

学位論文題名

Osteopontin affects the persistence of
 β -glucan-induced hepatic granuloma formation and
tissue injury through two distinct mechanisms

(オステオポンチンは二つの異なる機序により β -glucan 誘発性の
肝肉芽腫形成遷延化および肝障害増悪に関与する)

学位論文内容の要旨

肉芽腫形成は慢性炎症反応であり、貪食細胞などにより容易に異物が排除されない場合におこる生体防御反応である。その原因は自己免疫疾患や細菌, 寄生虫, ウイルス感染など非常に様々である。肉芽腫形成は生体にとって防御反応である一方、正常組織の破壊を引き起こしてしまう。近年の研究により肉芽腫を構成する細胞はマクロファージや CD4 T 細胞のみならず、抗原提示能を有する樹状細胞 (DC) もその構成細胞であることが報告されている。つまりこのことは肉芽腫形成が免疫反応の最終段階ではなく現在進行形の免疫反応であることを示唆するものである。

Osteopontin (OPN) は fibronectin や vitronectin と同様に、その分子の中央に Arg-Gly-Asp (RGD) 配列を有する細胞外マトリックス蛋白である。OPN は RGD 配列依存的に α V β 3, α V β 5, α V β 1 インテグリンとまた RGD 配列非依存的に CD44 と結合することにより T 細胞, マクロファージ, 線維芽細胞, 平滑筋細胞など様々な細胞の接着および遊走に関与している。さらに OPN は T 細胞活性化の初期に産生されるサイトカインでもあることから early T lymphocyte activation gene-1 (eta-1) とも呼ばれている。また近年 OPN は Th1 type の免疫反応における key molecule であることも報告されている。重要なことは結核やサルコイドーシスといった肉芽腫性疾患において OPN の発現増加が認められることである。しかしながら肉芽腫形成における OPN の役割についての詳細な研究はなされていない。そこで β -glucan 誘発性の肝肉芽腫形成モデルを用いて肉芽腫形成における OPN の役割について検討した。

β -glucan は酵母菌体成分であり、静脈内投与により肝臓内に肉芽腫を形成することが知られている。 β -glucan 誘発性の肝臓内肉芽腫形成の機序は、まずクッパー細胞上の Toll-like receptor 2 が活性化されることで、CCL2/MCP-1 などのケモカインを産生し、産生されたこれらケモカインが肝臓内への炎症性細胞の動員を促し、その結果肝臓内に肉芽腫が形成される。肉芽腫形成においてケモカインは重要な役割を果たしていることが知られている。事実、CCL2 ノックアウトマウスでは *Shistosoma mansoni* 虫卵誘発性の肺肉芽腫形成が低下することが報告されている。また CCL2 のレセプターである CCR2 のノックアウトマウスでは、 β -glucan 投与により形成される肝肉芽腫の数が減少することも報告されている。

本研究では、 β -glucan 誘発性の肝肉芽腫形成において OPN が肉芽腫形成の遷延化およ

び肝障害の増悪に関与していることを明らかにした。 β -glucan 投与に伴い、肝臓内において著しい OPN mRNA および OPN 蛋白の発現誘導が認められた。また OPN は肉芽腫内に強く発現していることが明らかとなった。続いて OPN ノックアウト(OPN^{-/-})マウスに β -glucan を投与したところ、投与後 7 日目では Wild type (WT)マウスおよび OPN^{-/-}マウスにおいて、同様に肝臓内に肉芽腫が形成された。しかしながら β -glucan 投与後 14 日目になると OPN^{-/-}マウスで WT マウスと比べると有意に肉芽腫数および肉芽腫の大きさが減少しているのが認められた。これらの結果より OPN は肉芽腫形成自体に関与するのではなく、肉芽腫形成遷延化に関与することが示唆された。次に肉芽腫形成において重要な役割を担っているケモカイン(CCL4,CCL2,CCL5,CXCL9,CCL3)の発現について mRNA レベルで検討したところ、 β -glucan 投与に伴って WT マウス,OPN^{-/-}マウス両者において著しい発現誘導が認められた。しかしながら WT マウスおよび OPN^{-/-}マウス間で差は認められなかった。この結果より OPN^{-/-}マウスにおける肉芽腫形成遷延化の低下はケモカイン発現能の低下に起因するものではないことが示唆された。また局所リンパ節である肝リンパ節細胞を用いて IL-2 および IFN- γ の産生を検討したところ、両者に差は認められなかった。しかしながら β -glucan 投与後 7 日目ですでに肝臓内の IL-12 および IFN- γ の産生量が OPN^{-/-}マウスで有意に低下していた。さらに OPN^{-/-}マウスにおける肝臓内の炎症性細胞浸潤について検討してみたところ、 β -glucan 投与後 14 日目においてマクロファージ,CD4 T 細胞, DC の肝臓内浸潤が WT マウスと比べると有意に低下していることが認められた。また肝臓内の TNF- α の産生量が有意に低下し、この低下は血中 ALT および AST 値の低下を伴っていた。

以上の結果より OPN は肉芽腫形成初期段階においては肉芽腫内におけるサイトカイン産生を制御することにより、また肉芽腫形成後期段階においては炎症性細胞の肝臓内動員および TNF- α の産生を制御することで、肉芽腫形成の遷延化および肝障害の増悪に関与していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則
副 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 小 林 邦 彦

学 位 論 文 題 名

Osteopontin affects the persistence of β -glucan-induced hepatic granuloma formation and tissue injury through two distinct mechanisms

(オステオポンチンは二つの異なる機序により β -glucan誘発性の
肝肉芽腫形成遷延化および肝障害増悪に関与する)

肉芽腫形成は慢性炎症反応であり、貪食細胞などにより容易に異物が排除されない場合におこる生体防御反応である。その原因は自己免疫疾患や細菌、寄生虫、ウイルス感染など多様である。肉芽腫形成は生体にとって防御反応である一方、正常組織の破壊を引き起こす。osteopontin はその分子の中央にアルギニン・グリシン・アスパラギン酸 (RGD) 配列を有する細胞外マトリックス蛋白である。また結核やサルコイドーシスといった肉芽腫性疾患において病巣局所で osteopontin の発現増加が認められており、肉芽腫形成において osteopontin が重要な役割を担っていることが示唆されている。申請者は今回酵母菌体成分である β -glucan 誘発性の肝肉芽腫形成モデルを用いて肉芽腫形成における osteopontin の役割について検討した。 β -glucan 投与後、肝臓内特に肉芽腫内において著しい osteopontin 蛋白の発現上昇を認めた。さらに osteopontin ノックアウトマウスではコントロールマウスと比べると、 β -glucan 投与後7日目では肉芽腫数に差は認められないが、投与後14日目になると肉芽腫数および肉芽腫の大きさが著しく減少することを見出した。さらに過去の報告で肉芽腫形成に重要であるとされている種々のケモカイン(CCL4,CCL2,CCL5,CXCL9,CCL3)の肝臓内発現は、 β -glucan 投与後著しい増加を認めたが、osteopontin ノックアウトマウスとコントロールマウス間で差は認められなかった。しかしながら免疫染色の結果より、 β -glucan 投与後14日目の肝臓内に浸潤するマクロファージ、CD4 T細胞、樹状細胞の数は osteopontin ノックアウトマウスで有意に減少していることを見出した。続いて肝臓内におけるサイトカインの発現動態について検討したところ、 β -glucan 投与後7日目ですでに osteopontin ノックアウトマウスでは IFN- γ および IL-12 の産生量の低下を認め、投与後14日目では TNF- α の低下および肝細胞の破壊を示す ALT, AST 値の低下を認めた。また osteopontin がリンパ球細胞で過剰発現する osteopontin トランスジェニックマウスを用いて同様の実験を行ったところ、 β -glucan 投与後7日目では肉芽腫数はコントロールマウスと比べ差は認められなかったが、投与後14, 21日目では osteopontin トランスジェニックマウスでその数は有意に増加し、ALT, AST 値はコントロールマウスと比べ高値を示していた。

これらの結果より、申請者は酵母菌体成分である β -glucan 誘発性の肝肉芽腫形成モデルを用いて、osteopontin が肉芽腫形成初期段階においては肉芽腫内における IL-12, IFN- γ 産生を制御することにより、また肉芽腫形成後期段階においては炎症性細胞の肝臓内動員および TNF- α の産生を制御することで、肉芽腫形成の遷延化および肝障害の増悪に関与していることを明らかにした。公開発表に際し、副査の小林, 上出両教授および主査の小野江教授より 1)肉芽腫消失の機序 2)肉芽腫内における osteopontin と炎症性細胞の接着について 3)IFN- γ および TNF- α 産生減少の機序について 4)TNF- α の作用時期について 5)Fgr および Hck 活性化の検討について 6)マクロファージとクッパー細胞の区別について 7)肝リンパ節の役割について 8)炎症性細胞の局所への動員における osteopontin の役割についてなどの質問があった。これらの質問に対して申請者は、今回の論文のデータおよび過去に報告された論文を引用し、的確に解答した。

この論文は、肉芽腫形成における osteopontin 作用機序の分子メカニズムについて明らかにした点で高く評価され、今後の肉芽腫性疾患治療への応用が期待される。

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。