

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11249

研究課題名(和文) 骨代謝阻害薬のVEGFR2を介したVEGF-VEGFRシグナルの制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of regulatory system of VEGF-VEGFR signaling via VEGFR2 by anti-bone modifying agents

研究代表者

中川 貴之 (NAKAGAWA, Takayuki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・助教

研究者番号：30456230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：末梢血からDensity gradient法で単核球を分離し、さらにmagnetic cell sorting法でCD11b陽性細胞(CD11b+)を抽出した。CD11b+細胞はRANKLにより破骨細胞分化が誘導された。さらにゾレドロン酸を投与することによりCD11b+細胞の破骨細胞形成は阻害され、破骨細胞分化マーカーであるNFATc1やVEGFR2の発現も低下していた。さらにVEGFR2の破骨細胞の分化の影響を調べるためVEGFR2中和抗体を投与し破骨細胞分化を行ったところ、中和抗体投与により濃度依存的に破骨細胞への分化が阻害された。

研究成果の概要(英文)：Mononuclear cells were isolated from peripheral blood by the density gradient method and CD11b positive cells (CD11b+) were further extracted by the magnetic cell sorting method. Osteoclast differentiation was induced in CD11b+ cells by RANKL. Further administration of zoledronic acid inhibited the formation of osteoclasts of CD11b+ cells, and the expression of NFATc1 and VEGFR2, which are osteoclast differentiation markers, also declined. Furthermore, in order to investigate the effect of differentiation of osteoclasts of VEGFR2, administration of VEGFR2 neutralizing antibody and differentiation of osteoclasts resulted in inhibition of osteoclast differentiation in a concentration dependent manner by administration of neutralizing antibody.

研究分野：口腔外科学

キーワード：薬剤関連顎骨壊死

1. 研究開始当初の背景

BP 製剤、抗 RANKL 抗体薬のデノスマブなどの骨代謝阻害薬は骨粗鬆症や悪性腫瘍の骨転移や多発性骨髄腫などの骨病変に対し広く使用されているが、骨代謝阻害薬により生じる顎骨壊死が問題になっている。近年では VEGF 抗体ベバシズマブや VEGF 受容体チロシンキナーゼ阻害薬などの血管新生阻害薬でも同様の顎骨壊死症例が報告されており、これらは薬剤関連顎骨壊死 (medication-related osteonecrosis; MRONJ) と呼称され、非常に難治性で、顎骨切除などの外科的な加療を要する場合は術後の QOL が著しく損なわれる。しかしながら MRONJ の病態は未だ明らかになっていない。

申請者はこれまでマウスの破骨前駆細胞にゾレドロン酸を投与し、マイクロアレイを用いて破骨細胞関連因子として報告のある遺伝子の発現を解析してきた。その結果、大理石骨病の責任遺伝子としても知られる、破骨細胞の分化に重要な転写因子 NFATc1 と骨基質の分解に重要な酵素 Carbonic anhydrase II (CA II) がゾレドロン酸により発現が抑制され、破骨細胞の分化が阻害されている可能性を報告した (Nakagawa T et al. Arch Oral Biol. 2015.)

さらにマイクロアレイ解析を再検討した結果、KDR/Flt-1/VEGFR2 (以下 VEGFR2) がゾレドロン酸により有意な発現低下を認めた。これまでの研究成果ではゾレドロン酸により破骨前駆細胞で VEGFR2 が抑制される意義は明らかにできていないが、Yang らは VEGF が VEGFR2 に結合することで成熟破骨細胞の骨吸収活性を上昇させることを示している。一方でゾレドロン酸が血管新生に抑制的に作用しているとの報告もみられ (Gao SY et al. PLoS One 2017)、骨リモデリングには骨代謝と血管新生の相互作用が重要であることを示唆している。

2. 研究の目的

ヒト型抗 RANKL モノクローナル抗体である MRONJ では骨のリモデリングが抑制されることで顎骨壊死を生じる。一方で炎症性骨破壊をきたす関節リウマチでは滑膜中の VEGF の発現亢進と新生血管の増生がみられ、多くの抗リウマチ薬は血管新生阻害作用を有する。申請者は VEGF-VEGFR による血管新生が生理的な骨吸収に寄与しており、このバランスが崩れることにより RA のような過度な骨破壊や、MRONJ のような骨代謝障害を引き起こすと考えた。そして MRONJ は骨代謝阻害薬による破骨細胞障害で緻密骨が増大し、骨髄腔や血管腔が狭小化すること血管新生のバランスが崩れ、顎骨や歯周組織への血行障害をきたし、易感染性や栄養障害に陥ることが原因であると考えた。このため申請者は、ゾレドロン酸により VEGFR2 の発現抑制を受ける意義を検討し、血管新生と骨吸収の関係を明らかにすることで、

MRONJ の病態の解明を目的とし研究を行った。

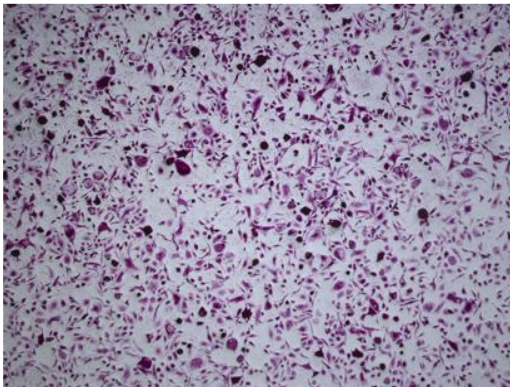
3. 研究の方法

まず申請者らは CD11b 陽性細胞に着目し研究を継続した。CD11b は単球/マクロファージのマーカーであり、CD11b 陽性細胞が破骨細胞に分化することが知られている一方で、血管内皮細胞にも作用し、血管新生に関与する可能性が示唆されている (Kerbel RS.: N Engl J Med 2008, Kawamoto T, et al.: Int J Hematol. 2013)。実際にまず我々は健常人末梢血から Density gradient 法で単核球を分離し、さらに magnetic cell sorting 法で CD11b 陽性細胞 (CD11b+) を抽出した。その後、破骨細胞分化誘導を行い、破骨細胞分化マーカーとして報告した NFATc1 と CAII の発現解析をおこなった。さらにゾレドロン酸処理と未処理の細胞に対して mRNA を抽出し、ゾレドロン酸による NFATc1, CAII, VEGFR2 の発現の影響を検討した。さらに抗ヒト VEGFR2 抗体を用いて TRAP アッセイを行い、VEGFR2 の発現の破骨細胞分化への影響を検討した。

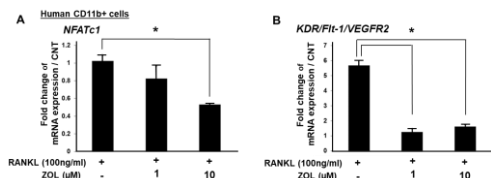
4. 研究成果

末梢血から Density gradient 法と magnetic cell sorting 法で抽出した CD11b 陽性細胞 (CD11b+) 細胞は RANKL により破骨細胞分化が誘導された。さらにゾレドロン酸を投与することにより CD11b+ 細胞の破骨細胞形成は阻害され (図 1)、破骨細胞分化マーカーである NFATc1 や VEGFR2 の発現も低下していた (図 2)。さらに VEGFR2 の破骨細胞の分化の影響を調べるため VEGFR2 中和抗体を投与し破骨細胞分化を行ったところ、中和抗体投与により濃度依存的に破骨細胞への分化が阻害された (図 3)。

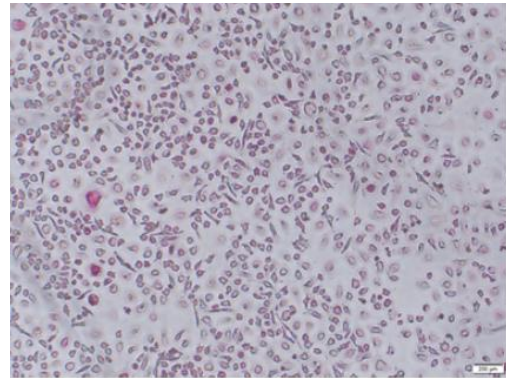
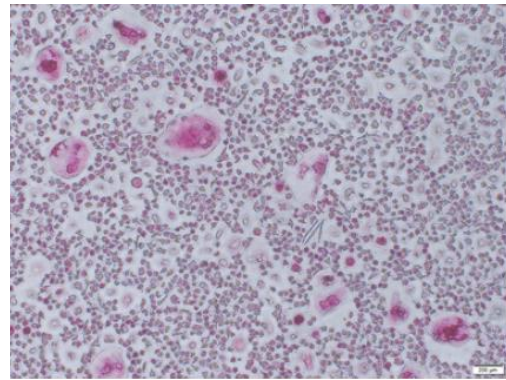
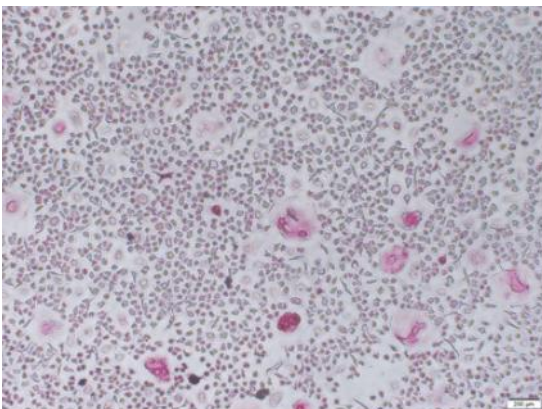




(図 1)CD11b 陽性細胞はゾレドロン酸による破骨細胞への分化が阻害されている。(上：無添加 中央：RANKL のみ添加 下：RANKL とゾレドロン酸 10 μ g 添加)



(図 2)CD11b 陽性細胞の NFATc1(A) と VEGFR2(B)の mRNA 発現解析
いずれもゾレドロン酸により発現抑制がみられる。



(図 3)CD11b 陽性細胞は抗ヒト VEGFR2 抗体による破骨細胞への分化が阻害されている。(上：無添加 中央：抗ヒト VEGFR2 抗体 0.5 μ g/ml 添加 下：抗ヒト VEGFR2 抗体 1.0 μ g/ml 添加)

以上の結果は血管新生が破骨細胞分化と直接かかわりがある可能性が示唆するものである。このため今後も MRONJ の発生機序の解明を目的として研究を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

①破骨細胞前駆細胞の分化におけるゾレドロン酸の標的遺伝子の網羅的探索

○中川貴之 太田耕司 武知正晃 宮本洋二
第 62 回日本口腔外科学会学術大会 (2017 年 10 月 京都)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中川 貴之 (NAKAGAWA, Takayuki)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：30456230

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()