Потенциальное антипролиферативное действие фактора роста гепатоцитов на различные клеточные линии

Хисао Тайима, Кунио Мацумото, Тошиказу Накамура

Кафедра биологии, научный факультет, Университет Киушу, Факуока 812, Япония

Получено 7 августа 1991 г.

Фактор роста гепатоцитов (ФРГ) обладает митогенной активностью в отношении зрелых гепатоцитов и различных нормальных эпителиальных клеток. Сейчас у нас есть данные, что ФРГ в концентрациях 1—10 нг/мл заметно тормозит пролиферацию клеток рака печени линии HepC2, клеток меланомы B6/F1 и клеток плоскоклеточного рака KB. Эти опухолевые клетки экспрессируют рецепторы, высокоаффинные к ФРГ, с K_d 25—28 пмоль, как и гепатоциты. ФРГ в концентрациях 1—100 нг/мл выраженного цитолитического действия на опухолевые клетки не оказывает. Таким образом, антипролиферативное действие ФРГ на опухолевые клетки, вероятно, имеет цитостатическую, а не цитолитическую природу. Поскольку ФРГ влияет на клеточную пролиферацию двунаправленно, заслуживает внимания вопрос о его применении в качестве противоопухолевого средства.

Фактор роста гепатоцитов (ФРГ), противоопухолевое средство, торможение пролиферации, рецептор ФРГ

1. ВВЕДЕНИЕ

Фактор роста гепатоцитов (ФРГ) — новый фактор роста, состоящий из альфа-субъединицы 69 кДа и бета-субъединицы 34 кДа [1—3]. Клонирование кДНК ФРГ выявило, что ФРГ является результатом протеолиза единственного белка-предшественника, состоящего из 728 аминокислот. ФРГ гомологичен плазминогену на 38% [4, 5]. ФРГ в концентрациях 5—8 нг/мл (60—90 пмоль) ускоряет пролиферацию зрелых гепатоцитов в первичной культуре. Активность ФРГ и экспрессия мРНК ФРГ оказались заметно повышенными в печени и плазме крыс с повреждением печени различного характера [6—9]. Кроме того, уровни ФРГ были повышены в асцитической жидкости у больных с циррозом печени [10]. У зрелых гепатоцитов в первичной культуре экспрессируется высокоаффиннный рецептор к ФРГ с Kd 20—30 пмоль и 500—600 сайтами связывания ФРГ [11]. Рецептор ФРГ имеется на разнообразных эпителиальных клетках, в том числе зрелых гепатоцитах, но не на мезенхимальных клетках, таких, как фибробласты и гемопоэтические клетки. ФРГ ускоряет пролиферацию различных эпителиальных клеток, таких, как клетки почечных канальцев [12], кератиноциты [13] и меланоциты [14], но заметно не влияет на пролиферацию мезенхимальных клеток. Фактор рассеяния, впервые описанный Stoker и соавт., — это продукт фибробластов, усиливающий подвижность клеток. Как оказалось, этот фактор идентичен ФРГ [15, 16]. Рекомбинантный человеческий ФРГ в физиологических концентрациях заметно усиливает

миграцию эпителиальных клеток различных типов, в том числе клеток почечного эпителия собаки MDCK [17]. Сейчас у нас данные о том, что ФРГ оказывает цитостатическое антипролиферативное действие на различные опухолевые клетки, а, значит, является регулятором пролиферации двунаправленного действия и, возможно, может применяться в качестве противоопухолевого средства.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Клеточная культура

Клетки HepG2 (рак печени человека, подарок компании Genetech) и KB (эпидермоидный рак человека, JCR B 9027) культивировали в среде Дюльбекко в модификации Игла с добавлением 10% сыворотки коровьего эмбриона. Клетки B6/F1 (меланома мышей, подарок компании Genetech) культивировали в смеси среды Дюльбекко в модификации Игла и среды F12 Харнса (1:1) с добавлением 10% сыворотки коровьего эмбриона.

2.2. Количественная оценка синтеза ДНК и клеточной пролиферации

Клетки сеяли с плотностью 1×10^4 клеток на 1 $см^2$ на пластмассовую плашку с 24 лунками (Cornig) и культивировали в среде с соответствующим количеством ФРГ. Через 4 суток культивирования клетки метили ^{125}I-дезоксиуридином с активностью 0,3 мКи/мл (2200 Ки/ммоль, New England Nuclear) в течение 4 часов, отмывали двукратно раствором фосфатного буфера и однократно 10% раствором трихлоруксусной кислоты, а затем растворяли в 1-молярном растворе NaOH. Радиоактивность клеток измеряли с помощью гамма-счетчика.

Для количественной оценки клеточной пролиферации клетки сеяли (клетки B6/F1 —8×10^4 клеток на лунку, клетки HepG2 — 4×10^4 клеток на лунку) на плашку с 6 лунками (Cornig) и культивировали в присутствии ФРГ в различных концентрациях в течение 4 суток. Клетки диссоциировали, обрабатывая их трипсином; число клеток подсчитывали с помощью гемоцитометра.

2.3. Связывание с рецептором ФРГ

Для изучения свойств рецептора ФРГ проводили связывание ^{125}I-ФРГ с клетками по следующей методике: культуры уравновешивали в буфере для реакции связывания (раствор Хэнка, содержащий гидроксиэтилпиперазинэтансульфоновую кислоту в концентрации 2 ммоль, и сывороточный бычий альбумин, pH 7,0) в течение 30 минут при 10°C. Затем добавляли ледяной буфер для реакции связывания, содержащий возрастающие концентрации ^{125}I-ФРГ с или без немеченого ФРГ в 100-кратной концентрации и инкубировали смесь в течение 1 часа при 10°C. Культуры трехкратно отмывали ледяным буфером для реакции связывания и после растворения клеток в 1 -молярном растворе NaOH измеряли активность связанного ^{125}I-ФРГ.

2.4. Количественная оценка цитолитической активности

Цитолитическую активность оценивали следующим образом: клетки сеяли с плотностью 5×10^4 клеток на одну лунку на плашку с 24 лунками (Cornig). На следующий день среду заменяли на свежую и различные клетки метили с

использованием раствора $Na^{51}CrO_2$ с активностью 70 мкКи\мл (250—500 мКи\мг Cr, Amersham) при 37°C в течение 2,5 часов. Культуры трехкратно отмывали свежей средой и культивировали в течение 24 часов в среде, содержащей соответствующие концентрации ФРГ. Радиоактивность в среде и клеточном лизате, растворенном в 2% растворе додецилсульфата натрия, измеряли с помощью гамма-счетчика, и процент цитолиза подсчитывали по следующей формуле:

$$\% \text{ цитолиза} = 100 \times (A-A_0)/(A+Б),$$

где А — ралиоактивность среды для исследуемых клеток, культивированных с ФРГ в течение 24 часов,

Б — радиоактивность, оставшуюся в клетках после культивирования,

A_0 — радиоактивность среды для исследуемых клеток, культивированных без ФРГ, что означает спонтанное высвобождение ^{51}Cr.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Торможение синтеза ДНК под влиянием ФРГ

ФРГ тормозил синтез ДНК прямо пропорционально концентрации (рисунок 1). Выраженных морфологических изменений ФРГ в любых концентрациях не вызывал, что доказано с помощью фазово-контрастной микроскопии (не показано). Максимальное торможение (50—70%) наблюдалось при концентрации ФРГ 5—10 нг/мл. В более высоких концентрациях (свыше 10 нг/мл) торможение синтеза ДНК больше не нарастало. Для сравнения изучено влияние ФРГ на синтез ДНК зрелых гепатоцитов, причем в концентрациях 5—8 нг/мл ФРГ заметно ускорял синтез ДНК гепатоцитов. Следовательно, ФРГ обладает двунаправленным действием на синтез ДНК. Стимулирующее или ингибиторное действие ФРГ определяется типов клеток, нормальных или измененных: ФРГ стимулирует синтез ДНК гепатоцитов в первичной культуре, но тормозит синтез ДНК клеток рака печени HepG2. Аналогично, ФРГ стимулирует пролиферацию гепатоцитов [14], но угнетает пролиферацию клеток меланомы B6/F1.

3.2. Торможение клеточной пролиферации под влиянием ФРГ

Ингибиторное действие ФРГ на синтез ДНК опухолевых клеток выявили при изучении пролиферации опухолевых клеток (рисунок 2). ФРГ прямо пропорционально своей концентрации подавлял пролиферацию опухолевых клеток, причем максимальное торможение на 50—70% отмечалось при концентрациях 5—10 нг/мл ФРГ, что согласуется с результатами в отношении синтеза ДНК.

3.3. Рецепторы ФРГ на опухолевых клетках

Изучение рецепторов ФРГ показало, что ^{125}I-ФРГ связывается с опухолевыми клетками пропорционально концентрации, и связывание достигает насыщения (рисунок 3). Как показано на рисунке 3, кривые связывания указывают на существование только одного класса сайтов связывания, экспрессированных на опухолевых клетках. K_d и B_{max} для опухолевых и нормальных клеток представлены в таблице 1. На изученных опухолевых клетках экспрессировано примерно 300—1500 сайтов связывания

на одну клетку с K_d 25—28 пмоль. Следовательно, значимых различий в отношении рецепторов ФРГ на опухолевых и нормальных клетках не выявлено.

3.4. Цитостатическое действие ФРГ на опухолевые клетки

Цитолиз, обусловленный действием ФРГ, составлял не более 2,5% при концентрациях ФРГ 5—10 нг/мл, когда ФРГ подавлял и клеточную пролиферацию, и синтез ДНК (таблица 2). Более того, даже при такой высокой концентрации ФРГ, как 100 нг/мл, цитолиз не превысил 5%. Следовательно, антипролиферативное действие ФРГ в физиологической концентрации на опухолевые клетки является цитостатическим, а не цитолитическим по своей природе.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

Как установлено, ФРГ оказывает цитостатическое действие на пролиферацию опухолевых клеток. Поскольку половина максимальной дозы, вызывающей торможение пролиферации, согласуется с K_d (25—28 пмоль) рецепторов ФРГ на опухолевых клетках, возможно, что торможение клеточной пролиферации под действием ФРГ имеется и при его физиологических концентрациях. Относительно недавно Bottaro и соавт. сообщили, что рецептор ФРГ идентичен продукту протоонкогена c-met [18]. Поскольку протоонкоген c-met кодирует тирозинкиназу, связанную с трансмембранным рецептором, вероятно, действие ФРГ в первую очередь обусловлено аутофосфорилированием рецептора. Однако опухолевые клетки экспрессируют рецептор ФРГ, неотличимый по аффинности и количеству от рецептора на нормальных клетках, двунаправленное действие ФРГ, вероятно, не связано с различиями рецептора ФРГ на нормальных и опухолевых клетках. Возможно, опухолевые и нормальные клетки различаются по передаче внутриклеточного сигнала после этапа фосфорилирования ФРГ под действием тирозинкиназы.

Позже Shiots и соавт. сообщили, что пролиферация клеток рака печени FaO, трансфицированных вектором, содержащим кДНК ФРГ, связанную с альбуминовым промотором, заметно замедлялась по сравнению с родительскими клетками, причем после имплантации клеток безволосым мышам одновременно снижались и процент привитых опухолей, и их размер [19]. В совокупности эти результаты указывают, что ФРГ может тормозить пролиферацию опухолевых клеток in vivo и in vitro.

Higashio и соавт. утверждали, что опухолевый цитотоксический фактор, выделенный в очищенном виде из среды IMR90 (фибробласты легкого человеческого эмбриона), идентичен или очень схож с ФРГ [20]. В то же время, Sone и соавт. обнаружили, что у человека опухолевый цитолитический фактор является продуктом макрофагов альвеол и моноцитов крови [21, 22]. Эти авторы изучили цитотоксические свойства ФРГ/опухолевого цитолитического фактора при очень высоких концентрациях. Как оказалось, при физиологических концентрациях ФРГ присуще скорее цитолитическое, а не цитотоксическое действие.

В предыдущем исследовании мы отметили, что ФРГ тормозит пролиферацию нормальных человеческих кератиноцитов, культивированных при низкой концентрации кальция (0,1 ммоль) [13]. При таких условиях кератиноциты быстро пролиферировали, но окончательной дифференцировке не подвергались, в отличие от клеток, культивированных при физиологической

концентрации кальция (1,8 ммоль). Поскольку кератиноциты при низкой концентрации кальция проявили те же свойства, что и опухолевые клетки, антипролиферативное действие ФРГ, возможно, играет роль и в нормальных клетках, когда стимулируется их пролиферация, но без окончательной дифференцировки.

ФРГ — мощный митоген для зрелых гепатоцитов в первичной культуре; также он, вероятно, играет важную роль в регенерации печени после повреждения [6—10]. ФРГ не только стимулирует клеточную пролиферацию и регенерацию тканей, но и оказывает антипролиферативное действие на некоторые опухолевые клетки, а также и нормальные клетки при определенных условиях. Таким образом, ФРГ может действовать как отрицательный регулятор, подавляющий пролиферацию опухолевых клеток или нормальных клеток в процессе гиперплазии. ФРГ играет важную роль в поддержании тканевого гомеостаза благодаря двунаправленному действию. Антипролиферативное действие ФРГ на опухолевые клетки указывает на его возможное применение в качестве противоопухолевого средства.

Таблица 1. K_d и B_{max} для рецептора ФРГ на нормальных и опухолевых клетках

Клетки	Тип клеток	Рецептор ФРГ	
		K_d (пмоль)	B_{max} (сайтов на клетку)
Нормальные			
Гепатоцит[1]	клетки печеночной паренхимы (крысы)	24	565
Клетки почечных канальцев	эпителиальные (кролик)	28	720
Меланоцит[2]	эпидермальные (человек)	22	120
Кератиноцит[3]	эпидермальные (человек)	17—45	700—1100
Опухолевые			
KB	эпидермоидный рак (человек)	25	750
B6/F1	меланома (мышь)	24	350
HepG2	рак печени (человек)	25	1510

K_d и B_{max} для рассчитаны методом Скетчарда, как показано на рисунке 3Б.
1—3 Результаты, взятые из литературных источников. См. {11], [14] и [13] соответственно.

Таблица 2. Влияние ФРГ на цитолитическое высвобождение ^{51}Cr из опухолевых клеток

Клетки	ФРГ (нг/мл)	Высвобождение ^{51}Cr		% цитолиза
		в среде для культивирования (А) (импульс в	в клетках (Б) (импульс в минуту)	$(A-A_0)/(A+Б) \times 100$ (%)

		минуту)		
HepG2	0	11 876±0	35 722±1050	0
	5	11 905±29	39 196±367	0
	10	12 026±91	36 785±1163	0
	100	11 471±46	37 215±23	0
B6/F1	0	24 340±1411	54 108±642	0
	5	25 116±722	55 603±824	0,2
	10	25 482±220	54 806±729	0,4
	100	29 163±521	52 288±298	4,8
KB	0	21 900±59	60 297±15	0
	5	22 139±796	60 391±1199	0,2
	10	23 638±509	57 672±1866	2,5
	100	22 278±444	53 161±997	2,9

Каждая величина представлена средней ± SD при трехкратном измерении
A_0 — высвобождение ^{51}Cr (импульсов в минуту) в среде для культивирования исследуемых клеток в отсутствие ФРГ

Рисунок 1. Влияние ФРГ на синтез ДНК в клетках HepG2, B6/F1б и KB и гепатоцитах. Клетки сеяли на плашку с 24 лунками с плотностью 1×10^4 клеток на 1 $см^2$ и культивировали в средах, содержащих соответствующие концентрации ФРГ. Клетки культивировали в течение 4 суток, а затем метили ^{125}I-дезоксиуридином в течение 4 часов. Представлены средние величины после трехкратных измерений: (●) клетки B6/F1; (О) клетки HepG2, (▲) клетки KBб (Δ) гепатоциты

Рисунок 2. Влияние ФРГ на пролиферацию клеток HepG2, B6/F1б и KB. Клетки сеяли на плашку с 6 лунками (клетки B6/F1 —8×10^4 клеток на лунку, клетки HepG2 — 4×10^4 клеток на лунку) и культивировали в присутствии ФРГ в различных концентрациях в течение 4 суток. Клетки диссоциировали, обрабатывая их трипсином; число клеток подсчитывали с помощью гемоцитометра. Представлены средние величины после двукратных измерений: (●) клетки B6/F1; (О) клетки HepG2, (▲) клетки KBб

Рисунок 3. Связывание ^{125}I-ФРГ с рецептором на клетках HepG2, B6/F1б и KB. Клетки инкубировали с ледяным буфером для реакции связывания, содержащий возрастающие концентрации ^{125}I-ФРГ с или без немеченого ФРГ в 100-кратной концентрации и инкубировали смесь в течение 1 часа при 10°С. **А:** кривая насыщения специфических сайтов связывания ^{125}I-ФРГ в среде, содержащей возрастающие концентрации ^{125}I-ФРГ: (●) клетки B6/F1; (О) клетки HepG2, (▲) клетки KBб. **Б:** график Скетчарда для сайтов связывания ^{125}I-ФРГ. Обозначения те же, что на А.

Volume 291, number 2, 229–232 FEBS 10294 October 1991
© 1991 Federation of European Biochemical Societies 00145793/91/$3.50
ADONIS 001457939101003W

Hepatocyte growth factor has potent anti-proliferative activity in various tumor cell lines

Hisao Tajima, Kunio Matsumoto and Toshikazu Nakamura

Department of Biology, Faculty of Science, Kyushu University, Fukuoka 812, Japan

Received 7 August 1991

Hepatocyte growth factor (HGF) has potent mitogenic activity for mature hepatocytes and various normal epithelial cells. We now have evidence that HGF at 1–10 ng/ml, strongly inhibits the growth of HepG2 hepatocellular carcinoma cells, B6/F1 melanoma cells and KB squamous carcinoma cells. These tumor cells express high affinity receptors for HGF with a K_d of 25–28 pM, similar to findings with hepatocytes. HGF at 1–100 ng/ml had no significant cytolytic effect on tumor cells. Therefore, the anti-proliferative effect of HGF on tumor cells seems to be cytostatic, not cytolytic.

As HGF apparently has bidirectional effects on cell growth, the possibility that it can serve as an anti-tumor agent merits attention.

Hepatocyte growth factor (HGF); Anti-tumor agent; Growth inhibition; HGF receptor

1. INTRODUCTION

Hepatocyte growth factor (HGF) is a novel growth factor composed of a 69 kDa α-subunit and a 34 kDa β-subunit [1–3]. HGF cDNA cloning revealed that HGF derives by proteolytic processing from a single precursor protein consisting of 728 amino acids, and the homology with plasminogen is 38% [4,5]. HGF at 5–8 ng/ml (60–90 pM) promotes the growth of mature parenchymal hepatocytes in primary culture. HGF activity and expression of HGF mRNA were markedly increased in livers or plasma of rats with various liver injuries [6–9] and elevated levels of HGF were noted in ascites from patients with cirrhosis [10]. Mature hepatocytes in primary culture express a high affinity receptor for HGF, exhibiting K_d=20–30 pM and 500–600 sites/hepatocyte [11]. HGF receptor is widely distributed in various epithelial cells, including mature hepatocytes, but apparently not in mesenchymal cells such as fibroblasts and hematopoietic cells. HGF enhances the growth of various epithelial cells such as renal tubular cells [12], keratinocytes [13] and melanocytes [14], but it has no evident effect on growth of mesenchymal cells. Scatter factor first described by Stoker and his colleagues is a fibroblast-derived factor which enhances cell motility and was found to be identical to HGF [15,16]. Indeed, recombinant human HGF markedly enhances the migration of various species of epithelial cells, including MDCK canine renal epithelial cells, at physiological concentrations [17]. We have now obtained evidence that HGF has cytostatic anti-proliferative effects on various species of tumor cells, hence may be a bidirectional growth regulator, and possibly a putative anti-tumor agent.

Correspondence address: T. Nakamura, Department of Biology, Faculty of Science, Kyushu University, Fukuoka 812, Japan. Fax: (81) (92) 632 2741.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *Cell cultures*

HepG2 (human hepatocellular carcinoma, a gift from Genentech, Co.) and KB (human epidermoid carcinoma, JCRB 9027) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's (DME) medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). B6/F1 (mouse melanoma, a gift from Genentech Co.) cells were cultured in a mixture of DME and Ham's F12 medium (1:1) supplemented with 10% FCS.

2.2. *Measurement of DNA synthesis and cell growth*

Cells were seeded at a density of 1×10^4 cells/cm^2 on a 24-well plastic plate (Corning), and cultured in medium containing an appropriate amount of HGF. After 4 days of culture, the cells were pulse-labeled with 0.3 μCi/ml [^{125}I]deoxyuridine (2200 Ci/mmol, New England Nuclear) for 4 h, then were washed twice with phosphate-buffered saline and once with 10% (w/v) ice-cold TCA and solubilized with 1 M NaOH. The radioactivity incorporated to the cells was counted in a γ-counter.

To measure the cell growth, the cells were seeded (8×10^4 cells/well for B6/F1 cells and KB cells, and 4×10^4 cells/well for HepG2 cells) on 6-well plates (Corning) and cultured in the presence of various concentrations of HGF for 4 days. The cells were dissociated by trypsin-treatment and the number of cells was determined using a hemocytometer.

2.3. *Binding assay for HGF receptors*

To characterize HGF receptors, binding of [^{125}I]HGF to cells was analyzed as follows: cultures were equilibrated in binding buffer (Hank's solution containing 20 mM HEPES, 2 mg/ml bovine serum albumin, pH 7.0) for 30 min at 10°C. Ice-cold binding buffer containing increasing concentrations of [^{125}I]HGF, with or without a 100-fold excessive concentration of unlabeled HGF, was added and the preparation incubated for 1 h at 10°C. Subsequently cultures were rinsed three times with ice-cold binding buffer, and [^{125}I]HGF bound

02. 11. 15 (金) 10:20 FAX番号:03-3481-6065 P. 002/005

to cells was measured in a γ-counter after solubilization of the cells with 1 M NaOH.

2.4. *Measurement of cytolytic activity*

Cytolytic activity was measured as follows: cells were plated at a density of 5×10^4 cells/well on a 24-well plate (Corning). The next day, the medium was replaced with fresh medium and viable cells were labeled with 70 μCi/ml $Na^{51}CrO_2$ (250–500 mCi/mg Cr, Amersham) at 37°C for 2.5 h. Cultures were washed three times with fresh medium and cultured for 24 h in medium containing appropriate concentrations of HGF. The radioactivities in the culture media and cell lysates dissolved in 2% SDS were counted in a γ-counter, and the percent of cytolysis was calculated as follows:

$$\% \text{ of cytolysis} = 100 \times (A - A_0)/(A + B),$$

wherein A represents radioactivity in culture medium of target cells cultured with HGF for 24 h, B represents radioactivity remaining in target cells after cultivation, and A_0 represents radioactivity in culture medium of target cells cultured without HGF, which means the spontaneous release of ^{51}Cr.

3. RESULTS

3.1. *Inhibition of DNA synthesis by HGF*

HGF dose-dependently inhibited DNA synthesis of tumor cells (Fig. 1). There were no significant morphological changes seen with any concentration of HGF, as examined under a phase-contrast microscope (not shown). The maximal inhibition seen with 5–10 ng/ml HGF corresponds to 50–70% of inhibition. At higher concentrations (>10 ng/ml), there was no further inhibition of DNA synthesis by HGF. For purpose of comparison, the effect of HGF on DNA synthesis of mature parenchymal hepatocytes was examined, HGF at 5–8 ng/ml markedly stimulated DNA synthesis of hepatocytes. Therefore, HGF has bidirectional effects on DNA synthesis and the stimulatory or inhibitory effect of HGF seems to depend on the cell type, that is normal or transformed: HGF stimulates DNA synthesis of hepatocytes in primary culture, but inhibits that of HepG2 hepatocellular carcinoma cells. Similarly, HGF stimulates the growth of melanocytes [14], but inhibits that of B6/F1 melanoma cells.

Table I

K_d and B_{max} values of an HGF receptor on normal and tumor cells

Cells	Cell type	HGF receptor	
		K_d (pM)	B_{max} (sites/cell)
Normal cells			
Hepatocyte[a]	parenchymal liver cell (rat)	24	565
Renal tubular cell	epithelial (rabbit)	28	720
Melanocyte[b]	epidermal (human)	22	120
Keratinocyte[c]	epidermal (human)	17–45	700–1100
Tumor cells			
KB	epidermoid carcinoma (human)	25	750
B6/F1	melanoma (mouse)	24	350
HepG2	hepatocellular carcinoma (human)	25	1510

K_d and B_{max} values in tumor cells were calculated from Scatchard analysis as shown in Fig. 3B.

[a–c] The results were taken from our reported results. See references [11], [14] and [13], respectively.

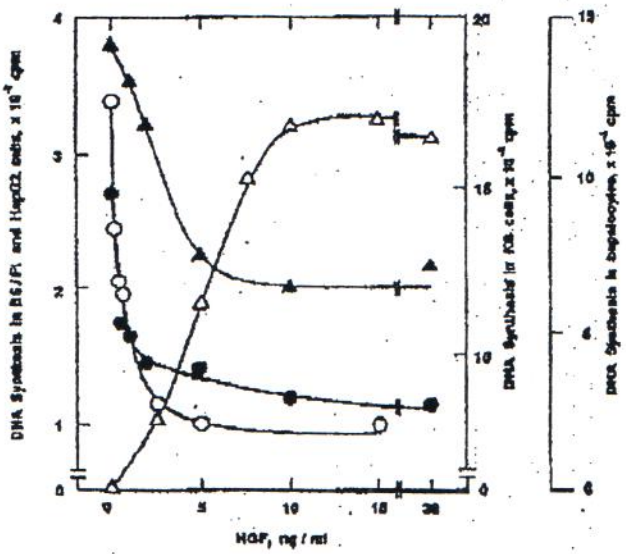

Fig. 1. Effect of HGF on the DNA synthesis of HepG2, B6/F1, KB cells and hepatocytes. Cells were plated in 24-well plates at a density of 1×10^4 cells/cm^2 and cultured in medium containing an appropriate amount of HGF. Cells were cultured for 4 days and pulse-labeled with [^{125}I]-deoxyuridine for 4 h. The average of triplicate measurements is shown: (●) B6/F1 cells, (○) HepG2 cells, (▲) KB cells and (△) hepatocyte.

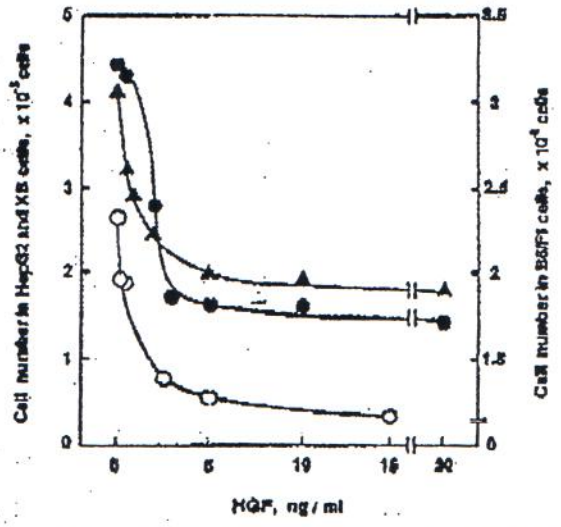

Fig. 2. Effect of HGF on growth of HepG2, B6/F1 and KB cells. Cells were plated in 6-well plates at a density of 8×10^4 cells/well for B6/F1 cells and KB cells, and 4×10^4 cells/well for HepG2 cells and cultured in the presence of various concentrations of HGF for 4 days. Cells were dissociated by trypsin-treatment and the number of cells was determined using a hemocytometer. The average of duplicate measurements is shown: (●) B6/F1 cells, (○) HepG2 cells and (▲) KB cells.

Table II

Effect of HGF on cytolytic release of ^{51}Cr from tumor cells

Cells	HGF	^{51}Cr release in		% of cytolysis
		cultured medium (A) (cpm)	cells (B) (cpm)	$((A-A_0)/(A+B)\times100)$
	ng/ml)			(%)
HepG2	0	11 876 ± 0	35 722 ± 1050	0
	5	11 905 ± 29	39 196 ± 367	0
	10	12 026 ± 91	36 785 ± 1163	0
	100	11 471± 46	37 215 ± 23	0
B6/F1	0	24 340 ± 1411	54 108 ± 642	0
	5	25 116 ± 722	55 603 ± 824	0.2
	10	25 482 ± 220	54 806 ± 729	0.4
	100	29 163 ± 521	52 288 ± 298	4.8
KB	0	21 900 ± 59	60 297 ± 15	0
	5	22 139 ± 796	60 391 ± 1199	0.2
	10	23 638 ± 509	57 672 ± 1866	2.5
	100	22 278 ± 444	53 161 ± 997	2.9

Each value is the mean ± SE of triplicate measurements. A_0 is ^{51}Cr release (cpm) in cultured medium of target cells in the absence of HGF.

3.2. *Inhibition of cell growth by HGF*

Inhibitory effects of HGF on DNA synthesis of tumor cells were evident when proliferation of the tumor cell lines was examined (Fig. 2). HGF dose-dependently suppressed the growth of tumor cells, and the maximal inhibition by 50–70% was seen with 5–10 ng/ml HGF, findings consistent with the effects on DNA synthesis.

3.3. *HGF receptors on tumor cells*

Analysis of HGF receptors showed that [^{125}I]HGF binds to these tumor cells in a concentration-dependent manner and that the binding is saturable (Fig. 3A). As shown in Fig. 3B, Scatchard plots of the binding indicated a single class of high affinity binding sites expressed on these tumor cells. K_d and B_{max} values of tumor cells and other normal cells are summarized in Table I. The tumor cell lines tested express approximately 300–1500 binding sites/cell with K_d of 25–28 pM. Therefore, there were no significant differences in HGF receptors between normal and tumor cell lines.

3.4. *Cytostatic effect of HGF on tumor cells*

The cytolysis caused by HGF was less than 2.5% at 5–10 ng/ml, concentrations at which HGF strongly suppressed both cell growth and DNA synthesis (Table II). Moreover, the cytolysis was still less than 5% at concentration as high as 100 ng/ml HGF. Therefore, the anti-

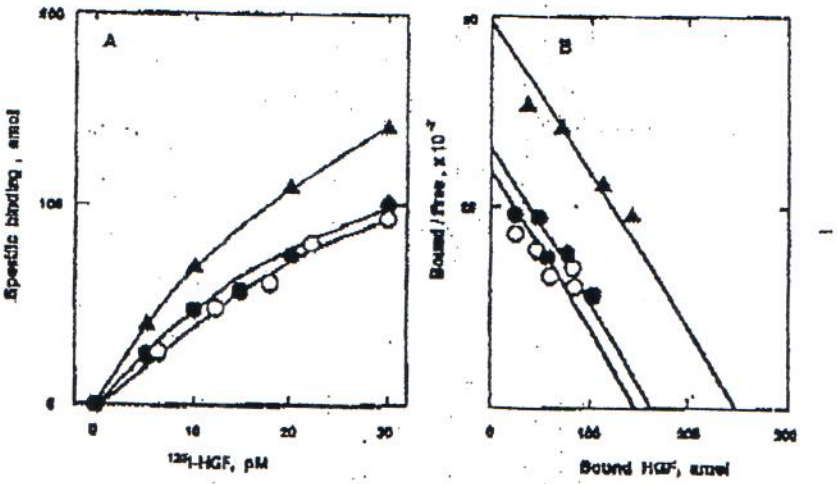

Fig. 3. Analysis of [^{125}I]HGF binding to the receptor on B6/F1 HepG2 and KB cells. Cells were incubated for 1 h at 10°C with ice-cold binding buffer containing increasing concentrations of [^{125}I]HGF with or without a 100-fold excessive concentration of unlabeled HGF. (A) Saturation curves of [^{125}I]HGF specific binding on cells exposed to increasing concentrations of [^{125}I]HGF are shown: (●) B6/F1 cells, (○) HepG2 cells and (▲) KB cells. (B) Scatchard plots of [^{125}I]HGF binding on these cells are shown. Symbols are the same as in (A).

2002. 11. 15 (金) 10:20 FAX番号:03-3481-6065 P. 004/005

proliferative effect of HGF on tumor cells is a cytostatic but not direct cytolytic effect, at physiological concentrations.

4. DISCUSSION

HGF was seen to have a cytostatic effect on the growth of tumor cells. Because the half-maximal dose exhibiting growth inhibition is consistent with the K_d values (25–28 pM) of HGF receptor on tumor cells, cell growth inhibition induced by HGF may be functioning at physiological concentrations of HGF. Recently, Bottaro et al. reported that HGF receptor is identical to *c-met* proto-oncogene product [18]. As the *c-met* proto-oncogene encodes transmembrane-associated receptor tyrosine kinase, the primary event following HGF binding to its receptor seems to be autophosphorylation of the receptor. However, because these tumor cell lines express HGF receptor which is indistinguishable in affinity or the number from that of the normal cells, the bidirectional effects of HGF do not seem to be due to differences in HGF receptors between normal and tumor cells. It is likely that intracellular signalling pathways downstream from tyrosine phosphorylation of HGF receptor differ between normal and tumor cells.

More recently, Shiota et al. reported that the growth of FaO hepatocellular carcinoma cells stably transfected with an expression vector containing HGF cDNA linked to albumin promotor was markedly retarded compared to that of parental cells, and both tumorigenicity and size of tumors when implanted into nude mice were markedly decreased [19]. Taken together, these results indicate that HGF can inhibit growth of tumor cells both in vitro and in vivo.

Higashio et al. stated that tumor cytotoxic factor (TCF) purified from conditioned medium of IMR90 (human embryonic lung fibroblast) is identical or highly related to HGF [20], and Sone et al. found tumor cytolytic factor (TCF) is produced by human alveolar macrophages and blood monocytes [21,22]. They examined the cytotoxic effect of HGF/TCF at extremely higher concentrations. HGF has no significant cytolytic activity, rather it has cytostatic effects at physiological concentrations.

In our previous study, we noted that HGF inhibited the growth of normal human keratinocytes cultured under conditions of low Ca^{2+} (0.1 mM) [13]. In the presence of low Ca^{2+} (0.1 mM), keratinocytes proliferate rapidly, while the terminal differentiation of cells is suppressed in undifferentiated states, in contrast to cells cultured under physiological Ca^{2+} (1.8 mM). Since keratinocytes in low Ca^{2+} seems to have properties similar to those of tumor cells, growth inhibitory effects of HGF may be also present in normal cells when the growth is extraordinarily promoted without undergoing a normal differentiation.

HGF is a potent mitogen for mature hepatocytes in primary culture and seems to have an important role as hepatotropic factor in liver regeneration after hepatic insult [6–10]. In addition to stimulating of cell growth and tissue repair, HGF has an antiproliferative effect on several tumor cells, and normal cells, under extraordinary conditions. Therefore, HGF may function as a negative regulator to suppress growth of tumor cells or normal cells during hyperplasia. HGF has an important role to sustain homeostasis of tissue organization by its bidirectional effects on cell growth. The antiproliferative effect of HGF on tumor cells suggests that this factor may be a putative anti-tumor agent.

Acknowledgements: We thank M. Ohara for helpful comments. This work was supported by Research Grants for Science and Cancer from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan.

REFERENCES

[1] Nakamura, T., Nawa, K. and Ichihara, A. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 122, 1450–1459.
[2] Nakamura, T., Teramoto, H. and Ichihara, A. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 6489–6493.
[3] Nakamura, T., Nawa, K., Ichihara, A., Kaise, N. and Nishino, T. (1987) FEBS Lett. 224, 311–316.
[4] Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugiyama, A., Tashiro, K. and Shimizu, S. (1989) Nature 342, 440–443.
[5] Tashiro, K., Hagiya, M., Nishizawa, T., Seki, T., Shimonishi, M., Shimizu, S. and Nakamura, T. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3200–3204.
[6] Kinoshita, T., Tashiro, K. and Nakamura, T. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 174, 831–838.
[7] Noji, S., Tashiro, K., Kayama, F., Nohno, T., Oyama, K., Taniguchi, S. and Nakamura, T. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 173, 42–47.
[8] Asami, O., Ihara, I., Shimizu, N., Shimizu, S., Tomita, Y., Ichihara, A. and Nakamura, T. (1991) J. Biochem. 109, 8–13.
[9] Konishita, T., Hirao, S., Matsumoto, K. and Nakamura, T. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 330–335.
[10] Shimizu, I., Ichihara, A. and Nakamura, T. (1991) J. Biochem. 109, 14–18.
[11] Higuchi, O. and Nakamura, T. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 176, 599–607.
[12] Igawa, T., Kanda, S., Kanetake, H., Saitoh, Y., Ichihara, A., Tomita, Y. and Nakamura, T. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 174, 831–838.
[13] Matsumoto, K., Hashimoto, K., Yoshikawa, K. and Nakamura, T. (1991) Exp. Cell. Res. 196 (in press).
[14] Matsumoto, K., Tajima, H. and Nakamura, T. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 176, 45–51.
[15] Gherardi, E. and Stoker, M. (1990) Nature 346, 228.
[16] Stoker, M. and Gherardi, E. (1991) Biochem. Biophys. Acta. 1072, 81–102.
[17] Furlong, R.A., Takehara, T., Taylor, W.G., Nakamura, T. and Rubin, J.S. (1991) J. Cell. Sci. (in press).
[18] Bottaro, D.P., Rubin, J.S., Faletto, D.L., Chan, A.M.L., Kmiecik, T.E., VandeWoude, G.F. and Aaronson, S.A. (1991) Science 251, 802–804.
[19] Shiota, G., Rhoads, D.B., Nakamura, T. and Schmidt, E.V. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA (in press).
[20] Higashio, K., Shima, N., Goto, M., Itagaki, Y., Nagao, M., Yasuda, H. and Morinaga, T. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 170, 397–404.
[21] Sone, S., Tachibana, K., Ishii, K., Ogawara, M. and Tzubura, E. (1984) Cancer Res. 44, 646–651.
[22] Sone, S., Lopez-Berestein, G. and Fidler, I.J. (1986) Cancer Immunol. Immunother. 21, 93–99.