

主論文の要旨

**Tyrosine Phosphorylation of an Actin-Binding  
Protein Girdin Specifically Marks Tuft Cells in  
Human and Mouse Gut**

〔 アクチン結合タンパク Girdin のチロシンリン酸化は  
ヒトおよびマウスの消化管タフト細胞を特異的に標識する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻  
病態外科学講座 腫瘍外科学分野

(指導：椰野 正人 教授)

陸 大輔

## 【緒言】

タフト細胞は、哺乳類消化管に散在する比較的少数の上皮細胞で頂端に微細な毛の密集した特徴的な構造（タフト；房）を持つ。1956年 Jarvi らによる発見以来タフト細胞の定義は形態に依るところが大きい。タフト細胞は存在部位に依らず、(1)散在性分布、(2)紡錘形細胞体、(3)長く太い微絨毛が核上領域まで伸び末端網を形成しない、という共通性質を持つ。従来、Villin、Phalloidin、Cox2、DCLK1などがタフト細胞の分子マーカーとして使われてきたが、これらのマーカーは特異性や感度が低く、さらに細胞内の一部しか染めないためこれらを用いてタフト細胞の研究をする上で種々の制約があった。

我々の研究室は2005年 F-actin 結合タンパクとして Girdin を同定した。このタンパクの一次配列のうち1798番目のチロシンを含む13個のアミノ酸配列が哺乳類では高度に保存されており上皮成長因子(EGF)受容体などの受容体型チロシンキナーゼの下流でリン酸化し、アクチンフィラメント再構成を介した細胞遊走に関与することが他グループにより報告されたため、この1798番目のチロシン(Y1798)のリン酸化状態だけを特異的に検出する抗体(pY1798抗体)を開発した。この抗体を用いたマウス空腸の免疫染色でタフト細胞に酷似した細胞を見いだした。今回我々はY1798のリン酸化がヒトおよびマウスの消化管タフト細胞を特異的に標識するかどうかを検証した。

## 【対象と方法】

pY1798抗体は免疫生物研究所と合同で開発した。Girdin アミノ酸配列の1798番目のチロシンとその周囲の計13アミノ酸(KDSNPYATLPRAS)のうちチロシン部分(下線部)だけをリン酸化させたペプチドをウサギに免疫して血清IgG精製後、チロシンをリン酸化させない同等配列のペプチドを含む固相カラムに通し不要な抗体を吸収除去してpY1798抗体を得た。抗体の性能は、ドットブロットアッセイ、発現ベクターの部位特異的変異源導入、ノックアウトマウスの免疫染色等により検定され既に論文発表している(Omori K 2015)。マウスとヒト消化管組織を対象に、pY1798抗体や各種抗体を用いて免疫染色や電子顕微鏡観察を行った。またマウスを用いてシスプラチンおよびX線によるアポトシス誘導を行い、空腸タフト細胞を解析した。

## 【結果】

### pY1798は哺乳類消化管でタフト細胞に酷似した細胞を標識する

pY1798抗体を用いてマウス小腸の免疫染色を行い特徴的な形態を持つ上皮細胞群を同定した。これらの上皮細胞は、1)小腸全長の絨毛の頂点から陰窩を含む全部分に散在し小腸上皮総数の概ね1%を占める、2)周囲の吸収上皮と異なり細胞体の特に管腔側が円錐状になった紡錘形細胞体を持つ、3)pY1798抗体により細胞質全体が染まり円錐状の頂端に1つだけ特に強染する集塊を持つ、という共通性質を持っていた。この細胞群は既知のタフト細胞マーカーであるCox2で染色された上皮細胞と酷似した形態を持っていた(Fig.1A)。マウス組織においてもヒト組織においても、pY1798陽性上

皮細胞は胃、十二指腸、小腸、大腸、胆嚢に存在した(Fig.1C, D)。

#### **pY1798 陽性細胞は電子顕微鏡でタフト細胞の形態を持つ**

pY1798 抗体で免疫染色したパラフィン切片の電子顕微鏡観察を行ったところ pY1798 抗体で強染する頂端の集塊は微絨毛そのものであり、微絨毛直径が正常吸収上皮の微絨毛に比べて2倍程度に太く、その小根 rootlet は吸収上皮とは異なり末端網で終わらず核近くまで延長していた(Fig.2)。pY1798 陽性細胞の電子顕微鏡的な特徴は1956年 Jarvi により記述されたタフト細胞の特徴と一致した。

#### **pY1798 は既知のタフト細胞マーカーと共染する**

F-actin を特異的に染める Phalloidin と pY1798 抗体による二重蛍光染色を行ったところ、pY1798 抗体で強染する頂端の集塊は刷子縁の肥厚部に一致し、肥厚部から一部の F-actin 線維は核近くまで延長していた(Fig.3C)。pY1798 陽性細胞の刷子縁肥厚部には通常の吸収上皮刷子縁の約3倍の厚さがあった。既知のタフト細胞マーカー Cox2/UEA-I/Phalloidin と pY1798 抗体を組み合わせた多重免疫蛍光染色を行ったところ、既知のタフト細胞マーカー陽性細胞、刷子縁肥厚部を持つ細胞、pY1798 陽性細胞の三者が一致した(Fig.3D)。

#### **pY1798 陽性上皮は他の少数上皮細胞と別集団である**

pY1798 Girdin 抗体に染色された細胞が、小腸の他の上皮集団(ゴブレット細胞、パネート細胞、神経内分泌細胞)とは完全に別集団であるかどうかを検定した。アルシアンブルー陽性のゴブレット細胞、HE染色で染め分けられるパネート細胞、Insm1 陽性の神経内分泌細胞が pY1798 陽性上皮と完全に別集団であることを確認した(Fig.4A-C)。一方で吸収上皮のマーカー SGLT1 が pY1798 陽性細胞でも発現しており、しかも SGLT1 の細胞内局在は吸収上皮では刷子縁に見られたのに対して pY1798 陽性細胞では細胞質に内在化していたことから、pY1798 陽性細胞が吸収上皮と別集団ながら何らかのつながりを持つと考えられた。タフト細胞は成熟した上皮であると考えられてきたため pY1798 陽性細胞と細胞分裂マーカー(Ki67/PCNA)の二重蛍光染色を行ったところ、pY1798 陽性細胞では常に細胞分裂マーカーは陰性であった (Fig.4E)。以上の所見から pY1798 陽性細胞がタフト細胞であることを最終的に確認した。

#### **タフト細胞はアポトシスを受けない**

腸上皮は増殖、移動、分化、アポトシスが常に行われる高度に動的な組織で、2-7日ごとに細胞が完全に入れ替わっていると言われている。例えば小腸絨毛先端では上皮がアポトシスをして剥離する。タフト細胞もそのようにアポトシスを受けるのかを pY1798 抗体とアポトシスマーカー(TUNEL/Cleaved caspase 3)を用いて検定した。その結果、基礎状態でタフト細胞が決してこれらのアポトシスマーカーを発現しなかった(Fig.5A, B)。致死量のシスプラチンによる強制的アポトシス誘導では興味深いことにタフト細胞の有意な細胞比率増加が観察されたが(高用量シスプラチンで約3倍)、そのような条件下でも pY1798 陽性タフト細胞は Cleaved Caspase 3 陽性のアポトシス細胞とは相互排他的であった(Fig. 5C,D)。

## 【考察】

電子顕微鏡解析、組織学的解析により Girdin の 1798 番目のチロシンでのリン酸化状態特異抗体 (pY1798 抗体) は哺乳類消化管での新しいタフト細胞マーカーであることを発見した。pY1798 がタフト細胞を染色する特異性と感度は極めて高く、またタフト細胞の細胞質だけでなく特有の構造体である頂端のタフトを特に強く染色する点でも pY1798 の性能は従来型タフトマーカーの性能を圧倒している。我々の発見には、新規マーカー同定という意義を超えた科学的価値がある。それはタフト細胞の特徴が、Girdin の発現状態でなく、Girdin のリン酸化状態だという点である。実際 Girdin を発現している吸収上皮では Girdin が全くリン酸化していないのに、隣接したタフト細胞においては極めて高いレベルにリン酸化しており、その対比は真に二値的(全か無か)であった。チロシンリン酸化とアポトシス抵抗性という2つの性質は、何らかのチロシンキナーゼがタフト細胞において特異的に活性化していることを示唆する。

タフト細胞にはまだ説明されていない特徴 (決して隣り合わない。細胞頂部が周囲の細胞に絞り込まれている。細胞底部が基底膜からしばしば外れて核位置が内腔側に偏位している) がある。機械的張力、例えば上皮の過密が引き起こす剰余圧力によるチロシンキナーゼ活性化機構が存在し吸収上皮からタフト細胞への変換を引き起こす可能性もある。

## 【結語】

Girdin の 1798 番目のチロシンでのリン酸化状態特異抗体 (pY1798 抗体) は、特徴的形態を可視化する新規タフト細胞マーカーである。タフト細胞での選択的チロシンリン酸化とアポトシス抵抗性はタフト細胞で活性化するチロシンキナーゼの存在を示唆し、これが将来タフト細胞の謎に満ちた役割を解明する手がかりになると思われる。