

## 近畿大学医学会奨励賞記念講演抄録

## MDCK 細胞を用いた非分泌性膜結合型 Heparin-binding EGF-like growth factors (HB-EGF) における接着複合体の増強効果

杉本圭相

近畿大学医学部小児科学教室

**目的** Heparin-binding EGF-like growth factors (HB-EGF) は Epidermal growth factor (EGF) ファミリーに属する成長因子であり、上皮細胞をはじめ、各臓器にひろく認められる。HB-EGF は細胞膜貫通型の前駆体 (proHB-EGF) として合成され、細胞膜表面でプロテアーゼによる切断 (ectodomain shedding) をうけ、遊離型 HB-EGF (solubleHB-EGF) となる。酵素切断をうけず、細胞表面に部分的に残存した proHB-EGF は隣接する細胞の Epidermal growth factor Receptor (EGFR) と結合し、活性化させる (juxtacrine 活性) が、その機序については不明な点が多い。HB-EGF は細胞増殖や組織障害時における損傷の修復に関与し、その際、膜結合型 HB-EGF 細胞と EGFR を介する juxtacrine 活性が重要な役割を担う。本研究では、変異型 HB-EGF 細胞を用いて、細胞接着および拡散時における Lamellipodia を含む接着複合体形成と接着関連蛋白 (Src, Focal adhesion kinase (FAK), Paxillin) の活性化について、野生株と比較し、膜結合型 HB-EGF の生物学的機能、および juxtacrine 活性について検討した。

**方法** 非分泌性膜結合型 HB-EGF (Mem) および、その変異型を強制発現させた MDCK II 細胞を作成し、野生株 (WT) と各変異株間における形態学的相

違を比較・検討するとともに、Western blotting 法を用いて、経時的に接着関連蛋白発現についての解析を行った。

**結果** 培養 plastic dish 上において、WT と比較して、Mem 細胞は plating 早期から細胞接着の促進と Lamellipodia の伸展を認めた。一方で、EGFR のリン酸化を抑制した変異株である非分泌性膜結合型 HB-EGF 細胞 ( $\Delta$ Mem) ではそれらの変化はほとんど認められなかった。同時期の Western Blotting 解析では、Mem 細胞において、FAK, Paxillin のリン酸化、および  $\beta$ 1-インテグリンの発現が高かった。EGFR 中和抗体を添加した Mem 細胞では、 $\Delta$ Mem 細胞と類似した形態変化を認め、western blotting 解析において FAK および Paxillin のリン酸化抑制を認められた。さらに、細胞間結合を抵抗値から定量化する Transepithelial resistance 法において、WT や  $\Delta$ Mem 細胞に比し、Mem 細胞では早期より有意な上昇が認められた。

**考察** 細胞の接着および運動性は接着関連蛋白の発現と相関し、本研究における Mem 細胞を用いた実験から、HB-EGF がそれらの生物学的機能を促進させるとともに、EGFR を介する Juxtacrine 活性に強い関連性があるものと考えられた。