

総説

肝細胞増殖因子 (HGF) の機能と産生制御

合田 榮一

要約: 肝細胞増殖因子 (HGF) は初代培養肝細胞の増殖を強く促進する因子として精製されたサイトカインであり、肝臓の旺盛な再生力を支える肝再生因子の有力な候補である。HGF は増殖因子としては大きく、分子量約6万の重鎖と約3.5万の軽鎖がジスルフィド結合したヘテロダイマーの構造をもつ。ヒト HGF はプラスミノゲンと相同性を有する728アミノ酸残基の1本鎖前駆体として合成された後、N末端シグナルペプチドの除去、細胞外への分泌を経て、HGF アクチベーター又はウロキナーゼ (u-PA) などにより2本鎖に切断され活性型となる。HGF は初代培養ラット肝細胞の増殖を10 pMの低濃度から促進し、その他の様々な上皮系細胞、内皮細胞、一部の間葉系細胞の増殖も促進する。また、ある種のがん細胞の増殖を逆に抑制し、アポトーシスを誘導することもある。さらに、細胞運動性亢進作用、管腔形成などの形態形成誘導作用、抗アポトーシス作用、血管新生作用および免疫応答調節作用なども有する。HGF の受容体はがん原遺伝子 *c-met* の産物でチロシンキナーゼ活性をもち、HGF の多様な生物作用は *c-Met* を介して発揮される。肝再生時には肝 DNA 合成誘導に先行して肝、脾、肺の HGF 遺伝子発現の増加並びに血中、肝中 HGF レベルの上昇が認められ、抗 HGF 抗体の投与により肝再生が抑制される。培養細胞における HGF 産生は PKC 活性化薬、cAMP 上昇薬、PKA 活性化薬、種々の増殖因子、炎症性サイトカインなどにより誘導され、TGF- β 、グルココルチコイド、活性型ビタミンD、レチノイン酸などによって抑制される。様々な細胞に対する強力な増殖促進作用を利用して HGF を肝硬変や慢性腎不全、肺線維症、心筋梗塞、閉塞性動脈硬化症など各種難治性臓器疾患の治療薬として応用できる可能性を示す報告

キーワード: 肝細胞増殖因子 (HGF)、産生制御、肝再生、肝障害、*c-Met*
 岡山大学薬学部分子細胞薬品科学講座免疫医薬品化学分野
 (〒700-8530 岡山市津島中一丁目1番1号)
 e-mail: gohda@pheasant.pharm.okayama-u.ac.jp
 原稿受領日: 2002年2月20日, 編集委員会依頼総説

が多数なされている。また、血清および血漿 HGF 定量 ELISA キットは肝炎劇症化の予知のために用いられている。

1. はじめに

肝臓は生体内物質代謝の中心的役割を果たしており、多様な分化機能を発揮するが、一方では極めて再生力が旺盛な臓器でもある。目を見張るばかりのその再生力の強さはギリシャ神話にも出てくるほど古くから知られており、多くの研究者の興味を引き付けてきた。肝再生機構についてはいまだ未解明の部分が多いが、強い再生力の原因の一つとして肝再生因子の存在があげられる(1)。本因子の存在は1960年代半ばに行われたラットを用いた2つの実験結果、すなわち、肝臓小片を皮下に自家移植したのち残存肝の部分切除を行うと移植片の増殖も誘導されること、および部分的肝切除ラットと正常ラットの血液を交叉循環すると正常ラットの肝臓も増殖を開始することなどから推測された。肝切除や肝障害により血中に出現するこの因子の実体を明らかにしようとする研究がその後世界中の多くの研究室で行われたが、悉く不成功に終わり容易には進展しなかった。しかし、1980年代後半になって筆者は、当時所属していた鹿児島大・歯・口腔生化学教室で大工原 恭教授および同大・医・第二内科学教室の坪内博仁助手(現宮崎医大教授)らと共に有力な候補として肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) をついに単離・精製することに成功した(2)。本総説では HGF の精製と構造決定、機能および産生制御について述べたい。

2. 肝細胞増殖因子 (HGF) の精製と構造解析

肝再生因子の単離・精製がなかなか進まなかったのは良い活性測定法がなかったこと、含量が極めて微量であったことなどが原因であった。1980年代に入り、それまでは増殖しないと言われていた初代培養成熟ラット肝細胞が、細胞密度を低くしかつ上皮増殖因子 (EGF) を添加すると増殖することがわかり、この培養系を活性測定法に用い

て肝再生因子の実体解明が進められた。しかしながら、部分的肝切除ラット血中から微量の因子を精製することは難しく、また、まもなくラット血小板に本因子が存在することも見いだされたものの、部分精製までしか至らなかった(3)。

筆者らはヒトでもこのような因子が存在するのかに興味をもち、慢性肝炎や肝硬変患者の血清を用いて調べていたところ、たまたま劇症肝炎患者が入院し、その患者の血清が驚くほど高い肝細胞増殖促進活性を示すことを発見した(4)。第二内科学教室に保存されていた劇症肝炎患者十数人の血清の活性を調べると、程度には大きな差があるもののほとんどすべての症例で健常人よりも高い値を示した。劇症肝炎の治療法として血漿交換療法が行われており、その際、患者血液由来の血漿は廃棄される。多くの場合患者血漿は肝炎ウイルスで汚染されており、取り扱いには細心の注意が必要であるが、1回の血漿交換療法で2~3リットルが集まるので精製の材料としては十分な量である。そこで、入手できた劇症肝炎患者交換血漿のうち活性が高いものから精製を試み、予備的試験で使えそうと判断された数種のカラムクロマトグラフィーを組み合わせた精製法を3カ月の短期間で世界に先駆けて確立できた(2,5)。血漿1リットルから約40 μ gの精製標品が得られ、SDS-PAGEで解析の結果、この因子(HGF)は分子量約6万の重鎖(α 鎖)と約3.5万の軽鎖(β 鎖)がジスルフィド結合したタンパク質であることがわかった。また、10pMという極めて低い濃度で作用を発揮することも明らかになった。ラットおよび家兔の因子も筆者らの結果を参考にその後まもなく精製されたが、ヒトHGFとほとんど同じ分子構成であった。

このように精製標品が得られたことからHGFの構造解明へ向けた競争が始まったが、発現組織がわからなかったことがネックとなってしばらく進展がみられなかった。ようやく1989年に至り、我々のグループ(関西医大・喜多村直実教授の研究室、鹿児島大・医・歯、岡山大・薬および三菱化学の共同研究)と中村らのグループがそれぞれヒト胎盤およびヒト肝臓のcDNAライブラリーよりHGFの分子クローニングに成功した(6,7)。ヒトHGFは728アミノ酸残基より成る1本鎖前駆体として合成された後、N末端31アミノ酸残基のシグナルペプチドが除去され、さらには細胞外へ分泌後に494番目のアルギニン残基と495番目のバリン残基の間で切断されて2本鎖となる。この切断部位のアミノ酸残基を置換した変異体は切断されず、HGF受容体へは結合するものの生物活性を有しないので、2本鎖への転換は活性発現には必須である。特異的な切断酵素として血中の新規セリンプロテアーゼであるHGFアクチベーターが見いだされており、また、ウロキナーゼタ

イププラスミノゲンアクチベーター(u-PA)や組織プラスミノゲンアクチベーター(t-PA)、*matriptase*も2本鎖HGFへの転換を触媒できる(8,9)。HGFアクチベーターは血中では不活性型で存在し、出血時などにトロンビンによって活性化される。HGF前駆体の一次構造は4個のクリングル構造を有するなど血液凝固・線溶系セリンプロテアーゼと類似している。中でもプラスミノゲンとの相同性は高く、約40%に達する。しかし、プラスミノゲンやプラスミンにはHGFのような肝細胞増殖促進活性は認められなく、逆に、HGFはセリンプロテアーゼの活性中心を構成する3つのアミノ酸残基のうち2つが他のアミノ酸に変異しており、プロテアーゼ活性は検出されない。ところで、先の2つのグループによってクローニングされたヒトHGF cDNAの構造の間ではアミノ酸レベルで14個の不一致が認められる。これほどの相違が何を意味するのかは明らかではないが、その後、他の細胞のcDNAライブラリーよりクローニングされたヒトHGF cDNAの一次構造はすべて我々のものと同一か又はその15塩基欠失体であった(10,11)。

3. HGFの生物作用

HGFは1ng/ml以上の濃度で初代培養成熟ラット肝細胞の増殖を強力に促進する(5)。当初、HGFは肝細胞に特異的な増殖因子と期待されたが、遺伝子組換えHGFが入手可能になると広範な細胞種に対する作用が調べられ、さまざまな上皮系細胞や内皮細胞、さらには一部の間葉系細胞の増殖も促進することが明らかになった(12)。これらには腎尿細管上皮細胞、乳腺上皮細胞、気管支上皮細胞、胆管上皮細胞、ケラチノサイト、メラノサイト、血管内皮細胞、皮膚線維芽細胞、軟骨細胞、破骨細胞、筋衛星細胞などがある。加えて、種々の神経細胞に対し神経栄養因子として働く。HGFはまた、IMR-90ヒト胎児肺線維芽細胞から産生される腫瘍傷害因子と同一であることが判明し、ある種のがん細胞の増殖に対しては逆に抑制的に働き、場合によってはアポトーシスを誘導することもある(11)。さらに、胎児線維芽細胞などから産生され、上皮細胞コロニーを分散し個々の細胞の運動性や遊走を亢進させる作用をもつ因子として単離されていたscatter factor(SF)が意外にもHGFと同一であることがクローニングの結果証明され、HGFは予期せぬ作用を有することが示された(10)。筋前駆細胞が四肢などに遊走する過程にもHGFが関与する。第四の作用として、管腔形成などの形態形成誘導作用を持つ(13)。犬腎細胞株であるMDCKをHGFと共にコラーゲンゲル内で培養すると管状構造が形成されてくる。HGFはそのほかに抗アポトーシス作用をもつことも知られている。また、最近注目されている作用として血管新生

促進作用があり、閉塞性動脈疾患に対する側副血行の確保をめざした治療への応用が期待されている(14)。さらには、免疫応答にも関与するとの報告も少なくない。例えば、T細胞依存性抗体産生応答における重要な過程として胚中心B細胞がインテグリンを介して粘着し、濾胞樹状細胞(FDC)と相互作用する過程があるが、ストロマ細胞から産生されるHGFがこの粘着の調節因子として働くという(15)。このようにHGFは単なる増殖促進因子ではなく、その他にもさまざまな作用を有する多機能性因子である。なお、HGFの多機能性の詳細についてはすぐれた総説があるのでそちらを参照していただきたい(16, 17)。

HGFの受容体はc-Metという当時はリガンド不明の既知レセプター型チロシンキナーゼであることが、1991年に2つのグループにより明らかにされた(18, 19)。がん遺伝子metはニトロソグアニジンにより形質転換されたヒト骨肉腫細胞株から1984年に単離されたものである。c-Metは分子量5万の α 鎖と14.5万の β 鎖がジスルフィド結合した構造であり、HGF結合部位およびチロシンキナーゼドメインは β 鎖上にある。先にあげたようなHGFの多様な生物作用はすべてc-Metを介して発揮され、どの作用が発現するかは細胞の型で決まり、 β 鎖のC末端領域にあるマルチファンクショナルドッキングサイト(MDS)にどのようなアダプタータンパク質が結合し、シグナル伝達分子をリクルートするかに依存すると考えられている。また、HGFに応答する細胞の多くは細胞当たり200~1500個のHGF受容体を発現しており、その値はHGFにより増殖が正および負に制御される細胞や運動性が促進される細胞の間で大差は認められていない。最近、c-Metは興味深いことに細胞内寄生性細菌であるリステリア菌が細胞内へ侵入する際の受容体としても機能することが明らかにされている(20)。

4. 肝再生におけるHGFの役割

このようにして肝再生因子として単離・精製され、構造が解明されたHGFであるが、生体内で真に肝再生因子として働いているであろうかの疑問が残る。精製過程におけるHGFの活性は初代培養ラット肝細胞の増殖刺激能で追跡しているので、試験管内での特殊な条件下における作用を見ている可能性があるからである。しかしながら、以下の証拠からHGFは生理的な肝再生因子と考えられる。第一に、HGFはこれまでに見出されている成熟ラット肝細胞の増殖因子の中で最も強力な因子であることがあげられる。EGFやTGF- α も同様に肝細胞増殖を促進するが、HGFと比べて1桁以上高いモル濃度を必要とする(12)。二番目には、部分的肝切除ラットや四塩化炭素による肝障害ラットでは、血中および肝中のHGFレベルが肝再生に

先行して上昇することがあげられる(1, 12)。同時に肝、脾および肺でのHGF mRNA量の増加が認められ、これらが上記のHGFレベルの上昇に関与していると思われる(21)。三番目の証拠としては、部分的肝切除ラットや肝障害ラットでは肝細胞膜上の高親和性HGF受容体の速やかなダウンレギュレーションが認められることがあげられる。このことは実際に生体内でHGFが肝細胞に働いていることを示すものである。第四には、正常動物や部分的肝切除動物にHGFを投与すると、肝臓の増殖が誘導ないしは増強されることがあげられる(22, 23)。興味深いことに、HGFは肝細胞の機能も促進し、血漿タンパク質レベルが上昇する。さらに、HGF遺伝子のトランスジェニックマウスでは肝細胞のラベリングインデックスが正常マウスの倍にも達し、肝DNA量も増加すること、部分的肝切除術後の残存肝重量の元の肝重量への回復が半分の日数に短縮されることが観察され、HGFの産生亢進に起因する肝の増殖が認められる(24)。第五には、四塩化炭素肝障害ラットに抗HGF中和抗体を持続注入すると肝再生が強く抑制されることがあげられる(25)。HGFあるいはc-met遺伝子ノックアウトマウスは胎生13.5日から15.5日にかけて死亡するため肝再生実験を行うことはできないが、肝臓の形成不全が認められる(26, 27)。これに関連して胎生期マウスの初代培養肝細胞系でHGFがデキサメタゾン存在下で胎児肝細胞の成熟を誘導することが示されている(28)。また、マウスES細胞をHGFを含む数種の増殖因子と共に培養すると成熟肝細胞へ分化することも認められている(29)。さらには、肝細胞の増殖を抑えるような条件下で肝再生を刺激した時に著しく増え、肝細胞へと分化する能力をもつoval cellの一部が骨髄に由来することが知られているが、ラットの骨髄細胞をHGFの存在下で培養すると肝細胞マーカーをもつ細胞の出現が強く促進されることも報告されている(30)。このようにHGFは成熟肝細胞の増殖のみならず未熟肝細胞にも作用し、その分化や形態形成に必須の役割りを担っていると思われる。

5. HGF産生の誘導

これまで述べたように、部分的肝切除ラットや肝障害ラットでは、血中および肝中のHGFレベルが上昇し、これが肝細胞の増殖誘導に重要な役割を果たしていると考えられる。肝、脾および肺でのHGF mRNA量の増加がこれらのHGFタンパク質レベル上昇の大きな要因と解釈される。では、このようなHGF産生誘導にはどのような機構が関与しているのだろうか。HGF産生細胞としてはMRC-5やIMR-90などの胎児肺線維芽細胞、rasやsisがん遺伝子で形質転換されたNIH 3T3細胞クローン、皮膚線維芽細胞、平滑筋細胞、白血病細胞、伊東細胞、メサン

Table 1 Inducers and inhibitors of HGF production

HGF production inducer and inhibitor	Target cell	Reference
Inducer		
phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) mezerein	MRC-5 (human fetal lung fibroblasts) human skin fibroblasts HL-60 (human promyelocytic leukemia cells)	31
dibutyryl cyclic AMP 8-bromo-cyclic AMP	HL-60 human skin fibroblasts, MRC-5	34, 36
forskolin cholera toxin prostaglandin E ₂	human skin fibroblasts MRC-5	36
interleukin 1 α (IL-1 α) interleukin 1 β (IL-1 β)	MRC-5 human skin fibroblasts	33
interleukin 6 (IL-6)	NIH 3T3 (mouse embryonic fibroblasts)	39
tumor necrosis factor α (TNF- α)	MRC-5, human skin fibroblasts	33
interferon α (IFN- α) interferon β (IFN- β) interferon γ (IFN- γ)	KG-1 (human myeloblastic leukemia cells) RPMI-8226 (human myeloma cells)	40
interferon-inducible protein 10 (IP-10)	MRC-5	45
epidermal growth factor (EGF) transforming growth factor α (TGF- α) platelet-derived growth factor (PDGF) acidic fibroblast growth factor (aFGF) basic fibroblast growth factor (bFGF) insulin-like growth factor I (IGF-I) insulin-like growth factor II (IGF-II)	human skin fibroblasts MRC-5 rat fat-storing cells	37
norepinephrine phenylephrine isoproterenol	MRC-5	42
ascorbic acid	human skin fibroblasts	41
okadaic acid calyculin A	human skin fibroblasts MRC-5	43
low-density lipoprotein (LDL)	human coronary artery endothelial cells	44
heparin	MRC-5, HL-60	35
scatter factor-inducing factor	MRC-5	38
injurin	MRC-5	32
Inhibitor		
glucocorticoids	human skin fibroblasts, MRC-5, HL-60	31
transforming growth factor β (TGF- β)	rat fat-storing cells, human skin fibroblasts, MRC-5, HL-60	46
1,25-dihydroxyvitamin D ₃	MRC-5, HL-60	34
angiotensin II	rat and human mesangial cells	47
retinoic acid	U87 (human astrocytoma cells)	48

ギウム細胞などが知られており、これらの培養細胞を用いて HGF 産生の制御因子が調べられた。その結果を表 1 にまとめた。HGF 産生を促進することが認められたものとしては、PMA (TPA) や PDBu などのプロテインキナーゼ C (PKC) 活性化ホルボールエステル、ジブチリルサイクリック AMP や 8-プロモ-サイクリック AMP, ホルスコリン, コレラトキシン, プロスタグランジン E₂ などのサイクリック AMP (cAMP) 上昇薬およびプロテインキナーゼ A (PKA) 活性化薬, EGF や PDGF, aFGF (FGF-1), bFGF (FGF-2), IGF-I などの種々の増殖因子, インターロイキン 1 (IL-1), インターロイキン 6 (IL-6), 腫瘍壊死因子 α (TNF- α), インターフェロン γ (IFN- γ), IFN-inducing protein 10 (IP-10), α_1 -および β -アドレナリン受容体アゴニスト, プロテインホスファターゼ阻害薬オカダ酸, アスコルビン酸, ヘパリン, 低密度リポタンパク質 (LDL) およびその実体は明らかではないが scatter factor-inducing factor, インジュリンなどがある (31~45)。逆に HGF 産生を抑制するものとしては, TGF- β や グルココルチコイド, 活性型ビタミン D, レチノイン酸などが報告されている (31, 34, 46~48)。これらのほとんどのものは HGF 遺伝子発現に影響を及ぼすことによって HGF 産生を制御するが, ヘパリンは HGF mRNA 量には影響することなく, HGF 産生を促進するようである。筆者らは以上の制御因子のいくつかを明らかにしたが, そのうち cAMP 上昇薬および PKA 活性化薬による HGF 産生誘導について以下に述べる (36)。筆者らは先にヒト皮膚線維芽細胞が少量の HGF を産生することを見い出しており, HGF の産生誘導因子を調べるためには MRC-5 のような多量の HGF を産生する細胞よりも本細胞を用いた方が効率が良いと判断した。本細胞の培養系に 1 pM のコレラトキシンを添加すると 15 時間後あたりから HGF 遺伝子発現が増加し, 培養上清中 HGF タンパク質量は添加後 24 時間で有意な増加が認められ, 48 時間以降で顕著となる。この時, HGF 産生量と細胞内 cAMP 量に対するコレラトキシンの用量反応曲線はよく一致する。コレラトキシンと比較して, ジブチリル-cAMP や 8-プロモ-cAMP はより多量の, ホルスコリンはほぼ同程度の, プロスタグランジン E₂ はより少量の HGF 産生を誘導する。これら cAMP 上昇薬および PKA 活性化薬による HGF 誘導は, 別々のヒト個体からの皮膚線維芽細胞間での変動が PMA や EGF などによる HGF 誘導よりも小さく, 調べた限りではほとんどのヒト由来の皮膚線維芽細胞で顕著な誘導が認められる。また, この HGF 誘導は TGF- β や グルココルチコイドで強く抑制される。

cAMP 上昇薬および PKA 活性化薬による HGF 遺伝子発現の増加には転写因子 CREB のリン酸化やその結合配

列 CRE が関与していると予想され, また, ヒト HGF 遺伝子のプロモーター領域には CRE 類似配列が存在するが, 機能解析はまだ進んでいない。マウス HGF 遺伝子プロモーターの機能解析によれば, 転写開始部位にまたがって転写因子 C/EBP ファミリーの結合配列があり, これに C/EBP β や C/EBP δ が結合し転写を活性化するという (49)。C/EBP β は PKA によりリン酸化を受けて活性化され, また, C/EBP β 遺伝子の転写は cAMP により CREB のリン酸化を介して増加することが知られている。このことから, cAMP 上昇薬および PKA 活性化薬による HGF 遺伝子発現の増加は C/EBP ファミリーの活性化ないしは誘導を介したものである可能性も考えられる。C/EBP β のリン酸化はまた, MAP キナーゼや間接的と思われるが PKC によっても起り, IL-1 や IL-6, TNF- α は C/EBP β および C/EBP δ の DNA 結合能を高めたり, 核内量を増加させる。よって, 増殖因子や PKC 活性化薬, 炎症性サイトカインによる HGF 誘導にも C/EBP ファミリーの関与が指摘されている。マウス HGF 遺伝子プロモーターにはこの他に正の転写制御領域として Sp1 結合部位 (Sp1 および Sp3 が結合), upstream stimulatory factor (USF) 結合部位が, 負の転写制御領域として AP2 結合部位, nuclear factor-1 (NF-1) 結合部位などが同定されている。また, TGF- β による HGF 遺伝子発現の抑制は転写の阻害ではなく, HGF mRNA 分解の促進によることが報告されている。以上述べたような因子による HGF の産生制御が実際に生体内でも培養細胞と同様に起こるかや肝再生時に実際に働いている因子は何かについての解析はこれからの課題である。

6. HGF および抗 HGF 抗体の臨床応用

肝細胞をはじめ様々な細胞に対する強力な増殖促進作用を利用して HGF を各種疾患の治療薬として応用できる可能性を示す成績が多数報告されている (50, 51)。HGF はジメチルニトロサミン, 四塩化炭素, コリン欠乏などによるラットの肝線維症や肝硬変の防止と治癒促進作用, シスプラチン, シクロスポリン A などによる急性腎不全の防止と腎再生促進作用, 自然発症慢性腎不全マウスにおける腎不全の防止と機能改善作用, 希塩酸, プレオマイシンによる急性肺傷害や肺線維症の防止と治癒促進作用を示す。また, 心筋梗塞, 閉塞性動脈硬化症, 胃潰瘍, 筋萎縮性側索硬化症などに対しても有効な治療薬となりうることが報告されている。

我々のグループが大塚製薬と共同で開発した血清および血漿 HGF 定量 ELISA キットは肝炎劇症化の予知のために用いられている (52)。劇症肝炎の予後は極めて悪く, できるだけ早期に劇症化 (脳症の発現) を予測し治療を開始

することが重要である。劇症肝炎患者の血清 HGF 値の平均は約 10 ng/ml であり、調べられた限り脳症発現のかなり前の段階で血清中 HGF 値が 1 ng/ml を超える症例がほとんどである。一方、劇症肝炎以外の肝疾患では急性肝炎、肝硬変および肝癌で健常者 (約 0.2 ng/ml) の 2~3 倍に上昇するが、1 ng/ml を超えることは極めて少ない。また、劇症肝炎の診断に用いられているプロトロンビン時間やヘパラスチンテスト等の血液凝固系因子の検査が異常値を示すよりも早期に血清 HGF 値が上昇する。このようなことから血清または血漿 HGF 値の測定は劇症肝炎の予知に有用である。

7. おわりに

筆者らが HGF の精製に成功してから十数年の歳月が過ぎた。精製できたことである程度研究の進展は予想されたが、その後の HGF 研究の発展ぶり、広がりには驚くばかりである。サイトカインではしばしばあることだが、多機能性で別の活性で追跡されていた複数の因子と同一分子であったこと、受容体ががん原遺伝子産物であり変異が細胞のがん化につながりうるということが原因と思われる。もし精製があと 1, 2 年遅れていたならば、遺伝子クローニングも他の活性因子に間違なく先を越され、別の名前となっていたであろう。世界は広いことをつくづく実感させられた。昨年には、閉塞性動脈硬化症患者に対する HGF 遺伝子治療が大阪大学附属病院で開始された。今後、組織や臓器の再生、修復、形成過程における HGF の役割と作用点並びに作用機構の詳細な解明と共に、各種難治性臓器疾患に対する HGF タンパク質および HGF 遺伝子の臨床応用の進展が期待される。

謝辞：本稿執筆の機会を与えていただきました岡山大学大学院自然科学研究科医療薬学専攻・川崎博己教授並びに本稿に対する有益なご助言をいただきました岡山大学薬学部・山本格教授に感謝いたします。

文 献

- 1) Michalopoulos GK and DeFrances MC: Liver regeneration. *Science* **276**, 60-66 (1997)
- 2) 合田栄一, 中山宏幸, 弘野修一, 坪内博仁, 崎山 修, 宮崎博臣, 橋本修治, 大工原恭: 劇症肝炎患者血漿中の肝細胞増殖因子の精製. *生化学* **58**, 906 (1986)
- 3) Nakamura T, Teramoto H and Ichihara A: Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 6489-6493 (1986)
- 4) Nakayama H, Tsubouchi H, Gohda E, Koura M, Nagahama J, Yoshida H, Daikuhara Y and Hashimoto S: Stimulation of DNA synthesis in adult rat hepatocytes in primary culture by sera from patients with fulminant hepatic failure. *Bio-med Res* **6**, 231-237 (1985)
- 5) 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)
- 6) Miyazawa K, Tsubouchi H, Naka D, Takahashi K, Okigaki M, Arakaki N, Nakayama H, Hirono S, Sakiyama O, Takahashi K, et al: Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* **163**, 967-973 (1989)
- 7) 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)
- 8) 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. Structural similarity of the protease precursor to blood coagulation factor XII. *J Biol Chem* **268**, 10024-10028 (1993)
- 9) Naldini L, Tamagnone L, Vigna E, Sachs M, Hartmann G, Birchmeier W, Daikuhara Y, Tsubouchi H, Blasi F and Comoglio PM: Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor. *EMBO J* **11**, 4825-4833 (1992)
- 10) Weidner KM, Arakaki N, Hartmann G, Vandekerckhove J, Weingart S, Rieder H, Fonatsch C, Tsubouchi H, Hishida T, Daikuhara Y, et al: Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 7001-7005 (1991)
- 11) 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)
- 12) Gohda E, Nakamura S, Yamamoto I and Minowada J: Hepatocyte growth factor-pleiotropic cytokine produced by human leukemia cells. *Leuk Lymphoma* **19**, 197-205 (1995)
- 13) 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)
- 14) Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffer A and Comoglio PM: Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol* **119**, 629-641 (1992)
- 15) van der Voort R, Taher TE, Keehnen RM, Smit L, Groenink M and Pals ST: Paracrine regulation of germinal center B cell adhesion through the c-met-

- hepatocyte growth factor/scatter factor pathway. *J Exp Med* **185**, 2121-2131 (1997)
- 16) Rubin JS, Bottaro DP and Aaronson SA: Hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, the c-met proto-oncogene product. *Biochim Biophys Acta* **1155**, 357-371 (1993)
 - 17) Matsumoto K and Nakamura T: Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor. *J Biochem* **119**, 591-600 (1996)
 - 18) Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM-L, Kmiecik TE, Vande Woude GF and Aaronson SA: Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* **251**, 802-804 (1991)
 - 19) Naldini L, Vigna E, Narsimhan RP, Gaudino G, Zarnegar R, Michalopoulos GK and Comoglio PM: Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene* **6**, 501-504 (1991)
 - 20) Shen Y, Naujokas M, Park M and Ireton K: InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* **103**, 501-510 (2000)
 - 21) Zarnegar R, DeFrances MC, Kost DP, Lindroos P and Michalopoulos GK: Expression of hepatocyte growth factor mRNA in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *Biochem Biophys Res Commun* **177**, 559-565 (1991)
 - 22) Ishiki Y, Ohnishi H, Muto Y, Matsumoto K and Nakamura T: Direct evidence that hepatocyte growth factor is a hepatotrophic factor for liver regeneration and has a potent antihepatitis effect in vivo. *Hepatology* **16**, 1227-1235 (1992)
 - 23) Ishii T, Sato M, Sudo K, Suzuki M, Nakai H, Hishida T, Niwa T, Umezu K and Yuasa S: Hepatocyte growth factor stimulates liver regeneration and elevates blood protein levels in normal and partially hepatectomized rats. *J Biochem* **117**, 1105-1112 (1995)
 - 24) Shiota G, Wang TC, Nakamura T and Schmidt EV: Hepatocyte growth factor in transgenic mice: effects on hepatocyte growth, liver regeneration and gene expression. *Hepatology* **19**, 962-972 (1994)
 - 25) Burr AW, Toole K, Chapman C, Hines JE and Burt AD: Anti-hepatocyte growth factor antibody inhibits hepatocyte proliferation during liver regeneration. *J Pathol* **185**, 298-302 (1998)
 - 26) 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)
 - 27) Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shiota 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)
 - 28) Kamiya A, Kinoshita T and Miyajima A: Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Lett* **492**, 90-94 (2001)
 - 29) Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, Papst PJ, Meacham AM, Zon LI and Terada N: Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. *FEBS Lett* **497**, 15-19 (2001)
 - 30) Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T, Shima N, Higashio K and Namba M: Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **279**, 500-504 (2000)
 - 31) Gohda E, Kataoka H, Tsubouchi H, Daikuhara Y and Yamamoto I: Phorbol ester-induced secretion of human hepatocyte growth factor by human skin fibroblasts and its inhibition by dexamethasone. *FEBS Lett* **301**, 107-110 (1992)
 - 32) Matsumoto K, Tajima H, Hamanoue M, Kohno S, Kinoshita T and Nakamura T: Identification and characterization of "injurin," an inducer of expression of the gene for hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 3800-3804 (1992)
 - 33) Tamura M, Arakaki N, Tsubouchi H, Takada H and Daikuhara Y: Enhancement of human hepatocyte growth factor production by interleukin-1 α and -1 β and tumor necrosis factor- α by fibroblasts in culture. *J Biol Chem* **268**, 8140-8145 (1993)
 - 34) Inaba M, Koyama H, Hino M, Okuno S, Terada M, Nishizawa Y, Nishino T and Morii H: Regulation of release of hepatocyte growth factor from human promyelocytic leukemia cells, HL-60, by 1,25-dihydroxyvitamin D₃, 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate, and dibutyryl cyclic adenosine monophosphate. *Blood* **82**, 53-59 (1993)
 - 35) Matsumoto K, Tajima H, Okazaki H and Nakamura T: Heparin as an inducer of hepatocyte growth factor. *J Biochem* **114**, 820-826 (1993)
 - 36) Matsunaga T, Gohda E, Takebe T, Wu YL, Iwao M, Kataoka H and Yamamoto I: Expression of hepatocyte growth factor is up-regulated through activation of a cAMP-mediated pathway. *Exp Cell Res* **210**, 326-335 (1994)
 - 37) Gohda E, Matsunaga T, Kataoka H, Takebe T and Yamamoto I: Induction of hepatocyte growth factor in human skin fibroblasts by epidermal growth factor, platelet-derived growth factor and fibroblast growth factor. *Cytokine* **6**, 633-640 (1994)
 - 38) Rosen EM, Joseph A, Jin L, Rockwell S, Elias JA, Knesel J, Wines J, McClellan J, Kluger MJ, Goldberg ID, et al: Regulation of scatter factor production via a soluble inducing factor. *J Cell Biol* **127**, 225-234 (1994)
 - 39) Liu Y, Michalopoulos GK and Zarnegar R: Structural and functional characterization of the mouse hepatocyte growth factor gene promoter. *J Biol Chem* **269**, 4152-4160 (1994)
 - 40) Gohda E, Takebe T, Sotani T, Nakamura S, Minowada J and Yamamoto I: Induction of hepatocyte growth factor by interferon- γ in human leukemia cells. *J Cell Physiol* **174**, 107-114 (1998)
 - 41) Wu YL, Gohda E, Iwao M, Matsunaga T, Nagao T, Takebe T and Yamamoto I: Stimulation of hepatocyte growth factor production by ascorbic acid and its stable 2-glucoside. *Growth Horm IGF Res* **8**, 421-428 (1998)

- 42) Broten J, Michalopoulos G, Petersen B and Cruise J: Adrenergic stimulation of hepatocyte growth factor expression. *Biochem Biophys Res Commun* **262**, 76-79 (1999)
- 43) Gohda E, Nagao T and Yamamoto I: Stimulation of hepatocyte growth factor production in human fibroblasts by the protein phosphatase inhibitor okadaic acid. *Biochem Pharmacol* **60**, 1531-1537 (2000)
- 44) Haug C, Schmid-Kotsas A, Zorn U, Bachem MG, Schuett S, Gruenert A and Rozdzinski E: Hepatocyte growth factor is upregulated by low-density lipoproteins and inhibits endothelin-1 release. *Am J Physiol* **279**, H2865-H2871 (2000)
- 45) Koniaris LG, Zimmers-Koniaris T, Hsiao EC, Chavin K, Sitzmann JV and Farber JM: Cytokine-responsive gene-2/IFN-inducible protein-10 expression in multiple models of liver and bile duct injury suggests a role in tissue regeneration. *J Immunol* **167**, 399-406 (2001)
- 46) Gohda E, Matsunaga T, Kataoka H and Yamamoto I: TGF- β is a potent inhibitor of hepatocyte growth factor secretion by human fibroblasts. *Cell Biol Int Rep* **16**, 917-926 (1992)
- 47) Yo Y, Morishita R, Yamamoto K, Tomita N, Kida I, Hayashi S, Moriguchi A, Kato S, Matsumoto K, Nakamura T, et al: Actions of hepatocyte growth factor as a local modulator in the kidney: potential role in pathogenesis of renal disease. *Kidney Int* **53**, 50-58 (1998)
- 48) Chattopadhyay N, Butters RRJr and Brown EM: Agonists of the retinoic acid- and retinoid X-receptors inhibit hepatocyte growth factor secretion and expression in U87 human astrocytoma cells. *Mol Brain Res* **87**, 100-108 (2001)
- 49) Jiang J-G and Zarnegar R: A novel transcriptional regulatory region within the core promoter of the hepatocyte growth factor gene is responsible for its inducibility by cytokines via the C/EBP family of transcription factors. *Mol Cell Biol* **17**, 5758-5770 (1997)
- 50) 高橋知之, 中村敏一: 肝細胞増殖因子 (HGF) -再生因子から治療因子へ. *蛋白質 核酸 酵素* **45**, 2100-2108 (2000)
- 51) Aoki M, Morishita R, Taniyama Y, Kaneda Y and Ogihara T: Therapeutic angiogenesis induced by hepatocyte growth factor: potential gene therapy for ischemic diseases. *J Atheroscler Thromb* **7**, 71-76 (2000)
- 52) Tsubouchi H, Niitani Y, Hirono S, Nakayama H, Gohda E, Arakaki N, Sakiyama O, Takahashi K, Kimoto M, Kawakami S, et al: 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)

Abstract—Function and regulation of production of hepatocyte growth factor (HGF). Eiichi GOHDA (Department of Immunochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan). *Folia Pharmacol. Jpn.* (Nippon Yakurigaku Zasshi) **119**, 287~294 (2002)

Hepatocyte growth factor (HGF) was purified as a potent mitogen for rat hepatocytes in primary culture and is believed to be the most physiological hepatotrophic factor that triggers liver regeneration. HGF is one of the largest disulfide-linked cytokines, consisting of a 60-kDa heavy chain and a 35-kDa light chain. Human HGF is synthesized as a single polypeptide chain precursor of 728 amino acid residues that has an appreciable homology with plasminogen, and it is processed proteolytically to release an N-terminal signal peptide of 31 amino acids and to generate an active heterodimer after secretion. The novel serine protease HGF activator and urokinase-type plasminogen activator (u-PA) are responsible for the latter extracellular processing. HGF stimulates the proliferation of rat hepatocytes in primary culture at concentrations as low as 10 pM. It also stimulates the growth of various epithelial cells, endothelial cells, and some kinds of mesenchymal cells. HGF inhibits the proliferation of several tumor cell lines and induces apoptosis of some of them. It also has motogenic, morphogenic, anti-apoptotic, angiogenic, and immunoregulatory activities. The receptor of HGF is the product of c-met proto-oncogene with tyrosine kinase activity that mediates the transduction of multiple biological signals of HGF. During liver regeneration, HGF gene expression in the liver, spleen, and lung and HGF levels in the blood and liver increase prior to the induction of liver DNA synthesis. Liver regeneration is markedly inhibited by continuous administration of a neutralizing anti-HGF antibody. HGF production in cultured cells is induced by PKC-activating agents, cAMP-elevating agents, PKA-activating agents, growth factors, and inflammatory cytokines; and it is inhibited by TGF- β , glucocorticoids, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, and retinoic acid. There are many reports on potential application of HGF as a therapeutic agent for organ diseases that are difficult to cure such as liver cirrhosis, chronic renal failure, pulmonary fibrosis, myocardial infarction, and arteriosclerosis obliterans utilizing its potent growth-stimulating activity for a wide variety of cells. ELISA kits for assays of serum and plasma HGF levels are clinically used to prognosticate the development of fulminant hepatic failure.

Keywords: hepatocyte growth factor (HGF); regulation of production; liver regeneration, liver injury; c-Met