

Topics 1

バイオマーカーとは
—ペリオスチンを中心に—太田昭一郎^a/ 出原 賢治^b

要旨：マトリセルラー蛋白質の一つであるペリオスチンは、種々の炎症疾患や線維化疾患で発現が上昇する。著者らは、血清ペリオスチン濃度を測定する高性能 ELISA システムを構築し、ペリオスチンのバイオマーカーとしての有用性を示してきた。呼吸器疾患のなかでは気管支喘息や特発性間質性肺炎のバイオマーカーとしての臨床応用が期待される。

キーワード：気管支喘息，特発性間質性肺炎，線維化，
コンパニオン診断薬，層別化医療
Bronchial asthma, Idiopathic interstitial pneumonia,
Fibrosis, Companion diagnostics, Stratified medicine

連絡先：太田 昭一郎

〒849-8501 佐賀市鍋島 5-1-1

^a 佐賀大学医学部臨床検査医学講座

^b 同 分子生命科学講座分子医化学分野

(E-mail: ohtasho@cc.saga-u.ac.jp)

はじめに

バイオマーカー¹⁾とは、生体から得られる情報や物質で、疾患の有無や進行度、治療への反応性、または副作用の強弱の指標となるものをいい、近年の層別化医療の進展に伴いその重要性がますます高まっている。

ペリオスチン (periostin) はマトリセルラー蛋白質の一つであり、線維化病変での発現がしばしば認められる。著者らは、ペリオスチンの発現がinterleukin (IL)-4/IL-13により誘導されることを見だし、以来アレルギー疾患において重要な役割をもつ分子として研究を進めている。当初はアレルギー疾患における解析が主であったが、気管支喘息の線維化部分のみならず、間質性肺炎や悪性腫瘍など、他の線維化が関与する疾患でも発現が上昇することがわかってきた。その発現は血中濃度にも反映され、血中ペリオスチンをバイオマーカーとして測定することが、種々の疾患の診断に新たな展開をみせている。

本稿ではペリオスチンについて概説し、気管支喘息と特発性間質性肺炎について、そのバイオマーカーとしての可能性を紹介する。

今日のバイオマーカーが果たす役割

従来、同じ疾患をもつ患者に対しては、疾患ごとに定まった治療法があり、同一の薬剤を用い同一のプロトコールに則って治療を進めるのが基本的な考え方であった。しかし、同一の治療を行っても、ある患者にはよく効き、ある患者にはあまり効果がない、といったことがしばしば経験される。それは、それぞれの患者がもつ特性や状態 (遺伝子、エピゲノム、蛋白質発現、環境など) に違いがあり、それによって治療に対する反応性や副作用が変わってくるからである。近年ようやく、各患者 (もしくは差異ごとに層別化された群) の特性に応じて治療方針を決定することで、治療効果を向上させ、また副作用を軽減することが試みられるようになってきた。これは、層別化医療と呼ばれ、急速に進展し始めている。層別化医療の類義語・同義語として、個別化医療、テーラーメイド医療、オーダーメイド医療、も存在する。層別化医療においては、患者の特性を分類し、それぞれに最適な治療を行うため、バイオマーカーによる患者状態の評

表1 層別化医療におけるバイオマーカーの用途

バイオマーカーのタイプ	用途
1. スクリーニング/リスクマーカー	発症前のハイリスク群の同定と層別化
2. 診断マーカー	症状出現後に診断を確定
3. 重症度マーカー	エンドタイプレベルでの重症度の判定
4. 予後マーカー	症状進行のリスクを示唆する表現型で層別化
5. 治療効果予測マーカー	治療に対する反応性で層別化
6. 薬物動態マーカー	薬剤代謝および副作用リスクの層別化

(Bieber ら²⁾より引用)

価が必須であり、①スクリーニング、②診断、③重症度、④予後、⑤治療効果、⑥薬物動態を規定するバイオマーカーが必要になってくる²⁾(表1)。体重・血圧・心拍数等の生理学的指標も古典的なバイオマーカーとして用いられてきたが、これらの個人差だけでは各人の特性を分類するのは難しい。層別化医療に求められるのは主に分子バイオマーカーや遺伝子バイオマーカーである。

2003年にヒトゲノム計画が終了して以降、DNA配列決定法は長足の進歩を遂げており、SNPsに代表されるジェノタイプの違いを簡易に安価で検査することができるようになった。それにより、抗腫瘍薬の分野では、非小細胞肺癌でのEGF受容体変異に対するゲフィチニブ投与選択をはじめとして、ジェノタイプをバイオマーカーとして分子標的薬を選択する治療が早くから開始されている。また、薬物代謝に関わるチトクロームP450グループの酵素でも、一塩基多型 (SNPs) の違いによる代謝能の差異をバイオマーカーとして、投与薬剤量を調節することが行われている。現在我が国では文部科学省が「オーダーメイド医療実現化プロジェクト」(<http://www.biobank.jp/index.html>)を推進しており、38疾患がその対象となっているが、どれもジェノタイプをバイオマーカーとした研究が主体である。

本稿でとりあげる気管支喘息患者の示すフェノタイプはある程度類似しているが、その発症進展には、遺伝要因や環境要因等の複数の要因が複雑に絡み合うため、個々の患者で異なる病態を示す場合が少なくない。特発性間質性肺炎にしても間質の線維化というフェノタイプを共有しながら、その進展度合いや薬剤反応性が患者間で異なることが知られている。したがって、これらの疾患では、疾患形成の分子的機序に基づく病態であるとこ

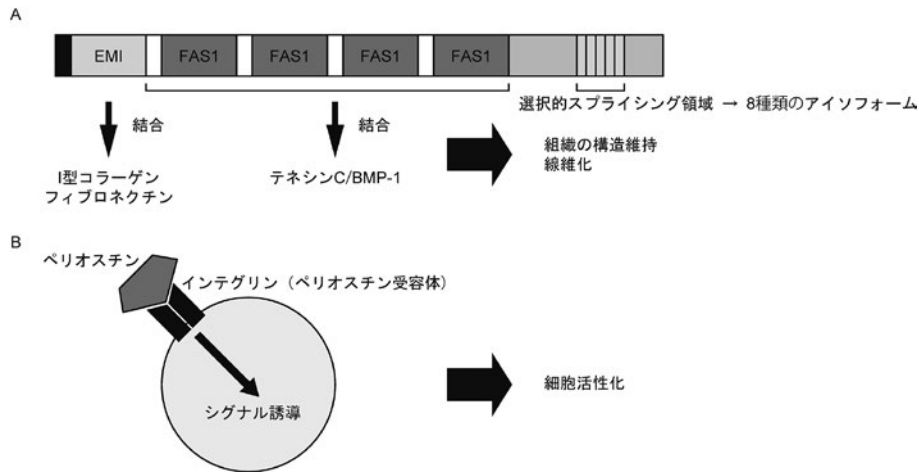


図1 ペリオスチンの構造と機能. (A) 細胞外マトリックス蛋白質としてのペリオスチン. (B) マトリセルラー蛋白質としてのペリオスチン.

ろのエンドタイプ³⁾を診断特定することによって初めてそれに対応する有効な治療を行うことが可能となり、そのためにはエンドタイプを診断できるバイオマーカーが必要となる。

また、創薬におけるバイオマーカーは、「コンパニオン診断薬」としてその重要性を増している。近年さかんに開発されている分子標的薬は、投与対象のエンドタイプにより薬効が大きく異なるため、効果判断にはエンドタイプを診断することが必須となるからである。

バイオマーカーとしてのペリオスチンの特徴

ペリオスチンはマトリセルラー蛋白質の一つであり、健全組織でもさまざまな組織で構造的に発現している。マトリセルラー蛋白質とは、受容体を介して細胞に結合し、その細胞の機能を調節する働きをもつ細胞外マトリックス蛋白質のことである。ペリオスチンは細胞表面のインテグリン $\alpha_v\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 、および $\alpha_6\beta_1$ を介して細胞にシグナルを誘導することがわかっており、細胞の遊走や分化増殖に関与すると考えられている(図1B)。その一方で、古典的な細胞外マトリックス分子として、コラーゲンI、フィブロネクチン、テネシンCといった他の細胞外マトリックス分子と結合して、コラーゲン線維形成を促進し、組織構造の維持構築を行うとともに、創

傷治癒や炎症に伴う線維化にも寄与している(図1A)。

ペリオスチンの発現を誘導する因子としてはTGF- β やBMP-2が知られているが、著者らは T_H2 型サイトカインであるIL-4およびIL-13がTGF- β 非依存的にペリオスチン発現を誘導することを明らかにし、これが気管支喘息で増加していることを示したのがアレルギー疾患分野においては最初の報告となった⁴⁾。そこで、当初はアレルギー疾患における T_H2 マーカーとしての開発を目指していたが、その後種々の線維化を伴う疾患で発現が上昇していることが明らかになってきた。つまり、慢性炎症による組織の再構成(リモデリング)が起こり、線維化が高度になるほど高い発現が認められるようになるため、ペリオスチンは組織リモデリングのバイオマーカーともいえる。

ペリオスチンがバイオマーカーとして有利な点の一つは、血清濃度が数十ng/mlと低いので、局所でのわずかな産生増加であっても血清濃度に反映されやすいことである。線維化部位では他の細胞外マトリックス蛋白質であるフィブロネクチンやビトロネクチンなども増加するが、それらの血清濃度は健常人でも数百 μ g/mlと高く、線維化部位局所で増加したとしても血清濃度の有意な上昇としては検出されにくい。反対に、IL-4やIL-13の血清濃度はpg/mlオーダーときわめて低値であり、正確な測定が困難である。

もう一つの利点は、著者らの開発した、高性能なペリオスチンのサンドイッチenzyme-linked immunosorbent

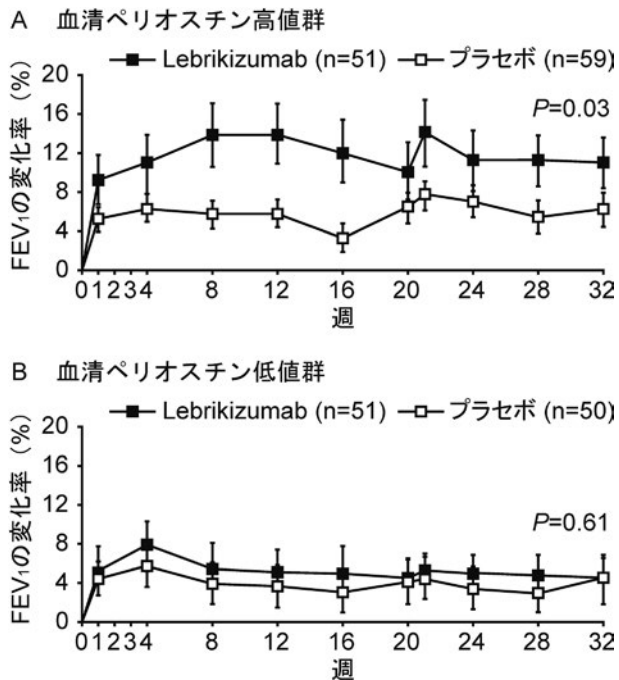


図2 Lebrikizumab 第III相臨床試験の結果。(A) 血清ペリオスチン高値群。(B) 血清ペリオスチン低値群。(Corren ら⁵⁾より引用)

assay (ELISA) システムが存在することである。このシステムを用いて算出した正常ヒト血清中のペリオスチン濃度は 95 ng/ml 以下であるが、本システムでの血清ペリオスチンの検出限界濃度は 20 pg/ml と十分に低く、200 倍以上の高い血清希釈倍率で測定することができるため、血清蛋白質の影響を最小限にしながら極少量の血清で測定することが可能である。これは現在市販されている他のペリオスチン ELISA キットと比較しても相当に性能が高い。

このキットを使い、目下、アレルギー疾患に加え、線維化疾患全般においてペリオスチンをバイオマーカーとして臨床応用するための準備を進めている。

気管支喘息とペリオスチン

気管支喘息では環境因子をはじめさまざまな病気が病態を引き起こし、結果的に似通った気道炎症を呈することから、気管支喘息を症候群としてとらえる考え方が浸透してきている。そのため、気管支喘息のエンドタイプ

を分類できるバイオマーカーが必要とされている。

IL-4 や IL-13 は、気管支喘息の病態において中心的な役割を果たすサイトカインであるため、近年、IL-4 や IL-13 の作用を阻害する分子標的薬の開発が活発に行われている。ところが、気管支喘息の病因は多様であり、IL-4/IL-13 阻害薬がすべての患者に有効なわけではなく、病態への IL-4/IL-13 の寄与度がより高い患者に使用することで効率のよい治療が可能になる。つまり、IL-4/IL-13 への依存性というエンドタイプを投与の判断基準に用いることが望ましい。最近報告された、抗 IL-13 抗体である lebrikizumab を用いた気管支喘息の第 IIa 相の臨床試験結果⁵⁾によると、対象としたステロイドでコントロール不良の気管支喘息患者全体に対して lebrikizumab は有効であった。さらにそれらの患者を血清ペリオスチン濃度が高い群と低い群とに分けて lebrikizumab の有効性を解析すると、ペリオスチン高値群では lebrikizumab の有効性が強調された (図 2A) のに対して、ペリオスチン低値群では lebrikizumab の有効性が認められなくなった (図 2B)。血清ペリオスチン濃度は病変部での IL-13 産生を反映しており、このことは、ペリオスチン高値群では IL-13 産生が高く、より lebrikizumab が有効であったことを示唆している。また、抗 IgE 抗体である omalizumab は現在臨床で気管支喘息に使用されている唯一の分子標的薬であり、ステロイドを含む既存の治療によるコントロールが不良な症例に使われているが、無効な症例も散見され、その効果を予測できるバイオマーカーが待望されている。Hanania らの、気管支喘息患者を血清ペリオスチン濃度が高い群と低い群とに分けて omalizumab の有効性を解析した報告では、ペリオスチン高値群でのみ薬効が認められた⁶⁾。これらの結果は、ペリオスチンが抗気管支喘息分子標的薬の効果を予測できるバイオマーカーとして、コンパニオン診断に有用であることを示している。

他方、現在の気管支喘息の第一選択薬は依然吸入ステロイド剤 (inhaled corticosteroid : ICS) である。ICS は非常に有効な薬剤であるが、5~10% の患者は ICS に抵抗性、または低感受性である。この ICS に対する感受性と血清ペリオスチン濃度との関連を解析することを目的として、Kanemitsu らは ICS 治療を受けている気管支喘息患者について著者らのペリオスチン ELISA システムを用いて解析を行った⁷⁾。健常者に比し血清ペリオスチン濃度は有意に上昇しており、95 ng/ml をカットオフ値として 99% の特異度で気管支喘息を診断することが可能で

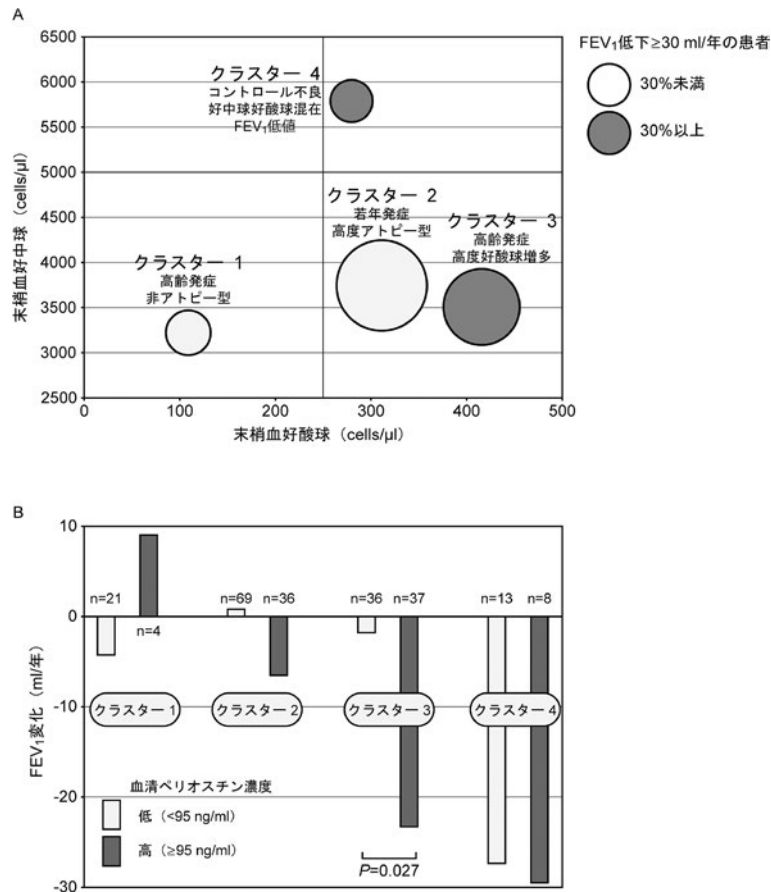


図3 気管支喘息患者のエンドタイプ分類。(A) 末梢血好中球数と好酸球数によるクラスター化。(B) 血清ペリオスチン濃度とFEV₁変化率の関係。(Nagasakiら⁸⁾より引用)

あったが、感度は38%にとどまった。これは、気管支喘息患者の中にペリオスチン高値の者と低値の者が混在していることを意味する。これらの患者を呼吸機能予後の不良な群と（FEV₁低下 ≥ 30 ml/年）と良好な群（FEV₁低下 < 30 ml/年）とに分類して解析を行うと、不良群の方で血清ペリオスチン濃度が有意に高く、また、血清ペリオスチン濃度が高値（95 ng/ml以上）の患者の割合が多かったものの、顕著な差ではなかった。つまり、呼吸機能予後だけを用いた分類では、ICS感受性と血清ペリオスチン濃度との十分な相関性を示すには至らず、ICS感受性が血清ペリオスチン濃度と相関する群と相関しない群が存在すると考えられた。そこでNagasakiらは、末梢血好中球数と好酸球数を用いて同じ気管支喘息患者を4つのクラスターに分類して、血清ペリオスチン濃度との関係を解析した（図3A）⁸⁾。すると、高齢発症で好酸

球が優位、かつ呼吸機能予後不良であるクラスター3において、血清ペリオスチン濃度の低い群（95 ng/ml未満）ではFEV₁の低下はごく軽度であったのに対して、血清ペリオスチン濃度の高い群（95 ng/ml以上）ではFEV₁が大きく低下していた（図3B）。すなわち、血清ペリオスチン濃度が高いと、ICS使用にもかかわらず、呼吸機能が大きく低下したということである。これらのことから、エンドタイプのクラスター化（層別化）が重要であることはもちろん、血清ペリオスチン濃度がICS低感受性を反映し、かつ呼吸機能予後を予測可能な、エンドタイプ診断バイオマーカーとして有用であることが示された。上述のように、ペリオスチンは組織リモデリングのバイオマーカーでもある。これらの場合は、リモデリングが不可逆的となり、ICS治療に不応性となった症例がペリオスチン高値群として抽出されたのであろう。

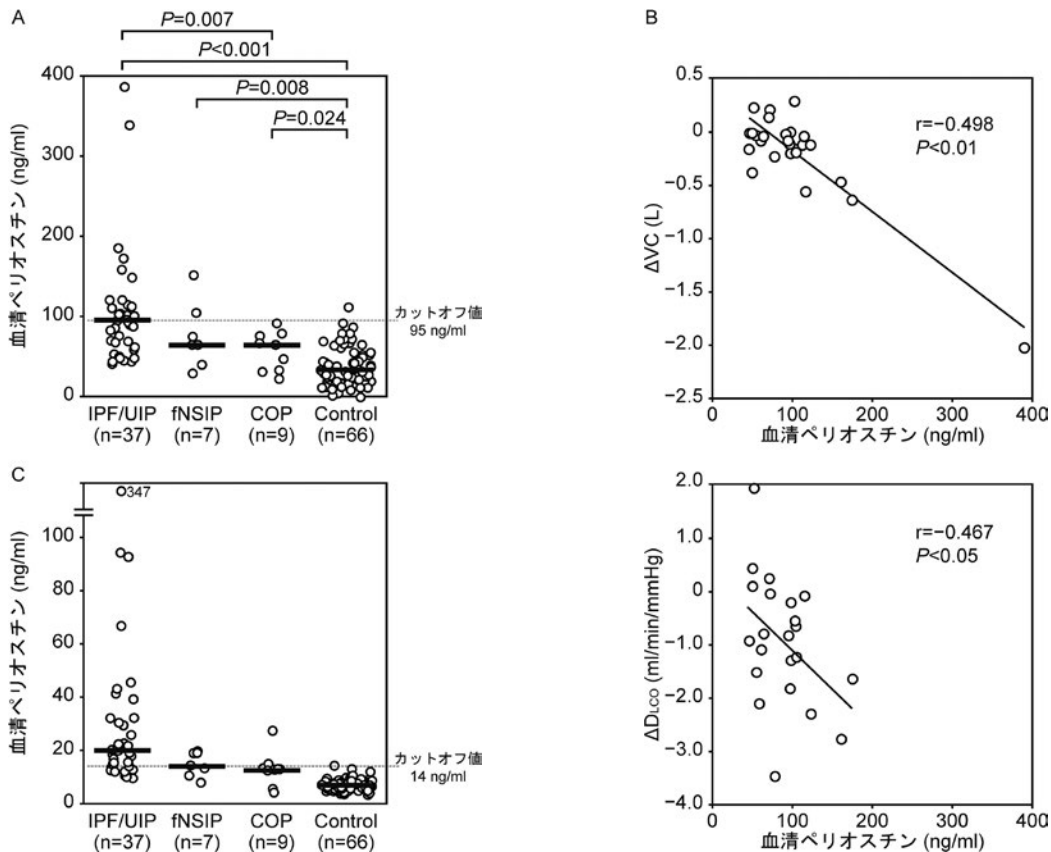


図4 IIPs患者における血清ペリオスチン濃度。(A) SS18A×SS17Bを用いたELISA。(B) IPF患者の血清ペリオスチン濃度と呼吸機能の相関。(C) SS20A×SS19Dを用いたELISA。(Okamotoら⁹⁾より引用)

特発性間質性肺炎とペリオスチン

特発性間質性肺炎(idiopathic interstitial pneumonias : IIPs)は臨床・画像・病理組織学的特徴により7病型に分類される。そのなかでも特発性肺線維症(idiopathic pulmonary fibrosis : IPF)は、比較的高頻度でありながら有効な治療に乏しく予後不良であるため、その対策が急務となっている。呼吸機能が増悪するにつれ、ステロイド、免疫抑制剤、pirfenidoneへといった薬物治療が行われるが、どの段階でどの薬物を使用するか明確なエビデンスがそろっていない状態である。現在補助診断に用いられているKL-6, SP-A, SP-Dといった血清バイオマーカーは病型による特異性や予後との相関は必ずしも高くない。そのため、専門家でなくとも病型の診断がつけられ、病勢判断と投薬開始の基準となるような血清バ

イオマーカーへの期待は高い。

Okamotoらは、IPF/usual interstitial pneumonia (UIP) 37名, fibrotic nonspecific interstitial pneumonia (fNSIP) 7名, cryptogenic organizing pneumonia (COP) 9名のIIPs患者検体を用い、ペリオスチンの肺組織における発現と、血清ペリオスチン濃度を解析した⁹⁾。その結果、IPF/UIP患者肺の線維化巣や線維芽細胞にペリオスチンが強く発現していることを見いだした。一方、COP患者ではほとんど発現しておらず、fNSIP患者ではIPF/UIP患者よりも弱い発現が認められた。血清ペリオスチン濃度はIPF/UIP患者で著明に高く、COP患者や健常者に比べ有意に上昇しており、fNSIP患者ではその中間的な値であった(図4A)。血清ペリオスチン濃度とKL-6濃度の間に相関は認められなかった。これは、ペリオスチンが線維芽細胞より分泌され線維化の指標となるのに対して、KL-6はII型肺胞上皮細胞上にある糖蛋白質が切

断されたものでII型肺胞上皮細胞の過形成を反映しているためと考えられる。さらに血清ペリオスチン濃度と肺機能との関連を解析してみると、ペリオスチン測定6ヶ月間の肺活量変化 (Δ VC) あるいは CO 拡散能の変化 (Δ D_{LCO}) との間に負の相関が認められた (図 4B)。すなわち、血清ペリオスチン濃度が高いほど機能予後が悪いことを示している。

その後著者らは別の抗体を使用して、上で用いた ELISA システム (SS18A×SS17B) よりも IPF/UIP を特異的に検出することができる ELISA システム (SS20A×SS19D) を構築した (図 4C)。この新システムは間質性肺炎以外の疾患で増加するペリオスチンはほとんど検出せず、IPF/UIP の特異的診断薬として非常に有用である。これらのことから、血清ペリオスチン測定によって IIPs の病型診断が可能となり、加えて IPF/UIP 患者の呼吸機能予後を予測するバイオマーカーとしてもペリオスチンが有用であることが明らかとなった。現在著者らは、全国の 7 施設で「間質性肺炎診断薬開発コンソーシアム」を設立し、この ELISA システムを用いた血清ペリオスチン測定キットの IIPs 診断における臨床応用を目指して準備を進めている。

ごく最近、新規のチロシンキナーゼ型受容体阻害薬である nintedanib の臨床試験第 III 相の結果が報告され、年間の FVC 低下および急性増悪の発生率を 50% 近く軽減することが示された¹⁰⁾。また同時に、pirfenidone 第 III 相試験も終了し、有意な FVC 低下の抑制と生存率の改善が報告された¹¹⁾。ペリオスチンがこれらの薬剤の投与判断基準、もしくは効果判定のコンパニオン診断薬となりうるかどうか、検討することが望まれる。

おわりに

気管支喘息と間質性肺炎における、ペリオスチンのバイオマーカーとしての有用性を概説した。近年、ペリオスチンは炎症や線維化に関わる分子として脚光を浴びており、今後も機能解析や臨床応用が急速に進むことが期待される。

謝辞：本稿の執筆にあたっては、京都大学呼吸器内科の長崎忠雄先生、金光禎寛先生、松本久子先生、三嶋理晃先生、久留米大学呼吸器内科の岡元昌樹先生、星野友昭先生、株式会社シノテストの小野純也氏との共同研究データを使用しております。誌面を借りてお礼申し上げます。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：出原 賢治, 特許使用料 (F. Hoffman-La Roche), 研究費・助成金 (中外製薬), 奨学寄付 (シノテスト)。他は本論文発表内容に関して特に申告なし。

引用文献

- 1) Gallo V, et al. Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology—Molecular Epidemiology (STROBE-ME): an extension of the STROBE Statement. *PLoS Med* 2011; 8: e1001117.
- 2) Bieber T, et al. Atopic dermatitis: a candidate for disease-modifying strategy. *Allergy* 2012; 67: 969–75.
- 3) Campo P, et al. Phenotypes and endotypes of uncontrolled severe asthma: new treatments. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2013; 23: 76–88.
- 4) Takayama G, et al. Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 98–104.
- 5) Corren J, et al. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. *N Engl J Med* 2011; 365: 1088–98.
- 6) Hanania NA, et al. Exploring the effects of omalizumab in allergic asthma: an analysis of biomarkers in the EXTRA study. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187: 804–11.
- 7) Kanemitsu Y, et al. Increased periostin associates with greater airflow limitation in patients receiving inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132: 305–12.e3.
- 8) Nagasaki T, et al. Integrating longitudinal information on pulmonary function and inflammation using asthma phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133: 1474–7, 1477.e1–2.
- 9) Okamoto M, et al. Periostin, a matrix protein, is a novel biomarker for idiopathic interstitial pneumonias. *Eur Respir J* 2011; 37: 1119–27.
- 10) Richeldi L, et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2014; 370: 2071–82.
- 11) King TE Jr, et al. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2014; 370: 2083–92.

Abstract**Biomarkers in respiratory diseases, focusing on periostin**

Shoichiro Ohta^a and Kenji Izuhara^b

^aDepartment of Laboratory Medicine, Saga Medical School

^bDivision of Medical Biochemistry, Department of Biomolecular Sciences, Saga Medical School

Periostin, a matricellular protein, is upregulated in various inflammatory and/or fibrotic diseases. We have developed outstanding periostin detection systems using enzyme-linked immunosorbent assay and demonstrated periostin as a useful biomarker. A clinical application of periostin is expected for bronchial asthma and idiopathic interstitial pneumonias among respiratory diseases.