

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：15401
 研究種目：基盤研究(B) (一般)
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17H04161
 研究課題名(和文) マウス肝線維化を抑制する新規インテグリン抗体の作用機序と治療応用への集大成研究

研究課題名(英文) Mechanism and therapeutic application of a novel integrin blocking mAb that inhibit liver fibrosis in mice

研究代表者
 横崎 恭之 (Yokosaki, Yasuyuki)

広島大学・保健管理センター・准教授

研究者番号：80210607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：マトリックス受容体インテグリンが、線維化形成において役割を果たすことは、過剰なマトリックス沈着が線維化の本体であること等が支持する。インテグリン 8 1は主に間葉系に発現する、ネフロネクチンなどの受容体である。線維化への関与は長年不明であったが、我々は阻害抗体を作製に成功し、マウスの肝線維化モデルに抗体を投与し、病態が改善することを見いだした(平成26-28年度 基盤B)。今回その機序として 8 1は筋線維芽細胞分化促進作用、TGF 活性化作用を有することを明らかにし、また組織圧に誘導される発現機構、そして詳細な発現分布を明らかにし、8 1が向線維化作用を有する機能的証拠を提示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実際現在幾つかのインテグリン阻害剤が臨床試験に入っている。しかし、個々のインテグリンの阻害剤作製は容易ではなく、現在まで一部のインテグリンで抗線維化作用が確かめられているだけである。8 1も例外ではなく、線維芽細胞での明瞭な発現にも拘わらず、線維化への関与は不明であった。

我々の作製したインテグリン 8 1阻害抗体は、抗線維化効果を示すと同時に、その機序や発現機構から、線維化の機序と抑制に対する多くの示唆を与えた。また、同時にこの阻害抗体自体が、抗体医薬としての大きなポテンシャルを有する。何故なら、ニワトリを宿主として作製されたため、マウスだけでなくヒト分子にも同様の阻害効果を示す。

研究成果の概要(英文)：The integrin family, matrix receptors, is an appealing therapeutic target proteins. Excessive matrix deposition is substantial pathology in tissue fibrosis. Integrin 8 1 is a mesenchymal integrin that functions as a receptor for matrix proteins including nephronectin. Its participation in development of fibrosis has been unknown mainly due to a lack of a specific inhibitor, in particular a neutralization monoclonal antibody. After we successfully generated the blocking mAb, we have demonstrated that the inhibition ameliorates fibrosis in mouse liver fibrosis models.

In the present investigation, we have shown, as functional evidence, its TGF- activation capacity and myofibroblast differentiation promotion. In addition, tissue stiffness-induced expression and accumulated expression in fibroblasts strongly support the profibrotic property of 8 1.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：インテグリン 肝線維症 TGF 筋線維芽細胞 YAP-1

1. 研究開始当初の背景

肺線維症、肝硬変などの致死的原因となる病理変化は組織線維化である。何らかの原因で生じた組織傷害は、通常生理的に修復されるが、時に修復は過剰となり歯止めが効かなくなる。この状態が進行性の線維化との理解が現在最も広く受け入れられているが、メカニズムの詳細は不明である。しかしながら、組織における過剰なマトリックス沈着は各臓器の線維化で共通して認められ、基本的な病態と考えられる。コラーゲンなどのマトリックス産生は筋線維芽細胞（線維芽細胞から分化）が中心であるが、一方でこの分化はマトリックス組成の変化が誘導し、マトリックスと筋線維芽細胞は相互に依存しているといえる。なお、筋線維芽細胞は α -smooth muscle actin を発現し弾性を獲得した特殊な線維芽細胞で、正常組織には存在しない。この相互依存を仲介するのが、マトリックス受容体インテグリンである。従って、インテグリンは線維化の治療標的であると認識されているが、その阻害剤の作製は容易ではなく、現在まで一部のインテグリン阻害による効果しか確かめられていない。

2. 研究の目的

線維化の進行を止める根底的な方法は現在ない。死亡の原因となる病理変化の約半数を占めるとする報告に見られるように、臓器の機能障害は一定程度線維化により生じる。近年、ようやく線維症を適応とした薬剤が認可され治療に使用されるようになったが、進行の程度を抑制するに留まる。このような状況で、抗線維化薬への期待は大きいですが、いくつもの有望薬剤が臨床試験で脱落している。インテグリンファミリーは主要なマトリックス受容体を形成し、前項に述べたように筋線維芽細胞の分化に役割を果たす。実際インテグリンファミリーの阻害は次世代の抗線維化薬として期待が大きく、実際にいくつかが臨床試験に入っている。我々は、インテグリン $\alpha 8\beta 1$ の阻害抗体 YZ3 を作製し、肝臓の線維化に対する効果を検討したところ有効性を認めた(萌芽研究 H24-25)。そのため、その機序を検討し幾つかの事実を明らかにした(基盤研究 B, H26-28)。即ち、1) 肝臓以外の肺、腎臓の線維化に対する効果、2) ヒト肝炎、肝硬変での $\alpha 8$ 発現の増加、3) *Itga8^{flox/flox}* を Cre-mouse と交配し、 $\alpha 8$ ノックアウトマウスは線維化に抵抗性であることを見出した。4) また抗体のエピトープを決定し $\alpha 8$ 機能阻害のメカニズムを解明した。本研究では、インテグリン $\alpha 8\beta 1$ の抗線維化性質を決定づけるため、 $\alpha 8\beta 1$ が線維化を誘導する機序を改めて検討し、 $\alpha 8\beta 1$ のシグナルによる線維化誘導能、TGF β 活性化能、そして発現制御機構を検討した。

3. 研究の方法

以下の3点について検討した。複数のインテグリンに向線維化作用が認められているがその機序はインテグリンシグナルによる筋線維芽細胞誘導、およびインテグリンによるTGF β 活性化に大別される。 $\alpha 8\beta 1$ についてもそれらの性質を解析した。また、これまで不明であったインテグリン $\alpha 8$ の詳細な発現分布と発現調整機構について検討した。

1) $\alpha 8\beta 1$ の筋線維芽細胞分化作用

肝星細胞をプラスチックプレート上で培養すると、活性化して筋線維芽細胞に分化する。この過程に、インテグリン $\alpha 8\beta 1$ がどのように関与しているかを知るため、肝星細胞のプレート活性化を YZ3 存在下/非存在下で行い、筋線維芽細胞のマーカーである、 α -SMA 発現を解析した。次に、 $\alpha 8\beta 1$ のリガンド(ネフロネクチン)をコートしたプレート上で $\alpha 8\beta 1$ 発現細胞を培養し、 α -SMA 発現と収縮能の変化を観察した。

2) $\alpha 8\beta 1$ の TGF β 活性化作用

最初に向線維化作用が報告されたインテグリン $\alpha v\beta 6$ は TGF β を活性化させることが知られている。TGF β は組織中ではマトリックス内に保存されており、活性化を防ぐため pro-蛋白と複合体を形成している (latent TGF β)。 $\alpha v\beta 6$ はこの pro-蛋白に結合し結果として pro-蛋白がはずれ、TGF β は受容体に結合可能となる。また $\alpha v\beta 6$ は pro-蛋白の Arg-Gly-Asp 配列 (RGD) に結合する。RGD-結合インテグリンの多くは αv -integrin が占めるが、 $\alpha 8\beta 1$ も RGD に結合する。そのため、 $\alpha 8\beta 1$ の TGF β 活性化能を解析した。

3) $\alpha 8\beta 1$ の発現調節

$\alpha 8$ は間葉系細胞を中心に発現する。特徴的には、 $\alpha 8\beta 1$ として機能を発揮するためには、上記の如く、機能の発揮に張力や収縮力が密接に関係していると考えられる。このような物理力は柔らかい組織では吸収されやすく、比較的硬度の高い組織において重要であると考えられる。そのため、発現調節も組織の物理的硬度に関係していると仮説を立てた。近年、組織の硬さに反応する転写因子として YAP1 が注目されている。また、インテグリンの発現は例えば $\beta 6$ のように、TGF β により誘導されることが知られており、両者の影響を確かめた。YAP1 は阻害剤である verteporfin により TGF β は recombinant TGF β を添加することにより解析した。

4) $\alpha 8\beta 1$ の細胞レベルでの発現分布

これまでの研究で、我々は肝臓において $\alpha 8$ は活性化星細胞に発現することを確認していた。血管平滑筋にも発現している。これまでの報告によれば、 $\alpha 8\beta 1$ は一部では上皮に発現とする報告があるものの、ほぼ間葉系細胞に発現すると認識されている。そこで、間葉系にどれほど特異的かまた、間葉系の中では線維芽細胞以外どの細胞に主に発現しているかを、細胞レベルの発現を網羅しているデータベース (初代培養細胞のデータ) で確かめた。

4 . 研究成果

1) $\alpha 8\beta 1$ の筋線維芽細胞分化作用

肝星細胞はプレート培養により、Acta2 (α -SMA), Col 1A1 (コラーゲン I 型 α) および EDA (Fibronectin extra domain A) のいずれの遺伝子も上昇させた。YZ3 の添加はこのうち Acta2 遺伝子だけを選択的に低下させた。 $\alpha 8\beta 1$ シグナルは Acta2 を上昇させると考えられたため、次に $\alpha 8\beta 1$ シグナルを細胞に入れたところ、上記の 3 遺伝子のうち、Acta2 だけを上昇させた。次に、筋線維芽細胞の表現型である収縮力を観察したところ、YZ3 により、収縮力の低下が認められた。これらより、 $\alpha 8\beta 1$ は筋線維芽細胞分化を誘導していると考えられた。

2) $\alpha 8\beta 1$ の TGF β 活性化作用

インテグリンの TGF β 活性化能は、目的のインテグリンを発現した細胞と、TGF β によりルシフェラーゼを発するレポーター細胞の共培養により測定される (PAI-1 プロモーター下にルシフェラーゼ遺伝子をおいたプラスミドによる遺伝子導入)。まず過去の報告通り、 $\alpha 8\beta 1$ を発現した上皮系腫瘍細胞株 (SW480) を用いたが TGF β 活性化は生じず、過去の発表と同じ結果であった。そこで、SW480 細胞の代わりに星細胞を用いてみたところ、明瞭なルシフェラーゼの発光を認めた。そしてこの発光は YZ3 の投与により低下した。また、サイトカラシン D 投与により発光は完全に失われ、 $\alpha 8\beta 1$ による TGF β 活性化も、細胞の収縮力に依存していることがわかった。この TGF β 活性化は肝星細胞の代わりに、肺線維芽細胞、心線維芽細胞を用いても同様の結果が得られた。 $\alpha v\beta 6$ も細胞収縮力がゼロの場合は TGF β 活性化能を発揮で

きないが SW480 は肝星細胞、肺線維芽細胞、心線維芽細胞に比べ収縮力は圧倒的に弱く、 $\alpha 8\beta 1$ の TGF β を活性化能は、収縮力の高い細胞表面において発揮されることがわかった。ちなみに *in vivo* での $\alpha 8\beta 1$ の発現は、ほぼ間葉系細胞に限られており、この結果はこの点とも良く一致する。以上より、 $\alpha 8\beta 1$ は収縮力の強い細胞上に発現することにより、TGF β を活性化していることが分かった。

3) $\alpha 8\beta 1$ の発現調節

近年、細胞がプレートでコンフルエントになるとそれ以上増殖しない仕組みが、Hippo 経路シグナルにより制御されていることが明らかになった。またこの経路の重要な転写因子である YAP-1 は癌組織など組織圧の高い状態で活性化する事が分かってきている。方法の項に述べたように、 $\alpha 8$ の作用は組織圧やずり応力に関係する可能性があるため、YAP-1 による発現調節を疑い、まず YAP-1 の阻害剤である verteporfin を $\alpha 8$ の発現が柔軟に変化する関与し細胞を用いて検討したところ、verteporfin 添加により著明に発現が低下した。このため、ChIP アッセイのデータベースをくまなく探したところ $\alpha 8$ 遺伝子の発現調節領域に YAP-1 と TEAD-1 が結合する様子が明瞭に認められた。これらは、コントリールとして用いた $\alpha 6$ subunit では認められなかった。また TGF β 添加により、 $\beta 6$ subunit は明瞭に発現が上昇したが、星細胞の $\alpha 8$ 発現は不変であった。

4) $\alpha 8\beta 1$ の発現細胞

本研究で $\alpha 8\beta 1$ は筋線維芽細胞の分化を促し、TGF β を活性化させるなど、線維化にかかわる機能的証拠が得られ、また組織の硬度が上がることにより、発現が促される転写機構からの証拠も得られた。これまで漠然と「平滑筋細胞と線維芽細胞などの間葉系細胞」とされてきた発現分布に、我々は活性化肝星細胞(基盤研究 B 26-28 年度)を加えたが、その分布は間葉系だけにとどまるか、またその場合どのような細胞に発現するか、を知るため細胞レベルでの発現を調べた。まず入手可能な線維芽細胞として、肝星細胞以外に、肺、心臓、腎臓から線維芽細胞の初代培養細胞を樹立して調べたところ、いずれも明瞭な $\alpha 8$ 発現を認めた。そこで約 20 種の初代培養線維芽細胞を含む、144 の正常初代細胞株について発現を網羅的に解析した(FANTOM データベース)。その結果 $\alpha 8$ の発現は非常に特徴的に、線維芽細胞に集積していることがわかった。この発現分布は $\alpha 8\beta 1$ が線維芽細胞固有の機能に役割を果たしていることが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Chaoqun Wang, Nabora Soledad Reyes de Mochel, Stephanie Christenson, Monica Cassandras, Rebecca Moon, Alexis Brumwell, Lauren Byrnes, Alfred Li, Yasuyuki Yokosaki, Peiying Shan, Julie Sneddon, David Jablons, Patty J. Lee, Michael A. Matthay, Harold Chapman, Tien Peng.	4. 巻 128
2. 論文標題 Expansion of hedgehog activation disrupts stromal identity and induces emphysema.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Invest	6. 最初と最後の頁 4343-4358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI99435	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakagawa Y, Sakuma T, Nishimichi N, Yokosaki Y, Takeo T, Nakagata N, Yamamoto T.	4. 巻 6
2. 論文標題 Culture time of vitrified/warmed zygotes before microinjection affects the production efficiency of CRISPR-Cas9-mediated knock-in mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Boil Open	6. 最初と最後の頁 706-713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1242/bio.025122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nanri Y, Nunomura S, Terasaki Y, Yoshihara T, Hirano Y, Yokosaki Y, Yamaguchi Y, Feghali-Bostwick C, Ajito K, Murakami S, Conway SJ, Izuhara K	4. 巻 69
2. 論文標題 Periostin forms a functional complex with IgA in human serum.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergol Int.	6. 最初と最後の頁 111-120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1165/rcmb.2019-02450C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nanri Y, Nunomura S, Terasaki Y, Yoshihara T, Hirano Y, Yokosaki Y, Yamaguchi Y, Feghali-Bostwick C, Ajito K, Murakami S, Conway SJ, Izuhara K.	4. 巻 62
2. 論文標題 The Crosstalk Between TGF- and Periostin Can Be Targeted for Pulmonary Fibrosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Respir Cell Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 204-216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1165/rcmb.2019-02450C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugiyama A, Kanno K, Nishimichi N, Ohta S, Ono J, Conway SJ, Izuhara K, Yokosaki Y, Tazuma S	4. 巻 51
2. 論文標題 Periostin promotes hepatic fibrosis in mice by modulating hepatic stellate cell activation via α v integrin interaction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 1161-1174,
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s00535-016-1206-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 西道 教尚、伊藤 益美、大谷 水景、横崎 恭之
2. 発表標題 インテグリン 11 1機能阻害モノクローナル抗体の樹立と活性評価
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤 益美、西道 教尚、大谷 水景、原田 真里、横崎 恭之
2. 発表標題 -シヌクレインのミクログリア内取り込みはインテグリン 9 1との結合を介したエンドサイトーシスである
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大谷 水景、西道 教尚、伊藤 益美、吉栖 正生、横崎 恭之
2. 発表標題 インテグリン阻害抗体の脱着・解離効果の有無とそのエピトープからの予測,
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nishimichi N, Kanno K, Sentani K, Sugiyama A, Ito M, Otani M, Hanaoka M, Yasui W, Yokosaki Y.
2. 発表標題 Integrin 8 1 promotes tissue fibrosis via differentiation of myofibroblast -a potent therapeutic target on fibrosis-
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Otani M, Nishimichi N, Ito M, Hanaoka M, Yoshizumi M, Yokosaki Y.
2. 発表標題 Identification of conformational epitopes for integrin blocking mAbs against 3 and 5 subunits.
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Li, GY, Kang, GJ, Lee, N, Gong, A, Yokosaki, Y, Chen, L,
2. 発表標題 Combined blockade of VEGFR-3 and integrin 9 1 inhibits corneal lymphangiogenesis and valvulogenesis in vivo and promotes high-risk graft survival.
3. 学会等名 Investigative ophthalmology & visual science (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 特許	発明者 横崎恭之、西道教尚	権利者 広島大学
産業財産権の種類、番号 特許、2018-036933	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

インテグリン治療開発フロンティア研究室
home.hiroshima-u.ac.jp/integrin/Integrin.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	茶山 一彰 (Chayama Kazuaki) (00211376)	広島大学・医系科学研究科(医)・教授 (15401)	
研究分担者	西道 教尚 (Nishimichi Norihisa) (00583486)	広島大学・保健管理センター・研究員 (15401)	
研究分担者	仙谷 和弘 (Setani Kazuhiro) (30508164)	広島大学・医系科学研究科(医)・講師 (15401)	