

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659367

研究課題名(和文) 肝線維化を抑制する活性化星細胞特異的インテグリンの抗体：作用機序解明と治療の展開

研究課題名(英文) Activated hepatic stellate cell specific antibody that attenuates liver fibrosis: mechanism of action and therapeutic use

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) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：我々が以前作製したインテグリン $\alpha 8 \beta 1$ 阻害抗体は、肝線維化モデルマウスに効果を認めた。本研究では $\alpha 8 \beta 1$ が線維化を引き起こす機序を解明することを目指した。その結果、インテグリン $\alpha 8 \beta 1$ は1) 線維化に大きな役割を果たす TGF- β を活性化させていることおよび2) 線維化組織を構成する筋線維芽細胞が生じるのを助けていることがわかった。1) はこれまで他のインテグリンに関して言われたことであるが、2) は新しい発見であった。

研究成果の概要(英文)：We have previously generated an anti-integrin $\alpha 8 \beta 1$ blocking antibody, which has been found to inhibit liver fibrosis in mouse models. In the present study, we aimed at the mechanism of the profibrotic activity of integrin $\alpha 8 \beta 1$. We found that 1) $\alpha 8 \beta 1$ activates TGF- β that plays major roles in fibrosis, and 2) $\alpha 8 \beta 1$ supports emergence of myofibroblast that is a constituent of fibrotic tissues. The activation was previously found also in other integrins, but the myofibroblast induction was a novel finding.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：インテグリン 線維症 星細胞 TGF- β 抗体医薬 肝硬変

1. 研究開始当初の背景

組織の線維化においては、役割を果たす分子の名が次第に具体化している。マトリックス受容体インテグリンファミリーもその一つで、インテグリン $\alpha\beta6$ が TGF- β 活性化作用をもち線維化を誘導すると報告された。我々はもし線維化の誘導がインテグリンに共通する性質であれば、線維芽細胞や筋線維芽細胞などの間質細胞に発現が限局するインテグリン $\alpha8\beta1$ の線維化誘導がより直接的ではないかと考えた。しかしインテグリンの作用を知るために不可欠とも言える「機能阻害抗体」が作製されていなかったことから、 $\alpha8\beta1$ の役割は長く不明のままであった。作製にはいくつもの研究室が挑戦し、あらゆる方法を試したが誰も成功していないことを $\alpha8$ 遺伝子の単離同定者 (Schnapp LM, Medical University of South Carolina) から聞き及び、学内でチームを作って挑戦し NEDO の支援の下 3 年後に抗体ができた。得られた 10 数クローンのうち 3 クローンが阻害活性を有する事を、細胞の $\alpha8\beta1$ を介したテネイシンに対する接着抑制を指標に確認した。また、ニワトリで作製したこの抗体はヒト、マウス、ラットの $\alpha8\beta1$ に共通して阻害作用をもっていた。

まず肝臓で効果を確かめたが、その理由は、肝臓には機序の異なる線維化モデルが良く確立されている上、線維化の主要なエフェクター星細胞が同定され、その単離技法も整い *in vitro* 実験に活用でき、さらに星細胞には $\alpha8\beta1$ が発現しているらしいといういくつかの条件が揃っていたからである。抗体を副作用軽減のため IgY からマウス IgG キメラ型にして 10 mg/kg を 3 日おきに投与すると、胆管結紮モデルおよび四塩化炭素投与モデルで、それぞれ抑制効果を得た。結果は病理組織像、ヒドロキシプロリン量および線維化関連遺伝子 (*ACTA2*, *COL1A1*) の差により確認された。また、肺のブレオマイシン誘導

線維化モデルでも同様に線維化抑制効果が得られた。

冒頭で述べたインテグリン $\alpha\beta6$ 阻害も肺と肝の線維化抑制に有効と報告されているが、四塩化炭素モデルには無効である。 $\alpha\beta6$ の TGF- β 活性化には両分子のコンタクトが必要なため、 $\alpha\beta6$ 発現部位近傍に作用が限局される。発現は上皮のみのため、胆管から離れた部位にある線維化には関与しない。その点、我々が確かめた $\alpha8\beta1$ 阻害抗体の線維化抑制作用のパターンは、組織や組織内の線維化分布によらず効果が発揮される事を示唆しており、 $\alpha8\beta1$ が線維化組織自体に発現することに良く一致していた。これらから、 $\alpha8\beta1$ 阻害抗体は非常に有望な抗線維化医薬のシーズである。抗線維化医薬はさかんに開発競争が行われているところであるが、十分に効果的な医薬がまだない。

$\alpha8\beta1$ がどのように線維化に加担するのかそのメカニズムは全く不明であるため、本研究ではその解明をめざし、以下の目的を掲げた。

2. 研究の目的

$\alpha8\beta1$ は肝臓において、定常状態の星細胞には発現していないが、星細胞の活性化に伴い発現する。我々は *in vitro* で分離した星細胞を活性化させると $\alpha8\beta1$ が発現してくること、*in vitro* では線維化肝において星細胞マーカー GFAP と $\alpha8$ 鎖が共存することを二重染色で確認している。星細胞が筋線維芽細胞の前駆細胞で線維化に伴い分化することを考えると、 $\alpha8\beta1$ の新規発現がこの分化に関連している可能瀬がある。そこで、まず、1) $\alpha8\beta1$ を介して細胞内に入るシグナルの筋線維芽細胞への分化誘導作用を確かめ、2) 次いでその $\alpha8\beta1$ シグナルが発現に影響する遺伝子群の同定を行うことを目的とした。また、一部のインテグリンは latent TGF- β から LAP をは

ずして活性化させる。まず LAP の RGD 配列に結合するのかが条件であるかが、その中でも活性化能を有するものは限定され ($\alpha\text{v}\beta 5$, $\alpha\text{v}\beta 6$, $\alpha\text{v}\beta 8$)、 $\alpha 8\beta 1$ は RGD を認識するが、TGF- β 活性化能はないとされている (*J Cell Sci* 115: 4641-, 2002)。しかし、この報告は 1 種類の人工的な細胞株 ($\alpha 8$ -transfected SW480 cell) で確かめただけで、さらに検証が望まれる。これらのことから、インテグリンの線維化誘導機序としてこれまで報告されているとおり、3) $\alpha 8\beta 1$ も TGF- β 活性化能を有するのかが。

以上の 3 点を具体的目標としてかかげた。

3. 研究の方法

まず、 $\alpha 8\beta 1$ シグナルが星細胞の筋線維化細胞への分化を誘導するかに関しては、株化星細胞 LX2 を用いて実験を行った。LX2 は $\alpha 8\beta 1$ を発現しておらず、 $\alpha 8\beta 1$ のリガンドであるテネイシンやネフロネクチンでコートしたプレート上で培養しても $\alpha 8\beta 1$ からシグナルが入ることはない。そこで、シグナルが入るように LX2 細胞に $\alpha 8$ cDNA を導入し $\alpha 8\beta 1$ を発現させた LX2/ $\alpha 8$ を作製し、LX2 とともにテネイシン、ネフロネクチン上で無血清培養し、 α -SMA の発現上昇を指標に分化誘導を観察した。対照として、poly-L-lysine (PL) とラミニンを用い、シグナル無し、および他のインテグリンからシグナルが入る場合、と比較した。

$\alpha 8\beta 1$ シグナルの影響で発現が誘導される遺伝子群を確かめる方法として、 $\alpha 8\beta 1$ からのシグナル(+)の組織と(-)の組織の包括的遺伝子発現変化をマイクロアレイで解析した。材料としては四塩化炭素により惹起されたマウスの線維化肝組織と、 $\alpha 8\beta 1$ 抗体を投与して線維化が抑制された肝組織を用いた。

TGF- β の活性化能測定はバイオアッセイの世界標準となっている PAI-1 プロモータ下流にルシフェラーゼをつないだコンストラ

クトを導入したミンク気道上皮細胞株 (Mv1Lu; Dan Rifkin より入手) を使用した。この細胞と TGF- β 活性化能を測定したい細胞を共に培養してルシフェラーゼの発光を指標に測定した。

4. 研究成果

1) $\alpha 8\beta 1$ シグナルの星細胞から筋線維芽細胞への分化誘導

LX2 細胞を PL, ネフロネクチン、テネイシン、ラミニン上で培養したところ、いずれの場合にも *ACTA2* 遺伝子 (α -SMA) の発現量にシグナル無しの PL と差を認めず、分化誘導は認められなかった。ところが $\alpha 8\beta 1$ を発現させた LX2/ $\alpha 8$ をネフロネクチン、テネイシン上で培養すると、PL に対し 3 倍以上の *ACTA2* 遺伝子発現上昇を認めた。一方で、ラミニン上では上昇はみられず、インテグリン $\alpha 3\beta 1$ からのシグナルは分化誘導に関与しないと思われた。このネフロネクチン、テネイシン上での上昇は si-RNA を用いて $\alpha 8$ 発現を低下させると失われることにより、 $\alpha 8\beta 1$ を必要とする現象であることを確かめた。

2) $\alpha 8\beta 1$ シグナルが誘導する遺伝子

マイクロアレイ解析の結果、抗体投与により発現低下した遺伝子群を調べると、 $\alpha 8\beta 1$ シグナルが失われたために低下したつまり $\alpha 8\beta 1$ シグナルにより誘導される遺伝子群がわかる。そのトップ 30 には *MMP12*, *MMP15*, *COL3A1*, *COL1A1*, *COL6A1*, *SPP1(OPN)*, *ACTA2* と 7 種の線維化関連遺伝子が含まれ、 $\alpha 8\beta 1$ が線維化を誘導する事実と良く一致していたが、一方ではこれらは線維化が抑制された結果低下した可能性も否定できず、環境の影響を除外できる *in vitro* での確認が必要と思われた。

3) TGF- β 活性化能

SW480 細胞を実験細胞として用いた場

合、SW480/β6 との共培養からは対照 (Mv1Lu 細胞のみ) に比べ 7 倍程度の発光を検出し TGF-β 活性化能を認めたが、SW480/α8 と共培養した際の発光は対照と同程度であり SW480/α8 に TGF-β 活性化能は認めなかった。α8β1 を発現させた星細胞株 LX/α8 または線維芽細胞株 MRC5 (α8 発現あり) にも活性化能は認めなかった。しかし、ラットの肝臓から分離した活性化星細胞を用いると活性化が認められた。これらのことから、α8β1 は潜在型 TGF-β に結合し活性化させ得るが、α8β1 を発現する細胞の種類に活性化の程度が大きく負うことが示唆された。これは細胞の収縮能の重要性を示すものかも知れない。また、星細胞は活性化に伴い自ら周辺の TGF-β を活性化させ、活性化 TGF-β により自身の筋線維芽細胞への分化が進むものと考えられた。

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 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

1. Yokosaki Y, Nishimichi N, Kanno K, Senatani K, Yasui W. A possible therapeutic agent for pulmonary fibrosis: antibody against integrin α8β1. European Respiratory Society, Sep 7-11, 2013, Barcelona, Spain

2. Nick Mark, Chi Hung C, Yu-Hua Chow, Norihisa Nishimichi, Lynn Schnapp, Yasuyuki Yokosaki. Role of α8β1 integrin in TGF-β activation by lung fibroblasts. American Thoracic Society 2013 International Meeting, May 17-22, 2013, Philadelphia, PA, USA

3. 西道教尚, 横崎恭之. インテグリンα8β1 機能阻害モノクローナル抗体の認識部位の同定、第85回日本生化学会、2012年12月14-16日、福岡

4. 西道教尚, 菅野啓司, 仙谷和弘, 安井弥, 横崎恭之. インテグリンα8β1 は活性化肝星細

胞に発現し肝線維化を促進する、第35回日本分子生物学会、2012年12月11-14日、福岡

5. Norihisa Nishimichi, Keishi Kanno, Neil C. Henderson, Dean Sheppard, Yasuyuki Yokosaki. Integrin α8β1 as a new therapeutic target for tissue fibrosis. American Thoracic Society, 2012 International Meeting, May 18-23, 2012, San Francisco, CA, USA

6. 岩崎剛雄, 武田吉人, 横崎恭之, 辻野和之, 木島 貴志, 立花功, 川瀬一郎, 熊ノ郷淳. インテグリンとVEGFR-3の仲介役テトラスパンインCD9はリンパ節転移 (リンパ管新生) を促進する. 第52回日本呼吸器学会、2012年4月20-22日、神戸

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: インテグリンα8β1の機能を阻害する事による線維化の抑制

発明者: 横崎恭之, 西道教尚

権利者: 広島大学

種類: 特許、

番号: 特許、PCT/JP2013/059368

出願年月日: 2013年03月28日

国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ等: <http://home.hiroshima-u.ac.jp/integrin/Home.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

菅野 啓司 (KANO KEISHI)

広島大学・病院・助教

研究者番号: 30448237

(3) 連携研究者

仙谷 和弘 (SENTANI KAZUHIRO)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号: 30508164

西道 教尚 (NISHIMICHI NORIHISA)

広島大学・保健管理センター・研究員

研究者番号: 00583486