

学 位 論 文 題 名

オステオポンチンと自己免疫疾患－オステオポンチン

トランスジェニックマウスを用いた解析

学位論文内容の要旨

オステオポンチン (OPN) は骨基質に存在する蛋白として同定された。一方ではT細胞の活性化に伴い発現されるearly T lymphocyte activation-1 (Eta-1)という遺伝子としても同定された。OPNは分子内にビトロネクチンやフィブロネクチンなどの細胞外マトリックスが有するアルギニン・グリシン・アスパラギン酸 (RGD) 配列という細胞接着配列を有する。このRGD配列を介して $\alpha v \beta 3$ を始めとする $\alpha v \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 5$ などのインテグリン分子とCa依存性に結合することが知られている。最近ではOPNのRGD配列を介さない接着についての研究も進められており、CD44と結合することやトロンビン切断後のN末端を含む半分がテナシン受容体である $\alpha 9 \beta 1$ と結合することも明らかにになってきた。OPNは骨、腎臓、内耳、ミルクなど生体内に広く分布している。その機能も多岐に及んでおり、マクロファージ、破骨細胞、各種腫瘍細胞、血管内皮細胞をはじめとする様々な種類の細胞への接着、マクロファージやCD44陽性の腫瘍細胞に対してchemotacticに作用するなどの細胞運動能、NO合成酵素をmRNAレベルで抑制することによる一酸化窒素 (NO) 産生の調節、石灰化の調節、そして自己免疫疾患への関与などが知られている。これらの中でも特に自己免疫疾患への関与については、1) ヒトの自己免疫疾患のひとつである全身性エリテマトーデス (SLE)やSLEのモデルマウスであるMRL-lprの血清中のOPNが上昇していた。2) MRL-lprマウスでは異常細胞であるCD4⁺CD8⁻double negative (DN) T細胞が増加するが、DN T細胞でOPNのmRNAの発現が上昇していた。3) MRL-lprマウス血清中ではIL-2、3、4などのポリクローナルなB細胞の活性化を引き起こすサイトカインの産生量には変化はないが、OPN量は増加していたため、OPNはMRL-lprマウスで認められるB細胞の活性化を担っていると思われる。4) MRL-lprマウスからT細胞を除去した脾臓細胞を調整し、OPN+LPSで刺激をするとIgGやIgMの産生が認められる。などがあげられる。このように自己免疫病態を示すMRL-lprマウスやヒトSLEではOPNは主に活性化T細胞によって産生されている。自己免疫疾患におけるOPNの役割は、T細胞から産生されたOPNがB細胞のポリクローナルな活性化を惹起し、IgGクラスの自己抗体を含むIgGの産生を増強することにあると考えられてきた。しかし、これらの疾患ではOPN値の上昇のみならず、種々の免疫系の異常が存在し、その影響を除外することはできない。より直接的にOPNの自己免疫疾患における役割を検討するためにリンパ球特異的に標的遺伝子を発現することのできるプロモーターを用いてOPNトランスジェニックマウスを作製した。これをIg-OPNと名付けた。

Ig-OPN におけるOPNmRNAの発現を調べたところ内因性のOPNmRNAの発現が腎臓に認められるのに対して外因性のmRNAの発現は脾臓細胞と胸腺細胞に認められた。tgの血中のOPN値も増強しているのが確認された。また細胞におけるOPN蛋白の発現を調べるためにIg-OPNより脾臓細胞、腹腔内細胞を調整後、B細胞に特異的な表面抗原であるB220で分画したものについても調べたところ、トランスジェニックマウス(tg)では脾臓細胞及び腹腔内細胞のB220陽性の分画ではOPN蛋白の発現が強くなっているのが確認された。次にOPNの強発現によるリンパ球の分化異常を調べるために表面抗原の解析を行った。胸腺細胞上のCD4、CD8、脾臓細胞上のCD3、CD5、B220、 αv integrin、腹腔内細胞上のB220、CD5、IgM、IgD、 αv integrinの発現をFACSを用いて解析した。T細胞については胸腺細胞のダブルネガティブ及びダブルポジティブ細胞の比、脾臓細胞の表面抗原の発現に異常は認められなかった。B細胞については、末梢のB細胞は2種類に分類され、ひとつは、IgM^{low}IgD^{high}であるB2細胞、もうひとつはIgM^{high}IgD^{low}のB1細胞である。B1細胞は更にCD5の発現により2種類に分類される。IgM^{high}IgD^{low}CD5⁺がB1a、IgM^{high}IgD^{low}CD5⁻がB1bと分類される。脾臓ではB1細胞、B2細胞ともに変化はなかったが、腹腔内細胞においてはtgでB1細胞(B1a、B1b共に)が増加していた。また、OPNのレセプターのひとつである αv integrinの発現も腹腔内細胞にのみ増加していた。B1細胞はIgM、IgG3をつくることが知られているためtgにおける血中のイムノグロブリンの濃度を測定した。IgG1の濃度はwtとtgで変化はなかったが、IgMとIgG3についてはtgの血中でwtに比べて上昇していた。また、B1細胞は自己抗体をつくることでも知られているため、代表的な自己抗体である抗DNA抗体について測定した。血中における抗1本鎖及び2本鎖DNA抗体を測定したところ、tgではIgMクラスの抗2本鎖及び1本鎖DNA抗体価が上昇していた。しかし、IgGクラスの抗体には変化は認められなかった。

本実験で作製したtgでは腹腔内B1細胞数が著明に上昇し、B1細胞を含む腹腔内B220陽性細胞群ではOPNの受容体である αv インテグリンの発現が増強していた。しかも、B1細胞由来と考えられるIgMとIgG3の血中値及び抗DNA抗体値が上昇していた。これらのことからOPNはB1細胞の増殖分化とB1細胞由来の抗DNA抗体の産生に関与していることを示唆している。しかしながら、本研究のきっかけとなったMRL-lprではOPN発現の上昇やB2細胞の活性化は認められるが、B1細胞の増加は認められない。すなわち、MRL-lprマウスでは、リンパ球の大多数を占める異常T細胞がOPNを産生し、B2細胞を活性化している。In vitroでOPNの刺激によりB2細胞から産生される免疫グロブリンはG2とG1でありG3はほとんど変化しないためこれらの抗体はB2細胞より産生されていることを示している。OPNtgでは、mRNAは胸腺細胞及び脾臓細胞で上昇しているものの、OPN蛋白の発現は主に腹腔内B220陽性細胞、すなわちB1細胞に限られている。しかも、これらの細胞は αv インテグリンの発現増強を示しているので少なくとも部分的には活性化されている。一方、B2細胞は活性化されていない。詳細な機序は不明であるが、OPNtgではB1細胞において、OPNとその受容体である αv インテグリンへの結合というautocrine機序が作用し、B1細胞の増殖分化を促進し、自己抗体の産生へと帰結している可能性がある。

いずれにしても本研究によりOPNが自己抗体の産生を惹起し、自己免疫疾患に関与する可能性が強く示唆された。このOPNtgを用い、自己免疫疾患とOPNの関係についての更なる解析が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 小 野 江 和 則

副 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 吉 木 敬

学 位 論 文 題 名

オステオポンチンと自己免疫疾患－オステオポンチン

トランスジェニックマウスを用いた解析

オステオポンチン(OPN)は、骨、腎臓、内耳、ミルクなど生体内に広く分布しており、その機能も多岐に及んでいる。すなわちマクロファージ、破骨細胞、各種腫瘍細胞、血管内皮細胞をはじめとする様々な種類の細胞への接着、細胞運動能促進

(chemotacticな作用)、inducible NO合成酵素をmRNAレベルで抑制することによる一酸化窒素(NO)産生の調節、石灰化の調節、更に自己免疫疾患への関与などが知られている。自己免疫疾患におけるOPNの役割は、T細胞から産生されたOPNがB細胞のポリクローナルな活性化を惹起し、IgGクラスの自己抗体を含む免疫グロブリンの産生を増強することにあると推察されてきた。しかし、これらの疾患ではOPN値の上昇のみならず、種々の免疫系の異常が存在し、その影響を除外することはできない。より直接的にOPNの自己免疫疾患における役割を検討するために、リンパ球特異的に標的遺伝子を発現することのできるプロモーターを用いてOPNトランスジェニックマウスを作製した。これをIg-OPNと名付けた。Ig-OPNにおけるOPNmRNAの発現を調べたところ内因性のOPNmRNAの発現が腎臓に認められるのに対して、外因性のmRNAの発現は脾臓細胞と胸腺細胞に認められた。OPN蛋白の発現は腹腔内B1細胞で増強していたが、胸腺細胞や脾臓細胞では認められなかった。血中のOPN値は対照群に比し有意に増強しているのが確認された。T細胞やB細胞の分化、増殖能に変化は認められなかったが、腹腔内B1細胞数が著明に上昇し、B1細胞を含む腹腔内B220陽性細胞群ではOPNの受容体である α vインテグリンの発現が増強していた。しかも、B1細胞由来と考えられるIgMとIgG3の血中値及びIgMクラスの抗一本鎖および2本鎖DNA抗体値が上昇していた。公開発表および個別の審査において、副査の吉木教授より、ホモ結合体でなく、ヘテロ結合体を用いた理由、自己免疫疾患類似の病理組織像の有無、週齢にともなう自己抗体等の変化、副査の小池教授より、 α vインテグリン受容体の生体内分布、OPNがB1細胞を増やす作用機序、OPNはautocrineに作用するのか、あるいはparacrineやendocrineの作用機序があるのか、副査の小野江教授より胸腺中のB1細胞は増加するか、OPNの受容体は α vインテグリンの他にどんなものが存在するか、トランスジェニックマウスではクラススイッチは正常か、免疫によって自己抗体

は変化するか等の質問がなされた。質問に対して申請者は、未発表データや関連論文を引用しつつおおむね妥当な回答をなし得た。明確な回答のなし得なかった点につき、主査の上出教授より、視点を変えた補足質問がなされた。更に3人の副査の教授より

今後、ホモ結合体を用いた解析が必要であること、他の系統のマウスの背景にOPNを導入したほうが、自己免疫症状の有無を検討しやすいこと、病理組織像の検討が必要であるとのアドバイスがあった。

本論文は、OPNトランスジェニックマウスを作製し、OPNがB1細胞の増加により自己抗体の産生を惹起し、自己免疫疾患に関与する可能性を強く示唆したものであり、今後の自己免疫疾患の発症機序を解析する上で貴重なモデル動物を提供するものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。