

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462796

研究課題名(和文) フィブロネクチンを活性化するDP-4ペプチドを用いた新規創傷治療法の確立

研究課題名(英文) A development of novel device for positively regulating the wound healing used by DP-4 peptide which promoted fibronectin fibrils

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

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、創傷治癒を促進すると考えられる。DPのFn結合部位はDP-4と呼ばれるペプチドであり、DP-4ペプチドもFnを活性化し、細胞接着を増強させることから、DPの活性ペプチドと考えた。我々はFnのDP結合部位も約30残基のペプチドのレベルまで同定した。さらに生体内でのDPの生物活性を明らかにするために、非変性条件でDPを精製し、Fnとの相互作用を検討したが、その結果は変性条件で精製したDPに比べてやや劣った。DPは創傷発生時に変性等により高次構造を変えて、創傷治癒を促進する可能性があると考えた。

研究成果の概要(英文)：Dermatopodin(DP), which is a dermal extracellular matrix protein, interacted with fibronectin(Fn), promoted Fn fibril formation, and enhanced cell adhesion. A Fn binding site in DP was identified as a DP-4(PHGQVVAVRS) peptide. We could narrow down the DP binding site in the Fn to about 30 amino acid specific peptide region in the molecule. The DP-4 peptide activated Fn and enhanced cell adhesion activity. These results indicate that DP-4 peptide could be used for therapeutic applications. Recombinant DP was purified from transfected cell culture medium in a native condition. The DP enhanced cell adhesion activity, but the activity was less compared with DP purified in a denaturing condition. These results suggest that DP is partially denatured within the wound, and promotes wound healing.

研究分野：医歯薬学・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 フィブロネクチン DP-4ペプチド 創傷治癒

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

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 22kDa の蛋白質である。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だし、DP が創傷治癒を促進するのではないかと考えている。さらに DP の Fn 結合部位は DP-4 と呼ばれるペプチドであり、DP-4 ペプチドも Fn を活性化し線維形成させ、細胞接着を増強することから、DP-4 ペプチドは DP の活性ペプチドであり、DP 同様に創傷治癒を促進すると考えた。仮マトリックスには DP とともに各種の細胞増殖因子が存在している。DP は PDGF や FGF-2 と結合すること、Fn と VEGF 相互作用を増強することが分かっており、DP-4 ペプチドも DP 同様に細胞増殖因子と相互作用を示すのではないかと考えた。

2. 研究の目的

DP-4 ペプチドの Fn 活性化における機能の解明、結合部位の同定を行う。非変性条件下で精製された DP の機能を解明する。

3. 研究の方法

(1) DP-4 ペプチドの生理活性の解明

Fn を活性化する DP-4 ペプチドの濃度を知るため、様々な濃度の DP-4 ペプチドを Fn 1 μ M と混合し、上清(Soup)と沈殿(Pellet)に分けて電気泳動し、Fn を不溶化する DP-4 ペプチドの至適濃度を検討した。

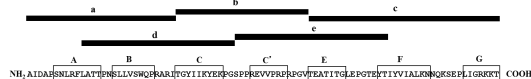
下図のような DP-4 ペプチドをアミノ末端およびカルボキシル末端より 1 残基ずつ欠損させたペプチド(DP-4a ~ DP-4h)を合成した。これらをと Fn を混合し、Fn を不溶化する最小塩基配列を決定した。

DP-4	PHGQVVAVRS
DP-4S	VRVHVPVQGS
DP-4a	-HGQVVAVRS
DP-4b	--GQVVAVRS
DP-4c	----VVAVRS
DP-4e	PHGQVVAVR-
DP-4f	PHGQVVAV--
DP-4g	PHGQVVVA---
DP-4h	PHGQVVV----

DP-4 ペプチドにより活性化された Fn の線維芽細胞接着は増強する。ヘパリン、EDTA および抗インテグリン抗体を用いて細胞接着阻害実験を行い、レセプターを同定した。

(2) Fn の DP および DP-4 ペプチド結合部位の同定

Fn の DP 結合部位はタイプ リピート 14 番 (14) であることがわかっている。下図に示すような 14 の部分ペプチドを 5 種類 (14a ~ 14e) 作成した。



これらを固相化し DP を加え、DP が 14 のどの部位に結合するかを検討した。ループ構造を有する 14d ペプチド (cyclo- 14d) を作成し、DP との結合性を検討した。



14 の部分ペプチドを固相化し、DP-4 ペプチドを加えて、DP-4 ペプチドが 14 のどの部位に結合するか検討した。

(3) 非変性条件下で精製した DP の機能解明
これまでに使用した DP は生体から変性条件下で精製した DP であり、生体中での DP の生物学的機能を明らかにするため、非変性条件下で精製した DP と比較した。

Fn を固相化し、非変性 DP および DP を加えて、Fn との相互作用を検討した。

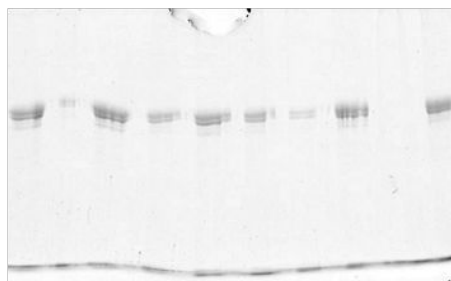
非変性 DP を固相化し、HaCaT 細胞との細胞接着実験を行った。

4. 研究成果

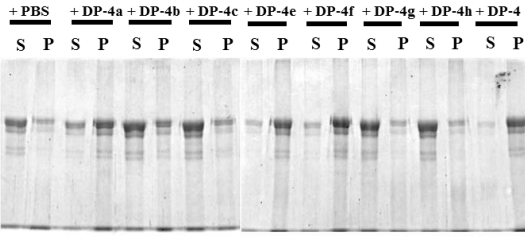
(1) DP-4 ペプチドの生理活性の解明

DP-4 ペプチドの濃度が 75 μ M を超えると不溶化する Fn の割合が高くなり、300 μ M を超えると完全に不溶化した。Fn の活性化を得る DP-4 ペプチドの至適濃度は、Fn 1 μ M に対し DP-4 ペプチド 300 μ M であることが分かった。

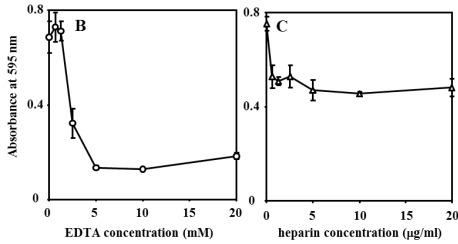
DP-4 conc.		0		37.5		75		150		300 μ M	
S	P	S	P	S	P	S	P	S	P	S	P



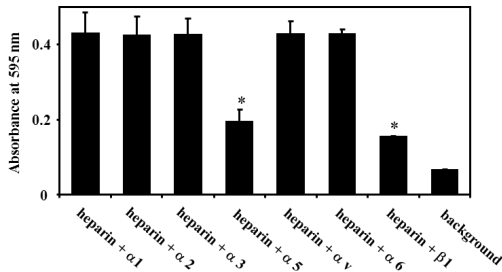
DP-4 ペプチドをアミノ末端より 1 残基欠損、カルボキシル末端より 2 残基欠損させたペプチドまでが、Fn を不溶化することができた。Fn を不溶化する最小塩基配列は HGQVVAV であることが分かった。



DP-4 ペプチドにより活性化された Fn の細胞接着は、ヘパリンにて部分的に、EDTA にて完全に阻害された。



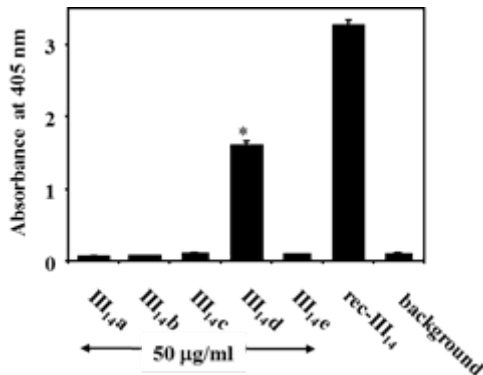
このことから、この細胞接着にはインテグリンとヘパラン硫酸プロテオグリカンが関与すると考えた。さらに抗インテグリン抗体を用いて阻害実験を行うと、ヘパリン存在下で抗 $\alpha 5$ および抗 $\alpha 1$ インテグリン抗体により阻害された。



以上より、DP-4 ペプチドにより活性化された Fn の細胞接着におけるレセプターは、 $\alpha 5$ $\alpha 1$ インテグリンであると判断した。

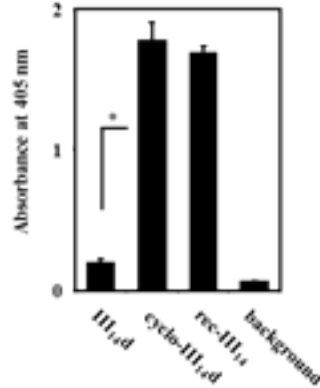
(2) Fn の DP および DP-4 ペプチド結合部位の同定

DP は 14 の部分ペプチドが 10µg/ml では明らかな相互作用を示さなかった (data not shown) が、50µg/ml では 14d と相互作用を示した。

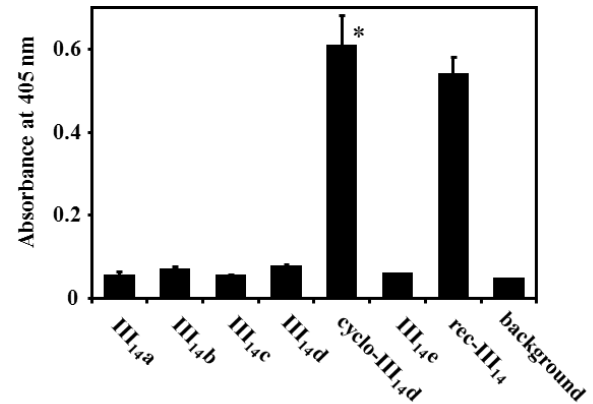


このことから、Fn の DP 結合部位は 14d であるが、何らかの高次構造が必要である可能性を考えた。

DP は cyclo- 14d と 10µg/ml で相互作用を示した。

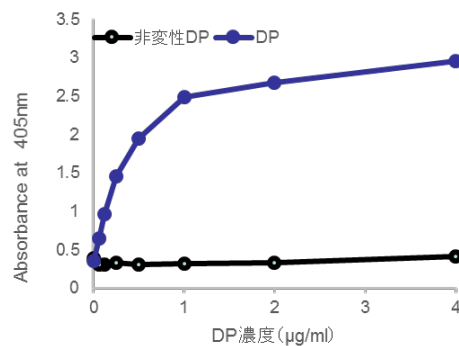


DP-4 ペプチドと 14 部分ペプチドとの相互作用を確認したところ、DP-4 ペプチドも cyclo- 14d と相互作用を示した。

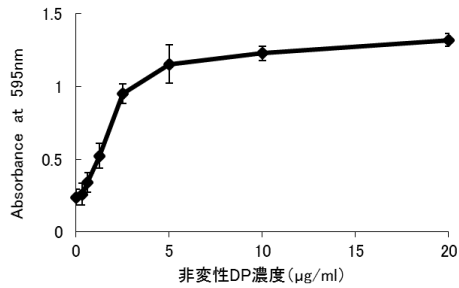


以上より、DP および DP-4 ペプチドの Fn 結合部位は 14d と名付けた 14 の部分ペプチドであることが分かった。

(3) 非変性条件で精製した DP の機能解明
非変性条件で精製した DP は Fn との相互作用を示さなかった。



非変性条件で精製した DP は HaCaT 細胞との細胞接着を示した。



これらのことから DP の細胞接着能は変性条件、非変性条件で精製した DP に共通した機能であり、フィブロネクチンとの相互作用は変性条件で精製した DP に特有の機能であることが分かった。すなわち DP は組織がダメージを受けた際に変性あるいは部分分解を受けて高次構造を変え、Fn やフィブリンの生物活性を修飾する可能性が示された。

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3件)

Kato A, Okamoto O, Wu W, Matsuo N, Kumai J, Yamada Y, Katagiri F, Nomizu M, Fujiwara S: Identification of fibronectin binding sites in dermatopontin and their biological function. Journal of Dermatological Science, 査読有, 76:51-59, 2014.

Wu W, Okamoto O, Kato A, Matsuo N, Kumai J, Nomizu M, Fujiwara S: Functional peptide of dermatopontin products fibrinogen fibrils and modifies its biological activity. Journal of Dermatological Science, 査読有, 76:34-43, 2014.

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, 査読有, 134:256-263, 2014.

〔学会発表〕(計3件)

岡本修:デルマトポンチンの生物学-これは何をしているのか-. 第67回日本皮膚科学会西部支部学術集会, 2015年10月17日~18日, 長崎ブリックホール・長崎新聞文化ホール(長崎県長崎市).

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: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. 第22回日本形成外科学会基礎学術集会, 2013年11月7日~8日, 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市).

Wu W, Okamoto O, Kato A, Matsuo N, Yoshioka H, Nomizu M, Fujiwara S: An active peptide of dermatopontin affects fibrinogen structure and its biological function. 第45回日本結合組織学会学術大会会・第60回マトリックス研究大会合同学術集会, 2013年6月28日~29日, 和歌山県立医科大学 講堂 生涯研修・地域医療支援センター(和歌山県和歌山市).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

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: 5 0 4 0 4 3 7 2

(2)研究分担者

岡本 修 (OKAMOTO, Osamu)
大分大学・医学部・客員研究員
研究者番号: 4 0 2 8 4 7 9 9

藤原 作平 (FUJIWARA, Sakuhei)
大分大学・医学部・教授
研究者番号: 9 0 1 8 1 4 1 1

(3)連携研究者

()

研究者番号: