様式Ｆ－１９

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：15401
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23710257
研究課題名（和文）凝集塊は老廃物か、生理活性物質か？
重合型オステオポンチンの生態解明
研究課題名（英文）Characterization and expression analysis of polymeric osteopontin
研究代表者
西道　教尚（NISHIMICHI NORIHISA）
広島大学・保健管理センター・研究員
研究者番号：00583486

研究成果の概要（和文）：本研究では、蛋白架橋酵素トランスグルタミナーゼ 2 により重合したオステオポンチンの生態解明を目的に実験した。はじめに本分子の受容体であるインテグリンα9β1 認識領域を絞り込んだ。続いて、炎症モデルマウスを用いて生体内における本分子の存在とその存在意義を検証し、炎症により出現、増加する分子であり、病態形成に関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, I examined to elucidate the characterization of osteopontin polymerized by protein crosslinking enzyme, transglutaminase 2. First, recognition site of an integrin alpha9beta1 in the polymeric osteopontin was determined. Next, using several inflammation-model mice, polymeric osteopontin appeared and increased according to inflammation, and was thought to be required for progression of inflammation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
交付決定額	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：分子生物学、免疫学、生化学、細胞接着分子
科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学
キーワード：活性発現の分子機構、生体分子、生理活性、タンパク質

１．研究開始当初の背景

(1) オステオポンチンは、9 種類のインテグリンを受容体に持つマトリックスタンパク質であり、炎症、創傷治癒、線維化や腫瘍転移など様々な現象への関与が報告されている。また、リン酸化や糖鎖付加に加えて酵素による切断や重合など種々の翻訳後修飾を受けて活性を変化させることが知られており、特にトロンビン切断により生じる「N 末断片」とトランスグルタミナーゼよる「重合体」では非修飾の野生型から受容体を切り替えて固有の機能を発揮すると考えられている。例えばN 末断片は、インテグリン α9β1 を介して造血幹細胞のニッチへのホーミングや、関節炎、肝炎への関与が報告されている。一方、重合型は歯や石灰化大動脈に存在することが報告されていたが、生理活性の有無などまったく不明であるのが現状であった。

(2) 本研究者は、2007 年より翻訳後修飾によるオステオポンチンの活性変化に着目し、特に重合型オステオポンチンの機能解析にフォーカスして研究をスタートした。その結果、重合型オステオポンチンはN 末断片とは異なるインテグリン α9β1 認識部位を形成して好中球遊走を惹起することを見出した。

さらに、マウスへの組み換えオステオポンチン投与実験により、その機能は生体内でも再現可能であること、重合が短時間に生じる事、好中球遊走活性は切断型を凌駕することなどを見出した。しかし、重合型オステオポンチンの機能の考察を更に展開するための障害は、基本情報が不十分なことであった。そこで本研究では、重合型オステオポンチンが生体内においてどのような組織に、どのような条件下で存在するのか、そもそもインテグリン α9β1 認識部位（活性部位）はどこなのか、などを解明する必要があると考えるに至った。

２．研究の目的

本研究者は、蛋白架橋酵素トランスグルタミナーゼ 2 により重合したオステオポンチンが、インテグリン α9β1 結合部位を形成して機能発揮することを試験管内及び生体内で示し、本重合体が単なる老廃物ではなく生理活性物質であることを提示した。しかし、その認識エピトープや生体分布など基本的な性質が全く不明であった。そこで本研究では、重合型オステオポンチンの生物活性の理解に不可欠な生態を明らかにし提示することを目的とした。

３．研究の方法

(1) 重合型オステオポンチンの新規インテグリンα9β1 結合部位の同定・・・組み換えオステオポンチンを作製し、N 末端、C 末端部分欠損変異体を多く作製、これらをトランスグルタミナーゼ 2 により重合し、インテグリンα9 発現細胞を用いた細胞接着試験により認識部位の同定を試みた。

(2) 重合型オステオポンチン特異的抗体の選抜と機能向上・・・既に作製済みのオステオポンチン抗体ファージディスプレイライブラリーから、重合型オステオポンチンのみに反応する抗体の選抜を試みた。選抜できた場合、抗体の活性に関して評価し、不十分の場合は活性を上昇させる変異導入を試みた。

(3) LPS 誘導腹腔内炎症細胞浸潤における重合型オステオポンチン存在の意義・・・マウスにオステオポンチン重合阻害抗体 BOP-1 を腹腔内に投与、非投与し、その後エンドトキシンである LPS を同様に腹腔内投与した。LPS 投与 18 時間後に腹腔内をリン酸緩衝食塩水で洗浄して腹腔内に浸潤した炎症細胞を回収し、各群での細胞数を比較した。

(4) 全身性炎症反応症候群(SIRS) モデルマウスにおける重合型オステオポンチン存在の意義・・・(3) で用いたオステオポンチン重合阻害抗体 BOP-1 を腹腔内に投与または非投与したマウスに、致死量の LPS（1 匹当たり 0.6 mg）を腹腔内投与して SIRS モデルマウスを作製した。これら各マウスの生存率を LPS 投与後 72 時間まで比較した。

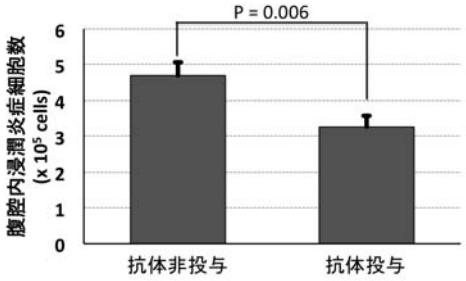
(5) 肝炎モデルマウスにおける重合型オステオポンチンの検出（生体内でどのような重合体を形成しているか）・・・エタノール過剰摂取による肝炎モデルマウスを作製し、ウェスタンブロッティングによりオステオポンチン検出を試みた。

４．研究成果

(1) 重合の結果出現した新規インテグリンα9β1 結合部位の同定・・・細胞接着試験の結果、N 末端側部分欠損変異体由来重合体はいずれも等しくα9 発現細胞と接着したことから、重合体のインテグリンα9β1 結合部位（結合領域）が C 末端側 に存在していることが判明した。しかし、本研究期間内では最小の認識エピトープの同定には至らなかった。

(2) 重合型オステオポンチン特異的抗体の選抜と機能向上・・・オステオポンチン抗体ファージディスプレイライブラリーから重合型オステオポンチンのみに反応する抗体の選抜に成功した。しかし、本抗体の反応性は十分ではなかったため、抗体のフレーム領域（結合を指示する領域）に変異導入を試みたところ、本抗体の機能向上に成功した。

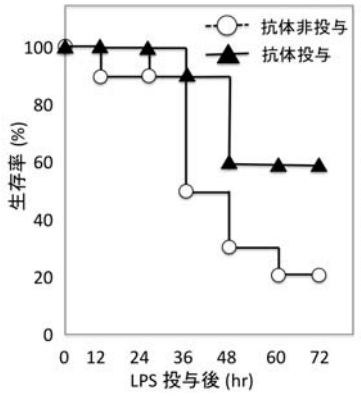
(3) LPS 誘導腹腔内炎症細胞浸潤における重合型オステオポンチン存在の意義・・・抗体非投与マウスと比較して、抗体投与マウスでは腹腔内に浸潤した炎症細胞数が有意に低下していた。本結果から、重合型オステオポンチンが LPS 投与により出現し、炎症細胞の遊走に関与していることが示唆された。



LPS 誘導腹腔内炎症細胞浸潤における重合型オステオポンチン存在の意義
オステオポンチン重合阻害抗体投与、非投与のマウスにLPSを腹腔内投与し18 時間後に腹腔内浸潤炎症細胞数を比較した。抗体投与により炎症細胞数が有意に低下していた。

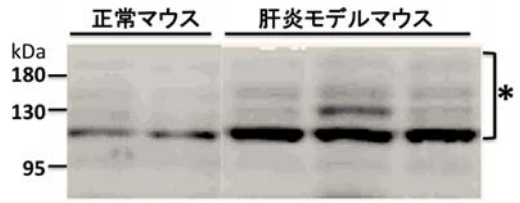
(4) 全身性炎症反応症候群(SIRS)モデルマウスにおける重合型オステオポンチン存在の意義・・・非投与群と比較して、抗体投与

群では抗体濃度依存的に生存率が著明に上昇していた。本結果は、敗血症を代表とするSIRS という重篤な疾患にオステオポンチンが、それも重合した形で関与していることを世界で始めて提示し、重合型オステオポンチンが本疾患の治療ターゲットになりうる可能性を示した。



SIRS モデルマウスに対するオステオポンチン重合阻害抗体の効果
致死量のLPS を投与したSIRS モデルマウスにオステオポンチン重合阻害抗体BOP-1 を投与し非投与群と生存率を比較した。抗体投与により生存率が改善しているのが明瞭である。(各条件10 匹で実施)

(5) 肝炎モデルマウスにおける重合型オステオポンチンの検出（生体内でどのような重合体を形成しているか)・・・正常マウスと比較して、肝炎モデルマウスではオステオポンチンが有意に増加しており、更にその形状は単量体ではなく重合体であった。またその重合の程度は、試験管内で見られる高分子スメアー状とは異なり、2ー4 量体からなるオリゴマーであった。本結果より、オステオポンチンは炎症において増加し、しかも重合して存在していること、生体内では不規則に重合するのではなく、(ある条件下においては)規則的なオリゴマー構造を形成することが判明した。アミロイドβ 等の神経変性疾患に関与するタンパク質もトランスグルタミナーゼにより規則的な 3ー7 量体のオリゴマーを形成するといわれており、これら基質タンパク質が重合、活性発現するには共通したメカニズムが存在している可能性がある。本結果は「重合体の生物学」にも一石を投じる可能性があると考える。



マウス炎症組織中の重合オステオポンチン
正常マウスと比較してエタノール誘導肝炎モデルマウスでは重合オステオポンチン (*) が明らかに増加している。試験管内で生じるスメアーな重合体とは異なり本疾患モデルでは2 ～ 4 量体のオリゴマーを形成している。

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 2 件）
(1) Ma L, Nishimichi N, Sugiyama T. (10 名中 8 番目) Generation of intracellular single-chain antibodies directed against polypeptide GalNAc-transferase using a yeast two-hybrid system. *Biochem Biophys Res Comun* 418, 628-633. (2012), 査読有 (DOI:10.1016/j.bbrc.2012.01.062)

(2) Nishimichi N, Sheppard D, Yokosaki Y. (6 名中 1 番目) Osteopontin undergoes polymerization in vivo and gains chemotactic activity for neutrophils mediated by integrin α9β1. *J Biol Chem* 286, 11170-11178. (2011), 査読有 (DOI:10.1074/jbc.M110.189258)

〔学会発表〕（計 3 件）
(1) 西道教尚ほか、全身性炎症反応症候群 (SIRS) に対するオステオポンチン重合阻害抗体の効果、第 15 回トランスグルタミナーゼ研究会学術集会、2012 年 12 月 13 日、九州大学理学部生物学科第二会議室

(2) 西道教尚ほか、トランスグルタミナーゼ重合によるオステオポンチンの蛋白結合部位形成と機能獲得、第 4 回トランスグルタミナーゼ研究会＆日本ポリアミン学会合同学術集会、2011 年 9 月 20 日、京都工芸繊維大学 60 周年記念館

(3) 西道教尚ほか、オステオポンチン投与後のオリゴマー化とそれに続く好中球集積、第 52 回日本生化学会中国・四国支部総会、2011 年 5 月 14 日、広島大学医学部広仁会館

〔産業財産権〕
○出願状況（計 2 件）
(1)
名称：インテグリン α8β1 の機能を阻害する事による線維化の抑制
発明者：西道教尚ほか 1 名
権利者：国立大学法人広島大学
種類：特許
番号：PCT/JP2013/059368
出願年月日：2013 年 3 月 28 日
国内外の別：国外

(2)
名称：インテグリン α8β1 の機能を阻害する事による線維化の抑制

発明者：西道教尚ほか1 名
権利者：国立大学法人広島大学
種類：特許
番号：2012-75147
出願年月日：2012 年3 月28 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
インテグリン治療開発フロンティア研究室
http://home.hiroshima-u.ac.jp/integrin/Home.html

６．研究組織
(1)研究代表者
西道　教尚（NISHIMICHI NORIHISA）
広島大学・保健管理センター・研究員
研究者番号：00583486

(2)研究分担者
（　　）

研究者番号：

(3)連携研究者
（　　）

研究者番号：