

イヌ骨髓細胞から肝細胞の分化誘導と
c-Metの機能に関する研究

麻布大学大学院獣医学研究科
獣医学専攻 獣医内科学
DV0103 根尾 櫻子

イヌ骨髓細胞から肝細胞の分化誘導と
c-Met の機能に関する研究

麻布大学大学院獣医学研究科
獣医学専攻 獣医内科学
DV0103 根尾 櫻子

目次

第 1 章 緒論 1

第2章 イヌ c-Met 遺伝子のクローニングならびに組織分布
 の検討と肝部分切除時の c-Met の変動 7

はじめに 7

材料と方法 9

結果 13

考察 15

小括 18

第 3 章 血液腫瘍におけるイヌ c-Met 遺伝子の検討 19

はじめに 19

材料と方法 22

結果 25

考察 26

小括 29

第 4 章 HGF およびヒト胎盤抽出液を用いた骨髄細胞から肝
 細胞の分化誘導 30

はじめに 30

材料と方法 33

結果 36

考察 38

小括 43

第 5 章 総括 45

謝辞 48

参考文献 49

図表 65

第 1 章 緒論

再生医療は、機能障害や機能不全に陥った生体組織や臓器に対して、自己細胞や、同種細胞、またはブタなどの異種細胞を利用する事でその機能再生をはかる医療である。現状では、機能不全に陥った場合などは、臓器移植や人工臓器に頼らざるを得ないが、拒絶反応、免疫抑制や生体適合性などの医学諸問題と、深刻な提供者不足という社会問題を抱えている。再生医療は、これらの問題点を回避できる画期的な医療であり、また、根治治療としても注目されている。特に自己組織を用いた再生医療は、拒絶反応がない事などから、今後有力な治療技術として発展していくと考えられている。このような背景を受けて、障害臓器以外の自己の細胞を用いて障害臓器を再生することを目標として、自己増殖と様々な機能細胞に分化する能力のある幹細胞についての研究が進められている。研究対象となっている幹細胞には、骨髄中の造血幹細胞や間葉系幹細胞、神経幹細胞などが挙げられるが、造血幹細胞は増殖機構などが最も詳細に解析されており、また採取時の生体侵襲が少ない事から、臨床応用する上で現実的な組織として考えられている。

近年、ラットやマウスにおいて、移植した骨髄細胞が肝細胞に分化したことが報告され、さらにラットにおいて、肝細胞増殖因子(Hepatocyte growth factor: HGF)を添加培養した骨髄細胞から肝細胞が誘導できることが明らかになった(Petersen *et al.*, 1999; Lagasse *et. al.*, 2000; Oh *et al.*, 2000)。このような背景のもと、人医療への応用を目標に、骨髄幹細胞から肝臓再生に関する研究や、それに関連した基礎研究が行われている。獣医療の対象であるイヌでは肝疾患が多いが、現在の治療では完治できない場合があり、まだ有効な治療法は確立されていないため、根治治療としての再生医療の必要性が挙げられている。し

かし、肝再生医療に必須と考えられる HGF ならびにそのレセプターである c-Met に関する研究報告はほとんどなく、基礎データも少ない状況にあり、これらに関する基礎研究が望まれている。

HGF は、肝細胞をはじめとして様々な細胞の増殖、遊走、形態形成および血管新生を誘導し、組織再生や腫瘍増殖機構に関わる増殖因子である(Matsumoto, *et al.* 1997)。また、HGF は、線維芽細胞、肝臓のクッパー細胞、マクロファージといった細胞から産生されるほか、線維肉腫、肺癌、肝細胞癌、膵臓癌などの腫瘍細胞からも産生されることが明らかにされている(Stoker *et al.*, 1987; Miyazaki *et al.*, 1991; Yoshinaga *et al.*, 1992; Hirota *et al.*, 1993; Rygaard *et al.*, 1993; Tsao *et al.*, 1993)。生体内で HGF は不活性の単一直鎖ポリペプチド(HGF 前駆体)として分泌され、加水分解を受けて活性型となる(Nakamura *et al.*, 1989; Miyazawa *et al.*, 1989; Mars *et al.*, 1993)。さらに活性型 HGF は、 α 鎖と β 鎖からなるジスルフィド結合ヘテロ二量体であり、 α 鎖は分子量が約 69kDa で、ヘヤーピンループ構造(アミノ酸残基 70-96)と四つの連続クリングルドメイン(アミノ酸残基 128-469)より構成されている。 β 鎖は分子量約 32 -34kDa で、C-末端セリンプロテアーゼ様ドメイン(アミノ酸残基 495 -728)を含んでいる(Nakamura, 1991)。HGF は個体発生における組織構築において重要な役割を果たしており、HGF 遺伝子のノックアウトマウスでは、胎盤や肝臓の形成不良を生じ、胎生致死となることが報告されている(Uehara *et al.*, 1995)。さらに、HGF の機能は、すべてターゲット細胞に存在する特異的レセプターである c-Met を介して発現するとされている(Bottaro *et al.*, 1991)。

一方、c-Met は proto-oncogene としてヒト骨肉腫細胞株から分離された遺伝子であり、Bottaro (1991) らによって HGF の高親和性レセプターとして同定され、種々の上皮、内皮系細胞に幅広く発現していることが明らかとなってい

る (Cooper *et al.*, 1984; Park *et al.*, 1986; Di Renzo *et al.*, 1991; Tarfaty *et al.*, 1992)。この HGF/c-Met を介したシグナル伝達機構が、肝臓の組織再生の中心的役割を果たすとされていることが、肝臓を部分的切除したラットの再生肝などで立証されている (Panis *et al.*, 1998; Borowiak *et al.*, 2004)。さらに、HGF/c-Met 伝達系は肝細胞以外のあらゆる生体組織でも機能し、その機能も多岐にわたり、組織の発生、再生および分化、また、造血の調節にも関与していると考えられている (Zarnegar *et al.* 1995b; Jiang *et al.*, 1997)。

c-Met はまず、HGF のターゲット細胞において単鎖前駆体として合成され、タンパク分解を経て、 α と β 鎖のジスルフィド結合よりなるヘテロ二量体を形成する (Giordano *et al.*, 1989)。その α 鎖は細胞外に存在するが、 β 鎖は細胞外ドメイン、膜貫通領域、細胞内チロシンキナーゼドメインを含んでいる。HGF/c-Met シグナル伝達は、c-Met への HGF 結合が引きがねとなって細胞内に存在するチロシン残基の自己リン酸化がおきることで開始する。ヒトでは、自己リン酸化するチロシンは細胞内領域の離れた二箇所位置し、一方は、チロシンキナーゼ領域の活性化ループ内に位置し、c-Met のキナーゼ反応を活性化する作用を持つ。もう一方は c-Met の C 末端領域に位置し、SHC、Gab1、Grb2、PI3-K をはじめとして様々なシグナル伝達因子が結合し、細胞増殖や形態形成をはじめとする HGF の多様な細胞活性シグナルを伝達する経路が活性化するために、重要な役割を担うとされている (Ponzetto *et al.*, 1994; Paumelle *et al.*, 2002; Birchmeier *et al.*, 2003)。

また、ヒトの腫瘍においては肝癌、肺癌、胃癌、骨肉腫をはじめとした様々な固形腫瘍における HGF や c-Met の発現増加が確認されている。これらの腫瘍において HGF/c-Met シグナル伝達は、腫瘍細胞の増殖、遊走、血管新生およびアポトーシス抑制を促すとされ、HGF または c-Met の発現が増加している症例

では、その予後が悪いことが示唆されている(Kuniyasu *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1994; Ferracini *et al.*, 1995)。また、固形腫瘍のみならずリンパ腫や白血病といった造血器系腫瘍においても HGF/c-Met と病態との関連性が示唆されている。すなわち、ヒトの骨髄性およびリンパ性白血病細胞やリンパ腫細胞株から HGF の産生が認められており、これら腫瘍から産生される HGF に加えて、正常組織であるストローマ細胞から分泌される HGF が、オートクリン、パラクリンに腫瘍細胞に作用し、増殖、遊走や転移に関わっていることも報告されている(Nakamura, *et al.* 1994a; Nakamura, *et al.* 1994b)。また、HGF が白血病細胞の増殖や遊走促進ならびにアポトーシスを抑制することが明らかとなっている(Weimar *et al.*, 1997; Weimar *et al.*, 1998b; Derksen *et al.*, 2003)。

c-Met の発現量を検討した報告は少ないが、造血腫瘍株の中で c-Met の mRNA 発現率が高いものは、ヒトの形質細胞腫で 100%、ホジキンリンパ腫で 91%に認められている(Jucker *et al.*, 1994)。また、急性骨髄性白血病 14 例中 1 症例で c-Met が高発現しており、急性経過と c-Met の発現量の関連が示唆されている(Jucker *et al.*, 1994)。多発性骨髄腫の症例においても HGF/c-Met 発現量と病態とに関連性があることが示唆されている(Borset *et al.*, 1999a; Borset *et al.*, 1999b)。

冒頭に述べたように、骨髄細胞から肝細胞が分化することが明らかにされ、その分化機序に、HGF の関与が報告されている(Oh *et al.*, 2000; Miyazaki *et al.*, 2002)。特に、ヒトチロシン血症 typeI のモデル動物である fumarylaceto acetate hydrolase (FAH)欠損マウスに健常マウスの造血細胞を静脈内投与したところ、移入した造血細胞に由来するマーカーを持った肝細胞が再生することが立証されており、骨髄細胞から肝細胞を誘導することによって、肝臓の再生医療が行

える可能性があるものと考えられている(Lagasse *et al.*, 2000)。人医学領域では現在、生体肝移植が最も有力な難治性肝疾患の治療手段であるが、提供者不足、拒絶反応の面から治療対象となる患者も限られている。このような背景から、根治的治療法となる再生医療の臨床応用が強く望まれている。特に、自己組織を用いた再生医療は、倫理面や拒絶反応の問題が無いことから、今後有力な手段になるものと考えられる。一方、イヌにおいても完治できない肝疾患が多く、新たな治療法が必要とされている。しかしながら、イヌでは、骨髄細胞を用いた再生医療の研究がほとんど行われていない。

本研究では、第2章においてまだ明らかにされていないイヌの c-Met 遺伝子のフルクローニングを行い、この c-Met 遺伝子の組織分布について検討し、さらに組織再生時の c-Met 遺伝子の動態を明らかにする目的で、肝臓の部分切除前後における c-Met の mRNA レベルでの発現について検討した (Neo *et al.*, 2005)。

第3章では、HGF/c-Met シグナル伝達と腫瘍との関係を解明することは、HGF を再生医療に応用する上で重要であることから、イヌの造血器腫瘍と c-Met 遺伝子の発現量の関連について検討した。急性骨髄性白血病(AML)1例、慢性骨髄性白血病 (CML) 2例、慢性リンパ性白血病 (CLL) 3例、骨髄異形成症候群(MDS) 5例、形質細胞腫(PCT)1例の骨髄由来細胞とリンパ芽球性白血病(ALL)1例の末梢血由来細胞から total RNA を抽出し、イヌ c-Met 特異的プライマー及びプローブを用いて c-Met mRNA の定量的 PCR により関連性の解明を試みた。

第4章では、犬の骨髄中に含まれる幹細胞から肝細胞を分化誘導する目的で、ネコリコンビナント HGF を添加して骨髄細胞を培養した。骨髄細胞を肝細胞に分化誘導する際の HGF の効用については他の動物で報告されているが、まだ分

化誘導効率が低い現状にある。そこで、ヒト胎盤抽出液が障害肝の再生を促進することが報告されていることから、多能性の因子を含んでいることを期待して、胎盤抽出液を添加して培養する方法についても同様に検討を行った (Nakayama *et al.*, 1989a; Nakayama *et al.*, 1989b)。

第 2 章 イヌ c-Met 遺伝子のクローニングならびに組織分布の 検討と肝部分切除時の c-Met の変動

はじめに

c-Met proto-oncogene は肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) のレセプターで、細胞の増殖、遊走、形態形成ならびに血管新生などあらゆる細胞活性に関与する分子として同定された(Bottaro., 1991; Comoglio, 1993; Ma *et al.*, 2003)。この分子はチロシンキナーゼファミリーに属し、細胞外領域の α 鎖と細胞膜を貫通する形で存在する β 鎖からなる二量体であるとされている(Comoglio, 1993)。HGF は、肝臓の再生に必須の分子であり、さらにその受容体である c-Met も肝細胞に存在することも明らかにされている(Huh, 2004)。ラットでは肝臓部分切除後の肝臓で c-Met の発現量増加が認められることが報告されており、c-Met は肝再生時に重要な役割を果たすことが示唆されている。また、体内のさまざまな障害臓器でその発現が増加することから、臓器組織再生においては HGF/c-Met が中心的役割を果たすものとされているが、詳細については明らかでない(Xian *et al.*, 2000)。c-Met 遺伝子は、ヒト、マウス、ラット、ニワトリ、ツメガエルといった種においてはクローニングされている。その組織分布としては、肝臓、腎臓、肺をはじめとする上皮系に加えて、血管などの内皮系組織での発現が確認され、生体内に広く分布している事が明らかにされている(Tashiro *et al.*, 1990; Di Renzo *et al.*, 1991; Thery *et al.*, 1995; Yang and Park, 1995; Aoki *et al.*, 1996)。

一方、イヌの c-Met に関しては、基礎および臨床研究としていくつかの報告があるものの、遺伝子のクローニングも行われていない状況で、基礎データの集積も非常に少ない。すなわち、イヌ腎上皮および甲状腺上皮細胞由来細胞株に対する HGF の増殖促進効果、慢性虚血性心筋症のイヌにおける HGF cDNA の血管新生促進効果、イヌの骨肉腫における c-Met の発現量の増加などであるが、今後、HGF/c-Met と組織再生の研究を進める上では極めて不十分なものである (Balkovetz, 1998; Ferracini *et al.*, 2000; Ahmet *et al.*, 2003; Vandeput *et al.*, 2003)。

本研究では、イヌにおける HGF/c-Met の動態について検討するためには、レセプターレベルでの研究が必須であると考え、まだ明らかにされていないイヌの c-Met 遺伝子のフルクローニングを行い、24 種の正常組織(末梢血単核球、骨髓、肝臓、腎臓、肺、胃、子宮、精巣、胸腺、リンパ節、小腸、直腸、副腎、甲状腺、心臓、骨格筋、皮膚、膵臓、卵巣、前立腺、脾臓、脂肪、大脳、小脳)における発現について検討した。さらにイヌの肝再生時における c-Met 遺伝子の動態を明らかにするために、肝部分切除前後の c-Met の mRNA 発現量について検討を行った。

材料と方法

正常組織の採材

臨床的に健康なイヌ(1歳齢)から、麻布大学動物実験委員会指針に基づきペントバルビタールを用いて安楽死を行い、末梢血単核球、骨髓、肝臓、腎臓、肺、胃、子宮、精巣、胸腺、リンパ節、小腸、直腸、副腎、甲状腺、心臓、筋肉、皮膚、膵臓、卵巣、前立腺、脾臓、脂肪、大脳、小脳、計24種の組織を採材した。採材した組織は液体窒素にて急速凍結し、 -80°C にて凍結保存した。

正常組織のRNAの抽出と Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

各組織のtotal RNAは、RNA抽出キット(Sepagene RV-R; Sanko Junyaku, Tokyo, Japan)を用いて抽出した。total RNA (1 μg)は、oligo dTプライマー、dNTPおよび蒸留水と混合して 65°C で5分間加熱後、氷上で1分間以上インキュベートした。その後5 \times First strand buffer、0.1MDTT、40UのRNase inhibitor、200UのSuperScript III (Invitrogen, CA, U.S.A.)で構成された反応液と混合して合計20 μl とし、 50°C で30~60分インキュベートした後、 70°C で15分間の加熱反応を経て逆転写反応を行い、cDNAを合成した。c-Met部分配列を得るためのPCR反応は、全てこのcDNAを鋳型として行った。

primerは、ヒト、ラット、マウスのc-Metの塩基配列を基にして設計した(Table 1)(Park *et al.*, 1987; Wallenius *et al.*, 1997; Chan *et al.*, 1988)。また、内部標準遺伝子としてイヌ β -actinを用いることとし、 β -actinのForward Primerの塩基配列は(5'ACTGGGACGACATGGAGAAGA3')、 β -actinのReverse Primerの塩基配列は(5'GATCTTCATGAGGTAGTCAGT3')と設計した(Table 2)。

c-Metの部分塩基配列を得るためのPCR反応条件は、94°Cを2分で変性後、94°Cを30秒、55°C～60°Cを30秒、72°Cを1分30秒の条件で構成される3ステップを34回繰り返して、最後に10分間の伸長反応を行った。得られたPCR産物は、2%アガロースゲルにて電気泳動を行った。

サブクローニングおよびシーケンスとシーケンス結果の解析

ゲルから精製した目的のサイズのPCR産物は、pCR2.1-TOPO plasmid vector (Invitrogen, CA, U.S.A.)に組み込み、プラスミドはDye terminator法によって蛍光色素を標識し、Dye terminator cycle sequence法を用いて、Applied Biosystem Model 310 sequencerでシーケンスを行った (Sanger *et al.*, 1977)。シーケンスの結果は、Edit View ABI automated DNA sequence viewer (Perkin Elmer, U.S.A.)を用いて解析した。

肝臓の部分切除

麻布大学動物実験委員会の許可のもとに、臨床上健康な1才齢のイヌに対して肝臓の部分切除術を行った。麻酔はメデトミジン(40 μ g/kg、筋肉注射)にて導入し、イソフルレンを用いた吸入麻酔にて維持した。肝切除術はHiggins and Anderson (1931)の手技を改変して、肝臓外側左葉の摘出を行った。摘出した外側左葉は液体窒素にて急速凍結し、-80°Cで保存した。肝切除72時間後にイヌは安楽死を行い、肝切除後の肝臓として前述と同様の方法にて保存した。

肝部分切除前後における肝臓の Total RNA の抽出と cDNA の合成

肝切除前および肝切除後の肝臓 total RNA の抽出は、正常組織の RNA と同様の方法で行った。total RNA(1 μ g)は real time PCR 用に合成した c-Met

Reverse primer(5' CACCACCTGATAAATTGGCTTTG3') および β -actin の reverse primer (5' TCGTCCCAGTTGGTGACGAT 3') と AMV reverse transcriptase (Takara Bio Inc., Kyoto, Japan)を用いて、55°Cを5分、99°Cを5分、5°Cを5分の反応条件下にて cDNA を合成した。

定性的 PCR

肝切除前および肝切除後の cDNA は、定量的 PCR 用に合成した c-Met に特異的な c-Met Forward primer (5' GGCCCGTGCTGGAACAC3') および c-Met Reverse primer (5' CACCACCTGATAAATTGGCTTTG3')、または、 β -actin に特異的な Forward primer (5' GATGAGGCCAGAGCAAGAG3') および Reverse primer (5' TCGTCCCAGTTGGTGACGAT 3')を用いて、94°Cを5分の熱変性の後 94°Cを30秒、60°Cを30秒、72°Cを1分30秒の3ステップを22サイクル繰り返す反応条件にて PCR 反応を行った。得られた PCR 産物は、2%アガロースゲルにて電気泳動を行った。

Real time PCR

ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, CA, U.S.A.)での反応条件に適した c-Met と β -actin に特異的な Taq man primer および probe の配列は、Primer Express version 1.5 (Applied Biosystems)に基づいて作製した。c-Met のプライマーおよびプローブの配列は、それぞれ、Taqman c-Met forward primer (5' GGCCCGTGCTGGAACAC3')、Taqman c-Met reverse primer (5' CACCACCTGATAAATTGGCTTTG3')、Taqman c-Met probe (5' CAGATTGTTCCCATGTCAGGACTGCAG3')と決定し、 β -actin の primer および probe の配列は、それぞれ、Taqman β -actin forward primer

(5'GATGAGGCCCGAGAGCAAGAG3')、Taqman β -actin reverse primer (5'TCGTCCCAGTTGGTGACGAT 3')、Taqman β -actin probe (5'ATCCTGACCCTGAAGTACCCCATTAGAC 3')と決定した(Table 3)。

Real time PCRはc-Metおよび β -actinに特異的なTaq man primerおよびprobeを用いてABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, CA, U.S.A.)にて行った。PCR反応液は蒸留水、c-Metまたはイヌ β -actinのForwardならびにReverse Taqman primerとprobe、Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems)および肝切除前あるいは肝切除後のcDNAの混合液とした。反応は、50℃で2分間uracil-N-glycosylaseとインキュベーションした後、95℃にて10分間、AmpliTaq gold DNA polymeraseと反応させ、その後、95℃を15秒、60℃を1分の2ステップを40サイクル繰り返す反応条件で行った。

Real time PCR の結果解析

PCR産物の定量結果の解析は、ABI Prism 7700の解析方法であるComparative threshold method (CT Method)(Pfaffl, 2001)に基づいて行った。各検体の定量結果は、内在性コントロールである β -actinを基準にして相対値化し、さらに各々の検体定量結果を $2^{-\Delta\Delta CT}$ で表し、比較する事で、c-Met発現量の相対的検討を行った。CT Methodに従い、肝切除前の数値を基準1として、再生肝での相対値をXと表した。

結果

イヌc-Met遺伝子のクローニング

c-Metの部分配列は初めに、Table 1に表記したF2 (Forward primer)とR2 (Reverse primer)に挟まれる領域ならびにF8 (Forward primer)とR8 (Reverse primer)に挟まれる領域を増幅した。R1およびR2 primerとF8 primerはmRNAの3'および5' 端をRace法で増幅する時に用いた。5'領域はR1およびR2 primerを用いて増幅した。3'領域は、R8 primerを用いて増幅した。その後、Race法で得られた部分配列を基にしてF12やR3 primerを設計し、PCRに用いた。

クローニングした産物は4419塩基で、シグナルペプチドと推定される24のアミノ酸領域と1358のアミノ酸コード領域を含む1383のアミノ酸で構成されるオープンリーディングフレームを含んでいた(Fig. 1)。

5'非翻訳領域は59塩基で構成され、アミノ酸翻訳領域は60番目の塩基からストップコドン内の4146番目の塩基までであり、3'非翻訳領域は、4147番目からの163塩基で構成されていた。

イヌc-Met mRNAの正常組織における発現の検討

イヌの正常組織(骨髄、肝臓、腎臓、肺、胃、子宮、精巣、胸腺、リンパ節、末梢血単核球、小腸、副腎、甲状腺、心臓、筋肉、膵臓、卵巣、前立腺、脾臓、脂肪、大脳、小脳)のTotal RNAに対してF2-R2で得られる部分配列(519塩基)を増幅し、各組織での発現を検討した。内在性コントロールには、 β -actinを用いた。その結果、検討した全ての組織でF2-R2に挟まれた519塩基のPCR産物が増幅された(Fig. 2, 一部のデータを示した)。

イヌの部分切除肝における c-Met の動態

イヌの、部分切除肝における c-Met の動態を調べるために部分切除前後で、c-Met 発現量の比較を行った。最初に c-Met の発現を定性的に確認した後、定量的 real time PCR にて発現量の比較を行った。定性的 PCR では、肝部分切除前および切除後において合成された PCR 産物に、大きな差は認められなかった (Fig.3)。

増幅結果は、イヌ β -actin に対して相対値化して $2^{-\Delta\Delta CT}$ 、で表し、肝切除前の $2^{-\Delta\Delta CT}$ を基準 1 としたところ、肝切除後の $2^{-\Delta\Delta CT}$ は 1.986 となり、肝切除後の c-Met 発現量は、肝切除前の 1.986 倍の上昇が認められた。

考察

今回明らかにできたイヌc-Met cDNAは、現在まで報告されている他の動物種のc-Metとの相同性が高く、アミノ酸翻訳領域において、ヒト、マウス、ラット、ニワトリ、ツメガエルとそれぞれ89%, 85%, 87%, 68%, 80%の相同性が認められ、また、シグナルペプチドを含めると、それぞれ89%, 89%, 88%, 73%, 63%の相同性が認められた。このようにイヌc-Met遺伝子はそのほかの動物種と高い相同性を示したことから、この遺伝子には動物種間で保存された領域が多数あることが考えられた。

5'非翻訳領域の塩基番号56番直後の配列 (ACCATGA)はKozak(1986)によって真核生物のmRNAにおける転写開始領域に保存されているコンセンサス配列と同様であり、ここが転写開始コドンと考えられた。細胞内領域のアミノ酸番号929-953に相当する親水性の領域はおそらく細胞膜貫通領域にあたると考えられる。細胞内領域のアミノ酸番号1079-1338にあたる部分はチロシンキナーゼ領域と推察され、ヒト、マウス、ラット、ニワトリ、ツメガエルと98%, 97%, 97%, 93%, 91%と高い相同性を示した。さらに、アミノ酸番号305-308ではタンパク質切断領域として生物間で高く保存されている配列 (R-X-R/K-R)と同一配列を認めた(Hosaka *et al.*, 1991)。このアミノ酸配列の存在は、c-Metの構造が α 鎖および β 鎖からなる二量体であることを示唆していた。

本研究で得られたイヌc-Metの cDNAは、ヒトとの相同性が最も高く、GTF-16, Kato3 や Calu1などのヒト腫瘍細胞株由来のc-Metでは、イヌと非常に酷似した配列であったが、HOS腫瘍細胞株からクローニングされたヒトc-Metはイヌc-Metよりも54塩基 (18アミノ酸) 長い配列を持っていた(Ponzetto *et al.*, 1991; Rodrigues *et al.*, 1991)。イヌの肝臓にもヒトのHOS腫瘍細胞株と同様にアイソ

フォームの存在する可能性を考え、ターゲットとなる54塩基が挿入されると予測される位置を挟む方法でプライマーを設計し、RT-PCRを実施した。その結果、イヌの正常肝臓由来のc-Metでは54塩基長いアイソフォームは検出されなかったことから（データ示さず）、本研究で得られた塩基配列が正常なイヌのc-Metの配列であると考えられた。

イヌのc-Met組織分布の検討では、ヒトやマウスの報告と同様に検索を行った24の組織すべてで発現が確認された。今回、イヌの末梢血単核球にもc-Metの発現が認められたが、ヒトの末梢血単核球にはc-Metの発現を認めないという報告がある（Jucker *et al.*, 1994）。また、活性化した末梢血単球にはc-Metが発現するという報告もあり（Beilmann *et al.*, 1997）、今後個々の細胞を単離し、各細胞についてc-Met発現の有無を詳細に検討することが必要である。

また、c-Met mRNA は肝臓のみならず、多くの組織での発現が確認されているため、HGFは種々の組織に結合して作用する可能性があると考えられている。その一方で、HGF/c-Met シグナル伝達が機能的になるのは障害臓器に限るという報告もある。HGF と c-Met のシグナル伝達に関する詳細なメカニズムは未解明だが、細胞外マトリックスと細胞表面の膜タンパク質の相互作用が関与していると推測されている（Tajima *et al.*, 1992; Jiang *et al.*, 1997）。

Borowiak ら(2004)によって、マウスでは HGF/c-Met シグナル伝達はマウスの臓器再生に最も重要なシグナルであることが報告されている（Borowiak *et al.*, 2004）。そこで、本研究では部分切除肝における c-Met 発現量の検討を行った。その結果、c-Met mRNA は肝臓切除 72 時間後には切除前の 1.986 倍に発現量が増加していたことから、イヌでも、肝再生において HGF/c-Met が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。ラットでは、85%の肝切除 1 時間後と 12 時間後に、c-Met の発現がピークとなることが報告されている。また、肝切除 72

時間後には今回の、イヌの部分切除肝における結果と同様に、c-Met の発現量は肝切除前の 2 倍の値であった(Panis *et al.*, 1998; Xian *et al.*,2000)。以上の結果から、イヌにおいても肝再生において c-Met が重要な役割を果たすことが示唆された。

小括

イヌの肝臓をはじめとして、生体組織における HGF の機能を検討するためには、c-Met 遺伝子の同定および生体内での発現を明らかにすることが重要であり、イヌではその遺伝子配列がまだ明らかにされていないことから、イヌの c-Met 完全長 cDNA のクローニングを行い、さらに正常組織における分布ならびに肝部分切除時における発現量の変動についても検討した。

イヌ肝臓より抽出した total RNA と c-Met 特異的プライマーを用いて RT-PCR 反応を行い、イヌ完全長 cDNA の塩基配列を決定した。イヌ c-Met cDNA の Open reading frame は 4419 塩基で、1383 残基のアミノ酸をコードし、その mRNA 発現は、検討を行った 24 種の組織(末梢血単核球、骨髓、肝臓、腎臓、肺、胃、子宮、精巣、胸腺、リンパ節、小腸、直腸、副腎、甲状腺、心臓、筋肉、皮膚、膵臓、卵巣、前立腺、脾臓、脂肪、大脳、小脳)の全てにおいて認められた。また、肝部分切除後の肝臓における c-Met 発現量をリアルタイム PCR にて定量した結果、肝切除前の 1.986 倍の増加が確認された。以上組織分布などの結果から、イヌにおいても HGF/c-Met 伝達経路は肝臓のみならず様々な臓器において細胞の発生および増殖に関与している可能性が示唆された。また、イヌの肝再生時に c-Met が重要な役割を果たしていることを示唆した。

第 3 章 血液腫瘍におけるイヌ c-Met 遺伝子の検討

はじめに

HGF/c-Met シグナル伝達は、様々な腫瘍において重要な役割を果たす事が示唆されている (Longati P., 2001)。HGF の受容体である c-Met の遺伝子は proto-oncogene として知られており、肝癌、肺癌、胃癌、直腸癌、骨肉腫、乳癌などさまざまな固形腫瘍において高発現することが報告されている (Kuniyasu *et al.* 1992; Liu *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1994; Ferracini *et al.*, 1995; Parr *et al.*, 2004)。HGF は、これらの腫瘍で発現する c-Met に特異的に結合し、c-Met の細胞内領域にあるチロシンキナーゼを活性化することで、腫瘍の増大や転移がおこるとされている (Comoglio, 1993)。

ヒト、マウスやラットの正常な造血機構において c-Met は、造血幹細胞のマーカーである CD34 陽性細胞に発現しており、特に造血初期段階で重要な役割を果たし、顆粒球、赤芽球系統の細胞の増殖や遊走に関与していると考えられている (Kmieciak *et al.*, 1992; Nishino *et al.*, 1992; Galimi *et al.*, 1994)。

ヒトの血液腫瘍においては HGF の発現が検討されており、病態との関連性を示唆する報告がある (Jucker *et al.*, 1994)。血液腫瘍における HGF の発現ならびに動態に関する報告例としては、急性骨髄性白血病 (Acute Myeloid Leukemia, AML) および慢性骨髄性白血病 (Chronic Myeloid Leukemia, CML) などの骨髄系腫瘍細胞株に HGF の mRNA 発現が認められる他、AML 症例の血清中 HGF 濃度が高値を示すことや、また、AML、骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic

Syndromes; MDS) の白血病移行期にある症例の骨髄から得た骨髄細胞は、HGF の添加培養で、細胞増殖能および遊走能を促進することを報告している (Nakamura *et al.*, 1994a; Nakamura *et al.*, 1994b; Pons *et al.*, 1998; Weimar *et al.*, 1998b)。一方、血液腫瘍において c-Met を検討した報告例は少ないが、骨髄系腫瘍の cell line においては AML 症例由来の KASUMI-1, KU-812, HEL, KMOE-2 および CML 症例由来の K-562 において mRNA の発現が確認され、また、AML 症例で c-Met 高発現も認められている (Jucker *et al.*, 1994; Pons *et al.*, 1998;)。これらのことから、骨髄系腫瘍の病態には、HGF、c-Met を介したシグナル伝達に関与することが強く示唆される。一方、リンパ系腫瘍においては、HGF や c-Met を発現する細胞株は少ない傾向にあるものの、形質細胞腫 (plasmacytoma; PCT) や形質細胞由来の多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫など、一部の腫瘍では HGF や c-Met の発現が認められており、また、多発性骨髄腫の症例において HGF 濃度が高値を示すことが、疾患の予後不良因子となることが推測されている。これらの腫瘍においては、HGF によって腫瘍細胞の増殖やホーミング、抗アポトーシス効果、骨破壊、および血管新生促進作用が確認され、病態との関連性が強く示唆されている (Pons *et al.*, 1998; Borset *et al.*, 1999; Derkson, *et al.*, 2003)。

イヌにおいてもヒトと同様にリンパ腫や白血病といった血液腫瘍の発生が多く認められ (Harvey *et al.*, 1981; Workman *et al.*, 2003)、特に、リンパ腫はイヌにおいて腫瘍症例の中で発生率も高く、また、ヒトと同様の病態を示すことから、モデル動物としても考えられてきた。さらに AML、CML、PCT および MDS などの臨床報告例はあるものの、その病態は明らかでなく、病態解析が望まれている (Graves *et al.*, 1997; Ramos-Vara *et al.*, 1998; Miyamoto *et al.*, 1999; Tarrant *et al.*, 2001; Weiss *et al.*, 2001; Antognoni *et al.*, 2003)。

そこで、本研究では、最終的に骨髄を用いた再生医療に、HGF を用いる前段階として、イヌの血液腫瘍と c-Met 遺伝子の発現量の関連性を明らかにする目的で、AML、CML、MDS、急性リンパ芽球性白血病（Acute lymphoblastic leukemia; ALL）、慢性リンパ性白血病（Chronic lymphocytic leukemia; CLL）、PCT ならびにリンパ系腫瘍細胞株における c-Met 遺伝子の発現量を、臨床的に健康な犬と比較して相対的に定量し、検討を行った。

材料と方法

症例

症例は、2000～2004年に麻布大学附属動物病院に来院し、臨床経過、身体検査、血液学的検査、骨髄検査などから血液腫瘍と診断されたイヌ 13 例を用いた (Table 4)。骨髄検査時の麻酔は、プロポフォール(6mg/kg)で導入しイソフルレンにて維持した。年齢は、2～10 歳で 8 例が雄で 5 例が雌であった。疾患の内訳は、骨髄球系の腫瘍としては AML1 例、CML2 例であり、一方、リンパ系の腫瘍としては、ALL1 例、CLL3 例、PCT1 例であった。また、AML の前段階である MDS は 5 例を用いた。症例から採取した骨髄液は 10%クエン酸にて抗凝固処理をし、採取後、速やかに-80℃に凍結保存した。末梢血は採取後、リンホプレップ(Fresenius Kabi Norge AS Axis-Shield proC AS, Oslo, Norway)を用いた比重遠心法で単核球分離を行い、-80℃に凍結保存した。各症例の骨髄ならびに末梢血は、各々の症例に対する診断用に採取したものを検体として用いた。また、対照群として临床上健康的な 5～7 歳齢のイヌ 9 頭(雄 6 頭、雌 3 頭)より骨髄液を採取し、検体とした(Table 4)。

細胞株

B リンパ系細胞株および T リンパ系細胞株は、麻布大学附属動物病院を受診した腫瘍症例由来の細胞株を用いた(Table 4)。それぞれの細胞株は、形質細胞腫を発症した、3 歳齢、オスのビーグルの肝臓及び脾臓より樹立した、形質細胞腫由来 B 細胞白血病細胞株と、消化管型 T 細胞性リンパ腫を発症した、7 歳齢、オスのヨークシャーテリアの腹水より樹立した、T 細胞白血病細胞株である (環境保健学部衛生技術学科、荻原喜久美先生より分与を受けた)。

total RNA の抽出と cDNA の合成

骨髓液、末梢血単核球および腫瘍細胞株から、また対照群として、臨床的に健康な 9 頭の骨髓液から核酸抽出キット(Sepagene RV-R, Sanko Jyunyaku, Tokyo, Japan).を用いて total RNA を抽出した。Total RNA(1 μ g)からリアルタイム PCR 用に Primer Express version 1.5 に基づいて合成した Taqman c-Met Reverse primer または Taqman β -actin Reverse primer と、AMV reverse transcriptase (Takara bio Inc., Kyoto, Japan)を用いて 55°Cを 5 分、99°Cを 5 分、5°Cを 5 分の反応条件下にて cDNA を合成した(Table 3)。この際、解析方法である CT Method の検体条件に合わせるために臨床的に健康な犬 9 頭の total RNA は cDNA 合成後に混合し、ひとつの検体とした。この混合液は定性的および Real time PCR において検体 1 として用いた(Table 4)。

定性的 PCR

各症例と正常犬の骨髓ならびに末梢血とリンパ系腫瘍細胞株の cDNA は、リアルタイム PCR 用に Primer Express version 1.5 に基づいて合成した c-Met に特異的な Forward および Reverse primer、または、 β -actin に特異的な Forward および Reverse primer を用いて、94°Cを 5 分の熱変性の後 94°Cを 30 秒、60°Cを 30 秒、72°Cを 1 分 30 秒の 3 ステップを 22 サイクル繰り返す反応条件にて PCR 反応を行った(Table 3)。得られた PCR 産物は、2%アガロースゲルにて電気泳動を行った。

Real time PCR

c-Met 遺伝子の定量的 PCR は、c-Met に特異的な Taq man primer および probe を用いて ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied

Biosystems, CA, U.S.A.)にて行った。ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)での反応条件に適した c-Met と β -actin に特異的な Taq man primer および probe の配列は、Primer Express version 1.5 (Applied Biosystems)に基づいて作製した(Table 3)。

Real time PCRはc-Metおよび β -actinに特異的なTaq man primerおよびprobeを用いてABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)にて行った。PCR反応液は蒸留水、c-Metまたはイヌ β -actinのForward ならびにReverse Taqman probeとprimer、Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems)および各症例の骨髄ならびに末梢血、リンパ系腫瘍細胞株のcDNAまたは対照群(临床上健康な犬9頭の骨髄)のcDNA混合液で構成される反応液とし、50℃で2分間uracil-N-glycosylaseとインキュベーションした後、95℃にて10分間、AmpliTaq gold DNA polymeraseと反応させ、その後、95℃を15秒、60℃を1分を40サイクル行う反応条件を適用した。

Real time PCR の結果解析

PCR 産物の定量の数値化は第 2 章と同様に ABI Prism 7700 の解析方法である CT Method に基づいて行った。CT Method に従い、正常犬 9 頭の混合液の数値を基準 1 として、そのほかの検体の相対値を X と表した。

結果

定性的 PCR

各症例と临床上健康な犬の、骨髓ならびに末梢血と、リンパ系腫瘍細胞株での c-Met の発現を定性的に確認した。検討したすべての症例およびリンパ系細胞株において c-Met mRNA の発現を確認できた。(データ示さず)

定量的 PCR

血液腫瘍間では、骨髓系腫瘍である AML (症例 2)、CML (症例 3,4) で c-Met 発現量が相対的に多く、リンパ系腫瘍である CLL (症例 10,11,12)、ALL (症例 13)、PCT (14)、リンパ系 cell line(15,16)では c-Met mRNA の発現量が少ない傾向が認められた。また、リンパ系腫瘍(症例 10,11,12,13,14,15,16)では临床上健康なイヌよりも c-Met 発現量が少ない傾向が認められた。さらに、AML の前段階である、MDS においては 5 例中 4 例 (症例 5,6,7,8) において、骨髓系腫瘍および临床上健康なイヌよりも c-Met mRNA の発現量が少ない傾向が認められた (Fig. 4)。

考察

本研究の結果から、イヌの血液腫瘍の中で、AML や CML といった骨髄系の白血病において c-Met の発現量が、リンパ系腫瘍に比べて高値を示すことが明らかとなった。ヒトにおいて造血機構に関わる正常な細胞で c-Met mRNA の発現が報告されているのは、骨髄幹細胞のマーカーである CD34 陽性細胞、樹状細胞、活性化単球や活性化 B リンパ球であり、造血機構の未熟な段階の細胞か、活性化した細胞に発現することが推測されている(Skibinski, 2003)。HGF は線維芽細胞、肥満細胞やマクロファージなどのストローマ細胞から産生され、細胞の増殖に関与しているが、ヒト骨髄系白血病細胞からもその産生が確認されている(Gohda *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1994a; Zarnegar, 1995a; Hino *et al.*, 1996)。また、骨髄系腫瘍細胞に作用する HGF は、腫瘍細胞自身から産生され、オートクリンのメカニズムで関与するだけでなく、線維芽細胞などの正常な細胞に由来する HGF が、パラクリンに骨髄系腫瘍細胞に作用し、影響を及ぼすとされている(Jucker *et al.*, 1994; Borset *et al.*, 1996b)。したがって、c-Met の発現量が高いイヌの骨髄系腫瘍には、白血病細胞もしくは正常な線維芽細胞などによって産生された HGF が、c-Met を介してシグナル伝達している可能性が示唆された。このことから、骨髄を用いた再生医療に *in vivo* で HGF を使用する場合、HGF が c-Met を介して腫瘍化に関与する可能性もあるため、注意が必要であると考えられた。

本研究結果から、リンパ系腫瘍では全般的に c-Met mRNA 発現量が低い傾向が認められたが、これはヒトと同様の傾向と考えられる。ヒトのリンパ系腫瘍で HGF/c-Met シグナル伝達の病態への関与が強く示唆されている疾患は、形質細胞腫、多発性骨髄腫(形質細胞由来の腫瘍)である。形質細胞腫由来の cell line

や多発性骨髄腫の cell line には c-Met mRNA の発現もしくは高発現が認められている。特に多発性骨髄腫に関しては、HGF が腫瘍の細胞増殖や抗アポトーシス効果、骨破壊、腫瘍細胞のホーミングおよび血管新生促進作用を示すことが明らかにされ、さらに HGF の血清濃度が高値を示す症例で予後不良になるなど臨床症状との関連性も示唆されている (Pons *et al.*, 1998; Borset *et al.*, 1999; Skibinski *et al.*, 2001)。しかしながら、今回我々が解析を行った形質細胞腫ではヒトの報告と異なり、c-Met mRNA の発現量は低値であったことから、今後、症例を重ねて検討する必要がある。

一方、本研究におけるイヌの MDS の症例では 5 例中 4 例で c-Met mRNA の発現量が、骨髄系腫瘍や臨床上健康なイヌよりも低い傾向が認められた。ヒトの MDS 症例において c-Met の発現量を検討した報告はなく、本研究における結果が MDS の c-Met に関する最初のデータと考えられる。HGF は造血機序において重要な役割を果たすと考えられているが、特に、ヒト、マウスやラットの CD34 陽性細胞に c-Met の発現が認められ、HGF/c-Met を介したシグナル伝達は造血幹細胞に近い段階で機能を果たすことが示唆されている (Kmiecik *et al.*, 1992; Galimi *et al.*, 1994; Nishino *et al.*, 1995; Zarnegar *et al.*, 1995; Goff *et al.*, 1996; Goff *et al.*, 1997; Weimar *et al.*, 1998; Miyazaki *et al.*, 2002)。さらに HGF は、エリスロポイエチン存在下で CD34 陽性細胞から顆粒球および赤芽球系細胞の形成を促進することや、G-CSF, GM-CSF および M-CSF の存在下で顆粒球コロニーを形成するなど、他の因子との共作用により、顆粒球および赤芽球系細胞の分化誘導に関与することが考えられる (Galimi *et al.*, 1994)。これらのことから、今回の研究で c-Met の発現量が少ない傾向を示した MDS においては、造血機序の早い段階で HGF/c-Met を介したシグナル伝達が阻害されたことにより骨髄細胞の分化・成熟異常が発生し、結果として末梢血

中の白血球、赤血球、血小板などの血球が減少した可能性が示唆された。しかしながら、ヒトの MDS の白血病移行期にある症例の骨髄細胞に HGF を作用させたところ、腫瘍細胞が増殖傾向を示したとの報告もあることから、今後 MDS の病態と HGF/c-Met の関連性については詳細に検討する必要がある。

Real time PCR では、定量結果の解析法(CT 法)に従って各検体の相対比を取るために、臨床上健康な犬 9 頭の検体を混合して基準の数値 1 としたが、その内訳として、9 頭の c-Met 発現量のばらつき幅は大きかった。最近、c-Met は通常の単球には発現しないが、活性化した単球では発現陽性となることが明らかとなり、c-Met が炎症機構に関わる可能性も示唆されている(Beilmann *et al.*, 1997)。今回使用した臨床上健康と思われるイヌにも、なんらかの炎症機序が働いていた可能性も否定できないため、母集団を増やしてさらに検討する必要性が考えられた。

小括

本章では、イヌの血液腫瘍と c-Met 発現量の関係を明らかにするために、急性骨髄性白血病(AML)1 例、慢性骨髄性白血病 (CML) 2 例、骨髄異形成症候群 (MDS) 5 例、慢性リンパ性白血病 (CLL) 3 例、形質細胞腫(PCT)1 例の骨髄由来細胞に加えて、急性リンパ芽球性白血病 (ALL) 1 例の末梢血由来細胞、さらに、B および T リンパ系 cell line について解析を行った。これら腫瘍組織から total RNA を抽出し、イヌ c-Met 特異的プライマー及びプローブを用いて c-Met 遺伝子の定量的 PCR を行った。

その結果、AML および CML といった検索したすべての骨髄系腫瘍における c-Met mRNA の発現量はリンパ系腫瘍に比べて高値を示す傾向が認められた。一方、リンパ系腫瘍症例および細胞株では c-Met の発現は臨床的に健康なイヌの c-Met 発現量に比べていずれも低いものであった。さらに前白血病段階である MDS の 5 例中 4 例では、c-Met の発現量は、臨床的に健康なイヌの c-Met 発現量と比較して低値を示した。以上の結果から、イヌの骨髄組織において、c-Met は主に骨髄系細胞を中心に発現していることが推察されたばかりでなく、c-Met が骨髄系腫瘍の病態形成に関与している可能性が示唆された。このことから、HGF を再生医療に応用する場合に注意が必要であると考えられた。

第 4 章 HGF およびヒト胎盤抽出液を用いた骨髄細胞から肝細胞の分化誘導

はじめに

近年、骨髄細胞から肝細胞が分化することが明らかとなり、さらにその機構には、肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor; HGF) が関与していることが報告された。Petersen(1999)らは、致死量の放射線照射を施し、その後肝細胞の再生を抑制する 2-acetylaminofluorene と肝細胞の壊死を引き起こす carbon tetrachloride(CCl₄)によって肝障害を起こした雌のラットに正常な雄の骨髄移植実験を行っている。この実験結果から、Y 染色体をもつ雄ラット由来の骨髄細胞が雌ラットの肝臓内で、移植 9 日後までに Oval cell へと分化し、13 日後に肝細胞へ分化する事を明らかにしている。さらに、肝疾患モデル動物であるマウスに骨髄を移植することによって肝疾患の改善が認められることや、ヒトの骨髄移植で骨髄が肝細胞と胆管細胞に分化することが報告された (Lagasse *et al.*, 2000; Theise., *et al.*, 2000)。in vitro においても HGF の添加培養でラット骨髄細胞から肝細胞を分化誘導可能であることが明らかとなった (Oh *et al.*, 2000; Miyazaki *et al.*, 2002)。また、Schwartz ら(2002) は Matrigel 上で、HGF や Fibroblast growth factor(FGF)の添加培養において、マウス、ラット、およびヒトの骨髄由来の多能性前駆細胞が肝細胞に分化可能であることを証明している。

人医領域における、難治性肝疾患の治療は、生体肝移植や脳死患者からの移

植が主流となっているが、ドナー不足や拒絶反応の問題から、治療対象となる患者も限られている。このような各種状況から組織適合抗原による拒絶などの障害が問題とならない自己組織を利用した再生医療の臨床応用が強く望まれている。特に、骨髄組織は採取時の生体侵襲が少なく、またその分化や増殖制御機構が最も解析されていることから、再生医療に自己組織を応用する上で、最も理想的かつ現実的な臓器として考えられている。しかしながら、現段階ではラットやマウスの動物実験においても骨髄から肝細胞を分化誘導する際の効率が著しく低く、臨床応用に際して最大の妨げとなっている (Oh *et al.*, 2000; Miyazaki *et al.*, 2002; Schwartz *et al.*, 2002)。

HGF による肝細胞への分化誘導能の活用と共に、本研究では、ヒト及びイヌの肝障害の治療に利用しているヒト胎盤抽出液(ラエンネック; Japan bio products industry, Tokyo, Japan)に注目した(Wolf *et al.*, 1991)。ラエンネックは、ヒト胎盤から生理活性成分を抽出したもので、ヒト由来の諸種のサイトカイン、アミノ酸、ペプチド、核酸塩基、糖質などを含有する、生物製剤である。ヒトでは肝機能改善剤として、臨床において慢性肝疾患患者に広く使用され、良好な臨床成績が得られている(増元 1958; 坂本ら 1973; 坂本ら 1974)。特に、ヒト胎盤抽出液には、微量の HGF を含む他、FGF、nerve growth factor(NGF)、vascular endothelial growth factor(VEGF)などの増殖因子や IL1 や IL6 といった複数種のインターロイキンなど、肝細胞を強力に増殖させる能力を持つものが含まれていると予想され、骨髄から肝細胞を誘導する分化効率を著しく増加しうる可能性が予測された。

イヌではヒトにおける場合と同様に、完治を望むことができない肝疾患の症例が数多く認められるが、その有効な治療法はまだ確立されていない。さらに、組織適合抗原の特定が明らかになっていないことから、脳死あるいは生体肝移植

を治療として用いる事が不可能である。このような状況から、自己組織を用いた再生医療は今後有力な治療手段として期待される。イヌは獣医臨床の対象であると共に動物実験の対象でありながら、イヌ骨髄細胞から肝細胞の分化誘導には成功していない。本研究では、まず、イヌ骨髄細胞に HGF あるいはヒト胎盤抽出液を添加して培養を行い、肝細胞への分化誘導について検討した。骨髄細胞から肝細胞に分化したことを証明するために、アルブミン mRNA の発現検出を試み、それに加えて肝細胞に特異的なタンパクであるアルブミン、CK8 および CK18 の検出を試みた。さらに、骨髄細胞の肝細胞への分化において、HGF/c-Met シグナル伝達系が関与しているかどうか検討するために、c-Met の自己リン酸化を特異的に抑制する c-Met 改変ペプチドを用いて解析を行った。

材料と方法

供試動物

本学生物科学総合研究所および同ベテリナリーアニマルセンターで飼育している臨床的に健康な 5～6 歳齢の雄のビーグル、述べ 8 頭を供試し、実験ごとに 1 頭ずつ用いた。

骨髓細胞の採取と細胞の単離

骨髓は、塩酸メデトミジン、ミタゾラム、塩酸ケタミンを、それぞれ 40 μ g/kg、0.3mg/kg、4mg/kg の混合液による麻酔下で、大腿骨または上腕骨から採取した。採取した骨髓はリンホプレップ(Fresenius Kabi Norge AS Axis-Shield proC AS, Oslo, Norway)を用いた比重遠心法で単核球分離を行い、これを培養に用いた。

細胞培養

骨髓細胞は、 $8 \times 10^5/\text{cm}^2$ の密度で、RNA 抽出用は 25 cm^2 の培養フラスコにて培養し、免疫染色用にはコラーゲンコートタイプのチャンバースライド(4 wells) (IWAKI, Chiba, Japan)を用いた。

基本培地には、初代肝細胞培養用に開発された HGM medium を基本として改変した培地(Miyazaki *et.al.*, 2002)を用いた(Table 5)。骨髓細胞は HGM medium を基本培地として、EGF、ヒト胎盤抽出液、ネコリコンビナント HGF を添加して、5%CO₂ 存在下、37°C で培養を行った。さらに、次に示す 3 系統の培地でそれぞれイヌ骨髓細胞を培養した。①10%FBS 添加 HGM medium、②10%FBS 添加 HGM medium + Epidermal growth factor (EGF) (20ng/ml) + ヒ

ト胎盤抽出液[ラエンネック; Japan bio products industry, Tokyo, Japan {日本生物製剤(株)より供与}]、③10%FBS 添加 HGM medium + EGF(20ng/ml) + ネコリコンビナント HGF {Miyake *et al.*, 2004 (日本全薬工業(株)より供与)} (1000ng/ml)。さらに、ヒト胎盤抽出液ネコリコンビナント HGF、EGF(Sigma, USA)は3日ごとに培地交換する毎に添加した。

RNA の抽出と RT-PCR

骨髓細胞ならびにイヌ肝臓のtotal RNAは、RNA抽出キット(Sepagene RV-R; Sanko Junyaku, Tokyo, Japan)にて抽出した。total RNA (1 μ g)からアルブミン及び内部標準遺伝子として用いる β -actinに特異的なReverse primerとAMV Reverse transcriptase (Takara Bio Inc., Kyoto, Japan)を用いて逆転写反応を行い、cDNAを合成した(Table 2)。94°Cで1分間の熱変性を行った後、94°Cを30秒、65°Cを1分、72°Cを1分で5サイクル、さらに94°Cを30秒、62°Cを45秒、72°Cを45秒で5サイクル、最後に94°Cを30秒、57-60°Cを45秒、72°Cを45秒の3ステップを50サイクル繰り返し、PCR反応を行った。アルブミン特異的primerはイヌアルブミンmRNAの配列を基にして作製した(Table 6)。

免疫組織学的染色

培養 28 日目に回収した培養骨髓細胞は、4%のリン酸緩衝液(phosphate-buffer saline; PBS)溶解パラフォルムアルデヒド(PFA)にて室温で30分間固定し、PBSで洗浄後に内因性ペルオキシターゼをブロックするために0.3% H_2O_2 添加メタノールに浸漬し、室温で30分間静置した。さらにPBSで洗浄後、10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)中で、マイクロウェーブを500Wで3分間、5回かけて、抗原性の賦活化を行った。20分間の冷却の後、PBSを用いて洗浄

を行い、1%BSA 含有 PBS に溶解した 10%正常ヤギ血清で 10 分間ブロックした後、1%BSA 含有 PBS にて 20 から 100 倍希釈した biotin labeled anti human albumin rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA)、あるいは、biotin labeled anti human CK18 mouse monoclonal antibody (PROGEN Biotechnik, USA)を一次抗体として用い、4℃で 1 晩反応させた。これ以降の工程で使用する PBS には、ゼラチンと Tween 20 を、最終濃度 0.1%ならびに 0.02%で加えた。この PBS にて洗浄した後に、1%BSA 含有 PBS に溶解した 10%正常ヤギ血清で 10 分間ブロッキングし、次に 1%BSA 含有 PBS にて 100 倍希釈した二次抗体(HRP-labeled anti rabbit antibody goat IgG、あるいは HRP-labeled anti mouse antibody goat IgG (DAKO Cytomation, Kyoto, Japan)と室温にて 3 時間反応させた。その後、PBS にて洗浄し、0.05M トリス塩酸(pH7.6)溶解 DAB 液に浸漬させて 20 分間の反応後、発色させるために、H₂O₂ 添加 0.05M トリス塩酸(pH7.6)溶解 DAB 液で 5 分間反応させた。

HGF/c-Met シグナル伝達の選択的抑制

HGF/c-Met シグナル伝達の選択的抑制については、Bardelli ら(1999)の報告に従って行った。c-Met チロシンキナーゼを選択的に抑制する合成ペプチドは、マウス c-Met の細胞内領域に存在するカルボキシル末端のテール部分(Y1349 および Y1356)を含む 35 のアミノ酸配列で、その中のチロシンをフェニルアラニンに変更したものを、直鎖配列の合成ペプチド(H-RQIKIWFQNRRHKWKKIGE HFVHVNATFVNVCVA-OH) (Kurabo, Osaka, Japan)として合成した(Fig. 1)。合成ペプチドは濃度 20 μ M で HGF 添加培地に添加し、3 日ごとの培地交換時に毎回添加した。

結果

細胞培養および細胞の形態学的所見

形態学的には、①10%FBS 添加 HGM medium で培養した骨髓細胞は、培養 3 日目から線維芽細胞様の細胞が培養フラスコ底部に固着し始め、7 日目には細胞密度が飽和状態となり、28 日目まで同様の形態の細胞が培養フラスコ底部に固着していた。②10%FBS 添加 HGM medium + EGF(20ng/ml) + ヒト胎盤抽出液添加群では、線維芽細胞様の細胞の増殖は少なく、当初は大きな浮遊細胞のコロニーで占められていたが、約 10 日後には線維芽細胞と比べてより四角形様の大型の細胞が培養フラスコ底部に固着し、その後肝細胞様の 5~6 角形の細胞が増え、培養 28 日目には細胞のほとんどが肝細胞様の細胞で占められた。③10%FBS 添加 HGM medium + EGF(20ng/ml) + ネコリコンビナント HGF (1000ng/ml) は、①10%FBS 添加 HGM medium よりも線維芽細胞様の細胞が底部に固着する時期が若干遅延したが、徐々に線維芽細胞様の細胞が培養容器底部に固着し始め、培養 21 日目頃に線維芽細胞と比べてより四角形様の細胞が線維芽細胞様の細胞間に散見されるようになり、28 日目までにその四角形様の細胞が増加していた(Fig. 6)。

アルブミン mRNA の発現

培養 7 日目、14 日目、21 日目、28 日目に PCR 法にてアルブミン mRNA の発現を検討した。その結果、ヒト胎盤抽出液添加 HGM 培地で培養した培養 14 日目の骨髓細胞において、形態学的に肝細胞様に変化したことに加えて、RT-PCR 法により、アルブミン mRNA の発現が明らかとなった。培養 28 日目ではヒト胎盤抽出液を添加した培地の他、HGF を添加して培養した骨髓細胞に

においてもアルブミン mRNA の発現が認められた。培養 28 日目までは、無添加の培地で培養した骨髄細胞にはアルブミン mRNA の発現は認められなかった (Fig. 7)。

免疫組織化学的染色

培養 28 日目の各細胞群について免疫組織化学的染色法でアルブミンおよび CK18 の蛋白の検出を試みたところ、ヒト胎盤抽出液またはネコリコンビナント HGF を添加して培養した骨髄細胞のほぼ全ての細胞質において、アルブミンが中等度の陽性を示し、CK18 は微弱な陽性を示した (Fig. 8)。CK8 に関しては明確な結果を得られなかった。

HGF/c-Met シグナル伝達の抑制

次に、②10%FBS 添加 HGM medium + EGF(20ng/ml) + ヒト胎盤抽出液 (0.2ml/ml)、③10%FBS 添加 HGM medium + EGF(20ng/ml) + ネコリコンビナント HGF (1000ng/ml) の培養群において、c-Met シグナル伝達阻害合成ペプチドを用いて、HGF/c-Met 伝達系を阻害した。その結果、ヒト胎盤抽出液およびネコリコンビナント HGF を添加培養したいずれの骨髄細胞においても、細胞の増殖は認められなかった。さらに、14、21、28 日目にアルブミン mRNA の発現を RT-PCR にて検討したが、いずれも発現が認められなかった (データ示さず)。

考察

本研究の結果から、イヌの骨髄細胞から肝細胞の特徴を有する細胞を分化誘導することが可能であることが明らかとなり、さらに、その分化には HGF/c-Met 伝達経路が重要な役割を果たしていることが示唆された。ラットでは、骨髄細胞を DF medium (Dulbecco's modified Eagle's medium と Ham's medium の 1:1 混合液) にて、HGF 存在下で培養したところ、21 日目にアルブミンの発現が認められ、さらに免疫染色においてアルブミンと CK8 および CK18 蛋白が陽性を示し、肝細胞が誘導されたことが報告されている (Oh *et al.*, 2000)。また宮崎らは、HGM medium を用い、HGF 存在下で骨髄細胞を培養したところ 14 日目にアルブミンの発現を認め、さらに肝細胞の分化最終段階で発現する tryptophan-2,3-dioxygenase および tyrosine aminotransferase の存在を確認して、成熟肝細胞の誘導に成功したと報告している (Miyazaki *et al.*, 2002)。肝臓由来細胞としては、肝臓幹細胞、Oval cell、小型肝細胞、成熟肝細胞あるいは胆管上皮細胞等と様々な細胞が存在する (Sell 1994; Thorgeirsson 1996; Alison 1998; Zheng 2003)。今回の研究で骨髄細胞から分化した細胞は、アルブミンと CK18 蛋白陽性であり、肝細胞に分化したことは明らかであるが、それらの分化成熟度、また、アルブミン産生能以外の機能については詳細に解析していない。今後、誘導された細胞の特徴を詳細に解析する必要があるものと思われた。

今回誘導された肝細胞の形質を持つ細胞の起源として考えられる細胞は、骨髄由来造血幹細胞、骨髄由来間葉系幹細胞、骨髄中に存在が確認されている肝幹細胞の 3 系統挙げられる。いずれの細胞も、ヒト、マウスやラットにおいて c-Met 陽性であることが明らかとなっており、HGF はこれらの細胞に発現する

c-Met レセプターを介して肝臓様の細胞への分化を誘導したと考えられる。
(Goff *et al.*, 1996; Goff *et al.*, 1997; Weimar *et al.*, 1998a; Avital *et al.*, 2001; Miyazaki *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004)。

ラットの骨髄細胞では、DF medium や、HGM medium に HGF ならびに EGF を添加培養することで、肝細胞が分化誘導される (Oh *et al.*, 2000、Miyazaki *et al.*, 2002)。HGM medium は初代肝細胞培養に適した培地であり、HGF、EGF、transforming growth factor α (TGF α)やフェノバルビタールを添加することで、活発な肝細胞の増殖が期待できる培地であると考えられている。(Block *et al.*, 1996; Miyazaki *et al.*, 1998)。さらに HGM medium には、初代肝細胞培養時に小型肝細胞の増殖と成長を刺激するニコチンアミド、初代肝細胞の DNA 合成を刺激するデキサメサゾン、ITS(insulin, transferring, serenium)、プロリンの他に、Zn、Cu、Mn などの微量元素を含み、初代肝細胞の増殖と生存維持に有効な培地である(Nakamura *et al.*, 1984; Houck *et al.*, 1985, Inoue *et al.*, 1989; Miyazaki *et al.*, 1989; Mitaka *et al.*, 1992; Block *et al.*, 1996; Bhatia *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2003;)。また、肝細胞培養時に、細胞の機能発現を促進する環境因子として、高密度培養が挙げられ、生体内の肝臓に似た環境を模造することで、肝細胞の機能発現の指標となるアルブミンなどの蛋白発現が誘引されると考えられている(Nakamura *et al.*, 1983; Takehara *et al.*, 1992; Bhatia *et al.*, 1999)。これらのことから、本研究では HGM medium を基本培地として、 $8 \times 10^5/\text{cm}^2$ の高密度でイヌの骨髄細胞を培養し、肝細胞への分化を試みたところ、肝細胞への分化が認められた。したがって、イヌの骨髄細胞から、肝細胞への分化を誘導する場合、培地と共に、その培養条件も重要であると考えられた。

また、本研究ではヒト胎盤抽出液を添加培養した骨髄細胞から肝細胞への分化誘導が認められた。ヒト胎盤抽出液は、肝臓の機能改善を促す薬剤として人医療の現場で利用されているが、現在までその作用機構等はほとんど不明のままであった。さらに、今回の実験では、ネコリコンビナント HGF 添加最終濃度は、1000ng/ml であるのに対して、ヒト胎盤抽出液添加群における HGF の最終濃度は、0.026ng/ml とごく微量であった。しかしながら、ネコリコンビナント HGF を添加した群に比較して、ヒト胎盤抽出液を添加した群において早期にアルブミンの発現が認められ、骨髄細胞から肝細胞への分化誘導に優れていた。また、形態学的にもヒト胎盤抽出液を添加した群では肝細胞様の形態をした細胞が多くを占めていたのに対し、ネコリコンビナント HGF を添加した群は線維芽細胞の中に少数の割合で肝細胞様の形態をした細胞が認められたのみであった。ヒト胎盤抽出液には HGF を微量(0.13ng/ml)に含む他、EGF、FGF、NGF、VEGF、TGF- α などの、肝細胞増殖を促進する種々の増殖因子や IL-6 に加えて、肝臓再生に促進的に働くレプチンや Dehydroepiandrosterone (DHEA)を含有していることが確認されている(Russell *et al.*, 1985; Bailie *et al.*, 1992; Fausto *et al.*, 1993; Michalopoulos *et al.*, 1997; Kitamura *et al.*, 1999; Leclercq *et al.*, 2003; Kaido *et al.*, 2004; Oe *et al.*, 2004; Sekhon *et al.*, 2004)。今回ヒト胎盤抽出液による骨髄細胞から肝細胞の分化誘導が、ネコリコンビナント HGF より早期に確認されたことは、ヒト胎盤抽出液中に含まれる様々な因子のうちいずれか、または複数が HGF と相乗効果を示して、イヌ骨髄細胞から肝細胞の分化誘導を促進したと推察される。

Miyazaki *et al.*(2002)は、骨髄細胞から肝細胞を分化誘導するに際して、HGF の濃度も重要な因子であると指摘している。彼らの報告によると、HGF 濃度 30ng/ml では肝細胞への分化は認められず、1000ng/ml で分化を認めている。

本研究では、臨床応用する上で問題となる分化誘導効率の改善を念頭におき、その一環として、分化速度の短縮も重要であり、ヒト胎盤抽出液を添加した群にさらにネコリコンビナント HGF を添加し、HGF 高濃度群についても検討した。10%FBS 添加 HGM medium+EGF(20ng/ml)+ ヒト胎盤抽出液(0.2ml/ml)と、HGF 濃度の増量群として 10%FBS 添加 HGM medium+EGF(20ng/ml)+ ヒト胎盤抽出液(0.2ml/ml)+HGF (1000ng/ml)で培養した骨髄の肝細胞への分化速度を比較検討した。その結果、形態的には、ヒト胎盤抽出液と HGF を添加した培地で培養した骨髄の方が、肝細胞様の形態を示す細胞が早期に認められたが、アルブミン mRNA の発現に関しては、いずれの培地で培養した場合も 14 日以前にはその発現を認めなかった(データ示さず)。この結果から、ヒト胎盤抽出液に HGF を添加して濃度を増しても、分化誘導の時期を早める事は困難であると推測された。

また、少量の HGF しか含有しない胎盤抽出液のみでも骨髄細胞から肝細胞への分化誘導が可能であったことから、骨髄細胞から肝細胞への分化誘導は HGF 非依存性である可能性も考えられた。そこで、HGF の機能発現に必須の存在である c-Met のチロシンキナーゼを特異的に阻害する合成ペプチドを用いて HGF/c-Met シグナル伝達の阻害実験を試みた。合成ペプチドは、Bardelli ら(1999)の報告に従って、c-Met の C 末端テール部分に存在するチロシン(Y1349 および Y1356)を含んだ 35 のアミノ酸配列で構成される単鎖アミノ酸として合成した。本研究では Bardelli ら(1999)が検討した合成ペプチドの中で、c-Met 抑制効果が最も強く認められた配列を選択し、チロシン(Y1349 および Y1356)をフェニルアラニンに変更した単鎖アミノ酸を合成した。このペプチドは、c-Met に結合して、細胞増殖、遊走、形態形成を 50%の割合で抑制することが立証されると共に、EGF や VEGF の活性を抑制することなく、c-Met 特異的に

そのキナーゼ反応を抑制することが明らかとなっている(Bardelli *et al.*, 1999)。本研究結果では、合成ペプチドの存在によって骨髄細胞から肝細胞の分化は完全に阻害され、骨髄細胞から肝細胞への分化に、HGF は必須の成分であることが考えられた。しかしながら、胎盤抽出液添加群が HGF の添加群よりも早期にアルブミンを発現し、さらに、より多くの肝細胞様の形態をもったアルブミン陽性細胞に分化したことから、ヒト胎盤抽出液中に含まれる因子と HGF の共同作用により、肝細胞への分化誘導がよりスムーズに行われた可能性が強い。今回の研究データからはそれらの因子を特定することができなかった。今後、胎盤抽出液に含まれている可能性のある分化誘導因子について検討することが重要であると考えられた。

小括

本研究では、イヌ骨髓細胞に HGF を添加培養し、肝細胞への分化誘導を試みた。さらに肝細胞増殖効果を有するヒト胎盤抽出液(ラエンネック)を骨髓細胞に添加培養し、あわせて検討を行った。

イヌの骨髓を採取し、HGM 培地にネコリコンビナント HGF と EGF の添加群とヒト胎盤抽出液と EGF の添加群を設定して培養し、28 日目まで観察を行った。さらに、HGF/c-Met シグナル伝達経路阻害時の胎盤抽出液の作用を確認するために、これらの条件下で、c-Met のシグナル伝達を特異的に阻害する合成ペプチド添加培養群についても検討を行った。肝細胞への分化を確認するために、RT-PCR でアルブミン mRNA の発現を、また免疫組織化学的染色にてアルブミンおよびサイトケラチン 8 (CK8) および 18(CK18)の検出を行った。その結果、ネコリコンビナント HGF を添加培養した細胞では、形態学的に肝細胞の特徴を有する細胞に変化したばかりでなく、培養 28 日目にアルブミン mRNA の発現が認められた。さらにヒト胎盤抽出液を添加した細胞では培養 14 日目にアルブミン mRNA の発現が認められた。これらの細胞は、いずれも培養 28 日目には免疫組織化学的染色にてアルブミンおよび CK18 が陽性であることが認められ、肝細胞の特徴を有することが確認された。また、c-Met シグナル伝達を阻害する合成ペプチドを添加した条件下では、細胞増殖そのものが困難であり、肝細胞様の形態をした細胞への分化は認められず、アルブミン mRNA の発現も認められなかった。以上の結果から、イヌ骨髓由来細胞は、HGF 存在下で肝細胞の性質を持つ細胞に分化誘導が可能であることが初めて立証された。さらにヒト胎盤抽出液によっても骨髓由来細胞を肝細胞へ分化させうることが新たに発見され、胎盤抽出液に含まれる HGF 以外の因子の解明が今後の再生医療への

応用に大いに貢献できるものと考えられた。

第 5 章 総括

近年、骨髄細胞から肝細胞が分化することが明らかとなり、さらにその機構には、肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor; HGF) が関与していることが報告された。HGF は、肝臓、腎臓をはじめとして多くの組織の細胞増殖、遊走、形態形成、血管新生、アポトーシスなどを制御し、さらにその細胞活性作用は組織発生や再生などに関与する。さらに、HGF の機能は、特異的レセプターである c-Met を介して発現する。本研究においては、最終的に骨髄細胞から肝細胞を誘導し、肝再生医療に臨床応用する目的で、今までに明らかにされていなかった①イヌ c-Met 遺伝子の全塩基配列の決定、②肝切除時における c-Met 遺伝子の発現状況、③イヌの血液腫瘍における c-Met 遺伝子の発現量、④骨髄細胞から肝細胞への分化の証明について検討を行った。

まず、第 2 章ではイヌにおける HGF/c-Met の機能解析を進めるための基礎研究としてイヌ c-Met 遺伝子の配列が明らかにされていなかったため、イヌの c-Met 完全長 cDNA のクローニングと、その各組織における mRNA 発現を検討した。その結果、イヌ c-Met cDNA の Open reading frame は 4419 塩基で、1383 残基のアミノ酸をコードしていた。また、他の動物との相同性も 68~89% と極めて高いことが明らかとなった。さらに、mRNA 発現は、肝臓、腎臓をはじめとして、検討を行った 24 組織全てにおいて認められた。部分的肝切除を行ったイヌにおいて c-Met の発現量を検討したところ、その肝切除後の肝臓において c-Met の発現量の増加が確認され、c-Met 遺伝子がイヌの肝細胞の増殖に重要な因子であることが明らかとなった。

第 3 章では、イヌの血液腫瘍症例の骨髄における c-Met 遺伝子の発現量の検討を行った。イヌでは血液腫瘍症例が多く、その臨床像や細胞形態的特徴はヒ

トと類似しているが、病態解析についてはほとんど明らかにされておらず、HGF/c-Met と腫瘍との関連についても不明のままである。そこで、イヌの急性骨髄性白血病(AML)1 例、慢性骨髄性白血病(CML)2 例、骨髄異形成症候群(MDS) 5 例、慢性リンパ性白血病 (CLL) 3 例、形質細胞腫(PCT)1 例の骨髄由来細胞に加えて、急性リンパ性白血病 (ALL) 1 例の末梢血細胞、さらに、B および T リンパ系 cell line における c-Met 遺伝子の発現量の検討を行った。その結果、血液腫瘍間で差が認められ、骨髄球系腫瘍症例(3 例)での c-Met の発現量が、リンパ系腫瘍症例および細胞株(7 例)に比べて高値を示し、骨髄系腫瘍では c-Met がその病態と関連している可能性が示唆された。また、リンパ系腫瘍および MDS では臨床的に健康なイヌと比べて低値を示す傾向にあることが明らかになった。さらに、血液腫瘍での c-Met 遺伝子の発現量の測定は、今後新たな病態把握のツールになりうることで、再生医療に HGF を応用する場合には注意が必要であることも指摘した。

第 4 章では、イヌ骨髄細胞から肝細胞の分化誘導を *in vitro* において検討した。近年、ラットの骨髄細胞から肝細胞が分化することが報告されたが、イヌにおける報告は皆無で未解明な部分が多い。また、HGF による肝細胞への分化誘導はその効率が悪く、臨床応用への最大の妨げになっている。そこで、イヌ骨髄細胞に HGF を添加して培養を行い、肝細胞への分化誘導を試みた。同時に実際の臨床の現場で肝細胞の増殖効果が認められているヒト胎盤抽出液に注目し、骨髄細胞に添加培養して肝細胞への分化誘導を試みた。

イヌの骨髄を採取し、HGM medium にネコリコンビナント HGF と EGF を添加し、28 日間培養を行った。ヒト胎盤抽出液と EGF を添加したものでも同様に培養を行った。さらに、HGF/c-Met シグナル伝達経路阻害時の胎盤抽出液の作用を確認するために、これらの条件下で、c-Met のシグナル伝達を特異的に阻害

する合成ペプチドを添加し培養を行った。その結果、ネコリコンビナント HGF を添加培養した細胞は、形態学的に肝細胞の特徴を有する細胞に変化すると共に、培養 28 日目にアルブミン mRNA の発現が認められた。一方、ヒト胎盤抽出液を添加した細胞は培養 14 日目にアルブミン mRNA の発現が認められた。これら細胞は、いずれも培養 28 日目には免疫染色にてアルブミンおよび CK18 が陽性であることが確認され、遺伝子的にも産生する蛋白においても肝細胞の特徴を有するものと考えられた。また、c-Met シグナル伝達を阻害する合成ペプチドを添加した条件下では肝細胞への分化は認められず、アルブミン mRNA の発現も認められなかった。以上の結果から、イヌ骨髓由来細胞は HGF 存在下で肝細胞の性質を持つ細胞に分化することを初めて確認でき、さらにヒト胎盤抽出液によっても骨髓由来細胞を肝細胞へ、HGF 添加よりも早く分化させることを発見した。これらのことから、ヒト胎盤抽出液中に HGF との協力作用で骨髓細胞から肝細胞を効率よく分化誘導する因子が存在することを示唆した。今後、胎盤中に含まれるこれらの因子を詳細に解析することで、再生医療への応用に大きく貢献できると思われた。これらの成果は、獣医臨床のみならず、生命科学全般において有用な情報であると考えられた。

謝辞

本研究は、麻布大学獣医学部獣医学科内科学第2研究室教授 山田隆紹博士、同研究室助教授 土屋亮博士、同研究室講師 久末正晴博士ならびに同学部動物応用科学科動物育種学研究室講師 神作宜男博士と同大学環境保健学部衛生技術学科病理学研究室講師 荻原喜久美先生に御指導を仰ぎ、ならびに内科学第2研究室卒業生古市満氏および同研究室学部学生の助力のもとに遂行することができた。

また、同大学獣医学科生物総合研究所所長 代田欣二博士、動物応用科学科動物工学研究室助教授 滝沢達也博士、育種学研究室講師 神作宜男博士、内科学第2研究室講師 久末正晴博士に懇切な論文校閲を賜り、日本生物製剤㈱にヒト胎盤抽出液（ラエンネック）を、さらに日本全薬㈱にネコリコンビナント HGF の供与を賜った。

稿を終えるに当たり、諸先生方、卒業生ならびに学生諸氏さらに貴重な検体を提供してくれたイヌ達に深く感謝致します。

参考文献

- Ahmet, I., Sawa, Y., Yamaguchi, T., Matsuda, H. 2003. Gene transfer of hepatocyte growth factor improves angiogenesis and function of chronic ischemic myocardium in canine heart. *Ann. Thorac. Surg.* 75: 1283-1287
- Alison, M. 1998. Liver stem cells: a two compartment system. *Curr Opin Cell Biol.* 10: 710-715.
- Antognoni, M.T., Mangili, V., Spaterna, A., Fruganti, G. 2003. Acute myeloid leukaemia in five dogs: clinical findings and cytochemical characterization. *Vet Res Commun.* 27: 367-71.
- Aoki S, Takahashi K, Matsumoto K, Nakamura T. 1996. Molecular cloning of the *Xenopus* c-met/hepatocyte growth factor receptor and its regional expression during early development. *J Biochem (Tokyo).* 120: 961-968.
- Avital, I., Inderbitzin, D., Aoki, T., Tyan, D.B., Cohen, A.H., Ferraresso, C., Rozga, J., Arnaout, W.S., Demetriou, A.A. 2001. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 288: 156-164.
- Bailie, M.B., Roth, R.A., Contreras, M.L. 1992. Nerve growth factor binding sites on hepatic parenchymal cells. *In Vitro Cell Dev Biol.* 28: 621-624.
- Balkovetz, D.F. 1998. Hepatocyte growth factor and Madin-Darby canine kidney cells: in vitro models of epithelial cell movement and morphogenesis. *Microsc Res Tech.* 43: 456-463.
- Bardelli, A., Longati, P., Williams, T.A., Benvenuti, S., Comoglio, P.M. 1999. A peptide representing the carboxyl-terminal tail of the met receptor inhibits kinase activity and invasive growth. *J Biol Chem.* 274: 29274-29281.
- Bhatia, S.N., Balis, U.J., Yarmush, M.L., Toner, M. 1999. Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of

hepatocytes and nonparenchymal cells. *FASEB J.* 13: 1883-1900.

Beilmann, M., Odenthal, M., Jung, W., Vande Woude, G.F., Dienes, H.P., Schirmacher, P. 1997. Neoexpression of the c-met/hepatocyte growth factor-scatter factor receptor gene in activated monocytes *Blood.* 90: 4450-4458.

Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., Vande Woude, G.F. 2003. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4: 915-925.

Block, G.D., Locker, J., Bowen, W.C., Petersen, B.E., Katyal, S., Strom, S.C., Riley, T., Howard, T.A., Michalopoulos, G.K. 1996. Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium. *J Cell Biol.* 132: 1133-1149.

Borowiak M, Garratt AN, Wustefeld T, Strehle M, Trautwein C, Birchmeier C. 2004 . Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci. U. S. A.* 101: 10608-10613.

Borset, M., Hjorth-Hansen, H., Seidel, C., Sundan, A., Waage, A. 1996.a Hepatocyte growth factor and its receptor c-met in multiple myeloma *Blood.* 88: 3998-4004.

Borset, M., Lien, E., Espevik, T., Helseth, E., Waage, A., Sundan, A. 1996.b Concomitant expression of hepatocyte growth factor/scatter factor and the receptor c-MET in human myeloma cell lines. *J Biol Chem.* 271: 24655-24661.

Borset, M., Seidel, C., Hjorth-Hansen, H., Waage, A., Sundan, A. 1999. The role of hepatocyte growth factor and its receptor c-Met in multiple myeloma and other blood malignancies. *Leuk Lymphoma.* 32: 249-256.

Bottaro, D.P. Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, Aaronson SA. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product.1991. *Science.* 251: 802-804

Chan, A.M., King, H.W., Deakin, E.A., Tempest, P.R., Hilkens, J., Kroezen, V., Edwards, D.R., Wills, A.J., Brookes, P., Cooper, C.S. 1988. Characterization of the mouse met proto-oncogene. *Oncogene*. 2 : 593-599.

Comoglio, P.M. 1993. Structure, biosynthesis and biochemical properties of the HGF receptor in normal and malignant cells. *E.X.S.* 65: 131-165.

Comoglio, P.M. 1993. Structure, biosynthesis and biochemical properties of the HGF receptor in normal and malignant cells. *E.X.S.* 65: 131-165.

Derksen, P.W., de Gorter, D.J., Meijer, H.P., Bende, R.J., van Dijk, M., Lokhorst, H.M., Bloem, A.C., Spaargaren, M., Pals, S.T. 2003. The hepatocyte growth factor/Met pathway controls proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Leukemia*. 17: 764-774.

Di Renzo, M.F., Narsimhan, R.P., Olivero, M., Bretti, S., Giordano, S., Medico, E., Gaglia, P., Zara, P., Comoglio, P.M. 1991. Expression of the Met/HGF receptor in normal and neoplastic human tissues. *Oncogene*. 6: 1997-2003.

Fausto, N., Webber, E.M. 1993. Control of liver growth. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 3: 117-135.

Ferracini, R., Angelini, P., Cagliero, E., Linari, A., Martano, M., Wunder, J., Buracco, P. 2000. MET oncogene aberrant expression in canine osteosarcoma. *J. Orthop. Res*. 18: 253-256.

Ferracini, R., Di Renzo, M.F., Scotlandi, K., Baldini, N., Olivero, M., Lollini, P., Cremona, O., Campanacci, M., Comoglio, P.M. 1995. The Met/HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit. *Oncogene*. 10: 739-749.

Fournel-Fleury, C., Ponce, F., Felman, P., Blavier, A., Bonnefont, C., Chabanne, L., Marchal, T., Cadore, J.L., Goy-Thollot, I., Ledieu, D., Ghernati, I., Magnol, J.P. 2002. Canine T-cell lymphomas: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. *Vet Pathol*. 39: 92-109.

Galimi, F., Bagnara, G.P., Bonsi, L., Cottone, E., Follenzi, A., Simeone, A., Comoglio, P.M. 1994. Hepatocyte growth factor induces proliferation and differentiation of multipotent and erythroid hemopoietic progenitors. *J Cell Biol.* 127: 1743-1754.

Goff, J.P., Shields, D.S., Boggs, S.S., Greenberger, J.S. 1997. Effects of recombinant cytokines on colony formation by irradiated human cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Radiat Res.* 147: 61-69.

Goff, J.P., Shields, D.S., Petersen, B.E., Zajac, V.F., Michalopoulos, G.K., Greenberger, J.S. 1996. Synergistic effects of hepatocyte growth factor on human cord blood CD34+ progenitor cells are the result of c-met receptor expression. *Stem Cells.* 14: 592-602.

Gohda, E., Nakamura, S., Yamamoto, I., Minowada, J. 1995. Hepatocyte growth factor--pleiotropic cytokine produced by human leukemia cells. *Leuk Lymphoma.* 19: 197-205..

Graves, T.K., Swenson, C.L., Scott, M.A. 1997. A potentially misleading presentation and course of acute myelomonocytic leukemia in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc.* 33: 37-41.

Harvey, J.W., Terrell, T.G., Hyde, D.M., Jackson, R.I. 1981. Well-differentiated lymphocytic leukemia in a dog: long-term survival without therapy. *Vet Pathol.* 18: 37-47.

Hino, M., Inaba, M., Goto, H., Nishizawa, Y., Tatsumi, N., Nishino, T., Morii H. 1996. Hepatocyte growth factor levels in bone marrow plasma of patients with leukaemia and its gene expression in leukaemic blast cells. *Br J Cancer.* 73: 119-23

Hirota, M., Egami, H., Corra, S., Fujii, H., Chaney, W.G., Rizzino, A., Pour, P.M. 1993. Production of scatter factor-like activity by a nitrosamine-induced pancreatic cancer cell line. *Carcinogenesis.* 14: 259-264.

Hosaka, M., Nagahama, M., Kim, W.S., Watanabe, T., Hatsuzawa, K.,

- Ikemizu, J., Murakami, K., Nakayama, K. 1991. Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 266: 12127-12130.
- Houck, K.A., Michalopoulos, G. 1985. Proline is required for the stimulation of DNA synthesis in hepatocyte cultures by EGF. *In Vitro Cell Dev Biol.* 21: 121-124.
- Huh, C.G., Factor, V.M., Sanchez, A., Uchida, K., Conner, E.A., Thorgeirsson, S.S. 2004. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 4477-4482.
- Inoue, C., Yamamoto, H., Nakamura, T., Ichihara, A., Okamoto, H. 1989. Nicotinamide prolongs survival of primary cultured hepatocytes without involving loss of hepatocyte-specific functions. *J Biol Chem.* 264: 4747-4750.
- Jiang, W.G., Hiscox, S. 1997. Hepatocyte growth factor/scatter factor, a cytokine playing multiple and converse roles. *Histol Histopathol.* 12: 537-555.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W.C., Largaespada, D.A., Verfaillie, C.M. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 418: 41-49.
- Jucker, M., Gunther, A., Gradl, G., Fonatsch, C., Krueger, G., Diehl, V., Tesch H. 1994. The Met/hepatocyte growth factor receptor (HGFR) gene is overexpressed in some cases of human leukemia and lymphoma. *Leuk Res.* 18: 7-16.
- Kaido, T., Oe, H., Imamura, M. 2004. Interleukin-6 augments hepatocyte growth factor-induced liver regeneration; involvement of STAT3 activation. *Hepatogastroenterology.* 51: 1667-1670.

Kitamura, T., Tanaka, K., Morita, K., Saito, S., Kiba, T., Numata, K., Sekihara, H. 1999. Dehydroepiandrosterone (DHEA) facilitates liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Life Sci.* 65: 1747-1756.

Kmiecik, T.E., Keller, J.R., Rosen, E., Vande Woude, G.F. 1992. Hepatocyte growth factor is a synergistic factor for the growth of hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 80: 2454-2457.

Kozak, M. 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell.* 44: 283-292.

Kuniyasu, H., Yasui, W., Kitadai, Y., Yokozaki, H., Ito, H., Tahara, E. 1992. Frequent amplification of the c-met gene in scirrhous type stomach cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 189: 227-232.

Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I.L., Grompe, M. 2000. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med.* 6: 1229-1234.

Leclercq, I.A., Field, J., Farrell, G.C. 2003. Leptin-specific mechanisms for impaired liver regeneration in ob/ob mice after toxic injury. *Gastroenterology.* 124: 1451-1464.

Liu, C., Park, M., Tsao, M.S. 1992. Overexpression of c-met proto-oncogene but not epidermal growth factor receptor or c-erbB-2 in primary human colorectal carcinomas. *Oncogene.* 7: 181-5.

Liu, C., Tsao, M.S. 1993. In vitro and in vivo expressions of transforming growth factor-alpha and tyrosine kinase receptors in human non-small-cell lung carcinomas. *Am J Pathol.* 142: 1155-1162.

Liu, Y., Sun, J., Zhang, J., Zhang, L., Horvat, G. 2003 . Effects of transferrin on the growth and proliferation of porcine hepatocytes: a comparison with

epidermal growth factor and nicotinamide. *Chin Med J (Engl)*. 116: 1223-1227.

Longati, P., Comoglio, P.M., Bardelli, A. 2001. Receptor tyrosine kinases as therapeutic targets: the model of the MET oncogene. *Curr Drug Targets*. 2: 41-55

Ma, P.C., Maulik, G., Christensen, J., Salgia, R. 2003. c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition *Cancer. Metastasis Rev*. 22:309-325.

増元正純. 1958. 細胞呼吸作用(in vivo)に影響を及ぼす胎盤漿の影響について. 久留米医大誌. 21: 299-312.

Matsumoto, K., Nakamura, T. 1997. Hepatocyte growth factor (HGF) as a tissue organizer for organogenesis and regeneration. *Biochem Biophys Res Commun*. 239: 639-644.

Matsushita, T., Ando, K., Kimura, K., Ohnishi, H., Imawari, M., Muto, Y., Moriwaki, H. 1999. IL-12 induces specific cytotoxicity against regenerating hepatocytes in vivo. *Int Immunol*. 11: 657-665.

Michalopoulos, G.K., DeFrances, M.C. 1997. Liver regeneration *Science*. 276: 60-66.

Mitaka, T., Mikami, M., Sattler, G.L., Pitot, H.C., Mochizuki, Y. 1992. Small cell colonies appear in the primary culture of adult rat hepatocytes in the presence of nicotinamide and epidermal growth factor. *Hepatology*. 16: 440-447.

Miyake, M., Yaguchi, T., Saze, K., Wang, J., Ogawa, T., Endo, Y., Suzuta, Y., Okazaki, M., Haga, Y., Waki, T., Takahashi, S.Y., Yamamoto, Y., Iwabuchi, S. 2004. Isolation and expression of five-amino-acid-deleted variant of feline hepatocyte growth factor (HGF) cDNA. *J Vet Med Sci*. 66: 9-14.

Miyamoto, T., Horie, T., Shimada, T., Kuwamura, M., Baba, E. 1999.

Long-term case study of myelodysplastic syndrome in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc.* 35: 475-481.

Miyazaki, M., Akiyama, I., Sakaguchi, M., Nakashima, E., Okada, M., Kataoka, K., Huh, N.H. 2002. Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 298: 24-30.

Miyazaki, M., Bai, L., Taga, H., Hirai, H., Sato, J., Namba, M. 1991. Expression of liver-specific functions and secretion of a hepatocyte growth factor by a newly established rat hepatoma cell line growing in a chemically-defined serum-free medium. *Res Exp Med (Berl).* 191: 297-307.

Miyazaki, M., Mars, W.M., Runge, D., Kim, T.H., Bowen, W.C., Michalopoulos, G.K. 1998. Phenobarbital suppresses growth and accelerates restoration of differentiation markers of primary culture rat hepatocytes in the chemically defined hepatocyte growth medium containing hepatocyte growth factor and epidermal growth factor. *Exp Cell Res.* 241: 445-457.

Miyazaki, M., Suzuki, Y., Oda, M., Kawai, A., Bai, L.Y., Sato, J. 1989. Improved maintenance of adult rat hepatocytes in a new serum-free medium in the presence or absence of barbiturates. *In Vitro Cell Dev Biol.* 25: 839-848.

Miyazawa, K., Tsubouchi, H., Naka, D., Takahashi, K., Okigaki, M., Arakaki, N., Nakayama, H., Hirono, S., Sakiyama, O., Takahashi, K., *et al.* . 1989. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 163: 967-973.

Nakamura, S., Gohda, E., Matsunaga, T., Yamamoto, I., Minowada, J. 1994.a Production of hepatocyte growth factor by human haematopoietic cell lines. *Cytokine.* 6: 285-94.

Nakamura, S., Gohda, E., Matsuo, Y., Yamamoto, I., Minowada, J. 1994.b Significant amount of hepatocyte growth factor detected in blood and bone marrow plasma of leukaemia patients. *Br J Haematol.* 87: 640-642

Nakayama, S., Kodama, K., Oguchi, K. 1989.a A comparative study of human placenta hydrolysate (Laennec) by intravenous or subcutaneous injection on liver regeneration after partial hepatectomy in normal and CCl₄-induced cirrhosis rats *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 94: 289-297.

Nakayama, S., Yamauchi, M., Oguchi, K. 1989.b A comparative study of Laennec by intravenous or subcutaneous injection on CCl₄-induced acute or chronic liver injury in rats. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 94: 137-144.

Nakamura, T. 1991. Structure and function of hepatocyte growth factor. *Prog Growth Factor Res*. 3: 67-85.

Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugimura, A., Tashiro, K., Shimizu, S. 1989. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature*. 342: 440-443.

Nakamura, T., Teramoto, H., Tomita, Y., Ichihara, A. 1984 . L-proline is an essential amino acid for hepatocyte growth in culture. *Biochem Biophys Res Commun*. 122: 884-891

Nakamura, T., Yoshimoto, K., Nakayama, Y., Tomita, Y., Ichihara, A. 1983. Reciprocal modulation of growth and differentiated functions of mature rat hepatocytes in primary culture by cell-cell contact and cell membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 80: 7229-7233

Neo, S., Kansaku, N., Furuichi, M., Watanabe, M., Hisamatsu S., Ohno, K., Hisasue, M., Tsuchiya, R., Yamada, T. 2005. Molecular cloning of the canine c-Met/HGF receptor and its expression in normal and regenerated liver. *J Vet Med Sci*. 67

Nishino, T., Hisha, H., Nishino, N., Adachi, M., Ikehara, S. 1995. Hepatocyte growth factor as a hematopoietic regulator. *Blood*. 85: 3093-3100.

Oe, H., Kaido, T., Furuyama, H., Mori, A., Imamura, M. 2004. Simultaneous transfer of vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor genes effectively promotes liver regeneration after hepatectomy in cirrhotic

rats. *Hepatogastroenterology*. 51: 1641-1647.

Oh, S.H., Miyazaki, M., Kouchi, H., Inoue, Y., Sakaguchi, M., Tsuji, T., Shima, N., Higashio, K., Namba, M. 2000. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 279: 500-504.

Panis, Y., Lomri, N., Emond, J.C. 1998. Early gene expression associated with regeneration is intact after massive hepatectomy in rats. *J Surg Res*. 79: 103-108.

Park, M., Dean, M., Cooper, C.S., Schmidt, M., O'Brien, S.J., Blair, D.G., Vande Woude, G.F. . 1986. Mechanism of met oncogene activation. *Cell*. 45: 895-904

Park, M., Dean, M., Kaul, K., Braun, M.J., Gonda, M.A., Vande Woude, G. 1987. Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84: 6379-6383.

Parr, C., Watkins, G., Mansel, R.E., Jiang, W.G. 2004. The hepatocyte growth factor regulatory factors in human breast cancer. *Clin Cancer Res*. 10: 202-211.

Paumelle, R., Tulasne, D., Kherrouche, Z., Plaza, S., Leroy, C., Reveneau, S., Vandebunder, B., Fafeur, V. 2002. Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway *Oncogene*. 21: 2309-2319.

Petersen, B.E., Bowen, W.C., Patrene, K.D., Mars, W.M., Sullivan, A.K., Murase, N., Boggs, S.S., Greenberger, J.S., Goff, J.P. 1999. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. 284: 1168-1170.

Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 29: e45.

Pons, E., Uphoff, C.C., Drexler, H.G. 1998. Expression of hepatocyte growth

factor and its receptor c-met in human leukemia-lymphoma cell lines. *Leuk Res.* 22: 797-804.

Ponzetto, C., Bardelli, A., Zhen, Z., Maina, F., dalla Zonca, P., Giordano, S., Graziani, A., Panayotou, G., Comoglio, P.M. 1994. A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell.* 77: 261-271.

Ponzetto, C., Giordano, S., Peverali, F., Della Valle, G., Abate, M.L., Vaula, G., Comoglio, P.M. 1991. c-met is amplified but not mutated in a cell line with an activated met tyrosine kinase. *Oncogene.* 6: 553-559.

Ramos-Vara, J.A., Takahashi, M., Ishihara, T., Miller, M.A., Pace, L.W., Craft, D., Common, R., Watson, G.L. 1998. Intestinal extramedullary plasmacytoma associated with amyloid deposition in three dogs: an ultrastructural and immunoelectron microscopic study. *Ultrastruct Pathol.* 22: 393-400.

Rodrigues, G.A., Naujokas, M.A., Park, M. 1991. Alternative splicing generates isoforms of the met receptor tyrosine kinase which undergo differential processing. *Mol. Cell. Biol.* 11: 2962-2970.

Ruslander, D.A., Gebhard, D.H., Tompkins, M.B., Grindem, C.B., Page, R.L. 1997. Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders. *In Vivo.* 11: 169-172

Russell, W.E., D'Ercole, A.J., Underwood, L.E. 1985. Somatomedin C/ insulinlike growth factor I during liver regeneration in the rat. *Am J Physiol.* 248 :E618-623.

Rygaard, K., Vindelov, L.L., Spang-Thomsen, M. 1993. Expression of myc family oncoproteins in small-cell lung-cancer cell lines and xenografts. *Int J Cancer.* 54: 144-152.

坂本浩二, 笠原多喜子, 林正朗, 西村忠典. 1974. Laennec のラット実験的慢性肝障害に及ぼす影響について. 東京医大誌. 32: 351-363.

坂本浩二, 笠原多喜子, 三上静雄. 1973. Laennec の CCl₄ に及ぼす影響 とくに抗脂肝作用について. 東京医大誌. 31:829-837.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74: 5463-5467.

Schwartz, R.E., Reyes, M., Koodie, L., Jiang, Y., Blackstad, M., Lund, T., Lenvik, T., Johnson, S., Hu, W.S., Verfaillie, C.M. 2002. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest.* 109: 1291-1302.

Sekhon, S.S., Tan, X., Micsenyi, A., Bowen, W.C., Monga, S.P. 2004. Fibroblast growth factor enriches the embryonic liver cultures for hepatic progenitors. *Am J Pathol.* 164: 2229-2240.

Sell, S. 1994. Liver stem cells. *Modern pathology.* 7; 105-112.

Skibinski, G. 2003. The role of hepatocyte growth factor/c-met interactions in the immune system. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 51: 277-282.

Skibinski, G., Skibinska, A., James, K. 2001. Hepatocyte growth factor (HGF) protects c-met-expressing Burkitt's lymphoma cell lines from apoptotic death induced by DNA damaging agents. *Eur J Cancer.* 37: 1562-1569.

Stoker, M., Gherardi, E., Perryman, M., Gray, J. 1987. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature.* 327: 239-242.
Suzuki, A., Zheng Yw, Y.W., Kaneko, S., Onodera, M., Fukao, K., Nakauchi, H., Taniguchi, H. 2002. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *J Cell Biol.* 156: 173-184.

Suzuki, K., Hayashi, N., Yamada, Y., Yoshihara, H., Miyamoto, Y., Ito, Y., Ito, T., Katayama, K., Sasaki, Y., Ito, A., *et al.* 1994 . Expression of the c-met protooncogene in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 20:

1231-1236.

Tajima, H., Higuchi, O., Mizuno, K., Nakamura, T. 1992. Tissue distribution of hepatocyte growth factor receptor and its exclusive down-regulation in a regenerating organ after injury. *J. Biochem.* 111: 401-406.

Takehara, T., Matsumoto, K., Nakamura, T. 1992. Cell density-dependent regulation of albumin synthesis and DNA synthesis in rat hepatocytes by hepatocyte growth factor. *J Biochem (Tokyo)*. 112: 330-334.

Tarrant, J.M., Stokol, T., Blue, J.T., McDonough, S.P., Farrell, P. 2001. Diagnosis of chronic myelogenous leukemia in a dog using morphologic, cytochemical, and flow cytometric techniques. *Vet Clin Pathol.* 30: 19-24.

Tashiro, K., Hagiya, M., Nishizawa, T., Seki, T., Shimonishi, M., Shimizu, S., Nakamura, T. 1990. Deduced primary structure of rat hepatocyte growth factor and expression of the mRNA in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 87: 3200-4.

Theise, N.D., Nimmakayalu, M., Gardner, R., Illei, P.B., Morgan, G., Teperman, L., Henegariu, O., Krause, D.S. 2000. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology.* 32: 11-16.

Thery, C., Sharpe, M.J., Batley, S.J., Stern, C.D., Gherardi, E. 1995. Expression of HGF/SF, HGF1/MSP, and c-met suggests new functions during early chick development. *Dev Genet.* 17: 90-101.

Thorgeirsson, S.S. 1996. Hepatic stem cells in liver regeneration. *FASEB J.* 10: 1249-1256

Tsao, M.S., Zhu, H., Giaid, A., Viallet, J., Nakamura, T., Park, M. 1993. Hepatocyte growth factor/scatter factor is an autocrine factor for human normal bronchial epithelial and lung carcinoma cells. *Cell Growth Differ.* 4: 571-579.

Tsarfaty, I., Resau, J.H., Rulong, S., Keydar, I., Faletto, D.L., Vande Woude,

G.F. 1992. The met proto-oncogene receptor and lumen formation. *Science*. 257: 1258-1261.

Uehara, Y., Mori, C., Noda, T., Shiota, K., Kitamura, N. 2000 Rescue of embryonic lethality in hepatocyte growth factor/scatter factor knockout mice. *Genesis*. 27: 99-103.

Vandeput, F., Perpete, S., Coulonval, K., Lamy, F., Dumont, J.E. 2003. Role of the different mitogen-activated protein kinase subfamilies in the stimulation of dog and human thyroid epithelial cell proliferation by cyclic adenosine 5'-monophosphate and growth factors. *Endocrinology*. 144: 1341-1349.

van der Voort, R., Taher, T.E., Keehnen, R.M., Smit, L., Groenink, M., Pals, S.T. 1997. Paracrine regulation of germinal center B cell adhesion through the c-met-hepatocyte growth factor/scatter factor pathway. *J Exp Med*. 185: 2121-2131.

Wallenius, V.R., Rawet, H., Skrtic, S., Helou, K., Qiu, Y., Levan, G., Ekberg, S., Carlsson, B., Isaksson, O.G., Nakamura, T., Jansson, J.O. 1997. Chromosomal localization of rat hepatocyte growth factor (Hgf) and HGF receptor (Met) and characterization of HGF receptor cDNA. *Mamm Genome*. 8: 661-667.

Wang, P.P., Wang, J.H., Yan, Z.P., Hu, M.Y., Lau, G.K., Fan, S.T., Luk, J.M. 2004. Expression of hepatocyte-like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction. *Biochem Biophys Res Commun*. 320: 712-716.

Weimar, I.S., Miranda, N., Muller, E.J., Hekman, A., Kerst, J.M., de Gast, G.C., Gerritsen, W.R. 1998a. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) is produced by human bone marrow stromal cells and promotes proliferation, adhesion and survival of human hematopoietic progenitor cells (CD34+). *Exp Hematol*. 26: 885-894.

Weimar, I.S., Voermans, C., Bourhis, J.H., Miranda, N., van den Berk, P.C., Nakamura, T., de Gast, G.C., Gerritsen, W.R. 1998b. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) affects proliferation and migration of myeloid

leukemic cells. *Leukemia*. 12: 1195-1203.

Weimar, I.S., de Jong, D., Muller, E.J., Nakamura, T., van Gorp, J.M., de Gast, G.C., Gerritsen, W.R. 1997. Hepatocyte growth factor/scatter factor promotes adhesion of lymphoma cells to extracellular matrix molecules via alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrins. *Blood*. 89: 990-1000

Weiss, D.J., Aird, B. 2001. Cytologic evaluation of primary and secondary myelodysplastic syndromes in the dog. *Vet Clin Pathol*. 30: 67-75.

Wolf, H.K., Zarnegar, R., Oliver, L., Michalopoulos, G.K. 1991. Hepatocyte growth factor in human placenta and trophoblastic disease. *Am J Pathol*. 138:1035-43.

Workman, H.C., Vernau, W. 2003. Chronic lymphocytic leukemia in dogs and cats: the veterinary perspective. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 33: 1379-1399

Xian, C.J., Couper, R., Howarth, G.S., Read, L.C., Kallincos, N.C. 2000. Increased expression of HGF and c-met in rat small intestine during recovery from methotrexate-induced mucositis. *Br J Cancer*. 82: 945-952.

Yang, X.M., Park, M. 1995. Expression of the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor tyrosine kinase is localized to epithelia in the adult mouse. *Lab. Invest*. 73: 483-491.

Yoshinaga, Y., Fujita, S., Gotoh, M., Nakamura, T., Kikuchi, M., Hirohashi, S. 1992 . Human lung cancer cell line producing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Jpn J Cancer Res*. 83: 1257-1761.

Zarnegar, R. 1995.a Regulation of HGF and HGFR gene expression. *EXS*. 74: 33-49.

Zarnegar, R., Michalopoulos, G.K. 1995.b The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J Cell BiolJun*. 129: 1177-1180.

Zheng, Y.W., Taniguchi, H. 2003. Diversity of hepatic stem cells in the *fetal* and adult liver. *Semin Liver Dis.* 23: 337-348

図表

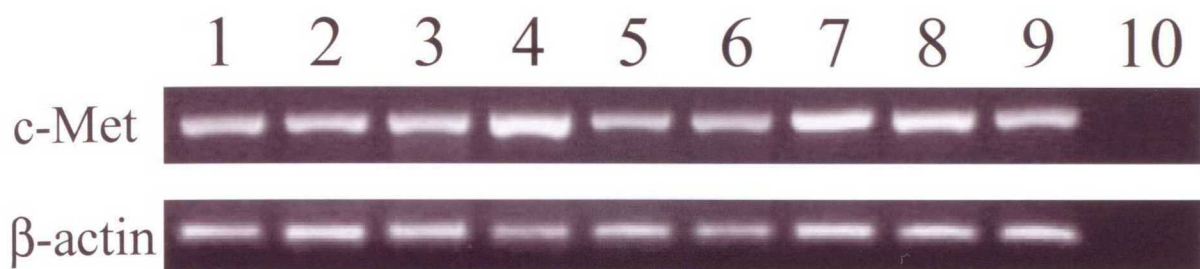


Fig. 2

RT-PCRによって確認したイヌ正常組織におけるc-Met遺伝子の発現

lane1～9はそれぞれ、骨髓、肝臓、腎臓、肺、胃、子宮、精巣、およびリンパ節におけるc-Met部分配列(519塩基)の発現を示している。

lane10は、ネガティブコントロールである。これら9組織に加えて末梢血、小腸、大腸、副腎髄質、甲状腺、心臓、骨格筋、皮膚、膵臓、卵巣、前立腺、脾臓、脂肪、大脳、小脳においてもc-Met部分配列(519塩基)の発現を示した(図示さず)。内在性コントロールとしてイヌβ-actinを用いた(図示さず)。

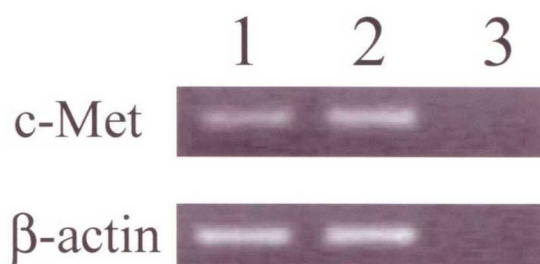


Fig. 3

肝部分切除前後の肝臓におけるc-Met mRNAの発現

lane1と2はそれぞれ肝部分切除前の肝臓と肝部分切除後の肝臓におけるc-Met mRNAの発現を示している。lane3は、ネガティブコントロールを示している。

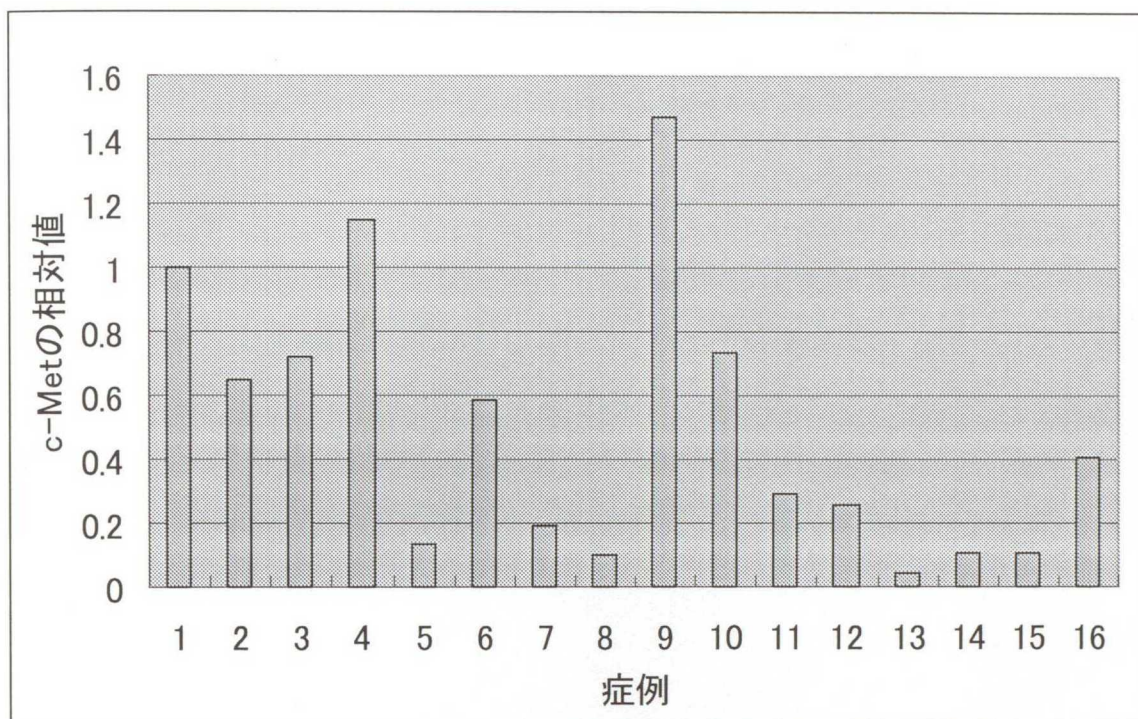


Fig. 4

血液腫瘍症例及びcell lineにおけるc-Met mRNAの定量

1:臨床上健康な犬9頭、2:AML、3,4:CML、5,6,7,8,9:MDS、10,11,12:CLL、13:ALL、14:PCTの骨髄由来細胞、または末梢血由来細胞と15:Bリンパ系cell line、16:Bリンパ系cell lineについて、Real time PCR法により、c-Metの発現量を相対的に比較検討した。骨髄系腫瘍(2,3,4)は相対的にc-Met発現量が多く、リンパ系腫瘍(10,11,12,13,14,15,16)は相対的にc-Met発現量が少ない傾向を示した。MDS(5,7,8)ではc-Met発現量が低い傾向を示した。

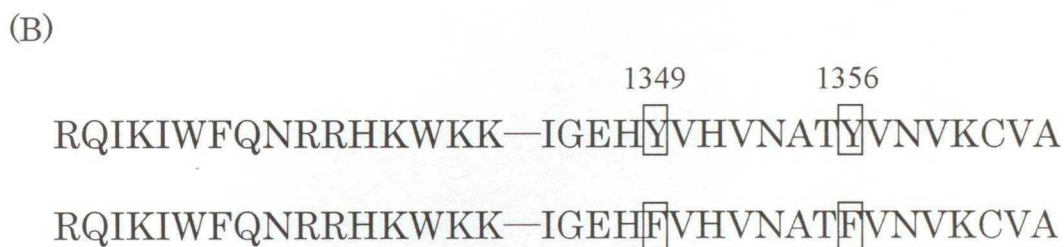
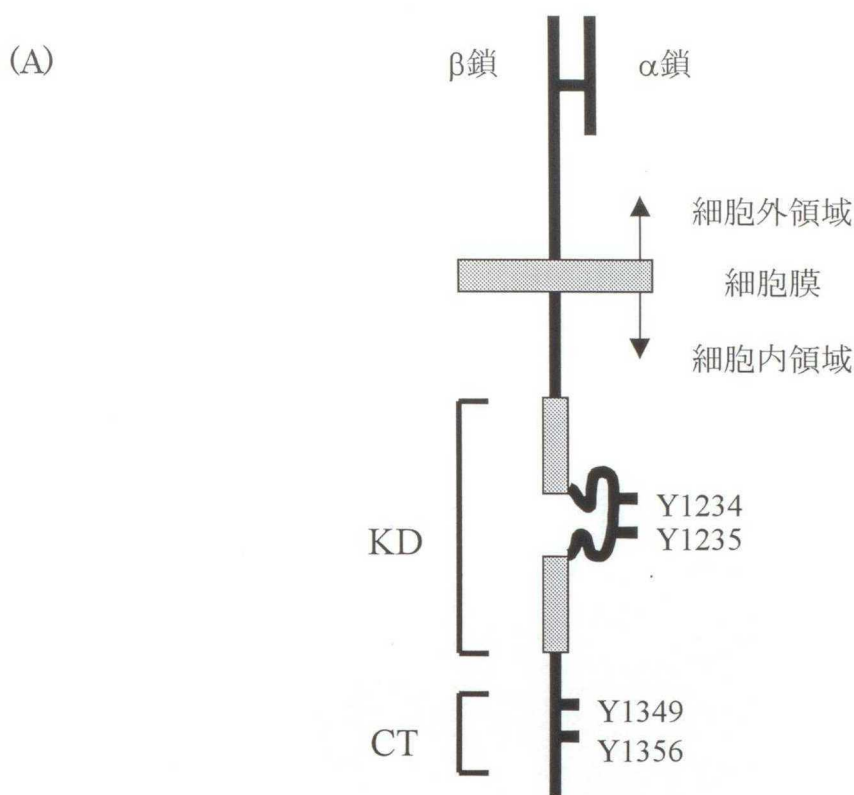
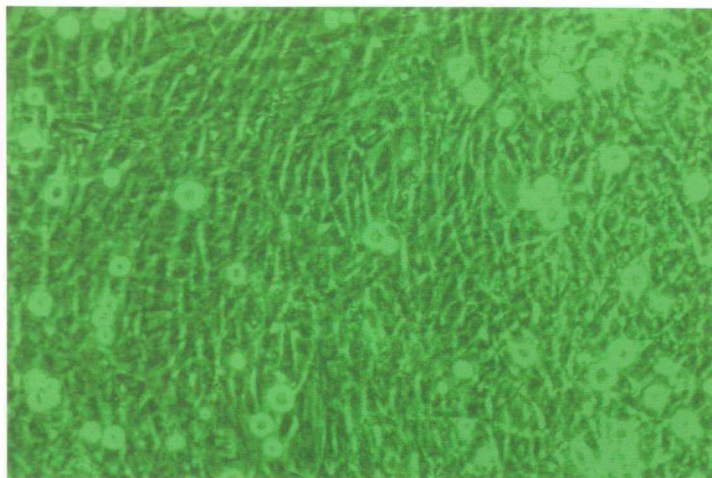


Fig. 5 マウスc-Metの配列に基づくc-Met自己リン酸化領域を含むHGF/c-Metシグナル伝達抑制ペプチド

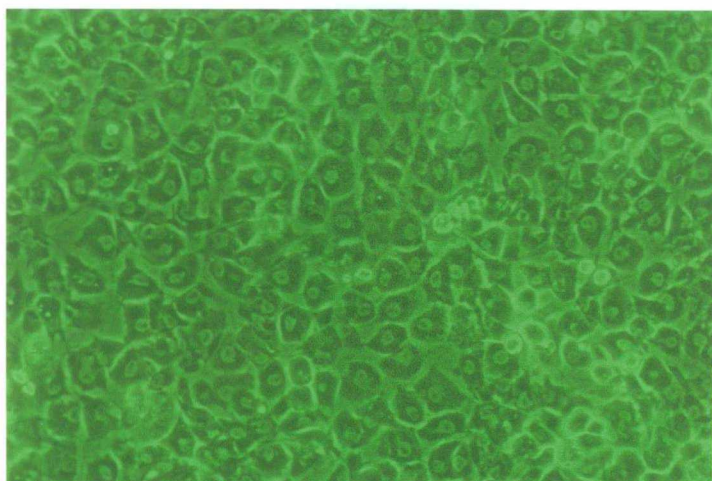
(A)マウスc-Metの構造模式図: β鎖の細胞内領域に位置するKDはチロシンキナーゼ領域、CTはカルボキシル末端のテール部分を示す。マウスc-Metのチロシンキナーゼ活性を抑制するとされているCT部分のチロシン残(Y1349,Y1356)を含むアミノ酸配列に基づいてc-Metシグナル伝達抑制ペプチドを合成した。

(B)上段はマウスCT部分のチロシン残基(Y1349、Y1356)を含む35のアミノ酸配列。下段は今回の研究で化学合成したペプチドの配列を表しているBardelli(1999年)と同様にHGF/c-Metシグナル伝達の抑制効果の上昇を目的として(Y1349、Y1356)のチロシンをフェニルアラニンに変更したペプチドを合成した。

(A)



(B)



(C)

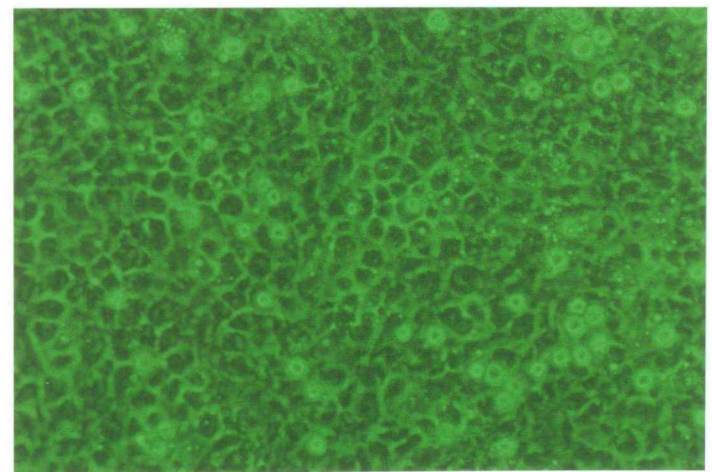


Fig. 6

培養28日目の培養骨髓細胞の形態

(A)(B)(C)はそれぞれ無添加培養群、ヒト胎盤抽出液添加群、HGF添加群の培養骨髓細胞を示す。(A)線維芽細胞様の低部固着細胞が確認できる。(B)培養した細胞のほとんどが肝細胞様の細胞。(C)線維芽細胞様の細胞の中に肝細胞様の細胞が散見される。

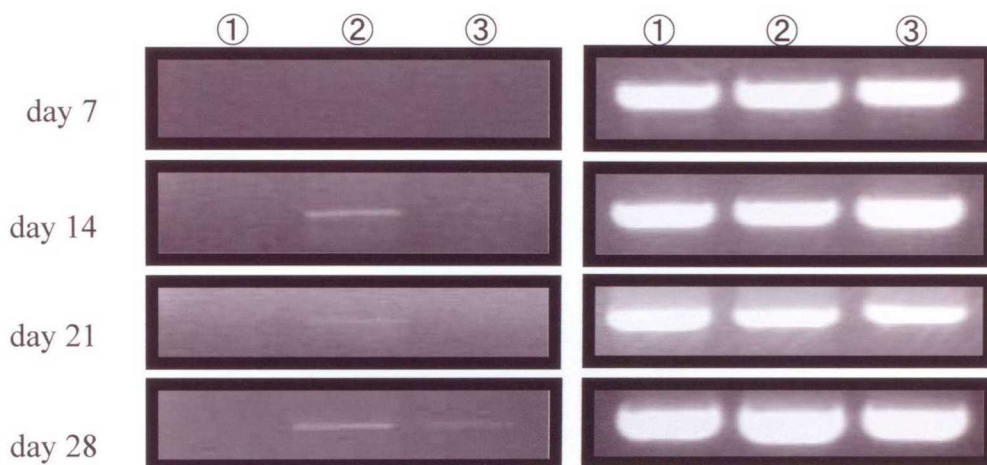
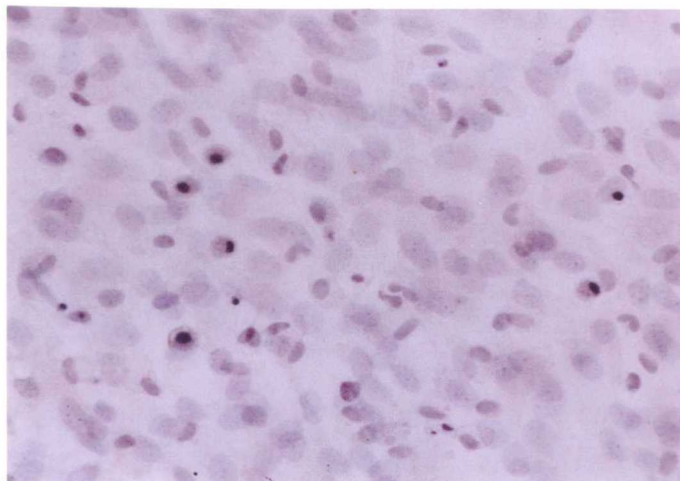


Fig. 7

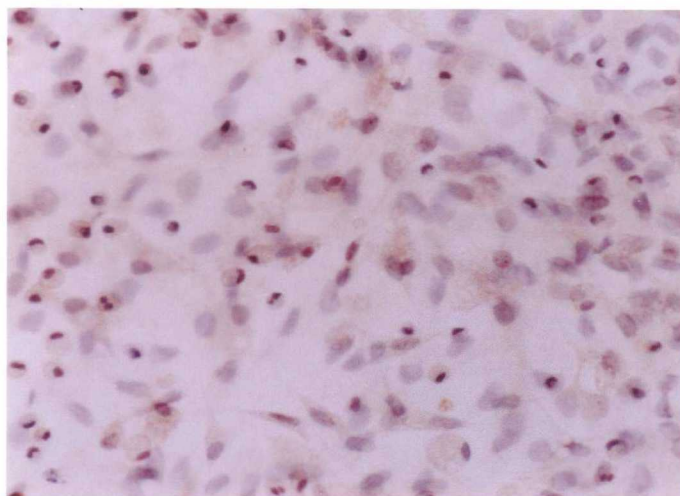
培養骨髓細胞におけるアルブミンmRNA発現の検討

①無添加、②ヒト胎盤抽出液添加、③ HGF添加群。
 左はアルブミンの発現を、右は β アクチンの発現を表している。培養14日目に②ヒト胎盤抽出液添加培養骨髓細胞で、培養28日目に③ HGF添加培養骨髓細胞でアルブミン mRNAの発現が認められた。

(A)



(B)



(C)

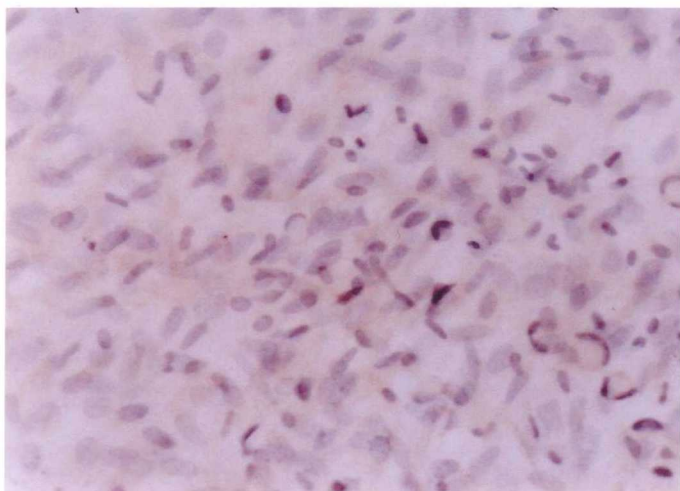
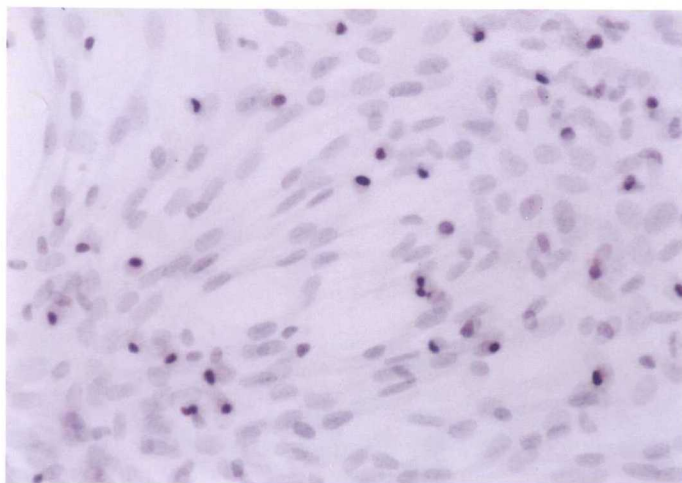


Fig. 8.1

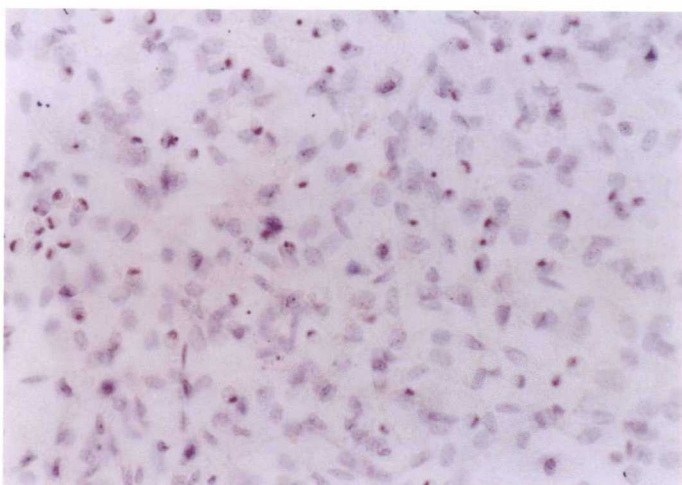
培養28日目培養骨髓細胞におけるアルブミンの発現

(A)Negative control、(B)無添加、(C)ヒト胎盤抽出液添加、
(D)HGF添加培養骨髓細胞。(A)アルブミン陰性、(B)アルブ
ミン陽性、(C)アルブミン陽性像、(D)アルブミン陽性像を示す。

(A)



(B)



(C)

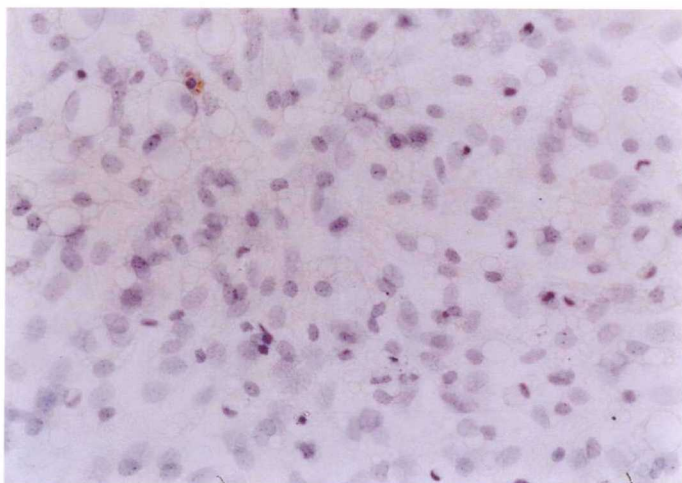


Fig. 8.2

培養28日目培養骨髓細胞におけるCK18の発現

(A)Negative control、(B)無添加、(C)ヒト胎盤抽出液添加、(D)HGF添加培養骨髓細胞。(A)CK18陰性、(B)CK18陽性、(C)CK18陽性像、(D) CK18陽性像を示す。

Table 1. イヌc-Met遺伝子の増幅に用いたForward 及びReverse Primer

Primer	Primer sequence	Purpose
F1	ctggtatggttttcagtt	*
R1	tcagcagtatgattgaggaa	Nested primer for 5'RACE
F2	ggagcaatggggagtgaaga	*
R2	tgtgaaaagtctgagcatctag	For amplifying 5'cDNA end
F3	tgtccacgcccttgaagca	*
R3	ggacgtccaagattagcaa	*
F4	cagttcaaccaagtctctt	*
R4	gcctcacttaaggfcaagg	*
F5	tggctggacttcggattca	*
R5	tcagttgcagtggcttgagct	*
F6	gtggcaccttgctcacttia	*
R6	tgttcagtgaggagtcgt	*
F7	ggatggtaatagatgtccat	*
R7	agtagctcggtagtctacag	For amplifying 3'cDNA end
F8	gagctaaatatagagtgaagc	*
R8	aatgccctctctatgacttc	*
F9	cacattgacctcagtgctct	*
R9	catgtctctggcaagaccaa	*
F10	ctggtggtctctaccatacat	*
R10	agagaagggtatggagcaac	*
F11	aaaatgctggcacccctagag	*
R11	tgtgcggttctgttggtca	*
F12	cggaaatcgaagctctggtatggttttcagtt	For amplifying complete length of cDNA
R12	cggaaatcgaagcttctgctggttggtca	For amplifying complete length of cDNA

* は、イヌc-Met遺伝子の部分配列を増幅するために用いたプライマーを示している

Table 2. β -actinのForwardおよびReverse Primer

Primer	Primer sequence
β -actin forward primer	actgggacgacatggagaaga
β -actin reverse primer	gattctcatgaggtagtcagt

Table 3. Real time PCRに用いたPrimerと Probe

Primer or Probe	Primer or Probe sequence
c-Met forward primer	ggcccggtgtggaacac
c-Met reverse primer	caccacctgataaaattggcttg
c-Met probe	cagattgttcccatgtcaggactgcag
β -actin forward primer	gatgagggcccagagcaagag
β -actin reverse primer	tcgtcccagttggtgacgat
β -actin probe	atcctgaccctgaagtacccattgagc

Table 4. 検体として用いた血液腫瘍症例とリンパ系cell line

検体番号	症例	性別		年齢	犬種
		雄(M)	雌(F)		
1	臨床上新健康なイヌ9頭	M(6頭)	F(3頭)	5〜7	
2	急性骨髄性白血病 (AML)		F	3	ウエリッシュコーギー
3	慢性骨髄性白血病 (CML)		M	10	パグ・チワワMix
4			M	6	マルチーズ
5	骨髄異形成症候群 (MDS)		M	3	プードル
6			F	4	ミニチュアダックスフンド
7			M	6	ウエリッシュコーギー
8			F	6	ラブラドルレトリバー
9			F	4	ポメラニアン
10	慢性リンパ性白血病 (CLL)		M	9	ゴールデンレトリバー
11			M	10	ブルドック
12			M	9	ゴールデンレトリバー
13	急性リンパ性白血病 (ALL)		M	9	ゴールデンレトリバー
14	形質細胞腫 (PCT)		F	2	ウエリッシュコーギー
15	B cell line		M	3	形質細胞腫(肝臓、脾臓)由来
16	T cell line		M	7	消化管型T細胞性リンパ腫(腹水)由来

Table 5. HGM mediumの組成 (pH7.2)

Dulbecco's modified Eagle's medium	10g/l	Gibco BRL, NY, USA
bovine serum albumin (BSA)	2g/l	Sigma Aldrich Co, MO, USA
glucose	1g/l 追加(最終濃度; 2g/l)	※
galactose	2.0g/l	※
ornithine	0.1g/l	※
proline	0.030g/l	※
glutamine	0.730g/l 追加(最終濃度; 5.0mM)	※
nicotinamide	0.610g/l	※
ZnCl ₂	0.544mg/l	※
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.750mg/l	※
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.20mg/l	※
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0.0327mg/l	※
ITS	10mM/l	Gibco BRL, NY, USA
<insulin >	1.0g/l	※
<sodium selenite>	0.67mg/l	※
<transferrin>	0.55g/l	※
<sodium pyruvate>	11.0g/l	※
dexamethazone	0.1μM	※
NaHCO ₃	3.7g/l	※
Hepes	10mM	Nakarai Tesque, INC, Kyoto, Japan
Penicillin Streptomycin (P/S)	5000U(P), 50mg(S)/l	※
L-glutamin	2mmol/l	ICN Biochemicals INC, OH, USA

※はSigma Aldrich Co, MO, USAを示す。

Table 6. イヌアアルブミンPCR用のForwardおよび Reverse primer

Primer	Primer sequence
Albumin forward primer	tcttgctgaggtggaaagag
Albumin reverse primer	agactaaggcagcttgagca