



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
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 5 8 4 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 $\alpha 5 \beta 1$ 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キログルトンの p145^{*c-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-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 *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。