

氏名(本籍)	根尾 櫻子(東京都)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第101号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 山田 隆 紹 (副査) 代田 欣 二 滝 沢 達 也 神 作 宜 男 久 末 正 晴

## 論 文 内 容 の 要 旨

近年、マウスにおいて、移植した骨髓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) を添加培養した骨髓細胞から肝細胞が誘導できることが明らかになった。このような背景のもと、人医療への応用を目標に、骨髓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完治を望むことのできない肝疾患が多く、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。

c-Met proto-oncogene は HGF に特異的なレセプターであり、HGF/c-Met シグナル伝達は、細胞の増殖、遊走、形態形成および血管新生などを誘導し、その結果として腫瘍増殖や細胞の分化再生機構に関わると考えられている。c-Met は、ヒト、マウスではあらゆる上皮、内皮系細胞での発現が認められ、その機能的重要性が示唆されている。また、腫瘍においては肝癌、肺癌、骨肉種をはじめとしてあらゆる固形腫瘍での発現増加と病態との関連性が明らかになっている。さらに、HGF/c-Met シグナル伝達は、障害肝における肝再生に重要な役割を果たすことが示唆されている。イヌにおける HGF に関連した報告は少なく、HGF のレセプターである c-Met 遺伝子配列についてはまだ明らかにされていない。そこで第2章では、イヌの HGF/c-Met の機能を解明することを目標に、最初にイヌ c-Met 遺伝子のフルクローニングおよび組織分布について検討した。次いで、組織再生時の c-Met の動態を明らかにするため、肝臓の部分切除前後における c-Met 遺伝子の発現について検討した。また、人医領域においては、肝癌、肺癌をはじめとして各種の固形腫瘍ならびに血液腫瘍における HGF や c-Met の発現について検討されているが、その詳細なメカニズムについては明らかにされていない。イヌの血液腫瘍の

病態もヒトのそれに類似していると考えられ、その病態解明は、人医療ならびに獣医臨床の両面から有用と考えられる。また、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。そこで第3章では、イヌの血液腫瘍におけるc-Met遺伝子の発現量について検討を行い、HGFと血液腫瘍の関連性についてレセプターレベルで検討した。第4章では、再生医療への応用の基礎実験として、イヌ骨髓細胞にネコリコンビナントHGFを添加して培養し、骨髓細胞から肝細胞への分化誘導法について検討した。また、現在、再生医療の基礎研究において細胞の分化効率が低いことが、再生医療の実現化に対して障害となっていることから、分化誘導効率を上げることを目的として、今回、障害肝の再生を促進する事が知られているヒト胎盤抽出液(ラエンネック)添加群についても同様に検討を行った。

## 【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

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る。

c-Met proto-oncogeneはHGFの特異的レセプターであり、チロシンキナーゼファミリーに属する膜貫通型タンパクである。すでにc-Met遺伝子は、ヒト、マウス、ラット、ニワトリ、ツメガエルでクローニングを終了している。一方、イヌにおいてもHGFやc-Metに関連した研究が注目されてきているが、c-Met遺伝子の配列はまだ明らかにされていない。そこで、本研究ではイヌのc-Met cDNA完全長のクローニングを行うと共に、組織分布の検討を行った。さらに、肝部分切除時におけるc-Metの変動を明らかにするために、临床上健康な犬を用いて肝切除術を行い、切除前後のc-Met遺伝子の発現量について検討した。

イヌ肝臓より抽出したtotal RNAから、ヒト、ラット、マウスのc-Met塩基配列において相同性の高い領域に設計したc-Met特異的プライマーを用いて、定法に従ってRT-PCR反応を行い、得られた産物の塩基配列をApplied Biosystem Model 310 sequencerを用いて決定した。その結果、得られたイヌc-Met cDNAは4419bpで、Open reading frameは24のシグナルペプチドと1358のタンパク翻訳領域を含んでいることを明らかにした。また、ヒト(89%)、マウス(85%)、ラット(87%)、ニワトリ(68%)、およびカエル(80%)と高い相同性があることを示した。イヌc-Met遺伝子の組織分布に関しては、临床上健康なイヌの末梢血単核球、骨髓、肝臓、腎臓、肺、胃、子宮、精巣、胸腺、リンパ節、小腸、大腸、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、以上24種の組織におけるc-Met遺伝子の発現を検討し、それらすべての組織において発現していることを確認した。部分切除肝におけるc-Met遺伝子の発現量の検討は、臨床的に健康なイヌを用いて外側左葉を切除し、切除前と切除後72時間のc-Met発現量について検討を行った。その結果、肝部分切除後のc-Metの発現量は、切除前と比較して、1.986倍に上昇していることを明らかにした。

今回明らかにしたイヌc-Met遺伝子の配列は、他の動物種との相同性が高く、生物間でよく保存された遺伝子であると考えられる。また、イヌ生体内では大部分の組織に分布しており、c-Met遺伝子が

重要な機能を果たしていることが窺われた。さらに、今回の、イヌにおいて肝切除後にc-Metの発現が増加した結果から、イヌにおいても肝再生時にHGF/c-Metシグナル伝達が重要な役割を果たしていると考えられた。

### 【第3章】血液腫瘍におけるイヌc-Met遺伝子の検討

HGF/c-Metは様々な腫瘍において重要な役割を果たすことが示唆されている。HGFは、骨髄性白血病および形質細胞腫など一部の血液腫瘍において発現が増加することが認められており、病態との関連性が示唆されている。c-Metの検討をした報告例は少ないが、HGFの作用発現はc-Metレセプターを介してのみ発現すると考えられることから、血液腫瘍においてc-Metの発現を検討することは、血液腫瘍におけるHGFの機能発現を検討する上で有用であると考えられる。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るものの、その病態は明らかでなく、解析が望まれている。本章では、イヌの血液腫瘍とc-Met発現量の関係を解明するために、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リンパ系腫瘍細胞株について解析を行った。これら腫瘍細胞から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、real time PCR法にてc-Met遺伝子の定量的PCRを行い、腫瘍間でのc-Met発現量について、相対的に定量した。その結果、血液腫瘍の中では、リンパ系腫瘍症例に比べて、MDSを除いた骨髄系腫瘍症例においてc-Metの発現量が多い傾向が認められた。骨髄系腫瘍の一種であるMDSは、他の骨髄系腫瘍と比較してc-Metの発現量が低い傾向が認められた。またリンパ系腫瘍、MDS共に、臨床上健康なイヌとの比較でc-Met発現が少ない傾向にあった。以上の結果から、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

前述の様に、造血幹細胞から肝細胞が再生することが報告され、さらにその分化誘導にはc-MetのリガンドであるHGFが重要な役割を果たすことが明らかとなっている。造血幹細胞を含む骨髄組織は、分化や増殖制御機構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ことから、自己組織を再生医療に応用する上で最も現実的な臓器として考えられている。そこで本研究では、HGFを用いて骨髄細胞から肝細胞の分化誘導能を検討すると共に、障害肝の再生作用があることが明らかにされているヒト胎盤抽出液(ラエンネック)に注目し、検討を行った。すなわち、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、肝臓細胞への分化誘導を試みた。骨髄から肝臓に分化したことの証明は、アルブミン遺伝子の検出を行うとともに、肝臓細胞に特異的なタンパクであるアルブミン、CK8およびCK18の検出を行った。さらに、骨髄細胞から肝細胞の分化誘導において、

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た検討も行った。その結果、ラエンネック添加 HGM 培地、HGF 添加 HGM 培地で培養した細胞は、それぞれ培養 14 日目、培養 28 日目にアルブミン遺伝子の発現が認められた。培養 28 日目の免疫染色でアルブミンおよび CK18 のタンパク発現が確認された。

本研究の結果から、イヌの骨髄細胞から肝臓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、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。また、ヒト胎盤抽出液を添加培養した骨髄細胞から肝臓細胞への分化誘導が認められた。興味深いことに、HGF 濃度が少ないヒト胎盤抽出液の添加が、高濃度の HGF 添加より骨髄細胞から肝臓細胞への分化誘導に優れていたことから、分化誘導機構は 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 HGF/c-Met シグナル伝達の阻害実験を試みた。その結果、骨髄細胞から肝臓細胞への分化は完全に阻害され、肝臓細胞の分化誘導に、HGF は必須の成分であることが示唆された。ヒト胎盤抽出液には HGF を微量 (0.13ng/ml) に含む他、epidermal growth factor (EGF)、fibroblast growth factor (FGF)、nerve growth factor (NGF)、vascular endothelial growth factor (VEGF)、transforming growth factor  $\alpha$  (TGF  $\alpha$ ) 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。これらの、ヒト胎盤抽出液中に含まれる因子が HGF と相乗効果を示して、イヌ骨髄細胞から肝臓細胞の分化誘導を促進したと考えられた。

## 【第5章】 総括

本研究において、イヌ c-Met の全塩基配列を解明し、c-Met が肝臓の組織再生に関与していることを立証した。また、HGF/c-Met シグナル伝達が、ヒトと同様に一部の血液腫瘍の病態にも関与していることを立証し、再生医療に応用する場合に注意が必要である点も指摘した。さらに、HGF 存在下でイヌの骨髄細胞から肝臓細胞への分化誘導が可能であることを明らかにし、ヒト胎盤抽出液中に骨髄細胞を肝臓細胞に効率的に分化誘導する HGF 以外の因子が存在する可能性を示唆した。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可能性を指摘した。これらの成果は、獣医学のみならず生命科学分野全般において有用な情報であると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、獣医臨床においてイヌの難治性肝疾患が多いことから、イヌにおける肝臓の再生医療を目標にした論文である。近年マウス、ラットの *in vitro* ならびに *in vivo* の実験系で肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor:HGF) の利用で骨髄細胞から肝細胞が分化・誘導可能であることが報告され、将来この手法をイヌに臨床応用するための基礎研究である。研究は3部の実験系からなり、第2章では再生医療を進める上で解明が必須の、HGF のレセプターである c-Met をコードする遺伝子のクローニングと動態解明を行っている。第3章では HGF/c-Met シグナル伝達と腫瘍との関係を明らかにす

る必要があることから、イヌの血液腫瘍症例における c-met mRNA の変動について検討している。第4章では遺伝子組み替えネコ HGF とヒト胎盤抽出物を利用してイヌ骨髄から肝細胞の分化誘導について検討を行っている。

### [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部分肝切除時の c-Met の変動

イヌ肝臓より抽出した Total RNA から、動物種間で相同性の高い領域に設計した c-Met 特異的プライマーを用いて、定法に従って RT-PCR 反応を行い、得られた産物の塩基配列を Applied Biosystem Model 310 sequencer を用いて決定した。その結果、得られたイヌ c-Met cDNA は 4419bp で、open reading frame は 24 のシグナルペプチドと 1358 のタンパク翻訳領域を含んでおり、ヒト (89%)、マウス (85%)、ラット (87%)、ニワトリ (68%)、およびカエル (80%) と高い相同性を示すことを明らかにした。また、イヌ c-Met 遺伝子の組織分布に関しても検討しており、臨床上健康なイヌの末梢血単核球、骨髄、肝臓、腎臓、肺、胃、子宮、精巣、胸腺、リンパ節、小腸、大腸、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、の 24 種の組織すべてにおいて発現していることを明らかにした。部分切除肝における c-Met 遺伝子の発現量を検討するために、外側左葉を切除した部分肝葉切除犬で、切除前と切除後 72 時間の c-Met 発現量について検討を行い、部分肝葉切除後の c-Met の発現量が切除前に比較して 1.986 倍に上昇していることを明らかにした。以上の結果から、イヌ c-Met 遺伝子の配列は、他の動物種との相同性が高く、生物間でよく保存された遺伝子であること、イヌ生体内では大部分の組織に分布していることを明らかにした。また、組織再生時における HGF/c-Met シグナルの重要性を指摘している。

### [第3章] 血液腫瘍における c-Met 遺伝子の検討

骨髄性白血病および形質細胞腫など一部の血液腫瘍において HGF の発現量が増加することを認めている背景の中で、イヌにおいても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ることから、その病態との関連の解明が重要と考え、そのレセプターである c-Met の検討を行っている。イヌの血液腫瘍のうち急性骨髄性白血病 (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 リンパ系腫瘍細胞株について検討を行なった。すなわち、これら腫瘍細胞から 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、real time PCR 法にて c-Met 遺伝子の定量的 PCR を行い、腫瘍間での c-Met 発現量について相対的に定量した。その結果、血液腫瘍の中では、リンパ系腫瘍症例に比べて、MDS を除いた骨髄系腫瘍症例において c-Met の発現量が多く、それぞれの腫瘍間で差があることを認めている。骨髄系腫瘍の一種である MDS は、他の骨髄系腫瘍症例と比較して c-Met の発現量が低い傾向であり、また、MDS、リンパ系腫瘍症例ともに臨床上健康なイヌと比較すると c-Met 発現が少ないことを認めている。以上の結果から c-Met が骨髄系腫瘍の病態とも関連があることを示唆し、再生医療に応

用する場合に腫瘍との関連を考慮する必要があることを指摘している。

#### [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

採取時の生体侵襲が少ない骨髄細胞を用いた肝再生医療への応用を目標に、イヌ骨髄細胞に遺伝子組み替えネコHGFを添加して培養を行い肝細胞への分化誘導を検討した。また、障害肝を再生することが知られているヒト胎盤抽出液（ラエンネック）についても同様に検討を行っている。すなわち、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、肝臓細胞への分化誘導を試みた。骨髄から肝細胞に分化したことの証明は、アルブミンmRNAの検出と共に、肝臓細胞に特異的なタンパクであるアルブミン、CK8およびCK18の検出を行った。さらに、骨髄細胞から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た検討も行った。その結果、ラエンネック添加培地では培養14日目、HGF添加培地では培養28日目に、それぞれアルブミンmRNAの発現を認めた。また、培養28日目の細胞について、アルブミン、CK8およびCK18の免疫染色を行い、胎盤抽出液およびHGFを添加して培養した骨髄細胞において、肝細胞に特異的なタンパクであるアルブミンおよびCK18の発現を確認した。本研究の結果から、イヌの骨髄細胞から肝臓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、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を示唆した。一方、ヒト胎盤抽出液を添加培養した骨髄細胞からも肝臓細胞への分化誘導が認められた。さらに興味深いことに、HGF濃度が少ないヒト胎盤抽出液の添加が、高濃度のHGF添加より骨髄細胞から肝臓細胞への分化誘導に優れていた。このことから、分化誘導機構はHGF非依存性である可能性も考え、HGFの機能発現に必須の存在であるHGF/c-Metシグナル伝達の阻害実験を試みている。その結果、骨髄細胞から肝臓細胞への分化は完全に阻害され、肝臓細胞の分化誘導に、HGFは必須の成分であることを確認している。しかし、ヒト胎盤抽出液にはHGFを微量(0.13ng/ml)に含む他、epidermal growth factor (EGF)、fibroblast growth factor (FGF)、nerve growth factor (NGF)、vascular endothelial growth factor (VEGF)、transforming growth factor a (TGF a)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。ヒト胎盤抽出液中に含まれる因子がHGFと相乗効果を示して、イヌ骨髄細胞から肝臓細胞の分化誘導を促進した可能性を示唆するものであり、今後の研究の重要性を指摘している。

以上の結果において、イヌc-Metの全塩基配列を初めて解明し、正常組織における分布ならびに肝再生時における発現増強を明らかにした。また、HGF/c-Metシグナル伝達が、ヒトと同様に一部の血液腫瘍の病態にも関与していることを立証し、今後、再生医療に利用する場合の注意点としても指摘している。さらに、HGF存在下でイヌの骨髄細胞から肝臓細胞への分化誘導が可能であることを明らかにすると共に、ヒト胎盤抽出液中に骨髄細胞を肝臓細胞に効率的に分化誘導するHGF以外の因子の

存在を初めて示した。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が、再生医療への応用に大きく貢献することを指摘している。これらの新しい知見は、獣医学分野のみならず生命科学分野全般において有用な情報であると考えられ、博士（獣医学）の学位を授与するにふさわしいものと判定した。