

酵母で量産したヒト型ラミニンによる再生医療の新展開

Development of regenerative medicine by the human laminins mass-produced by yeast

新美 友章 (Niimi Tomoaki)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教



研究の概要

体性幹細胞を用いた再生医学・組織工学において、幹細胞の維持あるいは分化に必要な細胞外マトリックス (extracellular matrix; ECM) は医療材料として欠くことのできない存在になることが予想される。本研究は、幹細胞の増殖、分化、遊走に強く作用するヒト型ラミニンを酵母系で量産し、医療用素材としてその臨床効果と安全性を評価することを目的とする。

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：細胞培養

1. 研究開始当初の背景・動機

再生医学の強化のために多くの国家予算が投入され高水準の研究成果が挙げられているが、これらの研究は移植に用いる幹細胞だけを重視し、細胞外マトリックスの視点を欠落している。動物組織は細胞だけで形成されているのではなく、細胞と細胞外マトリックスの相互作用で構築されている。特に再生医療の至近標的である間葉系組織では、組織特異的な細胞外マトリックス分子が作る網目構造の中に細胞が浮かんでいるのが実像である。我々は、マウス EHS 腫瘍から可溶化したマトリゲルと呼ばれる基底膜成分 (ラミニン-111 が主成分) をマウス皮下に注入すると、内在性幹細胞が活性化して、骨、筋肉、軟骨や脂肪を新生させることを発見し、幹細胞を移植しなくても細胞外マトリックスを注入するだけで内在性幹細胞の遊走、増殖と分化を制御して組織再建を操作できることを示した。そこで本研究では、幹細胞の増殖、分化、遊走に強く作用するヒト型ラミニンの機能構造を明らかにし、酵母系で量産してその効果と安全性の評価を試みた。

2. 研究の目的

15 種類以上存在するラミニンの中で、我々は間葉系細胞が産生するラミニン-411 ($\alpha 4\beta 1\gamma 1$) に注目して研究を進めてきた。そこで間葉系幹細胞に作用するラミニンの機能構造を明らかにし、再生医療に応用することを目的に、おもに以下の 3 点の研究テーマを設定した。

①脂肪新生を抑制するラミニン $\alpha 4$ 鎖 G 領域断片の作用機構の解明、②医薬応用を見据えたラミニン量産系の構築、③脂肪組織由来幹細胞の再生医療への臨床応用

3. 研究の方法

①マトリゲルと線維芽細胞増殖因子 (FGF)-2 をマウス皮下に注射して脂肪新生を誘導する系において、ラミニン $\alpha 4$ 鎖の G 領域断片が脂肪新生を抑制する分子メカニズムを生化学的手法にて解析する。
②ヒト型ラミニンの量産系を構築するため、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) の発現系および無細胞タンパク質合成系を用いて、ラミニン鎖会合機構を解析する。
③脂肪組織由来幹細胞の骨粗鬆症治療への臨床応用を目指し、小型動物用骨塩量測定装置を用いて基礎的研究を行う。

4. これまでの成果

①ラミニン $\alpha 4$ 鎖 G 領域の脂肪新生抑制効果は、G 領域全体 (LG1-5) を加えた場合よりもその部分構造である LG4-5 領域で顕著であり、これは脂肪細胞が分泌するラミニン-411 から $\alpha 4$ 鎖の G 領域が切断されて脂肪前駆細胞または血管内皮細胞に働きかけて脂肪新生を抑制するメカニズムが示唆された。その活性中心は LG4 モジュールの中にあり、その受容体であるシンデカン-2 および-4 の抗体をこの系に添加すると同じく脂肪新生が抑制されることを見出した (図 1)。これらの結果より、「脂肪分化に伴って発現するラミニン $\alpha 4$ 鎖から切断

される LG4-5 領域が、ヘパリン結合性増殖因子と競合的にシンデカンに結合して、成熟脂肪細胞の近隣の幹細胞を増殖刺激から遮断している。」というモデルを提唱した。

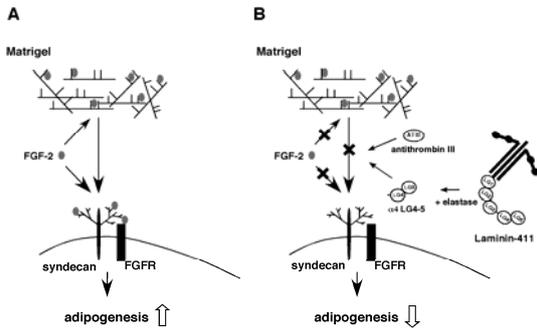


図1 ラミニン α 4鎖LG4-5ドメインの脂肪新生抑制モデル

②(株)島津製作所との共同研究により、昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系を用いて、短腕領域を欠失したヒト型ラミニン-332 (α 3 β 3 γ 2)の各構成鎖を共発現し、ジスルフィド結合で安定化された三量体である「ミニ・ラミニン」の合成に成功した。「ミニ・ラミニン」の合成と精製法を確立し、「ラミニンコイルドコイル(LCC)ドメインヘテロ多量体を含むタンパク質会合体の調製方法」(特願 2008-55649)として特許出願した。

③骨粗鬆症モデルマウスとして知られる OCIF/OPG ノックアウトマウスに、同じ遺伝的背景を持つマウスの脂肪組織から採取して体外培養した間葉系幹細胞を尾静脈注入したところ、低下していた骨密度が上昇する傾向が観察された(図2)。また別の骨粗鬆症モデルである卵巣摘出マウスでも同様の傾向が見られた。これには投与した幹細胞が実際に骨細胞に分化した結果である場合と、幹細胞が骨芽細胞を活性化(破骨細胞の分化抑制)した場合が考えられるが、詳細なメカニズムはまだ分かっていない。

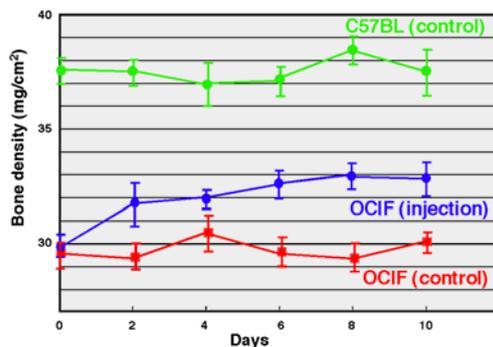


図2 OCIF/OPG KOマウスに脂肪組織由来幹細胞を移植後の骨密度の変化

5. これまでの進捗状況と今後の計画

これまでの成果を踏まえ、以下の研究を実施する。

①脂肪新生を抑制するラミニン α 4 鎖 G 領域の機能解明：ラミニン α 4 鎖 G 領域を切断する酵素を究明し、その機能制御を解明する。

②医薬応用を見据えたラミニン量産系の構築；新規発現系として、原虫発現系を試みる。ラミニン鎖会合を介助する分子シャペロンを探索し、酵母発現系へ導入する。

③脂肪組織由来幹細胞の再生医療への臨床応用；骨分化マーカーの測定と幹細胞の骨組織への移行を確認する。

6. これまでの発表論文等

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

- 1) Phan, H.-P., Ezure, T., Ito, M., Kadowaki, T., Kitagawa, Y., and **Niimi, T.** Expression and chain assembly of human laminin-332 in an insect cell-free translation system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* in press
- 2) Yamashita, H., Goto, C., Tajima, R., Kopalal, A. T., Kobori, M., Ohki, Y., Shitara, K., Narita, R., Toriyama, K., Torii, S., **Niimi, T.**, and Kitagawa, Y. Cryptic fragment α 4 LG4-5 derived from laminin α 4 chain inhibits de novo adipogenesis by modulating the effect of fibroblast growth factor-2. *Dev. Growth Diff.* 50, 97-107 (2008)
- 3) Yano, K., Imaeda, T., and **Niimi, T.** Transcriptional activation of the human claudin-18 gene promoter through two AP-1 motifs in PMA-stimulated MKN45 gastric cancer cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294, G336-G343 (2008)
- 4) Hisada-Ishihi, S., Ebihara, M., Kobayashi, N., and **Kitagawa, Y.** Bipartite nuclear localization signal of matrin 3 is essential for vertebrate cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 72-76 (2007)
- 5) **Niimi, T.**, Hayashi, Y., Sekiguchi, K., and **Kitagawa, Y.** The Sp family of transcription factors regulates the human laminin α 1 gene in JAR choriocarcinoma cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1759, 573-579 (2006)
- 6) **Niimi, T.**, Kurotani, R., Kimura, S., and **Kitagawa, Y.** Identification and expression of alternative splice variants of the mouse *Ppp1r3b* gene in lung epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349, 588-596 (2006)

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~tagen/>