

学位論文題名

Role of osteopontin in intraocular inflammation

(内眼炎におけるオステオポンチンの役割)

学位論文内容の要旨

I. 背景

オステオポンチン(osteopontin; OPN)は、その名前が示すように骨組織に存在している非コラーゲン性骨基質蛋白質として見いだされた。OPNは、分子内にインテグリン結合配列であるアルギニン、グリシン、アスパラギン酸からなる RGD 配列を有するリン酸化糖蛋白質であり、現在では細胞外マトリックスとして分類される。一方、OPN は骨基質のみならず、T 細胞、マクロファージ、NK 細胞、NKT 細胞などの多種の細胞によって分泌され、血液中、尿、乳汁からも検出される。OPN は、T 細胞の活性化後に発現誘導されるサイトカイン、early T lymphocyte activation-1 (Eta-1) と同一分子であることが判明した。従って、OPN は細胞外マトリックス蛋白として機能するのみならず、サイトカインとしても機能する多面的な生体活性物質である。特に OPN は IFN- γ (interferon- γ) や、IL-12 (interleukin-12) 産生増強作用、IL-10 産生抑制作用があり、T helper type 1 (Th1) 反応を促進する炎症性サイトカインと考えられる。さらに最近、T 細胞依存性特異的免疫反応において、強力な抗原提示細胞として機能する樹状細胞の遊走を OPN が制御していることも判明し、免疫疾患との関わりが注目されている。

II. 目的

内眼炎患者では OPN が上昇しているのか、またヒト内眼炎患者において OPN が治療標的分子となり得るかを検討するために、動物モデルである実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (experimental autoimmune uveoretinitis; EAU) において、OPN がどのように関与しているかを検討することを目的とした。

III. 方法

対象は活動性の眼炎症を有する HLA-B27 関連ぶどう膜炎患者 11 名、サルコイドーシス患者 18 名、ベーチェット病患者 8 名、Vogt-小柳-原田病患者 17 名、ならびに健常コントロール 19 名の 5 群とした。対象者の末梢血を採取し、ELISA を用いて血漿中 OPN を測定した。

また、マウスに視細胞間光受容器レチノイド結合蛋白質 (interphotoreceptor retinoid-binding protein; IRBP) で免疫して EAU を誘導し、血漿中 OPN を測定した。OPN ノックアウト (KO) マウスを用いて、EAU が軽症化するかどうか、OPN 中和抗体により EAU を抑制することができるかどうかについても検討した。

IV. 結果・考案

HLA-B27 関連ぶどう膜炎患者、サルコイドーシス患者の血漿中 OPN は健常コントロールと比べ有意に上昇していた。この結果より我々は OPN が内眼炎に何らかの関わりをもつと考えた。

EAU を誘導したマウスでは、網脈絡膜炎の発症に先立って血漿中 OPN が上昇した。血漿中 OPN レベルは免疫後 14 日目にピークとなり、その後徐々に低下した。一方、EAU のスコアは 21 日目にピークを示した。これらの結果より、我々は OPN が EAU の afferent phase に関与していると考えた。

OPN KO マウスを用いた実験では、有意に EAU の軽症化、および発症の遅れが認められ、OPN が病態形成に関与していることが判明した。また OPN KO マウスでは IRBP に対する T 細胞増殖反応が低下しており、この T 細胞反応の培養上清中の IFN- γ 、TNF- α の有意な産生低下が見られた。

次に、トロンビン切断により露出されるマウス OPN の SLAYGLR 配列を特異的に認識する中和抗体 (M5 抗体) を EAU マウスに投与すると、OPN KO マウス同様、EAU の軽症化が見られた。また M5 抗体を *in vitro* で T 細胞、抗原提示細胞、抗原ペプチドの培養中に加えたところ、T 細胞増殖反応が低下し、IFN- γ 、TNF- α の産生低下も認められた。これらの結果から、OPN は afferent phase のみならず、T 細胞が免疫抗原である IRBP に反応する efferent phase においても、EAU の進展に関与していると考えられた。

V. 結語

OPN は多くの自己免疫疾患の発症や病態形成に深く関わっている。実際、炎症性眼疾患において、血中 OPN 濃度は上昇しており、病態を判断するマーカーとなりうるということが判明した。また、OPN 中和抗体により内眼炎モデルの EAU の病態を抑制できることが明らかとなった。今後各疾患における OPN の役割がより詳細に明らかにされれば、OPN を標的とする治療法導入により、免疫反応制御システムが確立されることが期待される。また抗 TNF- α 抗体が、関節リウマチや内眼炎などの自己免疫疾患において効果的であると報告されているが、多種の疾患において病態形成に関与すると考えられる OPN に対する抗体による治療も、早期に臨床応用されることが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 野 重 昭
副 査 教 授 小 野 江 和 則
副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

Role of osteopontin in intraocular inflammation

(内眼炎におけるオステオポンチンの役割)

オステオポンチン (osteopontin; OPN) は、その名前が示すように骨組織に存在している非コラーゲン性骨基質蛋白質として見いだされた。OPN は、分子内にインテグリン結合配列であるアルギニン、グリシン、アスパラギン酸からなる RGD 配列を有するリン酸化糖蛋白質であり、現在では細胞外マトリックスとして分類される。一方、OPN は骨基質のみならず、T 細胞、マクロファージ、NK 細胞、NKT 細胞などの多種の細胞によって分泌され、血液中、尿、乳汁からも検出される。OPN は、T 細胞の活性化後に発現誘導されるサイトカイン、early T lymphocyte activation-1 (Eta-1) と同一分子であることが判明した。従って、OPN は細胞外マトリックス蛋白として機能するのみならず、サイトカインとしても機能する多面的な生体活性物質である。特に OPN は IFN- γ (interferon- γ) や、IL-12 (interleukin-12) 産生増強作用、IL-10 産生抑制作用があり、T helper type 1 (Th1) 反応を促進する炎症性サイトカインと考えられる。さらに最近、T 細胞依存性特異的免疫反応において、強力な抗原提示細胞として機能する樹状細胞の遊走を OPN が制御していることも判明し、免疫疾患との関わりが注目されている。

そこで本研究は、内眼炎患者では OPN が上昇しているのか、またヒト内眼炎患者において OPN が治療標的分子となり得るかを検討するために、動物モデルである実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (experimental autoimmune uveoretinitis; EAU) において、OPN がどのように関与しているかを検討した。HLA-B27 関連ぶどう膜炎患者、サルコイドーシス患者の血漿中 OPN は健常コントロールと比べ有意に上昇していた。この結果より我々は OPN が内眼炎に何らかの関わりをもつことが明らかとなった。EAU を誘導したマウスでは、網脈絡膜炎の発症に先立って血漿中 OPN が上昇した。血漿中 OPN レベルは免疫後 14 日目にピークとなり、その後徐々に低下した。一方、EAU のスコアは 21 日目にピークを示した。OPN ノックアウトマウスを用いた実験では、有意に EAU の軽症化、および発症の遅れが認められ、OPN が病態形成に関与していることが判明した。また OPN ノックアウトマウスでは IRBP に対する T 細胞増殖反応が低下しており、この T 細胞反応の培養上清中の IFN- γ 、TNF- α の有意な産生低下が見られた。次に中和抗体 (M5 抗体) を EAU マウスに投与すると、OPN ノックアウトマウス同様、EAU の軽症化が見られた。また M5 抗体を *in vitro* で T 細胞、抗原提示細胞、抗原ペプチドの培養中に加えたところ、T 細胞増殖反応が低下し、IFN- γ 、TNF- α の産生低下も認められた。以上より

OPN は内眼炎において、T 細胞応答を増強し、Th1 免疫偏倚を生ずることで炎症を悪化させると考えられ、抗体治療など OPN を標的にした薬物は、ヒトでの内眼炎の治療戦略の一つとして考慮すべきである。

審査にあたっては、副査上出利光教授から (1) HLA-B27 関連ぶどう膜炎が眼のみの炎症で血漿中 OPN が上昇している理由について質問があり、症状が眼だけのことが多いが、乾癬や強直性脊椎炎などを合併することもあり、全身の免疫と関わっており、CRP などの炎症マーカーも上昇すると回答した。(2) EAU で使うマウスの系統は決まっているのか、については、EAU を誘導する際に hIRBP 1-20 ペプチドを使う場合は C57BL/6 マウス、K2 ペプチドを使う場合は B10. BR マウスといったようにペプチドとマウスの系統を対応させる必要があると回答した。(3) OPN ノックアウトにおける T 細胞増殖の低下は T 細胞のアポトーシスと関連しているのか、については EAE では OPN がいないことで T 細胞のアポトーシスが誘導されるという報告があり、EAU でもその可能性があるかと回答した。

一方、副査小野江和則教授からは、(1) 全身病であるベーチェット病患者で血漿中 OPN が上昇していない理由について質問があり、全長型の OPN は上昇していなかったが、開裂型の OPN も含めて測定すると、ベーチェット病や原田病でも血漿中 OPN の上昇が見られたと回答した。(2) Con A 誘導肝炎では NKT 細胞が OPN を産生していると報告されているが EAU ではどうか、については CD1d ノックアウトマウスでは EAU が増悪するという未発表データがあり、EAU では NKT 細胞は疾患を改善する方向に働くと考えられ、EAU において NKT 細胞と OPN の直接の関連を示すことは難しいと回答した。(3) HLA と OPN が関連しているという報告はないか、については未だそのような報告はないと回答した。

また、主査大野重昭教授から (1) ノックアウトマウスでは発症の遅延が見られているが、抗体治療では発症遅延が見られない理由について質問があり、EAU は各実験でスコアなどばらつくので、抗体治療では発症遅延が見られないとは断定できないと回答した。(2) 眼と OPN の関連についての報告は他にどのようなものがあるか、については EAU と OPN に関する報告が我々の報告の他に 1 報あり、またアレルギー性結膜炎や春季カタル患者で血漿中 OPN が上昇する、糖尿病網膜症患者の硝子体中の OPN が上昇するという報告があると回答した。(3) 今後の内眼炎の新しい治療法に関してどのように考えるか、については抗 TNF- α 抗体などの新しい治療が行われているが、抗 OPN 抗体も内眼炎の治療に応用されることが期待されると回答した。

この論文は、EAU における OPN の役割を解明し、OPN 中和抗体により EAU の病態を抑制できることを初めて報告した点で高く評価され、今後 OPN に対する抗体による治療も、早期に臨床応用されることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。