

総説

動脈硬化と HGF

本田 謙次郎・野入 英世

東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科

Atherosclerosis and Hepatocyte Growth Factor

Kenjiro Honda and Eisei Noiri

Department of Nephrology and Endocrinology, The University of Tokyo

Summary Hepatocyte growth factor (HGF) is a mesenchymal-derived pleiotropic factor that regulates cell growth, motility and morphogenesis. Because HGF contributes to angiogenesis and anti-fibrosis, its role has been investigated in atherosclerotic diseases.

In advanced peripheral arterial disease (PAD), HGF gene therapy with intramuscular injection of a plasmid or viral vector has been applied in clinical settings. HGF plays an important role in the other therapeutic options for PAD, maggot debridement therapy and low-density lipoprotein apheresis. Elevated HGF value was observed in the acute phase of myocardial infarction and heart failure, and it was an independent risk factor for overall survival. HGF overexpression or administration improved cardiac function and brain injury by ischemia *in vivo*. The fact that HGF protects pancreas beta cells and that it inhibits damage of blood stem cells from dyslipidemia suggests its effectiveness in metabolic diseases. HGF will be applied as a diagnostic or therapeutic tool in atherosclerosis.

Key words: hepatocyte growth factor, peripheral arterial disease, maggot debridement therapy, cardiovascular disease, low-density lipoprotein apheresis

1. HGF の概要

肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor; HGF) は肝細胞に特異的な増殖因子として 1989 年にヒト DNA のクローニングが報告された^{1,2)}。1991 年には多彩な生物活性が明らかとなり, scatter factor と同一のタンパクであることや³⁾, *c-met* 癌原遺伝子産物が HGF 受容体の一部であることが明らかとなった^{4,5)}。その後 HGF の産生は主に線維芽細胞等の間葉系細胞によりなされることが明らかとなり, 様々な HGF 産生・抑制因子も報告されている。

HGF は分子量約 6 万の α 鎖と約 3.5 万の β 鎖がジスルフィド結合したヘテロダイマーの構造を有する。ヒト HGF は 728 アミノ酸残基より成る 1 本鎖前駆体, いわゆるプロ HGF としてまず合成される。プロ HGF の一次構造は 4 個のクリングルドメインと呼ばれる特徴的な構造を有し, プラスミノゲンなどの血液凝固・線溶系セリンプロテアーゼと類似している。しかし, HGF はセリンプロテアーゼの活性中心を構成するアミノ酸残基の変異があり, プロテアーゼ活性は検出されない。合成・分泌されたプロ HGF は N 末

端シグナルペプチドの除去, 細胞外への分泌を経て 2 本鎖に切断され, 活性型となる⁶⁾。

この HGF の活性化には, HGF アクチベーターや血液凝固第 XII・XI 因子, カリクレイン, ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター, 組織型プラスミノゲンアクチベーター, マトリプターゼ, ヘプシンといった様々なプロテアーゼが関与する。特に *in vitro* においてマトリプターゼとヘプシンは強く HGF を活性化させる。HGF アクチベーターはクリングル構造を持つセリンプロテアーゼであり, 構造上血液凝固第 XII 因子との相同性が見られる。HGF アクチベーターは 1 本鎖前駆体のプロ HGF アクチベーターとして不活性型で合成され血中に存在しているが, 一旦 HGF アクチベーターとして活性化されると内因性の HGF アクチベーターインヒビター HAI-1 または HAI-2 により制御される。さらにヒト血漿中または血清中では, プロテイン C インヒビター (protein C inhibitor; PCI) により制御される⁷⁾。

HGF の受容体は上述の通り c-Met というレセプター型チロシンキナーゼである。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. HGF が c-Met に結合すると, PI3K/Akt, STAT3, c-SRC, Grb2, Gab1 を含む複数の下流のシグナルを介し, 細胞増殖や遊走などの多面的作用を発揮する.

2. 末梢動脈疾患と HGF

血管新生作用・抗線維化作用を有する HGF は下肢末梢動脈疾患の治療として注目されてきた. HGF はウサギの虚血肢において側副血行路形成に関与し⁸⁾, 末梢動脈疾患 (peripheral arterial disease; PAD) 患者の患肢血管では作用が減弱していることが知られている.

2.1 Gene therapy

上述のような背景があり, HGF 遺伝子をプラスミドに組み込み, これを筋肉注射により投与することで下肢末梢動脈疾患の治療を行う gene therapy の試みがなされてきた^{9,10)}. Phase II の HGF-STAT 試験では無作為化された下肢の安静時疼痛または虚血性潰瘍を有する 104 人の PAD 患者がプラスミド投与 1.2, 8, 12 mg の 3 群またはプラセボ群に割り付けされた. プラスミドの高用量投与群において 6 か月後の TcPO₂ の改善が見られたものの, ABI や救肢率, 潰瘍改善率は各群間で差はなかった¹¹⁾. しかし, これに引き続いて行われたより少数例の比較試験 (プラスミド 12 mg 投与群 21 例, プラセボ群 6 例) において筋注部位を血管造影で評価された虚血部位に変更したところ, 安静時疼痛や ABI は治療群で改善が見られた¹²⁾. また, 日本の Phase III 試験では 40 名の患者をプラセボ群とプラスミド 8 mg 投与群に割り付けたが, 12 週後の安静時疼痛や虚血性潰瘍のサイズは治療群で有意な改善が見られた¹³⁾. なお, この研究では明らかな副作用は認めなかった.

2.2 医療用ウジ療法

HGF/c-Met シグナルは創傷治癒において重要な役割を担う. 一方, 医療用ウジ療法 (maggot debridement therapy; MDT) は難治性創傷の治療選択肢の一つであり, 本邦からも下肢難治性潰瘍での有効例が多数報告されるようになってきている. 我々はわずか 48 時間の MDT により, 既存の治療に抵抗性であった下肢難治性潰瘍を有する症例において患肢大腿静脈血中における HGF が有意に増加することを示した. 医療用ウジであるマゴットの分泌液/排泄液 (excretion/secretion; ES) は創傷治癒に寄与することが提

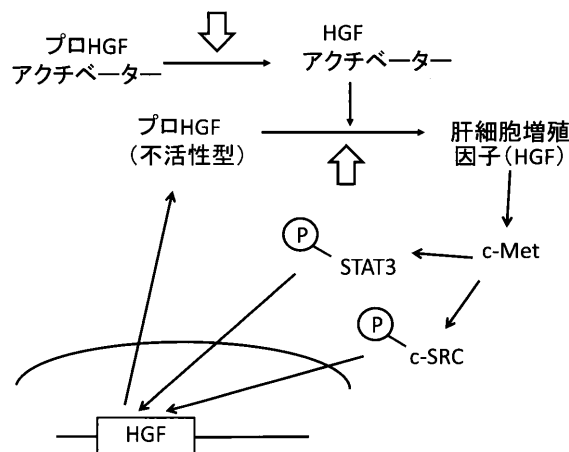


図1 医療用ウジ療法における HGF positive feedback loop
太い矢印は ES の作用が想定される部位を示す.

唱されていたが, ES 中に含まれるセリンプロテアーゼを主体としたプロテアーゼは HGF 産生を促進させる働きを有していた¹⁴⁾. 更に STAT3 や c-SRC のリン酸化を介した positive feedback により HGF 産生が増幅され, 臨床効果を発揮すると考えられる (図1). 同時に HGF 活性化は PI3K を介し Akt をリン酸化させることで, 細胞の周期や生存に関わる細胞内シグナルを形成し血管内皮細胞を遊走させる¹⁵⁾. 本治療法で見られる良好な肉芽増生の機序の一つとして, HGF を介した組織修復の可能性が示唆される.

2.3 LDL 吸着療法による HGF の変化

LDL 吸着療法 (LDL apheresis; LDL-A) は, 本邦では下肢末梢動脈疾患, 家族性高コレステロール血症, 巣状糸球体硬化症に保険適応がある. Kojima らは 3 例の高度の高コレステロール血症患者に LDL-A を施行し, 血中 HGF レベルが治療前 1.59 ± 0.78 ng/mL (mean $\pm$ SE, $n=5$) と比べ 1,000 mL の血漿処理を行った時点で 6.64 ± 0.97 ng/mL と上昇していたことを報告した¹⁶⁾. HGF はデキストラン硫酸カラムで吸着されるにもかかわらず患者の血中 HGF が上昇していた事実はきわめて興味深い. LDL-A の強力な HGF 誘導作用は, この治療法が下肢末梢動脈疾患のみならず全身の動脈硬化性疾患への治療選択肢になりうる可能性を示している.

3. 心血管疾患と HGF

HGF の血管新生能¹⁷⁾や抗線維化作用は心筋細胞においても示されている. 心筋梗塞や心不全の急性期においては血清 HGF が上昇し, ラットモデルにおいては特に虚血再灌流部位に HGF の発現が強い¹⁸⁾. 臨床

的にも HGF は心不全患者の生命予後に関わる独立した危険因子であること¹⁹⁾から、虚血性心疾患や心不全の診断・予後評価に今後使用されていく可能性がある。さらに心筋梗塞のラットに HGF を強発現する脂肪組織を移植すると、7, 14, 28 日目の収縮能を含めた心機能に改善が見られた²⁰⁾ことは治療に応用される可能性も示している。また、マウスの脳梗塞モデルでも HGF 投与は神経前駆細胞の分化を促進させ、虚血による壊死を抑制する²¹⁾ことが近年報告され、その有用性の研究は各臓器・組織に広がっている。

4. 糖尿病と HGF

膝において c-Met をノックアウトさせたマウスは、低用量のストレプトゾシンの複数回投与により容易に高血糖、低インスリン血症、膝β細胞の体積の低下を示す。このマウスモデルでは膝内の細胞浸潤や NO、ケモカイン産生の亢進を認め、膝β細胞のアポトーシスが見られる。*In vitro* では NF-κB 活性化や NO 産生の亢進を介することが明らかになっており、HGF/c-Met シグナルの膝β細胞保護への関与が考えられる²²⁾。

In vitro において、高血糖下では Bax を抑制する bcl-2 には影響せず Bax のみの発現が増加し、かつ Bax がミトコンドリア膜へ移行することが知られている。逆に HGF は Bax の発現には影響せず、bcl-2 の発現を増加させる。この結果、HGF は Bax のミトコンドリア膜への移行を抑制することになり、移行に引き続いて起こるミトコンドリアからのチトクローム c の放出、アポトーシスを抑制する働きを持つ。Bcl-2 は Bag-1 と作用して抗アポトーシス効果を示し、これらの結果は高血糖下での内皮細胞障害を HGF が抑制する可能性を示している²³⁾。

5. 脂質異常症と HGF

高濃度の LDL コレステロールは血液幹細胞の増殖や遊走を抑制し、アポトーシスを誘導する。HGF は PI3K/Akt 経路を介し、血液幹細胞に対するこれらすべての LDL コレステロールの作用を阻害する²⁴⁾。

一方、Lp(a) は心筋梗塞や脳梗塞、下肢末梢動脈疾患の危険因子として近年注目されており、高 Lp(a) 血症下では下肢末梢動脈疾患において側副血行路の形成が抑制される²⁵⁾。Lp(a) を低下させる治療として LDL-A は有効であるが、その適応疾患が限られている。また、スタチン系薬剤では Lp(a) を低下させるこ

とができず、十分に効果のある薬物治療を利用できない現状がある。このような高 Lp(a) 血症下であっても HGF は血管新生を促し、血管内皮前駆細胞の機能を改善させることが報告されている²⁶⁾。

文 献

- 1) Miyazawa K, Tsubouchi H, Naka D, et al: Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* **163**: 967-973, 1989
- 2) Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, et al: Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* **342**: 440-443, 1989
- 3) Weidner KM, Arakaki N, Hartmann G, et al: Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7001-7005, 1991
- 4) Naldini L, Weidner KM, Vigna E, et al: Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the Met receptor. *EMBO J* **10**: 2867-2878, 1991
- 5) Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, et al: Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the *c-met* proto-oncogene product. *Science* **251**: 802-804, 1991
- 6) 合田榮一: 肝細胞増殖因子 (HGF) の機能と産生制御. *日本薬理学雑誌* **119**: 287-294, 2002
- 7) Kataoka H, Kawaguchi M: Hepatocyte growth factor activator (HGFA): Pathophysiological functions *in vivo*. *FEBS J* **277**: 2230-2237, 2010
- 8) Morishita R, Nakamura S, Hayashi S, et al: Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as cytokine supplement therapy. *Hypertension* **33**: 1379-1384, 1999
- 9) Morishita R, Aoki M, Hashiya N, et al: Safety evaluation of clinical gene therapy using hepatocyte growth factor to treat peripheral arterial disease. *Hypertension* **44**: 203-209, 2004
- 10) Morishita R, Makino H, Aoki M, et al: Phase I/IIa clinical trial of therapeutic angiogenesis using hepatocyte growth factor gene transfer to treat critical limb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**: 713-720, 2011
- 11) Powell RJ, Simons M, Mendelsohn FO, et al: Results of a double-blind, placebo-controlled study to assess the safety of intramuscular injection of hepatocyte growth factor plasmid to improve limb perfusion in patients with critical limb ischemia. *Circulation* **118**: 58-65, 2008
- 12) Powell RJ, Goodney P, Mendelsohn FO, et al: Safety and efficacy of patient specific intramuscular injection of HGF plasmid gene therapy on limb perfusion and wound healing in patients with ischemic lower extremity ulceration: Results of the HGF-0205 trial. *J Vasc Surg* **52**: 1525-1530, 2010
- 13) Shigematsu H, Yasuda K, Iwai T, et al: Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of hepatocyte growth factor plasmid for critical limb ischemia. *Gene Ther* **17**: 1152-1161, 2010
- 14) Honda K, Okamoto K, Mochida Y, et al: A novel mechanism in maggot debridement therapy: Protease in excretion/secretion promotes hepatocyte growth factor

- production. *Am J Physiol Cell Physiol* **301**:C1423-1430, 2011
- 15) Sherman RA: Maggot versus conservative debridement therapy for the treatment of pressure ulcers. *Wound Repair Regen* **10**:208-214, 2002
 - 16) Kojima S, Shida M, Tanaka K, et al: Acute changes in plasma levels of hepatocyte growth factor during low-density lipoprotein apheresis. *Ther Apher* **5**:2-6, 2001
 - 17) Aoki M, Morishita R, Taniyama Y, et al: Angiogenesis induced by hepatocyte growth factor in non-infarcted myocardium and infarcted myocardium: Up-regulation of essential transcription factor for angiogenesis, ets. *Gene Ther* **7**:417-427, 2000
 - 18) Ono K, Matsumori A, Shioi T, et al: Enhanced expression of hepatocyte growth factor/c-Met by myocardial ischemia and reperfusion in a rat model. *Circulation* **95**:2552-2558, 1997
 - 19) Rychli K, Richter B, Hohensinner PJ, et al: Hepatocyte growth factor is a strong predictor of mortality in patients with advanced heart failure. *Heart* **97**:1158-1163, 2011
 - 20) Zhu XY, Zhang XZ, Xu L, et al: Transplantation of adipose-derived stem cells overexpressing hHGF into cardiac tissue. *Biochem Biophys Res Commun* **379**:1084-1090, 2009
 - 21) Doeppner TR, Kaltwasser B, ElAli A, et al: Acute hepatocyte growth factor treatment induces long-term neuroprotection and stroke recovery via mechanisms involving neural precursor cell proliferation and differentiation. *J Cereb Blood Flow Metab* **31**:1251-1262, 2011
 - 22) Mellado-Gil J, Rosa TC, Demirci C, et al: Disruption of hepatocyte growth factor/c-Met signaling enhances pancreatic beta-cell death and accelerates the onset of diabetes. *Diabetes* **60**:525-536, 2011
 - 23) Nakagami H, Kaneda Y, Ogihara T, et al: Endothelial dysfunction in hyperglycemia as a trigger of atherosclerosis. *Curr Diabetes Rev* **1**:59-63, 2005
 - 24) Yu X, Song M, Chen J, et al: Hepatocyte growth factor protects endothelial progenitor cell from damage of low-density lipoprotein cholesterol via the PI3K/Akt signaling pathway. *Mol Biol Rep* **37**:2423-2429, 2010
 - 25) Morishita R, Sakaki M, Yamamoto K, et al: Impairment of collateral formation in lipoprotein (a) transgenic mice: Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene. *Circulation* **105**:1491-1496, 2002
 - 26) Iwabayashi M, Taniyama Y, Sanada F, et al: Inhibition of Lp (a)-induced functional impairment of endothelial cells and endothelial progenitor cells by hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* **423**:79-84, 2012
- 利益相反：なし