

犬肝幹細胞に関する研究：犬 c-Met 遺伝子のクローニング

Studies on canine hepatic stem cells: Cloning of canine c-Met gene

山田隆紹¹, 根尾櫻子¹, 久末正晴², 土屋 亮¹, 辻本 元³

¹麻布大学大学院獣医学研究科

²麻布大学獣医学部

³東京大学大学院農学生命科学研究科

Yamada Takatsugu¹, Neo Sakurako¹, Hisasue Masaharu², Tsuchiya Ryo¹, Tsujimoto Hajime³

¹Graduate School of Veterinary Science, Azabu University

²School of Veterinary Medicine, Azabu University

³Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

Abstract: Recently, pluripotential stem cells are observed in various tissues. For example, bone marrow cells can differentiate into not only hematopoietic stem cell but also to other tissues, like as cardiac muscles, vascular endothelial cells, neurocytes and hepatocytes. For these cells' differentiation, a number of cytokines are needed. Rat bone marrow cells can differentiate into hepatocytes by culture with hepatocyte growth factor (HGF) containing medium. HGF is the one of these cytokines which induces the biological activation in every tissues to reconstruct the tissue through c-Met tyrosine, which is cell surface receptor for HGF and mediate the biological activity of the HGF. To investigate HGF function, we cloned complementary DNA for canine c-Met and analyzed its expression in some tissues by reverse transcriptase PCR (RT-PCR) amplification. Eighty % of the whole sequence have been sequenced and we subscribed the partial code (724bp) to GenBank.

Furthermore, to determine the probability that bone marrow cells differentiate to hepatocytes, we cultured fresh canine bone marrow cells with HGF (30ng/ml). Then the cultured cells were examined by RT-PCR the expression of mRNA of albumin and AFP as the marker of hepatocyte. Canine bone marrow cells did not express the hepatocyte marker under culture condition with 30 ng/ml HGF containing medium. This study indicates that the concentration of HGF was not enough for bone marrow cells to differentiate into hepatocytes. Consequently, we intend to culture bone marrow cells with medium containing high concentration of HGF at next experiments.

目 的

近年、あらゆる組織に存在する組織特異的幹細胞が組織固有の機能細胞を生み出すだけでなく、異なる系譜の細胞に分化転換することが報告され、発生的にも再生医学の面からも注目を浴びている。骨髓細胞からは、骨格筋細胞¹⁾や血管内皮細胞²⁾³⁾、

神経細胞⁴⁾、肝細胞⁵⁾が分化することが報告され、また、その分化に参与する様々なサイトカインが同定されている。最近、In Vitroにおいて、ラットの骨髓細胞が肝細胞増殖因子(HGF)の存在下で肝細胞に分化することが証明された⁶⁾。HGFは、肝再生力を担う内因性因子として発見された⁷⁾が、肝細胞だけでなく血管内皮や筋組織、神経系、腎臓、肺など

様々な組織にも作用することが明らかにされてきている。これらの組織で HGF はその特異的レセプター c-Met チロシンキナーゼを介して様々な活性を誘導すると言われている⁸⁾。

HGF の機能を検討するためにはそのレセプターである c-Met 遺伝子の同定が有用であるが、イヌではその遺伝子配列は未知であるため、まずイヌ c-Met 遺伝子配列の解明から着手した。現在までに約 80 % 解析済みであり、すでに部分配列 724 bp は Genbank に登録した (Genbank: AB096697)。

一方、イヌの難知性肝疾患の発生率は高く、その有効な治療方法は乏しい。本研究では、侵襲が少なく採取しやすい骨髄から肝細胞を誘導し、それを再生医療に応用するための基礎研究として、イヌ骨髄細胞を human recombinant HGF を添加、および非添加の状態 で培養し、肝細胞に分化誘導が可能か、あるいはラットとは全く異なった細胞が誘導されるかを検討している。今回はその途中経過を報告する。

材料および方法

1 イヌ c-Met 遺伝子のクローニング

1) total RNA 抽出

イヌ肝組織からの total RNA 抽出は Sepagene RVR (三光純薬) にて行った。

2) c-Met 遺伝子プライマーの作製

DANASIS 解析ソフトにて、ヒト、ラット、マウスにおける c-Met ホモロジーを検索し、ホモロジーの高い領域にプライマーを作製した。

3) c-Met 遺伝子の RT-PCR およびサブクローニング

1-1) で準備した total RNA を鋳型にして、1-2) のプライマーを用いて RT-PCR を行った。一本鎖 cDNA の合成および PCR は TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1 (TaKaRa) を使用した。control には、housekeeping gene である Canine β actin (Forward primer: 5'-ACTGGGACGACATGGAGAAGA-3') (Reverse primer: 5'-GATCTTCATGAGGTAGTCAAGT-3') を用いた。PCR 反応によって得られた各 PCR 産物はアガロース電気泳動にて DNA 断片の長さを確認した後、GenElute Minus EtBr Spin Columns (SIGMA)

によってゲルから精製し、TOPO TA cloning kits (INVITROGEN) にてサブクローニングを行った。

4) c-Met 遺伝子のシークエンス

プラスミドは、Plasmid Mini Prep Kit (Bio Lad) で精製し、Big Dye Terminator (Amersham Biosciences) でラベルした後、ABI PRISMTM310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) にてシークエンスを行った。遺伝子配列の解析は、Edit View ABI automated DNA sequence viewer (Perkin Elmer) にて行った。

5) 正常犬における c-Met 遺伝子の各臓器発現の検討

c-Met と HGF の相互関係を検討するために、3 歳齢のイヌの臓器から total RNA を抽出し、c-Met 特異的プライマー、5'-TGTCACGCCTTTGAAAGCA-3' (sense strand), 5'-GCTCTCACTTAAGGTCAAGG-3' (antisense strand) を用いて、RT-PCR を行い、c-Met の各臓器発現を検討した。

2 イヌ骨髄細胞の肝細胞への分化誘導の検討

1) 骨髄細胞の分離と培養

骨髄は 3 歳齢の正常犬から全身麻酔下で採取し、培地は 20 % FBS 添加 Dulbecco's modified Eagle medium and Ham's medium F12 (DF medium) を用い、細胞数が 5×10^5 個/ml となるように調製して human recombinant HGF (Pepro Tech) (30ng/ μ l) 添加および非添加条件下で培養した。細胞は 21 日間培養したが、その間、培地は 3 日ごとに新しい培地と交換した。

2) 骨髄培養細胞における c-Met, AFP, Albumin 発現の検討

正常イヌ肝臓および骨髄培養細胞から total RNA を抽出し、およそ 1 μ g を用いて c-DNA を合成し、その後の RT-PCR は次に示すような条件で行った。94 $^{\circ}$ C, 5 分に続いて 94 $^{\circ}$ C 30 秒, 59 $^{\circ}$ C (c-Met), 55 $^{\circ}$ C (AFP), 58 $^{\circ}$ C (Albumin), 60 $^{\circ}$ C (canine β actin), 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 90 秒のサイクルを 30 サイクル増幅させた。c-Met のプライマーは 5'-TGTCACGCCTTTGAAAGCA-3' (sense strand), 5'-GCTCTCACTTAAGGTCAAGG-3' (antisense strand), AFP のプライマーは、5'-CCCAGTTTGTTCAGGAAGCCAC-3' (sense strand),

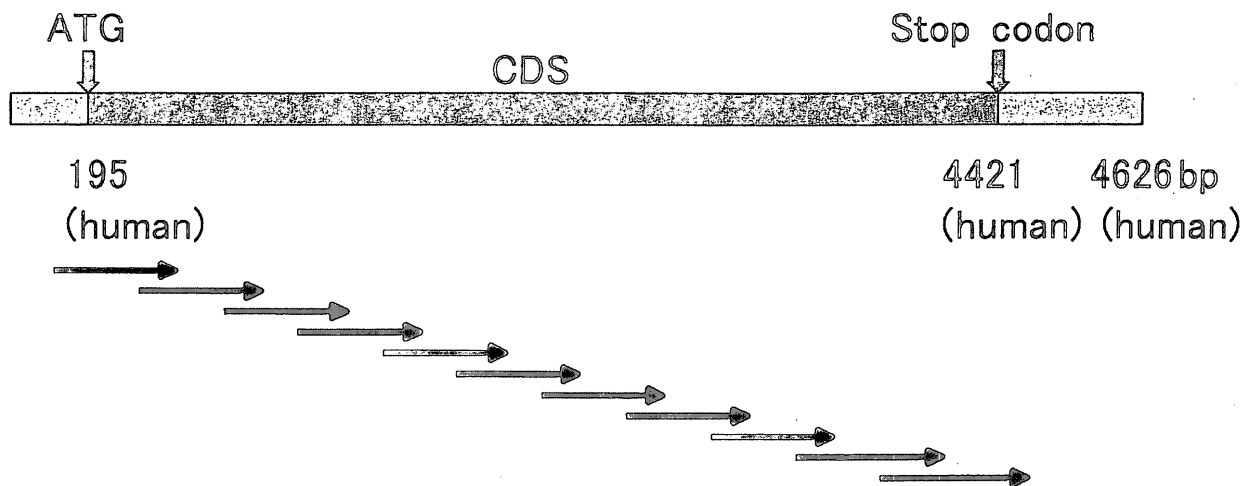


Fig.1 Sequencing fragments of canine c-Met

The primers were prepared by selecting high homology parts of c-Met in human, mouse and rat. Arrows show the sequencing fragment which length are approximately 500-700bp.

5'-TTCCCCATCCTGCAGACACTCC-3' (antisense strand), Albumin のプライマーは, 5'-AGAGTGAGATTGCTCATCGG-3' (sense strand), 5'-GTACGGATGTCTTCTGGCAA-3' (antisense strand) を用いた。

結果と考察

1 イヌ c-Met 遺伝子のクローニング

1) イヌ c-Met 遺伝子のクローニング

c-Met 遺伝子は, Genbank によると, ヒト 4626bp, マウス 4140 bp, ラット 4189 bp と報告されている。その全長を各種プライマーによって 10 の断片に分割し, シークエンスを行った。(Fig1) すでに c-Met 部分配列 724 bp は GenBank に登録済みであり, その領域のヒトとのホモロジーは, 87% であった。現在, 各シークエンス断片は解析中であるため, 全配列が決定し次第公表する。

2) 正常犬における c-Met 遺伝子発現の検討

c-Met はヒトやマウスでは肝臓, 胃, 肺など, あらゆる上皮細胞に発現していると言われている^{10) 11)}。今回は骨髄, 大脳, 小脳, 子宮, 卵巣, 腎臓 (皮質) 腎臓 (髄質) 肝臓, 肺, 胃, 十二指腸, 空回腸, 大腸, リンパ節, 脾臓について, RT-PCR によって c-Met 遺伝子の発現を検討した。結果は, リンパ節以外の組織に c-Met 遺伝子の発現が見られた。(Fig2)

マウスではリンパ組織に c-Met の発現が見られることから, イヌについては更なる検討が必要である。また, これ以外の組織については現在検討中である。

2 イヌ骨髄細胞の肝細胞への分化誘導の検討

1) イヌ骨髄細胞の培養

培養細胞における c-Met, AFP, Albumin 遺伝子発現の検討

HGF を添加および非添加条件で培養した骨髄細胞が肝臓に分化可能かどうかを調べるために, RT-PCR によって, c-Met, AFP, Albumin mRNA の発現を検討した (Fig3)。

はじめに, 新鮮骨髄細胞におけるこれらの遺伝子発現を検討した。すでに, ラットでは骨髄細胞に c-Met の発現が確認されており⁶⁾, HGF が骨髄細胞に働くこと明らかにされているが, イヌでもラットと同様に新鮮骨髄細胞に c-Met を発現しているかどうか検討した。

AFP の肝臓での発現は生後減少すると言われていた¹²⁾。また, Albumin はラットの場合, 11.5 日齢の胎子に初めて発現し, 成熟肝細胞にもその発現が残り, その発現は肝臓特異的である。これらの肝臓マーカーの発現を新鮮骨髄細胞で観察したところ, AFP (+) Albumin (-) であった (Fig 3 lane7)。

次に, 新鮮肝をコントロールとして, HGF 添加, 非添加条件で DF 培地を用いて培養した骨髄細胞に

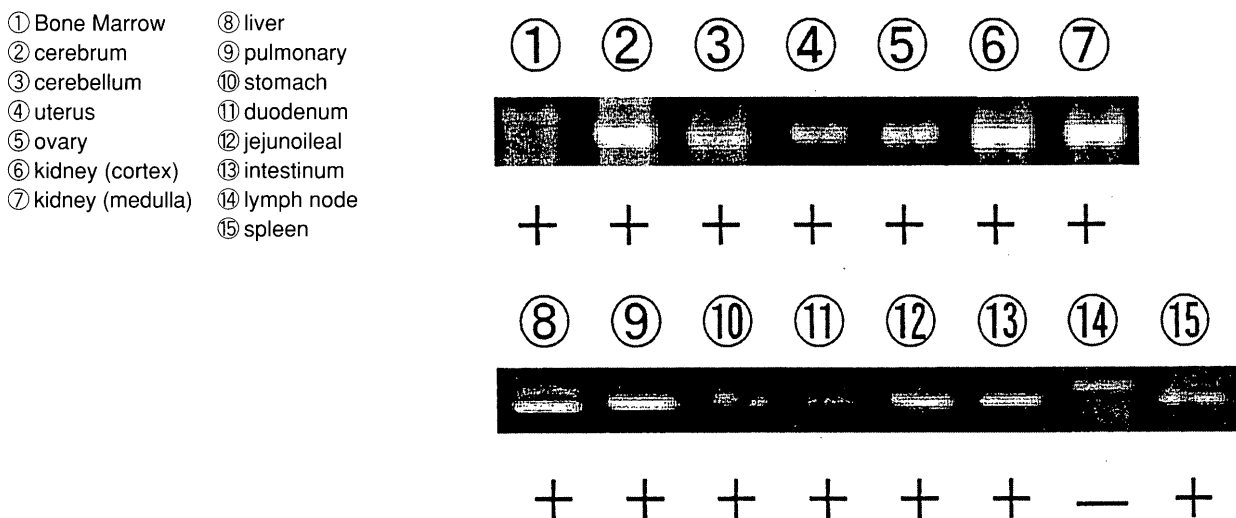


Fig.2 Detection of the c-Met mRNA in various tissues of a normal dog by RT-PCR. c-Met was detected in many tissues except lymphonode.

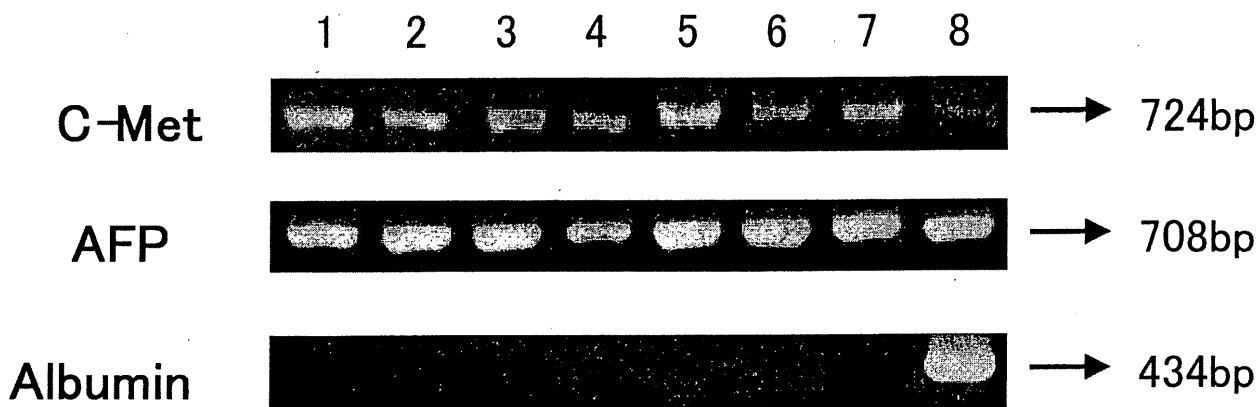


Fig.3 Expression of c-Met mRNA in cultured BM cells
 lane1: day7 (without HGF), lane2: day7 (with HGF)
 lane3: day14 (without HGF), lane4: day14 (with HGF)
 lane5: day21 (without HGF), lane6: day21 (with HGF)
 lane7: Bone Marrow
 lane8: liver

おけるこれらの遺伝子発現を経日的に検討した。

その結果、培養開始後7日目、14日目、21日目の培養骨髄は HGF 添加、非添加に関わらず、c-Met (+)、AFP (+)、Albumin (-) となった。つまり、HGF 添加/非添加で比較して、培養骨髄細胞の肝臓への機能的変化は認められず、また日数による変化も見られなかった。

骨髄が肝細胞に分化したとことを証明するためには培養骨髄細胞に AFP、Albumin 遺伝子の発現を確認する必要がある。今回の実験では骨髄細胞から肝細胞への分化を証明できなかったが、この理由とし

て、HGF の濃度が挙げられる。HGF を使用した研究では一般にその添加濃度は 10 ng/ml の場合が多いが、She-Hoon Oh らは、0.5 ~ 5 μg/ml という高濃度にした時に骨髄細胞が肝細胞様の細胞に分化したと報告している。肝細胞様に分化した骨髄の正体はおそらく自己増殖能と分化能を併せ持つ幹細胞であると考えられるが^{13) 14)}、その再生現象に必須の3要素は幹細胞と増殖因子、細胞が定着するための接着と考えられる。組織特異的幹細胞が異なる系譜の細胞に分化転換するには、幹細胞の置かれる環境に大きく作用されると考えられ、今後、高濃度での培養を検討

してゆきたい。

要 約

近年、種々の組織において、多能性幹細胞の存在が明らかにされている。例えば、骨髄細胞は骨髄細胞のみならず骨格筋、血管内皮細胞、神経細胞、肝細胞への分化が可能である。そして、これらの細胞が他の組織細胞に分化するためには、様々なサイトカインが必要である。ラットの骨髄細胞はHGF存在下で肝臓の細胞に分化することが報告され、このHGFは、あらゆる組織の細胞表面のレセプターであるc-Metチロシンキナーゼを介してあらゆる組織において組織再構築の為に生物活性を誘導するサイトカインの一つである。HGFの機能を検討する為に、我々はイヌc-Met遺伝子のクローニングを行い、また各組織での発現をRT-PCRにより検討した。現在までに80%のシーケンス解析が終了しており、すでに部分配列である724 bpをGenbankに登録した。

さらに、骨髄細胞が肝細胞に分化する可能性を検討するために、骨髄細胞をHGF (30 ng/ml) 存在下で培養した。その後、培養骨髄細胞はRT-PCRによって肝細胞のマーカーであるAFP、Albuminの発現について検討した。しかし、これらの遺伝子の発現は確認できず、今回の研究で用いたHGFの量は、骨髄細胞が肝細胞に分化するのに十分量ではなかったと考えられた。次回の研究では高濃度HGF下でイヌ骨髄細胞を培養し肝細胞への分化を証明したいと考えている。

文 献

- 1) Ferrari G, Cusella-DeAngelis, Coletta M, Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., Mavilio F. *Science* 279(6) 1528-1530 1998
- 2) Nakamura Y, Morishita R, Higaki J, Kida I, Aoki M, Moriguchi A, Yamada K, Hayashi S, Yo Y, Nakano H, Matsumoto K, Nakamura T, Ogihara T. *J Hypertens* 14 (9) : 1067-72 1996
- 3) Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. *Nat Med* 8(4) : 403-9 2002
- 4) Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, Koizumi A, Nakashima K, Gojo S, Taga T, Okano H, Hata J, Umezawa A. *Differentiation* 68(4-5): 235-44 2001
- 5) Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. *Nat Med* 6 (11): 1229-34 2000
- 6) Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T, Shima N, Higashio K, Namba M. *Biochem Biophys Res Commun.* 279 (2): 500-4. 2000
- 7) Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S. *Nature* 23; 342 (6248): 440-3 1989
- 8) Higuchi O, Mizuno K, Vande Woude GF, Nakamura T. *FEBS Lett* 27; 301(3) : 282-6 1992
- 9) Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmieciak TE, Vande Woude GF, Aaronson SA. *Science* 15; 251 (4995): 802-4 1991
- 10) Di Renzo MF, Narsimhan RP, Olivero M, Bretti S, Giordano S, Medico E, Gaglia P, Zara P, Comoglio PM. *Oncogene* 6 (11): 1997-2003 1991
- 11) Yang XM, Park M. *Lab Invest* 73(4): 483-91 1995
- 12) G. I. Abelev. *Sov. Sci.. Rev. D. Physicochem. Biol*-11 85-109 1993
- 13) Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. *Science* 1999 May 14; 284 (5417): 1168-70
- 14) 室田誠逸編 再生医学再生医療 41, 29-39 東京化学同人 2002.