

平成21年 5月15日現在

研究種目：基盤研究（C）一般
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18580296
 研究課題名（和文） 成体の主要臓器・組織に発現する分子システムEphとephrinの機能解析
 研究課題名（英文） Functional analyses on Ephs and ephrins expressing in adult tissues and organs
 研究代表者 小川 和重
 大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
 60231221

研究成果の概要：

腎臓、膀胱、肝臓、胃、心臓を対象に、Eph/ephrinの発現をRT-PCRと免疫染色により解析し、初代培養細胞を用いてEph/ephrinシグナルの解析を行った。腎臓では遠位尿細管の再吸収機構に、胃では粘膜上皮細胞の細胞構築維持機構にEph/ephrinシステムが深く関与する可能性を示唆する成果が得られた。また、副次的に、胚芽腫P19CL6から作出したクローンP19CL6-A1を用いて、既存の方法を改良して効率的に心筋細胞へ分化させる方法を開発した。加えて、ビデオ画像から心筋細胞の拍動リズムを解析するソフトウェアVisorhythmも開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,100,000	0	2,100,000
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	420,000	3,920,000

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：Eph, ephrin, 腎臓, 胃粘膜上皮, 心臓, P19CL6, 細胞構築

1. 研究開始当初の背景

Ephレセプターとそのリガンドephrinには、次の分子機能特性が示されている。(1)共に膜タンパクである。(2)EphとephrinはそれぞれAとBのサブクラスに分類される。(3)サブクラスが同じであれば結合し、レセプターとリガンドの両側にシグナルが発生する。(4)臓器・組織形成期（発生期）に一過性に強く発現する。(5)Eph/ephrin分子シグナルは、①神経のネットワーク形成、②血管形成と血管新生、③組織の境界形成、④細胞の接着・遊走に関与する。Ephはephrinに関する

研究はホットで競争の激しい分野であるが、報告のほとんどは、著しく高い発現が認められる発生期の臓器・組織あるいは腫瘍を対象にその機能が検討され、Eph/ephrin と言えば「神経の発生、血管形成・新生、腫瘍」が研究の主な対象になっていた。また、Eph/ephrinの分子シグナル機構は、高い発現が認められる株化（腫瘍）細胞あるいは遺伝子導入による強制発現系を材料に解明されてきた。成体の正常臓器・組織を対象にしたEph/ephrinに関する研究報告は非常に少なく、シナプス形成・可塑性の制御機構（Yamaguchi & Pasquale, Curr Opin

Neurobiol, 2004), 結腸粘膜上皮内の細胞移動制御機構 (Battle et al, Cell, 2002), T-リンパ球の組織浸潤機構 (Luo et al, J Clin Invest, 2002), 血小板の凝集制御機構 (Prevost et al, Blood, 2004)に関する報告以外には見当たらなかった。発生期の臓器・組織あるいは腫瘍と比べ正常臓器・組織における Eph と ephrin の発現量は高くない。それ故、報告の中には、「成体の正常臓器・組織では検出限界を下回るため発現細胞が特定できない。」と記載された論文が散見される。代表研究者のグループは、少量の発現量でも Eph/ephrin の発現細胞を免疫組織化学的に検出し、Eph のリン酸化 (活性化) 状態を検討することができる高い技術レベルを修得しており、特定不可能とされた報告を覆すデータが本研究の対象臓器・組織などから得られつつあった。神経系を対象にした研究は発生期から成体期へと広がりつつあること考慮すると、研究対象が成体の臓器・組織へと広がることは確実であった。

2. 研究の目的

代表研究者は、これまでの報告から Eph/ephrin の働きは細胞接着・遊走制御に帰着し、次の仮説を提唱するに至った。仮説: Eph と ephrin は仲間である細胞かどうかを判断する分子システムとして機能する。従って、発生期に限らず分化した成体の組織にも普遍的に働いている。細胞の組織化や組織化の維持を担う分子システムである。仮説の検証は、組織固有の細胞構築の形成・維持機構を知る重要な手がかりを与える。裏返して言えば、Eph/ephrin 分子システムの機能破綻は組織の機能不全 (炎症の慢性化など) や細胞の脱組織化 (腫瘍化) につながると考えて本研究を計画した。目的は、成体の主要臓器・組織の構成細胞における Eph と ephrin の発現性状と発現細胞における機能的役割を検討し、上記仮説を実験的に検証することである。具体的には、再生医療・獣医療や癌などを考慮して、(1)腎臓、(2)膀胱、(3)肝臓(肝細胞)、(4)胃(胃粘膜上皮)、(5)心臓(心筋細胞)を主な対象臓器・組織・細胞として選択した。

3. 研究の方法

(1) 臓器・組織の Eph/ephrin の発現解析

RT-PCR を用いて、どのタイプの Eph と ephrin が発現しているかスクリーニングする。解析する上で十分な発現量が認められた場合は、免疫組織化学的染色により発現細胞を特定する。また、対象臓器・組織のタンパク溶解液から免疫沈降で Eph 集め、これを試料として抗リン酸化チロシン抗体でウェスタンブロットし、Eph 発現細胞が ephrin 発現細胞と接触しシグナルを発生しているかどうか検討する。

(2) 培養細胞の Eph/ephrin の発現解析

対象臓器・組織の中で Eph と ephrin を発現していた細胞を対象に、初代培養を行う。初代培養方法が確立されていない場合は、方法を開発する。初代培養細胞を対象に RT-PCR で Eph と ephrin の発現解析を行う。

(3) 培養細胞の Eph/ephrin の機能解析

①可溶性 ephrin を添加後の Eph の活性化動態を解析する。同様に可溶性 ephrin および Eph を培養液に添加して、培養細胞の接着・運動性状どのように変化するか、②タイムラプス観察、③免疫染色により焦点接着やアクチンフィラメントを可視させてその動態を観察する。動態変化が認められた場合は、④アクチンフィラメントや焦点接着の形成を制御して細胞の接着・運動のシグナルを制御する Rho ファミリーGTPase が Eph/ephrin シグナルの下流で働くか調べる。

(4) 心筋細胞の拍動リズムの解析法

ビデオ画像をもとに拍動リズムを解析できるソフト Visorhythm を開発し、心筋細胞において Eph/ephrin シグナルが拍動に及ぼす影響を検討する。

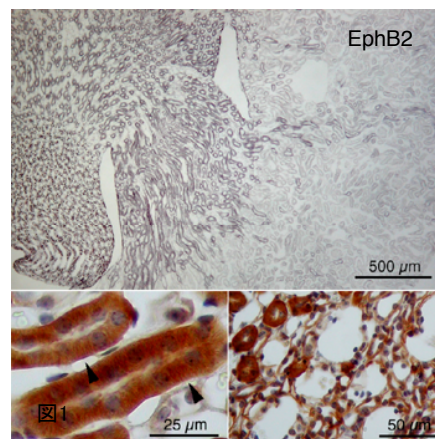
(5) 初代培養心筋細胞の代替法

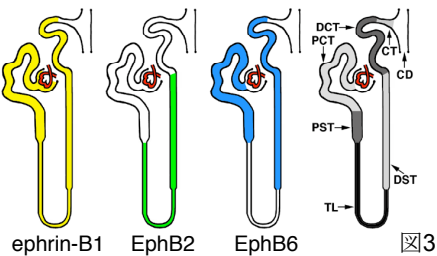
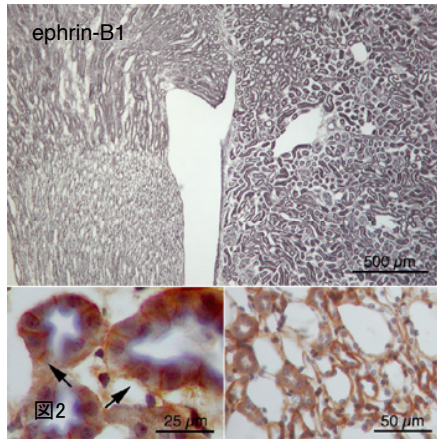
対象細胞として選択した心筋細胞の初代培養法は確立しており、修得済みの技術であるが、心筋細胞における Eph/ephrin を機能解析するには多量的心筋細胞を必要とする。そこで胚芽腫 P19CL6 から効率的に心筋細胞へ分化する方法の改良を既報の 5-azacytidine/DMSO 分化法を基に試みる。

4. 研究成果

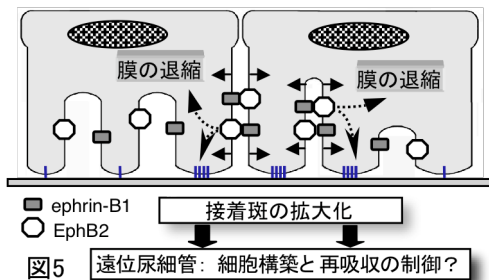
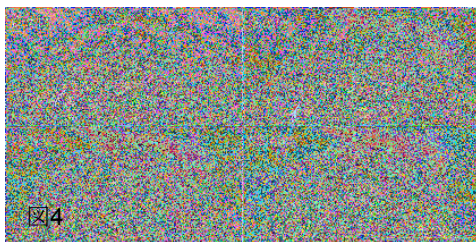
(1) 腎臓

① in vivo の発現解析: EphB/ephrin-B サブクラスについて RT-PCR および免疫組織化学的染色により発現解析を行った結果、EphB2 は遠位直尿細管およびヘンレのループの細い部分の尿細管に、特に遠位直尿細管細胞では基底陥入の細胞膜に発現していること、また、ephrin-B1 はネフロン全域の尿細管に発現していることを明らかにした (図 1, 2, 3)。





②初代培養細胞を用いた解析：培養髓質尿管細胞の EphB/ephrin-B サブクラスの発現パターンは *in vivo* における遠位直尿管細胞の発現パターンと同様であることを RT-PCR により確認した。この細胞を材料に、可溶性 ephrin-B1-Fc を添加して EphB2 を活性化させると、Rac1 活性の低下と RhoA の活性化が誘導され、アクチンフィラメントと焦点接着の再構成を介した膜退縮が起こること(図 4)を明らかにした。また、RhoA 阻害剤添加により EphB 活性化による膜退縮が抑制されることも明示した。これらの点から、遠位尿管に発現する EphB2/ephrin-B1 システムは基底陥入の間隙と外側部の細胞間隙の大きさや接着状態を制御して尿の再吸収を制御する可能性が示唆された(図 5)。



(2)膀胱

①*in vivo* の発現解析：RT-PCR および免疫組織化学的染色による発現解析を行い、移行上皮の構成細胞間および平滑筋細胞と神経線維間で細胞の接触により Eph/ephrin シグナルが発生する発現様式が認められることを明らかにした。

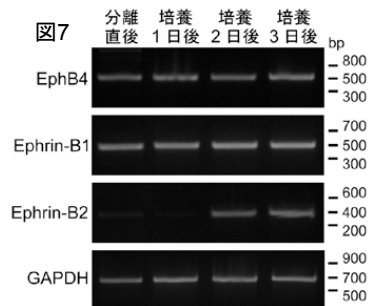
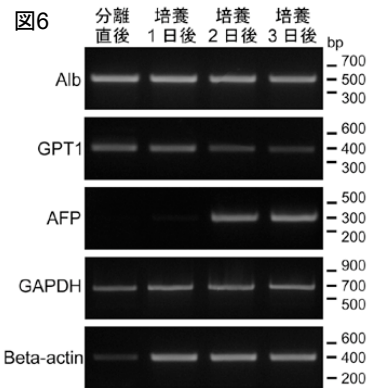
②初代培養細胞を用いた解析：培養移行上皮細胞でシグナル解析を行い、可溶性リガンドを添加して Eph の活性化させると細胞の膜退縮が誘導され、可溶性レセプターを添加して ephrin の活性化させると細胞の運動性が上昇することを明らかにした。

③ヒトおよび動物の膀胱癌細胞株と膀胱粘膜における Eph/ephrin 発現を RT-PCR により検索した結果、癌細胞特有の発現パターンを検出することはできなかった。

(3)肝臓(肝細胞)

①*in vivo* の発現解析：RT-PCR および免疫組織化学的染色による発現解析を行い、肝細胞間で EphB/ephrin-B シグナルが発生する発現様式が認められることを明らかにした。

②初代培養細胞を用いた解析：培養肝細胞を用いて培養 1-3 日目の B サブクラスの発現パターンと肝細胞の分化マーカー (Albumin, Alb; Glutamic-Pyruvate Transaminase 1, GPT1; alpha-Feto Protein, AFP) の発現パターンを解析し、培養 1 日目が *in vivo* により近い性状を示すが、培養時間が進むにつれて脱分化し、これに伴い ephrin-B2 発現が有意に上昇すること(図 6, 7)、培養 1 日目に細胞皮質に出現するアクチンフィラメントからなる帯状の構造体が EphB シグナルにより消失することを明らかにした。



(4) 胃(胃粘膜上皮)

① *in vivo* の発現解析: 胃底部・胃体部の粘膜上皮を対象に EphB と ephrin-B サブクラスについて RT-PCR と免疫組織化学的染色により発現解析を行い、管腔側に移動する細胞は ephrin-B1 を、基底側に移動する細胞は EphB2, EphB3, EphB4 を発現し幹細胞を境に発現境界が存在することを明らかにした (図 8)。

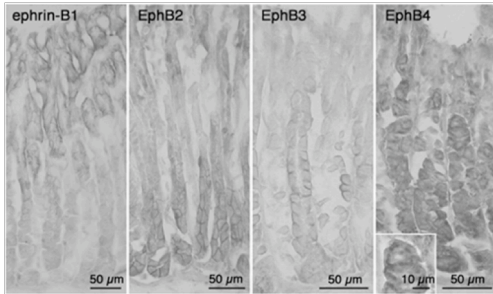


図8: 固有胃腺のEphB/ephrin-B発現

② 初代培養細胞を用いた解析: ラット胃腺細胞の初代培養法を確立した。可溶性リガンド ephrin-B1-Fc あるいは可溶性レセプター EphB2-Fc を用いて EphB/ephrin-B1 シグナル解析を行い、EphB シグナルが細胞の膜退縮を誘導することを明らかにした (図 9)。培養液に可溶性リガンドを添加すると EphB2 の活性化は 30 分後にピークを取り、活性化に相関して膜退縮は誘導されるが、可溶性レセプター添加による ephrin-B の活性化では膜退縮は誘導されないこと、また、EphB の活性化は、RhoA の活性化を有意に誘導するが、Rac1 の活性化を誘導しないことも明らかにした。加えて、ROCK 阻害剤である Y27632 を用いて細胞の形状、Focal Adhesion の状態、アクチンフィラメントの状態を、可溶性リガンド添加により EphB を活性化させた初代培養細胞を使って検討し、EphB シグナルによる胃腺細胞の膜退縮が RhoA を介した作用であることを確実に証明した。これらの結果から、胃粘膜上皮に発現する EphB と ephrin-B は幹細胞領域で新たに分裂し分化を開始した細胞の移動方向 (腺腔側または基底側) を決定づける働きを担うと推察された (図 10)。

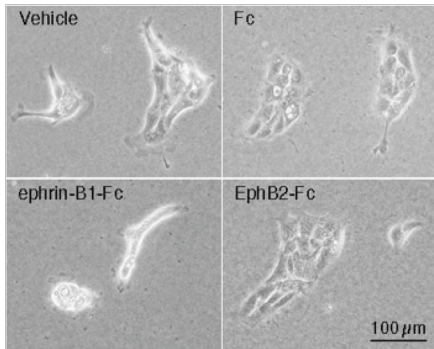


図9: ephrin-B1-Fcをコートした基質上では胃腺細胞は細胞質を広げて接着することが出来ない。

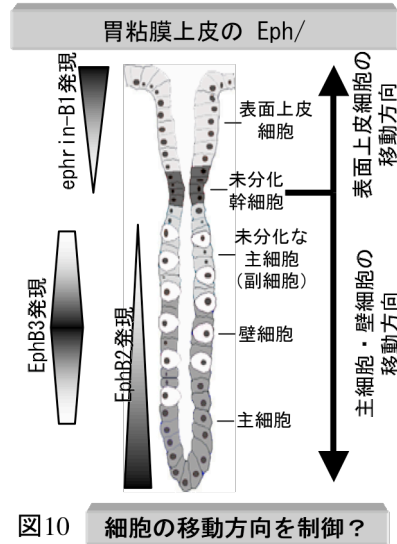


図10 細胞の移動方向を制御?

③ 胃潰瘍の解析: 酢酸塗布法で作製した胃潰瘍モデルマウスにおける再生胃粘膜上皮を材料に免疫組織化学的染色により発現解析を行い、幹細胞領域 (発現境界) の EphB および ephrin-B 発現が上昇することを明らかにした。酢酸塗布法による胃潰瘍モデルは、胃壁の穿孔を起こす可能性が高いため広範囲に潰瘍を作製することは困難であり、免疫沈降試料のウエスタンブロット解析など多量の材料を必要とする解析には向かない。そこで、塩酸アルコールの経口投与および水浸拘束により胃潰瘍モデルラットの作製を試みた。前者の方が、潰瘍が深く、比較的広範囲に潰瘍が形成されていたが、個体により粘膜上皮の再生に時間的な差異が認められ、改良が必要と判断された。

④ 胃癌の解析: 4 種の胃癌細胞と初代胃腺細胞の EphB/ephrin-B 発現を RT-PCR により検討した結果、癌細胞に特有な発現パターンは検出できなかった。また、MNNG の経口単回投与で胃癌モデルラットの作製を試みたが、固有胃腺あるいは幽門腺領域に肉眼で明確に判別できる固形癌を作製することはできなかった。免疫染色により細胞増殖性 (Ki67 陽性) を示す細胞塊が、胃腺の幹細胞領域外に認められたため、投与方法を再検討し、胃癌モデルラットを作製して発現解析する予定である。

(5) 心臓(心筋細胞)

① *in vivo* の発現解析: RT-PCR および免疫組織化学的染色による発現解析を行い、心筋細胞と毛細血管内皮細胞間で細胞接触により Eph/ephrin シグナルが発生する発現様式が認められることを明らかにした。

② 初代培養細胞を用いた解析: 初代培養心筋細胞に可溶性リガンドを添加して Eph の活性化させると、添加後 20 分前後でそれまで同期して拍動していた隣接する 2 つの心筋細胞塊の拍動リズムが乱れ (図 11)、この同調性阻害作用は Eph の強い活性化と相関性を示

すことを明らかにした。この心筋細胞拍動リズムの解析には代表研究者らが開発したソフトウェア Visorhythm を使用した。ビデオ画像をもとに、心筋細胞の拍動リズムを選択領域の白黒階調の経時的変化として捉え、相関係数の変化として表すソフトウェアであり、ビデオ画像の1フレーム画像から最大で6領域を選択し拍動リズムを表示することができる。

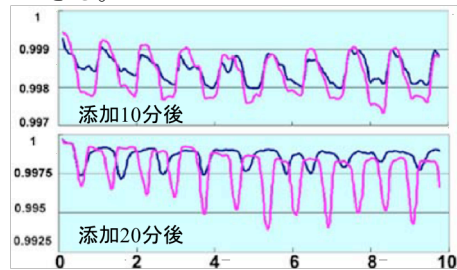


図11: 心筋細胞の拍動リズム
Ephrin-B1-Fc でEphB4を活性化すると
接着する細胞塊の同調性が消失した。

③分化心筋細胞: Eph 活性化と拍動リズムの乱れとの関連性を詳細に調べる目的で、心筋細胞に比較的簡単に遺伝子導入できる実験系の作出に着手した。遺伝子導入が容易で心筋細胞への分化が比較的簡単な胚芽腫細胞 P19CL6 からの作出を試みた。P19CL6 を心筋細胞に分化誘導する既存の方法は、分化率が一定せず実験間の再現性に乏しいため、サブクローン P19CL6-A1 を作製し再現性の高い分化誘導法を開発した(図12)。転写因子 GATA4, Nkx2-4 と収縮蛋白 α -MHC の発現動態を比較して親株よりも P19CL6-A1 の方が効率的に心筋細胞へ分化することを明示した。拍動リズムを解析するソフト Visorhythm と強心剤 (ouabain, IBMX) を使用して、P19CL6-A1 由来の心筋細胞が初代培養心筋細胞に代替できる細胞であることを証明した。P19CL6-A1 由来の心筋細胞を材料に、Eph シグナルが心筋細胞間の拍動同調性を乱す要因を検討する予定である。

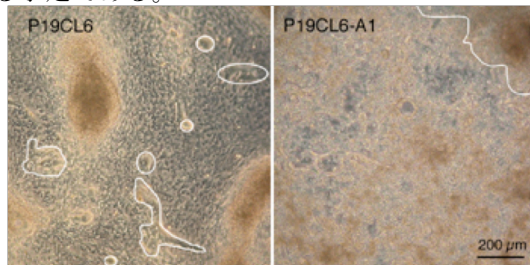


図12: 分化心筋細胞 (白線内の領域)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

① 小川和重, 武本奈津枝, 中島崇行 胃粘膜上皮に発現する EphB レセプターと

ephrin-B リガンド Acta Anatomica Nipponica, 82(Suppl.):136, 2007.

② 堀田名保恵, 中島崇行, 小川和重 成熟ラットの膀胱に発現する EphB と ephrin-B Acta Anatomica Nipponica, 82(Suppl.):136, 2007.

③ Ogawa, K., Wada, H., Okada, N., Harada, I., Nakajima, T., Pasquale, E.B., Tsuyama, S. EphB2 and ephrin-B1 expressed in the adult kidney regulate the cytoarchitecture of medullary tubule cellsthrough Rho family GTPases. J. Cell Sci., 119: 559-570, 2006.

[学会発表] (計 10 件)

① 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回日本獣医学会学術集会 (生理学・生化学分科会シンポジウム) 2009年4月4日 宇都宮市 (栃木県総合文化センター)

② ミユラー樹, 小林亮介, 中村 穰, 中島崇行, 小川和重 胚芽腫細胞 P19. CL6 を効率的に心筋細胞へ分化誘導させる方法の開発 第 84 回日本解剖学会近畿地区学術集会 2008年11月29日 大阪市 (大阪市立大学)

③ 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。第84回日本解剖学会近畿地区学術集会 2008年11月29日 大阪市 (大阪市立大学)

④ 小川和重, 内山慎太郎, ミユラー樹, 中島崇行 胃粘膜上皮細胞のEphBと ephrin-B (続報) 第146回日本獣医学会学術集会 2008年9月24日 宮崎市 (宮崎大学)

⑤ ミユラー樹, 小林亮介, 中島崇行, 小川和重 胚芽腫細胞株P19. CL6の心筋細胞への分化 第146回日本獣医学会学術集会 2008年9月24日 宮崎市 (宮崎大学)

⑥ 中村 穰, ミユラー樹, 中島崇行, 小川和重 マウス初代培養肝細胞に発現する EphB と ephrin-B 第 145 回日本獣医学会学術集会 2008年3月28日 相模原市 (麻布大学)

⑦ 堀田名保恵, ミユラー樹, 中島崇行, 小川和重 膀胱移行上皮に発現する EphB と ephrin-B 第 144 回日本獣医学会学術集会 2007年9月2日 江別市 (酪農学園大学)

⑧ 小川和重, 武本奈津枝, ミユラー樹, 中島崇行 胃粘膜上皮細胞の EphB と ephrin-B 第 144 回日本獣医学会学術集会 2007年9月2日 江別市 (酪農学園大学)

⑨ 武本奈津枝, 中島崇行, 小川和重 マウスの固有胃腺, 幽門腺, 十二指腸における EphB/ephrin-B 発現 第 142 回日本獣医学会学術集会 2006年9月23日 山口市 (山口大学)

⑩ 堀田名保恵, 中島崇行, 小川和重 ラット膀胱における EphB/ephrin-B の発現と局在
第 142 回日本獣医学会学術集会 2006 年 9 月
22 日 山口市 (山口大学)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

① P19CL6 のクローン細胞と心筋細胞への分化誘導法 小川和重, ミユラー樹, 室伏きみ子
大阪府立大学 特願 2009-060575 2009 年 3 月 13 日 国内

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) 研究分担者

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) 研究協力者

PASQUALE, ELENA

Burnham Institute (La Jolla, USA), 教授