

## 最近のトピックス

## 破骨細胞性骨吸収と血管内皮増殖因子 Osteoclastic Bone Resorption and Vascular Endothelial Growth Factor

新潟大学歯学部歯科矯正学教室<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 Orthodontics,

Faculty of Dentistry, Niigata University<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>, Kooji Hanada<sup>1</sup>

## 【はじめに】

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が出来ない<sup>1)</sup>。これまでに、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、これらは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<sup>2,3)</sup>。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<sup>4)</sup>。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<sup>5,6)</sup>、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が知られている<sup>7,8)</sup>。更に最近になって、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<sup>6,9)</sup>、などが報告されている。しかし、成熟破骨細胞の機能に対するVEGFの作用は未だ不明な点が多い。

そこで、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in vitroから検討したのでここに紹介する。

## 【方法】

成熟破骨細胞による骨吸収活性は、まず7日齢の日本白色ウサギの長管骨より未分画全骨細胞を調整し、コラーゲンゲル上に播き、各種酵素処理(pronase E, collagenaseなど)によって破骨細胞のみの細胞浮遊液(純度95%以上)を調整した後、単離破骨細胞を象牙片上に播種し、VEGF<sub>165</sub>を添加した。そして任意時間培養した後形成された吸収窩の面積より算定した<sup>10)</sup>。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)にて染色し、任意時間培養後の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分析、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<sub>165</sub>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、及び処理時間に依存して有意に現れた。また、象牙片上の破骨細胞はVEGF<sub>165</sub>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。(Fig.1.)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。(Fig.2,3)最後にVEGF<sub>165</sub>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。

## 【以上の結果より】

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り、破骨細胞内のチロシンキナーゼの活性化によってもたらされることが示された。

今回の検討において、成熟破骨細胞の単離は破骨細胞自身の強力な接着力を利用し、各種酵素処理にて破骨細胞以外の除去することで行った。得られた成熟破骨細胞は骨髄間質細胞などの介在を必要とせずに、象牙片上での骨吸収活性が認められた。このように、成熟破骨細胞のみを象牙片上で培養することによって、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。この破骨細胞の単離法および骨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の機能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。

これまでに、*in vivo*における研究で、*op/op*マウスにおいてVEGFがFlt-1を介して破骨細胞の形成を促し、VEGFがM-CSFの代替因子として作用する<sup>9)</sup>、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ない<sup>6)</sup>、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、骨吸収促進因子である活性型ビタミンD<sub>3</sub>やプロスタグランジンE<sub>2</sub>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<sup>11,12)</sup>。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めされた。

### 参 考 文 献

- 1) Baron, R.E.: Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, 3rd edition.(Favus, M.J., Ed.)p.3-10, Lippincott-Raven, New York, NY.,1996.
- 2) Woodhouse, E.C., Chuaqui, R.F. and Liotta, L.A. : Cancer 80(8 Suppl), p.1529-1537,1997.
- 3) Paleolog E.M. :Angiogenesis: a critical process in the pathogenesis of RA--a role for VEGF?Br J. Rheumatol. ,35:917-9,1996.
- 4) Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N.: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science,246:1306-9,1989.
- 5) Goad DL, Rubin J, Wang H, Tashjian AH Jr, Patterson C.: Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor I.Endocrinology, 137:2262-8, 1996.
- 6) Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N.: VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation.Nat.Med. ,5:623-8,1999.
- 7) Hidaka M, Stanford WL, Bernstein A.: Conditional requirement for the Flk-1 receptor in the *in vitro* generation of early hematopoietic cells.Proc. Natl .Acad. Sci. U S A. ,96:7370-5,1999.
- 8) Mitola S, Sozzani S, Luini W, Primo L, Borsatti A, Weich H, Bussolino F: Tat-human immunodeficiency virus-1 induces human monocyte chemotaxis by activation of vascular endothelial growth factor receptor-1.Blood,90:1365-72,1997.
- 9) Niida S, Kaku M, Amano H, Yoshida H, Kataoka H, Nishikawa S, Tanne K, Maeda N, Nishikawa S, Kodama H.: Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption.J. Exp. Med. ,190:293-8,1999.
- 10) Kakudo,S., Miyazawa,K., Kameda,T., Mano,H., Mori,Y., Yuasa,T., Nakamaru,Y., Shiokawa,M., Nagahira,K., Tokunaga,S., Hakeda,Y.and Kumegawa, M.Isolation of haighly enriched rabbit osteoclasts from collagen gels:a new assay system for bone-resorbing activity of mature osteoclasts. J.Bone Miner. Metab.,14:129-136,1996.
- 11) Wang DS, Miura M, Demura H, Sato K. :Anabolic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells. Endocrinology. ,138:2953-62,1997.
- 12) Harada S, Nagy JA, Sullivan KA, Thomas KA, Endo N, Rodan GA, Rodan SB.:Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts.J. Clin. Invest.,93:2490-6,1994.

### 【Figure legends】

Fig. 1. Dose- and time-dependent effect of VEGF on bone resorption by mature osteoclasts. Isolated mature osteoclasts(200 cells)were incubated with

various concentrations of VEGF for 24 h(A), or incubated without(open circle)or with VEGF(100 ng/ml, closed circle)for the indicated times(B) Then, the area of pits excavated by the isolated osteoclasts were measured. The number of TRAP-positive osteoclasts on the dentine slices were counted, and the percentage to the number of initially-seeded osteoclasts was indicated as survival rate. The experiments were performed four times, and the values are means + SD for 5 cultures in a representative experiment. \*P <0.01 vs. untreated cells.

Fig. 2. RT-PCR analysis for the expression of VEGF receptors in mature osteoclasts. (A), Equal amounts of total RNA from endothelial HUVEC cells, rabbit (Rab.)aorta, and isolated rabbit osteoclasts(Rab. OC) were reverse-transcribed(RT, +), or not(RT, -), and then the samples were amplified with Flt-1 or

KDR/flk-1 primers. The PCR products for Flt-1 and KDR/flk-1 were 971 bp and 398 bp, respectively.

Fig. 3. Expression of VEGF receptor proteins in mature osteoclasts. Rabbit unfractionated bone cells were immunostained with polyclonal rabbit anti-Flt-1 IgG(A), monoclonal mouse anti-KDR/flk-1 IgG(C) antibody, non-immune rabbit IgG(B), or non-immune mouse IgG(D) Note that multinucleate osteoclasts(arrows)were positively immunoreactive for two distinct receptors of VEGF. Bar in each photograph indicates 100 μm. (E), Western blotting analysis for VEGF receptors expressed on mature osteoclasts. Membrane proteins were extracted from HUVEC cells(lanes 1, 3) and isolated mature osteoclasts(lanes 2, 4), and used for Western blotting analysis of KDR/flk-1(lanes 1, 2)and Flt-1(lanes 3, 4) Arrows indicates immunoreactive bands for KDR/flk-1 and Flt-1, respectively.

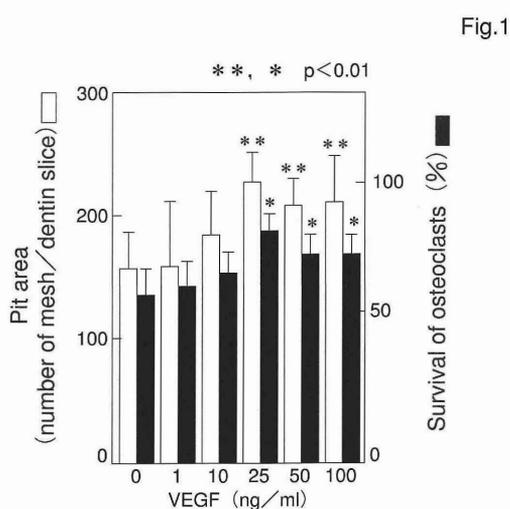


Fig.2

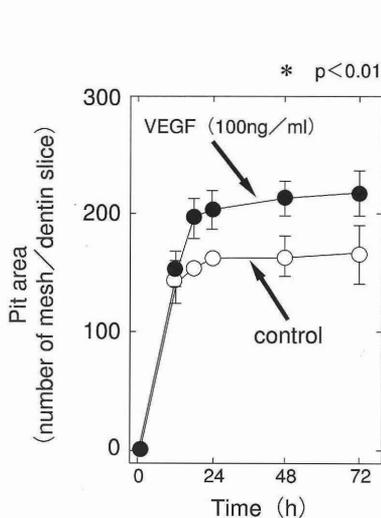


Fig.3

