

Title	Expression and phosphorylation of rat c-met/hepatocyte growth factor receptor during rat liver regeneration
Author(s)	堀本, 雅祥
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39036">https://hdl.handle.net/11094/39036</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	ほりもとまさよし 堀本雅祥
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 11783 号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	Expression and phosphorylation of rat c-met/hepatocyte growth factor receptor during rat liver regeneration (ラット肝再生過程における肝細胞増殖因子受容体の発現動態ならびにそのリン酸化)
論文審査委員	(主査) 教授 鎌田 武信  (副査) 教授 門田 守人 教授 祖父江憲治

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

肝細胞増殖因子は *in vivo* における強力な増殖能をはじめとした多彩な生理活性を有するが、肝再生過程における生物活性の発現機序については未だ不明な点が多い。一方、その受容体である肝細胞増殖因子受容体は c-met 遺伝子産物であるチロシンキナーゼ受容体ファミリーの一つであることが知られている。今回、肝再生過程における肝細胞増殖因子による細胞内情報伝達を明らかにするため、四塩化炭素投与によるラット肝再生モデルを用いて、肝細胞増殖因子受容体の発現動態及びそれにより活性化される細胞内情報伝達機構について解析した。

#### 【対象と方法】

動物モデルとしてSD雄性ラット(220-250g)に、四塩化炭素、オリーブオイル当量混合液を体重100gあたり0.5ml経口投与した四塩化炭素投与群(42匹)と、同量のオリーブオイルのみを投与したコントロール群(28匹)とを作製した。投与後0-72時間で経時的に両群より肝を摘出した後、RNA、組織ホモジネート、組織切片を調製した。met mRNAの発現動態を、RT-PCRにより部分クローニングしたcDNAをプローブとしてNorthern blot analysisおよびIn situ hybridizationにて検討した。さらに蛋白質発現動態を検討するために、抗マウスMETポリクローナル抗体、あるいは上述のラットmet cDNA部分塩基配列より予想されるアミノ酸配列を基にした合成ペプチドを免疫して得られた抗ラットMET家兎抗体を用いて、Western blot analysisならびに免疫組織染色を行った。また抗proliferating cell nuclear antigen(PCNA)抗体を用いて各肝細胞におけるDNA合成期を検討し、細胞周期S期に存在する肝細胞を同定した。受容体以後の情報伝達機構については、抗フォスフォチロシン抗体を用いてMET蛋白の自己リン酸化を検討し、さらに受容体のリン酸化チロシンに結合するSH2ドメインを有する細胞内情報伝達物質であるPLC $\gamma$ 、PtdIns 3-kinase、GRB2、rasGAPとの結合を解析するために、抗MET抗体との免疫沈降物をSDS-PAGEで分離した後、それぞれの抗体を用いてWestern blot analysisを行った。

#### 【結果】

抗PCNA抗体による検討から、四塩化炭素投与後肝再生モデルでは投与後24から48時間後にDNA合成のピークがあることが示された。met mRNAの発現は四塩化炭素投与後24時間に正常肝(投与前)に比べ約3倍のピークをもって増強しており、MET蛋白の発現もほぼ同様の時間的経過をもって約2倍のピークを示した。またこれらの発現亢進が認められる時相で、四塩化炭素投与により生ずる障害領域(中心静脈域)の周囲の肝細胞に、met mRNA、

MET 蛋白の発現を認めたが、これら陽性細胞の分布は PCNA 陽性細胞の分布と部位的に一致していた。コントロール群には核酸、蛋白質ともに c-met の発現増強は認められなかった。一方、MET 蛋白の自己磷酸化は肝再生過程の DNA 合成に先行して、四塩化炭素投与後12時間に正常肝に比し約30倍のピークをもって増強していた。更に SH2 領域を持つ細胞内情報伝達物質である PLC $\gamma$ , PtdIns 3-kinase, GRB 2, rasGAP と MET 蛋白との結合は、MET 蛋白の磷酸化の程度に応じて約3-9倍と増強していた。それぞれの情報伝達物質と MET 蛋白との結合は時間的な連続性を有しており、HGF により活性化される情報伝達経路が肝再生過程の時相によって異なることが示唆された。

#### 【総括】

以上より四塩化炭素投与ラット肝再生過程において、HGF 受容体/MET 蛋白は肝小葉内偏倚性をもって発現しており、自己磷酸化を介して種々の細胞内情報伝達物質と時間的規則性をもって結合することで、HGF 刺激を効率よく核へと伝達し肝細胞増殖に貢献していることが明らかになった。

### 論文審査の結果の要旨

肝細胞増殖因子 (HGF) は *in vivo* において強力な増殖能をはじめとした多彩な生物活性を有しているが、肝再生過程における生物活性の発現機序については未だ不明な点が多い。一方、肝細胞増殖因子受容体は c-met 遺伝子産物で、チロシンキナーゼ受容体ファミリーの一つであることが知られている。

本論文では、四塩化炭素障害ラット肝再生過程において、肝細胞増殖因子受容体が肝小葉内で偏倚性をもって発現しており、自己リン酸化を介して種々の細胞内情報伝達物質と時間的規則性をもって結合することで、HGF 刺激を効率よく伝達し肝細胞増殖に貢献している事を明らかにした。

今後、肝硬変、肝不全治療に対する HGF の臨床応用を考慮するうえで、本知見は受容体活性化という観点からの基礎的な論拠を提供するものと期待される。よって本論文は学位に値すると思われる。