β -thymosins は万能の傷薬か？

松 尾 拡 ・ 張 皿 ・ 福 山 宏

九州歯科大学生命科学講座口腔病態病理学分野

平成 17 年 8 月 1 日受付

平成 17 年 8 月 26 日受理

β -thymosins are versatile wound healers ?

Kou Matsuo, Min Zhang and Hiroshi Fukuyama

Division of Oral Pathology, Department of Biosciences,
Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

E-mail: kou@kyu-dent.ac.jp

The β -thymosins (TBs) are a family of highly conserved polar 5 kDa peptides consisting of 40–44 amino acids. In most mammalian tissues, thymosin β 4 (TB4) is the main peptide, representing about 70–80 % of the total TBs content. Thymosin β 10 (TB10) and thymosin β 15 (TB15) are also present in human, rat and mouse tissues as minor family members. TBs are often referred to as “G-actin sequestering peptide”, meaning TBs bind monomeric globular actin (G-actin) in a 1:1 complex and prevent polymerization into actin filament. Besides being simple actin monomer buffering proteins, recent studies have revealed that TBs are multifunctional peptides involved in cell migration, angiogenesis, wound healing, inflammation, morphogenesis and tumor metastasis. On the basis of results of pre-clinical studies showing the efficacy of TB4 for dermal wound healing in animal models, and the demonstration of its safety for use in a phase I human clinical trial with TB4, its first II clinical trials for the treatments of chronic ulcers has been initiated in the year 2005. A recent hot topic concerning TBs is that TB4 prevented and/or repaired cardiac damage after a myocardial infarction in mice, by promoting cardiac cell migration and survival. As for morphogenesis, an interesting action of TB4 is to promote hair growth by activation of hair follicle stem cells. Although there had been few reports related to TBs from the dental research field, we found out the direct association between TBs and tooth germ development. This review not only presents recent advances of basic and clinical researches for TBs, but provides some insight into their dental clinical applications including regenerative medical techniques.

Key words: β -thymosins/Angiogenesis/Wound healing/Tooth germ

抄 録

β -thymosins (TBs) は高度に保存された 40 ～ 44 個のアミノ酸からなる約 5 kDa の極性のあるペプチドのファミリーである。ほとんどの哺乳類の組織で, thymosin β 4 (TB4) は全 TBs 量の 70 ～ 80 % に相当するメインのペプチドである。ヒト, ラット, マウスの組織にはマイナーな TBs ファミリーメンバーとして thymosin β 10 (TB10) と thymosin β 15 (TB15) がある。TBs はしばしば “G アクチン隔離ペプチド” として言及されるが, それは, TBs が単量体の球状アクチン (G アクチン) と 1 : 1 で結合し, アクチンフィラメントへと重合するのを妨げるという意味である。最近の研究で, TBs が単純なアクチン単量体を緩衝する蛋白というだけではなく, 細胞遊走, 血管新生, 創傷治癒, 炎症, 形態形成および腫瘍の転移などに関わる多機能のペプチドであることが判明してきた。TB4 の動物モデルにおける皮膚の創傷治癒に対する効果を示す前臨床試験の結果や, TB4 のヒトでの臨床治験第 1 相でその安全性が証明されたことに基づき, 2005 年度から慢性潰瘍の治療に対する最初の臨床治験第 2 相が開始されている。最近の TBs に関する注目すべきトピックは, TB4 が心筋細胞の遊走や延命を促進してマウスにおける心筋梗塞後の心臓の損傷を防いだ (あるいは修復した) というものである。形態形成に関して TB4 の興味ある作用は毛嚢の幹細胞を活性化することで育毛を促進することである。歯科学研究の領域からは TBs に関連する報告はほとんどなかったが, 著者らは TBs と歯胚発生の直接的な関連を見出した。このレビューは TBs に関する基礎的あるいは臨床的研究の最近の進歩を示すのみならず, 再生治療も含めた歯科臨床応用への洞察を与えるものである。

キーワード: β -thymosins/血管新生/創傷治癒/歯胚

はじめに

昨年に刊行された Nature 誌の News and Views 欄に「解放されたプロメテウス (Prometheus unbound)」という見出しの記事があり, 同巻号に articles として掲載された Bock-Marquette ら (2004)¹⁾ の thymosin β 4 (TB4) の論文をトピックとして紹介していた。プロメテウスはギリシャ神話に出てくる巨人で, 神殿から盗んできた「火」を人間に与えたことで, ゼウスの怒りを買って、コーカサスの山の岩に鎖で縛られ, 大鷲によって腹を引き裂かれ, 肝臓をついばまれる刑に処せされた。彼は不死の身であり, 肝臓は毎日再生するため, 死ぬことも許されず, 永遠に苦痛を与え続けられる極刑であったが, ついに 3 万年後, ヘラクレスによって鎖から解放されたという。この話は肝臓の再生能力の高さが大昔から認知されていたという意味で, 再生医療の講演などでも時々とりあげられているが, この神話には別バージョン, すなわち大鷲のエサが肝臓ではなく心臓となっているのも知られている。病理学の教科書では, 心筋は高度に分化した組織であるため, 中枢神経系と並んで完全再生が望めない代表的な臓器として挙げられている。従って心筋梗塞のように心筋の一部が壊死すると, 急性期の致死的な経過を免れたとしても, その壊死した部分は肉芽組織から線維性組織に置き換えられ, 瘢痕化するため, 本来のポンプとしての機能を十分に回復できず, そ

の後も心不全の原因となり常に生命の危機に曝されながら生きていくことになる。Bock-Marquette ら (2004)¹⁾ はマウスの冠状動脈を結紮して人工的に心筋梗塞を起こさせる実験で, 結紮直後に TB4 を投与した群では PBS (phosphate buffered saline) を投与した対照群と比較して, 心筋の壊死や瘢痕化が大幅に減少していたと報告した。また収縮能や拍出量など機能的にも対照群に比較するとかなり改善されていたという。これまでは, 損傷を受けた心臓の再生治療として, 心筋に分化する幹細胞や前駆細胞を単離して心臓に導入する方法が有望視され, その実現に向けて世界中の研究者・臨床家に取り組んでいるが, そう簡単にはいかないことは想像に難くない。Bock-Marquette ら (2004)¹⁾ の報告は, より簡便でありながら即効性で有効な方法が存在することを示し, さらに新たな治療のターゲットやヒントを与えたという意味で重要なものであった。ヘラクレスが大鷲を射殺してくれたことで, 哀れなプロメテウスはそれまで延々と味わってきた苦痛から解放されたわけだが, 「TB4 を用いた治療は人類を長年にわたって苦しめてきた病気から開放してくれるだろうか?」というのがその記事のタイトルにこめられた意味であろうか。

thymosins は胸腺 (thymus) より抽出された種々のポリペプチドの総称であり, 等電点 (pI) により α -, β -, γ -thymosins の 3 グループに分類される^{2,3)}。そのうち, 本稿で取り上げる β -thymosins (TBs) ファミ

図1 β -thymosins のアミノ酸配列と生物学的活性。

リーは pI 5.0 ~ 7.0 の範囲にあり、現在まで 15 種類の TBs が様々な脊椎・無脊椎動物より報告されているが、それらは極めて類似したアミノ酸配列 (40 ~ 44 アミノ酸) を持つ水溶性ペプチドである。冒頭でふれた thymosin β 4 (TB4) はヒトを含めた哺乳類のほとんどの組織に最も多く分布する TBs で、全 TBs の 70 ~ 80 % を占める。また、ヒトやラット、マウスでは thymosin β 10 (TB10), thymosin β 15 (TB15) が少数派として存在し、後述するように、それぞれ TB4 とは生物学的活性が微妙に異なっている。本稿ではこの 3 つの TBs を取り上げる。

さて、TB4 には Bock-Marquette ら (2004)¹⁾ が報告した心筋に対する作用のみならず、これまでに様々な生物学的活性があることが報告されており、なかでも血管新生を促進する作用⁴⁻⁶⁾、皮膚や角膜の創傷治癒促進作用⁷⁻¹²⁾、抗炎症作用^{11,13)} などに関する研究報告は臨床応用へ直結することになり、すでに RegeneRX という米国

の生物医薬品会社が National Institutes of Health (NIH) との共同で臨床治験第一相を終了し、2005 年から臨床治験の第二相に入っている。そのプログラムのうち、1) 褥瘡性潰瘍、2) 慢性静脈うっ血性潰瘍、3) 糖尿病性潰瘍に対する治療効果の検討についてはすでに FDA (Food and Drug Administration: 米国の食品医薬品局) の認可を受けており、4) 眼球 (角膜) の創傷治癒や、5) Bock-Marquette ら (2004)¹⁾ の成果を受けた心疾患に関しても 2005 年末から 2006 年に計画しているという。

その他、TB4 および TB10, TB15 を含む TBs の生物学的活性として、育毛促進作用^{14,15)} や神経系の発生^{2,16,17)}、悪性腫瘍の発生・増殖・転移^{2,3,18,19)} への関与などが報告されている。

このように TBs に関して実に様々な領域から報告がなされている一方、歯科口腔領域からは口腔癌に関する報告²⁰⁾ 以外はほとんど見当たらない。著者らは歯胚形成

図2 β -thymosins の細胞内における基本的機能.

に関わる遺伝子群を網羅的に検出・同定する過程²¹⁻²³⁾において、TB4 や TB10 が歯胚形成に深く関わることを見出した。このことから歯科口腔領域における TBs の臨床応用を考えた場合、日常的な歯科治療への応用のみならず、歯の再生治療も含めたより発展的な新治療法のヒントにもなりうると考え、まだ知名度は低い但他の領域で着実に臨床応用が試みられつつある魅力的なポリペ

プチド、 β -thymosins を紹介すべく本稿を執筆することとした。

I. TB4, TB10, TB15 に関する基本的な構造、機能
アミノ酸配列については図1に示すごとく TB4 と TB10 は 43 個、TB15 は 44 個のアミノ酸よりなり、TB10 は TB4 と 11 個のアミノ酸が異なり、TB15 は

TB4 と 13 個のアミノ酸が異なる。N末端はいずれもアセチル化されている。ほぼ中央に位置する 17 番目～25 番目のアミノ酸配列モチーフ¹⁷LKKTETQEK²⁵ (TB15 は¹⁷LKKTNTTEEK²⁵) は、主要な細胞骨格であるアクチンフィラメント (F アクチン: Fibrous actin) の構成単位である G アクチン (globular actin) と結合する配列として重要である^{2, 3, 24, 25}。それに隣接する両サイドは Helix 構造をとるものと予想されている (図 1)。

アクチンは全ての真核細胞に最も大量に存在する蛋白質であり、そのアクチンと相互作用することがまず TBs の基本的な機能である。生理的なイオン条件下で単量体であるフリーの G アクチンが数個会合し、重合核というもの形成し、さらに多くの G アクチンが順次つき足されていき (重合)、ついには 2 本の数珠がよじれてできたような 2 重らせん状の線維状 F アクチンが形成される (図 2)。この F アクチンが集合してネットワークや束を形成して細胞の形態や運動に重要な働きをすることになる。イオン強度など条件が変わると F アクチンから G アクチンへと脱重合していき、この過程 (G-F 変換) は可逆的であり、この重合-脱重合を可逆的に繰り返すことで形態変化や細胞運動の動的な機械力を生み出すことがわかっている。今でこそ TBs の多様な作用機序が分子レベルで説明されつつあるが、最近まで TBs の分子レベルでの機能について明確にわかっていたことは、TBs が G アクチンと 1:1 で結合し、フリーの G アクチンが F アクチンへと重合していくのを防ぐという役割 (G-actin sequestering: G アクチン隔離) (図 2) だけだったため^{2, 3, 24, 25}、多くの論文で TBs について触れる場合、“G-actin sequestering peptide” と表現している。この G アクチンとの結合と保持には配列モチーフ¹⁷LKKTETQEK²⁵のみならず、N-末端および C-末端側の Helix 構造部分も重要であるといわれる。また、G アクチンとの結合能も TB4 < TB10 < TB15 の順で高くなるといわれている^{2, 3, 26, 27}。さらに、ここで詳細な説明は避けるが、実は TBs は単純に G アクチンとのみ結合するだけでなく、状態により F アクチンにも作用し、細胞骨格の制御に関わっていることがわかってきた^{2, 3, 28-33}。

以前までは TBs は基本的に細胞質内に局在するものと考えられていたが、最近 TB4 が細胞質内の因子により核内にも移行して局在することが示された³⁴。核移行には G アクチン結合配列と一部オーバーラップする配列¹⁴KSKLKK¹⁹が必要であると示唆されている (図 1)。TB4 の核内での働きはまだ明らかではないが、核内にもアクチンやアクチン関連蛋白が存在することから、それ

らと相互作用することが予想され、クロマチンのリモデリング、mRNA の加工や輸送、アポトーシスや発癌などへの関与が示唆されている^{35, 36}。

一方、すでに簡単に触れた創傷治癒や炎症における TBs の多彩な生物学的活性は、TBs が細胞外に出てからのイベントでもあるが、実は TBs の細胞外への分泌機構についてはよくわかっていない。

II. 血管新生における生物学的活性 (図 3 参照)

Grant ら (1995)⁴ はマトリジェル (基底膜マトリックス) 上で血管内皮細胞を培養すると 2-4 時間で細胞が移動し、細胞同士が接触して毛細血管様の管腔形成をすることから、プラスチック上で培養した細胞に比較して差別的に発現している mRNA を調べ、TB4 mRNA 発現量が 5 倍に上昇しているのを見出した。そこで血管内皮細胞に TB4 を強制発現させると、細胞の接着、拡散、管腔形成が促進され、その効果は TB4 のアンチセンスオリゴにより抑制されたという。また細胞外から与えられた TB4 によっても血管新生が促進されることも示された^{5, 6, 37}。Malinda (1997)⁵ らは血管内皮細胞培養系に TB4 を添加すると化学的走化因子として作用し、細胞を局所へ遊走させたと報告した。この遊走刺激活性は血管内皮細胞に特異的で、他の種類の細胞には効果がなかった。また、TB4 処理は血管内皮細胞から蛋白分解酵素である metalloproteinase-2 (MMP-2) の産生を上昇させた。この酵素の産生は、血管新生初期に血管内皮細胞が遊走を開始する際、基底膜を溶解する必要があるため理にかなっていると考えられる。TB4 を血管内皮細胞培養系に添加すると管腔形成を増加させたのみならず、vascular sprouting (径の大きな血管の側面から毛細血管様の細い枝が芽出すること: 出芽) を促進した⁶。さらに細胞外から添加された TB4 が細胞内部へ取り込まれ内在化されることを示唆した。TB4 の細胞内産生に関しては、hepatocyte growth factor (HGF) が血管内皮細胞を刺激して TB4 の mRNA 発現を上昇させることが報告されている³⁸。Philp ら (2003)³⁷ は TB4 の様々な切断片や合成ペプチドを用いて血管新生促進に関わるアミノ酸配列の同定を試みたところ、G アクチン結合配列モチーフ (¹⁷LKKTETQEK²⁵) 内部の 7 つのアミノ酸 (¹⁷LKKTETQ²³) が血管内皮細胞の遊走や出芽に必須であると報告した (図 1)。ところで、彼らは全長の TB4 と TB10 の血管新生刺激能も比較しており、遊走刺激能は両者とも同等であったが、出芽については、TB10 は TB4 にやや劣っていた。Koutrafouris ら

図3 β -thymosins の多様な生物学的活性.

(2001)³⁹⁾ はニワトリの絨毛尿膜を用いた *in vivo* 血管新生モデルを用いて血管新生刺激能を比較しており、その結果、TB4 は血管新生を増強したが、TB10 は血管新生過程に抑制的な効果を示した。さらに Lee ら (2005)⁴⁰⁾ は TB10 を血管内皮細胞に強制発現させると、細胞の増殖、遊走、浸潤、管腔形成、出芽、血管内皮増殖因子

(Vascular endothelial growth factor: VEGF) 産生など血管新生過程に関わる全ての機能が抑制されていることを示した。また TB10 が Ras に直接結合することで下流のシグナル伝達系を抑制し、その結果、増殖や VEGF 産生を抑制するデータを示した。一方、TB4 は Ras と結合しなかった⁴⁰⁾。このように、Philp ら (2003)³⁷⁾

が示した血管新生刺激に必須という7つのアミノ酸 (LKKTTETQ) はTB4とTB10の両者とも共通に有しているにかかわらず、どうやらTB10は血管新生に対して抑制的に働くらしい。N末端側、またはC末端側のわずかなアミノ酸の違いがこのような血管新生やRasシグナル系に関して逆の作用を生じると考えられるが、どの部分が重要なのかはまだ明らかにされていない。

Ⅲ. 創傷治癒、炎症における生物学的活性 (図3参照)

Malinda ら (1999)⁹⁾ はラットの背部皮膚に8mmの厚さのパンチバイオプシーの創傷を数カ所作り、TB4を局所塗布または腹腔内投与したものと、それぞれPBSを用いたものとで創傷治癒の経過を比較すると、TB4を局所塗布・腹腔内投与したもののいずれもが対照群と比較して再上皮化、創の閉塞、肉芽組織の形成、血管新生、コラーゲン線維の形成が促進されることを示した。また培養系でもTB4はケラチノサイトの遊走を刺激したと報告した。Philp ら (2003)⁹⁾ は糖尿病マウスと老化マウスを用いて同様の実験を行った結果、TB4はどちらのマウスにおいても創傷治癒を促進した。ただし再上皮化については、老化マウスではTB4により促進されたが、糖尿病マウスでは対照と差は生じなかった。

TB4が角膜の創傷治癒を促進し、かつ炎症反応を抑えることも報告された^{10,11)}。損傷後にTB4を局所塗布されたものは、PBS処理対照群と比較して、再上皮化が促進され、かつ多形核白血球の浸潤が減少していた。さらにinterleukin(IL)-1 β , macrophage inflammatory protein(MIP)-1 α , MIP-1 β , MIP-2, monocyte chemoattractant protein(MCP)-1など炎症反応を促進する因子の発現量が減少していた¹¹⁾。また同様の実験で、TB4処置群ではMMP-2, MMP-9, MT6-MMPが減少していたという⁴¹⁾。さらにTB4は角膜上皮細胞の遊走を刺激し、創傷治癒時の再上皮化、遊走に必要といわれるラミニン-5 (LM-5)⁴²⁻⁴⁴⁾の $\alpha 3$, $\gamma 2$ 鎖蛋白の発現を上昇させることが報告された^{12,45)}。LM-5の発現増加に関してTB4はtransforming growth factor $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)とは独立した経路でLM-5の発現増加を引き起こすらしい。現時点(2005年7月26日)で論文になってないが、今春開催されたシカゴの創傷治癒学会で、NIHのCell Biology研究室のチーフであるKleinmanは、創傷治癒に必要なkeyとなる「細胞の接着や移動」に重要な二つの遺伝子、LM-5とzyxin^{46,47)}を、TB4がup-regulateあるいは“turn on”することを強調していた。

さて、冒頭で紹介したBock-Marquette ら (2004)¹⁾

の報告の詳細であるが、まず彼らはマウス胎児の心臓で心筋細胞や血管内皮細胞にTB4 mRNAが発現しているのを認めた。またTB4を遺伝子導入された細胞から培養液中にTB4ペプチドが放出されることや、分泌されたTB4が培養細胞の表面から細胞内部へと内在化されるのを確認した。胎児および生後マウスの心筋細胞や血管内皮細胞の培養系にTB4を添加すると、PBSを与えた対照群と比較して細胞遊走が上昇していた。また、新生児マウス心筋の初代培養系でTB4を添加した群では細胞の生存期間が延長し、かつ心筋の収縮も持続し、拍動も早かったという¹⁾。次にTB4がどのような蛋白と相互作用しているのかをファージディスプレイシステムを用いて調べ、PINCHとintegrin-linked kinase (ILK)という細胞の遊走や延命(survival)に関わる蛋白と互いに結合して複合体を作り、Akt(別名: Protein Kinase B)をリン酸化することを示した。このAktは成長や延命に関わるシグナル伝達経路の中心にあるセリンスレオニンキナーゼで、ILKにより473番目のセリンがリン酸化されて活性化されることも報告されている⁴⁸⁻⁵⁰⁾。そこでILKのインヒビターを添加するとTB4により刺激されていた心筋細胞の遊走能や、収縮が対照群レベルまで戻った。またいくつかの方法でこれらの現象がアクチン重合と直接関わっていないと確認したという。これら*in vitro*の実験から、細胞内へ入ったTB4はPINCHとILKとで複合体を作り、Aktをリン酸化して活性化し、(アクチン重合とは独立した経路で)心筋細胞の遊走や延命を促進したと考えた。マウスの冠状動脈を結紮して人工的に心筋梗塞を起こす*in vivo*の実験で、結紮直後にTB4を腹腔内投与した群、心臓内に直接投与した群、腹腔内と心臓内両方から投与した群、そしてそれぞれに対応する投与法でPBSを用いた対照群で心筋の機能や形態学的変化を比較した。その結果、TB4投与群は心筋の収縮能や拍出量などの機能が対照群と比較して良好であり、投与法の違いによる差はなかった。組織学的に見てもTB4投与群では瘢痕形成が抑えられていた。さらに結紮して24時間後、TB4投与群ではアポトーシスの細胞が対照に比べて著明に減少していたことなどから、TB4が梗塞初期における心筋細胞の延命に働いたものと考えた。さらに、この*in vivo*実験の組織抽出サンプルを調べると、TB4投与群ではILKおよびリン酸化Akt-S473が増加していた。創傷治癒におけるアポトーシスに関しては、Sosne ら (2004)⁵¹⁾がヒトの角膜上皮培養細胞にアルコール処理を施して行うカスパーゼ仲介アポトーシス実験系にTB4を添加した場合

の効果をもっており、ミトコンドリアからのチトクロームC放出の減少や各種カスパーゼ（特にカスパーゼ-8）の活性阻害などの結果から、TB4には抗アポトーシス作用があることを示している。

創傷治癒局所の滲出液からTB4が血漿よりはるかに高い濃度で検出されることや、トロンビンによる血小板の活性化によりTB4の血漿中濃度が増加することが知られている^{2,7,52)}。Huffら（1999, 2002）^{53,54)}はTB4がXIIIa（トランスグルタミナーゼ）に触媒されてフィブリン、フィブリノーゲン、コラーゲン、アクチンと架橋されることを示した（図1）。トロンビンにより活性化された血小板からはTB4と共にXIIIaも放出されるので、TB4をフィブリンなどと架橋させ、凝血塊や組織損傷部位などの局所にTB4を高濃度に留めて、引き続く創傷治癒、血管新生、炎症反応などにおいて効率よく働かせるのではないかと示唆した。またTB10はフィブリンに対する架橋反応においてTB4と競合したと報告している⁵⁴⁾。TB4はフィブリンやフィブリノーゲンのalpha C-domainという部位に架橋されるらしい⁵⁵⁾。これら凝固系との関連に対して、線溶系の抑制因子であるplasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1)の血管内皮細胞による産生をTB4が上昇させるという報告もある⁵⁶⁾。TB10にはPAI-1産生促進作用はなかったらしい⁵⁶⁾。

Badamchianら（2003）⁵⁷⁾はラットにLD（50）量のLPSを投与すると血中のTB4の濃度が有意に減少するのを認めた。敗血症患者でも同様の現象を認めた。そこでマウスにLD（50）量のLPSを投与し、その直後にTB4を投与した群は致死率が有意に減少し、かつ血中の炎症性サイトカイン、エイコサノイド、その他エンドトキシンショック時に高度に上昇する分子が減少していた。このようにTB4はエンドトキシンなどで引き起こされる敗血症の治療にも利用されうる可能性があることを示唆した⁵⁷⁾。

IV. thymosin β 4-sulfoxide, Ac-SDKP などについて（図1, 3 参照）

さて、TBsが細胞外に分泌されて様々な場面で活躍することを述べてきたが、この分泌されたペプチドの全てが切断や修飾をされずにそのままの形（native form）で作用していると考えてよいのであろうか。

実はTB4には6番目のアミノ酸であるメチオニン（M）が酸化されたthymosin β 4-sulfoxide（TB4so）という形態があり（図1）、中性またはアルカリのpHの状態に曝されるとM残基が酸化されて形成されるとい

う³⁾。Youngら（1999）¹³⁾はグルココルチコイドの存在下で培養された単球の培養上清中にTB4soが産生されており、そのTB4soが好中球の拡散性移動を促進し、血管内皮細胞の接着を弱め、またfMLPに対する走化性反応を阻害するのを見出した。このような抗炎症作用はnative formのTB4にはなかった¹³⁾。逆にTB4soはGアクチンの隔離作用は弱いという^{3,13)}。これまで述べた他の文献ではTB4とTB4soの区別は特にされてなかったが、細胞外に分泌されたものや合成ペプチドを外から投与した実験でもTB4soの形となっている場合があるはずで、その点を考慮して実験報告を解釈する必要がある。

さらに、Ac-SDKP（N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline）というテトラペプチドがあり、通常の状態のヒトや実験動物の臓器や体液に存在することが知られているのであるが、実はこれもN末端に同じ配列をもつTB4がその前駆体であり、prolyl oligopeptidaseにより切断されて生ずることが示されている⁵⁸⁾。元々は、造血幹細胞が細胞増殖S期に入るのを妨げるインヒビターとして精製されたものでもある⁵⁹⁾。このAc-SDKPは専らangiotensin-converting enzyme（ACE）によってAc-SDとKPに加水分解され⁶⁰⁾、さらにKPは血中で速やかにリジンとプロリンに分解される。最近、Ac-SDKPが*in vitro*で線維芽細胞の増殖やコラーゲンの合成を抑制すること⁶¹⁾、高血圧ラットに長期投与することで心臓や腎臓の線維化や炎症性細胞浸潤を減少させることが報告された^{62,63)}。この心臓の線維化に関しては、Ac-SDKPがTGF- β とそのシグナル伝達系の下流に出てくるconnective tissue growth factorの発現抑制、炎症巣へのマクロファージ浸潤の抑制を引き起こすことで線維化を抑制すると考えられている^{64,65)}。さらに、*in vitro/vivo*実験系においてAc-SDKPは血管新生を刺激する作用があることが示された⁶⁶⁾。これらの作用は、これまで述べてきたフルサイズのTB4に関する報告とよく似ており、Gアクチン結合配列モチーフが血管新生作用に必須であるというPhilpらの報告³⁷⁾とは矛盾さえするように思える（図1）。しかしながら彼らの実験ではあらゆる欠損部をもったミュータントTBsを調べたわけではなく、特にN末端側の配列には狙いを付けてなかったため、今までの記述が否定されるわけではない。

またさらに解釈を複雑にする事実であるが、TB4にはリンパ組織や脾臓などに限られて発現しているlonger splice-variantが存在し、その予想されるアミノ酸配列は通常型のTB4のN末端側に6（または7）個のアミノ酸（M）LLPATMが追加されたものだとい

う⁶⁷⁻⁶⁹。Girardi ら (2003)⁷⁰ はその long splice-variant TB4 (LTB4) と通常型 TB4 のポリペプチドを合成し、M残基を酸化させて sulfoxide 型に変えたのち、マウス皮膚に様々な刺激を与える *in vivo* 実験系で抗炎症作用を比較した。その結果、LTB4の方が様々な種類の炎症刺激において広範な抗炎症作用を示し、かつ大部分においてTB4の作用より強力であった⁷⁰。他のTB4のvariantsの存在^{19, 67, 71}も報告されているが、ここではこれ以上触れないこととする。

V. 発生・発育・形態形成および組織幹細胞に対する役割 (図3参照)

発生・発育におけるTBsの役割については、特に脳神経系に関する報告が多い⁷²⁻⁸⁰。詳細は避けるが、TB4とTB10のmRNAまたはペプチドの発現を比較した報告では、両者とも胎生期の発生過程中的脳神経系組織に発現量が高く、生後、両者とも減弱するが、その減弱の仕方や発現細胞の分布が異なることなどからTB4とTB10は機能的な使い分けがなされていることが示唆されている^{72, 73, 76, 77, 80}。また神経(前駆)細胞の遊走、分化、神経軸索の伸長とTB4, TB10の関わりも示唆された^{77, 81}。Choe ら (2005)¹⁷ は発生期のラットの脳において、TB4, TB10, TB15が神経突起の形成に関わることを示し、海馬や大脳皮質の培養細胞に過剰発現させると、特にTB15が神経突起の分岐を増加させる効果が強いことを示した。この作用はG-アクチン結合部位に変異を起こすと無効になることや、G-アクチンとの結合能が高い順位と神経突起分岐作用が強い順位とが一致(TB15>TB10>TB4)することから、G-アクチンとの結合能と神経突起分岐作用とが関連するのではないかと示唆した¹⁷。

まだ機能のよくわかってない新しい遺伝子の発現の局在を、マウス胎児の全身を使ったホールマウント *in situ* hybridization で調べた論文の写真をよく見ると、明らかに歯胚に発現しているのになんかのコメントも付していないものを時々見かける。彼らのターゲットとするものと全く関係がなく興味がないのかもしれないが、そのせいか、TBsに関しても歯胚の形成に関わるという報告はなかった。著者らは歯の再生治療の足掛かりとすべく、cDNA subtraction 法を用いて歯胚形成に関わる遺伝子群を網羅的に検出・同定する作業を進めているが、その過程で見出された遺伝子群の多くはそれまで歯の発生学領域で報告されていないものがほとんどで、TB4もその一つとして同定された²¹⁻²³。 *in situ* hybridiza-

図4 マウス胎生15.5日目の歯胚における β -thymosinsの局在。*in situ* hybridizationによりTB4とTB10のmRNAの局在を調べた。TB4は外エナメル上皮～歯堤～口腔粘膜に明瞭なシグナルを認め、一方、TB10は歯乳頭間葉系細胞での陽性像が目立つ。

tionではTB4はマウス胎生10.5日(E10.5)の歯胚形成開始直前の時期から臼歯相当部位の上皮に強く発現していた。発生段階が進んでも上皮側(エナメル器)に強く発現する傾向を見せた(図4)。そこで、TB10 mRNAの発現について調べると、TB4とは対照的に外胚葉性間葉、写真では将来象牙質や歯髄となる歯乳頭にあたる部位に強く発現していた(図4)。歯の発生には上皮と間葉の相互作用により形態形成が進むが、まさにTB4とTB10はこの現象に関して使い分けられているようである。また、マウス胎児第一鰓弓(下顎)の器官培養系にTB4に対するアンチセンスオリゴを与えて、TB4遺伝子発現抑制実験を行うと、無添加群、センスオリゴ投与群などの対照群に比較してほとんど歯胚の形成が進まず、特にTB4抑制の効果は発生の進んだ時期のものより、E10.5など発生初期の歯胚において顕著であった(投稿準備中)。

Philp ら (2004)¹⁴ はマウスの毛嚢における育毛サイクルについて免疫組織化学的に検討し、TB4陽性細胞の動態と毛嚢の幹細胞の動態とが一致する所見を得た。そこでラットの毛嚢幹細胞に相当する細胞を分離・培養して、TB4を添加すると、幹細胞の初期分化、細胞の遊走、MMP-2の分泌を促進するというデータを得た。増殖には影響を与えなかった。次に、ラットやマウスの体毛を一部剃り、TB4を含んだ酸性ヒドロゲルを塗った群と酸性ヒドロゲルのみの群とを比較すると、TB4塗布された群がより早い育毛を示した。この育毛促進効果はヌードマウスや老化マウスにもみられたという¹⁵。このように、TB4は毛嚢の幹細胞に働きかけて育毛を促す薬として利用される可能性もある。

VI. 悪性腫瘍と TBs の関わり (図3 参照)

基本的に悪性腫瘍は狂った制御のもとにあるヘテロな細胞集団であるから、互いに異論を生むような報告がなされることがめずらしくないが、おおむね TB4, TB10, TB15 を過剰発現している悪性腫瘍は転移能が高いという報告が多い^{18, 19)}。

NIH 3T3 細胞に TB4 を過剰発現させると、G アクチンが増加するのみならず F アクチンも増加し、また細胞骨格系の蛋白群が 2 倍に増加し、培養皿における広がり方や接着能も増加する³³⁾。Cha ら (2003)⁸²⁾ はメラノーマ細胞株のうち、転移能の高いものが TB4 mRNA の発現量も高いことを認めた。TB4 を細胞株に過剰発現させると、ヌードマウスにおける造腫瘍能、血管新生像、実験的肺転移能の増加を認めた。この TB4 過剰発現細胞は VEGF を分泌しており、細胞の遊走能も上がっていた。しかし細胞の増殖能や浸潤能は対照と差はなかった。以上のことから、TB4 は腫瘍細胞の遊走能や VEGF 産生などによる血管新生能を活性化することで転移を促進すると結論している⁸²⁾。

一方、TB10 に関しては少し話しがすっきりしない。Sun ら (1996)³²⁾ は NIH 3T3 細胞に TB10 を過剰発現させると、アクチンの重合が増加し、かつ F アクチン束が太くなっているのを認めた。また培養皿上をより早く広がり、運動能、走化性実験における移動能も上昇したという。それに対し、Liu ら (2004)⁸³⁾ は転移能の高い各種悪性腫瘍細胞株で TB10 mRNA の発現上昇を認めたが、高転移能の細胞では、アクチン線維束の減少、短くなったアクチンフィラメントによるファジーなネットワーク、あるいは F-アクチンの凝集を認めた。非転移性や弱転移性の腫瘍細胞ではアクチンフィラメントは健常であり、秩序だった配列をしていたという。Lee ら (2001)⁸⁴⁾ は卵巣腫瘍細胞に TB10 を過剰発現させると F-アクチンのストレスファイバーの崩壊、細胞増殖の顕著な減少、アポトーシスの割合の増加を認めた。この TB10 依存性のアポトーシスに関しては TB10 の G アクチン結合部位が関連しているらしく、G-アクチン結合モチーフである¹⁷LKKKTET²²の中に含まれる 20 番目のアミノ酸 (スレオニン: T) をセリン (S) に置き換えたミュータント TB10 (T20S) (図1) を卵巣腫瘍細胞に過剰発現させると、アポトーシスが起こらず、また F-アクチンネットワークの断裂も起こらなかった。また G-アクチンとの結合も起こらなくなったという⁸⁵⁾。このように TB10 が過剰発現された場合は必ずしも腫瘍細胞に有利に働くとは限らない。また、TB10 は血管新生に関し

てはむしろ抑制的に働くらしいので、TB4 の転移促進作用とは別のメカニズムを考える必要がある。しかしながらメカニズムはさておき、転移能が高い腫瘍細胞や病理組織学的に悪性度の高い腫瘍において TB10 の発現が高いと報告している論文数は多い^{20, 86-89)}。

TB15 はもともとラット前立腺癌細胞株のなかで、転移能の高いものに差異的に発現している遺伝子として見出されたものである⁹⁰⁾。この TB15 が運動能や転移能を促進すること、ヒトの前立腺癌でも TB15 の遺伝子発現レベルが上昇し、予後や転移能と相関することなどが知られている⁹⁰⁾。またマウスの転移能の高い肺癌細胞やヒト乳癌細胞株でも TB15 の発現量が増加していたと報告されている⁹¹⁾。ただし、乳腺腫瘍に関しては、非転移性の上皮内管状癌でも TB15 の発現が上がるという報告から、TB15 は転移能よりはむしろ悪性転化の早期に現れるマーカーとしての利用価値があるかもしれない⁹²⁾。

おわりに

図2, 図3にまとめたように、TBs は様々な場面で重要な役割を果たすペプチドであり、臨床治験も進行中で、近い将来、皮膚潰瘍治療用の軟膏、角膜損傷時の点眼剤、狭心症・心筋梗塞治療薬、抗炎症剤、敗血症時の治療薬、育毛剤、脳神経系への治療薬などの形で身近に現れてくるものと思われる。歯科においても、ドライソケットなどの抜歯窩治癒不全、糖尿病患者の創傷治癒、口腔粘膜の難治性潰瘍など日常的な歯科治療に応用される可能性は当然として、TBs の歯の発生や神経軸索などへの作用を考えると、外傷歯の治療、歯の再植、歯髄の保存や再生、歯周組織の再生治療、インプラントにおける歯根膜感覚の誘導、究極的には歯の再生治療へと期待は広がっていく。また、癌治療についても、細胞の遊走や血管新生を阻害するような TBs のミュータント、TBs 拮抗剤などを工夫すれば、安全性に疑問のあるウイルスベクターを用いた遺伝子治療よりは、安全なペプチドを高濃度に局所に適用して治療できる可能性もあると考える。本稿を読まれた研究者、臨床家にとって、より進んだ歯科治療を考える上でのなんらかのヒントとなれば幸いである。

引用文献

- 1) Bock-Marquette, I., Saxena, A., White, M. D., Di-maio, J. M. and Srivastava, D.: Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature*

- 432: 466-472, 2004.
- 2) Huff, T., Muller, C. S., Otto, A. M., Netzer, R. and Hannappel, E.: beta-Thymosins, small acidic peptides with multiple functions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33: 205-220, 2001.
 - 3) Hannappel, E. and Huff, T.: The thymosins. Prothymosin alpha, parathymosin, and beta-thymosins: structure and function. *Vitam. Horm.* 66: 257-296, 2003.
 - 4) Grant, D. S., Kinsella, J. L., Kibbey, M. C., La-Flamme, S., Burbelo, P. D., Goldstein, A. L. and Kleinman, H. K.: Matrigel induces thymosin beta 4 gene in differentiating endothelial cells. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 12): 3685-3694, 1995.
 - 5) Malinda, K. M., Goldstein, A. L. and Kleinman, H. K.: Thymosin beta 4 stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J.* 11: 474-481, 1997.
 - 6) Grant, D. S., Rose, W., Yaen, C., Goldstein, A., Martinez, J. and Kleinman, H.: Thymosin beta4 enhances endothelial cell differentiation and angiogenesis. *Angiogenesis* 3: 125-135, 1999.
 - 7) Frohm, M., Gunne, H., Bergman, A. C., Agerberth, B., Bergman, T., Boman, A., Liden, S., Jornvall, H. and Boman, H. G.: Biochemical and antibacterial analysis of human wound and blister fluid. *Eur. J. Biochem.* 237: 86-92, 1996.
 - 8) Malinda, K. M., Sidhu, G. S., Mani, H., Banaudha, K., Maheshwari, R. K., Goldstein, A. L. and Kleinman, H. K.: Thymosin beta4 accelerates wound healing. *J. Invest. Dermatol.* 113: 364-368, 1999.
 - 9) Philp, D., Badamchian, M., Scheremeta, B., Nguyen, M., Goldstein, A. L. and Kleinman, H. K.: Thymosin beta 4 and a synthetic peptide containing its actin-binding domain promote dermal wound repair in db/db diabetic mice and in aged mice. *Wound Repair Regen.* 11: 19-24, 2003.
 - 10) Sosne, G., Chan, C. C., Thai, K., Kennedy, M., Szliter, E. A., Hazlett, L. D. and Kleinman, H. K.: Thymosin beta 4 promotes corneal wound healing and modulates inflammatory mediators *in vivo*. *Exp. Eye Res.* 72: 605-608, 2001.
 - 11) Sosne, G., Szliter, E. A., Barrett, R., Kernacki, K. A., Kleinman, H. and Hazlett, L. D.: Thymosin beta 4 promotes corneal wound healing and decreases inflammation *in vivo* following alkali injury. *Exp. Eye Res.* 74: 293-299, 2002.
 - 12) Sosne, G., Hafeez, S., Greenberry, A. L., 2nd and Kurpakus-Wheater, M.: Thymosin beta4 promotes human conjunctival epithelial cell migration. *Curr. Eye Res.* 24: 268-273, 2002.
 - 13) Young, J. D., Lawrence, A. J., MacLean, A. G., Leung, B. P., McInnes, I. B., Canas, B., Pappin, D. J. and Stevenson, R. D.: Thymosin beta 4 sulfoxide is an anti-inflammatory agent generated by monocytes in the presence of glucocorticoids. *Nat. Med.* 5: 1424-1427, 1999.
 - 14) Philp, D., Nguyen, M., Scheremeta, B., St-Surin, S., Villa, A. M., Orgel, A., Kleinman, H. K. and Elkin, M.: Thymosin beta4 increases hair growth by activation of hair follicle stem cells. *FASEB J.* 18: 385-387, 2004.
 - 15) Philp, D., Goldstein, A. L. and Kleinman, H. K.: Thymosin beta4 promotes angiogenesis, wound healing, and hair follicle development. *Mech. Ageing Dev.* 125: 113-115, 2004.
 - 16) Roth, L. W., Bormann, P., Bonnet, A. and Reinhard, E.: beta-thymosin is required for axonal tract formation in developing zebrafish brain. *Development* 126: 1365-1374, 1999.
 - 17) Choe, J., Sun, W., Yoon, S. Y., Rhyu, I. J., Kim, E. H. and Kim, H.: Effect of thymosin beta15 on the branching of developing neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331: 43-49, 2005.
 - 18) Goldstein, A. L.: Thymosin beta4: a new molecular target for antitumor strategies. *J. Natl. Cancer Inst.* 95: 1646-1647, 2003.
 - 19) Chen, C., Li, M., Yang, H., Chai, H., Fisher, W. and Yao, Q.: Roles of thymosins in cancers and other organ systems. *World J. Surg.* 29: 264-270, 2005.
 - 20) Vigneswaran, N., Wu, J., Sacks, P., Gilcrease, M. and Zacharias, W.: Microarray gene expression profiling of cell lines from primary and metastatic tongue squamous cell carcinoma: possible insights from emerging technology. *J. Oral Pathol. Med.* 34: 77-86, 2005.
 - 21) Yamaza, H., Matsuo, K., Kiyoshima, T., Shigemura, N., Kobayashi, I., Wada, H., Akamime, A. and Sakai, H.: Detection of differentially expressed genes in the early developmental stage of the mouse mandible. *Int. J. Dev. Biol.* 45: 675-680, 2001.
 - 22) Wada, H., Kobayashi, I., Yamaza, H., Matsuo, K., Kiyoshima, T., Akhtar, M., Sakai, T., Koyano, K. and Sakai, H.: In situ expression of heat shock proteins, Hsc73, Hsj2 and Hsp86 in the developing tooth germ of mouse lower first molar. *Histochem. J.* 34: 105-109, 2002.
 - 23) Yamaza, H., Matsuo, K., Kobayashi, I., Wada, H., Kiyoshima, T., Akhtar, M., Ishibashi, Y., Sakai, T., Akamine, A. and Sakai, H.: Expression of Set-alpha during morphogenesis of mouse lower first molar. *Histochem. J.* 33: 437-441, 2001.
 - 24) Safer, D., Elzinga, M. and Nachmias, V. T.: Thymosin beta 4 and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable. *J. Biol. Chem.* 266: 4029-4032, 1991.

- 25) Van Troys, M., Dewitte, D., Goethals, M., Carlier, M. F., Vandekerckhove, J. and Ampe, C.: The actin binding site of thymosin beta 4 mapped by mutational analysis. *EMBO J.* 15: 201-210, 1996.
- 26) Bubb, M. R.: Thymosin beta 4 interactions. *Vitam. Horm.* 66: 297-316, 2003.
- 27) Eadie, J. S., Kim, S. W., Allen, P. G., Hutchinson, L. M., Kantor, J. D. and Zetter, B. R.: C-terminal variations in beta-thymosin family members specify functional differences in actin-binding properties. *J. Cell. Biochem.* 77: 277-287, 2000.
- 28) Sanders, M. C., Goldstein, A. L. and Wang, Y. L.: Thymosin beta 4 (Fx peptide) is a potent regulator of actin polymerization in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4678-4682, 1992.
- 29) Yu, F. X., Lin, S. C., Morrison-Bogorad, M. and Yin, H. L.: Effects of thymosin beta 4 and thymosin beta 10 on actin structures in living cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 27: 13-25, 1994.
- 30) Sanger, J. M., Golla, R., Safer, D., Choi, J. K., Yu, K. R., Sanger, J. W. and Nachmias, V. T.: Increasing intracellular concentrations of thymosin beta 4 in PtK2 cells: effects on stress fibers, cytokinesis, and cell spreading. *Cell Motil. Cytoskeleton* 31: 307-322, 1995.
- 31) Carlier, M. F., Didry, D., Erk, I., Lepault, J., Van Troys, M. L., Vandekerckhove, J., Perelroizen, I., Yin, H., Doi, Y. and Pantaloni, D.: Tbeta 4 is not a simple G-actin sequestering protein and interacts with F-actin at high concentration. *J. Biol. Chem.* 271: 9231-9239, 1996.
- 32) Sun, H. Q., Kwiatkowska, K. and Yin, H. L.: beta-Thymosins are not simple actin monomer buffering proteins. Insights from overexpression studies. *J. Biol. Chem.* 271: 9223-9230, 1996.
- 33) Golla, R., Philp, N., Safer, D., Chintapalli, J., Hoffman, R., Collins, L. and Nachmias, V. T.: Co-ordinate regulation of the cytoskeleton in 3T3 cells overexpressing thymosin-beta4. *Cell Motil. Cytoskeleton* 38: 187-200, 1997.
- 34) Huff, T., Rosorius, O., Otto, A. M., Muller, C. S., Ballweber, E., Hannappel, E. and Mannherz, H. G.: Nuclear localisation of the G-actin sequestering peptide thymosin beta4. *J. Cell Sci.* 117: 5333-5341, 2004.
- 35) Olave, I. A., Reck-Peterson, S. L. and Crabtree, G. R.: Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 755-781, 2002.
- 36) Marinissen, M. J., Chiariello, M., Tanos, T., Bernard, O., Narumiya, S. and Gutkind, J. S.: The small GTP-binding protein RhoA regulates c-jun by a ROCK-JNK signaling axis. *Mol. Cell* 14: 29-41, 2004.
- 37) Philp, D., Huff, T., Gho, Y. S., Hannappel, E. and Kleinman, H. K.: The actin binding site on thymosin beta4 promotes angiogenesis. *FASEB J.* 17: 2103-2105, 2003.
- 38) Oh, I. S., So, S. S., Jahng, K. Y. and Kim, H. G.: Hepatocyte growth factor upregulates thymosin beta4 in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296: 401-405, 2002.
- 39) Koutrafour, V., Leondiadis, L., Avgoustakis, K., Livanou, E., Czarnecki, J., Ithakissios, D. S. and Evangelatos, G. P.: Effect of thymosin peptides on the chick chorioallantoic membrane angiogenesis model. *Biochim. Biophys. Acta* 1568: 60-66, 2001.
- 40) Lee, S. H., Son, M. J., Oh, S. H., Rho, S. B., Park, K., Kim, Y. J., Park, M. S. and Lee, J. H.: Thymosin {beta}(10) inhibits angiogenesis and tumor growth by interfering with Ras function. *Cancer Res.* 65: 137-148, 2005.
- 41) Sosne, G., Christopherson, P. L., Barrett, R. P. and Fridman, R.: Thymosin-{beta}4 Modulates Corneal Matrix Metalloproteinase Levels and Polymorphonuclear Cell Infiltration after Alkali Injury. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46: 2388-2395, 2005.
- 42) Larjava, H., Salo, T., Haapasalmi, K., Kramer, R. H. and Heino, J.: Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes. *J. Clin. Invest.* 92: 1425-1435, 1993.
- 43) Hormia, M., Falk-Marzillier, J., Plopper, G., Tamura, R. N., Jones, J. C. and Quaranta, V.: Rapid spreading and mature hemidesmosome formation in HaCaT keratinocytes induced by incubation with soluble laminin-5r. *J. Invest. Dermatol.* 105: 557-561, 1995.
- 44) Kainulainen, V., Wang, H., Schick, C. and Bernfield, M.: Syndecans, heparan sulfate proteoglycans, maintain the proteolytic balance of acute wound fluids. *J. Biol. Chem.* 273: 11563-11569, 1998.
- 45) Sosne, G., Xu, L., Prach, L., Mrock, L. K., Kleinman, H. K., Letterio, J. J., Hazlett, L. D. and Kurpaku-Wheater, M.: Thymosin beta 4 stimulates laminin-5 production independent of TGF-beta. *Exp. Cell Res.* 293: 175-183, 2004.
- 46) Crawford, A. W. and Beckerle, M. C.: Purification and characterization of zyxin, an 82,000-dalton component of adherens junctions. *J. Biol. Chem.* 266: 5847-5853, 1991.
- 47) Crawford, A. W., Michelsen, J. W. and Beckerle, M. C.: An interaction between zyxin and alpha-actinin. *J. Cell. Biol.* 116: 1381-1393, 1992.
- 48) Troussard, A. A., Mawji, N. M., Ong, C., Mui, A., St-Arnaud, R. and Dedhar, S.: Conditional knock-out of integrin-linked kinase demonstrates an essential role in protein kinase B/Akt activation. *J. Biol. Chem.* 278: 22374-22378, 2003.
- 49) Fukuda, T., Chen, K., Shi, X. and Wu, C.: PINCH-1

- is an obligate partner of integrin-linked kinase (ILK) functioning in cell shape modulation, motility, and survival. *J. Biol. Chem.* 278: 51324–51333, 2003.
- 50) Brazil, D. P., Park, J. and Hemmings, B. A.: PKB binding proteins. Getting in on the Akt. *Cell* 111: 293–303, 2002.
 - 51) Sosne, G., Siddiqi, A. and Kurpakus-Wheater, M.: Thymosin-beta4 inhibits corneal epithelial cell apoptosis after ethanol exposure *in vitro*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45: 1095–1100, 2004.
 - 52) Huang, W. Q. and Wang, Q. R.: Bone marrow endothelial cells secrete thymosin beta4 and AcSDKP. *Exp. Hematol.* 29: 12–18, 2001.
 - 53) Huff, T., Ballweber, E., Humeny, A., Bonk, T., Becker, C., Muller, C. S., Mannherz, H. G. and Hannappel, E.: Thymosin beta(4) serves as a glutaminy substrate of transglutaminase. Labeling with fluorescent dansylcadaverine does not abolish interaction with G-actin. *FEBS Lett.* 464: 14–20, 1999.
 - 54) Huff, T., Otto, A. M., Muller, C. S., Meier, M. and Hannappel, E.: Thymosin beta4 is released from human blood platelets and attached by factor XIIIa (transglutaminase) to fibrin and collagen. *FASEB J.* 16: 691–696, 2002.
 - 55) Makogonenko, E., Goldstein, A. L., Bishop, P. D. and Medved, L.: Factor XIIIa incorporates thymosin beta4 preferentially into the fibrin(ogen) alphaC-domains. *Biochemistry* 43: 10748–10756, 2004.
 - 56) Al-Nedawi, K. N., Czyz, M., Bednarek, R., Szemraj, J., Swiatkowska, M., Cierniewska-Cieslak, A., Wyczolkowska, J. and Cierniewski, C. S.: Thymosin beta 4 induces the synthesis of plasminogen activator inhibitor 1 in cultured endothelial cells and increases its extracellular expression. *Blood* 103: 1319–1324, 2004.
 - 57) Badamchian, M., Fagarasan, M. O., Danner, R. L., Suffredini, A. F., Damavandy, H. and Goldstein, A. L.: Thymosin beta(4) reduces lethality and down-regulates inflammatory mediators in endotoxin-induced septic shock. *Int. Immunopharmacol.* 3: 1225–1233, 2003.
 - 58) Cavaasin, M. A., Rhaleb, N. E., Yang, X. P. and Carretero, O. A.: Prolyl oligopeptidase is involved in release of the antifibrotic peptide Ac-SDKP. *Hypertension* 43: 1140–1145, 2004.
 - 59) Lenfant, M., Wdzieczak-Bakala, J., Guittet, E., Prome, J. C., Sotty, D. and Frindel, E.: Inhibitor of hematopoietic pluripotent stem cell proliferation: purification and determination of its structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 779–782, 1989.
 - 60) Rieger, K. J., Saez-Servent, N., Papet, M. P., Wdzieczak-Bakala, J., Morgat, J. L., Thierry, J., Voelter, W. and Lenfant, M.: Involvement of human plasma angiotensin I-converting enzyme in the degradation of the haemoregulatory peptide N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline. *Biochem. J.* 296 (Pt 2): 373–378, 1993.
 - 61) Rhaleb, N. E., Peng, H., Harding, P., Tayeh, M., La-Pointe, M. C. and Carretero, O. A.: Effect of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline on DNA and collagen synthesis in rat cardiac fibroblasts. *Hypertension* 37: 827–832, 2001.
 - 62) Rhaleb, N. E., Peng, H., Yang, X. P., Liu, Y. H., Mehta, D., Ezan, E. and Carretero, O. A.: Long-term effect of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline on left ventricular collagen deposition in rats with 2-kidney, 1-clip hypertension. *Circulation* 103: 3136–3141, 2001.
 - 63) Peng, H., Carretero, O. A., Raij, L., Yang, F., Kapke, A. and Rhaleb, N. E.: Antifibrotic effects of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline on the heart and kidney in aldosterone-salt hypertensive rats. *Hypertension* 37: 794–800, 2001.
 - 64) Yang, F., Yang, X. P., Liu, Y. H., Xu, J., Cingolani, O., Rhaleb, N. E. and Carretero, O. A.: Ac-SDKP reverses inflammation and fibrosis in rats with heart failure after myocardial infarction. *Hypertension* 43: 229–236, 2004.
 - 65) Peng, H., Carretero, O. A., Brigstock, D. R., Oja-Tebbe, N. and Rhaleb, N. E.: Ac-SDKP reverses cardiac fibrosis in rats with renovascular hypertension. *Hypertension* 42: 1164–1170, 2003.
 - 66) Wang, D., Carretero, O. A., Yang, X. Y., Rhaleb, N. E., Liu, Y. H., Liao, T. D. and Yang, X. P.: N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline stimulates angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287: H2099–2105, 2004.
 - 67) Rudin, C. M., Engler, P. and Storb, U.: Differential splicing of thymosin beta 4 mRNA. *J. Immunol.* 144: 4857–4862, 1990.
 - 68) Li, X., Zimmerman, A., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A. and Yin, H. L.: The mouse thymosin beta 4 gene: structure, promoter identification, and chromosome localization. *Genomics* 32: 388–394, 1996.
 - 69) Shires, J., Theodoridis, E. and Hayday, A. C.: Biological insights into TCRgamma delta+ and TCRalpha beta+ intraepithelial lymphocytes provided by serial analysis of gene expression (SAGE). *Immunity* 15: 419–434, 2001.
 - 70) Girardi, M., Sherling, M. A., Filler, R. B., Shires, J., Theodoridis, E., Hayday, A. C. and Tigelaar, R. E.: Anti-inflammatory effects in the skin of thymosin-beta4 splice-variants. *Immunology* 109: 1–7, 2003.
 - 71) Lahn, B. T. and Page, D. C.: Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 278: 675–680,

- 1997.
- 72) Lin, S. C. and Morrison-Bogorad, M.: Developmental expression of mRNAs encoding thymosins beta 4 and beta 10 in rat brain and other tissues. *J. Mol. Neurosci.* 2: 35-44, 1990.
 - 73) Lugo, D. I., Chen, S. C., Hall, A. K., Ziai, R., Hempstead, J. L. and Morgan, J. I.: Developmental regulation of beta-thymosins in the rat central nervous system. *J. Neurochem.* 56: 457-461, 1991.
 - 74) Hall, A. K.: Developmental regulation of thymosin beta 10 mRNA in the human brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 9: 175-177, 1991.
 - 75) Gomez-Marquez, J., Pedrares, J. I., Otero, A. and Anadon, R.: Prominent expression of the actin-sequestering peptide Fx gene in the hippocampal region of rat brain. *Neurosci. Lett.* 152: 41-44, 1993.
 - 76) Voisin, P. J., Pardue, S. and Morrison-Bogorad, M.: Developmental characterization of thymosin beta 4 and beta 10 expression in enriched neuronal cultures from rat cerebella. *J. Neurochem.* 64: 109-120, 1995.
 - 77) Border, B. G., Lin, S. C., Griffin, W. S., Pardue, S. and Morrison-Bogorad, M.: Alterations in actin-binding beta-thymosin expression accompany neuronal differentiation and migration in rat cerebellum. *J. Neurochem.* 61: 2104-2114, 1993.
 - 78) Carpinterio, P., Anadon, R., del Amo, F. F. and Gomez-Marquez, J.: The thymosin beta 4 gene is strongly activated in neural tissues during early postimplantation mouse development. *Neurosci. Lett.* 184: 63-66, 1995.
 - 79) Carpintero, P., Franco del Amo, F., Anadon, R. and Gomez-Marquez, J.: Thymosin beta10 mRNA expression during early postimplantation mouse development. *FEBS Lett.* 394: 103-106, 1996.
 - 80) Anadon, R., Rodriguez Moldes, I., Carpintero, P., Evangelatos, G., Livianou, E., Leondiadis, L., Quintela, I., Cervino, M. C. and Gomez-Marquez, J.: Differential expression of thymosins beta(4) and beta(10) during rat cerebellum postnatal development. *Brain Res.* 894: 255-265, 2001.
 - 81) Vartiainen, N., Pyykonen, I., Hokfelt, T. and Koistinaho, J.: Induction of thymosin beta(4) mRNA following focal brain ischemia. *Neuroreport* 7: 1613-1616, 1996.
 - 82) Cha, H. J., Jeong, M. J. and Kleinman, H. K.: Role of thymosin beta4 in tumor metastasis and angiogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 95: 1674-1680, 2003.
 - 83) Liu, C. R., Ma, C. S., Ning, J. Y., You, J. F., Liao, S. L. and Zheng, J.: Differential thymosin beta 10 expression levels and actin filament organization in tumor cell lines with different metastatic potential. *Chin. Med. J. (Engl)* 117: 213-218, 2004.
 - 84) Lee, S. H., Zhang, W., Choi, J. J., Cho, Y. S., Oh, S. H., Kim, J. W., Hu, L., Xu, J., Liu, J. and Lee, J. H.: Overexpression of the thymosin beta-10 gene in human ovarian cancer cells disrupts F-actin stress fiber and leads to apoptosis. *Oncogene* 20: 6700-6706, 2001.
 - 85) Rho, S. B., Lee, K. W., Chun, T., Lee, S. H., Park, K. and Lee, J. H.: The identification of apoptosis-related residues in human thymosin beta -10 by mutational analysis and computational modeling. *J. Biol. Chem.*, 2005 (in press).
 - 86) Santelli, G., Califano, D., Chiappetta, G., Vento, M. T., Bartoli, P. C., Zullo, F., Trapasso, F., Viglietto, G. and Fusco, A.: Thymosin beta-10 gene overexpression is a general event in human carcinogenesis. *Am. J. Pathol.* 155: 799-804, 1999.
 - 87) Takano, T., Hasegawa, Y., Miyauchi, A., Matsuzuka, F., Yoshida, H., Kuma, K. and Amino, N.: Quantitative analysis of thymosin beta-10 messenger RNA in thyroid carcinomas. *Jpn J. Clin. Oncol.* 32: 229-232, 2002.
 - 88) Chiappetta, G., Pentimalli, F., Monaco, M., Fedele, M., Pasquinelli, R., Pierantoni, G. M., Ribecco, M. T., Santelli, G., Califano, D., Pezzullo, L. *et al.*: Thymosin beta-10 gene expression as a possible tool in diagnosis of thyroid neoplasias. *Oncol. Rep.* 12: 239-243, 2004.
 - 89) Alldinger, I., Dittert, D., Peiper, M., Fusco, A., Chiappetta, G., Staub, E., Lohr, M., Jesnowski, R., Baretton, G., Ockert, D. *et al.*: Gene Expression Analysis of Pancreatic Cell Lines Reveals Genes Overexpressed in Pancreatic Cancer. *Pancreatology* 5: 370-379, 2005.
 - 90) Bao, L., Loda, M., Janmey, P. A., Stewart, R., Anand-Apte, B. and Zetter, B. R.: Thymosin beta 15: a novel regulator of tumor cell motility upregulated in metastatic prostate cancer. *Nat. Med.* 2: 1322-1328, 1996.
 - 91) Bao, L., Loda, M. and Zetter, B. R.: Thymosin beta15 expression in tumor cell lines with varying metastatic potential. *Clin. Exp. Metastasis* 16: 227-233, 1998.
 - 92) Gold, J. S., Bao, L., Ghoussoub, R. A., Zetter, B. R. and Rimm, D. L.: Localization and quantitation of expression of the cell motility-related protein thymosin beta15 in human breast tissue. *Mod. Pathol.* 10: 1106-1112, 1997.