

学位論文題名

オステオポンチンの構造解析と機能に関する研究

学位論文内容の要旨

オステオポンチン(OPN)は分子量約 41kDa の分泌型酸性リン酸化糖タンパク質である。乳汁、尿、腎尿細管、破骨細胞、骨芽細胞、マクロファージ、活性化 T 細胞、ある種の腫瘍細胞など広く発現が認められる。OPN 分子中央部には、細胞接着に重要とされる Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) 配列を有する。GRGDS 配列の直後にはトロンピン切断部位が存在する。OPN がトロンピン切断されると隠れていた細胞接着部位が現れ、新たな受容体と結合するようになる。OPN は細胞接着、細胞遊走、一酸化窒素(NO)産生の制御、腫瘍、免疫系への関与など多彩な機能が報告されてきている。これらの機能は受容体選択によって行われており、OPN の受容体選択手段としては、トロンピン切断などによる OPN 形態によって調節されていると考えられている。

OPN は炎症部位で発現が増強し、さらに同部位ではトロンピンやコラゲナーゼが活性化し、これら酵素による特異的分解を受ける事が考えられる。すなわち生体内においては、全長型 OPN、トロンピン切断型 OPN が混在していることが予想される。しかも、トロンピン切断型 OPN は、全長型 OPN より細胞接着能、細胞遊走能が上昇するという報告がある。

本研究では、トロンピン切断型 OPN、全長型 OPN を検出、定量できるような系を確立することと、OPN 分子内の機能部位を解析することを研究目的とした。

トロンピン切断型 OPN、全長型 OPN を検出、定量できる系を確立するために、ヒト OPN 内の異なったペプチドに対する 4 種のポリクローナル抗体と 1 種のモノクローナル抗体を作製した。これらの抗体は全て、大腸菌で作製した glutathion S-transferase (GST) 融合 OPN タンパク質、OPN 遺伝子導入 CHO-K1 細胞由来の OPN タンパク質を検出することができた。全ての抗体はトロンピン切断型 OPN を検出することができた。また、腫瘍細胞培養上清由来 OPN、尿中 OPN も検出でき、生体内に存在する OPN も検出可能であった。4 種のポリクローナル抗体と 1 種のモノクローナル抗体を組み合わせることにより、6 種のサンドイッチ ELISA 系を構築することができた。これらの ELISA を用いて、全長 OPN、トロンピン切断型アミノ基 (N) 末端フラグメント、カルボキシル基 (C) 末端フラグメントを定量できる系を確立した。

我々が作製した 5 種のモノクローナル抗体と、既に報告されている mAb53 とを用いて OPN 内機能部位を解析した。ヒト線維芽細胞株である TIG-7 細胞を用いた RGD 依存性の細胞接着において、モノクローナル抗体の細胞接着阻害能を検討した結果、VDTYDGRGDSVVYGLRS を抗原ペプチドとした 2K1 が阻害活性を有していることが判明し、mAb53 と同等の阻害活性を有していることが判明した。合成ペプチドを用いて 2K1 と mAb53 の詳細なエピトープ解析を行った結果、2K1 は SVVYGLR の N 末端近傍を認

識していることが示唆された。一方、mAb53は、SVVYGLRのC末端近傍を認識していることが示唆された。そこで、さらにSVVYGLRよりC末側にさらに3アミノ酸を付加したペプチドSVVYGLRSKSを作製し、検討した結果、非常に強い結合活性を示した。すなわちmAb53はRSというトロンビン切断部位をまたいで認識していることが明らかとなった。SVVYGLR配列は $\alpha 9\beta 1$ インテグリンとの結合配列なので、 $\alpha 9\beta 1$ インテグリンとの接着に対する2K1の阻害能を調べるため、 $\alpha 9$ 遺伝子導入SW480細胞を用いた細胞接着試験を行った。2K1はこの接着に対して細胞接着阻害能を示し、OPNと $\alpha 9\beta 1$ インテグリンとの接着も阻害できることが判明した。2K1とmAb53との細胞遊走阻害能を調べるために、U937細胞を用いて全長型OPN、トロンビン切断型OPN、N末端フラグメントOPNに対する細胞遊走試験を行った。その結果、2K1は全ての細胞遊走に対して阻害活性を有していたが、mAb53は全長型OPNに対してのみ遊走阻害活性を有していた。5A1と10A16は細胞接着、遊走阻害能を有さないことから、2K1とmAb53のエピトープとする配列、すなわち、細胞接着領域であるSVVYGLR、トロンビン切断部位を含むGLRSKS配列がOPNの細胞接着、細胞遊走能における機能部位であることが明らかとなった。

本研究で確立したOPNの多様な検出系、測定系を用いることによりOPNの形態を含めた機能をさらに解明することができると期待され、疾患の診断に応用できる可能性がある。また、OPNの発現抑制により、腫瘍、骨粗鬆症など疾患治療につながる報告があることから、機能阻害抗体2K1がこれらの疾患に対する抗体医薬となりうる可能性がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 三 浪 明 男

学位論文題名

オステオポンチンの構造解析と機能に関する研究

この学位論文では、トロンピン切断型オステオポンチン (OPN)、全長型 OPN を検出、定量できる系を確立するために、ヒト OPN 内アミノ酸配列を基に、複数の異なったペプチドに対する 4 種のポリクローナル抗体と 1 種のモノクローナル抗体を作製した。4 種のポリクローナル抗体と 1 種のモノクローナル抗体を組み合わせることにより、6 種のサンドイッチ ELISA 系を構築することができた。これらの ELISA を用いて、全長 OPN、トロンピン切断型アミノ基 (N) 末端フラグメント、カルボキシル基 (C) 末端フラグメントを定量できる系を確立した。腫瘍細胞培養上清由来 OPN、尿中 OPN も検出でき、生体内に存在する OPN も検出可能であった。次に、今回申請者が新規に作製した 5 種のモノクローナル抗体と、既に報告されている mAb53 とを用いて OPN 内機能部位を解析した。VDTYDGRGDSVVYGLRS を抗原ペプチドとした 2K1 は、RGD 依存性、 α V インテグリン依存性細胞接着において、接着阻害能を有していた。すでに接着阻害効果を有する事が、報告されているモノクローナル抗体 mAb53 と同等の阻害活性を有していることが判明した。更に、2K1 の認識部位は SVVYGLR の N 末端近傍であり、mAb53 は SVVYGLRS の R と S をまたいだ部位、つまりトロンピン切断部位を認識している事を見出した。SVVYGLR 配列は α 9 β 1 インテグリンとの結合配列でもある。そこで α 9 β 1 インテグリンとの接着に対する 2K1 の阻害能を調べるため、 α 9 遺伝子導入 SW480 細胞を用いた細胞接着試験を行った。2K1 はこの接着に対して細胞接着阻害能を示し、OPN と α 9 β 1 インテグリンとの接着も阻害できることを明らかにした。

この学位論文の公開発表に対して、まず副査の三浪教授から、骨芽細胞、破骨細胞の両方が OPN を産生するが、機能の差があるのか、単クローン抗体 2K1 はどのような病態に治療効果を示すのか、メカニカルストレスと OPN の関係について、副査の小林教授より、トロンピンで切断されるとウエスタンブロットで、完全長オステオポンチンで見られ

るブロードなバンドがシャープになるのは、どうしてか、CD44とOPNの結合に関する最近の考え方、母乳中のOPNの機能に関して、最後に主査の上出教授より、OPN分子内にこれまで同定された細胞接着ドメインおよびOPN受容体の種類に関して質問がなされた。これらの質問に対し、申請者は、自らの実験データや文献を引用しつつ、概ね妥当な答弁をなし得た。

この論文では、生体内で多様な存在形態をしめすOPNの測定系の作成を報告し、さらにはオステオポンチン分子内の配列に対する特異的単クローン抗体を作成し、オステオポンチンの機能部位の検討を行った。分子内の複数のインテグリン受容体を介する細胞接着に関わる機能ドメインに対する単クローン抗体2K1が癌細胞の遊走や接着を抑制する事を示した。すなわち、RGD依存性、 αV インテグリン依存性細胞接着のみならず、 $\alpha 9\beta 1$ インテグリン依存性細胞接着を阻害する。また全長型のみならず、トロンピン切断型OPNの機能を阻害することを報告した。この2K1抗体は、今後オステオポンチンが関与する種々の病態、すなわち、癌転移、骨粗鬆症や関節リウマチ等の治療薬としての可能性も期待される。

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。