

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591466

研究課題名(和文) アレルギー性炎症におけるマトリセルラータンパク質の役割の解明および治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation and therapeutic application of the role of matricellular proteins in allergic inflammation

研究代表者

太田 昭一郎 (OHTA, SHOICHIRO)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：20346886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の接着や遊走を制御するマトリセルラータンパク質であるペリオスチンは、アトピー性皮膚炎の発症において必須の役割を果たしている。本課題では、ペリオスチンとその細胞表面受容体であるインテグリンとの結合様式を明らかにすることで、ペリオスチンによる炎症シグナル誘導の分子機序を解明すると共に、ペリオスチンの阻害抗体を作製して、アレルギー疾患に対する分子標的薬開発に繋げることを目的とした。その結果、インテグリンとペリオスチンの結合部位を同定し、さらに細胞のインテグリン非依存性のペリオスチン結合を示した。また、ペリオスチンのインテグリンとの結合を阻害する抗体を得ることができ、今後の治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Periostin, a matricellular protein, plays a critical role in atopic dermatitis. In this study, we aimed to elucidate the function of periostin in the inflammatory signaling by identifying periostin receptors, and to establish antagonistic anti-periostin monoclonal antibodies as molecularly-targeted drugs. As a result, we identified an integrin-binding domain on the periostin molecule, and found integrin independent cellular binding to periostin. More over, we established several antagonistic anti-periostin antibodies. They promise the therapeutic application of periostin for allergic diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：ペリオスチン

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞外マトリックスタンパク質の中で、細胞の接着や遊走を制御する機能を持つマトリセルラータンパク質と呼ばれる分子群が、組織形成や創傷治癒の過程で働くことがわかってきた。我々は、マトリセルラータンパク質の一つであるペリオスチンが、アトピー性皮膚炎の発症において炎症メディエーターとして必須の役割を果たしていることを明らかにし、マトリセルラータンパク質の炎症における重要性を初めて示したが、その詳細な機能については未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本課題では、ペリオスチンとその細胞表面受容体であるインテグリンとの結合様式を明らかにすることで、ペリオスチンによる炎症シグナル誘導の分子機序を解明すると共に、ペリオスチンの阻害抗体を作製して、アレルギー疾患に対する分子標的薬開発に繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ペリオスチンとインテグリン $\alpha_v\beta_3$ との結合様式の解明

インテグリン $\alpha_v\beta_3$ とのプルダウンアッセイや固相結合実験、およびインテグリン $\alpha_v\beta_3$ を発現する細胞の接着実験により、ペリオスチンの構造ドメインの内、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ に結合するドメインを決定する。

(2) インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 以外のペリオスチン結合分子の同定

ペリオスチンのシグナル誘導には他の受容体や会合分子が関わっている可能性がある。ランダムペプチドライブラリを発現するファージディスプレイ法を用いてインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 以外のペリオスチン結合分子を同定する。

(3) ペリオスチンの阻害抗体の作製

1.および 2. で決定した結合ドメインのリコンビナントタンパク質を抗原として、ペリオスチンノックアウトマウスを免疫し、受容体との結合を阻害する抗ペリオスチンモノクローナル抗体を作製する。

(4) ペリオスチンによるシグナル誘導の解析および阻害抗体の効果の検討

ペリオスチンによりケラチノサイトから産生される TSLP を指標にして、シグナル誘導を評価する。また、アトピー性皮膚炎モデルマウスにペリオスチン阻害抗体を投与することにより、皮膚炎の発症の抑制を試みる。

4. 研究成果

(1) ドメインに分けて発現精製したペリオスチンリコンビナントタンパク質をプレートに固相化して、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ を発現しない細胞または発現する細胞を接着させる

と、前者は少なくとも R2 ドメインに接着した。即ちインテグリン $\alpha_v\beta_3$ が R2 ドメインに結合することがわかった。

(2) ペリオスチンの一部を省いた特定のフォームにはインテグリン $\alpha_v\beta_3$ を発現しない細胞と発現する細胞の両者が結合することを見出した。つまりインテグリン $\alpha_v\beta_3$ に依存しないペリオスチンへの結合が起きており、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 以外のペリオスチン結合分子の存在が示唆された。本分子の同定中である。

(3) ペリオスチン R2 ドメインのリコンビナントタンパク質をペリオスチンノックアウトマウスに免疫してハイブリドーマを作製した。(1)の実験系において、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 発現細胞の接着阻害を指標にペリオスチン阻害抗体をスクリーニングし、接着阻害活性を持つ抗体を産生するハイブリドーマを複数得た。これらの抗体の詳細な機能については解析中である。

(4) (3) で得られた抗体を用い解析予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 23 件)

1) 出原賢治、太田昭一郎 他 ペリオスチンによる気管支喘息の病態形成機序 *臨床免疫・アレルギー科* 57(1): 104-110 (2012) (査読なし)

2) Shoichiro Ohta, Kenji Izuhara et al. The usefulness of combined measurements of squamous cell carcinoma antigens 1 and 2 in diagnosing atopic dermatitis. *Annals of Clinical Biochemistry* 49: 277-284 (2012) doi: 10.1258/acb.2011.011065 (査読あり)

3) 出原賢治、太田昭一郎 他 間質性肺炎の血清マーカーとしてのペリオスチン *検査と技術* 40(2): 157-160 (2012) (査読なし)

4) Miho Masuoka, Shoichiro Ohta, Kenji Izuhara et al. Periostin promotes chronic allergic inflammation in response to Th2 cytokines. *Journal of Clinical Investigation* 122: 2590-2600 (2012) doi:10.1172/JCI58978 (査読あり)

5) Hiroshi Shiraishi, Shoichiro Ohta, Shoichi Suzuki, Kenji Izuhara et al. Periostin contributes to the pathogenesis of atopic dermatitis by inducing TSLP production from keratinocytes. *Allergology International* 61: 563-572 (2012) doi: 10.2332/allergolint.10-OA-0297 (査読あり)

6) 出原賢治、太田昭一郎 他 アレルギーに対するサイトカイン III. IL-13. *アレルギー・免疫* 19(12): 1884-1891 (2012) (査読なし)

7) Yukie Yamaguchi, Shoichiro Ohta, Kenji Izuhara et al. Serum periostin levels

are correlated with progressive skin sclerosis in patients with systemic sclerosis. *British Journal of Dermatology* **168**(4): 717-725 (2013) doi: 10.1111/bjd.12117 (査読あり)

8) Yoshihiro Kanemitsu, Kenji Izuhara, Shoichiro Ohta et al. Increased periostin associates with greater airflow limitation in patients receiving inhaled corticosteroids. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **132**, 305-312 (2013) doi: 10.1016/j.jaci.2013.04.050 (査読あり)

9) Tomoko Tajiri, Kenji Izuhara, Shoichiro Ohta et al. Efficacy of omalizumab in eosinophilic chronic rhinosinusitis patients with asthma. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* **110**, 387-388 (2013) doi:10.1016/j.anai.2013.01.024 (査読あり)

10) Hidenori Sumiyoshi, Shoichiro Ohta et al. Yokukansan Treatment of Chronic Renal Failure Patients Receiving Hemodialysis, With Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia: An Open-Label Study. *American Journal of Geriatric Psychiatry* **21**: 1082-1085 (2013) doi: 10.1016/j.jagp.2011.06.001 (査読あり)

11) 太田昭一郎、出原賢治 ペリオスチン：臨床応用の可能性 *アレルギー* **62**: 652-664 (2013) (査読なし)

12) 太田昭一郎、出原賢治 間質性肺炎の新規バイオマーカー：ペリオスチン *臨床化学* **42**: 346-353 (2013) (査読なし)

13) 出原賢治、太田昭一郎 他 基礎研究の炎症疾患診断薬・治療薬開発への応用 *臨床病理* **61**: 900-908 (2013) (査読なし)

14) Kenji Izuhara, Shoichiro Ohta et al. Periostin in allergic inflammation. *Allergology International* **63**: 143-151 (2014) doi:10.2332/allergolint.13-RAI-0663 (査読あり)

15) Kazuto Taniguchj, Shoichiro Ohta, Kenji Izuhara et al. Periostin Controls Keratinocyte Proliferation and Differentiation by Interacting with the Paracrine IL-1 α /IL-6 Loop. *Journal of Investigative Dermatology* **134**: 1295-1304 (2014) doi:10.1038/jid.2013.523 (査読あり)

16) Tadao Nagasaki, Kenji Izuhara, Shoichiro Ohta et al. Integrating longitudinal information on pulmonary function and inflammation using asthma phenotypes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **133**: 1474-1477.e2 (2014) doi:10.1016/j.jaci.2013.12.1084 (査読あり)

17) Yumi Izuhara, Kenji Izuhara, Shoichiro Ohta et al. GLCCII variant accelerates pulmonary function decline in patients with asthma receiving inhaled corticosteroids. *Allergy* **69**: 668-73 (2014) doi:10.1111/all.12400 (査読あり)

18) Yoshihiro Kanemitsu, Kenji Izuhara,

Shoichiro Ohta et al. Osteopontin and periostin associate with a 20-year decline of pulmonary function in asthmatics. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **190**(4): 472-474 (2014) doi: 10.1164/rccm.201403-0562LE (査読あり)

19) Kenzen Kou, Shoichiro Ohta, Kenji Izuhara, et al. Periostin levels correlate disease severity and chronicity in patients with atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology* **171**(2): 283-291 (2014) doi: 10.1111/bjd.12943 (査読あり)

20) 太田昭一郎、出原賢治 気管支喘息における新規生物学的製剤開発の可能性を探る IL-4/IL-13 *Respiratory Medical Research* **2**: 152-157 (2014) (査読なし)

21) 太田昭一郎、出原賢治 バイオマーカーとは—ペリオスチンを中心に— *日本呼吸器学会誌* **3**: 617-624 (2014)(査読なし)

22) Mi-Ae Kim, Kenji Izuhara, Shoichiro Ohta et al. Association of serum periostin with aspirin-exacerbated respiratory disease. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* **113**, 314-320 (2014) doi:10.1016/j.anai.2014.06.014 (査読あり)

23) Tadao Nagasaki, Kenji Izuhara, Shoichiro Ohta et al. Using exhaled nitric oxide and serum periostin as a composite marker to identify severe/steroid-insensitive asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **190** (12): 1449-1452 (2014) doi: 10.1164/rccm.201407-1290LE (査読あり)

[学会発表] (計 12 件)

1) Kazuto Taniguchi, Shoichiro Ohta, Kenji Izuhara et al. The IL-1 α /periostin/IL-6 axis contributes to the keratinocyte proliferation and differentiation in atopic dermatitis. *29th Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum (Jeju Island, Korea, 10/14-19/2012)*

2) Yukie Yamaguchi, Shoichiro Ohta, Kenji Izuhara et al. Increased Periostin Levels in Patients with Systemic Sclerosis. *2012 American College of Rheumatology/Associations of Rheumatology Health Professionals (ACR/ARHP) Annual Meeting (Washington D.C., USA, 11/10-14/2012)*

3) Kenji Izuhara, Shoichiro Ohta et al. The IL-1 α /periostin/IL-6 axis contributes to the keratinocyte proliferation and differentiation on atopic dermatitis. *Pathogenic Processes in Asthma and COPD, Keystone Symposia* (Santa Fe, New Mexico, 1/10-15/2013)

4) Anna James, Shoichiro Ohta, Kenji Izuhara et al. Controlled oral steroid intervention decreases serum periostin levels in

asthmatic patients. *2013 American Thoracic Society International Conference (Philadelphia, PA, 5/17-22/2013)*

5) Hiroki Kabata, Shoichiro Ohta, Kenji Izuhara et al. Relationship Between Serum Periostin Levels And Severity/Phenotype Of Asthma. *2013 American Thoracic Society International Conference (Philadelphia, PA, 5/17-22/2013)*

6) Yoshihiro Kanemitsu, Kenji Izuhara, Shoichiro Ohta et al. Periostin associates with greater pulmonary function decline in asthmatic patients on treatment. *2013 American Thoracic Society International Conference (Philadelphia, PA, 5/17-22/2013)*

7) Tomohiro Tajiri, Kenji Izuhara, Shoichiro Ohta et al. Efficacy Of Omalizumab In Asthmatic Patients With Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis Or Eosinophilic Otitis Media. *2013 American Thoracic Society International Conference (Philadelphia, PA, 5/17-22/2013)*

8) Anna James, Shoichiro Ohta, Kenji Izuhara et al. T_H2 specific biomarker profile determines steroid responsiveness in severe asthma. *European Respiratory Society Annual Congress 2013 (Barcelona, Spain, 9/7-11/2013)*

9) Tadao. Nagasaki, Kenji Izuhara, Shoichiro Ohta et al. Asthma phenotypes with rapid decline in lung function. *European Respiratory Society Annual Congress 2013 (Barcelona, Spain, 9/7-11/2013)*

10) G. Petrova, K. Izuhara, S. Ohta et al. Association between ADAM33 polymorphisms and asthma control. *European Respiratory Society Annual Congress 2013 (Barcelona, Spain, 9/7-11/2013)*

11) Shoichiro Ohta Periostin, a novel biomarker for IPF *MRC SORT-IPF Workshop (Winchester, UK, 6/13-14/2014)*

12) Anna James, Shoichiro Ohta, Kenji Izuhara et al. Effect of allergen challenge on two novel biomarkers of airway inflammation, periostin and YKL-40, in atopic asthmatic patients. *2014 American Thoracic Society International Conference (San Diego, CA, 5/16-21/2014)*

〔図書〕(計4件)

1) Kenji Izuhara, Shoichiro Ohta et al. Periostin, an extracellular matrix protein, acts as a master switch for the onset of inflammation in atopic dermatitis. *Translational Science: from Basic to Clinical Immunology and Allergy* 211-214 Pacini Editore S.p.A., Pisa, Italy (2012)

2) Kenji Izuhara, Shoichiro Ohta et al.

The role of Th2-type cytokines in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Atopic dermatitis Disease etiology and clinical management.* 39-50 InTech, Rijeka, Croatia (2012)

3) Kenji Izuhara, Shoichiro Ohta et al. Asthma. *Metabolism of Human Diseases* 215-219 Springer-Verlag, Wien, Austria (2014)

4) Kenji Izuhara, Shoichiro Ohta et al. Serum periostin levels are correlated with decline of pulmonary function in asthma patients. *Allegic Diseases: from Mechanisms to Cures.* 185-188 Pacini Editore S.p.A, Pisa, Italy (2014)

〔産業財産権〕

出願状況(計10件)

(1) 名称：ペリオスチンの特定領域に結合する抗体及びこれを用いたペリオスチンの測定方法

発明者：太田昭一郎、出原賢治、他

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2012/072774

出願年月日：2012年9月6日

国内外の別：国外

(2) 名称：慢性副鼻腔炎の検出方法

発明者：太田昭一郎、出原賢治、他

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2012/78008

出願年月日：2012年10月30日

国内外の別：国外

(3) 名称：気管支喘息の予防又は治療薬及びそのスクリーニング方法

発明者：太田昭一郎、出原賢治、他

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2013/051120

出願年月日：2013年1月22日

国内外の別：国外

(4) 名称：眼科疾患を除くペリオスチン発現に起因する疾患用医薬、およびその用途

発明者：太田昭一郎、出原賢治、他

権利者：同上

種類：特許

番号：特願2013-202051

出願年月日：2013年9月27日

国内外の別：国内

(5) 名称：アトピー性角結膜炎の検出法

発明者：太田昭一郎、出原賢治、他

権利者：同上

種類：特許

番号：特願2013-218612

出願年月日：2013年10月21日

国内外の別：国内

(6) 名称：気管支喘息の予防又は治療薬及びそのスクリーニング方法

発明者：太田昭一郎、出原賢治、他
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2013-555252
出願年月日：2014 年 5 月 21 日
国内外の別：国内
(7) 名称：眼科疾患を除くペリオスチン発現
に起因する疾患用医薬、およびその用途
発明者：太田昭一郎、出原賢治、他
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2014/075683
出願年月日：2012 年 9 月 26 日
国内外の別：国外
(8) 名称：アトピー性角結膜炎の検出法
発明者：太田昭一郎、出原賢治、他
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2014/077635
出願年月日：2014 年 10 月 17 日
国内外の別：国外
(9) 名称：慢性副鼻腔炎の検出方法（アメリ
カ）
発明者：太田昭一郎、出原賢治、他
権利者：同上
種類：特許
番号：14/354,355
出願年月日：2014 年 4 月 25 日
国内外の別：国外
(10) 名称：慢性副鼻腔炎の検出方法（ヨー
ロッパ）
発明者：太田昭一郎、出原賢治、他
権利者：同上
種類：特許
番号：12845463.4
出願年月日：2014 年 5 月 23 日
国内外の別：国外

取得状況（計 7 件）

(1) 名称：特発性間質性肺炎の検出方法（ア
メリカ）
発明者：太田昭一郎、出原賢治、他
権利者：同上
種類：特許
番号：8420310
出願年月日：2013 年 4 月 16 日
国内外の別：国外
(2) 名称：特発性間質性肺炎の検出方法（イ
ギリス）
発明者：太田昭一郎、出原賢治、他
権利者：同上
種類：特許
番号：2 295 599
出願年月日：2013 年 7 月 31 日
国内外の別：国外
(3) 名称：特発性間質性肺炎の検出方法（フ
ランス）
発明者：太田昭一郎、出原賢治、他
権利者：同上

種類：特許
番号：2 295 599
出願年月日：2013 年 7 月 31 日
国内外の別：国外
(4) 名称：特発性間質性肺炎の検出方法（ド
イツ）
発明者：太田昭一郎、出原賢治、他
権利者：同上
種類：特許
番号：602009017649.8
出願年月日：2013 年 7 月 31 日
国内外の別：国外
(5) 名称：アトピー性皮膚炎の検出方法およ
び予防・治療剤のスクリーニング方法
発明者：太田昭一郎、出原賢治、他
権利者：同上
種類：特許
番号：第 5522717 号
出願年月日：2014 年 4 月 18 日
国内外の別：国内
(6) 名称：増殖糖尿病網膜症の検出方法およ
び予防・治療剤のスクリーニング方法
発明者：太田昭一郎、出原賢治、他
権利者：同上
種類：特許
番号：第 5555940 号
出願年月日：2014 年 6 月 13 日
国内外の別：国内
(7) 名称：非特発性間質性肺炎の治療薬のス
クリーニング方法
発明者：太田昭一郎、出原賢治、他
権利者：同上
種類：特許
番号：第 5632994 号
出願年月日：2014 年 10 月 24 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biomol.med.saga-u.ac.jp/medbiochem/index.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田昭一郎 (OHTA, Shoichiro)
佐賀大学・医学部・助教
研究者番号：20346886

(2) 研究分担者

出原賢治 (IZUHARA, Kenji)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号：00270463