強皮症線維芽細胞における HGF, c-Met の発現

川口鎮司・高木香恵・太田修二・田中みち・田中栄一・
寺嶋久恵・針谷正祥・原まさ子・鎌谷直之*

Elevated levels of serum hepatocyte growth factor (HGF) in systemic sclerosis : HGF production of systemic sclerosis fibroblasts

Systemic sclerosis (SSc) is a connective tissue disease of unknown etiology. Since the most important clinical feature is thought to be the fibrosis of systemic organs, a lot of studies concerning tissue fibrosis were performed *in vivo* and *in vitro*. Several cytokines and growth factors were reported to be increased in SSc patients' sera and to be excessively expressed in various tissues, suggesting that they might play crucial roles in the immunopathogenesis of SSc.

Hepatocyte growth factor (HGF) was first described as a potent mitogen for adult rat hepatocytes in primary culture. Recent studies revealed that HGF targets a wide variety of epithelial cells including fibroblasts and that it has multiple biological properties in regulating cell proliferation, migration, morphogenesis, development and regeneration. Increased levels of serum HGF were observed in several fibrotic disorders including fulminant hepatitis, and HGF may be one of the promising candidates for serum marker of the tissue fibrosis.

In this study, we examined whether the level of serum HGF increased in SSc patients compared to that in normal controls and estimated the relationship between the level of serum HGF and the extent of the fibrosis in SSc.

Rec. 7/6/1999, Acc. 8/9/1999, pp 253~258

*Yasushi Kawaguchi・Kae Takagi・Shuji Ohta・
Michi Tanaka・Eiichi Tanaka・Hisae Terajima・
Masayoshi Harigai・Masako Hara・Naoyuki Kamatani**

*key words : hepatocyte growth factor, fibroblasts,
systemic sclerosis, fibrosis, transforming growth factor- β*

強皮症は、原因不明の全身性結合組織疾患として知られている。臨床症状としては、皮膚をはじめとする多臓器の線維化が特徴的である¹⁾。しかし、その線維化の発症の機序は、いままでのところ明らかにされていない。病変局所では、細胞外マトリックス、特に、コラーゲンの過剰な蓄積がみられるため、マトリックス産生細胞である線維芽細胞を用いた研究が盛んに行われてきた。

強皮症患者由来の皮膚線維芽細胞では、正常線

維芽細胞とは異なり、*in vivo* または *in vitro* にて、恒常的な細胞外マトリックスの産生亢進が報告されている^{2,3)}。近年、特定のサイトカイン・成長因子が、この細胞外マトリックス産生亢進に関与している可能性が論じられている^{4~8)}。

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF) は、当初、培養肝細胞の増殖因子として精製された⁹⁾。肝細胞以外にも、その作用の多様性が種々報告され、線維芽細胞を含む上皮系細胞を中心に広範な標的細胞に対して増殖促進、運動能亢進、形態形成促進の作用を示すことがわかった¹⁰⁾。その後、HGF の受容体は、ヒト骨肉腫由来細胞株から発見された c-Met であることが見いだされた¹¹⁾。c-Met は、上皮系の細胞を中心に、内皮細胞

* Institute of Rheumatology, Tokyo Women's Medical University 東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター
Offprint requests to : Yasushi Kawaguchi, Institute of Rheumatology, Tokyo Women's Medical University, 10-22 Kawadacho, Shinjuku-ku, Tokyo, 162-0054 Japan

図1 Levels of serum HGF by SSc patients and normal controls (NC)

HGF was measured by an ELISA kit. Results are expressed as means $\pm$ SD. Mann-Whitney rank sum test was used for the comparison of two groups.

Topo I : anti-topoisomerase I antibody, NS : not significant

胞やメラノサイトにも発現しており、膜貫通構造をもつレセプター型チロシンキナーゼ活性を有することがわかった。これらの HGF および c-Met の発現分布、機能より、同分子の強皮症病態形成への関与が考えられる。

筆者らは、今回、強皮症患者血清中の HGF 濃度を測定し正常人と比較した。強皮症由来培養線維芽細胞を用い、HGF の産生を正常線維芽細胞と比較検討した。さらに、HGF 受容体である c-Met の線維芽細胞における発現を検討した。

対象と方法

(1) 血清中 HGF 濃度測定

東京女子医科大学附属青山病院にて入院精査治療を行った強皮症患者 33 名の入院初診時の保存血清を用いた。患者の平均年齢は、48.5 歳で、男性 1 名、女性 32 名であった。強皮症の分類は、LeRoy らの文献¹²⁾に従って行われた。抗トポイソメラーゼ I 抗体の測定には、二重免疫沈降法を用いた。200 名の正常人血清をコントロールとした。HGF の測定には、ELISA キット (大塚製薬) を用いた¹³⁾。この ELISA キットにて測定した正常人の血清 HGF 値は、年齢、男女間にて有意差は認められなかった¹⁴⁾。

(2) 細胞培養

強皮症患者 6 名 (全例女性、平均年齢：42.3 歳、diffuse cutaneous type)、および正常人 3 名 (全例女性、平均年齢：47.0 歳) より皮膚生検を行い、線維芽細胞を培養した。継代培養には、10% 牛胎児血清 (FBS) を含む DMEM を用いた。本研究では、3 から 5 継代の細胞を用いた。

(3) 線維芽細胞上清中 HGF 濃度測定

線維芽細胞を 24 穴 culture plate にて培養し、confluent となったところで、PBS にて洗浄した。無血清培地 (QBSF-51, Sigma 社) に交換し、種々の濃度の TGF- β を添加し、その後 72 時間、培養を続けた。培養終了後、上清を回収して -20°C に保存した。HGF 測定には、ELISA キットを用いた。

(4) 免疫組織染色法による c-Met 発現の検討

線維芽細胞を chamber slide にて培養し、80% confluent となったところで、PBS にて洗浄、2% paraformaldehyde を用いて固定した。ヤギ血清にてブロッキングを行い、10 $\mu\text{g/ml}$ の一次抗体 (ポリクローナル抗 c-Met 抗体, Santa Cruz 社) を 1 時間反応させた。その後、PBS にて 3 回洗浄し、ABC キット (Vector 社) を用いて DAB 染色を行った。

図2 Spontaneous HGF production by cultured SSc and normal fibroblasts

Fibroblasts were obtained from 6 patients with systemic sclerosis(SSc)and 3 normal controls (NC). Cells were cultured in 24-well culture plates with serum-free medium. After incubation for an indicated time, the supernatants were collected and measured by an ELISA kit. Results are expressed as means±SD.

* : p<0.05 compared with normal controls

図3 Effect of TGF-β on HGF production by cultured fibroblasts

Fibroblasts were cultured in 24-well culture plates with serum-free medium containing various concentrations of TGF-β for 48 hours. Results are expressed as means±SD.

Open symbols : fibroblasts from 2 patients with SSc

Closed symbols : fibroblasts from 2 normal controls

表1 HGF production in SSc and normal fibroblasts

	HGF production (pg/10 ⁵ cells)	
	no stimuli	TGF-β (1 ng/ml)
SSc fibroblasts (N=6)	306±65	156±30*
Normal fibroblasts (N=3)	198±20	137±8*

Fibroblasts were cultured with or without TGF-β (1 ng/ml) for 48 h.

* : p<0.01 compared to no stimuli

結果

(1) 強皮症患者血清中の HGF 濃度

強皮症患者血清では、正常人血清に比し、有意に HGF 濃度は上昇していた(図1)。特に、広範な皮膚硬化が認められる diffuse cutaneous type では、limited cutaneous type に比べて有意に HGF 産生が高値を示していた。Diffuse cutaneous type のうち、抗トポイソメラーゼ I 抗体の発現の有無にて、HGF 濃度に違いがあるかどうかを検討したが、有意差を認めなかった。

(2) 線維芽細胞による HGF 産生と TGF-β の影響

強皮症線維芽細胞では、無刺激下の、48、72 時間培養にて、正常線維芽細胞に比し有意に HGF の産生が亢進していた(図2)。TGF-β は、線維芽細胞に対し、コラーゲン産生を増加させる成長因子であり、強皮症の病態との関連が報告されている。そこで、TGF-β の HGF 産生に及ぼす影響を検討した。線維芽細胞を 24 穴の culture plate にて培養し、種々の濃度の TGF-β を添加して、48 時間後の上清を回収し、HGF 産生量を定量した。

強皮症 2 例、正常人 2 例の代表的結果を図3に示した。強皮症および正常線維芽細胞ともに、TGF-β 添加により、HGF 産生量は濃度依存的に減少した。

強皮症 6 例、正常人 3 例にて同様の検討を行い、TGF-β (1 ng/ml) の HGF 産生抑制効果は、有意であることが示された(表1)。

(3) 線維芽細胞上の HGF 受容体の発現

HGF の受容体である c-Met の発現を強皮症お

図 4 Immunocytochemical staining of c-Met protein by cultured fibroblasts

Fibroblasts cultured in a chamber slide were fixed by 2% paraformaldehyde. Cells were incubated with polyclonal anti-c-Met antibody for a hour and were washed with PBS. A biotinylated anti-rabbit IgG antibody was used as the second antibody included in the ABC staining kit. The staining was developed with DAB peroxidase substrate for 10 min.

A : SSc fibroblasts, B : Normal control fibroblasts

よび正常線維芽細胞にて検討した。代表的な染色結果を図 4 (倍率：100×) に示した。強皮症線維芽細胞では、c-Met の強い発現を認めたが、正常線維芽細胞では認められなかった。6 例の強皮症患者由来線維芽細胞では、全例 c-Met 陽性であったのに対し、3 例の正常人線維芽細胞では、陰性であった。

考 察

強皮症では、正常人と比較して、血清 HGF 濃度の有意な亢進が認められた。HGF は、肝細胞にて産生されることが知られており、急性肝炎、特に劇症肝炎の患者血清中にて異常高値を示す^{15,16)}。HGF 値が高いほど肝炎の予後は悪いとされている。

強皮症においても、皮膚硬化が広範囲であり、内臓病変の合併頻度の高い、diffuse cutaneous type において、limited cutaneous type に比し、血清 HGF 濃度は高値を示していた。特に、HGF 400 pg/ml 以上を示した 5 例の強皮症患者では、肺線維症、心筋病変、腎病変のいずれかの内臓病変を重複して合併していた。これらのことより、重症例の強皮症にて血清 HGF は、より高値を示す可能性があり、HGF は、強皮症の重症度を反映する指標となりうることが示唆された。

血清 HGF は、肝細胞からの放出が主であると

考えられていたが、強皮症では、肝障害を引き起こすことはまれである。筆者らは、強皮症では肝細胞以外に、病変局所の線維芽細胞が HGF を産生すると考えた。この仮説を証明するため、強皮症の皮膚硬化部位から得た線維芽細胞を培養し、その HGF 産生量を検討した。本研究にて筆者らは、強皮症線維芽細胞は、正常と比し、HGF 産生が亢進していることを明らかにした。このことは、病変局所の線維芽細胞の異常が、強皮症の血清 HGF 濃度亢進の原因の一つである可能性を示唆している。

TGF- β は、線維芽細胞に作用し、コラーゲンを過剰に産生させることができる成長因子であり、強皮症の病態との関与が推定されている^{4,5)}。そこで、TGF- β の HGF 産生に及ぼす影響を検討した。TGF- β は、強皮症および正常線維芽細胞に対し、HGF の産生を有意に抑制した。Matsumoto ら¹⁷⁾は、ヒト胎児肺線維芽細胞を用い、TGF- β 1 が HGF 産生を mRNA レベルで抑制することを報告している。これらのことより、TGF- β は、HGF 産生に対し抑制的に作用することが明らかである。培養強皮症線維芽細胞において HGF が過剰に産生されていることより、強皮症患者の培養線維芽細胞の異常に TGF- β は関与していない可能性が示唆された。

強皮症線維芽細胞にて HGF の発現過剰がみら

れたが、線維芽細胞にて HGF による autocrine 作用が生じるためには、HGF の受容体である c-Met の細胞膜上での発現が必要である。そこで、c-Met が、強皮症線維芽細胞にて発現しているかどうかを検討した。非常に興味深いことに c-Met は、強皮症線維芽細胞でのみ発現が認められ、正常では、構成的な蛋白レベルでの発現はみられなかった。現在までの報告では、c-Met の mRNA は、正常の多くの組織にて構成的な発現がみられており¹⁸⁾、正常線維芽細胞においても c-Met mRNA の発現は認められる可能性はあると考えられた。一方、強皮症においては、HGF および HGF 受容体ともに強く発現しており、HGF の autocrine 作用が強皮症線維芽細胞の異常増殖に関与している可能性を示唆した。

HGF のトランスジェニックマウスを用いた実験では、HGF を強制発現させておくと肝炎の発症が抑制でき、肝線維化への進展を抑止できたと報告されている¹⁹⁾。つまり、HGF には、抗線維化作用があると考えられている。

以上の事実より、強皮症線維芽細胞にて増加している HGF、c-Met の発現は、生体の防御作用として考えることができる。しかし、HGF 高値の劇症肝炎例の致死率は非常に高いと報告されており^{15,16)}、また、本研究においても、強皮症重症例にて、血清 HGF の高値を認めた。このことより、生体内において、HGF の生理学的作用により、線維化を抑制できると考えるのは困難であると推察される。

今後、線維芽細胞に対し、コラーゲンの産生に及ぼす HGF の影響を検討し、コラーゲン産生抑制作用があるかどうかを検討する。

HGF は、IL-1 α , β の刺激により肝細胞、線維芽細胞より産生される²⁰⁾。筆者らは、強皮症線維芽細胞において、IL-1 α の産生が亢進していることを報告している²¹⁾。この IL-1 α の作用により、IL-6, PDGF-A の発現が亢進していることが明らかとなった⁷⁾。本研究にて示された線維芽細胞での HGF 産生亢進は、IL-1 α の作用による可能性を考えている。

今回の研究において、血清 HGF は強皮症の線

維化の一つの指標となりうることを示唆された。強皮症における HGF、c-Met の発現は、線維芽細胞にて亢進しており、線維芽細胞の HGF 産生過剰が、血清 HGF の増加に貢献していると考えられた。

文 献

- 1) Medsger TA Jr : Systemic sclerosis (scleroderma), localized forms of scleroderma, and calcinosis. (eds. McCarty DJ, Koopman WJ), Arthritis and allied conditions. Lea & Febiger, Philadelphia, 1993, p 1253-1292.
- 2) LeRoy EC : Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro. A possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblasts. J Clin Invest 54 : 880-889, 1974.
- 3) Rodnan GP, Lipinski E, Luksick J : Skin thickness and collagen content in progressive systemic sclerosis and localized scleroderma. Arthritis Rheum 22 : 130-140, 1979.
- 4) Gruschwitz M, Muller PU, Sepp N, Hofer E, Fontana A, Wick G : Transcription and expression of transforming growth factor type beta in the skin of progressive systemic sclerosis : A mediator of fibrosis? J Invest Dermatol 94 : 197-203, 1990.
- 5) Peltonen J, Kahari L, Jaakkola S, Kahari V-M, Varga J, Uitto J et al. : Evaluation of transforming growth factor beta and type I procollagen gene expression in fibrotic skin diseases by in situ hybridization. J Invest Dermatol 94 : 365-371, 1990.
- 6) Feghali CA, Bost KL, Boulware DW, Levy LS : Mechanisms of pathogenesis in scleroderma. I. Overexpression of interleukin-6 by fibroblasts cultured from affected skin sites of patients with scleroderma. J Rheumatol 19 : 1207-1211, 1992.
- 7) Kawaguchi Y, Hara M, Wright TM : Endogenous IL-1 α from systemic sclerosis fibroblasts induces IL-6 and PDGF-A. J Clin Invest 103 : 1253-1260, 1999.
- 8) Kadono T, Kikuchi K, Ihn H, Takehara K, Tamaki K : Increased production of interleukin 6 and interleukin 8 in scleroderma fibroblasts. J Rheumatol 25 : 296-301, 1998.
- 9) Nakamura T, Teramoto H, 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 : 6389-6393, 1986.
- 10) Vande Woude GF : Hepatocyte growth factor : Mitogen, motogen, and morphogen. Jpn J Cancer Res 83 : 227-232, 1992.
- 11) Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM-L, Kmiecik TE, van de Woude GF et al. : Identification of the hepatocyte growth factor as the c-met proto-oncogene product. Science 251 : 802-804, 1991.

- 12) LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA Jr et al. : Scleroderma (systemic sclerosis) : Classification subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 15 : 202-205, 1988.
- 13) Tsubouchi H, Niitani Y, Hirono S, Nakayama H, Gohda E, Arakaki N 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.
- 14) 武藤泰敏, 河合 忠, 佐藤俊一, 大久保昭行, 有馬軍勝, 大工原恭・他 : 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. *肝胆膵* 25 : 541-549, 1992.
- 15) Tsubouchi H, Kawakami S, Hirono S, Miyazaki H, Kimoto M, Arima T et al. : Prediction of outcome in fulminant hepatitis failure by serum human hepatocyte growth factor. *Lancet* 340 : 307, 1992.
- 16) Tsubouchi H, Hirono S, Gohda E, Nakayama H, Takahashi K, Sakiyama O et al. : Clinical significance of human hepatocyte growth factor in blood from patients with fulminant hepatic failure. *Hepatology* 9 : 875-881, 1989.
- 17) Matsumoto K, Tajima H, Okazaki H, Nakamura T : Negative regulation of hepatocyte growth factor gene expression in human lung fibroblasts and leukemic cells by transforming growth factor-beta 1 and glucocorticoids. *J Biol Chem* 15 : 24917-24920, 1992.
- 18) Moghul A, Lin L, Beedle A, Kanbour-Shakir A, DeFrances MC, Liu Y, Zarnegar R : Modulation of c-MET proto-oncogene (HGF receptor) mRNA abundance by cytokines and hormones : Evidence for rapid decay of the 8 kb c-Met transcript. *Oncogene* 9 : 2045-2052, 1994.
- 19) Okano J, Shiota G, Kawasaki H : Protective action of hepatocyte growth factor for acute liver injury caused by D-galactosamine in transgenic mice. *Hepatology* 26 : 1241-1249, 1997.
- 20) Simizu M, Takakuwa Y, Nitta S : Study of stimulation-secretion coupling in a flow culture system : periodic secretion of hepatocyte growth factor by interleukin-1 alpha-stimulated human embryonic lung fibroblasts. *Biochem Biophys Acta* 1244 : 357-362, 1995.
- 21) Kawaguchi Y : IL-1 alpha gene expression and protein production by fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 97 : 445-450, 1994.