

急性心筋梗塞における Hepatocyte Growth Factor 測定の意義

Significance of Hepatocyte Growth Factor Measurement in Patients With Acute Myocardial Infarction

佐藤 哲也
 吉野内猛夫*¹
 杉本 太郎
 坂本 泰祐
 藤枝 裕之
 佐藤 博彦
 村尾 敏*¹
 小林 博夫*²
 大江 透*³

Tetsuya SATO, MD
 Takeo YOSHINOUCI, MD*¹
 Taro SUGIMOTO, MD
 Taisuke SAKAMOTO, MD
 Hiroyuki FUJIEDA, MD
 Hirohiko SATO, MD
 Satoshi MURAO, MD*¹
 Hiroo KOBAYASHI, MD*²
 Tohru OHE, MD, FJCC *³

Abstract

The use of hepatocyte growth factor for acute myocardial infarction was investigated. Several other biochemical markers are already used for noninvasive detection of acute myocardial infarction.

Hepatocyte growth factor, creatine phosphokinase (CK) and CK isozyme (CK-MB) levels were measured in 10 patients with stable effort angina after diagnostic catheterization, and in 21 patients with acute myocardial infarction twice a day for the first 3 days and once a day for the next 4 days. The time to reach the maximum level and the time to decline to less than half of the maximum level for each patient was also measured.

Hepatocyte growth factor levels (ng/ml) were 0.3 ± 0.1 for patients with angina pectoris, and 10.4 ± 8.8 within 6 hours and 6.7 ± 4.5 within 12 hours after the onset for patients with acute myocardial infarction. The time to reach the maximum (hours) and the time to decline to less than half of the maximum level (days) were 9.2 ± 5.2 and 1.1 ± 0.3 for hepatocyte growth factor, 19.5 ± 7.2 and 2.3 ± 1.1 for CK and 16.3 ± 7.2 and 1.5 ± 0.4 for CK-MB, respectively. The correlation coefficients between the maximum level of hepatocyte growth factor and the maximum levels of CK and CK-MB were 0.64 and 0.70, respectively.

Hepatocyte growth factor is useful as a prognostic indicator and reflects the clinical course in patients with acute myocardial infarction.

J Cardiol 1998; 32(2): 77-82

Key Words

- Enzymes ■ Growth factors (hepatocyte growth factor) ■ Ischemia
- Myocardial infarction (pathophysiology)

はじめに

Hepatocyte growth factor (HGF) は、1984年、Nakamura

ら¹⁾によって発見され、その後増殖促進作用、腫瘍抑制作用、細胞運動性の促進作用、器官形成作用など種々の作用を持つことが明らかにされた。近年最も注

松山市民病院 循環器内科, *¹内科: 〒790-0067 愛媛県松山市大手町2-6-5; *²高松病院 循環器内科, 香川; *³岡山大学医学部 循環器内科, 岡山

Departments of Cardiovascular Medicine and *¹Internal Medicine, Matsuyama Shimin Hospital, Ehime; *²Department of Cardiovascular Medicine, Takamatsu Hospital, Kagawa; *³Department of Cardiovascular Medicine, Okayama University School of Medicine, Okayama

Address for reprints: SATO T, MD, Department of Cardiovascular Medicine, Matsuyama Shimin Hospital, Otemachi 2-6-5, Matsuyama, Ehime 790-0067

Manuscript received March 13, 1998; revised June 2, 1998; accepted June 3, 1998

目されている増殖因子の一つである。1989年には分子クローニングにより、その特徴的な全構造が解明された²⁾。つまり、HGFはヘアピン構造および4個のクリンゲル構造を持つ α 鎖とセリンプロテアーゼ様構造を持つ β 鎖からなるヘテロダイマー分子である。クリンゲルドメインは主にプラスミノゲンなどの凝固線溶系に特徴的な構造であり³⁾、HGF自体もプラスミノゲンと約40%の相同性を持つ。

HGFは劇症肝炎をはじめとする肝疾患⁴⁾や呼吸器、腎臓などの臓器障害で上昇することが知られている。しかし、急性心筋梗塞などの虚血性心疾患における報告は非常に稀であり、不明な点が多い。急性心筋梗塞の発症には血栓形成が深く関与することが知られており、凝固線溶系と構造的類似性を持つHGFの動向は興味を持たれるところである。

そこで、今回我々は急性心筋梗塞患者においてHGFの時間的推移を検討し、臨床経過を反映するかどうかを明らかにしたので報告する。

対象と方法

1. 対 象

対象は安定労作狭心症患者10例(狭心症群: 男性6例, 女性4例, 平均年齢 61 ± 8 歳), および急性心筋梗塞患者21例(心筋梗塞群: 男性13例, 女性8例, 平均年齢 70 ± 13 歳)である。急性心筋梗塞患者については、Killip分類Iが15名, IIが6名であった。

狭心症の診断は臨床症状, 運動負荷心電図, 運動負荷シンチグラフィ, および心臓カテーテル検査によって行った。急性心筋梗塞の診断については、臨床症状(30分以上の持続する胸痛), 心電図所見(連続2誘導以上における1mm以上のST上昇), 心筋酵素の上昇により行った。肝, 腎, 肺, 脳など他の諸臓器疾患を認める患者は除外した。

2. 心臓カテーテル検査

狭心症群に対しては、heparin 3,000単位静脈内投与後に施行した。心筋梗塞群に対しては、aspirin 243mg経口投与, heparin 5,000単位静脈内投与, nitroglycerin $0.2-4.0 \mu\text{g}/\text{min}/\text{kg}$ あるいはisorbide dinitrate $0.5-5.0 \mu\text{g}/\text{min}/\text{kg}$ 持続静脈内投与後に施行した。診断造影後, 責任冠動脈に70%以上の狭窄を認めた場合, direct 経皮的冠動脈形成術(percutaneous transluminal

Selected abbreviations and acronyms

HGF = hepatocyte growth factor

PTCA = percutaneous transluminal coronary angioplasty

coronary angioplasty: PTCA)を施行した。残存狭窄50%以下をPTCA成功とした。ステントの挿入例は除外した。Heparin 200単位/kgの持続静脈内投与を第2病日朝まで行った。

3. Hepatocyte growth factorの測定

血液採取は狭心症群については、診断用心臓カテーテル検査終了後に行った。心筋梗塞群については、最初の3日間は1日2回, 次の4日間は1日1回行った。いずれの場合も白血球数, creatine phosphokinase(CK), CK isozyme(CK-MB), GOT, LDHを同時に測定した。検査前に全ての患者, 家族に対して文書で十分説明し, 承諾を得た。

HGFの測定はオーツカELISAキット(大塚アッセイ研究所, 東京)を用い定量した⁵⁾。本キットは, 抗ヒトHGFモノクローナル抗体固相化プレートに被験血清を反応させ(第1次反応), 更に抗ヒトHGFポリクローナル抗体を加え(第2次反応), サンドイッチを形成させた後, 酵素標識抗体を反応させて(第3次反応)発色させる方法であり, 正常値は $0.39 \text{ ng}/\text{ml}$ 以下である。その感度と特異度については, 既に報告されている⁶⁾。

統計学的処理はStudentの*t*検定, 一元配置分散分析およびScheffe検定を用い, $p < 0.05$ をもって有意差の判定とした。結果は平均 \pm 標準偏差にて表現した。

結 果

急性心筋梗塞の発症から当院受診までの時間は平均 7.9 ± 3.3 時間であった。心筋梗塞群全例にdirect PTCAを行い, 完全血行再建を得た。

1. 血清hepatocyte growth factor値

狭心症群においては, 血清HGF値は $0.3 \pm 0.1 \text{ ng}/\text{ml}$ と正常範囲内であった(Table 1)。心筋梗塞群においては, $10.4 \pm 8.8 \text{ ng}/\text{ml}$ (6時間以内), $6.7 \pm 4.5 \text{ ng}/\text{ml}$ (12時間以内)と狭心症群と比較して有意に上昇していた。また第7病日にはほぼ正常範囲内に低下した。

2. 最大値に達する時間および最大値の半分以下に低下する時間

血清 HGF 値と血清 CK 値, 血清 CK-MB 値それぞれの最大値に達する時間 (time to reach the maximum level: Tp) および最大値の半分以下に低下する時間 (time to decline to less than half the maximum level: T 1/2) を検討した. 血清 HGF 値において Tp は最小であり, 血清 HGF 値は他の心筋酵素と比較して有意に早期に最大値に達していた (Table 2). 更に, T 1/2 も血清 HGF 値において最小であり, 血清 HGF 値は, 他の心筋酵素と比較して有意に早期に最大値の半分以下に低下していた.

Table 1 Serum level of hepatocyte growth factor (HGF)

	HGF (ng/ml)
AP patients	0.3±0.1
AMI patients	
0- 6 hour (s)	10.4±8.8
6-12	6.7±4.5
1 day (s)	5.4±4.1
1.5	3.5±3.3
2	2.0±1.2
2.5	1.8±1.5
3	1.2±1.1
4	1.2±1.4
5	0.8±0.6*
6	0.5±0.5

*p<0.05, **p<0.01 vs AP patients.

AP=angina pectoris ; AMI=acute myocardial infarction.

3. 血清 hepatocyte growth factor 最大値と血清 CK 最大値, 血清 CK-MB 最大値との相関

血清 HGF 最大値と血清 CK 最大値, 血清 CK-MB 最大値との相関関係を検討した. それぞれ, r = 0.64 (p<0.001; Fig. 1-左), r = 0.70 (p<0.001; Fig. 1-右) と, 有意な相関関係を認めた.

4. 血清 hepatocyte growth factor 最大値と左心機能との関連

血清 HGF 最大値を, 左室機能低下群 (左室駆出率 ≤ 45%; 男性 1 例, 女性 3 例, 平均年齢 74 ± 5 歳) と良好群 (左室駆出率 > 45%; 男性 12 例, 女性 5 例, 平均年齢 69 ± 14 歳) に分けて比較すると, 左室機能低下群で有意に高値であった (Table 3).

5. 血清 hepatocyte growth factor 最大値と責任冠動脈

血清 HGF 最大値を責任冠動脈別に比較検討したが,

Table 2 Time to reach the maximum level and to decline to less than half the maximum level

	HGF	CK	CK-MB
Tp (hours)	9.2±5.2**	19.5±7.2	16.3±7.2
T 1/2 (days)	1.1±0.3*	2.3±1.1	1.5±0.4

*p<0.05 vs CK, **p<0.01 vs CK, CK-MB.

CK=creatine phosphokinase; CK-MB=creatine phosphokinase isozyme; Tp=time to reach the maximum level; T 1/2=time to decline to less than half the maximum level.

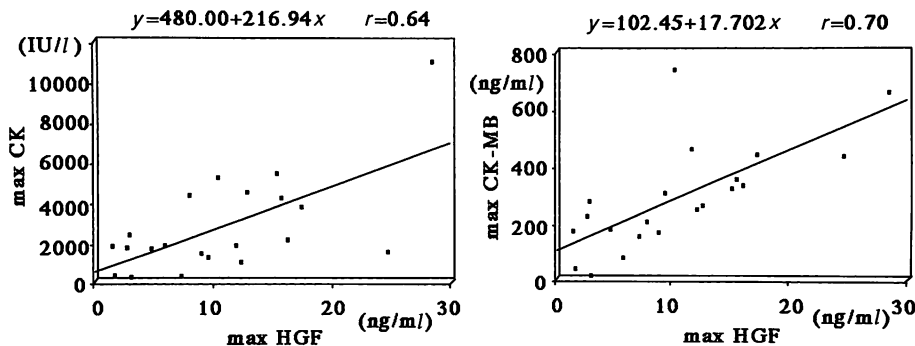


Fig. 1 Correlation between maximum serum level of HGF and maximum levels of CK and CK-MB
 There were significant correlations between maximum serum level of HGF and maximum levels of CK and CK-MB (r = 0.64, p < 0.001; r = 0.70, p < 0.001), respectively.
 max HGF = maximum level of hepatocyte growth factor; max CK = maximum level of creatine phosphokinase; max CK-MB = maximum level of creatine phosphokinase isozyme.

Table 3 Comparison of maximum serum level of hepatocyte growth factor, CK with ejection fraction

	EF≤45% group (n=4)	EF>45% group (n=17)
max HGF (ng/ml)	16.4±5.1**	8.5±8.2
max CK (IU/l)	5,171±3,540**	2,352±1,736

***p*<0.01.

EF=ejection fraction. Other abbreviations as in Fig.1.

有意差は認めなかった (Table 4).

考 察

今回の我々の検討では、急性心筋梗塞において HGF は有意に上昇した。更に CK や CK-MB など他の心筋酵素と比較して、最も早期に上昇および低下し、それぞれの最大値には有意な相関関係を認めた。虚血性心疾患における HGF の動向については殆ど報告がなく^{7,8)}、Matsumori ら⁷⁾ は急性心筋梗塞の早期において HGF が上昇することを報告しているが、それは各症例において入院時にわずか1回の測定をしているにすぎない。我々は HGF が急性心筋梗塞の生化学的マーカーとなりうることを報告した⁸⁾ が、今回症例数を増やしての検討でもほぼ同様の結果が得られた。つまり、HGF は急性心筋梗塞の臨床経過を反映する重要な指標の一つであると考えられた。

HGF は増殖促進、腫瘍抑制、細胞運動の促進、器官形態の形成など種々の生物活性を持つ、近年最も注目されている増殖因子の一つである⁹⁾。HGF の構造はプラスミノゲンなどの凝固線溶系蛋白質と高い相同性があり³⁾、重鎖に4個のクリングル構造を有している。また HGF は、最初1本鎖の前駆体として生成され、HGF 活性化因子により生物活性を持った活性型 HGF となる¹⁰⁾。興味深いのは HGF 活性化因子自身が、トロンビンによってプロセッシングを受け、前駆体からセリンプロテアーゼ活性を持つ活性型 HGF 活性化因子に変化することである¹¹⁾。組織障害にはしばしば局所における血液凝固が関与するが、その過程でトロンビンが産生される。このトロンビンにより HGF 活性化因子が活性型 HGF 活性化因子となり、1本鎖の HGF が活性型 HGF となる。つまり HGF が傷害組織で活性化されるということであり、HGF が傷害組織修復に合目的に関与することを意味している¹²⁾。

Table 4 Comparison of maximum serum level of hepatocyte growth factor with infarct-related coronary artery

	LAD	LCX	RCA
max HGF (ng/ml)	10.7±7.6	9.7±13.1	11.7±5.5

LAD=left anterior descending coronary artery; LCX=left circumflex coronary artery; RCA=right coronary artery. Other abbreviation as in Fig. 1.

急性心筋梗塞においては、DeWood ら¹³⁾ の報告により、急性冠動脈閉塞に血栓の関与が大きいことが明らかにされている。つまり、傷害を受けやすい粥状硬化性プラークの裂隙形成や破綻が冠動脈閉塞の開始機序となり、血栓やプラーク内出血、冠動脈攣縮などが冠動脈閉塞の起因になる¹⁴⁾。更に血栓形成により HGF が上昇するという報告¹⁵⁾ を考慮すれば、血栓が強く関与している組織傷害時に前述の如くに HGF が活性化され、その血中濃度が上昇することは十分考えられる。

HGF は間葉系細胞で産生され、主な産生部位は肝臓では Kupffer 細胞、類洞内皮細胞、伊東細胞であり⁹⁾、マクロファージ、血管内皮細胞、線維芽細胞でも産生されることが知られている¹⁶⁾。つまり組織傷害時に、オートクライン、パラクラインおよびエンドクリン機構を介して供給される¹⁷⁾。心臓においては、虚血再灌流部位での内皮細胞や間質に認めたとする報告¹⁸⁾ があり、本研究における HGF 産生の機序の一つと推察された。

今回の検討では、左室駆出率の低い群で血清 HGF 値が高かった。つまり、HGF が左室心筋の壊死量も反映すると推察され、組織傷害の程度や急性心筋梗塞の予後の判定にも有用である可能性が示唆された。

HGF の注目すべきもう一つの作用に、血管新生と組織修復作用および内皮細胞増殖作用がある¹⁹⁾。HGF の投与により血管の側副血行路が有意に発達したという報告²⁰⁾ を考慮すれば、急性心筋梗塞において HGF が高値を呈したのは、この血管新生作用や内皮細胞増殖作用も関与していると考えられた。今後側副血行路の程度による検討も必要と考えられた。

劇症肝炎においても、HGF は非常に高値を呈する⁴⁾。またショック肝や広範囲な横紋筋融解時などにも上昇すると推察され、そのように重篤な他疾患合併時にその鑑別に用いられるか否かが今後の検討課題であると

考えられた。

HGF産生促進作用のあるものとして、heparin, interleukin 1, tumor necrosis factor- α などが知られている²¹⁾。今回の検討では、急性心筋梗塞に対してPTCA施行時にheparinの投与を行っている。しかし、第1回目の採血のheparin投与前と第2回目のheparin投与後とは、血清HGF値に著明な差を認めなかったこと、heparinは第2病日には中止したが、その後も上昇を認めていたこと、狭心症群に対しても診断カテーテル検査施行時にheparinを投与しているが、血清HGF値の上昇を全く認めなかったことなどより、今回の我々の検討では、heparinの影響はさほど考慮しなくてもよいと考えられた。

今回用いたHGF測定用のキット(オーツカELISAキット)は、標準HGFにrecombinant HGFを用い、*in*

*vitro*にてビリルビン、イントラリピッドおよびRF因子などの共存物質や各種サイトカインとの免疫交叉性がないことが明らかとされている^{5,22)}。

今回の検討では、急性心筋梗塞に対しては全例PTCAによる完全血行再建術を施行している。また重症心不全やショック状態の患者は対象に含まれていない。今後PTCAを施行していない症例、ショック状態などの重症例など対象を増やしての検討が必要と考えられた。

結 論

以上より、HGFは急性心筋梗塞の早期診断およびその臨床経過を把握する上で非常に重要と考えられた。

要 約

急性心筋梗塞の非観血的診断には、現在数種類の生化学的マーカーが用いられている。しかし、多様な生物活性を持ち、サイトカインの一つであるhepatocyte growth factor (HGF)の心筋梗塞における時間的推移については不明である。そこで心筋梗塞において、HGFがその臨床経過を反映する生化学的マーカーになりえるか否かを明らかにした。

対象は安定労作狭心症10例(狭心症群:平均年齢61 \pm 8歳)、急性心筋梗塞21例(心筋梗塞群:平均年齢70 \pm 13歳)である。心筋梗塞群では入院日より3日間は1日2回、次の4日間は1日1回採血し、HGF, CK, CK-MB, GOT, LDH, 白血球数を測定した。更に、それぞれの最大値に達するまでの時間、最大値の半分以下に低下する時間を比較検討した。

HGF(ng/ml)は狭心症群0.3 \pm 0.1、心筋梗塞群10.4 \pm 8.8(6時間以内)、6.7 \pm 4.5(12時間以内)と心筋梗塞群で有意に高値であった($p < 0.01$)。最大値に達するまでの時間および最大値の半分以下に低下する時間はそれぞれ9.2 \pm 5.2時間、1.1 \pm 0.3日(HGF)、19.4 \pm 7.2時間、2.3 \pm 1.1日(CK)、16.3 \pm 7.2時間、1.5 \pm 0.4日(CK-MB)とHGFは有意に早期に上昇および低下した。血清HGF最大値は血清CK最大値、血清CK-MB最大値とそれぞれ有意な正の相関関係を認めた($r=0.64, 0.70$)。

HGFは、血栓形成に伴う心筋壊死の際、血中に遊離し、急性心筋梗塞において他の生化学的マーカーと比較して、その早期診断上および臨床経過を把握する上で、より鋭敏で有用なマーカーであると考えられた。

J Cardiol 1998; 32(2): 77-82

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) Koshimizu Y, Nakamura T: The functional role of HGF during development, organogenesis, and regeneration. *Jikken Igaku* 1997; **15**: 1026-1032 (in Japanese)
- 4) Shiota G, Okano J, Kawasaki H, Kawamoto T, Nakamura T: Serum hepatocyte growth factor levels in liver diseases: Clinical implications. *Hepatology* 1995; **21**: 106-112
- 5) 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. 臨床検査 1991; **35**: 1360-1364
- 6) 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: Levels of the human hepatocyte growth factor in serum of patients with various liver diseases determined by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Hepatology* 1991; **13**: 1-5
 - 7) 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
 - 8) Sato T, Yoshinouchi T, Sakamoto T, Fujieda H, Murao S, Sato H, Kobayashi H, Ohe T: Hepatocyte growth factor (HGF): A new biochemical marker for acute myocardial infarction. *Heart Vessel* 1997; **12**: 241-246
 - 9) Matsumoto K, Nakamura T: Potential clinical application of HGF for incurable various diseases. *Jikken Igaku* 1997; **15**: 1040-1047 (in Japanese)
 - 10) Tashiro K, Hagiya M, Nishizawa T, Seki T, Shimonishi M, Shimizu S, Nakamura T: Deduced primary structure of rat hepatocyte growth factor and expression of the mRNA in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 3200-3204
 - 11) Shimomura T, Kondo J, Ochiai M, Nada 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) Miyazawa K, Shimomura T, Naka D, Kitamura N: Proteolytic activation of hepatocyte growth factor in response to tissue injury. *J Biol Chem* 1994; **269**: 8966-8970
 - 13) DeWood MA, Spores J, Notske R, Mouser LT, Burroughs R, Golden MS, Lang HT: Prevalence of total coronary occlusion during the early hours of transmural myocardial infarction. *N Engl J Med* 1980; **303**: 897-902
 - 14) Sato T, Sato H, Tateishi H, Uchida T, Dote K: Distinctive response of coronary artery compared acute myocardial infarction with angina pectoris associated with angioplasty. *Kokyu to Junkan* 1990; **38**: 887-892 (in Jpn with Eng abstr)
 - 15) 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
 - 16) Yaekashiwa M, Sakai T, Nukiwa T: HGF and lung. *Kokyu* 1995; **14**: 1154-1161 (in Japanese)
 - 17) Kono S, Nagaïke M, Matsumoto K, Nakamura T: Marked induction of hepatocyte growth factor mRNA in intact kidney and spleen in response to injury of distant organs. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **186**: 991-998
 - 18) 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
 - 19) 森下竜一, 萩原俊男: 肝細胞増殖因子(HGF). *Bio Clin* 1997; **12**: 648-652 (in Japanese)
 - 20) Van Belle E, Witzensbichler 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
 - 21) Matsumoto K, Tajima H, Okazaki H, Nakamura T: Heparin as an inducer of hepatocyte growth factor. *J Biochem(Tokyo)* 1993; **114**: 820-826
 - 22) 木許政善, 坪内博仁, 弘野修一: 改良型ELISAによるヒト肝細胞増殖因子(hHGF)レベル測定の臨床的意義. *基礎と臨* 1992; **26**: 3975-3981