

学位論文の要旨

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	よしだ かくのしん 吉田 格之進
<p>主論文の題名</p> <p>Activated protein C suppresses osteoclast differentiation via endothelial protein C receptor, protease-activated receptor-1, sphingosine 1-phosphate receptor, and apolipoprotein E receptor 2</p> <p>主論文の要旨</p> <p>【背景】</p> <p>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発揮する。一方、APC は抗炎症作用や抗アポトーシス作用を有し、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。</p> <p>骨折部位では血液凝固の亢進が見られるが、凝固系の活性化が骨リモデリングに及ぼす影響は明らかではない。我々は、これまでに APC が骨芽細胞の増殖を促進することを明らかにしてきた。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。</p> <p>【方法】</p> <p>APC 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 日目に多核で酒石酸耐性酸ホスファターゼ (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、及び免疫蛍光染色により検討し、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</p>			

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。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 抗体及び抗 PAR-1 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、トロンピンが 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、まずはじめに、破骨細胞の分化に及ぼす APC の影響を検討した。その結果、APC は破骨細胞分化をその濃度依存性に抑制し、その抑制は骨芽細胞とは異なり、EPCR/PAR-1 の両者に依存するものであることが明らかになった。これまでに、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 等の様々な受容体候補分子が報告されているが、APC の破骨細胞への分化抑制作用には、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の詳細は明らかではないが、S1P 受容体シグナルは 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 存在下で生成した単核の破骨細胞も TRAP 陽性であったこと、及び APC により NF- κ B や NFATc1 の活性化が阻害されなかったことから、APC は主として破骨細胞の多核化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。

【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 レセプター及び 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。