

HGFの形質転換能および発癌における
関与についての研究

神 田 浩 明

①

HGFの形質転換能および発癌における関与についての研究

神田浩明

略号

HGF: hepatocyte growth factor

CMV: cytomegalovirus

BGH: bovine growth hormone

SV : Simian Virus 40

NEO: Neomycin resistant gene

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

MNNG: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

LOH: loss of heterozygosity

まとめ

最近、肝細胞増殖因子(HGF)は、さまざまな生理作用をもつことがわかってきた。他方HGFは、癌化においても積極的役割を果たすのではないかと予想されているが、この点に関しては、まだ不明な点が多い。我々は、不死化しているが、ヌードマウス移殖性や、軟寒天培地増殖性を示さない細胞株(MLE-10)に、HGF遺伝子を導入することにより、はじめてこの因子の形質転換能を証明することに成功した。HGFを強制発現させるため、サイトメガロウイルスのプロモーター領域の下流にラットHGF遺伝子をつないだプラスミドを作成し、ネオマイシン耐性遺伝子とともにリン酸カルシウム法で、MLE-10にHGFを遺伝子導入した。導入細胞をG418選択培地で培養の後、形成されたコロニーをステンスシリンジでクローニングした。導入HGF遺伝子の組み込みと発現を確認した後、5株の細胞株を樹立した(MLE-10-HGF-1~5)。ベクターだけを遺伝子導入して、同様に3株を樹立した(MLE-10-CMV-1~3)。MLE-10-HGFはすべて、MLE-10-CMVやMLE-10より増殖がはやく、かつ、軟寒天培地にコロニーを形成した。このコロニーは、HGFの産生量にほぼ比例した大きさで、かつ、培地中に抗HGF抗体を添加することにより形成が阻害された。MLE-10-CMVとMLE-10は、軟寒天培地にコロニーを形成しないが、外来性にHGFを添加することにより、コロニー形成がみられた。もっともHGFの産生の多かった二つの系(MLE-10-HGF-4&5)は、接種後2週間でヌードマウスの皮下に腫瘍を形成した。その組織像は、肝細胞癌であった。また、MLE-10も、また他の細胞も、ノーザンブロットで、HGF受容体遺伝子(HGFR/met)の高い発現がみられ、^[125I]レセプター結合アッセイでもHGFの高親和性受容体が細胞膜に高い発現を示していることが確認された。HGFの産生量と、軟寒天培地増殖性及びヌードマウス移殖性の間に関連のみられたこと、また、MLE-10がHGF受容体を高発現していることから、HGFのオートクライン機構による形質転換能が証明された。

序論

個体の発生、成長、活動、老化といった生命活動において、細胞増殖因子およびその受容体が重要な働きをしていることが、次第に明らかになってきた。他方、細胞増殖因子とその受容体が、オートクリンループをつくることにより、発癌に関与することが示されてきた(1)。現に、食道、胃、大腸といった消化管において、Epidermal Growth Factor (EGF)、Insulin-like Growth Factor(IGF)、Transforming Growth Factor- β (TGF- β)などが、マルチオートクリンループを作って発癌に関与していることも示されている(2)。肝細胞増殖因子(HGF)は、当初、肝細胞の増殖を特異的に促進する液性因子として部分肝切除後のラット血漿中(3)(4)や、劇症肝炎患者血漿中(5)(6)(7)より、その蛋白が精製された。さらに、1989年になり、中村ら、喜多村らのグループにより、ヒトHGFcDNAがクローニングされた(8)(9)。この蛋白は、728アミノ酸よりなる一本鎖の前駆体蛋白として合成されたのち、分泌蛋白に特有なN末端の31残基のシグナル配列が切断され、ついで、Arg₄₉₄とVal₄₉₅の間で再度切断されて、特徴的な4個のクリングル構造を持つ69キログルトンの α 鎖と直鎖状の34キログルトンの β 鎖よりなるヘテロダイマーの成熟分子となる。これはおおよそ82-84キログルトンである。クリングル構造を持つ蛋白は、プラスミノゲンなどが知られていたが、増殖因子でこの構造を持つものは、HGFに於いてが初めての発見であった。HGFは、プラスミノゲンとは、38%のホモロジーを持つ(10)(11)。HGFが受容体に結合する部分は、第1と第2のクリングル構造であると推定されている。ただし、第3以下のクリングルを欠くものは、結合活性が弱い。さらに、受容体からのシグナル伝達には、 β 鎖が不可欠であることもわかってきた。また、最近、HGFの変異蛋白が、数種発見された。これらは、成熟したHGFより、数アミノ酸から、数十アミノ酸が欠失、変異したものである。胃癌でこのような変異体の発現がみられ、発がんにおいて、癌細胞の機能や形態の多様性に関与しているのではないかと推定されている(田原ら、私信)。また、HGFとファミリーをつくる増殖因子として、マクロファージの増殖を促進する、Macrophage Stimulating Factorがクローニングされた。これは、HGFとアミノ酸で、50%の相同性を持つ(12)。

HGFの作用は、当初、肝細胞の増殖促進に限局すると考えられていたが、その後、これが肝細胞だけでなく、腎尿管上皮細胞、皮膚ケラチノサイト、メラノサイトなど広い範囲の細胞の増殖も促進すること(13)、また、増殖促進作用のほかに、上皮細胞の運動促進作用(14)、形態形成を促進する作用(15)(16)、ある種の癌の増殖を抑制する作用(17)(18)といった多様の作用があることがわかってきた(10)(11)。一方で、1991年になり、HGFの高親和性レセプターがc-metプロトオンコジーンそのものであることもわかった(19)。現在

までのところ、ヘパリン、ヘパランサルフェート、プロテオグリカンといった非特異的、低親和性の受容体を別にすれば、高親和性でHGFに結合するのはc-metのみであると考えられている(12)。

c-metは、チロシンキナーゼをコードする受容体で、50キロダルトンの α 鎖と145キロダルトンの β 鎖からなるヘテロダイマーよりなる(20)。このうち、 β 鎖では、膜を貫通し、C端に、チロシンキナーゼドメインがある。この遺伝子は、当初、NIH3T3細胞を形質転換させる癌遺伝子として単離された。後にこのとき見つかった遺伝子は、キメラ遺伝子であることがわかったが、プロトオンコジーン自体も、ひろく主として上皮系の細胞で発現がみられ、かつ培養細胞でしばしば遺伝子増幅や発現増強がある(21)。また、c-metプロトオンコジーンも、遺伝子導入により、その発現を増強させると、NIH3T3細胞を形質転換させることがわかってきた。他方HGFとc-metの遺伝子座が7q21(22)(23)と7q31(20)に近いこと、HGFが、血球系細胞や間質系細胞だけでなく、肺などの上皮系細胞でも発現がみられることから、HGFについても、c-metの相互作用によるオートクリン機構が発癌に関与する可能性が考えられる。しかし、NIH3T3等の線維芽細胞を用いたトランスフェクション実験では、HGFを発現させても形質転換をおこすことはできなかった(関西医大、上原より私信及び自験)。我々は、癌研の李らが開発したマウスの不死化肝細胞系を用いて、初めてHGFの形質転換作用の証明に成功した。

材料と方法および陰性対照

マウスの不死化肝細胞系

これらは、李らによって樹立された。C3Hマウスは、自然発生肝癌が多発し、また、癌原物質に対する感受性も高いことが知られている。8週令の雄のC3Hマウスから門脈灌流法で肝細胞を分離し、そのままプレートの上で培養を続けると、約3カ月でコロニーを形成する。このコロニーをステンレスシリンジを使ってクローニングを繰り返し、培養を続けることにより、15系統の細胞株(MLE-1~15)を樹立することが出来た(24)。これらの多くは、ヌードマウスの皮下に腫瘍を作らず、また、軟寒天培地での増殖性もない。in vivoのマウス肝がんを高頻度に変異が見つかった活性c-H-ras遺伝子を導入すると、可移植性になり、その組織像は、肝細胞癌である(25)(26)。これらの株のうち、アルブミンとアルファフェトプロテインの産生がみられ、軟寒天培地増殖性及びヌードマウス移植性のないことが繰り返したしめられている株(MLE-10)を実験に用いた。

導入した遺伝子

ラットfull length HGF cDNAは、pBS-rat(27) (大阪大学医学部 中村敏一教授より供与をうけた。)より、XbaI-BamHI site で切り出した。この断片を、サイトメガロウイルスのプロモーターを持つ真核細胞発現ベクター(pRc/CMV : Invitrogenより購入)のXbaI-ApaI site に挿入し、HGFをサイトメガロウイルスのプロモーターのコントロール下に発現させる新しいプラスミド(図1:RC/CMV-HGF)を作成した。このさい、インサート側の BamHI siteと、ベクター側のApaI siteは、Blunting kit (Amershamより購入)を用いて平滑化し、両者を連結した。このプラスミドはまた、SV40初期プロモーターの制御下に働くネオマイシン耐性遺伝子を有しており、G418選択培地での選択が可能になっている。陰性対照としては、HGFを挿入していないpRc/CMVを用いた。

形質転換実験

Rc/CMV-HGF またはpRc/CMV をMLE-10に遺伝子導入した。遺伝子導入法は、李らの方法にほぼ従った(25)。遺伝子導入の前日、 5.0×10^6 個の細胞を6.0cm dishにまいた。これらは、Waymouth培地(Flow, Irvine, UK)に10%牛胎児血清(Cell Culture Laboratory, Cleveland, OH, USA)を加えた培地で培養した。3.0 μ gのRc/CMV-HGFまたは、pRc/CMVを7.0 μ g のサケ精子DNAとともに磷酸カルシウム法でMLE-10に遺伝子導入した。3日後より培地をG418 選択培地(G418 200mg/ml, net. Geneticin(G418))は

GIBCOより購入した。)に代えて培養を続けた。約2週間後より、dish内に、G418耐性細胞のコロニーが出現し始めた。最大のコロニーが、径約8mmになった頃、できたコロニーをステンレスシリンジで、クローニングした。

サザンブロット

細胞、または組織より、SDS-Proteinase K法を用いてDNAを抽出した(25)。10 μ gのDNAを50unitのBamHI(Toyoboより購入)で切断後、電気泳動し、ナイロンメンブレン(Hybond N+, アマシャムより購入)に転写した。マルチプライム法(マルチプライムラベリングキット、アマシャムより購入)で、ラット HGFプロローブをラベルし、ハイブリダイズ、洗浄の後、X線フィルム(XAR-5, 富士フィルム)に暴露した。

ノザンブロット

細胞より、Chomczynski & Sacchiの方法に従って、total RNAを抽出した(28)。Oligo-dT latex法(Oligotex, Rocheより購入)により、poly-A tail RNAを選択した(29)。10 μ gのtotal RNAまたは、1 μ gのpoly-A RNAをホルムアミド変性ゲルを用い電気泳動し、ナイロンメンブレン(Dulalon-UV, Stratageneより購入)に転写した。これらに、rat HGF, chicken GAPDHまたは、mouse HGFR/met遺伝子をハイブリダイズさせた。プローブラベル、X線フィルムへの暴露は、サザンブロットと同様に行った。

増殖曲線

約 2.0×10^5 個の細胞を35mm径の培養皿にまき込んだ。まき込みから、2、24、48、72、96時間後に、トリプシン処理により、細胞をはがし、血球計算板で数を計測した。1つの細胞株に対し、各計測時に、3枚ずつ用意し、1枚を3回計測した。

ヌードマウス移植性

約 1.0×10^7 個の細胞をヌードマウス(CD-1(ICR)nu/nu, 雄, チャールズリバージャパンより購入)の皮下に移殖した。外表より、1週間に1度ずつ腫瘍の形成を観察した。形成された腫瘍は、一部より、DNA, RNAを抽出し、残りは、ホルマリン固定、パラフィン包埋の後、ヘマトキシリン-エオジン染色を施行し、鏡検した。

軟寒天培地増殖性

約 1.0×10^4 個の細胞を1.5mlの0.33%アガロース(Seaplaque, FMC Bioproducts,

Rockland, ME, USA)加メEDIUMに懸濁し、60mm dish上で、5mlの0.5%アガロース加メEDIUMに重層した。

抗HGF抗体の吸収は、100 μ gの抗ラットIgG抗体（大阪大学、中村敏一教授供与）を、100ngのリコンビナントラットHGF（大阪大学、中村敏一教授供与）と37 $^{\circ}$ C、3時間インキュベートして行った。リコンビナントヒトHGF(50 μ g/ml)、抗ラットHGF抗体(50 μ g/ml)または吸収抗体(10 μ g/ml)を加えたdishと、何も加えないdishを、4週間にわたり培養し、コロニーの形成を顕微鏡下に観察した。

マウスHGFR/met cDNA遺伝子断片のクローニング

方法は、渡邊らの方法に従った(30)。モロニー白血病ウイルスの逆転写酵素(BRL)を用いてNIH3T3細胞のcDNAライブラリーを作成した。このライブラリーをテンプレートにして、公表された配列(31);EMBL/GenBankY00671)をもとにした、下記のプライマーを用いて、PCRを施行した。406bpの増幅断片は、pUC19にサブクローンの後、数種の制限酵素で切断し、確認した。

Sence :GCAGTGACGAGTATCGACAGAGTT

Antisense:ACGCACACATTGATTGTGGACCAG

ELISAアッセイ

これは、大阪大学医学部、中村敏一教授に依頼した。

ELISAは以下のごとく行った。抗ラットHGFニワトリ抗体をディッシュ上に37 $^{\circ}$ C、一晚インキュベートし、固相化した。抗ラットHGFラビット抗体を二次抗体とし、各細胞の培養上清(WaymouthメEDIUM+1%ウシ血清アルブミン中で24時間培養)と37 $^{\circ}$ C、1時間、incubateした。洗浄の後、ブタ抗ラビットIg抗体-ペルオキシダーゼコンジュゲート(DAKO, P217)を加え、さらに37 $^{\circ}$ C、1時間インキュベートした。3mg/ml OPDで発色の後、OD₄₉₀₋₆₅₅を測定し、標準曲線より値を求めた。

[125] HGFレセプター結合アッセイ

これは、大阪大学医学部、中村敏一教授に依頼した。概要は、Higuchiらの方法に従った(32)。ヒト、リコンビナントHGFは、ヒトcDNAを遺伝子導入したCHO細胞の上清から抽出した(8)。このリコンビナントHGFをchloramine-T法でヨードラベルし、70-160 μ Ci/ μ g蛋白の活性を得た。24ウエルプレートに巻き込んだ細胞が、ほぼコンフルエントに達すると、ディッシュをbinding buffer (ハックス液+20mM HEPES,

2mg/mlウシ血清アルブミンPH7.0)で洗った後、10℃、30分間平衡化した。段階的濃度の $[^{125}\text{I}]$ HGFを加え、10℃、1時間インキュベートした。この際、一部のディッシュには過剰の非ラベルHGFを加えた。活性は、ガンマカウンターで測定した。

スキッターアッセイ

これは、大阪大学医学部、中村敏一教授に依頼した。概要はKonishiらの方法に従った(33)。細胞は、 4.0×10^4 細胞ずつ6ウエルディッシュ(Corning)に植えこんだ。細胞が壁着の後、2ng/mlのヒトHGFを添加し、0.2%クリスタルヴァイオレット、0.1Mクエン酸を加え、培養、観察をつづけた。

結果

遺伝子導入細胞の樹立

遺伝子導入後、約1月で形成された多数のコロニーからステンレスシリンジを用いてサブクローニングした。これらから独立に、DNAおよびRNAを抽出し、サザンおよびノザンプロットを施行した(後述)。導入HGFの組込みがあり、ノーザンプロットで発現が確認できた5株をMLE-10-HGF-1~5として樹立した。同様にベクターのみを遺伝子導入したもから、3株(MLE-10-CMV-1~3)を樹立した。これらの形質転換細胞系およびもとのMLE-10の性格を検討し比較した(後述)。それらの結果は、表にまとめた(表1)。

外来性HGFの組み込み

サザンプロットでマウスのHGF genomic DNAは、BamHI切断で約20kbp, 9.0kbp, 4.0kbp の3本のバンドとして検出される。外来性にHGFを導入した細胞(MLE-10-HGF-1~5)は、これ以外に、約2.6kbpのバンドが検出された。さらに、MLE-10-HGF-1には、他のバンドが約6本検出された。これは、こわれた遺伝子が導入されたものと考えられた(図2)。

外来性HGFの発現

HGFの発現は、ノーザンプロットおよびELISAで確認した。MLE-10および、MLE-10-CMV-1~3は、ノザンプロットでHGFのバンドが検出されず(図3)、培養液中のHGFをELISAで検索すると全くHGFの産生が見られない(表1)。他方MLE-10-HGF-1~5では0.22-0.69ng/10⁶cells/24hと様々な濃度で産生が見られかつ、ノザンプロットでもバンドが検出された。ノザンプロットのパンドの濃さと、ELISAにおけるHGFの産生量は、必ずしも一致しなかった。これは、translationの段階での効率に差があったからと思われる。

増殖曲線

図4に増殖曲線を示した。MLE-10-HGF-1~5は、MLE-10, MLE-CMV-1~3より増殖が盛んであった。MLE-10-HGF-1~5の中では、増殖の早さと、HGFの産生量は比例しなかった。

軟寒天培地増殖性

結果は、表1と2にまとめた。MLE-10-HGF-1~5は、全て軟寒天培地にコロニーをつくり、その大きさと数は、HGFの産生量にほぼ比例した。MLE-10、MLE-10-CMV-1~3では、コロニー形成はみられなかった。抗HGF抗体の添加により、MLE-10-HGF-5のコロニー形成は、著明に減弱したが、この作用は、吸収抗体では減弱した。さらに、MLE-10も、HGF添加により、コロニー形成が見られた。

ヌードマウス可移植性

MLE-10-HGF-1~5のうち、HGFの産生の高い2株(MLE-10-HGF-4&5)のみが腫瘍を形成した。その増殖性は極めて強いもので2週間で1cm大になった。これは、活性化ras遺伝子により形質転換したものとほぼ同一である(26)。組織像は、索状パターン、腺管形成パターンおよび紡錘型細胞肉腫様パターンの混在する肝細胞癌である(図5)。この組織像を、以前に、活性化ras遺伝子により形質転換させたMLE-10細胞が作った組織と比較すると、類似性が目立ち、HGFに特徴的な像は見いだせなかった。HGFはscattering effectをもつ(14)ため、転移能が注目されるが、6カ月の観察においても、遠隔転移は見いだされなかった。

レセプターアッセイ

MLE-10も、それから誘導された細胞系も、全て¹²⁵I-HGF結合アッセイで、高親和性レセプターを、ラット初代培養肝細胞と同程度に強く発現していた(660-1200sites/cell)。c-metの発現をノザンプロットでみると、MLE-10はNIH3T3の数倍の強さであった(図6)。また、後述するMNNG-HOS細胞では、形質転換の前後においてc-metの構造変換が起こっていることが知られている(34)が、今回の実験系では、遺伝子導入の前後でc-met遺伝子の発現の強さや転写の大きさともに変化はなかった(図7)。

スキッターアッセイ

HGFのScatter効果については、MLE-10細胞は、もともとコロニーを作って増殖するが、培養上清中に2ng/mlの濃度にHGFを加えると、ばらばらになって増殖するようになる(図8a,b)。遺伝子導入により、HGFを高濃度に産生するようになった細胞は、もともとばらばらになって増殖し、外来性にHGFを添加してもそれはさらに亢進はしない(図8c,d)。

考察

本研究では、1)HGFの遺伝子導入により、*in vitro*での細胞の増殖が亢進し、*in vivo*でも、HGF産生量の多くなったMLE-10-HGF-4と5がヌードマウスに腫瘍をつくること、2)MLE-10-HGF-1~5すべてが軟寒天培地で増殖し、コロニーの大きさとHGF産生量がほぼ比例し、それは抗HGF抗体により抑制されること、3)MLE-10細胞は、初代培養肝細胞と同じくらい強くHGF受容体を発現しており、4)c-met遺伝子についてはNIH3T3細胞の数倍も強く発現していること、また、5)MLE-10細胞は、HGFによる分散活性も保っていたことが明らかになった。これらより導き出される結論として、HGFが肝細胞で強く発現されたときは形質転換を生じること、その際c-metとの協調によるオートクリンのメカニズムが作用していることが強く示唆された。つまり、HGFが強く発現されている場合にMLE-10細胞は形質転換を起こすことが証明された。HGFの発癌における関与についての知見の集積がおこなわれつつあるが、現在までのところ、確定的な見解は出されていない。以下に、現在までのHGFの発癌への関与についての知見を述べ、考察したい。

HGFの癌細胞増殖に対する作用

HGFは、初代培養のケラチノサイト、メラノサイト、肝細胞などに対し、強い増殖促進作用がある(13)。しかしHGFの癌細胞に対する作用は様々であり、一見相反する所見もみられている。宮崎らは、5種の肝癌および肝芽腫株(HLE, HuH-6 Clone 5, HuH-7, PLC/PRF/5, HepG2)の培養上清中にHGFを加え、その反応を観察したが、HuH-6 clone-5では増殖が促進され、逆にHep G-2では増殖が抑制された(35)。他の癌においても、HGFの添加により、悪性黒色腫由来の細胞株の増殖が促進(13)され、肉腫細胞の増殖を逆に抑制する因子がHGFそのものだった(17)との報告がある。

潮田らは、肝癌株(Fao)にHGFを遺伝子導入したところ、*in vitro*でその増殖が抑制され、また、ヌードマウスの皮下への注入で、形成した腫瘍の大きさが、コントロール群の10%にすぎなかったと報告しており(18)、さらに、この初代培養肝細胞とFao細胞での違いは、protein kinase Cの変異によるシグナル伝達の差によるのではないかと推定している(36)。

以上の報告においては、c-metの活性化、遺伝子増幅の有無、発現量については情報がない。c-metが増殖の促進/抑制にどのような影響をあたえるのか、さらに、特に*in vivo*の実験において、HGFの作用が、たんにHGF-c-metの系を介してのみ働いているのか、他の増殖因子、あるいはまた免疫系などを介して作用しているのかは、今後に残された研究課題である。

HGFの癌細胞に対する分散効果及び形態形成作用

HGFが、犬の正常腎尿管上皮細胞であるMDCK細胞に対して、分散活性や、形態形成作用をもつことはよく知られている(15)(16)。MLE-10に対する前者の作用は、さき(図8)に示した。HGFが、これらの作用を、癌細胞に対してもつかどうかは、前者は、癌細胞の浸潤能及び転移能との関連で、後者は、癌の分化度との関連で、注目をあびている。

HGFの分散活性は正常細胞だけでなく癌細胞に対してもみられる。田原は、胃の未分化腺癌由来の細胞株であるTMK-1が、HGFの添加により、増殖はわずかしかか充進されないが、分散効果は”劇的である”と報告している(2)。この分散効果は、胃癌のいくつかの細胞のほか、膀胱癌由来であるT24でも報告されている(37)。これらの細胞は、すべて、c-met遺伝子を発現している。これらの細胞にHGFを導入することにより、転移能が獲得されるのだろうか。

癌の分化度とHGFの関連については、やはり田原が、胃の高分化腺癌においてその可能性を指摘した(2)。田原はさらに、胃壁由来の線維芽細胞にHGFの発現を確認し、胃におけるパラクリン機構によるHGF-c-metの胃癌発生への関与を指摘している(2)。

癌細胞のHGF産生

正常個体及び発達の過程において、どのような細胞や臓器がHGFを産生しているのかについては、現在知見の集積がされている。

癌細胞においても、細胞株を用いて、HGFを産生している癌の検索が行われてきた。HGFを産生する株の数は少なく、今までわかってきたのは、膠芽細胞腫、神経芽細胞腫、単球性白血病(18)などの非上皮性細胞由来の株に限られていたが、国立がんセンターのグループが、2種の肺癌細胞(PC-1:扁平細胞癌由来とPC-13:大細胞癌由来)でこの因子の発現を見いだした(37)。正常の肺は、HGF産生の主要臓器の一つであり、発癌との関連で興味深い。しかし、この2つの細胞においては、c-met遺伝子の発現はみられなかった。

癌組織ではないが、Horieらは、腎嚢胞中の嚢胞液中でHGFの濃度が高いことを見いだし、腎嚢胞の発生はHGFに関連があるとしている(38)。腎嚢胞腺癌の発生にこの因子が関与するか否かは今後の課題である。

正常組織では、一般に、HGFは間質の細胞において、またc-metは上皮細胞において発現のみられることが多いことから、この2者によるオートクリン機構による発癌は高頻度とは考えにくい、が、遺伝子変化によりHGF遺伝子が活性化される可能性はあり、その場合は癌化に直接関係してくると考えられる。実際に、肺癌細胞株において、両者のオートクリ

ン機構が証明されている(39)。

癌細胞におけるc-metの発現

c-metについては、ほぼ全ての上皮系細胞株でその発現がみられ(40)、NIH3T3などの非上皮細胞にも発現がある(41)。特に、c-metの研究のなかには、GTL-16などの胃癌細胞を用いて行われたことから象徴される(42)(43)ように、胃癌では、c-metの過剰発現や遺伝子増幅がしばしばみられる(43)。その他、膵腺癌や大腸癌、骨肉腫においても、この遺伝子の過剰発現があることが報告されている(44)(45)(46)。また、c-metは、alternative splicingにより、異なる蛋白をつくることが知られていたが(42)、国安は、胃癌株の多くでは、ノザンプロットにおいて、c-met遺伝子の発現が、7.0kbの正常組織にもみられる転写だけでなく、6.0kbの転写もみられ、これが意味をもつ可能性があると指摘している(47)。この6.0kbの転写は、胃癌細胞だけでなく、肝癌細胞や甲状腺癌細胞の一部にもみられる(自験、未発表)。

c-metの転写についての知見は、この遺伝子の活性化の機構を考える上で興味深い。c-metは当初、MNNG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)で処理した骨肉腫細胞(MNNG-HOS)中から、NIH3T3細胞を形質転換する癌遺伝子として発見された(48)が、その後このとき見つかった遺伝子は、MNNGによるc-metの活性化型であることがわかった。c-metプロトオンコジーン産物は、チロシンキナーゼ活性を持つ180kDaの細胞膜通過型蛋白で、50kDaの α 鎖および145kDaの β 鎖のヘテロダイマーである。この遺伝子の細胞外および膜通過領域をコードする遺伝子領域に、第1番染色体に位置するtpr(translocated promoter region)と呼ばれる遺伝子が挿入されて、60-65kDaの融合蛋白をつくり活性化型となる(34)。この正常と活性化型の2つの蛋白は、RNA レベルでの転写も異なり、ノザンプロットで後者は約5.0kbのバンドとして認識される。胃癌におけるc-met遺伝子が部分的にせよ活性化されているのか、発癌において影響を及ぼしているのか、更なる検討が必要である。

いずれにしても、HGF受容体としてのc-met遺伝子を議論する場合、それがきちんと膜に局在し、さらに、チロシン酸化の機能をもっていることが望ましい。

c-metについては、乳癌でc-metの位置する領域(7q31)のloss of heterozygosity (LOH)が頻発(40%)し、予後と密接な関係があった(49)という報告がある。田原は、胃の高分化腺癌の50%に7q31のLOHがみられ、それも、早期からおこると報告している(43)。

動物実験におけるHGFとc-met

α -hexachlorocyclohexane, phenobarbitalあるいは ciprofibrateなどの発癌プロモーターを投与したラットの血液中では、HGFの濃度が上昇していることが報告されている(50)。他方、潮田らの作成した、アルブミンプロモーターの制御下に肝臓でHGFを強制発現させたトランスジェニックマウスでは、過形成結節はみられるが、自発肝癌はみられない(18)。このマウスの肝細胞では、c-mycとc-junのmRNAレベルが高いことがわかっている(51)が、このマウスを用いての発癌実験は、まだ報告されていない。ジーンターゲットの手法により作出された、HGF欠損マウスにおいては、ヘテロでは、正常と変わりなく、ホモにおいては、胎盤の形成不全を起こして、発生の途中で死亡する。ヘテロのHGF欠損マウスの発癌感受性は調べられていない(52)(53)。

ウイルス病のモデル動物であるLECラットは、銅代謝異常をおこし、病理学的に急性肝炎から慢性肝炎状態へて、肝がんを発症することが知られている。Nakayamaらは、この肝がん過程でのHGFの発現を免疫組織学的に検討した。正常および肝炎状態では、HGF陽性細胞は非実質細胞に限局していたのに対し、肝がんでは非実質細胞に加えて、肝がん細胞にもHGF陽性細胞が現れており、HGFがオートクリン機構を介して肝がんに関与していることが示唆されている(54)。

金沢大学のグループは、ウッドチャック肝炎ウイルス持続感染ウッドチャック肝細胞癌において、肝癌30個中26個にHGFの発現を認め、そのうち3個は、非癌部より強かったと発表した。これらではHGF遺伝子の増幅や再構成はみられず、c-metについては検索されなかった(55)。HGFは、急性肝炎や劇症肝炎だけでなく、肝癌の前癌状態ともいえる慢性肝疾患患者でもその血中濃度が上昇している(56)(57)ことから、HGFと肝癌発生の関連を探るのは急務であると考えられる。

結語

HGFは、その強い臓器再生作用ゆえに、臨床応用が期待されている。その際に避けて通れないのが発癌との関連の問題である。今回我々は、c-metを発現しているマウス肝細胞系にHGF遺伝子を導入することにより、この因子には、オートクリンメカニズムによると考えられる形質転換能のあることを示した。上述のように、c-metを強く発現しているのは、上皮系の細胞株に多く、一方、HGFの産生が確認されたのは、非上皮性の細胞株に多いので、もしHGF-c-metの協調が、発癌に関与する場合があるとしても、in vivoの発癌においては、オートクリンよりは、パラクリン、エンドクリンの機序の方が考え易い。現在のところ、HGFの発癌に及ぼす影響についての知見はまだ不足しており、更なる展開が期待される。

文献

1. Heldin, C.-H. and Westermark, B., Growth factors: Mechanism of action and relation to oncogenes., *Cell*, 37, 9-20 (1984).
2. Tahara, E., Growth factors and oncogenes in human gastrointestinal carcinomas., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 116, 121-131 (1990).
3. Nakamura, T., Teramoto, H. and Ichihara, A., Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary culture., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 6489-6493 (1986).
4. Nakamura, T., Nawa, K., Ichihara, A., Kaise, N. and Nishino, T., Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets., *FEBS Lett.*, 224, 311-316 (1987).
5. Nakayama, H., Tsubouchi, H. and Gohda, E., Stimulation of DNA synthesis in adult rat hepatocytes in primary culture by sera from patient with fulminant hepatic failure., *Biomed. Res.*, 6, 231-237 (1985).
6. Gohda, E., Tsubouchi, H. and Nakayama, H., Human hepatocyte growth factor in plasma from patients with fulminant hepatic failure., *Exp. Cell Res.*, 166, 139-150 (1986).
7. Gohda, E., Tsubouchi, H. and Nakayama, H., Purification and characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure., *J. Clin. Invest.*, 81, 414-419 (1988).
8. Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugimura, A., Tashiro, K. and Shimizu, S., Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor., *Nature*, 342, 440-443 (1989).
9. Miyazawa, K., Tsubouchi, H., Naka, D., Takahashi, K., Okigaki, M., Arakaki, N., Nakayama, H., Hirono, S., Sekiyama, O., Takahashi, K., Gohda, E., Daikuhara, Y. and Kitamura, N., Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 163, 967-973 (1989).
10. Michalopoulos, G. K. and Zarnegar, R., Hepatocyte growth factor., *Hepatology*, 15, 149-155 (1992).
11. Nakamura, T., Structure and function of hepatocyte growth factor., *Prog. Growth Factor Res.*, 3, 67-86 (1991).
12. Matsumoto, K. and Nakamura, T., Pleiotrophic roles of HGF in mitogenesis,

morphogenesis, and organ regeneration. in eds. Matsumoto, K. and Nakamura, T., Growth factors: Cell growth, morphogenesis, and transformation. Gann Monograph on Cancer Res. 42, 91-112 (1994).

13. Kan, M., Zhang, G., R., Z., Michalopoulos, G., Myoken, Y., Mckeehan, W. L. and Stevens, J. I., Hepatocyte growth factor/hepatopoietin A stimulates the growth of rat kidney proximal tube epithelial cells (RPTE), rat nonparenchymal liver cells, human melanoma cells, and mouse keratinocytes and stimulates anchorage-independent growth of SV-40 transformed RPTE., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 174, 331-337 (1991).

14. Stoker, M., Gherardi, E., Perryman, M. and Gray, J., Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility., *Nature*, 327, 239-242 (1987).

15. Montesano, R., Schaller, G. and Orci, L., Induction of epithelial tubular morphogenesis in vitro by fibroblast-derived soluble factors, *Cell*, 66, 697-711 (1991).

16. Montesano, R., Matsumoto, K., Nakamura, T. and Orci, L., Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor., *Cell*, 67, 901-908 (1991).

17. Higashio, K., Shima, N., Goto, M., Itagaki, Y., Nagao, M., Yasuda, H. and Morinaga, T., Identity of a tumor cytotoxic factor from human fibroblasts and hepatocyte growth factor., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 170, 397-404 (1990).

18. Shiota, G., Rhoads, D. B., Wang, T. C., Nakamura, T. and Schmidt, E. V., Hepatocyte growth factor inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89, 373-377 (1992).

19. Bottaro, D. P., Rubin, J. S., Faletto, D. L., Chan, A. M.-L., Kmieciak, T. E., Vande Woude, G. F. and Aaronson, S. A., Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product., *Science*, 251, 802-804 (1991).

20. Dean, M., Park, M., Le Beau, M. M., Robins, T. S., Diaz, M. O., Rowley, J. D., Blair, D. G. and Vande Woude, G. F., The human met oncogene is related to the tyrosine kinase oncogene., *Nature*, 318, 385-388 (1985).

21. Tempest, P. R., Stratton, M. and Cooper, C. S., Structure of the met protein and variation of met protein kinase activity among human tumor cell lines., *Br. J. Cancer*, 58, 3-7 (1988).

22. Laguda, B., Selden, C., Jones, M., Hodgson, H. and Spurr, N., Assignment of the hepatocyte growth factor (HGF) to chromosome-7q22-qter., *Ann. Hum. Genetics.*, 55, 213-216 (1991).
23. Zarnegar, R., Petersen, B., Defrances, M. C. and Michalopoulos, G., Localization of hepatocyte growth factor (HGF) gene on human chromosome-7, *Genomics*, 12, 147-150 (1992).
24. Lee, G.-H., Sawada, N., Mochizuki, Y., Nomura, K. and Kitagawa, T., Immortal epithelial cells of normal C3H mouse liver in culture: Possible precursor populations for spontaneous hepatocellular carcinoma., *Cancer Res.*, 49, 403-409 (1989).
25. Lee, G.-H., Sakai, R., Nagao, M. and Kitagawa, T., Role of activated c-H-ras oncogene in the induction and progression of immortal liver epithelial cell lines derived from normal C3H mice., *Int. J. Cancer*, 47, 60-65 (1991).
26. Kanda, H., Lee, G.-H., Nomura, K., Ohtake, H. and Kitagawa, T., Malignant transformation of a mouse liver epithelial cell line by transfection of an activated c-H-ras gene with a point mutation at codon 12, *Carcinogenesis*, 14, 1061-1063 (1993).
27. Tashiro, K., Hagiya, M., Nishizawa, T., Seki, T., Shimonishi, M., Shimizu, S. and Nakamura, T., Deduced primary structure of rat hepatocyte growth factor and expression of the mRNA in rat tissues., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87, 3200-3204 (1990).
28. Chomczynski, P. and Sacchi, N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium triocyanate-phenol-chloroform extraction., *Anal Biochem.*, 132, 156-159 (1987).
29. Kuribayashi, K., Hikata, M., Hiraoka, O., Miyamoto, C. and Furuichi, Y., A rapid and efficient purification of poly(A)-mRNA by oligo(dT)30-Latex., *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.*, 19, 61-64 (1988).
30. Watanabe, T., Yamaguchi, K., Takatsuki, K., Osame, M. and Yoshida, M., Constitutive expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) gene in HTLV-1 carriers and adult T cell leukemia patients which can be trans-activated by HTLV-1 tax gene., *J. Exp. Med.*, 172, 759-765 (1990).
31. Chan, A. M. L., King, H. W. S., Deakin, E. A., Tempest, P. R., Hilkins, J., Kroezen, V., Edwards, D. R., Wills, A. J., Brookes, P. and Cooper, C. S.,

- Characterization of the mouse met protooncogene., *Oncogene*, 2, 593-599 (1988).
32. Higuchi, O. and Nakamura, T., Identification and change in the receptor for hepatocyte growth in rat liver after partial hepatectomy or induced hepatitis., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 176, 599-607 (1991).
 33. Konishi, T., Takehara, T., Tsuji, T., Ohsato, K., Matsumoto, K. and Nakamura, T., Scatter factor from human embryonic lung fibroblasts is probably identical to hepatocyte growth factor., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 180, 765-773 (1991).
 34. Park, M., Dean, M., Cooper, C. S., Schmidt, M., O'Brien, J., Blair, D. J. and Vande Woude, G. F., Mechanism of met oncogene activation, *Cell*, 45, 895-904 (1986).
 35. Miyazaki, M., Gohda, E., Tsuboi, S., Tsubouchi, H., Daikuhara, Y., Namba, M. and Yamamoto, I., Human hepatocyte growth factor stimulates the growth of HuH-6 clone 5 human hepatoblastoma cells., *Cell Biol. Int. Rep.*, 16, 145-154 (1992).
 36. Shiota, G., Kawasaki, H., Nakamura, T. and Schmidt, E.V., Inhibitory effect of hepatocyte growth factor against FaO hepatocellular carcinoma cells may be associated with changes of intracellular signalling pathways mediated by protein kinase C., *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, 85, 271-278 (1994).
 37. Yoshinaga, Y., Fujita, S., Gotoh, M., Nakamura, T., Kikuchi, M. and Hirohashi, S., Human lung cancer cell line producing hepatocyte growth factor/scatter factor, *Jpn. J. Cancer Res.*, 83, 1257-1261 (1992).
 38. Horie, S., Higashihara, E., Nutahara, K., Mikami, Y., Okubo, A., Kano, M. and Kawabe, K., Mediation of renal cyst formation by hepatocyte growth factor, *Lancet*, 344, 789-791 (1994).
 39. Rygaard, K., Nakamura, T. and Spang-Thomsen M., Expression of the proto-oncogenes c-met and c-kit and their ligands, hepatocyte growth factor/scatter factor and stem cell factor, in SCLC cell lines and xenografts., *Br. J. Cancer*, 67, 37-46 (1993).
 40. Di Renzo, M. F., Narsimhan, R. P., Olivero, M., Bretti, S., Giordano, S., Medico, E., Gaglia, P., Zara, P. and Comoglio, P. M., Expression of the Met/HGF receptor in normal and neoplastic human tissues., *Oncogene*, 6, 1997-2003 (1991).
 41. Cooper, C. S., Tempest, P. R., Beckman, M. P., Heldin, C.-H. and Brookes, P.,

Amplification and overexpression of the met gene in spontaneously transformed NIH3T3 mouse fibroblasts., *EMBO J.*, 5, 2623-2628 (1986).

42. Rodrigues, G. A., Naujokas, M. A. and Park, M., Alternative splicing generates isoforms of the met receptor tyrosine kinase which undergo differential processing., *Mol. Cell. Biol.*, 11, 2962-2970 (1991).

43. Tahara, E., Molecular mechanism of stomach carcinogenesis, *J. Cancer Res. and Clinical Oncology*, 119, 265-272 (1993).

44. Di Renzo, M. F., Poulsom, R., Olivero, M., Comoglio, P. M. and Lemoine, N. R., Expression of the Met/hepatocyte growth factor receptor in human pancreatic cancer, *Cancer Res.*, 55, 1129-1138 (1995).

45. Di Renzo, M., Olivero, M., Giacomini, A., Porte, H., Chastre, E., Mirossay, L., Nordlinger, B., Bretti, S., Bottardi, S., Giordano, S., Plebani, M., Gespach, C. and Comoglio, P. M., Overexpression and amplification of the Met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer, *Clin. Cancer Res.*, 1, 147-154 (1995).

46. Ferracini, R., Di Renzo, M. F., Scotlandi, K., Baldini, N., Olivero, M., Lollini, P. L., Cremona, O., Campanacci, M. and Comoglio, P. M., The Met/HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit, *Oncogene*, 10, 739-749 (1995).

47. Kuniyasu, H., Yasui, W., Yokozaki, H., Kitadai, Y. and Tahara, E., Aberrant expression of c-met mRNA in human gastric carcinomas, *Int. J. Cancer*, 55, 72-75 (1993).

48. Cooper, C. S., Park, M., Blair, D., Tainsky, K., Huebner, C. M., Croce, C. M. and Vande Woude, G., Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line, *Nature*, 311, 29-33 (1984).

49. Bieche, I., Champeme, M., Matifas, F., Hacene, K., Callahan, R. and Lidereau, R., Loss of heterozygosity on chromosome 7q and aggressive primary breast cancer, *Lancet*, 339, 139-143 (1992).

50. Lindroos, P., Tsai, W. H., Zarnegar, R. and Michalopoulos, G. K., Plasma levels of HGF in rats treated with tumor promoters., *Carcinogenesis*, 13, 139-141 (1992).

51. Shiota, G., Wang, T. C., Nakamura, T. and Schmidt, E. V., Hepatocyte growth factor in transgenic mice - effects on hepatocyte growth, liver regeneration and gene expression, *Hepatology*, 19, 962-972 (1994).

52. Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E. and Birchmeier, C., Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development, *Nature*, 373, 699-702 (1995).
53. Uehara, Y., Minowa, O., Mori, C., Sholta, K., Kuno, J., Noda, T. and Kitamura, N., Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor, *Nature*, 373, 702-705 (1995).
54. Nakayama, N., Kashiwazaki, H., Kobayashi, N., Hamada, J., Matsumoto, K., Nakamura, T. and Takeichi, N., Differing distribution of hepatocyte growth factor-positive cells in the liver of LEC rats with acute hepatitis, chronic hepatitis and hepatoma, *Jpn.J.Cancer Res.*, 86, 5-9 (1995).
55. 下田敦, 金子周一, 鷗浦雅志, 中村敏一, 小林健一, ウッドチャック肝細胞癌における肝細胞増殖因子の検討, *肝臓*, 33, 766-769 (1992).
56. Tomiya, T., Nagoshi, S. and Fujiwara, K., Significance of serum human hepatocyte growth factor levels in patients with hepatic failure., *Hepatology*, 15, 1-4 (1992).
57. 武藤泰敏, 河合忠, 佐藤俊一, 大久保昭行, 有馬暉勝, 大工原恭, 藤原研二, 与芝真, 渡辺明治, 野間昭夫, 鎌田武信, 溝口靖敏, 辻孝夫, 合田栄一, 白木和夫, 沖田極, 太田康幸, 谷川久一, 尾辻省悟, 杉原潤一, 村上啓雄, 弘野修一, 坪内博仁, 橋本修治, 肝疾患患者における血性ヒト肝細胞増殖因子(hHGF)レベル測定の臨床的意義—全国19施設による検討—, *肝胆膵*, 25, 541-549 (1992).

図表

表1

Cell lines	HGF*	Soft Agar	Tumorigenicity		Scattering		¹²⁵ I-HGF receptor(HGFR)/met		
		Growth	2wks	2mos	HGF-	HGF+	Kd	Bmax	mRNA
1. MLE-10	<0.16	-	0/3	0/3	-	+	37	1180	+
2. CMV-1	<0.13	-	0/4	0/4	-	+	17	860	+
3. CMV-2	<0.08	-	0/3	0/3	-	+	37	1270	+
4. CMV-3	0	-	0/2	0/2	-	+	40	780	+
5. HGF-1	0.22	+	0/2	0/2	-	+	26	990	+
6. HGF-2	0.33	++	0/7	0/7	+	+	25	660	+
7. HGF-3	0.38	++	0/2	0/2	+	+	19	870	+
8. HGF-4	0.50	+++	3/3	3/3	+	+	ND	ND	+
9. HGF-5	0.69	+++	6/6	6/6	+	+	17	660	+

2-9は、「MLE-10」を省略した。

*HGF production: ng per 10⁶ cells in 24 hr.
ND: Not determined.

表1: MLE-10とMLE-10より誘導された細胞系の性格

MLE-10 およびMLE-10-CMV-1~3はHGFを産生していない。

MLE-10-HGF-1~5は様々な濃度でHGFを産生する。MLE-10-HGF-1~5は

軟寒天培地中で増殖し、形成されたコロニーの数と大きさはHGFの産生量にほぼ比例する。

HGF産生量の最も多いMLE-10-HGF-4と5は、ヌードマウス造腫瘍性がある。MLE-10や

MLE-10-CMV-1~3は、軟寒天培地増殖性もヌードマウス造腫瘍性もない。

これらの細胞はすべてHGF受容体を高発現している。

—: 陰性、発現なし、または無添加、+: 陽性、発現あり、または添加あり、

++: 多数の大きなコロニーを形成、+++: 非常に多数の大きなコロニーを形成

N.D.: Not determined.

表2

	No addition	anti-HGF (10 μ g/ml)	anti-HGF(10 μ g/ml)+ HGF(10ng/ml)	HGF (50ng/ml)
MLE-10	-	-	-	+
MLE-10-CMV-1	-	-	-	+
MLE-10-HGF-1	+	-	±	++
MLE-10-HGF-5	+++	-	++	++++

表2：各細胞系の軟寒天培地増殖性

HGFを添加した軟寒天培地を用いると、MLE-10とMLE-10-CMV-1は、それにコロニーを作るようになる。抗体により、HGF蛋白の活性を吸収するとその結果はみられない。MLE-10-HGF-1と5はもともと軟寒天培地にコロニーを形成するが、抗体添加によりコロニー形成はみられなくなる。この結果は、HGF蛋白により抗体を吸収することにより減弱する。

-：コロニー形成なし。

-、±、+、++、+++、++++：コロニー形成あり。この順に多数で、かつ大きくなる。

図1

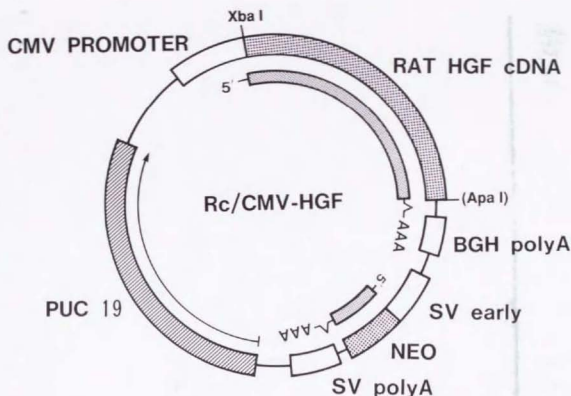


図1：導入遺伝子の構造

プラスミド、pRc/CMV(Invitrogenより購入)のサイトメガロウイルスプロモーター(CMV PROMOTER)の下流に、ラットHGFcDNA全長をつなぎ、ラットHGFを発現するプラスミド、Rc/CMV-HGFを作成した。

HGF遺伝子はサイトメガロウイルスプロモーターの制御下に発現される。また、SV40の初期プロモーターにより発現されたネオマイシン耐性遺伝子により、G418選択培地での選択培養が可能となる。

BGH: bovine growth hormone, SV early: Simian Virus 40 初期領域プロモーター,
SV: Simian Virus 40, NEO: Neomycin resistant gene

図2

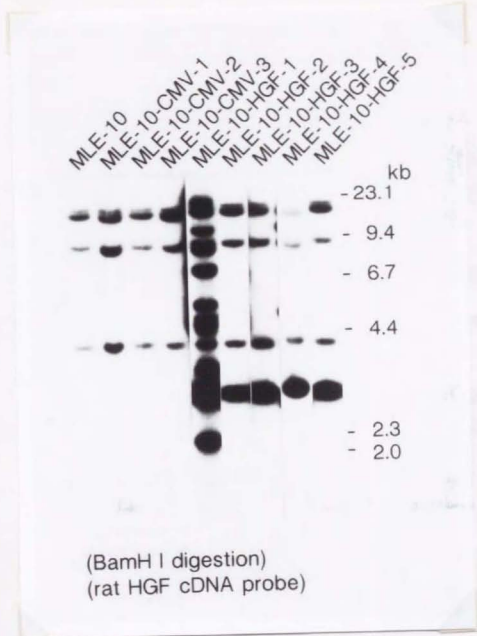


図2：各細胞系のサザンプロット解析(各10 μ g DNA)

マウスのHGF genomic DNAは、BamHI切断で、約、20kbp, 9.0kbp, 4.0kbpの3本のバンドとして検出される。外来性にHGFを導入した細胞(MLE-10-HGF-1~5)は、これ以外に、約2.6kbpのバンドが検出された。さらに、MLE-10-HGF-1には、他のバンドが約6本検出された。これは、こわれた遺伝子が導入されたものと考えられた。

図3



図3 : 各細胞系のノザンプロット解析(各 $10\mu\text{g}$ total RNA)

MLE-10および、MLE-10-CMV-1~3は、ノザンプロットでHGFのバンドが検出されなかった。他方MLE-10-HGF-1~5では2.6Kbにバンドが検出された。

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 各レーン間のアブライ量の是正のためにHGFをデプローブしたあとに再ハイブリダイズした。

図4

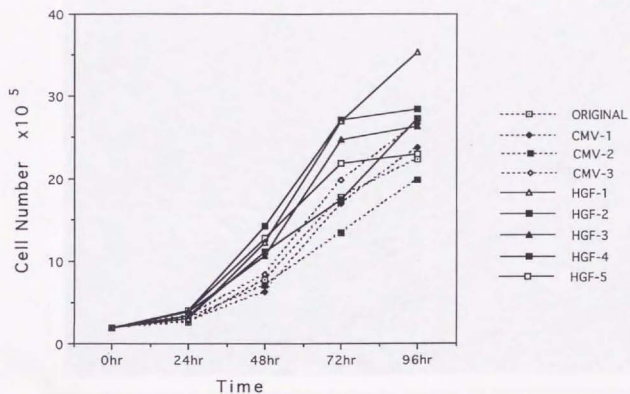


図4：MLE-10および誘導された細胞(MLE-10-HGF-1~5, MLE-10-CMV-1~3)の増殖曲線

MLE-10-HGF1~5は、MLE-10, MLE-CMV-1~3より増殖が盛んだった。MLE-10-HGF-1~5の中では、HGFの産生量と、増殖の早さとは比例しなかった。

図5

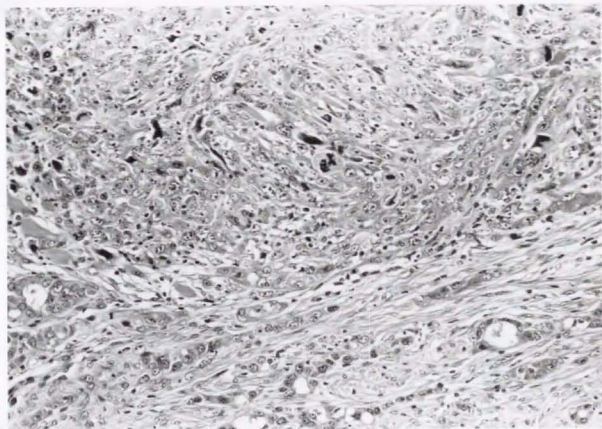


図5：ヌードマウス移植腫瘍の組織像(MLE-10-HGF-5)

索状パターン、腺管形成パターンおよび紡錘型細胞肉腫様パターンの混在する肝細胞癌の像である。

図6

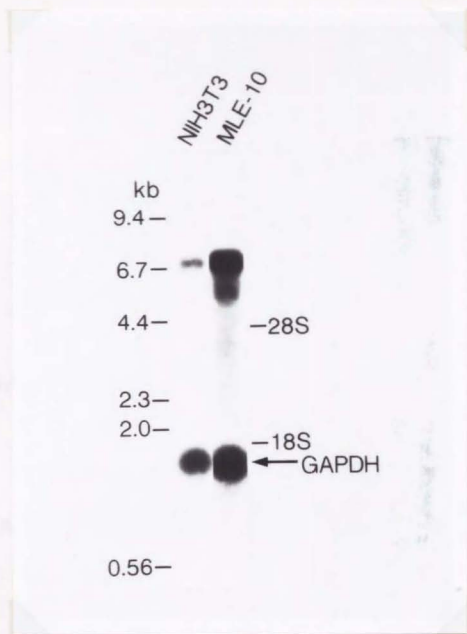


図6 : NIH3T3とMLE-10におけるc-met遺伝子の発現 (ノザンブロット, 1 μ g poly-A tail RNA)

MLE-10はNIH3T3に比べ、約7.0kbの位置に c-metを強く発現している。

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 各レーン間のアプライ量の是正のためにc-metと同時にハイブリダイズした。

図7

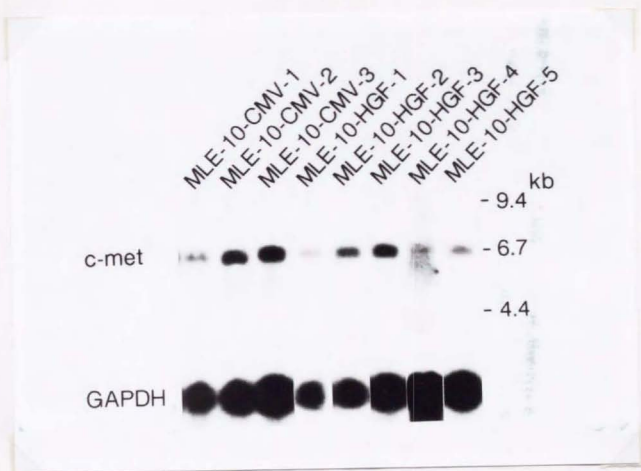


図7：各細胞株のc-met遺伝子の発現(ノザンプロット、各10 μ g total RNA)
各細胞株とも、強くc-met遺伝子を発現している。
GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 各レーン間のアブ
ライ量の是正のためにc-metをデブローブ後、再ハイブリダイズした。

図8

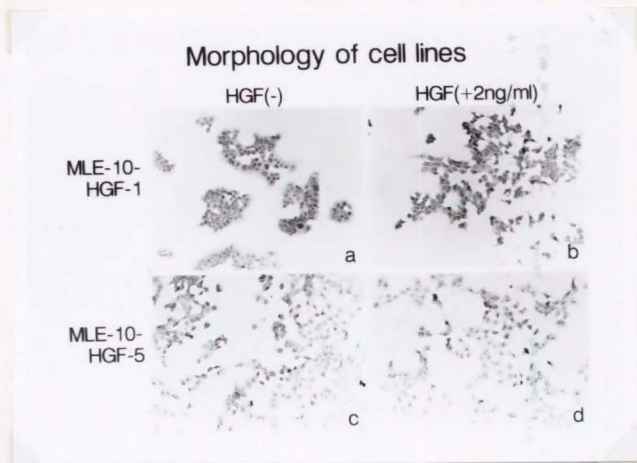


図8：MLE-10より誘導された細胞の形態とHGFのScatter効果

MLE-10-HGF-1はもともとコロニーを作って増殖する(a)が、HGFを添加することにより、ばらばらになって増殖するようになる(b)。MLE-10-HGF-5はHGFを強く産生しており、もともとばらばらになって増殖し(c)、HGF添加によってもそれはさらに充進はしない(d)。

