

Love, J., Gao, Q., Kim, J., & Jaenisch, R. (2009) *Cell Stem Cell*, 4, 513-524.

依馬 正次

(筑波大学人間総合科学研究科基礎医学系
解剖学・発生学講座)

Role of Klf gene family in the self-renewal of mouse ES cells

Masatsugu Ema (Department of Anatomy and Embryology, Institute of Basic Medical Sciences, University of Tsukuba, Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan)

ラミニン 5 α 3 鎖由来ペプチドの細胞遊走および創傷治癒への関与：シンデカン 4 とインテグリン β 1 凝集形成

初めに

創傷治癒過程は一般に炎症期、増殖期、リモデリング期と進み、各時期において種々のサイトカイン、細胞の関与が知られている。皮膚創傷治癒において、とくに再上皮化へ向かう機構はいまだ完全に理解されているとはいえない。皮膚への機械的組織障害は基底膜を含んだ組織構成成分（細胞外マトリックス：ECM）の破壊を引き起こし、細胞と ECM との安定した関係は破綻し、創傷部位に特有な新たな細胞-ECM 関係が構築されることになる。皮膚創傷辺縁では、定常状態の角化細胞から発生した leading keratinocyte (KC) が出現し、ラミニン 5 を生産・沈着させ細胞遊走・再上皮化に関与している。細胞接着受容体であるインテグリン β 1 は、1980 年代半ばに同定され、ECM と細胞の相互作用の主役である。遅れてシンデカンがフィブロネクチン、ラミニンなどの受容体として本格的に解析され始めたのは、1990 年代後半である。近年では、この二つの受容体はある ECM 分子の異なった部位を独立に認識する機能以外に、「機能的」にクロストークしているという報告が出始めている。

1. ラ ミ ニ ン

ラミニンはコラーゲン 4 とならんで基底膜の代表的構成 ECM であり、 α 、 β 、 γ の三本鎖からなる糖タンパク質で 10 種類以上のアイソフォームが存在する。いずれも多数の α -ヘリックスを有する α 、 β 、 γ 鎖を持ち、600 アミノ

酸におよぶ triple-stranded coiled-coil 構造で会合部分を形成し、十字架の形状を有する巨大分子である¹⁾。ラミニン 5 は皮膚基底膜に特有で、 α 3、 β 3、 γ 2 鎖の三本鎖からなり、ラミニン 332 とともに表記される。ヒト疾患の先天性表皮水疱症の原因遺伝子であり、皮膚の物理的安定性にも関与している。ラミニン 5 α 3 鎖では、C 末端に約 200 アミノ酸からなる五つの繰り返し構造が存在し (LG1~5)、球状ドメインを形成する。その C 末端 LG4-5 番は切り離され、成熟型となる。LG4-5 は定常状態の皮膚基底膜では切断されてもはや存在しない。一方 LG4-5 を保持する前駆体は創傷部位の基底膜にのみ存在する²⁾。また近年 α 3LG4-5 ドメインは扁平上皮がんの局所浸潤に関与していることも示された³⁾。これらの報告は LG4 ドメインが細胞遊走に関与していることを示唆している。

ラミニン 5 α 3 鎖にはインテグリン α 3 β 1、 α 6 β 4 により認識される部位があるが、我々はインテグリンで認識されない α 3LG4 ドメイン内にシンデカン 2、4 が認識するアミノ酸配列を同定した⁴⁾。レコンビナントタンパク質 α 3LG4 ドメイン、またそのシンデカン結合配列を含んだ合成ペプチド PEP75 を用いて、ラミニン 5 とシンデカンの結合が細胞接着促進、神経突起の伸長促進、MMP1 の分泌増加⁵⁾、MMP9 分泌を誘導することを示した。

2. シンデカン

シンデカンには 1~4 のアイソフォームがあり、それぞれが組織特異性を持って分布している。シンデカンは細胞外ドメインに数本のヘパラン硫酸をグリコサミノグリカン (GAG) として有する細胞表面プロテオグリカン (PG) であり (図 1)、ECM への細胞接着受容体、成長因子との結合などの機能を有する。皮膚創傷辺縁ではシンデカン 1,4 が過剰発現し、シンデカン 1,4 のノックアウトマウスは創傷治癒遅延を起こすことから、シンデカンは創傷治癒に関与していると考えられる。

3. インテグリンの特性

インテグリン β 1 は種々の α 鎖とヘテロダイマーを形成し、ECM 接着受容体として機能することから、細胞遊走・創傷治癒に必須であることが知られている。インテグリン活性は細胞外ドメインへのマンガンイオン、活性化抗体、基質の直接結合等により変化し、この制御機構は outside-in pathway とよばれる。一方、リンパ球の活性化の際などにインテグリンの接着性に変化が出る現象の制御機構は inside-out pathway で説明される⁶⁾。この活性化はアロ

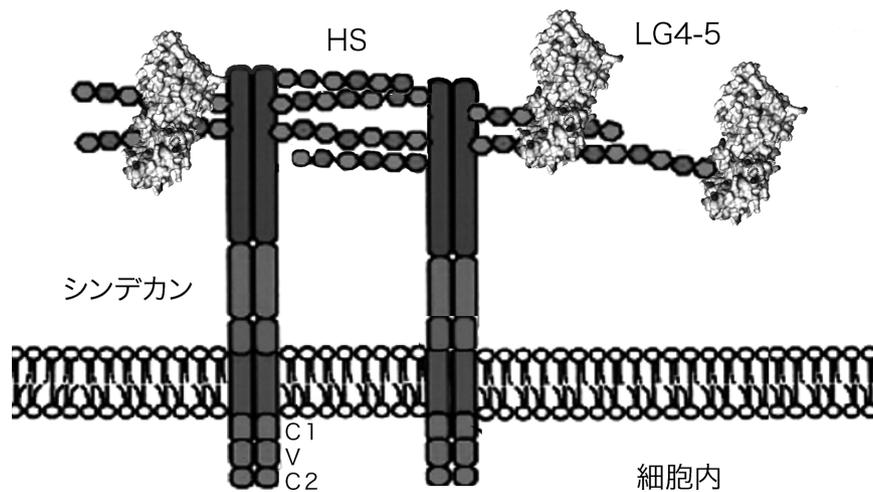


図1 シンデカン分子模式図

C1, C2: シンデカン 1-4 分子間でよく保存されている領域. 複数のシンデカン結合タンパク質が同定されている. V: 変化に富む領域で, PKC α , PIP2 の結合部位.

HS: ヘパラン硫酸; LG4-5: ラミニン α 3LG4-5

ステリック機構を介しているとされ, 種々のレベルの結合活性を示す中間体が存在する⁷⁾. インテグリンの活性化はよく研究されている分野で, 構造認識型のモノクローナル抗体が豊富に存在する. そのため構造依存性抗体との結合性の変化でその活性の変化をモニターすることができる. 代表的抗インテグリン β 1 モノクローナル抗体の特徴を簡単に述べる. 非構造認識タイプのモノクローナル抗体としては, JB1A (82-87 アミノ酸部位認識), K20 (426-587 アミノ酸部位認識) がある. これらは構造に左右されず結合する. すなわち活性化とは関係がない. 構造認識タイプのモノクローナル抗体としては, P4G11, mAb13 (207 リジン残基-218 リジン残基を認識), AG89, 12G10 (218 リジン残基, 154 アルギニン残基, 155 アルギニン残基を認識) などがある. これらの抗体のエピトープへの結合は, Mn/Mg の存在, α インテグリンの結合, 基質への結合, β 1 インテグリン活性化抗体の存在などで変化する. これらの抗体のインテグリン β 1 への結合性をたとえばフローサイトメトリーでみることで活性化の状況を知ることができる.

4. シンデカンとインテグリンの関係

シンデカン 4 とインテグリン α 5 β 1 とはフィブロネクチン分子の異なった部位をそれぞれ認識する共受容体として働くことが知られている. シンデカンについてはインテグリン α v β 3 と共にビトロネクチンへの受容体として働くことも知られている. さらに ADAM12 へは細胞はシンデカン 4 により接着し, その後 PKC α 依存性にインテグリン

β 1 が細胞伸展を制御する⁸⁾場合のように ECM 分子内の異なった部位を認識しない共同作用の存在が明らかになってきているが, その詳細な機構はまだ不明な点も多い. シンデカン 1 は, α v β 3 を活性化して細胞伸展を促進する. これを, Couchman は二つの受容体の「機能的カップリング」と呼んでいる^{9,10)}. しかしこの機能的カップリングが細胞外ドメインの直接結合を介しているのか, また両者の間にシグナル経路が存在するかは不明である. 近年, tenascin C 由来のシンデカン結合ペプチドがインテグリン β 1 活性化を起こすという報告がなされた¹¹⁾. 次に述べる我々のラミニン由来シンデカン結合ペプチドによるインテグリン β 1 活性化とは抗体への結合性などの相違はあるものの, 両受容体のクロストークの存在を示唆する例であると考え

5. ラミニン由来ペプチドを用いたシンデカン 4 からインテグリン β 1 へのクロスアクチベーション

シンデカンは細胞伸展の際に, インテグリンと協調して ECM 受容体として機能することが知られている^{9,12)}. しかしながら, 細胞遊走や創傷治癒においてこの機構の本態はいまだ完全には明らかにされていない. そこで今回我々は, 合成ペプチド PEP75 (ラミニン α 3LG4 内シンデカン結合配列) を用いて, シンデカン 4 へのシグナルがインテグリンのクロスアクチベーションを誘導し, この共同作用が細胞遊走を刺激する可能性を示した¹³⁾. 合成ペプチド PEP75 の培養液への添加により, インテグリン依存性に角

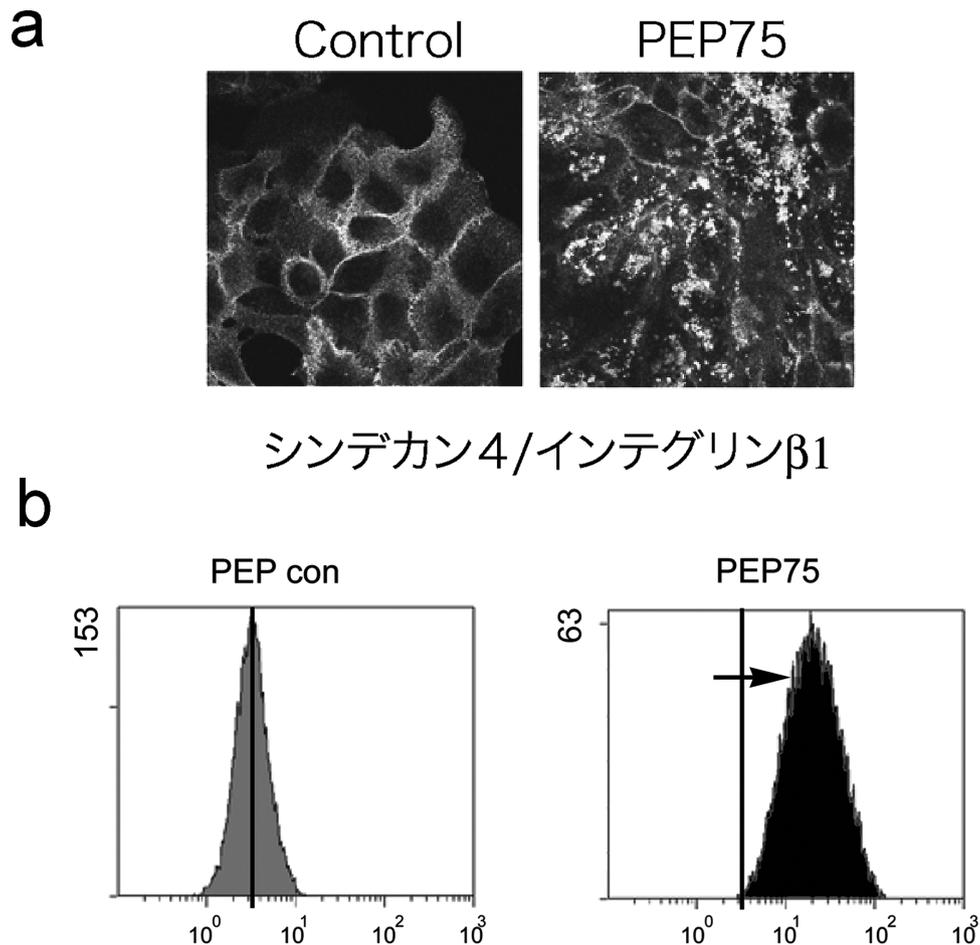


図2 シンデカン4とインテグリンβ1クラスター形成

a) 免疫染色：PEP75添加により，培養角化細胞表面にシンデカン4クラスター（図の点状塊）が形成され，インテグリンβ1の共存も証明された。

b) フローサイトメトリー：PEP75処理による角化細胞表面へのP4G11抗体結合性の増加（縦軸は細胞数，横軸は蛍光強度）

化細胞遊走が誘導されること，またマウス，ウサギ皮膚への合成ペプチドPEP75局所投与は，創傷治癒を促進することをまず示した。

この可溶性PEP75は培養液に添加することによりシンデカン4のクラスターを誘導した。また，その場所に構造変化を起こしたインテグリンβ1も共存することを示した（図2-a）。我々はまた，可溶性PEP75を細胞と共培養すると，インテグリンβ1分子内のP4G11抗体結合エピトープが曝露することを，細胞染色ならびにフローサイトメトリー（図2-b）で証明し，さらに可溶性PEP75はインテグリンβ1依存性にECMへの細胞接着機能を増強させた。阻害剤の添加実験によるとp38MAPK，PI3K，Rac1は，PEP75によるシンデカン結合に引き続いて起こるインテグ

リンβ1から細胞遊走へと至るシグナル伝達経路に関与していると考えられる。しかし，PKCαはこの経路には関与していなかった。一方これらすべてはPEP75によるP4G11抗体結合増加を阻害しなかった。またPKCα，FAK，ビンキュリン，ターリン，ビンネキシンなど，シンデカン，インテグリンよりシグナルを伝える機能を有する分子は，いずれもこのシンデカンクラスターには共存していなかった（未発表）。このように，細胞内シグナル伝達系がインテグリンβ1の構造変化に関与している証拠はつかめなかった。またSaitoら¹¹⁾は，tenascin C由来ペプチドの実験において，シンデカン4の細胞外ドメインのみでインテグリンβ1の構造変化が誘導できたとしている。現時点のデータではシンデカン4からインテグリンβ1への

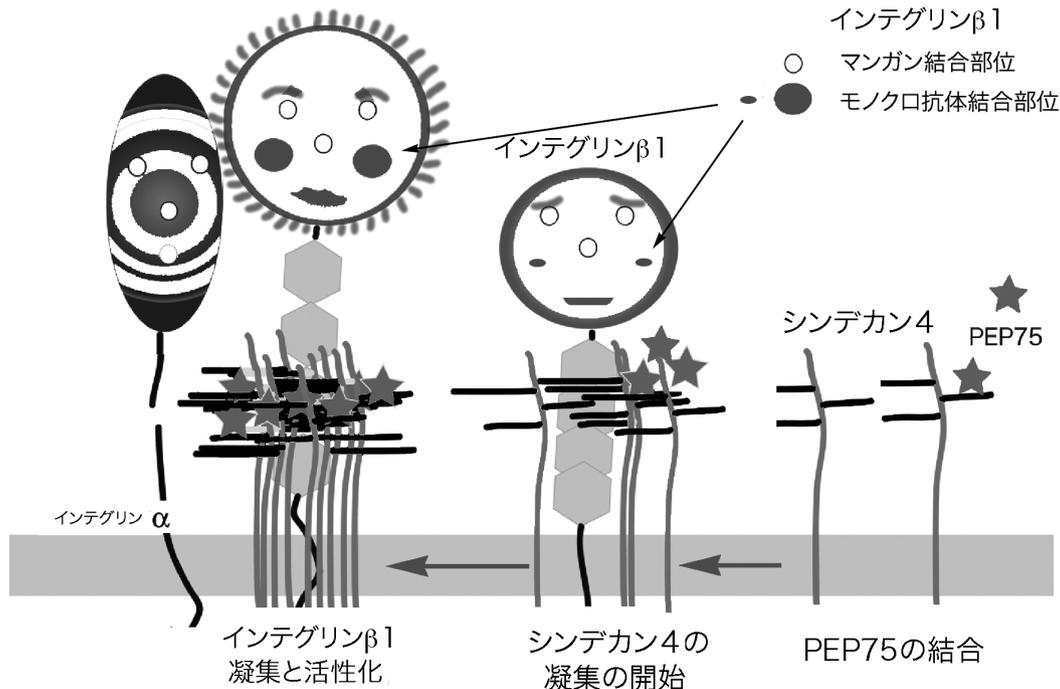


図3 PEP75のシンデカン4クラスター形成とインテグリンβ1活性化機構の模式図

クロスアクチベーションは、クラスター形成を介した細胞外の直接相互作用による可能性がより強いことを支持している (図3)。

P38MAPKの阻害剤は、部分的にはあるがPEP75誘導のインテグリンβ1依存性接着の増強を阻害した¹³⁾。PEP75が、p38MAPKを活性化することを我々は以前報告している⁵⁾。また皮膚の創傷においては、創傷辺縁の角化細胞でp38MAPKが活性化されていることが報告¹⁴⁾されている。これらのことから、創傷先端部位においてラミニンα3LG4がシンデカン4に結合することでインテグリンβ1を活性化し、ひいてはp38MAPKの活性化が起こり、細胞遊走を刺激する可能性も考えられる。以上の実験結果から、PEP75とシンデカン4の結合がクラスターを形成すること、その部位にインテグリンβ1が構造変化ならびに活性化を伴って共存し、最終的に角化細胞遊走を導いている可能性があると考えた。しかし、クロスアクチベーションの分子機構は解明されず、今後の課題となった。

おわりに

高齢社会になった現在、糖尿病や循環不全による皮膚潰瘍、褥瘡など慢性難治性疾患への治療のニーズが増している。表皮、真皮再生にかかわる治療的標的分子の同定は重

要性をまずと考えられる。インテグリン以外のECM受容体のシンデカン4は新しい標的として再生医療の面からも注目される領域であると考えられる。このミニレビューが今後の創傷治療薬開発の一助となれば幸いである。

- 1) Utani, A., Nomizu, M., Timpl, R., Roller, P.P., & Yamada, Y. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 19167-19175.
- 2) Sigle, R.O., Gil, S.G., Bhattacharya, M., Ryan, M.C., Yang, T. M., Brown, T.A., Boutaud, A., Miyashita, Y., Olerud, J., & Carter, W.G. (2004) *J. Cell Sci.*, **117**, 4481-4494.
- 3) Tran, M., Rousselle, P., Nokelainen, P., Tallapragada, S., Nguyen, N.T., Fincher, E.F., & Marinkovich, M.P. (2008) *Cancer Res.*, **68**, 2885-2894.
- 4) Utani, A., Nomizu, M., Matsuura, H., Kato, K., Kobayashi, T., Takeda, U., Aota, S., Nielsen, P.K., & Shinkai, H. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 28779-28788.
- 5) Utani, A., Momota, Y., Endo, H., Kasuya, Y., Beck, K., Suzuki, N., Nomizu, M., & Shinkai, H. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 34483-34490.
- 6) Luo, B.H. & Springer, T.A. (2006) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **18**, 579-586.
- 7) Mould, A.P., Humphries, M.J. (2004) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **16**, 544-551.
- 8) Thodeti, C.K., Albrechtsen, R., Grauslund, M., Asmar, M., Larsson, C., Takada, Y., Mercurio, A.M., Couchman, J.R., & Wewer, U.M. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 9576-9584.
- 9) Couchman, J.R. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 926-937.

- 10) Beauvais, D.M., Burbach, B.J., Rapraeger, A.C. (2004) *J. Cell Biol.*, 167, 171–181.
- 11) Saito, Y., Imazeki, H., Miura, S., Yoshimura, T., Okutsu, H., Harada, Y., Ohwaki, T., Nagao, O., Kamiya, S., Hayashi, R., Kodama, H., Handa, H., Yoshida, T., & Fukai, F. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 34929–34937.
- 12) Morgan, M.R., Humphries, M.J., & Bass, M.D. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8, 957–969.
- 13) Araki, E., Momota, Y., Togo, T., Tanioka, M., Hozumi, K., Nomizu, M., Miyachi, Y., & Utani, A. (2009) *Mol. Biol. Cell*, 20, 3012–3024.
- 14) Harper, E.G., Alvares, S.M., Carter, W.G. (2005) *J. Cell Sci.*,

118, 3471–3485.

宇谷 厚志

(長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学分野)

Laminin $\alpha 3$ chain-derived peptide promotes keratinocyte migration and wound closure: Clustering of syndecan-4 and integrin $\beta 1$

Atsushi Utani (Department of Dermatology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, 1-7-1, Sakamoto, Nagasaki 852-8501, Japan)