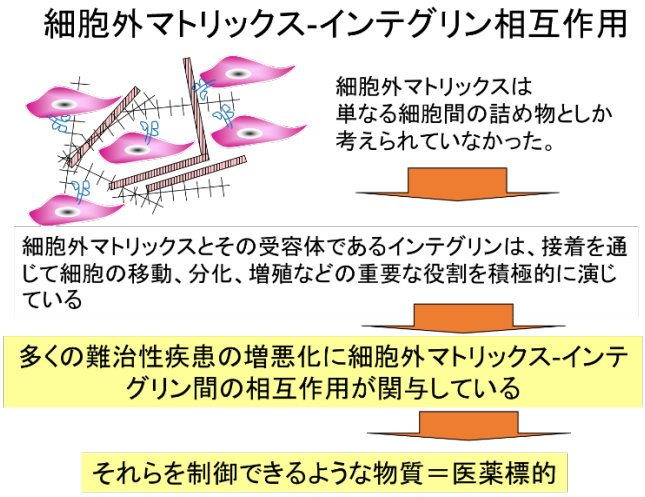
福山大学特別研究
「細胞接着分子を標的とした自己免疫疾患の新規治療法の確立」
報告書

研究代表者
福山大学薬学部薬学科
分子免疫学研究室
教授・今　重之

序文

生体組織は、細胞と細胞外マトリックスから構成されている。細胞外マトリックスは、細胞間隙に存在することから、細胞の隙間を埋める物質と考えられていたが、その後、細胞外マトリックスと細胞膜上に発現する細胞外マトリックスの受容体であるインテグリン間の相互作用により、細胞外マトリックスは細胞の生存や増殖、分化に積極的に関与することが明らかになっている。さらに、過剰な細胞外マトリックスとインテグリン間相互作用はがん、炎症、線維化など様々な難治性疾患の増悪化に関与することが分かってきた。そこで、本研究は、新規創薬への応用を目指した細胞外マトリックスとインテグリン間相互作用を人為的に阻害できる物質の開発を目的に研究を進めた。



以下に具体的な研究内容を示す。

(1) α4 インテグリンスプライシングバリアント α4SV を用いた治療薬の開発

(2) インテグリン活性化阻害剤の開発

(3) 抗オステオポンチン抗体を用いた NASH 増悪化抑制戦略

(4) 自己免疫疾患におけるネフロネクチンの役割

それぞれの研究は、3 年間の予定助成期間であったが、2 年間に短縮された。想定外の 2 年間であったが大きく研究発展させることができた。具体的には約２年間で国際共同研究を含め論文 8 報[1-8]、総インパクトファクターが約 50 となる成果を上げることができた。

次ページ以降にそれぞれの研究についての成果報告を行う。尚、本成果は、未発表のデータを多く含むため、公開は不可である。Confidential 下での報告書である。

以下、各研究テーマについての成果報告を示す。

「(1) α4 インテグリンスプライシングバリアント α4SV を用いた治療薬の開発」と「(2)インテグリン活性化阻害剤の開発」についての結果報告は、共通する目的により進めたことから同時に記載する。

背景

緻密なバランスの上に成り立つ免疫系の破綻は、自己免疫疾患などの疾患を引き起こす。自己免疫疾患は、生物学的製剤の発展により新たな治療法が開発されてはいるものの、未だに有効な治療薬のない患者が多く存在することから、新たな治療法の確立は急務である。

細胞外基質との細胞接着を司る細胞膜貫通タンパク質群であるインテグリン(図 1)は、多くの難治性疾患発症に関与することから多くの阻害剤が開発されているが、ほとんど医薬まで発展していない。その理由として、インテグリン阻害剤は標的インテグリンと複数のリガンドとの相互作用を完全に阻害してしまうことで生体に強い影響を与えてしまうことが原因と考えられている。インテグリンが創薬標的分子群であることは疑いようがないものの、現状のアプローチによるインテグリン阻害剤の開発は重篤な副作用の危険性が常に付きまとう。

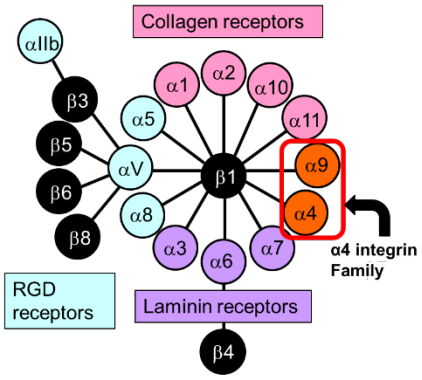


図1:インテグリンファミリー
α4とα9インテグリンは同一ファミリーに属する

インテグリン阻害剤が創薬に繋がらない原因が、インテグリンとリガンドとの相互作用を完全に阻害することが原因であるならば、その相互作用を完全には阻害しない次世代のインテグリン阻害剤を開発することで医薬として発展できるのか、が本研究の問である。

目的

申請者らは、同一のインテグリンファミリーに属し(図 1)、自己免疫疾患発症に関与するα4 インテグリン(α4)とα9 インテグリン(α9)に着目して研究を進めた結果、インテグリンとリガンドとの相互作用を完全には阻害しない(1)内在性分子α4SV と(2)抗甲状腺薬メチマゾールを見出した。(1)α4SV は分泌型α4 スプライシングバリアントである。α4 とα9 は、数種のリガンドを共有するが、α4SV はα4 のみならずα9 とそれらの共有リガンド(オステオポンチン等)との細胞接着を抑制することを明らかにした。一方で、VCAM-1 等のα4 特異的リガンドに対しては阻害効果を示さないことからα4SV はリガンド選択性を有する阻害分子であることが分かった。また、α4SV の

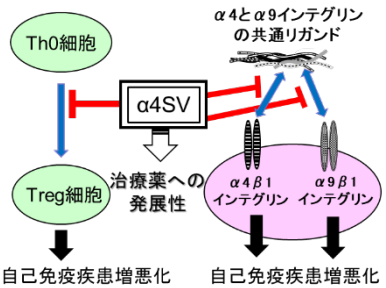


図2:α4SV研究の概略図
α4sは、α4とα9インテグリン機能阻害の他にTreg分化を抑制することで自己免疫疾患抑制効果を有することを示す

結合分子として TGF-β を見出した。TGF-β は、自己免疫疾患に関与する T 細胞サブセット Treg 分化に重要な因子であることから[9]、α4SV Th17 分化に影響を与える可能性を見出した（図 2）。

(2) インテグリン不活性化型から活性化の段階を阻害できれば、不活化型インテグリンには作用しない新たなインテグリン阻害剤になることが提唱されている。申請者は α9 スプライシングバリアント SF α9 が、α9 特異的活性化分子であることを報告したことから[10]、SF α9 機能阻害剤は α9 活性化阻害剤になると予想した。SF α9 結合分子として薬物代謝酵素 FMO4 を見出し、汎 FMO 阻害剤としてメチマゾールが存在することから、メチマゾールが α9 の活性化阻害剤になり得る可能性を見出した（図 3）。

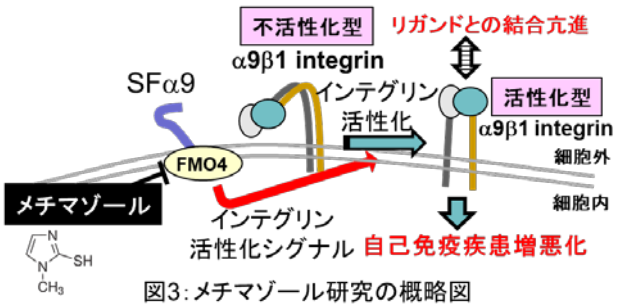


図3：メチマゾール研究の概略図
メチマゾールはSFα9下流のFMO4阻害によりα9インテグリン活性化を抑制することで自己免疫疾患抑制効果を有することを示す

そこで本研究では、α4SV やメチマゾールが持つ新たなインテグリン阻害機能が自己免疫疾患抑制効果を示すことを明らかにし、創薬への発展性を見出すことを目的とする。

実験方法

細胞接着試験

ELISA 用 96 well プレートにインテグリンリガンドを固相し 4℃で一晩静置した後、0.5% BSA を含む DMEM を用いて室温で 1 h ブロッキングを行った。ブロッキング液を除去後、2.5×10^5 cells/ml になるように 0.25% BSA を含む DMEM に調整した細胞を 200 μl /well ずつ播種し、37℃、1 h インキュベーションした。各ウェルを PBS で洗浄し、リガンドと接着した細胞を染色液（0.5% Crystal violet、20% ethanol）で 30 min 固定・染色し、20%酢酸で転溶させ、プレートリーダー（Bio-Rad）を用いて吸光度を測定（Absorbance：595 nm）することで定量化した。細胞接着試験に用いたリガンドを以下に示す。

FN	RGD 依存性細胞接着
OPN	OPN のα4/α9 インテグリン接着領域（SVVYGLR）
pp-vWF	フォンヴィレブランド因子のα4/α9 インテグリン接着領域（CQDHSFSIVIETVQ）
FN-CS1	フィブロネクチン CS1 変異体のα4 インテグリン接着領域（VTLPHPNLHGPEILDVPST）
VCAM-1	α4 依存性細胞接着
TN-C	テネイシン C のα9 インテグリン接着領域（AEIDGIEL）

実験的自己免疫性脳脊髄炎 EAE モデル

7～12 週齢 C57BL/6 マウスに対して MOG_{35-55} ペプチド（アミノ酸配列 MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK）（1 mg/ml）と CFA（H37Ra 結核死菌）（5

mg/ml）を 1:1 で混合して作製したエマルジョンを尾根部に左右 2 か所に分けて皮下投与（200 μl/匹）し、ペプチド感作当日及び 2 日後に百日咳毒素を 400 ng ずつ尾静脈投与を行った。臨床症状評価に関しては以下のスコアを用いて評価した（0:臨床症状無し、1:尾部の軽麻痺、2:運動失調、3:後肢の軽麻痺、4:後肢の麻痺、5:四肢麻痺、6:瀕死）。α4SV は MOG 免疫の前日及び 2 日後に 25 μg/匹を腹腔内に投与した。

DSS 誘導大腸炎モデル

7～12 週齢 C57BL/6 マウスに 3% となるようにデキストラン硫酸ナトリウムを添加した水を自由飲水させることで発症させた。α4SV は DSS 水の飲水の前日及び３日後に 50μg/匹を腹腔内に投与した。各実験群のマウスに対し、体重の減少（スコア: 0, 減少無し; 1, 0-5%; 2, 6-10%; 3, 11-15%; 4, 16-20%; 5, 21-25%; 6, 26-30%）、便の硬さ（スコア: 0, 通常; 1, 軟便; 2, 水溶便）、および血便（スコア: 0 血便無し; 1, 少量血便; 2, 多量血便）についてスコア付けし、スコアの合計を DAI スコアとした。スコア付けは、投与０日目から９日目まで毎日行った。

研究結果

(1) α4 インテグリンスプライシングバリアント α4SV の結果

α4SV の構造と発現を図４に示す。α4SV は野生型α4 インテグリンのＮ末型 185 アミノ酸の後にイントロン由来の新たなアミノ酸を有する構造を有する。野生型α4 インテグリンは、脾臓や胸腺、白血球といった免疫に関与する臓器や細胞に発現しているが、α4SV は、白血球に選択的に発現することが分かり、野生型α4 インテグリンとα4SV の発現様式は異なっていることが分かった（図５）。

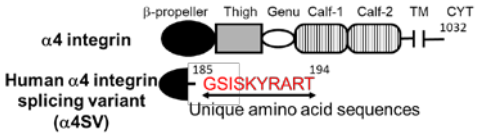


図４：ヒトa4インテグリンスプライシングバリアントα4SV

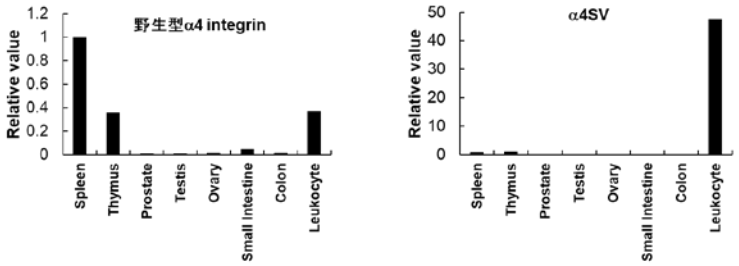


図５：ヒト正常組織におけるα4SV mRNA発現

α4SV は、α4 インテグリンスプライシングバリアントであることから、α4 インテグリンのリガンドと結合すると予想できる。そこで、α4SV タンパク質を精製し、リガンドとの結合能を検討した、その結果、α4SV は、オステオポンチン（OPN)とフォウィルブランド因子(pp-vWF)に対して結合する能力を有することが分かった（図６）。また、α4SV の C 末の特異的アミノ酸配列を欠損させた変異体（α4SVΔ10）ではリガンドとの結合能が低下していたことから、C 末の特異的アミノ酸配列は、α4SV の結合能に重要な機能を有することが分かった。

また、α4SV が結合する OPN、EIIIA、pp-vWF はα4 インテグリンのみならずα9 インテグリンのリガンドでもあることから、α4SV はα9 インテグリン機能にも影響を及ぼす可能性を示唆する結果を得た。

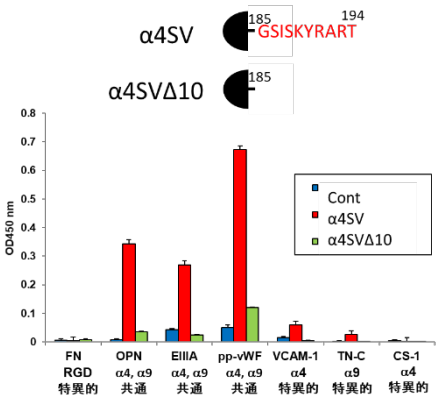


図6：α4SVとインテグリンリガンドとの結合実験

α4SV 機能を明らかにするため、細胞接着試験を行った。α4SV は、α4 とα9 インテグリン両者に共通するリガンドと結合したことから、α4 インテグリン発現細胞（α4/CHO）とα9 インテグリン発現細胞（α9/NIH3T3）の両者を用いた細胞接着試験を行った。その結果、α4SV は、α4 インテグリンとα9 インテグリンの共通するリガンド（OPN, pp-vWF）とα4/CHO とα9/NIH3T3 との接着を有意に抑制できる機能を有していた（図 7）。興味深いことに、α4SV は、α4 やα9 インテグリンの特異的リガンド（例えば FN-CS1 や TN-C）に対しては阻害能を有していることから、α4SV は「インテグリンとリガンドとの相互作用を完全には阻害しない」抗インテグリン薬になりうる可能性を示すことができた。

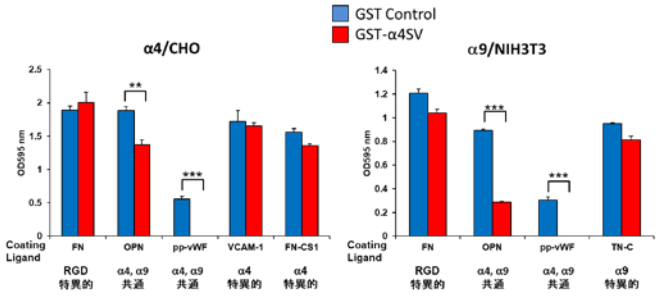


図7：α4SVはα4, α9インテグリンを介した細胞接着を阻害する

α4SV が実際の疾患動物モデルの病態を抑制できるかについて検討を行った。α4 インテグリンが関与する疾患として、多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎モデル（EAE）とデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘導性大腸炎モデルを用いて検討を行った。α4SV 投与により EAE の中枢系の麻痺を指標とした臨床スコアを有意に抑制することができた（図 8）。また、DSS 誘導大腸炎モデルにおいてもα4SV 投与は DAI スコアを抑制でき、腸管の長さの減少も抑制することができた（図 9）。大腸における遺伝子発現変化をリアルタイム PCR で検討した結果、α4SV は免疫抑制サイトカインである IL-10 発現の増強と大腸炎増悪化因子である IL-17 発現を抑制できることが分かった。さらに、大腸組織の HE 染色において α4SV 投与により上皮細胞の消失や炎症細胞の大腸内への浸潤が抑制されていることを示すことができた（図 10）。

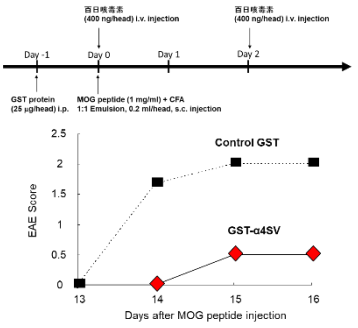


図8：α4SVによるEAE抑制効果

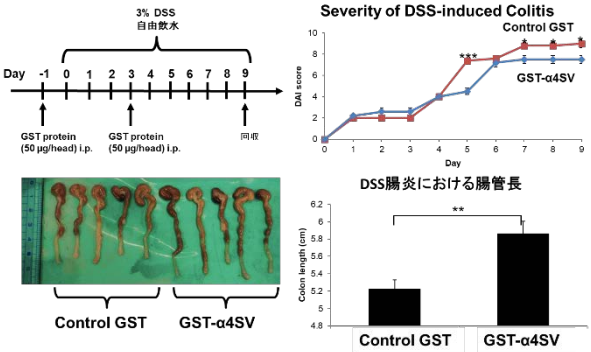


図9：α4SVによるDSS誘導大腸炎抑制効果（スコアと腸管長）

α4SV は分泌タンパク質であり血中にも存在する可能性がある。当研究室では既にα4SV のサンドイッチ ELISA の確立に成功していることから、北海道大学医学部整形外科との共同研究において、関節リウマチ患者（RA）と変形性関節症患者(OA)の血中α4SV 発現量の比較を行った。RA は自己免疫疾患であり、OA は自己免疫疾患ではない疾患である。その結果、RA 患者の血中では、α4SV は低下していることが分かった（図 11）。尚、本研究は、北海道大学在籍時の成果であり、北海道大学の倫理委員会の承認済み研究である。

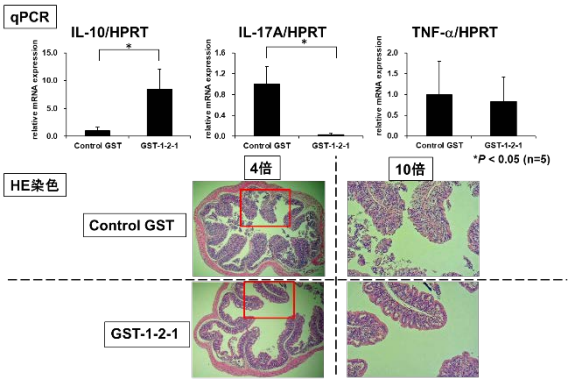


図10：α4SVによるDSS誘導大腸炎抑制効果（遺伝子発現と病理）

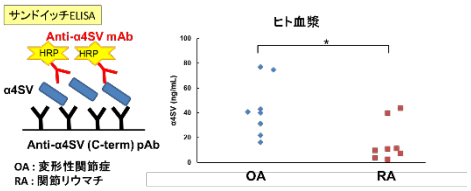


図11: 関節リウマチ患者における血中α4SV濃度

α4SV の疾患抑制効果をさらに詳細に解析するため、α4SV の結合分子の探索を行った。α4SV タンパク質を精製し（図 12）、質量分析を行った結果、α4SV 結合タンパク質の候補として、TGF-β を見出すことができた（図 13）。TGF-β は免疫抑制 T 細胞として知られる制御性 T 細胞(Treg)に関与する増殖因子である。α4SV と TGF-β の結合を調べるために、α4SV を NIH3T3 細胞に導入し、培養上清からα4SV を精製した。精製α4SV に TGF-β が結合していることを TGF-β の検出系である TMLC 細胞を用いて検討した。TGF-β シグナルは下流の Smad を介して PAI-1 転写が開始される。TMLC 細胞は、PAI-1 のプロモーターとルシフェラーゼとの融合遺伝子を恒常的に発現している細胞であることから TGF-β 活性を定量化できる細胞である（図 14）[11]。精製α4SV を TMLC 細胞に添加した結果、ルシフェラーゼの発光を検出することができたことから（図 15）、α4SV と TGF-β は結合していることを確認することができた。α4SVΔ10 も TGF-β に結合する活性は有することが分かった。

図12: 質量分析に使用した精製α4SVタンパク質

図13: 質量分析で得られたα4SV結合分子候補

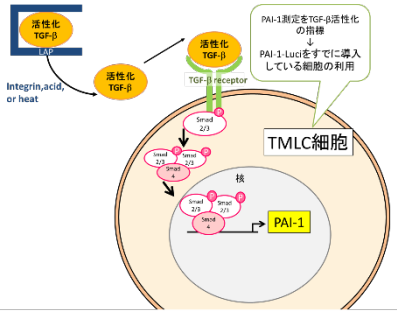


図14：TGF-βシグナル伝達機構

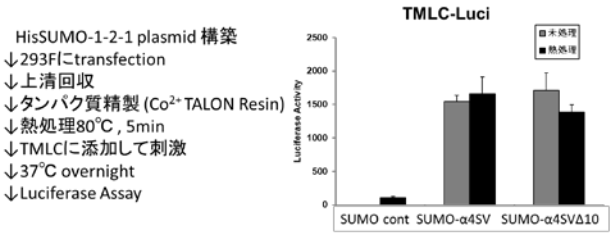


図15:精製α4SVタンパク質を用いたTGF-β活性化試験

α4SV の TGF-β発現に与える影響を検討した。NIH3T3 細胞にα4SV 遺伝子を導入した結果、上清中に有意な TGF-β発現の亢進がみられた（図 16）。さらに、TGF-βによるα4SV 発現に与える影響を shRNA を用いた TGF-β ノックダウン細胞を作製することで検討した。TGF-βを効率的にノックダウンできた 293T 細胞では、α4SV の発現を抑制することが分かった（図 17）。これらの結果から、α4SV と TGF-βは相互に発現を亢進させる分子であることが分かった。

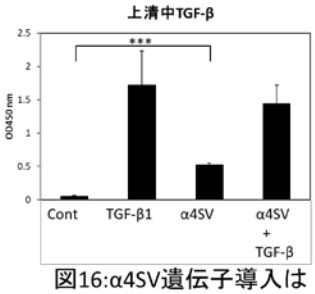


図16:α4SV遺伝子導入は TGF-β分泌を亢進させる

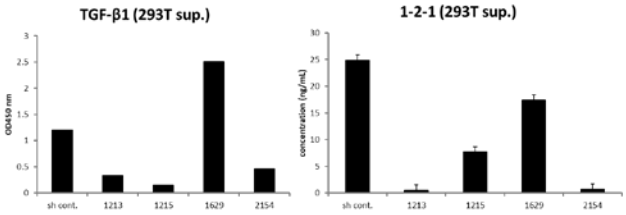


図17:hTGF-β1ノックダウン細胞はα4SV分泌を抑制する

shTGF-β1/293T 構築
↓ノックダウン効率チェック (TGF-β1 sandwich ELISA)（左図）
↓上記の細胞にtransfection (HisSUMO-1-2-1/pHEK293I, リン酸カルシウム法)
↓1-2-1分泌量測定 (1-2-1 sandwich ELISA)（右図）

考察

主に白血球に発現するα4 インテグリン α4 は、細胞接着や血管外遊出に関わることで様々な自己免疫疾患を増悪化させる。α4 に対する抗体は、多発性硬化症やクローン病を標的とした抗体医薬として著効を示している一方で、死亡例や重篤な副作用患者が続出したことから、現在は限られた条件に適合する患者のみに投与がなされている。つまり、本抗体医薬の恩恵を受けられない患者が多く存在する。そのような現状の中で、我々は、α4 のスプライシングバリアント α4SV を同定し、α4SV タンパク質が既存薬よりも生体に優しい次世代の創薬へと繋がる可能性を見出した。α4SV は細胞外へ分泌され一部の α4 リガンドと結合することで、α4 とリガンドとの接着を抑制する機能を有することが分かった。さらに、α4SV が結合する α4 リガンドは α9 インテグリン（α9）のリガンドでもあることが分かり、α4SV は α9 を介する接着も抑制することを見出した。

α4 と α9 は数種のリガンドを共有し類似した機能を有する。多くの細胞において、両インテグリンは同一細胞上に発現することから、片方を阻害してももう一方が相補してしまうことが予想され、効率的な疾患抑制効果のためには両インテグリンの機能を同時に阻害する必要性が考えられている。しかしながら、前述の通り α4 機能阻害は重篤な副作用の危険性があり、α9 に関しても欠損マウスではリンパ管形成不全により早期に死亡することから、両インテグリンの阻害剤の開発は現実的ではない。α4SV は、α4 と α9 両インテグリンの全ての機能をではなく、一部のリガンドとの接着を阻害するというこれまでのインテグリン阻害剤には存在しない全く新しい阻害様式を示す。この新しい阻害様式は生体内分子機能であることから、生体にとって意義のある機能と考えられる。

質量分析によりα4SV 結合分子を探索した結果、TGF-β を同定した。α4SV と TGF-β を細胞に共発現させると α4SV の細胞外分泌が亢進し、さらに TGF-β はα4SV と複合体を形成することにより TGF-β 受容体への結合が抑制されることを明らかにした。TGF-β は免疫抑制に関与する Treg の分化に関わる分子であることから、

α4SV による自己免疫疾患抑制効果は、α4、α9 インテグリン接着抑制とさらに Treg の影響があると予想できる。

今後、α4SV による Treg 分化への影響を明らかにした上で、論文作製を進める。

⑵インテグリン活性化阻害剤の開発

α9 インテグリンは、自己免疫疾患の増悪化に密接に関与することから医薬標的として注目されている分子である。申請者はα9 インテグリン活性化に関与する新規分子として SFα9 を見出しており、この結果から SFα9 機能阻害剤を作製することで、間接的に α9 インテグリン活性化を抑制できる新しい抗インテグリン薬の開発に繋がると考えた。そこで、SFα9 結合分子の探索を試みた結果、SFα9 結合分子として flavin-containingmonooxygenase4 (FMO4) の同定に成功した。FMO 阻害剤として抗甲状腺薬メチマゾールが存在することから、メチマゾールによるα9 インテグリン機能への影響を検討した結果、メチマゾールは SFα9 による α9 インテグリン活性化を抑制できることを明らかにした。本知見から、メチマゾールは経口投与可能なα9 インテグリン活性化阻害剤となり得ると考えた。

そこで本研究では、メチマゾールによるα9 インテグリンが関与する自己免疫疾患マウスモデルでの疾患抑制効果を明らかとすることで、副作用の少ない新規薬理作用を有する治療薬としての発展性を得ることを目的として研究を進めた。

方法

Methimazole による自己免疫疾患抑制効果

α9 インテグリンは、リウマチ関節炎や自己免疫性脳脊髄炎モデルの発症、増悪化に関与することを我々は報告している[12, 13]。そこで、メチマゾールをこれらモデルの腹腔内に投与することによる阻害効果を検討した。関節リウマチモデルは、コラーゲン II に対する抗体カクテルと LPS を併用した CAIA(Collagen Antibody-Induced Arthritis)モデルを BALB/c マウスを用いて発症させた。自己免疫性脳脊髄炎モデル EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis)は、ヒト多発性硬化症のマウスモデルであり、Myelin-oligodendrocyte glycoprotein（MOG）ペプチドと百日咳毒素を C57BL/6 マウスに投与することで発症させた。

結果

メチマゾールによる自己免疫疾患治療効果をリウマチ関節炎と多発性硬化症モデルを用いて検討した。メチマゾールのコントロールとしては PBS を用いた。メチマゾール投与により、マウス関節炎モデル CAIA に関しては、手脚の腫脹を顕著に抑えられることが分かった（図 18)。多発性硬化症モデル EAE に関しては、EAE の特徴である尾の麻痺や運動失調をメチマゾール投与によりほぼ完全に抑制することができた（図 19)。我々はこれまで抗α９インテグリン抗体を開発しており、リウマチ関節炎や多発性硬化症モデル抑制効果を示していることから、メチマゾールの自己免疫疾患治療効果は抗α９インテグリン抗体の治療効果と相関している。メチマゾールが新規インテグリン阻害剤となる可能性を見出すことができた。

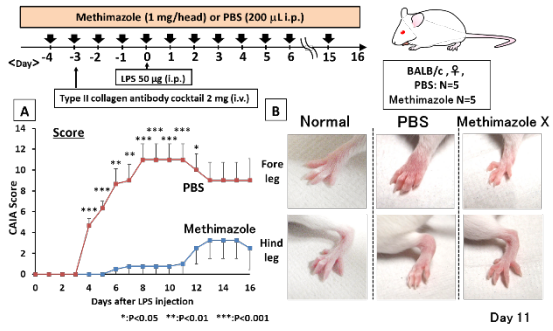


図18:メチマゾールによる関節炎抑制効果

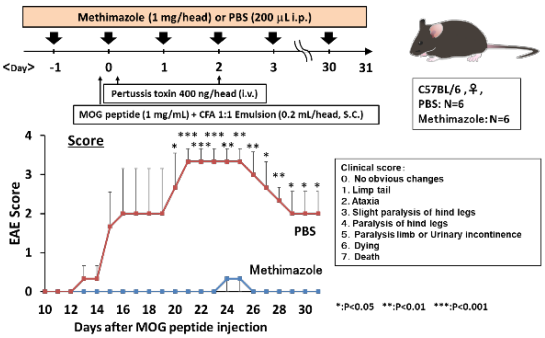


図19:メチマゾールによるEAE抑制効果

しかしながら、メチマゾールをマウスに投与すると大きな体重減少や白血球減少効果等の重篤な副作用がある。そこで、メチマゾール類縁体を合成することで、副作用が少なく自己免疫疾患抑制効果を有する化合物が合成できると考えた。そこで、図 20 に示すメチマゾール類縁体を合成し、現在、α9 インテグリン依存性細胞接着試験を用いてα9 インテグリン活性化抑制能を有するメチマゾール類縁体のスクリーニングを行っている。

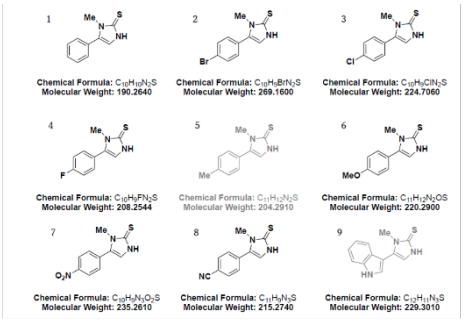


図20:メチマゾール類縁体

類縁体5と9については現在、作製中

考察

本研究では、メチマゾールを前投与（予防的投与）することで自己免疫疾患を著効に抑制できることを見出したが、今後は疾患発症後投与（治療的投与）で疾患抑制効果得られるかを検討する必要がある。また今回、マウスへの投与量はヒトにおける投与量の 10 倍以上の血中濃度となるように投与しているが、合成したメチマゾール類縁体の中でα9 インテグリン活性化抑制効果を有する化合物が得られたら、当該化合物を用いてより濃度の低い状態で投与して自己免疫疾患抑制能を有することを明らかにする。さらには体重減少等の副作用抑制を有することも確認する予定である。

メチマゾールは甲状腺機能亢進症の治療薬として使われている。メチマゾールと自己免疫疾患との関連は報告されているが[14]、具体的な治療メカニズムは示されていない。今回合成したメチマゾール類縁体が副作用の少ない自己免疫疾患抑制能を有することができたならば、新たな薬効を示す新薬への発展へと繋げることが可能となる。

⑶抗オステオポンチン抗体を用いたNASH増悪化抑制戦略

背景と目的

メタボリックシンドロームの代表的な表現系である脂肪肝の悪化に伴い進行する非アルコール性脂肪肝炎（NASH）は、有効な治療法が殆ど存在しないことからアンメット・メディカル・ニーズの代表的な疾患の1つとして知られる。NASHは一定の割合で肝硬変、肝細胞癌へと進行する疾患であり、今後も増加が見込まれる疾患であることから、治療法の確立は喫緊の解決すべき問題となっている。NASH は主に肥満者に認められるが、これは、以下のステップを介すると考えられている。

① 肥満者の腸内細菌叢の異常が生じ、エンドトキシン量が増大する。肥満者の肝クッパ-細胞はエンドトキシンの感受性が亢進することから、増大したエンドトキシンに対して肝クッパ-細胞が反応して活性化する。
② 肝クッパ-細胞が各種炎症性サイトカイン等を誘導し、肝臓内に炎症細胞を遊走させ、 慢性炎症を引き起こす。
③ 肝臓内に浸潤した炎症細胞が細胞障害を引き起こし線維化の誘導が起こる。
① から③のステップと同時に、過剰な脂肪がNKT細胞を活性化させ、肝細胞に脂肪を取り込ませ、脂肪化した肝細胞はリンパ球に攻撃されて肝臓にダメージを与える。

NASH 進展に慢性炎症や線維化が大きく関与するのであれば、慢性炎症や線維化の両方に関与する分子の機能を抑制することで、NASH 病態抑制効果を示すことができると考えた。

当研究室では細胞外マトリックスであるオステオポンチン(OPN)に着目した研究を進めており、自己免疫性肝炎モデルであるConcanavalin A誘導肝炎や関節リウマチ等の慢性炎症の増悪化、肺や心臓の線維化にOPNが関与することを報告している[15-17]。OPN は肝線維化に関与する肝星細胞の活性化に関与することも報告されている[18, 19]。

NASH モデルは、発症までに 6～8 週という長期間要するモデルであることから、ウサギやラット等の異なる種由来の抗体を投与すると、その抗体に対する抗体ができてしまい有効な抗体価を保持することが難しくなる。当研究室では抗マウスOPNマウスIgGとなるような抗体（35B6）を作製することに成功している。そこで、本抗体によるNASH進展の抑制効果を示すことが本研究の目的である。

方法

NASHモデルの確立

NASH モデルは、C57BL/6 マウスにコリン欠乏メチオニン減量高脂肪飼料（CDAHFD）を 6～8 週間給餌させることで発症させる。NASH の病態評価は血中ALT や肝組織の病理学的検討、肝臓内の炎症性サイトカインや線維化マーカー等で評価する。

抗 OPN 抗体 35B6 の NASH モデルへの関与の解明

NASH モデルは、発症までに 6～8 週という長期間要するモデルであることから、ウサギやラット等の異なる種由来の抗体を投与すると、その抗体に対する抗体ができてしまい有効な抗体価を保持することが難しくなる。本研究で使用する抗 OPN 抗体 35B6 はマウス IgG 抗体であることから、長期間抗体価を保持させることが可能というメリットを有する。そこで、35B6 は、CDAHFD を給餌の期間中（6～8 週）、週二回腹腔内に投与することで、抗 OPN 抗体の NASH 進展抑制効果を明らかにする。

結果

NASH モデルの肝臓中での OPN 発現を mRNA レベル、タンパクレベルで検討を行った。リアルタイム PCR、ELISA、ウエスタンブロット解析により、OPN は、NASH モデルで発現亢進することが分かった（図 21A, B）。OPN 受容体の発現も検討した。α4 インテグリンとα9 インテグリンの NASH における発現は、α4 インテグリンは有意に亢進し、α9 インテグリンに関しては有意ではないが発現が亢進する傾向がみられた（図 21C）。

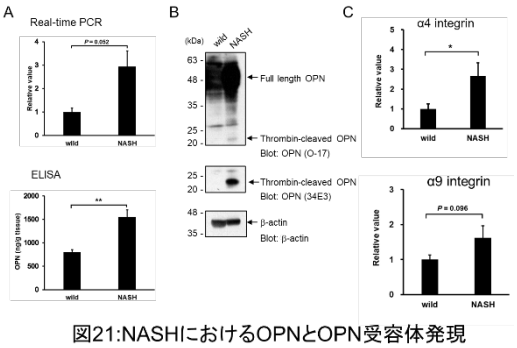


図21:NASHにおけるOPNとOPN受容体発現

抗 OPN 抗体 35B6 による NASH 進展抑制効果について検討を行った。35B6 投与スケジュールを示す（図 22A）。35B6 は、CDAHFD 給餌中の体重変化には影響を及ぼさなかったが（図 22B）、肝障害マーカーである ALT に関しては、35B6 投与により有意ではなかったが抑制傾向が見られた（図 22C）。

8 週間給餌後の肝臓組織像を示す。HE 染色では、脂肪変性と風船様肝細胞、炎症細胞の浸潤を見ることができるが、35B6 投与により脂肪変性と風船様肝細胞の形成には差異を見出すことができなかった（図 22D, E, F）。一方で、炎症細胞の浸潤は有意に抑制することが分かった（図 22G）。線維を染色できるシリウスレッド染色では、35B6 投与により線維化を有意に抑制できることを明らかにした（図 22D, H）。さらに抗コラーゲン I 抗体を用いた免疫染色（図 22D）やコラーゲン I の mRNA のリアルタイム PCR（図 22I）からも 35B6 によるコラーゲン I の抑制効果を明らかにした。

最後に、炎症と線維化のメディエーターである TNF-αとα-SMA の肝臓内の発現をリアルタイム PCR で検討した結果、両者とも 35B6 投与により有意に抑制できることが分かった（図 22J）。

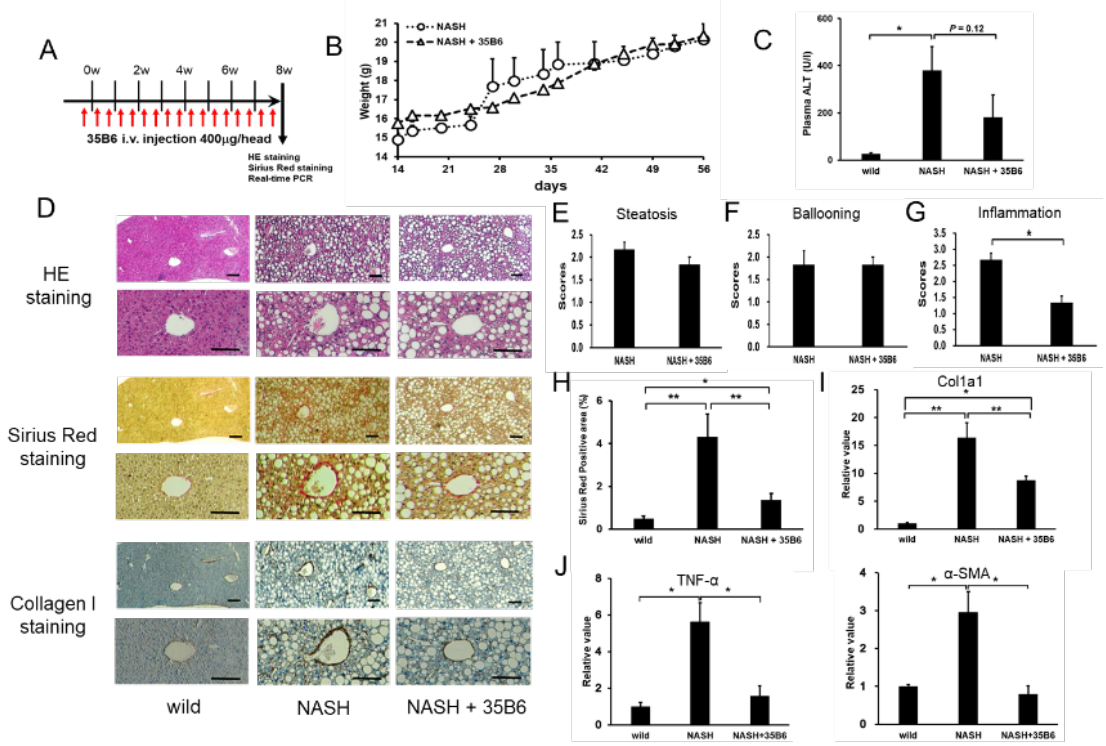


図22:35B6のNASH抑制効果

考察

35B6 投与により NASH の炎症細胞浸潤と線維化を抑制することができた。ただ、脂肪変性と風船様肝細胞の形成には影響を与えなかったことから、脂肪変性と風船様肝細胞の形成は OPN とは異なる分子が関与すると推察できる。また、本研究から OPN が炎症細胞浸潤と線維化に関与することを明らかにすることができたが、OPN の炎症細胞浸潤と線維化に関わる受容体は不明である。OPN 受容体であるαvβ3 は、線維化に関わる肝星細胞表面に発現しており、さらに炎症性サイトカインの放出に関わるインテグリンである。α4 とα9 インテグリンは、炎症細胞上の多くの細胞上に発現しており、星細胞の遊走にも関わる分子である。今後は、OPN 受容体に着目した NASH 研究を進める予定である。

本研究で報告した 35B6 は、マウスに長期間投与可能な抗体であることから、NASH の様な長期モデルでも使用可能な事が分かった。

本結果は、J Cell Commun Signal.誌に投稿し[6]、プレスリリースも行った。

本論文を報告したことで、国内外から共同研究の依頼が来ており、OPN 研究の発展に貢献できたと考える。

⑷自己免疫疾患におけるネフロネクチンの役割

背景

ネフロネクチン（Npnt）は α8β1 インテグリンを生理的受容体として腎臓発生に関与する細胞外マトリックスである[20]。我々は、ヒト、マウス臓器における Npnt 発現を検討した結果、Npnt とα8 インテグリン両者とも脾臓に多く発現していることを明らかにしたことから、免疫系に Npnt が関与する可能性を予想した。免疫系における Npnt の機能は全く不明であることから、本研究では Npnt の免疫疾患への影響を明らかにすることを目的として研究を進めた。

結果

ヒト、マウスの各臓器における Npnt とα8 インテグリン発現をリアルタイム PCR で解析した結果、Npnt とα8 インテグリンは、脾臓で多く発現していることが分かった（図 23）。そこで、我々は、独自に Npnt のサンドイッチ ELISA 定量系を開発し、様々な自己免疫疾患マウスモデルの血中における Npnt 発現量を検討した結果、Npnt はコンカナバリン A 誘導自己免疫性肝炎モデル（ConA 肝炎）、関節リウマチモデル(CAIA)、実験的自己免疫性脳脊髄炎モデル（EAE）の血中で発現亢進することを明らかにした（図 24）。

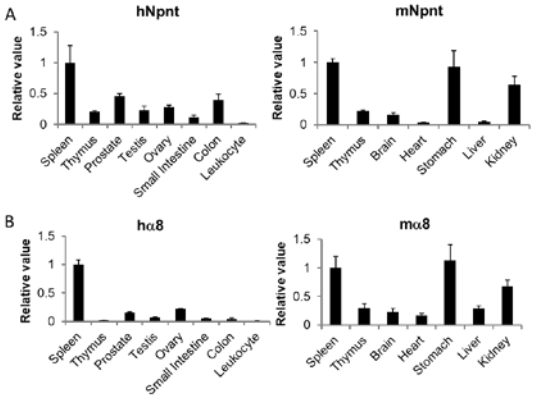


図23:臓器にNpntとα8インテグリン発現

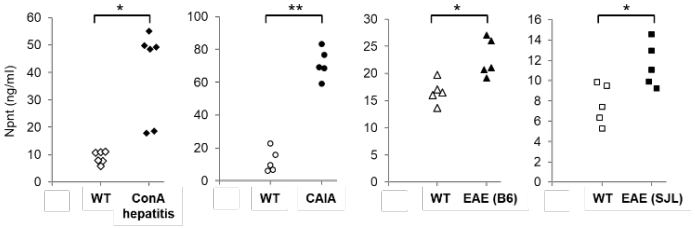


図24:自己免疫疾患モデル血中でNpnt発現が亢進する

Npnt が自己免疫疾患に関与することを明らかにするため、Npnt に対する中和抗体の作製を試みた。Npnt のα8β1 インテグリンとの結合部位は、インテグリン接着配列である RGD 配列と LFEIFEIER 配列であることが報告されていることから[21]、両者を含む領域ペプチド RGDVFIPRQPTND<u>LFEIFEIER</u> を抗原として合成し、ウサギに免疫することで抗体 Npnt-FD 抗体を作製した。作製した Npnt-FD 抗体は、ヒト、マウス Npnt と細胞との接着を有意に抑制することができ、RGD 配列を有する別の細胞外マトリックス Fibronectin や Vitronectin との接着は抑制しなかったことから（図 25）、Npnt-FD

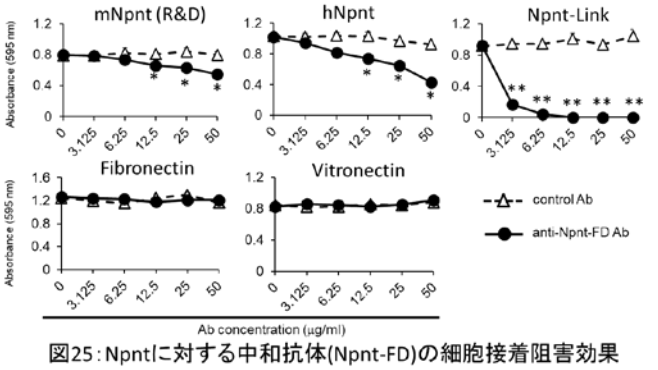


図25:Npntに対する中和抗体(Npnt-FD)の細胞接着阻害効果

抗体は Npnt 特異的な中和抗体であることが分かった。

Npnt-FD 抗体による関節リウマチモデル CAIA 抑制効果の検討を図 26A に示すプロトコールで行った。まず、Npnt が関節炎局所で発現亢進することを確認し、さらに関節炎内の滑膜線維芽細胞と滑膜マクロファージで発現亢進していることを明らかにした（図 26B)。Npnt-FD 抗体を図 26A に示す通り CAIA マウスに投与した結果、有意に関節炎抑制効果を有することが分かった(図 26C)。関節の炎症の写真を図 26D に示している。、また、関節組織の HE 染色とサフラニン O 染色から、Npnt-FD 抗体投与により炎症細胞浸潤抑制効果と関節軟骨破壊抑制効果を有することが分かった(図 26D, E, F, G)。

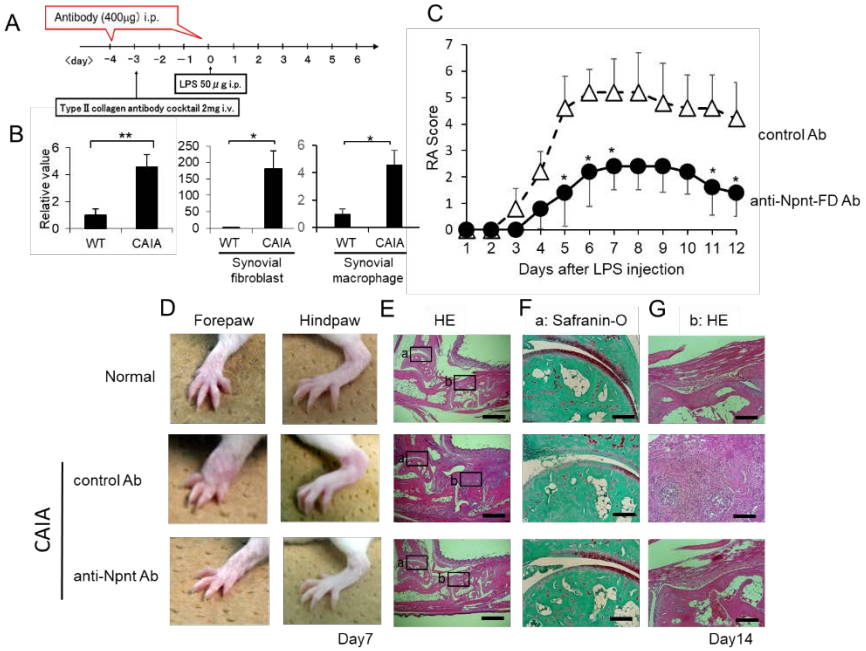


図26：Npnt-FD抗体による関節リウマチモデルCAIA抑制効果

以上の結果は、FEBS bio 誌で報告し[4]、プレスリリースも行った。

Npnt のサンドイッチ ELISA 定量系の結果で、Npnt は EAE モデルの血中でも亢進していたことから、Npnt の EAE モデル増悪化に与える影響の検討を進めた。Npnt 増悪化に伴い血中 Npnt 値が亢進することを再確認できたことから（図 27A)、Npnt-FD 抗体による EAE 抑制効果を検討した。その結果、Npnt-FD 抗体は有意に EAE 増悪化を抑制した(図 27B)。また、Npnt-FD 抗体投与により、EAE の血中 Npnt 発現を抑制できることが分かった（図 27C)。

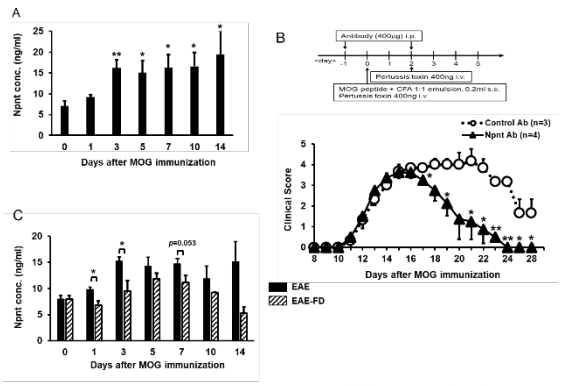


図27：EAEにおけるNpnt発現とNpnt-FD抗体によるEAE抑制効果

Npnt による EAE 抑制メカニズムを解明するため、Npnt 結合分子の同定を試みた。Npnt 遺伝子導入 293 細胞から精製 Npnt タンパク質を質量分析した結果、多くの候補を得たが（図 28A）、その中で免疫系への関与が報告されている分泌タンパク質セレン含有タンパク質セレノプロテイン P（SeP）に着目した[22]。Npnt と SeP の結合は共免疫沈降で確認した。SUMO タグを付けた Npnt を 293 細胞に遺伝子導入し、その培養上清を抗 SeP 抗体で免疫沈降させた沈降物を抗 SUMO タグ抗体で Npnt を検出することができた。（図 28B）。共免疫沈降実験の際に Npnt 遺伝子導入細胞では SeP 発現が亢進していたことから、Npnt は SeP 発現を亢進する可能性を得た。そこで、Npnt 遺伝子導入では SeP 発現が亢進することをウエスタンブロットとリアルタイム PCR により明らかにした（図 28C）。さらに、逆に SeP 遺伝子導入でも Npnt 発現が亢進することが分かった（図 28D）。SeP はグルタチオンペルオキシダーゼ GPx1 発現を亢進させ、活性酸素種 ROS の分解に関与する分子であることから[23]、Npnt による SeP 亢進は GPx1 発現を増加させると予想した。実際に、Npnt タンパク質の添加により SeP 発現が亢進し、GPx1 発現も亢進した（図 28E）。このことは、Npnt による SeP 発現は GPx1 発現を亢進させることができる十分量を亢進させることを示している。

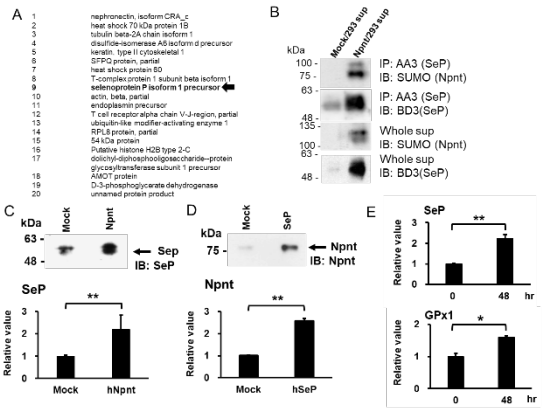


図28：Npnt結合分子としてのSePとNpnt-SeP間のポジティブフィードバック

Npnt 上の SeP 結合部位の同定を行った。Npnt は、EGF リピート、Linker、MAM 領域と構造的に分けることができる（図 29A）。SUMO タグを付けた Npnt と各領域からなる変異体を 293 細胞に遺伝子導入し、その培養上清を抗 SeP 抗体で免疫沈降し、沈降物を抗 SUMO タグ抗体で検出した結果、EGF と MAM 領域内に SeP との結合部位が存在することが分かった（図 29B）。さらに SeP はマウス、ヒト両者の Npnt と結合することも分かった(図 29B)。次に、各領域変異体の、SeP と GPx1 発現亢進能の検討をリアルタイム PCR にて行った結果、MAM 領域が SeP と GPx1 発現を亢進させることが分かった（図 29C）。

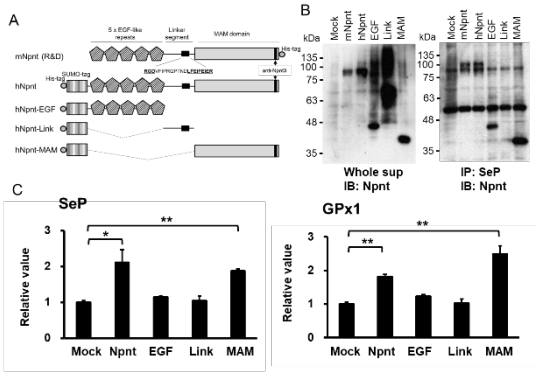


図29：NpntのSeP結合領域

EAE の増悪化には IL-17 産生 $CD4^+$T 細胞(Th17)が増悪化に関与し、制御性 T 細胞（Treg）は EAE 増悪化を抑制する[24-26]。すなわち、$CD4^+$T 細胞が EAE 病態の中心となる細胞であることから、EAE の脾臓から $CD4^+$T 細胞を分離（ソーティング）し、$CD4^+$T 細胞の精製度が 95%以上であることを確認した上で Npnt、SeP、GPx1 発現をリアルタイム PCR にて検討した。その結果、Npnt、SeP、GPx1 とも EAE 増悪期で発現亢進することが分かった（図 30A）。さらにその発現は Npnt-FD 抗体で抑制できることが分かった（図 30B）。

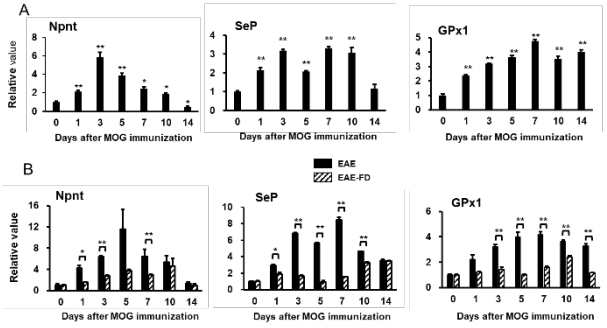


図30：EAEにおけるNpnt, SeP、GPx1発現

前述の通り EAE 増悪化には IL-17 産生 $CD4^+$T 細胞(Th17)が中心的に関与することから、まずは、$CD4^+$T 細胞からの IL-17 発現増強をリアルタイム PCR で検討した結果、報告通り EAE で IL-17 発現が亢進することを確認し、その IL-17 発現亢進は、Npnt-FD 抗体で抑制でることをリアルタイム PCR で明らかにした（図 31A）。さらに、IL-17 のサンドイッチ ELISA を用いて EAE からの $CD4^+$T 細胞を培養し IL-17 分泌を調べた結果、Npnt-FD 抗体で IL-17 の分泌も抑制できることが分かった（図 31B）。これらの結果は、Npnt-FD 抗体は Th17 分化を抑制する可能性があることを示している。そこで、さらに Npnt-FD 抗体による Th17 分化抑制効果を再確認するため、フローサイトメトリーで $CD4^+$ IL-17^+T 細胞の割合を検討した結果、Npnt-FD 抗体は、$CD4^+$ IL-17^+T 細胞の割合を低下させることを明らかにした（図 31C）。

RORγT は、Th17 細胞分化に関わる転写因子である。Npnt-FD 抗体は、$CD4^+$T 細胞内の RORγT 発現も抑制したことから Npnt-FD 抗体は Th17 分化を抑制する機能を有することを明らかにした（図 31D）。近年、Th17 は病原性ではない“non-Pathogenic”Th17 と病原性“Pathogenic”Th17 が存在することが報告されており、“Pathogenic”Th17 は IL-1β 存在下で分化する Th17 であることが分かっている[27]。そこで、Npnt-FD 抗体による $CD4^+$T 細胞の IL-1β 発現に及ぼす影響をリアルタイム PCR にて検討した結果、Npnt-FD 抗体は IL-1β 発現を抑制することから（図 31E）、Npnt は“Pathogenic”Th17 分化に関与することが分かった。

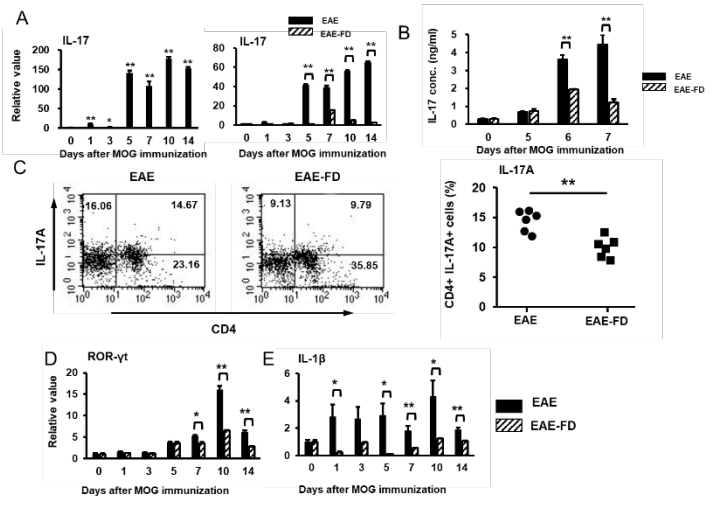


図31：Npnt-FD抗体によるTh17分化抑制効果

Th17 と Treg は共通する分化様式があることから、Npnt と Treg 分化との関与も検討した。Treg 分化に必須のマーカー分子として FoxP3 が知られている。Treg は免疫抑制性の T 細胞であることから、報告通り EAE 増悪化に伴い $CD4^+$T 細胞内の FoxP3 発現が低下することを確認した。Npnt-FD 抗体投与は MOG 免疫の 7 日後の $CD4^+$T 細胞内で FoxP3 発現を有意に増強することが分かった（図 32A)。また、フローサイトメトリー解析でも $CD4^+FoxP3^+$細胞が Npnt-FD 抗体投与により増えていることを確認できた（図 32B)。これらのことから、Npnt-FD 抗体投与により Treg 分化が亢進することから、Npnt は、Treg 分化を抑制することが分かった。

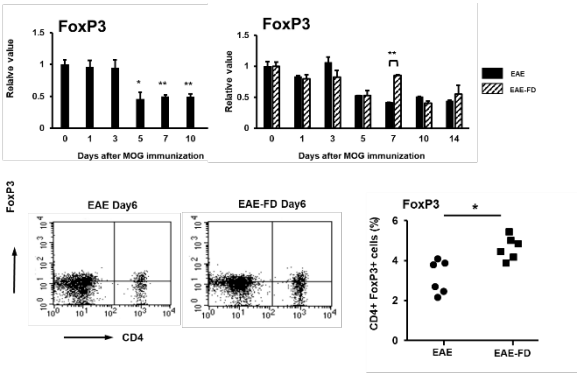


図32：Npnt-FD抗体によるTreg分化抑制効果

Npnt は SeP 発現を亢進させ、さらに GPx1 発現を誘導する。また、Npnt は Th17 分化を亢進させ、Treg 分化を減少させる。しかしながら、Npnt による Th17 と Treg 分化制御が、Npnt—SeP—GPx1 経路に関与するかは不明である。前述で「SeP はグルタチオンペルオキシダーゼ GPx1 発現を亢進させ、活性酸素種 ROS の分解に関与する分子である」と説明したように、ROS が Npnt による Th17 と Treg 分化制御に関与するかの検討を行った。EAE で Npnt—SeP—GPx1 経路が関与するのであれば、ROS 分解が進むと考えられる。

そこで、ROS 発現を CellROX Green Flow Cytometry Assay Kit を用いて検討した結果、予想通り EAE で ROS 分解が進んでおり、Npnt-FD 抗体でその分化が正常レベルまで戻ることが分かった（図 33A)。Npnt-FD 抗体による ROS レベルの正常化が Th17 や Treg 分化調節に関与することに関与することを、ROS スカベンジャーである N アセチルシステイン(NAC)を用いて検討した。NAC を前投与することで、Npnt-FD による $CD4^+$T 細胞からの IL-17 と RORγT 発現抑制をブロックすることができた（図 33B, C, D)。さらに Npnt-FD による $CD4^+$T 細胞からの FoxP3 発現亢進をブロックするこができた（図 33E)。最後に NAC による EAE 増悪化に与える影響を EAE 臨床スコアから解析した。その結果、NAC 前投与により、Npnt-FD による EAE 増悪化抑制も遮断することが分かった（図 33F)。

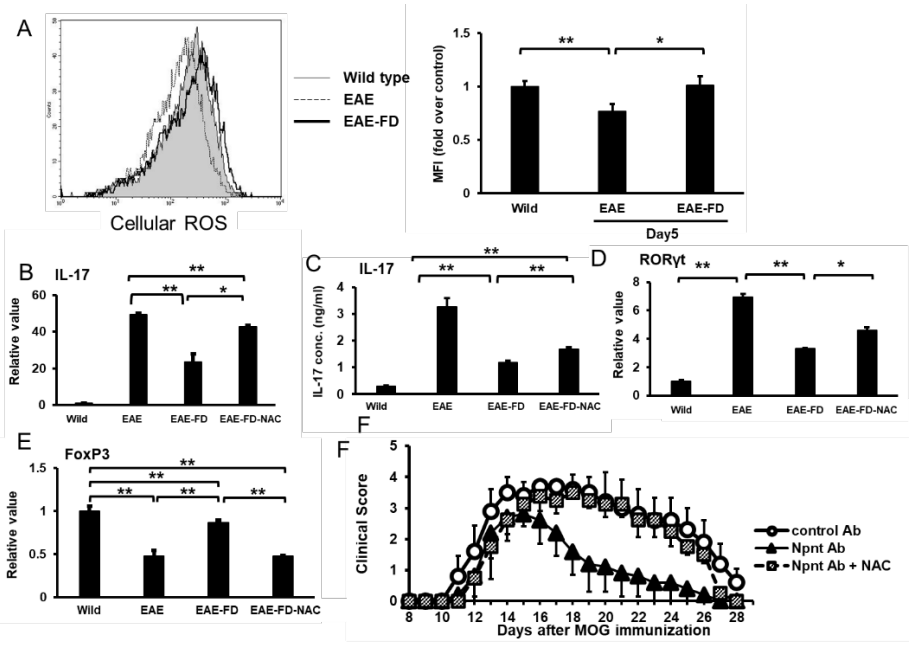


図33:Npnt誘導ROS低下がTh17分化亢進とTreg分化抑制に関与する

考察

本研究から、Npnt が関節リウマチモデル CAIA と多発性硬化症モデル EAE 増悪化に密接に関わることが分かった。Npnt は、CD4+T 細胞内で SeP 発現を亢進させ、さらに GPx1 発現亢進と ROS 分解を介して Th17 分化亢進と Treg 分化抑制をさせることで、自己免疫疾患増悪化に関与することを明らかにすることができた（図 34）。

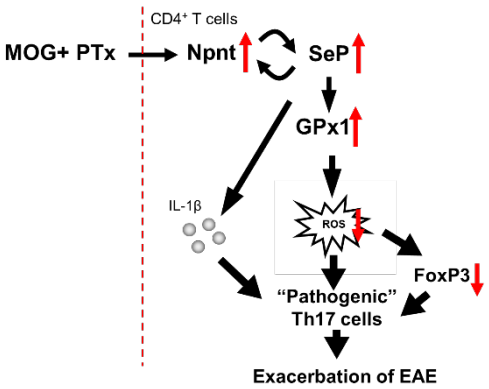


図34：EAE増悪化に及ぼすNpnt機能

Npnt は SeP 発現を亢進させ、SeP は Npnt 発現を亢進させる。このことから Npnt と SeP はポジティブフィードバックループを形成していると考えられる。Npnt-FD 抗体で EAE の血中 Npnt 値が低下したのは、Npnt-FD 抗体は Npnt-SeP のポジティブフィードバックループを阻害したことが原因と予想する。しかしながら、Npnt による SeP 発現亢進と SeP による Npnt 発現亢進の詳細なメカニズムは不明である。Npnt の受容体として α8β1 が知られており、SeP 受容体として ApoE2 が知られていることから、今後、これらの受容体の中和抗体や欠損細胞を用いて解析を行う予定である。

自己免疫疾患の新規医薬開発のために、世界中で Th17 と Treg との可塑性をめぐる研究が進められている。Npnt-FD 抗体は、Th17 と Treg 両者の分化制御に関わることを本研究から明らかにしたので、現在、製薬会社と本研究発展の相談を行っている。今後、さらに詳細に Npnt に着目した研究を進めることで、新たな大学発の創薬へと発展させたいと考えている。

参考論文

1. Kon S, Uede T: **The role of α9β1 integrin and its ligands in the development of autoimmune diseases**. *J Cell Commun Signal* 2018, **12**(1):333-342.
2. Yamashita M, Ukibe K, Matsubara Y, Hosoya T, Sakai F, Kon S, Arima Y, Murakami M, Nakagawa H, Miyazaki T: **Lactobacillus helveticus SBT2171 Attenuates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice**. *Frontiers in microbiology* 2017, **8**:2596.
3. Lee S, Honda M, Yamamoto S, Kumagai-Takei N, Yoshitome K, Nishimura Y, Sada N, Kon S, Otsuki T: **Role of Nephronectin in Pathophysiology of Silicosis**. *International journal of molecular sciences* 2019, **20**(10).
4. Kon S, Honda M, Ishikawa K, Maeda M, Segawa T: **Antibodies against nephronectin ameliorate anti-type II collagen-induced arthritis in mice**. *FEBS open bio* 2020, **10**(1):107-117.
5. Dhanesha N, Nayak MK, Doddapattar P, Jain M, Flora GD, Kon S, Chauhan AK: **Targeting myeloid-cell specific integrin α9β1 inhibits arterial thrombosis in mice**. *Blood* 2020, **135**(11):857-861.
6. Honda M, Kimura C, Uede T, Kon S: **Neutralizing antibody against osteopontin attenuates non-alcoholic steatohepatitis in mice**. *J Cell Commun Signal* 2020, **14**(2):223-232.
7. Dhanesha N, Jain M, Tripathi AK, Doddapattar P, Chorawala M, Bathla G, Nayak MK, Ghatge M, Lentz SR, Kon S *et al*: **Targeting Myeloid-Specific Integrin α9β1 Improves Short- and Long-Term Stroke Outcomes in Murine Models With Preexisting Comorbidities by Limiting Thrombosis and Inflammation**. *Circ Res* 2020, **126**(12):1779-1794.
8. Spenlé C, Loustau T, Murdamoothoo D, Erne W, Beghelli-de la Forest Divonne S, Veber R, Petti L, Bourdely P, Mörgelin M, Brauchle EM *et al*: **Tenascin-C orchestrates an immune suppressive tumor microenvironment in oral squamous cell carcinoma**. *Cancer immunology research* 2020.
9. Lee GR: **The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity**. *International journal of molecular sciences* 2018, **19**(3).
10. Kon S, Atakilit A, Sheppard D: **Short form of alpha9 promotes alpha9beta1 integrin-dependent cell adhesion by modulating the function of the full-length alpha9 subunit**. *Exp Cell Res* 2011, **317**(12):1774-1784.
11. Annes JP, Chen Y, Munger JS, Rifkin DB: **Integrin alphaVbeta6-mediated**

activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1. *J Cell Biol* 2004, **165**(5):723-734.

12. Kanayama M, Kurotaki D, Morimoto J, Asano T, Matsui Y, Nakayama Y, Saito Y, Ito K, Kimura C, Iwasaki N *et al.* **Alpha9 integrin and its ligands constitute critical joint microenvironments for development of autoimmune arthritis.** *J Immunol* 2009, **182**(12):8015-8025.
13. Matsumoto N, Kon S, Nakatsuru T, Miyashita T, Inui K, Saitoh K, Kitai Y, Muromoto R, Kashiwakura JI, Uede T *et al.* **A Novel alpha9 Integrin Ligand, XCL1/Lymphotactin, Is Involved in the Development of Murine Models of Autoimmune Diseases.** *J Immunol* 2017, **199**(1):82-90.
14. Benavides U, Gonzalez-Murguiondo M, Harii N, Lewis CJ, Sakhalkar HS, Deosarkar SP, Kurjiaka DT, Dagia NM, Goetz DJ, Kohn LD: **Phenyl methimazole suppresses dextran sulfate sodium-induced murine colitis.** *European journal of pharmacology* 2010, **643**(1):129-138.
15. Diao H, Kon S, Iwabuchi K, Kimura C, Morimoto J, Ito D, Segawa T, Maeda M, Hamuro J, Nakayama T *et al.* **Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases.** *Immunity* 2004, **21**(4):539-550.
16. Yamamoto N, Sakai F, Kon S, Morimoto J, Kimura C, Yamazaki H, Okazaki I, Seki N, Fujii T, Uede T: **Essential role of the cryptic epitope SLAYGLR within osteopontin in a murine model of rheumatoid arthritis.** *J Clin Invest* 2003, **112**(2):181-188.
17. Matsui Y, Jia N, Okamoto H, Kon S, Onozuka H, Akino M, Liu L, Morimoto J, Rittling SR, Denhardt D *et al.* **Role of osteopontin in cardiac fibrosis and remodeling in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy.** *Hypertension* 2004, **43**(6):1195-1201.
18. Coombes JD, Choi SS, Swiderska-Syn M, Manka P, Reid DT, Palma E, Briones-Orta MA, Xie G, Younis R, Kitamura N *et al.* **Osteopontin is a proximal effector of leptin-mediated non-alcoholic steatohepatitis (NASH) fibrosis.** *Biochim Biophys Acta* 2016, **1862**(1):135-144.
19. Syn WK, Choi SS, Liaskou E, Karaca GF, Agboola KM, Oo YH, Mi Z, Pereira TA, Zdanowicz M, Malladi P *et al.* **Osteopontin is induced by hedgehog pathway activation and promotes fibrosis progression in nonalcoholic steatohepatitis.** *Hepatology* 2011, **53**(1):106-115.
20. Brandenberger R, Schmidt A, Linton J, Wang D, Backus C, Denda S, Muller U, Reichardt LF: **Identification and characterization of a novel extracellular matrix protein nephronectin that is associated with integrin alpha8beta1 in**

the embryonic kidney. *J Cell Biol* 2001, **154**(2):447-458.

21. Sato Y, Uemura T, Morimitsu K, Sato-Nishiuchi R, Manabe R, Takagi J, Yamada M, Sekiguchi K: **Molecular basis of the recognition of nephronectin by integrin alpha8beta1**. *J Biol Chem* 2009, **284**(21):14524-14536.
22. Avery JC, Hoffmann PR: **Selenium, selenoproteins, and immunity**. *Nutrients* 2018, **10**(9):1203.
23. Saito Y: **Selenoprotein P as an in vivo redox regulator: disorders related to its deficiency and excess**. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 2020, **66**(1):1-7.
24. Lee PW, Severin ME, Lovett-Racke AE: **TGF-β regulation of encephalitogenic and regulatory T cells in multiple sclerosis**. *Eur J Immunol* 2017, **47**(3):446-453.
25. McGinley AM, Edwards SC, Raverdeau M, Mills KHG: **Th17 cells, γδ T cells and their interplay in EAE and multiple sclerosis**. *Journal of autoimmunity* 2018.
26. Kaskow BJ, Baecher-Allan C: **Effector T Cells in Multiple Sclerosis**. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2018, **8**(4).
27. Shainheit MG, Lasocki KW, Finger E, Larkin BM, Smith PM, Sharpe AH, Dinarello CA, Rutitzky LI, Stadecker MJ: **The pathogenic Th17 cell response to major schistosome egg antigen is sequentially dependent on IL-23 and IL-1β**. *The Journal of Immunology* 2011, **187**(10):5328-5335.

研究助成金（研究代表者のみ）

2019 年度

１．科学研究費補助金、基盤研究(C)　新規採択. 「新たな阻害作用機序を示す次世代抗インテグリン薬の開発」130 万円

2．大塚製薬アカデミックサポート.「血糖調節におけるセレノプロテイン P (SeP) とネフロネクチン (Npnt) 相互作用の役割」20 万円

3．ファイザー・アカデミック・コントリビューション. 25 万円

4．アステラス製薬 Research Support. 20 万円

5．MSD 奨学寄付(学術研究支援).「自己免疫疾患とインスリン抵抗性に及ぼすネフロネクチンとセレノプロテイン P との相互作用の役割」50 万円

6．日本イーライリリー株式会社(教育・研究助成).「細胞外基質ネフロネクチンとセレノプレテイン P 相互作用を標的とした関節リウマチ、糖尿病の新規創薬への発展性の検討」50 万円

2018 年度

１．科学研究費補助金、基盤研究(C)継続. 「ネフロネクチンによる制御性 B 細胞分化抑制機序の解明と新規自己免疫疾患治療法の開発」100 万円

2．イーライリリー・教育・研究助成. 『細胞外基質ネフロネクチンの制御性 B 細胞分化制御機能を利用した関節リウマチの新規創薬基盤の確立』50 万円

3．ファイザー・アカデミック・コントリビューション. 50 万円

4．アステラス製薬 Research Support. 50 万円

FEBS openbio

FEBS PRESS science publishing by scientists

Antibodies against nephronectin ameliorate anti-type II collagen-induced arthritis in mice

Shigeyuki Kon[1], Machiko Honda[1], Kiyoshi Ishikawa[2], Masahiro Maeda[2] and Tatsuya Segawa[2]

1 Department of Molecular Immunology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University, Japan
2 Immuno-Biological Laboratories, Fujioka, Japan

Keywords
antibody; anti-type II collagen-induced arthritis; autoimmune diseases; ELISA; nephronectin

Correspondence
S. Kon, Department of Molecular Immunology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University, 985, Sanzo, Higashimura-cho, Fukuyama 729-0292, Japan
Fax: +81 84 736 2024
Tel: +81 84 736 2112
E-mail: kon@fukuyama-u.ac.jp

(Received 27 August 2019, revised 25 October 2019, accepted 7 November 2019)

doi:10.1002/2211-5463.12758

The extracellular matrix protein nephronectin (Npnt) is known to be critical for kidney development, but its function in inflammatory diseases is unknown. Here, we developed a new enzyme-linked immunosorbent assay system to detect Npnt in various autoimmune diseases, which revealed that plasma Npnt levels are increased in various mouse autoimmune models. We also report that antibodies against the α8β1 integrin-binding region of Npnt protect mice from anti-type II collagen-induced arthritis, suggesting that Npnt may be a potential therapeutic target molecule for the prevention of autoimmune arthritis.

The extracellular matrix (ECM) primarily functions to support the intercellular space; however, recent studies suggest that the ECM regulates various cellular functions including cell differentiation, cell growth, survival, adhesion, and migration by mediating integrin receptors [1–3]. A wide variety of ECM proteins have the same primary sequence motif, a tripeptide, Arg-Gly-Asp (RGD) motif for integrin binding [4]. The expression of some ECM components is increased during autoimmune diseases [5,6]. For example, we previously reported that osteopontin (OPN), an ECM protein containing an RGD motif, is highly expressed in inflammatory diseases and critically involved in autoimmune diseases, including collagen antibody-induced arthritis (CAIA) [7,8] and concanavalin A (ConA)-induced hepatitis [9]. Therefore, aberrant ECM expression facilitates disease development.

An ECM protein, nephronectin (Npnt), is expressed in kidneys and hair follicles [10,11]. Npnt consists of five epidermal growth factor (EGF)-like repeats in N-terminal region, a linker segment containing an RGD integrin-binding site, and a meprin/A5-protein/PTPmu (MAM) domain in C-terminal region [10]. The RGD sequence in Npnt is critical for binding to its receptor, α8β1 integrin, and the interaction is critically involved in kidney development [10,12]. EGF-like repeats and MAM domains are responsible for binding to chondroitin sulfate and heparan sulfate, respectively [13]. The involvement of Npnt in diseases has been reported, particularly kidney diseases [14–17], acute

Abbreviations
CAIA, collagen antibody-induced arthritis; ConA, concanavalin A; EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis; ECM, extracellular matrix; EGF, epidermal growth factor; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; HE, hematoxylin and eosin; LPS, lipopolysaccharide; MAM, meprin/A5-protein/PTPmu; MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein; Npnt, nephronectin; Npnt-FD, nephronectin-functional domain; OPN, osteopontin; PLP, proteolipid protein; RA, rheumatoid arthritis; SUMO, small ubiquitin-related modifier; TLR, Toll-like receptor.

FEBS Open Bio (2019) © 2019 The Authors. Published by FEBS Press and John Wiley & Sons Ltd.
This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

and chronic hepatitis [18], and tumor progression [19–21].

We performed real-time PCR to evaluate Npnt expression in tissues and found that Npnt expression was high in the spleen. Therefore, we hypothesize that Npnt may play an important role in autoimmune diseases. To test this hypothesis, we developed an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system for quantification of Npnt protein expression levels and generated an antibody against the α8β1 integrin-binding site. In the present study, we show the expression and functional importance of Npnt in autoimmune diseases.

Materials and methods

Reagents and cell lines

Mouse nephronectin (Npnt) protein [called Npnt (R&D) protein in this study] was from R&D systems (Minneapolis, MN, USA). RD cells (derived from a human rhabdomyosarcoma), A549 cells (derived from human lung adenocarcinoma), HepG2 (derived from human hepatocellular carcinoma), LN-229 cells (derived from human glioblastoma), B16 cells (derived from mouse skin melanoma), NIH3T3 cells, MEF cells, L929 cells (derived from mouse fibroblast) were cultured in DMEM containing 10% fetal bovine serum (FBS). Raji cells (derived from human Burkitt's lymphoma), Jurkat cells (derived from human T-cell leukemia), U937 cells (derived from human histiocytic lymphoma), HL60 cells (derived from human acute promyelocytic leukemia), Ehrlich cells (derived from mouse Ehrlich-Lettre ascites carcinoma), X63 cells (derived from mouse myeloma) were cultured in RPMI containing 10% FBS.

Animals

Mice and rats were kept under specific pathogen-free conditions and provided food and water *ad libitum*. Every effort was made to minimize suffering during injections, and all surgery was performed on humanely sacrificed animals. All animal experiments were performed in accordance with the guidelines of the Bioscience Committee of and were approved by the Animal Care and Use Committee of Immuno-biological Laboratories.

Specific pathogen-free BALB/c mice, C57BL/6, and SD rats were purchased from Japan SLC (Hamamatsu, Japan).

Real-time PCR

Total RNA from healthy mouse tissues, arthritic joints, and synovial cells was extracted with TRIzol (Thermo Fisher, Hanover Park, IL, USA). First-strand cDNA was generated with a first-strand cDNA synthesis kit (TOYOBO, Osaka, Japan). For human Npnt expression in human tissues, a human multiple tissue cDNA panel was used (Takara, Kusatsu, Japan). The specific primers used are shown in Table 1. The expression level of mRNA was calculated using the calibration curve method using LIGHTCYCLER software version 3 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Data were standardized to G3PDH.

Npnt preparation

The human Npnt complementary DNAs (cDNAs) were PCR-amplified from A549 cells. Primer sets for cloning of Npnt are shown in Table 2. The amplified product was cloned into a pM-secSUMOstar vector (LifeSensors, Malvern, PA, USA), which contains a His-tag and SUMO tag at the 5′ end of the cloning sites for purification and enhancing expression and solubility. The cDNAs encoding domain of human Npnt was subcloned into pM-secSUMOstar in-frame with a His-tag and SUMO tag. EGF-like repeats, Linker segment, and MAM domain were amplified by PCR using primer sets described in Table 2. The Npnt expression plasmids after nucleotide sequence confirmation were transfected into 293 cells with Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher). His-SUMO-tagged human Npnt was purified using TALON Resin (Takara) following the manufacturer's protocol.

Production and purification of polyclonal and monoclonal antibodies against Npnt

Synthetic peptides used for immunization were as follows: Npnt3 peptide FKGEKRRGHTGEIGLDDVSL and NPNT-FD peptide PQKPRGDVFIPRQPTNDLFEIFEIER, which correspond to common amino acid sequences in human and mouse Npnt, and the functional domain of mouse Npnt for α8β1 integrin, respectively. These peptides were used to immunize rabbits after coupling with thyroglobulin. The immunoglobulin (Ig) G fraction was obtained from a sepharose column coupled with the synthetic peptide used as the immunogen.

Generation of monoclonal antibodies against Npnt was as follows. SD rats were subcutaneously immunized with mouse Npnt protein mixed with Freund's complete

Table 1. Real-time PCR primer sequences.

Gene	Sequence of primers
Human Npnt	5′-AAATGAGTGTGGCCTGAAGC-3′
	5′-TGCCTAAATCTAGGGCAGGA-3′
Mouse Npnt	5′-GCGGATGAGGAAGTAAAGGAC-3′
	5′-CCTTTGAAGATGACGCTTTTG-3′
Human α8 integrin	5′-TCTGCTGCACCCAATGATTA-3′
	5′-CTCCACAGTCCACCAGAATGT-3′
Mouse α8 integrin	5′-AGATTTGCTTGTAGGGGCATT-3′
	5′-GACAGCTTCAAGTCAGGAACG-3′

FEBS Open Bio (2019) © 2019 The Authors. Published by FEBS Press and John Wiley & Sons Ltd.

Table 2. Primer sequences for cloning of Npnt.

Gene	Sequence of primers
Human Npnt	5′-TATTGAGGCTCATCGCGAACAGATTGGAGGTGAGTTCGACGGGAGGTGGCCC-3′
	5′-ATGCCTGCAGGTCGACTTAGCGTTCTTCAGAGCAGTG-3′
EGF-like repeats	5′-TATTGAGGCTCATCGCGAACAGATTGGAGGTGAGTTCGACGGGAGGTGGCCC-3′
	5′-ATGCCTGCAGGTCGACTTACACACAAGTCAGTCCATCACC-3′
Linker segment	5′-TATTGAGGCTCATCGCGAACAGATTGGAGGTTATATCCCAAAAGTTATGATT-3′
	5′-ATGCCTGCAGGTCGACTTATACCAGAACACCTGGATCATC-3′
MAM domain	5′-TATTGAGGCTCATCGCGAACAGATTGGAGGTCACAGTTGTAATTTTGACCAT-3′
	5′-ATGCCTGCAGGTCGACTTAGCGTTCTTCAGAGCAGTG-3′

adjuvant (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) (day 1) and immunized with mouse Npnt protein mixed with Freund's incomplete adjuvant (Becton Dickinson) (days 7, 14, and 21) Spleen cells were harvested and fused with X63-Ag8-653 cells in the presence of polyethylene glycol (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Hybridomas were screened for production of antibody specifically reactive to immobilized mouse Npnt used for the immunization, and one IgG1 clone (20D1a) from the mouse Npnt protein was obtained.

Establishing the Npnt sandwich ELISA system

About 5 $\mu g \cdot mL^{-1}$ of rabbit anti-Npnt3 antibody was used as a capture antibody, and 2 $ng \cdot mL^{-1}$ of 20D1 conjugated with HRP by using Peroxidase labeling kit according to the manufacturer's instructions (DOJINDO, Kumamoto, Japan) was used as the detection antibody. Purified mouse Npnt (R&D) protein was used as the standard. 100 μL of the diluted sample was applied to each well of the antibody-coated plate and incubated for 1 h at 37 °C. The wells were washed three times with PBS-T [PBS containing 0.05% (v/v) Tween-20], and then, 100 μL of detection antibody was added and incubated for 30 min at 4 °C. Each well was washed with PBS-T and incubated with 100 μL of 3,3′,5,5′-tetramethyl benzidine (TMB) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 30 min, and then, 100 μL of 1 M sulfuric acid was added. Plates were read at a wavelength of 450 nm by an immunoreader (Thermo Fisher).

Direct ELISA

Mouse Npnt (R&D), fibronectin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), GRGDS peptide-coupled with BSA were coated onto 96-well plate at a concentration of 1 $\mu g \cdot mL^{-1}$ at 37 °C for 1 h, then blocked with 0.1% BSA in PBS containing 0.05% NaN_3 at 37 °C for at least 1 h. The plates were washed two times with PBS-T and incubated with anti-Npnt-FD mAb at various concentrations at 37 °C for 1 h. After a further three washes, 1 : 5000 dilution of HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA) was added to each well at room temperature for 30 min. Bound protein was quantified by a colorimetric assay using TMB as a substrate for 15 min at room temperature. Plates were read at a wavelength of 450 nm by an immunoreader.

Cell adhesion assay

The 96-well plates were precoated with hNpnt, mNpnt (R&D), NPNT-FD synthetic peptides, fibronectin, or vitronectin (2 $\mu g \cdot mL^{-1}$) at 37 °C for 1 h, followed by treatment with 0.5% BSA in PBS for 1 h at room temperature. Cells in the presence or absence of various concentrations of antibody were suspended in DMEM containing 0.25% BSA, and 200 μL of cell suspension (at a cell density of 5×10^4 cells/well) was applied to 96-well plates and incubated for 1 h at 37 °C. The medium was removed from the plates, and all wells were washed twice. The adherent cells were fixed and stained with 0.5% crystal violet in 20% methanol for 30 min. All wells were rinsed three times with water, and adherent cells were then lysed with 20% acetic acid. The resulting supernatants from each well were analyzed by an immunoreader, and the absorbance at 595 nm was measured to determine the relative number of cells adhered to wells.

Fractionation of synovial tissues

Hind limbs were surgically removed from the ankle joint, followed by surgical separation of the dermal, subcutaneous, tendinous, and muscle tissues from joints. The remaining soft tissues were removed from the bones and homogenized roughly with dissecting scissors. Homogenates were washed once with culture medium and treated with 3 $mg \cdot mL^{-1}$ type II collagenase (Worthington Biochemical, Freehold, NJ, USA) by vigorous stirring. After washing, synovial cells were fractionated into TLR-4^+ or TLR-4^- fractions using MACS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA). The TLR-4^+ fraction was considered macrophages and the TLR-4^- fraction was cultured overnight, and adherent cells were used as fibroblasts.

Arthritis model

Arthritis was induced using an arthritogenic 5-clone monoclonal antibody cocktail kit (Chondrex Inc., Redmond,

WA, USA) following the manufacturer's protocol. Briefly, 7-week-old female BALB/c mice were injected intravenously with a mixture of five anti-type II collagen monoclonal antibodies (2 mg each) on day −3, followed by an intraperitoneal injection of 50 μg of lipopolysaccharide (LPS) (0111:B4) on day 0. About 400 μg anti-Npnt-FD antibody or control rabbit IgG was administered intraperitoneally at doses of 400 μg per mouse on days −4 and 0. The clinical severity of arthritis was graded up to 9 days after LPS administration in each of the four paws on a 0–4 scale. The disease severity was recorded for each limb as follows: 0, normal; 1, focal slight swelling and/or redness in one digit; 2, moderate swelling and erythema of two digits; 3, marked swelling and erythema of the limb; and 4, maximal swelling, erythema, deformity, and/or ankylosis. Mice were scored in a double-blind manner. Mice were sacrificed, and then, joint sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) and fast green/safranin-O for immunohistochemical evaluation.

Induction of concanavalin A-induced hepatitis and experimental autoimmune encephalomyelitis

For induction of ConA-hepatitis, BALB/c mice were injected intravenously with 15 mg ConA (Sigma-Aldrich) per kilogram of body weight, dissolved in pyrogen-free PBS.

For induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), C57BL/6 or SJL/J mice were injected subcutaneously with 100 μg of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 35–55 peptide (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) or Myelin proteolipid protein (PLP) 139–151 (HSLGKWLGHPDKF) emulsified with complete Freund's adjuvant on day 0 and intravenous injection of 400 ng of pertussis toxin (List Biological Laboratories, Campbell, CA, USA) on days 0 and 2.

Statistical analysis

Data are presented as means ± SEM and are representative of at least three independent experiments. The statistical significance of differences between groups was calculated with a two-tailed Student's *t*-test. Differences were considered significant for $P < 0.05$ (*) or 0.01 (**).

Results

Expression of Npnt and α8 integrin in normal tissues

We first examined the expression level of human and mouse Npnt (Fig. 1A) and α8 integrin (Fig. 1B) in healthy human and mouse tissues using real-time PCR. Subsequently, we found both Npnt and α8 integrin were highly expressed in the spleen; thus, we hypothesized that the interaction between Npnt and α8 integrin may be involved in immunological diseases.

Establishing a sandwich ELISA system for Npnt

To analyze the expression level of Npnt in an autoimmune mouse model, we sought to establish an Npnt sandwich ELISA system. For ELISA construction, two antibodies against Npnt were generated, Npnt3 rabbit polyclonal antibody and 20D1 monoclonal antibody.

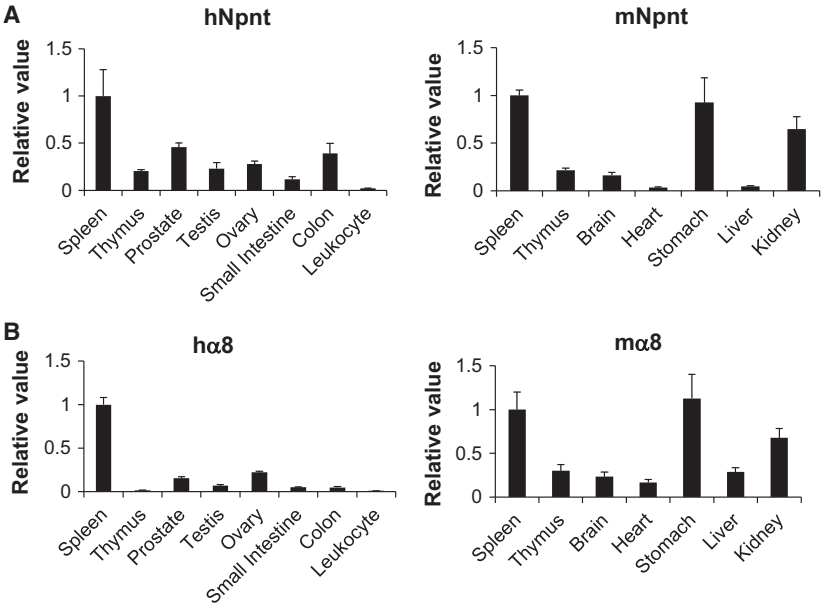


Fig. 1. Expression of Npnt and α8 integrin in human and mouse tissues. Npnt (A) and α8 integrin (B) expression in healthy tissues were evaluated by real-time PCR. Data are representative of three or more independent experiments with similar results. Data are presented as means ± SEM.

FEBS Open Bio (2019) © 2019 The Authors. Published by FEBS Press and John Wiley & Sons Ltd.

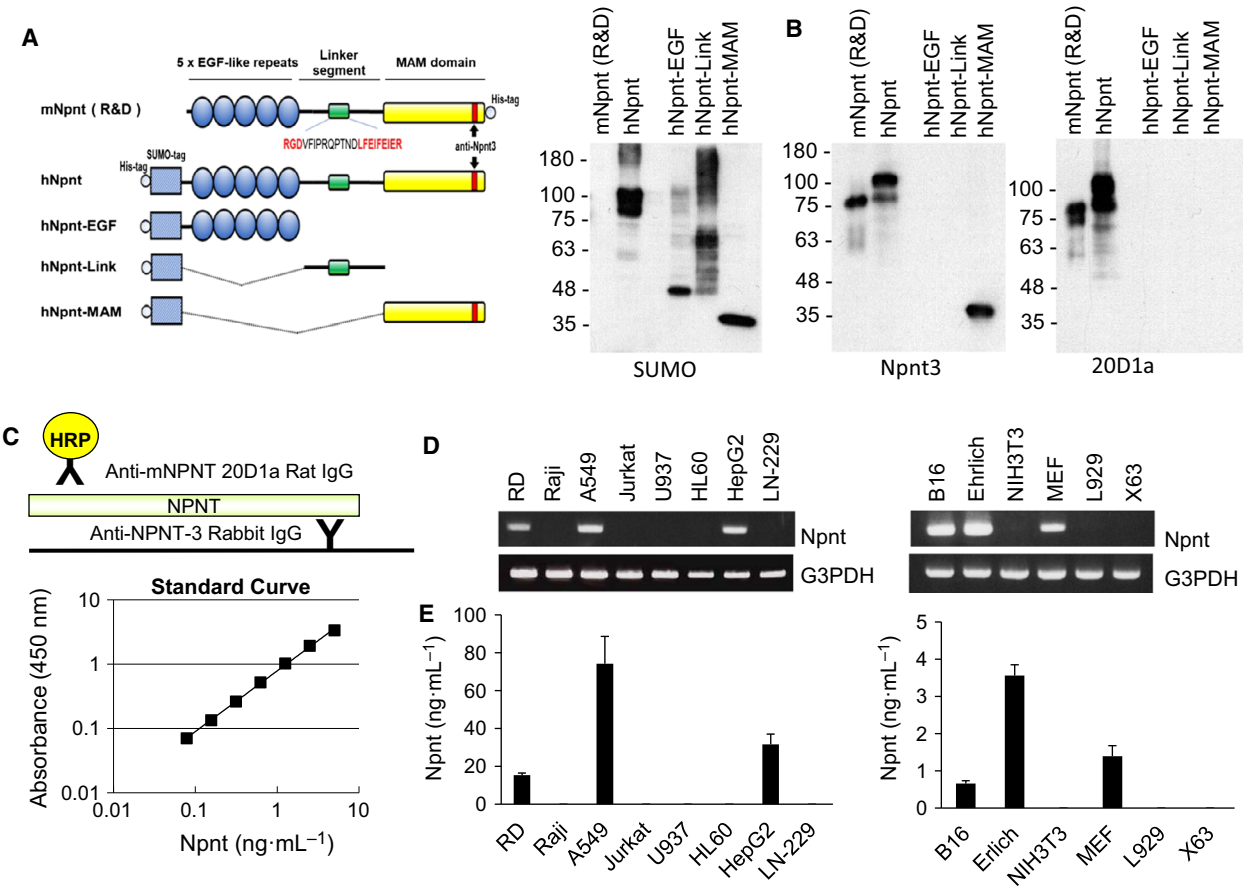


Fig. 2. Establishing the sandwich ELISA system for Npnt. (A) Schematic representation of Npnt and its truncated variants. Cell binding sequences (RGD sequences) in the linker segment and the epitope in the MAM domain of anti-Npnt3 antibody are indicated. (B) Specificity of Npnt3 and 20D1a antibodies by western blotting. (C) Diagram (top panel) and standard curve (lower panel) of the ELISA. Recombinant mNpnt (R&D) protein was used as the standard. (D) Expression of Npnt in cell lines by RT–PCR. Human or mouse cell lines were left or right panel, respectively. (E) Detection of Npnt in supernatants from cell lines used in (C). Data are representative of three or more independent experiments with similar results. Data are presented as means ± SEM.

For characterization of these antibodies, we purified full length of Npnt, EGF-like repeats, linker segment, MAM domain (Fig. 2A). Both antibodies were capable of detecting mouse and human Npnt (Fig. 2B). Notably, the molecular weight of human Npnt is higher than mouse because human Npnt is fused with a SUMO tag (approximate molecular weight of 20 kDa). A link truncated variant showed higher and broader bands than the expected size (approximately 28 kDa) as reported previously [22]. Anti-Npnt3 antibody recognized the MAM domain as predicted, whereas the 20D1 Ab did not react with a panel of Npnt truncated variants, suggesting that 20D1a Ab recognizes the Npnt conformation (Fig. 2B).

We developed an ELISA combination using Npnt3 as a coating antibody and 20D1 as a detecting antibody (Fig. 2C). The standard curve of the ELISA system exhibited a linear shape ranging from 0.078 to 5.0 ng·mL^{-1} calculated with mouse Npnt (R&D) protein (Fig. 2C). To analyze the specificity of the ELISA, Npnt mRNA expression in various human and mouse cell lines was explored by RT–PCR, and Npnt expression was detected in RD cells, A549 cells and HepG2 cells in human cell lines, and B16 cells, Ehrlich cells, and MEF cells in mouse cell lines (Fig. 2D). The ELISA we developed successfully detected secreted Npnt protein in the supernatant of the cell lines expressing Npnt by RT–PCR, but not from non-Npnt mRNA expressing cell lines (Fig. 2E).

Elevated expression of Npnt in autoimmune diseases

The antigenic peptide of anti-Npnt3 antibody is a common sequence shared by humans, mice, and rats, and the 20D1a antibody recognizes both human and

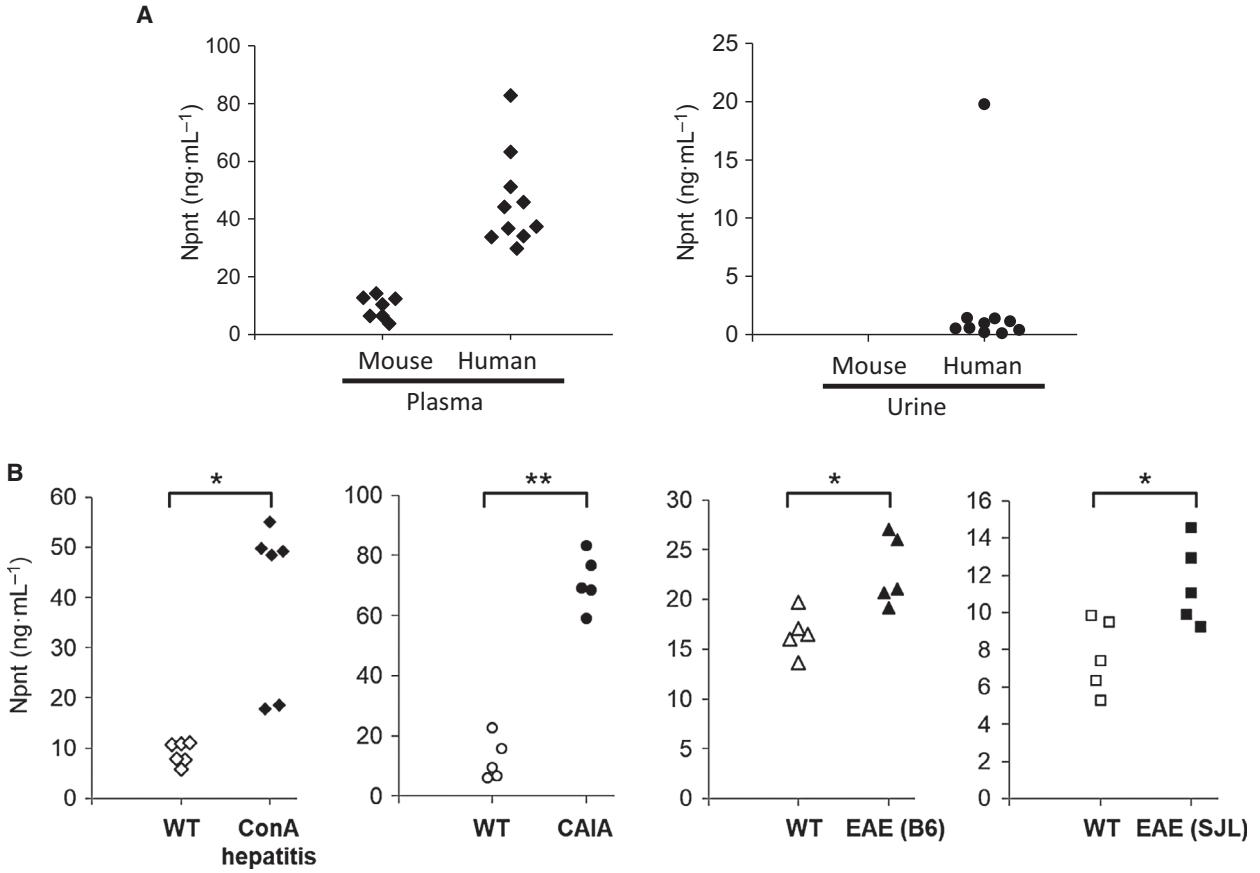


Fig. 3. Npnt in plasma and urine samples. (A) Npnt in plasma and urine samples from healthy mice and humans. (B) Npnt in plasma samples from various murine autoimmune disease models. Plasma samples were tested on the day when inflammation was exacerbated as follows, for ConA-hepatitis, 24 h after ConA injection; for CAIA, 7 days after LPS injection; for EAE, 14 days after MOG or PLP peptide immunization. Data are representative of three or more independent experiments with similar results. $*P < 0.05$ or $**P < 0.01$ versus plasma samples from wild-type mice (Student's *t*-test).

mouse Npnt. Therefore, we assayed Npnt values in healthy mouse, human, and rat plasma samples. We found that the Npnt system can be used for quantification of mouse and human Npnt values with Npnt (R&D) protein as the standard. We next evaluated Npnt expression in urine since Npnt is highly expressed in kidneys. Significant expression of Npnt in human urine, but not mouse urine, was detected (Fig. 3A). Next, we tested Npnt levels in plasma samples from autoimmune mouse models, specifically ConA-hepatitis, CAIA, and EAE models. We found that Npnt levels in all of the inflammatory models we tested were significantly elevated (Fig. 3B).

Involvement of α8β1 integrin-binding region of Npnt in inflammatory arthritis

The RGD motif and LFEIFEIER sequence in Npnt are required for binding to α8β1 integrin, which is the physiological receptor for Npnt. To assess the importance of the α8β1 integrin-binding region within murine Npnt, we prepared the anti-Npnt-FD antibody that recognizes the PQKPRGDVFIPRQPTNDLFEIFEIER motif used as the antigen. We first examined the specificity of the anti-Npnt-FD antibody by direct ELISA, western blotting, or cell adhesion test. We also asked whether Npnt-FD antibody cross-reacts with fibronectin or GRGDS peptide since RGD motif found in many ECM molecules is exist in antigen peptide. The anti-Npnt-FD antibody recognized mouse Npnt protein, but not RGD motif-containing ECM, fibronectin or GRGDS peptide by direct ELISA (Fig. 4A), and detected mouse Npnt, human Npnt, and the Linker segment, which contains the antigen region of the anti-Npnt-FD antibody, by western blotting (Fig. 4B). To examine the functional specificity, cell adhesion assays were performed. Anti-Npnt-FD antibody partially inhibited cellular adhesion to mouse

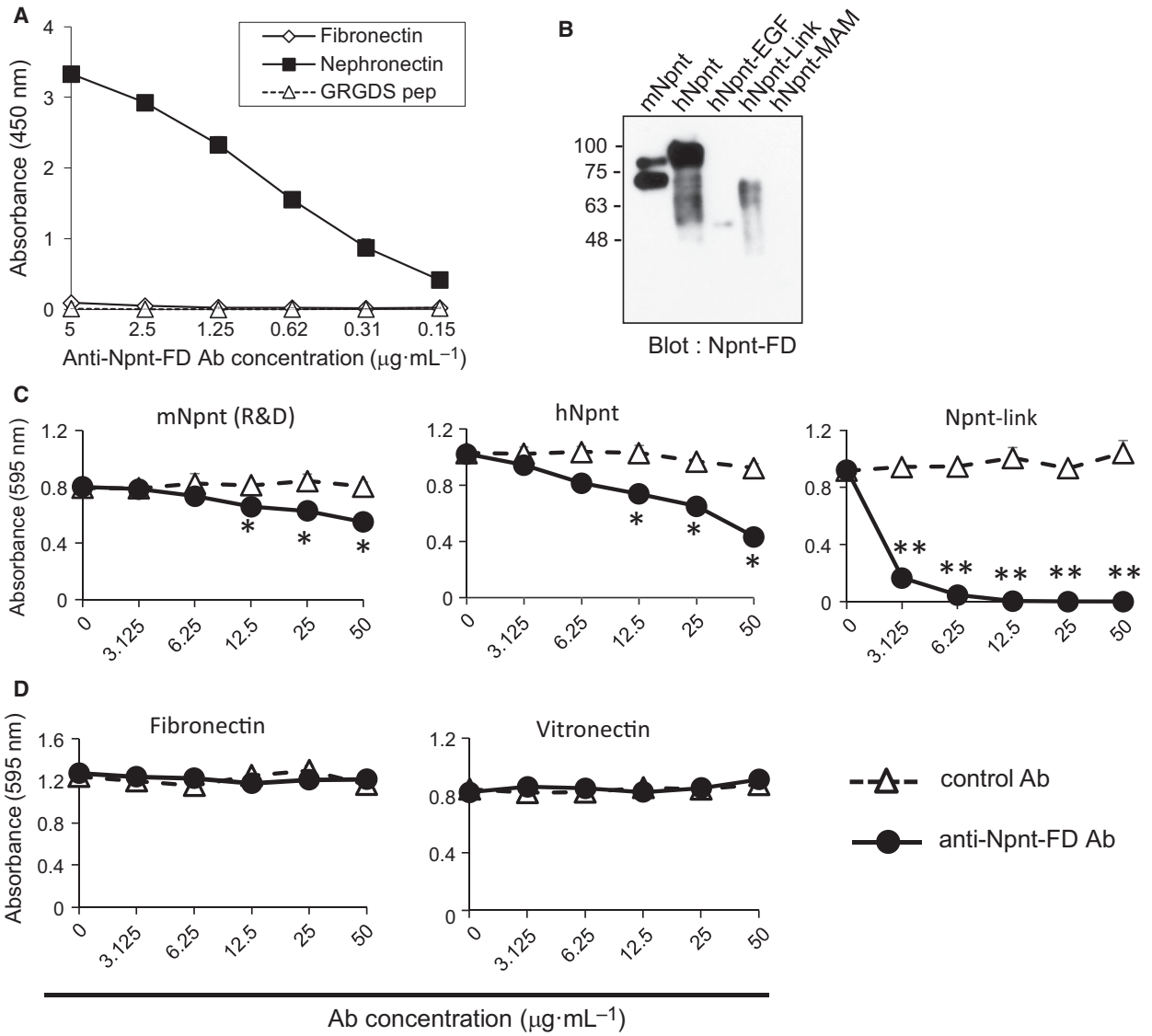


Fig. 4. Generation of neutralizing antibodies for Npnt. (A) Cross-reactivity of anti-Npnt-FD antibody to plates coated with Npnt, fibronectin, or GRGDS peptide-coupled with BSA (1 μg·mL^{-1}) by direct ELISA. (B) Specificity of anti-Npnt-FD antibody by western blotting. (C, D) NIH3T3 cells were allowed to adhere to 96-well plates precoated with full-length of Npnt or Npnt-Link (C), fibronectin, or vitronectin (D) in the presence of indicated concentrations of anti-Npnt-FD antibody. Normal rabbit IgG was used as a control antibody. Data are presented as mean ± SEM. Data are representative of three or more independent experiments with similar results. *$P < 0.05$, anti-Npnt-FD antibody versus control antibody (Student's *t*-test).

and human Npnt, whereas it completely inhibited the adhesion of the α8β1 integrin-binding region, suggesting that an alternative Npnt exists (Fig. 4C). Anti-Npnt-FD antibody did not show any inhibitory activity toward fibronectin or vitronectin (Fig. 4D). These results indicate that anti-Npnt-FD antibody specifically recognizes and functionally inhibits the interaction of the α8β1 integrin-binding region of Npnt with its receptor.

An antibody against OPN, which is one of the α8β1 integrin ligands, inhibits an exacerbation of CAIA; thus, we assessed the function of the anti-Npnt-FD antibody in the CAIA model [23]. In the CAIA model, on day 6 the Npnt mRNA in arthritic joints was elevated. Furthermore, synovial fibroblasts and synovial macrophages, which are the main cellular components in arthritic synovia and important players in the joint pathology of rheumatoid arthritis

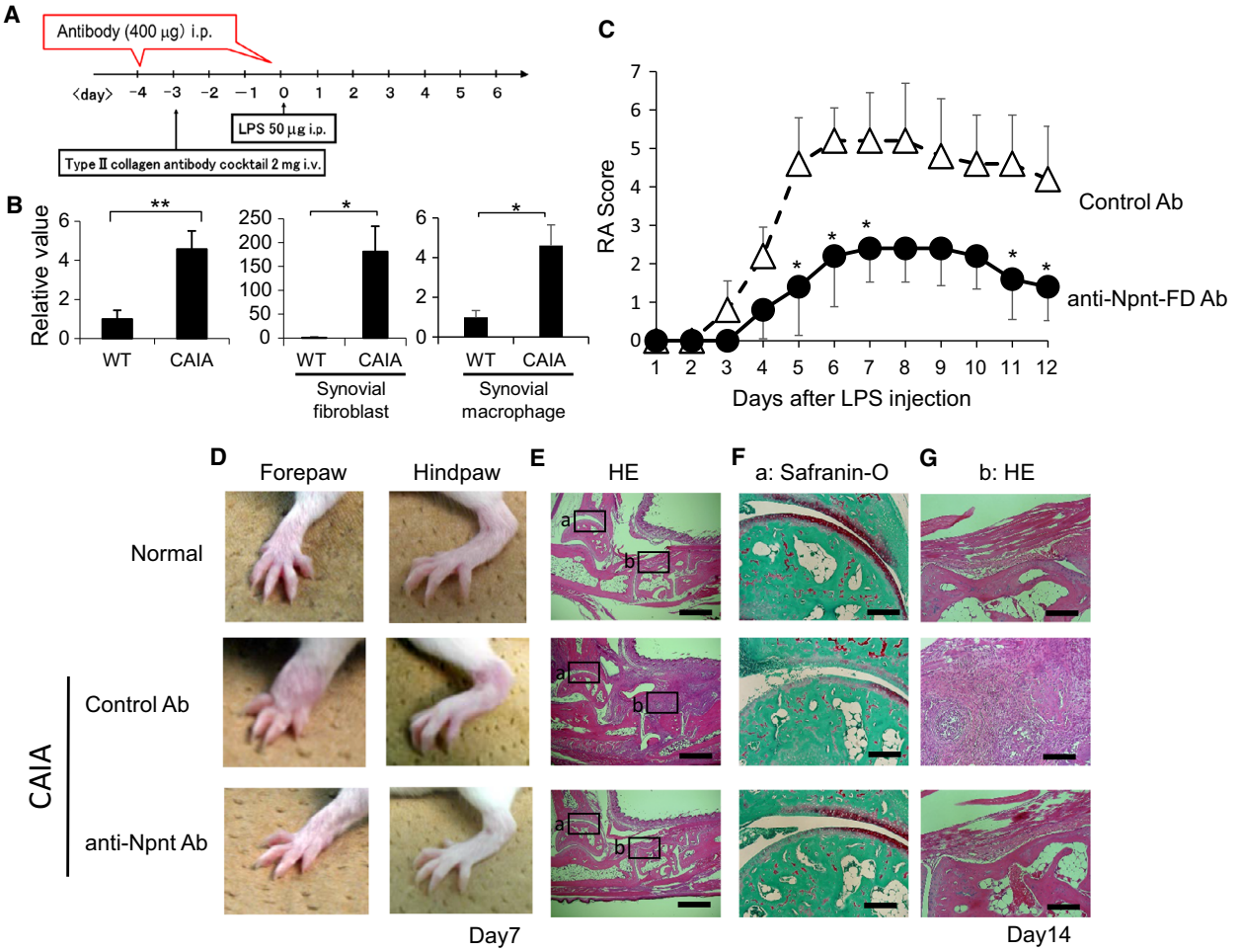


Fig. 5. Npnt neutralization by anti-Npnt-FD antibody ameliorates CAIA. (A) Protocol for CAIA with anti-Npnt-FD antibody treatment. The antibody was administered to BALB/c mice on days −4 and 0 relative to LPS injection during CAIA induction. (B) Npnt expression in arthritic joints on day 6, synovial fibroblasts, or synovial macrophages were evaluated by real-time PCR. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, wild-type versus CAIA (Student's *t*-test). (C) Arthritis scores of arthritic mice treated with control antibody (rabbit IgG) or an anti-Npnt-FD antibody at the indicated time points ($n = 5$ per group). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, anti-Npnt-FD antibody versus control Ig (Student's *t*-test). Data are presented as means ± SEM. (D) Representative images of the forepaw and hindpaw on day 7 are shown. (E–G) Representative histology of normal joints and arthritic joints on day 14 from mice treated with control antibody or anti-Npnt-FD antibody. Sections were stained with HE (E, G) or Safranin-O (F). Magnified views of the boxed areas a and b are shown in F and G, respectively. Scale bar = 2mm (E), 200μm (F and G). Data are representative of three or more independent experiments with similar results.

(RA) [24,25], were elevated (Fig. 5B). Treatment with the anti-Npnt-FD antibody on days −3 and 0 led to the delay of clinical onset of arthritis, and the severity of arthritis was significantly attenuated (Figure 5C). The gross appearance of arthritic joint treated with anti-Npnt-FD antibody on day 7 is shown in Fig. 5D. Finally, we evaluated the effect of anti-Npnt-FD antibody treatment on joint histology on day 14 after the LPS injection. In concert with the clinical score, histological analysis demonstrated marked differences. Cartilage destruction evaluated by Safranin-O staining was faint in the arthritic joints of control mice. In contrast, the staining was partially rescued in anti-Npnt-FD antibody-treated mice (Fig. 5F), indicating that the destruction of proteoglycans was partially prevented by the anti-Npnt-FD antibody. The proliferation of synovial cells, evaluated by HE staining, was detected in control antibody-treated mice; however, this feature of CAIA was clearly diminished following the administration of the anti-Npnt-FD antibody (Fig. 5G). These results strongly suggested that the α8β1 integrin-binding region of Npnt is involved in inflammatory arthritis.

FEBS Open Bio (2019) © 2019 The Authors. Published by FEBS Press and John Wiley & Sons Ltd.

Discussion

In the present study, we investigated the function of Npnt in autoimmune diseases as high levels of Npnt mRNA were found in the spleens of humans and mice. We developed a sandwich ELISA system for quantifying the protein level of Npnt in autoimmune diseases and found that Npnt in blood is increased in various autoimmune diseases. The results from ConA-hepatitis are consistent with previous reports that observed elevated Npnt mRNA [18].

For clarification of Npnt function in autoimmune diseases, we generated a neutralizing antibody against Npnt (anti-Npnt-FD antibody) by immunizing rabbits with the PQKPRGDVFIPRQPTNDLFEIFEIER peptide (Npnt-FD peptide), because the RGD motif and LFEIFEIER sequence in Npnt plays a critical role in the binding to its physiological receptor, α8β1 integrin [22]. Anti-Npnt-FD antibody partially inhibits cell adhesion of full-length mouse and human Npnt to NIT3T3 cells, which express α8β1 integrin [26]. This suggests that Npnt has other receptors on NIH3T3 cells. In fact, it has been reported that the MAM domain in Npnt binds to heparan sulfate proteoglycan and EGF-like repeats domain and activates the EGF receptor [13,27]. Therefore, anti-Npnt-FD antibody specifically inhibits the interaction between Npnt and receptors bound to Npnt-FD peptide such as α8β1 integrin.

Previously, we reported that neutralizing antibodies for osteopontin, one of the ligands of α8β1 integrin, inhibits the development of inflammatory arthritis in the CAIA model. Therefore, we analyzed the function of Npnt in CAIA and determined that anti-Npnt-FD antibody attenuates the severity of arthritis. We also found higher expression of Npnt in arthritic joints than in control mice. In RA joints, proliferating fibroblasts and macrophages are clearly seen. These cells are thought to cause an exacerbation of RA by secretion of various pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF)-α or interleukin (IL)-1β. In this study, Npnt expression in synovial fibroblasts and macrophages from CAIA was also increased, suggesting a critical involvement of the PQKPRGDVFIPRQPTNDLFEIFEIER sequence of Npnt and its receptor(s) in the development of inflammatory arthritis and, perhaps, the combination of Npnt and these cytokines have a synergistic effect on the severity of inflammation.

The α8β1 integrin, which is part of the RGD-recognizing integrin family, is prominently expressed in smooth muscle and has a defined in vivo role in kidney development and liver and lung fibrosis [10,11,28,29]. In this study, α8β1 integrin is highly expressed in human and mouse spleen, suggesting that α8β1 integrin has any important role in immune responses. It is conceivable that the binding of Npnt to α8β1 integrin is involved in α8β1 integrin, but we cannot exclude the possibility that other RGD-recognizing integrins, such as αvβ3 integrin, are the Npnt receptor during inflammatory arthritis. Further research is required to understand how α8β1 integrin is involved in inflammatory arthritis.

In conclusion, we found that Npnt is highly expressed in the spleen and upregulated in blood from various autoimmune mouse models. Furthermore, we provide evidence for a potential role of the α8β1 integrin-binding region of Npnt in the pathogenesis of inflammatory arthritis. Further studies will be directed at understanding the mechanism by which Npnt and its interactions with integrins affect autoimmune diseases.

Acknowledgements

This study was supported by research grants from JSPS KAKENHI Grant Numbers 16K08221 and 19K07492, Japan Rheumatism Foundation, the SUHARA Memorial Foundation, the FUGAKU TRUST for Medical Research, academic support from Pfizer, Chugai, Astellas, and Eli Lilly to SK. We thank S. J. Win, PhD, from Edanz Group for editing a draft of this manuscript.

Conflict of interest

SK and MH declare no conflicts of interest associated with this manuscript. KI, MM, and TS are employees of the Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.

Author contributions

SK conceived and carried out experiments and wrote the manuscript; MH performed experiments; KI, MH, MM, and TS generated anti-Npnt antibody and established the Npnt ELISA system; SK and TS supervised the study. All authors read and approved the final manuscript.

References

1 Hynes RO (2009) The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* **326**, 1216–1219.
2 Giancotti FG and Ruoslahti E (1999) Integrin signaling. *Science* **285**, 1028–1032.

3 Hynes RO (2014) Stretching the boundaries of extracellular matrix research. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 761–763.
4 Hynes RO (1987) Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* **48**, 549–554.
5 Hasegawa M, Yoshida T and Sudo A (2018) Role of tenascin-C in articular cartilage. *Mod Rheumatol* **28**, 215–220.
6 Schultz C (2019) Targeting the extracellular matrix for delivery of bioactive molecules to sites of arthritis. *Br J Pharmacol* **176**, 26–37.
7 Yamamoto N, Sakai F, Kon S, Morimoto J, Kimura C, Yamazaki H, Okazaki I, Seki N, Fujii T and Uede T (2003) Essential role of the cryptic epitope SLAYGLR within osteopontin in a murine model of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* **112**, 181–188.
8 Kon S, Nakayama Y, Matsumoto N, Ito K, Kanayama M, Kimura C, Kouro H, Ashitomi D, Matsuda T and Uede T (2014) A novel cryptic binding motif, LRSKSRSFQVSDEQY, in the C-terminal fragment of MMP-3/7-cleaved osteopontin as a novel ligand for alpha9beta1 integrin is involved in the anti-type II collagen antibody-induced arthritis. *PLoS ONE* **9**, e116210.
9 Diao H, Kon S, Iwabuchi K, Kimura C, Morimoto J, Ito D, Segawa T, Maeda M, Hamuro J, Nakayama T *et al.* (2004) Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases. *Immunity* **21**, 539–550.
10 Brandenberger R, Schmidt A, Linton J, Wang D, Backus C, Denda S, Muller U and Reichardt LF (2001) Identification and characterization of a novel extracellular matrix protein nephronectin that is associated with integrin alpha8beta1 in the embryonic kidney. *J Cell Biol* **154**, 447–458.
11 Fujiwara H, Ferreira M, Donati G, Marciano DK, Linton JM, Sato Y, Hartner A, Sekiguchi K, Reichardt LF and Watt FM (2011) The basement membrane of hair follicle stem cells is a muscle cell niche. *Cell* **144**, 577–589.
12 Miner JH (2001) Mystery solved: discovery of a novel integrin ligand in the developing kidney. *J Cell Biol* **154**, 257–259.
13 Sato Y, Shimono C, Li S, Nakano I, Norioka N, Sugiura N, Kimata K, Yamada M and Sekiguchi K (2013) Nephronectin binds to heparan sulfate proteoglycans via its MAM domain. *Matrix Biol* **32**, 188–195.
14 Cheng CW, Ka SM, Yang SM, Shui HA, Hung YW, Ho PC, Su YC and Chen A (2008) Nephronectin expression in nephrotoxic acute tubular necrosis. *Nephrol Dial Transplant* **23**, 101–109.
15 Muller-Deile J, Dannenberg J, Schroder P, Lin MH, Miner JH, Chen R, Brasen JH, Thum T, Nystrom J, Staggs LB *et al.* (2017) Podocytes regulate the glomerular basement membrane protein nephronectin by means of miR-378a-3p in glomerular diseases. *Kidney Int* **92**, 836–849.
16 Nakatani S, Ishimura E, Mori K, Fukumoto S, Yamano S, Wei M, Emoto M, Wanibuchi H and Inaba M (2012) Nephronectin expression in glomeruli of renal biopsy specimens from various kidney diseases: nephronectin is expressed in the mesangial matrix expansion of diabetic nephropathy. *Nephron Clin Pract* **122**, 114–121.
17 Kashani K and Kellum JA (2015) Novel biomarkers indicating repair or progression after acute kidney injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **24**, 21–27.
18 Inagaki FF, Tanaka M, Inagaki NF, Yagai T, Sato Y, Sekiguchi K, Oyaizu N, Kokudo N and Miyajima A (2013) Nephronectin is upregulated in acute and chronic hepatitis and aggravates liver injury by recruiting CD4 positive cells. *Biochem Biophys Res Commun* **430**, 751–756.
19 Dilmac S, Erin N, Demir N and Tanriover G (2018) Nephronectin is decreased in metastatic breast carcinoma and related to metastatic organs. *Pathol Oncol Res* **24**, 679–688.
20 Steigedal TS, Toraskar J, Redvers RP, Valla M, Magnussen SN, Bofin AM, Opdahl S, Lundgren S, Eckhardt BL, Lamar JM *et al.* (2018) Nephronectin is correlated with poor prognosis in breast cancer and promotes metastasis via its integrin-binding motifs. *Neoplasia* **20**, 387–400.
21 Wang D, Zhao C, Gao L, Wang Y, Gao X, Tang L, Zhang K, Li Z, Han J and Xiao J (2018) NPNT promotes early-stage bone metastases in breast cancer by regulation of the osteogenic niche. *J Bone Oncol* **13**, 91–96.
22 Sato Y, Uemura T, Morimitsu K, Sato-Nishiuchi R, Manabe R, Takagi J, Yamada M and Sekiguchi K (2009) Molecular basis of the recognition of nephronectin by integrin alpha8beta1. *J Biol Chem* **284**, 14524–14536.
23 Kanayama M, Kurotaki D, Morimoto J, Asano T, Matsui Y, Nakayama Y, Saito Y, Ito K, Kimura C, Iwasaki N *et al.* (2009) Alpha9 integrin and its ligands constitute critical joint microenvironments for development of autoimmune arthritis. *J Immunol* **182**, 8015–8025.
24 Muller-Ladner U, Ospelt C, Gay S, Distler O and Pap T (2007) Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. *Synovial fibroblasts, Arthritis Res Ther* **9**, 223.
25 Falconer J, Murphy AN, Young SP, Clark AR, Tiziani S, Guma M and Buckley CD (2018) Review: synovial cell metabolism and chronic inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* **70**, 984–999.
26 Denda S, Reichardt LF and Muller U (1998) Identification of osteopontin as a novel ligand for the

integrin alpha8 beta1 and potential roles for this integrin-ligand interaction in kidney morphogenesis. *Mol Biol Cell* **9**, 1425–1435.

27 Kahai S, Lee SC, Seth A and Yang BB (2010) Nephronectin promotes osteoblast differentiation via the epidermal growth factor-like repeats. *FEBS Lett* **584**, 233–238.

28 Hung CF, Wilson CL, Chow YH and Schnapp LM (2018) Role of integrin alpha8 in murine model of lung fibrosis. *PLoS ONE* **13**, e0197937.

29 Levine D, Rockey DC, Milner TA, Breuss JM, Fallon JT and Schnapp LM (2000) Expression of the integrin alpha8beta1 during pulmonary and hepatic fibrosis. *Am J Pathol* **156**, 1927–1935.

送信元：福山大学　総務部　企画・文書課
〒729-0292　広島県福山市学園町１番地三蔵
Tel：084-936-2111(代)　FAX：084-936-2213

令和元年　　月　　日

Press Release
報道関係者各位

関節リウマチの悪化に関与する新たな分子の発見

研究成果の概要

関節リウマチは、医療の発展により寛解を期待できる疾患となりつつありますが、未だに数割の患者に対しては治療法が見出されておらず、新規分子機序を利用した関節リウマチ治療薬の開発が望まれています。

福山大学薬学部の今重之教授、本田真知子助手らの研究グループは、腎臓形成に関与する分子であるネフロネクチンが、関節リウマチや多発性硬化症などの自己免疫疾患マウスの血中で発現が亢進していることを見出しました。このことから、ネフロネクチンが自己免疫疾患に関与すると予想し、ネフロネクチンに対する新たな抗体を作製することで関節リウマチマウスの増悪化に及ぼすネフロネクチンの影響を解析した結果、抗ネフロネクチン抗体は関節リウマチの関節腫脹（右図）や軟骨破壊を抑制できることを明らかにしました。ネフロネクチンが自己免疫疾患で発現が亢進し、増悪化に関与するという知見は、本研究が世界で初めて見出した結果であることから、今後、ネフロネクチンに着目した研究を進めることで関節リウマチを始めとした様々な自己免疫疾患の新たな治療薬への発展を期待できます。

本研究は、科学研究費補助金、日本リウマチ財団などの助成を受けて実施されました。

論文発表の概要

研究論文名：Antibodies against nephronectin ameliorate anti-type II collagen-induced arthritis in mice.
（ネフロネクチンに対する抗体は、関節リウマチマウスモデルの増悪化を抑制する）
公表雑誌：FEBS open bio
公表日： 2019 年 11 月 24 日（日曜日）（オンライン公開）

本件に関するお問い合わせ先

所属・職・氏名：福山大学薬学部　教授　今　重之（こん　しげゆき）
Tel：084-936-2112（内線 5255）、Fax: 084-936-2024、E-mail: kon@fukuyama-u.ac.jp
ホームページ：http://web.fukuyama-u.ac.jp/pharm/htmls/Labo/labs/mol.immun/index.html

Neutralizing antibody against osteopontin attenuates non-alcoholic steatohepatitis in mice

Machiko Honda, Chiemi Kimura, Toshimitsu Uede & Shigeyuki Kon

Journal of Cell Communication and Signaling

ISSN 1873-9601
Volume 14
Number 2

J. Cell Commun. Signal. (2020)
14:223-232
DOI 10.1007/s12079-020-00554-7

Springer

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by The International CCN Society. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Author's personal copy

Journal of Cell Communication and Signaling (2020) 14:223–232
https://doi.org/10.1007/s12079-020-00554-7

RESEARCH ARTICLE

Neutralizing antibody against osteopontin attenuates non-alcoholic steatohepatitis in mice

Machiko Honda[1] · Chiemi Kimura[2] · Toshimitsu Uede[2] · Shigeyuki Kon[1]

Received: 1 October 2019 / Accepted: 13 February 2020 / Published online: 16 February 2020
© The International CCN Society 2020

Abstract

Previously, we reported that an extracellular matrix protein, osteopontin (OPN), is involved in various autoimmune diseases using a neutralizing polyclonal antibody against OPN generated in rabbits. However, the antibody cannot be used for long-term mouse models of chronic inflammatory disease because of the induction of antibodies against anti-OPN rabbit IgG. In this study, we generated a new antibody, anti-mouse OPN mouse IgG (35B6). 35B6 inhibited the cell adhesion of mouse and human OPN to Chinese Hamster Ovary (CHO) cells or CHO cells expressing α4 or α9 integrin. It was reported that OPN is highly expressed and has an important role in a chronic liver disease, non-alcoholic steatohepatitis (NASH). 35B6 injection twice a week for 8 weeks attenuated liver inflammation and fibrosis in a NASH mouse model, suggesting 35B6 is beneficial for the treatment of NASH. 35B6 was preferable to the rabbit anti-OPN antibody for investigating the in vivo function of OPN in mouse models of long-term disease.

Keywords Osteopontin · Antibody · Non-alcoholic steatohepatitis in mice · Inflammation · Fibrosis

Abbreviations

CDAHFD	0.1% methionine on a high fat diet background
col1a1	type I collagen α1 chain
CHO	Chinese Hamster Ovary
ECM	extracellular matrix
HE	hematoxylin-eosin
HSC	hepatic stellate cells
RGD	arginine-glycine-aspartate
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease
NASH	non-alcoholic steatohepatitis in mice
OPN	osteopontin
SMA	smooth muscle actin

✉ Shigeyuki Kon
kon@fukuyama-u.ac.jp

Machiko Honda
honda@fukuyama-u.ac.jp

Chiemi Kimura
chiemi@igm.hokudai.ac.jp

Toshimitsu Uede
uedetoshimitsu@gmail.com

[1] Department of Molecular Immunology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University, 985, Sanzo, Higashimura-cho, Fukuyama 729-0292, Japan

[2] Division of Molecular Immunology, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, Kita-15, Nishi-7, Kita-ku, Sapporo 060-0815, Japan

Introduction

Osteopontin (OPN) is a secreted glycoprotein that mediates cell-matrix interactions and cellular signaling through integrin binding domains including arginine-glycine-aspartate (RGD) motif and SVVYGLR sequences (Yokosaki et al. 1999; Barry et al. 2000a; Denhardt et al. 2001). An important feature of OPN is the presence of a thrombin cleavage site (Denhardt et al. 2001). The non-thrombin cleaved form of OPN binds to RGD motif-recognizing integrins, such as α5β1 and αvβ3 integrins, expressed by various cells, including fibroblasts, endothelial cells, smooth muscle cells, and tumor cells (Barry et al. 2000b; Helluin et al. 2000; Denhardt et al. 2001). In contrast, the thrombin-cleaved form of OPN exposes a cryptic epitope, SVVYGLR, which preferentially binds to α9β1 and α4β1 integrins expressed by leukocytes (Yokosaki et al. 1999; Bayless and Davis 2001; Ito et al. 2009). By binding to these various integrins, OPN induces diverse effects including cell adhesion, migration, immune regulation, angiogenesis, prevention of apoptosis, and tumor

Author's personal copy

development (Uede et al. 1997; Denhardt et al. 2001; Weber 2001; Mazzali et al. 2002; Rangaswami et al. 2006). Previous studies revealed that OPN is involved in various disease conditions such as multiple sclerosis (Chabas et al. 2001; Shinohara et al. 2008), allergic airway disease (Xanthou et al. 2007; Takahashi et al. 2009), hepatitis (Diao et al. 2004; Kon et al. 2008), and rheumatoid arthritis (Yamamoto et al. 2003; Yamamoto et al. 2007).

To examine OPN functions in vivo, OPN deficient mice, recombinant proteins, or neutralizing antibody can be useful. However, there are several difficulties in using OPN deficient mice and recombinant proteins because the genetic background of mice and endotoxin contamination in recombinant proteins affects OPN functions (Blom et al. 2003; Konno et al. 2005). Therefore, neutralizing antibodies against OPN are a preferable approach to elucidate the functions of OPN. We previously generated a neutralizing antibody against mouse OPN (M5) (Yamamoto et al. 2003; Diao et al. 2004). However, polyclonal M5 antibodies produced in rabbits have the disadvantages of not being applicable for mouse models of disease that require long-term study such as chronic inflammation, because anti-rabbit antibody against M5 emerges. Therefore, additional approaches are needed to analyze OPN functions in vivo. To overcome this problem, we developed a monoclonal antibody (clone 35B6) generated in mice immunized with the VDVPNGRGDSLAYGLR peptide, the peptide used to generate the M5 antibody. The use of 35B6 allows the study of OPN functions in chronic inflammation.

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is a progressive non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) with an unmet medical need (Chen et al. 2018). The features of NASH include excessive fat accumulation, inflammation, and fibrosis of the liver (Papatheodoridi et al. 2019). OPN is upregulated in the blood and liver of NASH patients as well as NASH mouse models and it is an exacerbation factor of inflammation and fibrosis in NASH models (Sahai et al. 2004; Syn et al. 2011; Coombes et al. 2016). Here, we demonstrate that 35B6 suppresses hepatic inflammation and fibrosis in mice fed a choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet (CDAHFD).

Materials and methods

Production of monoclonal antibody against OPN

A synthetic peptide VDVPNGRGDSLAYGLR corresponding to the internal sequence of mouse OPN (Yamamoto et al. 2003; Diao et al. 2004) was coupled with thyroglobulin and used to immunize mice. Spleen cells were harvested and fused with X63-Ag8–653 cells. One clone (35B6; IgG1) was obtained.

Solid-phase binding assay

OPN proteins, synthetic peptides, fibronectin, vitronectin, or laminin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) were coated onto 96-well plates at a concentration of 5 μg/ml at 4 °C overnight, then blocked with 0.1% BSA in PBS containing 0.05% NaN_3 at 37 °C for at least 1 h. The plates were washed twice with PBS and incubated with 35B6 (2 μg/ml) at 37 °C for 1 h. After a further three washes, a 1:5000 dilution of peroxidase conjugated anti-mouse IgG antibody (Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK) was added to each well at room temperature for 30 min. Bound protein was quantified by a colorimetric assay using tetramethylbenzidine as a substrate for 15 min at room temperature. Plates were read at a wavelength of 450 nm.

Cell adhesion assay

The 96-well plates were precoated with human or mouse OPN N-half/GST protein (Ito et al. 2009) (5 μg/ml) at 37 °C for 1 h, followed by treatment with 0.5% BSA in PBS for 1 h at room temperature. Cells in the presence or absence of various concentrations of 35B6 or control antibody (5A1) (Kon et al. 2002) were suspended in DMEM containing 0.25% BSA and 200 μl of a cell suspension (at a cell density of 5×10^4 cells/well) was applied to 96-well plates and incubated for 1 h at 37 °C. The medium was removed from the plates, and all wells were washed twice. Adherent cells were fixed and stained by 0.5% crystal violet in 20% methanol for 30 min. All wells were rinsed three times with water, and adherent cells were then lysed with 20% acetic acid. The resulting supernatants from each well were analyzed by an immunoreader.

Analysis of mRNA expression

Total RNA from livers was extracted by Trizol (Thermo Fisher, Hanover Park, IL, USA). The specific primers used are shown in Table 1. Quantitative real-time PCR analysis of mRNA expression was performed using a LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I System (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). The expression of mRNA was calculated by LightCycler Software, version 3. Data were standardized to G3PDH.

Elisa

OPN concentrations were measured using ELISA kits according to the manufacturer's instructions (Immuno-Biological Laboratories, Gunma, Japan).

Author's personal copy

Table 1 Real-time PCR primer sequences

Gene	Sequence of primers
OPN	5′- CCCGGTGAAAGTGACTGATT-3’
	5′- TTCTTCAGAGGACACAGCATTC-3
α4 integrin	5′- TGGAAGCTACTTAGGCTACT-3’
	5′- CTCCCACGACTTCGGTAGTAT-3’
α9 integrin	5′- AAGGCTGCAGCTGTCCCACATGGACGAAG-3’
	5′- TTAGAGAGATATTCTTCACAGCCCCCAAA-3’
α-SMA	5′- CTCTCTTCCAGCCATCTTTCAT-3’
	5′- TATAGGTGGTTTCGTGGATGC-3’
TNF-α	5′- TCTTCTCATTCCTGCTTGTGG-3’
	5′- GGTCTGGGCCATAGAACTGA-3’
Col1a1	5′- CTCCTGGCAAGAATGGAGAT-3’
	5′- AATCCACGAGCACCCTGA-3’
G3PDH	5’-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3’
	5’-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3’

Ethical approval

Mice were provided food and water ad libitum. Every effort was made to minimize suffering during injections, and all surgery was performed on humanely sacrificed animals. All animal experiments were performed in accordance with the guidelines of the Bioscience Committee of Fukuyama University and were approved by the Animal Care and Use Committee of Fukuyama University.

Anti-OPN antibody concentration in blood

M5 antibody or 35B6 (300 μg/mice) were intraperitoneally injected into mice every 7 days for 4 weeks and serum was collected on days 1, 3 and 6 after antibody injection. Antibody concentration was calculated by a solid-phase binding assay. Serum collected after antibody treatment was added to immunogen peptide (VDVPNGRGDSLAYGLR peptide)-coated 96-well plates. After 1 h incubation, peroxidase conjugated anti-mouse IgG antibody for 35B6 or M5 antibody was added as described above. Purified M5 antibody or 35B6 was used as a standard.

Concanavalin A-induced hepatitis model

C57BL/6 mice were injected intravenously with 10 mg concanavalin A (ConA) (Sigma-Aldrich) per kilogram of body weight, dissolved in pyrogen-free PBS. M5 or 35B6 (400 μg) was intraperitoneally administered to mice 15 h before ConA challenge. After 24 h, blood samples were collected for ALT and livers were removed for HE staining. The plasma ALT levels were measured by using a standard clinical autoanalyzer (DRICHEM 5500 V; Fujifilm, Tokyo, Japan). Necrotic areas were measured in each section by using ImageJ Software (version 1.52; National Institutes of Health). Necrotic areas were measured in a double-blind manner. For each tissue, data were obtained using six high power fields (×100).

NASH model

Seven-week-old male C57BL/6 mice were divided into two groups. One group was fed a choline deficient diet supplemented with 0.1% methionine on a high fat diet background (CDAHFD) (A06071302, Research Diets, New Brunswick, NJ, USA) for 8 weeks. The second group was fed a CDAHFD and intraperitoneally injected with 35B6 twice a week for 8 weeks. After 8 weeks, blood samples were collected for ALT and OPN ELISA, and livers were removed for HE and Sirius-red staining. Collagen content was quantified using ImageJ Software by assessment of the area of liver tissue that was stained positively by Sirius-red. For each tissue, data were obtained using six high power fields (×100). The areas were quantified in a double-blind manner. The expression of collagen I was assessed by anti-collagen I antibody ab34710 (Abcam, Cambridge, MA, USA). Sections of paraffin-embedded liver tissues were processed for immunohistochemistry according to the manufacturer’s instructions.

Evaluation of the extent of resultant NASH was scored using scaling scores (Brunt et al. 1999). Briefly, steatosis was graded according to the following scale: 0 = normal; 1 = < 33% affected hepatocytes; 2 = 33%–66% affected hepatocytes; and 3 = > 66% affected hepatocytes. Ballooning was graded a score of 0–3 based on severity: 0 = none; 1 = rare or few; 2 = moderate; and 3 = many. Lobular inflammation was graded a score of 0–3 based on inflammatory foci per ×20 field: 0 = none; 1 = 2 foci; 2 = 7 foci; and 3 = > 4 foci/×20 field.

Western blot analysis

Livers were homogenized in a lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, and 1× Complete Mini protease inhibitor mixture (Roche Diagnostics). Lysates were fractionated by SDS-PAGE and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). The filters were then immunoblotted with anti-OPN antibody (O-17), (34E3) (Immuno-Biological Laboratories), or anti-β-actin (Wako, Osaka, Japan). Immunoreactive proteins were visualized using an ECL detection system (PerkinElmer, Boston, MA, USA).

Statistical analysis

Data are presented as the mean ± SEM and are representative of at least three independent experiments. The statistical significance of differences between groups was calculated using a two-tailed Student’s *t* test or nonparametric Wilcoxon Mann–Whitney *U*-test where applicable. Differences were

Author's personal copy

considered significant when *P* was less than 0.05 (*) or 0.005 (**).

Results

Generation and characterization of 35B6

We generated a monoclonal antibody (35B6) by immunizing mice with the VDVPNGRGDSLAYGLR peptide, the same peptide used to generate the M5 antibody previously. To characterize the 35B6 epitope, we tested it within the VDVPNGRGDSLAYGLR antigen peptide. The peptides used in this study are shown in Fig. 1A. Epitope mapping revealed that 35B6 preferentially bound to the GDSLAYGLR peptide in a solid-phase binding assay (Fig. 1B). Because the antigen peptide contains RGD, a common integrin-binding sequence of extracellular matrix proteins (ECMs), we investigated the binding ability of 35B6 to RGD-sequence containing ECMs and found that 35B6 did not recognize fibronectin, vitronectin or laminin (Fig. 1C). Of note, 35B6 recognized mouse and human OPN.

Identification of a mouse α4β1 and α9β1 integrin-binding sequence

The SLAYGLR amino acid sequence was reported to be involved in binding to α4β1 and α9β1 integrins (Yamamoto et al. 2003; Uede 2011). However, it is unknown whether the SLAYGLR sequence has binding ability. Therefore, we examined whether the SLAYGLR peptide bound to α4β1 and α9β1 integrins using a cell adhesion test with CHO cells expressing mouse α4 integrin or mouse α9 integrin (Kanayama et al. 2009; Kouro et al. 2014), because CHO cells express RGD-recognizing integrins but not α4 or α9 integrins (Ito et al. 2009). The SLAYGLR sequence showed weak binding ability for α4β1, but not α9β1, integrin. The GDSLAYGLR sequence, an epitope of 35B6, exhibited significant binding to α9β1 and α4β1 integrins (Fig. 2), indicating the SLAYGLR sequence is not long enough for α4β1 and α9β1 integrin binding, and that the GDSLAYGLR sequence is the binding sequence for α4β1 and α9β1 integrins.

35B6 Inhibits cell RGD, α4β1 and α9β1 integrin-dependent cell adhesion to mouse and human OPN

We examined whether 35B6 had an inhibitory function using a cell adhesion test. We used the amino-terminal half of OPN (OPN N half) because it was shown to be a ligand of RGD-recognizing α4β1 and α9β1 integrins (Yokosaki et al. 1999; Barry et al. 2000a; Ito et al. 2009). CHO cells or CHO cells expressing mouse α4 integrin or mouse α9 integrin were used when mouse OPN was used as a coating protein, and CHO cells or CHO cells expressing human α4 integrin or human α9 integrin (Ito et al. 2009) were used when human OPN was

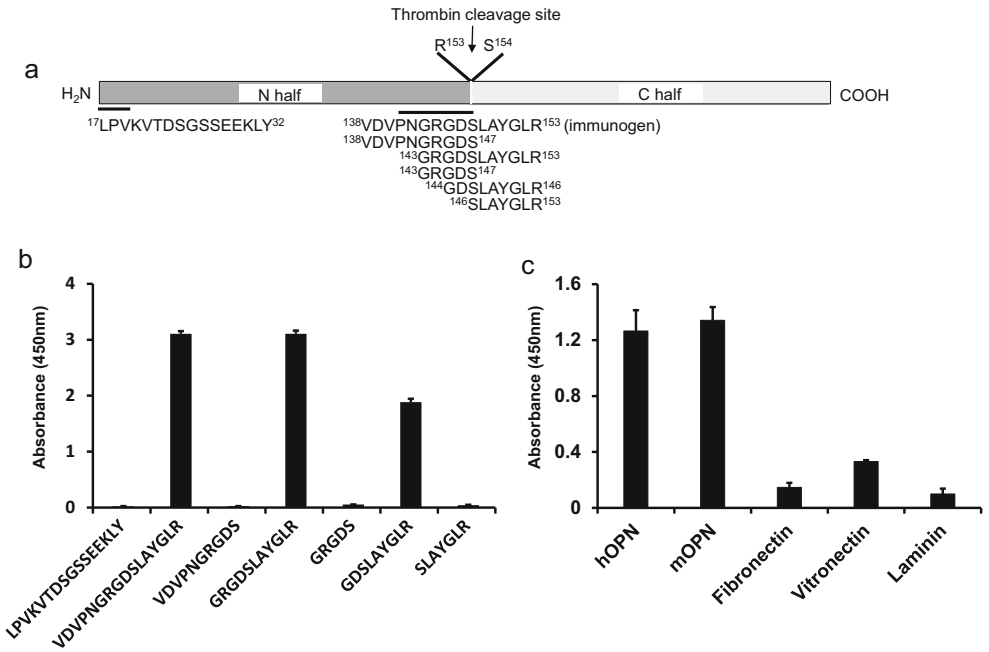


Fig. 1 Characterization of mAb 35B6. A. Mouse OPN structure and synthetic peptide. The position of the thrombin cleavage site (between R^{153} and R^{154}) and seven peptide sequences used for solid-phase binding assay are indicated. B-C. The synthetic peptides (5 μg/ml) (B), human OPN (hOPN), mouse OPN (mOPN), or fibronectin and vitronectin (5 μg/ml) (C) were coated onto 96-well plates. 35B6 at 2 μg/ml was added to protein-coated 96-well plates and the bound antibody was quantified as described in the Materials and Methods. Data are expressed as the mean of triplicate experiments

Author's personal copy

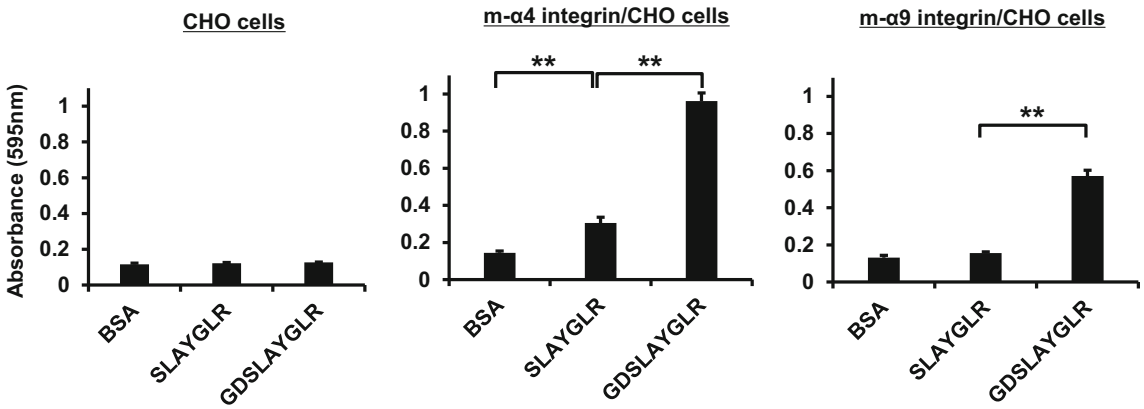


Fig. 2 Identification of mouse α4β1 and α9β1 integrin-binding sequences. Cell adhesion test results using BSA, SLAYGLR, or GDSLAYGLR peptides (5 μg/ml) with CHO cells or CHO cells expressing mouse α4 or α9 integrins. Data are presented as means ± SEM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$

used. 35B6 successfully inhibited the cell adhesion of mouse and human OPN to CHO cells or CHO cells expressing α4 or α9 integrin (Fig. 3A and B). 35B6 did not affect cell adhesion on the irrelevant substrates, fibronectin and vitronectin (Fig. 3C), indicating that 35B6 specifically inhibits OPN function. Cell adhesion inhibitory analysis revealed that 35B6 inhibited RGD-dependent cell adhesion as well as α4β1 and α9β1 integrin-dependent cell adhesion, although the epitope of 35B6 was GDSLAYGLR not GRGDS. This may be caused by steric hindrance because the GRGDS sequence is adjacent to the α4β1 and α9β1 integrin-binding sites.

To confirm that 35B6 persisted in the blood, we injected M5 or 35B6 into mice once a week and monitored the serum concentration of each antibody. 35B6 remained in the blood for at least 4 weeks, whereas the M5 antibody did not increase in concentration after the third injection

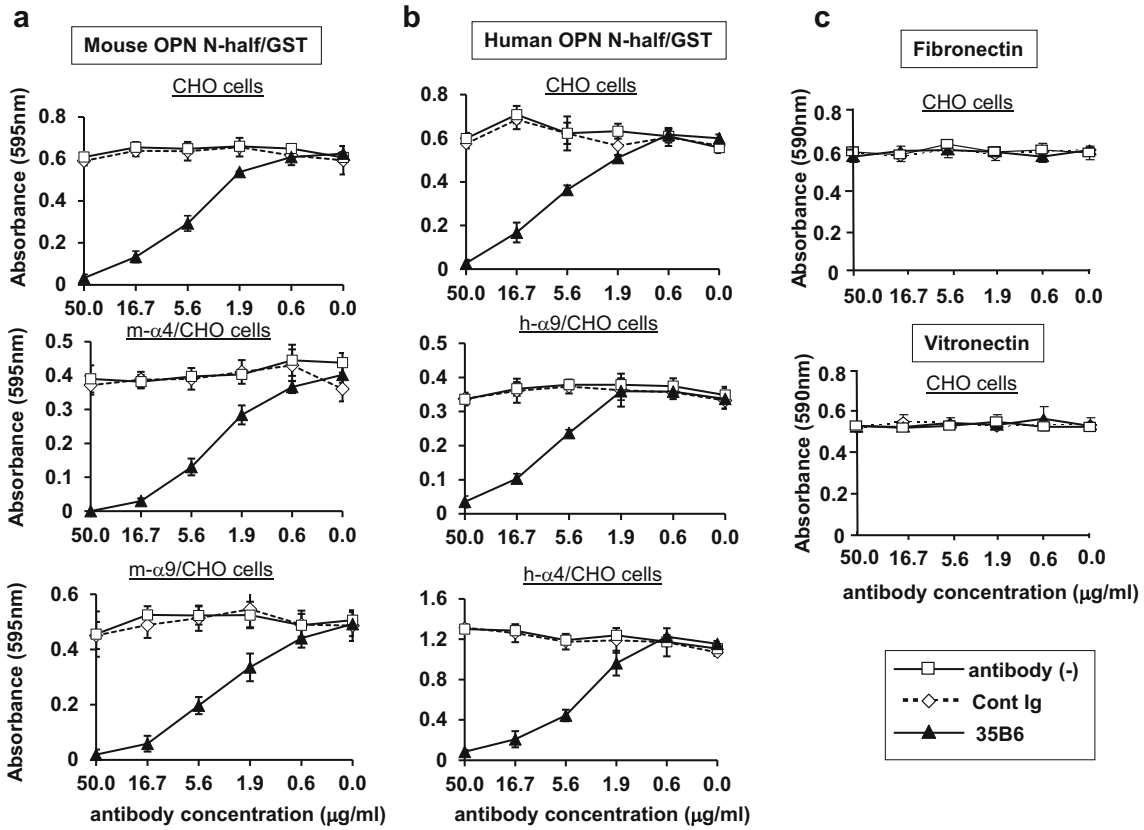


Fig. 3 35B6 inhibits the binding of OPN to CHO cells expressing integrin receptors. The inhibitory effects of 35B6 were assessed by cell adhesion assay. Cell adhesion inhibitory effect of 35B6 for mouse OPN (A), human OPN (B), or fibronectin and vitronectin (C) with CHO cells or CHO cells expressing α4 or α9 integrins

Author's personal copy

(Fig. 4), indicating that 35B6 can be used to inhibit OPN in long-term studies.

35B6 Inhibits ConA-induced hepatic injury

To confirm 35B6 has inhibitory effects on OPN function in vivo, we investigated whether 35B6 inhibited ConA-induced hepatitis because we previously reported that M5 protected mice from ConA-induced hepatitis (Diao et al. 2004). 35B6 treatment significantly ameliorated ConA-induced hepatitis as determined by the level of plasma ALT (Fig. 5A) and liver histology (Fig. 5B, C). The inhibitory effect of 35B6 was comparable with M5. Thus, 35B6 can be used to evaluate the in vivo function of OPN.

35B6 Inhibits the infiltration of inflammatory cells and fibrosis in NASH livers

A characteristic of NASH is the presence of hepatic inflammation and continued inflammation in the liver is thought to drive the development of fibrosis. It was reported that OPN is upregulated in the blood and liver and is involved in hepatic inflammation and fibrosis in NASH (Sahai et al. 2004; Syn et al. 2011; Coombes et al. 2016). However, whether NASH can be inhibited by blocking OPN function with an antibody is unknown. Therefore, we investigated whether 35B6 affected NASH progression in mice. To induce NASH, a CDAHFD was fed to mice for 8 weeks. Before antibody treatment, we analyzed OPN expression in NASH livers. OPN mRNA tended to be increased in livers ($P = 0.052$) by real-time PCR and OPN production was significantly upregulated in the liver by ELISA (Fig. 6A). Upregulated OPN expression was re-confirmed by western blotting (Fig. 6B). Of note, thrombin-cleaved OPN was detected by western blotting using antibody against thrombin-cleaved OPN. We next evaluated the expressions of α9β1 and α4β1 integrins because thrombin-cleaved OPN binds to α4 and α9 integrins. Real-time PCR revealed that α4 integrin was significantly upregulated and α9 integrin tended to be increased ($P = 0.096$) in NASH livers (Fig. 6C).

To analyze the effect of 35B6 in NASH progression, 35B6 was injected twice a week during CDAHFD feeding (8 weeks) (Fig. 7A). There was no difference in body weight between control NASH and 35B6-treated mice (Fig. 7B). Plasma ALT levels in 35B6-treated mice tended to be lower than in control NASH mice ($P = 0.12$) (Fig. 7C). Histochemical staining, and HE staining and Sirius-red staining, of NASH livers demonstrated that 35B6 treatment attenuated the infiltration of inflammatory cells and fibrosis, respectively (Fig. 7D, G), whereas there were no obvious differences in the degree of steatosis and ballooning between control NASH and 35B6-treated mice (Fig. 7E, F). Attenuation of fibrosis in 35B6-treated mice was confirmed by immuno-histochemical analysis using anti-collagen I antibody (Fig. 7D). Collagen content was quantified as the percentages of Sirius red-positive areas and we found that 35B6 significantly reduced the degree of liver fibrosis compared with control NASH mice (Fig. 7H). Furthermore, expression of the type I collagen α1 chain (col1a1) analyzed by real-time PCR was significantly decreased in 35B6-treated mice compared with control NASH mice (Fig. 7I). Finally, we analyzed the mRNA expressions of TNF-α and α-SMA, which are inflammation or fibrogenic mediators, respectively. TNF-α and α-SMA mRNA expressions were significantly decreased in the livers of 35B6-treated mice, compared with control NASH (Fig. 7J).

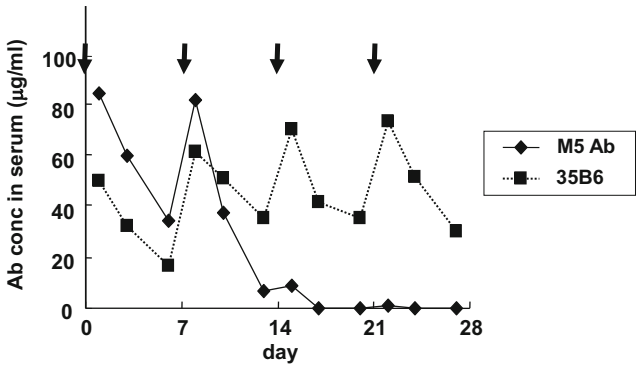


Fig. 4 Antibody concentration in serum after anti-OPN antibody injection. M5 antibody or 35B6 (300 μg/mice) were injected into mice every 7 days for 4 weeks. Arrows indicate antibody injection days. Sera were collected on days 1, 3 and 6 after antibody injection. Antibody concentration was tested by a solid-phase binding assay using an immunogen-coated plate coated with antigen peptide

Discussion

There have been many reports of the pathological roles of OPN in inflammatory disease, fibrosis, or tumor development, using OPN deficient mice. However, the genetic background of deficient mice affects the development of various disease models especially immune diseases including collagen-induced arthritis or experimental autoimmune encephalitis (Blom et al. 2003). Therefore, the use of a neutralizing antibody is a preferable approach to analyze the function of OPN in vivo. To date, two neutralizing antibodies against mouse OPN have been reported: AF-808 antibody by R&D Systems (Xanthou et al. 2007; Murugaiyan et al. 2008) and M5 (Yamamoto et al. 2003; Diao et al. 2004). However, these polyclonal antibodies are generated in goats (AF-808) or rabbits (M5) and do not persist in the blood to inhibit OPN function over long periods because an anti-idiotype antibody against anti-OPN polyclonal antibody is induced. Indeed, Fig. 4 indicates that the antibody concentration of M5 was maintained for only 2 weeks in mice. In this study, we generated a mouse monoclonal antibody in mice and confirmed

Author's personal copy

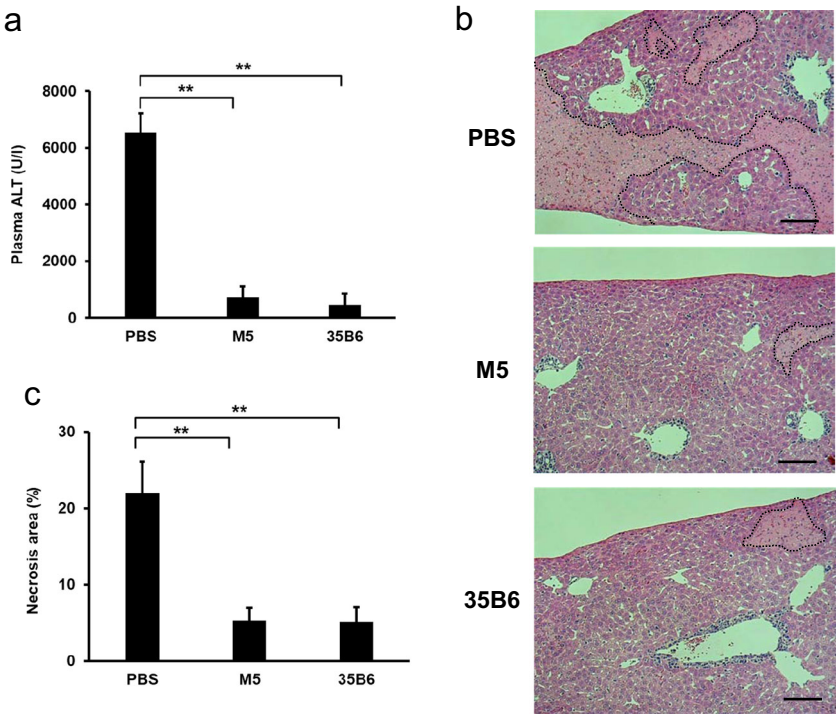


Fig. 5 Inhibitory effect of M5 and 35B6 on the development of ConA-induced hepatitis. C57BL/6 mice were intraperitoneally treated with M5 or 35B6 antibody (400 μg/head) at 15 h before ConA injection. Plasma ALT levels (A) and HE staining (B) at 24 h after ConA injection are shown. Dotted line denotes necrotic area. Necrotic areas per liver section were quantified by ImageJ software. Data are presented as means ± SEM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$. Bar = 100 μm

that the antibody titer of 35B6 in the blood was maintained for at least 1 month by treatment once a week. Furthermore, 35B6 recognized human OPN and inhibited the binding of mouse and human OPN to OPN receptors, and RGD-recognizing α4 and α9 integrins, indicating it might help elucidate the role of OPN in the pathogenesis of disease in humans and various animal models.

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common chronic liver disease, and some patients (approximately 10%–20%) develop NASH, which has a high risk for

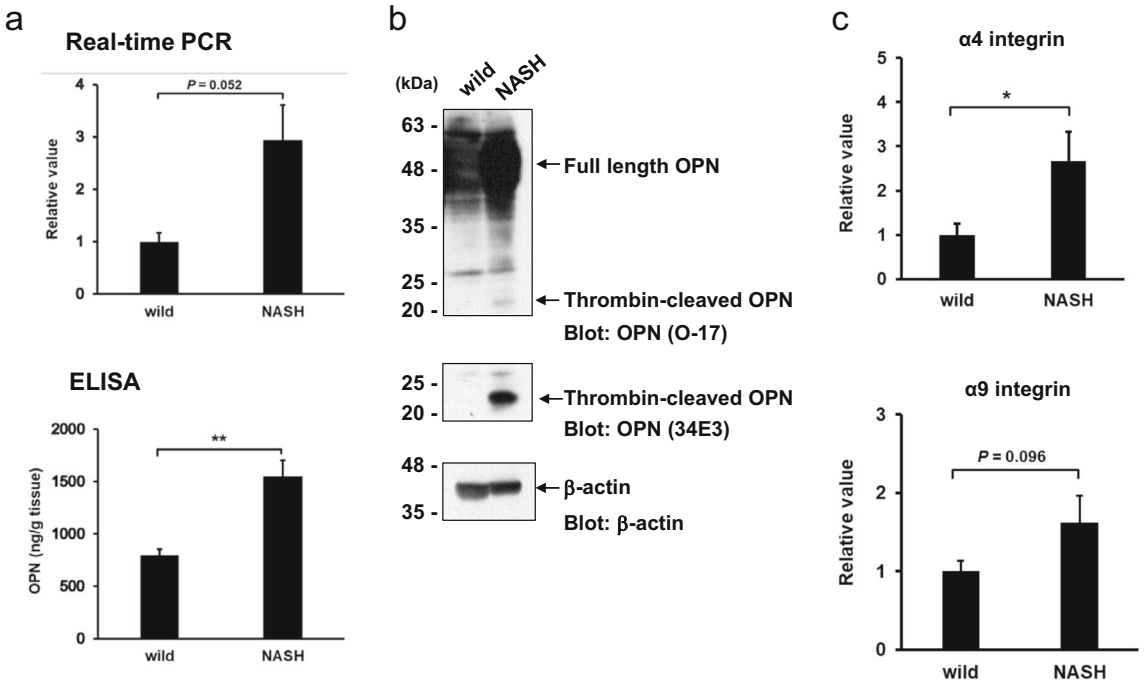


Fig. 6 Expression of OPN in NASH livers. A. Expression of OPN in NASH analyzed by real-time PCR (upper panel) and ELISA (lower panel). B. Expression of OPN and thrombin-cleaved OPN in NASH by western blotting. C. Expression of α4 (upper panel) or α9 integrins (lower panel) in NASH analyzed by real-time PCR. Data are presented as means ± SEM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$

Author's personal copy

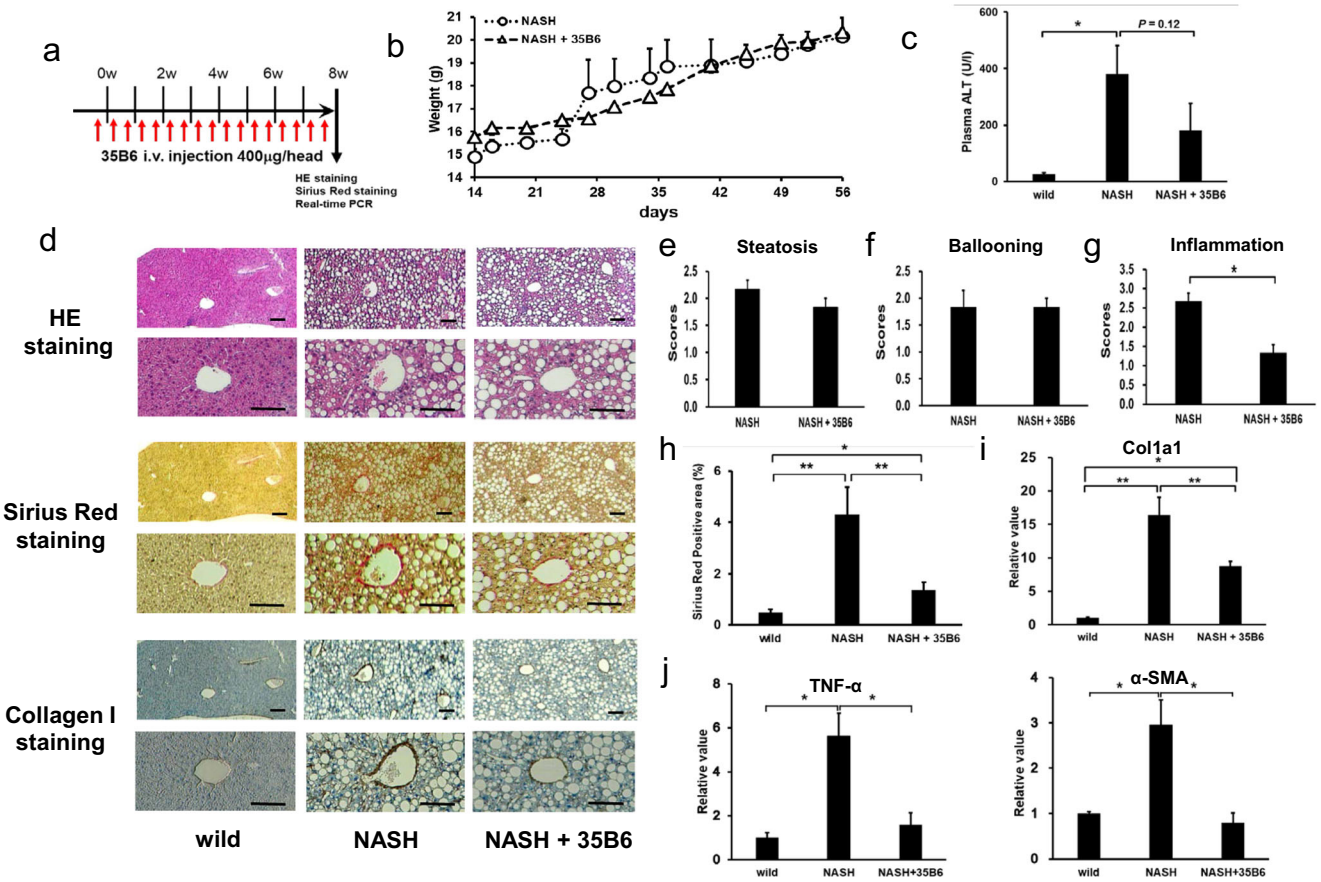


Fig. 7 35B6 protects mice from NASH progression. A. Protocol for NASH with anti-35B6 treatment. B. Change in body weight. C. Plasma ALT levels at 8 weeks after feeding with CDAHFD. D. Representative liver histology of mice treated with 35B6, control NASH mice, or wildtype mice. Livers were obtained at 8 weeks after feeding with CDAHFD and 35B6 treatment. Liver sections were stained with HE, Sirius Red, or anti-collagen I antibody. Original magnification, ×40 (upper panel) or ×100 (lower panel). Scale bar = 100 μm. E. Scale scores of steatosis (E), ballooning (F) and inflammation (G). H. Quantification of Sirius Red stained images by ImageJ software. Relative mRNA expression levels of col1a1 and col3a1 (I), and TNF-α and α-SMA (J) analyzed by real-time PCR in livers obtained after 8 weeks of treatment. Data are presented as means ± SEM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$

cirrhosis or hepatocellular carcinoma (Chen et al. 2018; Papatheodoridi et al. 2019). CDAHFD feeding in mice is a well-established NASH model with similar histological features to human NASH patients including hepatic inflammation and pericellular fibrosis (Matsumoto et al. 2013). It was reported that OPN levels were upregulated in the liver tissues and blood of NASH patients and in NASH mouse models (Sahai et al. 2004). Furthermore, the loss of OPN function reduced liver inflammation and fibrosis in mouse models of NASH (Syn et al. 2011; Coombes et al. 2016). In this study, we confirmed the reduction of inflammation and fibrosis in NASH livers using 35B6. These results implicate RGD-recognizing integrins such as αvβ3, α4, or α9 in NASH progression, which is an hypothesis requiring specific testing in blocking the relevant integrins. αvβ3 integrin is expressed on hepatic stellate cells (HSC) and is involved in the activation of HSC (Li et al. 2015), and has important proinflammatory functions such as inducing the production of proinflammatory cytokines and activation of leukocytes at sites of inflammation (Kahles et al. 2014). α4β1 and α9β1 integrins are expressed on neutrophils and macrophages (Uede 2011). Neutrophils generate reactive oxygen species (ROS) that cause lipid peroxidation and HSC migration; thus facilitating cellular injury and fibrosis (Casini et al. 1997). Macrophages produce a variety of cytokines such as TNF-α and TGF-β. Livers contain many natural killer T (NKT) cells. We previously reported that NKT cells express α4β1 and α9β1 integrins (Diao et al. 2004). In that report, OPN secreted from NKT cells augmented NKT cell activation and M5 antibody suppressed concanavalin A (Con A)-induced hepatitis. NKT cells were reported to accumulate and promote fibrosis progression in NASH (Syn et al. 2010).

35B6 treatment showed a partial inhibition of inflammation and fibrosis in NASH livers, which might be associated with the involvement of other integrin ligands in the integrin family. Further studies will be directed at understanding the mechanism by which interactions between integrins and integrin ligands including OPN affect NASH progression.

Author's personal copy

In this study, 35B6 suppressed hepatic inflammation and fibrosis in mice fed a CDAHFD. However, our study had some limitations. It was reported that a choline deficient diet model, such as the MCD model, does not reflect human NASH pathogenesis (Li et al. 2018) where the metabolic context is distinct between a choline deficient diet model and human NASH. Therefore, further investigations are required to elucidate the role of OPN in NASH pathogenesis by using clinically relevant models such as the high-fat-fed, streptozotocin-induced model (Fujii et al. 2013).

In conclusion, we generated an anti-mouse OPN mouse monoclonal antibody, 35B6, which recognizes mouse and human OPN and blocks the adhesion of human and mouse OPN to OPN receptors. Moreover, 35B6 concentrations were maintained at high levels over a long duration by repeated antibody injection. Thus, 35B6 is a powerful experimental tool to clarify OPN function in the development of various diseases. In this study, we showed that 35B6 treatment suppressed inflammatory cell infiltration and fibrosis in a mouse model of NASH. Therefore, 35B6 might be a useful antibody for the prevention and treatment of hepatic inflammation and fibrosis in NASH.

Acknowledgements We would like to thank to Junko Miyazaki (Fukuyama University), Kazutaka Matsunami (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.) and Masaya Takeuchi (Sapporo General Pathology Laboratory Co., Ltd.) for excellent support in the in vivo studies. This study was supported by research grants from JSPS KAKENHI (Grant Numbers 16 K08221 and 19 K07492), the Japan Rheumatism Foundation, the SUHARA Memorial Foundation, the FUGAKU TRUST for Medical Research, and academic support from Pfizer, Chugai, Astellas and Eli Lilly to SK. We thank Edanz Group (www.edanzediting.com/ac) for editing a draft of this manuscript.

Author contributions TU and SK designed the study. MH, CK, and SK performed the experiments. SK wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Barry ST, Ludbrook SB, Murrison E, Horgan CM (2000a) Analysis of the alpha4beta1 integrin-osteopontin interaction. Exp Cell Res 258: 342–351

Barry ST, Ludbrook SB, Murrison E, Horgan CM (2000b) A regulated interaction between alpha5beta1 integrin and osteopontin. Biochem Biophys Res Commun 267:764–769

Bayless KJ, Davis GE (2001) Identification of dual alpha 4beta1 integrin binding sites within a 38 amino acid domain in the N-terminal thrombin fragment of human osteopontin. J Biol Chem 276: 13483–13489

Blom T, Franzen A, Heinegard D, Holmdahl R (2003) Comment on "the influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease". Science 299:1845 author reply 1845

Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR (1999) Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. Am J Gastroenterol 94: 2467–2474

Casini A, Ceni E, Salzano R, Biondi P, Parola M, Galli A, Foschi M, Caligiuri A, Pinzani M, Surrenti C (1997) Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. Hepatology 25:361–367

Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, Bernard CC, Rittling SR, Denhardt DT, Sobel RA, Lock C, Karpuj M, Pedotti R, Heller R, Oksenberg JR, Steinman L (2001) The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. Science 294:1731–1735

Chen W, Zhang J, Fan HN, Zhu JS (2018) Function and therapeutic advances of chemokine and its receptor in nonalcoholic fatty liver disease. Ther Adv Gastroenterol 11:1756284818815184

Coombes JD, Choi SS, Swiderska-Syn M, Manka P, Reid DT, Palma E, Briones-Orta MA, Xie G, Younis R, Kitamura N, Della Peruta M, Bitencourt S, Dolle L, Oo YH, Mi Z, Kuo PC, Williams R, Chokshi S, Canbay A, Claridge LC, Eksteen B, Diehl AM, Syn WK (2016) Osteopontin is a proximal effector of leptin-mediated non-alcoholic steatohepatitis (NASH) fibrosis. Biochim Biophys Acta 1862:135–144

Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS (2001) Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. J Clin Invest 107:1055–1061

Diao H, Kon S, Iwabuchi K, Kimura C, Morimoto J, Ito D, Segawa T, Maeda M, Hamuro J, Nakayama T, Taniguchi M, Yagita H, Van Kaer L, Onoe K, Denhardt D, Rittling S, Uede T (2004) Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases. Immunity 21:539–550

Fujii M, Shibazaki Y, Wakamatsu K, Honda Y, Kawauchi Y, Suzuki K, Arumugam S, Watanabe K, Ichida T, Asakura H, Yoneyama H (2013) A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of association between diabetes and hepatocellular carcinoma. Med Mol Morphol 46:141–152

Helluin O, Chan C, Vilaire G, Mousa S, DeGrado WF, Bennett JS (2000) The activation state of alphavbeta 3 regulates platelet and lymphocyte adhesion to intact and thrombin-cleaved osteopontin. J Biol Chem 275:18337–18343

Ito K, Kon S, Nakayama Y, Kurotaki D, Saito Y, Kanayama M, Kimura C, Diao H, Morimoto J, Matsui Y, Uede T (2009) The differential amino acid requirement within osteopontin in alpha4 and alpha9 integrin-mediated cell binding and migration. Matrix Biol 28:11–19

Kahles F, Findeisen HM, Bruemmer D (2014) Osteopontin: a novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes. Molecular metabolism 3:384–393

Kanayama M, Kurotaki D, Morimoto J, Asano T, Matsui Y, Nakayama Y, Saito Y, Ito K, Kimura C, Iwasaki N, Suzuki K, Harada T, Li HM, Uehara J, Miyazaki T, Minami A, Kon S, UedeT (2009) Alpha9 integrin and its ligands constitute critical joint microenvironments for development of autoimmune arthritis. J Immunol 182:8015–8025

Kon S, Ikesue M, Kimura C, Aoki M, Nakayama Y, Saito Y, Kurotaki D, Diao H, Matsui Y, Segawa T, Maeda M, Kojima T, Uede T (2008) Syndecan-4 protects against osteopontin-mediated acute hepatic injury by masking functional domains of osteopontin. J Exp Med 205: 25–33

Kon S, Yokosaki Y, Maeda M, Segawa T, Horikoshi Y, Tsukagoshi H, Rashid MM, Morimoto J, Inobe M, Shijubo N, Chambers AF, Uede T (2002) Mapping of functional epitopes of osteopontin by

Author's personal copy

monoclonal antibodies raised against defined internal sequences. J Cell Biochem 84:420–432

Konno S, Hoshi T, Taira T, Plunkett B, Huang SK (2005) Endotoxin contamination contributes to the in vitro cytokine-inducing activity of osteopontin preparations. J Interferon Cytokine Res 25:277–282

Kouro H, Kon S, Matsumoto N, Miyashita T, Kakuchi A, Ashitomi D, Saitoh K, Nakatsuru T, Togi S, Muromoto R, Matsuda T (2014) The novel alpha4B murine alpha4 integrin protein splicing variant inhibits alpha4 protein-dependent cell adhesion. J Biol Chem 289: 16389–16398

Li D, He L, Guo H, Chen H, Shan H (2015) Targeting activated hepatic stellate cells (aHSCs) for liver fibrosis imaging. EJNMMI Res 5:71

Li H, Toth E, Cherrington NJ (2018) Asking the right questions with animal models: methionine- and choline-deficient model in predicting adverse drug reactions in human NASH. Toxicol Sci 161:23–33

Matsumoto M, Hada N, Sakamaki Y, Uno A, Shiga T, Tanaka C, Ito T, Katsume A, Sudoh M (2013) An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. Int J Exp Pathol 94:93–103

Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R, Hughes J (2002) Osteopontin–a molecule for all seasons. Qjm 95: 3–13

Murugaiyan G, Mittal A, Weiner HL (2008) Increased osteopontin expression in dendritic cells amplifies IL-17 production by CD4+ T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and in multiple sclerosis. J Immunol 181:7480–7488

Papatheodoridi AM, Chrysavgis L, Koutsilieris M, Chatzigeorgiou A (2019) The role of senescence in the development of non-alcoholic fatty liver disease and progression to non-alcoholic steatohepatitis. Hepatology (Jun 23). https://doi.org/10.1002/hep.30834

Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC (2006) Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. Trends Cell Biol 16:79–87

Sahai A, Malladi P, Melin-Aldana H, Green RM, Whitington PF (2004) Upregulation of osteopontin expression is involved in the development of nonalcoholic steatohepatitis in a dietary murine model. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 287:G264–G273

Shinohara ML, Kim JH, Garcia VA, Cantor H (2008) Engagement of the type I interferon receptor on dendritic cells inhibits T helper 17 cell development: role of intracellular osteopontin. Immunity 29:68–78

Syn WK, Choi SS, Liaskou E, Karaca GF, Agboola KM, Oo YH, Mi Z, Pereira TA, Zdanowicz M, Malladi P, Chen Y, Moylan C, Jung Y, Bhattacharya SD, Teaberry V, Omenetti A, Abdelmalek MF, Guy CD, Adams DH, Kuo PC, Michelotti GA, Whitington PF, Diehl AM (2011) Osteopontin is induced by hedgehog pathway activation and promotes fibrosis progression in nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology 53:106–115

Syn WK, Oo YH, Pereira TA, Karaca GF, Jung Y, Omenetti A, Witek RP, Choi SS, Guy CD, Fearing CM, Teaberry V, Pereira FE, Adams DH, Diehl AM (2010) Accumulation of natural killer T cells in progressive nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 51:1998–2007

Takahashi A, Kurokawa M, Konno S, Ito K, Kon S, Ashino S, Nishimura T, Uede T, Hizawa N, Huang SK, Nishimura M (2009) Osteopontin is involved in migration of eosinophils in asthma. Clin Exp Allergy 39:1152–1159

Uede T (2011) Osteopontin, intrinsic tissue regulator of intractable inflammatory diseases. Pathol Int 61:265–280

Uede T, Katagiri Y, Iizuka J, Murakami M (1997) Osteopontin, a coordinator of host defense system: a cytokine or an extracellular adhesive protein? Microbiol Immunol 41:641–648

Weber GF (2001) The metastasis gene osteopontin: a candidate target for cancer therapy. Biochim Biophys Acta 1552:61–85

Xanthou G, Alissafi T, Semitekolou M, Simoes DC, Economidou E, Gaga M, Lambrecht BN, Lloyd CM, Panoutsakopoulou V (2007) Osteopontin has a crucial role in allergic airway disease through regulation of dendritic cell subsets. Nat Med 13:570–578

Yamamoto N, Sakai F, Kon S, Morimoto J, Kimura C, Yamazaki H, Okazaki I, Seki N, Fujii T, Uede T (2003) Essential role of the cryptic epitope SLAYGLR within osteopontin in a murine model of rheumatoid arthritis. J Clin Invest 112:181–188

Yamamoto N, Nakashima T, Torikai M, Naruse T, Morimoto J, Kon S, Sakai F, Uede T (2007) Successful treatment of collagen-induced arthritis in non-human primates by chimeric anti-osteopontin antibody. Int Immunopharmacol 7:1460–1470

Yokosaki Y, Matsuura N, Sasaki T, Murakami I, Schneider H, Higashiyama S, Saitoh Y, Yamakido M, Taooka Y, Sheppard D (1999) The integrin alpha(9)beta(1) binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin. J Biol Chem 274:36328–36334

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

送信元：福山大学　総務部　企画・文書課
〒729-0292　広島県福山市学園町１番地三蔵
Tel：084-936-2111(代)　FAX：084-936-2213

令和元年　　月　　日

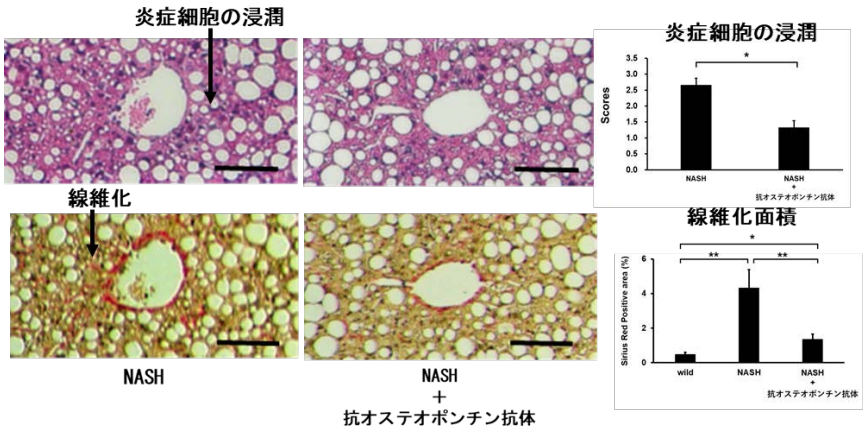
Press Release
報道関係者各位

非アルコール性脂肪肝炎の新たな治療薬への期待！

研究成果の概要

肝臓の病気というと、お酒（アルコール）の関与を多くの人が考えると思います。しかし、現在、お酒をほとんど飲まない人に起こる脂肪肝が増加しており、肝組織に炎症を伴う状態を非アルコール性脂肪肝炎（NASH）と言います。NASH は、肥満や糖尿病などの生活習慣病を合併している場合が多く、「生活習慣病の肝臓への反映像」とも呼ばれており、国内で 100 万人に達するとの報告もあります。また、NASH が進行すると肝線維化や肝硬変、肝がんのリスクが高まることが分かっておりますが、NASH の有効な薬物療法は未だ確立されておりません。このことから、NASH 進展に関わる分子の発見や治療薬の開発が切望されております。

福山大学薬学部の本田真知子助手と今重之教授らの研究グループは、自己免疫疾患に関与する分子であるオステオポンチンが、NASH マウスで発現が亢進することを見出しました。そこで当研究室ではオステオポンチン機能を効果的に阻害できる抗体を作製し、本抗体を用いることで NASH 進展に伴う肝臓内への炎症細胞の浸潤や線維化を有意に阻害することに成功しました（下図）。今回作製した抗体は、ヒトオステオポンチン機能も阻害できる能力も有することから、今回使用した抗体はヒト NASH の治療薬への効率的な抗体医薬への応用が可能になると期待できます。



本研究は、科学研究費補助金などの助成を受けて実施されました。

論文発表の概要

研究論文名：Neutralizing antibody against osteopontin attenuates non-alcoholic steatohepatitis in mice.
（オステオポンチンに対する阻害抗体は、非アルコール性脂肪肝炎の増悪化を抑制する）
公表雑誌：Journal of Cell Communication and Signaling
公表日：2020 年　2 月　16 日（日曜日）（オンライン公開）

本件に関するお問い合わせ先

所属・職・氏名：福山大学薬学部　教授　今　重之（こん　しげゆき）
Tel：084-936-2112（内線 5255）、Fax：084-936-2024、E-mail：kon@fukuyama-u.ac.jp
ホームページ：http://web.fukuyama-u.ac.jp/pharm/htmls/Labo/labs/mol.immun/index.html