

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293174

研究課題名(和文) マウス肝線維化を抑制する新規インテグリン抗体作用機序解明と治療応用に向けた研究

研究課題名(英文) A novel anti-integrin monoclonal antibody that attenuates mouse liver fibrosis: Mechanism of action and therapeutic application

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) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：世界に先駆け作製したインテグリン  $\alpha 8 \beta 1$  阻害抗体(特願 2011-537260)は、マウス肝の実験で明瞭な抗線維化作用を示した。引き続き、インテグリン  $\alpha 8 \beta 1$  について、TGF- $\beta$  の弱い活性化、星細胞の活性化に伴う発現、筋線維芽細胞分化を誘導することを見出した(萌芽研究)。本研究では、医薬への展開の適否を判断するため、1) 肺および腎線維化モデルマウスにおける  $\alpha 8 \beta 1$  阻害抗体YZ3投与による抑制、2) ヒト肝炎・肝硬変組織における  $\alpha 8 \beta 1$  発現、3) 線維芽細胞特異的  $\alpha 8 \beta 1$  KOマウスの線維化抵抗性、4) 抗体のエピトープマッピングの4項目を観察し、有力な医薬シーズであることを確認した。

研究成果の概要(英文)：The first integrin  $\alpha 8 \beta 1$  blocking mAb (Patent 2011-537260) we have generated showed drastic effects on mouse hepatic fibrosis (Grant-in-aid for challenging exploratory research). We have analyzed  $\alpha 8 \beta 1$  and demonstrated its weak TGF- $\beta$  activation, expression on activated stellate cells, and induction of myofibroblastic differentiation. In the present study, to develop the mAb into a medical drug, we investigated anti-fibrotic effects on pulmonary and kidney fibrosis of the mAb,  $\alpha 8 \beta 1$  expression on human fibrotic livers, anti-fibrotic effect in fibroblast specific  $\alpha 8 \beta 1$  KO mice and epitope mapping of the mAb, which confirmed a potency of the mAb as a medical drug.

研究分野：内科学、分子病態学

キーワード：fibrosis antibody drug integrin myofibroblast stellate cell

## 1. 研究開始当初の背景

組織の線維化は、肺線維症、肝硬変などの致死疾患に繋がる病的な変化である。組織が何らかの原因で傷害を受けた際には、組織は生理的に修復されるが、それが過剰になった状態と理解されているが、メカニズムの詳細は不明である。しかしながら、組織における過剰なコラーゲンの沈着は共通して認められ、線維化形成の基本的な反応と考えられる。コラーゲンの産生は線維芽細胞から分化した筋線維芽細胞がおもに担っている。筋線維芽細胞は  $\alpha$ -smooth muscle actin を発現し弾性を獲得した特殊な線維芽細胞で、正常組織には存在しない。

## 2. 研究の目的

線維化の進行を根底的に止める方法は現在なく、死亡の原因となる病理変化の約半数を占めるとする報告がある。近年、ようやく線維症を適応とした薬剤が認可され治療に使用されるようになったが、進行の程度を抑制するに留まる。そこで、線維化のメカニズムを良く理解した上、より有効な薬剤の誕生が待たれている。我々は、マトリックス受容体インテグリン  $\alpha 8\beta 1$  の阻害抗体 YZ3 を作製し、線維化に対する効果を検討したところ有効性を認め、機序も一部解明した (萌芽研究 H24-25)。本研究ではその有効性に関する検討をさらに進めることを目的とした。

## 3. 研究の方法

以下の4点について検討した。

### 1) 肺および腎線維化モデルマウスにおける $\alpha 8$ 阻害抗体 YZ3 投与による抑制

肺はブレオマイシン投与、腎臓は尿管結紮により線維化を惹起、同時に抗体投与を開始した。

### 2) ヒト肝炎・肝硬変組織における $\alpha 8\beta 1$ 発現

肝移植のレシピエントの組織 (n=78) を定量 PCR および western blotting で解析した

### 3) $\alpha 8$ の線維芽細胞特異的 KO マウスの線維化抵抗性の検討

PDGFR $\beta$  のプロモーター下に Cre 遺伝子を持つ Cre Tg マウスと ITGA8 遺伝子に lox P を挿入した ITGA8<sup>flax/flax</sup> を交配して、目的のマウスを作製した。

### 4) 抗体のエピトープマッピング

本研究で使用した  $\alpha 8$  阻害抗体 YZ3 および同時に作製された他の5つのクローンのエピトープマッピングを行った。 $\alpha$  サブユニット阻害抗体の殆どは  $\beta$ -propeller ドメインの特定ループに結合するため、ホモロジーモデリング 3D 像から推察されるループ構造部位とその頂点および宿主 (ニワトリ) と抗原 (マウス) の  $\alpha 8$  の相同性を考慮して変異導入し、各変異体に対する抗体の認識変化を FACS で解析した。

## 4. 研究成果

### 1) 肺・腎の線維化に対する YZ3 の効果

肺、腎の線維化に関して、ACTA2, COL1A1 遺伝子 (それぞれ  $\alpha$ -SMA, Collagen Type I 遺伝子) の発現、ヒドロキシプロリン量、病理所見を指標として、YZ3 の効果を観察した。両線維化組織において、ACTA2, COL1A1 の発現量は正常組織に比べ上昇していたが、それは YZ3 投与によって抑制された。ヒドロキシプロリン量も同様で、さらに病理標本における組織線維化所見も、抗体投与により軽減していた。

### 2) ヒト肝線維症における $\alpha 8\beta 1$ 発現

定量 PCR によって、ヒト肝組織の線維化と ITGA8 遺伝子 ( $\alpha 8$  サブユニット) 発現の関連を検討した。正常 7, 肝炎 44, 肝硬変 27 例の検討で、肝炎、肝硬変と線維化の進行に対応して ITGA8 発現は上昇した。線維化の指標とされる ACTA2 および COL1A1 遺伝子も同様に上昇していた。

### 3) $\alpha 8$ 遺伝子改変マウスの線維化抵抗性

抗体の作用など、これまでの結果は、インテグリン  $\alpha 8\beta 1$  に線維化を促進する作用があることを強く示唆している。そこで、マウスで  $\alpha 8$  を除去した場合、線維化の程度が軽減するかどうかを確かめた。全身性の  $\alpha 8$  除去マウスは、腎臓の発生が悪く致死性であるため、線維芽細胞選択的に  $\alpha 8$  を欠失するコンディショナル KO マウスを作製した。線維芽細胞特異的な Cre リコンビナーゼプロモーターとして PDGFR $\beta$  を用いた。四塩化炭素誘導肝線維化をこのマウスで確かめたところ、線維化形成の程度に wild type mouse と比べて違いはなかった。線維芽細胞において  $\alpha 8\beta 1$  が機能していなくても、線維化は正常に形成された。このことは、線維化形成にとって  $\alpha 8\beta 1$  が重要でないことを示すと考えられた。しかし一方で、別の考え方として、線維芽細胞が  $\alpha 8\beta 1$  を発生時から欠損した状態でマウスは成長しており、他のインテグリンおよびその他の分子により、 $\alpha 8\beta 1$  の機能は完全に代償されていると考えられた。従って、 $\alpha 8\beta 1$  の機能阻害が線維化の抑制に繋がるか否かは、線維化の形成中あるいは形成開始と同時に機能を失う状態で確認する必要があると考えられた。

### 4) 抗体のエピトープマッピング

今回の一連の研究で、中心的役割を果たしたのは、 $\alpha 8$  阻害抗体である。インテグリン阻害抗体の生体内での効果は、作用様式によって異なるともいわれており、 $\alpha 8$  阻害抗体が競合的かアロステリックかを知ることは重要である。エピトープの同定は、その作用の差を反映すると考えられるため、得られた6クローンのエピトープを同定した。6クローンは CDR のアラインメントから3種類に分類され、クローン YZ3, YZ5, YZ26 の3種のエピトープを同定した。インテグリン  $\alpha$  サブユニットには  $\beta$  プロペラドメインがあり、概ねその一部に阻害抗体は結合する。そこで  $\beta$  プロ

ペラドメイン内の個々の結合可能ループに変異導入を行い、抗体の結合性の変化を確かめたところ、YZ3とYZ26はW2:41に結合し、YZ5はW2:41とW3:34の二つのループに結合した。今後、臨床的に有用な抗体を得るために、重要な情報となると考えられた。

## 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7件)

1. 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  $\alpha$ v integrin interaction. *J Gastroenterol*. 51:1161-1174, 2016. doi: 10.1007/s00535-016-1206-0 査読有
2. Bridget Sackey-Aboagye, Abby L Olsen, Sarmistha M Mukherjee, Alexander Ventriglia, Yasuyuki Yokosaki, Linda E Greenbaum, Gi Yun Lee, Hani Naga, Rebecca G Wells. Fibronectin extra domain A promotes liver sinusoid repair following hepatectomy. *PLoS one* 11: e0163737, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0163737 査読有
3. Gina M Many, Yasuyuki Yokosaki, Kitipong Uaesoontrachoon, Peter P Nghiem, Luca Bello, Sherry Dadgar, Ying Yin, Jesse M Damsker, Heather B Cohen, Joe N Kornegay, David M Mosser, Kanneboyina Nagaraju, Eric Hoffman. OPN-a induces muscle inflammation by increasing recruitment and activation of pro-inflammatory macrophages. *Experimental Physiology* 101:1285-1300, 2016. doi: 10.1113/EP085768. 査読有
4. 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  $\alpha$  subunits. *Sci Rep* 5:13756, 2015. doi: 10.1038/srep13756. 査読有
5. 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. 査読有
6. Yoshiko Nakagawa, Tetsushi Sakuma, Norihisa Nishimichi, Yasuyuki Yokosaki, Noriyuki Yanaka, Toru Takeo, Naomi Nakagata, Takashi Yamamoto. Ultra-superovulation for the CRISPR-Cas9-mediated production of gene-knockout, single-amino-acid-substituted, and floxed mice. *Biology Open* 5:1142-8, 2016. doi: 10.1242/bio.019349. 査読有
7. 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. *Ann Am Thorac Soc* 12: S74, 2015. doi: 10.1513/AnnalsATS.201406-256MG 査読有

[学会発表] (計18件)

1. Nishimichi N, Kanno K, Sentani K, Sugiyama A, Ito M, Otani M, Hanaoka M, Yasui W, Yokosaki Y. Integrin  $\alpha$ 8 $\beta$ 1 promotes tissue fibrosis via differentiation of myofibroblast -a potent therapeutic target on fibrosis-. **Gordon Research Conference** Jan 29-Feb 2, 2017, Ventura, CA, USA.
2. Otani M, Nishimichi N, Ito M, Hanaoka M, Yoshizumi M, Yokosaki Y. Identification of conformational epitopes for integrin blocking mAbs against  $\alpha$ 3 and  $\alpha$ 5 subunits. **Gordon Research Conference**, Jan 29-Feb 2, 2017, Ventura, CA, USA.
3. Yokosaki Y, Nishimichi N, Ito M. Transglutaminase induced Polymeric  $\alpha$ -synuclein binds to integrin  $\alpha$ 9 $\beta$ 1. **Gordon Research Conference**. July 10-14, 2016, Girona, Spain.
4. 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**, Mar 6-10, 2016, Vancouver Canada.
5. 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.
6. 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 Canada.
7. 西道 教尚、伊藤 益美、大谷 水景、花岡 みずほ、原山 郁花、横崎 恭之。インテグリン機能阻害モノクローナル抗体はインテグリンのリガンド結合ドメイン内特定領域を認識する。 **日本分子生物学会年会**、2016.11.30-12.2、横浜 (優秀ポスター賞)
8. 大谷 水景、西道 教尚、伊藤 益美、花岡 みずほ、吉栖 正生、横崎 恭之。ホモロジーモデリングによる立体構造を参照とするインテグリン機能阻害抗体のエピトープ同定、 **日本分子生物学会年会**、2016.11.30-12.2、横浜
9. 伊藤 益美、西道 教尚、大谷 水景、花岡 みずほ、横崎 恭之。  $\alpha$ -シヌクレインはインテグリン  $\alpha$ 9 $\beta$ 1 のリガンドである、 **日本分子生物学会年会**、2016.11.30-12.2、横浜
10. 阿賀康弘、西道教尚、吉栖正生、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 -第二報-, 日本分子生物学会年会、2016.11.30-12.2、横浜

11. 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
12. 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
13. 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. **BMB 2015** (生化学会・分子生物学会合同年会)、2015. 12.1-4、神戸
14. 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. **BMB 2015** (生化学会・分子生物学会合同年会)、2015. 12.1-4、神戸
15. Yokosaki Y, Nishimichi N, Kanno K, Sentani K. Inhibition Of Pulmonary Fibrosis By Integrin  $\alpha 8 \beta 1$  Blocking Antibody And TGF $\beta$ -Independent Myofibroblast Differentiation By  $\alpha 8 \beta 1$  Mediated Signal, **American Thoracic Society**, May 16-21, 2014, San Diego, CA, USA
16. Mark NM, Hung C, Chow Y-H, Kennewick K, Lewis S, Nishimichi N, Yokosaki Y, Hinz B, Schnapp LM.  $\alpha 8 \beta 1$  Integrin and mechanical traction are necessary for activation of TGF- $\beta$  in fibroblasts, **American Thoracic Society**, May 16-21, 2014, San Diego, CA, USA
17. 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. 日本分子生物学会、2014.11.25-27、横浜
18. 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ーズ インテグリン  $\alpha 8 \beta 1$  阻害抗体. 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

[その他]

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/integrin/Home.htm>

1

## 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

茶山 一彰 (CHAYAMA KAZUAKI)  
広島大学・医歯薬保健学研究院・教授  
研究者番号：00211376

正木 崇生 (MASAKI TAKAO)  
広島大学・病院・教授  
研究者番号：30397913

仙谷 和宏 (SENTANI KAZUHIRO)  
広島大学・医歯薬保健学研究院・講師  
研究者番号：30508064

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

辻野 和之 (TSUJINO KAZUYUKI)  
カリフォルニア大学サンフランシスコ校・  
肺バイオロジーセンター・博士研究員