

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590289

研究課題名(和文)骨・軟骨再生における組織線溶系の役割の解明

研究課題名(英文)Roles of tissue-fibrinolytic system in bone/cartilage regeneration

研究代表者

梶 博史(KAJI, Hiroshi)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：90346255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：組織線溶系とそれにより誘導されるタンパク分解酵素系や増殖因子が組織修復過程において重要な役割をはたすことがこれまで示唆されてきた。そこで、私共は骨修復・再生過程における組織線溶系の役割を検討した。マウス大腿骨に骨欠損を作製することにより、骨修復・再生過程を検討できるモデルを確立した。プラスミノゲン欠損マウスを用いて、プラスミノゲンが骨修復過程に必須であることを示した。さらに、組織型プラスミノゲンアクチベーター(tPA)の欠損マウスを用いて、tPAも骨修復に重要で、骨芽細胞にAnexin2やMAPキナーゼを介する機序により働いて、骨芽細胞増殖を促進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Previous evidence suggested that tissue-fibrinolytic system and subsequent proteolytic system and growth factor induction play important roles in tissue repair. We therefore investigated the roles of tissue-fibrinolytic system in bone repair and regeneration in this study. We established the model to evaluate the process of bone repair and regeneration by making a bone defect in mouse femorae. We demonstrated that plasminogen is crucial for bone repair process using plasminogen-deficient mice. Moreover, tissue-type plasminogen activator (tPA) is involved in bone repair using tPA-deficient mice. In that study, we showed that tPA enhances the proliferation of osteoblasts through Annexin 2 and MAP kinase.

研究分野：生理学

キーワード：骨・軟骨再生 骨修復 線溶 骨形成 プラスミノゲン プラスミノゲンアクチベーター PAI-1 血管形成

## 1. 研究開始当初の背景

近年、再生医療が注目されてきており、骨・軟骨再生医療は、再生医療のなかでは最も臨床応用が進んできた分野である。その重要な基本要素は、再生に用いる細胞源、再生を誘導する環境因子の調整、再生をおこなう足場とされている。

線溶系因子のプラスミンは、プラスミノゲンを前駆体として産生され、tPA および uPA によって活性化され、さらに抑制系として PA の阻害因子の PAI-1 が存在し、これらの因子は血管内および組織線溶を調節している。しかし、骨・軟骨の分化や再生における組織線溶系の役割は未だ不明である。

## 2. 研究の目的

再生医療のうち、骨・軟骨再生は最も臨床研究が進んだ分野であるが、その効果的な方法は未だ充分明らかではない。組織線溶系は基質の分解、増殖因子などを介して組織修復に重要な役割をはたすと考えられている。本研究では、組織線溶系の調節に重要な因子を欠損するマウスおよび細胞培養系を用いて、骨・軟骨再生における組織線溶系の役割を明らかにする。さらにその分子機構の解明を通じて、組織線溶系を操作することにより骨・軟骨再生を誘導する際の最適な環境因子を見いだす。それにより、骨・軟骨再生のみならず再生医学における新しい視点を開くことを目的とする。

## 3. 研究の方法

線溶系因子遺伝子欠損マウスとしては、プラスミノゲン、tPA、uPA、PAI-1 欠損マウスおよびそれぞれの野生型マウスを用いた。

(1)骨欠損モデルにおける骨・軟骨再生における線溶系因子の役割

マウスの大腿骨に物理的に骨欠損を作

成し、経時的に再生骨・軟骨の組織学的解析、遺伝子発現、血管形成を検討する。

(2)異所性骨・軟骨再生における線溶系因子の役割

BMP-2 含有コラーゲンスポンジをマウス大腿部の筋肉内に移植すると異所性骨・軟骨化が誘導される。異所性に誘導した骨・軟骨再生における分析をおこなう。

(3)in vitro の初代培養細胞および細胞株における線溶系因子の役割とそのメカニズムの検討

マウスから得た骨髄細胞、軟骨細胞、骨芽細胞とこれらに対応する細胞株を用いて、骨・軟骨分化における線溶系因子の役割を検討する。細胞増殖因子、血管因子、細胞内シグナルの面から分子生物学的にアプローチする。

## 4. 研究成果

(1)骨欠損からの骨修復において、軟骨および骨形成はプラスミノゲン欠損マウスにおいて減少し、骨修復が著明に遅延した。さらに、骨修復部位のマクロファージ集積、TGF- $\beta$  発現、血管内皮増殖因子(VEGF)発現および血管新生がプラスミノゲン欠損マウスにおいて減少した。一方、異所性骨化はプラスミノゲン欠損マウスにおいて変化がなかった。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 VEGF を介した血管新生を亢進することで骨修復に寄与することが示唆された。また、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た。

(2)骨欠損後の骨修復過程において、tPA 欠損マウスでは、骨形成が減少し、骨修復が遅延した。骨欠損部位および初代培養の検討で、tPA 欠損によって骨芽細胞増殖が減

少しだが、アポトーシスに差はなかった。さらに、マウス骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において、tPA は ERK1/2 のリン酸化、細胞増殖を促進した。MEK 阻害剤、annexin 2 siRNA は tPA の増殖促進作用を阻害した。また、tPA 欠損マウスでは骨欠損部位における血管形成、VEGF、HIF-1 $\alpha$  発現が低かった。tPA はプラスミノゲン非依存性に骨局所で annexin 2 と ERK1/2 シグナルを介する機序により骨芽細胞増殖を促進するものと考えられた。さらに、tPA は HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 発現を介して血管形成を増加させ、骨修復を促進することが示唆された。

(3)骨欠損後、uPA 欠損マウスでは4-6日後の早期のみ有意に骨修復が遅延した。骨欠損4日後の骨修復部でのマクロファージの集積と貪食能は uPA 欠損マウスで低下した。さらに、野生型マウスでは、骨障害のない部位と比較して骨修復部の CCL3 発現は増加していたが、uPA 欠損マウスでは骨欠損部の CCL3 発現増加はみられなかった。野生型マウスにおいて、CCL3 中和抗体腹腔内投与は骨欠損部でのマクロファージ集積および早期骨修復を減少させたが、uPA 欠損マウスではこの CCL3 抗体の効果はみられなかった。uPA は、組織線溶を介して、マクロファージの集積・活性化に寄与することにより骨修復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 は uPA による骨修復過程早期におけるマクロファージ集積作用に関与することが示唆された。

(4)In vivo, in vitro の検討により、PAI-1 欠損により、骨代謝・骨修復はあまり影響を受けなかった。そこで、ストレプトゾトシン (STZ) 投与糖尿病モデルの雌性マウスを用いて、糖尿病病態における PAI-1 の役割

を検討した。野生型で STZ 投与により血中 PAI-1 濃度が増加したが、PAI-1 欠損マウスと野生型マウスでは、血糖増加に差はなかった。野生型マウスでは、糖尿病群で骨欠損部の骨形成および骨芽細胞数は減少し、骨修復が遅延した。PAI-1 欠損マウスでは、この糖尿病状態による骨形成、骨芽細胞数の減少が阻害されていた。また、PAI-1 欠損マウスでは、糖尿病状態による骨分化マーカー減少が阻害された。一方、糖尿病状態による軟骨形成、II 型、X 型コラーゲン、アグリカン mRNA 減少および脂肪分化マーカーの増加については、PAI-1 欠損の影響はなかった。これらの結果より、PAI-1 は糖尿病による骨修復遅延に寄与することが示唆された。さらに、糖尿病病態の骨修復過程における骨芽細胞数の減少および骨芽細胞分化抑制に PAI-1 が関与する可能性が考えられた。同様に、PAI-1 が糖尿病およびステロイド投与マウスにおける骨代謝異常に関与することも示した

#### 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)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① 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 (査読有) in press.
- ② 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 (査読有)2014 Dec 31. pii: DB\_141192. [Epub ahead of print]
- ③ 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*(査読有) 307: E278-288, 2014. (doi: 10.1152/ajpendo.00129.2014.)
- ④ 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*(査読有) 289: 16966-16977, 2014. (doi:10.1074/jbc.M113. 526038.)
- ⑤ Mao Li, 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*(査読有) 9:e92686, 2014. (doi: 10.1371/journal.pone.0092686.)
- ⑥ 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*(査読有)155: 1708-1717, 2014. ( doi: 10.1210/en.2013-1888.)
- ⑦ Mao Li, 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*(査読有) 61: 102-108, 2014. (doi: 10.1016/j.bone.2013.12.024.)
- ⑧ 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 Diabet*(査読有) 122: 7-14, 2014. ( doi: 10.1055/s-0033-1357129.)
- ⑨ Mao L, Yano M, Kawao N, Tamura Y, Okada K, Kaji H. Role of matrix metalloproteinase-10 in the BMP-2 inducing osteoblastic differentiation. *Endocr J*(査読有) 60: 1309-1319, 2013.
- ⑩ 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*(査読有) 62: 3170-3179, 2013. (doi: 10.2337/db12-1552.)
- ⑪ 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*(査読有) 28: 1561-1574, 2013. (doi: 10.1002/jbmr.1921.)

[学会発表] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶 博史 (KAJI Hiroshi )

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：90346255

(2) 研究分担者

河尾直之 (KAWAO Naoyuki)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：70388510