

学 位 論 文 の 要 約

三 重 大 学

所 属	三重大学大学院医学系研究科 乙 生命医科学専攻 病態解明医学講座 腫瘍集学治療学分野	氏 名	吉田 格之進
-----	--	-----	--------

主論文の題名

Activated protein C suppresses osteoclast differentiation via endothelial protein C receptor, protease-activated receptor-1, sphingosine 1-phosphate receptor, and apolipoprotein E receptor 2

(活性化プロテイン C は EPCR、PAR-1、S1P 受容体および apoE レセプター2 を介して破骨細胞分化を抑制する)

Kakunoshin Yoshida, Nobuyuki Akita, Takayuki Okamoto, Kunihiro Asanuma, Atsumasa Uchida, Akihiro Sudo, Motomu Shimaoka, Koji Suzuki, Tatsuya Hayashi

Thromb. Res.

Published: 2018 Mar;163:30-40. doi: 10.1016/j.thromres.2018.01.001

主論文の要約

【背景】

活性化プロテイン C (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て生成され、生成された APC は凝固補酵素蛋白質の第 Va 因子や第 VIIIa 因子を分解・失活化させることにより抗凝固作用を発揮する。一方、APC は抗炎症作用、抗アポトーシス作用、血管新生促進作用などを有し、これらの作用の発現には血管内皮 PC 受容体 (EPCR) とプロテアーゼ活性化受容体-1 (PAR-1) が関係することが明らかになっている。加えて、これまでに、スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) 受容体及び apoE レセプター2 等も APC の受容体として知られている。

一方、破骨細胞分化の early stage において、通常、骨芽細胞等の膜表面に存在する RANKL が、破骨前駆細胞表面上の RANK と結合した後のシグナル伝達が重要で、そのシグナル伝達において中心的な役割を担う分子が NF- κ B である。破骨細胞分化の early stage では NF- κ B の活性化に続き、c-Fos や NFATc1 等が活性化されるが、このうち、カテプシン K、酒石酸耐性酸ホスファターゼ (TRAP) やカルシトニン受容体など多くの破骨細胞特異的遺伝子の発現を調節する最も重要な転写因子が NFATc1 である。加えて、NF- κ B や

NFATc1以外にも、ERK、JNKやp38MAPKなども破骨細胞分化に関与している。

カテプシン K、TRAPやカルシトニン受容体などを発現した単核の破骨細胞は、続いて細胞融合により多核巨細胞を形成するが、最近では、樹状細胞特異的膜貫通タンパク (DC-STAMP) や破骨細胞刺激性膜貫通タンパク (OC-STAMP) が多核巨細胞の形成に必要な不可欠であることが報告されている。

骨折部位では血液凝固の亢進が見られるが、凝固系の活性化と骨リモデリングとの関連性についての研究は極めて少なく、トロンビンの骨リモデリングに及ぼす影響に関する報告はあるものの、まさに緒に就いたばかりである。このような背景の下、我々は、これまでに APC が EPCR を介して骨芽細胞の増殖を促進すること、及びその促進には PAR-1は無関係であることを明らかにしてきた。しかしながら、破骨細胞の分化やその機能に及ぼす APC の役割は明らかでない。

本研究では、これまでの研究をさらに発展させ、APC の破骨前駆細胞の破骨細胞への分化に及ぼす影響を検討し、APC が破骨前駆細胞の破骨細胞への分化を抑制することを見出すとともに、その分子機序についても詳細に検討した。

【方法】

APC やトロンビンのヒト破骨前駆細胞の破骨細胞への分化に及ぼす影響は、ヒト破骨前駆細胞を96穴プレートに播種し、血清存在下で培養後、その4日目及び7日目に血清非存在下で種々の濃度の APC を処理し、8日目に多核で TRAP 陽性の細胞を破骨細胞として計数することにより検討した。APC の破骨前駆細胞の破骨細胞への分化抑制に及ぼす PC、アプロチニン、スフィンゴシン1-リン酸 (S1P) 受容体アンタゴニスト、抗 apoE レセプター2抗体及び組換え apoE レセプター2の影響については、APC に対してこれらのそれぞれを混合して処理し、同様に多核で TRAP 陽性の破骨細胞数を計数し検討した。

破骨前駆細胞における EPCR 及び PAR-1の発現は、それぞれに特異的な一対のプライマーを用いた RT-PCR 法、及び抗 EPCR 抗体、抗 PAR-1抗体を用いた免疫蛍光染色により検討した。EPCR 及び PAR-1の APC による破骨前駆細胞の破骨細胞への分化抑制に対する関与は、それぞれに対する特異抗体を用いて検討した。

APC の破骨前駆細胞や破骨細胞における NF- κ B や NFATc1の活性化に及ぼす影響は、それぞれに特異的な ELISA 法を用いて検討した。

【結果】

APC はその濃度依存性に破骨前駆細胞の破骨細胞への分化を抑制したが、トロンビンは破骨細胞分化には影響しなかった。この APC 依存性の破骨細胞分化抑制は PC、セリンプロテアーゼ阻害剤であるアプロチニンによって阻害された。

RT-PCR、免疫蛍光染色により、破骨前駆細胞や破骨細胞における EPCR と PAR-1 の発現が確認され、抗 EPCR 抗体 (RCR-252) 及び抗 PAR-1 (ATAP-2) 抗体は、APC 依存性の破骨細胞分化抑制を阻害した。

加えて、S1P 受容体アンタゴニスト (VCP 23019) もまた APC 依存性の破骨細胞分化抑制を阻害し、さらに抗 apoE レセプター-2 抗体及び組換え apoE レセプター-2 も、APC 依存性の破骨細胞分化抑制を阻害した。一方、APC は破骨前駆細胞や破骨細胞における NF- κ B や NFATc1 の活性化には影響しなかった。

【考察】

APC は PC 凝固制御系において最も重要な抗凝固セリンプロテアーゼである。血液凝固と骨リモデリングとの関連性については、トロンビンが PAR-1 を介して骨芽細胞の増殖を促進し、骨芽細胞のアポトーシスを阻害するといった報告がある一方で、我々は、APC が EPCR を介して、骨芽細胞の増殖を促進するが、その APC 依存性の骨芽細胞の増殖には、骨芽細胞上の PAR-1 は無関係であることを報告してきた。

このような背景の下、本研究では、まず破骨細胞の分化に及ぼす APC とトロンビンの影響を検討した。その結果、APC は破骨細胞の分化をその濃度依存性に抑制したが、トロンビンは破骨細胞の分化には影響せず、APC 依存性の破骨細胞の分化抑制はセリンプロテアーゼインヒビターであるアプロチニンにより阻害されたことから、破骨細胞の分化抑制は APC に特異的であり、その抑制には APC のセリンプロテアーゼ活性が必要であることが示唆された。骨芽細胞とは異なり、APC の破骨細胞の分化抑制には EPCR/PAR-1 の両者に依存するものであることが明らかになり、このことは APC のプロテアーゼ活性が APC 依存性の破骨細胞分化抑制に必要であることに矛盾しなかった。これまでの種々の細胞を用いた検討より、APC の細胞上の受容体については、EPCR や PAR-1 以外に S1P 受容体や apoE レセプター-2 等の様々な受容体が報告されているが、APC による破骨細胞の分化抑制には、EPCR/PAR-1 に加えて、S1P 受容体や apoE レセプター-2 も関係している事が明らかになった。破骨前駆細胞の破骨細胞に対する分化抑制における、これらの受容体によるシグナル伝達機序の詳細は明らかではないが、S1P 受容体を介したシグナルは EPCR/PAR-1 依存性であること、apoE レセプター-2 を介したシグナルは EPCR/PAR-1 非依存性であることが報告されていることから、APC による破骨前駆細胞の破骨細胞への分化抑制には、EPCR/PAR-1/S1P 受容体を介するシグナルと apoE レセプター-2 を介するシグナルの両者が同時に必要で、この両シグナルが細胞内で合流する必要がある可能性が示唆された。

また、APC 存在下で生成された単核の破骨細胞も TRAP 陽性であったこと、及び破骨細胞分化の early stage で見られる NF- κ B や NFATc1 の活性化が APC により阻害されなかったことから、APC は主として late stage である、単核細胞同士の融合による多核巨細胞の形成を阻害することにより、破骨細胞の分化を抑制している可能性が考えられた。単核の破骨細胞の融合による多核化には、細胞上の DC-STAMP、OC-STAMP が重要であることが報告されていることから、APC が DC-STAMP、OC-STAMP の発現や機能に影響を与えている可能性も考えられ、今後更なる研究が必要であると考えられた。

【結論】

APC による破骨前駆細胞の破骨細胞への分化抑制は、EPCR/PAR-1/S1P 受容体及び apoE レセプター-2 を介した両シグナル経路の同時活性化による破骨細胞の多核化の阻害による可能性が示唆された。