

論文内容の要旨

氏 名 杉 本 圭 相

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 医 第 9 9 9 号

学位授与の日付 平成 21 年 3 月 21 日

学位授与の要件 学位規程第 4 条第 1 項該当

学位論文題目 Non-cleavage membrane-anchored HB-EGF enhances focal adhesion complexes in MDCK cells  
(MDCK 細胞を用いた非分泌性膜結合型 HB-EGF における接着複合体の増強効果)

論文審査委員 (主査) 教授 竹 村 司

(副主査) 教授 植 村 天 受

(副主査) 教授 重 吉 康 史

【目的】

Heparin-binding EGF-like growth factor (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 (MDCK<sup>mem</sup>) 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の解析を行った。

【結果】

培養 plastic dish 上において、WT と比較して、MDCK<sup>mem</sup> 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 (MDCK<sup>dmem</sup>) では有意差は認めなかった。同時期の Western Blotting 解析では、MDCK<sup>mem</sup> 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 MDCK<sup>mem</sup> 細胞では、MDCK<sup>dmem</sup> 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、細胞間結合を定量する Transepithelial resistance 法では、WT や MDCK<sup>dmem</sup> 細胞に比し、MDCK<sup>mem</sup> 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 MDCK<sup>mem</sup> 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。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2008 年 12 月 日 公表予定	出版物名 Acta Medica Kinki University Vol.33 No.1
	公 表 内 容	2008 年 12 月 日 発行予定
	全 文	

## 論文審査結果の要旨

【背景】 Heparin-binding EGF-like growth factors (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。遊離型 HB-EGF は近隣の細胞表面に存在する Epidermal growth factor Receptor (EGFR) と結合 (paracrine/autocrine) し、細胞の遊走や増殖に働く。しかし、proHB-EGF が生物学的機能を有するには必ずしも遊離型になる必要はなく、その大部分が酵素切断をうけずに膜結合型として、隣接した細胞の EGFR と結合し、その活性 (juxtacrine 活性) を獲得する。Juxtacrine 活性は、細胞-細胞間や細胞-細胞外基質間結合に働くことで、細胞のアポトーシス抑制や細胞生命維持に働くことから、膜結合型 HB-EGF 細胞と EGFR を介する juxtacrine 活性は細胞の接着や細胞形態の維持においても重要な役割を担っているものと考えられる。

【目的】 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いて、lamellipodia を含む細胞形態の変化と接着関連蛋白である 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】 細胞-細胞間における juxtacrine 機能を検討するため、非分泌性膜結合型 HB-EGF および、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 の 2 種を酵素切断をうけないタイプとして MDCK II 細胞に強制発現させ、それぞれ Mem および  $\Delta$ Mem とした。また、juxtacrine 機能との比較する目的で、膜結合能を有しない分泌型 HB-EGF (Sol) を作成した。Plating 後の野生株 (WT) と各変異株における形態学的相違を経時的に比較・検討するとともに、Western blotting 法を用いて、接着関連蛋白発現の解析を行った。

【結果】 ectodomain shedding の強力な誘導物質である phorbol ester (PMA) により刺激した Mem および  $\Delta$ Mem 細胞の培養液中に、抗ヒト HB-EGF 抗体にて、分泌型 HB-EGF を示すバンドを認めなかった。さらに、回収した培養液を無血清・静止状態の MDCK 細胞に添加し、EGFR のリン酸化を検討した結果、Sol の培養液にて EGFR リン酸化を認めた一方で、Mem および  $\Delta$ Mem 細胞の培養液の添加では、そのリン酸化を認めなかったことから、これら 2 種の細胞が非分泌性膜結合型 HB-EGF 細胞として機能することを証明した。

WT および変異型 HB-EGF 細胞を培養 plastic dish 上に plating し、最も細胞形態変化を認めた 3 時間後において顕微鏡下にて観察した。WT では大部分での細胞が接着し、一部の細胞にて lamellipodia の形成を認めたが、Mem 細胞は plating 後、早期より細胞接着の促進と lamellipodia の伸展を認めた。 $\Delta$ Mem 細胞では一部の細胞で接着が遅延し、lamellipodia の形成が完全に抑制された。plating 後の細胞を回収し、western blotting 法にて、経時的に接着関連蛋白のリン酸化を検討したところ、WT に比し、Mem 細胞において、plating 早期より FAK, Paxillin のリン酸化発現が有意に高かったが、Src のリン酸化は有意差を認めなかった。また、Mem 細胞における  $\beta$ 1-インテグリンの upregulation を認めた。

膜結合型 HB-EGF 細胞における EGFR の関与を検討するため、EGFR 中和抗体を Mem 細胞に添加した実験を施行した。 $\Delta$ Mem 細胞と類似した形態変化、すなわち細胞接着時間の遅延や lamellipodia 形成の抑制を認め、western blotting 解析でも FAK および paxillin のリン酸化抑制を認めたことから、膜結合型 HB-EGF が EGFR へ結合し、その後、EGFR がリン酸化することは細胞の接着に重要なプロセスであると同時に、FAK および paxillin リン酸化は細胞接着後に認める lamellipodia の形成に関与していることを示唆する結果となった。細胞接着およびその後の接着複合体形成における Src の関与を検討するため、さらに、Src リン酸化の阻害剤である PP2 を、Mem 細胞へ EGFR 中和抗体と同時に加えた実験では、EGFR 中和抗体を加えた群と比較し、さらに細胞接着が抑制されるとともに、lamellipodia の形成が完全に抑制された。興味深いことに western blot 解析では、PP2 添加群における Src リン酸化がそれほど抑制されておらず、しかも WT に比し、Mem 細胞では中和抗体および PP2 添加群のいずれにおいても EGFR リン酸化は Src 依存性を示す、Tyr845 のリン酸化発現が有意に認められた。この結果より、Mem 細胞では、細胞表面に膜結合型 HB-EGF が存在することで、 $\beta$ 1-インテグリンの upregulation を生じ、それが Src のリン酸化を促進させていることが推測された。さらに Src リン酸化は下流シグナルである FAK および paxillin リン酸化を促進させ、接着複合体形成に関連しているものと考えられた。Src のリン酸化はおそらく、今回検討した時間よりも、より早期に発現の変化を認めていることが予想され、今後、spreading した直後からの数分単位での検討が必要であると考えられた。

細胞間結合を定量する方法として Trans-epithelial resistance 法を用いたが、膜結合型 HB-EGF と EGFR の結合および、EGFR リン酸化により細胞間接着が強固となることが予測された Mem 細胞では測定早期から抵抗値の有意な上昇を認め、WT や ΔMem 細胞の抵抗値と有意な差を認めたことから、細胞間接着およびそれを維持するには、膜結合型 HB-EGF の存在とそれらが EGFR と結合し、EGFR リン酸化を促す活性、すなわち juxtacrine 活性が関与していることが示唆された。

【考察】今回の実験系では、特に細胞-細胞間における juxtacrine 機能を検討する目的で変異型である膜結合型 HB-EGF を作成し、細胞の接着および、その後の接着複合体形成における膜結合型 HB-EGF が、最終的に接着関連蛋白のリン酸化、Src 依存性 EGFR リン酸化を促進させ、野生株と比較し、ダイナミックな細胞形態変化に関連している結果を得た。細胞のアポトーシス抑制や細胞生命維持に関与する HB-EGF、特に膜結合型 HB-EGF の生物学的意義を解明することは生体の正常状態の維持という点を考慮した場合に非常に重要なプロセスであると考えられ、非分泌性膜結合型 HB-EGF を用いた本研究が、今だ不明な点が多い juxtacrine 活性の生物学的意義をさらに解明するうえで非常に重要な役割をもつものとして考えられる。

氏名	吉田健史
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	医第1000号
学位授与の日付	平成21年3月21日
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当
学位論文題目	Matuzumab and cetuximab activate the epidermal growth factor receptor but fail to trigger downstream signaling by Akt or Erk (EGFR 抗体療法による EGFR 活性化と下流シグナル阻害)
論文審査委員 (主査)	教授 中川和彦
(副主査)	教授 植村天受
(副主査)	教授 奥野清隆