




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第540号	氏名	呉偉民
審査委員会委員	主査氏名	明田淳一	
	副査氏名	長谷川英男	
	副査氏名	下田恵	
論文題目 Dermatopontin regulates fibrin formation and its biological activity (デルマトポンチンはフィブリン形成に影響し、その生物活性を修飾する)			
論文掲載雑誌名 Journal of Investigative Dermatology			
論文要旨 <p>デルマトポンチン(DP)は真皮に多く存在する分子量 22KDa の細胞外マトリックス蛋白で、創傷の治癒過程の早期において、主にフィブリンとフィブロネクチンで構成されている仮マトリックスに存在し、フィブリンやフィブロネクチンと相互に作用していることを報告してきた。そこで本研究はフィブリンの機能に及ぼす DP の役割について検討することを目的とした。</p> <p>DP とフィブリンの相互作用は、フィブリノーゲンの D および E ドメインを固相化した solid-phase assay で検討し、作用点の決定には DP の部分的なペプチドである DP-4 とコントロールのペプチドとして DP-4S を作成し解析を行った。フィブリン形成過程の動的解析は吸光度を測定することによる濁度の変化を観察し、また電顕を用いてフィブリン構造の観察を行った。新規に形成されたフィブリン細線維への DP の取り込みは SDS-PAGE とウエスタンブロットにより確認した。フィブリンの生物活性である細胞の接着能は、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を使用して DP の存在下および非存在下で観察した。</p> <p>DP はフィブリノーゲンの D ドメインと相互作用するが、E ドメインとは作用しなかった。特に DP とフィブリンとの相互作用は DP-4 ペプチドによって阻害されたことから、作用点は DP の DP-4 ペプチドとフィブリノーゲンの D ドメインであると考えられた。DP はフィブリン細線維の形成を促進し、濃度依存的に細線維の構造的変化を起こし、さらに新規に形成されたフィブリン細線維に取り込まれていた。電顕での観察では、DP 存在下で形成されたフィブリン細線維は DP 非存在下に比べてより厚く、薄い細線維は少なかった。このような過程で形成されたフィブリン細線維においては DP の濃度に依存して HUVEC の接着と拡散の亢進がみられた。この接着は抗 <math>\alpha v \beta 3</math> および <math>\beta 1</math> サブユニットインテグリン抗体で完全に抑制された。HUVEC が接着し拡大したフィブリン細線維は DP 非存在下に比して DP 存在下において細胞骨格をより良く構築した。</p> <p>この結果から、DP はフィブリン細線維の形成を促進し、HUVEC の接着および拡大を亢進させて血管新生や細胞外マトリックスの形成を促し、創傷治癒過程すなわち肉芽腫形成に関わっていると考えられた。</p> <p>本研究は、創傷治癒過程に DP とフィブリンの複合体が重要な役割を果たしていることを明らかにし、創傷治癒を促進するための人工的マトリックスの開発に有用である可能性を示した重要な研究であると考えられ、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験  
の結果の要旨  
~~学力の確認~~

審査区分 (課)・論	第540号	氏名	呉 偉 民
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	門田 淳一 (門田)	
	副査氏名	長谷川 英男 (長谷川)	
	副査氏名	下田 恵 (下田)	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) デルマトポンチン(DP)は細胞外マトリックスに常に存在しているのか、あるいは炎症時に誘導されるのか。</li> <li>2) DP が組織の修復過程に関わっている臓器は皮膚以外でどの程度明らかとなっているのか。</li> <li>3) 血清中の DP を測定することで、疾患の治癒過程や重症度がわかる可能性はあるか。</li> <li>4) Fibrin formation assay で溶液の濁度を吸光度で測定しているが、定量的測定法はないのか。</li> <li>5) Cell adhesion assay の実験は Fibrin formation assay の実験時の条件と同じか。</li> <li>6) 今回の研究では DP がフィブリノーゲンにもフィブリンと同様の強さで結合し、以前の研究ではフィブリノーゲンには弱くしか結合しなかったが、この差の理由として反応条件の最適化が異なることをあげている。具体的には反応条件のどの部分を変えたのか。</li> <li>7) HUVEC のフィブリンへの接着阻害試験で使用した抗体をどのように選定したのか。</li> <li>8) フィブリン細線維形成過程において、DP-4 を使用すると DP と同じようにフィブリン細線維形成が起こるのか。あるいは DP と同時に DP-4 を入れるとフィブリン細線維の形成は阻害されるか。</li> <li>9) DP は DP-4 部分によってフィブリノーゲン、フィブリン、デコリン、シンデカンなどに結合するとされているが、それらのタンパクには DP-4 と相互作用をする共通のアミノ酸配列あるいは立体構造があるのか。</li> <li>10) Fig 5d で抗 B1 抗体のみでは細胞接着を阻害しないのに、抗 avB3 抗体と混ぜると抗 avB3 抗体単独の場合より強く阻害するが、B1 と対になる α サブユニットは何か。また抗 α5B1 抗体で実験しなかったのはなぜか。</li> <li>11) フィブリノーゲンの 1 個の D ドメインに DP の結合サイトが 1 箇所しかない判断した根拠は何か。</li> <li>12) DP とフィブリンの結合様式は何か。</li> <li>13) フィブリン上に HUVEC が広がるのを DP が促進するとしているが、実際の仮マトリックスではフィブリン・フィブロネクチン・DP の複合体が形成されるのではないか。このとき 1 つの DP 分子がフィブリンとフィブロネクチンの双方に結合していると考えなのか。</li> <li>14) DP の組織中濃度によって wound healing に向かうのか、あるいは fibrosis に向かうのか、その違いは分かっているのか。</li> </ol> <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 吳 偉民

## 論 文 題 目

..... Dermatopontin regulates fibrin formation and its biological activity .....

..... (デルマトポンチンはフィブリン形成に影響し、その生物活性を修飾する) .....

## 要 旨

**Introduction:** Dermatopontin (DP) is a small extracellular matrix protein with a molecular weight of 22KDa, and is abundant in the dermis. Previously, we found that DP is present in the provisional matrix that is mainly composed of fibrin and fibronectin in an early phase of wound healing, and that DP interacts with both fibrin and fibronectin (Kato, et al., J. Biol. Chem. 2011). The present study was aimed to examine the functional relationship between DP and fibrin.

**Methods:** Interaction between proteins was examined by solid-phase assays. Sixteen partial peptides of DP were produced and were used for determining interaction sites. Fibrin was formed from fibrinogen by incubating with thrombin in the presence or absence of DP. The kinetics of fibrin formation was monitored by turbidity change, and the structure of fibrin was observed by a transmission electron microscope. DP incorporation in newly-formed fibrin was assessed by SDS-PAGE and western-blotting. Cell adhesion assay was performed using human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).

**Results:** DP interacted with both fibrin and fibrinogen in a dose-dependent manner. DP interacted with fibrinogen D domain but not with E domain. The interaction between DP and fibrin was specifically

inhibited by a peptide named DP-4 (PHGQVVAVRS). Biotinylated DP-4 peptide interacted with fibrin as well as with fibrinogen D domain. Thus, the interaction sites were supposed to be a DP-4 peptide in DP and a D domain in fibrinogen, respectively. Bioactivities of the functional DP-4 peptide were further explored in our following publication (Wu W, et al., J. Dermatol. Sci. 2014, in press).

DP enhanced fibrin fibril formation, and the final turbidity of fibrin was increased in proportion to the DP concentration. DP was incorporated in the newly formed fibrin fibrils. On the other hand, when DP and fibrinogen, or DP and thrombin were incubated, no apparent turbidity change was observed. Electron microscopically, fibrin fibrils formed in the presence of DP were thicker, and they showed less thinner fibrils around them, by comparing with those formed in the absence of DP.

DP enhanced HUVEC adhesion to fibrin in a dose-dependent manner. The cell adhesion was inhibited by anti- $\alpha v \beta 3$  integrin antibody, and a complete inhibition was achieved by a mixture of anti- $\alpha v \beta 3$  and  $\beta 1$ -subunit integrin antibodies. DP also enhanced the HUVEC spreading on fibrin, and the cytoskeletons were developed better than in its absence.

**Conclusion:** DP promotes fibrin fibril formation, and it enhances HUVEC adhesion and spreading. Thus DP modifies structures and biological activities of fibrin which is the major component of the provisional matrix at the wound site. Provisional matrix provides a scaffold for a series of cellular events, such as cell adhesion, migration, proliferation and differentiation. Endothelial cells and fibroblasts mainly exert such cell activities and contribute to angiogenesis and new extracellular matrix formation, resulting in granulation tissue formation. Therefore, the present findings would indicate that DP acts as an enhancing factor for an early phase of wound healing when added externally. These results imply a possibility that an artificial DP-fibrin provisional matrix is used as a new biomaterial for treatment of wound healing.

**Prospect:** DP has a characteristic ability to modify biological functions of not only fibrin, but also fibronectin and other extracellular matrix proteins. By a systemic exploration of the abilities, possibility of clinical application of DP to certain pathological conditions such as wound would be expanded. In addition, identification of novel functional DP peptides would lead a development of other kinds of novel bioactive materials.