

2-1-2 研究成果

中テーマ名：分泌タンパク質マッピング技術の開発 サブテーマ名：細胞接着分子ラミニン5及び6の機能解析と応用	
中テーマリーダー（所属、役職、氏名） 横浜市立大学木原生物学研究所 所長	宮崎 香
研究従事者（所属、役職、氏名） 横浜市立大学木原生物学研究所 助手 (財) 木原記念横浜生命科学振興財団	東 昌市 安田知永 森山佳谷乃
(株) エーシーバイオテクノロジーズ 代表取締役社長	石塚保行 高崎夕嫁 張 紅 清水佐弥子
研究の概要、新規性及び目標	
①研究の概要 ラミニンは α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖からなる分泌タンパク質であり、種々の細胞を基底膜に接着固定させるとともに、それらの移動、増殖、分化、細胞死などを調節している。私たちは過去に、ラミニン5 ($\alpha 3 \beta 3 \gamma 2$) が細胞の接着と運動を強く促進する特殊なラミニン分子であることを明らかにした。ラミニンは分子量50-80万の巨大な複合タンパク質であるため純粋な形で調製するのが困難であり、それらの機能の解析は非常に遅れている。そこで本研究では、ラミニン5および関連分子の効果的な発現系を確立し、それらの機能解析と応用法を確立することを目標とした。	
②研究の独自性・新規性 長年の研究により、技術的および知的優位性をもっている。ラミニン5および関連分子の生産方法において唯一あるいは最高レベルの系を開発した。	
③研究の目標（フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に） フェーズⅠではラミニン5A ($\alpha 3 A \beta 3 \gamma 2$)、ラミニン5B ($\alpha 3 B \beta 3 \gamma 2$)、ラミニン6 ($\alpha 3 \beta 1 \gamma 1$) を大量に発現させる系を確立する。 フェーズⅡでは上記で得られた組み換え型ラミニンを用いて、これらの分子の機能を明らかにする。 フェーズⅢではラミニン5の皮膚創傷治癒剤、種々の培養細胞（幹細胞、正常組織細胞、凍結保存細胞など）に対する細胞接着剤および増殖促進剤としての応用性を明らかにする。	
研究の進め方及び進捗状況（目標と対比して）	
(1) 各ラミニンのサブユニット遺伝子を順次HEK293細胞に導入し、それらの安定発現系を確立する。ほぼ目標を達成した。 (2) 上記の系を用いて、変異型および部分欠損型ラミニンおよびドメイン断片を調製し、個々のドメインの機能や生理的意義を解析し、多くの成果を得た。 (3) ラミニン5A/Bの応用として幹細胞や正常組織細胞に対する効果マウスでの創傷治癒効果を調べた。 (4) コラーゲン発現細胞に対するラミニン5Bの増殖促進効果を調べた。	
主な成果	
具体的な成果内容： (1) ラミニン5A ($\alpha 3 A \beta 3 \gamma 2$) およびラミニン5B ($\alpha 3 B \beta 3 \gamma 2$) の安定大量発現系を確立した。ラミニン6 ($\alpha 3 \beta 1 \gamma 1$) の発現系もほぼ確立した。 (2) 上記のラミニンがそれぞれ異なる生理活性をもつこと、ラミニン $\alpha 3$ 鎖のLG3ドメインにインテグリン結合部位が存在すること、ラミニン5・ $\alpha 3$ 鎖のLGドメイン内や $\beta 3$ 鎖と $\gamma 2$ 鎖のN末端部位でそれぞれプロテアーゼの限定分解を受けること、それによりラミニン5の接着活性や運動促進活性が変化すること、これらの末端部位にはラミニン5が細胞外マトリックスに組み込まれるのに重要な領域が存在すること、などが明らかになった。その他、ラミニン5による細胞の接着と移動の調節機構の概要、がんの浸潤・転移におけるラミニン5の役割、などを明らかにすることができた。 (3) 骨髄の間葉系幹細胞は骨、軟骨、脂肪、筋肉などの細胞へ分化する能力をもち、怪我、変形	

性関節症、骨粗しょう症などの再生医療への応用が最も期待されている。ラミニン5（5Aおよび5B）がこの間葉系幹細胞の分化能を維持したままで、その増殖を促進することを見出した。

(4) ラミニン5発現HEK細胞が産生するラミニン5マトリックスが、精製ラミニン5と異なり細胞移動を抑制しながら、細胞の接着と伸展を効果的に促進することを見出した。

(5) Conditioned Medium（無血清）をベースとした培地におけるラミニン5の効果を確認した。

特許件数：4 論文数：24 口頭発表件数：35

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

ラミニン5と関連分子の発現系および機能解析において、世界最高水準の成果が得られた。これらの培養器材や研究試薬としての応用が期待される。

2 実用化に向けた波及効果

本研究で開発したラミニン5関連分子を、培養器材や研究試薬として役立てることができる。間葉系幹細胞は近い将来での再生医療への応用が最も期待されている細胞であるが、この細胞に対するラミニン5（5Aおよび5B）の増殖促進効果はラミニン5の高い応用性を示すものである。

残された課題と対応方針について

- (1) ラミニン5を利用した間葉系幹細胞の効果的な無血清培地を開発する。
- (2) ラミニン5の医薬品としての応用性を明らかにするために、マウスを用いた創傷治癒実験を進める。
- (3) Conditioned Mediumをベースにした無血清培地を完成させ、18年度の販売を目標とする（エーシーバイオテクノロジーズ社）。

	JST負担分（千円）							地域負担分（千円）							合計
	H12	H13	H14	H15	H16	H17	小計	H12	H13	H14	H15	H16	H17	小計	
人件費	1,649	13,674	16,021	6,211	5,427	3,816	46,798	0	0	0	2,655	4,564	3,262	10,481	57,279
設備費	25,603	0	3,561	0	0	0	29,164	0	0	0	0	0	0	0	29,164
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	5,413	11,420	9,661	4,817	6,948	3,642	41,901	0	0	0	601	1,953	1,829	4,383	46,284
旅費	4	80	70	34	181	35	404	0	0	0	0	0	0	0	404
その他	0	13	13	13	12	4	55	0	0	0	0	0	0	0	55
小計	32,669	25,187	29,326	11,075	12,568	7,497	118,322	0	0	0	3,256	6,517	5,091	14,864	133,186

代表的な設備名と仕様 [既存（事業開始前）の設備含む]

JST負担による設備：アプライドバイオプロテインシーケエンサー

地域負担による設備：

※複数の研究課題に共通した経費については按分する