

機関番号：34311

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790097

研究課題名 (和文) LPS による炎症性骨破壊における線維素溶解系因子 uPAR の重要性

研究課題名 (英文) The role of uPAR on the LPS-induced bone resorption.

研究代表者

菅野 陽介 (KANNO YOSUKE)

同志社女子大学・薬学部・助教

研究者番号：40416178

研究成果の概要 (和文)：

我々は、uPAR の遺伝子が欠損していると LPS によって誘導される破骨細胞への分化は抑制され、結果として骨破壊が抑制されることを発見した。また、uPAR の発現が LPS の誘導する NF- κ B の活性化を制御し、破骨細胞への分化を制御していることを明らかにした。更に、uPAR は、インテグリンを介して LPS が誘導する破骨細胞への分化に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：

We found that the absent of uPAR attenuated LPS-induced osteoclast differentiation and bone destruction. In addition, we found that uPAR regulated LPS-induced osteoclast differentiation through NF- κ B pathway. Moreover, The inhibitor of integrin pathway attenuated uPAR-increased osteoclasts differentiation. These data suggest that uPAR plays a pivotal role on the LPS-induced osteoclasts differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000 円	420,000 円	1,820,000 円
2010 年度	900,000 円	270,000 円	1,170,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000 円	690,000 円	2,990,000 円

研究分野：生化学・細胞生物学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：LPS, uPAR, 炎症性骨破壊

1. 研究開始当初の背景

骨の機能は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成により厳密に制御され恒常性が維持されている。近年、歯周病や関節炎などによる炎症が、骨吸収を引き起こすことが明らかになっている。その結果、骨形成と骨吸収のバランスが崩壊して骨量が減少し、骨粗鬆症や関節リウマチのような病態をきたす。そのため骨吸収の中心的な役割を果たす破骨細胞の機能を解明する

ことがこれらの問題を解決するために重要であると考えられる。

LPSによる炎症性骨吸収メカニズム

成熟破骨細胞へ分化するためには、骨芽細胞が発現する receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) が、破骨細胞が発現する RANK に結合することが必要である。しかしながら、近年、炎症によって、RANKL/RANK

を介さず、骨吸収が誘導されることが報告されている。歯周病の原因菌であるグラム陰性細菌細胞壁成分のリポ多糖 (Lipopolysaccharide; LPS) は、炎症性骨吸収を強力に誘導することが知られている。LPS の重要な標的細胞はマクロファージや単核球細胞であり、TNF- α 、IL-1、IL-6、IFN- γ などの炎症性サイトカインや活性酸素、亜硝酸イオン NO₂⁻ の産生を誘導する。LPS による細胞内へのシグナル伝達は、血中に存在する LPS binding protein (LBP) と LPS/LBP 複合体を形成した状態で、Toll-Like Receptor (TLR) によって行われる。LPS/LBP 複合体はマクロファージ細胞表面の CD14 と結合し、その後、TLR4 に結合し、MyD88 を介してシグナルが細胞質内に伝えられることによって、破骨細胞の分化が誘導されると考えられている。更に LPS は、骨芽細胞にも作用し、RANKL の産生を誘導させることも知られている。

線維素溶解系と破骨細胞分化

近年、本研究の中心となる uPAR は、uPA の受容体として機能してプラスミノゲンをプラスミンに変換するだけではなく、様々な機能が新たに発見されている。uPAR は、GPI アンカーを介して細胞膜に結合しているが、細胞膜を貫通していないため細胞外からの刺激を細胞内に伝えることが出来ない。しかしながら、ビトロネクチンやインテグリンなどの蛋白質と結合して、それらの働きを補強し、共受容体としての機能を果たしていることが明らかになっている。一方で、GPI アンカーが細胞膜から解離されると、uPAR 自身が G 蛋白質などのアゴニストとして機能するということが知られている。以上のように uPAR は、受容体やアゴニストとして様々な細胞の機能制御に関与していることが報告されているが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。破骨細胞の分化においても関与していることが報告されているが、その詳細な働きについては依然として明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究は、uPAR がどのように破骨細胞の機能を制御し、炎症による骨吸収に関与しているのかを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) uPAR 発現系と安定 uPAR 発現株の作製

uPAR の遺伝子を PCR によって増幅し、増幅した遺伝子を pcDNA3.1 に導入し、uPAR の遺伝子発現ベクターを作製した。作製した uPAR 遺伝子発現ベクターを破骨前駆細胞である Raw264.7 cells に遺伝子導入した。その後、

抗生物質 (G418) により遺伝子が導入されていない細胞を排除し、安定 uPAR 発現株を作製した。

(2) 炎症 (LPS) によって誘導される破骨細胞への分化における uPAR の働き

LPS、M-CSF を用いて、破骨前駆細胞である Raw264.7 cells が破骨細胞に分化する条件を確立した。続いて、1 で作製した安定 uPAR 発現株に LPS、M-CSF を添加し、破骨細胞の分化を誘導した。破骨細胞への分化度を判定するために、TRAP 染色を行った。同時に siRNA によって、uPAR の遺伝子発現を減少させた際の破骨細胞分化能を調べた。

(3) uPAR 遺伝子欠損マウスを用いた LPS による炎症性骨吸収モデルの解析

野生型マウスと uPAR 遺伝子欠損マウスに LPS を連続投与し、炎症による骨吸収モデルマウスを作製した。野生型マウスと uPAR 遺伝子欠損マウスの LPS 投与群、非投与群を CT スキャンを用いて経過観察し、骨密度の変化を調べた。同時に、骨組織のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

(4) LPS シグナル伝達における uPAR の役割

uPAR 発現株及びコントロール株に LPS を添加、回収したサンプルを用いて、ウエスタンブロット法にて I- κ B の分解の度合いをみることで、LPS が誘導する NF- κ B の活性化の違いを検討した。また、siRNA によって uPAR の遺伝子発現を減少させた細胞を用いて、上述と同様の方法にて LPS が誘導する NF- κ B の活性化の違いを検討した。

(5) uPAR 遺伝子欠損マウスの骨髄の未分化間葉系細胞を用いた破骨細胞分化能の検討

uPAR 遺伝子欠損マウス及び野生型のマウス (同週齢) より、大腿部長管骨を採取し、骨髄抽出液を得た。遠心操作により、骨髄液中の未分化間葉系細胞を回収した。これらの未分化間葉系細胞から破骨細胞へ分化誘導するために LPS、M-CSF を添加した。破骨細胞への分化度の判定には、TRAP 染色法を用いた。

(6) uPAR 結合蛋白質による破骨細胞分化機構の解析

代表的な uPAR 結合蛋白質であるインテグリンに着目し、安定型 uPAR 発現株及びコントロール株にインテグリンの阻害ペプチドを前処理後、LPS 及び M-CSF により分化誘導を行い、破骨細胞への分化能を検討した。破骨細胞への分化度の判定には、TRAP 染色法を用いた。

4. 研究成果

(1) uPAR 発現系と安定 uPAR 発現株の作製

uPAR 発現系及びその安定 uPAR 発現株の作製に成功した。

(2) 炎症 (LPS) によって誘導される破骨細胞への分化における uPAR の働き

uPAR 発現株は、コントロール株と比較し LPS によって誘導される破骨細胞への分化が惹起された (図 1)。

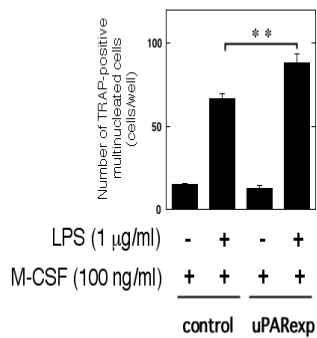


図 1

一方、siRNA によって uPAR の発現を減少させると LPS によって誘導される破骨細胞への分化は抑制された (図 2)。

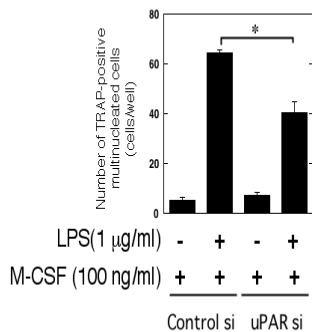


図 2

これらの結果より、LPS が誘導する破骨細胞への分化において uPAR は、重要な役割を果たしている事が示唆された。

(3) uPAR 遺伝子欠損マウスを用いた LPS による炎症性骨吸収モデルの解析

マウスを用いた LPS による炎症性骨吸収モデルの作製を行い、そのモデルマウスの作製に成功した。そのモデルマウスの骨組織において uPAR の発現が顕著に増加する事を発見した (図 3)。

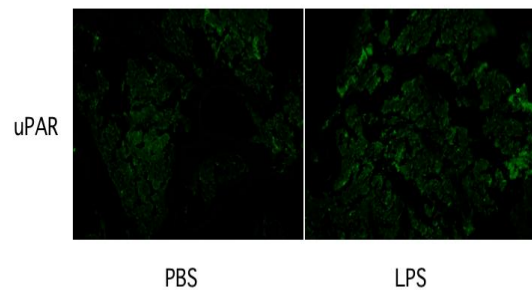


図 3

次に、野生型及び uPAR 遺伝子欠損マウスに LPS を投与し、骨密度の変化を調べたところ、uPAR 遺伝子欠損マウスでは、LPS によって誘導される骨吸収が野生型マウスと比較して抑制される事を発見した (図 4、5)。

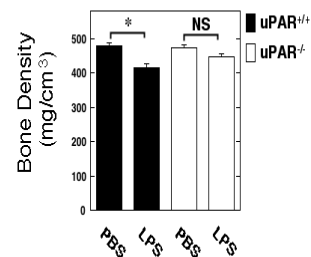


図 4

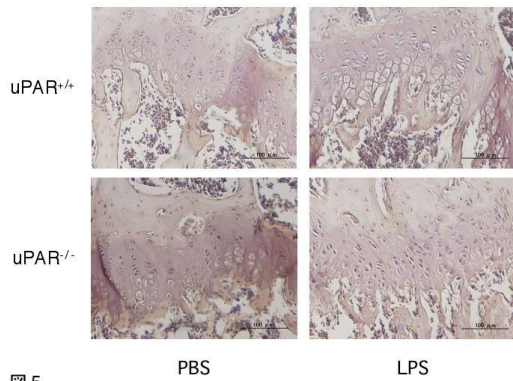


図 5

(4) LPS シグナル伝達における uPAR の役割

uPAR 発現株では、コントロール株と比較して LPS によって誘導される I-kB α の分解が増加した (図 6)。

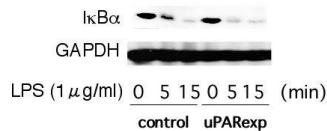


図 6

また、siRNA 法を用いて Raw264.7 cells の uPAR の遺伝子発現を抑制し、その細胞に LPS を添加したところ、LPS によって誘導される I-kB α の分解が抑制された (図 7)。

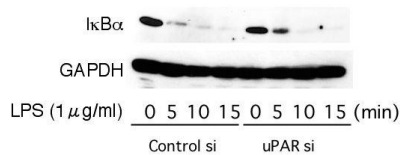


図 7

これらの結果より、uPAR の発現変化が、LPS が誘導する NF-kB のシグナル伝達を制御していることが示唆された。

(5) uPAR 遺伝子欠損マウスの骨髄の未分化間葉系細胞を用いた破骨細胞分化能の検討

野生型マウス及び uPAR 遺伝子欠損マウスから採取した骨髄細胞を用いて、LPS による

破骨細胞への分化能を検討した結果、uPAR 遺伝子欠損マウス由来の骨髄細胞からの破骨細胞への分化は、野生型マウスと比較して抑制された (図 8)。

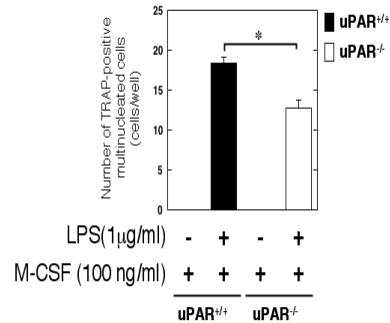


図 8

(6) uPAR 結合蛋白質による破骨細胞への分化機構の解析

安定型 uPAR 発現株及びコントロール株にインテグリンの阻害ペプチド (RGD) を前処理後、LPS 及び M-CSF により分化誘導を行い、破骨細胞への分化能を検討した結果、インテグリンの活性化を阻害することによって uPAR が誘導する破骨細胞への分化は抑制された (図 9)。

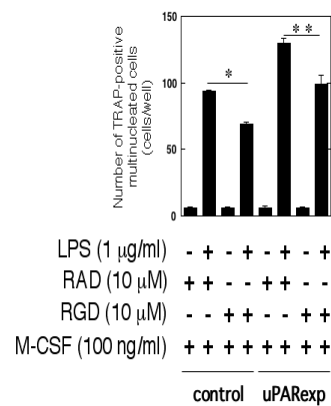


図 9

以上の結果より、uPAR がインテグリンの活性化を制御することで、LPS が誘導する破骨細胞への分化を調節していることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Yosuke Kanno, Akira Ishisaki, Eri Kawashita, Naoyuki Chosa, Keiichi Nakajima, Tatsuji Nishihara, Kuniaki Toyoshima, Kiyotaka Okada, Shigeru Ueshima, Kenji Matsushita, Osamu Matsuo, Hiroyuki Matsuno Plasminogen/Plasmin modulates bone metabolism by regulating the osteoblast and osteoclast function. J Biol Chem. 2011 286: 8952-60. 査読有
- ② Yosuke Kanno, Hiroyuki Matsuno, Eri Kawashita, Kiyotaka Okada, Hidetaka Suga, Shigeru Ueshima, Osamu Matsuo uPAR is associated with the development of adipose tissue. Thrombosis and Hemostasis 2010 104:1124-32. 査読有
- ③ Yosuke Kanno, Eri Kawashita, Misato Minamida, Aki Kaneiwa, Kiyotaka Okada, Shigeru Ueshima, Osamu Matsuo, Hiroyuki Matsuno Alpha 2-antiplasmin is associated with the progression of fibrosis. Am J Pathol. 2010 176:238-245. 査読有

[学会発表] (計3件)

- ① Yosuke Kanno, Akira Ishisaki, Eri Kawashita, Keiichi Nakajima, Kiyotaka Okada, Shigeru Ueshima, Osamu Matsuo, Hiroyuki Matsuno Plasminogen/Plasminは、骨芽細胞と破骨細胞を制御する事によって骨代謝を制御している。第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会 神戸 2010. 12
- ② Yosuke Kanno, Eri Kawashita, Kiyotaka Okada, Shigeru Ueshima, Osamu Matsuo, Hiroyuki Matsuno Plasmin and α 2-antiplasmin modulate bone metabolism by regulating the osteoblast and

osteoclast function. The 20th International Congress of the ISFP Amsterdam, 2010. 8

- ③ 菅野陽介、河下映里、岡田清孝、上嶋繁、松尾理、松野浩之 線維化病態における α 2-antiplasmin の役割 第82回日本生化学会大会 神戸 2009. 10

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 陽介 (KANO YOSUKE)
同志社女子大学・薬学部・助教
研究者番号：40416178