

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861303

研究課題名(和文) 椎間板変性におけるmTORの役割の解明

研究課題名(英文) Novel function of mTOR in inducing intervertebral disc degeneration

研究代表者

若生 政憲 (WAKO, Masanori)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：30402077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：凝固・線溶系の骨折修復への影響、特にトロンビンと骨折修復に関する研究を行った。マウス骨芽細胞株MC3T3のPAR-1受容体の発現をWB法で確認した。トロンビン刺激によってMC3T3細胞のMCP-1、TFの発現量がRNAレベル、タンパクレベルともに増強されていた。発現されたMCP-1は上清中に放出されRAW細胞の遊走を促した。これらの反応は、LY294002、PD98059およびSCH79797により抑制された。骨折モデルマウスの骨折部、仮骨部には正常骨髄にはないトロンビンの発現がみられ、同部位にMCP-1、TFの発現をみた。本研究は、トロンビンが骨芽細胞機能の一部を制御する可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：We herein report various effects of thrombin on mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. MC3T3-E1 cells expressed PAR1, also known as the coagulation factor II receptor. They also produced MCP-1, tissue factor (TF), MCSF and IL-6 upon thrombin stimulation through PI3K-Akt and MEK-Erk1/2 but not the MKK-p38 pathway. Furthermore, MCP-1 obtained from thrombin-stimulated MC3T3-E1 cells induced migration by macrophage RAW264 cells. All these effects of thrombin on MC3T3-E1 cells were abolished by the selective non-peptide thrombin receptor inhibitor SCH79797. We also found that thrombin, PAR-1, MCP-1, TF as well as phosphorylated AKT and p42/44 were significantly expressed at the fracture site of mouse femoral bone. Collectively, thrombin/PAR-1 interaction regulated MCP-1, TF, MCSF and IL-6 production by MC3T3-E1 cells. Furthermore, MCP-1 induced RAW264 cell migration. Thrombin may thus be a novel cytokine that regulates several aspects of osteoblast function and fracture healing.

研究分野：骨軟骨代謝

キーワード：トロンビン PAR-1 MCP-1 migration

### 1. 研究開始当初の背景

マウス椎間板における mTOR のオートファジーに関する研究を進めるものの、実験が予定通り進まず、研究方針を変更した。我々は過去に線溶系と骨代謝に関する報告をしてきたので、これに関する研究を進めた。

骨折修復のプロセスは完全には解明されていない。一般に、このプロセスは 1) 炎症 2) 修復 3) リモデリングの 3 段階に分けられる。炎症期には、骨折部位における血腫が、骨形成、軟骨形成および脂肪生成能を有する間葉系幹細胞 (MSC) を誘導する。また、インターロイキン 1、IL-6 及び TNF- $\alpha$  を含むいくつかのサイトカインは、骨折の際の血腫において増加し、これらのサイトカインの重要性は既に確立されている。最近では、間質由来因子 (SDF)-1 及び単球走化性タンパク質 (MCP)-1 などのケモカインは、骨折の修復に影響を与えることが報告されている。

凝固系は内因性および外因性経路に分けられ、骨折の際は内因性経路よりも外因性経路が血腫の調節に関係するとされている。外因性経路が一旦活性化されると、トロンピンが産生され、それがフィブリノーゲンをフィブリンに変換する。また、線溶系の活性化は、フィブリンの堆積物を溶解するプラスミンの生成につながり、この過程は PAI-1 (プラスミノゲン活性化抑制因子) によって調節される。PAR-1 はトロンピンに対する受容体であり、広く正常細胞と癌細胞の両方において発現している。PAR-1 の機能は、細胞の種類に依存するとされているが、骨芽細胞に対する作用は依然として不明である。臨床では、抗凝固剤の投与によるトロンピンの阻害や抗線維素溶解薬の投与によるプラスミンの阻害により、骨折の修復と骨代謝の調節が可能なことがわかっている。

### 2. 研究の目的

骨折の際には、トロンピンが活性化し凝血促進状態となる。しかし、骨折の際のその生理的役割と骨芽細胞との関係は不明な点が多い。骨折治癒過程においてトロンピンが PAR-1 を介して炎症期にどのように影響したか、特に骨芽細胞に対する作用について評価することを目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

(1) マウス骨芽細胞 MC3T3-E1 を培養し、トロンピン受容体である PAR-1 の発現を検討する。タンパクレベルでの PAR-1 の発現をウエスタンブロット法で測定する (過去に報告のある RAW264 細胞をポジティブコントロールとした)。細胞は 0nM、50nM、100nM のトロンピンでそれぞれ刺激したものを測定。

(2) MC3T3-E1 をトロンピンで刺激することにより炎症性サイトカインである MCP-1、MCSF、IL-6、TNF- $\alpha$  が発現するかを調べる。

MC3T3-E1 を 0~200 nM のトロンピン刺激下に培養し、上清中の MCP-1、MCSF、IL-6、TNF- $\alpha$  をウエスタンブロット法で測定。

(3) MC3T3-E1 細胞の TF 発現について検討する。MC3T3-E1 を 12.5~200nM の濃度のトロンピン刺激下に 48 時間培養し、細胞表面上の TF を FACS にて測定。

MC3T3-E1 を 0~200 nM のトロンピン刺激下に 24 時間培養し、TF の mRNA を PCR にて評価。

MC3T3-E1 を 100 nM トロンピンと 100 nM トロンピン + PAR-1 の阻害剤である SCH79797 刺激下に培養し、TF の mRNA を PCR にて評価。

と同様の条件で培養した MC3T3-E1 を TF にて免疫染色を行う。

(4) トロンピン刺激による MC3T3-E1 における MCP-1 の発現の変化を検討し、この MCP-1 による細胞の遊走能を検討する。

MC3T3-E1 を 0~200 nM のトロンピン刺激下に培養し、MCP-1 の mRNA を PCR にて評価。

MC3T3-E1 を 100 nM トロンピンと 100 nM トロンピン + 0.3  $\mu$ M SCH79797 刺激下に培養し、MCP-1 のタンパク発現をウエスタンブロット法で測定。

と同様の条件で培養した MC3T3-E1 を MCP-1 にて免疫染色を行う。

と同様の条件で MC3T3-E1 を培養し、上清中の MCP-1 を ELISA で測定。

MC3T3-E1 を 0~200 nM のトロンピン刺激下 (0.3  $\mu$ M SCH79797 を加えたものと加えないもの) で培養した条件で RAW264 の migration assay を行う。

Cell migration assay



(5) MC3T3-E1 に対するトロンピンのシグナル伝達経路を検討する。

MC3T3-E1 を 100 nM トロンピンに、PI 3-kinase の阻害剤である LY294002、MAPK の阻害剤である PD98059、SCH79797 を加えて培養し、ウエスタンブロット法でリン酸化 Akt, Akt, リン酸化 Erk P42/44, Erk P42/44 をみる。

と同様に培養した上清中の MCP-1、IL-6 を ELISA で測定する。

トロンピンと LY294002、PD98059 刺激下に MC3T3-E1 を培養し RAW264 の migration assay を行う。

トロンピンと LY294002、PD98059 刺激下に MC3T3-E1 を培養し、リン酸化 Akt, Akt, リン酸化 Erk P42/44, Erk P42/44 のウエスタンブロットを行い、PI3K-AKT シグナルと MAPK-Erk P42/44 シグナルのどちらが上流なのかを検討する。

(6) マウスの骨折モデルを作成し、骨折部位

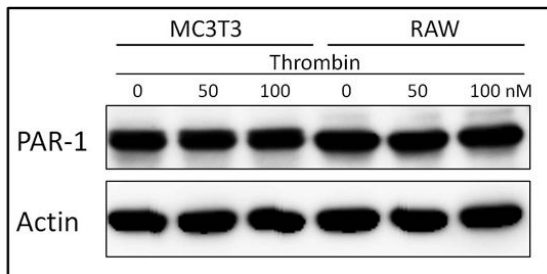
での凝固関連因子の局在を検討する。

8週齢の雄 C57BL / 6 マウスを用い、全身麻酔下に人工的に左大腿骨を骨折させ、骨折モデルを作成した。マウスは3群に分けた：1- メジャー骨折、2- マイナー骨折、3- コントロール（骨折なし）（各群 n = 3）。マウスは二酸化炭素吸入により1週間（9週齢）後に屠殺した。その後、大腿骨を固定、脱灰したのち、HE染色、サフラニンO染色、アルシアンブルー染色、アルカリホスファターゼ染色、TRACP染色を行った。

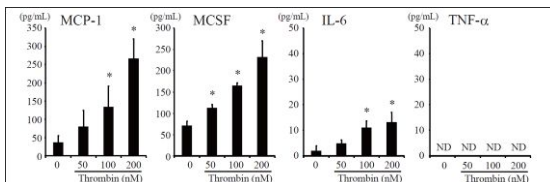
同様の組織を用いてトロンビン、PAR-1、MCP-1、TF、リン酸化 AKT、リン酸化 P42 / 44 の免疫染色を行った。

#### 4. 研究成果

(1) MC3T3-E1 におけるタンパクレベルでの PAR-1 がポジティブコントロールと同等に発現することをウエスタンブロット法にて確認した。また、これらの発現量はトロンビン刺激により変化はなかった。

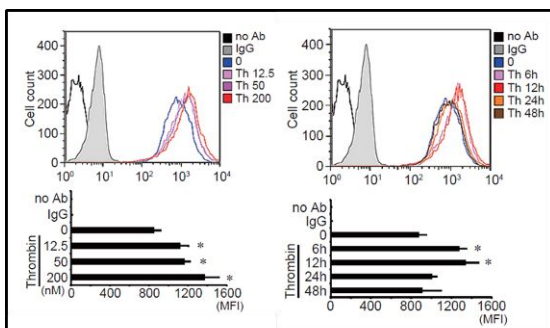


(2) MC3T3-E1 をトロンビン刺激することにより、トロンビンの容量依存性に MCP-1、MCSF、IL-6 の産生が誘導されることを ELISA で確認した。



(3) MC3T3-E1 細胞の TF 発現

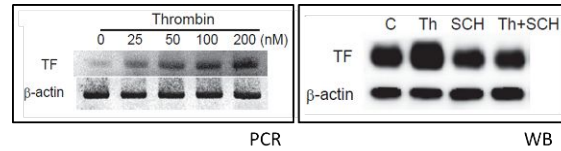
トロンビンは容量依存的に6~12時間をピークに MC3T3-E1 の細胞表面上の TF 発現を増加させることを FACS で確信した。



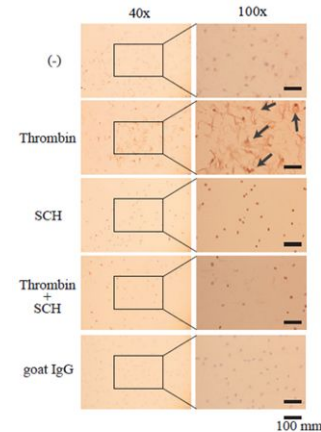
FACS

トロンビンの容量依存性に MC3T3-E1 における TF の mRNA の発現が増加することを PCR で確認した。また、タンパクレベルでもトロン

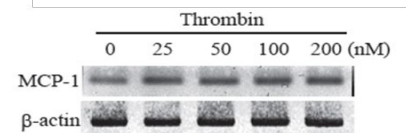
ビン刺激により TF の産生が増加し、それが阻害剤 SCH79797 を加えることにより抑えられることをウエスタンブロット法で確認した。



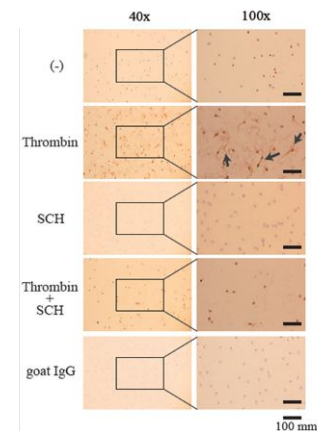
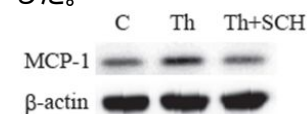
また、TF の免疫染色を行い、ウエスタンブロット法と同様の結果を得た。



(4) トロンビンの容量依存性に MC3T3-E1 における MCP-1 の mRNA の発現が増加することを PCR で確認した。

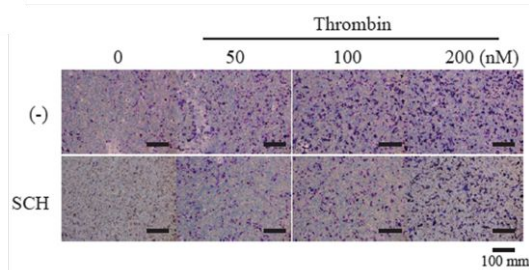


また、タンパクレベルでもトロンビン刺激により MCP-1 の産生が増加し、それが阻害剤 SCH79797 を加えることにより抑えられることをウエスタンブロット法、免疫染色で確認した。

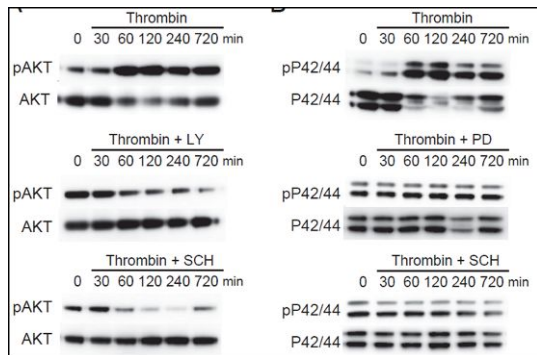


MC3T3-E1 で RAW264 の migration assay を行

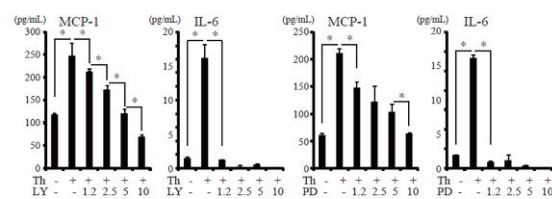
うとトロンビンの容量依存性に migration が増強し、SCH79797 を加えることによりそれが抑制された。



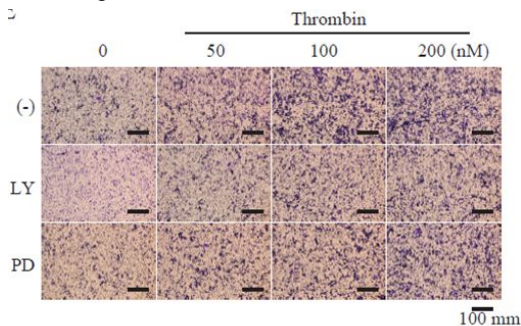
(5) MC3T3-E1 でトロンビンによって誘導される MCP-1 及び IL-6 産生に与える細胞内シグナル伝達経路を解明するために、阻害剤の効果を調べた。AKT のリン酸化は、MC3T3-E1 細胞のトロンビン処理によって誘導され、これは、LY294002、または SCH79797 の添加により抑制された。また、ErkP42 / 44 のリン酸化は同様にトロンビン処理によって誘導され、PD98059、SCH79797 の添加により抑制された。



また、トロンビンによる MCP-1、IL-6 の誘導は LY294002、PD98059 を加えることにより容量依存性に抑制されることを ELISA にて確認した。

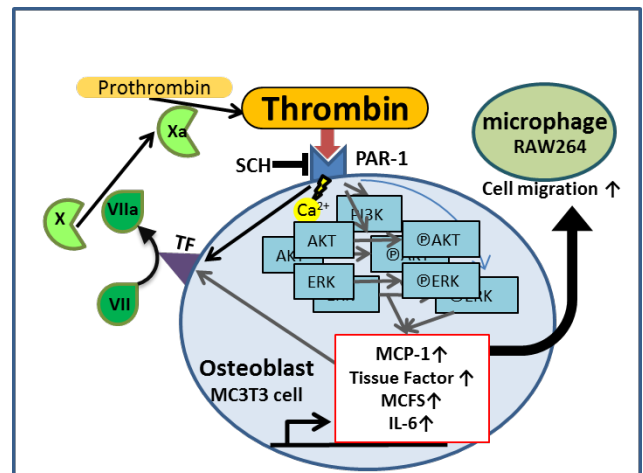
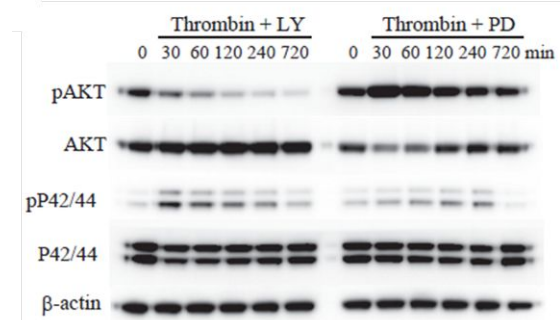


RAW264 の migration assay において LY294002、PD98059 でトロンビン刺激を抑制することにより migration が抑制された。

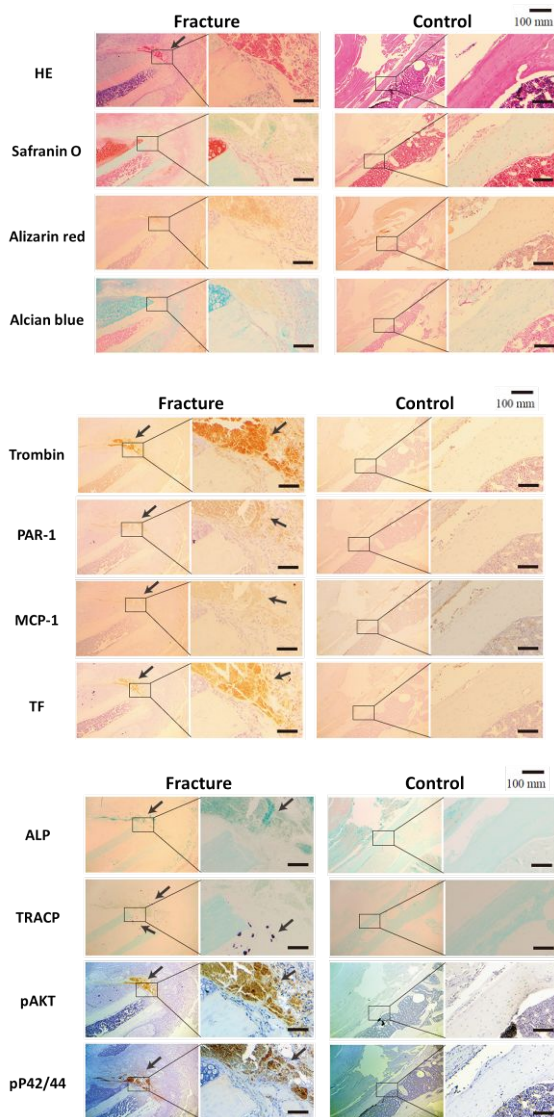


MC3T3-E1 細胞のトロンビン処理によって誘

導される AKT および ErkP42/ 44 のリン酸化は、PI3K 阻害剤 LY294002 の添加によって抑制された。しかし、MAPK 阻害剤 PD98059 は、ErkP42/44 のリン酸化を抑制したが、AKT のリン酸化レベルに影響しなかった。これらの結果は、MC3T3-E1 細胞は、トロンビンによって活性化されたときに、PI3K-AKT シグナル伝達は、MAPK-ERK シグナルからおそらく上流にあることを示唆した。



(6) 骨折モデルにおける免疫染色  
メジャー骨折ではマイナー骨折よりも ALP 陽性細胞を多く認めた。一方、マイナー骨折は、メジャー骨折よりも多くの TRACP 陽性細胞を認めた。トロンビン、PAR-1、TF はマイナー骨折よりもメジャー骨折でより多く発現していた。逆に、MCP-1 は、マイナー骨折で多く認めた。対照的に、コントロールの正常な骨皮質には陽性に染色された細胞はなかった。また、リン酸化 AKT-およびリン酸化 P42 / 44 陽性細胞は、トロンビン陽性領域に非常に近いことが見出されました。これらの結果は、トロンビンは、PAR-1 / PI3K-AKT および MAPK の P42 / in vivo での 44 のシグナル経路を介して活性化骨芽細胞による MCP-1、TF 産生を誘導することを示唆した。



(2) 研究協力者

波呂 浩孝 (HARO, Hirotaka)

山梨大学・総合研究部

・教授

研究者番号：10313264

安藤 隆 (ANDO, Takashi)

山梨大学・総合研究部

・助教

研究者番号：10377492

佐藤 信隆 (SATO, Nobutaka)

山梨大学・総合研究部

・助教

研究者番号：00418716

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)

〔学会発表〕(計1件)

安藤隆, 市川二郎, 大場哲郎, 佐藤信隆,  
齊藤正憲, 波呂浩孝 “マウスおよびヒト  
 骨芽細胞様細胞へのトロンビン刺激は  
 PAR-1 受容体から MAPK を介して MCP-1 産  
 生を促進させる”第29回 日本整形外科  
 学会基礎学術集会(2014年10月09日～  
 10月10日)城山観光ホテル / 鹿児島市

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/orthop/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若生 政憲 (WAKO, Masanori)

山梨大学・総合研究部

・助教

研究者番号：30402077