

研究種目： 基盤研究 (B)

研究期間： 2006-2009

課題番号： 18390422

研究課題名 (和文)

骨・骨髄損傷後の修復過程における骨と血管のシグナルネットワークの解明

研究課題名 (英文)

Bone and vascular signals during the repair process after bone and bone marrow injury

研究代表者

酒井 昭典 (SAKAI AKINORI)

産業医科大学・医学部・准教授

90248576

研究分野：医学

科研費の分科・細目：外科・整形外科学

キーワード：骨髄損傷、骨芽細胞、シグナル伝達、ビタミンA、血管、VEGF、HIF-1、BMP-2

1. 研究計画の概要

(1) 骨・骨髄損傷マウスモデルと損傷部修復の経時的变化を骨形態計測から明らかにする。

(2) 骨・骨髄再構築における骨形成と血管形成に関わる遺伝子発現の経時的变化をリアルタイム RT-PCR から明らかにする。局在については、免疫染色と in situ hybridization を用いて明らかにする。

(3) VEGF 受容体ノックアウトマウスを用いて実験を行う。VEGF 受容体ノックアウトマウスの骨代謝動態を調べる。また、このマウスを用いて骨・骨髄損傷モデルを作成し、損傷部の骨再構築が遅延するか否かを明らかにする。

(4) 骨代謝における PECAM-1 の役割を明らかにする。血管内皮細胞から産生される PECAM-1 のシグナルがブロックされることにより骨芽細胞分化が障害されるか否かを明らかにする。

2. 研究の進捗状況

(1) マウス脛骨の骨と骨髄にドリルで穴をあけ、その修復過程を組織学的に調べた。損傷後 3 日目に、von Willebrand factor が陽性である新生毛細血管細胞の近くにアルカリフォスファターゼ陽性細胞が多数出現した。骨芽細胞分化と血管系因子の関連性が示唆された。損傷後の髄内仮骨において VEGF とその受容体である Flt-1 タンパクは骨梁表面の骨芽細胞と血管内皮細胞の両方に発現していた。VEGF のもうひとつの受容体である Flk-1 タンパクは血管内皮細胞にの

み発現していた。

(2) VEGF には 3 つの splicing isoforms (120, 164, 188) がある。髄内仮骨の骨芽細胞は損傷後 1 日目から VEGF120 と VEGF164 を、損傷後 5 日目から VEGF188 を発現しはじめた。VEGF188 の発現と同期してオステオカルシン mRNA の発現が認められた。

(3) VEGF 受容体である flt-1 の tyrosine kinase domain を欠損させたノックアウトマウスを用いて、その骨代謝動態を調べた。このマウスは、正常に生まれ、外観や行動、体重は野生型マウスと差がなかった。脛骨近位海綿骨量 (BV/TV) は、野生型マウスと比べて低下傾向はあるものの有意差はなかった。骨形成率 (BFR/BS) は低下し、破骨細胞面 (Oc. S/BS) は減少した。VEGF/flt-1 シグナルを遮断することにより骨代謝回転が低下することが明らかとなった。

また、このノックアウトマウスに骨・骨髄損傷を生じさせ、損傷部の骨再構築を調べたところ、層板骨構造の形成が野生型マウスに比べて遅延することが明らかとなった。

(4) マウスの尾部を懸垂して後肢を非荷重にすると、骨髄細胞における PECAM-1 の発現が低下する。非荷重後に再荷重すると PECAM-1 の発現は正常化することを我々は明らかにした。PECAM-1 を発現する血管内皮細胞と骨芽細胞を共存培養すると骨芽細胞からのアルカリフォスファターゼ産生は亢進したが、PECAM-1 を発現しない血管内皮細胞と共存培養しても産生は亢進しなかった。

3. 現在までの達成度

区分②と評価する。おおむね順調に進展している。骨芽細胞分化に対する血管系シグナルの関与について、VEGF 及び PECAM-1 を中心に徐々に明らかとなっており、当初の計画通りに進んできていると考えている。

4. 今後の研究の推進方策

現在、VEGF の発現低下が既に確認されているビタミン A 欠乏マウスを用いて、骨・骨髄損傷修復過程を調べている。このビタミン A 欠乏マウスでは、損傷後の骨修復が遅延している。現在、我々は、VEGF シグナルの下流に位置する BMP-2 を中心としたシグナルネットワークの解析と、BMP-2 を補充することでこの骨・骨髄損傷修復遅延がレスキューされるか否かを明らかにする実験を推進中である。

5. 代表的な研究成果

(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 5 件)

- 1) 酒井昭典. 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2006 年版に準じた高齢者骨粗鬆症患者の管理. 老年医学. 査読無. 46: 817-821, 2008.
- 2) Sabanai K, Sakai A, Nakamura T, et al. Genetic disruption of all nitric oxide synthase isoforms enhances BMD and bone turnover in mice in vivo: Involvement of the renin-angiotension system. J Bone Miner Res. 査読有. 23: 633-643, 2008.
- 3) Otomo H, Sakai A, Nakamura T, et al. Flt-1 tyrosine kinase-deficient homozygous mice result in decreased trabecular bone volume with reduced osteogenic potential. Bone 査読有. 40: 1494-1501, 2007.
- 4) Nakai K, Sakai A, Nakamura T, et al. Cyclooxygenase-2 selective inhibitor suppresses restoration of tibial trabecular bone formation in association with restriction of osteoblast maturation in skeletal reloading after hindlimb elevation of mice. Bone 査読有. 39: 83-92, 2006.

[学会発表] (計 8 件)

- 1) Sakai A. Skeletal loading enhances osteoblast differentiation and inhibits adipogenic differentiation in bone marrow cells. International

Symposium on Biophysical Stimulation on Bone and Fracture Healing. 2008 年 11 月 26 日. Kyoto (Kyoto International Conference Center).

- 2) Tanaka K, Sakai A, Nakamura T, et al. Vitamin A deficiency delays healing process after cortical bone and bone marrow injury. 17th Scientific Meeting International Bone and Mineral Society. 2007 年 6 月 28 日. Montreal, Quebec, Canada.
- 3) Sabanai K, Sakai A, Nakamura T, et al. Genetic disruption of all nitric oxide synthase isoforms enhances bone turnover and bone mineral density in mice in vivo. 28th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2006 年 9 月 15 日. Pennsylvania, Philadelphia, USA.
- 4) Sakai A. Changes of osteoblast development after unloading and reloading in murine models. 第 24 回日本骨代謝学会. 2006 年 7 月 6 日. 東京都 (東京ファッションタウン).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし