

## インジュリン (器官傷害のメディエーター) の精製と構造解析

### Purification and structural analysis of injurin, a mediator of tissue injury

代表研究者 大阪大学医学部バイオメディカル教育研究センター助手 松本 邦夫  
Assist. Prof., Biomedical Res. Center, Osaka Univ. Medical Sch.  
Kunio MATSUMOTO

Hepatocyte growth factor (HGF) is kringle-containing polypeptide growth factor, originally identified and purified as a potent mitogen for mature hepatocytes. Although HGF was initially implicated as hepatotropic factor for liver regeneration, it is now considered to be "organotropic factor" which stimulates regeneration of organs, including kidney and lung as well as the liver. We have recently reported the evidence for the presence of a humoral factor "injurin", which induces expression of the HGF gene in MRC-5 human lung fibroblasts. We have now purified a factor from porcine liver which stimulates HGF production but differs from previously characterized injurin. When injurin activity was measured as stimulatory effect on HGF production by MRC-5 cells, injurin activity was found in various acid extracts from porcine tissues. The factor with injurin activity was 4286-fold purified from the porcine liver through two successive anion-exchange chromatography. The purified factor stimulated the amount of HGF pulse-labeled with [<sup>35</sup>S] methionine, whereas it had no significant effect on HGF mRNA level. Therefore, this factor seem to stimulate HGF synthesis affecting post-transcriptional step and is distinct from previously characterized injurin which stimulates HGF gene expression. Chemical treatments of this injurin-like factor indicated that this factor is related to heparin. Indeed, we found that heparin stimulates HGF production in a post-transcriptional mechanism. In addition to these factors, we found that interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and prostaglandin (PG)-E<sub>1</sub> and PG-I<sub>2</sub> are potent inducer for HGF gene expression, whereas transforming growth factor- $\beta$ 1 and glucocorticoids are negative regulators for HGF expression. On the basis of these findings, we conclude that inducers of HGF (injurin, IL-1, TNF- $\alpha$ , PG, and heparin) are important mediator of tissue regeneration through inducing expression of HGF, and that these inducers, as well as HGF, have therapeutic potential for treatments of patients with various organ diseases.

#### 研究目的

長らく実体が不明であった肝再生因子の本体と考えられる肝細胞増殖因子 (HGF) は分子量 69,000 の  $\alpha$  鎖と分子量 34,000 の  $\beta$  鎖からなるヘテロダイマー構造を持つ新しい増殖因子である<sup>1,2)</sup>。1989年に、HGF cDNA クローニングによりラットならびにヒト HGF の全 1 次構造が明らかになった<sup>1,2)</sup>。HGF は種々の肝傷害や腎傷害に伴って傷害臓器のみならず肺や脾臓などの遠隔無傷臓器においても速やかかつ顕著な発現誘導を受けることが明らかになった。これらの結果は傷害に伴って HGF 発現を促す何らかのメディエーターの存在を示唆している。最近、このメディ

エーターの存在を証明し、それが熱および酸処理に安定な分子量 2~3 万のタンパク質性因子であることを明らかにした<sup>3)</sup>。この因子を injury をメデイエートすることにちなんでインジュリン (injurin) と名付けた。本研究はインジュリンの精製とその構造解明を目的として行った。

#### 研究成果

##### (1) 方法

ヒト胎仔肺線維芽細胞 (MRC5 細胞) を始めヒト肺線維芽細胞 (WI-38I や MR-90), HL-60, A431 などの HGF 産生細胞を用い, *in vitro* における HGF 産生促進能を指標にインジュリンおよびインジュリン様活性を測定した。HGF 量の測

定は抗 HGF ポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法によって行った。HGF mRNA 量の測定はヒト HGF cDNA をプローブとして Northern blot 法によって行った。

#### (2) インジュリン様活性のブタ組織分布

インジュリン様活性はブタの広い組織中に認められ、その中でも肺に最も多く、つづいて肝臓、脾臓、大脳、小脳に多く含まれている。そこで、インジュリンの精製には臓器の大きさや取り扱いやすさなどを考えブタ肝臓を材料とすることにした。

#### (3) ブタ肝臓からのインジュリン様因子の精製

ブタ肝臓から 1 M 酢酸バッファー (pH 3.5) でインジュリン様活性を抽出後、20 mM リン酸バッファーで平衡化し、Q セファロースカラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにかけた。インジュリン様活性はカラム素通り分画に加え、ピーク I, II, III と大きく分けて四つの分画に分離された。このことはブタ肝臓中にはインジュリン様因子が少なくとも複数種存在することを示唆している。そこで活性量の比較的多いピーク III 分画をまず最初に精製することにした。

ピーク III 分画をさらに Mono Q カラムを用いた FPLC により精製を進め最初の酸抽出液の段階から 4286 倍の標品を得た。この精製インジュリン様因子は酸および熱処理に安定であり、さらに還元剤 (DTT) 処理でも安定であった。また、種々のプロテアーゼにも耐性であることからこの標品はタンパク質性因子でなく、強い陽性荷電を持つ多糖体である可能性が考えられた。そこでヘパリナーゼ処理を行うと、インジュリン様活性が失活することからこの因子はヘパリンあるいはヘパラン硫酸などのグリコサミノグリカンであると考えられる<sup>4)</sup>。

#### (4) ヘパリンによる HGF 産生誘導活性

ブタ肝臓中のピーク III 分画のインジュリン様因子はヘパリン様のグリコサミノグリカンであることが明らかになったので、ヘパリンが果たして HGF 産生誘導活性を示すかどうか調べた。ヘパリンは MRC-5 細胞の HGF 産生を濃度依存的に

促進し、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で約 4 倍の産生促進効果を示した<sup>5)</sup>。ヘパリンの HGF 産生誘導活性は他の HGF 産生細胞に対して同様に認められる。ヘパリンによる HGF 産生誘導は <sup>35</sup>S-Met を用いた実験から HGF 合成能の促進によっていることが明らかになった。しかしながら、ヘパリンは HGF mRNA 量を増加させなかった。したがってヘパリンの HGF 産生誘導活性は転写レベルでなく翻訳段階の促進であると結論づけられた。また、ヘパリン以外のグリコサミノグリカンの HGF 誘導活性を調べると、ヘパリンほど強くはないがヘパラン硫酸にも活性が認められる。調べた限りの他のグリコサミノグリカンには HGF 誘導活性は認められなかった。

#### (5) 他の既知因子のインジュリン様活性

多くの既知サイトカイン類についてインジュリン様活性を調べたところ、インタロイキン 1 (IL-1 $\alpha$  と 1 $\beta$ ) に強力なインジュリン活性が検出された。IL-1 は多くの HGF 産生細胞の HGF mRNA 量を 3~4 倍増加させ、HGF 産生を促す<sup>6)</sup>。TNF- $\alpha$  やインターフェロン $\gamma$  などにも IL-1 などではないがインジュリン様活性が認められる。一方、TGF- $\beta$  やグルコルチコイドは HGF 産生細胞の HGF mRNA 量を濃度依存的に強く低下させ、anti-injuring activity を持っていることが明らかになった<sup>7)</sup>。

#### 今後の課題と発展

ブタ肝臓中には複数種のインジュリン様因子の存在が示唆された。その中の最もカチオン性成分を精製するとヘパリンあるいはヘパラン硫酸であることが明らかになった。この事実から、他の既知サイトカインについてインジュリン様活性を調べると、IL-1 や TNF- $\alpha$ 、INF $\gamma$  などにインジュリン活性が検出された。ブタ肝臓中の Q セファロース素通り分画の精製を進めると IL-1 $\beta$  と考えられるインジュリン活性分画が得られることから、ブタ肝臓中の複数個のインジュリンには IL-1 $\beta$  やヘパリンが含まれることがわかる。現在、これらの既知因子以外に新しいインジュリンが含まれると考えられ分画の精製を進めている。

本研究によりインジュリンを HGF 産性のアク

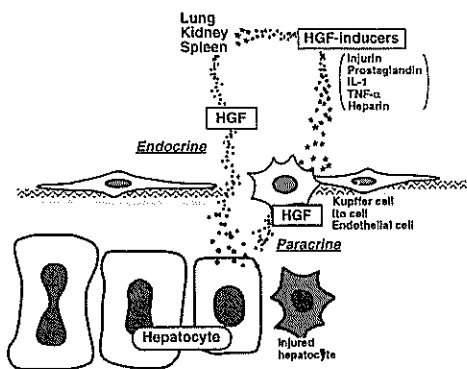


Fig. 1. Possible mechanism of liver regeneration by HGF.

セルとすると、そのブレーキが明らかになり、 $TGF-\beta 1$  やグルココルチコイドがそれに属する。またアクセルの中にはインジュリンや IL-1 のように転写レベルで働き HGF mRNA 量を増加させるものと、ヘパリンのように HGF 合成の翻訳レベルで働く 2 種類が存在する。

以上の結果をもとにしてさまざまな器官傷害に伴って HGF 発現調節を介して組織器官の再生や創傷治癒が起こる機構を肝再生を例にして要約すると Fig. 1 のようにイラストすることができる。傷害に伴い、HGF 誘導因子群が速やかに産生・分泌され傷害臓器間葉系細胞ならびに肺など遠隔無傷臓器に作用し、HGF の産生を促す。HGF はパラクリン機構さらにはエンドクリン機構を介して肝再生を駆動する。おそらく基本的には同様の機構で腎再生・肺再生も HGF によって駆動されると考えられる。

## 発表論文リスト

- 1) Matsumoto, K. and Nakamura, T. (1992): Hepatocyte growth factor; molecular structure, roles in liver regeneration, and other biological functions. *Crit. Rev. Oncogenesis*, 3, 27-54.
- 2) Matsumoto, K. and Nakamura, T. (1993): Roles of HGF as a pleiotropic factor in organ regeneration. In "Hepatocyte Growth Factor-Scatter Factor (HGF-SF) and the c-Met Receptor" (ed. by I. D. Goldberg and E. M. Rosen), Birkhauser Verlag Basel, Switzerland.
- 3) Matsumoto, K., Tajima, H., Hamanoue, M., Kohno, S., Kinoshita, T. and Nakamura, T. (1992): Identification and characterization of "injurin", an inducer of the gene expression of hepatocyte growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 3800-3804.
- 4) Matsumoto, K., Okazaki, H., Tajima, H. and Nakamura, T. (1993): Heparin as an inducer of hepatocyte growth factor. *J. Biochem.*, 114, 820-826.
- 5) Okazaki, H., Matsumoto, K. and Nakamura, T. (1993): Partial purification and characterization of injurin-like factor from porcine liver. *Biochim. Biophys. Acta*, in press.
- 6) Matsumoto, K., Okazaki, H. and Nakamura, T. (1992): Up-regulation of hepatocyte growth factor gene expression by interleukin-1 in human skin fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 188, 235-243.
- 7) Matsumoto, K., Tajima, H., Okazaki, H. and Nakamura, T. (1992): 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.*, 267, 24917-24920.