

物種間で差があり、マウスではメサンギウム細胞増生はみられるものの蛋白尿は出現しないため、蛋白尿は異種蛋白による免疫反応の可能性も考えられる。さらに、これらの腎毒性は可逆性で、BUNやクレアチニンの上昇はみられない。ほかの毒性試験の結果とあわせて、遺伝子組換え型ヒトHGFの無毒性量は0.03~0.1 mg/kgと考えられる。しかし、腎毒性は4~13週の反復投与で出現するため、10日前後の投与期間が考えられる劇症肝炎や生体部分肝移植では、腎臓に変化をきたさずに薬用量の遺伝子組換え型ヒトHGFを投与できる可能性が高い。

### 3. 発癌性

肝細胞をはじめとした種々の上皮細胞に対して増殖促進作用をもつHGFの発癌性は慎重に判断せねばならない。HGFトランスジェニックマウスを用いた研究では、HGFの過剰発現が発癌を促進するという成績と、逆にc-mycの過剰発現で誘導される肝発癌を抑制するという相反する2つの成績が報告されている<sup>22,23)</sup>。一方、ラットおよびマウスを用いた肝二段階発癌モデルでは薬用量の遺伝子組換え型ヒトHGFに発癌性は認められなかった。短期投与で効果が期待される劇症肝炎や生体部分肝移植では、疾患の重篤さからも発癌性はそれほど問題にならないかもしれない。しかし、肝硬変は肝細胞癌の発生母地であり、肝硬変に対する遺伝子組換え型ヒトHGF投与は長期に及ぶことが考えられるため、肝硬変を背景にした肝発癌に及ぼす遺伝子組換え型ヒトHGFの影響は明らかにすべき課題である。

### おわりに

われわれは、HGFを精製し、その測定系を開発して血清HGFの臨床的意義を明らかにし<sup>5,6)</sup>、またこれまで多くの研究者がHGFの研究にたずさわって種々の機能が明らかとなった。残されたHGFの課題は臨床的な効果を明らかにすることである。われわれは、製薬会社と共同でHGFの医薬品化を進め、ようやくGMPに準拠した遺伝子組換え型ヒトHGFの供給が

可能となった。安全性の確認、プロトコル作成、倫理委員会の承認を経て、まずは劇症肝炎患者、成人生体部分肝移植および肝硬変を対象として遺伝子組換え型ヒトHGFの臨床試験を始める予定である。このようなトランスレーショナルリサーチにおいては、十分に議論を尽くして、倫理的に承認された臨床試験計画を作成し、さらに客観的な評価に耐えうる臨床試験データを得ることが大変重要である。

### References

- 1) Gohda E, Tsubouchi H, Nakayama H et al: Human hepatocyte growth factor in patients with fulminant hepatic failure. *Exp Cell Res* 166: 139-150, 1986
- 2) Gohda E, Tsubouchi H, Nakayama H et al: Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure. *J Clin Invest* 81: 414-419, 1988
- 3) 坪内博仁: 肝細胞増殖因子(HGF). *肝臓* 39: 413-427, 1998
- 4) 合田榮一: 肝細胞増殖因子(HGF)の機能と産生制御. *日本薬理学会雑誌* 119: 287-294, 2002
- 5) Tsubouchi H, Niitani Y, Hirono S 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
- 6) Tsubouchi H, Kawakami S, Hirono S et al: Prediction of outcome in fulminant hepatic failure by serum human hepatocyte growth factor. *Lancet* 340: 307, 1992
- 7) Ishiki Y, Ohnishi H, Muto Y et al: Direct evidence that hepatocyte growth factor is a hepatotrophic factor for liver regeneration and has a potent antihepatitis effect *in vivo*. *Hepatology* 16: 1227-1235, 1992
- 8) Ozaki M, Haga S, Zhang HQ et al: Inhibition of hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress in HGF-stimulated antiapoptotic signaling: role of PI3-K and Akt kinase upon rac1. *Cell Death Differ* 10: 508-515, 2003
- 9) Wang X, DeFrances MC, Dai Y et al: A Mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor *Met*. *Mol Cell* 9: 411-421, 2002
- 10) Ikegami T, Nashizaki T, Uchiyama H et al: Deletion variant of hepatocyte growth factor prolongs allograft survival after liver transplantation in rats. *Surgery* 125: 602-607, 1999
- 11) Tashiro H, Fudaba Y, Itoh H et al: Hepatocyte growth factor prevents chronic allograft dysfunction in



- liver-transplanted rats. *Transplantation* 76 : 761-765, 2003
- 12) Uchiyama H, Yanaga K, Nishizaki T et al : Effects of deletion variant of hepatocyte growth factor on reduced-size liver transplantation in rats. *Transplantation* 68 : 39-44, 1999
  - 13) Ikegami T, Nishizaki T, Uchiyama H et al : Experimental study of the effects of deletion variant of hepatocyte growth factor on hepatic ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 87 : 59-64, 2000
  - 14) Sakakura Y, Kaibori M, Oda M et al : Recombinant human hepatocyte growth factor protects the liver against hepatic ischemia and reperfusion injury in rats. *J Surg Res* 92 : 261-266, 2000
  - 15) Oe S, Hirose T, Fujii H et al : Continuous intravenous infusion of deleted form of hepatocyte growth factor attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *J Hepatol* 34 : 832-839, 2001
  - 16) Kaibori M, Inoue T, Sakakura Y et al : Impairment of activation of hepatocyte growth factor precursor in to its mature form in rats with liver cirrhosis. *J Surg Res* 106 : 108-114, 2002
  - 17) Corpechot C, Barbu V, Wendum D et al : Hepatocyte growth factor and c-Met inhibition by hepatic cell hypoxia : a potential mechanism for liver regeneration failure in experimental cirrhosis. *Am J Pathol* 160 : 613-620, 2002
  - 18) Mitsue S, Hamanoue M, Tanabe G et al : Expression of HGF and TGF- $\beta$ 1 mRNA after partial hepatectomy in rats with liver cirrhosis. *Sug Today* 25 : 237-243, 1995
  - 19) 持田 智, 藤原研司 : 劇症肝炎・LOHFの現況 わが国における劇症肝炎, LOHFの実態. *日消誌* 99 : 895-904, 2002
  - 20) 武藤泰敏, 石木佳英, 杉原潤一ほか : 平成四年劇症肝炎全国集計. 厚生省特定疾患一難治性の肝炎調査班 平成5年度研究調査報告書. 1994, pp.44-50
  - 21) Kiuchi T, Tanaka K, Ito T et al : Small-for-size graft in living donor liver transplantation : How far should we go? *Liver Transplant* 9 : S29-S35, 2003
  - 22) Sakata H, Takayama H, Sharp R et al : Hepatocyte growth factor/scatter factor overexpression induced growth, abnormal development, and tumor formation in transgenic mouse livers. *Cell Growth Differ* 7 : 1513-1523, 1996
  - 23) Santoni-Rugiu E, Preisegger KH, Kiss A et al : Inhibition of neoplastic development in the liver by hepatocyte growth factor in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 9577-9582, 1996

総説

## 肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor) —その発見の歴史, 歯科医学との関連, 臨床応用の現状—

大工原 恭<sup>1</sup>, 坪内 博仁<sup>2</sup>

ヒトの肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor) は, 1985年に我々鹿児島大学のグループが, 劇症肝炎患者血漿に出現することを初めて発見し, 精製に成功した新規の増殖因子であり, その分子クローニングも我々のグループが, 関西医科大学のグループなどとの共同研究により成功した。また, 当初肝実質細胞に特異的と考えられてきた肝細胞増殖因子は, その後の研究により種々の上皮系及び内皮系の細胞に対して多様な生物学的活性を持つことが明らかとなり, 現在では広範囲・多機能型増殖因子の一つとして, 種々の臓器の発生, 再生, 修復に不可欠の因子と考えられている。本稿では, 初めにこの興味深いヒト肝細胞増殖因子の発見と, 一次構造決定の経緯を記した。また, 歯科医学と肝細胞増殖因子との関連についてはこれまであまり知られていないため, この方面の研究を紹介すると共に, 本因子は最近になってようやくその臨床応用が模索され始めて来たので, これらのことについても最後に展望したい。

### はじめに

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, 以下 HGF と略す) は, 肝実質細胞に特異的な増殖因子としてラットなどの実験動物で長年研究が続けられてきたものであるが, 1985年に我々は初めてヒトでの存在を明らかにし, 1986年に劇症肝炎患者血漿から精製した新規のペプチド性増殖因子である。さらに我々は, 1989年にヒトの HGF の cDNA 分子クローニングに成功し, その推定1次構造を明らかにすると共に, 組換え体 HGF の発現による大量の HGF の供給を可能とした。また, 当初肝実質細

胞に特異的と考えられてきた HGF は, 1991年になって種々の上皮系及び内皮系の細胞に対して, 多様な生物学的活性を持つことが明らかとなり, さらにその受容体が c-Met 原がん遺伝子産物であることも明らかにされた。従って, それ以降 HGF は広範囲・多機能型増殖因子の一つとして分類されるようになり, 肝臓学者のみならず, 広く細胞生物やがん医学の研究者に注目を浴びることになった。このように, 現在では HGF は種々の臓器の発生, 再生, 修復に不可欠の因子と考えられている。本稿は, 我々が鹿児島大学でヒトの HGF を発見するに至った経緯を中心に述べるが, その後の研究による歯科医学への応用や臨床応用についても, その現状を概説する。

### 1. HGF 研究の歴史とヒト HGF の発見

肝臓は極めて再生能力の高い臓器であって (図1参照), この能力が肝切除や肝移植手術を可能にしている。この再生能力を初めて実験的に証明したのは, 1931年の Higgins と Anderson<sup>1)</sup> によるラット部分肝切除法の確立である。すなわち彼らは, 2/3の肝臓を切除されたラットの残存肝が, 2日後には約2倍に, 1週間後にはほぼ元の大きさにまで達することを示したのである。このラット部分肝切除術は, 組織の再生や細胞増殖の実験モデルとして, 現

<sup>1</sup>鹿児島大学名誉教授 (〒899-2503 鹿児島県日置郡伊集院町妙円寺2丁目91-16)

<sup>2</sup>宮崎大学医学部内科学第二講座

Hepatocyte growth factor—History of discovery, physiological roles in dentistry and clinical application

<sup>1</sup>Yasushi Daikuhara (Professor Emeritus, Kagoshima University, 91-16 Myoenji-2-chome, Ijuinn-cho, Hioki-gun, Kagoshima Pref. 899-2503, Japan)

<sup>2</sup>Hirohito Tsubouchi (Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Miyazaki University, 5200 Kihara, Kiyotake-cho, Miyazaki-gun, Miyazaki Pref. 889-1692, Japan)



図1 鷲に肝臓をついばまれるプロメテウス  
ギリシャ神話のティタン(巨人)神族の一人であるプロメテウスは、天上の火を盗んで人間に与えるなど人間に親切であったことからゼウスの怒りを買ひ、コーカサスの山の岩に鎖でつながれて、毎日鷲に生きた肝臓をついばまれた。しかし、彼の肝臓は夜のうちに何時も元に戻ったという。肝臓学者の間では、これが肝臓の再生能力を記述した最初の文献とされている。

在でも広く用いられている。この肝再生の機序は今も未だ完全には解明されていないが、1967年に Moolten と Bucher<sup>2)</sup> が2匹のラットの血管系を結合する実験系(パラピオシス)を用いて、一方のラットが部分肝切除を受けると、そのパートナーである正常ラットの肝細胞増殖能が増加することを見だし、部分肝切除ラット血漿中に体液性の肝再生促進因子が存在していることを示唆した。しかし、当時はこの肝再生因子の活性を測定する適当な *in vitro* の系がなかったため、その後の研究はほとんど進展しなかった。

一方、1960年代後半に研究が始まったラットの初代培養肝細胞調製法<sup>3)</sup>は、その後多くの人たちによって改良が加えられた結果<sup>4)</sup>、1980年代に入ってこれが肝再生因子活性の *in vitro* の測定系に応用されるようになり<sup>5)</sup>、主とし

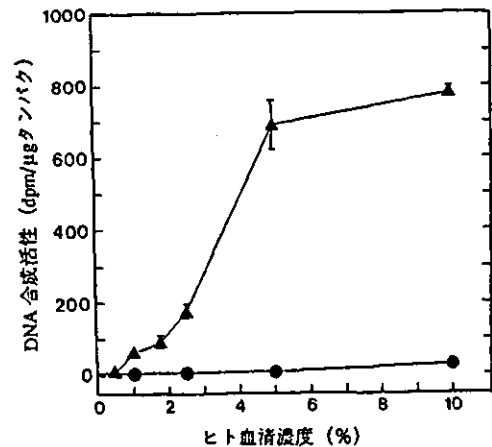


図2 ラット初代培養肝細胞のDNA合成に対する健常および劇症肝炎患者血清の影響  
細胞は、図に示した濃度の血清存在下で24時間培養した後、<sup>3</sup>H-チミジンを加えて2時間パルス培養を行い、DNA合成活性を測定した。●、健常者8名の混合血清；▲、劇症肝炎患者血清。

て米国及び日本でラットの部分肝切除ラット血清から肝再生因子を精製する試みが始まった。しかし、それら部分精製標品の分子量は、12万以上の高分子、あるいは3,000以下の低分子と一定せず、本体は不明のままであった<sup>6-9)</sup>。これとは別に、Strainら<sup>9)</sup>は1982年にラットの血小板に肝細胞の増殖を強く促進する活性があることを見いだした。さらに彼らのグループはこの血小板由来の因子を部分精製して、1984年に分子量約65,000の既知の細胞増殖因子とは異なる、熱に不安定な物質であることを示した<sup>10)</sup>。しかし、ヒトの血小板をラットのそれと同様に処理しても肝細胞の増殖を促進する活性は得られず、ヒトの体液中にこのような肝再生因子が存在するか否かについてはその時点では全く不明で、ヒトにはそのような因子はないという意見の方がむしろ主流であった。なお、肝再生因子に hepatocyte growth factor という名称を用いたのは、ラット血小板由来の因子を部分精製した Bucher らのグループが最初であり、我々もこの名称を踏襲した。

このような背景の下で、我々(鹿児島大学歯学部口腔生化学講座と医学部内科学第二講座の肝臓グループ)は、「ラットにあるものはヒトにもあるはず」という単純な発想で1984年からヒト HGF の共同研究に着手した。試料は種々の肝疾患患者血清、活性測定系はラットの初代培養肝細胞である。しかし、期待するような positive な結果はなかなか得られず、肝疾患患者血清のスクリーニングを始めてほぼ1年後、もうこの研究は止めようかと話し合っている時に、偶然にも第二内科に緊急入院した劇症肝炎の患者があり、その血清中に肝細胞のDNA合成を強く促進する因子が存在することを発見したのである<sup>11)</sup>(図2)。劇症肝炎は、70~80%の肝細胞が急速に壊死に陥ることに

表1 HGF研究の歴史

---

1931: ラットの部分肝切除法の確立 <sup>1)</sup> .
1967: 部分肝切除ラット血液中に肝再生促進因子が存在することを示唆 <sup>2)</sup> .
1969: ラットの初代培養肝細胞調製法の確立 <sup>3)</sup> .
1982: ラットの初代培養肝細胞を用い、部分肝切除ラット血清が正常ラット血清より DNA 合成促進活性が高いことを報告 <sup>4)</sup> .
1982: ラットの血小板に HGF 活性が存在することを発見 <sup>5)</sup> .
1984: 部分肝切除ラット血清からの HGF 部分精製。 分子量 12 万以上と 3000 以下の 2 種類がある <sup>7)</sup> 。 分子量 15 万以上 <sup>8)</sup> .
1985: 劇症肝炎患者血清中に HGF 活性が出現することを発見 <sup>11)</sup> .
1986: 劇症肝炎患者血漿から、分子量約 85,000 (ヘテロダイマー) のヒト HGF を精製 <sup>12)</sup> .
1986: ラット血小板から分子量 27,000 (シングルペプチド) の HGF を精製 <sup>13)</sup> .
1987: ラット血小板 HGF の分子量を約 85,000 のヘテロダイマーと訂正 <sup>15)</sup> .
1988: ヒト HGF 精製の英文発表 <sup>14)</sup> .
1989: ヒト HGF の cDNA クローニングと 1 次構造の決定 <sup>17)</sup> .
1989: ヒト HGF の cDNA クローニングと 1 次構造の決定 <sup>18)</sup> .
1991: HGF ELISA の開発 <sup>27)</sup> .
1991: HGF と SF が同一タンパク質であることを同定 <sup>20)</sup> .
1991: HGF がヒト肝細胞の増殖も促進することを証明 <sup>20)</sup> .
1991: HGF が種々の上皮系および内皮系細胞に対する増殖因子であることを証明 <sup>21)</sup> .
1991: HGF と Tumor Cytotoxic Factor が同一タンパク質であることを証明 <sup>22)</sup> .
1991: HGF 受容体の一つが c-Met 原がん遺伝子産物であることを発見 <sup>27,28)</sup> .

---

太字は、我々のグループ (共同研究を含む) によるものを示す。

よる肝性昏睡を伴う重篤な肝不全症であって、これは前述の 2/3 部分肝切除ラットに匹敵することから、このような状態で血清中に HGF が出現することは、後で考えれば当然のことであったが、その当時は我々も含めて誰も全く気付かなかったことである。

我が国では、劇症肝炎の治療法の一つに血漿交換が行われている。そこで我々は、この血漿交換療法時に得られる患者血漿から HGF の精製を試み、約 1 年後の 1986 年に成功した。すなわち、HGF は分子量約 6 万の重鎖と約 3 万の軽鎖が S-S 結合した分子量約 9 万のヘテロダイマーであり、肝細胞に対する増殖因子としてそれまで知られていた上皮増殖因子 (EGF) やインスリンとは相加的あるいは相乗的に作用することから、これら既知の増殖因子とは異なる新しい因子であることを明らかにして、特許を出願すると共に、その年の日本生化学会大会で発表した<sup>12)</sup>。一方、ほぼ同時期に Nakamura ら<sup>13)</sup> (徳島大学、後九州大学、現大阪大学) は、ラット血小板から HGF の精製に成功し、その分子量は約 27,000 のシングルペプチドであると発表した。

その当時、「増殖因子はシングルペプチドで、分子量は数千からせいぜい 3 万まで」というのが一般的な常識であった。従って、我々の発表は「そんなに大きい増殖因子があるはずはない。ヘテロダイマーの軽鎖と称している 3 万の部分が活性部分で、未だ精製不十分なのであろう」と、学会などで強く批判された。我々の結果を投稿した英文誌の referee も同様で、「Nakamura らのラット HGF と比較せよ」などと無理難題を言ってきた閉口したが、ようやく 1987 年 8 月に accept された。しかし、それから印刷さ

れるまでにまた約半年かかり、英文による公表は 1988 年になってしまった<sup>14)</sup>。また、その頃には Nakamura ら<sup>15)</sup> もラット血小板の HGF は、分子量約 9 万のヘテロダイマーであると訂正する論文を発表し、さらにウサギの血清からも、我々が報告した HGF と同様のサブユニット構造を持つ HGF が精製されて<sup>16)</sup>、我々の主張がようやく世の中に認められるようになった (表 1 参照)。

## 2. HGF の構造

HGF の精製競争が終わり、次は何処が cDNA をクローニングするかが競走になった。その HGF cDNA は、1989 年に二つのグループからほぼ同時に発表された。その一つは、我々が関西医科大学の喜多村 直実教授 (現東京工業大学) と三菱化学総合研究所 (当時) との共同研究によって得たものであり<sup>17)</sup>、もう一つは Nakamura らのグループと東洋紡研究所との共同研究によるものである<sup>18)</sup>。

我々は、精製 HGF 標品の部分アミノ酸配列に基づいてプローブを作ったが、どの臓器の cDNA library を使うかが大きな問題であった。それまでに我々は HGF の抗体を調製することに成功しており、これを用いて HGF の産生細胞を免疫染色で検索していたが、positive な結果が得られていたのは脾臓のみであったため、HGF の産生臓器は脾臓と考えていた。しかし、脾臓の cDNA library からはどうしても positive なクローンが得られず、最終的には喜多村教授の判断でヒト胎盤 cDNA library を用いることになり、これが成功したのである<sup>17)</sup> (図 3)。

一方、Nakamura らは東洋紡研究所との共同研究によ

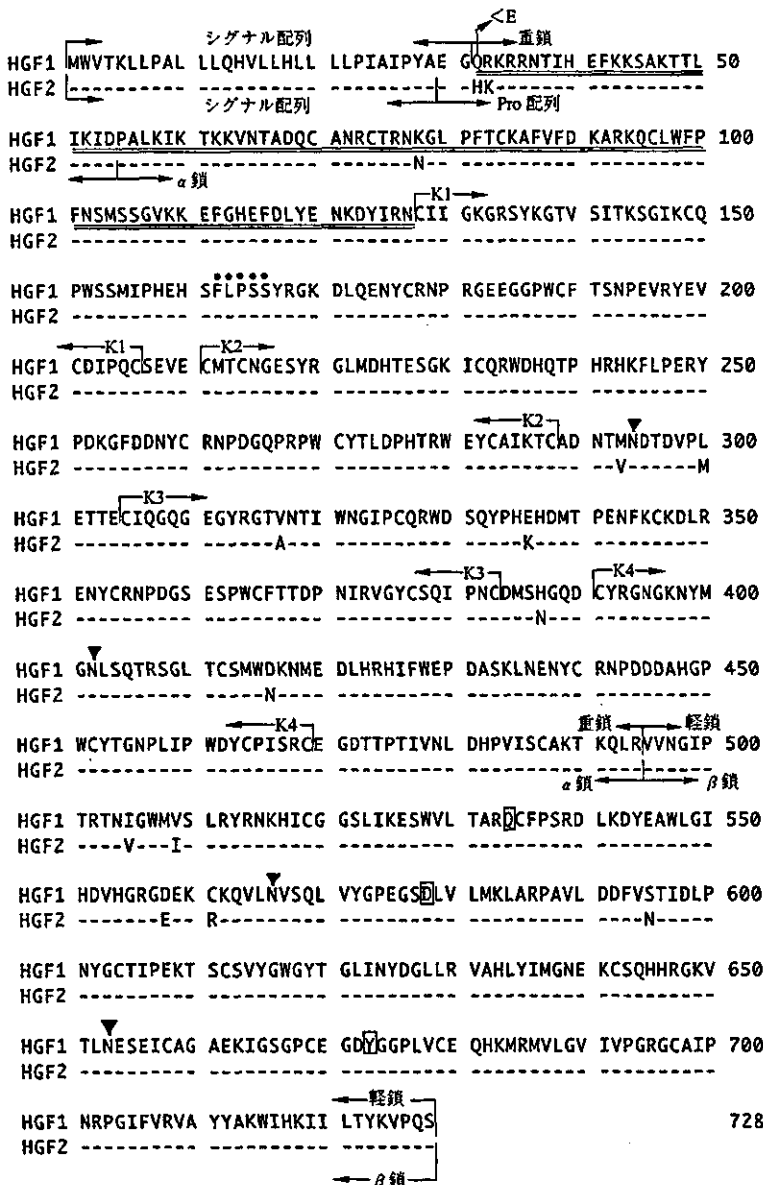


図3 2種のHGF cDNAから推測されるHGFのアミノ酸配列

上段(HGF 1)は、我々のグループの報告(Miyazawaら<sup>17)</sup>)によるもの、下段(HGF 2)は、Nakamuraら<sup>18)</sup>の報告によるものを示すが、HGF 2のうちHGF 1と同一アミノ酸残基は、-で示した。また、HGF 2では、α鎖のN末端をPro<sup>55</sup>とし、その上位をシグナル配列とPro配列に分けているが、実際のN末端はHGF 1に示したように、Gln<sup>32</sup>に由来するピログルタミン酸である(本文参照)。二重下線、へパリン結合部位；<E, ピログルタミン酸；K1~K4, クリングル構造相当部位(図4参照)；●, dHGFで欠損しているアミノ酸残基；▲, N-結合型糖鎖結合相当部位；□, プラスミンにおけるセリンプロテアーゼ活性中心相当部位。

り、ラット血小板由来の精製HGFの部分アミノ酸配列からプローブを合成し、ヒト肝臓のcDNA libraryからクローニングを行ったと発表した<sup>18)</sup>。しかし、Nakamuraらが得たHGF cDNAを我々のものと比較すると、その塩基配列から推定されるHGFの1次構造は、総アミノ酸の数では728個と一致するものの、このうち14個のアミノ酸に相違が認められる(図3)。この相違の真の理由は明らかではないが、その後東洋紡のグループは、ヒト白血球のcDNA libraryから我々が得たcDNAと同一の塩基配列を持つものと、483~497番目の15塩基が欠如しているもの(deleted variant HGF, dHGF)の2種のHGF cDNAを得ている<sup>19)</sup>(図3参照)。また、後述するようにドイツのBirchmeierのグループ<sup>20)</sup>も東洋紡のグループがヒトの白血球から得た2種のcDNAと同じ配列を持つ

HGFのcDNA(MRC-5細胞由来)のクローンを得ており、NIHのAaronsonのグループ<sup>21)</sup>はヒト胎児繊維芽細胞(M426)からHGFと同一の増殖因子を精製したが、そのcDNAの塩基配列も我々の得たものと完全に一致している。さらに、雪印乳業生物科学研究所(当時)のHigashioのグループ<sup>22)</sup>が得たtumor cytotoxic factorは、次項で述べるようにHGFと同一タンパク質であるが、このcDNA(IMR-90細胞由来)も、やはり483~497番目の15塩基が欠如しているものの、他は我々が得たcDNAと同一の塩基配列である。このように、我々が1989年に発表したHGFの1次構造は、その後四つの独立したグループからconfirmされていることになるが、Nakamuraらが得たとするヒトHGF cDNAの配列は、その後もconfirmされていない。なお、Nakamuraらも、

今は HGF の 1 次構造として我々が得たものと同じアミノ酸配列に訂正したものを、彼らが発表した論文<sup>18)</sup>を引用して記載している。

また、HGF の重鎖 N 末端アミノ酸について、Nakamura らは 55 番目の Pro であると報告しており<sup>18)</sup>、これが一般に信じられていた。我々は、55 番目の Pro より上位の配列が精製 HGF に含まれていることから、これが誤りであることは分かっていたが、重鎖 N 末端アミノ酸は修飾されているらしく、通常の方法ではどうしても同定出来なかった。そこで、最終的には FAB マススペクトロメーターを用い、劇症肝炎患者血漿から精製した HGF と、その頃発現に成功した組換え体 HGF の重鎖 N 末端アミノ酸を解析した結果、いずれも Met から数えて 32 番目の Gln が環状化したピログルタミン酸であることを明らかにした<sup>23)</sup> (図 3)。その後 Nakamura らも、重鎖 N 末端アミノ酸をピログルタミン酸に訂正したが、その根拠は示していない。

上記の結果、HGF は 31 アミノ酸残基からなるシグナルペプチドに続く 463 アミノ酸残基の重鎖と、234 アミノ酸残基の軽鎖 (Nakamura ら<sup>18)</sup>は、それぞれ  $\alpha$  鎖、 $\beta$  鎖と命名している。図 3) が 1 本の mRNA からまず不活性型のシングルペプチドである pro-HGF として合成された後、Arg<sup>494</sup> と Val<sup>495</sup> 間でプロセッシングを受け、生物学的な活性のある成熟型のヘテロダイマーに転換されること

が明らかとなった。なお、免疫染色で HGF の産生細胞を同定出来なかった原因は、上記のように HGF は不活性型のシングルペプチドとして合成、分泌され、細胞外でプロセッシングを受けて活性型 (成熟型) のヘテロダイマーへ転換されるのであるが、我々が用いていた抗体は成熟型の HGF にしか反応しないものであったためと考えている。また、pro-HGF に特異的な抗体は現在でもなお得られていないため、HGF の産生細胞を同定するためには *in situ* hybridization しかない。産生細胞を、免疫染色で同定したとする発表を今でも時に見かけるが、これは信頼性に欠けることを付け加えておきたい。

この cDNA から推定される HGF のアミノ酸配列と既知のタンパク質のそれとの相同性を比較したところ、プラスミノゲンなどの凝固線溶系のタンパク質と高い相同性が認められ、特にプラスミノゲンは Cys の位置もほぼ一致した。図 4 は、ヒトのプラスミノゲンの構造から推定した HGF の構造である。このうち、重鎖 N 末端付近には 2 個の S-S 結合からなるヘアピンループが存在し、このヘアピンループを含む部位はヘパリンに対する親和性が高い。Pro-HGF はこの部位で細胞外基質に結合していると考えられている<sup>24)</sup>。ヘパリン結合部位に続くクリングル構造は、3 個の S-S 結合を基に描かれた平面構造が北欧のクリングルビスケットに似ていることから命名されたもので、血液凝固線溶系のタンパク質によく見られ、タンパ

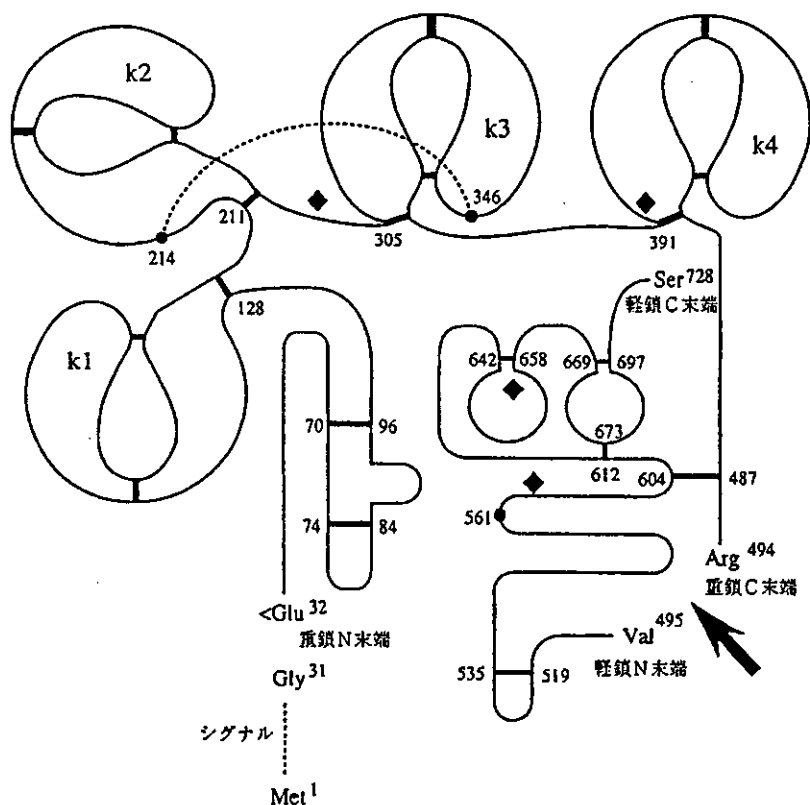


図 4 プラスミノゲンの構造から推定したヒト HGF の構造  
数字は、タンパク質合成開始部位のメチオニンから数えたアミノ酸残基の番号を示す。1 本の mRNA から合成された pro-HGF は、↑の部位で HGFA などによりプロセッシングを受けて、活性化される。●、S-S 結合部位；<Glu, ピログルタミン酸；k1~k4, クリングル構造；●, Cys 残基；◆, N-結合型糖鎖結合部位。

ク質間の相互作用に重要なドメインと推定されている。HGFでは、このクリングル構造が4個あり、受容体(c-Met)との結合に重要な役割を果たしていると考えられている。

また、このpro-HGFは、プラスミノゲンと同様にArgとValの間がプロセッシングを受けて生物学的な活性のあるHGFに転換されるが、HGFの軽鎖のアミノ酸配列を見ると、セリンプロテアーゼの活性中心であるHis, Asp, Serのうち、HGFではHisとSerが他のアミノ酸と置換しているため(図3)、プロテアーゼとしての活性はない。しかし、このようなHGFと凝固線溶系のタンパク質との高い相同性は、HGFが生物進化の過程で、この凝固線溶系の遺伝子を利用して獲得されたものと推定される。またこの推定は、後述するHGFの活性化機構と凝固線溶系との類似性からも裏付けられる。

### 3. HGFの多様な生物活性

我々がこの研究を始めた当初、HGFは肝細胞に特異的な増殖因子と考えていたが、1991年に至り、HGFには多様な生物活性のあることが次々と明らかにされた。その一つは、HGFが細胞分散因子(scatter factor, SF)と同一タンパク質であることの証明である<sup>20)</sup>。

1990年の春に、Essen大学(その頃はまだ西独)がん研究所のWalter Birchmeier教授(現Max-Delbrück-Centrum, Berlin)から「がんの転移促進因子としてSFの研究をしているが、これを精製したところそちらのHGFとよく似ており、同じものではないかと思う。ついては、そちらのHGFを少し分けてくれないか」との手紙が突然来た。SFは、通常互いに固く結合している上皮細胞を個々に分散させ、さらに細胞に運動性を与える因子として、組織の発生やがん細胞の転移に関与していると考えられて、主としてヨーロッパで長く研究されていたものである。しかしその頃我々は、まだHGFは肝細胞に特異的な増殖因子と考えていたので、上皮細胞を分散させるというような奇妙な因子と同じはずがないと思ったが、Birchmeier教授の手紙によると、繊維芽細胞の培養上清から精製されたそのSFは、分子量約3万と6万のヘテロダイマーということなので、確かによく似ている。そこで、この際HGFとSFは異なるタンパク質であることを証明することも良いかと思い、試料を互いに交換するという条件で共同研究することにして、劇症肝炎患者血清から精製したHGFを送り、先方からも早速SFが送られて来た。これをお互いの活性測定系にのせて測定したところ、SFは肝細胞増殖促進活性を、HGFは細胞分散活性を示し、しかもタンパク質重量あたりのspecific activityまで見事に一致したのである。さらにBirchmeier教授の研究室では、その後SF cDNAの分子クローニングを行い、これも

HGFのそれと完全に一致した<sup>20)</sup>。

一方、東尾侃二博士ら(雪印乳業生物科学研究所, 現埼玉医科大学)が、ある種のがん細胞に対して増殖抑制的に働く因子(その後の研究により、これはアポトーシスを促進することによるものであることが明らかにされている<sup>25)</sup>)として研究を進めていたtumor cytotoxic factorも、HGFと同一タンパク質であることが証明され<sup>22)</sup>、米国NIHのAaronsonのグループが、広く上皮系および内皮系の細胞に対する増殖因子として研究を進めていた因子(fibroblast-derived mitogen)も、1991年にHGFと同一タンパク質であることが明らかとなった<sup>21)</sup>。また、HGF及びその遺伝子組換え体は、ヒトの肝細胞増殖も促進することが、英国BirminghamのQueen Elizabeth Hospital, Strain博士との共同研究により同年に証明された<sup>26)</sup>。この事実は、同年の初めに我々が開発したHGF ELISA<sup>27)</sup>と共に、その後のHGF臨床応用研究進展に大きな弾みとなった。

さらに、HGFの受容体が、c-Metと呼ばれる原がん遺伝子産物であることも1991年に明らかとなった<sup>28,29)</sup>。従って、1991年以降HGFという一つのペプチド性因子は、一つの受容体を介して多種多様な生物活性を発現する広範囲・多機能型サイトカインの一つとして認識されるようになり、肝臓のみならず、種々の組織の再生、修復に不可欠の因子と考えられるようになったのである。表1は、ここまでのHGF研究の歴史をまとめたものである。

このような多様な生物活性のあるHGFの受容体の一つということは、c-Met以降の標的細胞内でのシグナル伝達経路が多様であることを意味している。c-MetにHGFが結合すると、c-Metの膜貫通型β鎖細胞内領域に存在するチロシンキナーゼが活性化され、次いでそのC末端に位置する多機能型結合部位(multifunctional docking domain)中のチロシン残基(特にTyr<sup>1348</sup>とTyr<sup>1356</sup>)が、自己リン酸化され、さらにSH2ドメインを持つ種々のシグナル伝達物質がここに結合して、以降の多様なシグナルを伝達すると考えられている。これらについても多くの報告があるが、ここでは省略する。詳細は、その方面の総説など<sup>30-32)</sup>を参照されたい。また、文献32)はHGFが持つ生物活性のうち、特にSF活性について述べた優れた総説でもある。

### 4. HGFの産生誘導と活性化

HGFとSFが同一タンパク質であることを証明した上記の論文<sup>20)</sup>は、別に二つの大きな価値があった。その一つは、これまで肝臓学者には興味を持たれていたものの、その数は少なかったHGF研究者が、この論文発表以来多数の細胞生物学やがん医学の研究者がHGF研究に参画してきたことである。またもう一つは、それまで不明であっ



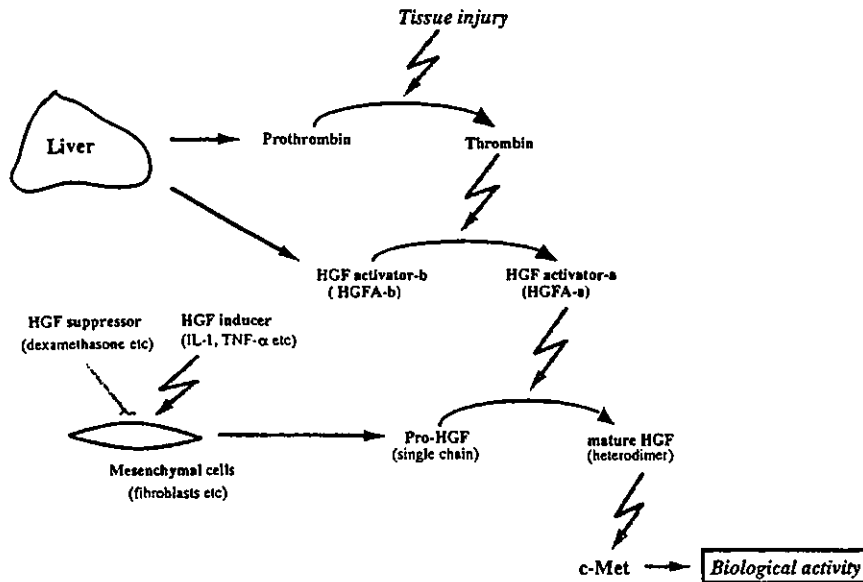


図5 HGF 活性化のカスケード機構

ProthrombinとHGFAの前駆体 (pro-HGFA, HGFA-b) は、肝臓で合成され、血中に分泌されて循環している。一方不活性型のHGF (pro-HGF) は、繊維芽細胞などの間葉系細胞で合成され、細胞外基質に結合している。組織の傷害などで血液凝固系が活性化されると、prothrombinがthrombinに活性化され、thrombinがHGFAを活性化 (HGFA-a) する。このHGFA-aはヘパリンに親和性が高く、活性化された部位の細胞外基質に結合して、その部位のpro-HGFを活性型のHGFに転換する。次いで、HGFが上皮細胞などの受容体 (c-Met) に結合し、種々の生物学的な活性を現す。

たHGFの産生細胞が、主に間葉系の細胞 (例えば繊維芽細胞) であると判明したことである。これを受けて我々は、HGFの誘導因子の研究に着手し、繊維芽細胞でのHGF産生がIL-1やTNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインで誘導されることを初めて明らかにした<sup>33)</sup>。さらにその後、多くのHGF産生誘導因子が示されたが<sup>31)</sup>、我々は、口腔内細菌の菌体成分もHGF産生を誘導することを明らかにし、HGFが歯科医学領域においても重要な生理活性物質であることを初めて示した<sup>34,35)</sup>。

前述したように、HGFは1本のmRNAから生物学的な活性を持たないpro-HGFとして産生され、その後プロセッシングを受けて生物学的な活性のある成熟型 (ヘテロダイマー) HGFとなる。このプロセッシングは、HGFの産生細胞内で起こると考えられていたが、その後、細胞からはpro-HGFとして分泌されることが明らかとなり、我々は、この細胞外でHGFを活性化する因子がurokinaseであると1992年に発表した<sup>36)</sup>。しかし、その約1年後にMiyazawa<sup>37)</sup>らはpro-HGFに対してurokinaseよりはるかに活性の高い新規のセリンプロテアーゼを血清中に発見し、HGF-activator (HGFA) と命名した。現在では、HGF活性化の主役はこのHGFAと考えられている。

このHGFAも不活性型のpro-HGFAとして、主として肝臓で合成され、血中に分泌された後、thrombinなどによりプロセッシングを受けると活性型のHGFAとなる<sup>38)</sup>。すなわち、HGFは血液凝固系のセリンプロテアーゼカスケード反応を介して活性化されるのであるが、さらに興味深いことに、pro-HGFAはヘパリンに対して親和性が低く、反対に活性型HGFAはヘパリンに対して親和性が高い<sup>38)</sup>。前項で記したように、pro-HGFはヘパリン

に対する親和性が高いため、細胞外基質と結合していると考えられていることから、HGFAはthrombinなどにより活性化された局所で細胞外基質と結合し、その部位のpro-HGFを活性化して、近傍のc-Metを発現している上皮系あるいは内皮系の細胞に対してパラクリン的に作用し、組織の再生、修復に関与していると考えられる (図5)。またHGFAは、肝臓以外でもいくつかの上皮細胞で産生されていることも明らかにされている<sup>39,40)</sup>。

##### 5. 歯科医学領域を中心としたHGFの生理的意義

HGFと同一タンパク質と同定されたSFは、前述したように、胚の形成過程に関与する因子として研究されていたものである。Sonnenbergら<sup>41)</sup>は、マウス発生期の種々の臓器でHGFが間葉系組織で発現し、c-Metはその近傍の上皮組織で発現していることを明らかにして、HGFは上皮-間葉相互作用のmediatorであることを初めて示唆した。その後HGF欠損マウスが作られたが、このいわゆるHGFノックアウトマウスは胎生13~16日目にすべて死に至る<sup>42,43)</sup>。この事実は、HGFが種々の臓器の発生に不可欠の因子であることを示すものである<sup>31)</sup>。

歯の発生においても同様であって、HGFは歯胚の歯乳頭細胞に、c-Metは内エナメル上皮細胞に発現して、正常な歯胚の形成に関与している。Tabataら<sup>44)</sup>は、歯胚の器官培養系を用いて、HGFの発現を抑制すると異常な形態 (いわゆる 'inside-out') の歯胚が形成されることを報告した。また、歯胚の形成期ではc-Metが歯乳頭の細胞にも発現しており、HGFがオートクリン的に歯乳頭の発育にも関与していると考えられる<sup>45)</sup>。さらに最近我々は、舌の発生、発育にもHGFが重要な役割を果たしていることを明らかにしている<sup>46)</sup>。

表2 高感度 HGF ELISA (検出感度 2 pg/ml)<sup>49)</sup> による種々のヒト体液中の HGF 濃度

体液	疾患	例数	HGF 濃度 (pg/ml)	文献
血清	健常	138	244±65	(49)
	劇症肝炎	46	12,140±14,420 <sup>*1</sup>	(16, 47)
脳脊髄液	対照疾患 <sup>*2</sup>	15	34.1±11.9	(56)
	アルツハイマー病	34	59.9±16.9	(56)
歯肉溝滲出液	健常歯肉	9	1,700±730	(40)
	歯周疾患	13	3,230±1,010	(40)
尿	健常	19	(pg/mg creatinine) 19.3±7.1	(49)

数値は平均±SD。

<sup>\*1</sup>市販の HGF ELISA (検出感度 200 pg/ml) で測定。

<sup>\*2</sup>神経障害および筋障害疾患。

体液中の HGF 濃度は、種々の生理的あるいは病理的な条件、特に組織の炎症時に上昇する。このうち、最も顕著なものは劇症肝炎時の血中濃度であって、劇症肝炎の診断に応用されているが<sup>27)</sup> (表2)、この他にも種々の肝疾患の際に血中 HGF の上昇が認められている<sup>16,47)</sup>。このような炎症あるいは組織の再生時での HGF の上昇は、炎症性サイトカインなどによる HGF 産生誘導に由来すると考えられ、生体防御反応の一つとして、傷害を受けた組織の修復、再生に関与していると考えられている。特に、口腔内の粘膜組織は皮膚などに比べて傷の治癒が早く、また瘢痕形成が少ないことは古くから知られている事実であるが、その理由について口腔内の粘膜細胞での HGF 発現が皮膚などの細胞に比べ、より高いことが最近報告されており<sup>48)</sup>、HGF を口腔領域疾患の治療薬として応用し得る可能性を示唆している。

上記のように、組織に炎症や傷害が起こると HGF の産生が誘導されることは、種々の臓器で HGF mRNA レベルの上昇により確認されているが<sup>31)</sup>、その局所でどの程度 HGF 濃度が上昇しているか、実際に測定した報告はない。我々は、歯周疾患患者の歯肉溝滲出液中に、その炎症の程度に応じて局所で産生される HGF 濃度が反映しているのではないかと考えた。しかし、採取量が 10~20  $\mu$ l という微量な歯肉溝滲出液の HGF 濃度を測定することは、我々が以前に開発し<sup>27)</sup>、現在市販されている HGF ELISA (大塚製薬、測定感度 200 pg/ml) では不可能である。そこで我々は、先ず高感度 HGF ELISA (測定感度 2 pg/ml) を開発し<sup>49)</sup>、これを用いて歯肉溝滲出液中の HGF 濃度を測定したところ、健常歯肉では 1.7 ng/ml、また歯周疾患歯肉では 3.2 ng/ml であった<sup>40)</sup> (表2)。この濃度は、*in vitro* の系で歯肉上皮細胞の増殖を促進するに十分なものである<sup>34)</sup>。またこの結果は、健常者血清中の HGF 濃度が約 0.2 ng/ml (表2)であることを考え合わせると、歯肉で実際に HGF が産生され、さらに炎症部位ではその産生が他の組織と同様に、種々のサイトカイン<sup>33)</sup>や PGE<sub>2</sub><sup>50)</sup>

あるいは口腔内細菌の菌体成分<sup>34,35)</sup>などで誘導されていることを示している。ただ、歯周疾患では、上皮の増殖が疾患をかえって増悪させることも考えられるため、この HGF の産生誘導が生体防御反応なのか、あるいはその反対なのかは議論の分かれるところであろう。しかし、HGF は強い血管新生作用も有することから、我々は HGF が歯周疾患の修復に働いていると考えている。

## 6. HGF の臨床応用

HGF の臨床応用には、1. HGF 濃度測定による診断、2. HGF の投与、3. HGF 遺伝子治療、が考えられる。このうち、HGF 濃度測定による診断については前項で述べたように、劇症肝炎の早期診断や予後診断に 1993 年から応用されている。また前項で述べた高感度 HGF ELISA を用いると、歯肉溝滲出液や脳脊髄液など量の少ない試料や、尿などの HGF 濃度が低い試料も濃縮操作なしに測定可能となった (表2)。これまでのところ、これらの試料を用いた診断は、有効な cut off 値が設定出来ないために実際の臨床応用に至ってはいないが、さらに多種の体液中 HGF レベルの変動が、疾患の診断に応用されることも可能となろう。

我々がヒトの HGF を発見して約 20 年が経過した。この間に、遺伝子組換え体 HGF が 1995 年から Sigma などから試薬として市販され、肝疾患、腎疾患、血管病変などの実験動物疾患モデルにこの遺伝子組換え体を投与、あるいは HGF 遺伝子を導入すると、症状の改善、死亡率の低下など、投与の有効性が数多く報告されており、特に肝不全や肝硬変のモデル動物には、死亡率低下、繊維化抑制に有効と報告されている<sup>51-53)</sup>。しかし、その臨床応用はまだ緒についたばかりである。このうち組換え体 HGF を用いる試みは、劇症肝炎、成人生体肝移植、肝硬変を対象にした「HGF 肝再生医療プロジェクト」(研究代表者：坪内博仁)が京都大学医学部附属病院探索医療センターの流動プロジェクトの一つとして、2002 年 7 月に発足した。

一方、HGF 遺伝子治療については、大阪大学の森下ら<sup>54)</sup>が閉塞性動脈硬化症などに導入する試みで成果を挙げており、近いうちに実用化が期待されている。また、海外（特にヨーロッパ）では、組換え体 HGF を用いた人工肝臓の開発も進んでいる。これらの研究がさらに発展し、HGF の臨床応用が1日も早く実現することを願うと共に、今後は歯科医学への応用もますます進展するものと期待している。

初めに記したように、鹿児島大学における HGF 研究は、医学部内科学第二講座と歯学部口腔生化学講座との共同研究により始められたもので、特に当時の医学部内科学第二講座主任教授橋本修治先生には、物心両面から大変お世話になった。心から感謝する。また本研究の遂行にあたっては、合田栄一助教授（現岡山大学薬学部）らによる劇症肝炎患者血漿からの HGF の精製<sup>12,14)</sup>、故申貞均博士（大塚製薬診断事業部）らによる HGF ELISA の開発<sup>27)</sup>、喜多村直美教授（関西医科大学肝臓研究所、現東京工業大学生命理工学部）らによる HGF cDNA のクローニング<sup>17)</sup>、菱田忠士博士、石井健久博士（三菱化成総合研究所、現三菱ウエルファーマ横浜研究所）らによる組換え体 HGF の発現<sup>23)</sup>、W. Birchmeier 教授（Essen 大学がん研究所、現ベルリン MDC 分子医学研究所）らによる HGF と SF が同一タンパク質であることの証明<sup>20)</sup>、A. J. Strain 博士（英国 Queen Elizabeth Hospital 肝臓研究部、現 Birmingham 大学教授）らによるヒトの肝細胞を用いた共同研究<sup>26,55)</sup>が、それぞれ大きなマイルストーンとなっていることを付記して、感謝する。なお、我々の HGF 研究の一部は、文部省（文部科学省）及び日本学術振興会の科学研究費補助金（一般研究、基盤研究、がん特別研究、特定領域研究など）、及びいくつかの民間企業からの奨学寄付金により遂行された。併せて感謝する。

#### 文 献

- 1) Higgins, G.M. & Anderson, R.M. (1931) *Arch. Pathol.* **12**, 186-202
- 2) Moolten, C.D.G. & Bucher, N.L.R. (1967) *Science* **158**, 272-274
- 3) Berry, M.N. & Friend, D.S. (1969) *J. Cell Biol.* **43**, 506-520
- 4) Seglen, P.O. (1975) *Meth. Cell Biol.* **13**, 29-83
- 5) McGowan, J.A. (1986) Hepatocyte proliferation in culture. in *Isolated and Cultured Hepatocytes* (Guillouzo, A. & Guguen-Guillouzo, C. eds.) pp. 13-38, John Libbey Eurotext, Montrouge
- 6) Michalopoulos, G., Cianciulli, H.D., Novotny, A.R., Kligerman, A.D., Strom, S.C., & Jirtle, R.L. (1982) *Cancer Res.* **42**, 4673-4682
- 7) Michalopoulos, G., Houck, K.A., Dolan, M.L., & Luettker, C. (1984) *Cancer Res.* **44**, 4414-4419
- 8) Nakamura, T., Nawa, K., & Ichihara, A. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122**, 1450-1459
- 9) Strain, A.J., McGowan, J.A., & Bucher, N.L. (1982) *In Vitro* **18**, 108-116
- 10) Russel, W.E., McGowan, J.A., & Bucher, N.C.R. (1984) *J. Cell. Physiol.* **119**, 183-192
- 11) Nakayama, H., Tsubouchi, H., Gohda, E., Koura, M., Nagahama, J., Yoshida, H., Daikuhara, Y., & Hashimoto, S. (1985) *Biomed. Res.* **6**, 231-237
- 12) 合田栄一, 中山宏幸, 弘野修一, 坪内博仁, 崎山 修, 橋本修治, 大工原恭 (1986) *生化学*, **58**, 906
- 13) Nakamura, T., Teramoto, H., & Ichihara, A. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 6489-6493
- 14) Gohda, E., Tsubouchi, H., Nakayama, H., Hirono, S., Sakiyama, O., Takahashi, K., Miyazaki, H., Hashimoto, S., & Daikuhara, Y. (1988) *J. Clin. Invest.* **81**, 414-419
- 15) Nakamura, T., Nawa, K., Ichihara, A., Kaise, N., & Nishino, T. (1987) *FEBS Lett.* **224**, 311-316
- 16) Tsubouchi, H., Gohda, E., Strain, A.J., & Daikuhara, Y. (1993) The role of HGF-SF in animal and human hepatic physiology and pathology. in *Hepatocyte Growth Factor-Scatter Factor and the c-MET Receptor* (Goldberg, I.D. & Rosen, E. eds) pp. 251-273, Birkhäuser Verlag, Basel
- 17) Miyazawa, K., Tsubouchi, H., Naka, D., Takahashi, K., Okigaki, M., Arakaki, N., Nakayama, H., Hirono, S., Sakiyama, O., Takahashi, K., Gohda, E., Daikuhara, Y., & Kitamura, N. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**, 967-973
- 18) Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugimura, A., Tashiro, K., & Shimizu, S. (1989) *Nature* **342**, 440-443
- 19) Seki, T., Ihara, I., Sugimura, A., Shimonishi, M., Nishizawa, T., Asami, O., Hagiya, M., Nakamura, T., & Shimizu, S. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**, 321-327
- 20) Weidner, K.M., Arakaki, N., Hartmann, G., Vandekerckhove, J., Weingart, S., Rieder, H., Fonatsch, C., Tsubouchi, H., Hishida, T., Daikuhara, Y., & Birchmeier, W. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7001-7005
- 21) Rubin, J.S., Chan, A.M.-L., Bottaro, D.P., Burgess, W.H., Taylor, W.G., Chech, A.C., Hirschfield, D.W., Wong, J., Miki, T., Finch, P.W., & Aaronson, S.A. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 415-419
- 22) Shima, N., Nagao, M., Ogaki, F., Tsuda, E., Murakami, A., & Higashio, K. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**, 1151-1158
- 23) Yoshiyama, Y., Arakaki, N., Naka, D., Takahashi, K., Hirono, S., Kondo, J., Nakayama, H., Gohda, E., Kitamura, N., Tsubouchi, H., Ishii, T., Hishida, T., & Daikuhara, Y. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**, 660-667
- 24) Aoyama, H., Naka, D., Yoshiyama, Y., Ishii, T., & Kondo, J. (1997) *Biochemistry* **36**, 10286-10291
- 25) Arakaki, N., Kajihara, T., Arakaki, R., Ohnishi, T., Kazi, J.A., Nakashima, H., & Daikuhara, Y. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 13541-13546
- 26) Strain, A.J., Ismail, T., Tsubouchi, H., Arakaki, N., Hishida, T., Kitamura, N., Daikuhara, Y., & McMaster, P. (1991) *J. Clin. Invest.* **87**, 1853-1857
- 27) Tsubouchi, H., Niitani, Y., Hirono, S., Nakayama, H., Gohda, E., Arakaki, N., Sakiyama, O., Takahashi, K.,

- Kimoto, M., Kawakami, S., Setoguchi, M., Tachikawa, T., Shin, S., Arima, T., & Daikuhara, Y. (1991) *Hepatology* 13, 1-5
- 28) Naldini, L., Weidner, M., Vigna, E., Gaudino, G., Bardelli, A., Ponzetto, C., Narsimhan, R., Hartmann, G., Zarnegar, R., Michalopoulos, G., Birchmeier, W., & Comoglio, P.M. (1991) *EMBO J.* 10, 2867-2878
- 29) Bottaro, D.P., Rubin, J.S., Faletto, D.L., Chen, A.M.-L., Kmiecik, T.E., Vande Woude, G.F., & Aaronson, S.A. (1991) *Science* 251, 802-804
- 30) Schaeper, U., Gehring, N., Fuchs, K., Sachs, M., Kempkes, B., & Birchmeier, W. (2000) *J. Cell Biol.* 149, 1419-1432
- 31) Ohnishi, T. & Daikuhara, Y. (2003) *Arch. Oral Biol.* 48, 797-804
- 32) Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., & Vande Woude, G.F. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 915-925
- 33) Tamura, M., Arakaki, N., Tsubouchi, H., Takada, H., & Daikuhara, Y. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 8140-8145
- 34) Sugiyama, A., Arakaki, R., Ohnishi, T., Arakaki, N., Daikuhara, Y., & Takada, H. (1996) *Infect. Immun.* 64, 1426-1431
- 35) Sugiyama, A., Ogawa, T., Daikuhara, Y., & Takada, H. (2000) *J. Med. Microbiol.* 49, 319-325
- 36) Naldini, L., Tamagnone, L., Vigna, E., Sachs, M., Hartmann, G., Birchmeier, W., Daikuhara, Y., Tsubouchi, H., Blasi, F., & Comoglio, P.M. (1992) *EMBO J.* 11, 4825-4833
- 37) Miyazawa, K., Shimomura, T., Kitamura, A., Kondo, J., Morimoto, Y., & Kitamura, Y. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 10024-10028
- 38) Shimomura, T., Kondo, J., Ochiai, M., Naka, D., Miyazawa, K., Morimoto, Y., & Kitamura, N. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 22927-22932
- 39) Matsubara, Y., Ishinose, M., Yahagi, N., Tsukada, S., Oka, M., Miki, K., Kimura, S., Omata, M., Shiokawa, K., Kitamura, N., Kaneko, Y., & Fukamachi, H. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 477-484
- 40) Kakimoto, K., Machigashira, M., Ohnishi, T., Kajihara, T., Semba, I., Setoguchi, T., Tamura, M., Izumi, Y., & Daikuhara, Y. (2002) *Arch. Oral Biol.* 47, 655-663
- 41) Sonnenberg, E., Meyer, D., Weidner, K.M., & Birchmeier, C. (1993) *J. Cell Biol.* 123, 223-235
- 42) Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E., & Birchmeier, C. (1995) *Nature* 373, 699-702
- 43) Uehara, Y., Minowa, O., Mori, C., Shiota, K., Kuno, J., Noda, T., & Kitamura, N. (1995) *Nature* 373, 702-705
- 44) Tabata, M.J., Kim, K., Liu, J.-G., Yamashita, K., Matsumura, T., Kato, J., Iwamoto, M., Wakisaka, S., Matsumoto, K., Nakamura, T., Kumegawa, M., & Kurisu, K. (1996) *Development* 122, 1243-1251
- 45) Kajihara, T., Ohnishi, T., Arakaki, N., Semba, I., & Daikuhara, Y. (1999) *Arch. Oral Biol.* 44, 135-147
- 46) Bandow, K., Ohnishi, R., Tamura, M., Semba, I., & Daikuhara, Y. (2004) *J. Cell. Physiol.* (in press)
- 47) 武藤泰敏ほか23名 (1992) 肝胆脾, 25, 541-549
- 48) Okazaki, M., Yoshimura, K., Uchida, G., & Harii, K. (2002) *J. Dermatol. Sci.* 30, 108-115
- 49) Ohnishi, T., Kakimoto, K., Hashida, S., Fujii, M., Hirono, S., Nishiyama, K., Amita, Y., Ishikawa, E., Tsubouchi, H., & Daikuhara, Y. (2000) *J. Immunol. Meth.* 244, 163-173
- 50) Ohnishi, T., Suwa, M., Oyama, T., Arakaki, N., Torii, M., & Daikuhara, Y. (2000) *J. Dent. Res.* 79, 748-755
- 51) 田村正人, 大工原恭 (2000) 蛋白質 核酸 酵素, 45(増刊号, 最先端創薬), 1152-1157
- 52) 井戸章雄, 坪内博仁 (2002) 日消誌, 99, 1436-1442
- 53) 石井健久, 佐藤真紀, 杉本次郎, 角張雅江, 川村 誠 (2003) 三菱ウエルファーマ研究年報, 3, 1-14
- 54) 青木元邦, 森下龍一, 萩原俊男 (2001) 日本臨床, 59, 2460-2469
- 55) Joplin, R., Hishida, T., Tsubouchi, H., Daikuhara, Y., Ayres, R., Neuberger, J.M., & Strain, A.J. (1992) *J. Clin. Invest.* 90, 1284-1289
- 56) Tsuboi, Y., Kakimoto, K., Nakajima, M., Akatsu, H., Yamamoto, T., Ogawa, K., Ohnishi, T., Daikuhara, Y., & Yamada, T. (2003) *Acta Neurol. Scand.* 107, 81-86

## Serologic Assessment of Type 1 and Type 2 Immunity in Healthy Japanese Adults

Brenda M. Birmann,<sup>1</sup> Nancy Mueller,<sup>1</sup> Akihiko Okayama,<sup>3</sup> Chung-Cheng Hsieh,<sup>1,5</sup> Nobuyoshi Tachibana,<sup>6</sup> Hirohito Tsubouchi,<sup>4</sup> Evelyne T. Lennette,<sup>7</sup> Donald Ham,<sup>2</sup> and Sherri Stuver<sup>1,8</sup>

Departments of <sup>1</sup>Epidemiology and <sup>2</sup>Immunology and Infectious Diseases, Harvard School of Public Health, Boston, Massachusetts; Departments of <sup>3</sup>Laboratory Medicine and <sup>4</sup>Internal Medicine II, Miyazaki Medical College, Miyazaki, Japan; <sup>5</sup>Division of Biostatistics and Epidemiology, University of Massachusetts Medical School Cancer Center, Worcester, Massachusetts; <sup>6</sup>Miyazaki Prefectural Nursing University, Miyazaki, Japan; <sup>7</sup>Nectandra Institute, San Ramon, Costa Rica; and <sup>8</sup>Department of Epidemiology, Boston University School of Public Health, Boston, Massachusetts

### Abstract

We assessed the informativeness of several serologic biomarkers of immune function using serum specimens collected in the Miyazaki Cohort Study from subjects who were seronegative for anti-human T-cell lymphotropic virus I and anti-hepatitis C virus. To broadly characterize type 1 immune status, we measured EBV antibody titers, because titer profiles associated with cellular immune suppression are well described. We also tested for three type 2 biomarkers: total serum IgE, soluble CD23, and soluble CD30. Nonreactivity to a tuberculin purified protein derivative (PPD) skin test is indicative of diminished delayed-type hypersensitivity (type 1) responsiveness in the study population due to a history of tuberculosis exposure or *Bacillus Calmette-Guérin* vaccination. We therefore evaluated the serologic markers as predictors of PPD nonreactivity using logistic regression. Subjects

whose EBV antibody profiles were consistent with deficient type 1 immunity were more than thrice as likely to be PPD nonreactive as persons with "normal" antibody titers. Elevated total IgE was also strongly associated with PPD nonreactivity (odds ratio 3.4, 95% confidence interval 1.2-9.9); elevated soluble CD23 had a weaker, but positive, odds ratio, whereas soluble CD30 levels were not predictive of PPD status. Therefore, PPD nonreactivity is associated, in this population, with a pattern of serum biomarkers that is indicative of diminished type 1 and elevated type 2 immunity. We conclude that, with the exception of soluble CD30, the serologic markers are informative for the characterization of type 1/type 2 immune status using archived sera from study populations of healthy adults. (Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2004;13(8): 1385-91)

### Introduction

The type 1/type 2 cytokine paradigm has been used to characterize immune system dysfunction in a variety of clinical conditions. In brief, type 1 cytokines include interleukin (IL)-12, IL-2, and interferon (IFN)- $\gamma$  and stimulate cellular immune responses (1-3), such as the delayed-type hypersensitivity response to recall antigens and the activation of cytotoxic T lymphocytes (2). In contrast, secretion of type 2 cytokines, which include IL-4, IL-10, and IL-13, leads to the activation of humoral immunity and antibody secretion (1-3). Stimulation of the humoral immune response results in the proliferation and differentiation of B lymphocytes and in the secretion of high levels of IgE (2, 3). In immunocompetent persons, cytokine secretion is tightly regulated and balanced, whereas type 1 and/or type 2 dysregulation may occur in cases of immune deficiency (1, 2).

We evaluated the informativeness of several serologic type 1 and type 2 biomarkers in the Miyazaki Cohort Study using the study's extensive serum repository. Due to the potential effects of freeze/thaw cycles (4, 5), we did not directly measure cytokines. Instead, we chose EBV serology to broadly characterize type 1 responses, because EBV antibody patterns indicative of cellular immune dysfunction are well described (6). For type 2 biomarkers, we measured serum levels of total IgE, soluble CD23 (sCD23), and soluble CD30 (sCD30). Elevated total IgE levels indicate an activated humoral immune response and secretion of IL-4 (1, 2). CD23 is a low-affinity receptor for IgE with limited expression on naïve cells (7, 8). In response to IL-4, the receptor is up-regulated on B lymphocytes and rapidly cleaved to the soluble molecule (7, 8). The presence of sCD23 in peripheral blood thus represents activated proliferating B cells and a type 2 cytokine milieu (8, 9). Likewise, CD30, a cytokine receptor of the tumor necrosis factor superfamily (10), has virtually no constitutive expression on resting or naïve cells (11, 12). The detection of sCD30 in human sera thus reflects the presence of activated proliferating type 2 helper T lymphocytes and increased IL-4 secretion (13, 14).

The present study population experienced community exposure to tuberculosis during the postwar period or

Received 1/7/04; revised 3/26/04; accepted 4/2/04.

Grant support: Public Health Service grant CA-38450 from the National Cancer Institute and Public Health Service training grants CA 09001-25 and CA 09001-28 (B. Birmann).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Requests for reprints: Brenda M. Birmann, Department of Epidemiology, Harvard School of Public Health, 677 Huntington Avenue, Boston, MA 02115. Phone: 617-432-1221; Fax: 617-432-4626. E-mail: bbirmann@hsph.harvard.edu  
Copyright © 2004 American Association for Cancer Research.

received *Bacillus Calmette-Guérin* vaccination through a national immunization program (15). Thus, a subject's nonreactivity to dermal challenge with purified protein derivative (PPD) is indicative of deficient cellular (type 1) immunity. To assess the informativeness of EBV antibody patterns and serum levels of total IgE, sCD30, and sCD23 for characterizing immune function, we evaluated their ability to predict PPD nonreactivity. Under the assumption that the PPD nonreactivity observed in study subjects reflects type 1/type 2 dysregulation, we hypothesized that persons who were nonreactive to PPD would exhibit an EBV antibody profile indicative of depressed cellular immunity and elevated levels of each type 2 serologic marker. Because the Miyazaki Cohort Study includes a substantial proportion of persons who are carriers of human T-cell lymphotropic virus I (HTLV-I) and/or seropositive for anti-hepatitis C virus (HCV), we restricted these analyses to subjects who were seronegative for antibodies to both viruses.

## Materials and Methods

**Study Population.** The Miyazaki Cohort Study (16) is a prospective study of the natural history of HTLV-I and HCV, in which adult residents of two small, rural villages in southwestern Japan were followed from 1984 to 2000. HTLV-I infection is endemic in this region, and ~26% of the >2,000 participants are seropositive for anti-HTLV-I (17). One study village also has high levels of HCV infection, with a seroprevalence of ~23% (18). The subjects for the present study were drawn from the 273 participants from that village who had data on PPD reactivity and sufficient serum volume for immune marker testing. Of these 273 persons, the 152 who were seronegative for anti-HTLV-I and anti-HCV are included in the present analysis.

**Data Collection.** Details of data collection for the Miyazaki Cohort Study have been published elsewhere (16). In brief, all study data were obtained during free annual, government-sponsored health examinations. Collected blood specimens were stored at -30°C until use. Portions of each sample were subsequently shipped, packed in dry ice, to the Harvard School of Public Health (Boston, MA), where they were stored at -80°C until biomarker testing for the present analysis. Anti-HTLV-I and anti-HCV serostatus was determined as has been described previously (19).

**Type 1 and Type 2 Biomarkers.** The serologic markers were measured in blood specimens collected at the screening visit, during which the skin test for PPD reactivity was administered, using samples stored at the Harvard School of Public Health. As part of a study of viral effects on immune function, serum specimens from subjects who were seropositive for anti-HTLV-I and/or anti-HCV were tested at the same time as the seronegative samples pertinent to the present study. Each assay batch included aliquots from virus antibody-positive and antibody-negative persons, and laboratory technicians were blinded to serum antibody status. The distributions of values obtained for each serologic biomarker among the anti-HTLV-I and anti-HCV negative subjects are summarized in Table 1. The observed levels confirm that each marker was readily detectable in the archived serum specimens.

**PPD Reactivity.** Skin tests for tuberculin PPD responsiveness were administered to randomly selected subjects during attendance at an annual health screen between 1987 and 1991. Skin testing was conducted, and results were characterized, according to standard Japanese clinical practice, as described previously (19-21). For the present analysis, subjects' PPD test responses were categorized as PPD "reactive" (+, ++, or +++) or "nonreactive" (- or ±; ref. 19).

**EBV Serology.** Antibodies to EBV antigens were measured at Virolab, Inc. (Berkeley, CA), under the direction of Dr. Evelyne Lennette, using standard immunofluorescence techniques (22, 23). Each specimen was tested for IgG antibodies to EBV nuclear antigen (EBNA), viral capsid antigen (VCA), early antigen-diffuse (EA-D), and early antigen-restricted (EA-R). Antibody titers were reported as the highest of serial 2-fold dilutions to yield a positive reading on immunofluorescence. Negative titers were defined as <1:5 for anti-EBNA and both forms of anti-EA and <1:20 for anti-VCA. To confirm the specificity of the observed anti-EBNA reactions, sera were tested for reactivity to BJAB cells, which do not harbor EBV (23). Two (1.3%) of the 152 subjects in the present study showed nonspecific serum reactivity to EBNA and were removed from analyses related to EBV antibody titers.

**Serum IgE.** IgE testing was done for the 128 anti-HTLV-I and anti-HCV seronegative subjects with sufficient serum volume using the UniCAP. Total IgE

**Table 1. The distribution of values of serologic type 1 and type 2 biomarkers**

Biomarker	% (n) Seropositive*	Mean†	Range‡
<b>Type 1 EBV antibody titers (n = 152)</b>			
Anti-EBNA	98.7 (150)	1:255	1:5-1:2,560
Anti-VCA	98.7 (150)	1:803	1:80-1:5,120
Anti-EA-R	3.2 (5)	1:61	1:20-1:160
Anti-EA-D	10.5 (16)	1:19	1:5-1:160
<b>Type 2</b>			
Total serum IgE, kilounits/L (n = 128)	99.2 (127)	390.0 ± 593.4	3.3-3,653.0
sCD23, units/mL (n = 104)	100.0 (104)	52.5 ± 16.9	15.5-104.0
sCD30, units/mL (n = 107)	100.0 (107)	47.1 ± 33.8	20.4-317.2

\*Of all subjects tested for a given marker.

†Geometric mean titer for EBV antibodies in seropositive subjects or arithmetic mean ± SD for type 2 markers among subjects with levels above assay detection limits.

‡Among marker seropositive subjects.

Fluoroenzymeimmunoassay (Pharmacia and Upjohn, Kalamazoo, MI). The assays were conducted in the laboratory of Dr. Craig Lilly (Brigham and Women's Hospital, Boston, MA) according to the manufacturer's instructions. All samples were tested in duplicate, and we observed an average intraassay coefficient of variation of 6.2% among all 235 subjects tested (including subjects seropositive for anti-HTLV-I and/or anti-HCV). The assay limit of detection is 2.0 kilounits/L. One (0.8%) subject had a total IgE level below the detection limit. That person's total IgE value was omitted from the computation of mean levels (Table 1) but was included in the lowest tertile group in categorical analyses.

**sCD23 and sCD30.** sCD23 was measured with the Human sCD23 ELISA kit (Bender MedSystems, Vienna, Austria). Of the 152 subjects in the present analyses, 107 had sufficient specimen volume for sCD23 testing. The Human sCD30 ELISA kit (Bender MedSystems) was used to measure sCD30 in the 104 anti-HTLV-I and anti-HCV seronegative subjects with sufficient serum volume. Assays were done in duplicate according to manufacturer's instructions in the laboratory of Dr. Nader Rifai (Children's Hospital, Boston, MA). The average intra-assay coefficient of variation was 3.6% for sCD23 and 5.3% for sCD30 when estimated in all 217 and 224 samples tested, respectively. We included blinded repeat samples to assess the between-batch reproducibility of the assays. For sCD23, we observed a mean interassay coefficient of variation of 13.6% in six repeat tests of each of two control samples. For sCD30, the mean interassay coefficient of variation was 7.1% using the same control samples. The assay limits of detection are 10.3 units/mL for sCD23 and 0.5 units/mL for sCD30. All of the subjects tested for sCD23 and sCD30 had levels above the respective detection limits (Table 1).

**Statistical Analyses.** Statistical analyses were conducted using SAS statistical software (SAS Institute, Inc., Cary, NC). All *P* values were two tailed, and all tests of statistical significance assumed an  $\alpha$  level of 0.05. We used logistic regression to evaluate serum EBV antibody titers, as well as levels of total IgE, sCD23, and sCD30, as predictors of PPD nonreactivity among subjects who were seronegative for anti-HTLV-I and anti-HCV. In the logistic models, a single serologic marker (such as an EBV antibody titer variable or a type 2 indicator) was included as an independent predictor, and PPD nonreactivity was entered as the dependent variable. The odds ratios (OR) from these models provided estimates of the magnitude of the association of the independent predictor with PPD nonreactivity. In addition, 95% confidence intervals (CI) were estimated around each OR to describe its precision and statistical significance (24), and *P* values corresponding to each OR and 95% CI were obtained from the Wald  $\chi^2$  test. We controlled for potential confounding by gender, age, and smoking history (current or past versus never) in multivariate models. We also evaluated confounding by alcohol consumption (ever versus never). However, adjustment for this factor did not notably change the effect estimates, and alcohol use was therefore not included in the final models.

*Type 1 Biomarkers (EBV Antibodies) and PPD Reactivity.* EBV infection in immunocompetent persons is predom-

inantly latent, with a typically stable antibody profile that includes moderate titers of anti-EBNA and anti-VCA, usually with no anti-EA detectable (6). In contrast, patients with severe clinical immune deficiencies have elevated anti-VCA and anti-EA titers and low or absent anti-EBNA titers, a pattern indicative of compromised cellular immune control of EBV (6) and thus consistent with diminished type 1 immunity. Immunocompromised persons would therefore also be expected to have relatively high ratios of anti-VCA to anti-EBNA titers. Indeed, an anti-VCA to anti-EBNA titer ratio of  $\geq 4$  was found empirically to predict clinical immune dysfunction in the extensive clinical experience of Dr. Lennette's laboratory.<sup>9</sup> In addition, geometric mean titer ratios of Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma patients were observed to be ~6- and 14-fold higher, respectively, than those of healthy controls (23).

We assumed that, in the present study population, observed PPD nonreactivity reflects systemic type 1 dysregulation, and we therefore hypothesized that PPD nonreactive subjects would be more likely than PPD responsive subjects to have EBV antibody patterns consistent with diminished type 1 immunity. Thus, we expected that low anti-EBNA, high anti-VCA, and/or high anti-EA titers would be predictive of PPD nonreactivity (6). To test this hypothesis, we categorized anti-EBNA, anti-VCA, and anti-EA titers according to their distributions among all 150 EBV seropositive subjects. These distributions did not accommodate quantile-based categorization. We therefore created anti-EBNA and anti-VCA titer variables with three categories each by combining adjacent strata that had similar ORs for PPD nonreactivity in preliminary analyses to improve statistical precision (24). The final titer categories for anti-EBNA were  $\leq 1:80$ , 1:160 to 1:320, and  $\geq 1:640$ . For anti-VCA, the final groups were  $\leq 1:320$ , 1:640 to 1:1,280, and  $\geq 1:2,560$ . Because the prevalences of seropositivity for anti-EA-R and anti-EA-D were too low to analyze separate titer categories (Table 1), we defined subjects as seropositive for any anti-EA if the titer was  $>1:5$  for at least one of the two forms and seronegative otherwise. We constructed separate logistic regression models to test the associations of the low ( $\leq 1:80$ ) and high ( $\geq 1:640$ ) categories of anti-EBNA titer, the middle (1:640-1:1,280) and high ( $\geq 1:2,560$ ) categories of anti-VCA titer, and anti-EA seropositivity with PPD nonreactivity.

To evaluate combined antibody titer patterns as predictors of PPD nonreactivity, we computed the anti-VCA to anti-EBNA titer ratio (categorized for analysis as  $>4.0$ ,  $\leq 4.0$ ), and we defined a joint classification of anti-VCA and anti-EBNA titers. To create the latter term, the two individual titer variables were dichotomized, based on the similarity of titer-specific ORs observed in the main effects analyses, to yield a joint classification term with the following four categories: anti-VCA  $\leq 1:320$ , anti-EBNA  $\geq 1:160$  (i.e., both "normal"); anti-VCA  $\leq 1:320$ , anti-EBNA  $\leq 1:80$  ("normal" anti-VCA, "low" anti-EBNA); anti-VCA  $\geq 1:640$ , anti-EBNA  $\geq 1:160$  ("high" anti-VCA, "normal" anti-EBNA); and anti-VCA  $\geq 1:640$ , anti-EBNA  $\leq 1:80$  ("high" anti-VCA, "low" anti-EBNA). We used separate

<sup>9</sup> E. Lennette, unpublished data.

logistic regression models to determine whether the anti-VCA to anti-EBNA titer ratio or the joint classification of anti-VCA and anti-EBNA predicted PPD nonreactivity. The prevalence of anti-EA seropositivity was too low to warrant the study of interactions of anti-EA with other EBV antibody titers.

**Type 2 Biomarkers and PPD Reactivity.** We hypothesized that PPD nonreactivity reflects underlying type 2 predominance and that subjects who were nonreactive to a PPD skin test would be more likely than those with positive PPD responses to have elevated levels of total IgE, sCD23, and sCD30. The data allowed tertile categorization of total IgE ( $\leq 71.0$ ,  $>71.0$  to  $314.0$ ,  $>314.0$  kilounits/L), sCD23 ( $\leq 45.8$ ,  $>45.8$  to  $58.0$ ,  $>58.0$  units/mL), and sCD30 ( $\leq 35.7$ ,  $>35.7$  to  $47.9$ ,  $>47.9$  units/mL). We conducted logistic regression analysis of the association of the second and third tertile categories of these markers with PPD nonreactivity using separate logistic models for each type 2 biomarker. To test the two-way correlations of the type 2 biomarkers with one another, we computed a Spearman rank correlation coefficient for each pairwise comparison of the continuous total IgE, sCD23, and sCD30 variables. We assessed the statistical significance of the correlation coefficients using the one-sample *t* test.

**Combined Prediction of PPD Reactivity by Serologic Biomarkers.** To evaluate whether the serologic biomarkers were more informative in combination than individually for characterizing immune status, we constructed score-type variables to tally a subject's total number of abnormal EBV antibody titers, type 2 marker levels, and all serum type 1 and type 2 biomarker values. When creating the score variables, "abnormal" values were defined according to the associations with PPD nonreactivity observed for each individual marker in main effects analyses. We constructed separate logistic regression models in which each of the three score variables was entered as an independent predictor of PPD nonreactivity. We hypothesized that persons with mul-

iple abnormal serum biomarker values would be more likely than those with fewer or with only one abnormal level to have a systemic condition of immune dysfunction, as indexed by PPD nonreactivity.

## Results

In logistic regression analyses, individual EBV antibody titers showed weak to moderate associations with PPD reactivity (Table 2). We observed a higher relative risk of PPD nonreactivity among subjects with comparatively low anti-EBNA titers, with anti-VCA titers in the middle or highest categories, or with detectable anti-EA. None of the ORs were statistically significant as evidenced by the inclusion of the null value of 1.0 in the 95% CIs. However, the direction of each antibody's association with PPD nonreactivity was consistent with our hypotheses.

Analysis of the joint classification of anti-VCA and anti-EBNA titers revealed that, compared with subjects having normal titers of both antibodies (i.e., anti-VCA  $\leq 1:320$  and anti-EBNA  $\geq 1:160$ ), participants with a high anti-VCA and/or low anti-EBNA titer had ~3.5-fold higher risk of PPD nonreactivity after adjustment for age, gender, and smoking. The increased risk of PPD nonreactivity with the abnormal antibody combinations is again consistent with our hypothesis that patterns indicative of diminished cellular (type 1) immunity would predict PPD nonreactivity. In contrast, and contrary to expectation, an elevated ratio of anti-VCA to anti-EBNA titers ( $>4.0$ ) did not predict nonreactivity to PPD (data not shown).

For the individual type 2 biomarkers, the most noteworthy predictor of PPD nonreactivity was serum total IgE (Table 3); a level in the highest tertile category ( $>314.0$  kilounits/L) conferred a statistically significant ( $P = 0.02$ )  $>3$ -fold higher risk compared with levels in the lowest tertile ( $<71.0$  kilounits/L). sCD23 levels in the

**Table 2. The association of serum EBV antibody titer patterns with skin nonreactivity to PPD**

Antibody Titer/Pattern	% Specified Titer Level by PPD Status		OR (95% CI) for PPD Nonreactivity, Adjusted for Age, Gender, and Smoking History
	Nonreactive (n = 50)	Reactive (n = 100)	
Anti-EBNA			
$\leq 1:80$	18.0	15.0	1.2 (0.5-3.3)
1:160-1:320	60.0	58.0	1.0
$\geq 1:640$	22.0	27.0	0.6 (0.3-1.5)
Anti-VCA			
$\leq 1:320$	22.0	34.0	1.0
1:640-1:1,280	54.0	46.0	2.2 (0.9-5.3)
$\geq 1:2,560$	24.0	20.0	2.1 (0.7-6.0)
Anti-EA			
Seronegative ( $<1:5$ )	82.0	88.0	1.0
Seropositive ( $\geq 1:5$ )	18.0	12.0	1.7 (0.6-4.5)
Joint classification of anti-VCA* and anti-EBNA†			
Anti-VCA normal, anti-EBNA normal	12.0	27.0	1.0
Anti-VCA normal, anti-EBNA low	10.0	7.0	3.7 (0.8-17.6)
Anti-VCA high, anti-EBNA normal	70.0	58.0	3.4 (1.2-9.9)
Anti-VCA high, anti-EBNA low	8.0	8.0	3.7 (0.7-18.7)

\*Anti-VCA titers are "normal" if  $\leq 1:320$  and "high" if  $\geq 1:640$ .

†Anti-EBNA titers are "normal" if  $\geq 1:160$  and "low" if  $\leq 1:80$ .



**Table 3. The association of serologic type 2 biomarkers with skin nonreactivity to PPD**

Biomarker	% Specified Titer Level by PPD Status		OR (95% CI) for PPD Nonreactivity, Adjusted for Age, Gender, and Smoking History
	Nonreactive*	Reactive	
Total IgE (kilounits/L)	(n = 45)	(n = 83)	
≤71.0	24.4	37.4	1.0
>71.0-314.0	35.6	32.5	1.6 (0.6-4.3)
>314.0	40.0	30.1	3.4 (1.2-9.9)
sCD23 (units/mL)	(n = 37)	(n = 70)	
≤45.8	29.7	34.3	1.0
>45.8-58.0	29.7	35.7	1.0 (0.3-2.9)
>58.0	40.5	30.0	1.5 (0.5-4.2)
sCD30 (units/mL)	(n = 34)	(n = 70)	
≤35.8	32.4	34.3	1.0
>35.8-47.9	29.4	35.7	0.8 (0.3-2.2)
>47.9	38.2	30.0	1.1 (0.4-3.4)

\*Column percents may not sum to 100.0 due to rounding.

highest tertile showed a weak positive association with PPD nonreactivity compared with levels in the lowest tertile. In contrast, sCD30 levels were not associated with PPD status. Nonetheless, these observations collectively suggest that PPD nonreactive subjects have elevated type 2 immunity. Levels of sCD23 and sCD30 were positively correlated with one another; the correlation coefficient was 0.4 ( $P < 0.0001$ ) when continuous variables were compared. In contrast, total serum IgE was not correlated with sCD23 ( $r = -0.04$ ,  $P = 0.7$ ) and was only weakly correlated with sCD30 ( $r = 0.2$ ,  $P = 0.06$ ).

We expected that combined use of the biomarkers, which were all measured in the same serum sample, would improve the serologic classification of a subject's immune status by increasing the specificity of an "abnormal" characterization over that obtained with a single marker value. As predicted, the relative risk of nonreactivity to PPD increased with increasing numbers of abnormal marker values, and subjects with at least four abnormal values (and thus evidence for concomitant type 1 and type 2 dysregulation) had a notably higher prevalence of PPD nonreactivity than those with only one abnormal biomarker level (data not shown). Thus, the biomarkers in combination were informative indicators of immune function among the subjects who were seronegative for anti-HTLV-I and anti-HCV. However, in subsequent analyses that included subjects who were seropositive for anti-HTLV-I or anti-HCV, the score variables were not more informative than the individual biomarkers for characterizing the type 1 and type 2 status of virus-seropositive subjects (data not shown). We concluded that the biomarkers in combination did not markedly enhance the characterization of immune function in this population.

## Discussion

We undertook this analysis to identify biomarkers that could be used as alternatives to PPD skin testing to broadly characterize type 1 and type 2 immune status in this study population. Of the markers tested, total IgE had the strongest individual association with PPD status. Subjects with the jointly classified pattern of high anti-VCA and low anti-EBNA titers also had a moderately large relative risk of PPD nonreactivity. Serum sCD23

was not strongly associated with PPD nonreactivity, nor were individual EBV antibody titers, but the ORs estimated for these markers were nonetheless consistent with the hypothesis that PPD nonreactivity reflects both type 1 and type 2 dysregulation. Serum sCD30 did not predict PPD status and therefore does not seem to be a sensitive marker of type 2 dysregulation in this study population.

Our evaluation of anti-EBNA may have been limited by the lack of information on titers of antibodies to specific components of the EBNA complex (i.e., EBNA-1 and EBNA-2). Elevated anti-EBNA-2 and diminished anti-EBNA-1 titers, and in particular a ratio of EBNA-1 to EBNA-2 titers of  $<1$ , have been observed in cases of chronic EBV infection and are considered indicative of defective immune control of EBV latency (23, 25). Thus, measurement of anti-EBNA-1 and anti-EBNA-2 titers and/or their titer ratio may have been more informative for characterizing immune status than the single titer of antibodies to the EBNA complex.

Evaluation of the joint classification of anti-EBNA and anti-VCA titers yielded notably stronger ORs than those estimated for individual anti-EBNA and anti-VCA titer variables. One reason for these stronger associations is likely to be that the reference group for the combined variable comprised only subjects with normal titers for both antibodies, whereas, in the main effects analysis of either individual antibody, the comparison group included some subjects with abnormal titers of the other antibody. Therefore, the relative risks observed for the three abnormal titer patterns in the joint classification likely reflect more closely the true association of these abnormal titers with PPD nonreactivity.

To our knowledge, this is the first study in which PPD skin reactivity has been measured concurrently with serum EBV antibody titers and levels of all three type 2 biomarkers in a population of healthy adults. Several studies have investigated whether *Bacillus Calmette-Guérin* vaccination predicts lower total IgE levels and/or is protective against atopic disease, with inconsistent results (26). The majority of our study subjects were likely to have been exposed naturally rather than iatrogenically to mycobacteria (15). Therefore, we do not attribute the observed inverse association of PPD reactivity with total IgE to protection from atopic disease by *Bacillus Calmette-Guérin* immunization. One previous

report documented inverse correlations between positive PPD reactivity and a variety of atopic symptoms among *Bacillus Calmette-Guérin*-immunized 12- and 13-year-old Japanese school children (27). PPD nonresponders had higher total serum IgE levels than subjects with positive PPD responses in that study, an observation consistent with the current findings. Several cytokine levels were also measured in the pediatric study, and PPD nonreactive children had significantly higher serum levels of the type 2 cytokines IL-4, IL-10, and IL-13 (27); in contrast, levels of IFN- $\gamma$ , a type 1 cytokine, were significantly lower among children who were nonreactive to PPD. Collectively, these data indicate that PPD nonreactivity is associated with diminished type 1 and increased type 2 immune marker levels and that total IgE levels are informative for characterizing type 2 status.

In the present study population, serum levels of sCD23 were less strongly associated, and levels of sCD30 were unassociated, with PPD nonreactivity. These findings were contrary to our expectation, because both sCD23 and sCD30 have been used to empirically detect elevated type 2 immune responses in a variety of contexts (9, 14). For each of these two markers, the means and ranges of values we observed were similar to the expected values cited in the assay kit inserts, which were obtained from tests done by the manufacturer on sera from blood donors. Therefore, it does not seem that assay insensitivity contributed to the weaker associations of these two biomarkers with PPD nonreactivity. We also observed a significant moderate correlation of sCD23 with sCD30 similar to that reported by Schönermarck et al. (28). In addition, a lack of correlation between total IgE and sCD23 has been described previously (29-31), as has a weak positive correlation between total IgE and sCD30 (32, 33). The differences between mean values within each tertile category of sCD23 and sCD30 were small, as evidenced in part by the narrow range of values that defines the middle tertile category of each variable. It is plausible that the small differences in the mean values correspond to relatively small differences in prevalence of PPD nonreactivity. In addition, many subjects with insufficient serum volume were omitted from the sCD23 and sCD30 analyses. Thus, with reduced sample sizes, we had low statistical power to detect significant small associations of tertile category of sCD23 or sCD30 with PPD nonreactivity.

Misclassification of PPD status or the serologic immune function markers could have affected the observed associations. Some subjects within the PPD nonreactive group may never have been exposed to mycobacteria and thus had healthy immune function and, presumably, normal levels of the serologic biomarkers. However, the number of such subjects is likely to be very small, because the Japanese Ministry of Health and Welfare has a longstanding program of skin testing and immunization of PPD nonreactive citizens with *Bacillus Calmette-Guérin* (15, 27). With regard to serum marker misclassification, we did not observe evidence of systematic measurement error in any of our biomarker assays, with acceptable coefficients of variation within and between test batches. Furthermore, the laboratory assays were done by experienced technicians who were blinded to PPD status. Thus, any misclassification of serologic marker levels is expected to be small and non-

differential with respect to PPD reactivity. Nonetheless, such nondifferential misclassification would further reduce statistical power and may therefore explain in part the lack of association we observed for sCD23 and sCD30 with PPD nonreactivity, because true associations between these variables were likely to be small.

In conclusion, we have showed an association between concurrent measures of several serologic type 1 and type 2 biomarkers and PPD nonreactivity in healthy Japanese adults. PPD nonreactivity was predicted consistently, if not always strongly, by EBV antibody titers indicative of deficient cellular immune control of EBV as well as by elevated levels of total serum IgE and sCD23. These findings suggest that the subclinical immune dysfunction observed as nonreactivity to PPD is characterized by both type 1 and type 2 immune dysregulation. We conclude that, with the exception of sCD30, the serologic markers evaluated are informative for broadly characterizing general immune competency and type 1/type 2 status using archived sera from populations of healthy Japanese adults and likely among healthy adults of other ethnicities as well.

#### Acknowledgments

We thank Drs. Nader Rifai and Gary Bradwin for the sCD23 and sCD30 testing, Dr. Craig Lilly and Brian Morse for the serum IgE testing, Yuriko Kuwabara and Bruce Molay for expert assistance with data management, and the participants in the Miyazaki Cohort Study for their invaluable contribution to this research.

#### References

1. Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:532-62.
2. Romagnani S. Biology of human T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 cells. *J Clin Immunol* 1995;15:121-9.
3. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;85:9-21.
4. Bienvenu JAD, Monneret G, Gutowski MC, Fabien N. Cytokine assays in human sera and tissues. *Toxicology* 1998;129:55-61.
5. Whiteside TL. Cytokine measurements and interpretation of cytokine assays in human disease. *J Clin Immunol* 1994;14:327-39.
6. Henle W, Henle G. Epstein-Barr virus-specific serology in immunologically compromised individuals. *Cancer Res* 1981;41:4222-5.
7. Delespessis G, Suter U, Mossalayi D, et al. Expression, structure and function of the CD23 antigen. *Adv Immunol* 1991;49:149-91.
8. Gordon J. CD23 and B cell activation. *Clin Exp Allergy* 1992;22:199-204.
9. Bansal AS, Ollier W, Marsh MN, Pumphrey RSH, Wilson PB. Variations in serum sCD23 in conditions with either enhanced humoral or cell-mediated immunity. *Immunology* 1993;79:285-9.
10. Smith C, Davis T, Anderson D, et al. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 1990;248:1019-23.
11. Schwab U, Stein H, Gerdes J, et al. Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin's and Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. *Nature* 1982;299:65-7.
12. Stein H, Maon DY, Gerdes J, et al. The expression of the Hodgkin's disease-associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that the Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood* 1985;66:848-58.
13. Pizzolo G, Romagnani S. CD30 molecule (Ki-1 Ag): more than just a marker of CD30+ lymphoma. *Haematologica* 1995;80:357-66.
14. D'Elia MM, Romagnani P, Scaletti C, et al. *In vivo* CD30 expression in human diseases with predominant activation of Th2-like cells. *J Leuk Biol* 1997;61:539-44.
15. Hisada M, Stuver SO, Okayama A, Mueller NE. Gender differences in skin reactivity to purified protein derivative among carriers of HTLV-I in Japan. *J AIDS J Acquir Immune Defic Syndr* 1999;22:302-7.
16. Mueller N, Okayama A, Stuver S, Tachibana N. Findings from the

- Miyazaki Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996;13 Suppl 1:S2-7.
17. Okayama A, Stuver S, Iga M, et al. Sequential change of virus markers in seroconverters with community-acquired infection of human T-lymphotropic virus type I. *J Infect Dis* 2001;183:1031-7.
  18. Boschi-Pinto C, Stuver S, Okayama A, et al. A follow-up study of morbidity and mortality associated with hepatitis C virus infection and its interaction with human T lymphotropic virus type I in Miyazaki, Japan. *J Infect Dis* 2000;181:35-41.
  19. Hisada M, Shima T, Okayama A, Mueller N, Tsubouchi H, Stuver S. Suppression of skin reactivity to purified protein derivative by hepatitis C virus among HTLV-I carriers in Japan. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998;19:421-5.
  20. Tachibana N, Okayama A, Ishizaki J, et al. Suppression of tuberculin skin reaction in healthy HTLV-I carriers from Japan. *Int J Cancer* 1988;42:829-31.
  21. Murai K, Tachibana N, Shioiri S, et al. Suppression of delayed-type hypersensitivity to PPD and PHA in elderly HTLV-I carriers. *J AIDS* 1990;3:1006-9.
  22. Henle W, Henle G, Horwitz CA. Epstein-Barr virus specific diagnostic tests in infectious mononucleosis. *Hum Pathol* 1974;5:551-65.
  23. Lennette ET, Rymo L, Yadav M, et al. Disease-related differences in antibody patterns against EBV-encoded nuclear antigens EBNA 1, EBNA 2 and EBNA 6. *Eur J Cancer* 1993;29A:1584-9.
  24. Rothman KJ, Greenland S. *Modern epidemiology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1998.
  25. Henle W, Henle G, Andersson J, et al. Antibody responses to Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen (EBNA)-1 and EBNA-2 in acute and chronic Epstein-Barr virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:570-4.
  26. Matricardi PM, Yazdanbakhsh M. Mycobacteria and atopy, 6 years later: a fascinating, still unfinished, business. *Clin Exp Allergy* 2003;33:717-20.
  27. Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997;275:77-9.
  28. Schönemmarck U, Csemok E, Trabandt A, Hansen H, Gross WL. Circulating cytokines and soluble CD23, CD26 and CD30 in ANCA-associated vasculitides. *Clin Exp Rheumatol* 2000;18:457-63.
  29. Yawetz S, Cumberland WG, van der Meyden M, Martínez-Maza O. Elevated serum levels of soluble CD23 (sCD23) precede the appearance of acquired immunodeficiency syndrome-associated non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1995;85:1843-9.
  30. Wilhelm D, Klouche M, Görg S, Kirchner H. Expression of sCD23 in atopic and nonatopic blood donors: correlation with age, total serum IgE, and allergic symptoms. *Allergy* 1994;49:521-5.
  31. Schroeder JR, Saah AJ, Hoover DR, et al. Serum soluble CD23 level correlates with subsequent development of AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:979-84.
  32. Latza U, Davis S, Wilhelm D, McKnight B, Seyfarth M, Stein H. Soluble cytokine receptor CD30 in atopic disorders: a case-control study. *Clin Exp Allergy* 1999;29:97-104.
  33. Katoh N, Hirano S, Suehiro M, et al. Soluble CD30 is more relevant to disease activity of atopic dermatitis than soluble CD26. *Clin Exp Immunol* 2000;121:187-92.

## Transforming growth factor- $\beta$ -induced stimulation of formation of collagen fiber network and anti-fibrotic effect of taurine in an in vitro model of hepatic fibrosis

Junya Kato<sup>a</sup>, Akio Ido<sup>a,b</sup>, Satoru Hasuike<sup>a</sup>, Hirofumi Uto<sup>a</sup>, Takeshi Hori<sup>a</sup>, Katsuhiko Hayashi<sup>a</sup>, Shigeru Murakami<sup>c</sup>, Akira Terano<sup>d</sup>, Hirohito Tsubouchi<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Internal Medicine II, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, 5200 Kihara, Kiyotake, Miyazaki 889-1692, Japan

<sup>b</sup> Department of Experimental Therapeutics, Translational Research Center, Kyoto University Hospital, 54 Shogoin-Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

<sup>c</sup> Medical Research Laboratories, Taisho Pharmaceutical Co. Ltd., 1-403 Yoshino-cho, Kita-ku, Saitama 331-9530, Japan

<sup>d</sup> Department of Gastroenterology, Dokkyo University School of Medicine, 880 Kitakobayashi, Mibu, Shimotsuga, Tochigi 321-0293, Japan

Received 4 November 2003; received in revised form 29 March 2004; accepted 30 April 2004

Available online 4 July 2004

### Abstract

The cell strain M, which was established from normal rat liver cells, is characterized by the active formation of a collagen fiber network. In this study, we investigated the characterization of M cells and evaluated the anti-fibrogenic effects of taurine using this culture system. M cells expressed cytokeratin (CK)8, CK18, vimentin, and  $\alpha$ -smooth muscle actin, whereas expression of CK-19 or desmin was not detected. Also, M cells expressed transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, and TGF- $\beta$  type I and II receptors, and treatment with TGF- $\beta$ 1 (1 ng/ml) for 6 days markedly stimulated the formation of a collagen fiber network and expression of procollagen  $\alpha$ 1(I) mRNA. When M cells were treated with various concentrations of taurine (10–50 mM), network formation and procollagen  $\alpha$ 1(I) expression were significantly suppressed in a dose dependent manner. Additionally, even in the presence of TGF- $\beta$ 1, taurine treatment effectively reduced the formation of a collagen fiber network. These results suggest that M cells exhibit features of not only hepatocytes but also myofibroblasts, and TGF- $\beta$ 1 plays an important role in the formation of collagen fiber networks in this culture system. Additionally, this M cell culture system is appropriate for use as an in vitro model of hepatic fibrosis in the evaluation of the anti-fibrogenic effects of various agents.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** M cell; Hepatic stellate cell; Myofibroblast; Liver cirrhosis; Procollagen  $\alpha$ 1(I)

### 1. Introduction

Hepatic fibrosis is a wound healing response, and multiple cycles of tissue injury and repair induces the net accumulation of extracellular matrix (ECM), leading to the development of cirrhosis [1]. Fibrous bands disrupt normal blood flow in cirrhotic livers, leading to portal hypertension and its complications, and hepatocellular carcinoma occurs closely associated with advanced fibrosis or cirrhosis, especially that caused by hepatitis B or C virus infection [2]. The cells participating hepatic fibrosis are principally the hepatic stellate cells (HSCs) [3]. In normal liver, HSCs are

non-parenchymal, quiescent cells whose main function is to store vitamin A. However, in response to liver injury, HSCs undergo an activation process in which they lose vitamin A, become highly proliferative, and synthesize fibrotic matrix rich in type I collagen, exhibiting features of myofibroblasts. Conversely, recent investigations have shown that transforming growth factor (TGF)- $\beta$  is one of the most powerful profibrogenic mediators, and it plays a major role in the development of liver cirrhosis [4,5]. Although TGF- $\beta$  is also an important negative regulator of proliferation and an inducer of hepatocyte apoptosis, TGF- $\beta$  upregulates the expression of collagens I, II and IV, fibronectin and laminin in HSCs, and accelerates the transformation of quiescent HSCs into myofibroblasts. In addition to accelerating activation and stimulating matrix synthesis, TGF- $\beta$  downregulates the degradation of ECM proteins by matrix

\* Corresponding author. Tel.: +81 985 85 0987; fax: +81 985 85 5194.  
E-mail address: [htsubo@med.miyazaki-u.ac.jp](mailto:htsubo@med.miyazaki-u.ac.jp) (H. Tsubouchi).