

## 学位論文審査結果の要旨

氏名	加藤 亜希
審査委員	主査 三木 哲郎 副査 佐山 浩二 副査 長谷川 均 副査 石野 智子 副査 加納 誠

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

### 審査結果の要旨

#### [背景]

特発性肺線維症（IPF）は難病であり、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であり、OPNはIPF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、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の発現はリアルタイムPCR法で、OPN(分泌)蛋白はELISA法で定量した。

1. A549、MLE12の培養液中に1  $\mu\text{g/mL}$ と10  $\mu\text{g/mL}$ のBLMを添加し、OPNとOPN蛋白の発現量を測定した。
2. A549、MLE12の培養液中にBLMを添加した際のMAPK活性を評価した。さらにこれらの細胞を終濃度50  $\mu\text{M}$ のPD98059、U0126で処理し、その培養液中に1  $\mu\text{g/mL}$ と10  $\mu\text{g/mL}$ のBLMを添加した際のOPNとOPN蛋白の発現量の変化を測定した。

3. 小胞体ストレスを評価するため、A549、MLE12 の培養液中にツニカマイシンを添加し、*OPN* 発現量を測定し ERK リン酸化を評価した。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、その培養液中にツニカマイシンを添加した際の *OPN* 遺伝子発現量の変化を測定した。

4. A549 を *OPN* siRNA またはコントロール siRNA で処理し、その培養液中に 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 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、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* 発現が誘導された。

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。PD98059、U0126 で処理し、その培養液中に BLM を添加すると BLM によって誘導された *OPN* や *OPN* 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* 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。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 *OPN* 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。リコンビナント *OPN* が含まれた培養液に抗 *OPN* 中和抗体を添加すると、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。

本論文の公開審査会は 2014 年 2 月 3 日に開催された。申請者は研究内容を明確に発表し、以下の内容を含む多くの質疑に対する的確に回答した。

1) BLM による ERK 活性化と *OPN* 発現誘導の時間的な経緯について、2) 添加した BLM 量は、薬理的な量なのか生理的な量なのか、3) *OPN* 中和抗体を用いた研究について、4) *OPN* のノックアウトマウスの表現型について、5) 将来の臨床研究に必要な要件についてなど。

本研究は難病である特発性肺線維症の治療法開発に繋がる基礎研究であるが、さらなる発展が期待された。審査会は全員一致して本論文が学位論文に値すると判定した。