

機関番号：17301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591344
 研究課題名（和文） ラミニン由来ペプチドによる角化細胞遊走：機構解明および創傷治癒促進への応用
 研究課題名（英文） Mechanisms of keratinocyte migration stimulated by laminin a3 chain-derived peptide: Its application for wound healing acceleration
 研究代表者
 宇谷 厚志（UTANI ATSUSHI）
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号：10292707

研究成果の概要（和文）：

基底膜の主要構成成分の1つであるラミニンは組織構築の維持ばかりでなく、細胞の分化、増殖の制御、ならびに創傷治癒に関わっている。本研究の目的は皮膚基底膜タンパク質のラミニン5の創傷治癒への関与を分子レベルで解明することである。ラミニン5由来の合成ペプチドを用い解析を進め、角化細胞遊走刺激効果を証明した。また動物における皮膚創傷の治癒促進効果も有することを実証した。

研究成果の概要（英文）：

Laminin-5 (LN332) is a heterotrimeric basement membrane-specific glycoprotein composed of α 3, β 3, and γ 2 subunits and involves in biological activities such as keratinocyte differentiation, proliferation, as well as a maintenance of stable basement membrane structure. Studies of in vivo wound tissue suggest that LN332 plays a role in facilitating cell migration during wound healing. In this study, we demonstrated that a synthetic peptide, PEP75, which contains the syndecan-binding sequence of the laminin α 3LG4 module, induces keratinocyte migration in in vitro, ex vivo, and in vivo. To activate integrin function through syndecans by this synthetic peptide could be a novel therapeutic approach for chronic cutaneous wound.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：ラミニン、シンデカン、創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックスは組織の構築成分であり、いわゆる細胞の住む家を安定に供給する。そのことにより細胞外マトリックスは細胞へ至適な微小環境を提供しその機構維持に重要な役割を果たしている。皮膚基底膜の主要構成成分の1つであるラミニン5 (LN5) は皮膚組織維持ならびに表皮細胞の接着、遊走、増殖、分化などの機能を有する。LN5が創傷縁で発現を強める事実や、またその生物学的活性から創傷治癒に対する関与を示唆されていた。申請者はLN5の機能を分子レベルで解明することを目標に研究を進めてきた。まずLN5 α 3鎖C-末端球状部分が、細胞表面のシンデカン受容体を介して細胞接着活性を示すことを明らかにした。これに続いて、LN5 α 3鎖C-末端球状部分内の活性中心の15アミノ酸配列を決定した。これを含む合成ペプチドPEP75は、細胞培養液に添加するのみで受容体(シンデカン)に結合し、p38MAPKからIL-1 β のautocrine loopを介してMMP-1分泌を誘導することを報告した。これに引き続き合成活性ペプチドPEP75は培養表皮細胞に添加するだけで細胞遊走を促進した。そこで、この*in vitro*での活性は、創傷治癒の場でも「表皮再生」に寄与する可能性に着眼して、本研究を申請した。

2. 研究の目的

本研究はラミニン5の創傷治癒への関与を分子レベルで解明することを目的とする。そのために申請者が自ら見出した細胞接着活性を有するペプチドPEP75の添加による細胞遊走促進の機序解明と*in vivo*での創傷治癒促進効果の検討を行う。

(1) ペプチドPEP75の受容体であるシンデカンとマトリックス受容体の1つであるインテグリンに注目して、遊走刺激への経路を解明する目的を有する。ペプチドPEP75結合時のシンデカン、インテグリン β 1受容体の

位置的、時間的変化を共焦点顕微鏡で詳細に検討する。

(2) その変化をflow cytometryにても確認する。

(3) インテグリン β 1の活性への影響を種々の細胞外マトリックスへの接着性で検討する。

(4) 最終的には角化細胞遊走刺激効果が動物での治癒促進効果に結びつくかを検証する。

3. 研究の方法

(1~3) *in vitro*での細胞遊走機構解明

① 細胞遊走活性アッセイ

② シンデカン(量的・質的变化)ならびにアイソフォーム特異性の同定

③ インテグリン(量的・質的变化): 種々の構造依存性抗体を用いた共焦点顕微鏡、flow cytometry、ペプチド(PEP75)添加による種々のマトリックス(コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン)への接着活性の検定。

④ シグナル伝達経路(MAPK, p38MAPK, PI3K, Rac)への阻害剤添加による検討: シンデカン-インテグリンクロストーク、遊走の阻害実験

(4) *in vivo*創傷促進効果検討

① マウス背部皮膚創傷への添加。創傷治癒経過の検討

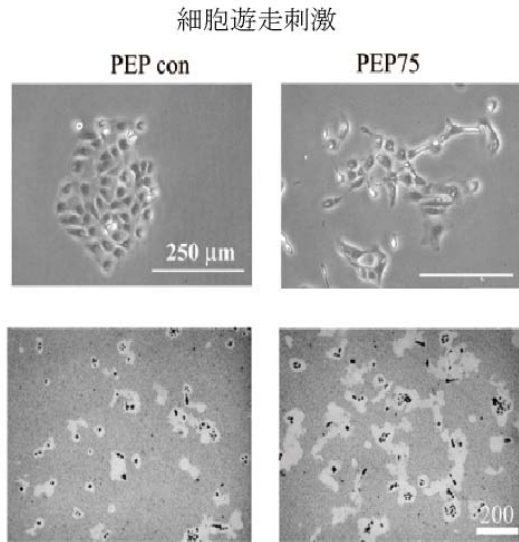
② ウサギ耳介内側皮膚への添加。創傷治癒経過の検討

4. 研究成果

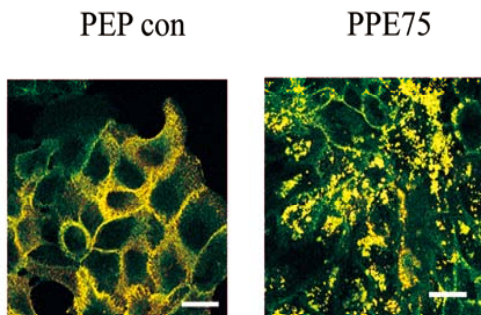
(1) 遊走促進効果の検討:

① 合成ペプチドPEP75は金コロイド貪食法、スクラッチ法、スキヤタリング法で検討した。Primary角化細胞、HaCaT

細胞の遊走を濃度依存性に刺激することが判明した。(細胞遊走刺激。図は PEP75 添加により細胞遊走が刺激されていることを示す。上段は、スキヤタリングアッセイ、下段は金コロイド貪食法)

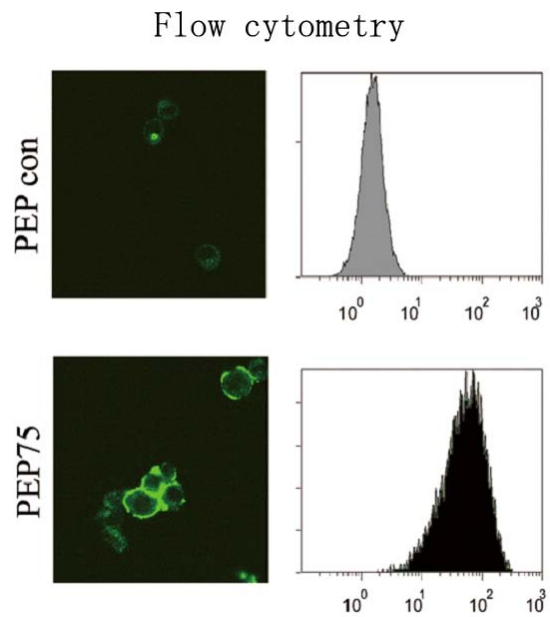


② 共焦点顕微鏡による解析により、合成ペプチド PEP75 は細胞表面のシンデカンに結合し、シンデカンの凝集を引き起こすことを示した。その後インテグリン $\beta 1$ も細胞表面で凝集し、シンデカンと共存することを見出した。(凝集誘導: 図は、PEP75 添加により、角化細胞表面の受容体が凝集し、塊状になることを示している。)



シンデカン-インテグリンの凝集誘導

③ インテグリンの凝集は構造変化を伴うことを構造依存性抗体による染色を行い、共焦点顕微鏡により証明した。またこの事実は、細胞を一旦浮遊させ、合成ペプチド PEP75 と incubation した後、Flow cytometry によっても確かめた。(図: Flow cytometry. PEP75 により角化細胞表面のインテグリンの構造変化が起きていることが判明。)



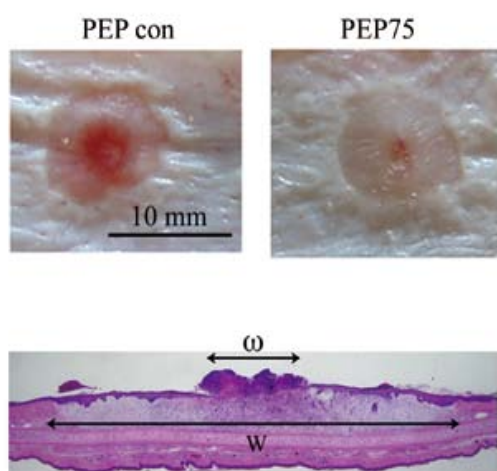
④ この構造変化はインテグリン $\beta 1$ の活性化につながり、種々の細胞外マトリックスに対する接着性を増加させた。

⑤ この事象に関与するシンデカンを決定するために siRNA を用いて、シンデカン-1 ではなく、シンデカン-4 がこの活性を担っている受容体であることを示した。またアフィニティーカラムを用いて、インテグリン $\beta 1$ は結合しないが、シンデカン-4 がペプチド PEP75 カラムに特異的結合することを示した。

⑥ シグナル伝達経路は種々の阻害剤を用いて検討し、細胞遊走刺激には多くの伝達経路が関与していることが明らかになった。

(2) *in vivo* 創傷促進効果検討

C57BL マウス背部、ウサギの耳介内側皮膚に潰瘍を作成し、そこへ合成ラミニン5ペプチド PEP75 を投与した。特に創傷収縮の起こらないウサギ耳介皮膚での検討は、この合成ペプチド PEP75 は主に表皮細胞を遊走させることで再生を促進することを確認した。(創傷治癒促進。図の上段は PEP75 添加によりウサギ耳介内側の皮膚潰瘍の治癒を促進させている。下段は表皮再生により促進していることを示す病理像。)



合成ペプチドは不純物を除くことで純粋な物質が得られ、また無菌的に合成も可能であることから、創傷への局所投与により「表皮再生」を促進させる潰瘍治療薬の開発への足がかりになる成果と考える。

現時点の創傷治癒促進は被覆材、外用剤など市販されているが表皮の再生を刺激する活性のあるものはほとんど無い。慢性難治性皮膚潰瘍を治療しうれば、長期入院の患者も減り、また QOL の向上にも繋がると考えられる。

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 2 件)

1. Araki E, Momota Y, Togo T, Tanioka M, Hozumi K, Nomizu M, Miyachi Y, Utani A. Clustering of syndecan-4 and integrin b1 by laminin a3 chain-derived peptide promotes keratinocyte migration. *Mol Biol Cell*, 20(13):3012-24, 2009
2. Utani A. Laminin alpha3 chain-derived peptide promotes keratinocyte migration and wound closure: clustering of syndecan-4 and integrin beta1. *Seikagaku*. 2010 Apr;82(4):327-31.

[学会発表] (計 2 件)

1. 宇谷厚志 :
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 シンポジウム「組織を支える基底膜分子の機能解明と展望」2008 年 5 月 29 日(木)～31 日(土) 東京
2. Atsushi Utani, Eri Araki, Yutaka Momota, Takeshi Togo, Yoshiki Miyachi :
Syndecan-binding peptide PEP75 derived from laminin a3 stimulates integrin b1 dependent cell migration and accelerates wound healing in vivo. *Cell adhesion / Matrix biology, Minisymposium, the 5th International Investigative Dermatology Kyoto 2008, May16-18, J Invest Dermatol*, 128, S1, S43, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇谷 厚志 (UTANI ATSUSHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号 : 10292707