

劇症肝炎患者血漿中に見出された ヒト肝細胞増殖因子 (hHGF)

新垣尚捷, 弘野修一

鹿児島大学歯学部 口腔生化学講座

Abstract

We found the existence of a hepatotropic factor in plasma or sera of patients with fulminant hepatic failure, and have recently purified a hepatocyte growth-promoting factor, human hepatocyte growth factor (hHGF) from the plasma obtained during the plasma exchange therapy of the patients. The hHGF level in plasma changed parallel with the coma grade of the patients, and it rapidly decreased to almost the normal level when the patient recovered from the disease. Thus, the plasma hHGF level seems to be the result of a self-defense mechanism and hHGF may be a physiological hepatotropic factor for human liver regeneration.

In this review, we summarized our recent papers on hHGF including purification and characterization of hHGF, amino acid sequence of hHGF deduced from its cDNA sequence and plasma levels of hHGF in patients with liver diseases determined by an enzyme-linked immunosorbent assay using polyclonal and monoclonal antibodies against hHGF. Because the amino acid sequence of hHGF has high homology to some serum proteins involved in blood coagulation and fibrinolysis such as plasminogen, we also discussed and predicted the secondary structure of hHGF from that of human plasminogen.

Key words

Hepatocyte, Primary culture, Hepatocyte growth factor, DNA synthesis, Fulminant hepatic failure.

I. はじめに

肝臓は、人体で最も多種多様な機能を有する代謝の心臓ともいべき臓器であって、例えば大部分の血清タンパク質の合成と分泌、血糖調節のためのグリコーゲン合成分解と糖新生、尿素形成、胆汁の合成分泌、P-450や抱合による解毒など生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。さらにこれらの肝機能は、ホ

ルモン、神経、栄養素などにより複雑に調節されている。それゆえ、肝臓の機能をテーマとした基礎研究は生命科学全領域にわたって行われており、歯科医学領域においても例外ではない。

組織の石灰化、骨の再生、リモデリングの機構解明は、歯科医学研究領域の非常に興味ある重要な研究課題であり、現在は細胞生物学の手法を用いた研究が活

Human hepatocyte growth factor (hHGF) in plasma from patients with fulminant hepatic failure.

Naokatu Arakaki and Shuichi Hirono.

Department of Biochemistry, Kagoshima University Dental School, 1208-1 Usuki-cho, Kagoshima 890, JAPAN.

発に進められている。古くから、骨組織の形成と吸収が多くのタンパク質をはじめ、プロテオグリカンや低分子化合物によって幾重にも制御を受けていることが示されているが、最近ではI型コラーゲン以外の細胞外基質である非コラーゲン性タンパク質や各種の成長因子、サイトカインなどが骨の形成と吸収に重要な役割を果たしていることが次第に明らかにされてきた。こうして、phosphophoryn, amelogenin, osteopontin, osteocalcin, osteonectin, bone morphogenetic protein, α_2 -HS-glycoprotein (A2HSG) など多くの非コラーゲン性タンパク質が骨や歯などの石灰化組織から精製され、その構造と機能が明らかになりつつある。中でもA2HSGは肝臓で合成、分泌される血清糖タンパク質の1つであって、他の血清糖タンパク質に比べ300倍も高濃度で骨や象牙質に濃縮されていることから、石灰化過程に重要な役割を果たしていることが示唆されている^{1,2)}。さらに、先天性骨形成不全症やある種の悪性腫瘍、Paget's diseaseなどの患者ではA2HSGの血中レベルが正常人に比べ高いこと、炎症時においては逆に低くなることが示されており、骨におけるA2HSGの直接的作用に加え、肝臓でのA2HSG発現に及ぼす因子の研究が石灰化過程を解明するうえでの重要な研究課題の1つとなって来た。本稿で述べるラット初代培養肝細胞を用いるin vitro実験系は、A2HSG発現調節機構を研究するうえでも有効な手段となり得ると考えられる。

このように、肝臓は多種多様な機能を有する最終分化細胞でありながら、肝再生現象でよく知られているごとく旺盛な再生能力を備えている。たとえば、ラットの肝臓を $\frac{2}{3}$ 切除すると、残存している肝臓は速やかに増殖をはじめ、1~2週間後にはほぼ元の大きさまで回復する。このような肝再生現象は古くから多くの研究者の関心を引きつけてきたが、約25年前にMooltonとBucher³⁾が体液交流(parabiosis)実験によって、肝再生が何らかの体液性因子によって行われること、そしてこの因子こそが肝再生因子の本体であることを示唆して以来、ますます多くの研究者が、この肝再生因子の実体を求めて努力を続けてきた⁴⁻⁶⁾。しかし、これらの研究はすべてイヌやラットなどの実験動物を用いて行われたものであって、ヒトの肝再生因子の報告は全くなく、1985年に、本講座と医学部第2内科学講座(主任:橋本修治教授)との共同研究により、広範囲な肝細胞壊死を伴う劇症肝炎患者血漿中に肝細胞増殖因子が出現することを報告したのが、ヒトの体液性肝再生因子に関する初めての報告である。その後

我々はこの肝再生因子の精製に成功し、ヒト肝細胞増殖因子(human hepatocyte growth factor, hHGF)と命名し、さらにその性状と生理的役割に関して研究を進めると共にhHGFのcDNAクローニング、およびhHGFの全一次構造を明らかにした。

本稿では、このヒト肝細胞増殖因子の構造と生理的役割を中心に紹介し、他の肝再生及び抑制因子については、最近の総説^{7,8)}に譲ることにしたい。

II. 初代培養肝細胞を用いた肝再生因子の検索

前述のように肝再生因子(hepatotrophic factor)と名付られた体液性因子の存在が示唆されて以来、多くの研究者がその実体を明らかにせんと努力したが、最近まで肝再生因子研究の画期的な進展はみられなかった。その原因の1つは肝再生因子の活性を高感度で、再現性よく、しかも定量的に測定できるin vitro実験系がなかったことによる。

Bissellら⁹⁾は1973年に初めてラット肝細胞の初代培養を報告したが、その後の多くの研究により、この初代培養肝細胞がin vivoに近い多くの肝特異機能を有していること、インスリンなどのホルモンに対する応答性を維持していることが示され、肝機能の生化学的研究に優れたin vitro実験系であることが明らかにされた。つづいて、Richmanら¹⁰⁾や中村ら¹¹⁾によりこのラット初代培養肝細胞は、インスリンや上皮成長因子(EGF)の存在下でDNA合成活性が促進すること、細胞密度を低くすることによって分裂・増殖することが明らかにされた。それ以来、このラット初代培養肝細胞を用いて、肝再生因子の肝細胞増殖活性をin vitroで再現性よく高感度で測定できるようになり、いくつかのグループによって実験動物の血中や組織中に肝再生因子が存在することが報告されるようになった。すなわち、Russellら¹²⁾はラット血小板に、Michalopoulosら¹³⁾や中村ら¹⁴⁾は部分肝切除ラットの血清や血漿中に肝再生因子が存在することを1984年に報告した。さらに、最近では正常ラット脾臓やD-ガラクトサミン肝障害ラットの肝臓にも肝再生因子が存在することが明らかにされている¹⁵⁻¹⁷⁾。しかしながら、これらの肝再生因子の中でその後純粋な形にまで精製されたものは、中村ら¹⁸⁾のラット血小板由来肝細胞増殖因子と、以下に述べる劇症肝炎患者血漿中のヒト肝細胞増殖因子のみである。昨年、ウサギ血清由来の肝細胞増殖因子が精製され発表されたが、まだ全構造決定まで至っていない。

III. 劇症肝炎患者血漿中のヒト肝細胞増殖因子 (hHGF)

A. hHGF の精製と性質

劇症肝炎は、広範な肝細胞壊死のために重篤な肝不全状態に陥り、種々の治療法の試みにもかかわらず、いまなお致死率が80%である予後不良の疾患である。この疾患の患者の救命には肝の再生が極めて重要な役割を果たしていると考えられるが、この過程を制御する因子についてはほとんど明らかになっていない。我々は医学部第2内科の肝臓グループとの共同研究により、ラット初代培養肝細胞に劇症肝炎患者血清を加えると肝細胞の増殖が強く促進されることを1985年に初めて見出し発表した¹⁹⁾。すなわち、Fig.1に示すように、患者血清は用量依存的にラット初代培養肝細胞のDNA合成活性を促進し、10%の添加では最適濃度のインスリン+上皮成長因子 (epidermal growth

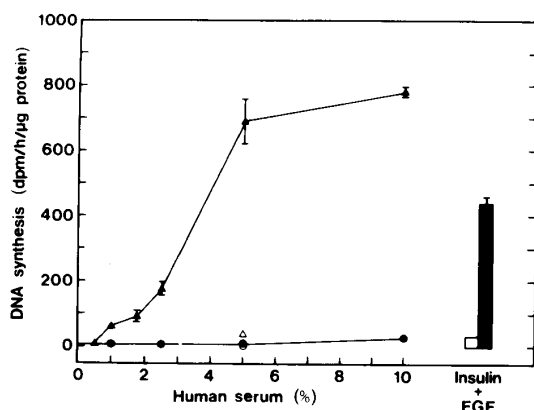


Fig. 1. Dose-response curve for stimulation of DNA synthesis in cultured rat hepatocytes by serum from a patient with fulminant hepatic failure¹⁹⁾. Adult rat hepatocytes were cultured in the presence of various concentrations of human serum, and DNA synthesis was determined. Values are means \pm SD for triplicate wells. Open and closed symbols represent values 1 day and 2 day, respectively, after the first addition of human serum or insulin plus EGF. ○, ● : normal human serum (mixtures of serum from normal subjects); △, ▲ : serum from a patient with fulminant hepatic failure; bars : insulin (0.1 μ M) plus EGF (100 ng/ml).

factor, EGF) よりも高い値を示した。一方、健常人血清は10%の添加でもDNA合成活性の促進はわずかであった。

17人の劇症肝炎患者から得られた血清あるいは血漿中の増殖因子の活性を検討した結果、1例を除いた16例において健常人血清よりも高い活性が認められ、最も高い症例では100倍近いDNA合成の促進が認められた (Table 1)。このDNA合成の促進は、劇症肝炎の病因とは無関係であり薬剤性の劇症肝炎患者血漿でも認められた。

その後我々は、劇症肝炎患者の血漿交換治療の際に得られる患者血漿から、加熱 (56°C, 15分)、硫酸分画、アフィゲルブルー、ヘパリンセファロース、及びハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーの5つのステップによりこの因子を単離・精製することに成功し、ヒト肝細胞増殖因子 (human hepatocyte growth factor, hHGF) と名付けた^{20,21)}。これはヒトの肝再生因子を単離した最初の報告である。

Fig.2にその精製法を、Table 2に精製表を示した。

精製したhHGFをSDS-PAGEで解析すると、非還元条件下で分子量約79,000と86,000の位置に2本の濃いバンドが認められるが (Fig. 3)、その後の実験により、この2本のバンドとも肝細胞増殖促進活性を有

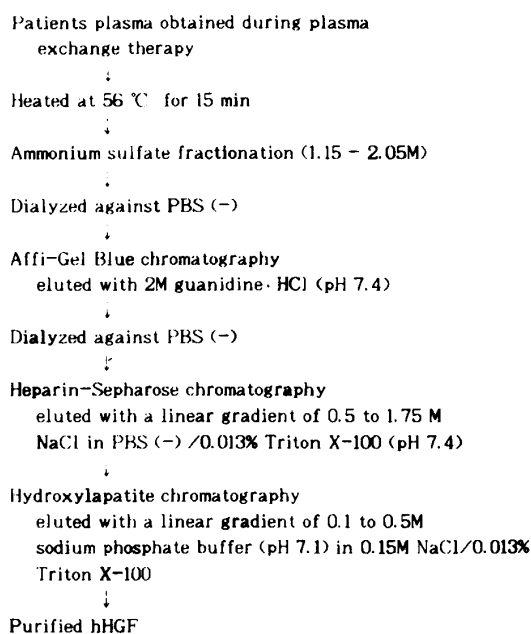


Fig. 2. Purification procedure of hHGF from plasma of patients with fulminant hepatic failure.

Table 1. Effects of sera or plasma from patients with fulminant hepatic failure and normal subjects on DNA synthesis in cultured adult rat hepatocytes.

Subject	Sex/Age	Etiology	Coma grade at sampling	Outcome	DNA synthesis (dpm/h/ μ g protein)
Normal	—	—	—	—	8.7 \pm 1.4*
Fulminant hepatic failure					
1	F/33	HB	III	alive	27.6 \pm 4.9
2	F/36	HB	I	alive	34.4 \pm 6.0
3	F/32	Halothane	IV	dead	702.7 \pm 142.9
4	F/60	HB	IV	dead	49.3 \pm 6.1
5	M/39	HB	IV	dead	304.8 \pm 12.3
6	M/65	Unknown	IV	dead	111.6 \pm 18.1
7	F/51	NANB	I	dead	12.5 \pm 0.3
8	F/27	HB	III	alive	84.8 \pm 5.6
9	M/31	HB	IV	dead	117.4 \pm 0.6
10	F/53	HB	III	dead	128.7 \pm 20.5
11	M/50	HB	III	dead	205.2 \pm 16.1
12	F/21	HA	III	alive	237.6 \pm 90.3
13	M/62	NANB	IV	alive	44.9 \pm 5.4
14	F/73	Drug	III	dead	158.0 \pm 1.7
15	M/59	Drug	II	dead	161.7 \pm 40.5
16	F/36	Drug	IV	alive	215.3 \pm 3.0
17	F/67	NANB	I	dead	7.7 \pm 1.1

Values are shown as means \pm SD for 3 assays.

*Mean \pm SD for 11 subjects.

Table 2. Purification of hHGF from plasma of a patient with fulminant hepatic failure.

Step	Total protein (mg)	Total activity* (units \times 10 ⁻⁴)	Specific activity (units/mg)	Purification (— fold)	Yield (%)
Heated plasma	43,700	18.5	4.23	1	100
Ammonium sulfate	13,600	12.6	9.29	2.2	68.3
Affi-Gel Blue	602	11.1	185	44	60.2
Heparin-Sepharose	1.48	6.82	46,200	10,900	36.9
Hydroxylapatite	0.0426	6.15	1,450,000	342,000	33.3

A sample of 853 ml of patient's plasma obtained during plasma exchange therapy was used.

*One unit of activity is defined as the quantity of hHGF required for 50% of the maximal response to mEGF in the assay system.

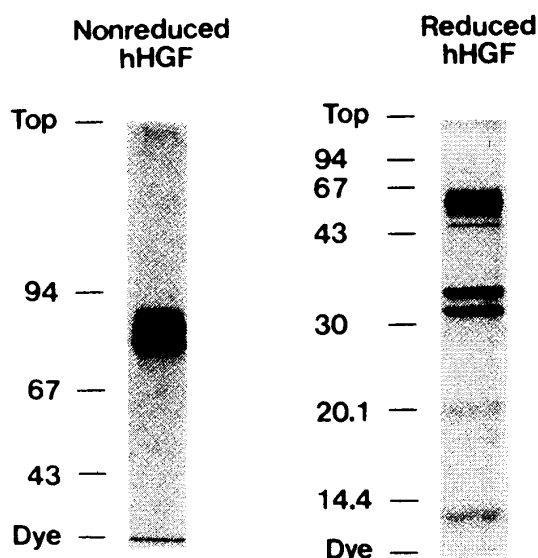


Fig. 3. SDS-PAGE of purified hHGF⁽²¹⁾. The purified hHGF preparations nonreduced (79 ng of protein) and reduced (70 ng of protein) were subjected to SDS-PAGE using 8% and 13.5% separating gels, respectively. Molecular size standards (in kilodaltons) are also indicated.

していることが明らかとなり、精製した hHGF は分子量が異なる multiple form を示すことがわかった。Multiple form を示す原因については明らかではないが、劇症肝炎患者血清中に存在する強いタンパク分解酵素によって、限定分解を受けたものと考えている。一方還元条件下では、hHGF は分子量56,000~65,000と31,500~34,500のメインバンドに分離することから (Fig. 3), 分子量約60,000の heavy chain と約33,000の light chain の2種類のサブユニットから成るヘテロダイマーであると考えられたが、このことは後の cDNA の解析により確認された。

hHGF の主な性質を Table 3 に要約した。hHGF は熱に不安定なタンパク質であり、80℃で10分間の熱処理で失活し、トリプシン消化やメルカプトエタノールによる還元によっても失活する。

hHGF は 1ng/ml の低濃度でラット初代培養肝細胞の DNA 合成を促進し、5~10ng/ml の濃度で最大増殖促進活性を示す (Fig. 4)。また、Fig.5 に示すように、hHGF はこれまでに初代培養肝細胞の増殖を促進することが知られている transforming growth factor- α (TGF- α) や EGF よりも一桁低い濃度で有効であった。従って hHGF は現在までのところ、最も低濃度で肝細胞の増殖を促進する因子である。さらに hHGF の効果は、インスリン及び EGF や TGF- α と相乗的あるいは相加的であった²¹⁾。このことは、hHGF が

Table 3. Characterization of hHGF

Molecular weight (SDS-PAGE)	72,000 - 96,000
Molecular weight of subunits	
heavy chain	56,000 - 65,000
light chain	31,500 - 34,500
N-terminal amino acid	
heavy chain	ND*
light chain	valine
Treatment	
heat (80°C, 10 min)	labile
acid (0.5N acetic acid, 4°C, 20 hr)	stable
trypsin (0.1 ng/ml, 37°C, 30 min)	loss of activity
reduction (2-mercaptoethanol)	loss of activity
Optimal dose (in vitro)	5-10 ng/ml

*Not determined.

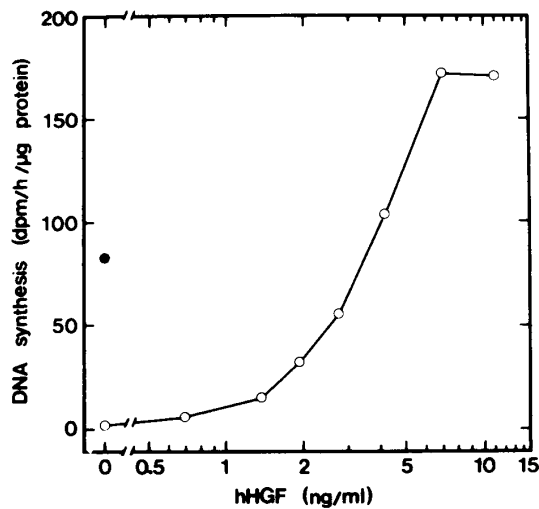


Fig. 4. Dose-response curve for stimulation of DNA synthesis in cultured rat hepatocytes by hHGF⁽²¹⁾. Various doses of the pooled active fractions of hHGF from a hydroxylapatite column were added to cultured hepatocytes, and DNA synthesis was determined (○). DNA synthesis in hepatocytes cultured in the basal medium with an optimal concentration of mouse EGF (25 ng/ml) are also shown (●). Values are means for duplicate wells.

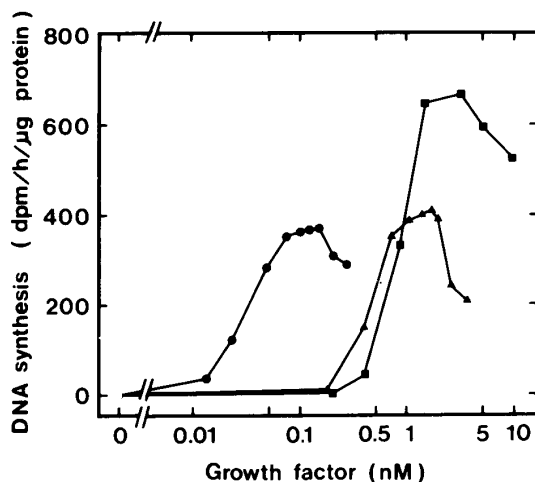


Fig. 5. Dose-response curve for stimulation of DNA synthesis in cultured rat hepatocytes by hHGF, human EGF and TGF- α . Various doses of hHGF (●), human EGF (▲) and TGF- α (■) were added to cultured hepatocytes, and DNA synthesis was determined.

インスリンやEGFの受容体とは異なるhHGFに特異的な受容体を介して肝細胞の増殖を促進しているものと思われる。

B. hHGFのcDNAクローニング²²⁾

精製したhHGFをlysyl endopeptidaseにより消化し、逆相HPLCでfragmentを分離・精製した後、Table 4に示すような4種類のペプチドについてそのアミノ酸配列を決定した。次にペプチドNo 4のAsn - Met - Glu - Asp - Leu - HisとHis - Ile - Phe - Trp - Glu - Proの配列を基にして2種類のオリゴヌクレオチドプローブを作成し、ヒト胎盤cDNAライブラリーをスクリーニングした結果、約100万個のクローンから6個の陽性クローンが得られた。このうち0.9kbpのoverlapping sequenceを含む2個のクローン(それぞれ1.8kbpと1.7kbpのインサートを含む)について、その配列の中にプローブとして用いたペプチドNo. 4の配列、及びTable 4に示した全てのペプチドの配列を含むことを確認した後、hHGFのcDNA塩基配列を決定し、hHGFの全一次構造を決定した(Fig.6)。

Table 4. Amino acid sequences of hHGF-derived peptides⁽²²⁾.

Peptide No.	Amino acid sequence
1	FLPERYPDK
2	EFGHEFDLYENK
3 *	DYEAWLGIHDVHGRGDXK
4	NMEDLHRHIFWEPDASK

* An amino acid not determined is denoted by X.

GGGCTCAGAGC

-90 CGACTGGCTCTTTTAGGCACTGACTCCGAACAGGATTCTTTACCCAGGCATCTCTCCAGAGGGATCCGCCAGCCCTCCAGCAGCACC

1 ATGTGGGTGACCAAACCTCTGCGAGCCCTGCTGCTGCAGCATGTCTCTCTGCATCTCTCTGCTCCCATGCCATCCCTATGCAGAG
1 **MetTrpValThrLysLeuLeuProAlaLeuLeuLeuGlnHisValLeuLeuHisLeuLeuLeuProIleAlaIleProTyrAlaGlu**

91 GGACAAAGGAAAAGAAGAAATACAATTCATGAATTCAAAAATCAGCAAAGACTACCCTAATCAAATAGATCCAGCACTGAAGATAAAA
31 **GlyGlnArgLysArgArgAsnThrIleHisGluPheLysLysSerAlaLysThrThrLeuIleLysIleAspProAlaLeuLysIleLys**

181 ACCAAAAAGTGAATACTGCAGACCAATGTGCTAATAGATGTACTAGGAATAAAGGACTTCCATTCACTGCAAGGCTTTTGTTTTGTAT
61 **ThrLysLysValAsnThrAlaAspGlnCysAlaAsnArgCysThrArgAsnLysGlyLeuProPheThrCysLysAlaPheValPheAsp**

271 AAAGCAAGAAAACAATGCCTCTGGTTCCTTCAATAGCATGTCAAGTGGAGTGAAAAAGAATTTGGCCATGAATTTGACCTCTATGAA
91 **LysAlaArgLysGlnCysLeuTrpPheProPheAsnSerMetSerSerGlyValLysLysGluPheGlyHisGluPheAspLeuTyrGlu**

361 AACAAAGACTACATTAGAACTGCATCATTGGTAAAGGACGCGACTACAAGGGAAACAGTATCTATCACTAAGAGTGGCATCAAATGTCAG
121 **AsnLysAspTyrIleArgAsnCysIleIleGlyLysGlyArgSerTyrLysGlyThrValSerIleThrLysSerGlyIleLysCysGln**

451 CCCTGGAGTTCATGATACCACACGAACACAGCTTTTGCCTTCGAGCTATCGGGGTAAGACCTACAGGAAAACACTACTGTGCAATCCT
151 **ProTrpSerSerMetIleProHisGluHisSerPheLeuProSerSerTyrArgGlyLysAspLeuGlnGluAsnTyrCysArgAsnPro**

541 CGAGGGGAAGAAGGGGGACCCTGGTGTTCACAAGCAATCCAGAGGTACGCTACGAAGTCTGTGACATTCCTCAGTGTTCAGAAGTTGAA
181 **ArgGlyGluGluGlyGlyProTrpCysPheThrSerAsnProGluValArgTyrGluValCysAspIleProGlnCysSerCysGluValGlu**

631 TGCATGACCTGCAATGGGGAGAGTTATCGAGGTCTATGGATCATAAGAATCAGGCAAGATTTGTCAGCGCTGGGATCATCAGACACCA
211 **CysMetThrCysAsnGlyLeuSerTyrArgGlyLeuMetAspHisThrGluSerIleCysGlnArgTrpAspHisGlnThrAsp**

721 CACCGGCACAATTCTTGCTGAAAGATATCCCGACAAGGGCTTTGATGATAATTATTGCCGCAATCCCGATGGCCAGCCGAGGCCATGG
241 **HisArgHisLysPheLeuProGluArgTyrProAspLysGlyPheAspAspAsnTyrCysArgAsnProAspGlyGlnProArgProTrp**

811 TGCTATACTCTTGACCTCACACCCGCTGGGAGTACTGTGCAATTAACATGCGCTGACAATACTATGAATGACACTGATGTTCTCTTTG
271 **CysTyrThrLeuAspProHisThrArgTrpGluTyrCysAlaIleLysThrCysAlaAspAsnThrMetAsnAspThrAspValProLeu**

901 GAAACAACGAATGCATCCAAGGTCAAGGAGAAGGCTACAGGGGCACTGTCAATACCATTGGAATGGAATTCATGTCAGCGTTGGGAT
301 **GluThrThrGluCysIleGlnGlyGlnGlyGluGlyTyrArgGlyThrValAsnThrIleTrpAsnGlyIleProCysGlnArgTrpAsp**

991 TCTCAGTATCCTCAGCAGCATGACATGACTCCTGAAAATTTCAAGTGAAGGACCTACGAGAAAATTAAGTCCGAAAATCCAGATGGGTCT
331 **SerGlnTyrProHisGluHisAspMetThrProGluAsnPheLysCysLysAspLeuArgGluAsnTyrCysArgAsnProAspGlySer**

1081 GAATCACCTGGTGTTTTACCCTGATCCAAACATCCGAGTTGGCTACTGCTCCCAAATTCCAAACCTGTGATATGTCACATGGACAAGAT
361 **GluSerProTrpCysPheThrThrAspProAsnIleMetValGlyTyrCysSerGlnIleProAsnCysAspMetSerHisGlyGlnAsp**

1171 TGTTATCGTGGGAATGGCAAAAATTATATGGGCAACTTATCCCAAACAGATCTGGACTAACATGTTCAATGTGGGACAAGAATGGAA
391 **CysTyrArgGlyLysAsnGlyLysAsnTyrMetGlyAsnLeuSerGlnThrArgSerGlyLeuThrCysSerMetTrpAspLysAsnMetGlu**

1261 GACTTACATCGTCATATCTTCTGGGAACAGATGCAAGTAAGTGAATGAGAATTACTGCCGAAAATCCAGATGATGCTCATGGACCC
421 **AspLeuHisArgHisIlePheTrpGluProAspAlaSerLysLeuAsnGluAsnTyrCysArgAsnProAspAspAlaHisGlyPro**

1351 TGGTGCTACACGGGAAATCCACTCATTCTTGGGATTATTGCCCTATTTCTCGTTGTGAAGGTGATACCACACCTACAATAGTCAATTTA
451 **TrpCysTyrThrGlyAsnProLeuIleProTrpAspTyrCysProIleSerArgCysGluGlyAspThrThrProThrIleValAsnLeu**

1441 GACCATCCCGTAATATCTTGTGCCAAAACGAAACAATTGCGAGTTGTAATGGGATTCACACGAAACAAACATAGGATGGATGGTTAGT
481 **AspHisProValIleSerCysAlaLysThrLysGlnLeuArgValValAsnGlyIleProThrArgThrAsnIleGlyTrpMetValSer**

1531 TTGAGATACAGAAATAACATATCTGCGGAGGATCATTGATAAAGGAGAGTTGGGTTCTTACTGCACGACAGTGTTCCTTCTCGAGAC
511 **LeuArgTyrArgAsnLysHisIleCysGlyGlySerLeuIleLysGluSerTrpValLeuThrAlaArgGlnCysPheProSerArgAsp**

1621 TTGAAAGATTATGAAGCTTGGCTTGGAAATTCATGATGTCCACGGAAGAGGAGATGAGAAATGCAAACAGGTTCTCAATGTTTCCAGCTG
541 **LeuLysAspTyrGluAlaTrpLeuGlyIleHisAspValHisGlyArgGlyAspGluLysCysLysGlnValLeuAsnValSerGlnLeu**

1711 GTATATGGCCCTGAAGGATCAGATCTGGTTTTAATGAAGCTTGCCAGGCTGCTGCTCCTGGATGATTTTGTAGTACGATTGATTACCT
571 **ValTyrGlyProGluGlySerAspLeuValLeuMetLysLeuAlaArgProAlaValLeuAspAspPheValSerThrIleAspLeuPro**

1801 AATTATGGATGCACAATTCCTGAAAAGACCAGTTGCAGTGTATGCTGGGGCTACACTGGATTGATCAACTATGATGGCCTATTACGA
601 **AsnTyrGlyCysThrIleProGluLysThrSerCysSerValTyrGlyTrpGlyTyrThrGlyLeuIleAsnTyrAspGlyLeuLeuArg**

1891 GTGGCACATCTCTATATAATGGGAAATGAGAAATGCAGCCAGCATCATCGAGGGAAGGTGACTCTGAATGAGTCTGAAATATGTGCTGGG
631 **ValAlaHisLeuTyrIleMetGlyAsnGluLysCysSerGlnHisHisArgGlyLysValThrLeuAsnGluSerGluIleCysAlaGly**

1981 GCTGAAAAGATTGGATCAGGACCATGTGAGGGGATATGGTGGCCCACTGTTTGTGAGCAACATAAAATGAGAATGGTTCTTGGTGTG
661 **AlaGluLysIleGlySerGlyProCysGluGlyAspTyrGlyGlyProLeuValCysGluGlnHisLysMetArgMetValLeuGlyVal**

2071 ATTGTTCTGGTCTGGATGTGCCATTCCAAATCGTCTGGTATTTTTGTCCGAGTAGCATATTATGCAAAATGGATACACAAAATTT
691 **IleValProGlyArgGlyCysAlaIleProAsnArgProGlyIlePheValArgValAlaTyrTyrAlaLysTrpIleHisLysIleIle**

2161 TTAACATATAAGGTACCACAGTCATAGCTGAAGTAAGTGTGTCTGAAGCACCCACCAATACAACCTGTCTTTTACATGAAGATTCAGAGA
721 **LeuThrTyrLysValProGlnSer ***

2251 ATGTGGAATTTAAAAATGTCACCTACAACAATCCTAAGACAACACTACTGGAGAGTCATGTTTGTGAAATTTCTCATTAATGTTTATGGGTGT
2341 TTTCTGTTGTTTTGTTGTCAGTGTATTTTGTCAATGTGAAGTGAATTAAGGTACATGCAAGTGAATAACATATCTCTGAAGATAC
2431 TTGAATGATTAAAAAACACACAGGTATATTTGCTGGATGATAA

Fig. 6. The cDNA sequence and the deduced amino acid sequence of hHGF⁽²²⁾. Nucleotide residues are numbered in the 5' to 3' direction, beginning with the first residue of the ATG triplet coding for the putative initiation methionine. The predicted amino acid sequence of hHGF is shown below the nucleotide sequence. The amino acid residues are numbered from the initiation methionine. The termination codon is indicated by an asterisk. The cleavage site between the heavy chain and the light chain of hHGF is indicated by an arrow. Regions corresponding to the amino acid sequences of the peptides derived from purified hHGF are underlined. Potential N-glycosylation sites are indicated by white arrows.

C. hHGF の一次構造とプロセッシング

Fig. 6 の結果から, hHGF は heavy chain (約464 残基) と light chain (234残基) を含む728アミノ酸残基からなる1本のプロ前駆体として合成されることが明らかになった。Heavy chain のN末端上流には, 他の分泌タンパク質の signal peptide に特徴的な疎水性アミノ酸に富む, 約30アミノ酸残基からなる signal peptide と思われる配列があり, おそらくプロセッシングの過程でプロテアーゼにより加水分解されるものと思われるが, hHGF の heavy chain のN末端アミノ酸配列がまだ明らかになっていないため, どの部位で切られるかについては不明である。hHGF の light chain については, そのN末端アミノ酸配列は Val - Val - Asn - Gly - Ile - Pro であることが別の実験か

ら確認されている。従って, hHGF の heavy chain と light chain は, 494番目と495番目の Arg - Val でつながって生合成された後, Arg - Val を切断するプロテアーゼによりプロセッシングを受けて, ヘテロダイマー構造を取るものと思われる。さらに, heavy chain と light chain にはそれぞれ2ヶ所の糖鎖結合部位 (Asn - X - Ser/Thr sequence) があることから, 糖が付加されて成熟型 hHGF が生成されると考えられる (Fig.7)。また, Table 4 で示したペプチドNo. 1, 2, 4 は heavy chain に, No. 3 は light chain に存在することも確認された。

hHGF はホモロジー検索の結果, 驚いたことにプラスミノゲンやプロトロンビンといったいくつかの血液凝固系及び線溶系のタンパク質とアミノ酸レベルで

Structure and Processing of hHGF

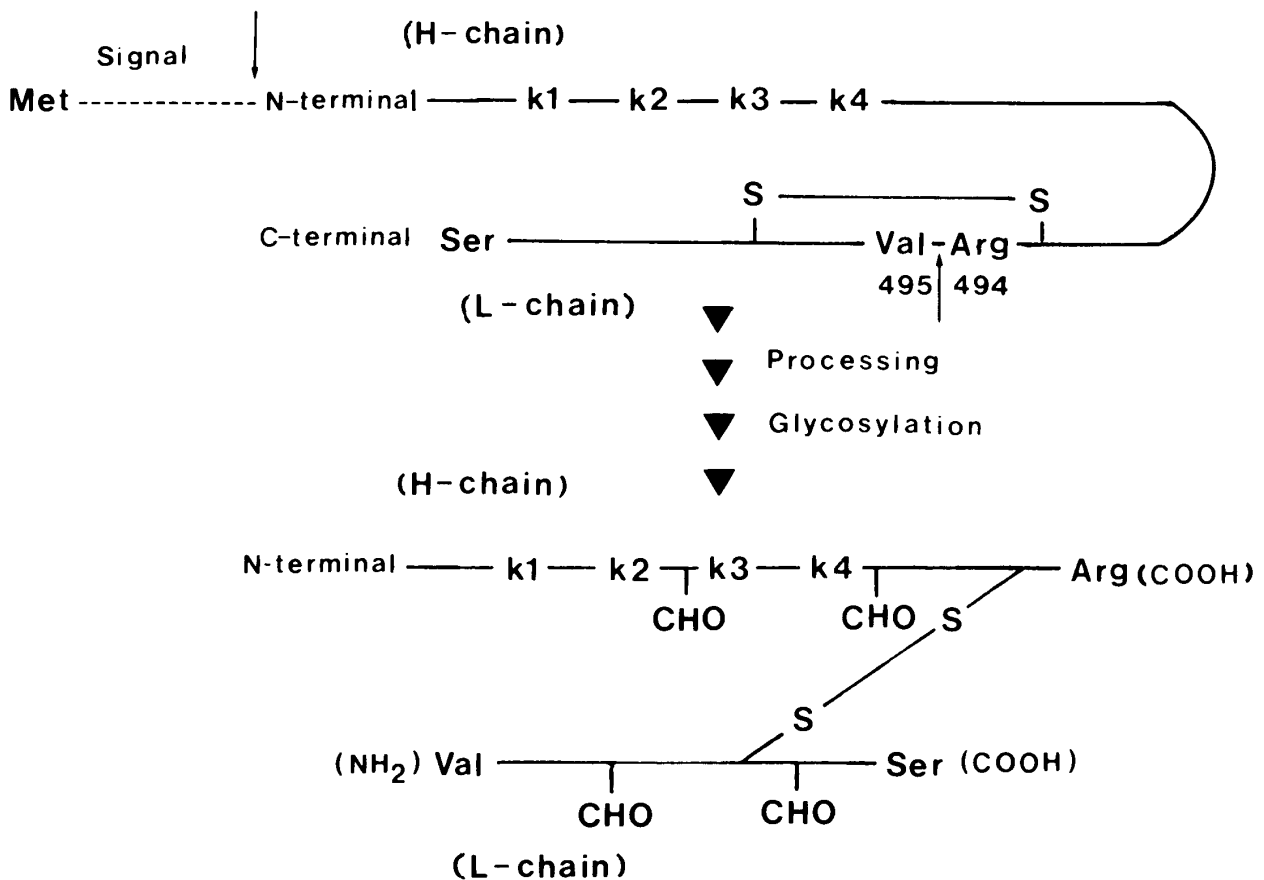


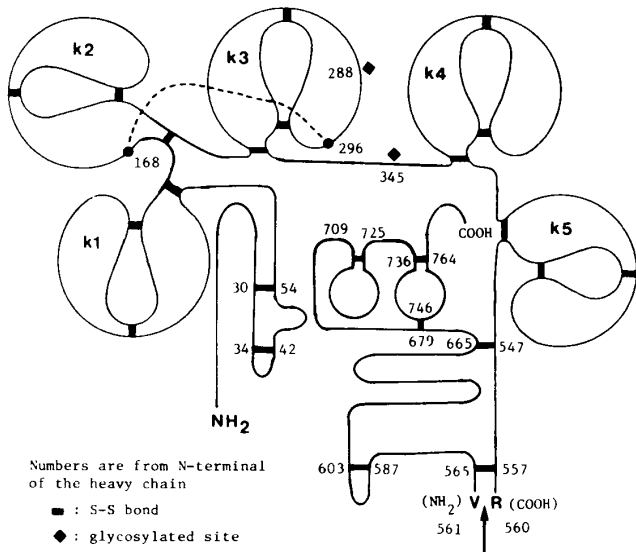
Fig. 7. Structure and processing of hHGF. S-S and CHO indicate the disulfide linkage and possible glycosylation sites, respectively. K1, K2, K3, K4, represent the kringle domain. Amino acid numbers are given from the structure in Fig. 6. The cleavage site between the signal peptide and the heavy chain (H-chain) is not definite.

Table 5. Some amino acid sequence-homologous proteins to hHGF*

Proteins	Homology (%)
Plasminogen - human	32.8 - 46.7
Prothrombin precursor - human	19.7 - 48.8
" - bovine	21.2 - 47.6
Coagulation Factor XI precursor - human	30.8
" XII (Hageman factor)	
precursor - human	20.8 - 32.8
Protein C precursor - human	28.3
Tissue plasminogen activator	
precursor - human	25.1 - 30.7
Urokinase type plasminogen activator	
precursor - human	25.1 - 32.0

*Based on NBRF data base.

Secondary Structure of Human Plasminogen



Proposed Structure of hHGF

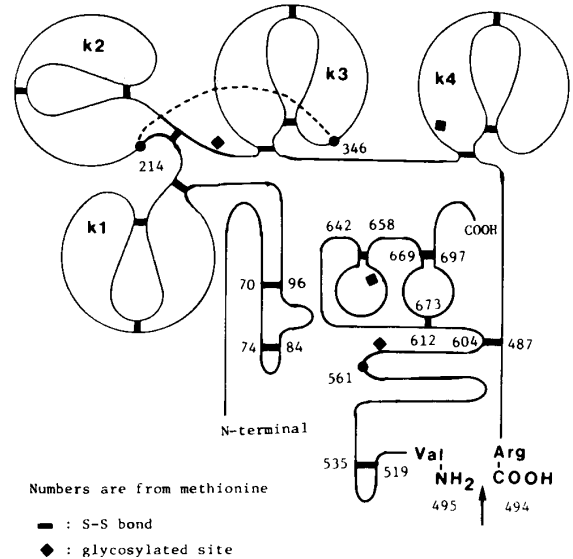


Fig. 8. Secondary structure of human plasminogen and hHGF. Secondary structure of hHGF (right) was predicted from that of human plasminogen (left). In hHGF, an interchain S-S is possibly formed between Cys⁴⁸⁷ in the heavy chain and Cys⁶⁰⁴ in the light chain.

高い相同性を有することが明らかになった (Table 5)。プラスミノゲンには、構造上の特徴として Fig.8 に示すような5個のクリンクル構造が存在することが知られているが、興味あることに、hHGFのheavy chainにもクリンクル構造をとるための必須なアミノ酸配列が4ヶ所存在することが明らかになっ

た。さらに、hHGFのlight chainはプラスミンのβ鎖と高い相同性を有するが、プラスミンのセリンプロテアーゼ活性中心であるβ42位のヒスチジンとβ180位のセリンは、hHGFのlight chainではそれぞれグルタミンとチロシンに置換されている。従って、hHGFにはプラスミンのようなプロテアーゼ作用はな

いと思われる。現在, hHGF の2次構造を図8のように考えているが, これはあくまでもプラスミノゲンの構造から予想したものであり, 正確な構造決定はX線回析などによって確かめる必要がある。

hHGF cDNA クローニングの発表より少し遅れて, ラット血小板由来肝細胞増殖因子 (HGF) の cDNA クローニングと全一次構造が決定された²³⁾。これまで hHGF とラットの HGF は, 生物学的活性及び化学的性質において非常に似かよった物質であることが示唆されていたが, cDNA クローニングの結果, 両因子は構造の上でも高いホモロジーを有する (アミノ酸レベルで約90%) ことが明らかになった。また最近精製されたウサギ血清由来肝細胞増殖因子²⁴⁾についても, 未だ24個のN末端アミノ酸配列しか決定されていないが, hHGF や HGF と高いホモロジーを有することが明らかになっている。

IV. 肝疾患における血中 hHGF レベルとその生理的意義

hHGF の生理的意義を明らかにするために, 劇症肝炎患者血中の hHGF レベルとその臨床的背景について検討した。その結果, 血中の hHGF 活性は患者の年齢, 性別あるいは病因などとは明確な関係はなく,

患者の昏睡度と密接に関連して変動することが明らかになった (Table 1 及び 6)²⁵⁾。すなわち肝性昏睡の程度を Trey と Davidson の分類に従って分けて hHGF 活性を調べると, 昏睡度が 0 ~ II 度の患者血中では健常者の約 4 倍に, III 度及び IV 度の症例では hHGF 活性はそれぞれ約 12 倍及び 24 倍と昏睡度の進行とともに著明な上昇が認められた。そして興味あることは, 回復期の患者血中 hHGF 活性は, ほとんど健常者のレベルにまで低下していたということである²⁵⁾。

さらに, 急性肝炎患者の血清 hHGF レベルは健常者の約 3 倍に, 慢性肝炎や肝硬変症では軽度であるが hHGF レベルは上昇していた²⁶⁾。特に, 急性肝炎では, α -フェトプロテイン, GOT, GPT の一過性の上昇と平行して, 血中 hHGF 活性の上昇が見られた (Fig.9)。従って, 各種肝疾患では程度の差こそあれ肝細胞壊死とともに, 肝再生が促進していると考えられる。以上の結果は, hHGF が生体防御反応の1つとして, 肝細胞壊死の程度に応じて合成, 分泌され, ヒトの肝再生に重要な役割を果たしていることを示唆するものと考えている。

これまでに述べてきた血中の hHGF レベルは, ラット初代培養肝細胞を用いた bioassay により測定した結果である。この bioassay 系は非常に優れた方法で

Table 6. Relationship between coma grade of patients with fulminant hepatic failure and stimulation of DNA synthesis in cultured rat hepatocytes by patient's sera or plasma⁽²⁵⁾.

Subject	Coma grade ^a at sampling	No. of sampling	hHGF level ^b (dpm/hr/ μ g protein)
Normal		11	8.7 \pm 0.4
Fulminant hepatic failure	0-II	12	34.7 \pm 12.0
	III	8	108.2 \pm 22.3 ^c
	IV	14	206.8 \pm 48.1 ^d
	Recovery stage	5	19.8 \pm 4.1 ^e

^a Coma grade of patients was classified according to Trey and Davidson.

^b Values are means \pm S. E. for number of patients studied.

^c $p < 0.001$ and $p < 0.025$ vs. normal subjects and fulminant hepatic failure with Grade 0-II coma, respectively.

^d $p < 0.005$ and $p < 0.001$ vs. normal subjects and fulminant hepatic failure with Grade 0-II coma, respectively.

^e $p < 0.005$, $p < 0.025$ and $p < 0.05$ vs. normal subjects and fulminant hepatic failure with Grade III coma and with Grade IV coma, respectively.

ある反面、結果が出るまでに時間がかかること（約4日）、そして血中に存在する他の肝再生促進因子や阻害因子などの影響を除くことができないという欠点がある。たとえば、前述のEGFやTGF- α は培養肝細胞のDNA合成を促進させること、またTGF- β やインターロイキン-1 β などはEGFやhHGFによって促進された肝細胞増殖を抑制することが明らかになっているが^{27,28}、bioassay系ではこれらの効果を除外して測定することは不可能である。従って、hHGFの生理的意義を正確に判断するためには、培養肝細胞を用いたbioassay系よりもさらに鋭敏で、特異性の高い測定系を確立する必要がある。

そこで我々は最近、hHGFに対するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いて、固相法3ステップサンドイッチ法の酵素免疫抗体測定法（ELISA）を確立した²⁹。この方法により、上記のbioassay系の欠点をカバーし、さらに高感度で、し

かも短時間に患者血中hHGFレベルを定量出来るようになった。ELISAにより劇症肝炎患者血清のhHGFレベルを測定した結果がFig.10である。健常者血清のhHGFレベルの平均値は 0.24 ± 0.12 (SD) ng/ml、患者血清の平均値は 8.06 ± 1.06 (SD) ng/mlであり、健常者血清のそれとは明確な差が認められた。このELISA系を用いて、さらに多数の種々の肝疾患患者血中hHGFレベルの変動が測定できるようになれば、近いうちにhHGFの臨床的意義も明らかになってくると期待している。

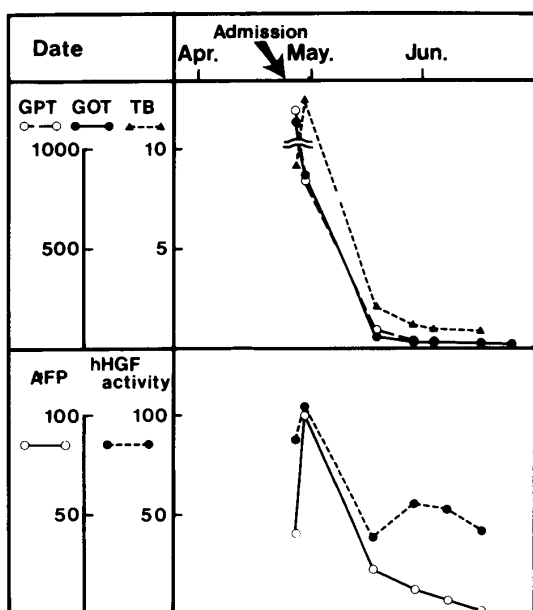


Fig. 9. Details of clinical course and changes in hHGF level in sera or plasma of a patient with acute hepatitis⁽²⁶⁾. hHGF activities are expressed as in Fig. 1. Activities of serum alanine transaminase (GPT) and aspartate aminotransferase (GOT) are expressed as Karmen unit and contents of α -fetoprotein (AFP) and total bilirubin (TB) in plasma are as ng/ml and mg/dl, respectively.

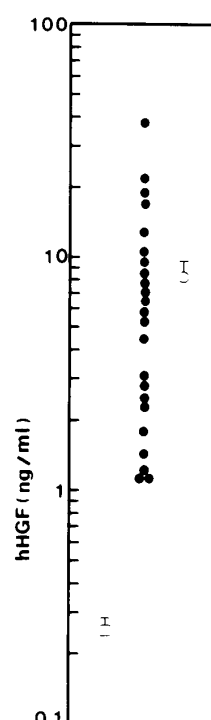


Fig. 10. Serum hHGF levels in patients with fulminant hepatic failure determined by ELISA⁽²⁹⁾. Closed circle, open circle and open square indicate individual hHGF values of patients with fulminant hepatic failure, a mean value of hHGF for 23 patients with fulminant hepatic failure, and that for 30 normal subjects, respectively. Bar shows SE.

V. おわりに

今後 hHGF に関して解明されねばならない問題点は以下のである。

①hHGF 産生臓器の同定。現在, hHGF cDNA を用いて, *in situ* ハイブリダイゼーションの手法により hHGF mRNA の検出を行っているが, 未だ産生臓器の決定には至っていない。また Northern blot 法による解析も同時に進行しているがはっきりした結果は得られていないのが現状である。

②hHGF 遺伝子発現調節機構の解明。この問題は, 産生臓器が決まった後の研究課題であるが, 肝再生における hHGF の生理的役割を知るうえでも重要な問題である。

③hHGF 受容体の構造と機能の解明。hHGF の作用がどのような機構で細胞内に伝わり, そして核内まで伝わるのか, 非常に興味ある課題であるが, その機構を解明するためには, 受容体の構造の解明が必須である。

最近, DNA 組換えによる hHGF の発現にも成功し, hHGF の大量生産が可能になりつつある。hHGF が大量に得られるようになると, 上記の hHGF 受容体の解析を始め, 肝再生における hHGF の役割を明らかにする *in vivo* での実験も飛躍的に進むと思われる。また, 基礎研究だけでなく, 各種肝疾患の診断や予後の判定, さらに種々の肝疾患や肝癌切除手術, あるいは肝移植などの外科手術後の治療薬として, 臨床医学への応用も可能になるものと期待される。

謝 辞

本研究はすべて, 鹿児島大学医学部第2内科学講座肝臓グループとの共同研究であり, 特に1989年まで第2内科主任教授であった橋本修治先生(現名誉教授), 同第2内科坪内博仁博士には多大なる御助言, 御協力をいただきました。深く感謝申し上げます。また hHGF の精製は本講座の合田栄一前助教授(現岡山大学薬学部), hHGF cDNA クローニングは関西医科大学喜多村直実教授と三菱化成総合研究所, hHGF の ELISA の確立は大塚アッセイ研究所の研究スタッフの力に負うところが大きであることを付記し, 厚くお礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり, 本講座の研究スタッフ諸氏及び学生諸君の御助言と御協力をいただきました。記して感謝の意を表します。

文 献

- 1) Triffitt, J. T., Gebauer, U., Ashton, B. A., Owen, M.E. & Reynolds, J. J.: Origin of plasma α_2 HS-glycoprotein and its accumulation in bone. *Nature* 262: 226-227, 1976.
- 2) Ashton, B. A., Hohling, H. J. & Triffitt, J. T.: Plasma proteins present in human cortical bone: Enrichment of the α_2 HS-glycoprotein. *Calcif. Tissue Res.* 22: 27-33, 1976.
- 3) Moolton, F. L. & Bucher, N. L. R.: Regeneration of rat liver: Transfer of humoral agent by cross circulation. *Science* 158: 272-274, 1967.
- 4) Sakai, A.: Humoral factor triggering DNA synthesis after partial hepatectomy in the rat, *Nature* 228: 1186-1187, 1970.
- 5) Fisher, B., Szuch, P., Levine, M. & Fisher, E.R.: A portal blood factor as the humoral agent in liver regeneration. *Science* 171: 575-577, 1971.
- 6) Morley, C. G. D. & Kingdon, H. S.: The regulation of cell growth. I, Identification and partial characterization of a DNA synthesis stimulation factor from the serum of partially hepatectomized rats. *Biochim. Biophys. Acta* 308: 260-275, 1973.
- 7) Alison, M. R.: Regulation of hepatic growth. *Physiol. Rev.* 66: 499-541, 1986.
- 8) 坪内博仁, 合田栄一, 中山宏幸, 弘野修一, 高橋耕三, 崎山 修, 宮崎博臣, 大工原恭, 橋本修治, 肝細胞増殖因子と抑制因子。肝胆膵17: 759-771, 1988.
- 9) Bissell, D. M., Hammaker, L. E. & Myer, U. A.: Parenchymal cells from adult rat liver in non-proliferating monolayer culture. *J. Cell Biol.* 59: 722-734, 1973.
- 10) Richman, R. A., Claus, T. H., Pilkis, J. & Friedman, D. L.: Hormonal stimulation of DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73: 3589-3593, 1976.
- 11) Nakamura, T., Tomita, Y. & Ichihara, A.: Density-dependent growth control of adult rat hepatocytes in primary culture. *J. Biochem.* 94: 1029-1035, 1983.
- 12) Russell, W., McGowan, J. A. & Bucher, N. L.

- R.: Partial characterization of a hepatocyte growth factor from rat platelets. *J. Cell Physiol.* 119 : 183-192, 1984.
- 13) Michalopoulos, G., Houck, K. A. Dolan, M. L. & Luetke, N. C.: Control of hepatocyte replication by two serum factors. *Cancer Res.* 44 : 4414-4419, 1984.
- 14) Nakamura, T., Nawa, K. & Ichihara, A.: Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122 : 1450-1459, 1984.
- 15) Suzuki, T., Koga, N., Imamura, T & Mitsui, Y.: A novel growth factor in rat spleen which promotes proliferation of hepatocytes in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153 : 1123-1128, 1988.
- 16) Francavilla, A., Dileo, A., Polemeno, L., Gavalier, J., Pellicci, R., Todo, S., Kam, I., Prelich, J., Makowka, L., & Starzl, T. E.: The effect of hepatic stimulatory substance, isolated from regenerating hepatic cytosol, and 50,000 and 300,000 subfractions in enhancing survival in experimental acute hepatic failure in rats treated with D-galactosamine. *Hepatology* 6 : 1346-1352, 1986.
- 17) Suemori, S., Eto, T., Yamada, T., Nakamura, T., Nakanishi, T. & Kajiyama, G.: Partial purification and characterization of hepatocyte proliferation factor from liver of rats treated with D-galactosamine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150 : 133-139, 1988.
- 18) Nakamura, T., Nawa, K., Ichihara, A., Kaise, N. & Nishino, T.: Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets. *FEBS Lett.* 224 : 311-316, 1987.
- 19) Nakayama, H., Tsubouchi, H., Gohda, E., Koura, M., Nagahama, J., Yoshida, H., Daikuhara, Y. & Hashimoto, S.: Stimulation of DNA synthesis in adult rat hepatocytes in primary culture by sera from patients with fulminant hepatic failure. *Biomed. Res.* 6 : 231-237, 1985.
- 20) Gohda, E., Tsubouchi, H., Nakayama, H., Hirono, S., Takahashi, K., Koura, M., Hashimoto, S. & Daikuhara, Y.: Human hepatocyte growth factor in plasma from patients with fulminant hepatic failure. *Exp. Cell Res.* 166 : 139-150, 1986.
- 21) Gohda, E., Tsubouchi, H., Nakayama, H., Hirono, S., Sakiyama, O., Takahashi, K., Miyazaki, H., Hashimoto, S. & 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.
- 22) Miyazawa, K., Tsubouchi, H., Naka, D., Takahashi, K., Okigaki, M., Arakaki, N., Nakayama, H., Hirono, S., Sakiyama, O., Takahashi, K., Gohda, E., Daikuhara, Y. & Kitamura, N.: Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163 : 967-973, 1989.
- 23) 中村敏一: 肝細胞増殖因子 (HGF) の分子クローニング。 *実験医学* 8 : 62-67, 1990.
- 24) Zarnegar, R., Muga, S., Enghild, J. & Michalopoulos, G.: NH₂-terminal amino acid sequence of rabbit hepatopoietin A, a heparin-binding polypeptide growth factor for hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163 : 1370-1376, 1989.
- 25) Tsubouchi, H., Hirono, S., Gohda, E., Nakayama, H., Takahashi, K., Sakiyama, O., Miyazaki, H., Sugihara, J., Tomita, E., Muto, Y., Daikuhara, Y., & Hashimoto, S.: Clinical significance of human hepatocyte growth factor in blood from patients with fulminant hepatic failure. *Hepatology* 9 : 875-881, 1989.
- 26) Tsubouchi, H., Hirono, S., Gohda, E., Nakayama, H., Takahashi, K., Sakiyama, O., Kimoto, M., Kawakami, S., Miyoshi, H., Kubozono, O., Kaharada, Y., Mizumoto, R., Arakaki, N., Daikuhara, Y. & Hashimoto, S.: Human hepatocyte growth factor in blood from patients with fulminant hepatic failure. I. Clinical aspects. *Dig. Dis. Sci.* 1990.(in press).
- 27) Nakamura, T., Tomita, Y., Hirai, R., Yamaoka, K., Kaji, K. & Ichihara, A.: Inhibitory effect of

- transforming growth factor β on DNA synthesis of adult rat hepatocytes in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133 : 1042-1050, 1985.
- 28) Nakamura, T., Arakaki, R. & Ichihara, A.: Interleukin - 1 β is a potent growth inhibitor of adult rat hepatocytes in primary culture. *Exp. Cell Res.* 179 : 488-497, 1988.
- 29) Tsubouchi, H., Niitani, Y., Hirono, S., Nakayama, H., Gohda, E., Arakaki, N., Sakiyama, O., Takahashi, K., Kimoto, M., Kawakami, S., Setoguchi, M., Tachikawa, T., Shin, S., Arima, T. & 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* (submitted for publication).