

平成23年5月10日現在

機関番号：15301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590058
 研究課題名（和文）天然物による肝細胞増殖因子（HGF）の産生誘導と組織再生
 研究課題名（英文）Production of hepatocyte growth factor (HGF) and tissue regeneration induced by natural products
 研究代表者
 合田 栄一（GOHDA EIICHI）
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号：20028814

研究成果の概要（和文）：肝細胞増殖因子（HGF）は肝細胞をはじめ様々な組織の上皮系細胞の増殖を促進し、組織再生に重要な役割を担っていることが知られている。本研究でヒト線維芽細胞における HGF 産生が天然物であるニガウリ胎座抽出物、冬虫夏草抽出物及びポリミキシン B により促進されること、その作用機序並びに活性成分の性状を明らかにした。また、ポリミキシン B 投与によりラット血漿及び肝臓中の HGF レベルが増加した。

研究成果の概要（英文）：Hepatocyte growth factor (HGF) has been shown to stimulate the proliferation of epithelial cells in various tissues including hepatocytes and play critical roles in regenerative events of tissues. Here we found that the extracts of bitter melon placenta and *Cordyceps sinensis* and polymyxin B promoted HGF production in human fibroblasts and described their mechanism and properties of active component(s). Injection of polymyxin B to rats significantly increased both plasma and hepatic HGF levels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：免疫生化学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：肝細胞増殖因子（HGF）、細胞増殖、ニガウリ、冬虫夏草、ポリミキシン B

1. 研究開始当初の背景

HGF は、初代培養肝細胞の増殖を強力に促進する因子として著者らが劇症肝炎患者血漿中より世界に先駆けて単離・精製し、続いて

分子クローニングに成功した増殖因子である (Gohda et al., J. Clin. Invest. 81, 414, 1988; Miyazawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 163, 967, 1989)。

HGF はヘパトトキシンによる障害肝や部分肝切除後の残余肝の再生に重要な役割を果たしていることがほぼ証明されている。すなわち、HGF ノックアウトマウスは胎生期致死のため肝再生実験はできないが、HGF 遺伝子や HGF に対する唯一の受容体である *c-Met* 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスでは、肝障害や部分肝切除後の肝再生が十分に起こらないことが明らかにされている (Phaneuf et al., DNA Cell Biol. 23, 592, 2004; Huh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 4477, 2004)。また、抗 HGF 中和抗体の投与によっても肝再生の抑制が報告されている。当初は肝細胞に特異的な因子と考えられた HGF であるが、遺伝子組換え HGF を用いた研究により、様々な上皮系細胞、血管内皮細胞及び神経細胞などの増殖を促進することがわかり、肝のみならず、腎や肺などの再生・修復、アポトーシス抑制、血管新生にも重要な役割を果たすことが明らかになった。このような生理作用を利用して HGF を組織障害の治療薬として応用しようとする研究が進められ、現在、HGF 遺伝子を用いた閉塞性動脈硬化症に対する臨床試験、HGF タンパク質を用いた劇症肝炎に対する臨床試験が行われている。一方、生体内で HGF 産生を誘導することにより障害組織の再生・修復を促す基礎的研究も行われている。HGF 産生誘導物質としてはこれまでに、PKC 活性化薬、PKA 活性化薬、EGF や bFGF などの増殖因子、IL-1、TNF- α 、IFN- γ 、ノルエピネフリン、スタウロスポリン、オカダ酸などが著者のグループ等から報告されている。しかしながら、これらの物質はそれ自身が多くの生物作用を有しており、*in vivo* における HGF 産生誘導効果を評価するまでには至っていない。著

者らは副作用が低く、安全性が高いと考えられる天然物中に HGF 産生誘導物質を広く探索した結果、ニガウリ抽出物並びに冬虫夏草抽出物が HGF 産生を強く誘導することを見出した。

2. 研究の目的

本研究は天然物であるニガウリ抽出物並びに冬虫夏草抽出物の HGF 産生誘導作用メカニズムを解析するとともに、HGF 産生誘導活性成分を精製し、*in vivo* における HGF 産生誘導作用を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) HGF 産生の測定

ヒト真皮線維芽細胞及び MRC-5 ヒト胎児肺線維芽細胞を 10% ウシ胎児血清添加ダルベッコ変法イーグル培地 (1.7 g/L NaHCO₃、100 U/ml penicillin G 及び 100 μ g/ml streptomycin 含有) 中で 37°C、5% CO₂ 気相下、96 穴平底マイクロウェルプレートにてサブコンフルエントになるまで (約 7 日間) 培養後、培地交換と同時に試薬を添加し、目的時間培養を行った。培養上清中の HGF レベルは坪内らによって開発されたヒト HGF ELISA 法で測定した。

(2) 血漿及び肝臓中 HGF レベルの測定

6 週齢雄性 Wistar 系ラットに polymyxin B sulfate (1 mg/ml) のリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) 溶液または PBS を 2 mg/kg 体重で 1 日 1 回、2 日間連続で尾静脈内投与を行った。2 回目の投与 16 時間後にジエチルエーテルで麻酔下、下行大静脈より 3.44% クエン酸 3Na \cdot 2H₂O (200 μ l) を含むシリンジにより 1.5 ml 採血し、血漿を調製した。採血後、門脈より生理食塩水を灌流し (約 15 分)、肝中の血液を除いた後、肝臓を摘出した。4 倍量の抽出用 buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、

2M NaCl、0.1% polyoxyethylene sorbitan monooleate (Tween 80)、1 mM EDTA・2Na、1 mM PMSF] を加え、ポリトロンホモジナイザーにてホモジナイズ後、遠心上清を肝抽出物とした。血漿中及び肝抽出物中の HGF レベルの測定はラット HGF EIA キット (特殊免疫研究所) を用いて行った。

(3) 細胞増殖の測定

細胞を種々の時間培養後、50 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ [^3H]thymidine を添加し (10 $\mu\text{l}/\text{well}$)、さらに培養を続けた。PBS で洗浄後、トリプシン溶液で剥離した細胞をセルハーベスターでグラスフィルター上に回収した。乾燥後トルエンカクテルを加え、(約 5 ml)、細胞に取り込まれた [^3H]thymidine の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

4. 研究成果

(1) ニガウリ胎座の凍結乾燥粉末を PBS で攪拌・抽出し、遠心後の上清を濾過滅菌し抽出物とした。コンフルエントの培養ヒト真皮線維芽細胞をこの抽出物と共に培養したところ、本抽出物は添加後 96 時間から HGF 産生を濃度依存的に促進し、HGF mRNA 発現も増加させた。しかし、対照として用いた EGF と比べると HGF 産生誘導作用の発現時間が遅かった。また本抽出物は多量の HGF を産生する MRC-5 ヒト胎児肺線維芽細胞からの HGF 産生も促進した。本抽出物中の活性成分の精製をエタノール分画、各種クロマトグラフィーにより試みたが、ゲル濾過クロマトグラフィー以外では精製度の上昇が認められなかった。本抽出物により ERK、p38 MAPK 及び JNK の 3 つの MAPKs のリン酸化が添加後 24~48 時間以降持続的に増加し、一方、本抽出物による HGF 産生誘導は、MEK 阻害剤、p38 MAPK 阻害剤及び JNK 阻害剤により抑制された。また、ニガウリ胎座抽出

物は添加後 72~120 時間で細胞増殖を有意に促進した。EGF は添加後 16 時間で増殖促進作用を発揮したが、ニガウリ胎座抽出物はこの時間では同作用を示さなかった。本抽出物中の HGF 産生誘導活性物質はトリプシン処理で失活せず、また、70%エタノールで沈殿しなかった。ゲル濾過クロマトグラフィーにより測定した活性物質の分子量は約 14000 であり、HGF 産生誘導作用と細胞増殖促進作用のピークの溶出位置はほぼ一致した。以上のようにニガウリ胎座抽出物はヒト真皮線維芽細胞の HGF 産生及び増殖を誘導することが明らかとなり、このことはニガウリの創傷治癒効果に関与する可能性がある。また、本作用は何らかの増殖因子産生誘導を介した間接的なものであること及び活性物質は非タンパク質性の高分子であることが示唆された。ニガウリ可食部抽出物も同胎座部抽出物には及ばないが、ヒト真皮線維芽細胞における HGF 産生誘導作用を示した。しかし、ラットに 2%ニガウリ可食部凍結乾燥粉末添加固型飼料を 8 日間摂取させたが、血中および肝臓中 HGF レベルの増加を認めることはできなかった。

(2) 伝統的な漢方薬であり、肝線維化抑制作用も報告されている冬虫夏草の抽出物が HGF 産生誘導作用を示すことをすでに見出しており、今回、本作用について検討し、以下の結果を得た。冬虫夏草菌糸体 (*P. h. Chen*) 凍結乾燥粉末を PBS で攪拌・抽出し、遠心後の上清を濾過滅菌し抽出物とした。コンフルエントのヒト真皮線維芽細胞および MRC-5 ヒト胎児肺線維芽細胞をこの抽出物と共に培養したところ、冬虫夏草抽出物は両細胞の HGF 産生を用量依存的に促進し、最大産生量はヒト真皮線維芽細胞で対照の約 20 倍、MRC-5 細胞で約 2.5 倍に達した。また、HGF mRNA レベルも冬虫夏草抽出物処理により増加した。本抽出物

による HGF 産生誘導はアデニル酸シクラーゼ阻害剤の MDL-12330A 及び PKA 阻害剤の H-89 により抑制されたが、MAPKs 阻害剤および PKC 阻害剤では影響されなかった。冬虫夏草抽出物により細胞内 cAMP レベルの上昇と CREB リン酸化の増加が早期に認められた。本作用の活性成分の分子量はゲルろ過の結果より 3 万以上と推定され、トリプシン処理で失活しなかった。以上のように、冬虫夏草抽出物の HGF 産生誘導作用には cAMP-PKA 経路による CREB リン酸化の増加の関与が示唆された。

(3) バチルス属細菌により産生される抗生物質のポリミキシン B が、ヒト真皮線維芽細胞における HGF 産生を誘導すると共に、本細胞の増殖も促進することを見出した。ポリミキシン B は本細胞の DNA 合成を数倍に増加させ、また、細胞数も増加させた。ヒト真皮線維芽細胞におけるポリミキシン B の HGF 産生誘導作用メカニズムの解析を行い、本薬物が HGF mRNA 発現を 24 および 48 時間で 5～8 倍に増加させること、本薬物による HGF タンパク質産生誘導が MEK 阻害剤 (PD98059)、p38 MAPK 阻害剤 (SB203580) および JNK 阻害剤 (SP600125) の処理により抑制されること、PKC 阻害剤 (GF109203X) 及び PI3K 阻害剤 (wortmannin) では影響されないことが明らかとなった。これらの阻害剤のうち PD98059 による抑制が最も強いものであった。また、これと一致してポリミキシン B 添加により ERK、p38 MAPK および JNK のリン酸化がそれぞれ増加した。それらのピークは ERK および JNK ではポリミキシン B 添加後 2 時間、p38 MAPK では 24 時間以降であった。以上の結果よりポリミキシン B の HGF 産生誘導作用には ERK、p38 MAPK および JNK を介する MAPK 経路の活性化の関与が示唆された。

ポリミキシン B をラットに 1 日 1 回、2 日

間静脈内投与することにより、血清中の ALT 並びに AST 活性を上昇させることなく、血漿中および肝臓中 HGF レベルの上昇が認められた。

ポリミキシン B のヒト真皮線維芽細胞増殖促進作用の時間経過を上皮増殖因子 (EGF) と比較したところ、増殖誘導開始時間が EGF より若干遅れるものの顕著なずれがなかったことから、ポリミキシン B の直接的な刺激により細胞増殖が誘導されると判断された。また、ポリミキシン B 処理により 130 kDa タンパク質のチロシンリン酸化が速やかに誘導された。

(4) ニガウリ抽出物及びポリミキシン B が HGF 産生を誘導するとともに、産生細胞である真皮線維芽細胞の増殖促進作用を有することは創傷治癒の観点から興味深い。創傷治癒過程では皮膚の表皮と真皮の調和のとれた再生・修復が必要である。HGF は表皮を構成するケラチノサイトの遊走と増殖を促進し、表皮の形成・再生に関与することが報告されており、ニガウリ抽出物及びポリミキシン B は HGF 産生誘導を介して表皮の再生を促進する一方で、線維芽細胞の増殖誘導作用により真皮の修復を促進することが期待される。さらに、HGF は血管新生を誘導することが知られており、本作用も真皮の修復充進に働くものと思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Ono, T., Tsuji, T., Sakai, M., Yukizaki, C., Ino, H., Akagi, I., Hiramatsu, K., Matsumoto, Y., Sugiura, Y., Uto, H., Tsubouchi, H. and Gohda, E. Induction of

hepatocyte growth factor production in human dermal fibroblasts and their proliferation by the extract of bitter melon pulp. Cytokine、査読有、46 卷、2009、119-126

〔学会発表〕（計 2 件）

① 土手口修平、浜渦玲美、木村 洗、合田榮一、ポリミキシンBによるヒト皮膚線維芽細胞の増殖誘導、第 48 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会、2009 年 11 月 7 日、徳島市

② 小野雄大、齋藤大介、小林かほり、辻 友絵、酒井美穂、柚木崎千鶴子、井野寿俊、赤木功、坪内博仁、合田榮一、ニガウリ抽出物のヒト真皮線維芽細胞における増殖促進作用、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 26 日、京都市

〔その他〕

合田榮一、ゴーヤに傷の治りを早くする成分があると実験で判明、壮快、2009、98-99、マキノ出版

6. 研究組織

(1) 研究代表者

合田 榮一 (GOHDA EIICHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：20028814

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者