The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	HB-EGF Decelerates Cell Proliferation Synergistically With TGFα in Perinatal Distal Lung Development
Author(s)	南, 誠剛
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48866
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

【34】

氏　　名	南（みなみ）　誠（せい）　剛（ご）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２１８２４　号
学位授与年月日	平成 20 年３月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学　位　論　文　名	HB-EGF Decelerates Cell Proliferation Synergistically With TGFα in Perinatal Distal Lung Development （HB-EGF は TGFα と協調して、周産期の末梢肺形成において増殖性の抑制に寄与する。）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　川瀬　一郎 （副査） 教　授　青笹　克之　　教　授　奥村明之進

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

HB-EGF は EGF ファミリーに属し、EGF レセプター（EGFR）及び ErbB4 を活性化する。HB-EGF ヌル変異型（$HB^{del/del}$）マウスでは、これまでに心臓弁形成異常や目蓋形成遅延等の発生異常が報告されている。今回、我々は $HB^{del/del}$ マウスにおいて出生前後の末梢肺形成に異常を来たすことを見出したので、その詳細な解析や作用機序を明らかにした。

【方法ならびに成績】

マウス肺における HB-EGF の発現

まず、胎生 16.5 日目（E16.5）～生後２ケ月齢の野生型マウス肺より、各種 EGF ファミリーの発現を RT-PCR にて経時的に観察した。TGFα・Amphiregulin・Epiregulin・Betacellulin の発現は、出生直前の E18.5～E19.5 にかけて一旦発現が減少して、出生後に再び発現量が増大した。一方、HB-EGF は E16.5～出生直前まで徐々に発現量が増していき、出生後には更に急速に増加した。EGF の発現量はどの時期を通じても少なく検出できなかった。

HB-EGF プロモーター支配の LacZ をレポーターとして、マウス肺における HB-EGF 遺伝子の発現を組織学的に観察したところ、出生直前および成育したマウス肺において、肺胞上皮および間質にびまん性に認められた。血管や気管からの発現は検出されなかった。

野生型（$HB^{+/+}$）と $HB^{del/del}$ マウス肺の比較

C57BL/6J 系統にて維持されている HB ヘテロ変異型（$HB^{del/+}$）マウス雌雄の交配から得られたマウスの遺伝子型を経時的に観察したところ、$HB^{del/del}$ マウスは、ほとんどが出生後数日以内に死亡していた。

$HB^{+/+}$ と $HB^{del/del}$ 肺を比較すると、E18.5 以降、$HB^{del/del}$ 肺では、肺胞壁が肥厚しており、部分的には肺胞の膨らみが不十分であった。このような表現型は半分くらいの $HB^{del/del}$ 肺で観察された。以上のような表現型を定量的に比較するために、terminal saccular space area (TSSA) を測定した。E18.5 以降の $HB^{del/del}$ 肺の TSSA は、$HB^{+/+}$ 肺に比べて、低下していて、特に出生直後が顕著であった。pro-surfactant protein C による免疫染色にて分化能の違

いを比べたが、有意な差は認められなかった。Ki67 免疫染色による増殖能の検討では、$HB^{+/+}$ 肺では E18.5～P0 にかけて増殖性が徐々に低下していくのに対して、$HB^{del/del}$ 肺では増殖性が亢進していた。一方、この時期の TUNEL 染色では有意差がなかった。

HB-EGF と TGFα とのダブル変異マウス肺の検討

HB-EGF ヘテロと TGFα ヘテロのダブル変異（$HB^{del/+}$; TGFα $^{+/-}$）マウス雌雄の交配では、両者ともヌル変異型（$HB^{del/del}$; TGFα $^{-/-}$）となる新生仔は生まれなかったので、これ以外の遺伝子型の肺を比較検討した。形態学的および Ki67 免疫染色による増殖能の比較から、互いに表現型を高める遺伝的相関性がみられた。TGFα も、HB-EGF に比べて弱い作用ではあるが、末梢肺細胞に対する増殖抑制作用を有していて、HB-EGF と協調的に働いていることが示唆された。

HB-EGF と EGFR 機能低下変異（Waved2）とのダブル変異マウス肺の検討

EGFR の活性不全変異を持つ waved2 マウスを用いて、waved2 ヘテロと HB-EGF ヘテロのダブル変異（$HB^{del/+}$; $wa2^{+/-}$）マウス雌雄の交配では、両者ともホモ変異型（$HB^{del/del}$; $wa2^{-/-}$）となる新生仔は稀にしか生まれなかったので、これ以外の遺伝子型の肺を比較検討した。形態学的および Ki67 免疫染色による増殖能の比較から、互いに表現型を高める遺伝的相関性がみられた。従って、HB-EGF は、EGFR を介して作用していると考えられた。

【総括】

本研究の結果より、HB-EGF は、出生前後の末梢肺の形成において、末梢肺細胞の増殖を抑制する役割を担っており、この働きは EGFR を介して TGFα と協調的に作用していることが明らかになった。しかしながら、これらの過程を制御している分子メカニズムのネットワークに関しては、依然として未解明であり、今後の課題である。

論文審査の結果の要旨

EGF ファミリーの一員である HB-EGF は、増殖因子として癌細胞の増殖を促進していることが知られている。本研究では、HB-EGF 欠損マウス肺の出生前後の発生過程を観察して、HB-EGF は正常肺の形成に必要であり、その役割は増殖抑制作用であることを明らかにしている。

HB-EGF は、他の EGF ファミリーと異なって、出生前後のマウス肺内で徐々に発現量が増していることを見出し、HB-EGF 発現細胞が末梢肺でびまん性に存在することを確認した。HB-EGF 欠損マウス肺の形態的変化を観察すると、胎生 18.5 日目頃から肺胞壁の肥厚が顕著になり、この表現型の形成には末梢肺細胞の増殖亢進が起因していた。このことから HB-EGF は出生前後の末梢肺細胞の増殖を抑制していることが分かった。更に、TGFα 欠損マウスや HB-EGF の受容体である EGFR の機能低下変異マウス（waved2）との相互交配によって遺伝的な相互作用を解析した結果、HB-EGF と TGFα はともに EGFR を介したシグナルによって末梢肺細胞の増殖を抑制していることが明らかとなった。

本研究は、これまで増殖因子として捉えられてきた HB-EGF には、正常肺の発生のような生理的過程では増殖抑制作用をも有していることを明らかにしており、これまでの一般的な増殖因子の概念を変えるものである。肺胞が形成される出生前後の発生学的知見は、肺の再生や損傷治癒などの過程を解明していくうえで役立つことが期待され、意義深く学位に値すると考える。