

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791284

研究課題名（和文） Periostin に着目した全身性強皮症の病態解析

研究課題名（英文） The role of periostin in the pathogenesis of systemic sclerosis

研究代表者

山口 由衣（YAMAGUCHI YUKIE）

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：60585264

研究成果の概要（和文）：本研究では、全身性強皮症における Periostin の役割について追及した。Periostin は、全身性強皮症患者から採取した血液、皮膚組織、皮膚および肺由来の線維芽細胞で発現が増強しており、とくに血清 Periostin 値は、皮膚線維化の重症度と有意に相関を示し、線維化のバイオマーカーとなりうることが分かった。また、Periostin は、単独で線維芽細胞からのコラーゲン産生を増強するほか、TGF β によるコラーゲン産生促進作用をさらに増強する可能性が明らかとなった。Periostin は線維化誘導因子として線維化疾患における治療の標的となりうる。

研究成果の概要（英文）：Fibrosis is a hallmark of scleroderma (SSc). There are no useful markers are clinically available to predict skin fibrosis. In this study, periostin levels were examined in the skin, primary fibroblasts (skin and lung), and serum in SSc patients. Periostin was strongly expressed in the affected dermis and fibroblasts in SSc patients. Co-localization study revealed that periostin was expressed not only in fibroblasts but in myofibroblasts and endothelial cells. Serum levels of periostin in SSc were markedly elevated compared with those in controls. Significantly higher levels of periostin were observed in patients with diffuse cutaneous SSc with disease duration < 5 years, and the modified Rodnan total skin thickness score (MRSS) was positively correlated with periostin levels in patients with SSc. Serial analysis revealed a correlation between periostin and MRSS, indicating an elevated periostin level in patients with SSc is associated with severity of skin fibrosis. Finally, in skin fibroblasts in vitro, recombinant periostin induced type I collagen production by itself and enhanced the response of TGF β on extracellular matrix production. Taken together, periostin may be a potential biomarker for skin fibrosis, and may be a therapeutical target in patients with SSc.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：全身性強皮症、線維化、Periostin

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症 (SSc) は、皮膚や肺などの過剰な線維化と末梢血管障害、さらに自己免疫

異常の 3 つを特徴とする結合組織疾患である。細胞外マトリックス (ECM) の過剰な沈着である線維化や血管障害に対する有効な治療法はいまだ発展途上である。これまでの研究成

果により、線維化病態における TGF- β シグナルの重要性や免疫細胞の機能異常、血管内皮前駆細胞異常などが示されているが、その病態はいまだ不明な点が多い。近年、ECM は、細胞構築を支える重要な間質であるだけでなく、直接的に細胞とクロストークすることにより、細胞の活性化や機能調節も行うことが知られるようになっていく。

Periostin は、Fasciclin I ドメインを持つ 90kDa の分泌型、IL-4/IL-13 誘導型の ECM タンパクで、マウスの osteoblasts の cell line より発見された。創傷治癒過程、ストレス組織部に多く発現し、線維芽細胞、上皮細胞、種々の癌細胞、血管平滑筋細胞、さらには末梢血単球における発現が報告され、細胞の接着・移動、血管新生に関与するといわれる (Shimazaki et al. J Exp Med 2008, Lindner V et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005)。Periostin は、インテグリン $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ と結合するほか、細胞外マトリックスの fibronectin や tenascin C, collagen V などと直接結合するため、種々の細胞や ECM タンパクの発現調節を行う可能性が示唆されている (Gillan L et al. Cancer Res 2002)。近年、線維化における Periostin の重要性が着目されている。気管支喘息では、気管支上皮細胞での Periostin 発現が高く、TGF- β を誘導し周囲の線維化が生じる (Sidhu SS et al. PNAS 2010)ほか、骨髄の線維化における Periostin の関与も指摘されている。Periostin ノックアウトマウスを用いたブレオマイシン誘導性の線維化モデルでは、炎症細胞リクルートを抑制することで線維化が抑制され、Periostin の線維化誘導への関与が指摘されている。

2. 研究の目的

本研究では細胞外マトリックスタンパク、特に Periostin に着目し、全身性強皮症の線維化病態形成・維持における Periostin の関与を検討する。SSc 患者より採取された検体を用いた Periostin の発現解析、Periostin 発現レベルと臨床的スコアの相関、また患者より採取した細胞を用いた in vitro 解析により、強皮症の線維化病態における Periostin の役割を追求し、新規治療法の開発につながる基盤の構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) SSc 組織における Periostin の発現検討。SSc 患者皮膚、肺由来の primary fibroblast, および患者皮膚組織を用いて、PCR 法、western blot 法、免疫組織学的染色法で

Periostin の発現レベルを健常人と比較し検討した。皮膚や移植肺から培養した primary fibroblasts は Dr Feghali-Bostwick (University of Pittsburgh, PA) より供与。また、蛍光免疫組織染色法を用いて、強皮症皮膚における Periostin 発現細胞の検討を行った。

(2) 血清 Periostin 値の臨床的検討。

強皮症患者 56 名 (diffuse cutaneous SSc: dSSc 16 名、limited cutaneous SSc: lSSc 40 名)、および健常人 66 名の血清を用いて、ELISA 法で血清 Periostin 値を測定した。測定は共同研究を行っている佐賀大学出原先生の開発された ELISA 法を使用した。健常人との比較のほか、臨床型、皮膚線維化の重症度、肺線維症の有無、罹病期間などで臨床的解析を行った。また、ROC 解析を行い、血清 Periostin の SSc 診断的意義について検討した。

(3) 培養線維芽細胞を用いた in vitro 解析。Periostin の線維化誘導能を調べるため、皮膚線維芽細胞を用いた in vitro 培養系において、recombinant Periostin 刺激による ECM 産生を検討した。また、線維化病態の重要なサイトカインである TGF- β や IL-13 は Periostin を誘導する。その存在下における Periostin の意義を RNA 干渉法で検討する。

4. 研究成果

(1) 強皮症患者の皮膚・肺線維芽細胞、皮膚組織における Periostin 発現検討。

現在までの報告では、健常人皮膚においても真皮上層および毛包周囲に Periostin が淡く染色される。SSc 患者皮膚では、特に dSSc において真皮上層から下層にかけて強く染色された (図 1)。

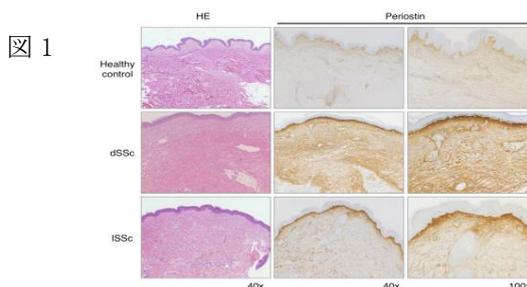
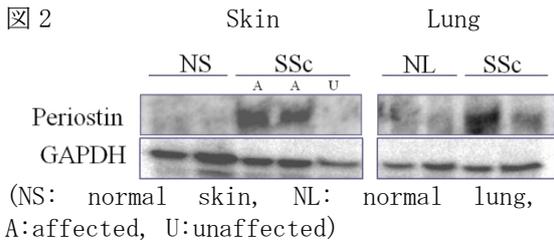


図 1

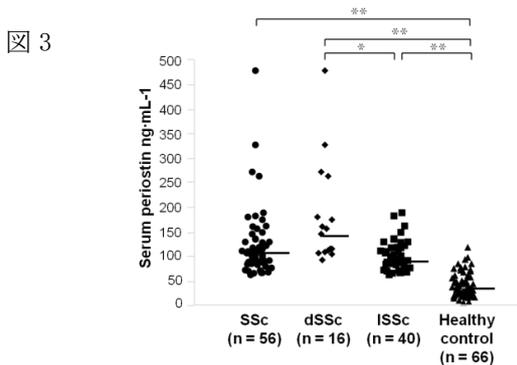
また、SSc 患者の皮膚・肺より培養した primary fibroblast においても、mRNA、蛋白レベル (図 2) で健常人に比較して有意に Periostin 発現が増強していた。興味深いことに、SSc 患者皮膚の非線維化部 (図 2: U) から採取した細胞で Periostin 増強はなかった。



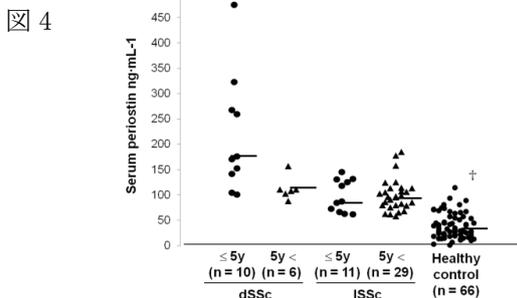
SSc 患者皮膚を用いた蛍光免疫組織染色では、Periostin は真皮の α smooth muscle actin (α SMA) 陽性紡錘形細胞や、CD31 陽性細胞と共染した。Periostin は ECM の主要な産生細胞である筋線維芽細胞や血管内皮細胞で発現を認め、強皮症の主要病態形成に関与する可能性がある。

(2) 血清 Periostin 値の臨床的検討

SSc 患者 56 人と健常人 66 名における血清 Periostin 値を ELISA で比較検討した。SSc では、病型によらず健常人に比較して有意に高値を示した ($p < 0.00001$, 図 3)。線維化の軽度である ISSc においても健常人に比較すると有意に高値を示しており、線維化のみならず、血管障害などに Periostin が関与する可能性が再度示唆された。



また、興味深いことに、発症 5 年以内の dSSc で有意に血清 Periostin 値が高値であり、(図 4)、

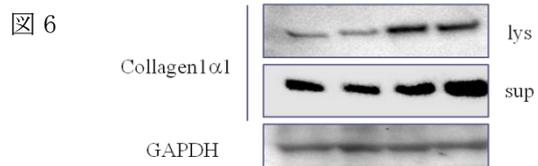
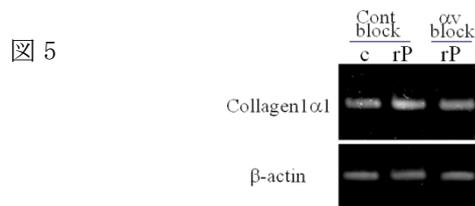


皮膚線維化スコア (modified Rodman total skin thickness score: MRSS) と強い正の相関を認めた ($r=0.79$, $P=5.94E-13$)。経時的変化の検討では、MRSS 減少に伴って血清 Periostin 値も減少する傾向が得られた。以

上より、Periostin は、線維化の程度を表すバイオマーカーになりうると考えられた。一方で、間質性肺炎の有無と血清 Periostin 値との相関は明らかにならなかったが、%VC 値や%DLco 値と逆相関の傾向にあり、さらなる大規模な調査での検討が必要である。

(3) 培養線維芽細胞を用いた in vitro 解析

Periostin が線維化を促進する生物学的活性を持っている可能性が示されてきている。In vitro において、Periostin が線維芽細胞に直接的に働いて ECM 産生を増強させるかを検討するため、皮膚線維芽細胞を serum free 下にリコンビナント Periostin で刺激し、type I collagen の発現を PCR および WB 法で測定した。Periostin は mRNA レベルでは type I collagen の発現を軽度上昇させ、それは Periostin のレセプターであるインテグリンの αv ブロッキングによって一部抑制された (図 5)。しかし、蛋白レベルでは Periostin 単独刺激による type I collagen 産生の増強は明らかではなかった。一方で、リコンビナント TGF β 存在下に Periostin で刺激すると、TGF β 単独刺激に比較して type I collagen の産生が蛋白レベルでも有意に増強した。よって、Periostin が TGF β による ECM 産生をさらに増強する作用があることが示唆された (図 6)



(lys: lysate, SUP: supernatant)

IL-13 や TGF β 刺激により線維芽細胞からの ECM 産生は増強する。一方で、同刺激は線維芽細胞における Periostin の産生刺激でもある。よって、IL-13 や TGF β からの ECM 誘導作用に Periostin が介在する可能性があり、Periostin を RNA 干渉法でノックダウンする方法で現在検討している。

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1件)

①Y. Yamaguchi, J. Ono, M. Masuoka, S. Ohta, K. Izuhara, Z. Ikezawa, M. Aihara, K. Takahashi. Serum periostin levels are correlated with progressive skin sclerosis in patients with systemic sclerosis. British Journal of Dermatology (2013) 168, pp717-725. Peer review. DOI 10.1111/bjd.12117

[学会発表] (計2件)

①Yamaguchi Y et al. Increased Periostin levels in patients with systemic sclerosis. International Investigative Dermatology 2013, May 8-11/2013. Edinburgh, UK.

②Yamaguchi Y et al. Increased Periostin levels in patients with systemic sclerosis. 76th ACR/ARHP Annual meeting. Nov 10-14/2012. Washington DC, USA.

[その他]

Dermatology Today 2013 vol.012

4月16日発行

<http://www.dermatology-today.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 由衣 (YAMAGUCHI YUKIE)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：60585264

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：