Osaka University Knowledge Archive

Title	細胞周期におけるHB-EGFの動態解析
Author(s)	土岐, 富士緒
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45423
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【3】

氏　　名	土　岐　富士緒（とき ふじお）
博士の専攻分野の名称	博　士（保健学）
学　位　記　番　号	第　18999　号
学位授与年月日	平成16年9月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科保健学専攻
学　位　論　文　名	**細胞周期におけるHB-EGFの動態解析**
論文審査委員	（主査） 教　授　松中　成昭 （副査） 教　授　川野　　淳　　教　授　山村　　卓

論文内容の要旨

〔　目　　的　〕HB-EGFはI型の膜蛋白質（proHB-EGF）として合成され、形質膜表面においてメタロプロテアーゼによってシェディングを受け、遊離型増殖因子（HB-EGF）とC末端側の断片（HB-EGF-C）とに二分される。HB-EGFは細胞外空間に遊離後、他の細胞もしくは自身のEGF受容体と結合してチロシンキナーゼの活性化とその後に続く増殖シグナルカスケードの引き金を引く。一方、HB-EGF-Cは細胞内に取り込まれ、核内へ移行し、cyclinA等の転写リプレッサーであるPLZFの核外輸送を引き起こす。その結果、細胞周期の進行に必須の遺伝子発現抑制を解除し、細胞増殖が起こる。proHB-EGFのシェディングは、他の増殖因子やサイトカイン等の刺激によって起こるが、通常培養中に特別な刺激の無い状態でも起こる事が知られている。本研究では刺激の無い状態でのproHB-EGFのシェディングのメカニズムを解明する為に、細胞周期との関与を調べた。それと同時に、細胞周期の進行に伴うHB-EGFの挙動を解析し、これらを明らかにする事を目的とした。

〔　方法ならびに成績　〕細胞の増殖とproHB-EGFのシェディングとの関係を調べる為、proHB-EGFのN末端側にAP（Alkaline Phosphatase）を融合した蛋白質を発現させた細胞（HT1080/HB-EGF-AP）を個々の細胞が単独で存在する濃度で播き、オーバーコンフルエントに達するまで培養を続けた。その間の培養上清のAP活性測定し、一細胞当たりの遊離HB-EGF量を比較した結果、細胞が疎な時ほど増殖活性が高く、proHB-EGFのシェディングが良く起こっている事が明かとなった。更に以下の方法でproHB-EGFシェディング時期を詳細に調べた。1）細胞周期を同調したHT1080/HB-EGF-APのAP活性と細胞数を経時的に測定し、細胞周期の進行に伴った一細胞当たりの遊離HB-EGF量を得た。2）proHB-EGFを強制発現させた細胞（HT1080/HB-EGF）の細胞表面に存在するproHB-EGFをHB-EGFのN末端側を認識する抗体（#H6）を反応させ、FITC標識後、固定し、DNAをPI（Propidium Iodide）染色した。FITCとPIの一細胞当たりの蛍光強度をFACSにて同時に測定し、細胞周期毎の一細胞当たりの細胞表面proHB-EGF量を得た。3）細胞周期を同調したHT1080/HB-EGFを経時的に固定し、それをHB-EGFのC末端側を認識する抗体（#H1）と抗βチュブリン抗体で免疫染色後、染色体をHoechst33342で染色して観察した。固定した時点と、微小管、染色体像を指標に細胞周期を検討し、その際のHB-EGFの染色像を観察して細胞膜から消失した時期を検討した。4）HT1080/HB-EGFを固定し、#H1抗体で免疫染色後、染色体をPIで染色してそれぞれをレーザースキャニングサイトメーター（LSC）で解析した。LSCは細胞個々の発する蛍光および散乱光を蛍光

総量・最大輝度・面積等を細胞の位置情報と供に記録する事ができる。得られた細胞集団の PI 蛍光データを、細胞個々の DNA 量とクロマチン凝集度との関係を元に、細胞周期毎に識別する。細胞周期毎に細胞を順時呼び出し、個々の細胞染色像を蛍光顕微鏡下で詳細に解析した。以上の様に様々な角度から慎重に検討を重ねた所、proHB-EGF シェディングは G1 後期に起こっていた。同時に細胞周期を通しての HB-EGF の挙動も明らかにする事が出来た。更に PLZF の核外移行と細胞周期の関係も、上記の方法４）に加え、PLZF に CFP を融合した蛋白質を発現させた細胞で観察することにより調べた。又、HB-EGF と PLZF を内在性に発現するヒト培養ケラチノサイトにおいて、方法４）で解析した結果、同様の結果を確認した。

〔 総　　括 〕本研究から、HB-EGF は G1 後期にシェディングを受け、続いて HB-EGF-C は S 期に細胞内に移行して行き、S 期後期には PLZF を核外にくみ出す事、また M 期では中心体や二つの染色体間に局在する事を見い出した。これは細胞周期の進行による膜結合型増殖因子のシェディング制御およびその C 末端断片の分布に関する初めての報告であり、HB-EGF を含む膜結合型増殖因子の研究に新たな展開をもたらすものとして期待される。又、癌細胞において HB-EGF および EGF 受容体の発現の上昇や、proHB-EGF シェディングの亢進が報告されて来ている。癌治療方法としてメタロプロテアーゼ阻害剤の投与が考えられているが、本研究成果は HB-EGF-C の核内移行阻害、PLZF との結合阻害等といった、他の方面からの治療法を開発する手掛かりとなることが期待される。

論文審査の結果の要旨

膜結合型増殖因子である EGF family の一つである HB-EGF は、G1 後期にシェディングを受け、続いて HB-EGF-C は S 期に細胞内に移行して行き、S 期後期には PLZF を核外にくみ出す事、また M 期では中心体や二つの染色体間に局在する事を見い出した。これは細胞周期の進行による膜結合型増殖因子のシェディング制御およびその C 末端断片の分布に関する初めての報告であり、HB-EGF を含む膜結合型増殖因子の研究に新たな展開をもたらすものとして期待される。

また、癌細胞において EGF family および EGF 受容体の発現の上昇が数々報告されており、これらの分子をターゲットとした癌治療薬の創薬が盛んになされていますが、これらの分子は正常細胞でも発現しているので、副作用の問題がある。癌細胞で、HB-EGF の発現亢進に加え、proHB-EGF シェディングの亢進が報告されていて、proHB-EGF シェディングは正常細胞では余り起こっていないため、本研究はより副作用の少ない治療法の開発に、役立つと期待される。

本研究の結果は、癌治療及び検査において有効に利用できるものであり、博士（保健学）に値するものと認める。