



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1622号
学位記番号	第1157号
氏名	酒井 剛
授与年月日	平成 30年 3月 26日
学位論文の題名	Heat Shock Protein 70 Negatively Regulates TGF- $\beta$ -Stimulated VEGF Synthesis via p38 MAP Kinase in Osteoblasts. (骨芽細胞において HSP70 は TGF- $\beta$ による VEGF 産生を p38 MAP kinase を介して抑制的に制御する)  Cellular Physiology and Biochemistry Vol. 44, P.1133-1145, 2017
論文審査担当者	主査： 和田 郁雄 副査： 岡本 尚, 大塚 隆信

## 論文内容の要旨

### 【目的】

Heat shock protein (HSP) は、熱や低酸素など種々のストレスによって誘導される一連の蛋白質であり、分子シャペロンとして機能する。HSP70 は分子量 70 kDa の HSP であり、非刺激状態の細胞においても恒常的に発現している。また HSP70 は、癌や自己免疫疾患などの疾患の病態に関与していることが報告されている。HSP70 の過剰発現とその予後が関連することが報告され、現在では HSP70 の機能を阻害することが新たな治療標的の一つと考えられている。

骨代謝は、破骨細胞による骨吸収とそれに続く骨芽細胞による骨形成により厳格に制御され、骨の強度が維持されている。骨代謝は微小血管による血液供給が不可欠であり、骨芽細胞及び破骨細胞に加えて血管内皮細胞も適切な骨量維持のために重要な役割を担っていると考えられている。血管内皮細胞の特異的増殖因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) は、骨芽細胞において transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) を含む様々な骨代謝調節因子によって産生されることが報告されているが、その詳細は未だ明らかとされていない。

TGF- $\beta$  は骨形成促進因子として知られている。TGF- $\beta$  は骨基質中に貯蔵されており、破骨細胞による骨吸収により放出、活性化される。細胞内情報伝達機構として、TGF- $\beta$  の作用は主として Smad 依存性経路を介することがよく知られている。近年、その作用は Smad 依存性経路に加えて mitogen-activated protein (MAP) kinase 等の Smad 非依存性経路を介することが明らかとされた。私共の研究室でも、骨芽細胞において Smad 依存性経路に加えて、p38 MAP kinase が TGF- $\beta$  による VEGF 産生を促進的に制御していることを報告している。

本研究では、骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において TGF- $\beta$  刺激による VEGF 産生における HSP70 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  $\alpha$ -MEM 培地で 5 日間培養後、牛胎仔血清を 0.3%とし 48 時間後に実験に供した。HSP70 knockdown MC3T3-E1 細胞は、10%牛胎仔血清を含む  $\alpha$ -MEM 培地で 2 日間培養後、HSP70-siRNA を導入し、24 時間後に 0.3%牛胎仔血清とした後、実験に供した。HSP70 の阻害剤である VER-155008 及び YM-08 を用いて細胞を前処置した後、TGF- $\beta$  で刺激し、上清中の VEGF を ELISA 法で、VEGF mRNA の発現を real-time RT-PCR 法にて測定した。Smad2、Smad3 及び p38 MAP kinase のリン酸化を Western blot 法にて解析した。

### 【結果】

VER-155008 及び YM-08 で前処置した細胞は、TGF- $\beta$  による VEGF の遊離を時間依存的に増強させた。VER-155008 は TGF- $\beta$  刺激による VEGF mRNA の発現を有意に増強させた。HSP70 の阻害剤は TGF- $\beta$  の刺激による Smad2 および Smad3 のリン酸化に何ら影響しなかったが、p38 MAP kinase のリン酸化を増強させた。また、HSP70-siRNA を導入した MC3T3-E1 細胞においても TGF- $\beta$  刺激による p38 MAP kinase のリン酸化は増強された。p38 MAP kinase の特異的阻害剤である SB203580 は、HSP70 の阻害剤による TGF- $\beta$  の VEGF の遊離増強を有意に抑制した。

### 【考察】

骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において、HSP70 の阻害剤が TGF- $\beta$  による VEGF 遊離を有意に増強させること、また TGF- $\beta$  による VEGF mRNA 発現を増強させることが示された。これらのことから、骨芽細胞において HSP70 が TGF- $\beta$  による VEGF 産生を抑制的に制御していることが示唆された。加えて HSP70 の阻害剤は TGF- $\beta$  による Smad2 及び Smad3 のリン酸化には何ら影響

を及ぼさなかったが、p38 MAP kinase のリン酸化を有意に増強することが示された。HSP70 を knockdown した細胞においても同様に p38 MAP kinase のリン酸化が有意に増強されることが示された。さらに SB203580 は HSP70 の阻害剤による VEGF 遊離の増強作用を抑制したことから、骨芽細胞において HSP70 は TGF- $\beta$  による VEGF 産生において、p38 MAP kinase の上流で抑制的に機能していることが示唆された。HSP70 が骨リモデリングや骨折の治癒過程において、TGF- $\beta$  による VEGF 産生の調節因子として重要な役割を担っていることが示唆され、骨粗鬆症などの代謝性疾患への新たな治療戦略となる可能性が考えられた。

#### 【結論】

骨芽細胞において HSP70 は、TGF- $\beta$  による VEGF 産生を p38 MAP kinase を介して抑制的に制御していることが強く示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

【目的】 Heat shock protein (HSP) は、熱や低酸素など種々のストレスによって誘導される一連の蛋白質であり、分子シャペロンとして機能する。HSP70 は分子量 70 kDa の HSP であり、非刺激状態の細胞においても恒常的に発現している。また HSP70 は、癌や自己免疫疾患などの疾患の病態に関与していることが報告されているが、骨芽細胞における詳細な役割はいまだ明らかでない。血管内皮細胞の特異的増殖因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) は、骨芽細胞において transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) を含む様々な骨代謝調節因子によって産生されることが報告されているが、その詳細は未だ明らかとされていない。TGF- $\beta$  は骨基質中に貯蔵されており、破骨細胞による骨吸収により遊離、活性化される。TGF- $\beta$  の細胞内情報伝達機構として近年、その作用は Smad 依存性経路に加えて mitogen-activated protein (MAP) kinase 等の Smad 非依存性経路を介することが明らかとされた。本研究では、骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において TGF- $\beta$  刺激による VEGF 産生における HSP70 の役割を検討した。

【方法】 実験には骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞を用いた。HSP70 knockdown は、HSP70-siRNA を導入し実験に用いた。HSP70 の阻害剤である VER-155008 及び YM-08 を用いて細胞を前処置した後、TGF- $\beta$  で刺激し、上清中の VEGF を ELISA 法で、VEGF mRNA の発現を real-time RT-PCR 法にて測定した。Smad2、Smad3 及び p38 MAP kinase のリン酸化を Western blot 法にて解析した。

【結果】 VER-155008 及び YM-08 で前処置した細胞は、TGF- $\beta$  による VEGF の遊離を時間依存的に増強させた。VER-155008 は TGF- $\beta$  刺激による VEGF mRNA の発現を有意に増強させた。HSP70 の阻害剤は TGF- $\beta$  の刺激による Smad2 および Smad3 のリン酸化に何ら影響しなかったが、p38 MAP kinase のリン酸化を増強させた。また、HSP70-siRNA を導入した MC3T3-E1 細胞においても TGF- $\beta$  刺激による p38 MAP kinase のリン酸化は増強された。p38 MAP kinase の阻害剤である SB203580 を用いて p38 MAP kinase の関与をさらに検討したところ、HSP70 の阻害剤による TGF- $\beta$  の VEGF の遊離増強作用は SB203580 で有意に抑制された。

【考察】 骨芽細胞において HSP70 が TGF- $\beta$  による VEGF 産生を抑制的に制御していることが示唆された。加えて細胞内情報伝達機構に関して HSP70 は TGF- $\beta$  による VEGF 産生において、p38 MAP kinase の上流で抑制的に機能していることが示唆された。今回の結果より HSP70 が骨リモデリングや骨折の治癒過程において、TGF- $\beta$  による VEGF 産生の調節因子として重要な役割を担っていることが示唆され、骨粗鬆症などの代謝性疾患への新たな治療戦略となる可能性が考えられた。

【審査の内容】 主査の和田教授より HSP70 の細胞保護作用に関して、HSP70 とアルカリフォスファターゼとの関連について、仮骨延長法や骨折の遷延治癒に対する HSP70 阻害剤の臨床応用について、TGF- $\beta$  の整形外科領域での創薬に関して等 7 項目、第 1 副査の岡本教授より VEGF の細胞内情報伝達機構について、HSP70 阻害剤の作用部位、オフターゲット効果について等 10 項目、第 2 副査の大塚教授より骨粗鬆症薬とその副作用に関して、ロコモティブシンドロームと骨粗鬆症の関連について等 4 項目の質問があった。これらの質問に対して申請者より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備えていると判断された。本研究は HSP70 の骨代謝における役割の一端を明らかとする重要な基礎研究であり、臨床的な見地からも高く評価される。従って、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 和田郁雄

副査 岡本 尚 大塚隆信