

各種肝疾患におけるHepatocyte growth factor(HGF)

およびHGFレセプター (c-met)蛋白の発現:

免疫組織化学的検討

鳥取大学医学部内科学第二教室 (主任 川崎 寛中教授)

岡 野 淳 一

Expression of hepatocyte growth factor(HGF) and HGF receptor(c-met)proteins in liver diseases: an immunohistochemical study

Jun-ichi OKANO

*Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine,
Tottori University, Yonago 683, Japan*

ABSTRACT

We examined hepatic expressions of hepatocyte growth factor(HGF)and HGF receptor(c-met)in liver diseases. Liver tissues from 62 patients with liver diseases were examined for their expression of HGF and c-met protein by means of an immunohistochemical technique using polyclonal HGF and c-met antibody, respectively. Immunoreactivity for HGF was noted in hepatocytes and biliary epithelial cells. Intense immunoreactivity was observed in acute hepatitis(AH), chronic hepatitis(CH)and liver cirrhosis(LC), although no immunoreactivity was seen in hepatocellular carcinoma(HCC). c-met protein was expressed in hepatocytes and biliary epithelial cells. The expression of c-met protein was higher in patients with HCC and AH than in those with CH. The correlation of immunoreactivity between HGF and c-met was observed only in patients with LC. The results of the present study indicate that HGF and c-met proteins are highly expressed in liver diseases. However, the expression of the two proteins is not identical except in LC. Therefore, HGF may play an important role in human liver diseases, mostly in a manner independent of c-met expression.

(Accepted on January 8, 1997)

Key words : hepatocyte growth factor, c-met,
human liver diseases

はじめに

Hepatocyte growth factor (HGF)は、部分肝切除後のラット血清¹²⁾、ラット血小板¹³⁾¹⁴⁾、ウサギ血清³⁵⁾、ヒト劇症肝炎患者血清⁸⁾および肝硬変患者腹水中²³⁾より分離精製された、肝細胞に対する最も強力なマイトゲンである。HGFは正常肝ではほとんど発現しないが、肝障害後にその発現が増加すること¹⁵⁾¹⁶⁾、血清のHGFレベルは肝障害の程度に比例して増加すること²⁵⁾²⁸⁾³²⁾³⁴⁾が今までに報告されており、HGFは肝疾患において重要な役割を担っていると考えられる。

HGFは種々の生理活性を有していることが報告されている。すなわち、HGFは α -naphthylisothiocyanate (ANIT)による肝障害に対し肝細胞保護作用を有すること²⁰⁾、HGFはラット初代培養肝細胞においてアルブミン合成を促進すること³¹⁾、HGFは肝癌細胞の増殖を抑制すること²⁴⁾³⁰⁾、HGFがtransforming growth factor α (TGF- α)とのダブルトランスジェニックマウスにおいて肝細胞癌発生を有意に抑制すること²⁷⁾などがある。HGFおよびそのレセプターであるc-met蛋白の発現については、HGFはアルコール性肝炎の類洞内皮細胞⁷⁾、慢性肝炎と肝硬変の浸潤多核白血球と胆管上皮細胞で発現がみられた²¹⁾との報告があり、また、c-met蛋白の発現量は肝癌細胞の悪性度との関連が示唆されている⁵⁾²⁹⁾。しかしながら、ヒトの肝疾患においてHGFとc-met蛋白の発現を同時に検討した報告はまだなく、今回われわれは、免疫組織化学的手法によりこれらを検討したので報告する。

対象と方法

対象は表1に示すごとく急性肝炎7例、慢性肝炎20例、肝硬変9例、肝細胞癌26例で、急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変はエコー下あるいは腹腔鏡下にMajima針¹¹⁾あるいはシルバーマン針にて、肝細胞癌は外科手術時に検体を得た。HBs抗原、HCV抗体の測定はそれぞれRPHA、EIA法で行った。血清HGF値は、ヒトHGF EIAキット(特殊免疫研究所、東京)により、急性肝炎5例、慢性肝炎11例、肝硬変6例、肝細胞癌6例につき測定した。

肝組織は、10%ホルマリン固定後、常法によりパラフィン包埋し、マイクロトームで3 μ mに薄切

し、スライドガラス上に切片をのせた。脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼ阻害のため0.3%過酸化水素水に30分間浸透後、リン酸緩衝液(PBS)で3回洗浄した。非特異的IgG結合を阻害するため1.5%ヤギ血清に30分間浸透後、アビジン・ビオチン阻害をアビジン・ビオチンブロッキングキット(Vector Laboratories)により15分間行った。その後、600倍希釈した抗HGF抗体¹⁵⁾(大阪大学、中村敏一先生より供与)、あるいは抗ヒトc-met抗体(Santa Cruz Biotechnology, USA)により37°Cで2時間一次反応を行った。PBSで3回洗浄後、0.5%ビオチル化ヤギIgG(Vector Laboratories)で30分間反応後、アビジン・ビオチン複合体(Vector Laboratories)により発色させた。核染色はメチルグリーンで行った。正常対照として、胆嚢摘出時に得た正常肝組織を用いた。また、リコンビナントHGFあるいはc-metと、抗HGF抗体あるいは抗c-met抗体とを各々2時間反応させたものを一次抗体として供することにより、吸収試験を行った。

HGFおよびc-met蛋白の発現の程度は、肝細胞1000個あたりの陽性細胞数の3視野平均値で評価し、スコア化した。すなわち、肝細胞1000個あたりの陽性細胞数が0-50を(-)、50-200を(+), 200-400を(++), 400以上を(+++)とした。

統計処理は、Wilcoxon rank testを用いた。肝HGFとc-met蛋白の発現量の相関はSpearmanの相関係数を用いた。肝c-met蛋白と肝細胞癌の臨床パラメーターとの比較は、 χ^2 検定により行った。p値は、5%未満を有意差ありとした。

結 果

1. 患者背景

表1に示すごとく、血清ビリルビン値は急性肝炎と肝硬変で慢性肝炎に比し高値であった。血清アルブミン値は肝細胞癌で慢性肝炎に比し低値であった。血清AST、ALT、LDH値は急性肝炎が他疾患に比し高値であった。血清AFP値、ICG15分停滞率は、肝硬変と肝細胞癌は急性肝炎、慢性肝炎に比し高値であった。

2. 抗体の特異性の検討

図1にHGFの吸収試験の結果を示す。HGFを抗HGF抗体と前処置したことにより、HGFの発現は消失した。図には示していないが、c-metについても同様の結果であった。これらのことから、

表 1. 患者背景因子

	急性肝炎	慢性肝炎	肝硬変	肝細胞癌
n(M/F)	7(2/5)	20(15/5)	9(6/3)	26(22/4)
年齢	43±16	48±12	55±14	62±8 ^b
病因				
A	5	0	0	0
B	1	3	1	8
C	1	15	8	16
NANBNC ^a	0	1	0	2
B + C	0	1	0	1
Bilirubin(mg/dl)	5.8±4.9 ^{c,d}	0.7±0.2	1.4±0.4 ^{c,d}	0.9±0.3
Albumin(g/dl)	3.6±0.6	4.0±0.4 ^e	3.8±0.8	3.7±0.4
AST(IU/L)	985±1641 ^{c,e,f}	82±68	78±38	80±50
ALT(IU/L)	1624±1845 ^{c,d,g}	124±99	105±93	80±56
γ-GTP(IU/L)	182±146	64±38	92±72	121±96 ^h
ALP(IU/L)	421±139 ^{e,h}	255±134	286±152	287±186
LDH(IU/L)	498±457 ^{c,d,g}	179±40	174±46	198±66
γ-globulin(g/dl)	1.5±0.3	1.6±0.4	1.9±0.6	1.8±0.5
Prothrombin time(%)	91±16	80±19	70±21	85±21
AFP(ng/ml)	3.9±2.7	5.9±6.0	412±601 ^{c,j}	604±1821 ^{c,j}
ICGR15 (%)		13±6	27±16 ^c	24±15 ^c
S-HGF(ng/ml)	0.33±0.24(5) ^k	0.23±0.08(11) ^k	0.23±0.06(6) ^k	0.30±0.10(6) ^k

平均±SD.

^a:IgM-HA 抗体, HBs抗原, HCV抗体 陰性^b:p<0.01 vs CH or AH. ^c:p<0.01 vs CH. ^d:p<0.01 vs HCC. ^e:p<0.05 vs HCC.^f:p<0.05 vs LC. ^g:p<0.01 vs LC. ^h:p<0.05 vs CH. ⁱ:p<0.05 vs AH. ^j:p<0.01 vs AH.^k: 検討症例数

今回使用した抗HGF抗体および抗c-met抗体の特異性が示された.

3. 肝疾患における肝組織HGFの発現

図2に各疾患におけるHGFの発現例を示す. HGF染色の陽性細胞は, 肝細胞と胆管上皮細胞に認められた. 図には示さないが, 正常肝組織にはHGFの発現を認めなかった.

HGFの発現量を, 各疾患別にスコア化したものを図3に示す. HGFの発現量の平均スコアは, 肝硬変1.89, 慢性肝炎1.65, 急性肝炎1.43であり, この3群間には有意差を認めなかったが, 肝細胞癌の平均スコア0とは有意差を認めた. また, HGFの発現細胞の分布は, 小葉内で一定の傾向を示さなかった.

4. 肝疾患における肝組織c-met蛋白の発現

図4に各疾患におけるc-met蛋白の発現例を示

す. c-met染色の陽性細胞は肝細胞, 肝癌細胞, 胆管上皮細胞に認められた.

c-met蛋白の発現量を, 各疾患別にスコア化したものを図5に示す. c-met蛋白の発現量の平均スコアは, 急性肝炎2.43, 肝細胞癌1.92であり, 慢性肝炎の1.15に比し有意に高値 (p<0.05) であった. なお, 肝硬変の平均スコアは1.78であった.

5. 肝組織HGFとc-met蛋白の発現量の相関

肝組織のHGFとc-met蛋白の発現量との間に相関関係があるか否かを検討した. 全疾患をまとめて検討した結果, 図6に示すごとく, 両者には相関関係を認めなかった (p=0.5467). 次に, 各疾患別に肝組織のHGFとc-met蛋白の発現量との相関関係を検討したところ, 図7に示すごとく, 肝硬変のみで両者間に正の相関関係を認めた (p<

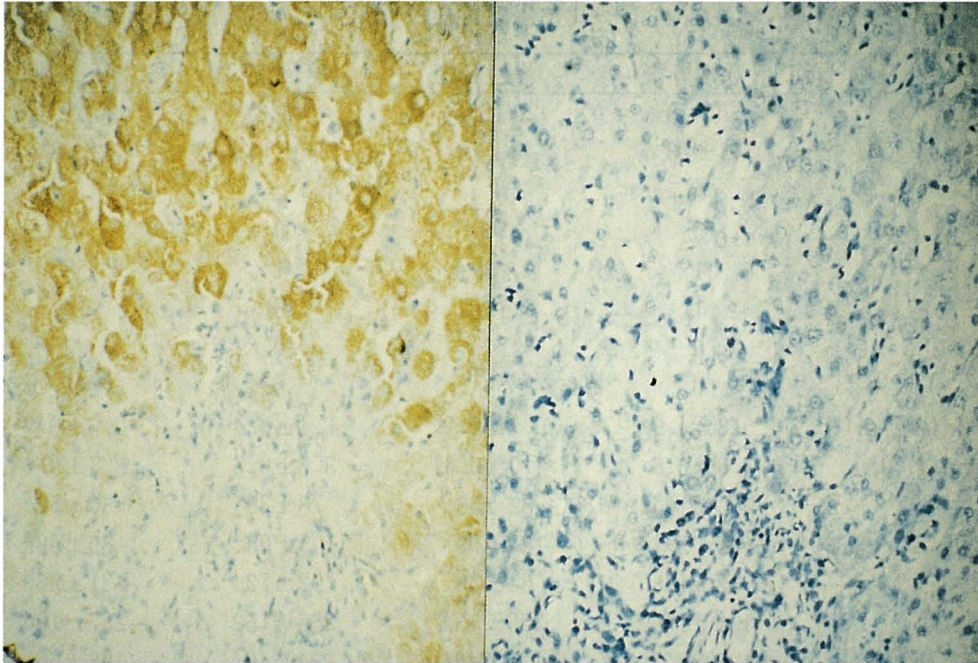


図1：抗HGF抗体の特異性（吸収試験，x200）

（左）慢性肝炎の抗HGF抗体陽性例。

（右）同症例において，抗HGF抗体をリコンビナントHGFで前処理したものを一次抗体として使用．陽性細胞は消失している．

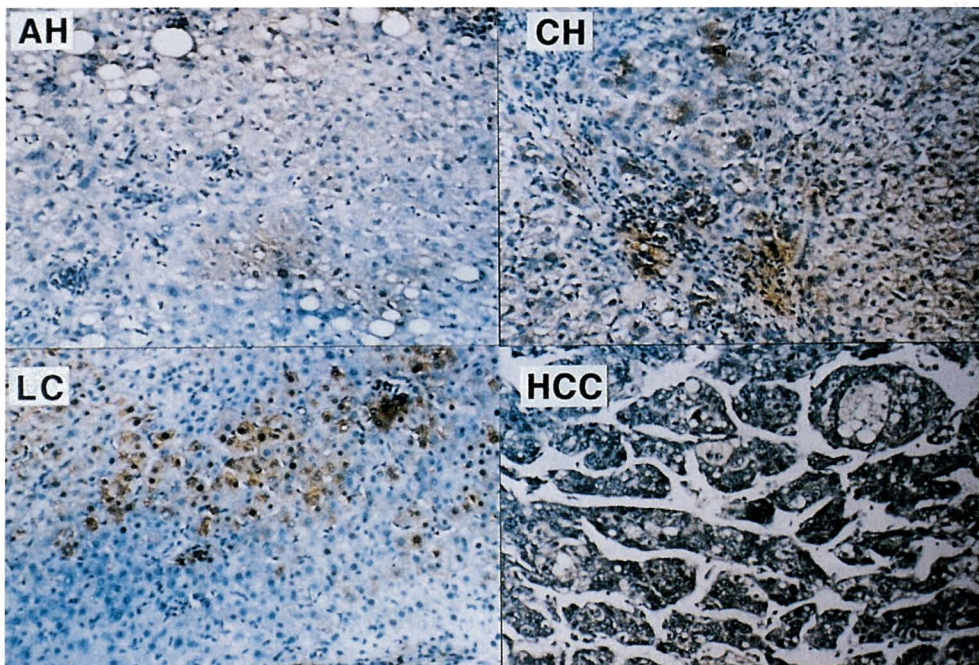


図2：各疾患における肝HGFの発現（x200）

AH:急性肝炎，CH:慢性肝炎，LC:肝硬変，HCC:肝細胞癌

（AH，CH，LC）：陽性細胞を，類洞内皮細胞，肝細胞，胆管上皮細胞に認める．

（HCC）：陽性細胞を認めない．

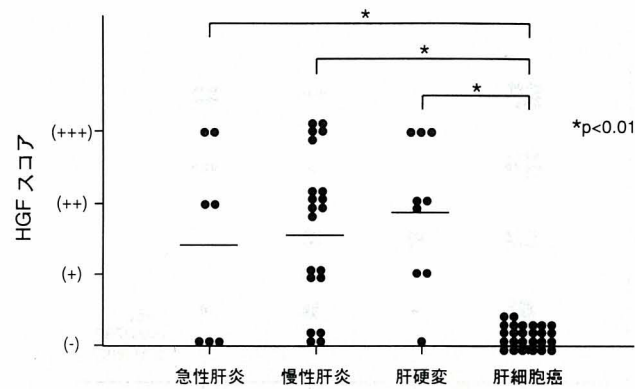


図3：各疾患におけるHGF発現量

急性肝炎，慢性肝炎，肝硬変においてHGFの強い発現を認める。

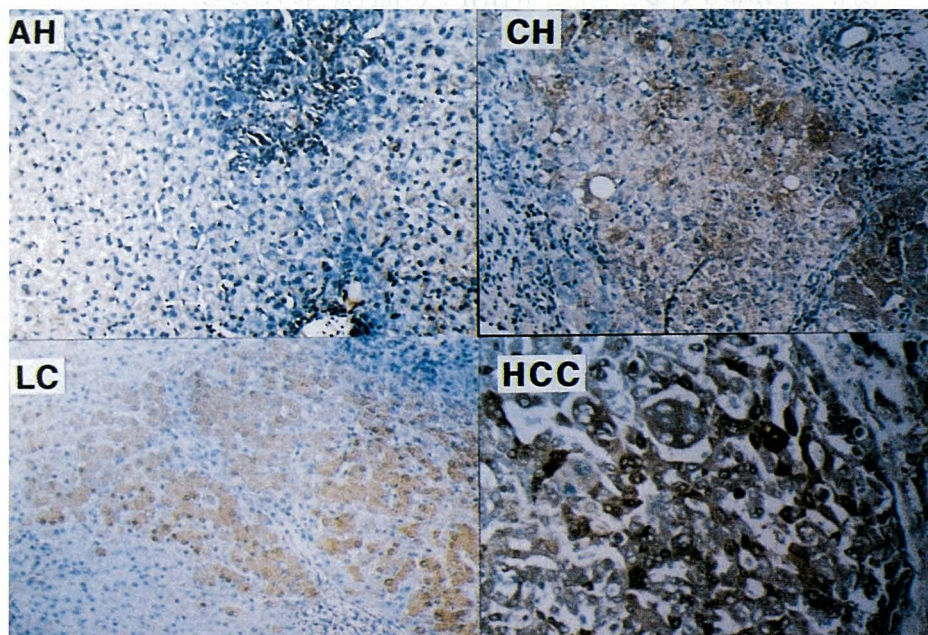


図4：各疾患における肝c-met蛋白の発現 (x200)

AH:急性肝炎，CH:慢性肝炎，LC:肝硬変，HCC:肝細胞癌

(AH, CH, LC, HCC):陽性細胞を，肝細胞，胆管上皮細胞，肝癌細胞に認める。

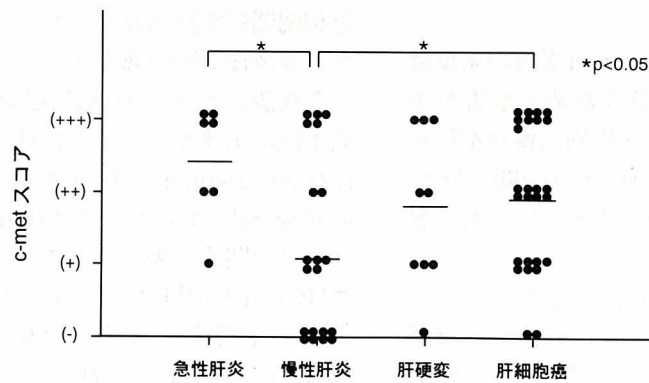


図5：各疾患におけるc-met 蛋白発現量

急性肝炎，肝細胞癌では慢性肝炎に比し，c-met蛋白の強い発現を認める。

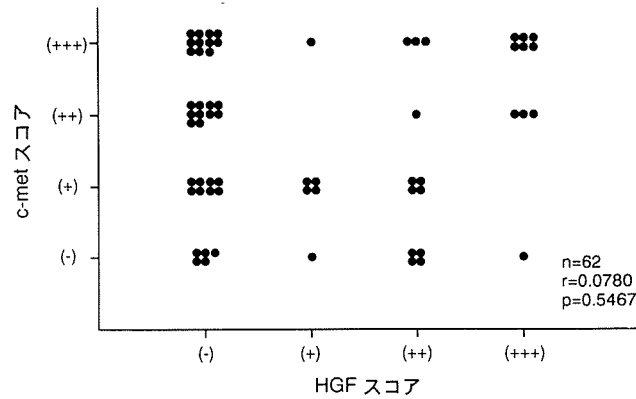


図6：全疾患を対象とした，肝HGFとc-met蛋白の発現量の相関
肝HGFとc-met蛋白の発現量との間には相関関係を認めない。

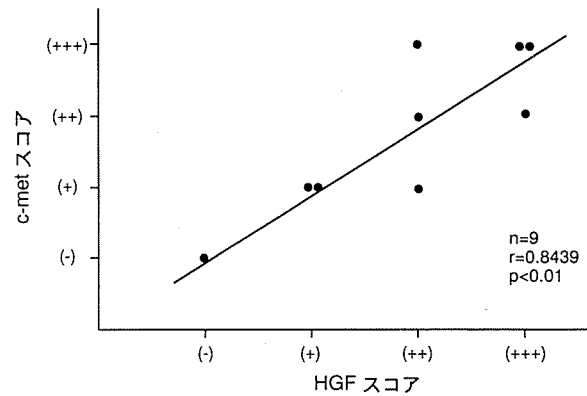


図7：肝硬変における肝HGFとc-met蛋白の発現量の相関
肝HGFとc-met蛋白の発現量との間には正の相関関係を認める。

0.01).

6. 肝組織HGF、c-met蛋白と血清HGF値との相関

次に，肝組織HGFあるいはc-met蛋白の発現量と，血清HGF値とに相関関係を認めるか否かを検討した．全疾患あるいは各疾患別に検討を行ったが，肝HGF発現量と血清HGF値の間，肝c-met蛋白発現量と血清HGF値との間にはともに有意な相関関係を認めなかった．

7. 肝細胞癌におけるc-met蛋白の発現

肝c-met蛋白の発現に影響を与える因子の有無について検討を行った．表2に示すごとく，肝細胞癌の分化度別に肝c-met蛋白発現量を検討したが，一定の傾向は認められなかった．また，肝細

胞癌の大きさ，門脈浸潤の有無，被膜の有無，血清AFP値，肝c-met蛋白発現量との間にも，有意な相関関係を認めなかった．

8. 血清HGF値と臨床パラメーターとの関係

各疾患における血清HGF値の平均は，表1の最下段に示すごとく，急性肝炎0.33ng/ml，慢性肝炎0.23ng/ml，肝硬変0.23ng/ml，肝細胞癌0.30ng/mlであった．血清HGF値と臨床パラメーターとの関係を表3に示す．肝硬変において，血清HGF値とAST値との間に正の相関を認めた．また，全疾患をまとめた検討において，血清HGF値とビリルビン値および γ -GTP値との間に正の相関関係を認めた．

表2. c-met 蛋白の発現と肝細胞癌の分化度との関係

c-metスコア	肝細胞癌分化度		
	高分化	中分化	低分化
(+++)	3	2	4
(++)	2	2	4
(+)	2	4	1
(-)	1	0	1

表3. 血清HGF値と臨床パラメータとの関係

	急性肝炎		慢性肝炎		肝硬変		肝細胞癌		全疾患	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
sHGF vs Bilirubin	0.76	0.1319	-0.31	0.3580	0.08	0.8860	0.62	0.9661	0.59	0.0009
sHGF vs Albumin	-0.46	0.4384	-0.18	0.6061	-0.41	0.4142	0.02	0.9630	-0.31	0.1096
sHGF vs AST	-0.43	0.4653	-0.17	0.6245	0.84	0.0355	0.43	0.3969	-0.06	0.7792
sHGF vs ALT	-0.29	0.6361	-0.21	0.5328	0.51	0.3055	0.67	0.2017	<0.01	0.9924
sHGF vs ALP	0.30	0.6994	0.19	0.5749	-0.05	0.9195	0.31	0.5524	0.24	0.2280
sHGF vs γ -GTP	0.72	0.2850	-0.35	0.2915	-0.37	0.4622	0.32	0.6043	0.43	0.0286
sHGF vs LDH	-0.28	0.7169	0.25	0.4497	-0.08	0.8810	0.40	0.4282	0.04	0.8258
sHGF vs γ -globulin	0.38	0.6179	-0.40	0.2844	0.40	0.4316	-0.84	0.0731	<0.01	0.9999
sHGF vs AFP	-0.19	0.8118	0.11	0.7559	-0.13	0.8051	-0.41	0.4254	-0.05	0.8224
sHGF vs Prothrombin time	-0.49	0.5056	-0.29	0.4238	0.20	0.1143	-0.15	0.7715	-0.18	0.3830
sHGF vs ICG R15			0.22	0.5123	-0.71	0.6728	-0.38	0.4536	0.13	0.5681

sHGF: 血清HGF

考 察

血清のHGF値が各種肝疾患において上昇していることが知られており²⁵⁾²⁸⁾³²⁾³⁴⁾, その機序として, HGF産生の増加あるいは肝クリアランスの低下が考えられている¹⁰⁾¹⁶⁾²⁵⁾ものの, 不明の点が多く, HGFの産生部位も明らかにされていない. また, HGFは*in vivo*で肝再生を促進する²⁶⁾にもかかわらず, 一般に予後の悪い劇症肝炎患者で, 血清HGF値が上昇している理由も分かっていない. よって, 各種肝疾患における肝HGFの発現を検討することは, その臨床的意義を考える上で重要である. 今回のわれわれの研究では, 肝でのHGF発現と, 血清HGF値との間に相関関係を認めなかったことから, 肝疾患で血清HGF値が上昇する機序として, 肝でのHGF産生よりも, 肝でのクリアランスの低下あるいは肝以外の臓器でのHGF産生が重要であると考えられた.

肝におけるHGFの産生細胞は, 類洞内皮細胞,

クッパー細胞, 伊東細胞などの報告があるが¹⁷⁾¹⁹⁾²²⁾, 免疫組織化学的手法を用いたわれわれの研究では, Zarnegarら³⁶⁾の報告と同様に, 肝細胞においてHGFの発現が認められた. その原因として以下のことが考えられる. ひとつは, 本研究で用いた抗HGF抗体が, HGFと同じ構造ドメインを有するhepatocyte growth factor-like protein (HGFL)¹⁾と交差反応を起こした可能性がある. いまひとつは, 障害肝ではクリアランスが低下しているためにHGFが長く肝細胞内に残留し, 抗HGF抗体がHGFレセプターであるc-met蛋白に結合後, 肝細胞内に取り込まれたものを認識した可能性である. これらの可能性を鑑別するためには, HGF特異的プローブによる*in situ hybridization*を今後行う必要がある.

c-met蛋白は, 化学的発癌物質処理後のヒト骨肉腫細胞株から同定されたproto-oncogeneであるが⁴⁾¹⁸⁾, 種々の上皮系細胞で発現していることが知られている⁶⁾³³⁾. さらに, c-met蛋白は,

HGFに対する高親和性のレセプターであることが報告された³⁾。c-met mRNAの発現が再生肝で増強していることが動物実験で報告されているが⁹⁾、ヒトの肝疾患におけるc-metの発現を検討した報告は少ない。そこで、われわれは免疫組織化学的手法により、各種肝疾患におけるc-met蛋白の発現を検討した結果、主に肝細胞にその発現が認められた。これは、肝細胞膜に存在するc-met蛋白にHGFが結合後、肝細胞内に取り込まれたものを認識しているか、あるいは蛋白合成能の増加を反映しているのかも知れない。肝におけるHGFとc-met蛋白の発現は、予想外に、肝硬変でのみ両者に相関関係を認め、急性肝炎や慢性肝炎では認められなかった。このことから、障害肝におけるHGFおよびc-met蛋白の発現は、それぞれが異なったメカニズムにより制御を受けていることが示唆された。

今回の研究において、肝細胞癌ではHGFの発現が認められず、これは以前の報告²⁴⁾と同じ結果であった。一方、c-met蛋白は肝細胞癌で高発現していることが示された。この所見は、c-met mRNAが肝細胞癌で非癌部に比し高発現していたとする報告²⁾と一致する。肝細胞癌において、c-metの発現の程度と癌の分化度との関連を検討した報告によると、肝細胞癌が低分化である程c-met蛋白の発現が強かったとする報告¹¹⁾と、c-met mRNAレベルでの検討では、肝細胞癌の分化度との関連はなかったとする報告²⁾とがあり、意見の一致をみていない。今回のわれわれの検討では、c-met蛋白の発現と肝細胞癌の分化度との間には相関関係を認めず、肝細胞癌の大きさ、門脈浸潤の有無、被膜の有無とも関連はなかった。この点については、今後のさらなる検討が必要である。

結 語

各種肝疾患におけるHGFおよびHGFレセプターであるc-met蛋白の発現を、免疫組織化学的に検討した。

1. HGFは急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変において高発現を認め、肝細胞癌では発現を認めなかった。
2. c-met蛋白は急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌でともに高発現を認めた。
3. 肝におけるHGFとc-met蛋白の発現程度の間

には、肝硬変でのみ正の相関関係を認め、急性肝炎、慢性肝炎、肝細胞癌では相関関係を認めなかった。

4. 肝HGFおよびc-met蛋白の発現は、血清HGF値と無関係であり、各種肝疾患における血清HGFの上昇には、肝外由来のHGFの増加や肝クリアランスの低下の関与が示唆された。

5. 肝細胞癌におけるc-met蛋白の発現の程度は、癌の悪性度を必ずしも反映していなかった。

稿を終えるにあたり終始懇切なる御指導と御校閲を賜りました鳥取大学内科学第2教室川崎寛中教授、また御校閲を賜りました同小児科学教室白木和夫教授、同臨床検査医学教室猪川嗣朗教授に深謝いたします。また直接御指導いただきました同内科学第2教室汐田剛史先生をはじめ教室員各位に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Bezerra JA, Witte DP, Aronow BJ, Friezner Degan SJ. (1993). Hepatocyte-specific expression of the mouse hepatocyte growth factor-like protein. *Hepatology* 18, 394-399.
- 2) Boix L, Rosa JL, Ventura F, Castells A, Bruix J, Rodes J, Bartrons R. (1994). c-met mRNA overexpression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 19, 88-91.
- 3) Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AML, Kmieciak TE, Vande Woude GF, Aaronson SA. (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 251, 802-804.
- 4) Cooper CS, Park M, Blair DG, Tainsky MA, Huebner K, Croce CM, Vande Woude GF. (1984). Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* 311, 29-33.
- 5) D'Errico A, Fiorentino M, Ponzetto A, Daikuhara Y, Tsubouchi H, Brechot C, Scoazec JY, Grigioni WF. (1996). Liver hepatocyte growth factor does not always

- correlate with hepatocellular proliferation in human liver lesions: Its specific receptor c-met does. *Hepatology* 24, 60-64.
- 6) Di Renzo MF, Narsimhan RP, Olivero M, Bretti S, Giordano S, Medico E, Gaglia P, Zara P, Comoglio PM. (1991). Expression of the Met/HGF receptor in normal and neoplastic human tissues. *Oncogene* 6, 1997-2003.
 - 7) Fang JWS, Bird GLA, Nakamura T, Davis GL, Lau JYN. (1994). Hepatocyte proliferation as an indicator of outcome in acute alcoholic hepatitis. *Lancet* 343, 820-823.
 - 8) Gohda E, Tsubouchi H, Nakayama H, Hirono H, Sakiyama O, Takahashi K, Miyazaki H, Hashimoto S, Daikuhara Y. (1988). Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with hepatic failure. *J Clin Invest* 81, 414-419.
 - 9) Ito T, Hayashi N, Horimoto M, Sasaki Y, Tanaka Y, Kaneko A, Fusamoto H, Kamada T. (1993). Expression of the c-met/hepatocyte growth factor receptor gene during rat liver regeneration induced by carbon tetrachloride. *Biochem Biophys Res Commun* 190, 870-874.
 - 10) Liu KX, Kato Y, Yamazaki M, Higuchi O, Nakamura T, Sugiyama Y. (1993). Decrease in hepatic clearance of hepatocyte growth factor in carbon tetrachloride-intoxicated rats. *Hepatology* 17, 651-660.
 - 11) Majima Y, Fujimoto T, Iwai I, Tanaka M, Sakai T, Abe M, Tanikawa K. (1988). Histological diagnosis of hepatocellular carcinoma by a new technique of ultrasound-guided fine needle biopsy. *Acta Hepatol Jpn* 29, 628-632.
 - 12) Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. (1984). Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 122, 1450-1459.
 - 13) Nakamura T, Teramoto H, Ichihara A. (1986). Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 6489-6493.
 - 14) Nakamura T, Nawa K, Ichihara A, Kaise N, Nishimoto T. (1987). Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets. *FEBS Lett* 224, 311-316.
 - 15) Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S. (1989). Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342, 440-443.
 - 16) Nakamura T. (1991). Structure and function of hepatocyte growth factor. *Progr Growth Factor Res* 3, 67-85.
 - 17) Noji S, Tashiro K, Koyama E, Nohno T, Ohyama K, Taniguchi S, Nakamura T. (1990). Expression of hepatocyte growth factor gene in endothelial and Kupffer cells of damaged rat livers, as revealed by in situ hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* 173, 42-47.
 - 18) Park M, Dean M, Cooper CS, Schmidt M, O'Brien SJ, Blair DG, Vande Woude GF. (1986). Mechanism of met oncogene activation. *Cell* 45, 895-904.
 - 19) Ramadori G, Neubauer K, Odenthal M, Nakamura T, Knittel T, Schwogler S, Meyer zum Buschenfelde K-H. (1992). The gene of hepatocyte growth factor is expressed in fat-storing cells of rat liver and is down regulated during cell growth and by transforming growth factor- β . *Biochem Biophys Res Commun* 183, 739-742.
 - 20) Roos F, Terrell TG, Godowski PJ, Chamow SM, Schwall RH. (1992). Reduction of α -naphthylisothiocyanate-induced hepatotoxicity by recombinant human hepatocyte growth factor. *Endocrinology* 131, 2540-2544.
 - 21) Sakaguchi H, Seki S, Tsubouchi H, Daikuhara Y, Niitani Y, Kobayashi

- K. (1994). Ultrastructural location of human hepatocyte growth factor in human liver. *Hepatology* 19, 1157-1163.
- 22) Schimacher P, Geerts A, Pietangelo A, Dienes HP, Rogler CE. (1992). Hepatocyte growth factor/hepatopoietin A is expressed in fat-storing cells from rat liver but not myofibroblast-like cells derived from fat-storing cells. *Hepatology* 15, 5-11.
- 23) Shimizu I, Ichihara A, Nakamura T. (1991). Hepatocyte growth factor in ascites from patients with cirrhosis. *J Biochem* 109, 14-18.
- 24) Shiota G, Rhoads DR, Wang TC, Nakamura T, Schmidt EV. (1992). Hepatocyte growth factor inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 373-377.
- 25) Shiota G, Okano J, Umeki K, Kawasaki H, Kawamoto T, Nakamura T. (1994). Serum hepatocyte growth factor in acute hepatic failure in comparison with acute hepatitis. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 85, 157-162.
- 26) Shiota G, Wang TC, Nakamura T, Schmidt EV. (1994). Hepatocyte growth factor in transgenic mice: Effects on hepatocyte growth, liver regeneration and gene expression. *Hepatology* 19, 962-972.
- 27) Shiota G, Kawasaki H, Nakamura T, Schmidt EV. (1995). Characterization of double transgenic mice expressing hepatocyte growth factor and transforming growth factor α . *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 90, 17-24.
- 28) Shiota G, Okano J, Kawasaki H, Kawamoto T, Nakamura T. (1995). Serum hepatocyte growth factor levels in liver diseases: Clinical implications. *Hepatology* 21, 106-112.
- 29) Suzuki K, Hayashi N, Yamada Y, Yoshihara H, Miyamoto Y, Ito Y, Ito T, Katayama K, Sasaki Y, Ito A, Kishida Y, Kashiwagi T, Fusamoto H, Kamada T. (1994). Expression of the c-met protooncogene in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 20, 1231-1236.
- 30) Tajima H, Matsumoto K, Nakamura T. (1991). Hepatocyte growth factor has a potent anti-proliferative activity in various tumor cell lines. *FEBS Lett* 291, 229-232.
- 31) Takehara T, Matsumoto K, Nakamura T. (1992). Cell-density dependent regulation of hepatocyte growth factor. *J Biochem* 112, 330-334.
- 32) Tomiya T, Nagoshi S, Fujiwara K. (1992). Significance of serum human hepatocyte growth factor levels in patients with hepatic failure. *Hepatology* 15, 1-4.
- 33) Tsarfaty I, Resau JH, Rulong S, Keydar I, Faletto DL, Vande Woude GF. (1992). The met proto-oncogene receptor and lumen formation. *Science* 257, 1258-1261.
- 34) 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). 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.
- 35) Zarnegar R, Michalopoulos G. (1989). Purification and biological characterization of human hepatopoietin A, polypeptide growth factor for hepatocytes. *Cancer Res* 49, 3314-3320.
- 36) Zarnegar R, Muga S, Rahija R, Michalopoulos GK. (1990). Tissue distribution of hepatopoietin A: A heparin-binding polypeptide growth factor for hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 1252-1256.