

## 総説

### 胃粘膜上皮細胞の初代培養系を用いた増殖と分化の研究

六 反 一 仁

徳島大学医学部栄養生理学教室

(平成10年2月3日受付)

#### *Studies on proliferation and differentiation of gastric epithelial cells using primary culture systems*

Kazuhito Rokutan

Department of Nutritional Physiology, School of Medicine, The University of Tokushima

胃底腺を構成する機能細胞は、狭部の増殖帯に存在する一つの幹細胞に由来する。胃底腺上皮細胞の細胞動態は主に形態学的手法により解析されたが、最近ではトランスジェニックマウスによる解析も行われている。また、いくつかの実験動物から胃粘膜上皮細胞の初代培養系が確立され、個々の増殖因子の作用をin vitroで解析できるようになった。しかし、高濃度の牛胎児血清を用いる従来の培養系は、増殖と分化の研究には適さなかったが、我々は、モルモットの未分化な pre-pit cells を増殖停止した状態で短期間維持できる無血清培養系を確立した。最近、SV40 large T 抗原を導入したトランスジェニックマウスの胃底腺から細胞株(GSMO cells)が樹立され、さらに、ラットの正常胃粘膜上皮細胞株(RGM 1 cells)も樹立された。正常細胞の機能を備えたこれらの培養細胞を用いて、胃底腺粘膜細胞の増殖と分化の研究の進展が期待される。

#### はじめに

培養細胞は、細胞生物学・分子生物学の研究に欠くことの出来ないものである。癌細胞から樹立された多くの細胞株と比較して、正常細胞としての機能を保ったまま維持できる初代培養細胞(primary culture)は、培養の困難さを差し引いたとしてもその有用性は計り知れないものがある。胃粘膜上皮細胞のprimary cultureは1983年に Terano らにより確立された<sup>(1)</sup>。その後、多くの研究者が胃の病態生理の研究にこの初代培養胃粘膜細胞を用い、この分野での研究の進展を大きく進展させた。

本総説では、胃粘膜上皮細胞の初代培養系の特徴を述

べ、この培養系を用いた増殖と分化の研究について概略する。

#### 粘液産生細胞の重要性

胃底腺粘膜には、表層に存在する pit cells と、頸部に存在する頸部粘液細胞(mucous neck cells)の二種類の粘液産生細胞が存在する。これらの細胞から分泌された粘液は粘液層を形成して胃粘膜を保護する。また、重炭酸を分泌し、胃酸の中和を行なっている。これらの粘液産生細胞は他の細胞に比べ、比較的単純な細胞としてあまり重要視されていなかった。しかし、胃粘膜傷害の最も早期に被蓋上皮細胞の剥離が観察され、これを契機に、びらん・潰瘍へと進展していくことから、被蓋上皮細胞は管腔内の傷害因子に対する primary defense として重要な細胞と認識されるようになった。培養胃粘膜上皮細胞は、絶えず物理化学的な環境変化に曝される胃粘膜の特性を反映しており、著者らは、細胞のストレス応答の研究に優れた実験モデルとして使用している<sup>(2-6)</sup>。さらに、ヘリコバクター・ピロリ菌が慢性胃炎、胃潰瘍の誘起細菌として認定され、さらに、胃癌の危険因子として考えられるようになり、粘液産生細胞の重要性が益々高まってきた。周知のように、ヘリコバクター・ピロリ菌は胃の粘液産生細胞にのみ接着する。さらに、粘液産生細胞はヘリコバクター・ピロリの感染に伴い、IL-8などの炎症性サイトカイン、ICAM-1などの接着分子やclass II MHC 抗原を発現することが明らかにされ<sup>(7-9)</sup>、ヘリコバクター・ピロリ感染に対して、胃粘膜の炎症と免疫応答を引き起こす可能性が明らかになり、胃の病態

生理の研究には欠くことの出来ない重要な細胞として認識されるようになった。

胃底腺粘膜細胞の細胞動態

まず、初代培養を行う場合は、常に得られた細胞が胃底腺粘膜のどの細胞であるかを明らかにしておく必要がある。Karam と Leblond により胃底腺上皮細胞の細胞動態が詳細に検討された<sup>(10-14)</sup> (図1 参照)。彼らは論文の中で、胃体部粘液細胞を11種類に分類し、それぞれの細胞の由来と分化に伴う形態変化の詳細を明らかにした。胃粘膜に存在する高度に分化した細胞は、被蓋上皮細胞 (pit cell, surface epithelial cell), 頸部粘液細胞 (mucous neck cell), 主細胞 (zymogenic cell), 壁細胞 (parietal cell), D細胞やG細胞などの内分泌細胞 (entero-endocrine cell) などである。一つの胃底腺あたり一個の幹細胞 (stem cell) が狭部の増殖体に存在し、すべての機能細胞はこの幹細胞に由来する。幹細胞は顆粒を持たない増殖能の極めて高い細胞である<sup>(10)</sup>。さらに、Karam と Leblond は、顆粒を持たない細胞をゴルジの形態から分類して、pre-pit cell precursor, pre-parietal precursor, pre-neck cell precursorの三種類の前駆細胞を分類した<sup>(10)</sup>。pre-pit cell precursor は上方へ (管腔側) と移動するにしたがい pre-pit cell, pit cell, surface epithelial cell (top pit cell) へと分化する。pre-pit cell の段階で分泌顆粒が出現する

が、上方へと移動しながら成熟し、大きな分泌顆粒を持った被蓋上皮細胞へと最終分化していく<sup>(11)</sup>。pre-parietal cell は下方へと (一部は上方へも移動する) 移動しながら parietal cell へと分化していく<sup>(13)</sup>。pre-neck cell precursor も下方へと移動しながら、pre-neck cell, neck cell へと分化し、neck cell は頸部を1~2週間かけて下方へ移動しながら粘液産生細胞 (頸部粘液細胞, 副細胞とも呼ばれる) に成熟していく。腺底部に達すると形質転換して、顆粒成分を粘液からペプシノーゲンに変化させる (pre-zymogenic cell), さらに腺底部に移動して主細胞へと分化していく<sup>(12)</sup>。pre-pit cell precursor と pre-neck cell precursor のごく一部 (1~2%程度) は pre-parietal cell にも分化することも確認された<sup>(13)</sup>。

胃粘膜上皮細胞の初代培養系の確立

初代培養に用いる細胞は、モルモット<sup>(2,15,16)</sup>, ウサギ<sup>(17)</sup>, イヌ<sup>(18-20)</sup>, 新生児ラット<sup>(1)</sup>, およびマウスの胃底腺粘膜から分離可能である。胃底腺粘膜を剥離し細片化した後、プロナーゼを含む培養液で振蕩し粘液を溶解させる。その後、コラゲナーゼ (Type 1) を含む培養液で振蕩し胃粘膜細胞を単離する。単離細胞は約70%が粘液分泌細胞 (被蓋上皮細胞と頸部粘液細胞) であり、10%が壁細胞, その他は、主細胞や内分泌細胞などである。

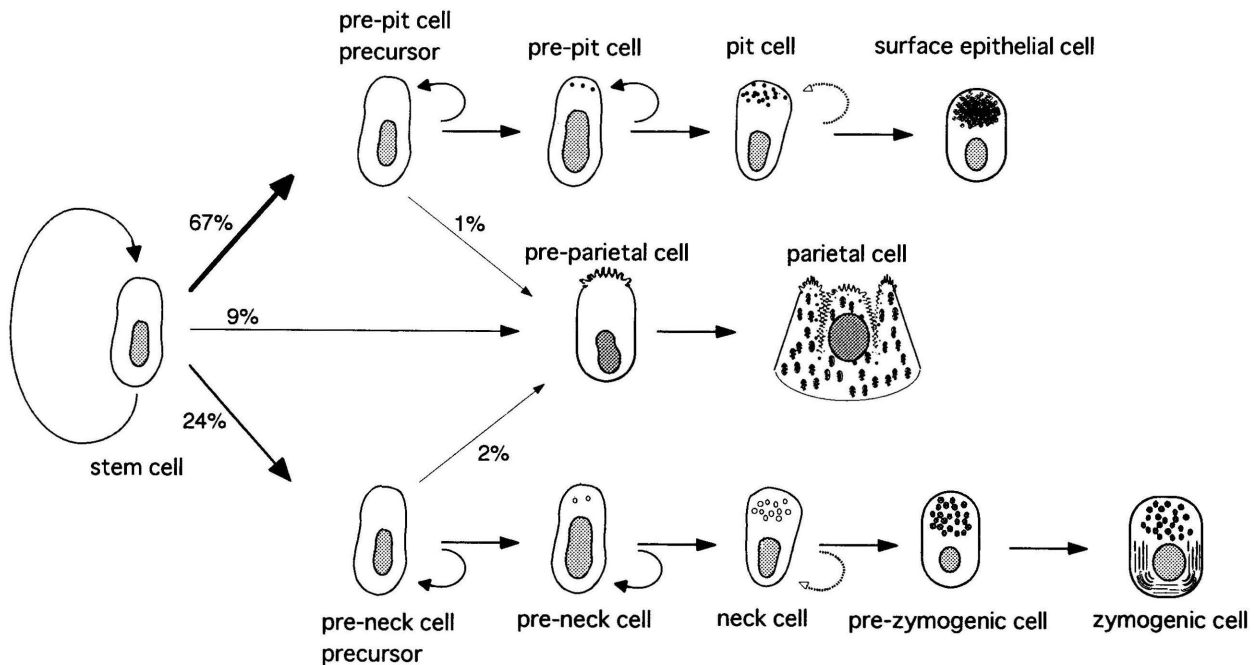


図1. 胃底腺上皮細胞の細胞動態 (文献10より改変)。

牛胎児血清 (FCS) を10%含む培地であれば, DMEM, Ham's F-12, RPMI 1640などの培地で培養可能である。培養開始後数時間で接着し始め, 2-3日でコンフルエントになる。この際, 細胞密度は重要で35 mm 培養ディッシュの場合,  $1 \times 10^6$ 個程度の細胞で培養開始するのが適当である。既にモルモットの培養胃粘膜細胞については詳細に報告したが<sup>(15)</sup>, 図2に10%FCSを含むRPMI 1640で培養したモルモット胃底腺粘膜細胞を示した。大部分の細胞は(90%), galactose oxidase Schiff (GOS) 反応陽性の分泌顆粒をもつ pit cells である(図2A)。約5%が  $\text{NA}^+/\text{K}^+$ -ATPase をもつ壁細胞(図2C)で, 残りは, 1%の paradoxical conconavalin A 染色陽性顆粒を持つ頸部粘液分泌細胞(mucous neck cells)と1%程度の線維芽細胞が含まれる(図2B)。主細胞は培養されない。個々の細胞集団を選択的に密度勾配法により分離して培養することが出来るが, 機能を持った壁細胞と主細胞の培養は困難である。最近, 無血清培地を用いて酸分泌能を保った壁細胞の培養が報告されているが, 極めて高度な技術が必要であり一般的ではない。このように, 胃底腺粘膜から分離した胃粘膜上皮細胞の初代培養系は pit cells の培養系である。培養細胞の doubling time は約24時間である。培養開始後2日目で増殖能が最高値に達した後, 3日以降 pit cells あるいは被蓋上皮細胞に成熟して増殖能を失う。その後, 経日的に細胞数が減少して, 1週間以降しだいに線維芽細胞に置き換わっていく。この細胞の継代培養は出来ない。

### 胃粘膜上皮細胞と増殖因子

胃底腺粘膜細胞の培養では, 細胞接着を促進させるため高濃度のFCSが必要である。しかしながら, FCS存在下で培養した細胞は急速に増殖して2-3日で成熟 pit cells から被蓋上皮細胞に分化してしまうため, FCSを含む培地で培養した細胞は増殖と分化の研究には適さない。FCS存在下で培養した細胞から血清を除いた血清枯渇細胞や, FCS濃度を0.1%に低下させ, 血清の作用を最小限にした培養細胞を使って増殖因子の研究がなされている。epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), insulin, insulin-like growth factor 1 (IGF-1), hepatocyte growth factor (HGF)などの増殖因子は pit cells の増殖を刺激する<sup>(16,17,19,20)</sup>。これらの増殖因子の役割についても研究がなされ, 潰瘍の修復時には, EGF 産生粘液細胞が増殖してくることが報告されている<sup>(21)</sup>。また, pit cells は TGF- $\alpha$  を産生し, 培養細胞においても paracrine として細胞増殖を促すことが明らかにされている<sup>(20)</sup>。これらの増殖因子のなかでも HGF は最も強力な増殖作用を発揮することが培養細胞で確認されている<sup>(17)</sup>。比較的未分化な粘液産生細胞は HGF の受容体である *c-met* を発現しており, 主に線維芽細胞から産生される HGF は, 胃粘膜細胞の遊走能の高めると同時に, 粘液産生細胞の増殖を刺激して粘膜病変の修復に重要な役割を担っていると考えられている。プロスタグランディンは以前から胃粘膜に cytoprotective な作用を有することが知られていたが, 最近, プロスタ

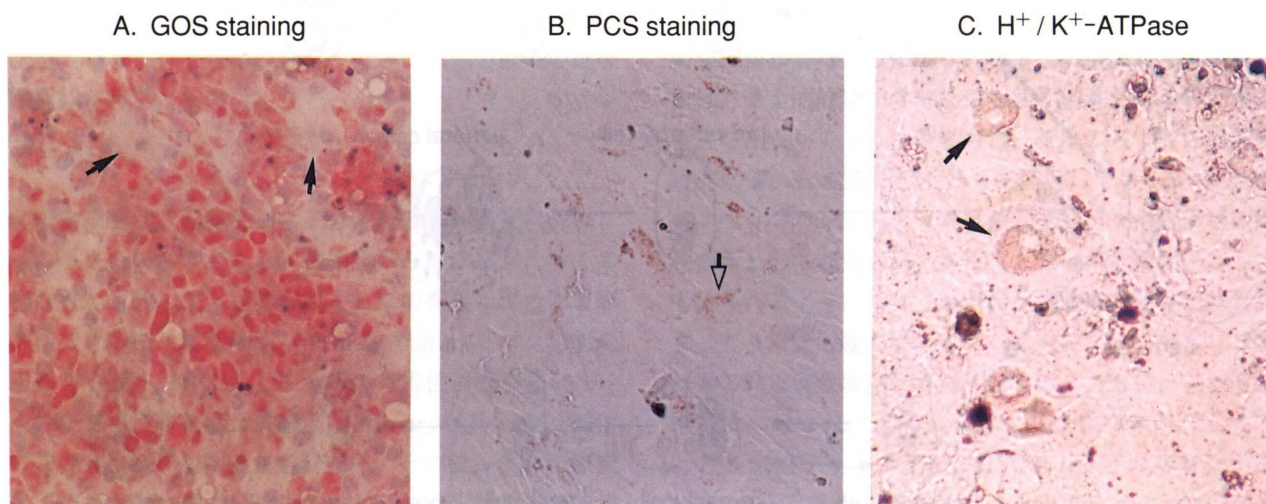


図2. モルモット胃底腺より分離・培養した胃粘膜細胞。10%FCSを含むRPMI 1640培地で3日間培養した細胞をGOS染色(A), PCS染色(B),  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\beta$  サブユニットに対する抗体を用いた免疫組織化学染色(C)を行い, 被蓋上皮細胞, 頸部粘液細胞, および, 壁細胞をそれぞれ染色した。(A)および(C)の矢印は壁細胞を示し, (B)の矢印は頸部粘液細胞を示す。

グランディンが線維芽細胞の HGF 産生を誘導し、胃粘膜修復に関与していることが明らかにされた<sup>(22)</sup>。

### 胃粘膜細胞の無血清培養系

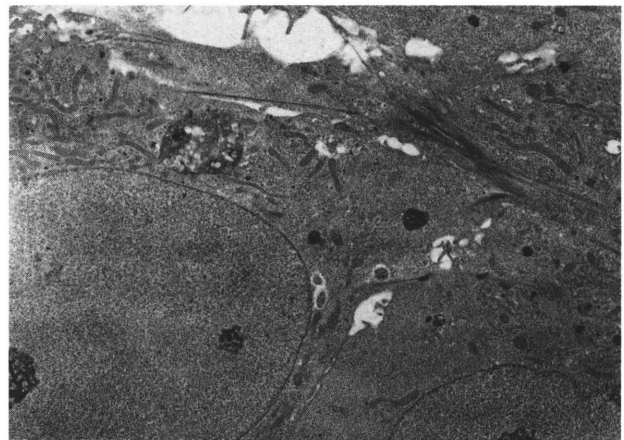
著者らは、pit cells の分化と増殖の研究を行うため、新しく無血清培養系を確立した<sup>(23)</sup>。モルモットの胃底腺から分離した粘膜細胞を付着させるため、コラーゲン type 1 でコーティングした培養ディッシュを使用している。培地は、DMEM と Ham's F-12 を 1 : 1 で混合した基本培地に、0.2% 牛血清アルブミン、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  トランスフェリン、2.5  $\text{ng}/\text{ml}$  セレン酸ナトリウムを添加したものを使用している。添加物についてはいくつか検討したが、基本的にはこれだけで十分である。分離した胃粘膜細胞を無血清培地で培養すると、約 30% の細胞が 48 時間かけてゆっくりと付着する。この時点で浮遊細胞を除いた後、さらに培養を続けると、付着した細胞は全く増殖しない。この細胞を細胞化学、免疫組織化学および電子顕微鏡で観察すると、比較的大きな核をもち細胞内小器官の発達が悪く小さな分泌顆粒が細胞質にごくわずかに散在する細胞がほとんどで、pre-pit cells の段階にある (図 3 A)。一部には全く分泌顆粒を持っていない細胞も観察される。約 5% の細胞は apical に分泌顆粒の集合が認められ、この顆粒は GOS 染色によっても確認できる。しかしながら、ほとんどの細胞は、さらに培養を続けても分泌顆粒を増加させない。このように本培養系は、一部 (5% 程度) は pit cell の段階の細胞を含むもの、ほとんどが未分化な pre-pit cells が選択的に接着し、しかも、接着した後、増殖停止した状態で短期間維持できる培養系である。

### pit cell lineage の分化・増殖の解析

pre-pit cells の無血清培養系を用いて、pit cells への成熟過程を調べることが出来る。EGF を添加すると、細胞は急速に増殖し 24 時間で細胞数は 2 倍になり、その後増殖を停止する。<sup>[3H]</sup> glucosamine の取り込みも増加して EGF 添加後 2 日目には GOS 陽性顆粒を持った pit cells あるいは surface epithelial cells に成熟する。pit cell lineage の成熟過程は分泌顆粒の出現により特徴づけることが出来る。pre-pit cells は、小型の分泌顆粒が細胞質に散在するのみであるが (図 3 A)、pit cells の段階になり分泌顆粒が apical に集合してくる。in vivo では low pit, mid pit, high pit へと移動するに従い、ゴルジ、ミトコンドリア、小胞体が発達してきて、粘液顆粒の集合は

high pit cells で最高に達する。粘液顆粒は ectoplasm と呼ばれる細胞内小器官のない apical 部分に集合する。この pit cells の成熟過程を培養細胞でも経時的に観察することが出来る。pit cells の粘液顆粒は 1  $\mu\text{m}$  にも達するが、高密度で均一な内容物で満たされているのが特徴であり、中心部に密度の薄い core が存在する頸部粘液細胞の粘液顆粒と区別できる。楕円形の顆粒も存在するが、ゴルジで形成された粘液顆粒が細胞質を apical へと移動し ectoplasm に達し、その後数時間は楕円形であるが、やがて球形に変わるとされている。high pit から表層の被蓋上皮細胞に最終分化すると、むしろ粘液顆粒は減少し、ミトコンドリアなどの細胞内小器官の数も減少し、核が変形してやがてアポトーシスにより消滅していく。図 3 B に、無血清培地で培養した pre-pit cells に

A. untreated cells (x 6,000)



B. EGF-treated cells (x10,000)

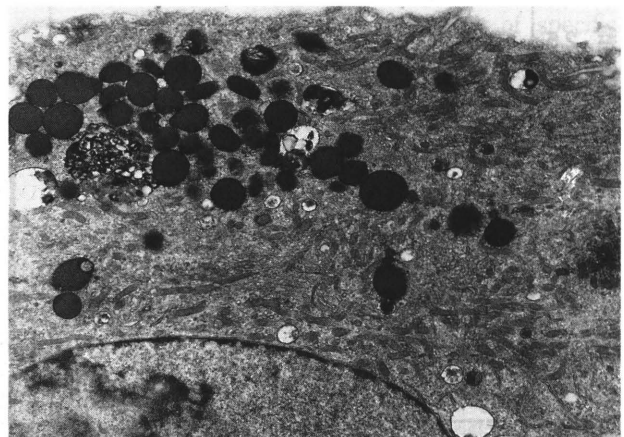


図 3. 無血清培地で培養したモルモットの胃粘膜上皮細胞。モルモットの胃底腺より分離した細胞を、コラーゲンタイプ 1 をコートした培養プレートに本文で述べた無血清培地で培養した細胞を電子顕微鏡で観察した。(A) 無処理の細胞。(B) 20 nM EGF で 2 日間処理した細胞。pit cells に特徴的な粘液顆粒の出現を認める。

EGF 添加を添加すると、粘液顆粒を多くもつ pit cells に成熟することを示した。培養細胞は in vivo での観察と異なり、分泌顆粒がやや少ないこと、二次的な大きなライソゾームや空胞が多数存在することなど、人工的な培養環境による形態的な変化が認められるが、無血清培地で培養した胃粘膜細胞でも pit cells の成熟過程をほぼ再現できる。

未分化な pre-pit cells から pit cells への成熟にともない、いくつかの蛋白質の発現が変化することが報告されている。c-met、フェリリンなどは未分化な pre-pit cells に強く発現しているが、分化した細胞では発現していない。逆に、カテプシン E や TGF- $\alpha$  は分化した pit cells に強く発現することが報告されている<sup>(24-26)</sup>。分化に伴う遺伝子発現の変化とその制御機構を解明することで、pit cell lineage の分化のメカニズムを解明できるかもしれない。

### TGF- $\beta$ の作用

EGF は、無血清培地で pre-pit cells の増殖を刺激するが、この増殖は TGF- $\beta$  により完全に阻害される (図 4)。さらに、TGF- $\beta$  は EGF による pre-pit cells の成熟も完全に阻害する。pit cell lineage の増殖を刺激する増殖因子は多く知られているが、増殖を抑制する因子として明らかにされたのは TGF- $\beta$  のみである。一般的に TGF- $\beta$  は、

間質系の細胞増殖を刺激し、逆に、上皮系の細胞増殖を抑制する<sup>(27-29)</sup>。また、いくつかの上皮細胞の分化を促進することが知られているが、我々の培養系では TGF- $\beta$  は pre-pit cells の形態変化をおこさず、また、頸部粘液細胞などへの phenotype の変化も誘導しない。これらの結果から、無血清培養系で維持されている pre-pit cells は、1~2 回分裂した後、自発的に pit cells に成熟するように既にプログラムされていると思われる。TGF- $\beta$  は、この分裂を阻害することで pit cells への成熟も阻害していると考えられる。正常胃粘膜では、間質の線維芽細胞にわずかな proTGF- $\beta$  が発現しているのみで上皮細胞には TGF- $\beta$  は発現していない。TGF- $\beta$  ノックアウトマウスのヘテロ型では、ヒトの cystica profunda に類似した肥厚病変が徐々に進行することが報告されているが<sup>(30)</sup>、正常時に TGF- $\beta$  が積極的に pit cells の増殖を制御しているとは考えにくい。最近、TGF- $\beta$  の SMAD ファミリーを介した細胞内シグナル伝達経路が次々と明らかにされており<sup>(31,32)</sup>、胃粘膜細胞における TGF- $\beta$  の標的遺伝子が解明されれば、胃粘膜上皮細胞の増殖と分化に関する情報が得られるのではないと思われる。

### 新しい培養細胞系の確立

胃底腺粘膜上皮細胞は、狭部の stem cells から上方あるいは下方へと移動するに伴い機能性細胞へと分化して

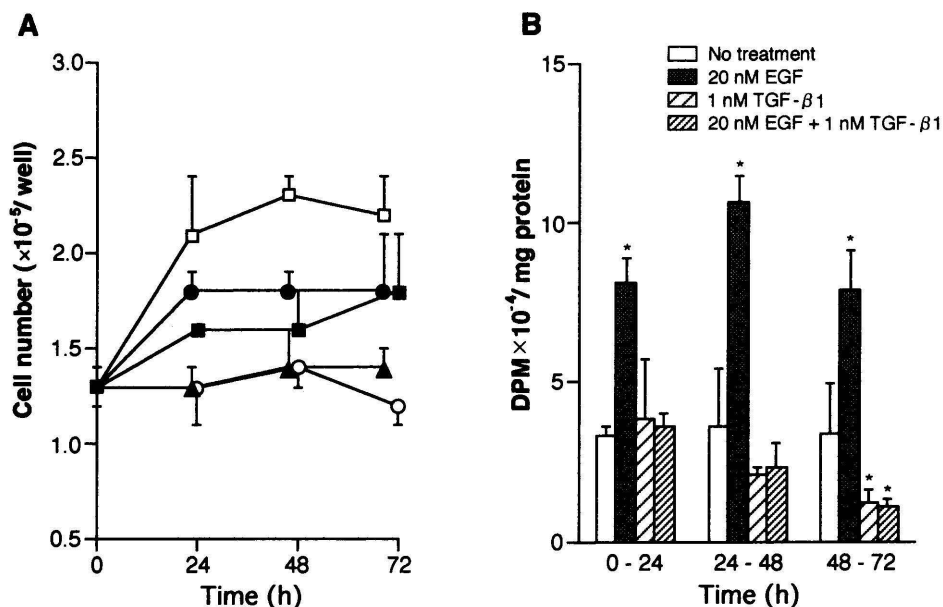


図 4. 胃粘膜細胞に対する EGF と TGF- $\beta$  の作用。無血清培地で維持したモルモット胃粘膜細胞に 20 nM EGF と種々の濃度の TGF- $\beta$  を投与し、細胞数の変化 (A) と  $^3\text{H}$  チミジンの取り込み (B) を測定した。A: (□) 無処理の細胞; (●), 20 nM EGF + 0.01 nM TGF- $\beta$ ; (■), 20 nM EGF + 0.1 nM TGF- $\beta$ ; (▲), 20 nM EGF + 1 nM TGF- $\beta$ ; (○), 1 nM TGF- $\beta$

いく。この分化を制御するメカニズムを解明するためには、従来の培養方法では困難である。最近、間質細胞との相互作用を調べるために線維芽細胞との共培養を行ったり<sup>(22)</sup>、コラーゲンゲルを用いた三次元の培養システム<sup>(33)</sup>などでの解析が進んでいる。

pit cells は pre-pit cells から pit cells へと分化した後、成熟して 3-4 日で寿命を終え、管腔内へ剥がれ落ちて行くか、あるいはアポトーシスをおこして処理される。このように寿命の短い細胞を不死化させ、正常細胞の性格を保った培養細胞

が求められた。SV40 large T 抗原は癌抑制遺伝子 p53や網膜芽腫抑制遺伝子産物 Rb と結合し、T 抗原が発現している細胞は不死化されるはずであるが、高度に分化した初代培養細胞に SV40 large T 抗原を導入し不死化させることは困難である。このため、SV40 large T 抗原を導入したトランスジェニックマウスを作製し、その組織から細胞を単離して細胞株を確立することが試みられ、脾β細胞由来の細胞株 min 6 などが確立されている。同じトランスジェニックマウスの胃から単離され細胞株として樹立された GSMO 細胞がある<sup>(34)</sup>。GSMO 細胞は pre-pit cells から未熟な pit cells の分化段階を反映する培養細胞であり、pit cells の成熟過程の研究が可能である。さらに、ラットの胃底腺より正常細胞株 (RGM1) が樹立された<sup>(35)</sup>。今後、これらの優れた細胞を用いて、増殖と分化の研究が進展することが期待されている。

#### トランスジェニックマウスを用いた解析

TGF- $\alpha$  のトランスジェニックマウスでは、メネトリエー病に類似した胃体部の粘膜肥厚が発生する<sup>(36)</sup>。また、ガストリンのトランスジェニックマウスでも pit cells の増殖による肥厚が発生することが明らかにされ、これらの因子が pit cells の増殖と分化に深く関わっていることが示された。また、H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase の  $\beta$ -サブユニット遺伝子のプロモーター領域に SV40 large T 抗原を導入し、これを組み込んだトランスジェニックマウスでは、pre-parietal cells の増殖が誘導されるが、parietal cells への分化が阻止される。同時に、neck cells から zymogenic cells への分化も阻止され、pit cells が増加することが示された<sup>(37)</sup>。さらに、H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase の  $\beta$ -サブユニットとジフテリアトキシンの組み換え遺伝子を導入したトランスジェニックマウスでは、parietal cells が消失するが、この際、pit cells が著明に増加し、neck cells から zymogenic cells への分化が生じないことが示された<sup>(38)</sup>。このように、壁細胞が粘液産生細胞の増殖と分化に深く関与することも明らかにされている。

#### おわりに

胃底腺粘膜の上皮細胞は、一個の幹細胞が整然と規則正しく異なった機能を持つ細胞に分化していく。神秘的とも言えるこの過程に多くの研究者が魅せられてきたが、消化管粘膜細胞の分化の研究は、他の臓器に比べかなり立ち後れている。その理由はいくつか挙げられる。まず、優れた実験系が確立されていないことによる。ヘリコバ

クター・ピロリ菌の発見以来、胃の研究者の頭脳はピロリ病に侵されており、本来の基礎的な研究がおろそかになっている感がある。やがて、ヘリコバクター・ピロリの問題が解決され、誰もが胃に興味を示さなくなったとき、どれだけの胃の研究者が残っているのであろうか。幸いにも、本総説で引用した論文の多くが日本人研究者によるものであり、寺野彰先生を中心この分野で活発な研究が続いている。今後、分子生物学的手法を用いて、新たな展開がなされることを期待している。

#### 謝 辞

本総説に示したデータの一部は、東京医科大学第四内科齊藤俊彦教授との共同研究のもと、同教室の荻原正示先生、山田昌彦先生によりなされたものである。また、電子顕微鏡の所見については、徳島大学医学部第一解剖学講座石村和敬教授にご教示頂いた。ここに深謝致します。

#### 文 献

1. Terano, A., Ivey, K. J., Stachura, J., Sekhon, S., et al.: Cell culture of rat gastric fundic mucosa. *Gastroenterology*, 83 : 1280-1291, 1982
2. Nakamura, K., Rokutan, K., Marui, N., Aoike, A., et al.: Induction of heat shock proteins and their implication in protection against ethanol-induced damage in cultured guinea pig gastric mucosal cells. *Gastroenterology*, 101 : 161-166, 1991
3. Rokutan, K., Johnston, R. B. Jr., and Kawai, K.: Oxidative stress induces S-thiolation of specific proteins in cultured gastric mucosal cells. *Am. J. Physiol.*, 266 : G247-G254, 1994
4. Rokutan, K., Hirakawa, T., Teshima, S., Honda, S., et al.: Glutathione depletion impairs transcriptional activation of heat shock genes in primary cultures of guinea pig gastric mucosal cells. *J. Clin. Invest.*, 97 : 2242-2250, 1996
5. Rokutan, K., Teshima, S., Miyoshi, M., Nikawa, T., et al.: Oxidant-induced activation of nuclear factor-kappa B in cultured guinea pig gastric epithelial cells. *Dig. Dis. Sci.*, 42 : 1880-1889, 1997
6. Rokutan, K., Teshima, S., Miyoshi, M., Kawai, T., et al.: Glutathione depletion inhibits oxidant-induced activation of nuclear factor-kappa B,

- AP-1, and c-Jun/ATF-2 in cultured guinea pig gastric epithelial cells. *J. Gastroenterol.*, 33, 1998 (in press)
7. Sharma, S. A., Tummuru, M. K., Miller, G. G., et al. : Interleukin-8 response of gastric epithelial cell line to *Helicobacter pylori* stimulation in vitro. *Infect. Immun.*, 63 : 1681-1687, 1995
  8. Crowe, S. E., Alvarez, L., Dytoc, M., et al. : Expression of interleukin-8 and CD54 by human gastric epithelium after *Helicobacter pylori* infection in vitro. *Gastroenterology*, 108 : 65-74, 1995
  9. Engstrand, L., Scheynius, A., Pahlson, C., Grimelius, L., et al. : Association of *Campylobacter pylori* with induced expression of class II transplantation antigen on gastric epithelial cells. *Infect. Immun.*, 57 : 827-832, 1989
  10. Karam, S. M., and Leblond, C. P. : Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. I. Identification of proliferative cell types and pinpointing of the stem cells. *Anat. Rec.*, 236 : 259-279, 1993
  11. Karam, S. M., and Leblond, C. P. : Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. II. Outward migration of pit cells. *Anat. Rec.*, 236 : 280-296, 1993
  12. Karam, S. M., and Leblond, C. P. : Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. III. Inward migration of neck cells followed by progressive transformation into zymogenic cells. *Anat. Rec.*, 236 : 297-313, 1993
  13. Karam, S. M. : Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. IV. Bidirectional migration of parietal cells ending in their gradual degradation and loss. *Anat. Rec.*, 236 : 314-332, 1993
  14. Karam, S. M., and Leblond, C. P. : Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. V. Behavior of entero-endocrine and caveolated cells : general conclusions on cell kinetics in the oxyntic epithelium. *Anat. Rec.*, 236 : 333-340, 1993
  15. Hirakawa, T., Rokutan, K., Nikawa, T., and K. Kishi. : Geranylgeranylacetone induces heat shock proteins in cultured guinea pig gastric mucosal cells and rat gastric mucosa. *Gastroenterology*, 111 : 345-357, 1996
  16. Rutten, M. J., Dempsey, P. J., Solomon, T. E., and Coffey, R. J. : TGF- $\alpha$  is a potent mitogen for primary cultures of guinea pig gastric mucous epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, 265 : G361-G369, 1993
  17. Takahashi, M., Ota, S., Shimada, T., Hamada, E., et al. : Hepatocyte growth factor is the most potent endogenous stimulant of rabbit gastric epithelial cell proliferation and migration in primary cultur. *J. Clin. Invest.*, 95 : 1994-2003, 1995
  18. Boland, C. R., Kraus, E. R., Scheiman, J. M., Black, C., et al. : Characterization of mucous cell synthetic functions in a new primary canine gastric mucous cell culture system. *Am. J. Physiol.*, 258 : G774-G787, 1990
  19. Chen, M.C., Lee, A.T., and Soll, A.H. : Mitogenic response of canine fundic epithelial cells in short-term culture to transforming growth factor  $\alpha$  and insulinlike growth factor I. *J. Clin. Invest.*, 87 : 1716-1723, 1991
  20. Chen, M. C., Lee, A. T., Karnes, W. E., Avedian, D., et al. : Paracrine control of gastric epithelial cell growth in culture by transforming growth factor- $\alpha$ . *Am. J. Physiol.*, 264 : G390-G396, 1993
  21. Wright, N. A., Pike, C., and Elia, G. : Induction of a novel epidermal growth factor-secreting cell lineage by mucosal ulceration in human gastrointestinal stem cells. *Nature*, 343 : 82-85, 1990
  22. Takahashi, M., Ota, S., Shimada, T., et al. : Hepatocyte growth factor as a key to modulate anti-ulcer action of prostaglandins in stomach. *J. Clin. Invest.*, 98 : 2604-2611, 1996
  23. Ogihara, M., Yamada, M., Saito, T., Shono, M., et al. : Insulin potentiates mitogenic effect of epidermal growth factor on cultured guinea pig gastric mucous cells. *Am. J. Physiol.*, 271 : G104-G112, 1996
  24. Beauchamp, R. D., Bernard, J. A., McCutchen, C. M.,

- Cherner, J.A., et al. : Localization of transforming growth factor  $\alpha$  and its receptor in gastric mucosal cells. *J. Clin. Invest.*, **84** : 1017-1023, 1989
25. Konda, Y., Yokota, H., Kayo, T., Horiuchi, T., et al. : Proprotein-processing endopeptidase furin controls the growth and differentiation of gastric surface mucous cells. *J. Clin. Invest.*, **99** : 1842-1851, 1997
26. Fukamachi, H., Ichinose M., Ishihama, S., Tsukada, S., et al. : Fetal rat glandular stomach epithelial cells differentiate into surface mucous cells which express cathepsin E in the absence of mesencymal cells in primary culture. *Differentiation*, **56** : 83-89, 1994
27. Massague, J. : Transforming growth factor-beta family. *Ann. Rev. Cell Biol.*, **6** : 597-641, 1990
28. Moses, H. L., Yang, E. Y., and Pietenpol, J. A. : TGF- $\beta$  stimulation and inhibition of cell proliferation : new mechanistic insights. *Cell*, **63** : 245-247, 1990
29. Bernard, J. A., Warwick, G. J., and Gold, I. I. : The cell biology of transforming growth factor  $\beta$ . *Biochim. Biophys. Acta*, **1032** : 79-87, 1990
30. Boivin, G. P., Molina, J. R., Ormsby, I., Stemmermann, G., et al. : Gastric lesions in transforming growth factor beta-1 heterozygous mice. *Lab. Invest.*, **74** : 513-518, 1996.
31. Massague, J. : TGF- $\beta$  signaling receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell*, **85** : 947-950, 1996
32. Heldin, C.H., Miyazono, K., and Dijke, P.T. : TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, **390** : 465-471, 1997
33. Longsdon, C. D., Bisbee, C. A., Rutten, M. J., et al. : Fetal rabbit gastric epithelial cells cultured on floating collagen gels. In *Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, **18** : 233-242, 1982
34. Sugiyama, N., Tabuchi, Y., Horiuchi, T., et al. : Establishment of gastric surface mucous cell lines from transgenic mice harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *Exp. Cell Res.*, **209** : 382-387, 1993
35. Kobayashi, S., Tsuji, H., Matsui, H., et al. : RGM 1, a cell line derived from normal gastric mucosa of rat. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **32** : 259-261, 1996
36. Takagi, H., Jhappan, C., Sharp, R., et al. : Hypertrophic gastropathy resembling Menetrier's disease in transgenic mice overexpressing transforming growth factor  $\alpha$  in the stomach. *J. Clin. Invest.*, **90** : 1161-1167, 1992
37. Li, Q., Karam, S. M. and Gordon, J. I. : Simian virus 40T antigen-induced amplification of pre-parietal cells in transgenic mice. *J. Biol. Chem.*, **270** : 15777-15788, 1995
38. Li, Q., Karam, S. M., and Gordon, J. I. : Diphtheria toxin-mediated ablation of parietal cells in the stomach of transgenic mice. *J. Biol. Chem.*, **271** : 3671-3676, 1996



## SUMMARY

Gastric fundic glands have a complex organization of several types of epithelial cells, including pit cells, parietal cells, neck cells, chief cells, and a variety of enteroendocrine cells. These functionally active cells come from multipotent stem cells that are found in the isthmus, and filiation and kinetics of these cells have been intensively studied in experimental animals. Transgenic mice have been introduced to study the mechanisms of cell lineage-specific and differentiation-dependent patterns of gene expression in the gastric units.

Primary cultures of gastric epithelial cells from rat, dog, rabbit, and guinea pig have been used to study interactions between distinct growth factors and gastric epithelial cells, and several growth factors, including epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor- $\alpha$ , hepatocyte growth factor, insulin, and insulin-like growth factor 1, have been shown to stimulate proliferation of gastric epithelial cells. These primary cultures usually requires the presence of a high concentration of fetal calf serum, and cultured cells rapidly formed a monolayer within 2-3 days. A majority of the cells (90%) was identified as pit cells. We developed a complete serum-free culture of guinea pig gastric epithelial cells. The cells maintained in our culture conditions did not exhibit mitotic activity, and a great majority of the cells was in a pre-pit cell stage. EGF stimulated cell growth and then maturation into pit cells, suggesting that this culture system may be a excellent model to study the processes of maturation of a pit cell lineage.

Recently, gastric surface mucous cell lines (GSMO cells) from transgenic mice harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene were established. A normal gastric epithelial cell line from rat gastric mucosa (RGM 1 cells) was also established. These cell lines may be useful for studying the proliferation and differentiation of a pit cell lineage.

Key words : primary cultures, gastric epithelial cells, proliferation and differentiation, pit cell lineage