

Title	培養アストロサイトにおけるc-Metの産生と分泌性因子によるその調節
Sub Title	
Author	島崎, 賢仁(Shimazaki, Kenji) 河瀬, 斌(Kawase, Takeshi)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2003
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.80, No.4 (2003. 12) ,p.T311- T322
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20031201-0311

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

学位論文

培養アストロサイトにおける c-Met の産生と分泌性因子によるその調節

慶應義塾大学医学部外科学教室

(指導：河瀬斌教授)

しまざき けんじ
島崎 賢仁

(平成 15 年 5 月 14 日受付)

Key Word : c-Met, astrocyte, regeneration, brain injury, cytokine

化学発癌剤で処理されたヒト骨肉腫細胞から met と名付けられた癌原遺伝子が発見され¹⁾, met の過剰発現が NIH3T3 の変異株で多く認められた²⁾. c-met 癌原遺伝子産物である c-Met は膜貫通レセプター型チロシンキナーゼであることが明らかになったが, そのリガンドは不明であった³⁾. その後, c-Met は, 肝細胞増殖因子 (hepatocyte-growth-factor ; HGF) の細胞膜表面受容体として同定された^{4,5)}. HGF は種々の細胞に対して, mitogen, motogen, morphogen として作用することが知られている⁶⁻⁸⁾. HGF と c-Met は中枢神経系においても産生されることが報告されており⁹⁻¹²⁾, ヒト脳組織においては, 腫瘍性または反応性アストロサイトが c-Met を産生しており, 正常アストロサイトはこれを産生していないことが報告された^{13,14)}. また, c-Met および HGF の mRNA または蛋白産生が astrocytoma の組織および細胞に認められたという, いくつかの報告がなされた¹⁵⁻¹⁷⁾. これらの結果は, c-Met が腫瘍進展過程または神経再生過程においてニューロン-グリアまたはグリア-グリア間の重要な mediator である可能性を示唆する.

アストロサイトは神経系においてニューロンの支持細胞であり, 特有の神経栄養効果を持つ. これまでに, 脳損傷時に損傷部位に供給される fibroblast growth factor (FGF), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) などの種々の分泌性因子が, アストロサイトからの神経成長因子 (nerve growth factor ; NGF) の分泌や, 非 NGF 型神経栄養因子の産生を刺激することで, アストロサイトが持つコリン作動性ニュー

ロンへの神経栄養効果を増強することが報告されている¹⁸⁻²⁰⁾. これら分泌性因子で活性化されたアストロサイトは損傷されたニューロンの生存を支持し, 損傷された神経回路網の再構築を促進すると考えられている. 中枢神経系の再生過程における c-Met の役割を明らかにするために, アストロサイトにおける c-Met の産生と分泌性因子によるその調節を検討した.

実験方法

1. アストロサイト初代培養系の作成

アストロ初代培養系の作成は Yoshida らの方法に準じた²⁰⁾. なお動物実験は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインを遵守して施行した. 顕微鏡下に無菌的にラット (Wistar albino) 新生仔の海馬を摘出し, 髄膜, 血管, 脈絡叢を除去したあと, ステンレスメッシュ (孔径 200 μ m) を通して細片化し, 10% fetal calf serum (FCS) および gentamicin (GM) 40 mg/L を添加した minimum essential medium (MEM) を用い, poly-L-lysine (PLL) でコーティングした culture flask (Greiner, Frickenhausen, Germany) 内で初代培養した. 細胞培養はすべて 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 飽和水蒸気下で行った. 0.05% trypsin 処理により 2 回の継代後の培養細胞を本実験に用いた.

2. 免疫蛍光二重染色による c-Met の検出

アストロサイトを PLL にてコーティングした 24-well plate (IWAKI, Tokyo) 内の coverslip 上に

本論文は, Shimazaki K, Yoshida K, Hirose Y, Ishimori H, Katayama M and Kawase T : Cytokines regulate c-Met expression in cultured astrocytes. Brain Research 962 : 105-110, 2003 の一部を含む.

0.7x10⁵/cm²の細胞密度にて播種し、10% FCS および GM 40 mg/L を添加した MEM (10% FCS-MEM) にて3日間培養後、Hank's balanced salt solution (HBSS) で2回洗浄し、以下の1)~8)に示す分泌性因子を添加した10%FCS-MEMを用い、さらに48時間培養した。1) 無添加; 2) acidic FGF (25 ng/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); 3) basic FGF (25 ng/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); 4) IL-1 β (50 U/ml, Genzyme, Cambridge, MA, USA); 5) TNF- α (100 ng/ml, Dainippon Pharmaceutical, Osaka); 6) transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1; 10 ng/ml, Sigma, St. Louis, MO, USA); 7) epidermal growth factor (EGF; 100 ng/ml, Chemicon International, Temecula, CA, USA); 8) HGF (10 ng/ml, TOYOBO, Osaka). 培養細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、5% bovine serum albumin (BSA) でブロッキングした後、1次抗体に rabbit polyclonal anti-mouse c-Met antibody (1:50, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 2次抗体に fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1:200, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA) を用いて免疫染色した。さらに、1次抗体に mouse monoclonal anti-porcine glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody (1:200, Chemicon International, Temecula, CA, USA), 2次抗体に rhodamine-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (1:100, Organon Teknika, Durham, NC, USA) を用いて免疫二重染色した。染色した培養細胞を封入し、蛍光顕微鏡で鏡検した。

3. Western blot 法による c-Met の検出

アストロサイトを PLL にてコーティングした culture dish (Corning, Corning, NY, USA) 上に 0.7x10⁵ cells/cm² の細胞密度にて播種し、10%FCS-MEM にて3日間培養後、HBSS で2回洗浄し、以下の1)~8)に示す分泌性因子を添加した10% FCS-MEM を用い (5 ml/dish), さらに48時間培養した。1) 無添加; 2) acidic FGF (25 ng/ml); 3) basic FGF (25 ng/ml); 4) IL-1 β (50 U/ml); 5) TNF- α (100 ng/ml); 6) TGF- β 1 (10 ng/ml); 7) EGF (100 ng/ml); 8) HGF (10 ng/ml). 培養終了後、アストロサイトを HBSS で2回洗浄し、cell scraper を用いて細胞融解液 (20 mM Tris, 15 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1 mM PMSF, 1 kU/ml

aprotinine, 10 μ g/ml leupeptin) 100 μ l 中に回収した。回収した細胞を sonicator にて破砕し、遠心 (10000 rpm, 5 分間) した後の上清を、蛋白濃度 6 mg/ml となるように細胞融解液に希釈し、アストロサイト抽出液とした。蛋白定量は BSA を標準として蛋白定量キット (Pierce, Rockford, IL, USA) にて行った。アストロサイト抽出液を等量の Tris-sodium dodecyl sulfate- β -mercaptoethanol seprazol (Enprotech, New York, NY, USA) にて希釈して8分間煮沸した。2~15%濃度勾配 polyacrylamide gel (Daiichi Chemicals, Tokyo) にアストロサイト抽出液を 10 μ l/lane (30 μ g protein/lane) 泳動し、polyvinylidene difluoride membrane (Daiichi Chemicals, Tokyo) に転写した。転写膜を1次抗体として rabbit polyclonal anti-mouse c-Met antibody (1:100), 2次抗体として horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1:1000, BioMakor, Rehovot, Israel) を反応させた。HRP を chemiluminescence reagent (NEN, Boston, MA, USA) により化学発光させ c-Met を検出した。

4. Image analyzing system を用いた c-Met の半定量

アストロサイト抽出液の Western blot 法にて得られた c-Met のバンドを image scanner (GT-8000, EPSON, Nagano) にて取り込み、Macintosh および image analyzer (LUZEX-F, Nireco, Tokyo) から構成される system により解析した。バンドの濃度を 256 段階 (0~255) に数値化し、バンドの面積と濃度を乗じた値 (以下、Area*Dense と略す) を算出し、アストロサイト抽出液中の c-Met を半定量した。

5. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法による c-met および HGF mRNA の検出
アストロサイトを PLL にてコーティングした 6-well plate (IWAKI, Tokyo) 内の coverslip 上に 0.5x10⁶/cm² の細胞密度にて播種し、10%FCS-MEM にて3日間培養後、HBSS で2回洗浄し、以下の1)~4)に示す分泌性因子を添加した10% FCS-MEM を用い、さらに0~28時間培養した。1) 無添加; 2) acidic FGF (25 ng/ml); 3) basic FGF (25 ng/ml); 4) HGF (10 ng/ml). 培養終了後、Trizol (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) を用いて、Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform 法により、全 RNA を抽出した。2 μ g の全 RNA を、random hexamer と M-MuLV reverse transcriptase を含む First-Strand cDNA

Synthesis Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ, USA) を用いて、逆転写し、cDNA を合成した。c-met, HGF および内因性陽性コントロール glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) 各々に特異的なプライマー各 0.2 μ M と cDNA 混合液 1 μ l を、1.25 U の Taq polymerase (Z-Taq; TaKaRa Shuzo Co., Otsu, Japan) を含む PCR 反応液 50 μ l に添加し、programmable heating block (MJ Reserch, Inc., Waltham, MA, USA) を用いて PCR を施行した。PCR 反応液 5 μ l を 2% アガロースゲル上で電気泳動した。PCR 産物を ethidium bromide で染色し、検出した。PCR 産物を、Macintosh および EDAS 120 (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA) からなる system を用いて、取り込み、解析した。データは c-met/GAPDH 比および HGF/GAPDH 比として算出し、c-met および HGF mRNA 量を半定量した。

6. プライマーおよび PCR プロトコール

PT-PCR に使用した合成オリゴヌクレオチドプライマーは以下の通りである。

HGF mRNA に対する特異的プライマーは 5'-GGGG AATGAGAAATGCAGTCAG-3' (1920-1941) および 5'-CCTGTATCCATGGATGCTTC-3' (2215-2234)、c-met mRNA に対する特異的プライマーは 5'-ACAGT GGCATGTCAACATCGCT-3' (2413-2434) および 5'-GCTCGGTAGTCTACAGATTC-3' (3049-3068)、GAPDH mRNA に対する特異的プライマーは 5'-CCTG CACCACCAACTGCTTAGC-3' (517-538) および 5'-GCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3' (734-755)。

HGF と c-met に対する PCR プロトコールは、変性反応を 98°C 10 秒間、アニーリングを 56°C 10 秒間、伸長反応を 72°C 10 秒間行い、このサイクルを 35 回繰り返した。GAPDH に対する PCR プロトコールは、変性反応を 98°C 10 秒間、アニーリングを 62°C 10 秒間、伸長反応を 72°C 10 秒間行い、このサイクルを 25 回繰り返した。HGF、c-met、GAPDH mRNA に対して予測される PCR 産物はそれぞれ 314、655、239 base pairs である。

7. 統計

データは平均値±標準偏差で示した。多群間の比較は one-way ANOVA にて有意差がみとめられたものに対して Fisher's PLSD を施行した。危険率 5% 未満の場合を統計学的に有意差ありとした。

結 果

1. 免疫蛍光二重染色による培養アストロサイトにおける c-Met の産生の検討

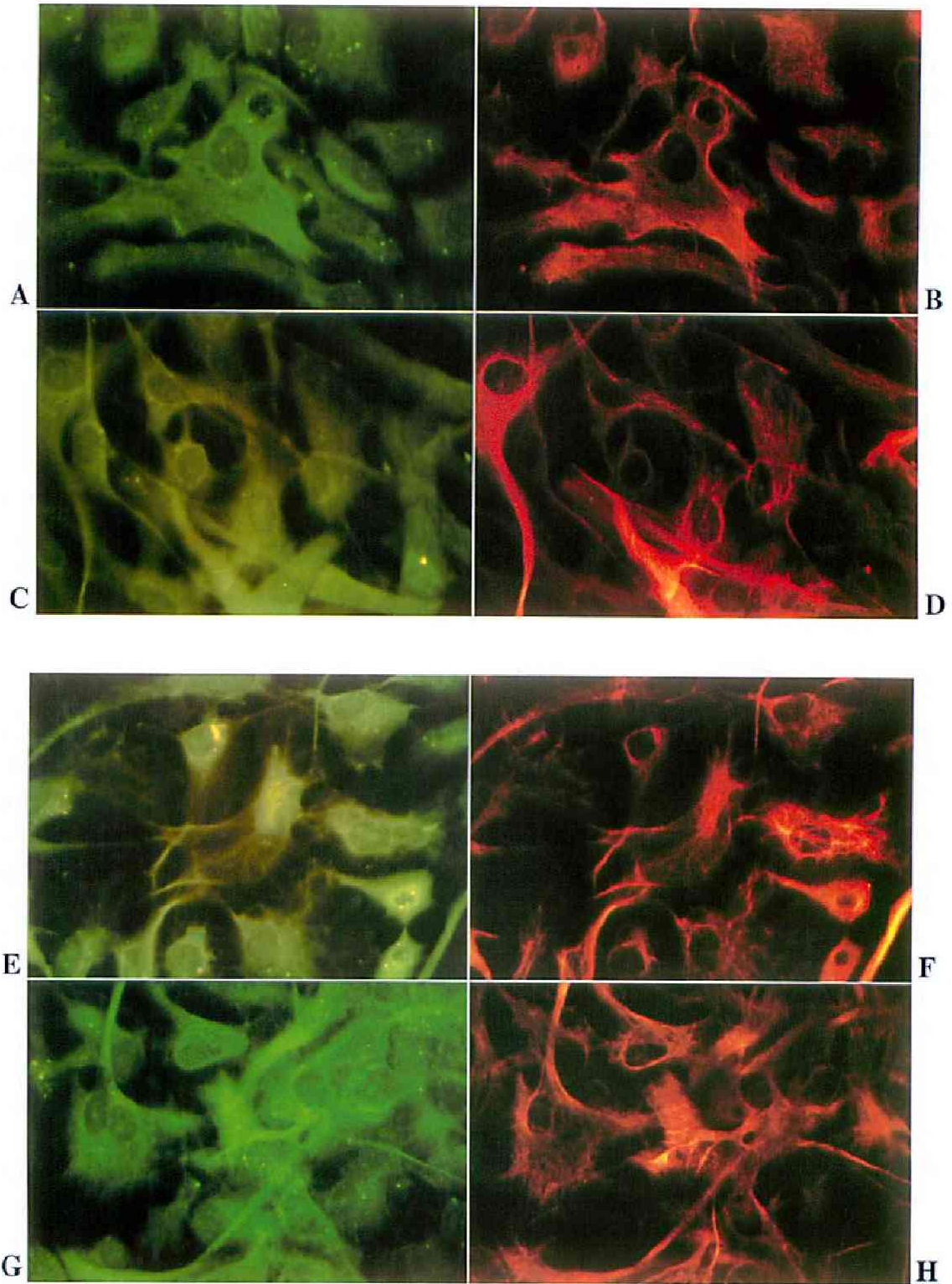
免疫蛍光二重染色により培養細胞において c-Met が検出された (第 1 図 A)。c-Met 陽性細胞は GFAP 陽性細胞と同一であることが示された (第 1 図 B)。このことから c-Met は培養アストロサイトにおいて産生されることが明らかにされた。c-Met の染色パターンは種々の分泌性因子により影響を受けないことが示され (第 1 図 C, E, G, I, K, M, O)。

2. Western blot 法による培養アストロサイトにおける c-Met の産生の検討

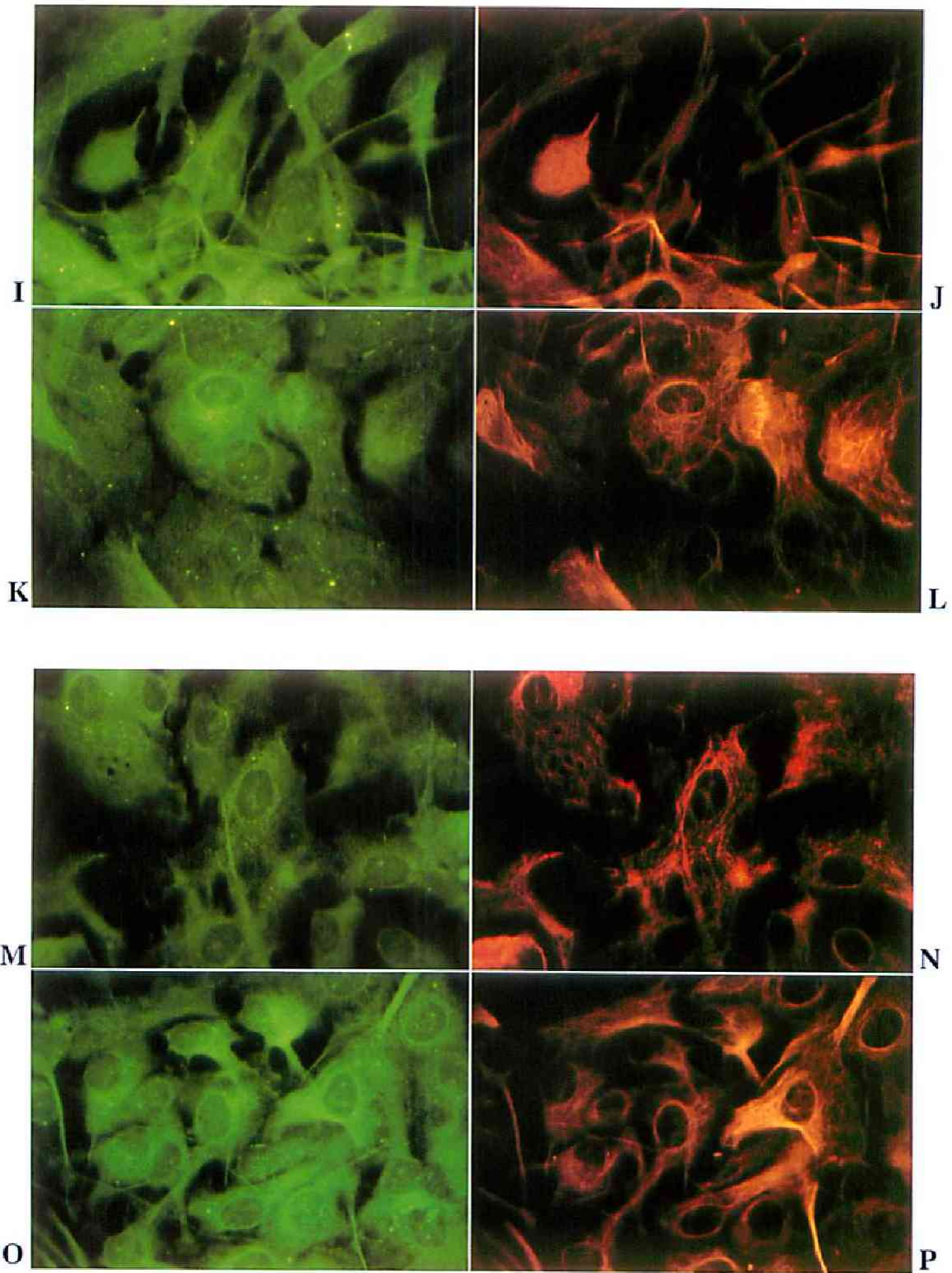
Western blot 法により、培養アストロサイトにおける c-Met が検出された。培養アストロサイトは 145 および 170 kD isoform の c-Met を産生していることが明らかにされた (第 3 図)。無処理のアストロサイト抽出液を、1~12 mg/ml の蛋白濃度となるよう細胞融解液で希釈し、Western blot 法により検出された 145 および 170 kD c-Met isoform のバンドから image analyzer を用いて Area*Dens を算出した。アストロサイト抽出液の蛋白濃度と Area*Dens は直線関係にあることが判明した (第 2 図 A, B)。Image analyzer を用い、無処理のアストロサイトにおける c-Met の産生量に対する分泌性因子で処理したアストロサイトにおける c-Met の産生量の比を比較し c-Met 産生量を半定量した結果、170 kD isoform の産生は aFGF、bFGF により有意に増強され、HGF により有意に減弱されることが明らかにされた (第 4 図 A)。145 kD isoform の産生は種々の分泌性因子により有意な変化を示さなかった (第 4 図 B)。

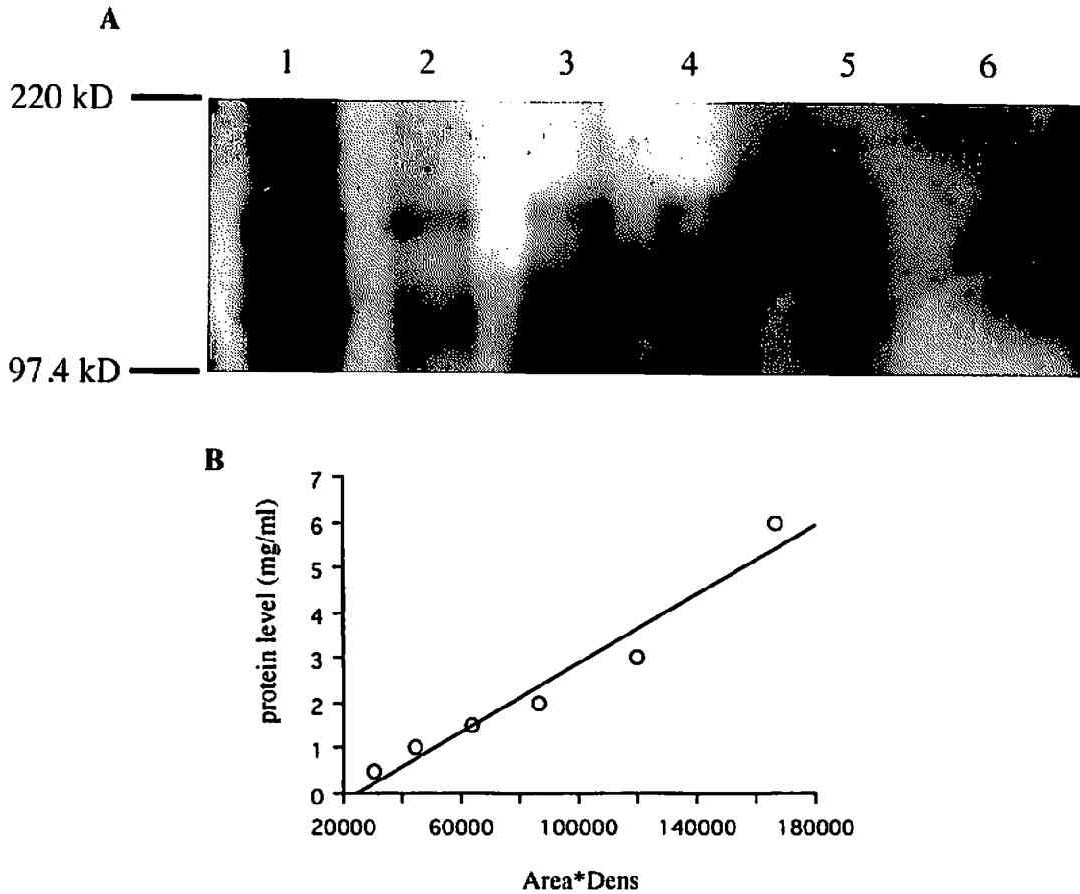
3. RT-PCR による培養アストロサイトにおける c-met 発現の検討

RT-PCR により、培養アストロサイトにおける c-met の発現が明らかにされた (第 5 図)。また、培養アストロサイトにおける HGF の遺伝子の発現も明らかにされた (第 5 図)。内因性陽性コントロール GAPDH の mRNA 量に対する c-met mRNA 量の比 c-met/GAPDH を比較し半定量した結果、aFGF、bFGF、HGF は c-met の発現を有意に増強させた (第 6 図 A)。c-met mRNA の産生量は aFGF、bFGF、HGF の刺激後 3 時間で最大になることが観察された (第 7 図 A)。HGF mRNA の

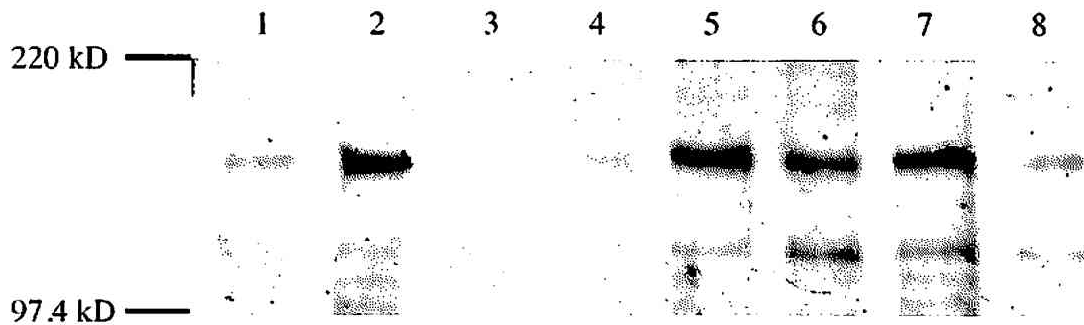


第1図 培養アストロサイトにおける c-Met (A, C, E, G, I, K, M, O) と GFAP (B, D, F, H, J, L, N, P) 免疫蛍光二重染色。A, B. 分泌性因子無添加 (control)。C, D. acidic FGF 添加。E, F. TNF- α 添加。G, H. IL-1 β 添加。I, J. basic FGF 添加。K, L. TGF- β 1 添加。M, N. EGF 添加。O, P. HGF 添加。(倍率160倍) (Shimazaki K, et al : Brain Research 962 : 105-110, 2003 Fig. 1 より許可を得て一部を転載。)

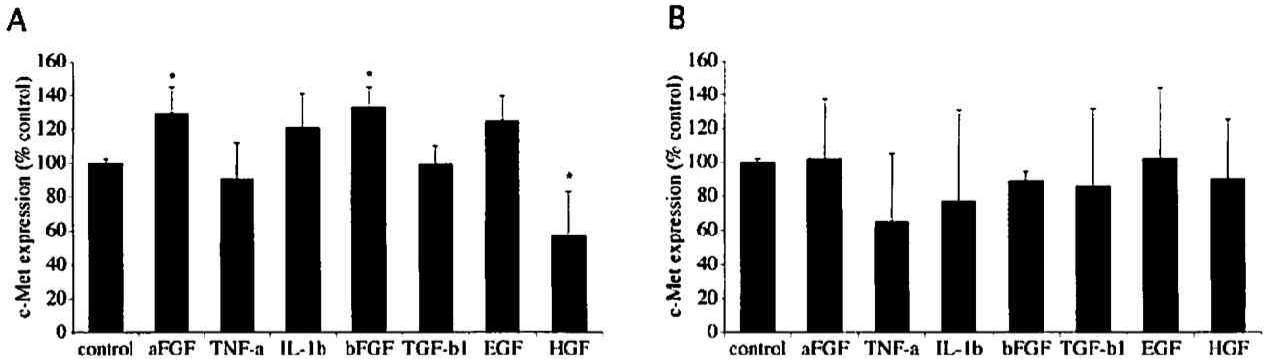




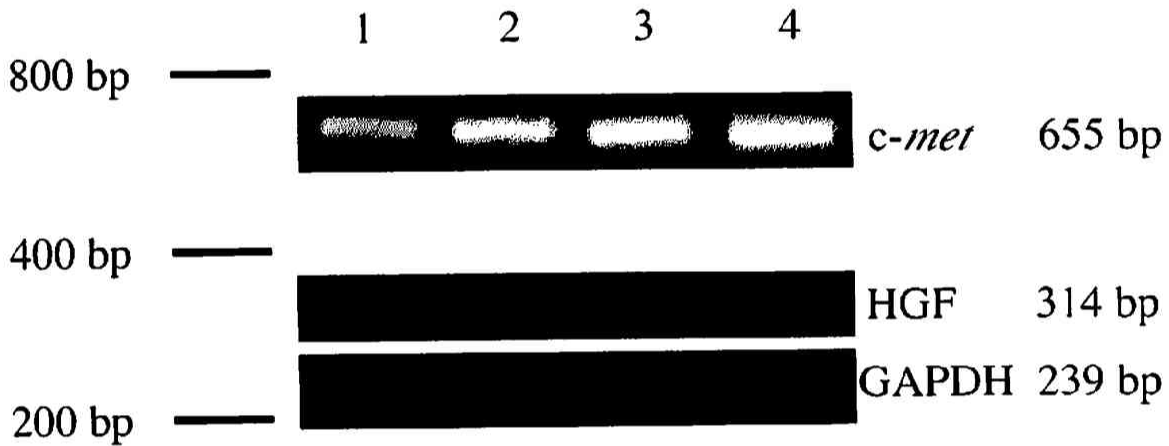
第2図 培養アストロサイトにおけるc-MetのWestern blot法-画像解析による定量. A. 無処理アストロサイト抽出液を蛋白濃度で希釈系列を作成しWestern blot法で解析. 1) 6 mg/ml, 2) 3 mg/ml, 3) 2 mg/ml, 4) 1.5 mg/ml, 5) 1 mg/ml, 6) 0.5 mg/ml. B. 蛋白濃度とArea*Densとの相関関係 (adjusted R²=0.95)



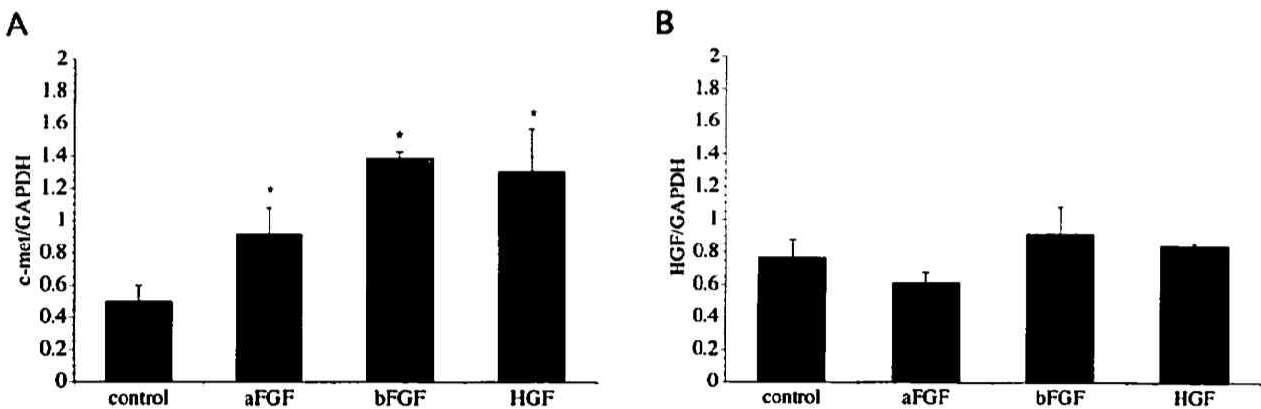
第3図 各種分泌性因子により刺激した培養アストロサイトにおけるc-MetのWestern blot法による解析. 1) control, 2) acidic FGF, 3) TNF- α , 4) IL-1 β , 5) basic FGF, 6) TGF- β 1, 7) EGF, 8) HGF. (Shimazaki K, et al : Brain Research 962 : 105-110, 2003 Fig. 2より許可を得て転載.)



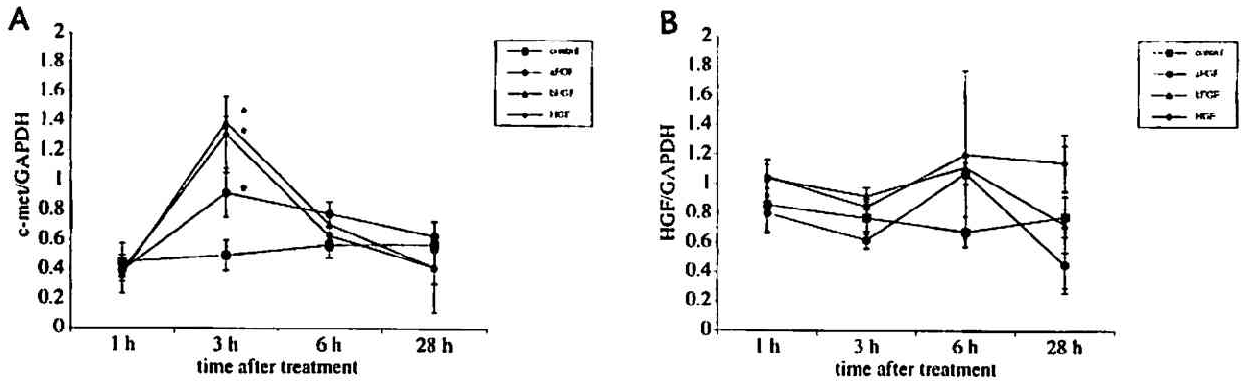
第4図 各種分泌性因子により刺激した培養アストロサイトにおける c-Met を Western blot 法・画像解析にて定量し、無処理群 (control) との比率をパーセントで表示。A. 170-kD isoform. Control と比較して* : $p < 0.05$. B. 145-kD isoform. (Shimazaki K, et al : Brain Research 962 : 105-110, 2003 Fig. 2 より許可を得て一部を転載。)



第5図 各種分泌性因子により刺激した培養アストロサイトにおける c-met, HGF mRNA の RT-PCR による解析。1) control, 2) acidic FGF, 3) basic FGF, 4) HGF. (Shimazaki K, et al : Brain Research 962 : 105-110, 2003 Fig. 3 より許可を得て転載。)



第6図 各種分泌性因子により刺激した培養アストロサイトにおける c-met, HGF mRNA を RT-PCR・画像解析にて定量し、無処理群 (control) と比較し表示 (刺激後3時間)。A. 内因性陽性コントロール GAPDH の mRNA 量に対する c-met mRNA 量の比 c-met/GAPDH を求め半定量した結果。Control と比較して* : $p < 0.05$. B. 内因性陽性コントロール GAPDH の mRNA 量に対する HGF mRNA 量の比 HGF/GAPDH を求め半定量した結果。 (Shimazaki K, et al : Brain Research 962 : 105-110, 2003 Fig. 3 より許可を得て一部を転載。)



第7図 各種分泌性因子により刺激した培養アストロサイトにおける *c-met*, HGF mRNA 産生量の時間経過による変化。A. *c-met* mRNA. Control と比較して* : $p < 0.05$. B. HGF mRNA. (Shimazaki K, et al : Brain Research 962 : 105-110, 2003 Fig. 3 より許可を得て一部を転載.)

産生量は種々の分泌性因子により影響を受けなかった (第6図B, 第7図B)。

考 察

本研究において、ラット海馬の培養アストロサイトにおける *c-Met* 蛋白の産生が、免疫蛍光二重染色と Western blot 法により初めて示された。これまでに *c-Met* 蛋白の産生は、ミクログリア^{9,11)}、ニューロン¹²⁾、glioma 組織^{13-15,17,21)}、glioma cell lines^{15,16,22)}において報告があり、*c-met* mRNA の産生は、ミクログリア¹²⁾、ニューロン^{12,23)}、アストロサイト¹²⁾、glioma cell lines^{16,17,22,24)}において報告がある。HGF のアストロサイトにおける産生も報告されている¹¹⁾。しかし、ラット海馬の培養アストロサイトにおける *c-Met* 蛋白の産生はこれまで報告がみられなかった。

本研究で使用した培養細胞は GFAP 陽性細胞で構成されている。これらの培養細胞は Yoshida ら²⁰⁾による方法により得られ、95%以上がアストロサイトであり、培養アストロサイトと特徴づけるに十分である。これら培養アストロサイトは、継代操作により機械的および酵素的に刺激される。刺激され、活性化状態にある培養アストロサイトは NGF および他の神経栄養因子を産生しており、神経栄養因子の産生は、脳損傷時に供給されると考えられる分泌性因子により増加する¹⁸⁻²⁰⁾。それゆえ、この培養細胞は脳損傷後の中枢神経系の再生過程のアストロサイトにおける *c-Met* の産生とその調節を検討するのに適したものと考えられる。もちろん、アストロサイトは *in vivo* では *in vitro* とは異なった活動をするが、これら活性化されたアストロサイトは、分泌性因子に対

するアストロサイトの反応を検討するに有用であると考えられる。本研究において、分泌性因子は、アストロサイトにおける NGF および他の神経栄養因子の産生を最大限引き出すと考えられる濃度で使用した¹⁸⁻²⁰⁾。HGF は、培養肝細胞における DNA 合成を刺激する至適濃度で使用した^{6,7)}。

これまでに *c-Met* には種々の isoform が報告されている。主に産生されるのは、50 kD の α subunit と 145 kD の β subunit からなる 190 kD isoform である²⁵⁾。この isoform は 170 kD immature protein (prepro *c-Met* protein) から glycosylation と proteolytic cleavage により産生される²⁶⁾。もうひとつの 170 kD isoform は alternative splicing により産生され、これは細胞外ドメインに 18 アミノ酸が付加されている²⁷⁾。一方、カルボキシ側を欠いた 130 と 140 kD isoform も産生され、これは細胞内チロシンキナーゼドメインを欠く²⁸⁾。190 と 140 と alternative splicing により産生された 170 kD isoform は細胞膜上に存在し²⁵⁻²⁸⁾、前駆体 170 kD isoform は細胞質内に存在し²⁶⁾、130 kD isoform は可溶性である²⁸⁾。

本研究で使用した rabbit polyclonal anti-mouse *c-Met* antibody は、マウス *Met* 蛋白のカルボキシ末の 28 個のペプチドに対する抗体である²⁹⁾。それゆえ、この抗体は 190 kD isoform の 145 kD β subunit または alternative splicing により産生された 170 kD isoform および細胞質内に局在する前駆体 170 kD isoform を検出できるが、カルボキシ末を欠く 130 および 140 kD isoform は検出できない。

免疫蛍光二重染色により、培養アストロサイトにおける *c-Met* の染色パターンは種々の分泌性因子により影

響を受けないことが示され、検出された c-Met の細胞内局在は分泌性因子の影響を受けないのではないかと考えられた。検出された c-Met は、細胞膜上の 190 kD isoform の 145 kD β subunit または alternative splicing により産生された 170 kD isoform および細胞質内に局在する前駆体 170 kD isoform の可能性がある。今後、細胞外ドメインの違いを認識する抗体を使った免疫染色や、細胞内局在について、共焦点レーザー蛍光顕微鏡等を用いた厳密な解析を行うなどの検討を要する。

Western blot 法により、検出された 170 kD isoform は、細胞質内に局在する前駆体 170 kD isoform もしくは alternative splicing により産生された 170 kD isoform の可能性がある。これらを区別するには、細胞外ドメインの違いを認識する抗体を使った免疫染色や Western blotting を行うなど、今後の検討を要する。

本研究において、培養アストロサイトにおける c-Met の 170 kD isoform の産生が aFGF, bFGF により増強されることが示された。また、c-met mRNA の産生も aFGF, bFGF により増強されることが示された。産生が増強された 170 kD isoform が前駆体蛋白であると仮定すると、活性化されたアストロサイトにおいて、分泌性因子は c-met mRNA および c-Met 蛋白の産生を増加させ、HGF に対する反応性を up-regulate する可能性が考えられる。

HGF は c-Met のチロシンリン酸化を刺激し⁵⁾、c-Met の下流のシグナル伝達を刺激し³⁰⁾、種々の細胞への作用を発現することが知られている。組織損傷時に放出されることが知られている炎症性サイトカインである IL-1 α , IL-6, TNF- α や TGF- β 1, EGF, HGF, ステロイドホルモンが、human carcinoma cell lines における 8 kb c-met mRNA の産生レベルに著しく影響することが報告されている³¹⁾。また、c-met 遺伝子が血清、HGF や TPA により誘導され、その誘導は転写レベルであることが報告されている³²⁾。

詳細な分子機構は未だ明らかではないが、HGF は、産生が増強された c-Met を刺激し、シグナル伝達経路を活性化させることにより、活性化アストロサイトによる神経栄養効果が増強する可能性が考えられる。今後、シグナル伝達経路に関して、詳細な検討が必要とされる。

別の分子機構も推測されている。座骨神経の損傷後に Schwann 細胞が c-Met を産生していることが免疫組織化学的分析で認められたという報告がなされている³³⁾。この報告では、座骨神経損傷後の c-Met の産生の増強は、座骨神経損傷部位遠位部の Schwann 細胞表面における HGF の濃度を上げるメカニズムであり、recruit

された HGF は Schwann 細胞に作用せず、直接ニューロンに作用し神経再生を促進するのではないかと推測している。しかしながら、中枢神経系でも同様のメカニズムがアストロサイトとニューロンの間に存在するかは明らかでない。

HGF と c-met の mRNA の産生が胎生期、発達期、成体の脳に認められ、HGF が神経栄養因子として中枢神経系の発達および再生過程に関与する可能性が報告されている^{23, 34, 35)}。また、HGF と c-Met の産生がラット海馬のニューロンに認められたが、HGF が autocrine か paracrine に作用するかは不明である¹⁰⁾。一方、HGF と c-Met の産生が astrocytoma に認められ、autocrine loop が、腫瘍形成と浸潤、転移、増殖に関与しているのではないかと報告がなされている^{14, 16, 17, 22)}。

HGF は培養アストロサイトにおける c-met mRNA と c-Met 蛋白の産生に対して対立する反応を引き起こした。HGF も c-met mRNA の産生を増強し、c-Met 蛋白の産生を増強し、HGF はさらに c-Met を刺激するのかもしれない。HGF mRNA の産生は分泌性因子により影響を受けなかったが、HGF は活性化されたアストロサイトにおいて autocrine により作用する可能性が考えられる。その後、HGF は negative feedback により c-Met の合成を抑制する可能性が考えられる。なぜなら、本研究において、外因性の HGF の刺激後 3 時間においては mRNA の産生は増強するが、6 時間～28 時間後には元のレベルまで低下し、その後 48 時間後には蛋白レベルで mature な c-Met 190 kD isoform の産生量に変化はないものの、c-Met の前駆体の可能性のある 170 kD isoform の産生が減弱しており、これらの変化は、RT-PCR は初期の転写の増強を、Western blotting は後期の蛋白合成の抑制を見ている可能性があるからである。この可能性については、Western blotting, RT-PCR により分泌性因子刺激後 3 時間～48 時間での mRNA および蛋白双方の産生量を調べるなど、今後の検討を要する。

以上、培養アストロサイトにおいて c-Met の産生が認められた。c-Met は、分泌性因子により産生の調節を受けることにより、HGF に対する反応性を up-regulate される可能性があることが示唆された。HGF により c-Met のシグナル伝達経路が活性化されることで、アストロサイトの持つ神経栄養効果が増強する可能性があり、c-Met が中枢神経系の再生過程に関与していることが示唆された。

総括

中枢神経系の再生過程における c-Met の役割を明らかにするために、脳損傷時に損傷部位に供給される FGF, IL-1 β , TNF- α などの種々の分泌性因子にて刺激した培養アストロサイトにおける c-Met の産生を、免疫蛍光二重染色, Western blot 法, RT-PCR にて検討した。培養アストロサイトにおける c-Met および *c-met* mRNA の産生量を指標とし、上記の分泌性因子による影響を検討することにより、以下の結果を得た。

1. 免疫蛍光二重染色による検討により、培養アストロサイトにおいて c-Met の産生が認められた。c-Met の染色パターンは分泌性因子により影響を受けないことが示唆された³⁶⁾。今後、細胞内局在について共焦点レーザー蛍光顕微鏡等を用いた緻密な解析を進める予定である。

2. Western blot 法による検討により、培養アストロサイトにおける c-Met の産生が明らかにされた。また、培養アストロサイトは 145 および 170 kD isoform の c-Met を産生していることが明らかにされた。170 kD isoform の産生は aFGF, bFGF により有意に増強され、HGF により有意に減弱されることが認められたが³⁶⁾、145 kD isoform の産生は分泌性因子により有意な変化を示さなかった。Western blot 法の結果より、分泌性因子により産生の調節を受けた 170 kD isoform が、細胞質内に局在する前駆体 170 kD isoform もしくは alternative splicing により産生された 170 kD isoform であるかについては、細胞外ドメインの違いを認識する抗体を使った免疫染色や Western blotting により今後の検討を行う予定である。

3. RT-PCR による検討により、培養アストロサイトにおける *c-met* mRNA の産生が明らかにされた。aFGF, bFGF, HGF は *c-met* mRNA の産生を有意に増強させた。c-met mRNA の産生量は aFGF, bFGF, HGF の刺激後 3 時間で最大になることが観察された³⁶⁾。

4. RT-PCR による検討により、培養アストロサイトにおける HGF mRNA の産生も明らかにされた³⁶⁾。HGF mRNA の産生量は分泌性因子により影響を受けなかった。

以上、培養アストロサイトにおいて c-Met の産生が認められた。c-Met は、分泌性因子により産生の調節を受けることにより、HGF に対する反応性を up-regulate される可能性があることが示唆された。HGF により c-Met のシグナル伝達経路が活性化されること

で、アストロサイトの持つ神経栄養効果が増強する可能性があり、c-Met が中枢神経系の再生過程に関与していることが示唆された。

謝辞

稿を終えるに当たり、本研究に終始懇篤なるご指導、ご高聞を賜りました慶應義塾大学医学部外科学教室河瀬斌教授に深甚なる謝意を表します。また本研究を直接ご指導いただきました吉田一成講師に深謝いたします。さらに多大なご協力をいただきました脳神経外科研究室の諸先生方に感謝いたします。

本研究の一部は文部省科学研究費補助金(基盤研究(C)(2)(No. 08671615)、奨励研究(A)(No. 10770691))の援助を受けた。

文献

- 1) Cooper CS, Park M, Blair DG, Tainsky MA, Huebner K, Croce CM, Vande Woude GF : Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* 311 : 29-33, 1984
- 2) Cooper CS, Tempest PR, Beckman MP, Heldin CH, Brookes P : Amplification and overexpression of the met gene in spontaneously transformed NIH3T3 mouse fibroblasts. *EMBO J* 5 : 2623-2628, 1986
- 3) Park M, Dean M, Cooper CS, Schmidt M, O'Brien SJ, Blair DG, Vande Woude GF : Mechanism of met oncogene activation. *Cell* 45 : 895-904, 1986
- 4) Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiećik TE, Vande Woude GF, Aaronson SA : Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the *c-met* proto-oncogene product. *Science* 251 : 802-804, 1991
- 5) Naldini L, Vigna E, Narsimhan RP, Gaudino G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, Comoglio PM : Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene* 6 : 501-504, 1991
- 6) Gohda E, Tsubouchi H, Nakayama H, Hirono S, Sakiyama O, Takahashi K, Miyazaki H, Hashimoto S, Daikuhara Y : Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure. *J Clin Invest* 81 : 414-419, 1988
- 7) Nakamura T, Nawa K, Ichihara A, Kaise N, Nishino T : Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets. *FEBS Lett* 224 : 311-316, 1987
- 8) Rubin JS, Bottaro DP, Aaronson SA : Hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, the *c-met* proto-oncogene product. *Biochim Biophys Acta* 1155 : 357-371, 1993

- 9) Di Renzo MF, Bertolotto A, Olivero M, Putzolu P, Crepaldi T, Schiffer D, Pagni CA, Comoglio PM : Selective expression of the Met/HGF receptor in human central nervous system microglia. *Oncogene* 8 : 219-222, 1993
- 10) Honda S, Kagoshima M, Wanaka A, Tohyama M, Matsumoto K, Nakamura T : Localization and functional coupling of HGF and c-Met/HGF receptor in rat brain : implication as neurotrophic factor. *Brain Res Mol Brain Res* 32 : 197-210, 1995
- 11) Yamada T, Tsubouchi H, Daikuhara Y, Prat M, Comoglio PM, McGeer PL, McGeer EG : Immunohistochemistry with antibodies to hepatocyte growth factor and its receptor protein (c-MET) in human brain tissues. *Brain Res* 637 : 308-312, 1994
- 12) Yamagata T, Muroya K, Mukasa T, Igarashi H, Momoi M, Tsukahara T, Arahata K, Kumagai H, Momoi T : Hepatocyte growth factor specifically expressed in microglia activated Ras in the neurons, similar to the action of neurotrophic factors. *Biochem Biophys Res Commun* 210 : 231-237, 1995
- 13) Hirose Y, Kojima M, Sagoh M, Murakami H, Yoshida K, Shimazaki K, Kawase T : Immunohistochemical examination of c-Met protein expression in astrocytic tumors. *Acta Neuropathol (Berl)* 95 : 345-351, 1998
- 14) Nabeshima K, Shimao Y, Sato S, Kataoka H, Moriyama T, Kawano H, Wakisaka S, Koono M : Expression of c-Met correlates with grade of malignancy in human astrocytic tumours : an immunohistochemical study. *Histopathology* 31 : 436-443, 1997
- 15) Koochekpour S, Jeffers M, Rulong S, Taylor G, Klineberg E, Hudson EA, Resau JH, Vande Woude GF : Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. *Cancer Res* 57 : 5391-5398, 1997
- 16) Moriyama T, Kataoka H, Tsubouchi H, Koono M : Concomitant expression of hepatocyte growth factor (HGF), HGF activator and c-met genes in human glioma cells *in vitro*. *FEBS Lett* 372 : 78-82, 1995
- 17) Yamamoto S, Wakimoto H, Aoyagi M, Hirakawa K, Hamada H : Modulation of motility and proliferation of glioma cells by hepatocyte growth factor. *Jpn J Cancer Res* 88 : 564-577, 1997
- 18) Kamiguchi H, Yoshida K, Sagoh M, Sasaki H, Inaba M, Wakamoto H, Otani M, Toya S : Release of ciliary neurotrophic factor from cultured astrocytes and its modulation by cytokines. *Neurochem Res* 20 : 1187-1193, 1995
- 19) Kamiguchi H, Yoshida K, Wakamoto H, Inaba M, Sasaki H, Otani M, Toya S : Cytokine-induced selective increase of high-molecular-weight bFGF isoforms and their subcellular kinetics in cultured rat hippocampal astrocytes. *Neurochem Res* 21 : 701-706, 1996
- 20) Yoshida K, Gage FH : Fibroblast growth factors stimulate nerve growth factor synthesis and secretion by astrocytes. *Brain Res* 538 : 118-126, 1991
- 21) Rosen EM, Laterra J, Joseph A, Jin L, Fuchs A, Way D, Witte M, Weinand M, Goldberg ID : Scatter factor expression and regulation in human glial tumors. *Int J Cancer* 67 : 248-255, 1996
- 22) Moriyama T, Kataoka H, Seguchi K, Tsubouchi H, Koono M : Effects of hepatocyte growth factor (HGF) on human glioma cells *in vitro* : HGF acts as a motility factor in glioma cells. *Int J Cancer* 66 : 678-685, 1996
- 23) Jung W, Castren E, Odenthal M, Vande Woude GF, Ishii T, Dienes HP, Lindholm D, Schirmacher P : Expression and functional interaction of hepatocyte growth factor-scatter factor and its receptor c-met in mammalian brain. *J Cell Biol* 126 : 485-494, 1994
- 24) Welch WC, Kornblith PL, Michalopoulos GK, Petersen BE, Beedle A, Gollin SM, Goldfarb RH : Hepatocyte growth factor (HGF) and receptor (c-met) in normal and malignant astrocytic cells. *Anticancer Res* 19 : 1635-1640, 1999
- 25) Tempest PR, Stratton MR, Cooper CS : Structure of the met protein and variation of met protein kinase activity among human tumour cell lines. *Br J Cancer* 58 : 3-7, 1988
- 26) Giordano S, Di Renzo MF, Narsimhan RP, Cooper CS, Rosa C, Comoglio PM : Biosynthesis of the protein encoded by the c-met proto-oncogene. *Oncogene* 4 : 1383-1388, 1989
- 27) Rodrigues GA, Naujokas MA, Park M : Alternative splicing generates isoforms of the met receptor tyrosine kinase which undergo differential processing. *Mol Cell Biol* 11 : 2962-2970, 1991
- 28) Prat M, Crepaldi T, Gandino L, Giordano S, Longati P, Comoglio P : C-terminal truncated forms of Met, the hepatocyte growth factor receptor. *Mol Cell Biol* 11 : 5954-5962, 1991
- 29) Rong S, Bodescot M, Blair D, Dunn J, Nakamura T, Mizuno K, Park M, Chan A, Aaronson S, Vande Woude GF : Tumorigenicity of the met proto-oncogene and the gene for hepatocyte growth factor. *Mol Cell Biol* 12 : 5152-5158, 1992
- 30) Faletto DL, Kaplan DR, Halverson DO, Rosen EM, Vande Woude GF : Signal transduction in c-met mediated motogenesis. *Exs* 65 : 107-130, 1993
- 31) Moghul A, Lin L, Beedle A, Kanbour-Shakir A, DeFrances MC, Liu Y, Zarnegar R : Modulation of c-MET proto-oncogene (HGF receptor) mRNA abundance by cytokines and hormones : evidence for rapid decay of the 8 kb c-MET transcript. *Oncogene* 9 : 2045-2052, 1994
- 32) Boccaccio C, Gaudino G, Gambarotta G, Galimi F, Comoglio PM : Hepatocyte growth factor (HGF) receptor expression is inducible and is part of the delayed-early response to HGF. *J Biol Chem* 269 :

12846-12851, 1994

- 33) Hashimoto N, Yamanaka H, Fukuoka T, Dai Y, Obata K, Mashimo T, Noguchi K : Expression of HGF and cMet in the peripheral nervous system of adult rats following sciatic nerve injury. *Neuroreport* 12 : 1403-1407, 2001
- 34) Sonnenberg E, Meyer D, Weidner KM, Birchmeier C : Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the *c-met* tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J Cell Biol* 123 : 223-

235, 1993

- 35) Thewke DP, Seeds NW : Expression of hepatocyte growth factor/scatter factor, its receptor, *c-met*, and tissue-type plasminogen activator during development of the murine olfactory system. *J Neurosci* 16 : 6933-6944, 1996
- 36) Shimazaki K, Yoshida K, Hirose Y, Ishimori H, Katayama M, Kawase T : Cytokines regulate c-Met expression in cultured astrocytes. *Brain Res* 962 : 105-110, 2003
-