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 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791372

研究課題名（和文）

臨床応用を目指した血液凝固関連因子による骨リモデリング制御機構の細胞生物学的研究

研究課題名（英文）

Evaluation about the role of the blood coagulation system in bone remodeling

研究代表者

吉田 格之進（YOSHIDA KAKUNOSHIN）

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50525326

研究成果の概要（和文）：

我々は、血液凝固制御系と骨形成・破壊の関連を明らかにするため、抗凝固セリンプロテアーゼである活性化プロテイン C (APC) のヒト骨芽細胞の細胞増殖、及びヒト破骨前駆細胞からの破骨細胞形成に及ぼす影響を解析した。その結果、APC は内皮細胞プロテイン C 受容体及び p44/42MAP キナーゼを介して骨芽細胞の増殖を促進すること、同様に、APC は内皮細胞プロテイン C 受容体を介して NF- κ B の活性化を阻害することにより破骨前駆細胞の破骨細胞への分化を阻害することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

It is well known that bone remodeling depends on a delicate balance between formation and resorption of bone tissues, and osteoblasts and bone-resorbing osteoclasts play central roles in this bone remodeling. But the role of the blood coagulation system in bone remodeling is still unclear. In the present study, we evaluated the effect of APC on osteoblast proliferation and osteoclast differentiation. We found that APC stimulates osteoblast proliferation by activating p44/42 MAP kinase via EPCR and suppresses human osteoclast differentiation through inactivation of NF- κ B *via* EPCR.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：(1)活性化プロテイン C (2)破骨細胞 (3)血液凝固 (4)内皮細胞プロテイン C 受容体

1. 研究開始当初の背景

最近、申請者らは、種々の抗凝固因子の骨リモデリングに対する影響を検討した。その結果、活性化プロテイン C(APC)が、そのプロテアーゼ活性非依存的に骨芽細胞の増殖を促進するとともに破骨細胞の分化を阻害するという驚くべき現象を見出した。APC は、プロテアーゼ前駆体であるプロテイン C (PC) が、血管内皮細胞上のトロンボモジュリン (TM) と複合体を形成したトロンビンにより活性化されることにより生成し、生成した APC は、凝固補酵素蛋白質の第 Va 因子と第 VIIIa 因子を分解・失活化させることにより抗凝固作用を示す。また、APC は、内皮細胞 PC 受容体 (endothelial PC receptor: EPCR) に結合して、プロテアーゼ活性化受容体-1 (protease-activated receptor-1: PAR-1) を活性化し、抗炎症・抗アポトーシス作用、細胞増殖作用など様々な生理活性作用を示すことが知られている。今回、申請者が見出した APC が骨芽細胞の増殖を促進し、破骨細胞の分化を阻害するという事実は、APC が骨リモデリングに対しても重要な役割を果たしていることを示すものである。

2. 研究の目的

こうした背景の下、本研究では、APC の骨芽細胞増殖促進作用及び破骨前駆細胞の破骨細胞への分化阻害作用の分子機序について、それぞれの培養細胞を用いて解析した。

3. 研究の方法

【1】 骨芽細胞における EPCR 及び PAR-1 の発現は RT-PCR 法及び免疫蛍光染色法を用いて評価した。抗 EPCR 抗体と抗 PAR-1 抗体の APC 誘導性の骨芽細胞増殖作用に対する影響を WST-1 assay を用いて検討した。また、骨芽細胞増殖のシグナル伝達経路における APC の作用点については、シグナル伝

達因子のリン酸化型に対する特異抗体を用いた Western blot 法を用いて明らかにした。

【2】 ヒト破骨前駆細胞からの RANKL 及び M-CSF 誘導性の破骨細胞分化は、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (Tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP) 染色で解析した。破骨細胞における EPCR, PAR-1 の発現は RT-PCR 法及び免疫蛍光染色法を用いて評価した。破骨前駆細胞の分化に関わるシグナル伝達系における APC の作用点については、転写因子の NF- κ B の活性化を NF- κ B 特異的 ELISA を用いて解析し、明らかにした。

4. 研究成果

【1】 骨芽細胞では、EPCR 及び PAR-1 の両者の発現が認められた。APC による骨芽細胞増殖促進作用は、抗 EPCR 抗体により阻害され、抗 PAR-1 抗体では影響されなかった。APC は、骨芽細胞における p44/42MAPK の活性化を促進し、その促進は抗 EPCR 抗体により抑制された。

【2】 破骨細胞では、EPCR 及び PAR-1 の両者の発現が認められた。APC による破骨細胞分化抑制作用は、抗 EPCR 抗体により阻害され、抗 PAR-1 抗体では影響されなかった。また、APC は、RANKL 及び M-CSF 誘導性の NF- κ B の活性化を阻害した。

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 20 件)

1. Yoshida K, Wada H, Hasegawa M, Wakabayashi H, Matsumoto T, Shimokariya Y, Noma K, Yamada N, Uchida A, Nobori T, Sudo A.

- Increased fibrinolysis increases bleeding in orthopedic patients receiving prophylactic fondaparinux. *Int J Hematol*. 査読有 2012, 95(2):160-6.
2. Hasegawa M, Yoshida K, Wakabayashi H, Sudo A. Pseudotumor with dominant B-lymphocyte infiltration after metal-on-metal total hip arthroplasty with a modular cup. *J Arthroplasty*. 査読有 2012, 27(3):493.e5-7.
 3. Yoshida K, Wada H, Hasegawa M, Wakabayashi H, Ando H, Oshima S, Matsumoto T, Shimokariya Y, Noma K, Yamada N, Uchida A, Nobori T, Sudo A. Monitoring for anti-Xa activity for prophylactic administration of Fondaparinux in patients with artificial joint replacement. *Int J Hematol*. 査読有 2011, 94(4):355-60.
 4. Hasegawa M, Yoshida K, Wakabayashi H, Sudo A. Minimally invasive total knee arthroplasty: comparison of jig-based technique versus computer navigation for clinical and alignment outcome. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 査読有 2011, 19(6):904-10.
 5. Yoshida K, Okamoto T, Asanuma K, Hayashi T, Suzuki K, Uchida A, Sudo A. Anticoagulant activated protein C suppresses osteoclast differentiation via endothelial protein C receptor. XXIII Congress of The International Society on Thrombosis and Haemostasis, July, 2011, Kyoto, Japan 査読有
 6. 長谷川正裕, 吉田格之進, 若林弘樹, 須藤啓. Trochanteric flip アプローチを用いた hip resurfacing の大腿骨頭血流. 中部日本整形外科災害外科学会雑誌査読有 2011, 54(5):1019-1020
 7. 吉田格之進, 長谷川正裕, 若林弘樹, 須藤啓. プレスフィットカップの固定性に影響する因子の検討. 中部日本整形外科災害外科学会雑誌. 査読有 2011, 54(5):1011-1012
 8. 吉田格之進, 長谷川正裕, 若林弘樹, 須藤啓. 50 歳未満セメントレス人工股関節全置換術の長期成績. *Hip Joint* 査読有 2011, 37:133-136
 9. 長谷川正裕, 吉田格之進, 須藤啓. 32mm コバルトクロム骨頭を用いたハイリークロスリンクポリエチレンの摩耗. *Hip Joint* 査読有 2011, 37:29-32
 10. 森川寛之, 古谷一真, 高口有香子, 吉田格之進, 長谷川正裕, 須藤啓. 人工股関節全置換術後患者に対する退院後アンケート調査. 看護介入クリニカルパスの改定に向けて. *Hip Joint* 査読有 2011, 37:Suppl. :4-6
 11. 和田英夫, 天満大志, 藤原圭人, 小川真央, 池尻誠, 松本剛史, 片山直之, 登勉, 辻明宏, 太田寛史, 土肥薫, 山田典一, 中村真潮, 伊藤正明, 吉田格之進, 長谷川正裕, 須藤啓. 人工関節置換術後のフォンダパリヌクス濃度のモニター. *心臓* 査読有 2011, 43(7):1039-1040
 12. 長谷川正裕, 吉田格之進, 若林弘樹, 須藤啓. 【運動器疾患に対する最小

- 侵襲手術】人工関節 膝関節 ナビゲーション併用最小侵襲人工膝関節全置換術の臨床的・X線学的評価.別冊整形外科 査読有 2011, 59:34-38
13. 長谷川正裕, 吉田格之進, 若林弘樹, 須藤啓広. MIS TKA における骨切り時とインプラント設置時のナビゲーションを用いた術中エラー計測. 中部日本整形外科災害外科学会雑誌 査読有 2011, 54(1):173-174
 14. Kurata T, Hayashi T, Yoshikawa T, Okamoto T, Yoshida K, Iino T, Uchida A, Suzuki K. Activated protein C stimulates osteoblast proliferation via endothelial protein C receptor. *Thromb Res.* 査読有 2010, 125(2):184-91.
 15. 長谷川正裕, 吉田格之進, 若林弘樹, 須藤啓広. Metal-on-metal THA におけるソケット設置角度の血中金属濃度への影響. 日本人工関節学会誌 査読有 2010, 40:568-569
 16. 吉田格之進, 長谷川正裕, 若林弘樹, 須藤啓広. 人工股関節再置換術におけるステム温存例の治療成績. 日本人工関節学会誌 査読有 2010, 40:108-109
 17. 長谷川正裕, 若林弘樹, 吉田格之進, 西村明展, 須藤啓広. navigation TKA の近未来 有用性と課題を科学する OrthoPilot を用いた MIS TKA の冠状面・矢状面・回旋アライメント. 日本人工関節学会誌 査読有り 2010, 40:18-19
 18. 吉田格之進, 長谷川正裕, 若林弘樹, 須藤啓広. PCA 型人工股関節の長期成績. 中部日本整形外科災害外科学会雑誌 査読有 2010, 53(4):815-816
 19. 長谷川正裕, 吉田格之進, 若林弘樹, 須藤啓広. 大径骨頭を用いた Metal-on-metal THA 後の血中金属イオン濃度. 中部日本整形外科災害外科学会雑誌 査読有 2010, 53(4):761-762
 20. 吉田格之進, 倉田竜也, 浅沼邦洋, 岡本貴行, 林辰弥, 須藤啓広, 内田淳正, 鈴木宏治. 活性化プロテイン C は骨芽細胞増殖を促進する. 日本整形外科学会誌. 84(8) : S1305, 2010 査読有
- [学会発表] (計 40 件)
1. 長谷川正裕, 吉田格之進, 若林弘樹, 須藤啓広. 大径骨頭メタルオンメタル THA (Cormet) の成績と合併症. 第 42 回日本人工関節学会 2012 年 2 月 24-25 日 宜野湾市
 2. 若林弘樹, 長谷川正裕, 吉田格之進, 西岡久寿樹, 須藤啓広. THA 後関節リウマチ患者における ADL と股関節機能の検討. 第 42 回日本人工関節学会 2012 年 2 月 24-25 日 宜野湾市
 3. Masahiro Hasegawa, Kakunoshin Yoshida, Hiroki Wakabayashi, Akihiro Sudo. METAL ION LEVELS IN METAL-ON-METAL TOTAL HIP ARTHROPLASTY WITH LARGE-DIAMETER HEAD. SICOT September 6-9, 2011 Prague
 4. Kakunoshin Yashida, Masahiro Hasegawa, Hiroki Wakabayashi, Akihiro Sudo. LONG-TERM RESULTS OF SECOND GENERATION CEMENTLESS TOTAL HIP ARTHROPLASTY. SICOT September 6-9, 2011 Prague

5. Akinobu Nishimura, Masahiro Hasegawa, Hiroki Wakabayashi, Kakunoshin Yashida, Ko Kato, Atsumasa Uchida, Akihiro SUDO. PREVALENCE AND CHARACTERISTICS OF UNILATERAL KNEE OSTEOARTHRITIS. SICOT September 6-9, 2011 Prague
6. Masahiro Hasegawa, Takahiro Iino, Kakunoshin Yshida, Shigeto Ikemura, Hiroki Wakabayashi, Akihiro SUDO. Serum Metal Ion Levels in Patients with a Large-diameter Metal-on-metal Total Hip Arthroplasty. Orthopaedic Research Society January 13-16, 2011 California
7. 長谷川正裕、吉田格之進、若林弘樹、須藤啓広. Trochanteric flip アプローチを用いた hip resurfacing の大腿骨頭血流. 第 116 回中部日本整形外科学会学術集会 2011 年 4 月 7-8 日 南国市
8. 中川太郎、長谷川正裕、吉田格之進、三浦良浩、松本寿夫、須藤啓広. 人工関節置換術後の創傷被覆剤における無作為比較試験. 第 116 回中部日本整形外科学会学術集会 2011 年 4 月 7-8 日 南国市
9. 長谷川正裕、吉田格之進、池田雄三、若林弘樹、須藤啓広. モジュラータイプの metal-on-metal THA 後に生じた pseudotumor の 1 例. 第 116 回中部日本整形外科学会学術集会 2011 年 4 月 7-8 日 南国市
10. 山田淳一、長谷川正裕、吉田格之進、若林弘樹、須藤啓広. 人工股関節再置換術後にステム折損を来した 1 例. 第 6 回東海股関節外科研究会 2011 年 6 月 11 日 名古屋市
11. 西村明展、長谷川正裕、若林弘樹、吉田格之進、福田重紀、加藤公、内田淳正、須藤啓広. 膝関節周囲骨折が片膝罹患変形性膝関節症に与える影響について—旧宮川村コホート研究より—. 第 3 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 2011 年 6 月 16-18 日 札幌市
12. 吉田格之進、長谷川正裕、若林弘樹、加藤公、須藤啓広. ポーラスコーティングの剥離により弛みを生じたセメントレス TKA の 1 例. 第 3 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 2011 年 6 月 16-18 日 札幌市
13. 鈴木慶亮、長谷川正裕、吉田格之進、新美壘、若林弘樹、須藤啓広. 人工膝関節置換術後の深部静脈血栓症予防におけるフォンダパリヌクス 1.5mg の有用性の検討. 第 3 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 2011 年 6 月 16-18 日 札幌市
14. 長谷川正裕、吉田格之進、若林弘樹、須藤啓広. ナビゲーション手術の有用性. 第 3 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 2011 年 6 月 16-18 日 札幌市
15. 長谷川正裕、吉田格之進、若林弘樹、須藤啓広. MIS UKA 後の深屈曲例の検討. 第 3 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 2011 年 6 月 16-18 日 札幌市
16. 長谷川正裕、吉田格之進、若林弘樹、須藤啓広. 大径骨頭メタルオンメタル THA の短期成績と合併症. 第 38 回日本股関節学会学術集会 2011 年 10 月 7-8 日 鹿児島市
17. 若林弘樹、長谷川正裕、吉田格之進、須藤啓広. THA 術後関節リウマチ患者における疾患活動性の股関節機能への影響. 第 38 回日本股関節学会学術集会 2011 年

- 10月7-8日 鹿児島市
18. 吉田格之進、長谷川正裕、若林弘樹、須藤啓広. MRI を用いた梨状筋の走行に関する検討. 第 38 回日本股関節学会学術集会2011年10月7-8日 鹿児島市
 19. 森川寛之、河野由貴、須藤啓広、長谷川正裕、吉田格之進. 人工股関節全置換術後のADL向上と不安定之改善～術後4日目からのシャワー浴への取り組み～. 第38回日本股関節学会学術集会 2011年10月7-8日 鹿児島市
 20. 岡嶋正幸、直江祐樹、吉田格之進、若林弘樹、長谷川正裕、須藤啓広. 最小侵襲人工股関節全置換術(MIS-THA)術後早期の機能回復について. 第38回日本股関節学会学術集会 2011年10月7-8日 鹿児島市
 21. 鈴木慶亮、長谷川正裕、吉田格之進、新美壘、若林弘樹、須藤啓広. 人工股関節置換術後のフォンダパリヌクスと早期歩行による深部静脈血栓症の予防効果. 第38回日本股関節学会学術集会 2011年10月7-8日 鹿児島市
 22. 長谷川正裕、吉田格之進、若林弘樹、須藤啓広. 鍛造製と鋳造製のメタルオンメタルTHA後における血清金属濃度の比較. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会 2011年10月20-21日 前橋市
 23. 長谷川正裕、吉田格之進、若林弘樹、須藤啓広. メタルオンメタル人工股関節の短期成績と問題点. 第117回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会 2011年10月28-29日 宇部市
 24. 若林弘樹、長谷川正裕、吉田格之進、須藤啓広. Pinnacle と S-ROM を用いた人工股関節の3年以上の成績. 第117回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会 2011年10月28-29日 宇部市
 25. 吉田格之進、長谷川正裕、若林弘樹、須藤啓広. MRI における梨状筋の走行に関する検討. 第117回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会 2011年10月28-29日 宇部市
 26. 若林弘樹、長谷川正裕、吉田格之進、須藤啓広. Pinnacle と S-ROM を用いた Metal-on-Metal 人工股関節の治療成績. 第39回日本関節病学会 2011年11月12-13日 横浜市
 27. 吉田格之進、長谷川正裕、若林弘樹、須藤啓広. MRI を用いた梨状筋走行の解析. 第39回日本関節病学会 2011年11月12-13日 横浜市
 28. 吉田格之進、林辰弥、鈴木宏治、須藤啓広. 活性化プロテインCはプロテアーゼ活性非依存的に骨芽細胞の増殖を促進する. 第33回日本血栓止血学会 2010年4月23日 鹿児島市
 29. 吉田格之進、林辰弥、鈴木宏治、須藤啓広. 破骨細胞分化における活性化プロテインCの影響. 第28回日本骨代謝学会 2010年7月21日 東京都
 30. 吉田格之進、林辰弥、鈴木宏治、須藤啓広. 活性化プロテインCは骨芽細胞増殖を促進する 第25回日本整形外科基礎学会 2010年10月14日 京都市
- [その他]
ホームページ
<http://www.medic.mie-u.ac.jp/seikeigeka/>
6. 研究組織
(1) 研究代表者
吉田 格之進 (YOSHIDA KAKUNOSHIN)
三重大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50525326
(2) 研究分担者
なし