

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791024

研究課題名（和文） HGF がヒト髄膜細胞の MMP-9 発現に及ぼす影響
～出血後水頭症の治療開発に向けて

研究課題名（英文） The effect of HGF on MMP-9 expression in human meningeal cells; Toward the development of novel therapeutic strategies for posthemorrhagic hydrocephalus

研究代表者

岡本 年男（OKAMOTO TOSHIO）

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：20431405

研究成果の概要（和文）：ヒト髄膜細胞を HGF で刺激し、semi-quantitative RT-PCR により MMP-9 mRNA 発現量の変化を調べたところ、濃度依存性に MMP-9 発現量が増加した。この効果は MEK および PI3K の特異的インヒビターによって抑制された。また、HGF と TGF-beta1 には MMP-9 発現増加の相加効果を認めた。本研究の結果は、早産児の脳室内出血後水頭症が自然軽快するメカニズムの一端を明らかにし、HGF を用いた出血後水頭症治療応用の可能性を示すものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We treated cultured human meningeal cells with human recombinant HGF and TGF-beta1. We found that the expression of MMP-9 was enhanced by HGF, most probably through the activation of the ERK1/2 and PI3K signaling pathways. And more, we found that TGF-beta1 enhances the effect of HGF on MMP-9 expression in human meningeal cells. Our present data may provide an impetus for the development of therapies targeting MMP-9 or HGF, which will eliminate the need for a shunt operation in PHH patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：脳室内出血、出血後水頭症、HGF、TGF-beta1、MMP-9、ヒト髄膜細胞

1. 研究開始当初の背景

早産児の出血後水頭症（posthemorrhagic

hydrocephalus: PHH) は、脳室内出血 (intraventricular hemorrhage: IVH) に引き続いておこる交通性水頭症で、その病理学

的特徴はクモ膜下腔の線維化＝細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) の増生である。現在、脳室-腹腔内シャント術が唯一確立された治療法であるが、早産児では外科的侵襲に耐えられないため、新生児医療の現場ではより侵襲の少ない治療法の開発が望まれている。そこで我々が注目したのは、PHH 発症例の中に脳室拡大の進行が停止・軽快する症例が存在することである。この機序を解明できれば PHH の新たな治療法の開発につながる可能性がある。

PHH の発症機序として、IVH 後に transforming growth factor (TGF)-beta1 が髄液中に放出され、その作用で ECM が増殖し、髄液吸収障害が生じることが報告されている。一方、増殖した ECM 分解の中心的役割を果たすのが、matrix metalloproteinases (MMPs) である。したがって我々は、PHH 軽快のメカニズムに MMPs が深く関与していると考えた。

この仮説を証明するため、正常新生児 3 例、クモ膜下出血 2 例、PHH 3 例の髄液中 MMP-9 活性を SDS-PAGE zymography で検討した結果、PHH 症例のみ髄液中 MMP-9 活性が高く、中でも脳室拡大が軽快した 2 例ではシャント術に至った 1 例より MMP-9 活性が高かったことを明らかにした。また in vitro において、PHH 発症に深く関与するサイトカインである TGF-beta1 により、ヒト髄膜細胞から MMP-9 が誘導されることを証明し、PHH 軽快例における MMP-9 産生の方が髄膜細胞である可能性を報告した。さらに、MMP-9 は hepatocyte growth factor (HGF) に誘導されること、更にその作用を利用して HGF が様々な線維性病態に治療応用されていることに着目し、PHH 患者の髄液中 HGF および MMP-9 濃度を測定した。その結果、

PHH 軽快例はシャント症例に比べて有意に HGF、MMP-9 濃度が高く、さらに HGF 濃度と MMP-9 濃度は有意な正の相関を示すことを見出した。これらの研究結果より、IVH 後に HGF が MMP-9 を誘導し、MMP-9 の作用で ECM 分解が促進され、PHH が軽快するという機序が考えられた。

しかし、PHH において HGF が MMP-9 を誘導するメカニズムは不明である。そこで、HGF が MMP-9 を誘導する分子生物学的メカニズムを in vitro で検討することで、PHH が軽快する病態の解明が進み、HGF を用いた PHH の治療応用の可能性が示されると考えられる。

2. 研究の目的

出血後水頭症が軽快する分子病態を明らかにし、新たな治療法の開発に寄与することを最終目的とし、これまでの研究成果を踏まえて以下の検討を行う。

- ① ヒト髄膜細胞 (human meningeal cells: HMC) を用いて HGF 刺激により MMP-9 産生が誘導されるかどうかを検討する。
- ② HGF が MMP-9 産生を誘導するのであれば、HGF 刺激の細胞内シグナル伝達経路を特定する。
- ③ HGF が MMP-9 産生を誘導するのであれば、より実際の PHH 病態に近い条件、すなわち TGF-beta1 存在下において HGF の MMP-9 産生促進作用がどのように変化するのかを検討する。

3. 研究の方法

- ① HMC を様々な濃度のヒトリコンビナン

ト HGF で刺激し、48 時間培養する。細胞から mRNA を抽出し、cDNA を合成する。MMP-9 特異的プライマーを用いて PCR 法にて MMP-9 DNA を増幅し、PCR 産物の intensity を GAPDH を対照とし、半定量化する。刺激する HGF 濃度の違いで MMP-9 発現量の違いに変化があるかどうかを比較検討する。

- ② HGF の代表的な細胞内シグナル伝達経路である MEK, PI3K それぞれの特異的インヒビター (PD98059, LY294002) 存在下と非存在下において、ヒトリコンビナント HGF による HMC 刺激を行い、MMP-9 の mRNA 発現に変化がないかどうかを検討する。
- ③ ヒトリコンビナント TGF-beta1 存在下と非存在下において、ヒトリコンビナント HGF による HMC 刺激を行い、MMP-9 の mRNA 発現に変化がないかどうかを検討する。

4. 研究成果

まず我々は、HMC が HGF のレセプターである c-Met および TGF-beta1 のレセプターである TGFBR1・TGFBR2 を発現していることを RT-PCR 法にて証明した (図 1)。

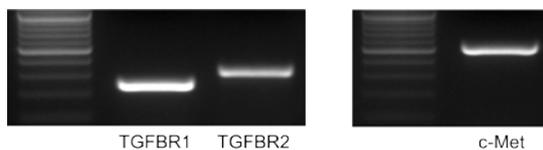


図 1 HMC における c-Met および TGFBR1・TGFBR2 の発現

次に、HMC を様々な濃度 (0-100 ng/ml) のヒトリコンビナント HGF で刺激し、semi-quantitative RT-PCR により MMP-9 mRNA 発現量の変化を調べたところ、濃度依

存性に MMP-9 発現量が増加することが判明した。(図 2)。

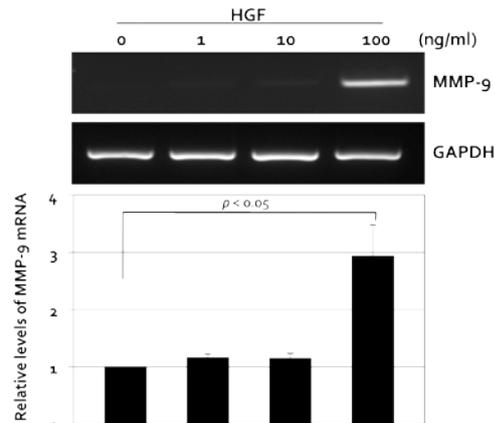


図 2 HGF による MMP-9 産生の変化

次に、MEK, PI3K の特異的インヒビターで前処置した HMC と、前処置を行っていない HMC それぞれをヒトリコンビナント HGF 100 ng/ml で刺激し、MMP-9 mRNA 発現量の変化の有無を semi-quantitative RT-PCR にて検討した。その結果、インヒビターの存在下では HGF の作用による MMP-9 の発現量増加が抑制されることが判明した。(図 3)。従って、HGF 刺激によってヒト髄膜細胞の MMP-9 産生は増加し、その細胞内シグナル伝達には MEK と PI3K の経路が関与している可能性が考えられた。

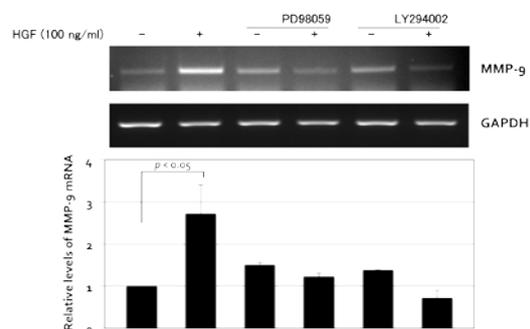


図 3 MEK および PI3K インヒビターによる MMP-9 発現の抑制効果

更に、ヒトリコンビナント TGF-beta1 10 ng/ml 存在下と非存在下において、ヒトリコンビナント HGF 10 ng/ml による刺激を行い、MMP-9 mRNA 発現量の変化を semi-quantitative RT-PCR にて検討したところ、TGF-beta1 非存在下では HGF による MMP-9 発現増加作用はほとんど認められなかったが、TGF-beta1 存在下においては MMP-9 発現増加作用は有意に増加することが判明した (図 4)。

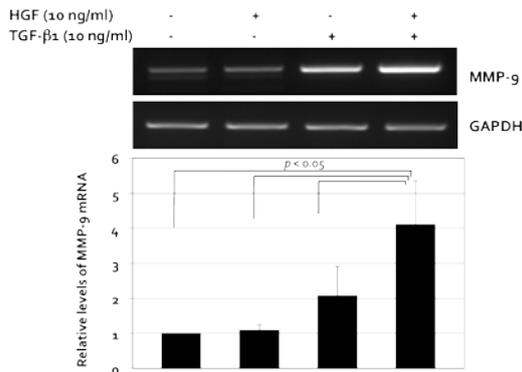


図 4 TGF-beta1 と HGF の MMP-9 産生における相加効果

以上の結果より、HGF 単独では 100 ng/ml という高濃度の刺激によってのみ HMC の MMP-9 産生増加を認めていたが、実際の PHH の病態に近い状態、すなわち TGF-beta1 の存在下においては、より生理的濃度に近い 10 ng/ml の HGF 刺激でも MMP-9 発現増加が認められた。このことは、HGF を用いた出血後水頭症治療応用の可能性を示すものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Okamoto T, Takahashi S, Nakamura E, Nagaya K, Hayashi T, Shirai M, Fujieda K. Increased expression of

matrix metalloproteinase-9 and hepatocyte growth factor in the cerebrospinal fluid of infants with posthemorrhagic hydrocephalus. Early Hum Dev. 2010; 86: 251-54. (査読あり)

DOI:10.1016/j.earlhumdev.2010.03.007.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 年男 (OKAMOTO TOSHIO)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号: 20431405

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: