

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590398

研究課題名（和文） 敗血症進展における肝細胞増殖因子による生体防御機構と
その分子基盤解析研究課題名（英文） Molecular Basis for HGF-mediated Self-defense System
During sepsis

研究代表者

水野 信哉（MIZUNO SHINYA）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10219644

研究成果の概要（和文）：

敗血症病態では HGF は炎症の場となるマクロファージに直接作用し、NF- κ B 活性化制御とともに炎症性サイトカインの産生を転写レベルで抑制する事が判明した。この際、HGF は抗炎症因子であるヘムオキシゲナーゼ 1 の発現を介して、急性腎不全、肺傷害、肝炎の発症を顕著に抑制する事がマウス敗血症モデルを用いた解析から明らかとなった。今回の検討から、マクロファージでの HGF-ヘムオキシゲナーゼ 1 経路の活性化が敗血症の病態改善に有効な治療戦略になる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：

We demonstrated that direct effects of HGF on macrophages during leads to inhibition of the NF- κ B activation and subsequent transcription of pro-inflammatory cytokines. Furthermore, we found, using a mouse model of sepsis, that HGF-mediated up-regulation of hemoxygenase-1 is required for HGF to inhibit the onset of septic acute renal failure, lung injury and hepatitis. Based on the present data, we conclude that enhancement of the HGF-hemoxygenase-1 pathway in macrophages can be a reasonable strategy to improve the sepsis-related pathological conditions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：HGF, c-Met, 多臓器不全, 敗血症, 炎症性サイトカイン, マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞をはじめとする急性致死性疾患では、救命医療技術の向上により一次救命率が大幅に改善された反面、細菌感染から多臓器不全に至る患者が相加の一途を辿っている。米国の 2003 年統計では敗血症による年間死亡は実に 70 万人を超えており、とりわけ急性腎機能障害、呼吸器不全を併発した症例では予後は極めて悪い（死亡率 80%以上）。したがって敗血症の発症予防、病態改善は救命医学の最重要課題といえる。今までの研究では、主に敗血症の進展増悪に関わる分子機構の解析に精力が注がれた。その結果、tumor necrosis factor- α (TNF- α) や interleukin-6 (IL-6) といった炎症性サイトカインが敗血症での初期病態、特に全身性炎症反応性症候群 (SIRS) を誘起する責任分子であることが解明され、これらの増悪因子の産生や機能の制御が多臓器不全初期病態改善につながる実証された。感染症→SIRS→多臓器不全の進展は自然免疫を介した過剰な炎症応答に基づくと考えられるが、生体には過剰炎症を制御する内在性機構 (self-defense mechanism) が存在すると考えられる。このような生体防御機構を駆動する液性因子の同定とその分子基盤の解明はこれまで有効な治療法がなかった敗血症・多臓器不全の新しい治療法確立に向けて大きな意味を持つ。しかしながら、SIRS→多臓器不全に至る過程で病態進展を制御する、防御機構の解析は海外、国内ともに立ち後れていた。

肝細胞増殖因子 (HGF) は初代培養肝細胞の DNA 合成を指標に私達の研究室で精製、遺伝子クローニングされた増殖因子である。申請者はこれまでに急性腎不全や肺炎、肝炎の動物モデルを用いて、虚血再灌流傷害により急性腎不全を惹起したマウスや糖尿病性腎症を誘起した高血糖マウスに HGF 中和抗体を投与すると、尿細管細胞のアポトーシス亢進、間質線維化に一致して好中球やマクロファージの浸潤が高まることを見出した [Mizuno-S et al., Am J Pathol 166: 1895 (2005); Am J Physiol 286: F134 (2004); Kidney Intl 59: 1304 (2001)]。このような内因性 HGF による臓器保護の重要性は胆汁性肝炎や抗がん剤を投与した消化器・呼吸器障害のマウスモデルでも再現される事を明らかにして来た [Li-Z, Mizuno-S et al., Am J Physiol 292: G639 (2007); Nakahira-R, Mizuno-S, et al., BBRC 341: 897 (2006); Hattori-N, Mizuno-S et al., Am J Pathol 164: 1091 (2004)]。一方、慢性炎症初期では HGF はマクロファージなどの間質細胞によって産生されるが、進行期 (線維形成期) にはマクロファージでの HGF 産生が枯渇しており、このことが組織線維化の進展に直結という

新しい病理発生論を提唱した [Mizuno-S et al., FASEB-J19: 580 (2005); Mizuno-S & Nakaura-T, Regener. Med. 2: 161 (2007); Mizuno-S & Nakamura-T, Diabetic Kidney pp225-253 Humana Press, Totawa (2006)]。このように申請者は過去 10 数年間、各種病態における HGF の生体機能解析について深い背景を有して来た。

2. 研究の目的

敗血症、多臓器不全の患者では血中 HGF レベルが上昇することが報告されている。実際、リポポリサッカライド (LPS) を投与した敗血症マウスでも各臓器において HGF 産生が一過性に亢進していることを申請者らは確認している。しかしながら、SIRS 初期から多臓器不全に至る過程での内因性 HGF の生理的機能に関する研究は皆無であり、また HGF が標的とする細胞ならびにその生物活性、シグナル経路についても不明な点が多い。

一方、近年の研究により SIRS/敗血症を始めとする様々な炎症性疾患において自然免疫を規定するマクロファージの重要性が着目されている。マクロファージには LPS を始めとするエンドトキシンに対する受容体 (Toll-like receptor など) が発現しており、この下流で NF-kappaB 活性化を介した炎症反応が起こるとされている。またマクロファージは敗血症の後期炎症を司り、敗血症死のメディエーターとされる HMGB1 を放出する細胞としても重要である。その一方で、マクロファージはヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) を供給する事で IL-6 などの産生を抑制し、様々な炎症反応を抑制することが知られている。興味深い事に敗血症患者や動物モデルにおいて、血中および組織中のマクロファージにおける c-Met/HGF 受容体の発現が著しく亢進することが報告されている。この事から SIRS/敗血症の病態では HGF が何らかの機能を獲得している可能性が示唆される。そこで今回、(1) HGF による敗血症病態改善は主にマクロファージを標的とした経路に依存する事を実証する、(2) SIRS 病態下でマクロファージが産生する防御因子 (HO-1, IL-10 など)、増悪因子 (TNF- α , IL-6 など) に対して HGF/c-Met 系がそれぞれ促進的、抑制的に働くことを示す、(3) 以上により敗血症に対する生体防御機構、特に HGF によるマクロファージを標的とした過剰免疫応答制御の分子基盤解明を目指す。さらにリコンビナント HGF の注射によって敗血症の病態が改善されることをモデルにより実証し、HGF 補充療法が敗血症の生体防御機構に根を降ろした合理的な治療戦略になることを提案する。

3. 研究の方法

【第1段階】エンドトキシン投与または盲腸穿孔による敗血症マウスを作成し、敗血症初期 (SIRS 相) の自然経過中に誘導される HGF の産生亢進ならびにマクロファージでの c-Met/HGF 受容体チロシンリン酸化の発現量とそのピーク時期を明らかにする。

(1) 一般臨床検査：血中 BUN 値, GPT 値, サーファクタント蛋白, 自発運動, 体重の測定。

(2) HGF/c-Met 発現推移の検討：

*蛋白レベル：免疫組織化学, ELISA, ウェスタン解析, フローサイトメトリー。

*mRNA レベル: real-time PCR, in situ ハイブリダイゼーション, ノーザン解析。

(3) TNF- α , IL-6, HMGB1 などの炎症増悪因子, IL-10, HO-1 などの炎症制御因子の

動態解析：ELISA, ウェスタンブロット, リアルタイム PCR, ノーザンブロット解析。

(4) 各臓器での炎症/傷害の評価：

① 肝臓、腎臓、肺における NF- κ B 活性化 (ゲルシフトアッセイ/ELISA)。

② 上記組織中の好中球/マクロファージ定量 (ミエロペルオキシダーゼ活性)。

③ 上記組織中のアポトーシス定量 (TUNEL 染色、DNA ラダー), 一般病理解析。

【第2段階】エンドトキシンなどにより敗血症を惹起したワイルドタイプのマウスにリコンビナント HGF 製剤を投与し、マクロファージでの c-Met リン酸化に一致して、炎症性サイトカインの産生・放出が抑制され、多臓器不全の病態が改善されることを実証する。以上により HGF 補充が敗血症改善を実現する治療戦略になることを提唱する。

特にマクロファージが産生する炎症刺激因子 (IL-6, HMGB1 など) および炎症制御因子 (HO-1, IL-10) の発現が HGF/Met シグナル消失により修飾を受けるのかについてポイントを絞る。以上の解析により敗血症初期相ではマクロファージに対する HGF /c-Met シグナルが炎症制御機構を駆動していることを立証する。

【最終段階】野生型マウスまたは KO マウスより腹腔マクロファージを採取し、primary culture に供する。また LPS 刺激による炎症反応がよく解析されているマウス M ϕ 株化細胞 Raw. 264.7 細胞についても同様の解析を行う。このような In Vitro Assay 系を用いて、LPS 刺激による炎症性サイトカインの産生誘

導に対する、HGF の抑制効果とそのメカニズムを分子生物学的手法により詳細に調べる。

(1) サイトカイン, 酵素の測定：IL-6, IL-10, HO-1 の産生量→real-time PCR 法, ELISA 法。

(2) 細胞の活性状態評価：CD11b, eat-me-signal などの発現分子→フローサイトメトリー。

(3) 転写因子の解析：NF-E2-related factor (Nrf2), AP-1→ルシフェラーゼ法。

(4) シグナル系：MAPK 系, PI3K 系, COX-2 系の各種阻害剤または siRNA を用いて炎症制御に必要な HGF/c-Met 下流シグナルを決定する。

4. 研究成果

(1) 平成20年度：

様々な感染症により惹起される敗血症は近年増加しており、多臓器不全に至る症例では致死率が高い。以上の病態はIL-1, IL-6, IL-18などの炎症性サイトカインを介した全身性炎症反応症候群(SIRS)によって惹起される。一方、生体には敗血症の進展を阻害する生体防御機構が備わっており、たとえば炎症時に誘導されるヘムオキシゲナーゼ1 (HO-1)はSIRS病態を制御することで多臓器不全の進行を遅延させることが知られている。そこで今回、エンドトキシン(LPS)により敗血症を惹起したマウスを用いて、炎症病態におけるHGFによるHO-1誘導促進の可能性と、その意義について解析を行った。

健常マウスにLPSを投与したところ、血中IL-1, IL-6, IL-18濃度が著しく上昇した。LPS投与後腎臓、肺、肝臓を組織学的に精査したところ、各臓器ともに炎症像、血栓形成といった所見が顕著に観察され、これに一致して多臓器不全が進行した。そこで、LPS処置マウスにHGFを投与したところ、LPS投与後尿管上皮、肺・肝のマクロファージでのHO-1発現が高まること、HGFはLPSによるHO-1発現をさらに数倍に高める事が明らかとなった。以上に一致して、LPSによる血中IL-1, IL-6, IL-18濃度の上昇はHGFにより顕著に抑制された。その結果、各臓器のinjury scoreはHGF投与群では有意に低下していた。最後にHGFによるHO-1産生促進の意義を明らかにする目的でLPS投与マウスに、HGFとともにHO-1阻害剤 (SnPP) を皮下投与した。その結果、HGFによるIL-1, IL-6, IL-18産生阻害効果はHO-1阻害剤により解除される事が明らかとなった。HGFはLPSマウスに必見される腎・肺・肝の組織傷害を強く抑制するが、このような臓器保護作用はHO-1阻害剤によって減弱されていた。

今回の解析から、HGFはLPSが標的とするマクロファージに作用してIL-1, IL-6, IL-18産生を抑制することが浮きぼりとなった。即ち、HGFは敗血症初期相ではHO-1と連携して、SIRSを特徴づける高サイトカイン血症そのものを阻止する事により、来るべき多臓器不全の発症を事前にブロックしていると考えられる。

(2) 平成21年度:

細菌感染などによる敗血症は近年増加の一途を辿っており、米国では年間70万人以上が敗血症経過中の多臓器不全によって死亡している。私達は肝細胞増殖因子 (HGF) による多臓器不全症の発症予防効果を敗血症のマウスモデルを用いて明らかにしていた (前年度)。本年度はその分子機構を明らかにすべく、敗血症病態における生体防御機構、とりわけIL-1, IL-6, IL-18などの炎症性サイトカインの産生を制御する事が知られているヘムオキシゲナーゼ (HO-1) に注目し、その発現に対するHGFの効果を調べた。

HO-1研究で汎用されているマクロファージ、Raw264細胞を用い、HO-1産生に対するHGFの機能を調べた。その結果、HGFはLPS刺激後12時間以内に、HO-1 mRNAのレベル修飾なしに蛋白レベルを数倍に上昇させることが判った。そこでLPS刺激したRaw264細胞にリボゾーム阻害剤(シクロヘキシミド)を添加したところ、HGFによるHO-1産生誘導が阻害されたのに対し、転写阻害剤(アクチノマイシンD)では変化が認められなかった。次にHGFの抗炎症作用に対するHO-1の貢献度を明らかにすべく、Raw264細胞にHO-1阻害剤(SnPP)を添加した。その結果、LPS刺激マクロファージではHGF添加によりIL-6産生抑制とIL-10産生亢進が促されたのに対し、HGFにSnPPを併用すると、IL-6発現低下の解除、IL-10発現上昇の制御が認められた。以上の結果はLPS処置マウスにHGF単独またはHGF+SnPPを投与したin vivo系でも再現された。

今回の結果から、炎症病態では(1)HGFはマクロファージを直接標的とし、翻訳後修飾を介してHO-1発現を高める、(2)HGFによるHO-1発現促進を介したIL-6産生抑制、IL-10産生促進が肝炎や肺傷害の改善に寄与する、以上の作用機序が明らかとなった。

(3) 平成22年度:

敗血症病態において腎傷害は致命的な病態イベントとなりうる。そこで本年度は敗血症病態における腎傷害に着目し、マウス疾患モデル動物を用いてHGFによる腎保護機構を下記の通り解析した。

敗血症病態における蛋白尿発症機序について解析を行った。その結果、炎症性サイトカインであるIL-1 β の産生亢進がLPS投与後12時間目にマクロファージを中心に観察され、投与後24-36時間にかけて糸球体ポドサイトにおいてスリット分子であるネフリンの産生抑制が認められた。この時、ネフリンの転写促進因子であるWT1の核内発現は減弱していた。これに一致してアルブミン尿の排泄が顕著となった。以上の成果はBiomed Research 31: 363-369 (2010)に公表した。

次いで敗血症病態における蛋白尿漏出に対するHGFの効果を検討した。LPS処置マウスにHGFを投与すると、マクロファージでのIL-1産生が抑制され、ネフリンの産生抑制が軽減された。さらにポドサイト自身にHGFシグナル伝達を示すc-Metチロシンリン酸化が認めら

れた。その結果、HGF投与群では炎症時に惹起される炎症性酵素、カテプシンLの誘導は抑制され、その基質であるシナプトポディンの分解も緩和される事が判明した。以上の成果はNephrology 16: 310-318 (2011)に報告した。

その一方で、ヒトHGFを動物に反復投与すると、蛋白尿が惹起されるという知見も相次いでおり、HGFによる蛋白尿抑制効果を疑問視する報告も見受けられる。私達はヒトHGFがラットに対して抗原性を持つ事に注目し、免疫介在性糸球体腎炎によるpseudo-toxicな効果である事を実証した。実際、抗原性を持たないラットHGFをラットに長期間投与しても免疫複合体の沈着は認められず、重篤な蛋白尿も惹起されない事を実証した。以上の成果はClin Exp Pharmacol Physiol 38: 192-201 (2011)に報告した。

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17件)

以下全て査読有り

- [1] Mizuno S, Ohnishi H and Nakamura T: Hepatocyte growth factor (HGF), an endogenous pulmonotrophic regulator, for the rescue of acute and chronic lung diseases. **Cell Signaling Transduction Therapy**, in press.
- [2] Oka K, Fukuta K and Mizuno S: Hepatocyte growth factor (HGF) for a cell-signal-based therapy during acute and chronic liver diseases. **Cell Signaling Transduction Therapy**, in press.
- [3] Mizuno S, Ikebuchi F, Fukuta K, Kato T, Matsumoto K, Adachi K, Abe T and Nakamura T: Recombinant human HGF, but not rat HGF, elicits glomerular injury and albuminuria in normal rats via an immune complex-dependent mechanism. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 38: 192-201 (2011)
- [4] Kato T, Mizuno S and Nakamura T: Preservations of nephrin and synaptopodin by HGF in podocytes for the attenuations of foot process injury and albuminuria in nephritic mice. **Nephrology** 16: 310-318 (2011)
- [5] Nakamura T and Mizuno S: Discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. **Proc. Japan Acad. Series-B** 86: 588-610 (2010)
- [6] Kato T, Mizuno S and Kamimoto M: The decreases of nephrin and nuclear WT1 in podocytes may cause albuminuria during the experimental sepsis in mice. **Biomed Res** 1: 363-369 (2010)
- [7] Nakazato K, Naganuma W, Ogawa K, Yaoita H, Mizuno S, Nakamura T and Maruyama Y:

- Attenuation of ischemic myocardial injury and dysfunction by cardiac fibroblast-derived factor(s). **Fukushima J Med Sci** 56: 1-16 (2010)
- [8] Kamimoto M, Mizuno S, Ohnishi H and Mizuno-Horikawa Y: Type 2a sodium-phosphate co-transporter serves as a histological predictor of renal dysfunction and tubular apical damage in the kidneys of septic mice. **Biomed Res** 30: 251-258 (2009)
- [9] Kishi Y, Kuba K, Nakamura T, Wen J, Suzuki Y, Mizuno S, Nukiwa T, Matsumoto K and Nakamura T: Systemic NK4 gene therapy inhibits tumor growth and metastasis of melanoma and lung carcinoma in syngeneic mouse tumor models. **Cancer Sci** 100: 1351-1358 (2009)
- [10] Kanai M, Funakoshi H, Takahashi H, Hayakawa T, Mizuno S, Matsumoto K and Nakamura T: Tryptophan 2,3-dioxygenase is a key modulator of physiological neurogenesis and anxiety-related behavior in mice. **Mol Brain** 2: 8-23 (2009)
- [11] Kamimoto M, Mizuno S and Nakamura T: Reciprocal regulation of IL-6 and IL-10 balance by HGF via recruitment of HO-1 in macrophages for attenuation of hepatic injury in a mouse model of endotoxemia. **Int J Mol Med** 24: 161-170 (2009)
- [12] Kamimoto M, Mizuno S, Matsumoto K and Nakamura T: Hepatocyte growth factor prevents multiple organ injuries in endotoxemic mice through a heme oxygenase-dependent mechanism. **Biochem Biophys Res Commun** 380: 333-337 (2009)
- [13] Mizuno S, Matsumoto K and Nakamura T: HGF, as a renoprotective and anti-fibrotic regulator in chronic renal disease. **Front Biosci** 13: 7072-7086 (2008)
- [14] Kato T, Mizuno S, Taketo MM and Kurosawa T: The possible involvement of tensin2 in the expression and extension of nephrin by glomerular podocytes in mice. **Biomed Res** 29: 279-287 (2008)
- [15] Hegab-AE, Kubo-H, Hayama-M, Asada-M, He-M, Mizuno S and Nakamura T: Intranasal HGF administration ameliorates the physiological and morphological changes in lung emphysema, **Mol Therapy** 16: 1417-1426 (2008)
- [16] Ohnishi H, Mizuno S and Nakamura T: Inhibition of tubular cell proliferation by neutralizing endogenous HGF leads to renal hypoxia and bone marrow-derived cell engraftment in renal failure of mice. **Am J Physiol** 294: F326-F335 (2008)
- [17] Ito W, Tanimoto M, Ono K, Mizuno S, Yoshida A, Koga H, Fuchimoto Y, Kondo N, Tanimoto Y, Kiura K, Matsumoto K, Kataoka M, Nakamura T, Gelfand EW and Kanehiro A: Growth factors temporally associate with airway responsiveness and inflammation in allergen-exposed mice. **Int Arch Allergy Immunol** 145: 324-339 (2008)
- [学会発表] (計 10 件)
- [1] 大西浩之, 岡清政, 水野信哉, 中村敏一: 骨髄由来DCの遊走およびサイトカイン産生に対するHGFの調節作用 第83回日本生化学学会 平成22年12月8日 神戸市
- [2] 水野信哉, 大西浩之, 神元幸, 中村敏一: 急性腎不全マウスモデルでの病態進展に伴うHGF標的細胞の変遷とその意義 第83回日本生化学学会 平成22年12月7日 神戸市
- [3] 水野信哉, 池淵文彩, 福田一弘, 加藤貴史, 安達喜一, 松本邦夫, 中村敏一: リコンビナントヒトHGFは免疫複合体の沈着を介して健常ラットに蛋白尿を惹起する. 第9回日本再生医療学会総会 2010年3月18日 広島市
- [4] 水野信哉, 中村敏一: 内因性HGFによる胆管上皮細胞の代償性成長を介した胆管硬化症の進展制御機構の解析. 第82回日本生化学学会大会 2009年10月23日 神戸市
- [5] 神元幸, 水野信哉, 中村敏一: 培養マクロファージを用いたHGFによるHMGB1放出抑制とその分子機構の解析. 第82回日本生化学学会大会 2009年10月23日 神戸市
- [6] 加藤貴史, 水野信哉, 中村敏一: HGFによるカテプシンLの誘導抑制とその意義: 糸球体傷害モデルを用いた解析. 第82回日本生化学学会大会 2009年10月23日 神戸市
- [7] 神元幸, 水野信哉, 中村敏一: 敗血症マウスにおけるHGFによる急性肺傷害の発症阻止とその分子基盤. 第8回日本再生医療学会. 2009年3月5日 東京都
- [8] 加藤貴史, 水野信哉, 中村敏一: HGFによるポドサイトでのネプリン発現増強を介した蛋白尿発症制御. 第8回日本再生医療学会. 2009年3月5日 東京都
- [9] 神元幸, 水野信哉, 中村敏一: HGFによるマクロファージでの翻訳後修飾を介したHO-1誘導促進とその生理的意義. 第81回日本生化学学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会. 2008年12月11, 12日 神戸市
- [10] 加藤貴史, 水野信哉, 中村敏一: HGFによるポドサイトの機能促進を介した蛋白尿制御機構. 第81回日本生化学学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会. 2008年12月10日 神戸市
- [図書] (計 2 件)
- [1] Mizuno S and Nakamura T: Gene Therapy for HGF Supplementation in the Rescue of Intractable Diseases. *In "Gene Therapy: Types, Vectors and Developments"*, NOVA Science Publisher, Hauppauge, New York, in press.
- [2] Mizuno S and Nakamura T: Hepatocyte growth factor (HGF): Cardioprotective roles

and potential therapeutics for cardiovascular disease. *In: "Coronary Stent Restenosis"*, (Edited Ion Tintoiuin), in press.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 信哉 (MIZUNO SHINYA)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：10219644

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

中村 敏一 (NAKAMURA TOSHIKAZU)
大阪大学・先端科学イノベーション
センター・特任教授
研究者番号：00049397