



EGF rapidly translocates tight junction proteins from the cytoplasm to the cell-cell contact via protein kinase C activation in TMK-1 gastric cancer cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 吉田, 賢一 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/316">http://hdl.handle.net/10271/316</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 4 1 5 号	学位授与年月日	平成 1 8 年 1 月 2 0 日
氏 名	吉 田 賢 一		
論文題目	EGF rapidly translocates tight junction proteins from the cytoplasm to the cell-cell contact via protein kinase C activation in TMK-1 gastric cancer cells (胃癌培養細胞 TMK-1 において EGF は protein kinase C の活性化を介して tight junction 蛋白を短時間に細胞質から細胞膜へと移動させる)		

博士(医学) 吉田賢一

## 論文題目

EGF rapidly translocates tight junction proteins from the cytoplasm to the cell-cell contact via protein kinase C activation in TMK-1 gastric cancer cells

(胃癌培養細胞TMK-1においてEGFはprotein kinase Cの活性化を介してtight junction蛋白を短時間に細胞質から細胞膜へと移動させる)

## 論文の内容の要旨

[はじめに]

Tight junction (TJ)は最もapical側にある細胞間接着装置であり、膜蛋白としてoccludin、claudin、junction adhesion moleculeが同定されている。ZO-1は細胞膜下に存在するTJ蛋白でkey proteinと考えられている。ところで、癌は様々な増殖因子により制御されており、癌ではTJが破壊されていることが知られているが、癌に様々な作用をする増殖因子はTJの制御にも関与することが知られている。胃癌ではEGFやEGF receptorが高発現しているとの報告がみられるが、胃癌細胞におけるEGFのTJへの影響についてはよくわかっていない。そこで、低分化型胃癌培養細胞株TMK-1を用いてTJの発現・局在の検討を行うとともに、EGFを含む増殖因子のTJへの影響と、関与する細胞内シグナルを検討した。

[材料ならびに方法]

60-70%の細胞密度で培養した胃癌培養細胞株MKN-7(高分化型)、MKN-28(中分化型)TMK-1(低分化型)を用いた。

- (1) MKN-7、MKN-28、TMK-1の各細胞株におけるZO-1の発現を免疫蛍光染色(IF)で比較した。
- (2) TMK-1細胞において10%FBSを含む新鮮な培養液に交換後30分でのTJ蛋白(ZO-1、occludin)の局在変化をIFとWestern blot(WB)で観察し、培養液交換前と比較検討した。
- (3) TMK-1細胞においてEGF(100ng/ml)作用後30分でのTJ蛋白(ZO-1、occludin)の局在変化をIFとWBで観察し、作用前と比較検討した。また経時的にこれらの変化を観察した。
- (4) 細胞内シグナル阻害剤であるPD98059(MAP kinase inhibitor)、LY294002(PI3 kinase inhibitor)、KT5720(PKA inhibitor)、calphostin C、Go6976、bisindolylmaleimide I(以上PKC inhibitor)を前投与し、FBSやEGFによる局在変化に関与する細胞内シグナルをIFで検討した。

[結果]

- (1) TMK-1はMKN-7やMKN-28と比較し、cell-cell contactでのZO-1の発現が低下している一方、細胞質での染まりが強くみられた。
- (2) 10%FBSを含む培養液を新鮮なものに交換すると、30分でTMK-1は細胞間接着が密になり、IF上ZO-1、occludinのcell-cell contactでの染まりが増加した。WBではZO-1、occludin共に総蛋白量に変化を認めなかったが、NP-40不溶性分画/可溶性分画比の上昇を認めた。
- (3) EGF100ng/mlを30分間作用させると、細胞間接着の促進とcell-cell contactでのZO-1、occludinの発現の増加がIFで認められた。WBではNP-40不溶性分画/可溶性分画比の上昇を認めた。またこれらの変化は30分~2時間をピークとした一過性変化であった。TGF- $\beta$  110ng/ml、PDGF 5ng/mlでは有意な変化は認められなかった。

(4) 細胞内シグナル阻害剤PD98059、LY294002、KT5720の前投与では、10%FBSを含む新鮮な培養液、あるいはEGF100ng/mlによるTJ蛋白の局在変化は阻害されなかった。10%FBSを含む新鮮な培養液によるTJ蛋白の局在変化はcalphostin C(non-specific PKC inhibitor)により阻害され、bisindolylmaleimide I(classical & novel PKC inhibitor)により部分的に阻害された。またEGFによるTJ蛋白の局在変化はcalphostin C、bisindolylmaleimide Iによりほぼ完全に阻害された。尚、FBSとEGFによる変化は共にGö6976(classical PKC inhibitor)では阻害されなかった。

#### [考察]

EGFのTJに対する再構築作用はepidermal carcinoma細胞株A431cellでZO-1の局在変化をみた報告があるが、胃癌培養細胞での報告は初めてである。EGFの作用である増殖/運動能の亢進時、細胞間接着は解離に働くが、短時間でのTJ蛋白のcell-cell contactへの局在変化は細胞間接着を促進するようにみえる。これはリンパ節などにおける癌の転移巣での初期のcolonizationに関与している可能性が考えられる。

#### [結論]

TMK-1では、培養液中のFBSは短時間(30分)で細胞間接着を密にし、TJ蛋白であるZO-1、occludinをcytosolからcell-cell contactへ移動させた。この局在変化をおこす因子の一つとしてEGFが関与していることが示唆され、またこの局在変化にPKCシグナルの関与が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

腫瘍細胞の種々の接着装置は腫瘍の形を作るばかりでなく、その生物学的あるいは病理学的性質にも影響する。中でもTight junction(TJ)は最もapical側にある細胞間接着装置であり、膜蛋白としてoccludin、claudin、junction adhesion moleculeが同定されている。さらにZO-1は細胞膜下に存在するTJ蛋白でkey proteinと考えられている。ところで、癌は様々な増殖因子により制御されており、癌ではTJが破壊されていることが知られているが、癌に様々な作用をする増殖因子はTJの制御にも関与することが知られている。胃癌ではEGFやEGF receptorが高発現しているとの報告がみられるが、胃癌細胞におけるEGFのTJへの影響についてはよくわかっていない。そこで、申請者は、胃癌細胞に於けるZO-1の状態を調べ、続いて低分化型胃癌培養細胞株TMK-1を用いてTJの発現・局在の検討を行うとともに、EGFを含む増殖因子のTJへの影響と、関与する細胞内シグナルを検討した。

#### [材料ならびに方法]

60-70%の細胞密度で培養した胃癌培養細胞株MKN-7(高分化型)、MKN-28(中分化型)TMK-1(低分化型)を用いた。

- (1) MKN-7、MKN-28、TMK-1の各細胞株におけるZO-1の発現を免疫蛍光染色(IF)で比較した。
- (2) TMK-1細胞において10%FBSを含む新鮮な培養液に交換後30分でのTJ蛋白(ZO-1、occludin)の局在変化を蛍光抗体法(IF)とWestern blot(WB)で観察し、培養液交換前と比較検討した。
- (3) TMK-1細胞においてEGF(100ng/ml)作用後30分でのTJ蛋白(ZO-1、occludin)の局在変化をIFとWBで観察し、作用前と比較検討した。また経時的にこれらの変化を観察した。細胞内シグナル阻害剤であるPD98059(MAP kinase inhibitor)、LY294002(PI3 kinase inhibitor)、KT5720(PKA inhibitor)、calphostin C、

Go6976, bisindolylmaleimide I (以上PKC inhibitor) を前投与し、FBSやEGFによる局在変化に關与する細胞内シグナルをIFで検討した。

〔結果〕

- (1) TMK-1はMKN-7やMKN-28と比較し、cell-cell contactでのZO-1の発現が低下している一方、細胞質での染まりが強くみられた。
- (2) 10%FBSを含む培養液を新鮮なものに交換すると、30分でTMK-1は細胞間接着が密になり、IF上ZO-1、occludinのcell-cell contactでの染まりが増加した。WBではZO-1、occludin共に総蛋白量に変化を認めなかったが、NP-40不溶性分画／可溶性分画比の上昇を認めた。
- (3) EGF100ng/mlを30分間作用させると、細胞間接着の促進とcell-cell contactでのZO-1、occludinの発現の増加がIFで認められた。WBではNP-40不溶性分画／可溶性分画比の上昇を認めた。またこれらの変化は30分～2時間をピークとした一過性変化であった。TGF- $\beta$ 1 10ng/ml、PDGF 5ng/mlでは有意な変化は認められなかった。
- (4) 細胞内シグナル阻害剤PD98059、LY294002、KT5720の前投与では、10%FBSを含む新鮮な培養液、あるいはEGF100ng/mlによるTJ蛋白の局在変化は阻害されなかった。10%FBSを含む新鮮な培養液によるTJ蛋白の局在変化はcalphostin C (non-specific PKC inhibitor) により阻害され、bisindolylmaleimide I (classical & novel PKC inhibitor) により部分的に阻害された。またEGFによるTJ蛋白の局在変化はcalphostin C、bisindolylmaleimide Iによりほぼ完全に阻害された。FBSとEGFによる変化は共にGö6976 (classical PKC inhibitor) では阻害されなかった。

以上の結果から申請者は、胃癌培養細胞TMK-1でEGFの作用である増殖／運動能の亢進時、細胞間接着は解離に働くが、短時間でのTJ蛋白のcell-cell contactへの局在変化は細胞間接着を促進するものと解釈し、リンパ節などにおける癌の転移巣での初期のcolonizationに關与している可能性があると考えた。この時のPKCシグナルの介在も初めて指摘した。

審査委員会はこの論文について以下の質問を行った。

- 1) claudinの腫瘍細胞に於ける発現の変化について
- 2) TJ蛋白の発現の変化と局在の変化について
- 3) 胃癌以外の癌におけるこれらの分子の変化の傾向について
- 4) A431細胞におけるEGFRの状態について
- 5) IFとWBには同じ抗体を用いているのか
- 6) 共焦点顕微鏡下で、apical側、basal側の発現の違いが同定できたか
- 7) ZO-1、occludinのリン酸化状態について
- 8) 実験に供した細胞のdoubling timeは
- 9) 培養液の交換頻度
- 10) FBSのロットによる違いはあったか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 梶 村 春 彦  
副査 峯 田 周 幸 副査 中 村 利 夫