

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 4 月 23 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460305

研究課題名(和文) 組織線溶系によるマクロファージを介した新規な骨・軟骨再生機構

研究課題名(英文) Novel mechanisms of bone regeneration induced by the tissue fibrinolytic system through macrophage regulation

研究代表者

河尾 直之 (KAWAO, Naoyuki)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：70388510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では骨修復・再生過程でのマクロファージの動態および活性化における組織線溶系の役割を検討した。今回、骨修復・再生過程において組織線溶系が中心的な役割を果たすことが明らかになった。さらに、組織線溶系は骨修復・再生部位にマクロファージを集積させ、それらの活性化に寄与することで骨修復に寄与することが明らかになった。今後、組織線溶系を標的としたマクロファージの機能調節により、効率よく骨修復・再生を亢進する方法の確立を目指してさらに研究を進めたい。

研究成果の概要(英文)：We aimed to investigate the role of the tissue fibrinolytic system in macrophage accumulation and their activation during bone repair and regeneration. We found that the tissue fibrinolytic system plays a crucial role in bone repair and regeneration. Moreover, the tissue fibrinolytic system contributes to macrophage accumulation at the damaged site of bone defect and their activation during bone repair. Since these findings suggest that the tissue fibrinolytic system is critical for the formation of a suitable microenvironment for bone repair and regeneration through macrophage accumulation and activation, the spatiotemporal regulation of the tissue fibrinolytic system is a promising strategy to meet the clinical needs for the regeneration of bone tissue for reconstruction. We would like to proceed the further study of the regulation of macrophage functions by the tissue fibrinolytic system for the development of the effective bone repair and regeneration.

研究分野：生理学

キーワード：組織線溶系 マクロファージ 骨修復・再生

## 1. 研究開始当初の背景

骨・軟骨再生は外傷や腫瘍切除によって欠損した骨の修復に用いられるが、自家骨移植のみでは十分ではない症例が多数存在する。さらに、患者数が増加し続けている骨粗鬆症や変形性関節症の治療にも骨・軟骨再生医療の応用が期待されている。

骨の恒常性は骨形成を担う骨芽細胞と骨吸収を担う破骨細胞によって維持されているが、両者は直接および液性因子を介して間接的に互いに分化、活性を制御する。また、破骨細胞は単球・マクロファージ系の細胞を起源とする細胞である。従って、単球・マクロファージの動態、形質、機能の検討は骨化機構の更なる解明に重要であると考えられている。

線溶系は血栓溶解の中心酵素であるプラスミンを活性化する蛋白分解カスケードであり、プラスミンの前駆体であるプラスミノゲンが組織型プラスミノゲンアクチベーター(tPA)やウロキナーゼ型 PA (uPA)によって活性化される。また、これらの因子は $\alpha_2$ -アンチプラスミンや PA インヒビター-1 によって抑制的に制御されている。

申請者らはこれまで肝臓や中枢神経の組織修復機構、組織修復に伴う血管新生およびマクロファージの機能について研究を進め、線溶系因子の欠損マウスを用いて組織修復に寄与する細胞の役割とそれらの組織線溶系による制御機構を探索してきた。(Kawao *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, 2007; Nagai, Kawao *et al.*, *Neurosci Lett*, 2008; Kawao *et al.*, *Thromb Res*, 2010; Kawao *et al.*, *Thromb Haemost*, 2012)。

骨の恒常性維持において組織線溶系の寄与が示唆されているが、骨・軟骨の分化、修復、再生における組織線溶系の役割は不明である。申請者らは骨修復・再生における組織線溶系の役割を明らかにすることを目的として検討を行い、これまでに組織線溶系の最も重要な因子であるプラスミノゲンの遺伝子欠損マウスにおいて骨・軟骨形成が抑制され骨修復が遅延すると共に、骨修復部位へのマクロファージの集積が抑制される結果を得ている。

近年、マクロファージが骨形成に寄与することが指摘されている。また、申請者らは組織線溶系が肝修復過程においてマクロファージの障害部位への集積や貪食能亢進に寄与することを報告している(Kawao *et al.*, *J Thromb Haemost*, 2010; Kawao *et al.*, *Thromb Haemost*, 2011)。従って、上記の結果は組織線溶系が骨・軟骨の修復および再生過程において単球・マクロファージや破骨細胞の分化、活性化を介して骨形成に寄与することを示唆する。しかしながら、その詳細な機構の解明は残されたままである。

## 2. 研究の目的

これまでの知見より、プラスミノゲンは骨

修復において中心的な役割を果たしており、またそれにはマクロファージや破骨細胞を介することが考えられる。そこで本研究課題では次の点を明らかにしたい。

(1) 大腿骨の骨欠損モデルと骨形成タンパク 2 (BMP-2) をコラーゲンスポンジと共に筋肉内に埋め込むことで異所性骨化を誘導するモデルを使用し、骨形成過程における組織線溶系の役割を明らかにする。

(2) 骨軟骨再生部位での骨吸収促進因子と骨軟骨誘導因子の発現における組織線溶系の関与を線溶系因子の欠損マウスを用いて検討する。これにより、破骨細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、血管形成におけるマクロファージと組織線溶系の関連について明らかにする。

(3) マクロファージは周囲の微小環境に依存して様々な表現型を示して多様な役割を果たす。そこで線溶系因子欠損マウスにおいて骨軟骨再生部位に集積したマクロファージを組織学的に検討し、マクロファージ活性化に関連するサイトカインの発現量を検討する。それにより、骨軟骨再生に寄与するマクロファージの表現型とその誘導における線溶系因子の役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 骨欠損後の骨軟骨再生における組織線溶系の役割

プラスミノゲン、tPA、uPA の欠損マウスおよび野生型マウスの大腿骨に骨欠損を作成し、骨再生過程を実験動物用 CT 装置にて経時的に検討した。さらに、再生骨の HE 染色、骨芽細胞染色 (Osterix 免疫染色、アルカリフォスファターゼ染色)、軟骨基質染色 (アルシアンブルー染色、トルイジンブルー染色)、血管内皮細胞の染色 (CD31 免疫染色) を行った。さらに、骨軟骨分化に関連する既知の因子の発現を分子生物学的に検討した。

(2) 異所性骨軟骨再生における組織線溶系の役割

BMP-2 含有コラーゲンスポンジをマウス下肢筋組織内に移植することで骨再生を誘導した。誘導した再生骨を実験計画 1) と同様に検討した。

(3) 骨軟骨再生過程のマクロファージの動態および形質における組織線溶系の役割

プラスミノゲン、tPA、uPA 欠損マウスにおいて、再生骨・軟骨におけるマクロファージの染色 (F4/80 免疫染色)、破骨細胞の染色 (TRAP 染色) を行い、マクロファージ集積と破骨細胞形成における線溶系因子の役割を検討した。さらに、再生骨におけるマクロファージや破骨細胞前駆細胞の走化因子の発現を分子生物学的に検討した。

(4) 骨再生部位において組織線溶系がマクロファージの機能におよぼす影響

マクロファージの表現マーカーの発現を免疫染色法によって、形態観察を電子顕微鏡法によって検討した。さらに、再生骨・軟骨におけるサイトカイン発現量を検討した。また、FACSによって骨・軟骨再生部位に集積したマクロファージを分取し、リアルタイムPCR法によってサイトカインの発現量を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 骨欠損後の骨軟骨再生におけるプラスミノゲンの役割

骨欠損からの骨修復において、プラスミノゲン欠損マウスでは軟骨および骨形成が野生型マウスと比較して減少し、骨欠損 4 - 14 日後の骨修復が遅延した。さらに、プラスミノゲン欠損マウスにおいて、骨修復部位の軟骨形成、マクロファージ集積、TGF- $\beta$  発現、VEGF 発現、血管形成が野生型マウスと比較して減少した。また、骨欠損を与えた大腿骨から単離したマクロファージにおける TGF- $\beta$  発現が野生型マウスと比較してプラスミノゲン欠損マウスで減少した。一方、プラスミノゲン欠損は筋組織内での異所性骨再生に影響をおよぼさなかった。

これらの結果より、骨修復再生過程においてプラスミノゲンが中心的な役割を果たすことが明らかになった。さらに、プラスミノゲンはマクロファージからの TGF- $\beta$  発現とそれに続く血管形成を促進することで骨修復に寄与することが示唆された。また、これらの知見からプラスミノゲンは骨髄細胞の存在下での骨化過程に重要な役割を果たす可能性が考えられ、骨髄幹細胞を用いた再生医療において組織線溶系の調節が重要であることが示唆された。

##### (2) 骨欠損後の骨軟骨再生における tPA の役割

骨欠損からの骨修復において、tPA 欠損マウスでは野生型マウスと比較して骨形成が減少し、骨欠損 7 - 14 日後の骨修復が遅延した。さらに、tPA 欠損マウスにおいて、骨修復部位の骨芽細胞数が野生型マウスと比較して減少した。また、tPA 欠損マウスでは野生型マウスと比較して骨修復部位での骨芽細胞増殖が減少した。骨芽細胞の初代培養の検討で、tPA 欠損は骨芽細胞増殖を減少したがアポトーシスには影響をおよぼさなかった。さらに、骨芽細胞系細胞株 MC3T3-E1 細胞の検討で、tPA は ERK1/2 のリン酸化と細胞増殖を促進した。MEK 阻害剤 (ERK1/2 リン酸化阻害剤) および tPA の結合タンパクであるアネキシン 2 の発現減少は tPA の骨芽細胞増殖作用を阻害した。また、tPA 欠損マウスでは野生型マウスと比較して骨欠損部位における血管形成、VEGF 発現、HIF-1 発現が低

かったが、軟骨形成およびマクロファージ集積は野生型マウスと差がなかった。

これらの結果から、tPA は骨芽細胞増殖を促進して骨修復に寄与することが明らかになった。また、骨修復過程におけるマクロファージ集積、血管形成のメカニズム、軟骨形成における tPA とプラスミノゲンの役割が異なることを考慮すると、tPA はプラスミノゲン活性化非依存性に骨局所でアネキシン 2 と ERK1/2 を介する機序によって骨芽細胞増殖を促進することが考えられた。

##### (3) 骨欠損後の骨軟骨再生における uPA の役割

骨欠損後の骨修復において、uPA 欠損マウスでは野生型マウスと比較して 4 - 6 日後の早期の骨修復が遅延した。uPA 欠損マウスにおいて、骨欠損部位におけるマクロファージ集積が野生型マウスと比較して減少した。さらに、電子顕微鏡を用いた解析において、uPA とプラスミノゲン欠損マウスでは骨修復部位に集積したマクロファージの貪食能が野生型マウスと比較して低かった。また、野生型マウスでは骨欠損がない反対側の大腿骨と比較して、骨欠損側の大腿骨ではマクロファージの走化因子である CCL3 の発現が増加したが、uPA およびプラスミノゲン欠損マウスでは骨欠損による CCL3 の発現増加は見られなかった。一方、他のマクロファージの走化や活性化に関連するサイトカインにはこのような変化はなかった。野生型マウスにおいて、骨修復部位におけるマクロファージ集積と早期の骨修復が CCL3 中和抗体投与によって阻害された。

これらの結果から、uPA はプラスミノゲン活性化を介して骨修復部位におけるマクロファージの集積と活性化に寄与することで骨修復の早期に重要な役割を果たすことが明らかになった。さらに、CCL3 が uPA による骨修復部位へのマクロファージの集積に寄与することが示唆された。本研究課題の成果から、プラスミノゲン、tPA、uPA の調節によりマクロファージを介して効率よく骨修復・再生を誘導することができる可能性が考えられ、今後、さらに検討を進めたい。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 17 件)

(1) Okada K, Kawao N, Yano M, Tamura Y, Kurashimo S, Okumoto K, Kojima K, Kaji H. Stromal cell-derived factor-1 mediates changes of bone marrow stem cells during the bone repair process. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016;310(1):E15-23. 査読有. doi: 10.1152/ajpendo.00253.2015.

(2) Shiomi A, Kawao N, Yano M, Okada K, Tamura Y, Okumoto K, Matsuo O, Akagi M, Kaji H.  $\alpha_2$ -Antiplasmin is involved in

bone loss induced by ovariectomy in mice. *Bone*. 2015;79:233-41. 査読有.  
doi: 10.1016/j.bone.2015.06.009.

(3) Kawao N, Tamura Y, Horiuchi Y, Okumoto K, Yano M, Okada K, Matsuo O, Kaji H. The Tissue Fibrinolytic System Contributes to the Induction of Macrophage Function and CCL3 during Bone Repair in Mice. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123982. 査読有.  
doi: 10.1371/journal.pone.0123982.

(4) Tamura Y, Kawao N, Yano M, Okada K, Okumoto K, Chiba Y, Matsuo O, Kaji H. Role of plasminogen activator inhibitor-1 in glucocorticoid-induced diabetes and osteopenia in mice. *Diabetes*. 2015;64(6):2194-206. 査読有.  
doi: 10.2337/db14-1192.

(5) Kawao N, Tamura Y, Okumoto K, Yano M, Okada K, Matsuo O, Kaji H. Tissue-type plasminogen activator deficiency delays bone repair: roles of osteoblastic proliferation and vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014;307(3):E278-88. 査読有.  
doi: 10.1152/ajpendo.00129.2014.

(6) Yano M, Kawao N, Okumoto K, Tamura Y, Okada K, Kaji H. Fibrodysplasia ossificans progressiva-related activated activin-like kinase signaling enhances osteoclast formation during heterotopic ossification in muscle tissues. *J Biol Chem*. 2014;289(24):16966-77. 査読有.  
doi: 10.1074/jbc.M113.526038.

(7) Mao L, Kawao N, Tamura Y, Okumoto K, Okada K, Yano M, Matsuo O, Kaji H. Plasminogen activator inhibitor-1 is involved in impaired bone repair associated with diabetes in female mice. *PLoS One*. 2014;9(3):e92686. 査読有.  
doi:10.1371/journal.pone.0092686.

(8) Tamura Y, Kawao N, Yano M, Okada K, Matsuo O, Kaji H. Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency ameliorates insulin resistance and hyperlipidemia but not bone loss in obese female mice. *Endocrinology*. 2014;155(5):1708-17. 査読有.  
doi:10.1210/en.2013-1888.

(9) Mao L, Tamura Y, Kawao N, Okada K, Yano M, Okumoto K, Kaji H. Influence of diabetic state and vitamin D deficiency on bone repair in female mice. *Bone*. 2014;61:102-8. 査読有.

doi: 10.1016/j.bone.2013.12.024.

(10) Yano M, Kawao N, Tamura Y, Okada K, Kaji H. A novel factor, Tmem176b, induced by activin-like kinase 2 signal promotes the differentiation of myoblasts into osteoblasts. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2014;122(1):7-14. 査読有.  
doi:10.1055/s-0033-1357129.

(11) Okada K, Ueshima S, Kawao N, Yano M, Tamura Y, Tanaka M, Sakamoto A, Hatano M, Arima M, Miyata S, Nagai N, Tokuhisa T, Matsuo O. Lack of both 2-antiplasmin and plasminogen activator inhibitor type-1 induces high IgE production. *Life Sci*. 2013;93(2-3):89-95. 査読有.  
doi: 10.1016/j.lfs.2013.05.023.

(12) Tamura Y, Kawao N, Okada K, Yano M, Okumoto K, Matsuo O, Kaji H. Plasminogen activator inhibitor-1 is involved in streptozotocin-induced bone loss in female mice. *Diabetes*. 2013;62(9):3170-9. 査読有.  
doi: 10.2337/db12-1552.

(13) Kawao N, Tamura Y, Okumoto K, Yano M, Okada K, Matsuo O, Kaji H. Plasminogen plays a crucial role in bone repair. *J Bone Miner Res*. 2013;28(7):1561-74. 査読有.  
doi: 10.1002/jbmr.1921.

〔学会発表〕(計 13 件)

(1) 河尾直之, 毛 莉, 田村行識, 奥本勝美, 岡田清孝, 松尾 理, 梶 博史. 糖尿病による骨修復・再生遅延における plasminogen activator inhibitor-1 の役割. 第 15 回日本再生医療学会総会・大阪国際会議場・大阪府大阪市. 2016 年 3 月 17-19 日.

(2) Kawao N, Shiomi A, Yano M, Okada K, Tamura Y, Okumoto K, Matsuo O, Akagi M, Kaji H. 2-Antiplasmin Deficiency Protects from Bone Loss Induced in Ovariectomized Mice. American Society for Bone and Mineral Research 2015 Annual Meeting. Seattle, WA, USA. 2015 年 10 月 9-12 日.

(3) 河尾直之, 田村行識, 堀内喜高, 奥本勝美, 矢野昌人, 岡田清孝, 松尾 理, 梶 博史. ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーターは CCL3 を介して骨修復過程早期のマクロファージ集積に關与する. 第 33 回日本骨代謝学会学術集会. 京王プラザホテル. 東京都新宿区. 2015 年 7 月 23-25 日.

(4) 河尾直之, 田村行識, 堀内喜高, 奥本勝美, 矢野昌人, 岡田清孝, 松尾 理, 梶 博

史．骨修復過程におけるマクロファージ集積に組織線溶系と CCL3 が関与する．第 14 回日本再生医療学会総会．パシフィコ横浜．神奈川県横浜市．2015 年 3 月 19-21 日．

(5) 河尾直之, 毛 莉, 田村行識, 奥本勝美, 矢野昌人, 岡田清孝, 松尾 理, 梶 博史． Plasminogen activator inhibitor-1 は糖尿病による骨修復遅延に関与する．第 32 回日本骨代謝学会学術集会．大阪国際会議場．大阪府大阪市．2014 年 7 月 24-26 日．

(6) 河尾直之, 田村行識, 奥本勝美, 矢野昌人, 岡田清孝, 松尾 理, 梶 博史．組織型プラスミノゲンアクチベーターの骨修復過程における線溶系を介さない新しい役割．第 32 回日本骨代謝学会学術集会．大阪国際会議場．大阪府大阪市．2014 年 7 月 24-26 日．

(7) Kawao N, Kaji H, Matsuo O. Role of Plasminogen in bone repair. 22nd International Congress on Fibrinolysis and Proteolysis. Marseille, France. 2014 年 7 月 6-9 日．

(8) Kawao N, Kaji H. Plasminogen plays a primary role in bone repair. Anti-Aging International Mini-Symposium 2014: Cell Signaling and Therapeutic Targets for Geriatric and Inflammatory Diseases. 近畿大学 39 号館．大阪府東大阪市．2014 年 6 月 7 日．

(9) 河尾直之, 田村行識, 奥本勝美, 矢野昌人, 岡田清孝, 松尾 理, 梶 博史．骨修復過程における tPA の重要性．第 36 回日本血栓止血学会学術集会．大阪国際交流センター．大阪府大阪市．2014 年 5 月 29-31 日．

(10) 河尾直之, 田村行識, 奥本勝美, 矢野昌人, 岡田清孝, 松尾 理, 梶 博史．Role of tissue-type plasminogen activator in bone repair. 第 87 回日本薬理学会年会．仙台国際センター．宮城県仙台市．2014 年 3 月 19-21 日．

(11) 河尾直之, 田村行識, 奥本勝美, 矢野昌人, 岡田清孝, 松尾 理, 梶 博史．骨修復における組織型プラスミノゲンアクチベーターの役割．第 13 回日本再生医療学会総会．国立京都国際会館．京都府京都市．2014 年 3 月 4-6 日．

(12) Kawao N, Tamura Y, Okumoto K, Yano M, Okada K, Matsuo O, Kaji H. Tissue-type plasminogen activator is involved in bone repair. American Society for Bone and Mineral Research 2013 Annual Meeting. Baltimore, Maryland, USA. 2013 年 10 月 4-7 日．

(13) Kawao N, Tamura Y, Okumoto K, Yano M, Okada K, Matsuo O, Kaji H. Plasminogen plays an essential role in bone repair. 2nd Joint Meeting of the international Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research. 神戸コンベンションセンター・神戸ポートピアホテル．兵庫県神戸市．2013 年 5 月 28-6 月 1 日．

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.med.kindai.ac.jp/physio2/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河尾 直之 (KAWAO Naoyuki)  
近畿大学・医学部・講師  
研究者番号：70388510

### (2) 研究分担者

梶 博史 (KAJI Hiroshi)  
近畿大学・医学部・教授  
研究者番号：90346255