

学位論文

炎症性疾患モデルにおける
細胞外マトリックスの機能に関する研究

2023年 3月

福山大学
薬学部 分子免疫学研究室

本田 真知子

目次

緒論.....	1
第1章 抗オステオポンチン中和抗体を用いた非アルコール性脂肪性肝疾患モデルに 及ぼすオステオポンチンの機能解析	
第1節 序論.....	5
第2節 実験方法.....	6
第3節 結果.....	10
第4節 考察.....	18
第5節 小括.....	20
第2章 抗ネフロネクチン中和抗体を用いた抗Ⅱ型コラーゲン抗体誘導関節炎に 及ぼすネフロネクチンの機能解析	
第1節 序論.....	21
第2節 実験方法.....	22
第3節 結果.....	27
第4節 考察.....	35
第5節 小括.....	37
第3章 ネフロネクチンによる実験的自己免疫性脳脊髄炎増悪化機構の解明	
第1節 序論.....	38
第2節 実験方法.....	39
第3節 結果.....	43
第4節 考察.....	58
第5節 小括.....	62
結語.....	63
今後の展望.....	64
参考文献.....	65
論文目録.....	74
謝辞.....	75

略語一覽

2-Me	2-Mercaptoethanol
ALT	Alanine aminotransferase
BSA	Bovine serum albumin
CAIA	Collagen antibody-induced arthritis
CDAHFD	0.1% methionine on a high fat diet background
cDNA	Complementary DNA
CFA	Complete Freund's adjuvant
CHO	Chinese Hamster Ovary
Col1a1	Collagen type I alpha 1 chain
Ct	Cycles to threshold
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
EAE	Experimental autoimmune encephalomyelitis
ECL	Electrochemiluminescence
ECM	Extracellular matrix
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	Fetal bovine serum
FN	Fibronectin
FoxP3	Forkhead box P3
GPx1	Glutathione peroxidase 1
GST	Glutathione S -Transferase
HE	Hematoxylin-eosin
HRP	Horseradish peroxidase
HSC	Hepatic stellate cells
IB	Immunoblot
IL	Interleukin
IP	Immunoprecipitation
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LFB	Luxol fast blue
LPS	Lipopolysaccharide
mAb	Monoclonal antibody
MAM	Meprin/A5-protein/PTPmu
MCD	Methionine-Choline Deficiency

MOG	Myelin oligodendrocyte glycoprotein
NAC	N-acetylcysteine
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis in mice
Npnt	Nephronectin
Npnt-FD	Nephronectin-functional domain
OD	Optical density
OPN	Osteopontin
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEI	Polyethylenimine
PLP	Proteolipid protein
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RA	Rheumatoid arthritis
RAR	Retinoic acid receptor
RGD	Arginine-glycine-aspartate
RNA	Ribonucleic acid
ROR γ T	RAR-related orphan receptor- γ T
ROS	Reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	Standard error of the mean
SeP	Selenoprotein P
SESIC	Selenocysteine insertion sequence
SUMO	Small ubiquitin-related modifier
TGF- β	Transforming growth factor- β
TMB	Tetramethylbenzidine
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl) aminomethane
α -SMA	α -Smooth muscle actin

諸 論

生体組織は、細胞と細胞外マトリックスから構成されている。細胞外マトリックスは、すべての組織に存在する非細胞性の構成成分で、細胞間隙に存在することから、細胞の隙間を埋める物質と考えられてきた。しかし、その後の研究で、細胞外マトリックスと細胞膜上に発現する細胞外マトリックス受容体であるインテグリン間の相互作用が、細胞分化、細胞増殖、生存、接着、遊走などの様々な細胞機能を調整していることが分かっている [1-5]。

インテグリンは、 α 鎖と β 鎖からなるヘテロダイマーで構成されている。現在までに18個の α 鎖と8個の β 鎖が発見され、これらの組み合わせにより24種のインテグリンを形成する [6]。インテグリン分子群はアミノ酸配列の相同性やリガンドの違いにより複数の分子群に分類される (Fig. A)。インテグリンは通常、細胞膜上で折れ曲がった不活性型構造を示すが、リガンドとの結合 (outside-in signal) や増殖因子などの細胞内からのシグナル (inside-out signal) により直立構造の活性型となり、活性型インテグリンは細胞外マトリックスと高い結合性を示す (Fig. B) [7]。インテグリンと細胞外マトリックスとの相互作用は非常に複雑であり (Fig. C に一例を挙げる)、これらの相互作用により多彩な生体機能を発揮するが、相互作用の複雑性のため個々のインテグリン機能は不明であった。

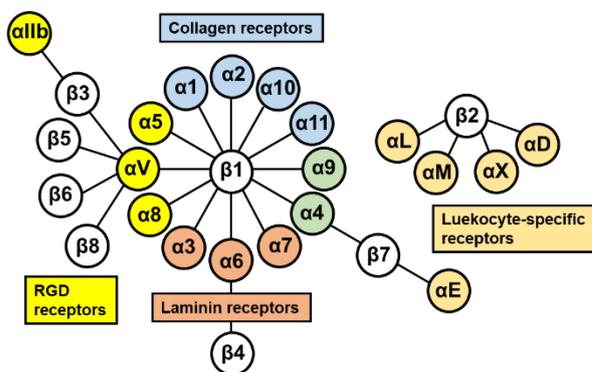


Fig. A Integrin family

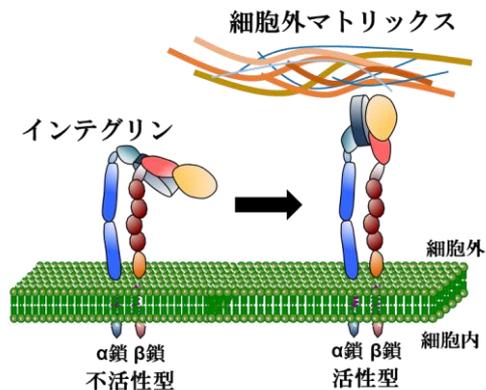


Fig. B Conformational shift of integrin from non-active form to active form

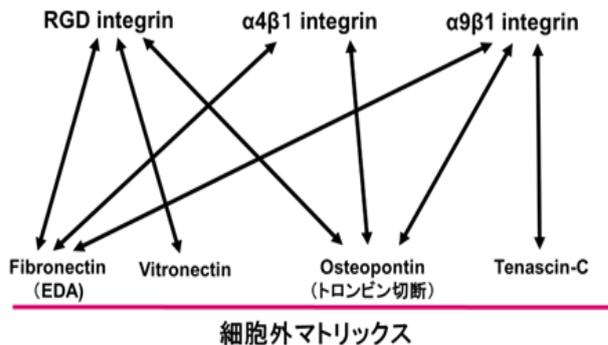


Fig. C The complexity of adhesion between extracellular matrices and integrin

Fibronectin EDA and Thrombin-cleaved OPN bind RGD integrin, $\alpha 4\beta 1$ integrin and $\alpha 9\beta 1$ integrin. Vitronectin and tenascin-C bind to RGD integrin and $\alpha 9\beta 1$, respectively.

そこで、それぞれのインテグリン機能の解明のために欠損マウスが作製された。しかし、多くの表現系は胎生致死や幼児期で死亡することが分かり [8] (Table A:文献 8 より一部改変)、それぞれのインテグリンは相補的な役割を持たず、多くのインテグリンが発生に必要不可欠な分子であることが見出された。そのような背景から現在、インテグリン機能はコンディショナル欠損マウスや中和抗体を用いた解析が主流となった。その結果、インテグリンと細胞外マトリックスとの相互作用は、がんや自己免疫疾患、線維化を始めとする様々な難治性疾患に関与することが明らかとなり、それらの相互作用は創薬標的として注目されている。一方で、インテグリンの多彩な機能を中和抗体により強力に抑制することは、生体にとって非常に強い副作用を示すことが危惧されている。実際に、 $\alpha 4$ インテグリンに対する抗体医薬品ナタリズマブは進行性多巣性白質脳症 (PML) の発症などを高め死亡例が続出するなど、重篤な副作用が報告されている [9, 10]。

Table A Integrin gene knockout phenotypes

$\alpha 1$	V, F	No immediately obvious developmental defects, reduced tumor vascularization
$\alpha 2$	V, F	Few immediately obvious developmental defects, delayed platelet aggregation and reduced
$\alpha 3$	P	Kidney tubule defects, reduced branching morphogenesis in lungs, mild skin blistering, lamination defects in neocortex
$\alpha 4$	E11/14	Defects in placenta (chorioallantoic fusion defect) and heart (epicardium, coronary vessels). Chimeras show defects in hematopoiesis.
$\alpha 5$	E10-11	Defects in mesoderm (posterior somites) and vascular development, neural crest apoptosis. Chimeras show muscular dystrophy
$\alpha 6^a$	P	Severe skin blistering, other epithelial tissues also defective. Lamination defects in cortex and retina.
$\alpha 7$	V, F	Muscular dystrophy, defective myotendinous junctions
$\alpha 8$	P	Small or absent kidneys, inner ear hair cell defects
$\alpha 9$	V	Die within 10 days of birth, chylothorax due to lymphatic duct defect
$\alpha 10$	V, F	Disturbed columnar arrangement of chondrocytes, abnormal chondrocyte shape and reduced chondrocyte proliferation.
$\alpha 11$	V, F	Greatly reduced cell adhesion and spreading on collagen I, reduced ability to retract collagen lattices, reduced cell proliferation.
αv	E10/P	Two classes: embryonic lethality due to placental defects, perinatal lethality with cerebral vascular defects probably due to neuroepithelial defects, cleft palate. Most blood vessels develop normally
$\alpha II b^b$	V, F	Hemorrhage, no platelet aggregation
αL	V, F	Impaired leukocyte recruitment
αM	V, F	Defective recruitment of neutrophils and mast cells to bacterial and fungal pathogens; a defect in neutrophil binding to fibrinogen and degranulation; impaired mast cell development and innate immunity; a defect in macrophage egression from the peritoneal cavity.
αX	V, F	Defect in intraperitoneal recruitment and adhesive functions of monocytes and macrophages and their ability to kill/phagocytose pathogens.
αD	V, F	Survival advantage in <i>P. berghei</i> infection over a 30-day observation period
αE	V, F	Greatly reduced numbers of intraepithelial lymphocytes.
$\beta 1$	E6.5	Peri-implantation lethality, ICM deteriorates, embryos fail to gastrulate. Extensive analyses of chimeras.
$\beta 2^c$	V, F	Leukocytosis, impaired inflammatory responses, skin infections, T cell proliferation defects
$\beta 3^d$	V, F	Hemorrhage, no platelet aggregation, osteosclerosis, hypervascularisation of tumors
$\beta 4^e$	P	Severe skin blistering, other epithelial tissues also defective
$\beta 5$	V, F	No immediately obvious developmental defects
$\beta 6$	V, F	Inflammation in skin and airways, impaired lung fibrosis—all probably due to failure to activate TGF
$\beta 7$	V	Deficits in gut-associated lymphocytes—no Peyer's patches, reduced intraepithelial lymphocytes (IEL).
$\beta 8$	E10/P	Two classes: embryonic lethality due to placental defects, perinatal lethality with cerebral vascular defects probably due to neuroepithelial defects. Most blood vessels develop normally.

Abbreviations: E, embryonic lethal (day of lethality); P, perinatal lethal; V, viable; F, fertile.

細胞外マトリックスの多くは、インテグリン結合配列として3つのアミノ酸から構成されるアルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) 配列を有している。RGD 配列を有する細胞外マトリックスは、 $\alpha v\beta 3$ などの RGD 認識インテグリンと相互作用することで、臓器の発生や、がん、線維化疾患などに関与する [11-13]。本学位論文で注目している細胞外マトリックスであるオステオポンチン (OPN) は RGD 配列を介して $\alpha v\beta 3$ インテグリンと結合することでがん進展に関与する (Fig. D) [14]。また、ネフロネクチン (Npnt) も RGD 配列を有しており、 $\alpha 8\beta 1$ インテグリンを生理的受容体として腎臓発生に関与する (Fig. E) [15]。

一方で、RGD 非依存性インテグリンである $\alpha 4$ や $\alpha 9$ インテグリンは白血球に発現し、免疫機能に関与する [16, 17]。OPN は翻訳後修飾を受けることで $\alpha 4$ や $\alpha 9$ インテグリンと相互作用する機能を獲得し (Fig. D) [18, 19]、それらの相互作用は関節リウマチや自己免疫性肝炎に関与することが報告されている [20, 21]。

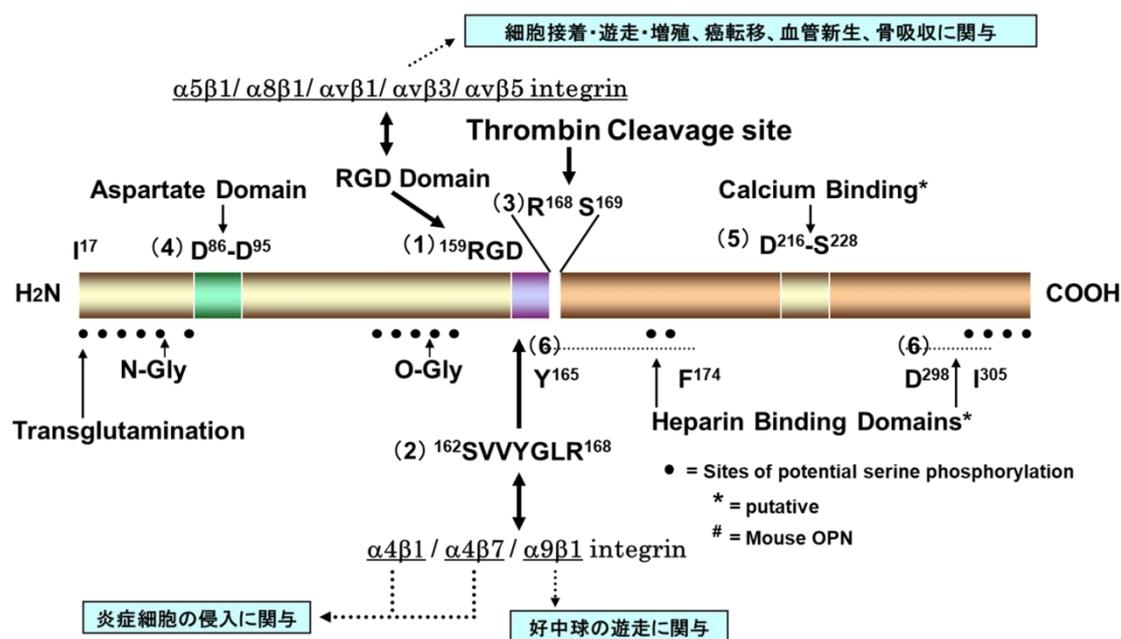


Fig. D Function of OPN and its receptor interactions

OPN is consists of (1): RGD sequence amino acid sequence Arg159-Asp161 binds RGD-recognizing integrins such as $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, (2): SVVYGLR sequence amino acid sequence Ser162-Arg168 binds $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$ and $\alpha 4\beta 7$, (3): Thrombin cleavage site-amino acid sequence Arg168-Ser169, (4): Aspartate domain-amino acid sequence Asp86-Asp95, (5): Calcium binding domain-amino acid sequence Asp216-Ser228-calcium binding, (6): Heparin-binding domain-amino acid sequence Tyr165-Phe174 and Asp298-Ile305.

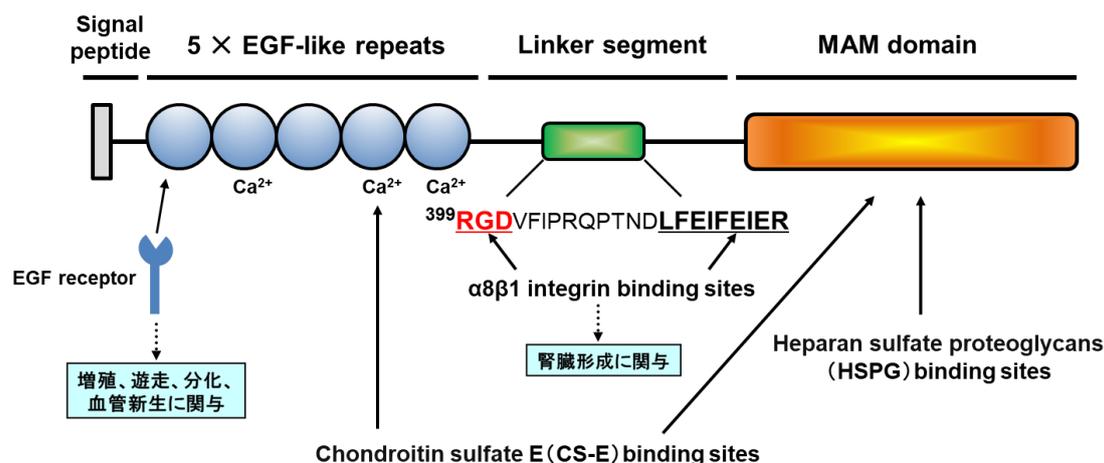


Fig. E Structure and function of Npnt

インテグリンと細胞外マトリックスの相互作用は創薬標的であるものの、前述のようにインテグリン機能阻害は強い副作用が危惧される。そこで、本研究では細胞外マトリックス機能阻害剤を開発し、疾患増悪化抑制効果を明らかにすることを目的として研究を進めた。本研究から、副反応の少ない治療薬への応用を目指している (Fig. F)。

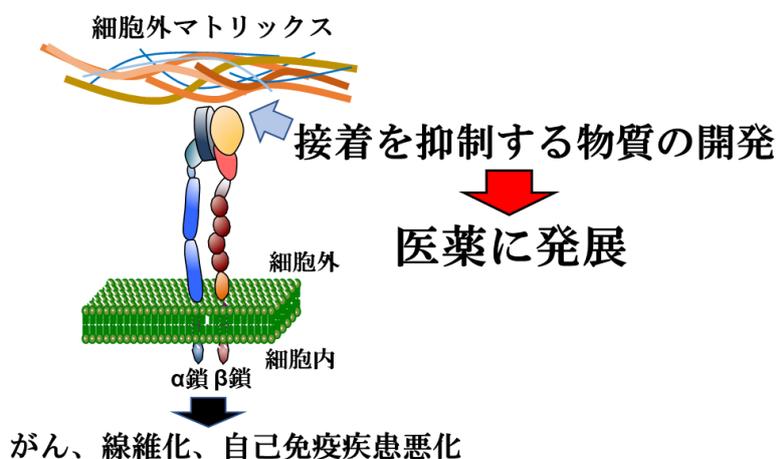


Fig. F Development of therapeutic drugs focused on cell adhesion

本学位論文は、これまで筆者が報告した以下の3つの論文を中心にまとめる。

1. Neutralizing antibody against osteopontin attenuates non-alcoholic steatohepatitis in mice. *J Cell Commun Signal.* 14: 223–232, 2020.
2. Antibodies against nephronectin ameliorate anti - type II collagen - induced arthritis in mice. *FEBS Open Bio.* 10: 107-117, 2020.
3. Nephronectin influences EAE development by regulating the Th17/Treg balance via reactive oxygen species. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 28: C699-C711, 2022.

第1章 抗オステオポンチン中和抗体を用いた非アルコール性脂肪性疾患モデルに及ぼすオステオポンチンの機能解析

第1節 序論

細胞外マトリックスの一つであるオステオポンチン (OPN) は、インテグリンとの結合を介して細胞内に様々なシグナルを導入する分泌型糖タンパク質である [18, 19, 22]。OPN の特徴の一つに、構造内にトロンビン切断部位を有することが挙げられる [22]。全長 OPN は、線維芽細胞、内皮細胞、平滑筋細胞および腫瘍細胞など様々な細胞に発現している $\alpha v\beta 3$ などの RGD 認識インテグリンと結合する [22-24]。一方、トロンビン切断型 OPN はトロンビン切断によりトロンビン切断部位末端に存在する潜在的エピトープである SVVYGLR 配列を露出させ、白血球に発現している RGD 非依存性の $\alpha 4\beta 1$ および $\alpha 9\beta 1$ インテグリンと結合する (Fig. D) [19, 25, 26]。OPN はこれら様々なインテグリンと結合することで、細胞接着、遊走、免疫調節、血管新生、生存および増殖など多彩な機能を誘導する [22, 27-30]。これまでの研究で、OPN が多発性硬化症モデル [31]やアレルギー性気道炎モデル [32]、自己免疫性肝炎 [21, 33]および関節リウマチモデル [20, 34]など、様々な自己免疫疾患に関与することが報告されている。

生体内での OPN の機能解析には、OPN 欠損マウス、組み換えタンパク質または中和抗体がこれまで使用されている。しかし、マウスの遺伝的背景や組み換えタンパク質のエンドトキシン汚染が OPN 機能に影響を及ぼすため [35, 36]、OPN 欠損マウスや組み換えタンパク質を用いた解析はミスリードを誘う。そのため、OPN に対する中和抗体は OPN 機能を正確に解析できる有効な手段となる。以前に関節リウマチモデルや自己免疫性肝炎モデル増悪化における OPN 機能解析に用いられたマウス OPN に対する中和抗体 (M5) は [20, 21]、ウサギで作製したポリクローナル抗体であった。そのため、M5 抗体投与により抗ウサギ IgG 抗体が体内で作られてしまい、慢性炎症などの検討に長期間を要する疾患モデルには適さないという欠点があった。そこで、本研究では M5 抗体作製に使用した抗原ペプチド VDVPNGRGDSLAYGLR をマウスに免疫することで抗マウス OPN マウスモノクローナル抗体 (クローン 35B6) を作製し実験に用いた。

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の進行形であり、有効な治療法がほとんど存在しないことからアンメット・メディカル・ニーズの代表的な疾患の一つである [37]。NASH の特徴には肝臓の過剰な脂肪蓄積、炎症および線維化などがあげられる [38]。OPN は NASH 患者および NASH モデルマウスの血液および肝臓で発現が亢進しており、NASH モデルにおける肝臓の炎症および線維化の増悪化に関与することが示唆されている [39-41]。そこで、作製した 35B6 抗体を用いて、NASH 進展に及ぼす OPN の機能解析を目的として研究を進めた。

第2節 実験方法

実験動物

本研究で使用した BALB/c および C57BL/6 マウスは、福山大学研究安全倫理委員会（動物実験安全倫理部会）によって承認され（H29-動-6号）、文部科学省による動物の管理と使用に関するガイドラインに準拠して実験を行った。

抗 OPN モノクローナル抗体の作製

マウス OPN に内在する配列の合成ペプチドである VDVPNGRGDSLAYGLR [20, 21]をマウスに免疫後、脾臓細胞を摘出しマウスミエローマ細胞である X63 と細胞融合を行い、HAT（Sigma-Aldrich）培地にて選択培養を行った。ハイブリドーマのコロニー形成が認められた後に、抗原ペプチドを固相した ELISA 法にてスクリーニングを行い、陽性コロニーは二回限界希釈法を繰り返すことによってシングルクローンを得た。シングルクローンの培養上清を精製し、抗マウス OPN マウスモノクローナル抗体（35B6: IgG1）を得た。

抗原固相 ELISA

50mM 炭酸バッファーに OPN タンパク質、合成ペプチド、フィブロネクチン（Sigma-Aldrich）、ビトロネクチン（Sigma-Aldrich）またはラミニン（Sigma-Aldrich）を 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で希釈し 96 ウェルプレートに添加後、4°Cで一晩放置し固相を行った。0.1% BSA を含む PBS でブロッキングし、PBS-T（0.05%の Tween20 を含む PBS）で 2 回洗浄後、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 35B6 抗体を 37°Cで 1 時間反応させた。PBS-T で 3 回洗浄後、5000 倍希釈した HRP 標識抗マウス IgG（Jackson ImmunoResearch）を各ウェルに 100 μL 添加し、室温で 30 分間反応させた。PBS-T で洗浄後、100 μL の TMB（SeraCare）を加え暗所で 15 分間放置した後、2N 硫酸を 100 μL 加え反応を停止させた。マイクロプレートリーダー（Multiskan FC ; Thermo Fisher）により 450 nm の波長でプレートを測定し吸光度を得た。

細胞接着試験

50mM 炭酸バッファーにヒトまたはマウス OPN N-half の GST 融合タンパク質 [26]を 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で希釈し 96 ウェルプレートに添加後、37°Cで 1 時間放置し固相を行った。0.5% BSA を含む PBS でブロッキング後、Fig. 3 に示した濃度の 35B6 抗体存在下またはコントロール抗体（5A1）[42]存在下で 0.25% BSA を含む DMEM（Wako）で細胞を懸濁し、200 μL の細胞懸濁液（ 5×10^4 個/well）を各ウェルに加え、37°Cで 1 時間反応した。播種した細胞懸濁液を除去した後、各ウェルを PBS（200 $\mu\text{L}/\text{well}$ ）で 2 回洗浄後、0.5% クリスタルバイオレットを含む 20% メタノールを 50 μL 加え室温で 30 分間放置し、接着した細胞の固定・染色を行った。各ウェルを水で 3 回洗浄し、接着細胞を 100 μL の 20% 酢酸で転溶させ、マイクロプレートリーダーにより 595 nm の波長でプレートを測定して、ウェルに接着した

細胞の相対数を決定した。

mRNA の発現解析

正常マウスおよび NASH モデルマウスの肝臓から、TRIzol (Thermo Fisher) を用いてトータル RNA を抽出した後、LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I System (Roche) を使用してリアルタイム PCR を行った。内在性コントロール遺伝子として G3PDH を用い比較定量法 ($\Delta\Delta C$ 法) を用いて相対比較を行った。使用したプライマーは Table I に示す。

Table I Real-time PCR primer sequences

Gene	Sequence of primers
OPN	5'- CCCGGTGAAAGTGACTGATT-3' 5'- TTCTTCAGAGGACACAGCATTTC-3'
$\alpha 4$ integrin	5'- TGGAAGCTACTTAGGCTACT-3' 5'- CTCCCACGACTTCGGTAGTAT-3'
$\alpha 9$ integrin	5'- AAGGCTGCAGCTGTCCCACATGGACGAAG-3' 5'- TTAGAGAGATATTCTTCACAGCCCCCAA-3'
α -SMA	5'- CTCTCTCCAGCCATCTTTCAT-3' 5'- TATAGGTGGTTTCGTGGATGC-3'
TNF- α	5'- TCTTCTCATTCTGCTTGTGG-3' 5'- GGTCTGGGCCATAGAAGTGA-3'
Col1A1	5'- CTCCTGGCAAGAATGGAGAT-3' 5'- AATCCACGAGCACCCCTGA-3'
G3PDH	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

ELISA

OPN 濃度は OPN ELISA kit (免疫生物研究所) を用い、製品マニュアルに従い測定した。

血中の抗 OPN 抗体濃度の測定

C57BL/6 マウスに M5 抗体または 35B6 抗体を 300 μ g/匹で週に 1 回 4 週間、腹腔内投与を行った。抗体投与後 1、3、6 日後に血漿を回収した。回収した血漿を、抗原ペプチド VDVPNGRGDSLAYGLR で固相した 96 ウェルプレートに加え 1 時間反応後、M5 抗体または 35B6 抗体に対する HRP 標識二次抗体を添加し 45 分後に TMB で発色させ、それぞれの精製抗体で作成した検量線を用いて定量化した。

コンカナバリン A 誘発性肝炎 (ConA 肝炎) の作製

C57BL/6 マウスに PBS で溶解した ConA (Sigma-Aldrich) を 10 mg/kg で静脈内投与を行った。M5 抗体および 35B6 抗体は ConA 投与の 15 時間前に、マウス 1 匹あたり 400 μ g の用量で腹腔内投与を行った。24 時間後に ALT 測定用の血液と、HE 染色のための肝臓を回収した。血漿中 ALT レベルは臨床分析装置 (DRICHEM 5500V ; FujiFilm) を用いて測定し、壊死の領域は ImageJ ソフトウェアを用いて解析した。

NASH モデルの作製

7 週齢の雄の C57BL/6 マウスに超高脂肪コリン欠乏メチオニン減量飼料 (CDAHFD) (Research Diets) を 8 週間与えた。抗体投与群は CDAHFD 給餌中に週 2 回 8 週間、抗体を腹腔内に投与した。8 週間後、ALT レベルの測定および OPN ELISA のための血液を採取し、HE およびシリウスレッド染色のために肝臓を摘出した。コラーゲン含有量は、シリウスレッドで陽性に染色された肝臓組織の領域を評価し、ImageJ ソフトウェアを用いて定量化した。コラーゲン 1 の発現は抗コラーゲン 1 抗体 ab34710 (Abcam) を用いて評価した。パラフィン包埋肝臓組織の切片は、メーカーの指示に従い処理を行った。

NASH モデルの重症度評価のスコアは、以下の評価基準に従い評価した [43]。

1) 脂肪沈着

- 0 : 正常
- 1 : 肝細胞の 33%以下に影響
- 2 : 肝細胞の 33-66%に影響
- 3 : 肝細胞の 66%以上に影響

2) 肝細胞の風船様腫大 (バルーンング)

- 0 : 無し
- 1 : まれまたは少数
- 2 : 中程度
- 3 : 多数

3) 小葉内炎症

- 0 : 無し
- 1 : 20 視野あたり 2 病巣
- 2 : 20 視野あたり 2 から 4 病巣
- 3 : 20 視野あたり 4 病巣以上

ウェスタンブロット

肝臓は可溶化バッファー (50 mM Tris-HCl (pH7.4) , 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche)) 内でホモジナイズし、肝臓可溶化物を SDS-PAGE で分離し PVDF 膜に転写した後、ブロッキングを行った。その後、OPN 検出用一次抗体として抗 OPN 抗体 (O-17) (免疫生物研究所)、トロンピン切断型特異的抗 OPN 抗体として 34E3 抗体 (免疫生物研究所)、コントロールとして抗 β -アクチン抗体 (Wako) を反応させた。洗浄後に HRP 標識二次抗体を反応させ、ECL システム (PerkinElmer) により発光させ、X 線フィルム (Wako) に感光させた。

統計処理

実験のデータは平均値±標準誤差 (SEM) で示した。グループ間の有意差検定は Student's t-test または Wilcoxon-Mann-Whitney U-test の両側検定を行い、 P 値が 0.05 (*)、0.005 (**)
未満で有意差ありとした。

第3節 結果

抗オステオポンチン (OPN) モノクローナル抗体 (35B6) の作製

抗 OPN ポリクローナル抗体 (M5) の作製に使用した抗原ペプチド VDVPNGRGDSLAYGLR をマウスに免疫することで、抗 OPN マウスモノクローナル抗体 (35B6) を得た。35B6 抗体の抗原認識配列を同定するために、Fig. 1A に示す7種類のペプチドを用いて抗原固相 ELISA を行った結果、35B6 抗体は GDSLAYGLR ペプチドをエピトープとすることが分かった (Fig. 1B)。また、抗原ペプチド中には多くの細胞外マトリックスに存在するインテグリン結合配列である RGD 配列が含まれているため、RGD 配列を有するその他の細胞外マトリックスに対する 35B6 抗体の反応性を ELISA で解析した。その結果、35B6 抗体はマウスとヒト両方の OPN を認識し、一方で RGD 配列を有するフィブロネクチン、ビトロネクチンおよびラミニンには結合しないことが分かった (Fig. 1C)。以上の結果から、35B6 抗体は OPN を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体であることが分かった。

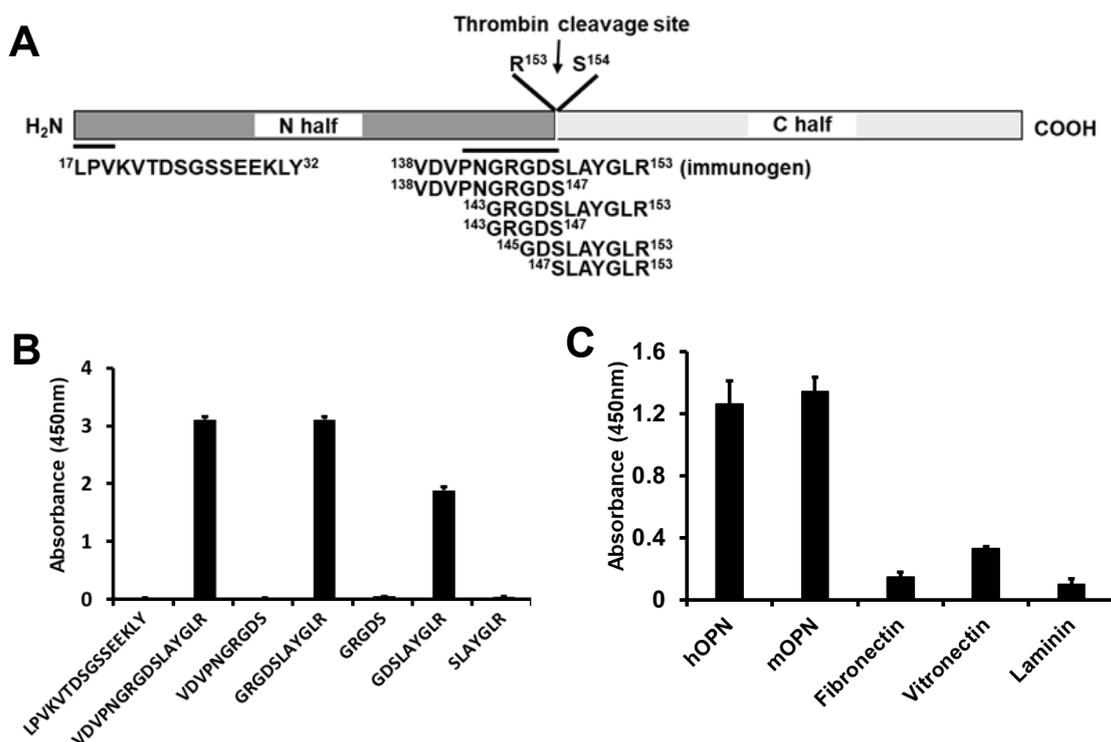


Fig. 1 Characterization of mAb 35B6

A. Mouse OPN structure and synthetic peptide. The position of the thrombin cleavage site (between R¹⁵³ and S¹⁵⁴) and seven peptide sequences used for solid-phase binding assay are indicated. B-C. The synthetic peptides (5 µg/ml) (B), human OPN (hOPN), mouse OPN (mOPN), or fibronectin and vitronectin (5 µg/ml) (C) were coated onto 96-well plates. 35B6 at 2 µg/ml was added to protein-coated 96-well plates and the bound antibody was quantified as described in the Materials and Methods. Data are expressed as the mean of three independent experiments.

マウス $\alpha 4\beta 1$ および $\alpha 9\beta 1$ インテグリン結合配列の同定

ヒト OPN の SVVYGLR 配列が $\alpha 4\beta 1$ および $\alpha 9\beta 1$ インテグリンの結合に関与することが報告されている [20, 44]。しかし、その SVVYGLR のマウスの相同性配列にあたる SLAYGLR が $\alpha 4\beta 1$ および $\alpha 9\beta 1$ インテグリンとの結合能を有するかは不明であった。そこで、 $\alpha 4$ または $\alpha 9$ インテグリンを発現させた CHO 細胞 [45, 46] を用いた細胞接着試験を行い、SLAYGLR ペプチドに対する $\alpha 4\beta 1$ および $\alpha 9\beta 1$ インテグリンの結合を検討した。なお、野生型 CHO 細胞は RGD 認識インテグリンは発現しているが、 $\alpha 4$ および $\alpha 9$ インテグリンは発現していない [26]。実際に、CHO 細胞は SLAYGLR 配列や SLAYGLR 配列の N 末端に二つアミノ酸を伸ばした 35B6 抗体の抗原認識配列である GDSLAYGLR には接着しない (Fig. 2)。次に、 $\alpha 4$ または $\alpha 9$ インテグリンを導入した CHO 細胞を用いて細胞接着試験を行った結果、SLAYGLR 配列の $\alpha 4\beta 1$ インテグリンに対する結合は非常に弱く、 $\alpha 9\beta 1$ インテグリンには結合しなかった。一方で GDSLAYGLR 配列は $\alpha 4\beta 1$ および $\alpha 9\beta 1$ インテグリンへの有意な結合能を示したことから、 $\alpha 4\beta 1$ および $\alpha 9\beta 1$ インテグリンの結合配列は GDSLAYGLR であることを見出した (Fig. 2)。

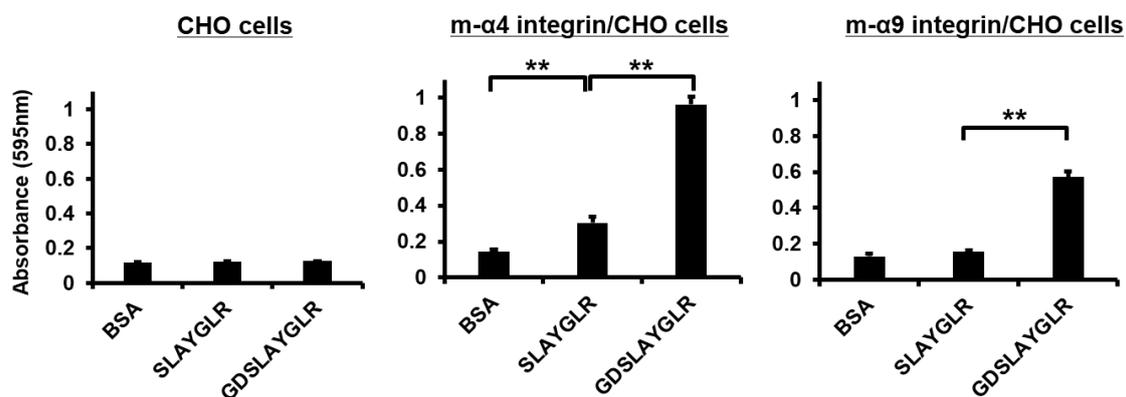


Fig. 2 Identification of mouse $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 9\beta 1$ integrin-binding sequences

Cell adhesion test results using BSA, SLAYGLR, or GDSLAYGLR peptides (5 μ g/ml) with CHO cells or CHO cells expressing mouse $\alpha 4$ or $\alpha 9$ integrins. Data are presented as means \pm SEM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$.

35B6 抗体による OPN の接着阻害効果

35B6 抗体の接着阻害能の検討を行った。固相には、RGD 認識インテグリンおよび $\alpha 4\beta 1$ 、 $\alpha 9\beta 1$ インテグリンと接着能を有する OPN の N 末端側半分のタンパク質 (OPN N-half) [18, 19, 26]を用いた。細胞はマウス OPN N-half を固相した細胞接着阻害試験にはマウス $\alpha 4$ または $\alpha 9$ インテグリンを導入した CHO 細胞を用い、ヒト OPN N-half を固相した細胞接着阻害試験にはヒト $\alpha 4$ または $\alpha 9$ インテグリン導入 CHO 細胞を用いた。細胞接着阻害試験の結果、35B6 抗体はマウスおよびヒト OPN N-half に対する CHO 細胞、 $\alpha 4$ または $\alpha 9$ インテグリンを導入した CHO 細胞の全ての細胞接着を阻害した (Fig. 3A, B)。さらに、35B6 抗体の特異性について調べるために、RGD 配列を有するその他の細胞外マトリックスであるフィブロネクチンとビトロネクチンを固相して細胞接着阻害試験を行った。その結果、ELISA の結果を反映して (Fig. 1C)、35B6 抗体は接着阻害能を示さなかった (Fig. 3C)。これらの結果から、35B6 抗体は OPN を特異的に阻害する抗体であることが分かった。

35B6 抗体の抗原認識配列は GRGDS ではなく GDSLAYGLR であるが、35B6 抗体は $\alpha 4\beta 1$ および $\alpha 9\beta 1$ インテグリンの細胞接着のみならず OPN と RGD 依存性の細胞接着も阻害した。これは GRGDS 配列が $\alpha 4\beta 1$ および $\alpha 9\beta 1$ インテグリン結合配列と隣接していることから、35B6 抗体の立体障害により引き起こされていると推測した。

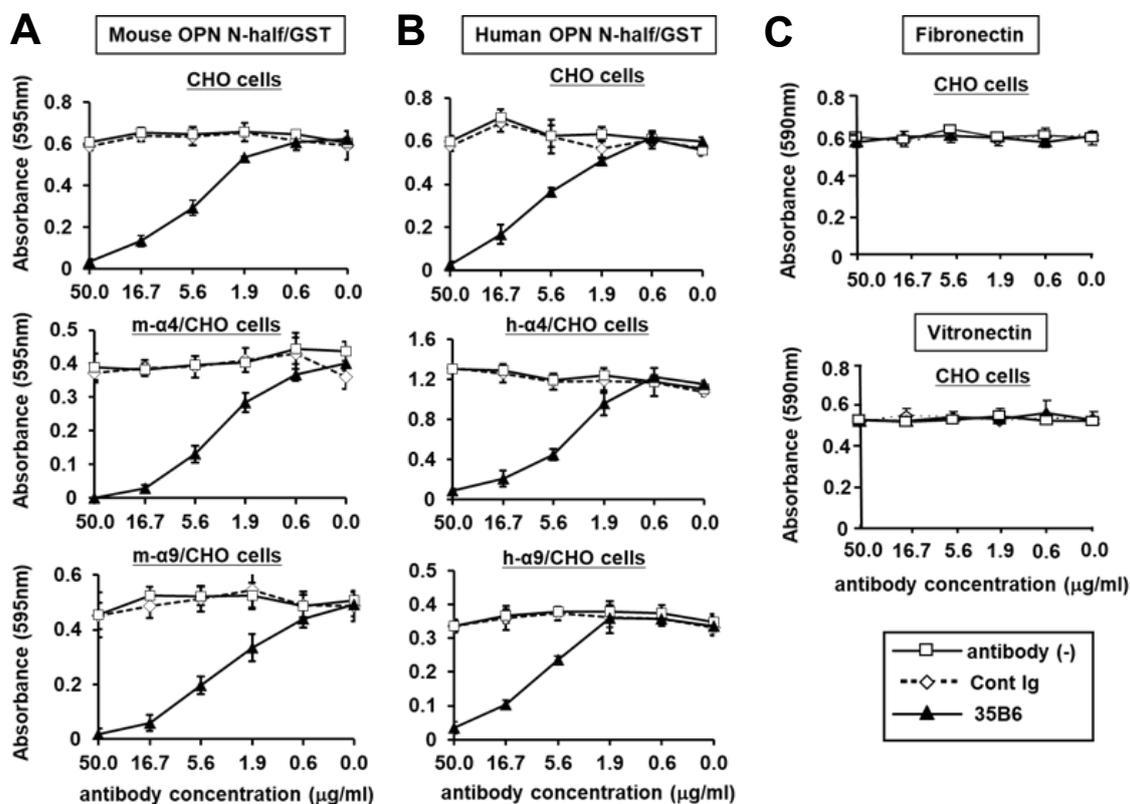


Fig. 3 35B6 inhibits the binding of OPN to CHO cells expressing integrin receptors
The inhibitory effects of 35B6 were assessed by cell adhesion assay. A-C. Cell adhesion inhibitory effect of 35B6 for mouse OPN (A), human OPN (B), or fibronectin and vitronectin (C) with CHO cells or CHO cells expressing $\alpha 4$ or $\alpha 9$ integrins.

35B6 抗体の血中の濃度推移の検討

35B6 抗体はマウスモノクローナル抗体であるが、実際にマウス体内で長期間血中濃度を維持できるかを確認した。M5 抗体および 35B6 抗体を週 1 回マウス腹腔内投与し、各抗体の血中濃度を測定した。その結果、ウサギポリクローナル抗体である M5 抗体は 3 回目の投与以降、血中濃度は上昇しなかった。一方、35B6 抗体は少なくとも 4 週間血中濃度を維持できることが分かった (Fig. 4)。この結果から、今回作製した 35B6 抗体は検討に長期間を要する疾患モデルにおいても血中抗体価を維持できる抗体であると考えられる。

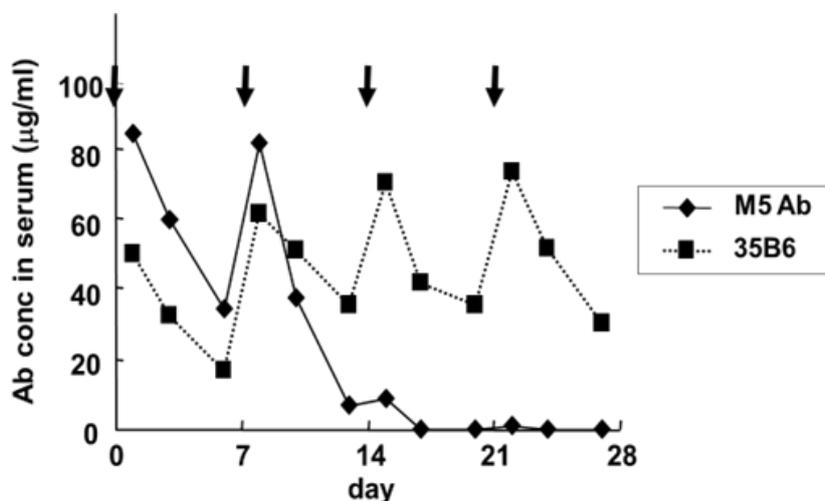


Fig. 4 Antibody concentration in serum after anti-OPN antibody injection

M5 antibody or 35B6 (300 µg/mice) were injected into mice every 7 days for 4 weeks. Arrows indicate antibody injection days. Sera were collected on days 1, 3 and 6 after antibody injection. Antibody concentration was tested by a solid-phase binding assay using an immunogen-coated plate coated with antigen peptide.

35B6 抗体によるコンカナバリン A 誘発性肝炎 (ConA 肝炎) の抑制効果

既存の OPN 中和抗体 M5 ポリクローナル抗体が自己免疫性肝炎のマウスモデルである ConA 肝炎を抑制した報告がある [21]。そこで、35B6 抗体が生体内においても OPN の機能を阻害できるか ConA 肝炎を作製し検討した。その結果、35B6 抗体投与により血漿 ALT 値が低下し (Fig. 5A)、組織学的染色では肝細胞壊死の抑制を確認できたことから、35B6 抗体は ConA 肝炎を有意に改善できることが分かった (Fig. 5B, C)。これらの結果から、35B6 抗体は生体内においても OPN 機能を抑制できることを確認できた。

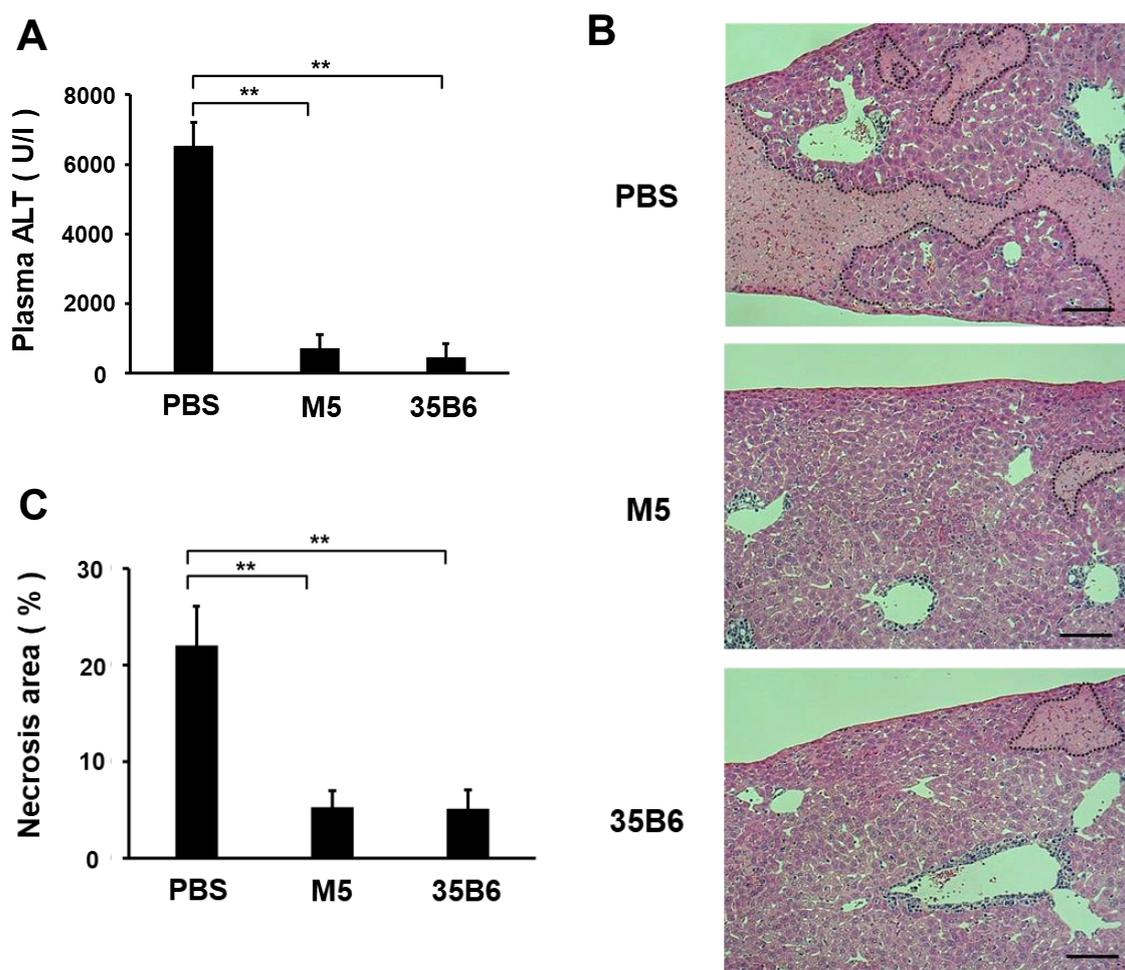


Fig. 5 Inhibitory effect of M5 and 35B6 on the development of ConA-induced hepatitis C57BL/6 mice were intraperitoneally treated with M5 or 35B6 antibody (400 μ g/head) at 15 h before ConA injection. A-B. Plasma ALT levels (A) and HE staining (B) at 24 h after ConA injection are shown. Dotted line denotes necrotic area. C. Necrotic areas per liver section were quantified by ImageJ software. Data are presented as means \pm SEM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$. Bar = 100 μ m.

非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）モデルマウスの肝臓における OPN 発現

NASH では肝臓の継続的な炎症により線維化を促進する。さらに、NASH 患者の血中および肝臓で OPN 発現が亢進しており、NASH 進展に OPN が関与していることが示唆されている [40, 41, 47]。今回作製した NASH モデルマウスの肝臓においても、リアルタイム PCR では OPN mRNA が増加傾向にあり、ELISA 解析からは OPN タンパク質が有意に増加していることが分かった (Fig. 6A)。また、ウェスタンブロット解析でも NASH モデルマウスの肝臓内で OPN の発現亢進が認められ、さらに興味深いことに NASH モデルマウスの肝臓ではトロンビン切断型 OPN も検出されることが分かった (Fig. 6B)。トロンビン切断型 OPN は $\alpha 4$ または $\alpha 9$ インテグリンと結合することから、肝臓内の $\alpha 4\beta 1$ および $\alpha 9\beta 1$ インテグリンの発現をリアルタイム PCR で測定した。その結果、NASH モデルマウスの肝臓では $\alpha 4$ インテグリンの発現が有意に亢進し、 $\alpha 9$ インテグリンは増加傾向にあることが分かった (Fig. 6C)。このことは、肝臓内に $\alpha 4$ や $\alpha 9$ インテグリンを発現する白血球が浸潤しているためと考えられる。

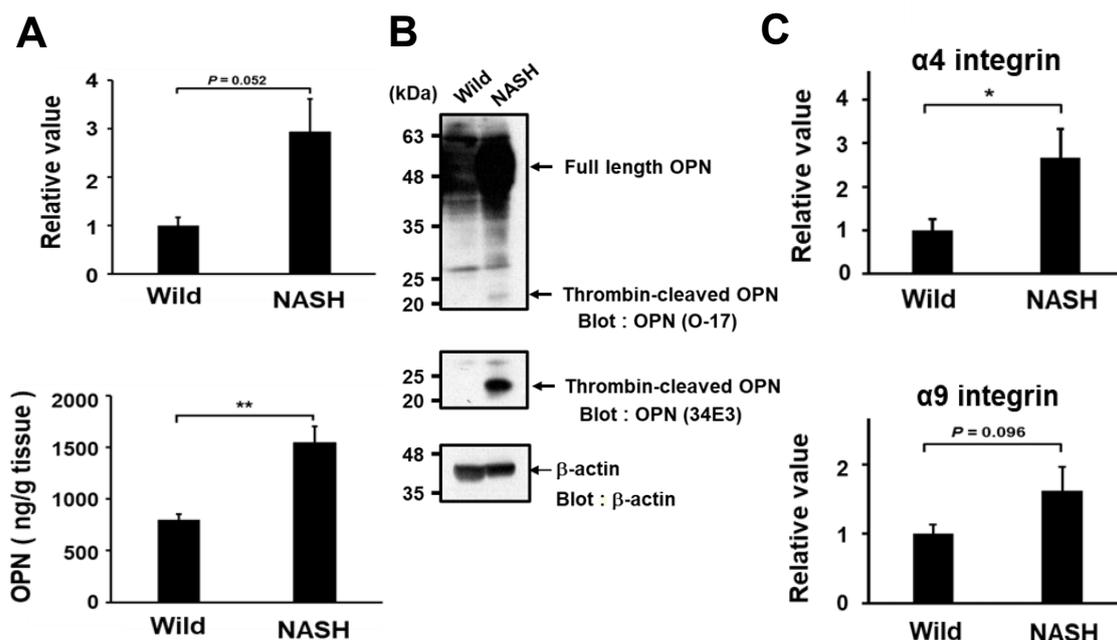


Fig. 6 Expression of OPN in NASH livers

A. Expression of OPN in NASH analyzed by real-time PCR (upper panel) and ELISA (lower panel). B. Expression of OPN and thrombin-cleaved OPN in NASH by western blotting. C. Expression of $\alpha 4$ (upper panel) or $\alpha 9$ integrins (lower panel) in NASH analyzed by real-time PCR. Data are presented as means \pm SEM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$.

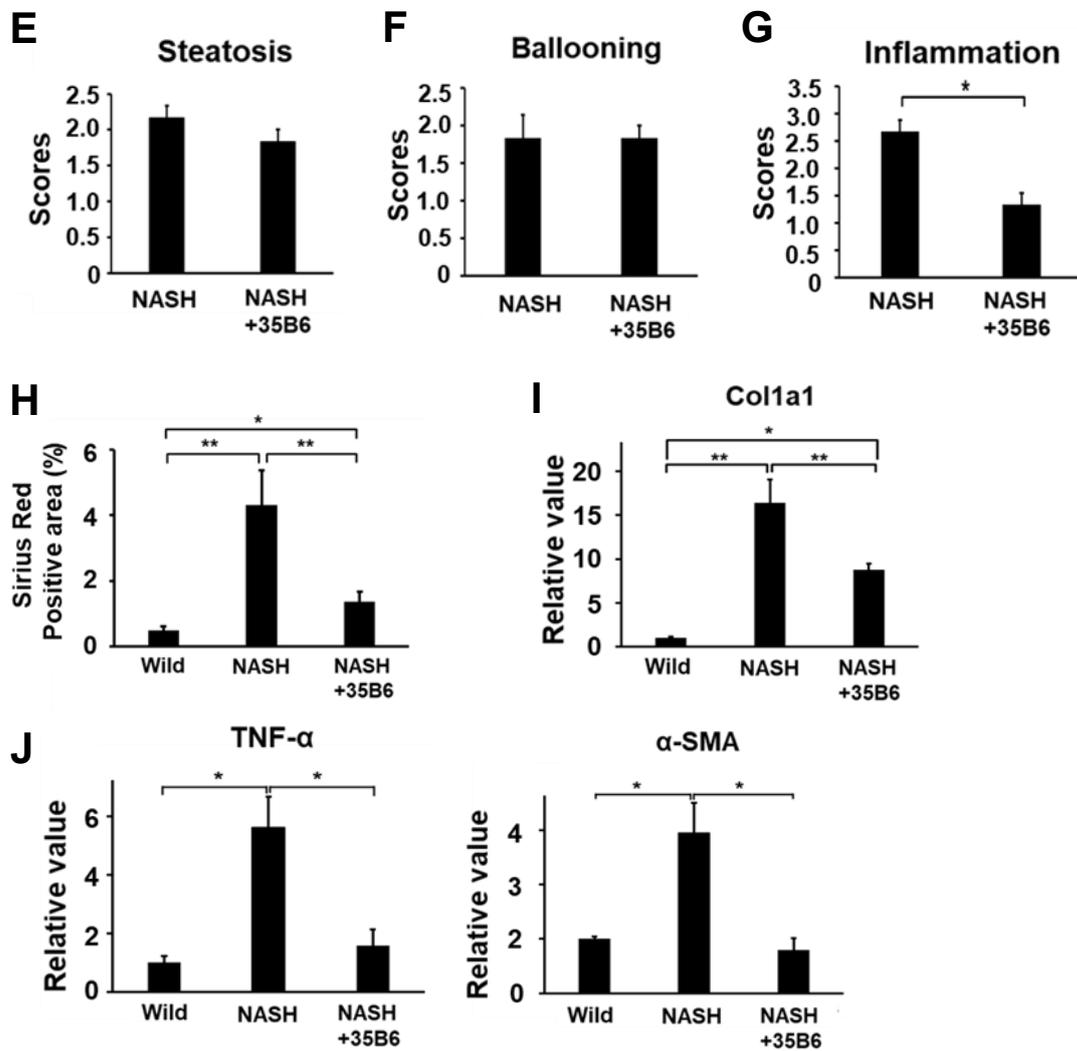


Fig. 7 35B6 protects mice from NASH progression

A. Protocol for NASH with anti-35B6 treatment. B. Change in body weight. C. Plasma ALT levels at 8 weeks after feeding with CDAHFD. D. Representative liver histology of mice treated with 35B6, control NASH mice, or wildtype mice. Livers were obtained at 8 weeks after feeding with CDAHFD and 35B6 treatment. Liver sections were stained with HE, Sirius Red, or anti-collagen I antibody. Original magnification, $\times 40$ (upper panel) or $\times 100$ (lower panel). Scale bar = $100\mu\text{m}$. E-G. Scale scores of steatosis (E), ballooning (F) and inflammation (G). H. Quantification of Sirius Red stained images by ImageJ software. I-J. Relative mRNA expression levels of *coll1a1* (I), and *TNF- α* and α -SMA (J) analyzed by real-time PCR in livers obtained after 8 weeks of treatment. Data are presented as means \pm SEM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$.

第4節 考察

OPN 欠損マウスを用いて炎症性疾患、線維化、腫瘍の増悪化における OPN 機能の解析は多く行われている。しかし、OPN 欠損マウスの遺伝的背景は様々な疾患モデル、特にリウマチモデルである抗Ⅱ型コラーゲン抗体誘導関節炎 (CAIA) や多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) などの免疫疾患モデルの発症や増悪化に強く影響を与えることが報告されている [35]。したがって、*in vivo* での OPN 機能の解析には中和抗体を用いた解析が好ましい。現在までに、マウス OPN に対する中和抗体は AF-808 抗体 [32, 48] および M5 抗体 [20, 21] の 2 つが報告されている。しかし、これらの抗体はヤギ (AF-808) やウサギ (M5) で作製されたポリクローナル抗体である。ポリクローナル抗体は抗体のロット差の影響や、マウスへの投与により抗体に対する抗ヤギ IgG や抗ウサギ IgG に対する抗体が誘導されるため、血中抗体価を長期間維持することが出来ないという欠点がある。実際、Fig. 4 において M5 抗体は血中濃度を 2 週間程度しか維持できないことを確認している。本研究では、抗 OPN マウスモノクローナル抗体 (35B6) を作製し、血中の 35B6 抗体価を少なくとも 1 ヶ月間維持できることを明らかにしている。さらに、35B6 抗体はマウスのみならずヒト OPN も認識し、マウスおよびヒト OPN と RGD 認識インテグリンとの結合、 $\alpha 4$ および $\alpha 9$ インテグリンとの結合を完全に阻害した。これらの結果から、35B6 抗体はマウス疾患モデルにおける OPN 機能の解明に非常に有用な抗体であると考えられる。

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は、慢性肝疾患であり一部の患者 (約 10~20%) が非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) を発症し、肝硬変や肝細胞癌のリスクが高まることが知られている [37, 38]。マウスの CDAHFD 給餌は、肝臓の炎症や線維症などヒトの NASH 患者と同様の組織学的特徴を示す確立された NASH モデルである。NASH 患者および NASH モデルマウスの肝臓組織および血液で、OPN の発現亢進が報告されている [41]。さらに、OPN 欠損マウスで作製した NASH モデルマウスの肝臓では、炎症と線維化の軽減も報告されている [39, 40]。本研究では 35B6 抗体を用いて NASH モデルマウスにおける OPN 機能を解析し、35B6 抗体が NASH モデルマウスの肝臓の炎症と線維化を抑制することを見出した。これらの結果は、OPN 受容体である $\alpha v \beta 3$ などの RGD 認識インテグリンおよび RGD 非依存性インテグリンである $\alpha 4$ と $\alpha 9$ インテグリンとの相互作用が NASH の増悪化に関与していることを示唆している。 $\alpha v \beta 3$ インテグリンは肝星細胞に発現し、肝星細胞の活性化に関与している [49]。さらに、炎症性サイトカイン産生や炎症部位での白血球の活性化を誘導するなど、重要な炎症誘発機能を有することが報告されている [50]。 $\alpha 4 \beta 1$ および $\alpha 9 \beta 1$ インテグリンは、好中球やマクロファージに発現している [44]。好中球は、脂質過酸化と肝星細胞の遊走を引き起こす活性酸素種を産生し、細胞損傷と線維化を促進することが報告されている [51]。マクロファージは、TNF- α やトランスフォーミング増殖因子 (TGF) - β など様々なサイトカインを産生することが知られている。また、肝臓には多くのナチュラルキラー T (NKT) 細胞が存在している。NKT 細胞は $\alpha 4 \beta 1$ および $\alpha 9 \beta 1$ インテグリンが発

現しており、NKT 細胞から分泌される OPN が NKT 細胞の活性化を促進することも報告されている [21]。さらに、NKT 細胞は NASH の線維化を促進することも報告されている [52]。

35B6 抗体投与による NASH モデルマウスの肝臓の炎症と線維化阻害効果は部分的だったことから、インテグリンファミリーのその他のリガンドが関与する可能性も考えられる。インテグリンと OPN を含むインテグリンリガンド間の相互作用を詳細に解析することで、新たな NASH の増悪化機構の解明に繋がると期待できる。

35B6 抗体投与は CDAHFD を給餌したマウスの肝臓の炎症と線維化を抑制した。しかし、我々の NASH モデルにはいくつかの問題点もあると考えている。そのうちの 1 つは、CDAHFD 給餌で作製した NASH モデルに類似したメチオニン・コリン欠乏食負荷 (MCD) モデルのようなコリン欠乏食モデルは、ヒト NASH と代謝の状況が異なることから、ヒト NASH の病因を反映していないという報告があることである [53]。したがって、高脂肪食ストレプトゾトシン誘発モデルのような臨床的に関連するその他のモデルで、NASH 病因における OPN の役割をさらに検討する必要があると考える [54]。

結論として、本研究で作製した抗マウス OPN マウスモノクローナル抗体 (35B6) は、マウスおよびヒト OPN を認識し、OPN 受容体へのマウスおよびヒト OPN の接着を阻害できた。さらに、35B6 抗体は繰り返し投与しても、長期間にわたり抗体価を維持できる抗体であることから、35B6 抗体は様々な疾患モデルにおける OPN 機能を解明するための重要なツールになると考えられる。今回検討した NASH モデルマウスにおいては、35B6 抗体投与により肝臓の炎症細胞の浸潤と線維化を抑制できることが明らかとなった。このことから、35B6 抗体が NASH における肝臓の炎症および線維症の予防、治療に有用な抗体である可能性を見出すことができた。本抗体を用いて有効な疾患抑制効果を得られた際には、35B6 抗体はヒト OPN も認識することから、抗体医薬への発展へと直結させることが可能であるとも考える。

第2章 抗ネフロネクチン中和抗体を用いた抗Ⅱ型コラーゲン抗体誘導関節炎に及ぼすネフロネクチンの機能解析

第1節 序論

細胞外マトリックスの一種であるネフロネクチン (Npnt) は、腎臓形成における $\alpha 8\beta 1$ インテグリンのリガンドとして 2001 年に同定された比較的新しい分子である [15, 55, 56]。Npnt は N 末端領域に 5 つの EGF 様リピート、中間に細胞接着配列である RGD 配列を含むリンカーセグメント、そして C 末端領域の MAM ドメインから構成されている (Fig. E) [15]。Npnt 上の $\alpha 8\beta 1$ インテグリン結合部位は、リンカーセグメント内の RGD 配列と RGD 配列の 11 アミノ酸後に存在する LFEIFEIER 配列の二つが関与することが報告されている [57]。また、Npnt の EGF 様リピートと MAM ドメインは、それぞれコンドロイチン硫酸とヘパラン硫酸と結合することが知られている (Fig. E) [58]。Npnt の疾患への関与は、腎臓病、急性および慢性肝炎、腫瘍の進行などが報告されている [59-63]。

前章に記載した OPN は Npnt と同じく腎臓で高発現し RGD 配列を有し、さらに $\alpha 8\beta 1$ インテグリンも受容体の一つであるなど多くの共通点が存在する [64]。そこで、Npnt は OPN と類似機能を有すると予想し、免疫疾患における Npnt 研究を進めることとした。本研究では、免疫疾患における Npnt の役割を解析することを目的に研究を進めた。

第2節 実験方法

実験動物

本研究で使用したSDラット、BALB/cおよびC57BL/6マウス、は、福山大学研究安全倫理委員会（動物実験安全倫理部会）によって承認され（H29-動-6号）、文部科学省による動物の管理と使用に関するガイドラインに準拠して実験を行った。

細胞培養

ヒト横紋筋肉腫細胞株 RD 細胞、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞株 A549 細胞、ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞、ヒト脳膠芽腫細胞株 LN-229 細胞、マウス皮膚黒色腫細胞株 B16 細胞、マウス線維芽細胞株 NIH3T3 細胞、マウス胎児線維芽細胞株 MEF 細胞および L929 細胞は、10% FBS を含む DMEM を用いて、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

ヒトリンパ腫細胞株 Raji 細胞、ヒト T 細胞性白血病細胞株 Jurkat 細胞、ヒト単球系細胞株 U937 細胞、ヒト骨髄性白血病細胞株 HL60 細胞、マウス腹水癌細胞株 Ehrlich 細胞、マウス骨髄腫細胞株 X63 細胞は、10% FBS を含む RPMI を用いて、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

浮遊性 293 細胞である 293F (Thermo Fisher) は、無血清培地である FreeStyle 293 Expression Medium (Thermo Fisher) を用いて、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

mRNA の発現解析

正常マウスの組織、関節炎の関節および滑膜細胞から、TRIzol を用いてトータル RNA を抽出した後、ランダムプライマーを使用し逆転写酵素 ReverTra Ace (TOYOBO) により cDNA を合成した。ヒト組織における Npnt 発現検討には、ヒト多組織 cDNA パネル (Takara) を使用した。プライマーは Table II に示すもの使用し、リアルタイム PCR を行った。内在性コントロール遺伝子として G3PDH を用い比較定量法 ($\Delta\Delta C$ 法) を用いて相対比較を行った。

Table II Real-time PCR primer sequences

Gene	Sequence of primers
human Npnt	5'- AAATGAGTGTGGCCTGAAGC-3'
	5'- TGCCTAAATCTAGGGCAGGA-3'
mouse Npnt	5'- GCGGATGAGGAAGTAAAGGAC-3'
	5'- CCTTTGAAGATGACGCTTTTG-3'
human $\alpha 8$ integrin	5'- TCTGCTGCACCCAATGATTA-3'
	5'- CTCCACAGTCCACCAGAATGT-3'
mouse $\alpha 8$ integrin	5'- AGATTTGCTTGTAGGGGCATT-3'
	5'- GACAGCTTCAAGTCAGGAACG-3'

Npnt タンパク質の作製

ヒト Npnt の cDNA は A549 細胞から PCR を用いて増幅を行った。また、各領域変異体の遺伝子はヒト Npnt cDNA からサブクローニングした。それぞれのクローニングに用いたプライマーは Table III に示す。PCR 産物はそれぞれ pM-secSUMOstar ベクター (LifeSensors) に組み込み、配列を確認後に 293F 細胞に Lipofectamine2000 (Thermo Fisher) を用いて遺伝子導入した。pM-secSUMOstar ベクターは 5' 末端に His タグと SUMO タグが付いており、ほ乳類細胞での分泌性の向上と培養上清からの大量精製を期待できることから、遺伝子導入した 293F 細胞の培養上清から Talon affinity beads (Takara) を用いた精製を行った。

Table III Primer sequences for cloning of Npnt

Gene	Sequence of primers
human Npnt	5'- TATTGAGGCTCATCGGAACAGATTGGAGGTGAGTTCGACGGGAGGTGGCCC-3' 5'- ATGCCTGCAGGTTCGACTTAGCGTTCTTCAGAGCAGTG-3'
EGF-like repeats	5'- TATTGAGGCTCATCGGAACAGATTGGAGGTGAGTTCGACGGGAGGTGGCCC-3' 5'- ATGCCTGCAGGTTCGACTTACACACAAGTCAGTCCATCACC-3'
Linker segment	5'- TATTGAGGCTCATCGGAACAGATTGGAGGTTATATCCCAAAAGTTATGATT-3' 5'- ATGCCTGCAGGTTCGACTTATACCAGAACACCTGGATCATC-3'
MAM domain	5'- TATTGAGGCTCATCGGAACAGATTGGAGGTGACAGTTGTAATTTTGACCAT-3' 5'- ATGCCTGCAGGTTCGACTTAGCGTTCTTCAGAGCAGTG-3'

合成ペプチドを用いた Npnt ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の作製

抗マウス Npnt ポリクローナル抗体を作製するために免疫に使用した合成ペプチドは以下の配列のものを用いた。

Npnt3 ペプチド : FKGEKRRGHTGEIGLDDVSL

Npnt-FD ペプチド : PQKPRGDVFIPRQPTNDLFEIFEIER

これらのペプチドをウサギに免疫し、抗血清を免疫した合成ペプチドをチオールセファロースビーズに結合させたカラムを用いて精製した。PBS に対して透析後、精製ポリクローナル抗体とした。

抗マウス Npnt モノクローナル抗体は、マウス Npnt タンパク質 (rmNpnt) (R&D) を SD ラットに皮下免疫を行い、血清のペプチドに対する抗体価上昇を認めた後、脾細胞とマウスミエローマ細胞 X63 と細胞融合を行い、HAT 培地にて選択培養を行った。ハイブリドーマのコロニー形成が認められた後に、抗原ペプチドを固相した ELISA 法にてスクリーニングを行い、陽性コロニーは二回限界希釈法を繰り返すことによって、シングルクローンを得た。シングルクローンの培養上清をポリクローナル抗体と同様に精製し、抗マウス Npnt ラットモノクローナル抗体 (20D1a: IgG1) を得た。

Npnt サンドイッチ ELISA システムの構築

96 ウェルプレートに抗 Npnt3 ポリクローナル抗体 5 µg/mL を固相し、検出抗体はペルオ

キシダーゼ標識キット（同仁化学研究所）を使用して HRP で標識した抗 Npnt モノクローナル抗体（20D1a）を 2 ng/mL の濃度で使用した。標準タンパク質は rmNpnt を用いた。100 μ L の被験サンプルを抗体固相した各ウェルに添加し 37°C で 1 時間反応させた。各ウェルを PBS-T で 3 回洗浄した後、100 μ L の検出抗体を添加し、4°C で 30 分間反応させた。PBS-T で洗浄後、100 μ L の TMB を加え暗所で 30 分間反応した後、2N 硫酸を 100 μ L 加え反応を停止させた。マイクロプレートリーダーにより 450 nm の波長でプレート測定し吸光度を得た。

抗原 ELISA

50mM 炭酸バッファーで rmNpnt とフィブロネクチン及び GRGDS ペプチドを 1 μ g/mL の濃度で希釈し 96 ウェルプレートに添加し、37°C で 1 時間固相した。0.1% BSA を含む PBS でブロッキングした後、各ウェルを PBS-T で 2 回洗浄後、Fig. 11 に示した様々な濃度の抗 Npnt-FD 抗体を添加し 37°C で 1 時間反応させ、PBS-T で 3 回洗浄後に 5000 倍希釈した HRP 標識抗ウサギ IgG を各ウェルに 100 μ L 添加し室温で 30 分間反応させた。PBS-T で洗浄後に 100 μ L の TMB を加え暗所で 15 分間反応した後、2N 硫酸を 100 μ L 加え反応を停止させた。マイクロプレートリーダーにより 450 nm の波長でプレート測定し吸光度を得た。

細胞接着試験

50 mM 炭酸バッファーでヒト Npnt、マウス Npnt、Npnt-FD 抗原ペプチド及びフィブロネクチン、ピトロネクチンを 2 μ g/mL の濃度で希釈し 96 ウェルプレートに添加し、4°C で一晩固相した。0.5% BSA を含む PBS でブロッキング後に様々な濃度の抗 Npnt-FD 抗体の存在下または非存在下で細胞を 0.25% BSA を含む DMEM に懸濁し、200 μ L の細胞懸濁液（ 5×10^4 個/well）を各ウェルに加え 37°C で 1 時間反応させた。播種した細胞懸濁液を除去した後、各ウェルを PBS（200 μ L/well）で 2 回洗浄を行った後、0.5% クリスタルバイオレットを含む 20%メタノール 50 μ L で接着細胞の固定・染色を行った。各ウェルを水で洗浄し、接着細胞を 100 μ L の 20% 酢酸で転溶後にマイクロプレートリーダーで 595 nm の波長でプレート測定し、ウェルに接着した細胞の相対数を決定した。

滑膜組織の分画

マウス後肢を足首関節から外科的に取り除き、さらに皮膚、皮下、腱および筋肉組織を関節から外科的に除去した。残りの軟組織を骨から取り除いた組織を滑膜組織とし、解剖用ハサミで大まかにホモジナイズを行った。ホモジネートを培養液で 1 回洗浄し、3 mg/mL の II 型コラゲナーゼ（Worthington Biochemical）で攪拌し処理した。洗浄後、MACS（Miltenyi Biotec）を用いて、滑膜細胞を TLR-4 陽性または TLR-4 陰性画分に分画を行った。TLR-4 陽性画分をマクロファージとし、TLR-4 陰性画分は一晩培養した後、接着細胞を線維芽細胞として使用した。

抗Ⅱ型コラーゲン抗体カクテル誘導関節炎（CAIA）モデルの作製

1) CAIA の誘導と重症度の評価

関節炎は、抗Ⅱ型コラーゲン抗体モノクローナル抗体カクテルキット（Chondrex Inc.）を用い誘導を行った。

7週齢の雌のBALB/cマウスに、5種類の抗Ⅱ型コラーゲンモノクローナル抗体カクテル（各2mg/匹）をリポ多糖（LPS）投与の3日前に静脈内投与し、0日目にLPS 50 µgを腹腔内投与した。抗Npnt-FD抗体またはコントロールウサギIgGは-4日目と0日目に400 µg/匹を腹腔内に投与した。

関節炎スコアは以下に示す5段階の評価基準に従い、四肢の関節炎重症度を評点化し、最大で16点とした。

- 0: 症状なし
- 1: 四肢の指など少関節が1本のみ腫脹発赤
- 2: 少関節2本以上、もしくは手首や足首などの比較的大きな関節が腫脹発赤
- 3: 1本の手や足全体が腫脹発赤
- 4: さらに1本の手や足の腫脹発赤が最大限に達している

2) 関節組織の観察と病理的評価

LPS投与後14日目のマウスから、後肢の関節を回収し、10%ホルマリン溶液中で固定、その後HEとサフラニン-Oを用いて関節組織を染色した。HE染色で染色した組織では、滑膜浸潤細胞の増殖、炎症細胞の浸潤度合いを観察した。サフラニン-O染色では軟骨組織の成分であるプロテオグリカンを染色することで、関節部の軟骨の変性を観察した。

コンカナバリン A 誘発性肝炎（ConA 肝炎）および実験的自己免疫性脳脊髄炎モデル（EAE）の作製

ConA肝炎を誘導するために、BALB/cマウスにPBSで溶解したConA（Sigma-Aldrich）を15 mg/kgで静脈内投与を行った。

EAEの誘発のために、C57BL/6またはSJL/Jマウスに0日目に、中枢神経由来ペプチドのミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質（MOG）35-55ペプチド（MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK）またはプロテオリピドタンパク質（PLP）139-151ペプチド（HSLGKWLGHDPKF）と結核菌死菌を含む完全フロイントアジュバントとを等量混合しエマルジョンを作製し、マウス尾根部に皮下投与した（0.2 mg/匹）。併せて、0日目と2日目にマウス1匹あたり400 ngの百日咳毒素（List Biological Laboratories）をマウス尾静脈に投与した。

統計処理

実験のデータは平均値±標準誤差 (SEM) で示した。グループ間の有意差検定は Student's t-test の両側検定を行い、 P 値が 0.05 (*)、0.01 (**) 未満で有意差ありとした。

第3節 結果

正常組織における Npnt および $\alpha 8$ インテグリンの発現

正常なヒトおよびマウスの各種臓器におけるヒト、マウス Npnt と $\alpha 8$ インテグリンの発現はリアルタイム PCR を用いて測定した。その結果、ヒト、マウスともに脾臓において Npnt と $\alpha 8$ インテグリンの両者とも高い発現を示した (Fig. 8A, B)。

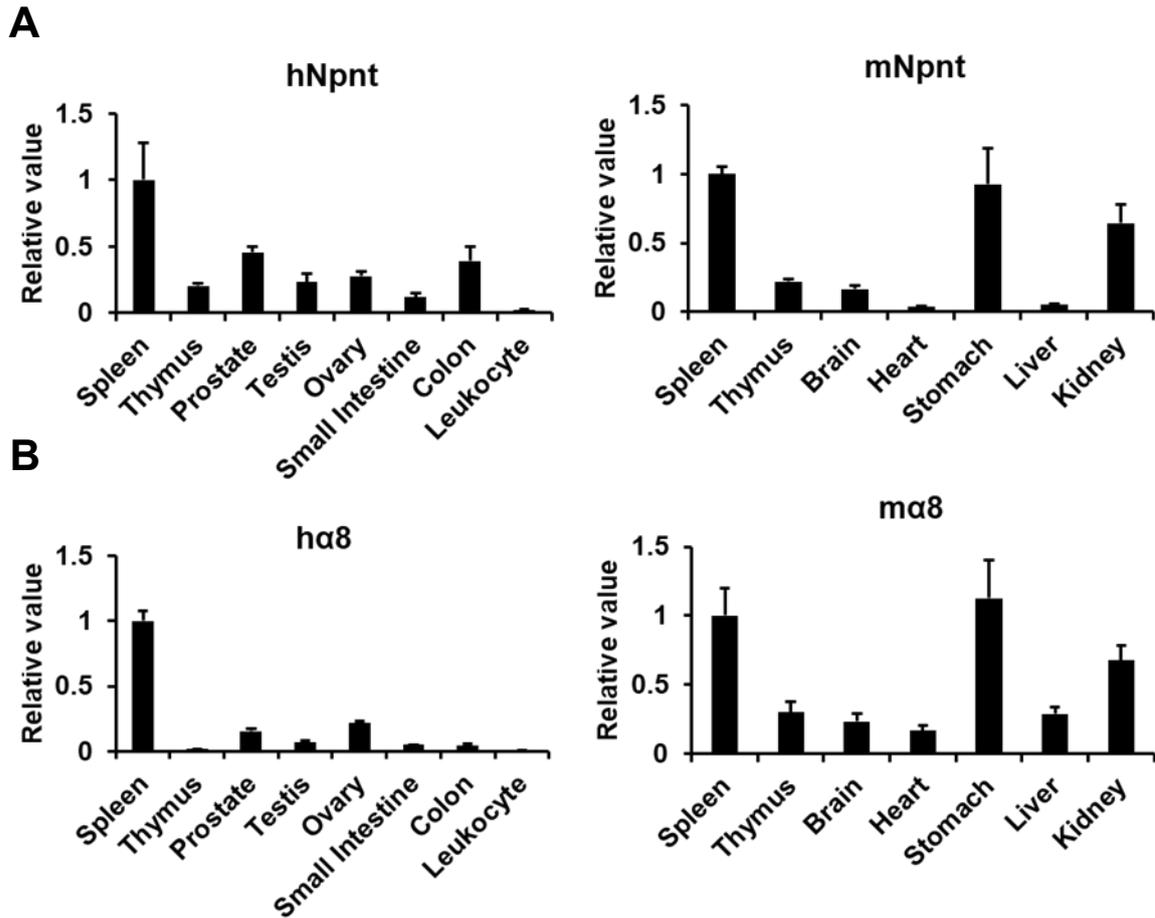


Fig. 8 Expression of Npnt and $\alpha 8$ integrin in human and mouse normal tissues

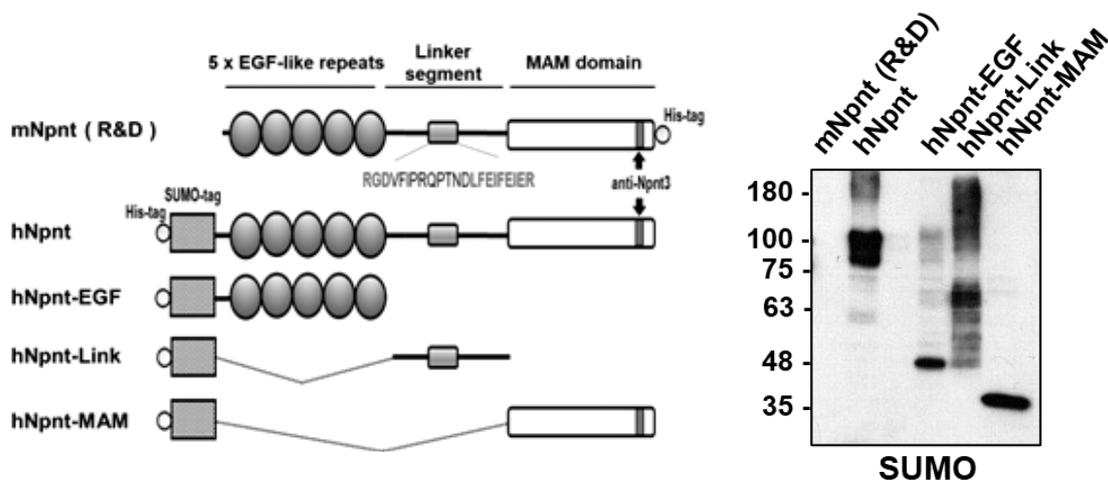
A-B. Npnt (A) and $\alpha 8$ integrin (B) expression in healthy tissues were evaluated by real-time PCR.

Npnt のサンドイッチ ELISA システムの構築

脾臓は免疫系に關与する臓器であることから、自己免疫疾患モデルにおける Npnt の発現変化を調べるために、Npnt サンドイッチ ELISA システムの構築を行った。構築のために、Npnt3 ウサギポリクローナル抗体と 20D1a モノクローナル抗体の 2 つの Npnt に対する抗体を作製した。それらの抗体の特異性評価は、全長 Npnt、EGF 様リピート、リンカーセグメントおよび MAM ドメインの精製タンパク質への抗体の反応性から確認した。その結果、Npnt3 抗体と 20D1a 抗体はマウスとヒト両方の全長 Npnt を認識し、さらに Npnt3 抗体は抗原配列を有する MAM ドメインも認識した (Fig. 9A, B)。20D1a 抗体は各領域変異体には反応しなかったことから (Fig. 9B)、全長 Npnt の構造のみを認識する抗体であることが示唆された。

Npnt3 抗体を固相用抗体、20D1a を検出用抗体として組み合わせたサンドイッチ ELISA システムを確立しマウス Npnt の検出を行った。その結果、サンドイッチ ELISA システムの標準曲線は、0.078~5.0 ng/ml の範囲で濃度と吸光度間で直線状の相関を得ることができた (Fig. 9C)。次にサンドイッチ ELISA の特異性を確認するために、様々なヒトおよびマウス細胞株での Npnt 発現を RT-PCR で確認した。その結果、ヒト細胞株の RD 細胞、A549 細胞および HepG2 細胞、マウス細胞株の B16 細胞、Ehrlich 細胞および MEF 細胞で、Npnt の発現が確認できた (Fig. 9D)。そこで、作製したサンドイッチ ELISA システムを用いて、これら各種細胞株の培養上清中の Npnt タンパク質を測定した結果、Npnt 発現を確認できた細胞株の上清において Npnt を検出でき、Npnt を発現していない細胞株の上清からは Npnt は検出しないことが分かった (Fig. 9E)。本結果から、構築した Npnt サンドイッチ ELISA システムは Npnt を特異的に定量できるシステムであることが分かった。

A



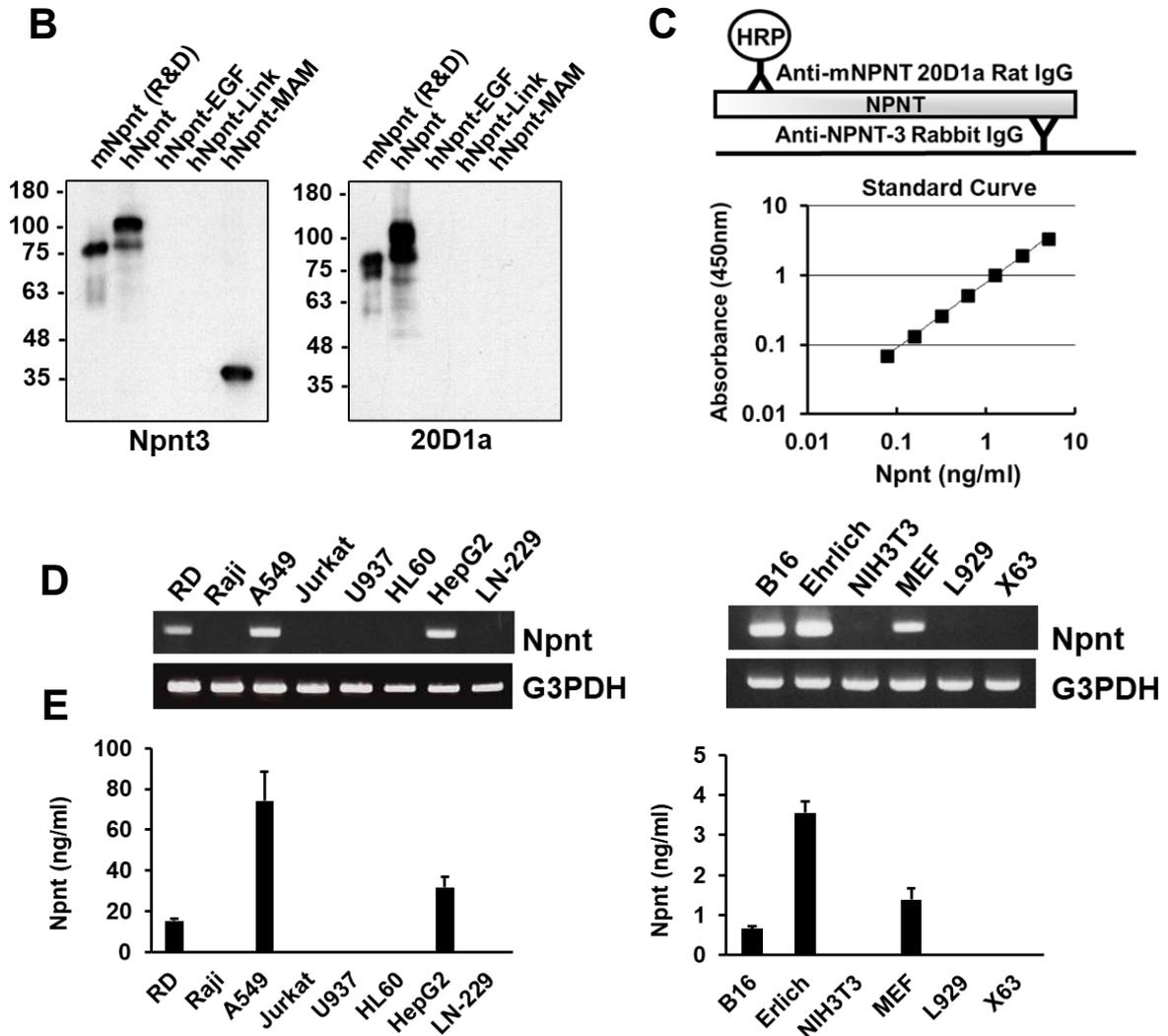


Fig. 9 Establishment of the sandwich ELISA system for Npnt

A. Schematic representation of Npnt and its mutants. Cell binding sequences (RGD sequences) in linker segment and the epitope in MAM domain of anti-Npnt3 antibody are indicated. B. Specificity of Npnt3 and 20D1a antibodies by western blotting. C. Diagram (upper panel) and standard curve (lower panel) of the ELISA. Recombinant mNpnt (R&D) protein was used as the standard. D. Expression of Npnt in cell lines by RT-PCR. Human or mouse cell lines were left or right panel, respectively. E. Detection of Npnt in supernatants from cell lines used in (C).

血漿および尿中の Npnt タンパク質の定量

Npnt サンドイッチ ELISA を用いて、正常マウスおよび健常人の血漿サンプルで Npnt 発現を測定した。その結果、マウスとヒト両方の Npnt を定量的に検出することができた。さらに、Npnt は腎臓に多く発現していることから、尿中 Npnt を測定した結果、マウス尿中では Npnt は検出されなかった一方で、ヒトの尿中においては Npnt を定量できた (Fig. 10A)。

さらに、自己免疫疾患モデルであるコンカナバリン A 誘導自己免疫性肝炎モデル (ConA 肝炎)、抗Ⅱ型コラーゲン抗体カクテル誘導関節炎 (CAIA)、実験的自己免疫性脳脊髄炎モデル (EAE) の疾患スコアが最大になった時に血漿を回収し、血中 Npnt 量を測定した。その結果、測定したすべての自己免疫疾患モデルの血中において、Npnt の発現量が有意に高値であることを見出した (Fig. 10B)。

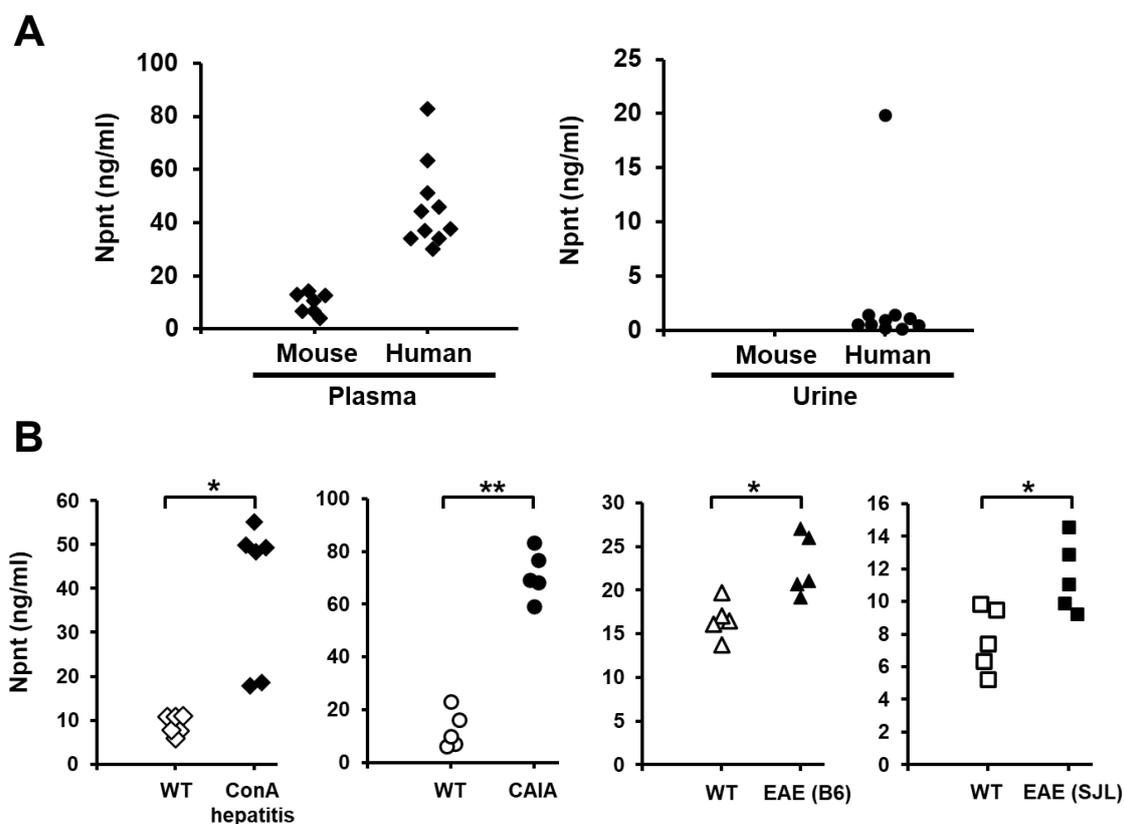


Fig. 10 Npnt in plasma and urine samples

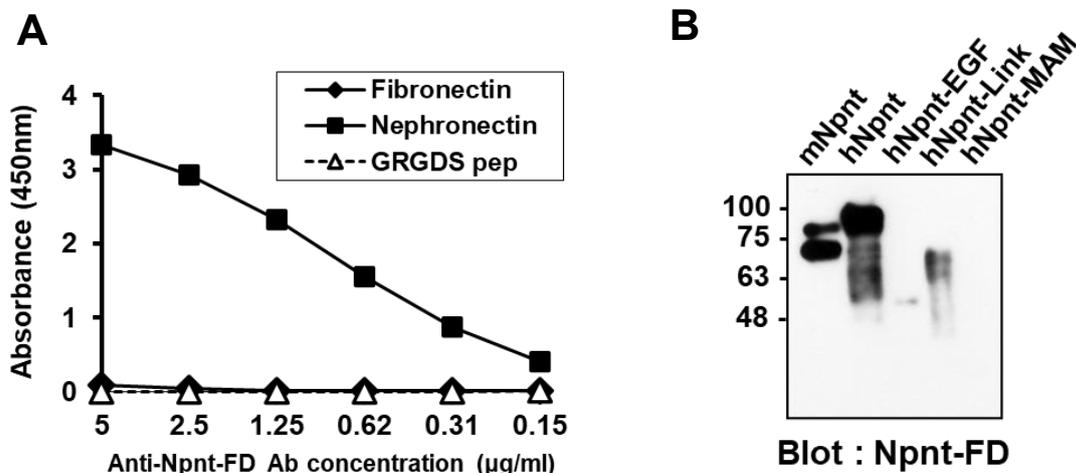
A. Npnt in plasma and urine samples from healthy mice and human. B. Npnt in plasma samples from various murine autoimmune diseases models. Plasma samples were tested on day when inflammation was exacerbated as follows, for ConA hepatitis, 24 hr after ConA injection; for CAIA, 7 days after LPS injection; for EAE, 14 days after MOG or PLP peptide immunization. * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$ versus plasma samples from wild-type mice.

Npnt に対する中和抗体の作製

Npnt 受容体である $\alpha 8\beta 1$ インテグリンとの Npnt 上の結合部位は、RGD 配列と LFEIFEIER 配列であることが報告されている [57]。そこで、両者を含む領域ペプチド P Q K P R G D V F I P R Q P T N D L F E I F E I E R (Npnt-FD ペプチド) を抗原として、ウサギに免疫し抗 Npnt-FD ポリクローナル抗体を作製した。RGD 配列は多くの細胞外マトリックスに共通して存在するため、作製した抗体のフィブロネクチンや GRGDS ペプチドとの交差性を抗原固相 ELISA で確認した。その結果、抗 Npnt-FD 抗体は、フィブロネクチンや GRGDS ペプチドには反応せず、Npnt にのみ反応する特異的抗体であることが分かった (Fig. 11A)。

さらに、抗 Npnt-FD 抗体の反応領域をウェスタンブロットで確認した結果、抗 Npnt-FD 抗体はマウスおよびヒト全長 Npnt と Npnt-FD ペプチドの配列を有するリンカーセグメントを認識した (Fig. 11B)。

次に、抗 Npnt-FD 抗体の Npnt に対する機能阻害効果を細胞接着阻害試験で検討した。その結果、 $\alpha 8\beta 1$ インテグリン結合領域であるリンカーセグメントとの接着は完全に阻害し、マウスおよびヒト全長 Npnt との接着については部分的であるものの、有意な阻害効果を有することが分かった (Fig. 11C)。一方で、RGD 配列を有する Npnt 以外の細胞外マトリックスであるフィブロネクチンやビトロネクチンとの接着は全く阻害しなかったことから (Fig. 11D)、抗 Npnt-FD 抗体は Npnt に特異的な中和抗体といえる。



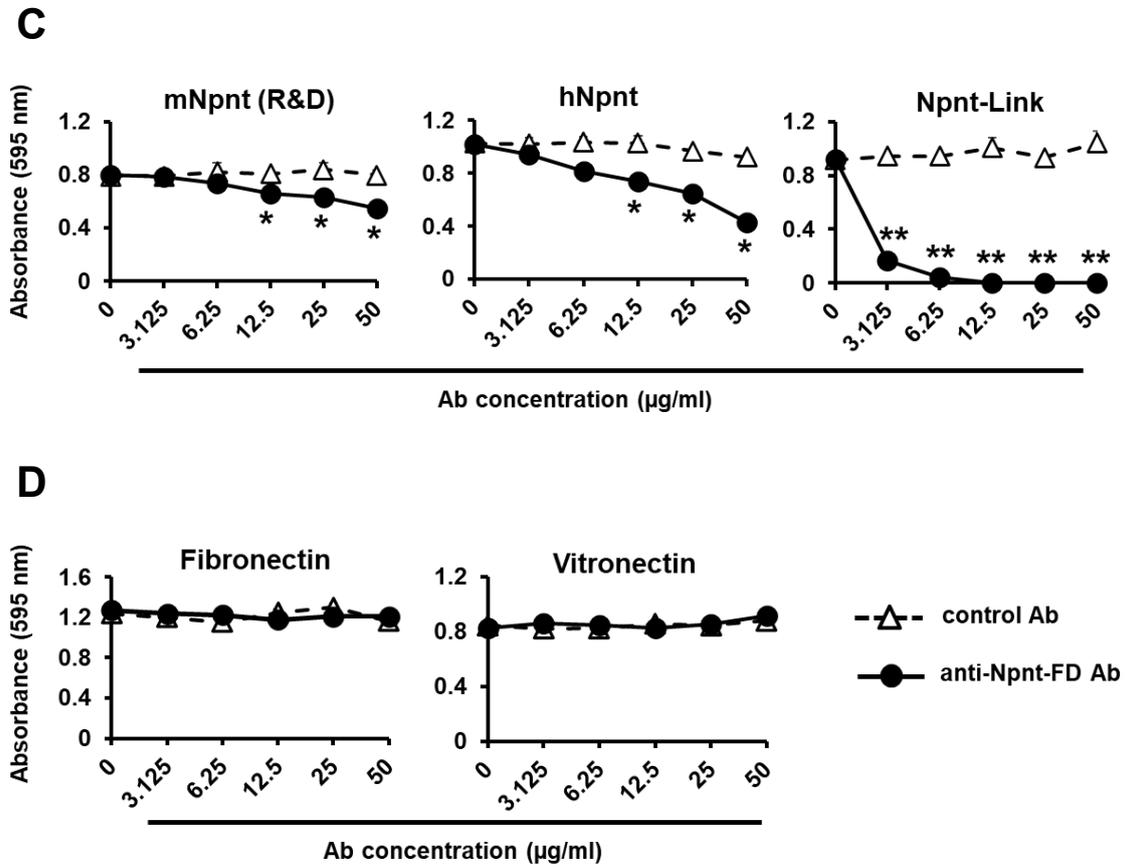
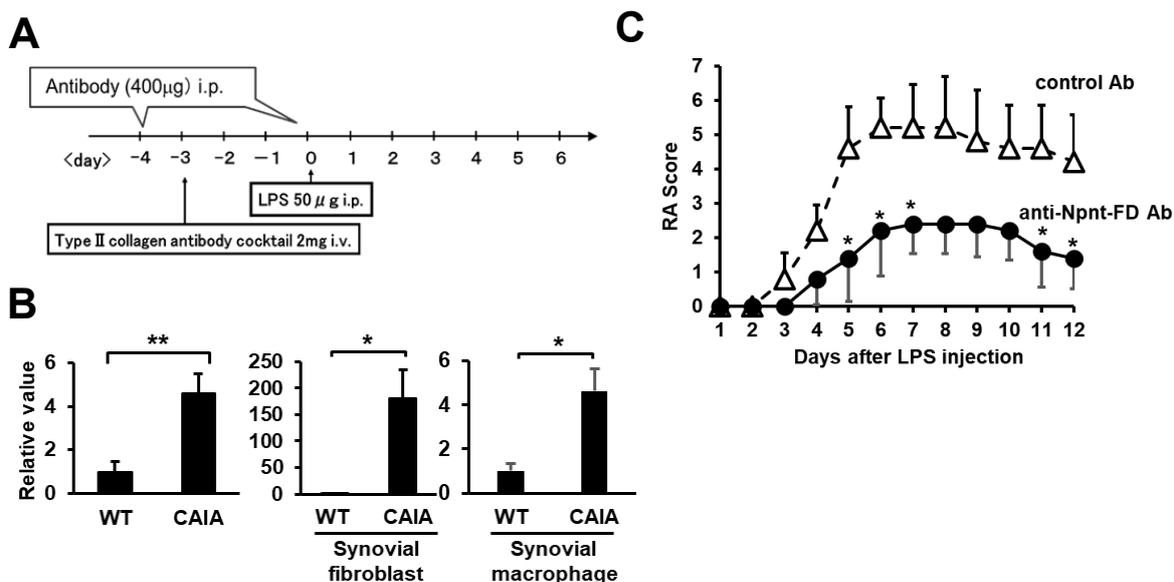


Fig. 11 Generation of neutralizing antibody for Npnt

A. Cross-reactivity of anti-Npnt-FD antibody to plate coated with Npnt, fibronectin, or GRGDS peptide-coupled with BSA (1 µg/ml) by direct ELISA. B. Specificity of anti-Npnt-FD antibody by western blotting. C-D. NIH3T3 cells were allowed to adhere to 96-well plates precoated with full-length of Npnt or Npnt-Link (C), fibronectin or vitronectin (D) in the presence of indicated concentrations of anti-Npnt-FD antibody. Normal rabbit IgG was used as a control antibody. Data are presented as mean ± SEM. * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$ anti-Npnt-FD antibody versus control antibody.

抗 Npnt-FD 抗体による抗Ⅱ型コラーゲン抗体カクテル誘導関節炎 (CAIA) 抑制効果

Npnt 受容体である $\alpha 8\beta 1$ インテグリンは OPN の受容体でもある [64]。OPN 欠損マウスや OPN 中和抗体を用いることで、関節リウマチモデルである CAIA の増悪抑制効果が報告されていることから [20, 34, 65]、Npnt も CAIA に関与すると予想した。そこで、CAIA に対する抗 Npnt-FD 抗体の効果を検討するために、抗Ⅱ型コラーゲン抗体カクテルを静脈内投与し、その3日後に LPS を腹腔内投与することで関節炎を発症させた。抗 Npnt-FD 抗体は、LPS 投与の4日前と0日に腹腔内投与を行った (Fig. 12A)。CAIA では、6日目に関節における Npnt mRNA が有意に上昇した (Fig. 12B)。また、関節由来滑膜線維芽細胞と滑膜マクロファージの増殖は関節リウマチ増悪化に密接に関与することから [66, 67]、関節の滑膜線維芽細胞と滑膜マクロファージの Npnt 発現を測定した結果、LPS 投与後6日目の関節由来滑膜線維芽細胞と滑膜マクロファージ両者において有意に Npnt の発現が亢進していることが分かった (Fig. 12B)。臨床スコアに関しては、抗 Npnt-FD 抗体投与により関節炎の発症を遅らせ、関節炎の重症度も大幅に軽減できることが分かった (Fig. 12C)。Fig. 12D に LPS 投与後7日目の前肢および後肢の写真を載せる。コントロール抗体投与マウスでは正常マウスと比較して関節炎が生じている。一方、抗 Npnt-FD 抗体投与マウスではコントロール抗体投与マウスと比較して関節炎が抑制できることが分かった。さらに、14日目の関節組織における抗 Npnt-FD 抗体の効果を、HE 染色およびサフラニン-O 染色により観察した。その結果、サフラニン-O 染色では、コントロール抗体投与の関節において関節軟骨プロテオグリカンが破壊され赤く染まらないのに対し、抗 Npnt-FD 抗体投与の関節ではプロテオグリカンの破壊が抑制され赤く染まっていることが分かった (Fig. 12F)。さらに、コントロール抗体投与マウスの関節では関節リウマチの特徴である滑膜線維芽細胞が増殖しているのに対し、抗 Npnt-FD 抗体投与マウスでは明らかに滑膜線維芽細胞の増殖が抑制されていることを HE 染色より見出した (Fig. 12G)。



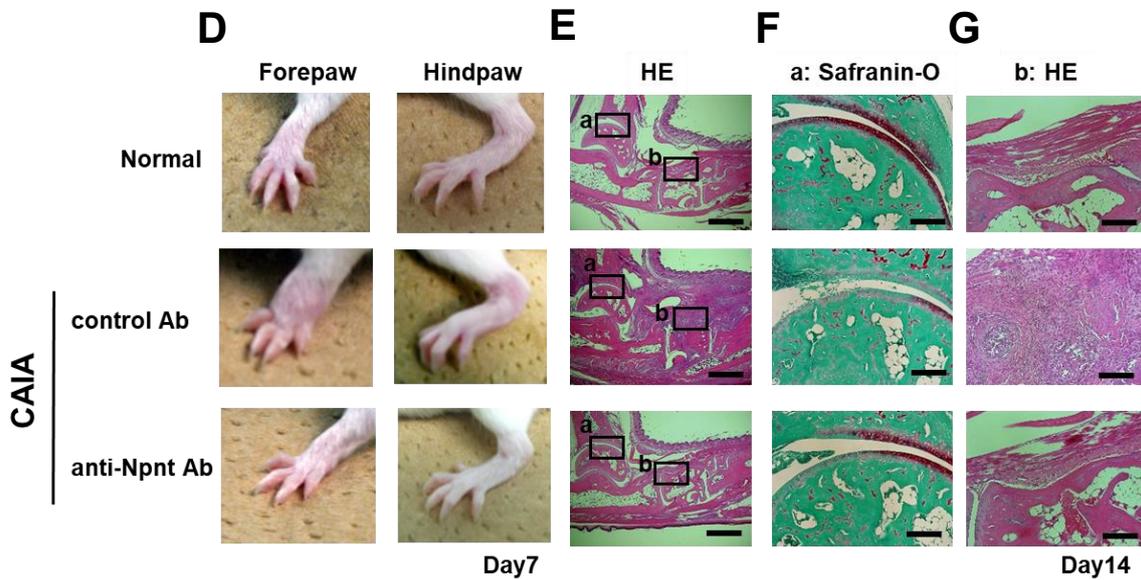


Fig. 12 Npnt neutralization by generated anti-Npnt-FD antibody ameliorates CAIA

A. Protocol for CAIA with anti-Npnt-FD antibody treatment. The antibody was administered into BALB/c mice on days -4 and 0 after LPS injection during CAIA induction. B. Npnt expression in arthritic joints on day 6, synovial fibroblasts, or synovial macrophages were evaluated by real-time PCR. C. Arthritis scores of arthritic mice treated with control antibody (rabbit IgG) or an anti-Npnt-FD antibody at the indicated time points (n=5 per group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, anti-Npnt-FD antibody versus control Ig. Data are presented as means \pm SEM. D. Representative images of gross appearances of the forepaw and hindpaw on day 7 are shown. E-G. Representative histology of normal joints and arthritic joints on day 14 from mice treated with control antibody or anti-Npnt-FD antibody. Sections were stained with hematoxylin and eosin (E, G) or Safranin-O (F). Magnified views of the boxed areas a and b were shown in F and G, respectively.

第4節 考察

本研究では、ヒトとマウス両方の脾臓において Npnt mRNA が高いレベルで発現していることを見出したことから、自己免疫疾患モデルにおける Npnt の発現および機能を明らかにすることを目的に研究を進めた。まず、自己免疫疾患モデルにおける Npnt タンパク質の発現を調べるために Npnt のサンドイッチ ELISA システムを構築し、各種自己免疫疾患モデルマウスの血中 Npnt を測定した。その結果、測定した全ての自己免疫疾患モデルの血中で Npnt 発現が亢進していることが分かった。特に、ConA 肝炎の血中 Npnt の発現に関しては、過去の報告の再現が得られた [63]。

Npnt は $\alpha 8\beta 1$ インテグリンの生理的なりガンドとして同定されたタンパク質である。自己免疫疾患モデルにおける Npnt の機能を明らかにするために、 $\alpha 8\beta 1$ インテグリンとの結合に重要とされる Npnt の RGD 配列と LFEIFEIER 配列を含む Npnt-FD ペプチドをウサギに免疫し、Npnt に対する中和抗体（抗 Npnt-FD 抗体）を作製した。この抗 Npnt-FD 抗体は、 $\alpha 8\beta 1$ インテグリンを内在的に発現している NIH3T3 細胞 [64]のマウスおよびヒト全長 Npnt への細胞接着を部分的にしか阻害できなかった。この結果は、Npnt は Npnt-FD ペプチド以外の領域にも細胞接着部位が存在することを示唆している。実際に、Npnt の EGF 様リピートと MAM ドメインはそれぞれヘパラン硫酸との結合と EGF 受容体の活性化に参与することが報告されている [58, 68]。抗 Npnt-FD 抗体は、リンカーセグメントと NIH3T3 細胞との接着は完全に阻害できることから、Npnt と $\alpha 8\beta 1$ インテグリン結合領域の受容体との相互作用を特異的に阻害する抗体であると考えられる。

$\alpha 8\beta 1$ インテグリンのリガンドの一つである OPN に対する中和抗体が、関節リウマチマウスモデルである CAIA の発症を阻害することが報告されている[34]。そこで、本研究では抗 Npnt-FD 抗体を用いて CAIA 増悪化への Npnt の関与を検討した。その結果、CAIA 関節では正常マウスと比較して有意に Npnt の発現が亢進していることが明らかになった。一般的に関節リウマチの関節局所では、線維芽細胞やマクロファージの異常増殖が認められ、それらの細胞から産生される腫瘍性壊死因子 (TNF) - α やインターロイキン (IL) - 1β などの様々な炎症性サイトカインの分泌により、リウマチの悪化が引き起こされると考えられている。今回の結果から、CAIA 関節由来の滑膜線維芽細胞およびマクロファージにおいて Npnt 発現が亢進していることが明らかになり、これらの細胞からの炎症性サイトカインの分泌に Npnt 上の PQKPRGDVFIPRQPTNDLFEIFEIER 配列と受容体の相互作用が重要であることを示唆する結果を得た。

RGD 認識インテグリンファミリーの一つである $\alpha 8\beta 1$ インテグリンは、平滑筋に多く発現し、腎臓の発達のみならず肝臓および肺の線維化において重要な役割を果たしていることが報告されている [15, 69-71]。本研究より、 $\alpha 8\beta 1$ インテグリンがヒトおよびマウスの脾臓に高度に発現していることから、 $\alpha 8\beta 1$ インテグリンが免疫応答において重要な役割を担っ

ている可能性が示唆された。CAIA モデルでは Npnt と $\alpha 8\beta 1$ インテグリンの結合が重要な役割を果たしていると考えられるものの、 $\alpha v\beta 3$ インテグリンなどの他の RGD 認識インテグリンが関与する可能性は排除できないため、さらなる検討が必要となる。

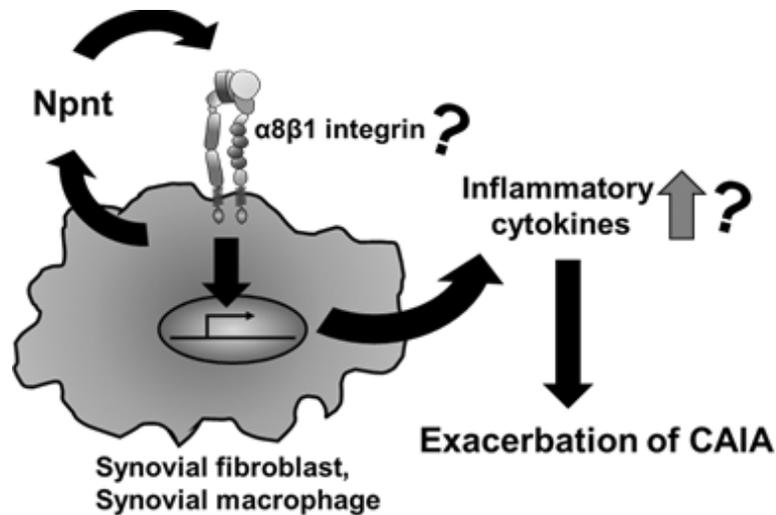
関節リウマチや多発性硬化症などの自己免疫疾患では、IL-17 産生ヘルパーT 細胞(Th17) が強く関与することが知られており [72]、Th17 分化に関しては $\alpha 8\beta 1$ インテグリンのような RGD 認識インテグリンよりも、 $\alpha 4$ や $\alpha 9$ インテグリンが重要な役割を担っている [73-76]。そのため、Npnt-FD ペプチド近傍に未知の $\alpha 4$ や $\alpha 9$ インテグリンとの接着領域が存在し、抗 Npnt-FD 抗体によるその接着阻害が CAIA モデルの有意な病態抑制に関わっている可能性も考えられ、今後の検討課題になると考えている。

第5節 小括

本章の検討より、以下の知見が得られた。

- 1 Npnt はマウス、ヒト両者とも脾臓に多く発現していた。
- 2 Npnt を特異的かつ定量的に検出できるサンドイッチ ELISA システムの構築に成功した。
- 3 各種自己免疫疾患モデルマウスの血中で Npnt の発現が亢進していた。
- 4 Npnt の中和抗体（抗 Npnt -FD 抗体）を作製し、抗体投与により CAIA 増悪化を抑制できることを明らかにした。

Npnt による CAIA 増悪化機構の予想図を以下に示す。



CAIA 増悪化が Npnt の中和抗体投与で抑制できたことから、Npnt の関節リウマチへの関与が強く示唆された。さらに、抗 Npnt-FD 抗体の抗原が $\alpha 8 \beta 1$ インテグリン結合配列を含むことから、CAIA に Npnt と $\alpha 8 \beta 1$ インテグリンの結合が関与していることも示唆された。

Npnt が関節リウマチモデルで発現亢進し関節炎の悪化に関与することから、今回作製した Npnt サンドイッチ ELISA が関節リウマチの診断ツールになりうる可能性や、Npnt が関節リウマチの新規治療標的になる可能性を見出すことができた。

第3章 ネフロネクチンによる実験的自己免疫性脳脊髄炎 増悪化機構の解明

第1節 序論

前章では、構築した Npnt サンドイッチ ELISA で、各種自己免疫疾患モデルにおいて血中 Npnt が発現亢進していることを明らかにした。さらに、Npnt の機能領域であり $\alpha 8 \beta 1$ インテグリン結合部位を含むペプチド P Q K P R G D V F I P R Q P T N D L F E I F E I E R を抗原とした Npnt を特異的に阻害する抗体（抗 Npnt-FD 抗体）を作製し、その抗体が CAIA 増悪化を抑制することを明らかにした [77]。

Npnt 発現が亢進した自己免疫疾患モデルの中には、多発性硬化症のマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）がある。EAE も CAIA と同じく Th17 が関与する疾患であることから [72]、Npnt が Th17 分化を介して EAE 増悪化に関与すると予想した。そこで、抗 Npnt-FD 抗体を用いて EAE への Npnt の関与を検討することにした。また、Th17 と分化経路が一部類似する免疫抑制性 T 細胞である制御性 T 細胞（Treg）分化に及ぼす Npnt の役割も調べる。

Th17 はヘルパー T 細胞の分化細胞であることから、本研究では EAE 増悪化におけるヘルパー T 細胞（CD4⁺ T 細胞）内における Npnt の機能を明らかにすることを目的に研究を進めた。

第2節 実験方法

実験動物

本研究で使用した C57BL/6 マウスは、福山大学研究安全倫理委員会（動物実験安全倫理部会）によって承認され（H29-動-6号）、文部科学省による動物の管理と使用に関するガイドラインに準拠して実験を行った。

細胞培養

浮遊性 293 細胞である 293F は、無血清培地である FreeStyle 293 Expression Medium を用いて、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。Npnt およびその領域変異体、SeP 遺伝子は 293F 細胞に Lipofectamine 2000 を用いて導入した。

LC-MS/MS 分析

His タグをつけた Npnt を導入した 293F 細胞を 4 日間培養し、回収した上清に Talon affinity beads (Takara) を添加し 4°C でローテート後にビーズを洗浄し、イミダゾールを含む TBS で結合タンパクを溶出した。溶出液を濃縮用カラムで 20 倍に濃縮した後、タンパクをウェスタンブロットで確認し、Npnt 結合分子を LC-MS/MS 分析で探索した。

実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデルの作製

8 週齢の C57BL/6 マウス（雌）の 0 日目に、中枢神経由来ペプチドであるミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質（MOG）35-55 ペプチド（MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK）と結核菌死菌を含む完全フロイントアジュバントとを等量混合することにより MOG ペプチド（0.5 mg/mL）のエマルジョンを作製し、マウス尾根部に皮下注射した（0.2 mg/匹）。併せて、0 日目と 2 日目にマウス 1 匹あたり 400 ng の百日咳毒素をマウス尾静脈内投与した。抗 Npnt-FD 抗体またはコントロールウサギ IgG は、MOG 免疫の 1 日前および 2 日後にマウス 1 匹あたり 400 µg の用量で腹腔内投与を行った。N-アセチルシステイン（NAC）（富士フィルム）は 1 匹あたり 3 mg の用量で腹腔内投与を毎日行った。

疾患の重症度は次のようにスコア付けを行い評価した。

- 0: 正常
- 0.5: 尾の軽度下。
- 1: 尾の完全下垂
- 1.5: 軽度の立ち直り反射異常
- 2: 歩行以上または不完全な立ち直り反射
- 2.5: 後肢不全麻痺
- 3: 後肢麻痺

3.5: 後肢麻痺を伴う後肢の完全脱。

4: 前肢および後肢麻痺

5: 瀕死

マウスは二重盲検法で採点を行った。

CD4⁺ T 細胞の分離

マウス脾臓を摘出した後、抗 CD4 抗体結合磁気ビーズ (IMag) (BD Bioscience) を用いて CD4⁺ T 細胞を分離した。分離後、フローサイトを用い CD4⁺ 画分を分析し、95%以上の精製度であることを確認後に CD4⁺ T 細胞として使用した。

脊椎からの単核細胞の分離は、MOG 免疫 2 週間後に脊椎を回収し調製を行った。回収した脊椎から脊髄組織を取り出したのち、外科用ハサミで細かく切断しコラゲナーゼ/ディスパーゼ (Roche) で細胞を分散させた後、Percoll (cytiva) で勾配分離を行った。37%と 70%の Percoll の中間相を回収し、IMag を用いて CD4⁺ T 細胞の分離を行った。

リアルタイム PCR

遺伝子導入した 293F 細胞や CD4⁺ T 細胞のトータル RNA は TRIzol を用いて抽出し、ランダムプライマーを使用し逆転写酵素 ReverTra Ace により cDNA を合成した。使用した PCR プライマーを Table IV に示す。内在性コントロール遺伝子として β -アクチンを用い比較定量法 ($\Delta\Delta C$ 法) を用いて相対比較を行った。

マウス Npnt 遺伝子のクローニング

B16 マウスメラノーマ細胞株から Table V で示したプライマーを使用して PCR にてマウス Npnt を伸長させ、pM-secSUMOstar ベクターに組み込み、配列を確認した。その後、293F 細胞にマウス Npnt 遺伝子導入し、培養上清を MagneHis 精製システム (Promega) により精製した。

セレノプロテイン P (SeP) タンパク質の精製

2 つの Selenocysteine insertion sequence (SECIS) 領域を含む SeP [78] は Table VI で示したプライマーを使用して、HepG2 細胞からクローニングを行い、pM-secSUMOstar ベクターに組み込み、配列を確認した。その後、293F 細胞に遺伝子導入し、培養上清を MagneHis 精製システムにより精製した。

Table IV Real-time PCR and cloning PCR primer sequences

Gene	Sequence of primers
human β -actin	5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3'
	5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3'
human Npnt	5'-GCTGGTATCCTCGCTCTACCT-3'
	5'-AGGCCAATCGATGACACTATTT-3'
human SeP	5'-TCATCAAGGAATCTCTTCTCG-3'
	5'-CAAGACGGCCACATCTATCA-3'
human GPx1	5'-CAACCAGTTTGGGCATCAG-3'
	5'-GTTACCTCGCACTTCTCG-3'
mouse β -actin	5'-TGACAGGATGCAGAAGGAGA-3'
	5'-CGCTCAGGAGGCAATG-3'
mouse Npnt	5'-GCGTCCTCGCTCTACCTG-3'
	5'-GGCCGATTGAAGAACTATTTG-3'
mouse SeP	5'-ATGACAGATGTGGCGTCTT-3'
	5'-GTGGTGGCTATGAGCCTCTG-3'
mouse GPx1	5'-CAGGAGAATGGCAAGAATGA-3'
	5'-GAAGGTAAGAGCGGGT GAG-3'
mouse IL-17	5'-TCCAGAAGGCCCTCAGACTA-3'
	5'-AGCATCTTCTCGACCCTGAA-3'
mouse IL-1 β	5'-TCCAGAAGGCCCTCAGACTA-3'
	5'-AGCATCTTCTCGACCCTGAA-3'
mouse ROR γ T	5'-ACCTCTTTTACGGGAGGA-3'
	5'-TCCCACATCTCCCACATTG-3'
mouse FoxP3	5'-TCAGGAGCCACCAGTACA-3'
	5'-TCTGAAGGCAGAGTCAGGAGA-3'

Table V Primer sequences for cloning of mNpnt

Gene	Sequence of primers
mNpnt	5'-TATTGAGGCTCATCGCGAACAGATTGGAGGTGACTTCGACGGGGGGTGGCCC-3'
	5'-ATGCCTGCAGGTGACACAGCAGCGACCTCTTTTCAA-3'

Table VI Primer sequences for cloning of SeP

Gene	Sequence of primers
SeP	5'-TATTGAGGCTCATCGCGAACAGATTGGAGGTATGTGGAGAAGCCTGGGGCTT-3'
	5'-ATGCCTGCAGGTGACCTAGTTTGAAGGTCATTCTCA-3'

共免疫沈降およびウェスタンブロット

抗 SeP 抗体 (AA3) [79] で免疫沈降し、SDS-PAGE そして転写後に抗 SeP 抗体 (BD3) [79] と抗 SUMO 抗体で検出した。

CD4⁺ T 細胞内における Npnt と SeP、GPx1 の検出はそれぞれ抗 Npnt 抗体 (20D1a)、抗 SeP 抗体 (BD3) および抗 GPx1 抗体 (ab22604) でウェスタンブロットを行った。

サンドイッチ ELISA

血漿中の Npnt は、前章で構築したサンドイッチ ELISA システム [77] を使用して定量を

行った。

血漿中および PMA（富士フィルム）とイオノマイシン（富士フィルム）で 4 時間刺激を行った CD4⁺ T 細胞の培養上清中の IL-17 は、IL-17 ELISA キット（Biolegend）のプロトコールに従い定量を行った。

Npnt-SeP 複合体の検出用サンドイッチ ELISA システムの構築

96 ウェルプレートに補足抗体として抗 SeP 抗体（AA3）5 μg/mL を固相し、検出抗体はペルオキシダーゼ標識キットを使用して HRP で標識した抗 Npnt モノクローナル抗体(20D1a) を 2 ng/mL の濃度で使用した。ELISA 反応は Can Get Signal（TOYOBO）を使用し、メーカーのプロトコールに従って行った。

CD4⁺ T 細胞の培養上清中の Npnt-SeP 複合体レベルの検出は、EAE 由来 CD4⁺ T 細胞を PMA およびイオノマイシンで 4 時間刺激後の培養上清を使用した。

フローサイトメトリー解析

293F 細胞と CD4⁺ T 細胞は抗 α8β1 インテグリン抗体（YZ26）（富士フィルム）と氷上で 20 分間放置し、洗浄後、二次抗体として PE 標識抗マウス IgG 抗体（Biolegend）と反応させた。同一の抗体サブクラスのコントロール抗体（mIgG）（MG1-45）（Biolegend）をネガティブコントロールとして使用した。

IL-17 のフローサイトメトリー解析は、CD4⁺ T 細胞をプレフェルディン A（Biolegend）存在化で PMA およびイオノマイシンで 4 時間刺激し、Biolegend 社のプロトコールに従って Cyto-Fast Fix/perm Buffer Set（Biolegend）を使用して固定および透過処理を行った。FoxP3 染色は、Biolegend 社のプロトコールに従って True-Nuclear Transcription Factor Buffer（Biolegend）を使用して行った。分画（ゲート）領域は、サブクラス一致のコントロール抗体（RTK201、RTK2758 および RTK4530）（Biolegend）で染色したサンプルを使用して決定した。ROS 染色はメーカーのプロトコールに従って CellROX Green Flow Cytometry Assay kit（Thermo Fisher）を用いて行った。

組織染色

マウス脊椎は MOG 免疫 2 週間後に回収し、10% ホルムアルデヒドで固定し、パラフィンで包埋した。得られたパラフィン包埋切片は、炎症を可視化する HE 染色および脱髄を可視化するためにルクソールファストブルー染色（LFB）染色を行った。

統計処理

実験のデータは平均値±標準誤差（SEM）で示した。グループ間の有意差検定は Student's t-test または Kruskal-Wallis test の両側検定を行い、*P* 値が 0.05（*）、0.01（**）、0.001（***）未満で有意差ありとした

第3節 結果

EAE に及ぼす抗 Npnt-FD 抗体の影響

前章で、EAE マウス血漿中で Npnt 発現が亢進していることを示したが、本研究でも再現を得るために Npnt 発現を経時的に測定した。MOG 免疫後 1、3、5、7、10、14 日後の EAE マウスから血漿を回収し、ELISA により Npnt の定量を行った (Fig. 13A)。その結果、MOG 免疫の 3 日後から Npnt 発現が亢進することが分かった。次に、Npnt の中和抗体である抗 Npnt-FD 抗体を用いて、Npnt が EAE の増悪化に関与しているかを臨床スコアにて比較した。その結果、抗 Npnt-FD 抗体の投与により、EAE の臨床スコアは MOG 免疫 17 日後から有意に抑制できた (Fig. 13B)。さらに、EAE の血中 Npnt の発現亢進は、抗 Npnt-FD 抗体投与により抑制できることが分かった (Fig. 13C)。

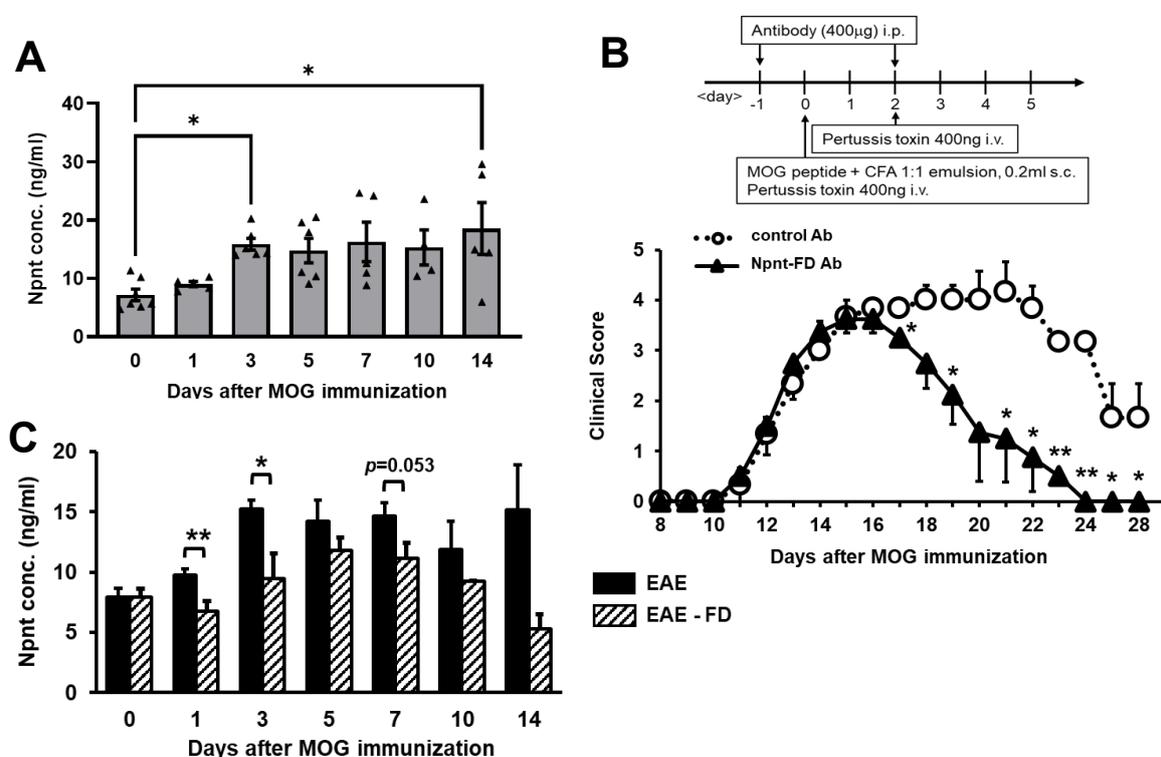


Fig. 13 Effect on EAE of Npnt neutralization by the anti-Npnt-FD antibody

A. Npnt concentration in plasma samples from EAE mice. $*P < 0.05$ versus 0 day after MOG immunization. B. Protocol for EAE induction with anti-Npnt-FD antibody treatment (upper panel). Disease severity scores of the EAE mice treated with control antibody (rabbit IgG) or the anti-Npnt-FD antibody at the indicated timepoints (lower panel). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ versus control antibody. C. Npnt concentration in plasma samples from EAE mice treated with the anti-Npnt-FD antibody (FD) or control antibody. Data are presented as means \pm SEM. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ for control antibody versus anti-Npnt-FD antibody.

Npntの新規結合分子の探索とセレノプロテイン P (SeP) の同定

NpntによるEAE増悪化機構を解明するために、Npntの新規結合分子の探索を行った。 $\alpha 8\beta 1$ インテグリンを内在的に発現する293F細胞 (Fig. 14A) にNpnt遺伝子を導入し、その培養上清からNpntタンパク質を精製し、質量分析解析を行った、その結果、Npnt結合分子として多くの候補分子を見出した。その中でEAE増悪化に関与する可能性のあるNpntの新規結合分子としてセレノプロテイン P (SeP) に着目した (Fig. 14B)。SePはT細胞増殖に関与し [80, 81]、生体内において組織のセレン輸送体として作用するセレノシステインを含む分泌型糖タンパク質である [82]。また、セレンは $CD4^+$ T細胞の活性化や分化に関与する [83]。これらの理由から、NpntとSePの結合は自己免疫疾患に関与する可能性を考えた。

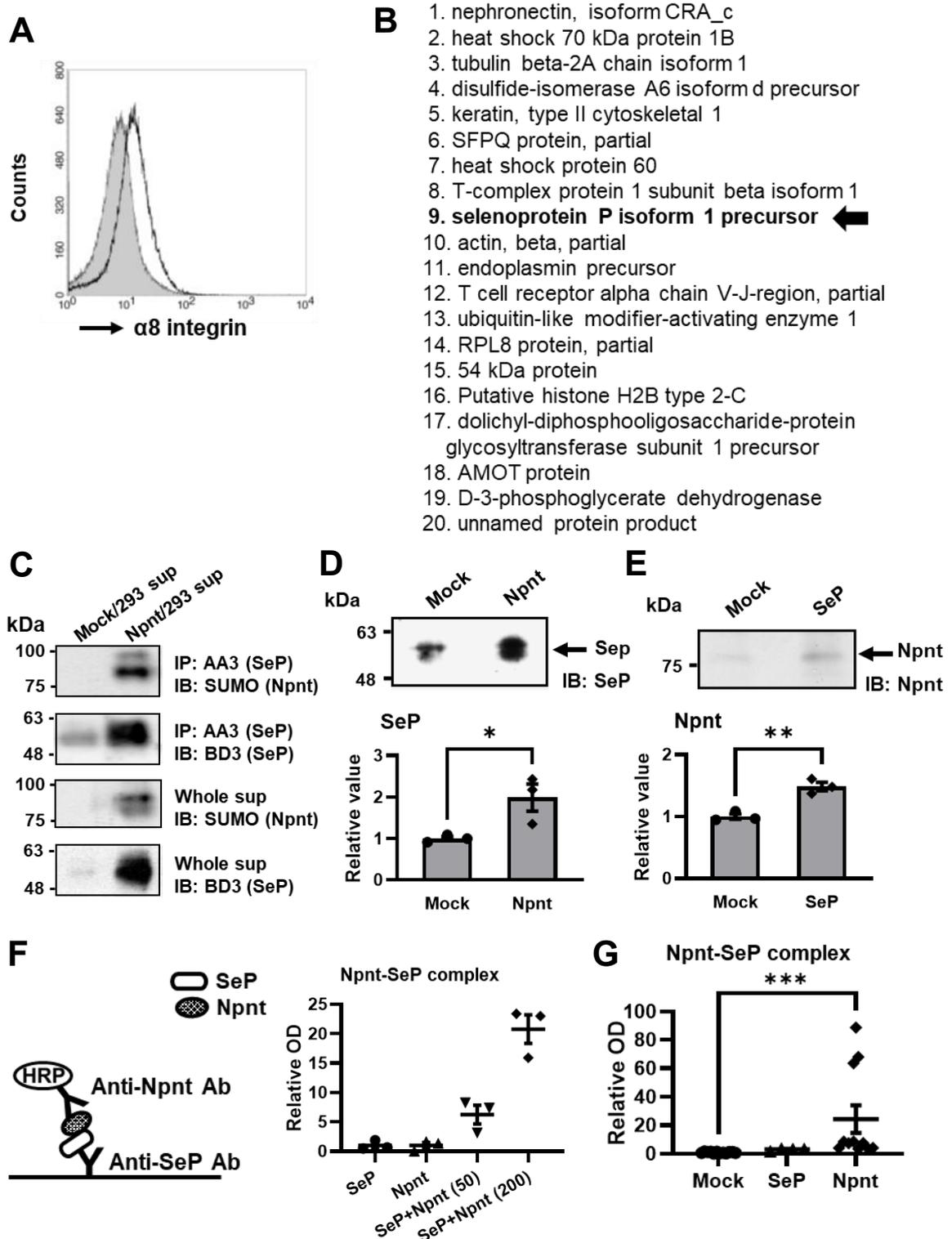
まず、NpntとSePの相互作用を確認するために、内在的にSePを発現する293F細胞 [84] にSUMOタグを付加させたNpnt遺伝子を導入し、その培養上清を用いて共免疫沈降を行った。空ベクターまたはNpnt遺伝子を導入した293F細胞の培養上清を抗SeP抗体で免疫沈降させた後に、抗SUMO抗体でNpntを検出した。その結果、空ベクター導入細胞の培養上清のSePとの免疫沈降物ではNpntは検出されなかったが、Npnt遺伝子導入細胞の培養上清から得たSePとの免疫沈降物ではNpntを検出することができた (Fig. 14C)。興味深いことに、Npnt遺伝子導入を行った293F細胞の培養上清中 (Whole sup) には空ベクターを導入した293F細胞の培養上清よりも多くのSePが分泌されていることが分かった。そこで、NpntがSePの発現に影響を与える可能性を考え、リアルタイムPCRおよびウェスタンブロットにより解析した。その結果、Npnt遺伝子導入によりSePの発現を亢進させ (Fig. 14D)、さらにSeP遺伝子導入によりNpntの発現を亢進させることも分かった。 (Fig. 14E)

培養上清中でNpntとSePが直接的に結合していることを確認するために、NpntとSePの複合体を検出するサンドイッチELISA (Npnt-SeP複合体ELISA) を構築した。NpntとSePのそれぞれのリコンビナントタンパク質を用いた解析から、Npnt-SeP複合体ELISAはNpntとSePを混合させた場合のみ検出でき、それぞれ単独の場合は検出しなかった。この結果から、Npnt-SeP複合体ELISAはNpnt-SeP複合体を特異的に検出できるサンドイッチELISAであることが分かった (Fig. 14F)。そこで、Npnt-SeP複合体ELISAを用いて、空ベクター、SeP遺伝子およびNpnt遺伝子を導入した293F細胞の培養上清中のNpnt-SeP複合体を検出した。その結果、Npnt遺伝子を導入した293F細胞の培養上清においてNpnt-SeP複合体が有意に増加していることが分かった (Fig. 14G)。

293F細胞の培養上清中にリコンビナントNpntを添加しても、48時間後にSePの発現が亢進することも分かった (Fig. 14H)。セレンの添加またはSePの導入はグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) の主なアイソフォームであるGPx1の発現を誘導することが知られている [85-87]。Npntによって誘導されるSePの発現亢進が、SePの下流分子の発現に影響を与えるのかを明らかにするために、GPx1の発現量をリアルタイムPCRで測定した。その結果、リコンビナントNpntの添加によってSePのみならずGPx1のmRNAも上昇した。さらに、リコンビナントNpnt添加によるSePおよびGPx1の発現亢進は抗Npnt-FD抗体を加え

ることで抑制できることが分かった (Fig. 14H)。

これらの結果から、Npnt と SeP は複合体を形成し、ポジティブフィードバック機構を介して SeP シグナルを増強させていることを明らかにすることができた。



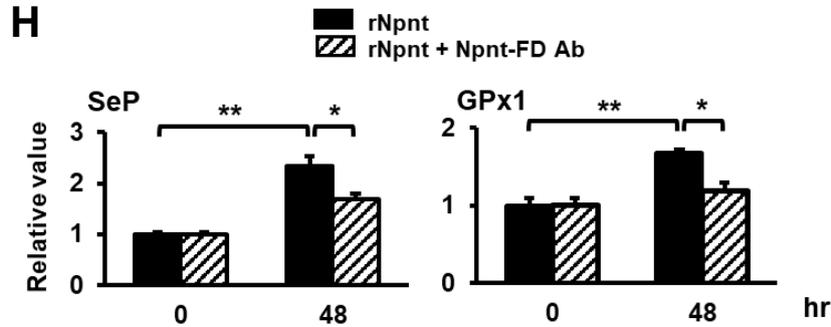


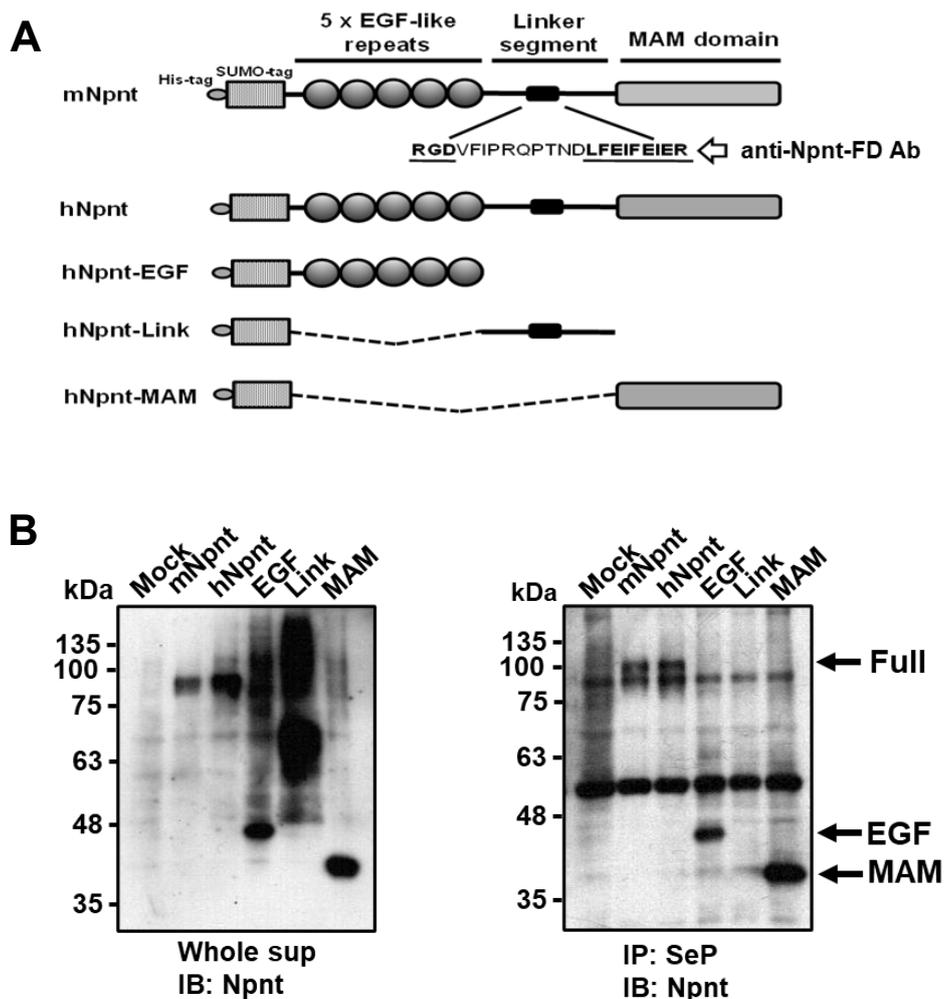
Fig. 14 Association of Npnt with SeP

A. Surface expression of $\alpha 8$ integrin on 293F cells. B. LC-MS/MS results indicating that selenoprotein P isoform 1 precursor (No.9, in bold) is a candidate Npnt-binding protein. C. supernatant from 293F cells transfected with Npnt for 48 h was immunoprecipitated using anti-SeP (AA3) antibody. The precipitated proteins were then separated by SDS-PAGE and blotted with anti-SUMO or anti-SeP (BD3) antibody. The whole supernatant were immunoblotted with anti-SUMO or BD3 antibody. D. Western blot analysis of SeP in culture supernatant from 293F cells transfected with Npnt for 48 h (upper panel). Relative mRNA expression level of SeP in 293F cells expressing control empty vector (Mock) or Npnt at 48 h post-transfection (lower panel). E. Western blot analysis of Npnt in culture supernatant from 293F cells transfected with SeP for 48 h (upper panel). Relative mRNA expression level of Npnt in 293F cells expressing Mock or SeP at 48 h post-transfection (lower panel). F. Diagram of the ELISA system used to detect the Npnt–SeP complex (left panel), and characterization of this ELISA system (right panel). Detection of the Npnt–SeP complex, but not SeP or Npnt alone, using the Npnt–SeP complex ELISA detection system. G. Absorbance in the supernatant of 293F cells transfected with SeP or Npnt, as compared with Mock-expressing 293F cells. H. Relative transcription levels of SeP (left panel) and GPx1 (right panel) in 293F cells treated with Npnt recombinant protein (100 ng/mL) in the presence or absence of the anti-Npnt-FD antibody (10 mg/mL) were determined by real-time PCR analysis. Data are presented as means \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Npnt 上の SeP 結合領域と SeP シグナル伝達に関わる機能領域の同定

本研究で作製した Npnt とその変異体構造を示す (Fig. 15A)。ヒト、マウスの全長 Npnt とヒト Npnt 変異体の遺伝子を導入した 293F 細胞の培養上清のウェスタンブロット解析から、それぞれのタンパク質が精製できていることを確認した (Fig. 15B left panel)。リンカーセグメントがスメアになっているが、これは以前の報告と一致している [77]。次に、抗 SeP 抗体で免疫沈降後に抗 Npnt 抗体で検出した結果、EGF 様リピートと MAM ドメインが SeP との結合に関与する領域であることが分かった。同時に、ヒトのみならずマウス Npnt も SeP と結合することも分かった (Fig. 15B right panel)。

Npnt 内の SeP シグナルの伝達に関わる機能領域を明らかにするため、各ドメインの遺伝子を導入した 293F 細胞の SeP および GPx1 の遺伝子発現をリアルタイム PCR で測定した。その結果、全長 Npnt と MAM ドメインの遺伝子導入細胞の SeP と GPx1 発現が亢進しており、Npnt 上の SeP シグナル伝達に関わる機能領域は MAM ドメインであることが分かった (Fig. 15C)。



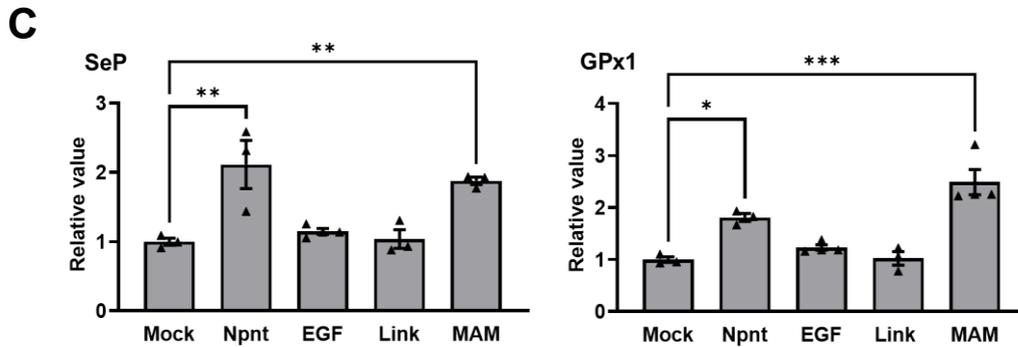


Fig. 15 Identification of the Npnt functional region for SeP upregulation

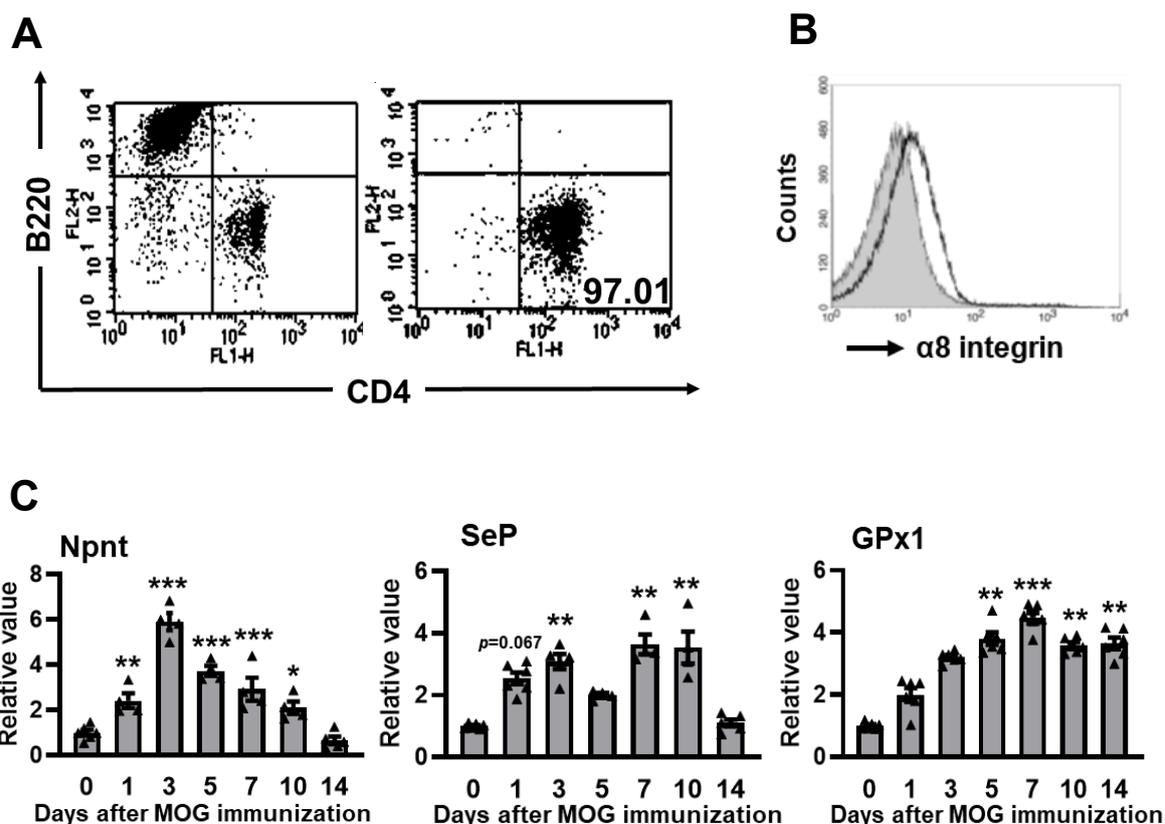
A. Schematic representation of Npnt and its truncated variants. The epitope of the anti-Npnt-FD antibody in the linker segment is indicated. B. Supernatant from 293F cells transfected with the indicated expression vectors at 48 h was subjected to immunoprecipitation using anti-SeP (AA3) antibody, and SeP-bound Npnt or its variants were detected by anti-SUMO antibody. C. Relative transcription levels of SeP and GPx1 in 293F cells transfected with Npnt or its variants at 48 h were determined by real-time PCR analysis. Data are presented as means \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

EAE における CD4⁺ T 細胞内の Npnt、SeP および GPx1 の発現変化

EAE は Th17 依存性の自己免疫疾患モデルとして知られている。そこで、抗 Npnt-FD 抗体投与有無の EAE マウスの脾細胞から CD4⁺ T 細胞を分離し研究を進めた。本研究で使用した CD4⁺ T 細胞は、分離後のフローサイトメトリー解析から 95%以上の精製度であることを確認し実験に使用した (Fig. 16A)。得られた CD4⁺ T 細胞は Npnt のリガンドである $\alpha 8$ インテグリンを発現していることも確認した (Fig. 16B)。

EAE における CD4⁺ T 細胞内の Npnt、SeP および GPx1 の発現をリアルタイム PCR で測定した結果、Npnt は EAE マウスの血中と同様に発現亢進しており、SeP と GPx1 も発現亢進していた (Fig. 16C)。また、その発現亢進は抗 Npnt-FD 抗体投与により抑制できることも分かった (Fig. 16D)。ウェスタンブロット解析からも同様の結果を得た (Fig. 16E)。

次に、構築した Npnt-SeP 複合体 ELSA を用いて、EAE マウスの CD4⁺ T 細胞を PMA とイオノマイシンで刺激した培養上清中の Npnt-SeP 複合体を測定した。その結果、EAE マウスの CD4⁺ T 細胞の培養上清では、Npnt-SeP 複合体量が増加しており、抗 Npnt-FD 抗体を投与した EAE マウスの培養上清では Npnt-SeP 複合体量の増加が抑制されることが分かった (Fig. 16F)。血中の Npnt-SeP 複合体量も同様の結果を得た (Fig. 16G)。



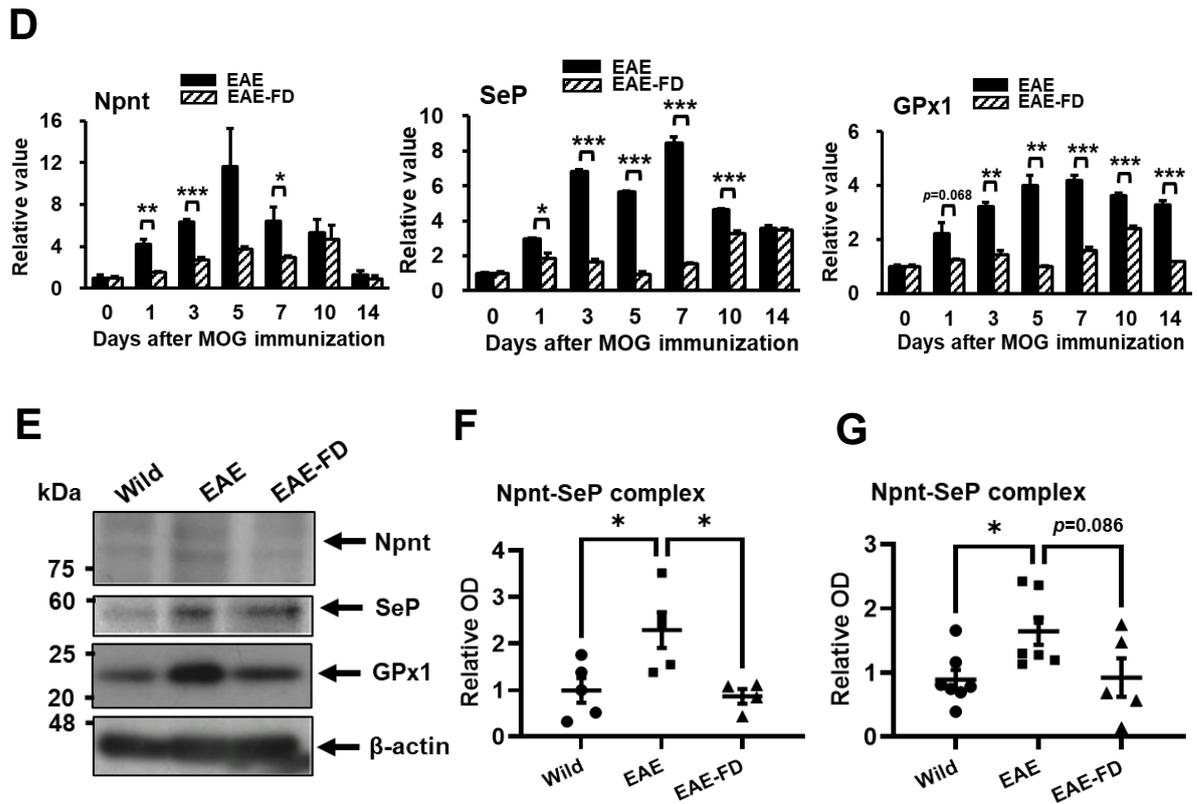


Figure. 16 Expression of Npnt, SeP, and GPx1 in CD4⁺ T cells from the splenocytes of EAE mice

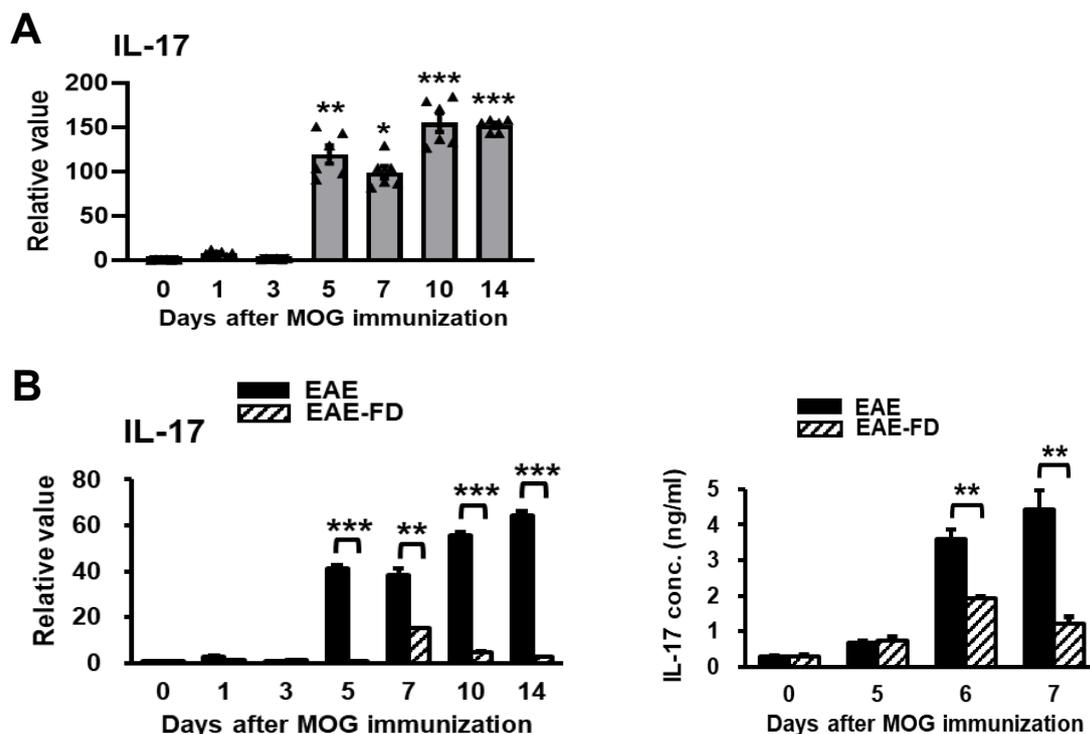
A. CD4⁺ T cells isolation. B. Surface expression of $\alpha 8$ integrin on CD4⁺ T cells. C. Relative transcription levels of Npnt, SeP, and GPx1 in CD4⁺ T cells from EAE mice at the indicated days after MOG immunization were determined by real-time PCR analysis. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. versus 0 day after MOG immunization. D. Relative transcription levels of Npnt, SeP, and GPx1 in CD4⁺ T cells from EAE mice treated with control antibody or anti-Npnt-FD antibody (FD) as described in Fig. 1B. E. Western blot analysis of Npnt, SeP, and GPx1 expression in CD4⁺ T-cell lysates from EAE mice on day 7 after MOG immunization. F. Absorbance levels from an ELISA for Npnt-SeP complex detection performed on the supernatant of CD4⁺ T cells from EAE mice (day 7) that were treated with the anti-Npnt-FD antibody or a control antibody. G. Absorbance levels from an ELISA for Npnt-SeP complex detection performed on plasma samples from EAE mice (day 7) that were treated with the anti-Npnt-FD antibody or a control antibody. Data are presented as means \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Th17 分化に及ぼす抗 Npnt-FD 抗体投与の影響

Th17 は IL-17 産生ヘルパー T 細胞であることから、EAE 増悪化における CD4⁺ T 細胞の IL-17 の経時的発現を測定した。IL-17 の発現は MOG 免疫 5 日後に有意に亢進し、14 日後まで高発現を維持した (Fig. 17A) この結果から、Th17 分化は MOG 免疫約 5 日後から始まると推測した。次に、抗 Npnt-FD 抗体投与の EAE における CD4⁺ T 細胞の IL-17 発現をリアルタイム PCR、ELISA およびフローサイトメトリーにより検討した、その結果、EAE における IL-17 の発現亢進は抗 Npnt-FD 抗体の投与により抑制できることが全ての解析系で確認できた (Fig. 17B, C)。また、Th17 の転写因子であるレチノイン酸受容体関連オーファン受容体 (ROR) γ T も、抗 Npnt-FD 抗体投与により抑制できることが分かった (Fig. 17D)。

IL-1 β は病理性 Th17 への移行に重要なサイトカインとして知られている [88]。CD4⁺ T 細胞の IL-1 β 発現をリアルタイム PCR で測定した結果、抗 Npnt-FD 抗体投与により IL-1 β の発現も抑制されることが分かった (Fig. 17E)。これらの結果から、抗 Npnt-FD 抗体は Th17 分化を抑制し、さらに病理性 Th17 への移行も抑制できる可能性を見出した。

制御性 T 細胞 (Treg) は EAE を含む様々な自己免疫疾患を抑制する免疫抑制性 T 細胞である。Th17 と Treg は類似する分化様式であることから [89]、抗 Npnt-FD 抗体投与による Treg 分化への影響を検討した。Treg の転写因子であるフォークヘッドボックス転写因子 (FoxP3) の発現レベルをリアルタイム PCR 及びフローサイトメトリーで解析した結果、FoxP3 発現は MOG 免疫 5 日後から有意に抑制されていた (Fig. 18A)。さらに、抗 Npnt-FD 抗体投与により MOG 免疫 7 日後で FoxP3 の発現抑制を阻害できることが分かった (Fig. 18B, C)。



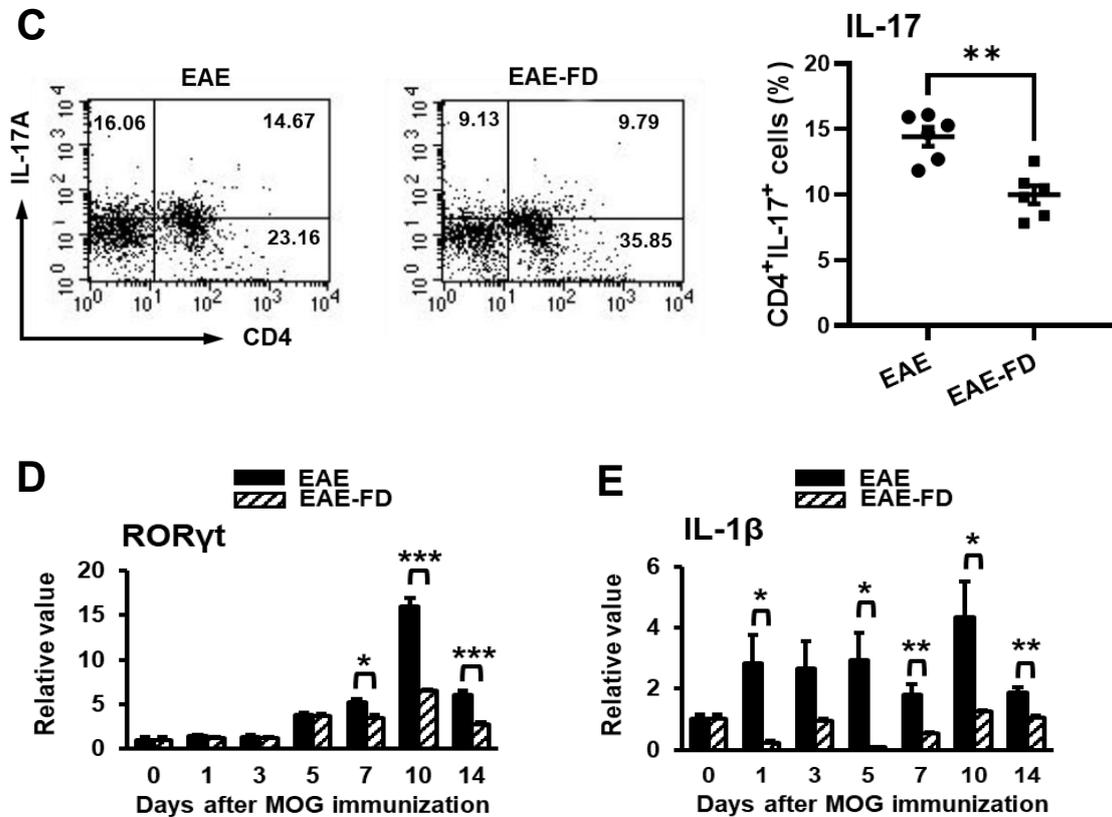


Figure. 17 Effect of anti-Npnt-FD antibody treatment on Th17 differentiation

A. Relative mRNA expression level of IL-17 in CD4⁺ T cells from EAE mouse splenocytes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus 0 day after MOG immunization. B. Relative transcription levels of IL-17 in CD4⁺ T cells from anti-Npnt-FD antibody (FD)-treated or control antibody-treated mice at the indicated days after MOG immunization were determined by real-time PCR analysis (left panel). IL-17 production in the supernatant from CD4⁺ T cells stimulated with PMA and ionomycin for 4 h was determined by ELISA analysis (right panel). C. Flow cytometric analysis of IL-17 production in CD4⁺ T cells stimulated with PMA and ionomycin for 4 h in the presence of brefeldin A. Percentage of Th17s (CD4⁺ IL-17⁺ cells) in the spleens of EAE mice treated with control antibody or the anti-Npnt-FD antibody. D-E. Relative mRNA expression level of RORγt (D) or IL-1β (E) in CD4⁺ T cells from the splenocytes of EAE mice treated with control antibody or the anti-Npnt-FD antibody. Data are presented as means ± SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; $n = 3-6$ in each group; Kruskal-Wallis test (A, B, D, and E) or Student's t test (C). Data are representative of at least three independent experiments with similar results.

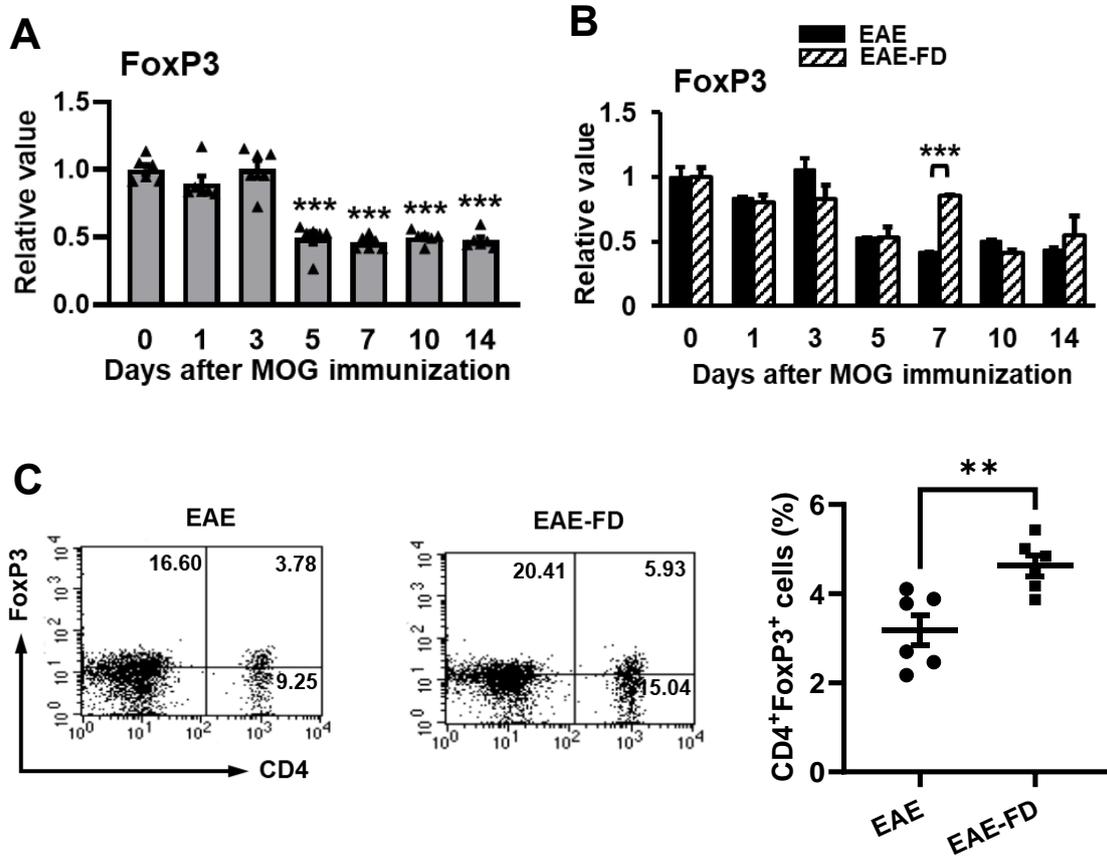


Figure.18 Effect of anti-Npnt-FD antibody treatment on Treg differentiation.

A. Relative FoxP3 mRNA expression level in CD4⁺ T cells from the splenocytes of EAE mice. *** $P < 0.001$ versus 0 day after MOG immunization. B. relative FoxP3 mRNA expression level in CD4⁺ T cells from the splenocytes of EAE mice treated with control antibody or the anti-Npnt-FD antibody (FD). *** $P < 0.001$ versus 0 day after MOG immunization. C. Flow cytometric analysis of FoxP3 production in CD4⁺ T cells from EAE mice. Percentage of Tregs (CD4⁺ FoxP3⁺ cells) in the spleens of EAE mice treated with control antibody or the anti-Npnt-FD antibody. Data are presented as means \pm SEM. ** $P < 0.01$. $n = 3-6$ in each group; Kruskal-Wallis test (A and B) or Student's t test (C). Data are representative of at least three independent experiments with similar results.

EAE に及ぼす活性酸素種 ROS の影響

GPx1 は活性酸素種 ROS の分解除去に関わる抗酸化酵素である。EAE マウスの CD4⁺ T 細胞内で GPx1 発現が亢進することから (Fig. 16C)、EAE の CD4⁺ T 細胞内では ROS レベルが低下していると予想した。そこでフローサイトメトリーを用い、野生型マウスおよび EAE マウスの 5 日目の CD4⁺ T 細胞における細胞内 ROS レベルを測定した。その結果、予想通り野生型マウスと比較して EAE マウスの CD4⁺ T 細胞の ROS レベルは低下しており、さらに抗 Npnt-FD 抗体投与マウスでは低下した ROS レベルが正常レベルまで回復することが明らかになった (Fig. 19A)。

ROS レベルの低下は Th17 分化を促進させるという報告がある [90, 91]。本研究では、抗 Npnt-FD 抗体投与は Th17 分化を抑制し、尚且つ低下した ROS レベルを正常レベルまで戻すことを見出している。そこで、この ROS レベルの正常化が Th17 分化抑制に関与しているかを明らかにするために、ROS スカベンジャーである N-アセチルシステイン (NAC) を用いて検討した。リアルタイム PCR および ELISA を用いて解析した結果、NAC 投与は抗 Npnt-FD 抗体投与で抑制できた IL-17 産生を亢進させ (Fig. 19B, C)、ROR γ T mRNA 発現も同様の結果を得られた (Fig. 19D)。さらに、抗 Npnt-FD 抗体投与で亢進した FoxP3 発現を NAC 投与により阻害されることが分かった (Fig. 19E)。これらの結果から、Npnt-SeP-GPx1 軸によって誘導される ROS レベルの低下が、Th17 分化促進と Treg 分化抑制を引き起こすことを示唆する結果を得た。

さらに、抗 Npnt-FD 抗体による EAE 増悪化抑制効果における NAC の影響を調べるために、脊椎の HE 染色および LFB 染色を用いた組織学的解析を行った。HE 染色は炎症細胞の浸潤、LFB 染色は脱髄が確認できる染色法である。その結果、抗 Npnt-FD 抗体投与による脊椎内への炎症細胞浸潤抑制効果は、NAC 投与により阻害されることが HE 染色から分かった。さらに、LFB 染色から抗 Npnt-FD 抗体投与による脱髄箇所の減少が、NAC 投与で増加されることも分かった (Fig. 20A)。

Npnt による中枢神経系の CD4⁺ T 細胞分化に与える影響を解析するために、抗 Npnt-FD 抗体投与と NAC 投与有無の EAE 脊椎から CD4⁺ T 細胞を分離し、IL-17、ROR γ T および FoxP3 の発現をリアルタイム PCR で測定した。その結果、抗 Npnt-FD 抗体投与による IL-17 および ROR γ T の発現抑制は NAC 投与により阻害されることが分かった (Fig. 20B, C)。さらに、抗 Npnt-FD 抗体により亢進した FoxP3 の発現亢進も NAC 投与により阻害されることが分かった (Fig. 20D)。

最後に、EAE 病態への影響を確認するために、EAE 増悪化における NAC 投与の影響を臨床スコアから解析した。その結果、抗 Npnt-FD 抗体投与による EAE 増悪化抑制効果は NAC 投与により有意に遮断できることを見出した (Fig. 21)。これらの結果から、Npnt は ROS レベルの低下を介して、Th17 分化の亢進と Treg 分化を抑制させることで EAE 増悪化に関与していることが分かった。

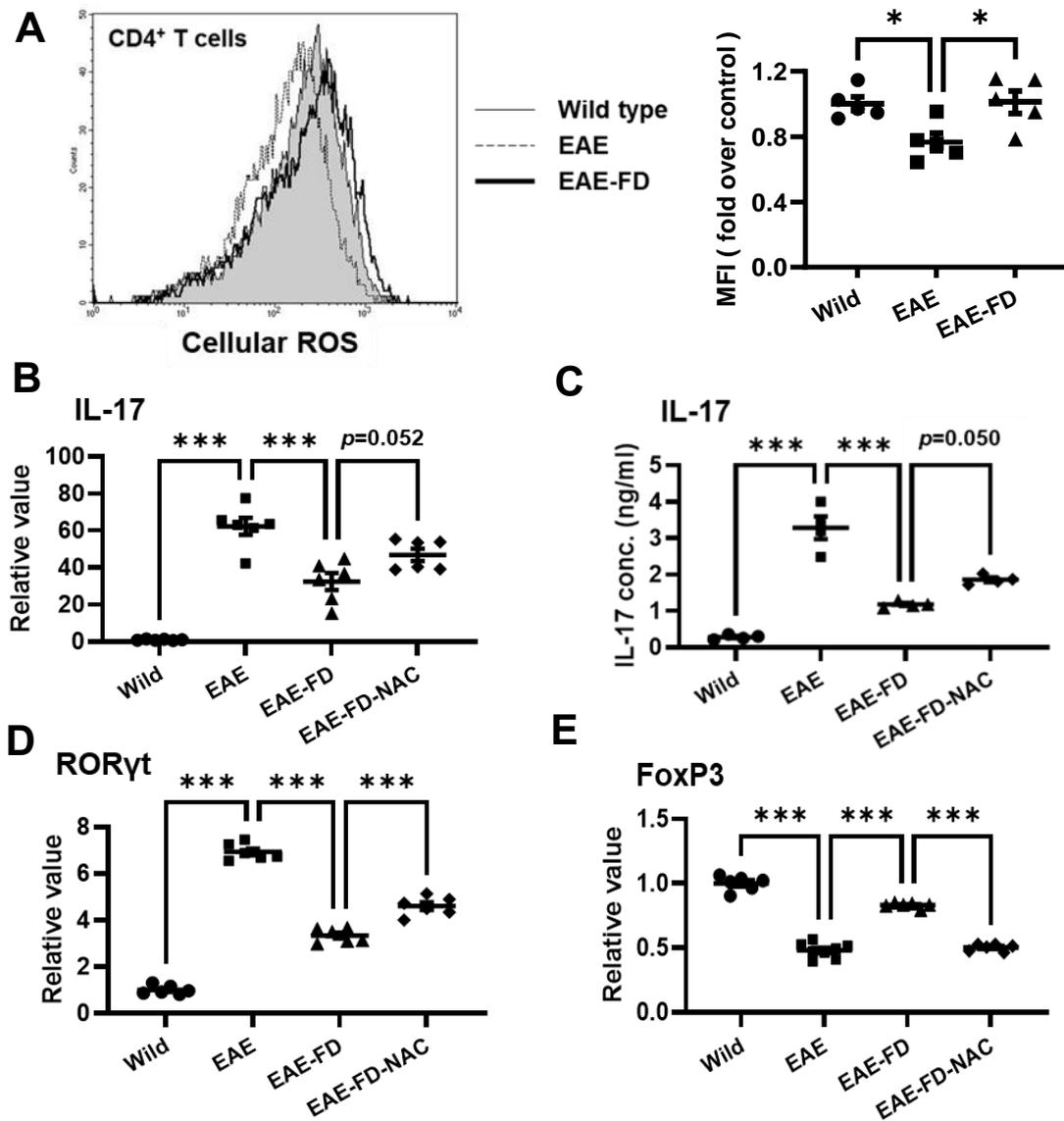


Fig.19 Role of ROS reduction induced by Npnt for Th17 and Treg differentiation

A. Levels of ROS in CD4⁺ T cells from the splenocytes of healthy non-EAE mice or EAE mice treated with the anti-Npnt-FD antibody or a control antibody on day 5 after MOG immunization. B. Relative IL-17 mRNA expression level in CD4⁺ T cells from the splenocytes of EAE mice (day 7) treated with the anti-Npnt-FD antibody in the presence or absence of NAC (3 mg/head). C. ELISA analysis of IL-17 in the culture supernatant of CD4⁺ T cells from EAE mice (day 7) treated with the anti-Npnt-FD antibody in the presence or absence of NAC (3 mg/head) that had been stimulated with PMA and ionomycin for 4 h. D-E. Relative mRNA expression level of ROR γ t (D) or FoxP3 (E) in CD4⁺ T cells from the splenocytes of EAE mice (day 7) treated with the anti-Npnt-FD antibody in the presence or absence of NAC (3 mg/head). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. $n = 4-8$ in each group; Kruskal–Wallis test.

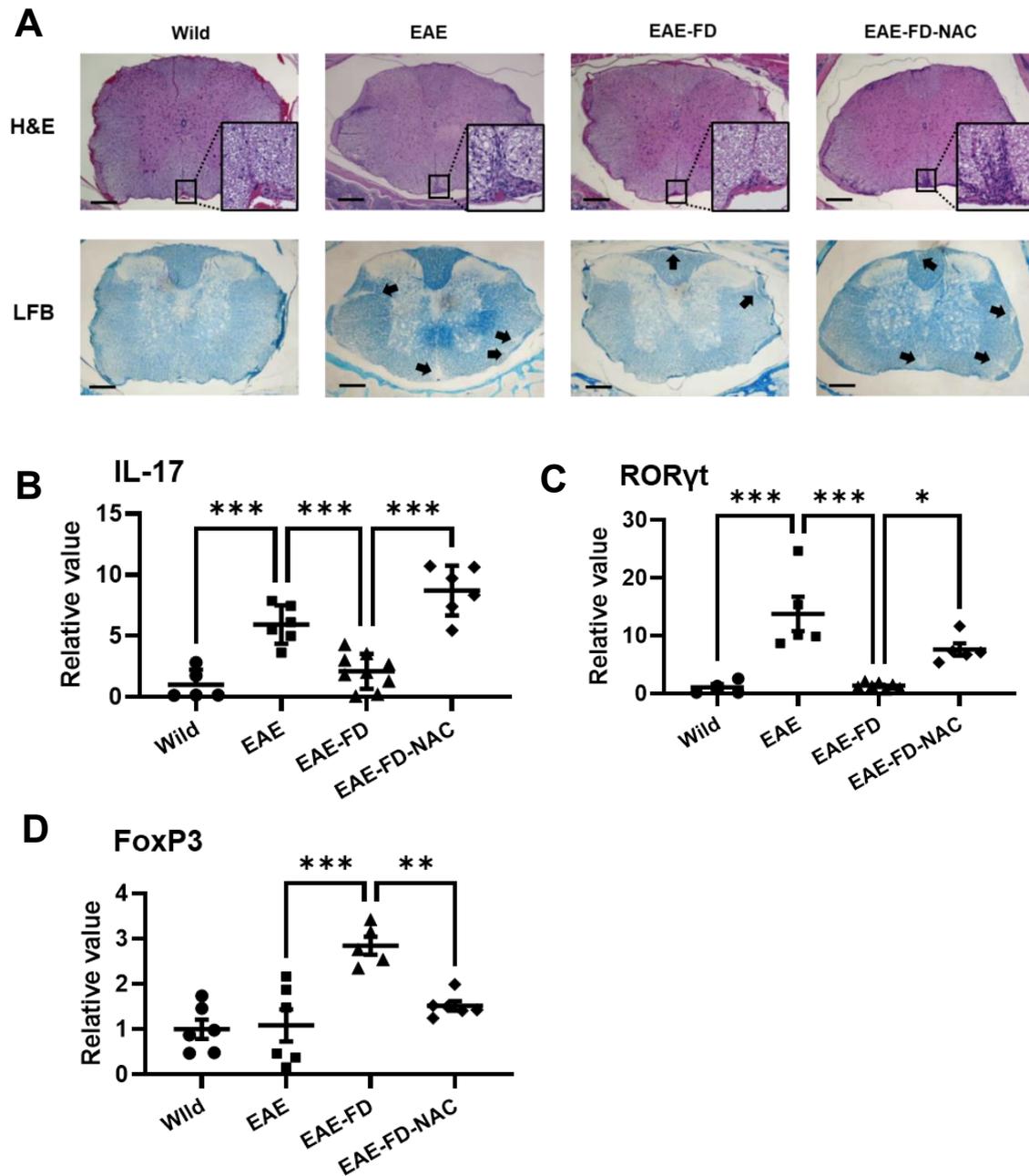


Fig.20 Role of Npnt in CD4⁺ T cells from the spinal cord

A. Histological examination of spinal cords removed from EAE mice on day 14 after MOG immunization. Spinal cord sections were stained with hematoxylin-eosin (top panel) or LFB (bottom panel). Arrows indicate regions of demyelination. Scale bar = 200 μ m. B-D. Relative IL-17 (B), ROR γ t (C), or FoxP3 (D) mRNA expression level in CD4⁺ T cells from the spinal cords of EAE mice (day 14) that had been treated with the anti-Npnt-FD antibody (FD) in the presence or absence of NAC (3 mg/head). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. n = 4–9 in each group; Kruskal–Wallis test.

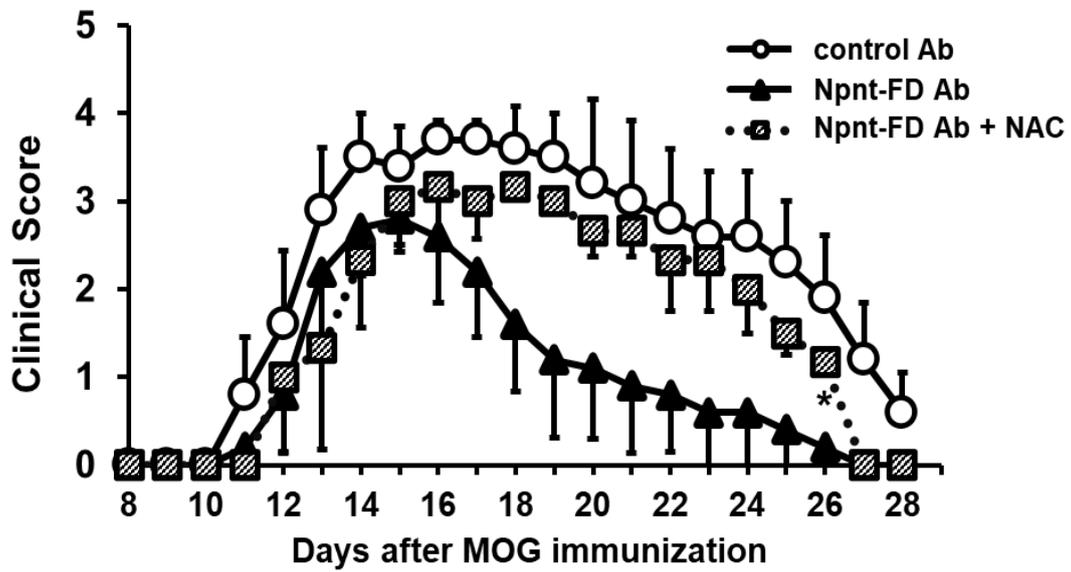


Fig.21 Effect of NAC treatment on the clinical sores of EAE mice

Mean clinical scores of mice with EAE treated with a control or Npnt-blocking antibody in the presence or absence of NAC. Data are presented as means \pm SEM. * $P < 0.05$ for anti-Npnt-FD antibody + NAC versus anti-Npnt-FD antibody. n = 4–6 in each group; Kruskal–Wallis test.

第4節 考察

前章の結果で、Npntの発現がCAIAやEAEなどの自己免疫疾患モデルの血中で亢進していることを明らかにし、Npntに対する中和抗体（抗Npnt-FD抗体）がCAIAの関節炎スコアを改善させることを報告した[77]。そこで本研究では、抗Npnt-FD抗体を用いてEAE増悪化に与えるNpnt機能を解明することを目的に研究を進めた。

まず、新たなNpnt機能を解明するために新規Npnt結合分子を探索した。そのために、Npnt遺伝子を導入した293F細胞の培養上清からNpntタンパク質を精製し質量分析解析によりNpnt結合分子としてSePを同定した。さらに、NpntとSePが複合体を形成することを共免疫沈降および新たに確立したNpnt-SeP複合体を検出するサンドイッチELISA系で明らかにした。SePは血中のセレン輸送タンパク質であり、セレン含有の抗酸化酵素であるGPx1発現を誘導して活性化することが知られている。ウェスタンブロット解析から、Npntは細胞培養上清中のSeP発現を亢進させることを見出し、その結果は培養上清にNpntタンパク質を添加した実験でも再現を得ることができた。さらに、SePを導入することで、Npntの発現レベルの上昇が誘導されることから、NpntとSePはポジティブフィードバック関係にあることを明らかにした。また、Npnt添加はGPx1の発現レベルも上昇させたことから、NpntによるSeP発現亢進がGPx1の発現亢進を引き起こしていると考えた。これらのことから、Npnt-SePのポジティブフィードバックによりGPx1発現を効率的に亢進させていることを示唆する結果を得た。

Npnt上のSeP結合部位に関しては、共免疫沈降にてNpntのEGF様リピートとMAMドメインが関与することを見出したが、SePとGPx1発現亢進にはMAMドメインが関与したことから、SeP機能に影響を与えるNpnt部位はMAMドメインであると考えられた。一方、抗Npnt-FD抗体はリンカーセグメント上のペプチドを抗原とした抗体であり、抗体の認識配列はMAMドメインとは離れおり、抗Npnt-FD抗体の認識部位とSePシグナルに関与する領域は異なっている。この点に関しては、抗Npnt-FD抗体の認識配列とMAMドメインが隣接していることで起こる抗体の立体障害によるものと推測している。

NpntとSePはお互いに発現を亢進し合うが、NpntのSeP発現亢進に関わる受容体は不明である。腎臓形成に関与するNpntの生理的なりガンドである $\alpha 8\beta 1$ インテグリンは[15]293F細胞やCD4⁺T細胞にも発現していることから、 $\alpha 8\beta 1$ インテグリンがNpntによるSePの発現亢進に関与している可能性がある。また、SePの受容体はアポリポ蛋白E受容体2（ApoER2）であることから[92]、ApoER2を介してNpnt-SeP複合体がSeP発現亢進に関与している可能性も考えられる。これらの受容体機能の解明には、受容体に対する中和抗体や、受容体ノックアウトした細胞、またはノックアウトマウスを用いての検討が必要となる。

EAE は CD4⁺ T 細胞の中でも主に Th17 細胞を介して中枢神経系の炎症性脱髄を引き起こす自己免疫疾患である。EAE モデルの CD4⁺ T 細胞内では Npnt、SeP および GPx1 発現はすべて亢進しており、抗 Npnt-FD 抗体投与により発現亢進を抑制できることを明らかにした。さらに、抗 Npnt-FD 抗体投与は IL-17 発現亢進を抑制し、FoxP3 発現抑制を阻害した。これらのことから、Npnt は Th17 および Treg 分化に関与していることが示唆された。GPx1 は過酸化水素誘導体を分解し、細胞内の活性酸素種 ROS を除去することが知られており [93]、EAE マウス由来の CD4⁺ T 細胞では GPx1 発現が亢進していることから、ROS 分解が進んでいると考えた。予想通り EAE マウスの CD4⁺ T 細胞内では ROS レベルが低下しており、抗 Npnt-FD 抗体投与では ROS レベルを正常レベルまで回復させることを確認できた。そこで、Npnt により誘導された低レベル ROS が Th17 および Treg 分化に重要な役割を担うと考え、ROS スカベンジャーである NAC を用いた解析を行った。その結果、NAC 投与は抗 Npnt-FD 抗体投与による CD4⁺ T 細胞内の IL-17 および ROR γ T の発現抑制を阻害し、FoxP3 の発現亢進も阻害させることを見出した。これらの結果から、ROS レベルの低下は Th17 分化亢進と Treg 分化抑制を引き起こし、Npnt 依存的な EAE 増悪化に関与していることを明らかにした。

ROS と自己免疫疾患の機能的相関はすでに報告されている。最近では、ROS は自己免疫疾患を含む T 細胞依存性の免疫応答において負の調節因子であることや、ROS レベルが亢進している GPx1 ノックアウトマウスでは、Th17 分化が抑制されることでアレルギー誘発性気管支炎や実験的大腸炎が改善することが報告されている [94, 95]。さらに、低レベルの ROS は T 細胞の免疫応答を増強させることで、リウマチや EAE を悪化させる [91, 96, 97]。これらの報告は、抗 Npnt-FD 抗体による ROS レベル正常化が Th17 分化抑制と Treg 分化亢進を誘導する結果と一致する。

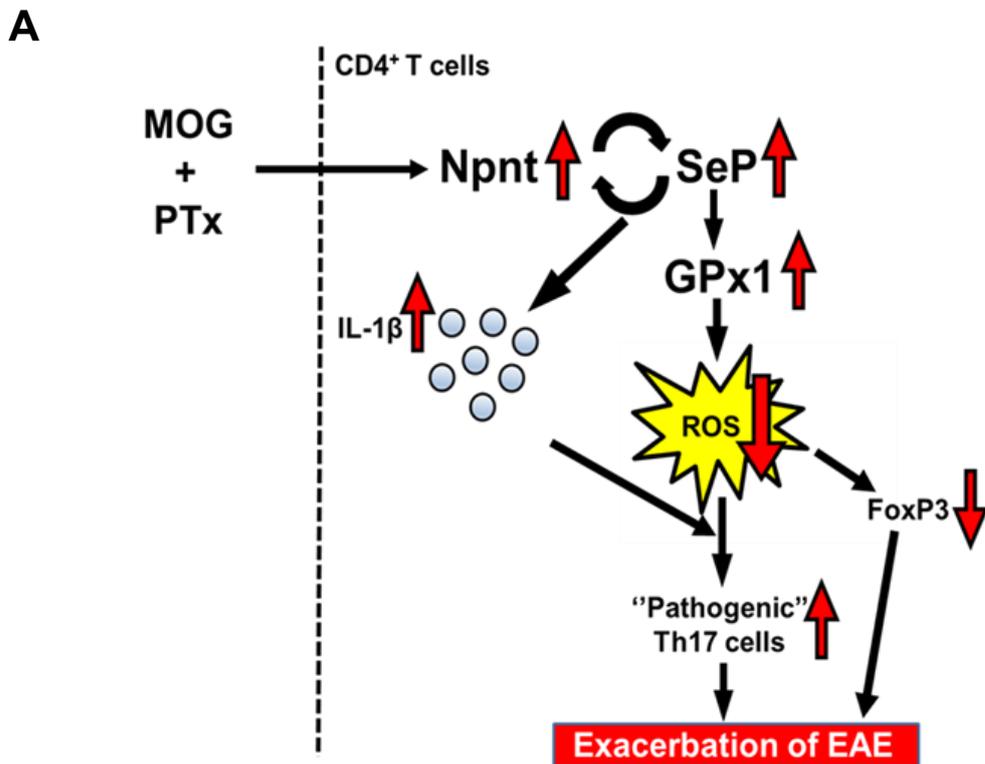
これまでに、筆者は抗 Npnt-FD 抗体投与が CAIA の増悪化を改善する結果を示しているが [77]、Npnt による詳細な CAIA 増悪化機構は未だ不明である。本研究から、Npnt が CAIA においても ROS 分解を亢進し、その結果 CAIA の重症化を引き起こす可能性があることから、今後検討を行う予定である。

IL-1 β 存在下で Th17 が分化すると病原性 Th17 へと進むことが知られており [88]、本研究では、抗 Npnt-FD 抗体投与が EAE 由来 CD4⁺ T 細胞の IL-1 β 発現亢進を阻害することも明らかにした。以前に、セレン欠乏食を与えられたニワトリの脾臓における IL-1 β と Th17 の発現レベルが低下するという報告があり [98]、このことから、Npnt は SeP 発現亢進を介して CD4⁺ T 細胞の IL-1 β 発現増強に関与することが示唆された。

OPN は、活性化された T 細胞とマクロファージによって分泌される細胞外マトリックスタンパク質の一つであり、Th17 分化に関与することが知られている [48]。OPN 中和抗体を投与されたマウスや OPN 欠損マウスにおいては、EAE や CAIA の病態スコアが抑制されることが報告されている [20, 31, 65, 99]。Npnt も EAE および CAIA の増悪化に関与している

ことから、自己免疫疾患の増悪化において Npnt と OPN は機能的相関を有する可能性があるため、今後検討を進める予定である。

本研究では、Npnt と SeP のポジティブフィードバックと、それともなう GPx1 発現レベルの亢進という新たな相互作用を発見した。GPx1 発現亢進は、ROS 分解を介して Th17 分化亢進と Treg 分化抑制につながることを明らかにした (Fig. 22A)。抗 Npnt-FD 抗体は Npnt による SeP 発現亢進や Th17 分化亢進、Treg 分化抑制を阻害し、NAC 投与により抗 Npnt-FD 抗体による Th17 分化抑制と Treg 分化亢進を阻害した (Fig. 22B)。これらのことから、Npnt によって誘導される SeP と GPx1 は、ROS と Th17/Treg のバランス間のクロストークに重要な役割を担っていることを示唆する結果を得た (Fig. 22B)。



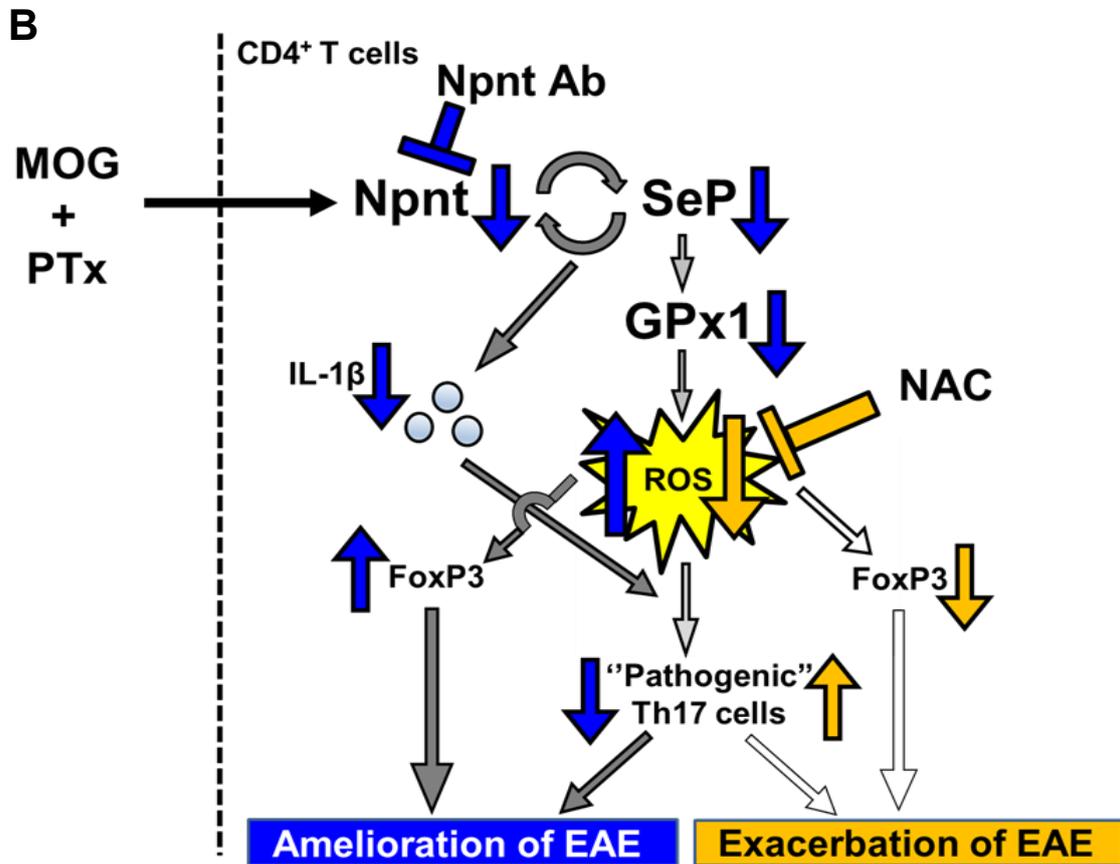


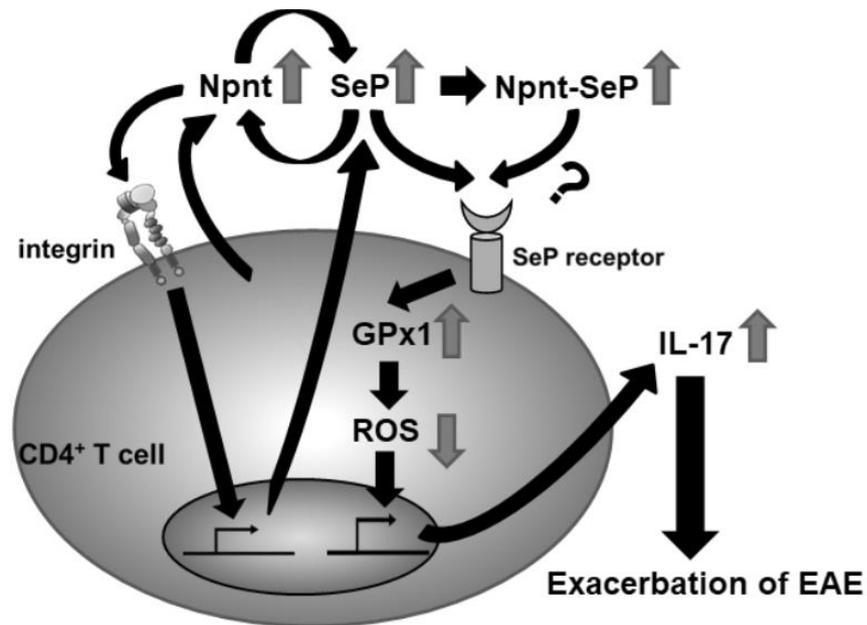
Fig.22 Schematic representation of the role of Npnt in CD4⁺ T cells during EAE development
 A. Mechanism for EAE exacerbation by Npnt. Npnt expression in CD4⁺ T cells from mice immunized with MOG and pertussis toxin is increased. The increased Npnt levels induce SeP expression, establishing a positive feedback loop, which upregulates GPx1 expression. The increased GPx1 levels cause a reduction in ROS levels, inducing not only elevated IL-17 expression and inhibited FoxP3 expression, but also EAE exacerbation. B. Mechanism for EAE amelioration by anti-Npnt-FD antibody treatment and exacerbation of anti-Npnt-FD antibody-treated EAE by NAC. The anti-Npnt-FD antibody inhibits Npnt expression in CD4⁺ T cells, leading to the decreased expression of SeP and GPx1. The enhanced ROS level resulting from anti-Npnt-FD antibody treatment leads to FoxP3 expression and inhibits IL-17 expression. NAC inhibits ROS, which subsequently inhibits FoxP3 expression and augments IL-17 expression.

第5節 小括

本章の検討より、以下の知見が得られた。

- 1 Npnt の結合分子として新たに SeP を同定した。
- 2 Npnt の中和抗体（抗 Npnt -FD 抗体）投与により、EAE 増悪化を抑制できた。
- 3 Npnt を起点とする EAE の新規増悪化機構を解明した。

Npnt による EAE 増悪化機構の模式図を以下に示す



EAE の CD4⁺T 細胞内では Npnt 発現が亢進している。亢進した Npnt はインテグリンを介して SeP 発現を誘導し、亢進した SeP はその受容体を介して Npnt の発現を誘導する。このポジティブフィードバック機構を介して増加した Npnt-SeP 複合体は、GPx1 を活性化させることで ROS を分解し Th17 分化を誘導する。

これらのことから、Npnt と SeP の相互作用に起因する Npnt-GPx1-ROS という新たな軸が、自己免疫疾患における効果的な治療標的になる可能性を見出した。

結 語

本学位論文では、炎症性疾患における細胞外マトリックスとインテグリンとの接着の役割を明らかにすることを目的に当研究室で作製した OPN と Npnt に対する抗体を用いて研究を進めた。その結果、以下のことを明らかにすることができた。

- 1) NASH モデルマウスの肝臓において OPN の発現が亢進することを見出した。
NASH モデルは発症までに 8 週間程度かかることから、長期間 OPN 機能を抑制できる抗 OPN マウスモノクローナル抗体 35B6 を作製した。35B6 抗体を NASH モデルに投与した結果、35B6 抗体は NASH モデルマウスの肝臓の炎症および線維化を抑制できることが分かった。
- 2) Npnt は各種自己免疫疾患モデルマウスの血中で発現亢進していた。また、CAIA の増悪期に滑膜線維芽細胞と滑膜マクロファージで Npnt 発現が増加していることから、Npnt が関節炎に関わることを予想した。そこで、Npnt 中和抗体の抗 Npnt-FD 抗体を作製し投与した結果、CAIA の増悪化を抑制できた。このことから、Npnt が CAIA 増悪化に関与することを明らかにできた。
- 3) Npnt の新規結合分子として SeP を同定し、Npnt と SeP は互いに発現を亢進させるポジティブフィードバック関係にあることを見出した。さらに、EAE マウスを用いた解析から Npnt と SeP のポジティブフィードバック機構は GPx1 の発現を亢進させ、ROS 分解を介して Th17 分化の亢進と Treg 分化を抑制する結果を得た。これらのことから、Npnt を開始点とした新たな EAE 増悪化機構を明らかにした。本研究は米国生理学会誌の「best of the best」論文に選出された。(Fig. G)
- 4) 本学位論文には記載しないが、Npnt が珪肺症患者の血中で発現亢進することも報告した [100]。



Fig. G Certificate of APS select

今後の展望

自己免疫疾患に関与する Npnt 受容体に関しては、全くの不明である。腎臓形成に関しては、Npnt 受容体は $\alpha 8\beta 1$ インテグリンであることが報告されているが、 $\alpha 8\beta 1$ が自己免疫疾患に関与するとの直接的なデータは存在せず、また、当研究室で作製した抗 $\alpha 8\beta 1$ 抗体では EAE の発症や増悪化を抑制しなかった。これらのことから、自己免疫疾患の増悪化には、新たな Npnt 受容体が存在すると考えた。

本学位論文では Npnt が CAIA や EAE 増悪化に関与することを示したが [77, 101]、これらの疾患には $\alpha 4$ や $\alpha 9$ インテグリンが密接に関与する。そこで、Npnt が $\alpha 4$ と $\alpha 9$ インテグリンと結合するかを検討したが、Npnt は $\alpha 4$ と $\alpha 9$ インテグリンとは結合しないことが分かった。したがって、本学位論文は自己免疫疾患に関与する Npnt 受容体を報告することはできない。

筆者は Npnt による EAE 増悪化機構の論文を報告後 [101]、新たな Npnt 受容体を探索するために Npnt 研究を引き続き進めた。その結果、自己免疫疾患局所では Npnt は翻訳後修飾されることで構造変化を引き起こすことが分かった。様々なインテグリンを導入した細胞を用いた接着試験から、翻訳後修飾された Npnt (T-Npnt) は $\alpha 8\beta 1$ インテグリンではなく、RGD 配列を認識しない $\alpha 4$ 、 $\alpha 9$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 7$ インテグリンを共発現している細胞と結合することを明らかにした。細胞外マトリックスとの細胞接着で、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 9$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 7$ インテグリン全ての共発現を必要とする結合様式はこれまでに知られておらず、新規の発見である。

現在、それらインテグリンを内在的に共発現する免疫細胞も見出しており、T-Npnt との接着によりナイーブ T 細胞から Th17 細胞に分化させる機構も明らかにできつつある。また、T-Npnt に対する特異的抗体作製も行っている。これらの研究を遂行することで、今回報告した Npnt を起点とする EAE 増悪化機構をほぼ完全に解明できると考える。

今後は、関節リウマチモデルなど他の自己免疫疾患モデルを用いて T-Npnt と新たな受容体との相互作用の役割を明らかにすることを計画している。本研究を通じて、ステロイド以外有効な治療薬の無い自己免疫疾患患者の新たな治療法の確立に繋げることを目指す。

参考文献

1. Hynes RO (2009) The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 326:1216-9. doi:10.1126/science.1176009
2. Giancotti FG and Ruoslahti E (1999) Integrin signaling. *Science* 285:1028-32. doi:10.1126/science.285.5430.1028
3. Hynes RO (2014) Stretching the boundaries of extracellular matrix research. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:761-3. doi: 10.1038/nrm3908
4. Hood JD and Cheresch DA (2002) Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2:91-100. doi: 10.1038/nrc727
5. Arnaout MA, Goodman SL and Xiong JP (2007) Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 19:495-507. doi: 10.1016/j.ceb.2007.08.002
6. Hynes RO (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25.
7. Takagi J and Springer TA (2002) Integrin activation and structural rearrangement. *Immunol Rev* 186:141-63.
8. Hynes RO (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110:673-87. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00971-6
9. Davenport RJ and Munday JR (2007) Alpha4-integrin antagonism--an effective approach for the treatment of inflammatory diseases? *Drug Discov Today* 12:569-76. doi: 10.1016/j.drudis.2007.05.001
10. Yousry TA, Major EO, Ryschkewitsch C, Fahle G, Fischer S, Hou J, Curfman B, Miszkiel K, Mueller-Lenke N, Sanchez E, Barkhof F, Radue EW, Jäger HR and Clifford DB (2006) Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med* 354:924-33. doi: 10.1056/NEJMoa054693
11. Ruoslahti E (1997) Integrins as signaling molecules and targets for tumor therapy. *Kidney Int* 51:1413-7. doi: 10.1038/ki.1997.193
12. Kanchanawong P and Calderwood DA (2022) Organization, dynamics and mechanoregulation of integrin-mediated cell-ECM adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. doi:10.1038/s41580-022-00531-5
13. Henderson NC, Arnold TD, Katamura Y, Giacomini MM, Rodriguez JD, McCarty JH, Pellicoro A, Raschperger E, Betsholtz C, Ruminski PG, Griggs DW, Prinsen MJ, Maher JJ, Iredale JP, Lacy-Hulbert A, Adams RH and Sheppard D (2013) Targeting of α v integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. *Nat Med* 19:1617-24. doi:10.1038/nm.3282

14. Tan Y, Zhao L, Yang YG and Liu W (2022) The Role of Osteopontin in Tumor Progression Through Tumor-Associated Macrophages. *Front Oncol* 12:953283. doi:10.3389/fonc.2022.953283
15. Brandenberger R, Schmidt A, Linton J, Wang D, Backus C, Denda S, Muller U and Reichardt LF (2001) Identification and characterization of a novel extracellular matrix protein nephronectin that is associated with integrin $\alpha 8 \beta 1$ in the embryonic kidney. *J Cell Biol* 154:447-58.
16. Hight-Warburton W and Parsons M (2019) Regulation of cell migration by $\alpha 4$ and $\alpha 9$ integrins. *Biochem J* 476:705-718. doi: 10.1042/bcj20180415
17. Kon S and Uede T (2018) The role of $\alpha 9 \beta 1$ integrin and its ligands in the development of autoimmune diseases. *J Cell Commun Signal* 12:333-342. doi: 10.1007/s12079-017-0413-7
18. Barry ST, Ludbrook SB, Murrison E and Horgan CM (2000) Analysis of the $\alpha 4 \beta 1$ integrin-osteopontin interaction. *Exp Cell Res* 258:342-51. doi: 10.1006/excr.2000.4941
19. Yokosaki Y, Matsuura N, Sasaki T, Murakami I, Schneider H, Higashiyama S, Saitoh Y, Yamakido M, Taooka Y and Sheppard D (1999) The integrin $\alpha (9) \beta (1)$ binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin. *J Biol Chem* 274:36328-34.
20. Yamamoto N, Sakai F, Kon S, Morimoto J, Kimura C, Yamazaki H, Okazaki I, Seki N, Fujii T and Uede T (2003) Essential role of the cryptic epitope SLAYGLR within osteopontin in a murine model of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 112:181-8.
21. Diao H, Kon S, Iwabuchi K, Kimura C, Morimoto J, Ito D, Segawa T, Maeda M, Hamuro J, Nakayama T, Taniguchi M, Yagita H, Van Kaer L, Onoe K, Denhardt D, Rittling S and Uede T (2004) Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases. *Immunity* 21:539-50.
22. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D and Berman JS (2001) Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest* 107:1055-61.
23. Barry ST, Ludbrook SB, Murrison E and Horgan CM (2000) A regulated interaction between $\alpha 5 \beta 1$ integrin and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun* 267:764-9. doi:10.1006/bbrc.1999.2032
24. Helluin O, Chan C, Vilaire G, Mousa S, DeGrado WF and Bennett JS (2000) The activation state of $\alpha v \beta 3$ regulates platelet and lymphocyte adhesion to intact and thrombin-cleaved osteopontin. *J Biol Chem* 275:18337-43.
25. Bayless KJ and Davis GE (2001) Identification of dual $\alpha 4 \beta 1$ integrin binding sites within a 38 amino acid domain in the N-terminal thrombin fragment of human osteopontin. *J Biol Chem* 276:13483-9.

26. Ito K, Kon S, Nakayama Y, Kurotaki D, Saito Y, Kanayama M, Kimura C, Diao H, Morimoto J, Matsui Y and Uede T (2009) The differential amino acid requirement within osteopontin in alpha4 and alpha9 integrin-mediated cell binding and migration. *Matrix Biol* 28:11-9.
27. Uede T, Katagiri Y, Iizuka J and Murakami M (1997) Osteopontin, a coordinator of host defense system: a cytokine or an extracellular adhesive protein? *Microbiol Immunol* 41:641-8.
28. Weber GF (2001) The metastasis gene osteopontin: a candidate target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 1552:61-85.
29. Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R and Hughes J (2002) Osteopontin--a molecule for all seasons. *Qjm* 95:3-13.
30. Rangaswami H, Bulbule A and Kundu GC (2006) Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol* 16:79-87.
31. Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, Bernard CC, Rittling SR, Denhardt DT, Sobel RA, Lock C, Karpuj M, Pedotti R, Heller R, Oksenberg JR and Steinman L (2001) The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science* 294:1731-5.
32. Xanthou G, Alissafi T, Semitekolou M, Simoes DC, Economidou E, Gaga M, Lambrecht BN, Lloyd CM and Panoutsakopoulou V (2007) Osteopontin has a crucial role in allergic airway disease through regulation of dendritic cell subsets. *Nat Med*.
33. Kon S, Ikesue M, Kimura C, Aoki M, Nakayama Y, Saito Y, Kurotaki D, Diao H, Matsui Y, Segawa T, Maeda M, Kojima T and Uede T (2008) Syndecan-4 protects against osteopontin-mediated acute hepatic injury by masking functional domains of osteopontin. *J Exp Med* 205:25-33.
34. Yamamoto N, Nakashima T, Torikai M, Naruse T, Morimoto J, Kon S, Sakai F and Uede T (2007) Successful treatment of collagen-induced arthritis in non-human primates by chimeric anti-osteopontin antibody. *Int Immunopharmacol* 7:1460-70.
35. Blom T, Franzen A, Heinegard D and Holmdahl R (2003) Comment on "The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease". *Science* 299:1845; author reply 1845.
36. Konno S, Hoshi T, Taira T, Plunkett B and Huang SK (2005) Endotoxin contamination contributes to the in vitro cytokine-inducing activity of osteopontin preparations. *J Interferon Cytokine Res* 25:277-82.
37. Brunt EM, Kleiner DE, Carpenter DH, Rinella M, Harrison SA, Loomba R, Younossi Z, Neuschwander-Tetri BA and Sanyal AJ (2021) NAFLD: Reporting Histologic Findings in Clinical Practice. *Hepatology* 73:2028-2038. doi: 10.1002/hep.31599

38. Papatheodoridi AM, Chrysavgis L, Koutsilieris M and Chatzigeorgiou A (2020) The Role of Senescence in the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Progression to Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* 71:363-374. doi: 10.1002/hep.30834
39. Syn WK, Choi SS, Liaskou E, Karaca GF, Agboola KM, Oo YH, Mi Z, Pereira TA, Zdanowicz M, Malladi P, Chen Y, Moylan C, Jung Y, Bhattacharya SD, Teaberry V, Omenetti A, Abdelmalek MF, Guy CD, Adams DH, Kuo PC, Michelotti GA, Whittington PF and Diehl AM Osteopontin is induced by hedgehog pathway activation and promotes fibrosis progression in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 53:106-15.
40. Coombes JD, Choi SS, Swiderska-Syn M, Manka P, Reid DT, Palma E, Briones-Orta MA, Xie G, Younis R, Kitamura N, Della Peruta M, Bitencourt S, Dolle L, Oo YH, Mi Z, Kuo PC, Williams R, Chokshi S, Canbay A, Claridge LC, Eksteen B, Diehl AM and Syn WK (2016) Osteopontin is a proximal effector of leptin-mediated non-alcoholic steatohepatitis (NASH) fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 1862:135-44. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.10.028
41. Sahai A, Malladi P, Melin-Aldana H, Green RM and Whittington PF (2004) Upregulation of osteopontin expression is involved in the development of nonalcoholic steatohepatitis in a dietary murine model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287:G264-73. doi:10.1152/ajpgi.00002.2004
42. Kon S, Yokosaki Y, Maeda M, Segawa T, Horikoshi Y, Tsukagoshi H, Rashid MM, Morimoto J, Inobe M, Shijubo N, Chambers AF and Uede T (2002) Mapping of functional epitopes of osteopontin by monoclonal antibodies raised against defined internal sequences. *J Cell Biochem* 84:420-32.
43. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA and Bacon BR (1999) Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 94:2467-74. doi: 10.1111/j.1572-0241.1999.01377.x
44. Uede T (2011) Osteopontin, intrinsic tissue regulator of intractable inflammatory diseases. *Pathol Int* 61:265-80. doi: 10.1111/j.1440-1827.2011.02649.x
45. Kanayama M, Kurotaki D, Morimoto J, Asano T, Matsui Y, Nakayama Y, Saito Y, Ito K, Kimura C, Iwasaki N, Suzuki K, Harada T, Li HM, Uehara J, Miyazaki T, Minami A, Kon S and Uede T (2009) Alpha9 integrin and its ligands constitute critical joint microenvironments for development of autoimmune arthritis. *J Immunol* 182:8015-25.
46. Kouro H, Kon S, Matsumoto N, Miyashita T, Kakuchi A, Ashitomi D, Saitoh K, Nakatsuru T, Togi S, Muromoto R and Matsuda T (2014) The novel alpha4B murine alpha4 integrin protein splicing variant inhibits alpha4 protein-dependent cell adhesion. *J Biol Chem* 289:16389-98. doi: 10.1074/jbc.M114.553610

47. Syn WK, Choi SS, Liaskou E, Karaca GF, Agboola KM, Oo YH, Mi Z, Pereira TA, Zdanowicz M, Malladi P, Chen Y, Moylan C, Jung Y, Bhattacharya SD, Teaberry V, Omenetti A, Abdelmalek MF, Guy CD, Adams DH, Kuo PC, Michelotti GA, Whittington PF and Diehl AM (2011) Osteopontin is induced by hedgehog pathway activation and promotes fibrosis progression in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 53:106-15. doi: 10.1002/hep.23998
48. Murugaiyan G, Mittal A and Weiner HL (2008) Increased osteopontin expression in dendritic cells amplifies IL-17 production by CD4+ T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and in multiple sclerosis. *J Immunol* 181:7480-8.
49. Li D, He L, Guo H, Chen H and Shan H (2015) Targeting activated hepatic stellate cells (aHSCs) for liver fibrosis imaging. *EJNMMI Res* 5:71. doi: 10.1186/s13550-015-0151-x
50. Kahles F, Findeisen HM and Bruemmer D (2014) Osteopontin: A novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes. *Mol Metab* 3:384-93. doi:10.1016/j.molmet.2014.03.004
51. Casini A, Ceni E, Salzano R, Biondi P, Parola M, Galli A, Foschi M, Caligiuri A, Pinzani M and Surrenti C (1997) Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology* 25:361-7. doi: 10.1053/jhep.1997.v25.pm0009021948
52. Syn WK, Oo YH, Pereira TA, Karaca GF, Jung Y, Omenetti A, Witek RP, Choi SS, Guy CD, Fearing CM, Teaberry V, Pereira FE, Adams DH and Diehl AM (2010) Accumulation of natural killer T cells in progressive nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 51:1998-2007. doi:10.1002/hep.23599
53. Li H, Toth E and Cherrington NJ (2018) Asking the Right Questions With Animal Models: Methionine- and Choline-Deficient Model in Predicting Adverse Drug Reactions in Human NASH. *Toxicol Sci* 161:23-33. doi: 10.1093/toxsci/kfx253
54. Fujii M, Shibazaki Y, Wakamatsu K, Honda Y, Kawauchi Y, Suzuki K, Arumugam S, Watanabe K, Ichida T, Asakura H and Yoneyama H (2013) A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of association between diabetes and hepatocellular carcinoma. *Med Mol Morphol* 46:141-52. doi: 10.1007/s00795-013-0016-1
55. Linton JM, Martin GR and Reichardt LF (2007) The ECM protein nephronectin promotes kidney development via integrin alpha8beta1-mediated stimulation of Gdnf expression. *Development* 134:2501-9.
56. Miner JH (2001) Mystery solved: discovery of a novel integrin ligand in the developing kidney. *J Cell Biol* 154:257-9.
57. Sato Y, Uemura T, Morimitsu K, Sato-Nishiuchi R, Manabe R, Takagi J, Yamada M and Sekiguchi K (2009) Molecular basis of the recognition of nephronectin by integrin alpha8beta1. *J Biol Chem* 284:14524-36.

58. Sato Y, Shimono C, Li S, Nakano I, Norioka N, Sugiura N, Kimata K, Yamada M and Sekiguchi K (2013) Nephronectin binds to heparan sulfate proteoglycans via its MAM domain. *Matrix Biol* 32:188-95. doi: 10.1016/j.matbio.2013.01.005
59. Cheng CW, Ka SM, Yang SM, Shui HA, Hung YW, Ho PC, Su YC and Chen A (2008) Nephronectin expression in nephrotoxic acute tubular necrosis. *Nephrol Dial Transplant* 23:101-9. doi: 10.1093/ndt/gfm496
60. Muller-Deile J, Dannenberg J, Schroder P, Lin MH, Miner JH, Chen R, Brasen JH, Thum T, Nystrom J, Staggs LB, Haller H, Fiedler J, Lorenzen JM and Schiffer M (2017) Podocytes regulate the glomerular basement membrane protein nephronectin by means of miR-378a-3p in glomerular diseases. *Kidney Int* 92:836-849. doi: 10.1016/j.kint.2017.03.005
61. Nakatani S, Ishimura E, Mori K, Fukumoto S, Yamano S, Wei M, Emoto M, Wanibuchi H and Inaba M (2012) Nephronectin expression in glomeruli of renal biopsy specimens from various kidney diseases: nephronectin is expressed in the mesangial matrix expansion of diabetic nephropathy. *Nephron Clin Pract* 122:114-21. doi: 10.1159/000350816
62. Kashani K and Kellum JA (2015) Novel biomarkers indicating repair or progression after acute kidney injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 24:21-7. doi: 10.1097/mnh.0000000000000090
63. Inagaki FF, Tanaka M, Inagaki NF, Yagai T, Sato Y, Sekiguchi K, Oyaizu N, Kokudo N and Miyajima A (2013) Nephronectin is upregulated in acute and chronic hepatitis and aggravates liver injury by recruiting CD4 positive cells. *Biochem Biophys Res Commun* 430:751-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.076
64. Denda S, Reichardt LF and Muller U (1998) Identification of osteopontin as a novel ligand for the integrin alpha8 beta1 and potential roles for this integrin-ligand interaction in kidney morphogenesis. *Mol Biol Cell* 9:1425-35. doi: 10.1091/mbc.9.6.1425
65. Yumoto K, Ishijima M, Rittling SR, Tsuji K, Tsuchiya Y, Kon S, Nifuji A, Uede T, Denhardt DT and Noda M (2002) Osteopontin deficiency protects joints against destruction in anti-type II collagen antibody-induced arthritis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4556-61.
66. Muller-Ladner U, Ospelt C, Gay S, Distler O and Pap T (2007) Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. *Synovial fibroblasts. Arthritis Res Ther* 9:223. doi: 10.1186/ar2337
67. Falconer J, Murphy AN, Young SP, Clark AR, Tiziani S, Guma M and Buckley CD (2018) Review: Synovial Cell Metabolism and Chronic Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol* 70:984-999. doi: 10.1002/art.40504
68. Kahai S, Lee SC, Seth A and Yang BB (2010) Nephronectin promotes osteoblast differentiation via the epidermal growth factor-like repeats. *FEBS Lett* 584:233-8. doi:10.1016/j.febslet.2009.11.077

69. Fujiwara H, Ferreira M, Donati G, Marciano DK, Linton JM, Sato Y, Hartner A, Sekiguchi K, Reichardt LF and Watt FM (2011) The basement membrane of hair follicle stem cells is a muscle cell niche. *Cell* 144:577-89. doi: 10.1016/j.cell.2011.01.014
70. Hung CF, Wilson CL, Chow YH and Schnapp LM (2018) Role of integrin alpha8 in murine model of lung fibrosis. *PLoS One* 13:e0197937. doi: 10.1371/journal.pone.0197937
71. Levine D, Rockey DC, Milner TA, Breuss JM, Fallon JT and Schnapp LM (2000) Expression of the integrin alpha8beta1 during pulmonary and hepatic fibrosis. *Am J Pathol* 156:1927-35. doi: 10.1016/s0002-9440(10)65066-3
72. Yasuda K, Takeuchi Y and Hirota K (2019) The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases. *Semin Immunopathol* 41:283-297. doi: 10.1007/s00281-019-00733-8
73. Rothhammer V, Heink S, Petermann F, Srivastava R, Claussen MC, Hemmer B and Korn T (2011) Th17 lymphocytes traffic to the central nervous system independently of α 4 integrin expression during EAE. *J Exp Med* 208:2465-76. doi: 10.1084/jem.20110434
74. Glatigny S, Duhon R, Oukka M and Bettelli E (2011) Cutting edge: loss of α 4 integrin expression differentially affects the homing of Th1 and Th17 cells. *J Immunol* 187:6176-9. doi:10.4049/jimmunol.1102515
75. Prajeeth CK, Kronisch J, Khorrooshi R, Knier B, Toft-Hansen H, Gudi V, Floess S, Huehn J, Owens T, Korn T and Stangel M (2017) Effectors of Th1 and Th17 cells act on astrocytes and augment their neuroinflammatory properties. *J Neuroinflammation* 14:204. doi:10.1186/s12974-017-0978-3
76. Kanayama M, Morimoto J, Matsui Y, Ikesue M, Danzaki K, Kurotaki D, Ito K, Yoshida T and Uede T (2011) alpha9beta1 integrin-mediated signaling serves as an intrinsic regulator of pathogenic Th17 cell generation. *J Immunol* 187:5851-64. doi: 10.4049/jimmunol.1101524
77. Kon S, Honda M, Ishikawa K, Maeda M and Segawa T (2020) Antibodies against nephronectin ameliorate anti-type II collagen-induced arthritis in mice. *FEBS Open Bio* 10:107-117. doi: 10.1002/2211-5463.12758
78. Berry MJ, Banu L, Harney JW and Larsen PR (1993) Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine insertion at UGA codons. *Embo j* 12:3315-22.
79. Saito Y and Takahashi K (2002) Characterization of selenoprotein P as a selenium supply protein. *Eur J Biochem* 269:5746-51. doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.03298.x
80. Shrimali RK, Irons RD, Carlson BA, Sano Y, Gladyshev VN, Park JM and Hatfield DL (2008) Selenoproteins mediate T cell immunity through an antioxidant mechanism. *J Biol Chem* 283:20181-5. doi: 10.1074/jbc.M802559200

81. Carlson BA, Yoo MH, Shrimali RK, Irons R, Gladyshev VN, Hatfield DL and Park JM (2010) Role of selenium-containing proteins in T-cell and macrophage function. *Proc Nutr Soc* 69:300-10. doi: 10.1017/s002966511000176x
82. Saito Y (2020) Selenoprotein P as an in vivo redox regulator: disorders related to its deficiency and excess. *J Clin Biochem Nutr* 66:1-7. doi: 10.3164/jcbs.19-31
83. Hoffmann FW, Hashimoto AC, Shafer LA, Dow S, Berry MJ and Hoffmann PR (2010) Dietary selenium modulates activation and differentiation of CD4⁺ T cells in mice through a mechanism involving cellular free thiols. *The Journal of nutrition* 140:1155-1161.
84. Tujebajeva RM, Harney JW and Berry MJ (2000) Selenoprotein P expression, purification, and immunochemical characterization. *J Biol Chem* 275:6288-94. doi: 10.1074/jbc.275.9.6288
85. Sunde RA, Thompson BM, Palm MD, Weiss SL, Thompson KM and Evenson JK (1997) Selenium regulation of selenium-dependent glutathione peroxidases in animals and transfected CHO cells. *Biomed Environ Sci* 10:346-55.
86. Mita Y, Nakayama K, Inari S, Nishito Y, Yoshioka Y, Sakai N, Sotani K, Nagamura T, Kuzuhara Y, Inagaki K, Iwasaki M, Misu H, Ikegawa M, Takamura T, Noguchi N and Saito Y (2017) Selenoprotein P-neutralizing antibodies improve insulin secretion and glucose sensitivity in type 2 diabetes mouse models. *Nat Commun* 8:1658. doi: 10.1038/s41467-017-01863-z
87. Gong G, Méplan C, Gautrey H, Hall J and Hesketh JE (2012) Differential effects of selenium and knock-down of glutathione peroxidases on TNF α and flagellin inflammatory responses in gut epithelial cells. *Genes Nutr* 7:167-78. doi: 10.1007/s12263-011-0256-4
88. Shainheit MG, Lasocki KW, Finger E, Larkin BM, Smith PM, Sharpe AH, Dinarello CA, Rutitzky LI and Stadecker MJ (2011) The pathogenic Th17 cell response to major schistosome egg antigen is sequentially dependent on IL-23 and IL-1 β . *The Journal of Immunology* 187:5328-5335.
89. Lee YK, Mukasa R, Hatton RD and Weaver CT (2009) Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. *Curr Opin Immunol* 21:274-80. doi: 10.1016/j.coi.2009.05.021
90. Martinez GJ (2017) MINK1: The missing link between ROS and its inhibition of Th17 cells. *J Exp Med* 214:1205-1206. doi: 10.1084/jem.20170571
91. Fu G, Xu Q, Qiu Y, Jin X, Xu T, Dong S, Wang J, Ke Y, Hu H, Cao X, Wang D, Cantor H, Gao X and Lu L (2017) Suppression of Th17 cell differentiation by misshapen/NIK-related kinase MINK1. *J Exp Med* 214:1453-1469. doi: 10.1084/jem.20161120
92. Olson GE, Winfrey VP, Nagdas SK, Hill KE and Burk RF (2007) Apolipoprotein E receptor-2 (ApoER2) mediates selenium uptake from selenoprotein P by the mouse testis. *J Biol Chem* 282:12290-7. doi: 10.1074/jbc.M611403200

93. Lubos E, Loscalzo J and Handy DE (2011) Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 15:1957-97. doi: 10.1089/ars.2010.3586
94. Won HY, Sohn JH, Min HJ, Lee K, Woo HA, Ho YS, Park JW, Rhee SG and Hwang ES (2010) Glutathione peroxidase 1 deficiency attenuates allergen-induced airway inflammation by suppressing Th2 and Th17 cell development. *Antioxid Redox Signal* 13:575-87. doi:10.1089/ars.2009.2989
95. Kim HR, Lee A, Choi EJ, Kie JH, Lim W, Lee HK, Moon BI and Seoh JY (2014) Attenuation of experimental colitis in glutathione peroxidase 1 and catalase double knockout mice through enhancing regulatory T cell function. *PLoS One* 9:e95332. doi: 10.1371/journal.pone.0095332
96. Hultqvist M, Olofsson P, Holmberg J, Bäckström BT, Tordsson J and Holmdahl R (2004) Enhanced autoimmunity, arthritis, and encephalomyelitis in mice with a reduced oxidative burst due to a mutation in the *Ncf1* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:12646-51. doi:10.1073/pnas.0403831101
97. Gelderman KA, Hultqvist M, Holmberg J, Olofsson P and Holmdahl R (2006) T cell surface redox levels determine T cell reactivity and arthritis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12831-6. doi: 10.1073/pnas.0604571103
98. Khoso PA, Zhang Y, Yin H, Teng X and Li S (2019) Selenium deficiency affects immune function by influencing selenoprotein and cytokine expression in chicken spleen. *Biological trace element research* 187:506-516.
99. Clemente N, Comi C, Raineri D, Cappellano G, Vecchio D, Orilieri E, Gigliotti CL, Boggio E, Dianzani C, Sorosina M, Martinelli-Boneschi F, Caldano M, Bertolotto A, Ambrogio L, Sblattero D, Cena T, Leone M, Dianzani U and Chiocchetti A (2017) Role of Anti-Osteopontin Antibodies in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Front Immunol* 8:321. doi: 10.3389/fimmu.2017.00321
100. Lee S, Honda M, Yamamoto S, Kumagai-Takei N, Yoshitome K, Nishimura Y, Sada N, Kon S and Otsuki T (2019) Role of Nephronectin in Pathophysiology of Silicosis. *Int J Mol Sci* 20. doi: 10.3390/ijms20102581
101. Honda M, Segawa T, Ishikawa K, Maeda M, Saito Y and Kon S (2022) Nephronectin influences EAE development by regulating the Th17/Treg balance via reactive oxygen species. *Am J Physiol Cell Physiol* 322:C699-c711. doi: 10.1152/ajpcell.00376.2021

論文目録

本研究内容は、以下の論文に公表した。

- 1 **Machiko Honda**, Chiemi Kimura, Toshimitsu Uede, Shigeyuki Kon. Neutralizing antibody against osteopontin attenuates non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Journal of Cell Communication and Signaling*. 14: 223–232, 2020.
- 2 Shigeyuki Kon, **Machiko Honda**, Kiyoshi Ishikawa, Masahiro Maeda, Tatsuya Segawa. Antibodies against nephronectin ameliorate anti-type II collagen-induced arthritis in mice. *FEBS Open Bio*. 10: 107–117, 2020.
- 3 **Machiko Honda**, Tatsuya Segawa, Kiyoshi Ishikawa, Masahiro Maeda, Yoshiro Saito, Shigeyuki Kon. Nephronectin influences EAE development by regulating the Th17/Treg balance via reactive oxygen species. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 28: C699-C711, 2022.

謝 辞

本研究の遂行並びに本論文の作成にあたり、終始ご懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました、福山大学薬学部分子免疫学研究室 今重之教授に深謝致します。

また、本研究を遂行するにあたり、抗体を御供与くださりました東北大学大学院薬学研究所生命情報薬学講座 斎藤芳郎教授に深く感謝申し上げます。

最後に、本論文の審査にあたり有益なるご指導、ご助言をいただきました福山大学薬学部免疫生物学研究室 赤崎健司教授、薬物治療学研究室 井上敦子教授、病態生理・ゲノム機能学研究室 道原明宏教授に深く感謝致します。