
抄 録

Abstract

招待講演

Invited Lecture

Trafficking, cellular assembly and structure of collagen fibrils

Wellcome Trust Centre for Cell-Matrix Research, Faculty of Life Sciences, University of Manchester, Michael Smith Building, Oxford Road, Manchester M13 9PT UK

KARL E. KADLER

The goal of the Kadler laboratory is to understand how cells in tendons and ligaments build an extracellular matrix (ECM) comprising parallel arrays of collagen fibrils. Our research is directly relevant to statistics released by the NHS that 14,000 tendon and 85,000 ligament injuries are reported each year, with repetitive strain injury (RSI) alone costing UK industry up to £20 billion pounds per annum in lost working days. We are using high-resolution electron microscopy to determine the structure of the cell-ECM interface in tendons and ligament, the developmental biology of tendon and ligaments, and stem cell approaches to engineer these tissues *in vitro* and to devise novel therapies for tendon and ligament healing.

Using serial section reconstruction we have identified novel plasma membrane protrusions, called fibripositors, in embryonic cells in tendon, ligament and other tissues where parallel collagen fibrils occur (Canty et al., 2004). Fibripositors contain collagen fibrils that extend from transport carriers within the cell to collagen fibril bundles in the ECM. Removal of fibripositors by depolymerisation of the actin cytoskeleton results in loss of fibril parallelism, suggesting that actin-mediated micromechanics are involved in generating tendon architecture (Canty et al., 2006). Future work is aimed at deciphering the mechanism of protein trafficking through fibripositors. Interestingly, we have shown that fibripositor-containing cells transiently appear in post-wounded tendons.

We have shown that cadherin-11 is a key component of cell-cell junctions between embryonic tendon cells. Cadherin-11 knockdown using siRNA results in loss of cell condensation and misalignment of collagen fibrils (Richardson et al., submitted). Future work is aimed at promoting cadherin-11 junctions in healing tendons and ligaments.

In collaboration with bioengineers we have developed a three-dimensional tendon cell culture system in which parallel collagen fibrils, cadherin-11-mediated cell junctions and fibripositor-containing cells are observed. This culture system is currently being extended to use tendon progenitor cells that have been derived from mesenchymal stem cells. This 3D culture system will be used to study the biogenesis of cell-cell junctions, fibripositors, and actin-mediated force generation during tendon and ligament formation.

The research is funded by The Wellcome Trust and the BBSRC (UK).

Canty, E. G., Lu, Y., Meadows, R. S., Shaw, M. K., Holmes, D. F. and Kadler, K. E. (2004). Coalignment of plasma membrane channels and protrusions (fibripositors) specifies the parallelism of tendon. *Journal of Cell Biology* 165, 553-563.

Canty, E. G., Starborg, T., Lu, Y., Humphries, S. M., Holmes, D. F., Meadows, R. S., Huffman, A., O'Toole, E. T. and Kadler, K. E. (2006). Actin filaments are required for fibripositor-mediated collagen fibril alignment in tendon. *J Biol Chem* 281, 38592-38598.

Extracellular microfibrils in development and disease.

Child Health Institute of New Jersey, Robert Wood Johnson Medical School, 89 French Street, New Brunswick, NJ 08901 USA, *Corresponding author ramirefr@umdnj.edu

RAMIREZ FRANCESCO*, CARTA LUCA, NISTALA HARIKIRAN, LEE-ARTEAGA SUI, AND LIU CATHERINE

Fibrillins 1 and 2 are the main structural components of extracellular microfibrils and the defective gene products in Marfan syndrome (MFS) and congenital contractural arachnodactyly (CCA), respectively. MFS is a pleiotropic disorder of the connective tissue with wide variation in clinical severity, whereas CCA is a rare condition akin to MFS but with major manifestations confined to the skeletal system. Fibrillins can form homo- or heteropolymeric microfibrils and interact with integrins, growth factors, several other matrix components, and latent TGF β -binding proteins (LTBPs). Recent analyses of genetically targeted mouse lines have provided insights into the differential roles of fibrillin proteins in organ formation and homeostasis. One of the studies has focused on the cardiovascular phenotype of a newly created strain of mice that completely lack fibrillin-1 and the consequences of combined deficiency of fibrillins 1 and 2 on tissue formation. The results have demonstrated that involvement of fibrillin-2 in the initial assembly of the aortic matrix overlaps in part with fibrillin-1, and that continued fibrillin-1 deposition is absolutely required for the maturation and function of the vessel during neonatal life. These findings have important implications for our understanding of aneurysm progression and rupture in MFS. The study of the skeletal phenotype in mice lacking fibrillin-2 or underexpressing fibrillin-1 has demonstrated overlapping roles of the fibrillins in this organ system as well. Reduced bone mass in these mutant animals is in fact accounted for by distinct cellular abnormalities. Whereas osteopenia in fibrillin-2 null mice was associated with reduced osteoblast activity both *in vivo* and *in vitro*, this phenotype in fibrillin-1 underexpressing mice was instead associated with both reduced bone formation and increased bone resorption. These results validate the long-held belief that osteopenia/osteoporosis is indeed part of the MFS phenotype, in addition to providing mechanistic insights into the underpinning of reduced bone mass in this condition and in CCA as well.

Pathobiology of the Basement Membrane Associated Proteins in the Skin

Department of Dermatology, University Medical Center Freiburg, 79104 Freiburg, Germany

e-mail: bruckner-tuderman@uniklinik-freiburg.de

LEENA BRUCKNER-TUDERMAN

The major role of the skin is to separate and protect the inner environment of the organism from the external milieu and its physical, chemical and biological insults. To achieve these complex functions, numerous structural proteins and molecular networks in the epidermis corroborate to assure the mutual cohesion of keratinocytes and their adhesion to the basement membrane. Multi-protein complexes, e.g. the hemidesmosomes, the focal contacts, or the anchoring fibrils, play an important role in keratinocyte-basement membrane-dermal adhesion. Genetic diseases with skin fragility are caused by mutations in genes encoding different protein components of these structures. Epidermolysis bullosa (EB), the prototype of the skin fragility syndromes, represents a clinically and genetically heterogeneous group of diseases characterized by skin blistering after minor trauma. In the different EB forms, the phenotypes range from very mild symptoms to extensive muco-cutaneous blistering and multiorgan disease. Mutations in 12 distinct genes are responsible for the different subtypes, including genes for keratins, integrins, basement membrane collagens, and laminins.

The study of the biological consequences of the gene mutations is useful for understanding the molecular disease mechanisms and for planning biologically valid therapeutic strategies. Equally importantly, it generates new indirect information on the normal functions of the affected proteins. Particularly interesting in this context is collagen XVII, the largest transmembrane collagen known and a member of the newly emerging family of collagenous transmembrane proteins. The ectodomain of this collagen is shed proteolytically from the cell surface, a process that regulates epithelial cell adhesion and motility. Recently, the molecular basis of the first $\beta 1$ integrin associated disorder, the Kindler syndrome, was revealed, adding a new member to the EB disease family. The Kindler syndrome, is caused by mutations in *KIND1* gene, which encodes kindlin-1, a component of focal adhesions. Kindlin-1 is a phosphoprotein in integrin $\beta 1$ complexes and is emerging as an important intracellular stabilizer of the dermal-epidermal junction, since it participates in the anchorage of the actin cytoskeleton to the plasma membrane. Actin microfilaments are utilized for cell polarity, and contractile and migratory processes in all cell types. Correspondingly, kindlin-1 defects are associated with abnormalities of cell adhesion, spreading, morphology and migration.

This talk will summarize the current knowledge of the molecular characteristics, interactions and functions, and pathological alterations of proteins involved in adhesion and stability of the epidermal basement membrane zone in the skin.

Interfacing the ECM and Cytokine Networks through Protease Activity

University of Toronto, Canada

Rama Khokha

The discovery of novel substrates subject to proteolytic processing has linked metalloproteinase activity to inflammation and cell fate, in addition to its well established role in cancer. The inhibition profile of TIMPs (tissue inhibitors of metallo proteinase) has also expanded beyond matrix metalloproteinases (MMPs) to include other metalloproteinases responsible for cytokine processing. Tumor necrosis factor alpha (TNF) is known for its ability to control the initiation, propagation and resolution of the inflammatory response. We have found that TIMP3 is an innate negative regulator of inflammation in vivo: systemic, hepatic and following arthritic joint disease. It regulates TNF bioactivity and signaling by controlling ADAM17-mediated shedding of the cell surface bound TNF. In a model of heart disease that mimics pressure overload, TIMP3 couples the regulation of cytokine homeostasis (specifically TNF) with the homeostasis of extracellular matrix. The use of single (*timp3*^{-/-}, *tnf*^{-/-}) and double knockouts (*timp3*^{-/-}/*tnf*^{-/-}) has allowed us to identify subsets of MMPs that are transcriptionally dependent or independent on TNF, as well as those influenced de novo in these double knockout mice. Combining MMP inhibition with TNF deficiency completely abrogates dilated cardiomyopathy in *timp3*^{-/-} mice. Our collaborative studies show that TIMP3-mediated regulation of TNF activity also extends to another important human disease, namely type 2 diabetes. Inflammation is now considered an important promoter of cancer development. Data is now emerging on how TIMP3 loss affects tumor development and progression, and how these processes interface with inflammation.

教育講演

Special Lecture

「細胞間接着による細胞の運動・増殖機構」

大阪大学大学院医学系研究科分子生物学講座

高井義美

ヒトのような多細胞生物での細胞機能として、増殖、分化、死、運動、接着などが極めて重要である。これまでの研究によって、これらの個々の細胞機能の制御機構は分子レベルでかなり解明されてきている。個体の維持のためにはこれらの機能が統合的に制御されている必要があるが、その機構に関してはほとんど理解されていない。例えば、運動や増殖している正常細胞同士が接触すると、細胞は互いに接着を形成して運動と増殖は停止する。この現象は接触阻害として1950年代に見出されているが、今日までその機構は不明である。一方、がん細胞では細胞が接触しても運動や増殖は止まらず、異常に増殖し続ける。さらに悪性度が増すと、がん細胞は周囲組織に浸潤し、他臓器に転移する。このようにがん細胞では接触阻害が消失しているが、その消失機構もまた不明である。私共の研究室では、新しい細胞間接着分子であるネクチンを見出し、この分子を介した細胞間接着装置が細胞の運動や増殖、分化、死を統合的に制御していることを明らかにしている。また、この装置の異常が、がん細胞における接触阻害の消失に関与したり、他のいくつかの病態にも関与していることも解明している。本会では、この新しい細胞間接着装置による高次細胞機能の統合的制御機構を紹介したい。

Roles of cell adhesion in cell movement and proliferation

Department of Molecular Biology and Biochemistry,
Osaka University Graduate School of
Medicine/Faculty of Medicine

Yoshimi Takai

Cell movement, proliferation, adhesion, differentiation, and death are essentially fundamental cellular functions in multicellular organisms such as human. The molecular mechanisms of these cellular functions have been individually clarified. However, the systemic regulation of these functions that is indispensable for living of multicellular organisms is poorly understood. When moving and proliferating normal cells contact with each other, they form cell-cell junctions and cease both movement and proliferation. This phenomenon has been identified in 1950s as contact inhibition of cell movement and proliferation. However, the molecular mechanism for this phenomenon has not been elucidated yet. On the other hand, transformed cells abnormally continue to move and proliferate even after they contact with each other. This results in enhanced malignancy of transformed cells and facilitates their invasiveness into neighboring tissues and metastasis to other organs. Thus, contact inhibition of cell movement and proliferation is disrupted in transformed cells, but further studies are necessary to entirely uncover the mechanism of this disruption. We have discovered a novel cell-cell adhesion molecule nectin, which mediates the formation of a specialized junctional apparatus at cell-cell adhesion sites. This junctional apparatus systemically regulates cell movement, proliferation, differentiation, and apoptosis, and its dysfunction is associated with the disruption of contact inhibition of cell movement and proliferation in transformed cells and also causes several pathological disorders. At this meeting, I focus on the newly identified cell-cell adhesion molecule nectin and the nectin-based junctional apparatus that is involved in the systemic regulation of cellular functions.

大高賞受賞講演

Ohtaka Award Lecture

メラノーマの悪性形質と酸性細胞外微小環境—マトリックスメタロプロテアーゼ-9発現を誘導する酸性細胞外pHの細胞内情報伝達機構—

神奈川県立 生化学・分子生物学分野
横須賀市稲岡町82番地

○加藤靖正

20世紀初頭以来、腫瘍組織内の細胞外pH (pH_e) がしばしば酸性を示すことはよく知られている。これは主に乳酸に代表される解糖系からの酸性代謝産物により生ずる。解糖系は腫瘍におけるATP産生の主要な供給源であり、これにより腫瘍細胞は正常細胞に比較して低酸素下での生存能力が高い。腫瘍細胞は、低酸素に反応するとHIF1を介して血管新生を誘導することから、低酸素は“微小環境因子”として確立されている。一方、酸性 pH_e はNF κ Bなどの活性化を介してMMP-9やVEGF-A、IL-8などの蛋白質発現を上昇させることから、酸性 pH_e は低酸素とは独立した重要な“微小環境因子”であると考えられる。この概念は、酸性 pH_e はペントースリン酸経路からのCO₂により生じるという知見からも支持される。

MMPsは、細胞外基質の分解を介して腫瘍の浸潤や転移に関与する重要な酵素群である。これまでに私達はMMP-9の合成が酸性 pH_e により誘導されることを見出している。そこで今回、酸性 pH_e によるMMP-9発現の情報伝達機構について検討した。酸性 pH_e はホスホリパーゼD (PLD)を活性化し、この活性化を1-butanol等により阻害すると、酸性 pH_e によるMMP-9発現は抑制された。酸性 pH_e 刺激によりERK1/2やp38などのMAPキナーゼのリン酸化が惹起され、これらのリン酸化はPLD阻害剤で抑制された。MMP-9のpromoterにおける酸性 pH_e の刺激に反応する部位はNF κ Bを含む遺伝子上流-670から-531に位置しており、実際NF κ Bの結合領域への変異によりMMP-9 promoter活性は減弱した。酸性 pH_e により誘導されたNF κ BおよびMMP-9 promoter活性は、MEK阻害剤やp38阻害剤などで抑制された。これらの結果は、酸性 pH_e によるMMP-9の誘導には、PLD, MAPKs (ERK1/2, p38), NF κ Bが関与することを示している。

最近私達は、Ca²⁺ influxが酸性 pH_e によるPLD活性化のトリガーとして働くこと、また、acidic sphingomyelinaseがPLD-MAPK経路とは独立してNF κ Bの活性化に関与することを見出している(投稿中)。本講演では、大高賞対象論文の内容に加え、これら私たちの最近の結果についても合わせて紹介する。

Acidic extracellular microenvironment and melanoma's malignant phenotype - signal transduction pathways for acidic extracellular pH to induce matrix metalloproteinase-9 expression -

Department of Biochemistry and Molecular Biology,
Kanagawa Dental College
82 Inaoka-cho, Yokosuka 238-8580, JAPAN

Yasumasa Kato

Since early 20 century, the extracellular pH (pH_e) of tumor tissues has been well known to be often acidic. This acidification is mainly due to acidic metabolites, e.g., lactate, caused by anaerobic glycolysis in tumor cells. The glycolysis is a major source of ATP production in tumor cells so that tumor cells have a stronger survivability in hypoxia than normal cells do. Because tumor cells induce angiogenesis by responding to hypoxia through hypoxia-inducible factor1 (HIF1), hypoxia is well established as a "microenvironmental factor". On the other hand, acidic pH_e upregulates the expression of several proteins including matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), and interleukin-8 (IL-8), through NF κ B activation, suggesting that acidic pH_e is also an important "microenvironmental factor" independently from hypoxia. This concept is also supported by the findings that CO₂ from pentose phosphate pathway is a major source of acidity in glycolysis impaired mice.

The MMPs are key enzymes which are involved in extracellular matrix disruption associated with tumor invasion and metastasis. We previously showed that production of MMP-9 was induced by culturing cells at acidic pH_e (5.4-6.5). Here we have investigated the signal transduction pathway by which acidic pH_e induces MMP-9 expression. We found that acidic pH_e (5.9) activated phospholipase D (PLD), and inhibition of PLD activity by 1-butanol and Myr-ARF6 suppressed the acidic pH_e -induced MMP-9 expression. Western blot analysis revealed that acidic pH_e increased the steady-state levels of phosphorylated ERK1/2 and p38 and that the PLD inhibitors suppressed these increases. Using 5'-deleted constructs of the MMP-9 promoter, we found that the acidic pH_e -responsive region was located at nucleotide -670 to -531, a region containing the NF κ B binding site. A mutation into the NF κ B binding site reduced the acidic pH_e -induced MMP-9 promoter activity, and NF κ B activity was induced by acidic pH_e . Pharmacological inhibitors specific for MEK1/2 (PD098059) and p38 (SB203580) attenuated the acidic pH_e -induced NF κ B activity and MMP-9 expression. These data suggest that PLD, MAPKs (ERK 1/2 and p38), and NF κ B mediate the acidic pH_e signaling to induce MMP-9 expression.

Moreover, we found that calcium influx triggers acidic pH_e -induced PLD activation and acidic sphingomyelinase mediates acidic pH_e signaling to NF κ B activation independently from PLD-MAPK pathway (submitted). In this lecture, I will talk about not only the data in the paper awarded the Otaka Award 2006 but also our recent data for the acidic pH_e signaling.

骨粗鬆症における骨質低下のメカニズム - コラーゲン架橋からみた骨血管相関 -

東京慈恵会医科大学 整形外科

斎藤 充

AuthorsMitsuru Saito, Katsuyuki Fuji, Shigeru Soshi S, and Takaaki Tanaka

TitleReductions in degree of mineralization and enzymatic collagen cross-links and increases in glycation induced pentosidine in the femoral neck cortex in cases of femoral neck fracture

Journal nameOsteoporosis International, 2006, 17, 986-995

【背景】

近年、骨の強度は骨密度（骨量）のみならず、骨の質にも規定されていることが明らかとなり2001年、NIHが骨粗鬆症の定義を改訂した。骨の質を規定する因子としてコラーゲン架橋や2次石灰化の重要性が指摘されているが、骨脆弱化との関連は明らかにされていない。そこで、大腿骨頸部骨折例から採取した骨は、新たに確立した骨質評価系を用いて解析した。

【方法】

ヒト骨は若い骨単位（低石灰化度）と古い骨単位（高石灰化度）が混在しており、個々の領域毎にコラーゲンの成熟度や老化度は異なっている。そこで、骨は密度勾配分画法により新旧の骨単位に分画したた後、すでに我々が確立したHPLC法(Saito M, Anal Biochem, 1997)を用いて、酵素反応を介して形成される生理的架橋（還元性未熟型、非還元性成熟型）と、酵素反応を介さずに形成されるAdvanced glycation end products (AGEs)を分離定量した。これらの架橋パラメータをもとにコラーゲンの成熟指数と老化指数を定義し評価に加えた。

【結果・結論】

大腿骨頸部骨折例では、骨強度にプラスに作用する生理的架橋の低形成とマイナスに作用するAGEsの過形成が生じていた。さらに骨折群では、石灰化早期の若い骨単位により多くのAGEsが形成されており、時間依存的な老化過程からは逸脱したパターンを示した。さらに最近、架橋異常のみで骨強度が低下することを動物モデルで明らかにした(Saito M, OI (10) 2006)。その後、こうした架橋異常の原因として動脈硬化の危険因子でもあるホモシステイン・ビタミン代謝の異常が関与していること明らかにし骨血管相関という観点から研究を継続している(Saito, CTI 2006)。さらに、尿中AGEs高値が骨折予測因子になることも見いだしており(submitted)、骨質評価や骨質治療の可能性を探索している。

Reductions in degree of mineralization and enzymatic collagen cross-links and increases in glycation induced pentosidine in the femoral neck cortex in cases of femoral neck fracture

Department of Orthopaedic Surgery
Jikei University School of Medicine
Tokyo, Japan

Mitsuru Saitou

Introduction: Bone loss and impaired bone quality, which encompass the structural and material properties of bone, have been proposed as major causes of increased bone fragility in osteoporosis. Intermolecular collagen cross-link is candidate for determining the material properties of bone. Collagen cross-links are of two types: lysyl oxidase and lysyl hydroxylase (PLOD1, PLOD2) controlled cross-links (Saito M, JBMR 2003, BONE 2004), and advanced glycation end products (AGEs), pentosidine (Saito M, Anal Biochem 1997). These two types of cross-links play important roles in the expression of bone strength. The cross-link pattern is affected by tissue maturation and senescence. Because the distinctive collagen reactions may be carried to different degrees of mineralization in different bone areas, we should analyze separate fractions from an area, each containing a sample with a different degree of mineralization, which reflects tissue aging. However, the classical whole-bone analysis cannot be used to estimate different degrees of mineralization in certain areas. In the present study, the technique of density gradient fractionation was used to obtain the separation of each osteon in different stages of mineralization. The aim of our study was to understand the distinctive posttranslational modifications of collagen in areas with different degrees of mineralization with and without hip fracture.

Methods: Sixteen female cases of intracapsular hip fracture (78 ± 6 years) and 16 age- and gender-matched postmortem controls (76 ± 6 years) were included in this study. A sample of each femoral neck cortex was fractionated into low-mineralized (1.7 to 2.0 g/ml) and high-mineralized (>2.0 g/ml) portions. The contents of enzymatic cross-links (dihydroxylysine, norleucine, hydroxylysine, norleucine, lysine, norleucine, pyridinoline, and deoxypyridinoline) and nonenzymatic cross-links (pentosidine) and the extent of lysine (Lys) hydroxylation were determined in each fraction by our established HPLC system (Saito M, Anal Biochem 1997).

Results: In the controls, there was no significant difference in the contents of enzymatic cross-links between low- and high-mineralized bone fractions, whereas pentosidine content was significantly higher in high-mineralized bone compared with low-mineralized bone. When comparing enzymatic cross-link contents between controls and fracture cases, a trend toward lower cross-link content in low-mineralized bone and a significant reduction in high-mineralized bone were observed. Pentosidine content of low-mineralized bone was significantly higher in fracture cases than in controls. The extent of Lys hydroxylation was significantly higher in fracture cases than in controls. The higher hydroxylation of Lys in collagen from fracture cases relative to controls was associated with significantly higher values of hydroxylysine-derived cross-link such that the enzymatic cross-link patterns correlated with the extent of Lys hydroxylation in the collagen molecules.

Conclusion: Recently, we reported that mildly hyperhomocysteinemia and vitamin B6 in general population are crucial determinants of detrimental crosslinking of bone collagen in patients with hip fracture (Saito M, Calcif Tissue Int 2006) and detrimental cross-link formation reduces bone strength without the reduction in bone mineral density in diabetic rat (Saito M, Osteopros Int (10) 2006). These results suggest that enzymatic cross-links and excessive formation of AGEs, pentosidine, may play an important role in explaining poor bone quality in osteoporosis.

ランチョンセミナー

Luncheon Seminar

関節症における滑膜線維芽細胞(間葉系幹細胞)の活性化および高分子ヒアルロン酸療法

広島大学大学院医歯薬学総合研究科(口腔生化学)

加藤幸夫

多くのOA, RA患者に対して、ヒアルロン酸、NSAID、ステロイド、その他の化学的あるいは生物学的製剤が用いられている。しかし関節症の病態には不明な点が多い。関節症において、滑膜線維芽細胞はパンヌスを形成するのみならず異常な骨棘形成や軟骨形成にも関与している。つまり滑膜線維芽細胞は、高レベルの増殖能と基質分解能をもった一種の間葉系幹細胞(MSC)であり、関節症の病理に重要な役割を果たしていると推察される。

我々は、MSCと滑膜線維芽細胞の特徴を明らかにするために、MSC特徴的遺伝子群を同定した。またこれらがMSCのidentity、自己複製能および多分化能に必須であることを見いだした。一方でMSC、滑膜線維芽細胞および皮膚線維芽細胞の各種HAS、HYAL、HABPの発現レベルを比較した。そして幹細胞とHAの観点からOA, RAに新しい洞察を加えたいと考えている。また高分子ヒアルロン酸療法の最近の動向についても紹介する。

Activation of synovial fibroblasts (mesenchymal stem cell-like cells) in arthritic joints and treatment with high molecular weight hyaluronan

Department of Dental and Medical Biochemistry,
Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences

Yukio Kato

Many patients with OA or RA are being treated with hyaluronan (HA), NSAID, steroid, and other chemical and biological drugs, but the pathology of joint diseases has not been fully understood. In arthritic joints, synovial fibroblasts are involved in HA metabolism and ectopic osteophyte/chondrocyte formation: Both of which are crucial to joint diseases. In other words, synovial fibroblasts are mesenchymal stem cell (MSC)-like cells with high proliferation and matrix-degrading activities.

To characterize self-renewal and multi-potency of MSC and synovial fibroblasts, we identified MSC-characteristic genes, including several transcription factors, and found that these genes were essential for "stemness" of these cells. In addition, we compared gene expression levels of various HAS, HYAL, and HABP in synovial fibroblasts and MSC - using DNA chips. I also introduce recent topics of high molecular weight HA.

分子から見た心臓弁膜症:心臓再生への第2ステップ

慶應義塾大学医学部再生医学教室

福田 恵一

我々はこれまで種々の幹細胞を用いて心筋細胞を再生し、さらにこれを利用して培養条件下での心臓組織の構築と細胞移植、心臓の再生を試み、大きな進歩を遂げてきた。一方、心臓弁は臨床的に重要な組織であるにもかかわらず、弁膜症の病因と病態生理は全く解明されてこなかった。本セミナーでは心臓弁の機能維持に関わる分子機構とその破綻による心臓弁膜症の発症機転に関する最新の研究を解説する。心臓弁は軟骨、眼球等と並ぶ無血管組織であることが知られている。我々はこの心臓弁の無血管性に着目し、その維持機構と破綻が心臓弁に如何なる変化をもたらすかを研究した。その結果、心臓弁では胎生中期の心臓弁形成期より一生涯を通じてコンドロモジュリン-1 (ChM-1) が弁間質細胞より豊富に分泌され、細胞外マトリックスに蓄積されていることを明らかにした。ChM-1は牛胎児軟骨より単離された血管新生抑制因子で、培養心臓弁間質細胞が分泌する同因子はヒト血管内皮細胞の血管腔形成能、遊走能を抑制し、同時にアポトーシスを惹起した。ChM-1の遺伝子ノックアウトマウスでは出生直後は変化がないものの、36週を過ぎた頃より徐々に心臓弁にVEGFの発現、血管内皮細胞や炎症細胞の浸潤、血管腔の形成、脂質沈着、石灰化を生じるようになった。90週の時点では心臓弁が肥厚し、心エコーでは初期の大動脈弁狭窄症を呈するようになった。動脈硬化モデルマウスとして知られるApoEノックアウトマウスを解析すると、心臓弁膜症様の変化の出現した時期に、心臓弁の一部の組織でChM-1の発現低下が観察され、同部位にVEGFの発現が観察された。ヒト剖検例および心臓弁膜症の手術症例の検討では、正常心臓弁にはChM-1が豊富に存在しているが、リウマチ性心臓弁膜症、感染性心内膜炎、動脈硬化性心臓弁膜症例の心臓弁ではChM-1の発現が種々の程度に低下し、発現低下した部分にVEGFの発現、血管腔の形成、炎症細胞の浸潤、MMPの活性化が観察された。以上より、心臓弁ではChM-1が豊富に存在する状況では心臓弁の機能が正常に保たれるが、炎症や機械的ストレスにより弁間質細胞が障害されるとChM-1の発現が低下し、これに引き続いて血管新生、炎症細胞の浸潤が開始され、心臓弁膜症が形成されてゆくことが明らかとなった。

Keeping valves clear: Role of chondromodulin-I as a protective factor for maintaining cardiac valvular function

Department of Regenerative Medicine and Advanced Cardiac Therapeutics
Keio University School of Medicine

Keiichi Fukuda, Masatoyo Yoshioka

The avascularity of cardiac valves is abrogated in several valvular heart diseases. This study investigated the molecular mechanisms underlying valvular avascularity, and its correlation with valvular heart diseases induction. Chondromodulin-I, an anti-angiogenic factor isolated from the cartilage, is abundantly expressed in normal murine, rat and human cardiac valves. It is first detected at developmental stage E9.5 in the left ventricle, outflow tract and valvular primordium, but is restricted to cardiac valves from late embryogenesis to the adult. Gene targeting of *chondromodulin-1* resulted in enhanced VEGF-A expression, angiogenesis, lipid deposition and calcification in the cardiac valves of aged mice. Echocardiography revealed aortic valve thickening, calcification and turbulent flow signifying early changes in aortic stenosis. Conditioned medium obtained from cultured valvular interstitial cells strongly inhibited tube formation, mobilized endothelial cells and induced their apoptosis, and these effects were partially inhibited by *chondromodulin-1* siRNA. In both *ApoE*^{-/-} mice and human valvular heart diseases, including infective endocarditis, rheumatic heart disease and atherosclerosis, VEGF-A expression, neovascularization and calcification were observed in the areas of *chondromodulin-1* down-regulation. These findings provide evidence that chondromodulin-I plays a pivotal role in maintaining valvular normal function by preventing angiogenesis, thickening and calcification that may lead to valvular heart diseases.

シンポジウム 1

細胞外マトリックス成分の新規機能

Symposium 1

New functions of ECM proteins

S01 エラスチン線維形成におけるトロポエラスチンの分子内ドメイン

星薬科大学臨床化学教室

輪千浩史

弾性線維は、皮膚、動脈、肺、靭帯などの軟部組織において、弾性の保持に寄与する重要な結合組織である。弾性線維の主要成分であるエラスチンは、分子量約70 kDaの可溶性トロポエラスチンとして細胞外に分泌され、微細線維であるfibrillinやDANCE/Fibulin-5と分子間相互作用し、リジルオキシダーゼによってトロポエラスチン分子間で架橋形成することで成熟化したエラスチン線維になると考えられているが、その詳細な機序については多くの点が不明である。我々は、トロポエラスチンを発現せずマイクロフィブリルを発現しているヒト網膜色素上皮細胞 (ARPE-19) を用いた *in vitro* エラスチン線維再構築モデルを開発し、構造の異なる組換えトロポエラスチンのエラスチン線維形成について解析した。その結果、1) C末端領域が変異したトロポエラスチンは、細胞外への沈着を認めるものの、架橋形成が低下することがわかった。2) 構造の異なるトロポエラスチン分子を同時に処理した場合、沈着量と架橋量はそれぞれ単独に処理した時の和となることがわかった。3) 親水性エクソン26Aを欠損したトロポエラスチンは、架橋量が有意に増加することが分かった。4) トロポエラスチン分子内のエクソン16と30はトロポエラスチンの沈着に重要なドメインであることがわかった。本シンポジウムでは、トロポエラスチン分子に焦点をあてて、エラスチン線維形成におけるトロポエラスチンの分子内ドメインの役割に関する最近の知見を述べたい。

Intermolecular domains of tropoelastin in elastic fiber formation

Department of Clinical Chemistry, Hoshi University
School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

Hiroshi Wachi

Elastic fibers, which comprise an elastin core surrounded by fibrillin-rich microfibrils, are major insoluble extracellular matrix structures and impart elasticity to organs such as skin, lungs, ligaments, and arteries. During elastic fiber formation, tropoelastin, which is secreted from cells as the soluble precursor of elastin, is deposited on preformed microfibrillar templates including fibrillin or DANCE/fibulin-5. Tropoelastins are cross-linked in the extracellular space by one or more members of the lysyl oxidase gene family to form an elastin polymer, which is the functional form of the mature protein. However, the mechanisms of elastic fiber assembly are still not fully understood. We have recently developed an *in vitro* model of elastic fiber assembly, which enables the quantitative comparison of various tropoelastin molecules. We found that 1) The amount of cross-linked amino acids unique to mature insoluble elastin in the mutated tropoelastin at C-terminal domain assembly was decreased; 2) The combination with different tropoelastin molecule indicated that the deposition and maturation of tropoelastin depend on the ability of each tropoelastin molecular; 3) Exon 26A missing tropoelastin significantly increased the formation of cross-linking amino acids and the binding to scaffold proteins without change of getting into the matrix. 4) Domain 16 as well as domain 30 is important for self-association of tropoelastin and elastic fiber formation. In this symposium, I would like to mention particularly the role of intermolecular domains of tropoelastin in elastic fiber formation.

S02 弾性線維形成におけるDANCE/fibulin-5の役割

関西医科大学 薬理学講座

中邨智之

個体の老化の大きな特徴は、皮膚・肺・動脈など身体の至る所で弾性（引き伸ばしても元に戻る性質）が失われていくことであり、このことが皮膚のたるみ、肺気腫、動脈の硬化などの直接原因となっている。その多くは弾性線維の機能低下によると考えることができる。弾性線維は、これらの伸び縮みする臓器・組織に多くあり、その弾性を担っているからである。

弾性線維の伸び縮みする性質はマイクロフィブリルの周りにエラスチンが凝集し、互いにクロスリンクされることで生じる。しかしその分子機構には不明な点も多い。我々はDANCE（別名fibulin-5）という分泌タンパク質をクローニングし、その遺伝子欠損マウスを作成したところ、驚いたことに全身の弾性線維がばらばらになっていることを見いだした。このためDANCE遺伝子欠損マウスの表現型はヒトの老化に非常に類似しており、皮膚は弾性が無く垂れ下がり、肺気腫を来し、動脈は蛇行して硬くなっていた。このマウスでは弾性線維の分解は亢進していなかった。すなわち、DANCEは弾性線維形成に必須のタンパク質である。

DANCEがどのようにして弾性線維形成に寄与しているのか明らかにするため、ヒト皮膚線維芽細胞を用いて *in vitro* の弾性線維構成系を作成し、リコンビナントDANCEタンパク質を培養上清に加えるだけで弾性線維形成が著しく促進されることを見いだした。DANCEを加えてもエラスチンその他の弾性線維構成タンパク質の発現は変わらないので、DANCEはシグナル分子としてではなくこれらの構成タンパク質を組織化して弾性線維にするためのオーガナイザー分子として働くと考えられた。本講演では、DANCEが弾性線維形成のオーガナイザーとして働く分子機構、さらに老化と弾性線維劣化にDANCEの変化が関与しているのかどうかについて最新の知見を紹介する。

The role of DANCE/fibulin-5 in elastic fiber assembly

Department of Pharmacology, Kansai Medical University

Tomoyuki Nakamura

Elastic fiber is required for the elasticity of tissues such as skin, lung and arteries, and deterioration of elastic fiber causes many aging-associated diseases. We previously showed that Developing Arteries and Neural Crest EGF-like (DANCE) (also designated fibulin-5), an integrin ligand for $\alpha\beta5$, $\alpha\beta3$ and $\alpha9\beta1$, is essential for elastic fiber development. DANCE deficient mice recapitulate human aging phenotypes such as loose skin, emphysema and stiff arteries, due to disorganized elastic fibers. However, the specific role of DANCE in elastogenesis and correlation of aging-associated alteration of DANCE with aging phenotypes remains elusive. In this seminar we show that recombinant DANCE protein potently induces elastic fiber assembly even in serum-free cell culture without changing the expression of elastic fiber components, suggesting that DANCE serves as an organizer molecule for elastogenesis. DANCE dimerizes or oligomerizes, deposits on microfibrils, promotes aggregation of tropoelastin molecules through coacervation, and also interacts with lysyl oxidase-like (LOXL) 1, 2 and 4, the enzymes that cross-link elastin. We propose a model that DANCE tethers LOXL enzymes to microfibrils, thus facilitating aggregation and cross-linking of elastin on microfibrils. Intriguingly, much less full-length DANCE and more truncated form of DANCE was detected in aged mouse loose skin than in young mouse skin, due to proteolytic cleavage of the NH_2 -terminal domain. The cleavage of DANCE abrogates DANCE-DANCE interaction and DANCE-microfibrils interaction, leading to loss of elastic fiber organizing activity of DANCE. These data suggest that decrease in full-length DANCE by proteolytic cleavage may contribute to loss of elastogenic potential in aged elastic tissues.

S03 ファイブリリンマイクロファイブリル

国立長寿医療センター先端医療部

磯貝善蔵

弾性線維はふたつのエレメント、つまりエラスチンとマイクロファイブリルから構成される。マイクロファイブリルは主にファイブリリンがクロスリンクした重合体であり、エラウニンやオキシタランを含む弾性線維全般に存在する。

我々はマイクロファイブリルの構造と機能を明らかにするために、今までと違ったマイクロファイブリル抽出法を開発した。 Guanidinium塩酸を用いた方法で組織から抽出したマイクロファイブリルは電子顕微鏡的にファイブリリン分子がビーズを超えて幅広く広がった形態をとる。我々のモノクローナル抗体のエピトープもすべて含んでいた。

Guanidinium塩酸抽出のマイクロファイブリルは機能的なエレメントでもあり、ヒアルロンに結合する。これはマイクロファイブリルに結合したバーシカンのヒアルロン酸結合活性による。興味深いことに光老化皮膚や眼の硝子体のマイクロファイブリルはバーシカンのヒアルロン酸結合領域が失われており、ヒアルロンに結合できない。

もうひとつ、マイクロファイブリルに特徴的な機能を付加する分子としてlatent transforming growth factor-beta binding protein (LTBP)がある。LTBPはTGF-betaと共有結合する。LTBP-1はC末でファイブリリン1と結合し、かつマイクロファイブリルに局在する。さらにN末では重合体を作るとともに、そのスプライシング領域はTGF-beta活性発現に重要な働きをする。つまりマイクロファイブリルはファイブリリンとLTBPの相互作用を介してTGF-beta活性を制御している。実際ファイブリリン-1の遺伝子異常であるマルファン症候群の臨床症状はマイクロファイブリルの物理的性質不全とTGF-beta活性制御異常による形成不全で説明されている。

褥瘡の肉芽組織ではファイブリリンとLTBP-1の共存がなく、かつ創傷表面からLTBP-1のTGF-beta結合部位を含む断片が検出された。創傷治癒においてもマイクロファイブリルなど細胞外マトリックスによるTGF-beta活性制御機構が働いている可能性を検討している。

Fibrillin-Microfibrils

⁶Department of Advanced Medicine, National Center for Geriatrics and Gerontology, Obu, Aichi, Japan

Zenzo Isogai

Elastic fibers are composed of two distinct elements, elastin and microfibrils. Microfibrils are elastic cross-linked polymers mainly comprised of fibrillins and are present throughout elastic fiber elements including elauinin and oxytalan.

In order to understand structure and functions of microfibrils, we developed the different extraction procedures of microfibrils from various tissues. Our new procedure using guanidine hydrochloride revealed new morphology of microfibrils. In contrast to collagenase extract microfibrils used for many years, fibrillin-1 filaments splayed out, extending beyond the width of the periodic globular beads. Guanidine extracted microfibrils containing all epitopes of our monoclonal antibodies to fibrillin-1.

Guanidine extracted microfibrils are functional element that are capable of binding to hyaluronan. That indicates versican, bound to microfibrils, can interact with HA, forming a macromolecular complex. Interestingly, in specific tissue like photo-aged skin and vitreous, the microfibrils lost HBR of versican and in unable to binds HA.

Another molecule that imparts distinct function to microfibrils is latent transforming growth factor-beta binding protein (LTBP) that covalently binds to transforming growth factor-beta (TGF-beta). We have found that the carboxyl terminal fragment of LTBP-1 interacts with fibrillin-1 and LTBP-1 localizes to fibrillin containing microfibrils. Furthermore, we have found that the amino-terminal region of LTBP-1 makes macro aggregates and alternative splicing of the region plays important roles for activation of TGF-beta. Therefore, microfibrils can regulate TGF-beta activity through LTBP-1 fibrillin interaction. Indeed, genotype-phenotype correlation of Marfan syndrome (mutation in fibrillin-1) has been explained based on the impaired mechanical properties and dysregulation of TGF-beta.

In granulation tissue in pressure ulcer, colocalization of fibrillin-1 and LTBP-1 is disturbed. Consistent with the observation, LTBP-1 fragment containing TGF-beta binding region is detected from wound surface of remodeling pressure ulcer. Extracellular regulation of TGF-beta activity may be important for wound healing.

S04 生体内におけるパーシカン/PG-Mの機能:ノックインマウスを用いた解析

¹愛知医大・分医研、²理研、³日下部医学生物学的研究所、⁴北里大学・分子形態科学、⁵東京医歯大・硬組織

渡辺秀人¹、幡野その子¹、平岩典子²、日下部守昭³、安達栄治郎⁴、篠村多摩之⁵、木全弘治¹

アグリカンファミリーのプロテオグリカン (PGs) は、細胞外マトリックス型のコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPGs) で、アグリカン、パーシカン/PG-M、ニューロカン、プレピカン等のファミリーメンバーが知られている。これらの分子はN-末端のG1ドメインにてヒアルロン酸 (HA) と、C-末端のG3ドメインにてテネシン、フィブリリン、フィブリリン等と結合することによって細胞外マトリックスに沈着し、中央のコンドロイチン硫酸鎖が局所において機能すると考えられている。パーシカンは発生期の心臓、軟骨原基等に一過性に高発現して遊走、接着、分化、増殖等の細胞挙動を制御する一方、成獣では心血管系、皮膚、脳等のマトリックスの構成成分として安定的に発現している。パーシカンの遺伝子欠損マウスはジントラップ法によってすでに作製されているが同マウスは胎生10.5日に心形成不全によって死亡するため、その他の臓器における同分子の機能は解明されていない。我々は、N-末端G1ドメイン内のAサブドメインを欠失するパーシカンのノックインマウスを作製しその解析を行った。ヘテロ接合体は正常に発育したがホモ接合体は出生直後までに全例死亡した。生化学的機能解析からAサブドメインはHAとの結合を補強することが明らかとなっており、Aサブドメインを欠失した変異パーシカンではマトリックスへの沈着は低下すると推測されるが、事実、同ホモ接合体において変異パーシカンの沈着は低下していた。同マウスでは心拡大、大動脈壁形成不全と動脈平滑筋細胞の分化遅延、真皮膠原繊維幅の低下が認められた。これら表現型の発症機構を検討したところ、同分子がコラーゲン線維の形成と沈着に関与すること、BMPやTGFβのシグナル伝達調節を通じて細胞分化を制御していることが明らかとなった。本シンポジウムではパーシカンの多面的な生体内機能を紹介する。

In vivo function of versican/PG-M: Analysis of knock-in mice

¹Institute for Molecular Science of Medicine, Aichi Medical University, ²Experimental Animal Division, Bio Resource Center, RIKEN, ³Institute for Animal Reproduction, ⁴Department of Molecular Morphology, Graduate School of Medicine, Kitasato University, ⁵Tissue Regeneration, Department of Hard Tissue Engineering, Tokyo Medical and Dental University

Hideto Watanabe¹, Sonoko¹Hatano, Noriko Hiraiwa², Moriaki Kusakabe³, Eijiro Adachi⁴, Tamayuki Shinomura⁵, and Koji Kimata¹

The extracellular matrix comprises fiber components and the ground substance. Whereas collagen and elastic fibers form framework of the ECM, molecules of the ground substance, such as proteoglycans, hyaluronan, and other glycoproteins, fill the space among the fibers.

Versican/PG-M is a large chondroitin sulfate (CS) proteoglycan of the extracellular matrix, which contains a core protein of approximately 550 kDa and about twenty CS chains. Its core protein consists of two globular domains G1 and G3 at N- and C-termini, respectively, and two CS-attachment domains between them. The G1 domain, composed of A, B and B subdomains, binds to hyaluronan (HA) and link protein (LP) and is believed to be important for formation of the proteoglycan aggregate. Biochemical analysis has revealed that, whereas the B-B stretch provides the binding site for HA, the A subdomain enhances their interaction. The G3 domain interacts with several matrix molecules such as fibrillins, fibulins, and tenascins. Thus, versican is incorporated into the ECM by these interactions at both the G1 and G3 domains, and there its CS chains exert specific functions. Versican-null mice generated by a gene-trap technique die at E10.5 with severe heart defects, which disables further analysis at late embryonic stages. Here, we generated mice whose versican lacks the A subdomain by the homologous recombination. Whereas the heterozygotes are born and grow without abnormalities, the homozygotes (*Cspg2*^{3/3}) are small and survive up to a perinatal period. They show cardiac dilatation, impaired development of aorta due to delayed smooth muscle cell differentiation, and loose dermis with less fibers and capillaries. Detailed analysis using organ and cell culture systems reveals altered signal transduction mediated by BMPs and TGFβ, suggesting the ECM structure with adequate levels of versican regulates their signaling. In the symposium, we present detailed analysis data and discuss the *in vivo* function of versican.

シンポジウム 2

結合組織疾患における最近のトピックス

Symposium 2

New topics in connective tissue diseases

S05 上皮-間葉系移行における細胞外マトリックスの影響

和歌山県立医科大学眼科

雑賀司珠也

緒言：水晶体、網膜、腎、肺などでは、線維化の過程で上皮細胞が筋線維芽細胞に形質転換し、細胞外マトリックス(ECM)を沈着させるが、(上皮-間葉系移行、EMT)。しかし、逆にECMが上皮-間葉系移行を調節しているか否かについては充分解明されていない。演者らは、水晶体外傷後の上皮細胞は、Smadシグナルを活性化させ、そのEMTは、眼内に特異的に多量存在するTGF β 2/Smad3シグナルを介することを報告した。今回、ECM成分であるルミカンとオステオポンチンが水晶体上皮細胞のEMTに関与しているか否かを検討した。**方法：**マウス水晶体前嚢を穿刺し、上皮のEMT過程でのルミカンマウスとオステオポンチンの発現を検討した。それぞれのECM成分の欠失マウスでのEMTを野生型と比較した。EMTマーカーとしての α 平滑筋アクチンとコラーゲンの発現とリン酸化Smadの発現を検討した。同ノックアウトマウスのTGF β 2添加器官培養水晶体でのEMTも検討した。さらにオステオポンチンの培養水晶体上皮細胞株の挙動に対する影響を検討した。**結果：**マウス水晶体前嚢穿刺後は、24時間以内にルミカンとオステオポンチンが発現し、5日以内にEMTが完成した。ルミカンとオステオポンチンそれぞれの欠失マウスでは、Smad活性化とEMTが遅延した。オステオポンチンは培養水晶体上皮細胞株の接着を促進した。**結論：**水晶体上皮細胞は、創傷治癒過程やTGF β 2暴露でEMTに先だててルミカンマウスとオステオポンチンを発現し、両分子は細胞のTGF β /SmadシグナルとEMTを調節する。

キーワード：上皮-間葉系移行、水晶体上皮、ルミカン、オステオポンチン、Smad

Roles of Extracellular Matrix Components in Regulation of Epithelial-mesenchymal Transition

Dept. of Ophthalmology, Wakayama Medical University

Shizuya Saika

Introduction: Epithelial cells in eye lens, retina, kidney and lung transdifferentiate to myofibroblasts during the process of tissue fibrosis (Epithelial-mesenchymal transition, EMT). However, roles of such matrix components deposited in the modulation of EMT have not been fully uncovered. I have reported that injury-induced EMT in mouse lens epithelium is regulated by endogenous TGF β 2/Smad3 signal. In the present study roles of two ECM components, lumican and osteopontin, were investigated. **Methods:** EMT was induced in a mouse eye lens by using a needle puncture. Expression pattern of lumican and osteopontin was examined. Effects of lacking lumican or osteopontin on lens epithelium EMT were then examined by using knockout mice. An organ-cultured lens of a knockout mouse was employed to evaluate the effects of lacking such ECM components on TGF β 2-induced EMT. EMT was evaluated by expression pattern of α -smooth muscle actin and collagens. Effect of exogenous osteopontin on behaviors of lens epithelial cell line were finally studied. **Results:** Lens epithelium upregulates lumican and osteopontin in 24 hrs prior to development of EMT. Loss of lumican or osteopontin perturbs injury-induced TGF β /Smad signal activation and EMT in vivo. TGF β 2-induced EMT was also inhibited by lacking lumican. Exogenous osteopontin promotes adhesion of lens epithelial cell line. **Conclusion:** Lens epithelium upregulates lumican and osteopontin, both of which are required full activation of TGF β /Smad signal and EMT after injury or exposure to TGF β 2.

Key words: Epithelial-mesenchymal transition, lens epithelium, lumican osteopontin, Smad.

S06 心筋細胞ギャップ結合リモデリングの頻脈性不整脈への関与

山口大学大学院医学研究科器官病態内科学循環器内科

大草知子

ギャップ結合は、隣接する細胞を直接連結して細胞間のイオン、シグナル伝達物質、分子交換を行い興奮伝播や電氣的結合を調節する。頻脈性不整脈は、その発生・維持には心筋細胞の機能的・器質的リモデリングの関与があり、それらには心筋細胞間結合構成蛋白、ギャップ結合の変化がある。ギャップ結合はconnexin (Cx) 蛋白により構成され、半減期は1~2時間で、短時間のうちに様々な負荷の影響を受ける。Cxの安定性はリン酸化により調節され、蛋白の変性や崩壊が促進される。本研究は、頻脈性不整脈基質としてギャップ結合リモデリングに焦点をあて、以下の目的にて行った。1) Cxの質的・量的変化が頻脈性不整脈の発生・維持へどのように関与するのか、2) ギャップ結合リモデリングにレニン・アンジオテンシン・アルドステロン (RAA) 系はどのように関わっているのか、3) ギャップ結合リモデリングを制御するupstream治療として、RAA系阻害薬を位置づけることが可能か否か。その結果、慢性心房細動 (AF) 患者心房筋のCx40発現量の減少とセリン・リン酸化の増加を認め、AFの病態形成への重要性が示された。また、心筋細胞への高頻度電気刺激負荷は、早期よりangiotensin II (AGII) およびMAPK系を介してCx43発現量を増し、電気生理学的特性に変化を来した。これらの変化はAGII受容体拮抗薬により抑制された。さらに、心不全発現過程では、心室筋細胞のCx43の量的・質的变化により、細胞の電気生理学的特性に変化を生じ、致死性心室性不整脈が生じることが証明された。以上より、ギャップ結合リモデリングは細胞間の興奮伝播異常に反映され、頻脈性不整脈の発生・維持に関与する重要な基質と考えられた。また、ギャップ結合リモデリングへの直接的なRAA系の関与が証明され、RAA系制御は頻脈性不整脈のupstream治療となる可能性が示された。

Gap Junction Remodeling of Cardiomyocytes and Arrhythmogenicity

Division of Cardiology, Department of Medicine and Clinical Science, Yamaguchi University Graduate School of Medicine

Tomoko Ohkusa

Electrical coupling in the heart is mediated by cardiac gap junctions. The expression and distribution of gap junctions can be easily changed under a variety of pathological conditions because of dynamic turnover of connexins (Cxs), and GJs are considered to be an important factor in the origin of lethal reentrant arrhythmias. Here, we investigated 1) the alterations in connexin (Cx) as an arrhythmogenic substrate in cardiomyocytes from patients with chronic atrial fibrillation (AF), cultured ventricular myocytes exposed to rapid electrical stimulation (RES), and animal model of heart failure, 2) the contribution of renin angiotensin aldosterone system (RAAS) to GJ remodeling, and 3) whether the regulation of RAAS will be a new upstream therapy for the treatment of arrhythmias. In patients with AF, downregulation and abnormal phosphorylation of Cx40 may result in abnormal cell-to-cell communication and alteration in the electrophysiologic properties, leading to the initiation and/or perpetuation of AF. Moreover, a short-term RES caused upregulation of Cx43 in cardiomyocytes and a concomitant increased of conduction velocity, mainly through an autocrine action of angiotensin II to activate MAKPK. During the development of heart failure, in addition to interstitial fibrosis, down-regulation and abnormal serine-phosphorylation of Cx43 resulted in abnormal cell-to-cell communication and alteration in the electrophysiologic properties of the ventricle, leading to the initiation and perpetuation of ventricular arrhythmias. Our results suggest that gap junction remodeling might be an important arrhythmogenic substrate, therefore upstream approach which prevents the gap junction remodeling should be considered as an alternative strategy to traditional treatment with membrane-active anti-arrhythmic agents.

S07 臓器線維症の進展ならびに改善における骨髄と末梢の臓器相関

¹東海大学医学部肝線維化研究ユニット、²国際医療福祉大学山王病院

稲垣 豊¹、東山礼一¹、岡崎 勲^{1, 2}

臓器線維症は、コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスが組織に過剰に沈着し、臓器の機能不全をきたした病態である。近年の研究により、線維化組織に生着した骨髄由来の筋線維芽細胞がコラーゲンを産生することで線維化進展に関与する可能性が報告された。しかしながらその一方で、骨髄由来細胞の障害臓器への遊走は組織修復や線維化の改善に寄与するという報告もあって、未だ一定した見解は得られていない。

肝線維症の終末像である肝硬変症は、これまで進行性かつ不可逆性と考えられてきたが、近年ではその原因を除去することで正常肝に近い状態にまで改善することが臨床的にも実証された。演者らは最近、四塩化炭素投与による実験的肝線維症からの回復過程において、自家骨髄由来の幹細胞・前駆細胞が一過性にMMP-13を発現し、MMP-9発現を誘導して肝線維化の改善に寄与することを明らかにした (*Hepatology*, 2007)。また、G-CSF投与あるいはHGFの強制発現は自家骨髄細胞の肝内移行とMMP-9発現を促進させたことから、肝線維症治療に有用な手段となり得る可能性を示した。

線維化組織で増加した細胞外マトリックスの主要成分であるI型コラーゲンの $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子 (COL1A2)の上流には、強力な組織特異的エンハンサーが存在する。このCOL1A2エンハンサー・プロモーターとEGFPもしくはルシフェラーゼ遺伝子を連結した癒合遺伝子を保持したトランスジェニックマウスを作製した。このマウスに四塩化炭素を反復投与して肝線維症を作製すると、線維束に存在する間葉系細胞においてEGFPの強い発現が観察された。しかしながら、同マウスの骨髄で置換したレシピエントマウスに同様の肝線維症を誘導しても、肝組織中のEGFP発現やルシフェラーゼ活性の上昇が認められなかったことから、骨髄由来細胞のコラーゲン産生による直接的な肝線維化への関与は否定的であった。

Interrelation between Bone Marrow and Peripheral Organs in the Progression and Regression of Organ Fibrosis

¹ Liver Fibrosis Research Unit, Tokai University School of Medicine, Kanagawa, Japan; and ² Sanno Hospital, International University of Health and Welfare, Tokyo, Japan.

Yutaka Inagaki ¹, Reiichi Higashiyama ¹, and Isao Okazaki ^{1, 2}

Organ fibrosis is caused commonly by an excessive deposition of collagen and other components of extracellular matrix in various organs including liver, lung, kidney and skin. Several recent studies have shown that bone marrow (BM)-derived cells express collagen and accelerate organ fibrosis. On the other hand, others have reported that BM-derived cells contribute to wound healing and the resolution of organ fibrosis. Thus, contribution of BM-derived cells to the progression and regression of organ fibrosis has been a matter of controversy.

Liver fibrosis is usually progressive, but it can be occasionally reversed if the causative agents are removed or patients are treated effectively. We have recently demonstrated contribution of autologous BM cells to the spontaneous regression of liver fibrosis (*Hepatology*, 2007). Repeated carbon tetrachloride injections after hematopoietic reconstitution with enhanced green fluorescent protein (EGFP)-expressing BM cells caused migration of a large number of EGFP+ cells into fibrotic liver tissue. Some of them, as well as EGFP-negative liver resident cells, produced matrix metalloproteinase (MMP)-13 and MMP-9. While MMP-13 was transiently expressed in stem/progenitor cells clustering in the periportal areas, MMP-9 expression was detected over the resolution process in several different kinds of cells located in the portal areas and along the fibrous septa. Therapeutic recruitment of BM cells by granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) treatment significantly enhanced migration of BM-derived cells into fibrotic liver and accelerated the regression of liver fibrosis. Furthermore, experiments using transgenic mice overexpressing hepatocyte growth factor (HGF) indicated that G-CSF and HGF synergistically increased MMP-9 expression along the fibrous septa, indicating their potential clinical application.

Transgenic mice have been established in our laboratory that harbor the tissue-specific $\alpha 2(I)$ collagen gene enhancer/promoter sequence linked to either EGFP or firefly luciferase gene. By using the mice as BM donors, work is now in progress to determine whether BM-derived cells migrating into liver tissue produce collagen and contribute to the progression of liver fibrosis.

S08 「DC-STAMPは破骨細胞及びマクロファージ巨細胞の細胞融合に必須である」

慶應義塾大学医学部 発生・分化生物学/整形外科学/運動器機能再建・再生学

宮本健史

破骨細胞は骨を吸収する生体唯一の細胞であり、骨における石灰化や、結合組織、細胞外マトリックス蛋白のリモデリングの他、骨粗鬆症や腫瘍の溶骨性転移、関節リウマチなど様々な疾患においても中心的な働きをしている。一方、異物巨細胞に代表されるマクロファージ巨細胞は、異物反応に反応して形成され、マトリックス蛋白や局所の組織破壊を引き起こすと考えられている。破骨細胞とマクロファージ巨細胞はどちらも造血幹細胞由来の細胞であり、細胞融合することによって多核細胞を形成することが知られている。様々な分子が細胞融合に関与していることが報告されてきたが、必須である分子や、なぜ多核化するのか、ということについては解明されていなかった。我々はDNAのサブトラクション法により、7回膜貫通型受容体蛋白であるdendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP)を同定し、DC-STAMP欠損マウスを作製したところ、破骨細胞の細胞融合が完全に抑制されていることを見出した。DC-STAMP欠損マウス由来の破骨細胞は、マーカー分子の発現や細胞骨格の形成には異常がなく、またDC-STAMPの発現を戻すことによって細胞融合も回復することから、DC-STAMPは細胞融合に特異的に作用することが示唆された。破骨細胞の多核化が抑制されることによって骨吸収能が低下し、その結果DC-STAMP欠損マウスでは骨量が増加していた。同様に、異物巨細胞の細胞融合もDC-STAMP欠損マウスでは完全に抑制されていたことから、我々は破骨細胞とマクロファージ巨細胞に共通の細胞融合因子を同定した。しかし、破骨細胞とマクロファージ巨細胞ではDC-STAMPの発現制御機構が全く異なっていることを見出している。本会ではDC-STAMPの機能や役割、そしてその発現制御機構について考察したい。

「DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and macrophage giant cells」

Department of Cell Differentiation, Department of Orthopedic Surgery, Department of Musculoskeletal Reconstruction and Regeneration Surgery, Keio University School of Medicine

Takeshi Miyamoto

Osteoclasts are bone resorbing cells that play a pivotal role in remodeling of mineralization, connective tissues and extracellular matrix proteins in bone. Since bone volume is tightly regulated by an interaction between osteoclasts and osteoblasts, imbalance of the activity of these cells causes bone disease such as osteoporosis. Osteoclasts are also implicated in the bone destructive diseases such as bone metastasis and rheumatoid arthritis, and that regulation of osteoclast activity is crucial to control these diseases. On the other hand, macrophage giant cells such as foreign body giant cells are formed in response to foreign body reaction, and are considered to play a role in matrix and tissue destruction under inflammatory condition.

Osteoclasts and macrophage giant cells are both derived from hematopoietic stem cells and form large multinuclear giant cells by cell-cell fusion of mononuclear osteoclasts or macrophages, respectively. Several cell fusion mediating factors have been reported in osteoclasts and macrophage giant cells, however, what molecules are required for cell-cell fusion, and the role of multinucleation remain uncharacterized. Here we identify the dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP), a putative seven transmembrane protein, by a DNA subtraction screen between multinuclear osteoclasts and mononuclear macrophages.

To analyze the role of DC-STAMP *in vivo*, we generated DC-STAMP deficient mice. We interestingly found that cell-cell fusion of osteoclasts was completely abrogated in DC-STAMP deficient, despite normal expression of osteoclast markers and cytoskeletal structure. The cell-cell fusion in osteoclasts was effectively rescued by forced expression of DC-STAMP in DC-STAMP null cells by an infection of retrovirus expressing DC-STAMP. Thus DC-STAMP specifically regulates cell-cell fusion in osteoclasts. Defects in osteoclast multinucleation reduce bone-resorbing activity, and that DC-STAMP deficient mice show increased bone mass. Thus DC-STAMP regulates physiological bone volume by regulating osteoclast function through cell-cell fusion. Similar to osteoclasts, foreign body giant cell formation by macrophage cell fusion was also completely abrogated in DC-STAMP deficient mice. We have thus identified an essential regulator of osteoclast and macrophage cell fusion, DC-STAMP. Interestingly, regulation of DC-STAMP expression in osteoclasts and macrophage giant cells is different. This may explain a physiological role of DC-STAMP in osteoclasts whereas an inflammatory role of DC-STAMP in macrophage giant cells. I will discuss about the role of DC-STAMP and the regulation of DC-STAMP expression in osteoclasts and macrophage giant cells.

シンポジウム 3

細胞運動・接着・転移とプロテアーゼ

Symposium 3

**Cell migration, adhesion, invasion and
proteinase**

S09 MT1-MMPによるEMMPRINのsheddingを介した 間質からのMMP発現調節機構

東京大学医科学研究所・腫瘍細胞社会学分野

越川直彦、江川長靖、清木元治

膜型マトリックス・メタロプロテアーゼ1 (MT1-MMP) は癌細胞の浸潤・転移の際の組織破壊のみならず、癌細胞と細胞外環境のインターフェースとして働くことで、細胞外からもたらされる細胞増殖、生死、運動等の様々なシグナルの伝達の制御に関与する。そのため、癌細胞表層のMT1-MMPを含む複合体分子の網羅的な検索や、それら複合体分子のプロテオリシスが癌細胞に及ぼす影響について系統的に調べることは、MT1-MMPによる癌細胞の悪性形質の発現のメカニズムを解明するための重要な手がかりとなりうる。本発表では、MT1-MMPと細胞表層で複合体を形成する分子の検索の過程に見出したExtracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) に対するMT1-MMPのsheddingについての詳細な検討とその役割について報告する。EMMPRINは2つのイムノグロブリン (Ig) 様ドメインをもつ糖タンパク質であり、MMPの天然の誘導因子として見出された。これまでにEMMPRINはメタロプロテアーゼによるsheddingを受けることが報告されているが、その詳細は未だ明らかとなっていない。そこで、私達は内在性にMT1-MMPを発現するヒト上皮癌A431細胞にEMMPRINを強制発現させたところ、新規の22k-DaのEMMPRIN断片がMT1-MMP発現量に依存して培養上清中に切り出されることを見出した。次に、EMMPRINのMT1-MMPによるshedding部位を同定するため、この22-kDa断片をA431細胞の培養上清から精製し、質量分析装置を用いてそのC末端を解析した。その結果、EMMPRINは第1、第2 Ig様ドメインの間で切断されていた。興味深いことに、22-kDa断片のMMP誘導活性を測定したところ、この断片は正常線維芽細胞からの前駆体MMP 2の産生量を濃度依存的に亢進した。さらに、ヒトの悪性卵巣癌組織を用いた免疫組織化学的な解析では、MT1-MMPとEMMPRINは共に癌部での発現が見られた。以上、MT1-MMPは癌細胞の膜上のEMMPRINから機能ドメインを切り出すことで、周囲の間質細胞からの前駆体MMP 2の産生を亢進し、前駆体MMP2を癌細胞上で活性化することで、癌浸潤・転移の際の組織破壊に重要な役割を担っている可能性をもつ。

Membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is a potent inducer for MMP production in stroma through EMMPRIN shedding

Division of Cancer Cell Research, Institute of Medical Science, University of Tokyo

Naohiko Koshikawa, Nagayasu Egawa and Motoharu Seiki

Membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is a powerful modulator of the pericellular environment through its proteolytic activity. To date, it has been reported that MT1-MMP functionally cleaves extracellular matrix (ECM) proteins and cell surface molecules and their pericellular proteolysis plays important roles in cell migration, invasion and proliferation.

We found previously that Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) forms complex with MT1-MMP at cell surface and it is a potential substrate for MT1-MMP. EMMPRIN is a multifunctional glycoprotein that has two Ig-like domains in its extracellular portion and functions in cell adhesion as an inducer of MMP expression in surrounding cells. Although the cleavage of EMMPRIN was reportedly because of cleavage by metalloproteinases, the responsible proteases, cleavage sites, and its role are not determined yet.

In this study, we have further characterized EMMPRIN shedding by MT1-MMP in human carcinoma A431 cells and have found that MT1-MMP sheds EMMPRIN to a novel 22-kDa EMMPRIN fragment at cell surface. The 22-kDa fragment was purified, and the C-terminal amino acid was determined. The cleavage site was located in the linker region connecting the two Ig-like domains of EMMPRIN. Moreover since the N-terminal Ig-like domain was reported to be important for the MMP inducing activity of EMMPRIN, the 22-kDa fragment retained the ability to augment MMP2 production in human fibroblasts. Furthermore immunohistochemical analysis using human carcinoma specimens demonstrated that co-expression of EMMPRIN and MT1-MMP was detectable in several types of ovarian carcinomas.

Take together, these results strongly suggest that MT1-MMP is not only a natural activator of proMMP2 but also is a potent inducer for MMP2 production in stroma adjacent to cancer tissues through EMMPRIN shedding in cancer invasion and metastasis.

S10 接着分子CD44切断のマトリクス内細胞運動における意義

慶應義塾大学医学部先端医科学研究所 遺伝子制御研究部門

佐谷 秀行、永野 修

CD44はヒアルロン酸をリガンドとする接着分子で、細胞と細胞外マトリクスとの接着や細胞運動、マトリクスリモデリング、さらには癌細胞の浸潤・転移能に関与することが多くの研究によって示されている。私達はCD44細胞外ドメインが、さまざまな刺激やシグナルによって膜型メタロプロテアーゼ (MMP) によって切断を受けること、そして細胞外ドメインの切断に続いて、細胞膜貫通ドメインにおいてもCD44は連続的に切断を受け、その結果産生された切断片が核内に移行することを明らかにした。この切断は γ -セクレターゼを介して行われ、切断によって細胞膜から遊離したCD44の細胞内ドメイン (CD44ICD) は核内に移行することにより内因性のCD44自身の転写を上昇させることを見出し、CD44の切断が新たなCD44分子の合成を促進することが示唆され、切断がCD44自身のターンオーバーを亢進させる機構として働いていると考えられる。

次に、CD44連続的切断のトリガーである細胞外ドメイン切断に関わる分子を解析した結果、ADAM型MMP、特にADAM10とADAM17の活性化によって生じることを見出した。そして更に、ADAM10の活性化は細胞外カルシウムの流入とカルモジュリンを介した経路で、ADAM17の活性化はPKC、Racを介した経路によって、それぞれ互いに独立したシグナル経路で行われていることを明らかにした。さらに、これらのADAM10とADAM17の発現を低下させることによって、細胞のヒアルロン酸マトリクスへの付着、ならびにマトリクス内への浸潤が有意に抑制されることが分かった。また、特にADAM17のsiRNAを行ったU251MG細胞では、細胞内ヒアルロン酸およびCD44が共に蓄積し、細胞周囲のマトリクスが著明に増加することを新たに見出し、ADAM17を介したCD44の切断は、CD44自身のターンオーバーだけでなくヒアルロン酸の細胞内代謝を回転させるためにも働き、マトリクスリモデリングを促進することによりマトリクス内での細胞運動能を高めていることが分かった。

Biological significance of CD44 ectodomain cleavage in cell migration in extracellular matrix

Division of Gene Regulation, Institute for Advanced Medical Research
Keio University School of Medicine

Hideyuki Saya and Osamu Nagano

There are multiple steps in the metastasis of cancer cells. Tumor-cells must first be dissociated from the tumor mass and invade into the surrounding extracellular matrix (ECM). In these processes, cell surface adhesion molecules play an important role in the interaction between the cells and their microenvironments. CD44 is an adhesion molecule that interacts with hyaluronic acid (HA) and implicated in a wide variety of physiological and pathological processes. Recently, the proteolytic cleavage of CD44 has been emerging as key regulatory events for the CD44 dependent cell-matrix interaction and signaling pathway. CD44 undergoes sequential proteolytic cleavage in the ectodomain and intramembranous domain, resulting in the release of a CD44 intracellular domain (ICD) fragment. The ectodomain cleavage of CD44 is triggered by multiple stimulations and contributes to the regulation of cell attachment to and migration on HA matrix. The ectodomain cleavage subsequently induces the intramembranous cleavage which is mediated by presenilin (PS)-dependent γ -secretase. The intramembranous cleavage generates CD44ICD, which acts as a signal transduction molecule, where it translocates to the nucleus and activates transcription.

The ectodomain cleavage of CD44 is triggered by extracellular Ca^{2+} influx or the activation of protein kinase C (PKC) and is mediated by two different ADAM family metalloproteases, ADAM10 or ADAM17, respectively. Depletion of those ADAM proteases by RNAi effectively blocks cancer cells to invade in HA matrix. Especially, downregulation of ADAM17 induces the accumulation of intracellular HA and CD44 as well as the increase in pericellular HA matrix. Furthermore, we found that phosphorylation of moesin by PKC is a crucial step for triggering the endocytosis of CD44-HA complex, and following CD44 ectodomain cleavage. In the absence of ADAM17-mediated CD44 cleavage, intracellular CD44-HA is stabilized and accumulated in the Rab11-positive recycling endosomal compartments. These findings suggest that PKC/ADAM17-mediated CD44 ectodomain cleavage plays an important role in engulfment and turnover of HA, facilitating ECM remodeling which activates cancer cell motility in the HA-rich ECM.

S11 活性型マトリライシンと癌細胞表面コレステロール硫酸との相互作用:とくに癌細胞表面のタンパク質分解および癌転移能に及ぼす効果について

横浜市大・木原生研・細胞生物

東 昌市、山本 和博、久田 直輝、大枝 民和、宮崎 香

マトリライシン(MMP-7, MAT)は、種々の大腸癌細胞株で広く発現しているマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)であり、このMMPの発現量は大腸癌の悪性度とも高い相関を示す。私達は、これまでに、ヒト大腸癌細胞を活性型マトリライシン(MMP-7, MAT)で処理すると、細胞凝集が誘導されると共に、その肝転移能が顕著に上昇することを明らかにした。一方、活性型MATは細胞表面に速やかに結合するのに対し、他の活性型MMPsあるいはMAT前駆体は細胞に結合しないことから、活性型MATに特異的に結合する分子が癌細胞表面に存在することを予想した(Oncogene 22, pp. 8662-8670, 2003)。近年、この分子の同定を試みたところ、コレステロール硫酸(CS)が癌細胞表面における主要なMAT結合分子であることを明らかにした(J. Biol. Chem. 281, pp. 9170-9180, 2006)。事実、細胞表面のCSを β -シクロデキストリンを用いて枯渇させると、MATが細胞に結合しなくなると共に、MATによる細胞表面タンパク質の分解、およびMATが誘導する細胞凝集が顕著に抑制された。したがって、細胞表面のCSに結合したMATは近傍の細胞膜タンパク質を切断しつつ、細胞凝集を誘導するのではないかと考えている。ごく最近、細胞外マトリックスの構成成分であるフィブロネクチンやラミニン-5のMATによる分解がCSの存在下、著しく促進されるのに対し、合成ペプチド基質の水解反応はCSによって部分的に阻害されることが判明し、CSとの結合に伴ってMATの基質特異性が変化することが示唆された。本シンポジウムでは、CSとの相互作用に伴うMAT基質特異性変化の分子メカニズム、およびこの活性変化が細胞表面タンパク質およびマトリックスタンパク質の分解に及ぼす効果について議論したい。

INTERACTION BETWEEN ACTIVE MATRILYSIN AND CELL SURFACE CHOLESTEROL SULFATE: ITS IMPACT ON PERICELLULAR PROTEOLYSIS AND CANCER METASTASIS.

Div. of Cell Biology, Kihara Inst. Biol. Res.,
Yokohama City Univ., Yokohama, Japan.

Shouichi Higashi, Kazuhiro Yamamoto, Naoki Hisada,
Miwa Oeda, and Kaoru Miyazaki

Regulation of cell surface molecules by matrix metalloproteinase (MMPs), as well as MMPs-catalyzed degradation of extracellular matrix, is important for tumor invasion and metastasis. Our previous study (Oncogene 22, pp. 8662-8670, 2003) demonstrated that active matrilysin, but neither pro-matrilysin nor other active MMPs, efficiently binds to the surface of colon cancer cells and induces notable cell aggregation due to processing of the cell membrane proteins. Furthermore, these aggregated cells showed dramatically enhanced metastatic potential. To elucidate the mechanism of matrilysin-induced cell aggregation, we tried to identify the matrilysin-binding substance on cell surface. We demonstrated that cholesterol sulfate (CS) on cell surface is a major matrilysin-binding substance (J. Biol. Chem. 281 pp. 9170-9180, 2006). We found that human active matrilysin bound to cell membrane and CS incorporated into liposome with similar affinities ($K_d = ca. 20 \text{ nM}$). Treatment of colon cancer cells with β -cyclodextrin significantly reduced not only matrilysin binding to the cell surface but also matrilysin-dependent proteolysis and cell aggregation. Interestingly, replenishment of CS, but not cholesterol, neutralized the effects of β -cyclodextrin. Taken together, it is likely that the binding of matrilysin to CS facilitates the matrilysin-catalyzed modulation of cell surface proteins, thus inducing the cancer cell aggregation.

More recently, we also found that matrilysin-catalyzed degradations of fibronectin and laminin-5, components of extracellular matrix, were accelerated dramatically in the presence of CS. In contrast, CS reduced the rate of matrilysin-catalyzed hydrolysis of a synthetic peptidyl substrate. These results suggest that substrate-preference of matrilysin is altered upon CS binding. To determine the site of matrilysin essential for the interaction with CS, we constructed chimeric MMPs consisting of various parts of matrilysin and those of gelatinase A. Structural and functional analyses of these chimeric enzymes showed that both the NH_2 - and COOH -terminal parts of active matrilysin are essential for the CS binding.

In this symposium, we will discuss the mechanism of CS-mediated alteration of the activity of matrilysin and its impact on pericellular proteolysis and cancer metastasis.

S12 炎症細胞-血管内皮細胞接着におけるADAM28の役割

慶應義塾大学医学部 病理学教室

下田将之、橋本学爾、望月早月、池田栄二、岡田保典

ADAM (a disintegrin and metalloproteinase)分子は、メタロプロテアーゼドメインを持つMMP (matrix metalloproteinase)近縁ファミリーであるが、構造上ディスインテグリンドメインを有する点でMMP分子と大きく異なる。ADAMは種々のインテグリンと結合すると報告されているが、ADAMのプロテアーゼ活性を介さない生物学的機能は十分に解明されていない。本研究では、分泌型ADAM28 (ADAM28s)結合タンパク質を酵母two-hybrid法により網羅的に検索し、候補分子としてP-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)を同定した。また、PSGL-1発現細胞を用いて、ADAM28sとPSGL-1の細胞表面での結合を免疫沈降法と免疫二重染色法で証明した。炎症細胞に発現するPSGL-1は、血管内皮細胞上のP-selectinと相互作用し、ローリング・接着に関わることが知られている。興味深いことに、PSGL-1発現HL-60細胞の固相化P-selectinおよび血管内皮細胞への接着は、ADAM28sの存在で特異的に亢進し、同様な接着・浸潤促進作用は炎症性マウスモデルにおいても認められた。さらに、ヒト肺炎組織ではADAM28とPSGL-1が血管や肺胞腔内の炎症細胞膜上に共存するとともに、炎症部血管内皮細胞にADAM28の高発現を認めた。一方、培養血管内皮細胞ではTNF- α 刺激によりprotein kinase Cを介したADAM28sの発現誘導が認められた。以上のデータから、ADAM28sはPSGL-1との結合により、P-selectinを介した炎症細胞の血管内皮細胞へのローリング・接着・浸潤を亢進するとともに、炎症部血管内皮細胞で発現されたADAM28sが局所での炎症細胞浸潤を制御している可能性が考えられた。

Role of ADAM28 in leukocyte adhesion to endothelial cells at inflammatory sites

Department of Pathology, School of Medicine, Keio University

Masayuki Shimoda, Gakuji Hashimoto, Satsuki Mochizuki, Eiji Ikeda and Yasunori Okada

ADAMs (a disintegrin and metalloproteinases) are a recently discovered gene family of membrane-anchored and secreted proteins and related to matrix metalloproteinases (MMPs). Accumulated lines of evidence have shown that like MMPs, one of the established functions of ADAMs is the membrane protein shedding through its proteolytic activity. ADAMs are unique in that they possess the disintegrin-like domain and some ADAMs bind to integrins. However, little information is available for the non-proteolytic biological functions except for the integrin binding. ADAM28 was originally reported to be expressed by human peripheral blood lymphocytes in two alternative forms, i.e. a prototype membrane-anchored form (ADAM28m) and a secreted form (ADAM28s). We have recently reported that both forms of ADAM28 are highly expressed by carcinoma cells in the human breast and lung carcinomas, and showed the role in the carcinoma cell proliferation through the digestion of insulin-like growth factor binding protein-3. ADAM28 is also known to interact with integrins $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$ and $\alpha 9\beta 1$ in an activation-dependent manner of the integrins, but the non-proteolytic biological functions of ADAM28 are not well determined. In the present study, we screened binding molecules to ADAM28s by the yeast two-hybrid system and identified P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1). Binding between the disintegrin-like domain of ADAM28s and the extracellular portion of PSGL-1 was determined by yeast two-hybrid assays, binding assays of the domain-specific recombinant ADAM28s species using PSGL-1 stable transfectants and leukocyte cell lines expressing native PSGL-1 (HL-60 cells and Jurkat cells), and co-immunolocalization and co-immunoprecipitation of the molecules in these cells. PSGL-1 is a major P-selectin ligand on leukocytes and mediates the tethering and rolling of leukocytes on the vascular endothelium. Interestingly, the interaction of ADAM28s with PSGL-1 enhanced the binding of HL-60 cells to immobilized P-selectin and the adhesion to P-selectin-expressing human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). The proteinase activity of ADAM28s was not required for the increased binding, since both proADAM28s and active ADAM28s exhibited a similar effect, which was not abrogated by treatment with a synthetic ADAM inhibitor. In addition, intravenous injection of ADAM28s-treated HL-60 cells increased their accumulation in the pulmonary microcirculation and alveolar spaces in a mouse model of endotoxin-induced inflammation. Furthermore, we found the co-localization of ADAM28 and PSGL-1 on neutrophils and monocytes (macrophages) selectively at the inflammatory lung tissues from the bronchopneumonia patients. Endothelial cells of blood vessels in the bronchopneumonia tissues, but not non-inflammatory lung tissues, expressed ADAM28, and tumor necrosis factor- α treatment of HUVECs induced the expression of ADAM28 through protein kinase C-dependent pathway. These data suggest a new pathway by which ADAM28s plays a role in the promotion of leukocyte rolling adhesion to blood vessel endothelial cells and the subsequent migration into tissues spaces under inflammatory conditions.

一般演題(口演)

Oral Presentation

A01 テネascinCおよびXII型コラーゲン遺伝子発現に及ぼす張力負荷と細胞環境の影響

¹東京農工大学 農学部 硬蛋白質利用研究施設
²資生堂 ライフサイエンス研究センター

杉本 真美¹ 土屋 博之¹ 小倉 有紀² 天野 聡²
新井 浩司¹ 新井 克彦¹ 西山 敏夫¹

【目的】線維芽細胞において力学的負荷にตอบสนองして発現が上昇する遺伝子として、現在テネascin-C (TN-C) とXII型コラーゲン (COL12) が報告されている。本研究では、ヒト線維芽細胞を用い、周期的張力負荷培養と静的張力負荷培養を、通常の単層培養系と真皮環境類似の収縮コラーゲンゲル内培養系で行い、二種類の張力のかけ方の違いと細胞環境による応答性の違いを検討した。

【方法】単層培養系：ヒト新生児包皮由来線維芽細胞をコラーゲンコートしたシリコン製チャンパーに播種し、24時間後に張力負荷培養を開始した。張力負荷は、20%の伸長率、10 cycles/minの周期的張力負荷培養と、20%の伸長率でチャンパーを伸長させたまま培養する静的張力負荷の二通りで行った。24時間培養後、細胞を回収してRNAの抽出を行い、リボヌクレアーゼプロテクションアッセイとリアルタイムPCR法により遺伝子発現の定量的解析を行った。

コラーゲンゲル内培養系：同細胞を用いてコラーゲンゲルを作製し、48時間培養した収縮コラーゲンゲルを特製の培養ゲル保持器具に装着し、単層培養系と同条件で二通りの張力負荷培養を開始した。24時間後、収縮コラーゲンゲルを回収してRNAの抽出を行い、同方法で遺伝子発現解析を行った。

【結果と考察】単層培養系では24時間の周期的張力負荷により、TN-Cの発現が上昇したが、COL12は変化しなかった。一方、静的張力負荷では両遺伝子ともに発現量に変化は見られなかった。収縮コラーゲンゲル内培養系では、どちらの張力負荷培養においても両遺伝子の発現量の変化は見られなかった。以上のことから、張力負荷の掛け方によってTN-CとCOL12の応答性が異なることが示された。さらに単層培養系と収縮コラーゲンゲル内培養系で応答性に差があり、張力負荷応答において三次元的なコラーゲン線維と細胞の相互作用も重要な要因であると考えられた。

Effect of tensile stress and cell environment on gene expression of tenascin-C and type XII collagen

Division of Matrix Biology, Scleroprotein Research Institute, Tokyo University of Agriculture and Technology

Mami Sugimoto, Hiroyuki Tsuchiya, Yuki Ogura, Satoshi Amano, Koji Arai, Katsuhiko Arai and Toshio Nishiyama

Mechanical forces play an important role in cellular activity and function. It has been reported that gene expression of two extracellular matrix proteins, tenascin-C (TN-C) and type XII collagen (COL12) were upregulated in response to tensile stress. In this study we investigated the difference of cell response between cyclic and static strain using different culture systems, collagen-coated monolayer culture and contracted collagen gel culture. Human fibroblasts from newborn foreskin were seeded on collagen-coated silicon dishes. After 24 h of cell attachment, the culture started stretching by cyclic or static strain for 24 h at 20 % stretch rate. To examine the effect in the contracted collagen gel we prepared a unique culture device for performing the stretched culture. The contracted collagen gels were equipped with the device and started stretching under the same strain condition. TN-C expression at the mRNA level was upregulated in response to cyclic strain in the monolayer culture, while COL12 expression was not affected. In the contracted collagen gel culture there was no change in both mRNA levels. Static strain also showed no change of both mRNA levels in both culture systems. These results suggest that different signal pathways regulate the gene expressions induced by cyclic and static strains. Moreover, the three-dimensional interaction between fibroblasts and collagen fibrils may be important in regulating cell response to tensile stress.

A02 IV型コラーゲンゲル上でのヒトメサンギウム細胞による細胞メッシュワーク形成のタイムラプス観察

¹工学院大学 工学部 応用化学科

²帝京平成大学 薬学部

今村 保忠¹ 渡邊 武¹ 梶村 大介¹ 林 利彦²

【目的】IV型コラーゲンは条件によりゲル化する。IV型コラーゲンゲル上でヒトメサンギウム細胞を培養すると、細胞同士が繋がったメッシュワーク様のネットワーク構造が形成される。本研究では細胞メッシュワーク形成過程を経時的に観察し形成メカニズムを解析する。

【方法】IV型コラーゲン標品は、ウシレンズカプセルから非酵素的に酢酸抽出したものをを用いた。1mM塩酸溶液を調製し、PBSにて中和させゲル化した。細胞懸濁液を重層し、ゲル上に付着した細胞を顕微鏡下で3-7日間培養し経時的に位相差像を記録し動画化した。

【結果・考察】ヒトメサンギウム細胞の運動は、IV型コラーゲンゲル上では非ゲルのIV型コラーゲン会合体コートあるいはI型コラーゲンゲル上などに比べると制限されていた。このことからヒトメサンギウム細胞の運動性は用いる培養基質およびIV型コラーゲンの物理的な性状により大きく変化することが明らかになった。2つの細胞間で互いに突起を伸ばし、直接の接触を形成しつつ移動した。最終的には細胞のメッシュワーク様のネットワーク構造が形成された。メッシュワーク様の細胞のネットワークは準安定な状態で、細胞間の突起は一部切断され消失する一方、ほぼ同一部位、あるいは他の部位で再形成された。細胞の突起が直接接触できる以上に離れた細胞との間に延伸された接続を形成する際には、両者の間でIV型コラーゲン基質を互いに引き合って引かれた方向へ突起を延ばす像が見られた。メッシュワーク形成には細胞同士の直接の接触の他に、細胞外マトリックスを媒介して行なう可能性が示された。

Time-lapse imaging of cellular meshwork formation by human mesangial cells on type IV collagen gel

Kogakuin University, Department of Applied Chemistry

Yasutada Imamura, Takeshi Watanabe

Daisuke Kajimura

Toshihiko Hayashi

[Introduction] Type IV collagen can take a gel form. When human mesangial cells are cultured on the type IV collagen gel, a meshwork of elongated cells is formed on the gel. We report the result from time-lapse observation of cellular meshwork formation by the cell and discuss the formation mechanism.

[Methods] Type IV collagen was prepared from bovine lens capsule by acetic acid extraction without using proteases. The gel was formed by neutralizing the collagen solution in 1mM HCl with PBS. Cells were cultured with microscope equipped with a stage top cell culture incubator and monitored by using phase contrast microscope and recorded for 3-7 days.

[Results&Discussion] Motility of mesangial cells on the type IV collagen gel was limited compared to those of cells on coated type IV collagen aggregates or type I collagen gel. The result demonstrates that motility of cells depends on physical property of type IV collagen aggregates. The cells on the Type IV collagen gel protruded processes between cells. Cellular network on the gel was in a quasi-steady state since the cells moved along the network and their division was observed at times. Their cell processes were partly disappeared and reformed at the almost same place. The cell seems to pull the collagen substrate between two cells and form cell processes along the strained substrate. This indicates a possibility that the cells utilize indirect connection mediated by the culture substrate as well as direct contacts between cells in a process of the network formation.

*A03 表皮基底膜の表皮の構造・分化に及ぼす影響の解析

¹株式会社 資生堂 ライフサイエンス研究センター
皮膚科学研究所

²東京農工大学 農学部 硬蛋白質利用研究施設

小倉 有紀¹ 松永 由紀子¹ 西山 敏夫² 天野 聡¹

【目的】表皮基底膜は、表皮と真皮を強く繋ぎとめるだけでなく、皮膚機能の維持にも重要な役割を果たしている。露光部皮膚では表皮基底膜が多重化、断裂などの損傷を受けている。この損傷は基底膜機能に影響し、皮膚老化を促進させる一因になると考えられている。我々はこれまで、基底膜成分を分解する酵素を阻害すると、基底膜構造形成が促進されることを見出してきた。そこで今回は、基底膜状態が表皮の構造・分化に及ぼす影響に関して解析した。

【方法と結果】基底膜および表皮の観察にはヒト線維芽細胞を含む収縮コラーゲンゲル上にヒト表皮ケラチノサイトを培養して作製した三次元培養皮膚モデルを用いた。本モデルでは、MMP-2、MMP-9、ウロキナーゼなどの基底膜分解に関与する酵素が産生され、基底膜の構造形成を阻害していた。そこで、MMP阻害剤（CGS27023A）を添加すると、基底膜構造が改善された。この基底膜改善皮膚モデルと改善前のモデルとの間で表皮状態を比較すると、基底膜構造の改善によって表皮の分化状態が良好となり、表皮顆粒層では保湿因子(NMF)の前駆タンパク質であるフィラグリンの発現もが良好となった。本皮膚モデル系では、プラスミン前駆タンパクであるプラスミノゲンが産生されないため、添加血清由来の少量しか存在しない。そこで、外部よりプラスミノゲンを添加するとMMP阻害剤存在下でも基底膜構造形成が見られず、表皮の極性・分化状態も乱れていた。しかし、プラスミンを阻害するトラネキサム酸を同時に添加すると、基底膜構造形成は回復し、表皮の分化状態も良好となり、表皮顆粒層でのフィラグリンの発現も回復した。

【考察と結論】以上の結果より、基底膜の状態は、表皮の構造・分化状態に影響することが示され、基底膜を良好に保つことは表皮の状態を良好に保つためにも重要であることが示唆された。

Disorganized epidermal basement membrane disorders polarity and differentiation in the epidermis

SHISEIDO Life Science Research Center

Yuki Ogura, Yukiko Matsunaga, Toshio Nishiyama,
Satoshi Amano

The basement membrane (BM), which is located at the dermal-epidermal junction, plays important roles not only in adhesion between the epidermis and dermis, but also in controlling skin functions. Disruption and reduplication of the BM have been reported in sun-exposed areas of skin. In this study, we examined whether such damage to the BM impairs polarity and differentiation in the epidermis.

We used a skin-equivalent model prepared by culturing epidermal keratinocytes on contracted collagen gels containing dermal fibroblasts. In this model, the BM is not formed since the synthesized BM components are degraded by MMPs or the urokinase(uPA)-plasmin system. The addition of a MMP inhibitor, CGS27023A, resulted in clear BM structure, and also improved epidermal organization. In addition, filaggrin, a precursor protein of natural moisturizing factors (NMF) in the stratum corneum, was stained more strongly than in the control model cultured without the inhibitor. The addition of plasminogen increased the enzymatic activity of plasmin, which was activated by uPA, and subsequently damaged the BM even in the presence of CGS27023A. The epidermis lost its polarity and showed abnormal differentiation with no staining of filaggrin. The addition of a plasmin inhibitor, tranexamic acid, improved the BM structure and restored the polarity and differentiation in the epidermis, as well as the filaggrin content.

These results suggest that disorganization of the BM impairs epidermal polarity and differentiation, and that maintaining the BM structure in a good condition is necessary to keep the epidermis healthy.

A04 三次元培養皮膚モデルの表皮構築ならびに基底膜構造形成におけるマトリックス分解酵素阻害剤の影響

¹東京農工大学 農学部 硬蛋白質利用研究施設

²北里大学大学院 医療系研究科 分子形態科学

伊藤 嘉奈子¹ 高野 寛¹ 安達 栄治郎² 西山 敏夫¹

【目的】培養人工皮膚は三次元立体培養の特性を活かし、皮膚の構造と機能を解析するバイオアッセイ系としての活用が期待できる。今までにこの系を用いて表皮基底膜の構造形成因子について報告してきた。これらの結果を基に、今回はマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)およびセリンプロテアーゼ阻害剤の両者の添加による基底膜形成ならびに表皮分化への影響を解析し、再現性の良い皮膚モデル系の作製を試みた。

【方法】ヒト線維芽細胞をコラーゲンゲル内で培養し、収縮コラーゲンゲルを作製し、ヒト表皮角化細胞を重層させ皮膚モデルとした。培養開始7日目にMMP阻害剤のCGS27023Aとセリンプロテアーゼ阻害剤のアプロチニンを追加し、その後7日間および21日間培養した(全培養期間14日間と28日間)。培養後、Zamboni固定液で固定し、パラフィン切片、凍結切片、電子顕微鏡試料を作製し、組織学的および微細形態的に解析した。

【結果と考察】組織学的解析から、培養14日目で基底表皮細胞、有棘細胞、顆粒細胞、角化細胞に分化していた。有棘細胞層から角化細胞にかけてフィラグリン、トランスグルタミナーゼが、表皮-真皮境界部には型コラーゲン、ラミニン5および型コラーゲンが局在していた。微細構造解析により、基底表皮細胞の基底面には幅30nmの基底板がほぼ全域にわたって観察された。透明板は幅50nm程度であったが、ヘミデスモソームに特徴的な基底細胞下電子密層は観察されなかった。基底板の直下には40-140nm径のコラーゲン細線維が観察されたが、係留細線維は確認できなかった。一方、培養28日目では、表皮角化細胞層が2層程度しかなく角層肥厚が著しいが、基底膜成分の染色は維持されていた。以上の結果から、基底膜成分の分解に関与するプロテアーゼの阻害により、表皮層の重層化、分化マーカーの発現、基底膜成分の沈着、微細構造形成が再現性よく観察された。

Effect of matrix metalloproteinase inhibitor and serine proteinase inhibitor on epidermal organization and basement membrane formation in skin-equivalent model

Division of Matrix Biology, Scleroprotein Research Institute, Tokyo University of Agriculture and Technology

kanako Ito, Kan Takano, Eijiro Adachi and Toshio Nishiyama

Three-dimensional organotypic cultures such as skin-equivalents (SEs) provide suitable models for investigating the structure and function of epidermal or dermal tissue. Analyses through SEs have revealed that matrix metalloproteinases (MMPs) and plasmin are involved in basement membrane (BM) formation. In this study we examined effects of inhibitors for MMPs and serine proteinase on the BM formation and the epidermal structure and differentiation in the SEs. The SEs were prepared by culturing human keratinocytes on contracted collagen gels containing human fibroblasts. After 7-day culture, MMP inhibitor (CGS27023A) and serine proteinase inhibitor (aprotinin) were added to the culture media. In 14-day culture, the epidermis was well organized with multilayered keratinocytes consisting of basal, spinous, granular, and cornified layers. The epidermal differentiation markers, filaggrin and transglutaminase, were expressed in the upper layer of the epidermis and the sharply defined depositions specific for type IV collagen, laminin 5 and type VII collagen were observed at the dermal-epidermal interface. Ultrastructurally, the extended and continuous lamina densa with approximately 30 nm thick was observed underneath the basal keratinocytes. The lamina lucida was approximately 50 nm thick, but the sub-basal dense plaque which is characteristic of hemidesmosomes was not observed. The collagen fibrils with 40-140 nm in diameter were observed directly under the lamina densa, while the anchoring fibrils were not clearly confirmed. These results suggest that the assembly of BM under the basal keratinocytes and the differentiation of epidermis are extensively promoted under the influence of inhibitors for MMPs and serine proteinases.

A05 *C. elegans*の器官形成における細胞移動を制御するMIG-17/ADAMTSの下流カスケード

¹理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター

久保田 幸彦¹ 大蔵 清貴¹ 長田 香代¹ 西脇 清一¹

線虫*C. elegans*の生殖巣の器官形成過程では、Distal Tip Cells (DTCs) と呼ばれるリーダー細胞が移動し、U字型の生殖巣形成をリードする。*mig-17*変異体ではDTCが蛇行・迷走し、U字型の生殖巣が形成されない。MIG-17蛋白質はADAMTS familyに属する分泌型メタロプロテアーゼであり、体壁筋細胞から分泌された後、移動中の生殖巣の基底膜に局在しDTCの移動方向を制御する。我々は*mig-17*変異体のDTC移動異常を抑圧するサプレッサー変異体の解析を進めている。サプレッサー遺伝子の一つ*fbl-1*は基底膜蛋白質fibulin-1のホモログをコードする。線虫にはFBL-1CとFBL-1Dの2種類のスプライスアイソフォームが存在するが、サプレッサー変異はCアイソフォーム特異的な第三番目のEGF様モチーフ内のアミノ酸置換であった。遺伝学的解析から*fbl-1*変異による*mig-17*の抑圧はNID-1/nidogen依存的事であることが分かった。

本研究において二つめのサプレッサー遺伝子をクローニングしたところ、基底膜type IV collagen・2鎖をコードする*let-2*遺伝子であり、サプレッサー変異ではtype IV collagen・2分子のC末端に存在するNC1ドメイン内およびその直前にアミノ酸置換が見つかった。興味深いことに*let-2*による*mig-17*変異の抑圧は*nid-1*非依存的事であった。以上の結果から、MIG-17による細胞移動調節経路において、NID-1はFBL-1の下流およびLET-2の上流で働いていると考えられる。哺乳類のfibulin-1Cおよびtype IV collagenがnidogenに特異的に結合するin vitroの知見を考え合わせMIG-17、FBL-1、LET-2およびNID-1によるDTC移動制御について考察したい。

Molecular cascade downstream of MIG-17/ADAMTS controlling cell migration in *C. elegans*

RIKEN Center for Developmental Biology (CDB),
Kobe, Japan

Yukihiko Kubota, Molecular cascade downstream of MIG-17/ADAMTS controlling cell migration in *C. elegans*

During development of the *C. elegans* gonad, the gonadal leader cells called distal tip cells (DTCs) migrate, and lead morphogenesis of the U-shaped gonad. In this process, appropriate interaction between the basement membrane of the gonad and that of the body wall is required. The ADAMTS family metalloprotease, MIG-17, localized to the gonadal basement membrane controls directional migration of DTCs. To understand the MIG-17-mediated mechanism that controls DTC migration, we have isolated many suppressor mutations that can bypass the requirement of MIG-17 activity in DTC migration. We previously reported that specific amino acid substitutions in the third EGF-like motif of fibulin-1C (FBL-1C) can suppress *mig-17* defects and that this suppression depends on nidogen (NID-1). In this study, we cloned a second suppressor gene *let-2*, which encodes an alpha 2 chain of the type IV collagen. These suppressor *let-2* mutations occurred at or near the C-terminal NC1 domain. Interestingly, unlike *fbl-1*, the suppression by *let-2* mutations does not depend on NID-1. In mammals, nidogen is known to specifically bind to fibulin-1C as well as type IV collagen in vitro. Based on our findings in genetic interactions together with in vitro observations, we propose a molecular cascade controlling DTC migration in the gonadal basement membrane: MIG-17-dependent proteolysis activates FBL-1/fibulin-1, which in turn acts on LET-1/type IV collagen through NID-1/nidogen and controls directional migration of DTCs.

A06 ラミニン α 2鎖LG4-5モジュールにおけるヘパリンおよび α -ジストログリカン結合活性配列の同定

¹東京薬科大学 薬学部 病態生化学研究室

²Molecular Biology Section, Craniofacial Developmental Biology and Regeneration Branch, NIDCR, National Institutes of Health

漆畑 俊哉¹ 鈴木 喜晴² 保住 健太郎² 吉川 大和¹ 山田 吉彦² 野水 基義¹

基底膜を構成するラミニンは α 、 β 、 γ 鎖から成り、中でも α 鎖は5種類 (α 1 ~ α 5) が同定され、 α 鎖のC末端にはLG1-5から成る5つのLGモジュールが存在している。 α 2鎖Gドメインは細胞膜受容体の α -ジストログリカン (α -DG) や、ヘパリン硫酸プロテオグリカンであるシンデカンと相互作用することが知られており、特に α -DGとの相互作用は筋ジストロフィーの発症機序において非常に重要である。本研究ではこれらの相互作用に注目し、ペプチドスクリーニングにより α 2鎖LG4-5モジュールにおけるヘパリンおよび α -DG結合活性配列の同定を行った。

まず、 α 2鎖LG4-5の組換えタンパク (rec- α 2LG4-5) とそのアミノ酸配列を網羅した42種類のペプチドを用いて、rec- α 2LG4-5へのヘパリン結合阻害アッセイを行った結果、A2G78 (GLLFYMARINHA) がこの結合を阻害した。この阻害効果における最小活性中心配列はA2G78C-3

(GLLFYMARI) であった。一方、ELISAによるヘパリン結合アッセイにおいてもA2G78とA2G78C-3はヘパリン結合活性を示し、A2G78配列延長ペプチドであるA2G7879

(GLLFYMARINHADFATVQLR) はより強いヘパリン結合活性を示した。これらの結果より、A2G7879部位が α 2鎖LG4-5のヘパリン結合部位として重要であることが示された。

次にA2G78とA2G7879を用いて α -DG結合活性をELISAによって調べた結果、共に α -DG結合活性を示し、A2G7879がより強い結合活性を示した。またA2G7879配列内のアルギニン残基 (Arg2803) は、 α 2鎖と α -DGとの結合に重要であることが変異導入試験により報告されており、我々の行ったスクリーニング結果と一致することが判った。

今回我々は、 α -DG結合部位として機能するペプチドであるA2G7879を同定することができた。また、A2G7879は α -DGの生物学的機能や筋ジストロフィーの病態メカニズムの解明、及びそれらに基づく組織工学や薬学分野への応用に大きな寄与をもたらすものと期待される。

Identification of the Sequence with a Heparin and α -Dystroglycan Binding Activity in the Laminin α 2 Chain LG4-5 Module

Laboratory of Clinical Biochemistry, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science

Shunsuke Urushibata, Nobuharu Suzuki, Kentaro Hozumi, Yamato Kikkawa, Yoshihiko Yamada, and Motoyoshi Nomizu

Laminins, a major component of the basement membrane, are multifunctional glycoproteins. So far, five α chains have been identified, and specifically laminin α 2 chain LG4-5 module plays a critical role for syndecan, heparin and α -dystroglycan (α -DG) binding. Especially, it is known that the mutation of interaction with α -DG triggers muscular dystrophy. In this study, we focused on these interactions of laminin α 2 chain with α -DG.

First, we screened the inhibitory effect of the peptides on the heparin binding of rec- α 2LG4-5 using the peptides covered entire α 2 chain LG4-5 module. As a result, the A2G78 peptide (GLLFYMARINHA, mouse laminin α 2 chain: 2796-2807) inhibited heparin binding. Then, we evaluated the inhibitory effect of A2G78 truncated peptides on heparin binding of rec- α 2LG4-5, and we found that A2G78C-3 (GLLFYMARI) is the minimal critical sequence for heparin binding activity. Furthermore, we designed several A2G78 extended peptides, and identified that A2G7879 (GLLFYMARINHADFATVQLR, mouse laminin α 2 chain: 2796-2815) binds to heparin more strongly. These results showed that A2G7879 regions play a prominent role as heparin binding site in laminin α 2 chain LG4-5 module.

Next, we examined α -DG binding activity of A2G78 and A2G7879 with ELISA. And A2G7879 significantly showed α -DG binding activity which stronger than A2G78. These indicated that A2G7879 region is a critical position which laminin α 2 chain LG4-5 module binds to α -DG.

Muscular dystrophy doesn't still be elucidated very well. An α -DG binding peptide identified by our study is useful in elucidating the mechanisms of muscular dystrophy and laminin-related biological events.

A07 ラミニン α 1のリコンビナントLG4におけるシンデカン依存細胞接着とインテグリン α 2 β 1依存細胞伸展

¹National Institute of Health, NIDCR, Craniofacial Development Biology and Regeneration Branch

²東京薬科大学 薬学部 生態生化学教室

保住 健太郎¹ 鈴木 喜晴¹ Peter K. Nielsen¹
野水 基義² 山田 吉彦¹

ラミニンは基底膜の主要成分として同定された糖タンパク質で α 、 β 、 γ 鎖のヘテロトライマーから成り、15のアイソフォームが報告されている。現在までに5種類の α 鎖が同定され、LG1から5で呼ばれるC末端の球状ドメインには様々な生化学的活性があり、ラミニンの機能において重要な役割を担っていると考えられている。以前の研究で我々はペプチドスクリーニングによりヘパリン/シンデカン結合ペプチドAG73とインテグリン α 2 β 1結合ペプチドEF-1を α 1鎖LG4から同定した。しかし、二つの異なるリガンドに対する結合活性を持つと考えられるLG4の機能、及びラミニン1(α 1 β 1 γ 1)中におけるLG4の役割はこれまで研究されて来なかった。我々はAG73サイト、EF-1サイトに変異を導入したラミニン α 1LG4リコンビナントタンパク質を作成しLG4中におけるこれらのサイトの機能とラミニン1中におけるLG4の機能の検討を行った。LG4とヘパリン硫酸含有レセプターであるシンデカン1-4またはグリピカン1との相互作用はシンデカン特異的で、AG73サイトへの変異導入により失われた。また、繊維芽細胞のLG4への接着能も同様にAG73変異導入により失われるが、EF-1サイトへの変異導入は細胞接着能に影響を及ぼさなかった。これらのことからLG4への細胞接着はAG73サイトを通してシンデカン特異的に誘導されることが推測された。一方、細胞伸展はEF-1サイトへの変異導入により失われ、LG4上での細胞伸展は抗インテグリン α 2または β 1抗体によって阻害された。また、ラミニン1上の細胞伸展は抗インテグリン β 1抗体でのみ阻害された。以上の結果からLG4においてAG73サイトは細胞接着に、EF-1サイトはインテグリン α 2 β 1経由の細胞伸展に重要であることが判った。また、これらの機能はラミニン1と異なっており、ラミニン1から酵素消化等により遊離したLG4を含む α 鎖ドメイン分画が形成され、異なる機能を果たしていることが考えられる。

Laminin α 1 chain LG4 module promotes cell adhesion through syndecans and cell spreading through integrin α 2 β 1 distinct from laminin-1

National Institute of Health, NIDCR, Craniofacial Development Biology and Regeneration Branch

Kentaro Hozumi, Nobuharu Suzuki, Peter K. Nielsen, Motoyoshi Nomizu, and Yoshihiko Yamada

Laminins are a family of heteromeric glycoproteins specific to basement membranes. Laminin α 1 is a component of laminin-1 (laminin-111) and has a large globular domain (LG) consisting of five submodules LG1-5. We previously identified active synthetic peptides AG73 and EF-1 from laminin α 1 LG4 for binding to heparin/syndecan and integrin α 2 β 1, respectively. However, their activity and functional relationship within the laminin-1 protein and LG4 module are not known. To address this question, we prepared recombinant LG4 proteins, which contain site-specific mutations within AG73, EF-1 and α -dystroglycan binding sites, and examined their activities for receptor binding, cell adhesion and cell spreading and compared them with laminin-1. We found that LG4 promotes cell adhesion and spreading and binds to heparin and heparan sulfate containing cell surface receptor syndecans but not glypican-1. Mutant LG4 at AG73 reduced cell and syndecan binding, indicating that LG4 cell binding was mediated through syndecans. Cell spreading of fibroblasts on LG4 was inhibited by antibodies to integrin α 2 or β 1 and a substitution mutation within EF-1 of LG4, but not cell adhesion, suggesting that the EF-1 site of LG4 is required for cell spreading but not required for LG4 cell adhesion. These results indicate that the AG73 site of LG4 binds cells through syndecans and the EF-1 site promotes cell spreading through integrin α 2 β 1, and suggest that LG4 may be produced proteolytically in vivo and exerts its activity distinct from laminin-1.

A08 ラミニン-111 由来の合成ペプチドを用いたラット肝細胞の培養

¹東京薬科大学 薬学部

吉川 大和¹ 高橋 直哉¹ 野水 基義¹

肝細胞は、血漿タンパクの合成や薬物の代謝、解毒といった多様な生理機能を持つ細胞である。肝細胞の機能は、多様な増殖因子や細胞外マトリックスによって制御されているため、肝臓から単離するとその機能が急速に低下する。現在、人工肝臓の開発といった組織工学の観点から、肝細胞培養に有効な培養基質が求められている。本研究では、マウス肉腫由来のマトリゲルが肝細胞の機能を維持できることから、その主要成分であるラミニン-111 に着目し、肝細胞培養基質としてラミニン-111 由来の合成ペプチドの有用性について検討を行なった。我々は、これまでにラミニン-111 の 3 つの鎖 α 1、 β 1、 γ 1 のアミノ酸配列を網羅した合成ペプチドの中から生物活性を持つ 60 種類のペプチドを見出している。ラットの肝臓から単離した初代培養肝細胞を用いて、これらの合成ペプチドの細胞接着活性を検討したところ、 α 1 鎖由来の A13 (RQVFQVAYIIIIKA) に強い肝細胞接着活性が見られ、 γ 1 鎖由来の C16 (KAFDITYVRLKFS) にも活性がみられた。さらに、ラット肝細胞を合成ペプチドでコートした培養プレート上で培養し、代謝遺伝子の発現を RT-PCR 法にて解析した。その結果、通常の培養プレート上では、Tyrosine aminotransferase (TAT)、Tryptophan-2,3-dioxygenase (TO)、Cytochrome P450 (CYP4A3) といった代謝遺伝子の発現が経時的に消失していくが、A13 上では、マトリゲルと同様に72時間後においてもTAT、TO、CYP4A3の発現を維持した。一方、C16上では、72時間後においてもTAT、TOの発現を維持することができた。以上の結果から、ラミニン-111 由来の合成ペプチドが肝細胞の機能を維持できる新しい培養基質として有用であることが示された。

Primary culture of hepatocytes on synthetic peptides derived from laminin-111

Laboratory of Clinical Biochemistry, Tokyo University of Pharmacy and Life Science

Yamato Kikkawa, Naoya Takahashi, Motoyoshi Nomizu

Liver transplantation is a curative treatment for hepatic dysfunction such as cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. However, it is limited by severe shortage of donors. Therefore, a bioartificial liver is expected as assist device that can provide the critical hepatic functions. Design of effective biomaterial for hepatocyte adhesion is important for development of a bioartificial liver. Previously, we have identified 60 cell adhesive sequences in the mouse laminin-111, a multifunctional glycoprotein in basement membranes, using 673 synthetic peptides. Here, we screened hepatocyte-adhesive peptides using the cell adhesive peptides to apply as a biomaterial for development of bioartificial liver. Rat hepatocytes were isolated by two-steps collagenase perfusion and used for cell adhesion assay. When we tested the 60 synthetic peptides in a hepatocyte adhesion assay, only two peptides, A13 (RQVFQVAYIIIIKA, mouse laminin α 1 chain residues 121-133) and C16 (KAFDITYVRLKF, mouse laminin γ 1 chain residues 139-150) exhibited the activities in a dose-dependent manner. Furthermore, we tested the expression of metabolic genes such as Tyrosine aminotransferase (TAT), Tryptophan-2,3-dioxygenase (TO), and Cytochrome P450 (CYP4A3) in hepatocytes cultured on the peptides. Although hepatocytes on non-coated plate rapidly lost the gene expression, the cells on plate coated with A13 peptide maintained the expression of tested metabolic genes. C16 peptide maintained expressions of TAT and TO but not CYP4A3. Together with, the peptides have a potential to maintain hepatic function in long-term culture and may be useful for development of bioartificial liver as a biomedical material.

A09 laminin-1によるGM1を介した神経突起伸長の分子機構の解明

¹順天堂大学 医学部 老人性疾患病態治療研究センター

²順天堂大学 看護学部

³順天堂大学 医学部 解剖学

⁴アメリカ国立衛生研究所

市川 直樹¹ 岩淵 和久² 栗原 秀剛³ 保住 健太郎⁴ 山田 吉彦⁴ 平澤 恵理¹

近年、脂質ラフトにおいてシグナル関連分子が共局在し、細胞外からのシグナルを増幅する機構に興味が持たれているが、そこには細胞外マトリックス分子の関与も推定される。細胞外マトリックス分子laminin-1は、integrin受容体を介した神経突起伸長促進活性が知られているが、脂質ラフトの構成成分であるガングリオシドと相互作用することが報告されている。一方で、神経突起の伸長には神経成長因子（NGF）シグナルが必須であり、ガングリオシドGM1とNGF受容体（TrkA）の会合が重要であると考えられている。そこで我々は、laminin-1の神経突起伸長促進活性における脂質ラフトの関与を想定し、GM1に着目して検討した。laminin-1はそのLG4サブドメインによりGM1と直接的に結合することが分かった。また、マウス後根神経節細胞とPC12細胞を用いて、GM1、TrkA、integrin β 1の生細胞上における局在の経時的変化を調べた結果、laminin-1によるGM1、TrkA、integrin β 1の凝集を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。免疫電顕法による電子顕微鏡下での観察においても、TrkAの凝集が観察された。また、laminin-1によるGM1の凝集を阻害すると、integrin β 1の凝集も阻害された。laminin-1刺激により、Src family kinase分子Lynが活性化されたが、GM1の凝集を阻害するとLynの活性化は減少し、神経突起伸長が阻害された。これらの結果から、laminin-1の神経突起伸長促進活性には、integrinとの結合だけでなく、GM1との結合によるシグナル分子の凝集が重要である可能性が示唆された。

Laminin-1 directly binds GM1 in lipid rafts to activate cellular signaling to promote neurite outgrowth

Juntendo University School of Medicine Research Institute for Diseases of Old Age

Naoki Ichikawa, Kazuhisa Iwabuchi, Hidetake Kurihara, Kentaro Hozumi, Yoshihiko Yamada, Eri Arikawa-Hirasawa

Growing evidence suggests that a local enrichment of cell surface receptors and signaling molecules in the cell membrane lipid raft transduces cellular signaling for various biological processes. It is known that laminin-1, an extracellular glycoprotein, binds integrins and promotes neurite outgrowth. In this report, we demonstrate that laminin-1 induces the clustering of monosialoganglioside GM1, receptors, and signaling molecules in lipid microdomains and enhances NGF-mediated neurite outgrowth. We found that laminin-1 directly bound GM1 through the LG4 subdomain. Using time-lapse analysis and confocal microscopy on living dorsal root ganglion and PC12 cells, we showed that laminin-1 induced clustering of GM1, NGF receptor TrkA, and integrin β 1 at a focal region on the membrane. We also found that laminin-1 induced clustering of TrkA by immunoelectron microscopy. We demonstrated that laminin-1 activated Lyn, a Src family kinase and NGF downstream signaling molecule, and that clustering of integrin β 1 was inhibited when laminin-1-induced clustering of GM1 was inhibited. Moreover, the inhibition of GM1 clustering reduced Lyn kinase activation, and the promotion of neurite outgrowth was inhibited. Our results suggest that the interaction of laminin-1 and GM1 induces the aggregation of GM1 and subsequent clustering of integrins and TrkA in the membrane microdomain, which provides a signaling platform to enhance neurite outgrowth.

☆A10 ペプチドの自己集合による人工コラーゲンゲルの創製

¹新潟薬科大学 薬学部

○山崎 ちさと¹ 浅田 真一¹ 北川 幸己¹ 小出 隆規¹

化学合成したペプチドの相補的な自己集合能を利用した人工コラーゲンゲルを創製した。ここでデザインしたペプチドは、相補的な形を持つ3量体ペプチドである。3量体ペプチドを構成する3本のペプチド鎖は、コラーゲン様 Gly-Pro-Hyp 繰り返し配列をもち、それぞれを相互にずらしてジスルフィド結合により架橋した。このような3量体ペプチドは、分子間での相補的な自己集合（3本らせん形成）に伴って、長軸方向に伸長することが可能である。

まず、3量体ペプチドを構成する3本のペプチド鎖をそれぞれFmoc固相法により合成した。続いて、分子中に導入したシステインのチオール基を利用した段階的かつ選択的なジスルフィド架橋形成により3量体化を行った。作成したペプチド溶液は冷却によりゲル化し、昇温によりゾルとなった。また、この過程は可逆的であった。この3量体ペプチドが分子間で3本らせん構造を形成することは、CDスペクトルで確認した。さらに、作成した人工コラーゲンゲルの熱安定性を、異なるデザインの3量体ペプチド間で比較したところ、3量体ペプチドのデザインによりゲル-ゾル間の転移温度を制御できることが明らかとなった。

このタイプ的人工コラーゲンには、天然のコラーゲン上に存在する様々な機能性ペプチド配列を組み込むことが原理的に可能である。今後、特定の機能配列を組み込んだ人工コラーゲンを作成し、新規培養基剤としての応用を検討していきたいと考えている。

Totally synthetic collagen gel

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Niigata
University of Pharmacy and Applied Life Sciences,
Niigata 956-8603, Japan

Chisato M. Yamazaki, Shinichi Asada, Kouki
Kitagawa, Takaki Koide

Here, we report the development of artificial collagen gels constituted by self-assembling synthetic peptides. The peptides are disulfide-linked trimers of 27-mer peptides comprised of collagenous Gly-Pro-Hyp (4-Hydroxyproline) triplet repeats. Between the adjacent peptide strands, 12 to 18 residue staggers were introduced to create self-complementary cohesive ends. These self-complementary peptides are able to form elongated supramolecular architectures through spontaneous self-assembling process.

Single-chain precursors of the trimeric peptides were synthesized using the standard N-(9-fluorenyl) methoxycarbonyl-based solid-phase method. Heterotrimeric assembly of such peptide strands was achieved by regioselective disulfide bond-formation involving stepwise activation of Cys side-chains.

Upon cooling the aqueous solutions of the trimers, peptide hydrogels formed, and the sol-gel transition was appeared to be thermally reversible. Circular dichroism spectroscopic analysis revealed that intermolecular triple helix-formation is critical for gelation. In addition, the sol-gel transition temperature is found to be tunable by the design of the peptides, and a transition temperature of 42° C was achieved. The use of synthetic peptides as building blocks will allow further functionalization of the artificial collagen by incorporating specific sequences, such as receptor-binding motifs found in native collagen. This concept for the totally synthetic artificial collagen gel presented here offers a novel strategy toward the development of innovative biomaterials.

*A11 ショウジョウバエXV/XVIII型コラーゲンの生物学的機能

¹岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 人体構成学

²岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 分子医化学

百田 龍輔¹ 内藤 一郎¹ 二宮 善文² 大塚 愛二¹

Gly-X-Yの繰り返し断続的なコラーゲン領域を中央部に持ち、C末端に特徴的なエンドスタチン領域をもつコラーゲンは、ヒトやマウスなどの解析によると、XV型・XVIII型の2種類が存在し、IV型コラーゲンと同じく基底膜の構成成分であることが知られている。データベースの検索より、XV/XVIII型コラーゲン分子をコードする遺伝子は、ショウジョウバエゲノムにおいて1つ存在することがわかり、これをicbm (Invertebrate Collagen of Basement Membrane)と名づけた。この遺伝子をコードする領域にトランスポゾン挿入が起きた系統 (icbm¹, icbm²)の解析を行ったところ、それぞれのホモ接合体の多くは発生初期の段階で致死性であった。また、無事に孵化することのできたホモ接合体の幼虫は運動異常のほか、野生型と比較して物理的な刺激に対する反応性の低下、さらに成虫においては筋力が劣ることがわかった。トランスポゾン挿入によりicbmの強力な機能喪失が起きているものと考えられる。

以上の結果から、icbmはショウジョウバエの初期発生、神経・筋の形成において重要な役割を果たしているものと考えられる。

Biological Function of Drosophila Type XV/XVIII Collagen

Okayama University Graduate School of Medicine,
Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Ryusuke Momota, Ichiro Naito, Yoshifumi Ninomiya,
and Aiji Ohtsuka

Vertebrate type XV and XVIII collagens are characterized by an interrupted collagenous domain and a potential antiangiogenic agent endostatin at C-terminal noncollagenous region, and have been shown to be widely distributed in the basement membrane. We have identified one copy of gene encoding type XV/XVIII molecule in Drosophila genome, designated icbm, an acronym of Invertebrate Collagen of Basement Membrane. We investigated two independent fly lines with disruptive transposon insertions in this gene (icbm¹, icbm²). In both lines, most of homozygotes die before hatching and few of them survived to be adults. Although the survivors were indistinguishable from wild-type, the larvae showed abnormal locomotion and were less sensitive to external stimuli. Moreover, the surviving adults showed defective wall climbing ability.

These results indicate that icbm plays some important roles during embryogenesis and formation of nervous and muscular systems in drosophila.

¹大分大学 医学部 生体分子構造機能制御講座（生化学2）

住吉 秀明¹ 松尾 哲孝¹ 調 恒明¹ 吉岡 秀克¹

我々は線維化のメカニズムを解明する目的で、各種コラーゲン遺伝子転写調節機構の研究を行っている。その中でも 型コラーゲン遺伝子の転写調節はプロモーター活性と実際の遺伝子発現の間に矛盾点もあり、比較的キャラクタライズが進んでいない。一例として、RDとA204は共に強い 型コラーゲンプロモーター活性を有する横紋筋肉種細胞であるが、A204には実際の 型コラーゲンの発現はない。この矛盾の背景には未知の転写抑制機構が存在することが考えられ、我々はそこに着目して研究を行っている。これまでにA204には他の細胞株には見られない分子量40～52kDaの新規DNA結合タンパク質があり、

型コラーゲンプロモーター活性に必須である普遍的転写因子BBFと、全く同じ結合配列に結合する事が分かっている。またプラスミドベクターを用いた方法でなく、染色体上に 型コラーゲンプロモーターとGFPによるトランスジーンを挿入しRNaseプロテクションによって実際の転写開始を調べたところ、A204では細胞本来の 型コラーゲンの転写産物は検出されないことに対し、トランスジーン由来の転写は起きていることが示され、この転写抑制機構は遺伝子の染色体上の本来の位置に依存するものである事が分かった。さらにRDをG418耐性株に形質転換することにより多くのクローンで小型、円形状の形態になり、増殖速度が増すなど幼若な性質を示すようになった。同時に 型コラーゲンの発現も見られなくなった。このような細胞でもトランスジーンの転写は検出され、A204と類似する状態となった。面白い事に、この細胞株からA204と同じ新規DNA結合タンパク質が検出されるようになっていた。これらクローン細胞間の核蛋白を二次元電気泳動法にてプロファイルしたところ、そのパターンもA204に似ていた。現在、新規DNA結合タンパク質と見られる幾つかのスポットの解析を行っている。

The study report for the human a1(III) collagen gene regulation.

Dept. of Anatomy, Biology and Medicine, Faculty of Medicine, Oita University

Hideaki Sumiyoshi, Noritaka Matsuo, Komei Shirabe and Hidekatsu Yoshioka.

Collagen production excess caused tissue fibrosis. The collagen gene regulation study are important for understanding of collagen production mechanism. TypeIII collagen gene regulation was characterized poor, and had contradiction between promoter activity on luciferase assay and mRNA expression indeed. An example RD and A204 are rhabdomyosarcoma cell line, and has TypeIII collagen promoter activity both. But A204 has no mRNA expression. Our point of view, the background of these contradiction has unknown gene inactivation system. We already reported A204 has a new found DNA binding protein (40 - 52kDa) specificity. And this binding to same region of BBF binding. BBF were ubiquitous factor and most important for TypeIII collagen promoter activity. On the other hand we done transgene assay, use TypeIII collagen promoter/GFP minigene stable transfection, not plasmid system. For detection gene expression use RNase protection. In A204 cell line detected only transgene transcript but endogenous. This suggested gene inactivation system in A204 demanded not only promoter on the chromosome, but also correct location. The other hand RD expressed transgene and endogenous both transcribes. In same time, RD cell was transformed to G418 resistant for stable transfection. Many RD cells going to smaller and looks immature, and TypeIII collagen expression was stop like A204. Interestingly the new DNA binding protein in A204, was found changed RD clones also. Changed RD clones nuclear protein profiles from 2D electrophoresis more resemble at A204s pattern. In several protein spots just studying for candidate DNA binding protein related gene inactivation system.

*A13 アクチニジン処理コラーゲンにより誘導される 好中球の新奇な運動能

¹近畿大学 生物理工学部 生物工学科

²近畿大学 医学部 細菌学

森本 康一¹ 國井 沙織¹ 柴野 三智子² 齋藤 卓也¹

【目的】線維性コラーゲンは自己会合して線維構造を形成し、細胞の足場調節因子としての機能や発生・分化、炎症等の生体内の動的な現象に関与する。多形核白血球である好中球は細菌等の感染初期に活躍し、コラーゲナーゼ(MMP-8)を産生することから、線維性コラーゲンとの接点が示唆される免疫細胞である。本発表では、アクチニジン(システイン・プロテアーゼ)でテロペプチド領域を加水分解したI型コラーゲン(A-Col)を培養皿に塗布し、マウス好中球の挙動を走査型電子顕微鏡(SEM)により観察した結果を報告する。

【方法】ニワトリ皮部から10%酢酸で酸可溶性I型コラーゲンを抽出し、酵素処理によりペプシン処理コラーゲン(P-Col)とA-Colを得た。可溶化したP-ColまたはA-Colをセルディスクに塗布して風乾後、マウス腹腔から得た好中球(5% FCS含有DMEM培地)を播種した。培養物をグルタルアルデヒドで固定して好中球の形態と挙動の時間依存をSEMで観察した。さらに、-40度から+40度まで8度ずつ角度をかけて観察し、3次元解析を試みた。また抗コラーゲン抗体を用いた免疫電子顕微鏡法とフォンウィルブラント因子に対する免疫酵素化学測定法(ELISA)により、P-ColとA-Colの各高次構造に対する反応性の差異を調べた。

【結果】好中球はP-Colの線維構造とA-Colの微細網目構造で、細胞運動能に違いが認められた。A-Colでは培養3分後に能動的な好中球の接着挙動が確認され、培養2時間後には細胞表面の特定が困難なほどにA-Col会合体中に浸潤し、互いに3次的に集合した。また免疫電子顕微鏡観察とELISAにより、P-ColとA-Colでは局所的な立体構造に微細な変化が生じていることが明らかになった。好中球がA-Col会合体の高次構造の微細な変化を認識し、特異的な運動を示したと考察した。

Neutrophil dynamics induced by a novel superstructure of actinidain-hydrolyzed type I collagen

Dept.of Biotechnological Science, Kinki University

Koichi Morimoto, Saori Kunii, Michiko Shibano,
Takuya Saito

Most of the collagen studies have been investigated using pepsin-hydrolyzed collagen (P-col). We found that actinidain-hydrolyzed type I collagen (A-col) shows a poor fibrillogenesis and nano-scale three-dimensional structure such as a spider web. It is not still understood how the superstructure of the collagen self-assembly forms. However, biological function of the collagen, such as cell adhesion or migration, should be altered. The aim of this study is to analyze the structural feature of A-col and the interaction between neutrophil and A-col. Neutrophil is phagocytic cell and produces many reactive molecules and enzymes. It is well known that neutrophil secreted matrix metalloproteinase-8 cleaves type I collagen.

To investigate the interaction between A-col and neutrophil, we observed cell behavior on the A-col matrix using ultra-resolution scanning electron microscopy. Also, we identified the epitope expression on the surfaces of the A-col or P-col self-assembly using anti-collagen antibody labeled with gold-particle. In addition, the immunoreactivities of anti-von Willebrand factor polyclonal antibody against the hydrolyzed collagens under neutral pH were measured.

We found that the neutrophil motility on the A-col matrix was clearly different from that on the P-col matrix. After 2-h incubation, neutrophils deeply migrated in the A-col matrix. Interestingly, those hydrolyzed collagens showed to be significant difference in the epitope expression. Thus, several lines of evidence suggest that the ultrastructure of A-col molecule would be responsible for the activation of cell behaviors.

A14 型コラーゲン線維の癌細胞の増殖抑制効果

¹株式会社ニッピバイオマトリックス研究所

²北里大学大学院

佐々木 純¹ 藤崎 ひとみ¹ 安達 栄治郎² 入江 伸吉¹ 服部 俊治¹

【背景】

現在、型コラーゲン線維は *in vitro* で生体内により近い細胞の挙動を観察するための3次元モデルの研究材料として用いられている。これまでに我々は、型コラーゲン線維と細胞の相互作用について研究を行い、コラーゲン分子上では活性化される生存シグナルAktがコラーゲン線維上で培養したヒト皮膚表皮細胞においては活性化が抑制されることを明らかにしている。また、型コラーゲン線維上のヒト皮膚表皮細胞で抑制された生存シグナルAktは癌の悪性化に寄与することが報告されている。

【目的】

本研究では、型コラーゲン線維による癌細胞のAktの活性化および増殖抑制効果の有効性について検討するために、4種の癌細胞（Caco-2, MCF-7, MDA231, HT1080）について型コラーゲン分子上とコラーゲン線維上の細胞挙動を比較した。

【方法】

MTTアッセイ法により、各コラーゲン基質上の細胞増殖を測定した。さらにウェスタンブロット法により生存シグナルAktの発現及び活性化解析を行った。またCaco-2については、インテグリン下流シグナル分子としても働くFAK、パキシリンの発現及び活性化解析を行った。さらにCaco-2について、インテグリン $\alpha 2\beta 1$ 、FAK、パキシリン、ビンキュリンの局在を調べた。

【結果・考察】

型コラーゲン線維上では4種の癌細胞ともに細胞増殖が抑制され、さらにはAktの活性化も抑制された。また、コラーゲン線維上のCaco-2細胞では、インテグリン $\alpha 2\beta 1$ やFAs支持タンパク質の細胞辺縁部におけるFAs様の集積が認められず、さらにインテグリン下流のシグナル分子のFAK、パキシリンの活性化が抑制された。以上のことより、型コラーゲン線維上の細胞では、インテグリン下流シグナルの活性化が阻害されることで、Aktの活性化が阻害され、細胞増殖が抑制されると考えられる。

Suppression of proliferation of human cancer cell lines cultured on type collagen fibrils

Nippi Research Institute of Biomatrix

Jun Sasaki, Hitomi Fujisaki, Eijiro Adachi, Shinkichi Irie, Shunji Hattori

Collagen is known as one of the typical substratum for cell culture, and is used as a form of monomer (coated collagen) or a form of polymer (fibrils). Cultured cells adhere to coated collagen via integrin and are able to proliferate. However, collagen fibrils have different properties for cell behaviors. When human foreskin keratinocytes (HFKs) were cultured on coated collagen, HFKs adhered, spread and well-proliferated. On the other hand, HFKs cultured on collagen fibrils underwent apoptosis within several days. Akt, which is known as one of classical survival signals, was phosphorylated in HFKs cultured on coated collagen. But phosphorylation of Akt was not observed in HFKs on the collagen fibrils. (Exp. Cell Res. 280, 255-269, 2002, Fujisaki et al). It is also known that Akt activation plays important roles on malignancy in cancer cells.

Here, we investigated the effects of collagen fibrils on proliferation of four kinds of cancer cells. On coated collagen, all tested cells were spread and proliferate, however, on collagen fibrils, all tested cells did not spread nor proliferate. When we examined Akt activation in four kinds of cancer cells on collagen fibrils, phosphorylation of Akt was not detected. To elucidate the FAs formation of Caco-2 cells on collagen fibrils, we examined accumulation and activation of FAs-associated proteins. In Caco-2 cells cultured on collagen fibrils, accumulation of integrin $\alpha 2\beta 1$, FAK, paxillin and vinculin at the edge of cells was not observed, and FAs-associated proteins were not activated.

A15 食道扁平上皮癌における 型コラーゲンの発現と予後との関連

¹熊本大学医学部附属病院病理部

²岡山重井研究所免疫部門

³岡山大学大学院医歯学総合研究科 分子医化学

馬場 祥史¹ 猪山 賢一¹ 佐渡 義一² 二宮 善文³

(背景) 癌細胞の浸潤、転移において基底膜の破壊は必要不可欠である。型コラーゲンは、基底膜の主要な構成要素で、 $\alpha 1 \sim \alpha 6$ の6種類の α 鎖からなる。我々はこれまで、大腸癌等では浸潤早期に $\alpha 5 / \alpha 6$ 鎖が完全に消失すること、 $\alpha 5 / \alpha 6$ 鎖消失とそのプロモーター領域のメチル化が関連することなどを報告してきた。

(方法) 食道扁平上皮癌切除症例93例について、 $\alpha 2$ 鎖、 $\alpha 6$ 鎖の免疫染色を行い、その動態と臨床病理学的因子との関連を検討した。また、食道癌細胞株(TE series ; 11種)における $\alpha 6$ 鎖の発現を検討し、SiRNAを用いた $\alpha 6$ 鎖の機能解析を行った。

(結果) 正常食道上皮の基底膜には $\alpha 2(\alpha 1 / \alpha 2)$ 、 $\alpha 6(\alpha 5 / \alpha 6)$ 鎖が発現していた。上皮内癌(m1)では同様の結果であったが、m2, m3の症例では一部 $\alpha 6$ 鎖の消失を認めた。また、sm以深の症例は、癌巣周囲に一部 $\alpha 6$ 鎖が発現するA群と、完全に消失してしまうB群に分けられた。予後解析にて、B群ではA群より有意に再発しやすかった。

食道細胞株11種のうち5種の培養下において、protein levelでの $\alpha 6$ 鎖の発現を認めた。食道癌細胞株においては、 $\alpha 6$ 鎖の消失はプロモーター領域のメチル化に関連性はなかった。 $\alpha 6$ 鎖の発現を認めたTE13で、SiRNAによる発現抑制を行ったところ、増殖能に変化はなかったが、浸潤能に軽度増加を認めた。

(考察) 食道扁平上皮癌では、腺癌と異なり、浸潤した癌巣周囲に $\alpha 5 / \alpha 6$ 鎖を含む基底膜を認める症例が存在し、それらの予後は良好であった。IV型コラーゲン α 鎖の細胞増殖抑制作用、MMP抑制作用は既に報告されているが、今回 $\alpha 6$ 鎖の消失による浸潤能増加の可能性が示された。食道扁平上皮癌において、型コラーゲン $\alpha 5 / \alpha 6$ 鎖の発現の有無は新たな予後因子の1つとなり得ると考えられた。

The expression of Type IV collagen $\alpha 6$ chain is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma

Department of Surgical Pathology, Kumamoto University Hospital

Yoshifumi Baba, Ken-ichi Iyama, Yoshifumi Ninomiya, Yoshikazu Sado

Background: The destruction of the basement membrane (BM) is the first step in cancer cell invasion and metastasis. Type IV collagen is a major component of BM, and is composed of six genetically distinct α (IV) chains, $\alpha 1$ (IV) to $\alpha 6$ (IV). We have reported the loss of the $\alpha 5$ (IV)/ $\alpha 6$ (IV) chains in epithelial BM at early stage of cancer cell invasion in several cancers.

Material and method: We examined immunohistochemically the expression of α (IV) chains in esophageal squamous cell carcinoma(ESCC), and performed the functional analysis of $\alpha 6$ chain by SiRNA using esophageal cancer cell lines.

Result: In normal esophageal epithelium and intraepithelial carcinoma (m1), the $\alpha 5 / \alpha 6$ chains were stained in continuous linear pattern in the BM, but in intramucosal carcinoma(m2,3) partly and discontinuously. In some cases of ESCC with the stromal invasion, the $\alpha 5 / \alpha 6$ chains were lost, but in other cases were remained in the BM zone surrounding cancer cell nests. Prognostic analysis of the former cases had a poorer prognosis than that of the latter. In 5 of 11 esophageal cancer cell lines, the expression of $\alpha 6$ chain was detected at protein level. The suppression of $\alpha 6$ chain by SiRNA revealed the slight increase of cancer cells invasiveness in vitro.

Conclusion: Evaluation of Type IV collagen $\alpha 6$ chain expression may be useful for determining the tumor cell properties, as one of a prognostic factor, in patients with ESCC.

A16 脂肪細胞のヒアルロン酸マトリックス形成とその機能

¹ (株) カネボウ化粧品 基盤技術研究所

佐用 哲也¹ 赤澤 裕見子¹ 井上 紳太郎¹ 杉山 義宣¹

【目的】前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化機構については、転写因子やその調節因子を中心に急速に知見が集積しつつある。一方、線維芽細胞様から脂肪細胞特有な形態への変化には細胞外マトリックスのリモデリングが重要と考えられているが、ヒアルロン酸 (HA) についての知見はごく限られている。今回、まず分化初期におけるHAの合成様式および存在様式について検討を行い、また細胞分化におけるHAの役割を知る目的でHA合成阻害剤の影響について検討を加えた。【方法】前駆脂肪細胞として3T3-L1を用い、*Has* mRNAの発現をRT-PCRにより、培養上清および細胞trypsinate画分のHA量をhyaluronan binding proteinを用いたsandwich assay法にて検討した。また細胞表面におけるHAの局在性を共焦点顕微鏡にて観察した。【結果】分化誘導後、*Has2*, *Has3* mRNAの発現が上昇し、培養上清および細胞表面のHA量が著しく増加した。この時、細胞に沈着したHAはcable likeな形状を呈した。HAと高次構造を形成する成分について探索したところ、分化初期にmRNA発現量が増加するPG-M/バーシカンがHAと共局在することがわかった。次に、HA合成阻害剤である4-methylumbelliferone (4-MU) を添加培養したところ、mitotic clonal expansionが阻害されるとともに、誘導刺激により惹起されるPPAR γ , aP2 mRNAの発現が抑制された。4-MU添加10日目では脂肪蓄積の顕著な抑制が観察された。【考察】分化刺激により、HAはPG-M/バーシカンとともに細胞表面に高次の細胞外ネットワークを形成すると考えられた。また、形成されたHAマトリックスが脂肪細胞の分化初期段階に重要な役割を担っていることが示唆された。

Involvement of hyaluronan matrix formation during 3T3-L1 preadipocyte differentiation

Kanebo cosmetics Inc. Basic Research Laboratory

Tetsuya Sayo, Yumiko Akazawa, Shintaro Inoue, Yoshinori Sugiyama

Adipocyte differentiation is a very complex process that is triggered and promoted by coordinated signals from transcription factors. In the early stage of differentiation, the extended fibroblast-like morphology of the preadipocytes becomes rounded. This change most likely occurs through extracellular matrix (ECM) remodeling, but less attention has been focused on hyaluronan (HA). Changes in HA production and *Has* gene expressions during differentiation were examined using a 3T3-L1 preadipocyte cell line as an *in vitro* model. In the early stage of differentiation, HA increased dramatically in both the medium and the trypsinate (*i.e.*, on the cell surface). RT-PCR analysis demonstrated that mRNA expressions of the *Has2* and *Has3* genes were up-regulated prior to the induction of adiponectin and leptin expressions, which are adipocytokines secreted from differentiated cells. Confocal imaging studies revealed cable-like HA structures over the cell surface. Furthermore, PG-M/versican was found to be co-localized with HA, suggesting PG-M/versican binds with HA in the matrix structure.

An inhibitor of hyaluronan synthesis, 4-methylumbelliferone (4-MU), suppressed mitotic clonal expansion and the gene expressions of PPAR γ and aP2, suggesting that HA synthesis is involved in the preadipocyte differentiation. Long term treatment (10d) with 4-MU inhibited lipid accumulation of adipocytes.

Taken together, our findings suggest that the formation of an HA network structure plays a crucial role in differentiating of preadipocytes at the early stage.

*A17 細胞周囲微細環境の自由度維持による発生腎からのネフロン形成の試み

¹筑波大学 生命環境研究科

村澤 裕介¹ 王 碧昭¹

腎組織形成の根幹は、刻々と移り変わる細胞と細胞周囲微細環境（ニッチ）の協調にあり、腎組織形成誘導の軸となるのは、細胞と因子の住み分けと交流、両者の反復を許す胎環境の創造にある。本研究では、V型コラーゲン線維の果す役割を、腎組織胎環境の創造手として明示し、V型コラーゲン線維マトリクスが腎再生に果す可能性を論考した。in vitro 発生期腎組織培養において、V型コラーゲン線維上の発生腎では、間充織ダイナミクス誘導が観察される。又、尿管芽と間充織と相関境界、間充織細胞の血管変化、尿管芽と糸球体の融合におけるV型コラーゲン線維の役割が観察できる。これは、間充織細胞の流動性がV型線維によって誘導された結果と考察できるが、流動だけでは組織形成は不全であり、安定フェイズと流動フェイズの繰り返しの連鎖が組織形成には必須である。V型コラーゲン線維は、細胞自身の働きで、ニッチダイナミクスとニッチ安定双方の連鎖を誘導できる。故に、この連鎖を誘導する指揮者としてV型コラーゲン線維の意味があると筆者らは示唆する。更に、本発表で討議するのは、V型コラーゲン線維による効果的な組織化誘導方法である。組織化制御要因として、V型線維の培養系への投入タイミングによる、ECM消化制御、初期マトリクス選択によるECM沈着と蓄積の制御を明らかにした。本自由ニッチ誘導法は、腎再生における新しい系として提示、臨床応用を模索する。

Glomeruli Tissue Engineering by Free Microenvironment Utilizing Type V Collagen Fiber

Institute of Applied biochemistry, University of Tsukuba

Yusuke Murasawa, Pi-Chao Wang

Complicated nephron cannot be completed by current tissue engineering. One barrier is that artificial tissue derived from renal cells can hardly fuse to patient tissue and both blood and urine flows can not form after transplantation. Particularly, regeneration of glomeruli from tissue fused between microvascular and epithelial ureter is difficult. Although recent tissue engineering improved generation of renal tubes from ureteric buds at development stage, it can neither regenerate glomeruli nor induce microvascular formation within epithelial tissue. This study is to develop a method using type V collagen fiber to regulate niche dynamics and induce kidney morphogenesis to balance vascular and epithelial formation. Microgravity was applied to culture system and result showed V fiber induced glomeruli formation with microvessel. Glomeruli requires both epithelial and vascular formation. But in vitro culture showed interaction of cells and factors for epithelial and vascular morphogenesis inhibited each other during renal development and caused failure formation of glomeruli. Separating cell and factor spatially is important. Type V works as a mediator not only keeping synergic extracellular environment but also allowing dynamics for phase changes. This niche dynamics induced mesenchyme aggregation and separately localized different tissue morphogenesis with harmony. In summary, V fiber ECM induces microvascular and glomeruli formation, and fusion between glomeruli and ureteric bud.

*A18 脊髄発生時のアクソンガイダンスにおけるヘパラン硫酸の役割

¹九州大学医学部整形外科

²バーナム医学研究所

³熊本大学医学部眼科

松本 嘉寛¹ 入江 史敏² 稲谷 大³ 山口 祐² 岩本 幸英¹

(目的)

脊髄発生において、アクソンはNetrin-1などの可溶性因子によってガイダンスされる。一方、ヘパラン硫酸(Heparan Sulfate; HS)が神経発生に必須であることが、HSの合成酵素であるExostosin 1(EXT1)のコンディショナルノックアウトシステムを用いて証明された。Netrin-1はHSに強く結合することが知られているため、本研究ではアクソンガイダンスにおけるHSとNetrin-1の関係を解析した。

(方法)

脊髄の発生時の交連神経アクソンの背側から腹側への伸長は、アクソンガイダンスの解析に最も適したモデルのひとつである。今回、発生段階に脊髄背側に特異的に発現するWnt1を用いて、EXT1を交連神経特異的に欠損させ(EXT/Wnt-1マウス)、変異個体の組織学的解析を行った。また、胎生約11.5日の胎仔より、脊髄背側の組織片、交連神経細胞を採取し In vitroの解析を行った。

(結果)

EXT/Wnt-1マウスは、Netrin-1やそのレセプターであるdeleted colorectal cancer(DCC)のノックアウトマウスと類似した交連神経のアクソンガイダンスの異常を認めた。さらに、EXT/Wnt-1マウスより採取したHSを欠損する交連神経細胞はNetrin-1による刺激に反応しないこと、その際Netrin-1-DCCの下流に存在するMAPK経路が活性化されていないことが、in vitroの解析にて確認された。

(考察)

今回の研究により、アクソンガイダンスにおけるNetrin-1-DCCの情報伝達には、HSが必須であることが示された。脊髄再生には、損傷されたアクソンの秩序だった再接続が必須である。そのため、Netrin-1-DCC-HS複合体によるアクソンガイダンス制御メカニズムの解析は、脊髄再生研究に際しての新しい分子的基盤を提供すると考えられた。

Essential role of heparan sulfate in axon guidance in developmental spinal cord

Dept. of Orthop. Surg., Kyushu Univ. School of Medicine

Yoshihiro Matsumoto, Fumitoshi Irie, Masaru Inatani, Yu Yamaguchi, Yukihide Iwamoto

In developmental spinal cord, axons grow and find appropriate targets. These biological steps define as axon guidance. During axon guidance, growth cones are navigated by diffusible cues. For example, netrin-1 and its receptor deleted in colorectal cancer (DCC) regulate axon guidance of commissural axons originating from dorsal part of spinal cord. Heparan sulfate (HS) is one of the glycosaminoglycans, which play major role in mammalian development. HS synthesis is governed by HS copolymerases, such as extosin 1 (Ext1) and extosin 2 (Ext2). Since netrin-1 and DCC strongly bind HS, physiological role of HS in netrin-1/DCC signaling has long been speculated. In this study, we ablated HS production, via inactivation of Ext1, specifically in the dorsal part of the spinal cord, where the cell bodies of commissural neurons reside (Ext1/Wnt-1 mutant).

Mutants showed remarkable defects in commissural axon guidance. The defects are strikingly similar to those of Netrin-1 and DCC mutant mice, affirming a physiological role for HS in netrin-1/DCC mediated axon guidance. Moreover, in vitro results demonstrated that expression of HS is essential for transduction of netrin-1 signals to DCC-expressing commissural axons. Together, our present results suggest a model in which HS on growth cones associates with both netrin-1 and DCC, thereby acting as a functional coreceptor. Future biochemical and structural studies should elucidate the exact molecular mechanism whereby HS participates in netrin-1/DCC signaling.

A19 細胞外マトリックスの解析に有用な新規遺伝子発現システム

¹東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 硬組織再生学分野

²山形大学 医学部 整形外科

篠村 多摩之¹ 佐竹 寛史² 伊藤 和生²

【緒言】

我々はこれまで、ECM成分の機能解析を目的として、培養細胞系でそれらの遺伝子を強制発現させる実験を行ってきた。その際市販のベクターを含め種々のプラスミドベクターを試したが、一過性発現はともかくとして、外来性の遺伝子を安定に且つ高レベルで発現させ続けることは必ずしも容易なことではなかった。しかしその一方で我々は、遺伝子トラップ法を用いた研究において、コンフルエントに達した細胞ですらマーカー遺伝子が安定にかつ高レベルで発現され続けることを経験していた。そこで我々は遺伝子トラップ法の基礎の上に、目的の遺伝子を安定に発現させる為の新たな遺伝子発現システムの開発を進め、完成したので報告する。

【新規遺伝子発現システムの概要】

今回我々が構築した発現システムは2つの部分から構成されている。一つは、レトロウイルスベクターを用いてレポーター遺伝子を目的とする細胞の染色体DNAに挿入し、それが安定に発現している細胞株を樹立する段階である。そしてもう一つは、レポーター遺伝子が挿入された染色体位置に組換え酵素を用いて、部位特異的に目的とするcDNAを組込む段階である。

このシステムでは、プロモータートラップ型のレトロウイルスベクターを用いることで、レポーター遺伝子の発現が内在性遺伝子の発現に依存して起こるようにした。従って、レポーター遺伝子を導入した細胞のクローンを選ぶことによって、目的とするcDNAの発現レベルあるいは発現パターンは変えることが可能である。また内在性のプロモーターを使うことで、これまで問題の多かったウイルス性のプロモーターを使わずにcDNAを発現させることが可能になった。尚、我々は既に4種類の細胞株(RCS, ATDC5, Kusa-A1およびEND-D)で本システムがうまく働くことを確認してある。以上のことから本システムは、レトロウイルス感染が必要条件ではあるが、汎用性は高いものと考えている。

A New Gene Expression System Useful for the Analysis of ECM

Tokyo Medical and Dental University

Tamayuki Shinomura, Hiroshi Satake, Kazuo Ito

For the functional analysis of ECM molecules in vitro, we have been tried to carry out the exogenous expression of their cDNA in various cells. To this end, we have examined different types of plasmid vector such as pcDNA3.1 (Invitrogen) and pIRESpuro3 (Clontech). However, the results were not satisfactory in quality and quantity. Leaving aside a transient expression, it is not always easy to succeed in the stable expression at high-level in mammalian cells. On the other hand, we have known by experience that marker genes are stably expressed at high level in clonal cells obtained by gene trap experiments. Taking a cue from these observations, we have developed a new expression system combining gene trapping and site-specific gene integration methods.

Our system is composed of two parts. One is the establishment of target cell line that is stably expressing a reporter gene at high level. The other is the site-specific integration of cDNA into the position of reporter gene for its consistent expression. In this system, we use a retroviral promoter-trapping vector for expressing cDNA by an endogenous promoter. Our expression system is quite new and will have a broad range of applications, even though retrovirus infection for target cells is a minimum requirement.

*A20 水溶性エラスチン:項韧带からの単離・調製および薬物徐放担体への応用

¹九州工業大学大学院 生命体工学研究科

²九州工業大学 情報工学部 生命情報工学科

³大阪府立大学 理学部 生物科学科

白土 絵理¹ 太田 暖菜² 前田 衣織² 古田 雅一³
岡元 孝二¹

エラスチンは項韧带、動脈壁、肺、皮膚などの主要な構成成分である弾性線維のコアタンパク質であり、その性質は不溶性である。その不溶性エラスチンを可溶化することによって得られる水溶性エラスチン水溶液は、温度を上昇させると相転移を起こしてコアセルベーションと呼ばれる自己集合特性を示し、コアセルベート液滴を形成する。このコアセルベート液滴に γ 線を照射して架橋させることにより、簡単にナノ粒子を作製することができるので、我々は現在このナノ粒子を薬物徐放担体として応用することを考えている。このような水溶性エラスチンのバイオマテリアルへの応用には、簡便な方法での純度の高い水溶性エラスチンの単離・調製が必要となる。そこで本研究では、まず材料となる水溶性エラスチンをウシ及びウマ項韧带から単離する方法を検討した。純度確認として、濁度測定、SDS-PAGE、アミノ酸分析を行った結果、NaCl抽出、アルカリ抽出及び酸による分解を行うことにより、効率的な方法で高純度の水溶性エラスチンを得ることができた。次に、単離・調製した水溶性エラスチンのコアセルベート液滴に対してCo-60 γ 線照射による架橋を行い、安定なナノ粒子を作製した。透過型顕微鏡によりナノオーダーの粒子が作製できたことを確認した。エラストラーゼによる酵素安定性の検討を行った。さらに、作製したナノ粒子に抗がん剤を取り込ませて薬物徐放試験を試験管内で行った結果、粒子内からの抗がん剤の徐放が確認できた。これらの結果より、水溶性エラスチンのコアセルベート液滴から作製したナノ粒子が薬物徐放担体として有用であることが示唆された。

Soluble elastin : isolation from ligamentum nuchae and its application to drug release devices

Graduate School of Life Science and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology

Eri Shiratsuchi, Haruna Ohta, Iori Maeda, Masakazu Furuta, Kouji Okamoto

Elastin is the insoluble core protein of the elastic fibers which furnish the resilience for the elastic tissues such as arterial walls, ligaments, lungs, skin, etc. Soluble elastin, a fragmentation product of insoluble elastin, undergoes self-assembly called coacervation, in which coacervate droplets are formed. These coacervate droplets are easily converted to nanoparticles by cross-linking with cobalt-60 γ -irradiation. In this study, we examined first the isolation of highly purified soluble elastin from bovine and horse ligamentum nuchae by successive treatments of salt-extractions, alkali-extractions and acid-degradations. Next, on raising the temperature, soluble elastin in water self-assembled and became turbid by a phase transition. The coacervate droplets formed in turbid solution were cross-linked by cobalt-60 γ -irradiation to yield stable nanoparticles. The sizes of nanoparticles obtained were measured by transmission electron microscope and the stability in the treatment of elastase was studied. Furthermore, the release of anticancer drug from nanoparticles was examined in vitro and its release profile appeared to be diffusible. These results suggest that nanoparticles prepared from coacervate droplets of soluble elastin may be a useful drug release device.

A21 細胞外マトリックス蛋白質デルマトポンチンとコラーゲンの相互作用の解明

¹大分大学医学部生体分子構造機能制御講座 皮膚科

²東京薬科大学薬学部

³北里大学医学部

⁴ニッピバイオマトリックス研究所

岡本 修¹ 藤原 作平¹ 高橋 直哉² 鈴木 彩² 野水 基義² 安達 栄治郎³ 蛭原 哲也⁴ 服部 俊治⁴

【目的】デルマトポンチン（DP）は細胞外マトリックス中でも豊富な非コラーゲン成分である。これはコラーゲンの線維形成を調節することが知られているが、この両者の相互作用部位およびその様式を明らかにする。

【方法】免疫組織化学と免疫電顕にてDPとコラーゲンの共存を検討し、この両者の分子間相互作用は固相法と共沈法で検討した。DPのI型コラーゲンとの相互作用部位の決定にはDPのオーバーラップペプチドを用い、固相法にてDPとI型コラーゲンとの相互作用を阻害させた。また、I型コラーゲンに種々の化学修飾を加え、DPとの相互作用を比較した。

【成績】光顕的、電顕的にDPとコラーゲンは共存し、DPはコラーゲン細線維表面に分布することが示された。固相化I型コラーゲンおよびゼラチンにDPは濃度依存性に結合した。しかし塩濃度を高めると両者の結合は濃度依存性に阻害された。オーバーラップペプチドによる検討ではDPの4番目のループの一部がコラーゲンへの結合阻害活性を有していた。修飾コラーゲンを用いた実験からは、コラーゲン側の必要条件として等電点が中性あるいは塩基性であることが必要で、特にリジン残基の荷電が重要であろうと推測された。

【結論】DPとコラーゲンの相互作用はイオン結合が主であろうと考えられ、相互作用部位はDPの4番目のループ構造の後半部分であるということが判明した。生体内でコラーゲンは単独で線維を形成するのではなく、DP、デコリンをはじめ複数の非コラーゲン成分が結合した状態で存在する。そしてこれらの非コラーゲン成分の寡多によりコラーゲン線維の高次構造が影響を受けることが知られている。よって非コラーゲン成分のコラーゲンへの相互作用の詳細は今後生体内でのコラーゲン線維の形成機構を解明する上で必要な情報となるが、今回その一部が明らかになったと考えられる。

Analysis of interaction between extracellular matrix dermatopontin and collagen

Dermatology, Department of Anatomy, Biology and Medicine, Faculty of Medicine, Oita University

Osamu Okamoto, Naoya Takahashi, Aya Suzuki, Tetsuya Ebihara, Shunji Hattori, Motoyoshi Nomizu, Eijiro Adachid, Sakuhei Fujiwara

[Purpose] Dermatopontin (DP) is an abundant noncollagenous component in the extracellular matrix (ECM). Because DP modifies the fibrillogenesis of type I collagen, the aim of this study is to examine the mode of interaction between DP and type I collagen.

[Methods] The spatial relationship between DP and collagen was assessed by immunoelectron microscopy. The interaction between DP and type I collagen was examined by solid-phase and co-precipitation assays. Synthetic overlapping peptides were generated and used for the determination of the interaction site, by inhibiting the interaction between these molecules. Several modifications were introduced to collagen and the prerequisite of this molecule to interact with DP was examined.

[Results] DP distributed on the surface of collagen microfibrils. In solid-phase assay, DP showed dose-dependent interaction with type I collagen as well as gelatin. The same result was given by co-precipitation assay. The interaction between these molecules was abolished by NaCl. The interaction site of DP with collagen was specified to the fourth loop. For collagen to interact with DP, neutral and basic isoelectric point of the molecule, especially the charge of lysine residue was supposed to be important.

[Discussion] The collagen molecules are present in the ECM by forming complexes with noncollagenous components, and more importantly, the collagen microfibril structure is affected by these components including DP. Therefore close examination of interaction of these noncollagenous components with collagen would provide informations about the mechanisms during fibrillogenesis, and a part of the information was given in this study.

A22 電顕トモグラフィーによる基底膜の骨格構造

¹岩手医科大学 歯学部 口腔解剖学第一講座

大澤 得二¹ 野坂 洋一郎¹

Ranaの幼生の変態時において、尾の表皮基底膜に網状構造が出現することが知られている。これはIV型コラーゲンを主体とする基底膜の骨格構造を示すものかもしれない。今回は日立透過型電子顕微鏡H-7650（電子線トモグラフィー用3D-TEMシステム）を用いて、この網状構造のトモグラムを作製したので報告する。ヤマアカガエル *Rana temporaria ornativentris* のStage XXII~XXIVの個体をクロレトンで麻酔後、尾部を切断して電子顕微鏡観察用に固定した。70nm厚のエボン切片を作製して上記の日立トモグラフィーシステムでトモグラムを作製した。表皮基底膜の崩壊過程においてlamina lucidaにおいて1辺が約40nmのハニカム構造が観察されたが、今回は像を回転させることによりZ軸方向の情報も得ることができた。このハニカム構造は平面的なものではなく、Z軸方向に線維を突出させながら、ゆるく折れ曲がっていることが明らかとなった。Yurchenko and Furthmayr (1984) はIV型コラーゲン分子による基底膜の骨格構造のモデルを発表しているが、それに大変近似の像を得たと思われる。

Basic framework of the basement membrane revealed by electron computed tomography.

Oral Anatomy I, Iwate Medical University School of Dentistry

Tokuji Osawa, Yohichiro Nozaka

It is known that the honeycomb structure appears in the Rana epidermal basement membrane during metamorphosis. This structure may be the basic framework of type IV collagen in the basement membrane. We will report the tomogram of this structure obtained by a Hitachi H-7650 3D-TEM system. Tadpoles (*Rana temporaria ornativentris*, Stage XXII~XXIV) were anesthetized with chloretone. The tails were excised and fixed for electron microscopy. 70 nm-thick sections were cut and the electron computed tomograms were made. With this method, the honeycomb structure with 40 nm-long sides was observed. By the rotation of this tomogram the Z-axis information was also obtained. This honeycomb structure was not flat, but was slightly bent to the Z-direction. This structure was quite similar to the scheme reported by Yurchenko and Furthmayr (1984).

A23 (崔式)中医気功経絡療法による混合性結合組織病改善例の報告

¹日本中医気功瘦身協会 宮医堂中国宮廷医学気功経絡療法院

崔 星¹ 崔 学林¹

背景と目的

混合性結合組織病 (Mixed Connective Tissue Disease: MCTD) は膠原病重複症候群の中の一病型に分難する原因不明の難治性疾患で、日本では1993年から厚生省が特定疾患に指定されている。臨床的に全身性エリテマトーデス (SLE) 様、強皮症様、多発性筋炎様の症状が混在し、かつ血清中に抗U1-RNP抗体が高値で検出される。今回われわれは、中医学内気功経絡療法を用いて中～重度MCTD患者の著名な症状改善例を経験したのでご報告する。

方法

患者、女性、32歳、24歳時にMCTDと診断され、入院時は最大60 mgのステロイドを投与していた。近年8 mgのプレドニゾロンの治療を受けていた。2005年8月より当治療院に通いはじめ、当院が独自に開発した崔式全身内気功金剛指経絡刺激療法を10ヶ月間受けた。

結果と考察

当患者は10ヶ月間全身内気功金剛指経絡刺激療法を受けて以来、リウマチで強張っていた手指関節の肥大症状が著名に改善され、全身状態も治療前より良くなった。また、プレドニゾロン使用量も2年間以上8 mg投与していたのが、6-7 mgまで下げ、一日置きに服用しても病状が安定に保つことができた。現在、抗U1RNP抗体値、血清筋原性酵素CK、GOT、LDH値や血液生化学指標などが正常範囲値を維持している。以上より、中医学内気功経絡療法は難治性疾患であるMCTD治療に有効であることが判明し、今後症例を増やしてさらにその効果を確かめていく予定である。

Effective Treatment of Mixed Connective Tissue Disease With Sai-Style Chinese Qigong Meridian Therapy

Japan Chinese Medical Qigong Diet Association,
Kyuido Chinese Medical Qigong Meridian Therapy
Facility

Sai Sei, Sai Gakurin

Background & Aims

Mixed connective tissue disease (MCTD) is an overlap syndrome as an "apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with high titers of antibody to an extractable nuclear antigen", and was defined as an intractable disease from 1993 in Japan. It is clinically characterized by features of two or more defined autoimmune diseases, namely systemic lupus erythematosus (SLE), systemic sclerosis (scleroderma), dermato- or polymyositis, or rheumatoid arthritis. Here, we try to present a case report of effective treatment of MCTD with Sai-style Chinese Qigong Meridian Therapy.

Materials & Methods

A 32 years old female patient diagnosed as MCTD 8 years ago, and treated with Prednisolone at concentration of 60 mg at first. The dose of Prednisolone was used at 8 mg in recent 2 years. From Aug 2005, the patient was treated with Sai-style Chinese Qigong Meridian Therapy for 10 months.

Results & Conclusions

After treatment with Sai-style Chinese Qigong Meridian Therapy for 10 months, a significant improvement of scleroderma and rheumatoid arthritis was obtained. The dose of Prednisolone was reduced to 6-7 mg every 2 days and the patient's condition is stable. All the MCTD-concerning parameters such as U1RNP, CK, GOT and LDH are in normal ranges. In conclusion, Sai-style Chinese Qigong Meridian Therapy is effective to treat MCTD.

A24 靱帯線維芽細胞と細胞外マトリックスの周期的伸張負荷による構造変化～単層培養, 3次元培養下での違い～

¹防衛医科大学校 整形外科

²国立病院機構村山医療センター 整形外科

³慶應義塾大学 医学部 整形外科

金子 大毅¹ 笹崎 義弘² 菊地 寿幸² 根本 孝一¹
松本 秀男³ 戸山 芳昭³

【目的】靱帯の強い抗張力は、伸張方向に対して平行に配列したコラーゲン線維の構造に由来する。再生靱帯においてコラーゲン線維と細胞の配列を整えることは重要であるが、伸張負荷による細胞と細胞外マトリックスの構造変化については、未だ不明な点が多い。われわれは、単層培養と3次元培養系における、伸張負荷による靱帯由来線維芽細胞と細胞外マトリックスの構造変化について検討した。

【方法】日本白色家兎膝前十字靱帯から細胞を単離して増殖させた後、1型コラーゲンコーティングしたシリコン膜上に付着させたものを単層培養群、1型コラーゲンゲル内に包埋培養したものを3次元培養群とした。それぞれの群の細胞に、伸張負荷装置を用いて6%、0.1 Hzの周期的伸張負荷を1日に3時間ずつ、3日間加えた。位相差顕微鏡、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いてそれぞれの群について、伸張負荷前後での細胞配列、細胞骨格(actinとvimentin)、 $\beta 1$ integrin分布の変化を観察した。

【結果】単層培養群においては、伸張負荷に対して細胞は垂直方向に配列し、細胞骨格も同方向に配列した。またintegrinはactin stress fiberの両端に局在した。一方、3次元培養群では、伸張負荷により細胞は負荷と平行に配列し、紡錘形に伸張されていた。3次元培養群では、actinはstress fiberを形成せず、またインテグリンの分布も負荷方向に局在していた。

【考察】靱帯由来線維芽細胞の伸張負荷に対する配列の変化は、単層培養群と3次元培養群で異なった。力学的負荷は再生靱帯に整然とした配列をもたせるのに有効と考えられるが、このためには3次元培養下で伸張負荷を与えるべきと思われた。

STRAIN INDUCED REARRANGEMENT OF INTEGRIN AND CYTOSKELETON WITHIN LIGAMENT-FIBROBLASTS

National Defense Medical College

Daiki Kaneko, Yoshihiro Sasazaki, Toshiyuki Kikuchi, Kohichi Nemoto, Hideo Matsumoto, Yoshiaki Toyama

Introduction

Adequate application of strain might promote the tissue-engineering ligament in which well-aligned bundles of collagen fibrils are formed. The aim of this study is, using confocal laser scanning microscopy (CLSM), to visualize the strain induced rearrangement of integrin and cytoskeleton in ligament fibroblasts either seeded on substrate or in collagen gel.

Materials and methods

Ligament derived fibroblasts were isolated from Japanese white rabbits and seeded either on silicon substrate or in type1-collagen gel. In each culture condition, using a cell-stretch device (ST-140, STREX), fibroblasts were subjected to 0-6% cyclic strain at 0.1Hz for 3 hours daily. Beta1 integrin, actin, vimentin and nucleus were immunostained to observe with CLSM.

Results

Cells seeded onto silicon membranes tended to align perpendicular to the direction of applied strain. Actin and vimentin were aligned perpendicular to the direction of applied strain. Integrin was distributed on the polar sides of stretched cells and located at the both ends of actin stress fibers. On the other hand, cells in collagen gel were aligned parallel to the direction of applied strain. Although actin did not form stress fibers, it was distributed along the stretched cells.

Integrin was also distributed along the spindle shaped cells and localized on the polar sides of the cells.

Discussion

This study has firstly visualized the strain-induced changes in cell morphology and distribution of integrin and cytoskeleton within fibroblasts seeded either on substrate or in collagen gel. Mechano-transduction process seems to be different between 2-D and 3-D culture conditions.

*A25 膜型タイプ1マトリックスメタロプロテアーゼの
腱・靭帯におけるコラーゲン線維束成長への関
与

¹慶應義塾大学医学部整形外科

²クリーブランドクリニック生命医用工学部門

³トーマスジェファーソン大学病理学

⁴慶應義塾大学医学部病理学

榎本 宏之¹ バサンジ アミット² バーク デビッ
ド³ 岡田 保典⁴ 戸山 芳昭¹ アプテ スニール²

【目的】マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)は細胞外マトリックスを分解し、その過剰発現は変形性関節症や関節リウマチでの軟骨変性や関節破壊など様々な病態に関与する。一方でMMP阻害剤の臨床治験投与による関節拘縮や筋肉痛、膜型タイプ1 MMP (MT1-MMP)欠損マウスでの関節線維症は、MMPが生体の恒常性維持にも関与することを示唆している。今回、MT1-MMP欠損マウスにおける腱・靭帯の表現型を解析して、MT1-MMPの腱・靭帯発生への関与を検討した。

【方法】Zhouらに報告されたMmp-14(+/-)を交配してMT1-MMP(-/-)マウスを作成した(N群)。野生型(W群)胎生15.5日、生後3日、1週、2週時における膝周囲の腱・靭帯におけるMT1-MMPの発現を免疫染色で検討した。次に生後1日、3日、1週、2週で、野生型およびMT1-MMP(-/-)マウスより長趾屈筋腱を採取して、腱のコラーゲン線維束を透過型電子顕微鏡(TEM)で観察後にデジタル画像を撮影し、コラーゲン線維束の形態を画像処理ソフトで解析した。

【結果】W群の免疫組織染色による検討では、いずれの時期でも膝蓋腱、前および後十字靭帯など靭帯・腱実質部および付着部でMT1-MMPが産生されていた。TEM解析では生後1日でその差は明かでなかったが、3日目ではN群ではW群に比してより小さい径と大きい径の線維束が混在しており、線維束周囲も粗造であった。1週ではW群で大小線維束が2相性に分布していたのに対して、N群ではより小さい線維束が主体であった。この傾向は2週時により顕著になった。

【考察】これまでMMPの過剰発現によるマトリックス分解が注目されてきたが、腱・靭帯のコラーゲン線維束の横径成長にもMT1-MMPが必須であることが明らかになった。

Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase
regulates collagen fibril growth of tendon and
ligament

Dept of Orthopaedic Surgery, Keio University

Hiroyuki ENOMOTO, Amit VASANJ, David BIRK,
Suneel APTE, Yasunori OKADA, Yoshiaki TOYAMA

[Objective] Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is a membrane anchored collagenase and its deficient mice showed arthrofibrosis. To investigate the involvement of MT1-MMP in the collagen fibril growth in tendon and ligament, we analyzed their structural property in the deficient mice.

[Materials and Methods]

The generation of Mmp14 null mice has been reported previously by Zhou et al. To confirm the production of MT1-MMP, we performed immunohistochemistry on sections of knee joints from 15.5 dpc embryos, 3d, 7d, and 14d postnatal mice. Cross sections of flexor digitorum longus were examined and photographed using a transmission electron microscope (TEM). Histomorphometric analysis was performed using software.

[Results]

Immunolocalization of MT1-MMP was detected in patellar tendon as well as in cruciate and collateral ligaments. Morphometric analysis of TEM showed consistent differences at 3d, 7d, and 14d. At 3d TEM images in null group showed heterogeneous distribution diameters of fibrils including smaller as well as larger fibrils than those in wild type, which were homogeneously distributed. The surface shape of each fibril in null mice was not smoothly round. At 7d, wild type fibrils show a bimodal distribution of small and large fibrils, but in the null mice, the fibrils were mainly composed of smaller diameter fibrils. These differences became more pronounced at 14d.

[Discussion]

This study provides the observation that MT1-MMP, a cell-surface enzyme previously implicated in pro-MMP2 activation and collagenolysis, is also essential for optimal development of collagen fibrils in tendon and ligament.

A26 コラーゲン誘導関節炎マウスにおける沖縄産柑橘シークワーサー由来ノビレチンの関節破壊抑制作用

¹東京薬科大学 薬学部 生化学・分子生物学教室

²中国中医科学院 中薬研究所

³中日友好病院

⁴中国中医科学院 基礎理論研究所

⁵(独)農業・食品産業技術総合研究機構 生物系特定産業技術研究支援センター

今田 啓介¹ Lin Na² Liu Chungfang² Xiao Cheng³ Jia Hongwei⁴ Wu Hao⁴ 矢野 昌充⁵ 佐藤 隆¹ 伊東 晃¹

【目的】培養細胞を用いた *in vitro* 実験で沖縄産柑橘シークワーサー由来ポリメトキシフラボノイドであるノビレチン(5, 6, 7, 8, 3', 4'-hexamethoxy flavone)が抗リウマチ作用を発揮することは周知であるが, *in vivo* における作用については不明のままである。そこで, コラーゲン誘導関節炎(CIA)マウスにおけるノビレチンの関節破壊抑制作用を検討した。

【方法】ウシtype IIコラーゲンの皮内投与により作成したCIAマウス(DBA1/J, 雄)に初回免疫より21日目から3週間ノビレチン(15, 30または60 mg/kg/day)を1日1回腹腔内投与した。その後, 摘出膝関節部の組織切片を用いて病理組織学的評価を実施するとともに, matrix metalloproteinase (MMP)-13, MMP-3およびtissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 mRNA発現を *in situ* hybridization法により, cyclooxygenase (COX)-1およびCOX-2産生を免疫染色法により検討した。また, 関節組織中サイトカインmRNA発現量およびタンパク質量をそれぞれリアルタイムRT-PCR法およびELISA法により, prostaglandin (PG) E₂量をRIA法によりそれぞれ測定した。

【結果】ノビレチンはCIAマウスの関節炎罹患率および重症度スコアを投与量依存的に抑制した。病理組織学的評価においては滑膜の炎症, パンヌスの形成, 骨・軟骨破壊のいずれについてもノビレチンの投与量依存的な抑制作用が観察された。CIAマウスにおける関節組織中IL-1 β , TNF α ならびにIL-6量の増加はいずれもmRNA発現レベルにおいて抑制された。また関節組織中PGE₂量はノビレチンによりCOX-2産生抑制と共に低下した。さらに, 関節軟骨においてはノビレチンによるMMP-13およびMMP-3 mRNA発現の抑制, ならびにTIMP-1 mRNA発現の促進が観察された。

【結語】ノビレチンは関節炎抑制作用ならびに関節軟骨において, MMP-13, MMP-3発現抑制作用, さらにはTIMP-1発現促進作用を発揮する優れた抗リウマチ薬の候補である。

Nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, suppresses inflammation and cartilage destruction in collagen-induced arthritis mice

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, Tokyo, Japan

Keisuke Imada¹, Na Lin², Chunfang Liu², Cheng Xiao³, Hongwei Jia⁴, Hao Wu⁴, Masamichi Yano⁵, Takashi Sato¹, and Akira Ito¹,

²Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, China ³Institute of Clinical Research, China-Japan Friendship Hospital, Beijing, China

⁴Institute of Chinese Basic Theory, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, China ⁵Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, Tokyo, Japan

We have previously reported in *in vitro* studies that nobiletin (5, 6, 7, 8, 3', 4'-hexamethoxy flavone), a citrus polymethoxy flavonoid, is useful for the treatment of arthritis. But its *in vivo* actions have not been clarified. In this study, we investigated the effects of nobiletin on inflammation and cartilage destruction in collagen-induced arthritis (CIA) mice.

Nobiletin (15, 30, and 60 mg/kg) was intraperitoneally administered daily for three weeks from day 21 after initial immunization in CIA mice. Clinical assessment of incidence and arthritis severity were conducted during the experiment. At the end of the experiment, pathological severity was evaluated, and the levels of IL-1 β , TNF α , and IL-6 in joint tissues were measured by real-time RT-PCR and ELISA. Matrix metalloproteinases (MMPs)-13 and -3, and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 mRNA in the articular cartilage were detected by *in situ* hybridization. Prostaglandin (PG) E₂ was measured by radio immunoassay. Cyclooxygenases (COXs)-1 and -2 were determined by immunohistochemistry.

Nobiletin significantly reduced arthritis severity including synovial inflammation, pannus formation, and the destruction of cartilage and bone accompanying the suppression of the production of IL-1 β , TNF α , and IL-6 in the joint tissues of CIA mice. PGE₂ levels were also decreased by nobiletin according to the selective suppression of COX-2 production. Moreover, nobiletin interfered with the expression of MMPs-13 and -3 mRNA, whereas TIMP-1 mRNA expression was augmented by nobiletin.

Based on these results, we provided novel evidence that nobiletin is a useful candidate for the treatment of arthritis diseases.

*A27 変形性関節症(OA)関節軟骨における膜型 ADAM12の発現とOA軟骨細胞増殖への関与

¹慶応義塾大学医学部病理学教室

²九州大学医学研究院整形外科

岡田 愛子¹ 望月 早月¹ 谷田部 拓¹ 木村 徳宏¹
潮見 隆之¹ 岩本 幸英² 岡田 保典¹

【目的】ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) は、細胞膜上の増殖因子やレセプターのshedding、細胞の接着・運動などに関与する多機能分子である。本研究ではOA関節軟骨において高発現するADAM分子を同定し、病態との関連を検討した。

【方法】OAと正常関節軟骨組織において13種類の酵素型ADAMの発現をRT-PCRでスクリーニングし、膜型ADAM12 (ADAM12m)の遺伝子・タンパク発現をreal-time PCR、in situ hybridization、免疫組織化学、immunoblotting法を用いて比較・検討した。また、培養OA関節軟骨細胞を用いてTGF- β 刺激下におけるIGF-I (insulin-like growth factor -I)/IGFBP-5 (IGF binding protein-5)系への作用を調べた。

【結果】ADAM12mはOA関節軟骨では正常軟骨に比べて7.2倍有意に高発現しており、OA軟骨細胞の細胞膜上に活性型酵素として発現していた。ADAM12mのOA関節軟骨での免疫染色陽性率は、Mankin score (軟骨破壊の程度)、軟骨細胞のクローニングの程度、PCNA染色陽性率と正の相関を示した。培養軟骨細胞はTGF- β 刺激で増殖が亢進し、ADAM12mの発現も増幅された。TGF- β による増殖促進はADAMインヒビター、ADAM12に対する中和抗体、IGFレセプター中和抗体、ADAM12のsiRNAにより抑制された。また、TGF- β 刺激時のIGFBP-5分解はADAMインヒビターやADAM12 siRNAにより抑制された。

【考察と結論】IGF-IはIGFBPとの複合体形成によってその活性が制御されている。本実験により、ヒトOA関節軟骨で高発現するADAM12mはTGF- β 刺激によるIGF-I/IGFBP-5シグナルを介した軟骨細胞増殖とクローニングに関与することが示唆され、関節軟骨再生にも何らかの役割を果たす可能性が考えられた。

Overexpression of ADAM12 in osteoarthritic cartilage and its role in chondrocyte proliferation

Department of Pathology¹, School of Medicine, Keio University, Kyushu University,; Department of Orthopaedic Surgery², Graduate School of Medical Sciences

Aiko Okada^{1,2}, Satsuki Mochizuki¹, Taku Yatabe¹, Tokuhiro Kimura¹, Takayuki Shiomi¹, Yukihide Iwamoto² and Yasunori Okada¹

Objective. ADAMs (a disintegrin and metalloproteinases) are a gene family of multifunctional proteins. The purpose of the present study was to determine the ADAM species up-regulated in osteoarthritic cartilage and examine its biological function.

Methods. Expression of 13 different metalloproteinase-type ADAM species was screened by RT-PCR, and expression levels of the prototype membrane-anchored ADAM12 (ADAM12m) were determined by real-time quantitative PCR. ADAM12m expression in articular cartilage was examined by in situ hybridization, immunohistochemistry and immunoblotting.

Results. ADAM12m was selectively expressed in 87% of the osteoarthritic cartilage, and the expression level was significantly higher in osteoarthritic cartilage than in normal cartilage. In situ hybridization showed that osteoarthritic chondrocytes are responsible for the gene expression. ADAM12m was immunolocalized on the cell membranes of osteoarthritic chondrocytes, and the immunoreactivity directly correlated with Mankin score and degrees of chondrocyte cloning and proliferation. Immunoblotting analysis of osteoarthritic chondrocytes demonstrated an active form of ADAM12m. ADAM12m expression in osteoarthritic chondrocytes was selectively enhanced with transforming growth factor- β (TGF- β), which also induced chondrocyte proliferation and degradation of insulin-like growth factor binding protein-5 (IGFBP-5). TGF- β -induced chondrocyte proliferation was inhibited by the suppression of the IGF-I signaling. In addition, TGF- β -induced chondrocyte proliferation, chondrocyte cluster formation in agarose gel culture and digestion of IGFBP-5 were inhibited with ADAM inhibitor, anti-ADAM12 antibody and siRNA of ADAM12.

Conclusion. These data suggest the novel function that ADAM12m is involved in the chondrocyte cloning in osteoarthritic cartilage through enhanced bioavailability of IGF-I from the IGF-I/IGFBP-5 complex by selective IGFBP-5 degradation.

A28 前駆軟骨細胞株ATDC5を用いた生理活性リゾリン脂質LPAおよびS1Pの作用解析

¹京都大学 再生医科学研究所 生体分子設計学分野

近藤 俊哉¹ 伊東 良太¹ 開 祐司¹

軟骨はその発生過程において、未分化間葉系細胞の凝集、軟骨分化、特異的細胞外マトリックスの沈着、肥大化/石灰化といった複数の段階を経て形成される。マウスATDC5細胞はこのような軟骨形成過程を培養系において再現する。lysophosphatidic acid (LPA)およびsphingosine-1-phosphate (S1P)は血中に存在し多彩な生理作用を示すリゾリン脂質であり、生体内に広く分布する細胞膜上のGタンパク共役型受容体に作用して、その増殖、分化、アポトーシス、遊走、浸潤等に影響を与えることが知られている。今回我々はATDC5細胞にLPA受容体LPA1、或いはS1P受容体S1P1が発現することを見出し、この細胞系を用いてLPA或いはS1Pの作用解析を行った。ATDC5細胞の軟骨分化過程に伴い、S1P1の発現レベルに変動は見られなかったが、LPA1の発現レベルは変動し、未分化期では高いが軟骨分化に伴って減少し、さらに石灰化するに従って再び増加することが明らかとなった。一方ATDC5細胞の移動に対するLPA或いはS1Pの影響を調べると、LPAが濃度依存的にATDC5細胞の移動を促進し、またこの効果がGi阻害剤PTX、或いはLPA受容体特異的拮抗剤Ki16425により抑制されること、或いはS1PがPDGFによる細胞移動を濃度依存的に抑制することが明らかとなった。さらに、血清存在下で進行するATDC5細胞の軟骨分化過程に対し、LPAやS1Pの添加は特に影響を及ぼさなかったが、Ki16425の存在下では軟骨分化が著しく抑制されることも明らかとなった。これらの結果は、LPAやS1Pの作用が軟骨前駆細胞の移動や軟骨細胞分化等を介して軟骨形成の制御に関与する可能性を示唆している。

Functional analysis of bioactive lysophospholipids LPA and S1P using chondrogenic cell line ATDC5

Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

Shunya Kondo, Ryota Ito, Yuji Hiraki

Chondrogenesis is a multi-step process that involves mesenchymal condensation, chondrogenic differentiation, cartilage extracellular matrix deposition, and cell hypertrophy/calcification. Mouse chondrogenic cell line ATDC5 recapitulates these sequential events *in vitro*. Lysophosphatidic acid (LPA) and sphingosine-1-phosphate (S1P) are bioactive lysophospholipids which can activate the G-protein-coupled receptor on cell surfaces and participate in various cellular processes, such as proliferation, differentiation, apoptosis, migration, and invasion. In this study, we found that ATDC5 cells expressed both the LPA receptor, LPA1 and the S1P receptor, S1P1, and attempted to study the effects of these lipids in this cell line. The level of LPA1 expression significantly changed during the chondrogenic differentiation of ATDC5 cells, i.e. it was high in the undifferentiated stage, decreased during the chondrogenic differentiation, and increased again in the hypertrophy/calcification stage, whereas there was no obvious change in the level of S1P1 expression. Moreover LPA promoted migration of ATDC5 cells in a dose-dependent manner. This effect was blocked by the addition of Gi inhibitor, PTX or LPA receptor antagonist, Ki16425. S1P suppressed PDGF-induced migration of ATDC5 cells in a dose-dependent manner. Ki16425 clearly suppressed the serum-induced chondrogenic differentiation of ATDC5 cells, although the addition of LPA or S1P showed no obvious effect on this process. These results suggest the possibility that LPA and S1P are involved in the regulation of chondrogenesis through the regulation of migration and differentiation of chondroprogenitor cells.

*A29 ヒト骨芽細胞において活性持続型ビタミンCは型コラーゲン合成を介して細胞増殖を促進する

¹神奈川歯科大学学生体管理医学講座薬理学分野

²神奈川歯科大学学生体機能学講座生化学・分子生物学分野

前畑 洋次郎¹ 高見沢 紳治² 加藤 靖正² 李 昌一¹ 畑 隆一郎²

【目的】我々はヒト骨芽細胞の増殖・分化にコラーゲンが必須であることを報告した (Takamizawa and Maehata et al., Cell Biol. Int. 2004)。また、骨の骨格形成に重要なI型コラーゲンが骨芽細胞の分化を促進することを示した。(Maehata et al., Matrix Biology.2006) しかし、細胞増殖に関するコラーゲン分子種はまだ特定されていない。そこで骨芽細胞の増殖に関するコラーゲン分子種の検討を行った。

【方法】ヒト骨芽細胞様細胞であるMG-63細胞を活性持続型ビタミンC (Asc 2-P)、存在下および非存在下で培養した。遺伝子発現の変化はcDNAマイクロアレイ法、ノーザンブロット法及びRT-PCR法を用いて評価した。さらに、コラーゲンタンパク質の合成量はフルオログラフィーにより測定した。

【結果】Asc 2-PはMG-63細胞の増殖、および型コラーゲン合成を促進したが、本実験条件ではI型コラーゲン α 鎖遺伝子であるCOL1A1の発現に変化は見られなかった。正常ヒト骨芽細胞及び、ヒト骨髄由来未分化幹細胞においても同様の結果が得られた。また、型コラーゲン被覆培養皿上ではMG-63細胞の増殖活性は促進された。さらに、siRNAを用いて型コラーゲン α 鎖遺伝子であるCOL3A1の発現を阻害したところ、COL3A1の発現抑制レベルに比例してMG-63細胞の細胞増殖活性は低下した。

【結論】型コラーゲンはヒト骨芽細胞においてマイナー成分ではあるが、細胞増殖を促進するコラーゲン分子種であることが示された。また、骨折治癒初期過程や、頭蓋骨縫合部に拡大矯正力を加えた際に、型コラーゲンの発現が促進されることから、骨基質に僅かに存在している型コラーゲンは骨形成時、および再生時の骨芽細胞増殖に必須であると考えられる。

Type III collagen is essential for growth acceleration of human osteoblastic cells by ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Kanagawa Dental College, 82 Inaoka-cho, Yokosuka, 238-8580, Japan

Yojiro Maehata, Shinji Takamizawa, Shigeyuki Ozawa, Yasumasa Kato, Masaichi-Chang-il Lee, Ryu-Ichiro Hata

(Introduction) Collagen has been reported to be essential for the proliferation of various kinds of cells including human osteoblastic cells (Takamizawa et al., 2004), but the type(s) of collagen responsible for growth regulation is not known. Thus, we examined molecular species of the collagen, which regulates the growth of the human osteoblastic cells.

(Methods) We cultured human osteosarcoma-derived MG-63 cells, normal human osteoblasts and human bone marrow-derived mesenchymal stem cells, in the presence or absence of ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative (Asc-2P). The levels of mRNA were analyzed by cDNA microarray method, northern blotting and/or RT-PCR. The production of collagen proteins was determined by gel electrophoresis followed by fluorography.

(Results) We found that Asc 2-P stimulated both cell growth and the expression of mRNA for type III collagen, but not the expression of type I collagen in all cell lines examined. Among MG-63 cell clones, their growth rates correlated significantly with their COL3A1 mRNA levels but not with their COL1A1 or COL1A2 messenger RNA levels. Transfection of MG 63 cells with siRNA for COL3A1 but not with that for COL1A1 decreased the growth rates of the transfected cells, concomitant with a drop in the level of COL3A1 mRNA. Furthermore, cell proliferation as observed by thymidine incorporation into DNA and cell number was increased when MG-63 cells were cultured on type III collagen-coated dishes.

(Conclusion) These results indicated that type III collagen is the collagen component responsible for the growth stimulation of human osteoblastic cells.

*A30 軟骨特異的TGF- β I型受容体の欠損マウスにおける軸骨格形成異常

¹九州大学 医学部 整形外科

²アメリカ国立衛生研究所 歯科頭蓋研究分野

³ルンド大学 分子医科遺伝子治療分野

鳥越 清之¹ Ishijima Muneaki² Nakamura Takashi² Haruyama Naoto² Kulkarni Ashok² Karlsson Stefan³ Yamada Yoshihiko² 岩本 幸英¹

【目的】TGF- β シグナルの軟骨での発達における制御は、未だ、明らかにされておらず、個体形成にいかに関与しているか、生体での役割を解明することは、きわめて重要である。In vitroの実験において、これまで、軟骨細胞におけるTGF- β シグナルの役割に関して様々な報告がなされてきている。中でも、TGF- β は、MEK-ERK-E1k1伝達系を介して、軟骨細胞の増殖を促し、軟骨様細胞株において、細胞外マトリックス主成分であるaggrecan遺伝子の発現誘導にて、軟骨増殖を強いている。一方、軟骨細胞の最終分化を抑制し、前肥大軟骨層において、それ以後の分化を抑制している。また、ATF-2分子は、TGF- β に反応し、p38MAPキナーゼの活性を通して、リン酸化され、リン酸化されたATF-2は、Smad3と協調し、軟骨成熟を抑えるといった報告がなされており、以上より、軟骨細胞の制御に対して、正ならびに負の作用が報告されている。【方法】今回の研究は、in vivoにおいて軟骨発達におけるTGF- β シグナルを解析するもので、軟骨特異的TGF- β I型受容体の欠損マウスを用いて、そのシグナル伝達を抑制し、その表現系を解析した。【結論】外観は、四肢に、比較的表現系が少ないものの、頭蓋骨ならびに脊椎には、著明な形態異常を呈しており、様々な細胞外マトリックスの産生低下が、この表現系に関与していた。それらを含め、今回報告する。

Abnormal axial skeleton in TGF- β type I receptor-deficient mice

Dept.of orthopedic surgery Kyushu university

Kiyoyuki Torigoe, Muneaki Ishijima, Takashi Nakamura, Naoto Haruyama, Ashok B. Kulkarni, Stefan Karlsson, Yukihide Iwamoto, Yoshihiko Yamada

Transforming growth factor beta (TGF- β) initiates its diverse cellular response during development and pathogenesis by binding to a specific cell surface complex consisting of TGF- β type I (T β r/Alk5) and type II (T β r/II) receptors, and activating downstream signaling through Smad and MAPK proteins. TGF- β has been implicated in the growth and differentiation of chondrocytes. For example, TGF- β induces aggrecan expression in chondrogenic cell lines. While TGF- β enhances chondrocyte proliferation, it inhibits the terminal differentiation of chondrocytes and helps them remain in the prehypertrophic stages. In response to TGF- β , ATF2 is phosphorylated via the activation of p38 MAP kinase. The phosphorylated ATF2 cooperates Smad3 to inhibit the rate of chondrocyte maturation. To study the role of TGF- β signaling in cartilage development and disease, we have created cartilage-specific conditional knockout mice for TGF- β receptor type I by mating floxed-T β r/ mice and with Col2a1 cre transgenic mice which express cre recombinase specific to cartilage under the control of the type II collagen promoter and enhancer. We found that in the mutant mice, development of the axial cartilage in the spine and skull was impaired, while appendicular cartilage was relatively normal. The upper portion of the vertebra was more severely disorganized than the lower portion. The formation of intervertebral disks were defective. Although chondrocytes were differentiated, histological staining indicated significantly reduced extracellular matrix and GAG (glycosaminoglycan) levels in mutant vertebral cartilage than wild-type cartilage. Mechanical force may cause the position-dependent and disproportionate abnormality of the vertebra.

A31 人工ECMの幾何学: ハニカム長軸構造を持つ人工細胞外マトリックスにおける血管・骨の新生誘導能について

¹北海道大学 名誉教授、高研バイオサイエンス研究所

²高研バイオサイエンス研究所

³北海道大学大学院 歯学研究科 口腔病態学講座

⁴(株)パイロットプレジション社

⁵北海道医療大学 歯学部口腔病理学講座

久保木 芳徳¹ 寺田 典子³ 北川 善政³ 高山 満利子⁴ 河野 牧子² 郁 小兵² 阿蘇 雄² 賀来 亨⁵ 宇尾 基弘⁶ 巨理 文夫⁶

私たちは、「人工ECM幾何学」を提唱し、再生医療への重要性を強調してきた。組織の再生には、細胞、細胞外マトリックス (ECM)、制御因子、栄養供給、力学刺激という5大要素の統合が必要であるが、そのうちECMについては、物理、化学、生化学的性質が詳しく追究されてきた一方、「人工ECMの幾何学的性質」の分析が等閑にされてきた。私たちはこの点に着目し、同一材料でも幾何構造によって組織の分化、成長に多大な影響を与えることを実証・報告してきた。今回、多数の直線状トンネルを有するハニカム構造が、骨・軟骨・血管の再生医療に極めて有効であることを見出したので報告する。

【実験方法】直径3 mm、長さ1 ~ 4 mmの円柱の長軸方向に、37個の内径0.3mmのトンネルを有する多孔性 β -TCP (ハニカム β -TCP) を試作した。対照としてトンネルの無い β -TCPを用い、BMPと共に、4週齢WKAH系雄ラットの背部皮下に埋植した。2 - 5 週後、摘出物の生化学的分析 (ALP活性)、脱灰組織切片の組織学的分析を行った。

【結果】埋植後、2週にしてトンネル内に直線的に、多数の毛細血管が入り込み、4 mmの全長に達した。毛細血管の伸長に平行し、それと競うように骨組織も直線的に成長した。トンネル入口付近には、内皮細胞・骨芽細胞の予備軍と推定される多数の未確認細胞が結集した。

【考察と結論】このハニカム β -TCPは、吸収性の骨補填剤として有効である。従来品に無い多くの特徴をもつのみならず、血管新生と骨新生の相互関係研究に有用である。

【文献】

久保木芳徳・他：人工細胞外マトリックスの幾何学の統一原理、日本再生医療学会雑誌、再生医療、5: 20-30, 2006.

久保木芳徳・他：人工ECM細胞外マトリックスの幾何学、田畑泰彦、岡野光夫 編集、日本組織工学会監修、ティッシュエンジニアリング2006、東京、日本医学館、24-33, 2006.

Geometry of artificial ECM: inductions of bone and vasculature within the tunnels of honeycomb-shaped β -tricalcium phosphate ceramics *in vivo*

Hokkaido University and Koken Bioscience Institute, Pilot-Precision Co., Health Science University of Hokkaido

Yoshinori Kuboki, Michiko Terada, Yoshimasa Kitagawa, Mariko Takayama, Makiko Kono, Iku Shouhei, Yu Aso, Tohru Kaku, Motohiro Uo and Fumio Watari

We have been proposing a new science: geometry of artificial ECM, as an important background of tissue engineering (Kuboki et al., JBJS, 83A: 105, 2001). Essential properties of ECM were classified into four categories: (1) physical, (2) chemical, (3) biochemical and (4) geometrical properties, the last one of which, so far, has been poorly elucidated. Therefore we have shown by various instances that geometry of artificial ECM can clearly direct cell differentiation and tissue formation. Ten categories of geometries of artificial ECM were proposed as a strategic classification, and individual category was verified by each example, leading to conclusion that every tissue has its "optimal space" of artificial ECM, for the tissue formation in the body. The optimal spaces were exemplified by many cases including: vasculature, bone, cartilage and nerve formation. In this presentation, we used honeycomb shaped artificial ECMs (thickness and tunnel width of which were 1-4 mm and 0.3 mm, respectively) made by collagen, hydroxyapatite-coated collagen (Koken Co.), and β -tricalcium-phosphate (Pilot-Precision Co.), combined with BMP-7 and implanted subcutaneously into rats. After 2 weeks, it was clearly shown that new bone and capillaries developed straightly side by side, throughout the entire length of the tunnel (4 mm) of honeycomb shaped β -tricalcium phosphate. Within these tunnels the functional relationships between the osteoblasts and endothelial cells were vivid, due to their constantly close vicinities, which could not found in the other experimental systems. This artificial ECM is useful both for tissue engineering and studies of osteogenesis and vascularization.

*A32 低細胞密度のヒト子宮頸部ガン細胞SKG-IIからのPKC依存的なEMMPRINの細胞外分泌促進

¹東京薬科大学 薬学部 生化学・分子生物学

石井 美和¹ 佐藤 隆¹ 渡邊 真実¹ 今田 啓介¹
伊東 晃¹

【目的】ガン細胞膜上に発現するガン転移促進因子EMMPRIN (EMP)は、ガン細胞周囲の正常細胞からマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の産生を促進する。最近、EMPはMMP依存的限定分解または微小胞を介して分泌されると示唆されているが、EMPの分泌機構については十分に理解されていない。演者らは、EMPを恒常的に発現するヒト子宮頸部ガン細胞SKG-IIにおいて細胞密度の違いによるEMPの細胞外分泌調節を検討した。【方法】ConfluentおよびpreconfluentのSKG-II細胞、またはホルボールエステル(TPA)およびprotein kinase C (PKC)阻害剤を処理した細胞において培養液中のEMP量をWestern blot法により検討した。さらに、ヒト線維芽細胞においてMMP産生に対する分泌型EMPの作用を同様に検討した。【結果】培養上清中に膜型と同一分子量の糖鎖、NおよびC末端領域を有するEMPが検出されたことから、SKG-II細胞が全分子(whole molecule)のEMP (whEMP)を恒常的に分泌することが判明した。また、このwhEMP分泌はconfluentよりもpreconfluentの培養条件下において増強された。さらに、TPAはwhEMP分泌を促進すること、TPA誘導性およびpreconfluentのSKG-II細胞におけるwhEMP分泌がPKC阻害剤により抑制された。一方、whEMPは線維芽細胞のproMMP-1産生を促進し、この促進はEMP抗体により抑制された。また、whEMPはSKG-II細胞の移動活性を増強した。【結論】SKG-II細胞において、EMPは低細胞密度状況下にPKC活性化に起因して全分子型として細胞外に分泌されることで、MMP産生およびガン細胞移動を促進するガン転移促進因子として機能する。

Protein Kinase C-dependent Whole Molecule EMMPRIN Secretion in Human Uterine Cervical Carcinoma SKG-II Cells at Low Cell Density Population

Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, Hachioji, Tokyo, Japan

Miwa Ishii, Takashi Sato, Mami Watanabe, Keisuke Imada, and Akira Ito

Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) plays an important role in the acceleration of tumor invasion and metastasis by augmenting matrix metalloproteinase (MMP) production in peritumoral stroma cells. Since EMMPRIN is generally located on the cell surface, recent reports have shown that EMMPRIN is extracellularly secreted and thereafter stimulates tumor cell invasiveness. However, the regulatory mechanisms of EMMPRIN secretion in tumor cells remain to be clarified. In the present study, we examined the regulation of EMMPRIN secretion in a different cell density population of human uterine cervical carcinoma SKG-II cells, which are known to constitutively express EMMPRIN on the cell surface. Western blot analysis showed that SKG-II cells secreted whole molecule EMMPRIN with the same molecular weight as the membrane-bound form under preconfluent rather than confluent culture conditions. In contrast, there was little change in the level of membrane-bound EMMPRIN under both culture conditions. Phorbol ester (TPA) also stimulated SKG-II cells to secrete EMMPRIN. The augmentation of EMMPRIN secretion in both TPA-treated and preconfluent SKG-II cells was inhibited by the protein kinase C (PKC) inhibitor, RO-31-8425. In addition, the secreted EMMPRIN augmented the production of proMMP-1, and the augmented production was diminished by adding an EMMPRIN antibody. Furthermore, the secreted whole molecule EMMPRIN augmented SKG-II cell migration. Therefore, these results suggest that EMMPRIN is secreted by PKC activation in SKG-II cells at a low cell density population, and thereby results in the acceleration of tumor invasion and metastasis by increasing not only peritumoral MMP expression but also tumor cell migration.

*A33 分泌型EMMPRINによるガン細胞の移動活性促進作用とその活性部位の同定

¹東京薬科大学 薬学部 生化学・分子生物学

²東京薬科大学 薬学部 病態生化学

佐藤 隆¹ 渡邊 真実¹ 太田 智子¹ 今田 啓介¹
野水 基義² 伊東 晃¹

【目的】ガン細胞膜上に発現するEMMPRIN (EMP)は、2つの細胞外ループ構造(ループIおよびII)をもつガン転移促進因子である。また、EMPは細胞外へ分泌されることが報告され、分泌型EMPもガン転移促進に寄与する可能性が示唆されている。本研究では、ヒト子宮頸部ガン細胞SKG-IIからの膜貫通および細胞質領域を有するwhole molecule EMP (whEMP)のガン転移促進作用をガン細胞移動促進活性の観点から検討するとともに、その機能発現に必須な活性部位の同定を試みた。【方法】SKG-II細胞由来whEMP、膜貫通・細胞質領域を欠損した大腸菌発現型組換え体EMP (Δ TM-EMP)、各ループを網羅したEMPペプチドおよびそのペプチド抗体の作用をSKG-II細胞を用いたWound Assay法、およびSKG-II細胞とヒト線維芽細胞の共存培養におけるMMP-1産生調節により解析した。【結果】whEMPおよび Δ TM-EMPはSKG-II細胞の移動活性を促進した。また、両者による促進作用がループIIのアミノ酸配列(EM9)に対するペプチド抗体で阻害され、逆にこの合成EM9ペプチドが細胞移動活性を促進した。さらに、ループIに位置するアミノ酸配列(EM1)の合成ペプチドとそのペプチド抗体は共存培養におけるEMP依存的proMMP-1産生を抑制したが、whEMPおよび Δ TM-EMPによる移動活性促進作用には影響を及ぼさなかった。【考察】SKG-II細胞においてwhEMPは分子内糖鎖非依存的、かつEMPループII領域の活性部位を介してガン細胞の移動活性を増強することが初めて示唆された。すなわち、EMPは細胞外ループ構造の異なる活性部位を介してMMP産生促進作用とガン細胞の移動活性を調節するガン転移促進因子として機能するものと示唆される。

Augmentation of Tumor Cell Migration by Whole Molecule EMMPRIN Secreted from Human Uterine Cervical Carcinoma SKG-II Cells: Identification of an Active Site Located in the Loop II Region of EMMPRIN

Department of Biochemistry and Molecular Biology, and *Laboratory of Clinical Biochemistry, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, Hachioji, Tokyo, Japan

Takashi Sato, Mami Watanabe, Tomoko Ota, Keisuke Imada, Motoyoshi Nomizu*, and Akira Ito

Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) is involved in tumor invasion and metastasis progression by augmenting matrix metalloproteinase (MMP) production in peritumoral stroma cells. EMMPRIN has two extracellular loop domains; termed loops I and II, which are individually associated with the bioactivities of EMMPRIN including MMP induction. However, there is little evidence of active site(s) in the loop domains, which may be associated with the progression of tumor invasiveness. In the present study, we found that human uterine cervical carcinoma SKG-II cells secreted whole molecule EMMPRIN (whEMP), and that whEMP augmented not only proMMP-1 production in human fibroblasts but also SKG-II cell migration. *E. coli*-derived EMMPRIN mutant (TM-EMP) without sugar chains and transmembrane and cytoplasmic regions also augmented SKG-II cell migration, indicating that sugar chains in EMMPRIN were not requisite for its cell migration activity. Both whEMP and TM-EMP-augmented cell migration was inhibited by an antibody against an amino acid sequence (EM9) located in loop II. In contrast, a synthetic EM9 peptide enhanced SKG-II cell migration. Furthermore, a synthetic peptide coding an amino acid sequence (EM1) located in loop I was found to diminish EMMPRIN-mediated proMMP-1 production, but not to influence cell migration. Similarly, there was no change in cell migration in SKG-II cells treated with an antibody against EM1. Therefore, these results suggest novel evidence that whEMP augments tumor cell migration through an active site within the loop II region, which is distinguished from the active site for the augmentation of MMP production by EMMPRIN.

*A34 VEGF-A,-Cトランスジェニックマウス皮膚発癌モデルにおけるリンパ節転移とリンパ管新生の促進機序

¹愛媛大学医学部皮膚科

²マサチューセッツ総合病院

³ヘルシンキ大学

⁴スイス連邦工科大学

平川 聡史¹ 小玉 正太² アリタロ カリ³ 橋本 公二¹ マイケル デトマー⁴

多くの悪性腫瘍において、リンパ管を介した所属リンパ節転移は、腫瘍の進行を意味する。しかし、原発巣からリンパ節への転移と、リンパ系への転移拡大機序は、依然不明である。近年確立した培養ヒト皮膚リンパ管内皮細胞から、VEGF-A及びVEGF-Cが細胞増殖と遊走を促進することが明らかとなった。このことから、リンパ系の転移においてVEGF-AとVEGF-Cが果たす役割、すなわちリンパ管新生を検討するため、表皮特異的K14プロモーターを用いたVEGF-A/GFPあるいはVEGF-C/GFPを強発現するダブルトランスジェニックマウス(TG)を作成した。野生型対照群と共に多段階皮膚化学発癌を行った結果、VEGF-A TGは強力に血管新生を誘導し、原発巣では多数の乳頭腫と扁平上皮癌(SCC)を生じた。一方、VEGF-C TGは野生型と同様の腫瘤形成に留まった。しかし、VEGF-A及びVEGF-C TGに生じたSCCは、原発巣に際立ったリンパ管新生を誘導し、野生型に比べ、所属リンパ節への転移頻度を高めた。このことから、VEGF-AあるいはVEGF-Cにより誘導された新生リンパ管は、リンパ節転移を促進することが明らかになった。さらに重要なのは、遠隔(胸腔内)リンパ節を評価すると、VEGF-A及びVEGF-C TGでは野生型に比し、有意に転移巣が確認されたことである。VEGF-A TG及びVEGF-C TGでは、リンパ節転移巣で新たにリンパ管新生が誘導されることから、リンパ節内でのリンパ管新生は、リンパ系における腫瘍進展の新たな要因になることが推察される。さらにVEGF-A TG及びVEGF-C TGの所属リンパ節では、転移に先立ちリンパ管新生が誘導されることが、マウス皮膚化学発癌モデルで明らかになった。今後、リンパ管新生が癌治療の焦点になり、転移抑制を目標とする新たな治療戦略が期待される。

Targeted overexpression of VEGF-A or -C in the skin promotes lymph node metastasis and lymphangiogenesis

Department of Dermatology, Ehime University School of Medicine

Satoshi Hirakawa, Shohta Kodama, Kari Alitalo, Koji Hashimoto, Michael Detmar

The metastatic spread of tumor cells to sentinel lymph nodes (LN) via lymphatic vessels represents the first step of tumor progression in the majority of human cancers. However, the mechanism that mediate lymphatic metastasis to sentinel lymph nodes and further spread beyond remain unclear. We found that vascular endothelial growth factor (VEGF) -A and -C potently promote proliferation and migration of human dermal lymphatic endothelial cells in vitro. To directly investigate the importance of VEGF-A and -C in mediating metastasis via the lymphatic system, we generated transgenic mice that express either VEGF-A or VEGF-C, as well as green fluorescent protein, under control of the keratin 14 promoter. These mice were subjected to a standard chemically-induced skin carcinogenesis regimen. VEGF-A transgenic mice, but not VEGF-C transgenic mice, showed strongly enhanced tumor angiogenesis and accelerated and increased development of benign papillomas and of squamous cell carcinomas (SCC), as compared with wild-type controls. However, both VEGF-A and VEGF-C transgenic mice showed strikingly enhanced tumor lymphangiogenesis and sentinel LN metastasis. Importantly, the percentage of sentinel LN metastases that further spread to distant LN was significantly higher in VEGF-A and -C transgenic mice than in wild-type mice. VEGF-A or -C-overexpressing tumors continued to induce lymphatic vessel growth within metastatic LN. Surprisingly, VEGF-A or VEGF-C overexpressing primary tumors induced sentinel LN lymphangiogenesis even before metastasizing. This newly identified mechanism of intranodal lymphangiogenesis likely contributes to lymphatic metastasis and represents a new therapeutic target for the prevention or treatment of cancer metastasis.

*A35 ヒアルロン酸細胞外微小環境は腫瘍内リンパ管新生を促進する

¹信州大学大学院医学研究科加齢適応医科学系専攻
分子細胞学部門分子腫瘍学分野

²信州大・医・第二外科

³科技構・CREST、愛知県がんセ・分子病態

⁴愛知医科大・分子医科研

小林 宣隆¹ 小山 洋¹ 藤森 実² 天野 純² 神
奈木 玲児³ 木全 弘治⁴ 谷口 俊一郎¹ 板野 直樹¹

【目的】ヒアルロン酸(HA)の過剰な産生は、多くの進行性乳癌において特徴的な臨床病理学的所見である。我々は昨年の本大会において、ヒアルロン酸合成酵素2

(HAS2) 遺伝子を導入した乳癌発症トランスジェニックマウスの解析から、乳癌細胞におけるヒアルロン酸の過剰な産生が、腫瘍間質と腫瘍血管の形成促進に働くことを報告した。今回我々は、本乳癌モデルマウスを用いて、HA細胞外マトリックスがリンパ管新生に及ぼす作用を検討したので報告する。

【方法】HA過剰産生群と対照群のマウスより乳癌組織を摘出して、その組織切片をリンパ管内皮特異的のマーカ分子であるpodoplaninに対する抗体を用いて免疫組織染色した。また、腫瘍組織よりRNAを抽出して、real time RT-PCR法により、リンパ管新生因子のVEGF-Cと-Dの発現を調べた。さらに、腫瘍からtumor-associated fibroblast (TAF)を分離して、細胞株として樹立した。ヒト乳癌細胞株MCF-7をTAF存在下あるいは非存在下でヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍形成並びにリンパ管新生に対するTAFの作用を検討した。

【結果】リンパ管の形成は、HA過剰産生腫瘍において腫瘍間質に高頻度に認められた。さらに、VEGF-Cや-Dの発現は、間質を取り巻く腫瘍部で増加していた。これらの結果は、腫瘍リンパ管の形成に腫瘍間質が密接に関与していることを示唆している。そこで、この可能性を明らかにするため、HA過剰産生腫瘍よりTAFを樹立し、ヒト乳癌細胞株MCF-7と共にヌードマウスに皮下移植して、腫瘍形成とリンパ管新生について検討した。その結果、TAF存在下では非存在下に比べ、腫瘍内リンパ管の増加とともに腫瘍の成長促進が認められた。

【結論】HAに富む細胞外微小環境は、腫瘍内に間質反応を惹起する結果、腫瘍-間質細胞の協調作用により腫瘍内リンパ管新生の促進に働くことが示唆された。

Hyaluronan-rich tumor microenvironment promotes intratumoral lymphangiogenesis.

Department of Molecular Oncology, Division of Molecular and Cellular Biology, Institute on Aging and Adaptation, Shinshu University Graduate School of Medicine; Department of Surgery, Shinshu University School of Medicine; Program of Molecular Patholog

Nobutaka Kobayashi, Hiroshi Koyama, Minoru Fujimori, Jun Amano, Reiji Kannagi, Koji Kimata, Shun ichiro Taniguchi, and Naoki Itano

OBJECTIVE: Overproduction and accumulation of hyaluronan (HA) in the most advanced breast cancers are well documented by extensive clinical evidence. Our previous studies using the transgenic mouse model of breast cancer have shown that overproduction of HA accelerated stromal reaction accompanied by formation of intratumoral neovasculature. Using this spontaneous cancer model, we evaluated here the role of HA in tumor lymphangiogenesis.

METHODS: Mammary tumors were surgically excised from HA-overproducing and control mice. Tissue sections were then immunostained with an antibody against podoplanin, a lymphatic vessel marker. Real time quantitative RT-PCR for the gene expression analyses of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and -D was performed using total RNA isolated from the mammary tumors. Tumor-associated fibroblasts (TAFs) were established from mammary tumors and subcutaneously inoculated with or without TAFs into nude mice.

RESULTS: Lymphatic vessel frequently penetrated and accumulated into the stromal compartments of HA-overproducing mammary tumors. Furthermore, up-regulation of VEGF-C and -D was detected within tumor parts surrounding the stromal structures. In order to assess the contribution of stromal cells to lymphangiogenesis in vivo, we established TAFs from HA overproducing tumors, and implanted them together with human breast carcinoma cell line MCF-7 in nude mice. Carcinoma cells rapidly grew in association with marked lymphangiogenesis. Without the stromal cells, however, the tumors slowly developed with less lymphatic vessels.

CONCLUSION: Our results showed that microenvironmental HA played a pivotal role in intratumoral lymphangiogenesis. Tumor xenograft study further demonstrated significance of tumor-stromal cell cooperation in the promotion of intratumoral lymphangiogenesis.

A36 Transgenic dual reporterマウスを用いたコラーゲン合成系および分解系の包括的解析

¹(株)ミノファゲン製薬 研究所

²東海大学 医学部 肝線維化研究ユニット

³国際医療福祉大学 山王病院

茂呂 忠¹ 中尾 祥絵² 東山 礼一² 岡崎 勲³ 稲垣 豊²

【目的】細胞外マトリックスの主要成分である 型コラーゲンの合成と分解の不均衡は諸臓器の線維化をもたらすが、合成系と分解系の複合的な調節機構は未だ十分に解明されていない。そこで今回、 $\alpha 2(I)$ コラーゲン遺伝子 (COL1A2) プロモーター/EGFPと MMP-13遺伝子プロモーター/DsRed2を組み込んだTransgenic dual reporterマウスを作製し、コラーゲン合成系と分解系の包括的解析を試みた。

【方法】COL1A2あるいはMMP-13プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子に連結した癒合遺伝子を肝星細胞に導入し、両プロモーターの活性化を確認した。次に、COL1A2/EGFPとMMP-13/DsRed2の両癒合遺伝子断片を組み込んだTransgenic dual reporterマウスを作製し、四塩化炭素投与により肝細胞壊死と線維化を惹起した際の両蛍光を観察した。さらに、当該マウスから肝星細胞を分離し、初代培養に伴う両蛍光の発現の推移を観察した。

【成績】ルシフェラーゼアッセイにより、COL1A2あるいはMMP-13を導入した肝星細胞において両プロモーターの活性化を確認した。その活性は、それぞれTGF- β あるいはTPA刺激により有意に増加した。Transgenic dual reporterマウスに四塩化炭素を投与すると、壊死巣ならびに線維束に沿ってEGFPの蛍光が観察されたが、DsRed2の発現は認められなかった。さらに当該マウスから分離した初代培養肝星細胞において、培養初期ではDsRed2が、培養による星細胞の活性化に伴ってEGFPの蛍光がそれぞれ観察された。

【結論】COL1A2/MMP-13 transgenic dual reporterマウスは、コラーゲン合成系と分解系を包括的解析に解析することで、臓器線維症の進展ならびに改善の病態解明に有用な手段になりうると考えられた。

A Comprehensive Study on Collagen Synthesis and Degradation by Using Transgenic Dual Reporter Mouse

Research Laboratory of Minophagen Pharmaceutical Co., Ltd.

Tadashi Moro, Sachie Nakao, Reiichi Higashiyama, Isao Okazaki, Yutaka Inagaki

[Background & Aim] Collagen plays important roles not only for maintaining tissue integrity but also for repair and wound healing processes. Disequilibrium between the synthesis and degradation of collagen results in organ fibrosis. Here we report establishment of transgenic dual reporter mouse to examine cooperative or counteracting regulatory mechanisms of expression of collagen and its degrading enzyme, matrix metalloproteinase (MMP).

[Method] Promoter sequence of either $\alpha 2(I)$ collagen (COL1A2) or MMP-13, the major interstitial collagenase in rodent, was linked to firefly luciferase gene. Their promoter activities were analyzed by luciferase assay after transfection into cultured hepatic stellate cells (HSC). Transgenic dual reporter mouse was established that harbors COL1A2 promoter/EGFP and MMP-13 promoter/DsRed2 fusion genes. EGFP and DsRed2 fluorescence was examined in liver tissue after a single or repeated carbon tetrachloride administration and during the culture-activated process of isolated primary HSC.

[Result] Both COL1A2 and MMP-13 promoters were activated in transfected HSC. Their promoter activities were significantly accelerated by TGF- β and TPA, respectively. After carbon tetrachloride administration into the dual reporter mouse, EGFP fluorescence was observed within the necrotic areas and along the fibrous septa in the liver. In primary cultured HSC isolated from the mouse, DsRed2 was observed at the quiescent initial stage, whereas EGFP expression was increased during the culture-activated process.

[Conclusion] Transgenic dual reporter mouse harboring COL1A2/EGFP and MMP-13/DsRed2 has been established, which contributes to the elucidation of regulatory mechanisms of collagen synthesis and degradation during the progression of organ fibrosis.

*A37 プレオマイシン誘導皮膚硬化症における骨髄由来細胞の関与

¹東海大学医学部 肝線維化研究ユニット

²ミノファーゲン製薬研究所

³国際医療福祉大学 山王病院

東山 礼一¹ 中尾 祥絵¹ 茂呂 忠² 岡崎 勲³ 稲垣 豊¹

【目的】臓器線維症はコラーゲンをはじめとする細胞外基質が組織に過剰沈着し、臓器の機能不全をきたした病態である。このうち、全身性強皮症は皮膚硬化を主徴とし、肺、心、腎、消化管などに広範な線維化を引き起こす。近年の研究により、骨髄由来細胞が線維化組織に生着し、コラーゲンを産生することでその進展に関与する可能性が報告されている。本研究では、I型コラーゲンの $\alpha 2$ 鎖遺伝子(COL1A2)プロモーターとEGFPとを連結した癒合遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを用いて、皮膚硬化過程における骨髄由来細胞の組織への生着とコラーゲン産生の有無を検討した。

【方法】COL1A2/EGFPトランスジェニックマウスの剃毛背部に1mg/mlPBSのプレオマイシンを100 μ lずつ30日間、連日皮下投与して皮膚硬化症を作製した。また、致死放射線照射を受けた野生型マウスにCOL1A2/EGFPマウスの骨髄細胞を移植して骨髄細胞を置換した後、同様にプレオマイシンの皮下投与を行った。最終投与から24時間以内に皮膚組織を採取して、HE染色により皮膚硬化の程度を計測するとともに、 α SMA抗体による免疫蛍光染色を行い、EGFPとの共発現を共焦点レーザー顕微鏡観察により解析した。

【成績】プレオマイシン投与により硬化した真皮組織には、多数のEGFP発現細胞が存在し、COL1A2プロモーターの活性化が認められた。その多くは α SMA陽性であった。一方、COL1A2/EGFPマウスの骨髄で置換されたマウスを用いた検討では、硬化皮膚組織においてもEGFP陽性骨髄由来細胞の発現は極めてわずかであった。

【結論】プレオマイシン投与による皮膚硬化にともない、筋線維芽細胞を含むコラーゲン産生細胞の活性化が認められた。しかしながら、この皮膚硬化過程において骨髄由来細胞はほとんど関与しないと推察された。

Little Contribution of Bone Marrow-Derived Cells to Bleomycin-Induced Dermal Sclerosis

Liver Fibrosis Research Unit, Tokai University School of Medicine

Reiichi Higashiyama, Sachie Nakao, Tadashi Moro, Isao Okazaki, Yutaka Inagaki

Background/Aim: Systemic scleroderma is characterized by an excessive deposition of collagen and other components of extracellular matrix in skin and other organs such as lung, heart, kidney and gastrointestinal tract. Several recent studies have shown that bone marrow (BM)-derived cells express collagen and accelerate organ fibrosis. Here we examined the possible migration of BM-derived cells and their collagen production in experimental dermal sclerosis.

Methods: Transgenic mice harboring the $\alpha 2(I)$ collagen (COL1A2) promoter/EGFP fusion gene were established and injected daily with 100 μ l of 1 mg/ml bleomycin into the shaved back skin for 30 days. BM cells obtained from the transgenic mice were injected intravenously to the irradiated wild type animals, and the recipients underwent the same subcutaneous bleomycin injections. Skin tissues were obtained within 24 hours after the final bleomycin injection. Dermal thickness was measured by hematoxylin and eosin staining and the expression of EGFP and α SMA was analyzed by immunofluorescent studies.

Results: A large number of EGFP-positive cells were observed in thickened dermis of COL1A2/EGFP mice after repeated bleomycin injections, indicating the activation of COL1A2 promoter. Most of the EGFP-positive cells co-expressed α SMA. In contrast, there were few, if any, EGFP-positive cells observed in thickened skin tissues of BM recipient mice.

Conclusion: A number of collagen-producing cells including myofibroblasts were observed in experimental dermal sclerosis. However, BM-derived cells had little contribution to this fibrogenic process.

A38 培養ケロイド細胞のパーシカン発現機構

¹京都大学 医学部 皮膚科

²京都大学 医学部 形成外科

荒木 絵里¹ 内藤 素子² 宮地 良樹¹ 宇谷 厚志¹

ケロイドは、ヒト皮膚真皮に細胞外マトリックスが異常沈着する原因不明の難治性疾患である。その治療に向けて発症病理を解明するため沈着するマトリックスに焦点をあてて研究を行っている。

一昨年の本学会で、ケロイド組織のマイクロアレイ等により軟骨関連分子など、本来皮膚に存在しない多様な分子の発現が認められたことを報告した。

1) 今回 ケロイド (KL) 組織を用いてマトリックス分子の組織染色を行ったところ、KL組織におけるパーシカン沈着の増加が確かめられた。

2) 病変部より確立した培養KL細胞を用いた検討においても、組織と同様にパーシカンの発現が増強していることがRT-PCRで証明された。この発現コントロールをSB431542 (TGFβ阻害剤)、LY294002 (PI3K阻害剤)の添加により検討したところ、血清非存在下では正常線維芽細胞ではPI3Kの経路が主であるがKL細胞ではTGFβ経路もパーシカンの発現に関与する結果が得られた。

3) パーシカンのプロモーター領域 (-559 to +280) を含み下流にLuciferaseをいれたベクターを利用しレポーターアッセイを行った。培養KL細胞ではパーシカン転写活性の上昇を示した。

4) 正常培養線維芽細胞でのβ-カテニンの強制発現ではパーシカンの転写活性が増強したが、KL細胞でも同様に転写活性が増強することが判明した。現在β-カテニンのsiRNAにて、阻害がかかるかを検討している。組織に異常増殖しているKL細胞に特異的な経路を明らかにすることが治療へ結びつくと考えられる。

Versican expression in the cultured keloidal cells

Department of Dermatology, Kyoto University,
Graduate School of Medicine

Eri Araki, Motoko Naitoh, Yoshiaki Miyachi, Atsushi Utani

Keloid is a refractory disease of the human skin characterized by proliferation of specific mesenchymal (keloidal cells) and excessive deposition of extracellular matrix (ECM) in the dermis. In this study, we investigated characteristics of keloidal cells, focusing on their ECMs expression properties.

1) Immunohistochemistry of human keloid tissues for various ECM molecules revealed increased deposition of versican, compared to control skin.

2) RT-PCR studies of cultured primary keloidal cells verified the upregulation of versican. Inhibitory studies using SB431542 (TGF-βinhibitor) and LY294002 (PI3K inhibitor) showed that versican expression in normal fibroblasts under serum-free conditions was predominantly regulated by the PI3K pathway, while in keloidal cells more involvement of the TGF-βpathway was indicated.

3) Versican transcriptional activity was examined using a reporter construct driven by the versican promoter region (-559 to +280). Upregulation of versican in keloid cells was attributed to increased versican transcriptional activity.

4) Overexpression of β-catenin resulted in increased versican promoter activity both in normal fibroblasts and keloidal cells. We are now examining whether siRNA of β-catenin can suppress versican transcription. Delineating versican regulation pathways specific to keloidal cells may lead to the development of new treatment modalities.

*A39 慢性移植片対宿主病の涙腺組織におけるheat shock protein 47の発現の検討

¹慶應義塾大学 医学部 眼科

²慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所 細胞情報部門

³慶應義塾大学 医学部 病理診断部

⁴慶應義塾大学医学部 内科

⁵ハーバード大学 医学部

小川 葉子¹ 河合 正孝⁶ Razzaque Mohammed. S.⁴
亀山 香織⁵ 長谷川 豪² 榛村 重人¹ 岡本 真一郎³
池田 康夫³ 坪田 一男¹ 河上 裕² 桑名 正隆³

【目的】Heat shock protein 47(HSP47)は、コラーゲン合成に関わる特異的分子シャペロンであり、肺線維症、腎硬化症などの線維化疾患での高発現が報告されている。私達は、涙腺の慢性移植片対宿主病(cGVHD)によるドライアイの病態において、線維芽細胞が過剰な細胞外基質を産生することにより中心的な役割を果たすことを報告した。本研究では、cGVHD涙腺のHSP47の発現を検討し、その病態における役割を明らかにすることを目的にした。

【方法】対象は造血幹細胞移植後にcGVHDによるドライアイを発症した8例で、同様にドライアイを呈するシェーグレン症候群7例を対照とした。涙腺生検により得られた涙腺切片のHSP47と細胞増殖の指標であるKi67、I型、III型コラーゲンおよび α -SMAの発現を免疫染色およびRT-PCR、免疫プロットにより検討した。

【結果】cGVHD全例HSP47は中等度の導管、血管周囲および小葉間の線維芽細胞の一部と血管内皮に発現していた。一方、シェーグレン症候群ではHSP47の発現は明らかではなく、1例で間質にびまん性に散在する線維芽細胞と血管内皮に淡い発現が認められた。cGVHD導管周囲の線維芽細胞にはKi67の発現が認められた。cGVHDでは導管周囲間質にIII型コラーゲンが過剰に蓄積していた。涙腺GVHD線維芽細胞はシェーグレン症候群に比し、mRNAおよび蛋白レベルで、 α SMAの発現が低かった。

【結論】涙腺のcGVHDでは、中等度の導管周囲に集積する線維芽細胞がHSP47を発現し間質の過剰な線維化に関与することが示唆された。涙腺GVHD線維芽細胞はシェーグレン症候群の線維芽細胞に比べて、mRNAおよび蛋白レベルで、 α SMAの発現が低く、筋線維芽細胞に変換しない線維芽細胞が過剰な細胞外基質産生に関与する可能性が考えられた。

Role of heat shock protein 47, a collagen-binding chaperone, in lacrimal gland pathology in patients with cGVHD

1Department of Ophthalmology, 2 Institute for Advanced Medical Research, 3 Department of Diagnostic Pathology, 4Department of Internal Medicine, Keio University, School of Medicine, Tokyo, Japan; 5Departm

Yoko Ogawa ,1,2, Mohammed S. Razzaque,5, Kaori Kameyama,3, Kazuto Yamazaki,3, Go Hasegawa,2, Shigeto Shimmura,1, Masataka Kawai1, Shinichiro Okamoto4, Yasuo Ikeda4, Kazuo Tsubota1, Yutaka Kawakami2 and Masataka Kuwana4, Yoko Ogawa 1, 2, Mohammed S. Razzaque5, Kaori Kameyama3, Kazuto Yamazaki,3 Go Hasegawa2 Shigeto Shimmura1, Masataka Kawai1, Shinichiro Okamoto4, Yasuo Ikeda4, Kazuo Tsubota1, Yutaka Kawakami2 and Masataka Kuwana4

PURPOSE. Heat-shock protein 47 (HSP47) is involved in the molecular maturation of collagen, and shown to have a fibrogenic role in various fibrotic diseases. We investigated the role of HSP47 in the pathogenesis of lacrimal gland (LG) of cGVHD patients.

METHODS. The expression of HSP47, Ki67, types I and III collagen, and arufa-smooth muscle actin (arufa-SMA) was examined in tissue sections and in primary cultures of fibroblasts obtained from the LG of patients with cGVHD (n=8) and Sjögren s syndrome (SS; n=7).

RESULTS. Tissue sections of the LG of cGVHD patients showed markedly increased expression of HSP47 in fibroblasts around the medium-sized ducts than did those from SS patients. The elevated expression of HSP47 in cGVHD patients was mostly detected in Ki67-positive fibroblasts, and associated with increased accumulation of types I and III collagen, in and around the fibrotic areas. Primary fibroblast cultures generated from cGVHD LG showed higher HSP47 mRNA expression than did fibroblasts isolated from SS biopsies, as determined by RT-PCR (P<0.05). In contrast, arufa-SMA was higher in the SS than cGVHD fibroblasts at both mRNA and protein levels, and more LG fibroblasts in the SS were positive for arufa-SMA than cGVHD (P<0.01).

CONCLUSIONS. In cGVHD, increased expression of HSP47 may promote excessive collagen assembly around the periductal areas where fibroblasts are mostly in an active state. The less arufa-SMA in the cGVHD LG fibroblasts suggests a relative lack of myofibroblastic transformation. The fibroblasts incapable of myofibroblastic transformation are likely the main source of HSP47 and collagen production.

A40 テネascin-Cの遺伝子欠失は免疫仲介性慢性肝炎の肝線維化を軽減する

¹三重大学大学院医学系研究科 修復再生病理学

吉田 利通¹ El-Karef Amro¹ 西岡 朋弘¹ 今中
(吉田) 恭子¹

細胞外マトリックス糖蛋白のひとつであるテネascin-C (TNC) は慢性肝疾患で発現が亢進していることが知られている。我々は肝線維化におけるTNCの働きについて、野生型 (WT) とTNC遺伝子欠失 (TNKO) マウスにおけるコンカナバリンAで誘導される免疫仲介性肝炎モデルを比較することによって検討を行った。

8週令のメスBALB/cマウスに1週間に1回の20 mg/KgのコンカナバリンAを静脈投与し肝炎を引き起こし、3、6、9、12回目の投与から1週間後に屠殺して検討を行った。

WTマウスの肝臓の免疫染色では、次第に増強するTNCの沈着を認めた。定量的PCR解析では、TNCの遺伝子発現は次第に増加し、9回目の投与以降がピークであった。

Picrosirius red染色における膠原線維の沈着は、WTマウスと比較しTNKOマウスでは有意に減少していた。また、I型およびIII型のプロコラーゲンの転写産物はWTマウスで有意に増加していた。炎症細胞浸潤は両者とも3週から6週で最も強く、WTマウスでより顕著であった。インターフェロン- γ 、腫瘍壊死因子- α 、インターロイキン-4はいずれもWTマウスで高値を示した。TNCおよびプロコラーゲンの産生細胞である活性化肝星細胞 (HSC) と筋線維芽細胞はWTマウスでより多数の出現を認めた。線維化を引き起こす腫瘍増殖因子 (TGF) - β のmRNA発現はWTマウスで有意に亢進していたが、TNKOマウスでは見られなかった。

TNCは、サイトカイン発現の亢進を伴う炎症反応の増強、HSCの動員、TGF- β 発現の増強を通して、肝炎から肝線維化に至る進行を促進していると考えられた。

Deficiency of tenascin-C attenuates liver fibrosis in immune-mediated chronic hepatitis in mice

Mie University Graduate School of Medicine,
Department of Pathology and Matrix Biology

Toshimichi Yoshida, Amro El-Karef, Tomohiro
Nishioka, Kyoko Imanaka-Yoshida

Tenascin-C (TNC), an extracellular matrix glycoprotein, is upregulated in chronic liver disease. We investigated the contribution of TNC to liver fibrogenesis by comparing immune-mediated hepatitis induced by concanavalin A (ConA) in wild-type (WT) and TNC-deficient (TNKO) mice. Eight-week-old BALB/c mice received weekly intravenous injections of ConA, and were sacrificed one week after the 3rd, 6th, 9th and 12th injections. In WT livers, TNC expression in both protein and mRNA levels gradually increased, and peaked after the 9th injection. Collagen deposition stained with picrosirius red was significantly less intense in TNKO mice than in WT mice, and procollagen I and III mRNA were significantly upregulated in WT mice compared with TNKO mice. Inflammatory infiltrates were most prominent after the 3rd-6th injections in both groups and were less intense in TNKO mice than in WT mice. Interferon- γ , tumor necrosis factor- α and interleukin-4 mRNA levels were significantly higher in WT mice than in TNKO mice, while α -smooth muscle actin-positive hepatic stellate cells (HSCs) and myofibroblasts, a cellular source of TNC and procollagens, were more abundant in WT livers. Transforming growth factor (TGF)- β 1 mRNA expression was significantly upregulated in WT mice, but not in TNKO mice. TNC can promote liver fibrogenesis through enhancement of inflammatory response with cytokine upregulation, activated HSC recruitment and TGF- β expression during progression of hepatitis to fibrosis.

*A41 マウス肝障害モデルにおけるSHAP-ヒアルロン酸複合体の機能の研究

¹愛知医科大学分子医科学研究所

²愛知医科大学微生物免疫学

卓 麗聖¹ 横地 高志² 祝 龍¹ 木全 弘治¹

炎症部位におけるヒアルロン酸の合成の亢進は多くの報告がある。我々は、そのヒアルロン酸にSHAP(Serum-derived Hyaluronan-Associated Proteins、血清タンパク質インター- α -トリプシンインヒビター - (ITI)ファミリー分子の重鎖サブユニットに相当する)と名付けたタンパク質が共有結合していることを見出した。この分子修飾の機能的意義を解明するために、ITI分子の軽鎖サブユニット(ビクニン)の遺伝子欠損マウスを作製した。そのマウスはITI分子がないため、SHAP-ヒアルロン酸複合体の形成ができない。D-ガラクトサミン(GaIN)ノリポポリサッカライド(LPS)によるマウス急性肝障害モデルでは、野生型マウスに比べ、ノックアウトマウスの血中TNF- α とALTの濃度が顕著に低かった。組織学検査においても、肝細胞アポトーシスと炎症細胞の浸潤が軽度だった。その結果として、GaIN/LPS投与後の生存率はノックアウトマウスが90%で、野生型マウスの0~20%に比べて明らかに高かった。また、野生型マウスの血中のSHAP-ヒアルロン酸複合体濃度は明らかに増加していた。これらの結果は、SHAP-ヒアルロン酸複合体はGaIN/LPSによる肝障害の発症に正方向に働くことを示唆する。我々は、最近SHAPがCD44-ヒアルロン酸の相互作用を促進する効果があることを見出しているので、ノックアウトマウスの肝障害モデルに対する抵抗性はこの効果に関連するものと考えている。

ROLE OF SHAP-HYALURONAN COMPLEX IN LIVER INJURY

Institute for Molecular Science of Medicine, Aichi Medical University

Lisheng Zhuo, Takashi Yokochi, Long Zhu, Koji Kimata

Upregulation of hyaluronan production is frequently observed in inflammatory sites. We previously found that under these conditions hyaluronan is often modified by covalently bound proteins, SHAP (Serum-derived Hyaluronan-Associated Proteins), which are identical to the heavy chains of inter- α -trypsin inhibitor (ITI) family molecule. In order to gain insight into the physiological significance of the formation of SHAP-hyaluronan complex, we generated the bikunin-knockout mice, which lack ITI molecules and, as a consequence, are unable to form the SHAP-hyaluronan complex. When the mice are subjected to experimental acute liver injury with D-galactosamine (GaIN) and bacterial lipopolysaccharide (LPS), the elevation of serum levels of TNF- α and ALT is significantly suppressed in the null mice. Histological examination also revealed a decrease in the number of apoptotic hepatocytes and infiltrated leukocytes in the null mice. These lead to a great improvement of mice surviving rate (from 0~20% of wild mice to 90% of null mice). The SHAP-HA complex was found to accumulate significantly in the sera of wild mice. Taken together, these observations suggest that the formation of the SHAP-hyaluronan complex accelerates the inflammatory process in the GaIN/LPS-induced liver failure model. The enhancing effect of SHAP on the CD44-hyaluronan interaction-mediated leukocytes adhesion and extravasation may underlie such a pathological role.

A42 肝線維化の責任細胞である肝星細胞のビタミンA貯蔵と脂質滴形成の関係

¹秋田大学 医学部 構造機能医学講座 細胞生物学分野

吉川 究¹ 目崎 喜弘¹ 山口 典子¹ 三浦 光隆¹
今井 克幸¹ 小嶋 直介¹ 入江 俊明¹ 妹尾 春樹¹

肝類洞周囲に存在する星細胞は、肝における細胞外基質産生・分解の中心的な役割を担う細胞であるとともにビタミンAの貯蔵・代謝の中心的な役割を果たす細胞である。哺乳類では生体のビタミンA総量の約80%がレチニルエステル(RE)として肝星細胞の脂質滴に貯蔵されている。肝障害時や細胞培養系においては、細胞増殖能の増加や細胞外基質の産生が亢進すると同時に脂質滴および貯蔵REの消失が観察されるが(星細胞の活性化)、これらの事象が相互にどのような関係にあるかは不明である。本研究では、活性化し脂質滴およびREを失った肝星細胞に、REの構成成分であるレチノール(ROL)と長鎖脂肪酸を負荷することにより脂質滴を形成させ、RE貯蔵との関係について検討した。

ラット肝より分離し2~3回継代して脂質滴を失った星細胞にROLおよび長鎖脂肪酸(オレイン酸)を添加して培養し、脂質滴形成の観察と貯蔵REの定量を行った。ROL単独、オレイン酸単独、ROL・オレイン酸両方添加のすべての条件で脂質滴が形成された。形成された脂質滴の数・大きさと貯蔵RE量には必ずしも相関関係は見られなかった。例えば、オレイン酸単独添加で、ROL単独添加よりも数・大きさともに勝る脂質滴が形成された場合でも、貯蔵REの量は2桁程度低い値であった。これは、ROLあるいは長鎖脂肪酸を添加する肝星細胞の培養系が、高濃度のREを含有する脂質滴と低濃度のREしか含有しない脂質滴の形成を直接比較できる実験系であり、星細胞に特徴的であるビタミンAの貯蔵機構の解明に有用であることを示唆している。

Relation between vitamin A storage and lipid droplet formation in hepatic stellate cells

Department of Cell Biology and Histology Akita University School of Medicine

Kiwamu Yoshikawa, Yoshihiro Mezaki, Noriko Yamaguchi, Mitsutaka Miura, Katsuyuki Imai, Naosuke Kojima, Toshiaki Irie, Haruki Senoo

Hepatic stellate cells lie in the perisinusoidal space and play central role in production and degradation of extracellular matrix (ECM) components in the liver. The cells also store about 80% of total body vitamin A as retinyl esters (RE) in their lipid droplets and play key roles in hepatic uptake and release of retinoids. Under pathological conditions such as liver fibrosis, the cells lose their lipid droplets and RE, proliferate rapidly and produce a large amount of ECM components such as type I, III and IV collagens. However, whether the events are mechanically correlated or not is unknown. In this study, we cultured rat hepatic stellate cells, which have lost their lipid droplets and RE by subculture, with retinol and/or long chain fatty acid (oleic acid), the components of RE. The cells formed lipid droplets in all the conditions examined. The cells with many large lipid droplets cultured with oleic acid alone stored two order lower level of RE than the cells with a little small lipid droplets cultured with retinol alone. Since it became possible to form RE poor and rich lipid droplets in culture system, it is possible to investigate the relation of vitamin A storage and lipid droplet formation in hepatic stellate cells.

一般演題（ポスター展示）

Poster Presentation

P01 褥瘡表面におけるSHAP-HA複合体の存在とその臨床的意義

¹愛知県立看護大学

²国立長寿医療センター

³名古屋市立大学病院

松本 尚子¹ 磯貝 善蔵² 山中 真² 黒田 喜幸³
大島 弓子¹ 米田 雅彦¹

褥瘡は外力による皮膚潰瘍と定義される。しかし各々の褥瘡には様々な臨床的特徴がある。細胞外マトリックス (extra cellular matrix: 以下、ECMと略) は褥瘡の創傷治癒に関する重要な因子であるばかりでなく、創傷の所見にも相関する。一部の褥瘡ではみずみずしく、浮腫を帯びた創面が認められ、ヒアルロン酸に富むECMが構成成分である可能性がある。そこで関節リウマチで特徴的にみられるSHAP-HA複合体 (serum-derived HA-associated protein) を含むECMに注目した。

一部の褥瘡では黄色で除去可能なフィルム様の物質が固着しているが、我々はこれを臨床的に偽膜 (英語名で fibrin-containing film) と定義した。この所見は特に仙骨部褥瘡に特徴的に認められた。これを生化学的、免疫組織学的に解析した。

同意の得られた患者からのサンプルを用いて生化学的分析をおこなった。ヒアルロニダーゼ消化後の免疫ブロット法でSHAP-HA複合体が偽膜において検出された。前駆体であるinter-alpha-trypsin inhibitor (ITI) は偽膜以外の創面にも検出されたものの、SHAP-HA複合体は検出されなかった。ヒアルロン酸結合性プロテオグリカンであるパーシカンも褥瘡から検出されたが、偽膜への特異性はなかった。また免疫組織学的に偽膜でのITIの局在を確認した。

結論として、ある種の褥瘡ではSHAP-HA複合体を含む偽膜が存在し、関節リウマチに類似した炎症性の病態をとることが示唆された。すなわちこれらの臨床・蛋白相関から細胞外マトリックスからみた褥瘡の多様性が示された。

Presence and clinical significance of SHAP-HA complex in pressure ulcer

Aichi Prefectural College of Nursing and Health,
Nagoya, Japan

Hisako Matsumoto, Zenzo Isogai, Makoto Yamanaka,
Yoshiyuki Kuroda, Yumiko Ooshima¹ and Masahiko
Yoneda

Pressure ulcer can be defined as skin ulcer induced by mechanical stress. However, each pressure ulcer shows variety of features. Extra cellular matrix (ECM) is a key player not only for wound healing process but also for "would appearance". Wound surface looks hydrated and edematous in pressure ulcer, hyaluronan(HA) rich matrix may be a constituent of the wound. Therefore, we have focused HA-rich matrix containing SHAP (serum-derived HA-associated protein)-HA complex that is characteristic in rheumatoid arthritis.

On the surface of pressure ulcers, yellowish and removable film-like material is often observed. We clinically defined this condition as fibrin containing film. This finding was usually observed pressure ulcer developed at sacral lesion. We characterized the fibrin containing film by biochemical and immunohistochemical analyses.

Using patient samples obtained after informed consent, biochemical analyses were performed. Immunoblotting following hyaluronidase digestion revealed presence of SHAP-HA complex in fibrin containing film. Although ITI (inter-alpha-trypsin inhibitor) which is a precursor of SHAP, is detected from wound surface from other pressure ulcer, SHAP-HA complex is specific for fibrin containing film. Relevant HA binding molecule, versican is also detected in wound surface proteins from pressure ulcer, however, not specific for fibrin containing film. Immunolocalization of ITI is also observed in fibrin containing film.

In conclusion, presence of SHAP-HA in pressure ulcer, inflammatory response like rheumatoid arthritis can be involved in specific pressure ulcer. These certain clinical/biochemical relevance of wound also indicates heterogeneity of pressure ulcers.

P02 HMG-CoA還元酵素阻害剤(スタチン)は骨髄間葉系細胞の軟骨分化を誘導する

¹九州大学 医学部 整形外科

赤崎 幸穂¹ 松田 秀一¹ 中山 功一¹ 深川 真吾¹
三浦 裕正¹ 岩本 幸英¹

【目的】HMG-CoA還元酵素阻害剤(スタチン)はコレステロール合成阻害作用を介した高脂血症治療薬として広く臨床で使用されている。近年、スタチンは種々の細胞の分化、増殖に対して多彩な薬理作用が報告されており、骨軟骨分野では骨芽細胞におけるBMP-2発現促進を介した骨形成促進作用がある。本研究では、軟骨再生における細胞源として有用である骨髄間葉系細胞の軟骨分化に及ぼすスタチンの効果について検討した。

【方法】日本白色家兎より骨髄液を採取し、単層培養後、対数増殖期にある細胞を骨髄間葉系細胞として使用した。培養方法は三次元培養であるペレット培養を行った。培養にはTGF- β を含まない不完全軟骨分化誘導培地をコントロールとし、それにMevastatinを10 μ Mの濃度で添加したものをスタチン添加群として用いた。評価にはRT-PCR法を行い、BMP-2と軟骨特異的遺伝子のmRNA発現を比較した。組織染色として、Safranin-O染色とCol2免疫染色を行った。色素法によりsGAGの定量を行った。

【結果】RT-PCRにて、BMP-2、Sox9、Col2、AggrecanのすべてでmRNA発現はコントロール群と比較し、スタチン添加群で発現の増加を認めた。Safranin-O染色とCol2免疫染色においても、スタチン添加群の方で強く染色された。色素法によるsGAGの定量でもスタチン添加群で有意な増加を認めた。

【考察】本研究にて、スタチンはin vitroにおいて、骨髄間葉系細胞の軟骨系細胞への分化を促進することが示唆された。従来、骨髄間葉系細胞の軟骨分化には外因性の成長因子が必要とされているが、成長因子を臨床で使用する際には高コストであることや安全性の面で問題がある。一方、スタチンは現在広く臨床で使用されており、本研究のスタチンの効果は外因性の成長因子を必要としない、新たな軟骨分化促進薬としての可能性が示唆される結果であった。

Statin induces chondrogenic differentiation in bone marrow stromal cells

Orthopaedic surgery, Kyushu University

Yukio Akasaki, Shuichi Matsuda, Koichi Nakayama,
Shingo Fukagawa, Hiromasa Miura, Yukihide
Iwamoto

[Introduction] HMG-CoA reductase, or statin, has been used globally as the most effective drug to reduce serum cholesterol levels. Recently, a number of studies suggest that statin exerts many pleiotropic effects including cell differentiation by inhibiting the synthesis of isoprenoid which is required for modification of small G-proteins such as Rho family. Mundy reported that statin induces the expression of BMP-2 in osteoblasts and stimulates new bone formation in vitro and in vivo. The present study evaluated the chondrogenic potential of statin in bone marrow stromal cells.

[Methods] BMCs were harvested from bone marrow of rabbits. We used chemically defined medium without TGF-beta and pellet culture. Pellets were divided into 2 experimental groups with or without Mevastatin. We analyzed BMP-2 and chondrocyte-specific gene expression by RT-PCR. We also evaluated ECM by staining of GAG and type 2 collagen. Measurement of sGAG was conducted using DMMB.

[Results] The levels of expression of BMP-2 and chondrocyte-specific gene were increased in the presence of Mevastatin compared. Supplementation with Mevastatin enhanced the deposition of GAG and type2 collagen respectively.

[Discussion] Our results suggest that statin induces chondrogenic differentiation makers and stimulates ECM accumulation in bone marrow stromal cells. Generally, growth factors are used as chondrogenic inducers of BMCs. These reagents, however, have some drawbacks related to cost, biological half-life, and safety for clinical application. In contrast, statin, has been used globally in clinical, statin could be a promising agent for tissue engineering of cartilage regeneration.

P03 塩基性線維芽細胞増殖因子はミオシン軽鎖リン酸化を線維芽細胞では促進するが筋線維芽細胞には影響しない

¹群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学

安部 正敏¹ 曾我部 陽子¹ 横山 洋子¹ 周東 朋子¹ 石淵 裕久¹ 石川 治¹

近年、線維芽細胞増殖因子 (bFGF) は、難治性皮膚潰瘍において治癒を促進するのみではなく、創傷治癒の質的改善いわゆるscarless wound healingをもたらすことが臨床的に明らかとなった。しかし、その機序は未だ不明である。今回我々は筋線維芽細胞に着目し、その機序の一端を検討した。ヒト正常真皮由来線維芽細胞をtransforming growth factor- β (TGF β) 存在下で培養することにより筋線維芽細胞を得た。得られた細胞を用い、b-FGFが及ぼすゲル収縮能を検討したところ、bFGFは筋線維芽細胞含有コラーゲンゲル収縮を惹起しなかった。次にTGF β とbFGF両者共存下で線維芽細胞を培養し、 α -smooth muscle actin (α SMA) 発現過程をTGF β 単独刺激群と比較した。その結果bFGFはTGF β との共存下において、非共存下に比較して線維芽細胞の α SMAの発現を遅延させた。また、創収縮に関与すると考えられるミオシン軽鎖のリン酸化について、線維芽細胞と筋線維芽細胞間で比較したところ、bFGFは線維芽細胞に対してミオシン軽鎖のリン酸化は促進したが、筋線維芽細胞においてはこの効果はみられなかった。以上の結果よりbFGFはヒト真皮線維芽細胞に対して、 α SMAの発現を遅延させると共に、筋線維芽細胞のミオシン軽鎖のリン酸化には影響を及ぼさないことが明らかとなった。bFGFは創傷治癒過程成熟期において創収縮を抑制することにより、創傷治癒の質的变化をもたらす可能性が示唆された。

basic fibroblast growth factor induced myosin II regulatory light chain phosphorylation on fibroblast but not on myofibroblast

Department of Dermatology, Gunma University
Graduate School of Medicine

Masatoshi Abe , Yoko Sogabe, Yoko Yokoyama,
Tomoko Shyuto, Hirohisa Ishibuchi, Osamu Ishikawa

Recent clinical reports have pointed out that basic fibroblast growth factor (bFGF) promotes scarless wound healing. The aim of present study is to elucidate this mechanism. Previous studies reported that 3-10 days of transforming growth factor- β (TGF β) treatment were required to activate fibroblasts to express the myofibroblast phenotype, increased expression of α -smooth muscle actin (α SMA). Then we employed this technique to obtain myofibroblast. bFGF well stimulated fibroblast-collagen gel contraction but not myofibroblast-collagen gel contraction. Subsequent studies were carried out to determine if co-stimulation of fibroblasts with TGF β and bFGF affected their ability to express the myofibroblast phenotype. In these experiments, fibroblasts in monolayer were incubated with or without 1ng/ml of bFGF in the presence of 10ng/ml of TGF β , harvested, and then tested for the expression level of α SMA. Levels of cellular α SMA increased after 2-4 days of TGF β treatment alone and were consistently elevated after 5 days with unchanged levels of total actin. However it is of note that levels of cellular α SMA increased after 4-6 days of bFGF and TGF β treatment. Other experiments were carried out to test the effects of bFGF on myosin II regulatory light chain (MLC) phosphorylation on fibroblasts and myofibroblasts. After 30 min of bFGF, levels of diphosphorylated MLC were highest in fibroblasts. In contrast, levels of diphosphorylated MLC were still elevated in myofibroblasts spontaneously, and were consistently unchanged even if stimulated with bFGF. Our results indicated that bFGF had certain roles on the expression of myofibroblast phenotype by fibroblasts and MLC phosphorylation by myofibroblasts.

P04 Hsp47 ノックアウト細胞におけるコラーゲンの凝集体形成とアポトーシス誘導

¹京都大学 再生医科学研究所 細胞機能調節学分野

石田 義人¹ 久保田 広志¹ 北村 朗¹ 永田 和宏¹

Hsp47は、小胞体に局在するコラーゲン特異的分子シャペロンであり、細胞内で新規に合成されるコラーゲンに一過的に結合し、小胞体-ゴルジ体間で解離することが知られている。Hsp47ノックアウト(KO)マウスは、受精後10.5日で胎生致死となるが、最近我々はHsp47 KOマウス胚や胚繊維芽細胞(MEF)を用いた解析から、Hsp47が欠損すると、コラーゲンは小胞体内で蓄積し、細胞外に分泌されても、細胞外で正常にプロセッシングされないことを明かにした。これらの知見は、Hsp47がコラーゲンの正しい3本鎖形成に寄与することを示唆している。

本研究では、Hsp47非存在下で小胞体内に形成されるコラーゲンの凝集体の詳しい解析を行った。まず蛍光イメージングの一つである退色後蛍光回復(FRAP)法による解析から、Hsp47非存在下のコラーゲンは動かない不溶性の凝集体を小胞体内で形成していることがわかった。このコラーゲンは、BipやP4Hといったコラーゲンのフォールディングに関与するとされる分子シャペロン等と強く結合していた。よって、このコラーゲンは小胞体内で変性状態にあることが示唆される。更に、KO細胞では、小胞体ストレスセンサーの一つであるXBP-1の活性化が認められた。さらに、Hsp47 KO細胞において、小胞体ストレス依存的細胞死の経路であるCHOPの誘導、Caspase-3, 12の活性化に伴い、アポトーシスが検出された。

したがって、Hsp47非存在下においては、コラーゲンが小胞体内で正常にフォールディング出来ず、Bipなどの分子シャペロンと変性状態で結合している可能性が高い。これらの変性状態のコラーゲンが小胞体ストレスを惹起することで、小胞体ストレス応答経路を介してアポトーシスを起こすものと考えられる。

Aggregation of type I collagen and induction of apoptosis in Hsp47-null cells

Department of Molecular and Cellular Biology,
Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto
University

Yoshihito Ishida, Hiroshi Kubota, Akira
Kitamura, Kazuhiro Nagata

Hsp47 is a collagen-specific molecular chaperone localized in the Endoplasmic reticulum (ER). Hsp47 transiently binds to newly-synthesized collagen in the ER, and dissociates during the transport from ER to cis-Golgi, suggesting that Hsp47 plays a role in productive folding of collagen in vivo. Hsp47-null mice are embryonic lethal at 10.5 day post coitum. Analysis of Hsp47-null embryos and embryonic fibroblasts (MEF) indicated that type I and type IV collagens were accumulated in the ER. Furthermore, type I collagen secreted from Hsp47-deficient cells could not be processed normally at the N-propeptide even if secreted.

In this study, we analyzed aggregation state of type I collagen in Hsp47 null cells. Live cell imaging by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) indicated that collagen in the ER of Hsp47-null cells forms insoluble aggregates of immobile collagen. Collagen accumulated in the ER was found to be strongly bound to Bip and P4H, suggesting that type I collagen was unfolded or misfolded in the ER. Moreover, activation of XBP-1, a sensor of ER stress, was detected in Hsp47-null cells. CHOP was induced and caspases-3, 12 were activated in the Hsp47-null cells, suggesting ER stress-mediated cell death pathway was activated. Finally, apoptosis was observed to occur in these cells.

These data suggest that type I collagen in Hsp47-null cells fails to be correctly folded and forms aggregates recognizable by Bip and P4H, resulting in activating the ER stress-induced apoptosis pathway.

P05 *Vibrio Hollisae* 1706B株由来コラゲナーゼの調製と部分塩基配列決定

¹株) ニッピ バイオマトリックス研究所

²財) 日本皮革研究所

磯部 直子¹ 飯島 克昌¹ 林田 治¹ 鈴木 興輝²
上野 智規¹ 服部 俊治¹ 入江 伸吉¹

【背景】バクテリア由来のコラゲナーゼとして一般的に知られているのは*Clostridium histolyticum*由来のものである。我々は海浜よりコラゲナーゼ産生菌 *Vibrio hollisae*1706B株を単離し、その生化学的性質(高い安定性及び強い酵素活性)を報告した(文献1)。今回は、本酵素の精製を行い、その部分アミノ酸配列を決定し、PCR法にて部分塩基配列を決定した結果、本酵素が新規のコラゲナーゼであることを見出した。

【方法】*Vibrio Hollisae*1706B株の培養上清(3L)から限外濾過、硫酸塩析、陰イオン交換クロマトグラフィーによりコラゲナーゼを得た。比活性は約200倍に精製された。ザイモグラフィーで酵素活性のあるバンドは3本(60kD、50kD、40kD)あった。そのうちEDTAで阻害され、メタロプロテアーゼであると考えられる分子量約60kDのバンドのN末アミノ酸配列、及びV8プロテアーゼで分解した内部配列を読んだ。得られた部分アミノ酸配列EAlFSSNHMYNとEHEYを元に設計したdegenerate primerを用いたPCRを行い、約1.1kbpの単一バンドが得られたのでDNAシーケンシングを行った。

【結果・考察】PCR産物の塩基配列からの推定アミノ酸配列の相同性検索により、本コラゲナーゼは新規の酵素であることがわかった。また、既報の*Vibrio Alginolyticus*および *Vibrio Parahaemolyticus*由来のコラゲナーゼと相同性の高い配列を含み、その中にはバクテリアのメタロエンドペプチダーゼの間で保存されている配列HEXXHが含まれていることもわかった。今後、本酵素の全配列を決定し、分解特性などについて研究を進め応用法を探る予定である。

文献1. 鈴木興輝 皮革科学 Vol.45, No.4, pp.272~283(2000)

Purification and partial DNA sequencing of *Vibrio hollisae* 1706B collagenase

Nippi Research institute of Biomatrix

Naoko Isobe, Katsumasa Iijima, Osamu Hayashida,
Koki Suzuki, Tomonori Ueno, Shunji Hattori, and
Shinkichi Irie

[Introduction] In the industrial and research fields, collagenase derived from *Clostridium histolyticum* is generally used as collagenolytic enzyme. Previously we found *Vibrio hollisae* at Shinkiba coast as a new bacterial source for preparing a stable and highly activated collagenase(ref.1). Here we purified this collagenase and determined partial amino acid sequences and nucleotide sequences. Those were compared with other known bacterial collagenases.

[Method] Cultured medium (3L) of *Vibrio hollisae* 1706B strain was concentrated with ultra filtration and salted out with ammonium sulfate. Collagenase was further purified with negative ion exchange chromatography (Q-Sepharose column). Collagenase activity was measured using FITC-collagen as a substrate. The specific activity of purified enzyme was attained 200 folds (7.1U/mg to 1560U/mg protein). Among the collagenase fraction, three active bands (60kD, 50kD, 40kD) were detected by gelatin zymography. N-terminal and internal amino acid sequences of 60kD band, which activity was inhibited with EDTA were determined by V8 protease peptide mapping method. Based on internal amino acid sequences EAlFSSNHMYN and EHEY, degenerate primers were constructed and the 1.1kbp band was obtained from PCR.

[Result and Discussion] Homology search of the deduced amino acid sequences of the PCR product revealed that this is a new bacterial collagenase. The sequences were homologous to both collagenases from *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. The sequences contains the preserved metalloendopeptidases sequences HEXXH. Complete DNA sequences of this collagenase would be determined and further works should be necessary to characterize its proteolytic features.

Ref.1 Kouki Suzuki Hikaku Kagaku Vol.45, No.4, pp.272~283 (2000)

P06 ヒト 型コラーゲン発現トランスジェニックマウス における係留線維形成の解析

¹北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野

²山形大学遺伝子実験施設

³英国ロンドン大学

⁴米国ジェファーソン医科大

伊藤 圭¹ 澤村 大輔¹ 中村 秀樹¹ 後藤 真希¹
西園 悦子¹ 芝木 晃彦¹ 中島 修² Christopher P
Denton³ Jouni Uitto⁴ 清水 宏¹

【背景】 栄養障害型表皮水疱症は、先天的に皮膚に水疱を形成する遺伝性疾患で、表皮 真皮境界部の接着構築を担う係留線維の構成蛋白である 型コラーゲン (COL7A1) 遺伝子の変異により発症する。有効な治療法は未だないのが現状である。

【目的】 マウスの表皮角化細胞および真皮線維芽細胞に正常ヒトCOL7A1遺伝子を強制発現させ、導入遺伝子が十分な機能を果たし、将来的に効果のある治療法へと結びつくかについてトランスジェニックマウス(Tgm)を作製・解析することにより検討する。

【方法】 表皮発現ベクターではヒトケラチン14(K14)プロモーター、真皮発現ベクターではマウス 型コラーゲン (COL1A2) プロモーターとし、共にその下流にヒトCOL7A1 cDNA全長を配置するベクターを作製し、Microinjection法にてTgmを作製した。産仔マウス中、PCR法および抗ヒト 型コラーゲン抗体であるLH7.2抗体にて陽性を認めたマウスをTgm(F0)とした。Tgm(F0)をC57BL/6マウスと交配し、得られた産仔を前述同様にスクリーニングを行い、ヘテロで発現しているTgm(F1)をRT-PCR, Western blot法, 免疫電子顕微鏡にて解析した。

【結果】 K14 Tgm(F1)では、LH7.2抗体を用いた蛍光抗体法所見で、基底膜部に線状、表皮角化細胞細胞質に顆粒状の沈着を認めた。COL1 Tgm(F1)では、基底膜部に線状、真皮全層に広範囲に顆粒状の沈着を認めた。RT-PCR法およびWestern blot法では、K14 Tgm表皮側およびCOL1 Tgm真皮側に強いヒトCOL7A1 mRNAおよび同蛋白の発現を認めた。LH7.2抗体を用いた免疫電子顕微鏡による解析では、いずれのTgmにおいても基底膜の係留線維基部に金コロイド粒子の存在を認めた。

【結論】 表皮角化細胞もしくは真皮の線維芽細胞、いずれにCOL7A1を導入しても係留線維の形成を認めた。このことは、今後の遺伝子治療において、遺伝子を導入するターゲットを表皮、真皮いずれを自由に選択しても係留線維の形成に支障がないことを意味する。

Analysis of anchoring fibril formation in the transgenic mice carrying the human type VII collagen gene

Department of Dermatology, Hokkaido University
Graduate School of Medicine

Kei Ito, Daisuke Sawamura, Hideki Nakamura, Maki Goto, Etsuko Nishizono, Akihiko Shibaki, Osamu Nakajima, Christopher P Denton, Jouni Uitto, Hiroshi Shimizu

【Background】 Recessive dystrophic epidermolysis bullosa comprises a group of hereditary bullous diseases characterized by subepidermal blistering caused by mutations in the type VII collagen gene (COL7A1) that is a major component of anchoring fibril (AF). No specific therapies are available for any form of epidermolysis bullosa.

【Purpose】 We have investigated AF formation in the transgenic mice (Tgm) that express human COL7A1 in epidermal keratinocytes or dermal fibroblasts.

【Methods】 The vector for epidermal expression was constructed with human keratin 14 (K14) promoter and human COL7A1 cDNA. The vector for dermal expression was constructed with mouse COL1A2 (COL1) promoter and human COL7A1 cDNA. We generated the Tgm by microinjection method. Screening of the founder mice (F0) was performed by PCR and immunohistochemistry with an antibody against type VII collagen (LH7.2; human specific antibody). Tgm(F0) were outbred with the wild type to produce Tgm(F1), that were also analysed using by PCR, immunohistochemistry and RT-PCR, Western blotting, immunoelectron microscopy.

【Results and Conclusion】 In both K14 Tgm(F1) and COL1 Tgm(F1) skin, normal AF formation was seen within basement membrane zone. These data indicate that we can select either keratinocytes or fibroblasts as target cells in case of gene therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa.

P07 光投射型断層撮影イメージング技術(OPT)によるマウス関節標本の3D画像解析

¹岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科

²大阪大学 大学院生命機能研究科

大橋 俊孝¹ 稲川 喜一¹ 八代 健太² 西田 圭一郎¹ 濱田 博司² 二宮 善文¹

【背景】OPTとはOptical Projection Tomographyの略で英国MRCが開発した光投射型断層撮影イメージング技術である。Back-Projectionアルゴリズムを搭載し、2次元の断面情報から生体標本の3次元画像を立体的に再構築することができる。

OPTは、例えばwhole mountの蛍光免疫染色を施したマウス胎仔の蛍光シグナルをスキャンすることにより、胎仔がintactなままで蛍光3D像を構築することができ、特に発生生物学の分野での応用例が多い。

【目的】我々は、OPTによる骨・軟骨部の3D画像解析の応用の可能性について検討を行った。

【方法・結果】マウス大腿骨遠位部を採取し、fluorophore(Calsein, Safranin-O etc.)で蛍光染色、洗浄、4%PFAで固定後、OPTでスキャンし、関節の骨・軟骨部をそれぞれ特異的に3D画像構築することを試みた。さらに、正常またはリウマチ(RA)モデルマウスの関節を用い3D画像解析を試みた。マウス関節部の骨・軟骨の形状を3Dで計測することができる感度・精度の高い技術である結果を得ている。

【考察】OPTはマウスなどモデル動物の骨・軟骨の3D画像解析を行う今後の有力な手段となり得、リウマチや変形性関節症などのモデル解析にも応用が可能と考えられる。

A 3D analysis of mouse knee joint by optical projection tomography

Okayama Univ. Grad. Sch. of Med., Dent., and Pharm. Sci., Osaka University Graduate School of Frontier Biosciences

Toshitaka Ohashi, Kiichi Inagawa, Kenta Yashiro, Keiichiro Nishida, Hiroshi Hamada, and Yoshifumi Ninomiya

Optical projection tomography (OPT) is a new technique for three-dimensional (3D) imaging of small biological tissues or embryos. OPT has advantages to produce high-resolution 3D images of fluorescent biological specimens with a thickness of up to 15 millimeters. It is therefore mostly used for mapping of RNA and protein expression in intact embryos in the studies of developmental biology.

We have applied this technique for the 3D imaging of mouse knee joint surface. The isolated knee joints were stained with fluorophores (Calsein, Safranin-O) and fixed with 4% PFA overnight. The specimens were embedded in 1% low melting agarose, then dehydrated and cleared. The fluorescent signal was scanned by OPT 3001 using FITC or Cy3 filter.

We could construct the 3D images of normal and arthritic articular surface in high-resolution.

OPT would become a powerful technique for the 3D analysis of knee joints of mouse model of osteoarthritis or rheumatoid arthritis.

P08 フィブロネクチン由来反接着性ペプチドFNIII14と抗がん剤を併用した急性骨髄性白血病の根絶治療法

¹東京理科大学薬学部分子病態学研究室

²札幌医科大学医学部内科学第4講座

大脇 敏之¹ 中根 吉富¹ 松永 卓也² 新津 洋司郎² 深井 文雄¹

抗がん剤や支持療法の進歩により急性骨髄性白血病の完全寛解率は約80%まで向上したが、再発が多く、長期生存率は30-40%程度であり十分ではない。AMLの治療においては、その再発防止が臨床上最も重要な課題の一つである。AMLの再発は完全寛解期の骨髄に微少に残存するAML細胞(微少残存白血病; MRD)が主因とされている。一方、造血器悪性腫瘍細胞が骨髄間質のフィブロネクチン(FN)をはじめとする細胞外マトリクス(ECM)に接着すると、抗がん剤耐性を獲得すること(Cell adhesion-mediated drug resistance; CAM-DR)が明らかにされている。我々も先に(1)AML細胞はインテグリンVLA4を介したFN接着によりCAM-DRを成立させること(2) VLA4強発現症例群の化学療法後の長期生存率がVLA4低発現症例群のそれに比べて不良であることを明らかにした。これらの結果は、VLA4とFNの相互作用を阻害する因子の存在下で抗がん剤治療を行うことによりAML細胞の骨髄微少残存を根絶できる可能性を示唆している。一方、我々はFN由来の反接着性ペプチドFNIII14が β 1インテグリンを不活性化することによりVLA4を介して細胞接着を阻害することを明らかにしている。本研究では、AML細胞をSCIDマウスに移植して作製したヒトAMLモデルに対して抗がん剤とペプチドFNIII14の併用療法を施行したところ、抗がん剤単独では得られない骨髄MRDの根絶が達成された。以上、MRDを有するAML症例にはペプチドFNIII14を用いた分子標的療法が有用である可能性が示唆された。

Combination therapy using anticancer drug and antiadhesive peptide FNIII14 overcomes cell adhesion-mediated drug resistance of acute myelogenous leukemia

Department of Patho-Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science

Toshiyuki OWAKI, Yoshitomi NAKANE, Takuya MATSUNAGA, Yoshiro NIITSU, Fumio FUKAI

Acute myelogenous leukemia (AML) cells are generally chemosensitive, and 70-80% of AML patients undergo complete remission. Unfortunately long-term, disease-free survival remains as low as 30-50%, mainly because of relapses after chemotherapy. Improved survival requires new strategies to prevent relapse. Bone-marrow minimal residual disease (MRD) causes relapse after chemotherapy in patients with AML. We postulate that the drug resistance is induced by the attachment of VLA-4 on leukemic cells to fibronectin on bone-marrow stromal cells. We found that VLA-4-positive cells acquired resistance to anoikis or drug-induced apoptosis through the PI-3K/Akt/Bcl-2 signaling pathway, which is activated by the interaction of VLA-4 and fibronectin and the complete remission rate for the VLA-4-positive patients was lower than that of VLA-4-negative patients. These results suggest that the inhibiting factor that inhibits the interaction between VLA-4 on AML and stromal fibronectin may exterminate AML cells on MRD by the combination therapy with anti-cancer drug. We also demonstrate that anti-adhesive peptide FNIII14 derived from fibronectin suppresses VLA-4-mediated-cell adhesion to fibronectin by inactivation of beta1 integrin. In this study we achieved a 100% survival rate by combining FNIII14 and cytosine arabinoside in a mouse model of MRD, whereas the cytosine arabinoside alone prolonged survival only slightly. Thus, FNIII14 is useful for overcoming cell adhesion-mediated drug resistance of AML as a molecular targeting therapy.

*P09 好中球運動能の新規亢進因子として機能する
アクチニジン処理I型コラーゲン

¹近畿大学大学院 生物理工学研究科 生物工学専攻

²近畿大学 医学部 細菌学

³近畿大学 医学部 ライフサイエンス研究所

國井 沙織¹ 柴野 三智子² 堀内 喜高³ 齋藤 卓也¹ 森本 康一¹

【目的】細胞の運動能を惹起するシグナルは、基質となる型コラーゲンの状態または形態に依存して異なることが知られている。また、生体の免疫や恒常性の維持に重要な働きをもつ好中球や血小板などの血球系の細胞は、生理的な刺激や環境にตอบสนองして細胞形態を激しく変化させる。本発表では、2種類の会合形態の異なる酵素処理型コラーゲン(線維構造・微細網目構造)を足場として培養した好中球を蛍光染色することで、細胞内の動態や運動能を解析したので報告する。【方法】ニワトリ皮部から常法により抽出した酸可溶性I型コラーゲンを酵素処理し、ペプシン処理コラーゲン(P-Col)とアクチニジン処理コラーゲン(A-Col)を調製した。可溶性P-ColまたはA-Colをセルディスクに塗布して風乾後、マウス腹腔の好中球(5% FCS含有DMEM培地)を播種して培養した。培養後、定時間ごとホルマリン固定し、アクチンやその上流を司るRhoファミリータンパク質(Cdc42, Rac1, RhoA)を蛍光染色して細胞骨格の動態変化を顕微鏡観察した。また、示差走査熱量計(DSC)を用いてP-Col会合体とA-Col会合体の熱転移温度やピーク形状の差異を測定した。【結果】A-Colの微細網目構造が惹起する好中球の特異的な活性化は、アクチンやRhoファミリータンパク質の活性化レベルや発現量、シグナル伝達の速度が密接に関与することが蛍光観察により明らかとなった。DSC測定からP-Col会合体とA-Col会合体の熱転移温度は異なることが示され、両コラーゲン会合体の熱安定性に違いが認められた。またDSC曲線の特徴も異なることからP-ColとA-Colでは高次構造の微細な変化が生じていることが明らかになった。つまり、A-Col会合体の高次構造が好中球のアクチン動態を変化させ、細胞挙動に影響することが示された。

The actinidain-hydrolyzed type I collagen as a novel mediator of neutrophil motility

Dept. of Biotechnological Science, Kinki University

Saori Kunii, Michiko Shibano,
Yoshitaka Horiuchi,
Takuya Saito,
Koichi Morimoto

Collagen is an essential protein because of serving a functional environment for cell and providing a mechanical stability for tissue. To regulate the biological functions, in vivo, collagen fibril has the ability to bind to biomolecules such as $\alpha\beta 1$ integrin. Especially, the linkage of the collagen to the cell requires the matrix receptors and induces the reconstruction of the cell's cytoskeleton. However, the intracellular signaling pathways depended on the structural properties of collagen still remains to be quantified. Among those cells, neutrophil certainly interacts with collagen.

We investigated the thermal stability of actinidain-hydrolyzed collagen (A-col) and pepsin-hydrolyzed collagen (P-col) using a differential scanning calorimetry (DSC), respectively. DSC measurement detects the minimal difference in the state of the collagen superstructure. To investigate the actin cytoskeleton polymerization of neutrophil cultured on those hydrolyzed collagen matrix, we observed actin filaments labeled with fluorescent phalloidin using a fluorescence microscopy. To find further evidence of the actin activation, Rho family protein, Cdc42, Rac1, and RhoA, were visualized by staining with specific antibodies, respectively.

Although the thermal transition of the A-col displayed two adsorption peaks, the P-col showed mainly single peak. Interestingly, actin filaments in the A-col matrix were significantly stained. Fluorescence observations of Rho family protein also provided evidence for the migration of the neutrophil. It is likely that neutrophil recognizes the structural differences between the hydrolyzed collagens. In conclusion, the A-col formed unique self-assemblies, which was responsible for the activation of neutrophil motility, and they probably change intracellular signaling pathways.

***P10 ADAMTSL-4とFibrillin-1はオキシタラン線維形成を介して歯根膜発生に協調的に働く**

¹大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座
生化学教室

²大阪大学蛋白質研究所蛋白質化学研究部門

³国立がんセンター研究所ウイルス部

⁴新潟大学大学院医歯学総合研究科顎顔面再建学講座
硬組織形態学分野

⁵東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科口腔機能
発育学講座咬合機能矯正学分野

高坂 一貴¹ 齋藤 正寛¹ 筒井 仰² 眞鍋 理一郎²
清野 透³ 大島 勇人⁴ 須田 直人⁵ Ganburged
Ganjargal⁵ 関口 清俊² 米田 俊之¹

オキシタラン線維は微小線維タンパクと微小線維結合タンパクの複合体より構成され、靱帯組織である歯根膜の弾性や柔軟性に、重要な役割を担うと考えられている。しかしオキシタラン線維形成の分子機構はほとんど知られていないのが現状である。ここで、新規細胞外マトリックスのADAMTSL-4が、オキシタラン線維形成に関わることを報告する。免疫組織化学解析においてADAMTSL-4は、歯根膜の原基である歯小嚢で発現が始まり、歯根膜ではオキシタラン線維を形成することが観察された。さらにADAMTSL-4をMG63細胞で過剰発現させると、オキシタラン線維様の微小線維の形成が誘導された。そこでADAMTSL-4の役割を調べるため、オキシタラン線維の主成分であるFibrillin-1と共局在するかを解析した。二重免疫組織化学解析の結果ADAMTSL-4は、ADAMTSL-4過剰発現細胞および歯根膜で形成されるFibrillin-1陽性のオキシタラン線維と共局在していた。またFibrillin-1低形質対立遺伝子(mgR)のホモ接合体のマウスでは、ADAMTSL-4オキシタラン線維の形成異常が観察され、さらに歯根膜の顕著な形態異常も確認された。以上の結果より、ADAMTSL-4はFibrillin-1と結合してオキシタラン線維を形成し、これらの複合体は歯根膜の形態形成に重要な役割を担っていることが示唆された。

ADAMTSL-4 and Fibrillin-1 cooperate in the formation of periodontal ligaments through oxytalan fiber assembly.

Department of Molecular and Cellular Biochemistry,
Graduate School of Dentistry, Osaka University,
Osaka, Japan.

Kazutaka Kosaka, Masahiro Saito¹, Ko Tsutsui², Ri-
ichiroh Manabe², Tohru Kiyono³, Hayato Ohshima⁴,
Naoto Suda⁵, Ganburged Ganjargal⁵, Kiyotoshi
Sekiguchi² and Toshiyuki Yoneda¹

1. Department of Molecular and Cellular
Biochemistry, Graduate School of Dentistry, Osaka
University, Osaka, Japan.

2. Institute for Protein Research, Osaka University,
Osaka, Japan.

3. Virology Division, National Cancer Research
Institute, Tokyo, Japan

4. Department of Tissue Regeneration and
Reconstruction, Niigata University Graduate School
of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan.

5. Maxillofacial Orthognathics, Graduate School,
Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan.

Oxytalan fibers are a complex structure composed of microfibrillar and microfibril-associated proteins, and have been suggested to play an important role in elasticity and flexibility of the ligament tissues such as periodontal ligaments (PDL). However, little is known about the molecular mechanisms of oxytalan fiber formation. Here we report the novel extracellular protein ADAMTSL-4 is involved in oxytalan fiber formation. Immunohistochemical analysis showed that ADAMTSL4 was initially expressed in dental follicle cells at the PDL forming-stage of tooth germ, and became assembled as oxytalan fibers in the adult PDL. Overexpression of ADAMTSL4 in MG63 cells induced formation of oxytalan fiber-like microfibril assembly. To investigate the functional role of ADAMTSL4, we examined whether ADAMTSL4 associated with fibrillin-1, a major microfibril component of oxytalan fiber. Double immunostaining analysis showed that ADAMTSL4 was colocalized with fibrillin-1 in cells overexpressing ADAMTSL4 and in the adult PDL. Mice homozygous for hypomorphic allele (MgR) of fibrillin-1 showed abnormal oxytalan fiber assembly of ADAMTSL4, and significant disorganization of PDL. Our results suggest that ADAMTSL4 associates with fibrillin-1 during the assembly of oxytalan fibers, and that these complexes play an important role in the formation of PDL.

P11 Emmprin (CD147) 部分ペプチドによるemmprin 活性阻害に関する検討

¹福岡大学医学部病理学教室

²福岡大学病院 病理部

³東京大学医科学研究所腫瘍細胞社会学分野

古賀 佳織¹ 鍋島 一樹² 青木 光希子² 川上 豪
人¹ 濱崎 慎¹ 江川 長靖³ 清木 元治³ 岩崎 宏¹

(目的)腫瘍細胞表面に発現するmatrix metalloproteinase (MMP) 産生促進因子emmprinは、細胞外に2つのイムノグロブリンドメインをもつ糖蛋白質で、間質細胞からのMMP発現を増強させ、腫瘍の浸潤、転移に重要な役割を果たしている。我々は、第1細胞外ドメインの糖鎖付着部位を含む合成ペプチド(emp#2)が脳腫瘍細胞・間質細胞相互作用によるMMP-2発現増強を抑制することを報告してきた。今回、種々の腫瘍細胞と間質細胞相互作用によるMMP発現増強と浸潤活性増強に対するemp#2の抑制効果を検討した。(方法と結果) Coculture systemを用いて、MMPの発現増強をzymography, Western blottingにて検討したところ、ヒト大腸癌、胃癌、メラノーマ、グリオブラストーマ、T細胞リンパ腫、類上皮肉腫細胞と線維芽細胞によるMMP-2発現増強はemp#2によって約60~80%抑制された。これらの細胞株によるMMP-2発現増強はemmprin中和抗体にて抑制され(40%~90%)、また胃癌細胞株TMK-1では、emmprin shRNAの導入により約40%の抑制が認められた。グリオブラストーマ細胞株U251と線維芽細胞のcocultureによる基底膜浸潤能の増強もemp#2により約70%抑制された。Emp#2の作用機序に関して、腫瘍細胞膜上でのemmprin homodimer形成に対する効果を検討したが、明らかな抑制効果は認められなかった。(結論)Emp#2は種々の腫瘍細胞と線維芽細胞間のemmprinを介した相互作用によるMMP-2発現増強と腫瘍浸潤に対して抑制効果を有する。

Synthetic emmprin (CD147) peptide inhibited MMP-2 up-regulation and tumor cell invasion by tumor-stromal interaction

Department of Pathology, School of Medicine,
Fukuoka University

Kaori Koga,

Extracellular matrix metalloproteinase inducer (emmprin, CD147) plays a critical role in invasive and metastatic activity of tumor cells by stimulation the surrounding fibroblasts to express matrix metalloproteinases (MMP). Emmprin is a glycosylated transmembrane protein containing two Ig domains. The first Ig domain (EC1) of emmprin contains the biologically active site. We found a shorter EC1-derived 20-amino acid peptide (emp#2), containing one of the N-glycosylation sites but no carbohydrate, can inhibit emmprin activity to stimulate MMP-2 production. In this study, we investigated the inhibitory effect of emp#2 for MMP-2 up-regulation and tumor cell invasion by tumor-stromal interaction. First, to confirm the involvement of emmprin in the tumor-fibroblast interaction, we used gastric cancer cell, which is knock down the expression of emmprin by RNA interference. Compared with vector-transfected cell cocultured with fibroblasts, the expression of MMP-2 by emmprin shRNA transfection cell cocultured with fibroblasts was reduced. The stimulation of MMP-2 in coculture of 5 kind of tumor cell with fibroblasts was effectively inhibited by emp#2. Moreover, emp#2 significantly inhibited the invasiveness of glioblastoma cells under the coculture with fibroblasts condition. Perturbation of emmprin activity by emp#2 may have potential therapeutic uses in the prevention of MMP-2-dependent tumor invasion.

P12 I型Marfan症候群患者由来の歯根膜細胞による線維形成の異常

¹東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 顎顔面矯正学分野

²大阪大学 大学院歯学研究科 生化学教室

³慶應大学 医学部 小児科学教室

⁴国立がんセンター研究所 ウィルス部

志賀 百年¹ 齋藤 正寛² 服部 架¹ 小崎 健次郎³ 清野 透⁴ 須田 直人¹

【目的】歯根膜は、歯を歯槽骨内に植立させる重要な組織であり、線維、血管、神経、種々の細胞より構成される。線維成分の大半を占めるコラーゲン線維は、束状構造を形成し歯を支持に関わる。一方、歯根膜弾性線維は、microfibrilのみから成るオキシタラン線維に分類されるものの、その機能は不明である。また高身長、眼・心血管症状を主徴とし、microfibril中のフィブリリン1をコードする*FBN1*遺伝子の変異を原因とするI型Marfan症候群(MFS1:MIM#154700)患者は、しばしば重篤な歯周炎を合併する。しかしながらMFS1における歯周炎の原因や発症機構は明らかでない。そこで歯根膜弾性線維の機能を明らかにする目的として、*FBN1*に6431A>G (N2144S)の変異を有し歯周炎を合併するMFS1患者より歯根膜細胞を単離し、種々の解析を行った。

【方法・結果】単離後、retrovirusを用いたhTERTとBmi-1の遺伝子導入により不死化した歯根膜細胞(M-HPL1)は、同様に不死化した健常人由来の歯根膜細胞(HPDL2)と比較して、活性型TGF- β の亢進をみた。両者の細胞増殖能や、歯と骨の主要無機成分であるヒドロキシアパタイト(HA)上への接着能には差はなかった。しかしながらM-HPL1をHAと共に免疫不全マウス背側皮下に移植し、異所性にヒト線維様組織を形成させた結果、HPDL-2の移植片にはみられない不規則な細胞配列がみられ、fibrillin assemblyにも異常をみた。

【考察】MFS1の肺や心血管症状の発症機構に、TGF- β シグナル亢進が関与すると報告されている。歯周炎の発症におけるTGF- β シグナルの働きには多くの不明な点がある。今後、歯根膜の発生や歯周炎発症にTGF- β シグナルや、fibrillin assemblyがどのように関与しているか明らかにしたい。

Disorganized cell alignment and fibrillin assembly by immortalized periodontal cells from a Marfan syndrome type1 patient.

Maxillofacial Orthognathics, Graduate School, Tokyo Medical & Dental Univ.

Momotoshi Shiga¹, Saito M², Hattori M¹, Kosaki K³, Kiyono T⁴, Suda N¹

The periodontal ligament (PDL) is a specialized connective tissue situated between the tooth root and alveolar bone to support teeth. It is composed of collagen and elastic system fibers. The latter are mainly formed by microfibrils, which are predominantly composed of glycoproteins, fibrillin-1 and 2. Marfan syndrome type I (MFS1, MIM # 154700) results from the mutation of the gene encoding fibrillin-1 (*FBN1*). MFS1 is characterized by a tall stature, aortic/mitral valve prolapse, ectopia lentis, and is occasionally accompanied by severe periodontitis. Since little is known about the biological functions of the elastic system fibers in PDL, PDL cells were isolated from a MFS1 patient with a heterozygous mutation in Ca binding epidermal growth factor-like (cbEGF) domain of *FBN1*. Isolated PDL cells were immortalized by transducing a retrovirus carrying human Bmi-1 and human hTERT. Immortalized PDL cells (M-HPL1) showed a higher level of the active form of TGF- β than those from a healthy volunteer (HPDL2). The growth rate and attachment to hydroxyapatite powder of M-PDL1 were comparable to those of HPDL2. However, when transplanted with hydroxyapatite powder into immunodeficient mice, M-HPL1 were disorganized and showed irregular cell alignment around the powder. These observations were not seen in the implanted tissue of HPDL2. The present immortalized PDL cells from a MFS1 patient provide a powerful tool to clarify the biological roles of the elastic system fibers in the PDL, and results suggested that the elastic fibers might regulate cell alignments and fibrillin-assembly.

P13 脳特異的プロテオグリカン,ニューログリカンC の細胞外領域切り出し機構の解析

¹北陸大学 薬学部 環境健康学教室

²愛知県心身障害者コロニー 発達障害研究所 周生
期学部

周尾 卓也¹ 丸山 浩代¹ 青野 幸子² 中西 圭子²
藤原 泰之¹ 山本 千夏¹ 大平 敦彦² 鍛冶 利幸¹

【目的】ニューログリカンC (NGC) は脳特異的な膜貫通型コンドロイチン硫酸プロテオグリカンである。これまでの解析から、NGCの細胞外領域には、培養神経細胞の神経突起伸長を促進する活性があることが明らかになっていた。このことから、NGCは切断され、その結果生じたNGCの細胞外領域(可溶性NGC)が生理機能を発揮していることが予想された。そこで本研究では、NGCの細胞外領域の切り出し機構について検討した。

【方法・結果】脳の可溶性画分にNGCの細胞外領域が存在することを確認するために、生後10日のラット脳から可溶性画分と膜画分を調製した。膜画分からは、120 kDaのコアタンパクを持つ全長型NGCとNGCの細胞内領域(35 kDa)が得られた。一方、可溶性画分からは、細胞内領域を欠いた75 kDaのコアタンパクを持つNGCが検出された。この可溶性NGCの量は、神経回路形成が盛んな胎生期および新生仔期に多いことがわかった。ラット胎仔から得た神経細胞の初代培養系では、全長型NGCは細胞層に、低分子量の可溶性NGCは培養上清に回収された。この培養系に各種プロテアーゼ阻害剤を添加したところ、可溶性NGCの遊離は、TAPI-1, TIMP-2, およびTIMP-3で効果的に阻害されたが、TIMP-1では阻害されなかった。以上の結果から、NGCは細胞表面で切断され、細胞外領域が遊離することが明らかとなった。プロテアーゼ阻害剤の特異性から、この切断には膜型マトリックスメタロプロテアーゼ(MT-MMP)の関与が考えられる。

【考察】NGCは、発達期の脳組織内において、神経細胞上に膜貫通型として発現した後、メタロプロテアーゼによって切断されることで可溶性NGCとなり、神経突起の伸長促進活性をもつ生理活性分子として機能している可能性が示唆された。

Ectodomain shedding of neuroglycan C, a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan, by TIMP-2- and TIMP-3-sensitive proteolysis

Department of Environmental Health, Faculty of
Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University

Takuya Shuo, Hiroyo Maruyama, Sachiko Aono,
Keiko Nakanishi, Yasuyuki Fujiwara, Chika
Yamamoto, Atsuhiko Oohira, and Toshiyuki Kaji

Neuroglycan C (NGC) is a transmembrane-type of chondroitin sulfate proteoglycan with an epidermal growth factor (EGF)-like module that is exclusively expressed in the central nervous system. Since ectodomain shedding is a common processing step for many transmembrane proteins, we examined whether NGC was subjected to proteolytic cleavage. Western blotting demonstrated the occurrence of a soluble form of NGC with a 75 kDa core glycoprotein in the soluble fraction of the young rat cerebrum. In contrast, full-length NGC with a 120 kDa core glycoprotein and its cytoplasmic fragment with a molecular size of 35 kDa could be detected in the membrane fraction. The soluble form of NGC was also detectable in culture media of fetal rat neurons, and the full-length form existed in cell layers. The amount of the soluble form in culture media was decreased by adding a physiological protease inhibitor such as a tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 or TIMP-3, but not by adding TIMP-1. Both EGF-like and neurite outgrowth-promoting activity of the NGC ectodomain may be regulated by this proteolytic processing.

**P14 Sphingosine-1-phosphateによるヒト線維芽細胞
ストレスファイバーにはmDiaを介する系が存在
する**

¹群馬大学 医学部 皮膚病態学

周東 朋子¹ 安部 正敏¹ 石川 治¹

Sphingosine-1-phosphate (S1P) は細胞の増殖、分化、接着、運動、アポトーシスなどに関与する脂質メディエーターであり、創傷治癒への応用が期待される。今回我々は、S1Pによるヒト線維芽細胞内シグナル伝達系を検討した。まず、創傷治癒のモデルと考えられるコラーゲンゲル収縮能を検討したところ、S1Pは濃度依存性にゲル収縮を惹起した。次に $G_i\alpha$ を不活化するPertussis toxin、Rac 1 阻害剤NSC23766およびROCK/Rhoキナーゼ (ROCK) 阻害剤Y27632で前処置してゲル収縮を検討したところ、いずれもS1P惹起性ゲル収縮は阻害された。次に、コラーゲンコートしたカバーガラス上で、S1Pは濃度依存性にヒト線維芽細胞のストレスファイバーを形成したため、Y27632とRhoを阻害するボツリヌス菌C3酵素を用いてS1Pの細胞骨格形成への影響を検討した。その結果、非刺激下においてY27632存在下ではストレスファイバーの形成はなかったが、S1P刺激ではストレスファイバーの形成がみられた。しかし、C3酵素処理下では、S1P刺激でもストレスファイバーは形成されなかった。そこでRhoAの下流にROCKと同列に存在するmDiaを介する系を検討した。その結果、S1P刺激後のヒト線維芽細胞においてmDiaの細胞質から核内への移行を、免疫組織学的およびWestern Blot法で確認した。今回の検討結果は、S1Pが創傷治癒を促進する可能性を示唆し、その細胞内シグナル伝達系は $G_i\alpha$ Rac 1 RhoA ROCKが関与することが示された。さらに興味深いことに、S1Pによるストレスファイバー形成にはROCKのみならず、mDiaを介する系が存在した。

**mDia may involve in the signal transduction on
developing actin stress fiber of human
fibroblasts with Sphingosine 1-phosphate
stimulation.**

The Department of Dermatology, Gunma University
Graduate School of Medicine, Maebashi, Japan

Tomoko Syuto, Masatoshi Abe, Osamu Ishikawa

Sphingosine 1-phosphate (S1P) is a biologically active lipid mediator that has a lot of pivotal roles in the regulations of cell growth, migration, differentiation and apoptosis. Therefore, S1P is considered to promote human dermal wound healing. We studied the effects of S1P on signal transduction in human fibroblasts using collagen matrices contraction model. S1P promoted collagen matrices contraction with a dose-dependent manner. However, after pretreatment with $G_i\alpha$ inhibitor (Pertussis toxin), Rac 1 inhibitor (NSC23766), or Rho kinase inhibitor (Y27632), S1P-stimulated collagen matrices contraction were completely cancelled. S1P could promote actin stress fibers of fibroblast on collagen-coated coverslip. Rho inhibitor (exotransferase C3) suppressed their stress fiber promotions regardless of the presence or absence of S1P, whereas S1P promoted their stress fibers even if Rho kinase inhibitor were present. Then, further experiments were carried out to explore whether or not mDia is involved in the signal transduction on developing stress fibers, employing immunofluorescence study and western blotting. The translocation of mDia from the cytoplasm to the nucleus was seen only in the presence of S1P stimulation. Our results indicate that not only ROCK but also mDia may be involved in the downstream of $G_i\alpha$, Rac1 and RhoA on developing actin stress fiber of human fibroblasts with S1P stimulation. S1P is expected to promote human dermal wound healing.

P15 ヘパラン硫酸による異なるFGFファミリー分子に特異的なシグナリングの制御

¹愛知医科大学 分子医科学研究所

菅谷 典子¹ 羽瀧 弘子¹ 芦刈 - 羽田 智子¹ 永井尚子¹ 木全 弘治¹

ヘパラン硫酸 (HS) はヘパリン結合性増殖因子 (HB-GF) やECM分子等の様々なリガンドと相互作用し、それらの活性を制御している。これらの相互作用は硫酸化パターンやウロン酸残基のエピマー化によって形成される様々な構造に依存している。6 硫酸化はパターンを決定する主要な反応の一つで、HS 6 STの3つのアイソフォームによって触媒される。我々は、HS 6 ST 1 又は 2、及び両者の欠損マウス (1-KO、2-KO、dKO) を作成した。1-KO及びdKOマウスは各々胎生15.5及び15日で致死となる。今回我々は、これらの変異マウス由来の繊維芽細胞を用いて、HS鎖における6-O-硫酸基の機能を調べた。胎生14.5日の胎児よりマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) を調整した。dKO-MEFは、6-O-硫酸欠損型のHS鎖を産生していた。10%FCS条件下でのdKO-MEFの増殖は正常細胞とほとんどかわらなかった。しかしながら、FGFシグナリングに対する応答性は正常MEFとは異なっていた。dKO-MEFのFGF 4、FGF 2 依存的シグナリングは、各々正常細胞のおよそ30、60%に減少していた。FGF 1 依存的シグナリングについては、低濃度領域において正常細胞よりも減少していた。表面プラズモン共鳴解析の結果、FGF 4 に対するdKO-MEF由来HS鎖の親和性が著しく減少しており、FGF 1 に対する親和性はわずかに減少していることがわかった。逆に、FGF 2 に対する親和性は正常細胞由来のHSに対するものと同程度、およそ2.5倍に増加していた。これらの結果から、HS鎖における6 硫酸基がFGF 4 を細胞表面にトラップすることで、そのシグナリングを刺激していると考えられる。以上から、HSとHB-GFとの相互作用において6 硫酸基が重要な役割を果たしていることが示された。

Distinctive regulation by heparan sulfate of various FGF family molecule-dependent signalings

Institute of Molecular Science of Medicine, Aichi Medical University

Noriko Sugaya, Hiroko Habuchi, Satoko Ashikari-Hada, Naoko Nagai, and Koji Kimata

Heparan sulfate (HS) interacts with diverse ligands, including heparin-binding growth factors (HB-GFs) and ECM molecules, so that it regulates their activities. These interactions depend on the structures characterized by the patterns of sulfate and uronic acid isoform residues. The 6-O-sulfation, one of the major reactions to determine the pattern, is catalyzed by three isoforms of HS6ST. We generated HS6ST-1- and/or HS6ST-2-deficient mice (1-KO, 2-KO, dKO). 1-KO and dKO mice became lethal at E15.5 and E15, respectively. We thus examined the functions of 6-O-sulfation in HS using fibroblasts derived from these mutant mice.

Mouse embryonic fibroblasts (MEF) were prepared from E14.5. dKO-MEF produced little 6-O-sulfated HS. dKO-MEF in 10% FCS proliferated almost at the same rate as normal cells. However, their response to FGFs signaling differed from normal MEF. FGF-4 and FGF2-dependent signaling in dKO-MEF was reduced to about 30 and 60% of normal MEF, respectively. FGF-1-dependent signaling in dKO-MEF was reduced, compared with normal MEF at the lower concentrations. Surface plasmon resonance analysis showed that the apparent affinity of dKO-MEF HS was markedly reduced for FGF-4, but slightly reduced for FGF1. In contrast, the apparent affinity for FGF-2 was increased up to 2.5-folds compared with normal MEF HS. These results suggest that 6-O-sulfate in HS stimulates FGF-4 signaling through trapping it on the cell surface. Taken together, 6-O-sulfate in HS likely play important roles in the interaction between HS and some of HB-GFs.

P16 塩基性線維芽細胞増殖因子によるヒト角化細胞での細胞内シグナル伝達にはインテグリン $\alpha 2\beta 1$ が関与する

¹群馬大学 医学部 皮膚科

曾我部 陽子¹ 安部 正敏¹ 石川 治¹

塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) は、血管内皮細胞や線維芽細胞に対し増殖促進効果を有し、血管新生や肉芽形成を促進することにより創傷治癒を促進することが知られているが、ヒト角化細胞に対する作用について検討した報告はほとんどない。現在までに私たちは、I型コラーゲン処理したカバーガラス上で、ヒト角化細胞がbFGF刺激によりラメリポディア様構造をとり、細胞先端にvinculinを発現させ、その際にはRacの活性化が関与することを示した。またこの変化は、無処理のカバーガラス上、さらにfibronectinでコートしたカバーガラス上では起こらなかった。

私たちはこのRacの活性化に、細胞とI型コラーゲンの接着に関与するインテグリン $\alpha 2\beta 1$ が関与しているという仮説を立て、インテグリン $\alpha 2\beta 1$ の関与の有無、Racの関わりについて詳細に検討した。

I型コラーゲンでコートしたカバーガラス上でヒト角化細胞を播種しbFGFで刺激した後にインテグリン $\alpha 2\beta 1$ 、FAKの発現を免疫染色により検討した。さらにインテグリン $\alpha 2\beta 1$ の中和抗体やRac阻害剤で前処理後、同様にbFGFで刺激し、形態の変化、vinculin, やactin stress fiberの発現を観察したところ、細胞はラメリポディア様構造をとらなかった。さらに現在中和抗体・阻害剤の存在下でbFGF刺激した際のRacおよびcdc42の活性化を、pull down法により、さらに細胞運動についてボイデンチャンバーを用いて検討中である。

今回の検討により、bFGF刺激により引き起こされるヒト角化細胞の細胞内シグナル伝達の一部が明らかとなった。

Signal Transduction Through Integrin $\alpha 2\beta 1$ Human Keratinocyte Stimulated by Basic Fibroblast Growth Factor

Department of Dermatology, Gunma University
Graduate School of Medicine, Maebashi, Japan

Yoko Sogabe, Masatoshi Abe and Osamu Ishikawa,

Topical application of human recombinant basic fibroblast growth factor (bFGF) promotes wound healing. bFGF, however, has been reported to have little in vitro effects on keratinocyte compared to other cell types such as endothelial cells or fibroblasts. Normal human keratinocytes (NHK) formed lamellipodia only when they were stimulated with bFGF on the type 1 collagen-coated coverslips. Under these conditions, vinculin and GTP-loaded Rac (an activated form) were involved in the phenomenon. These results strongly suggest that integrin $\alpha 2\beta 1$ may play a crucial role in this morphological change.

We examined the expressions of integrin $\alpha 2\beta 1$ and the activation of FAK in bFGF-stimulated keratinocytes on type 1 collagen-coated coverslips by immunofluorescence microscopy, and also studied the expression of integrin $\alpha 2\beta 1$ and vinculin, FAK activation and induction of actin stress fiber in the same way after the treatment with neutralizing antibody for integrin $\alpha 2\beta 1$ or Rac1 inhibitor. Antibody or inhibitor inhibited NHK to form lamellipodia. Further analyses, pull-down assay to detect GTP-loaded Rac and cdc42 (an activated form) and Boyden chamber assay to examine keratinocyte migration, are now under investigation.

These in vitro studies partly clarify an intracellular signal transduction that bFGF exerts its stimulatory effect on keratinocyte migration under the presence of type I collagen as a scaffold.

P17 ADAMTS4の活性阻害を介したカルシウムペントサンポリ硫酸の軟骨保護作用

¹慶應義塾大学 医学部 病理学教室

滝沢 雅之¹ 谷田部 拓¹ 岡田 愛子¹ 千々岩 みゆき¹ 望月 早月¹ 岡田 保典¹

【目的】カルシウムペントサンポリ硫酸(CaPPS)は変形性関節症(OA)動物モデルにおいて軟骨保護作用を示し、培養軟骨組織片を用いた実験でアグリカナーゼによるアグリカン分解産物の形成を抑えることが知られている。しかし、CaPPSがアグリカナーゼであるADAMTS分子に対し直接作用するかについては全く不明である。本研究では、CaPPSのADAMTS1、4、5、8、9、15に対する作用と阻害機序について検討した。

【方法】培養ヒトOA関節軟骨細胞にCaPPS (0, 0.1, 1, 10 μ g/ml)とIL-1 α (1 ng/ml)および精製アグリカンを添加し、培養液中のアグリカナーゼによるアグリカン分解産物をネオエピトープ抗体(抗NITEGE抗体)を用いてイムノプロットで検出した。また、これらADAMTS分子のmRNA発現変化をRT-PCRで検討するとともに、CaPPSのADAMTS4への直接阻害作用の有無を調べた。さらに、CaPPSとADAMTS4分子の結合実験を行った。

【結果】軟骨細胞におけるアグリカナーゼによるアグリカン分解産物はIL-1 α 存在下で増加し、CaPPSの同時添加で著しく減少した。しかし、CaPPS処理でADAMTS1、4、5、8、9、15のmRNA発現は変化しなかった。一方、CaPPSは野生型と Spacerドメインを欠失したADAMTS4のアグリカン分解活性を阻害し、野生型に対してより強く作用した。また、CaPPSはADAMTS4へ結合し、その結合はSpacerドメインとシステインリッチドメインのペプチド断片で阻害された。

【結論】CaPPSはADAMTS4と直接結合することでADAMTS4のアグリカナーゼ活性を阻害し、OA関節軟骨において軟骨保護作用を発揮する可能性が示唆された。

Chondroprotective effect of calcium pentosan polysulfate through the inhibition of ADAMTS4 aggrecanase activity

Department of Pathology, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan

Masayuki Takizawa, Taku Yatabe, Aiko Okada, Miyuki Chijiwa, Satsuki Mochizuki and Yasunori Okada

Calcium pentosan polysulfate (CaPPS) is known to have chondroprotective effects in the animal model of osteoarthritis (OA) and suppress the release of aggrecan fragments generated by the action of aggrecanases, which include ADAMTS1, 4, 5, 8, 9 and 15. However, little or no information is available for the action of CaPPS to the ADAMTS species. In the present study, we examined the effects of CaPPS on the aggrecanase activity and the mRNA expression of the ADAMTS species in cultured OA chondrocytes treated with or without IL-1. We also studied whether CaPPS inhibits the aggrecanase activity of ADAMTS4 and the binding to immobilized CaPPS. Formation of aggrecan fragments generated by the action of aggrecanases was increased in cultured OA chondrocytes treated with IL-1 and CaPPS inhibited the enhanced fragment formation. However, treatment of the chondrocytes with CaPPS did not affect the mRNA expression of ADAMTS1, 4, 5, 8, 9 or 15. On the other hand, the aggrecanase activity of ADAMTS4 and its mutant without spacer region was dose-dependently inhibited by the CaPPS treatment. Iodinated ADAMTS4 bound to the immobilized CaPPS and the binding was partially inhibited by addition of peptides corresponding to the spacer region and cysteine-rich domain of ADAMTS4. Thus, these data demonstrate that CaPPS inhibits aggrecanase activity of ADAMTS4 through the direct binding to the spacer and cysteine-rich regions and suggest that CaPPS functions as a chondroprotective drug in OA.

P18 ヘアレスマウス光老化モデルにおける好中球の挙動と組織崩壊

¹ポラ化成工業株式会社

²山形大学医学部看護学科

竹内 啓貴¹ 穴戸 まゆみ¹ 五味 貴優¹ 末延 則子¹ 渡辺 皓²

UV暴露頻度の高い顔面等の皮膚表面では、コラーゲン・弾性線維など結合組織構成成分（ECM）の変性・崩壊などのダメージに伴い、シワが形成されることはよく知られている。また各種エラスターゼ・MMPsがECM崩壊に関与していると考えられている。我々は軽度の炎症の繰り返しと、それに伴うECM分解酵素の生成が光老化皮膚の形成に関与していると考え、炎症性細胞である好中球の光老化過程での挙動と好中球が特異的に放出する好中球エラスターゼの活性について検討した。

ヘアレスマウス（Hos：HR-1）に東芝FL-20S、E-30/DMRランプを用いUVBを週3回、10週間背部皮膚に照射して光老化モデルを作製した。照射量は、最小紅斑量未満の照射強度である、50 mJ/cm²で1週間、その後9週を100 mJ/cm²とした。未照射皮膚および、UVB照射5、10週間の皮膚のそれぞれUVB照射終了後6、24、48時間後の好中球浸潤を、光学顕微鏡、透過型電子顕微鏡（TEM）にて観察した。また、*in situ* zymographyを用いて好中球エラスターゼについて検討した。

光学顕微鏡およびTEM観察によりUVB光老化モデルマウスで好中球の浸潤が確認された。また *in situ* zymographyを用いた検討から、好中球浸潤が確認された組織にエラスターゼ活性が認められ、好中球エラスターゼ特異的阻害剤の添加によりその活性が抑制された事より、UVB繰り返し照射皮膚中に好中球エラスターゼ活性が存在することが確認された。

本研究において、UVB繰り返し照射による光老化モデル皮膚中での好中球浸潤と好中球エラスターゼ活性が確認された事から、好中球および好中球エラスターゼが光老化に関与している可能性が考えられた。現在、好中球エラスターゼによる光老化形成機序について更に詳細な検討を行っている。

Behavior of neutrophils and ECM degradation in hairless mouse photoaging model

¹ POLA Chemical Industries, INC., Yokohama, Japan

² School of Nursing, Yamagata University Faculty of Medicine, Yamagata, Japan

Hiroataka Takauchi, Mayumi Shishido¹, Takamasa Gomi¹, Noriko Suenobu¹, Hiroshi Watanabe²

Photoaging results from repeated exposure of skin to ultraviolet (UV) irradiation. Connective tissue damage in photoaged skin is thought to be associated with wrinkle formation. It has been reported that elastase and matrix metalloproteinase are involved in connective tissue alteration. We hypothesized that repeated mild inflammation, which causes connective tissue alteration, may lead to photoaging, and thus studied the behavior of neutrophils, a type of inflammatory cell, and neutrophil elastase activity in the photoaging process.

The dorsal skin of 5-week-old female hairless mice (Hos: HR-1) was irradiated with UVB 3 times/week for 10 weeks, with the first week under the erythema dose at 50 mJ/cm²/d, followed by 9 weeks at 100 mJ/cm²/d. Skin samples were collected at 6, 24, and 48 h after UVB exposure at the end of 5 and 10 weeks. Each skin sample was investigated under light microscopy (LM) and electron microscopy (EM). We also examined neutrophil elastase activity by *in situ* zymography.

LM and EM observation revealed neutrophil infiltration in repeatedly UV-irradiated mouse dorsal skin and elastase activity was observed by *in situ* zymography. Since the substrate degradation observed by *in situ* zymography was inhibited by neutrophil elastase inhibitor, the degradation was caused by neutrophil elastase. This suggests that neutrophil elastase is present in skin repeatedly exposed to UVB.

In this study we found neutrophil infiltration and neutrophil elastase activity in the UVB exposed skin of hairless mice. These data suggest that neutrophil elastase, released by neutrophils, may play a role in skin photoaging.

*P19 ADAMTS/aggrecanases are differentially expressed in cultured astrocyte

¹岡山大学 医歯薬学 分子医化学

²岡山大学 医歯薬学 人体構成学

DEMIRCAN KADIR¹ 広畑 聡¹ 米澤 朋子¹ 瀧川 朋亨¹ 黒崎 雅恵¹ 西田 圭一郎² 二宮 善文¹

There is no Japanese abstract
please see the english part

best regards

ADAMTS/aggrecanases are differentially expressed in cultured astrocyte

1Department of Molecular Biology and Biochemistry,

2 Department of Anatomy, Okayama University

Graduate School of Medicine, Dentistry and

Pharmaceutical Sciences, Okayama, Japan

Kadir Demircan, Satoshi Hirohata¹, Tomoko

Yonezawa ¹, Tomoyuki Takigawa ¹, Masae

Kurosaki¹, Keiichiro Nishida², Yoshifumi Ninomiya¹

The activity of aggrecanases in the central nervous system (CNS) has been reported. However, there is minimal literature on ADAMTSs in the CNS and research in this area should be encouraged as many of the substrates for ADAMTSs, such as versican, are upregulated in CNS injury sites. The function of astrocytes is to maintain the homeostatic environment, thus promoting the proper functioning of the neuronal network. Astrocytes are stimulated in the inflammatory disease in CNS and produced various molecules including cytokines and growth factors. In fact, Aggrecanase-1 (ADAMTS4) was reported to be upregulated in amyloid- treated astrocytes. CNS proteoglycans include the chondroitin sulphate proteoglycans (CSPGs), aggrecan, brevican, neurocan, phosphacan and versican. These molecules are important to brain structure through maintenance of the correct hydrodynamics and in their interactions with other ECM components. They also contribute to disease processes and their synthesis is modulated by injury. They are known to inhibit neurite outgrowth and axonal regeneration and promote neural cell death.

Mouse astrocytes were isolated from neonates and RNA was extracted. The expression levels of ADAMTS mRNAs (ADAMTS1, 4, 5, 8, 9 and 15) were examined by RT-PCR. ADAMTS1 was strongly expressed in neonatal astrocytes. Our result demonstrated that ADAMTS-aggrecanases are differentially regulated in cultured astrocytes. There is no previous documentation showing the expression analysis of aggrecanases family in CNS. These studies present novel information on aggrecanases involved in proteoglycan cleavage in the CNS. They also provide the basis for investigating the function of ADAMTS-aggrecanases in the CNS.

P20 脂肪細胞と前駆細胞における細胞外マトリックス関連遺伝子の発現比較解析

¹独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 畜産物品質研究チーム

中島 郁世¹ 大江 美香¹ 室谷 進¹ 柴田 昌宏¹
千国 幸一

【目的】細胞外マトリックス(ECM)が多彩な細胞活動に影響を及ぼすことは知られているが、脂肪細胞におけるその機能は不明である。脂肪細胞研究の関心事は脂質代謝に関わる細胞内活動に向いているため、ECMに関する詳細な情報はほとんどない。本研究で我々は、ECM及び接着分子に限定したアレイを用いて脂肪細胞と前駆細胞における発現様式を解析した。【方法】当研究所で樹立したブタ皮下脂肪前駆細胞株(PSPA)を用いた。培養は10%FCS添加DMEMで行い、脂肪細胞への分化誘導はconfluentにした後、分化誘導培地(インスリン、デキサメタゾン、ビオチン、パントテン酸、オクタノ酸添加)に置換し更に10日間培養した。分化誘導後10日目の脂肪細胞及び前駆細胞からRNAを抽出し、ビオチン標識cDNAプローブを合成した。SuperArray社GEArray Qシリーズの「細胞外マトリックス&接着分子」(ヒト)を用いてハイブリダイゼーションを行い、化学発光によりスポットを検出し、GEArray Expression Analysis Suiteソフトウェアでアレイイメージを解析した。【成績】脂質代謝関連分化マーカーが脂肪細胞でのみ明確に発現しているのに対し、多種多様のECM、接着分子及びMMP類が脂肪細胞、前駆細胞の両方で発現していた。その中でも脂肪細胞ではMMPファミリーの発現が強く、前駆細胞ではインテグリンファミリーの発現が目立った。一方、白血球のローリングに関与するような接着分子が脂肪細胞で強発現することも新たに判明した。【結論】ECMに関わる多くの遺伝子は前駆細胞及び脂肪細胞共に発現が見られ、それらの発現量の増減により脂肪細胞に適切な細胞外環境を構築していくことと推察された。また、白血球で発現するような接着分子が脂肪細胞においてどのような機能を果たすのかは今後の検討課題である。

Extracellular matrix and adhesion molecules gene expression profiling in pig preadipocyte and adipocyte by SuperArray analysis

National Institute of Livestock and Grassland Science

NAKAJIMA Ikuyo, OE Mika, MUROYA Susumu,
SHIBATA Masahiro, CHIKUNI Koichi

Hormonal regulation and the increase in levels of enzymes and proteins related lipid metabolism have been studied in detail, though less attention has been focused on the role of the extracellular matrix (ECM) components and its relevance that accompany adipose development. Here differential gene expression between preadipocytes and adipocytes was analyzed using a GEArray Q series human ECM and adhesion molecules gene array kit obtained from SuperArray Bioscience Corp. We made investigations using an established porcine preadipocyte cell line (PSPA) derived from subcutaneous tissue of crossbred fetuses. When confluent cultures were stimulated with insulin, dexamethasone, biotin, pantothenate, and octanoate, PSPA adipocytes clearly demonstrated adipose-specific characteristics, including those master regulators of adipocyte gene transcription, and further enzymes and proteins needed to carry out both de novo lipogenesis and lipolysis which were undetected in undifferentiated preadipocytes. On the other hand, ECM related gene expression patterns were considerably more complex. Various ECM components, adhesion molecules and matrix metalloproteinases (MMP) were mostly present in both preadipocytes and adipocytes. However, comparative analysis of the non-differentiated and differentiated PSPA cell expression data revealed that fibroblast-like preadipocytes predominantly expressed integrins, whereas adipocytes showed much higher levels in other cell adhesion molecules such as selectins known as the "homing receptor" on lymphocytes and also in MMPs. In conclusion, these data offer an overview of the ECM related gene expression profiles in preadipocytes and adipocytes and indicate unexpected genes with potentially novel functions in adipose tissue development.

* P21 テネascinCはマクロファージを制御することで
高血圧心線維化進展を促進する

¹三重大学大学院医学系研究科修復再生病理学講座

西岡 朋弘¹ 鈴木 舞子¹ 伊奈田 宏康¹ 吉田 利
通¹ 今中-吉田 恭子¹

【目的】テネascinC (TNC) は細胞外マトリックス糖蛋白で、正常成体の心臓ではほとんど発現せず、病的状態で発現する。我々は以前高血圧心線維化進展過程でTNCが発現することを報告したが、今回はさらにTNCの分子的作用機序について検討した。【方法】7週令のBalb/c系マウス野生型 (WT群) とTNCノックアウトマウス (TNKO群) に浸透圧ポンプを用いてアンジオテンシンII (AngII) (500ng/kg/min) を4週間持続投与して高血圧モデル (WT/AngII群、TNKO/AngII群) を作製し、シリウスレッド染色した組織の線維化定量、アルーシャンブルー (AB) 染色、Mac-3、PDGF-AおよびB、パーシカンに対する免疫染色を行った。【結果】収縮期血圧は、WT/AngII群はWT群に対して有意に上昇し ($p < 0.001$)、WT/AngII群とTNKO/AngII群間では有意差はなかった。WT/AngII群の心筋血管周囲の線維化率はWT群と比べ有意に増加した ($p < 0.001$)。TNKO/AngII群の線維化率はWT/AngII群より有意に少なかった ($p < 0.05$)。血管周囲のMac3陽性細胞のマクロファージ数を計測するとWT/AngII投与群はTNKO/AngII群に比べ有意に増加した。さらにマクロファージから産生されるサイトカインと考えられるPDGF-AおよびBの発現を免疫染色により検討すると、WT/AngII投与群はTNKO/AngII群に比べ血管周囲のPDGF-AおよびB陽性細胞の数が有意に増加した。WT/AngII群においてAB陽性グルコサミノグルカン類の沈着が増加し、TNKO/AngII群ではより粗な構造を示し、WT/AngII群の血管周囲のパーシカンがTNKO/AngII群より多く沈着することが明らかとなった。【結語】TNCは高血圧心線維化進展を制御することが明らかとなった。

Tenascin-C promotes myocardial fibrosis by
recruiting macrophages in mouse hypertensive
heart

Departments of Pathology and Matrix Biology, and
laboratory Mie University school of Medicine

Tomohiro Nishioka, Maiko Suzuki, Hiroyasu Inada,
Toshimichi Yoshida, Kyoko Imanaka-Yoshida

Tenascin-C (TNC) is an extracellular matrix glycoprotein not detected in normal adult myocardium but expressed under various pathological conditions.

To elucidate the role of TNC in myocardial fibrosis in hypertensive heart, experiments on mice were done.

Balb/c wild type mice (WT) and TNC knockout mice (TNKO) were treated with (560 ng/kg body weight/min) AngiotensinII (AngII) subcutaneously by osmotic minipump for 4 weeks. In both wild type and TNKO, AngII treatment increased blood pressure, heart weight/body weight ratio, and sizes of cardiomyocytes but no significant differences were detected between WT/AngII and TNKO/AngII. AngII treatment also caused increase of interstitial collagen fiber at perivascular regions. Increase of interstitial collagen fiber in TNKO/AngII was lower than that in WT/AngII.

The accumulation of mac-3 positive macrophages observed at perivascular region was significantly higher in WT/AngII than in TNKO/AngII. Next, we investigate the PDGF-A and B, cytokines thought to be released by Macrophages. The number of PDGF-A and B positive cells were counted. Especially in perivascular area, more cells accumulated in WT/AngII than those in TNKO/AngII mice.

Alcian Blue staining showed dense deposition of glycosaminoglycans (GAGs) at perivascular area in WT/AngII. In contrast, TNKO/AngII showed sparse and rough fibrillar staining pattern.

Immunostaining demonstrated that deposition of PGM/versican, a chondroitin sulphate proteoglycan, was lower in TNKO/AngII than in WT/AngII.

These results suggest that, TNC may promote fibrosis in hypertensive heart by enhancing macrophages accumulation and deposition of proteoglycans.

*P22 ラット膝関節不動化モデルにおける関節包組織の粘弾性の経時的変化

¹東北大学 医学部 整形外科

²東北大学 医学部 加齢医学研究所 病態計測分野

³東北大学 歯学部 顎口腔形態創建学分野

萩原 嘉廣¹ 千本 英一¹ 安藤 晃¹ 西條 芳文²
笹野 泰之³ 国分 正一¹ 井樋 栄二¹

【背景】関節の不動化によっておこる「関節拘縮」は関節可動域の減少と定義され、整形外科領域のみならず寝たきりなどの廃用でも起こる。拘縮関節は著しく生体動作を制限し、患者のQOLを損なう。関節拘縮の原因は未だに不明で、その解決策を論じられる機会は他の疾患と比較して極端に少なかった。臨床的に関節包を切開することで関節可動域の拡大が得られることから、関節包の組織学的変化が関節拘縮の原因の一つとして考えられる。

【目的】in situで組織の音速（粘弾性）を計測可能な超音波顕微鏡（Scanning acoustic microscopy）を用い、不動化によって起こる関節包組織の音速を経時的に観察すること。

【方法】雄Sprague-Dawleyラット（体重380～400g）を使用した。実験群として片側膝をプラスチックプレートとスクリューを用いて大腿骨と脛骨を屈曲位150度で固定した。対照群としてスクリューのみをそれぞれの骨に挿入した。1, 2, 4, 8, 16週間の不動化後、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、10%EDTAにて脱灰し、パラフィン包埋した。大腿骨内側顆部中央を通る5 μ mの矢状断面の切片を作製した。脱パラフィン後に超音波顕微鏡を用いて前方、後方の関節包組織の音速を計測した。

【結果】前方関節包の音速は対照群と比較して全ての実験期間で統計学的有意差はなかった。後方関節包の音速は8, 16週の実験群で増加し、対象群と比較して統計学的有意差を認めた。

【結論】後方関節包の組織学的変化が関節可動域の伸展障害の原因の一つと考えられた。超音波顕微鏡は切片上で組織の音速を計測するのに有益であった。

Increased elasticity of capsule in a rat knee contracture model assessed by scanning acoustic microscopy

Department of Orthopaedic Surgery, Tohoku University, Graduate School of Medicine

Yoshihiro Hagiwara, Yoshihiro Hagiwara, Eiichi Chimoto, Akira Ando, Yoshifumi Saijo, Shoichi Kokubun, and Eiji Itoi

Objectives: The mechanical property of immobilized joints is not well understood. The present study was designed to investigate the tissue elasticity of the anterior and posterior capsules in a rat knee contracture model using scanning acoustic microscopy (SAM).

Material and Methods: Adult male Sprague-Dawley rats weighing from 380 to 400 g were used. Their knee joints were immobilized at 150° in flexion with a plastic plate and metal screws for various periods (1, 2, 4, 8 and 16 weeks). Sham operated animals had holes drilled in the femur and tibia and screws inserted but none of them were plated. The rats were fixed with 4% paraformaldehyde and the specimens were decalcified in EDTA. Standardized serial sections of the medial midcondylar region of the knee were made. A new concept SAM using a single pulsed wave instead of continuous waves was applied to measure the sound speed of the anterior and posterior capsules, comparing it with the corresponding light microscopic images.

Results: The sound speed of the posterior capsule increased significantly in the 8- and 16-week experimental group compared with that in the control group. The sound speed of the anterior capsule showed no statistical difference between the experimental and the control groups at any period of immobilization.

Conclusions: Our data suggest that the increased elasticity of the posterior capsule are one of the main causes of limited extension after a long period of immobilization in using SAM, which is a powerful tool for evaluating the elasticity of targeted tissues.

P23 ADAMTS1は内皮細胞特異的に細胞浸潤を抑制する

¹岡山大学 大学院 医歯薬学総合研究科

²岡山大学 医学部 保健学科

廣畑 聡¹ 小比賀 真就¹ 小川 弘子¹ 三好 亨¹
Cilek Mehmet Zeynel¹ Demircan Kadir¹
Hatipoglu Omer Faruk¹ 草地 省蔵² 二宮 善文¹

【背景】ADAMTSは分泌型メタロプロテアーゼファミリーに属する多機能タンパクである。ADAMTSファミリーのうち、ADAMTS-1, 4, 5, 8, 9, 15は細胞外マトリクスであるアグリカンなどのプロテオグリカン分解酵素として働くために、アグリカナーゼファミリーと呼ばれている。このうち、ADAMTS-1, 8には抗血管新生作用があることが報告されているが、まだ詳細は明らかではない。

【方法】二つのADAMTS-1コンストラクト（全長・プロテアーゼドメイン欠損）を作製した。COS-7細胞にtransfectionして培養上清を回収した。回収した培養上清を、それぞれヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）、線維芽細胞、平滑筋細胞の培養上清中に1：1で混合し効果を検討した。Cell migrationはスクラッチアッセイにて、cell proliferationはMTSアッセイにて検討した。

【結果】検討したADAMTS-1のコンストラクトはいずれもHUVECのmigrationを抑制しproliferationを抑制した。一方、どちらのコンストラクトも平滑筋など他の細胞では変化なく、この効果は内皮細胞特異的と考えられた。

【結論】ADAMTS-1による細胞抑制機能は内皮細胞特異的である。

Endothelium-specific inhibition of cell migration and proliferation by ADAMTS1

Okayama University Graduate School of Medicine,
Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Satoshi Hirohata, Masanari Obika, Hiroko Ogawa,
Toru Miyoshi, Mehmet Zeynel Cilek, Kadir Demircan,
Omer Faruk Hatipoglu, Shozo Kusachi, Yosifumi
Nnomiya

Objective: ADAMTS1 is a metalloprotease originally cloned from cancer cell line. ADAMTS4 was identified as Aggrecanase-1 and several ADAMTS members have been demonstrated to cleave aggrecan. Interestingly, ADAMTS1 and ADAMTS8 were reported to inhibit angiogenesis. However, the precise mechanism of anti-angiogenic activity was unknown. Methods: We constructed two different cDNAs; full length of ADAMTS1 (full-ADAMTS1) and protease domain-truncated ADAMTS1 (delta-ADAMTS1). We transfected these cDNAs to COS7 cells and collected the transfected medium. We co-cultured various cells such as HUVEC, fibroblasts and smooth muscle cells (SMC) with the transfected conditioned medium. Cell migration was examined by scratch assay and cell proliferation assay was performed by MTS assay. Results: Western blot analysis revealed that both full-ADAMTS1 and delta-ADAMTS1 proteins were secreted. Both conditioned medium inhibited cell proliferation in HUVEC ($62.1 \pm 2.0\%$ and $78.9 \pm 3.6\%$, compared with control) by MTT assay, but not in fibroblasts and SMC. Cell migration assay showed that both conditioned medium significantly inhibited migration of HUVEC. Cell migration was not inhibited in other types of cells such as SMC. In addition, both full-ADAMTS1 and delta-ADAMTS1 inhibited tube formation in HUVEC. Conclusion: These results suggest that the inhibitory activity of cell migration and cell viability by ADAMTS1 is endothelial cell-specific.

P24 微生物感染のマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs)の発現に及ぼす影響

¹昭和薬科大学

藤田 哲弘¹ 池島 秀明¹ 山形 菜々子¹ 工藤 裕子¹ 加藤 尚子¹ 宇都宮 郁¹ 田口 恭治¹ 星 恵子¹

【目的】

近年、動脈硬化の進展に微生物感染を含めた炎症との関連が指摘されている。また、マトリックス代謝の異常も動脈硬化に重要と考えられており、特にマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)が注目されている。MMPsは炎症性サイトカインにより惹起されることが知られているが、微生物感染にてもMMPsの発現が変化すると考えられるため、この点を明らかにする。

【方法】

ヒト単球のcell lineである単球性白血病細胞株(THP-1)に、伝染性紅斑の病原ウイルスであるヒトパルボウイルスB19のVPタンパクを用いて抗原刺激を行った。THP-1細胞よりRNeasy Mini Kit (QIAGEN)にてRNAを抽出し、動脈硬化に關与するとされるMMP-2とその刺激因子であるTGF- β 、MMP-9とその刺激因子であるTNF- α 、IL-1 α 、IL-1 β 、TGF- β についてRT-PCR法にて経時的にRNAの変化を調べた。

【結果・考察】

VPタンパクによる抗原刺激6時間後にMMP-2、MMP-9、IL-1 β 、24時間後にIL-1 α 、IL-1 β 、48時間後にTGF- β のmRNAレベルが有意に上昇した。MMP-2、MMP-9のmRNAの上昇は、刺激因子であるIL-1 α 、IL-1 β 、TGF- β の上昇より早期、もしくは同時であったため、VPがMMP-2、MMP-9の増加に直接的に作用することが示唆された。従って、VPタンパクは単球においてMMP-2、MMP-9の発現を直接増加させることで、動脈硬化と関連している可能性が考えられた。現在、すでに動脈硬化との関連性が指摘されているChlamydia pneumoniaeについても同様に検討中である。

Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) by microbial infection

Showa Pharmaceutical University

Tetsuhiro Fujita, Hideaki Ikejima, Nanako Yamagata, Yuko Kudo, Naoko Kato, Iku Utsunomiya, Kyoji Taguchi, Keiko Hoshi

Introduction:

Inflammation including microbial infection such as Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori and Cytomegalovirus, now recognized as an one of the player in atherosclerosis. Matrix metalloproteinases (MMPs) has been implicated in the pathogenesis of atherosclerotic diseases. We investigate that the effect of MMPs expression by microbial infection.

Methods:

THP-1 (human monocyte cell line) and VP (structural protein of Human parvovirus B19 antigen) infection model was used to present study. Total RNA was extracted from cells, and the reverse transcription was performed. We determined that expression of MMP-2, MMP-9, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β and TGF- β mRNA levels in THP-1 cells by treatment with VP antigen. TGF- β is MMP-2 and MMP-9 stimulating factor, and also TNF- α , IL-1 α and IL-1 β are MMP-9 stimulating factors. VP antigen was kindly donated by Denka Seiken.

Result:

MMP-2, MMP-9 and IL-1 β mRNA levels of THP-1 cells treatment with VP were increased as compared with control after 6 hours. IL-1 α and IL-1 β were increased after 24 hours. TGF- β was increased after 48 hours.

Conclusion:

Our data showed that VP may be directly increased MMP-2 and MMP-9 mRNA levels of THP-1 cells, since the increase of MMP-2 and MMP-9 expressions were an early stage compared with IL-1 α , IL-1 β and TGF- β expression. These findings suggest that microbial infections induced the atherosclerotic diseases via MMP-2, MMP-9 expression. It is under examination similarly about Chlamydia pneumoniae.

¹北陸大学 薬学部 環境健康学教室

²愛知学院大学薬学部衛生薬学講座

³北陸大学学術フロンティア研究組織

Department of Environmental Health, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University

Yasuyuki Fujiwara, Chika Yamamoto, Toshiyuki Kaji

藤原 泰之^{1,2} 山本 千夏^{1,3} 鍛冶 利幸^{1,3}

【目的】血管内皮細胞表層にはヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPGs) を主成分とするグリコカリックスと呼ばれる層が存在し、血管内腔の抗血栓性やFGF-2の活性制御に基づく内皮細胞の機能調節に重要な役割を果たしている。鉛は血管病変誘発の危険因子の一つであるが、我々は鉛が内因性FGF-2依存的に内皮細胞増殖を阻害することを見出している。そこで今回、内皮細胞のPG合成に対する鉛の作用を検討した。

【方法】増殖期のウシ大動脈由来血管内皮細胞を鉛存在下、³⁵S硫酸で代謝標識し、細胞層および培地に蓄積したPGsの特性を解析した。

【結果および考察】鉛は細胞層および培地への³⁵S硫酸PGsの蓄積を有意に減少させた。DEAE-Sephacel, Sepharose CL-4BおよびSepharose CL-6Bクロマトグラフィーによる解析の結果、鉛によって高分子量型HSPGsがヘパラン硫酸 (HS) 糖鎖の長さに影響を及ぼすことなく有意に減少していることが分かった。また、HS糖鎖の微細構造を蛍光標識糖鎖電気泳動法で分析したところ、鉛は構成二糖であるGlcA/IdoA-GlcNAc, GlcA/IdoA-GlcNSおよびIdoA(2S)-GlcNS量を有意に減少させたが、各構成二糖の存在比は鉛により有意に変化しなかった。細胞層および培地に蓄積した³⁵Sアミノ酸標識コア蛋白のSDS-PAGEの結果、分子量約400 kDaの大型HSPGコア蛋白の鉛による減少が認められ、このコア蛋白がウエスタンブロット分析によってパールカンであることが確認された。以上より、パールカンの合成過程において、鉛はHS糖鎖の形成に影響を及ぼすことなくコア蛋白合成に対して毒性を発現し、パールカン分子の産生を阻害する結果、内皮細胞表層のHS糖鎖量を減少させ、内因性FGF-2に対する応答性を低下させるものと推察される。

Heparan-sulfate containing membrane architecture, so called glycocalyx, is on the surface of the vascular endothelial cell layers. The major component of glycocalyx is perlecan which is a large heparan sulfate proteoglycan molecule bound to the extracellular matrix. Perlecan exhibits a heparin-like activity and promotes the binding of basic fibroblast growth factor (FGF-2) to its receptor. Lead is a heavy metal which has been experimentally and epidemiologically shown to induce vascular lesions such as atherosclerosis. Previously, we have shown that lead inhibits the proliferation of endothelial cells depending on endogenous FGF-2 in vitro. In the present study, we investigated the effect of lead on the synthesis of proteoglycans using bovine aortic endothelial cells in a culture system. Lead reduced the accumulation of ³⁵Ssulfate-labeled proteoglycans in the cell layer and the conditioned medium in dose-dependent manners. DEAE-Sephacel ion exchange chromatography, CL-4B chromatography, and CL-6B chromatography of ³⁵Ssulfate-labeled proteoglycans revealed that lead markedly decreased the accumulation of a large HSPGs without a change in length of heparan sulfate chains. Analysis of core protein labeled with ³⁵S-labeled amino acids by SDS-PAGE indicated that lead markedly decreased the amount of a large HSPG core protein with a molecular mass of approximately 400 kDa. This core protein was identified as perlecan by Western blot analysis. These results suggested that inhibition of the endothelial cell proliferation by lead is due to a lower proliferative response of the cells to endogenous FGF-2, caused by a perlecan synthesis.

*P26 膀胱壁弾性線維の構造に関する3次元解析

¹近畿大学医学部泌尿器科

²近畿大学医学部病理学

松本 成史¹ 杉本 公一¹ 伊藤 浩行²

【目的】弾性線維は生体内に広く分布する結合組織であり、そのゴム状弾性により臓器・組織の機能に重要な役割を果たしている。しかし、形態学的に微細構造が不明であり、構造や機能の解析は不十分である。そこで、排尿と蓄尿の極めてダイナミックな機能を持つ膀胱壁を対象として、弾性線維の構造解析を試みた。【方法】体重2kgの雄兔より膀胱を摘出し、切開して洗浄後、膀胱体部前壁を2分した。1片はglutalaldehydeで固定し、型のごとく電顕用試料とした。通常の透過電顕による観察と共に、2ミクロンの切片を作成し、超高压電顕を用いて2MVで観察した。-70から+70度まで2度おきに傾斜をかけて撮影し、これらの画像を用いて解析ソフトIMOD packageにより3次元再構築像を作成した。他片は、KOH-collagenase処理を行ってcollagenやムコ多糖を除いた後、走査電顕で弾性線維の走行を観察した。【成績】光学顕微鏡による観察では弾性線維は外膜に比較的豊富に存在するが、筋層では極めて僅かで、平滑筋細胞間に糸くず状に観察される。KOH-collagenase処理後、走査電顕で観察すると筋層間にコイル状の線維が観察される。透過電顕ではこの線維は細胞間に断片状に見られ、タンニン酸染色陽性であることから弾性線維と同定されるが、微細構造は不明である。しかし、2 μ の切片を超高压電顕で観察すると、1本の線維の中に多数の細線維が認められる。コンピュータ上で再構築を行いその3次元断層像を作成することにより細線維の束状構造が明瞭となった。線維の横断面でも縦断面でも多数の細線維が認められることから、膀胱壁弾性線維は細線維の集合から成ることが明らかとなった。【結論】膀胱壁における弾性線維は量的には膠原線維に比べ僅かであるが、収縮時にはコイル状を呈することや、個々の線維が細線維の束状集合であることは、膀胱機能に重要な意義を有していると考えられる。

3D-analysis using electron-tomography concerning the structure of elastic fibers in rabbit urinary bladder

Department of Urology, Kinki University School of Medicine

Seiji Matsumoto, Koichi Sugimoto, Hiroyuki Ito

By 3D-analysis using electron-tomography, it was revealed that elastic fibers in rabbit urinary bladder show coil-like appearance in muscle layer and each fiber was composed of several fibrils. Such particular structure may be closely related to physiological function of urinary bladder.

*P27 ヒト滑膜由来細胞を用いた三次元培養組織の鉛直繰返し圧縮負荷による影響 長期的観察

¹大阪歯科大学口腔外科学第二講座

²大阪大学整形外科

室井 悠里¹ 鈴木 智之² 岩橋 武彦² 中村 憲正²
覚道 健治¹ 吉川 秀樹² 中田 研²

我々は現在までにヒト滑膜由来細胞を用いて三次元培養組織を作製し、鉛直繰返し圧縮負荷刺激に対する細胞応答の検討を行ってきた。今回、より長期の応答を検討したので報告する。

ヒト滑膜をコラゲナーゼ処理にて単離、単層培養した。得られた滑膜由来細胞をコラーゲンゲル内に混和した後コラーゲンスポンジに填入し、三次元培養組織とした。5日間静置培養した後、cyclic loading bioreactorにて5kPa、20kPa(それぞれ初期には約5%、20%strain相当)の鉛直繰返し圧縮負荷刺激を0.5Hz、1時間/日の負荷条件で5日間または15日間与えた。無負荷をコントロール群として組織学的観察を行い、RT-PCR法にてmRNAレベルでの遺伝子の発現を調べた。MMP-1、-3は免疫染色を行い、培地上清に含まれるGAG、HA量、炎症性タンパクの変化を調べ、ザイモグラフィによりMMP活性を調べた。力学的特性について負荷後の変化をみた。

組織学的観察により、スポンジの機械的破断はみられなかったが、コラーゲン量は負荷群で減少した。RT-PCRでは負荷後5日目に負荷群でMMP-1、-3、IL-6、-8の発現の上昇がみられ、負荷後15日目にもその発現パターンに変化はみられなかった。Type II collagenの発現は5kPa負荷で5日目から上昇した。免疫染色にてMMP-1、-3のタンパク発現がみられ、ザイモグラフィでMMP-2の活性が負荷群で上昇した。力学特性は負荷後10日目より強度が低下し、変形は50%に達した。

負荷後5日目に、20kPa群では分解系遺伝子・タンパク発現、コラーゲン量の低下がみられ、負荷15日に、スポンジの繊維の断裂、強度低下がみられたことから、20kPaは分解系が亢進する過大な負荷といえる。合成系遺伝子発現は5kPa負荷群で負荷5日目からみられたことから、5kPaは合成亢進の生理的負荷として有用であることが示唆された

Effects of cyclic compressive stress on human synovium-derived cells. –long term examination using cyclic load bioreactor-

Osaka Dental University, Oral and Maxillofacial Surgery

Yuri Muroi, Tomoyuki Suzuki, Takehiko Iwahashi, Norimasa Nakamura, Kenji Kakudo, Hideki Yoshikawa, Ken Nakata

Previously we examined the effects of cyclic compressive loading on matrix degradation of 3D tissues containing human synovium-derived cells. The aim of this study is to investigate the effects for longer periods.

Human synovium-derived cells were isolated. Collected cells were suspended in atellocollagen gel and cooperated into a collagen sponge. After 5 days, unconfined axial compressive loading was applied for 5 or 15 days at 0, 5 or 20 kPa at 0.5 Hz for 1 hour/day using a cyclic load bioreactor. Histological sections and mRNA expressions for matrix degradation and chondrogenic genes were assessed. Supernatants were also examined for GAG and HA contents, protein level and activity of MMPs. Deformation of 3D construct during compression were also evaluated.

After 5 days loading, histometric analysis demonstrated that the amount of collagen of the loaded groups was significantly lower than that in controls. The mRNA expression for MMP-1, -3 and IL-8 in the 20 kPa-loaded constructs increased. The mRNA expression level of type II collagen was up-regulated at 5 kPa loading for 5 days and 15 days. MMP-1 and -3, and increased MMP-2 activity were also detected in loaded groups. Deformation of the 3D tissue significantly increased after 10 days.

This study showed that cyclic compressive loading for longer period causes both degradation of collagen-based 3D tissue and ECM synthesis, and that MMPs might play a role in this process.

*P28 高分子量ヒアルロン酸は軟骨細胞における
ADAMTS4 (aggrecanase-1)の発現を抑制する

¹慶應義塾大学 医学部 病理学教室

²慶應義塾大学 医学部 整形外科教室

谷田部 拓¹ 滝沢 雅之¹ 望月 早月¹ 千々岩
みゆき¹ 岡田 愛子¹ 木村 徳宏¹ 藤田 貴也² 松
本 秀男² 戸山 芳昭² 岡田 保典¹

【目的】我国において高分子ヒアルロン酸製剤 (HA) は変形性関節症 (OA) の治療薬として既に使用されている。本研究では、OAの関節破壊に作用するアグリカン分解酵素 (ADAMTS1, 4, 5, 8, 9, 15) に対する HAの作用について検討した。【方法】OA関節軟骨細胞をIL-1 α 刺激下で培養し、HA製剤 (分子量30万、80万、190万) によるこれらADAMTS分子の発現をRT-PCRとリアルタイムPCRで調べた。また、ADAMTS4の蛋白レベルとアグリカナーゼ活性 (Glu373-Ala374切断活性) をイムノブロット法で検討した。【結果】IL-1 α 刺激により、ADAMTS4遺伝子発現は著明に増加したが、ADAMTS1, 5, 9発現に変化はなく、ADAMTS15発現は減少した。また、ADAMTS8発現はIL-1 α 刺激においても認めなかった。IL-1 α 刺激下で高分子HAを添加するとADAMTS4, 5, 9の遺伝子発現が有意に抑制され、特にADAMTS4の抑制が顕著であった。ADAMTS4は軟骨細胞分画では73 kDaのバンドとしてみられ、培養液中には57 kDaの分子として分泌されていた。これらADAMTS4分子の産生はIL-1 α 刺激で増加し、高分子HA添加で抑制された。軟骨細胞のアグリカナーゼ活性はIL-1 α 刺激で増加し、高分子HAの添加で抑制され、siRNAによるADAMTS4発現低下によりアグリカナーゼ活性は強く抑制された。また、IL-1 α 刺激によりIL-1 receptor-associated kinaseとERK1/2のリン酸化がみられ、高分子HA処理でリン酸化が抑制された。一方、高分子HAはADAMTS4との直接的な結合は認めなかった。【結論】IL-1 α 刺激下のOA関節軟骨細胞においては、高分子HAはADAMTS4の遺伝子発現を低下させて軟骨アグリカン分解を抑制することが示唆された。

High molecular weight hyaluronan inhibits
ADAMTS4 (aggrecanase-1) expression in
osteoarthritic chondrocytes

Departments of Pathology and Orthopaedic Surgery,
School of Medicine, Keio University

Taku Yatabe, Masayuki Takizawa, Satsuki Mochizuki,
Miyuki Chijiwa, Aiko Okada, Tokuhiko Kimura,
Yoshinari Fujita, Hideo Matsumoto, Yoshiaki Toyama
and Yasunori Okada

Objective. High molecular weight hyaluronan (HMW-HA) has been widely used in the treatment of osteoarthritis (OA). We examined the effects of HMW-HA on the expression of aggrecanases (ADAMTS1, 4, 5, 8, 9 and 15), which play roles in the cartilage destruction in OA. *Methods.* Effects of HA on the expression of ADAMTS species in IL-1 α -stimulated OA chondrocytes were examined by RT-PCR and real-time PCR. The protein levels and aggrecanase activity of ADAMTS4 were determined by immunoblotting. *Results.* Under the treatment with IL-1 α , ADAMTS4 was induced, but ADAMTS1, 5 and 9 appeared to be constitutively expressed and the expression of ADAMTS15 was decreased. No expression of ADAMTS8 was observed even under the stimulation. When IL-1 α -stimulated chondrocytes were treated with HMW-HA, the mRNA expression of ADAMTS4, 5 and 9 was significantly decreased. ADAMTS4 protein was detected as 73-kDa and 57-kDa bands in the cell lysates and culture media from IL-1 α -stimulated chondrocytes, respectively. When the chondrocytes were treated with HMW-HA, these bands appeared to decrease. The aggrecanase activity in OA chondrocytes was increased after treatment with IL-1 α , and reduced to a basal level by the HMW-HA treatment or transfection of siRNA for ADAMTS4. Phosphorylation of IL-1 receptor-associated kinase and ERK1/2 in OA chondrocytes was up-regulated by the IL-1 α treatment and this was down-regulated by the treatment with HMW-HA. No direct binding of HMW-HA to ADAMTS4 was detected. *Conclusion.* These data suggest that HMW-HA suppresses the aggrecan degradation by down-regulation of the ADAMTS4 expression in OA chondrocytes stimulated with IL-1 α .

P29 肝線維化、肝硬変において主たる役割を担う活性化肝臓星細胞に対するビタミンEの増殖抑制作用

¹秋田大学 医学部 構造機能医学講座

²エーザイ株式会社 ビタミンE情報室

山口 典子¹ 阿部 皓一² 吉川 究¹ 目崎 喜弘¹
今井 克幸¹ 三浦 光隆¹ 妹尾 春樹¹

肝臓星細胞は肝臓の類洞壁に位置し、肝線維化、肝硬変等の病理的条件下では脂質滴を失い、筋線維芽細胞様に形態が変化して増殖能を獲得すると共に、コラーゲンなどの細胞外マトリックスを盛んに合成するいわゆる活性化状態になる。慢性肝炎は肝線維化を経て肝硬変、肝がんへと進行することから、肝臓星細胞は疾患治療の標的細胞と考えられている。ビタミンEは4種(α, β, γ, δ)のトコフェロールと4種のトコトリエノールから構成されるが、それらのクロマンオール環のメチル基を欠いたトコールは、難溶性や水溶性薬剤の賦形剤としての有用性が注目されている。ビタミンEはその強力な抗酸化作用の応用に加え、近年血清コレステロールの低下作用、B16メラノーマ細胞などのがん細胞の増殖抑制、血小板凝集抑制作用を有することが報告されている。

私たちのグループは活性化した肝臓星細胞に対して、非活性化状態の導入を模索することが肝線維化の治療に繋がるのではないかと考え、ビタミンEの適用を検討した。肝臓星細胞はラット肝臓からコラゲナーゼ灌流により調製し、生体外で培養、継代することにより活性化状態を誘導した。活性化状態の星細胞に4種のトコフェロール及びトコールを添加して細胞増殖に対する影響を検討したところ、δ-トコフェロールとトコールに相対的に高い増殖抑制活性が観察された。またトコール添加群には用量依存性に細胞の脱着が観察され、アポトーシスの誘導が認められた。以上の結果からビタミンEが肝線維化、肝硬変の治療に有効であることが示唆される。

Proliferation inhibition activity of vitamin E to "activated" hepatic stellate cells, which participate the principal function in liver fibrosis and liver cirrhosis

Department of Cell Biology and Histology, Akita University School of Medicine

Noriko Yamaguchi, Koichi Abe, Kiwamu Yoshikawa, Yoshihiro Mezaki, Katsuyuki Imai, Mitsutaka Miura and Haruki Senoo

Hepatic stellate cells are localized in sinusoidal space of liver. In pathological conditions, such as liver fibrosis or liver cirrhosis, they lose lipid droplets, morphologically change to myofibroblast-like phenotype and acquire increased proliferation activity. They also become synthesizing relatively large amount of matrix components including fibrillar collagens, what is called the "activated" state. Vitamin E is composed of eight different forms: α-, β-, γ- and δ-tocopherols and α-, β-, γ- and δ-tocotrienols. Tocotrienol is lacking methyl groups attached to the chromanol ring and considered to be a potential drug delivery vehicle for poorly soluble and water-soluble drugs. All vitamin E molecules are well known as antioxidants, however, recent research developments demonstrated that they possess powerful cholesterol lowering, platelet adhesion inhibition and anti-cancer properties.

We have investigated the treatment for liver fibrosis based on the concept of targeting "activated" hepatic stellate cells by introducing "non-activated" condition. In this study, four tocopherols and tocotrienol were applied to "activated" hepatic stellate cells and examined the effects on proliferation activity of stellate cells. Rat hepatic stellate cells were prepared by collagenase perfusion and the "activated" state was induced by culture in vitro and passage once. Among four tocopherols and tocotrienol, relatively high proliferation inhibition effects were detected in δ-tocopherol and tocotrienol. In addition to proliferation inhibition, cell detachment and apoptosis were observed in tocotrienol treated cells in a dose response manner. These data suggest that vitamin E is effective for the treatment of hepatic fibrosis and liver cirrhosis.

P30 ヒト皮膚線維芽細胞におけるMEA(N-methylethanolamine)の抗線維化作用について

¹群馬大学 医学部 皮膚科

山中 正義¹ 石川 治¹

全身性強皮症の病態形成機序の1つとしてI型コラーゲンをはじめとする細胞外基質の過剰沈着が考えられおり、その制御が強皮症治療のターゲットの1つとなる。最近、心室線維化モデルマウスにMEA (N-methylethanolamine) を投与したところ、心室の線維化が抑制されたとする報告がなされたが、その詳細なメカニズムについては検討されていない。そこで今回我々は、MEAによるI型コラーゲンおよびMMP-1発現制御のメカニズムを正常皮膚線維芽細胞を用いて検討した。その結果、MEAはI型コラーゲンの発現を抑制し、MMP-1の発現を亢進することが明らかになった。更に、MEAによるMMP-1の発現亢進には、MEK/ERK、JNK情報伝達系によるpositive regulation及びp38MAPK、PI3K情報伝達系によるnegative regulationが関与していること、またMEAによるI型コラーゲンの発現抑制は、MEK/ERK情報伝達系を介している可能性を明らかにした。以上の結果より、MEAは細胞外基質の産生を抑制すると共に分解を増強することにより、全身性強皮症のような線維化病変の治療に応用できる可能性が示唆された。

Antifibrotic actions of N-methylethanolamine (MEA) in human dermal fibroblasts

Department of Dermatology, Gunma University
Graduate School of Medicine

Masayoshi Yamanaka, Osamu Ishikawa

Tissue fibrosis develops when dysregulation of extracellular matrix (ECM) turnover favors deposition of ECM proteins over degradation. Fibrosis may then lead to organ dysfunction as observed in systemic sclerosis (SSc).

In the present study, we investigated the antifibrotic properties of N-methylethanolamine (MEA). MEA suppresses the expression of COL α 2(I) mRNA and its protein levels in a dose- and time-dependent manner in human dermal fibroblasts. In the same conditions, MEA enhances the expression of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) mRNA and its protein levels. Together, these observations suggest that MEA may inhibit ECM deposition.

TGF- β , a master cytokine leading to fibrosis, up-regulates the production of type I collagen, but down-regulates the synthesis of MMP-1. In contrast, the proinflammatory cytokine TNF- α exerts antifibrotic activities by reducing the type I collagen expression and inducing the MMP-1 expression. TGF- β signaling is propagated through SMAD pathways. TNF- α signaling involves principally NF- κ B and the MAP kinase cascade. Therefore, we investigated which pathway is involved in the action of MEA. Although MEA did not influence SMAD phosphorylation, MEA induced ERK1/2, JNK phosphorylation and inhibited p38 MAPK phosphorylation. Assays using specific inhibitors of MAP kinase, PD98059, JNK inhibitor and SB203580, strongly indicated that MAP kinase pathway is involved in MEA-induced regulation of MMP1 and COL α 2(I) production.

In conclusion, our study demonstrates that MEA has an antifibrotic action by reducing type I collagen production and inducing MMP-1 production. Therefore, MEA can be a promising candidate for the treatment of diseases characterized by excessive ECM deposition such as SSc.

P31 Study on whitening effect and cosmeceutical activities of gamma-irradiated Semen Persicae shell

Dept. Cosmeceutical Science, Daegu Haany Univ., Korea

¹Dept. Cosmetology Science, Nambu Univ., ²Dept. Beauty & Make up Geochang prov. college, ³Soriso cosmetic Ltd., ⁴Daegu Bio Industry Center

JOE WOOA¹KIM YOUNGHUN, CHEON SOONJU, JANG MINJUNG, SUNG JIYEUN, OH WHASIN, HWANG YEONKYOUNG, KANG BOYEUN, CHOI EUNYOUNG, AN BONGJEUN, LEE JINTAE, SON AERYANG², CHOI HYANGJA³, KIM DAEIK⁴

Abstract

This study was investigated whitening effect and cosmeceutical activities of Semen Persicae shell (SPS) by irradiation. For improving the color of SPS, SPS was irradiated by 5, 10 and 20 kGy of gamma rays. Lightness was improved with increasing irradiation dose, while redness and yellowness were decreased with increasing irradiation dose. The result was implied that the color of SPS changed from dark brown to brighter brown. SPS was screened through anti-oxidative activity and free radical scavenging ability by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and nitric oxide (NO). In the test of DPPH, SPS with various doses of gamma-irradiation was showed scavenging abilities of 86~99.6 % at 10,000 ppm concentration. As result of testing NO scavenging ability, SPS was showed 40.5 % (0kGy) and 60.6 % (10kGy) at 100 ppm, and gamma-irradiated SPS was higher than the non-irradiated SPS. Tyrosinase inhibition of gamma-irradiated SPS at 5,000 ppm concentration showed 52.1, 72.8, 76.7 and 80.6 %, respectively. Increasing irradiation dose of SPS was improved tyrosinase inhibition activity. In the test of α -MSH induced mouse melanoma B16F10 cells *in vivo*, melanoma cell inhibition of SPS was decreased with increasing irradiation dose and SPS concentration. It was showed 43.8, 45.5, 44.1 and 88.2% at 1,000 ppm, respectively.

From these results, it proved that SPS has a sufficient potentiality to apply in the industry, and also SPS can be utilized as a natural material of cosmetics.

<This research was supported by a grant from Ministry of Commerce, Indus. & Eng. No.70000475>

P32 Study on anti-inflammatory and antibacterial activity of gamma-irradiated Semen Persicae shell

Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Republic of Korea

¹Department of Cosmetology Science, Nambu University, Republic of Korea, ²LJH cosmetic LTD., Republic of Korea, ³SEUNGJAE orient medicinal Hospital, Korea, ⁴Dept. Cell regulation Technology, Kyushu Univ., Japan

LEE JINTAE, KIM YOUNGHUN, CHEON SOONJU, JANG MINJUNG, SUNG JIYEUN, OH WHASIN, HWANG YEONKYOUNG, AN BONGJEUN, LEE CHANGEON, JOE WOOA¹, KIM YOUNGSUN², LEE JUNSOOK³, JEONG YEONSUK⁴

Abstract

This study was carried out to investigate the anti-inflammatory of gamma irradiated Semen Persicae shell (SPS). In the test of antimicrobial activity, gamma-irradiated SPS with 5 mg/disc resulted in the clear zone of 20(non-irradiated), 18(5kGy), 31 (10kGy), and 28(20kGy) mm on *Propionibacterium acnes*, respectively. In the anti-inflammatory test, non gamma-irradiated SPS and gamma-irradiated SPS significantly inhibited generation of nitric oxide, IL-6, TNF- α , and iNOS on LPS-stimulated macrophage RAW 264.7 cells with a dose-dependent manner. In the test of nitric oxide in LPS stimulated RAW 264.7 cells, the amount of Nitrite was showed 0.23, 0.04, 0.08, and 0.05 mg/ml at 0, 5, 10, and 20 kGy, respectively. The amount of cytokine (IL-6) in LPS stimulated RAW 264.7 cells was showed 400 pg/ml at 10,000 ppm concentration, and the amount of cytokine (TNF- α) was showed 100, 95, 88, and 105 pg/ml at 10,000 ppm concentration, respectively. In the test of iNOS by Western blot, ethanol extract of SPS was defined that iNOS expression was decreased with increasing SPS concentration and gamma-irradiated SPS was higher than the non-irradiated SPS.

These results proved that SPS had anti-inflammatory and antibacterial activity. Therefore, SPS can be utilized as natural materials of cosmetics and other industries.

P33 がん細胞株におけるADAMTS1の発現レベルの検討

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 分子医化学¹
岡山大学医学部保健学科²

メフメット・ゼネユル・チレッキ¹、廣畑 聡¹、カディール・デミルジャン¹、オメル・ファルク・ハティポール¹、小川弘子¹、米澤朋子¹、草地省蔵²、大橋俊孝¹、二宮善文¹

目的：ADAMTS はマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) ファミリーに属する多機能タンパクである。これまでにマトリックス分解能の他に、プロコラーゲン N - プロテアーゼとしてコラーゲン合成に関与、血管新生を抑制、フォンビルブランド因子に関連して血液凝固に影響することなど多機能性が知られている。中でも、ADAMTS1 は最初大腸がんの細胞株よりクローニングされ、血管新生との関連など、がんに密接に関与するADAMTSと考えられている。しかしながら最近の報告で、非小細胞肺癌や膵臓がんにおける発現低下が報告されている。今回、我々はいくつかのがん細胞株を用いてADAMTS1の発現量をリアルタイムRT-PCR法を用いて定量的に解析した。

方法と結果：4種類のがん細胞株 (DU145, PC3, HT1080, H1299) をコンフルエントになるまで培養し、Trizolを用いてRNAを抽出した。逆転写した後にSYBR-Green法を用いて定量的にADAMTS1 mRNA発現量を比較した。内部標準にはβアクチンを用いた。ADAMTS1 mRNAは前立腺がん細胞株であるDU145において最も強く発現していた。また、もう一つの前立腺がん細胞株であるPC3でもある程度の発現量を認めた。一方、非小細胞肺癌であるH1299ではADAMTS1の発現量は低下しており、線維芽肉腫であるHT1080では殆ど発現を認めなかった。

結論：ADAMTS1のmRNA発現量はがん細胞株の中でも種によって大きく異なる。エピジェネティックな影響を含め、ADAMTS1の発現レベルに及ぼす影響を更に詳細に検討していきたい。

Differential Expression of ADAMTS1 gene in cancer cell lines

¹Department of Molecular Biology and Biochemistry, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, ²Department of Medical Technology, Faculty of Health Science, Okayama University Medical School

M. Zeynel Cilek ¹, Satoshi Hirohata¹, Kadir Demircan¹, Omer Faruk Hatipoglu¹, Hiroko Ogawa¹, Tomoko Yonezawa¹, Shozo Kusachi², Toshitaka Oohashi¹, Yoshifumi Ninomiya¹

Objective: The ADAMTSs (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) are a group of extracellular, multidomain proteases that are found both in mammals and invertebrates whose known functions include: (i) collagen processing as procollagen N-proteinase; (ii) cleavage of matrix proteoglycans; (iii) inhibition of angiogenesis; and (iv) blood coagulation homeostasis. ADAMTS1 was originally cloned from colon cancer cells. However, recent reports demonstrated the down regulation of ADAMTS1 gene in cancers, including human non-small-cell lung carcinomas (NSCLC) and pancreatic cancer tissue. The aim of this study is to examine the expression level of ADAMTS1 gene in various cancer cell lines.

Methods and Results: Cancer cell lines (DU145, PC3, HT1080 and H1299) were cultured and mRNA was extracted by Trizol. RNA was reverse-transcribed and a quantitative real time RT-PCR for ADAMTS1 was performed. Beta-actin was used for internal control. ADAMTS1 was most highly expressed in DU145, a prostate cancer cell line. PC3, another prostate cancer cell line, also expressed ADAMTS1 mRNA at considerable levels. On the other hand, H1299 (NSCLC) expressed ADAMTS1 at low levels and HT1080 (fibrosarcoma) rarely expressed ADAMTS1.

Conclusions: The expression levels of ADAMTS1 mRNA varied among the cancer cell lines.

P34 RNAi法によるヒト線維芽細胞由来CTGF発現抑制と細胞外基質関連蛋白産生の変化

¹群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学

石淵 裕久¹ 安部 正敏¹ 横山 洋子¹ 石川 治¹

全身性強皮症(SSc)における皮膚硬化の発症機序として、まずtransforming growth factor β (TGF β)が真皮線維芽細胞を刺激し、その後connective tissue growth factor (CTGF)の作用により硬化病変が形成されるという二段階仮説が提唱されている。SScの病変部においてはCTGF発現が亢進していることが明らかとなっており、全身性強皮症では、TGF β よりCTGFを抑制する方が治療のターゲットとなる可能性がある。我々はSScにおける治療の可能性を探るべく、RNAi法を用いてヒト真皮線維芽細胞のCTGFを産生抑制する試みを行なった。また、併せてCTGF産生抑制線維芽細胞についてTGF β 刺激後の細胞外基質関連蛋白産生の変化を検討した。

CTGF特異的small interfering RNA (siRNA)について、異なる2種のsiRNAを設計した。線維芽細胞は72, 144時間後に回収した。その結果、一方のsiRNAで144時間後にCTGF産生低下がみられた。更にRNAi法によりCTGFの発現を抑制した正常人およびSScの線維芽細胞を用い、TGF β で刺激した後単層培養し、6, 12, 24, 48時間培養後に回収した上清中のI型コラーゲン, matrix metalloproteinase (MMP)1産生量をwestern blot法で検討した。I型コラーゲンは正常人およびSScともにその産生性は低下したが、MMP1は正常人ではCTGFの抑制とともに低下したが、SScでは逆に亢進した。

今回の検討より、cell lineではない真皮線維芽細胞においてもsiRNAを用いてCTGFノックアウトが可能であることが示された。また、CTGFの発現を抑制した線維芽細胞が産生するMMP1の挙動は正常人とSScで異なることが示された。

THE CHANGES OF EXTRACELLULAR MATRIX PRODUCTION BY HUMAN DERMAL FIBROBLASTS WITH OR WITHOUT SILENCING OF CTGF

Department of Dermatology, Gunma University
Graduate School of Medicine

Hirohisa Ishibuchi, Masatoshi Abe, Yoko Yokoyama,
Osamu Ishikawa

Although the pathogenesis of systemic sclerosis (SSc) is still unknown, a fascinating hypothesis called a 2-step process of fibrosis has been proposed. The key cytokines are transforming growth factor β (TGF β), which stimulates fibroblasts first, and connective tissue growth factor (CTGF), which acts to maintain tissue fibrosis. Following this hypothesis, a new therapeutic strategy focusing CTGF may be a promising choice for the treatment of SSc. In the present study, we aimed at silencing of CTGF production by human dermal fibroblasts (HDF) using RNAi method. We transfected siRNA, then cultured for 144 hrs. Immunoblotting study confirmed that cells transfected with one siRNA with CTGF-specific oligonucleotides markedly reduced the production of CTGF in HDF after 144 hrs. Then, further experiments are carried out to test the effects of CTGF silencing in HDF originated from normal or SSc. HDF from normal and SSc were cultured for 144 hours. Then CTGF-specific siRNA were transfected. After stimulating TGF β , we measured the production of type I collagen and matrix metalloproteinase (MMP)1 by western blot. Then, the production of type I collagen were decreased in both fibroblasts from normal and SSc. Although the production of MMP1 was decreased in normal fibroblasts, those from SSc was increased.

This preliminary study suggests the possibility that the therapeutic use of RNAi is promising for the treatment of SSc in the future. It is of note that the opposite effects were seen in the production of MMP1 in normal and SSc fibroblasts whose CTGF was silenced.