

学 位 論 文 の 要 旨

所 属	三重大学大学院医学系研究科 生命医科学専攻病態解明医学講座	氏 名	倉田 竜也
<p>主論文の題名</p> <p>Activated protein C stimulates osteoblast proliferation <i>via</i> endothelial protein C receptor</p> <p>主論文の要旨</p> <p>【目的】</p> <p>骨損傷部位での出血に伴い形成される血腫には骨形成に関係する多数の生理活性物質が含まれている。出血部位で血腫が形成される過程では、血液凝固系の活性化に続き、プロテイン C (PC) 凝固制御系が活性化されると考えられる。そこで本研究では、PC 凝固制御系の中心的プロテアーゼである活性化 PC (activated PC: APC) の骨芽細胞の増殖に及ぼす影響を検討した。</p> <p>【方法】</p> <p>骨折部血腫中の PC は、PC 特異的抗体を用いた免疫染色を用いて検出した。正常ヒト骨芽細胞 (Normal Human Osteoblast: NHOst) の血管内皮 PC 受容体 (Endothelial Protein C Receptor: EPCR) は、EPCR 特異的抗体を用いた免疫染色法及び EPCR に特異的な一対のプライマーを用いた RT-PCR 法を用いて検出した。APC、PC あるいは diisopropyl fluorophosphates(DIP)不活性化 APC (DIP-APC) の骨芽細胞の増殖に及ぼす影響は、NHOst の培養上清にこれらを添加し、24 時間反応後の生細胞数を WST-1 アッセイと BrdU の取り込み量を測定して評価した。APC の NHOst の増殖に及ぼす影響におけるアプロチニン、抗 PC 抗体、PC、抗 EPCR 抗体(RCR-252、RCR-92)、抗 protease-activated receptor (PAR)-1 抗体の影響は、NHOst の培養上清にこれらの物質と APC を添加し、24 時間反応後の生細胞数を WST-1 アッセイにより測定して評価した。APC による NHOst の p44/42 MAP Kinase(MAPK) の活性化はリン酸化 p44/42 MAPK 特異的抗体を用いたウェスタンブロット法により評価した。</p> <p>【結果】</p> <p>抗 PC 抗体を用いた免疫染色により、骨折部血腫に PC が高濃度に存在することが明らかになった。また、抗 EPCR 抗体を用いた免疫染色法により、NHOst 上に EPCR の存在が示唆され、RT-PCR 法により、NHOst 中に EPCR mRNA の存在が確認された。APC はその濃度依存性に NHOst の増殖を促進し、その促進作用は DIP-APC でもみられたが、PC では認められなかった。APC の NHOst 増殖促進効果は、アプロチニン、抗 PC 抗体、PC の EPCR への結合を阻害しない抗 EPCR 抗体 (RCR-92) 及び抗 PAR-1 抗体では阻害されなかった。しかし、PC の EPCR への結合を阻害する抗 EPCR 抗体 (RCR-252) 及び PC により阻害された。NHOst における p44/42 MAPK のリン酸化は</p>			

(注) 2, 0 0 0 字以内にまとめて記入すること。

APC添加5分後より検出され、15分後をピークに30分後まで検出された。さらに、NHOstにおけるAPCによるp44/42 MAPKのリン酸化はRCR-92では阻害されなかったが、RCR-252により阻害された。

【考察】

APCは血漿中では活性化第Ⅴ因子や第Ⅷ因子を不活化することにより血液凝固を阻害し、生理的止血反応に重要な役割を果たしている。これまでに、APCは血液凝固の制御だけでなく、炎症の制御、皮膚ケラチノサイトや血管内皮細胞の創傷治癒においても重要な役割を有していることが示唆されているが、骨リモデリングにおける役割はいまだ明らかでない。

本研究では、骨リモデリングにおけるAPCの役割を解明するため、APCの骨芽細胞増殖に及ぼす影響を詳細に検討した。その結果、APCはプロテアーゼ活性非依存的にEPCRを介してp44/42 MAPKの活性化を促進することにより骨芽細胞の増殖を促進することが判明した。また、このAPCの作用発現には、骨芽細胞上のPAR-1は関与しないことも明らかになった。

EPCRには細胞内シグナル伝達ドメインが同定されていないことから、EPCR依存性でPAR-1非依存性のAPCによる骨芽細胞の増殖促進作用には、APCによる細胞内シグナル伝達に関与が報告されているスフィンゴシン-1-リン酸受容体やアポE2レセプターなどのPAR-1以外のレセプターの関与が示唆されるが、この点については今後の検討が必要である。

【結語】

APCは、EPCRを介して、そのプロテアーゼ活性非依存的にp44/42 MAPKを活性化し、骨芽細胞の増殖を促進することが明らかになった。