

関口細胞外環境プロジェクトの研究成果

目次

機能情報	2
新規基底膜蛋白質 QBRICK の同定	
毛包発生における基底膜微小環境の変化	
応答遺伝子	5
1. 壁側内胚葉細胞の基底膜大量産生メカニズムの解明	
2. 基底膜の主要構成成分ラミニンの大量生産系の確立	
3. 基底膜による細胞運命決定機構の解明	
工学	10
1. 新規細胞外マトリックス蛋白質の網羅的スクリーニングと マウス基底膜ボディーマップデータベースの作成	
2. 腎臓および小腸における基底膜蛋白質の時空間的発現制御の解析	
3. 新規細胞外マトリックス蛋白質 ADAMTSL-4 の同定とその機能解析	
4. 新規オルファクトメディンドメイン含有蛋白質 photomedin-1 および photomedin-2 の同定と機能解	
5. 新規 C1q /TNF スーパーファミリーメンバー、CRF ファミリー蛋白質の同定	
6. マトリックス工学によるマトリックス自己固相化型増殖因子の作成と 増殖因子活性の増強	

機能情報

新規基底膜蛋白質 QBRICK の同定

研究成果の概要

マウス毛包において誘導され、細胞接着活性を有する新規な基底膜蛋白質として QBRICK を同定した (図 1)。QBRICK ノックアウトマウスがヒトの遺伝性の発生異常である Fraser 症候群様の表現型 (目、肢、腎臓、皮膚などの発生異常) を示したことから (図 2)、QBRICK が器官形成において重要な分子であることが明らかとなった。

QBRICK のノックアウトマウスでは、当該遺伝子産物だけでなく、QBRICK のホモログ分子でありヒト Fraser 症候群の原因遺伝子でもある *Fras1*, *Frem2* の 3 者すべての基底膜における発現が著しく低下していた (図 3)。このような QBRICK, *Fras1*, *Frem2* の 3 者すべての基底膜における発現の低下は、Fraser 症候群様の表現型を示す *Frem2* 変異マウス、細胞内アダプター蛋白質 GRIP1 変異マウスにおいても起こっていることを明らかにした (図 3)。これらの結果から、QBRICK, *Fras1*, *Frem2* の 3 者はお互いの局在の安定化に機能していること、この安定化の破たんが Fraser 症候群を引き起こすことが明らかとなった。

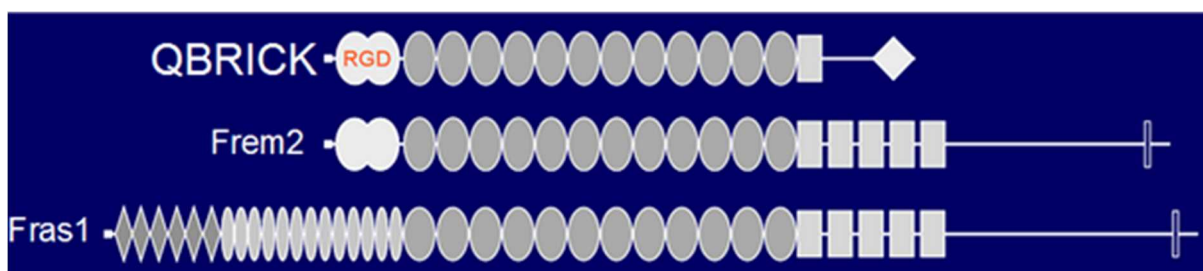


図 1 QBRICK 及びそのホモログ分子 *Fras1*, *Frem2* の分子構造



図 2 QBRICK ノックアウトマウスは異栄養型表皮水疱症 (左)、潜在眼球症 (中央)、合指 (右) など Fraser 症候群様の表現型を示す。

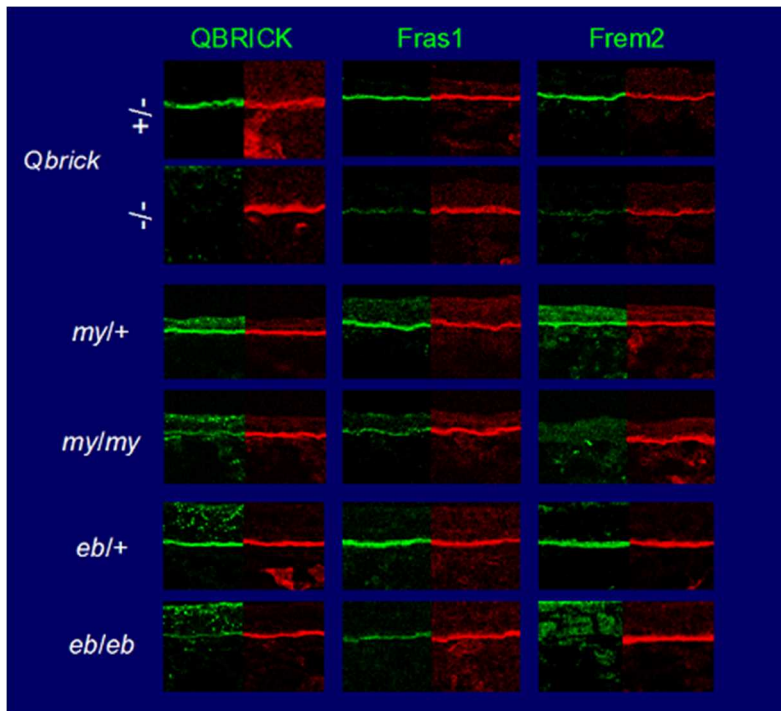


図3 QBRICK ノックアウトマウス、Frem2 変異マウス my/my、GRIP1 変異マウス eb/eb のいずれにおいても、基底膜における QBRICK, Fras1, Frem2 の発現が著しく低下している。各蛋白質の局在は緑色で、基底膜成分であるラミニン γ 1 鎖の局在を赤で示す。

出願特許

- 1) 特願 2002-272055 (特開 2004-105086) 「毛包プラコードに特異的に発現する新規細胞外マトリックスタンパク質、及びその遺伝子」出願人：科学技術振興機構・エーザイ株式会社、発明者：浄住大慈、岡田明子、関口清俊、長田亜樹、今井俊夫、尾野雄一（整理番号 E065P05、出願日 2002 年 9 月 18 日）

報告書など

- 1) D. Kiyozumi, D. A. Osada, N. Sugimoto, C.N. Weber, Y. Ono, T. Imai, A. Okada, K. Sekiguchi, Identification of a novel cell-adhesive protein spatiotemporally expressed in the basement membrane of mouse developing hair follicle. *Exp. Cell Res.* 306, 9-23 (2005).
- 2) D. Kiyozumi, N. Sugimoto, K. Sekiguchi, Breakdown of reciprocal stabilization of QBRICK, Fras1 and Frem2 at the basement membrane provokes Fraser syndrome-like defects. Submitted.

研究者名：浄住 大慈、長田 亜樹、岡田 明子

毛包発生における基底膜微小環境の変化

研究成果の概要

マウス毛包において誘導され、細胞接着活性を有する新規な基底膜蛋白質として QBRICK 及び MAEG を同定した。毛包発生において QBRICK や MAEG は限定的な発現分布を示した。種々の基底膜蛋白質および受容体インテグリンの発現を検討した結果、毛包発生においては基底膜の分子組成と細胞が発現するインテグリンのサブタイプが局所的に変化していることが明らかとなった。

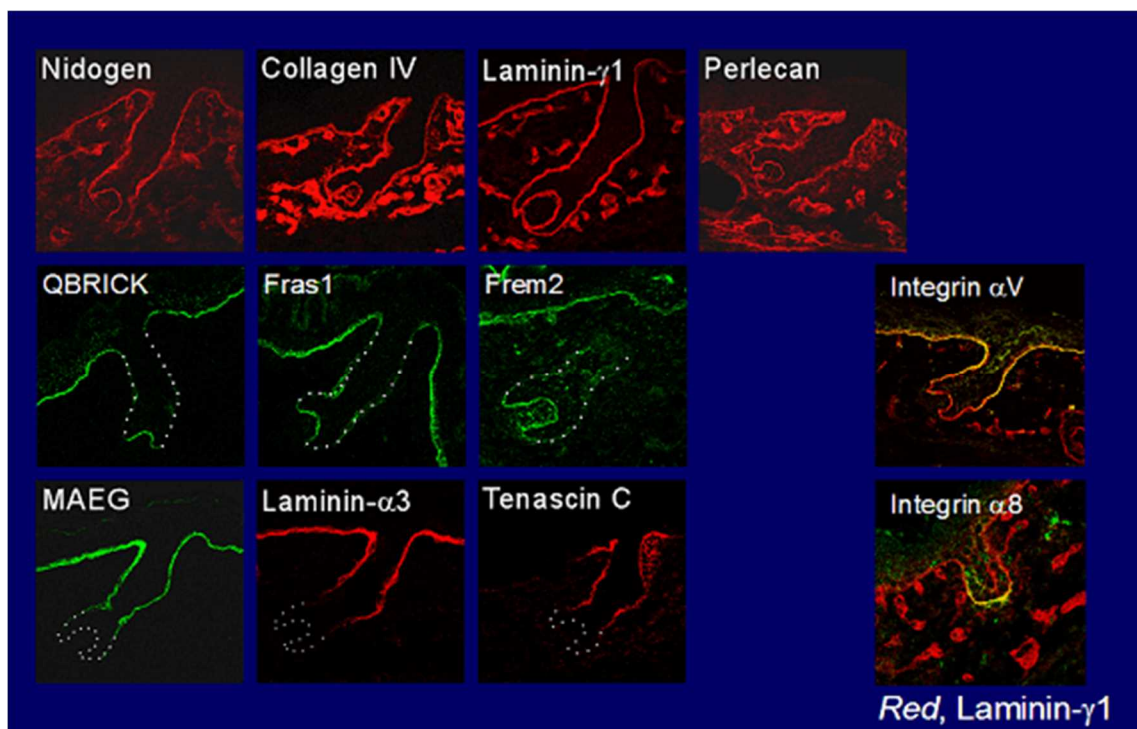


図3 毛包発生における種々の基底膜蛋白質および受容体インテグリンの発現分布。
Nidogen, Collagen IV, Laminin- γ 1, Perlecan は一様に発現しているのに対し、
QBRICK, Fras1, Frem2, MAEG, Laminin- α 3, Tenascin C は局所的に発現している。
またインテグリン α V鎖、 α 8鎖も局所的に発現している。

報告書など

- 1) A. Osada, D. Kiyozumi, K. Tsutui, Y. Ono, C.N. Weber, N. Sugimoto, T. Imai, A. Okada, K. Sekiguchi, Expression of MAEG, a novel basement membrane protein, in mouse hair follicle morphogenesis. *Exp. Cell Res.* 303, 148-159 (2005).
- 2) D. Kiyozumi, D. A. Osada, N. Sugimoto, C.N. Weber, Y. Ono, T. Imai, A. Okada, K. Sekiguchi, Identification of a novel cell-adhesive protein spatiotemporally expressed in the basement membrane of mouse developing hair follicle. *Exp. Cell Res.* 306, 9-23 (2005).

研究者名：長田 亜樹、浄住 大慈、岡田 明子

応答遺伝子

1. 壁側内胚葉細胞の基底膜大量産生メカニズムの解明

研究成果の概要

細胞運命の制御により組織の構築・再生を目標とする組織工学・再生医学の分野においては、基底膜環境を再構成する技術、“基底膜工学”が非常に重要な位置を占めると考えられるが、基底膜成分を大量に精製する事は非常に困難である。壁側内胚葉細胞が初期発生期に基底膜を大量産生するメカニズムを図1に示すように種々のアプローチにより解析した。その結果、この幹細胞から壁側内胚葉細胞への分化及び基底膜大量産生における遺伝子発現制御のネットワークの一端(図2)、特に転写因子 Sox7 が重要な役割を果たす事を明らかにした。

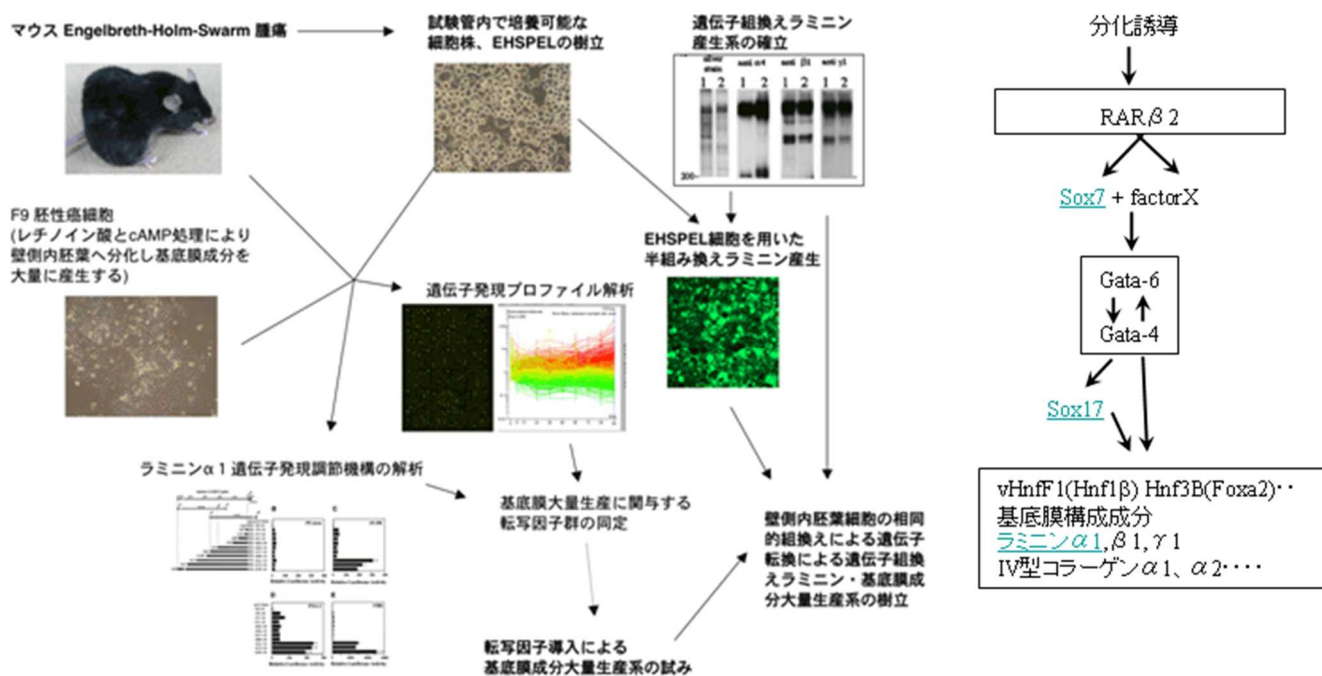


図1

図2

報告書他

- 1) T. Niimi, Y. Hayashi, K. Sekiguchi: "Identification of an upstream enhancer in the mouse laminin alpha 1 gene defining its high level of expression in parietal endoderm cells." J Biol Chem. 278 (2003) : 9332-9338
- 2) S. Futaki, Y. Hayashi, M. Yamashita, K. Yagi, H. Bono, Y. Hayashizaki, Y. Okazaki, K. Sekiguchi: "Molecular basis of constitutive production of basement membrane components; Gene expression profiles of Engelbreth-Holm-Swarm tumor and F9 embryonal carcinoma cells." J. Biol. Chem. 278 (2003) 50691-701

- 3) T. Niimi, Y. Hayashi, S. Futaki, K. Sekiguchi:” Sox7 and Sox17 regulate the parietal endoderm-specific enhancer activity of mouse laminin alpha 1 gene.” J. Biol. Chem 279 (2004) 38055-38061.
- 4) Y. Hayashi, T. Emoto, S. Futaki, K. Sekiguchi, Establishment and characterization of a parietal endoderm-like cell line derived from Engelbreth-Holm-Swarm tumor (EHSPEL), a possible resource for an engineered basement membrane matrix. Matrix Biol. 23 (2004) 47-62
- 5) S. Futaki, Y. Hayashi, T. Emoto, C.N. Weber, K. Sekiguchi:” Sox7 Plays Crucial Roles in Parietal Endoderm Differentiation in F9 Embryonal Carcinoma Cells through Regulating Gata-4 and Gata-6 Expression.”Mol Cell Biol. 24(2004)10492-10503

研究者名：林 良敬、二木 杉子、新美 友章、関口 清俊

2. 基底膜の主要構成成分ラミニンの大量生産系の確立

研究成果の概要

基底膜の主要構成成分であるラミニンの組み換え産生系を構築した。さらに壁側内胚葉細胞を用いて相同的遺伝子組み換えによりさまざまなラミニンアイソフォームを 10mg/L のオーダーで産生する細胞を作り出すシステムを確立した（図 3）。

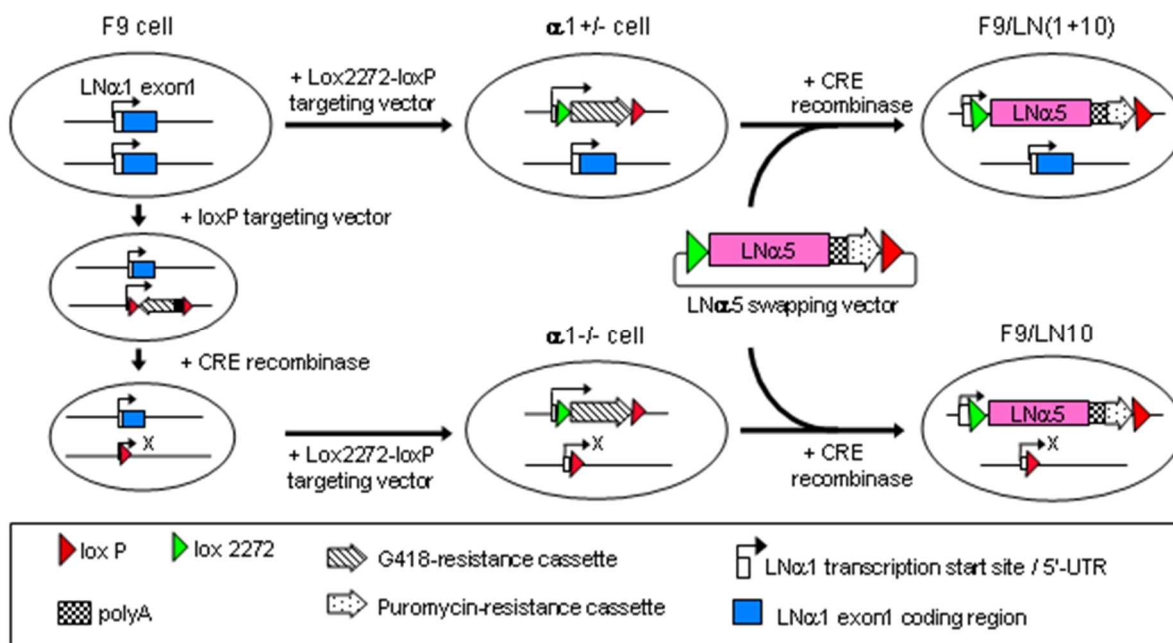


図 3 ラミニン $\alpha 5$ サブユニット cDNA を用いた遺伝子置換

成果展開可能な分野

- 1) 新規細胞培養基質・組織工学・再生医学研究

出願特許

- 1) 特願 2002-301052 (特開 2004-135519) 「壁側内胚葉様細胞株、及びその樹立方法、並びに分泌蛋白の製造方法」出願人：科学技術振興機構、発明者：林良敬、関口清俊（整理番号 E065P06、出願日 2002 年 10 月 15 日）
- 2) 特願 2005-130194 「蛋白質の生産に用いることが可能な F9 胚性腫瘍細胞、及びその利用」出願人：科学技術振興機構、発明者：林良敬、関口清俊（整理番号 E065P10、出願日 2005 年 4 月 27 日）

報告書他

- 1) Y. Hayashi, K.-H. Kim, H. Fujiwara, C. Shimono, M. Yamashita, N. Sanzen, S. Futaki, and S. Sekiguchi Identification and recombinant production of human laminin α 4 subunit splice variants, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 299 (2002) : 498-504.
- 2) H. Ido, K. Harada, S. Futaki, Y. Hayashi, R. Nishiuchi, Y. Natsuka, S. Li, Y. Wada, A. C. Combs, J. M. Elvasti, K. Sekiguchi, Molecular dissection of the alpha -dystroglycan- and integrin-binding sites within the globular domain of human laminin-10. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 10946-54
- 3) Y. Hayashi, C. N. Weber, T. Emoto, H. Fujiwar, N. Sanzen, S. Futaki, K. Sekiguchi, A Novel Large-scale Production System for Modified Basement Membrane Matrices Using Gene-Swapped Parietal Endoderm Cells. *Matrix Biol.* 25 (2006) 85-8

研究者名：林 良敬、二木 杉子、藤原 裕展、関口 清俊

3. 基底膜による細胞運命決定機構の解明

研究成果の概要

基底膜は細胞の分化運命を制御していると考えられているが、その分子メカニズムはほとんど明らかにされていない。本研究では、ラミニン $\gamma 1$ サブユニット $^{-/-}$ ES細胞由来の embryoid body (基底膜を欠く) を用い、基底膜が ES 細胞の上皮-間充織転換を抑制することにより、ES 細胞の中胚葉分化を抑制することを明らかにした (図 4)。

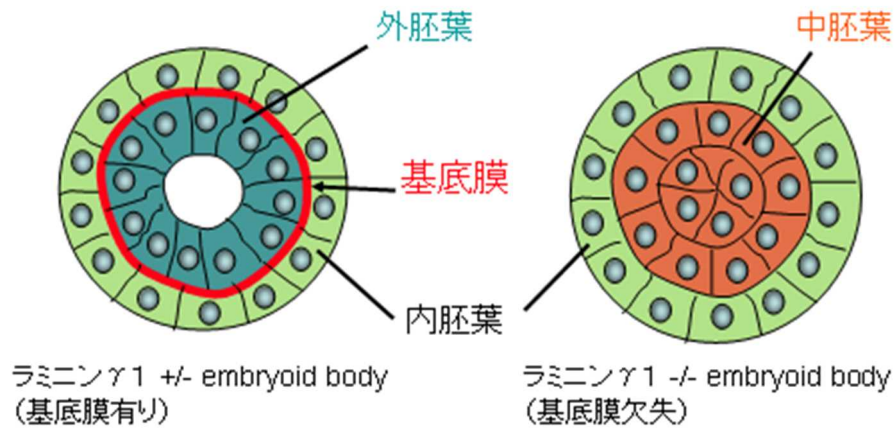


図 4

研究者名：藤原 裕展、林 良敬、二木 杉子、関口 清俊

工学

1. 新規細胞外マトリックス蛋白質の網羅的スクリーニングと

マウス基底膜ポディーマップデータベースの作成

細胞はその外側にある細胞外環境からの刺激に応答して、様々な生命活動を営んでいる。では、細胞外環境とはどのような分子により作られているのであろうか？これを理解すれば、細胞の増殖や分化などの活動を自由に制御することも可能になる。

そこで私たちは、細胞外環境の中でも中心的な役割を果たしている細胞外マトリックスに注目し、その分子構成のすべてを明らかにすることを旨とする「マトリオームプロジェクト」を推進した。マトリオーム (matriome = matrix + -ome) とは「細胞外マトリックスの分子構成の総体」を指す言葉として我々が提唱している概念である。

マトリオームを明らかにするためには、まず、未だ知られていない新規な細胞外マトリックス因子を探索し、そして次に、それぞれの細胞外マトリックス因子がどの組織のどの細胞のマトリックスに存在するのかを解読する必要がある。

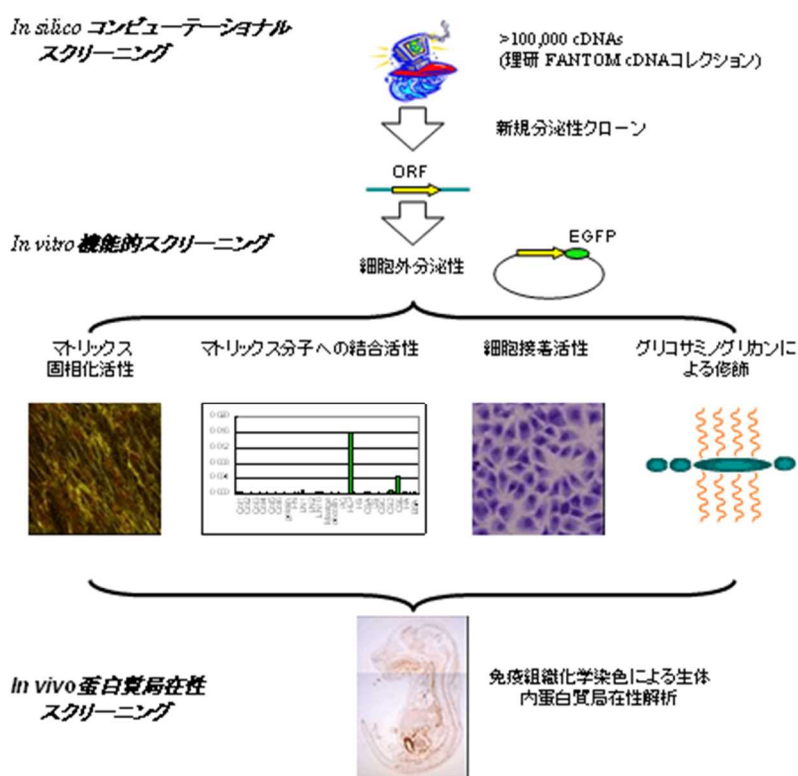


図1 新規細胞外マトリックス蛋白質の網羅的スクリーニング方法

10万個のcDNA情報から候補クローンを絞り込むために、まず*in silico* コンピューテーショナルスクリーニングにより機能未知な細胞外分泌性クローンを抽出した。次にマトリックス固相化活性、他の細胞外マトリックス分子への結合活性、細胞接着活性およびグリコサミノグリカンによる修飾を指標とした*in vitro* 機能的スクリーニングにより、新規細胞外マトリックス蛋白質候補クローンを選り出した。これら蛋白質が生体内において細胞外マトリックス構造に局在することを、免疫化学染色法を用いた*in vivo* 蛋白質局在性スクリーニングにより確認した。

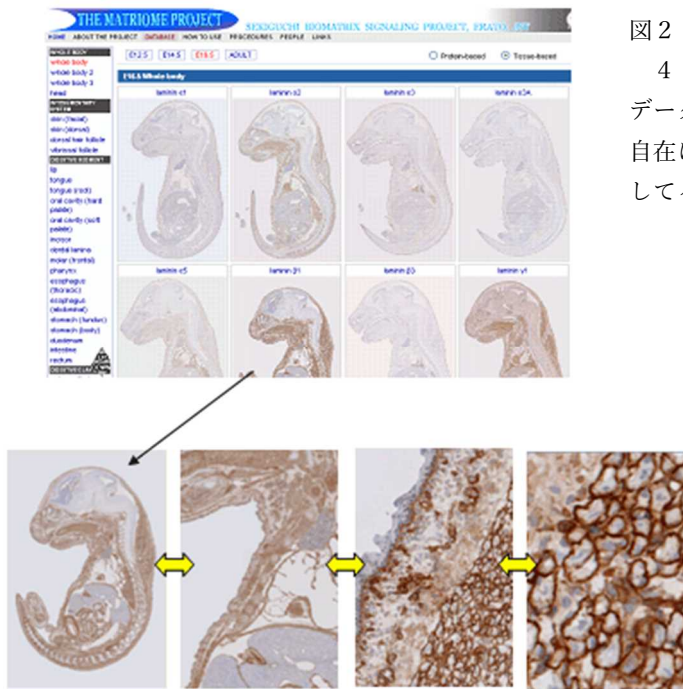


図2 マウス胎児染色標本とマトリオームデータベース
4 種類の基底膜蛋白質のマウス胎児全身染色画像をデータベース化した。全体標本から細胞レベルまで自由自在に拡大・縮小・移動が可能なバーチャルスライドとしてインターネット上で閲覧できる。

研究成果の概要

- 1) 新規細胞外マトリックス蛋白質の網羅的スクリーニング法を開発し、16個の新規細胞外マトリックス蛋白質を同定した。このうち、8個は基底膜に局在する蛋白質であった。
- 2) 基底膜に注目し、それを構成する43個の基底膜蛋白質のマウス胎児全身における局在パターンを免疫組織化学的手法により調べた。これにより、マウス基底膜を構成する全蛋白質のうち、その80%のマトリオームを明らかにした。
- 3) 免疫染色標本のすべてをデジタル化し、インターネット上で自由自在に観察できる高精細バーチャルスライドを作成し、これを「マウス基底膜ボディーマップデータベース」として公開した(<http://www.matrixome.com/bm/>)。

将来への展望・応用の可能性

本研究で実施した細胞外マトリックスの大規模探索および基底膜構成蛋白質の網羅的局在性解析は世界で初めての成果である。また、そのデータをまとめた基底膜ボディーマップデータベースは、大画像コンテンツ含むデータベースとして世界最大規模となった。

本研究の成果は、上皮系細胞に特化した基底膜の科学的バイブルとして、発生・臓器形成における基底膜の理解のための重要な情報資産となるとともに、基底膜再構成するための基盤情報として、今後、必須のデータベースになるものと考えられる。

今後、本研究で構築された技術的資産を基に、疾病におけるマトリオームの変化を明らかにすることももう一つの大きな目標となるであろう。これにより、疾病と細胞外マトリック

ス環境の相関を明らかにし、どのようなマトリックス環境の破綻が病態に結び付くのか、また、それを改善するための分子的基盤を明らかにしていくことが可能となるだろう。これら発生および疾病におけるマトリオーーム解析は再生医療分野における細胞培養技術、特に細胞外基質の再構成技術の開発において、極めて重要かつ貴重な分子的基盤を与えるものと考えている。

特許出願

1) 特願 2002-272055 (特開 2004-105086)

「毛包プラコードに特異的に発現する新規細胞外マトリックスタンパク質、及びその遺伝子」

出願人：科学技術振興機構・エーザイ株式会社

発明者：浄住大慈、岡田明子、関口清俊、長田亜樹、今井俊夫、尾野雄一

(整理番号 E065P05、出願日 2002 年 9 月 18 日)

2) グリコサミノグリカン結合性物質のスクリーニング法

特開 2004-170194 平成 16 年 6 月 17 日

眞鍋理一郎、関口清俊、木全弘治、杉浦信夫

独立行政法人 科学技術振興事業団、生化学工業 (株)

3) 新規細胞外マトリックスタンパク質、及びその遺伝子

特開 2004-8016

関口 清俊、眞鍋理一郎、筒井 仰、林崎 良英、神谷 守

科学技術振興事業団、理化学研究所、(株)ダナフォーム

4) 新規細胞外マトリックスタンパク質、及びその遺伝子

特開 2004-8019

関口 清俊、眞鍋理一郎、林崎 良英、神谷 守

科学技術振興事業団、理化学研究所、(株)ダナフォーム

5) 新規細胞外マトリックスタンパク質、及びその遺伝子

特開 2004-8021

関口 清俊、眞鍋理一郎、古谷 裕、筒井 仰、林崎 良英、神谷 守

科学技術振興事業団、理化学研究所、(株)ダナフォーム

6) 網膜に発現する新規細胞外マトリックスタンパク質、及びその遺伝子

特開 2004-65133

古谷 裕、眞鍋理一郎、関口 清俊、林崎 良英、神谷 守

科学技術振興事業団、理化学研究所、(株)ダナフォーム

7) 新規マトリックスタンパク質、及びその遺伝子

特開 2004-180541 平成 14 年 11 月 29 日

筒井仰、眞鍋理一郎、関口清俊、林崎良英、神谷守

科学技術振興事業団、理化学研究所、株式会社ダナフォーム

論文・報告書他

- 1) ティッシュエンジニアリング：再生医療のためのテーラーメイド環境設計, 再生医療 13-21, 3 (2), 2004, 眞鍋理一郎、関口清俊
- 2) Mouse Basement Membrane Bodymap Database (<http://www.matrixome.com/bm/>)

研究者：眞鍋 理一郎、筒井 仰、福田 友彦、下野 知性、関口 清俊

2. 腎臓および小腸における基底膜蛋白質の時空間的発現制御の解析

個体レベルでの調和の取れた生命活動は、多くの臓器の働きの総和のうえに成り立っており、この臓器の主要な機能は主に上皮系細胞によって担われている。この上皮系細胞が生体内で足場としているのが基底膜である。

多様な基底膜構成と多様な細胞の機能発現の関係を総合的に理解するために、細胞外マトリックス蛋白質の網羅的スクリーニングにより同定した8個の新規基底膜蛋白質を含め、43種類の基底膜蛋白質に対する抗体を用意し、マウス胎仔および成体組織の免疫組織化学染色を行い、それぞれの基底膜におけるすべての蛋白質構成「マトリオーム」の解読を試みた。

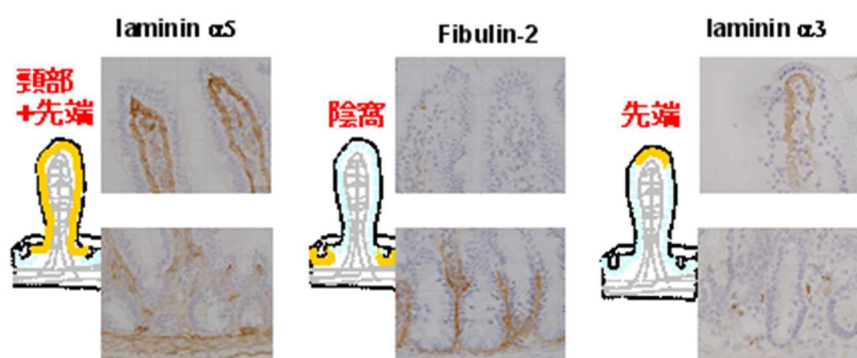


図1 成体小腸粘膜の構造と基底膜タンパク質の領域特異的発現様式の例

小腸の粘膜には絨毛とよばれる多数の突起があり、この突起の底部は陰窩とよばれている。絨毛のほとんどは吸収を行う腸上皮細胞と、その細胞間に散在し粘液産生を担っている杯細胞から構成されている。43種類の基底膜蛋白質に対する抗体を用いた蛋白質局在性スクリーニングにより、小腸粘膜基底膜は「陰窩部」、「絨毛頸部」、「絨毛先端部」の3つの領域に区分された（基底膜タンパク質の発現部位を黄色で示している）。

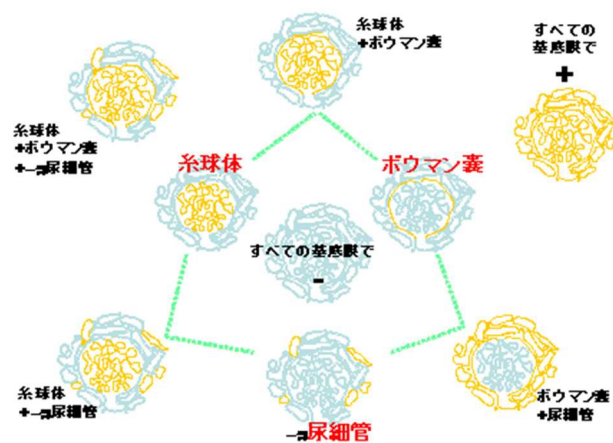


図2 腎臓ネフロン基底膜タンパク質の発現様式パターン

43種類の基底膜蛋白質に対する抗体を用いた蛋白質局在性スクリーニングにより得られた情報を模式化すると、基底膜タンパク質の発現様式は9つのパターンに分類された。ここで得られたパターンは基本的に4つの領域、すなわち「糸球体」、「ボウマン嚢」、「近位尿細管」、「遠位尿細管」の組み合わせによって出来上がっている（基底膜タンパク質の発現部位を黄色で示している）。

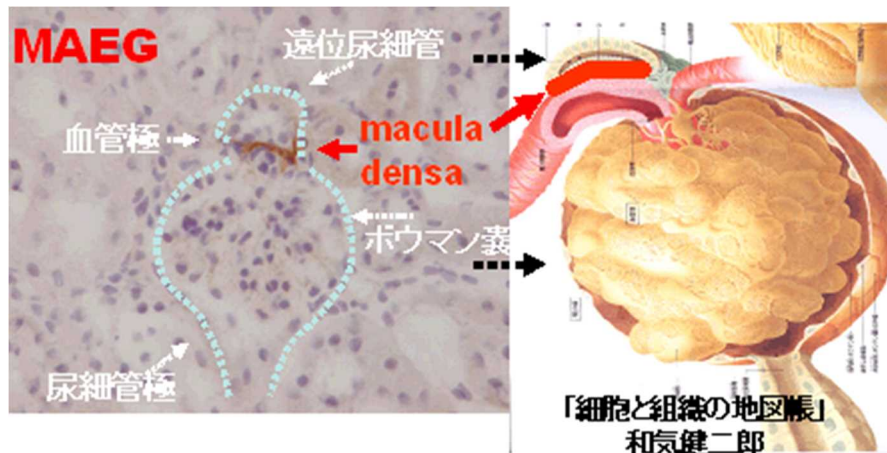


図3 MAEGの腎臓緻密斑(macula densa：マクラデンサ)における特異的発現

マクラデンサ細胞は、遠位尿細管が輸入細動脈に付着した部分の付着側に存在する円柱状の特異な上皮細胞である。マクラデンサ細胞はATPチャネルであるNaClセンサーによって尿細管の原尿中のCl⁻濃度を感知し、近傍の顆粒細胞からのレニン分泌を制御するとともに、輸入細動脈を収縮させて糸球体血行動態を調節するなど、腎臓の原尿生成、血圧調節に重要な役割を果たしている。MAEGがマクラデンサ細胞の基底膜に局限していることは、マクラデンサ細胞の機能や形態的特徴を規定する分子として、基底膜の最適化に寄与しているものと考えられる。

研究成果の概要

- 1) 成体小腸粘膜および腎臓ネフロンの上皮基底膜マトリオームを明らかにした。
- 2) 基底膜分子構成の違いから、小腸粘膜は3つ、腎臓ネフロンは4つの領域に大きく区分された(図1、2)。
- 3) 新規基底膜蛋白質MAEGは上記の領域区分の一つ、遠位尿細管のなかでも、緻密斑に限局して発現していた(図3)。同様に上記の領域区分内のさらに一部でのみ、検出されるものが存在したことから、基底膜の領域区分はさらに細分化されていると考えられた。

将来への展望・応用の可能性

これまで、多くの研究により明らかにされてきた「細胞」の機能を、本来細胞が生活している環境において調べる事が可能となれば、より複雑な事象の理解が進むと期待される。例えば、臓器・組織の再生は、基本的に発生と同様な分子機構によることから、臓器・組織の再生機構を理解するため、今後は、様々な発生ステージでのマトリオーム解析が必要であると考えられる。これら発生から成熟にいたる基底膜マトリオームの変化から、個々の細胞・組織の形成に重要な基底膜分子を絞り込むことも可能であろう。

今後、これら基底膜分子構成の全体像を解読する研究を通じて、生体内の基底膜環境をミミックできる再構成基底膜をカスタムメイドにデザインするための分子的基盤を確立することが課題となる。

論文・報告書他

- 1) ティッシュエンジニアリング：再生医療のためのテーラーメイド環境設計, 再生医療 13-21, 3 (2), 2004, 眞鍋理一郎、関口清俊
- 2) Mouse Basement Membrane Bodymap Database (<http://www.matriome.com/bm/>)

研究者：福田 友彦、眞鍋 理一郎、筒井 仰、下野 知性、関口 清俊

3. 新規細胞外マトリックス蛋白質 ADAMTSL-4 の同定とその機能解析

われわれは、マトリオームを明らかにする一環として、新規細胞外マトリックス蛋白質の網羅的スクリーニングを行った。その結果、ある特定の細胞外マトリックスに局限して発現する多くの因子を同定した。これら因子の細胞外マトリックスカスタマイゼーションにおける重要性を検証すべく、網羅的スクリーニングにより見いだされた新規細胞外マトリックス蛋白質 ADAMTSL-4 (図1) の機能解析を行った。

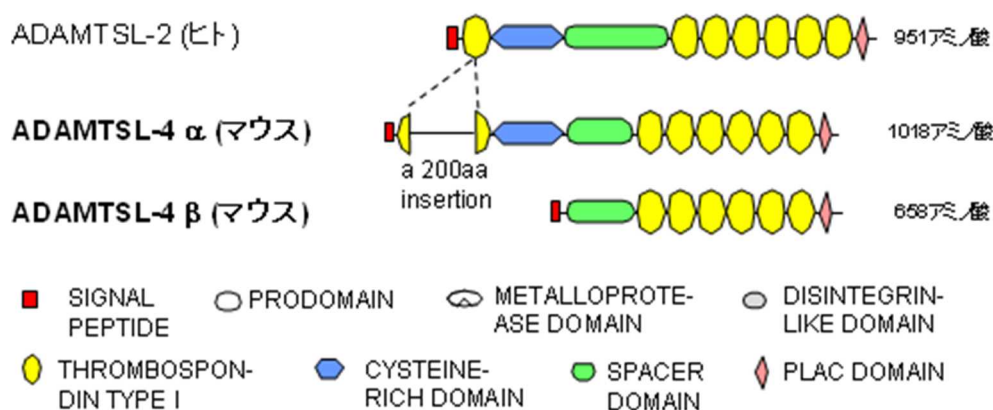


図1 ADAMTSL-4はADAMTSプロテアーゼと構造的に相同性がある新規細胞外マトリックス因子である。ADAMTSプロテアーゼと異なり、酵素活性領域を持たないことを特徴とする。異なる発現制御を受けるα formとβ formの2種類のバリエーションが存在する。

研究成果の概要

- 1) 新規細胞外マトリックス蛋白質 ADAMTSL-4 は培養細胞が作るフィブリリン-1 (fibrillin-1) を含む線維状マトリックスに対する会合能を持ち、フィブリリン-1 の線維形成を促進する (図2)。
- 2) ADAMTSL-4 はマウス胚の皮下、動脈、軟骨膜など非常に局限された部位の線維状マトリックスに局在する (図3)。
- 3) 軟骨・骨形成過程において、ADAMTSL-4 は軟骨凝集塊形成時から発現が認められ、軟骨分化が進むとともに軟骨周囲に形成される軟骨膜に局限する (図3)。
- 4) 軟骨内に恒常的に ADAMTSL-4 を発現するトランスジェニックマウスを作製し、その表現型を解析したところ、体躯は小型化し、顔面形成に異常が認められた。また、軟骨基質の主要構成成分である2型コラーゲンのマトリックス沈着にも異常が認められた (図4)。このことから、ADAMTSL-4 が2型コラーゲンの成熟に関わる ADAMTS プロテアーゼ活性を制御している可能性が示唆された。

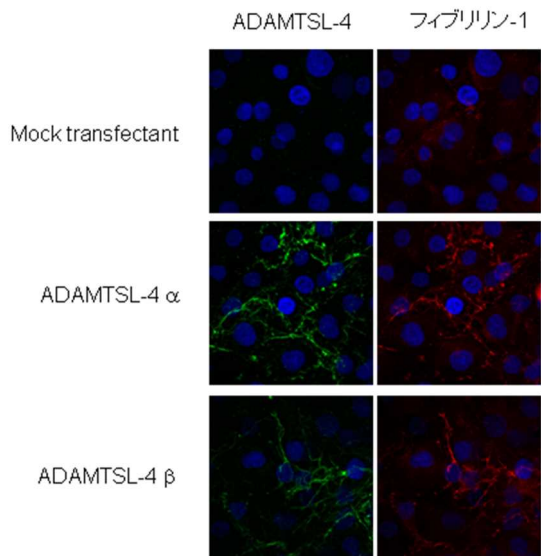


図2 ADAMTSL-4はフィブリリン-1のマトリックス形成を促進する
 MG63細胞にトランスフェクション後、3日目の蛍光二重染色像。左側に導入したADAMTSL-4の染色(緑色)を、右側に細胞由来フィブリリン-1蛋白質の染色(赤色)を示す。細胞の核を青色に染めてある。Mockではフィブリリン-1のマトリックス形成は認められないが、ADAMTSL-4を発現させることによってフィブリリン-1のマトリックス形成が強く促進されている。

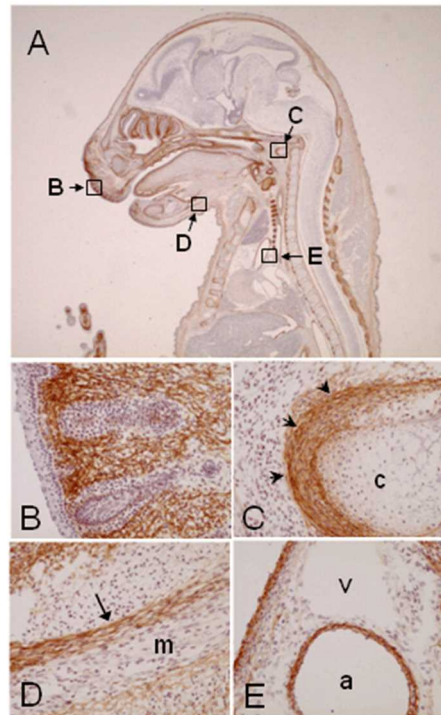


図3 ADAMTSL-4の生体内局在性(マウス胎生16.5日胚)
 Aに上半身の染色像を示し、図中四角で囲んである領域の拡大写真をB, C, D, Eに示した。Bはほおひげ毛包周囲の皮膚。Cは輪状軟骨(c)と軟骨膜(矢尻)。Dは下顎骨につながる骨格筋(m)と腱様構造(矢印)。Eは心臓周囲に認められる静脈(v)と動脈(a)の断面。いずれも線維状の染色が認められる。

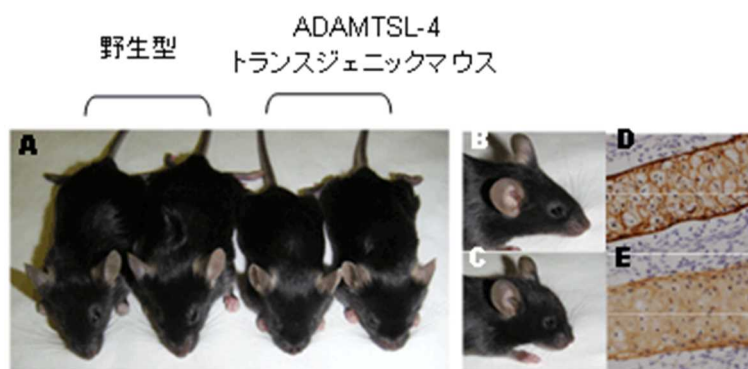


図4 ADAMTSL-4を軟骨に発現するトランスジェニック(Tg)マウスに認められる骨格異常
 ADAMTSL-4トランスジェニックマウスは野生型マウスと比べ体格が小さく(A)、特に鼻先が短い(B, C)。また、軟骨マトリックス内の2型コラーゲンの沈着が減弱している(D, E)。
 A; 左から順に生後6週齢の野生型♀、野生型♂、Tg♀、Tg♂。B; 野生型、C; Tgマウス横顔。D; 胎生14.5日目の野生型肋軟骨 type II collagenの免疫染色像。E; 胎生14.5日目のTgマウス肋軟骨 type II collagenの免疫染色像。

将来への展望・応用の可能性

フィブリリン-1は多くのマイクロフィブリルや弾性線維に必須な構成成分であるが、会合の詳細なメカニズムは全くわかっておらず、線維形成を促進する因子も今回の発見が初めてである。創傷治癒時など早急にマイクロフィブリルの線維形成が必要な場面において、それを促進する薬剤として ADAMTSL-4 蛋白質が利用可能かもしれない。

フィブリリン-1は軟骨膜でもマイクロフィブリルを形成しているが、最近軟骨／骨形成の重要なモジュレーターである BMP-7 が直接 fibrillin-1 に結合しうることが報告されている。また ADAMTSL-4 のターゲットと考えられる ADAMTS プロテアーゼは軟骨や軟骨膜で強く発現し、軟骨マトリックス蛋白質を基質とする。ADAMTSL-4 によるフィブリリンマトリックス形成と ADAMTS プロテアーゼ活性の制御を明らかにして行くことで、軟骨分化における軟骨膜の機能がより明確になるものと期待される。

論文・報告書他

1) 歯周病治療用組成物

特願 2005-163337 平成 17 年 6 月 2 日

齊藤正寛、筒井仰、眞鍋理一郎、関口清俊

独立行政法人 科学技術振興機構、神奈川歯科大学

2) 新規細胞外マトリックスタンパク質、及びその遺伝子

特開 2004-8016

関口 清俊、眞鍋理一郎、筒井 仰、林崎 良英、神谷 守

科学技術振興事業団、理化学研究所、(株)ダナフォーム

研究者：筒井 仰、眞鍋 理一郎、関口 清俊

4. 新規オルファクトメディンドメイン含有蛋白質 photomedin-1 および photomedin-2 の同定と機能解

近年ゲノム配列や完全長 cDNA ライブラリーの公開により、配列情報からの細胞外マトリックス蛋白質の選択が可能となってきた。しかし、細胞外マトリックス蛋白質の機能は一部のものしか分かっていない。そこで、理研マウス完全長 cDNA ライブラリーより新規細胞外マトリックス蛋白質をコンピュータショナルにスクリーニングし、カルボキシ末端に“オルファクトメディン”ドメインを持つ2つ蛋白質を見つけた。Photoreceptor（光受容器）に強く発現していることから photomedin（フォトメディン）と名付け、この機能について解析を行った。

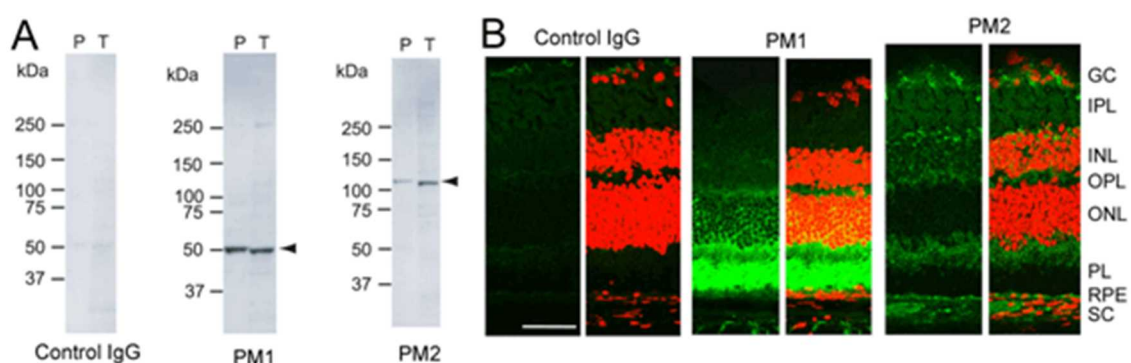


図1 (A) photomedins 特異的抗体を用いた眼ライゼートに対するウェスタンブローディング。
(B) 網膜における photomedins の局在。

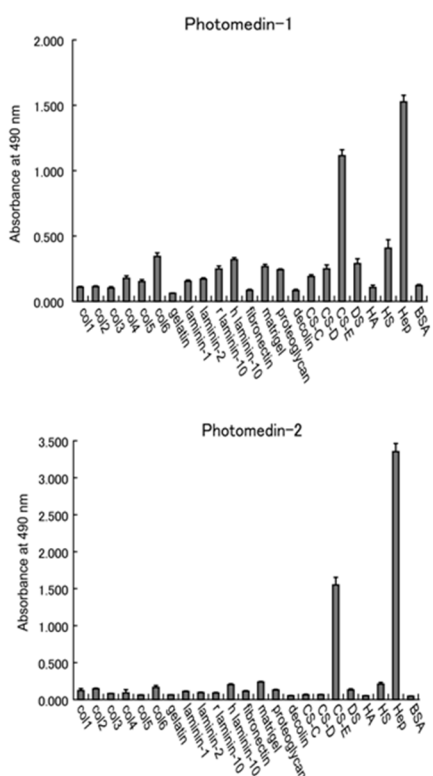


図2 photomedin の細胞外マトリックス
因子結合活性

研究成果の概要

photomedin-1 は視神経細胞外接に、photomedin-2 は全ての網膜神経細胞に発現が観られ、photomedin-1 と photomedin-2 は互いに排他的な局在をとっていた（図1）。Photomedins はグリコサミノグリカンの一種であるコンドロイチン硫酸 E に対する結合活性を持っていた（図2）。細胞染色とウェスタンブロッティングの結果から、Photomedins は細胞外で凝集体として存在していると考えられた。そのため、この凝集体が細胞表面にあるコンドロイチン硫酸 E をもつプロテオグリカンに結合し、シナプス形成など細胞間接着を制御する可能性が考えられる。また、凝集体を作らない様にプロセッシングされた photomedin-1 は細胞間接着を抑制、または、接着をガイダンスするなどの作用を持っているものと考えられる。

将来への展望・応用の可能性

“オルファクトメディン”ドメインを持つ蛋白質として緑内障の原因遺伝子である myocilin、neural crest の形成に関わる noelin、神経管の背側の決定に関わる tiarin、運動神経のシナプス形成に関わる colmedin などが知られており、ほとんどの“オルファクトメディン”ドメインを持つ蛋白質は神経形成に関わっている。Myocilin に“オルファクトメディン”ドメインを欠損するような変異が入ると緑内障になることが解っており、また colmedin でも“オルファクトメディン”ドメインを欠損した変異体は運動神経の接合が上手くいかなくなり運動障害の表現型を示す。この様なことから photomedins における変異も神経接合などに障害を起こす可能性があり、神経疾患の病態と photomedins の変異との関連を調べる必要がある。

特許出願

- 1) 網膜に発現する新規細胞外マトリックスタンパク質、及びその遺伝子

特開 2004-65133

古谷 裕、眞鍋理一郎、関口 清俊、林崎 良英、神谷 守

科学技術振興事業団、理化学研究所、（株）ダナフォーム

論文・報告書他

- 1) Identification and characterization of photomedins: novel olfactomedin-domain-containing proteins with chondroitin sulphate-E-binding activity. *Biochem J.* 2005 Aug 1;389(Pt 3):675-84. Furutani Y, Manabe R, Tsutsui K, Yamada T, Sugimoto N, Fukuda S, Kawai J, Sugiura N, Kimata K, Hayashizaki Y, Sekiguchi K

研究者：古谷 裕、眞鍋理一郎、筒井 仰、関口 清俊

5. 新規 C1q/TNF スーパーファミリーメンバー、CRF ファミリー蛋白質の同定

研究成果の概要

本研究では、マトリウムプロジェクトの一環として神経組織特異的な新規細胞外マトリックス因子の網羅的探索を行った。理化学研究所のマウス完全長 cDNA ライブラリーを母集団として、in silico での細胞外分泌蛋白質のスクリーニングと免疫組織化学染色法による組織内発現部位のスクリーニングを行った結果、神経組織特異的な C1q-related factor (CRF) ファミリーを同定した。CRF ファミリーは C1q/TNF スーパーファミリーの新たなサブファミリーであり、CRF1-4 の 4 つの蛋白質からなる (図 1)。これらの蛋白質は collagen triple helix repeats と C1q ドメインをもつコラーゲン様の分子群である。CRF ファミリーのうち、CRF3 は海馬で高い発現が認められ、おもに歯状回から CA3 領域の透明層にかけて局在していることが分かった (図 2)。また、海馬の in situ ハイブリダイゼーションや免疫組織化学染色、免疫電子顕微鏡観察から、CRF3 は海馬の歯状回の顆粒細胞で発現され、その神経軸索である苔状線維の中を運ばれてシナプス終末端から分泌されることが分かった。さらに、CRF3 の発現は海馬とともに記憶の形成に関係する嗅内野皮質や視床前核でも認められた。強制発現系による精製蛋白質の解析の結果、同じドメイン構造をもつアディポネクチンと同様に高分子量の多量体を形成していることが明らかになった (図 3)。

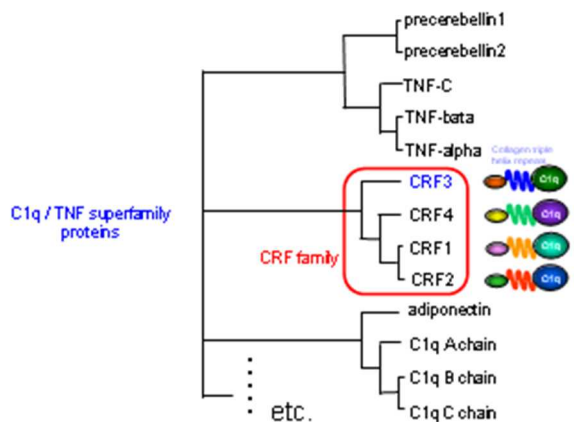


図 1 C1q/TNF スーパーファミリーと CRF ファミリーとの関連

CRF ファミリーは C1q/TNF スーパーファミリーの中でサブファミリーを形成している。C1q/TNF スーパーファミリーは TNF ligand superfamily と C1q-domain-containing protein family を合わせた約 50 種類以上の蛋白質が報告されているが、ここでは代表的な蛋白質を記した。

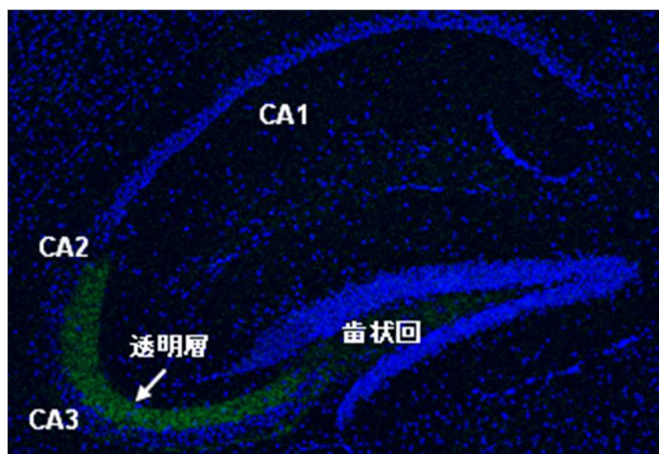


図 2 CRF3 の海馬における局在

9 週齢のマウス海馬を CRF3 特異的なラビットポリクローナル抗体で染色した。CRF3 は歯状回から CA3 領域にかけての透明層に局在している。(green:CRF3, blue:Hoechst33342)

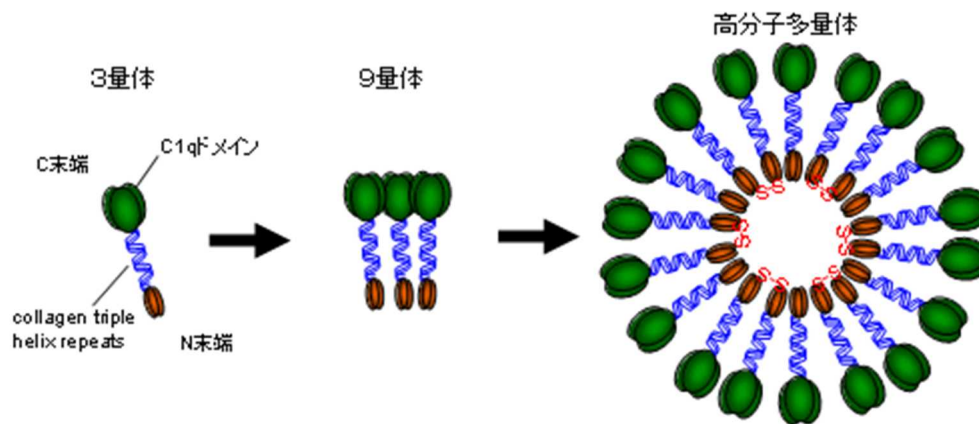


図3 CRF3 の多量体形成

CRF3 は C1q ドメインと collagen triple helix repeats を使って 3 量体を形成し、さらに会合して 9 量体、最終的には N 末端領域で分子間 S S 結合を行って高分子多量体となっている。通常はほとんどが高分子多量体となっている。

将来への展望・応用の可能性

本研究の結果、CRF3 は神経組織特異的な細胞外分泌因子であり、海馬を含めた神経ネットワークの形成・維持に働いている可能性が考えられた。今後は海馬の歯状回の顆粒細胞と CA3 錐体細胞との間における CRF3 の働きに着目した電気生理学的なアプローチ、あるいは、ノックアウトマウスなどの解析によって CRF ファミリーの生理的な機能が明らかになり、神経学的な新たな発見が期待される。また、CRF3 の分子ドメイン構造や分子特性から同じ C1q/TNF スーパーファミリーに属するアディポネクチンとの共通点が見出された。そのことからアディポネクチン受容体に類似した神経組織に特異的な受容体候補が見つまっている。CRF3 受容体が明らかになれば、その受容体を介したシグナル伝達経路の解析の道が開け、分子生物学的なアプローチから CRF3 の機能が明らかになっていくことが期待される。

研究者：下野 知性、眞鍋 理一郎、古谷 裕、筒井 仰、関口 清俊

6. マトリックス工学によるマトリックス自己固相化型増殖因子の作成と増殖因子活性の増強

生体内の環境を理解し、それを細胞外に再構築することは、細胞の増殖、分化を制御する上で極めて重要である。しかし、組織工学・再生医療においては、生体内と同様なゆっくりとした細胞増殖や分化のサイクルでは実用に満たない。より多くの細胞をより早く準備するために、より積極的に細胞の増殖や分化を促進する高機能な細胞外環境の作成も必要である。

われわれはその方法論の一つとして、自己固相化能を持つマトリックス蛋白質に強力な生物活性を付与した人工マトリックス蛋白質の作製技術を構築した。われわれは、この方法論を「マトリックス工学」と呼んでいる。

研究成果の概要

- 1) 形質転換増殖因子 α (TGF α) を、フィブロネクチンのマトリックスアッセンブリードメインのみからなる組換えフィブロネクチン（以下、ミニフィブロネクチン (miniFN) と呼ぶ）とキメラ化することにより、TGF α を細胞外マトリックスに不溶化することに成功した（図 1 A, B）。
- 2) 細胞外マトリックスに組み込まれた miniFN-TGF α は、持続的に細胞表面レセプターを活性化し、そのため、可溶性 TGF α より強い細胞増殖活性を示した。miniFN-TGF α の強い活性は実験的角膜創傷治療モデルでも確認された（図 1 C）。
- 3) 細胞外マトリックスへのターゲッティングによる生理活性の増強効果は、白血病阻害因子 LIF による ES 細胞の分化抑制活性においても同様に認められた。

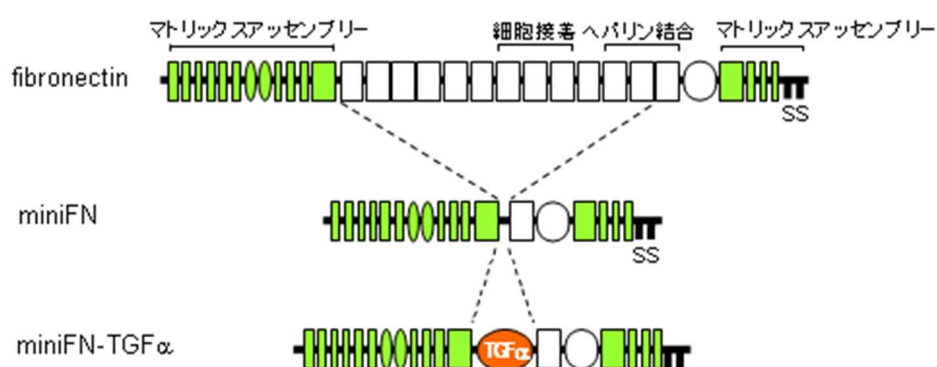


図1 マトリックス工学による増殖因子の細胞外マトリックスへの固相化と活性の増強効果

A. フィブロネクチン(FN)は、その両末端にマトリックスアッセンブリードメインを持つ。マトリックスアッセンブリードメインを持つのみからなる組換え蛋白質 miniFN の中央部分に増殖因子を組み込むことで、増殖因子を細胞外マトリックスに固相化することができる。

抗TGF α 抗体染色

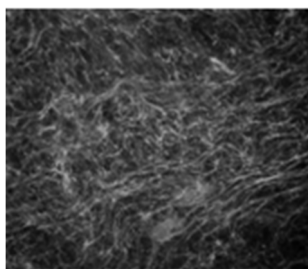


図1 B.精製 miniFN-TGF α 蛋白質を Rat-1 細胞の培養系に加え、抗 TGF α 抗体で染色した。TGF α が線維状の構造、すなわち細胞外マトリックスに並んでいるのがわかる。

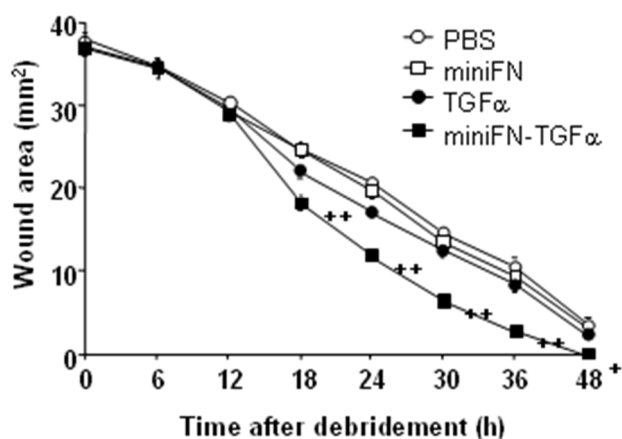


図1 C.精製 miniFN-TGF α を家兎実験的創傷治癒モデルに投与した。創傷部位の直径を経時的に測定したところ、miniFN-TGF α はインタクトな TGF α より強い創傷治癒促進効果を示した。

将来への展望・応用の可能性

再生医療の実現を目指し、今後も新たな（幹）細胞の発見とその応用が試みられるであろう。そのたび毎に組織培養法の開発が必要である。「マトリックス工学」による人工マトリックス蛋白質の開発は、細胞の増殖や分化の積極的な制御系としての利用とともに、細胞外環境を規定する活性を持った人工マトリックス開発に役立つものと考えている。

マトリックス自己固相化システムは遺伝子治療やドラッグデリバリーシステムと同様に活性の持続化を図るシステムである。くわえて特定部位へ固相化、組織からのクリアランスに対する抵抗性およびレセプターの細胞内移行によりダウンレギュレーションの抑制といった際だった特徴を持つ。したがって、遺伝子治療、ドラッグデリバリーシステムとマトリックス自己固相化システムを組み合わせることで、より局所的・より副作用の少ない生理活性のターゲティングと、活性持続性の延長、さらに活性発現時期のコントロールも可能になるかもしれない。いずれも、より厳密な細胞機能制御が必要である再生医療や組織工学において、今後検討されるべき重要な技術的課題である。

特許出願

1) 細胞外マトリックス自己固相型白血病阻害因子とその利用法

特開 2004-166641 平成 14 年 11 月 21 日

会津善紀、眞鍋理一郎、関口清俊、科学技術振興事業団、会津善紀

論文・報告書他

1) ティッシュエンジニアリング：再生医療のためのテーラーメイド環境設計, 再生医療 13-21, 3 (2), 2004, 眞鍋理一郎、関口清俊

研究者：会津 善紀、眞鍋 理一郎、関口 清俊