

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592987

研究課題名(和文)骨折治癒過程における血管新生因子 angiogenin の発現と生物学的役割の解析

研究課題名(英文) Analysis of the biological role and the expression of angiogenin in the process of fracture healing

研究代表者

吉岡 徳枝 (YOSHIOKA, NORIE)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：50362984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：angiogenin (ANG) は、血管内皮細胞や癌細胞の増殖を促進するほか、骨や骨髄内の細胞群にも作用し骨代謝機構を制御する可能性がある。骨折モデルにおいて、ANG KOマウスの骨折治癒過程はWTと比較し有意な差を認めなかった。in vitroではANGは破骨細胞性骨吸収を促進し、ANGの発現抑制により破骨細胞形成は抑制された。ANG KOマウスでは破骨細胞形成がWTと比較して抑制された。一方、破骨細胞形成支持細胞において、破骨細胞形成に関するシグナル発現や遊走能に対するANGの影響は明らかでなかった。以上より、ANGが骨代謝機構において破骨細胞性骨吸収に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Angiogenin, which is an angiogenic factor, has a role in angiogenesis and cancer cell proliferation. Angiogenin has a possibility to control bone metabolism by an action to the cells in the bone and bone marrow. We established the bone fracture animal model in ANG KO mice. There is no significantly difference between ANG KO mice and WT mice in the process of fracture healing. Angiogenin stimulated osteoclast formation and osteoclastic bone resorption in vitro. Down-regulation of angiogenin expression decreased osteocalst formation in vitro. Additionally, osteocalst formation in ANG KO mice was suppressed compared with WT mice. On the other hand, it was not clear that an effect of ANG on the signaling for osteoclastogenesis and migration in osteoblasts and bone marrow stromal cells. In conclusion, these results suggest that angiogenin has an influence on the osteoclastgenesis in bone metabolism.

研究分野：口腔外科学

キーワード：angiogenin 骨折 骨代謝

1. 研究開始当初の背景

口腔顎顔面領域においては骨折手術、顎変形症手術、口腔癌切除後の血管柄付き遊離骨皮弁による顎骨再建術をはじめ、顎骨腫瘍手術、抜歯術など骨を対象とした治療が数多く存在する。患者の QOL を向上させるためには、正常な骨治癒過程をたどり、機能障害を最小限にとどめて咀嚼能力を回復させ、術後早期に社会復帰させることが望まれる。骨のリモデリングには骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞間のクロストークのみならず、骨髄中に存在する多種の細胞から産生される因子との密接な相互作用（オステオネットワーク）が重要な役割を果たし、血管内皮細胞も関連している。angiogenin (ANG)は HT-29 大腸癌細胞株の培養上清から分離された血管新生蛋白である。ANG は血管内皮細胞に作用し、血管新生に重要な役割を果たす。ANG は受容体に結合すると、シグナル伝達因子である ERK と Akt を活性化させると同時に、ANG 自体も直接核へ移行する。核内の ANG はリボゾーム DNA(rDNA)のプロモーター領域に結合することにより血管内皮細胞の rRNA の転写を促進する。rRNA の転写は血管内皮細胞の増殖を促進する。整形外科領域における骨延長術や骨切断術の術後早期の患者血清中には、VEGF や ANG ならびに蛋白分解酵素である MMP/TIMP ファミリーの発現上昇が認められている。これらの背景から、ANG は rRNA の転写を促進し、血管内皮細胞や癌細胞の増殖を促進するのみならず、骨および骨髄内に存在する細胞群にも作用し、骨代謝機構を制御している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究計画では、骨折治癒過程における ANG の生物学的な役割について未だ解明されていない基礎的な問題を解決し、顎顔面領

域の骨折治療をはじめ顎変形症手術や口腔癌切除後の顎骨再建手術などにおける術後の早期骨修復過程に ANG の関与の可能性を見出すことにより、骨再生医療への ANG の応用を展開するための研究基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ANG KO マウスの作製。

マウス ANG-1 はヒト ANG と最も相同性が高く、組織分布（主に肝臓）が同じであり、血管新生能をもつことから、ANG-1 遺伝子をノックアウトした。組織特異的にノックアウトできる点、胎生致死であった場合に成体となってから薬剤誘導性にノックアウトできる点から、Cre-loxP 遺伝子組換え系を用いて作製した。ANG-1 遺伝子座に 2 つの loxP 配列をもち、ANG-1 を正常に発現する floxed マウス (ANG-1^{loxP/loxP} マウス) を作製し、全身において Cre リコンビナーゼを発現する Ella-Cre マウス (Jackson Lab 社 No:003314) を ANG-1^{loxP/loxP} マウスと交配させ、得られた Mosaic マウスを野生型と交配し、ヘテロ接合体 (ANG-1^{+/-} マウス) を得る。さらに ANG-1^{+/-} マウス同士を交配させてホモ接合体 (ANG-1^{-/-} マウス、以下 ANG KO マウス) を作製した。

(2) 骨折モデルの骨修復過程における ANG の発現に関する検討。

マウス肋骨骨折モデルにおける ANG の役割について。

麻醉下にて 7 週齢の ANG KO マウスの右側第 8 肋骨を切断し、術後 1, 3, 5, 7, 28 日目に 4% paraformaldehyde を用いて灌流固定し、骨折させた肋骨を周囲組織とともに一塊として摘出し、4°C の条件で 10% EDTA を用いて 3 週間脱灰処理を行ったのち、通常にてパラフィン包埋した。コントロールとして野生型 (WT) マウスを使用し、組織学的に骨折治

癒過程について比較した。

(3) 骨代謝機構に対する ANG の役割の解析。

骨髄細胞に対する ANG の影響について。

C/57 black マウスから回収した骨髄細胞に $1\alpha 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を添加し破細胞形成を誘導する系に ANG (0, 0.5, 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加し, 形成された破骨細胞数を TRAP 染色してカウントした。

また, C/57 black マウス骨髄細胞に Lipofectamine RNAi MAX(Invitrogen) を使用して遺伝子導入し, ANG の発現を抑制した ANG-RNAi および Block-iT transfectant (CNTL-RNAi) を作製し, 同様に $1\alpha 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を添加し破細胞形成を誘導させ, TRAP 染色にて破骨細胞数を測定した。

ANG KO マウスから骨髄細胞, 脾細胞を回収し, それぞれ $1\alpha 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ あるいは RANKL, M-CSF を添加し培養後, TRAP 染色を行い, 形成された破骨細胞数を WT マウスと比較した。

ANG が破骨細胞形成・分化・吸収活性に与える影響について。

C/57 black マウス骨髄細胞を Osteoclast Activity Assay Substrate (OAASTM) 上に播種し, ANG (0.5, 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加して培養後, 形成された吸収窩の面積をデジタル画像として記録し, 画像解析ソフトウェア (Luminavision[®]) を用いて面積の測定を行った。

破骨細胞形成支持細胞に対する ANG の関与について。

1) 骨芽細胞/ストローマ細胞に対する ANG の影響についての検討。マウス骨髄間質細胞 ST2 細胞を 60mm ディッシュに播種し, サブコンフルエントに達した時点で各濃度 (0, 0.5, 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の ANG を添加し, 24 時間培養後に total RNA を回収した。RT-PCR を行い RANKL, OPG, M-CSF の発現を調べた。

2) Scratch assay

破骨細胞形成支持細胞の遊走能に対する ANG の影響を検討した。マウス前骨芽細胞様細胞株 MC3T3E1 細胞およびマウス骨髄間質細胞 ST2 細胞を 6 穴細胞培養プレート上でコンフルエント状態になるまで培養したあと, 滅菌した 200 μl のピペットチップの先で均一な 1 本の線になるようにひっかけ傷をいれて, 37 で ANG を添加して培養を行った。ひっかけ直後, 12 時間後に顕微鏡を用いてそれぞれ撮影後, ANG 非添加群, ANG 添加群について, 細胞が存在しない領域の面積を計測し, 減算法をもちいて細胞の遊走範囲を算出した。

4. 研究成果

(1) ANG KO マウスの特徴

ANG KO マウスは外見上ほぼ正常に生まれ, 特異な表現型は認めなかった。肝臓から単離した血管内皮細胞の増殖能は WT マウスと比較して抑制されていた。

(2) 骨折モデルの骨修復過程にける ANG の発現に関する検討。

7 週齢 ANG KO マウスの肋骨骨折モデルを作製し, 経時的に肋骨を周囲組織と一塊にして摘出し, 病理組織学的に検討した。

骨折後 3 日目では骨折部位の骨膜肥厚と炎症性細胞の浸潤を認め, 骨折後 5 日目では骨折断端部に紡錘形線維芽細胞の増生や破骨細胞, 骨芽細胞を認め, 断端付近の骨膜には軟骨様細胞を認めた。骨折後 7 日目では骨折断端周囲に肥大軟骨細胞の形成を, 骨折 28 日目には層板骨の形成が見られた。これらの過程は HE 染色では ANG KO マウスと WT で有意な差はみられなかった。

(3) 骨代謝機構に対する ANG の役割の解析。

破骨細胞形成・吸収活性における ANG の影響について

マウス骨髄細胞より破骨細胞を形成させ

る系に各濃度の ANG を添加し、培養したところ、ANG は濃度依存的に破骨細胞形成ならびに骨吸収活性を促進した (図 1)。

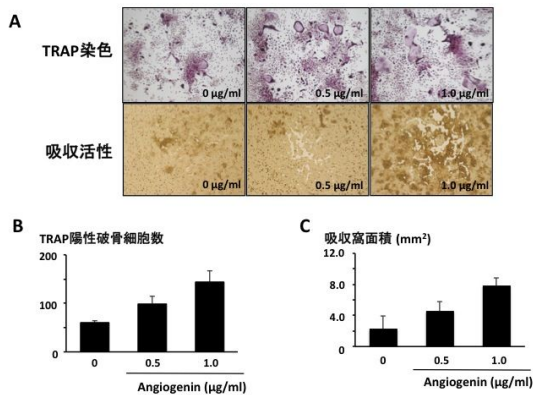


図1 破骨細胞性骨吸収に対するANGの影響

マウス骨髄細胞に siRNA を用いて、一過性に ANG の発現を抑制すると、破骨細胞形成は抑制された (図 2)。

ANG KO マウスの骨髄細胞および脾細胞から破骨細胞を形成させると、WT マウスと比較してともに破骨細胞の形成が抑制された。骨髄細胞を用いた実験系では、ANG を添加しても破骨細胞の形成はレスキューされなかったが、脾細胞の場合、ANG を添加すると破骨細胞の形成がレスキューされた (図 3)。

以上のことから、in vitro において ANG は破骨細胞形成を促進させ、骨吸収活性も促進することが明らかとなった。

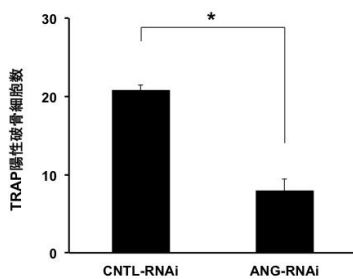


図2 angiogenin-siRNAによる破骨細胞形成系への影響

マウス骨髄細胞にANG-siRNAを遺伝子導入して、破骨細胞形成を誘導したところ、angiogeninをノックダウンすると破骨細胞形成が抑制した。

*: CNTL-RNAiに対する統計学的有意差 ($p < 0.01$)。

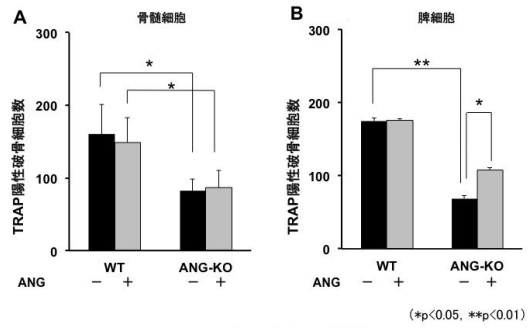


図3 ANG KOマウスにおける破骨細胞形成

破骨細胞形成支持細胞に対する ANG の関与について。

骨髄間質細胞 ST2 細胞に ANG を濃度依存的に添加し、RT-PCR 法にて RANKL、OPG、M-CSF の mRNA の発現を検討したが、その発現に有意な増減は認めなかった (図 4)。

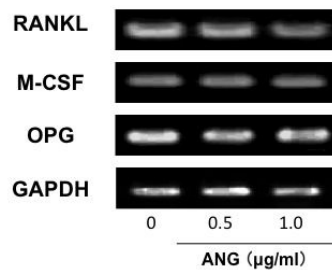


図4 ANGが破骨細胞形成支持細胞に与える影響

マウス前骨芽細胞様細胞 MC3T3E1 細胞およびマウス骨髄間質細胞 ST2 細胞の細胞遊走能に対する ANG の影響について、Scratch assay を用いて検討した。ANG を添加しても破骨細胞形成支持細胞の細胞遊走能はコントロール群と比較して、有意な差を認めなかった。(図 5)

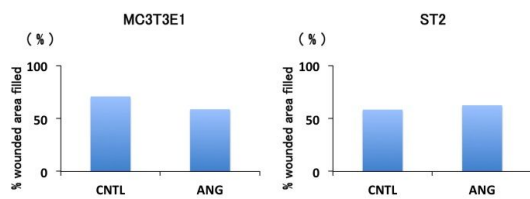


図5 ANGが破骨細胞形成支持細胞の遊走能に与える影響

5 . 主な発表論文等

該当なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉岡徳枝 (YOSHIOKA NORIE)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50362984

(2)研究分担者

佐々木朗 (SASAKI AKIRA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00170663