

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年05月31日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792048

研究課題名（和文）

デルマトポンチン・フィブロネクチン・細胞増殖因子を用いた新しい創傷治療法の開発

研究課題名（英文） A development of a novel device for positively regulating the wound healing used by a complex of DP, Fn, and some cell growth factors

研究代表者

加藤 愛子 (KATO AIKO)

大分大学・医学部・客員研究員

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デルマトポンチン（DP）はフィブロネクチン（Fn）と相互作用し 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すると思われる。DP は Fn が安定化して存在するための分子内相互作用を抑制することで Fn の高次構造を変化させ、Fn の細線維形成に必要な分子間相互作用を増強することで、Fn の活性化を促進していると考えた。Fn は血管内皮細胞増殖因子と相互作用するが、DP はその相互作用を増強したため、DP・Fn・細胞増殖因子を用いた創傷治療法の可能性を考えた。

研究成果の概要（英文）：Dermatopontin (DP), one of the dermal extracellular matrix protein, interacted with fibronectin (Fn), promoted Fn fibril formation, and enhanced cell adhesion. DP enhanced intermolecular interactions of Fn which is important for Fn fibril formation, and DP disrupted interdomain interaction within a Fn molecule which is crucial for maintaining a compact molecular conformation of native Fn. These results indicate that DP changes Fn conformation and renders Fn form fibrils. Moreover, we newly found that DP enhanced the interaction between Fn and VEGF. These results suggest that a complex of DP, Fn, and some cell growth factors could be used as a novel device for positively regulating the wound healing.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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：デルマトポンチン・創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

デルマトポンチン（DP）は、真皮細胞外マトリックスに豊富に存在する分子量 22kD の蛋白質であるが、その機能は不明な部分が多い。我々はこれまでに DP が創傷初期の仮マトリックス中でフィブリンやフィブロネクチン（Fn）と複合体を形成し、Fn を活性化し線維形成させ、Fn の細胞接着を増強することを見いだし、DP が創傷治癒を促進するのではないかと考えた。一方仮マトリックスには DP と

もに各種の細胞増殖因子が存在しており、我々は DP が PDGF や FGF-2 と結合することを見いだしている。これらのことから DP・Fn と他の増殖因子による「創傷治癒カクテル」が開発できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

DP が Fn を活性化するメカニズムの解明を行う。DP や Fn と他の増殖因子の結合を検討

し、機能が增強する増殖因子を見いだす。

3. 研究の方法

(1) DP による Fn 活性化のメカニズムの解明

Fn は 12 個のタイプ I リピード (I_1 - I_{12})、2 個のタイプ II リピード (II_1 - II_2)、15 個のタイプ III リピード (III_1 - III_{15}) と呼ばれるドメインから構成される (下図)。



III_{2-3} と III_{12-14} が相互作用してらせん状の構造をとり安定化していること、 III_{12-14} と I_{1-5} が相互作用して細線維を形成することが知られている。

①大腸菌に発現させた Fn のドメインを用いて、これらを固相化し、DP を加えて、DP が Fn のどの部位に結合するかを同定した。

②Fn の細線維形成に関わる Fn の分子間相互作用を DP がどのように修飾するかを検討するために、 III_{1-2} 、 III_{12-14} 、 III_{15} を固相化し I_{1-5} ± DP を加え、これらに結合する I_{1-5} を検出した。

③Fn の安定化した高次構造に関わる分子内相互作用を DP がどのように修飾するかを検討するために、 III_{12-14} を固相化し III_{2-3} ± DP を加え、 III_{12-14} に結合する III_{2-3} を検出した。

(2) 仮マトリックスにおける DP の部分ペプチドである DP-4 の役割

これまでに DP-4 が DP の活性ペプチドである可能性について細胞接着実験により検討してきた。今回は DP-4 の検出のためにビオチン化した DP-4 を作成し、直接的に検討した。

①フィブリンを固相化し Fn と DP-4 の混合物を加え、フィブリンと Fn の結合に DP-4 がどのように影響を与えるかを検討した。

②DP-4 と Fn を混合しインキュベートした後、上清 (Soup) と沈殿物 (Pellet) に分けて電気泳動し、DP-4 による Fn の不溶化 (活性化) について検討した。

(3) Fn、DP による細胞増殖因子の保持能の検討

①Fn と DP を固相化し RI ラベルした血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を加え、固相に結合する VEGF をカウントした。

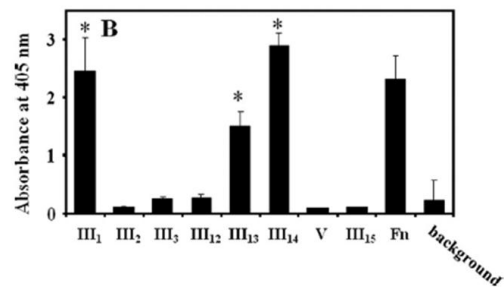
②Fn を固相化し、RI ラベルした VEGF と DP の混合物を加え、Fn に結合する VEGF をカウントした。

③上記②において DP の濃度を変化させ、同様の検討を行い、濃度依存性を確認した。

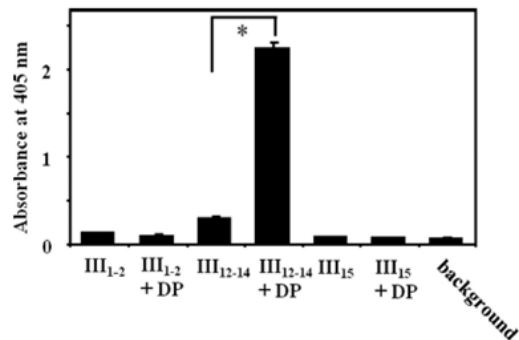
4. 研究成果

(1) DP による Fn 活性化のメカニズムの解明

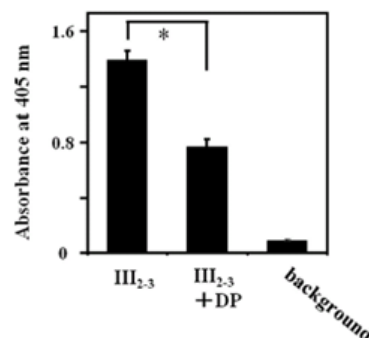
①DP は Fn の III_1 または III_{13} または III_{14} に結合したが、特に III_{13-14} に強く結合した。これは Fn の細線維形成に関して、分子内および分子間相互作用に関与するドメインの一部であった。



②DP は固相化した III_{12-14} と I_{1-5} の相互作用のみを增強した。これは Fn の線維形成に必要な分子間相互作用であり、このことから DP は Fn の線維形成を促進すると考えた。



③DP は III_{12-14} と III_{2-3} の相互作用を抑制した。これは Fn が安定化した高次構造を取るための分子内相互作用であり、このことから DP はこの安定化した Fn の高次構造を変化させるのではないかと考えた。

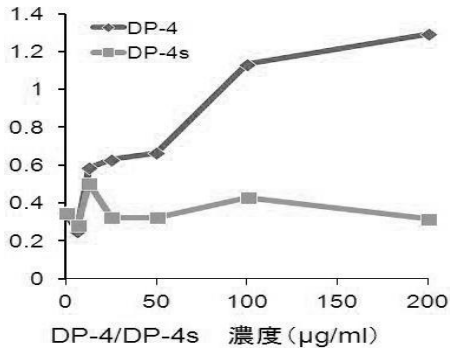


以上より DP は、 III_{2-3} と III_{12-14} の相互作用を抑制することで Fn の高次構造を変化させ、また III_{12-14} と I_{1-5} の相互作用を增強することで、細線維を形成させていると考えた。これによ

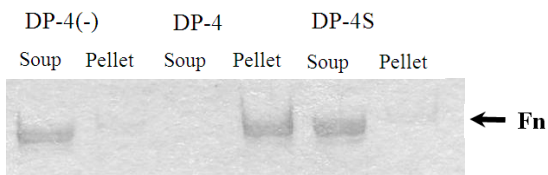
り DP による Fn 活性化のメカニズムが明らかになった。

(2) 仮マトリックスにおける DP の部分ペプチドである DP-4 の役割

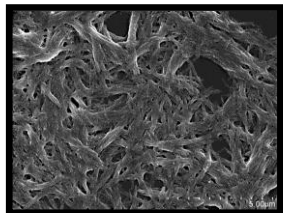
①フィブリンを固相化した Fn と DP-4 の混合物を加えると、DP-4 の濃度依存性にフィブリンと Fn の結合は増強した。対照には DP-4 のスクランブルペプチドである DP-4s を用いた。



②DP-4 と Fn を混合してインキュベートすると DP-4 は Fn を不溶化した。対照の DP-4s では不溶化しなかった。



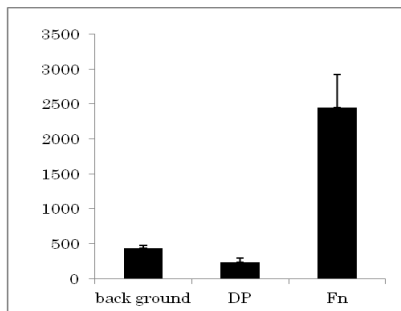
さらに電子顕微鏡でも、Fn の線維化が確認できた。



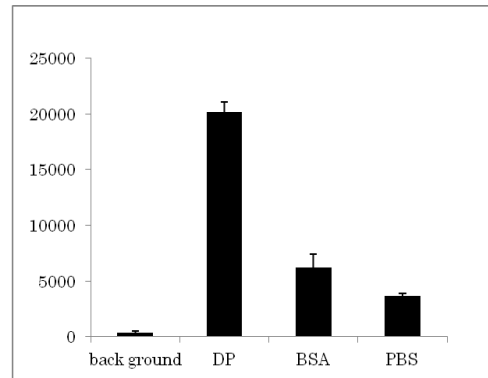
以上より、以前確認していた Fn の細胞接着を増強することと併せて、DP-4 は DP の活性ペプチドと考えられた。

(3) Fn、DP による細胞増殖因子の保持能の検討

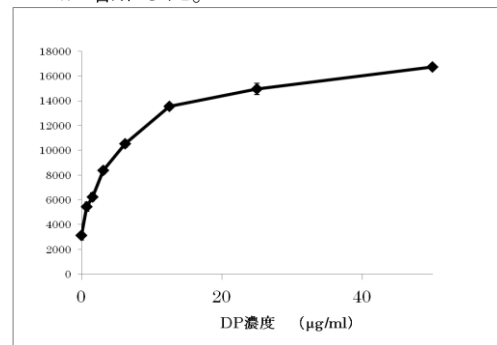
①VEGF は固相化した Fn と相互作用し、DP とは相互作用しなかった。



②DP 存在下で固相化した Fn に結合する VEGF が増強した。(対照は BSA と PBS)



③さらに②の条件下で DP の濃度を変化させると、DP の濃度依存性に Fn に結合する VEGF が増加した。



以上より、DP は Fn と VEGF の相互作用を濃度依存性に増強することが分かった。VEGF は創傷治癒を促進することが知られているので、DP と Fn、VEGF を用いた創傷治癒カクテルは創傷治癒を促進する可能性があると考えた。

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岡本修、加藤愛子、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の分子生物学. *Aesthetic Dermatology*, 査読有, 21(4): 303-317, 2011.

②Kato 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.

〔学会発表〕(計 3 件)

①加藤愛子：デルマトポンチンの活性ペプチドの生物活性の検討. 第 21 回日本形成外科学会基礎学術集会, 2012 年 10 月 4 日-5 日, 福島県猪苗代市.

②加藤愛子：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とその生物活性の検討. 第 20 回日本形成外科学会基礎学術集会, 2011 年 10 月 6 日-7 日, 東京都新宿区.

③加藤愛子: 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. 第 43 回日本結合組織学会学術大会, 2011 年 6 月 10 日-11 日, 大分県別府市.

[その他]

①第 2 回中塚医学賞(大分大学医学研究表彰)受賞(臨床医学専門分野)

②第 2 回大分大学女性卒研究奨励賞
女性研究者部門優秀賞 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・客員研究員
研究者番号: 50404372

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし