

## 学位論文題名

気管支喘息における osteopontin (OPN) と  
好酸球性気道炎症の関連

## 学位論文内容の要旨

【背景】osteopontin(OPN, early T lymphocyte activation-1 (Eta-1)としても知られている)は骨蛋白基質として同定されたリン酸化糖蛋白である。その後、骨、免疫、炎症、癌など様々な場面で機能する活性化物質であることが示されてきた。インテグリン結合部位である RGD 領域、SVVYGLR 領域など複数の機能領域を含み、多彩な機能を持つと考えられている。マクロファージ、単球、リンパ球、好中球といった炎症細胞の接着や遊走に関連することも報告されている。OPN(-/-)マウスや OPN 抗体を用いた研究で OPN の炎症性疾患、特に Th-1 関連疾患における重要性が示され、ヒト検体を用いた研究でサルコイドーシス、多発性硬化症、肺結核といった Th1 関連疾患で高発現しているという報告が多くみられている。一方で、OPN とアレルギー性疾患の関連を示す報告は少ない。気管支喘息における、OPN と好酸球性気道炎症との関連についてはこれまでに十分に明らかにされていない。

【目的】気管支喘息における OPN と好酸球性気道炎症との関連を明らかにする。

【方法】ヒト検体、Ovalbumin(OVA)感作曝露によるマウス喘息モデルの検体を用いて検討を行った。

## (1)ヒト検体を用いた検討

- ・ 研究は北海道大学倫理委員会の許可を得て行われ、検体を供与いただいたすべての患者、健常者より文書にて同意を得た。
- ・ 当科通院中喘息患者 25 名、喘息の既往がなく、呼吸器症状や鼻症状のない健常者 19 名より誘発喀痰を得て、OPN 濃度を測定し比較した。また、喘息患者において OPN 濃度と好酸球比率との相関を検討した。
- ・ 肺癌にて手術を施行された喘息患者、非喘息患者より肺組織を得て、腫瘍のない部分に OPN 免疫染色を行い、OPN 発現細胞の検討を行った。
- ・ ヒト健常者 3 名、喘息患者 3 名の血液より好酸球を分離し、in vitro で Millicell Culture Plate Insert (5µm 孔, Millipore, Billerica, MA, USA)を用いて OPN の好酸球に対する遊走能を検討した。また、健常者検体において、OPN のインテグリン結合部位を認識する 2K1 抗体、抗 $\alpha$ -4 インテグリン抗体(P1H4)の効果も検討した。
- ・ 好酸球遊走を強力に誘導する Eotaxin と OPN の好酸球遊走能を比較するため、健常者 2 名、喘息患者 1 名の血液より好酸球を分離し、in vitro において、Boyden chamber (NeuroProbe Inc, Gaithersburg, MD)、5 µm 孔の polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate 膜 (Nucleopore)を用いて、比較検討した。

## (2)マウス検体を用いた検討

- ・ 研究は北海道大学の動物実験に関する指針に基づき、北海道大学倫理委員会の許可を得て行われた。
- ・ 6 週齢、メスの Balb/c マウス day0,7 に OVA 腹腔内注射、day21~23 に OVA 経鼻曝露することによりマウス喘息モデルを作成した。コントロールとして PBS を投与した。最終曝露の 24 時間後(day24)に気管支肺胞洗浄(BAL)及び肺組織の採取を行った。

- ・ BAL 液中 OPN 濃度を ELISA にて測定し、コントロール群と比較検討を行った。また、肺組織より RNA を単離し、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を施行、OPN mRNA レベルの比較検討を行った。
- ・ 肺組織に OPN 免疫染色を行い、OPN 発現細胞を検討した。
- ・ OPN のインテグリン結合部位を認識する M5 抗体もしくはコントロール抗体を OVA 曝露 1 時間前に腹腔内投与し、BAL 液中の好酸球数やサイトカイン(インターロイキン(IL)-4、IL-5、IL-13、インターフェロン(IFN)- $\gamma$ )濃度を測定し比較、及ぼす影響を検討した。

【結果】

(1)ヒト検体を用いた検討

- ・ 誘発喀痰中 OPN 濃度は喘息患者群で有意に高値であり( $p < 0.005$ )、喘息患者で好酸球割合と有意な正の相関が認められた( $r=0.530, p < 0.01$ )。
- ・ 喘息患者肺組織で、気道周囲炎症細胞において OPN の発現が認められた。
- ・ OPN に対する好酸球遊走は有意に亢進しており( $p < 0.01$ )、2K1 及び P1H4 によりその効果は抑制された( $p < 0.01$ )。
- ・ OPN に対する好酸球遊走は Eotaxin と比較すると弱いものであった( $p < 0.05$ )。

(2)マウス検体を用いた検討

- ・ OVA 感作曝露群で BAL 液中 OPN 濃度は高値であり( $p < 0.05$ )、肺組織 OPN mRNA は高発現していた( $p < 0.05$ )。
- ・ OVA 感作曝露群で気道周囲炎症細胞において OPN の発現がみとめられた。
- ・ M5 抗体投与群で BAL 液中好酸球数の有意な低下が認められた( $p < 0.05$ )が、BAL 液中 IL-4、IL-5、IL-13、IFN- $\gamma$ 濃度は差を認めなかった。

【考案】ヒト喘息患者検体、マウス喘息モデル検体で OPN が高発現しており、OPN は気管支喘息と関連していると考えられた。ヒト喀痰中 OPN 濃度と好酸球比率に正の相関が認められ、*in vitro* における検討で OPN に対して好酸球の遊走が亢進していたことから、好酸球遊走に関連している可能性が考えられた。さらに、2K1 抗体にて好酸球遊走が抑制され、マウスモデルにおいて M5 抗体を投与にて BAL 中好酸球数が減少したことから OPN のインテグリン結合部位が関与している可能性が考えられた。*in vitro* において P1H4 抗体によっても好酸球遊走が抑制されたことから、OPN はインテグリン結合部位と好酸球表面に発現している $\alpha 4$  インテグリンとの間の作用を介して好酸球遊走に関連していると考えられた。マウスモデルで M5 抗体が BAL 液中 IL-4、IL-5、IL-13、IFN- $\gamma$ 濃度に影響を与えなかったことから、Th1/Th2 バランスとは独立した機序である可能性が考えられた。

【結論】気管支喘息において、OPN は好酸球遊走に関連し、病態に関与している可能性が考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 正 治  
副 査 教 授 上 出 利 光  
副 査 教 授 有 賀 正  
副 査 教 授 西 村 孝 司

学 位 論 文 題 名

## 気管支喘息における osteopontin (OPN) と 好酸球性気道炎症の関連

OPN は様々な機能をもつ細胞外基質蛋白である。複数の機能領域を含み、多彩な機能を持つと考えられている。免疫においては Th-1 関連疾患との関連の報告が多く、様々な炎症細胞の遊走に参与していることも報告されている。しかし、Th-2 関連疾患についての報告は少なく、好酸球遊走との関連についてはこれまで報告されていない。気管支喘息における好酸球性気道炎症と OPN の関連を明らかにすることを目的に研究を行った。

喘息における OPN の発現をヒト誘発喀痰、肺組織、マウス喘息モデルの気管支肺胞洗浄液 (BALF)、肺組織において検討した。誘発喀痰中の OPN 濃度は喘息患者で高値であり、好酸球割合と正の相関がみとめられた。マウス喘息モデルの BALF 中の OPN 濃度は Ovalbumin (OVA) 腹注・経鼻曝露群 (喘息群) で高値であり、肺組織 OPN mRNA レベルの亢進もみとめられた。ヒト、マウスの喘息群の肺組織免疫染色にて気道周囲炎症細胞において OPN の発現亢進がみとめられた。さらに、マウス喘息モデルにインテグリン結合部位を認識する抗 OPN 抗体 (M5) を投与し、喘息における OPN の役割を検討した。M5 投与群で BALF 中総細胞数、好酸球の低下がみとめられ、OPN はインテグリン結合部位を介して関与していることが示唆された。また、BALF 中の IL-4、IL-5、IL-13、IFN- $\gamma$  濃度に差を認めなかったことから Th1/Th2 反応とは異なった機序で関与している可能性も考えられた。さらにヒト好酸球を用いて *in vitro* にて OPN と好酸球遊走に関する検討を行った。OPN に対し好酸球遊走は亢進しており、マウスの M5 抗体と同じくインテグリン結合部位を認識する抗体 (2K1) にて抑制された。また、好酸球表面に発現している  $\alpha 4$  インテグリン抗体である P1H4 にても抑制された。以上より、OPN はインテグリン結合部位と好酸球表面に発現している  $\alpha 4$  インテグリンの間の作用を介して好酸球遊走に関連し、喘息の病態に関与していることが示唆された。

最後に 2007 年に発表された OPN と気管支喘息の関連についての論文 (Xanthou G, et al. Nat Med 2007;13:570-8) と本研究の結果の不一致に関する考察を行った。同論文において主にマウス喘息モデルを用いた検討が行われていた。喘息で OPN が高発現していたという点は本研究と同じ結果であったが、OPN 抗体 (AF-808) 投与により BALF 好酸球の増加、気道過敏性の亢進がみとめられていた点は逆の結果であった。OPN は複数の機能領域をもち、機能が異なることも報告されている。AF-808 抗体の認識部位は明らかにされていないが、認識部位の機能が M5 抗体と異なっていることが、不一致の要因ではないかと推測された。

審査にあたり、副査上出教授から 1)喘息患者の気道上皮細胞における OPN の発現の有無およびその意義、2)好酸球遊走における eotaxin と OPN の関連、3)OPN へ遊走する好酸球の特徴についての質問があった。次いで副査有賀教授から 1)マウス喘息モデルと実際のヒトの喘息との整合性、2)喘息における OPN の主な産生細胞、3)喘息に関連している OPN の遺伝子多型の有無についての質問があった。さらに主査西村正治教授より 1)OPN 発現に及ぼす喘息治療の影響、2)喘息のコントロール状態による OPN 発現の差異、3)OPN(-/-)マウスにおける検討の有無についての質問があった。

申請者はこれらの質問について、自験データと文献を引用して概ね適切な回答を行った。

公開発表とは別に平成 21 年 5 月 1 日 16 時 00 分より先端科学研究所遺伝子制御研究所免疫制御学分野研究室にて副査西村孝司教授による個別審査が行われた。申請者はスライドを用いながら約 20 分にわたって学位論文内容の発表を行い、発表後、西村孝司教授より 1)作用部位毎の OPN の機能の多様性の意義、2)健常肺における OPN 発現細胞、3)喘息気道粘膜下における OPN 高発現の意義についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は概ね適切に回答した。質疑応答の時間は約 10 分であった。出席者は西村孝司教授、同教室大学院生 2 名の計 3 名であった。

本研究は OPN のインテグリン結合部位を介した好酸球性気道炎症、喘息との関連を明らかにし、気管支喘息における OPN の多彩な機能を示した点が高く評価される。今後、OPN の喘息に対する役割、2K1 の喘息における効果について更に解明されると期待される。

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。