

肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor) - その発見の歴史と特に歯科医学分野での生理的意義 -

大工原 恭

鹿児島大学歯学部口腔生化学講座

Hepatocyte Growth Factor - Its Discovery and Physiological Roles in Dentistry -

Yasushi Daikuhara

Department of Biochemistry, Kagoshima University Dental School,
35-1 Sakuragaoka-8-chome, Kagoshima, 890-8544, Japan.

Abstract

Human hepatocyte growth factor (HGF) was first discovered in plasma from fulminant hepatic failure as a potent mitogen for adult hepatocytes in 1985, and it was purified from the patients' plasma in 1986 in our laboratory. However, subsequent studies have revealed that HGF has various physiological activities such as mitogen, motogen, morphogen and angiogen to most of epithelial and endothelial cells. Thus, HGF is now known as a broad-spectrum and multifunctional cytokine involved in a variety of physiological processes, including tissue development, regeneration and wound healing. In this review, a history how HGF was discovered is described. It is also described the physiological roles of HGF, especially in oral biology.

Keywords: hepatocyte growth factor, scatter factor, physiological role, oral biology.

はじめに

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, 以下 HGF と略す) は、肝実質細胞に特異的な増殖因子としてラットなどの実験動物で長年研究が続けられてきたものであるが、1985年に我々は初めてヒトでの存在を明らかにし、1986年に劇症肝炎患者血漿から精製し

たペプチド性因子である。さらに1989年には、ヒトの HGF の cDNA が分子クローニングされてその推定 1 次構造が明らかにされ、次いで組換え体 HGF の発現により大量の HGF の供給が可能になるに及び、その臨床的な応用が模索されるようになってきている。また、当初肝実質細胞に特異的と考えられてきた HGF は、

1991年になって種々の生物学的な活性を持つことが明らかとなり、さらにその受容体がc-Met原癌遺伝子産物であることも明らかにされた。従って、それ以降HGFは広範囲・多機能型増殖因子の1つとして分類されるようになり、肝臓学者のみならず、広く細胞生物や癌医学の研究者に注目を浴びることになった。このように、現在ではHGFは種々の臓器の発生、再生、修復に不可欠の因子と考えられている。本稿は、我々の講座でHGFを発見するに至った経緯を中心に述べ、その後の研究による特に歯科医学分野での意義について、その現状を我々の研究成果を中心に概説する。

なお我々の研究の大部分は、医学部内科学第二講座（当時の主任：橋本 修治 教授）の坪内 博仁 博士（現 宮崎医科大学内科学第二講座教授）らのグループとの共同研究であることをあらかじめお断りしておきたい。

1. HGF研究の歴史とヒトHGFの発見

肝臓は極めて再生能力の高い臓器であって（図1参照）、この能力が肝切除や肝移植手術を可能にしている。この再生能力を初めて実験的に証明したのは、1931年のHigginsとAnderson¹⁾によるラット部分肝切除法の確立である。すなわち彼らは、2/3の肝臓を切除されたラットの残存肝が、2日後には約2倍に、1週間後にはほぼ元の大きさにまで達することを示したのである。このラット部分肝切除術は、組織の再生や細胞増殖の実験モデルとして、現在でも広く用いられている。この肝再生の機序は今も未だ完全には解明されていないが、1967年にMooltenとBucher²⁾が2匹のラットの血管系を結合する実験系（パラビオシス）を用いて、一方のラットが部分肝切除を受けると、そのパートナーである正常ラットの肝細胞増殖能が増加することを見出し、部分肝切除ラットの血漿中に体液性の肝再生促進因子が存在していることを示唆した。しかし、当時はこの肝再生因子の活性を測定する適当なin vitroの系がなかったため、その後の研究はほとんど進展しなかった。

一方、1960年代後半に研究が始まったラットの初代培養肝細胞調製法³⁾は、その後多くの人たちによって改良が加えられた結果⁴⁾、1980年代に入ってこれが肝再生因子活性のin vitroの測定系に応用されるようになり⁵⁾、主として米国及び日本でラットの部分肝切除ラット血清から肝再生因子を精製する試みが始まった。しかし、それら部分精製標品の分子量は、12万以上の高分子、あるいは3,000以下の低分子と一定せず、本



図1 鷲に肝臓をついばまれるプロメテウス。

ギリシャ神話のティタン（巨人）神族の一人であるプロメテウスは、天上の火を盗んで人間に与えるなど人間に親切であったことから、ゼウスの怒りを買って、コーカサスの山の岩に鎖でつながれて、毎日鷲に生きた肝臓をついばまれた。しかし、彼の肝臓は夜の内に何時も元に戻ったという。肝臓学者の間では、これが肝臓の再生能力を記述した最初の文献とされている。

体は不明のままであった⁶⁻⁸⁾。これとは別に、Strainら⁹⁾は1982年にラットの血小板に肝細胞の増殖を強く促進する活性があることを見出した。さらに彼らのグループはこの血小板由来の因子を部分精製して、1984年に分子量約65,000の既知の細胞増殖因子とは異なる、熱に不安定な物質であることを示した¹⁰⁾。しかし、ヒトの血小板をラットのそれと同様に処理しても肝細胞の増殖を促進する活性は得られず、ヒトの体液中にこのような肝再生因子が存在するか否かについてはその時点では全く不明で、ヒトにはそのような因子はないという意見の方がむしろ主流であった。なお、肝再生因子にhepatocyte growth factorという名称を用いたのは、ラット血小板由来の因子を部分精製したBucherらのグループが最初であり、我々もこの名称を踏襲した。このような背景の下で、我々は医学部第二内科の肝臓グループと共同して1984年からヒトHGFの研究に着手し、種々の肝疾患患者血清のスクリーニングを開始した。活性測定系はラットの初代培養肝細胞である。しかし、期待するようなpositiveな結果はなかなか得

られず、スクリーニングを始めてほぼ1年後、もうこの研究は止めようかと話し合っている時に、偶然にも第二内科に緊急入院した劇症肝炎の患者があり、その血清中に肝細胞のDNA合成を強く促進する因子が存在することを発見したのである¹¹⁾ (図2)。劇症肝炎

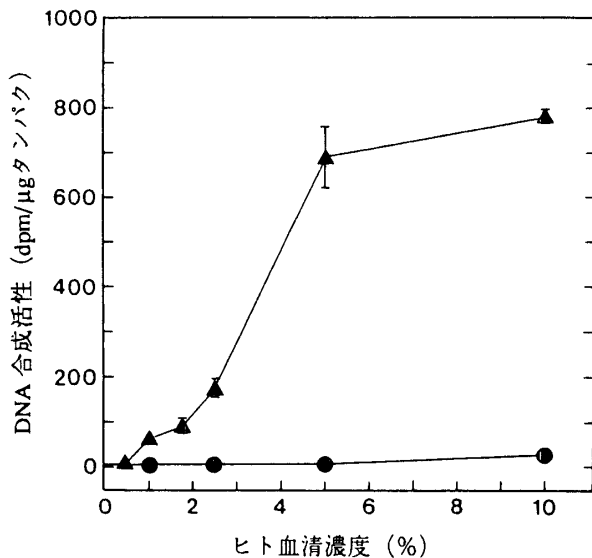


図2 ラット初代培養肝細胞のDNA合成に対する健常および劇症肝炎患者血清の影響¹¹⁾。

細胞は、図に示した濃度の血清存在下で48時間培養した後、³H-チミジンを加えて2時間パルス培養を行い、DNA合成活性を測定した。●、健常者8名の混合血清；▲、劇症肝炎患者血清。

は、70~80%の肝細胞が急速に壊死に陥る重篤な肝不全症であって、これは前述の2/3肝部分切除ラットに匹敵することから、このような状態で血清中にHGFが出現することは、後で考えれば当然のことであったが、その当時は全く気付かなかったことである。

我が国では、劇症肝炎の治療法の1つに血漿交換が行われている。そこで我々は、この血漿交換療法時に得られる患者血漿からHGFの精製を試み、約1年後の1986年に成功した¹²⁾。すなわち、HGFは分子量約6万の重鎖と約3万の軽鎖がS-S結合した分子量約9万のヘテロダイマーであり、肝細胞に対する増殖因子としてそれまで知られていた上皮増殖因子(EGF)やインスリンとは相加的あるいは相乗的に作用することから、これら既知の増殖因子とは異なる新しい因子であることを明らかにして、その年の日本生化学会大会で発表した。一方、ほぼ同時期にNakamuraら¹³⁾(九大、現阪大)は、ラット血小板からHGFの精製に成功し、HGFは分子量約27,000のシングルペプチドであると発表した。

その当時、「増殖因子はシングルペプチドで、分子量は数千からせいぜい3万まで」というのが一般的な常識であった。従って、我々の発表は「そんなに大きい増殖因子があるはずはない、ヘテロダイマーの軽鎖と称している3万の部分活性部分で、未だ精製不十分なのであろう」と、学会などで強く批判された。我々の結果を投稿した英文誌のrefereeも同様で、ようやく

表1 HGF研究の歴史

-
- 1931: ラットの部分肝切除法の確立 (Higgins and Anderson¹⁾)。
 - 1967: 部分肝切除ラットと正常ラットのparabiosis実験 (Moolten and Bucher²⁾)。
 - 1969: ラットの初代培養肝細胞調製法の確立 (Berry and Friend³⁾)。
 - 1982: ラットの初代培養肝細胞を用い、部分肝切除ラット血清が正常ラット血清よりDNA合成促進活性が高いことを報告 (Michalopoulos, et al.⁶⁾)。
 - 1982: ラットの血小板にHGF活性が存在することを発見 (Strain, et al.⁹⁾)。
 - 1984: 部分肝切除ラット血清からのHGF部分精製。
分子量12万以上と3000以下の2種類がある (Michalopoulos, et al.⁷⁾)。
分子量15万以上 (Nakamura, et al.⁸⁾)。
 - 1985: 劇症肝炎患者血清中にHGF活性が出現することを発見 (Nakayama, et al.¹¹⁾)。
 - 1986: 劇症肝炎患者血漿から、分子量約85,000 (ヘテロダイマー) のヒトHGFを精製 (Gohda, et al.¹²⁾)。
 - 1986: ラット血小板から分子量27,000 (シングルペプチド) のHGFを精製 (Nakamura, et al.¹³⁾)。
 - 1989: ヒトHGFのcDNAクローニングと1次構造の決定 (Miyazawa, et al.¹⁶⁾)。
 - 1989: ヒトHGF (?) のcDNAクローニングと1次構造の決定 (Nakamura, et al.¹⁷⁾)。
 - 1990: HGFとScatter Factor (SF) との構造類似性を指摘 (Gherardi and Stoker²⁴⁾)。
 - 1991: HGFとSFが同一タンパクであることを証明 (Weidner, et al.¹⁹⁾)。
 - 1991: HGFが種々の上皮系および内皮系細胞に対する増殖因子であることを証明 (Rubin, et al.²⁰⁾)。
 - 1991: HGFとTumor Cytotoxic Factorが同一タンパクであることを証明 (Shima, et al.²¹⁾)。
 - 1991: HGF受容体の1つがc-Met原癌遺伝子産物であることを発見 (Comoglioのグループ²⁵⁾ とAaronsonのグループ²⁶⁾ がほぼ同時)。
-

acceptされ、印刷公表された時は1988年になってしまっていた¹⁴⁾。また、その頃にはラット血小板やウサギの血清からも、我々が報告したHGFと同様のサブユニット構造を持つHGFが精製され¹⁵⁾、ようやく世の中に認められるようになった。しかしNakamuraらは、今もHGFを最初に精製したのは自分達であると主張し、HGFは分子量3万と6万のヘテロダイマーであると言いながらも、その文献には上記の「分子量約27,000のシングルペプチドである」と書いた1986年の論文¹³⁾を引用しているのである(表1参照)。

2. HGFの構造

HGFの構造は、1989年に2つのグループからほぼ同時に発表されたcDNAのクローニングにより明らかにされた。その1つは、我々が関西医科大学の喜多村直実教授(現東工大)と三菱化学総合研究所との共同研究により、精製HGFから得た部分アミノ酸配列に基づいて作成したプローブを用いて、ヒト胎盤cDNAライブラリーから得られたものである¹⁶⁾(図3)。その結果、HGFは31アミノ酸残基からなるシグナルペプチドに続く463アミノ酸残基の重鎖と、234アミノ酸

残基の軽鎖が、1本のmRNAからまず不活性型のシングルペプチド(pro-HGF)として合成された後、Arg⁴⁹⁴とVal⁴⁹⁵間でプロセッシングを受け、生物学的な活性のある成熟型のヘテロダイマーに転換されることが明らかとなった。

一方、Nakamuraらは東洋紡研究所との共同研究により、ラット血小板由来の精製HGFの部分アミノ酸配列からプローブを合成し、ヒト肝臓のcDNAライブラリーからクローニングを行ったと発表した¹⁷⁾。しかし、これら2種のHGF cDNAを比較すると、その塩基配列から推定されるHGFの1次構造は、総アミノ酸の数では728個と一致するものの、この内14個のアミノ酸に相違が認められる。この相違の真の理由は明らかではないが、その後東洋紡のグループは、ヒト白血球のcDNAライブラリーから我々が得たcDNAと同一の塩基配列を持つものと、483~497番目の15塩基が欠如しているもの(deleted variant HGF, dHGF)の2種のHGF cDNAを得ている¹⁸⁾(図3参照)。また、ドイツのBirchmeierのグループ¹⁹⁾も東洋紡のグループがヒトの白血球から得た2種のcDNAと同じ配列を持つHGFのcDNA(MRC-5細胞由来)のクローンを得ており、NIHのAaronsonのグループ²⁰⁾はヒト胎児線維芽細胞(M426)からHGFと同一の増殖因子を精製したが、そのcDNAの塩基配列も我々の得たものと完全に一致している。さらに、雪印乳業生物科学研(当時)のHigashioのグループ²¹⁾が得たtumor cytotoxic factorは、次項で述べるようにHGFと同一タンパクであるが、このcDNA(IMR-90細胞由来)も、やはり483~497番目の15塩基が欠如しているものの、他は我々が得たcDNAと同一の塩基配列である。このように、我々が1989年に発表したHGFの1次構造は、その後4つの独立したグループからconfirmされていることになる。しかし、Nakamuraらが得たとするヒトHGF cDNAの配列は、その後もconfirmされていない。なお、Nakamuraらも、今はHGFの1次構造として我々が得たものと同じものを記載しているが、その文献には彼らの発表論文¹⁷⁾を引用し、我々の文献には触れていないことを付記しておく。

このcDNAから推定されるHGFのアミノ酸配列と、既知のタンパクのそれとの相同性を比較したところ、プラスミノゲンなどの凝固線溶系のタンパクと高い相同性が認められ、特にプラスミノゲンはCysの位置もほぼ一致した。図4は、ヒトのプラスミノゲンの構造から推定したHGFの構造である。この内、重鎖N-末端付近には2個のS-S結合からなるヘアピン

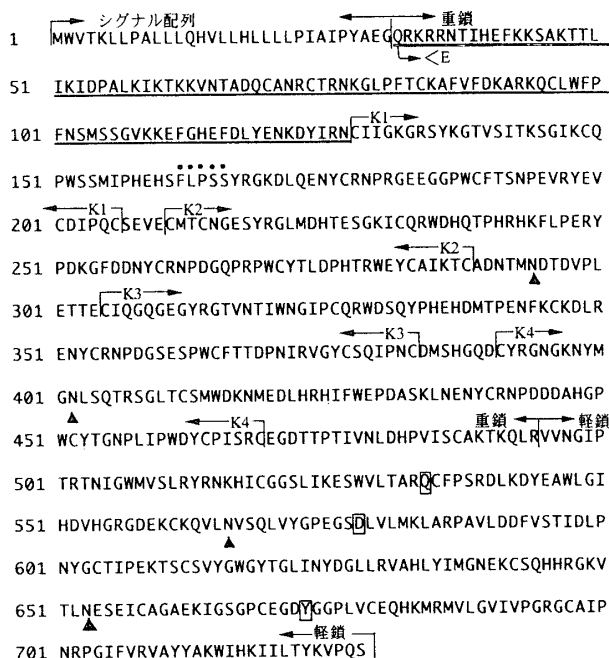


図3 HGF cDNAから推測されるHGFのアミノ酸配列(Miyazawaら¹⁶⁾に一部加筆)。

下線, ヘパリン結合部位; <E, ピログルタミン酸; K1~K4, クリソリン構造相当部位; ●, dHGFで欠損しているアミノ酸残基; ▲, N-結合型糖鎖結合部位; □, プラスミンにおけるセリンプロテアーゼ活性中心相当部位。

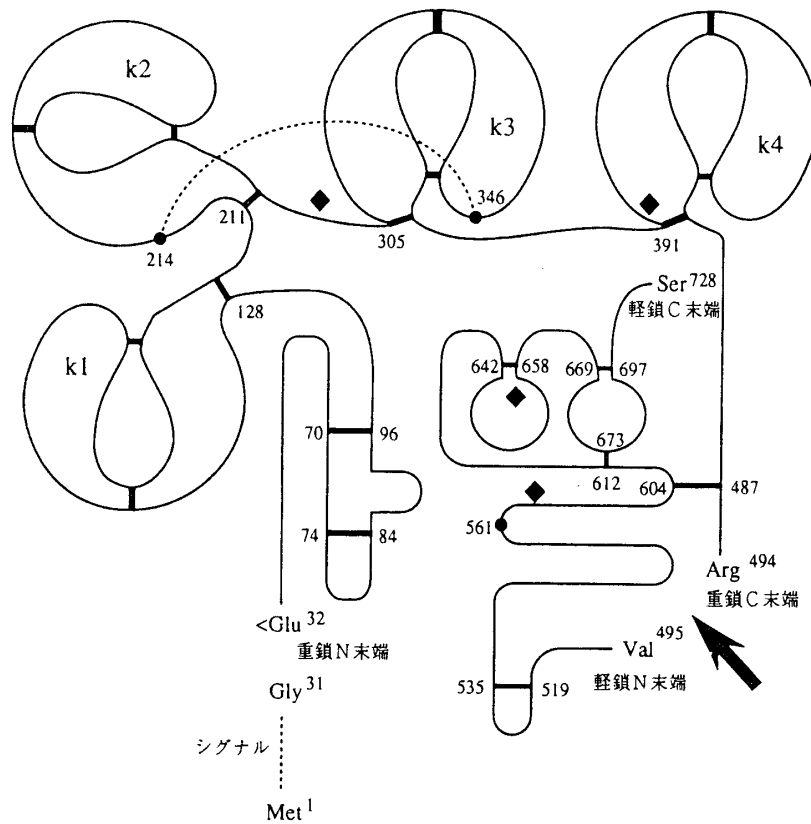


図4 プラスミノーゲンの構造から推定したヒトHGFの構造。
 数字は、タンパク合成開始部位のメチオニンから数えたアミノ酸残基の番号を示し、一本のmRNAから合成されたPro-HGFは、←の部位でHGFAなどによりプロセッシングを受けて活性化される。—, S-S結合部位；<Glu, ピログルタミン酸；K1~K4, クリングル構造；●, Cys残基；◆, N-結合型糖鎖結合部位。

ループが存在し、このヘアピンループを含む部位はヘパリンに対する親和性が高い。Pro-HGFはこの部位で細胞外基質に結合していると考えられている²²⁾。ヘパリン結合部位に続くクリングル構造は、3個のS-S結合を基に描かれた平面構造が北欧のクリングルビスケットに似ていることから命名されたもので、血液凝固線溶系のタンパクによく見られ、タンパク間の相互作用に重要なドメインと推定されている。HGFでは、このクリングル構造が4個あり、受容体(c-Met)との結合に重要な役割を果たしていると考えられている。

Pro-HGFは、プラスミノーゲンと同様にArgとValの間がプロセッシングを受けて生物学的な活性のあるHGFに転換されるが、HGFの軽鎖のアミノ酸配列を見ると、セリンプロテアーゼの活性中心であるHis, Asp, Serの内、HGFではHisとSerが他のアミノ酸と置換しているため(図3)、プロテアーゼとしての活性

はない。しかし、このようなHGFと凝固線溶系のタンパクと高い相同性は、HGFが生物進化の過程で、この凝固線溶系の遺伝子を利用して獲得されたものと推定される。

また、劇症肝炎患者血漿から精製したHGFおよび組換え体HGFの重鎖と軽鎖のN-末端アミノ酸をそれぞれ決定したところ、重鎖のN-末端は、最初のMetから数えて32番目のGlnが環状化したピログルタミン酸、軽鎖のそれは495番目のValであることを明らかにした²³⁾。一方、Nakamuraらは重鎖のN-末端が55番目のProであると報告しているが¹⁷⁾、これも何らかの誤りであろう。

3. HGFの多様な生物活性

我々がこの研究を始めた当初、HGFは肝細胞に特異的な増殖因子と考えていたが、1991年に至り、HGF

には多様な生物活性のあることが次々と明らかにされた。その1つは、HGFが細胞分散因子 (scatter factor, SF) と同一タンパクであることの証明である。SFは、通常互いに固く結合している上皮細胞を個々に分散させ、さらに細胞に運動性を与える因子として、組織の発生や癌細胞の転移に関与していると考えられ、主としてヨーロッパで長く研究されていたものであるが、1990年頃からこのSFとHGFの構造類似性が指摘されるようになった²³⁾。これについて、我々はドイツのEssen大学との共同研究により、HGFとSFが同一タンパクであることを、その生物活性およびcDNAの分子クローニングにより明らかにした²⁰⁾。一方、東尾侃二博士ら (雪印乳業生物科学研究所) が、ある種の癌細胞に対して増殖抑制的に働く因子として研究を進めていたtumor cytotoxic factorも、HGFと同一タンパクであることが証明された²¹⁾。さらに、米国NIHのAaronsonのグループが、広く上皮系および内皮系の細胞に対する増殖因子として研究を進めていた因子 (fibroblast-derived mitogen) も、1991年にHGFと同一タンパクで

あることが明らかとなった²⁰⁾。また、HGFの受容体は、c-Metと呼ばれる原癌遺伝子産物であることも同年に明らかとなった^{25, 26)}。従って、1991年以降HGFという1つのペプチド性因子は、1つの受容体を介して多種多様な生物活性を発現する広範囲・多機能型サイトカインの1つとして認識されるようになり、肝臓のみならず、種々の組織の再生、修復に不可欠の因子と考えられるようになったのである。表1は、ここまでのHGF研究の歴史をまとめたものである。

このような多様な生物活性のあるHGFの受容体が1つということは、c-Met以降の標的細胞内でのシグナル伝達経路が多様であることを意味している。c-MetにHGFが結合すると、c-Metの膜貫通型 β -鎖細胞内領域に存在するチロシンキナーゼが活性化され、次いでそのC-末に位置する多機能型結合部位 (multi-functional docking domain) 中のチロシン残基 (特にTyr¹³⁴⁹とTyr¹³⁵⁶) が、自己リン酸化され、さらにSH2ドメインを持つ種々のシグナル伝達物質がここに結合して、以降の多様なシグナルを伝達すると考えられてい

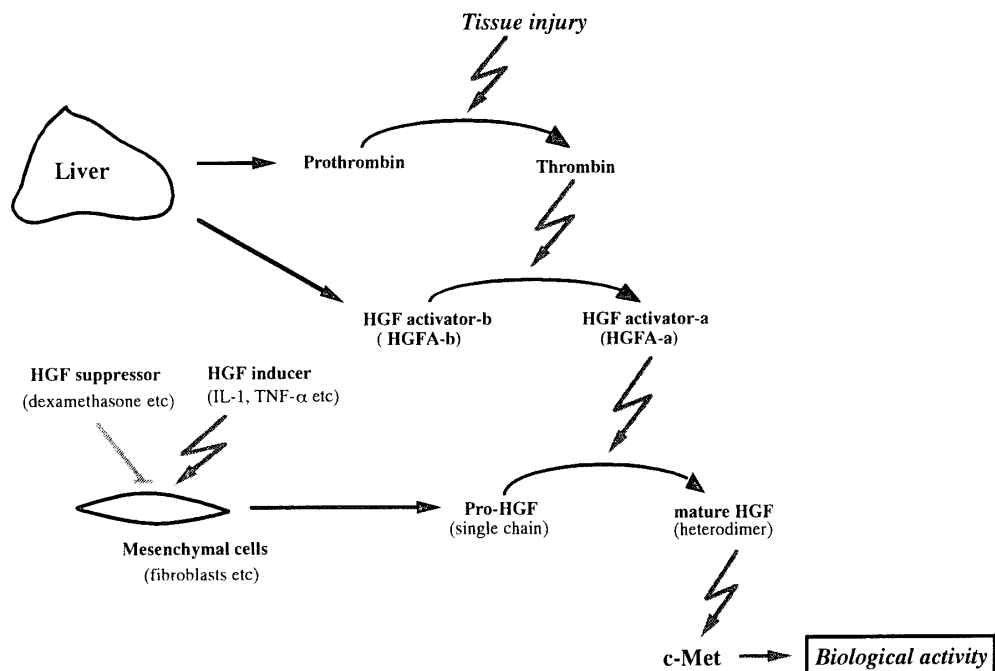


図5 HGF活性化のカスケード機構。

ProthrombinとHGFAの前駆体 (Pro-HGFA, HGFA-b) は、肝臓で合成され、血中に分泌されて循環している。一方不活性型のHGF (Pro-HGF) は、線維芽細胞などの間葉系細胞で合成され、細胞外基質に結合している。組織の傷害などで血液凝固系が活性化されると、prothrombinがthrombinに活性化され、thrombinがHGFAを活性化 (HGFA-a) する。このHGFA-aはヘパリンに親和性が高く、活性化された部位の細胞外基質に結合して、その部位のPro-HGFを活性型のHGFに転換する。次いで、HGFが上皮細胞などの受容体 (c-Met) に結合し、種々の生物学的な活性を現す。

る。これらについても多くの報告があるが、ここでは省略する。詳細は、その方面の総説など^{27, 28)}を参照されたい。

4. HGFの産生誘導と活性化

上記の研究結果から、それまで不明であったHGFの産生細胞は、主に間葉系の細胞(例えば繊維芽細胞)であることが分かってきた。これを受けて我々は、繊維芽細胞でのHGF産生が、IL-1やTGF- α などの炎症性サイトカインで誘導されることを初めて明らかにした²⁹⁾。さらにその後、多くのHGF産生誘導因子が示され²⁸⁾、また、口腔内細菌の菌体成分もHGF産生を誘導することが明らかになっている^{30, 31)}。

前述したように、HGFは1本のmRNAから生物学的な活性を持たないpro-HGFとして産生され、その後プロセッシングを受けて生物学的な活性のある成熟型(ヘテロダイマー)HGFとなる。このプロセッシングは、HGFの産生細胞内で起こると考えられていたが、その後、細胞からはpro-HGFとして分泌されることが明らかとなり、我々は、この細胞外でHGFを活性化

する因子がurokinaseであると1992年に発表した³²⁾。しかし、その約1年後にMiyazawa³³⁾らはpro-HGFに対してurokinaseよりはるかに活性の高い新規のセリンプロテアーゼを血清中に発見し、HGF-activator (HGFA)と命名した。現在では、HGF活性化の主役はこのHGFAと考えられている。

このHGFAも不活性型のpro-HGFAとして、主として肝臓で合成され、血中に分泌された後、thrombinなどによりプロセッシングを受けると活性型のHGFAとなる³⁴⁾。すなわち、HGFは血液凝固系のセリンプロテアーゼカスケード反応を介して活性化されるのであるが、さらに興味深いことに、pro-HGFAはヘパリンに対して親和性が低く、反対に活性化型HGFAはヘパリンに対して親和性が高い。前項で記したように、pro-HGFはヘパリンに対する親和性が高いため、細胞外基質と結合していると考えられていることから、HGFAはthrombinなどにより活性化された局所で細胞外基質と結合し、その部位のpro-HGFを活性化して、近傍のc-Metを発現している上皮系或いは内皮系の細胞に対してパラクリンの作用し、組織の再生、修復

表2 種々のヒト体液中のHGF濃度 (Ohnishi and Daikuhara²⁷⁾ を1部改変)

体 液	疾 患	HGF濃度 (pg/ml)	文 献
血清	健常	200 ± 170	(41)
	劇症肝炎	12,140 ± 14,420	(40, 41)
	急性肝炎	550 ± 1,040	(41)
	肝がん	480 ± 300	(41)
	急性膵炎	2,300 ± 610	(47)
脳脊髄液	対照疾患* ¹	30.7 ± 9.8	(48, 49)
	アルツハイマー病	81.2 ± 32.7	(48, 49)
涙	健常	186 - 290* ²	(50)
	術後	453 - 619* ²	(50)
歯肉溝滲出液	健常歯肉	1,700 ± 730	(44)
	歯周疾患	3,230 ± 1,010	(44)
尿		(pg/mg creatinine)	
	健常	9 ± 2	(51)
	健常	19.3 ± 7.1* ³	(43)
	膀胱がん	139 ± 45	(51)

数値は、*2を除き平均 ± SD。

*1 神経障害および筋障害疾患。

*2 下限および上限値。

*3 高感度HGF ELISAで測定。

に關与していると考えられる (図5)。

5. HGFの生理的意義 (特に歯科医学分野)

HGFと同一タンパクと同定されたSFは、前述したように、胚の形成過程に關与する因子として研究されていたものである。Sonnenbergら³⁵⁾は、マウス発生期の種々の臓器で、HGFが間葉系組織で発現し、c-Metはその近傍の上皮組織で発現していることを明らかにして、HGFが上皮-間葉相互作用のmediatorであることを初めて示唆した。その後HGF欠損マウスが作られたが、このいわゆるHGFノックアウトマウスは胎生13~16日目にすべて死に至る^{36, 37)}。この事実は、HGFが種々の臓器の発生に不可欠の因子であることを示すものである²⁸⁾。

歯の発生においても同様であって、HGFは歯胚の歯乳頭細胞に、c-Metは内エナメル上皮細胞に発現して、正常な歯胚の形成に關与している。Tabataら³⁸⁾は、歯胚の器官培養系を用いて、HGFの発現を抑制すると異常な形態 (いわゆる'inside-out') の歯胚が形成されることを報告している。また、歯胚の形成期ではc-Metが歯乳頭の細胞にも発現しており、HGFがオートクリンのに歯乳頭の發育にも關与していると考えられる³⁹⁾。

体液中のHGF濃度は、種々の生理的或いは病理的な条件、特に組織の炎症時に上昇する (表2)。この内、最も顕著なものは劇症肝炎の時の血中濃度であって、劇症肝炎の診断に応用されているが⁴⁰⁾、この他にも種々の肝疾患の際に血中HGFの上昇が認められている⁴¹⁾。このような炎症或いは組織の再生時でのHGFの上昇は、炎症性サイトカインなどによるHGF産生誘導に由来すると考えられ、生体防御反応の1つとして、傷害を受けた組織の修復、再生に關与していると考えられている。特に、口腔内の粘膜組織は皮膚などに比べて傷の治癒が早く、また瘢痕形成が少ないことは古くから知られている事実であるが、その理由について口腔内の粘膜細胞でのHGF発現が皮膚などの細胞に比べ、より高いことが最近報告されており⁴²⁾、HGFを創傷治癒のための治療薬として応用し得る可能性を示唆している。さらに、種々の体液中HGFレベルの上昇を、疾患の診断に応用することも可能となろう。

上記のように、組織に炎症や傷害が起こるとHGFの産生が誘導されることは、種々の臓器でHGF mRNAレベルの上昇により確認されているが²⁸⁾、その局所での程度HGF濃度が上昇しているか、実際に測定し

た報告はない。我々は、歯周疾患患者の歯肉溝滲出液中に、その炎症の程度に応じて局所で産生されるHGF濃度が反映しているのではないかと考えた。しかし、採取量が10~20 μ lという微量な歯肉溝滲出液のHGF濃度を測定することは、我々が以前に開発し⁴⁰⁾、現在市販されているHGF ELISA (大塚製薬、測定感度: 200 pg/ml) では不可能である。そこで我々は、先ず高感度HGF ELISA (測定感度 2 pg/ml) を開発し⁴³⁾、これを用いて歯肉溝滲出液中のHGF濃度を測定したところ、健常歯肉では1.7 ng/ml、また歯周疾患歯肉では3.2 ng/mlであった⁴⁴⁾ (表2)。この濃度は、in vitroの系で歯肉上皮細胞の増殖を促進するに十分なものである³⁰⁾。またこの結果は、健常者血清中のHGF濃度が0.2 ng/ml (表2) であることを考え合わせると、歯肉では実際にHGFが産生され、さらにその炎症ではその産生が他の組織と同様に、種々のサイトカイン²⁹⁾ やPGE₂⁴⁵⁾ あるいは口腔内細菌の菌体成分^{30, 31)} などで誘導されていることを示している。ただ、歯周疾患では、上皮の増殖が疾患をかえって増悪させることも考えられるため、このHGFの産生誘導が生体防御反応なのか、或いはその反対なのかは議論の分かれるところであろう。しかし、HGFは強い血管新生作用も有することから、我々はHGFが歯周疾患の修復に働いていると考えている。また我々は、歯肉上皮組織ではHGFAも産生されていることも明らかにした⁴⁴⁾。

6. HGFの臨床応用

我々がヒトのHGFを発見して約20年が経過した。この間、肝疾患、腎疾患、血管病変などの実験動物疾患モデルにHGFを投与、あるいはHGF遺伝子を導入すると、症状の改善、死亡率の低下など、投与の有効性が数多く報告されている⁴⁶⁾。しかし、その実用応用はまだ緒についたばかりである。このうち、大阪大学の森下竜一助教授が、メドジーンバイオサイエンスとの協力により、HGF遺伝子をヒト閉塞性動脈硬化症などに導入する試みで成果を挙げておられ、近い内に実用化が期待されている。また、遺伝子組換え体HGFは、すでに1995年からSigmaなどから試薬として市販されており、これを用いてこれまで多くのHGF研究がなされたが、海外 (特にヨーロッパ) では、組換え体HGFを用いた人工肝臓の開発も進んでいる。さらに、2002年4月からは、京都大学医学部附属病院探索医療流動プロジェクトの1つとして、組換え体HGFを劇症肝炎などの肝疾患治療に用いる試み (研究代表者: 坪内博仁 宮崎医科大学第二内科教授) も発足し

た。これらの研究により、HGFの臨床応用が1日も早く実現することを期待すると共に、歯科分野での臨床応用にも道が開かれることを願っている。

謝 辞

我々のHGF研究の一部は、文部省（文部科学省）及び日本学術振興会の科学研究費補助金（一般研究、基盤研究、がん特別研究、特定領域研究など）、及びいくつかの民間企業からの奨学寄付金により遂行された。

文 献

- 1) Higgins, G. M. & Anderson, R. M.: Experimental pathology of the liver: I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.*, 12, 186-202, 1931
- 2) Moolten, C. D. G. & Bucher, N. L. R.: Regulation of the rat liver. Transfer of humoral agent by cross circulation. *Science*, 158, 272-274, 1967
- 3) Berry, M. N. & Friend, D. S.: High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *J. Cell Biol.*, 43, 506-520, 1969
- 4) Seglen, P. O.: Preparation of isolated rat liver cells. *Meth. Cell Biol.*, 13, 29-83, 1975
- 5) McGowan, J. A.: Hepatocyte proliferation in culture., In: *Isolated and Cultured Hepatocytes*, A. Guillouzo & C. Guguen-Guillouzo, Ed., 13-38, John Libbey Eurotext, Montrouge, 1986
- 6) Michalopoulos, G., Cianciulli, H. D., Novotny, A. R., Kligerman, A. D., Strom, S. C. & Jirtle, R. L.: Liver regeneration studies with rat hepatocytes in primary culture. *Cancer Res.*, 42, 4673-4682, 1982
- 7) Michalopoulos, G., Houck, K. A., Dolan, M. L., & Luetkeke, C.: Control of hepatocyte replication by two serum factors. *Cancer Res.*, 44, 4414-4419, 1984
- 8) 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
- 9) Strain, A. J., McGowan, J. A. & Bucher, N. L.: Stimulation of DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes by rat platelet-associated substance(s). *In Vitro*, 18, 108-116, 1982
- 10) Russel, W. E., McGowan, J. A. & Bucher, N. C. R.: Partial characterization of a hepatocyte growth factor from rat platelets. *J. Cell. Physiol.* 119, 183-192, 1984
- 11) 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
- 12) 合田栄一, 中山宏幸, 弘野修一, 坪内博仁, 崎山修, 橋本修治, 大工原恭: 劇症肝炎患者血漿からの肝細胞増殖因子の精製. *生化学*, 58: 906, 1986
- 13) Nakamura, T., Teramoto, H. & Ichihara, A.: Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 6489-6493, 1986
- 14) 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
- 15) Tsubouchi, H., Gohda, E., Strain, A. J. & Daikuhara, Y.: The role of HGF-SF in animal and human hepatic physiology and pathology., In *Hepatocyte Growth Factor-Scatter Factor and the c-MET Receptor*, I. D. Goldberg, & E. Rosen, Ed., 251-273, Birkhauser Verlag, Basel, 1993
- 16) 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
- 17) Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugimura, A., Tashiro, K., & Shimizu, S.: Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature*, 342, 440-443, 1989
- 18) Seki, T., Ihara, I., Sugimura, A., Shimonishi, M., Nishizawa, T., Asami, O., Hagiya, M., Nakamura, T. & Shimizu, S.: Isolation and expression of cDNA for different forms of hepatocyte growth factor from

- human leukocyte. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172, 321-327, 1990
- 19) Weidner, K. M., Arakaki, N., Hartmann, G., Vandekerckhove, J., Weingart, S., Rieder, H., Fonatsch, C., Tsubouchi, H., Hishida, T., Daikuhara, Y. & Birchmeier, W.: Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 7001-7005, 1991
 - 20) Rubin, J. S., Chan, A. M.-L., Bottaro, D. P., Burgess, W. H., Taylor, W. G., Chech, A. C., Hirschfield, D. W., Wong, J., Miki, T., Finch, P. W. & Aaronson, S. A.: A broad-spectrum human lung fibroblast-derived mitogen is a variant of hepatocyte growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 415-419, 1991
 - 21) Shima, N., Nagao, M., Ogaki, F., Tsuda, E., Murakami, A. & 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
 - 22) Aoyama, H., Naka, D., Yoshiyama Y., Ishii, T. & Kondo, J.: Isolation and conformational analysis of fragment peptide corresponding to the heparin-binding site of hepatocyte growth factor. *Biochemistry*, 36, 10286-10291, 1997
 - 23) Yoshiyama, Y., Arakaki, N., Naka, D., Takahashi, K., Hirono, S., Kondo, J., Nakayama, H., Gohda, E., Kitamura, N., Tsubouchi, H., Ishii, T., Hishida, T. & Daikuhara, Y.: Identification of the N-terminal residue of the heavy chain of both native and recombinant human hepatocyte growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 175, 660-667, 1991
 - 24) Gherardi, E., & Stoker, M.: Hepatocyte growth factor and scatter factor. *Nature*, 346, 228, 1990
 - 25) Naldini, L., Weidner, M., Vigna, E., Gaudino, G., Bardelli, A., Ponzetto, C., Narsimhan, R., Hartmann, G., Zarnegar, R., Michalopoulos, G., Birchmeier, W. & Comoglio, P. M.: Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the Met receptor. *EMBO J.*, 10, 2867-2878, 1991
 - 26) Bottaro, D. P., Rubin, J. S., Falletto, D. L., Chen, A. M.-L., Kmiecik, T. E., Vande Woude, G. F. & Aaronson, S. A.: Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science*, 251, 802-804, 1991
 - 27) Schaeper, U., Gehring, N., Fuchs, K., Sachs, M., Kempkes, B., & Birchmeier, W.: Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. *J. Cell Biol.* 149, 1419-1432, 2000
 - 28) Ohnishi, T. & Daikuhara, Y.: Hepatocyte growth factor/scatter factor in development, inflammation and carcinogenesis: Its expression and role in oral tissue. *Arch. Oral Biol.*, 48, 2003 (in press)
 - 29) M. Tamura, N. Arakaki, H. Tsubouchi, H. Takada and Y. Daikuhara. 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).
 - 30) A. Sugiyama, R. Arakaki, T. Ohnishi, N. Arakaki, Y. Daikuhara and H. Takada. Lipoteichoic acid and interleukin 1 stimulate synergistically production of hepatocyte growth factor (scatter factor) in human gingival fibroblasts in culture. *Infect. Immun.*, 64, 1426-1431 (1996).
 - 31) A. Sugiyama, T. Ogawa, Y. Daikuhara, and H. Takada. Enhancement of hepatocyte growth factor (scatter factor) production by human gingival fibroblasts in culture stimulates with *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *J. Med. Microbiol.*, 49, 319-325 (2000).
 - 32) Naldini, L., Tamagnone, L., Vigna, E., Sachs, M., Hartmann, G., Birchmeier, W., Daikuhara, Y., Tsubouchi, H., Blasi, F. & Comoglio, P. M.: Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J.*, 11, 4825-4833, 1992
 - 33) Miyazawa, K., Shimomura, T., Kitamura, A., Kondo, J., Morimoto, Y. & Kitamura, Y.: 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
 - 34) Shimomura, T., Kondo, J., Ochiai, M., Naka, D., Miyazawa, K., Morimoto, Y. & Kitamura N.: Activation of the zymogen of hepatocyte growth factor activator by thrombin. *J. Biol. Chem.*, 268, 22927-22932, 1993

- 35) Sonnenberg, E., Meyer, D., Weidner, K. M. & Birchmeier, C.: Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J. Cell Biol.*, 123, 223-235, 1993
- 36) 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
- 37) 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
- 38) Tabata, M. J., Kim, K., Liu, J.-G., Yamashita, K., Matsumura, T., Kato, J., Iwamoto, M., Wakisaka, S., Matsumoto, K., Nakamura, T., Kumegawa, M. & Kurisu, K.: Hepatocyte growth factor is involved in the morphogenesis of tooth germ in murine molars. *Development*, 122, 1243-1251, 1996
- 39) Kajihara, T., Ohnishi, T., Arakaki, N., Semba, I. & Daikuhara, Y.: Expression of hepatocyte growth factor/scatter factor and c-met in human dental papilla and fibroblasts from dental papilla. *Arch. Oral Biol.*, 44, 135-147, 1999
- 40) 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*, 13, 1-5, 1991
- 41) 武藤泰敏 ほか23名：肝疾患患者における血清ヒト肝細胞増殖因子 (hHGF) レベル測定の臨床的意義—全国19施設による検討—。 *肝胆臓*, 25: 541-549, 1992
- 42) Okazaki, M., Yoshimura, K., Uchida, G. & Harii, K.: Elevated expression of hepatocyte and keratinocyte growth factor in cultured buccal-mucosa-derived fibroblasts compared with normal-skin-derived fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.*, 30, 108-115, 2002
- 43) Ohnishi, T., Kakimoto, K., Hashida, S., Fujii, M., Hirono, S., Nishiyama, K., Amita, Y., Ishikawa, E., Tsubouchi, H. & Daikuhara, Y.: Development of highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assays for hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF): determination of HGF/SF in serum and urine from normal human subjects. *J. Immunol. Meth.*, 244, 163-173, 2000
- 44) Kakimoto, K., Machigashira, M., Ohnishi, T., Kajihara, T., Semba, I., Setoguchi, T., Tamura, M., Izumi, Y. & Daikuhara, Y.: Hepatocyte growth factor (HGF) levels in gingival crevicular fluid and distribution of HGF-activator in gingival tissue from adult periodontitis. *Arch. Oral Biol.*, 47, 655-663, 2002
- 45) Ohnishi, T., Suwa, M., Oyama, T., Arakaki, N., Torii M., & Daikuhara, Y.: Prostaglandin E₂ predominantly induces production of hepatocyte growth factor/scatter factor in human dental pulp in acute inflammation. *J. Dent. Res.*, 79, 748-755, 2000
- 46) 田村正人, 大工原恭: HGF (肝細胞増殖因子), 蛋核酵, 45 (増刊号, 最先端創薬), 1152-1157, 2000
- 47) Ueda, T., Takeyama, Y., Toyokawa, A., Kishida, S., Yamamoto, M. & Saitoh, Y.: Significant elevation of serum human hepatocyte growth factor levels in patients with acute pancreatitis. *Pancreas*, 12, 76-83, 1996
- 48) Tsuboi, Y., Kakimoto, K., Akaku, H., Daikuhara, Y. & Yamada, T.: Hepatocyte growth factor in cerebrospinal fluid in neurologic disease. *Acta Neurol. Scand.*, 106, 79-103, 2000
- 49) Tsuboi, Y., Kakimoto, K., Nakajima, M., Akatsu, H., Yamamoto, T., Ogawa, K., Ohnishi, T., Daikuhara, Y. & Yamada, T.: Increased hepatocyte growth factor level in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.*, 107, 81-86, 2003
- 50) Li, Q., Weng, J., Mohan, R. R., Bennett, G. L., Schwall, R., Wang, Z.-F., Tabor, K., Kim, J., Hargrave, S., Cuevas, K. H. & Wilson, S. E.: Hepatocyte growth factor and hepatocyte growth factor receptor in the lacrimal gland, tears, and cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 37, 727-739, 1996
- 51) Rosen, E. M., Joseph, A., Jin, L., Yao, Y., Chau, M. T., Fuchs, A., Gomella, L., Hastings, H., Goldberg, I. D., & Weiss, G. H.: Urinary and tissue levels of scatter factor in transitional cell carcinoma of bladder. *J. Urol.*, 157, 72-78, 1997