

学 位 論 文 要 旨

氏 名 加藤 亜希

論 文 名 細胞ストレスは ERK の活性化を介して II 型肺胞上皮細胞に
オステオポンチンの発現を誘導する

学位論文要旨

[背景]

特発性肺線維症 (IPF) は原因不明の予後不良疾患で、近年、繰り返す肺胞上皮障害に対する異常修復が線維化の原因であると提唱されている。

オステオポンチン (OPN) は組織障害における修復と線維化に関わるサイトカインの一種である。OPN は IPF 患者の肺組織やブレオマイシン (BLM) 肺障害マウスの肺組織に強発現しており、OPN ノックアウトマウスでは BLM による線維化が抑制されることが報告されている。そこで線維化の治療標的として OPN に注目し、その発現機構と線維化における役割を明らかにすることを目的として本研究を行った。

[方法]

II 型肺胞上皮細胞として A549、MLE12 を用いた。また肺線維芽細胞として NHLF を用いた。細胞障害物質として BLM、ツニカマイシンを使用した。OPN mRNA の発現は real time PCR 法で、OPN 分泌蛋白の発現は ELISA 法で定量した。

1. A549、MLE12 の培養液中に $1 \mu\text{g/mL}$ あるいは $10 \mu\text{g/mL}$ で BLM を添加し、OPN mRNA と OPN 分泌蛋白の発現を測定した。
2. これまでに OPN の発現と MAPK の関与が示されていたことから、A549、MLE12 の培養液中に $10 \mu\text{g/mL}$ の BLM を添加した際の MAPK 活性を、Western blotting 法で評価した。さらにこれらの細胞を終濃度 $50 \mu\text{M}$ の PD98059 あるいは U0126 で処理し、その培養液中に $1 \mu\text{g/mL}$ あるいは $10 \mu\text{g/mL}$ の BLM を添加した際の OPN mRNA と OPN 分泌蛋白の発現量の変化を測定した。
3. 小胞体ストレスが OPN の発現に与える影響を評価するため、A549、MLE12 の培養液中にそれぞれ $0.5 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.025 \mu\text{g/mL}$ のツニカマイシンを添加し OPN mRNA の発現を測定した。ま

氏名 加藤 亜希

た、それぞれの培養液中に同様の濃度でツニカマイシンを添加した際の ERK 活性を、Western blotting 法で評価した。さらにこれらの細胞を終濃度 50 μM の PD98059 あるいは U0126 で処理し、その培養液中に A549 は 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、MLE12 は 0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でツニカマイシンを添加した際の *OPN* mRNA の発現量の変化を測定した。

4. A549 を終濃度 20 nM の *OPN* siRNA またはコントロール siRNA で処理し、その培養液中に 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の BLM を添加してさらに 48 時間培養した。その後 A549 の増殖の変化を EdU を用いた細胞増殖実験で評価した。

5. A549 の培養液中に 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の BLM を添加し 48 時間培養した培養上清をコンディショニングメディアム (CM) として使用した。ELISA 法で CM の *OPN* 濃度を測定したところ約 1.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。CM あるいは 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のリコンビナント *OPN* を添加した培養液とこれらの培養液に 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗 *OPN* 中和抗体あるいはコントロール IgG を加えた場合に、NHLF の遊走に与えられる変化をリアルタイムモニタリングシステムで評価した。

[結果]

1. A549 の培養液中に 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の BLM を添加すると、48 時間後には約 5 倍の *OPN* mRNA の発現が誘導された。BLM は 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で添加するよりも 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で添加した方が、より *OPN* mRNA の発現を誘導した。A549 を 6 日間培養すると、培養液中の *OPN* 分泌蛋白は経時的に増加した。この培養液中に 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の BLM を添加すると培養液中の *OPN* 分泌蛋白はさらに増加した。また MLE12 も A549 と同様に、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の BLM の添加により 48 時間後には約 2 倍の *OPN* mRNA の発現が誘導され、さらに BLM を 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で添加した方が、より *OPN* mRNA の発現を誘導した。

2. A549、MLE12 の培養液中に BLM を添加すると、それぞれ 24 時間、36 時間後に ERK が活性化された。A549、MLE12 を PD98059、U0126 で処理し、その培養液中に BLM を添加すると、BLM の濃度に関わらず、BLM によって誘導された *OPN* mRNA や *OPN* 分泌蛋白の発現が抑制された。

3. A549、MLE12 の培養液中にツニカマイシンを添加すると、48 時間後にそれぞれ約 2 倍、約 2.5 倍の *OPN* mRNA の発現が誘導された。またそれぞれ 24 時間、36 時間後に ERK が活性化された。A549、MLE12 を PD98059、U0126 で処理し、その培養液中にツニカマイシンを添加すると、ツニカマイシンによって誘導された *OPN* mRNA の発現が抑制された。

4. *OPN* siRNA で処理し、その培養液中に BLM を添加した A549 は、コントロール siRNA で処理し、その培養液中に BLM を添加した A549 と比較して、EdU 取り込み細胞数が減少していた。また観察した 12 視野の全細胞数に対する EdU 取り込み細胞数の割合も低下していた。

5. *OPN* を含まない培養液と比較して、*OPN* の発現が誘導された CM やリコンビナント *OPN* を含む培養液は NHLF の遊走を促進した。これら *OPN* が含まれた培養液に抗 *OPN* 中和抗体を添加すると、*OPN* により促進された NHLF の遊走が抑制された。

[考察]

BLM、ツニカマイシンにより ERK の活性化を介して II 型肺胞上皮細胞に誘導された *OPN* は、自身の増殖と肺線維芽細胞の遊走を促進した。この結果は IPF の組織学的特徴である II 型肺胞上皮細胞の増生、肺胞腔内線維化と一致しており、*OPN* が肺線維症の進展に関与することを示唆している。これらの結果から *OPN* は IPF の治療標的になり得るのではないかと考えた。

キーワード (3~5)

オステオポンチン、特発性肺線維症、II 型肺胞上皮細胞
肺線維芽細胞、ERK