



Expression of heregulin α , erbB2 and erbB3 and their influences on proliferation of gastric epithelial cells

野口, 仁

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2001-02-14

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2526

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002526>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【180】

氏 名・(本 籍) 野口 仁 (東京都)

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博ろ第1787号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の 日 付 平成13年2月14日

【学位論文題目】

Expression of heregulin α , erbB2 and erbB3 and their influences
on proliferation of gastric epithelial cells

(ヘレギュリン α , erbB2 及び erbB3 の発現と胃粘膜細胞の増殖に対する影響)

審 査 委 員

主査 教授 春日 雅人

教授 片岡 徹 教授 黒田 嘉和

緒言

消化管粘膜にはEpidermal growth factor (EGF)及びそのファミリー増殖因子(Transforming growth factor (TGF) α 等)が発現し、これらが消化管上皮に広く分布するEGF受容体(EGFR)のチロシン磷酸化を刺激し、消化管の様々な機能に關与する。

EGFファミリーのもう一つの因子であるheregulin (HRG)はerbB3、erbB4のリガンドで、HRG遺伝子からのスプライシングの違いにより多くのアイソフォームが生じるが、EGF様ドメインのc末端部分の相違によりHRG- α とHRG- β に大別され、消化管ではHRG- α が優位に発現すると考えられている。HRGがerbB3、erbB4に結合するとerbB2とのヘテロ二量体が形成される。erbB2やerbB3も消化管上皮に存在するが、消化管におけるHRGの役割は解明されていない。HRGは様々な細胞の増殖や分化を制御することが知られており、我々は消化管細胞に対してHRG- α がどのような役割を果たしているのか、細胞増殖やmigrationへの影響などについて調べた。

材料と方法

ヒト胃癌細胞株としてKATO-III, MKN-1, MKN-28, MKN-45, MKN-74, TMK-1、ラットの上皮細胞としてRGM-1, IEC-6細胞を用いた。その他対照としてHT-1080細胞、erbB4をトランスフェクトしたCHO細胞を用いた。ヒト胃線維芽細胞は手術により切除した胃粘膜の正常部分を細断し、培養液に静置することによって得られた。

HRG- α として市販のrecombinant HRG- α EGF domain (rHRG- α)を用いた。

各種細胞を用いて、EGFR, erbB2, erbB3, erbB4の蛋白の発現をWestern blot法により、erbB4及びHRG- α のmRNAの発現をRT-PCR法により調べた。

EGFR, erbB2, erbB3の3つの受容体を発現しているMKN-28細胞を10ng/mlのEGF, TGF- α , rHRG- α にて10分間刺激し、各々の受容体のチロシン燐酸化をWestern blot法により調べた。また受容体の二量体形成やPI-3 kinaseのassociationについても同様の方法により調べた。

手術により切除した胃粘膜の正常部分を用いてHRG- α 及びerbB3の免疫染色を行った。

MKN-28細胞を培養中のヒト胃線維芽細胞の上に添加しcocultureを行い、48時間後に回収しerbB3の燐酸化をWestern blot法により調べた。

MKN-28細胞及びRGM-1細胞を様々な濃度のTGF- α やrHRG- α で刺激し、DNA合成に対する影響を $[^3\text{H}]$ -チミジン法により調べた。

細胞のmigrationアッセイはRGM-1細胞の培養の一部に細胞の欠損部分を作り、10 ng/ml rHRG- α またはTGF- α を添加。その欠損の修復過程を経時的に面積の変化を計測することで評価した。

結果

消化管細胞株におけるEGFRファミリーの発現

EGFRはヒト胃癌細胞株のJR-1、MKN-1、MKN-28、MKN-45、MKN-74で高い発現を認め、TMK-1やKATO-IIIでは比較的少なかった。erbB2は全ての細胞で認め、特にTMK-1で高い発現を示した。erbB3はMKN-1以外の細胞で発現していた。ラット消化管上皮細胞にも三つの受容体が発現していた (Figure 1A-C)。erbB4はWestern blotで確認できず (Figure 1D)、RT-PCR法を追加したが、ほぼ全ての細胞でmRNA 発現が認められた (Figure 2A)。

ヒト胃線維芽細胞におけるHRG- α の発現

ヒト胃癌細胞株、ヒト胃線維芽細胞を用いRT-PCR法にて調べたところ、ヒト胃線維芽細胞にのみHRG- α cDNAフラグメントが増幅された (Figure 2B)。

MKN-28細胞におけるerbB3のチロシン磷酸化

EGFR、erbB2、erbB3の三つを発現するMKN-28細胞をrHRG- α 、TGF- α 、EGFで刺激すると、TGF- α 及びEGFはEGFRとerbB2のチロシン磷酸化を促進するが、rHRG- α はerbB2とerbB3だけでなく、EGFRの磷酸化も刺激した (Figure 3)。

リガンド刺激によるEGFRファミリーのheterodimerization

MKN-28細胞でTGF- α とEGFの刺激ではEGFR/erbB2ヘテロ二量

体のみを誘導したのに対し、rHRG- α 刺激ではerbB3/erbB2だけでなくerbB3/EGFRやerbB2/EGFRのヘテロ二量体も誘導した (Figure 4)。

HRG- α によるerbB3とPI-3 kinaseとのassociation

MKN-28細胞でrHRG- α 刺激によるerbB3とPI-3 kinaseのp85 サブユニットが結合したが、TGF- α とEGFでは生じなかった (Figure 5)。

ヒト胃粘膜組織の免疫化学染色

ヒト胃粘膜で、HRG- α は線維芽細胞に対応するlamina propriaの間葉細胞にのみ見い出された。erbB3は上皮細胞のbasolateral sitesに局在、腺管細胞がわずかに染まったが、間葉細胞には認めなかった (Figure 6)。

MKN-28細胞と胃線維芽細胞のcocultureにおけるerbB3のチロシン磷酸化

上皮細胞と間葉細胞をcocultureすると、erbB3のチロシン磷酸化が促進された。それぞれの単独培養ではerbB3のチロシン磷酸化は見られなかった (Figure 7)。

消化管細胞のDNA合成に対するHRG- α の影響

TGF- α もrHRG- α も濃度依存性にMKN-28細胞のDNA合成を刺激したが、TGF- α に比べrHRG- α の増殖活性は低かった。RGM-1細胞で

も同様の結果が得られた (Figure 8)。

胃粘膜上皮のrestitutionに対するHRG- α の影響

ウシ胎児血清は強力にrestitutionを刺激したが、rHRG- α やTGF- α で刺激したRGM-1細胞は対象と比較し、有意な相違は認めなかった (Figure 9)。

考察

この研究では、(1)HRG- α の発現が胃線維芽細胞に局在すること (2)HRG- α は胃癌細胞のerbB3、erbB2だけではなくEGFRのチロシンリン酸化を刺激すること (3)上皮細胞と間葉細胞のcocultureで上皮細胞のerbB3のチロシンリン酸化が刺激されること (4)HRG- α は胃癌細胞株、胃粘膜上皮細胞の増殖を刺激すること、を明らかにした。

これまでHRGとその受容体の消化管での存在が報告されている。我々もいくつかの胃癌細胞株や消化管上皮細胞でerbB2やerbB3を確認し、ヒト胃粘膜の免疫染色でもHRG- α を間質の細胞に、erbB3を上皮細胞に認めた。erbB4はWestern blot法では発現は認めなかった。erbB4のmRNAは今回の実験や過去の報告で胃粘膜上皮で確認されているが、総合的に判断して胃粘膜でのerbB4 蛋白の発現量が低いものと考えられる。erbB3は上皮や末梢神経に、erbB4は中枢神経や心臓、骨格筋などに局在することと言われており、消化管上皮ではerbB3がHRGの主たる受容体と考えられる。

HRG- α 刺激でのMKN-28細胞のEGFR活性化を確認した。これはHRG- α がerbB3/EGFRヘテロ二量体形成を刺激したと考えられる。これまではEGFRとerbB3をトランスフェクトした細胞で β -isoformのみがerbB3/EGFRヘテロ二量体形成を刺激する報告があったが、HRG- α によるこのヘテロ二量体形成は今回初めて確認された。erbB3とerbB2が同時に存在するとHRG- α の結合親和性が増強されることがこの二量体形成に関与すると思われる。さらにHRG- α によるerbB2/EGFRヘテロ二量体形成も観察された。HRG- α により活性化されたerbB3/erbB2ヘテロ二量体が分離し、磷酸化されたerbB2とEGFRが二次的に二量体を形成したものと考えられる。また今回は従来の報告と異なり、TGF- α やEGFによるEGFR/erbB3ヘテロ二量体は見い出せなかった。以前の報告を詳細に検討するとEGFRを過剰発現させた細胞を高濃度のEGFで刺激し、EGFR/erbB3ヘテロ二量体形成を観察している。erbBのリガンドの感受性はerbB 受容体の適切な発現と関連するとの報告がある。HRG- α でのみerbB3とPI-3 kinaseのp85 サブユニットが結合することからも、MKN-28細胞でTGF- α やEGFによるEGFR/erbB3ヘテロ二量体は形成されないと思われる。

これまでにHRGのmRNA発現が唾液腺、胃、小腸にあることがNorthern blot法で示され、HRG- α アイソフォームが消化管間葉で優位とされているが、各臓器でどの細胞がHRG- α を産生するかは明らかではなかった。今回初めてRT-PCR法と免疫染色でHRG- α がヒト胃線維芽細胞に発現することを示した。HRG- α が線維芽細胞に、erbB3が上皮に局在し、上皮と間葉細胞のcocultureでerbB3のチロシン磷酸化

が起こることから、胃粘膜ではHRG- α がerbB3/erbB2ヘテロ二量体を介して作用することが示唆される。

今回HRG- α の濃度依存性の胃癌細胞株や胃粘膜上皮細胞のDNA合成促進も初めて示したが、migrationの刺激は観察されなかった。表皮の創傷モデルでケラチノサイトのmigration刺激が知られているが、器官によりHRG- α が異なる作用を及ぼす理由は現在のところ不明である。

HRG- α は多様な受容体のヘテロ二量体を形成し、胃粘膜で複雑な作用を及ぼすことが考えられる。しかし、DNA合成促進以外にはその作用は今回明らかにできなかった。胃粘膜でのHRGの生物学的作用の理解にはさらなる研究が必要である。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第1790号	氏 名	野口 仁
論文題目	<p>Expression of heregulin α, erbB2 and erbB3 and their influences on proliferation of gastric epithelial cells</p> <p>ヘレギュリンα, erbB2 及び erbB3 の発現と胃粘膜細胞の増殖に対する影響</p>		
審査委員	<p>主 査 春日 雅人</p> <p>副 査 片岡 徹</p> <p>副 査 黒田嘉和</p>		
審査終了日	平成13年 / 月26日		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

Heregulin (HRG) は、Epidermal growth factor (EGF) ファミリーに属する細胞増殖因子で、種々の細胞の増殖分化を制御しているが、消化管におけるその作用はほとんど知られていない。そのため本研究は消化管細胞に対するHRGの役割を調べることを目的としている。

まず、ヒト癌細胞、ラット消化管上皮細胞、ヒト胃線維芽細胞を用いてEGF受容体 (EGFR) ファミリー (EGFR, erbB2, erbB3, erbB4) と HRG- α の発現を調べている。癌細胞、ラット消化管上皮細胞で erbB2 と erbB3 の発現が見られたが、erbB4 の蛋白は認めていない。HRG- α は胃線維芽細胞のみで確認している。ヒトの胃粘膜を用いた免疫組織化学でも erbB3 を胃粘膜上皮細胞に、HRG- α を線維芽細胞に対応する lamina propria の間葉細胞に確認している。胃粘膜でのHRG- α の局在を調べたのは本研究が初めてである。胃癌細胞株 MKN-28 細胞と間葉細胞を coculture することでMKN-28 細胞の erbB3 のチロシン磷酸化の促進を認めている。以上のような研究結果から HRG- α は胃粘膜において間葉 - 上皮間で作用することを示唆している。

EGFR ファミリーはリガンドの刺激により二量体を形成することが知られている。そこでEGFR, erbB2, erbB3 の三つの受容体を発現している MKN-28 細胞を用いて、transforming growth factor (TGF) - α , EGF 及び HRG- α の刺激による受容体のチロシン磷酸化及び受容体の二量体形成を Western blot 法により調べている。TGF- α , EGF 刺激においては EGFR 及び erbB2のみが刺激され、EGFR/erbB2 の二量体のみが見られたのに対し、HRG- α 刺激により erbB3/erbB2, erbB3/EGFR, erbB2/EGFR のすべての組み合わせの二量体を確認している。ここでみられたHRG- α 刺激による erbB3/EGFR の二量体形成は、従来の報告では確認されず形成されないとされていたが、これらの研究はerbB3 と

EGFR のみをトランスフェクトした細胞で調べており、本研究では erbB2 が存在することで erbB3/EGFR の二量体が形成されることを初めて報告したことになる。また HRG- α 刺激による erbB2/EGFR の形成を secondary dimerization によって生じることを説明している。

HRG- α が消化管上皮に対してどのような作用を及ぼすかに関して本研究では、MKN-28 細胞及びラット胃上皮細胞である RGM-1 を用いて細胞増殖作用と restitution について検討している。TGF- α も HRG- α も濃度依存性に両者の DNA 合成を刺激したものの、TGF- α に比べ HRG- α の増殖活性は低かったようである。HRG- α や TGF- α による RGM-1 細胞の restitution は有意な刺激を受けなかったようである。以上の研究結果は HRG- α は胃粘膜において erbB3 を介して間葉 - 上皮間で作用し、上皮の増殖に関与することを示唆している。

本研究の要点をまとめると (1) HRG- α の発現が胃線維芽細胞に局在すること (2) HRG- α は胃癌細胞の erbB3、erbB2 だけではなく EGFR のチロシン磷酸化を刺激すること (3) 上皮細胞と間葉細胞の coculture で上皮細胞の erbB3 のチロシン磷酸化が刺激されること (4) HRG- α は胃癌細胞株、胃粘膜上皮細胞の増殖を刺激すること、である。

本研究は、HRG 及びその受容体について、消化管における発現や作用を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった HRG- α による受容体の二量体形成や消化管細胞に対する作用について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。