

# ラミニン-5 $\alpha$ 3LG4 由来シンデカン結合ペプチドによる表皮細胞遊走活性化

京都大学大学院医学研究科皮膚生命科学講座

宇谷 厚志

Laminin  $\alpha$ 3 chain, a functional key subunit of laminin-5, contains a large globular module (G module) at its C-terminus, which consists of a tandem repeat of five homologous LG modules (LG1-5). Here, we show that a recombinant  $\alpha$ 3LG4 and synthetic peptides containing syndecan binding motif within LG4 (A3G756) induced keratinocytes motility and a MMP-9 expression in keratinocytes. The A3G756-induced cell motility was inhibited by an MMP-9 inhibitor and a neutralizing antibody of MMP-9, indicating the cell motility was dependent on an MMP-9 activity. In addition, the A3G756-induced cell migration was also abolished by the presence of p38MAPK inhibitor, but not by Erk MAPK inhibitor. Neutralizing antibody to integrin  $\alpha$ 5 as well as  $\beta$ 1 could inhibit A3G756-induced cell migration. These data showed that syndecan binding with laminin-5  $\alpha$ 3LG4 module induced keratinocyte migration, which was mediated by a set of molecules such as MMP-9, p38MAPK, and integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1. These results suggest that the interaction between laminin and syndecan may have a significant role in reepithelialization at wound healing.

## 1 緒言

表皮真皮基底膜に接して存在する表皮細胞の「皮膚基底細胞層」には、表皮細胞、メラノサイトなどが属する。これらの細胞は、基底膜の細胞外マトリックスに直接結合しており、マトリックスからシグナルを受け、分化、増殖、アポトーシス等生物学的活動を調節している。基底膜は表皮幹細胞のいわゆる「ニッチェ」を提供していると考えられる。一般に接着細胞は、その足場を「受容体」で認識し、本来の機能を発揮する。皮膚基底膜には、4型コラーゲン、パーレカンをはじめとするプロテオグリカン、ラミニンなどが存在する。これらが、複雑に相互結合し、細胞へのシグナルを調節していると考えられる。その中で、ラミニン-5は、特に皮膚科で精力的に研究されている分子の1つである。角化細胞に対して、ラミニン-5は、細胞接着、遊走、分化、アポトーシス等の機能を有し、また癌細胞の転移を制御する機能もあるなど皮膚科医にとって興味深い分子である。

私は、ラミニン-5の生物学的活性を研究してきており、近年、ヘパリン依存性細胞接着活性中心を同定した<sup>1,2)</sup>。本研究では、ラミニン-5由来細胞接着活性中心を含む合成ペプチドの表皮細胞遊走活性化をマトリックスメタロプロテイナーゼ産生、MAPK、インテグリンに焦点を当てて解析する。皮膚基底膜は、単なる「構成成分」としての機

能があまりに明確であるために、かえってマトリックス成分が細胞を活性化するという面に、関心が低かったと言える。それだけに、「基底膜分子が表皮を活性化する」というコンセプトは、これから注目を集める分野に成りうると考える。

## 2 実験

### Materials and methods

#### 1 Cell culture

Human primary keratinocytes were purchased from Clonetics and maintained in keratinocyte-SFM supplemented with EGF and bovine pituitary extracts (Invitrogen Life Technologies). Keratinocytes were used at the 2nd ~ 5th passage in the experiments.

#### 2 Recombinant Proteins and Synthetic Peptide

Recombinant  $\alpha$ 3 LG4-5, LG4 and LG5 modules were expressed as a chimera with human IgG Fc portion at the C-terminus and purified as previously described with a minor modification<sup>1,2)</sup>. Briefly, recombinant proteins were expressed in 293 T cells by Ca-P transfection kit (Invitrogen Life Technologies). After 24h, cells were incubated with CHO medium (Invitrogen Life Technologies) for another 2 days, followed by purification with protein A-Sepharose (Amersham-Pharmacia Biotech).

#### 3 Reagents

An anti-human MMP-9 monoclonal antibody (6-6B) and a MMPs inhibitor (MMP-9/MMP-13 Inhibitor I, 444252) were purchased from Calbiochem.



Keratinocyte migration activated by synthetic peptide containing syndecan binding site within laminin-5 $\alpha$ 3LG4 domain

Atsushi Utani

Associate professor, Department of dermatology, Kyoto University Graduate School of Medicine

FITC-conjugated anti fibronectin antibody (#4470-2504) was from Biogenesis. MAPKs inhibitors, SB203580 and PD98059, were from Calbiochem. The MMPs and MAPKs inhibitor were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). Heparin was from SEIKAGAKU KOGYO and cycloheximide from Sigma Chemical Co. The protein concentration is calculated by the BCA Protein Assay Kit (Pierce). Purity of proteins was determined by reducing 10% SDS-PAGE and Coomassie Blue staining.

The following function-blocking monoclonal antibodies (mAbs) against integrin subunits were used: PIE6 against integrin  $\alpha$ 2; P1B5 against integrin  $\alpha$ 3; P1D6 against integrin  $\alpha$ 5; GoH3 against integrin  $\alpha$ 6. All of them were obtained from chemicon, Temecula, CA. Rat mAb13 against integrin  $\beta$ 1 was a kind gift from Dr. K. M. Yamada (National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, Bethesda, USA).

#### 4 Colloidal Gold Phagokinetic Assay<sup>3)</sup>

Cell migration induced by synthetic peptides was examined by a phagokinetic track assay, as previously described by Albrecht-Buehler. Briefly, cover slips (10 mm in diameter) were dipped in 1 % freshly prepared bovine serum albumin (BSA) in distilled water and then in 100% ethanol and were quickly dried with a hair dryer. They were placed into 24-well tissue culture plates. The BSA-coated cover slip was covered with 0.3 ml of Gold salt solution (0.01% of formaldehyde was mixed in the solution (10% of 14.5mM HAuCl<sub>4</sub>, 58% of H<sub>2</sub>O and 32% of 36.5mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) with boiling.) and left undisturbed for 1-2 h to let the gold salt particles settle. Following PBS wash, the cover slips were kept at 4 °C in dMEM. Plates were rinsed once with PBS before use. Approximately 3,000 cells were plated onto the wells and allowed to adhere the cover slips for 30-60 minutes, the peptide was added to medium to induce migration. The cells were incubated for 12-24 h, washed and fixed in 10% formaldehyde in PBS for 10 min. Three randomly selected and non-overlapping fields (x40) analyzed under dark field optics and photographed with a CCD camera (Model VB7010, KEYENCE) and by a NIH Image 1.60 program. The migration was detected as an area without gold particle. The migration index (MI) represented the ratio of the area consumed by cell migration tracks to a whole area of the field.

#### 5 RT-PCR Analysis of MMP-9

After 24 h stimulation of recombinant proteins or synthetic peptides, total RNA was prepared from cells by RNAeasy kit (Qiagen GmbH). cDNA was synthesized from RNA (2.0  $\mu$ g) with an oligo (dT) primer in a total volume of 21  $\mu$ l by SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies). cDNA (1 $\mu$ l for MMP-9 or 0.1  $\mu$ l for GAPDH) was subjected to PCR for amplification. In preliminary experiments, we determined the optimal number of cycles within the linearity of reactions for each PCR product. The cycle number for MMP-9 was 30 cycles and GAPDH was 25 cycles. The primers for PCR are: The primers for PCR are: human MMP-9 (1715-2129nt, Genbank™ J05070), forward 5'-AAGCTGGACTCGGTCTTTGAG and backward 5'-ACTGCAGGATGTCATAGGTC; human GAPDH (292-885 nt, Genbank™ J04038), forward 5'-CCCATCACCATCTTCCAG and backward 5'-CCTGCTTCACCACCTTCT. Using these primers, PCR was performed by the Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics) at 94°C for 4 min followed by individual cycles at 94°C for 30s, 58°C for 30s, 72°C for 1 min with an extension step of 7 min at 72°C at the end of the last cycle. The products were separated on 1.5% agarose gel. The bands were visualized with ethidium bromide staining.

#### 6 Gelatin Zymography

Keratinocytes (1.2 $\times$ 10<sup>4</sup> cells in 96-well dishes) were seeded and incubated for 24h. Cells were starved for 24h and treated in 50 $\mu$ l of fresh medium with reagents. Conditioned media were recovered, and lyophilized. The lyophilized samples were dissolved in nonreducing sample buffer (6% glycerol, 1% SDS, and 0.004 % bromophenol blue) , and incubated in 37°C water bath for 10 min. Samples were loaded on a 10% SDS-polyacrylamide gel containing 1 mg/ml gelatin (BioRad Co.Ltd.) . The gel was run in Tris/glycine buffer for 2h and then incubated in 2.5% Triton X-100 solution for 15 min twice to remove SDS. To detect gelatinase activity, the gel was incubated in reaction buffer containing 50 M Tris-HCl (pH 7.4) , 0.2M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> and 1 mM ZnCl<sub>2</sub> overnight at 37 °C . The gelatinolytic activity was visualized by staining with 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 10% (v/v) glacial acetic acid, and 30% (v/v) methanol and destaining with 10% (v/v) acetic acid and 30% (v/v) methanol. Protease activity

was detected as translucent area in a Coomassie blue-stained gel. The scanned results of gels were calculated by NIH image 1.60. The values except time course analysis were depicted as the ratio of the conditioned media only as a control.

### 7 Immunostaining

HaCat cells (immortalized keratinocytes) seeded on poly-D-lysine coated cover glass were fixed with 4% paraformaldehyde/PBS and followed by incubation with FITC-conjugated anti fibronectin antibody (Biogenesis) at 1 : 200 for 1 h at room temperature. Photograph was

taken by Carl Zeiss LSM510 Confocal microscopy.

## 3 結果・考察

### 3・1 ラミニン-5 $\alpha$ 3鎖のLG4ドメインは、角化細胞遊走を刺激する。

以前、ラミニン $\alpha$ 3鎖LG4に細胞接着活性があること<sup>1)</sup>、また同部位がMMP-1分泌を促すこと<sup>2)</sup>を証明した。本研究において、その活性部位が細胞遊走を刺激するかどうかを判定した。はじめにレコンビナント蛋白でLG45ドメインをつくり、培養角化細胞に投与し、その遊走刺激活性を金コロイド法で判定した (Fig. 1A, B)。細胞が動いた部分の金コロイドを貪食するという性質を利用した方法であ

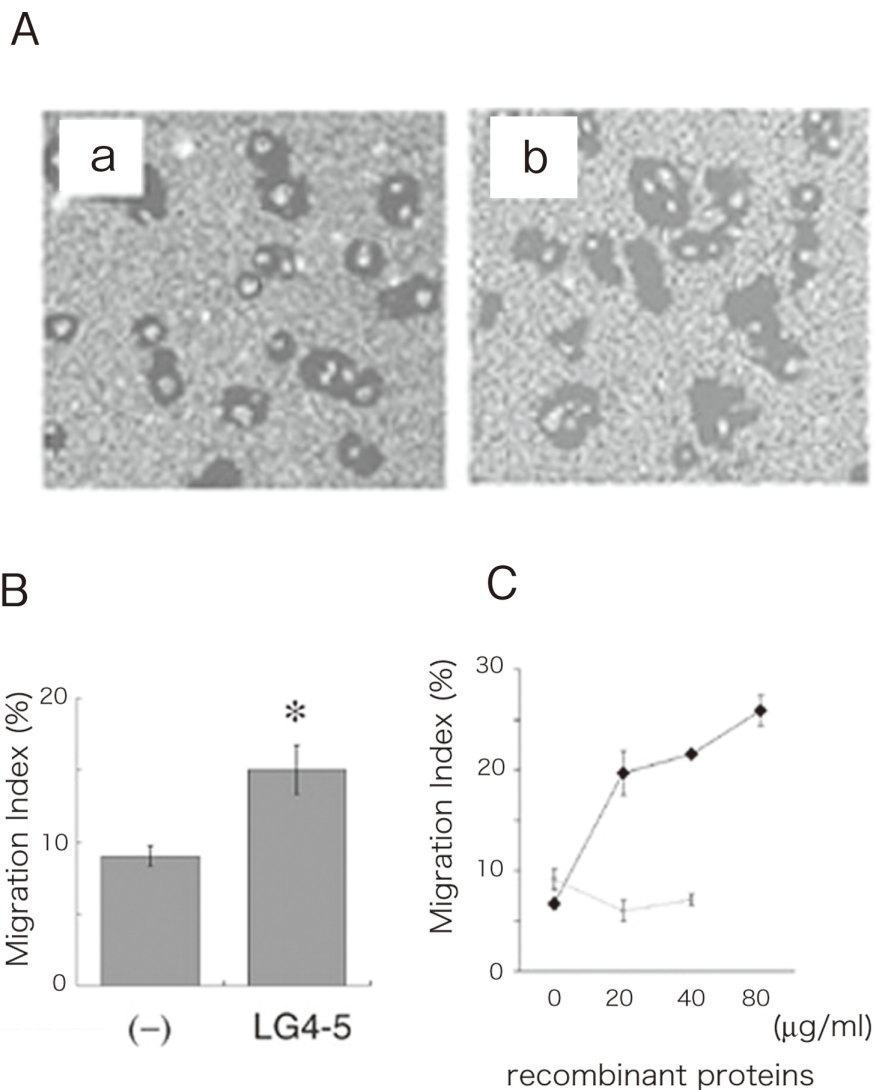


Figure1 ラミニン  $\alpha$ 3LG4 はケラチノサイトの遊走を刺激する

A: Keratinocyte migration stimulated by recombinant laminin  $\alpha$ 3LG4-5 module. Keratinocytes were incubated on gold particle coated cover slips without (a) or with (b) 10  $\mu$ g/ml of the rec-LG4-5 module. After 24 hour stimulation, cells were fixed and representative fields were photographed at x 40 under dark field optics.

B: Quantitation of the Phagokinetic track was calculated by measuring the MIs, using NIH Image 1.60. The data presented are mean  $\pm$  S. D. of three independent experiments. \*,  $p < 0.05$ .

C: Dose-dependent manner of cell migration activity stimulated by recombinant LG4 modules. Keratinocytes were stimulated for 24 h. Quantitation of the Phagokinetic track was calculated as above.

る。この結果 LG4 は、濃度依存性に遊走刺激活性を持つことが明らかになった (Fig. 1C)。

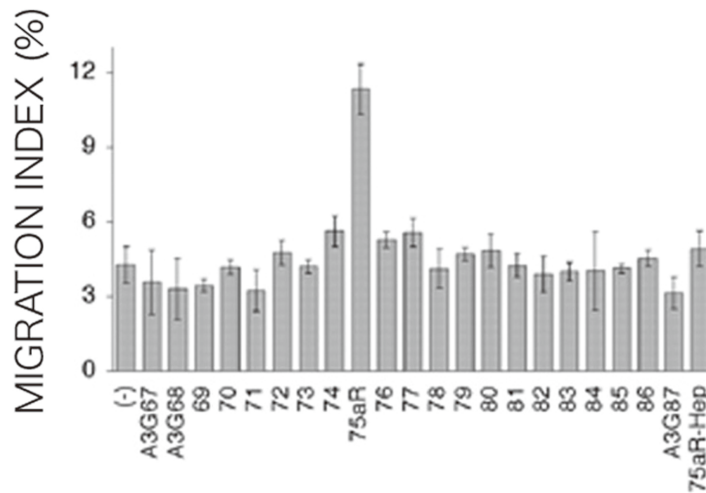
### 3・2 活性部位マッピング

LG4 ドメイン (約 200 アミノ酸残基) のうちの活性部位のマッピングをおこなった (Fig. 2A)。LG4 ドメインをカバーする 21 個の合成ペプチド 1) を用いて、遊走刺激活性を金コロイド法で計測した。シンデカン結合部位として同定した部分 (75aR) のみに活性が同定できた。この活性はヘパリン共存により阻害されるので、この活性はシンデカン依存性であると考えた。水溶性を増すために、

5 アミノ酸残基ほど C 末にのばした 19mer の合成ペプチド A3G756 を新たに作成し、活性を証明した (Fig. 2B)。これらの実験は  $\alpha$ 3 鎖 LG4 ドメインのシンデカン結合部位は、遊走刺激活性を有するというを示している。

一般に細胞遊走を引き起こす機構は実に数多くの分子が関与している。そのなかでも、細胞外マトリックスと直接関係している分子として、受容体のインテグリンと細胞周辺成分を分解することで遊走を引き起こす MMP (マトリックスメタロプロテイナーゼ) に注目した。まず MMP から解析を始めた。以前 A3G756 が角化細胞の MMP-1 の産生増加を引き起こすことを報告していたため<sup>2)</sup>、遊走刺激

A



B

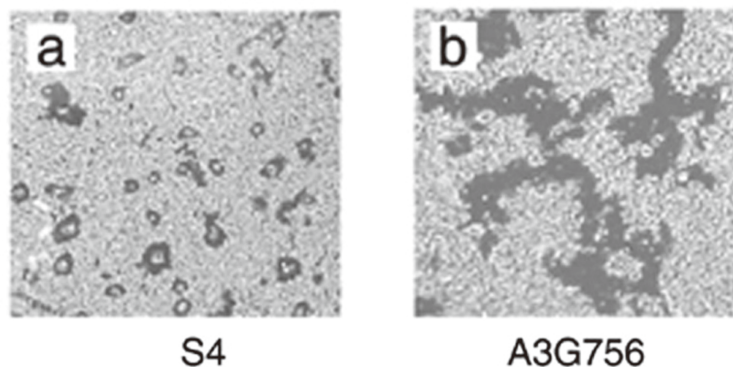


Figure 2 合成ペプチドを用いた活性部位マッピング

A: Cell migration was stimulated by the synthetic peptides (192  $\mu$ g/ml) for 12 hour. The active peptide, A3G75aR- promoting migration was inhibited by heparin (30  $\mu$ g/ml) (column 75aR-Hep).

B: Keratinocytes were treated with 30  $\mu$ g/ml of the scrambled peptide (S4) (a) or the A3G756 (b) for 12 hours on colloidal gold coated cover slips, and photographed at x40.

と代表的 MMP の1つである MMP-9 に注目した。

### 3・3 A3G756 による MMP-9 産生刺激

まず MMP-2, -9 のタンパク量を、ゼラチンザイモグラフィを行った (Fig. 3A)。レコンビナント蛋白 (rec-LG4)、および合成ペプチド (A3G756) で、明らかに濃度依存性に MMP-9 のみの増加を引き起こした。その増加は、mRNA の増加によるものであり、ヘパリン依存性であると共に *denovo* な蛋白合成を必要とすることが、RT-PCR にて判明した (Fig. 3B)。

### 3・4 A3G756 ペプチドによる細胞遊走刺激およびその MMP-9 依存性

A3G756 ペプチドによる細胞遊走刺激をペプチドによる遊走刺激活性を金コロイド法で計測した。濃度依存性に遊走を刺激した。ただし 30 $\mu$ g/ml をこえて濃度をこくして

も逆に活性は減弱した。時間の検討では、ペプチド添加後 12 時間でプラトーに達した (Fig. 4AB)。この A3G756 は実験 (Fig. 2) より MMP-9 の産生増加を引き起こすので、化学阻害剤 (MMP-9/MMP-13 chemical inhibitor 444252) ならびに MMP-9 中和抗体を共存させ、金コロイド法実験を行った。A3G756 ペプチドによる遊走刺激は中和抗体、MMP-9/-13 に対する阻害剤の共存で完全に阻害できた (Fig. 4C)。この事実は、A3G756 ペプチドは、シンデカンに結合後、遊走を引き起こす機構には、MMP-9 の活性が必須であることを示している。

### 3・5 p38MAPK の関与

この A3G756 は、シンデカンに結合後 p38MAPK をリン酸化することにより細胞内へシグナルを伝達することを報告した<sup>2)</sup>。そこで、この細胞遊走への MAPK の関与を検討した (Fig. 4D)。P38MAPK と MEK の阻害剤共存下

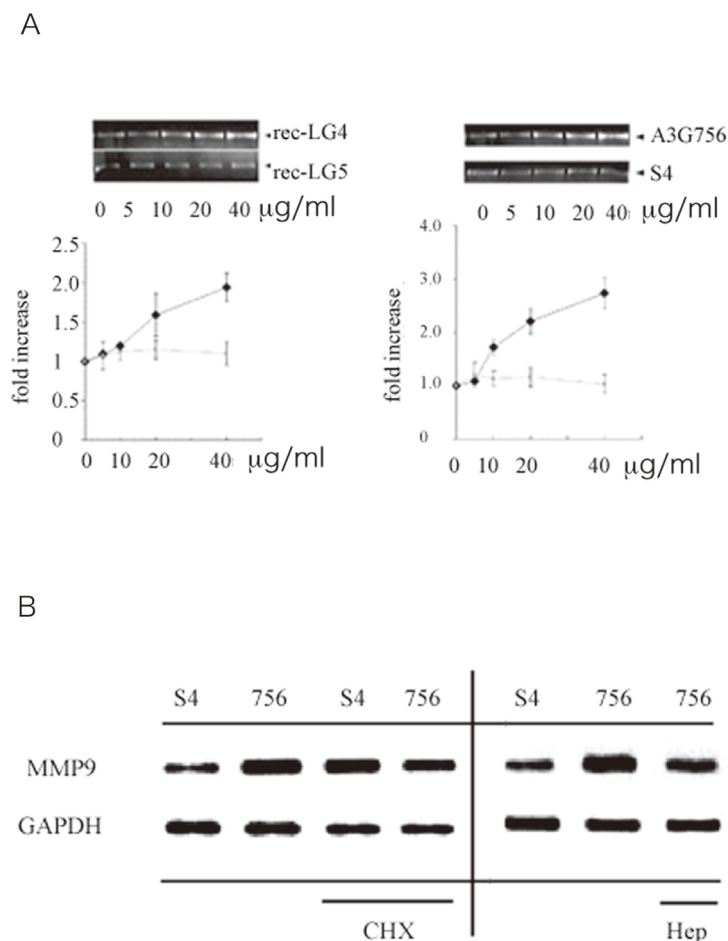


Figure 3 ラミニン αLG4 and A3G756 による MMP-9 の発現増加。

A: MMP-9 activity induced by the recombinant LG4 modules (left) or the A3G756 (right). Keratinocytes were incubated for 24 h. MMP-9 in the conditioned medium was analyzed by zymography (Upper). Lower, pooled results of zymography analysis. S4, scrambled peptide.

B: The A3G756-mediated MMP-9 induction through an increase of mRNA. Keratinocytes were incubated with 30  $\mu$ g/ml of the A3G756 or the S4 peptide in the presence of cycloheximide (CHX) or heparin (Hep). RT-PCR was performed as described in M&M.

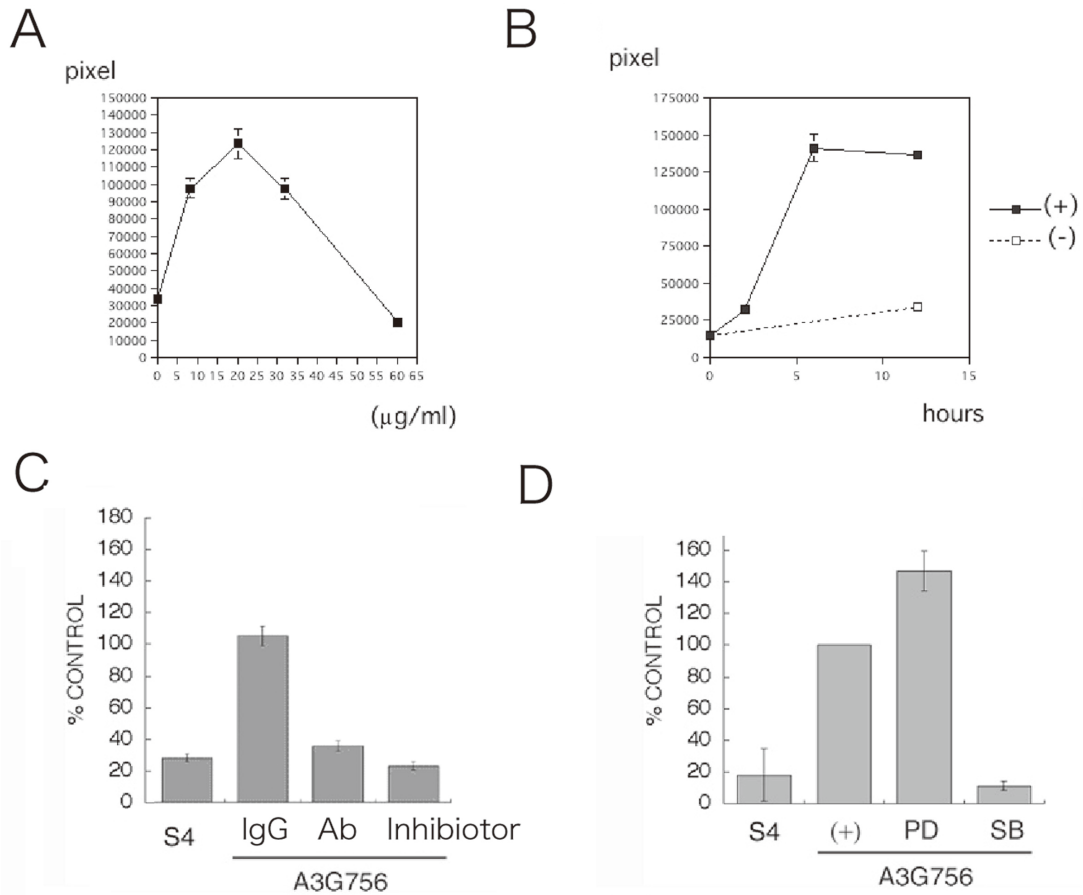


Figure 4 A3G756による遊走刺激はMMP-9とp38MAPKに依存している。

- A: Dose-dependent cell migration. Keratinocytes were incubated with various amounts of A3G756 for 12 h.
- B: Time course of cell migration. Keratinocytes were incubated with 30µg/ml A3G756 (+) or S4 (-) for indicated periods. Data presented are mean +/- S.D. of three non-overlapped fields from each cover slip.
- C: Keratinocytes on gold particle-coated cover slips were incubated with the S4 or the A3G756 peptide (30µg/ml) for 12 h in the presence of an MMP-9 neutralizing antibody (Ab) (20µg/ml), an MMP-9/-13 chemical inhibitor 444252 (inhibitor), 2mM, or a mouse IgG as a control antibody (IgG) (20µg/ml).
- D: Keratinocytes were incubated with 30µg/ml A3G756 in the presence of PD98053 (20µM) or SB203580 (30µM) for 12 h. The value of the sample incubated with A3G756 was taken as 100%. Data are mean +/- S. D. of three independent experiments.

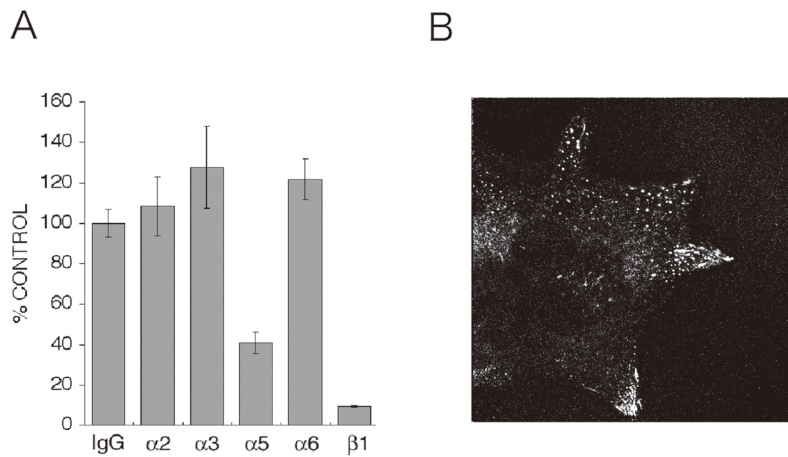


Figure 5 A3G756による遊走はインテグリン $\alpha$ 5 $\beta$ 1を介している。

- A: Keratinocytes were incubated with A3G756 in the presence of functional blocking antibodies. Mouse IgG for control (IgG), integrin  $\alpha$ 2 (P1E6), integrin  $\alpha$ 3 (P1B5), integrin  $\alpha$ 5 (P1D6), and integrin  $\alpha$ 6 (GoH3), and integrin  $\beta$ 1 (rat IgG2 antibody mAb13). Data presented are mean +/- S.D. of three non-overlapped fields from each cover slip.
- B: Fibronectin staining using HaCat cell with Carl Zeiss LSM510 Confocal microscopy. Original magnification, X100.

で遊走刺激活性測定を金コロイド法で試みた。P38MAPK 阻害剤を添加した場合に遊走は著しく低下した。このことより、A3G756 の遊走刺激活性には P38MAPK が関与していると示された。RT-PCR の結果から、P38MAPK は MMP-9 の mRNA の増加を阻害することが判明した<sup>4)</sup>。この結果から p38MAPK は、MMP-9 転写レベルの抑制により遊走活性を阻害する可能性を示している。

### 3・6 integrin $\alpha 5 \beta 1$ の関与

これらの実験よりラミニン-5 $\alpha 3$  鎖 LG4 は、シンデカンに結合することにより細胞遊走を刺激しその際に増加する MMP-9 が細胞遊走に必須であることが判明した。そこで、細胞遊走の際に必須といわれているインテグリンについてその関与を検討した (Fig. 5A)。インテグリン中和抗体を共存下で遊走刺激活性測定を金コロイド法で試みた。結果は、インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  の関与が最も考えられた。抗  $\alpha 5$  中和抗体単独で 100% 阻害できないので、他の  $\alpha$  鎖の関与も少ないながら存在すると考えられる。抗  $\beta 1$  抗体では完全に抑制できたので、 $\beta$  鎖に関しては  $\beta 1$  のみであると考えられる。

培養ケラチノサイトはファイブロネクチンを培養細胞のまわりに分泌沈着させている (Fig. 5B)。インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  のリガンドは、ファイブロネクチンである事実より、A3G756 による遊走活性には細胞自身が分泌しガラス面に沈着させるファイブロネクチンの存在が必要であり、インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  を介してのシグナルが必須であると考えら

れる。そこに MMP-9 が何らかのマトリックス蛋白もしくは細胞表面分子などをプロセスする経路も加わって、遊走が可能になると考えられる。

以上により A3G756 は、19 アミノ酸と短く合成が容易であり、皮膚へ直接作用させる際にも、工夫しやすいと考えられる。In vitro の実験である程度分子機構が明らかにされたと考え、in vivo の動物実験による潰瘍治癒促進効果の検討を計画している。

#### (文献)

- 1) Utani A, Nomizu M, Matsuura H, et al. A unique sequence of the laminin alpha3 G domain binds to heparin and promotes cell adhesion through syndecan-2 and -4. *J Biol Chem* 276: 28779-28788, 2001
- 2) Utani A, Momota Y, Endo H, et al. Laminin alpha3 LG4 module induces matrix metalloproteinase1 (MMP1) through MAPK signaling. *J Biol Chem* 278: 34483-34490, 2003
- 3) Albrecht-Buehler G. The Phagokinetic Tracks of 3T3 Cells. *Cell* 1977, 11 (2), 395-404
- 4) Momota Y, Suzuki N, Kasuya Y, Kobayashi T, Mizoguchi M, Yokoyama F, Nomizu M, Shinkai H, Iwasaki T, Utani A. Laminin ?3 LG4 module induces keratinocyte migration: involvement of matrix metalloproteinase-9. *J Recept Signal Transduct Res.* 25:1-17, 2005