
抄 録

Abstract



特別招待講演



Invited Lecture

Can metalloproteinases be therapeutic targets in osteoarthritis?

Hideaki Nagase¹

¹The Kennedy Institute of Rheumatology Division, Imperial College London, London UK

Osteoarthritis (OA) is the most prevalent age-related joint disease and imposes a major socio-economic burden on a society with an expanding elderly population. The hallmark of OA is loss of articular cartilage matrix, which results in impairment of joint function. The primary cause of cartilage destruction is elevated levels of zinc metalloproteinases, MMPs and ADAMTSs. Inhibition of these metalloproteinases is therefore considered to be a potential therapeutic route, but synthetic inhibitors with a zinc-chelating moiety directed to the active site showed serious side effects in clinical trials, probably due to lack of selectivity. To develop new types of inhibitors, we have been investigating the mechanism of action of collagenases (members of MMPs) and aggrecanases (ADAMTS-4 and -5). Structural and functional studies of these proteinases have indicated that inhibitors that interact with their non-catalytic domains would achieve selectivity. Calcium pentosan polysulfate is the first example of an exosite inhibitor of aggrecanases. In the cartilage, it exhibits three interrelated modes of action to block aggrecan degradation. TIMP-3 is also considered to be a potential therapeutic agent as it inhibits MMPs and ADAMTSs. Protection of cartilage from degradation in an OA mouse model by over-expressing an aggrecanase-selective TIMP-3 variant, but not by over-expression of wild type TIMP-3 suggests that aggrecanase may be a good target and that selectivity is required for successful metalloproteinase inhibitor therapy in OA.

Multiple functional roles of perlecan in development and diseases

Yoshihiko Yamada¹

¹Laboratory of Cell and Developmental Biology, National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health

Perlecan is a large heparan sulfate proteoglycan that is expressed in all basement membranes and cartilage. Perlecan interacts with matrix proteins, growth factors, and receptors and is implicated in many biological processes. Perlecan deficiency causes perinatal lethal chondrodysplasia, and mutations of the protein result in myotonia and mild chondrodysplasia, indicating that perlecan is essential for cartilage development and muscle function. However, the roles of perlecan in cartilage development and adult tissue functions are unclear. To address the question, we used perlecan KO (Perl^{-/-}) mice and lethality-rescued (Perl^{-/-};TgPerl) mice in the Perl KO genetic background by expressing recombinant perlecan specifically in cartilage. We found that perlecan plays a critical role in endochondral bone formation in part through modulating FGF/VEGF signaling and promoting vascularization.

Perlecan is implicated in wound repair, tumor growth, and metastasis in adult tissues. Activities of perlecan in these biological processes are sometimes controversial, in part because perlecan is present in these experimental systems. Therefore, Perl^{-/-};TgPerl mice, which lack perlecan in most tissues, should be useful for defining the real role of perlecan in pathogenesis and tissue regeneration. We found that tumor growth was faster in Perl^{-/-};TgPerl mice than in control mice. We also found that wound healing was accelerated in mutant mice in skin-punch assays. Increased tumor growth and accelerated wound healing were accompanied by an increase in angiogenesis. This may be caused by an increase in availability and/or expression of growth factors for cellular activity in the absence of perlecan.

大高賞受賞講演

Ohtaka Award Lecture

腱・靱帯に発現する血管新生抑制因子：Tenomodulin

○宿南 知佐¹

¹ 京都大学再生医科学研究所

線維性結合組織は、コラーゲンがまばらに不規則に走行する疎性結合組織と緻密に規則正しく走行する白色不透明の強靱結合組織に分類される。強靱結合組織は、柱状、ひも状、膜状に一定の形をなす構造で、腱、靱帯、筋膜、腱膜、強膜、角膜などに存在する。強靱結合組織では栄養血管は認められるものの、その数は極めて少なく、皮下、粘膜下、小葉間結合組織のような血管網に富む疎性結合組織とは明確に区別される。典型的な強靱結合組織である腱・靱帯は、個別に形成される骨、軟骨、骨格筋などの運動器を連結するだけでなく、外力に対する力学的伝達機能を担っており、運動器の生体機能に不可欠の役割を果たしている。しかしながら、これまで細胞分化の指標となる特異的分子マーカーが知られていなかったため、腱・靱帯の形成や再生を制御する分子機構はほとんど解明されていない。ところが、最近、私達は軟骨由来血管新生抑制因子 Chondromodulin-I (ChM-I) に相同性を有する II 型膜貫通型蛋白質である Tenomodulin (TeM) が、強靱結合組織に特異的に発現していることを明らかにした。ChM-I は軟骨性骨原基の無血管領域に発現するが、TeM は強靱結合組織の無血管領域に特異的に発現している。アデノウイルスを用いて TeM の C 末端側に存在する ChM-I 様ドメインを可溶性分子として発現させると、血管新生を抑制すると共に抗腫瘍活性も示す。腱形成過程では、TeM は腱原基の形成に伴って発現が誘導され、gap junction を形成して縦列する分化した腱細胞において高いレベルで発現していた。また、ニワトリ胚や培養腱細胞を用いた解析から、basic helix-loop-helix 型転写因子 Scleraxis が、分化した腱細胞でのみ TeM の発現を増強することが明らかになった。

Tenomodulin is an angiogenesis inhibitor that is predominantly expressed in tendons and ligaments

Chisa Shukunami¹

¹ Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

Tendons and ligaments are typical dense connective tissue mainly composed of regularly aligned type I collagen fibers. Tendons physically connect muscles to bones and act as a mechanical transmitter, while ligaments attach adjacent bones to one another and maintain them at their correct anatomical positions during movement. Fibroblasts in tendons and ligaments *in vivo* are histologically distinct as characterized by the longitudinal rows of elongated fibroblasts separated by type I collagen fibers. However, these cells are indistinguishable from fibroblasts isolated from loose connective tissue *in vitro* since their morphological characteristics are lost. Due to a lack of the specific differentiation marker, little is known about the molecular mechanism underlying differentiation of tendon/ligament fibroblasts. We cloned *tenomodulin* (*TeM*) as a *ChM-I* related gene. *TeM* is a type II transmembrane protein with the ChM-I like anti-angiogenic domain at the C-terminus and is predominantly expressed in the avascular regions of tendons and ligaments. *TeM* expression was induced during tendon/ligament formation. Expression of *TeM* in tendon fibroblasts was upregulated by the retroviral expression of *Scleraxis* (*Scx*) that is a basic helix-loop-helix transcription factor and a marker for tendon progenitors and fibroblasts. However, *TeM* was not induced in chondrocytes overexpressing *Scx*. Moreover, the misexpression of *Scx* in chick hindlimb was unable to induce the additional tendons, but did result in the upregulation of *TeM* expression in tendon fibroblasts. These lines of evidence suggest that *TeM* is an excellent marker of tendon fibroblasts and that *Scx* positively regulates *TeM* expression in a cell lineage-dependent manner.

マウス角膜アルカリ外傷後の創傷治癒過程での TNF α の役割

○雑賀 司珠也¹

¹和歌山県立医科大学 医学部 眼科学講座

目的:マウス角膜アルカリ外傷での内因性 TNF α の役割を検討すること. 方法: TNF α 欠失 (以下 KO) マウスと野生型コントロール (以下 WT) マウスに 1N 水酸化ナトリウムでアルカリ外傷を作成し, その創傷治癒過程を組織学・免疫組織化学, および real-time RT-PCR とウエスタンブロットを用いて検討した. KO マウスでの創傷治癒過程がアデノウイルスベクターを用いた Smad7 遺伝子導入で変化するかどうかを同様に検討した. 両マウス間で骨髄移植を行い, アルカリ外傷創傷治癒過程の状態を検討した. 両マウスから得られたマクロファージと眼線維芽細胞の共培養での線維芽細胞の遺伝子発現を検討した. 結果: アルカリ外傷後の角膜創傷治癒過程では, WT マウスと比較して, KO マウスにおいて, 過剰な炎症と後期の著明な線維化が観察された. 線維化関連遺伝子発現と Smad2 の活性化も WT マウスと比較して KO マウスにおいて高かった. KO マウス角膜の著明な炎症と線維化は, Smad7 遺伝子導入と WT 骨髄の移植でレスキューされた. 供培養実験では, 線維芽細胞の表現型に拘わらず, マクロファージが KO マウス由来の場合, 線維芽細胞の線維化関連遺伝子発現と筋線維芽細胞への変化が増強された. 結論: マウスの角膜でのアルカリ外傷後の治癒過程では, 内因性 TNF α が, TGF β の過剰な活性化を制御し, 炎症と線維化を終焉させる.

Roles of TNF α in healing mouse cornea post-alkali burn

Shizuya Saika¹

¹Department of Ophthalmology, Wakayama Medical University School of Medicine

Purpose: To investigate the roles of endogenous TNF α in the process of healing in a mouse cornea post-alkali burn. Methods. TNF α -null (KO) and wild-type (WT) mice were used. After producing a burn in cornea by using 1N NaOH, the cornea was allowed to heal. Histology, immunohistochemistry, real-time RT-PCR and western blotting were employed to evaluate the healing process. The effects of adeno viral intraocular injection of Smad7 on the healing in KO mice was examined. After bone marrow transplantation (BMT) between mice of each genotype, healing of burned corneas were again studied. In culture experiments, macrophages and fibroblasts of each genotype were co-cultured and expression of fibrosis-related genes in fibroblasts was assayed. Results: Lacking TNF α resulted in marked inflammation and fibrosis in a burned cornea as compared with WT mice. Smad2 activation and fibrosis-related gene expression were also more marked in KO corneas than in WT corneas. Both Smad7 gene transfer and BMT from WT to KO mice rescued KO phenotype of healing. KO macrophages activated more markedly fibroblasts' fibrosis-related gene expression of both genotypes. Conclusion. Endogenous TNF α has a role of limitation of TGF β -involved tissue inflammation and fibrosis in a mouse cornea during healing post-alkali burn.



ランチョンセミナー



Luncheon Seminar

○戸井田 敏彦¹Toshihiko Toida¹¹千葉大学 大学院 薬学研究院¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences

コンドロイチン硫酸は生体内に広く分布するグリコサミノグリカン的一种で、抗炎症作用および関節保護作用を有する。私たちは以前、コンドロイチン 4 硫酸 (CS-A) が *in vitro* において、OVA で予め感作したマウス脾細胞の抗原特異的 Th1 型応答を亢進することを報告した。今回このコンドロイチン硫酸の作用について、デキストランおよびデキストラン硫酸を対照とし、コンドロイチン硫酸の硫酸化パターンについて完全硫酸化および部分的過硫酸化コンドロイチン硫酸を調製し調べた。その結果、部分的過硫酸化コンドロイチン硫酸が、完全硫酸化コンドロイチン硫酸に比べてマウス脾細胞の Th1 型免疫応答をより亢進することが明らかになった。また CS-A は CS-B あるいは CS-C に比べて高い作用を示した。さらに、CS-E は CS-A あるいは CS-D に比較して高い作用を示すことが明らかになった。これらの結果は、コンドロイチン硫酸を構成する N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 4, 6 位の硫酸基が Th1 型免疫応答に重要な役割を演じている可能性を示唆している。さらにマウス L-セレクトインに対する抗体 CD62L で前処理することにより、コンドロイチン硫酸の Th1 型免疫応答亢進作用がほぼ消失することから、その作用が細胞膜表面の L-セレクトインに対する結合を介している可能性が示唆された。これらの知見は、コンドロイチン硫酸の抗炎症作用および関節保護作用のメカニズムを解明する手掛かりを与え、さらには即時型過敏症の治療に応用できる可能性が期待できる。

一方、コンドロイチン硫酸の需要が高まる中、市場には様々な健康食品が流通するようになった。私たちが開発した分析法を用いて評価した結果、由来、品質など疑わしい商品も存在していた。本発表では、これら現状についてもご報告する予定である。

Chondroitin sulfate (CS) is a glycosaminoglycan widely distributed in animal tissues, which has anti-inflammatory and chondroprotective properties. We previously reported that chondroitin 4-sulfate (CS-A) up-regulates the antigen-specific Th1 immune response of murine splenocytes sensitized with ovalbumin *in vitro* and that CS suppresses the antigen-specific IgE responses. We now demonstrate that a specific sulfation pattern of the CS polysaccharide is required for the Th1 promoted activity, as other polysaccharides such as dextran and dextran sulfate do not significantly induce this activity. While the presence of some O-sulfo groups are essential for activity, CS-A and synthetically prepared, partially O-sulfonated CS induced higher Th1 promoted activity than did synthetically prepared, fully O-sulfonated CS. CS-A induced an activity greater than chondroitin sulfate B (CS-B) or chondroitin 6-sulfate (CS-C). In addition, chondroitin sulfate E induces greater activity than CS-A or chondroitin sulfate D. These results suggest that the GlcA1-3GalNAc (4,6-O- disulfo) sequence in CS is critical for Th1 promoted activity. Furthermore, rat anti-mouse CD62L antibody, an antibody to L-selectin, inhibits the Th1 promotes activity of CS. These results suggest that the Th1 promoted activity is mediated through L-selectin on lymphocytes. These findings provide a new mechanism for the anti-inflammatory and chondroprotective properties of CS and may be useful for designing new therapeutic applications for CS for the treatment of immediate-type hypersensitivity.

○後藤 眞¹Makoto Goto¹¹ 桐蔭横浜大学医用工学部臨床工学科 不老科学・加齢制御学¹ Division of Anti-Ageing and Longevity Sciences, Department of Clinical Engineering, Faculty of Medical Engineering, Tooin University of Yokohama

老化の理論は、星の数ほどではないにしろ、研究者の数だけあるといわれる。免疫機構の変化が加齢の本質的な原動力であろうとは最も初期に提案された理論だが、素朴なデータの蓄積しかなく、しばらく鳴りを潜めていた。

近年の免疫学、分子遺伝学、分子疫学の驚異的な進展により、遺伝と環境の相互作用につき、多くの知見が集積されつつあり、この古くさい領域で、新しい衣装を羽織った免疫と老化の理論に、再び強い関心が寄せられはじめている。曰く、炎症と老化を合体させた造語：Inflammageing（炎症性老化）の誕生である。

ここでは、進化論にのっとった最近の老化理論にもとづき、一般健常人と比較しながらヒト老化モデルであるWerner 症候群を例にとりあげ、結合組織に関連した老化と炎症に関する具体的な治療法につき私見を交えながら論じたい。

Among a huge number of theories on ageing proposed, the old-fashioned immune system dysfunction theory causing chronic inflammation has attracted a keen attention of gerontologists. With the recent remarkable advances in immunology, molecular genetics and molecular epidemiology, numerous findings have accumulated concerning tight interactions among genetics, epigenetics and environments. The renewed theory pertaining to the relationship between (natural) immunity and ageing coined a new concept "inflammageing", combining "*inflammation*" with "*ageing*."

Referring to recent theories on ageing, proposed mainly on the basis of the theory of evolution, I would like to compare Werner syndrome (a human model of ageing) with healthy elderly people and discuss possible future treatment for ageing in general.

日本結合組織学会
40周年記念シンポジウム
結合組織を巡る基礎・臨床研究の進歩と展望

結合組織を巡る基礎・臨床研究の進歩と展望

*40th Memorial Symposium
of
The Japanese Society for Connective Tissue Research*

○二宮 善文¹Yoshifumi Ninomiya¹¹岡山大学¹Okayama University

私がコラーゲンの抽出を初めて行った頃（1975 年）コラーゲンのタイプは確か4つであった。大学院で研究している間にV型コラーゲンが出現した。私自身が留学し、クローニングすることになったコラーゲンに番号がついていないためオルセン教授と相談した結果、その当時累積していたコラーゲン（タンパク質としては同定されていたが、遺伝子として未同定）に番号をつけてもらい、その後ろに新しいコラーゲン種としてIX型コラーゲンcol9 α 1を命名した（1984年）。その後、ゲノム解析が進んで、現在29コラーゲン型、44コラーゲンペプチドの存在が同定され、20以上のコラーゲン様ドメインを持つタンパク質が存在し、20以上のコラーゲン分解酵素群がわかっている。コラーゲンは分子として存在するためどの α 鎖と三本鎖を巻くかというタンパク質化学を明らかにしなければならない。そして、フィブリル形成コラーゲンに加えて、別の種類のコラーゲン種であるFACIT、基底膜型、膜貫通ドメインを有するコラーゲン他も出現し、組織特異的発現と機能の関係が追求されている。遺伝子がGlyXxxYyy 倍数の54bpのエクソンからなる特異構造をしていたり、エンハンサー配列が第一イントロンに存在したり、二方向性のプロモーターで制御されていることなどの様々の特徴が報告されてきた。コラーゲン分子と他のECM分子の相互作用が明らかになり、ECMでの存在様式が様々の生物現象とリンクすることがわかってきている。ECM分子の断片が特異な機能を持つこともわかってきた。また、インテグリンなどのレセプターの存在も明らかとなり、細胞との接着や増殖にも関わってきていることもわかってきた。ECM分解系に特異な酵素群が関わっていることもコラーゲンが関係する生物現象の理解には欠かせない因子となっている。コラーゲン遺伝子上の変異と疾患の関係が明らかになることで、今後更に未知のコラーゲンの機能が明らかになる可能性がある。

Four collagen types were present in 1975. Collagen V was reported a few years later. When I identified a new collagen chain by cDNA cloning, we designated it in 1984 as type IX collagen in the order of its discovery since there were three other collagens already identified but not numbered. Collagens and proteins with collagen-like domains form large superfamilies in various species and their numbers were increasing thereafter. Vertebrates have at present at least 29 collagen types with 44 distinct polypeptide chains, more than additional proteins with collagen-like domains and more than 20 isoenzymes of various collagen-modifying enzymes. When you identify a new collagen chain, you have to know how it makes a collagen molecule with other α -chains since each α -chain usually has high specificity for triple-helix formation. Collagen superfamily can be divided into certain families on the basis of the supramolecular assemblies and other features of its members: for instance, fibril-forming collagens, FACITs, hexagonal network collagens, basement membrane collagens and others. The large number of domain structures present in the superfamily implies that they are involved in numerous different biological functions. The non-collagenous domains of many collagens also have important functions. Major interest has been focused on endostatin, which inhibits endothelial cell migration and proliferation and reduce tumors in animal models. Work is in progress to elucidate differences in the expression patterns and functions of the various collagen modifying enzymes. Vast majority of the known collagen gene mutations have been identified in relatively rare heritable disorders.

○木村 友厚¹Tomoatsu Kimura¹¹富山大学医学部整形外科¹Department of Orthopaedic Surgery, Faculty of Medicine, University of Toyama

コラーゲンと臨床研究のかかわりは古くて新しい。Paul Klemperer による病理学的なフィブリノイド変性を伴う疾患群である collagen disease (1942 年) は、フィブリノイド変性やコラーゲンそのものが疾患原因ではないにせよ、結合組織の主要成分であるコラーゲンと結合組織疾患の密接な接点を明示している。その後、生命現象とは比較的縁遠い存在のように思われがちであった構造蛋白であるコラーゲンに対する病的な免疫応答も、その後炎症性疾患の病態に深く関与することが知られるようになった。さらにコラーゲン分子種そのものの質的・量的異常が、疾患の直接的な原因となることも次々と明らかにされてきた。骨形成不全症における I 型コラーゲン変異の発見 (1983 年) 以来、軟骨、皮膚、腎、血管などの結合組織の疾患原因として、種々のコラーゲンや代謝酵素の異常が解明されるエキサイティングな時代があった。さらにこのような単一遺伝子疾患のみならず、common disease の病態形成や加齢にもコラーゲンは密接に関っている。疾患感受性遺伝子としての関与に加えて、疾患や加齢とともに見られるコラーゲン構造の修飾や変化は、古くからそして今後とも重要な病態解明上のテーマであり、また治療戦略の糸口の重要なターゲットである。一方でコラーゲンは「物」としての臨床的重要性を有している。スキャフォールド、止血剤としての応用、I 型コラーゲン N 末端テロペプチド (NTx) で代表される代謝マーカーとして役割など、枚挙にいとまがない。われわれの体の主要蛋白であるコラーゲンにおこる様々な変化を凝視することなくして、結合組織の多くの疾患の全貌には迫れない。コラーゲンは、これからも生き生きとした臨床研究のターゲットであろう。

Starting from 'collagen disease' of Klemperer with pathological fibrinoid degeneration, collagen has been closely related to various diseases of connective tissues. Collagen is known to be involved in immune response that may cause inflammatory condition. In addition, qualitative and quantitative abnormality of collagens directly lead to structural and functional deterioration of connective tissues as evidenced by the discovery of gene mutations in collagens on and after the eighties. Also, certain collagen gene now acts as susceptibility gene in common diseases such as spinal disc degeneration. Other molecular modification of collagens under pathological conditions as well as aging is continued targets for detailed analysis and future therapeutic intervention. Collagen is the major protein constituting our body and the most interesting and exiting part of the clinical research on collagen is yet to be performed in the coming era.

MS3 プロテオグリカン：研究史と最近のトピックス

Proteoglycans and glycosaminoglycans: research history and recent advances.

○渡辺 秀人¹

Hideto Watanabe¹

¹愛知医科大学・分子医科学研究所

¹Institute for Molecular Science of Medicine, Aichi Medical University

プロテオグリカン (proteoglycans, PGs) はコアタンパク質と呼ばれるタンパク質に1本以上のグリコサミノグリカンが共有結合した分子と定義される。グリコサミノグリカン (glycosaminoglycans, GAGs) はウロン酸またはガラクトースとアミノ糖の二糖繰り返し構造から成る糖鎖と定義され、そのメンバーとしてはヘパラン硫酸 (HS)、コンドロイチン硫酸 (CS)、ヒアルロン酸 (HA)、ケラタン硫酸 (KS) が知られている。GAGs の発見は Schmiedeberg らの軟骨由来 CS の発見 (1891 年) に遡る。その約 40 年後の 1934 年、HA が Meyer らによって発見された。一方 HS に関しては抗凝固作用物質ヘパリンの発見 (1916 年) に端を発している。GAGs は単独で存在すると長年にわたって考えられていたが、1969 年、CS がタンパク質に共有結合しているという事実を Muir が報告しプロテオグリカンという分子群の概念が完成する。分子の単離・精製、GAG 鎖糖鎖構造解析から PGs や GAGs の生体内構造が次々と明らかになった。さらに近年は GAGs の糖鎖合成・修飾酵素の遺伝子クローニングがほぼ完了し、これらの酵素群を用いて糖鎖構造を変化させて糖鎖機能を解析することによって GAG 鎖の微細構造と特異的機能との関連が明らかにされつつある。本シンポジウムでは PGs, GAGs の研究史と最近の研究のトピックスを紹介する。

Proteoglycans (PGs) are defined as molecules composed of a core protein and one or more glycosaminoglycans (GAGs) attached to the core protein. GAGs can be defined as polysaccharides of repeating disaccharides of unonic acid or galactose and aminosugar. The first GAG identified was chondroitin sulfate (CS), reported by Schmiedeberg in 1891. Hyaluronan (HA) was discovered by Myer's group (1934), whereas studies on HS started at discovery of heparin as an anticoagulant molecule. GAGs had been thought to be present independent of proteins until 1969 when Muir reported the fact that CS is covalently attached to a protein, when the concept of PGs was established. Recent advances on saccharide analysis have revealed specific function of GAGs based on their fine structures. A series of studies using knockout mice and model animals have demonstrated *in vivo* functions of PGs. In this symposium, history of researches on PGs and GAGs, and recent advances of studies in these fields are discussed.

○藤原 作平¹Sakuhei Fujiwara¹¹ 大分大学 医学部 皮膚科¹ Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Oita University

デコリンが TGF- β 1 と結合し、その活性を抑制することで、腎硬化症モデルマウスを治療しうることが報告されて以来 (Border, 1992), デコリン・ファミリーに属するビグリカン、フィブロモデュリンも TGF- β と結合し、その活性を抑制することが報告された。確かに Schaefer らの報告 (2002) でも、片側尿管結紮による腎の間質線維化モデルにおいて、デコリン欠損マウスではカスパーゼが誘導され、尿細管上皮のアポトーシスが高まり、TGF- β 1 が高値となる。ビグリカンの発現は亢進するが、I 型コラーゲンの蓄積量は減少し、野生型に比べ強く腎萎縮が生じる。したがってデコリン欠損は、炎症反応を悪化させると考えられる。また創傷治癒においては、デコリンの発現が抑制、逆にフィブロモデュリンの発現が亢進した状態では、瘢痕形成が抑制されることが報告された。しかしデコリン欠損マウスで心筋梗塞巣を作成すると、梗塞巣の大きさは野生型に比し変化がなかったが、瘢痕のサイズ、左右の心室肥大の程度が、野生型に比し増加した。したがってデコリンが低下した細胞外マトリックスは、機械的張力に対する抵抗性が低下する傾向にある。

創傷治癒において、線維芽細胞の膜貫通型のプロテオグリカンであるシンデカン 4 も発現が亢進する。シンデカン 4 欠損マウスでは、創傷治癒が遅延する。Midwood らの報告では (2004), 線維芽細胞は $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンとシンデカン 4 の両方でフィブロネクチンに接着する。接着性の表現型は接着斑キナーゼと Rho GTPase の活性化を促し、創収縮を生じさせ、創傷治癒を促す。テネシン C が存在すると線維芽細胞は移動性の表現型となる。FAK と Rho のシグナルが低下し、フィロポディアが伸張する。この現象は、テネシン C がフィブロネクチンと結合し、フィブロネクチンとシンデカン 4 の結合を競合阻害するためと考えられている。

In this session, I would like to focus on the wound healing and review the papers on the clinical research on proteoglycans.

The addition of decorin to a rat model of glomerulonephritis decreased TGF- β mediated matrix accumulation and glomerular injury (Border, 1992). Several small ECM proteoglycans of the decorin family, including biglycan and fibromodulin, can bind activated TGF- β and suppress TGF- β activity.

Schaefer reported absence of decorin adversely influenced tubulointestinal fibrosis of the kidney by enhanced apoptosis and increased inflammatory reaction (2002). Naturally occurring or therapeutically induced down-regulation of decorin, or up-regulation of fibromodulin seems to favour a scarless tissue healing (Nakamura, Soo, 2000). In the remodeling of myocardial infarction, scar size, right ventricular remote hypertrophy, and left ventricular dilatation were greater in decorin-null mice compared with wildtype animals (Weis, 2005). These data indicate that decorin and fibromodulin can regulate collagen fibril formation and tensile strength.

Syndecan 4 expression is significantly increased during tissue repair in the mouse and human dermis, localizing to the site of injury (Gallo, 2004). Mice deficient in syndecan 4 delayed healing of dermal wounds. In addition, dermal fibroblasts isolated from syndecan 4 null mice exhibit decreased cell migration in *in vitro* wound healing assays and an inability to contract three-dimensional fibrin-fibronectin matrices in *in vitro* wound closure assays (Midwood, 2004). Fibroblasts treated with heparinase or cultured under sulfate-depleted conditions have reduced binding of bFGF and decreased proliferation (Clayton, 2001, Richardson, 1999). Midwood et al also proposed that syndecan 4 cooperates with fibronectin and tenascin-C, to modulate matrix deposition and wound closure.

**MS5 膜型マトリックスメタロプロテアーゼによる
細胞機能制御**

**Regulation of cellular functions by membrane type
matrix metalloproteinases**

○清木 元治¹

Motoharu Seiki¹

¹ 東京大学医科学研究所

¹ Institute of Medical Science, The University of Tokyo

MMP の中に膜型酵素が存在することが 1994 年の MT1-MMP の報告により始めて明らかとなった. MT1-MMP は高頻度にがん細胞で発現しており, それまで基底膜浸潤の主役と考えられていた MMP-2 を特異的に活性化することから一躍脚光を浴びた. また, その活性化は, MMP インヒビターである TIMP-2 を必須の因子として要求する一見矛盾するようなメカニズムによることが明らかとなり, 細胞表層におけるプロテオリシスの仕組み, 制御, 役割が注目を集めた. しかし, MT1-MMP の生理的な意味での重要性が確認されたのはノックアウトマウスの表現系によってであった. MMP-2 の活性化が見られないのは予想された範囲であるが, 遺伝子欠損マウスは体格的な異常を伴って誕生し, 骨格の成長が無く, 組織の繊維化を伴って生後 3-4 週間で死亡する. 同様の重篤な表現形は他の MMP 欠損では観察されておらず, MT1-MMP の機能が他のプロテアーゼで代償することが出来ない生命維持にとって重要な機能を担っていることが明らかとなった. この様な表現形を呈する為に重要な基質の一つは I 型コラーゲンであることが示された. MT1-MMP は単純にコラーゲンを分解するだけではなく, 分解を介してコラーゲン環境下における細胞の増殖や分化を制御するという新しい役割も明らかとなった. MT1-MMP を中心とした研究から見えてきた MMP の役割と研究の将来展望について述べる.

Identification of MT1-MMP as the first membrane type MMP opened a new research area of pericellular proteolysis by MMPs. As it is clear from the severe phenotype of knockout mice, MT1-MMP plays developmentally critical roles that cannot be complemented by other proteases. Collagen I was identified as one of the important substrates for mice to develop such phenotype. Processing of collagen I by MT1-MMP is not simply for collagen turnover, but it regulates various cellular functions in collagen environment such as proliferation, migration, invasion, and differentiation. Lessons from the MT1-MMP study and future prospect will be discussed.

MS6 癌細胞の浸潤・転移と細胞外マトリックス：
臨床研究

Translational research on the development of
antimetastatic agents

○岩本 幸英¹

Yukihide Iwamoto¹

¹九州大学大学院医学研究院整形外科

¹Dept. of Orthopaedic Surgery, Graduate School of Medical Sciences,
Kyushu University

【Bedside to Bench】癌の治療が進歩した今日においても、いったん確立された転移巣の制御はきわめて困難である。たとえば肺転移の場合、ほとんどが多発例であるため外科的切除の対象とならない。また骨転移の場合、手術は病的骨折と疼痛により苦しむ患者の QOL 改善に有用であるが、生命予後改善効果はない。また、転移例には本来末期症例が多く全身状態不良なので、制癌剤の投与量が限られ効果は期待できない。したがって、確立された肺転移や骨転移に対しては、今後、副作用がなく転移巣の増殖を制御できる新規薬物療法の開発が望まれる。一方悪性腫瘍切除後の局所再発例は、ほとんどの場合遠隔転移を伴っておりきわめて予後不良である。これは再発病巣が増大するまでの間に癌細胞が血管に浸潤するためと考えられており、今後は術後に投与する転移予防薬の開発が望まれる。

【Bench to Bedside】以上の臨床的背景をもとに、癌の転移の機序・病態の解析とその制御法の開発を行ってきた。1) 悪性腫瘍では細胞間接着分子の機能異常があり、原発巣からの遊離、ひいては転移をきたしやすい。われわれの臨床病理学的検討においても、細胞間接着分子の異常がある症例は転移をきたしやすく予後不良であった。2) 血管内への侵入において、癌細胞はバリアーである基底膜を酵素的に破壊し、浸潤・貫通する。基底膜浸潤は、さらに基底膜への接着、MMP による酵素的破壊、運動という3つのプロセスに分けられる。癌細胞の基底膜への接着阻害、MMPs 活性の抑制、細胞運動に関わる Rho-FAK 経路の活性調節などにより基底膜浸潤・転移を制御しうることが明らかになった。3) 転移巣増殖抑制の候補物質は数多く存在するが、腫瘍血管新生因子に対する阻害剤もその一つである。以上のような基礎的検討に基づいた臨床試験ですぐれた有効性を示す抗転移薬の出現が期待されている。

The eradication of distant metastases with conventional therapies such as chemotherapy, surgery and irradiation is difficult; therefore, we have tried to develop new antimetastatic agents based on the analysis of the mechanisms of tumor invasion and metastasis. Metastasis is generated by multi-step processes. Tumor cells must first separate themselves from the primary site, then enter the blood circulation, penetrate subendothelial basement membranes in order to migrate into the target organ, and finally produce a rapidly growing metastatic lesion by inducing neovessels from the pre-existing vessels. The invasion of the basement membrane by tumor cells proceeds in discrete three steps: first, the adhesion of the cells to the membrane via integrins, second, the production of MMPs which destroy the basement membrane barrier, and finally the motility of the cells. We previously developed *in vitro* invasion assay using basement extract, Matrigel, to assess the invasive potential of tumor cells. These steps of adhesion, degradation and motility were involved in the invasion assay. We have used this assay for the screening of antimetastatic agents. MMP inhibitors and the agents which induce TIMPs inhibit the invasiveness and metastasis of various malignant tumor cells. Agents which regulate Rho-FAK pathway inhibit the locomotion, invasion and metastasis of tumor cells. Various angiogenesis inhibitors reduced the angiogenesis of tumor cells and prolonged the survival of mice bearing lung metastasis. In the future, molecular target therapy based on the translational researches described above may prolong the survival of the patients bearing metastasis.

シンポジウム 1

組織を支える基底膜分子の機能解明と展望

Symposium 1

S1 ラミニン γ 2 鎖 N 末端部位の癌の悪性増殖への関与

Roles of NH₂-terminal region of laminin γ 2 chain in tumor growth and invasion.

○小川 崇¹ 坪田 芳明¹ 宮崎 香¹

Takashi Ogawa¹, Yoshiaki Tsubota¹, and Kaoru Miyazaki¹

¹横浜市立大学 木原生物学研究所 細胞生物学部門

¹Division of Cell Biology, Kihara Institute for Biological Research, Yokohama City University

皮膚基底膜の主要構成成分であるラミニン 5 (laminin-332) は3つのサブユニット (α 3, β 3, γ 2 鎖) からなるヘテロ 3 量体分子で、種々の癌組織でも発現する。Lm-332 は他のラミニンやECMと比較して細胞の接着と運動を強く促進し、この活性は創傷治癒や癌の浸潤に重要であることが示唆されている。Lm-332 は分泌された後、 γ 2 鎖がプロテアーゼによる切断を受け、その活性が細胞接着促進型から細胞運動促進型へ変換される。切断により遊離する γ 2 鎖短腕の生理活性を調べた結果、 γ 2 鎖短腕は切断型 Lm-332 の細胞接着を促進し細胞運動を抑制することが明らかになった。またそのメカニズムとして、 γ 2 鎖短腕が、上皮の安定接着構造であるヘミデスモソーム構造を安定化し、その結果細胞運動が抑制されることが明らかになった。これらの結果は、がん組織において切断をうけた Lm-332 が、がん細胞の運動や浸潤を促進することを示唆する。

また、既に私達は、胃癌や肺癌などの浸潤先端部位では γ 2 鎖が単独で高発現することを明らかにした。そのため、癌の浸潤過程等で γ 2 鎖が重要な役割を果たしている可能性が考えられた。そこで、ヒト膀胱癌細胞株 EJ-1 に γ 2 鎖全長及び短腕を単独で強制発現させ、ヌードマウスにおける造腫瘍性の変化を検討した。その結果、対照細胞と比べて、 γ 2 鎖強制発現細胞では腹腔内での腫瘍形成率、腫瘍体積ともに増大し、また横隔膜筋層への浸潤が顕著であった。これらのことから、 γ 2 鎖が癌細胞の浸潤能に影響を与えることが明らかになった。さらに、 γ 2 鎖は間質のECM分子であるフィブロネクチン上での細胞接着や運動を促進した。この活性と癌の浸潤能との関係について考察する。

Laminin-332 (Lm332; formerly laminin-5), consists of α 3, β 3, and γ 2 chains and promotes cellular adhesion and motility. These activities of Lm332 are thought to contribute to tissue repair and tumor invasion. The proteolytic cleavage of the short arm of γ 2 chain (γ 2sa) increases cell migration activity but decreases cell adhesion activity of Lm332. On the other hand, histological studies have shown that a monomeric form of the laminin γ 2 chain is overexpressed by invading human carcinoma cells. These facts suggest that the NH₂-terminal region of the γ 2 chain, γ 2sa, has specific activity, which might be involved in tumor invasion. These possibilities were examined in this study.

We found that γ 2sa promoted cell adhesion but suppressed cell migration on the processed Lm332 substrate. γ 2sa suppressed EGF-induced tyrosine phosphorylation of integrin β 4 and resultant disruption of hemidesmosome-like structures on the processed Lm332. These activities of γ 2sa were mediated by the interaction of the domain V (γ 2dV) with syndecan-1 on cell surface. Meanwhile, we found that domain V of the γ 2 chain promoted cell motility on fibronectin. These results indicate that domain V of the γ 2 chain negatively or positively regulates cell adhesion and motility depending on the type of substrates. We also found that overexpression of the γ 2 monomer or γ 2sa in human cancer cells promotes invasive growth of tumor cells *in vivo*. Our results suggest that the γ 2 monomer, especially its NH₂-terminal γ 2 domain contributes to the tumor cell growth and migration during tumor invasion into stromal tissues.

S2 ヒトラミニン 511 におけるインテグリン結合部位の探索

○李 紹良¹ 乗岡 尚子¹ 原田 謙司¹ 井戸 寛之¹ 中村 彩¹
関口 清俊¹

¹大阪大学 蛋白質研究所

Probing amino acid residues in laminin-511 responsible for integrin binding

Shaoliang Li¹, Naoko Norioka¹, Kenji Harada¹, Hiroyuki Ido¹, Aya Nakamura¹, and Kiyotoshi Sekiguchi¹

¹Institute for Protein Research, Osaka University

目的：基底膜分子ラミニンが細胞表面受容体インテグリンと結合するためには、 α 鎖LG1~3ドメインの他に γ 鎖C末端領域のGlu残基が必要であることを我々は最近見いだした。しかし、この γ 鎖C末端領域のGlu残基がインテグリンのリガンド結合部位を構成する二価金属イオンに配位する酸性アミノ酸残基であるか、それとも α 鎖LG1~3ドメインにそのような酸性アミノ酸残基が存在するかはこれまで不明であった。本研究では、ヒトラミニン α 鎖LG1~3ドメインで保存されている91個のアミノ酸残基の変異体を作成し、インテグリン結合部位を構成するアミノ酸残基の同定を試みた。

方法： α 鎖間で保存されているLG1~3ドメイン内の酸性、塩基性及び極性アミノ酸残基をAlaに置換したラミニン511変異体を293F細胞を用いて発現・精製した。これら変異体のインテグリン $\alpha 3 \beta 1$, Lutheran, およびラミニン $\alpha 5$ 鎖抗体4C7との結合活性およびA549細胞接着活性を測定し、これらのアミノ酸残基の役割を評価した。

結果と考察： $\gamma 1$ 鎖C末端領域のGlu→Gln変異体（EQ変異体）ではインテグリン結合活性と細胞接着活性が約90%低下したが、 $\alpha 5$ 鎖LG1~3ドメインに存在するものの酸性アミノ酸残基を置換しても>50%の活性が保持されていた。一方、抗体4C7とLutheranに対する反応性の低下は $\gamma 1$ 鎖EQ変異体では認められなかった。また、いくつかの塩基性アミノ酸残基変異体ではインテグリン結合活性が低下していたが、Lutheranとの反応性の間に明確な相関は認められなかった。以上の結果は、 $\gamma 1$ 鎖C末端領域のGlu残基がインテグリンの二価金属イオンに配位結合する最も重要な酸性アミノ酸残基であることを示すと同時に、LGドメインにおけるLutheran結合部位とインテグリン結合部位は部分的に重複するものの同一ではないことを示している。

A Glu residue at the C-terminal region of $\gamma 1$ chain has been shown to be critical to the integrin binding activity of laminin-511. However, it remains unclear whether this Glu residue is the one that coordinates the divalent metal ion in the MIDAS motif of the laminin-binding integrins. To address this question, we conducted Ala-scanning assays for all acidic amino residues in the $\alpha 5$ LG 1-3 domains and for other residues conserved among other α chains. All laminin-511 mutants with Ala substitution for acidic amino acid residues exhibited over 50% activities relative to the wild-type protein in binding to integrin $\alpha 3 \beta 1$ and mediating adhesion of A549 cells, while substitution of the $\gamma 1$ Glu residue with Gln led to ~90% loss of integrin-binding and cell adhesion activities. Importantly, the $\gamma 1$ EQ mutant held full reactivity not only toward 4C7 mAb, an anti- $\alpha 5$ mAb capable of inhibiting binding to integrins, but also toward Lutheran/B-CAM, another cell surface receptor for laminin-511. We also found that several basic amino acid residues contribute to integrin binding partially and the binding profiles of these mutants were not the same for Lutheran. These results support the possibility that the Glu residue at the C-terminal region of the $\gamma 1$ chain is the critical acidic amino acid residue that coordinates the divalent metal ion in the MIDAS motif in integrins and also show that the binding sites for integrins and Lutheran in the LG domains partly overlap but are not identical.

S3 肝前駆細胞の3次元培養を用いた胆管形態形成の分子メカニズムの解析

Liver progenitor cells differentiate to functional cholangiocytes in three dimensional culture

○谷水 直樹¹ Mostov Keith² 宮島 篤¹

Naoki Tanimizu¹, Keith Mostov², and Shi Miyajima¹

¹東京大学分子細胞生物学研究所

²カリフォルニア大学サンフランシスコ校

¹Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo

²University of California San Francisco

肝臓の幹細胞である肝芽細胞は、胎生中期に肝細胞と胆管上皮細胞へと分化する。その後、肝細胞は肝臓の代謝機能を担う細胞へと成熟する。一方、胆管上皮細胞は胆管を形成し、肝細胞が産生する胆汁を肝臓から小腸へと排泄するための流路を提供することに加えて、炭酸イオンや水をアピカル側の管腔に分泌して胆汁の pH や流量を調整するなどの生理的機能も担っている。近年、胆管に異常が生じるヒトの遺伝病や、胆管の発生が異常になる変異マウスの解析により、胆管の発生についての研究が進んできたが、その詳細なメカニズムについては不明な点が多い。そこで、胆管の構造形成の分子メカニズムを解析するために、新たな培養系の構築を試みた。

我々は、マトリゲルを含むゲル中で、肝前駆細胞株 HPPL が上皮細胞としての極性を獲得し、中央が空洞になったシスト構造を形成することを見いだした。シスト構造を形成した HPPL は、胆管上皮細胞のマーカーであるサイトケラチン 19 やインテグリン $\beta 4$ を発現している一方で、培養前に発現していたアルブミンの発現を消失していた。さらに、mdr の基質である rhodamine123 を、基底膜側からアピカル側に輸送し、管腔中に蓄積することがわかった。以上のようなことから、3次元培養を行うことで、HPPL が機能を持った胆管上皮細胞へと分化してシストを形成したと考えた。

HPPL がシスト構造を形成するためには、マトリゲルの構成成分中のラミニン 111 が必須であった。一方、HPPL 自身は、ラミニン 511/521 を発現していた。さらに、免疫染色を行ったところ、シスト構造を囲むようにラミニン $\alpha 5$ の発現が確認された。胎児期の胆管上皮細胞の周囲に検出されるラミニン $\alpha 1$ は、後にラミニン $\alpha 5$ に置き換わることから、これら 2 つの α 鎖は、HPPL の胆管上皮細胞への分化過程において異なる機能を持っていることが推測された。

Liver progenitor cells called hepatoblasts differentiate to hepatocytes or cholangiocytes in mid-gestation. Hepatocytes acquire numerous metabolic functions later in development, whereas cholangiocytes acquire secretory functions to modulate the composition of bile. In parallel with functional differentiation, cholangiocytes undergo tubular morphogenesis and form bile ducts to excrete the bile from the liver. Genetic mutations causing paucity of bile ducts have been reported in human and mice. However, the molecular mechanisms governing cholangiocyte morphogenesis has not been studied in detail.

We applied three dimensional (3D) culture techniques on HPPL, a liver progenitor cell line, to establish a new culture system. In the presence of Matrigel, HPPL formed cysts with the central lumen. In these cysts, HPPL localized F-actin and atypical PKC in the apical domain, E-cadherin in the lateral domain, and integrin $\alpha 6$ in the basolateral domain. HPPL expressed cholangiocyte markers including cytokeratin 19 and integrin $\beta 4$. Furthermore, HPPL acquired secretory function shown by the directional transport of rhodamine123, a mdr substrate, from the basal side to the apical. Based on these results we concluded that HPPL develop cholangiocyte-type epithelial polarity in 3D culture.

We found that laminin111 in Matrigel is essential to induce cyst formation. On the other hand, HPPL expressed laminin511/521 and formed an ECM layer containing laminin $\alpha 5$ around cyst structure. Given that laminin $\alpha 1$ associated with cholangiocytes is replaced by laminin $\alpha 5$ in the perinatal period, these two α chains may have different roles for cholangiocyte differentiation of HPPL.

S4 歯の形成過程におけるインテグリンと基底膜の相互作用

○福本 敏¹ 湯浅 健司² 福本 恵美子³ 山田 亜矢² 岩本 勉²

¹東北大学大学院 歯学研究科 小児発達歯科学分野

²九州大学大学院 歯学研究院 小児口腔医学分野

³長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 口腔保健学分野

歯の形成過程においては、口腔上皮と間葉細胞の基底膜を介した厳密な相互作用が重要であると考えられている。我々は以前、インテグリン $\alpha 6 \beta 4$ とラミニン $\alpha 5$ 鎖の相互作用が、歯の形態形成に重要であることを報告した。ラミニン $\alpha 5$ を欠損したマウスでは、歯の咬頭の形成と、上皮細胞の増殖が抑制されていた。また、内エナメル上皮の極性形成が阻害されていた。インテグリン $\beta 1$ は、歯の発生過程において上皮細胞と間葉細胞の双方に発現しているが、その歯の発生での役割に関しては全く分かっていなかった。そこで、サイトケラチン 14 プロモーター下でインテグリン $\beta 1$ を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスを作製し、歯の発生における役割を検討した。このマウスは、エナメル質形成不全と、歯の萌出遅延を示した。またエナメル芽細胞と象牙芽細胞は、それぞれ特異的なマトリックスを同時に分泌し、石灰化を誘導する。しかしながら、インテグリン $\beta 1$ 欠損マウスでは、象牙質マトリックスの分泌が始まっているにもかかわらず、エナメル芽細胞の極性化と分化の遅延が認められた。さらに成熟期において、エナメル芽細胞は歯の表面に接着することができず、嚢胞状の構造を有していた。このことからインテグリン $\beta 1$ を介した基底膜の相互作用も、また歯の発生には必須であることが明らかとなった。

Interaction between integrin and basement membrane during tooth organogenesis

Satoshi Fukumoto¹, Kenji Yuasa², Emiko Fukumoto³, Aya Yamada², and Tsutomu Iwamoto²

¹Division of Pediatric Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry

²Section of Pediatric Dentistry, Faculty of Dental Science, Kyushu University

³Division of Preventive Dentistry, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

In tooth development, the oral ectoderm and mesenchyme coordinately and reciprocally interact through the basement membrane for their growth and differentiation to form the proper shape and size. Previously, we showed that integrin $\alpha 6 \beta 4$ -laminin $\alpha 5$ interaction is important for the determination of tooth morphology. *Lama5*-null mice develop a small tooth germ with defective cusp formation and have reduced proliferation of dental epithelium. Also, cell polarity and formation of the monolayer of the inner dental epithelium are disturbed. Integrin $\beta 1$ is also expressed in both dental epithelium and mesenchyme. However the role of integrin $\beta 1$ in tooth development have never clearly understood. We created integrin $\beta 1$ conditional knockout mouse under control of cytokeratin-14 promoter. These mice showed enamel hypoplasia and delayed tooth eruption. Ameloblast and odontoblast secrete enamel and dentin matrix to form mineralized tissues at the same time. However, ameloblast differentiation and polarization were delayed in mutant mice, whereas odontoblasts start the secretion of dentin matrices. At maturation stage, ameloblasts detached from tooth and formed cyst like structure indicating that integrin $\beta 1$ -basement membrane interaction is important for ameloblast differentiation.

○平澤 恵理¹ 許 卓¹ 二木 啓¹ 市川 直樹¹ 小崎 慶介²
山田 吉彦²

Eri Arikawa-Hirasawa¹, Xu Xhuo¹, Akira Futatsugi¹, Naoki Ichikawa¹,
Keisuke Kosaki², and Yoshihiko Yamada²

¹順天堂大学医学部医学科

¹Juntendo University School of Medicine

²米国国立衛生研究所

²NIDCR, NIH

ヘパラン硫酸プロテオグリカンの一つであるパールカンは、本来基底膜の主要構成成分として同定されたが、多様な生物学的活性をもつ多機能細胞外マトリックスとして知られている。他の細胞外マトリックスと結合して基底膜を構成する構造タンパク質である一方、FGFをはじめとする成長因子や細胞膜受容体とも結合して様々な細胞内シグナリングを修飾制御する機能分子としても働く。我々はパールカン遺伝子のノックアウトマウスの作成、解析の結果からパールカンが軟骨の発生、分化に必須であることを見出し、さらに、ヒトでのパールカン機能完全欠損疾患として周産期致死性の軟骨異形成症 (Silverman-Handmaker 型 Dyssegmental Dysplasia: DDSH)、パールカン機能部分欠損疾患として Schwartz-Jampel 症候群 (SJS) における遺伝子異常を報告した。SJS は、別名 軟骨異栄養性筋強直症と呼ばれ、筋の収縮弛緩異常であるミオトニア症状と軟骨異常を伴う遺伝性疾患で DDSH と異なり患者は生存する。本疾患では、ミオトニアに伴い筋の肥大や変性を認める。我々はその発症機構につき、軟骨以外でパールカンを欠損させたマウスを遺伝子改変モデルとして用いて解析をしているのでその結果をもとにパールカンの神経筋接合部と筋での機能につき概説する。また、パールカン欠損筋より筋管細胞を単離し、増殖や分化、アセチルコリン刺激によるカルシウム上昇について、野生型筋管細胞との差等を検討したので報告する。

Perlecan is a large heparan sulfate proteoglycan expressed in all basement membranes. Perlecan binds extracellular matrix molecules, growth factors, and receptors and is implicated in many biological functions. Mutations in the perlecan gene were identified in 2 human disorders: The functional loss of perlecan causes lethal perinatal chondrodysplasia in mice and human. Functional mutations cause Schwartz-Jampel syndrome (SJS), which is characterized by myotonia and mild chondrodysplasia.

A mouse model for SJS was created by rescuing the perinatal lethality of perlecan-null mice by expressing recombinant perlecan only in cartilage under the control of a cartilage-specific promoter. The mutant mice survived and developed myotonia, which was characterized a continuous discharge on the electromyography and myopathy. Analyses of the neuromuscular junction (NMJ) of the lethality-rescued mice showed a partial deficiency of acetylcholine esterase (AChE). These results indicate that the continuous discharge in perlecan-null muscle is partly caused by AChE deficiency in the NMJ. The mutant mice also developed muscle degeneration and hypertrophy, suggesting that perlecan plays a role in maintaining muscle homeostasis. To address this question, we analyzed biological activities of muscle cells from perlecan-null mice with those of wild-type mice. To address this question, we analyzed biological activities of muscle cells prepared from perlecan-null mice and compared them with those of wild-type muscle cells. Proliferation and differentiation of myoblasts, and acetylcholine-mediated calcium influx were analyzed. Our preliminary results *in vitro* and *in vivo* results suggest that perlecan exerts multiple activities in adult muscle function and maintenance.

S6 ラミニン α 3LG4 由来のシンデカン結合ペプチドのPEP75は角化細胞遊走と *in vivo*での創傷治癒を促進する

○宇谷 厚志¹ 荒木 絵里¹ 百田 豊² 都甲 武³ 野水 基義⁴
宮地 良樹¹

¹京都大学大学院医学研究科皮膚生命科学講座

²岩手大学 農学部 小動物内科学講座

³京都大学大学院医学研究科形成外科

⁴東京薬科大学薬学部病態生化学教室

我々は、ECM の 1 つであるラミニンに注目し、合成ペプチドを用いる手法で多くの細胞接着活性部位の同定を行ってきた。演者らは特に皮膚のラミニンに関心をもち、ラミニン-332 の α 3 鎖の活性を解析している。本発表で、ラミニン α 3LG4 由来のシンデカン結合部位を含む合成ペプチドである PEP75 が角化細胞遊走を促進する機構の解明をしめす。また同時にウサギおよびマウスに作成した創傷に PEP75 を投与したところ創傷治癒が有意に促進されたことから、PEP75 が *in vivo* で創傷治癒促進効果を有することを見出した。細胞の PEP75 への接着、伸展にはシンデカンが必要であり、一方インテグリン β 1 は関与しないことが強制発現、中和抗体などを用いた実験で示された。しかし PEP75-シンデカン結合が誘導する角化細胞遊走はインテグリン β 1 依存性であることがスクラッチアッセイおよび金コロイド法により判明した。

PEP75 はレコンビナント LG4 と同様に、細胞表面シンデカンに結合しその cluster 形成を引き起こした。シンデカン cluster へのインテグリン β 1 の共存も観察できた。さらにパルス-チェイスで PEP75 の存在は活性化インテグリン β 1 の分布を変化させることが判明した。また最後に、PEP75 添加により、細胞はコラーゲンへの接着性を増強させることが判明した。これらのデータから、PEP75 のシンデカンへの結合は何らかの経路でインテグリン β 1 の再分布・活性化を引き起こすと考えられた。

要約すると、ラミニン α 3 鎖由来ペプチド PEP75 はインテグリン β 1 を活性化して細胞を遊走させており、このことが再表皮化促進効果につながっている可能性がある。本研究の *in vivo* 創傷実験の結果は、同ペプチドを創傷治癒促進剤として臨床応用できる可能性を示唆している。

Syndecan-binding peptide PEP75 derived from laminin α 3 LG4 stimulates keratinocyte migration and wound healing *in vivo*

Atsushi Utani¹, Eri Araki¹, Yutaka Momota², Takeshi Togo³,
Motoyoshi Nomizu⁴, and Yoshiaki Miyachi¹

¹Department of dermatology Graduate School of Medicine Kyoto University

²Department of Veterinary Internal Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University,

³Department of Plastic and Reconstructive surgery, Graduate School of Medicine Kyoto University

⁴Laboratory of Clinical Biochemistry, School of Pharmaceutical Science, Tokyo University of Pharmacy and Life Science

Our research interest has focused on the biological functions of Laminin 5 (Lm-332). We have identified several active sites for cell adhesion by use of Laminin 5-derived synthetic peptides. We previously demonstrated that the synthetic peptide containing syndecan-binding sequence within laminin-5 α 3 chain LG4 module, which we designated as PEP75, promoted keratinocyte migration. In this study, mechanisms in which PEP75 induces cell migration was extensively analyzed *in vitro*. Further, PEP75 topically applied on skin wound significantly promoted wound closure in the back skin of mice and in rabbit ear.

Adhesion and spread assays were performed using various neutralizing antibodies and overexpression of cell surface molecules, showing that cells required syndecan for both adhesion and spreading on PEP75, whereas integrin β 1 was not required. Meanwhile integrin β 1 was shown to be involved in the PEP75-induced cell migration by scratch assay and colloidal gold phagokinetic assay.

Addition of PEP75 as well as recombinant α 3LG4 in the culture medium triggered cluster formation containing syndecan 4 on the cell surface. The clusters of syndecan 4 induced by cross-link with anti-mouse IgG antibody were found to colocalize with integrin β 1. Pulse-chase study disclosed that PEP75 treatment retained activated form of integrin β 1 at cell-cell contact. PEP75 significantly enhanced cell adhesion to extracellular matrices, demonstrating that integrin β 1 was functionally activated by PEP75.

These results propose a possibility that PEP75 could accelerate reepithelialization of skin wound by activating integrin β 1 and may serve as a novel therapeutic reagent for chronic skin ulcers.

シンポジウム 2

細胞インターフェイスにおける膜結合性機能分子

Symposium 2

S7 皮膚バリア機能と表皮細胞の脂質輸送蛋白 ABCA12

Keratinocyte lipid transporter ABCA12 is a key player in skin lipid barrier formation

○秋山 真志¹

Masashi Akiyama¹

¹北海道大学 大学院医学研究科 皮膚科学分野

¹Department of Dermatology, Hokkaido University Graduate School of Medicine

ヒトは乾燥した外部環境に適応するため、角化という体表面のバリア機能を有しているが、その主体は、角化した細胞の間隙を満たす角層細胞間脂質層である。我々は、ATP-binding cassette (ABC) transporters の一つである表皮細胞の脂質輸送蛋白 ABCA12 の遺伝子変異が道化師様魚鱗癬の病因であることを明らかにした。道化師様魚鱗癬は、出生時より、全身の皮膚が非常に厚い板状の角層に覆われる最も重症の遺伝性皮膚疾患で、新生児期に死亡する例も多い。ABC transporters は、最も大きな遺伝子ファミリーの一つであるが、そのなかでも、ABCA12 が属する ABCA サブファミリーは、近年、生体内での脂質輸送に重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。皮膚において、角質細胞間に存在する脂質は水分保持やバリア機能の維持に不可欠であるが、表皮ケラチノサイトによる脂質輸送システムについてはいまだに謎の部分が多く残されている。ABCA12 の役割は、表皮細胞の脂質輸送、分泌顆粒である層板顆粒への脂質の輸送であり、セラミド等の層板顆粒内脂質は角層細胞間脂質層を形成し、皮膚バリアの要となる。道化師様魚鱗癬では、ABCA12 の高度の機能障害により、層板顆粒を介する脂質の輸送が破綻し、角層細胞間脂質層の形成が妨げられ、バリア機能障害を来し、魚鱗癬の病因となる。

臨床的には、ABCA12 が道化師様魚鱗癬の病因であることがわかり、道化師様魚鱗癬の DNA 解析に基づく出生前診断が可能になり、さらに、遺伝子治療への可能性も開けたことになる。

さらに、最近、バリア機能に必須な分子フィラグリンの遺伝子変異がアトピー性皮膚炎の重要な発症因子であることも、明らかになった。多様な皮膚疾患の病因として、角層細胞間脂質を主体とする皮膚バリア機能の障害が重要な役割を果たしていることは確かである。

A keratinized barrier is essential for our evolutionary adjustment to living in a dry environment. Intercellular lipid layers in the stratum corneum are indispensable for proper skin barrier function. ABCA12 belongs to a large superfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters, which bind ATP and aid in the transport of various biomolecules across the limiting membrane. The ABCA subfamily, of which the ABCA12 is a member, works in lipid transport. We have identified ABCA12 as a keratinocyte lipid transporter associated with keratinocyte lamellar granules. Lamellar granules are involved in lipid transport and secretion in epidermal keratinocytes and a loss of ABCA12 function leads to defective lamellar granule lipid transport and a malformation of stratum corneum lipid barrier, resulting in harlequin ichthyosis, one of the severest genodermatosis. Immunoelectron microscopy and immunofluorescence studies revealed that ABCA12 is localized in the Golgi apparatus, trans-Golgi network and lamellar granules in human granular layer keratinocytes. In addition, ABCA12 was expressed from the very early stages of human fetal skin development.

Filaggrin is also a key protein involved in skin barrier function and mutations in FLG, the gene encoding filaggrin, are thought to be associated with lipid barrier defects in atopic dermatitis. We have demonstrated unique FLG mutations that are important predisposing factors for atopic dermatitis in the Japanese population.

Considering all these facts together, we now understand that malformation of the epidermal lipid barrier plays a major role in the pathogenesis of both rare and more common skin disorders including ichthyosis and atopic dermatitis.

○橋爪 一善¹Kazuyoshi Hashizume¹¹ 岩手大学農学部基礎獣医学¹ Iwate University

着床は妊娠初期に生じる子宮と受精胚のダイナミックな変化を伴う現象である。受精の成立すなわちアログラフトである受精胚を母体が受け入れる過程に数多くの分子が関与することは疑いのないところであるが、その詳細は不明の点が多い。ウシでの着床、受胎過程は他の哺乳動物と少し異なり、細胞接着、着床が子宮内膜の限定された領域で始まる。そのため、細胞間の接着、着床制御にかかわる要因検索に特異的なモデルを提供する。ウシの受精胚は直径約 200 μ m の胚盤胞期をすぎると、急激な伸長が始まり着床直前には約 20cm を超す。この伸長は単に細胞の大きさが増すだけでなく著しいタンパク質合成やインターフェロン・タウ (IFNT) などの特異分子の産生を伴っている。ウシの着床は子宮内膜に約 100 島状に分布する小丘においてだけ生じる。小丘とその周囲の小丘間の間には、子宮腺の分布以外組織学的に顕著な差はない。それ故、細胞接着、着床が限局して生じるためには領域および時期特異的に発現する分子の存在が推定される。妊娠 20 日頃になると、細胞接着が始まる領域において、伸長した受精胚の最外層である栄養膜細胞に多核の細胞が出現し、この細胞はプロラクチン関連タンパク質 (PRP-1) 遺伝子並びにタンパク質を発現する。PRP-1 の発現は時期特異的であり、子宮内膜上皮の基底膜成分の 1 種である IV 型コラーゲンに特異的に結合する。ウシの着床が始まる領域では、この他、胎盤性ラクトジェン、妊娠関連糖タンパク質、IFNT、カテプシン、Allograft Inflammatory Factor-1、Trophoblast Kunitz Domain protein 等が特異的に発現している。これらの分子と MMP、インテグリン等子宮内膜に発現する分子の相互作用の統合が着床の成立の正否を規定している。

Implantation includes intricate processes involving various factors derived from the embryo and the mother; cells that derived different origin contact and make one organ, i.e., placenta. It involves complex molecular and mechanical events such as cell-cell interaction, because in bovine, implantation begins in a small area in the endometrium, namely, the caruncle. Immediately before the attachment of trophoblast cells to the endometrium, bovine embryos begin to elongate and grow to a size 1000 times greater than that in the blastocyst stage. Only some trophoblast cells adhere to the endometrial epithelia in a small area during the initiation period. Adhesion molecules, like integrins, fibronectin, lamin, and Muc-1, are expressed in the interface area. Extracellular matrix-degrading molecules are detected in the endometrium and trophoblast. Cathepsins, which are peptidases, are specifically expressed in the critical period of implantation. The adhesion and remodeling mechanisms are still unclear, and the molecules that play a central role in these pathways have not yet been determined. During implantation, endometrial stromal cells proliferate extensively, and certain factors that aid this process may be derived from the embryo; however, no factors have yet been clarified. In our studies, some specific up-regulated genes have been detected around implantation in trophoblast cells; these include genes encoding interferon-tau, trophoblast Kunitz domain proteins, pregnancy-associated glycoproteins, prolactin-related proteins, and placental lactogen. Some of these genes are expressed in trophoblast giant cells, which are specifically found in the caruncle around implantation. These genes may possibly regulate cell-to-cell interaction during the peri-implantation period in bovines.

S9 炎症性肺疾患における basigin/EMMPRIN の役割

Role of basigin/EMMPRIN in inflammatory lung diseases

○別役 智子¹

Tomoko Betsuyaku¹

¹北海道大学病院

¹Hokkaido University School of Medicine

Matrix metalloproteinases (MMPs) は肺の炎症性疾患、特にリモデリングを伴う病態において重要な役割を果たすことが知られている。しかし、その活性調節は複雑である。我々は、MMP 発現を誘導する蛋白のひとつとして、膜型糖蛋白 basigin/EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) に注目した。肺における basigin/EMMPRIN は、胎児期のみで正常な成人肺にはほとんど発現していない。肺癌などの悪性腫瘍において高発現し周囲の間葉系細胞に MMP-1, -2, -3 などを誘導し浸潤、転移に関与する。我々は、肺線維症のモデルマウスにおいて basigin/EMMPRIN の発現が増加すること、ヒト線維化肺の再生上皮に強く発現し、MMP-2, MMP-7, MMP-9 とともに共発現していることを明らかにした。一方、疾患・病態のバイオマーカーとしての可能性を検討するため、basigin/EMMPRIN の高感度 ELISA 法を確立した。肺線維症、タバコによる肺の破壊性病変が進行する肺気腫、肺リンパ脈管筋腫症 (LAM) というまれな疾患においても気管支肺胞洗浄液中の、basigin/EMMPRIN 濃度上昇が認められた。また、肺上皮において basigin/EMMPRIN を誘導する機序のひとつに基底膜が関与するのではないかと考え、ラット気道上皮細胞を様々な基底膜成分の上で培養し、basigin/EMMPRIN と MMPs の発現を検討している。basigin/EMMPRIN は、MMP 誘導能以外にも、モノカルボン酸トランスポーターが発現される際のシャペロン様の役割を担うなど、細胞内の新たな機能が次々に判明している。basigin/EMMPRIN の肺細胞における生理的、病的意義について議論を深めたい。

Basigin/extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) is a glycosylated transmembrane protein. Basigin/EMMPRIN is strongly expressed in fetal lung epithelium, although it is essentially absent in normal adult lungs. Pathological upregulation has been reported in lung cancers, as well as in various malignant tumors. One defining property of basigin/EMMPRIN is its capacity to stimulate production of various matrix metalloproteinases (MMPs) by adjacent mesenchymal cells or cancer cells in an autocrine manner. We found that it is upregulated in murine bleomycin-induced lung injury and in human lung fibrosis in association with MMPs-2, -7, and -9. Basigin/EMMPRIN was prominent in abnormal epithelial cells, such as hyperplastic type II cells and alveolar bronchiolization, suggesting a role of EMMPRIN in re-epithelialization in lung fibrosis. We also have developed an enzyme-linked immunosorbent assay for soluble basigin/EMMPRIN. It was increased in bronchoalveolar lavage fluids from the patients with lung fibrosis, pulmonary emphysema and lymphoangiomyomatosis (LAM). However, the regulatory mechanisms of EMMPRIN expression under physiological and pathological conditions in the lungs are not fully understood. We therefore examined its expression as well as cell growth of rat airway epithelial cells cultured on various components of basement membrane, and found the substrate-specificity of basigin/EMMPRIN induction in airway epithelial cells. These results imply a potential role of basigin/EMMPRIN in inflammatory lung diseases.

S10 ガン細胞の浸潤・転移促進に寄与する EMMPRIN/basigin の機能部位

○佐藤 隆¹ 今田 啓介¹ 伊東 晃¹

¹東京薬科大学薬学部 生化学・分子生物学教室

EMMPRIN (Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer)/ basigin/CD147 は、細胞外に 2 個の免疫グロブリン様ループドメイン (EC1 および EC2) をもつ膜結合型糖タンパク質である。EMMPRIN は、matrix metalloproteinases (MMPs) の産生誘導を介してガン細胞の浸潤・転移を促進すること、またその機能発現には EMMPRIN の EC1 ドメインが重要な役割を担っている。最近、EMMPRIN は膜型としてのみならず分泌型としても存在し、MMP 依存的な shedding および微小胞を介した細胞外分泌が示唆されている。分泌型 EMMPRIN も MMP 産生誘導活性を有することから、MMP 産生調節において膜結合型としての局所作用のみならず、遊離型としてのパラクリン機構も存在する可能性が考えられる。しかしながら、EMMPRIN の分子機能発現に寄与する活性部位、その分泌機構の多様性および新規生物活性など十分に理解されていない。演者らは、EMMPRIN を恒常的に発現するヒト子宮頸部ガン細胞 SKG-II を用いた *in vitro* ガン浸潤モデルにおいて、MMP 産生促進に寄与する EMMPRIN EC1 ドメインの活性部位を同定した。また、低細胞密度培養条件下において C 末端側の細胞質ドメインを保持した膜型と同一分子量の EMMPRIN (whEMP) が有意に細胞外へ分泌されること、この whEMP がガン細胞の移動活性を促進することを見出した。さらに、whEMP によるガン細胞の移動活性促進の活性部位が EMMPRIN の EC2 ドメインに存在することを明らかにした。本シンポジウムでは、EMMPRIN によるガン細胞の浸潤・転移促進における EMMPRIN の存在様式および分子内ドメインの機能について最新の知見を紹介する。

Molecular mechanisms of EMMPRIN/basigin in progression of tumor invasion and metastasis

Takashi Sato¹, Keisuke Imada¹, and Akira Ito¹

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

EMMPRIN (Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer)/basigin/CD147 is a membrane-bound glycoprotein that has two extracellular loop domains; termed EC1 and 2, individually associated with the biological activities of EMMPRIN. EMMPRIN stimulates peritumoral fibroblasts to produce matrix metalloproteinases (MMPs) and thereby progresses tumor invasion and metastasis *in vivo* and *in vitro*. Recently, EMMPRIN has been reported to be secreted from tumor cell surfaces by microvesicle and MMP-dependent shedding systems. Therefore, in addition to the local action on the membrane-bound EMMPRIN, the paracrine mechanism of the secreted form is likely to exist in the regulation of MMP production in tumor environments. However, the active site(s) for EMMPRIN functions, the regulatory mechanism of EMMPRIN secretion, and bioactivity of the secreted EMMPRIN remain to be clarified. Our recent studies revealed that a whole molecule EMMPRIN (whEMP) with transmembrane and cytosolic regions was constitutively secreted into culture medium in human tumor cells, of which secretion was augmented under low-cell density conditions. Furthermore, whEMP stimulated tumor cell migration through an active site in EC2, which differed from the active site in EC1 for MMP induction. These results suggest that the secreted whEMP progresses tumor invasion and metastasis by not only the known MMP inducible effect but also novel action that EMMPRIN augments tumor cell migration via EC2 domain. In this symposium, we would like to introduce our latest findings about the molecular features of EMMPRIN focusing on the progression of tumor invasion and metastasis.

**S11 細胞表面と核内に発現するヘパラーゼ：
それらの細胞浸潤と細胞分化における異なる
役割**

○中島 元夫¹

¹ ジョンソン・エンド・ジョンソン ニュービジネス&テクノロジー
ジートランスファー

ヘパラーゼはヘパラン硫酸に特異的なエンドグル
クロニダーゼである。その活性は腫瘍細胞による細胞外
マトリックスの分解に伴って発揮され、がん細胞の転移
能とヘパラーゼ活性の間には正の相関がある。腎細胞
癌に関する最近の研究においては、ヘパラーゼの
mRNA レベルとタンパク質レベルが、乳頭癌や非染色性
腎細胞癌と非癌部に比べて淡明細胞癌で著しく亢進
しており、ヘパラーゼ発現は原発巣の進展、遠隔転移、
静脈浸潤、そして病期と相関していた。ヘパラーゼを
標的とする siRNA はヘパラーゼの mRNA とタンパク
質の発現レベルを低下させ、腎細胞癌細胞の浸潤能を抑制
した。

ヒト白血病 U937 細胞を用いた細胞の分化のモデルで
は、TPA で誘導されるヘパラーゼの細胞表面での発現
は微小管によって仲介され、細胞接着と走化物質により
触発されるヘパラーゼの浸潤先端への局在は、F-アク
チンに依存している。ヘパラーゼは細胞質内と細胞表
面のみばかりでなく、核内にも局在する。ヘパラーゼ
の核内移動は様々な癌細胞の分化誘導におけるひとつ
の鍵となっている。ヒト白血病 HL60 細胞の TPA による
分化誘導モデルでは、HSP90 によるヘパラーゼの核内
移行が明らかにされた。ヘパラーゼの核内移行の阻止
は TPA による分化誘導を抑制した。核内には活性型ヘ
パラーゼのみが検出され、酵素活性を有するヘパラー
ゼの核内移行は分化誘導に十分であったが、酵素活性を
持たないヘパラーゼの核内導入発現では分化を誘起
できなかった。このようなヘパラーゼの細胞分化にお
ける新奇機能の解明は、癌治療の新たな方策を立ち上げ
るのに寄与するかもしれない。

**Heparanases expressed on cell surface and in
nucleus: their distinct roles in cell invasion and
differentiation**

Motowo Nakajima¹

¹ Johnson & Johnson, New Business & Technology Transfer

Heparanase (HPSE) is a heparan sulfate specific endo-beta-D-
glucuronidase. Expression of HPSE activity is associated with
ECM degradation by tumor cells. A good correlation is
observed between HPSE activity and metastatic potential of
tumor cells. Our recent study demonstrated that expression
levels of HPSE mRNA and protein were significantly higher in
clear cell renal cell carcinomas (RCCs) than in papillary RCCs,
chromophobe RCCs and non-neoplastic renal tissues. HPSE
protein expression levels were positively correlated with
progression of primary tumor, distant metastasis, venous
invasion and pathological stage. siRNA targeting HPSE down-
regulated HPSE mRNA and protein expression, and resulted in
inhibition of the invasion of RCC cells.

In an *in vitro* differentiation model using human leukemia
U937 cells the cell surface expression of HPSE induced by
TPA is mediated by microtubules, and its localization to invasion
front initiated by cell adhesion and chemoattractants is
dependent on F-actin. HPSE is located not only in cytoplasm/
cell surface but also in nucleus. Nuclear translocation of
HPSE is a key step in cell differentiation of a variety of cancer
cells. An *in vitro* differentiation model of HL-60 cells with TPA
revealed nuclear translocation of HPSE driven by HSP90.
Inhibition of nuclear translocation of HPSE abolished TPA-
induced differentiation. Only active form of HPSE was
detected in nucleus, and nuclear translocation of enzymatically
active heparanase was sufficient for differentiation induction,
while nuclear transduction of catalytic negative HPSE did not
cause differentiation. Exploring such a novel function of HPSE
would lead to development of a new strategy for cancer
therapy.

シンポジウム 3

コンドロイチン硫酸の機能・応用研究の最前線

Symposium 3

S12 コンドロイチン硫酸: 多様な糖鎖構造と生合成機構

○渡辺 秀人¹

¹ 愛知医科大学・分子医科学研究所

コンドロイチン硫酸 (CS) は N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) とグルクロン酸 (GlcA) の二糖の繰り返し糖鎖骨格に硫酸基の修飾が加わったグリコサミノグリカンで、硫酸修飾の位置により多彩な糖鎖構造を持つ。CS は主として軟骨および脳神経系に存在し、アグリカン、パーシカン/PG-M 等のプロテオグリカンの糖鎖部分として機能している。近年、CS 鎖が神経再生に対して阻害的に働くこと、硫酸基を持たないコンドロイチン (CH) が線虫系において卵の分割に必須であること等、CS/CH 鎖の特異的な生体内機能が明らかとなりつつある。また、CS は軟骨機能を担う分子であり関節破壊性疾患の予防効果等が社会的に深い関心を集めており健康食品のみならず医薬品としても注目されている。この数年に、CS 糖鎖合成酵素群の網羅的遺伝子クローニングが行われ、現在、6 種類の糖転移酵素が CS 糖鎖骨格の生合成に関与することがわかっている。最近我々は、これらの糖転移酵素群のうちコンドロイチン硫酸 N-アセチルガラクトサミン転移酵素-1 (CS N-acetylgalactosaminyltransferase-1, GalNAcT-1) が CS 生合成の鍵を握る酵素であることを明らかにした。さらに同転移酵素の強制発現によってアグリカンの持つ CS 量が 2.2 倍にまで増加すること、アデノウイルス系を用いて同酵素を椎間板に強制発現させると CS が増加することを見いだした。本シンポジウムでは、CS の多彩な糖鎖構造、生合成機構、生体内機能について概説するとともに CS 生合成に関して我々が最近得た研究成果を紹介する。

Chondroitin sulfate: saccharide structure and biosynthesis

Hideto Watanabe¹

¹ Aichi Medical University, Institute for Molecular Science of Medicine

Chondroitin sulfate (CS) comprises repeating disaccharide units of N-acetylgalactosamine (GalNAc) and glucuronic acid (GlcA) residues with sulfate residues at various positions. CS chains are covalently bound to a core protein of proteoglycans including aggrecan and versican/PG-M. Although ubiquitously expressed, CS is most abundant in cartilage and the central nervous system. Recent studies have revealed specific functions of CS chains such as inhibition of neuro-regeneration and a critical role of chondroitin saccharide backbone in cell division in *C. elegans*. To date, six glycosyltransferases involved in CS biosynthesis have been identified. Recently, we found that, among these enzymes, CS N-acetylgalactosaminyltransferase-1 (CSGalNAcT-1) plays a critical role in CS biosynthesis in cartilage. Overexpression of the enzyme demonstrated 2.2-fold increase of CS on aggrecan molecule and its *in vivo* overexpression in the intervertebral disc showed increase of CS in the matrix. In this symposium, CS saccharide structure, CS biosynthesis and modification, and *in vivo* functions of CS will be discussed.

S13 遺伝子工学を利用したコンドロイチン硫酸の合成

Synthesis of chondroitin sulfate using genetic engineering

○杉浦 信夫¹

Nobuo Sugiura¹

¹愛知医科大学 分子医科学研究所

¹Institute for Molecular Science of Medicine, Aichi Medical University

コンドロイチン硫酸 (CS) は、プロテオグリカンとしてほとんどの動物の細胞外マトリックス・結合組織に広く分布しており、関節軟骨の形態維持や神経系の再生、免疫系の調節、および細胞分化など多くの重要な生理機能を担っている。CS は *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) とグルクロン酸 (GlcA) の二糖が繰り返すコンドロイチン (CH) 骨格をもつ一本鎖の多糖体である。そして GalNAc の 4 位 6 位, GlcA の 2 位に硫酸基が多様に結合したきわめて複雑な構造をしている。その広範囲な糖鎖長と複雑に硫酸化された多様な分子群中にある活性構造が CS の多彩な生理機能を示すと考えられる。我々は CS の構造活性相関を明確にするために、特異な構造を持つ CS 糖鎖を遺伝子工学的手法で合成しようと試みている。

CS など糖鎖は、DNA や蛋白質と異なり「鋳型」から一気にコピーされるわけではなく、特異的な合成酵素を使って一つ一つの糖転移反応と硫酸基修飾反応がなされて生合成が完成する。CH 糖鎖を伸長させる酵素は上記二糖を繰り返し転移させる酵素であり、ヒトでは関連する遺伝子が 6 種類発見された。それぞれの糖水酸基の位置特異的に硫酸基を結合させる硫酸基転移酵素の遺伝子も各種同定されている。

微生物は CS プロテオグリカンを合成することはないが、コンドロイチンに類似した構造の多糖体を莢膜抗原として生産する菌体が知られている。我々はその一つである大腸菌 K4 株から CH 糖鎖を伸長させる酵素 K4CP を含む遺伝子クラスターをクローニングした。この組換え酵素及び変異酵素を用いて CH オリゴ糖を逐次合成する方法や、超高分子の CH 多糖体を合成する系を確立した。さらに、バキュロウイルス感染昆虫細胞培養系で得られた各種組換え硫酸基転移酵素を用いて、糖鎖長及び硫酸基位置と量が様々に異なった CS 誘導体の合成を試みている。本シンポジウムでは、それら合成系の開発経過を報告する。

Chondroitin sulfate (CS) is widely distributed in extracellular matrices and connective tissues of most animals as proteoglycans and plays important biological functions such as morphological maintenance of joint cartilage, regeneration of nervous system, regulation of immunological system, and cell development. CS is a linear polysaccharide chain with an alternating carbohydrate backbone (chondroitin, CH) of *N*-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) and D-glucuronic acid (GlcA), and is sulfated at C-4 and/or C-6 position of GalNAc and/or C-2 position of GlcA. The chain elongation is catalyzed by bi-functional glycosyltransferases. The diverse sulfo-modifications are carried out by specific sulfotransferases. Active structures in the complex molecules of CS represent the various biological functions. Although bacteria do not synthesize CS-proteoglycans, *E. coli* strain K4 produces a polysaccharide similar to CH as a capsule antigen. We have cloned the gene cluster from *E. coli* strain K4 encoding CH polymerase (K4CP) that transfers GalNAc and GlcA alternately to CH acceptor substrate. We have expressed the recombinant K4CP enzyme and the mutants that produce not only oligosaccharides stepwisely but also super-high molecular polysaccharides of CH chain. The CH chains thus obtained are then subjected to sulfation at various positions by recombinant sulfotransferases obtained from cultures of baculovirus-infected insect cells having the sulfotransferase genes. These techniques would enable production of CS oligo- and poly-saccharides with specific structures, and would provide a useful tool for analysis of structure-function relationship.

○今田 啓介¹ 佐藤 隆¹ 伊東 晃¹Keisuke Imada¹, Takashi Sato¹, and Akira Ito¹¹東京薬科大学薬学部 生化学・分子生物学教室¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

コンドロイチン硫酸は関節軟骨に多く含まれるグリコサミノグリカンの一つであり、主にアグリカンの糖鎖として軟骨の構造および機能に関わっている。一方、ほ乳動物やサメなどから抽出したコンドロイチン硫酸には関節疾患の予防および治療効果が期待されており、健康食品や変形性関節症治療薬として多くの国々使用されている。また、コンドロイチン硫酸は安全性の高い反面、効果発現までに時間がかかる symptomatic slow-acting drugs for osteoarthritis (SYSADOA) として位置づけられている。しかし、コンドロイチン硫酸の軟骨代謝に対する作用については今もなお判然とせず、変形性関節症に対する効果を裏付けるデータに乏しい。

私たちは、ヒト関節軟骨細胞をアルギン酸ナトリウムビーズ法により培養し、ブタ軟骨由来コンドロイチン硫酸およびサメ軟骨由来コンドロイチン硫酸（各々1-100 $\mu\text{g/ml}$ ）にて6日間処理した。その結果、軟骨細胞のアグリカンコアタンパク質 mRNA 発現レベルが用量依存的に増加する傾向を確認した。さらに、培養ヒト関節滑膜細胞をこれら2種類のコンドロイチン硫酸により4日間処理し、MMP 阻害因子である TIMP-1 産生量を Western blot 法にて検討したところ、何れも用量依存的に培養液中の TIMP-1 量を増加させた。また、この促進作用はコンドロイチナーゼ ABC で前処理したコンドロイチン硫酸には認められなかったことから、高分子のコンドロイチン硫酸が作用発現に重要であることが判明した。このように TIMP-1 産生の増加や軟骨基質であるアグリカン発現の促進を通じて、コンドイチン硫酸は長期的使用において関節破壊に対する保護作用を示すものと考えられる。

Chondroitin sulfate is a most abundant glycosaminoglycan in articular cartilage, and participates in the maintenance of cartilage structure and function as the main glycochain of aggrecan. Chondroitin sulfate extracted from mammalian or shark cartilage is widely taken around the world as a dietary supplement and/or medicine for the prevention of joint diseases including osteoarthritis. Chondroitin sulfate is well recognized as a symptomatic slow-acting drug for osteoarthritis (SYSADOA). However, its action mechanisms on the metabolism of cartilage matrices are not well understood.

We examined the effect of chondroitin sulfate on the expression of aggrecan core protein mRNA in human articular chondrocytes cultured in alginate beads. Both chondroitin sulfates (1 to 100 $\mu\text{g/ml}$) derived from porcine and shark cartilage slightly but steadily increased the aggrecan core protein mRNA after six days of treatment. Furthermore, these chondroitin sulfates augmented the production of endogenous MMP inhibitor, TIMP-1 in cultured human synoviocytes in a dose-dependent manner after four days of treatment. Chondroitinase ABC-pretreated chondroitin sulfate did not exert any effect on synoviocytes, suggesting that chondroitin sulfates with high molecular mass maintain bioactivities. Therefore, chondroitin sulfates are likely to exert chondroprotective action in long-term use through the promotion of aggrecan and TIMP-1 production.

S15 変形性膝関節症におけるコンドロイチン硫酸の効果

○野村 義宏¹ 村澤 知佳子¹ 渡部 睦人¹

¹東京農工大学農学部

Effect of chondroitin sulfate on synovial production of hyaluronan in an animal model of knee osteoarthritis (OA)

Yoshihiro Nomura¹, Chikako Murasawa¹, and Mutsuto Watanabe¹

¹Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology

【目的】変形性膝関節症 (OA) 患者におけるコンドロイチン硫酸 (CS) 投与試験について多数報告されており、副作用が無く、痛みの軽減効果が示されている。CS の作用として、プロテオグリカンおよびヒアルロン酸 (HA) 合成促進効果が報告されている。しかし、その作用メカニズムについて不明な点が多い。そこで、本研究では、自然発症型 OA モデルである STR/ort マウスに CS を経口投与することで OA 症状改善効果の検証、および滑膜 B 細胞 (線維芽細胞) を用いてヒアルロン酸産生に及ぼす CS の効果の検証を行った。

【方法】STR/ort の雄マウスは 35 週齢で 85% が OA を自然発症すると報告されている。30 週間の予備飼育後、31 週齢から CS (1000mg/kg B.W.) の経口投与を 4 週間連日行い、35 週齢で解剖を行った。膝関節の組織標本を作製し、Mankin 法を用いてスコア化した。関節症未発症のコントロールには同じ週齢の STR/ort 雌マウスを用いた。滑膜細胞は、雌ニュージーランド白ウサギの膝関節滑膜組織に由来した HIG-82 細胞を用いた。CS 添加による HA 合成酵素 (HAS) の遺伝子発現を定量的リアルタイム RT-PCR を用いて解析した。また、培養上清中の HA を抽出し、セルロースアセテート膜電気泳動法 (CE) を用いて分析した。

【結果および考察】STR/ort マウスの水投与群の Mankin スコアが 9.1 であるのに対し、CS 投与群で 6.8 であり OA 症状の改善が認められた。特に、Mankin スコアの structure の部分での改善が顕著であった。滑膜細胞を CS で刺激すると、HAS-1 および 2 の遺伝子発現の上昇が認められ、この効果は CS 濃度 0.1 μ g/ml のときに最大であった。また、CE による解析の結果から、培養上清中の HA 量に大きな違いは認められないが、コントロールと比較して若干泳動位置が遅れる傾向が認められた。このことから、CS は関節の滑膜細胞に作用し、HA 合成酵素の発現を促進し、また合成される HA の性質を変化させることにより、関節症の症状を改善する可能性が示唆された。

Chondroitin sulfate (CS) is particularly one of the symptomatic slow-acting drugs for treating osteoarthritis (OA). OA is the most common disorders of the synovial joints in middle-aged and older people. There are about seven million people suffered from this disease in Japan. It is reported that the concentration and molecular weight of synovial hyaluronan (HA) are decreased in OA. By intra-articular injection of HA, the improvement of the OA clinical symptoms is observed. CS has also recently been shown to have a inhibitory effect on osteoarthritic structural changes in the subchondral bone. However, the precise mechanism of CS on OA is not clear. We tested the effect of CS on OA using a murine STR/ort model *in vivo* and rabbit synoviocytes *in vitro*.

About 85% of all STR/ort strain of male mouse develop OA in the medial tibial plateau. After 30 weeks breeding, CS (1000 mg/Kg BW) was orally administrated on STR/ort model for 4 weeks. Mankin score of control groups was about 9.1, and that of CS intake groups was about 6.8. Structural part of this score remarkably improved by administration of CS. CS increased mRNA expression of HAS-1 and HAS-2 in HIG-82 cells from synovial membrane of rabbit joint. By analysis of CS stimulated medium by cellulose-acetate membrane electrophoresis, there was no difference in HA concentration, but the HA with distinctive mobility was detected. CS directly influences the structure of synovial HA, this indicates that CS may have a structure modifying effect through HA metabolism in synovial fluid.

一般演題（口演）

Oral Presentation

*A1 弾性線維形成における DANCE/fibulin-5 プロセッシングの役割

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

○堀口 真仁¹ 大林 徹也² 中邨 智之³

Masahito Horiguchi¹, Tetsuya Ohbayashi², and Tomoyuki Nakamura³

¹京都大学 医学研究科 循環器内科

²鳥取大学 生命機能研究支援センター 動物資源開発分野

³関西医科大学 薬理学講座

¹Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine, Kyoto University

²Division of Laboratory Animal Science, Research Center for Bioscience and Technology, Tottori University,

³Department of Pharmacology, Kansai Medical University

動脈、肺、皮膚などの伸縮する臓器では組織の弾力が重要である。弾性線維が劣化すると動脈は硬化・蛇行し、肺は気腫状になり、皮膚はたるむ。組織の弾性を担っている弾性線維は、エラスチンやマイクロフィブリル、マイクロフィブリル結合タンパクなどで構成されている。しかし、弾性線維が形成されるメカニズムの全貌はわかっていない。我々は、DANCE (Developmental Arteries and Neural Crest EGF-like, または Fibulin-5) のノックアウトマウスでは全身の弾性線維がばらばらであり、弾性線維形成に DANCE が必須であることを報告した。DANCE は分泌タンパクであり、発生期の動脈に強く発現して、弾性線維上に存在する。In vitro のデータでは、DANCE はマイクロフィブリルと共に存在して、弾性線維の形成を促進する。また、DANCE はセリンプロテアーゼによってN末端ドメインの一部が切断され、この切断型 DANCE は全長型 DANCE の持つ弾性線維形成能を失う。そしてマウス生体においては加齢とともにこの切断型 DANCE の割合が増加することから、老化関連症状に DANCE プロセッシングが何らかの影響を持つことが示唆される。生体における DANCE プロセッシングの意義を検討するために切断型 DANCE のノックインマウスを作成した。このマウスの皮膚はたるんでおり、大動脈の弾性は低下していたが、DANCE 欠損マウスとは表現型が一致していなかった。このことから切断型 DANCE が弾性線維の形成になにか役割を持つことも考えられる。

Elasticity is an important character of various human organs, such as aorta, lungs and skin. Loss of elasticity may cause aging related signs, such as tortuous aorta, lung emphysema and loose skin. Elastic fibers, important components for elasticity, are known to be composed of polymerized elastin and microfibrils and microfibril-associated proteins. However, precise mechanisms of elastic fiber assembly are still not elucidated. We have previously reported that DANCE (Developmental Arteries and Neural Crest EGF-like, or fibulin-5) is indispensable for elastogenesis because elastic fiber formation is impaired in DANCE deficient mice. DANCE is a secreted protein, which colocalizes with elastic fibers and is abundantly expressed in developing arteries. In vitro analysis showed that DANCE assembles with microfibrils and induces elastic fiber formation. DANCE is cleaved at its N-terminal region by serine protease, and the truncated form of DANCE loses its ability to promote elastic fiber assembly in vitro. As this truncated form of DANCE increases in aged mice, it is implied that the accumulation of the truncated form of DANCE have some pathological meaning in aging related symptoms. We have generated gene-targeted mice in which a truncated form of DANCE is knocked-in. These mice have loose skin, firm aorta, but the phenotype was not the same as that of DANCE deficient mice, suggesting that the truncated DANCE may have something to do with elastogenesis.

A2 トロポエラスチン沈着におけるリジロキシダーゼファミリーの機能解析

Role of lysyl oxidase and lysyl oxidase like-1 in the process of elastic fiber formation

○村松 卓¹ 野中 里紗¹ 輪千 浩史¹ 瀬山 義之¹

Makoto Muramatsu¹, Risa Nonaka¹, Hiroshi Wachi¹, and Yoshiyuki Seyama¹

¹星薬科大学大学院 薬学研究科 医療薬科学専攻

²星薬科大学大学院 薬学研究科 医療薬学専攻

¹Department of Clinical Chemistry, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

²Department of Clinical Chemistry, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

【目的】弾性線維形成過程において, Lysyl oxidase (LOX) 及び Lysyl oxidase like-1,-2,-3,-4 (LOXL-1,-2,-3,-4) と呼ばれる 5 種類のアイソザイムは, tropoelastin (TE) の微細線維への沈着や, TE の分子間または分子内の架橋形成 (成熟化) に重要な役割を果たしているが, その詳細については不明である. そこで本研究では, トロポエラスチン沈着における LOX 及び LOXL-1 の機能を検討した.

【方法】LOX 及び LOXL-1 の siRNA を Reverse Transfection 法によりヒト網膜色素上皮細胞に導入し, それぞれのノックダウン細胞を作製した. これらに V5 標識した大腸菌組み換え TE (rTE) を添加後, 蛍光免疫染色法により構築した微細線維及び rTE の沈着量を観察した.

【結果】蛍光免疫染色法の結果, LOX 及び LOXL-1 のノックダウン細胞共に微細線維には影響が無かったものの, LOXL-1 のノックダウン細胞においては rTE の沈着量が若干減少し, LOX のノックダウン細胞においては rTE の沈着量がほぼ完全に抑制されていることが確認された.

【考察】本研究より, LOX は主に TE 沈着過程作用している可能性が示唆された. 今後は架橋形成過程に対する影響も検討していくと共に, 他の LOXL についても同様に検討を行うことで, リジロキシダーゼファミリーの弾性線維形成における役割が明らかになると推察される.

【Aims】Lysyl oxidase (LOX) and LOX like-1 (LOXL-1) plays an important role on the deposition and maturation of tropoelastin (TE). However it is still unclear in detail. In the present study, we investigated elastic fiber formation using siRNA of LOX and LOXL-1.

【Methods】Recombinant human TE (rTE) was added to human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19 cells) after trasfection with siRNA of LOX or LOXL-1. Expression of mRNA and deposition of rTE was evaluated by RT-PCR and Immunofluorescence, respectively.

【Results】Immunofluorescence showed that deposition of rTE are completely inhibited on siLOX, but not siLOXL-1, without change of fibrillin-1 fiber formation.

【Conclusions】Our data cleared that LOX plays critical role on the deposition of TE.

This study would provide beneficial information on the understanding of mechanism of elastic fiber formation.

***A8 細胞外環境下で不溶性な立方体蛋白質結晶への FGF-2 のマイクロ固定化と細胞培養系の特異的空間制御**

○開 祐司¹ 宿南 知佐¹ 西崎 有利子¹ 古山 明子² 野津裕之² 森 肇²

¹京都大学再生医科学研究所

²京都工芸繊維大学昆虫バイオメディカル研究センター

結合組織を構成する細胞は、巨大な細胞外マトリックスとこれに結合した特異的な細胞機能制御分子が織りなす超分子構築のために、1 細胞レベルでもヘテロトピックなシグナルを受けている。我々は、再生医療応用を視野に入れて、組織幹細胞あるいは前駆細胞のマイクロマニピュレーションを可能にするシグナル伝達ツールの開発を目指している。今回、カイコ細胞質多角体病ウイルスが作り出す多角体粒子を利用してヒト FGF-2 のマイクロ固定化を試みた。細胞質多角体病ウイルス (CPV) は、昆虫の冬眠に自らの発育ステージを合わせるため、宿主の細胞質中に多数のウイルス粒子を封入したタンパク質のカプセルである多角体を形成する。多角体はアルカリ性 (pH10~11, 昆虫の中腸内腔環境) でのみ溶解するので、ウイルス粒子は長期間外的環境下に放置されてもその感染力を保つことが可能である。最近、共著者らによって、多角体が数ミクロンの立方体形状を有する微細な多角体蛋白質結晶であることが明らかとなった (1)。そこで (FGF-2) の末端に固定化シグナルを付加して、これを発現する組換えウイルスを作成して FGF-2 を多角体に固定化した。線維芽細胞や前駆軟骨細胞に多角体固定化 FGF-2 を添加すると、MAP kinase の p44/p42 のリン酸化が検出され細胞増殖が促進された。増殖促進活性は、FGFR の阻害剤である SU5402 によって抑制されることから、多角体固定化 FGF-2 は FGFR を介して作用していると考えられた。培養皿上に、多核体固定化 FGF-2 をスポットすると、近傍の細胞の増殖のみを促進することから、単一細胞レベルでも細胞の挙動を簡便に制御する新しいツールになることが期待される (2)。

(1) Nature 446, 97-101 (2007)

(2) J. Biol. Chem. 282, 17289-96 (2007)

Immobilization and spatially restricted actions of FGF-2 into cubic proteinous microcrystals that are insoluble in a physiological cellular environment

Yuji Hiraki¹, Chisa Shukunami¹, Yuriko Nishizaki¹, Akiko Furuyama², Hiroyuki Notsu², and Hajime Mori²

¹Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

²Insect Biomedical Research Center, Kyoto Institute of Technology

The supramolecular architecture of the extracellular matrix and the disposition of its specific growth-regulating molecules give rise to variable heterotopic signaling cues at a single cell level *in vivo*. Aiming at the application in regenerative medicine, we are developing a novel tool for a minute manipulations of growth and differentiation of tissue stem cells or progenitors at a particular position of the organ/tissue. We report here the successful occlusion of human FGF-2 into the cubic inclusion bodies (FGF-2 polyhedra) of the Bombyx mori cytoplasmic polyhedrosis virus (BmCPV). The polyhedra are proteinous cubic crystals of several microns in size that are insoluble in the extracellular milieu (1). Purified FGF-2 polyhedra were found to stimulate proliferation and phosphorylation of p44/p42 mitogen-activated protein kinase in cultured fibroblasts. Cellular responses were blocked by a synthetic inhibitor of the FGF signaling pathway, SU5402, suggesting that FGF-2 polyhedra indeed act through FGFRs. Moreover, FGF-2 polyhedra retained potent growth stimulatory properties even after desiccation. Thus BmCPV polyhedra microcrystals that occlude extracellular signaling proteins are a novel and versatile tool that can be employed to analyze cellular behavior at the single cell level (2).

(1) Coulibaly, F. et al. Nature 446, 97-101 (2007)

(2) Mori, H. et al. J. Biol. Chem. 282, 17289-96 (2007)

A3 Fibrillin-1 繊維形成は Rho-ROCK signaling pathway の抑制により阻害される

Role of Rho-ROCK signaling pathway on the elastic fiber formation

○小川 達也¹ 野中 里紗¹ 輪千 浩史¹ 瀬山 義幸¹

Tatsuya Ogawa¹, Risa Nonaka¹, Hiroshi Wachi¹, and Yoshiyuki Seyama¹

¹ 星薬科大学大学院薬学研究科医療薬科学専攻

¹ Department of Clinical Chemistry, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

【目的】細胞外マトリックス成分であるフィブロネクチン線維の形成が、Rho-ROCK pathway の阻害により抑制され、細胞外線維形成と細胞内情報伝達は、密接に関与していることが報告された。そこで、本研究では、弾性線維の足場タンパク質として重要な役割を担う fibrillin-1 線維に焦点をあて、その線維形成と Rho – ROCK signaling pathway の関与について検討した。

【方法】ラット肺線維芽細胞 (RFL-6) を培養後、Y-27632 (Rho-ROCK kinase inhibitor) で処理した。また、ヒト網膜色素上皮細胞 (ARPE-19) を培養後、エラスチン前駆体タンパクである組換えトロポエラスチンと Y-27632 で処理した。各細胞における弾性線維の構築は蛍光免疫染色法にて観察し、構築された線維量は、ELISA 法を応用し半定量的に解析した。さらに、mRNA を採取し、RT-PCR を行った。

【結果】両細胞共に、Y-27632 処理濃度依存的に fibrillin-1 線維が細くなることが認められた。しかし、トロポエラスチン沈着は、高濃度の Y-27632 処理においてのみ抑制が認められた。RT-PCR の結果より、高濃度の Y-27632 処理において、弾性線維関連タンパクである LOX, MAGP, Fibrillin-1 の遺伝子発現低下が認められた。

【考察】Fibrillin-1 線維形成は Rho-ROCK signaling pathway を介して調節される事が示唆された。当教室では、トロポエラスチンの沈着に LOX が重要な役割を果たしていることを見出しており、高濃度の Y-27632 処理による LOX の発現低下が原因であると推察した。Fibrillin-1 線維は弾性線維の足場タンパク質として重要であることが知られている。本研究結果は、fibrillin-1 線維形成の機序解明に大きく寄与するものと思われる。

Background & Aims: Recently it has been reported that fibronectin fiber formation is closely related to Rho and Rho-associated coiled-coil forming kinase (ROCK) signaling pathway. Our purpose of this study was to investigate the relationship between Rho-ROCK signaling pathway and elastic fiber formation.

Methods: Rat lung fibroblast cells (RFL-6 cells) or human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19 cells) were treated with Y-27632, one of Rho kinase inhibitor. Elastic fiber formation was evaluated by immunofluorescence staining and semi-quantitative ELISA. Moreover, mRNA expression of elastic fiber related molecule was determined by RT-PCR.

Results: Immunofluorescence staining showed that treatment with Y-27632 cause abnormal fibrillin-1 fiber in both RFL-6 cells and ARPE-19 cells. Tropoelastin deposition was markedly inhibited only by treatment with high concentration of Y-27632. Moreover, mRNA expression of lysyl oxidase (LOX), microfibril-associated glycoprotein (MAGP), and fibrillin-1 was suppressed by treatment with high concentration of Y-27632.

Conclusions: In this study, our data revealed that fibrillin-1 fiber formation was regulated via Rho-ROCK signaling pathway. Our unpublished data showed down regulation of LOX mRNA expression by treatment with siLOX completely inhibited the deposition of tropoelastin. Thus, we considered that inhibition of tropoelastin deposition result in the suppression of LOX mRNA by treatment with high concentration of Y-27632. Fibrillin-1 is one of important molecule for elastic fiber formation. Our present study would be useful for understanding of mechanisms of fibrillin-1 fiber formation.

A4 THP-1 細胞の tropoelastin 分解に関する検討

Study of tropoelastin degradation with THP-1 cells

○古賀 綾子¹ 野中 里紗¹ 小林 孝志² 輪千 浩史¹ 瀬山 義幸¹

Ayako Koga¹, Risa Nonaka¹, Takashi Kobayashi², Hiroshi Wachi¹, and Yoshiyuki Seyama¹

¹星薬科大学大学院 薬学研究科 医療薬科学専攻

²防衛医科大学校皮膚科

¹Department of Clinical Chemistry, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

²Department of Dermatology, National Defense Medical College

【目的】慢性閉塞性肺疾患（COPD）の主要原因として考えられている弾性線維の断裂は、肺胞 Macrophage（Mφ）が産生する protease, 特に MMP の関与が示唆されている。そこで我々は、ヒト単球細胞（THP-1）および THP-1 を分化誘導した Mφ を用いて、tropoelastin（TE）の分解特性について検討した。

【方法】THP-1 に TPA 処理することで Mφ に分化誘導させた。THP-1 および Mφ の培養上清を採取し、gelatin zymography および RT-PCR 法により MMP の発現を検討した。また、各培養上清に大腸菌組換え tropoelastin（rTE）を添加し、37°C でインキュベートして一定時間反応させた。rTE の分解について Western blotting 法を用いて解析した。なお、各種 protease 阻害剤を用いて、rTE 分解に関与する protease についても検討した。

【成績】Mφ に分化誘導することにより、MMP-9 の顕著な発現増加を確認した。次に、rTE に対する、各培養上清の分解作用について検討したところ、rTE の分解は THP-1 において顕著であり、MMP-9 発現が高い Mφ においては、rTE の分解はほとんど認められなかった。この THP-1 培養上清の rTE 分解活性は、THP-1 の培養上清を熱処理するか protease 阻害剤を添加することにより消失した。

【結論】これまで、Mφ 由来の protease が弾性線維の分解に関与すると報告されているが、本研究は新たに、Mφ の前駆細胞である単球細胞が弾性線維の分解に関与する可能性を示唆し、COPD に代表される弾性線維の分解機序解明に大きく貢献すると思われる。

【Aims】The degradation of elastic fibers plays an important role in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) or atherosclerosis. It is known that Matrix metalloproteinases (MMPs) related in the degradation of elastic fiber is produced by alveolar macrophages. Our aim of this study was to examine the degradation of tropoelastin in human monocyte leukemia (THP-1) cells.

【Methods】THP-1 cells were differentiated into macrophages-like cells by treatment with TPA (12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate). The conditioned medium from THP-1 cells or macrophage cells was used in this study. The expression of MMPs was determined by gelatin zymography and RT-PCR. Moreover, recombinant tropoelastin (rTE) in the conditioned medium was incubated at 37°C. Then western blot analysis was performed for evaluation of the degradation of rTE. In some experiments, various protease inhibitors were used.

【Results】Gelatin zymography and RT-PCR showed that macrophages-like cells remarkably express MMP-9. However, degradation of rTE in conditioned medium from undifferentiated THP-1 cells was higher than that in conditioned medium from macrophages-like cells. The degradation of rTE was inhibited when conditioned medium was treated with heat or was added protease inhibitor, but not EDTA.

【Conclusion】It is believed that the proteases produced by macrophages are able to degrade elastic fibers. However our data suggest that monocyte cells, such as THP-1 cells, play a critical role in the degradation of elastic fibers. This present study would provide us new information about the degradation of elastic fibers in COPD or atherosclerosis.

A5 コラーゲンゲル上での低酸素培養がヒトおよびハムスター胎児肺上皮細胞の神経内分泌細胞への分化を促進する

○高橋 勇二¹ 地田 義明¹ 加藤 由紀子¹ 古堅 裕¹ 井口 孝一¹ 高橋 滋¹

¹東京薬科大学 生命科学部 環境ゲノム学科

Low oxygen culture on collagen gel stimulates differentiation of human and hamster fetal pulmonary epithelial cells to neuroendocrine cells

Yuji Takahashi¹, Yoshiaki Chida¹, Fukiko Kato¹, Yutaka Furugen¹, Koichi Iguchi¹, and Shigeru Takahashi¹

¹School of Life Sciences, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

【目的】肺神経内分泌細胞（PNEC）は単独、もしくは神経上皮複合体として、主に胎生末期から新生児期の肺細気管支に存在し、多数の生理活性物質を合成、放出し、肺の発生、肺気道の分枝へも関与が報告されている。また、PNEC は成熟個体において肺上皮の再生・修復を促すことも知られ、肺組織幹細胞の微小環境維持に重要な役割を果たしていることも示唆されている。しかし、PNEC の分化機構の詳細は明らかにされていない。今回、18 週齢のヒト胎児の気管支上皮から分離された株化細胞の HFBE、あるいは、ハムスター胎仔肺上皮から株化された M3C3/E3 細胞を用いて PNEC へと分化する培養系の確立を行った。

【方法】コラーゲンゲル上に HFBE あるいは M3E3/C3 を $0.3 \sim 4.0 \times 10^4$ cell/dish ($\phi 60\text{mm}$) の細胞密度でコラーゲンゲルを塗布した培養皿に播種し、CO₂ 10% 37°C の条件で培養した。その後、低酸素条件下 (CO₂ 15%, O₂ 0%) または通常酸素条件下 (CO₂ 15%, O₂ 20%) で分化誘導培地を用いて 4 日間培養した。分化の確認は内分泌細胞の鑑別染色であるグリメリウス染色、NEC の分化マーカーである CGRP、クロモグラニン A の蛍光抗体法、Realtime RT-PCR による ASH1 mRNA の発現量によって行った。

【結果】コラーゲンゲル上での 5 日間培養し、その後、低酸素条件での 4 日間の培養によって、還元性顆粒の増加、CGRP、クロモグラニン A タンパク質の発現量の増加、Realtime RT-PCR での ASH1 mRNA 発現量の増加が確認された。このことから低酸素環境がコラーゲンからの刺激とともにハムスターおよびヒト胎児から分離した未分化株化肺上皮細胞が肺神経内分泌細胞へと分化を促していることが示唆された。

Pulmonary neuroendocrine cells (PNEC) locating mainly on the terminal airway epithelium play endocrine and paracrine secretory roles associated with nerve fibers. Their traditionally ascribed functions include chemoreception and regulation of lung morphogenesis, development and growth. Moreover, PNEC may be important for inflammatory responses, and pivotal for lung stem cell niches. There is recent evidence that neuroendocrine differentiation in the lung is regulated by genes and pathways that are conserved in the development of the nervous system from *Drosophila* to humans (such as achaete-scute homolog-1: Ash-1), or implicated in the carcinogenesis of the nervous or neuroendocrine system (such as the retinoblastoma tumor suppressor gene). However, mechanism of PNEC differentiation is unclear. To examine the pathways to the PNEC differentiation, we tried to establish *in vitro* PNEC differentiation system. We used hamster and human fetal lung epithelial cell lines (M3E3/C3 and HFBE) which are seem to be progenitor of distal airway and alveolar epithelial cells. Culture of these undifferentiated cells on collagen dish under hypoxic condition stimulated cytodifferentiation to neuroendocrine-like phenotype. Accumulation of reductive granules and upregulation of Ash-1 mRNA were prominent. These results suggest that hypoxic condition combining with extracellular matrix signals could promote PNEC cytodifferentiation.

A6 肺扁平上皮癌細胞株 Calu-1 のコラーゲン上の遊走を惹起する持続的 ERK 活性: PP2A/B56 γ , B56 δ と IEX-1 の関与

○西村 好博¹ 島田 恵利¹ 河原 栄¹

¹金沢大学大学院 医学系研究科 保健学専攻

Regulatory mechanism of a sustained activation of ERK signaling pathway in Calu1 lung squamous carcinoma cell migration: Implication of PP2A/B56gamma, B56delta and IEX-1

Yoshihiro Nishimura¹, Eri Shimada¹, and Ei Kawahara¹

¹Division of Health Science, Kanazawa University Graduate School of Medical Science

【目的】細胞遊走には細胞外基質への接着と増殖因子による ERK の持続的な活性化が必要である。近年、ERK の活性調節に PP2A/B56 と IEX-1 が作用していることが報告され、この機構が ERK のリン酸化を持続させていると推測される。今回は、肺扁平上皮癌細胞株 Calu-1 を用いて、ERK のリン酸化調節機構と遊走の関係を明らかにする。

【方法】RNAi 法により B56 γ , B56 δ と IEX-1 を特異的にノックダウンした Calu-1 細胞を用い、ERK のリン酸化状態と、コラーゲン上での遊走能を検討した。

【結果】Calu-1 細胞に EGF を投与して、遊走アッセイをすると、Calu-1 細胞は濃度依存的に遊走が亢進して、10 ng/ml で最大効果を示した。10 ng/ml の EGF を浮遊 Calu-1 細胞に投与すると、Thr/Tyr リン酸化 (pTpY)-ERK は 30 分まで増加し、60 分で元のレベルに戻った。EGF を投与してコラーゲンに接着させると、30 分で EGF 単独刺激よりも高いレベルに達し、60 分まで同じレベルを保った。pY-ERK でも 30 分でやや増加し 60 分まで持続した。IEX-1 を阻害すると細胞遊走は抑制された。また、EGF/コラーゲン共刺激による pTpY-ERK は減少し、pY-ERK は増加した。IEX-1 タンパクの発現亢進は共刺激後 30 分で始まった。B56 γ と B56 δ を RNAi すると細胞遊走は抑制され、EGF/コラーゲン共刺激後の pTpY-ERK は減少した。これは、リン酸化、遊走能共に最大効果に達しているためと推測されたので、より弱い刺激である 2 ng/ml の EGF を用いたところ、細胞遊走は亢進し、pTpY-ERK のリン酸化も増加した。

【結論】IEX-1 は ERK のリン酸化の持続を惹起し、細胞遊走を亢進することが明らかとなった。この現象は IEX-1 が PP2A による ERK の脱リン酸化を抑制するためと考えられた。

Cell migration requires sustained activation of ERK co-stimulated by growth factors and cell-matrix adhesion. Recently, it has been reported that B56 family PP2As directly dephosphorylate ERK and IEX-1 inhibits the action. It is suggested that ERK phosphorylation could be sustained due to the mechanism. To elucidate that PP2A/B56 and IEX-1 are implicated in sustained phosphorylation of ERK and regulate cell migration, the function of PP2A/B56s and IEX-1 were analyzed by RNAi method. Migratory ability was evaluated by migration assay using Transwell. EGF-stimulated Calu1 cell migration on collagen was enhanced in a dose-dependent manner, and the maximum effect was revealed at a concentration of 10 ng/ml. Thr/Tyr phosphorylated (pTpY)-ERK in the cells co-stimulated with collagen and EGF remained at the high level. When the expression of IEX-1 was inhibited, migration was inhibited. The levels of pTpY-ERK decreased. IEX-1 protein was upregulated 30 min after co-stimulation. When B56gamma or B56delta was inhibited, migration was inhibited and the level of pTpY-ERK decreased contrary to our expectation. These results might have been caused by the saturation effect of phosphorylation of ERK and migration when cells were co-stimulated with 10 ng/ml EGF and collagen. Then, in B56gamma-RNAi cells stimulated with a lower concentration of EGF, the cell migration was enhanced and the level of pTpY-ERK increased. These results elicited that the sustained activation of ERK induced by IEX-1 in a positive feed back manner causes cell migration. The effect of upregulated IEX-1 has been suggested to be caused by inhibition of PP2A-mediated dephosphorylation of ERK.

★A7 S1P によるヒト線維芽細胞ストレスファイバー形成には mDia を介する系が存在する

Evidence of corporation of ROCK and mDia in actin stress fiber formation of human dermal fibroblasts with SIP stimulation

○周東 朋子¹ 安部 正敏¹ 石川 治¹

Tomoko Syuto¹, Masatoshi Abe¹, and Osamu Ishikawa¹

¹群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学

¹The Department of Dermatology, Gunma University Graduate School of Medicine

Sphingosine-1-phosphate (S1P) は血清中に高濃度で存在し、血小板から放出されることから創傷治癒に関与していると考えられている。本研究はヒト創傷治癒のモデルと考えられるコラーゲンゲルを用いて、S1P のゲル収縮能を検討し、ヒト線維芽細胞内のシグナル伝達系を明らかにすることにより、将来の臨床応用への可能性を探ることを目的とした。

S1P は早期の創傷治癒モデルとされる Floating matrix contraction (FMC) においてゲル収縮を惹起した。Rho の上流と下流 ($G_i\alpha$, Rac 1, Rho 及び ROCK) を、それぞれの阻害剤で前処置したところ、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に線維芽細胞を播種し、組織化学的に S1P の細胞骨格形成能を検討したところ、S1P はアクチンストレスファイバーを形成することが可能であり、Rho 阻害下ではストレスファイバーを形成することはできなかったが、ROCK 阻害下では形成がみられた。これらの結果より、S1P によるストレスファイバー形成には ROCK だけではなく、ROCK と同列に存在する mDia を介する系が存在することが示唆された。免疫組織学および Western Blot 法にて S1P 刺激後のヒト線維芽細胞における mDia の細胞質から核内への移行を確認した。さらに RNAi を用いて mDia のサイレンシングを行い、さらに ROCK を阻害したところ、siRNA を導入した細胞では S1P 刺激下でもストレスファイバーの形成がほとんど見られなかった。

以上の結果は S1P は創傷治癒を早期の段階で促進している可能性と、S1P によるヒト線維芽細胞ストレスファイバー形成には Rho-ROCK を介する系のみならず mDia を介する系の存在が示唆された。

Sphingosine 1-phosphate (S1P) is a biologically active lipid mediator with a lot of pivotal roles in the regulations of cell growth, migration, differentiation and apoptosis. However, the signal transduction promoted by S1P in human dermal fibroblasts is still unclear. We investigated the signal transduction by S1P in human fibroblasts using collagen matrices contraction. This study aims at investigating whether or not S1P has the possibility to apply the treatment for cutaneous wound healing in the future. We found that S1P promoted floating collagen matrices contraction (FMC), as a model of initial phase of wound contraction, and some kinds of G protein, $G_i\alpha$, Rac 1, Rho and ROCK (Rho associated coiled-coil forming kinase) were involved in S1P promoting FMC. However, ROCK was considered to be partially involved in S1P promoting FMC. mDia as well as ROCK have been recognized to be putative downstream target molecules of Rho. In mDia-silenced cells, ROCK inhibitor suppressed the stress fiber formation regardless of the presence or absence of S1P. Our results indicate mDia as well as ROCK may be involved in the downstream of $G_i\alpha$, Rac1 and RhoA on developing actin stress fiber of human dermal fibroblasts with S1P stimulation.

*A20 シンデカンを介した細胞接着とインテグリンを介した細胞接着

○小林 一樹¹ 保住 建太郎¹ 山縣 夏美¹ 小田切 大¹ 吉川 大和¹ 門谷 裕一² 野水 基義¹

¹東京薬科大学 薬学部 病態生化学教室

²北里大学 医学部 解剖学

細胞接着受容体として働くシンデカン及びインテグリンを介した細胞接着の様式を、ラミニンの活性ペプチドを用いて細胞生物学的及び速度論的見地から解析した。ラミニンは α , β , γ 鎖の3重鎖からなる糖タンパク質で、 α 鎖C末端のLG1~LG5の球状ドメインはラミニンの機能に重要な役割を担っていると考えられている。以前、我々はペプチドを用いたラミニン-111 ($\alpha 1 \beta 1 \gamma 1$) の網羅的なスクリーニングによりラミニン $\alpha 1$ 鎖LG4からシンデカン結合ペプチドAG73 (RKRLQVQLSIRT) とインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ 結合ペプチドEF-1 (ATLQLQEGRLHFMFDLGKGR) を同定した。2つの活性ペプチドのLG4タンパク質中の機能を組換えタンパク質を用いて解析したところ、AG73配列は細胞接着に、EF-1配列は細胞伸展に重要であることが分かった。一方、我々はこれまでに、活性ペプチドをキトサン膜上に結合させることにより、ペプチドの細胞接着や細胞形態に与える影響を正確に評価できることをみいだしてきた。まず、AG73 またはEF-1 ペプチドを固定したペプチド-キトサン膜に細胞を加えたところ、AG73-キトサン膜上では伸展は生じないが多くの細胞が接着し、EF-1-キトサン膜上では接着細胞数は少ないが接着した細胞は強く伸展した。そこで、それぞれのペプチドに対する細胞接着の速さを比較したところ、AG73の細胞接着はEF-1の細胞接着より早いことが分かった。また、AG73とEF-1を様々な比で混合したキトサン膜上では、混合比によって細胞接着様式が変化し、AG73とEF-1を1:9で固定化した場合、最も強い細胞接着と伸展を示した。これらのことから、シンデカン及びインテグリンを介した細胞接着は異なるメカニズムで進行し、両方が同時に起こることが重要であることが示唆された。受容体の異なるペプチドを組み合わせ固定したキトサン膜を用いる本アプローチは、細胞接着における受容体のクロストークの解明や、新規医用材料への応用が期待される。

Syndecan-mediated cell attachment and integrin-mediated cell attachment

Kazuki Kobayashi¹, Kentaro Hozumi¹, Natsumi Yamagata¹, Dai Otagiri¹, Yamato Kikkawa¹, Yuichi Kadoya², and Motoyoshi Nomizu¹

¹Laboratory of Clinical Biochemistry, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

²Department of Anatomy, Kitasato University School of Medicine

Laminins are a family of heteromeric glycoproteins specific to basement membranes. Laminin $\alpha 1$ chain has a large globular domain consisting of five modules LG1-5. We previously identified a syndecan binding peptide AG73 (RKRLQVQLSIRT) and an integrin $\alpha 2 \beta 1$ binding peptide EF-1 (ATLQLQEGRLHFMFDLGKGR) from laminin $\alpha 1$ chain LG4 module. Site-directed mutagenesis analysis of the LG4 protein demonstrated that the AG73 site promotes syndecan-mediated cell attachment and the EF-1 site promotes cell spreading through integrin $\alpha 2 \beta 1$. When AG73 and EF-1 peptides were conjugated on a chitosan membrane, the AG73-chitosan membrane promoted strong cell attachment through syndecan and the EF-1-chitosan membrane promoted cell spreading through integrin $\alpha 2 \beta 1$. When we compared the speed of cell attachment to the peptides, AG73 showed faster cell attachment than that of EF-1. Further, we conjugated both AG73 and EF-1 on a chitosan membrane with various ratios and tested their cell attachment and spreading activities. AG73-EF1(1:9)-chitosan membrane promoted the strongest cell attachment and spreading. These results suggest that the peptide-chitosan approach has a potential to use as multifunctional biomaterials for analyzing cell attachment mechanisms and tissue engineering.

A9 パールカンによるマイオスタチンシグナル伝達の制御

Extracellular regulation of myostatin signaling by perlecan

○佐々木 隆子¹ Dorothe Spillmann² Zhuo Xu² 平澤 恵理³

Takako Sasaki¹, Dorothe Spillmann², Zhuo Xu², and Eri Hirasawa³

¹Shriners Hospital for Children and Department of Biochemistry and Molecular Biology, Oregon Health & Science University

¹Shriners Hospital for Children and Department of Biochemistry and Molecular Biology, Oregon Health & Science University

²Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala University

²Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala University

³順天堂大学 医学部 神経学教室

³Department of Neurology, Juntendo University School of Medicine

TGF- β スーパーファミリーの属するマイオスタチンは、GDF8とも呼ばれ、骨格筋の増殖を抑制し、その変異は、骨格筋肥大と過形成を引き起こすことが知られています。本研究では、マイオスタチンの細胞外マトリックスにおける制御分子を同定するため、マイオスタチンのプロドメインと反応する分子を各種細胞の培養上清をスクリーニングし、横紋筋肉腫細胞の上清中に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンが、さらに、このプロテオグリカンがパールカンであること、ならびにそのドメイン V のヘパラン硫酸鎖に特異的に結合することを見出しました。パールカンは、アミノ末端のドメイン I に 3 本の、カルボキシ末端のドメイン V に 1 本のグリコサミノグリカン鎖を持ちますが、リコンビナントとして発現した両ドメインのヘパラン硫酸鎖の分析により、ドメイン V のヘパラン硫酸鎖は、ドメイン I のものよりもより硫酸化されていることが、わかりました。また、パールカンの存在しない骨格筋では、一部に骨格筋肥大が認められました。これらの結果は、パールカンは、マイオスタチンをそれが作用する場所に適切に保持するのに必要であることを示唆しています。現在、この結合の生物学的意味について、より詳細な解析を進行中です。

Myostatin (GDF8), a member of the TGF- β superfamily, functions as a negative regulator of muscle growth. Loss of function mutations cause muscle hypertrophy and hyperplasia. To identify extracellular regulators of myostatin, we performed screens of cell culture supernatants with the myostatin propeptide. Blot overlay assays demonstrated binding of the myostatin propeptide to a proteoglycan secreted into the medium by A204 rhabdomyosarcoma cells. Treatment with heparanase abolished the binding. Perlecan, a heparan sulfate (HS) proteoglycan found in basement membranes and in cartilage, has three HS chains located in the N-terminal domain I and one in the C-terminal domain V. In order to test whether the myostatin-binding protein was perlecan, recombinant perlecan peptides and full-length perlecan from EHS sarcoma were tested in ELISA.

A10 骨肉腫細胞の細胞外マトリックス形成は oligonucleotides の細胞内導入効率に関与する

○鈴木 喜貴¹ 西田 佳弘¹ 成瀬 隆裕² 玄番 岳踐³ 石黒直樹¹

¹名古屋大学大学院医学系研究科整形外科

²名古屋共立病院整形外科

³アンジェス

【目的】腫瘍細胞の細胞外マトリックスの重要な機能の一つに、薬剤に対するバリアーの働きが報告されている。一方、癌細胞において様々な機能を果たす NFκB に対する decoy oligonucleotides は治療薬の一つとして期待されている。本研究の目的はヒト骨肉腫細胞における細胞外マトリックス形成と NFκB decoy の導入効率との関連を調べることである。

【方法】ヒト骨肉腫細胞株 HOS, MG-63 を用いた。細胞外マトリックス形成は particle exclusion assay, マトリゲルを用いた 3 次元培養にて、蛍光標識 NFκB decoy の細胞内導入効率は蛍光顕微鏡, FACS にて解析した。NFκB の活性化は ELISA, Western blotting を、NFκB decoy の抗腫瘍効果は MTT assay, 細胞周期解析を用いて解析した。

【結果】MG-63 では HOS に比べ細胞外マトリックス形成が経時的に増加するとともに NFκB decoy の細胞内への導入が経時的に低下したが、HA' ase 処理により細胞外マトリックスを除去すると、導入効率は再び増加した。MG-63 では NFκB decoy の添加により細胞増殖が抑制され、細胞周期では G0/G1 期の細胞数が増加した。

【結論】豊富な細胞外マトリックスは NFκB decoy oligonucleotides の細胞内取り込みを阻害する。細胞外マトリックスの形成を変化させることにより、外来投与した oligonucleotides の抗腫瘍効果を高める可能性が示唆された。

Pericellular matrix formation alters the efficiency of intracellular uptake of oligonucleotides in osteosarcoma cells

Yoshitaka Suzuki¹, Yoshihiro Nishida¹, Takahiro Naruse², Takefumi Gamba³, and Naoki Ishiguro¹

¹Nagoya University Graduate School of Medicine, Orthopedic Surgery

²Nagoya Kyoritsu Hospital Orthopedic Surgery

³Anges MG

One of the crucial roles of tumor extracellular matrix (ECM) is to act as a barrier to drug delivery. In this study, we analyzed the relationship between the formation of tumor ECM and the efficiency of intracellular uptake of oligonucleotides in human osteosarcoma cell lines, HOS and MG-63. Oligonucleotides used in this study were nuclear factor kappa B (NF-κB) decoy which might be a therapeutic tool for neoplasms. Pericellular matrix formation was examined by particle exclusion assay and 3-dimensional cell culture. Cellular uptake of FITC-labeled NF-κB decoy was evaluated by fluorescent microscopy and flowcytometry. NF-κB activation was investigated with ELISA and western blot. Effects of NF-κB decoy on cell viability and cell cycle arrest in MG-63 cells were determined by MTT assay and flowcytometry, respectively. MG-63 cells exhibited abundant pericellular matrix with time compared with HOS cells. Uptake of FITC-labeled NF-κB decoy decreased in MG-63 cells with time but not in HOS cells in both monolayer and 3-dimensional cell culture using matrigel. However, after enzymatic removal of pericellular matrix, the uptake markedly recovered in MG-63 cells. NF-κB decoy inhibited cell proliferation and induced G0/G1 cell cycle arrest in MG-63 cells. These results suggest that abundant pericellular matrix might disturb the uptake of NF-κB decoy. Therefore, modification of pericellular matrix composition would increase the efficacy of exogenous oligonucleotides treatment for neoplasms.

A11 ビネキシン欠損細胞でのフィブロネクチン繊維化の亢進

○木岡 紀幸¹ 高橋 穂波¹ 竹上 慧¹ 曾我部 隆之¹ 植田 和光¹

¹京都大学農学研究科応用生命科学専攻

フィブロネクチンは2量体として分泌された後、細胞表面の $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンとの結合を介してフィブロネクチン繊維となる。細胞を *in vitro* で培養すると $\alpha v \beta 3$ インテグリンとビンキュリンなどを主に含む安定で強い張力を持つ接着斑 (Focal Adhesion) が形成される。ここから $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンやテンシンを主に含む構造 (繊維状接着: Fibrillar Adhesion) がフィブロネクチンとともに細胞中央部に向かって移動し、このときフィブロネクチン分子に構造変化が起こりフィブロネクチン繊維へと変換されると考えられている。このように繊維状接着形成がフィブロネクチンの繊維化の開始に重要な役割を持つと考えられているが、接着斑と繊維状接着の形成制御については良くわかっていない。我々はインテグリン裏打ちタンパク質ビネキシンがビンキュリン非存在下では繊維状接着構造へも局在することを見出した。そこで、ビネキシン破壊 (KO) マウスから胎児繊維芽細胞 (MEF) を作製し、ビネキシンが繊維状接着構造形成とフィブロネクチン繊維化に与える影響について調べた。野生型 MEF とビネキシン KO MEF の免疫染色を行なったところ、ビネキシン破壊細胞では $\alpha 5$ インテグリンとテンシンの繊維状の集積、つまり繊維状接着の形成が促進されていた。また、フィブロネクチンの繊維化も同様に亢進され一部は $\alpha 5$ インテグリンと共局在していた。おもしろいことに、このとき $\alpha 5$ インテグリンとフィブロネクチン、およびビネキシンファミリーの別の分子の発現量が増加していた。以上の結果から、ビネキシンまたはそのファミリータンパク質が繊維状接着形成を介してフィブロネクチン繊維の形成制御に関与していることが考えられる。

Increased fibronectin fibrillogenesis in vinexin deficient mouse embryonic fibroblast cells

Noriyuki Kioka¹, Honami Takahashi¹, Megumi Takegami¹, Takayuki Sogabe¹, Kazumitsu Ueda¹

¹Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Secreted fibronectin as a dimer is reorganized into insoluble fibrils at cell surface. The reorganization process involves the association of fibronectin with its cell surface receptor, integrin $\alpha 5 \beta 1$. Fibrillar adhesions, which include integrin $\alpha 5 \beta 1$ and tensin, are thought to be the initiation process of fibronectin fibrillogenesis. Molecular mechanisms how fibrillar adhesions are formed and how fibronectin fibrillogenesis is initiated are not fully understood. We previously showed that a focal adhesion protein, vinexin, is localized at fibrillar structure in vinculin-null cells. Here we show that this fibrillar structure contained the integrin $\alpha 5$, suggesting that vinexin can be localized at fibrillar adhesion in a specific condition. We next examined the effect of disruption of vinexin gene on formation of fibrillar adhesion and fibronectin fibrillogenesis. We, first, generated the embryonic fibroblast cells from wild-type and vinexin-knockout mice. Enhanced fibrillar staining of integrin $\alpha 5$ and tensin was observed in vinexin-knockout cells compared to in wild-type cells. Furthermore, fibronectin fibrillogenesis was also enhanced in vinexin-knockout cells. Interestingly, expression of integrin $\alpha 5$ and fibronectin was increased, although expression of tensin was unchanged. These observations suggest the role of vinexin in the formation of fibrillar adhesion and fibronectin fibrillogenesis.

★A12 マウス部分胆管結紮モデルの確立と抗線維化薬の薬効評価への応用

○茂呂 忠¹ 中尾 祥絵² 東山 礼一² 池田 一雄³ 岡崎 勲⁴
稲垣 豊²

¹株式会社ミノファゲン製薬 研究所

²東海大学 医学部 基礎診療学系 肝線維化ユニット

³大阪市立大学 器官構築形態学

⁴国際医療福祉大学 山王病院

【目的】肝線維化は、肝細胞壊死や胆汁うっ滞など複数の原因によって生じ、それぞれに異なる線維化進展のメカニズムが存在する。後者に対する抗線維化薬の薬効評価には胆管結紮モデルが頻用されるが、とりわけマウスでは高度の黄疸や出血傾向により死亡率が増大するために、充分な解析が行えないことが多い。そこで今回、I型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子(COL1A2)のエンハンサー・プロモーターとEGFPもしくはLuciferase(LUC)遺伝子との融合遺伝子を持したトランスジェニックマウス(Tg)に対して部分胆管結紮を行い、術後生存率ならびに各肝葉におけるCOL1A2プロモーター活性と α SMAの発現を検討した。

【方法】上記Tgに対して、総胆管結紮あるいは左胆管の部分結紮を行い、14日目における生存率を比較した。生存マウスの右葉、中葉、左葉をそれぞれ採取し、Mallory-Azan染色により肝線維化の程度を評価するとともに、EGFPと α SMAの発現を共焦点レーザー顕微鏡観察により解析した。また、LUCアッセイを行い、各肝葉のCOL1A2プロモーター活性を定量解析した。

【成績】14日目における生存率は、総胆管結紮マウス42.8%に対して左葉部分胆管結紮マウスでは88.2%と、後者の生存率は有意に改善された。また、部分胆管結紮マウスでは術後の黄疸や出血傾向は認められなかった。胆管周囲の線維化とEGFPや α SMAの発現は、胆管を結紮された左葉においてのみ認められた。左葉におけるCOL1A2プロモーター活性は1.279 cpm/ μ g proteinと、それ以外の肝葉の平均0.288 cpm/ μ g proteinに比して有意に上昇していた。

【結論】マウス肝左葉の選択的部分胆管結紮モデルでは、総胆管結紮に比して生存率が有意に改善し、組織学的ならびにCOL1A2プロモーター活性を指標とした抗線維化薬の薬効評価に有用な手段になりうると思われた。

Establishment of a mouse partial bile duct ligation (BDL) model and its application for evaluating beneficial effects of anti-fibrotic reagents

Tadashi Moro¹, Sachie Nakao², Reiichi Higashiyama², Kazuo Ikeda³, Isao Okazaki⁴, and Yutaka Inagaki²

¹Research Laboratory of Minophagen Pharmaceutical Co., Ltd.

²Liver Fibrosis Research Unit, Tokai University School of Medicine

³Department of Anatomy, Graduate School of Medicine, Osaka City University

⁴Sanno Hospital, International University of Health and Welfare

Background & Aims Liver fibrosis is caused by several different mechanisms such as hepatocellular necrosis and chronic cholestasis. Although BDL is frequently used for evaluating beneficial effects of anti-fibrotic reagents in the cholestasis-induced fibrosis, it is often accompanied by severe jaundice and bleeding tendency. Here we examined postoperative survival rates and activation of $\alpha 2(I)$ collagen (COL1A2) promoter in each lobe following partial BDL by utilizing transgenic mice harboring COL1A2 enhancer/promoter linked to either EGFP or luciferase gene.

Methods Survival rates were studied until day 14 after ligation of the common bile duct or the left hepatic duct. Liver specimens were subjected to Mallory-Azan staining estimating degree of fibrosis, and confocal microscopic examination detecting EGFP and α SMA expression. COL1A2 promoter activities were determined quantitatively by luciferase assays.

Results Survival rate at day 14 was 42.8 % in common BDL mice, whereas it was statistically improved to 88.2 % in the left partial BDL animals. There was no jaundice or bleeding tendency observed in the latter mice. Extensive fibrosis as well as EGFP and α SMA expression were observed around the dilated bile ducts only in the left lobe. The mean COL1A2 promoter activity in the left lobe was 1.279 cpm/ μ g protein, while it was 0.288 cpm/ μ g protein in the remaining lobes.

Conclusion Partial BDL model has been established for evaluating the beneficial effects of anti-fibrotic reagents in mice. It is superior to the common BDL model in terms of higher survival rate and less severe complications.

****A13 悪性腫瘍細胞のインテグリン活性化によるプログラム細胞死誘導と抗がん剤感受性増強**

○小松 美代子¹ 深井 文雄¹ 大脇 敏之¹

¹東京理科大学大学院 薬学研究科

【目的】固形組織を構成する細胞の生/死, 増殖は接着分子インテグリンを介した細胞外マトリックス (ECM) への接着によって厳密に規定されている. 当研究室において, ECM の一つであるテネシン (TN)-C に由来するペプチド TNIIIA2 によって $\beta 1$ インテグリンの活性化が誘導されることが見出された. 今回, TNIIIA2 によって細胞接着を増強すると, 難治性悪性固形腫瘍細胞 (マウス骨肉腫細胞 LM8) の増殖/生存が抑制されると共に, 抗がん剤感受性が上昇することを見いだしたので報告する.

【方法・結果・考察】LM8 には $\beta 1$ インテグリンの発現が認められた. TNIIIA2 によって $\beta 1$ インテグリンを活性化すると, それに伴って ECM への接着が上昇し, 続いて生細胞数の減少がみられた. また, 抗がん剤ドキソルビシン (DOX) と TNIIIA2 を併用すると, 相乗的な細胞死誘導が認められ, 本作用の一因として TNIIIA2 による DOX の細胞内蓄積量の増加が明らかになった. TNIIIA2 はトランスポーター阻害剤である Verapamil 及び Cyclosporin A とほぼ同様に DOX 細胞内蓄積を誘導したこと, また, 接着誘導作用のない TNIIIA2 変異体では DOX の細胞内蓄積量の増加はみられなかったこと等から, TNIIIA2 は, $\beta 1$ インテグリンの活性化に基づいて, 薬剤排出トランスポーターの活性を阻害する可能性が示唆された.

Increased induction of programmed cell death and chemosensitivity of malignant tumor cell type through $\beta 1$ -integrin activation.

Miyoko Komatsu¹, Fumio Fukai¹, and Toshiyuki Owaki¹

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science

[Purpose]

Adhesion receptor integrin as well as growth factor receptor plays an essential role in fundamental cellular processes, such as cell growth and survival. In our laboratory, it has been found that a peptide derived from tenascin-C, termed TNIIIA2, has the ability to induce $\beta 1$ -integrin activation. In this study, we investigated the effect of TNIIIA2 on the survival of malignant tumor cells (mouse osteosarcoma, LM8).

[Methods, Results and Discussion]

The expression of $\beta 1$ integrin was detected in LM8 cells. TNIIIA2 induced adhesion of LM8 cells to the fibronectin substrate by activating $\beta 1$ integrin. LM8 cells underwent apoptotic death when kept in the presence of TNIIIA2. Next, we evaluated the ability of anti-cancer drug (Doxorubicine: DOX) to induce apoptosis in LM8 cells in the presence or absence of TNIIIA2. As a result, TNIIIA2 was shown to have the ability to increase chemosensitivity of cells to DOX. Accumulation of DOX in LM8 cells became increased in the presence of TNIIIA2. Since TNIIIA2 also induced the intracellular accumulation of DOX in the pattern similar to transporter inhibitors, Verapamil and Cyclosporin A, and since TNIIIA2mut, a control peptide of TNIIIA2, was inactive in the accumulation of DOX into LM8 cells, the effect of TNIIIA2 was attributed to inhibition of drug-transporter including p-glycoprotein through $\beta 1$ -integrin activation.

A14 癌細胞の浸潤・転移に関わる ADAM28 の結合蛋白質及び新規基質の探索

Analyses of ADAM28-interacting proteins that may relate to cancer cell invasion and metastasis

○望月 早月¹ 副島 見事² 下田 将之¹ 岡田 保典¹

Satsuki Mochizuki¹, Kenji Soejima², Masayuki Shimoda¹, and Yasunori Okada¹

¹慶應義塾大学医学部病理学教室

²化学及血清療法研究所

¹Department of Pathology, School of Medicine, Keio University

²The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institut

ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) は、細胞外マトリックスの分解、膜蛋白の shedding、細胞接着などに関わる多機能分子である。我々の研究から、ADAM28 はヒト癌細胞の増殖・浸潤・転移と相関することが明らかとなっているが、ADAM28 による癌細胞浸潤・転移機構に関しては不明な点が多い。本研究では、yeast two-hybrid 法と 2D-difference Gel Electrophoresis (2D-DIGE) 法を用いて ADAM28 の結合蛋白質と新規基質を網羅的に探索し、癌細胞浸潤・転移への関与を検討した。Yeast two-hybrid 法により、ADAM28 と相互作用する候補蛋白質として von Willebrand factor (vWF) を見出した。¹²⁵I-proADAM28 を用いた binding アッセイにより proADAM28 は vWF と特異的に結合し、活性型 ADAM28 は vWF マルチマー分解活性を示した。ADAM28 は、vWF 分解酵素である ADAMTS-13 の蛍光基質 (FRETs-vWF73) を分解せず、vWF 分解パターンも異なることから、ADAMTS-13 とは別の部位で切断すると考えられた。活性型 ADAM28 で処理した vWF は、コラーゲンとの結合能が著しく低下し、vWF マルチマー分解による機能低下が認められた。一方、ADAM28 を高発現する肺癌細胞株と非発現細胞株を用いて vWF によるアポトーシスを検討したところ、ADAM28 発現細胞株ではアポトーシスが抑制された。

以上のことより、ADAM28 高発現癌細胞は、ADAM28 による vWF 分解を通して、vWF 誘導性の癌細胞アポトーシスを抑制し、癌細胞の浸潤・転移促進に働く可能性が示唆された。2D-DIGE を用いた ADAM28 の基質候補分子検索についても現在解析中である。

ADAMs (a disintegrin and metalloproteinases) are multifunctional proteins, which function in ECM (extracellular matrix) degradation, shedding of membrane proteins, and cell adhesion, fusion and signaling. Our recent studies showed that ADAM28 is expressed predominantly by cancer cells, showing positive correlations with cell proliferation and lymph node metastasis. In the current study, we screened binding proteins and/or substrates for ADAM28 by yeast two-hybrid system and 2D-difference gel electrophoresis (2D-DIGE). By yeast two-hybrid system, we identified von Willebrand factor (vWF) as a candidate protein and further demonstrated the specific binding by the binding assay using ¹²⁵I-labeled proADAM28 and immobilized vWF. Incubation of vWF with recombinant ADAM28 resulted in the degradation of vWF multimer to smaller fragments. Collagen-binding assay for vWF, which depends on the quantity of vWF multimers, showed that treatment with ADAM28 decreases vWF binding activity. FRETs-vWF73, a fluorogenic peptide substrate for ADAMTS13, was not cleaved by ADAM28, suggesting that ADAM28 cleaves vWF at different sites from those by ADAMTS13. We also demonstrated that vWF induced cellular death with A549 lung carcinoma cells without ADAM28 expression, whereas this effect was not obtained with PC9 lung carcinoma cells which highly express ADAM28. vWF is known to act as an anti-metastatic factor by enhancing immune cell mediated clearance or apoptosis of cancer cells. Thus, our data suggest the possibility that ADAM28 may play a role in cancer cell metastasis through cleavage of vWF. Further studies about ADAM28 substrates by 2D-DIGE are on going in our laboratory.

***A15 EMMPRIN を介して細胞表層に局在する間質
プロコラゲナーゼ/proMMP-1 の活性化とガ
ン細胞浸潤能の促進**

○塩野 智康¹ 今田 啓介¹ 佐藤 隆¹ Robert Visse² Hideaki Nagase² 伊東 晃¹

¹東京薬科大学薬学部, 生化学・分子生物学教室

²ロンドン大学ケネディ・リウマチ研究所

【目的】EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) は種々のガン細胞表層に高発現し, MMP 産生促進作用とともに間質プロコラゲナーゼ/proMMP-1 と相互作用するガン転移促進因子である。これまで私たちは, proMMP-1 と同様に活性型 MMP-1 もそのヒンジ領域と EMMPRIN との相互作用によりガン細胞表層に局在し, コラーゲンゲル浸潤活性が促進されることを報告してきた。今回, proMMP の生理的活性化因子である plasmin による細胞表層 proMMP-1 の活性化について検討した。

【方法】ProMMP-1 を結合させたヒト子宮頸部扁平上皮ガン細胞 SKG-II を plasmin または plasminogen 存在下で培養した。細胞表層 proMMP-1 および MMP-1 は免疫染色法により, コラーゲンゲル浸潤活性はチャンバーアッセイにより検討した。また, Plasminogen の活性化はカゼインザイモグラフィーにより検討した。

【結果】ProMMP-1 の局在した SKG-II を plasmin で処理したところ, 細胞表層に活性型 MMP-1 が出現し, 同時に細胞のコラーゲンゲル浸潤活性も促進された。また plasminogen 処理によっても SKG-II の同浸潤活性促進が認められ, 同時に plasminogen の活性型 plasmin (83kDa) への移行がカゼインザイモグラフィーにより観察された。すなわち, plasminogen は SKG-II 依存的に plasmin に活性化されることが判明した。

【結語】これまでガン組織における MMP-1 の増加については多くの報告があるものの, その機能については不明な点が多かった。今回 EMMPRIN を介して細胞表層に局在した proMMP-1 は生理的条件下で活性化され, ガン細胞の浸潤・転移活性に直接関わることを初めて示した。

**The activation of interstitial procollagenase/
proMMP-1 localized on tumor cell surface via
EMMPRIN and augmentation of tumor cell invasion**

Tomoyasu Shiono¹, Keisuke Imada¹, Takashi Sato¹, Robert Visse², Hideaki Nagase², and Akira Ito¹

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

²Department of Matrix Biology, Kennedy Institute of Rheumatology Division, Imperial College London

Objective: EMMPRIN(extracellular matrix metalloproteinase inducer), which is highly expressed on the cell surface of several tumors, has been shown to interact with interstitial procollagenase/proMMP-1. We have previously reported that active MMP-1 as well as proMMP-1 is localized on the cell surface through the interaction between EMMPRIN and the hinge region of MMP-1, resulting in a promotion of collagen gel-invasive activity. In this study, we examined the activation of tumor cell surface proMMP-1 bound to EMMPRIN by plasmin, and changes in tumor cell invasion.

Methods: The localization of proMMP-1 and active MMP-1 on the cell surface of human uterine cervical carcinoma SKG-II was observed by immunohistochemical analysis. Collagen gel-invasive activity was measured by collagen-gel chamber assay. Activation of plasminogen was monitored by casein zymography.

Results: ProMMP-1 localized on the surface of SKG-II was converted to active MMP-1 by plasmin, resulting in the promotion of collagen gel-invasive activity. The acceleration of invasive activity was also observed in cells treated with plasminogen. Active plasmin (approximately 83 kDa) was detected in a culture medium of the plasminogen-treated cells by casein zymography, indicating that SKG-II cells and/or their product activated plasminogen.

Conclusion: The frequent appearance of MMP-1 in tumor tissue has been reported, however the exact roles of MMP-1 have not been well understood. Therefore, this is the first evidence that proMMP-1 localized on the tumor cell surface via EMMPRIN can be physiologically activated; thereby active MMP-1 directly participates in the tumor cell invasion and metastasis.

A16 乳房外 Paget 病におけるリンパ行性転移 機序：上皮-間葉転換とリンパ管新生に着目 して

○平川 聡史¹ 永松 将吾¹ 松尾 恵太郎² 渡部 明香¹ 種村
篤³ 片山 一朗³ 橋本 公二¹

¹愛媛大学 医学部 感覚皮膚医学分野

²愛知がんセンター 疫学・予防部

³大阪大学 情報統合医学講座 皮膚科学教室

多くのがん組織で、リンパ管新生は所属リンパ節転移及び患者予後と相関する重要な生物像である。乳房外 Paget 病は、リンパ行性転移を来す皮膚上皮性悪性腫瘍である。肉眼的に紅斑を呈し、上皮内がんとして緩徐に進行する一方、浸潤がんは高転移性であり、予後不良である。この臨床的特徴から、本疾患では血管・リンパ管が、病態形成に重要な役割を果たすことが示唆される。しかしながら、乳房外 Paget 病における血管・リンパ管新生の知見は、いまだ存在しない。さらに、いかに Paget 細胞がリンパ節へ転移するか、この機序も不明である。そこで、我々は本疾患 115 例について、まず血管及びリンパ管を組織学的に検討した。この結果、乳房外 Paget 病では上皮内がん 72 例で、既に血管・リンパ管新生が強力に誘導されていた。次に、本疾患における予後因子を見出すべく、腫瘍細胞の特性を評価した。この結果、浸潤がん 43 例のうち所属リンパ節転移を来とし、予後不良であった 14 例で上皮-間葉転換を見出した。さらに、予後不良例では、Paget 細胞が CXCR4 を発現していた。一方、本疾患がん組織では、活性化したリンパ管が stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) を産生していることを見出した。以上より、乳房外 Paget 病では、CXCR4-SDF-1 を介したリンパ管侵襲が、リンパ行性転移の初期プロセスを促進することが示唆される。さらに所属リンパ節を観察すると、Paget 細胞が転移する以前、辺縁洞でも SDF-1 が産生されていた。この知見は、リンパ節が pre-metastatic niche として転移を誘導している可能性を示唆するものである。さらに、転移を来した所属リンパ節ではリンパ管新生が誘導され、リンパ管内に腫瘍細胞が浸潤していることを見出した。この事実は、リンパ管新生が所属リンパ節転移を越えるリンパ行性転移を促すこと、すなわちリンパ管新生が遠隔転移を促進する結果、患者予後に重大な結果をもたらすことを裏付けるものである。

Activation of tumor and nodal lymphatic vessels promotes metastasis of extramammary pagets disease undergoing epithelial-mesenchymal transition

Satoshi Hirakawa¹, Shogo Nagamatsu¹, Keitaro Matsuo², Sayaka Watanabe¹, Atsushi Tanemura³, Ichiro Katayama³, and Koji Hashimoto¹

¹Department of Dermatology, Ehime University Graduate School of Medicine

²Division of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute

³Department of Dermatology, Osaka University Graduate School of Medicine

Extramammary Paget's disease (EMPD), a cutaneous neoplasm of epithelial origin, often shows slow growth within the epidermis. However, adoption of an invasive phenotype by Paget cells often leads to lymphatic and distant organ metastasis, resulting in poor prognosis. However, little is known about the mechanisms how Paget cells metastasize to the lymph nodes, critical sites for metastatic spread of EMPD. To investigate the potential role of tumor angiogenesis and lymphangiogenesis in EMPD, we studied 115 cases by immunohistochemical analyses for blood vascular and lymphatic specific markers. Tumor angiogenesis and lymphangiogenesis were strongly induced already in the early stages of EMPD. Furthermore, 14 advanced cases of EMPD, which developed regional lymph node metastases, demonstrated epithelial-mesenchymal transition (EMT) during tumor progression. Importantly, expression of the EMT markers N-cadherin and vimentin was significantly correlated with poor survival of the patients. These advanced cases also revealed strong CXCR4 expression by invasive Paget cells in close association with EMT markers. We found that tumor-associated lymphatic vessels, but not lymphatic vessels in normal skin, strongly expressed stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), a specific ligand for CXCR4. Moreover, immunohistochemical analyses identified that the lymph node marginal sinuses, the primary sites for lymph node metastasis, abundantly produced SDF-1, indicating a premetastatic niche which attracts metastatic tumor cells to the lymphatic system. Most surprisingly, we found that metastatic Paget cells strongly induce lymph node lymphangiogenesis. This newly identified mechanism of intra-nodal lymphangiogenesis likely contributes to lymphatic metastasis and represents a new therapeutic target for the prevention of invasive EMPD.

A17 N-結合型糖鎖によるラミニン-332 (ラミニン-5) の機能制御

○荻谷 慶喜¹ 加藤 里佳¹ 福田 友彦¹ 顧 建国¹

¹東北薬科大学 分子生体膜研究所 細胞制御学教室

ラミニン-332 (Lm332; ラミニン-5) は, $\alpha 3$, $\beta 3$, $\gamma 2$ の三つの鎖からなる糖タンパク質である. Lm332 は主に皮膚の基底膜に存在し, ヘミデスモソーム構造を形成するとともに, 創傷治癒や癌の浸潤・転移などの細胞運動に関与している. 現在までの研究により, その機能ドメインや構成鎖のプロセッシングと機能との関係が明らかとなっている. その一方で, Lm332 の糖鎖修飾と機能に関する研究はほとんどなされていない.

いくつかの癌細胞において, N-acetylglucosaminyltransferase V (GnTV) により触媒される $\beta 1,6$ -GlcNAcを持つ糖鎖の増加は, 癌細胞の運動を促進する. 一方, N-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) の産物である bisecting GlcNAc を持つ糖鎖は, GnT-V の基質への糖鎖付加および糖鎖伸長反応ができなくなり, 癌細胞の運動を抑制する. そこで本研究では, それら糖鎖修飾が及ぼす Lm332 の機能への影響について検討をおこなった. ヒト胃癌細胞株 MKN45 細胞に vector, GnT-III, GnT-V の遺伝子を導入し, それぞれの培養上清から Lm332 を精製した. Lm332 の GnT-III や GnT-V による糖鎖修飾の有無を調べるために, 各糖鎖構造を認識するレクチンを用いたレクチンブロットをおこなった. その結果, $\alpha 3$ 鎖と $\beta 3$ 鎖において, それら発現させた糖転移酵素による糖鎖構造の増加が確認された. また, 接着活性を調べたところ, GnT-III-Lm332 において vec-Lm332 および GnT-V-Lm332 に比べ著しい活性の低下が認められた. また, 細胞分散活性においても同様の傾向がみられた. これらの結果から, Lm332 の機能が N-結合型糖鎖修飾により, 量的ではなく質的に制御されることが明らかとなった.

N-glycosylation regulates function of laminin-332 (laminin-5)

Yoshinobu Kariya¹, Rika Kato¹, Tomohiko Fukuda¹, and Jianguo Gu¹

¹Division of Regulatory Glycobiology, Institute of Molecular Biomembrane and Glycobiology, Tohoku Pharmaceutical University

Laminin-332 (Lm332; laminin-5) is a large heterotrimeric glycoprotein composed of $\alpha 3$, $\beta 3$ and $\gamma 2$ chain. Lm332 is a prominent component of basement membrane in the skin, and forms hemidesmosome. Lm332 also plays important roles for cell migration during wound healing or cancer metastasis. The past studies identified functional domains of Lm332 and revealed relationships between its activities and processing of subunits. However, there is little report about the effects of N-glycosylation on Lm332 activities.

In some cancer cells, increase of $\beta 1,6$ -GlcNAc catalyzed by N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) is related to promotion of cancer cell motility. By contrast, bisecting GlcNAc catalyzed by N-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) suppresses the further processing with branching enzymes such as GnT-V and elongation of N-glycans, resulting in inhibition of cancer metastasis. To examine the effects of those N-glycosylations to Lm332 on its activities, we introduced the cDNAs encoding GnT-III, GnT-V or empty vector into MKN45 cells, and then purified Lm332 from their conditioned media. To check whether Lm332 was modified by GnT-III or GnT-V, lectin blotting was performed against purified Lm332s. A comparison of bands corresponding to $\alpha 3$ and $\beta 3$ chains indicated that increased GnT-III and GnT-V products presented on GnT-III-Lm332 and GnT-V-Lm332, respectively. Interestingly, the cell adhesion activities of GnT-III-Lm332 were apparently decreased compared to those of vec-Lm332 and GnT-V-Lm332. In addition, increase of GnT-III products on Lm332 resulted in decreased its cell scattering activity. Taken together our results demonstrate that N-glycosylation of Lm332 regulates its biological functions qualitatively but not quantitatively.

*A18 ラミニン α 2 鎖 LG4-5 モジュールの生物活性部位の解明

○漆畑 俊哉¹ 鈴木 喜晴² 林 剛光¹ 保住 建太郎¹ 吉川 大和¹ 野水 基義¹

¹東京薬科大学 薬学部 病態生化学教室

²アメリカ国立衛生研究所

基底膜を構成する主要なタンパクであるラミニンは α , β , γ 鎖から成る三重鎖構造をとり, α 鎖のC末端にはGドメインと呼ばれる5つのLGモジュール(LG1-LG5)が存在している。これまでに同定された5種類の α 鎖(α 1- α 5鎖)のうち, α 2鎖は筋肉や神経組織に発現し、インテグリンや、シンデカン、 α -ジストログリカン(α -DG)などの細胞膜受容体とLGモジュールを介して結合する。中でも α -DGとの結合は筋機能の維持に重要であり, α 2鎖と α -DGのどちらかを欠損しても筋ジストロフィー症状を呈することが知られている。本研究では、タンパクレベルでヘパリンおよび α -DG結合活性を持つことが分かっているLG45に注目し、これらの結合活性配列の決定を試みた。まず α 2鎖LG45の組換えタンパク(rec- α 2LG45)とそのアミノ酸配列を網羅した42種類のペプチド(A2G72-113)を合成した。まず、rec- α 2LG45のヘパリン結合に対するペプチドの阻害効果を評価したところ、A2G78(GLLFYMARINHA: Mouse Lama2, 2796-2807)が結合阻害活性を有した。この結果から、A2G78がLG45モジュールにおける重要なヘパリン結合配列であることが示唆される。次に、 α -DG結合活性配列をスクリーニングしたところ、A2G78とA2G80(VQLRNGFPYFSY: Mouse Lama2, 2812-2823)が結合活性を示した。2つのペプチドのうち、A2G80は14本の β ストランドからなるLG4配列中で、E-Fストランド間のループ構造部位であった。以前の研究で我々は、各 α 鎖LG4のE-F間ループ部位が重要な生物活性を示すことを報告している。本研究の結果から、 α 2鎖LG4のE-F間ループ部位は α -DGと結合することが示された。以上の結果から、A2G78がヘパリンと α -DG両方と、A2G80が α -DGのみと相互作用することを同定した。これら α -DG結合ペプチドはラミニン α 2鎖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に大きな寄与をもたらすものと期待される。

Biological active sites of laminin α 2 chain LG4-5 module

Shunsuke Urushibata¹, Nobuharu Suzuki², Takemitsu Hayashi¹, Kentaro Hozumi¹, Yamato Kikkawa¹, and Motoyoshi Nomizu¹

¹Laboratory of Clinical Biochemistry, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

²Molecular Biology Section, Laboratory of Cell and Developmental Biology, NIDCR, National Institutes of Health

Laminin α 2 chain is specifically found in basement membranes surrounding muscle and peripheral nerve. There are five laminin globular-like modules (LG1-LG5) on its C-terminus of laminin α 2 chain. Laminin α 2 chain binds to diverse cell receptors through LG modules such as integrins, syndecans, and α -dystroglycan (α -DG). The interaction with α -DG greatly contributes to maintenance of muscle functions and nerve regeneration, and the defect of either α -DG or laminin α 2 causes muscular dystrophy. Previously, many studies have been identified that recombinant protein of laminin α 2 chain LG45 module (rec- α 2LG45) has the binding activities of both heparin and α -DG. Here, to identify the binding sequences to α -DG in laminin α 2 chain LG45 module, we synthesized 42 overlapped peptides (A2G72-A2G113) covering the entire molecule. First, we evaluated the inhibitory effect of peptides on heparin binding of rec- α 2LG45, and found that A2G78 (GLLFYMARINHA: Mouse Lama2, 2796-2807) critically showed inhibitive activity. This result suggested that A2G78 is a crucial sequence for heparin binding of laminin α 2 chain LG45 module. Next, we screened α -DG binding activity of 42 synthetic peptides. A2G78 and A2G80 (VQLRNGFPYFSY: Mouse Lama2, 2812-2823), significantly showed α -DG binding activity. From these results, we identified two binding active peptides that A2G78 is important for both heparin and α -DG binding, whereas A2G80 is prominent for only α -DG binding by the systematic screenings of laminin α 2 chain LG45 module. These peptides may be used for elucidating the interaction between laminin α 2 chain and α -DG and for development of therapeutic agent.

***A19 ラミニン α 1 鎖由来の合成ペプチドを用いた
ラット肝細胞の培養**

○三輪 隆博¹ 松田 佑二¹ 高橋 直哉¹ 野水 基義¹ 吉川
大和¹

¹東京薬科大学 薬学部 病態生化学教室

肝臓は血糖調節や薬物代謝など多種類の特異機能を有する臓器であり、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。肝細胞の機能は、増殖因子や細胞外マトリックスによって制御されており、肝臓から単離するとその機能が急速に低下する。本研究では、マウス肉腫由来のマトリゲルが単離した肝細胞の機能を維持出来ることから、その主要成分であるラミニン-111 (α 1, β 1, γ 1) に着目し、そのアミノ酸配列に由来した合成ペプチドの肝細胞培養基質として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 の全アミノ酸配列を網羅した 673 種の合成ペプチドから、生物活性を持つ 60 種を見出している。ラット初代培養肝細胞を用いて、これら合成ペプチドの細胞接着活性を検討したところ、 α 1 鎖に含まれる A13 (RQVFQVAYIIIIKA) に強い活性がみられた。さらに、ラット肝細胞を A13 でコートした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たが、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、A13 が有用な肝細胞培養基質であると示唆された。さらに、A13 と肝細胞を結合させる受容体を検討するため、EDTA とヘパリンによる細胞接着の阻害効果を調べたところ、EDTA とヘパリンによる阻害が見られた。さらに、接着阻害活性のある抗インテグリン β 1 抗体により阻害されなかったことから、インテグリンではない 2 価イオンとヘパリン依存性の受容体であることが示唆された。

**Primary culture of hepatocytes on synthetic
peptides derived from laminin α 1 chain**

Takahiro Miwa¹, Yuji Matsuda¹, Naoya Takahashi¹, Motoyoshi Nomizu¹, and Yamato Kikkawa¹

¹Laboratory of Clinical Biochemistry, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, Hachioji, Tokyo, Japan

Liver transplantation is a curative treatment for hepatic dysfunction such as cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. However, since it is limited by severe shortage of donors, 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 (α 1, β 1, γ 1), a multifunctional glycoprotein in basement membranes, using 673 synthetic peptides. Here, we screened hepatocyte-adhesive peptides using the 60 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 synthetic peptides in a hepatocyte adhesion assay, 30 peptides revealed the cell adhesion activity in dose-dependent manner. Of the peptides, A13 (RQVFQVAYIIIIKA), mouse laminin α 1 chain residues 121-133) exhibited the strongest activity. Furthermore, although the hepatocytes on non-coated plate rapidly lost the expression of metabolic genes, the cells on plate coated with A13 peptide maintained the gene expression such as Tyrosine aminotransferase, Tryptophan-2,3-dioxygenase, and Cytochrome P450 (CYP4A3). We also tested inhibitory effects of EDTA and heparin on cell adhesion to A13 peptide to characterize ligands at the cell surface. Both EDTA and heparin inhibited adhesion of hepatocytes to A13 peptides, suggesting that the cellular interaction was dependent on a divalent cation and potentially interact with heparin/heparan sulfate proteoglycans.

***A28 *Qbrick* ノックアウトマウス基底膜における
インテグリンリガンドの発現低下**

○浄住 大慈¹ 武市 真希子¹ 佐藤 祐哉¹ 上村 俊人¹ 高木
淳一² 関口 清俊¹

¹大阪大学 蛋白質研究所 細胞外マトリックス研究室

²大阪大学 蛋白質研究所 プロテオーム物質創製研究系

【目的】我々はこれまでに器官発生に関わる新規基底膜分子として QBRICK を同定した。 *Qbrick*^{-/-}マウスは異栄養型表皮水疱症, 合指, 潜在眼球症, 腎臓形成不全といったヒト Fraser 症候群様の器官発生異常を示す。 QBRICK はこのように正常な器官発生に必須の基底膜分子であるが, QBRICK が基底膜から消失するとなぜ上述の器官発生異常を生じるのか, その分子機構の詳細は明らかではない。これを説明する一つの可能性として基底膜が細胞へ提示するシグナルの異常が考えられる。この可能性を検証するため, 本研究では基底膜分子の主要なレセプターであるインテグリンの組換え蛋白質を用いた in situ リガンド検出を行うことで, *Qbrick*^{-/-}マウス基底膜のインテグリン親和性を検討した。

【方法・結果】精製した組換え可溶性インテグリンを胎児凍結切片に反応させたところ, *Qbrick*^{-/-}マウスの基底膜は野生型に比べてインテグリン $\alpha 8 \beta 1$ に対する親和性が著しく低下していることが明らかとなった。親和性の低下は表皮を初めとする種々の組織の基底膜で認められた。代表的なインテグリン $\alpha 8 \beta 1$ リガンド基底膜分子であるネフロネクチンと MAEG を免疫組織染色で検出したところ, いずれの発現も *Qbrick*^{-/-}マウスにおいて顕著に低下していた。一方構成的な基底膜分子であるラミニンや IV 型コラーゲン等の発現には異常は認められなかった。

【考察・結論】 *Qbrick*^{-/-}マウスでは細胞がインテグリン $\alpha 8 \beta 1$ を介して受容する基底膜シグナルが低下していることが強く示唆された。インテグリン $\alpha 8 \beta 1$ やそのリガンドであるネフロネクチンは腎臓発生に必須であることが報告されていることから, *Qbrick*^{-/-}マウスにおいてもインテグリン $\alpha 8 \beta 1$ -基底膜リガンド相互作用の異常が腎臓形成不全の原因である可能性が強く示唆された。

**Reduction of integrin ligand expression at the
basement membrane in *Qbrick* null mice**

Daiji Kiyozumi¹, Makiko Takeichi¹, Yuya Sato¹, Toshihito Uemura¹,
Junichi Takagi², and Kiyotoshi Sekiguchi¹

¹Laboratory of Extracellular Matrix Biochemistry, Institute for Protein Research, Osaka University

²Research center for Structural and Functional Proteomics, Institute for Protein Research, Osaka University

[Purpose] We have identified QBRICK, a novel basement membrane (BM) protein that is implicated in organ development. *Qbrick*^{-/-} mice develop typical Fraser syndrome-like phenotypes such as dystrophic epidermolysis bullosa, syndactyly, cryptophthalmos, and renal dysgenesis. Thus QBRICK is indispensable for organ development, but the molecular mechanism underlying such developmental defects in *Qbrick*^{-/-} mice remains to be clarified. One possible scenario is that aberrant signals are transduced from BM to cells in *Qbrick*^{-/-} mice. To test this, we performed in situ ligand detection using soluble recombinant integrins, the major receptors for BM components, and evaluated the availability of integrin ligands in the BM of *Qbrick*^{-/-} mice. [Methods and results] The binding of purified soluble integrin $\alpha 8 \beta 1$ to BM was greatly reduced in *Qbrick*^{-/-} embryo when compared with wildtype littermates. The reduced integrin binding was observed in the BM's of various organs such as skin and lung. Immunofluorescent detection of nephronectin and MAEG, representative integrin $\alpha 8 \beta 1$ ligands in the BM, revealed that the expression of both ligands were greatly reduced in *Qbrick*^{-/-} mice. The expression of constitutive BM proteins such as laminin and type-IV collagen remained unaffected. [Discussion and conclusion] Our results strongly suggest that signals from the BM to cells through integrin $\alpha 8 \beta 1$ are reduced in *Qbrick*^{-/-} mice. Since integrin $\alpha 8 \beta 1$ and its ligand nephronectin is critical in renal development, it seems likely that defects in BM signals mediated through integrin $\alpha 8 \beta 1$ cause renal dysgenesis in *Qbrick*^{-/-} mice.

A21 ペプチドファイバーを用いた人工細胞外マトリックスの設計

○平野 義明¹ 西下 直希¹

¹大阪工業大学 工学部 応用化学科

組織を大きく損傷した場合、損傷部位は細胞外マトリックスが欠如した状態となり、自己の治癒能力での修復は困難である。このような問題を自己の細胞と人工の細胞外マトリックスを用いて再生することを目的とした「組織工学」の研究が活発に行われている。RGDS 配列は、インテグリンレセプターを特異的に認識し細胞接着性を示すことで知られている。また、細胞外マトリックスは、生体内の様々なタンパク質や糖が非共有結合により構築されているため、高含水性やレオロジー特性などの材料特性を有している。つまり、細胞と細胞外基質との界面制御および細胞外マトリックスのような相互作用による3次元構築を模倣することで人工の細胞外マトリックスの設計が可能となる。

本研究では、RGDS 配列とβ-シート構造を組み合わせて分子間相互作用により自己組織化させることのできるペプチドを分子設計した。さらには、ペプチド集合体を自己集合させることで3次元構造体を創成することを目的とした。β-シート構造を構築するペプチドとして (Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys)₂ (EAK16)、(Arg-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Asp-Ala)₂ (RAD16) を選択し RGDS 配列と組み合わせた。細胞接着実験の結果から RGDS 含有β-シートペプチド間では細胞接着に優位な差は見られなかった。しかしながら、EAK16RGDS および RAD16RGDS は人工細胞接着性タンパク質 Pronectin[®]174 に比べて高い細胞の伸展が確認できた。これらのペプチド間に働く分子間相互作用を制御することで、ファイバー状の構造体を構築することに成功した。今回、設計したペプチドは人工細胞外マトリックスや組織工学用材料としての可能性をもつと考えられる。

Evaluation of peptide scaffold for tissue engineering

Yoshiaki Hirano¹, and Naoki Nishishita¹

¹Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Osaka Institute of Technology

In order to be useful, tissue engineering scaffolds must possess many key characteristics including high porosity and surface area, structural strength, and a specific three-dimensional shape. The scaffold can also provide specific biological signals to cells in order to control or facilitate tissue formation or regeneration. RGDS cell adhesion peptides have been incorporated into scaffolds to enhance cell adhesion or to allow biospecific interactions. For example, the RGDS cell attachment site of fibronectin has been incorporated into b-strand peptide sequences, improving cell-attachment activity. In this study, Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys (EAK8), (Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys)₂ (EAK16) and (Arg-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Asp-Ala)₂ (RAD16) were selected as typical sequences having high propensities for forming b-strands. We reported that RGDS-containing peptides have high cell-attachment activity, and the EAK16RGDS and RAD16RGDS peptides are effectively spreading activity among RGDS-containing peptides. We here discuss the correlation between peptide conformation and intramolecular interactions, in order to help develop effective tissue engineering scaffolds. These results suggest that the EAK16RGDS peptide becomes more structured when it self-assembles. The EAK16 and RAD16 peptides have sequences typical of peptides exhibiting a high propensity to self-assemble. Solutions of EAK16RGDS and RAD16RGDS become gelatinous and then form fibers. EAK16RGDS and RAD16RGDS peptides interact with each other and become more structured upon fiber formation. Such peptides may find utility as *in vivo* tissue engineering scaffolds.

A22 細胞外マトリックス蛋白質デルマトポンチンは表皮細胞接着活性を持つ

○岡本 修¹ 藤原 作平¹ 住吉 秀明² 松尾 哲孝² 吉岡 秀克² 高橋 直哉³ 保住 建太郎³ 野水 基義³

¹大分大学医学部生体分子構造機能制御講座 (皮膚科)

²大分大学医学部生体分子構造機能制御講座 (生化学)

³東京薬科大学薬学部病態生化学

真皮の細胞外マトリックスは多様な分子により構成されている。このうち比較的分子量の小さい成分中にデルマトポンチン (DP) と呼ばれる蛋白質が豊富に含まれていることが知られている。我々はこの DP の生物学的機能の解明を試み、その結果 DP が表皮細胞の強力な接着活性を持つことを見出した。表皮細胞株の HaCaT 細胞は DP に濃度依存性に接着し、接着した細胞はスプレディングを示した。本蛋白質への細胞接着は EDTA とヘパリンで抑制され、この蛋白質の細胞表面レセプターとして $\alpha 3 \beta 1$ インテグリンが考えられた。ビオチン化細胞表面蛋白質を DP 固相化アフィニティーカラムに供すと分子量約 70 kDa の蛋白質が結合し、これは 67 kDa ラミニンレセプターと思われる。DP に対する細胞接着は抗 67 kDa ラミニンレセプター抗体により阻害された。DP の合成部分ペプチドを用いた検討では、アミノ末端に近い部分に相当する DP-4 と名づけたペプチドに HaCaT 細胞が接着し、かつこのペプチドが HaCaT 細胞と DP との接着を阻害することから、この DP-4 に相当するアミノ酸配列が細胞接着部位と考えられた。そして細胞接着に必須なアミノ酸配列はこのペプチド内部の 8 アミノ酸であると決定された。この DP-4 に対する細胞接着は抗 67 kDa ラミニンレセプター抗体により阻害されたがインテグリン抗体では阻害されなかった。マウスの実験的創傷の *in situ hybridization* では、初期には筋膜から創傷部位を覆うように延長する真皮での DP の発現が認められ、その後は完成した線維化の部位での発現が最も多かった。これらのことから本蛋白質が創傷治癒の初期から線維化に至る段階において生物学的役割を担っていることが示唆された。

Extracellular matrix dermatopontin is a new adhesion molecule for the keratinocyte cell line, HaCaT

Osamu Okamoto¹, Naoya Takahashi¹, Hideaki Sumiyoshi², Tetsutaka Matsuo², Hidekatsu Yoshikawa², Naoya Takahashi³, Kentaro Hozumi³, and Motoyoshi Nomizu³

¹Dermatology, Department of Biology and Medicine, Faculty of Medicine, Oita University

²Biochemistry, Department of Biology and Medicine, Faculty of Medicine, Oita University

³Laboratory of Clinical Biochemistry, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

Dermatopontin, an extracellular matrix component initially purified from bovine dermis, has a potent cell adhesion activity for the human keratinocyte cell line, HaCaT. HaCaT cells spread on dermatopontin and formed focal contacts as well as discrete actin fibers. The cell adhesion to dermatopontin was inhibited by EDTA and heparin. A synthetic peptide, named DP-4, which locates near to amino-terminus of DP, specifically inhibited the cell adhesion to dermatopontin. The peptide promoted cell adhesion in a dose-dependent manner. An active core sequence of the peptide was localized to an 8 amino acids in this peptide. These results suggest that the sequence is critical for the cell adhesive activity of dermatopontin. Cell surface receptors for dermatopontin were supposed to be $\alpha 3 \beta 1$ integrin and a 67 kDa laminin receptor. The 67 kDa laminin receptor contributed to the cell adhesion to DP-4, but $\alpha 3 \beta 1$ integrin did not. Using an *in situ hybridization* of mouse experimental wound, DP expression was seen in the dermis under re-epithelializing epidermal cells. The expression was the most strongest in the area of fibrosis. These results indicate that dermatopontin is a new adhesion molecule for epidermal cells, and suggest that DP contributes to all stages of wound healing process.

A23 フィブロネクチン由来PHSRN 合成ペプチドの 角膜上皮伸長作用に対する配列特異性の検討

○服部 篤司¹ 保住 建太郎¹ 高 知愛² 大見川 香代³ 加藤
隼太³ 石田 一海³ 星 範男³ 野水 基義¹ 西田 輝夫²

¹東京薬科大学 薬学部 病態生化学

²山口大学大学院 医学系研究科 眼科学

³株式会社日本点眼薬研究所 研究開発本部

【目的】フィブロネクチン (FN) は血漿や細胞外基質に存在し、細胞接着・伸展・創傷治癒などの生物活性を有している。FN のインテグリン認識部位として知られる Arg-Gly-Asp (RGD) モチーフには、それと相乗的に働き、インテグリン活性化の機能亢進に関与していると考えられる Pro-His-Ser-Arg-Asn (PHSRN) 配列の存在が報告されている。また、これまでに我々は PHSRN ペプチドが、それ自体で角膜上皮の伸長や角膜上皮創傷治癒亢進作用を示すことを報告してきた。今回我々は、PHSRN 由来の種々の合成ペプチドを用い角膜上皮の伸長作用に対する配列特異性について検討を行った。

【方法】角膜上皮の伸長に対する PHSRN の配列特異性の検討には、ウサギ角膜器官培養系および培養ヒト角膜上皮 (HCE) 細胞の細胞コロニー伸長作用について検討した。

【成績】PHSRN 配列を含む長鎖ペプチドは、PHSRN と同等の角膜上皮伸長活性を示したことから、PHSRN は活性発現に対して十分なアミノ酸配列を有することが分かった。PHSRN のN末端とC末端の官能基の違いによっても、その活性に変化はなかったが、家兔涙液中での化学的安定性は、Ac-PHSRN-NH₂が最も安定であった。アラニン置換による検討では、Ser もしくは Arg 残基を置換した場合にのみ、器官培養、細胞培養共に活性が消失した。しかし、短鎖の Ser-Arg 自体は活性を示すことはなかった。従って、PHSRN の活性には Ser もしくは Arg 残基が必須であり、且つ隣接するアミノ酸残基も構造上重要であることが示唆された。

【結論】Ac-PHSRN-NH₂は、ウサギ角膜器官培養系および培養ヒト角膜上皮細胞の細胞コロニー伸長活性を示すために必要十分な配列で、化学的にも安定なことから、角膜上皮障害に対して有効な薬剤になり得る可能性が示された。

Sequence specificity of a PHSRN peptide from fibronectin on the corneal epithelial migration

Atsushi Hattori¹, Kentaro Hozumi¹, Ji-Ae Ko², Kayo Oomikawa³,
Junta Kato³, Kazuumi Ishida³, Norio Hoshi³, Motoyoshi Nomizu¹, and
Teruo Nishida²

¹Laboratory of Clinical Biochemistry, Tokyo University of Pharmacy
and Life Sciences

²Department of Ophthalmology Yamaguchi University Graduate
School of Medicine

³Nitten Pharmaceuticals Co., Ltd.

【Objective】Fibronectin plays a critical role in diverse biological activities, including promotion of integrin-mediated cell adhesion, cell migration, and wound healing. Several active sites of fibronectin have been identified. Arg-Gly-Asp (RGD) sequence has been well characterized as an integrin-binding site. Additionally, Pro-His-Ser-Arg-Asn (PHSRN) sequence has been implicated as a synergistic site for the RGD. Previously, we reported that the synthetic PHSRN peptide stimulates corneal epithelial migration *in vitro* and *in vivo*. Here, we examine the sequence specificity of PHSRN on the corneal epithelial migration using various synthetic peptides.

【Methods】The evaluation of sequence specificity on corneal epithelial migration *ex vivo* was tested with an organ culture system of the rabbit cornea. Additionally, cell colony outgrowth-migration *in vitro* was examined with a cell culture of simian virus 40 (SV40)-transformed human corneal epithelial (HCE) cells.

【Results and discussion】The Ac-PHSRN-NH₂ peptide was a sufficient amino acid length for the corneal epithelial migration activity and the N-terminal acetyl and C-terminal amide groups contributed for the chemical stability in tear. Alanine substituted analyses of Ac-PHSRN-NH₂ peptide indicated that the Ser- and/or Arg-residues are important for promotion of the corneal epithelial migration and for stimulation of the HCE cell colony outgrowth-migration. The Ser-Arg motif is involving in various biologically active peptides, suggesting that the unique sequence interacts with cellular receptor(s) and regulates the biological functions. The Ac-PHSRN-NH₂ peptide may be useful as a therapeutic application including corneal wound healing.

***A24 表皮角化細胞におけるヘミデスモゾームと接着斑 (focal contact) の相互作用**

The relationship between hemidesmosomes and focal contacts in stable and/or motile keratinocytes

○小澤 俊幸¹ 鶴田 大輔² 小林 裕美² 原田 輝一¹ 石井 正光²

Toshiyuki Ozawa¹, Daisuke Tsuruta², Hiromi Kobayashi², Teruichi Harada¹, and Masamitsu Ishii²

¹大阪市立大学大学院医学研究科形成外科学

¹Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Osaka City University, Graduate School of Medicine

²大阪市立大学大学院医学研究科皮膚科学

²Dermatology, Osaka City University Graduate School of Medicine

細胞—細胞外マトリックス結合 (cell-matrix adhesion; CMA) は組織の発達や恒常性維持に不可欠である。間葉系細胞での CMA はダイナミックな構造である Focal contacts (FCs) で、上皮系細胞では強固かつ静的と考えられてきた hemidesmosomes (HDs) が主なものとされてきた。しかし、近年の我々を含めた研究により HDs も非常にダイナミックな構造であることが明らかにされた。一方、表皮角化細胞 (KC) の CMA は HDs のみではなく、FCs と HDs 両者により担われることが報告されてきたが、静止時や運動時の両者の interaction の詳細な報告はない。そこで今回我々は、KC における FCs と HDs の動態を Live cell imaging 法を用いて静止時、運動時、薬剤処理時に比較することにより両者の interaction を調べた。

Communication between cells and the extracellular matrix (ECM) impacts the regulation of various cellular functions. The focal contacts (FCs) are highly dynamic adhesive devices in mesenchymal cells, while hemidesmosomes (HDs) had been believed to be stable anchoring structure in epithelial cells. However, recent studies showed that HDs are also dynamic. In addition to HDs, FCs also have been found to be in keratinocytes. However, there have no detailed studies focused on the relationship between HDs and FCs in stable and/or motile keratinocytes. In order to characterize them, we conducted the live cell imaging of stable and motile keratinocytes. We used dynamics of HDs probed with YFP-tagged beta4 integrin and FCs probed with GFP or CFP-tagged actinin-1 under subconfluent, confluent, or wound culture conditions in live HaCat keratinocytes. Moreover, drugs which affect cytoskeletons for keratinocytes (nocodazole and cytochalasin D) were added onto the same culture conditions.

****A25 β 1 インテグリン活性化による悪性腫瘍細胞のアポトーシス誘導とその分子機構の解明**

○江口 真由¹ 羽原 広¹ 大脇 敏之¹ 深井 文雄¹

¹東京理科大学大学院 薬学研究科 分子病態学研究室

【背景・目的】正常細胞の生存・増殖には、増殖因子によるシグナルだけでなく、接着分子インテグリンを介した接着シグナルも必須の役割を果たす。当研究室で見出されたインテグリン活性化ペプチド TNIIIA2 は、正常マウス線維芽細胞に対しては接着促進に伴い増殖を促進するが、足場依存性が低下している悪性腫瘍細胞に対しては、接着は促進するものの正常線維芽細胞とは全く逆にアポトーシスを誘導することが明らかとなった。また、興味深いことに TNIIIA2 は、正常線維芽細胞においては古典的 MAPK 経路を活性化させるが、悪性腫瘍細胞においては古典的 MAPK 経路の不活性化をもたらした。本研究では、ヒト線維肉腫様細胞 WI38VA13 を用いて TNIIIA2 による細胞死誘導のシグナル伝達機構について検討した。

【方法・結果・考察】WI38VA13 を TNIIIA2 刺激するとインテグリン下流シグナルの Rac が活性化し、Rac 下流シグナル分子である PAK、Cofilin がリン酸化した。また Rac 不活性変異体遺伝子を導入すると、TNIIIA2 誘導性アポトーシスが部分的に抑制された。この Rac-PAK-Cofilin 経路の変化に伴い、TNIIIA2 によるアクチン繊維の脱重合が確認された。そこで、Bcl-2 ファミリーの一つである Bmf に着目した。Bmf は通常はアクチン繊維と結合しているがアポトーシス刺激によってアクチンから遊離して Bcl-2 と結合し、アポトーシスを進行させる。TNIIIA2 を WI38VA13 に作用させると、この Bmf の発現が上昇、更に Bcl-2 との結合促進が認められた。Bmf の下流のシグナル分子について調べたところ、caspase-3 や AIF がアポトーシス実行因子として関与していることが確認された。以上より、 β 1 インテグリンの活性化に伴う Rac-PAK-Cofilin 経路を介したアクチンの再構成が TNIIIA2 誘導性アポトーシスに関与している可能性が示唆された。

Activation of β 1 integrins induces apoptosis of malignant cell types

Mayu Eguchi¹, Hiromi Habara¹, Toshiyuki Owaki¹, and Fumio Fukai¹

¹Molecular Pathophysiology Laboratory, Faculty of Pharmaceutical Science, Tokyo University of Science

【Background, Purpose】

Cell survival and proliferation require not only a signal from growth factor receptor but also an additional signal from a family of adhesion receptor, integrin. We recently found that a peptide derived from tenascin (TN)-C, termed TNIIIA2, stimulates cell adhesion to ECM by inducing β 1 integrin activation (J Biochem. 2008). Based on this proadhesive activity, TNIIIA2 positively regulates survival and proliferation of normal fibroblasts. In sharp contrast, some malignant tumor cells undergo apoptotic death by forced activation of β 1 integrin with TNIIIA2. Interestingly, TNIIIA2 induces activation of the classical MAP-kinase pathway in normal fibroblastic cells, but conversely inactivates it in fibrosarcoma-like cells. Here we investigate the signaling mechanisms of TNIIIA2-induced apoptosis in WI38VA13 cells.

【Methods, Results, and Discussion】

TNIIIA2 induced Rac activation. PAK and Cofilin, downstream signaling molecules of Rac, were also phosphorylated by TNIIIA2. Actin fibers were depolymerized followed by transition of Rac-PAK-Cofilin pathway. We then focused on Bmf, a apoptotic Bcl-2 family protein. Bmf is usually binding to actin fibers, whereas apoptotic stimuli release it as a pro-apoptotic protein, allowing it to capture anti-apoptotic Bcl-2 proteins, thereby activating the apoptotic program. TNIIIA2 increased Bmf expression. Furthermore confocal microscopic analysis showed the release of Bmf from actin fibers. TNIIIA2 activated apoptotic executing factor, caspase-3 and AIF. In conclusion, β 1 integrin activation induces apoptosis of malignant cell types through reorganization of actin stress fiber, in which the Rac-PAK-Cofilin pathway plays an important role in triggering the apoptotic program.

***A26 VLA-4 を介した強固なフィブロネクチン接着が造血器悪性腫瘍細胞のアポトーシスを引き起こす**

○大脇 敏之¹ 齋藤 陽平¹ 松永 卓也² 新津 洋司郎² 深井 文雄¹

¹東京理科大学 薬学部 生命創薬科学科

²札幌医科大学 医学部 第四内科

急性骨髄性白血病 (AML) 細胞は, VLA-4 を介した骨髄間質フィブロネクチン (FN) 接着によって抗癌剤耐性を獲得すること, この接着を阻害すると抗癌剤感受性を飛躍的に増強できることを昨年本学会学術大会にて報告した. 一方, 我々はテネイシン-C 由来ペプチド TNIIIA2 がシンデカン-4 を受容体として $\beta 1$ インテグリンの活性化して細胞接着を誘導することを見出した. 今回, バーキットリンパ腫 Ramos が, TNIIIA2 刺激による強固な FN 接着によってアポトーシスを引き起こすことを見出したので報告する.

Ramos をはじめとする造血器悪性腫瘍細胞の $\beta 1$ インテグリンは, 機能不全状態にあるため FN 接着性を持たない. Ramos を FN コート上で培養すると, 無血清条件下であるにも関わらず, 少なくとも 3 日間は生存/増殖し続けた. ここに TNIIIA2 を添加すると, $\beta 1$ インテグリンの活性化に伴って FN 接着が観察されたが, 生存細胞数は TNIIIA2 濃度に依存して減少した. TNIIIA2 によるこの接着誘導や生存細胞数の減少は, VLA-4 リガンド/CS-1 ペプチドや抗 VLA-4 機能阻害抗体により抑制された. TNIIIA2 によるこの生存細胞数の減少は, インテグリン活性化因子である Mg^{2+} や TS2/16 によっても誘導され, カスパーゼ阻害剤によって有意に抑制された. インテグリンは, ERK, Akt などの活性化調節を介して細胞増殖/生存を制御していることが知られているが, TNIIIA2 は ERK, Akt の不活性化に引き続いて Bad を活性化し, これらはいずれも CS-1 ペプチド添加により減弱された. さらに, TNIIIA2 誘導性細胞死は, SiRNA による Bad 発現抑制に依存して減少した.

以上, TNIIIA2 を初めとするインテグリン活性化因子によって VLA-4 の接着機能を回復させ, FN 上に強く接着させると, アポトーシスに基づいて造血器悪性腫瘍細胞の無秩序な生存が阻止される可能性が示された.

Apoptosis induction of hematopoietic tumor cells by forced adhesion to fibronectin via VLA-4

Toshiyuki Owaki¹, Yohei Saito¹, Takuya Matsunaga², Yoshiroh Niitsu², and Fumio Fukai¹

¹Department of Molecular Patho-Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science

²Fourth Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University, School of Medicine

It has been postulated that functionally impaired $\beta 1$ -integrins are involved in the disordered growth of hematopoietic malignant progenitors. We recently found that TNIIIA2, a tenascin-C peptide, can induce functional activation of $\beta 1$ -integrins through syndecan-4 in hematopoietic tumor cell lines with impaired $\beta 1$ -integrins. We have shown that Ramos Burkitt's lymphoma cells continued to survive and proliferate in suspension even under serum-free conditions, whereas forced adhesion to fibronectin induced by TNIIIA2 led the cells to apoptosis. Adhesion-dependent apoptosis, which was also induced under potentiated conditions by other integrin activators, Mg^{2+} or TS2/16 in combination with a bridging antibody, was blocked by $\beta 1$ -integrin- blocking antibody or CS-1 peptide. The inactivation of ERK and Akt and the subsequent activation of Bad were shown to play a critical role in the induction of apoptosis. U937 cells, which express VLA-4 and VLA-5 as fibronectin-receptors and syndecan-4 as a TNIIIA2-receptor, underwent apoptosis when adhered to the COOH-terminal heparin-binding fibronectin fragment, but not when adhered to the RGD-containing fibronectin fragment. Other hematopoietic tumor cell lines (HL-60, Jurkat) and fresh leukemic cells from a patient with acute myelogenous leukemia (AML), which expressed VLA-4 and syndecan-4, underwent apoptosis through TNIIIA2-induced adhesion, whereas K562, Raji cells and fresh leukemic cells from another AML patient, which lacked VLA-4 or syndecan-4 expression, did not. Thus, forced adhesion to fibronectin via VLA-4 was shown to lead hematopoietic malignant progenitors to apoptosis. TNIIIA2 may contribute to preventing prolonged survival of hematopoietic malignant progenitors by its potent ability to activate $\beta 1$ -integrins.

****A27 オートファジー誘導に基づく細胞内寄生性細菌の殺滅に関する基礎的検討**

○千賀 芳寛¹ 島田 朋和¹ 雲越 俊介¹ 大脇 敏之¹ 深井 文雄¹

¹東京理科大学大学院 薬学研究科

【背景・目的】再興感染症として問題となっている結核の治療薬の開発を目指している。近年では超多剤耐性結核菌の出現などもあり、その治療薬の開発は急務である。私の研究室で TNIII A2 というペプチドの発見に成功した。この TNIII A2 がある種の細胞にオートファジー様の作用を引き起こす可能性が示唆されたため、これを抗結核薬に利用することを考えている。オートファジーとは真核生物のほぼ全ての細胞に備わっている自食機構のことであり、アミノ酸が不足した栄養飢餓時などに強く誘導され、細胞内の不要なタンパクをアミノ酸に分解し、栄養源として利用するシステムである。

【方法・結果・考察】マクロファージに寄生した生存 BCG 数を、短時間かつ定量的に評価する手法の確立に成功した。この手法を用い、TNIII A2 が寄生 BCG 殺傷作用を有することが明らかになった。さらに、Western blotting 法や共焦点顕微鏡を用いたタンパク解析により、その作用はオートファジーに基づくものであることを見出した。また TNIII A2 は、接着分子である β_1 インテグリン活性化を介した接着促進作用を有していることが分かっている。そこで、インテグリンとオートファジーの関連を調べるため、 β_1 インテグリン活性化抗体である 9EG7 を用いて同様の実験を行ったところ、9EG7 も寄生 BCG 殺傷作用を有することが判明した。インテグリンとオートファジーの関連は現在知られておらず、興味深い事実である。さらに TNIII A2 は、代表的なオートファジー誘導剤の rapamycin と異なり、宿主マクロファージの生存には無影響であることも分かった。また本研究では元々細胞に備わった分解系であるオートファジーを用いているため、冒頭の多剤耐性菌にも有効である可能性がある。

Inhibition of mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages by inducing autophagy

Yoshihiro Senga¹, Tomokazu Shimada¹, Syunsuke Kumokoshi¹, Toshiyuki Owaki¹, and Fumio Fukai¹

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science

Mycobacterium tuberculosis is an intracellular pathogen persisting within phagosome through interfering with phagolysosome biogenesis. Tuberculosis become serious problems, but current tuberculosis drug has many difficulties such as long treatment period, serious side effect, and multiple drug resistance. On the other hand, autophagy system is known to function as a potent lysosomal degradation pathway for cytoplasmic materials. We have attempted to kill intracellular M.tuberculosis by stimulating the autophagic degradation pathway. We found that survival of Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin(BCG) in infected Raw264.7 macrophages are inhibited by treating macrophages with peptide TNIII A2, which has been previously found as a β_1 integrin activator. In this study, we investigate the involvement of integrin signaling in killing of BCG through the autophagic degradation system.

Peptide TNIII A2 was capable of inducing β_1 integrin activation of Raw264.7 macrophages, with a concomitant decrease in BCG survival in infected macrophages. To examine the involvement of the integrin signaling in autophagy induction, effects of integrin activation on mycobacterial viability was evaluated. When Raw264.7 macrophages were infected with BCG and then treated with a β_1 integrin-activating mAb, 9EG7, a significant decrease in the viability of BCG was observed. Further treatment with a secondary antibody to cluster the activated β_1 integrin on cell surfaces caused a further decrease in the viability of BCG. These results suggest that integrin activation is able to induce autophagic degradation of BCG in infected macrophages. Investigation to clarify the molecular mechanisms by which integrin activation initiates autophagic degradation of BCG is in progress.

A29 新規遺伝子発現システムを用いた歯根膜成分の機能解析

Functional analysis of a molecule expressed in periodontal ligament by our new gene expression system

○篠村 多摩之¹ 中村 さやか² 伊藤 和生³

Tamayuki Shinomura¹, Sayaka Nakamura², and Kazuo Ito³

¹東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科

²名古屋大学 医学部

³山形大学 医学部

¹Tokyo Medical and Dental University

²Nagoya University School of Medicine

³Yamagata University School of Medicine

【緒言】我々は昨年の本大会に於いて、遺伝子トラップ法に基づく新規遺伝子発現システム (Trap-In System) について報告した。本年はこのシステムを用いて行った、歯根膜細胞が合成・分泌する新規遺伝子産物の機能解析について報告する。

歯根膜は歯と歯槽骨を繋ぐ靱帯であり、I 型及びIII型コラーゲンを豊富に含む組織である。しかし、歯根膜組織の特性については依然として不明な点も多い。そこで我々は歯根膜組織を特徴的づけている成分を明らかにする目的で、PCR サブトラクション法による cDNA の解析を行った。その結果、FDC-SP と名付けられたタンパク質が歯根膜組織に於いて特異的に発現していることが明らかになった。このタンパク質は、唾液中に存在するスタチリンと構造が類似していることから、機能的には抗石灰化作用あるいは抗菌作用を持つことが期待される。そこで本研究では骨芽細胞様細胞である Kusa-A1 細胞を用いて FDC-SP を強制発現させ、このタンパク質が石灰化部位へ特異的に沈着するかどうか検討した。

【方法と結果】解析を容易にするため、FDC-SP は GFP との融合タンパク質 (GFPhFDC-SP) として Kusa-A1 細胞で発現させた。イムノブロット解析の結果、石灰化を誘導しない限り、融合タンパク質は培養液中へ分泌され、細胞外基質中への蓄積は認められなかった。しかし細胞を β -グリセロリン酸で処理して石灰化を誘導すると、GFPhFDC-SP は石灰化部位に特異的に検出された。更にこの石灰化部位への局在化には、FDC-SP の C 末端構造が重要であることが、アミノ酸を一部欠損させた変異タンパク質の発現解析から明らかになった。以上より、FDC-SP は石灰化表面に特異的に結合して機能していることが示唆される。

We examined the unique gene expression in human periodontal ligament (PDL) by suppression subtractive hybridization, and revealed the specific expression of follicular dendritic cell secreted protein (FDC-SP) not previously found in PDL. FDC-SP is a small secretory protein having structural similarities to statherin, a protein in saliva thought to play a role in calcium retention in saliva. To understand the function of FDC-SP, we used our novel gene expression system to express FDC-SP in Kusa-A1 cell, an osteogenic progenitor cell line with long-term stability. Then we found that FDC-SP specifically adsorbs onto the surface of hydroxyapatite and mineral deposits. This adsorption was highly dependent on the structural integrity of the C-terminus of FDC-SP. These results suggest that FDC-SP may play an important role on mineral surface.

A30 皮膚創傷治癒過程をモデルとした組織線維化のメカニズムの解析

The study of fibrogenesis used mouse wound healing step model.

○住吉 秀明¹ 松尾 哲孝¹ 吉岡 秀克¹

Hideaki Sumiyoshi¹, Noritaka Matsuo¹, and Hidekatsu Yoshioka¹

¹大分大学医学部生体分子構造機能制御講座 (旧生化学2)

¹Anatomy, Biology and Medicine, Faculty of Medicine Oita university

組織線維症は加齢により進行することが多い慢性で難治性の疾患である。

線維化を及ぼす主体はコラーゲン線維の増生であるが、それを支配している遺伝子の転写や、翻訳後の調節、コラーゲン分子の会合過程の調節等については殆ど解っていない。我々はマウスの皮膚に創傷を与え、治癒、瘢痕化を観察する最も迅速で簡便に出来る実験系を用いることにより組織線維化症の一般的モデルを確立する目的で本研究を進めている。

マウス背部に直径 6mm の創傷を与えた。その治癒の過程において早期から I 型、III 型、V 型各種コラーゲンの発現が上昇することが in-situ hybridization により確認された。面白いことに、胎児期の一部結合組織にしか発現しない、 $\alpha 3(V)$ という新規 V 型コラーゲン分子が創傷部に一過性のみ発現することが見いだされた。主たるコラーゲン発現の責任細胞は真皮線維芽細胞ではなく、線維芽細胞様に見られない細胞が創傷部に多数動員され、線維芽細胞に変化する事が観察された。これらは筋上皮膜もしくは新生血管より動員されるものと考えられた。電子顕微鏡による観察で、これらの細胞から新たに生成してきたコラーゲン線維と、真皮のコラーゲン線維では形態的な相違がみられた。 $\alpha 3(V)$ コラーゲンは、この新たに発生した線維芽細胞に対し、強い細胞接着活性を有しており、新生肉芽組織の形成に関わっていると考えられる。我々は本分子が線維化のステップを示すマーカーとして使える可能性を検討している。

Collagen production excess caused tissue fibrosis. The collagen gene regulation study are important for understanding of collagen production mechanism. We have just tried the establishment of model for fibrogenesis step use mouse skin wound healing.

ICR mouse were anesthetized and made wound (6mm diameter) on the dorsal skin. Checked expression of Type I, Type III and Type V collagen in each time point of wounded skin, used in-situ hybridization. All kinds of collagen up-regulated since after 4days. More strongly expressed in connective tissues in superficial fascia of muscle, under subcutaneous, than dermal region. Interestingly we found, the new kind of collagen $\alpha 3(V)$ were expressed in one point at 4days - 6days after wound tissue. Responsible for fibrogenesis in scar formation were looks like, contained cell of superficial fascia of muscle in connective tissues, not dermal fibroblast. These cells were migrated rapidly in wound area and transformed fibroblast like cell. Formed new collagen fiber in the scar were different of shapes at dermal collagen fiber in electron microscopy. These cells derived in superficial fascia local fibroblast and circulating fibrocytes both. And local one were expressed $\alpha 3(V)$ collagen one part of term. The $\alpha 3(V)$ collagen N-terminal region we observed cell adhesion activity for fibroblasts. We think this collagen has a role of formed granulation tissue in step of fibrogenesis in wound healing, and has a possibility one of maker for step fibrogenesis model.

★A31 創傷治癒過程における TGF- β 活性の細胞外マトリックスによる制御機構

Extracellular regulation of TGF- β in wound healing process

○水野 晃治¹ 米田 雅彦² 輪 千 浩史¹ 瀬山 義幸¹ 藤井 聡³ 磯貝 善蔵⁴

Koji Mizuno¹, Masahiko Yoneda², Hiroshi Wachi¹, Yoshiyuki Seyama¹, Satoshi Fujii³, and Zenzo Isogai⁴

¹星薬科大学 薬学部

²愛知県立看護大学

³名古屋市立大学薬学部

⁴国立長寿医療センター

¹Hoshi university school of pharmacy

²Aichi Prefectural College of Nursing and Health

³Department of Molecular and Cellular Pathobiology and Therapeutics, Nagoya City University Graduate School of Pharmaceutical Sciences

⁴Department of Advanced Medicine, National Center for Geriatrics and Gerontology, Obu, Aichi, Japan

TGF- β は、創傷治癒を促進する強力な増殖因子であり、通常そのプロペプチドである latency associated protein (LAP) との複合体を形成して潜在型として分泌される。さらに LAP は、latent transforming growth factor β (LTBP) とジスルフィド結合し、複合体を形成し、結合組織中に貯蔵されている。TGF- β は LTBP-1 を介して fibrillin-1 と結合するので、マイクロファイブリルは fibrillin-1 と LTBP の相互作用を介して TGF- β 活性を制御している。褥瘡などの創傷治癒過程においてはマトリックスの分解と合成がダイナミックに行われるが、その TGF- β 活性制御機構は不明である。そこで創傷治癒過程での LTBP-1 を介した TGF- β の活性制御機構を検討した。動物細胞で発現させた LTBP-1 を用いて fibrillin-1 結合部位とモノクローナル抗体のエピトープを同定した。正常真皮に貯蔵された TGF- β /LTBP-1 複合体はプラスミンの消化によって fibrillin-1 分子全体の分解を伴わずにマイクロファイブリルから遊離した。その LTBP-1 断片は TGF- β 結合ドメインと fibrillin-1 との結合部位を含み TGF- β は LAP と共有結合していた。さらに褥瘡の肉芽組織の表面マトリックス解析においても正常皮膚のプラスミン消化断片と同じ LTBP-1 断片が検出された。さらに創面からプラスミン活性も認めた。正常真皮においては fibrillin-1 と LTBP-1 の共存が観察されるが、肉芽組織中では LTBP-1 の分布は減少し、線維パターンを失っていた。

創傷治癒において、結合組織に LTBP-1 を介して貯蔵された TGF- β は細胞外マトリックスの分解によって調節され、活性化されることが示唆された。

Transforming growth factor β (TGF- β) is a potent growth factor that contributes to wound healing. TGF- β is usually secreted as a latent form complexed with its propeptide, latency-associated peptide (LAP). LAP covalently binds to latent TGF- β binding protein (LTBP) forming large latent complex. LTBP-1 further interacts with fibrillin-1. Then, fibrillin sequesters TGF- β within connective tissue microfibrils through LTBP-1. However, it is not clear whether cutaneous microfibrils can regulate TGF- β activity in dynamic physiological process such as wound healing. Therefore, we aimed to elucidate extracellular regulation of TGF- β by LTBP-1 during wound healing.

A smaller recombinant LTBP-1 polypeptide spanning the third 8 cysteine domain and the following calcium binding EGF-like domain was expressed and demonstrated to bind to fibrillin-1. Monoclonal antibodies were characterized by new recombinant polypeptides of LTBP-1. Plasmin treatment on skin tissues released LTBP-1 fragment containing LAP and fibrillin-1 binding region. LTBP-1 in microfibrils was released by plasmin in a dose dependent manner without entire degradation of fibrillin-1.

In chronic skin ulcer, LTBP-1 fragment was detected from wound surface and the fragment featuring similar characteristics to that generated by plasmin treatment. Enzymatic activity of plasmin was also detected from wound surface. Organized colocalization of LTBP-1 with fibrillin-1 was observed in normal dermis. However, distribution of LTBP-1 in granulation tissue was decreased and exhibited non-fibrous pattern, indicating dissociation of LTBP-1 from fibrillin-microfibrils may be necessary for wound healing process. These results indicate that proteolytic release of LTBP-1 from connective tissue is physiological and pivotal in regulating wound healing.

****A32 健康人および全身性強皮症ヒト線維芽細胞における CTGF サイレンシングの細胞外マトリックスへの効果**

○石渕 裕久¹ 安部 正敏¹ 石川 治¹

¹群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学

The effect of CTGF silencing on extracellular matrix metabolism of human dermal fibroblasts obtained from normal individuals and SSc patients

Hirohisa Ishibuchi¹, Masatoshi Abe¹, and Osamu Ishikawa¹

¹Department of dermatology, Gunma university graduate school of medicine

ヒト線維芽細胞に CTGF 特異的 siRNA を導入し、144 時間後の CTGF のサイレンシングをウェスタンブロット法で確認した。次に、健康人および全身性強皮症由来の線維芽細胞に siRNA を導入し、TGF- β 刺激 6,12,24,48 時間後の細胞上清中の I 型コラーゲン、MMP-1 産生量をウェスタンブロット法で経時的に比較検討した。健康人では I 型コラーゲン、MMP-1 とともに CTGF のサイレンシングに伴い産生が減少していた。強皮症では、I 型コラーゲンは健康人と同様の変化だったが、MMP-1 は産生が亢進していた。また、CTGF サイレンシングを行った線維芽細胞を TGF- β で刺激し 12 および 24 時間後、その上清中の I 型コラーゲン、MMP-1、-2、-9、TIMP-1 産生量を ELISA 法により測定した。その結果、健康人での I 型コラーゲン産生は、TGF- β 刺激 12 時間後で siRNA で Mock に比べ有意に低下していた。Real-time PCR による mRNA 発現の検討では、CTGF サイレンシングにより健康人の MMP-1 mRNA 量は低下したが、強皮症では逆に増加し、Mock と有意な差があった。以上より、cell line 化されていない真皮線維芽細胞においても siRNA を用いた CTGF サイレンシング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 MMP-1 の産生量は、蛋白レベル、遺伝子レベルで強皮症でより産生が増加していた。siRNA の投与方法に関して解決すべき問題は残るものの、この結果は強皮症に対する RNAi 法の治療応用を想定する上で、きわめて整合性のある結果と考えた。

Systemic sclerosis (SSc) is characterized by sclerotic fibrosis in the skin and internal organs. Although the pathogenesis of SSc is still unknown, a fascinating hypothesis has been proposed, in which transforming growth factor- β (TGF- β) stimulates fibroblast first and connective tissue growth factor (CTGF) maintains tissue fibrosis. Given the fact that CTGF is involved in the fibrosis of scleroderma, the suppression of CTGF expression may provide us with approach for treatment of SSc. Skin fibroblasts obtained from normal individuals and SSc patients were cultured *in vitro* and transfected with CTGF-specific siRNA. Western blot analysis demonstrated that siRNA could suppress the synthesis of CTGF. Then, the effect of CTGF-specific siRNA on the expression and production of alpha 1 type 1 collagen (COL1A1), matrix metalloproteinase (MMP)-1,-2,-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 were quantified by Western blot analysis, ELISA and real-time PCR. The production and expression of COL1A1 were reduced by CTGF-specific siRNA in both normal and SSc fibroblasts. The production and expression of MMP-1 were reduced by RNAi in normal fibroblasts, however, those were increased by RNAi in SSc fibroblasts. There were not significant changes in the production and expression of other ECM in normal and SSc fibroblasts. Our findings suggest that CTGF RNAi can be a novel therapeutic strategy for fibrosis in SSc.

A33 褥瘡創面におけるバーシカンの状態とその意味：マイクロファイブリルとヒアルロン酸をめぐる水のマトリクス

○村澤 裕介¹ 折居 千賀¹ 米田 雅彦² 渡辺 研¹ 篠村 多摩之³ 木全 弘治⁴ 磯貝 善蔵¹

¹国立長寿医療センター 先端医療部

²愛知県立看護大学

³東京医科歯科大学

⁴愛知医科大学

褥瘡は高齢者医療の重要な問題であるが、その創の多様性のために予防や治療の選択が難しかった。褥瘡の外用治療は創の水分をコントロールすることから、創面の肉芽組織の水和性は臨床的に治療の選択に重要である。ヒアルロン酸に富むマトリックスは肉芽組織の水分を保つとともに、創の修復に関与していることが示されてきた。我々は創面肉芽組織のヒアルロン酸と主要なヒアルロン酸結合分子であるバーシカン・PG-M に注目して、褥瘡の多様な病態を解析した。

免疫組織学的にはバーシカンはびまん性に肉芽組織に分布した。一方、正常真皮ではバーシカン、ヒアルロン酸はマイクロファイブリルネットワークに分布した。創表面の解析ではバーシカンのヒアルロン酸結合ドメインを含んだ断片が検出できた。この断片はバーシカンのコンドロイチン硫酸結合ドメインのアルファ鎖を含むものが主要であり、正常皮膚ではベータ鎖を含むものが主であることと異なっていた。興味深いことに、バーシカンの断片化していない単量体は創面から検出できなかった。さらに、我々は同一創面の特定の部位からバーシカン断片が検出できることを発見し、その臨床像と重ね合わせることに成功した。これらの方法によって創表面の細胞外マトリックスが創の臨床所見とどのように関連するかが、より理解しやすくなった。

このように創表面の細胞外マトリックス解析は褥瘡のような多様な疾患の病態解析とともに、マトリックス分子の機能、特に分子会合や分解に関する情報を得るのにも有用である。

Function of versican/PG-M in granulation tissues

Yusuke Murasawa¹, Chika Orii¹, Masahiko Yoneda², Ken Watanabe¹, Tamayuki Shinomura³, Koji Kimata⁴, and Zenzo Isogai¹

¹Department of Advanced Medicine, National Center for Geriatrics and Gerontology, Obu, Aichi, Japan

²Aichi Prefectural College of Nursing & Health

³Tokyo Medical & Dental University

⁴Aichi Medical University

Pressure ulcer is an important issue in geriatric medicine, however, heterogeneity of the wound makes its prevention and treatment difficult. Hydration of granulation tissue is critical for the clinical choice of treatment, since topical therapy affect on the hydration of the granulation tissues. Hyaluronan (HA) rich matrix is an important factor not only to keep granulation tissue hydrated, but also regulate remodeling process of wound. Therefore, by focusing the HA-rich matrix, consisted of HA and major HA binding component, versican/PG-M, we aimed to elucidate the heterogenous pathogenesis of the pressure ulcer.

Immunohistochemical analyses showed that versican and HA were diffusely accumulated in the granulation tissue, while they were co-distributed at microfibril in normal dermal tissue. Wound surface protein analyses showed the presence of versican fragment containing the HABR. The HABR of versican from wound surface contained mainly CS-alpha chain, not CS-beta chain showing the difference from that of normal skin. Interestingly, intact versican monomer was not detected from the surface. Furthermore, we found the wound surface versican was detected in specific sites within the wound. Combined data from the immunoblotting analyses and the clinical findings gave new insight for matrix/clinical correlation in the wound.

From these results, analyses of wound surface ECM provide useful information for the pathogenesis of pressure ulcer and functions of each ECM molecule, especially assembly and degradation.

***A34 皮膚創傷におけるバーシカン発現：ケロイド
発生病理との関連**

**Up-regulation of versican during cutaneous wound
healing: implication for keloid pathogenesis**

○荒木 絵里¹ 内藤 素子² 宮地 良樹¹ 宇谷 厚志¹

Eri Araki¹, Motoko Naitoh², Yoshiki Miyachi¹, and Atsushi Utani¹

¹京都大学 医学部 皮膚科

¹Department of Dermatology, Kyoto University School of Medicine

²京都大学 医学部 形成外科

²Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Kyoto University School of Medicine

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。昨年の本学会でケロイド組織の免疫組織染色でバーシカン沈着が増加していること、また培養ケロイド細胞においてもバーシカン遺伝子の発現が増強していることを発表した。今回我々は、正常の皮膚創傷治癒過程におけるバーシカン発現の変化を調べた。C57BL マウスの背部に作成した皮膚創傷ではバーシカン発現が経時的に増加し、創傷作成後5日目にピークに達したのち減少することがわかった。このバーシカンを発現する細胞を同定しその運命をトレースするために versican promoter-Cre/Rosa26 トランスジェニックマウスを作成した。Versican 発現細胞は創傷作成後5日目まで創傷部位において経時的に増数したあと減少し、14日以内に消失した。この結果から、ケロイドにおける過剰な ECM 産生には、この創傷部位に出現するバーシカン発現細胞が消失せずに生存を続け、異常増殖することが関与しているのではないかと考えた。

次に RT-PCR とルシフェラーゼアッセイにて皮膚線維芽細胞およびケロイド細胞におけるバーシカンの遺伝子発現調節に関わる因子を調べた。Wnt, β カテニン, TGF- β , androgen, IL-1 β , PI3K 等のうち、後者2つのシグナル伝達経路が関与している可能性が示唆された。ケロイドの *in vivo* モデル作成の試みとして、コラーゲンスポンジにヒト培養ケロイド細胞を播種したものをヌードマウスの皮下に移植し、4週間後に取り出した。ケロイド細胞を播種した方が正常皮膚線維芽細胞のものより有意に重量が大きく、ケロイドの動物モデルとして有用と考えられた。今後はこのモデルを使用し、*in vitro* でバーシカン発現を抑制する薬剤を *in vivo* で検討する予定である。

Keloids are a refractory disease characterized by excessive deposition of extracellular matrices. We previously reported that keloid lesions contained large amount of chondroitin sulfate proteoglycan versican. In this study, we examined versican expression in normal skin wound healing process using C57BL mice. Immunohistochemistry showed that versican transiently upregulated and reached the maximum at 5 days post-wounding and thereafter decreased. To trace the destination of versican-expressing cells in skin wounds, we generated transgenic mice expressing versican promoter-Cre recombinase/rosa26. The number of LacZ positive cells in the wounds reached the maximum at 5 days post-wounding, thereafter decreased and disappeared within 14 days. Based on these observations, we hypothesized that excessive ECM deposition of human keloids is developed by persistent survival and proliferation of these versican-expressing cells.

Next, versican gene regulation was analyzed by RT-PCR and versican-promoter luciferase assay, which demonstrated two-fold higher transcription level in cultured keloid cells. Screening of Wnt, β catenin, TGF- β , androgen, IL-1 β and PI3K showed that the latter two signals were involved in versican expression.

Establishment of keloid model is required for development of keloid therapy. To this end, we implanted cultured keloid cells with collagen sponge scaffolds in nude mice. Collagen sponges with keloid cells deposited versican and weighed significantly heavier than normal fibroblasts sponges after 4 weeks. Utilization of this model may support the development of novel keloid treatment by testing cytokine or reagents, which had been identified to be effective for down-regulation of versican in *in vitro* assays.

***A35 アディポネクチンはヒト皮膚線維芽細胞のヒアルロン酸合成を促進する**

○赤澤 裕見子¹ 佐用 哲也¹ 杉山 義宣¹ 井上 紳太郎¹

¹株式会社カネボウ化粧品 基盤技術研究所

Adiponectin upregulates hyaluronan synthesis in cultured human dermal fibroblasts

Yumiko Akazawa¹, Tetsuya Sayo¹, Yoshinori Sugiyama¹, and Shintaro Inoue¹

¹Kanebo cosmetics Inc. Basic Research Laboratory

【目的】脂肪組織は余剰エネルギーを脂肪に変換し貯蔵するだけでなく、アディポカインを分泌して様々な組織の代謝に影響を与えていることが明らかにされつつある。近年、脂肪組織が特異的に分泌するアディポネクチンが、エネルギー代謝だけでなく細胞外マトリックス代謝に関与することが報告されている。そこで今回、アディポネクチンが皮膚由来細胞のヒアルロン酸 (HA) 合成に及ぼす影響について検討した。

【方法】正常ヒト皮膚線維芽細胞および正常ヒト表皮細胞にアディポネクチンを 1~10 μ g/ml の濃度で添加し、培養上清中に分泌される HA を HA binding protein を用いた sandwich 法により定量した。また、アディポネクチン受容体 (ADIPOR1, ADIPOR2) および HA 合成酵素 (HAS) の遺伝子発現を RT-PCR 法により解析した。

【結果および考察】皮膚線維芽細胞における *ADIPOR1*, *ADIPOR2* mRNA の発現が確認できた。そこでアディポネクチンの HA 合成に対する影響を検討したところ、アディポネクチンは皮膚線維芽細胞の HA 合成を濃度依存的に促進し、その効果は添加 8 時間後より認められた。また、アディポネクチン刺激により *HAS2* mRNA の発現量が増加した。一方、表皮細胞では *ADIPOR1*, *ADIPOR2* mRNA の発現は検出されたが、アディポネクチンによる HA 合成促進作用は認められなかった。このことから、アディポネクチンは *HAS2* mRNA の発現を介して、皮膚線維芽細胞の HA 合成を促進すると考えられた。脂肪組織由来のアディポネクチンは真皮マトリックス代謝においても重要な役割を担う可能性がある。

Adipose tissue is a hormonally active tissue producing adipokines, which influence activity of other tissues. Adiponectin, an adipocyte-specific adipokine involved in systemic metabolism, is reported to affect the metabolism of the extracellular matrix. In this study, we investigated the effect of adiponectin on hyaluronan (HA) synthesis in cultured human skin cells.

RT-PCR analyses showed that mRNA expression of adiponectin receptors (*ADIPOR1*, *ADIPOR2*) was expressed in cultured human dermal fibroblasts. Addition of adiponectin at 1 – 10 μ g/ml to the fibroblast cultures increased HA synthesis dose-dependently. The effect of adiponectin was detected at 8 hours and reached maximal at 24 hours after the addition. Furthermore, hyaluronan synthase 2 (*HAS2*) mRNA expression was up-regulated by adiponectin. In cultured keratinocytes, both mRNA expression of adiponectin receptors was detected, but adiponectin had no effect on HA synthesis. These results suggest that adiponectin controls HA synthesis via expression of *HAS2* mRNA in dermal fibroblasts. Adipose tissue-derived adiponectin may play an important role in dermal matrix metabolism.

*A36 繊維芽細胞株における UVB 感受性の違い

Different response to UVB in human foreskin fibroblasts

○田中 啓友¹ 桐山 智美¹ 小倉 孝之¹ 高橋 哲也² 服部 俊治¹ 入江 伸吉¹

Keisuke Tanaka¹, Tomomi Kiriya¹, Takayuki Ogura¹, Tetsuya Takahashi², Shunji Hattori¹, and Shinkichi Irie¹

¹株式会社ニッポ バイオマトリックス研究所

¹Nippi Research Institute of Biomatrix

²島根大学 教育学部

²Faculty of Education, Shimane University

近年のオゾン層破壊により、地表に到達する紫外線量、特に UVB 量が増えており、人体への影響が懸念されている。UVB はその大半が表皮層で吸収されるが、約 10% は真皮層まで届くことが知られている。本研究では、UVB により誘導されることが知られているコラゲナーゼ (MMP-1) を指標とし、二種類の繊維芽細胞株の UVB に対する感受性、および細胞死との関係を調べた。

繊維芽細胞 (Human Foreskin Fibroblast: HFF-11 および HFF-14) を播種し血清含有培地 (10%FBS/DMEM) でコンフルエントになるまで培養した。PBS (+) で洗浄後、少量の PBS (+) を添加し、UVB (302nm) を 2.5~20mJ/cm² のエネルギー量で照射した。照射後、無血清培地 (DMEM) に置換して 2 日間培養し、細胞層と培地を回収した。細胞層は DNA の定量に用い、培地はコラゲナーゼ測定およびザイモグラフィに用いた。

HFF-14 では 2.5~10mJ/cm² の範囲でエネルギー量依存的に MMP-1, 72k ゼラチナーゼ (MMP-2) およびストロメライシン (MMP-3) が誘導されたが、HFF-11 ではこれらの MMP が誘導されなかった。20mJ/cm² のエネルギー量ではどちらの細胞株も MMP-1 を分泌せず、約 5 割が細胞死を引き起こした。インターロイキン-1 β (IL-1 β) を添加した MMP-1 誘導実験においても HFF-11 では MMP-1 はほとんど誘導されなかった。

今回用いた繊維芽細胞株では UVB による MMP-1 の誘導が異なることが明らかとなった。IL-1 β 添加実験により、これらの細胞株では IL-1 β に対する感受性に差があることが示唆された。さらには、HFF-11 では IL-1 β の産生が減少している可能性も考えられ、反応性および産生能の低下のために MMP-1 が誘導される前に細胞死が起きたと考えられる。

Due to substantial damage to the ozone layer, an increased amount of ultraviolet (UV) radiation, especially UVB, is reaching the ground in recent years. UV radiation causes many acute and chronic detrimental cutaneous effects. UVB is less penetrating than UVA, but approximately 10% of UVB is known to reach the upper layer of dermis. Here, we investigate the sensitivity of primary fibroblast cell lines to UVB irradiation.

As MMP-1 is known to be an indicator protein of UVB response, we examined the effect of UVB on induction of MMP-1. Human foreskin fibroblasts (HFF-11 and HFF-14) were irradiated at 2.5~20 mJ/cm² and cultured in the fresh medium for 2 days. After incubation, cultured medium were collected and analyzed. HFF-14 induced MMP-1 production in proportion to UV-B dose (2.5~10 mJ/cm²). Similar effects were observed in MMP-2 and MMP-3 production. As contrasted, HFF-11 was not found to secrete MMP-1 at the same doses. At 20 mJ/cm², these cell lines didn't secrete MMP-1 and underwent UV-induced cell death. Furthermore, the difference in the sensitivity to IL-1 β , known as an inducer of MMP-1, was observed between two cell lines, and the induction of MMP-1 didn't occur in HFF-11 by IL-1 β as well as UVB irradiation.

Our study elucidated that HFF-14 was more sensitive than HFF-11 to UVB irradiation on MMP-1 induction, and suggested that MMP-1 production may be affected by the susceptibility to IL-1 β . Furthermore, in case of HFF-11, UV-induced cell death might occur before MMP-1 induction due to the low secretion of IL-1 β .

***A37 偏光分解SHGイメージングによる真皮コラーゲンの光老化の解析**

○小倉 有紀¹ 桑原 智裕¹ 松永 由紀子¹ 高橋 由² 安井 武史² 荒木 勉²

¹株式会社資生堂 ライフサイエンス研究センター

²大阪大学大学院 基礎工学研究科 機能創成専攻

Observation of photo-aged dermal collagen fibers using polarization-resolved second-harmonic-generation microscopy

Yuki Ogura¹, Tomohiro Kuwahara¹, Yukiko Matsunaga¹, Yu Takahashi², Takeshi Yasui², and Tsutomu Araki²

¹Life Science Research Center, SHISEIDO Co., Ltd.

²Graduate School of Engineering Science, Osaka university

【目的】紫外線は加齢皮膚におけるシワ形成の最も大きな要因である。露光部皮膚における真皮コラーゲン線維構造の変化は古くから報告されており、皮膚の力学的特性が変化することによってシワが形成されると考えられている。従来、真皮コラーゲン線維構造の解析は染色法や電子顕微鏡を用いて行われてきた。これらの方法はいずれも皮膚生検を必要としており、非侵襲で計測することは不可能であった。

近年、非侵襲でコラーゲン線維構造を計測できる技術として、SHG 光（第2高調波発生光）が注目されている。これは、フェムト秒オーダーの超短パルス光を生体組織に照射すると、コラーゲン分子の非線形光学特性によって照射した半波長の光が発生することを応用した技術である。本研究では SHG 光の偏光依存性に着目し、シワとコラーゲン配向の関連を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】SHG 光の発生効率は入射レーザー偏光とコラーゲン配向の関係に依存する。両者が平行な場合は強い SHG 光が発生し、両者が直交すると SHG 光はほとんど発生しない。この偏光依存性に着目し、光老化マウスとコントロールマウスの皮膚を *ex vivo* において偏光分解 SHG イメージングを行った。その結果、光老化皮膚ではシワの走行方向に沿って顕著な SHG 異方性を示し、コラーゲン配向とシワ走行方向との関連性を示す結果を得た。

【考察と結論】以上の結果より、シワの形成とコラーゲン配向の変化が関連していることが示唆された。本研究により、偏光分解 SHG イメージングが、光老化の評価に有用なツールであることが明らかとなった。

It is thought that ultraviolet light irradiation is the major cause of wrinkles in skin. Degenerative alterations of collagen fiber structure have been reported in photo-damaged skin. Since dermal collagen fiber structure plays an important role in determining the morphology and function of skin, there is a need in skin cosmetics for an optical probe method that can reveal the structure and/or orientation of dermal collagen fibers *in situ*.

In this work, we used second-harmonic-generation (SHG) imaging, a recently introduced nonlinear optical microscopy technique, for selective visualization of collagen fibers with high spatial resolution, noninvasive character, deep penetration, and no staining. When an ultrashort pulse of light is incident on collagen-rich tissues such as dermis, SHG light with half the wavelength of the incident light is observed as a result of the nonlinear optical properties of the collagen molecule. We also used polarization methods. The efficiency of SHG light generation is sensitive to collagen bundle direction when the incident light is polarized, and hence SHG anisotropy indicates the collagen orientation in tissue.

We analyzed the SHG anisotropy of photo-aged mouse skin and control mouse skin. We found a correlation between collagen fiber orientation and the direction of skin wrinkles in the photo-aged skin, i.e. collagen fiber orientation is parallel to the direction of skin wrinkles.

Our results indicate that changes of collagen orientation may be involved in the formation of wrinkles. SHG anisotropy imaging appears to be a useful modality for noninvasive evaluation of the degree of photo-aging of skin.

***A38 新しい軟骨基質結合ペプチドを用いた関節軟骨 *in vivo* 蛍光イメージング法の開発**

○大橋 俊孝¹ 稲川 喜一¹ 西田 圭一郎¹ 美名口 順¹ ヤイ Kursat Oguz Yaykasli¹ 二宮 善文¹

¹岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科

【目的】変形性関節症などの軟骨破壊を伴う関節疾患の画像診断の多くは X 線検査による軟骨裂隙の狭小化を指標により行われているが、軟骨基質のイメージング法・定量化法はまだ確立されていない。今回我々は軟骨基質に特異的に結合するペプチド（CSBP）を発見し、このペプチドの関節軟骨 *in vivo* イメージングへの有用性を検討した。

【方法】蛍光（Rhodamine）ラベル CSBP を健常なマウス膝関節腔へ投与し、軟骨基質特異性などについて、凍結切片（粘着フィルムを用いた非脱灰硬組織凍結切片作製法：ライカ、川本法）により検討を行った。さらに、抗コラーゲン抗体（CIA）惹起関節炎モデルマウスの膝関節にローダミンラベル-CSBP を反応させ、本ペプチドの染色性について OPT（Optical Projection Tomography）法を用いて蛍光 3D 像を構築して調べた。現在、近赤外蛍光色素 ATTO655 ラベル CSBP を用い、*in vivo* 蛍光イメージング装置（eXplore Optix, GE）により軟骨イメージングの定量性を評価中である。

【結果】関節軟骨基質に特異的な CSBP の結合シグナルが観察された。軟骨のコンドロイチン硫酸マトリックスの減少と蛍光シグナルの減少が相関していた。

【結論】本研究に使用した CSBP は近赤外領域の蛍光物質で標識することにより、*in vivo* イメージングを利用した軟骨基質定量法などに応用が可能となる要素技術である。リウマチや変形性関節症などのモデルの病態解析にも応用が可能と考えられる。

Development of a new quantitative *in vivo* imaging method of articular hyaline cartilage using a cartilage-specific binding peptide

Toshitaka Oohashi¹, Kiichi Inagawa¹, Keiichiro Nishida¹, Jun Minaguchi¹, Kursat Oguz Yaykasli¹, and Yoshifumi Ninomiya¹

¹Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences

【Objective】The common X-ray can detect the loss of joint cartilage indirectly, i.e. narrowing of the joint space between adjacent bones, and bone spur formation. We found a peptide which can specifically bind on cartilage pericellular matrix and are going to develop a new method to quantitate the cartilage mass and facilitate its use for the treatment of OA or RA patients.

【Methods】A fluorescent-labeled CSBP (Cartilage specific binding peptide) was injected intra-articular to the knee joint of C57/B6 mouse. The specimens were fixed and embedded in 4% CMC compound after snap-freezing. The cryosections were prepared according to the Kawamoto's method (<http://www.leica-microsystems.com/>). Fluorescent images were captured with a DP71 digital camera followed by quantification with ImageJ. For three-dimensional imaging, specimens of knee joints labeled with Rhodamine-CSBP were scanned by OPT (Optical Imaging Tomography) 3001. Analysis and visualization of OPT data was performed with Amira package. *In vivo* imaging analysis was conducted by eXplore Optix (GE Healthcare) using near-infrared fluorescence (Atto655)-labeled CSBP.

【Results】The fluorescent signals were specifically detected at the cartilage pericellular matrix, which could be decreased in accordance with the loss of its matrix in CIA model mice. 3D reconstructions of CSBP-labeled cartilage matrix scanned by OPT could reveal the damaged arthritic articular surface in high-resolution.

【Conclusion】Our results demonstrate that the quantitative optical imaging with CSBP may provide novel prognostic indicators for clinical evaluation of articular hyaline cartilage and its response to therapy.

***A39 Bio-rapid prototyping project: Scaffold freeによる細胞立体構造体の3Dマイクロパターンニング**

○中山 功一¹ 下戸 健² 上菌 理恵² 松田 秀一¹ 三浦裕正¹ 岩本 幸英¹

¹九州大学 医学部 整形外科

²JST イノベーションプラザ福岡

近年、細胞・成長因子/遺伝子・Scaffoldの3つの組み合わせにより *in vitro* で、立体構造体を形成する試みがすでになされている。しかし、生体と同等の複雑なマイクロパターンを有した細胞構造体を *ex vivo* だけで形成する方法はほとんど開発されていない。我々は数年前から、細胞だけで立体構造体を作成する方法を開発しており、一昨年の本学会で家兎の骨軟骨欠損モデルに対し、自家間葉系幹細胞だけからなる直径4.6ミリ高さ5ミリ程度の細胞プラグを移植し、良好な軟骨と骨の再生が得られたことを報告した。今回、この手法をさらに発展させ、任意のXYZの位置に複数種の細胞を配置した細胞構造体を形成させる新たな手法を開発した。*IN VITRO*において細胞構造体の大型化には血管網と同等の内部への栄養供給を付与する必要があるが、本手法では構造体内に任意の間隙を付与することも可能であるため、内部への培養液の交換は可能であると思われる。現在は、顕微鏡下での手作業で作成するため、5ミリ四方形程度の立方体しか形成できず、内部も単純なパターンにしか細胞を配置できない。しかし、ロボットや微細加工の技術などを集約することにより、より大型で微細なパターンをもつ細胞構造体を Scaffold free で形成できると期待でき、実質臓器の再生や創薬支援に応用できると考えられる。

Bio-rapid prototyping project: A simple method to build living 3D micro patterned cell construct *ex vivo* without scaffold

Koichi Nakayama¹, Takeshi Shimoto², Rie Kamizono², Shuichi Matsuda¹, Hiromasa Miura¹, and Yukihide Iwamoto¹

¹Orthopaedic surgery, Kyushu university

²JST INNOVATION PLAZA Fukuoka

One of the major goal in regenerative medicine or tissue engineering must be build living tissue/organ *in vitro* from patients own cells for autologous transplantation. Combinations of cells, gene/growth factors, and biomaterials are widely recognized as essential keys for tissue engineering. Yet, in clinical side, the risk of unexpected effect is always concerned from these biomaterials, growth factors, or genes. Obviously it will be better to reduce such risk for patients. We've previously reported the development of scaffold free cell delivery system, and showed good healing of rabbit osteochondral defect by implantation of mesenchymal stem cells (MSCs) without use of exogenous factors until one year. In this study, we will report our new method to build larger scaffold free constructs. With this method, we can position various types of cells at desired XYZ position under appropriate condition in the cell construct. Until now, the construct are build by our hands under microscope, it takes much hours to build only 5mm cubic shaped cell only construct. The inner patterns are simple shape. Near future combination of the robotic technology and bio technology, we may able to build living tissue or organ for autologous transplantation. And the multi cell construct maybe useful research tools for drug development.

***A40 *Tenomodulin* 遺伝子の腱・靱帯特異的な転写制御領域の解析**

○西崎 有利子¹ 杉本 由紀¹ 開 祐司¹ 宿南 知佐¹

¹京都大学再生医科学研究所 生体分子設計学分野

強靱結合組織は、I 型コラーゲン線維が緻密に規則正しく走行し、血管網に乏しい特徴を有する。典型的な強靱結合組織である腱・靱帯は、骨格と筋肉、骨格と骨格とを結合し、運動機能の発現に不可欠の役割を果たしているが、その形成機構はほとんど明らかにされていない。我々は、軟骨由来血管新生抑制因子 *chondromodulin*-I の機能ドメインに相同性を有する II 型膜貫通蛋白質 *tenomodulin* (*TeM*) が、腱、靱帯を含む強靱結合組織に特異的に発現することを報告してきた。今回、腱・靱帯形成の分子機構の一端を明らかにすることを目指して、マウス *TeM* 遺伝子の組織特異的な発現制御を担う転写制御領域について解析を行った。マウス *TeM* 遺伝子は X 染色体 E3 領域に存在し、14 kb にわたる 7 つの exon から構成されていた。CapSite Hunting 法によって、*TeM* 遺伝子の転写開始点は、翻訳開始点の上流-58 bp と-84 bp に同定され、-115 bp には TATA box が存在していた。そこで、転写開始点を含むゲノム領域について、*hsp68* 最小プロモーターを持つ *LacZ* レポーターカセットを用いてエンハンサー活性の検定を行った。まず、*TeM* 遺伝子の転写開始点上流-11 kb から+3 kb を含むゲノム DNA を *LacZ* レポーターカセットに導入し、そのトランスジェニックマウス胚を作成した。その結果、胎生 13~15 日目の腱・靱帯原基において特異的な *LacZ* レポーターの発現が検出された。次に、この領域を約 1kb に細分化したゲノム DNA 断片を *Luciferase* レポーター遺伝子の上流に導入し、*in vitro* で転写活性を検定した。ラットの四肢の腱から分離した腱細胞、線維芽細胞株 NIH3T3 及び前駆軟骨細胞株 ATDC5 において解析した結果、*TeM* を発現している腱細胞でのみ活性が見られる領域が複数同定された。

Characterization of tendon and ligament specific enhancer of the mouse *tenomodulin* gene

Yuriko Nishizaki¹, Yuki Sugimoto¹, Yuji Hiraki¹, and Chisa Shukunami¹

¹Department of Cellular Differentiation, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

Tendons and ligaments are the hypovascular dense connective tissue that is mainly composed of regularly aligned thick type I collagen fibers. Tendons physically connect muscles to skeletal structures to act as a mechanical transmitter. Ligaments link bones together and maintain them at their correct anatomical positions during movement. For understanding of the molecular mechanism of tendon/ligament formation, we analyzed the transcriptional regulation of the mouse *tenomodulin* (*TeM*) gene that is predominantly expressed in tendons and ligaments. Using the CapSite Hunting method, we identified two transcriptional start sites of the mouse *TeM* gene at positions -58 bp and -84 bp upstream of the translational start site. A putative TATA box was found at position -115 bp. We then tested the enhancer activity of the mouse *TeM* genomic fragment extending from -11kb to +3kb in transgenic mouse embryos by using a *LacZ* reporter cassette with the *hsp68* minimal promoter. This genomic fragment showed an activity to drive the tendon/ligament specific expression *in vivo*. To identify the regions responsible for the enhancer activity, the 14 kb genomic region was cut into a series of ~1 kb DNA fragments to construct of *luciferase* reporters and tested them in *TeM*-expressing (tenocytes) and nonexpressing cells (fibroblastic NIH3T3 and chondrogenic ATDC5 cells). We found that several specific fragments could drive the specific activation of the reporter gene in tenocytes, but not in NIH3T3 and ATDC5 cells.

***A41 サイトカイン TNF- α による軟骨基質蛋白 Cd-rap 転写制御機序**

○今村 寿宏¹ 宮原 寿明¹ 寺田 和正¹ Linda J. Sadel³
岩本 幸英²

¹ 国立病院機構 九州医療センター整形外科

² 九州大学整形外科

³ ワシントン大学整形外科

背景 慢性関節リウマチの関節破壊機序に TNF- α , IL-1 β 等のサイトカインが関与し, 様々な転写因子発現が誘導される. 軟骨における重要な転写因子間ネットワークは未知の部分が残されている. 今回我々は軟骨基質蛋白のひとつである Cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein (以下 Cd-rap) のプロモーターを用いて TNF- α による Cd-rap promoter down-regulation に新しい C/EBP 結合部位が関与していることを解明した.

方法および結果 Cd-rap promoter construct を用いた Co-transfection Assay で新しい C/EBP 結合部位 (position -1059~-1046) を見出した. 新しい C/EBP は TNF- α による Cd-rap down-regulation に関与している事が分かった. また, その C/EBP 結合部位の塩基配列を変異させることで C/EBP 結合阻害すると Sox9, CBP/p300 による Cd-rap 転写活性がより効率良く上昇することが分かった.

考察 軟骨基質蛋白 Cd-rap の発現調節には正 (Sox9) と負 (C/EBP) の転写因子のバランスが重要であり, co-regulator (CBP/p300) がその転写調節に重要であることが示唆された

A Novel TNF- α responsive C/EBP site regulates cartilage Cd-rap expression

Toshihiro Imamura¹, Hisaaki Miyahara¹, Kazumasa Terada¹, Linda J. Sadel³, and Yukihide Iwamoto²

¹ National Hospital Organization, Dept. of Orthopaedic Surgery, Kyushu Medical Center

² Dept. of Orthopaedic Surgery, Kyushu Univ.

³ Dept. of Orthopaedic Surgery, Washington University

Objective. Inflammatory processes in RA are primarily regulated by the cytokines Tumor Necrosis Factor (TNF)- α and Interleukin-1 (IL-1) β . The aim of this study was to investigate novel, TNF- α -mediated mechanisms that regulate the expression of Cd-rap.

Methods. Rat chondrosarcoma (RCS) cells were transiently transfected with cDNA constructs encoding Cd-rap in the presence of TNF- α . Results. We identified a new C/EBP binding site in the Cd-rap promoter (position -1059 to -1046). Binding of C/EBP to this site was regulated by TNF- α , but not IL-1 β , resulting in down-regulation of Cd-rap expression. In addition, the activation potential of Sox9 and CBP/p300 on the Cd-rap promoter was enhanced after mutation of the new C/EBP binding site, indicating that blockage of this site would increase transcription.

Conclusion. TNF- α regulates the expression and/or DNA binding potential of key positive and negative-acting transcription factors that control the expression of the cartilage matrix gene, Cd-rap.

*A42 内軟骨性骨化における Smad7 の作用の解析

○岩井 貴男¹ 村井 純子¹ 吉川 秀樹¹ 妻木 範行²

¹大阪大学 医学部 整形外科

²大阪大学 医学部 骨軟骨形成制御学

Smad7 inhibits chondrocyte differentiation at multiple steps during endochondral bone formation

Takao Iwai¹, Junko Murai¹, Hideki Yoshikawa¹, and Noriyuki Tsumaki²

¹Department of Orthopaedic Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine

²Department of Bone and Cartilage Biology, Osaka University Graduate School of Medicine

骨形成因子 (BMP) は内軟骨性骨化の各段階で重要な役割を果たす。培養細胞において Smad7 は TGF β , BMP のシグナルを抑制することが知られているが、生体での軟骨形成における Smad7 の機能は明らかではない。今回我々は軟骨発生の各段階における Smad7 の役割を調べるために、Cre/loxP システムを用いて軟骨分化の異なる段階から Smad7 を過剰発現するコンディショナルトランスジェニックマウスを作製した。Coll1a2-LacZ^{flox} – Smad7 マウスを作製し、3 種類の Cre マウスと交配してそれぞれ Smad7^{Px1}, Smad7^{11Enh}, Smad7^{11Prom} コンディショナルトランスジェニックマウスを得た。Smad7^{Px1} マウスでは間葉系細胞凝集のステージから Smad7 が過剰発現し、Sox9 の発現を抑制し、四肢軟骨が著しく低形成であった。Smad7^{11Enh} マウスでは静止軟骨細胞層から Smad7 が過剰発現し、軟骨細胞の増殖が低下した。Smad7^{11Prom} マウスでは増殖軟骨細胞層から Smad7 が過剰発現し、軟骨細胞肥大化の遅延が認められた。次にマウス肢芽間葉系細胞を調整し、BMP2 存在下で micromass 培養を行ったところ Smad7 を過剰発現させた場合や、MAP キナーゼの阻害剤を加えた場合に軟骨様結節の形成が抑制されたが、Smad6 を過剰発現させた場合は抑制されなかった。また、Smad7 の過剰発現により MAP キナーゼ経路の下流の ATF2 のリン酸化が抑制されたが、Smad6 の過剰発現では抑制されなかった。以上の結果から、Smad7 は内軟骨性骨化の種々の段階で作用し、間葉系凝集の段階では BMP によって誘導された MAP kinase 経路を抑制することで、軟骨細胞への分化を抑制していると考えた。

In vitro evidence suggests that Smad7, a potent inhibitor of bone morphogenetic proteins (BMPs) and transforming growth factor- β signaling pathways, is involved in cartilage formation and homeostasis. Here, we describe a conditional transgenic mouse system for expressing Smad7 that we developed to identify *in vivo* roles for these pathways in chondrocytes at different stages of differentiation. Smad7 overexpression in prechondrogenic cells disturbed mesenchymal condensation associated with decreased Sox9 expression, leading to poor cartilage formation. Smad7 overexpression in round chondrocytes resulted in decreased proliferation rates. Smad7 overexpression in flat chondrocytes led to inhibition of maturation toward hypertrophy. Micromass culture of mesenchymal cells showed that BMP-induced cartilaginous nodule formation was inhibited by overexpression of Smad7 or by addition of MAP kinase inhibitors but not by overexpression of Smad6. The expression of Smad7, but not Smad6, downregulated the phosphorylation of ATF2, a downstream target of MAP kinase pathways. Our data provide *in vivo* evidence for the distinct roles of Smad7 during chondrocyte differentiation and suggest that Smad7 in prechondrogenic cells inhibits chondrocytic differentiation by downregulating BMP-activated MAP kinase pathways.

***A43 人工関節周囲組織 PLFs の軟骨分化（特にマクロファージ産生の非蛋白成分に注目して）**

○小坂 泰一¹ 山本 謙吾

¹東京医科大学整形外科

The role of PGE2 from macrophage in the potentiality of PLFs for mesenchymal cell differentiation into chondrogenesis with focusing on EP4 receptor .

Kosaka Taiichi¹, and Yamamoto Kengo

¹Department of Orthopedic Surgery, Tokyo Medical University

【目的】

マクロファージから産生される非蛋白成分の、人工関節周囲組織内（以下 PLFs）の役割を検討した。

【方法】

マクロファージから産生される炎症性サイトカインのヒト未分化間葉系細胞への影響を極力抑えるため RAW マウスマクロファージより抽出した上清を用いた。RAW マウスマクロファージ 6 時間培養した後上清中の PGE2 等の非蛋白成分を ELISA にて測定した。免疫染色にて PGE2 の受容体の一つである EP4 を PLFs 組織で検討した。

PLFs 培養系に上清を添加し 12 時間後 totalRNA を採取、蒸留水のみを添加したものをコントロールとして DNA アレイを行い realtimePCR でこれらの結果を確認した。

【結果】

培養 6 時間目の PGE2 濃度は直後に比較し有意に上昇した。EP4 は PLFs において顕著に染色された。DNA アレイでは COL11A1, FGF18, Angiopoietin like 4, CBFA2 等が upregulate し, MCP1, IL6, IL8 などケモカインを中心とした多くの炎症性サイトカインが downregulate した。realtimePCR でもこれらの結果は確認された。

【考察と結論】

RAW マウスマクロファージより抽出した上清を用いた場合、マウスサイトカインのヒト組織への感受性はきわめて低いため、結果的に非蛋白成分の効果が顕著に現れたと考える。上清は炎症性サイトカインを抑え、かつ COL11A1, FGF18, CBFA2 等の軟骨化促進遺伝子を活性化させたと推察する。PGE2 が受容体の一つである EP4 を介して NF κ B に作用した可能性が推察された。今後は PGE2 以外の非蛋白成分の解析が必要があると考ええる。

【Objective】

We discuss the role of non cytokine factors from macrophage in the potentiality of PLFs for mesenchymal cell differentiation into chondrogenesis with focusing on EP4 receptor.

【Methods】

1. We examined expression of EP4 in PLFs by immunohistochemistry
2. Detection of PGE2 in SN from RAW macrophage by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
3. Analysis of RNA expression in PLFs with GeneChip array.
4. Confirmation using realtime PCR

【Results】

1. EP4 is abundantly expressed in tissue sections from PLFs.
2. There was significantly much PGE2 in SN in comparison with control.
3. With the DNA array, COL11A1, FGF18, Angiopoietin like 4, CBFA2 were upregulated, and much inflammatory cytokine mainly on the chemokine such as MCP1, IL6, IL8 downregulated.
4. These results of DNA array were confirmed in real-time PCR.

【Conclusion】

This artificial low influence condition from RAW is similar to the condition from human macrophage, in which almost proinflammatory cytokine genes were knock down. Under a low influence of cytokines, other unknown factors in supernatants might facilitate on EP4 function and suppress the NF κ B activation in PLFs.

***A44 線維芽細胞増殖因子 (FGF)-2 の軟骨破壊における役割**

○澤地 恭昇¹ Tonia Vincent¹ Shi-Lu Chia¹ Jeremy Saklatvala¹

¹ ケネディーリュウマチ研究所, インペリアル大学

【目的】線維芽細胞増殖因子 (FGF)-2 は、関節軟骨細胞近傍に多く存在する増殖因子である。軟骨破壊で観察される、軟骨主要細胞外基質アグリカンの分解に対する FGF-2 の影響を検討した。

【方法】Interleukin (IL)-1 により誘導される軟骨破壊に対する FGF-2 の影響を、ヒト関節軟骨培養系を用いて検討した。アグリカン分解酵素 (ADAMTS-4 および-5) 依存的に切断されるアグリカン断片を、neo-epitope 抗体を用いてウェスタンブロット法により検討した。ADAMTS-4 および-5 遺伝子発現は定量的 PCR 法により検討した。Matrix metalloproteinase (MMP)-1, -3 および-13, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 および-3 の産生はウェスタンブロット法, IL-6 および-8 の産生は ELISA 法により検討した。プロテオグリカン産生は放射線ラベルされた硫酸塩の取り込みを指標に検討した。さらにマウス変形性関節症モデルにおける FGF-2 の影響を、FGF-2 欠損マウスと野生型マウスを用いて比較検討した。

【成績】ヒト軟骨細胞において IL-1 は、ADAMTS-4 および-5 遺伝子発現増加を伴い、アグリカン分解酵素依存的アグリカン断片の遊離を惹起し、これらは FGF-2 添加により抑制された。外因性 TIMP-1 および TIMP-3 は、IL-1 により誘導されたアグリカン分解を抑制したが、FGF-2 は IL-1 存在下、TIMP の産生に影響を及ぼさなかった。IL-1 によるプロテオグリカン産生抑制、MMP-1, -3, -13 および IL-6, -8 産生誘導に FGF-2 は影響を及ぼさなかった。マウス変形性関節症モデルで観察される軟骨破壊は、野生型マウスにくらべ FGF-2 欠損マウスにおいて有意に促進され、FGF-2 の皮下投与により遅延された。

【結論】FGF-2 はアグリカン分解酵素の発現を抑制し、ヒト軟骨破壊を抑制することが示唆される。さらに FGF-2 欠損マウスの軟骨破壊が促進されたことから、FGF-2 が *in vivo* においても軟骨破壊抑制に重要な役割を担っていると推察される。

Chondroprotective role of fibroblast growth factor-2

Yasunobu Sawaji¹, Tonia Vincent¹, Shi-Lu Chia¹, and Jeremy Saklatvala¹

¹ Kennedy Institute of Rheumatology, Imperial College London

【Objective】Articular chondrocytes are surrounded by an extracellular pool of fibroblast growth factor (FGF)-2. The possible role of FGF-2 in aggrecan catabolism by aggrecanase was investigated.

【Methods】Aggrecan catabolism was induced by interleukin (IL)-1 in normal human articular cartilage and assessed by measuring the release of aggrecanase-dependent fragments by Western blotting with neo-epitope antibodies. The ADAMTS-4 and -5 mRNA expression was measured by quantitative real-time PCR. Matrix metalloproteinase (MMP)-1, -3 and -13 and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 and -3 production was measured by Western blotting. IL-6 and -8 were measured by ELISA. Proteoglycan synthesis was monitored by radio labelled sulphate incorporation. Progression of osteoarthritis (OA) in FGF-2 knock out (KO) mouse was compared with wild type mouse.

【Results】IL-1 caused cleavage of aggrecan in human cartilage explants, with release of neo-epitopes and induction of ADAMTS-4 and -5 mRNA expression. These were inhibited by FGF-2. IL-1-induced aggrecan breakdown was inhibited by exogenous TIMP-1 or TIMP-3, although FGF-2 did not affect production of endogenous TIMPs when IL-1 was present. FGF-2 did not prevent IL-1 suppression of proteoglycan synthesis nor its ability to stimulate the production of IL-6, IL-8, MMP-1, -3 and -13. FGF-2 KO mouse exhibited accelerated OA and this was delayed by subcutaneous FGF-2 if administered prior to OA induction.

【Conclusion】Our findings suggest that FGF-2 may play a chondroprotective role in human articular cartilage by controlling the expression of the aggrecanases. Furthermore the acceleration of OA in FGF-2 KO mice indicates the importance of FGF-2 in cartilage degradation *in vivo*.

A45 軟骨細胞特異的に TIMP3 および変異体 TIMP3 を発現させたトランスジェニックマウスでの関節破壊阻害

○中村 博幸¹ Phuong A. Vo² Ngee Han Lim¹ ke Liu³
Dominic J Wells³ George Bou-Gharios² Hideaki Nagase¹

¹Kennedy Institute of Rheumatology, Imperial College London

²Department of Medicine Faculty of Medicine, Imperial College of London

³Department of Neuroscience, Imperial College of London

関節症においてアグリカンの分解は重要なステップである。最近ではアグリカン分解活性をもつ ADAMTSs (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) が関節破壊に重要であると報告されている。近年私たちは TIMP3 (tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3) が ADAMTS-4 と 5 を阻害することを見出し、今回さらに、変異体 TIMP3 ([1A]TIMP-3) を作製し同様に ADAMTS-4 と 5 を阻害することを確認した。しかし、この変異体は本来 TIMP-3 がもつ MMP (Matrix Metalloproteinase) に対する阻害活性を持っていなかった。そこで、関節症での MMP および ADAMTS-4, 5 の役割を明らかにするために、II 型コラーゲンプロモーターを用いて TIMP-3 と変異体 TIMP-3 が軟骨細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスをそれぞれ作製しその関節破壊阻害効果を関節症モデルマウスで観察した。Beta-galactosidase を用いてトランスジーンを発現を胎児 (E15.5) で確認したところ、軟骨細胞特異的に発現が観察された。さらに関節症モデルマウスにおいて手術後 2 週間ですでに発現が観察された。このマウスの関節を手術後 8 週間で観察したところ、変異体 TIMP-3 発現マウスは関節破壊を阻害していた。一方 TIMP-3 発現マウスの阻害効果は変異体 TIMP-3 発現マウスと比較して弱かった。これらの結果から関節破壊阻害にはアグリカナーゼの阻害が重要であり、いくつかの MMP を阻害するのは関節症の治療において有用ではない可能性が示唆された。変異体 TIMP-3 はそのアグリカナーゼに対する高い特異性から新しい関節症の治療を考える上で有用であると考えられる。

Aggrecanase-selective TIMP-3 variant protects cartilage from destruction in a mouse osteoarthritis model

HiroYuki Nakamura¹, Phuong A. Vo², Ngee Han Lim¹, ke Liu³,
Dominic J Wells³, George Bou-Gharios², and Hideaki Nagase¹

¹Kennedy Institute of Rheumatology, Imperial College London

²Department of Medicine Faculty of Medicine, Imperial College of London

³Department of Neuroscience, Imperial College of London

The aggrecan proteoglycan of articular cartilage is primary target of osteoarthritic cartilage degradation. Recent studies using gene deletion mouse models have suggested that ADAMTS-5 might be a key aggrecanase involved in cartilage destruction. We previously reported that TIMP-3 inhibits ADAMTS-4 and -5 and also blocks aggrecan degradation in cultured articular cartilage stimulated with interleukin 1. We have characterized that TIMP-3 variant that has an extra Ala at the N-terminus ([1A]TIMP-3) inhibits aggrecanases, but not MMPs. To investigate whether TIMP-3 or [1A]TIMP-3 effectively block cartilage breakdown in osteoarthritis (OA), we have generated transgenic mice that overexpress TIMP-3 or [1A]TIMP-3 together with beta-galactosidase which are driven by type II collagen promoter. These mice of 10 weeks old were then challenged for OA by transecting meniscotibial ligament and the histological changes of their joints 8 weeks after surgery were analyzed. The expression of a surrogate marker for TIMP-3 expression, beta-galactosidase, was detected at the side of cartilage injured 2 weeks after surgery. OA lesions were observed in the knee cartilage of the wild-type animals 8 weeks after surgery. The knee cartilage of [1A]TIMP-3 transgenic mice was protected from destruction whereas the knee cartilage from TIMP-3 transgenic mice were only weakly protected. Transgenic mice expression higher levels of TIMP-3 failed to protect cartilage. These results suggest that selective inhibition of aggrecanase is crucial as a therapeutic intervention to protect cartilage from degradation.

★A46 マウス成長軟骨における ADAMTS-9 発現の検討

○熊岸 加苗¹ 西田 圭一郎¹ 百田 龍輔¹ 山合 友一朗²
広畑 聡³ Kadir Demircan³ 内藤 一郎¹ 二宮 善文³ 大塚 愛二¹

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 口腔機能解剖学

³岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 分子医化学

【目的】本研究では正常マウスの成長軟骨において、新規アグリカナーゼ ADAMTS-9 の発現を蛋白および mRNA レベルで検討した。

【方法】0 週, 7 週, 14 週齢雄 ICR マウス脛骨近位骨幹端のパラフィン切片において、まずマウス ADAMTS-9 の cDNA を用いて、DIG ラベルしたプローブを作成し、in situ hybridization により mRNA 発現の検討を行った。抗 ADAMTS-9 抗体を用いて免疫染色を行い、成長軟骨における ADAMTS-9 の蛋白局在を検討した。さらに、collagen X, PCNA の蛋白局在との比較を行い、内軟骨性骨化のどの段階における ADAMTS-9 の局在が強いのかを検討した。

【結果】マウス脛骨の成長軟骨において、ADAMTS-9 は成熟軟骨細胞層で一部陽性、肥大軟骨細胞においては、mRNA および蛋白レベルで強く発現していることが判明した。しかし、増殖軟骨細胞層や、骨芽細胞、破骨細胞、未分化間葉系細胞では陰性だった。

【考察】近年同定された新しいアグリカン分解酵素（アグリカナーゼ）である ADAMTS-9 の生体での役割はほとんど分かっていない。本研究結果から、成長軟骨における軟骨分化過程において、軟骨細胞が肥大化する際に、周辺のマトリックスを分解する手段の一つとして ADAMTS-9 が関与する可能性があると考えられた。

ADAMTS9 expression in growth plate cartilage of mice

Kanae Kumagishi¹, Keiichiro Nishida¹, Ryusuke Momota¹, Yuichiro Yamaai², Satoshi Hirohata³, Kadir Demircan³, Ichiro Naito¹, Yoshifumi Ninomiya³, and Aiji Ohstuka¹

¹Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences Department of Human Morphology

²Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences Department of Oral Function and Anatomy

³Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences Department of Molecular Biology and Biochemistry

Recently, ADAMTS-9 was identified as a new aggrecanase though its role has not been elucidated yet. We investigated the location and expression of ADAMTS-9 in the growth plate of long bones. We used male ICR mice of age 0, 7 and 14 weeks. Paraffin sections were set up from proximal metaphyses of their tibiae. We made DIG labeled ADAMTS-9 RNA probe to examine the distribution of mRNA by in situ hybridization. Immunohistochemistry was applied to identify the location of ADAMTS-9. The expression of ADAMTS-9 was compared to those of collagen X and PCNA to evaluate the stage of the growth plate.

In the growth plate, we observed strong expression of ADAMTS-9 in hypertrophic region but weak in mature chondrocytes. Proliferative chondrocytes, undifferentiated mesenchymal cells, osteoclasts and osteoblasts showed no expression of ADAMTS-9.

From these results, we presume that ADAMTS-9 may be involved in chondrocyte hypertrophic process by digesting extracellular matrix around the chondrocytes.

***A47 RECK 分子はヒト変形性関節症軟骨に発現し
軟骨細胞の cloning に関わる**

○木村 徳宏¹ 岡田 保典¹

¹慶應義塾大学医学部病理学教室

**Expression and function of RECK in human
osteoarthritic articular cartilage**

Tokuhiro Kimura¹, and Yasunori Okada¹

¹Department of Pathology, Keio University School of Medicine

【目的】RECK (Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) 分子は近年発見された GPI アンカー型タンパク質で、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 活性を阻害する新規のインヒビターと考えられている (Cell 107:789-800, 2001). RECK と血管新生との関係についての研究はみられるが、関節軟骨での発現や機能についてはほとんどわかっていない. 本研究では、ヒト変形性関節症 (OA) 関節軟骨における RECK の発現と軟骨細胞での機能解析を行った.

【方法】正常およびヒト OA 関節軟骨組織における RECK 発現を、定量 PCR 法と免疫組織化学により検討した. また、OA 関節軟骨から単離した培養軟骨細胞における RECK の発現と局在を Western blot 法と共焦点レーザー顕微鏡で調べるとともに、siRNA を導入し RECK 発現抑制による解析実験を行った.

【結果】OA 軟骨では正常軟骨に比べ有意に RECK 発現が亢進していた. OA 軟骨組織中では RECK は主として増殖性の軟骨細胞 (cloning chondrocytes) に発現しており、RECK 陽性率は cloning の程度と正の相関を示した. 単層培養した OA 軟骨細胞においても RECK 発現を認め、細胞表面での局在が示された. また、siRNA を用いて RECK 発現を抑制すると、軟骨細胞の増殖と focal adhesion 形成が抑制された.

【結論】以上のデータは、OA 軟骨の再生性変化である軟骨細胞の cloning に RECK が関与することを示唆しており、細胞表面における細胞-細胞外マトリックス相互作用を介した機序が推定される.

Objective. Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein which inhibits the activity of matrix metalloproteinases. The aim of this study was to investigate the expression and function of RECK in human osteoarthritic articular cartilage.

Methods. Expression of RECK in normal and osteoarthritic human articular cartilage was examined by quantitative PCR and immunohistochemistry. RECK expression and localization were also studied in primary cultured chondrocytes from human osteoarthritic cartilage by Western blotting and confocal microscopy. Down-regulation experiment was performed using small interfering RNA (siRNA) targeting RECK.

Results. The expression level of RECK mRNA was significantly higher in osteoarthritic cartilage than that in normal cartilage. By immunohistochemistry, RECK was expressed mainly in cloning chondrocytes, i.e. clustered chondrocytes showing proliferative activity in response to tissue damage. Morphometrical analysis revealed a direct correlation between RECK immunopositivity and degree of chondrocyte cloning. RECK was also expressed by cultured osteoarthritic chondrocytes, and immunolocalized to the cell surfaces. siRNA experiments showed that down-regulation of RECK in osteoarthritic chondrocytes results in inhibition of proliferation and focal adhesion formation.

Conclusion. These data suggest a potential role of RECK in chondrocyte cloning in osteoarthritic cartilage. Its mechanism might be via cell-extracellular matrix interaction at the cell surfaces.

A48 ヒト関節軟骨における inter-alpha-trypsin inhibitor

Biochemical analysis of inter-alpha-trypsin inhibitor in healthy and osteoarthritic human cartilage

○吉原 愛雄¹ Anna Plaas² 根本 孝一¹ John D Sandy³

Yasuo Yoshihara¹, Anna Plaas², Koichi Nemoto¹, and John D Sandy³

¹防衛医科大学校 医学部 整形外科

²ラッシュ大学医療センター 生化学講座

³ラッシュ大学医療センター 生化学講座

¹Department of Orthopaedic Surgery, National Defense Medical College

²Department of Biochemistry, and Department of Internal Medicine (Rheumatology), Rush University Medical Center

³Department of biochemistry, and Department of Orthopaedic Surgery, Rush University Medical Center

【目的】inter-alpha-trypsin inhibitor (I-alpha-I) は、血中のプロテアーゼインヒビターの一つであり、2種の蛋白(HC2およびHC2)がコンドロイチン硫酸(CS)鎖を介してインヒビター活性を有するビクニンに結合する。近年、HC1およびHC2がヒアルロン酸(HA)結合蛋白の一つであることが明らかにされ、HAの豊富な組織中では血中I-alpha-IからHAに移行しHC-HA (SHAP-HA)複合体を形成することが報告されたが、軟骨内の動態については明らかにされていない。今回、我々は、ヒト軟骨におけるI-alpha-Iの生化学的検討を行った。

【方法】変形性関節症および健常の軟骨から蛋白を抽出し、Western blotによる解析を行った。あわせて、同軟骨片を用いた免疫組織学的検討も行った。

【結果】変形性関節症軟骨では、250, 130, 40kDaのビクニンが検出され、それぞれI-alpha-I, CS鎖を介するHC1またはHC2との複合体、CS鎖-ビクニン複合体、と考えられた。健常軟骨では痕跡程度のビクニンが検出されたのみであった。一方、軟骨中のHC1およびHC2は、変形性関節症および健常軟骨ともに、その多くは50kDaの切断型として存在することがコンドロイチナーゼ処理により明らかになった。この切断型は、ビクニンが検出されない分画でも認められたため、bikunin以外のCS-プロテオグリカンと結合していることが示唆された。免疫組織染色では、これらコンポーネントは軟骨細胞内および周囲に局在することが確認された。

【結論】本検討により、軟骨内には得異的な形態でI-alpha-Iコンポーネントが存在しており、これらは血中I-alpha-Iからの移行ではなく、炎症に関連して軟骨細胞から産生されていることが示唆された。これら分子は、関節炎の診断、治療における新しい指標になりうると考えられた。

Inter-alpha-trypsin inhibitor (I-alpha-I) is one of many circulating proteinase inhibitors synthesized by hepatocytes. This inhibitor is typically composed of two heavy chains (HC1 and HC2) linked to the single chondroitin sulfate chain of the serine proteinase inhibitor, bikunin. Recently it was reported that the interaction of I-alpha-I with hyaluronan-rich tissue can result in transfer of the HCs from circulating I-alpha-I to hyaluronan and the formation of HA-HC complexes as SHAP-HA. In the present study we examined the abundance and structure of the HC1, HC2 and bikunin species in healthy and OA human cartilages.

Free bikunin proteoglycan and bikunin proteoglycan complexed with HC1, HC2 or both were abundant in OA cartilage, however we could detect only a trace of this complexed form of bikunin in extracts of healthy cartilages. On the other hand, HC1 and HC2 were abundant in both OA and healthy cartilage, largely in a novel truncated 50 kDa form, apparently esterified to the chondroitin sulfate chain of a proteoglycan (PG) other than bikunin. Immunohistochemistry of human cartilages showed intracellular and cell-associated staining for bikunin and both HCs consistent with their synthesis and secretion by chondrocytes.

Our data suggest that the I-alpha-I components in human cartilage are not primarily derived from the circulation but are synthesized by chondrocytes in a specifically truncated form. The analysis of the HCs and bikunin in osteoarthritic cartilages provides novel tools for diagnostic and therapeutic approaches.

A49 コラーゲン 3 重らせん上に存在するタンパク質結合配列の探索

Search of protein binding sequences in the collagen triple helix

○小杉 日登美¹ 浅田 真一¹ 北川 幸己¹ 小出 隆規²

Hitomi Kosugi¹, Shinichi Asada¹, Kouki Kitagawa¹, and Takaki Koide²

¹新潟薬科大学 薬学部 薬品製造学

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences

²早稲田大学 先進理工学部 化学・生命化学科

²Department of Chemistry and Biochemistry, School of Advanced Science and Engineering, Waseda University

【目的】コラーゲンは細胞外マトリックスの主成分で、多様な生物活性を示す多機能タンパクである。コラーゲンの生物活性の多くは、特異な 3 重らせん構造に提示されたアミノ酸配列と、コラーゲン結合タンパク質との相互作用によって惹起される。コラーゲン結合タンパク質には、血管新生阻害活性を有する pigment epithelium-derived factor (PEDF)、分子シャペロン HSP47、血液凝固に重要な von Willebrand factor (VWF)、glycoprotein VI (GPVI) などがある。本研究は、これらのタンパク質が結合するコラーゲン 3 重らせん上のアミノ酸配列を、システムティックに探索するためのスクリーニング法の構築を目的とする。

【方法・結果】コラーゲンの *in vitro* での線維化は、生理的バッファー中でのゲル化に伴う濁度の増加により容易に測定できる。ここであらかじめコラーゲン結合タンパク質を添加しておくと、タンパク質のコラーゲンへの結合により、ゲル化が阻害される。さらに、この系にコラーゲン結合タンパク質の阻害剤を共存させると、タンパク質によるゲル化阻害がキャンセルされる。我々は、この現象が様々なコラーゲン結合タンパク質に共通の性質であることを見出し、この性質を利用したマイクロプレートフォーマット上での比色アッセイ系を確立した。この系を用いて、HSP47、PEDF、その他数種のコラーゲン結合タンパク質に対する阻害物質の探索・評価を行った。我々が別のアプローチにより同定した HSP47 に結合するペプチドは、本アッセイ系においても効果的に HSP47 のコラーゲン結合活性を阻害した。一方、HSP47 の特異的阻害剤として報告されている小分子化合物(Thomson et al. *J. Med. Chem.*2005) の再評価を行ったが、その阻害活性は認められなかった。

Collagen is the major component of the extracellular matrix (ECM), and is a multifunctional protein that exhibits diverse biological activities. These functions are elicited by the interactions between dozens of collagen-binding proteins (CBPs) and the specific sequences displayed on the collagen triple-helix. CBPs include soluble factors, cell surface collagen receptors and other ECM proteins. Here, we have developed a convenient system to identify CBP-binding sequences in the collagen triple helix.

Our system is based on the colorimetric measurement of collagen fibril-formation in physiological buffers. We have found that various CBPs inhibit the fibril-formation process *in vitro*, and utilized phenomenon to develop a high-throughput system to search the compounds that compete the CBP-collagen interactions. In this paper we will show results of our trials to identify the responsible collagen sequences for some CBPs, i.e., Hsp47, pigment epithelium-derived factors, glycoprotein VI etc. In addition, using this system, we reevaluated the activity of small molecule inhibitors of Hsp47 (Thomson et al. *J. Med. Chem.*2005), and they did not show any detectable activities.

****A50 I 型コラーゲン自己会合体の癌細胞増殖抑制効果**

○佐々木 純¹ 藤崎 ひとみ¹ 安達 栄治郎² 服部 俊治¹
入江 伸吉¹

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 医療系研究科 分子形態科学

Cancer cell status on type I collagen fibrils—life or death matter

Jun Sasaki¹, Hitomi Fujisaki¹, Eijiro Adachi², Shunji Hattori¹, and Shinkichi Irie¹

¹Nippi Research Institute of Biomatrix

²Kitasato Univ.

【背景】現在、I 型コラーゲン自己会合体(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、I 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、MTT アッセイ法を用いた増殖測定では、コラーゲン分子上で培養したヒト大腸上皮癌細胞 Caco-2 細胞は増殖するが、コラーゲン線維上では増殖抑制効果が見られた。

【目的】コラーゲン線維上で惹起された増殖抑制の原因として、細胞周期の停止による細胞の休止状態に起因するものか、あるいは細胞増殖と細胞死が同時に起こる動的平衡状態による可能性が考えられることから、増殖抑制についてより詳細に検討する。

【方法】I 型コラーゲン分子上とコラーゲン線維上の Caco-2 細胞について、BrdU を取り込ませ、細胞周期 S 期の細胞の割合を比較した。また、コラーゲン線維上の細胞の挙動をタイムラプスを用いたライブセルイメージングで観察した。さらに走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察を行った。

【結果・考察】BrdU 取り込み実験では、コラーゲン線維上においても S 期の細胞が 8% 見られた。コラーゲン分子上の S 期の割合 16% と比較すると、その割合は低いながら線維上でも細胞周期が進行していることが明らかになった。さらに、ライブセルイメージングでは、コラーゲン線維上で 2 日間培養した細胞において、細胞分裂および細胞死 (細胞破裂による) の両者が観察された。また、SEM 観察ではコラーゲン線維上で培養した細胞の周辺に細胞断片と思われるものが観察されたことから、コラーゲン線維上では細胞増殖と細胞死が同時に起こる可能性が強く示唆された。今後、この現象が経時変化に伴って、細胞の生と死のどちらかに収束するか否かを検討し、I 型コラーゲン自己会合体の癌細胞に対する作用を解明していく。

Type I collagen is known as one of the typical substratum for cell culture. With this purpose, collagen is used in a form of monomer (non-fibrous collagen) or a form of polymer (fibrils). Three-dimensional cell culture model using collagen fibrils have been developed to mimic natural interactions between cells and extracellular matrices. Cells on non-fibrous collagen are able to spread and proliferate well. On the other hand, collagen fibrils show different features for cell behaviors. Our previous study indicated that human colonic cancer cell line (Caco-2) did not proliferate on type I collagen fibrils, as though cells on non-fibrous collagen were grown well.

To further elucidate the inhibitory effects of type I collagen fibrils on cancer cell proliferation, we compared the BrdU incorporation into nuclei of cells on non-fibrous collagen with that on collagen fibrils. As a result, we found that incorporation of BrdU into nuclei occurred on both substrates, but the incorporating rate decreased significantly in cells on collagen fibrils (8.1%) compared with cells on non-fibrous collagen (16.0%). Next, we observed cells on collagen fibrils by using scanning electron microscopy. In case of cultured cells on collagen fibrils, cells exhibited round shape and cell fragments were also observed. Further, we observed the cells on collagen fibrils using time-lapse microscopy. Interestingly, cancer cell proliferation and cell-death occurred at the same time on collagen fibrils. These data suggested that repression of cell growth on collagen fibrils is in dynamic equilibrium between cell proliferation and cell death.

***A51 ショウジョウバエ XV/XVIII 型コラーゲン, ICBM, は中枢神経で発現している**

Drosophila type XV/XVIII collagen, ICBM, is expressed in the central nervous system

○百田 龍輔¹ 内藤 一郎² 二宮 善文³ 大塚 愛二¹

Ryusuke Momota¹, Ichiro Naito², Yoshifumi Ninomiya³, and Aiji Ohtsuka¹

¹岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 人体構成学

²新見公立短期大学

³岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 分子医化学

¹Human Morphology, Okayama Graduate School of Medicine

²Niimi College

³Molecular Biology and Biochemistry, Okayama Graduate School of Medicine

昨年の本会において、ショウジョウバエにもコラーゲン 3 本らせん構造とエンドスタチン領域を含む XV/XVIII 型コラーゲン様の分子が存在し、その遺伝子変異により胚あるいは幼虫期での致死、運動異常、脂肪組織の微細構造の変化などが引き起こされることを報告した。

今回我々は、こうした異常が起こる機構を明らかにするため、ICBM の発現の詳細な解析を行った。

第 3 期幼虫より RNA を抽出し RT-PCR を行ったところ、異なる 2 つのプロモーターから 2 種類の転写産物が作られることがわかった。それぞれに対する特異的な DIG 標識 RNA プローブを作成し胚の whole mount *in situ* hybridization を行った。その結果、2 種の転写産物の分布に大きな差異は認められず、いずれも幅広く分布し特に中枢神経に蓄積していることがわかった。さらに、大腸菌で GST 融合組換え体タンパク質を作成し、マウスに免疫し抗血清を作成した。これを用いて胚における ICBM タンパク質の分布を調べたところ、ICBM 転写産物と同様、少ないながらも幅広く分布し、特に中枢神経に強い蓄積が認められた。

以上のことから、ICBM は基底膜に幅広く分布し、初期の胚発生において神経系の形成に重要な役割を担っているのではないかと考えられる。

The loss of function effects caused by insertions of transposon in the gene *icbm*, fly homologue of collagen type XV/XVIII, are lethality during embryonic and larval stage and abnormal locomotion. To clarify the mechanism of such defects, we have further investigated the expression patterns of ICBM transcripts and proteins.

We isolated total RNA from third instar larvae to perform RT-PCR. We found that *icbm* transcripts were generated from two promoters. We generated specific DIG labeled riboprobes to each transcript to perform whole mount *in situ* hybridization of embryos. We observed similar pattern of their localization. Both of them were ubiquitously expressed and prominently in the central nervous system. Furthermore, we injected ICBM-GST fusion protein into mice. We used the resulting antiserum for staining embryos to find that the protein was accumulated in the central nervous system.

Thus, ICBM is widely distributed in basement membrane and may play some important roles during the formation of the central nervous system.

A52 マウス皮膚における細胞外マトリックス遺伝子発現の成長に伴う変化

Changes in extracellular matrix gene expression during murine postnatal skin development

○工藤 千香子¹ 新井 浩司¹ 西山 敏夫¹

Chikako Kudo¹, Koji Arai¹, and Toshio Nishiyama¹

¹東京農工大学 農学部附属 硬蛋白質利用研究施設

¹Scleroprotein Research Institute, Tokyo University of Agriculture and Technology

【目的】皮膚では出生後成長に伴い厚さや弾力性など概観や物理的性状に大きな変化が生じる。線維性コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスは皮膚の主要な構成要素であり、その組成は皮膚の性状に影響を与える主要な因子であると考えられる。成長に伴う皮膚細胞外マトリックス含有量の変化を測定した報告はヒトの研究で散見されるが、成長に伴う細胞外マトリックス mRNA 発現量の詳細な変化は不明である。そこで本研究では、出生直後から成熟までのマウス皮膚における細胞外マトリックス mRNA の発現変化を検討した。

【方法】生後 0, 5, 10, 15, 30 および 60 日の雄マウスの背部皮膚を検体とした。採取した皮膚から総 RNA を抽出し、ジゴキシゲニン標識プローブを用いたリボヌクレアーゼプロテクションアッセイで I (Col1a1, Col1a2), III (Col3a1), IV (Col4a1, Col4a2), V 型 (Col5a1, Col5a2) コラーゲンの各 α 鎖およびフィブロネクチン mRNA を検出した。

【結果】I 型の mRNA は生後 15 日までほぼ一定のレベルで推移した後、30 日齢で一過性の増加を示し、個体が成熟に達する 60 日齢には増加前のレベルまで減少した。III 型の mRNA は出生後 10 日までに急激に発現が減少したが、30 日齢で一過性の増加を示し、60 日齢には再び減少した。一方、V 型の mRNA は生後 10 日までに急激に発現が減少し、その後 60 日齢までほぼ一定のレベルで推移した。I 型 mRNA に対する III 型および V 型 mRNA の発現比率は生後 10 日まで急速に低下し、その後も徐々に減少した。IV 型の mRNA は 5 日齢以降成長に伴い減少した。フィブロネクチン mRNA は有意な発現変化を示さなかった。

【考察】成長に伴う I, III, IV, V 型 mRNA の発現変化が認められたこと、また、I 型に対する III 型および V 型の発現比率が成長に伴い減少することなどから、これらの mRNA の発現変化が成長に伴う皮膚の性状変化に関与している可能性が示唆された。

The features of the skin, such as thickness and elasticity, change during postnatal development. Extracellular matrix is a major component of the skin and its composition affects the skin features. Although age-associated changes in extracellular matrix contents in the human skin were examined by a number of studies, information about the developmental changes in extracellular matrix gene expression is quite limited. Therefore, we examined the expression of types I, III, IV, and V collagen and fibronectin mRNAs in the mouse back skin from the neonatal stage to adulthood (60 days of age) by RNase protection assays using digoxigenin-labelled RNA probes. Expression of type I collagen mRNAs was almost constant but increased temporarily at 30 days of age. Expression of type III collagen mRNA decreased quickly during the first 10 postnatal days, increased temporarily at 30 days of age, and decreased again at 60 days of age. Type V collagen mRNAs decreased rapidly during the first 10 postnatal days and remained at constant levels thereafter. Levels of types III and V mRNAs relative to type I mRNAs noticeably decreased during the first 10 postnatal days. Type IV collagen mRNAs decreased as the mice grew. Fibronectin mRNA did not show significant change. The present results suggest that the postnatal changes in extracellular matrix mRNA expression are partly responsible for the age-associated changes in the skin features.

A53 ビタミンC欠乏は皮膚のコラーゲン含量を減少させる

Vitamin C deficiency decreases skin collagen

○新井 浩司¹ 工藤 千香子¹ 土屋 博之¹ 佐藤 安訓² 近藤 嘉高¹ 野村 義宏¹ 石神 昭人² 西山 敏夫¹

Koji Arai¹, Chikako Kudo¹, Hiroyuki Tsuchiya¹, Yasunori Sato², Yoshitaka Kondo¹, Yoshihiro Nomura¹, Akihito Ishigami², and Toshio Nishiyama¹

¹東京農工大学 農学部附属硬蛋白質利用研究施設

²東京都老人総合研究所 老化ゲノムバイオマーカー研究チーム

¹Scleroprotein Research Institute, Tokyo University of Agriculture and Technology

²Department of Molecular Pathology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

【目的】加齢指標蛋白質 SMP30 は肺や肝臓、腎臓などで発現し、加齢に伴い減少する蛋白質として発見された。その後 SMP30 はビタミン C (VC) 合成経路の酵素グルコラクトナーゼであり、SMP30 ノックアウト (KO) マウスは体内で VC を合成できず、VC 不含飼料で飼育すると早期に老化が進行することが明らかにされた。VC はコラーゲンプロリン残基のヒドロキシ化に必要とされるため、VC を欠乏させた SMP30KO マウスでは皮膚のコラーゲン発現にも異常が生じている可能性がある。そこで本研究では SMP30KO マウスの皮膚コラーゲン発現について検討した。

【方法】SMP30KO マウスあるいは野生型マウスを 30 日齢前後に離乳し、VC 不含飼料と塩酸水または VC 含有水 (1.5g/L) で飼育した。離乳後 30 日および 60 日に背部皮膚を採取して総 RNA を抽出し、コラーゲン mRNA をリボヌクレアーゼプロテクションアッセイで検出した。また、一部の皮膚からは生検トレパンを用いて直径 6mm の円形皮膚片を採取し、アミノ酸分析により単位面積あたりのヒドロキシプロリン含量 (コラーゲン含量) を測定した。さらにパラフィン包埋切片を作製し、エラスチカ・ワンギーソン染色を行った。

【結果および考察】皮膚のコラーゲン遺伝子発現は系統間で若干の差が認められたが、VC 投与の有無による明瞭な変化は認められなかった。皮膚ヒドロキシプロリン含量は離乳後 30 日までは変化せず、60 日目に VC を欠乏させた SMP30KO マウスで野生型マウスに比較して有意に減少した。また、この減少は VC の投与で完全に抑制されており、VC が欠乏すると主に翻訳後修飾の異常により皮膚コラーゲン含量が減少するものと考えられた。皮膚の組織所見では真皮の厚さなどに明瞭な差はなかったが、各群で毛周期のステージが異なっており、VC が毛周期にも影響を与える可能性が示唆された。

Senescence marker protein 30 (SMP30) is a 34-kDa protein whose expression in the liver, kidney, and lung decreases with aging. Recently, SMP30 is revealed to be a gluconolactonase required for vitamin C synthesis, and SMP30-null mice, fed a vitamin C-deficient diet, show accelerated aging. Since vitamin C is necessary for proline hydroxylation in collagen molecules, vitamin C-deficient SMP30-null mice may have collagen synthesis disorders in the skin in addition to the accelerated senescence. Therefore, we examined expression of collagens in the skin of SMP30-null mice. SMP30-null or wild type mice were weaned around day 30 of age, and fed vitamin C-deficient diet. They were given water containing either hydrochloric acid or vitamin C (1.5g/L). At 30 or 60 days after the weaning, animals were sacrificed and back skin was collected. Collagen mRNA expression, hydroxyproline content, and histological features were examined. Although strain-dependent differences were found in levels of some collagen mRNAs, vitamin C-dependent differences were not observed. On the other hand, hydroxyproline contents (mol/area) decreased at 60 days after the weaning in vitamin C-deficient SMP30-null mice as compared to wild type. Furthermore, the decrease was prevented by the administration of vitamin C. These data indicate that skin collagen contents decrease under the vitamin C-deficient condition, and the decrease is probably due to impaired post-translational modification of collagen molecules. Although there was no apparent difference in the thickness of the dermis, the hair cycle was not synchronized between the groups, suggesting that vitamin C may also affect the hair cycle.

A54 共培養による角膜実質細胞での Connexin43, N-cadherin 発現に対する角膜上皮細胞の作用

○高 知愛¹ 柳井 亮二¹ 西田 輝夫¹

¹山口大学 医学部 眼科学

Effects of corneal epithelial cells on the expression of connexin43 and N-cadherin in corneal fibroblasts

Ji-Ae Ko¹, Ryoji Yanai¹, and Teruo Nishida¹

¹Department of Ophthalmology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine

【目的】角膜実質細胞が角膜上皮のバリアー機能に重要である Tight-Junction 構成蛋白質の発現を促進することを報告した。角膜実質細胞は gap junction で結合し、網目状構造を形成している。そこで、角膜上皮細胞が角膜実質細胞の細胞間接着蛋白質の発現にどのような影響を与えているのかを共培養系を用い検討した。また、この共培養系を用いることで、異なった細胞間の作用、および、細胞間の信号伝達のメカニズムを明らかにする。

【方法】ヒト角膜実質細胞とヒト角膜上皮細胞 (SV40-transformed human corneal epithelial cells, HCE) をコラーゲン膜を用いて一定期間内共培養した。角膜実質細胞内での Junctional 蛋白質である Connexin43, N-cadherin, ZO-1, Occludin, Claudin の発現の変化を RT-PCR 法、および Western Blot 法により検討し、また、si-RNA を用いた遺伝子ノックダウンを行い、その影響を RNA レベル、蛋白質レベルで検討する。

【結果】角膜上皮細胞が存在すると角膜実質細胞での Connexin43, または N-cadherin の発現は mRNA, 蛋白質のレベルで促進した。mRNA の発現は培養後 12 時間、蛋白質発現は培養後 24 時間でその発現の増加のピークが認められた。しかし、ZO-1, Occludin, Claudin の発現には影響しなかった。

【結論】*In vivo* での角膜の構成を反映した角膜実質細胞と角膜上皮細胞の共培養系での実験で角膜実質細胞での細胞同士のシグナル伝達のために重要な役割を果たしている Junction 系蛋白質 (Connexin43, N-cadherin) の発現の調節に角膜上皮細胞の存在が必要である。さらに、この共培養系を用いることで、異なった細胞間の信号伝達に重要な役割を果たしている因子の同定が容易になったと考えられる。

Purpose: We have previously shown that the expression of tight junctional proteins in corneal epithelial cells is regulated by corneal fibroblasts in a coculture system. We have now examined the effects of corneal epithelial cells on the expression of intercellular junctional proteins including connexin43, N-cadherin, ZO-1, occludin, and claudin in corneal fibroblasts.

Methods: Human corneal fibroblasts and simian virus 40 transformed human corneal epithelial (HCE) cells were cultured on opposite sides of a collagen vitrigel membrane. Expression of junctional proteins in corneal fibroblasts was examined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunoblot analyses.

Results: RT-PCR analysis revealed that the abundance of connexin43 and N-cadherin mRNAs in corneal fibroblasts was increased in the presence of HCE cells compared with that apparent in their absence. Immunoblot analysis also showed that the amounts of connexin43 and N-cadherin in corneal fibroblasts were increased by the presence of HCE cells. The increases in the amounts of these mRNAs and proteins were maximal at 12 and 24 hours, respectively, after the onset of coculture. The amounts of ZO-1, occludin, or claudin mRNAs or proteins in corneal fibroblasts were not affected by the presence of HCE cells.

Conclusions: These results suggest that corneal epithelial cells may play an important role in intercellular communication between corneal fibroblasts as well as in maintenance of the three-dimensional network structure of these cells. Therefore, this co-culture system of different types cells separated by a collagen membrane provides an *in vitro* model for studies of the interactions between these two cell types *in vivo*.

****A55 強皮症モデルマウスにおけるコラーゲンの
性状解析**

○小倉 孝之¹ 田中 啓友¹ 蛭原 哲也¹ 服部 俊治¹ 中沢
正年² 南 陸彦² 入江 伸吉¹

¹株式会社ニッピバイオマトリックス研究所

²横浜市立大学大学院医学研究科免疫学

**Analysis of collagen property in Tight-skin mouse,
a genetic murine model of systemic sclerosis**

Takayuki Ogura¹, Keisuke Tanaka¹, Tetuya Ebihara¹, Shunji Hattori¹,
Masatoshi Nakazawa², Mutsuhiko Mimami², and Shinkichi Irie¹

¹Nippi Research Institute of Biomatrix

²Department of Immunology, Yokohama City University

全身性強皮症 (Systemic sclerosis: SSc) は皮膚, 肺, 消化管における線維化, レイノー現象を特徴とする血管病変を代表的な症状とする自己免疫疾患の一つである。多くの場合皮膚症状として皮膚硬化を認め, コラーゲンの増生が起こることが知られているが, 詳細な発症メカニズムは不明である。

本研究では, SSc における皮膚硬化が, コラーゲンの線維構造や組成, 性状の変化に起因している可能性を考え, SSc モデル動物である Tight-skin (TSK) マウスと正常 (Pale) マウスにおけるコラーゲンの性状を比較検討した。

初めに, 皮膚硬化を起こした真皮ではコラーゲン線維構造の変化が予想されることから, 発症前後でのコラーゲン抽出率の違いを検討した。その結果, 発症前および発症初期の TSK マウスにおいて I 型コラーゲンの酸抽出率が Pale マウスに比べて低いことが判明した。しかしながら, 発症後期では抽出率に変化は見られなかった。一方, 精製した I 型コラーゲンの変性温度およびアミノ酸組成には顕著な差は観察されなかった。コラーゲンは年齢を重ねるにしたがい, 架橋を形成し酸可溶化率の低下が起こる。TSK マウスにおいては発症に先行して架橋が増加している可能性が考えられる。次に, ペプシンによりコラーゲンを抽出し, コラーゲンの型別組成を検討したところ, TSK マウスにおいて VI 型コラーゲンの増加が観察された。VI 型コラーゲンはミクロフィブリルを形成し, 間質の大きな構造を周囲の結合組織につなぎとめる役割を担っていることが知られていることから, 皮膚硬化において VI 型コラーゲンが皮膚組織をつなぎとめる重要な役割を担っている可能性が考えられる。

以上より, 物理的強度に重要な架橋の形成, および VI 型コラーゲンの増加が TSK における皮膚硬化に関与する可能性が示唆された。

Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune connective tissue disease characterized by fibrosis of the skin, internal organs, and vascular endothelial dysfunction. In many cases, the pathogenesis of SSc is a cutaneous hyperplasia by abnormal accumulation of collagen. However, the details of the pathogenesis are not clear.

In this research, we hypothesize that alteration of collagen property contributes to cutaneous hyperplasia. The change of collagen properties in the cutaneous hyperplasia was examined by using the Tight-skin (TSK) mouse; a genetic murine model of SSc.

Acid soluble collagen was extracted from TSK and normal murine dermis and analyzed. The solubilization rate of type I collagen in the TSK mouse was found to be lower than that of a normal mouse. However, the purified type I collagen properties (denaturation temperature and amino acid composition) was not apparently different from the normal one. Inter- and intramolecular cross-links were formed in collagen molecules during ageing, resulting that collagen fibers display an increase in tensile strength and insolubility. Therefore, it was suggested that cross-link has increased proceeding to symptom in the TSK mouse. Next, the pepsin-solubilized collagen was extracted and the collagen typing was examined. The type VI collagen was found to increase in the TSK mouse compared with a normal mouse.

These results suggest that the cross-links formation involved in mechanical strength and the amount of the type VI collagen may be implicated in the cutaneous hyperplasia in the TSK mouse.

***A56 皮膚創傷治癒ならびに線維化過程における骨髄由来細胞のコラーゲン合成への関与**

○東山 礼一¹ 中尾 祥絵¹ 茂呂 忠² 渋沢 弥生³ 石川 治³
岡崎 勲⁴ 稲垣 豊¹

¹東海大学医学部肝線維化研究ユニット

²ミノファーマ製薬研究所

³群馬大学大学院医学研究科皮膚病態学

⁴国際医療福祉大学山王病院

【目的】近年、骨髄から動員された細胞がI型コラーゲンを産生して皮膚の創傷治癒促進に関わる可能性が報告されている。しかし骨髄由来細胞の同定法やコラーゲン産生の評価法は報告により異なるため、骨髄由来細胞の関与は十分に解明されていない。本研究ではI型コラーゲンの $\alpha 2$ 鎖遺伝子エンハンサー・プロモーターとEGFPとを連結した融合遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス(COL/EGFP Tg)を用いて、皮膚の創傷治癒ならびに線維化過程における骨髄由来細胞の生着とコラーゲン産生を特異的に検出することを試みた。

【方法】野生型マウスの骨髄をCOL/EGFP Tgより得た骨髄細胞で置換し、骨髄由来のコラーゲン産生細胞のみがEGFPを発現するレシピエントマウスを作製した。COL/EGFP Tgおよび同レシピエントマウスの剃毛背部に全層皮膚創傷を作製し、あるいはブレオマイシン含有ポリ乳酸マイクロスフェアの単回皮下投与により皮膚線維症を誘導した。創傷作製後7日目およびブレオマイシン投与後21日目に皮膚組織を採取しHE染色に供するとともに、抗 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。

【結果】COL/EGFP Tgにおいては、皮膚創傷部あるいはブレオマイシン投与により誘導された線維化皮膚の真皮層に紡錘形や突起を有する細長い形態のEGFP発現細胞が多数集簇しており、一部は α SMA陽性であった。一方、同レシピエントマウスの線維化皮膚組織の真皮にはEGFP陽性の骨髄由来コラーゲン産生細胞が少数認められたが、皮膚創傷部に骨髄由来のEGFP発現細胞は認められなかった。

【考察】創傷治癒および線維化皮膚組織内の骨髄由来あるいは皮膚固有のコラーゲン産生細胞を特異的に検出する系を確立した。いずれのモデルにおいても皮膚真皮層に多数のコラーゲン産生細胞が認められたが、生理的な創傷治癒と病的な皮膚線維化では骨髄由来細胞の関与は異なると考えられた。

Contribution of bone marrow-derived cells to collagen synthesis during dermal wound healing and fibrosis

Reiichi Higashiyama¹, Sachie Nakao¹, Tadashi Moro², Yayoi Shibusawa³, Osamu Ishikawa³, Isao Okazaki⁴, and Yutaka Inagaki¹

¹Liver Fibrosis Research Unit, Tokai University School of Medicine

²Research Laboratory, Minophagen Pharmaceutical Co. Ltd.

³Department of Dermatology, Graduate School of Medicine, Gunma University

⁴Sanno Hospital, International University of Health and Welfare

Background/Aims: Recent studies have indicated that bone marrow (BM)-derived cells migrating into dermal wounds promote the healing process by producing collagen type I. However, their contribution remains unclear due to various methods employed for the identification of BM origin and collagen production. Here we detected specifically the migration and possible collagen production of BM-derived cells during dermal wound healing and fibrosis.

Methods: BM of wild type mice was replaced by cells obtained from transgenic mice harboring an $\alpha 2(I)$ collagen enhancer/promoter-EGFP fusion gene (COL/EGFP Tg). Full thickness cutaneous wounds were made, or a single dose of bleomycin-PLA microsphere was injected subcutaneously into the shaved back of COL/EGFP Tg or its BM recipients. Obtained dermal tissues were subjected to HE staining, and confocal microscopic examination to detect EGFP and α SMA expression.

Results: A large number of thin or spindle-shaped EGFP-expressing cells were observed in the dermis of both dermal wounds and bleomycin-induced fibrosis in COL/EGFP Tg. Some of them co-expressed α SMA. A small number of EGFP-expressing cells were also observed in the fibrotic dermis of COL/EGFP recipients following bleomycin administration. In contrast, there were few, if any, BM-derived cells detected in dermal wounds of the recipient animals.

Conclusion: We have established an experimental system which can specifically detect BM-derived or dermal resident collagen-producing cells during dermal wound healing and fibrosis. Although a large number of collagen-producing cells were observed in the dermis of both models, contribution of BM-derived cells to collagen synthesis seemed different between physiological wound healing and pathological fibrosis.

****A57 骨髄移植は17型コラーゲンノックアウトマウスにおいて欠損蛋白を補充し生命予後を改善する**

○藤田 靖幸¹ 阿部 理一郎¹ 猪熊 大輔¹ 佐々木 美香子¹
西江 渉¹ McMillan James¹ 中村 秀樹¹ 清水 忠道² 澤村
大輔³ 清水 宏¹

¹北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野

²富山大学大学院医学薬学研究科皮膚科学講座

³弘前大学大学院医学研究科皮膚科学講座

表皮水疱症は皮膚の脆弱性を特徴とする遺伝性の疾患であり、皮膚を構成する構造蛋白の先天性異常によって発症する。欠損蛋白の存在部位から約 30 の亜系に分類され、中には生後 1 年以内にその多くが死亡する重症型も存在する。現時点で表皮水疱症に対する根本的な治療法は存在しない。遺伝子治療を施した自己表皮培養移植などが試みられているが、効果が局所に限られることや、拒絶反応・遺伝子操作による倫理的課題といった障壁が残されている。一方、骨髄由来細胞 (BMDCs) は様々な系統の細胞へ分化しうることが報告されており、我々もマウスの骨髄移植モデルにおいて、ドナー骨髄由来の表皮細胞がわずかに出現しうることを示している (*Stem Cells* 2006)。そこで我々は、重症表皮水疱症に対して現在の医療レベルで実現可能な治療法として、同種骨髄移植の可能性に着目した。ヒト BMDCs でも同様に皮膚構成細胞へ分化しうるか検討するために、NOG (NOD/Shi-scid, IL-2R γ^{null}) マウスにヒト臍帯血由来細胞を移植して血液系ヒト化モデルを作成した。このマウスの創傷治癒部において、ヒト細胞由来の表皮細胞が発現し、ヒト基底膜蛋白 (17 型コラーゲン (COL17) など) の発現も示唆された。次に、我々が作成した COL17 欠損表皮水疱症モデルマウス (*Nat Med* 2007) に対し正常マウスからの骨髄移植による治療実験を行った。骨髄生着後の創傷治癒部を検討したところ、ドナー由来の緑色蛍光色素 (GFP) 陽性表皮細胞の直下に COL17 の発現が認められた。臨床的に未処置群と比較して皮膚びらん・脱毛の減少がみられ、さらには生命予後の有意な改善も認められた (73.2% 対 20.6%, 移植後 150 日後, $p < 0.05$)。以上から、ヒトにおいても骨髄移植を含めた幹細胞移植が重症型表皮水疱症を改善しうることを示唆された。

Improvements of the clinical phenotype in collagen XVII knockout mice by bone marrow transplantation

Yasuyuki Fujita¹, Riichiro Abe¹, Daisuke Inokuma¹, Mikako Sasaki¹, Wataru Nishie¹, James R McMillan¹, Hideki Nakamura¹, Tadamichi Shimizu², Daisuke Sawamura³, and Hiroshi Shimizu¹

¹Department of Dermatology, Hokkaido University Graduate School of Medicine

²Department of Dermatology, Toyama University Graduate School of Medicine

³Department of Dermatology, Hirosaki University Graduate School of Medicine

There are currently no effective treatments to improve the prognosis in epidermolysis bullosa (EB), which is a group of congenital genodermatoses caused by the lack of basement membrane proteins. Recent studies have shown that bone marrow-derived cells (BMDCs) can play a significant role in regenerative medicine by transdifferentiating into various cell types. We previously reported that 0.05% of epidermal keratinocytes at wound sites were derived from donor BMDCs in bone marrow transplantation (BMT) model mice. The purpose of this study was to determine whether a knocked-out protein can be re-expressed after BMT, and to explore the possibility of using this technique to treat severe forms of EB. Firstly, we investigated whether human cells could transdifferentiate into keratinocytes as demonstrated by our mouse BMT model. Human cord blood cells were transplanted into immunodeficient NOG (NOD/Shi-scid, IL-2R γ^{null}) mice. At the wound site we found cord blood-derived keratinocytes as well as expression of human BMZ proteins such as collagen XVII (COL17). Secondly, BMT was accomplished using cells from green fluorescence protein (GFP) expressing-transgenic mice into our recently established adult COL17 knockout mice, which was used as a model for human junctional EB. The expression of COL17 beneath GFP+ epidermal cells was found at the wound site in BMT-treated COL17 knockout mice. Furthermore, BMT-treated mice showed fewer EB-associated erosions and better survival rates (73.2% versus 20.6%, 150 days after BMT, $p < 0.05$). These findings indicate that conventional BMT techniques show significant potential as systemic therapeutic approaches for treatment of human severe EB.

***A58 上皮細胞の管腔形成における膜型コラーゲナーゼ MT1-MMP の基底膜への局在にコラーゲンシグナルは必須である**

○伊藤 義文¹ Sarah Bird¹

¹インペリアルカレッジ, ケネディーリウマチ研究所

Collagen signalling is essential for basal localization of membrane-anchored collagenase MT1-MMP during branching morphogenesis of epithelial cells

Yoshifumi Itoh¹, and Sarah Bird¹

¹Kennedy Institute of Rheumatology Division, Imperial College London

多細胞生物にとって上皮細胞の形成する管腔は生命維持のために必要な構造体である。しかしながらその管腔形成の基本的なメカニズムは未だに不明である。犬腎上皮細胞である MDCK をコラーゲンゲル中で 3 次元培養し、肝細胞増殖因子 (HGF) で刺激するとゲル中で管腔形成が起こる。この過程に、膜型コラーゲナーゼである membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) が必須であることは過去に報告されている。今回我々は、管腔形成するための MT1-MMP によるコラーゲン分解が、極性化した上皮細胞における MT1-MMP の上層膜/基底膜の局在制御で調節されていることを明らかにした。刺激を受けていない極性化した MDCK 細胞では MT1-MMP は上層膜側に特異的に局在する一方、HGF で刺激することにより基底膜側にその局在がシフトし、接着面のコラーゲン分解を誘発する。さらにこの局在スイッチにはコラーゲンからのシグナルも必要であり、細胞がゼラチンやプラスチック上で極性化している場合には HGF 刺激に関わらず MT-MMP は基底膜側には局在しない。この局在スイッチは二次元培養系だけではなく、実際に 3D の管腔構造過程でも起こっており、MT1-MMP は伸展している管腔構造を形成している細胞でより強く基底側に局在することが確認された。以上、上皮細胞の管腔形成の新たなメカニズムとして MT1-MMP の局在スイッチがコラーゲンと増殖因子のシグナルによって調節されていることを報告する。

Epithelial tubes are essential structures in multicellular organisms. However, the fundamental mechanism underlying the formation of such structures is still unclear. It has been shown that membrane-bound collagenase membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) plays an essential role in branching tube formation of Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. Here we show that interplay between matrix signalling and growth factor signalling regulates this morphogenic program through changing localisation of MT1-MMP from the apical surface to the basal surface of the cells. Inert polarised epithelial cells exclusively localize MT1-MMP at the apical surface whereas HGF stimulated cells localize a portion of MT1-MMP at the basal surface resulting in collagen degradation at cell attachment site. For this basal localization to take place, collagen signalling is absolutely essential, and MT1-MMP does not localize to basal surface when cells were cultured either on gelatin or plastic. In 3D tube structure, MT1-MMP localization at basal side was observed in cells consisting extending tube, but not the cells in base structure. Our results suggest that collagen together with HGF provides essential signals which determine apical and basal localization of MT1-MMP enabling tubulogenesis to take place.

***A59 コラーゲン分子とカーボンナノチューブの
相互反応にはトリプルヘリクス構造が必須で
ある**

○久保木 芳徳¹ 寺田 典子² 北川 善政² 宇尾 基弘² 亘理
文夫²

¹北海道大学 名誉教授

²北海道大学・大学院・歯学研究科

**Triple-helix structure of collagen is essential for its
interaction with carbon nanotubes**

Yoshinori Kuboki¹, Michiko Terada², Yoshimasa Kitagawa², Motohiro
Uo², and Fumio Watari²

¹Professor Emeritus, Hokkaido University

²Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University,

【目的】カーボンナノチューブ（以下CNT）は、その特異な強靱性、伝導性、幾何学的構造から、現在工学的な応用が進んでいるが、一方では、生物学的な応用も期待されている。しかし生体分子との反応性の研究は進展せず、とくに生体の最大量タンパクであるコラーゲンとの反応は、ほとんど分かっていない。その理由の一つには、CNTが本来、固相であり、溶液中分子との反応の研究には工夫を要する点で、あろう。我々は以前からCNTが不溶性コラーゲンに吸着、これを黒く染める事実から両者には、かなり強い親和性があると推定してきたが、コラーゲン分子との反応機構は不明であった。そこで今回、濁度の変化によって凝集度を測定するという方法で、コラーゲンとCNTとの反応を追跡したところ、コラーゲン添加によって顕著なCNTの凝集反応を確認した。ところが、コラーゲン溶液を加熱変性させると、凝集はまったく起こらず、変性コラーゲンは、CNTと凝集しないことを見出したので報告する。

【実験方法及び結果】10 ppm のCNT懸濁液（0.1%トライトン）に終濃度25 ppmになるように中性コラーゲン溶液を加えると急に濁度が減少しはじめ、20分後には平衡に達した。これに対し、予めコラーゲンを60度で、数分間加熱変性すると濁度の減少は鈍くなり、加熱時間の増加と共にその傾向は強まり、1時間の加熱では全く濁度減少がなくなり、凝集は起こらなくなった。同濃度のアルブミン、ならびリゾチームでは、凝集は起こらない。

【考察】以上の結果から、CNTと反応して凝集を起こすためには、コラーゲンの3次元構造、すなわちトリプルヘリクスが必要であり、棒状分子であればCNTが多数吸着し凝集を起こすが、ゼラチンになって、一定の立体構造を失った場合には、CNTは凝集できないと推定される。この現象は今後、コラーゲンとCNTとの反応メカニズムを解明するために重要な手がかりになると考えられる。

【Introduction】Exceptionally high mechanical strength, electric conductivity and unique geometrical structures of carbon nanotubes (CNT) have been attracting attentions from various fields, including biological application, but the interactions with important biomolecules, above all, collagen molecules have not been studied in details. This situation partly dues to the fact that CNT is a solid entity, while the most of the biomolecules can be prepared into soluble entity. Thus, we introduced to evaluate turbidity in order to analyze the interaction between CNT and collagen molecules. It was found that native collagen induced distinct aggregation with CNT, while denaturation of this protein deprived of the ability to aggregate with CNT.

【Methods and results】To a stable suspension of CNT (10 ppm in 0.1% Triton), collagen solution was added to obtain final concentration of 25 ppm. Degree of aggregation was evaluated by measuring the turbidity of the suspension at 660 nm on a Sienco aggregation meter (Morrison Co., USA). It was found that addition of collagen induced remarkable aggregation immediately and reached plateau after 15-20 minutes. Interestingly when the collagen solution was denaturated at 60 degree beforehand, no aggregation was observed; just like the other globular molecules albumin and lysozyme which were added under the same conditions.

【Discussions and conclusion】It was concluded that rigid rod-like structure the collagen triple helix is essential for interaction with CNT to form aggregation. This finding will open a new avenue to clarify the mechanism of interaction between collagen molecules and CNT.

A60 コラーゲン・フォールディングにおけるヒステリシス

○水野 一乗¹ Jürgen Engel¹ Sergei Boudko¹ Hans Peter Bächinger¹

¹Shriners Hospital for Children

コラーゲン 3 本鎖らせん構造の安定性について、GlyXaaYaa 繰り返しの長さや配列の異なるモデルペプチドを用いた研究がなされているが、それらの変性温度や変性エンタルピー、エントロピーの値は、ほとんど同じペプチドを用いて測定した場合においてさえ、報告によって著しく異なっていることがある。多くの研究では、平衡状態から遠い条件での実験結果から熱力学データを求めていることが、原因の一つであると考えられる。コラーゲンの熱力学データを求める場合、溶解度の問題から、高濃度の試料を測定することが困難であり、また、CD の実験では UV による試料の劣化、DSC の実験では、解析可能なシグナルを得るには、ある程度以上の走査速度が必要となることなどが問題になる。多くの温度スキャン実験の結果において、温度を上昇させた場合と、下降させた場合とで、転位温度に差がある。これをヒステリシスと呼んでいる。今回の発表では、各種モデルペプチドの初期濃度や走査速度を変えた条件で得られた CD 曲線をもとに、得られたヒステリシスのカーブに合う反応モデルを作り、定温でのフォールディング実験で得られた定数と比較して解析した結果を発表する。

Hysteresis in the collagen triple helix-coil transition

Kazunori Mizuno¹, Jürgen Engel¹ Sergei Boudko¹, and Hans Peter Bächinger¹

¹Shriners Hospital for Children

Collagen model peptides with different -Gly-Xaa-Yaa-sequences can be used to study the thermodynamic parameters of the triple helix <-> coil transition, and these parameters can provide basic clues to understand the molecular mechanism of genetic disorders related to collagen. The stability of collagen triple helices has experimentally been determined from thermal changes of circular dichroism, calorimetry and other conformation dependent quantities. Very different values for the transition temperature and the thermodynamic parameters have been reported in the literature. One of the main reasons for these discrepancies is the slow speed of the folding/unfolding kinetics caused by the slow rate of prolyl cis/trans isomerization and the necessity to nucleate the triple helix from three polypeptide chains. Most of the values were therefore measured under conditions where the system is not at equilibrium. Transitions of collagen model peptides and (pro) collagen molecules often show a hysteresis, that is, the heating (unfolding) and the cooling (folding) curves do not overlap in both directions. We quantitatively described the hysteresis of the triple helix <-> coil transitions with kinetic models applying different initial conditions for unfolding and folding. Heating and cooling curves were recorded by CD with different scanning rates and different initial peptide concentrations. Experimental transitions were fitted by differential equations solved by the math software. The fitted parameters of the rate constants and the activation energies of each step were compared with the data determined from constant temperature experiments. The relationship between the kinetic model data and the thermodynamic parameters will be presented.

○妹尾 春樹¹ 今井 克幸¹ 三浦 光隆¹ 目崎 喜弘¹
Tikhonov Alexei² 服部 俊治³ 吉川 究¹ 山口 典子¹

Haruki Senoo¹, Katsuyuki Imai¹, Mitsutaka Miura¹, Yoshihiro Mezaki¹, Tikhonov Alexei², Shunji Hattori³, Kiwamu Yoshikawa¹, and Noriko Yamaguchi¹

¹秋田大学 医学部 医学科

²ロシア科学アカデミー

³ニッピバイオマトリックス研究所

¹Akita University School of Medicine

²Russian Academy of Sciences

³Nippi Biomatrix Research Institute

細胞外マトリックスが組織を支える安定な分子群であることの1つの証拠として、絶滅してしまい冷凍状態で発見されるマンモスの組織を細胞外マトリックスの保存の点から解析した。ロシア科学アカデミー動物研究所に保存されている2匹のベビーマンモスの肝臓と肺を光学顕微鏡・電子顕微鏡を用いて観察し、免疫蛍光法により細胞外マトリックス成分の局在を解析、アミノ酸分析をおこなった。肝臓と肺では、肉眼的および組織学的形態がよく保存されていた。肝臓では類洞壁様構造が、肺では肺胞様の構造が確認できた。細胞外マトリックス成分の微細構造はよく保存されていて、線維性構造とコラーゲン特有の周期的縞模様、基底膜様構造が電子顕微鏡観察で確認された。免疫蛍光染色ではIV型コラーゲン陽性の細胞外マトリックス構造を確認した。肺組織アミノ酸分析ではコラーゲン線維構成アミノ酸であるプロリン、ヒドロキシプロリン、グリシンが突出して多かった。以上の結果はコラーゲタンパク質をふくむ細胞外マトリックス成分は、これらのマンモス諸器官において4万年の間その分子構造が安定し、よく保存されていることを示している。このことは器官の肉眼的形態形成および組織構造構築において、コラーゲンなどの細胞外マトリックスによる三次元構造の構築がきわめて重要であることを示している。同時にこれらの器官に、線維症が生じていた可能性をも示唆している。

To examine stability of extracellular matrix (ECM) molecules supporting tissues (scaffolding function), we analyzed organs of 2 frozen baby mammoths died about 40,000 years ago and buried in permafrost in Siberia. We observed the livers and the lungs of the 2 mammoths (kept in fixatives in Russian Academy of Sciences in St. Petersburg) by light and electron microscopy, scrutinized localization of ECM components by immunofluorescence, and analyzed amino acid contents. The livers and lungs were preserved well at gross anatomical and histological levels. Sinusoidal walls of the liver and alveolar-like structures of the lungs were well kept. Ultrastructure of ECM components, namely fibrillar structure having characteristic pattern of cross striation and basement membrane structure, were clearly demonstrated by transmission (TEM) and scanning electron microscopy (SEM). Type IV collagen was shown in ECM components by immunofluorescence. Amino acid analysis of the lungs revealed high content of amino acids forming collagen fibril, namely, proline, hydroxyproline, and glycine. These results indicate that ECM molecules including collagen were stable and well preserved in these frozen mammoths for 40,000 years. These findings suggest that three-dimensional structure of ECM is important for maintaining gross and histological morphology. At the same time, however, the present results may suggest that these mammoths suffered from organ fibrosis.

一般演題（ポスター展示）

Poster Presentation

P1 マウス 24 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖遺伝子の発現調節機構の解析

○松尾 哲孝¹ 田中 静子² 住吉 秀明¹ 吉岡 秀克¹
Ramirez Francesco²

¹大分大学 医学部 生体分子構造機能制御(生化学第二)講座

²Child Health Insutitute of New Jersey, Robert W. Johnson Medical School

マウス 24 型コラーゲンをクローニングし、その転写調節および発現調節機構を解析したので報告する。この遺伝子は、骨芽細胞および前骨芽細胞に発現しており、その発現は間葉系細胞の骨分化過程で誘導され、前骨芽細胞から骨芽細胞への分化過程でその発現は増強された。更に、骨芽細胞の mineralization 過程でも安定的に発現していた。加えて、in situ hybridization 解析により、骨のシャフト部分に強い発現が認められ、この遺伝子が骨組織に特異的に発現していることを明らかにした。次に転写調節機構を解析したところ、この遺伝子は異なった 5' UTR エクソンを持ち、2 種類の alternative splice variant が存在した。プロモーター活性を検討した結果、-144 から+80 までの領域が基本転写活性に重要であった。EMSA の解析により核タンパク結合部位が2カ所存在し、mutation 及び deletion 解析結果から、そのうちの1カ所がこの遺伝子の転写活性上昇に必要な領域であることが分かった。この領域は CERB/AP1 結合配列を有し、少なくとも3つの DNA 結合タンパクの存在が示唆されたので、特異抗体を用いたスーパーシフト解析を行った。その結果、c-Jun, CREB1, ATF1, ATF2 が結合しており、その組み合わせは、c-Jun/ATF2, CREB1/ATF1 の heterodimer 及び CREB1 の homodimer であった。これら結合する転写因子を強制発現すると、この遺伝子のプロモーター活性は上昇し、ChIP アッセイにより、これらの転写因子は細胞内でも直接結合している事が明らかとなった。以上の結果から、24 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖遺伝子は、骨芽細胞・骨組織に特異的に発現しており、その転写には、CREB/ATF ファミリー転写因子が正の調節をしていることが明らかとなった。

Analysis of mouse type XXIV collagen $\alpha 1$ (Col24a1) gene: Transcriptional regulation and bone specific expression.

Noritaka Matsuo¹, Shizuko Tanaka², Hideaki Sumiyoshi¹, Hidekatsu Yoshioka¹, and Francesco Ramirez²

¹Dep. of Anatomy, Biology and Medicine, Oita Univ.

²Child Health Insutitute of New Jersey, Robert W. Johnson Medical School

Collagen XXIV is a recently discovered member of member of the fibrillar collagens with structural features of invertebrate molecules. In this study, we identified mouse type XXIV collagen (Col24a1) transcripts, determined their tissue distribution and analyzed the transcriptional regulation of this gene. Col24a1 transcript was specific expressed in osteoblast and pre-osteoblast cells. *In vitro* osteoblast differentiation models indicated that the expression of Col24a1 transcript was activated from pluripotent mesenchymal to pre-osteoblast cells, subsequently was increased during osteoblast differentiation, followed by stable expressed and/or accumulated during bone mineralization. In addition, in situ hybridization analysis demonstrated that collagen XXIV is highly restricted in trabecular bone on post-natal tibia. Furthermore, Oligo-CAP Race indicated that mouse col24a1 gene has at least two major splicing variants. Cell transfection experiments in combination with DNA-binding assays demonstrated that Col24a1 promoter activity is under the control of an upstream cis-acting element, which is shared by both transcripts and is recognized by specific combinations of c-Jun, CREB1, ATF1 and ATF2 dimers. Consistent with these results, overexpression of c-Jun, ATF1, ATF2 or CREB1 in transiently transfected osteoblastic cells stimulated transcription from reporter gene constructs driven by the Col24a1 promoter to different degrees. Moreover, chromatin immunoprecipitation experiments showed that these nuclear factors bind the same upstream sequence of the endogenous Col24a1 gene. These results suggest that Col24a1 is a specific marker of osteoblast differentiation, implicating in regulating the formation of a mineralization-competent matrix in bone, and the AP1/CREB family members play a critical role in regulating its activity.

P2 大腸ガン株化細胞 Caco-2 SP 細胞はI型コラーゲンゲル上培養で増殖するか？

The behaviors of SP cells in Caco-2 human carcinoma cells on type I collagen gel

○藤崎 ひとみ¹ 佐々木 純¹ 入江 伸吉¹ 服部 俊治¹

Hitomi Fujisaki¹, Jun Sasaki¹, Shinkichi Irie¹, and Shunji Hattori¹

¹ニッピ バイオマトリックス研究所

¹Nippi Research Institute of Biomatrix

【背景 目的】我々は大腸ガン株化細胞 Caco-2 細胞がI型コラーゲン分子上培養では増殖するにもかかわらず、I型コラーゲン線維（ゲル）上で培養すると増殖が抑制されることを見いだし昨年度本体会で報告した。近年フローサイトメトリー解析でSP（Side Population）細胞とよばれる、DNA 結合色素ヘキスト 33342 で染色されにくい細胞集団が臓器幹細胞ではないかと議論されている。SP細胞は正常組織のみならず一部株化ガン細胞においても同定され、ガン幹細胞様細胞である可能性が示唆されている。また幹細胞が自己複製能、未分化性維持等の幹細胞特性を維持するためには細胞外マトリックス、細胞などの微小環境（niche）と幹細胞の相互作用が重要だと考えられている。我々は形態観察から Caco-2 細胞もこのような heterogeneous な細胞集団ではないかと考え、それぞれの細胞集団にコラーゲン線維が与える影響を検討した。

【方法】Caco-2 細胞をソーティングし Caco-2-SP 細胞を分取した後、SP, non-SP 細胞分画をI型コラーゲンゲル上、10%血清存在下で培養し、ホルマザン法で生細胞数を定量した。また3日培養した細胞をSP解析した。

【結果】Caco-2 細胞でSP細胞分画が確認された。SP, non-SP 細胞共にI型コラーゲンゲル上培養では増殖が抑制された。また non-SP 細胞分画からは non-SP 細胞分画のみが生じる一方、SP 細胞分画は SP 及び non-SP 細胞分画が生じた。

【考察】I型コラーゲンゲル上培養でホルマザン法の定量では全生細胞数が変わらないにもかかわらず、SP細胞の割合が変化したという結果はI型コラーゲン線維がSP細胞, non-SP 細胞の分画調節に影響を与えている可能性を示唆している。

We previously reported that human colon carcinoma cell line Caco-2 cells did not proliferate on type I collagen gel culture, meanwhile on collagen molecule they proliferated well. Recently there is increasing evidence that tumors and cancer cell lines contain a small subset of their stem-like cells (cancer stem cells; CSCs). By using clonal and population analysis, side population (SP) cells, which is sorted with the flow cytometry-based technique, is mainly composed of CSCs. Identification of SP cells in several cancer cell lines are reported. In this study, after identified and isolated SP cells, we examined SP analysis of Caco-2-SP cells cultured on collagen gel and estimated living cell numbers. Neither SP nor non-SP cells in Caco-2 proliferated on collagen gels. SP cells could generate both cell types of populations conversely non-SP cells generated only non-SP cells.

These results show that collagen fibrils can transform cell type and inhibit proliferation in carcinomas SP cells.

P3 演題取り下げ

P4 I型コラーゲンによる好中球からのIL-8分泌の抑制

Inhibition of IL-8 secretion from neutrophil by type I collagen

○権 伍勇¹ 高 知愛¹ 西田 輝夫¹

Wuyong Quan¹, Ji-Ae Ko¹, and Teruo Nishida¹

¹山口大学 医学部 眼科学

¹Department of Ophthalmology Yamaguchi University Graduate School of Medicine

目的

細胞外マトリックスが、好中球の活性化に重要な働きをしていることが報告されている。我々は角膜潰瘍や角膜炎などで好中球が角膜に浸潤した時、どのように角膜実質を構成している細胞外マトリックスである I 型コラーゲンによって細胞機能が制御されているかを知る目的で細胞外マトリックスによる好中球のサイトカイン発現の変化を検討した。

方法

ヒト血液から精製した好中球を Ficoll-Paque PLUS で調整した。I 型コラーゲン、IV 型コラーゲンあるいはラミニンをコーティングしたプレートに播種し、一定時間培養した。培養上清中のサイトカインを Bio-Plex 法により測定した。

結果

好中球を I 型コラーゲンマトリックス上で培養すると検討したサイトカイン中、IL-8 のみが対照に比べて発現が減少した。また、IV 型コラーゲン、あるいはラミニンマトリックス上では何ら変化を認められなかった。

結論

好中球による IL-8 の分泌は I 型コラーゲン特異的に抑制され、正常時角膜実質内での I 型コラーゲンの存在の重要性が示唆され、また、炎症を起こし、I 型コラーゲンの分解による IL-8 の活性化の機構を探る重要な糸口になると考えられる。

PURPOSE

It was reported that extracellular matrix (ECM) may play an important role on the activation of neutrophils during the infection and inflammation. In the infected corneal tissue such as ulceration and keratitis, we investigated if the secretion of cytokines is controlled by type I collagen consists of the corneal stroma.

METHODS

We have isolated human neutrophils by Ficoll-Paque PLUS. The neutrophils were plated on the type I collagen, type IV collagen and laminin coated plate and incubated for indicated times. Then, we measured the expression of cytokines in the supernatant by Bio-Plex analysis.

RESULTS

When neutrophils were cultured on type I collagen-coated conditions, the expression of IL-8 decreased. Secretion of IL-8 by neutrophils did not change when the cells were cultured on type IV collagen, laminin coated.

CONCLUSIONS

The IL-8 secretion from neutrophils was down-regulated by type I collagen. The present results suggest that type I collagen plays a regulatory function for cytokine production by neutrophils.

***P5 動脈瘤組織におけるエラスチン及びコラーゲンの量的検討及び抗 26A ポリクローナル抗体を用いた解析**

○白土 絵理¹ 下浦 博之¹ 竹下 公弥子² 馬渡 孝治² 前田 衣織¹ 坂田 則行³ 岡元 孝二¹

¹九工大院・生命体工

²九工大・情報工・生命情報

³福大医・第2病理

【序論】現在、わが国の心疾患や脳血管疾患は、癌に匹敵する重大な疾患である。現在、血管系疾患の治療は困難で患部の特定も難しい状況であり、血管系疾患に関する様々な研究がなされている。当研究室では、血管系疾患の1つである動脈瘤について研究を行っている。動脈瘤とは動脈局所が膨張する病態で、ほとんどが大動脈で発生し自覚症状はほとんどない場合が多く、発症の仕組みもあまり明らかでない。しかし近年、血管壁の脆弱化によって起こることが示唆されている。そこで壁構成主要タンパク質であるエラスチンとコラーゲンに着目し、大動脈瘤組織におけるこれらの量的変化を検討した。また近年、ヒトトロポエラスチンにのみ存在するドメイン 26A が疾患と関連して発現することも示唆されており、この 26A 内に高い抗原性が予測されている。本研究では抗 26A 抗体を精製し、26A 発現と動脈瘤形成との関連を示した。

【本論】まず、動脈瘤組織と非動脈瘤組織におけるエラスチン・コラーゲンの量的検討のため、大動脈瘤組織と非大動脈瘤組織からコラーゲン画分・エラスチン画分を抽出した。コラーゲン量は Hydroxyproline 量を、エラスチン量は ELISA 法を用いてエラスチンに特有な Desmosine 量を定量することで算出した。結果より、非大動脈瘤組織と比較して、大動脈瘤組織でのエラスチン量の有意な減少と、コラーゲン量の増加傾向が見られた。これより動脈瘤の発生と壁組織のタンパク質の量的変化との関連が示唆された。

次にエクソン 26A の発現と動脈瘤との関わりについて、まず Fmoc 固相法によりドメイン 26A ペプチドを合成した。このドメイン 26A ペプチドを用いてアフィニティークロマトグラフィーを行い、以前当研究室で作成した 26A ペプチドに対する抗血清を精製した。現在、この得られた抗 26A ポリクローナル抗体を用いて、動脈瘤病変とエクソン 26A の発現との関わりについて検討中である。

Quantitative investigation of elastin and collagen and analysis with anti-26A polyclonal antibody in aneurysm tissue

Eri Shiratsuchi¹, Hiroyuki Shimoura¹, Kumiko Takeshita², Kouji Mawatari², Iori Maeda¹, Noriyuki Sakata³, and Kouji Okamoto¹

¹Grad. Sch. of Life Sci. & Sys. Eng., Kyushu Inst. of Tech.

²Dept. of Biosci. & Bioinform., Kyushu Inst. of Tech.

³Dept. 2nd. Pathol., sch. Med., Univ. of Fukuoka

A number of vascular diseases have been getting to a serious problem. The aneurysm is a clinical condition which the artery section expands, and it is known that there is rarely emerging certain symptom. The weakening angioembrittlement in aneurysm tissues is suggested in these researches. In this study, we focused on elastin and collagen, and examined their quantitative changes in aneurysm tissue. Since there is little consciousness symptom in the aneurysm, it is important to achieve the research directed to the development of the diagnostic marker of the aneurysm. Although it has been suggested that the expression of exon26A may have the connection with vascular diseases, there is little report concerning relation between this 26A domain and diseases. We prepared the anti-26A polyclonal antibody and investigated relationship between domain 26A and aneurysm formation.

First, aortic aneurysm and non-aortic aneurysm tissues were treated to remove fat. Then, collagen and elastin were extracted by treatment with collagenase and elastase, respectively, and their quantitative analysis were performed. As results, it was shown that collagen tended to increase and elastin decreased significantly in aortic aneurysm. These results suggested that aneurysm is related with the quantitative change of extracellular matrix in vascular wall. It was also suggested that the domain 26A was detected by the use of the anti-26A polyclonal antibody in atherosclerotic lesions but not in nonatherosclerotic aorta. Further analysis in aneurysm tissues are in progress.

***P6 エラスチン由来ペプチドによるマクロファージの遊走**

○前田 衣織¹ Maria Portia P. Briones² 溝入 紀昭² 岡元 孝二¹

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

【目的】エラスチンは結合組織に存在する弾性線維の主成分であるが、動脈硬化などの病態部分においては分解され、エラスチン由来ペプチドが生成する。エラスチン由来ペプチドは、種々の生理作用を示し病態の進行と関連していることが示唆されている。エラスチンの構造中にはペンタペプチド (Val-Pro-Gly-Val-Gly; VPGVG)、ヘキサペプチド (Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly; VGVAPG)、ノナペプチド (Ala-Gly-Val-Pro-Gly-Leu/Phe-Gly-Val-Gly; AGVPGL/FGVG) などの、繰り返し配列が存在している。これらの中で、ヘキサペプチド配列は細胞遊走などの生物活性を有することが報告されている。

【方法】ペンタペプチド及びヘキサペプチド配列について、順列入れ替え配列のペプチドを合成し、ラット由来マクロファージに対する遊走作用を調べた。また、ノナペプチドについては、2 種のエラスチン由来ノナペプチド (AGVPGLGVG 及び AGVPGFGVG) に加え、6 位のアミノ酸を他のアミノ酸 (Ile, Val, Ala, Gly, Pro, Lys, Glu) に置換したアナログペプチドを合成し、遊走作用を調べた。

【結論】ペンタペプチドについては、5 種の順列入れ替え配列のうち VGVPG のみが、ヘキサペプチドでは 6 種のうち VGVAPG, GVAPGV, VAPGVG, GGVVAP の 4 種が遊走活性を示した。ノナペプチドにおいては、2 種のエラスチン由来ペプチド (AGVPGLGVG 及び AGVPGFGVG) はいずれも遊走作用を示した。6 位のアナログペプチドにおいては Ile 置換体である AGVPGIGVG のみが遊走作用を示した。脱感作実験及びラクトース阻害実験により、ノナペプチドはペンタペプチド及びヘキサペプチドとは異なる受容体を介して活性を発現することが示唆された。

Macrophage chemotaxis induced by elastin-derived peptides

Iori Maeda¹, Maria Portia P. Briones², Noriaki Mizoiri², and Kouji Okamoto¹

¹Graduate School of Life Science and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology

²Department of Bioscience and Bioinformatics, Faculty of Computer Science and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology

Elastin is the core protein of elastic fibers in connective tissues like arteries, lungs and skin, and is degraded to peptide fragments in several diseases such as atherosclerosis, emphysema and metastasis. It has been reported that elastin fragments that is elastin-derived peptides have various biological activities and they are involved in the progress of diseases. Elastin has several repeating peptide sequences in its hydrophobic regions of human, bovine and porcine elastin molecules: pentapeptide (VPGVG), hexapeptide (VGVAPG) and nonapeptides (AGVPGL/FGVG). Hexapeptide (VGVAPG) has been identified as a chemoattractant for macrophages.

In this study, circular permutations of VPGVG and VGVAPG were synthesized and examined their chemotactic abilities for macrophages. Two elastin-derived nonapeptides and their seven analogue peptides in which Leu or Phe is substituted by Ile, Val, Ala, Gly, Pro, Lys or Glu were synthesized and also tested their macrophage chemotactic activity.

It was observed that one pentapeptide VGVPG and four hexapeptides VGVAPG, GVAPGV, VAPGVG, GGVVAP showed chemotactic response. Two nonapeptides (AGVPGLGVG and AGVPGFGVG) and Ile-substituted analogue (AGVPGIGVG) induced the chemotaxis of macrophages. Results of deactivation test and of effect by lactose on macrophage migration showed that lactose-insensitive receptor which mainly recognizes AGVPGIGVG is presumably present on the membrane of macrophages in addition to the elastin-binding protein sensitive to lactose.

P7 Fibrillin-1 線維に対する紫外線および過酸化水素の影響

○錦織 麻衣¹ 野中 里紗¹ 輪千 浩史¹ 尾之上 聡² 瀬山 義幸¹

¹星薬科大学大学院 薬学部 医療薬科学専攻

²株式会社コーセー開発研究所

【目的】皮膚における弾性線維は主に真皮中に存在し、その展延・収縮性や弾力性維持に重要な役割を果たしている。これまで加齢や光加齢による皮膚弾力性低下に弾性線維の異常が関与するという報告はあるものの、詳細な解明には至っていない。そこで我々は弾性線維が紫外線または過酸化水素によりどのような影響を受けるか検証した。

【方法】実験は Confluent まで培養した正常ヒト皮膚線維芽細胞に UVA を連回照射（24 時間ごとに 3 回照射）または過酸化水素を処理後、弾性線維関連タンパク質の遺伝子発現とタンパク質発現を、RT-PCR 法または Western blotting 法にて解析した。弾性線維の形態変化および線維量変化を、蛍光免疫染色法および ELISA 法にて検討した。

【結果及び考察】UVA 連回照射により Fibrillin-1 (Fib-1) の発現が抑制され、Fib-1 線維の形態異常が確認された。さらに、UVA 照射直後に大腸菌組換え tropoelastin (rTE) を添加すると、rTE の沈着亢進が認められた。なお、これらの UVA による変化は、H₂O₂ の処理により同様な結果が観察された。皮膚真皮層では、UVA により活性酸素の産生が知られている。本研究結果は、紫外線による弾性線維の変化に、活性酸素の一部関与が考えられ、皮膚の光老化の解明に寄与すると思われる。

UVA irradiation and hydrogen peroxide cause an abnormality of fibrillin-1 fiber on human skin fibroblast cells

Mai Nishikiori¹, Risa Nonaka¹, Hiroshi Wachi¹, Satoshi Onoue², and Yoshiyuki Seyama¹

¹Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

²KOSE Corporation, Research & Development Division

【Aims】Fibrillin-1 containing microfibrils are a secreted extracellular matrix protein that functions as a scaffold for elastin fiber assembly. Chronically sun-exposed human skin is characterized by dermal connective tissue damage including the abnormal accumulation of elastic fibers. However, little is known about the relationship between the abnormal accumulation of elastic fiber and the sun-damaged skin. In this study, we demonstrated the expression of fibrillin-1 and the accumulation of fibrillin-1 fiber by ultraviolet-A (UVA) irradiation and hydrogen peroxide in cultured human skin fibroblasts (HSF) cells.

【Methods】HSF cells were treated with UVA irradiation (10 J/cm²/day) for three days or hydrogen peroxide. Expression of protein levels and mRNA levels was determined by the RT-PCR and the Western blotting, respectively. Morphological change and amount of fibrillin-1 fibers were evaluated by immunofluorescence staining and semi-quantitative ELISA, respectively.

【Results】The UVA irradiation caused decrease of fibrillin-1 expression at both protein level and mRNA level in a dose- and time-dependently manner, respectively. We also observed the increase of thick fibrillin-1 fibers and tropoelastin deposition after the exposure to UVA irradiation. A similar result was observed when HSF cells were treated with hydrogen peroxide.

【Conclusion】These results suggest a possibility that the abnormal accumulation of elastic fiber caused by the sun-damaged skin result from the abnormal fibrillin-1 metabolisms, especially the abnormal accumulation of fibrillin-1 fiber. The present study would be useful for the understanding of progression of solar elastosis or the development of treatment on the sun-damaged skin.

P8 弾性線維形成における tropoelastin の疎水性領域の役割

○野中 里紗¹ 小川 達也¹ 前田 衣織² 岡元 孝二² 輪千
浩史¹ 瀬山 義幸¹

¹星薬科大学 臨床化学

²九州工業大学 生命体工学研究科

Role of hydrophobic domains in the tropoelastin molecule on the elastic fiber formation

Risa Nonaka¹, Tatsuya Ogawa¹, Iori Maeda², Kouji Okamoto², Hiroshi
Wachi¹, and Yoshiyuki Seyama¹

¹Department of Clinical Chemistry, Hoshi University School of
Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

²Department of Biochemical Engineering and Science, Kyushu
Institute of Technology

【目的】弾性線維形成過程において、分泌された Tropoelastin (TE) の自己集合は重要な反応であり、TE の疎水性領域はこの自己集合に必須な領域であると考えられている。しかし、自己集合と弾性線維形成との詳細な関係は未だ明らかにされていない。弾性線維再構築モデルを用いて、TE の疎水性領域と弾性線維形成について検討した。

【対象及び方法】大腸菌組換え全長ヒト TE (HTE) および TE の疎水性領域である exon18 を欠損した HTE (Δ 18) を作製した。作製した組換え TE のマイクロフィブリル線維への沈着を比較するため、それぞれの TE を前培養したヒト網膜色素上皮細胞 (ARPE-19) に添加し、経時的に TE の沈着を蛍光免疫染色法で確認した。

【結果】HTE および Δ 18 のマイクロフィブリル線維への沈着を比較検討したところ、添加 24 時間後では、HTE は線維状の沈着を示すのに対し、 Δ 18 は凝集をした沈着を示した。添加 72 時間後では、両者とも同等の線維状態が観察された。

【考察】疎水性領域であるエクソン 18 は、初期段階での TE 沈着に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。今後、他の疎水性領域についても同様に検討するとともに、自己集合と架橋アミノ酸量についても測定し、疎水性領域と弾性線維形成の関係を明らかにしたい。

It is believed that the process of coacervation is mainly due to interactions between the hydrophobic domains of tropoelastin and promotes the formation of covalent cross-links, such as desmosine or isodesmosine. However, little is known about role of hydrophobic domain of TE involved in elastic fiber formation. In the present study, we examined elastic fiber formation using exon 18, a hydrophobic domain of TE molecule, missing tropoelastin. Bacterial recombinant full length human tropoelastin (HTE) and exon18 missing human tropoelastin (Δ 18) was added to ARPE19 culture medium. Double immunofluorescence staining showed abnormal aggregation of Δ 18 on the fibrillin-1 fiber, but not HTE. Our data suggest that exon18 plays an important role on initial deposition of TE.

P9 末梢神経発生におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの役割

Role of heparan sulfate in the development of peripheral nervous system

○松本 嘉寛¹ 山口 悠² 入江 史敏² 岩本 幸英¹

Yoshihiro Matsumoto¹, Yu Yamaguchi², Fumitoshi Irie², and Yukihide Iwamoto¹

¹九州大学医学部医学科整形外科

²バーナム医学研究所

¹Department of Orthopaedic Surgery, Kyushu University School of Medicine

²Burnham Institute of Medical Research

【目的】近年、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。我々は、脊髄発生において HS が アクソンガイダンスに必須であることを報告した。今回は、さらに解析をすすめ、末梢神経発生における HS の役割について検討した。

【方法】頸随より発生する横隔神経の、その標的臓器である横隔膜への伸長は、末梢神経発生の解析に最も適したモデルのひとつである。今回、発生段階に神経根、シュワン細胞に発現する Nestin を用いて、EXT1 を末梢神経特異的に欠損させ (EXT/Nestin マウス)、変異個体の組織学的解析を行った。

【結果】EXT/Nestin マウスは、呼吸不全のため生直後に死亡した。その際、肺泡は虚脱しており横隔膜機能不全が疑われた。EXT/Nestin マウスにおいて、横隔神経の伸長は障害されており、横隔膜上のシュワン細胞数も減少していた。一方、神経筋接合部の総数も減少していたが、形成異常は認められなかった。また、EXT/Nestin マウスのシュワン細胞は野生型と比較して、増殖能は同程度であったが、運動能は低下していた。

【考察】シュワン細胞は、末梢神経の正常な伸長、神経筋接合部の形成の初期に必須である。EXT/Nestin マウスにおいては、シュワン細胞の運動能低下のため、横隔膜へ到達するシュワン細胞が減少し、末梢神経形成の障害が生じたと考えられる。今回の研究により、HS は末梢神経の正常な伸長、筋支配に必須であることが示された。

Heparan sulfate (HS) is one of the glycosaminoglycans, which play major role in mammalian development. Recently, we have shown that conditional deletion of Ext1 allele in spinal cord resulted in abnormal axon guidance of commissural axon, suggesting the essential role of HS in the development of spinal cord. In this report, we analyzed the role of HS in the development of peripheral nervous system (PNS).

To determine the physiological role of HS in mammalian PNS development, we used the Nestin-Cre-mediated recombination in entire PNS, including in the spinal cord, dorsal root ganglion. Schwann cells (SCs). The mutant mouse (mutants) died after birth because of the dyspnea, suggesting the dysfunction of a diaphragm. In the mutants, the axonal branches of phrenic nerve shorter than those of wild type, resulting in the nerve covering a narrow area of the diaphragm. To analyze these phenotypes, the phrenic nerve was dissected and examined. The mutant nerve was thin and the number of the SCs was markedly decreased in mutant nerve. Then, we prepared both of the proximal and distal stamps of the nerves and counted the number of SCs. In mutants, the number of SCs in the proximal stamp was not significantly different, while the number of SCs in the distal region of the mutants nerve was decreased, strongly demonstrated that the motility of SCs in mutants was decreased. Therefore, we supposed that impaired cell migration of SCs along the developing nerve was one of the likely cellular causes underlying the PNS phenotype of mutants.

P10 プロテオグリカンを用いた新規切迫早産治療薬の開発

○田中 幹二¹ 松倉 大輔¹ 谷口 綾亮¹ 樋口 毅¹ 水沼 英樹¹

¹ 弘前大学医学部産婦人科

Development of a novel therapeutic drug for treatment of preterm delivery

Kanji Tanaka¹, Daisuke Matsukura¹, Ryousuke Taniguchi¹, Tsuyoshi Higuchi¹, and Hideki Mizunuma¹

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Hirosaki university school of medicine

【目的】早産の原因として絨毛羊膜炎（CAM）が極めて重要である。また CAM の発症、子宮頸管熟化には、頸管中、羊水中の種々な炎症性サイトカインが重要な働きをしている。一方、プロテオグリカン（PG）は細胞外基質の主要構成成分でありながら、これまでは単に組織構造を維持する物質と考えられていた。ところが近年の研究で細胞の機能発現に重大な影響を与える事が知られるようになり、特に最近ではその抗炎症作用が注目されている。そこで今回は、リポ多糖（LPS）により刺激した子宮頸管由来培養線維芽細胞に PG を添加し、同細胞における PG の炎症性サイトカインへの影響を調べる事により、PG の早産防止の新しい治療薬としての可能性について検討した。

【方法】患者の同意を得て手術時採取した子宮頸管組織片を培養し、得られた線維芽細胞の培地に LPS を 1 μ g/ml の濃度で添加し、さらに PG 添加群、非添加群（LPS 群）、既存の早産治療薬ウリナスタチン（UTI）添加群に分けて 48 時間まで培養後、培地中の IL-1 β 、IL-6、IL-8 の産生量を ELISA 法により定量し比較検討した。

【成績】ヒト子宮頸管培養線維芽細胞は上記量の LPS 添加によっては IL-1 β を産生しなかった。一方、IL-6 については LPS 群では経時的に産生が増加したが、PG を添加することにより、33%から 54%の産生量の減少を示した。また、UTI とほぼ同等の抑制効果が認められた。IL-8 産生も LPS 添加により経時的に増加したが、PG を添加することにより 30%前後の減少を示した。しかし、全体として、その減少幅は UTI に比較すると小さいものであった。

【結論】PG は CAM の発症、頸管熟化に重要な種々の炎症性サイトカインを著明に抑制したことから、PG が早産防止の新しい治療薬となり得る可能性が示唆された。

Chorioamnionitis (CAM) is an extremely important factor in preterm delivery, and various inflammatory cytokines of amnion fluid have important roles in the onset of CAM and cervical ripening. Although proteoglycan (PG), a main component of the extracellular matrix, was once considered merely to maintain tissue, recent studies have shown its important effect on cellular function manifestation, and its anti-inflammatory effects have attracted particular attention. In the present study, the effect of PG on inflammatory cytokines was investigated in cultured fibroblasts from the uterine cervix which was stimulated by lipopolysaccharide (LPS). With the informed consent of the patient, who had undergone total hysterectomy for uterine myoma, a specimen of normal human uterine cervix was collected. LPS was added to the fibroblastic culture media, and the cells were incubated with or without PG, UTI for 48 h. The amounts of IL-1 β , IL-6 and IL-8 in the medium were assayed by the ELISA method. The amount of IL-6 in the medium produced by cultured fibroblasts from the uterine cervix increased after the addition of LPS. The addition of PG to the medium of cultured cells reduced the amount of IL-6 in a dose-dependent manner. The amount of IL-6 incubated with PG was suppressed by 33~54% compared with the controls. In addition, similar decreases in IL-8 were brought about by the addition of PG. These results indicate that preterm delivery may be suppressed by using PG since it inhibited various inflammatory cytokines that mainly contribute to the onset of CAM and cervical ripening.

***P11 マウス胚発生初期における基底膜蛋白質の局在プロファイル**

○二木 杉子¹ 中野 伊津子¹ 眞鍋 理一郎¹ 筒井 仰¹ 三千典子¹ 佐渡 義一² 関口 清俊¹

¹大阪大学蛋白質研究所

²重井医学研究所

Developmental regulation of basement membrane composition during early stages of mouse embryogenesis

Sugiko Futaki¹, Itsuko Nakano¹, Ri-ichiroh Manabe¹, Ko Tsutsui¹, Noriko Sanzen¹, Yoshikazu Sado², and Kiyotoshi Sekiguchi¹

¹Institute for Protein Research, Osaka university

²Shigei Medical Research Institute

基底膜は上皮細胞の基底部などに形成されるシート状の細胞外マトリックスで、生体内では組織構築に不可欠な役割を果たす。基底膜を構成するのはラミニンやIV型コラーゲンをはじめとする基底膜特異的な蛋白質やプロテオグリカンで、その多くは組織や発生段階ごとに異なる局在パターンを示す。このような発生段階・組織特異的な基底膜分子の発現は、発生や器官形成に重要な役割を果たしていると考えられるが、胚発生初期の組織・器官における基底膜分子の発現プロファイルの包括的な解析はほとんど行われていない。我々は発生初期の器官形成期における基底膜分子構成の時空間制御の実体を解明するため、胎生5日目(E5.5)からE10.5のマウス胚を用いて、ラミニンとIV型コラーゲンの全サブユニットを含む主要基底膜蛋白質20種類の局在を免疫組織化学的に解析した。E5.5からE7.5のマウス胚では外胚葉・中胚葉・内胚葉という細胞系譜の分化が生じ、さらにその中で将来異なる組織を形成する予定領域の分化が起こる。この時期の胚の基底膜の分子組成は比較的一様であるのに対し、羊膜などの胚外組織ではより多様な基底膜分子の発現が見られることが明らかとなった。E8.5からE10.5にかけては神経管と脳胞、心臓、肺、消化管、肝臓、血管系などの主要な臓器・器官が形成される。解析の結果、器官原基の形成や発達に伴って基底膜の分子組成が大きく多様化することが示された。これらの発現パターンの変化は、器官形成の初期段階から基底膜組成が制御されていることを示しており、発生過程における細胞分化の制御において基底膜が果たす役割の一端を示唆している。

Basement membrane (BM) is a sheet-like extracellular matrix composed of BM-specific molecules such as laminin, type IV collagen, nidogen and perlecan. Expression of the BM molecules are tissue-specific and developmentally regulated, indicating that the composition of BMs plays an important role in organogenesis and cell fate determination during embryonic development. However, the expression profiles of BM proteins at early developmental stages remain fragmentary and restricted to certain organs and/or developmental stages. To obtain the comprehensive profiles of BM composition during organogenesis, we focused on early stages of mouse embryogenesis and analyzed immunohistochemically the distribution of 20 major BM proteins including individual subunits of laminins and type IV collagens in whole embryos at embryonic day (E) 5.5 through E10.5. At the stages between E5.5 and E7.5, where embryonic cells differentiate into three germ layers, ectoderm, mesoderm and endoderm, the BM composition in the embryonic regions did not show any prominent variation, although it was more diverse in the extraembryonic tissues such as amnion and extraembryonic mesoderm. As the development proceeds to E8.5-E10.5, where major organs such as neural tube, heart, lung, guts, liver, and vascular systems begin to develop, we found that the BM composition became more diverse, showing clear distinctions among different organs and tissues. These results are consistent with the proposed concept that the BM composition is regulated developmentally and such spatiotemporal regulation of BM composition plays an important role in organogenesis and its associated cell fate determination.

P12 無細胞蛋白質合成系を用いたラミニンサブユニット会合機構の解析

○新美 友章¹ Phan Hoang-Phuong¹ 江連 徹² 伊東 昌章²
門脇 辰彦¹ 北川 泰雄¹

¹名古屋大学大学院生命農学研究科

²株式会社島津製作所

【目的】本格的に始まりつつある再生医療を見据え、幹細胞の培養基質としてヒト型ラミニンを大量に調製する方法を確立することが重要である。本研究では、昆虫細胞由来の無細胞蛋白質合成系を用いてヒト・ラミニンサブユニットを合成し、*in vitro* で三量体を再構成することを試みた。

【方法】ヒト表皮角化細胞から抽出した mRNA を用いて RT-PCR 法により、ラミニン-332 (ラミニン-5) の構成鎖である $\alpha 3$ A 鎖、 $\beta 3$ 鎖、 $\gamma 2$ 鎖の全長 cDNA をクローニングし、*in vitro* 転写用ベクターである pTD1 に挿入した。また各鎖のコイルドコイル (LCC) ドメインのみ、および $\alpha 3$ A 鎖の短腕の一部または LG ドメインの一部を欠失させた変異体も同時に作製した。*in vitro* 転写により mRNA を調製し、昆虫細胞由来の無細胞蛋白質合成系を用いて蛋白質を合成した。サンプルを非還元条件の SDS-PAGE に供し、免疫ブロット法により二量体および三量体の形成を検出した。その結果、各鎖の LCC ドメインを共発現させた場合のみ、ジスルフィド結合によって会合した $\beta 3$ - $\gamma 2$ ヘテロ二量体および $\alpha 3$ A- $\beta 3$ - $\gamma 2$ ヘテロ三量体の形成が観察された。各鎖の会合様式は細胞内での結果と同じであり、昆虫細胞由来の無細胞蛋白質合成系が、ラミニン鎖の会合機構のみならず、他の複合体を形成する多量体蛋白質の会合機構を解析するモデル系として使えることが示唆された。現在、この系を用いて、鎖間会合におけるジスルフィド結合の役割について解析中である。

Expression and chain assembly of laminin subunits in cell-free translation system

Tomoaki Niimi¹, Hoang-Phuong Phan¹, Toru Ezure², Masaaki Ito²,
Tatsuhiko Kadowaki¹, and Yasuo Kitagawa¹

¹Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University

²Shimadzu Corporation

Laminins are a family of large heterotrimeric glycoproteins comprising α , β , and γ chains. To understand the molecular mechanisms of chain assembly *in vitro*, we expressed human laminin-332 (formerly known as laminin-5) subunits in insect cell-free translation system. For this, we prepared the plasmid constructs encoding full-length and laminin coiled-coil (LCC) domain of laminin $\alpha 3$, $\beta 3$, and $\gamma 2$ chains. In addition, several shorter versions of $\alpha 3$ chain were prepared lacking LEC domain, and also LG2-5 or LG4-5 domain. These chains were synthesized in insect cell-free translation system, and the products were evaluated by immunoblotting. We successfully produced $\beta 3$ - $\gamma 2$ heterodimer and $\alpha 3$ - $\beta 3$ - $\gamma 2$ heterotrimer of LCC domain in co-translation of each chain. $\alpha 3$ - $\beta 3$ or $\alpha 3$ - $\gamma 2$ heterodimer was not detected, suggesting that $\alpha 3$ chain can assemble with only $\beta 3$ - $\gamma 2$ heterodimer to form heterotrimer with disulfide bonds. These results are consistent with the previous report that laminin chain assembly proceeds through β - γ heterodimer to α - β - γ heterotrimer *in vivo*. We therefore suggest that the cell-free translation system could be a valid system to study a mechanism of laminin chain assembly. Using this system, we are currently investigating roles of disulfide bonds during chain assembly.

P13 GM1 を介した laminin-1 による神経突起伸長機構の解明

○市川 直樹¹ 岩渕 和久² 栗原 秀剛³ 保住 建太郎⁴ 山田 吉彦⁵ 平澤 恵理¹

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 環境医学研究所

³順天堂大学 医学部 解剖学

⁴東京薬科大学 医療薬物薬学科

⁵アメリカ国立衛生研究所

細胞外マトリックス分子 laminin-1 は、神経成長因子 (NGF) シグナルの存在下で、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。また、NGF シグナルには、ガングリオシド GM1 と NGF 受容体 (TrkA) の会合が必須であることが報告されている。これまでの研究から、我々は、laminin-1 が GM1 と直接的に結合し、細胞膜上の GM1, TrkA, integrin $\beta 1$ が凝集すること、また GM1 の凝集を阻害すると、integrin $\beta 1$ の凝集と神経突起伸長が阻害されることを明らかにしてきた。今回、私たちは laminin-1 が TrkA と直接的に結合はしないが、間接的に NGF/TrkA の下流シグナルである Akt や MAPK の活性化を増強していること、また siRNA による integrin $\beta 1$ の knockdown の条件下では、突起形成はみられるが、突起伸長そのものは抑制されること、さらに GM1 の凝集を阻害させると、神経突起の形成と伸長の両方が見られないことを明らかにした。更に、GM1 と結合する Cholera toxin B subunit (CTxB) は、integrin $\beta 1$ と結合する collagen や fibronectin 上で培養した PC12 cells の神経突起伸長を促進することが分かった。また、integrin $\beta 1$ の knockdown 時や GM1 凝集の阻害時には、これらの神経突起伸長活性が顕著に抑制された。これらの結果から、laminin-1 が GM1 と結合し、GM1 の凝集を誘導し、それによって integrin と TrkA の局在凝集誘導がもたらされ、神経突起形成シグナルの活性化が起こると考えられる。その過程において、GM1 との結合と凝集は神経突起形成に、また、integrin シグナルの活性化は突起伸長に必要であることが明らかになった。

The mechanism of laminin-1-induced neurite outgrowth via ganglioside GM1

Naoki Ichikawa¹, Kazuhisa Iwabuchi², Hidetake Kurihara³, Kentaro Hozumi⁴, Yoshihiko Yamada⁵, and Eri Arikawa-Hirasawa¹

¹Research Institute for Diseases of Old Age Juntendo University School of Medicine

²Inst. Environmental and Gender-Specific Medicine Juntendo University School of Medicine

³Dept. Anatomy Juntendo University School of Medicine

⁴Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

⁵Cell and Dev Biol, NIDCR, NIH

Laminin-1 is one of the most potent matrix molecules to promote neurite outgrowth through integrin in the presence of nerve growth factor (NGF). It is also reported that the interaction of NGF receptor (TrkA) and monosialoganglioside GM1 is required for NGF-mediated neurite outgrowth. However, it is not clear how laminin-1 coordinates integrin and TrkA signaling pathways in promoting neurite outgrowth. We found that laminin-1 directly bound to GM1, induced the aggregation of GM1, and promoted subsequent clustering of TrkA and integrin in lipid rafts. Prevention of laminin-1-induced clustering of GM1 inhibited clustering of integrin and neurite outgrowth, indicating that the laminin-1-GM1 interaction is a prerequisite for these processes. Laminin-1 did not directly bind to TrkA, but indirectly enhanced the activation of Akt and MAPK, downstream of TrkA signaling. When integrin $\beta 1$ expression in PC12 cells was suppressed by RNAi, neurite formation occurred, but neurite processes were not elongated. In contrast, prevention of clustering of GM1 by lyso-GM1 inhibited the protrusion of neurites. Moreover, we found that the Cholera toxin B subunit (CTxB), which binds to GM1, promoted neurite outgrowth of PC12 cells when the cells were plated on a collagen or fibronectin substrate, which binds integrin $\beta 1$. This CTxB-induced neurite outgrowth was inhibited by knockdown of integrin $\beta 1$ or prevention of clustering of GM1. These results suggest that laminin-1 serves as a ligand for GM1 to form focal lipid rafts that act as signaling centers for neurite outgrowth by linking and coordinating with NGF and integrin signaling pathways.

P14 血管および上皮基底膜におけるラミニン α 3B鎖の発現と分布

○森 泰三¹ 刈谷 慶喜¹ 安田 知永¹ 小川 崇¹ 宮崎 香¹

¹横浜市立大学 木原生物学研究所 細胞生物部門

ラミニンは基底膜の主要な構成分子であり、 α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖の三つのタンパク質が会合して形成されるヘテロ三量体のマトリックスタンパク質である。この分子は、*in vitro* において細胞接着、細胞運動活性等を示すことから、主に組織構造の維持や創傷治癒において機能していると考えられている。近年、ラミニン構成鎖の一つである α 3鎖には、N末端の短い α 3A鎖に加え、N末端が長く、スプライシングバリエントである α 3B鎖が存在することが明らかになっている。 α 3A鎖を含むアイソフォームであるラミニン3A32は、ケラチノサイトから分泌され、上皮構造の安定的な接着に寄与していると考えられており、生理活性に関する詳細な分析が行われてきた。しかし、現在までにおいて α 3B鎖についての研究はほとんど行われていない。そこで私達は、RT-PCRを用いて生体内における α 3B鎖の発現を調べたところ、正常組織において幅広い発現を示した。加えて、ラミニン α 3B鎖特異的モノクローナル抗体を作製し、正常組織における発現を分析した。その結果、皮膚、乳腺、食道、肺の上皮基底膜において α 3B鎖の発現が確認され、また α 3A鎖、 β 3鎖、 γ 2鎖との共局在を示した。この結果から、これらの正常組織の上皮基底膜におけるラミニン3B32の発現が明らかとなった。ラミニン3B32の発現量は肺胞においてはラミニン3A32より高く、その他組織の上皮基底膜においては、ラミニン3A32よりも低いと考えられた。一方、これらの組織の血管基底膜においてはラミニン3A32構成鎖がほとんど発現していないのに対し、 α 3B鎖の強い発現が確認され、また β 1、 γ 1鎖との共局在を示した。以上の結果から、血管基底膜におけるラミニン α 3B鎖はラミニン3B11/3B21として存在しており、正常組織において幅広く発現していることが示唆された。 α 3B鎖を含むこの新規ラミニンが正常血管内皮細胞の機能を調節している可能性が予想される。

Expression of laminin α 3B chain in vascular and epithelial basement membranes and its possible functions

Taizo Mori¹, Yoshinobu Kariya¹, Chie Yasuda¹, Takashi Ogawa¹, and Kaoru Miyazaki¹

¹Yokohama City University, Kihara Institute for Biological Research, Division of Cell Biology

The basement membrane (BM) proteins laminins, which consist of α , β , γ chains, play critical roles in the maintenance of tissue structures and cellular functions. In blood vessels, the α 4- and α 5-laminin, e.g. laminin-411 (laminin-8) and laminin-511 (laminin-10), are thought to play major roles, and there are few studies reporting other laminins. The present study demonstrates the presence of novel α 3B-containing laminins in vascular BMs. Laminin α 3 chain has two isoforms, the truncated form α 3A and the full-sized form α 3B. Although the α 3A-containing laminin, laminin-3A32 (laminin-5A), has been extensively studied. However, there is little information about α 3B-containing laminins. To show the histological distribution of the laminin α 3B chain, we prepared α 3B-specific monoclonal antibodies. RT-PCR analysis indicated the wide distribution of the α 3B chain in normal human tissues. Immunohistochemical analysis showed that the α 3B chain was colocalized with the α 3A, β 3 and γ 2 chains in the epithelial BMs of the skin, esophagus, breast and lung, suggesting the presence of laminin-3B32 (laminin-5B) and laminin-3A32. In the lung alveoli, laminin-3B32 was dominant over laminin-3A32, but vice versa in other epithelial BMs. In contrast, the BMs of blood vessels including capillaries and venules in these tissues were strongly positive for α 3B, almost negative for α 3A, and completely negative for β 3 and γ 2. The α 3B chain was colocalized with the β 1 and γ 1 chains in these BMs. These results strongly suggest that the laminin α 3B chain is widely expressed in vascular BMs of normal tissues, probably as laminin-3B11/3B21 (laminin-6B/7B).

***P15 Cyclophosphamide を用いた脱毛モデル
マウスの毛包における laminin-332, -511 の
解析**

○今西 久幹¹ 鶴田 大輔¹ 菅原 弘二¹ 池田 一雄² 小林
裕美¹ 石井 正光¹

¹大阪市立大学大学院医学研究科皮膚病態学

²大阪市立大学医学研究科器管構築形態学

抗癌剤による脱毛はその程度、頻度の高さから一般にも広く知られているところである。我々は最近、基底膜構成分子である laminin-332 および laminin-511 が毛周期成長期において時間的、空間的にその発現レベルを変動させることにより、毛の成長を的確に制御する機構を解明した。即ち、laminin-511 が毛成長に対して促進的に作用するが、その毛成長促進作用は laminin-332 の投与によって有意に抑制される。今回の我々の目的は細胞外マトリックス分子である laminin の観点から化学療法後脱毛のメカニズムを解明することである。

ヒトの毛周期と類似の毛周期を同期的に示す代表的モデルと考えられている C57black/6 マウスの背部から抜毛し、その9日後に cyclophosphamide (150mg/kg) を腹腔内注射する。腹腔内注射施行後8日目までのマウス背部皮膚サンプルを採取し、免疫ブロット・蛍光抗体染色法・in situ hybridization・RT-PCR 法を施行した。その結果、成長期において下部毛包の外毛根鞘で消失する laminin-332 が、化学療法後の mid dystrophic catagen から late dystrophic catagen にかけて再出現する傾向が示された。また蛍光抗体染色法では成長期において外毛根鞘で発現する laminin-511 が、late dystrophic catagen 以降に消褪する傾向が認められた。上記より cyclophosphamide による化学療法後脱毛において、下部毛包の laminin-332 の再出現と、laminin-511 の消褪が関与していることが示唆された。

**Analysis of laminin-511 and-332 in the hair follicles
in cyclophosphamide-induced alopecia (CIA)
model mice**

Hisayoshi Imanishi¹, Daisuke Tsuruta¹, Koji Sugawara¹, Kazuo Ikeda²,
Hiromi Kobayashi¹, and Masamitsu Ishii¹

¹Department of Dermatology, Osaka City University Graduate School of Medicine

²Department of Anatomy, Osaka City University Graduate School of Medicine

Chemotherapy-induced alopecia (CIA) is widely known because of its severity and high frequency. We recently revealed that laminin-332 (5) and -511 (10), the basement membrane zone (BMZ) components, precisely regulate hair growth both spatially and temporally during the induction of anagen hair growth; laminin-511 plays the positive role and laminin-332 does the negative role on hair growth. The purpose of this study is to elucidate the role of laminin-511 and -332 on the development of CIA.

Mice hair-depilation model was used, which was previously reported. At ninth day after depilation, 150 mg per kg body weight of cyclophosphamide was injected intraperitoneally. Mice were killed and the dorsal skin was harvested each day after cyclophosphamide was injected. We performed western immunoblotting, immunohistochemistry, in situ hybridization, and semi-quantitative RT-PCR analyses for those samples. In anagen, laminin-332 is reported to be lost at the BM around the outer root sheath of lower one thirds of hair follicle, it was reappeared after mid to late dystrophic catagen both quantitatively and qualitatively. In contrast, Laminin-511, which is considered to be an inducer of hair growth, was downregulated steadily after late dystrophic catagen in the epidermal and ORS keratinocytes. In conclusion, the reappearance of laminin-332 and the regression of laminin-511 at BM in the hair follicles may contribute to the development of CIA.

***P16 ヘパリンは線維芽細胞のシステインプロテアーゼ型カテプシンの分泌を亢進する**

○石川 孝¹ 稲村 奈津美² 平原 未歩³ 岡本 浩明² 七島直樹¹ 中村 敏也¹

¹弘前大学大学院保健学研究科医療生命科学領域

²弘前大学大学院保健学研究科保健学専攻生体機能科学領域

³弘前大学医学部保健学科検査技術科学専攻

【目的】肥満細胞は内部顆粒にヒスタミン、ヘパリン(以下Hepと略記)等を含み、皮膚では線維芽細胞とともに真皮層に局在する。癌によっては肥満細胞がその周囲に集積し、肥満細胞の一部が脱顆粒を起こして周辺の細胞外マトリックスの分解が亢進することが知られている。しかしその原因物質については不明な点が多い。そこで今回Hepに焦点を当て、線維芽細胞のカテプシン活性への影響について検討した。

【方法】ヒト皮膚線維芽細胞をHep添加無血清MEM培地で3日間培養し、培地を回収した。培地中のタンパク質を硫酸分画法で濃縮し、カテプシン検出用のLDSザイモグラフィにてカテプシン活性へのHep濃度、培養時間、システインプロテアーゼの特異的阻害剤E-64の影響を検討した。カテプシン活性の定量はZ-Phe-Arg-MCAを基質として行った。また、他のグリコサミノグリカンの影響についても調べた。さらに二次元ザイモグラフィ、抗ヒトカテプシンV抗体を用いたウェスタンブロットを行った。

【結果】1μg/ml以上のHep濃度で分子量37kDaと105kDaのゼラチン分解活性が濃度依存性に増加した。またその活性増加は培養時間依存性であった。検出された活性バンドはE-64によってほとんど完全に阻害された。カテプシン活性の増加は使用した全ての硫酸化GAGで認められ、ヘパリンが最も強い影響を示した。しかしヒアルロン酸は影響しなかった。二次元ザイモグラフィによる105kDaのカテプシンの等電点は5.0であったが、37kDaの位置にはpH5.1~6.3付近にマルチプルなスポットが検出された。また105kDaのカテプシンはカテプシンVと免疫学的交差性を示した。

【結論】Hepは極めて低い濃度でシステインプロテアーゼ型カテプシンの分泌を亢進し、105kDaのカテプシンはカテプシンVと免疫学的交差性を示した。

Heparin increases the secretion of cysteine proteinase-type cathepsins in human skin fibroblasts

Takashi Ishikawa¹, Natsumi Inamura², Miho Hirahara³, Hiroaki Okamoto², Naoki Nanashima¹, and Toshiya Nakamura¹

¹Division of Medical Life Sciences, Hirosaki University Graduate School of Health Sciences

²Division of Biomedical Sciences, Course of Health Sciences, Hirosaki University Graduate School of Health Sciences

³Department of Medical Technology, Hirosaki University School of Health Sciences

Purpose: Mast cells contain heparin in internal granules and are localized in the dermis with fibroblasts. It has been recognized that mast cells accumulate at the periphery of some tumors and that mast cell degranulation is often associated with disruption of the extracellular matrix. However, the stimulus responsible for the increase of proteinase expression has not been clarified. Therefore, the influence of heparin on the secretion of cathepsins was examined in human skin fibroblasts.

Methods: Quiescent sub-confluent cells were cultured for 3 days in serum-free medium with or without heparin. The conditioned media were then collected and the effects of heparin concentration, cultivation time and E-64 were examined by zymography. Cathepsin activity was assayed with Z-Phe-Arg-MCA as a substrate. Additionally, two-dimensional zymography and immunoblot analysis using anti-human cathepsin V antibody were performed.

Results: Gelatinolytic activities with molecular masses of 37 kDa and 105 kDa were detected in the presense of heparin (>1 μg/ml) and increased in proportion with dose and cultivation time, but were entirely inhibited by E-64 in the zymography and cathepsin assay. Among the various glycosaminoglycans, heparin was the most effective for increasing these activities, whereas hyaluronan had no effect. Two-dimensional zymography showed that the isoelectric point of 105-kDa cathepsin was 5.0, whereas the 37-kDa enzyme showed multiple activity spots. Immunoblot analysis indicated that 105-kDa cathepsin cross-reacted with cathepsin V. These findings suggest that heparin is a potent inducer of cysteine proteinase-type cathepsins in human skin fibroblasts, and that one of them is immunologically related to cathepsin V.

P17 テネシンC由来ペプチド TNIIIA2 の受容体を媒介した β 1インテグリン活性化機構の究明

○原田 陽生¹ 齋藤 陽平¹ 奥津 啓明¹ 大脇 敏之¹ 深井 文雄¹

¹東京理科大学大学院 薬学研究科

【目的】細胞の細胞外マトリクス (ECM) への接着は細胞の生存, 増殖, 分化など様々な細胞応答に関与しており, この足場依存性の細胞機能制御は細胞膜上のインテグリンなどの接着分子によって規定される. 当研究室で見出されたテネシン C 由来のペプチド TNIIIA2 は, β 1インテグリンを強く活性化することが明らかになっている. 本研究では, ペプチド TNIIIA2 の細胞膜受容体を同定するとともに, 本受容体を介した β 1インテグリン活性化機構を明らかにする.

【方法・結果・考察】ヒト線維肉腫様細胞 WI38VA13 をヘパリチナーゼ I 処理すると, TNIIIA2 の β 1インテグリン活性化作用が消失した. HSPG の一つであるシンデカン-4 を siRNA を用いてノックダウンすると TNIIIA2 による β 1インテグリン活性化作用は抑制された. TNIIIA2 を作用させることでシンデカン-4 と β 1インテグリンの結合が上昇することが光アフィニティーラベルによって明らかになった. TNIIIA2 は, シンデカン-4 コアタンパクの細胞内領域を欠損した変異体の導入や本領域のエフェクターとして知られる PKC α の阻害剤の存在下や不活性型変異体 PKC α の導入いずれの場合においてもインテグリン活性化作用を示した. 一方, シクロデキストリンでraft/caveolaeを破壊すると, TNIIIA2 による β 1インテグリン活性化は阻害され, コレステロールの供給により回復した. 実際, 蛍光免疫染色法によって caveolin とシンデカン-4, β 1インテグリンが TNIIIA2 によって共局在することが確認された. 以上の結果から, TNIIIA2 はシンデカン-4 の HS 鎖に結合して複合体を形成することで直接 β 1インテグリン活性化を促進し, その際シンデカン-4 と β 1インテグリンはraft/caveolae に集積して作用を発現している可能性が示唆された.

Saito Y et al. J Biol Chem., 282 34929-34937 (2007)

A peptide derived from Tenascin-C induces β 1 integrin activation through syndecan-4

Yosei Harada¹, Yohei Saito¹, Hiroaki Okutsu¹, Toshiyuki Owaki¹, and Fumio Fukai¹

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science

<Introduction>

Interactions of cells with the extracellular matrix (ECM) are largely mediated by members of the integrin superfamily of adhesive receptors. The unique feature of integrins is the ability to alter their ligand-binding and signaling activities. Since integrin-mediated cell-ECM interactions play key roles in maintaining normal cellular functions, affinity modulation of integrins are critical for the anchorage-dependent cellular processes, such as growth, survival, migration and differentiation.

Tenascin (TN)-C is expressed predominantly during inflammation, wound healing and neoplastic processes. We have found a peptide derived from Tenascin-C, termed TNIIIA2, regulated cell survival and proliferation by stimulating β 1 integrin-mediated cell adhesion of nonadherent and adherent cell types, by inducing activation of β 1 integrin. In this study, we have attempted to identify cell surface receptor mediating proadhesive effect of TNIIIA2. The mechanism by which TNIIIA2 receptor activates β 1 integrins after ligation with TNIIIA2 was also investigated.

<Method Results Discussion>

TNIIIA2 was shown to bind to cell surface heparan sulfate proteoglycan (HSPG) via its HS chains, as examined by photo-affinity labeling. siRNA-based down-regulation of syndecan-4 expression reduce TNIIIA2-induced β 1 integrin activation, suggesting that syndecan-4 serves as a receptor. TNIIIA2-induced β 1 integrin activation was abrogated through disrupting cell surface raft/caveolae by cholesterol-depletion with cyclodextrin.

These results suggest that TNIIIA2 binds to syndecan-4 via its HS chains, and this TNIII-syndecan-4 complex interact laterally with β 1 integrin to activate β 1 integrin. The result using cyclodextrin reveals the accumulation of syndecan-4 and β 1 integrin into raft/caveolae region of cell surface in the process of β 1 integrin activation.

P18 接着抑制性ペプチドFNIII14の作用を媒介する受容体の実体究明

○長谷川 淳¹ 深井 文雄¹ 大脇 敏之¹ 内藤 壽彦¹ 板垣 圭祐¹

¹東京理科大学大学院

【目的】フィブロネクチン (FN) は、細胞膜上のインテグリン受容体を介した細胞接着のみならず、細胞機能を制御していることが知られている。当研究室では、FN由来のペプチド FNIII14 は積極的に細胞接着を阻害することで乳がんの転移抑制や急進骨髄性白血病の抗がん剤感受性の増強といった接着依存性の病態を改善することを見出してきた。本研究では、FNIII14 の作用を媒介すると考えられる 50KDa 膜タンパク質 (p50) の実体究明とその作用機序を明らかにすべく以下の実験を行った。

【方法・結果】ビオチン化 FNIII14 を用いたアフィニティー標識法により、p50 の検出を行ったところ、様々な細胞の中でマウス大腸がん細胞株 colon26.M3.1/FNIII14 の反接着作用を様々な細胞で解析した結果、マウス大腸がん細胞株 colon26.M3.1 及びマウス乳がん細胞株 4T1-C6 の細胞膜上には p50 が検出されなかった。それと相関して上記細胞では FNIII14 による接着阻害作用も見られなかった。次に、精製した p50 タンパクの内部配列を解析したところ、驚いたことに細胞質内で多彩な役割を担うことが知られているタンパク質 (タンパク質 X と仮称) と一致した。FNIII14 が細胞内に透過してタンパク質 X と作用しないことを立証するため、ポリエチレングリコールやアルブミンと抱合させた膜透過不能な FNIII14 を作成し、それらを用いた接着実験を行った。その結果、抱合 FNIII14 は未抱合 FNIII14 と同様に接着抑制作用を示すことが確認された。さらに、フローサイトメトリー解析や免疫細胞染色によって細胞膜上にタンパク質 X の存在が確認された。

【考察】FNIII14 に応答性のある細胞では、細胞質内に発現しているタンパク質 X が、一部細胞膜にも移行し、FNIII14 容体として機能する可能性が示された。

Identification of a membrane receptor mediating antiadhesive effect of peptide FNIII14

Jun Hasegawa¹, Fumio Fukai¹, Toshiyuki Owaki¹, Naito Toshihiko¹, and Keisuke Itagaki¹

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science

【Introduction】

It is demonstrated that Fibronectin (FN) regulates cell function through integrin-mediated cell adhesion. We previously found that a synthetic FN peptide derived from the 14th FN type III-like (FN-III) repeat, termed peptide FNIII14, inhibits cell adhesion to FN, which contributes improvement of anchorage-dependent diseases, for instance, anti-metastasis of breast cancer and increasing sensitivity to anti-cancer drug of acute myeloid leukemia. In this study we investigate to identify putative membrane receptor of 50 kDa, (p50), may mediate the antiadhesive effect of FNIII14.

【Result and discussion】

Firstly we performed p50 detection on various cell lines by affinity-labeling using biotinylated FNIII14. In those cells, the p50 band was not visualized on cell surfaces of Colon26M3.1 cells and 4T1-C6 cells, which was correlated with susceptibility to the antiadhesive effect of peptide FNIII14. Surprisingly the protein sequencing for purified p50 is identical to a well-known multifunctional protein, "protein X" (assuming a fictional name), that serves its role as an intracellular/cytoplasmic protein. To verify a hypothesis that FNIII14 does not penetrate the plasma membrane to show antiadhesive effect within the cell, we prepared polyethylene glycol- or ovalbumin-conjugated FNIII14 to perform adhesion assay. The antiadhesive effects of those conjugated FNIII14 were comparable to none-conjugated FNIII14. Moreover, both flow cytometric analysis and immunocytochemistry showed that protein X was expressed on outer cell surface.

These results suggest that some of protein X is transferred to outer surface of the FNIII14-responsive cell to mediate the antiadhesive effect of FNIII14, which may function as FNIII14 receptor.

***P19 関節リウマチにおける滑膜 EMMPRIN の関節破壊への関与**

Pathophysiological roles of EMMPRIN in rheumatoid arthritic synovium

○澤田 賢志¹ 今田 啓介¹ 佐藤 隆¹ 伊東 晃¹

Satoshi Sawada¹, Keisuke Imada¹, Takashi Sato¹, and Akira Ito¹

¹東京薬科大学薬学部 生化学・分子生物学教室

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

【目的】 Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) は、ガン細胞のみならず関節リウマチの滑膜においてもその発現が報告されている。しかし、滑膜細胞の MMP 産生に対する EMMPRIN の関節リウマチ病態への関与については未だ不明な点が多い。そこで、培養ヒト滑膜細胞の MMP 産生におよぼす EMMPRIN ノックダウンの影響について検討した。

【方法】 培養ヒト滑膜細胞を EMMPRIN siRNA で 72 時間前処理した後、IL-1 β および TNF α で処理し、proMMP-1, proMMP-2, proMMP-3, TIMP-1 産生におよぼす EMMPRIN ノックダウンの影響を Western blot 法、ゼラチンザイモグラフィ法、リアルタイム RT-PCR 法により検討した。

【結果】 ヒト滑膜細胞は恒常的に細胞表層に EMMPRIN を発現しており、EMMPRIN siRNA 処理によりその mRNA 発現量は 20% 程度にまで抑制された。この EMMPRIN ノックダウンにより IL-1 β または TNF α により促進された proMMP-1 および proMMP-3 産生は、mRNA レベルおよびタンパク質レベルともに強く抑制された。一方、proMMP-2 および TIMP-1 産生は EMMPRIN ノックダウンの影響を受けなかった。

【結語】 滑膜細胞は恒常的に EMMPRIN を発現しているものの、proMMP-1 および proMMP-3 産生レベルは極めて低い。しかし、IL-1 β または TNF α により促進された proMMP-1 および proMMP-3 産生が EMMPRIN ノックダウンにより特異的に抑制されたことから、EMMPRIN は炎症性サイトカインによるこれら proMMP 産生の増強因子として関節破壊に密接に関与することが判明した。

Objective: Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) has been shown to express in rheumatoid arthritic (RA) synovium as well as tumor tissue. However, the pathophysiological roles of EMMPRIN in RA remain unclear. In the present study, we examined the effect of EMMPRIN knock-down on matrix metalloproteinase (MMP) production in human synovial cells.

Methods: Human synovial fibroblasts were treated with EMMPRIN siRNA for 72 h prior to the treatment with IL-1 β or TNF α , and the expression and production of interstitial procollagenase/proMMP-1, progelatinase A/proMMP-2, prostromelysin-1/proMMP-3, and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 were monitored by Western blot analysis, gelatin zymography, and real-time RT-PCR.

Results: EMMPRIN was constitutively located on the cell surface of human synovial fibroblasts, and the expression level was lowered up to 20% from that of untreated cells by siRNA for EMMPRIN. IL-1 β - and TNF α -mediated production of proMMP-1 and -3 were suppressed by EMMPRIN knock-down, whereas proMMP-2 and TIMP-1 production was not unaffected.

Conclusion: EMMPRIN is expressed in synovial fibroblasts, however MMP production is not observed in the untreated cells. The present study revealed that EMMPRIN participates in joint destruction through the potentiation of proinflammatory cytokine-mediated proMMP-1 and -3 production in synovial fibroblasts.

P20 RA 滑膜細胞発現のオステオポンチン : B 細胞の抱きこみ現象と IL-6 産生刺激

Osteopontin in rheumatoid arthritis synovial cell : key molecule for B-cell pseudoemperipolesis and IL-6 production.

○武 靖浩¹ 中田 研¹ 吉川 秀樹¹ 越智 隆弘²

Yasuhiro Take¹, Ken Nakata¹, Hideki Yoshikawa¹, and Takahiro Ochi²

¹大阪大学大学院医学系研究科 器官制御外科学 整形外科

²大阪警察病院

¹Department of Orthopaedics, Osaka University Graduate School of Medicine

²Osaka Police Hospital

【目的】関節リウマチ (RA) 滑膜細胞は B 細胞を抱き込み IL-6 を含むサイトカイン産生を刺激していることが知られている。本研究では RA 滑膜において発現が上昇しているオステオポンチン (OPN) が, B 細胞の接着・IL-6 産生に関わるか検討した。

【方法】RA および非 RA それぞれ 4 患者由来の初代培養滑膜細胞 (Sy) (4~10 継代) と, B 細胞株 (BL) として MC/Car を実験に使用した。Sy の OPN 発現をウェスタンブロットにて確認した。Sy 単独, Sy と BL の細胞接触を伴う共培養, Transwell を挟み Sy と BL の細胞接触を伴わない共培養を行ない, 培養上清の IL-6 濃度を ELISA にて測定した。共培養状態で IL-6 に対する免疫蛍光染色を行ないその局在を観察した。Sy に OPN siRNA を導入し, BL との共培養を行ない, 培養上清の IL-6 濃度を ELISA にて測定した。Sy に OPN 中和抗体を投与し, BL との共培養を行ない, 抱きこまれた BL の細胞数を計測した。

【結果】ウェスタンブロットでは RA 滑膜全てと一つの非 RA 滑膜で OPN 発現が認められ, それらの滑膜細胞と BL との細胞接触を伴う共培養では培養上清中の IL-6 の著明な上昇が認められた ($>10\text{ng/mL}$)。一方 Sy 単独および Transwell を挟んだ共培養では IL-6 の上昇は認められなかった ($<2\text{ng/mL}$)。共培養状態での免疫蛍光染色では BL が IL-6 陽性であった。OPN siRNA 導入により培養上清中の IL-6 濃度は有意に減少し ($p<0.001$), OPN 中和抗体により, 抱き込まれた BL 数は有意に減少した ($p<0.001$)。

【考察】RA では Sy の発現する OPN により BL の抱きこみ現象が起こり, Sy と BL の細胞接触が持続することで BL の IL-6 分泌が刺激されていると考えられた。

Purpose: To elucidate how Osteopontin (OPN), which is known to be upregulated in rheumatoid arthritis (RA) synovium, affects pathomechanism of RA.

Methods: Primary cultured synovial cells (Sy) derived from 4 RA and 4 non-RA patients in passage from 4 to 10, and B lymphocyte (BL) cell line MC/Car, were used for experiments. OPN expression in Sy was assessed by western blotting. Each Sy was cultured alone, or cocultured with BL with or without Transwell insert to inhibit direct contact between Sy and BL. Culture supernatant was collected from each culture and its IL-6 concentration was measured by ELISA. Immunofluorescence assay was performed for assessment of IL-6 localization in Sy/BL coculture. OPN siRNA was transfected to Sy, cocultured with BL and its culture supernatant was assessed for IL-6 concentration. OPN neutralization antibody was added to Sy, cocultured with BL and the number of BL pseudoemperipolesis was counted.

Results: By western blotting, OPN was detected in all RA and one non-RA Sy, in accordance with elevated IL-6 concentration in Sy/BL coculture supernatant without Transwell. Meanwhile, IL-6 was not elevated in culture supernatant from Sy alone or Sy/BL coculture with Transwell. OPN siRNA transfection to Sy resulted in decrease of IL-6 concentration in Sy/BL coculture supernatant. OPN neutralizing antibody in Sy/BL coculture resulted in decrease of BL pseudoemperipolesis.

Conclusion: In RA, OPN expressed by Sy causes BL pseudoemperipolesis, which holds direct contact between Sy and BL and induces IL-6 expression in BL.

P21 シアリルLewis X糖鎖結合リポソームのリウマチ関節炎症部位への集積についての組織学的検討

○美名口 順¹ 大橋 俊孝¹ 峯松 秀希³ 大谷 敬亨³ 大家 一典³ 西田 圭一郎² 大塚 愛二² 二宮 善文¹ 五十嵐 貢一³

¹岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 分子医化学

²岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 人体構成学

³片山化学工業

【目的】我々はレクチンと糖鎖間の特異的な相互認識能を利用した標的指向性リポソームに注目し、糖鎖リポソームの開発を行っている。リポソームの膜表面にシアリルLewis X (SLX) 糖鎖を結合させた SLX リポソームは炎症部位の内皮に発現した E-セレクトインと相互作用し、関節炎あるいは担癌マウスの炎症や癌組織に特異的かつ効率的に集積することが、*in vivo* 蛍光イメージングの技術を利用してわかった (Hirai et al., 2006)。さらに走査型蛍光顕微鏡による観察から、リポソームが炎症部の血管から周辺組織へ移行していることが観察できた。しかしながら、SLX リポソームの周辺組織への移行状況とその最終ターゲットについての詳細な観察は行われていない。今回我々は関節炎モデルマウスにおいて、SLX リポソームの集積を電子顕微鏡レベルで観察したので報告する。

【方法】抗コラーゲン抗体 (CIA) 惹起関節炎モデルマウスに Cy 蛍光色素内包 SLX リポソームを尾静脈より投与する。24 時間後、足関節を摘出し、凍結切片 (粘着フィルムを用いた非脱灰硬組織凍結切片作製法: ライカ, 川本法) により蛍光の集積を確認した。さらに、電顕観察用試料に供した。観察は透過型電子顕微鏡 (日立 H-7100S) で行った。

【結果】関節炎モデルマウスの足関節周囲軟部組織にリポソーム内包蛍光色素集積が観察された。現在、電子顕微鏡レベルで詳細な観察結果の取りまとめを行っている。

【結論】本研究に使用した SLX リポソームはレクチンと糖鎖間の特異的結合を利用したアクティブ・ターゲティング DDS 技術として、炎症部位への種々の薬剤等を送達できる有用性があると考えられる。

Histological detection of the accumulation of liposomes with Sialyl lewis X to the inflammatory region in arthritic mice

Jun Minaguchi¹, Toshitaka Oohashi¹, Hideki Minematsu³, Takayuki Otani³, Kazunori Oie³, Keiichiro Nishida², Aiji Ohtsuka², Yoshifumi Ninomiya¹, and Koichi Igarashi³

¹Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, Department of Molecular Biology and Biochemistry

²Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, Department of Human Morphology

³Katayama Chemical Industries Co., LTD.

【Objective】Interaction of leukocytes and endothelial cells plays a crucial role in inflammatory disease. E-selectin is expressed on vascular endothelial cells activated by inflammatory cytokines, which can bind Sialyl-Lewis X (SLX) carbohydrate ligands on the surface of leukocytes. The interaction of E-selectin with leukocyte SLX is important for the initiation of attachment, rolling and homing of leukocyte on endothelium.

Previously, we have prepared the liposome with SLX on the surface, in which fluorescent substance Cy5.5 was included. The SLX-Lipo-Cy5.5 could mimic the leukocytes behavior, thus *in vivo* fluorescent imaging system (eXplore Optix) could demonstrate its accumulation to inflammatory region in arthritic mouse and in tumor bearing mouse. Furthermore, a shift of the liposomes from the blood vessels to their surrounding tissues was observed by scanning fluorescent microscopy. However, the final targeted region of SLX-lipo has not been clarified in detail. To evaluate the feasibility of SLX-lipo for active targeting of inflammatory tissues, histochemical analysis was examined in the collagen antibody-induced arthritis (CIA) mice model.

【Methods】A Cy3-labeled SLX-lipo was injected intravenously to the CIA mice. After twenty four hours, ankle joints were removed, fixed and embedded in 4% CMC compound. The cryosections were prepared according to the Kawamoto's method. Fluorescent images were captured with an AxioCam digital camera.

【Results】The fluorescent signals were detected at the hyperplastic synovium including pannus invasion with inflammatory cells.

【Conclusion】Our results demonstrate the feasibility and potential use of SLX-Lipo as drug delivery vehicle for active targeting to the inflammation in the preclinical model of CIA mice.

***P22 腱の骨（軟骨）付着部におけるTenomodulin
と Chondromodulin-I 遺伝子の発現と局在**

○油形 公則¹ 松井 好人² 宿南 知佐³ 西崎 有利子³ 廣橋
紀¹ 開 祐司³ 安井 夏生¹

¹徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・運動機能外科学分野

²大阪府立母子保健総合医療センター 整形外科

³京都大学再生医科学研究所・生体分子設計学分野

**Expression of tenomodulin and chondromodulin-I
at the insertion sites of the rabbit various tendons**

Kiminori Yukata¹, Yoshito Matsui², Chisa Shukunami³, Yuriko
Nishizaki³, Nori Hirohashi¹, Yuji Hiraki³, and Natsuo Yasui¹

¹Department of Orthopedics, Institute of Health Biosciences, The
University of Tokushima Graduate School

²Department of Orthopedics, Osaka Medical Center and Research
Institute for Maternal and Child Health

³Department of Cellular Differentiation, Institute for Frontier Medical
Sciences, Kyoto University

【目的】Tenomodulin (TeM) と Chondromodulin-I (ChM-I) はそれぞれ腱、軟骨細胞で特異的に発現している糖タンパク質である。腱の骨（軟骨）付着部は腱実質部から線維軟骨を介して骨（軟骨）へと移行する部位であるが、TeM と ChM-I の発現の有無や局在に関してはよく知られていないため、その局在を in situ hybridization (ISH) 法にて調べた。

【方法】RT-PCR および RACE 法にてウサギ TeM cDNA 全長 (1203bp) をクローニングした。ウサギ TeM 遺伝子は、ヒト、マウスと高い相同性を持って保存されていた。1, 4 週齢ウサギの肩棘上筋腱、アキレス腱、膝蓋腱の骨（軟骨）付着部を採取し、ISH 法にて TeM, ChM-I 遺伝子と腱、軟骨の主要細胞外マトリックスである Type I collagen alpha 1 (Col1a1), Type II collagen alpha 1 (Col2a1) の局在を比較検討した。

【結果】4 週齢では腱実質部の細胞は TeM と Col1a1 共に陽性であった。また腱実質部と線維軟骨との境界に TeM 陰性、Col1a1 陽性の領域を認めた。線維軟骨部分は ChM-I 陰性、Col2a1 陽性であった。一方 1 週齢においてもほぼ同様の結果であったが、この時期にはまだ腱の付着部には線維軟骨は介在しておらず、腱は直接骨端軟骨に付着していた。この付着部の骨端軟骨は ChM-I 陽性、Col2a1 陽性であった。

【考察】腱の骨（軟骨）付着部において、腱の実質部と線維軟骨組織の間に TeM 陰性、Col1a1 陽性の領域が存在することが明らかとなった。この領域は腱とも線維軟骨とも異なった性質をもつ組織の可能性がある。

Tenomodulin (TeM) and Chondromodulin-I (ChM-I), which have a domain homologous at its C-terminus, are specifically expressed in tenocytes or chondrocytes, respectively. The insertion site of tendon consists of tendon substance, fibrocartilage, and bone. The localization of TeM and ChM-I in the tendon insertion has not yet been clearly defined. The present study was carried out to examine the distribution of TeM and ChM-I in the rabbit various tendon insertions using in situ hybridization analysis. RT-PCR and RACE methods were employed to obtain the full-length rabbit TeM cDNA. Rabbit TeM is highly homologous to those of human and mouse. TeM, ChM-I, Col1a1, and Col2a1 mRNAs localization was determined in the insertion sites of supraspinatus, patellar, and Achilles tendons at 1 and 4-week old rabbits. TeM mRNA was co-expressed with Col1a1 gene in all tendon substances. Surprisingly, TeM expression was not found in the fibroblasts at the boundary between tendon substance and fibrocartilaginous tissue despite of Col1a1 expression. No ChM-I signals were observed in the Col2a1-positive fibrocartilage of 4-week old rabbits. Although the genes expression pattern in 1-week old rabbits is similar to those of 4-week old rabbits, tendon directly attached to ChM-I- and Col2a1-positive physal cartilage because of no fibrocartilage tissues. The present study revealed the presence of the TeM-negative and Col1a1-positive area at the boundary between tendon substance and fibrocartilaginous tissue in the tendon insertion site. These results suggest that this area is the different tissue from tendon and fibrocartilage.

P23 Zucker fatty rat 脊柱靱帯骨化へのレプチンの影響

○山藤 崇¹ 馬嶋 正和¹ 久保 宏介¹ 小坂 泰一¹ 山本 謙吾¹

¹東京医科大学整形外科

Effect of leptin on ossification of the spinal ligament in Zucker fatty rat

Takashi Sando¹, Masakazu Majima¹, Kosuke Kubo¹, Taiichi Kosaka¹, and Kengo Yamamoto¹

¹Dept. of Orthop. Surg., Tokyo Medical University, Tokyo, Japan

【目的】レプチン受容体機能異常を認める Zucker Fatty Rat (以下 ZFR) は交感神経活動低下を呈する脊柱靱帯骨化症自発生モデルである。近年、レプチンが骨形成・骨吸収の制御機能を有し骨量の制御を行っていることが報告され、骨量の調節だけでなくレプチンが脊柱靱帯骨化に影響していることが予想される。今回、ZFR 脊柱靱帯におけるレプチンの影響を病理組織学的・免疫組織化学的に検討を行うことを目的として実験を行った。

【対象と方法】実験動物はレプチン受容体機能異常を有する ZFR, 表現系に異常を呈さない Non Fatty Rat (以下 NFR), NFR に Monosodium glutamate を投与し視床下部弓状を選択的に破壊した MSG 処置 Rat (以下 MSG) を用い、脊柱薄切切片を作製し、抗レプチン受容体 (Ob-R) 抗体, 抗 β 2 アドレナリン受容体 (β 2AR) 抗体を使用し免疫組織化学染色を施行した。

【結果】ZFR の脊柱靱帯において靱帯付着部を中心に Ob-R の発現を有意に認めた。また、ZFR の脊柱靱帯における β 2AR の発現は Ob-R 同様に著明に多く認め、靱帯骨化前段階において β 2AR が発現していることが確認できた。

【考察】ZFR において増殖細胞に Ob-R の発現が有意に多かったが、Ob-R は機能異常によりその役割を果たしていないことから、ZFR 靱帯骨化にはレプチンによる直接作用の関与は少ないと考えられた。また、ZFR の脊柱靱帯において、靱帯骨化前段階において β 2AR が発現していることが確認でき、交感神経刺激があれば ZFR における脊柱靱帯骨化は抑制できる可能性が示唆された。今後、 β -stimulator の投与が靱帯骨化の進展を予防することが可能になれば、OPLL の予防薬としての応用も期待できる。

[Background] Zucker fatty rats (ZFR), that have a with functional abnormality of leptin receptors are a spontaneous model of ossification of the posterior longitudinal ligament that develops sympathetic nerve hypoactivity. Leptin has recently been reported to control bone mass by regulating bone formation and resorption, suggesting that it affects not only bone mass but also ossification of the spinal ligament. Thus, we investigated the effects of leptin on the spinal ligament in ZFR histopathologically and immunohistochemically. [Materials and Methods] ZFR with functional abnormality of leptin receptors and rats treated with monosodium glutamate (MSG), which selectively destroys the arcuate nucleus of the hypothalamus, were used. Thin spinal sections were prepared, and immunohistochemically stained using antibodies against leptin receptor (Ob-R) and beta-2-adrenergic receptor (beta-2AR).

[Results] Significant expression of Ob-R was noted in the central region of the attachment site of the spinal ligament in ZFR. beta-2AR was also expressed as markedly as Ob-R in the spinal ligament in ZFR, confirming that beta-2AR was expressed in the stage preceding ligament ossification.

[Conclusions] Since Ob-R does not play any role due to functional abnormality in ZFR, the direct involvement of leptin in ligament ossification may be slight in ZFR. beta-2AR expression in the stage preceding ligament ossification was confirmed, suggesting that ossification of the spinal ligament may be inhibited by sympathetic nerve stimulation in ZFR. If administration of beta-stimulators prevents the advancement of ligament ossification, they can be expected as OPLL-preventive drugs.

*P24 ふか肉摂取による骨質改善効果

○小池 朋¹ 佐藤 憲一¹ 渡部 睦人¹ 野村 義宏¹ 川口 真以子² 入江 かをる² 氷見 敏行²

¹東京農工大学 農学部 硬蛋白質利用研究施設

²武蔵野大学 薬学研究所

【目的】骨粗鬆症は骨が脆くなる疾患であり、女性に多いことが特徴である。60歳代の半数、70歳代で約6割が骨折しやすい状態にあるといわれている。当研究室では、サメ皮由来のゼラチンが骨粗鬆症の改善に効果を示すことを報告している(Nutrition, 2005)。サメ肉はコラーゲンを主体とする‘すじ’を多く含み、骨が無く加工しやすい。しかし、近年の魚離れや‘ふか肉’のイメージの悪さから敬遠されている。そこで、当研究室では、‘ふか肉’に付加価値を高める事を目的にその食理効果の検証を進めている。‘ふか肉’(すじを含有) および‘すじ除去肉’をサンプルとし、卵巣摘出した骨粗鬆症モデル動物に投与し、その骨質改善効果を検証した。

【方法】8週齢の雌ラットの卵巣を摘出し(ovx)、閉経後の骨粗鬆症モデルを作製した。20週齢から、食餌のタンパク源をカゼインから‘ふか肉’および‘すじ除去肉’に置き換え、8週間与えた。飼育終了後、大腿骨を摘出し、 μ CTおよび二重エネルギー吸収測定(DEXA)を行い、骨密度を測定した。また、クリープメーターを用いた3点曲げ試験により大腿骨の骨強度を測定した。

【結果および考察】偽手術群(sham)に比べ、ovx群で有意な体重増加が認められた。タンパク源を‘ふか肉’および‘すじ除去肉’に変えても、食下量および体重に変化を認めなかった。 μ CTの結果から、‘すじ除去肉’投与群の全骨密度が $644\text{mg}/\text{cm}^3$ であり、カゼイン投与群の $613\text{mg}/\text{cm}^3$ に比べ有意に高いものであった。大腿骨中央部におけるDEXAの結果で、‘すじ除去肉’投与群が $115\text{mg}/\text{cm}^2$ であり、カゼイン投与群の $111\text{mg}/\text{cm}^2$ に比べ有意に高いものであった。骨強度は、ふか肉群で上昇がみられたが、有意な差は認められなかった。以上の結果から、‘すじ除去肉’食は骨質を高める効果を有するものと思われる。

Increase in bone mineral density by oral administration of shark meat in ovariectomized rats

Tomo Koike¹, Kenich Sato¹, Mutsuto Watanabe¹, Yoshihiro Nomura¹, Maiko Kawaguchi², Kaoru Irie², and Toshiyuki Himi²

¹Laboratory of Applied Protein Chemistry, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology

²Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Research Institute of Pharmaceutical Science, Musashino University

Collagen hydrolysate is of interest as a therapeutic agent with potential use in osteoporosis. There have been some reports about the collagen hydrolysate treatment with the animal models of bone and joint diseases. Shark meat contains abundant fascia that is composed of collagen fibers. In this report, the effect of shark meat on ovariectomized rats was examined.

The shark meat and its fascia removed fraction were orally administered to 20 weeks old female ovariectomized rats for 8 weeks, respectively. Bone mineral density (BMD) was estimated by the μ CT and dual-energy X-ray absorptiometry analysis. BMD of femurs in rats fed the fascia removed shark meat was higher than that in rats fed casein diet (control group). BMD of diaphysis in femurs treated with fascia removed shark meat was significantly higher than that of control group. These results show that the fascia removed fraction of shark meat increases BMD in a model of osteoporosis.

**P25 消化管間葉系腫瘍 GIST における ADAM17 の
高発現 : EGFR, EGFR ligands との共発現**

○中川 元道¹ 鍋島 一樹² 浅野 重之³ 浜崎 慎¹ 山下
裕一⁴ 岩崎 宏¹

¹福岡大学医学部病理学講座

²福岡大学病院病理部

³いわき市立総合磐城共立病院病理科

⁴福岡大学医学部消化器外科学講座

【目的】ADAM は膜貫通型タンパク質のメタロプロテアーゼで、特に ADAM17 は EGFR ligands の sheddase として働き、大腸癌、乳癌などの浸潤・増殖への関与が報告されている。今回、我々は、GIST における ADAM および EGFR-EGFR ligands の発現と臨床病理学的な関連について検討を行った。

【対象】外科的に切除された GIST80 例を対象とした。ADAM 発現は免疫組織化学的染色、RT-PCR、Western blotting (WB) を施行し評価した。

【結果】免疫染色の結果 CD117 陽性は 100%、CD34 陽性 96%であった。ADAM 各種の mRNA 発現を検討した結果、ADAM17、9、10 の mRNA 発現率が高かった。WB においては、非腫瘍組織に比べ腫瘍組織で優位に高い ADAM17 の蛋白発現を認めた。ADAM17 の免疫染色では、腫瘍組織の 92%に陽性で、正常固有筋層にあるカハールの介在細胞では発現が認められず、腫瘍化によって発現が増強したものと考えられた。EGFR も mRNA レベルで腫瘍における高率な発現が認められ、蛋白レベルでも、EGFR およびリン酸化 EGFR が確認された。EGFR ligands では、分子量の異なる数種の可溶型 amphiregulin (AR) が腫瘍中に確認された。

【結論】GIST における ADAM17 の発現率増強が認められた。ADAM17 の sheddase 活性の基質である EGFR ligands とその受容体 EGFR の発現も認められ、特に AR では shed form に相当する可溶型が腫瘍組織中に存在することが示された。ADAM17 が EGFR-EGFR ligands 系を介して GIST の増殖・浸潤に影響している可能性を示唆しており、分子標的治療への応用が期待される。

**Up-regulated expression of ADAM17 in
gastrointestinal stromal tumors: co-expression with
EGFR and EGFR ligands**

Motomichi Nakagawa¹, Kazuki Nabeshima², Shigeyuki Asano³,
Makoto Hamasaki¹, Yuichi Yamashita⁴, and Hiroshi Iwasaki¹

¹Fukuoka University School of Medicine, Department of Pathology

²Fukuoka University Hospital, Department of Pathology

³Iwaki Kyoritsu General Hospital, Division of Pathology

⁴Fukuoka University School of Medicine, Department of
Gastroenterological Surgery

Metalloproteinase activities of a disintegrin and metalloproteinases (ADAMs) are involved in many aspects of tumor biology. ADAMs are transmembrane proteins that cleave membrane-anchored proteins to release soluble factors, and thereby mediate important biological phenomena in tumors. The aim of this study was to analyze histopathology, expression and roles of metalloproteinases, especially ADAMs in gastrointestinal stromal tumors (GIST) of stomach. Immunohistochemically, tumors were positive for CD117 (100%) and CD34 (97%). RT-PCR analysis showed frequent expression of ADAM9 (91%), ADAM10 (64%), ADAM17 (82%). However, ADAM17 was the only metalloproteinases that were up-regulated in GISTs at the protein level compared with non-neoplastic gastric tissues. The difference was statistically significant for ADAM17. ADAM17 was immunohistochemically expressed in 93% of GIST vs 16% of normal gastric tissues. ADAM17 was not demonstrated in interstitial cells of Cajal. Expressions of epidermal growth factor receptor (EGFR) and several EGFR ligands were also demonstrated by RT-PCR. Protein expression of EGFR, phosphorylated-EGFR, amphiregulin, and HB-EGF, both of which can be shed by ADAM17, was confirmed by immunoblotting. Moreover, proteolytically cleaved soluble forms of amphiregulin were identified in tumor extracts. Considered together, the results suggest that ADAM17 contributes to the progression and growth of GIST through shedding of EGFR ligands and consequent EGFR stimulation. ADAM17, as a major sheddase in GIST, could be potentially a suitable target in anti-cancer treatment of imatinib-resistant GISTs.

***P26 ケモカイン BRAK/CXCL14 は Rap1 の活性化により舌癌由来細胞のコラーゲンへの接着を増強する**

○佐藤 かおり¹ 小澤 重幸² 加藤 靖正² 畑 隆一郎²

¹ 東京都医学研究機構東京都臨床医学総合研究所蛋白質代謝研究分野

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

目的：我々は内在性の腫瘍抑制分子の探索中に、舌癌由来細胞（HSC-3）にケモカイン BRAK/CXCL14 を強制発現すると、移植腫瘍において腫瘍抑制作用を示すことを見いだした（Ozawa S. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 348, 406-412, 2006）。本研究では、癌細胞の造腫瘍活性低下の原因を明らかにするために、HSC-3 を用いて細胞接着活性および遊走能について解析した。

方法と結果：BRAK を強制発現させた HSC-3 細胞（HSC-3BRAK）は、コントロール細胞（HSC-3Mock）に比べて、より扁平に伸展し、細長い形態を示した。HSC-3BRAK は、典型的な接着斑を形成し、ストレスファイバー末端と局在が一致していたが、HSC-3Mock では、未成熟な点状の接着斑（Focal complex）を形成し、アクチン線維との局在の一致は観察されなかった。細胞接着活性については HSC-3BRAK は HSC-3Mock に比べて、I 型コラーゲンへの接着が約 2 倍強いことが判明した。さらに、接着関連分子の発現をウェスタンブロットで検出したところ、HSC-3BRAK において、focal adhesion kinase の発現量が 1.6 倍に増加していたが、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ 、パキシリン、アクチニンの発現量には差がみられなかった。細胞遊走能については、HSC-3BRAK で有意に低下していた。低分子量 GTP アーゼである Rap1 の活性化について試みたところ、BRAK による刺激後 1 分から Rap1 の活性化が観察され、Rap1 の下流分子である Rac1 についても、持続的な活性化が観察された。

結論：BRAK の強制発現によって細胞内骨格の安定化により細胞の細胞外マトリックス接着が強化され、細胞遊走が低下することによって、頭頸部扁平上皮癌細胞の浸潤性が低下することが考えられた。

BRAK/CXCL14 stabilizes cell adhesion through activation of Rap1 in human tongue carcinoma cells

Kaori Sato¹, Shigeyuki Ozawa², Yasumasa Kato², and Ryu-Ichiro Hata²

¹ Department of Enzymatic Regulation for Cell functions, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research

² Department of Biochemistry & Molecular Biology, Kanagawa Dental College

Introduction: Forced expression of a non-ELR chemokine BRAK/CXCL14 in tongue carcinoma cells decreased the rate of tumor formation and size of tumor xenografts ((Ozawa S. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 348, 406-412, 2006). In order to clarify mechanisms of tumor suppressive activity of BRAK, we examined effects of BRAK on the cell migration and cell adhesion to the matrix in tongue carcinoma derived HSC-3 cells.

Methods and Results: The BRAK expression vector-transfected HSC-3 cell clones (HSC-3BRAK) showed flatter and better spreading morphology than Mock-transfected HSC-3 clones (HSC-3Mock). HSC-3BRAK formed typical focal adhesions, which anchored stress fibers at the cell leading edge, whereas HSC-3Mock only showed immature focal complex without any stress fibers. HSC-3BRAK adhered to type I collagen 2-fold stronger than HSC-3Mock, and expressed higher levels of focal adhesion kinase than HSC-3Mock. While the protein levels of integrin $\alpha 2 \beta 1$, paxillin, and alpha-actinin were not different. HSC-3BRAK had lower migration activity in scratch assays. These results suggested that adhesive activity of integrin is upregulated without any change of protein level of it by BRAK overexpression. Addition of BRAK on the cultured cells induced rapid and temporal activation of Rap1 GTPase and sustained activation of Rac1 GTPase.

Conclusions: Our results indicated that over-expression of BRAK in HSC-3 cells stabilized cytoskeleton of the cells and strengthened cell adhesion. This may be responsible for reduction of malignant phenotypes in HSC-3 cells.

**P27 Matrix metalloproteinase-9 発現を誘導する
酸性細胞外 pH シグナリングにおける
NF-kappaB サブユニットの役割**

○加藤 靖正¹ 小澤 重幸² 久保田 英朗² 佃 守³ 宮崎 香⁴
畑 隆一郎¹

¹ 神奈川歯科大学 生化学・分子生物学

² 神奈川歯科大学 顎顔面外科学

³ 横浜市立大学大学院 医学研究科 頭頸部生体機能・
病態医科学

⁴ 横浜市立大学 木原生物学研究所 細胞生物学

酸性細胞外 pH (pHe) は腫瘍組織における普遍的な特徴であり、腫瘍の進展を促進する因子として知られている。これまでに私達は、マウス B16 メラノーマ細胞を用いて、酸性スフィンゴミエリナーゼや細胞外カルシウムの流入により惹起されるホスホリパーゼ D-MAPKs などによる NF- κ B の活性化が、酸性 pHe によるマトリックス・メタロプロテアーゼ-9 (MMP-9) の合成を促進している事を明らかにしてきた。NF- κ B は、5つのサブユニット (RelA, RelB, c-Rel, p52, p50) から成るヘテロあるいはホモダイマーとして転写を制御している。本研究では、マウス B16 メラノーマを用いて酸性 pHe による MMP-9 発現における NF- κ B サブユニットの役割について検討した。c-Rel 以外のサブユニットについてはほぼ同レベルで発現し、さらに酸性 pHe によりそのレベルは上昇したが、これらの誘導レベルは転移性と相関しなかった。NF- κ B サブユニットに対する siRNA を細胞に導入すると、RelA, p50 の siRNA 導入では MMP-9 発現は抑制されたが、p52 siRNA を導入すると酸性 pHe により誘導された MMP-9 発現レベルはさらに上昇した。酸性 pHe により RelA は核移行し、RelA の阻害剤により MMP-9 誘導は抑制されたが、p50 は核移行せず、p50 の核移行阻害剤で MMP-9 誘導は抑制できなかった。また、p52 は核移行しなかった。以上の事から酸性 pHe による NF- κ B の活性化には RelA が重要で、p52 は抑制性に働き、p50 は、p52 の抑制性作用を阻害することにより NF- κ B の活性化とそれに続く MMP-9 発現に寄与している可能性が高い。

**Role of NF-kappaB subunits on acidic extracellular
pH signaling to induce matrix metalloproteinase-9
expression**

Yasumasa Kato¹, Shigeyuki Ozawa², Eiro Kubota², Mamoru Tsukuda³,
Kaoru Miyazaki⁴, Ryu-Ichiro Hata¹

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology

² Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Kanagawa Dent
College

³ Department of Biology and Function in the Head and Neck,
Yokohama City University Graduate School of Medicine

⁴ Division of Cell Biology, Kihara Institute for Biological Research,
Yokohama City University

Acidic extracellular pH (pHe) is known to be a common feature of tumor tissues and associate tumor progression. We have reported that matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression is induced by acidic pHe through both calcium influx-triggered phospholipase D-MAPKs and acidic sphingomyelinase pathways leading to NF-kappaB activation. Because NFkappaB regulates transcription as the hetero- or homo-dimer consisting of RelA, RelB, c-Rel, p52, and p50, we determined role of NF-kappaB subunits on acidic pHe-induced MMP-9 expression in mouse B16 melanoma cells. Although 4 kinds of the subunits, except c-Rel, almost equally expressed at neutral pHe and their levels were increased by acidic pHe, these levels and their induction rate were not observed significant correlation with tumor metastatic abilities. In siRNA experiment, we found that acidic pHe-induced MMP-9 expression was inhibited by RelA and p50 siRNAs but not by RelB siRNA. Interestingly, introduction of p52 siRNA further stimulated acidic pHe-induced MMP-9 expression. We observed RelA nuclear translocation after acidic pHe treatment and suppression of acidic pHe-induced MMP-9 expression by RelA inhibitor. However, p50 did not nuclear translocate at acidic pHe and the inhibitor for nuclear translocation of p50 had no effect on the acid induction of MMP-9 expression. In addition, p52 nuclear translocation was not obvious at acidic pHe. Our data showed that RelA plays an important role of acidic pHe-induced NF-kappaB activation for MMP-9 expression and suggested that p50 interfered to inhibit p52's suppressive function for NF-kappaB activation leading to the MMP-9 expression.

P28 がんのアノイキス誘導療法に関する基礎的研究

○赤利 精悟¹ 中根 由富¹ 折田 寛朗¹ 大脇 敏之¹ 深井 文雄¹

¹東京理科大学大学院 薬学研究科 薬学専攻

【目的・方法】

細胞外マトリックス (ECM) は細胞接着の足場を提供することにより、細胞の生・死、増殖、分化のみならず白血球浸潤やがん転移にも関与する。ECM と細胞の接着は主に接着分子インテグリンを介するが、当研究室で見出されたフィブロネクチン由来のペプチド FNIII14 は $\beta 1$ インテグリンの活性化を抑制することで足場喪失性細胞死 (アノイキス) を誘導する。本研究では FNIII14 がアノイキスを誘導するシグナル伝達系の解明、および $\beta 1$ インテグリンを分子標的とする抗がん剤補助薬として FNIII14 を応用しうる可能性を検討した。

【結果・考察】

マウス乳がん細胞 4T1 に FNIII14 を作用することで誘発されるアノイキスは、アポトーシス促進タンパク質 Bim の発現上昇および、その微小管からの遊離により誘導されていることが示された。また *in vitro* において FNIII14 は抗がん剤ドキソルビン (Dox) の感受性を飛躍的に上昇させる。FNIII14 と Dox を併用すると、それぞれ単独時に比べて、更なる Bim の発現上昇が認められたこと、siRNA により Bim ノックダウンによって FNIII14 と Dox 併用による抗がん剤感受性上昇が消失したことから、FNIII14 は Bim を介して作用を発現していると推測された。そこで、FNIII14 と Dox 併用の *in vivo* 効果を、4T1 のがん転移を指標として解析した。その結果 *in vivo* の実験においても、FNIII14 を抗がん剤ドキソルビンと併用することで、FNIII14 あるいはドキソルビン単独に比べて、顕著ながん転移抑制効果が認められた。以上、FNIII14 と抗がん剤を併用するがん転移治療法として FNIII14 と抗がん剤を併用するがんのアノイキス誘導療法の可能性が見出されたものと考えている。

A new strategy for cancer chemotherapy — Anoikis-based cancer cell killing using peptide FN III14 —

Seigo Akari¹, Yoshitomi Nakane¹, Hiroaki Orita¹, Toshiyuki Ohwaki¹, and Fumio Fukai¹

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science

【Purpose & Method】

Cell adhesion to extracellular matrix (ECM) participates in various biological processes, such as cell survival, proliferation, differentiation, migration and even tumor metastasis. Cell adhesion to the ECM proteins is mediated mainly by $\beta 1$ subfamily of integrins. In our laboratory, peptide FNIII14 derived from fibronectin was found to induce apoptosis by disrupting $\beta 1$ integrin-mediated cell adhesion to the fibronectin, a process termed "anoikis". In this study, we investigated the molecular mechanism of the FNIII14-induced apoptosis. We examined the possibility that FNIII14 might be useful as a new type of antimetastatic agent targeting $\beta 1$ integrin.

【Result & Discussion】

FNIII14 induced apoptotic death in mouse mammary tumor cells, 4T1, by disrupting their adhesion to the fibronectin. FNIII14-induced apoptosis, anoikis, was shown to be mediated by Bim upregulation. This FNIII14-induced apoptosis was accompanied either by a marked upregulation of Bim expression or by its release from binding with microtubules. As a result, FNIII14 increased the susceptibility of 4T1 cells to Doxorubicin (Dox). The results showed the possibility that FNIII14 might be applicable as antimetastatic agent targeting $\beta 1$ integrin. Therefore, we examined the effect of combinatorial administration of FNIII14 and Dox in an *in vivo* assay system. The results demonstrated that FNIII14 in combination with Dox significantly inhibited metastasis of 4T1 cells as compared with either treatment alone or than untreated control. These results suggest that combination therapy of FNIII14 and anticancer agent such as Dox, is a new approach that offers enhanced inhibitory effects on tumor metastasis.

P29 ヒト肝細胞癌におけるラミニン α 鎖とその受容体の発現

○吉川 大和¹ 須藤 亮⁴ 今 純子² 水口 徹³ 野水 基義¹
平田 公一³ 三高 俊広²

¹東京薬科大学 薬学部 病態生化学教室

²札幌医科大学 がん研究所 分子病理病態学部門

³札幌医科大学 医学部 第一外科

⁴慶応大学 大学院 理工研究科

基底膜の主要な構成分子であるラミニンは α , β , γ 鎖からなる三量体であり, α 鎖がラミニンの生物活性を担っている. 現在, α 鎖が5, β 鎖が4, γ 鎖が3種類報告されており, 組み合わせによって15種類のアイソフォームが存在している. これまでの肝細胞癌におけるラミニンの発現は, すべての鎖を認識するポリクローナル抗体を用いて解析されているため, どの α 鎖アイソフォームが発現しているか不明であった. 本研究では, 各ラミニン α 鎖に対する特異的抗体を用いて, 肝細胞癌における発現について解析を行った. ヒト肝組織はインフォームドコンセントを得た患者かつ病理学的診断がついている症例について検討した. 常法に従い凍結切片を作製した後, 蛍光抗体染色を行った. その結果, 肝細胞癌では α 5鎖の発現が高分化型・低分化型を通して見られた. さらに, 肝細胞癌で観察される α 5鎖が β , γ 鎖と三量体を形成しているか, 肝細胞癌株の培養上製を利用した免疫沈降により調べた. その結果, α 5鎖はすべての肝細胞癌株で発現し, β 鎖, γ 鎖と三量体を形成し, 機能的な分子として存在することが明らかになった. また, ラミニンを認識する受容体についても検討を行ったところ, インテグリン α 6とラミニン α 5鎖の特異的な受容体であるLutheranの発現上昇が高分化型・低分化型を通して観察された. イムノグロブリンスーパーファミリーのひとつであるLutheranは, スプライシングの違いによって細胞内ドメインが短いBasal cell-adhesion molecule (B-CAM)となる. 肝細胞癌株を用いて, LutheranとB-CAMについて検討したところ, Lutheranが主な発現分子であることが明らかになった. 以上のことから, 肝細胞癌において α 5鎖を含むラミニンは異所的に蓄積するだけでなく, 癌細胞に発現する受容体を介して細胞接着などの相互作用に関与する事が示唆された.

Ectopic deposition of laminins in human hepatocellular carcinoma tissues are associated with expression of laminin receptors

Yamato Kikkawa¹, Ryo Sudo⁴, Junko Kon², Toru Mizuguchi³,
Motoyoshi Nomizu¹, Koichi Hirata³, and Toshihiro Mitaka²

¹Laboratory of Clinical Biochemistry, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, Hachioji 192-0392

²Department of Pathophysiology, Cancer Research Institute, Sapporo Medical University School of Medicine, Sapporo 060-8554

³Department of 1st Surgery, Sapporo Medical University School of Medicine, Sapporo 060-8554

⁴Center for Life Science and Technology, School of Fundamental Science and Technology, Keio University, Yokohama 223-8522

Laminins are a diverse group of $\alpha/\beta/\gamma$ heterotrimers formed from five α , three β and three γ chains; they are major components of all basal laminae (BLs). One laminin chain that has garnered particular interest due to its widespread expression pattern and importance during development is laminin α 5. Little is known, however, about the expression and function of laminins containing the α 5 chain in human hepatocellular carcinoma (HCC). Here, using a specific antibody, we examined the expression of laminin α 5 in HCCs. In normal liver, although laminin α 5 was observed in hepatic BLs underlying blood vessels and bile ducts, it was absent from the parenchyma, which may be the origin of HCC. On the other hand, laminin α 5 deposition was observed throughout all HCCs, regardless of tumor grade. In well-differentiated HCCs, it localized along the trabeculae of the tumor. In poorly-differentiated HCCs, it was present in surrounding tumor nodules. In HCC cell lines, laminins α 5 heterotrimerized with β and γ chains and was secreted into the culture media. To attempt to understand the function of lamins containing α 5, the expression of its receptors in HCS was also determined. In relation to ectopic deposition of laminin α 5, lutheran/basal cell adhesion molecule (Lu/B-CAM), a specific receptor for the α 5 chain, was expressed by HCC cells. Finally, cell-adhesion assays showed that HCC cells readily attached to laminin containing the α 5 chain, more so than did primary hepatocytes. These results suggest that laminins containing α 5 serve as functional substrates regulating progression of HCC.

P30 Study on antioxidant and anti-inflammatory activities of *Magnolia biondii*

Kim Young-Hun¹, Ji Yeun, Sung, Soon Ju, Cheon, Min Jung, Jang¹, Dong Ha, Jun, Tae Hoon, Kim², Il Chul, Kim³, Woo A, Cho⁴, Hyang Ja, Choi⁵, and Jin Tae, Lee¹

¹Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Gyeongbuk, Republic of Korea

²Department of Herbal Medicinal Pharmacology, Daegu Haany University, Gyeongbuk, Republic of Korea

³Department of Cosmetic Science, Joong Bu University, Chungnam, Republic of Korea

⁴Department of Cosmetology Science, Nambu University, Gwangju, Republic of Korea

⁵Soriso cosmetic Ltd., Republic of Korea

There was an increasing interest that herbal medicine and natural material extracts were proved processes of antioxidant, anti-inflammatory activity and the other effects.

The aim of this study was to assess the antioxidant and anti-inflammatory activities of *Magnolia biondii* extracts from water and ethanol.

The antioxidant and anti-inflammatory activities of *Magnolia biondii* extracts were investigated by DPPH radical scavenging, superoxide dismutase (SOD)-like, Xanthine oxidase inhibition, Nitric oxide inhibition and iNOS expression by western blotting. DPPH free radical-scavenging activity of *Magnolia biondii* extracts from water and ethanol was more than 70.3% and 70.8% at 500 µg/ml concentration, respectively. It was similar to that of the BHA (positive control).

In the test of Superoxide dismutase (SOD)-like activity, *Magnolia biondii* extracts from water and ethanol were showed 85% and 43.6 % at 5,000 µg/ml concentration, respectively.

In the test of xanthine oxidase inhibition, *Magnolia biondii* extract from water was 52.1% at 500 µg/ml.

Magnolia biondii showed good antioxidant activities. *Magnolia biondii* was found to inhibit Nitric oxide (NO) production in a dose-dependant manner in lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage RAW 264.7 cells.

To determine the inhibitory mechanism of *Magnolia biondii* on LPS-induced NO production, the iNOS protein level was measured by Western blotting. *Magnolia biondii* reduced the LPS-induced protein level of iNOS in a dose-dependant manner.

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

**P31 アンジオテンシン受容体拮抗剤による心臓
肥大・線維化阻害は血圧低下と独立している**

○岩本 睦¹ 廣畑 聡¹ 小川 弘子¹ 三好 亨¹ 上川 滋¹ 幡
中 邦彦¹ 山本 和秀² 草地 省蔵³ 二宮 善文¹

¹岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 分子医化学

²岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 消化器・肝臓・感染症
内科

³岡山大学 大学院保健学研究科 検査技術学専攻

【目的】結合組織成長因子 (CTGF) は線維化に重要な役割を果たしている。アンジオテンシン受容体拮抗剤 (ARB) は血管周囲線維化を含む各種臓器の線維化を抑制することが知られている。しかし、基礎的な多くの実験では血圧に影響しない少量投与による報告が多く、実際臨床で降圧剤として用いられた場合の抗線維化作用ははたして血圧低下による影響なのか ARB による血圧とは独立した効果なのかよくわかっていない。

【方法】麻酔下に雌性 SD ラットの下行大動脈を腎動脈直上で結紮し圧負荷心肥大モデルを作成した。生理食塩水、オルメサルタンおよびヒドララジン投与の三群に分け、投与後 28 日まで経過観察した。投与後 28 日目に心臓エコー検査にて心機能を測定した後に心臓を摘出し、CTGF 発現および血管周囲線維化の程度を比較検討した。

【結果】結紮後、頸動脈での血圧は生理食塩水投与群では上昇したが、オルメサルタン群及びヒドララジン群は同等に血圧を低下させた。しかし、心体重比および左室リモデリングをとともに改善したのはオルメサルタン群のみであった。オルメサルタン群がもっとも CTGF 発現が減弱していた。

【結論】ARB は、血圧とは独立して心肥大を抑制し、CTGF 発現を減少させ血管周囲線維化を抑制した。

**Protective effect of angiotensin receptor blockade
against hypertrophic cardiac dysfunction was
independent of blood pressure lowering**

Mutsumi Iwamoto¹, Satoshi Hirohata¹, Hiroko Ogawa¹, Toru Miyoshi¹,
Shigeshi Kamikawa¹, Kunihiko Hatanaka¹, Kazuhide Yamamoto²,
Shozo Kusachi³, and Yoshifumi Ninomiya¹

¹Department of Molecular Biology and Biochemistry, Okayama
University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical
Sciences

²Department of Medicine and Medical Science, Okayama University
Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

³Department of Medical Technology, Okayama University Graduate
School of Health Sciences

Background: CTGF (connective tissue growth factor) is a secreted protein regulating connective tissue synthesis and fibrosis. Angiotensin Receptor Blockers (ARBs) have been reported to ameliorate perivascular fibrosis. However, these reports were performed under usage of low dose of ARB, which did not alter the blood pressure. Accordingly, we examined whether ARB ameliorated cardiac dysfunction and CTGF expression induced by aortic banding and compared its effect with other anti-hypertensive drug.

Methods: Supra-renal aortic banding was performed in female Sprague-Dawley rats (n=24). Olmesartan (10 mg/kg/day) and hydralazine continuously administered using osmotic pump after aortic banding. After 28 days, LVEF and LVDd were measured by echocardiography and CTGF expression was compared.

Results: Blood pressure (142 ± 11.4 mmHg) significantly increased after banding in saline-administered rats. In drug treated rats, blood pressure was not different between olmesartan and hydralazine (109 ± 10.3 and 109 ± 9.9 mmHg, respectively) but LVEF was significantly preserved in olmesartan compared with hydralazine (82.6 ± 3.5 and 75.3 ± 6.3 %, respectively). LV remodeling was also ameliorated (LVDd; 7.05 ± 0.45 and 8.33 ± 0.99 mm, respectively). Heart weight/ body weight and perivascular localization of CTGF was also decreased in olmesartan-administered group.

Conclusions: Olmesartan ameliorated cardiac dysfunction induced by aortic banding along with reduced perivascular fibrosis and decreased CTGF expression, which was independent of blood pressure control.

P32 テネイシン C は心筋梗塞後心室リモデリングを促進する

○今中 恭子¹ 西岡 朋弘¹ 長野 由佳¹ 飛田 理世¹ 吉田 利通¹

¹ 三重大学大学院 医学系研究科 修復再生病理学

テネイシン C (TNC) は正常な心臓では発現しないが、心筋障害後の修復の際、一過性に限局した部位に発現する。最近の我々の検討で、急性期に血中 TNC 濃度の高い心筋梗塞患者は 6 ヶ月後に左室拡大や心機能低下をおこしやすく予後が悪いことが明らかになり、過剰な TNC が、心筋傷害に対する正常な修復反応を阻害し、いわゆる心室リモデリングをひき起こすことが予想される。心筋組織修復における TN-C の役割を明らかにするために、TNC ノックアウトマウス (KO) を用い心筋梗塞モデルを作成した。野生型では TNC は梗塞巣と健常部の境界部に限局して梗塞後 1 日以内に発現しはじめ、5 日目に強く、2 週間にはほぼ消失した。KO は野生型と梗塞後 4 週目の生存率に差は見られなかったが、左室収縮終期径、拡張終期径、左室拡張終期圧が有意に低く、左室駆出率、心筋 stiffness の改善が良好であった。組織学的には、KO の方が境界部残存心筋間質の線維化が野生型より有意に少なかった。次に、CAG プロモーターと TNC 遺伝子の間に lox ではさんだ stop を挿入したトランスジェニックマウスを作成し心臓での過剰発現誘導を試みた。Myosin Heavy Chain (α MHC) のプロモーター Cre マウスと交配した Cre/TG マウスでは正常な心筋組織に広範に TNC が発現し、電気凝固による傷害モデルを作成すると、筋線維芽細胞数、傷害部位周囲の心筋間質膠原線維面積率が野生型より多い傾向が見られた。 α -smooth muscle actin プロモーター Cre と交配した Cre/TG マウスでも心臓に広範な TN-C 発現し、野生型 (WT) と血圧に差は見られなかったが、心体重比、心筋細胞幅が有意に大きく、AngiotensinII 負荷で、ANP/BNP の上昇が大きい傾向がみられた。TNC は心室リモデリングの過程で、心臓間質線維化、心筋細胞肥大を促進することが示唆された。

Tenascin-C accelerates ventricular remodeling in heart.

Kyoko Imanaka-Yoshida¹, Tomohiro Nishioka¹, Yuka Nagano¹, Risei Hida¹, and Toshimichi Yoshida¹

¹Department of Pathology and Matrix Biology, Mie University Graduate School of Medicine

Background: Tenascin-C(TNC) is an extracellular matrix glycoprotein with strong bioactivity. In the heart, TN-C is expressed only at the very early stage of development, not detected in adult myocardium, but becomes re-expressed under pathological condition associated with tissue injury. Recently, we reported that high serum TNC levels in patients with acute myocardial infarction may indicate a greater incidence of ventricular remodeling and worse long-term prognosis. In this study, the involvement of TNC for myocardial remodeling was directly examined using TNC-deficient mice and TNC overexpressing mice.

Methods and Results: Myocardial infarction was produced by ligating the coronary artery in female Balb/c background TNC knockout (TNKO) mice and sibling wild type (WT) mice. At 4 weeks after infarction, no significant difference of the survival rate was found, but left ventricular end-diastolic and systolic dimension, and left ventricular end-diastolic pressure was significantly lower in the TNKO mice, while ejection fraction, fractioning shortening, and myocardial stiffness constant significantly improved to compare with that of the WT mice. By histological analysis, the infarct size was comparable but fibrosis at the border zone was significantly reduced in KO to compare with WT. Next, we generated transgenic mice that conditionally express TNC by Cre/LoxP system. Overexpression of TNC in heart crossing by two Cre expression mouse line; α -myosin heavy chain Cre/+ or α -smooth muscle actin Cre/+ caused significant increase of heart/body ratio, myocyte size and expression level of hypertrophy markers, and fibrosis. Conclusion: TNC may accelerate ventricular remodeling, hypertrophy and fibrosis in heart.

***P33 ハムスター脂腺細胞および線維芽細胞におけるグラム陽性および陰性菌由来成分による proMMP-2 産生促進作用**

○栗原 弘和¹ 佐藤 隆¹ 田代 早苗¹ 今田 啓介¹ 伊東 晃¹

¹東京薬科大学薬学部 生化学・分子生物学教室

The transcriptional augmentation of proMMP-2 production by peptidoglycan polysaccharides and lipopolysaccharides in hamster sebocytes and fibroblasts

Hirokazu Kurihara¹, Takashi Sato¹, Sanae Tashiro¹, Keisuke Imada¹, and Akira Ito¹

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

【目的】尋常性ざ瘡（ニキビ）は、皮脂腺のみならず毛包周囲組織に伝播する炎症性皮膚疾患である。この病態発症・増悪化には、嫌気性グラム陽性桿菌である *Propionibacterium acnes*（アクネ菌）に加え、他の皮膚常在菌が協調して関与する可能性が示唆されつつある。また、ニキビの増悪化に伴う毛包周囲組織の細胞外マトリックス（ECM）の分解促進が、難治性のざ瘡癬痕の形成に繋がると考えられる。本研究では、ニキビにおけるグラム陽性および陰性菌による皮脂腺および皮脂腺周囲組織の ECM 改変調節を明らかにするために、matrix metalloproteinase（MMP）産生に対するグラム陽性菌由来細胞壁成分の peptidoglycan polysaccharide（PGN）およびグラム陰性菌由来内毒素の lipopolysaccharide（LPS）の作用を検討した。

【方法および結果】培養ハムスター脂腺細胞および皮膚線維芽細胞を PGN および LPS にて処理し、培養液中の proMMP-2/プロゼラチナーゼ A 産生をゼランチンザイモグラフィ法、またその mRNA 発現を real-time PCR 法により解析した。その結果、ハムスター脂腺細胞はヒトと同一の分子量および免疫交差性を示す proMMP-2 を恒常的に産生すること、その産生が PGN および LPS により mRNA 量の増加に起因して促進されることが判明した。また、PGN および LPS による proMMP-2 産生および遺伝子発現促進は、ハムスター皮膚線維芽細胞においても観察された。

【考察】ハムスター脂腺細胞および皮膚線維芽細胞において PGN および LPS が転写レベルにおいて proMMP-2 の産生を増強するものと示唆された。すなわち、ECM 破壊に連動したざ瘡癬痕形成にアクネ菌およびグラム陰性菌が協調して寄与する可能性が示唆される。

Acne vulgaris is an inflammatory disease in the sebaceous glands and pilosebaceous units in the skin. *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), a Gram-positive anaerobic microbial species, plays a principal role in the development of acne. In addition, recent studies suggest that the skin flora of Gram-negative bacteria take part in the appearance and increased deterioration of acne in concert with *P. acnes*. On the other hand, the aberrant remodeling of extracellular matrix (ECM) in acne skin is considered to result in scar formation. However, it remains to be clarified whether or not *P. acnes* and/or other commensal microorganisms directly participate in ECM remodeling in acne skin. In the present study, we examined the effects of peptidoglycan polysaccharides (PGN) from Gram-positive bacteria walls, and lipopolysaccharides (LPS), an endotoxin of Gram-negative bacteria, on the production and gene expression of promatrix metalloproteinase 2 (proMMP-2)/progelatinase A in hamster sebocytes and skin fibroblasts. Both sebocytes and fibroblasts were found to constitutively produce proMMP-2, which was immunologically identical to human proMMP-2. PGN and LPS were found to transcriptionally augment the production of proMMP-2 in both cell lines. Therefore, these results suggest that PGN and LPS up-regulate the gene expression and production of proMMP-2 in hamster sebocytes and skin fibroblasts. Given an increase in the quantity of Gram-positive and/or -negative bacteria in acne regions, aberrant ECM degradation is likely to progress in pilosebaceous units, which is associated with scar formation on skin.

○石河 利広¹ 内藤 素子¹ 久保田 広志² 池田 実香¹
吉川 勝宇¹ 山脇 聖子¹ 永田 和宏² 中邨 智之³ 鈴木
茂彦¹

Toshihiro Ishiko¹, Motoko Naitoh¹, Hiroshi Kubota², Mika Ikeda¹,
Katsuhiro Yoshikawa¹, Satoko Yamawaki¹, Kazuhiro Nagata²,
Tomoyuki Nakamura³, and Shigehiko Suzuki¹

¹京都大学大学院 医学研究科 形成外科

²京都大学再生医科学研究所 細胞機能調節学分野

³関西医科大学 薬理学講座

¹Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Graduate School of
Medicine, Kyoto University

²Department of Molecular and Cellular Biology, Institute for Frontier
Medical Science, Kyoto University

³Department of Pharmacology, Kansai Medical University

【背景・目的】ケロイドは、皮膚の創傷治癒過程の異常によって起こる線維性疾患であるが、その発生病理は依然として不明であり、根治療法が存在しない。病変部の主体は、真皮内における細胞外マトリックスの異常であり、コラーゲン等の過剰蓄積と弾性線維の欠損が報告されているが、その原因は不明である。今回我々は、ケロイド病変部における弾性線維の欠損について詳細に検討を行った。

【方法】手術時に切除されたケロイド組織からパラフィン切片、凍結切片を作成し、抗 elastin 抗体、抗 fibrillin-1 抗体、抗 DANCE/fibulin-5 抗体にて蛍光免疫組織学的染色を行った。さらに、ケロイド組織から total RNA を抽出し、弾性線維構成成分である tropoelastin, fibrillin-1, fibulin-1, fibulin-2, EMILIN-1, MAGP-1 について、RT-PCR 解析を行った。

【結果】病変部内では弾性線維が形成されていないことが確認されたが、その構成成分の一つ fibrillin-1 の沈着が認められた。一方、別の構成成分である elastin と DANCE の組織内沈着は低下していた。また、RT-PCR では、各弾性線維構成成分の mRNA の発現は、正常皮膚組織と比較して、同等もしくは亢進していた。

【考察】DANCE は、tropoelastin が microfibril 上へ沈着するために必須であることが知られており、ケロイド組織における弾性線維欠損は、DANCE と tropoelastin と複合体が何らかの理由で microfibril 上に沈着できないために起こるものと考えられる。

Keloid is a dermal fibrotic disease characterized by abnormal accumulation of extracellular matrix. Keloid lesions expand over the boundaries of the initial injury site with rapid proliferation of fibroblast-like cells during the wound-healing process. Although keloid lesions are known to contain excessive amount of collagen fibrils but no elastic fibers, molecular mechanism leading to the abnormal extracellular matrix formation is largely unknown.

Here, we analyzed distribution of elastic fiber components including elastin fibrillin-1 and DANCE/fibulin-5 by immunostaining. Although fibrillin-1 was found to be deposited in the extracellular matrix of keloid lesion, DANCE and elastin were hardly detected. RT-PCR analysis of tropoelastin, fibrillin-1, fibulin-1, fibulin-2, EMILIN-1 and MAGP-1 mRNAs revealed that these elastic fiber components are highly expressed in the keloid lesions. These results indicate that DANCE and elastin cannot assemble on microfibrils in the extracellular matrix of keloid, despite that all components are highly expressed.

*P35 トリベノシドによるラミニン α 5 鎖の発現誘導

○岡部 晃一¹ 松田 佑二¹ 高木 崇¹ 谷口 正和² 大町 賢吾² 鮫島 輝行² 保住 建太郎¹ 吉川 大和¹ 野水 基義¹

¹東京薬科大学 薬学部 病態生化学教室

²天藤製薬

深い創傷は上皮細胞だけでなく上皮組織を支える基底膜も損傷する。このため創傷治癒は上皮細胞の増殖や移動などとともに、基底膜の再生が必要である。基底膜の主要な分子であるラミニンは、細胞接着や細胞運動促進などの活性を有し、創傷治癒に関与している事が示唆されている。一方、トリベノシド(化学名 Ethyl-3,5,6-tri-O-benzyl-D-glucufuranoside)は痔疾用剤として使用されており、臨床的に循環障害改善作用だけでなく創傷治癒を促進することが知られている。しかしながら、その作用機序については明らかになっていない。本研究では、基底膜の分子であるラミニンに着目し、トリベノシドがヒト表皮由来の HaCat 細胞においてラミニン遺伝子の発現に与える影響について検討を行った。ラミニンは α 、 β 、 γ 鎖のヘテロ三量体で、5種類の α 鎖、4種類の β 鎖、3種類の γ 鎖が報告されており、各ラミニン鎖は発生段階や臓器特異的な基底膜の構成に関与している。HaCat 細胞はトリベノシドを 0 μ M または 30 μ M となるように加えた DMEM+10%FCS 培地中で 1 時間のインキュベーションにより処理した。インキュベーションの後、細胞から RNA を精製、そして逆転写により cDNA を作製し、各ラミニン鎖に対する特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行なった。HaCat 細胞は α 3、 α 5、 β 1、 β 3、 γ 1、 γ 2 鎖を構成的に発現しており、トリベノシド処理した細胞において他のラミニン鎖が発現してくることはなかった。さらに real time PCR を用いてラミニン遺伝子の発現を定量的に測定したところ、ラミニン α 5 鎖の発現が約 4 倍に亢進していた。以上の結果から、トリベノシドは傷害を受けた基底膜に α 5 鎖を含むラミニンを供給することで、その創傷治癒の促進に関与することが示唆された。

Expression of laminin alpha5 chain in HaCat cells treated with tribenoside

Koichi Okabe¹, Yuji Matsuda¹, Shu Takaki¹, Masakazu Taniguchi², Kengo Oomachi², Teruyuki Samejima², Kentaro Hosumi¹, Yamato Kikkawa¹, and Motoyoshi Nomizu¹

¹Laboratory of Clinical Biochemistry, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

²Amato Pharmaceutical Products, Ltd

Epithelial wounds often disrupt basement membranes underlying epidermal cells. Healing of epidermal wounds, therefore, requires for not only cell-proliferation, cell-migration, and gene regulation but also reconstruction of the basement membranes. Tribenoside promotes wound healing in hemorrhoidal diseases and has been already clinically used. However the mechanism of wound healing promoted with tribenoside is unclear. To define the function of tribenoside, we focused on molecules of basement membranes. Of the molecules, laminins play a pivotal role in adhesion of epidermal cells to basement membranes. In this study we examined if tribenoside affects the expression of laminin genes in HaCat cells derived from human epidermal tissues. The cells were incubated in DMEM+10%FCS supplemented with 30 micromole/L of tribenoside. After incubation for 1 hour, total RNA was purified from the cells and used for preparation of cDNA. RT-PCR using primers specific for human laminin chains showed that HaCat cells constitutively expressed laminin alpha3, alpha5, beta1, beta3, gamma1, and gamma2 chains. Tribenoside-treated cells did not induce expression of the other laminin chains. We also quantified the expression of laminin chains in tribenoside-treated cells using real time PCR. The expression level of laminin alpha3, beta1, beta3, gamma1, and gamma2 chains was not affected. In contrast, the expression of laminin alpha5 in tribenoside-treated cells was four times higher than that of control cells. Our results suggest that tribenoside regulates the expression of laminin alpha5 gene in HaCat cells. The tribenoside-induced alpha5 chain may be provided for reconstruction of the basement membranes in wound healing.