

機関番号：17501

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791747

研究課題名 (和文) デルマトポンチンの新規創傷治癒促進ペプチドの分子機構解明

研究課題名 (英文) The functional analysis of the active peptide of dermatopontin in wound healing

研究代表者

加藤 愛子 (KATO AIKO)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：50404372

研究成果の概要 (和文) : 真皮細胞外マトリックスに豊富に存在する蛋白質であるデルマトポンチン (DP) は、表皮細胞の接着を誘導する他、細胞増殖と細胞遊走を増強し、またその接着ドメインで DP の部分ペプチドである DP-4 はマウスの創傷治癒を促進した。また DP は仮マトリックスにおいてフィブロネクチン (Fn) と相互作用し、Fn を活性化することで Fn の細胞接着を増強した。DP-4 も Fn を活性化し細胞接着を増強したため、DP の活性ペプチドと考えられ、このようにして DP および DP-4 は創傷治癒を促進していると考えた。

研究成果の概要 (英文) : Dermopontin (DP), one of the dermal extracellular matrix protein, promoted cell adhesion of the human keratinocyte cell line. A synthetic peptide of DP, named DP-4, is critical for the cell adhesive activity of DP. We found DP enhanced cell migration and proliferation. These results suggest that DP and DP-4 promote wound healing. Moreover, we found that DP interacted with fibronectin (Fn), promoted Fn fibril formation, and enhanced cell adhesion. DP-4 also promoted Fn fibril formation, and enhanced cell adhesion. Thus DP and its active peptide DP-4 had an accelerating role in wound healing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
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：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：創傷治癒、デルマトポンチン

1. 研究開始当初の背景

デルマトポンチン (DP) は細胞外マトリックス中に豊富に存在する分子量 22kD の蛋白質だが、その機能は不明な部分が多い。我々は DP が表皮細胞である HaCaT 細胞の接着を強力に誘導すること、その細胞接着ドメインの 1 つが DP-4 と呼ばれるアミノ末端に近い 11 残基のペプチドであることを同定した。ま

た DP-4 ペプチドをマウスの実験的創傷に塗布すると新生表皮の延長が誘導された。以上より DP および DP-4 ペプチドには創傷治癒促進効果があるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

創傷治療への応用を目的として DP および

DP-4 ペプチドの創傷治癒機構における生物学的メカニズムの解明を行う。

3. 研究の方法

(1) DP および DP-4 ペプチドの機能

①合成 DP-4 ペプチドをマウス背部に作成した実験的創傷に塗布して6日後に創傷を切除し、このパラフィン切片のHE染色標本にて顕微鏡下に新生表皮の延長距離を計測した。

②マルチウェルプレートに細胞を播種、一晚培養後、細胞層に帯状の欠損部を作成した後に、培養液を DP-4 ペプチドおよび対照のペプチド含有のものに変更して一定時間培養を継続し、欠損部に遊走した距離、被覆された面積を各々比較した。

③全長の DP 分子は DP-4 よりも強力な細胞接着活性を持つため、DP 発現 293 細胞の動態、増殖活性をベクターのみをトランスフェクションした 293 細胞と比較検討した。

A. DP 発現 293 細胞と対照の 293 細胞をアガロース滴に封入し、ディッシュに各々 $2\mu\text{l}$ ずつ滴下の後、72 時間培養後の細胞の動態を観察した。

B. DP 発現 293 細胞と、対照の 293 細胞をマルチウェルプレートに播種し、翌日に培養液を交換し、2~6 日目の細胞数をカウントした。

(2) 仮マトリックスにおける DP および DP-4 の役割

①フィブリンおよび Fn と DP の相互作用を検討するために、フィブリンを固相化し DP を加え、固相に結合する DP を検出した。Fn を固相化し同様に検討した。さらにフィブリンを固相化し Fn と DP の混合物を加え、フィブリンに結合する Fn の量を検出した。

②フィブリンを固相化し Fn と DP の混合物を加え、線維芽細胞との細胞接着実験を行った。

③Fn と DP を混合しインキュベートした後、上清(Soup)と沈殿物(Pellet)に分けて泳動し、Fn の不溶化(活性化)について検討した。

④Fn を固相化し DP と DP の部分ペプチドの混合物を加え、Fn と DP の結合を DP の部分ペプチドが阻害するか固相法で検討した。

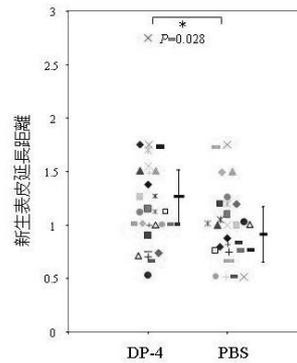
⑤上記②③を DP の代わりに DP-4 を用いて同様に検討した。

4. 研究成果

(1) DP および DP-4 ペプチドの機能

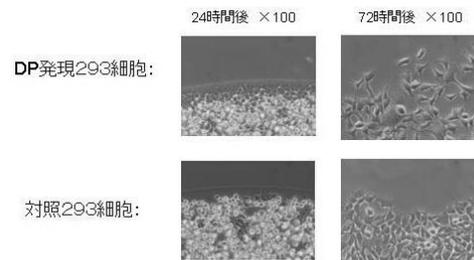
①マウス背部の実験的創傷における6日後の新生表皮の延長距離は、 $0.89\mu\text{g}/\text{mm}^2$ の濃度では、DP-4 塗布群は対照と比較し有意に新生表皮距離が長かった。しかし、その2倍の

濃度では DP-4 ($0.89\mu\text{g}/\text{mm}^2$) 塗布群と比較し、有意差が得られなかった。

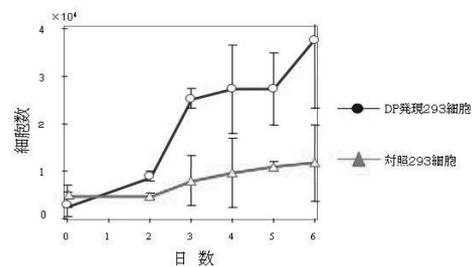


②マルチウェルプレートに播種した細胞の欠損部に遊走した距離、被覆された面積を DP-4 ペプチド含有群と対照群で各々比較したところ、明らかな有意差を得ることが出来なかった。

③A. アガロース滴に封入した DP 発現 293 細胞と対照細胞の動態を観察したところ、DP 発現細胞は対照細胞と比較し、細胞の分散が著明で、Membrane ruffling を示す細胞数が多かった。



③B. また DP 発現 293 細胞と、対照の 293 細胞を $3,000\text{cells}/100\mu\text{l}$ にてマルチウェルプレートに播種し、2, 3, 4, 5, 6 日目の細胞数をカウントしたところ、DP 発現細胞は対照細胞と比較し、高い細胞増殖活性を有していた。

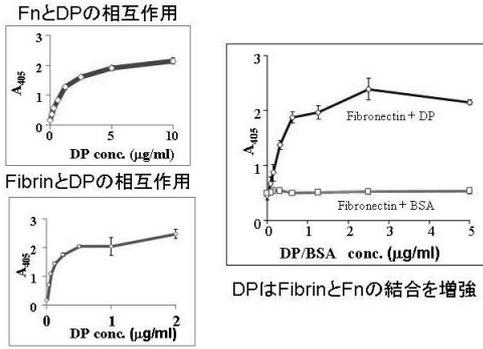


以上より DP-4 は創傷治癒促進能を有しており、DP は細胞増殖能と、細胞遊走能を有していることが示唆された。

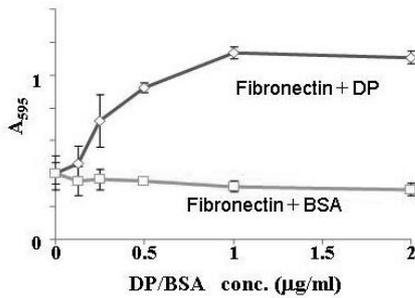
(2) 仮マトリックスにおける DP および DP-4 の役割

①DP はフィブリンや Fn と濃度依存性に相互作用した。フィブリンと Fn の結合は、DP

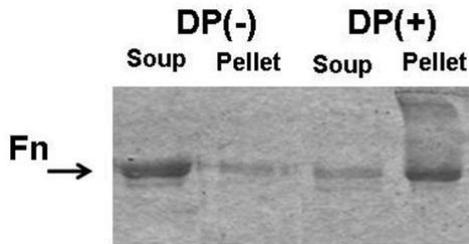
の濃度依存性に増強した。



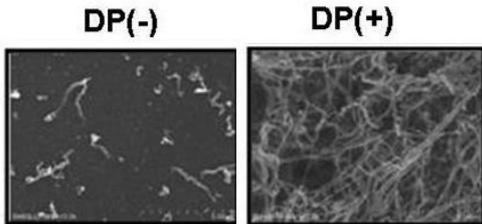
②線維芽細胞との細胞接着実験では DP の濃度依存性に Fn の細胞接着能を増強した。



③DPをFnとインキュベートするとFnは不溶化した。すなわちDPはFnを活性化し線維形成させていた。



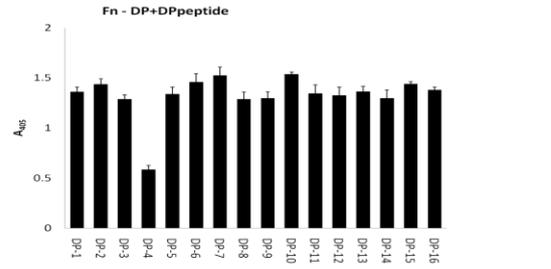
DPはFnにFibriを形成させ、不溶化させる



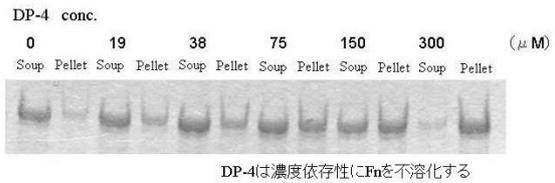
SEMでもFnのFibri形成が確認できる

以上より DP は創傷初期の仮マトリクスにおいてフィブリンや Fn と相互作用し、Fnを活性化することで創傷治癒を促進しているのではないかと考えた。この内容を論文に発表した。

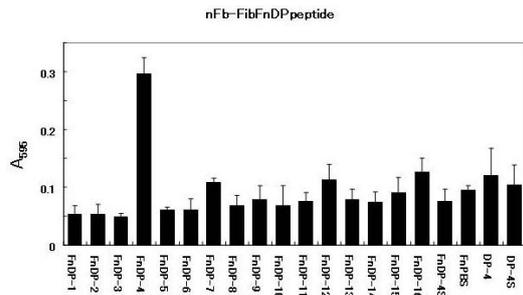
④FnとDPの結合をDPの部分ペプチドが阻害するか固相法で検討したところ、DP-4でのみ両者の結合は阻害された。



⑤DP-4をFnとインキュベートするとDP-4は濃度依存性にFnを不溶化した。すなわちFnを活性化し、スーパーフィブロネクチンを形成させていると思われた。



フィブリンを固相化しFnとDPペプチドを加え、線維芽細胞を用いた細胞接着実験では、DP-4においてのみ接着する細胞数は増加した。



以上の結果よりDP-4はDPの活性ペプチドと考えられ、Fnと相互作用してFnを活性化し、Fnの細胞接着を増強することで創傷治癒を促進していると考えた。

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 Kato A, Okamoto O, Ishikawa K, Sumiyoshi H, et al.: Dermatopontin interacts with fibronectin, promotes fibronectin fibril formation, and enhances cell adhesion. The Journal of Biological Chemistry, 査読有, 286(17): 14861-14869, 2011.
- ② 岡本修, 加藤愛子, 藤原作平: 新規細胞接着ペプチドを用いた創傷治療への応用. ケミカルエンジニアリング, 査読無, 55(8): 589-596, 2010.

〔学会発表〕(計4件)

- ① 加藤愛子：細胞外マトリックス蛋白質デルマトボンチンの創傷治癒機構への関与. 第19回日本形成外科学会基礎学術集会, 2010年9月16日, 横浜.
- ② 加藤愛子：真皮細胞外マトリックス蛋白質デルマトボンチンの創傷治癒における役割. 第42回日本結合組織学会学術集会, 2010年8月19日, 秋田.
- ③ 加藤愛子：細胞外マトリックス蛋白質デルマトボンチンの創傷治癒機構への関与. 第13回九州基礎皮膚科研究会, 2009年12月12日, 福岡.
- ④ 加藤愛子：細胞外マトリックス蛋白質デルマトボンチンの創傷治癒機構への関与. 第18回日本形成外科学会基礎学術集会, 2009年10月1日, 東京.

〔その他〕

第42回日本結合組織学会優秀演題賞受賞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 愛子 (KATO AIKO)
大分大学・医学部・助教
研究者番号：50404372

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし