

ラット消化管形態形成における肝細胞増殖因子
(Hepatocyte Growth Factor)の関与およびその調節機構

松 原 康 朗

ラット消化管形態形成における肝細胞増
殖因子(Hepatocyte Growth Factor)の関与
およびその調節機構

大学院博士課程 医学系研究科

内科学専攻 学生証番号 41-67426

松 原 康 朗

[目次]

研究の背景と目的	1
材料と方法	5
結果	
1) 各種増殖因子の消化管上皮・間質における遺伝子発現	9
2) HGF 関連遺伝子の消化管上皮間質における発現	12
3) HGF 関連遺伝子の消化管発生における発現変化	12
4) ラット消化管発生過程での組織学的変化	17
5) ラット消化管上皮細胞増殖の検討	23
考察	26
まとめ	32
参考文献	33
謝辞	43

[研究の背景と目的]

消化管上皮組織は、各個体の生涯を通じて不断の増殖分化の営みを続ける高度に統制された組織である。消化管各部域の特異機能を担う上皮組織の増殖分化は、他臓器の実質細胞と同様に、それに働きかける生体内因子および外的な環境因子間の複雑な相互作用によって調節されている。その結果、消化管上皮特異的な機能を果たす構造が形成され、また、上皮組織の損傷に際しては同調節機構を背景にした修復機転の働きで組織特異的な高次構造が維持されていることが想定されている。

消化管はもとより、多細胞生物における器官の高次構造形成のメカニズムは十分に解明されているとはいいがたいが、こうした中で古くから上皮間質相互作用(epithelial-mesenchymal interaction)と呼ばれる上皮系と間葉系の両組織間の相互作用が、上皮組織の機能を調節し、臓器の三次構造の確立・維持に大きな役割を果たしていることが指摘されている^{1)~4)}。

上皮間質相互作用は2つのタイプに分けられる。一つは間質の種類によらず、上皮に特異的な遺伝的プログラムが引き起こされる誘導的な働きで、この場合、上皮細胞はそのゲノムの許容範囲内でしか間質の指令に従えない。もう一つは間質の種類により上皮の分化が決定される指令的な働きで、間質由来のシグナルにより上皮組織での遺伝子発現、機能発現が変化し、個々の間質に特異的な上皮が誘導される。前者の例としては外分泌腺^{7,3)} (すなわち、ほぼどの臓器の間質でも上皮の分化誘導能が認められる)、後者の例としては唾液腺間質による乳腺上皮の唾液腺への分化^{7,4)}、また子宮上皮の誘導は子宮の間質でしか起きないこと^{7,5)}などが挙げられる。

上皮間質相互作用の仲介因子としては増殖因子に代表される液性因子⁵⁾、細胞外マトリックス⁶⁾、細胞間の接触⁷⁾などのシグナルが想定されている。増殖因子としてはHGFによるMDCK細胞の形態形成^{1,8)}、細胞外マトリックスとしてはコラーゲン分子による角膜上皮の誘導^{7,4)}、細胞間の接着としてはエビモルフィンによる肺上皮細胞の腺管形成^{7,6)}などが例として挙

げられる。これらのシグナルは互いにネットワークを形成しながら作用しているものと考えられているが、詳細は未だ明らかとはなっていない。

教室における消化管上皮器官培養系を用いた検討で、胎生 16 日のラット胎児胃粘膜上皮を培養したところ、上皮組織のみの培養では腺管形成など形態変化が全く見られず、また腺胃分化のマーカーであるペプシノゲンの発現も認められなかった。一方、同じ胎生 16 日の腺胃間質を下に敷いて上皮組織の培養を行ったところ腺管形成が起き、ペプシノゲンの発現が認められた (personal communication)。これは消化管 (胃) においても上皮組織の発生・分化に間質のサポート (上皮間質相互作用) が極めて重要であることを示すものである。さらに上皮と間質の間にコラーゲンを挟んで培養を行っても、形態変化、ペプシノゲンの発現が認められたことから、その作用がコラーゲンを通して働く、液性因子を介したものであることが示唆された。

そこで本研究では、まず最初に間質由来で上皮に作用する上皮間質相互作用の仲介因子、特に液性細胞増殖因子の検索を行った。消化管領域においては実験系の不備もあり上皮間質相互作用の検討はこれまで決して芳しいものではなかったが、教室では既報の消化管上皮器官培養系⁸⁾、細胞培養系⁹⁾に加え、新たに各発育段階でラット消化管の各部域を上皮と間質にコンタミネーションなく分離する手法を開発しており (Ichinose, M. et al. 投稿中) これを利用して消化管各部域の上皮間質における代表的な増殖因子及びその受容体の遺伝子発現を検討した。

HGF (hepatocyte growth factor; 肝細胞増殖因子) は代表的な間質由来増殖因子で、培養肝細胞の増殖を促進する因子として発見された¹⁰⁾⁻¹²⁾。劇症肝炎などの肝障害に際して産生増加がみられる¹³⁾ことから、当初肝再生の本体として肝細胞特異的な増殖因子と考えられていたが、その後、上皮細胞の拡散を引き起こす scatter factor¹⁴⁾、ある種の腫瘍細胞の増殖を抑制する tumor cytotoxic factor¹⁵⁾と同じ物質であることが判明し、これまでに数多く

の臓器に対し細胞増殖・遊走・形態形成など様々な活性を有するユニークな増殖因子であることが明らかになっている^{16)~22)}。特に形態形成作用はレセプター型チロシンキナーゼを受容体とする増殖因子では HGF にのみ認められている⁸¹⁾。

HGF は 728 アミノ酸残基の前駆体(preproHGF)として合成され、細胞内で切断を受け一本鎖の不活型(proHGF)となる。さらに細胞外にてセリンプロテアーゼにより 494arg-495val で切断され、69kDa の α 鎖と 34kDa の β 鎖よりなるヘテロ二量体の成熟型^{23) 24)}となる。HGF の受容体として c-met 癌原遺伝子産物(c-Met)が同定されている^{30)~32)}。c-Met は膜貫通構造をもつレセプター型チロシンキナーゼで、HGF によって刺激されると二量体化とチロシン残基の自己リン酸化が起きる³³⁾。HGF の多彩な作用はすべて c-Met のチロシンキナーゼ活性を介して伝達されることが明らかにされている^{34) 35)}。

HGF の産生は Interleukin-1, TNF- α ³⁶⁾, TGF- β ³⁷⁾ などの因子により遺伝子翻訳のレベルで調節されているが、HGF が作用するためには二量体化が必須のため^{25)~29)}, proHGF の活性化も HGF の活性制御に重要な役割を果たしているものと考えられている^{29) 38) 39)}。

その代表的な活性化因子が HGF activator (HGFA)で⁴⁰⁾, 血清中より初めて分離され, blood coagulation factor XIIa と 4 割のホモロジーを持つプロテアーゼであることが明らかになっている。そのほかにも urokinase-type plasminogen activator, tissue-type plasminogen activator^{63) 64)}, blood coagulation factor XIIa⁶⁵⁾ が proHGF を活性化することが報告されているが, plasminogen の proHGF 活性化作用は極めて低く^{29) 65)}, blood coagulation factor XIIa も活性は HGFA に比べ低く, また HGFA と異なり血清中のプロテアーゼインヒビターによって阻害される⁶⁵⁾。

HGFA は HGF の活性化を通して発生や傷害修復に寄与することが想定され肝障害, 腎障害さらに胃潰瘍修復^{41)~43)} への関与が報告されているが,

一方、器官発生における役割は明らかではない。本研究ではラット消化管発生過程での HGF の役割およびその活性制御のメカニズムを明らかにするため HGF, HGF 受容体である c-met, HGFA, さらに HGFA のインヒビターである HGF activator inhibitor type1 (HAI-1)⁽¹⁴⁾ を含め遺伝子発現の解析を行った。

[材料と方法]

Fischer 系ラット(Charles River Japan inc.)を交配させ、腔内スメアにて妊娠を確認。精子が認められた日を胎生0日とした。妊娠ラットを頸椎脱臼にて屠殺後、胎生15日から21日の胎児より消化管各部域(前胃、腺胃(ラット胃は前胃と腺胃に分けられる。前胃は重層扁平上皮に被われているが、腺胃は円柱上皮に被われ、酸およびペプシノゲンを分泌する。)、十二指腸、大腸)を摘出。新たに開発したキレートと実体顕微鏡を用いた手法(Ichinose, M. et al. 投稿中)で上皮・間質を分離した。各組織は phosphate-buffered saline (PBS)で洗い、生化学的解析に用いるサンプルは-80℃で保存した。

1) 組織学的検討

各組織はアセトン固定後、パラフィン包埋し切片を PAS-hematoxylin で染色した。上皮細胞増殖の評価のため消化管各部域組織を切離した後、細片に分割。フィルター(Type HAWP: Nihon Millipore, Tokyo, Japan)に載せ、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)中に 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU; 0.1mg/ml, Sigma)を加え 5% CO₂, 37℃で1時間培養を行った。標本は同じくアセトン固定後、パラフィン包埋し、BrdUを取り込んだ核を特異的抗体を用い免疫組織染色で検出した。1000細胞あたりの標識された細胞数を各組織につき3サンプルずつ計測し平均値を出した。

2) RNA の抽出及び Northern hybridization

各組織より Chomczynski と Sacchi^{4,5)}の方法により total RNA を抽出。10 μ g を変性後ホルムアルデヒド-アガロースゲルで電気泳動し、ナイロンフィルターにトランスファー。フィルターを ³²P でラベルした各サブクローンの cDNA でハイブリダイズした。

3) reverse transcription-polymerase chain reaction

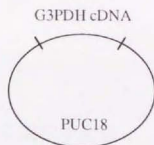
reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)を用い mRNA の解析を行った。total RNA 5 μ g より cDNA 合成キット(Gibco BRL)を用い cDNA を作成。特異的プライマー (次頁) で, AmpliTaq DNA polymerase (Perkin Elmer Cetus, USA)を用い, 35-40 サイクルで PCR を施行した。PCR 産物は 2% アガロースゲル, TAE buffer で電気泳動を行った。また一方で PCR 産物を pUC18 の SmaI site にサブクローニングし, dideoxy chain-termination method^{4,6)} でシーケンスを行った。mRNA の半定量には competitive PCR^{4,7)} を用いた。サブクローニングした各 cDNA より, 制限酵素サイトを検索し, 一部切り出した後, 再度ライゲーションすることで, 同じプライマーで増えるサイズの小さい competitor を作製した。(例) G3PDH cDNA よりの competitor 作成: pUC18 の SmaI site にサブクローニングされた G3PDH cDNA には Acc I サイトが 2 箇所存在する。しかしこのまま酵素処理したのではプラスミドも Acc I で切断されてしまうため, まず Eco RI, Bam HI 処理で cDNA を含むフラグメントを切り出し, その上で Acc I 処理を行った。Acc I で切り出される 161bp を抜いて, 改めて Eco RI, Bam HI 処理された BLS(KS-)にライゲーションした。これをさらに PCR で増やし, 濃度を測定し希釈列を作成した。)

サンプルの cDNA とともに competitor を加え PCR を施行すると, それぞれが濃度依存的に増幅される。PCR は反応が必ずしも一定ではないため既知の濃度の competitor をコントロールとして反応のばらつきを補正することができる。アガロースゲル電気泳動を行うと, competitor よりの PCR 産物は元の cDNA よりサイズが小さく分離される。定量にはイメージアナライザーを用い泳動ゲルを解析した。

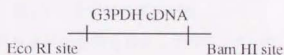
Sequences of primers used for PCR analysis

gene	primer	size of amplified fragment	size of amplified fragment of competitor
HGF	5'-primer, 5'-CCAACACAAACAAGTAGG-3' 3'-primer, 5'-AACAATGCAACCAAGAACCA-3'	585 bp	482 bp
c-met	5'-primer, 5'-GTCAATGACTTCTTCAACAAGATTGT-3' 3'-primer, 5'-CCTGGAGACACAGGATAGGAATC-3'	359 bp	186 bp
KGF	5'-primer, 5'-GTAGCGATCAACTCAAGGTC-3' 3'-primer, 5'-ATTAAAGGCCACGAACATT-3'	570 bp	407 bp
KGFR	5'-primer, 5'-GTCAGACAAAGGCAACTACA-3' 3'-primer, 5'-CCAGCATCCATCTCCGTCAC-3'	342 bp	165 bp
EGF	5'-primer, 5'-CCGAAACAGTAACACAGG-3' 3'-primer, 5'-TAGGACCACAAACCAAGG-3'	394 bp	281 bp
EGFR	5'-primer, 5'-AGACACCTGCCACCACTCA-3' 3'-primer, 5'-AATAATCACATCCCATCAC-3'	607 bp	490 bp
TGF α	5'-primer, 5'-CCCTGCGCTCGGAAGATG-3' 3'-primer, 5'-GGCACGGCACCACTCACA-3'	417 bp	353 bp
HB-EGF	5'-primer, 5'-GACTTGGAAGGGACCGATCTGGA-3' 3'-primer, 5'-TAGGGTCAGCCCATGACACCTC-3'	260 bp	130 bp
amphiregulin	5'-primer, 5'-AGTCAGAGTTGAACAGGTGATTAAGCC-3' 3'-primer, 5'-GGATTTTCTCCACACCGTTC-3'	255 bp	151 bp
TGF β	5'-primer, 5'-CTTCAGCTCCACAGAGAAGAACTGC-3' 3'-primer, 5'-CACGATCATGTTGGACAACCTGCC-3'	298 bp	216 bp
BMP-2	5'-primer, 5'-TTATAAAGCCTGCCACAGCCAGTCA-3' 3'-primer, 5'-GCTGTGCTAGCGACACCCGC-3'	671 bp	554 bp
BMP-4	5'-primer, 5'-ACTAGTCCGTCACAATGTGACACG-3' 3'-primer, 5'-ACTGAAGTCCACGTAGAGCGAATG-3'	346 bp	219 bp
inhibin	5'-primer, 5'-CTTGAAGAAGAGACCCGATGTGAC-3' 3'-primer, 5'-AACAGACGGATGGTGACTTTGGTC-3'	336 bp	168 bp
/activin β A	5'-primer, 5'-AGGCAACAGTCTCTCATCGACITTCGGCT-3' 3'-primer, 5'-AGCCACATCTCTCCACAATCATGTT-3'	300 bp	180 bp
inhibin	5'-primer, 5'-GGCAAGAGGCACAAAGAAGAG-3' 3'-primer, 5'-CAGCAACAGGGGGACCACT-3'	508bp	252bp
/activin β B	5'-primer, 5'-GTGGAACGTGTGGGGACTCAA-3' 3'-primer, 5'-TCGCTGAAGGGGTTGTAGTA-3'	572bp	402bp
HGF α	5'-primer, 5'-TGAAGGTGCGGTGTCAACGGATTGGGC-3' 3'-primer, 5'-CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC-3'	983 bp	822 bp

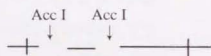
G3PDH cDNAをPUC18の
Sma Iサイトにサブクローニング。



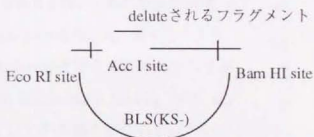
Eco RI-Bam HIでcDNAを含む
フラグメントを切り出す。



Acc I処理。
(フラグメントは3分割される)



Eco RI-Bam HI処理されたBLS(KS-)とともに
ライゲーションを行う。



competitorとなるフラグメントが入った
プラスミド (PCRにて確認) をテンプレートとし
M13プライマーでPCR施行。



PCR産物の濃度を測定し、希釈列を作成。

(例) サブクローニングしたG3PDH cDNAよりのcompetitor作成

[結果]

1) 各種増殖因子の消化管上皮・間質における遺伝子発現

上記手法により胎生 16 日のラット消化管の各部域において上皮、間質をコンタミネーションなく分離することができた(図1)。まずノーザンブロットティングで上皮・間質における各種増殖因子の遺伝子発現を検討したが、シグナルが極めて低く解析が困難であった。検体はラット胎児消化管でさらに上皮、間質に分ける操作を加えているため、多量のサンプルを得るのが難しく、そのため RT-PCR を用い遺伝子発現の解析を進めた。今回用いたブライマーにより増幅される cDNA はシークエンスの結果いずれも、目的とする遺伝子に由来するものであることが確認された。胎生 16 日のラット消化管各部域における各種増殖因子(今回解析した増殖因子は、一般に間質由来増殖因子と考えられている HGF, KGF(keratinocyte growth factor), 最も古くより研究が進められている EGF(epidermal growth factor)及びそのファミリーである TGF α (transforming growth factor α), HB-EGF(heparin binding EGF like peptide), AR (Amphiregulin), 分化誘導因子としてその働きが注目されている TGF β super family (TGF β 1, BMP-2(bone morphogenetic protein 2), BMP-4, Activin)である。)の遺伝子発現は下記の通りであった(図2)。

- (1) 間質にのみ遺伝子発現が認められるのは HGF, KGF であった。
- (2) その受容体 c-met, KGF receptor mRNA の発現は上皮、間質ともに認められ、KGF receptor mRNA の発現は上皮に多く認められた。
- (3) EGF family では EGF, HB-EGF は上皮、間質ともに遺伝子発現が認められた。HB-EGF の遺伝子発現は上皮優位であった。
- (4) TGF α , AR mRNA は上皮にのみ発現が認められた。
- (5) EGF family 共通の受容体である EGF receptor mRNA は上皮、間質ともに発現が認められた。
- (6) TGF β 1, BMP-2, BMP-4, Activin β A, Activin β B mRNA の発現は上皮、間

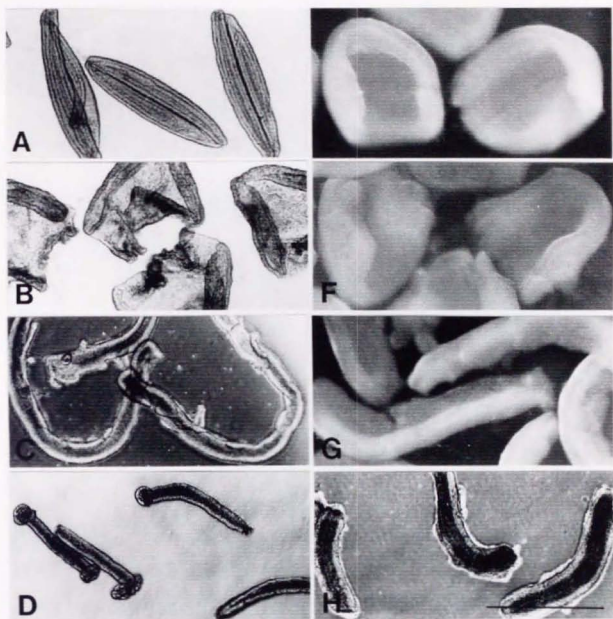


図1 分離されたラット胎児消化管各部域の上皮および間質
 A,E:前胃, B,F:腺胃, C,G:十二指腸, D,H:大腸
 A-D:上皮, E-H:間質 棒線は1mmを示す。

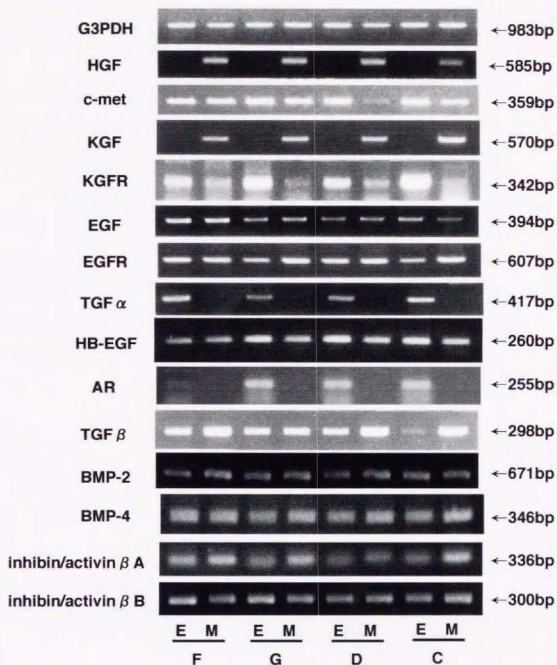


図2 ラット消化管各部域の上皮・間質における
各種増殖因子およびその受容体mRNAの発現
E:前胃, G:腺胃, D:十二指腸, C:大腸, E:上皮, M:間質

質ともに認められたが、TGF β 1 及び Activin β A mRNA の発現は間質優位であった。

- (7) 各部域(前胃, 腺胃, 十二指腸, 大腸)間での比較では, KGF receptor mRNA の発現量が, 前胃の上皮にて他の部域の上皮より約 10 倍多く発現が認められたが, 他には部域間の有意な違いは認められなかった(図 3)。

2) HGF 関連遺伝子の消化管上皮間質における発現

HGF 関連遺伝子について, 同様に上皮, 間質における分布を解析したところ, HGF mRNA は間質に限局して認められたが HGF A 及び HAI-1 mRNA の発現は上皮のみに見られた。また c-met mRNA は上皮・間質とも発現が認められた(図 4)。この c-met mRNA の発現量は上皮・間質で同程度であった。HGF, c-met mRNA の発現量は消化管各部域で大きな違いは認められなかったが, HGF A mRNA の発現は前胃で特に少なく, 大腸で多いという頭尾軸にそった発現量の傾向が認められた(図 5)。腺胃, 十二指腸の比較ではやや十二指腸で発現量が多く, 前胃ではその 10%, 大腸ではその 10 倍程度であった。HAI-1 mRNA は, 前胃で他の部域に比べ発現量が少ない傾向にあった。

3) HGF 関連遺伝子の消化管発生における発現変化

腺胃間質における HGF mRNA の発現量は胎生 16 日では比較的少なく, これより徐々に増加し 19 日にピークが認められ, その後出生前まで減少していた(図 6)。腺胃上皮における c-met および HGF A mRNA の発現は類似したパターンを呈した。前半ではこれらも発現量が比較的少なく, 胎性 18 日で小さなピークを形成した後, 19 日でやや減少, その後増加し出生前で最大の発現量となっていた(図 7)。HGF 関連遺伝子の発現増加は消化管の他の部域(前胃, 十二指腸, 大腸)においても認められた。HGF mRNA の

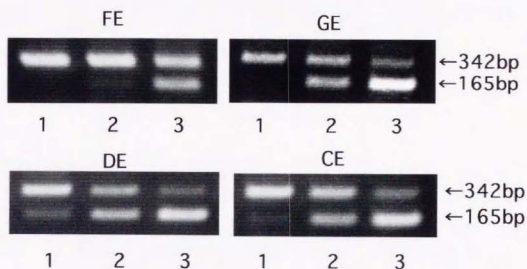


図3 消化管各部域におKGF receptor mRNA発現量の比較
 FE:前胃, GE:腺胃, DE:十二指腸, CE:大腸, の各上皮
 342bp: KGF receptor mRNA, 165bp: competitorのシグナル
 1,2,3はそれぞれcompetitor量 $10^1, 10^2, 10^3$ コピーと,
 各同量のc-DNAサンプルでPCRを行った結果を示す。

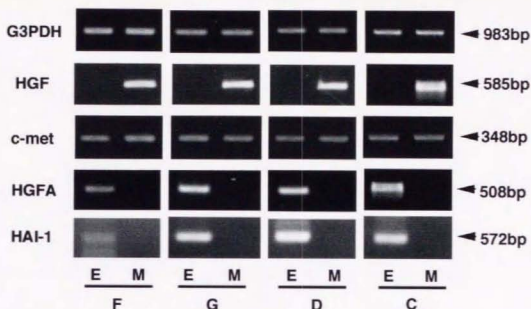


図4 ラット胎児消化管各区域におけるHGF, c-met, HGFA, HAI-1及びG3PDH遺伝子の発現
1 μ gのpoly(A+)RNAよりRT-PCRを施行。
F:前胃, G:腺胃, D:十二指腸, C:大腸, E:上皮, M:間質

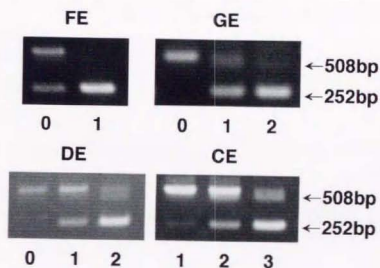


図5 消化管各区域におけるHGFA mRNA発現量の比較
FE:前胃, GE:腺胃, DE:十二指腸, CE:大腸, の各上皮
508bp: HGFA mRNA, 252bp: competitorのシグナル
0,1,2,3はそれぞれcompetitor量 $10^0, 10^1, 10^2, 10^3$ コピーと,
各同量のc-DNAサンプルでPCRを行った結果を示す。

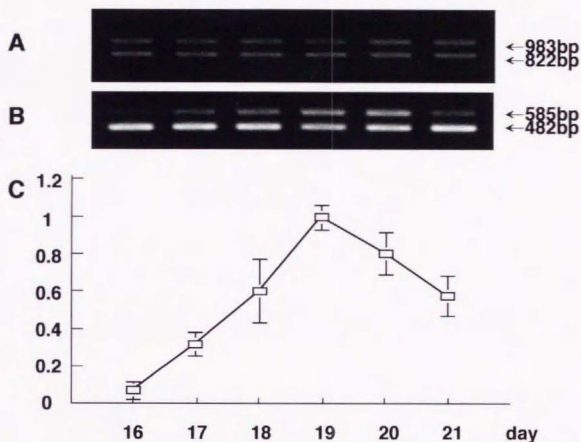


図6 腺胃発生過程における間質のHGF mRNA発現変化

A: サンプルRNA中のG3PDH mRNAの発現変化.

983bp: G3PDH mRNA, 822bp: competitorのシグナル.

B: HGF mRNAの発現変化.

585bp: HGF mRNA, 482bp: competitorのシグナル.

C: HGF mRNAの発現量の変化. 泳動ゲルのバンドをイメージアナライザーを用いcompetitor対比で解析, G3PDHで補正し最高点を1とした. 結果は平均 \pm SD (n=3).

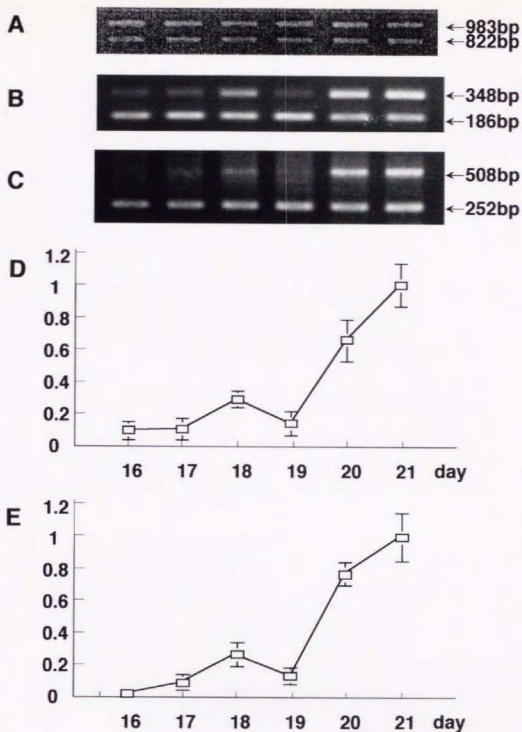


図7 腺胃発生過程における上皮のc-metおよびHGFA遺伝子発現変化。

A: サンプルRNA中のG3PDH mRNAの発現変化。

983bp: G3PDH mRNA, 822bp: competitorのシグナル。

B: c-met mRNAの発現変化。

348bp: c-met mRNA, 186bp: competitorのシグナル。

C: HGFA mRNAの発現変化。

508bp: HGFA mRNA, 252bp: competitorのシグナル。

D, E: c-met mRNA(D)及びHGFA mRNA(E)の発現量の変化。

図6と同様の解析を行った。結果は平均±SD (n=3)。

発現は胎生 16 日より増加し、前胃では 18 日、十二指腸では 17 日、大腸では 19 日でピークを形成し、その後出生前まで減少している。c-met mRNA の発現もこれら臓器の形態形成過程で発現増加がみられた。HGFA mRNA の発現は、前胃では発現量が少なく定量不能であったが、十二指腸、大腸ではこれも発現増加が認められた(図 8)。

4) ラット消化管発生過程での組織学的変化

(腺胃) 胎生 16 日に見られる重層円柱上皮は徐々に単層化し、胎生 19 日には単層円柱上皮に変化する。この頃より上皮組織の空胞化が明らかになり、未熟な腺管が形成される。その後さらに絨毛様の突出がみられ細胞分化が起きる(図 9)。さらに遺伝子解析用に用いた上皮・間質を分けたサンプルでは、こうした発生の各段階で腺胃上皮・間質がコンタミネーションなく分離されていることが分かる(図 10)。

(前胃) 胎生 16 日の前胃では単層円柱上皮がみられるが、17 日には上皮細胞の多層化、胎生 18 日より表層上皮の扁平化が起き、さらに角化がはじまっている。胎生 20 日では上皮の角化が明らかとなっている(図 11)。

(十二指腸) 胎生 16 日では十二指腸粘膜上皮は未分化な細胞が 2-3 層に重層している。胎生 17~18 日に組織分化の最初の兆候である上皮の管腔側への不整な突出が始まっており、一方間葉系細胞が上皮細胞層に陥入し絨毛構造の基礎を形成するが、陰窩はまだ不完全で一部の重層細胞層は残存する。この後さらに形態変化は進み、胎生 20 日には単層上皮に被われた絨毛がみられている(図 12)。

(大腸) 胎生 16 日にみられる重層上皮は胎生 18 - 19 日頃より一部単層化し、内腔の拡大と間葉系細胞の陥入が進行し初期陰窩が形成される。さらに

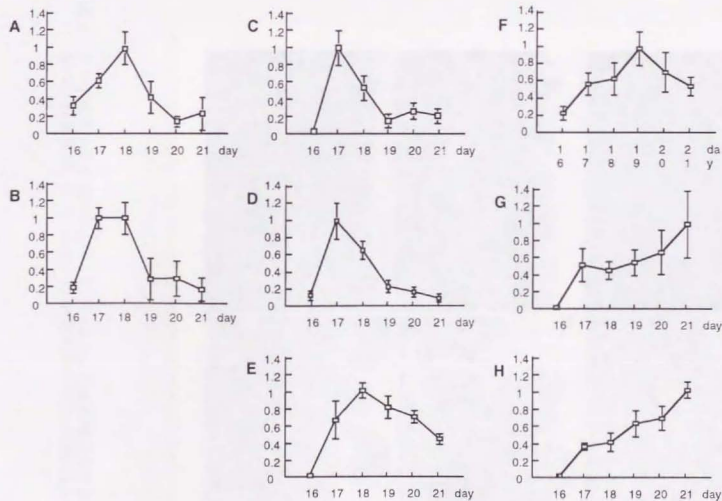


図8 前胃, 十二指腸, 大腸発生過程におけるHGF, c-met, HGFAの発現変化。
 前胃(A,B), 十二指腸(C-E), 大腸(F-H)におけるHGF(A,C,F), c-met(B,D,G), HGFactivator(E,H)
 mRNAの発現変化を示しており, 図6及び図7と同様の解析を行った。結果は平均 \pm SD (n=3)。
 前胃におけるHGFA遺伝子は発現量が少なく, 定量的解析は不能であった。

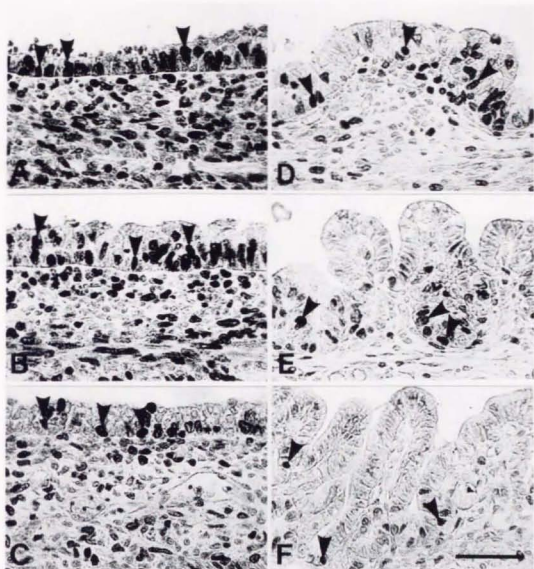


図9 ラット腺胃の発生過程における形態形成およびBrdU標識細胞数の変化。
A～F：妊娠後15～20日，矢頭：BrdU標識された核。棒線は $1\mu\text{m}$ を示す。

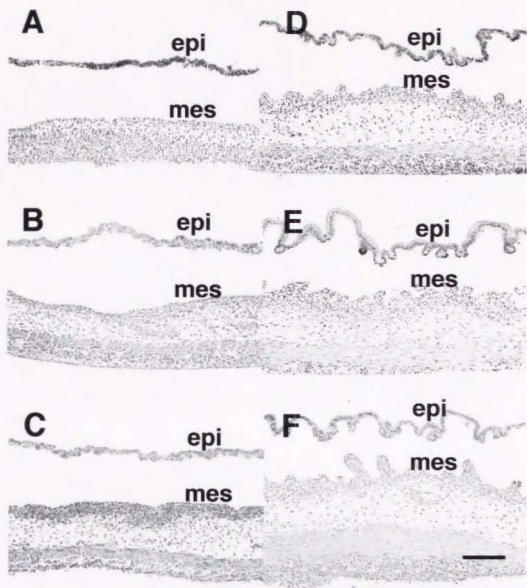


図10 ラット胎児腺胃上皮，間質の組織像
 A～F：妊娠15～20日。棒線は50 μ mを示す。
 上皮(epi)と間質(mes)にコンタミネーションなく分離されている。

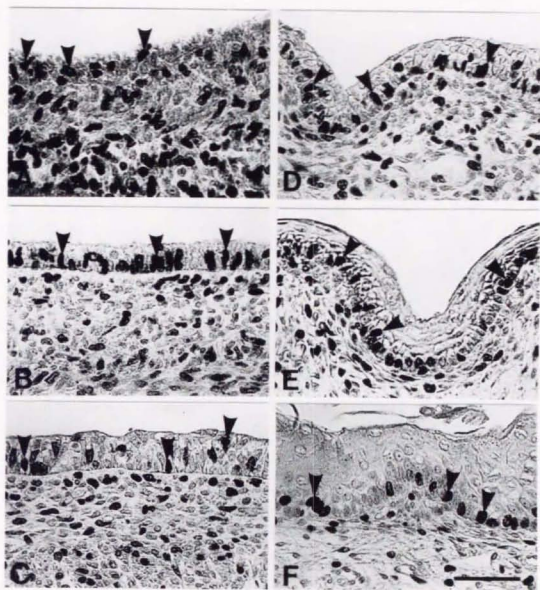


図 1 1 ラット前胃の発生過程における形態形成およびBrdU標識細胞数の変化。
A~F: 妊娠後15~20日, 矢頭: BrdU標識された核。棒線は1 μ mを示す。

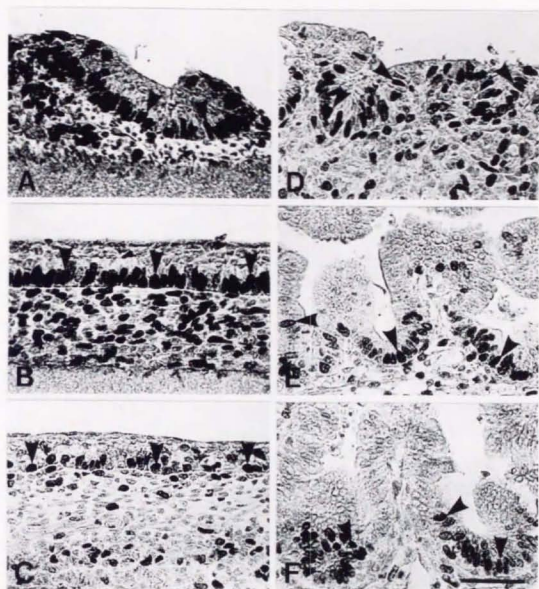


図12 ラット十二指腸の発生過程における形態形成およびBrdU標識細胞数の変化。
A~F: 妊娠後15~20日, 矢頭: BrdU標識された核。棒線は1 μ mを示す。

杯細胞や内分泌細胞の識別が可能となる。20 日すぎには単層の上皮に被われた陰窩がさらに伸長し、出生前には成獣とほぼ同じ構造となる（図 13）。

5) ラット消化管上皮細胞増殖の検討

BrdU 標識による上皮細胞増殖の解析結果は、図 14 に示すとおりであった。腺胃における標識率は胎生 18 日でわずかに増加がみられるものの、全体としては胎生 16 日より出生前にかけて徐々に減少する傾向がみられた。前胃、十二指腸、大腸は特に増加は認められず、胎生 16 日から 21 日まで漸減していた。何れの組織においても、標識細胞は初期では上皮全体に見られたが、発生が進むに従い基底側に限局している（図 9、図 11—13）。

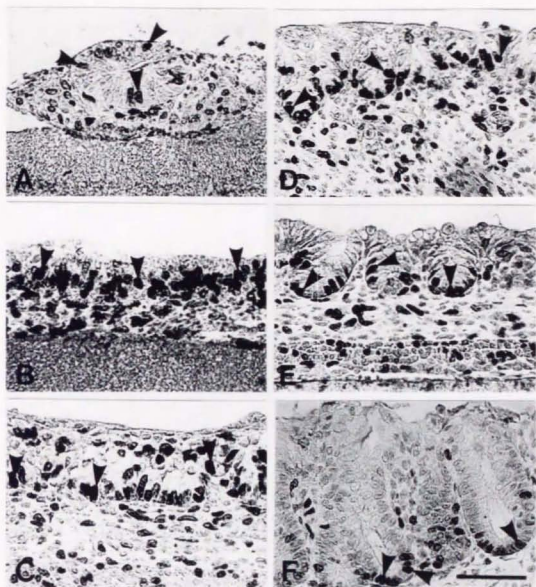


図13 ラット大腸の発生過程における形態形成およびBrdU標識細胞数の変化。
A~F: 妊娠後15~20日, 矢頭: BrdU標識された核。棒線は $1\mu\text{m}$ を示す。

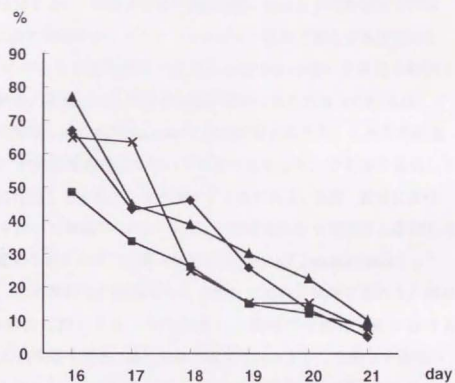


図14 ラット消化管発生過程での各部域における
BrdU標識上皮細胞の割合の変化。

- | | |
|------|--------|
| ■ 前胃 | ▲ 十二指腸 |
| ◆ 腺胃 | × 大腸 |

[考察]

器官発生において上皮・間質相互作用が極めて重要な働きを担っていることは古くより知られているが^{1)~3)}、そのメディエーターに関する検討は必ずしも十分とは言えない。本研究ではまず消化管における上皮間質相互作用の仲介者、特に液性増殖因子をスクリーニングする目的で消化管各部域の上皮および間質における各種増殖因子及びその受容体の遺伝子発現の検討を行った。その結果、間質にのみ遺伝子発現が認められたのは HGF、KGF で、上皮にはその受容体 c-met、KGF receptor の発現が認められた。これらの結果は HGF、KGF が消化管各部域において間質で産生され、受容体を発現している上皮組織に作用していることを示唆するものである。実際、教室における初代培養系を用いた検討で HGF、KGF の部域特異的な消化管上皮細胞増殖促進作用が認められている（文献 6・8 および personal communication）。

本研究では、その多彩な生理活性より HGF に注目し検討を進めた。増殖因子の部域特異性に関しては、今回検索した範囲では前胃上皮における KGFR mRNA の高発現を除き、消化管各部域間ではっきりした遺伝子発現の差が認められなかった。この結果より、これら増殖因子が消化管において極めて根元的な役割を担っており、上皮の分化を決定する部域特有の指令的シグナルではなく、誘導的なシグナルに関与していることが示唆された。

HGF 関連遺伝子の消化管各部域の上皮間質における発現パターンはヒト脳の検討結果とは対照的（白質星状細胞では HGF、HGFA 遺伝子の発現が共に認められている^{4・8)}）であるが、マウス肝臓とは一致したパターンとなっている（parenchymal cell（上皮に相当）に HGFA mRNA, non-parenchymal cell（間質に相当）に HGF mRNA が認められている）。ヒト胎児消化管において上皮に HGF mRNA の発現が認められたとの報告もあるが^{5・9)}、これらの実験結果より消化管局所において間質より非活性型 HGF が分泌され、標的組織の上皮レベルで HGFA により活性化され作用する、さらにその HGFA も上皮より分泌されるインヒビターにより制御される、というシステムが存

在することが示唆された(図15)。いくつかの実験結果より活性化型二量体の HGF が不安定であることが示されており⁴⁹⁾⁵⁰⁾, そうした点から proHGF の活性化がレセプターの近傍で行われることは、極めて合理的といえる。間質で c-met mRNA の発現が認められているが、HGFA mRNA の発現は認められておらず、その意義ははっきりしないが、ヒト消化管の筋層における c-met 遺伝子の発現が報告されている⁶²⁾。

HGF や c-met mRNA の発現量は消化管の各領域ではっきりした差異が見られないが、HGFA 及び HAI-1 mRNA の発現量は領域による違いが認められている。この違いが、何に由来するのか明らかではないが、前胃においては HGFA, HAI-1 mRNA の発現量がともに少なく、HGFA の turn over の状態が原因となっている可能性はある。

ラット胎児消化管は胎生後期の16日から21日で著明な構造変化が起きるが、この形態形成期における腺胃間質での HGF mRNA 発現増加、上皮における c-met, HGFA mRNA 発現増加から HGF 関連遺伝子が厳密なコントロール下にあり、局所における HGF システムが HGFA の HGF 変換酵素としての働きとともに腺胃の腺管形成に深く関与していることが示唆された。また c-met, HGFA mRNA の発現変化はほぼ同じパターンであり、この両遺伝子の発現が、その本体は不明であるが、類似のメカニズムにより制御されている可能性が示された。c-met, HGFA mRNA の発現が出生直前に増加しているのに対し、HGF mRNA の発現はこの時期に減少している。この解離に対する説明としては、過剰に産生された HGF が細胞外基質にストックされ^{28)・60)・61)}、発生過程が進むに従い HGFA により活性化され c-met に結合している可能性が考えられる。

HGF, c-met mRNA の発現増加は消化管の他の領域(前胃、十二指腸、大腸)の形態形成過程でも認められた。BrdU 標識による解析では対応するような上皮細胞増殖は認められず、HGF の持つ細胞増殖促進作用とは異なった作用が働いていることが示唆された。HGF は腎、乳腺、細胆管上皮細胞

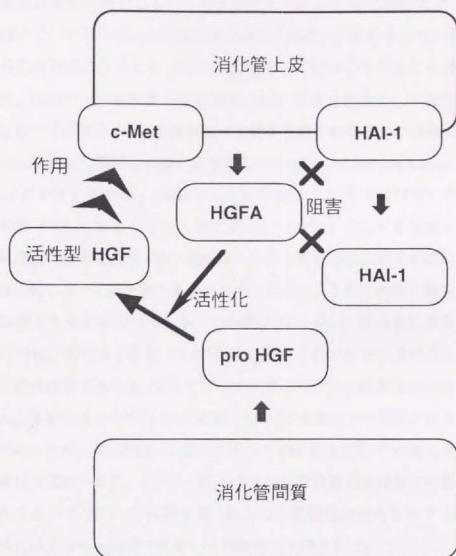


図15 ラット胎児消化管におけるHGF活性制御のシェーマ

などに対し、腺管様構造の形成作用が認められており^{1, 8), 51)-53)}、上皮組織の形態形成作用を有するものと考えられている。上記実験結果で HGF mRNA 発現のピークがいずれも形態形成の開始と時期が一致しており、消化管各部域の発生過程においても HGF が形態形成に関与していることが強く示唆された。実際ラット胃粘膜上皮組織を HGF 産生細胞株として知られる MRC5 の存在下で培養すると、上皮組織の著明な増殖と腺管形成の初期に認められる vacuolation に類似した変化が生じている(personal communication)。

HGF ノックアウトマウス (c-met ノックアウトマウス⁵⁴⁾) もほぼ同一の表現形) は胎生 13.5-15.5 日にかけて死亡する^{54), 55)}。このとき胎盤形成不全、肝実質細胞の顕著な減少、肢・横隔膜・舌などの骨格筋の異常が観察されるが、消化管においては特別な異常は認められない。そのため消化管発生に HGF は関与しないのではないかと疑問も生じるが、消化管に異常が認められないのは、死亡する胎生 13.5-15 日までのことであり、検討された形態形成期以前の時期にあたる。従ってノックアウトマウスの結果は本研究の結果となら矛盾するものではない。前胃では HGFA 遺伝子の発現が少なく定量不能であったが、十二指腸、大腸ではやはり形態形成過程で HGFA 遺伝子の発現増加が認められた。これらの結果より消化管形態形成過程での劇的な構造変化において HGF の作用が局所における発現増加のみならず HGFA による活性化によっても調節されている可能性が示唆された。

HGF はその多彩な生理活性から様々な検討がなされているが、その活性制御については未だ不明な点が多い。HGF の活性は複数のレベルで調節されていることが明らかにされており、高度に統制された制御機構が形成されている。その一つは遺伝子翻訳のレベルである。本研究結果でも示されたように、HGF の遺伝子発現はある組織(間質)に局限している。間質の細胞に HGF の発現を誘導する cis-acting element は同定されている⁷⁷⁾ものの、そこに反応し、HGF を誘導する転写因子は十分に検討されているとはいえない。HGF 遺伝子の発現を増加、あるいは抑制する因子もいくつか報告され

ているが²²⁾、どのように転写制御がおこなわれているのかは不明である。もう一つの活性制御段階が本研究で取り上げた蛋白活性化のステップであるが先にも述べたように、HGF 活性化因子として HGFA 以外にも Factor XII, uPA, tPA が知られている。これら活性化因子がそれぞれどの程度関与しているのか、さらに HGFA 自体も作用するのに活性化のステップが存在しており^{40), 78)}、こちらも不明な点が多く残されている。今後こうした活性制御のメカニズムをさらに明らかにしていくとともに、もともとの出発点である上皮間質相互作用におけるサイトカイン、細胞外マトリックスなどとのネットワークを解明していきたい。

今後の検討課題としてもうひとつ重要なのは、HGF の作用の多様性、すなわち細胞内シグナル伝達である。HGF により C-Met のチロシン残基の自己リン酸化が起きるが、リン酸化された C 末端側の 1349 番目と 1356 番目のチロシン残基は SH2 ドメインをもついくつかのシグナル分子が結合する部位として HGF のシグナル伝達において本質的な役割を果たしており、multifunctional docking site と呼ばれている⁷⁹⁾。ここに結合する分子としては Grb2, Gab1, SHC, Phosphoinositide 3-kinase (PI 3-kinase), phospholipase C γ (PLC- γ) などがあるが⁵⁹⁾、こうした各シグナル分子、シグナル伝達経路の違いにより異なった作用が発現するものと考えられている。例えば MDCK 細胞の分散では PI 3-kinase PI 3-kinase⁸⁰⁾や Ras-Rac/Rho 経路の活性化が必要^{81), 82)}であることが示されているが、細胞増殖促進作用には Grb2-SOS 複合体を介した Ras-mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway の活性化が必要である⁸³⁾ことが報告されている。また形態形成作用に関しては Gab1 によって HGF を加えなくても MDCK 細胞の形態形成が起きることが知られており⁸⁴⁾、その他にも signal transducers and activator of transcription (STAT)特に STAT3 の関与が報告されている。STAT の活性化を阻害すると HGF による MDCK 細胞の形態形成は抑制されるが、増殖や遊走は抑制されない⁸⁵⁾。

本研究はこれから多岐にわたり拡がるものであるが、こういった正常発生

におけるメカニズムは損傷修復においても働いていることが想定され、さらに発生分化の機構を明らかにすることは発癌、癌の進展のシステムの理解にも役立つことが期待される。その解明は臨床に重要な知識をもたらすものである。

[まとめ]

1) 消化管各部域の上皮・間質における各種増殖因子及びその受容体の遺伝子発現の検討において、間質にのみ遺伝子発現が認められたのは HGF, KGF で、上皮にはその受容体 c-met, KGF receptor の発現が認められた。これらの結果より HGF, KGF が消化管各部域において間質で産生され、受容体を発現している上皮組織に作用していることが示唆された。

2) HGF 関連遺伝子の消化管各部域の上皮間質における発現パターン (HGF mRNA は間質に限局して認められたが HGFA 及び HAI-1 mRNA の発現は上皮のみに見られた。また c-met mRNA は上皮・間質とも発現が認められた。) より消化管局所において間質より非活性型 HGF が分泌され、標的組織の上皮レベルで HGFA により活性化され作用する、さらにその HGFA も上皮より分泌されるインヒビターにより制御される、というシステムが存在することが示唆された。

3) 消化管各部域の形態形成過程で HGF, c-met mRNA の発現増加がみられたが、BrdU 標識による解析では対応するような上皮細胞増殖は認められず、組織像との対応からも HGF が細胞増殖促進作用とは異なった作用、すなわち形態形成に働いていることが示唆された。HGFA mRNA も発生過程で発現増加を示しており、HGF の作用が局所における発現増加のみならず、HGFA による活性化によっても調節されている可能性が示唆された。

[参考文献]

- (1) Sawer, R. H., and Fallon, J. F. Epithelial-mesenchymal interactions in development. Praeger Publishers, New York, 1983.
- (2) Sharpe, P. M., and Ferguson, M. W. J. Mesenchymal influences on epithelial differentiation in developing systems. *J. Cell Sci. Suppl.* 10, 195-230, 1988.
- (3) Mizuno, T., and Yasugi, S. Susceptibility of epithelia to directive influence of mesenchymes during organogenesis: Uncoupling of morphogenesis and cytodifferentiation. *Cell. Different. Dev.* 31, 151-159, 1990.
- (4) Cunha, G. R., Bigsby, R. M., Cooke, P. S., and Sugimura, Y. Stromal-epithelial interactions in adult organs. *Cell Differ.* 17, 137-148, 1985.
- (5) Mercola, M., and Stiles, C. D. Growth factor superfamilies and mammalian embryogenesis. *Development* 102, 451-460, 1988.
- (6) Bissell, M. J., Hall, H. G., and Parry, G. How does the extracellular matrix direct gene expression? *J. Theor. Biol.* 99, 31-68, 1982.
- (7) Sariola, H., Aufderheide, E., Bernhard, H., Henke-Fafe, S., Dippold, W., and Ekblom, P. Antibodies to cell surface ganglioside GD3 perturb inductive epithelial-mesenchymal interactions. *Cell* 54, 235-245, 1988.
- (8) Tsukada, S., Ichinose, M., Yahagi, N., Matsubara, Y., Yonezawa, S., Shiokawa, K., Furihata, C., Miki, K., and Fukamachi, H. Induction of precocious pepsinogen synthesis by glucocorticoids in fetal rat gastric epithelium in organ culture: Importance of mesenchyme for epithelial differentiation. *Differentiation* 62, 239-247, 1998.
- (9) Fukamachi, H., Ichinose, M., Ishihama, S., Tsukada, S., Yasugi, S., Shiokawa, K., Furihata, C., Yonezawa, S., and Miki, K. Fetal rat glandular stomach epithelial cells differentiate into surface mucous cells which express cathepsin E in the absence of mesenchymal cells in primary culture. *Differentiation* 56, 83-89, 1994.
- (10) Gohda, E., Tsubouchi, H., Nakayama, H., Hirono, S., Sakiyama, O., Takahashi K., Miyazaki, H., Hashimoto, S., and 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.

(11) 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.

(12) Zarnegar, R., and Michalopoulos, G. K. Purification and biological characterization of human hepatopoietin A, a polypeptide growth factor for hepatocytes. *Cancer Res.* 49, 3314-3320, 1989.

(13) Tsubouchi, H., Niitani, Y., Hirano, S., Nakayama, H., Gohda, E., Arakaki, N., Sakiyama, O., Takahashi, K., Kimoto, M., Kawakami, S., Setoguchi, M., Tachikawa, T., Shin, S., Arima, T., and Daikuhara, Y. Levels of the human hepatocyte growth factor in serum of patients with various liver diseases determined by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Hepatology* 13, 1-5, 1991.

(14) Weidner, K. M., Arakaki, N., Hartmann, G., Vanderkerckhove, J., Weingart, S., Reider, H., Fonatsch, C., Tsubouchi, H., Hishida, T., Daikuhara, Y., and Birchmeier, W. Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7001-7005.

(15) Shima, N., Nagao, M., Ogaki, F., Tsuda, E., Murakami, A., and Higashio, K. Tumor cytotoxic factor/hepatocyte growth factor from human fibroblasts: cloning of its cDNA, purification and characterization of recombinant protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180, 1151-1158, 1991.

(16) Rubin, J. S., Chan, A. M. -L., Bottaro, D. P., Burges, W. H., Taylor, W. G., Cech, A. C., Hirschfield, D. W., Wong, J., Miki, T., Finch, P. W., and Aaronson, S. A. Broad-spectrum human lung fibroblast-derived mitogen is a variant of hepatocyte growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 415-419, 1991.

(17) Uehara, Y., and Kitamura, N. Expression of a human hepatocyte growth factor/scatter factor cDNA in MDCK epithelial cells influences cell morphology,

- motility and anchorage-independent growth. *J. Cell Biol.* 117, 889-894, 1992.
- (18) 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.
- (19) Bussolino, F., Di Renzo, M. F., Ziche, M., et al. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J. Cell Biol.* 119, 629-641, 1992.
- (20) Boros, P. and Miller, C.M. Hepatocyte growth factor : a multifunctional cytokine. *Lancet* 345, 293-295, 1995.
- (21) Zarnegar, R., and Michalopoulos, G. K. The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J. Cell. Biol.* 129, 1177-1180, 1995.
- (22) Matsumoto, K., and Nakamura, T. Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor. *J. Biochem.* 119, 591-600, 1996.
- (23) Miyazawa, K., Tsubouchi, H., Naka, D., Takahashi, K., Okigaki, M., Arakaki, N., Nakayama, H., Hirano, S., Sakiyama, O., Takahashi, K., Ghoda, E., Daikuhara, Y., and Kitamura, N. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 967-973, 1989.
- (24) Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimomura, M., Sugimura, A., Tashiro, K., and Shimizu, S. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342, 440-443, 1989.
- (25) Lokker, N. A., Mark, M.R., Luis, E. A., Bennett, G. L., Robbins, K. A., Baker, J. B., and Godowski, P. J. Structure-function analysis of hepatocyte growth factor: identification of variants that lack mitogenic activity yet retain high affinity receptor binding. *EMBO J.* 11, 2503-2510, 1992.
- (26) Naka, D., Ishii, T., Yoshiyama, Y., Miyazawa, K., Hara, H., Hishida, T., and Kitamura, N. Activation of hepatocyte growth factor by proteolytic conversion of a single chain form to a heterodimer. *J. Biol. Chem.* 267, 20114-20119, 1992.

- (27) Gek, E., Taylor, W. G., Chan, A. M. and Rubin, J. S. Processing of hepatocyte growth factor to the heterodimeric form is required for biological activity. *FEBS Lett.* 311, 17-21, 1992.
- (28) Naldini, L., Tamagnone, L., Vigna, E., Sachs, M., Hartmann, G., Birchmeier, W., Daikuhara, Y., Tsubouchi, H., Blasi, F., and Comoglio, P. M. Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J.* 11, 4825-4833, 1992.
- (29) Mizuno, K., Takehara, T., and Nakamura, T. Proteolytic activation of a single-chain precursor of hepatocyte growth factor by extracellular serine-protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 1631-1638, 1992.
- (30) Bottaro, D., Rubin, J. S., Faletto, D. L., Chan, A. M., 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.
- (31) Naldini, L., Weidner, K. M., Vigna, E., Gaudino, G., Bardelli, A., Ponzetto, C., Narsimhan, R. P., Hartmann, G., Zarnegar, R., Michalopoulos, G. K., Birchmeier, W., and Comoglio, P. M. Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J.* 10, 2867-2878, 1991.
- (32) Komada, M., Miyazawa, K., Ishii, T., and Kitamura, N. Characterization of hepatocyte-growth-factor receptors on Meth A cells. *Eur. J. Biochem.* 204, 857-864, 1992.
- (33) Bardelli, A., Pugliese, L., and Comoglio, P. M. "Invasive-growth" signaling by the Met/HGF receptor: the hereditary renal carcinoma connection. *Biochem. Biophys. Acta* 1333, M41-M51, 1997.
- (34) Komada, M. and Kitamura, N. The cell dissociation and motility triggered by scatter factor/hepatocyte growth factor are mediated through the cytoplasmic domain of the c-Met receptor. *Oncogene* 8, 2381-2390, 1993.
- (35) Weidner, K. M., Sachs, M., and Birchmeier, W. The met receptor tyrosin kinase

- transduces motility, proliferation, and morphogenic signals of scatter factor/hepatocyte growth factor in epithelial cells. *J. Cell Biol.* 121, 145-154, 1993.
- (36) Tamura, M., Arakaki, N., Tsubouchi, H., Takada, H., and Daikuhara, Y. Enhancement of human hepatocyte growth factor production by interleukin-1 alpha and -1 beta and tumor necrosis factor-alpha by fibroblasts in culture. *J. Biol. Chem.* 268, 8140-8145, 1993.
- (37) Matsumoto, K., Tajima, H., Okazaki, H., and Nakamura, T. Negative regulation of hepatocyte growth factor gene expression in human lung fibroblasts and leukemic cells by transforming growth factor- β 1 and glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 267, 24917-24920.
- (38) Trusolino, L., Pugliese, L., and Comoglio, P. M. Interactions between scatter factors and their receptors: hints for therapeutic applications. *FASEB J.* 12, 1267-1280, 1998.
- (39) Rubin, J. S., Bottaro, D. P., and Aaronson, S. A. Hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, the c-met prot-oncogene product. *Biochem. Biophys. Acta* 1155, 357-371, 1993.
- (40) Miyazawa, K., Shimomura, T., Kitamura, A., Kondo, J., Morimoto, Y., and Kitamura, N. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. *J. Biol. Chem.* 268, 10024-10028, 1993.
- (41) Miyazawa, K., Shimomura, T., and Kitamura, N. Activation of hepatocyte growth factor in the injured tissues is mediated by hepatocyte growth factor activator. *J. Biol. Chem.* 271, 3615-3618, 1996.
- (42) Okajima, A., Miyazawa, K., Naitoh, Y., Inoue, K., and Kitamura, N. Induction of hepatocyte growth factor activator messenger RNA in the liver following tissue injury and acute inflammation. *Hepatology* 25, 97-102, 1997.
- (43) Kinoshita, Y., Kishi, K., Asahara, M., Matsushima, Y., Wang, H., Miyazawa, K.,

- Kitamura, N., and Chiba, T. Production and activation of hepatocyte growth factor during the healing of rat gastric ulcers. *Digestion* 58, 225-231, 1997.
- (44) Shimomura, T., Denda, K., Kitamura, A., Kawaguchi, T., Kito, M., Kondo, J., Kagaya, S., Qin, L., Takata, H., Miyazawa, K., and Kitamura, N. Hepatocyte growth factor activator inhibitor, a novel kunitz-type serine protease inhibitor. *J. Biol. Chem.* 272, 6370-6376, 1997.
- (45) Chomczynsky, P. and Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159, 1987.
- (46) Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 5463-5467, 1977.
- (47) Gilliland, G., Perrin, S., Blanchard, K., and Bunn, H.F. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 2725-2729, 1990.
- (48) Yamada T., Yoshiyama, Y., Tsuboi, Y., and Shimomura, T. Astroglial expression of hepatocyte growth factor and hepatocyte growth factor activator in human brain tissues. *Brain Res.* 762, 251-255, 1997.
- (49) Thewke, D. P., and Seeds, N. W. 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.
- (50) Wang, Y., Selden, C., Galnán, D., and Hodgson, H. J. Hepatocyte growth factor (HGF/SF) is expressed in human epithelial cells during embryonic development; studies by in situ hybridisation and northern blot analysis. *J. Anat.* 185, 543-551, 1994.
- (51) Soriano, J. V., and Pepper, M. S., Nakamura, T., Orci, L., and Montesano, R. J. *Cell Sci.* 108, 413-430, 1995.
- (52) Niranjan, B., Buluwela, L., Yant, J., Perusinghe, N., Atherton, A., Phippard, D.,

- Dale, T., Gusterson, B., and Kamalati, T. Development 121, 2897-2908, 1995.
- (53) Johnson, M., Koukoulis, G., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Iyer, A. Hepatology 17, 1052-1061, 1993.
- (54) Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shiota K, Kuno J, Noda T, Kitamura N. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. Nature 373, 703-705, 1995.
- (55) Schmidt, C. Blatt, 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, 1995.
- (56) Blatt, F. Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A., and Birchmeier, C. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. Nature 376, 768-771, 1995.
- (57) Matsumoto, K., and Nakamura, T. Hepatocyte growth factor (HGF) as a tissue organizer for organogenesis and regeneration. Biochem. Biophys. Res. Commun. 239, 639-644, 1997.
- (58) Trusolino, L., Pugliese, L., and Comoglio, P. M. Interactions between scatter factors and their receptors: hints for therapeutic applications. FASEB J. 12, 1267-1280, 1998.
- (59) Birchmeier, C., and Gherardi, E. Developmental roles of HGF/SF and its receptor c-Met tyrosine kinase. Trends in Cell Biol 8, 404-410, 1998.
- (60) Lyon, M. Deakin, J.A. Mizuno, K. Nakamura, T. Gallagher, J.T. Interaction of hepatocyte growth factor with heparan sulfate. Elucidation of the major heparan sulfate structural determinants. J Biol Chem 1994, 269, 11216-23.
- (61) Taipale, J. and Keski-Oja, J. Growth factors in the extracellular matrix. FASEB J. 11, 51-59, 1997.
- (62) Kermorgant, S., Walker, F., Hormi, K., Dessirier, V., Lewin, M.J.M., and Lehy, T. Developmental expression and functionality of hepatocyte growth factor and c-met in

- human fetal digestive tissues. *Gastroenterology* 112, 1635-1647, 1997.
- (63) Mars, W. M., Zarnegar, R., Michalopoulos, G. K. Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. *Am. J. Pathol.* 143, 949-958, 1993.
- (64) Naldini, L., Vigna, E., Bardelli, A., Follenzi, A., Galmi, F., Comoglio, P. M. Biological activation of pro-HGF by urokinase is controlled by a stoichiometric reaction. *J. Biol. Chem.* 270, 603-611, 1995.
- (65) Shimomura, T., Miyazawa, K., Komiyama, Y., Hiraoka, H., Naka, D., Morimoto, Y., Kitamura, N. Activation of hepatocyte growth factor by two homologous proteases, blood-coagulation factor XIIa and hepatocyte growth factor activator. *Eur. J. Biochem.* 229, 257-261, 1995.
- (67) Thewke, D. P. and Seeds, N. W. Expression of hepatocyte growth factor/ scatter factor, its receptor, c-met, and tissue-type plasminogen activator during development of the murine olfactory system. *J. Neuroscience* 16, 6933-6944, 1996.
- (68) Fukumachi, H., Ichinose, M., Tsukada, S., Kakei, N., Suzuki, T., Miki, K., Kurokawa, K., and Masui, T. Hepatocyte growth factor region specifically stimulates gastro-intestinal epithelial growth in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 1445-1451, 1994.
- (69) Gumbiner, B. M. Epithelial morphogenesis. *Cell* 69, 385-387, 1992.
- (70) Sonnenberg, E., Meyer, D., Weider, K. M., and 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.
- (71) Rosen, E., Nigam, S. K., and Goldberg, I. D. Scatter factor and the c-met receptor: a paradigm for mesenchymal/epithelial interaction. *J. Cell Biol.* 127, 1783-1787.
- (72) Miyazawa, K., Shimomura, T., Naka, D., and Kitamura, N. Proteolytic activation of hepatocyte growth factor in response to tissue injury. *J. Biol. Chem.* 269, 8966-

8970, 1994.

(73) Fell, P. E. and Grobstein, C. The influence of extra-epithelial factors in the growth of mouse pancreatic epithelium. *Exp. Cell Res.* 53, 301-304, 1968.

(74) Kratochwil, K. "Embryonic induction." In *Cell interactions and Development Molecular Mechanisms* (ed. K. M. Yamada). John Wiley and Sons, New York, pp. 99-122, 1983.

(75) Saxen, L. *Organogenesis of the kidney*. Cambridge University Press, Cambridge, England, 1987.

(76) Hirai, Y., Takabe, K., Takashina, M., Kobayashi, S., and Takeichi, M. Epimorphin: Mesenchymal protein essential for epithelial morphogenesis. *Cell*, 69, 471-481, 1992.

(77) Plaschke-Schlutter, A., Behrens, J., Gherardi, E., and Birchmeier, W. Characterization of the scatter factor/hepatocyte growth factor gene promoter. *J. Biol. Chem.* 270, 830-836, 1995.

(78) Shimomura, T., Kondo, J., Ochiai, M., Naka, D., Miyazawa, K., Morimoto, Y., and Kitamura, N. Activation of the zymogen of hepatocyte growth factor activator by thrombin. *J. Biol. Chem.* 268, 22927-22932, 1993.

(79) Ponzetto, C., Bardelli, A., Zhen, Z., Maina, F., dalla Zonca, P., Giordano, S., Graziani, A., Panayotou, G., Comoglio, P. M. A multifunctional docking site mediates signalling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor-family. *Cell* 77, 261-271, 1994.

(80) Royal, I., and Park, M. Hepatocyte growth factor-induced scatter of Madin-Darby canine kidney cells requires phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 270, 27780-27787, 1995.

(81) Sachs, M., Weidner, K. M., Brinkmann, V., Walther, I., Obermeier, A., Ullrich, A., and Birchmeier, W. *J. Cell Biol.* 133, 1095-1107, 1996.

(82) Ridley, A. J., Comoglio, P. M., and Hall, A. Regulation of scatter

factor/hepatocyte growth factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1110-1122, 1995.

(83) Ponzetto, C. Zhen, Z., Audero, E., Maina, F., Bardelli, A., Basile, M. L., Giordano, S., Narsimhan, R., and Comoglio, P. J. *Biol. Chem.* 271, 14119-14123, 1996.

(84) Weidner, K. M. Di Cesare, S., Sachs, M., Brinkmann, V., Behrens, J., Birchmeier, W. Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature*, 384, 173-176, 1996.

(85) Boccaccio, C. Ando, M., Tamagnone, L., Bardelli, A., Michieli, P., Battistini, C., and Comoglio, P. M. *Nature*, 391, 285-288, 1998.

〔謝辞〕

今回の学位の提出にあたり本当に数多くの方々の御指導、お力添えをいただきました。皆様方のご協力なくしては、決して本研究は成り立ちませんでした。心より御礼申し上げます。

平成6年に大学に戻りましてから、一瀬雅夫先生には文字どおり一から、研究の直接の御指導をいただいております。学問に対する真摯な態度、研究者さらに人としてかくあるべし、という姿を身をもってお示し下さいました。私が、データがまとまらず落ち込んで御迷惑をおかけしているときも本当に根気強く励ましていただき、進むべき道を教えて下さいました。

三木一正先生には公私にわたり本当にひとかたならず、お世話になりました。研究するご許可をくださり、臨床面、研究面含め暖かく見守ってくださり、様々な発表の機会をお与えいただきました。

理学部分子発生 深町博史先生には実験開始当初より懇切丁寧に御指導いただき、消化管培養系を用いた検討、検体のサンプリング、標本の撮影をはじめとし、本当にお世話になりました。お忙しい最中、熱意あふれる興味深いお話をうかがわせていただき、本当に多くのことを教えていただきました。

指導教官の黒川 清先生、木村 哲先生には大学院で勉強させていただくことをご許可いただき、論文作製にあたっては貴重なご助言をいただきました。

小俣政男先生は臨床に研究に、若輩者の私を何かにつけ御指導下さいました。

愛知がんセンター病理学第一部 立松正衛先生、一瀬増太郎先生には本論文にもあります BrdU 標識による上皮細胞増殖の検討のご協力をいただきました。

京都大学霊長類研究所生化学 景山 節先生には研究室に伺わせていただき HGF activator の機能解析の御指導をいただきました。

東京工業大学生命理工学部生命理工学科 喜多村直美先生はラット HGF activator の sequence を教えて下さり、抗体をご提供下さいました。宮澤恵二先生、下村 猛先生には HGF activator の発現解析に際しお世話になりました。

理学部生化学 石丸 聡先生は私が実験開始当初のまだ右も左も分からぬ時、ご自身の実験の忙しい最中、それこそプラスミドの抽出から御指導下さいました。学生の方々にも何かとお世話になりました。西郷 薫先生には実験機材の使用、出入り許可をいただきました。榎森康文先生には実験機材の使用を御許可いただき、懇切丁寧に御指導いただきました。

理学部分子発生 塩川光一郎先生は実験機材の使用、出入りを御許可下さいました。田代先生には実験手法に関し、貴重なアドバイスをいただきました。学生の方々にもお世話になりました。

金子義保先生は増殖因子の検討にあたり、プライマー、RNA の御供与下さいました。

私の所属します消化器内科第八研究室の矢作直久先生、岡政志先生、加藤真子先生、建石綾子先生、倉形秀則先生、和田知則先生、城戸正開先生、辻 正弘先生、清水靖仁先生、鈴木雄久先生の諸先生方には私の実験時間、スペース、実験費用など多大なご迷惑をおかけしました。それにもかかわらず、常に励ましていただき、御指導、御協力下さいましたこと心より御礼申し上げます。矢作先生にはいつも頼りきりで、甘えてご負担ばかりおかけしてしまいました。岡先生は実験、コンピュータによるデータ処理を含め、何かにつけご助力いただきました。加藤先生は本論文でも使用しましたラット組織像の標本作製をして下さいました。

清水繁子さんには本当にいつも細かい組織標本作製していただきました。

鬼丸さんにはラットの世話で本当にお世話になりました。

医局の神谷さんには写真撮影でいつも急ぎの無理なお願いをきいていただきました。身内になりますが、両親、また妻にはいつも励まされ、勇気を与えてもらいました。

皆様に深く感謝申し上げるとともに、ご厚情に恥じないよう、本研究を道しるべとし精進したいと思います。

この書は、日本の経済発展と、その背景にある社会文化の変遷を、
戦後から現在までの長い時間をかけて、丁寧に描き出している。
著者は、経済学だけでなく、社会学、歴史学、文化研究などの
多岐にわたる分野の知識を駆使し、読者に深い洞察と理解を
提供する。本書は、単なる経済データの羅列ではなく、人々の
生活と経済の密接な関係性を、具体的な事例を通じて示す。
また、国際的な視点から日本の経済状況を比較対照し、
グローバルな文脈の中で日本の位置づけを明らかにしている。
本書は、学生だけでなく、社会人にも広く読まれるべき、
非常に価値のある一冊である。

