

ラット上皮組織における コラーゲン特異的ストレスタンパク質Hsp47の発現

櫻井裕子 奥山典子 玉村清治
小澤 亮 伊東博司 山崎 章

Expression of Collagen-specific Stress Protein Hsp47 in Rat Epithelial Tissue

Yuuko SAKURAI, Noriko OKUYAMA, Kiyoharu TAMAMURA
Ryou OZAWA, Hiroshi ITO and Akira YAMASAKI

An immunohistochemical study was undertaken to clarify the role of collagen-specific stress protein Hsp47 in rat epithelial tissue. Basal keratinocytes of squamous epithelia including back skin epidermis and lining epithelia of oral mucosa and esophagus commonly displayed expression of Hsp47 to various extents. The most prominent expression was observed in gingival epithelium. Glomerular podocytes showed a strong expression of Hsp47. The lining epithelia of respiratory, digestive, and urinary system, renal tubules, and salivary gland did not exhibit notable expression of Hsp47. From the distributional characteristic, Hsp47 in the squamous epithelium and podocytes is presumed to play an essential role as a molecular chaperon in the folding and assembly of type IV collagen, a main constituent of basement membrane.

Key words : Hsp47, epithelial cells, basement membrane, type IV collagen

緒 言

ショウジョウバエを高温に曝したところ唾液腺に特異的なタンパク質が誘導された。その後このタンパク質はほとんどすべての生物に保存されていることが明らかになり、温度の上昇によって誘導されることから熱ショックタンパク質heat shock protein (Hsp) と名付けられた。その後の研究で熱ショック以外の様々な環境ストレスや病的ストレスによっても誘導され、傷害を受けた細胞を防御することが明らかになり、現在ではストレスタンパク質と称されている。さらに近年、ストレスを受けていない細胞でも発現し、正常の細

胞機能、殊にタンパク質の折り畳みや会合にいわゆる分子シャペロンとして必須の役割を演じていることが明らかになってきた¹⁾。

1986年Nagataら²⁾は、胎生ニワトリ線維芽細胞を温度42℃以上で培養するとコラーゲン結合能を有する分子量47,000の糖タンパク質の合成が促進されることを見出し、これを新たな熱ショックタンパク質heat shock protein 47 (hsp47) として報告した。その後Hsp47は、コラーゲン産生細胞の小胞体内に存在し、その動態がコラーゲンの成熟、細胞内輸送と密接に関係していることが明らかになり³⁻⁵⁾、現在ではコラーゲン特異的分子シャペロンとして認識されている。またストレスを受け

ていない細胞にも出現するところからコラーゲン産生細胞の組織化学的分化マーカーとしても用いられている⁶⁾。

Hsp47の発現はコラーゲン産生細胞を本来の機能としない細胞でも観察されている。Suzukiら⁷⁾は、実験的腎線維症において尿細管上皮細胞にHsp47の発現を観察し、病変の発生への上皮細胞の直接関与を示唆している。また、ラット胎児表皮⁸⁾や創傷治癒時の再生表皮⁹⁾でも発現が観察されているがその意義については言及されていない。最近我々はラット口蓋粘膜上皮基底層にHsp47の構成的発現を観察した。本研究ではその意義を明らかにするために、種々のラット上皮組織におけるHsp47の発現を免疫組織化学的に検討した。

材料と方法

1. 実験動物と試料作製

実験動物の扱いに関しては奥羽大学実験動物取り扱い規程に従った。観察対象として8週齢Wistarラットを用いた。50mg/kg体重のペントバルビタールナトリウム（ネンプタール，ABOTT, USA）腹腔投与による麻酔下，左心室からリン酸緩衝4%パラホルムアルデヒド120mlを約15分間灌流させたのち各試料を採取，同じ固定液に浸漬してさらに18時間固定した。硬組織を含む試料は10%EDTA水溶液（pH7.4，室温）で10日間脱灰した。試料は通法に従いパラフィンに包埋し，厚さ4 μ mの切片を作製した。

2. 免疫組織化学

免疫組織化学的染色はLabeled-streptavidin - biotin(LSAB)法で行った。キシレンにより脱パラフィンを行ったのち，切片を95°Cのグリシン-HCl緩衝液に7分間2回浸漬し抗原の賦活化を行った，次に0.3%過酸化水素水加PBSに室温で20分浸漬して内因性ペルオキシダーゼを除去し，抗体の非特異的反応を防止するため，切片にヤギ正常血清を室温で20分反応させた。一次抗体としてマウス抗ヒトHsp47モノクローナル抗体（1:500, StressGen, USA）を室温で1時間反応させた。次いで二次抗体としてビオチン標識ヤギ抗マウスIgG（1:100, CHEMICON, Canada）を室温で30分，ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジ

ン（ニチレイ（東京））を室温で30分反応させたのち，0.005%過酸化水素水を添加した0.02%3'-ジアミノベンチジン・4HCl/0.05Mトリス塩酸緩衝液，pH7.6（DAB基質キット，ニチレイ（東京））にて発色させた。核染色はヘマトキシリンで行った。一次抗体に代えて非免疫正常血清で反応を行った切片を陰性対照とした。

結 果

表1にラット各種上皮組織でのHsp47発現状況を示した。

口腔粘膜では，いずれの部位においても被覆上皮基底層がHsp47の発現を示したが，歯肉が最も強く（図1，2），口蓋がそれに次ぎ，これらに比べると頬や舌では全体に弱く，発現を示さない部分も観察された。唾液腺では腺房細胞，導管上皮ともに発現を示さなかった。歯肉では，エナメル質に面する1層の接合上皮細胞が発現を示した（図2）。

切歯分泌期エナメル芽細胞が強いHsp47発現を示したが（図3），増殖期や成熟期では発現はほとんど認められなかった。

背部および口唇の皮膚では，表皮および毛包の

表1 ラット上皮細胞におけるHsp47の発現

口腔粘膜上皮	歯肉	+++
	口蓋	++
	頬	+
	舌	±
切歯エナメル芽細胞	増殖期	±
	分泌期	+++
	成熟期	-
皮膚	背部表皮	++
	口唇表皮	++
	口唇毛包	++
	耳朶内面表皮	+
呼吸器系	鼻腔	-
	気管支	-
	肺胞	+
消化器	食堂	+
	胃	-
	小腸	-
泌尿器	糸球体	+++
	腎尿細管	-
	膀胱	-

染色の強さ

-：陰性 ±：偽陽性

+：弱陽性 ++：中等度陽性 +++：強陽性

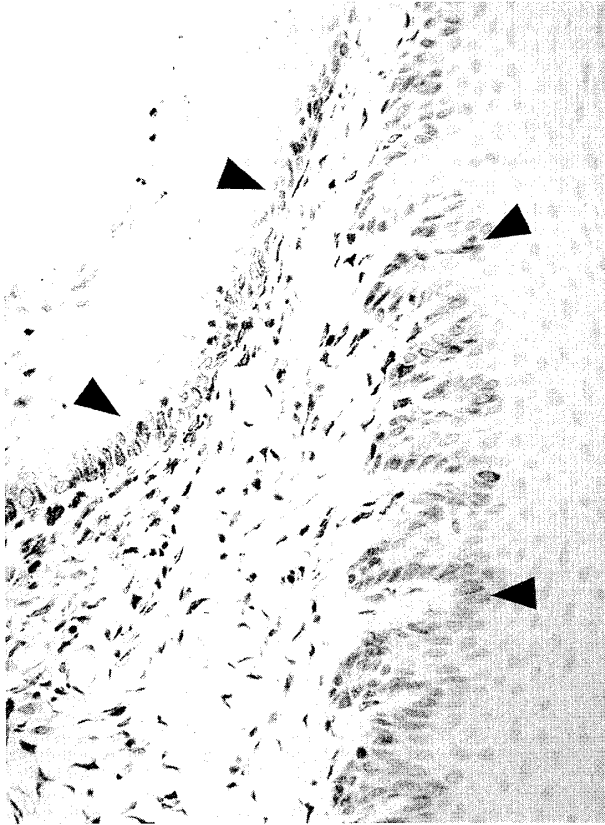


図1 歯肉上皮
基底細胞（矢頭）が陽性を示す。

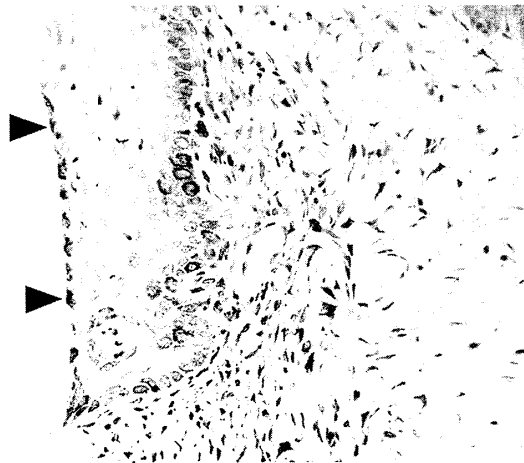


図2 歯肉上皮
接合上皮（矢頭）が陽性を示す。

基底細胞が強いHsp47発現を示した（図4，5）。一方，耳朶内面の皮膚表皮での発現は軽度であった。脂腺は発現を示さなかった。

泌尿器系では腎糸球体上皮細胞が強いHsp47発現を示したが（図6），尿管・尿管上皮および膀胱上皮は発現を示さなかった。

消化器系では唯一食道上皮が発現を示したが

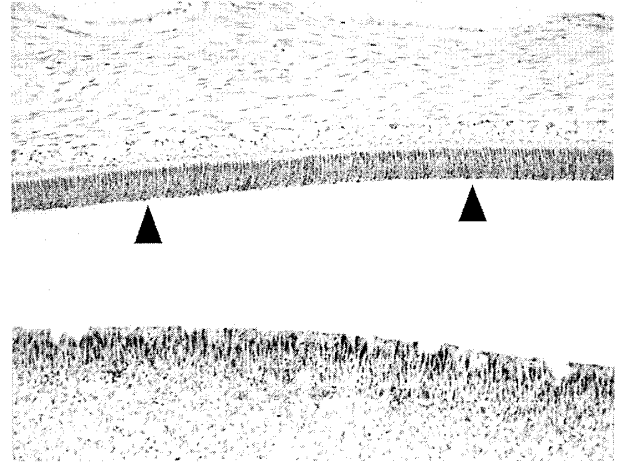


図3 切歯
分泌期エナメル芽細胞（矢頭）が陽性を示す。

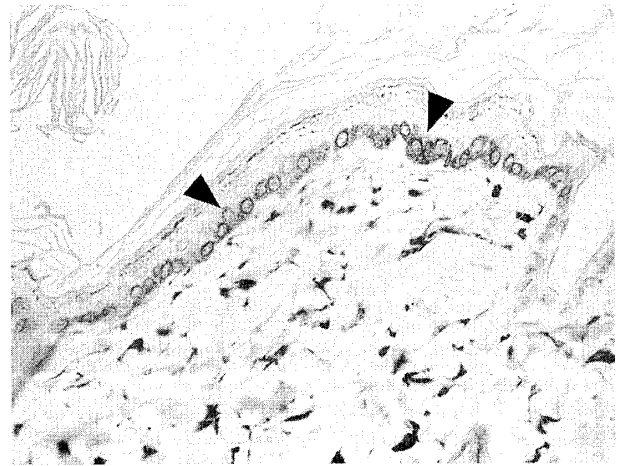


図4 背部皮膚
基底細胞（矢頭）が陽性を示す。

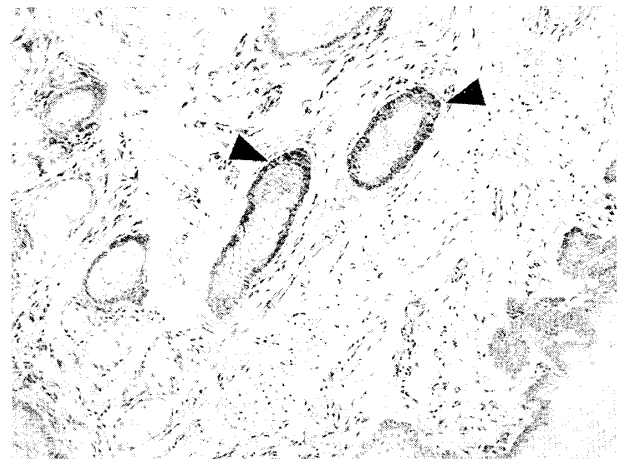


図5 口唇部皮膚
毛包（矢頭）が陽性を示す。

（図7），胃，小腸粘膜上皮，肝細胞は発現を示さなかった。鼻腔粘膜を含む呼吸器系上皮はどれもHsp47発現を示さなかった。

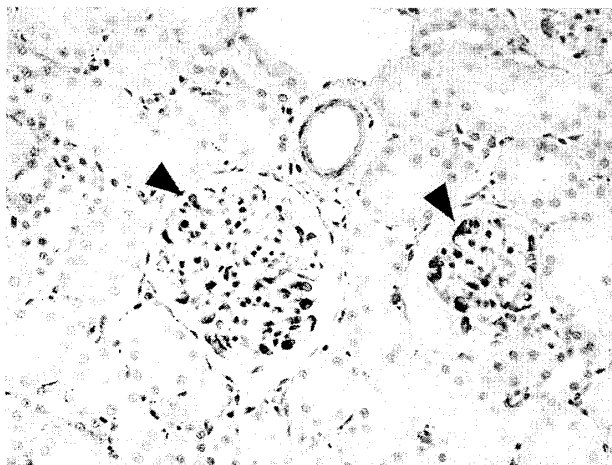


図6 腎臓
糸球体(矢頭)が陽性を示す。

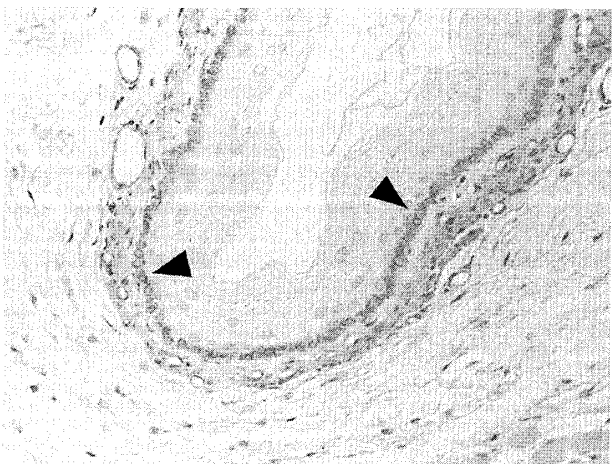


図7 食道
基底細胞(矢頭)が陽性を示す。

呼吸器系では肺胞で発現が認められたが(図8)、気管支上皮、鼻腔粘膜上皮は発現を示さなかった。

なお皮膚真皮や粘膜固有層および組織間質では、線維芽細胞に加え血管内皮細胞、平滑筋細胞がHsp47の構成的発現を示した。

考 察

本研究において、表皮、口腔粘膜上皮、食道上皮、腎糸球体上皮細胞でHsp47の構成的発現が認められた。腎糸球体を除いて発現の認められた上皮はいずれも重層扁平上皮で、発現は基底細胞に限局していた。強い発現を示した腎糸球体上皮細胞を含めこれらの細胞に共通するのは自らが基底膜を形成することである。なかでも糸球体は厚い基底膜の存在を特徴とする。従って上皮細胞におけるHsp47の発現は、基底膜の主成分であるタイ

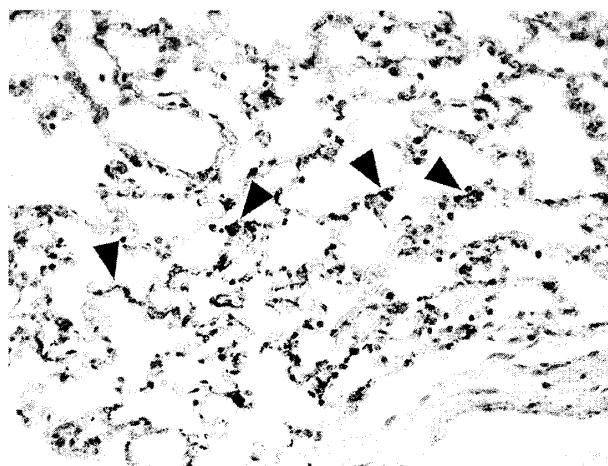


図8 肺
肺胞壁の陽性細胞(矢頭)

プⅣコラーゲン形成に際してのシャペロン機能によるものと考えられる。皮膚真皮や粘膜固有層において、線維芽細胞以外に、コラーゲン形成を本来の役割としない血管内皮細胞や平滑筋細胞がHsp47発現を示したが、これら細胞も基底膜を形成する点で共通している。最近、Hsp47ノックアウトマウス由来細胞の分泌するタイプⅣコラーゲンが野生型マウス由来細胞の産生するものに比べ量が少なくかつプロテアーゼ消化に対し高い感受性を示すところから、タイプⅣコラーゲンの成熟にHsp47が必須であることが示されている¹⁰⁾。

同じ重層扁平上皮でも部位によって発現の程度が異なっていた。口腔粘膜の場合、常に強い発現を示したのは歯肉および口蓋上皮であった。この部位は食物摂取に伴い常に強い刺激を受ける。そのため、組織学的にこれら上皮は層が厚く、上皮脚がよく発達している。背部皮膚表皮も強いHsp47発現を示したが、耳朶内面の皮膚表皮での発現は弱かった。これらのことから、Hsp47の発現が外来刺激と密接に関連していることが推測される。すなわち上皮細胞ターンオーバーの高まりにともない基底膜の改築が活発化していることの表れと考える。

Takechiら¹¹⁾は未分化な細胞株F9 teratocarcinoma cellをレチノイン酸で刺激し分化させたところ、Hsp47とタイプⅣコラーゲンの発現がともに開始されることから、Hsp47の発現が細胞の分化開始によっても調節されると考えている。した

がって、基底細胞でのHsp47発現が有棘細胞への分化開始と関連している可能性も考慮する必要がある。Keagleら⁹⁾はラット皮膚創傷治癒時の表皮でHsp47発現の増強を認めている。このことの意義については考察していないが、再生表皮の伸展に伴う基底膜の形成以外に、表皮細胞分化との関連も推測される。また皮膚毛包上皮細胞が強い発現を示したが、この場合、活発な基底膜の改築が行われているとは考とえにくい。したがってここでのHsp47発現は刺激反応性と言うより細胞分化に関連している可能性が高い。

一方食道を除く消化管上皮、腎尿細管上皮、膀胱上皮、鼻腔粘膜を含む呼吸器系上皮、胆上皮および肝細胞には発現が認められなかった。これらはいずれも単層上皮であり、重層扁平上皮に比べてターンオーバーに伴う基底膜の改築に乏しいことがその理由と考えられる。またこれらの上皮組織では幹細胞の同定が困難で、その分化過程を捉えにくいことも発現を確認できない一因かもしれない。

なお、肺胞でHsp47発現が認められたが、これが肺胞上皮細胞によるものか否かについては、組織学的レベルでの間質線維芽細胞や毛細血管内皮細胞との識別が困難なため明らかではない。むしろ線維芽細胞によるものと考えの方が妥当であろう。ブレオマイシンによって引き起こされた実験的肺線維症においてHsp47の発現増強とともに、これに平行してコラーゲンタイプIおよびIIIの産生促進を伴った線維芽細胞と筋線維芽細胞の増加が観察されている¹²⁾。

切歯分泌期エナメル芽細胞での強い発現については、エナメル質基質にはコラーゲンは含まれないところから興味深い。現在のところその理由については不明である。エナメル芽細胞の基底膜は、象牙前質が形成され、エナメル芽細胞が分泌期へと分化するに従い崩壊していく。したがって、Hsp47の発現は基底膜形成とは関係がない。Hsp47のシャペロン機能を必要とする未知の分子がエナメル質基質に含まれるのかもしれないが、この点も含め、分泌期エナメル芽細胞でのHsp47発現についてはさらに検討する価値があると考えられる。

結 論

ラットの様々な上皮組織におけるHsp47の発現を免疫組織化学的に検討した。口腔では、歯肉および口蓋粘膜上皮の基底層で強い発現が観察されたほか、切歯分泌期エナメル芽細胞も発現を示した。そのほかの消化器系では、食道粘膜上皮基底層でも中等度の発現が見られたが、胃および小腸では発現が観察されなかった。口唇および背部皮膚表皮基底層および毛包外郭細胞が強い発現を示した。腎では糸球体上皮細胞が強い発現を示したが尿細管や膀胱上皮での発現は観察されなかった。呼吸器系上皮での発現は認められなかった。以上の結果から上皮組織での発現は基底膜タイプIVコラーゲンの産生と関係していることが示唆された。

文 献

- 1) 由良 隆：ストレス応答研究の歴史. ストレス蛋白質 (永田和宏編)；1-9 中外医学社 東京 1994.
- 2) Nagata, K., Saga, S. and Yamada, K. M. : A major collagen-binding protein of chick embryo fibroblasts is a novel heat shock protein. *J Cell Biol* **103** ; 223-229 1986.
- 3) Saga, S., Nagata, K., Chen, W. T. and Yamada, K. M. : pH-dependent function, purification and intracellular location of a major collagen-binding glycoprotein. *J Cell Biol* **105** ; 517-527 1987.
- 4) Nagata, K., Hirayoshi, K., Ohara, M., Saga, S. *et al.* : Biosynthesis of a novel transformation-sensitive heat shock protein that bind to collagen. *J Biol Chem* **263** ; 8344-8349 1988.
- 5) Satoh, M., Hirayoshi, K., Yokota, S. I., Hosokawa, N. *et al.* : Intracellular interaction of collagen specific stress protein hsp47 with newly synthesized procollagen. *J Cell Biol* **133** ; 469-483 1996.
- 6) Yamashita, S., Maeshima, A. and Nojima, Y. : Involvement of renal progenitor tubular cells in epithelial-mesenchymal transition in fibrotic rat kidneys. *J Am Soc Nephrol* **16** ; 2044-2051 2005.
- 7) Suzuki, T., Kimura, M., Asano, M., Fujigaki, Y. *et al.* : Role of atrophic tubules in development of interstitial fibrosis in microembolism-induced renal failure in rat. *Am J Pathol* **158** ; 75-85 2001.

- 8) Wang, Z. L., Inokuchi, T., Ikeda, H., Baba, T. T. *et al.* : Collagen-binding heat shock protein HSP47 expression during healing of fetal skin. *Int J Oral Maxillofac Surg* **31** ; 179-184 2002.
- 9) Keagle, J. N., Welch W. J. and Young, D. M. : Expression of heat shock proteins in a linear rodent wound. *Wound Rep Reg* **9** ; 378-385 2001.
- 10) Marutani, T., Yamamoto, A., Nagai, N., Kubota, H. *et al.* : Accumulation of type IV collagen in dilated ER leads to apoptosis in Hsp47-knockout mouse embryos via induction of CHOP. *J Cell Sci* **117** ; 5913-5922 2004.
- 11) Takechi, H., Hirayoshi, K., Nakai, A., Kudo, H. *et al.* : Molecular cloning of a mouse 47-kDa heat shock protein(HSP47), a collagen-binding stress protein, and its expression during differentiation of F9 teratocarcinoma cells. *Eur J Biochem* **206** ; 323-329 1992.
- 12) Razaque, M. S., Hossain, M. A., Kohno, S. and Taguchi, T. : Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rat is associated with increased expression of collagen-binding heat shock protein (HSP) 47. *Virchows Arch* **432** ; 455-460 1998.

著者への連絡先：櫻井裕子，(〒963-8611)郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部口腔病態解析制御学講座口腔病理学分野

Reprint requests : Yuuko SAKURAI, Department of Oral Medical Science (Division of Oral Pathology), Ohu University School of Dentistry
31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan