氏　　　　名	竹　内　健　治
生　年　月　日	
本　　　　籍	大阪府
学 位 の 種 類	博士（薬学）
学 位 記 番 号	博乙第242号
学位授与の日付	平成14年3月22日
学位授与の要件	論文博士（学位規則第4条第2項）
学位授与の題目	肝細胞増殖因子/scatter factor（HGF/SF）による細胞の増殖及び運動性の制御
論文審査委員（主査）	米田　幸雄（自然科学研究科・教授）
論文審査委員（副査）	正宗　行人（薬学部・教授）大熊　勝治（薬学部・教授） 中西　義信（医学系研究科・教授）伊藤　文昭（摂南大学・教授）

学 位 論 文 要 旨

HGF/SF is a growth factor that possesses diverse biological activities, such as stimulation of cell growth and motility. It exerts these diverse actions through binding to HGF/SF receptor, c-*met* protooncogene product. This binding activates various downstream targets of the HGF receptor, such as phosphatidylinositol-3'-OH kinase (PI3-K) and mitogen-activated protein kinase (MAPK), and also induces the expression of c-Fos, a transcription factor. However, the exact roles of these signaling molecules for the expression of a particular activity of HGF/SF remain to be clarified.

In this study, the signaling pathways of HGF/SF leading to stimulation of cell growth and motility were examined using several gastric carcinoma cell lines. HGF/SF induced c-*fos* transcription via the MAPK pathway which was essential for the mitogenic signal of HGF/SF, but not for the motogenic signal. c-Fos level was also regulated by HGF/SF at the translation step. HGF/SF induced phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E-binding protein via PI3-K- and FRAP/mTOR-dependent pathways, thereby stimulating the translation initiation rate of c-*fos* mRNA. These results indicate that regulation of the translation process of c-*fos* mRNA in addition to the immediate activation of c-*fos* transcription is necessary for the increase in the level of c-Fos protein to stimulate cell proliferation.

細胞増殖という生物、細胞にとってもっとも基本的な性質は、増殖因子とよばれる一群の物質が細胞に作用することによって誘起される。増殖因子は細胞膜上の受容体と結合し、細胞内で種々のシグナル伝達分子を活性化し、新たな遺伝子の発現を引き起こすことにより増殖に必要なプログラムを作動させる。

肝細胞増殖因子/scatter factor (HGF/SF)は、初代培養肝細胞の増殖を促進する因子として劇症肝炎患者や健常人の血漿より精製された増殖因子であり、上皮、内皮細胞を含む種々の細胞に対して増殖や運動性を促進する活性や、上皮細胞の集塊分散を促進する活性など多様な生物活性を持っている。また、ノックアウトマウスの解析によって、HGF/SF が欠失すると胎生期致死的になることより、発生過程において必須であることや、肝臓および腎臓が障害を受けた後の組織再生において重

要な役割を果たしていることが知られている。

HGF/SF は形質膜に存在する HGF/SF 受容体に結合することにより作用を発揮する。受容体はα鎖とβ鎖よりなるチロシンキナーゼ型受容体であり、HGF/SF の受容体への結合によってβ鎖のカルボキシル末端領域の二つのチロシン残基 Tyr1349、Tyr1356 がリン酸化される。これらのリン酸化残基は Grb2/Sos 複合体や Gab1 との結合を経て、Mitogen-activated protein kinase (MAP キナーゼ)や Phosphatidylinositol-3-kinase(PI3キナーゼ)など種々のシグナル伝達分子を活性化することが知られている。しかし、HGF/SF 刺激後の細胞応答、例えば細胞増殖や運動性の促進、細胞集塊の分散が、どのようなシグナル伝達分子を介して発現しているかについての詳細は明らかでない。そこで、著者は HGF/SF が誘導する細胞増殖、および運動性促進機構の解明を目的に以下の三つの研究を行った。

1. HGF/SF に対する増殖の応答性が異なる二種のヒト胃ガン細胞株 MKN74 と MKN7 を比較し、c-*fos* の発現誘導が、細胞増殖や運動性を促進するシグナルに関与しているかを検討した。

種々の増殖因子によるシグナル伝達は、細胞膜受容体、タンパク質リン酸化カスケードなどを経て、核における c-*fos* 遺伝子などの遺伝子群の発現に至る。そこで HGF/SF 刺激により c-*fos* mRNA、c-Fos タンパク質の発現が誘導されるかを、それぞれノザンブロティング法とイムノブロッティング法により検討した。その結果、HGF/SF により増殖が促進される MKN74 細胞では、10ng/ml HGF/SF 刺激後 c-*fos* mRNA は 40 分をピークに、c-Fos タンパク質は 60 分をピークに発現量が増加した。一方、増殖が影響を受けない細胞株 MKN7 では c-*fos* mRNA、c-Fos タンパク質ともに発現誘導は見られなかった。そこで、c-*fos* の発現を調節していると考えられる MAP キナーゼ活性を比較すると、いずれの細胞株においても HGF/SF 刺激 30 分をピークとする活性の上昇が見られたが、MKN7 細胞に比べ MKN74 細胞では顕著な MAP キナーゼ活性の増強が見られた。このことより、HGF/SF が誘導する細胞増殖の促進には、MAP キナーゼの活性化を介する c-*fos* の誘導が重要である可能性が示された。しかし、HGF/SF 刺激によって c-Fos 発現が誘導されない MKN7 細胞でも細胞集塊分散や、細胞運動性の促進が見られることより、c-Fos の発現が HGF/SF に応答した細胞集塊分散や細胞運動性促進には必要でないことが明らかとなった。また、細胞集塊分散に MAP キナーゼの活性化が必要であるかを MAP キナーゼ阻害剤 PD98059 を用いて調べると、HGF/SF が誘導する細胞集塊分散は MAP キナーゼ阻害剤によって完全に抑制された。このことより、細胞集塊分散や細胞運動を導くシグナルはMAP キナーゼ以降でc-*fos*を誘導する経路とは異なる経路により伝達されることが明らかとなった[1]。

2. HGF/SF によっては増殖が促進されるが、上皮増殖因子(EGF)によっては促進されない細胞株を材料とし、両因子により誘導されるシグナル伝達系、特に、転写制御因子 c-Fos の発現誘導を比較し、HGF/SF による細胞増殖促進機構の解明を目指した。

ヒト胃ガン細胞株 MKN74 を HGF/SF あるいは EGF で処理すると、MKN74 細胞の増殖は HGF/SF

によって促進されたが、HGF/SF 受容体と同様にチロシンキナーゼ型受容体を介して作用する EGF によっては促進されなかった。しかしながら、HGF/SF、EGF いずれの刺激によってもそれぞれの受容体のチロシンリン酸化は刺激後速やかに増加した。また、*c-fos* mRNA の発現も両因子の刺激により 40 分をピークとする応答性を示し、発現の強さ、及び、経時変化ともに一致した。c-Fos タンパク質の発現はいずれの因子の刺激においても 60 分をピークとする発現誘導が見られたが、その発現量は HGF/SF により顕著に増大したが、EGF では非常に低かった。これらの結果は、HGF/SF 処理細胞では転写後のレベルで c-Fos 発現量が制御されていることを示しており、HGF/SF が c-Fos の分解を抑制している可能性と、HGF/SF が *c-fos* mRNA の翻訳を促進している可能性が考えられた。c-Fos タンパク質はユビキチン-プロテアソーム系で分解される不安定なタンパク質であることが知られている。そこでプロテアソームの選択的阻害剤であるラクタシスチンを用いて分解過程を調べた結果、HGF/SF はプロテアソームによる c-Fos の分解を抑制していないことが明らかになった。このことより、HGF/SF は *c-fos* mRNA の翻訳を促進している可能性が考えられた。

翻訳調節の主な標的は翻訳開始段階であり、翻訳開始因子の eIF4E が mRNA の 5' キャップ構造に結合することが翻訳開始に必須である。 eIF4E は、翻訳抑制タンパク質 eIF4E-binding protein 1(4E-BP1)との結合によって活性が抑制されるが、4E-BP1 がリン酸化されると eIF4E が解離し翻訳が開始される。最近、細胞外の刺激により 4E-BP1 のリン酸化を導くシグナルが、 PI3 キナーゼ、 KBP12-rapamycin-associated protein / mammalian target of rapamycin (FRAP/mTOR)依存性であることが示された。HGF/SF、EGF 刺激による PI3 キナーゼと FRAP/mTOR の活性を *in vtro* キナーゼアッセイ法により検討すると、HGF/SF 刺激により PI3 キナーゼと FRAP/mTOR の顕著な活性化が起きたが、EGF 刺激ではそれらの活性化は弱かった。また、4E-BP1 のリン酸化をイムノブロット法により調べると、HGF/SF 処理した細胞でのみ速やかに 4E-BP1 のリン酸化が検出された。さらに、PI3 キナーゼ、FRAP/mTOR それぞれの選択的阻害剤 LY294002、ラパマイシンでの前処理は、HGF/SF によって誘導される 4E-BP1 のリン酸化を完全に阻害した。また、それらの阻害剤は HGF/SF によって誘導される c-Fos 発現量を EGF で誘導した細胞で見られた発現量にまで減少させた。これらの結果より、HGF/SF は PI3 キナーゼと FRAP/mTOR の両方に依存する経路を介して 4E-BP1 のリン酸化を促進し、*c-fos* mRNA の翻訳を促進することが明らかとなった[2)]。

3. HGF/SF と EGF との相互作用を受容体レベルで検討し、細胞運動性制御機構の解明を試みた。

三種のヒト胃ガン細胞株 MKN1、MKN7、MKN28 の細胞運動に対する HGF/SF、EGF の作用をボイデンチャンバー法により検討すると、両因子はいずれの細胞株の運動性も促進した。しかし、HGF/SF、EGF の両因子共存下では、三種の細胞株のうち MKN7 細胞でのみ HGF/SF が誘導する細胞運動が EGF により抑制された。HGF/SF は HGF/SF 受容体の自己リン酸化によってチロシンキナーゼを活性化し、それが HGF/SF の生物活性を誘導すると考えられている。そこで、MKN7 細胞における EGF による HGF/SF 作用の抑制の原因を調べるために、HGF/SF 受容体のチロシンリン酸化

に対するEGFの作用を検討すると、EGFはHGF/SFの誘導するHGF/SF受容体のチロシンリン酸化をさらに増強した。しかし、EGFによるHGF/SF作用の抑制が見られないMKN1、MKN28細胞では、EGFによるHGF/SF受容体のチロシンリン酸化の増強は検出できなかった。このことより、MKN7細胞でのEGFによるHGF/SF作用の抑制は、EGFが誘導するHGF/SF受容体のチロシンリン酸化亢進が原因であると考えられた[3]。

HGF/SFは初め肝細胞の増殖を促進する因子として発見されたが、その後上皮、内皮細胞を含む種々の細胞に対して増殖や運動性を促進する活性など多様な生物活性を持つ因子であることが知られるようになった。また、HGF/SFが活性化するシグナル伝達経路の解明も進み、多くのシグナル伝達分子が活性化することが知られるようになった。本研究では、HGF/SFが誘導するMAPキナーゼを介する*c-fos*の発現誘導が増殖促進に重要であり、そのc-Fosの発現量はHGF/SFによって誘導される*c-fos*遺伝子の転写促進シグナルのみならず、*c-fos* mRNAの翻訳促進シグナルによっても制御されていることを明らかとした。

文献

1) Nagamine, K., Shibamoto, S., Takeuchi, K., Miyazawa, K., Kitamura, N., Chatani, Y., Kohno, M., and Ito, F. (1996) *Eur. J. Biochem.* **236**, 476-481

2) Takeuchi, K., Shibamoto, S., Nagamine, K., Shigemori, I., Omura, S., Kitamura, N., and Ito, F. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 26077-26083

3) Takeuchi, K., Shibamoto, S., Hayakawa, M., Hori, T., Miyazawa, K., Kitamura, N., and Ito, F. (1996) *Exp. Cell Res.* **223**, 420-425

学位論文審査結果の要旨

肝細胞増殖因子（HGF）は，細胞膜上のチロシンキナーゼ型受容体を介して，細胞の増殖，分化，および運動性を制御する増殖因子である。しかしながら，HGF により誘起される細胞内各シグナルが，増殖や運動性の調節に関与する機構については不明な点が多い。

本論文では，HGF の作用に関して以下に要約する新規知見を通じて，生物が細胞増殖能あるいは細胞運動性を調節する機構解明に成功している。すなわち，①HGF/SF により細胞増殖が促進される細胞株（MKN74）では，転写因子 *c-fos* 遺伝子の発現が見られるが，促進されない細胞株（MKN7）では *c-fos* 遺伝子の発現が見られないことから，*c-fos*遺伝子の転写活性化がHGFの増殖促進活性に重要な反応である可能性を示した。②*c-fos* 遺伝子の発現は，細胞増殖が促進される場合には必須であるが，細胞運動促進の場合には必要でないのに対して，*c-fos*遺伝子上流に存在するMAPキナーゼ活性は運動性促進に必要であった。③PI3 キナーゼと FRAP/mTOR の両方に依存する経路を介して，4E-BP1 のリン酸化を促進し，このリン酸化に伴い翻訳開始因子の eIF4E が mRNA 上の 5'キャップ構造へ結合して，c-Fos 蛋白質への翻訳を促進することを解明した。

以上 3 点に概略された内容は，HGF の細胞増殖および細胞運動を制御するシグナル伝達経路を理解する上で新知見を与えるものであり，博士（薬学）論文に値する内容であると判断する。