

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840034

研究課題名(和文) 生理活性物質重合オステオポンチンの新機能 -炎症における作用機序解明-

研究課題名(英文) The role of polymeric osteopontin on inflammation

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

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により重合するオステオポンチンの炎症における役割解明を目的に実験した。その結果、オステオポンチンは炎症性サイトカインであるTGF- β 1の刺激により増加し、且つ細胞膜上で重合することを明らかにした。また、肺特異的に重合不能変異オステオポンチンを発現する遺伝子改変マウスの樹立に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, I examined to reveal the role of polymerized osteopontin (catalyzed by protein-crosslink enzyme, transglutaminase 2) on inflammation. As a result, it was cleared that osteopontin and transglutaminase 2 were up-regulated by pro-inflammatory cytokine, TGF- β 1 and the former was polymerized on cell membrane fraction by the latter. I was also successful in the generation on transgenic mice expressed polymerization-incompetent mutant osteopontin specific in lung.

研究分野：免疫学、分子生物学、細胞接着分子、細胞外マトリックス

キーワード：生理活性物質 オステオポンチン 重合 炎症

1. 研究開始当初の背景

(1) オステオポンチンは、インテグリン (計 9 種) を受容体に持ち、炎症や創傷治癒、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マトリックスタンパク質である。同分子は、酵素による切断や重合など種々の翻訳後修飾を受けるが、特にトロンビン切断により生じる「N 末断片型」と架橋酵素トランスグルタミナーゼによる「重合型」は未修飾の野生型とは異なる固有の機能を発揮すると考えられている。例えば N 末断片型は、造血幹細胞のニッチへのホーミングや関節炎、肝炎への関与など研究が進展しているが、その一方で重合型は出現分布や機能等殆ど解明されてこなかった。

(2) 本研究者は、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、中でも重合型の機能解析に着目して研究した。その結果、オステオポンチン重合体はインテグリン $\alpha 9 \beta 1$ 認識部位を形成して好中球遊走を惹起することを試験管内及びマウス生体内で見出し、その活性は同様に好中球走化因子として知られる N 末断片型を凌駕することを示した。更に、本重合体は炎症に伴い出現、増加することを明らかにし、同分子が新しい「炎症性生理活性物質」であると考察するに至った。

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の機能に着目し、これまでに同重合体がインテグリン $\alpha 9 \beta 1$ を介して好中球の遊走を誘導すること (試験管内およびマウス生体内)、炎症に伴い出現、増加することを見出した。本研究ではオステオポンチン重合体の炎症形成における意義を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞におけるオステオポンチン発現と重合体形成・・・ヒト 2 型肺上皮細胞株およびヒト肝星細胞株を主要な炎症メディエーターである TGF- $\beta 1$ で刺激し、オステオポンチン及び架橋酵素トランスグルタミナーゼ 2 遺伝子の発現を定量 PCR により解析した。また同刺激細胞の膜画分を抽出し、オステオポンチン重合体をウェスタンブロッティングによる検出を試みた。

(2) 生体内でのオステオポンチン重合体の局在・・・本研究者らが作製した野生型オステオポンチン特異的モノクローナル抗体と

野生型、重合型の両者を認識可能なモノクローナル抗体を用いて免疫組織化学染色を試みた。

(3) 細胞膜上オステオポンチン重合体の好中球遊走能・・・重合オステオポンチン発現細胞の好中球遊走能をトランスウェルアッセイにより検討した。

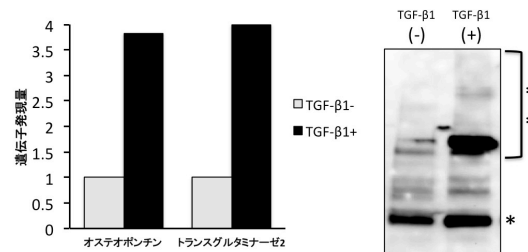
(4) 肺特異的重合不能変異オステオポンチン発現マウスの作製・・・重合不能オステオポンチン導入遺伝子改変マウス (内在のオステオポンチン遺伝子はホモで欠損) と 2 型肺上皮細胞特異的 Cre リコンビナーゼ発現マウスを交配し、肺のみで重合不能型を発現するトランスジェニックマウスの作製を試みた。

(5) 肺炎モデルにおけるオステオポンチン重合阻害抗体の効果・・・肺傷害剤であるブレオマイシンを気管内投与したマウスに、本研究者らが作製したオステオポンチン重合阻害抗体を腹腔内投与し、投与 14 日後に肺の炎症の程度を抗体非投与群と比較した。

(6) 肺特異的重合不能オステオポンチン発現マウスの肺傷害での評価・・・同遺伝子改変マウスの肺傷害時におけるオステオポンチン発現を評価した。

4. 研究成果

(1) 細胞におけるオステオポンチン発現と重合体形成・・・TGF- $\beta 1$ の刺激により、検討したいずれの細胞でもオステオポンチン及びトランスグルタミナーゼ 2 遺伝子発現が増加していた。また細胞膜画分を用いたウェスタンブロッティングの結果、同刺激によりオステオポンチンが増加し且つ重合体が形成されていた。以上の結果から、少なくともオステオポンチンは炎症メディエーターの刺激により発現が増加し、同時に増加したトランスグルタミナーゼ 2 を介して細胞膜表面で重合することが分かった。



細胞におけるオステオポンチン発現と重合体形成

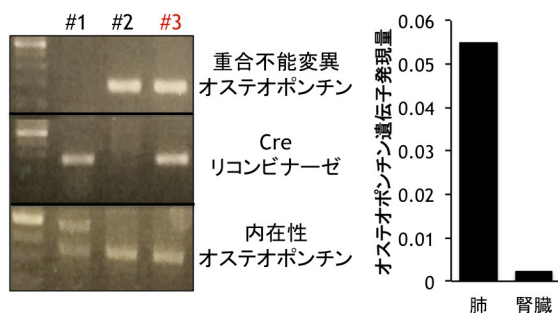
TGF- $\beta 1$ の刺激により、ヒト 2 型肺上皮細胞でオステオポンチン及びトランスグルタミナーゼ 2 遺伝子の発現が増加していた。また同刺激により細胞膜上でオステオポンチン単量体 (*) に加えて重合体が形成されていた (**).

(2) 重合体の組織分布・・・2 種類の抗体を用いた免疫組織化学染色では重合体を識別することが出来なかった。重合体の検出には重合型特異的抗体 (以前一度取得も免疫染

色に働かず)が必要であることが改めて考えられた。

(3) 細胞膜上オステオポンチン重合体の好中球遊走能・・・オステオポンチン重合の有無に関わらず、好中球遊走の程度に違いは認められなかった。好中球は陰性条件下でも大きな運動が認められる場合があり、同評価の際は、通常細胞運動が殆ど起きない上皮系細胞にインテグリン $\alpha 9$ を導入、発現させて実施することが望ましいと考えられた。

(4) 肺特異的重合不能変異オステオポンチン発現マウスの作製・・・重合不能オステオポンチン導入遺伝子改変マウスと 2 型肺胞上皮細胞特異的 Cre リコンビナーゼ発現マウスを交配した。ジェノタイピングの結果、重合不能変異オステオポンチン遺伝子及び Cre リコンビナーゼ遺伝子を保持し、内在のオステオポンチン遺伝子をホモで欠損したマウスを得た。同マウスの変異オステオポンチン遺伝子の発現を肺、腎臓由来 cDNA を鋳型に定量 PCR で検討したところ、肺のみで遺伝子発現が認められ、目的の変異オステオポンチンが肺特異的に発現していることが分かった。

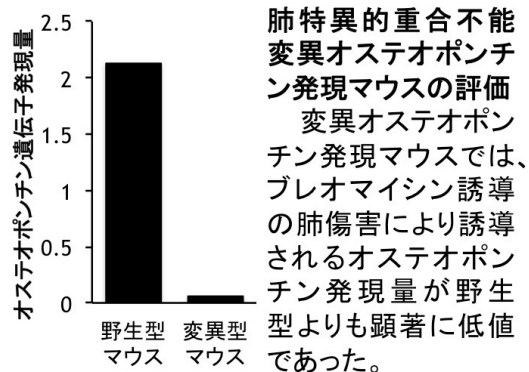


肺特異的重合不能変異オステオポンチン発現マウスの作製

交配により目的の遺伝子表現型マウスを得た (左#3の表現型タイプ)。同マウスは肺特異的に変異オステオポンチンを発現していた (右)。

(5) 肺炎モデルにおけるオステオポンチン重合阻害抗体の効果・・・肺組織標本の HE 染色での評価において、抗体投与群は非投与群よりもやや傷害の程度が低かった。しかし一方で炎症性サイトカイン遺伝子の発現量は非投与個体より高値であった。他の研究発表では、ブレオマイシン肺傷害による炎症は投与後数日で強く誘導されており、今回本研究者が設定した投与 14 日後は炎症の評価には長過ぎた可能性がある。よって、今後オステオポンチン重合の役割を検討するにはブレオマイシン投与 2, 3 日後に評価する必要があると考えられた。また、遺伝子発現は一過的な局面を捉えている可能性もあり、肺内に集積した炎症細胞の実数測定や、ELISA による炎症性サイトカインのタンパク質レベルでの測定が正確な評価に必要であると考えられた。

(6) 肺特異的重合不能オステオポンチン発現マウスの肺傷害での評価・・・作製した遺伝子組み換えマウスでの変異オステオポンチン発現をブレオマイシン肺傷害マウスと比較すると、同遺伝子発現量が極めて低かった。この結果から、ブレオマイシン誘導肺傷害では 2 型は違法上皮細胞以外の肺構成細胞 (肺胞マクロファージや肺線維芽細胞) もオステオポンチンを発現していることが予想された。今後生体内での重合オステオポンチンの機能解析を進めるには、相同組換えによる全身発現性のマウスを作製することが必要不可欠であるとの結論を得た。



肺特異的重合不能変異オステオポンチン発現マウスでは、ブレオマイシン誘導の肺傷害により誘導されるオステオポンチン発現量が野生型よりも顕著に低値であった。

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)

[学会発表] (計 4 件)

(1) 西道教尚ほか、オステオポンチン重合化と全身性炎症反応症候群、第 45 回日本結合組織学会学術大会・第 60 回マトリックス研究会大会合同学術大会、2013 年 6 月 28 日、和歌山県立医科大学

(2) 西道教尚ほか、osteopontin-polymerization-blocking antibody attenuates septic inflammation induced by LPS in mice、第 5 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、2013 年 9 月 10 日、キャンパスイノベーションセンター (東京都港区芝浦)

(3) 横崎恭之・西道教尚、osteopontin-polymerization-blocking antibody attenuates septic inflammation induced by LPS in mice、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日、パシフィコ横浜

(4) 西道教尚ら、インテグリン $\alpha 8\beta 1$ モノクローナル抗体の認識部位の同定、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜

[図書] (計 1 件)

(1) 西道教尚ら、ニューサイエンス社、月刊細胞、2015 年、52 ページ (各論: インテグリンを介した線維化調節機構を p20-23 の 4

ページ分担当)

[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