◆ 総 説 ◆

膜結合型 heparin-binding EGF-like growth factor (proHB-EGF)
の尿細管形態形成作用—三次元培養での検討—竹村 司・日野 聡・村田 由佳・柳田 英彦
八木 和郎・福島 強次・岡田 満・吉岡加寿夫

要 旨

膜結合型 heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (proHB-EGF) の尿細管形態形成作用について検討した。胎生ラット (16~18day) 腎組織では、HB-EGF 蛋白は、尿管芽に強く認められ、また mRNA レベルでも強い発現を認めた。Phorbol ester にて、soluble form の HB-EGF を切断した後の proHB-EGF 発現細胞は、無血清の plastic dish 上の monolayer culture にて、branching 像を呈した。その機序として、proHB-EGF の細胞運動能の促進、自身の receptor である EGF receptor の upregulation や切断された proHB-EGF の細胞接触面での局性を持った回復が重要な役割を持つことが示唆された。また、無血清 type I collagen gel を用いた three dimensional culture system での proHB-EGF 発現細胞の培養では、管腔側に microvilli を持つ apical surface を、外側には basal surface を示す管腔構造特有の性格を示しながら分裂した。一方、soluble form の HB-EGF を添加した empty vector cell ならびに wild NRK 52E 細胞の monolayer および collagen gel culture では、これら一連の branching や tubulogenesis は観察されなかったことから、proHB-EGF の juxtacrine を介した細胞間結

合ならびに細胞外基質との相互作用が、尿細管形態形成に重要な要素であることが示唆された。

序 言

heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) は、ヒト組織球性リンパ腫由来の U-937細胞の培養上清より分離された比較的新しい EGF family growth factor に属する成長因子である¹⁾。HB-EGF は、EGF 様 domain を1個持ち、細胞膜貫通型の前駆体 (proHB-EGF) として合成される。そのシグナル伝達は、種々な protease によりプロセッシングをうけ、遊離型である mature HB-EGF となり paracrine 的に EGF 受容体に結合することによる¹⁾。しかし最近の研究により、HB-EGF は proHB-EGF のままでも receptor に結合しうる juxtacrine 活性を持つことが明らかとなっている¹⁾²⁾。このシグナル伝達は、同じ受容体を持った細胞群の中から隣接した細胞にのみにシグナルを伝達するという利点を持つため、特に発生・器官形成の過程で、特定の細胞のみを増殖・分化させるといった重要な役割を持つものと考えられている。器管発達や形態形成の過程では、細胞の増殖や分化、遊走、また細胞外マトリックスの産生とその相互作用は、共通して認められる現象である³⁾⁴⁾。腎での尿細管の発生過程でも同様に、metanephros からの分化とそれを支持する間葉系組織の発展が基本的な現象である。近年この過程には、epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor- α (TGF- α) などの EGF family に属する成長因子や hepatocyte growth factor (HGF) などが重要な役割を持つことが報告されている⁵⁾⁶⁾。しか

近畿大学 小児科

(〒589-8511 大阪府大阪狭山市大野東377-2)

A potential role of membrane-anchored heparin binding EGF-like growth factor for tubulogenesis determined by using type I collagen gel culture system

Tsukasa Takemura, Satoshi Hino, Yuka Murata, Hidehiko Yanagida, Kazuro Yagi, kyouji Fukushima, Mitsuru Okada and Kazuo Yoshioka

Department of Pediatrics, Kinki University School of Medicine

Key Words: 膜結合型 HB-EGF

尿細管上皮細胞

juxtacrine 活性

collagen gel culture system

し nephrogenesis の過程における HB-EGF の役割については現在まだ十分には明らかにされていない。この研究では、これらを明らかにする目的で、proHB-EGF を強制発現させたラット尿細管細胞を作成し、尿細管形態形成における HB-EGF の役割について検討した。

方 法

(1) proHB-EGF 発現細胞の作成

Sprague-Dawley (S-D) ラット (12W, 雄, 体重 150~200g) にゲンタマイシンを 200mg/dl を 12 時間間隔で計 4 回皮下注することによりゲンタマイシン腎症を作成し、摘出した腎よりアイソジェンを用いて RNA を抽出した。RT-PCR 法にて proHB-EGF cDNA を増幅させ、これを一旦、非発現ベクターである pCR™2.1 vector に ligate し、direction と sequence の確認後に発現 vector pCR/CMV に組み込んだ。その後、ラット尿細管上皮細胞由来の NRK 52E 細胞にリポフェクテン法にて transfect し、geneticin (G418) によるセクション後にコロニーを単離した。Northern blot ならびに western blot にて、HB-EGF mRNA および蛋白レベルの強い発現が確認された 3 株を実験に用いた。培養方法は、10% FCS 加 DMEM 培地を使用し、通常の plastic dish を用いた単層培養と three dimensional type I collagen gel culture を用いた。

(2) ラット胎児腎における HB-EGF mRNA と蛋白の局在

胎生 16~18 日目の S-D ラットより腎を摘出し、mRNA を抽出後、northern blot を施行した。蛋白の局在は、抗 HB-EGF 抗体を用いた酵素抗体法によった。

成 績

(1) ラット胎児腎における HB-EGF 蛋白の発現とその局在ならびに mRNA の発現

胎生 18 日目のラットの腎での HB-EGF 蛋白の局在は、尿管芽に強く発現していた。一方、対照とした adult S-D ラット (12W) では、HB-EGF 蛋白は、糸球体や尿細管のいずれの部位にもその発現は認められなかった。胎生 18, 20 日目、生後 10 日目と 12 週のラットの腎での HB-EGF mRNA の発現を northern blot にて観察したところ、HB-EGF mRNA は、胎生ラット腎 (16~20 日目) で著明に、生後 10 日目の腎でも軽度な発現増強が観察されたが、一方 adult S-D ラットでは、ごく弱いものであった。

(2) proHB-EGF 発現細胞の単層培養による branching 現象

proHB-EGF 発現細胞を phorbol ester にて処理し、mature HB-EGF を切断した後に、無血清培地に単層培養し、検討した。この手順は、mature HB-EGF が切断された後、約 12 から 24 時間頃までに proHB-EGF は、細胞膜上に再構築されるという実験成績と FCS に含まれる tubulogenesis に関与する種々な成長因子を除外することにより、proHB-EGF の尿細管形成に関わる役割をより明らかにすることを目的としたものである。その結果、培養 10 から 12 時間後には、小さな cell cluster と短い single monolayer が観察され、さらに 14 から 16 時間後には branching が次第に延長され、20 時間頃より、隣接する branch 同士が連結し、20 から 24 時間目に管腔様構造を形成しながら分化する極性が認められ、36 時間後には尿細管類似の構造を呈した。一方、コントロールである empty vector を transfect させた細胞ではこのような極性は観察されず、またこれらに mature HB-EGF を添加しても branching は再現されなかった。

(3) 単層培養における proHB-EGF 発現細胞の branching の機序についての検討

Phorbol ester にて同様に処理し、無血清培地にて、proHB-EGF 発現細胞を培養し、その運動性を観察したところ、培養約 6 時間後より、接着した細胞は膨化し、9 時間目にはアメーバ様の偽足が出現し、12 時間後ではすでに遊走像を呈した。またこれらの細胞より、経時的に mRNA を抽出し、HB-EGF の receptor である EGF receptor mRNA の発現を northern blot にて検討したところ、EGF-receptor mRNA は 18~24 時間をピークとして upregulate されることが明らかとなった。一方、コントロール細胞では、これらのいずれの現象も観察されなかった。また、mature HB-EGF が切断された後の 12 時間目の proHB-EGF 発現細胞の細胞膜上での proHB-EGF 蛋白の回復を HRPO を標識とした免疫電顕にて観察したところ、proHB-EGF は、最初に細胞同士が接着する面の細胞膜上のみに極性を持った回復を示した。

(4) type I collagen gel 内における proHB-EGF 発現細胞の tubulogenesis についての検討

proHB-EGF の尿細管形態形成作用をより明らかにする目的で、無血清 type I collagen gel を用いた 3 次元培養を施行した。培養 1 日目で、phorbol ester にて処理された proHB-EGF 発現細胞は、small cyst を形成し、2 日目にはこれらの cyst は、管腔構造形成の基礎となる極性を持って分化した。3 日目には明らかな管腔構造を有する不完全な tubules 様の構造を示し、これ

らは4から5日目にさらに延長し、6日目には成熟した尿管類似構造が構築された。一方、mature HB-EGFを含む type I collagen gel 内でのコントロール細胞 (empty vector 細胞) の培養では、これらの現象は認められなかった。この尿管類似構造物の極性を電子顕微鏡にて観察したところ、管腔側には多数の microvilli を有する apical surface を、外側には細胞表面が平滑な basal surface を示す管腔構造特有の極性を持つことが明らかとなった。また、隣接する細胞間同士の接着部位に junctional complex の存在が確認された。

考 察

tubulogenesis あるいは nephrogenesis についての検討は、これまで、metanephritic culture system や尿管上皮細胞由来の cell line を用いた、3次元培養システムの確立以来飛躍的な進歩を遂げつつある⁷⁾⁹⁾。特に、HGF, platelet derived growth factor (PDGF) や TNF- α などの成長因子の tubulogenetic な役割が知られており⁵⁾⁶⁾⁹⁾、新しい成長因子である HB-EGF については十分には解明されていない。今回のわれわれの成績は、HB-EGF は、nephrogenesis に関与する重要な成長因子のひとつである可能性を示唆するものと思われる。そのメカニズムについての検討では、単層培養による branching 現象については、切断された proHB-EGF は、細胞と細胞の接着面を中心とした局性を持った回復を示すこと、ならびに細胞運動性の促進、また自身の receptor である EGF-receptor の数の制御によることが明らかとなった。また、器官形成の過程には、cell-cell interaction と同程度に cell-matrix との関係も重要であることが知られている。これまでのわれわれの検討で、proHB-EGF 強制発現細胞は、間質型コラーゲンである I 型、III型コラーゲンの発現増強を示すことが明らかとなっており、HB-EGF は、細胞対細胞、細胞対細胞外基質の相互関係を強化することにより、尿管形態形成に関与しているものと推察される²⁾。また、Phorbol ester にて処理したコントロールである empty vector 細胞に、mature form の HB-EGF を添加しても、これらの branching 現象が再現されなかったことから、この過程には、proHB-EGF による juxtacrine を介した機序が重要な役割を持つものと思われる²⁾。組織構築とは元来3次元的なものであり、単層培養による極性を形態形成と表現するにはやや矛盾があるが、しかしこれらの所見も、低い次元ながら尿管の形態形成を反映しているものと考えられる。しかし、今

回われわれの type I collagen gel を用いた3次元培養にて、proHB-EGF は、tubulogenesis にかかわる成長因子のひとつであることがより明らかとなった。tubulogenesis と branching は、尿管形態形成の基本的な現象ではあるが、両者は必ずしも同時に進行するものでないことは、これまでの研究により明らかにされている。TGF- α は、tubulogenesis の最終過程における、尿管成熟期に特に重要な役割を持ち、HGF は、branching ならびに tubulogenesis 誘導の両方の過程に作用することが報告されている⁹⁾。今回のわれわれの成績では、HB-EGF は、HGF と同様に、この両過程に必要な成長因子である可能性がある。近年 Jonathan らにより、ureteric bud cell の培養系が確立されており、今後これらを用いた検討により、より直接的な研究の発展が期待される¹⁰⁾。

文 献

- 1) Higashiyama, S., Abraham, J.A., Miller, J., Fiddes, J.C. and Klagsbrun, M.: Heparin binding growth factor secreted by macrophage-like cell line that is related to EGF. *Science* 251: 936-939, 1991.
- 2) Takemura, T., Kondo, S., Homma, T., Sakai, M. and Raymond C. Harris: The membrane-bound form of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor promotes survival of cultured renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 272: 31036-31042, 1996.
- 3) Nigam, S.K., Aperia, A. and Brenner, B.M.: Development, maturation of the kidney, in the kidney, edited by Brenner, B.M., Saunders, Philadelphia, 1996.
- 4) Saxen, L. and Lehtonen, E. Transfilter induction of kidney tubules as a function of the extent and duration of intracellular contacts. *J. Embryol. Exp. Morph.* 47: 97-109, 1978.
- 5) Goodyer, P.R., Fata, J., Goodyer, C.G. and Guida, H.: Transforming growth factor alpha and the ontogeny of epidermal growth factor receptors in rat kidney. *Growth Regulation* 1: 105-109, 1991.
- 6) Santos, O. F. and Nigam, S.K.: HGF-induced tubulogenesis and branching of epithelial cells is modulated by extracellular matrix and TGF-beta. *Dev. Biol.* 160: 293-302, 1993.
- 7) Briere, N.: Human fetal kidney explants in serum-free organ culture. *Anat. Embryol. (Berl.)* 176: 105-114, 1987.
- 8) Barros, E.J., Santos, O.F., Matsumoto, K., Nakamura, T. and Nigam, S.K.: Differential tubulogenic and branching morphogenetic activities of growth factors: Implications for epithelial tissue development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 4412-4416, 1995.
- 9) Montesano, R., Schaller, G. and Orci, L.: Induction of epithelial tubular morphogenesis in vitro by fibroblast-derived soluble factors. *Cell.* 66: 697-711, 1991.
- 10) Barasch, J., Pressler, L., Connor, J. and Malik, A.: A ureteric bud cell line induces nephrogenesis in two steps by two distinct signals. *Am. J. Physiol.* 271: F50-F61, 1996.