujiwara: **第45回日本結合組織学会・学術大会・第60回マトリックス研究会大会合同学術集会**. 2013年6月29日, 和歌山市.

4. デルマトポンチンはフィブリン形成に影響し、その生物活性を修飾する 呉 偉民, 岡本修, 加藤 愛子, 松尾 哲孝, 野水 基義, 藤原 作平: **第 44 回日本結合組織学会・学術大会・第 59 回マトリックス研究会大会合同学術集会**. 2012 年 6 月 7 日, 東京都. (**第 59 回 Japan Matrix Club Young Investigator Award 受賞**)

5. デルマトポンチンの活性ペプチドの生物活性の検討 加藤 愛子, 岡本 修: **第 21 回日本形成外科学会基礎学術集会**. 2012 年 10 月 4 日, 福島県猪苗代町.

6. デルマトポンチンはフィブリン形成に影響し、その生物活性を修飾する 呉 偉民, 岡本修, 加藤 愛子, 松尾 哲孝, 野水 基義, 藤原 作平: **第 21 回日本形成外科学会基礎学術集会**. 2012 年 10 月 4 日, 福島県猪苗代町.

7. デルマトポンチンはフィブリン形成に影響し、その生物活性を修飾する 呉 偉民, 岡本修, 加藤 愛子, 松尾 哲孝, 野水 基義, 藤原 作平: **第 16 回九州基礎皮膚科研究会**. 2012 年 11 月 17 日, 福岡市.

8. 細胞外マトリックス蛋白質デルマトポンチンの活性ペプチドの同定 加藤 愛子, 岡本 修, 松尾 哲孝, 吉岡 秀克, 野水 基義, 藤原 作平: **第 43 回日本結合組織学会・学術大会・第 58 回マトリックス研究会大会合同学術集会**. 2011 年 6 月 10 日, 大分県別府市.

9. 細胞外マトリックス蛋白質デルマトポンチンの活性化ペプチドの同定とその生物活性の検討 加藤 愛子, 岡本 修: **第 20 回日本形成外科学会基礎学術集会**. 2011 年 10 月 6 日, 東京都.

(図書)(計0件)

(産業財産権)

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

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

藤原 作平 (Fujiwara Sakuhei)

大分大学・医学部・教授

研究者番号: 90181411

(3)連携研究者

松尾 哲孝 (Matsuo Noritaka)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号: 10284788