Hepatocyte Growth Factor (HGF) による移植免疫・自己免疫反応の制御

岩崎 剛,^{*,a,b} 芝崎 誠司^{b,c}

Hepatocyte Growth Factor Regulates Immune Reactions Caused by Transplantation and Autoimmune Diseases

Tsuyoshi Iwasaki^{*,a,b} and Seiji Shibasaki^{b,c}

^aDivision of Pharmacotherapy, Department of Pharmacy, School of Pharmacy, Hyogo University of Health Sciences; ^bGraduate School of Pharmacy, Hyogo University of Health Sciences; and ^cGeneral Education Center, Hyogo University of Health Sciences; 1-3-6 Minatojima, Chuo-ku, Kobe 650-8530, Japan.

(Received July 30, 2013)

Hepatocyte growth factor (HGF) was first identified and cloned as a mitogenic protein for hepatocytes, and subsequent studies revealed that HGF has multiple biological effects on a wide variety of cells, including mitogenic, motogenic, morphogenic, anti-apoptotic, and angiogenic activities. It plays roles in organizing tissues during development and regeneration. HGF may be applied for the treatment of acute onset diseases such as fulminant hepatitis, myocardial infarction, acute renal failure, cerebral infarction, and chronic diseases like liver cirrhosis, chronic renal failure, pulmonary fibrosis, cardiomyopathy, and arteriosclerosis obliterans. HGF also has immunomodulatory activities and we previously demonstrated that its administration inhibited acute graft-versus-host disease (GVHD) after treatment with hematopoietic stem cell transplantation. We also demonstrated that HGF inhibited lupus nephritis induced by chronic GVHD and dermal sclerosis in systemic sclerosis using model mice. More than 7 hundred thousand patients suffer from rheumatoid arthritis (RA) in Japan. Although the prognosis of these patients has improved by the treatment of biological agents such as TNF- α and IL-6 blockers, there remain many for whom these agents have not proved beneficial. Recently, using RA model mice, we demonstrated that the HGF antagonist, NK4, can block disease progression of RA through its anti-angiogenic and immunomodulatory actions. In this review article, we discuss the possible roles of HGF signaling for the treatment of immunological reactions in transplantation and autoimmune diseases.

Key words——autoimmune disease; hepatocyte growth factor; transplantation

1. はじめに

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) は、肝細胞のみならず様々な細胞に対して、細胞増殖促進、細胞運動促進、抗アポトーシス、形態形成誘導、血管新生などの、組織や臓器の再生と保護を担う生理活性を有している。¹⁻³⁾ HGF は、劇症肝炎、心筋梗塞、急性腎不全、脳梗塞などの急性臓器疾患や、肝硬変、慢性腎不全、肺線維症、心筋症、閉塞性動脈硬化症などの慢性疾患の治療への臨床応用が期待されている。HGF は、組織再生や保護作

用のほか、免疫制御作用も有する。⁴⁻⁶⁾ われわれは、造血幹細胞移植後の合併症である急性移植片対宿主病 (graft-versus-host disease; GVHD) が、HGF 投与により制御できることを明らかにした。^{7,8)} また、HGF が慢性 GVHD による自己免疫反応により発症するループス腎炎や、全身性硬化症 (systemic sclerosis; SSc) による皮膚硬化も制御できることを、疾患モデルマウスを用いて明らかにした。^{9,10)} 関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) は、わが国で約 70 万人もの患者が罹患している難治性炎症性疾患である。現在、生物学的製剤の投与により、RA 患者の予後が著しく改善しているが、生物学的製剤の投与でも十分な治療効果が得られない患者が数多くいる。最近われわれは、HGF アンタゴニストである、NK4 の血管新生抑制作用と免疫制御作用により、RA による関節炎を制御できることを、

The authors declare no conflict of interest.

^a兵庫医療大学薬学部, ^b兵庫医療大学大学院薬学研究科, ^c兵庫医療大学共通教育センター (〒650-8530 神戸市中央区港島 1-3-6)

*e-mail: tsuyo-i@huhs.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 133 年会シンポジウム S28-302 で発表した内容を中心に記述したものである。

RA モデルマウスを用いて明らかにした.¹¹⁾ 本稿では, HGF の組織再生と免疫制御機構による, 移植免疫反応や自己免疫疾患の治療への可能性について概説する.

2. HGF による移植免疫反応の制御

造血幹細胞移植 (hematopoietic stem cell transplantation; HSCT) における GVHD の合併は, 移植患者の予後を著しく不良とするため, GVHD を制御することは HSCT の重要な課題である. 現在, 免疫抑制剤を用いた治療の進歩により, 急性 GVHD はある程度制御可能となったが, いまだ不十分な点が多い.¹²⁻¹⁴⁾ GVHD は, 移植造血細胞に混在するドナー T 細胞が, ホスト抗原提示細胞 (antigen presenting cells; APCs) に提示されたホストアロ抗原を認識することにより発症する. ホストアロ抗原により活性化されたドナー T 細胞は, Th1 細胞へと分化し, IL-2 や IFN- γ を産生する. 単球, マクロファージ系細胞はこれらの Th1 サイトカインによりプライムされ, エンドトキシンなどの微生物由来成分などによる toll-like receptor を介した刺激により, IL-1, TNF- α などの炎症性サイトカインを産生し, 皮膚, 肝臓, 腸管, 造血・リンパ組織が障害される (Fig. 1). ドナー T 細胞は急性

GVHD のエフェクターになる以外に, ホストの拒絶反応の制御や, 抗腫瘍 (graft-versus-tumor; GVT) 効果のエフェクターになることが知られている.¹⁵⁻¹⁸⁾ よって, 移植片からのドナー T 細胞除去や免疫抑制薬の投与はドナー T 細胞機能を阻害し, 急性 GVHD を制御できるが, 移植片拒絶や腫瘍の再発を伴う恐れがある (Fig. 2). HSCT を有効に行うには, GVT 効果を維持しながら GVHD や拒絶反応を制御する必要がある. そのためには, ドナー T 細胞活性化機構をある程度維持しながら GVHD による臓器障害を防御することが重要である. GVHD における炎症性サイトカインの産生は, 腸管障害による腸内細菌由来エンドトキシンが血中に流入し, 単球, マクロファージを活性化することによるものである. よって, HSCT の前処置や GVHD による腸管障害を防御できれば, ドナー T 細胞機能を抑制することなく, GVHD を制御できる. HGF は, 分子量 69 kDa の α 鎖と 34 kDa の β 鎖からなるヘテロダイマーで, チロシン型レセプター, c-Met に結合し, 増殖促進, 遊走促進, 形態形成誘導, 抗アポトーシス作用を発揮する.¹⁻³⁾ これらの生理活性を持つ HGF は, 臓器・組織の再生維持因子として各種疾患治療に有用である (Fig.

Fig. 1. Pathogenesis of GVHD

Donor T cells contaminating hematopoietic stem cells (HSCs) contribute to GVHD. The gastrointestinal tract has an important role in the amplification of inflammatory effectors, because normal bowel flora and their products (such as endotoxin) can serve as potent triggers of inflammatory cytokine production.

Fig. 2. Mechanisms of Graft-versus-Tumor (GVT) Effects

Much of the therapeutic potential of allogeneic HSCT is related to its GVT effect, which is mediated primarily by the cytotoxicity of donor T cells. Many approaches to controlling acute GVHD, *e.g.*, pharmacologic immunosuppression or *ex vivo* T-cell depletion of the donor HSCs, reduce GVL activity because these methods inhibit donor T-cell responses to host antigens.

3). われわれは、GVHDによる臓器障害をHGFにより防御可能かを、GVHDモデルマウスを用いて検討した。BDF1マウスを9 Gy全身照射し、B6マウス骨髓細胞と脾細胞を静脈注射すると、急性GVHDが発症し、マウスはすべて死亡した。しかし、ヒトHGF cDNAをHVJ-リポソーム法を用いて1週間間隔でマウス大腿骨格筋に遺伝子導入すると、マウス体内でHGFタンパクが産生され、GVHDマウスの死亡率が低下した (Fig. 4)。組織学的解析にて、腸管上皮細胞のアポトーシスが抑制され、腸管障害の改善が認められた。GVHDの標的臓器である肝臓においても、門脈周囲のリンパ球浸潤が抑制されていた (Fig. 5)。また、これらの臓器における炎症性サイトカイン mRNA の発現が抑制されていた。さらに、肝臓、脾臓における髄外造血が認められ、移植後の造血能の回復が促進されることが明らかになった。⁷⁾ 次に、HGFがGVT効果に及ぼす影響を検討した。BDF1マウスに9 Gy全身照射し B6マウス骨髓細胞と白血病細胞株 (P815) を静脈注射すると、マウスは白血病細胞の増殖により20日以内にすべて死亡したが、B6マウス脾細胞を静脈注射し、GVHDを発症させると、白血病細胞の増殖が制御できた。しかし、マウスは

その後GVHDにより死亡した。HGF遺伝子治療を行うと、GVT効果が維持され、急性GVHDの発症も制御でき、生存率の著しい改善が認められた (Fig. 6)。HGF遺伝子治療を行ったGVHDマウス脾臓T細胞のホストアロ抗原に対する反応は、未治療GVHDマウスの脾臓T細胞と同等の反応が認められた。以上の実験結果から、HGFはドナーT細胞機能を抑制することなく、GVHD標的臓器障害を防御できることが明らかになった。長期生存できた急性GVHDマウスは脾臓、胸腺の著明な委縮を認め、脾臓T細胞はホストアロ抗原に対して依然反応し、慢性GVHDの病像を呈していた。しかし、HGF治療を行ったマウスの脾臓、胸腺は委縮を認めなかった (Fig. 7)。⁸⁾ 胸腺障害により胸腺における自己反応性T細胞の除去機能が障害されると、慢性GVHDが発症すると考えられている。HGFは急性GVHDによる胸腺障害を防御し、慢性GVHDも制御できることが明らかになった。

3. HGFによる自己免疫反応の制御

Th1/Th2バランスがTh2に偏ると、IL-4の産生が過剰になり、B細胞のクラススイッチが生じてIgEの産生が多くなる。結果として、Th2へのシフトはアレルギー症状に陥り易いことを示している。

Fig. 3. Biological Roles of HGF

This heterodimer composed of the α -chain and β -chain exerts multiple actions for tissue repair and homeostasis such as mitogenic, motogenic, and morphogenic effects on various epithelial tissues, including the liver, kidneys, lungs, and intestines via its receptor, c-Mets.

Fig. 4. HGF Caused a Reduction of Mortality in a Lethal GVHD Model

BDF1 recipients were transplanted with 5×10^6 bone marrow cells plus 2×10^7 spleen cells from allogeneic (B6) donors after 9 Gy of total body irradiation (TBI). Recipients transplanted with 5×10^6 bone marrow cells from syngeneic (BDF₁) donors after TBI were used as BMT controls. Gluteal muscles of BDF₁ mice were injected with HGF-HVJ liposomes (or PBS) on days 0, 7, 14, and 21. $p < 0.05$ for survival of GVHD mice after PBS injection versus HGF-HVJ liposomes injection.

一方で、Th1/Th2 バランスが Th1 に偏ると、INF- γ の産生が多くなり、マクロファージの活性化を引き起こす。さらには IL-2 の産生が多くなり、CD8 + T 細胞や NK 細胞の活性化を引き起こす。Th1 にバランスが偏ると起こり易い自己免疫疾患として、実験的アレルギー性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) が知られている。EAE は、中枢神経系全体に組織障害が起こるヒトの多発性硬化症に類似している。その他、RA や、組織障害を起こす CD8 + T 細胞が引き起こす I 型糖尿病などが挙げられる。一方、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus; SLE) や SSc は Th2 バランスに偏るとの報告もある。慢性 GVHD に対する HGF の効果を確認するため、われわれは、慢性 GVHD モデルへの HGF 投与を試みた。BDF1 マウスに DBA/2 マウス脾細胞を静脈注射すると、ドナー CD4 + T 細胞がホス

Fig. 5. Effect of HGF on Liver and Intestinal Injury

GVHD was induced by injection of 10^8 spleen cells harvested from B6 donors into nonirradiated BDF₁ mice. From the time of GVHD induction, gluteal muscles of BDF₁ mice were injected either with HVJ liposomes containing 8 μ g of human HGF expression vector (HGF-HVJ liposomes) or with PBS (GVHD control). Gene transfer was repeated once a week after GVHD induction. Animals were sacrificed after 2 weeks of GVHD, and the liver and intestines were removed. Tissues were stained with hematoxylin eosin (HE) staining and TUNELL staining to detect apoptosis of small intestinal epithelial cells. Original magnification $\times 200$.

Fig. 6. Reduction of GVHD and Preservation of GVT Activity

BDF₁ recipients received TBI (9 Gy) followed by intravenous injection of B6 bone marrow cells (5×10^6) and P815 cells (10^4) on day 0. In addition, some recipients received B6 spleen cells (2.5×10^7) on day 0. BDF₁ recipients that received B6 bone marrow cells without P815 cells were used as BMT controls. BDF₁ recipients that received B6 bone marrow cells and B6 spleen cells without P815 cells were used as GVHD controls. HVJ liposomes containing 8 μ g human HGF cDNA or a mock vector were injected intramuscularly on days 0, 7, 14, and 21. The survival of HGF-treated GVHD recipients was significantly better than that of all other groups. $p < 0.01$ for survival of P815-injected GVHD mice after PBS injection versus P815-injected GVHD mice after HGF-HVJ liposomes injection.

ト B 細胞を活性化し、自己抗体産生を誘導し、ループス腎炎などの SLE の病像を呈する。また、Th1/Th2 免疫応答において、Th2 に偏ることが明

らかになっている。ヒト HGF cDNA を HVJ-リポゾーム法を用いて 1 週間間隔でマウス大腿骨格筋に遺伝子導入すると、これらの病像が改善した (Fig.

Fig. 7. Reduction of Thymic GVHD

Nonirradiated BDF1 recipients received an intravenous injection of B6 spleen cells (2.5×10^7) on day 0. BDF1 recipients that received BDF1 spleen cells (2.5×10^7) were used as BMT controls. HVJ liposomes containing 8 μ g human HGF cDNA or a mock vector were injected intramuscularly on days 0 and +7 of GVHD induction. On day 14 after GVHD induction, the thymi harvested from HGF-treated GVHD recipients were clearly larger than those from control-treated GVHD recipients (A). Cellularity of the thymus of HGF-treated GVHD recipients on day 14 after GVHD induction were higher than those from control-treated GVHD recipients (A). Cell surface expression of CD4 and CD8 demonstrated that CD4⁺CD8⁺ thymus cells were preserved in HGF-treated GVHD recipients (C).

Fig. 8. Therapeutic Effects of HGF on Autoimmune Diseases

(A) Protective effect of HGF against the development of nephritic syndrome, as determined by changes in urine protein excretion levels. Open circles, HGF-treated GVHD; closed circles, untreated GVHD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared to untreated GVHD at the same time point. (B) Histopathology of kidney tissue from untreated and HGF-treated GVHD mice. HGF treatment significantly inhibited these pathological changes. Original magnification $\times 200$. (C) Effect of HGF on skin fibrosis in TSK/+ mice. Skin fibrosis in dorsal skin from C57BL/6, pa/pa, and TSK/+ mice with or without treatment with HGF. Original magnification $\times 40$. An asterisk indicates the subcutaneous loose connective tissue layer beneath the panniculus carnosus (arrow).

8).⁹⁾ さらに、SSc モデルマウス (Tsk マウス) に HGF 遺伝子を導入すると、皮膚硬化の改善も認められた (Fig. 8).¹⁰⁾ IL-6 などの炎症性サイトカイン

は、生体内で HGF を誘導することが報告されている。¹⁹⁾ また、HGF がマクロファージからの IL-10 などの抗炎症性サイトカインを誘導し、炎症を終息

させることも報告されている。さらに、HGF は APC に作用し、Th2 分化を促進し、RA モデルマウスの関節炎を抑制することも報告されている。^{4,6)} われわれは *in vitro* の実験より、APC に HGF が作用し、Th1/Th2 サイトカインの産生が抑制されることも明らかにした。^{9,10)} 以上の結果より、HGF は Th1/Th2 免疫応答を調節し、慢性 GVHD や自己免疫疾患を改善できる可能性があることが示唆される。

4. HGF アンタゴニストによる関節リウマチの治療

NK4 は HGF アンタゴニスト作用を有する機能性分子であり、実験動物に移植した様々ながんに対して、浸潤・転移を阻止できる。NK4 は HGF 分子内の N 末ヘアピンドメインと 4 個のクリングル (Kringel) ドメインからなり、これは HGF の α 鎖から C 末 16 残基を欠失した領域にあたる。NK4 は c-Met に高い親和性で結合するものの、c-Met の活性化(チロシンリン酸化)を誘導しないことにより、HGF-Met 系に対するアンタゴニストとして作用する (Fig. 9)。⁹⁾ その後、NK4 は HGF アンタゴニスト活性とは独立に血管新生阻害作用を発揮することが明らかになり、NK4 の当初の生物活性である HGF アンタゴニスト活性と独立の活性があることも明らかになっている。²⁰⁻²²⁾ RA における滑膜細胞

Fig. 9. Structures and Functional Mechanisms to Block HGF by NK4

NK4 is a proteolytic fragment of HGF, consisting of an N-terminal hairpin domain and four kringel domains of the α -chain of HGF. In addition to antagonizing HGF by competitively binding to c-Met, NK4 inhibits the angiogenic responses of endothelial cells induced by bFGF and VEGF, suggesting that new binding molecules of NK4 other than c-Met may exist.

Fig. 10. NK4 Inhibits Arthritis in RA Model of SKG Mice

AdCMV.NK4 (1×10^9 pfu), or AdCMV.LacZ (1×10^9 pfu) as a control, was administered intravenously to the SKG mice from the time of β -glucan injection. Joint swelling of the AdCMV.LacZ-treated SKG mice began on day 32 after β -glucan injection and progressed significantly by day 75. In contrast, mice that received AdCMV.NK4 had less joint swelling as determined by the clinical score (B) and ankle volume (C) 60 days following β -glucan injection. SKG mice that received AdCMV.NK4 had less joint swelling than control mice that received AdCMV.LacZ 60 days following β -glucan injection (A).

は、がん細胞に類似した増殖形態を示し、血管新生が重要であることも明らかになっている。そこで、NK4 を RA モデルマウスに投与し、その効果を検討した。SKG マウスは単一遺伝子の突然変異により、ヒトの RA に非常によく似た病理像を示す関節炎を自然発症するマウスで、RA の疾患モデル動物として注目されている。われわれは SKG マウスに β グルカン腹腔内注射し関節炎を誘発し、NK4 の投与を試み、関節炎抑制効果を検討した。その結果、関節炎が有意に抑制され、関節組織における骨破壊や炎症性細胞浸潤、血管新生が抑制されることが明らかになった (Fig. 10).¹¹⁾

5. おわりに

HGF/c-Met シグナルは、組織再生、血管新生、免疫制御など、多様な生理作用を有している。よって、HGF/c-Met シグナルを制御することにより、障害臓器の修復、がんの制御、多様な自己免疫、移植免疫反応が制御できる可能性がある。HGF/c-Met シグナルの正の制御を担う者として、HGF タンパクにて、負の制御を担うものとしては、抗 HGF 抗体や NK4 などの HGF アンタゴニスト、c-Met 阻害薬などがあり、将来の臨床応用が期待できる。一方、分子ディスプレイ法を用いた経口医薬品の開発にも期待が持てる。われわれは、現在乳酸菌や酵母の表面に HGF タンパクを発現させ、GVHD モデルマウスに経口投与し GVHD が制御可能か検討している。GVHD による臓器障害は腸管障害が引き金となり、全身臓器障害に発展する。よって、経口的に腸管障害部位に、直接高濃度の HGF タンパク投与できれば、効率よく腸管障害を改善できる可能性がある。将来の、HGF/c-Met シグナル制御を目指した新規治療法の開発に期待したい。

REFERENCES

- 1) Nakamura T., Nishizawa T., Hagiya M., Seki T., Shimonishi M., Sugimura A., Tashiro K., Shimizu S., *Nature*, **342**, 440–443 (1989).
- 2) Bussolino F., Di Renzo M. F., Ziche M., Bochiello E., Olivero M., Naldini L., Gaudino G., Tamagnone L., Coffer A., Comoglio P. M., *J. Cell Biol.*, **119**, 629–641 (1992).
- 3) Birchmeier C., Birchmeier W., Gherardi E., Vande Woude G. F., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 915–925 (2003).
- 4) Okunishi K., Dohi M., Nakagome K., Tanaka R., Mizuno S., Matsumoto K., Miyazaki J., Nakamura T., Yamamoto K., *J. Immunol.*, **175**, 4745–4753 (2005).
- 5) Rutella S., Bonanno G., Procoli A., Mariotti A., de Ritis D. G., Curti A., Danese S., Pessina G., Pandolfi S., Natoni F., Di Febo A., Scambia G., Manfredini R., Salati S., Ferrari S., Pierelli L., Leone G., Lemoli R. M., *Blood*, **108**, 218–227 (2006).
- 6) Okunishi K., Dohi M., Fujio K., Nakagome K., Tabata Y., Okasora T., Seki M., Shibuya M., Imamura M., Harada H., Tanaka R., Yamamoto K., *J. Immunol.*, **179**, 5504–5513 (2007).
- 7) Kuroiwa T., Kakishita E., Hamano T., Kataoka Y., Seto Y., Iwata N., Kaneda Y., Matsumoto K., Nakamura T., Ueki T., Fujimoto J., Iwasaki T., *J. Clin. Invest.*, **107**, 1365–1373 (2001).
- 8) Imado T., Iwasaki T., Kataoka Y., Kuroiwa T., Hara H., Fujimoto J., Sano H., *Blood*, **104**, 1542–1549 (2004).
- 9) Kuroiwa T., Iwasaki T., Imado T., Sekiguchi M., Fujimoto J., Sano H., *Arthritis Res. Ther.*, **8**, R123 (2006).
- 10) Iwasaki T., Imado T., Kitano S., Sano H., *Arthritis Res. Ther.*, **8**, R161 (2006).
- 11) Tsunemi S., Iwasaki T., Kitano S., Matsumoto K., Takagi-Kimura M., Kubo S., Tamaoki T., Sano H., *Arthritis Res. Ther.*, **15**, R75 (2013).
- 12) Thomas E. D., Storb R., Clift R. A., Fefer A., Johnson L., Neiman P. E., Lerner K. G., Glucksberg H., Buckner C. D., *N. Engl. J. Med.*, **292**, 832–843 (1975).
- 13) Deeg H. J., Storb R., *Annu. Rev. Med.*, **35**, 11–24 (1984).
- 14) Ferrara J. L. M., Deeg H. J., *N. Engl. J. Med.*, **324**, 667–674 (1991).
- 15) Prentice H. G., Blacklock H. A., Janossy G., Gilmore M. J., Price-Jones L., Tidman N., Trejdosiewicz L. K., Skeggs D. B., Panjwani D., Ball S., *Lancet*, **1**, 472–475 (1984).
- 16) Martin P. J., Hansen J. A., Buckner C. D., Sanders J. E., Deeg H. J., Stewart P., Appelbaum F. R., Clift R., Fefer A., Witherspoon R. P., *Blood*, **66**, 664–672 (1985).
- 17) Hill G. R., Crawford J. M., Cooke K. R.,

- Brinson Y. S., Pan L., Ferrara J. L., *Blood*, **90**, 3204–3213 (1997).
- 18) Crawford J. M., “Graft-*versus*-Host Disease, Graft-*versus*-host disease of the liver,” 2nd ed., eds. by Ferrara J. L. M., Deeg H. J., Burakoff S. J., Marcel Dekker, New York, 1997, pp. 315–336.
- 19) Coudriet G. M., He J., Trucco M., Mars W. M., Piganelli J. D., *Plos One*, **5**, e15384 (2010).
- 20) Date K., Matsumoto K., Shimura H., Tanaka M., Nakamura T., *FEBS Lett.*, **420**, 1–6 (1997).
- 21) Kuba K., Matsumoto K., Date K., Shimura H., Tanaka M., Nakamura T., *Cancer Res.*, **60**, 6737–6743 (2000).
- 22) Martin T. A., Parr C., Davies G., Watkins G., Lane J., Matsumoto K., Nakamura T., Mansel R. E., Jiang W. G., *Carcinogenesis*, **24**, 1317–1323 (2003).