

論 文 要 旨

Hepatocyte growth factor stimulates the migration of gastric epithelial cells by altering the subcellular localization of the tight junction protein ZO-1

肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor)は、
タイトジャンクション蛋白 ZO-1 の細胞内局在を
変化させ、胃上皮細胞の遊走を促進する

那須 雄一郎

【序論および目的】 (適宜、項目をたてて、必ず2頁で記載する)

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF)は劇症肝炎患者血漿から単離された肝再生を強力に促進する増殖因子で、上皮細胞、血管内皮細胞および一部の間葉系細胞に対して、細胞増殖促進作用のみならず、細胞遊走、形態形成促進など多彩な作用を発揮する。また、HGFは、障害肝だけでなく傷害消化管粘膜の重要な再生・修復因子である。特に、傷害直後に欠損領域に近接する上皮細胞が、細胞増殖よりも早い段階に欠損部分を覆うように遊走する epithelial restitution という現象は修復過程に必須であるが、その分子機構の詳細は明らかとなっていない。本研究は、ヒト胃粘膜上皮細胞を用いて HGF の細胞遊走能促進の分子機構における役割を、特にタイトジャンクション蛋白 (tight junction protein; TJ)に着目して検討した。

【材料および方法】

ヒト胃粘膜上皮細胞 MKN74 に HGF (0, 10, 100 ng/ml)を添加し、下記の検討を行った。

- (1) 細胞遊走能 (migration)に及ぼす影響を、8 μ m pore を有する cell culture insert (Boyden chamber 法) および潰瘍修復モデルである Oris migration assay kit (Wounding assay)を用いて検討した。また、TetraColor ONE 及び BrdU ELISA 法を用いて細胞増殖能に及ぼす影響を検討した。
- (2) RT-PCR、ウェスタン法を用いて TJ である claudin-1、-3、-4、-7、occludin および ZO-1 発現に及ぼす影響を検討した。さらに、細胞膜および細胞質画分における TJ 発現を解析し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて免疫蛍光染色による TJ の細胞内局在に及ぼす影響を検討した。
- (3) 共免疫沈降法を用いて、ZO-1 と occludin の interaction に及ぼす影響をウェスタン法を用いて検討した。さらに、ZO-1 と OCLDN のリン酸化についても検討した。
- (4) 高分子である FITC-Dextran (4kDa)を用い、細胞膜の透過性について検討した。

【結果】

- (1) HGF は MKN74 細胞の増殖に影響を及ぼさなかったが、細胞遊走能を用量依存性に 1.7-2.0 倍促進した ($p < 0.05$)。
- (2) HGF は、claudin-1, 3, 4, 7, occludin, ZO-1 の mRNA およびタンパク発現に影響を及ぼさなかった。細胞膜に局在する claudin-4 および occludin に影響を及ぼさなかったが、細胞膜画分の ZO-1 を減少させ、細胞質画分の ZO-1 を増加させた。同様に蛍免疫染色でも、細胞膜の ZO-1 は減少した。
- (3) HGF は ZO-1 と OCLDN の interaction を減少させ、occludin のチロシンリン酸化を誘導した。
- (4) HGF は高分子デキストランに対する細胞膜透過性に変化を及ぼさなかった。

【結論及び考察】

HGF は傷害粘膜の修復過程に重要な役割を有している。今回我々は、HGF が傷害消化管粘膜の再生・修復過程において、粘膜上皮細胞の TJP ZO-1 の細胞内局在をダイナミックに変化させ、epithelial restitution に影響を与えることを明らかにした。

本研究で用いたヒト胃粘膜上皮細胞 MKN74 では、HGF 添加によってその特異的受容体 c-Met のチロシンリン酸化が誘導され、細胞遊走が有意に亢進したが、細胞増殖には影響はみられなかった。このことは、MKN74 細胞が粘膜上皮の傷害直後に誘導される epithelial restitution の分子機構を解明するのに適した in vitro モデルであることを示している。

今回の検討では、HGF は claudin-1, 3, 4, 7, occludin, ZO-1 の mRNA およびタンパク発現に影響を及ぼさなかったが、ZO-1 の細胞内局在を細胞膜から細胞質に移動させた。分子レベルにおいては、HGF は occludin のチロシンリン酸化を誘導し、ZO-1 と occludin の interaction を減少させた。一方、HGF による ZO-1 の細胞内局在の変化が細胞間透過性に与える影響も検討したが、HGF は高分子デキストランに対する粘膜透過性には影響を及ぼさなかった。

Tight junction では多くの TJP が複合体を形成しており、それらの TJP の相互作用によって、透過性や細胞遊走など、tight junction の重要な機能が調節されている。ZO-1 は、TJP 複合体の細胞膜内の裏打ちタンパクであり、細胞運動に関与する細胞内骨格への結合やシグナルタンパクとしても重要な役割を果たしていることが報告されている。従って、ZO-1 の細胞内局在の変化は、細胞分散及び細胞遊走 (migration) に関与していることが示唆される。

以上の結果から、HGF は傷害消化管粘膜の再生・修復過程において粘膜上皮細胞における ZO-1 の細胞内局在を変化させ、epithelial restitution をもたらしていることが示唆された。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 204号	学位申請者	那須 雄一郎
審査委員	主査	夏越 祥次	学位
	副査	武田 泰生	副査
	副査	古川 龍彦	副査
			堀内 正久

Hepatocyte growth factor stimulates the migration of gastric epithelial cells by altering the subcellular localization of the tight junction protein ZO-1.

(肝細胞増殖因子は、タイトジャンクション蛋白 ZO-1 の細胞内局在を変化させ、胃上皮細胞の遊走を促進する)

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) は上皮細胞、血管内皮細胞および一部の間葉系細胞に対して、細胞増殖促進作用のみならず、細胞遊走、形態形成促進など多彩な作用を発揮する。また、HGF は傷害消化管粘膜の重要な再生・修復因子であり、特に、傷害直後に誘導される epithelial restitution に必須の因子であるが、その分子機構の詳細は明らかでない。本研究は、ヒト胃粘膜上皮細胞 MKN74 を用いて HGF の細胞遊走能促進の分子機構における役割を、特にタイトジャンクション蛋白 (tight junction protein; TJ) に着目して明らかにすることを目的とした。細胞遊走 (migration) は Boyden chamber 法および Oris migration assay により、細胞増殖は TetraColor ONE assay および BrdU ELISA 法により評価し、遺伝子および蛋白発現は、それぞれ RT-PCR およびウェスタン法により行った。また、TJP の細胞内局在は免疫蛍光染色法により、細胞膜の透過性は FITC-Dextran (4KDa) を用いて測定した。

その結果、本研究で以下の知見が得られた。

- (1) HGF は MKN74 細胞の cMET のチロシンリン酸化を誘導し、用量依存性に細胞遊走能を約 1.7-2.0 倍有意に促進した ($p < 0.05$) が、細胞増殖には影響を及ぼさなかった。
- (2) HGF は claudin-1、-3、-4、-7、occludin、ZO-1 の遺伝子および蛋白発現に影響しなかったが、添加 1 時間後に細胞膜の ZO-1 を減少させた。この際、HGF は細胞膜画分の ZO-1 を減少させ、細胞質画分の ZO-1 を増加させたことから、HGF は ZO-1 を細胞膜から細胞質へ移動させたと考えられた。
- (3) ZO-1 と occludin の interaction を免疫疫沈降法により検討したところ、HGF はその interaction を減弱させた。この機序として、HGF による occludin のチロシンリン酸化が関与すると考えられた。また、HGF は tight junction の重要な機能であるバリアー機能 (細胞膜の透過性) に影響を及ぼさなかった。

以上の結果から、HGF は傷害消化管粘膜の再生・修復過程において粘膜上皮細胞における ZO-1 の細胞内局在を変化させ、epithelial restitution をもたらしていることが示唆された。

本研究では、ヒト胃粘膜上皮において HGF が occludin のチロシンリン酸化を介して、ZO-1 と occludin の interaction を減少させ、tight junction のバリアー機能の低下を起さず、細胞遊走を促進させたという一連の分子メカニズムを初めて明らかにした。今後傷害消化管に HGF を用いた臨床応用を進める上で極めて重要な知見である。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 204 号		学位申請者	那須 雄一郎
審査委員	主査	夏越 祥次	学位	博士 (医学)
	副査	武田 泰生	副査	東 美智代
	副査	古川 龍彦	副査	堀内 正久

主査および副査の 5 名は、平成 24 年 8 月 27 日、学位申請者 那須 雄一郎君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問 1) HGF はどのような細胞から分泌されるのか。

(回答) 線維芽細胞や炎症細胞などで産生され、血小板も HGF を含んでいる。産生細胞から一本鎖の pro-HGF として分泌され、肝細胞で産生される HGF activator により 2 本鎖の活性型 HGF へ変換される。

質問 2) HGF の遊走能を定量化しているが、コントロール群の 100 とはどういう意味か。

(回答) HGF による細胞遊走能促進作用をわかりやすくするために、HGF 無添加のコントロール群で遊走した細胞数を 100 とし、HGF 添加時の遊走細胞数を相対的に算出して表示した。

質問 3) 細胞遊走、細胞増殖を検討した実験で細胞密度が違うのはどうしてか。

(回答) 細胞密度がコンフルエントな状態では細胞増殖は起こりにくい。細胞増殖と細胞遊走が評価できる細胞密度である、それぞれ 2×10^3 cells in 0.1 ml/well および 2×10^5 cells in 0.5 ml/well で実験を行った。

質問 4) 細胞増殖を他の方法で検討しなかったのか。

(回答) 他の方法では検討していないが、本研究では生細胞内の脱水素酵素活性を測定する TetraColor ONE assay と核内へのヌクレオシド取り込みを測定する BrdU ELISA assay の 2 つの機序の異なる方法で評価した。

質問 5) HGF による細胞遊走は 10 ng/ml が最大で、100 ng/ml では少し減少しているがなぜか。

(回答) 理由はよくわからないが、細胞増殖でもそのようなことがみられ、10 ng/ml と 100 ng/ml 間に有意差はない。今回は、細胞遊走に及ぼす影響は 10 ng/ml の濃度で、tight junction に及ぼす影響はより確実な効果を見るために HGF 100 ng/ml の濃度で行った。

質問 6) ZO-1 タンパクの細胞膜画分と細胞質画分の検討について、その分画法は適切か。

(回答) 本研究では、界面活性剤不使用の分画キット (ProteoExtract Transmembrane Protein Extraction Kit) を用い、プロトコルに従いタンパクの細胞膜・細胞質分画を行った。ご指摘のように、この kit の成分は開示されていないため、既知の膜タンパクと細胞質タンパクを positive control として正しく分離できているか検証すべきであった。

質問 7) 免疫蛍光染色について、HGF 投与後一時間後一過性に ZO-1 の細胞内局在が変化するとあるが、細胞遊走能をもっと早い段階で評価すべきではないか。また、観察している細胞密度は高くないか。

(回答) 今回使用した MKN74 細胞では、その遊走を確認するのに少なくとも 24 時間は必要であった。HGF 投与 1 時間後という早い時間で ZO-1 の局在が変化するが、その後、細胞内骨格が変化し、最終的に細胞遊走が生ずるまでには若干の時間が必要だと考えている。免疫蛍光染色する際、細胞は密な状態ではなく、島状の集合体を形成する程度の疎な状態で培養しており、遊走しやすい環境での評価と考える。

質問 8) 免疫蛍光染色について、細胞膜から移動した ZO-1 は、細胞核に移動している可能性はないか。

(回答) 写真を観察すると HGF 投与 30 分後に ZO-1 が核に集合しているような印象もあるが、その点について詳細な検討を行っていない。

質問 9) 免疫沈降法に関して、使用した試薬、また、その免疫複合体を回収方法する方法は適切か。

(回答) 抗原-抗体反応した免疫複合体を吸着するために protein A が固相化されたアガロースビーズを使用した。吸着した免疫複合体の溶出及び回収方法には、 β メルカプトエタノール含有の SDS ローディングバッファーを使用した。同一抗体 (ZO-1 抗体、occludin 抗体) で免疫沈降・検出することで、検体間の回収効率に差がないことを確認した。

質問 10) cMET のリン酸化の評価は 1 時間後まででいいのか。また、バンドが 2 つある理由は？

(回答) cMET のリン酸化は HGF 添加後数分で起こるので、それが生理活性の発現には重要と考えており、1 時間後までしか検討していない。2 つのバンドが検出された原因について、タンパクの回収過程等による degradation の可能性を考えるが、詳細な検討をしておらず不明である。

質問 11) Tight junction protein の遺伝子発現を RT-PCR で検討しているが、real time PCR で検討すべきでは。

(回答) まずウェスタン法でタンパク発現が亢進していることが確認できたので、それを遺伝子発現から裏付けるため、簡易な RT-PCR で検討した。ご指摘のように real time PCRの方が定量的に評価できる。

質問 12) 細胞の Paracellular permeability について、HGF を上部下部どちらの well に添加したか。単層細胞層の形成をどのように確認したか。単層細胞層形成した状態では、遊走する細胞の透過性と言えるのか。

(回答) HGF を上下両方の well に入れて Paracellular permeability を検討した。単層細胞層を形成したかどうかは実際に顕微鏡で見て確認した。高密度のコンフルエントな状態というよりは、一層の細胞層を形成するサブコンフルエント状態で検討した。実際、細胞が遊走しやすいような細胞が疎な状況での、バリア機能を評価する方法はない。よって今回の検討で言えることは、遊走を起こす周囲の単細胞層の透過性が変化しないこと、つまりバリア機能が低下しないことを確認したことになる。粘膜の再生修復にとっては理にかなった結果である。

質問 13) Tight junction 以外の adherence junction や gap junction などへの影響はどうか。

(回答) 今回は上皮細胞にとって特に重要であり、かつ強固な接着機構である tight junction に絞って検討した。今回、adherence junction の構成タンパクである E-cadherin への影響を免疫蛍光染色で検討したが、検出が困難だった。HGF が adherence junction, desmosome, gap junction に影響を及ぼすという報告はある。

質問 14) 消化管傷害部位の周辺の細胞や正常の胃上皮細胞でも cMET は発現しているのか。

(回答) 正常の細胞に cMET は発現しており、細胞の基底側に発現している。傷害周囲の粘膜上皮では正常に比べ cMET は mRNA レベルで発現が亢進する。

質問 15) ヒトの胃癌細胞を使用した検討であるが、正常胃粘膜上皮と同じと考えてよいか。

(回答) ヒト胃粘膜上皮細胞を使用する実験系が確立されていないため、ヒト胃の中分化型腺癌である MKN74 細胞を使用した。HGF による細胞増殖促進作用はなく、細胞遊走を促進するという特徴があり、epithelial restitution の分子機構を解析するに適した in vitro モデルと考えた。

質問 16) HGF を今後臨床的にどのように発展させていくか。

(回答) 今回は、HGF の胃上皮細胞の遊走に及ぼす影響を検討した。HGF は胃の粘膜上皮の修復・再生を促進するが、臨床では胃潰瘍治療には極めて効果のあるプロトンポンプ阻害薬などがすでに用いられているので、胃潰瘍への投与は考えていない。炎症性腸疾患については、現在の治療では粘膜修復が十分でないので HGF の臨床応用を検討している。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。