

学 位 論 文 題 名

肝細胞の再生および癌化における肝細胞増殖因子受容体の解析

学位論文内容の要旨

緒言

細胞は外界からのシグナルを細胞膜の受容体で捉え、それを細胞質を介して核へと伝達する。その最も代表的な機構として、細胞増殖因子、神経成長因子、サイトカインによるチロシンキナーゼの活性化を介した細胞の増殖制御機構がよく研究されている。

近年、肝細胞のpotent mitogenとして肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor [HGF])が同定されるとともに、その受容体がc-met前癌遺伝子産物(*Met*蛋白)であることが明らかとなった。*Met*蛋白はチロシンキナーゼ活性をもつ糖蛋白で、170kDaの1本鎖のproreceptorとして生成された後、プロセシングによって50kDaの α 鎖と145kDaの β 鎖からなる二量体となり、細胞膜表面に発現する。 β 鎖は細胞内領域のC末端側にチロシンキナーゼドメインをもち、HGFの増殖刺激を細胞質内の種々の酵素群に伝達する。

c-metの過剰発現は、胃癌、甲状腺癌、大腸癌、肝癌で報告されているが、ヒト肝癌症例の癌部と非癌部を用いた定量的な解析や、肝再生過程における*Met*蛋白の解析は未だ報告がない。さらに、proreceptorからmatureな受容体蛋白に至るプロセシングの過程、およびそれらのチロシンリン酸化を含めた*Met*蛋白動態の詳細は不明である。

本研究では、肝細胞の再生および癌化における*Met*蛋白の動態を明らかにするため、ラット肝部分切除後の肝組織とヒト肝細胞癌手術材料を、抗リン酸化チロシン抗体および抗*Met*抗体を用いたwestern blot法で解析した。

材料および方法

1. 試料採取

1) 肝部分切除後ラット肝組織

雄のWistar系ラット(約260g)を用い、2/3肝部分切除術を施行した。術後0分、30分、1時間、12時間、24時間、5日、7日に肝組織を採取した。RIPA bufferを用いて組織を手動的にhomogenizeし、15,000回転30分遠沈後、上清を採取した。ラットは各時間3匹ずつ計19匹用いた(5日のみn=1)。

2) ヒト肝組織

肝細胞癌の手術症例18例から癌組織及び非癌部肝組織を採取し、前述と同様に蛋白を抽出した。

2. Western blot法

蛋白をSDS-PAGEで分離し、polyvinylidene difluoride membrane (PVDF 膜)に転写した。Membraneを1% ovalbuminあるいは5% skim milkで室温4時間ブロッキングし、1次抗体で室温1時間、あるいは4°C over night incubateした。洗浄後、2次抗体で室温1時間incubateし、ECL immunodetection systemを用いて発色した。

抗リン酸化チロシン抗体には、マウスモノクローナル抗体PY20を用いた。抗*Met*抗体は、*Met*蛋白β鎖C末端のoligopeptideを免疫原とするウサギポリクローナル抗体で、*Met*蛋白β鎖およびproreceptorを特異的に認識する。

2次抗体には、peroxidase標識抗マウスおよびウサギ免疫グロブリン抗体を用いた。

3. レクチン沈降法

受容体などの糖蛋白を選択的に抽出するため、wheat germ lectin (WGL)を用いた。WGLに吸着した蛋白を電気泳動で分離し、PVDF膜に転写し、western blotを行った。

4. ラット肝部分切除後の*Met*蛋白の解析

レクチン沈降で得られた試料をwestern blot法で解析した。検出されたバンドを、画像解析システムを用いて定量化し、0分～7日の時系列群3グループについて経時的变化を検討した。

5. ヒト手術材料の解析

肝細胞癌について、抗リン酸化チロシン抗体および抗*Met*抗体によるwestern blotを行い、検出されたバンドを画像解析システムを用いて定量化し、同一症例の癌部と非癌部について比較検討した。さらに肝炎ウィルスの関与、癌部お

よび非癌部の組織型と、*Met*蛋白の発現量との関連を検討した。

結果

1. 肝部分切除後再生肝細胞における*Met*蛋白の動態

1) *Met*蛋白発現量

Met β鎖の発現量は経時的に減少傾向を示し、肝部分切除後7日で約80%に低下した。proreceptorの発現量は、β鎖より強い減少傾向を示し、7日後約50%に低下した。

2) チロシンリン酸化蛋白

Met β鎖のリン酸化は7日目まではほぼ一定で、proreceptorのリン酸化は術後12時間以後、0分時の20～40%に低下した。

2. ヒト肝細胞癌および非癌部組織における*Met*蛋白

1) *Met*蛋白発現量

Met β鎖(p145β*MET*)と*Met* proreceptor (p160pro*MET*)の発現量を、同一症例の非癌部と癌部について比較すると、p145β*MET*の発現量は非癌部より癌部で多く、p160pro*MET*の発現量は癌部より非癌部で多かった($p < 0.05$)。また、分化度の低い肝細胞癌4例中3例では、非癌部でproreceptorが存在するにもかかわらず癌部ではp145β*MET*の発現が検出されなかった。

2) チロシンリン酸化蛋白

18例中11例(61%)の癌部、および18例中17例(94%)の非癌部において160kDaの位置にバンドが検出された。癌部および非癌部のチロシンリン酸化蛋白量に明らかな差を認めなかった。

考察

ラット肝では、部分切除後1～2時間で、血中HGFは15～17倍に上昇する。また、*in vitro*では、*Met*蛋白はHGF処理後数分でリン酸化する。HiguchiらとTajimaらは、肝細胞膜分画に対するHGFの結合が術後3時間後には60-70%に減少し、7日後に元のレベルの1.7倍に復すると報告し、この結果をHGF受容体のinternalizationに伴うdown-regulationと結論している。今回の実験では、肝再生の過程でβ鎖の発現量およびチロシンリン酸化の経時的变化が軽度であったのに対し、

proreceptorは発現量、チロシンリン酸化ともに術後早期から強い減少傾向を示した。この結果から、*Met*蛋白はHGFと結合してチロシンリン酸化され、膜表面から細胞質へ移動し代謝される一方、プロセシングの亢進によって新たに成熟な*Met*蛋白が供給されるため、proreceptorは減少するが*Met* β鎖は著変を示さないものと推測された。

*Met*のmRNAと蛋白はいずれも上皮性組織由来の悪性腫瘍で発現が高い傾向にあり、癌化に関わる要因のひとつであることが示唆されている。同一症例の癌部と非癌部について、*Met*蛋白の発現を比較したところ、癌部ではp145β*MET*の発現が多く、非癌部ではp160*MET* proreceptorの発現が多かった。この結果から、蛋白質プロセシングの亢進及びそれに伴う成熟な*Met*蛋白の生成は、肝細胞の癌化と密接に関連していることが推測された。

Tsarfatyらは、ヒト乳癌の腺管構造をもつ部分に*Met*蛋白およびチロシンリン酸化蛋白の強い発現がみられ、*Met*蛋白の発現および活性化が、管腔形成に重要であるとしている。今回、管腔構造ないし索状構造に乏しい低分化型の肝細胞癌で、*Met*蛋白の発現低下がみられたことは、Tsarfatyらの結果と一致するものであった。

結語

ヒト肝細胞癌の手術材料およびラット肝部分切除後再生肝を用いて、肝細胞癌および肝再生における肝細胞増殖因子受容体/*Met*蛋白の動態を、western blot法により解析し、次の結果が得られた。

1. ラット肝部分切除後早期にproreceptorの減少傾向がみられた。
2. ヒト手術材料の癌部および非癌部の比較において、*Met*蛋白β鎖は癌部で発現量が多く、*Met*蛋白proreceptorは非癌部で発現量が多かったが、チロシンリン酸化に明らかな差はなかった。
3. 低分化型肝細胞癌では、*Met*蛋白の発現量が低かった。

以上の結果より、肝細胞の癌化および再生には*Met*蛋白proreceptorのプロセシングが重要であること、また*Met*蛋白発現の有無が、分化度に関与していることが、推測された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 野 純 一

副 査 教 授 西 信 三

副 査 教 授 牧 田 章

学 位 論 文 題 名

肝細胞の再生および癌化における肝細胞増殖因子受容体の解析

細胞は、蛋白のリン酸化を介して増殖刺激等の情報を核内に伝達している。その代表的なものとして、チロシンキナーゼの活性化を介した細胞の増殖制御機構がよく研究されている。近年、肝細胞増殖因子hepatocyte growth factor (HGF)の受容体が、c-met前癌遺伝子にcodeされる受容体型のチロシンキナーゼであることが明らかとなった。Met蛋白は、チロシンキナーゼ活性をもつ糖蛋白で、170kDaの1本鎖のproreceptorとして生成された後、プロセッシングによって50kDaの α 鎖と145kDaの β 鎖からなる二量体となり、細胞膜表面に発現する。これまでに胃癌、甲状腺癌、肝細胞癌等、様々な上皮性悪性腫瘍で c-Metの発現が報告されているが、同一症例の癌部と非癌部を用いた定量的な解析や、肝再生過程における Met蛋白の解析はいまだ報告がない。

本研究では、肝再生におけるMet蛋白の動態を明らかにすること、また、肝細胞癌および非癌部肝組織におけるmet蛋白の発現を解析することを目的に、実験的および臨床材料による研究を行った。

材料と方法：

1. 試料採取

1)肝部分切除後ラット肝組織

雄のWistar系ラットを用い、2/3肝部分切除術を施行した。術後0分、30分、1時間、12時間、24時間、5日、7日に肝組織を

採取し、蛋白を抽出した。

2) ヒト肝組織

肝細胞癌の手術症例 18 例から癌組織及び非癌部肝組織を採取し、蛋白を抽出した。

2. Western blot法

蛋白をSDS-PAGEで分離し、polyvinylidene difluoride membrane (PVDF膜)に転写した後1次抗体、2次抗体でincubateし、ECL immunodetection systemを用いて発色した。抗リン酸化チロシン抗体には、マウスモノクローナル抗体PY20を用いた。抗met抗体はmet蛋白β鎖C末端のoligopeptideを免疫原とするウサギポリクローナル抗体で、met蛋白β鎖およびproreceptorを特異的に認識する。2次抗体にはperoxidase標識抗マウスおよびウサギ免疫グロブリン抗体を用いた。

3. レクチン沈降法

受容体などの糖蛋白を選択的に抽出するためwheat germ lectin (WGL)を用い、WGLに吸着した蛋白を電気泳動で分離し、PVDF膜に転写しwestern blotを行った。

4. ラット肝部分切除後のmet蛋白の解析

レクチン沈降でえられた試料をwestern blot法で解析した。検出されたバンドを、画像解析システムを用いて定量化し、0分～7日の時系列群3グループについて経時的変化を検討した。

5. ヒト手術材料の解析

肝細胞癌について、抗リン酸化チロシン抗体および抗Met抗体によるWestern blotを行い、検出されたバンドを画像解析システムを用いて定量化し、同一症例の癌部と非癌部について比較検討した。

結 果：

1. 肝部分切除後再生肝細胞におけるMet蛋白の動態

Met蛋白β鎖は、発現量、リン酸化ともに明らかな変化を示さなかったが、Met proreceptorは発現量、リン酸化いずれも術後早期に減

少傾向を示し、7日後には0分時の40～60%に低下した。

2. ヒト肝細胞癌および非癌部組織におけるMet蛋白の解析

1) Met蛋白発現量

Met β 鎖の発現量は非癌部より癌部で多く、Met proreceptorの発現量は癌部より非癌部で多かった($p < 0.05$)。また、分化度の低い肝細胞癌4例中3例では、癌部でのMet β 鎖の発現が低かった。

2) チロシンリン酸化蛋白

18例中11例(61%)の癌部および18例中17例(94%)の非癌部において160 kDaの位置にバンドが検出されたが、両者のチロシンリン酸化蛋白量に明らかな差を認めなかった。

以上の結果より、肝細胞の癌化および再生にはMet蛋白proreceptorのプロセシングが重要であること、また、Met蛋白の発現が肝細胞癌の分化度に関与していることが推測された。

審査にあたって、牧田教授より肝細胞の癌化に及ぼすHGFの影響について、西教授よりレクチン沈降の際の蛋白定量について、宮崎教授よりウィルスマーカーとMet蛋白の関連の有無などに関して質疑があったが、申請者はおおむね妥当な回答を行った。

本研究は、ラット肝再生過程におけるMet蛋白プロセシングの亢進、および肝細胞癌と非癌部肝組織におけるMet蛋白発現の差を示したものであり、増殖と癌化の両面からMet蛋白の動態を解析した新しい試みとして意義があり、学位授与に値するものと考ええる。