

## 学位研究紹介

血管内皮増殖因子 (VEGF) は直接的に  
成熟破骨細胞による骨吸収活性を促進  
し、また破骨細胞自身の生存を高める  
Vascular endothelial growth factor  
(VEGF) directly enhances osteoclastic  
bone resorption and survival of mature  
osteoclasts

新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔生命科学専攻  
摂食環境制御学講座咬合制御学分野<sup>1</sup>  
明海大学歯学部口腔解剖学第一講座<sup>2</sup>

中川麻里<sup>1</sup>, 羽毛田慈之<sup>2</sup>, 久米川正好<sup>2</sup>, 花田晃治<sup>1</sup>

Department of Oral Biological Science, Division of Orthodontics  
Niigata University Graduate School of Medical and Dental  
Sciences Course for Oral Life Science<sup>1</sup>

First Department of Oral Anatomy,  
Meikai University School of Dentistry<sup>2</sup>

Mari Nakagawa<sup>1</sup>, Yoshiyuki Hakeda<sup>2</sup>,  
Masayoshi Kumegawa<sup>2</sup> and Kooji Hanada<sup>1</sup>

## 【目 的】

骨組織のモデリング・リモデリングの過程において、血管新生と骨・軟骨組織の吸収は欠くことの出来ない事象である。また、組織学的に血管の侵入と破軟骨細胞及び破骨細胞の出現が同時期に認められることより、時を同じくして密接に関連していることが知られている。さらに、この2つの事象は生理的な骨形態形成過程のみならず、慢性関節リュウマチや癌の骨転移などの病態でも同様に認められる。そこで、血管新生と破軟骨細胞及び破骨細胞による軟骨・骨組織の吸収活性を同時に促進する因子の存在が考えられる。

血管内皮増殖因子 (VEGF) は強力な血管新生因子のひとつである。これまでに骨芽細胞や肥大化軟骨細胞などからも産生されることが知られており、VEGFが血管新生促進作用ばかりでなく、骨モデリング・リモデリングにも関与している可能性が考えられる。また、VEGFは血管内皮細胞ばかりでなく、造血系幹細胞にも作用することが知られており、単球の走化作用があること、また免疫組織学的手法により破軟骨細胞にVEGF受容体の発現が認められること、破骨細胞分化因子 (ODF) とともに破骨細胞の分化を促進すること、などが報告されている。しかし、in vitro における成熟破骨細胞に対

するVEGFの作用は未だ不明な点が多い。

そこで、本研究では高純度の成熟破骨細胞を用いて、成熟破骨細胞に対するVEGFの直接的な作用と成熟破骨細胞におけるVEGF受容体の発現について検討した。

## 【方 法】

成熟破骨細胞による骨吸収活性は、7日齢のウサギより調整した高純度の成熟破骨細胞を象牙片上に播種し、任意時間培養した後に形成された吸収窩の面積より算定した。また、この象牙片上の細胞を酒石酸耐性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色し、破骨細胞の生存を検討した。次に、成熟破骨細胞におけるVEGF受容体 (Flt-1, KDR/Flk-1) の発現をRT-PCR法、免疫染色およびwestern blot分析にて検討した。最後にVEGFの作用と破骨細胞内のチロシンキナーゼの活性化との関連性を抗フォスフォチロシン抗体を用いたwestern blot分析およびチロシンキナーゼ阻害剤であるherbimycin Aを用いて検討した。

## 【結 果】

VEGFは直接成熟破骨細胞による骨吸収活性を促進することが示され、この促進効果は濃度、及び時間に依存して有意にあらわれた。また、象牙片上の破骨細胞はVEGFを作用させることによって生存が高められることが示された。成熟破骨細胞におけるVEGF受容体 (Flt-1, KDR/Flk-1) の発現が遺伝子、及びタンパクレベルにて認められた。VEGFを成熟破骨細胞に作用させると破骨細胞内のチロシンキナーゼ活性が促進することが示され、この促進効果はチロシンキナーゼ阻害剤を作用させることによって、コントロールと同等のレベルにまで抑制された。

## 【考 察】

血管新生促進因子であるVEGFが破骨細胞による骨吸収活性を促進することが明らかになり、この促進効果には破骨細胞自身の生存が関与していることが示唆された。また、成熟破骨細胞には2つのVEGF受容体の発現が認められ、VEGFによる破骨細胞の骨吸収活性促進効果はVEGF受容体 (Flt-1もしくはKDR/Flk-1) を介した直接的な作用であることが示された。

本研究では、破骨細胞の強力な接着力を利用し、成熟破骨細胞のみを象牙片上で培養することで、VEGFの破

骨細胞に対する直接的な作用, すなわち骨吸収活性促進作用を示すことが可能になった。この精製・吸収活性分析法はこれまでに不明な点が多かった破骨細胞に及ぼす各種因子の直接的な作用を解明する有効な分析法であることが示された。

最近, *in vivo*における研究で, VEGFが*op/op*マウスにおいて破骨細胞の形成形成を促し, これはFlt-1を介してVEGFがM-CSFの代替因子として作用する, という報告や長管骨の成長板にFlt-1キメラタンパクを作用させると石灰化軟骨組織への血管侵入が妨げられ, 肥大化軟骨組織は吸収されず一次海綿骨への置換が行われぬという報告がある。また, 骨芽細胞や肥大化軟骨細胞がVEGFを産生することがこれまでも知られており, 骨芽細胞に関しては, 骨吸収促進因子を作用させるとVEGFの産生が促進することも知られている。これらの

報告からVEGFが骨形態形成において血管新生作用ばかりでなく, 軟骨・骨組織吸収作用にも関与していることが示唆されてきたが, 今回の*in vitro*における研究においてもVEGFが血管新生作用ばかりでなく, 骨吸収活性促進作用も合わせ持つことが示唆された。

【文献】

Nakagawa, M., Kaneda, T., Arakawa, T., Morita, S., Sato, T., Yamada, T., Hanada, K., Kumegawa, M. and Hakeda, Y. : Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances bone resorption and survival of mature osteoclasts, FEBS Letters 473 : 161-164, 2000.

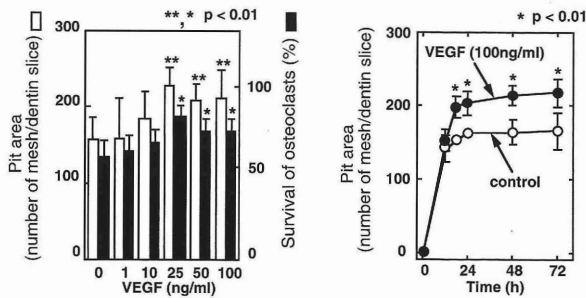


Fig. 1. Dose- and time-dependent effect of VEGF on bone resorption by mature osteoclasts.

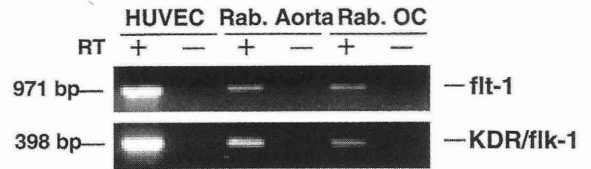


Fig. 2. RT-PCR analysis for the expression of VEGF receptors in mature osteoclasts.

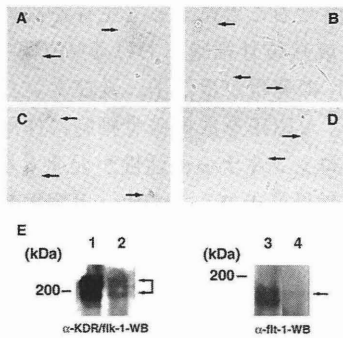


Fig. 3. Expression of VEGF receptor proteins in mature osteoclasts.