京都大学	博士（医学）	氏　名	荒　木　絵　里
論文題目	ラミニンα3鎖由来ペプチドによるシンデカン４およびインテグリンβ1の凝集は角化細胞の遊走を促進する		

（論文内容の要旨）

皮膚創傷などの組織障害時には基底膜を含んだ組織構成成分（細胞外マトリックス：ECM）と細胞との安定した関係が破壊される。皮膚創傷の治癒過程、特に再上皮化過程においては角化細胞とECMの相互作用が重要な役割を果たす。本研究では、皮膚基底膜構成成分の代表であるラミニン５（ラミニン 332）の再上皮化における役割に焦点を当て、特に細胞遊走への関与を調べた。

過去にラミニンα3LG4 ドメインの受容体がシンデカン４であることを証明し、結合部位のアミノ酸配列を同定した。シンデカンとはヘパラン硫酸を有する細胞表面プロテオグリカンで、１から４のサブタイプがある。このうちシンデカン１と４は皮膚創傷において過剰発現している。細胞伸展の際にシンデカンとインテグリンがECM受容体として協調して機能することが知られているが、細胞遊走や創傷治癒への関与は明らかにされていない。

そこで本研究では、α3LG4 ドメイン内シンデカン結合配列を含む合成ペプチドPEP75（19アミノ酸）を用いてその細胞遊走刺激ならびに創傷治癒促進効果を示し、さらにシンデカンとインテグリンの相互作用の機構を解析した。

まず、合成ペプチドPEP75の培養液中への添加で角化細胞の遊走がインテグリン依存性に誘導されることを示した。また、マウス背部およびウサギ耳介皮膚創傷モデルを用いてPEP75の *in vivo* での創傷治癒促進効果を明らかにした。

次にこの PEP75-シンデカン-インテグリンの経路を通じた細胞遊走促進の機序を調べた。可溶性PEP75の添加によりシンデカン４の凝集が細胞表面に誘導された。この凝集にはインテグリンβ1 も共存していた。この時インテグリンβ1 分子内の P4G11 抗体結合エピトープが曝露することを、免疫染色と flow cytometry で証明した。つまりシンデカンの凝集がインテグリンの構造変化を誘導していることが示された。さらにPEP75処理は、インテグリンβ1 依存性の ECM への細胞接着能も増強させた。Pull-down assay によりPEP75がインテグリンβ1 ではなくシンデカン４に直接結合していること、またsiRNA法によりシンデカン４がPEP75添加時のP4G11抗体結合エピトープの曝露の増加および細胞遊走に関与していることを明らかにした。シグナル伝達経路を調べたところ、細胞遊走にはp38MAPK、PI3Kが関与し、コラーゲンへの細胞接着増強効果にはp38MAPKが関与していた。一方P4G11抗体結合エピトープの曝露についての細胞内シグナル伝達経路の関与は証明できなかった。

要約すると、ラミニン５由来の合成ペプチドPEP75はシンデカン４に結合し、細胞表面でのシンデカン４の凝集を誘導する。その凝集部位にはインテグリンβ1が構造変化を伴って共存する。さらにPEP75の添加はインテグリンβ1依存性にECMへの接着能の増強を起こす。これら *in vitro* の実験結果より、PEP75はインテグリンβ1の活性化を介して角化細胞遊走を促進していることが明らかになった。また動物を用いた創傷治癒モデルにおいても、PEP75が創傷治癒促進効果を持つことが示された。以上より、ラミニン５由来の合成ペプチドPEP75が慢性難治性皮膚潰瘍の治療の選択肢として有用である可能性が示唆された。PEP75は角化細胞をターゲットとした創傷治療の新たなアプローチとなることが期待される。

（論文審査の結果の要旨）

皮膚創傷の治癒過程、特に再上皮化過程においては角化細胞と細胞外マトリックス(ECM)の相互作用が重要な役割を果たす。本研究は皮膚基底膜構成ECMの代表であるラミニン５の再上皮化における役割に焦点を当て、ラミニンα3LG4 ドメイン内のシンデカン結合配列を含む合成ペプチド PEP75 を作成してその細胞遊走および創傷治癒促進効果を明らかにし、さらに PEP75-シンデカン-インテグリンの経路を通じた細胞遊走促進の機序を詳細に解析したものである。PEP75 の添加は皮膚角化細胞の遊走をインテグリン依存性に刺激した。PEP75は細胞表面でのシンデカン４の凝集を誘導し、その凝集部位にはインテグリンβ１が構造変化を伴って共存していた。また同ペプチドはインテグリンβ１依存性に角化細胞のECMへの接着能を増強させた。これら *in vitro* の実験結果より、PEP75はインテグリンβ１の活性化を介して角化細胞遊走を促進していることが明らかにされた。また動物創傷治癒モデルにおいて同ペプチドの創傷治癒促進効果が示され、合成ペプチド PEP75 が慢性難治性皮膚潰瘍の治療の選択肢として有用である可能性が示唆された。

以上の研究はラミニン５の皮膚創傷治癒における役割およびシンデカンとインテグリンの相互作用の機構の解明に貢献し、表皮角化細胞をターゲットとした創傷治療剤の創薬に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（　医学　）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成２１年１２月２１日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降