

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 24 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590996

研究課題名（和文）

オステオポンチン重合体の間質性肺炎の病態形成における役割に関する研究

研究課題名（英文）

A STUDY ON ROLES OF POLYMERIC OSTEOPONTIN IN PROGRESSION OF PULMONARY FIBROSIS

研究代表者

横崎恭之（YOKOSAKI YASUYUKI）

広島大学・保健管理センター・准教授

研究者番号：80210607

研究成果の概要（和文）：

オステオポンチンは肺線維化に関与するが機序は不明である。オステオポンチンは生体内で重合化するためその点に着目し、以下を明らかにした。1) オステオポンチン重合体は好中球遊走を惹起（試験管内）2) 重合によりインテグリン $\alpha 9 \beta 1$ の認識部位形成、3) 好中球遊走は生体内でも生じる、4) オステオポンチン単量体は重合体に変化し遊走を惹起。これらから、線維化の誘因となる好中球組織集積に対する重合化の関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Osteopontin (OPN) is involved in pulmonary fibrosis by yet unknown mechanism. We investigated if OPN polymerization leads to pulmonary fibrosis, and found followings. 1) Polymeric OPN is a chemoattractant for neutrophils in vitro, 2) integrin $\alpha 9 \beta 1$ recognition site is formed on polymeric OPN upon polymerization, 3) polymeric OPN is also attracts neutrophils in vivo, 4) monomeric OPN, by converting into polymer, also attracts neutrophils in vivo. These results strongly suggest polymerization of OPN can regulate tissue accumulation of neutrophils that could induce fibrosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、トランスグルタミナーゼ、インテグリン、肺線維症、重合、好中球

1. 研究開始当初の背景

オステオポンチンはヒト特発性間質性肺炎の組織で最も発現が更新している分子であり、ノックアウトマウスでは病理像が典型的

線維化像を示さない、ことなどよりオステオポンチンは肺線維症の惹起因子と考えられているが、オステオポンチンの作用がどのように線維化につながっているのか明らかで

なかった。

一方で、オステオポンチンは重合化酵素トランスグルタミナーゼによってLysとGlnが共有結合で結ばれ重合化する事が知られていた。その意義は長い間不明であったが、私たちは2007年に重合化によりインテグリンとの結合性を増す事を見いだした。

そこで、オステオポンチンが肺線維症に役割を果たす過程に、重合化が関与しているのではないかと考え実験を開始した。

2. 研究の目的

(1) オステオポンチン重合化の生物学的意義を明らかにし、(2) 肺線維化形成にオステオポンチンが働く際、重合化することが必要であることを示す。

3. 研究の方法

リコンビナントオステオポンチンをトランスグルタミナーゼで重合させて、カラム精製し、重合オステオポンチンを作製した。末梢血から好中球を分離し遊走の実験に使用した。遊走はTAXIScanを使用してビデオ撮影を行った。

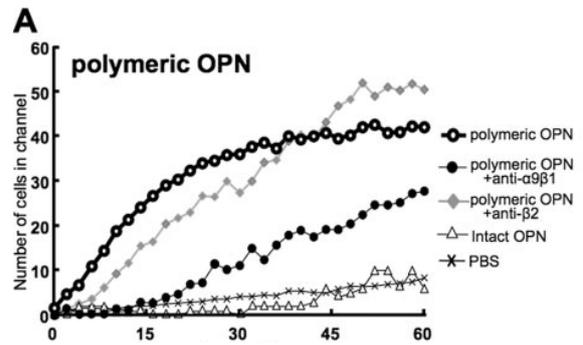
次に遊走の機序を解析するため、好中球インテグリン $\alpha 9 \beta 1$ との結合を確かめた。細胞接着アッセイとリコンビナント $\alpha 9 \beta 1$ を用いたピアコアアッセイ、結合アッセイの3種類の方法で確かめたところ、いずれの方法でも $\alpha 9 \beta 1$ と重合オステオポンチンが結合する事が確かめられた。

さらに、オステオポンチンが生体内でも好中球遊走に関与するかを確かめるため、重合オステオポンチンをマウスの腹腔に投与して好中球の集積を確かめた。重合化させていない単量体オステオポンチンを投与しても同じ結果が得られたが、以下の2つの場合は集積が抑制された。重合化に必要な部位に変異を加え重合を阻害すること、および $\alpha 9 \beta 1$ ノックアウトマウスに投与する事。

4. 研究成果

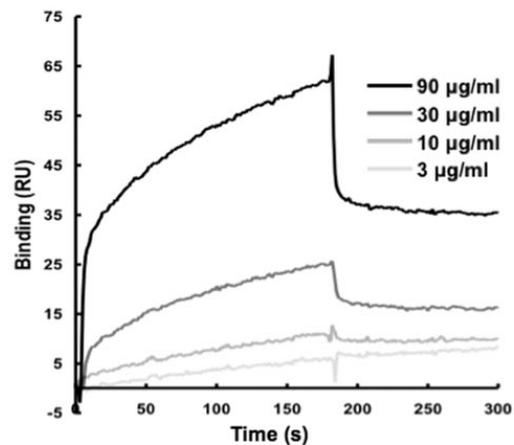
(1) オステオポンチン重合体の好中球走化性 (試験管内)

重合オステオポンチン濃度勾配のあるチャンパーの中を好中球が走化的に遊走することを以下の図のように確かめた。但し単量体に向かっては遊走しない。また、この遊走はインテグリン $\alpha 9 \beta 1$ に対する抗体で阻害される。単量体オステオポンチンは $\alpha 9 \beta 1$ に対する結合部位を持たないため、重合により結合部位が形成されると考えられ、次にこれを確かめた。



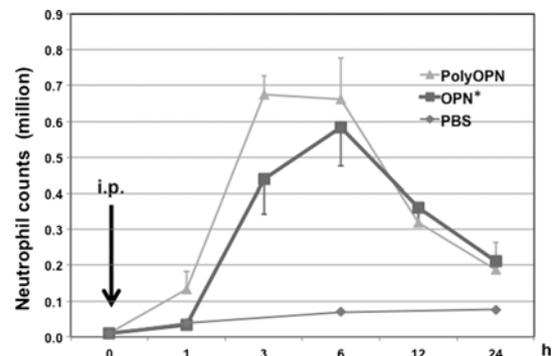
(2) 重合によるインテグリン $\alpha 9 \beta 1$ の認識部位形成

下の図はリコンビナントインテグリン $\alpha 9 \beta 1$ を固相化したセンサーチップ上にオステオポンチン溶液を流し核磁気共鳴により結合性を観察したもの。濃度依存的に結合が増している。



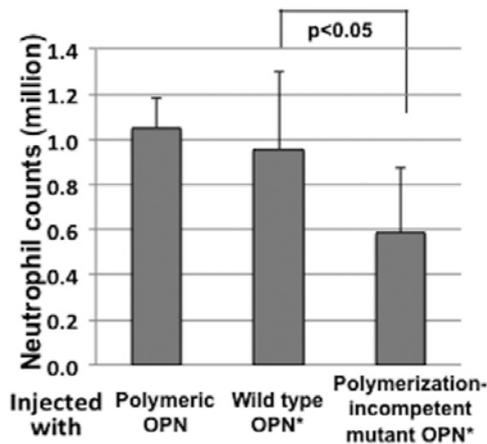
(3) 重合体の好中球走化能 (生体内)

マウスの腹腔に重合オステオポンチンを注射し経時的に好中球数を観察した。注射後3-6時間をピークとして好中球が集積している。また試験管内の結果と異なり、単量体の注射によっても集積している。



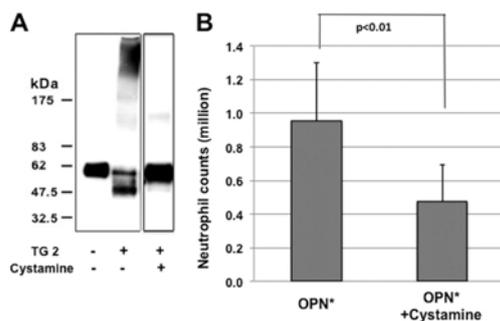
(4) オステオポンチン単量体は重合体に変化し遊走を惹起。

単量体は試験管内では好中球遊走を惹起しないため、生体内での遊走惹起は重合体に変化したために生じていると考えられた。これを証明するために、重合できないように変異導入したオステオポンチンを注射した場合には、集積の程度が下がることを確認した(下図)。

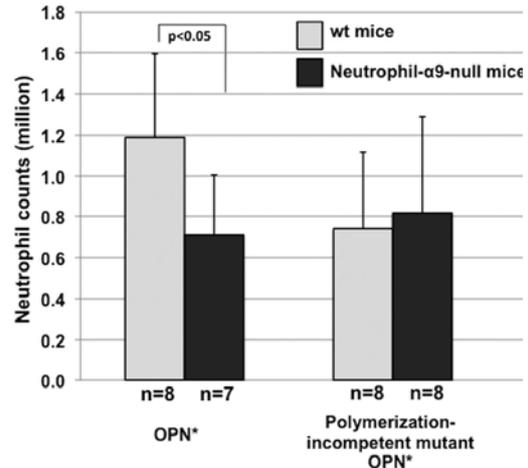


さらに、同じ系にトランスグルタミナーゼの阻害剤シスタミンを投与してみたところ、同様に集積が抑制された(下図 B)。なお、シスタミン投与により実際に重合が抑制される様子を左の図 A に示している。

最後に、これら生体内での好中球遊走惹起がインテグリン $\alpha 9 \beta 1$ を介していることを確かめるため、インテグリン $\alpha 9$ サブユニットを好中球特異的にノックアウトしたマウスにオステオポンチンを投与したところ、集積が低下していた(下図)。またこのマウスに重合不能オステオポンチンを投与した場合には集積の程度は野生型マウスに投与した場合と変化なく、重合不能オステオポンチンによる集積は $\alpha 9$ の有無に関係していなかった。



以上の研究結果から、重合オステオポンチ



ンはインテグリン $\alpha 9 \beta 1$ を介して好中球の遊走・集積に関与することを明らかにした。また、単量体オステオポンチンは直接の好中球走化性は示さないが、生体内では重合体となって走化性を発揮していた。すなわち、オステオポンチンは確かに好中球走化性をもつがそれは重合を介しており、トランスグルタミナーゼによる重合化が好中球集積作用の鍵を握っていた。好中球の集積は組織障害につながりそれが線維化の誘因となると考えられており、オステオポンチンは重合化を介して線維化を制御している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Nishimichi N, Kinoh-Hayashita H, Chen C, Matsuda H, Sheppard D, Yokosaki Y. Osteopontin undergoes polymerization *in vivo* and gains chemotactic activity for neutrophils mediated by integrin $\alpha 9 \beta 1$. 査読あり, *J Biol Chem* 286: 11170-11178, 2011, DOI: 10.1074/jbc.M110.189258
2. Tatiana M. Tilli, Eloísio A. Silva, Lívia C. Matos, Douglas V. Faget, Bianca F.P. Dias, Juliana S.P. Vasconcelos, Yasuyuki Yokosaki, Etel R.P. Gimba. Osteopontin is a tumor autoantigen in prostate cancer patients. 査読あり, *Oncol Lett* 2: 109-114, 2011, DOI: 10.3892/ol.2010.211
3. 横崎恭之、西道教尚、日山亨、黒崎充勇、岡本百合、吉原正治: オリゴマーの生物学と医学. 査読あり, *総合保健科学* 27: 91-98, 2011
4. Nishimichi N, Higashikawa F, Kinoh HH, Tateishi Y, Matsuda H, Yokosaki Y.

Polymeric osteopontin employs integrin $\alpha 9 \beta 1$ as a receptor and attracts neutrophils by presenting a *de novo* binding site. 査読あり, *J Biol Chem* 284: 14769-14776, 2009, DOI: 10.1074/jbc.M901515200

[学会発表] (計 10 件)

1. Yokosaki Y, Nishimichi N. Formation of functional protein-binding site upon transglutaminase-induced polymerization of osteopontin, In -The evolution and functional differentiation of transglutaminases- 第 84 回日本生化学会シンポジウム、2011 年 9 月 21-24 日、京都
2. 西道教尚、喜納裕美、松田治男、横崎恭之: オステオポンチンはオリゴマー化し好中球の走化性因子となる。第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会合同年会、2010 年 12 月 7-10 日、神戸
3. Yasuyuki Yokosaki, Norihisa Nishimichi, Hiromi H Kinoh, Haruo Matsuda, Chun Chen, Dean Sheppard. Distinct OPN function on neutrophil chemotaxis *in vivo* from *in vitro*, FASEB Conference -Osteopontin Biology-, August 1-6, 2010, Steamboat Springs, CO, USA
4. Yasuyuki Yokosaki, Norihisa Nishimichi, Hiromi H Kinoh, Haruo Matsuda. Blockade of post-translational acquirement of chemotactic property of osteopontin. 2nd International Congress of Antibodies. March 24-26, 2010, Beijing, China
5. 西道教尚、東川史子、喜納裕美、立石能子、松田治男、横崎恭之: 重合オステオポンチンはインテグリン $\alpha 9 \beta 1$ を受容体とし新規認識部位提示により好中球を惹き付ける、第 82 回日本生化学会、2009 年 10 月 21-24 日、神戸

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称: オステオポンチン特異的モノクローナル抗体

発明者: 松田治男、西道教尚、横崎恭之

権利者: 広島大学

種類: 特許

番号: 2010-065194

出願年月日: H 22.3.19

国内外の別: 国内

名称: オステオポンチン特異的モノクローナル抗体

発明者: 松田治男、西道教尚、横崎恭之

権利者: 広島大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2011/56478

出願年月日: H23.3.17

国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

横崎 恭之 (YASUYUKI YOKOSAKI)

広島大学・保健管理センター・准教授

研究者番号: 80210607

(2)研究分担者

中田 光 (KOH NAKATA) (H21→H22)

新潟大学・歯学総合病院・教授

研究者番号: 80207802

森本 泰夫 (YASUO MORIMOTO)

(H21→H22)

産業医科大学・産業生態科学研究所・教授

研究者番号: 30258628

松田 治男 (HARUO MATSUDA) (H21)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号: 80116863

(3)連携研究者

矢寺 和博 (KAZUHIRO YATERA)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号: 40341515