

HGFによる皮膚の再生促進と老化防止の基礎的研究

大阪大学医学部 バイオメディカル教育研究センター 腫瘍生化学研究部

松本邦夫

Hepatocyte growth factor (HGF), originally discovered and identified as a powerful mitogen for hepatocytes, has mitogenic, motogenic, and anti-apoptotic activities for a variety of cells. HGF has organotrophic roles for regeneration of the liver, kidney, lung, etc. In skin tissues, we previously showed that HGF has mitogenic and motogenic activities for normal human epidermal keratinocytes and melanocytes. We here studied a mechanism of epidermal wound healing by HGF. HGF is produced by normal human skin fibroblasts and HGF production is up-regulated by interleukin-1, platelet-derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor, transforming growth factor- α , and prostaglandins. Using in vitro epidermal wound healing model, we found that HGF but not PDGF stimulated healing of cultured keratinocyte sheet. Importantly, addition of the conditioned medium of PDGF-treated fibroblasts but not non-treated fibroblasts stimulated in vitro epidermal wound healing, indicating that PDGF-treated fibroblasts produce a soluble factor(s) which stimulates epidermal wound healing. The fibroblast-derived soluble factor was identified as HGF. Since PDGF is secreted from activated platelets in wounded skin tissues, the results implicate the presence of a paracrine cascade for epidermal wound healing: PDGF secreted from platelets activates HGF gene expression in dermal fibroblasts, while fibroblast-derived HGF stimulates both migration and cell growth in epidermal keratinocytes, leading to rapid wound healing after skin injury. In addition, HGF can induce growth and migration of dermal endothelial cells, which are essentially involved in wound healing as well. We recently found that HGF potently prevents apoptotic cell death in many types of cells and has therapeutic effects on various fibrotic diseases such as liver cirrhosis, renal fibrosis, and lung fibrosis. Taken together, HGF may well become therapeutic tool for treatment of skin injury and fibrotic skin diseases.

1 緒言

再生現象は古くから多くの発生生物学者の関心を集めてきた。ヒトを含め哺乳類においても組織・臓器は活発な再生能を有しており、とりわけ肝臓は旺盛な再生力をもつことが古くから知られている。例えば生体肝移植によって移植された400gの肝臓は1カ月後には約1kgにまで再生する。HGFはわれわれによって1984年に初代培養肝細胞に対する増殖因子として発見され、1989年分子クローニングにより全構造が解明された。HGFは長らく実体の不明であった肝再生因子の本体であり、さらに現在では、HGFはさまざまな細胞を標的とし、多様な生理活性を有する代表的な増殖因

子の1つとなった^{1, 2)}。HGFのもつ増殖促進、細胞運動性促進、形態形成促進活性はいずれも機能的な細胞社会の構築には必須の生物活性であり、今やHGFは器官再生や器官形成過程において組織化を担う実行分子であることが明らかになった。一方、われわれはリコンビナントHGFを実験動物に投与する実験から、HGFが肝臓のみならず腎臓や肺の再生を強力に促進することを明らかにし、HGFの臨床応用への可能性を示した。さらに最近では根本的治療法の確立されていない難治性臓器疾患に対し、HGFがその発症を防止するのみならず、積極的に組織の再構築を促し機能改善をもたらすことを見出した。

ところで私達はHGFがヒト正常皮膚組織より分離した正常ケラチノサイトやメラノサイトに対する強力な増殖促進因子であること、またHGFが正常ケラチノサイトの遊走を促進することを報告した^{3, 4)}。この結果はHGFが皮膚組織においても創傷治癒促進、再生促進機能を担う重要な因子である可能性を示唆している。またHGFは脂



Roles of HGF in Wound Healing and Prevention of Skin Aging

Kunio Matsumoto

Division of Biochemistry,
Biomedical Research Center,
Osaka University Medical School

質代謝を改善する作用や育毛促進作用を有している。本研究においては HGF による皮膚の再生促進、発毛促進、老化防止を目指し、皮膚組織を標的とした in vivo、in vitro における HGF の生理活性を解明することを目的としている。

2 実験

2.1 ヒト正常皮膚由来ケラチノサイト、線維芽細胞ならびに血管内皮細胞の培養

ヒト正常皮膚よりデイスパーゼ処理によって表皮を分離し、さらにトリブシン処理によってケラチノサイトを分散させた。高アミノ酸 MCDB153 培地にてケラチノサイトを培養し、初代培養後 2 回継代培養したものを実験に用いた^{5, 6)}。一方、皮膚組織を 10% FCS を含む DMEM 培地にて組織培養し、組織片より増殖する線維芽細胞を継代培養した。皮膚微小血管内皮細胞は岩城硝子社より購入、付属プロトコールに従って培養した。

2.2 ヒト正常線維芽細胞における HGF 発現の解析

線維芽細胞を 48 well plate にて 24 時間培養後、1% FCS を含む DMEM 培地に交換し、増殖因子、サイトカインを添加後 24 時間培養した。培養上清 (conditioned medium) を回収し、培養上清中の HGF 量を酵素抗体法 (ELISA) によって定量した⁷⁾。また、線維芽細胞における HGF の発現を Western blotting ならびに Northern blotting 法によっても解析した。

2.3 ケラチノサイトの in vitro 創傷治癒解析

ケラチノサイトを 12well plate にコンフルエントになるまで培養後 10% FCS を含む DMEM 培地に交換し 24 時間培養した。直径 7mm の角膜移植用の円形メスを用いて培養ケラチノサイトシートに創傷処理を施した。ケラチノサイトを 48 時間培養し、創傷位置からの修復された長さを指標にして創傷治癒を評価した。

2.4 HGF の血管内皮細胞に対する増殖・運動能促進効果の検討

皮膚微小血管内皮細胞を 24well plate 上、またはコラーゲンゲル・チャンバーにて 24 時間培養後、1% FCS を含む DMEM 培地に交換し、増殖因子を添加して 72 時間後の細胞数ならびに遊走細胞数を測定した。

2.5 表皮で HGF を高産生するトランスジェニックマウスの作製とその表現型の解析

ケラチン・プロモーター下に HGF cDNA を繋いだ construct をマウス受精卵に顕微注入し、表皮特異的に HGF を高産生するトランスジェニック (Tg) マウスを作

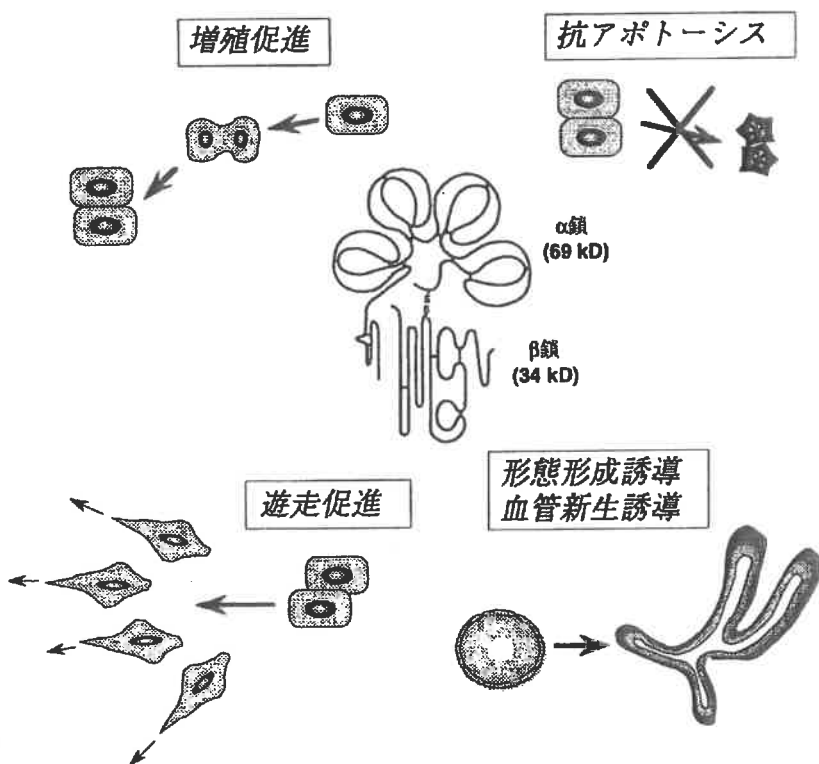


図 1 HGF の構造と代表的な生活物性。

製し、その皮膚組織を組織学的に調べた。

3 結果

3.1 ヒト正常線維芽細胞における HGF 産生

ヒト線維芽細胞における HGF の発現調節因子を調べるため、線維芽細胞の培養系に各種因子を添加し、24 時間後の HGF 産生量を ELISA により定量した (図 2)。その結果、IL-1 α (interleukin-1 α)、IL-1 β 、PDGF (platelet-derived growth factor)、bFGF (basic fibroblast growth factor)、TGF- α (transforming growth factor- α)、PGE $_1$ (prostaglandin E $_1$)、PGE $_2$ など複数の因子が HGF の産生を促進する positive regulator であることが明らかになった⁷⁻⁹⁾。これら複数の因子の中で、とりわけ PDGF は血小板中に存在し、皮膚の創傷治癒に関与することが予想された。そこで、今回 PDGF による皮膚線維芽細胞の HGF 発現誘導に注目し解析を進めた。

3.2 PDGF による HGF 発現誘導

皮膚線維芽細胞の培養系に PDGF (PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB) を添加すると濃度依存的に HGF 産生を強く促進した (図 2)。PDGF-

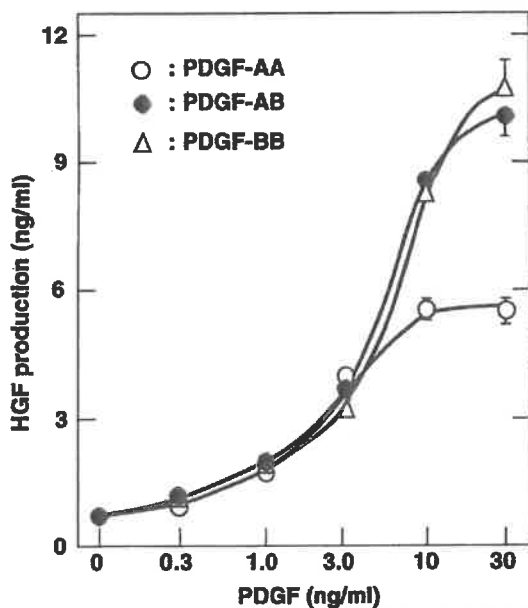


図2 PDGF によるヒト皮膚線維芽細胞の HGF 産生促進作用。

AB ならびに PDGF-BB はほぼ同等の HGF 産生促進活性を有し、30ng/mL の濃度で HGF 産生を約 10 倍促進した。また皮膚線維芽細胞の培養上清を回収し、Western blotting 法によって HGF 蛋白質の発現を調べたところ (図 3)、線維芽細胞は 85kDa の native type HGF を産生・分泌しており、PDGF ならびに IL-1 β は native type HGF の産生を著しく誘導することが明らかになった。さらに、PDGF による HGF 産生誘導が HGF 遺伝子の発現誘導を介したものであるか調べるため、線維芽細胞より RNA を調製し、Northern hybridization によって HGF mRNA の発現を調べた (図 4)。その結果、PDGF-AA、PDGF-BB、ならびに IL-1 β は HGF mRNA の発現を強く誘導し、HGF 蛋白質の産生促進活性と同様に、PDGF-BB は PDGF-AA よりも強い HGF 発現誘導活性をもっていた。したがって、PDGF は HGF 遺伝子の転写レベルでの活性化を介して HGF の産生・分泌を促進しているものと考えられる。

3.3 TGF- β 1 ならびにグルコルチコイドによる HGF 産生抑制

上記のように PDGF を含む複数の因子が HGF

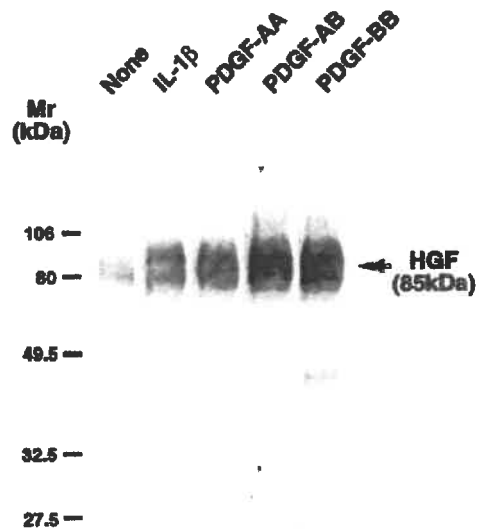


図3 PDGF によるヒト皮膚線維芽細胞の HGF 産生促進の Western blotting による解析。

の positive regulator として作用するのに対して、TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1) なら

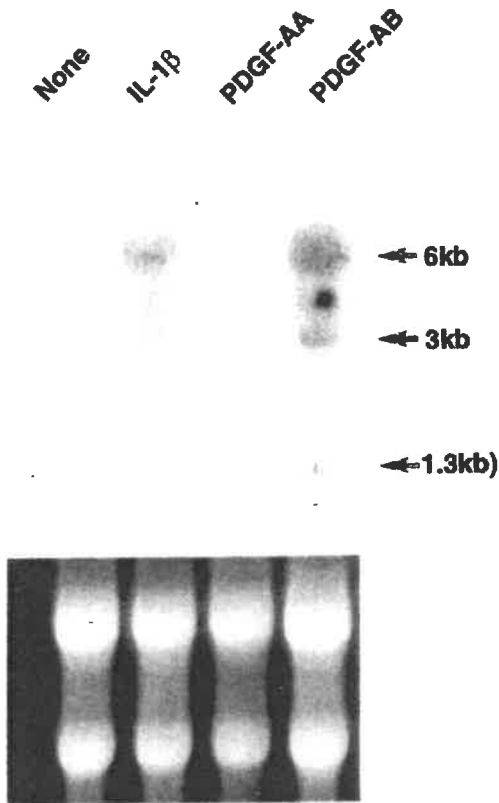
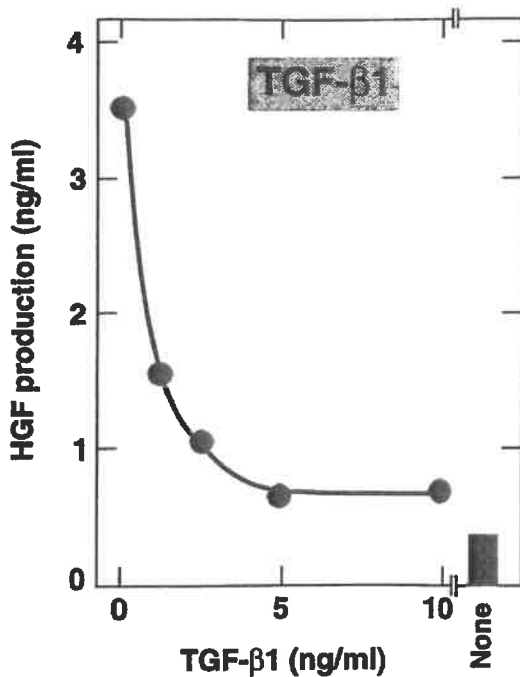


図4 PDGFならびにIL-1 β によるヒト皮膚線維芽細胞におけるHGF mRNA発現誘導。



びにグルココルチコイドはHGFの産生を抑制する negative regulator であることがわかった¹⁰⁾。皮膚線維芽細胞の培養系にPDGFを添加するとHGF産生は促進されるが、このときPDGF存在下にTGF- β 1あるいはグルココルチコイドと同様の活性をもつ dexamethasone を添加したところ、TGF- β 1ならびに dexamethasone はPDGFによって促進されるHGF産生を濃度依存的に抑制した(図5)。とりわけTGF- β 1の抑制活性は強く、5ng/mLの濃度においてPDGFのHGF産生促進活性を約90%阻害した。したがってTGF- β 1ならびにグルココルチコイドはHGF産生に対する negative regulator といえる。

3.4 PDGFによるHGF産生誘導を介した in vitro 創傷治癒促進

PDGFは血小板中に存在し、創傷に伴い血小板から分泌され治癒過程に関与すると予想される。そこで培養ケラチノサイトのシートに創傷処理を施し、その治癒に対するHGFならびにPDGFの作用を調べた(図6)。培養ケラチノサイトシートに創傷処理を施した後48時間培養すると、創傷

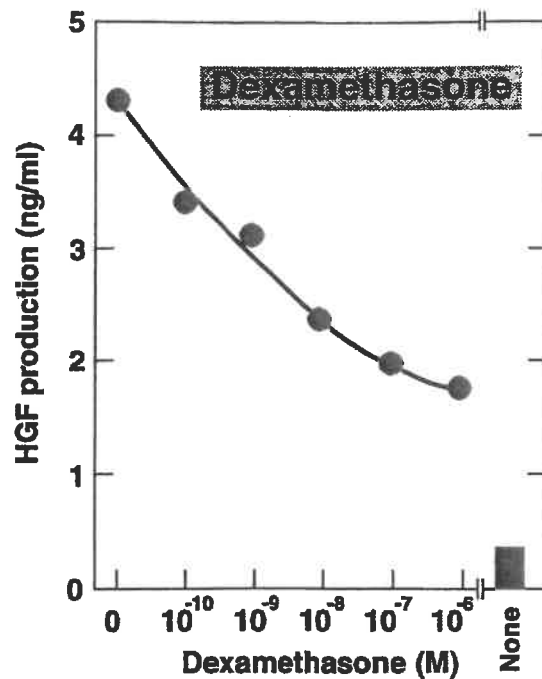


図5 ヒト皮膚線維芽細胞のHGF産生に対するTGF- β 1ならびに dexamethasone の濃度依存的抑制作用。

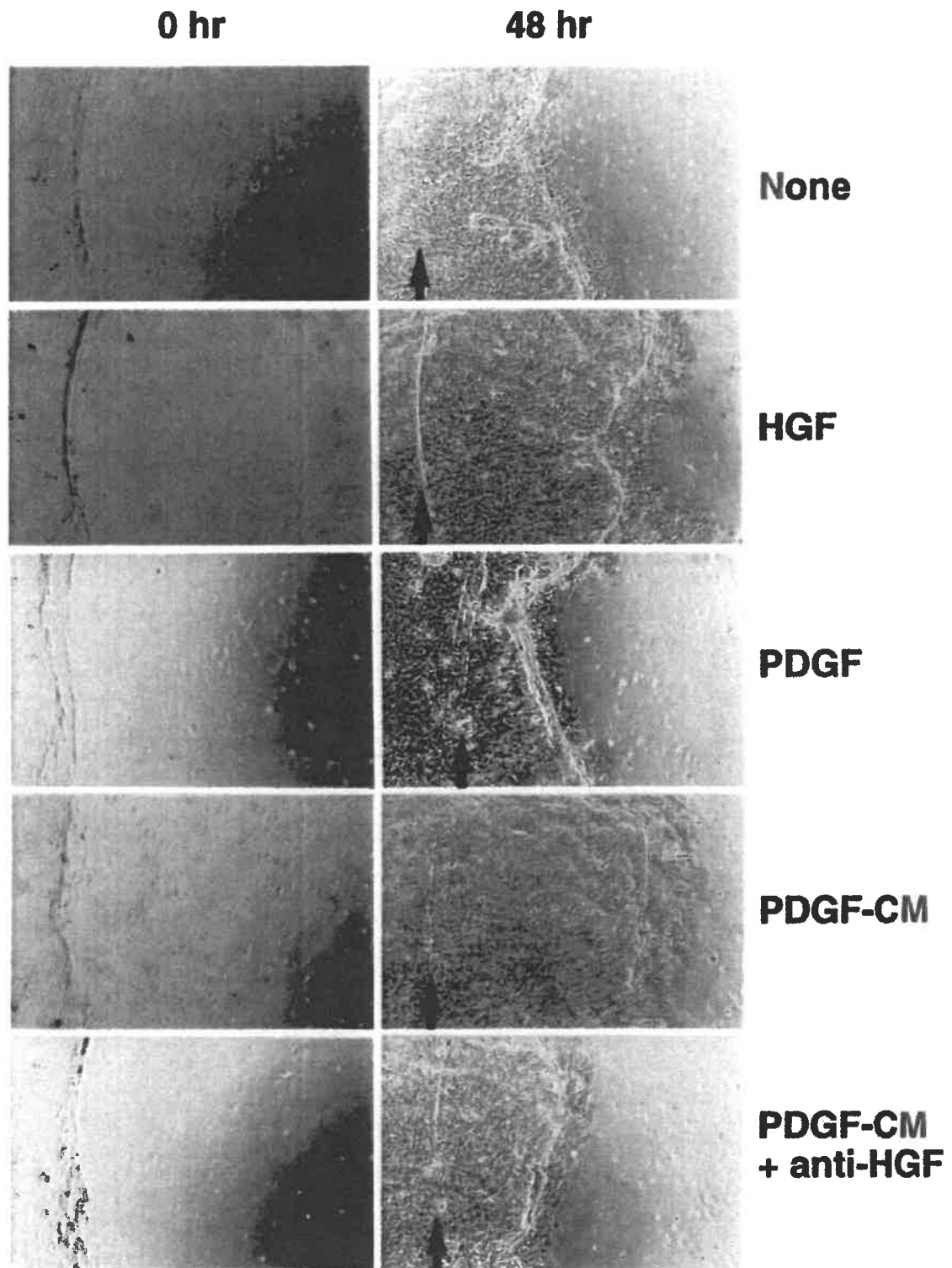


図6 ヒト正常皮膚ケラチノサイトの *in vitro* 創傷治癒に対する HGF、PDGF、ならびにヒト皮膚線維芽細胞由来培養上清 (CM) の作用。HGF ならびに PDGF で処理した線維芽細胞由来培養上清 (PDGF-CM) は培養ケラチノサイトの治癒を促進する。また、PDGF で処理した線維芽細胞由来培養上清 (PDGF-CM) の創傷治癒促進活性は抗 HGF によって中和された。

部先端よりケラチノサイトシートの伸展が認められる。一方、HGF 存在下に同様の処理を行い培養したところ、HGF は創傷部の修復を強く促進した。これに対して、PDGF は培養ケラチノサイトの修復には無効であった。PDGF は主に線維芽細胞や血管平滑筋細胞など間質細胞に作用し、上皮系細胞に対して生物活性を示さないことが知られており、ケラチノサイトは PDGF レセプターを発現していないものと考えられる。一方、私達は既に HGF がケラチノサイトの増殖ならびに遊走を強く促進することを報告しており、HGF はケラチノサイトの増殖ならびに遊走を促進することによって培養ケラチノサイトの修復を促進したものと考えられる。

ところで PDGF はケラチノサイトに対し直接生物活性を示さないものの間質線維芽細胞に対して強力な HGF 産生誘導因子として作用することから、PDGF は線維芽細胞における HGF 産生誘導を介して表皮の創傷治癒に関与する可能性が示唆された。そこで、次に皮膚線維芽細胞を PDGF の存在下ならびに非存在下で 24 時間培養し、その培養上清をケラチノサイトシートの培養系に添加し、修復に対する影響を調べた。その結果、無処理の線維芽細胞の培養上清はケラチノサイトシートの修復をわずかに促進した程度であったが、PDGF 処理を行った線維芽細胞の培養上清を添加したところ、ケラチノサイトシートの修復は強く促進された。この結果は PDGF 存在下で培養した皮膚線維芽細胞は表皮の創傷治癒を促進する液性因子を産生・分泌していることを示唆している。そこで、線維芽細胞由来の表皮創傷治癒促進因子が HGF ではないかと推定し、HGF に対する抗体存在下にて PDGF 処理線維芽細胞由来培養上清の作用を調べたところ、培養上清の表皮創傷治癒促進活性は HGF に対する抗体によってほぼ完全に阻害された。この結果は PDGF によって刺激された皮膚線維芽細胞が産生する表皮修復因子の実体は HGF であることを示している。

3.5 HGF による皮膚微小血管内皮細胞の増殖・遊走能促進効果

上述の様に HGF はケラチノサイトに対して強力にその増殖能や遊走性を亢進させるが、皮膚組織において HGF のレセプターである c-Met は血管内皮細胞でも発現が認められ、HGF の標的細胞となることが考えられる。そこで皮膚微小血管より単離した内皮細胞を用いて HGF の効果を検討した。まず増殖に及ぼす影響を調べたところ、HGF は著しい促進活性を示し、その効果は血管内皮細胞の強力な増殖因子である bFGF に勝るとも劣らず、VEGF (vascular endothelial growth factor) より有意に強かった (図 7 A)。またコラーゲンゲルへの浸潤能を指標に検討したところ、HGF は血管内皮細胞の遊走性を bFGF や VEGF よりも顕著に促進した (図 7 B)。

3.6 HGF の過剰発現が皮膚組織の発生・形成に及ぼす影響

ケラチノサイトに対する HGF の増殖促進因子ならびに創傷治癒促進因子としての機能を *in vivo* において確認するため、表皮特異的に HGF を高産生する Tg マウスを作製し、その皮膚組織構築に及ぼす影響を検討した。3 系統の Tg マウスを得ることに成功したが、これらのマウスの表皮は正常に形成され、過剰増殖等の組織秩序の乱れは全く認められなかった。しかし興味深いことにこれらの Tg マウスでは全身性に (耳や唇、鼻、尾

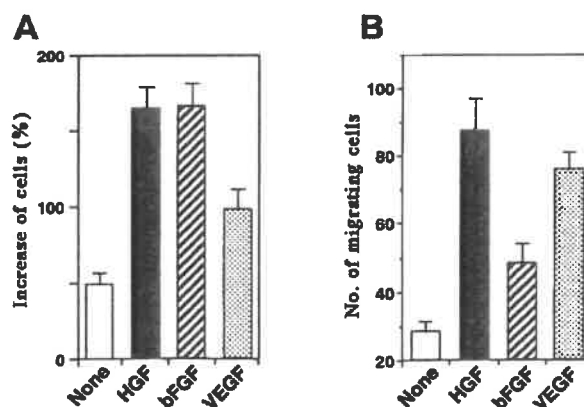


図7 HGF の皮膚微小血管内皮細胞に対する増殖 (A) ならびに (B) 促進効果。

などにも) 著しい色素の沈着が認められ(図8)、組織学的には異所的かつ過剰なメラノサイトの存在が観察された。このことは表皮で産生されたHGFが過剰なメラノサイトの増殖または移動・遊走をもたらした結果と考えられる。

4 考 察

4.1 PDGF-HGF ループを介した皮膚創傷治癒機構

PDGF ならびに HGF などの増殖因子は細胞増

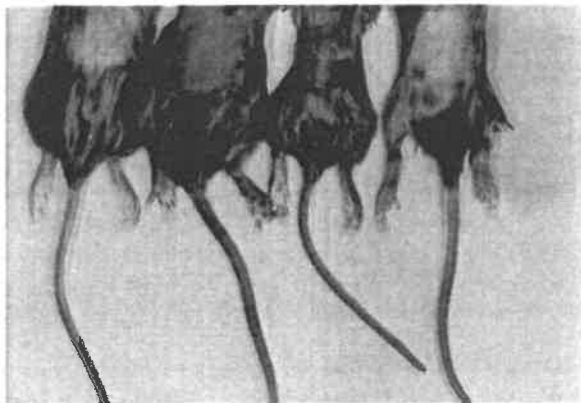


図8 表皮特異的にHGFを高産生するマウスの作出とその表現形質。1番左が野生型で他の3匹はHGFトランスジェニックマウスである。

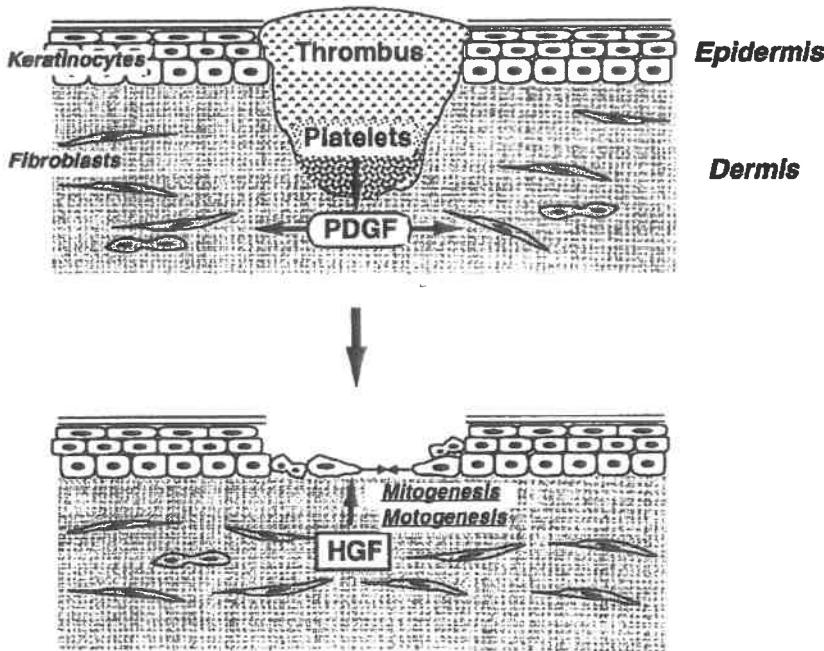


図9 HGF-PDGFループ機構を介した皮膚創傷治癒機構。血小板に由来するPDGFは間質線維芽細胞の増殖や促進を促し、真皮組織の修復を促す一方、間質線維芽細胞におけるHGFの産生を誘導する。このHGFは表皮ケラチノサイトの遊走ならびに増殖を促し、その結果、表皮の修復を促進している。

殖促進、細胞遊走促進活性を介して皮膚の創傷治癒促進に関与することが予想される。今回の研究から明らかになったPDGF-HGFループを介した皮膚創傷治癒機構を図9に示す。皮膚の創傷に伴い血小板が活性化され、血小板からは創傷部における血餅の形成を促すプロテアーゼに加えPDGFが分泌される。血小板に由来するPDGFは表皮ケラチノサイトには無効であるが、間質線維芽細胞の増殖や遊走を促し、真皮組織の修復を促すと同時に間質におけるHGFの発現を強力に促す。一方、間質線維芽細胞に由来するHGFは表皮ケラチノサイトに作用し、ケラチノサイトの遊走ならびに増殖を促し、その結果表皮の修復を促進していると考えられる。すなわち、PDGF-HGFループは皮膚の創傷治癒促進を支える重要な細胞間ネットワークとして機能しているものと思われる。

4.2 上皮-間葉(間質)相互作用と組織再生

腎臓、肺、肝臓、消化器官などを含む多くの臓器・組織の形成は上皮-間葉相互作用と呼ばれる組織間相互作用に依存することが知られている。HGF

は発生過程においては間葉に由来する因子として肝臓、腎臓、肺、消化管など様々な臓器における上皮系細胞(肝細胞、腎尿細管細胞、肺気管支上皮細胞、胃粘膜上皮細胞など)の増殖、遊走形態形成(例えば管腔形成など)を促進し、これら臓器の形成を担っている^{1, 2, 11)}。一方、成体においても様々な臓器の傷害にともない、HGFの発現は間葉系細胞(間質細胞)で高まり、上皮組織の再生を駆動している。皮膚はその発生学的起源からケラチノサイトやメラノサイトなど上皮系細胞によって構成される表皮と線維芽細胞や血管系細胞などによって構成される真皮からなる。今回の実験結果よりHGF

は皮膚微小血管の新生を促す因子であることが示唆され、表皮組織の再生に加え、皮膚血管新生促進を介して皮膚の創傷治癒を促していることが予想される。さらに HGF は毛根の発育をも促進することが知られている。皮膚組織における表皮-真皮相互作用は皮膚組織の再生・形成を支える重要な相互作用であり、HGF は主に真皮に由来する因子として皮膚組織の再生・維持を支える因子である。

4.3 HGF の抗線維化、抗アポトーシス作用

最近、私達は HGF が *in vivo* において肝硬変、慢性腎不全、肺線維症といった繊維性疾患に対して発症防止、治癒改善作用を有することを報告した¹²⁻¹⁴。HGF は組織の線維化を引き起こす TGF- β 1 の発現を抑制するとともに繊維性組織の融解、上皮組織の再構築を促す結果、これら繊維性疾患に対して強力な治癒改善作用を有している。これら慢性繊維性疾患はいずれも難治性疾患として知られ、現在でも根本的治療法は確立されておらず、HGF は根本的治療を可能にする有効な薬剤となろう。さらに、私達は HGF が劇症肝炎に代表される大量肝細胞死をほぼ完全にブロックすることも報告している¹⁵。また HGF の抗アポトーシス作用は肝細胞に限らず、尿細管上皮細胞、血管内皮細胞、神経細胞にも及んでいる^{13, 16, 17}。

皮膚疾患においても創傷後の斑痕、慢性皮膚疾患に伴う線維化に対して有効な治療法は確立されていない。皮膚組織の線維化も他の組織と同様に TGF- β 1 の過剰発現によって引き起こされることが知られており、HGF は皮膚の線維化をブロックする薬剤となることが予想される。また、紫外線・薬剤により表皮ケラチノサイト、メラノサイトなどのアポトーシスが引き起こされるが、HGF は表皮においても抗アポトーシス作用を発揮することが期待される。すなわち、HGF は皮膚においても皮膚の創傷治癒促進剤としての作用はもとより抗線維化、抗アポトーシス活性、毛根の発育促進、など複数の生理活性を介して皮膚の恒常性維

持、老化防止に機能することが期待される。

引用論文

- 1) K. Matsumoto and T. Nakamura (1997) Hepatocyte growth factor (HGF) as a tissue organizer for organogenesis and regeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 239, 639-644.
- 2) K. Matsumoto and T. Nakamura (1997) HGF: its organotrophic role and therapeutic potential. "Plasminogen-Related Growth Factors" (ed. E. Gherardi), Jhon Wiley & Sons, pp. 198-214.
- 3) K. Matsumoto, K. Hashimoto, K. Yoshikawa, and T. Nakamura (1991) Marked stimulation of growth and motility of human keratinocytes by hepatocyte growth factor. *Exp. Cell Res.*, 196, 114-120.
- 4) K. Matsumoto, H. Tajima, and T. Nakamura (1991) Hepatocyte growth factor is a potent stimulator of human melanocyte DNA synthesis and growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 176, 45-51.
- 5) K. Matsumoto, K. Hashimoto, M. Hashiro, H. Yoshimasa, and K. Yoshikawa (1990) Modulation of growth and differentiation in normal human keratinocytes by transforming growth factor- β . *J. Cell. Physiol.* 145, 95-101.
- 6) K. Matsumoto, Y. Azuma, M. Kiyoki, H. Okumura, K. Hashimoto, and K. Yoshikawa (1991) Involvement of endogenously produced 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the growth and differentiation of human keratinocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1092, 311-318.
- 7) T. Nakamura, K. Matsumoto, A. Kiritoshi, Y. Tano and T. Nakamura (1997) Induction of hepatocyte growth factor in fibroblasts by tumor-derived factors affects invasive growth of tumor cells: *In vitro* analysis of tumor-stromal interaction. *Cancer Res.* 57, 3305-3313
- 8) K. Matsumoto, H. Okazaki, and T. Nakamura

- (1992) Up-regulation of hepatocyte growth factor mRNA by interleukin-1 in human skin fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 188, 235-243.
- 9) K. Matsumoto, H. Okazaki, and T. Nakamura (1995) Novel function of prostaglandins as inducers of gene expression of HGF and putative mediators of tissue regeneration. *J. Biochem.*, 117, 458-464.
- 10) K. Matsumoto, H. Tajima, H. Okazaki, and T. Nakamura (1992) 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.
- 11) H. Ohmichi, U. Koshimizu, K. Matsumoto and T. Nakamura (1998) Hepatocyte growth factor (HGF) acts as a mesenchymal-derived morphogenic factor during fetal lung development. *Development*, 125, 1315-1324.
- 12) Y. Matsuda, K. Matsumoto, A. Yamada, T. Ichida, H. Asakura, Y. Komoriyama, E. Nishiyama and T. Nakamura (1997) Prevential and therapeutic effects in rats of hepatocyte growth factor infusion on liver fibrosis/cirrhosis. *Hepatology*, 26, 81-89
- 13) S. Mizuno, T. Kurosawa, K. Matsumoto, M. Okamoto, M. Naiki, and T. Nakamura (1998) Hepatocyte growth factor prevents renal fibrosis and dysfunction in mouse model of chronic renal disease. *J. Clin. Invest.*, 101, 1827-1834.
- 14) M. Yaekashiwa, S. Nakayama, K. Ohnuma, T. Sakai, T. Abe, K. Satoh, T. Nakamura, T. Takahashi and T. Nukiwa (1997) Both simultaneous and delayed administration of hepatocyte growth factor (HGF) repress the fibrotic changes in murine lung injury induced by bleomycin. *Am. J. Resp. & Clit Care Med.* 156, 1937-1944.
- 15) K. Kosai, K. Matsumoto, S. Nagata, Y. Tsujimoto and T. Nakamura (1998) Hepatocyte growth factor abrogates Fas-induced lethal liver apoptosis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 244, 683-690.
- 16) R. Morishita, S. Nakamura, Y. Nakamura, M. Aoki, A. Moriguchi, I. Kida, Y. Yo, K. Matsumoto, T. Nakamura and T. Ogihara (1997) Potential role of endothelium-specific growth factor hepatocyte growth factor, on endothelial damage in diabetes militus. *Diabetes*, 46, 138-142
- 17) T. Miyazawa, K. Matsumoto, H. Ohmichi, T. Yamashima, H. Chigasaki and T. Nakamura (1998) Protection of hippocampal neurons from ischemia-induced delayed neuronal death by hepatocyte growth factor: A novel neurotrophic factor. *J. Cerebral Blood Flow Metabolism.*, 18, 345-348.