

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 8 日現在

機関番号：34311

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790107

研究課題名（和文） 線維素溶解系因子 uPAR による炎症性骨破壊発症制御機構の解明

研究課題名（英文） The role of uPAR in the inflammation-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、LPS によって誘導される炎症性骨破壊において uPAR がどのような役割を担っているのかを明らかにすることを目的とし、研究を行った。最初に、LPS は破骨細胞において uPAR の発現を増加させるが、骨芽細胞では影響を及ぼさないことを発見した。次に、uPAR の発現が減少していると LPS が誘導する NF- $\kappa$ B の活性化は抑制され、uPAR の発現が増加していると NF- $\kappa$ B の活性化は促進されることを発見した。また、LPS が誘導する NF- $\kappa$ B の活性化及び破骨細胞への分化は uPA と uPAR との結合によって制御されることを発見した。更に、骨芽細胞において LPS が誘導する RANKL の発現機構にも uPAR が関与していることを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to clarify the role of uPAR on the LPS-induced bone resorption. We found that LPS induced the expression of uPAR in osteoclasts, but LPS did not induce the expression of uPAR in osteoblasts. We also found that the reduction of uPAR attenuated the LPS-induced NF- $\kappa$ B activation, and uPAR overexpression promoted the LPS-induced NF- $\kappa$ B activity. In addition, we demonstrated that the binding of uPA/uPAR regulates the LPS-induced NF- $\kappa$ B activation and osteoclast differentiation. Moreover, we found that uPAR is associated with LPS-induced RANKL expression in osteoblasts.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,400,000	720,000	3,120,000

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その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、過度の骨吸収を引き起こすことで、骨粗鬆症や関節リウマチのような病態をきたすことが明らかになっている。しかしながら炎症を引き起こす骨破壊進行の詳細なメカニズムは依然として明らかになっておら

ず、高齢化社会が進む日本においてその病因究明は急務である。

## 炎症性骨破壊メカニズム

成熟破骨細胞へ分化するためには、骨芽細胞が産生する receptor activator of NF- $\kappa$ 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 を介さずに、

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) や TNF- $\alpha$ 、IL-1 などの炎症性サイトカインが、骨吸収を強力に誘導することが報告されている。このメカニズムは、LPS や炎症性サイトカインによって細胞内に伝達されたシグナルが、NF- $\kappa$ B を活性化させることによって、破骨細胞の分化を誘導させるためであると考えられている。更に LPS や炎症性サイトカインは、骨芽細胞にも作用し、RANKL の産生を誘導することも知られている。

### 線維素溶解系と骨代謝

線維素溶解系の活性化因子であるウロキナーゼタイププラスミノゲンアクチベーター (uPA) は、その受容体であるウロキナーゼタイププラスミノゲンアクチベーターレセプター (uPAR) と結合することによって、不活性体であるプラスミノゲンを活性体であるプラスミン (線溶因子) に変換させる。そして、uPA/uPAR は生体内で血管内皮細胞や血小板から遊離されるプラスミノゲンアクチベーター阻害因子-1 (PAI-1) により不活性化される。uPA/uPAR により産生されたプラスミンはフィブリン (血栓) を溶解することで線溶系の中心的な役割を担うが、その活性は血液中の  $\alpha$ 2-アンチプラスミンによって抑制され制御されている。線溶因子のプラスミンは、線維素溶解系のみならず、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) などの蛋白質の限定分解を制御する機能を有することが明らかになっている。この機構によって、増殖、分化、遊走、接着などの様々な細胞機能が制御されていることが示唆されている。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。我々の研究グループも uPAR が動脈硬化、皮膚硬化、脂肪形成などに重要な役割を果たしている事を明らかにしている。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できない。しかしながら、ビトロネクチンやインテグリンなどの様々な蛋白質と結合して、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。

#### 2. 研究の目的

本研究は、線維素溶解系因子 uPAR が炎症性骨破壊の発症をどのように制御しているのかを解明する事を目的とする。

#### 3. 研究の方法

##### (1) LPS 刺激による uPAR の発現変化の解析

骨を構成する骨芽細胞、破骨細胞において、

LPS が uPAR の発現が変化させるかを明らかにするために Raw264.7 cells 及び osteoblasts に LPS を添加し、uPAR の発現量の変化を解析した。uPAR の発現変化は、定量的 RT-PCR 法を用いて行った。

##### (2) LPS によって誘導される細胞内シグナル伝達における uPAR の役割

破骨細胞への分化に必要な NF- $\kappa$ B シグナルを LPS が活性化する際に uPAR がどのように関与しているか明らかにするために、uPAR を siRNA 法にてその発現を減少させた際に LPS が誘導する NF- $\kappa$ B の活性はどのように変化するカルシフェラーゼアッセイを用いて検討した。

##### (3) LPS 及び炎症性サイトカインが誘導する破骨細胞分化における uPAR と uPAR 結合蛋白質との相互作用による影響

uPAR 発現ベクター及び uPAR の結合ドメインに遺伝子変異を持ち uPA と結合できない uPAR 発現ベクター (uPAR-Y57A) を破骨前駆細胞である Raw264.7 cells に遺伝子導入し、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することによって uPAR 発現株と変異 uPAR 発現株を作製した。その後、uPAR 発現株と変異 uPAR 発現株において LPS による破骨細胞への分化能の違いを比較検討した。同時に、integrin の中和抗体を uPAR 発現株に添加し、uPAR への integrin の結合が、破骨細胞への分化に及ぼす影響を調べた。また、LPS に uPA を追加投与し、LPS が誘導する破骨細胞への分化及び NF- $\kappa$ B の活性化に uPA が与える影響を調べた。破骨細胞への分化は、TRAP 染色により解析し、NF- $\kappa$ B の活性化は、ルシフェラーゼアッセイまたは I- $\kappa$ B の分解をウエスタンブロット法で確認することで検証した。

##### (4) LPS により骨芽細胞が産生する破骨細胞分化誘導因子産生における uPAR の役割

野生型マウス及び uPAR 遺伝子欠損マウスから骨芽細胞を初代培養した。それぞれの細胞に LPS を添加し、それによって誘導される RANKL の発現量の違いを解析した。誘導された RANKL の発現量は、定量的 RT-PCR 法を用いて解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) LPS 刺激による uPAR の発現変化の解析

Raw264.7 cells に LPS を添加した結果、uPAR の発現量は、時間に伴い顕著に増加した

(Fig. 1A)。一方、osteoblasts においては、LPS の刺激で、uPAR の発現は誘導されなかった (Fig. 1B)。uPAR の結合蛋白質である uPA の発現も Raw264.7 cells では LPS の刺激で誘導されたものの (Fig. 1C)、osteoblasts では誘導されなかった (Fig. 1D)。

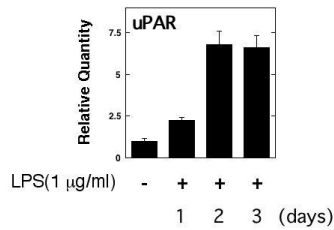


Fig. 1A

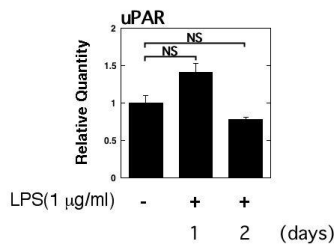


Fig. 1B

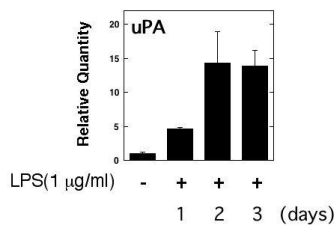


Fig. 1C

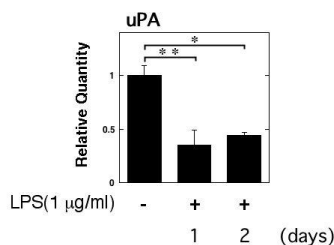


Fig. 1D

## (2) LPS によって誘導される細胞内シグナル伝達における uPAR の役割

Raw264.7 cells において uPAR の発現量を siRNA 法で減少させた後、LPS を添加し、NF-κB の活性をルシフェラーゼアッセイにより検証した。その結果、uPAR が減少していると LPS が誘導する NF-κB の活性は顕著に抑制された (Fig. 2)。

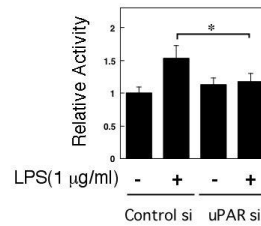


Fig. 2

## (3) LPS 及び炎症性サイトカインが誘導する破骨細胞分化における uPAR と uPAR 結合蛋白質との相互作用による影響

Raw264.7 cells に uPAR 発現ベクター及び uPAR の結合ドメインに遺伝子変異を持ち uPA と結合できない uPAR 発現ベクター (uPAR-Y57A) を遺伝子導入し、安定発現株の作製に成功した。その安定発現株に LPS を添加し、破骨細胞の分化を調べた結果、uPAR の発現増加は、LPS による破骨細胞の分化を促進し、uPAR に uPA が結合できない条件では破骨細胞の分化は抑制された (Fig. 3A)。また、LPS が誘導する NF-κB の活性化も uPAR の発現が増加すると促進され、uPAR に uPA が結合できない条件では抑制された (Fig. 3B)。I-κB の分解も uPAR の発現が増加すると促進され、uPAR に uPA が結合できない条件では抑制された (Fig. 3C)。また、uPAR が制御している破骨細胞への分化に integrin β3 が関与しているかどうかを中和抗体によって検証した結果、integrin β3 の中和によって、uPAR によって促進された破骨細胞の分化は抑制された (Fig. 3D)。また、uPA の追加投与は LPS が誘導する破骨細胞分化 (Fig. 3E) 及び NF-κB の活性化 (Fig. 3F) を抑制した。

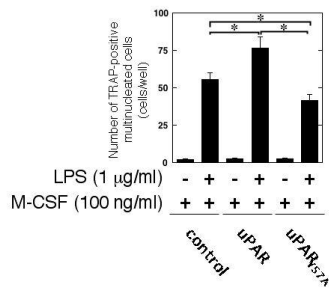


Fig. 3A

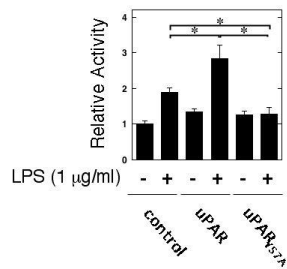


Fig. 3B



Fig. 3C

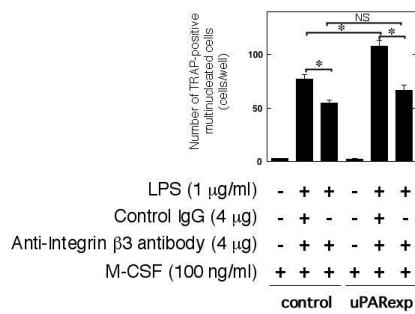


Fig. 3D

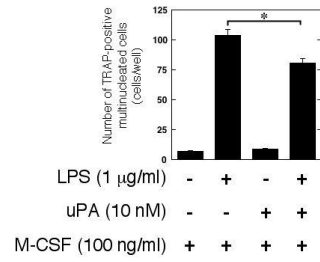


Fig. 3E

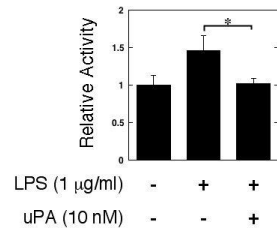


Fig. 3F

#### (4) LPS により骨芽細胞が産生する破骨細胞分化誘導因子産生における uPAR の役割

野生型及び uPAR 欠損マウスから初代培養した骨芽細胞に LPS を添加し、RANKL の発現を調べた結果、uPAR が欠損していると LPS によって誘導された RANKL の発現は顕著に抑制された (Fig. 4A)。同様に、野生型及び uPA 欠損マウスから初代培養した骨芽細胞に LPS を添加し、RANKL の発現を調べた結果、uPA が欠損していると LPS によって誘導された RANKL の発現は顕著に亢進した (Fig. 4B)。

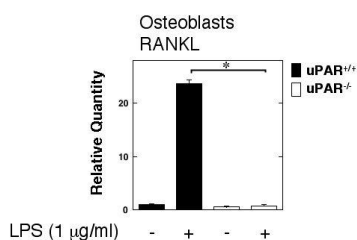


Fig. 4A

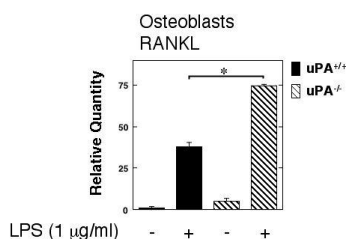


Fig. 4B

#### 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 1 件)

1. Yosuke Kanno, Eri Kawashita, Akiko Kokado, Kiyotaka Okada, Shigeru Ueshima, Osamu Matsuo, Hiroyuki Matsuno Alpha2-antiplasmin regulates the development of dermal fibrosis by PGF2a synthesis through ATGL/iPLA2. Arthritis Rheum. 2013 65:492-502. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

1. Y. Kanno - E. Kawashita - A. Kokado - K. Okada - S. Ueshima - H. Kaji - O. Matsuo - H. Matsuno ALPHA2-ANTIPLASMIN REGULATES THE DEVELOPMENT OF FIBROSIS BY PGF2alpha SYNTHESIS THROUGH ATGL/IPLA2. The 58th Scientific and Standardization

Committee (SSC) meeting of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) Liverpool, United Kingdom (27-30.06.2012)

2. H. Yasui- Y. Kanno - E. Kawashita - H. Nakagawa - M. Yamanaka - H. Matsuno CILOSTAZOL IMPROVES AN ACCUMULATION OF Abeta BY LRP-1 EXPRESSION ON ENDOTHELIAL CELLS The 58th Scientific and Standardization Committee (SSC) meeting of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) Liverpool, United Kingdom (27-30.06.2012).

3. E. Kawashita - Y. Kanno - H. Asayama- K. Okada - S. Ueshima - H. Kaji - O. Matsuo - H. Matsuno Involvement of ALPHA2-ANTIPLASMIN in dendric growth during memory formation. The 58th Scientific and Standardization Committee (SSC) meeting of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) Liverpool, United Kingdom (27-30.06.2012).

4. 小門亜希子、菅野陽介、河下映里、岡田清孝、上嶋繁、松尾理、松野浩之 血管の石灰化における plasmin の役割 第 55 回日本糖尿病学会 横浜 2012 年 5 月 17-19 日

5. 岸本奈緒美、菅野陽介、河下映里、岡田清孝、上嶋繁、松尾理、松野浩之線溶系因子が血栓形成後の内膜肥厚へ及ぼす影響の検討 第 84 回日本生化学会大会 京都 2011 年 9 月 21-24 日

6. 小井出望里、菅野陽介、石崎明、河下映里、岡田清孝、上嶋繁、松尾理、松野浩之 閉経後骨粗鬆症モデルマウスにお

ける plasmin の骨への影響 第 8 4 回日本生化学会大会 京都 2 0 1 1 年 9 月 2 1 - 2 4 日

7. 河下映里、菅野陽介、朝山遥、岡田清孝、上嶋繁、松尾理、松野浩之 記憶形成における alpha2-antiplasmin の役割 第 8 4 回日本生化学会大会 京都 2 0 1 1 年 9 月 2 1 - 2 4 日

8. Yosuke Kanno alpha2-antiplasmin: Clinical significance and therapeutic opportunities Educational Session XXIII congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 57<sup>th</sup> Annual SSC meeting Kyoto, July 23-28, 2011

9. Yosuke Kanno, Eri Kawashita, Kiyotaka Okada, Shigeru Ueshima, Osamu Matsuo, Hiroyuki Matsuno Plasminogen/Plasmin modulates bone metabolism by regulating the osteoblast and osteoclast function. XXIII congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 57<sup>th</sup> Annual SSC meeting Kyoto, July 23-28, 2011

10. Eri Kawashita, Yosuke Kanno, Haruka Asayama, Kiyotaka Okada, Shigeru Ueshima, Osamu Matsuo, Hiroyuki Matsuno Involvement of alpha2AP in age-related cognitive decline XXIII congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 57<sup>th</sup> Annual SSC meeting Kyoto, July 23-28, 2011

[その他]

ホームページ等

同志社女子大学 研究者データベース

[http://research-db.dwc.doshisha.ac.jp/rd/html/japanese/researchershtml/2842/2842\\_Researcher.html](http://research-db.dwc.doshisha.ac.jp/rd/html/japanese/researchershtml/2842/2842_Researcher.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 陽介 (KANNO YOSUKE)

研究者番号 : 40416178

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :