

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20296

研究課題名(和文)重症アレルギー眼疾患の結膜線維芽細胞におけるペリオスチンの恒常的な発現機構の解明

研究課題名(英文) Identification of constitutive expression mechanism of periostin in conjunctival fibroblasts derived from severe ocular allergic conjunctivitis patients

研究代表者

岡田 直子 (OKADA, NAOKO)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・免疫アレルギー・感染研究部・(非)研究員

研究者番号：50636165

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)：重症アレルギー性角結膜炎は結膜の強い炎症や線維化を主体とする難治性の疾患であるが、その機序は不明である。申請者はこれまでに患者由来の結膜線維芽細胞に着目し、遺伝子発現パターンを比較解析したところ、患者由来結膜線維芽細胞ではペリオスチン遺伝子が無刺激状態において有意に高発現し、継代培養後も発現が維持されることを見出している。本研究では、患者由来結膜線維芽細胞のペリオスチンのプロモーターにおいて、ヒストンのメチル化状態の変化が起きていること、さらにTGF- $\beta$ が長時間ペリオスチンを発現誘導していることを確認した。よって、ペリオスチン発現誘導にエピジェネティック制御機構が関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Atopic keratoconjunctivitis are severe, chronically relapsing, ocular inflammatory diseases that cause intense inflammation and fibrosis in conjunctiva. However, the precise mechanisms increasing the severity of these diseases remain unknown. We previously focused on conjunctival fibroblasts derived from severe ocular allergic conjunctivitis patients and compared the gene expression patterns. The conjunctival fibroblasts derived from patients showed significantly enhanced periostin expression in the nonstimulated state, and this expression was maintained even after the subculture. In this study, we found that histone methylation state change was occurring at the periostin promoter in patient-derived conjunctival fibroblasts. Furthermore, sustained periostin expression could observe by TGF- $\beta$  stimulation. Therefore, these suggested that epigenetic regulation was involved in the induction of long-term and sustained expression of periostin in patient-derived conjunctival fibroblasts.

研究分野：アレルギー

キーワード：アレルギー性結膜炎 線維芽細胞 エピジェネティクス ペリオスチン

### 1. 研究開始当初の背景

重症アレルギー性角結膜炎は結膜の強い炎症や線維化を主体とし、合併症により重大な視機能障害を引き起こす眼慢性炎症疾患であるが、難治化に至る機序は不明である。

眼アレルギーの重症化に至るメカニズムのひとつとして、アレルギー炎症の局所において、微小環境中に存在する様々な因子やストレスに応答して線維芽細胞が活性化され、炎症の増悪化を引き起こす可能性が報告されている。これまでに申請者は、ヒト角結膜線維芽細胞が IL-4 や TNF に反応して CCL11 や CCL5 などのケモカインを大量に産生することを見出し、眼局所の線維芽細胞がアレルギー性炎症の組織障害などに重要な役割をもつ好酸球の遊走・活性化に深く関わることを明らかにした (2009 Allergol Int, Fukagawa)。また、重症アレルギー性眼疾患患者と正常ドナー由来の結膜線維芽細胞の遺伝子発現を比較検討したところ、重症アレルギー性眼疾患患者の線維芽細胞において IL-4 刺激後の CCL11 の遺伝子発現が有意に増強し、継代培養後にも持続していた。この時、CCL11 のプロモーター領域におけるヒストン修飾状態をクロマチン免疫沈降法で比較したところ、重症アレルギー性眼疾患患者の線維芽細胞では、転写活性の高い遺伝子座に存在するヒストン H3 の 4 番目のリジンのトリメチル化 (H3K4me3) が増加し、逆に転写不活性領域に存在するヒストン H3 の 9 番目のリジン (H3K9me3) が減少し、転写が活性化されていることを発見した。さらに、重症アレルギー性眼疾患患者の涙液中で高値となるにも関わらず、その意義の不明な IFN- $\gamma$  に着目し、IFN- $\gamma$  の CCL11 遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。線維芽細胞へ IFN- $\gamma$  刺激を長期間 (72 時間以上) 行うと、CCL11 の発現が持続的に増加した。この作用は IL-4 では誘導できず、ステロイドでは抑制されなかった。ここで IFN- $\gamma$  長時間刺激後のヒストン修飾状態を調べたところ、CCL11 のプロモーター領域では、重症アレルギー性眼疾患患者の線維芽細胞におけるヒストン修飾状態の変化と同様に、H3K4me3 が増加し、H3K9me3 が減少していた。以上より、重症アレルギー性眼疾患患者では結膜線維芽細胞がエピジェネティック変化を受け、CCL11 の過剰発現を引き起こしていること、さらに IFN- $\gamma$  には CCL11 のエピジェネティック誘導能があることを分子レベルで明らかにした (平成 22-23 年度学術振興会特別研究員研究助成、平成 25-26 年度科研費若手 B、投稿準備中)。

一方、持続的なアレルギー炎症は、過剰な組織リモデリングを引き起こし、慢性炎症の不可逆的かつ難治性の病態を形成する。組織リモデリングにおいて線維芽細胞は活

性化され、自身の増殖因子や細胞外マトリックス蛋白を産生し、線維化へ関与することが知られている。細胞外マトリックス蛋白のひとつであるペリオスチンは、近年、様々なアレルギー炎症組織中で高発現していること、IL-4 や IL-13 によって線維芽細胞から誘導されることで、気管支喘息における組織リモデリングやアトピー性皮膚炎の炎症増悪を引き起こすことが明らかにされている (2006 JACI, Takayama, 2012 JCI, Masuoka)。また、申請者は、重症アレルギー性結膜炎患者の涙液中でペリオスチンが高発現し、炎症の重症度ともよく相関することから、アレルギー性眼疾患にも関連があることを発見した (2016 JACI, Fujishima and Okada)。さらに、重症アレルギー性眼疾患患者の結膜線維芽細胞の検討においてペリオスチン遺伝子が無刺激状態においても有意に発現増強され、この発現が継代培養後にも維持されることを見出している (平成 25-26 年度科研費若手 B)。よって、重症アレルギー性眼疾患患者の線維芽細胞におけるペリオスチン高発現は何らかのエピジェネティックな経路によって誘導され、かつ維持されることで、結膜組織の線維化を引き起こし、炎症の重症化に関与することが示唆された。

### 2. 研究の目的

先行研究結果を踏まえ、重症アレルギー性結膜炎患者の眼局所において、ペリオスチンの高発現に関与する新たなエピジェネティック機構を解明し、治癒困難な慢性炎症や組織リモデリングにおける新たな創薬標的の発見に貢献することを最終的な目標とする。

本申請課題では、具体的に次の 3 点を実施する事で研究目標に漸近したい。

(1) 疾患由来結膜線維芽細胞におけるペリオスチン遺伝子のエピジェネティック変換の表現型の検証

(2) ペリオスチン遺伝子のエピジェネティック変換を誘導する「候補因子」の解析

(3) ペリオスチン遺伝子のエピジェネティック誘導に関与する下流シグナルの検証

### 3. 研究の方法

(1) 疾患由来結膜線維芽細胞におけるペリオスチン遺伝子のエピジェネティック変換の表現型の検証

先行研究成果より、重症アレルギー性眼疾患患者の線維芽細胞において、ペリオスチンは無刺激の状態においても高発現することがわかっている。ここにエピジェネティック機構が関与しているかどうか検証するため、疾患由来結膜線維芽細胞の無刺激の状態におけるペリオスチン遺伝子のプロモーター領域のヒストン修飾状態を、抗ヒストン抗体を用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行い、正常結膜線維芽細胞との表現型の特徴を比較検討する。さらに、ヒストン修飾に関

連する酵素に対する阻害剤を用い、ペリオスチン遺伝子発現およびヒストン修飾状態の変化を検証し、エピジェネティクスの関与を確認する。

#### (2) ペリオスチン遺伝子のエピジェネティック変換を誘導する「候補因子」の解析

ペリオスチン発現を誘導することが既知であり、かつアレルギー炎症に關与する IL-13 と TGF- $\beta$  を第一の候補因子として、これらがペリオスチン遺伝子のエピジェネティックに発現を誘導できるどうか確認する。まず「候補因子」による細胞刺激後7日目までの経時的な遺伝子発現変動を定量PCR および ELISA で詳細に観察する。次に、刺激後に一度 wash out を行い、一定期間ペリオスチン発現誘導後の遺伝子発現への影響も確認し、性質が維持されうるのかも確認する。

さらに、疾患由来結膜線維芽細胞の無刺激の状態において、正常結膜線維芽細胞よりも発現上昇する遺伝子群を、マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を実施した。この際、正常群よりも疾患群において有意に高発現する遺伝子群を抽出し、IPA (Ingenuity pathway analysis) で上流解析を行い、新たな候補因子とする。

#### (3) ペリオスチン遺伝子のエピジェネティクス誘導に關与する下流シグナルの検証

項目(1)および(2)で明らかにしたエピジェネティックな変換作用を有する因子について、どのような仕組みでエピジェネティックな変換を誘導するのかを検証する。具体的には、(2)で抽出した疾患結膜線維芽細胞で有意に高発現する遺伝子群においてペリオスチン遺伝子のエピジェネティック変換が誘導される際に必須な下流分子を GO (Gene Ontology) 解析により網羅的に探索する。既知の下流分子だけでなく、ヒストン修飾に關連性のある酵素にも注目し、対象因子を絞り込む。対象因子については、qPCR 等で再現性を確認する。

### 4. 研究成果

#### (1) 疾患由来結膜線維芽細胞におけるペリオスチン遺伝子のエピジェネティック変換の表現型の検証

まず、正常および疾患由来結膜線維芽細胞を同一条件で培養後、いくつかの抗ヒストン修飾抗体を用いて、ペリオスチン遺伝子のプロモーター領域におけるヒストン修飾状態を比較検討した。結果、正常由来結膜線維芽細胞に比べ、疾患由来結膜線維芽細胞において、ペリオスチンのプロモーター領域における H3K9me3 (遺伝子発現抑制マーカー) が減少傾向を示すことがわかった。一方で、H3K4me3 (遺伝子発現促進マーカー) や H3AceK14 (遺伝子発現促進マーカー) は変動がなかった。

次に、正常および疾患由来結膜線維芽細胞の培養時に、ヒストンの脱アセチル化酵素 (HDAC) の抑制剤 (トリコスタチン A) を投与 (2~24 時間) し、無刺激状態のペリオスチン発現に対する影響を確認した。その結果、いずれの細胞においても、ペリオスチン発現にはほとんど影響がないことがわかった。以上の結果より、重症アレルギー性角結膜炎患者結膜線維芽細胞におけるペリオスチン高発現は、プロモーター領域における抑制性メチル化ヒストンマーカー (H3K9me3) の減少が影響している可能性が示唆された。

#### (2) ペリオスチン遺伝子のエピジェネティック変換を誘導する「候補因子」の解析

まず、ペリオスチンの発現誘導をおこなうことが既知である IL-13 および TGF- $\beta$  について、正常結膜線維芽細胞へ長期間 (~7 日間) 刺激を行い、その後 wash out を行い、さらに細胞培養を続け、前後のペリオスチンの遺伝子発現を qPCR で確認した。その結果、IL-13 は刺激がある状態ではペリオスチンを発現誘導するが、wash out 後には徐々に発現が低下し、無刺激の細胞とほぼ同じレベルになった。一方、TGF- $\beta$  は刺激中には IL-13 同様に発現を誘導し、かつ wash out 7 日後にもペリオスチンの遺伝子および培養上清中のたんぱく質発現を維持しうるということが分かった。

次に、疾患由来結膜線維芽細胞の無刺激の状態において、正常結膜線維芽細胞よりも発現上昇する遺伝子群を、マイクロアレイを用いて抽出した。その結果、正常結膜線維芽細胞に比べて疾患由来結膜線維芽細胞において2倍以上かつ統計学的に有意に高発現する遺伝子群として、ペリオスチンを含む512個が抽出された。これらの遺伝子群について、IPA を用いて上流因子の予測解析を行った。その結果、TGF- $\beta$  signaling が最も可能性が高い上流候補因子として予測された。以上の解析結果より、疾患由来結膜線維芽細胞におけるペリオスチン高発現には、TGF- $\beta$  が關与している可能性が示唆された。

#### (3) ペリオスチン遺伝子のエピジェネティクス誘導に關与する下流シグナルの検証

さらに、(2)で抽出した疾患由来結膜線維芽細胞で有意に高発現する遺伝子群の中に、エピジェネティック誘導に關連する因子があるかどうか GO 解析などを用いて検索した結果、いくつかの候補因子を発見した。興味深いことに、候補因子の中に H3K9 の脱メチル化に關与する因子 (KDM) が存在し、さらに KDM が疾患由来結膜線維芽細胞で有意かつ高発現することが qPCR によって再現性が確認された。さらに、無刺激の結膜線維芽細胞におけるペリオスチン遺伝子発現と高い正の相関がみられることがわかった。すでに研究成果(1)において、疾患由来結膜線維芽細胞では、ペリオスチンのプロモータ

一領域で、ヒストン (H3K9) のメチル化状態が変動していることを明らかにしており、この結果とも一致する。よって、このヒストン脱メチル化因子がペリオスチン遺伝子のエピジェネティクス誘導に直接関与する可能性が示唆された。

#### 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 5 件)

Fujishima H, Okada N, Matsumoto K, Fukagawa K, Igarashi A, Matsuda A, Ono J, Ohta S, Mukai H, Yoshikawa M, Izuhara K. "The usefulness of measuring tear periostin for the diagnosis and management of ocular allergic diseases." J Allergy Clin Immunol. 査読有 2016 Aug;138(2):459-467.e2. (共同筆頭著者)

Shoda T, Matsuda A, Arai K, Shimizu H, Morita H, Orihara K, Okada N, Narita M, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K, Nomura I. "Sera of patients with infantile eosinophilic gastroenteritis showed a specific increase in both thymic stromal lymphopoietin and IL-33 levels." J Allergy Clin Immunol. 査読有 2016 Jul;138(1):299-303.

Takeda T, Unno H, Morita H, Futamura K, Emi-Sugie M, Arae K, Shoda T, Okada N, Igarashi A, Inoue E, Kitazawa H, Nakae S, Saito H, Matsumoto K, Matsuda A. "Platelets constitutively express IL-33 protein and modulate eosinophilic airway inflammation." J Allergy Clin Immunol. 査読有 2016 Nov;138(5):1395-1403.e6.

Shoda T, Matsuda A, Nomura I, Okada N, Orihara K, Mikami H, Ishimura N, Ishihara S, Matsumoto K, Kinoshita Y. "Eosinophilic esophagitis versus proton pump inhibitor-responsive esophageal eosinophilia: Transcriptome analysis." J Allergy Clin Immunol. 2017 査読有 doi: 10.1016/j.jaci.2016.11.028.

Toyama S, Okada N, Matsuda A, Morita H, Saito H, Fujisawa T, Nakae S, Karasuyama H, Matsumoto K. "Human eosinophils constitutively express a unique serine protease, PRSS33." Allergol Int. 2017 査読有 Feb 16. pii: S1323-8930(17)30002-3. doi: 10.1016/j.alit.2017.01.001.

[学会発表](計 4 件)

岡田直子、藤島浩、深川和己、松田明生、出原賢治、斎藤博久、松本健治、"重症アレ

ルギー性眼疾患患者の涙液におけるペリオスチンの発現" 第 27 回日本アレルギー学会春季臨床大会、2015 年 5 月 26 日~28 日、グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール、東京都港区

Naoko Okada, Hiroshi Fujishima, Kazumi Fukagawa, Kenji Izuhara, Shoichiro Ohta, Junya Ono, Akio Matsuda, Hirohisa Saito and Kenji Matsumoto. "Increased periostin levels in tears from patients with allergic ocular diseases" European Academy of Allergy and Clinical Immunology. (EAACI) 2015 年 6 月 6 日~10 日、Barcelona, Spain

Naoko Okada, Tsuguhisa Nakayama, Daiya Asaka, Akio Matsuda, Hirohisa Saito, Mamoru Yoshikawa, Kenji Matsumoto "Distinct and common gene expression profiles of nasal polyp tissues in eosinophilic and non-eosinophilic chronic rhinosinusitis" American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. (AAAAI) 2016 年 3 月 4 日~8 日、Los Angeles, CA

岡田直子、松本健治、"重症アレルギー性結膜炎における涙液中へのペリオスチン産生" 第 65 回日本アレルギー学会学術大会、2016 年 6 月 27 日~29 日、東京国際フォーラム、東京都千代田区

[図書](計 1 件)

岡田直子、松本健治、小児科診療"アレルギー性結膜炎の診断における涙液ペリオスチン測定の有用性" 2016 年 10 月号

[産業財産権]

取得状況(計 1 件)

名称: アトピー性角結膜炎の検出方法  
発明者: 出原 賢治、有馬 和彦、鈴木 章一、太田 昭一郎、斎藤 博久、松本 健治、岡田直子、藤島浩  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特開 2015-081796  
取得年月日: 平成 27 年 4 月 27 日  
国内外の別: 国内

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

岡田直子 (OKADA NAOKO)

国立成育医療研究センター研究所・免疫アレルギー感染研究部・研究員

研究者番号: 50636165