

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2005～2008

課題番号：17607007

研究課題名（和文）

気管支喘息の発症・難治化におけるHGFの役割解明と再生医療への応用

研究課題名（英文） Effects of hepatocyte growth factor in the mechanism of airway hyperresponsiveness, inflammation and remodeling.

研究代表者

金廣 有彦（KANEHIRO ARIHIKO）

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：20243503

研究成果の概要：

今回の気管支喘息の発症・難治化における肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor; HGF）の研究において、喘息発症モデル及び気道リモデリングモデルを作製後、リコンビナントHGF及び抗HGF抗体を投与し気道炎症、気道過敏性、Th2サイトカインやTGF- $\beta$ 等の増殖因子さらに気道上皮細胞、上皮平滑筋や線維性変化を検討した。その結果、HGFがアレルギー性気道炎症、気道過敏性の抑制効果のみでなく、すでに形成された気道リモデリングに対しても抑制的に制御することが明らかとなり、HGFは今後極めて有用な重症難治性喘息治療薬として期待される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	1,300,000	0	1,300,000
2006年度	900,000	0	900,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,500,000	390,000	3,890,000

研究分野：呼吸器・アレルギー内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 呼吸器内科学

キーワード：HGF、気管支喘息、マウス喘息モデル、気道リモデリング、再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息の発症に重要な役割を果たす自然免疫（Innate Immunity）と獲得免疫（Adaptive Immunity）の相互作用には未だ不明な点が多く、これらと気道上皮細胞の傷害、気道基底膜下結合組織の肥厚を特徴とする不可逆性の線維化（気道リモデリング）との関係は全く明らかにされていない。申請者はこれまで喘息病態における好酸球

及びT細胞の関与を解明する目的で種々のマウス喘息モデルを作製し、世界ではじめてgdT細胞が気道過敏性をdown-regulateしていることを*Nature Med*に報告し、さらにgdT細胞サブセットであるVg4<sup>+</sup>CD8b<sup>+</sup>T細胞がMHC class I依存性に気道過敏性を抑制的に制御することを*Proc Natl Acad Sci USA*に報告した。申請者のpreliminaryな実験においてTCR-d deficient miceの気道上皮細胞には肝細胞

増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) 受容体であるc-Metが著明に減少しており、さらに recombinant HGF投与によりwild type miceでは気道炎症及び気道過敏性は有意に抑制されるのに対し、TCR-d deficient miceでは効果が認められなかったことより、HGFがgdT細胞の気道過敏性に対する抑制効果を制御している可能性が示唆されるが、そのメカニズムは複雑で明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

HGFは胎生期においては肺上皮組織の成長及びその形態形成を促す“器官形成因子”としてはたらし、成体では傷害を受けた組織を速やかに修復しその機能を回復させる“器官再生因子”として作用するが、喘息病態における意義は全く不明である。申請者はpreliminaryな実験よりrecombinant HGFが気道炎症を抑制することを確認しており、今回、喘息発症モデル及び慢性喘息モデルを作製後、recombinant HGF及びanti-HGF antibodyを投与し気道炎症及び気道過敏性の変化、Th1及びTh2サイトカイン、線維化の中心的growth factorであるtransforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )とその主たる産生細胞である好酸球と筋線維芽細胞、またHGF受容体であるc-Metの動態、さらに気道上皮細胞の傷害、気道基底膜下結合組織の肥厚などの気道の線維性変化を測定することにより、HGFが喘息の発症を抑制し、重症難治化の改善のみでなくすでに完成された線維化に対しても治癒効果をもたらすことが明らかとなり、HGFによる再生医療への応用が可能となる。

## 3. 研究の方法

(1) マウス喘息発症モデル、喘息モデル及びリモデリングモデルの作製

すでに申請者らのグループにより確立された喘息モデルより、まず下記モデルを作製し、これらを基本モデルとして recombinant HGF あるいは anti-HGF などの monoclonal antibody を投与し検討を行う。

① 卵白アルブミン(OVA)で吸入暴露のみ1日から3日間施行するモデル。

② OVAで2回腹腔内感作後、OVAを3日間吸入暴露するモデル。

③ OVAで2回腹腔内感作、3日間吸入暴露後、OVAにて隔日で4週間、6週間あるいは8週間持続吸入暴露を繰り返すモデル。

④ OVAで2回腹腔内感作、3日間吸入暴露後、OVAにて隔日で4週間、6週間あるいは8週間持続吸入暴露後、4週から8週間経時的に測定するモデル。

今回の研究で使用するマウスは、Balb/c mice、BL/6 mice、TCR- $\cdot$ 及びTCR- $\cdot$  gene deficient mice、CD8 deficient mice、 $\cdot$ 2M deficient mice、TAP-1 deficient mice、IL-7 receptor deficient mice、CCR5 deficient mice などである。気管内挿管後吸入メサコリン(MCh)に対するlung resistance/ dynamic complianceをdose-dependentかつtime course-dependentにコンピューター処理による解析systemにて詳細に検討する。申請者が所属するグループは上記の種々のノックアウトマウスを使用し、吸入MChに対するlung functionの測定方法を開発しており、さらにこれらのマウスモデルにrecombinant HGF、anti-HGF mAb、anti-TCR- $\cdot$  mAb、anti-TCR- $\cdot$  mAbの投与あるいはrecombinant HGFやanti-HGFなどのmonoclonal antibodyを投与したT細胞のadoptive transferを行うことにより、気道炎症及び気道過敏性の変化、TGF- $\cdot$ などのgrowth factorの測定、気道上皮細胞の傷害、気道基底膜下結合組織の肥厚などの組織学的線維性変化を検討するが、これらの研究は他のグループには追従できない世界最先端の研究である。さらに、HGFと $\cdot$  $\cdot$ T細胞、CD8 $^+$ T細胞さらにTGF- $\cdot$ との相互作用に関する詳細な解析が可能であり、innate immune response及びremodelingの病態及びHGFの喘息発症抑制効果、重症難治化の改善効果、さらにすでに完成された線維化に対する治癒効果が明らかとなる。

(2) 気管支肺胞洗浄液(BALF)及び血清の採取  
気道過敏性測定後、種々のmice及びrecombinant

HGF あるいは anti-HGF など monoclonal antibody 投与マウスに気管支肺胞洗浄を施行し BALF 中の炎症細胞とロイコトリエン及びサイトカイン (IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  など)、ケモカイン (eotaxin, IP-10, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1 など)、growth factor (HGF, TGF- $\beta$ , PDGF, VEGF など) を ELISA にて測定する。また BALF 中の T 細胞は FACS 解析にて  $\text{CD4}^+\text{T}$  細胞、 $\text{CD8}^+\text{T}$  細胞、 $\text{CD4}^+\text{CD8}^+\text{T}$  細胞、effector  $\text{CD8}^+\text{T}$  細胞、memory  $\text{CD8}^+\text{T}$  細胞、regulatory T 細胞等の種々の T 細胞を解析する一方血清中 OVA 特異的 IgE, IgG1 など申請者が所属するグループにより確立された ELISA 法にて測定する。

### (3) 肺組織の H&E 染色・各種免疫染色

気道過敏性及び気管支肺胞洗浄施行後、肺組織を H&E 染色、periodic acid-Schiff (PAS) 染色、Elastica Masson 染色にて気道上皮の goblet cells hyperplasia, collagen fiberなどを NIH Image analysis system を用い、顕微鏡デジタルカメラシステムにて解析する。さらに好酸球細胞内 major basic protein (MBP) を蛍光標識した anti-mouse MBP 免疫染色にて Macintosh IPLab2 software を使用し、申請者が所属するグループが報告しているコンピューターシステムにて解析する。また HGF 及び HGF 受容体である c-Met の免疫染色を行い経時的な発現を観察することにより内因性 HGF 及び外因性 HGF の肺組織における動態を詳細に検討する。さらに anti TGF- $\beta$  antibody による免疫染色を施行しその局在及び HGF との相互作用の検討を行う。気道上皮細胞から産生される種々の growth factor (HGF, TGF- $\beta$ , PDGF, VEGF など) や  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)、muscle proliferative cell nuclear antigen (PCNA)、またコラーゲンなどの細胞外マトリックス蛋白を免疫染色にて検討する。

## 4. 研究成果

### (1) HGF による気管支喘息の治療効果

我々はまず、卵白アルブミン(OVA)を用いて二週間

間隔で2回腹腔内感作を行い、その二週間後に OVA を三日間連続吸入暴露することにより喘息モデルを作製し、メサコリン(methacholine)吸入に対する気道過敏性及び気道局所への炎症細胞浸潤を検討した。この喘息モデルは喘息患者と同様に有意な気道過敏性の亢進、気道局所における好酸球およびリンパ球の集積、さらに気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar fluid; BALF) 中 Th2 サイトカインおよび血清中 OVA 特異的 IgE 抗体の産生亢進を認めた。

BALF 中の mouse HGF レベルの経時的検討では、OVA で感作も暴露も行っていない無処置マウスでは HGF レベルは低値 ( $0.5 \pm 0.16$  ng/ml) であった。OVA による腹腔内感作後、3日間吸入暴露施行群では有意に上昇し ( $3.80 \pm 1.82$  ng/ml)、さらに引き続き OVA の吸入暴露を2週間持続することにより HGF レベルはピークに達したが ( $6.77 \pm 1.08$  ng/ml)、4週間連続吸入暴露後には再び低下した ( $2.06 \pm 0.76$  ng/ml)。一方、肺組織中の HGF のレセプターである c-Met の免疫染色による検討では、c-Met 発現はこの内因性 HGF レベルとほぼ平行して増減したが、逆に BALF および肺組織中の TGF- $\beta$ 1 レベルは吸入暴露後持続的に増加することが判明した。すなわち肺組織における内因性 HGF の発現・産生レベルは、抗原刺激のない平常時では非常に低値であり、抗原の感作、暴露によるアレルギー性気道炎症を基盤とした喘息の発症とともに一時的に急速に上昇するが、その後の持続暴露による気道リモデリングの形成とともに HGF レベルは再び低下することより、気管支喘息の発症および重症難治化のメカニズムにおいて気道局所における内因性 HGF/c-Met は相反的に変動する TGF- $\beta$ 1 とともに非常に重要な役割を担っていることが明らかとなった。この OVA 吸入暴露時に human HGF の皮下投与を行い上記の抗原特異的アレルギー性気道炎症に対する治療効果を比較検討した。HGF は気道局所への好酸球やリンパ球等の炎症細胞の集積、BALF 中 IL-4, IL-5, IL-13 産生の増加のみでなく OVA 特異的 IgE 抗体の産生亢進を有意に抑

制し、さらに気道過敏性を濃度依存性に有意に抑制した。また HGF には気道上皮の胚細胞の過形成、粘液産生増加に対する有意な抑制効果が認められた。一方、中和抗体（抗 HGF 抗体）を OVA 吸入暴露時に投与し内因性 HGF を中和することにより、気道過敏性は有意に亢進し、BALF 中炎症細胞の増加および Th2 サイトカインの産生亢進作用が認められた。したがって内因性 HGF は抗原特異的に亢進したアレルギーカスケードを down-regulation しているのみでなく、治療薬としての HGF 投与はアレルギー性気道炎症の中心的役割を担っている気道局所における Th2 サイトカイン産生を抑制することにより気道過敏性の亢進を有意に抑制することが明らかとなった。

## (2) HGF の気道炎症抑制メカニズム

喘息の気道炎症に対する HGF の抑制メカニズムとして、抗原刺激による樹状細胞等の抗原提示細胞-Tリンパ球の免疫応答機序の抑制作用が考えられる。まず Th2 サイトカインの産生制御作用を有する Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  の欠損マウスを用いて同様に HGF の効果を比較検討した。Human HGF を投与した IFN- $\gamma$  欠損喘息マウスでは、気道過敏性および気道局所への好酸球やリンパ球の浸潤、BALF 中 IL-4、IL-5、IL-13 産生の抑制効果は認められなかったが、TGF- $\beta$ 1、PDGF、NGF といった増殖因子活性に対しては有意な抑制効果が認められ、HGF の気道炎症に対する抑制効果には一部 IFN- $\gamma$  依存性機序が関与している可能性が示唆された。また、HGF は抗原特異的免疫応答における樹状細胞の機能を抑制することにより気道炎症を制御する可能性も示唆されている。しかし HGF の作用機序は多岐にわたって非常に複雑であり今後更なる検討が必要である。

## (3) 気道リモデリングに対する HGF の治療効果

現在喘息治療の第一選択薬と考えられている吸入ステロイド薬および気管支拡張薬、抗ロイコトリエン薬等を併用しても喘息症状がコントロールできない不可逆性気道狭窄による重症難治性喘息が問題となっている。この原因として気道炎症の持

続に伴う気道上皮下の線維化、気道平滑筋の肥厚、胚細胞の過形成による粘液産生の増加など気道壁のリモデリング形成が想定されているが、我々はこの気道リモデリングに対する human recombinant HGF の治療効果を検討した。

OVA を用いて喘息モデルを作製後、隔日で OVA を 4 週間連続吸入暴露することにより気道リモデリングモデルを作製し経時的に詳細な検討を行った。

本モデルは喘息モデルと同様に、気道過敏性の亢進、気道局所における炎症細胞浸潤（喘息モデルと比較し好酸球の軽度減少、リンパ球の増加）および Th2 サイトカインの増加が認められたが、さらに慢性重症喘息に認められる BALF および肺組織中 TGF- $\beta$ 1 等の増殖因子の増加・過剰発現とともに気道上皮杯細胞の過形成、上皮基底膜下コラーゲン線維の増加および気道平滑筋の肥厚など線維化を中心としたリモデリング変化が有意に認められた。このような気道リモデリングがすでに形成されたマウスに、human HGF の皮下投与を 2 週間施行し抗原特異的気道炎症、気道過敏性および気道の線維性変化に対する効果を比較検討した。その結果、対照群と比較して HGF 投与マウスでは、気道炎症のみでなく気道リモデリングもその発現に寄与する気道過敏性の亢進は有意に抑制され、BALF 中好酸球やリンパ球、IL-4、IL-5、IL-13 などの Th2 サイトカインおよび気道の線維化を促進すると考えられる TGF- $\beta$ 1、PDGF、NGF といった増殖因子活性の有意な抑制効果が認められた。さらに肺組織の検討より、気道上皮杯細胞の過形成、粘液産生の増加および TGF- $\beta$ 1 免疫染色による気道周囲、血管周囲の TGF- $\beta$ 1 の発現増強のみでなく、Masson 染色による上皮コラーゲン線維および  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin) 免疫染色による気道平滑筋の増加など気道リモデリングと考えられる線維性変化も有意に抑制されることが確認された。一方、抗 HGF 抗体で内因性 HGF を中和することにより、肺組織における気道および血管周囲の TGF- $\beta$ 1 陽性細胞数は有意に増加した。以上より、気道炎症では好酸球、気道リモデリングで

は筋線維芽細胞が主たる産生細胞と考えられている。TGF- $\beta$ 1 の産生、発現上昇と内因性修復因子としての HGF の相反的減少が気道リモデリング発症の重要な要因となる可能性が高い。HGF 治療は TGF- $\beta$  と HGF のシーソーバランスを HGF 優位に誘導することにより、TGF- $\beta$  の発現抑制とともにコラゲナーゼなど細胞外マトリックスの分解を促進し、さらに HGF の有する上皮系細胞の増殖、遊走、形態形成誘導活性、抗アポトーシス作用等により気道の線維化の阻止と組織の再構築を促す結果強力な気道リモデリング改善効果を発揮する可能性が示唆される。

#### (4) HGF 治療の今後の展望

HGF は気道過敏性亢進を有意に抑制するのみでなく、気道炎症の持続に伴う気道壁のリモデリング形成により重症化したステロイド耐性で重積発作を繰り返す難治性喘息患者に対しても治療効果を有することが想定され、human recombinant HGF は今後喘息の治療薬としてきわめて有望な薬剤と考えられる。また将来的には HGF の投与方法として気道局所に直接的効果が期待できるネブライザーあるいはエアゾルによる吸入法も有用である。さらに、HGF が気管支喘息の気道炎症を有意に抑制したことより、同様に Th2 サイトカイン産生優位の免疫反応がその発症、増悪に関与しているアトピー性皮膚炎あるいはアレルギー性鼻炎等の喘息以外のアレルギー疾患にも治療効果が期待できる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

① Ito W, Kanehiro A, (他 9 名、7 番目). Hepatocyte growth factor suppresses production of reactive oxygen species and release of eosinophil-derived neurotoxin from human eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* 147:331-337. 2008. 査読有

② Ito W, Kanehiro A, (他 9 名、9 番目). Anti-allergic inflammatory effects of

hepatocyte growth factor. *Int Arch Allergy Immunol* 146:82-87. 2008. 査読有

③ Ueno T, Kanehiro A, (他 8 名、6 番目). Inflammatory markers in exhaled breath condensate from patients with asthma. *Respirology* 5:654-663. 2008. 査読有

④ Ito W, Kanehiro A, (他 13 名、15 番目). Growth factors temporally associate with airway responsiveness and inflammation in allergen-exposed mice. *Int Arch Allergy Immunol* 145:324-339. 2008. 査読有

⑤ Ito W, Kanehiro A, (他 5 名、3 番目). Hepatocyte growth factor attenuates eotaxin and PGD<sub>2</sub>-induced chemotaxis of human eosinophils. *Allergy* 62: 415-420. 2007. 査読有

⑥ Fujiwara Y, Kanehiro A, (他 10 名、9 番目). Elevated serum level of sialylated glycoprotein KL-6 predicts a poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer treated with gefitinib. *Lung Cancer* 59:81-87. 2007. 査読有

⑦ Hotta K, Kanehiro A, (他 8 名、7 番目). Whole blood interferon-gamma assay for baseline tuberculosis screening among Japanese healthcare students. *PLoS ONE* 2:e803. 2007. 査読有

⑧ Suzaki N, Kanehiro A, (他 8 名、8 番目). Severe interstitial pneumonia induced by paclitaxel in a patient with adenocarcinoma of the lung. *Acta Med Okayama* 60:295-298. 2006. 査読有

⑨ Hirano A, Kanehiro A, (他 9 名、2 番目). Pirfenidone modulates airway responsiveness, inflammation and remodeling after repeated challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35:366-377. 2006. 査読有

⑩ 伊藤 亘, 金廣有彦. 気道リモデリングの制御と HGF. *臨床免疫*. 45:64-69. 2006. 査読無

⑪ 伊藤 亘, 金廣有彦. 気道リモデリングにおけるHGFの役割と効果. アレルギー科. 21:557-565. 2006. 査読無

⑫ Hotta K, Kanehiro A, (他15名、13番目). Interstitial lung disease in Japanese patients with non-small cell lung cancer receiving gefitinib: an analysis of risk factors and treatment outcomes in Okayama Lung Cancer Study Group. *Cancer J* 11:417-424. 2005. 査読有

⑬ Umemura S, Kanehiro A, (他9名、8番目). Systemic tumor embolism mimicking gefitinib-induced interstitial lung disease in a patient with lung cancer. *Intern Med* 44:979-982. 2005. 査読有

⑭ Hirano A, Kanehiro A, (他8名、9番目). Sarcoidosis occurring after interferon-alpha therapy for chronic hepatitis C: report of two cases. *Respirology* 10:529-534. 2005. 査読有

⑮ Uchida A, Kanehiro A, (他7名、5番目). Successful treatment of pulmonary artery sarcoma by a two-drug combination chemotherapy consisting of ifosfamide and epirubicin *Jpn J Clin Oncol* 35:417-419. 2005. 査読有

⑯ Joetham A, Kanehiro A, (他5名、5番目). Airway hyperresponsiveness in the absence of CD4+ T Cells after primary but not secondary challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33:89-96. 2005. 査読有

⑰ Ito W, Kanehiro A, (他8名、2番目). Hepatocyte growth factor attenuates airway hyper responsiveness, inflammation and remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32:268-280. 2005. 査読有

⑱ Dakhama A, Kanehiro A, (他11名、8番目). Alteration of airway sensory neuropeptide expression and development of airway hyperresponsiveness following respiratory

syncytial virus infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288:L761-770. 2005. 査読有 [学会発表] (計3件)

① Ito W, Kanehiro A. Hepatocyte Growth factors attenuates production of reactive oxygen species and release of eosinophil-derived neurotoxicity from human eosinophils. American Thoracic Society International Conference 2008. 2008, 5, 20. Toronto.

② Ito W, Kanehiro A. Growth factors temporally associate with airway inflammation and responsiveness in Ovalbumin-sensitized mice. American Thoracic Society International Conference 2007. 2007, 5, 23. San Francisco.

③ Ito W, Kanehiro A. Hepatocyte growth factor attenuates eosinophil chemotaxis. American Thoracic Society International Conference 2006. 2006, 5, 23. San Diego.

[図書] (計1件)

金廣有彦. メディカルレビュー社. 気管支喘息と増殖因子.HGF. 細胞増殖因子と再生医療. 2006. 246-252.

[産業財産権]

○ 出願状況 (計1件)

Asthma Preparation. A preventive or therapeutic agent for asthma, comprising HGF or its salt as an active ingredient. 金廣有彦, 谷本光音, 伊藤 亘, 松本邦夫, 中村敏一. 同左. US 200702113261. 2007. 国外.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金廣 有彦 (KANEHIRO ARIHIKO)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号: 20243503

### (3) 連携研究者

なし