

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590227

研究課題名(和文) HGFディスプレイ乳酸菌によるGVHDの制御

研究課題名(英文) Regulation of GVHD by HGF displayed lactobacillus

研究代表者

岩崎 剛 (Iwasaki, Tsuyoshi)

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号：10151721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：分子ディスプレイ法を用いてHGFタンパクを発現させた酵母を経口投与し、高濃度のHGFタンパクを腸管局所に送達させ、腸管の組織修復と免疫担当細胞機能を制御する可能性を検証した。HGFタンパク(鎖)発現酵母菌を急性GVHDモデルマウスに経口投与すると、皮膚の炎症などのGVHD症状が抑制され、生存率も改善した。病理組織学的解析を行った結果、腸管上皮細胞障害が抑制されていることも明らかになった。さらに、腸管、肝臓、脾臓における炎症性サイトカインの発現が抑制されていることも明らかになった。以上の研究結果より、HGFタンパク発現酵母は、GVHDの新規経口治療薬として期待できることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We previously established hepatocyte growth factor (HGF) gene therapy to treat acute graft-versus-host disease (GVHD), preserve graft-versus-anti-leukemic (GVL) effect, and to recover T cell immunity. However, gene transfection and intravenous administration of HGF cannot supply sufficient amount of HGF to injured organs caused by GVHD. We tried to administer HGF displayed Yeast orally and to directly supply high concentration of HGF to injured intestine. Oral administration of yeast expressed HGF and chain into graft-versus-host disease (GVHD) model mice reduced clinical symptoms such as skin inflammation and prolonged their survival. Histopathological examination revealed that intestinal epithelial cell injuries were inhibited by this treatment. Inflammatory cytokine expressions in the liver, intestine, and spleen were reduced by this treatment. HGF-displayed yeast can therefore be potentially applied as a novel therapeutic approach for the treatment of GVHD.

研究分野：血液・免疫学

キーワード：肝細胞増殖因子 移植片対宿主病 酵母 分子ディスプレイ法

1. 研究開始当初の背景

肝細胞増殖因子 (HGF) は強力な組織再生・血管新生作用を持ち、劇症肝炎や閉塞性動脈硬化症の治療に応用されている。我々はマウス移植片対宿主病 (GVHD) に対する HGF を用いた遺伝子治療を確立し、HGF の組織再生作用により急性 GVHD が防御され (J Clin Invest 107, 2001)、移植片対白血病 (GVL) 効果が維持され、T 細胞免疫能の回復が促進されること (Blood 104, 2004)、HGF の免疫制御作用・抗線維化作用により SLE モデルマウス・強皮症モデルマウスの臓器障害や皮膚硬化が改善することを明らかにしてきた (Arthritis Res Ther 8, 2006)。また、HGF 受容体アンタゴニスト、NK4 をマウス腫瘍モデルに投与すると腫瘍血管新生が抑制され、抗腫瘍効果が認められることも明らかにしてきた (J Hepatol 45, 2006)。関節リウマチ (RA) は増殖した滑膜が関節を破壊する自己免疫疾患である。滑膜組織には新生血管が豊富に存在し、滑膜の増殖に血管新生が重要な役割を果たしていることが推測される。また、滑膜組織に HGF や VEGF などの血管新生因子が強発現していることも明らかにしている (Arthritis Rheum 39, 1996; J Exp Med 180, 1994)。HGF 受容体アンタゴニスト、NK4 を RA モデル SKG マウスに投与すると、滑膜組織の血管新生を抑制し、滑膜増殖を制御できることが明らかになった (Arthritis Res Ther 15, 2013)。しかしこれまで行ってきた HGF の遺伝子導入や静脈投与による方法は、障害局所に到達する HGF タンパク量が少なく、非効率的である。本研究は、分子ディスプレイ法を用いて HGF タンパクを発現させた酵母を経口投与し、高濃度の HGF タンパクを直接腸管局所に送達させ、腸管

の組織修復と免疫担当細胞機能を制御する新規治療法の開発を目指し、将来の臨床応用への可能性を検証した。

2. 研究の目的

研究目的達成のため、分子ディスプレイ法を用いて表層に HGF タンパクを発現させた酵母菌を、GVHD モデルマウスに経口投与し、その効果を検討する。

(1) GVHD モデルは、(Balb/c x B6) F1 マウスに B6 マウス脾細胞を移入して作成した。このモデルは脾細胞移入後 2~4 週に急性 GVHD を発症し、その後、8 週頃から慢性 GVHD に移行するため、腸管障害により生じる移植免疫反応と自己免疫反応の制御を解析するモデルに適している (J Immunol. 15, 2000)。

(2) HGF タンパクディスプレイは、HGF の分泌シグナルをコードする遺伝子を酵母菌に発現させ、HGF タンパクを酵母菌表層に発現させた (Appl Microbiol Biotechnol. 70, 2006)。急性 GVHD による腸管障害の抑制効果は、GVHD モデルマウスの生存率、体重、病理組織学的解析にて行った。腸管免疫機能の解析は、炎症性サイトカインの発現を RT-PCR 法にて解析した。慢性 GVHD による自己免疫疾患の発症は、蛋白尿の測定、腎組織の病理組織学的解析にて確認した。

3. 研究の方法

HGF 遺伝子導入により、GVHD モデルマウスの血中 HGF 濃度を上昇させると、急性 GVHD による腸管障害が抑制でき、死亡率が低下することを明らかにしている (J Clin Invest 107, 2001)。そこで、HGF タンパクディスプレイ酵母菌が急性 GVHD を抑制できるかどうかの検討を行

った。

(1) GVHD モデルの作成：10 週齢の (Balb/c x B6) F1 マウスに B6 マウス脾細胞を移入して GVHD モデルを作成した。このモデルは脾細胞移入後、2~4 週に急性 GVHD を発症し、その後、8 週頃から慢性 GVHD に移行する。

(2) HGF タンパクディスプレイ：提示すべき HGF タンパク遺伝子の 5' 末端に分泌シグナルをコードする遺伝子を、3' 末端に PgsA 遺伝子と融合し、適切なプロモーターの制御下で酵母菌に発現させた。そして HGF 蛋白質の融合遺伝子から酵母菌内で転写・翻訳され HGF タンパクを発現させた。

(3) 実験プロトコール：実験群は コントロール酵母菌投与群、 HGF 発現酵母菌投与群、 PBS 投与群に分け、酵母菌の投与は、 $5 \times 10^9/200 \mu\text{l}$ を GVHD 誘導後、Day 0-4、Day 7-11、Day 21-25 に胃ゾンデを用いて経口投与した。治療効果の判定は、GVHD マウスの死亡率、病理組織学的解析、組織の炎症性サイトカイン遺伝子の発現を解析し、急性 GVHD の抑制効果を検討した。本研究は、兵庫医療大学、兵庫医科大学、金沢大学の 3 大学の共同により研究を実施した。HGF 遺伝子ベクターの作成および酵母菌への HGF 遺伝子導入は、兵庫医療大学遺伝子関連施設 (P₂) にて行った(岩崎・芝崎)。モデル動物の作成および遺伝子導入酵母菌投与は、株式会社ジェクタス・イノベーターズに委託し、琉球大学分子生命科学研究所施設内 S216 研究室 (レンタルラボ) にて実施した。

4. 研究成果

(1) 酵母菌投与による GVHD 抑制効果：10 週齢の (Balb/c x B6) F1 マウスに B6 マ

ウス脾細胞を移入して GVHD モデルを作成した。そして、GVHD モデルマウスに酵母菌を投与し、その効果を検討した。酵母菌の投与は、 $5 \times 10^9/200 \mu\text{l}$ を GVHD 誘導後、Day 0-4、Day 7-11、Day 21-25 に胃ゾンデを用いて経口投与した。GVHD 誘導後 Day10 頃から酵母治療 GVHD 群、未治療コントロール GVHD 群ともにタンパク尿が認められた。その後コントロール GVHD 群のタンパク尿は持続したが、酵母治療 GVHD 群ではタンパク尿の改善が認められた(図 1)。病理組織学的解析では、コントロール GVHD 群では著明なループス腎炎の組織像と肝臓門脈周囲のリンパ球浸潤が認められたが、酵母治療 GVHD 群ではこれらの病理組織学的変化が軽減されていた(図 2)。

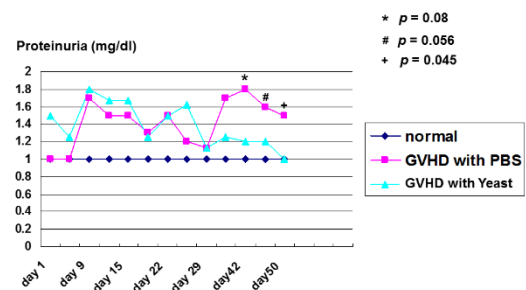


図 1. 酵母治療のタンパク尿改善効果

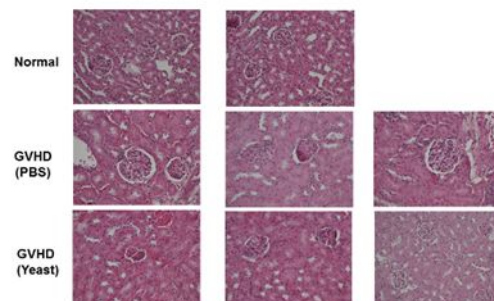


図 2. 酵母治療のループス腎炎抑制効果

(2) HGF ディスプレイ酵母の作成：提示すべき HGF heavy-chain タンパク、HGF light-chain タンパク、HGF heavy + light chain タンパク遺伝子の 5' 末端に分泌シグナルをコードする遺伝子を、3' 末端に PgsA 遺伝子を融合し、適切なプロモーターの制御下で各々の HGF 蛋白質の融合遺伝子を酵母菌に発現させた。そして HGF 蛋白質の融合遺伝子から酵母菌内で転写・翻訳された HGF タンパクを発現させた。HGF ディスプレイ酵母菌の細胞表面に HGF タンパク発現を蛍光抗体法で確認した。

(3) HGF ディスプレイ酵母菌投与の GVHD 抑制効果：9Gy 全身照射 BDF1 マウスに B6 マウス脾細胞 (5×10^6) 静脈注射し GVHD を作成した。9Gy 全身照射 BDF1 マウスに B6 骨髄細胞 (1×10^6) 静脈注射したマウスを BMT コントロールとした。GVHD 誘導後の酵母菌の投与は、 $5 \times 10^9/200 \mu\text{l}$ を Day 0-4、Day 7-11、Day 21-25 に胃ゾンデを用いて経口投与した。その結果、HGF heavy + light chain タンパク発現酵母を投与した GVHD 群の GVHD 臨床症状が改善し、生存率が向上した (図 3)。

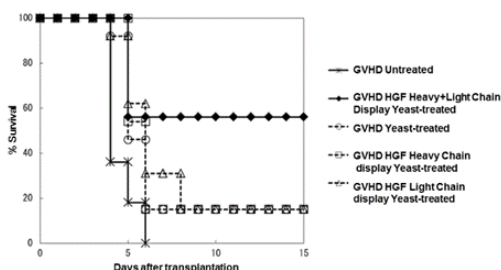


図 3 . HGF display 酵母の GVHD 抑制効果

(4) HGF ディスプレイ酵母菌投与の GVHD 標的臓器の病理組織変化の抑制効果：上記 GVHD マウスの臓器を病理組織学的解析したところ、HGF heavy + light chain タンパク発現酵母を投与した GVHD 群の腸管上皮細胞障害、肝臓門脈周辺のリンパ球浸潤、皮膚へのリンパ球浸潤が改善していることが明らかになった。

(5) HGF ディスプレイ酵母菌投与の GVHD 標的臓器の炎症性サイトカイン発現の抑制効果：上記 GVHD マウスの臓器の TNF- α 、IL-1 の発現を RT-PCR 法にて解析したところ、HGF heavy + light chain タンパク発現酵母を投与した GVHD 群の腸管、肝臓、皮膚のこれらの炎症性サイトカイン発現が抑制されていることが明らかになった。

5 . 主な発表論文等

[論文発表](計1件)

Iwasaki T, Shibasaki S. Hepatocyte growth factor regulates immune reactions caused by transplantation and autoimmune diseases. *Yakugaku Zasshi.*2013; 133(11):1159-1167. DOI: 10.1248/yakushi.13-00212-3 (査読有)

[学会発表](計4件)

Tsuyoshi Iwasaki, Masahiro Sekiguchi, Sachi Tsunemi, Seiji Shibasaki, Sachie Kitano, and Hajime Sano. Differential regulation of c-Met signal to synovial cell functions in rheumatoid arthritis. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR), June 13, 2014, Paris (France).

Tsuyoshi Iwasaki. Molecular targeting

of hepatocyte growth factor receptor for the treatment of graft-versus-host disease and autoimmune diseases. Conference of Basic and Clinical Research of Immune diseases. Beijing University of Chinese Medicine. May 26, 2014, Beijing (China).

Masahiro Sekiguchi, Tsuyoshi Iwasaki, Sachi Tsunemi, Sachie Kitano, and Hajime Sano. Hepatocyte growth factor receptor (c-Met) signaling pathway regulates synovial cell production of inflammatory mediators and osteoblast differentiation. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR), June 14, 2013, Madrid (Spain).

岩崎 剛、「バイオディフェンス 免疫システム分子制御の新たな局面」HGF による移植免疫・自己免疫反応の制御 日本薬学会第 133 年会 (シンポジウム)、2013.3.28 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岩崎 剛 (IWASAKI TSUYOSHI)

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号 : 1 0 1 5 1 7 2 1

(2)研究分担者

佐野 統 (SANO HAJIME)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 0 0 1 9 6 3 0 4

芝崎 誠司 (SHIBASAKI SEIJI)

兵庫医療大学・共通教育センター・准教授

研究者番号 : 5 0 3 4 2 5 3 0

(3)連携研究者

松本 邦夫 (MATSUMOTO KUNIO)

金沢大学・がん研究所・教授

研究者番号 : 9 0 2 0 1 7 8 0