

HGFの神経保護作用機序

船越 洋
ふなこし ひろし

大阪大学大学院助教授/医学系研究科
生化学・分子生物学講座
分子再生医学分野

角山 圭一
かどやまけいいち

大阪大学大学院/医学系研究科
生化学・分子生物学講座
分子再生医学分野

大谷 若菜 同
おおやわか な

中村 敏一 同 教授
なかむらとしかず

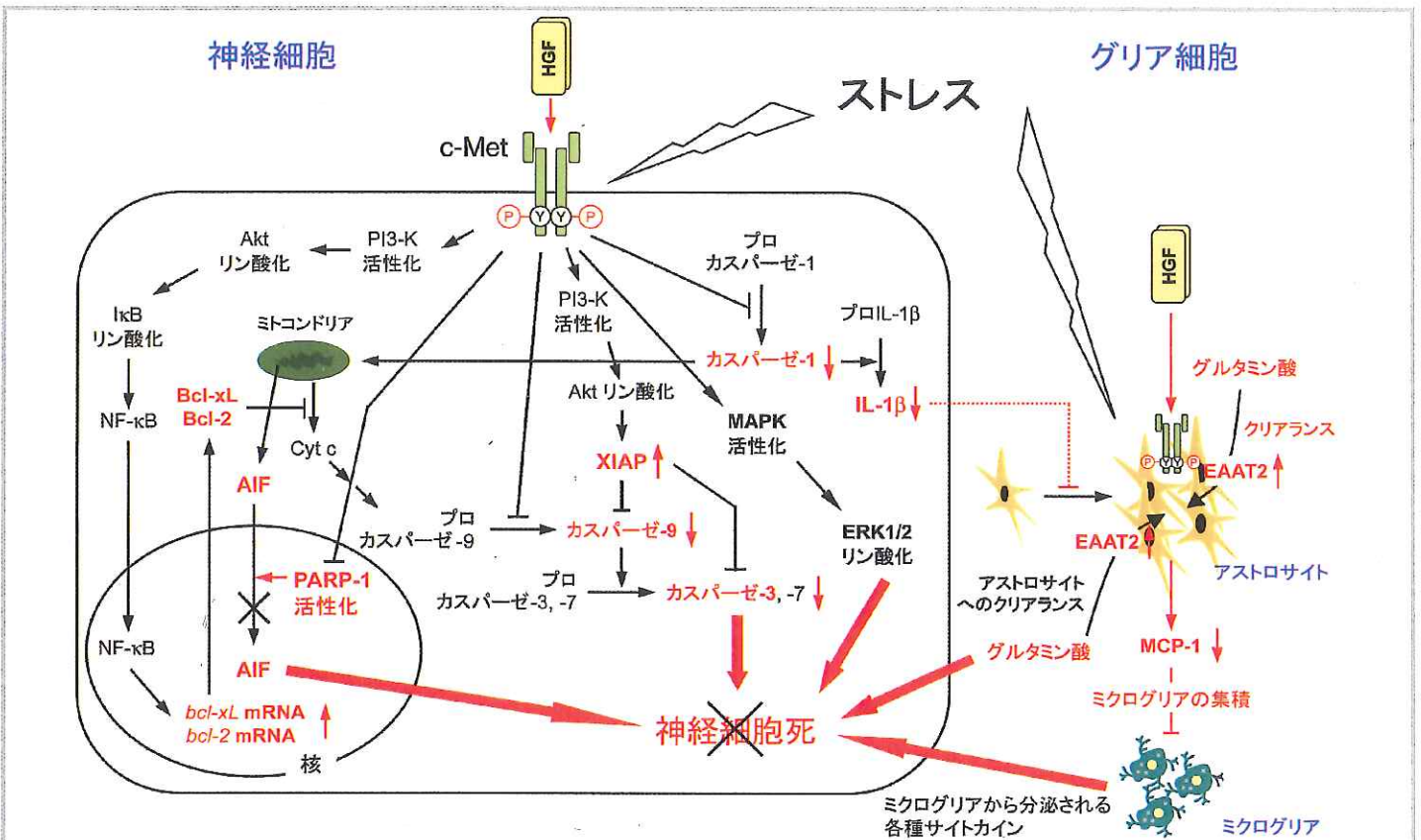


図1 HGFの神経保護作用分子機構(モデル)

HGFは神経細胞膜上にあるc-Metに結合し、チロシン残基の自己リン酸化を介してシグナルを神経細胞内へと伝達し、PI3キナーゼ-Akt系およびMAPキナーゼ系を活性化する。HGFはカスパーゼ群の上流に位置するアポトーシス阻害蛋白質(XIAP)を誘導し、その結果、下流のカスパーゼ群の活性化を阻害する。また、HGFはカスパーゼ-1の活性化の阻害を介してもミトコンドリアからのチトクロムcの遊離を抑制し、カスパーゼの活性化を阻害する。

疾患の種類によってはアンチアポトーシス蛋白質であるBcl-2、Bcl-xLの発現亢進を介してミトコンドリアからのチトクロムcの遊離を抑制する。このようにHGFは神経細胞に直接作用し、カスパーゼ依存性な神経細胞死シグナルを抑制し神経細胞保護に機能する。一方、HGFはPARP-1の活性化抑制を介して、カスパーゼ非依存性アポトーシスの重要な因子であるAIFの核内移行を抑制することによっても神経保護に機能する。

HGFの神経細胞内シグナルは、グリオシス抑制にも有利に働く。HGFはカスパーゼ-1の活性化抑制により神経細胞内におけるIL-1βの産生抑制に働き、アストロサイトーシスおよびアストロサイトにおけるMCP-1産生を抑制する。MCP-1の低下はマイクログリアの集積に抑制的に作用し、各種マイクログリア由来のサイトカイン分泌による神経細胞死シグナルを間接的に抑制する。

一方、HGFはアストロサイトに誘導されるc-Metに作用して、アストロサイトにおけるグルタミン酸トランスポーター(EAAT2/GLT-1)蛋白質レベルを維持・亢進することで、グルタミン酸のクリアランス効率を上げ、神経細胞に対するグルタミン酸毒性を間接的に抑制し神経細胞保護に働く。

Cyt c: チトクロムc, MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1

HGF (hepatocyte growth factor)の神経保護作用は、神経疾患の種類とHGFの投与方法により報告されている機序は異なるが、まとめると、① 神経細胞自体に対する作用、② グリア細胞を介した作用、および③ 血管新生促進作用を介した間接作用がある(図1)。

神経細胞への直接作用

1. カスパーゼ系の活性化抑制を介した神経保護作用

ALSトランスジェニックマウスと神経系特異的HGF発現トランスジェニックマウスの交配研究および脳虚血に対するHGFの機

能解析の結果、HGFは図1に示すようなアポトーシスカスケードの複数のステップに作用し神経保護作用を示すことが明らかとなってきた¹⁻³⁾(Kadoyamaら, unpublished data)。HGFは神経細胞膜上にあるc-Metと結合し、チロシン残基をリン酸化する。引き続き、PI3キナーゼ-Akt系およびMAPキナーゼ系を活性化する(疾患モデルでその程度は異なる)。HGFはカスパーゼの活性化を抑制するx-chromosome linked inhibitor of apoptosis protein(XIAP)の発現誘導をおこすとともに、カスパーゼ-1、-3、-9の活性化を抑制

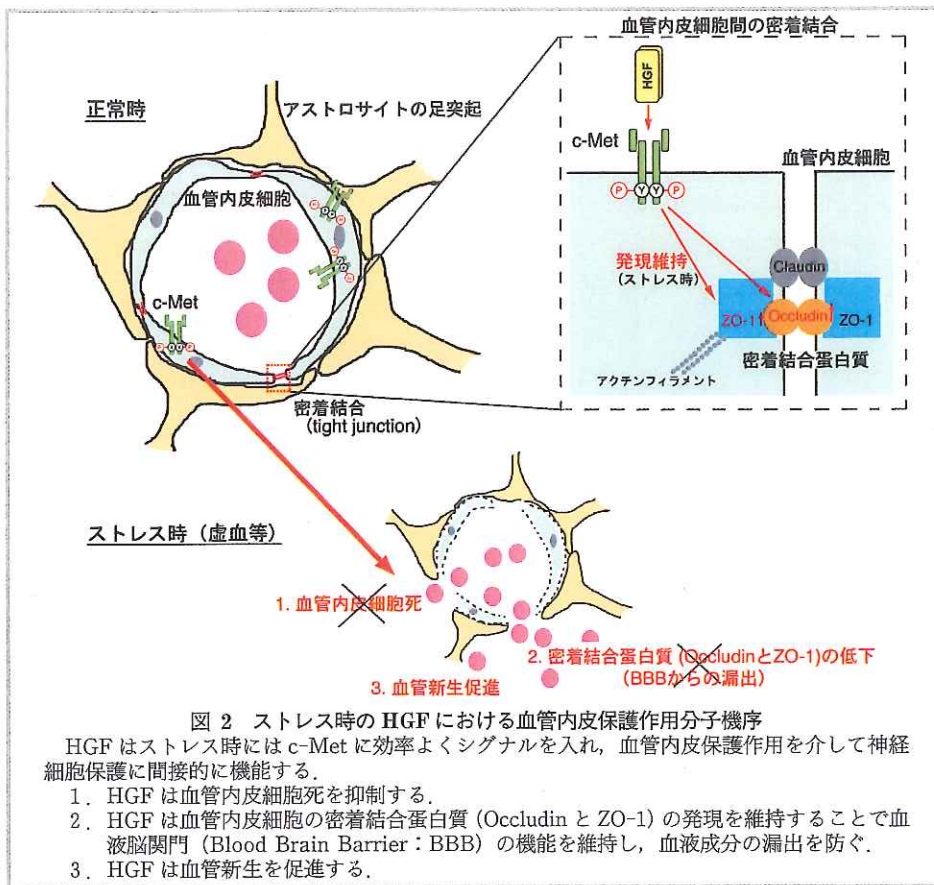


図2 ストレス時のHGFにおける血管内皮保護作用分子機構

HGFはストレス時にはc-Metに効率よくシグナルを入れ、血管内皮保護作用を介して神経細胞保護に間接的に機能する。

1. HGFは血管内皮細胞死を抑制する。
2. HGFは血管内皮細胞の密着結合蛋白質 (OccludinとZO-1)の発現を維持することで血液脳関門 (Blood Brain Barrier: BBB)の機能を維持し、血液成分の漏出を防ぐ。
3. HGFは血管新生を促進する。

することで神経保護作用を示す。カスパーゼ-1の活性化抑制により、神経細胞に対する疾患ストレスで生じるIL-1 β の活性化が抑制され、そのことで反応性アストロサイトの増殖を間接的に抑制する。さらに、HGFはアストロサイトにおけるMCP-1の産生を抑制しミクログリアの集積を抑制し、各種ミクログリア由来のサイトカインに対して間接的に神経細胞保護作用を示す。

2. アンチアポトーシス蛋白質の誘導および細胞内局在の修飾を介した作用

HGFは、アンチアポトーシス蛋白質であるBcl-2やBcl-xLの誘導をおこすとともに、プロアポトーシスに働くBaxの核内移行を抑制し、神経細胞保護に寄与する³⁻⁵⁾。

3. カスパーゼ非依存的アポトーシスカスケードの重要因子apoptosis-inducing factor (AIF)の細胞内局在修飾による神経保護作用

脳虚血に対するHGFの神経保護作用の詳細な解析により、HGFはカスパーゼ非依存的なアポトーシスに重要なAIFの細胞内局在のシフトを抑制することでも神経細胞保護作用を示すことが明らかとなった^{3,6)}。この作用は、PARP-1の活性化を抑制することで惹起されると示唆される⁶⁾。

4. 非アポトーシス依存性細胞死抑制作用

現時点では、神経系における非アポトーシス依存性細胞死抑制作用に対する詳細な解析の報告はないが、HGFには抗ネクローシス作用があることが明らかとなっており、今後神経系においてもネクローシスに対する保護作用に関する研究が進むことが期待される⁷⁾。

グリア細胞を介した作用

アストロサイトにおいては、c-Metの発現は通常検出レベル以下であるが、神経疾患においてはc-Metが著明に誘導されることが報告されている¹⁾。ALSのトランスジェニックマウスモデルと神経系特異的なHGF発現トランスジェニックマウスの交配実験結果から、HGFがアストロサイトにおけるグリア細胞特異的グルタミン

酸トランスポーター(excitatory amino acid transporter 2: EAAT 2/GLT-1)の発現レベルを維持、またその蛋白質レベルを上昇させる機能をもつことが明らかになった。HGFは、初代培養アストロサイトにおいてもEAAT 2蛋白質レベルを著明に発現誘導することから、その作用はアストロサイトへの直接作用であることが明らかとなった¹⁾。EAAT 2は、細胞外に放出された興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸をアストロサイトに回収することで、グルタミン酸のもつ神経毒性を緩和する主要なトランスポーターであり、HGFはアストロサイトにおいて発現するEAAT 2の蛋白質レベルの維持・上昇作用を介して神経保護に寄与する(図1)。何がアストロサイトにおけるc-Met発現誘導のトリガーかは、今後の解析を待つ必要があるが、Shimazakiらは、bFGFおよびaFGF処理で培養アストロサイトにおけるc-Metの発現を誘導できることを報告している⁸⁾。

血管内皮細胞および血液脳関門(BBB)保護作用・血管新生促進作用を介した間接的神経保護作用

HGFが神経系においても血管内皮細胞保護作用を示すことは、虚血性脳疾患治療を考える上で臨床的意義が大きい。竹尾らは脳血管塞栓モデルを用いてHGFのもつ血管内皮細胞保護作用をスマートに証明した。ラット右総頸動脈よりカテーテルを挿入し700個のmicrosphereで右内頸動脈に塞栓を作成し、その後10分後にrhHGFを右脳室にミニポンプで供給すると、血管内皮細胞におけるtunel陽性細胞が減少する

こと、すなわち血管内皮細胞のアポトーシスが減少し、学習機能が改善することを示した⁹⁾。さらにFITCでラベルしたアルブミンを血管中に投与して血管からの漏出を評価すると、脳血管塞栓モデルで起こるアルブミンの漏出がrhHGF投与で抑制されること、その作用は血液脳関門における密着結合蛋白質であるOccludinおよびZO-1の発現低下を抑制することによっていることが明らかとなっている¹⁰⁾(図2)。HGFのもつ血管新生促進作用は、全身臓器で明らかであるが、脳神経系においても示されている。これらの作用は、間接的とはいえ神経細胞保護に重要な貢献をすると考えられる。HGFのもつこれらの作用は、古典的な神経栄養因子には示されていないHGF独自の作用である。

むすび

これまでのHGFの神経疾患動物モデルへの機能解析の結果は、将来HGFが種々の神経疾患の治療薬として薬効を発揮するものと期待させる。特にHGFの神経保護作用分子機構の解析結果は、HGFが単に神経細胞に対する強力な神経栄養作用を発揮するだけでなく、グリア細胞や血管内皮細胞を含む種々の細胞に機能することで、神経保護・再生オーケストラのコンダクターとしての機能をもつことを示唆させる。動物で証明された結果のとおり、ヒトにおいてもHGFが期待どおり治療効果を発揮するか、臨床適用に向けた今後の研究が重要である。

文献

- 1) Sun W, et al. J Neurosci. 2002; 22: 6537-48.
- 2) Foveau B, et al. Cell Death Differ. 2006; 22: 22.
- 3) Ishihara N, et al. J Neurochem. 2005; 95: 1277-86.
- 4) Tsuzuki N, et al. Neurol Res. 2001; 23: 417-24.
- 5) Hayashi K, et al. Gene Ther. 2001; 8: 1167-73.
- 6) Niimura M, et al. J Cereb Blood Flow Metab. 2006; 11: 1354-65.
- 7) Zhaodong L, et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2007; in press.
- 8) Shimazaki K, et al. Brain Res. 2003; 962: 105-10.
- 9) Date I, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 319: 1152-8.
- 10) Date I, et al. Neurosci Lett. 2006; 407: 141-5.

HGFの神経疾患治療効果

船越 洋
ふなこし ひろし

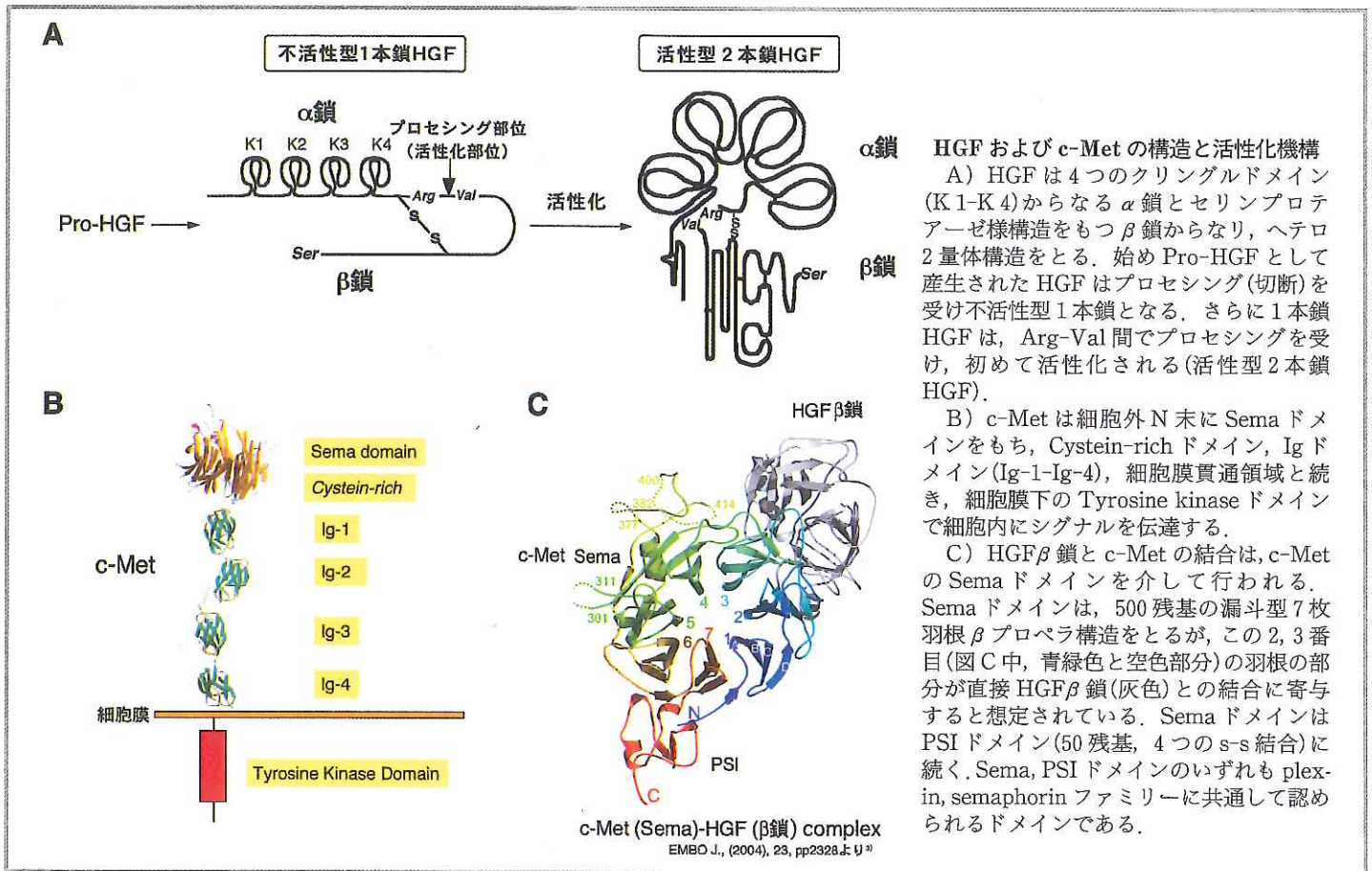
大阪大学大学院助教授/医学系研究科
生化学・分子生物学講座
分子再生医学分野

角山 圭一
かどやまけいいち

大阪大学大学院/医学系研究科
生化学・分子生物学講座
分子再生医学分野

大谷若菜 同
おおやわか な

中村敏一 同 教授
なかむらとしかず



α鎖 HGFおよびc-Metの構造と活性化機構
A) HGFは4つのクリングルドメイン(K1-K4)からなるα鎖とセリンプロテアーゼ様構造をもつβ鎖からなり、ヘテロ2量体構造をとる。始めPro-HGFとして産生されたHGFはプロセッシング(切断)を受け不活性型1本鎖となる。さらに1本鎖HGFは、Arg-Val間でプロセッシングを受け、初めて活性化される(活性型2本鎖HGF)。

B) c-Metは細胞外N末にSemaドメインをもち、Cystein-richドメイン、Igドメイン(Ig-1-Ig-4)、細胞膜貫通領域と続き、細胞膜下のTyrosine kinaseドメインで細胞内にシグナルを伝達する。

C) HGFβ鎖とc-Metの結合は、c-MetのSemaドメインを介して行われる。Semaドメインは、500残基の漏斗型7枚羽根βプロペラ構造をとるが、この2,3番目(図C中、青緑色と空白部分)の羽根の部分が直接HGFβ鎖(灰色)との結合に寄与すると想定されている。SemaドメインはPSIドメイン(50残基、4つのs-s結合)に続く。Sema, PSIドメインのいずれもplexin, semaphorinファミリーに共通して認められるドメインである。

はじめに

肝細胞増殖因子[hepatocyte growth factor (HGF)]は、始め初代培養肝細胞への増殖活性をもとに同定・精製・クローニングされた^{1,2)}。HGFは始めプロHGFの形で産生され、プロセッシング(切断)を受け不活性型の1本鎖型HGFとなる(図A)。HGFはこの状態では活性がなく、α鎖とβ鎖の間のArgとValの間でプロセッシングを受けて2本鎖HGFとなって初めて活性型HGFとなる。活性型2本鎖HGFは、特異的受容体であるc-Metと結合し、細胞膜下にあるチロシンキナーゼの自己リン酸化を介して細胞内にシグナルを伝達する(図B)。HGFのβ鎖とc-MetのN末端Semaドメインとの結晶構造解析の結果、Semaドメインの漏斗型7枚羽根βプロペラ構造の2,3番目(図C中、青緑色と空白部分)の羽根の部分が直接HGFβ鎖(灰色)と結合することが明らかにされた(図C)³⁾。今後HGFのfull sizeとc-Metの結晶解析が進めば、より完全な結合様式が明らかになる。神経ガイダンスに重要なsemaphorinと相同性が高いSemaドメインがc-Met上でHGF結合の少なくとも一端を担っていることが明らかになったことは、神経系におけるHGF/c-Met系の機能を考える上で興味深い。

HGFの具体的生物活性は、発見の端緒となった増殖活性に加え、

細胞移動(scatter)促進、抗アポトーシス作用、血管新生促進作用と多岐にわたる。その後の研究発展により、これらの生物活性は肝臓にとどまらず、肺、心臓、膵臓、腎臓、胃、腸管、骨、軟骨等広い臓器にわたって認められることが明らかとなってきた⁴⁾。脳神経系もHGFの標的臓器である⁵⁾。そのことは、ノックインマウスを作成することにより発生過程でc-Metの細胞内領域の一部のシグナル発信アミノ酸を変異させただけでも、筋肉および神経突起伸張が大幅に修飾されたことから明らかである^{6,7)}。さらに、HGFは種々の神経疾患モデル動物において強力な神経細胞保護作用を示すことが明らかとなってきた⁸⁾。本稿では、神経疾患モデルに対するHGFの神経保護作用の例をあげながら、その際の作用分子機構について概説する。

HGFの神経疾患モデル動物に対する治療効果

HGFは種々の神経疾患モデル動物に対して著明な治療効果を示すことが明らかとなっている(表)。以下その一部について解説する。

1. 虚血性神経疾患モデルに対する効果

脳虚血に対するHGFの治療効果は、1998年宮澤らによるリコンビナントヒトHGF(rhHGF)の投与報告により初めて明らかとなった⁹⁾。その後、同様の結果は表に示す通り数多くの報告がある。HGFのもつ神経細胞保護作用は、直接的神経細胞保護作用に加えて、血

0289-0585/07/¥500/論文/JCLS

HGF の代表的標的神経疾患モデルと HGF の神経保護作用機序				
	標的疾患	投与方法	作用機序	文献
脳虚血	脳梗塞	rhHGF 蛋白質	神経細胞死抑制効果 Bcl-2 の産生上昇 カスパーゼ-3 の活性化阻害 PARP-1 活性化抑制によるアポトーシス阻害因子(AIF)の核内移行抑制 p 53 蛋白質の発現亢進 密着結合蛋白質(occludin/ZO-1)の発現維持による血液脳関門の機能維持 血管内皮細胞の細胞死抑制効果	Miyazawa, et al. 1998 ; Tsuzuki, et al. 2000 ; Tsuzuki, et al. 2001 ; Date, et al. 2004 ; Date, et al. 2006 ; Ishihara, et al. 2005 ; Niimura, et al. 2006 ; Niimura, et al. 2006 ; Niimura, et al. 2006.
		HGF 遺伝子(HVJ-liposome)	血管新生の誘導, cerebral blood flowの改善	Yoshimura, et al. 2002.
		HGF 遺伝子導入(ex vivo)骨髄細胞移植	神経細胞死抑制効果	Zhao, et al. 2006.
薬剤性脳神経細胞死	パーキンソン病	HGF 遺伝子(naked plasmid)	ドーパミン作動性神経の神経細胞死抑制効果	Koike, et al. 2006.
神経変性疾患トランスジェニックマウスモデル	ALS	HGF 遺伝子(トランスジェニックマウス)	運動ニューロンの神経細胞死抑制効果 カスパーゼ-1 の活性化阻害 誘導型 NO 合成酵素の誘導阻害 グルタミン酸トランスポーター(EAAT 2/GLT 1)の発現維持・亢進 アストログリオシスの抑制	Sun, et al. 2002.
		rhHGF 蛋白質(髄注)	運動ニューロンの神経細胞死抑制効果	青木, 他. 2004
水頭症	水頭症	rhHGF 蛋白質	脳室拡大の抑制, 脳脊髄液流の改善	Tada, et al. 2006.
不安症	不安症	rhHGF 蛋白質		Isogawa, et al. 2005.
末梢神経損傷	同左	rhHGF 蛋白質	コリンアセチル転移酵素の発現維持	Okura, et al. 1999.
神経引き抜き損傷	同左	HGF 遺伝子(adeno virus)	神経細胞死抑制効果	Hayashi, et al. 2006.
末梢神経炎	糖尿病	HGF 遺伝子(HVJ-liposome)	触覚アロディニアの抑制, 運動神経伝導速度および振幅減少の抑制	Kato, et al. 2005 ; Kato, et al. 2005 ; Koike, et al. 2003.

管内皮細胞への保護作用, 密着結合(tight junction)蛋白質の発現低下阻止による血液脳関門保護作用等多彩にわたることが明らかとなってきた¹⁰⁻¹²⁾. rhHGF に加えて, HGF 遺伝子(HVJ-リポソーム)の投与や HGF 遺伝子導入骨髄細胞の移植が, 神経細胞死抑制に有効であることが明らかとなっている。

2. 神経変性疾患モデルトランスジェニック動物に対する効果

神経変性疾患の治療法開発は, 21 世紀医学目標の最重要課題の一つとされている。アルツハイマー病, パーキンソン病, ポリグルタミン病(ハンチントン舞踏病)等数ある神経変性疾患の中でも致死性で難病中の難病であるのが筋萎縮性側索硬化症(ALS)である。神経変性疾患に対する治療には, 血液脳関門の問題, さらに長期投与の課題を克服する必要がある。このため, ALS に対する HGF の効果を見るために, 始め HGF を神経系特異的に発現する HGF トランスジェニックマウスを作成し, このマウスと ALS 原因遺伝子 SOD1 G93A を過剰発現する ALS トランスジェニックマウスを交配し, ALS マウスの神経に生後長期間 HGF を供給した効果を解析した。その結果, HGF は ALS マウスの運動神経細胞死を抑制し, 運動機能を改善, さらに寿命を著明に延長することが明らかになった。この効果は, 神経細胞に対する直接作用と, グリア細胞(アストロサイト)に対する間接作用の 2 つの作用によることが明らかになっている¹³⁾。ヒト ALS(家族性, 孤発性共に)において, ALS マウスと同様に HGF と c-Met が発現制御を受けることから, HGF は大多数を占める孤発性ヒト ALS を含む ALS 治療に有用と期待される¹⁴⁾。実際の治療には HGF の投与方法が問題となるが, rhHGF の持続髄注が ALS モデルトランスジェニックラットの病態改善に有効であったことから, ヒトでも同様の方法をとることで大きな治療効果をもつものと期待されている¹⁵⁾。

3. 薬剤性細胞死誘導モデルに対する効果

パーキンソン病は患者数が多く重要な疾患であるが, 他の神経変性疾患と異なり, 原因遺伝子を導入した遺伝性の疾患トランスジェニック動物モデルがない。しかし薬剤性に, パーキンソン病でおこる

のと同じ黒質ドーパミン作動性神経細胞に人工的に神経細胞死を誘導し, その神経細胞変性に対して HGF が神経保護作用を示すかどうかを解析することで, パーキンソン病への効果を推測可能と考えられる。実際 naked プラスミドによる HGF 遺伝子導入により, 6-OHDA(カテコールアミン作動性神経細胞特異的人工神経毒)投与による黒質ドーパミン作動性神経細胞の細胞死が抑制され, 人工毒により惹起される行動異常をよく抑制できる事が明らかとなった¹⁶⁾。

4. 神経引き抜き損傷に対する効果

神経引き抜き損傷は, 交通事故等で問題とされる傷害で, 治療法に難渋する疾患の一つである。アデノウイルスベクターによる HGF 遺伝子投与により, 顔面神経, 脊髄神経共に運動ニューロンの変性が抑制できることが示された¹⁷⁾。

5. 抗不安効果

正常ラットの側脳室に rhHGF を持続投与すると, 高架迷路を始めとする行動解析で抗不安作用を示すことが明らかとなっている¹⁸⁾。(HGF の神経保護作用機序は次号に続く)

文献

- 1) Nakamura T, et al. Biochem Biophys Res Commun. 1984 ; 122 : 1450-9.
- 2) Nakamura T, et al. Nature. 1989 ; 342 : 440-3.
- 3) Stamos J, et al. Embo J. 2004 ; 23 : 2325-35.
- 4) Funakoshi H, et al. Clin Chim Acta. 2003 ; 327 : 1-23.
- 5) 船越 洋. HGF と神経系—新しい神経栄養因子としての HGF. HGF の分子医学. メディカルレビュー社 ; 1998. p. 61-7.
- 6) Maina F, Klein R. Nat Neurosci. 1999 ; 2 : 213-7.
- 7) Maina F, et al. Mol Cell. 2001 ; 7 : 1293-306.
- 8) 中村健二, 他. 脳の科学. 2003 ; 25(増刊) : 108-15.
- 9) Miyazawa T, et al. J Cereb Blood Flow Metab. 1998 ; 18 : 345-8.
- 10) Date I, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2004 ; 319 : 1152-8.
- 11) Date I, et al. Neurosci Lett. 2006 ; 407 : 141-5.
- 12) Niimura M, et al. J Cereb Blood Flow Metab. 2006 ; 11 : 1354-65.
- 13) Sun W, et al. J Neurosci. 2002 ; 22 : 6537-48.
- 14) Kato S, et al. Acta Neuropathol(Berl). 2003 ; 106 : 112-20.
- 15) 青木正志, 他. 最新医学. 2004 ; 59 : 1635-41.
- 16) Koike H, et al. Gene Ther. 2006 ; 13 : 1639-44.
- 17) Hayashi Y, et al. Brain Research. 2006 ; 1111 : 187-95.
- 18) Isogawa K, et al. Neuropsychobiology. 2005 ; 51 : 34-8.