

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K08402

研究課題名(和文) HGFによる骨髄移植での樹状細胞制御を介した免疫寛容誘導機構の解析

研究課題名(英文) Inhibition of DC cells by HGF for immune tolerance induction in a mouse model of bone marrow allotransplantation

研究代表者

水野 信哉 (Mizuno, Shinya)

岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号：10219644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚や消化器を冒すGVHDは骨髄移植(BM)患者の30-50%にみられる深刻な病態である。HGFは心や腎などの移植において免疫寛容をもたらすが、BM-GVHDなどの炎症性疾患に対する作用については不明な点も多い。今回、LPSとBM-GVHDの炎症モデルを用いて解析を行った。その結果、炎症マウスでは血中HGFレベルは数倍に上昇してマクロファージ(M $\phi$ )やDC細胞にc-Metの発現が高まること、HGFを投与するとM $\phi$ /DC細胞でのc-Metリン酸化亢進に一致してサイトカインストームが減弱することがわかった。M $\phi$ /DC細胞培養系ではHGFによるIDO1誘導に依存してサイトカインストームが軽減した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BM後に発症するGVHDはサイトカインストーム(CS)に依存する。CSは活性化したM $\phi$ やDC細胞が放出する炎症性サイトカインの過剰な反応によってもたらされる。一方、HO1やIDO1といったオキシゲナーゼは炎症病態や自己免疫疾患において免疫寛容をもたらす。今回の研究によりこのような病態ではHGFがM $\phi$ /DC細胞などの免疫指令細胞を直接標的とし、オキシゲナーゼの誘導を介してCS抑制と免疫寛容を促す可能性を見いだした。CSはGVHDのみならず敗血症や新型コロナウイルス感染症などでも問題視される共通病態であり、HGF補充療法がこのような疾患を制圧する可能性を示した上で大きなインパクトを持つ。

研究成果の概要(英文)： Graft versus host disease is one of the most pathological events after bone marrow transplantation (BMT), with a clinical frequency of 30-50% among them. HGF is known to induce immunological tolerance in animal models of cardiac and renal transplantation, but it is still unclear how HGF acquires the tolerant responses at molecular levels. Thus, we used murine models of LPS- and BMT-induced inflammation to address the molecular basis of HGF-induced anti-immunological outcomes.

As a result, we found that blood HGF levels apparently increased in the murine models during systemic inflammation, associated with the increase in c-Met active levels in macrophages and possibly in DC cells. Importantly, HGF injection further enhanced the c-Met activation in these immunogenic cells, along with the decreased blood levels of inflammatory cytokines. In addition, we found that induction of IDO1 by HGF is, at least in part, responsible for the inhibitory effect of HGF on cytokine storm in vitro.

研究分野：実験病理学

キーワード：HGF c-Met macrophages immune response cytokine storm

## 1. 研究開始当初の背景

腎臓や肝臓、心臓等の臓器移植においてドナー側とレシピエント側の MHC 完全一致は一卵性双生児などに限定されており、完全一致に近い MHC 適合性選択と免疫抑制剤の生涯服用という妥協のもとに実施されて来た。白血病の根本治癒を目指した骨髄移植においても同様であり、とりわけ MHC 適合性の不一致はドナー由来白血球がレシピエント臓器を攻撃することによって皮膚や腸管、肝臓などの組織傷害、すなわち移植片対宿主病 (Graft versus host disease; GVHD) の発症が臨床上的大きな課題として取り残されている。

一方、肝細胞増殖因子 (HGF) は肝再生を駆動する肝再生因子の実体として、代表者が所属した大阪大学・中村敏一研究室で精製・遺伝子クローニングされたサイトカインである。私達は世界に先駆けて HGF は肝臓のみならず、腎臓、肺、皮膚、消化管といった上皮系臓器に対し、組織修復・臓器保護をもたらす内因性修復因子の実体であることを病態モデル動物により明らかにして来た [Mizuno-S et al. Gastroenterol Res Pract 2012; 909350, 2012; Proc Jpn Acad Ser B. 86(6): 588-610, 2010]。HGF は心筋細胞や神経ニューロンに対しては HGF 受容体/c-Met のチロシンリン酸化を介して、心保護作用、ニューロン保護作用、神経突起伸長による機能改善効果を発揮する [Nakamura-T, Mizuno-S et al., J Clin Invest 106(12): 1511-9, 2000]。

HGF は免疫寛容を誘導するサイトカインとしても際立った特徴を有する。HGF はラットの腎移植モデルにおいて移植直後からの 2-4 週間投与が免疫抑制剤の完全離脱、すなわち免疫寛容を誘導する [J Am Soc Nephrol 12(6):1280-92, 2001]。以上の効果はマウスの心移植モデル、ラットの肝移植モデルでも再現されている。さらにマウスを用いたアロ骨髄移植後の GVHD モデルにおいて HGF は強力な臓器保護、再生効果を発揮することが報告されている [J Clin Invest 107(11):1365-73, 2001]。以上に関連して、私達は炎症病態ではマクロファージや樹状細胞 (DC 細胞) といった免疫指令細胞にも HGF 受容体である c-Met が強く発現している事象を発見していた [Kamimoto-M, Mizuno-S et al., Biochem Biophys Res Commun 380(2): 333-7, 2009; Int J Mol Med 24(2): 161-70, 2009]。

しかしながら、骨髄移植をはじめ、炎症病態における HGF の作用機序、とりわけ DC 細胞などの免疫指令細胞に対する機能についてはよく知られていない現状であった。

## 2. 研究の目的

我国では骨髄移植は年間 1,200 件程度、臍帯血移植を合わせると、年間 2,000-2,500 件程度実施されているが、GVHD II 度以上の発症率は 30-50%、III 度以上の発症率は 10-20%と無視できない数字である。骨髄移植後に GVHD が惹起される要因としてサイトカインストームが知られている。GVHD と同様にサイトカインストームを主徴とする代表的な疾患として敗血症があげられる。

以上の背景をもとに、骨髄移植や敗血症病態における免疫指令細胞に対する HGF の機能、ならびにシグナル伝達系を明らかにすることを目指した。特にサイトカインストームに着目することによって、骨髄移植や臓器移植、敗血症といった炎症病態に共通する“生体防御機構”に対する HGF-c-Met カスケードの重要性を明らかにすることを学術上の目的とした。

## 3. 研究の方法

代表者はマウス骨髄移植の系を用いて虚血による急性腎不全後の腎ネフロン修復、とりわけ尿細管や血管の修復における骨髄由来細胞の寄与率の検証を行った実績を有する [Ohnishi-H, Mizuno-S et al., Am J Physiol Renal Physiol 294(2): F326-35, 2008; J Vet Med Sci 77(3): 313-9, 2015]。そこで今回、GVHD マウスモデルを作出し、HGF および c-Met の発現動態を生化学的または病理組織学的に解析を行った。さらに炎症モデルとしてリポポリサッカライド (LPS) を投与した敗血症のマウスモデルを用いて、同様の解析を行った (in vivo 解析)。

研究代表者は培養マクロファージを用いてサイトカインストームにおける増殖因子の役割に関する研究を行った実績を有する [Kamimoto-K, Mizuno-S et al., Int J Mol Med 24(2): 161-70, 2009]。そこで HGF の作用起点やシグナル伝達機構を明らかにするために、培養細胞を用いてマウス骨髄細胞から誘導した DC 細胞やマクロファージを用いて HGF により誘導される機能分子の機能解析を、おもに炎症性サイトカインおよび抗炎症性サイトカインに着目して行った (in vitro 解析)。ついで各種シグナル伝達阻害剤を用いて、HGF-cMet 経路の下流に位置する実行分子の同定を試みた。さらに、炎症組織で産生される HGF 分子内断片、すなわち HGF-断片 (Fragment-X) とその受容体 (Receptor-Y) についても同様の解析を行った。

以上、マウスを用いた in vivo 解析、ならびに培養細胞を用いた in vitro の解析、両者を組み合わせることにより、炎症病態における生体防御因子としての HGF (ならびに分子断片) の重要性を検証することとした。

## 4. 研究成果

### A. In vivo 解析

- (1) 敗血症の発症に前後して、血中 HGF 濃度が数倍に上昇した。これに一致した肝臓や腎臓、肺での HGF 産生量も上昇した。組織学的には HGF はマクロファージや血管内皮細胞に発現していた。一方、受容体である c-Met のチロシンリン酸化は上皮細胞以外にはマクロファージ系の細胞に観察された。GVHD のモデルにおいても同様の傾向を示した。
- (2) リコンビナント HGF を炎症病態のマウスモデルに投与すると、マクロファージにおける c-Met チロシンリン酸化増強に一致して臓器傷害の軽減が認められた。
- (3) これに一致して IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IFN- $\gamma$ , HMGB1 などの炎症性サイトカインの上昇でみたサイトカインストームは軽減することがわかった。
- (4) 以上の結果から、炎症病態ではマクロファージや DC 細胞などの免疫指令細胞における c-Met チロシンリン酸化の程度（すなわち HGF シグナル伝達系の強さ）が病態を抑制する方向に作用している可能性が強く示唆された。

### B. In vitro 解析

- (1) マウス由来の培養マクロファージを用いて HGF による抗炎症作用を解析した。その結果、IL-1, IL-6, IL-17, IFN- $\gamma$ , HMGB1 といった炎症性サイトカインの分泌が HGF により抑制された。
- (2) HGF による抗炎症効果にはヘムオキシゲナーゼ 1 (HO1) とインドールオキシゲナーゼ 1 (IDO1) の発現上昇を随伴していた。そこで、HO1 阻害剤または IDO 阻害剤を用いると、HGF による抗サイトカインストーム効果は部分的に解除されることがわかった。
- (3) 培養マクロファージでの HGF による IDO1 発現上昇には細胞内に存在するあるキナーゼ（キナーゼ XX）の発現増加に一致していた。そこで、このキナーゼ XX 特異的な阻害剤を用いると、HGF による IDO1 発現誘導の大半がキャンセルされることが示された。また、HGF による TNF- $\alpha$  や IL-6 の発現制御には NF- $\kappa$ B 活性化に依存することも判明した。
- (4) 次に、ラット骨髓細胞より誘導した DC 細胞の培養系を用いて、HGF 分子内断片（Fragment-X）の影響を解析した。その結果、IL-4 刺激により誘導した M2 タイプの DC 細胞には Receptor-Y に対して、Fragment-X は免疫寛容を誘導する Interleukin-Z の産生を mRNA レベルで数十倍に高める事象を発見した。
- (5) この事象は Interleukin-Z の転写を促す転写因子 Stat3 の活性化に依存していた。すなわち、IL-4 による Stat3 活性化には ERK による Stat3 の 727 番目セリン残基のリン酸化ならびに Jak1,2,3 による 706 番目チロシン残基のリン酸化が重要であるが、HGF 分子内断片である Fragment-X は単独でも ERK のリン酸化を顕著に高める機能を有していることが判明した。さらに Fragment-X は Stat1,2,3 のリン酸化そのものも高める機能を示した。

以上の結果から、骨髓移植後の GVHD や敗血症に共通するサイトカインストームに対して、HGF-c-Met 経路は IDO1 の発現誘導を介して抑制的に機能している可能性がはじめて示された。さらに、炎症臓器で分解される HGF の断片が本来の受容体とは異なる分子に結合し、JAK1,2,3 経路および ERK 経路の活性化を介して免疫寛容に重要な役割を果たすサイトカイン産生を劇的に促すことが判明した。すなわち、HGF は本来の受容体である c-Met に作用して炎症を沈める一方、HGF の一部を切り離し、残った断片分子が c-Met とは異なる受容体を利用して免疫寛容を誘導する、といったユニークな 2 刀流作用を発揮している可能性が明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Shinya MIZUNO, Eriko OHSAKI and Hiroyuki OHNISHI	4. 巻 9
2. 論文標題 TNF Type-I receptor inhibitor, R-7050 attenuates acute kidney injury in a mouse model of crush syndrome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pharmacology and Pharmacy	6. 最初と最後の頁 547-558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4236/pp.2018.912043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Eriko OHSAKI and Shinya MIZUNO	4. 巻 13
2. 論文標題 Kinase Phosphorylation-based Mechanisms of PARP Inhibitor Resistance During Synthetic Lethal Oncotherapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Signal Transduction Therapy	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1574362413666180724134204	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takashi KATO and Shinya MIZUNO	4. 巻 66
2. 論文標題 Nephron, Wilms' tumor-1 (WT1), and synaptopodin expression in developing podocytes of mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 183-189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.16-0101	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shinya MIZUNO and Eriko OSAKI	4. 巻 4
2. 論文標題 DNA-Checkpoint kinase, ATR is a promising target for synthetic lethality-aimed anti-tumor therapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Tumor Research	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4172 / jtr.1000110	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shinya MIZUNO and Yoko MIZUNO-HORIKAWA	4. 巻 7
2. 論文標題 Up-regulation of local TGF-beta contributes to a decrease in renal Na+-K+-ATPase and hyperkalemia in amouse model of crush syndrome.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Pharmacology and Pharmacy	6. 最初と最後の頁 481-492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4236/pp.2016.712054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 水野信哉	4. 巻 44
2. 論文標題 敗血症病期でのHMGB1産生に対する脾臓の相反機能	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 細胞 (ニューサイエンス社)	6. 最初と最後の頁 31-33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiroyuki OHNISHI, Shinya MIZUNO S, Yoko MIZUNO-HORIKAWA, Takashi KATO	4. 巻 77
2. 論文標題 Stromal cell-derived factor-1 (SDF1)-dependent recruitment of bone marrow-derived renal endothelium-like cells in a mouse model of acute kidney injury	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci	6. 最初と最後の頁 313-319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 水野信哉, 大崎恵理子	4. 巻 78
2. 論文標題 増殖因子産生源としての脾臓による肝再生調節機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 血液内科 (科学評論社)	6. 最初と最後の頁 765-773
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水野信哉
2. 発表標題 肝細胞増殖因子 (HGF) によるマクロファージでのインドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO) 誘導の意義
3. 学会等名 第28回日本病態生理学学会 (横浜市立大学医学部)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水野信哉
2. 発表標題 シンポジウム：炎症機構と連携した肝再生の分子機構：急性肝炎モデルにおける炎症性サイトカインによる増殖因子の誘導
3. 学会等名 第24回肝細胞研究会 (旭川市民文化会館) (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水野信哉
2. 発表標題 交感神経刺激と炎症性サイトカインによるHGF誘導を介した肝再生機構：70%肝切除と急性肝炎のモデルを用いた解析
3. 学会等名 第27回病態生理学学会 (国立精神神経センター)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水野信哉、水野洋子
2. 発表標題 胆管硬化症マウスモデルでのHGFによる抗線維化機構とその分子機構の解析
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会 (鹿児島大学)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水野信哉、水野洋子
2. 発表標題 横紋筋融解症マウスモデルにおけるTNF1型受容体を介した急性腎傷害発症機構
3. 学会等名 第90回日本生化学学会（神戸国際会議場）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水野信哉、水野洋子
2. 発表標題 70%部分肝切除マウスにおける 1 交感神経刺激による肝再生分子機構の解析
3. 学会等名 第16回日本再生医療学会（仙台国際センター）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水野信哉、水野洋子
2. 発表標題 グリセロール腎症マウスモデルにおける近位尿管上皮でのBcl-xL 誘導を介した腎皮質保護効果
3. 学会等名 第25回日本病態生理学会（愛媛大学）
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 水野信哉
2. 発表標題 Happy Growth Factor (HGF) の発見に導かれて:疾患モデル動物でのPOC 獲得から臨床応用への苦難な道のり
3. 学会等名 第78回岡山実験動物研究会（岡山理科大学40周年記念ホール）（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 Shinya MIZUNO and Eriko Ohsaki	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 10
3. 書名 Chaptor-6. Molecular basis for fibrogenesis and angiogenesis during chronic liver disease: Impact of TGF-beta and VEGF on pathogenic mechanisms. In: Liver Diseases. A Multidisciplinary Textbook (Edited by Titau Ion et al.)	

1. 著者名 Shinya MIZUNO	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 27
3. 書名 Chapter-6. Angiogenesis-based strategy by HGF for the treatment of ischemic organ diseases: from biology to clinical trials. In: Biochemical basis and therapeutic implications of angiogenesis (2nd Edited by Jawahar L.Mehta)	

1. 著者名 Shinya MIZUNO and Yoko MIZUNO-HORIKAWA	4. 発行年 2016年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 12
3. 書名 Chapter-64. Transforming growth factor- (TGF- ) targeting strategies for prevention of coronary arterial restenosis post-angioplasty. In: Coronary Graft Failure: State of the Art (edited by Cook S.P. et al.)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>(1) Researchmap <a href="https://researchmap.jp/caepn010/">https://researchmap.jp/caepn010/</a></p> <p>(2) ResearcGate <a href="https://www.researchgate.net/profile/Shinya_Mizuno">https://www.researchgate.net/profile/Shinya_Mizuno</a></p> <p>(3) 大阪大学研究者総覧 (2015-2017年) <a href="http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/view?l=ja&amp;u=4471">http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/view?l=ja&amp;u=4471</a></p> <p>以上のホームページを用いて、情報公開に努めている。</p>
--



## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	大西 浩之  (Ohnishi Hiroyuki)	北里大学・医療衛星学部・講師	
研究協力者	水野 洋子  (Mizuno Yoko)	大阪大学・医学部・技術職員	
研究協力者	大崎 恵理子  (Osaki Eriko)	大阪大学・大学院医学系研究科・助教(学内講師)	