The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Role of Stem Cell Factor and c-kit Signaling in Regulation of Fetal Intestinal Epithelial Cell Adhesion to Fibronectin
Author(s)	清水, 光男
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43270
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏　　名　清水光男（しみずみつお）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学位記番号　第　16584　号

学位授与年月日　平成13年11月30日

学位授与の要件　学位規則第4条第2項該当

学位論文名　Role of Stem Cell Factor and *c-kit* Signaling in Regulation of Fetal Intestinal Epithelial Cell Adhesion to Fibronectin
（胎児腸管上皮細胞のフィブロネクチン接着調節における幹細胞因子と *c-kit* を介したシグナル伝達系の役割）

論文審査委員　（主査）
教　授　清野　宏

（副査）
教　授　岡田　正　　教　授　宮坂　昌之

論文内容の要旨

【目的】

小腸の腸管上皮細胞（intestinal epithelial cell:IEC）は、陰窩で未成熟なクリプト細胞より分裂増殖した後、絨毛先端へ移動しつつ発達分化する。未成熟なIECの活発な分裂増殖は種々の要因により調節されており、その中でも細胞－基底膜層（細胞外マトリックス）間、細胞－細胞間の相互作用が重要である。近年、IECの重要性については、物理的バリアーとしての防御機構だけではなく粘膜免疫装置としても注目されるようになってきた。小腸の創傷治癒や粘膜免疫機能にはIECの接着、増殖、移動が重要な要因となる。最近では、基底膜層を隔てて接している繊維芽細胞の産生する肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor：HGF）がIEC上の受容体 *c-met* を介しその増殖を調節し恒常性維持に重要であることが示され、細胞間のクロストークの重要性を示す報告も多い。しかしながら、IECの増殖、移動の足場となる基底膜への接着調節についての解析報告は見あたらない。そこで、本研究ではマウス胎児の小腸から調製した初代培養IECを材料として基底膜への接着調節機構の解明を目的とした。

【方法ならびに成績】

1）IECの調製

妊娠13.5～15.5日目のC3H/HeNマウス胎児から小腸を取り出し、コラゲナーゼ消化により繊維芽組織から上皮細胞層をチューブ状で分離した後、トリプシン消化によりIECを調製した。上皮細胞、リンパ系細胞の特異的マーカー（cytokeratin、CD3、CD45R/B220）に対する抗体染色、上皮細胞、繊維芽細胞の特異的mRNA（cytokeratin、E-cadherin、vimentin）のRT-PCR検出により、調製したIECに他の細胞混入が無いことを確認した。

2）IECの基底膜成分に対する接着

胎生13.5、14.5、15.5日目それぞれの胎児小腸由来IECについてフィブロネクチン、Ⅳ型コラーゲン、ラミニンへの接着試験を行った。次に、マウス胎児小腸繊維芽細胞に発現が認められ、幹細胞や未成熟細胞の分化や細胞生物学的、免疫学的機能を調節するサイトカインとして知られている幹細胞因子（stem cell factor：SCF）の接着に対する効果を検討した。その結果、胎生13.5日目のIECは、小腸の陰窩基底膜に集積されているフィブロネクチンへの接着性が特に高く、その接着細胞数はSCF刺激によって2倍以上に増加した。そこで更に、胎生13.5日目のIECを材料にフィブロネクチンへの接着に関して詳細な解析を進めた。上皮細胞の増殖や分化に重要とされているHGF、上皮増殖因子（epidermal growth factor：EGF）、角質細胞増殖因子（keratinocyte growth factor：KGF）が

IECのフィブロネクチン接着に影響するか検討したが、これらの増殖因子に対しては反応性は認められなかった。一方、SCF中和抗体を用いた試験により、SCF特異的な刺激によってのみフィブロネクチン接着細胞数が増加することを確認した。

3）SCF刺激によるIECのフィブロネクチン接着とインテグリン発現

SCF未添加培地中でフィブロネクチンへ接着しなかったIEC細胞群を回収し、これらについてSCF存在下で細胞接着試験を行った。その結果、SCFにより増大したフィブロネクチンへの接着は、接着能を発現していないIECがSCF刺激により接着能を獲得する事が原因であることが判明した。更に、抗α5β1インテグリン（VLA-5）抗体とRGDペプチドによりIECのフィブロネクチン接着は特異的に阻害された。一方、抗VLA-5抗体によりIECのインテグリン発現をフローサイトメトリー分析した結果、SCF刺激によるVLA-5発現量の変化は認められなかった。

4）SCF刺激による*c-kit*を介したシグナル伝達とVLA-5の接着機能

SCF刺激後のIECの細胞溶解成分をSCF受容体*c-kit*の特異的抗体と免疫沈殿させSDS-PAGE分画後、抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。その結果、刺激後数分で分子量145キロダルトンのp145$^{c\text{-}kit}$のチロシン残基リン酸化が検出された。また、SCF刺激によるp145$^{c\text{-}kit}$リン酸化とVLA-5のフィブロネクチンへの接着機能発現はリン酸化阻害剤により阻止された。これらの結果より、SCFが受容体*c-kit*に結合することで受容体チロシン残基がリン酸化されシグナル伝達系が活性化され、それに続くインサイドアウト/シグナルによりVLA-5は接着機能を発現することが明らかになった。

【総括】

マウス胎児小腸由来の初代培養IECを用いて、未成熟IECと陰窩基底膜に高濃度集積されているフィブロネクチンとの接着機構について検討した。その結果、SCF刺激による*c-kit*を介したシグナル伝達系により細胞表面に発現しているVLA-5のフィブロネクチン接着機能が調節されていることを初めて明らかにした。また、基底膜層を隔てて存在する繊維芽細胞の産生するSCFがこのパラクリン機構を成立させていると考えられ、未成熟IECの基底膜への接着調節機構においては腸管局所、特にIECの分裂増殖部位である陰窩での繊維芽細胞とのクロストークが重要であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

小腸の腸管上皮細胞（intestinal epithelial cell, IEC）は、陰窩で未成熟なクリプト細胞から増殖・移動しつつ発達分化する。このIECの重要性については物理的バリアーとしての防御機構だけではなく、粘膜免疫装置としても注目されるようになってきた。IECの増殖、移動が腸管内での様々な機能発現に重要であるにも関わらず、足場となる基底膜とIECの接着調節についての解析はほとんど進んでいない。

本研究においては、まず最初に、マウス胎児小腸より高純度にIECを調製するチューブ状上皮層分離法を開発した。本法により調製したIECを材料に、陰窩基底膜に集積されるフィブロネクチンとの接着調節について検討した。そして、その接着がIECの発現するインテグリンVLA-5依存的であり、VLA-5は幹細胞因子（stem cell factor, SCF）により活性化されフィブロネクチンへの接着能を発現することを見出した。また、このVLA-5活性化は、SCFの受容体である*c-kit*のチロシン残基のリン酸化からはじまるシグナル伝達系に続くインサイドアウト/シグナルによるものであることを明らかにした。更に、基底膜を隔てて存在する繊維芽細胞の産生するSCFが未成熟IECの5*c-kit*を介したシグナル伝達系を調節していることを示唆した。

本研究は、IECの基底膜への接着がインサイドアウト/シグナルにより調節されていることを初めて明確に示し、その調節機構についても繊維芽細胞由来SCFとIEC発現の*c-kit*がシグナル伝達系に関与することを示唆した。腸管局所の細胞間クロストークがIEC増殖分裂部位である陰窩基底膜とIECとの接着に重要であることを明確にした点において、極めて優れた研究であり、博士（医学）の学位授与に値すると考えられる。