

氏 名 (本籍)	百 田 豊 (兵庫県)
学 位 の 種 類	博士 (獣医)
学 位 記 番 号	獣医博甲第190号
学 位 授 与 年 月 日	平成17年3月14日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	東京農工大学
学 位 論 文 題 目	Effect of Laminin-5 $\alpha 3$ LG4 Domein on Reepithelization (ラミニン-5 $\alpha 3$ 鎖球状ドメインの創傷治癒に与える影響)
審 査 委 員	主査 東京農工大学 教授 岩 崎 利 郎 副査 帯広畜産大学 教授 藤 崎 幸 蔵 副査 岩 手 大 学 教授 谷 口 和 之 副査 東京農工大学 教授 山 根 義 久 副査 岐 阜 大 学 教授 柵 木 利 昭 副査 岐 阜 大 学 教授 工 藤 忠 明

論 文 の 内 容 の 要 旨

皮膚基底膜の主要な構成成分であるラミニン-5は、 $\alpha 3$ 、 $\beta 3$ 、 $\gamma 2$ 鎖のサブユニットからなる3本鎖コイルドコイル構造部分で会合する十字架構造を示す三量体で、その遺伝子異常は先天性表皮水疱症の原因として知られている。正常皮膚の基底膜に存在するラミニン-5は、 $\alpha 3$ 鎖、 $\gamma 2$ 鎖の一部がプロテアーゼによって消化 (プロセッシング) された成熟したラミニンである。一方、創傷部位ではプロセッシングを受けていない前駆体型ラミニン-5が多く発現している。*in vitro* では、ケラチノサイトは成熟型ラミニンと接着し、接着装置 (ヘミデスモゾーム) を形成して遊走しないが、前駆体型ラミニン-5はケラチノサイトの遊走を促進することが報告されている。このように、ラミニン-5はプロセッシングにより創傷治癒に重要な上皮化に関連することが示唆されている。本研究の目的はプロセッシングを受けるラミニン $\alpha 3$ 鎖カルボキシル基末端の5個の球状ドメイン (LGドメイン) のうち、 $\alpha 3$ 鎖LG4-5ドメインが創傷治癒に与える影響を評価することである。

第1章では、 $\alpha 3$ 鎖LG4-5ドメインのリコンビナント蛋白を作製して、このドメインによる培養ケラチノサイトの遊走促進作用ならびにその機序の1つとしてのMMP-9発現誘導作用について調べた。MMPは創傷部位に発現し、特にMMP-9は基底膜蛋白を消化することで、ケラチノサイトを接着から解放し、創傷部への遊走を促進すると考えられ

ている。培養ケラチノサイトを用いた金コロイド法で表皮細胞の遊走を定量的に観察したところ、LG4-5 ドメイン蛋白はヒト培養ケラチノサイトの遊走を促進した。次に、合成ペプチドによるスクリーニング法を行い、 α 3鎖LG4 ドメイン中のKNSFMALYLSKGR配列がもっとも強い細胞遊走活性部位であることを示した。この配列はヘパリン硫酸プロテオグリカンであるシンデカンとの結合部位として知られる部位であり、細胞遊走にはシンデカンとの結合が重要であると考えられた。また、MMP-9 に対する阻害剤および中和抗体を用いた阻害実験から、MMP-9 の分泌と細胞遊走は平行して起こるため、LG4-5 蛋白により惹起される細胞遊走には、MMP-9 の分泌が関連するのではないかと考えられた。以上より、 α 3LG4-5 ドメインはケラチノサイトの遊走を促進し、その活性部位はシンデカン結合部位であるKNSFMALYLSKGR配列にあると思われ、MMP-9 の発現とも関連すると考えられた。

第2章ではKNSFMALYLSKGR配列がシンデカンと結合してからMMP-1 とMMP-9 の発現に至る過程を、Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK)を中心とした細胞内伝達機構についてしらべた。IL-1 レセプター・アンタゴニストを用いてIL-1 のシグナルを阻害すると、MMP-1 の発現が阻害されることから、MMP-9 と同様にMMP-1 発現はIL-1 β オートクライン・ループを経由することが考えられた。次に、LG4-5 蛋白をケラチノサイト培養液中に添加すると、MAPK のうちp38 MAPK と Extracellular signal-related kinase (Erk)がリン酸化されることがわかった。シンデカンのアンタゴニストであるヘパリンをケラチノサイト培養液中に加えるとMAPK のリン酸化が抑制されることを認めた。次に、IL-1 β リコンビナント蛋白を培養液中に添加しても同じようにp38 MAPK とErk はリン酸化されたこと、蛋白合成阻害剤の添加によってもp38 MAPK のリン酸化は抑制されなかったことから、シンデカンは直接にp38 MAPK を制御することが示された。従って、シンデカンからのシグナルはp38 MAPK を介してIL-1 β を翻訳した結果、オートクライン・ループを経由してMMP-1 が発現されることがわかった。

第3章では、 α 3鎖LG4-5 ドメインのKNSFMALYLSKGR配列を含む活性ペプチド、A3G756 を合成し、その創傷治癒促進作用を細胞遊走に重要な役割を果たすインテグリンレセプターの活性化機構を検討して調べた。A3G756 は金コロイド法により、ケラチノサイト遊走を促進させることはすでに示したが、遊走に関わるインテグリンのサブタイプを決定するために、表皮細胞が発現するインテグリンの特異的阻害剤によりスクリーニングした。培養液中にintegrin β 1 の中和抗体、あるいはintegrin α 5 の抑制ペプチドを添加すると細胞遊走促進作用を阻害した。同様に、遊走に関わるMAPK カスケードをスクリーニングしたところ、p38 MAPK 特異的阻害剤が細胞遊走を阻害した。また、ビーズ法により、シンデカン-4 がintegrin β 1 を集積させること、integrin β 1 の細胞免疫染色法から、p38 MAPK によりintegrin β 1 が再分布し、細胞の「足」と考えられている接着斑を形成することがわかった。このことから、A3G756 はp38MAPK を介したシンデカン-4 とintegrin β 1 の相互作用の結果、活性化したintegrin が細胞運動を制御することが示された。したがって、A3G756 による細胞遊走はp38 MAPK を介した、integrin 依存的細胞運動であることが示唆された。*in vivo*において、マウスに作成した創傷を用いてA3G756 の創傷治癒促進作用を評価したところ、A3G756 投与群では、受傷後8日目に、対照群に較べて明らかに創部が縮小していた。A3G756 による創傷治癒が*in vitro*の遊走機構と相関するか調べるために、p38 MAPK 阻害剤を創部に塗布した。コントロール群においては受傷後8日目の創閉鎖には有意差が見られなかったが、A3G756 投与群ではペプチドによる治癒の促進が抑制された。したがって、*in vivo*においてもA3G756

の投与は上皮化に重要であり、p38 MAPK を介した表皮細胞の遊走に関連することが示唆された。

以上の一連の結果から、 $\alpha 3$ 鎖LG4-5を含む前駆体型ラミニン-5が創傷治癒を促進し、 $\alpha 3$ LG4 ドメインのシンデカン結合部位が責任活性部位であることが示唆された。また、 $\alpha 3$ LG4 ドメインが結合するシンデカンのシグナルはp38MAPKを活性化することで、細胞遊走やMMP、IL-1 β の発現など、再上皮化に関わる生物学的活性を発現・制御することが示唆された。また、本研究で決定した活性ペプチドであるA3G756は*in vivo*における創傷治癒を促進することから、創傷治療薬として検討可能なことが示された。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、ラミニン 5 $\alpha 3$ 鎖にある球状ドメイン LG4-5 の創傷治癒に関連する生物学的活性とその活性部位について検討している。

第1章では、ラミニン 5 $\alpha 3$ 鎖 LG4-5 ドメインによるヒト培養ケラチノサイト遊走促進効果について検討したものである。LG4-5 を含むリコンビナント蛋白を作製し、ヒト培養ケラチノサイトに添加することにより、このドメインがケラチノサイトの遊走を促進することが明らかにされた。活性部位を明らかにするためにLG4-5 ドメイン合成ペプチドライブラリーを作成し細胞遊走活性を調べたところ、配列 KNSFMALYLSKGR が強い活性を示すことが明らかにされた。次にLG4-5 ドメインによる細胞遊走促進の機序に関する検討では、LG4-5 ドメインおよびその活性ペプチドA3G756 がMMP-9 の発現を増強することを示している。LG4-5 ドメインによる細胞遊走促進はMMP-9 に対する阻害剤および中和抗体により阻害されることが示され、細胞遊走促進作用はMMP-9 を介する機構であることが明らかにされた。

第二章では活性ペプチドがMMP の発現を増強するメカニズムについて検討している。第一章で示されたペプチドA3G756 はMMP-1 およびMMP-9 の発現を増強するが、その増強作用はタンパク合成阻害剤により著しく抑制される。このことからA3G756 によるMMP-1 の発現増強は新規のタンパク合成を要求することが示唆された。細胞内シグナル伝達機構について詳細に検討したところ、LG4-5 ドメインが細胞表面のシンデカンと結合することが示唆され、添加直後からp38 MAPK がリン酸化されることが見いだされた。またp38MAPK 阻害剤によりMMP-1 の発現は抑制された。このことからp38MAPK により発現が制御される何らかのタンパクがMMP-1 の発現増強に関与することが示された。そのようなタンパクの中でIL-1 β に着目して関与を検討したところ、A3G756 によりIL-1 β の発現が増強されること、またIL-1 RA を添加するとMMP-1 の発現増強が阻害されることが明らかになった。これらの結果からA3G756 によるMMP-1 発現増強は主にIL-1 β の発現を介する機構によることが示唆された。またA3G756 がp38MAPK キナーゼを介する機構により細胞遊走に重要なインテグリンを活性化することも見出した。

第三章ではLG4 ドメインの創傷治癒促進作用を *in vivo* で検討するため、マウスに作成した創傷に対してA3G756 を塗布した。その結果、A3G756 がマウスの創面積を縮小させることを明らかにした。このことからA3G756 は創傷治療薬としての利用できる可能性が示唆された。

本研究は、ラミニン 5 $\alpha 3$ 鎖による創傷治癒促進作用を詳細に検討したものである。ラミニン 5 の生理活性部位の同定から作用機序まで詳細な研究を行っており、さらに創傷治療への臨床応用についても検討を加えている。以上について、審査員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Laminin $\alpha 3$ LG4 Module Induces Keratinocyte Migration
: Involvement of Matrix Metalloproteinase-9
著 者 名 : Momota, Y., Suzuki, N., Kasuya, Y., Kobayashi, T., Mizoguchi,
M., Yokoyama, F., Nomizu, M., Shinkai, H., Iwasaki, T., Utani, A
学術雑誌名 : Journal of Receptor and Signal Transductionに発表・発表予定
巻・号・頁・発行年 :

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Laminin $\alpha 3$ LG4 module induces matrix metalloproteinase-1
through mitogen-activated protein kinase signaling
著 者 名 : Momota, Y.^{*}, Utani, A.^{*}, Endo, H., Kasuya, Y., Beck, K., Suzuki, N.,
Nomizu, M. and Shinkai, H. (^{*}Both authors equally contributed to this
work.)
学術雑誌名 : The Journal of Biological Chemistry
巻・号・頁・発行年 : 278 (36) 34483-34490 : 2003
- 2) 題 目 : Localization of the laminin $\alpha 4$ chain in the skin and identification of a
heparin-dependent cell adhesion site within the laminin $\alpha 4$ chain C-
terminal LG4 module
著 者 名 : Matsuura, H., Momota, Y., Murata, K., Matsushima, H., Suzuki, N.,
Nomizu, M., Shinkai, H. and Utani, A.
学術雑誌名 : The Journal of Investigative Dermatology
巻・号・頁・発行年 : 122 (3) 614-620 : 2004