

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 年 ～ 2012 年

課題番号：22592097

研究課題名（和文）

血管内皮細胞における骨吸収抑制因子 OPG の新しいシグナル受容機構の解明

研究課題名（英文）

Characterization of osteoprotegerin-induced signaling in human endothelial cells

研究代表者

小林 美智代 (KOBAYASHI MICHIO)

北海道大学・創成研究機構・特任助教

研究者番号：80316265

研究成果の概要（和文）：炎症存在下でのオステオプロテゲリン（OPG）の血中濃度上昇のメカニズムとシグナル受容機構を明らかにする目的で、血液凝固因子で炎症メディエーターでもあるトロンビンが、血管内皮細胞からの OPG 産生に及ぼす作用について検討を行った。

その結果トロンビンは濃度依存的に、ヒト皮膚微小血管内皮細胞(HMVEC)から OPG 産生を誘導した。LY294002、PP1 および SCH79797 はトロンビンによる OPG 産生を抑制した。しかし、U0126 はトロンビンによる OPG 産生誘導に影響を及ぼさなかった。本実験結果より、OPG の血中濃度上昇においてトロンビンが関与しており、その情報伝達経路には PAR-1、Src および PI3K の活性が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Background and Objectives: Thrombin is a procoagulant and proinflammatory molecule that is also a potential mediator of bone resorption. Osteoprotegerin (OPG) is a key molecule that binds to the receptor-activator of the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ligand (RANKL), and inhibits osteoclast differentiation. This study aimed to evaluate the biological effects of thrombin on OPG production in human dermal microvascular endothelial cells (HMVEC). Materials and Methods: HMVEC were treated with 2.1-11.2 U/mL of thrombin for 18 h. Thrombin-induced OPG production was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Inhibitors were used to investigate the influence of thrombin on OPG production in HMVEC and the thrombin-signaling pathway. Results: Thrombin induced OPG production in HMVEC in a dose-dependent manner. The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor and Src kinase inhibitor exerted an inhibitory effect on thrombin-induced OPG expression. Thrombin-induced OPG production was also inhibited by the protease-activated receptor (PAR)-1 antagonist. Conclusion: Thrombin induces OPG expression in HMVEC, possibly through PAR-1. Thrombin-induced OPG production is regulated by the PI3K and Src pathways. These findings suggest that thrombin may play a significant role in regulating the levels of serum OPG.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学・歯学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：免疫、感染、炎症

## 1. 研究開始当初の背景

破骨細胞の活性化を抑制する **Osteoprotegerin (OPG)** は破骨細胞活性化因子 (**RANKL**) や腫瘍関連アポトーシス誘導因子 (**TRAIL**) の 1 つ (おとり) レセプターとして働くことが知られている。また臨床において、乳癌や前立腺癌などの骨転移を伴う癌や、動脈硬化や糖尿病などの血管の炎症を伴う疾患において血中濃度が上昇していることが報告されている。OPG が病的血管新生や炎症による血管石灰化に関与しているとの報告も有るが、OPG が骨代謝以外の場でのような機序で作用しているかはまだ不明である。また OPG の作用機序も不明であり、OPG が直接血管内皮細胞に作用するのか、RANKL および TRAIL の 1 つレセプターとして作用するのかも明らかではない。歯科の分野において唾液や歯肉溝浸出液の OPG 濃度は、歯槽骨の骨芽細胞と破骨細胞の活性を示す指標ととらえられている。歯肉溝浸出液中の OPG 濃度は血中の約 50~100 倍ときわめて高い。我々は歯周組織の高濃度の OPG に着目するとともに、OPG の生体での作用機序の研究をすすめてきた。

## 2. 研究の目的

炎症における血中 OPG 濃度上昇のメカニズムおよび RANKL などの相互関係を明らかにする目的で、血液凝固因子で炎症メディエーターでもある **トロンビン** が血管内皮細胞からの OPG 産生に及ぼす作用とその情報伝達経路について検討を行った。

## 3. 研究の方法

ヒト皮膚微小血管内皮細胞 (HMVEC) に **トロンビン** を添加し、18 時間および 24 時間培養を行った。必要に応じて Src キナーゼの阻害剤である **PP1** および **ERK** の阻害剤である **U0126**、**PI3K** 阻害剤である **LY294002**、**PAR-1** の阻害剤である **SCH79797** で HMVEC を 30 分間前処理を行った後に、トロンビン共存下で培養した。培養上清中の OPG 濃度は ELISA にて測定した。さらに、OPG を 1 つレセプターとする **RANKL** との相互作用を調べるために、HMVEC を **RANKL** 抗体で一時間前処理を行った後に、トロンビン共存下で培養し、炎症性サイトカインである **IL-6** および **IL-8** の産生を ELISA にて測定した。

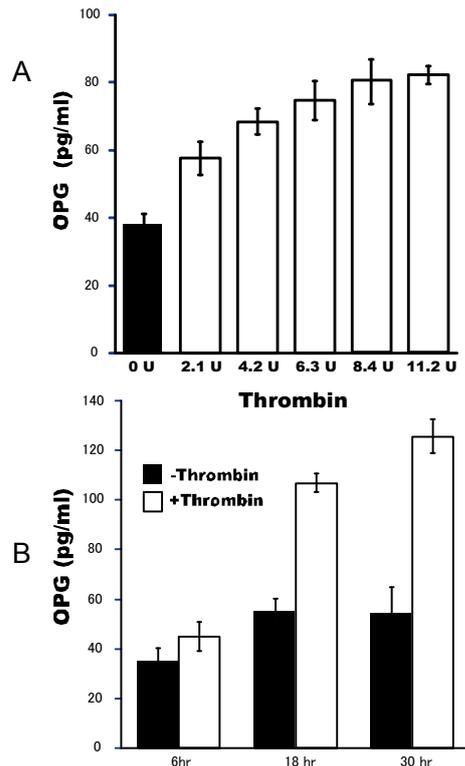
## 4. 研究成果

本実験結果より、炎症存在下での OPG の血中濃度上昇において **トロンビン** が関与している可能性 (図 1)、そしてその情報伝達経路には **PAR-1** (図 2) および **Src**、**PI3K** (図 3) の活性が関与する事が示唆された。さらに

**OPG** と **トロンビン** が炎症性サイトカイン産生を制御し、その制御メカニズムには **RANKL** が関与している可能性が示唆された (図 4)。

今後はこれらの結果を基に、**トロンビン** と **OPG** および **RANKL** と **TRAIL** との作用機構を解明する事により、OPG がどのように血液凝固や炎症、さらには歯周組織の修復に関与して行くか研究を進めて行く予定である。

図 1



## トロンビンは血管内皮細胞から OPG 産生を誘導する

A) HMVEC を示されているトリプシン濃度で刺激し 18 時間培養した後 ELISA にて OPG 濃度を測定した。トリプシン濃度依存性に OPG 産生が誘導された。

B) HMVEC をトリプシン濃度 4.2U/ml にて所定の時間培養し、培養液中の OPG 濃度を測定した。時間依存的に OPG 産生が増加した。

図 2

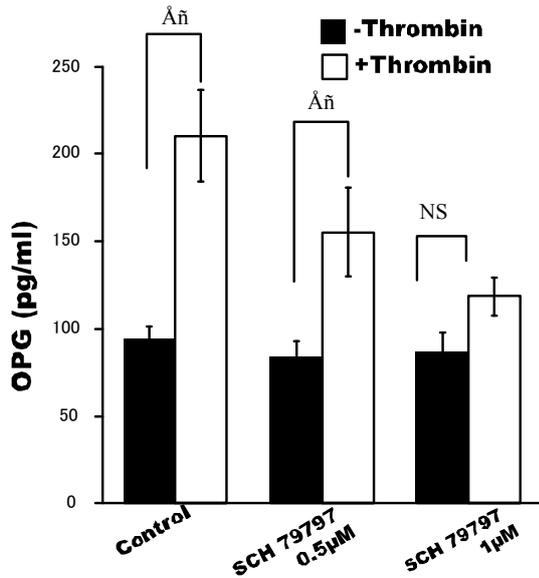


図 2 トロンビンによる OPG 産生誘導には PAR-1 が関与する

HMVEC を SCH79797 と 30 分前培養した後、トロンビン濃度 4.2U/ml にて 18 時間培養し、培養上清中の OPG 濃度を測定した。

SCH79797 濃度依存的に OPG 産生は抑制された。よって、トロンビン刺激による OPG 産生誘導には PAR-1 が関与する事が示された。

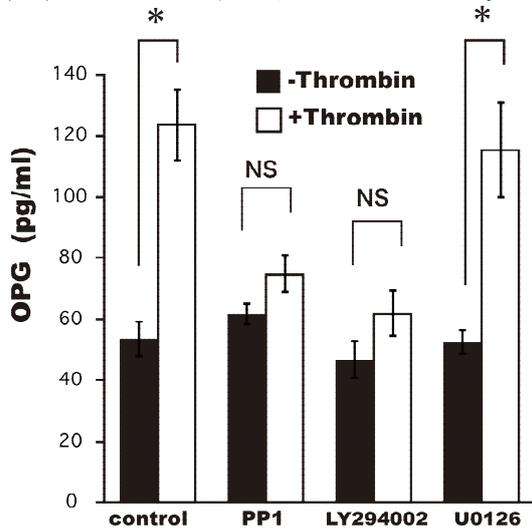


図 3 トロンビン刺激による OPG 産生誘導には Src および PI3K の活性が関与する

HMVEC を各種阻害剤と 30 分前培養した後、トロンビン濃度 4.2U/ml にて 18 時間培養し、培養上清中の OPG 濃度を測定した。

PP1 および LY294002 によりトロンビン刺激による OPG 産生は抑制されたが、U0126 は OPG

産生を抑制しなかった。よってトロンビン刺激による OPG 産生誘導には Src および PI3K の活性が関与することが示唆された。

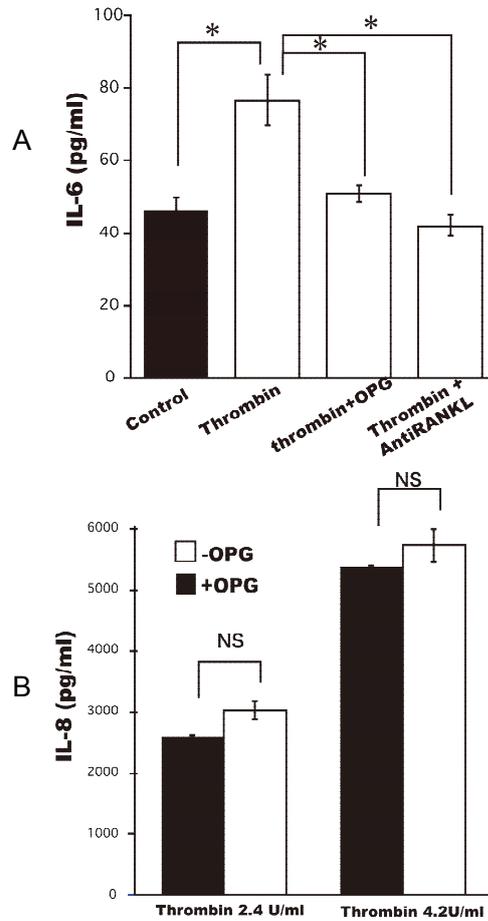


図 4 OPG はトロンビンによる IL-6 産生を制御する

HMVEC をトロンビン濃度 4.2U/ml にて 18 時間培養し、培養上清中の IL-6 濃度を測定した。必要に応じて OPG (33 ng/ml) または RANKL 抗体 (1 µg/ml) を添加し、2 時間前培養した後にトロンビンを添加し培養を行った。

トロンビンにより IL-6 産生は誘導されたが、OPG または RANKL 抗体を添加する事により、IL-6 の産生は抑制された (A)。また、OPG はトロンビンによる IL-8 の産生誘導を抑制しなかった (B)。さらに TNF-α の産生誘導も抑制しなかった。そのことより、OPG/RANKL がトロンビンによる炎症性サイトカイン産生制御に関わっており、特に IL-6 の機能メカニズムに関与している可能性が示された。

##### 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 2 件)

- ①. Nguyen SV., Icatlo FC Jr., Nakano T., Isogai E, Hirose K., Mizugai H., Kobayashi-Sakamoto M., Isogai H, Chiba I.  
Anti-glucosyltransferase IgY suppresses salivary mutans streptococci in volunteers. *The Journal of the American Dental Association* 142(8):943-9. (2011)  
(査読あり)  
<http://jada.ada.org/content/142/8/943.long>
- ②. Kobayashi-Sakamoto M., Isogai E., Holen .I. Osteoprotegerin induces cytoskeletal reorganization and activates FAK, Src, and ERK signaling in endothelial cells. *European Journal of Haematology* 85(1). 26-35 (2010) (査読あり)  
doi:10.1111/j.1600-0609.2010.01446.x
- ③.

[学会発表] (計 6 件)

- ①. 小林美智代, 広瀬公治, 千葉逸朗.  
トロンビンは血管内皮細胞においてオステオプロテゲリンの産生を誘導する. 2011年10月8日-10日, 第60回日本口腔衛生学会総会. 日本大学松戸歯学部 (松戸)
- ②. 小林美智代, 磯貝恵美子, 広瀬公治, 奥村一彦, 千葉逸朗. トロンビンは血管内皮細胞においてオステオプロテゲリンの産生を誘導する. 2011年6月2日-3日, 第32回日本炎症再生医学会. 国立京都国際会館(京都)
- ③. 小林美智代, 磯貝恵美子, 広瀬公治.  
血管内皮細胞におけるオステオプロテゲリンの役割とその作用機序の解

明. 2010年8月5日-6日, 第31回日本炎症再生医学会. 京王プラザホテル (東京) (2010)

- ④. Kobayashi-Sakamoto M., Isogai E., Hirose K., Holen I., Chiba I.  
Characterization of osteoprotegerin-induced signaling in human endothelial cells. *International and American Association for Dental Research*. July, 5-16, 2010, Centre de Convencions Internacional Barcelona, Spain
- ⑤. Okumura K., Sawada N., Isogai E., Kobayashi-Sakamoto M., Taira H., Shibata T., and Isogai H. A Human Cathelicidin hCAP18 Inhibits Tube Formation in Endothelial Cells. *International and American Association for Dental Research*. July, 5-16, 2010, Centre de Convencions Internacional Barcelona, Spain
- ⑥. Kobayashi D., Kobayashi-Sakamoto M., Isogai E., Hirose K., Holen .I. Chiba I. Inhibition of angiogenesis and cell proliferation by royal jelly. *International and American Association for Dental Research*. July, 5-16, 2010, Centre de Convencions Internacional Barcelona, Spain

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 美智代 ( KOBAYASHI MIHIYO )

北海道大学・創成研究機構・特任助教  
研究者番号：80316265

(2)研究分担者

磯貝 恵美子 ( ISOGAI EMIKO )  
東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・  
教授

研究者番号：80113570

千葉 逸朗 ( CHIBA ITSUO )  
北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号：50250460