

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670280

研究課題名(和文) オステオポンチン重合体を測定するELISA構築と新規臨床マーカーとしての意義

研究課題名(英文) Establishment of ELISA that detect polymeric OPN and its usefulness

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

研究成果の概要(和文)： 私たちが以前発見した炎症性物質重合オステオポンチンを体液中で簡単に測定できるようにするためELISA(酵素抗体法)測定法の樹立を目指した。

まず、胎生時から重合不能OPNのみ発現するマウスを作成し、OPNに対する免疫寛容を樹立させたのち、重合OPNを注射して、重合オステオポンチン特異的に反応する抗体を得た。しかし野生型OPNとの反応が著しく、重合OPN特異的クローンが得られなかった。その理由としてマウスの重合不能OPNの発現が弱く、十分な免疫学的寛容を得られていないことなどが考えられた。新しくCRISPR-Cas9法により野生型OPNには免疫的に寛容であるマウスの作製を開始した。

研究成果の概要(英文)： To establish a new ELISA that detects polymeric osteopontin, which we previously found as a chemoattractant for neutrophils, we attempted to obtain polymeric OPN specific monoclonal antibodies. First we generated mice that express only polymerization-incompetent OPN by introducing some mutations into the OPN gene. The mice produced many antibody clones responding to injected polymeric OPN. However, many of clones recognized wild type OPN, which prevent us from establish the specific clones. Probably, immunological tolerance was not sufficient for the mice not to respond wild type OPN. We restarted to generate the tolerant mice by CRISPR-Cas9 method.

研究分野：呼吸器内科学、分子病態学

キーワード：オステオポンチン 重合 ELISA 好中球

1. 研究開始当初の背景

インテグリン結合性サイトカインであり、マトリセルラー蛋白の一つであるオステオポンチン(OPN)は、免疫調節、がん化、組織傷害、骨化など多彩な局面で働く。OPNの臨床的な特徴の一つとして、がんや炎症性疾患で上昇が著しいことが挙げられ、マーカーとしての報告が多数ある。一方で、OPNの作用発現の分子機構の詳細は十分明らかではないが、振舞いの一つとして、生体内でマトリックス架橋酵素により重合し好中球の走化因子となることが確認されている。

2. 研究の目的

ある病態や疾患だけで上昇する物質があり、血液や尿を用いて測定できれば、臨床上極めて有用である。私たちは、以前ある物質の重合体が好中球を惹きつける現象を見出しているが、この重合したオステオポンチン(OPN)はまだどのような病態や疾患で上昇するかははっきりしていない。この重合体の生体反応に対応する挙動を知るため、また新たな疾患マーカーとしての可能性を探るため、重合 OPN に対する ELISA の構築を試みた。

3. 研究の方法

まず、重合不能 OPN 遺伝子(J Biol Chem 286: 11170-8, 2011) をマウスに導入し、OPN ノックアウトマウスと交配し、重合不能な OPN のみ発現するマウスを得た。重合不能 OPN は3 か所に変異が導入されており、完全に野生型 OPN と同じ構造ではないが、これらの変異部位は天然変性部位にあるため立体構造は異ならず、野生型 OPN と重合不能 OPN は単量体である場合、形状はほぼ同じで、同様の抗原性を有すると思われた。つまり、重合不能な OPN を胎生時より発現していれば野生型 OPN に対する免疫学的寛容は得られるものと考えた。このマウスに対して、試験管内でトランスグルタミナーゼと反応させ作製した重合 OPN (J Biol Chem 284:14769-76, 2009) を腹腔内に注射して免疫した。型の通りハイブリドームを作製しスクリーニングを行ったところ、当初の予想と異なり大多数が野生型 OPN と反応し、一部が重合 OPN と野生型 OPN の両者に反応した。

4. 研究成果

重合 OPN 特異的クローンが得られなかった理由としてマウスの重合不能 OPN の発現が弱く、十分な免疫学的寛容を得られていないこと、あるいは得られたクローンの多くが OPN の1次構造上の3箇所のアミノ酸置換部位を認識していることなどが考えられた。現在 CRISP R-Cas9 法により野生型 OPN には免疫的に寛容であるマウスの作製を開始している。

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)

1. Soltani AK, McCarthy DA, McKleroy W, Azary S, Sakuma S, Ha A, Tharp K, Yokosaki Y, Hart D, Stahl A, and Atabai K. $\alpha 8\beta 1$ integrin regulates nutrient absorption through an Mfge8-PTEN dependent mechanism. *eLife* 5: e13063, 2016. doi: 10.7554/eLife.13063. 査読あり
2. Sugiyama A, Kanno K, Nishimichi N, Ohta S, Ono J, Conway SJ, Izuhara K, Yokosaki Y, Tazuma S. Periostin promotes hepatic fibrosis in mice by modulating hepatic stellate cell activation via αv integrin interaction. *J Gastroenterol.* in press 2016 doi 10.1007/s00535-016-1206-0. 査読あり
3. Nishimichi N, Kawashima N, Yokosaki Y. Epitopes in $\alpha 8\beta 1$ and other RGD- binding integrins delineate classes of integrin-blocking antibodies and major binding loops in α subunits. *Sci Rep* 5:13756, 2015, doi: 10.1038/srep13756. 査読あり
4. Chi F, Hung, Nick M. Mark, Yu-Hua Chow, Norihisa Nishimichi, Yasuyuki Yokosaki, and Lynn M. Schnapp. Role of Integrin- $\alpha 8$ in Bleomycin-Induced Lung Injury. *Annals of the American Thoracic Society* 12: S74, 2015 doi: 10.1513/AnnalsATS.201406-256MG. 査読あり
5. 西道教尚, 川島永子, 横崎恭之: インテグリンを介した線維化調節機構. **細胞** 47, 180-183, 2015 <http://hokuryukan-ns.co.jp/>

magazines/ archives/2015/03/20154_4.html.
査読なし

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Norihisa Nishimichi, Nagako Kawashima, Yasuyuki Yokosaki. Epitopes of Anti-Fibrotic Monoclonal Antibodies against Integrin $\alpha 8\beta 1$ Explained Long Term Lacking of the mAb. American Thoracic Society, May 14-18, 2016, San Francisco, CA, USA.
2. Norihisa Nishimichi, Nagako Kawashima, Yasuyuki Yokosaki. Epitopes of Anti-Integrin $\alpha 8\beta 1$ Blocking mAbs Disclosed Difficulty in Generation of the mAbs in Mammals. Keystone Symposia (Antibody as drugs), Mar 6-10, 2016, Vancouver, BC, Canada.
3. Akiko Sugiyama, Keishi Kanno, Norihisa Nishimichi, Yasuyuki Yokosaki, Susumu Tazuma. Periostin stimulates hepatic stellate cells via interaction with integrins: Novel functional roles for periostin in hepatic fibrosis. American Association for the Study of Liver Disease, Nov 7-11, 2015, Boston MA, USA
4. N.M. Mark, C. Hung, Y.-H. Chow, K. Kennewick, S. Lewis, N. Nishimichi, Y. Yokosaki, B. Hinz, L.M. Schnapp. $\alpha 8\beta 1$ Integrin And Mechanical Traction Are Necessary For Activation Of TGF- β In Fibroblasts, American Thoracic Society, May 16-21, 2014, San Diego, CA, USA
5. Yokosaki Y, Nishimichi N, Kanno K, Sentani K. Inhibition Of Pulmonary Fibrosis By Integrin $\alpha 8\beta 1$ Blocking Antibody And TGF β -Independent Myofibroblast Differentiation By $\alpha 8\beta 1$ Mediated Signal, American Thoracic Society, May 16-21, 2014, San Diego, CA, USA
6. Norihisa Nishimichi, Keishi Kanno, Akiko Sugiyama, Yasuyuki Yokosaki. Myofibroblast Differentiation Mediated By Integrin $\alpha 8\beta 1$. Keystone Symposia, Mar 23-28, 2014, Keystone, CO, USA.
7. 西道教尚、菅野啓司、杉山晶子、仙谷和弘、安井弥、横崎恭之 .インテグリン $\alpha 8\beta 1$ は筋線維芽細胞分化を誘導して組織線維化を促進する . Integrin $\alpha 8\beta 1$ promotes tissue fibrosis via differentiation of

myofibroblastBMB 2016 (生化学会・分子生物学会合同年会)、2015. 12.1-4、神戸

8. 阿賀康弘、西道教尚、横崎恭之 . 糖尿病患者における心不全へのインテグリン $\alpha 8\beta 1$ の関与 . Involvement of integrin $\alpha 8\beta 1$ in development of cardiac failure in patients with diabetes mellitus. BMB 2015 (生化学会・分子生物学会合同年会)、2015. 12.1-4、神戸
9. Yasuyuki Yokosaki, Norihisa Nishimichi. Localization of integrin binding site in transglutaminase-catalyzed polymeric osteopontin (シンポジウム) BMB 2015 (生化学会・分子生物学会合同年会)、2015. 12.1-4、神戸
10. 西道教尚、横崎恭之 .インテグリン $\alpha 8\beta 1$ モノクローナル抗体の認識部位の同定 . 第 36 回日本分子生物学会、2014.11.25-27、横浜
11. 横崎恭之、西道教尚、仙谷和弘、菅野啓司、安井弥 . 新しい肺線維化抑制薬シリーズインテグリン $\alpha 8\beta 1$ 阻害抗体 . 第 54 日本呼吸器学会、2014.4.25-27、大阪

〔図書〕(計 1 件)

1. Yokosaki Y. A New Integrin-Binding Site on a Transglutaminase-Catalyzed Polymer. *In*: Hitomi K, Kojima S and Fesus L Eds. Transglutaminases., Multiple Functional Modifiers and Targets for New Drug Discovery. Springer, 129-151 (2016) DOI:10.1007/978-4-431-55825-5

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)
該当なし
取得状況 (計 件)
該当なし

〔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
該当なし

(3)連携研究者

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