



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1597号
学位記番号	第1135号
氏名	貝沼 慎悟
授与年月日	平成 29年 9月 28日
学位論文の題名	Heat shock protein 27 (HSPB1) suppresses PDGF-BB-induced migration of osteoblasts (HSP27 は PDGF-BB による骨芽細胞の遊走を抑制している) International Journal of Molecular Medicine (in press)
論文審査担当者	主査： 岡本尚 副査： 和田郁雄 大塚隆信

論文内容の要旨

【目的】

血小板由来成長因子(platelet-derived growth factor: PDGF)は結合組織細胞の強力な細胞増殖因子として知られている。骨代謝において PDGF は骨芽細胞の増殖を促進し、骨折治癒過程で重要な働きを担うことが報告されている。骨代謝は骨吸収を担う破骨細胞と骨形成を担う骨芽細胞によって巧緻に制御され、骨吸収と骨形成は絶えず活発に行われることで骨はリモデリングされ、骨量が維持されている。私共の研究室では既に骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において PDGF-BB が p44/p42 mitogen-activated protein (MAP) kinase、p38 MAP kinase 及び stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK)を介して骨代謝調節因子であるインターロイキン-6 (IL-6)の産生を促進すること、さらに IL-6 は phosphoinositide 3-kinase (PI3-kinase)/Akt 及び p70 S6 kinase により抑制的に制御されていることを明らかにしている。一方、PDGF-BB は骨芽細胞の遊走を促進することが最近報告されたが、その詳細は明らかとされていない。

Heat shock protein (HSP)は熱及び化学的刺激など様々なストレスに反応して細胞内で誘導される一連の蛋白質である。HSP は分子シャペロンとして機能し、生体防御機構において中心的な役割を担うと考えられている。HSP27 は分子量が 12-43 kDa の低分子量 HSP (HSPB)として分類され、リン酸化等による翻訳後修飾によりその機能が制御されていると考えられている。HSP27 は骨肉腫において過剰発現しており、その予後と関連することが報告されている。私共の研究室では、骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において HSP27 の発現レベルは非刺激時に非常に低レベルであるが、種々の生理活性物質によりその発現が誘導されることを明らかにしてきた。本研究では、PDGF-BB 刺激による骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞の遊走における HSP27 の役割を検討した。

【方法】

新生マウス頭蓋冠より分離株化された骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞を 10%牛胎仔血清を含む α -MEM 培地で 5 日間培養した後、牛胎仔血清を 0.3%とし、48 時間後実験に供した。PDGF-BB 刺激による細胞遊走の解析には Boyden chamber 法を用いた。さらに HSP27 を遺伝子導入にて強制発現させた MC3T3-E1 細胞を用いて、PDGF-BB 刺激による遊走を解析した。それぞれ p44/p42 MAP kinase、p38 MAP kinase、SAPK/JNK、Akt 及び p70 S6 kinase の阻害剤である PD98059、SB203580、SP600125、Akt inhibitor 及び rapamycin で前処置した MC3T3-E1 細胞を、PDGF-BB で刺激し遊走を解析した。また p44/p42 MAP kinase、p38 MAP kinase 及び SAPK/JNK のリン酸化を Western blot 法で解析した。

【結果】

骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において、PDGF-BB は HSP27 の発現を誘導しなかったが、HSP27 を強制発現した細胞(WT)では PDGF-BB は HSP27 のリン酸化を促進した。WT では対照群と比較して PDGF-BB 刺激による細胞遊走が抑制された。恒常的非リン酸化型 HSP27 を強制発現させた細胞(3A)と恒常的リン酸化型 HSP27 を強制発現させた細胞(3D)では、3D で PDGF-BB による細胞遊走は有意に抑制された。さらに WT でも 3A と比し、PDGF-BB による細胞遊走は抑制された。PDGF-BB 刺激による細胞遊走は PD98059、SB203580 及び SP600125 で抑制されたが、Akt inhibitor 及び rapamycin では何ら影響を及ぼさなかった。また WT と対照群、3A と 3D では PDGF-BB 刺激による p44/p42 MAP kinase、p38 MAP kinase 及び SAPK/JNK のリン酸化レベルに何ら影響を及ぼさなかった。

【考察】

HSP27はPDGF-BB刺激による骨芽細胞の遊走を抑制的に制御し、リン酸化HSP27はその抑制効果をさらに増強することが明らかとなった。またPDGF-BBはp44/p42 MAP kinase、p38 MAP kinase及びSAPK/JNKの活性化を介して骨芽細胞の遊走を促進すること、またHSP27はこれらの経路の下流もしくはその他の経路でその遊走を抑制していることが示唆された。今回の結果から、HSP27が骨リモデリングや骨折の治癒に関与していること、また骨芽細胞におけるHSP27発現レベルおよびそのリン酸化状態の制御により、骨代謝を調節出来る新たな可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

【目的】血小板由来成長因子(platelet-derived growth factor: PDGF)は結合組織細胞の強力な細胞増殖因子である。骨代謝において PDGF は骨芽細胞の増殖を促進し、骨折治癒過程で重要な働きを担う。本論文著者らの研究室では既に骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において PDGF-BB が p44/p42 mitogen-activated protein (MAP) kinase、p38 MAP kinase 及び stress-activated protein kinase/c-*Jun* N-terminal kinase (SAPK/JNK)を介して骨代謝調節因子であるインターロイキン-6 (IL-6)の産生を促進すること、さらに IL-6 は phosphoinositide 3-kinase (PI3-kinase)/Akt 及び p70 S6 kinase により抑制的に制御されていることを明らかにしている。Heat shock protein (HSP)は熱及び化学的刺激など様々なストレスに反応して細胞内で誘導される一連の蛋白質である。HSP27 はリン酸化等による翻訳後修飾によりその機能が制御されている。また、骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において HSP27 の発現レベルは非刺激時に非常に低レベルであるが、種々の生理活性物質によりその発現が誘導されることを明らかにしている。本研究では、PDGF-BB 刺激による骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞の遊走における HSP27 の役割に着目した。

【方法】以下の実験では骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞を用いた。さらに HSP27 を遺伝子導入にて強制発現させた MC3T3-E1 細胞も用いた。p44/p42 MAP kinase、p38 MAP kinase、SAPK/JNK、Akt 及び p70 S6 kinase のそれぞれの阻害剤である PD98059、SB203580、SP600125、Akt inhibitor 及び rapamycin で前処置した MC3T3-E1 細胞を PDGF-BB で刺激し、細胞遊走を Boyden chamber 法を用いて解析した。また PDGF-BB 刺激による細胞内伝達に対する HSP27 の影響については Western blot 法で解析した。

【結果】PDGF-BB は HSP27 の発現を誘導しなかったが、HSP27 を強制発現した細胞(WT)では PDGF-BB は HSP27 のリン酸化を促進した。WT では対照群と比較して PDGF-BB 刺激による細胞遊走が抑制された。恒常的非リン酸化型 HSP27 を強制発現させた細胞(3A)と恒常的リン酸化型 HSP27 を強制発現させた細胞(3D)では、3D で PDGF-BB による細胞遊走は有意に抑制された。さらに WT でも 3A と比し、PDGF-BB による細胞遊走は抑制された。PDGF-BB 刺激による細胞遊走は PD98059、SB203580 及び SP600125 で抑制されたが、Akt inhibitor 及び rapamycin では何ら影響を及ぼさなかった。また WT と対照群、3A と 3D、では PDGF-BB 刺激による p44/p42 MAP kinase、p38 MAP kinase 及び SAPK/JNK のリン酸化レベルに何ら影響を及ぼさなかった。

【考察】HSP27 は PDGF-BB 刺激による骨芽細胞の遊走を抑制的に制御し、リン酸化 HSP27 はその抑制効果をさらに増強することが示された。また PDGF-BB は p44/p42 MAP kinase、p38 MAP kinase 及び SAPK/JNK の活性化を介して骨芽細胞の遊走を促進し、HSP27 はこれらの経路の下流もしくはその他の経路でその遊走を抑制していることが示唆された。今回の結果から、HSP27 が骨リモデリングや骨折の治癒に関与していること、さらに骨芽細胞における HSP27 発現レベルおよびそのリン酸化状態の制御により、骨代謝を調節出来る新たな可能性が示唆された。

【審査の内容】主査の岡本教授より、PDGF-BB および HSP27 に着目した理由、HSP27 のリン酸化部位や 3A と 3D における実験結果の解釈について等 12 項目、第 1 副査の和田教授より、Charcot-Marie-Tooth 病の病態に対する HSP27 の関与や創薬の可能性について等 7 項目、第 2 副査の大塚教授より、骨粗鬆症とリエゾンとの関連および骨代謝マーカーについて等 3 項目の質問があった。これらの質問に対して、申請者から適切な回答が得られ、学位論文の内容を十分に把握しており、また大学院修了者としての学力を十分に備えていると判断された。本研究は HSP27 の骨代謝における役割の一端を明らかとする重要な研究であり臨床的な見地からも高く評価される。よって、本論文著者は、博士(医学)の学位を授与するのに値するものと判定した。

論文審査担当者 主査 岡本 尚

副査 和田郁雄 大塚隆信