

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月18日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究（C）一般

研究期間：2009年度～2011年度

課題番号：21580367

研究課題名（和文）胃粘膜に発現する EphB の生理的機能と胃潰瘍予防・胃癌診断の  
シーズとしての評価研究課題名（英文）Functional analysis on EphB and ephrin-B expressing in gastric  
mucosa and their expression behavior in gastric ulcer and cancer研究代表者 小川 和重 (OGAWA KAZUSHIGE)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授  
研究者番号：60231221

## 研究成果の概要（和文）：

実験動物胃粘膜のEphBとephrin-Bの発現と機能を解析した。①粘膜部位で発現パターンが異なるがEphBとephrin-Bを発現すること、②胃小窩の細胞はephrin-Bを、胃腺の細胞はEphBを発現し、Gastric Unitには峽を境に発現境界が存在すること、③再生胃粘膜ではEphB2発現が上昇すること、④胃癌細胞はEphBとephrin-Bを共発現すること、⑤EphB/ephrin-Bシグナルは細胞間反発シグナルとして働くこと、⑥EphBシグナルはRhoAの活性化を介することを明らかにした。これらの結果から、EphBとephrin-Bは胃粘膜上皮の細胞構築制御分子であること、胃癌はEphB/ephrin-B分子機構が乱れた状態を示すことが強く示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

Several EphB receptors and ephrin-Bs were detected in the gastric mucosa of the adult rodent stomach by RT-PCR amplification. Immunostaining showed complementary expression patterns, with EphB receptors preferentially expressed in the deeper regions and ephrin-Bs in the superficial regions of the gastric units. In a mouse ulcer model EphB2 expression was upregulated in the regenerating epithelium. EphB signaling in primary gastric epithelial cells promoted cell retraction and repulsion at least in part through RhoA activation. Based on these findings the author propose that the EphB-positive progeny of gastric stem cells migrates from the isthmus towards the bottom of the gastric glands due to repulsive signals arising from contact with ephrin-Bs, which are preferentially expressed in the more superficial regions of the isthmus and gastric pits. In a rat gastric cancer model EphB2 and ephrin-B were co-localized in Ki67-positive proliferative cells forming aberrant gastric units and gastric cancer cells were simultaneously expressed EphB receptors and ephrin-B ligands. These findings suggest that simultaneous expressions of both EphB receptors and ephrin-B indicates an characteristic of gastric cancer cells.

## 交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,800,000 | 540,000   | 2,340,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,800,000 | 1,140,000 | 4,940,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：EphB, ephrin-B, 胃粘膜上皮, 細胞構築, 境界形成

### 1. 研究開始当初の背景

本研究の対象分子 Eph と ephrin は、アクチン線維の動態制御を介して細胞の接着・遊走の制御に働く膜蛋白である。Clevers らは、①腸絨毛の細胞は ephrin-B, 腸陰窩の細胞は EphB を発現し、発現境界が存在すること、②境界領域で発生するシグナルは、細胞の移動方向を決定づけることを報告した (van de Wetering et al., Cell, 2002; Batlle et al., Cell, 2002)。しかしながら、胃粘膜上皮における上皮の細胞構築制御機構は研究開始当初は全く不明であった。

### 2. 研究の目的

代表研究者は、仮説「EphB/ephrin-B は胃粘膜上皮において構成細胞の配置を決定する分子システムである」を提唱した。本研究は仮説の検証と展開で、3つのサブテーマで構成された研究目的を持つ。

- (1)実験動物の正常な胃粘膜上皮を材料に EphB と ephrin-B の働きを検討する。
- (2)再生胃粘膜における EphB と ephrin-B の発現動態を調べ、上記仮説を検証する。
- (3)胃癌モデルと胃癌細胞株を材料に EphB と ephrin-B の発現状態を解析する。結果を総合分析し、EphB/ephrin-B が胃癌診断・治療のシーズになるか評価する。

### 3. 研究の方法

#### (1)実験動物

Balb/c・ICR マウス, F344・Wistar ラットの胃を使用した。動物実験は大阪府立大学実験動物委員会の承認を受けて行った。

#### (2)RT-PCR を用いた発現解析

胃体部・幽門部・無腺部の胃粘膜, 潰瘍誘発 7~10 日後の胃粘膜, 初代培養胃粘膜細胞, 胃癌細胞株 (AZ521, KATO III, MNK-7, SH-10-TC) を材料に RT-PCR で EphB (B1~B4, B6) と ephrin-B (B1~B3) の発現を検討した。

#### (3)免疫沈降と免疫ブロット

胃粘膜と細胞を材料とした。免疫沈降とウエスタンブロットで EphB 蛋白の発現とチロシンリン酸化 (活性化状態) を検討した。

#### (4)組織化学染色 (免疫染色・レクチン染色)

胃の凍結切片を作製し免疫染色を行った。H,K-ATPase を壁細胞, Ki67 を増殖細胞, GS-II を副細胞と幽門腺, UEA-I を表在部粘液細胞の指標として使用した。

#### ①ABC 法による免疫 HRP 染色

ABC-DAB 法で免疫染色を行った。

#### ②免疫・レクチン蛍光 2 重染色

EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, ephrinB1, の発現を蛍光 2 重染色で検討した。

#### (5)胃潰瘍モデルと胃癌モデル

Okabe らの酢酸塗布法 (Okabe et al., 1971) と Robert らのエタノール胃粘膜損傷法 (Robert et al., 1979) で、胃潰瘍モデルを作製した。Hirose らの MNNG 経口投与方法 (Hirose et al., 1989) で胃癌モデルの作製を試みた。

#### (6)初代培養胃粘膜上皮細胞

Dibona らの方法 (Dibona et al., 1979) を変更して胃粘膜上皮細胞の初代培養を行った。

#### (7)接着アッセイ

##### ①Time-Lapse 観察

Ephrin-B1-Fc/EphB2-Fc 添加後の胃腺細胞の形状変化を Time-Lapse 観察した。添加後の膜退縮細胞の割合を計測した。RhoA キナーゼの阻害剤 Y27632 を使用して検討した。

##### ②接着アッセイ

Ephrin-B1-Fc, EphB2-Fc を固着させた薄膜上に胃腺細胞塊を播種し、基質への接着状態を解析した。

#### (8)焦点接着・アクチン線維形成と活性化

Ephrin-B1-Fc/EphB2-Fc 添加後の胃腺細胞に vinculin 抗体の免疫染色で焦点接着を、蛍光標識 phalloidin でアクチン線維束の形状を顕微鏡観察した。

#### (9)RhoA・Rac1 活性化アッセイ

ブルダウンとウエスタンブロットで活性化 RhoA・Rac1 を検出した。

### 4. 研究成果

#### (1)EphB/ephrin-B の発現

##### ①mRNA 発現 RT-PCR

###### 正常胃粘膜

RT-PCR により、マウスおよびラットにおいて、胃体部の胃粘膜, 幽門部の胃粘膜, 無腺部の胃粘膜に、ほとんど全ての EphB サブクラスと ephrin-B サブクラスが発現していることが明らかになった (図 1)。一般に EphB1 と ephrin-B3 の発現は微弱であった。

###### 再生胃粘膜 (胃潰瘍)

半定量的 RT-PCR で比較検討した結果、潰瘍形成処置後 10 日後の再生胃粘膜で EphB2 発現の有意な上昇が認められた。

###### 株化胃癌細胞

4 種のヒトの胃癌細胞株 (AZ521, KATOIII, MNK7, SH-10-TC) はパターンは異なるが EphB と ephrin-B 共発現していた。

##### ②タンパク発現

胃体部粘膜では EphB2 と EphB3, 幽門部では EphB2-B4 がチロシンリン酸化し粘膜内で、

EphB 発現細胞と ephrin-B 発現細胞が接触する状態にあることが明らかになった。

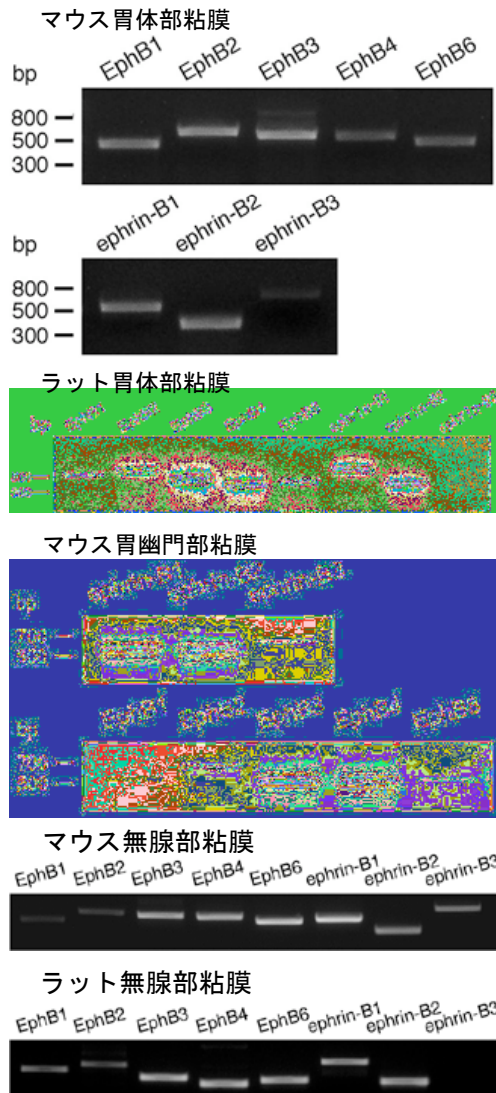


図1 RT-PCRによる粘膜の遺伝子発現

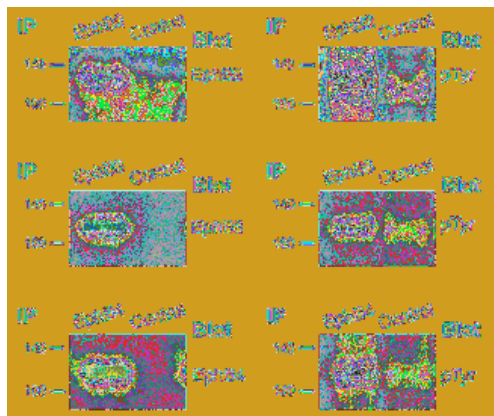


図2 幽門部粘膜のEphB蛋白発現

(2)発現細胞の局在

①胃体部の Gastric Unit

EphB1 は副細胞 mucous neck cell に, EphB2

は胃腺底部 base に位置する細胞には強く、頸部 neck の細胞には弱く、EphB3 は壁細胞 parietal cell と主細胞 chief cell に, ephrin-B1 は胃小窩 pit と峡 isthmus の細胞に局在することが判明した (図3)。

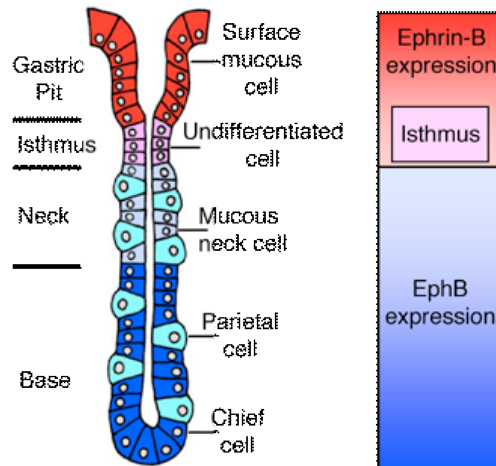


図3 胃体部Gastric UnitにおけるEphBとephrin-Bの発現領域を示す模式図

②幽門部の Gastric Unit

発現パターンは胃体部と類似し, ephrin-B1 は Gastric Unit 上部 (胃小窩, 峡) の細胞に, EphB2 と EphB3 は幽門腺 pyloric gland に, EphB4 は峡と幽門腺に局在することが判明した (図4)。胃体部・幽門部 Gastric Unit におけるパターンから, EphB 発現細胞と ephrin-B 発現細胞の境界が峡に存在し, 峡で EphB/ephrin-B シグナルが発生することが想定され, EphB リン酸化 (図2) を支持する結果が得られた。

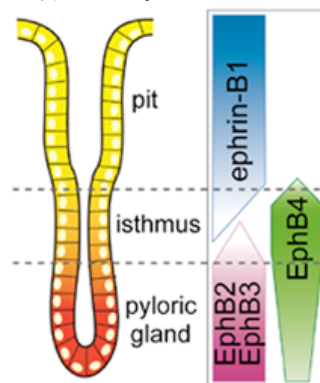


図4 幽門部Gastric Unitの発現

③噴門部と無腺部境界領域

EphB と ephrin-B の免疫染色を行ったところ, 境界領域に明確な局在が認められたのは EphB2 と ephrin-B1 であった。EphB2 は, 噴門部 Gastric Unit 全体に発現し, 発現強度は噴門腺が強く胃小窩に向かって減弱すること, 噴門部に隣接する狭い領域の無腺部粘膜上皮にも発現することが判明した。Ephrin-B1

は噴門部の胃小窩と峽、無腺部重層扁平上皮の基底細胞に発現し、噴門部に近い無腺部領域では, ephrin-B1 発現が減弱していた(図5)。以上の結果から、噴門部 Gastric Unit の発現パターンは、胃体部・幽門部と同様であることが判明した。

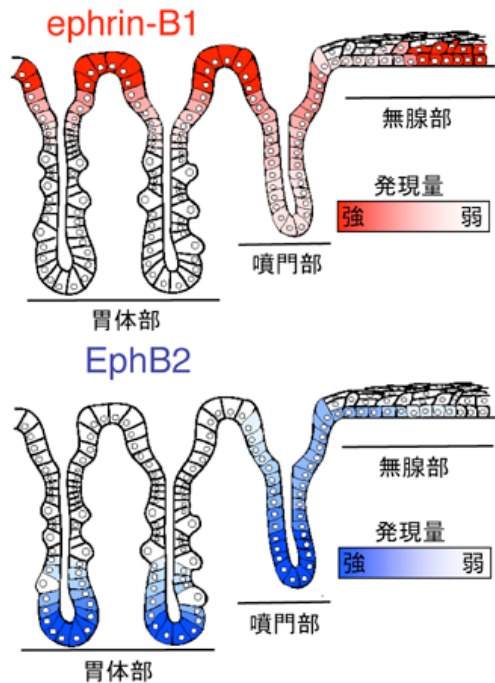


図5 噴門-無腺部境界領域の発現パターン

#### ④再生胃粘膜 (胃潰瘍)

胃潰瘍モデル動物の再生過程はマウスとラットで類似していた。潰瘍誘発処置5日後には表面は表面粘液細胞で覆われ、発達した増殖帯(峽)が出現し、7~10日後には胃腺も出現するが、胃腺は副細胞(未分化な主細胞)のみで構成されていた。

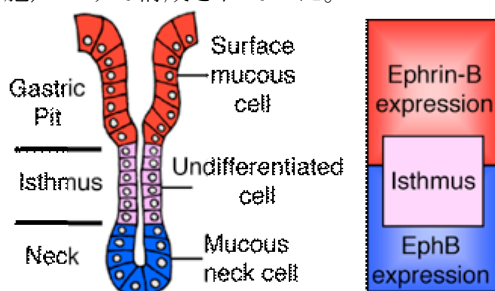


図6 再生胃粘膜のEphBとephrin-B発現

潰瘍誘発処置7~10日後の再生胃粘膜では、EphB2の発現はアップレギュレートし、再生中の胃腺(副細胞で構成)、峽(Ki67陽性細胞が局在)ならびに胃小窩に発現し、発現強度は胃腺から峽・胃小窩に向かって減弱することが判明した。EphB3発現もアップレギュレートし、峽と再生中の胃腺に発現することが判明した。Ephrin-A1の発現は正常の胃粘

膜上皮と同様で、胃小窩と峽に局在していた。以上の結果から、再生中の Gastric Unit では EphB 発現がアップレギュレートし、峽における EphB/ephrin-B シグナルは増強することが強く示唆された(図6)。

#### ⑤異常増殖胃粘膜 (胃癌)

肉眼で明瞭な胃癌を作製することはできなかったが、峽以外に Ki67 陽性細胞塊が認められ、組織学的に判定可能な微細な異常増殖部の誘発には成功した。この部位の細胞は EphB と ephrin-B を共発現し、胃癌細胞の特徴であることを明らかにした。

#### (3) EphB/ephrin-B シグナル

##### ①初代培養

代表研究者は、コラゲナーゼで胃粘膜を管状腺の状態まで分離して培養する初代培養法を確立した。

##### ②Time-Lapse 観察

EphB または ephrin-B シグナルが胃粘膜上皮細胞の反発シグナルとして働くかどうか Time-Lapse で解析した結果、可溶性リガンド ephrin-B1-Fc 添加15分後には細胞の膜退縮が誘導されることが判明した。

##### ③接着アッセイ

Ephrin-B1-Fc または EphB2-Fc を固着させた薄いニトロセルロース Film 上に細胞を播種して細胞の接着状態を解析した結果、ephrin-B1-Fc の Film 上で細胞は丸くなり十分に接着できないことが判明した(図7)。従って、EphB シグナルは細胞間の反発シグナルとして働くことが強く示唆された。

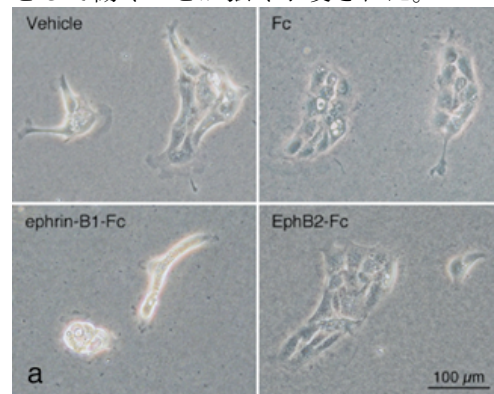


図7 EphB/ephrin-Bの活性化が胃粘膜上皮細胞の接着に及ぼす影響

#### (4) EphB/ephrin-B と RhoA・Rac1

##### ①焦点接着・アクチン線維形成

Vinculin 免疫染色と phalloidin 染色で EphB の活性化後の胃粘膜上皮細胞の細胞接着とアクチン線維の形成状態を検討した結果、EphB 活性化で、焦点接着の面積の拡大と密度の増大、アクチン線維束密度の著しい上昇が誘導された。この結果から EphB シグナルの下流に RhoファミリーGTPase が介在することが示唆された。



## ②EphB シグナルと RhoA・Rac1 の活性化

RhoA 阻害剤である Y27632 を使用して EphB シグナルとの関係を検討した。Y27632 をあらかじめ添加した培養液に ephrin-B1-Fc を加えて EphB を活性化しても、膜退縮は誘導されず、逆に ephrin-B1-Fc 添加して膜退縮を誘導した後に Y27632 を加えると、膜退縮はそれ以上進まず反転し膜が伸張することが明らかになり、EphB シグナルに RhoA が介在することが強く示唆された。Rac1 の不活性化で類似した現象が起こるため、EphB 活性化が RhoA と Rac1 の活性化を誘導するかどうか検討した。その結果、ephrin-B1-Fc を添加して胃体部粘膜上皮細胞の EphB を活性化させると、添加 5 分後には RhoA の強い活性化が起こることが判明した (図 8)。Rac1 の活性化は起こらなかった。以上より、EphB シグナルは RhoA の活性化を介して、胃体部粘膜上皮細胞の膜退縮を誘導し、細胞間反発シグナルとして働くことが強く示唆された。

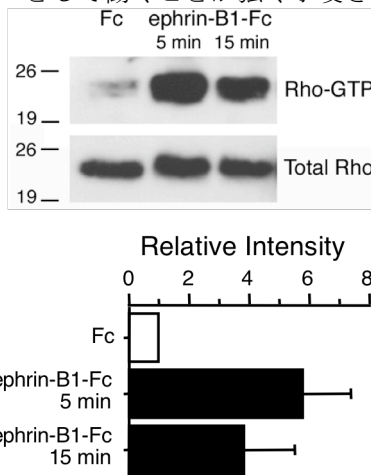


図8 EphBシグナルとRhoAの活性化

## (5)研究成果のまとめ

本研究から、仮説「EphB/ephrin-Bは胃粘膜上皮において構成細胞の配置を決定する分子システムである」を証明することができた。Gastric Unit において峽に存在する胃粘膜上皮の幹細胞は EphB と ephrin-B を発現するが、分裂・増殖し胃腺細胞や表在部粘膜細胞へと分化するに従って、EphB あるいは ephrin-B のどちらか一方を発現するようになる。EphB/ephrin-B シグナルは反発シグナルとして作動するために、EphB 発現細胞 (胃腺細胞) は ephrin-B 発現領域 (胃小窩・粘膜表面) には侵入することができず、発現強度が強くなるに従って下部に移動し胃腺を構成する (図 9)。このような機構で、Gastric Unit ならびにその細胞構築が維持されていると考えられた。

無腺部胃粘膜上皮と噴門部粘膜上皮間に

も EphB/ephrinB の発現境界が明らかになった (投稿準備中)。このシグナルがどのように作動するか現在検討を進めている。

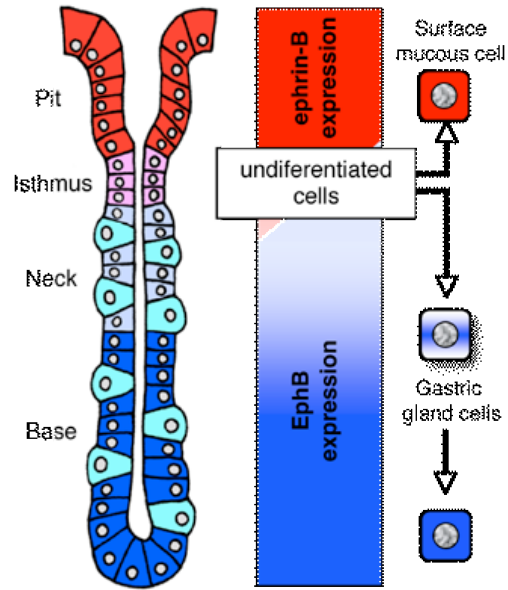


図9 Gastric Unitの形成・維持機構と EphB/ephrin-Bシステム

胃癌は上皮細胞の異形成を伴う異常増殖であるため、EphB/ephrin-B システム機構の破綻が起きていると想定される。また、胃潰瘍モデル (胃粘膜再生モデル) と胃癌モデルおよび正常胃粘膜の比較から、再生中の胃粘膜上皮では、細胞の Gastric Unit 内での分配をより正確に行うように、峽における一時的な EphB/ephrin-B シグナルの増強が誘導されると考えられた。胃癌細胞は EphB と ephrin-B の両者を一時的ではなく常時発現する細胞であると定義でき、そのため、増殖が亢進している胃癌細胞は Gastric Unit の破綻を誘発することが想定された (論文投稿準備中)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

①居蔵泰隆, 石井万幾, 中島崇行, 小川和重  
マウスとラットの胃の無腺部と噴門部粘膜上皮の境界領域に発現する EphB2 と ephrin-B1 解剖学雑誌 87 巻, 2012, 印刷中 (査読無し)

②Ogawa K, Takemoto N, Ishii M, Mueller I, Pasquale E B, Nakajima T. Complementary expression and repulsive signaling suggest that EphB receptors and ephrin-B ligands control cell positioning in the gastric epithelium. *Histochem Cell Biol* 136: 617-636, 2011. (査読有り)

③Ishii M, Nakajima T, Ogawa K. Complementary expression of EphB receptors and ephrin-B ligands in the pyloric and duodenal

epithelium of adult mice. *Histochem Cell Biol* 136: 345-356, 2011. (査読有り)

④内山慎太郎, 石井万幾, 中島崇行, 小川和重 再生および異常増殖胃粘膜上皮の EphB と ephrin-B 解剖学雑誌, 85 (2): 74, 2010. (査読無し)

⑤小川和重, 内山慎太郎, ミユラー樹, 中島崇行 EphB は RhoA を活性化して初代培養胃腺細胞の膜退縮を誘導する 日本解剖学雑誌 84(2): 63, 2009. (査読無し)

[学会発表] (計 7 件)

①Kazushige Ogawa, Yasutaka Igura, Yuta Hayashi, Noritaka Saeki, Maki Ishii and Takayuki Nakajima EphB2 and ephrin-B1 expression in the boundary between the glandular and nonglandular epithelium of the rodent stomach 14th International Congress on Histochemistry and Cytochemistry Aug 26-29, 2012 Kyoto, Japan (Kyoto International Conference Center)

②居蔵泰隆, 石井万幾, 中島崇行, 小川和重 マウスとラットの胃の無腺部と噴門部粘膜上皮の境界領域に発現するEphB2と ephrin-B1 第87回日本解剖学会近畿支部学術集会 2011年12月3日 西宮市 (兵庫医科大学)

③居蔵泰隆, 石井万幾, 中島崇行, 小川和重 無腺部と胃腺部の境界領域の胃粘膜上皮に発現する EphB2 と ephrin-B1 第 152 回日本獣医学会学術集会 2011 年 9 月 20 日 堺市 (大阪府立大学)

④内山慎太郎, 石井万幾, 中島崇行, 小川和重 再生および異常増殖胃粘膜上皮の EphB と ephrin-B 発現 日本解剖学会第 85 回近畿支部学術集会 2009 年 11 月 28 日 橿原市 (奈良県立医科大学)

⑤Kazushige Ogawa, Natsuki Takemoto, Maki Ishii, Takayuki Nakajima EphB/ephrin-B may regulate cell positioning in the gastric epithelium 第 50 回日本組織細胞化学会 2009 年 9 月 27 日 大津市 (ピアザ淡海滋賀県立県民交流センター)

⑥内山慎太郎, 石井万幾, 中島崇行, 小川和重 胃潰瘍および胃癌モデルラットの EphB と ephrin-B 発現 第 148 回日本獣医学会総会 2009 年 9 月 25 日 鳥取市 (とりぎん文化会館)

⑦小川和重 組織の細胞構築を制御する分子 Eph と ephrin: EphB/ephrin-B は胃粘膜上皮のポジショニングを制御する分子システムであるか? 第 147 回日本獣医学会総会生理・生化学シンポジウム 「細胞外基質と組織リモデリング」 2009 年 4 月 4 日 宇都宮市 (栃木県総合文化センター)

[その他]

ホームページ等

<http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/anat/anat.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 和重 (OGAWA KAZUSHIGE)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号: 60231221

(2) 連携研究者

中島 崇行 (NAKAJIMA TAKAYUKI)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号: 30333644

(3) 連携研究者

石井 万幾 (ISHII MAKI)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教

研究者番号: 50415535

(4) 研究協力者

PASQUALE, ELENA

Sanford-Burnham Medical Research Institute (La

Jolla, USA)・教授