

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 5 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2012

課題番号：21390113

研究課題名（和文） オステオポンチン機能制御による難治性炎症性疾患制御の分子基盤

研究課題名（英文） Molecular basis for the functional regulation of intractable inflammatory disorders by Osteopontin

研究代表者

上出 利光 (Uede Toshimitsu)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号：00160185

研究成果の概要（和文）：

従来細胞外マトリックス (ECM) と分類されていた分子群の中に、古典的 ECM とは機能の異なる Matricellular protein と呼ばれるオステオポンチン (OPN) やテナーシン C (TN-C) 等の分子群が存在し、関節リウマチや多発性硬化症等の難治性炎症性疾患の病態を制御していることを明らかにすることが出来た。また、OPN や TN-C の共通の受容体である $\alpha 9 \beta 1$ インテグリン分子を介して、細胞に種々のシグナルを伝達している事を明らかにした。また、OPN、TN-C、 $\alpha 9 \beta 1$ インテグリンは、難治性炎症性疾患の治療標的でもあり、これらの分子に対する抗体は、将来、抗体医薬としての可能性があることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

There is a distinct group of molecules within classical extracellular matrix proteins (ECM). These molecules should be called as matricellular proteins and we demonstrated that these proteins are involved in the pathogenesis of various intractable inflammatory disorders including rheumatoid arthritis and multiple sclerosis. Osteopontin (OPN) and tenascin-C (TN-C) are two examples and share common receptor, alpha9beta1 integrin and transducer intracellular signaling via this integrin receptor. Importantly, we found that OPN, TN-C and alpha9beta1 integrin are therapeutic targets in various inflammatory diseases and blocking monoclonal antibodies against OPN, TN-C and alpha9beta1 integrin can be future therapeutic antibody drugs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2012年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：炎症、細胞外マトリックス、Matricellular protein、 $\alpha 9 \beta 1$ インテグリン、抗体医薬、難治性炎症性疾患

1. 研究開始当初の背景

コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン等は、細胞外マトリックス(ECM)として分類されるが、ECMの中には、間質に不溶性膠質蛋白として存在するのみならず、分泌されサイトカイン様の機能を発揮する一群の分子群が存在する。この分子群の中には、オステオポンチン(OPN)、テナーシン C (TN-C)、オステオニクチン等が含まれて、matricellular protein という新しい概念で認識されつつある。これらの分子群は、生理的条件下では、発生過程で一過性の発現をするが、成人正常組織ではごく限られた部位に発現を認めるのみである。しかし、炎症疾患、癌、組織リモデリング過程においては、著明な発現増強を示し、これらの病態に重要な機能を担っていると推測されてきた。一方、matricellular protein 分子の受容体に関する研究は遅れており、疾患病態の解明および治療法の開発の妨げと成っている。申請者は、これまで判明した受容体の中で、 $\alpha 9 \beta 1$ インテグリンに着目した。それは、このインテグリンが、OPN と TN-C の共通の受容体であるからである。 $\alpha 9 \beta 1$ インテグリンの研究を介して、matricellular protein 分子の炎症性疾患や癌における機能を明らかにすることができると考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では、matricellular protein の関与が考えられている多くの疾患の中から、特に関節リウマチと多発硬化症を研究対象として選択し、matricellular protein としての OPN や TN-C およびその共通の受容体である $\alpha 9 \beta 1$ インテグリンが、いかなる機序で、疾患病態に関与しているのか、更にはその情報を基に、上記疾患の治療戦略を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) TN-C 欠損マウスや OPN/TN-C ダブル欠損マウスを用いて、関節リウマチおよび多発性硬化症における OPN と TN-C の機能を明らかにする。病理組織学的解析、病巣や所属リンパ節における炎症性サイトカイン、ケモカインの発現解析、matricellular protein の発現解析を行なう。

(2) 関節リウマチおよび多発性硬化症のモデルマウスを用いて、世界に先駆けて、申請者のグループが開発に成功した抗マウス $\alpha 9 \beta 1$ インテグリン阻害抗体をもちいて、投与を行い治療効果を検討する。病理組織学的検討、病巣や所属リンパ節における炎症性サイトカイン、ケモカインの発現解析および matricellular protein の発現解析を行なう。

(3) 最後に関節リウマチ患者の病巣に存在する $\alpha 9 \beta 1$ 発現細胞の機能を検討する。外科

的切除の対象となった肥厚した患者由来の滑膜組織を分離し、matricellular protein の発現解析や OPN や TN-C 刺激による炎症性サイトカイン、ケモカイン、matrix metalloproteinase (MMP) 等の発現解析を行なう。

4. 研究成果

(1) コラーゲン type II に対する 4 種類の抗体を投与し、その後、LPS を投与する事により、マウスに炎症性関節炎を惹起する事ができる (Collagen antibody induced arthritis model, CAIA model)。この CAIA モデルは、関節炎のエフェクター相の解析に適している。したがって、関節炎の現場である病巣の状況を詳しく解析できる。関節炎病巣では、滑膜線維芽細胞および滑膜マクロファージが、増加しており、関節滑膜の増生の主たる原因は、この 2 者のうち、線維芽細胞の細胞数の増加による事を明らかにした。しかもこの細胞は、マクロファージに比して、大量の OPN を産生している。両者は、OPN の受容体である $\alpha 9 \beta 1$ インテグリンを発現しているが、線維芽細胞ではほぼ全ての細胞が発現するのに対して、マクロファージは一部の細胞に発現するに留まっている。また、マクロファージは、OPN の別の受容体である $\alpha 4 \beta 1$ インテグリンも発現していた。病巣では全長型 OPN の他に、トロンビンで切断された切断型 OPN も増加していた。

(2) 病巣における OPN とその線維芽細胞上の $\alpha 9 \beta 1$ インテグリンの結合は、ケモカインである CXCL12 および蛋白分解酵素である MMP-9 の発現誘導を惹起する。一方、マクロファージ上の同様の受容体との結合により、炎症性サイトカインである IL-1 β 、TNF α 、TGF β の発現増強、さらには、ケモカインである CCL3、CCL4、CXCL2 の発現増強を惹起した。線維芽細胞とマクロファージに共通して、炎症性サイトカインである IL-6 および IL-1 α 、さらにはケモカインである CCL2 と CXCL5 の発現増強を惹起した。この様に、同様の受容体が、同一のリガンドである OPN により刺激されても、関節病巣の細胞により、共通する現象と細胞にユニークな現象が惹起されている事が明らかになった。

(3) 上記のようなサイトカインおよびケモカイン、蛋白分解酵素が病巣で発現上昇することにより、①病巣での血管新生、②好中球等の炎症細胞の動員、③破骨細胞の増加と活性化、④滑膜線維芽細胞のアポトーシスの抑制が起こり、結果として関節軟骨の破壊、パンスス増生が引き起こされ、関節の破壊が進行する事が明らかになった。重要な事に、この様な関節炎および関節破壊が、抗 $\alpha 9 \beta 1$

インテグリン抗体の投与により著明に改善する事である。CAIA を TN-C 欠損マウスで惹起すると、関節の炎症および関節破壊が著明に軽減する事から、病態には、OPN と同時に TN-C も関与している事が示唆された。しかし、病巣における OPN と TN-C の産生量を比較すると、このモデルにおいては、OPN の産生量が有意に高い。

(4) ついで、CAIA model ではなく、コラーゲン type II を免疫して、関節炎を惹起する Collagen induced arthritis (CIA) model にて、上記分子群の機能を検討した。このモデルは、関節炎の自己抗原の認識相およびその後のエフェクター相の両方を解析することが可能である。所属リンパ節で、自己組織である滑膜組織を攻撃する自己反応性 T 細胞の増殖、および分化を検討した。所属リンパ節の樹状細胞、cDC やマクロファージが、 $\alpha 9 \beta 1$ インテグリンを発現しており、コラーゲンで免疫後、所属リンパ節ではそのリガンドである OPN と TN-C の発現増強が認められた。cDC やマクロファージは、リガンドと受容体を同時に発現しており、autocrine および paracrine のメカニズムにより刺激されている。興味深い事にマクロファージは主に OPN を、cDC は TN-C を産生している。何れにせよ、 $\alpha 9 \beta 1$ インテグリンが刺激される事により、IL-6 および IL-23 の産生が著明に増強し、所属リンパ節では、このサイトカインの影響下で、T 細胞は Th17 細胞へと効率よく分化する。この Th17 細胞は、自己免疫疾患のエフェクター細胞として知られている細胞群である。

(5) 更に重要な事は、この様な所属リンパ節の微小環境下では、Th17 細胞上には、細胞の、リンパ節から病巣への動員に重要な機能を果たすケモカインの受容体である CCR6 の発現が誘導されている事である。このようなモデルでも、抗 $\alpha 9 \beta 1$ インテグリン抗体を投与すると、所属リンパ節における IL-6 および IL-23 の産生が低下し、Th17 細胞の産生が低下する。結果として関節炎が著明に改善した。しかし、長期間観察すると、所属リンパ節で Th17 細胞の増加が起こってくる。この矛盾は、以下の様なメカニズムが働いている事が判明した。IL-6 と IL-23 の低下した状態では、naïve T 細胞の Th17 細胞への分化は、減少する。しかしながら、Th17 細胞上の CCR6 の発現も低下する事から、Th17 細胞が、所属リンパ節から、関節炎病巣へと動員されなくなり、結果として所属リンパ節に Th17 細胞が、溜まってしまふ事となる。これが、抗 $\alpha 9 \beta 1$ インテグリン抗体投与による関節炎改善のメカニズムである。

(6) ついで、上記のようなメカニズムが、

炎症性疾患に共通した現象なのか、関節リウマチの特徴的な現象なのかを明らかにするために、多発性硬化症モデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) モデルにおいて検討を加えた。EAE の臨床スコアおよび中枢神経系への炎症細胞浸潤、炎症性サイトカインの産生、および脱髄の程度は、EAE マウスに抗 $\alpha 9 \beta 1$ 抗体を投与する事で、著明に改善した。一見、関節リウマチモデルと同様のメカニズムが働いているようであった。しかし、詳細に所属リンパ節における分子機序を検討すると、以下の点が明らかとなった。①抗体を投与する事で、Th17 細胞の分化の減少や、動員の減少は見られない。②しかしながら、CD4 T 細胞は所属リンパ節に溜まっている。③これは、リンパ節のリンパ管上皮細胞上に $\alpha 9 \beta 1$ インテグリンが発現し、同時にその周りに発現する TN-C と結合し刺激を受け、T リンパ球のリンパ節外への動員に重要な SIP の分泌をうながしている。これが、抗 $\alpha 9 \beta 1$ インテグリン抗体の投与により著明に抑制されてしまう。これが、脳炎のエフェクター細胞が中枢神経系へ浸潤できない理由である。関節リウマチで見られた、Th17 細胞上の CCR6 の発現の低下は EAE モデルではみられない。

(7) したがって、炎症性疾患では、 $\alpha 9 \beta 1$ インテグリンが重要な働きをしており、これが治療の標的となりうることは明らかであるが、疾患により、そのリガンドの発現が変化し、リウマチでは OPN が、EAE では TN-C の発現が主となる。また、所属リンパ節における $\alpha 9 \beta 1$ インテグリンの発現は、リウマチモデルでは cDC やマクロファージ、EAE ではリンパ管上皮と、微小環境が疾患で異なり、結果として疾患における $\alpha 9 \beta 1$ インテグリンで誘導される細胞内伝達メカニズムが異なる事が明らかに成った。

(8) 最後に関節リウマチ患者において検討したが、マウス関節リウマチとは異なる所見を得た。患者病巣の滑膜組織における $\alpha 9 \beta 1$ インテグリンの発現は、滑膜マクロファージ及び滑膜線維芽細胞の両方に認められ、マウスで得られた所見を再現する事ができた。しかし、マウス病巣では、そのリガンドの中で病態に重要なのは OPN であったが、ヒトでは病巣でのリガンドは、OPN ではなく、TN-C が主体であった。これは、リガンドに対する抗体医薬の開発を考える時、TN-C を標的とする事が望ましい事を示唆する重要な知見である。

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 40 件)

1. Nakamura-Ishizu A, Okuno Y, Omatsu Y, Okabe K, Morimoto J, Uede T, Nagasawa T, Suda T, Kubota Y. Extracellular matrix protein Tenascin-C is required in the bone marrow microenvironment primed for hematopoietic regeneration. *Blood* 119:5429-5437, 2012. DOI:10.1182/blood-2011-11-393645. 査読有
2. Diao H, Liu X, Wu Z, Kang L, Cui G, Morimoto J, Denhardt D, Rittling S, Iwakura Y, Uede T, Li L. Osteopontin regulates interleukin-17 production in hepatitis. *Cytokine* 60:129-137, 2012. DOI:10.1016/j.cyto.2012.06.287. 査読有
3. Sato K, Iwai A, Nakayama Y, Morimoto J, Takada A, Maruyama M, Kida H, Uede T, Miyazaki T. Osteopontin is critical to determine symptom severity of influenza through the regulation of NK cell population. *Biochem Biophys Res Commun* 417:274-279, 2012. DOI:10.1016/j.bbrc.2011.11.100. 査読有
4. Morimoto J, Sato K, Nakayama Y, Kimura C, Kajino K, Matsui Y, Miyazaki T, Uede T. Osteopontin modulates the generation of memory CD8⁺T cells during influenza virus infection. *J Immunol* 187:5671-83, 2011. DOI:10.4049/jimmunol.1101825. 査読有
5. Kanayama M, Morimoto J, Matsui Y, Ikesue M, Danzaki K, Kurotaki D, Ito K, Yoshida T, Uede T. Alpha9beta1 integrin-mediated signaling serves as an intrinsic regulator of pathogenic Th17 cell generation. *J Immunol* 187:5851-64, 2011. DOI:10.4049/jimmunol.1101524. 査読有
6. Hamamoto S, Yasui T, Okada A, Hirose M, Matsui Y, Kon S, Sakai F, Kojima Y, Hayashi Y, Tozawa K, Uede T, Kohri K. Crucial role of the cryptic epitope SLAYGLR within osteopontin in renal crystal formation of mice. *J Bone Miner Res* 26:2967-77, 2011. DOI:10.1002/jbmr.495. 査読有
7. Iwata D, Kitamura M, Kitaichi N, Saito Y, Kon S, Namba K, Morimoto J, Ebihara A, Kitamei H, Yoshida K, Ishida S, Ohno S, Uede T, Onoé K, Iwabuchi K. Prevention of experimental autoimmune uveoretinitis by blockade of osteopontin with small interfere-

ing RNA. *Exp Eye Res* 90:41-48, 2010. DOI:10.1016/j.exer.2009.09.008. 査読有

8. Seier AM, Renkl AC, Chulz GS, Uebele T, Ahrens T, Sindrilaru A, Iben S, Liaw L, Kon S, Uede T, Weiss JM. Antigen specific induction of osteopontin contributes to the chronification of allergic contact dermatitis. *Am J Pathol* 176:246-258, 2010. DOI:10.2353/ajpath.2010.090488. 査読有
 9. Ito K, Kon S, Nakayama Y, Kurotaki D, Saito Y, Kanayama M, Kimura C, Diao H, Morimoto J, Matsui Y, Uede T. The differential amino acid requirement within osteopontin in alpha4 and alpha9 integrin-mediated cell binding and migration. *Matrix Biol* 28:11-19, 2009. DOI:10.1016/j.matbio.2008.10.002. 査読有
 10. 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, Uede T. Alpha9 integrin and its ligands constitute critical joint microenvironments for development of autoimmune arthritis. *J Immunol* 182:8015-8025, 2009. DOI:10.4049/jimmunol.0900725. 査読有
- 他 30 件

[学会発表] (計 81 件)

1. Uede T: The role of matricellular proteins and their integrin receptors in generation of tumor tissue microenvironments. 第 71 回日本癌学会学術総会モーニングレクチャー, 2012. 9. 19-21, 札幌市教育文化会館(札幌)
2. Uede T: Tissue matricellular proteins regulate effector T cells from draining lymph nodes via alpha9 integrin-signaling. FASEB summer research conference Osteopontin Biology, 2012. 8. 5-10, Vermont Academy(USA)
3. Morimoto J, Kajino K, Danzaki K, Nakayama Y, Uede T: The role of splenic CD103⁺CD8 α ⁺cDCs in the induction of CTL responses during respiratory virus infection. 99th Annual Meeting the American Association of Immunologists, 2012. 5. 4-8, Hynes Convention Center(USA)
4. Ito K, Matsui Y, Kurotaki D, Morimoto J, Kihara A, Uede T: Interaction of alpha9 integrin on medullary sin-

- us with its ligand regulates lymphocyte egress via regulating S1P transporter, Spns2 expression and subsequent S1P secretion under inflammatory condition. 98th Annual Meeting the American Association of Immunologists, 2011.5.13-17, Moscone Center (USA)
5. Kanayama M, Morimoto J, Matsui Y, Yoshida T, Uede T: Alpha9beta1 integrin-mediated signaling serves as an intrinsic regulator of pathogenic Th17 cell generation. 98th Annual Meeting the American Association of Immunologists, 2011.5.13-17, Moscone Center(USA)
 6. Ohta D, Uede T: Alpha9beta1 integrin, as a critical regulator of lymphatic metastasis and growth of human breast cancer cells. American Association for Cancer Research 102nd Annual Meeting 2011, 2011.4.2-6, Orange County Convention Center(USA)
 7. Uede T: The aberrant interaction of matricellular proteins and integrins in pathological foci leads to inflammatory tissue damage. Invited speaker, FASEB summer research conferences, 2010.8.1-6, The Steamboat Grand Resort(USA)
 8. Morimoto J: The role of osteopontin in the generation of virus-specific memory CD8T cells. Invited speaker, FASEB summer research conferences, 2010.8.1-6, The Steamboat Grand Resort(USA)
 9. 上出利光: 組織微小環境の内的調節因子、オステオポンチンの病態病理学. 第99回日本病理学会総会宿題報告, 2010.4.27-29, 京王プラザホテル(東京)
 10. 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, Uede T: Alpha9 integrin and its ligands constitute critical joint microenvironments for development of autoimmune arthritis. 第39回日本免疫学会総会・学術集会, 2009.12.2-4, 大阪国際会議場(大阪)
- 他 71 件

[図書] (計 2 件)

1. 上出利光: 医科免疫学 2010 (改訂第 6 版), 163-184 免疫反応の制御機構 (菊地浩吉、上出利光、小野江和則編. 470

頁) 2010. 南江堂

2. 森本純子, 上出利光: 炎症・再生医学辞典, 106-108 オステオポンチン (松島綱治、西脇徹編.) 2009. 朝倉書店

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上出 利光 (Uede Toshimitsu)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授
研究者番号: 00160185

(2) 研究分担者

森本 純子 (Morimoto Junko)
徳島大学・疾患酵素学研究センター・助教
研究者番号: 20451396

松井 裕 (Matsui Yutaka)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・特任准教授
研究者番号: 30431381
(H21~H22)

