

## 論文内容の要旨

論文題目

細胞膜タンパク質 TROP2 の発現および機能解析

( Studies on the expression and function of a membrane protein TROP2 )

塚原 由布子

### 1. TROP2 による肝臓の幹／前駆細胞の同定と肝幹／前駆細胞の性状解析

肝臓は、糖や脂質の代謝、血清タンパクの産生や胆汁の排出を行うなど生命維持に必須の臓器であるが、それらの機能は主に容積の大部分を占める肝実質細胞が担っている。肝実質細胞と胆汁の排出経路となる胆管を構成する胆管上皮細胞は、肝臓の発生において共通の起源であるヘパトブラスト（胎児肝臓幹／前駆細胞）より分化することから、肝臓における幹／前駆細胞とは、肝実質細胞と胆管上皮細胞への分化能を持つことが定義となっている。成体肝臓では、有害物質や病原体による傷害に対して、残存した肝実質細胞が増殖することで肝機能が保持される。しかしながら、慢性肝炎、劇症肝炎などの重篤な傷害によって肝実質細胞の増殖が抑制された環境下においては、オーバル細胞と呼ばれる小型の細胞が門脈域より出現し増殖する。このとき、オーバル細胞は肝実質細胞と胆管上皮細胞へと分化しうることから、オーバル細胞は成体肝臓における肝幹／前駆細胞であると考えられている。

筆者の所属研究室では、実体の不明であったオーバル細胞の同定および性状解析を目的とし、シグナルシーケンストラップ法を用いてオーバル細胞表面に発現する膜タンパク質のスクリーニングを行った。その結果、Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM)が胆管上皮細胞およびオーバル細胞のマーカー遺伝子として見出された。そこで本研究では、オーバル細胞のみに発現するマーカー遺伝子を同定するために、マウスのオーバル細胞誘導

モデルである 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC) を含む食餌を与えた傷害肝臓（以下 DDC 傷害肝臓）を用いて、EpCAM 陽性のオーバル細胞で発現が上昇する膜タンパク質を複数同定した。中でも EpCAM ファミリーを構成する TROP2 は、正常肝臓では発現せず DDC 傷害肝臓の EpCAM 陽性細胞にのみ発現する新規オーバル細胞マーカーであることが示された（図 1）。

これまで、正常肝臓および DDC 傷害肝臓 EpCAM 陽性細胞の初代培養から樹立した細胞株は肝実質細胞と胆管上皮細胞へと分化することを示しており、これらの細胞株が肝幹／前駆細胞としての能力を有することを明らかにしていた。そこで、この 2 系統の細胞株に発現する表面抗原を比較検討したところ、上皮系幹／前駆細胞マーカーの発現強度および発現細胞の割合が一致しており、正常肝臓および DDC 傷害肝臓 EpCAM 陽性細胞に存在する肝幹／前駆細胞の性質が非常に類似していることがわかった。次に、DDC 傷害肝臓 EpCAM 陽性細胞に含まれる肝幹／前駆細胞の割合を *in vitro* コロニーアッセイにより検討したところ、正常肝臓 EpCAM 陽性細胞に含まれる肝幹／前駆細胞の割合と有意な差は見られなかった。したがって、門脈域で増殖するオーバル細胞はごくわずかな肝幹／前駆細胞と、多数の一過性に増殖する分化の進んだ細胞からなる不均一な細胞集団であることが明らかとなった（図 2）。

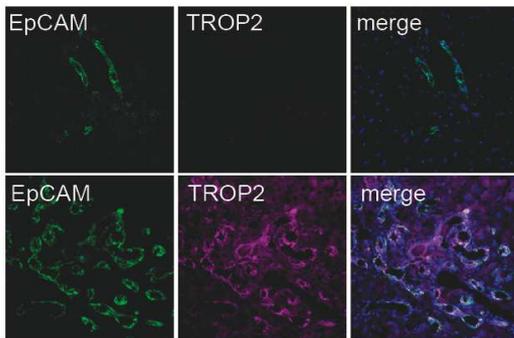


図1 正常肝臓およびDDC傷害肝臓におけるTROP2の発現解析

抗EpCAM抗体および抗TROP2抗体を用いたマウス成体肝臓の蛍光免疫染色。通常食のみ与えられた成体肝臓では、EpCAMは門脈周囲の胆管上皮細胞に発現するが、TROP2の発現は認められない。DDC傷害肝臓ではEpCAM陽性のオーバル細胞にTROP2が発現する。

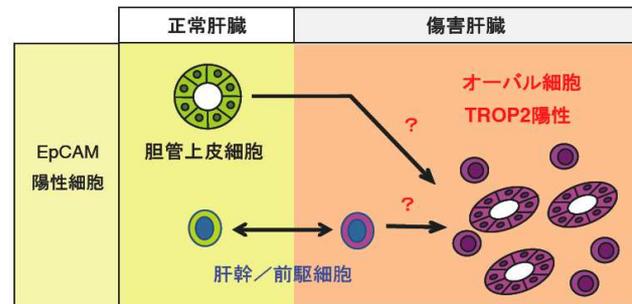


図2 マウス成体の正常肝臓および傷害肝臓における肝幹／前駆細胞とオーバル細胞の関係性

肝臓幹／前駆細胞は、正常肝臓においてEpCAM陽性の胆管上皮細胞に含まれている。重篤な傷害肝臓では、TROP2陽性／EpCAM陽性のオーバル細胞が門脈周囲に出現し、細胆管様構造を形成してうっ滞した胆汁の排泄を促し肝傷害を低減させるとともに、肝実質細胞へと分化し肝機能の回復にはたらく。正常肝臓と傷害肝臓に含まれる肝幹／前駆細胞は、性質が非常に類似しており同一の細胞である可能性が示唆される。また、オーバル細胞は均一な肝幹／前駆細胞の集団ではなく、大多数が分化した細胞集団であることがわかったが、オーバル細胞産生への肝幹／前駆細胞の寄与は不明である。

## 2. 腎臓の発生における TROP2 の機能解析

これまでの報告から、EpCAM および TROP2 は相同性が高く EpCAM ファミリーを構成しており、ともに癌細胞で発現が高いことや癌細胞の増殖を促進することが知られていた。しかしながら、オーバル細胞より樹立した細胞株を用いて EpCAM および TROP2 のオーバル細胞に

における増殖活性を検討したが有意な結果は得られなかった。そこで、EpCAM および TROP2 の新たな機能を明らかにするため、マウス発生過程における EpCAM と TROP2 の発現パターンを詳細に調べることで機能の推測を試みた。

胎生マウスを用いた蛍光免疫染色の結果、EpCAM は広く上皮細胞に発現するのに対し、TROP2 は腎臓、皮膚などの限られた組織の上皮細胞にのみ強く発現した。とりわけ胎児腎臓の尿管芽において、EpCAM は尿管芽の樹状構造全体に一樣に発現するのに対し、TROP2 は先端部では弱く基底部では強い発現を示した。また、皮膚でも EpCAM が基底層から上層にかけて発現するのに対し、TROP2 は上層の細胞にのみ強い発現を示した。このような TROP2 の発現パターンと増殖性を示す Ki67 の発現に相関性は認められなかったことから、発生過程の組織における TROP2 は、癌組織で報告されるような増殖活性以外の機能を持つ可能性が示唆された。そこで、尿管芽における TROP2 の局在を詳細に検討したところ、尿管芽の基底部で TROP2 は管構造の側底面に発現し、特に基底面で強く発現することを見出した。尿管芽はコラーゲンやラミニンといった細胞外マトリックスによって裏打ちされることで構造が強固に維持されるが、コラーゲンが尿管芽の先端から基底部にかけて発現が強くなる様子が TROP2 と発現パターンや局在が一致しており、基底面に多く存在する TROP2 がコラーゲンなどの細胞外マトリックスと細胞の接着性に影響を与えている可能性が示唆された。

そこで、尿管芽の初代培養系を用いて細胞と細胞外マトリックスとの接着性を検討すべく、はじめに EpCAM と TROP2 の発現を指標として尿管芽を分画しうるか調査した。マウス胎児腎臓の構成細胞を EpCAM と TROP2 で展開し、セルソーターにて EpCAM 陽性 TROP2 陰性細胞、EpCAM 陽性 TROP2 弱陽性細胞、EpCAM 陽性 TROP2 強陽性細胞の3分画を得た。それらを用いて遺伝子発現解析を行ったところ、EpCAM 陽性 TROP2 弱陽性細胞が尿管芽の先端部を含み、EpCAM 陽性 TROP2 強陽性細胞が尿管芽の基底部に相当することが示され、TROP2 の発現強度に基づき尿管芽を部位別に分けて性状解析を行うことが可能となった。そこで、TROP2 弱陽性細胞と強陽性細胞を用いて、コラーゲンコートした培養皿にて初代培養を行ったところ、尿管芽の先端部にあたる TROP2 弱陽性細胞では細胞が接着、伸展しラメリポディア様の運動性の高い細胞が観察されたのに対し、尿管芽の基底部にあたる TROP2 強陽性細胞では培養皿に対する接着性が低下し、TROP2 の発現レベルと細胞の接着性に負の相関が認められた。さらに、腎臓集合管由来細胞株である MDCK 細胞を用いて検討を行ったところ、TROP2 強制発現株はコラーゲンコート培養皿に対する接着性が有意に減少した。

細胞とコラーゲンなどの細胞外マトリックスの接着は、細胞膜上のインテグリンを介して行われており、インテグリンシグナルの下流にある focal adhesion kinase (Fak) や thymoma viral proto-oncogene1 (Akt1) の活性化によりアクチン重合が促進され、細胞の伸展や運動性が亢進する。そこで、コラーゲンコートした培養皿において TROP2 強制発現 MDCK 株を培養したとこ

ろ、Fak および Akt1 のリン酸化レベルが低下することを見出した。これらの結果から、TROP2 が細胞の伸展や運動性に関わる細胞内シグナルを抑制することで細胞の動態を負に制御するという TROP2 の新たな分子機構が明らかとなった。さらに、尿管芽の環境を模倣したコラーゲンゲル中での 3 次元培養において Hepatocyte growth factor (HGF) 刺激により細胞は樹状構造を形成するが、TROP2 強制発現 MDCK 株では樹状構造の形成能が低下していた。これらの結果から、TROP2 がコラーゲンに対する細胞の接着性や運動性を抑制することで、胎児腎臓の尿管芽に見られる管構造の安定性に寄与するものと考えられ、TROP2 による樹状構造構築に関わる分子メカニズムの一端が明らかにされた。また、TROP2 を発現する成体肝臓のオーバル細胞は細胆管構造を形成し、傷害によりうっ滞した胆汁の排泄に働くと考えられている。本研究で見出された TROP2 の機能は、腎発生における尿管芽のみならず、オーバル細胞における細胆管構造の構築にはたらく可能性が示唆された。