

研究種目：基盤研究（C）**研究期間**：2007～2008**課題番号**：19590725**研究課題名（和文）**

胃粘膜増殖因子 REG の受容体とされている EXTL3 の真の機能

研究課題名（英文）

Another function of EXTL3 that was cloned as the cell surface receptor for Reg

研究代表者

門脇 泰憲 (KADOWAKI YASUNORI)

島根大学・医学部・講師

研究者番号：50322475

研究成果の概要：

我々は胃粘膜増殖因子 Reg が胃粘膜組織の発生、形態形成に重要な役割を果たす事を報告してきた。このような研究は将来発展すると思われる消化管再生医療の礎となる。一方、生物の組織の形が決まる過程で、morphogen と称される分子の組織中での濃度の勾配が重要で、この濃度の違いによって各々の位置における細胞の性質が変わり、結果として生物の形が決定されるという機構がハエの研究などで知られている。我々は Reg が胃粘膜腺においてこのような濃度勾配を形成し、morphogen として働くと考えた。本研究では胃粘膜組織に模した培養細胞系を構築し、Reg にこのような性質があり、糖転移酵素 EXTL3 がこれを助けることを証明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：Reg、胃粘膜線、morphogen

1. 研究開始当初の背景

Reg は、そのアミノ酸配列から C 型レクチンファミリーに属する分泌ペプチドであり、1988 年に臍再生を制御する増殖因子として発見された。我々はこの Reg が臍のみならず胃粘膜線の再生および発生時の組織構築において重要な役割を果たす因子であることを報告してきた。

我々はまず Reg トランスジェニックマウスを作製し、胃底腺組織において Reg が主細胞、壁細胞系のみの増殖を著しく賦活することを明らかにした。それまでに遺伝子改変マウスにて胃粘膜細胞増殖作用が観察された HGF などの他の増殖因子は、全て表層粘液細胞系のみを増殖させており、Reg の特異で重要な役割が示されることとなった。

一方、この形質は、胃底腺増殖軸にそって適切な位置に正しく分化した細胞を並べるための機構に異常が生じている、と解釈する事もでき、Reg がこの増殖軸上での morphogen としての機能を持つ事が示唆された。

次に我々は Reg ノックアウトマウスを作製し、Reg が小腸吸収上皮細胞の増殖を賦活すること、そしてこの作用が、中空の単なる管である小腸に絨毛構造が初めて発生する胎生期 D14 に、時間的に限局して現れることを示した。

2. 研究の目的

このように消化管組織形成において重要な役割を果たす Reg の細胞表面受容体として、糖転移酵素 EXTL3 がクローニングされているが、これは増殖因子の受容体としては典型的ではなく、何か別の働きをもって Reg と関わっている可能性も示唆された。EXTL3 は既に細胞表面に糖鎖タンパク質を生成させる事が知られており、我々はレクチンである Reg がこの糖鎖に結合するのではないかと考えた。さらに、胃粘膜腺細胞にこの糖鎖タンパク質が生成して Reg と結合することにより Reg が胃粘膜腺の長軸方法にそって molecular gradient を作り、morphogen として働くのではないかと考えた。本研究ではこの仮説の証明にせまることを目的とした。

3. 研究の方法

筒状のチャンバーを利用し、培養プレートの中心に Reg 発現ベクターをトランスフェクションした COS 細胞を周囲の細胞と混じり合わないよう培養する、この周囲に EXTL3 をトランスフェクションした CHO 細胞を培養し、Reg の molecular gradient を観察する。

また、これと別に同様の細胞培養系を

用いて、GFP タンパク質と Reg タンパク質の fusion タンパク質を発現するベクターを、中心の細胞に発現させる。さらに EXTL3 ノックアウトマウスを用い in vivo にて Reg の molecular gradient が、EXTL3 の活性のある、なしによって変化するか調べる。

4. 研究成果

上記の細胞系にクロスリンカーを作用させた後、細胞表面に抗 Reg 抗体を作用させさらに固定、染色したところ、Reg が COS 細胞を中心に、CHO 細胞表面上に同心円状に molecular gradient を作っている事が観察された。EXTL3 をトランスフェクションしていない negative control では見られなかった。これは CHO 細胞に EXTL3 cDNA のかわりに mock をトランスフェクションした実験系ではみられなかった。GFP 融合 Reg タンパクを COS 細胞で発現させた系を用いると同様の molecular gradient が観察された。EXTL3 ノックアウトマウスに関する実験は、現在進行中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕計5件

1: Aziz MM, Ishihara S, Mishima Yo, Oshima N, Moriyama I, Yuki T, Kadowaki Y, Rumi MA, Amano Y, Kinoshita Y. MFG-E8 attenuates intestinal inflammation in murine experimental colitis by modulating osteopontin-dependent $\alpha\beta3$ -integrin signaling. J Immunol. In press

2: Moriyama I, Ishihara S, Rumi MA, Aziz MD, Mishima Y, Oshima N, Kadota C, Kadowaki Y, Amano Y, Kinoshita Y. Decoy oligodeoxynucleotide targeting activator protein-1 (AP-1) attenuates intestinal inflammation in murine experimental colitis. Lab Invest. 2008 Jun;88(6):652-63.

3: Aziz MM, Ishihara S, Rumi MA, Mishima Y, Oshima N, Kadota C, Moriyama I, Li YY, Rahman FB, Otani A, Oka A, Ishimura N, Kadowaki Y, Amano Y, Kinoshita Y. Prolactin induces MFG-E8 production in macrophages via transcription factor C/EBPbeta-dependent pathway. Apoptosis. 2008 May;13(5):609-20.

4: Chinuki D, Amano Y, Ishihara S, Moriyama N, Ishimura N, Kazumori H, Kadowaki Y, Takasawa S, Okamoto H, Kinoshita Y. REG Ialpha protein expression in Barrett's esophagus. J Gastroenterol Hepatol. 2008 Feb;23(2):296-302.

5: Ose T, Kadowaki Y, Fukuhara H, Kazumori H, Ishihara S, Udagawa J, Otani H, Takasawa S, Okamoto H, Kinoshita Y. Reg I-knockout mice reveal its role in regulation of cell growth that is required in generation and maintenance of the villous structure of small intestine. Oncogene. 2007 Jan 18;26(3):349-59.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

門脇 泰憲 (KADOWAKI YASUNORI)

島根大学・医学部・講師

研究者番号：50322475

(2) 連携研究者

木下 芳一

(KINOSHITA YOSHIKAZU)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：30243306