

冠動脈疾患における血清肝細胞増殖因子の変化

Changes of Serum Hepatocyte Growth Factor in Coronary Artery Disease

鈴木 洋
村上 幹高
近藤 武志
柴田 正行
江角 仁志
岡林 宏明
萬屋 穰
牧嶋 信行
濱寄 裕司
中谷 雅貴
並木 淳郎
片桐 敬

Hiroshi SUZUKI, MD
Mikitaka MURAKAMI, MD
Takeshi KONDO, MD
Masayuki SHIBATA, MD
Hitoshi EZUMI, MD
Hiroaki OKABAYASHI, MD
Minoru YOROZUYA, MD
Nobuyuki MAKISHIMA, MD
Yuji HAMAZAKI, MD
Masaki NAKATANI, MD
Atsuo NAMIKI, MD
Takashi KATAGIRI, MD, FJCC

Abstract

Hepatocyte growth factor (HGF) is an endothelial cell specific growth factor involved in the repair of endothelial cells and collateral formation, however, the role for coronary artery disease is still unknown. We measured serum HGF level in various coronary artery diseases to examine the clinical significance. Serum HGF level was measured using the enzyme-linked immunosorbent assay method in patients with stable effort angina pectoris ($n = 26$), old myocardial infarction ($n = 18$), unstable angina pectoris (UAP; $n = 10$) and acute myocardial infarction (AMI; $n = 21$). As a control group, we selected 11 patients with neurocirculatory asthenia. Blood samples from peripheral veins were collected at cardiac catheterization before heparin administration. In the AMI group, blood samples were also collected at 48, 72 hr, 1, 2, 3 and 4 weeks from the peripheral veins and 48 and 72 hr after reperfusion from the coronary sinus.

Serum HGF level was significantly higher in the UAP (0.41 ± 0.12 ng/ml, $p < 0.001$) and AMI groups (0.38 ± 0.26 ng/ml, $p < 0.05$) compared to the control group (0.19 ± 0.09 ng/ml). Serum HGF level peaked 48 hr after reperfusion in both the peripheral veins (0.42 ± 0.16 ng/ml) and coronary sinus (0.58 ± 0.23 ng/ml) in the AMI group, with a significantly higher level in the coronary sinus than the peripheral veins ($p < 0.05$). No significant correlation between peak HGF level in the peripheral veins and peak creatine kinase (CK), CK-MB, ejection fraction and cardiac index was observed.

Serum HGF was elevated in acute coronary syndrome, indicating advanced endothelial cell damage. HGF is produced, at least partially, in the heart in patients with AMI. Serum HGF level may be useful to detect endothelial cell damage rather than myocardial cell damage.

J Cardiol 2000; 35(5): 319-324

Key Words

■ Angina pectoris ■ Coronary artery disease ■ Growth factors (hepatocyte)
■ Myocardial infarction, pathophysiology

昭和大学医学部 第三内科: 〒142-8666 東京都品川区旗の台1-5-8

The Third Department of Internal Medicine, Showa University School of Medicine, Tokyo

Address for reprints: SUZUKI H, MD, The Third Department of Internal Medicine, Showa University School of Medicine, Hatanodai 1-5-8, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8666

Manuscript received June 7, 1999; revised December 27, 1999; accepted December 28, 1999

はじめに

最近、動脈硬化や高血圧との関連が注目され、心血管系においても重要な役割を果たしている可能性が報告されている肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor: HGF)は、1984年にNakamuraら¹⁾によりラット初代培養肝細胞のDNA合成能を指標にしてラット血中から発見された物質である。分子量は82-85kDaで、熱、酸および還元処理により失活する蛋白質であり、プラスミノゲンなどの血液凝固系、セリンプロテアーゼなどの線溶系に特徴的なクリングドメインを有している²⁾。HGFは肝細胞特異的な増殖因子と考えられていたが、その後、上皮細胞の増殖や細胞運動、形態形成を促進するなど、多様な生物活性を有することが報告されている³⁾。また、血管内皮細胞の増殖と細胞運動も促進することが知られており、その作用はvascular endothelial growth factorよりも強力であることが報告されている⁴⁾。一方、血管平滑筋細胞の増殖には関与せず、むしろ内皮細胞とのco-culture系ではHGFによりその増殖が抑制される。そのため動脈硬化の抑制や冠動脈形成術後の再狭窄病変の抑制のkey factorとして注目されている。しかし、虚血性心疾患における血中HGF濃度の検討は少なく、急性心筋梗塞の発症早期での上昇が報告されているのみである⁵⁾。そこで、種々の虚血性心疾患における末梢血中HGF濃度を、また急性心筋梗塞患者では、経時的に冠静脈洞血におけるHGF濃度も測定し、その病態との関連を検討した。

対象と方法

1. 対象

対象は安定労作性狭心症26例(SAP群; 男性18例, 女性8例, 平均年齢 64.8 ± 11.1 歳), 陳旧性心筋梗塞18例(OMI群; 男性11例, 女性7例, 平均年齢 69.7 ± 11.6 歳), 不安定狭心症10例(UAP群; 男性7例, 女性3例, 平均年齢 68.2 ± 7.2 歳), 急性心筋梗塞21例(AMI群; 男性14例, 女性7例, 平均年齢 65.0 ± 10.9 歳)とし、対照群は11例(男性7例, 女性4例, 平均年齢 65.9 ± 6.4 歳)とした。SAP群は運動負荷試験陽性のため心臓カテーテル検査を施行した患者で、冠動脈造影上75%以上の有意狭窄が認められたものとし、

OMI群は心筋梗塞の既往を有し、冠動脈インターベンション後の確認造影のため心臓カテーテル検査を施行した患者とした。AMI群は発症24時間以内に当科を受診し緊急心臓カテーテル検査を施行した患者とし、全例でThrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) 分類Ⅱ度以上の再灌流に成功した患者とした。また、対照群は胸痛を有するが運動負荷試験陰性で、冠動脈造影でも有意狭窄は認められず、アセチルコリン負荷も陰性の神経循環無力症患者とした。なお、すべての患者に対して事前に十分な説明を行い、承諾を得た。

2. 血液採取

対照群, SAP群, OMI群, UAP群では、心臓カテーテル検査施行時においてヘパリン投与前に末梢静脈血を採取した。AMI群の12例では、末梢静脈血に加え、左鎖骨下静脈より冠静脈洞にパーマカテーテルを挿入し冠静脈洞血採血も行った。冠静脈洞からは、ヘパリン投与前、再灌流48, 72時間後に採血を行い、末梢静脈からはそれに加え、1, 2, 3, 4週後にも採血を行った。また、ヘパリン投与の血清HGF濃度への影響を調べるために、健常成人7例にヘパリン5,000Uの静脈内投与を行い、投与1, 2, 6, 12, 24時間後に採血を行った。

3. HGFアッセイ

血液は採取後、直ちに3,000回転で10分間遠心分離し、血清は測定まで -80°C で保存した。HGFの測定は、オートカ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)キット(大塚アッセイ研究所製)を使用した⁶⁾。本キットの測定原理は、抗HGFモノクローナル抗体(マウス)固相化プレートに採取血清を加え反応させ(第一次反応)、つぎに抗HGFポリクローナル抗体(ウサギ)を加えて反応させて(第二次反応)サンドイッチを形成し、さらにペルオキシダーゼ標識抗ウサギ免疫グロブリンG抗体を加えて反応させ(第三次反応)、その後、酵素反応を行い吸光度を測定するというものである。

4. 統計処理

結果はすべて平均±標準偏差で表し、統計学的解析は、患者背景には χ^2 検定を使用し、他の解析はpaired Student's *t*検定ならびにunpaired Student's *t*検定により

Table 1 Patient characteristics

	SAP (n=26)	OMI (n=18)	UAP (n=10)	AMI (n=21)	Control (n=11)
Age (yr, mean \pm SD)	64.8 \pm 11.1	69.7 \pm 11.6	68.2 \pm 7.2	65.0 \pm 10.9	65.9 \pm 6.4
Male/female	18/8	11/7	7/3	14/7	7/4
Hypertension	12 (46.2)	10 (55.6)	7 (70.0)	9 (42.9)	4 (36.4)
Hyperlipidemia	12 (46.2)	8 (44.4)	5 (50.0)	11 (52.4)	2 (18.2)
Diabetes mellitus	10 (38.5)	7 (38.9)	6 (60.0)	11 (52.4)	3 (27.3)
Smoking	14 (53.8)	7 (38.9)	6 (60.0)	14 (66.7)	4 (36.4)

(): %.

SAP=stable effort angina pectoris; OMI=old myocardial infarction; UAP=unstable angina pectoris; AMI=acute myocardial infarction.

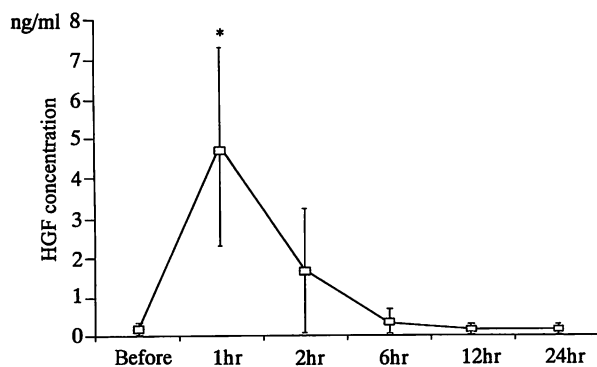
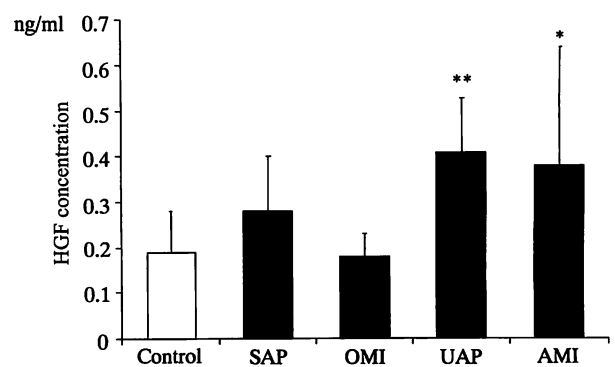


Fig. 1 Time course of serum hepatocyte growth factor concentration after heparin administration in healthy adults

* $p < 0.01$ vs before heparin administration.

HGF = hepatocyte growth factor.

Fig. 2 Serum hepatocyte growth factor concentration in the control, SAP, OMI, UAP and AMI groups
* $p < 0.05$ vs control group, ** $p < 0.01$ vs control group.

Abbreviations as in Table 1, Fig. 1.

行い, $p < 0.05$ を有意差の判定とした。

結 果

1. 患者背景

Table 1に患者背景を示すが、各群で年齢、性、高血圧、高脂血症、糖尿病、喫煙歴に有意差は認められなかった。

2. 血清HGF濃度のヘパリン投与による影響

健常成人7例にヘパリン5,000Uの静脈内投与を行い、経時的に血清HGF濃度の推移を検討した。投与前には0.17 \pm 0.05 ng/mlであったが、投与1時間後には最大値の4.82 \pm 2.52 ng/mlへと有意に上昇し($p < 0.01$)、その後は漸減し、12時間後にはほぼ投与前値(0.16 \pm 0.08 ng/ml)に復した(Fig. 1)。

3. 血清HGF濃度

血清HGF濃度は、OMI群では0.18 \pm 0.05 ng/mlであり、対照群(0.19 \pm 0.09 ng/ml)とほぼ同様であった。SAP群では0.28 \pm 0.12 ng/mlと、対照群に比べてやや上昇傾向が認められた。一方、急性冠症候群であるUAP群(0.41 \pm 0.12 ng/ml, $p < 0.001$)とAMI群(0.38 \pm 0.26 ng/ml, $p < 0.05$)では、対照群に比べて有意な血清HGF濃度の上昇が認められた(Fig. 2)。一方、UAP群では、発症からの時間と血清HGF濃度の間には相関は認められず、AMI群でも発症から時間が経過しているものほど血清HGF濃度は高い傾向を示したが、有意な相関は認められなかった。

4. 急性心筋梗塞群における血清HGF濃度の推移

末梢血清HGF濃度は、ヘパリン投与前には0.35 \pm

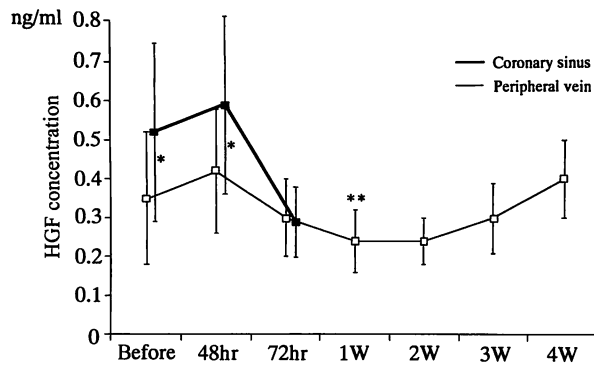


Fig. 3 Time course of serum hepatocyte growth factor concentration in the AMI group

* $p < 0.05$ (peripheral vein vs coronary sinus). ** $p < 0.05$ vs before heparin administration.

Abbreviations as in Table 1, Fig. 1.

0.27 ng/mlであったが、再灌流48時間後には 0.42 ± 0.16 ng/mlとピークに達し、以後漸減し、1週後には 0.24 ± 0.08 ng/mlとヘパリン投与前に比べて有意に低下した($p < 0.05$)。その後、有意ではないが徐々に増加し、4週後にはヘパリン投与前のレベルまで再上昇した。

一方、冠静脈洞血清HGF濃度は、ヘパリン投与前には 0.52 ± 0.24 ng/mlであり、再灌流48時間後には 0.58 ± 0.23 ng/mlとピークに達し、いずれも末梢血清HGF濃度に比べて有意に高値を示した($p < 0.05$)。再灌流72時間後には、末梢血と同レベルの 0.27 ± 0.09 ng/mlへと減少した(有意差なし; Fig. 3)。

5. 末梢血における最大血清HGF濃度と最大CK・CK-MB値との相関

末梢血における最大血清HGF濃度と最大クレアチンキナーゼ(creatinase: CK)・CK-MB値との相関関係を検討したところ、それぞれ $r = 0.32$ ($p = 0.31$), $r = 0.24$ ($p = 0.55$)と有意な相関は認められなかった。

6. 末梢血における最大血清HGF濃度と左室駆出率および心係数との相関

末梢血における最大血清HGF濃度と心臓カテーテル検査時の左室駆出率、心係数との相関関係を検討したところ、それぞれ $r = 0.52$ ($p = 0.09$), $r = 0.21$ ($p = 0.54$)と有意な相関はなかった。

考 察

今回の我々の検討では、対照群と比べて急性冠症候群である不安定狭心症や急性心筋梗塞患者で血清HGF濃度の有意な上昇が認められた。一方、急性心筋梗塞では、冠静脈洞でのHGF濃度が末梢静脈血のそれと比べて有意に高値を示し、その一部は心由来と考えられた。急性心筋梗塞での末梢血清最大HGF濃度は、末梢血清最大CK・CK-MB値や左室駆出率などの心筋傷害や心機能を表す指標とは有意な相関は示さなかった。血清HGF濃度は血管傷害をより鋭敏に表す可能性が示唆された。

HGFは血管内皮細胞の増殖と細胞運動を促進することが知られており、その作用はvascular endothelial growth factorよりも強力であることが報告されている⁴⁾。そのため側副血行路の発達を促し、recombinant HGFによる閉塞性動脈硬化症での臨床応用が期待されている⁷⁾。今回の検討でも有意ではなかったが、心筋梗塞発症後3週以降でみられた血清HGF濃度の再上昇は、心筋の修復過程や血管新生と関連がある可能性もある。また、HGFは血管内皮細胞の増殖と細胞運動の促進のみならず、血管平滑筋細胞の増殖には関与せず、むしろ内皮細胞とのco-culture系ではHGFによりその増殖が抑制される。そのため、動脈硬化の抑制や冠動脈形成術後の再狭窄病変の抑制のkey factorとして注目されている。

HGFはプラスミノゲンなどの血液凝固系、セリンプロテアーゼなどの線溶系に特徴的なクリングドメインを有しており、凝固線溶系との関連が示唆されている²⁾。Matsumoriら⁸⁾は、ラットの頸動脈内皮傷害モデルを用いて血栓量と血清HGF濃度との相関を報告しており、血栓形成が刺激となり血管壁よりHGFが遊離されるのではないかと推測している。今回の我々の検討でも、対照群と比べて血栓の関与の強いと考えられる急性冠症候群である不安定狭心症や急性心筋梗塞で来院時血清HGF濃度の有意な上昇が認められている。しかし、冠動脈インターベンションで血栓を破壊あるいは溶解した後もHGF濃度はさらに上昇しており、今回のHGF濃度の上昇と冠動脈血栓量との相関は少ないと考えられる。

今回の我々の検討で、急性心筋梗塞では冠静脈洞で

のHGF濃度が末梢血中のそれと比較して有意に高値を示し、上昇HGFの少なくとも一部は心臓で産生されたと考えられた。動物モデルにおいても、ラットの虚血再灌流モデルにおいてHGFとHGF受容体であるc-metのmRNAが再灌流24時間後でピークに達することが報告され、心臓におけるHGFとc-metの産生が証明されている⁹⁾。しかし、今回の検討における急性心筋梗塞群で、再灌流48時間後にみられた末梢血清最大HGF濃度は、末梢血清最大CK・CK-MB値とは有意な相関は示さず、HGFは心臓より産生されるものの内皮細胞、線維芽細胞など心筋細胞以外の細胞由来のHGFも含まれるため、心筋梗塞量を表すには適当なマーカーではないと考えられた。また、末梢血清最大HGF濃度は、心臓カテーテル検査時の左室駆出率、心係数とも有意な相関は示さず、心機能の指標ともなりえないと考えられた。また、不活性型1本鎖HGFは、HGF変換酵素¹⁰⁾、HGF活性化因子¹¹⁾により活性化2本鎖HGFとなる。HGF活性化因子も不活性型として循環血液中に存在するが、組織傷害に伴い、血液凝固系と連動して局所的に活性化されると考えられている。冠静脈洞血HGF濃度上昇の機序としては、冠動脈インターベンションによる内皮細胞傷害により減少した局所HGF産生を補充するために、循環血液中の不活性型1本鎖HGFが活性化されることによるかもしれない。また、末梢血中でも血清HGF濃度の上昇が認められたため、局所HGF産生を補充するために肝臓、

肺、腎臓などからHGF産生が上昇していることも考えられる。

一方、ヘパリンが血清HGF濃度に影響を与えることが知られているが、今回の検討でも、若年成人へのヘパリン5,000Uの静脈内投与により血清HGF濃度の著明な上昇が認められた。そのため当院では、急性心筋梗塞群では通常再灌流24時間後までヘパリンの投与を行っているため、再灌流48時間以前のデータは検討から除外した。しかし、血清HGF濃度は、末梢血、冠静脈洞血ともに48時間後が最大値を示しているが、24時間以前に最大となっている可能性も否定できない。ヘパリンは、インターロイキン1、腫瘍壊死因子 α 、インターフェロン γ とともにHGF産生促進作用を持つことが知られており¹²⁻¹⁴⁾、それがHGF上昇の一つのメカニズムかもしれない。

結 論

血清HGF濃度が、急性冠症候群である急性心筋梗塞と不安定狭心症の両群で有意に高値を示し、内皮細胞傷害の進行が示唆された。

急性心筋梗塞急性期にHGF濃度が末梢静脈血に比べて冠静脈洞血で高値を示し、その上昇の一部は心由来と推測された。

血清HGF濃度は心筋細胞傷害より、血管傷害をより鋭敏に表す可能性が示唆された。

要 約

肝細胞増殖因子(HGF)は内皮細胞特異的な増殖因子で、内皮細胞の再生や側副血行路の形成に関与していると考えられている。しかし、急性心筋梗塞での血清HGF濃度の上昇が報告されているものの、冠動脈疾患におけるその役割については不明な点が多い。そこで種々の冠動脈疾患における血清HGF濃度を測定し、その臨床的意義について検討した。

対象は安定労作性狭心症26例、陳旧性心筋梗塞18例、不安定狭心症10例、急性心筋梗塞21例で、神経循環無力症11例を対照群とした。心臓カテーテル検査施行時においてヘパリン投与前に末梢静脈血より採血を行った。急性心筋梗塞群では経時的採血を末梢静脈血(来院時、再灌流後48、72時間、1、2、3、4週)に加え、冠静脈洞(来院時、48、72時間)からも行い、enzyme-linked immunosorbent assay法で血清HGF濃度を測定した。

血清HGF濃度は不安定狭心症群($0.41 \pm 0.12 \text{ ng/ml}$, $p < 0.001$)と急性心筋梗塞群($0.38 \pm 0.26 \text{ ng/ml}$, $p < 0.05$)で、対照群($0.19 \pm 0.09 \text{ ng/ml}$)に比べてともに有意に高値を示したが、安定労作性狭心症群($0.28 \pm 0.12 \text{ ng/ml}$)と陳旧性心筋梗塞群($0.18 \pm 0.05 \text{ ng/ml}$)では有意な上昇は認められなかった。急性心筋梗塞群では再灌流48時間後に血清HGF濃度は最大値に達し、冠静脈洞血($0.58 \pm$

0.23 ng/ml)で末梢静脈血(0.42 ± 0.16 ng/ml)に比べて有意に高値を示した($p < 0.05$)。末梢血における最大血清CK・CK-MB値, 左室駆出率や心係数とは有意な相関を示さなかった。

血清HGF濃度が急性冠症候群で有意に高値を示し, 内皮細胞傷害の進行が示唆された。急性心筋梗塞の急性期にHGF濃度が末梢静脈血に比べて冠静脈洞で高値を示し, その上昇の一部は心由来と推測された。血清HGF濃度は, 心筋細胞傷害よりも内皮細胞傷害のマーカーとなりうるかもしれない。

J Cardiol 2000; 35 (5): 319–324

文 献

- 1) Nakamura T, Nawa K, Ichihara A: Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; **122**: 1450–1459
- 2) 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* 1989; **342**: 440–443
- 3) Matsumoto K, Nakamura T: Growth factors: Cell growth, morphogenesis, and transformation. *in* Gann Monograph (ed by Nakamura T, Matsumoto K) No. 42. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1994; pp 92–112
- 4) Van Belle E, Witzenbichler B, Chen D, Silver M, Chang L, Schwall R, Isner JM: Potentiated angiogenic effect of scatter factor/hepatocyte growth factor via induction of vascular endothelial growth factor: The case for paracrine amplification of angiogenesis. *Circulation* 1998; **97**: 381–390
- 5) Matsumori A, Furukawa Y, Hashimoto T, Ono K, Shioi T, Okada M, Iwasaki A, Nishio R, Sasayama S: Increased circulating hepatocyte growth factor in the early stage of acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **221**: 391–395
- 6) 二井谷好行, 立川哲也, 申 貞均, 坪内博仁, 大工原恭, 三上恵世, 大久保昭行: hHGF測定キットの改良. *臨検* 1991; **35**: 1360–1364
- 7) 木田岩男, 森下竜一, 荻原俊男: 遺伝子工学治療の研究開発動向. *日臨* 1999; **57**: 1519–1525
- 8) Matsumori A, Ono K, Furukawa Y, Okada M, Sasayama S: Circulating hepatocyte growth factor as an early marker of arterial thrombus formation. *Jpn Circ J* 1998; **62**: 311–313
- 9) Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S: Enhanced expression of hepatocyte growth factor/c-Met by myocardial ischemia and reperfusion in a rat model. *Circulation* 1997; **95**: 2552–2558
- 10) Mizuno K, Tanoue Y, Okano I, Harano T, Takada K, Nakamura T: Purification and characterization of hepatocyte growth factor(HGF)-converting enzyme: Activation of pro-HGF. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **198**: 1161–1169
- 11) 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* 1993; **268**: 22927–22932
- 12) Matsumoto K, Tajima H, Okazaki H, Nakamura T: Heparin as an inducer of hepatocyte growth factor. *J Biochem(Tokyo)* 1993; **114**: 820–826
- 13) Taniguchi T, Toi M, Tominaga T: Rapid induction of hepatocyte growth factor by heparin. *Lancet* 1994; **344**: 470
- 14) Kato Y, Liu KX, Nakamura T, Sugiyama Y: Heparin-hepatocyte growth factor complex with low plasma clearance and retained hepatocyte proliferating activity. *Hepatology* 1994; **20**: 417–424