

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 26 日現在

機関番号：34311

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460078

研究課題名(和文) uPA / uPARによる炎症性破骨細胞分化制御機構を用いた骨破壊の治療法の開発

研究課題名(英文) The roles of uPA/uPAR on the inflammatory osteoclastogenesis

## 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：炎症によって引き起こされる骨破壊の詳細なメカニズムを明らかにすると共に炎症性骨破壊に対する治療法を開発することを目的として本研究に着手し、uPAが、AMPKの活性化を誘導することで、炎症性破骨細胞分化を抑制すること、uPARがintegrin/Akt経路を活性化することで炎症性破骨細胞分化を制御すること、uPARが炎症によって誘導されるTNF- $\alpha$ の産生を制御していることを示し、uPA/uPARが炎症性の骨破壊において重要な役割を果た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 uPA/uPAR on the inflammatory bone loss. We found that uPA attenuated inflammatory osteoclastogenesis through the activation of AMPK. Additionally, we found that uPAR regulated inflammatory osteoclastogenesis through the integrin/Akt pathway. Moreover, we found that uPAR regulated inflammation-induced TNF- $\alpha$  production. These data suggest that uPA/uPAR plays an important roles on the inflammatory bone loss.

研究分野：細胞生物学

キーワード：uPAR uPA LPS osteoclast bone

1. 研究開始当初の背景

**炎症性骨破壊メカニズム**

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。しかしながら、近年、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。通常、成熟破骨細胞へ分化は、骨芽細胞が産生する receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) が、破骨前駆細胞に発現する RANK に結合することによって行われるが、LPS や炎症性サイトカインは、RANKL/RANK とは異なる経路で NF- $\kappa$ B を活性化し、破骨細胞の分化・骨破壊の進行を惹起すると考えられている。LPS や炎症性サイトカインはまた、骨芽細胞にも作用することで RANKL の産生を誘導し、産生された RANKL が骨破壊を惹起するとも考えられている。

**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 Urokinase type Plasminogen Activator (uPA) は、その受容体である uPA receptor (uPAR) と結合することによって、不活性体である Plasminogen (Plg) を活性体である Plasmin (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 Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) により不活性化される。uPA/uPAR により産生された Plasmin は Fibrin (血栓) を溶解することで線維素溶解系の中心的な役割を担うが、その活性は血液中の  $\alpha$ 2-antiplasmin によって抑制され制御されている。線溶因子の Plasmin は、線維素溶解系のみならず、Matrix Metalloproteinase (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、uPA/uPAR は、Plg を Plasmin に変換するだけでなく、様々な機能を有すること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 は細胞膜を貫通していない GPI アンカー型の受容体であるため、uPA との結合が直接細胞内にシグナルを伝えることはないが、Integrin などの様々な蛋白質と結合して、それらの働きを補強する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。骨代謝において Plasmin, uPA (Everts V et al., Bone 2008 43:915-20) 及び uPAR (Furlan F et al., J Bone Miner Res. 2007

22:1387-96) が重要な役割を果たしていることは報告されているが、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、線維素溶解系因子である uPA と uPAR に着目し、炎症によって引き起こされる骨破壊の詳細なメカニズムを明らかにすると共に炎症性骨破壊に対する治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

uPA と uPAR が、どのような因子を介し、どのようなシグナル伝達経路を制御することで、炎症によって誘導される破骨細胞への分化及び骨破壊を惹起・抑制しているのかを明らかにし、その制御メカニズムを治療法の開発に応用することを目的とし、研究を行う。具体的には、uPA/uPAR が炎症によって誘導される NF- $\kappa$ B の活性化をどのように制御しているのかを明らかにする。同時に、uPAR の中和が、炎症によって誘導される破骨細胞への分化及び骨破壊を抑制するかどうかを確認し、この uPA/uPAR による炎症性骨破壊制御機構が治療に応用できるかどうかを検証する。

4. 研究成果

(1) uPA が制御する LPS 誘導性破骨細胞分化における AMPK の役割

AMPK が炎症によって誘導される破骨細胞分化も抑制するか明らかにするために、AMPK の agonist として知られる AICAR を添加した。その結果、AICAR は LPS 誘導性の炎症性破骨細胞分化を抑制し (Fig. 1A)、uPA が抑制する LPS 誘導性の炎症性破骨細胞分化は、AMPK の阻害剤 compound C によって回復した (Fig. 1B)。

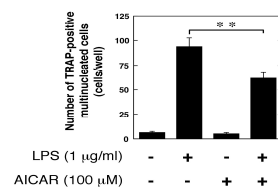


Fig. 1A

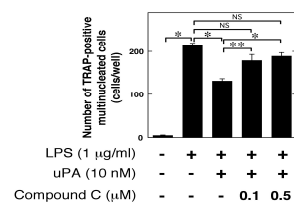


Fig. 1B

(2) uPAR の中和が LPS 誘導性破骨細胞分化に与える影響

uPAR の中和抗体をマウスに投与した結果、LPS が誘導する骨密度の減少及び破骨細胞の産生を緩和した (Fig. 2A, B)。

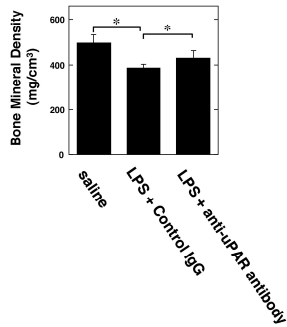


Fig. 2A

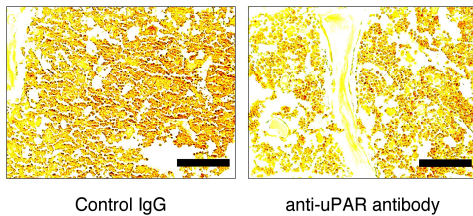


Fig. 2B

(3) uPAR による LPS 誘導性破骨細胞分化制御機構の解明

破骨細胞の分化に Akt が関与していることは既に報告されているが、本研究において uPAR が強く発現している細胞が、Akt の活性化を促進することを明らかにした (Fig. 3A)。また、Akt の阻害剤を添加すると uPAR の強発現によって促進された炎症性破骨細胞分化は抑制されることがわかり、uPAR が促進する炎症性破骨細胞分化には Akt シグナルが関与していることを明らかにした (Fig. 3B)。更に、また、uPAR が誘導する Akt シグナルは中和抗体による integrin の機能抑制によって抑制され、uPAR が integrin を介して Akt の活性化に関与していることが示唆された (Fig. 3C, D)。

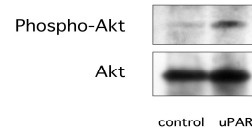


Fig. 3A

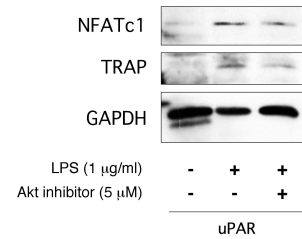


Fig. 3B

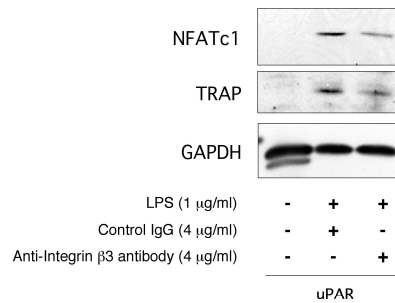


Fig. 3C

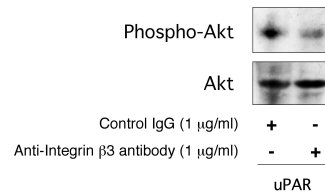


Fig. 3D

(4) LPS が誘導する TNF- $\alpha$ 産生における uPAR の役割

炎症性の破骨細胞分化に重要な役割を果たしている TNF- $\alpha$ の産生における uPAR の役割について解析し、uPAR 欠損及び siRNA 法によって uPAR の発現を減少させると LPS が誘導する TNF- $\alpha$ の産生は顕著に抑制された。一方で、uPAR 強発現細胞では、LPS が誘導する TNF- $\alpha$ の産生が増加した (Fig. 4A-C)。uPAR が調節する LPS 誘導性 TNF- $\alpha$ の産生にも integrin が関与していることを、中和抗体を用いて明らかにした (Fig. 4D)。これらの結果より、uPAR は、LPS が誘導する TNF- $\alpha$ の産生において重要な役割を果たし、炎症性の破骨細胞の分化を制御していることが明らかにされた。

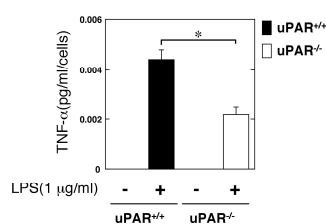


Fig. 4A

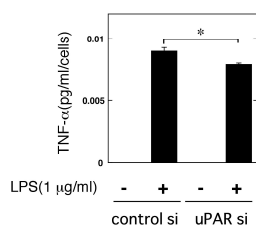


Fig. 4B

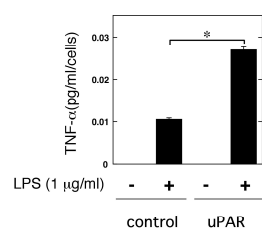


Fig. 4C

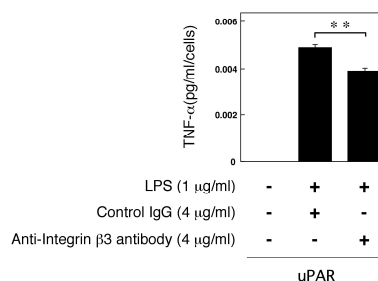


Fig. 4D

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 )

Kanno Y, Kawashita E, Kokado A, Kuretake H, Ikeda K, Okada K, Seishima M, Ueshima S, Matsuo O, Matsuno H.  $\alpha$ 2AP mediated myofibroblast formation and the development of renal fibrosis in unilateral ureteral obstruction. *Sci Rep*. 4:5967 (2014)

Kanno Y, Ishisaki A, Kawashita E, Kuretake H, Ikeda K, Matsuo O. uPA attenuated LPS-induced inflammatory osteoclastogenesis through the plasmin/PAR-1/Ca<sup>2+</sup>/CaMKK/AMPK axis. *Int J Biol Sci*. 12 63-71 (2016)

[ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

Kanno Y, Kokado A, Kawashita E, Tani M, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Matsuno H. The role of  $\alpha$ 2AP in the development of renal interstitial fibrosis. XXIV Congress of the international society on thrombosis and hemostasis. Amsterdam, Netherlands (2013.6)

呉竹 紘実、河下 映里、池田 夏菜子、菅野 陽介 骨代謝における alpha2-antiplasmin の役割 第 64 回 日本薬学会近畿支部総会・大会 京都 (2014.10)

呉竹 紘実、菅野 陽介、河下 映里、池田 夏菜子、松尾 理 骨代謝における alpha2-antiplasmin の役割 日本薬学会 第 135 年会 神戸 (2015.3)

[ 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  
同志社女子大学 研究者データベース

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：