

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：33905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860046

研究課題名(和文) HGF 鎖 マンノース受容体システムを介したマクロファージの免疫調節機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of macrophage immune response by HGF-beta/mannose receptor axis.

研究代表者

大西 浩之(OHNISHI, Hiroyuki)

金城学院大学・薬学部・助教

研究者番号：90523316

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞増殖因子(HGF)は傷害に応じてその産生が高まる一方で、炎症性細胞由来のプロテアーゼに消化されHGF鎖(HGF-)を生じる。本研究では、HGF-がマンノース受容体(MR)を介して、マクロファージ(M)からのIL-10産生をIL-4依存的に高めることを明らかにした。HGF-はJAKタンパク質の活性化を高めSTAT3チロシンリン酸化を増強するほか、p44/p42 MAPKの活性化を介したSTAT3セリンリン酸化によりSTAT3の核内移行を助けることでIL-10産生を誘導した。本研究の結果、HGF-はMに作用し、IL-10産生を介して炎症制御をもたらす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Production of hepatocyte growth factor (HGF) is induced by tissue damage, while, in the tissues with inflammation or damage, HGF is degraded by proteases from inflammatory cells such as neutrophils. Digestion of HGF by proteases yields HGF-chain remnant (HGF-) that binds to mannose receptor (MR) expressed on macrophages. Herein, we showed that HGF- induces IL-10 production by macrophages, which is dependent on the presence of IL-4. HGF- promoted IL-4-mediated activation of JAK proteins and downstream STAT3 tyrosine phosphorylation. In addition, HGF- increased STAT3 serine phosphorylation and its nuclear translocation through p44/p42 MAPK pathway. Enhancement of IL-4-mediated STAT3 activation by HGF- was required for the induction of IL-10 production by M. These findings raise the possibility that HGF- generated through fragmentation of HGF in damaged tissues induces IL-10-producing M with immunoregulatory phenotype.

研究分野：医歯薬学

キーワード：HGF- HGF Mannose receptor IL-10 IL-4 STAT3

1. 研究開始当初の背景

組織が傷害を受けると、炎症反応として好中球プロテアーゼによる組織破壊やマクロファージ (M ϕ) による不要物の貪食除去が行われる。炎症反応は組織傷害を増悪する一方で、組織再生の場を提供するための生体反応と考えられている。しかし、炎症反応を終結させ組織再生へとつなぐ分子機構の詳細については未解明な点が多い。

HGF (Hepatocyte growth factor: HGF) は α 鎖と β 鎖からなる増殖因子であり、c-Met 受容体に結合することで多様な活性を示し、組織を再生へと導く。HGF は好中球などの炎症性細胞が分泌するプロテアーゼによって、大きく α 鎖および β 鎖 (HGF- β) に断片化される。研究代表者は HGF- β の受容体として、M ϕ が発現するマンノース受容体 (Mannose Receptor, MR) を同定した。さらに、HGF- β を MR 陽性の M ϕ に作用させると、アポトーシスに陥った好中球の貪食が高まることを明らかにした。このことは、HGF の消化産物である HGF- β が、M ϕ の機能に影響し組織修復を促す可能性を示している。

近年、M ϕ には細胞表面抗原の発現やサイトカイン産生能の違いから様々な亜集団が存在し、異なる免疫機能を担うことが明らかにされてきている。例えば M1 は iNOS 誘導性の NO 産生や Th1 サイトカイン産生を介して炎症を拡大し、M2 は Arginase や IL-10 を産生し炎症反応を抑制する。近年、M2 には細胞表面抗原の発現やサイトカイン産生能の違いから M2a~M2c の亜集団が存在し、異なる免疫機能を担うことが明らかにされてきている。しかし、HGF- β /MR 系がどのような機能を有する M ϕ を誘導するのか、またそのメカニズムについては明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、炎症組織における HGF の断片化で生じた HGF- β が M ϕ に作用し、積極的に免疫応答を調節している可能性について、*in vitro* で研究を行った。具体的には、HGF- β /MR 系が M ϕ のサブタイプ制御機構にどう影響し、どのような機能を持つ M ϕ を誘導するのかを *in vitro* の実験系で解析した。

3. 研究の方法

(1) HGF- β の調製と分離精製

組換え HGF をエラスターゼで 5 時間処理後、ヘパリンカラム及びベンザミジンカラムを用いた液体クロマトグラフィーによって HGF- β を生化学的に精製した。

(2) HGF- β によって誘導される M ϕ のサブタイプの特定

ラット骨髄由来 M ϕ (BMM) を培養し、HGF- β で 24 時間刺激した。同時に M1 刺激として LPS 刺激、M2 刺激として IL-4 刺激を与えた BMM も用意した。また M1、M2 刺激

条件下で HGF- β 刺激した BMM も用意した。刺激後に細胞を回収し、タンパク質および mRNA を抽出した。c-Met および MR の発現をウエスタンブロット及びリアルタイム PCR で解析し、HGF- β が標的とする BMM の同定を行った。また M1 マーカーとして iNOS、M2 マーカーとして Arginase-1 を用いたウエスタンブロットを行い、HGF- β 刺激によってどのような M ϕ が誘導されたかを解析した。

(3) HGF- β が M のサイトカイン産生に及ぼす影響

(2) によって刺激した BMM の培養上清を回収し、含まれる IL-10、IL-12 p40、IL-6、IL-1 β 、TNF- α タンパク質の量を ELISA 法によって解析した。また、(2) の刺激 6 時間後に BMM から mRNA を抽出し、IL-10、IL-12b、IL-6 mRNA 発現をリアルタイム PCR 法によって解析した。また、MR 発現をノックダウンした BMM を用意して HGF- β 刺激を 6 時間行い、IL-10、IL-12b mRNA 発現をリアルタイム PCR 法で解析した。

(4) HGF- β が発揮する IL-10 産生促進活性の分子メカニズム解析

各種シグナル伝達阻害剤の存在下あるいは非存在下で HGF- β 刺激を行った。刺激後の BMM からタンパク質を抽出し、STAT3、STAT6、Janus kinsase (JAK)、p44/p42 MAPK の活性化状態について、リン酸化特異抗体を用いたウエスタンブロット法で解析した。また、STAT3 の細胞内局在について、抗体を用いた免疫細胞染色によって観察した。さらに、各種阻害剤の IL-10 産生への影響について、IL-10 ELISA によって評価を行った。

4. 研究成果

(1) HGF- β の調製

組換え HGF をエラスターゼで消化し、液体クロマトグラフィーを用いて、本研究に十分な量の HGF- β を精製した。

(2) HGF- β が誘導する M ϕ のサブタイプ

HGF- β が標的とする M の同定

BMM に M1 刺激として LPS、M2 刺激として IL-4 刺激を 24 時間行い、c-Met 及び MR の発現を解析したところ、c-Met は M1-BMM に強く発現する一方で、MR は M2-BMM で発現が増加した。このことから、HGF- β の標的となる M ϕ は主として M2-BMM であると考えられた。

HGF- β が誘導する M サブタイプの特定
次に、HGF- β 刺激によってどのような BMM が誘導されるかについて、iNOS と Arginase-1 を M1、M2 の指標として解析した。LPS 刺激を行った M1-BMM では iNOS が誘導され、IL-4 刺激 M2-BMM では Arginase-1 発現が増加した。HGF- β 刺激によって、iNOS

や Arginase-1 の発現に変化は認められなかった。

(3) HGF- β が M ϕ のサイトカイン産生に及ぼす影響

M2 刺激である IL-4 存在下で HGF- β 刺激を行い、代表的な抗炎症性サイトカインである IL-10 産生を観察した。IL-4 単独及び HGF- β 単独刺激群において、IL-10 産生は mRNA、タンパク質ともに認められなかった。これに対し、IL-4 と HGF- β の同時刺激群では IL-10 mRNA 発現が顕著に増加し、培養上清中にも IL-10 タンパク質が放出された。IL-4 共存下における HGF- β の IL-10 産生誘導は MR をノックダウンした BMM では認められなかったことから、MR を介した生物活性であることが示された。HGF- β は他の炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12b) の発現に関しては、IL-4 存在下、非存在下のどちらにおいても影響しなかった。炎症性サイトカインの産生には影響せず、IL-10 産生を増加させるという HGF- β の活性は、他の MR リガンド (Biglycan、Thyroglobulin および HGF) では認められず、HGF- β 特異的な活性であることが判明した。

(4) HGF- β が発揮する IL-10 産生促進活性の分子メカニズム解析

IL-4 存在下でのみ、HGF- β 刺激により BMM からの IL-10 産生が高まることから、HGF- β /MR 系は IL-4 シグナルに影響を与え IL-10 産生を高めていると考えられた。そこで IL-4 細胞内シグナル伝達経路について、その活性化をウエスタンブロットで解析した。そのところ、HGF- β は IL-4 が誘導する JAK1-3 タンパク質のリン酸化 (活性化) を促進し、結果として STAT3 活性化に必要な Y705 リン酸化を増強することが明らかとなった。逆に IL-4 のもう一つの主要なシグナル経路である STAT6 の活性化に関しては、HGF- β はむしろ減弱させていた。HGF- β 刺激によって MR が IL-4 受容体と複合体を形成し、独自のシグナルを伝達する可能性があると考えたが、IL-4 受容体と MR の複合体形成は免疫沈降実験では観察することはできなかった。IL-4 シグナルの修飾を HGF- β がどのようなメカニズムによって行っているのかについて詳細な解析を現在進めている。さらに、HGF- β は p44/p42 MAPK の活性化を促進し、STAT3 の S727 リン酸化を誘導することによって STAT3 の核内移行を促進していることが免疫細胞染色と p44/p42 MAPK 阻害剤 PD98059 を用いた実験から明らかとなった。HGF- β の IL-10 産生促進活性は STAT3 特異的阻害剤 S3I-201 及び PD98059 で阻害された。以上の結果から、HGF- β は IL-4 存在下において、JAK

タンパク質のリン酸化の亢進による STAT3 活性化増強及び p44/p42 MAPK 活性化を介した STAT3 核内移行促進の 2 つの経路によって IL-10 産生を誘導することが明らかとなった。

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 1 件)

1. Ohnishi H, Mizuno S., Mizuno-Horikawa Y. and Kato T. Stromal cell-derived factor-1 (SDF1)-dependent recruitment of bone marrow-derived renal endothelium-like cells in a mouse model of acute kidney injury. J. Vet. Med. Sci., 77: 313-319, 2015, 査読有

[学会発表](計 7 件)

1. 八木聡美、西川真衣、花井仁美、鈴村紗世、内藤由紀子、立松憲次郎、宮澤大介、橋本洋子、山村彩、大西浩之、大原直樹、奥山治美：カノーラ油摂取が SHRSP のステロイドホルモン代謝に及ぼす影響 Changes by canola (rapeseed) oil ingestion of steroid hormone metabolism in SHRSP. 第 89 回日本薬理学会年会、2016.3.10、パシフィコ横浜(神奈川県)
2. 大西浩之、稲山里美、宮澤大介、山田和代、水谷秀樹、大原直樹：がん細胞・マクロファージ間相互作用における c-Met とマンノース受容体の機能解析. 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2015、2015.11.1、金城学院大学(愛知県)
3. 花井仁美、西川真衣、高木彩菜、寺町仁那、立松憲次郎、宮澤大介、橋本洋子、山村彩、大西浩之、大原直樹、奥山治美：カノーラ油の有害効果 - SHRSP のステロイドホルモン代謝におよぼす影響 - . 日本薬病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2015、2015.11.1、金城学院大学(愛知県)
4. 西川真衣、高木彩菜、寺町仁那、内藤由紀子、立松憲次郎、宮澤大介、橋本洋子、山村彩、大西浩之、大原直樹、奥山治美：SHRSP のステロイドホルモン代謝に関わるいくつかの酵素の mRNA 発現に対するカノーラ油摂取の影響. 日本脂質栄養学会第 24 回大会、2015.8.28、ホテルグランデはがくれ(佐賀県)
5. 大西浩之、宮澤大介、小島亜衣梨、山田和代、水谷秀樹、岡清正、水野信哉、大原直樹、中村敏一：HGF- β 鎖/マンノース受容体系は IL-4-STAT3 シグナルの亢進によりマクロファージからの IL-10 産生を高める. 第 79 回日本生化学会中部支部例会、2015.5.23、信州大学(長野県)
6. 宮澤大介、大西浩之、内田優希、坂本康

子、木村愛莉、木村里奈、山田和代、北森一哉、大原直樹：親の食餌脂肪酸が乳仔マウス脳の神経栄養因子産生に及ぼす影響。第 87 回日本生化学会大会，2014.10.18、京都国際会館（京都府）

7. 大西浩之、宮澤大介、山田和代、大原直樹、水谷秀樹、岡清正、水野信哉、中村敏一：HGF- 鎖/マンノース受容体系がマクロファージのサイトカイン産生に及ぼす影響。第 87 回日本生化学会大会，2014.10.16、京都国際会館（京都府）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 浩之 (OHNISHI, Hiroyuki)

金城学院大学・薬学部・助教

研究者番号：90523316

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し