

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07051

研究課題名(和文)マトリックスタンパク質オステオポンチンの重合ー線維化形成における意義解明ー

研究課題名(英文)Role of polymeric OPN on fibrosis

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：オステオポンチンのトロンビン切断、トランスグルタミナーゼ重合の線維化における意義解明を目的に研究した。その結果、ゲノム編集によりトロンビン切断不能、トランスグルタミナーゼ重合不能変異オステオポンチン発現マウスの作製に成功した。同マウスを用いた線維化試験では両修飾の重要性は本研究期間内では明らかにできなかった。重合型オステオポンチン特異的な検出系に関して、重合型ヒトオステオポンチンのみを検出するELISAの構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined to reveal the role of post-translational modification such as thrombin-cleaved and transglutaminase-polymerized osteopontin on fibrosis. As a result, at first, we succeeded generation of mice expressing thrombin-cleaved formed or transglutaminase-polymerized formed of osteopontin by genome editing. But the importance of these post-translational modification of osteopontin on fibrosis was not cleared in this study. We were successful to construct polymeric human osteopontin specific ELISA system.

研究分野：免疫学、分子生物学、細胞接着分子、細胞外マトリックス

キーワード：オステオポンチン 線維化 翻訳後修飾 ゲノム編集 抗体

1. 研究開始当初の背景

オステオポンチンは特発性肺線維症 (IPF) 患者で最も高発現する分子であり、ノックアウトにより線維化が抑制されることから線維化促進に実際に作用している分子であると考えられているが、その具体的な作用点に関しては未だ不明な点が多いのが現状である。

2. 研究の目的

本研究ではオステオポンチンの二つの翻訳後修飾「トランスグルタミナーゼ重合」と「トロンビン切断」によりそれぞれ生じる重合型、N末切断型に着目し、両修飾の線維化への関与の有無を確かめることを目的とした。また重合型特異的抗体を用いて生体内の重合型を検出する系の作成を試みた。

3. 研究の方法

(1) 重合不能および切断不能オステオポンチン発現遺伝子組み換えマウスの作製・・・オステオポンチン翻訳後修飾の重要性をマウス生体内にて検証する為に、ゲノム編集法によりトロンビン切断不能および重合不能変異オステオポンチン発現遺伝子改変マウスの作製を試みた。

(2) 各組織線維化モデルの作製と同マウスにおけるオステオポンチン発現評価・・・肝、肺、腎臓線維化マウスを作製し、各組織におけるオステオポンチンを検出した。

(3) 遺伝子改変マウスへの線維化誘導・・・

(1) で作製したトロンビン切断不能オステオポンチン発現マウスに関して肝臓の、重合不能オステオポンチン発現マウスに関して肺の線維化を誘導した。

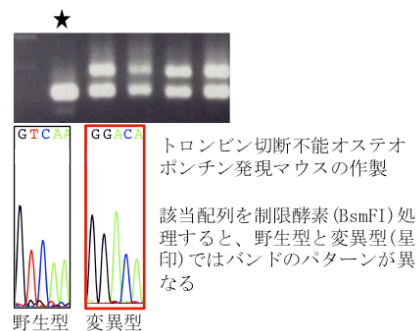
(4) 重合マウスオステオポンチン特異的抗体の作製・・・(1) で作製した重合不能オステオポンチン発現マウスを免疫動物、重合型オステオポンチン特異抗体の作製を試みた。

(5) 重合ヒトオステオポンチン特異的 ELSIA

検出系の構築・・・本研究者が既已取得していたヒトオステオポンチン抗体群の中から、抗体を組み合わせることで重合ヒトオステオポンチン特異的 ELSIA 検出系の構築を試みた。

4. 研究成果

(1) 重合不能および切断不能オステオポンチン発現遺伝子組み換えマウスの作製・・・CRISPR/Cas9及びPITCh法を活用したゲノム編集法により該当箇所の遺伝子変異を試みた。まずマウスオステオポンチン遺伝子エクソン5に存在するトロンビン切断認識配列をコードする遺伝子に変異導入を試みた。ジェノタイプングの結果、野生型の配列 (GTCAA) とは異なる目的の変異配列 (GGACA) に置換されたマウスを得ることができた (下図)。続いてエクソン3,4に存在するトランスグルタミナーゼ認識領域をコードする遺伝子4箇所に変異導入を試みた。ジェノタイプングの結果、野生型の配列 (CAG, CAG, CAG, CAA) とは異なる目的の変異配列 (GCA, GCA, GCG, CGA) に置換されたマウスを得ることができた。



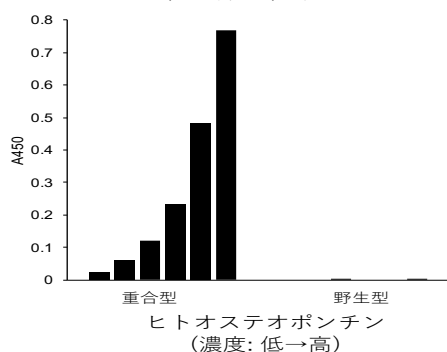
(2) 各組織線維化モデルの作製と同マウスにおけるオステオポンチン発現評価・・・線維化誘導の結果、肺での発現増加が最も大きいことが分かった。

(3) 遺伝子改変マウスへの線維化誘導・・・切断不能オステオポンチン発現マウスに対して肝臓線維化を誘導したが、野生型と比較して線維化の軽減は認められなかった。また、重合不能オステオポンチン発現マウスでは肺の

線維化を試みたが死亡個体が多く解析に至らなかった。

(4) 重合マウスオステオポンチン特異的抗体の作製・・・重合不能オステオポンチン発現マウスに組換え重合マウスオステオポンチンを免疫した。一次免疫の血清は重合型に反応し野生型には殆ど反応しなかったが、二次免疫後野生型へも強く反応し両者に対する反応性に差が見られなくなった。オステオポンチンを重合した際未重合の箇所も存在しており、その部位への抗体が産生された可能性が考えられた。そこで、重合箇所付近のみのマウスオステオポンチン小断片を作製してこれを重合化しマウスに免疫した。その結果、得られた血清は野生型よりも重合型に強く反応する結果を得た。同マウスから脾臓リンパ球を回収し細胞融合によりハイブリドーマを作製し、増殖したクローンの反応性を検討したが、重合型、野生型にはほぼ等しく反応しており重合型特異抗体は得られなかった。血清の段階で重合型、野生型への反応性に差があることから、細胞融合で得られるハイブリドーマの数を更に増やすことで重合マウスオステオポンチン特異的抗体の獲得が可能であると考えられた。

(5) 重合ヒトオステオポンチン特異的ELISA検出系の構築・・・(4)で得られた血清はヒトオステオポンチンには反応しない。よって、これまで我々が得ていた抗ヒトオステオポンチン抗体群から抗体を選別して組み合わせELISAを実施し、重合型、野生型ヒトオステオ



ポンチンへの反応性を検討した。その結果、クローン738と750の組み合わせで重合ヒトオステオポンチンのみを認識する系を構築した(前列の図)。今後本検出系を用いてIPF患者の気管支肺胞洗浄液など、ヒト検体を試料に重合オステオポンチンの検出・濃度測定が可能となった。

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4件)

- ① Nakagawa Y, Tetsushi Sakuma, Norihisa Nishimichi, Yasuyuki Yokosaki, Takeo T, Nakagata N, Yamamoto T. Culture time of vitrified/warmed zygotes before microinjection affects the production efficiency of CRISPR-Cas9-mediated knock-in mice. *Biology Open*, 査読有, vol. 6, 2017, 706-713. DOI: 10.1242/bio.025122
- ② Nakagawa Y, Tetsushi Sakuma, Norihisa Nishimichi, Yasuyuki Yokosaki, Yanaka N, Takeo T, Nakagata N, Yamamoto T. Ultra-superovulation for the CRISPR-Cas9-mediated production of gene-knockout, single-amino-acid-substituted, and floxed mice. *Biology Open*, 査読有, vol. 5, 2016, 1142-1148. DOI: 10.1242/bio.019349
- ③ Sugiyama A, Kanno K, Norihisa Nishimichi, Ohta S, Ono J, Conway SJ, Izuhara K, Yasuyuki Yokosaki, Tazuma S. Periostin promotes hepatic fibrosis in mice by modulating hepatic stellate cell activation via αv integrin interaction. *Journal of Gastroenterology*, 査読有, vol. 51, 2016, 1161-1174. DOI:10.1007/s00535-016-1206-0
- ④ Norihisa Nishimichi, Kawashima N, Yasuyuki Yokosaki. Epitopes in $\alpha 8\beta 1$ and other RGD-binding integrins delineate classes of integrin-blocking antibodies and major binding loops in α subunits. *Scientific Reports*, 査読有, vol. 5, 2015, 13756-13767. DOI: 10.1038/srep13756

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① 伊藤益美、西道教尚、大谷水景、横崎恭之. α -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 $\alpha 9 \beta 1$ との結合を介する. 2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017年12月8日、神戸ポートアイランド
- ② 大谷水景、西道教尚、伊藤益美、吉栖正生、横崎恭之. インテグリン $\alpha 9 \beta 1$ 阻害抗体の医薬としての有用性を規定する作用様式. 2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017年12月7日、神戸ポートアイランド
- ③ 西道教尚、伊藤益美、大谷水景、横崎恭之. 筋線維芽細胞分化におけるインテグリン $\alpha 8 \beta 1$ とTGF- β の役割. 2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017年12月7日、神戸ポートアイランド
- ④ Yasuyuki Yokosaki, Norihisa Nishimichi. Localization of integrin $\alpha 9 \beta 1$ binding site in transglutaminase-catalyzed polymeric osteopontin. 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会合同大会、2015年12月12日、神戸ポートアイランド

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

仙谷和宏 (SENTANI KAZUHIRO)
広島大学・医歯薬保健学研究院 (医)・講師
研究者番号：30508164

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

外丸祐介 (SOTOMARU YUSUKE)
広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授
研究者番号：90309352

佐久間哲史 (SAKUMA TETSUSHI)
広島大学・理学研究科・特任講師
研究者番号：90711143

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()