



組織タンパク分解系の制御による骨軟骨再生誘導に向けての研究

梶, 博史
河尾, 直之
松尾, 理

(Citation)

神戸大学医学部神緑会学術誌, 29:62-64

(Issue Date)

2013-08

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/81006800>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/81006800>



組織タンパク分解系の制御による 骨軟骨再生誘導に向けての研究

近畿大学医学部再生機能医学講座

梶 博 史 (平成元年卒)

河 尾 直 之 (近畿大・薬, 平成11年卒)

松 尾 理 (昭和42年卒)

はじめに

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、高齢化社会の進展とともに患者数が増加している変形性関節症や骨粗鬆症による骨折の治療にも骨・軟骨再生医療の応用が期待される。骨・軟骨の再生には、細胞源の他、これら細胞の足場と分化および機能を促進する刺激因子が重要である。私共はこれまでに新規骨形成因子とその調節機構を明らかにしてきた^{1,2)}。また、骨・軟骨再生には血管や細胞外基質などで構築される微小環境の重要性も指摘されており、軟骨内骨化では血管内皮増殖因子 (VEGF) を介した軟骨への血管の浸入が骨化に寄与する³⁾。

線溶系は、フィブリン血栓溶解の主要酵素であるプラスミンを生成するタンパク分解系であり、プラスミンは前駆体であるプラスミノゲンがプラスミノゲンアクチベーターによって活性化される。近年、組織線溶系が細胞外基質分解、マトリックスメタロプロテアーゼ活性化、皮膚や肝臓の修復に寄与することが指摘されている⁴⁾。これらの知見より、組織線溶系は組織修復に適した微小環境の構築に重要な役割を果たすことが示唆される。しかしながら、組織線溶系の骨修復および再生過程における役割は不明であった。本研究ではプラスミノゲンの骨修復過程における役割を検討した。

方 法

実験動物

雄性および雌性の7-10週齢プラスミノゲン欠損マウスとその野生型マウスを使用した。

大腿骨骨欠損モデルにおける骨修復の検討

マウス大腿骨骨幹部に直径0.9mmの円形の骨欠損を作製した。骨欠損部の修復を実験動物用X線CT装置 (Latheta LCT-200, 日立アロカメディカル株式会社) を用いて検討した。骨芽細胞のマーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) および Osterix の免疫染色を行い、骨欠損部位における ALP および Osterix 陽性細胞数を測定した。酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色を行い、TRAP 陽性多核細胞数を検討した。トルイジンブルー染色後、骨欠損部位において異染色性を示した面積を軟骨基質として測定した。

骨修復過程における血管形成の検討

血管内皮細胞のマーカーである CD31 の免疫染色を行い、骨欠損部位における血管数および血管面積を測定した。骨欠損側および反対健常側の大腿骨における VEGF, トランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β), リン酸化 Smad2/3, Smad2, Smad3, 低酸素誘導因子1 α (HIF-1 α) の発現をウェスタンブロット法によって検討した。

結 果

プラスミノゲン欠損による骨修復の遅延

プラスミノゲン欠損マウスでは野生型マウスと比較して4, 7, 14日後において大腿骨の修復が有意に遅延した (図1 A, B)。

プラスミノゲン欠損による骨修復過程における骨芽細胞形成および軟骨形成の減少

プラスミノゲン欠損によって大腿骨骨欠損部位における ALP および Osterix 陽性細胞数が有意に減少した (図2 A, B)。一方、骨欠損部位における TRAP

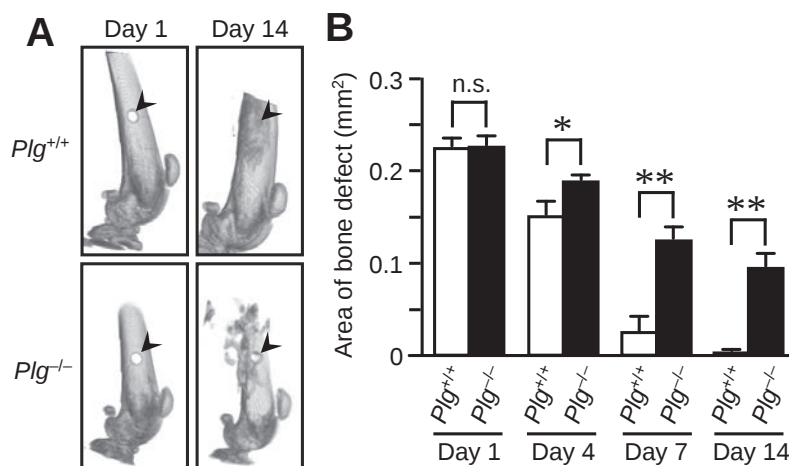


図1 (A) 野生型マウス (Plg^{+/+}) およびプラスミノゲン欠損マウス (Plg^{-/-}) の大腿骨骨欠損部位の解析. (B) 骨欠損面積の定量. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. n.s.: not significant.

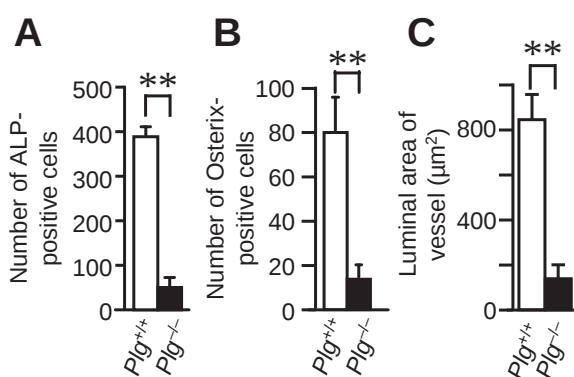


図2 (A, B) 野生型マウス (Plg^{+/+}) およびプラスミノゲン欠損マウス (Plg^{-/-}) の骨欠損部位におけるアルカリフォスファターゼ (ALP) および Osterix 陽性細胞数. (C) 骨欠損部位における血管面積. ** $p < 0.01$.

陽性多核細胞数はプラスミノゲン欠損によって変化しなかった。骨欠損部位における軟骨基質はプラスミノゲン欠損によって有意に減少した。

骨修復過程の血管形成に対するプラスミノゲン欠損の影響

プラスミノゲン欠損によって大腿骨骨欠損部位における血管数および血管面積は有意に減少した (図2C)。野生型マウスの骨欠損側の大腿骨では VEGF 発現が増加したが、プラスミノゲン欠損マウスではこの VEGF 発現増加が見られなかった。次に VEGF 発現を誘導することが報告されている TGF- β シグナル経路と HIF-1 α 発現を検討した。野生型マウスでは骨欠損側の大腿骨において TGF- β の発現増加と TGF- β シグナルの下流因子である Smad2/3 のリン酸化が見られたが、これらはプラスミノゲン欠損によって抑制

された。一方、プラスミノゲン欠損は骨欠損による HIF-1 α 発現に影響を及ぼさなかった。

考 察

生体内の骨化には膜性骨化と軟骨内骨化の2つの機構が存在するが、損傷を受けた大腿骨は軟骨内骨化によって修復する⁵⁾。プラスミノゲンは組織線溶系において中心的な因子であり、組織タンパク分解系の活性化や細胞外基質の分解を引き起こす⁶⁾。また、プラスミノゲンは皮膚や肝臓の修復に寄与することが報告されている^{4,6)}。今回、プラスミノゲン欠損によって大腿骨骨欠損部位の骨・軟骨形成が減少したことから、骨修復過程においてプラスミノゲンが重要な役割をはたすことが明らかになった。

骨損傷部位に新たに形成された血管は骨修復に寄与する細胞の増殖や分化を誘導する⁵⁾。さらに、軟骨内

骨化では軟骨への血管侵入が骨化に重要である。プラスミノゲン欠損マウスでは骨欠損部位における骨芽細胞形成と血管形成が減少した。これらより、プラスミノゲン欠損による骨修復の遅延は血管形成の減少が原因であることが示唆された。さらに、骨欠損部位での VEGF 発現の増加がプラスミノゲン欠損によって抑制されたことから、骨修復過程において VEGF がプラスミノゲン依存性に誘導されることが示唆された。VEGF 発現は TGF- β や HIF-1 α など様々な因子によって調節されている。プラスミノゲン欠損は骨欠損による TGF- β 発現増加と Smad2/3 のリン酸化を抑制したが、HIF-1 α 発現には影響を与えなかった。これより、骨修復過程においてプラスミノゲンは HIF-1 α ではなく TGF- β を介して VEGF 発現を亢進することが示唆された。

以上より、プラスミノゲンが骨軟骨再生に必要な微小環境の構築に重要であることが考えられ、組織線溶解系の調節によって骨・軟骨再生を誘導できる可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Hisa I, Inoue Y, Kaji H et al. (2011): Parathyroid hormone-responsive Smad3-related factor, Tmem119, promotes osteoblast differentiation and interacts with the bone morphogenetic protein-Runx2 pathway. J Biol Chem, 286, 9787-96.
- 2) Tanaka K, Matsumoto E, Kaji H et al. (2012): Role of osteoglycin in the linkage between muscle and bone. J Biol Chem, 287, 11616-28.
- 3) Street J, Bao M, deGuzman L, et al. (2002): Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. Proc Natl Acad Sci U S A, 99, 9656-61.
- 4) Kawao N, Nagai N, Matsuo O et al. (2010): Plasminogen is essential for granulation tissue formation during the recovery process after liver injury in mice. J Thromb Haemost, 8, 1555-66.
- 5) Claes L, Recknagel S, Ignatius A. (2012): Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. Nat Rev Rheumatol, 8, 133-43.
- 6) Matsuo O, Lijnen HR, Ueshima S et al. (2007): A guide to murine fibrinolytic factor structure, function, assays, and genetic alterations. J Thromb Haemost, 5, 680-9.