

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590866

研究課題名（和文）急性好酸球性肺炎におけるオステオポンチン上昇の意義

研究課題名（英文）Osteopontin in the pathogenesis of acute eosinophilic pneumonia

研究代表者

宮崎 英士 (MIYAZAKI EISHI)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：00264333

研究成果の概要（和文）：今回の研究で、急性好酸球性肺炎患者の気管支肺胞洗浄液には高濃度のオステオポンチンが検出されることを明らかにした。他の臨床病型である好酸球性肺炎でも高値であり、好酸球性炎症に特異的と考えられた。オステオポンチン濃度は、好酸球性炎症を惹起すると考えられているサイトカインと正の相関を示した。蛍光二重染色法では好酸球に強いオステオポンチンの発現が認められた。以上より、好酸球由来のオステオポンチンが急性好酸球性肺炎の病態形成を促進している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The present study demonstrated that osteopontin was significantly elevated in BALF from patients with acute eosinophilic pneumonia as well as other types of eosinophilic pneumonia. This suggests that osteopontin elevation may be associated with eosinophilic inflammation. The concentration of osteopontin was correlated with that of several cytokines and chemokines, which induce eosinophilic inflammation. Double immunofluorescence labeling showed that osteopontin was expressed in lung eosinophils. Osteopontin may contribute to the development of eosinophilic inflammation in patients with acute eosinophilic pneumonia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：オステオポンチン、急性好酸球性肺炎、好酸球、ケモカイン、Th2/Th2、バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

急性好酸球性肺炎は主として若年者に急性呼吸不全を来す疾患で、本邦では多く

の場合喫煙を契機に生じる。その病態は Th2 優位の免疫反応を特徴とする。これまでに我々は、本症患者の検体を用いて行なった検討から、急性好酸球性肺炎では樹状細胞

からの thymus-and activation-regulated chemokine (TARC)/CCL17 の過剰な産生が Th2 細胞の肺への動員を誘導し、肺に好酸球性炎症を惹起することが明らかにした。その後、患者の気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中に高濃度の Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) を検出したことから、原因となる煙草煙の刺激を受けた気道上皮細胞から TSLP が産生され、樹状細胞の分化、TARC 産生を誘導するとの病態機序が考えられる。一方、好酸球遊走性ケモカインであるエオタキシンは本症の病態にはあまり関与していない。

オステオポンチンには多様な免疫作用があるが、特に Th1 関連病態 (関節リウマチやサルコイドーシス) での向炎症作用は良く知られている。ところが、我々の最近の研究により、急性好酸球性肺炎の BALF 中に高濃度のオステオポンチンが含まれていることが明らかとなった。Th1 サイトカインであるオステオポンチンが Th2 免疫反応亢進を特徴とする好酸球性肺炎の病巣部に高発現しているのは炎症の収束に関わっている可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、好酸球性炎症の成立～収束におけるオステオポンチンの病態的意義を明らかにするために、① 各種好酸球性疾患におけるオステオポンチン発現、② 喫煙との関連を含めた好酸球からのオステオポンチン産生、調節機構、③ オステオポンチン過剰発現マウスにおける検証、④ オステオポンチンと好酸球機能との関連について検討を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 気管支肺胞洗浄液、血漿、血清、喀痰中オステオポンチンの測定

各種好酸球性肺疾患および好酸球増加を伴わない各種びまん性肺疾患患者の気管支肺胞洗浄液、血漿、血清中のオステオポンチンを市販の ELISA kit を用いて測定する。

### (2) 免疫蛍光二重染色によるオステオポンチン産生細胞の同定

風乾後に当教室の  $-80^{\circ}\text{C}$  冷凍庫に保管されている各種好酸球性肺疾患患者の気管支肺胞洗浄液細胞および末梢血から分離し

た好酸球に対して免疫二重染色を行なう。

(3) 好酸球培養とオステオポンチン産生  
患者、健常者より分離した好酸球を用い、無刺激およびサイトカイン刺激 (TARC, TSLP, IL-4, IFN, TNF)、喫煙刺激下での好酸球からのオステオポンチン産生について検討する。

### (4) 好酸球性肺炎モデルの作成

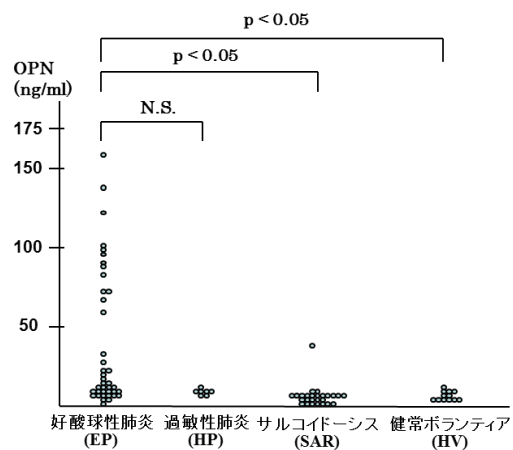
C57/BL6マウスとオステオポンチン過剰発現マウスに対して、アスペルギルス抗原の鼻腔内投与により好酸球性肺炎モデルを形成する。

## 4. 研究成果

### (1) 好酸球性肺炎では、気管支肺胞洗浄液中オステオポンチン濃度が、過敏性肺炎、サルコイドーシスと比較して有意に高値である

まず、Th2 型過敏反応が特徴の好酸球性肺炎と、Th1 型過敏反応である過敏性肺炎およびサルコイドーシスの気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中オステオポンチンを ELISA 法にて測定した。その結果を図 1 に示す。好酸球性肺炎では過敏性肺炎、サルコイドーシスと比較して優位に BALF オステオポンチン値が高いことが判明した。

図 1

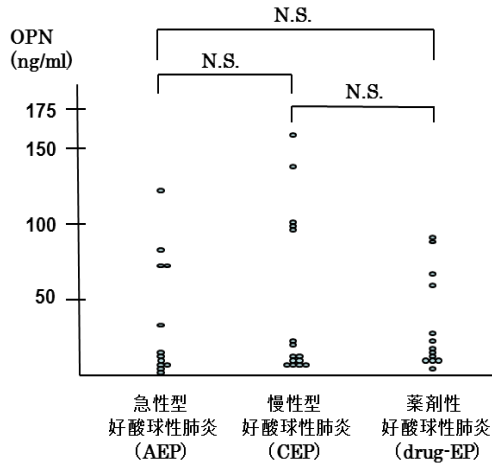


### (2) 急性好酸球性肺炎だけでなく、慢性型、薬剤性でも気管支肺胞洗浄液中オステオポンチンは高値である

次に、好酸球性肺炎の病型別に BALF 中オス

テオポンチン濃度を比較検討したが、急性好酸球性肺炎では BALF 中オステオポンチン濃度が著明に高値であるものの、慢性好酸球性肺炎および薬剤性好酸球性肺炎といった BALF 中に好酸球が増加する疾患では同様に BALF 中オステオポンチン濃度が著明高値を呈することが判明した。

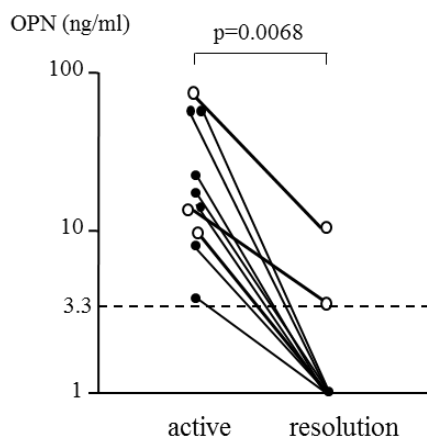
図 2



**(3) 急性期に高値を示したオステオポンチンは寛解期に入ると低下する**

ステロイドを使用して寛解した症例（白丸）、無治療で改善した症例（黒丸）ともに、急性期に高値を示した気管支肺胞洗浄液中オステオポンチンは寛解期には全例で低下した。

図 3

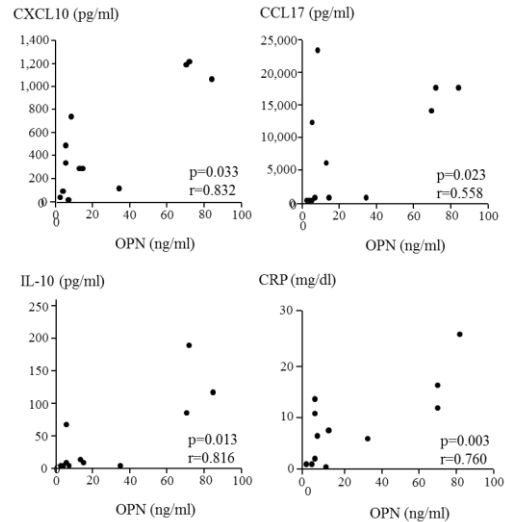


**(4) 気管支肺胞洗浄液中オステオポンチンは、Th2 ケモカイン、Th1 ケモカイン双方と正の相関を示す**

急性好酸球性肺炎患者から急性期に得られ

た気管支肺胞洗浄液中オステオポンチン濃度は、CXCL10, CCL17, IL-10 濃度と正の相関を示した。また、炎症指標である CRP 値とも正の相関を示した。

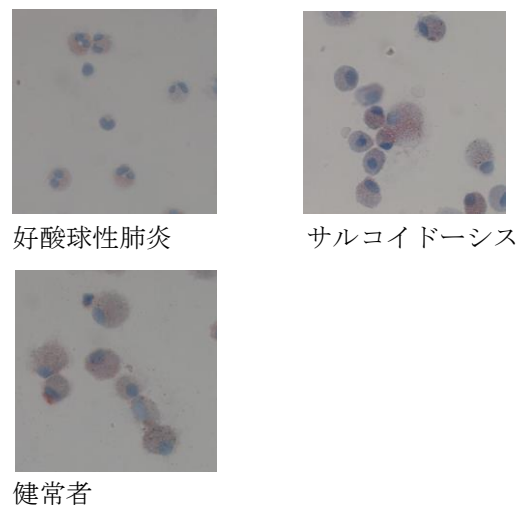
図 4



**(5) 免疫染色では好酸球、マクロファージがオステオポンチン陽性である**

気管支肺胞洗浄液で得られた細胞をサイトスピンにてプレパラートに貼り付け（BAL 貼り付け細胞）、ABC法でオステオポンチン染色を行った。その結果、健常人、サルコイドーシスでは大型の単核細胞（形態的には肺胞マクロファージ）および小型の単核細胞がオステオポンチン陽性であり、一方、好酸球性肺炎では単核細胞とともに、眼鏡型の核を持つ細胞（形態的には好酸球）に強い陽性像が認められた。

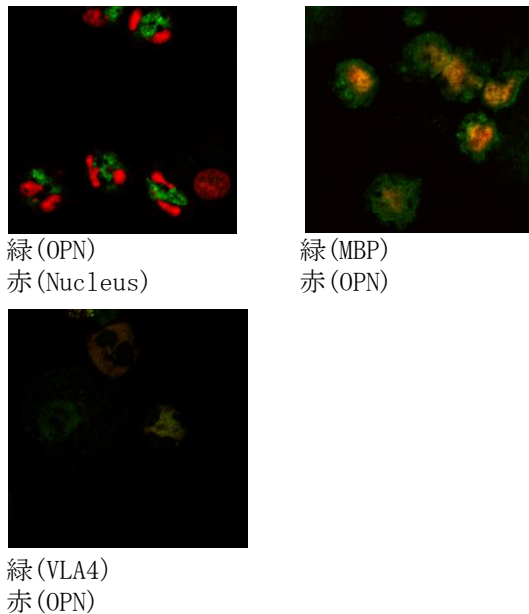
図 5



**(6) 蛍光二重染色により、VLA-4 陽性細胞、MBP 陽性細胞にオステオポンチンの発現を確認**

BALF 貼り付け細胞に対して蛍光二重染色を行い、オステオポンチン (OPN) 陽性細胞は眼鏡型の核を有し、MBP, VLA-4 が陽性であることを認め、これらは好酸球であることを確認した。

図 6



**(7) オステオポンチン過剰発現マウスでは肺に好酸球性炎症は惹起されない**

オステオポンチン過剰発現マウスにブレオマイシンを投与し、好酸球の出現、肺線維化の程度について正常マウスと比較した。その結果、線維化の程度、好酸球の出現において、オステオポンチン過剰発現マウスと正常マウスとで有意な差を認めなかった。

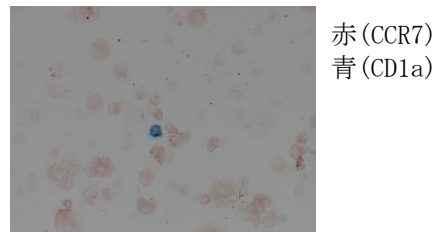
**(8) 好酸球性肺炎ではオステオポンチンの発現はTSLP、TARCと関連する**

オステオポンチンとアレルギー性炎症のマスタースイッチであるTSLP (thymic stromal lymphopoietin) およびTARC (thymus- and activation-regulated chemokine) との関連について検討した。BALF中のTSLPは健常者、サルコイドーシスや過敏性肺炎患者では検出されず (全症例で感度以下)、一方、好酸球性肺疾患では25例中10例に検出可能であった。血清中TSLPも同様に好酸球性肺疾患でのみ検出された。好酸球性肺炎において、オステオ

ポンチン濃度はTSLP濃度、TARC濃度と正の相関関係を示した。さらに、健常者、各種疾患患者から得られた肺胞マクロファージからのTSLP、TARC産生を検討した。その結果、オステオポンチン添加により肺胞マクロファージからのTSLP、TARC産生は亢進しなかった。以上の検討から、オステオポンチンは好酸球性炎症に関わる分子であること、臨床的に好酸球性肺炎のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

**(9) 急性好酸球性肺炎の気管支肺胞洗浄液中には、CCR7 陽性樹状細胞が出現**

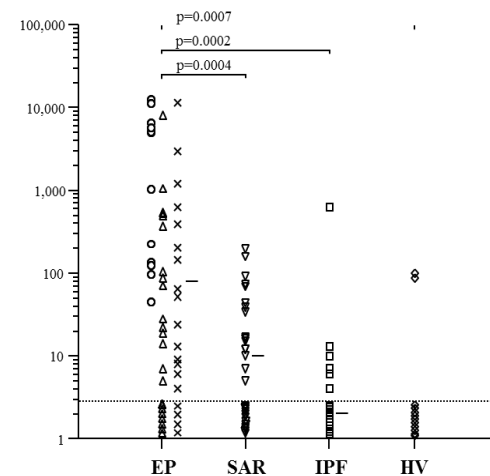
急性好酸球性肺炎患者のBALF 貼り付け細胞の解析では、CCR7 陽性細胞が出現しており、樹状細胞のマーカー (CD1a, S100, Langerin) との蛍光二重染色では、急性好酸球性肺炎では、CCR7 陽性細胞の5%がCD1a 陽性を呈しており、一方、健常者ではCCR7 陽性CD1a 陽性細胞は認めなかった。



**(10) 好酸球性肺炎では、CCR7 リガンドであるCCL19が増加している**

気管支肺胞洗浄液中CCL19はサルコイドーシス、特発性肺線維症、健常者と比較して、好酸球性肺炎で有意に高値であり、CCR7 陽性樹状細胞の動員に関与している可能性が示唆された。

図 7



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ① Ono E, Miyazaki E, Increase in Salivary Cysteinyl-Leukotriene Concentration in Patients with Aspirin-Intolerant Asthma. *Allergology International*, Vol. 60, 2011, pp. 37-43. 査読有  
DOI:10.2332/allergolint.09-0A-0166
- ② Honda K, Okada F, Ando Y, Miyazaki E (9番目), et al. Comparison of pulmonary thin section CT findings and serum KL-6 levels in patients with sarcoidosis. *Br. J. Radiol.* Vol 84, 2011, pp. 37-43. 査読有  
DOI:10.1259/bjr/65287605
- ③ Ono E, Taniguchi M, Higashi N, Miyazaki E (17番目), et al. CD203c expression on human basophils is associated with asthma exacerbation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, Vol. 125, 2010, pp. 483-489. 査読有  
DOI: 10.1016/j.jaci.2009.10.074
- ④ Ueno T, Miyazaki E, Ando M, Nureki S, Kumamoto T. Osteopontin levels are elevated in eosinophilic pneumonia. *Respirology* Vol. 15, 2010, pp. 1111-1121. 査読有  
DOI:10.1111/j.1440-1843
- ⑤ Ando M, Miyazaki E, et al. Successful treatment with tacrolimus of progressive interstitial pneumonia associated with amyopathic dermatomyositis refractory to cyclosporine. *Clin. Rheumatol.* Vol. 29, 2010, pp. 443-445. 査読有  
DOI: 10.1007/s10067-009-1358-x.
- ⑥ Ando M, Miyazaki E, et al. Significance of serum vascular endothelial growth factor level in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Lung* Vol. 188, 2010, pp. 247-252. 査読有  
DOI: 10.1007/s00408-009-9223-x

[学会発表] (計17件)

- ① 濡木真一、宮崎英士、他. 好酸球性肺炎における HMGB1-RAGE を介した好酸球性炎症と肺胞上皮細胞障害に関する検討. 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2012年11月29日~12月1日、大阪
- ② 石井稔造、濡木真一、他. 間質性肺炎における CXCL14/BRAK の関与. 第52回日本呼吸器学会学術講演会. 2012年4月20日~22日、神戸
- ③ 濡木真一、宮崎英士、他. 好酸球性肺炎

における HMGB1-RAGE を介した好酸球性炎症と肺胞上皮細胞障害に関する検討.

2012年4月20日~22日、神戸

- ④ 増田大輝、安東 優、他. 当科における CPFE に該当する特発性肺線維症の臨床的検討. 第52回日本呼吸器学会学術講演会. 2012年4月20日~22日、神戸
- ⑤ 藤崎秀明、濡木真一、他. ウェステルマン肺吸虫症9例の検討. 第52回日本呼吸器学会学術講演会. 2012年4月20日~22日、神戸
- ⑥ 濡木真一、宮崎英士、他. 肺サルコイドーシス症例に対する IOS を用いた呼吸抵抗測定. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2011年11月10日-12日、東京
- ⑦ 佐藤晴佳、濡木真一、他. 肺サルコイドーシス症例に対する Impulse Oscillometry (IOS) を用いた呼吸抵抗測定. 第31回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会. 2011年10月21日-22日、名古屋
- ⑧ 安東 優、宮崎英士、他. 腎機能障害を呈したサルコイドーシス症例の検討. 第31回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会. 2011年10月21日-22日、名古屋
- ⑨ 濡木真一、宮崎英士、他. 好酸球性肺炎における CCR7 リガンドを介した樹状細胞・マクロファージ集積機序の検討. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2010年11月25日~27日、東京
- ⑩ 濡木真一、宮崎英士、他. サルコイドーシスにおける IOS を用いた気道抵抗測定の有用性に関する検討. 第30回日本サルコイドーシス・肉芽腫性疾患学会総会. 2010年10月1日~2日、浜松
- ⑪ 西尾末広、宮崎英士、他. 当科で経験した腎サルコイドーシス症例の検討. 第30回日本サルコイドーシス・肉芽腫性疾患学会総会. 2010年10月1日~2日、浜松
- ⑫ 濡木真一、宮崎英士、他. 好酸球性肺炎における CCR7 リガンドを介した樹状細胞・マクロファージ集積機序の検討. 第50回日本呼吸器学会学術講演会. 2010年4月23日~25日、東京
- ⑬ 安東 優、宮崎英士、他. 当科における MPO-ANCA 陽性間質性肺炎の検討. 第50回日本呼吸器学会学術講演会. 2010年4月23日~25日、東京
- ⑭ 竹中隆一、宮崎英士、他. サルコイドーシス肺病変および胸郭外病変に対するミノサイクリン療法の検討. 第50回日本呼吸器学会学術講演会. 2010年4月23日~25日、東京
- ⑮ 山末まり、宮崎英士、他. 第50回日本呼吸器学会学術講演会. 2010年4月23日

- ～25日、東京
- ⑩ 貞村祐紀子、安東 優、山末まり、宮崎英士 (9番目)、他. 当科で経験した皮膚筋炎/多発性筋炎に伴う間質性肺炎の治療・経過・予後. 第50回日本呼吸器学会学術講演会. 2010年4月23日～25日、東京
- ⑪ 伊東猛雄、宮崎英士 (9番目)、他. 喫煙開始年齢と肺癌. 第50回日本呼吸器学会学術講演会. 2010年4月23日～25日、東京

[図書] (計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮崎 英士 (MIYAZAKI EISHI)  
大分大学・医学部・教授  
研究者番号：00264333

### (2) 研究分担者

安東 優 (ANDO MASARU)  
大分大学・医学部・講師  
研究者番号：20336267  
濡木 真一 (NUREKI SHIN-ICHI)  
大分大学・医学部・助教  
研究者番号：50423702  
石井 稔浩 (ISHII TOSHIHIRO)  
大分大学・医学部・助教  
研究者番号：00528911

### (3) 連携研究者

なし