



Title	Possible role of co-expression of CD9 with membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor and amphiregulin in cultured human keratinocyte growth
Author(s)	乾, 重樹
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40067">https://hdl.handle.net/11094/40067</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照ください</a> 。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	いぬい 重 樹
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 0 3 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 9 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科内科系専攻
学 位 論 文 名	Possible role of co-expression of CD9 with membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor and amphiregulin in cultured human keratinocyte growth (培養ヒトケラチノサイトの増殖における膜結合型ヘパリン結合性 EGF 様増殖因子およびアンフィレグリンと CD 9 の共発現の役割)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉川 邦彦  (副査) 教 授 谷口 直之    教 授 中村 敏一

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

正常ヒトケラチノサイトの増殖は様々な増殖因子により調節されているが、特に EGF ファミリーは重要である。EGF ファミリーのうち、TGF- $\alpha$ 、アンフィレグリン (AR)、ヘパリン結合性 EGF 様増殖因子 (HB-EGF) は正常ヒトケラチノサイトに対してオートクライン増殖因子として働く。一方、膜結合型 HB-EGF (proHB-EGF) のジャクスタクライン活性は他の膜蛋白である CD 9 により強く増強される。そこで、proHB-EGF のみならず他の膜結合型 EGF ファミリー増殖因子と CD 9 が相互作用するか、また正常ヒトケラチノサイトの増殖におけるその役割を検討した。

### 【方法ならびに成績】

- 1) MCDB153無血清培地にて培養した正常ヒトケラチノサイトの CD 9 の発現を検索した。ノーザンブロットにて 1.4kb の CD 9 mRNA を認め、さらに細胞表面をビオチン化の後 1% Triton X-100バッファーで可溶化し免疫沈降したところ、24kD の CD 9 蛋白を認めた。
- 2) 培養ヒトケラチノサイトを抗 CD 9 抗体にて免疫染色したところ細胞表面が陽性に染色された。
- 3) 可溶型 HB-EGF の活性を阻害せず、proHB-EGF の活性を阻害することが知られている抗 CD 9 抗体の正常ヒトケラチノサイトの増殖への影響を検討した。その結果、抗 CD 9 抗体はケラチノサイトの増殖を抑制し、その効果は抗 EGF レセプター抗体には及ばないものの、抗 HB-EGF 中和抗体よりも強かった。このことから CD 9 は proHB-EGF だけではなく、他の膜結合型 EGF ファミリーの活性をも増強している可能性が示唆された。
- 4) 3) の可能性を検討するため、ジャクスタクライン活性のアッセイを行った。マウス L cell に膜結合型の TGF- $\alpha$  (proTGF- $\alpha$ )、アンフィレグリン (proAR)、HB-EGF の遺伝子を一過性にトランスフェクトし、さらに CD 9 の遺伝子をコトランスフェクトした後、5%ホルマリンで固定した。これらと EGF レセプター依存的に増殖する EP170.7細胞をコカルチャーし、EP170.7細胞への [ $^3$ H]-チミジンの取り込みを測定し、この系でのジャクスタクライン活性のアッセイを行った。その結果、CD 9 の共発現により proHB-EGF のみならず proAR の活性も著明に増強された。他方 proTGF- $\alpha$  の活性は変化しなかった。
- 5) 正常ヒトケラチノサイトにおいて 4) で示した CD 9 と proHB-EGF および proAR が複合体を形成しているかどうかを免疫沈降にて検討した。細胞表面をビオチン化の後、10mM CHAPS バッファーで可溶化、抗 CD 9 抗体

で沈降したところ24kDのCD9とともに20-24kDの沈降物を認め、これらのバンドはリポフェクチンにてproHB-EGF遺伝子をトランスフェクトしたケラチノサイトでは著明に増強された。抗HB-EGF抗体にて同様に免疫沈降したところ、proHB-EGF遺伝子のトランスフェクションによって20-24kDの沈降物のバンドは増強した。また、proAR遺伝子のトランスフェクションによっても抗CD9抗体の20-24kDの沈降物は著明に増強された。抗AR抗体にて免疫沈降したところ、proAR遺伝子のトランスフェクションによって20-24kDの沈降物のバンドは増強した。TGF- $\alpha$ についても同様の実験を行ったが抗CD9抗体の沈降物はproTGF- $\alpha$ のトランスフェクションによって増強しなかった。これらの結果から正常ヒトケラチノサイトにおいてCD9とproHB-EGFおよびproARが複合体を形成していることが示唆された。

#### 【総括】

ヒトケラチノサイトの増殖においてはEGFファミリーが重要な役割を持つことが知られていたが、これまで主に可溶性EGFファミリーによるオートクライン、パラクラインについて研究されてきた。本研究はヒトケラチノサイトの増殖に膜結合型増殖因子によるジャクスタクラインが関与していることを明らかにした。また、CD9が従来知られていた膜結合型HB-EGFのみならず膜結合型ARの活性をも増強し、これらの共発現がヒトケラチノサイトの増殖において重要であることを明らかにした。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、正常ヒトケラチノサイトの増殖における、膜結合型ヘパリン結合性EGF様増殖因子とアンフィレグリンと共発現するCD9の役割について検討したものである。

本研究では抗CD9抗体が培養正常ヒトケラチノサイトの増殖を抑制することから、ジャクスタクライン増殖の存在を示している。従来、正常上皮細胞でジャクスタクライン増殖が存在するかどうかは知られていなかったもので、これは新知見であり評価できる。また、CD9がすでに知られている膜結合型ヘパリン結合性EGF様増殖因子の活性だけでなく膜結合型アンフィレグリンの活性をも増強することを独自のアッセイ系を用いて明らかにしており、オリジナリティーある研究と言えよう。また、それらの分子の相互作用が正常ヒトケラチノサイトにおいても存在することを免疫沈降によって示唆している。

ケラチノサイトが増殖の亢進を示す尋常性乾癬は未だその原因、根本的治療が明らかでない。膜結合型ヘパリン結合性EGF様増殖因子とアンフィレグリン、そしてそれらのコファクターであるCD9の役割を示した本研究は乾癬の病態解明への一つの手がかりとなろう。さらにはその治療法開発にも寄与することが期待できる研究であり、学位に値すると思う。