

平成 22 年 3 月 31 日現在

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
 研究者番号：90248576

研究成果の概要 (和文) : VEGF (vascular endothelial growth factor) 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は、骨芽細胞分化が障害され、骨・骨髄損傷部の修復が遅延した。また、骨芽細胞のアルカリフォスファターゼ産生は、血管内皮細胞と共存培養することで亢進し、この亢進は PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) 抗体により用量依存性に抑制された。これらのことから、骨・骨髄損傷後の骨の再生過程において、血管系因子 (VEGF や PECAM-1) が骨芽細胞分化を促進することを本研究により明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : The disruption of tyrosine kinase domain of *flt-1*, one of VEGF (vascular endothelial growth factor) receptors, disturbed osteoblast differentiation and delayed the repair process after bone and bone marrow injury in mice. The production of alkaline phosphatase increased in osteoblasts co-cultured with endothelial cells. This increase was dose-dependently inhibited by PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) antibody. These findings demonstrated that vascular factors including VEGF and PECAM-1 significantly contributed to osteoblast development in the repair process after bone and bone marrow injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,800,000	0	2,800,000
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
総計	6,800,000	1,200,000	8,000,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：外科・整形外科

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、PECAM-1、BMP-2

1. 研究開始当初の背景
 我々は、損傷部周囲の骨髄を温存するよう
 にして皮質骨と骨髄にドリルホール損傷を
 生じさせるモデルを用いて研究を行ってき

た。この骨・骨髄損傷モデルラットで、髄内仮骨の骨芽細胞が VEGF (vascular endothelial growth factor) とその受容体である Flt-1 を発現していることを既に確認している (Uchida S, Sakai A, et al.: Vascular endothelial growth factor is expressed along with its receptors during the healing process of bone and bone marrow after drill-hole injury in rats. *Bone* 32: 491-501, 2003)。また、フランスの Yao Z ら (Increase of both angiogenesis and bone mass in response to exercise depends on VEGF. *J Bone Miner Res* 19: 1471-80, 2004) は運動に対する骨形成増加反応には VEGF シグナルが重要であると報告している。マウスの大腿骨骨折に対して、VEGF の徐放性製剤を局所投与することにより、仮骨の石灰化が促進されること (Street J, et al.: Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9656-9661, 2002)、ラット大腿骨のドリル損傷モデルに、adenoviral vector を用いて VEGF を遺伝子導入した場合、早期から軟骨形成がみられ骨密度が増加すること (Tarkka T, et al.: Adenoviral VEGF-A gene transfer induces angiogenesis and promotes bone formation in healing osseous tissues. *J Gene Med* 5: 560-566, 2003) が *in vivo* 実験で報告されている。このように、骨損傷後の修復過程において血管系シグナルが重要な役割を担っていることが示唆されている。

また、*in vitro* の実験で、培養ヒト骨芽細胞の石灰化結節形成と alkaline phosphatase (ALP) 活性は、VEGF 用量依存的に増加し、VEGF 阻害により抑制されること (Street J, et al.: Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9656-9661, 2002)、低酸素状態は hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) を介して VEGF 発現を up-regulate すること (Fang J, et al.: HIF-1 α -mediated up-regulation of vascular endothelial growth factor; independent of basic fibroblast growth factor, is important in the switch to the angiogenic phenotype during early tumorigenesis. *Cancer Res* 61: 5731-5735, 2001)、低酸素と VEGF は、血管内皮細胞における bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) mRNA と蛋白の発現を up-regulate すること (Bouletreau PJ, et al.: Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. *Plast Reconstr Surg* 109: 2384-2397, 2002) が報

告されている。血管内皮細胞は、直接的に、あるいは BMP-2 のような osteogenic factor を介して間接的に骨芽細胞分化を促進していると考えられる。

実験開始当初のこれらの *in vivo* と *in vitro* の実験結果から、VEGF は直接、骨形成と血管新生のシグナルを発するとともに、他の骨形成性および血管形成性因子の中心的な mediator として働いていることが想定された。VEGF を中心とした骨と血管のシグナルネットワークの解明は重要な課題であると思われ、研究を開始した。

2. 研究の目的

骨・骨髄損傷後の修復過程における骨芽細胞の分化と血管・造血シグナルの相互作用を解明することを目的に研究を行った。研究期間内に下記の項目を行った。

(1) 骨・骨髄損傷マウスモデルと損傷部修復の経時的変化を骨形態計測と遺伝子発現から明らかにした。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変化をリアルタイム RT-PCR から明らかにした。局在については、免疫染色と *in situ hybridization* を用いて明らかにした。

(2) VEGF 受容体ノックアウトマウスを用いて実験を行った。VEGF 受容体ノックアウトマウスの骨代謝動態を調べた。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した。

(3) 骨代謝における PECAM-1 の役割を明らかにした。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した。

(4) ビタミン A 欠乏マウスを用いて、骨・骨髄損傷修復過程を組織形態学的及び分子生物学的に調べた。ビタミン A 欠乏マウスでは骨髄細胞中の VEGF と BMP-2 の発現が低下していた。このマウスに BMP-2 を補充することによりこの骨形成遅延と骨・骨髄損傷修復遅延が回復するか否かを調べた。

最終的にこれらの結果により、骨修復過程における間葉系幹細胞から骨芽細胞系列への分化に関わる分子群と血管系細胞からのシグナルとの連鎖機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 骨・骨髄損傷マウスモデルの修復過程における組織形態学的及び分子生物学的変化: 10 週齢の C57BL/6J 雄マウスを用いた。直径 1.0 mm の drill-hole をマウス大腿骨中央前面部にかけて、骨・骨髄損傷モデルを作成した。具体的には、ペントバルビター

ル麻酔下、大腿前面を縦に切開し、筋を分け、大腿骨に達した。膝関節近位 5 mm の部位にドリルで直径 1.0 mm の穴を開けた。損傷後 3、7、14、21、28 日目に評価した。

検体は脱灰標本をパラフィンで包埋し、HE (hematoxylin-eosin) 染色と TRACP (tartrate-resistant acid phosphatase) 染色を行った。28 日目の組織標本では、形成された骨の構造 (表面構造、骨幅、層板骨構造) について偏光顕微鏡を用いて観察した。

次に、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調べた。mRNA の発現は quantitative RT-PCR から明らかにした。局在は免疫染色と in situ hybridization から明らかにした。骨形成系シグナルについては、ALP、Osteocalcin などの骨芽細胞分化に関わる遺伝子群を、血管系シグナルについては、VEGF とその受容体である flt-1 (VEGFR-1)、flk-1/KDR (VEGFR-2) などの血管内皮細胞分化に関わる遺伝子群を調べた。

(2) VEGF 受容体ノックアウトマウスを用いた実験: VEGF 受容体のひとつである flt-1 の tyrosine kinase (細胞内ドメイン部分) を欠損させた 6、9、16 週齢のマウスを用いた。脛骨を採取し、脛骨近位二次海綿骨領域で骨形態計測を行うことにより、骨代謝動態を評価した。

また、直径 1.0 mm の drill-hole をマウス大腿骨中央前面部に開けて、骨・骨髄損傷モデルを作成した。脱灰標本をパラフィンで包埋し、HE 染色と TRACP 染色を行った。損傷後 21、28 日目の骨修復状態を組織所見で評価した。これらの結果から、VEGF のシグナルを flt-1 で遮断することにより、骨・骨髄損傷後の修復が遅延するか否かを明らかにした。

(3) 骨芽細胞分化と血管内皮細胞が発現する PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1、CD31) の関連: 骨芽細胞株 (MC3T3-E1 細胞) と血管内皮細胞株 (EOMA 細胞) の共存培養実験を行った。骨芽細胞が産生する ALP が血管内皮細胞の共存により増加するか否か、増加するならばこの増加は PECAM-1 抗体によって用量依存性に抑制されるか否か、マウスモノクローナル PECAM-1 抗体を培養液に添加することにより調べた。

(4) ビタミン A 欠損マウスを用いた実験: ビタミン A 欠乏 (VAD: vitamin A-deficiency) マウスには、胎児 10 日目から母マウスにビタミン A 欠乏食を与え、離乳期 (4 週齢) 以降も欠乏食を与えた。ビタミン A 欠乏・充足 (VADS: vitamin A-deficiency and sufficiency) マウスには、胎児 10 日目から母マウスにビタミン A 欠乏食を与え、離乳期以降

は標準食を与えた。ビタミン A 充足 (VAS: vitamin A-sufficiency) マウスには、実験期間中ずっと標準食を与えた。上記の 3 群を作成し比較した。10 週齢の C57BL/6J 雄マウスを用いた。直径 1.0 mm の drill-hole をマウス大腿骨中央前面部に開けて、骨・骨髄損傷モデルを作成した。損傷後 7、14、21、28 日目に検体を採取した。脱灰標本をパラフィンで包埋し、HE 染色と TRACP 染色を行った。損傷部の海綿骨領域で骨形態計測を行った。マイクロ CT で損傷部の皮質骨を観察した。これらにより骨の修復状態を定量的に評価した。

ビタミン A 欠乏マウスに BMP-2 を補充することにより骨形成遅延と骨・骨髄損傷修復遅延が正常レベルに回復するか否かを明らかにした。

骨・骨髄損傷部を含む骨髄細胞から mRNA を採取し遺伝子発現を調べた。骨形成系シグナルについては、TGF- β 、BMP-2、Dlx5、Msx2、Runx2-p2、Osterix、type I collagen (Col1a1)、Osterix、Osteocalcin などの骨芽細胞分化に関わる遺伝子群を、血管系シグナルについては、VEGF とその上流遺伝子である HIF について調べた。

4. 研究成果

(1) 骨・骨髄損傷マウスモデルと損傷部修復の経時的变化: 損傷後 3 日、損傷部に凝血塊が形成された (図 1)。7 日目に未分化間葉系細胞が出現し、部分的に woven bone が形成された。14 日目に髓内仮骨が形成された。21 日で皮質骨が形成されはじめ、髓内仮骨は減少した。28 日で皮質骨は完全に元の幅で形成され、髓内仮骨は完全に消失し髓腔が形成された。正常では 28 日で骨・骨髄損傷は完全に修復された。

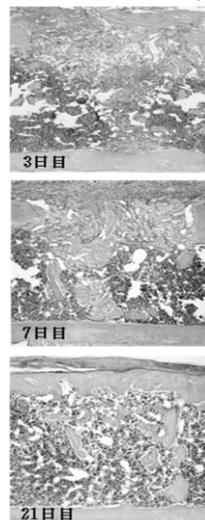


図 1. 骨・骨髄損傷の修復
マウス大腿骨の骨・骨髄損傷後の修復過程を組織像で示す (HE 染色)。

次に、発現する分子と局在について調べた。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 ALP 陽性細胞が多数出現した。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。VEGF 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。

(2) VEGF 受容体ノックアウトマウスを用いた実験: VEGF 受容体のひとつである *flt-1* tyrosine kinase を欠損させたマウスは、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。脛骨近位二次海綿骨量 (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。これらの骨形態計測の結果から、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。骨髓細胞を採取し、mineralized nodule formation を調べたところ、ノックアウトマウスでは低下していた (図 2)。

また、このノックアウトマウスに骨・骨髓損傷を生じさせ、偏光顕微鏡を用いて損傷部の骨再構築を調べたところ、層板骨 (lamellar bone) の形成が野生型マウスと比べて遅延することがわかった。

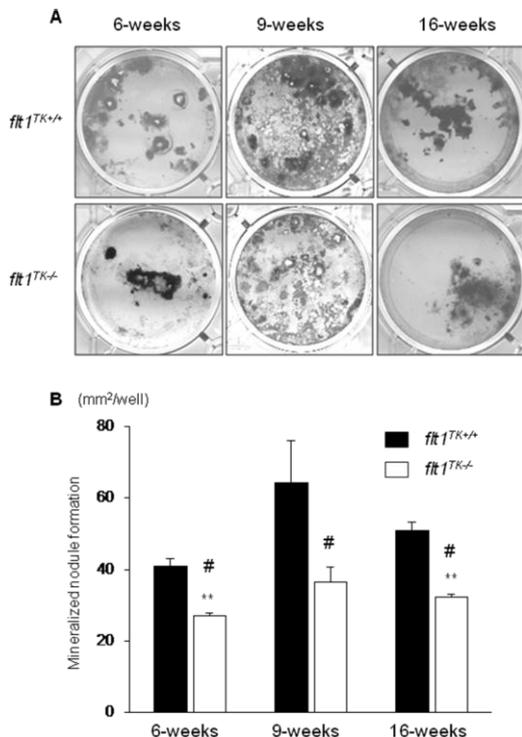


図 2. 骨髓細胞の石灰化能

骨髓細胞を採取し、mineralized nodule formation を調べた。アリザリンレッドで石灰化部分の面積を測定した。(A) 実際のカルチャーディッシュの写真、(B) 測定した面積をグラフにしたものを示す。

(3) 骨芽細胞分化と血管内皮細胞が発現する PECAM-1 の関連: マウスの尾部を懸垂して後肢を非荷重にすると、骨髓細胞における PECAM-1 の発現が低下すること、非荷重後に再荷重すると PECAM-1 の発現は正常レベルまで回復することがわかった。

PECAM-1 を発現する血管内皮細胞 (EOMA 細胞) と骨芽細胞 (MC3T3-E1 細胞) を共存培養すると骨芽細胞からの ALP 産生は、骨芽細胞単独のときよりも 1.8 倍亢進した (図 3)。しかし、PECAM-1 を発現しない血管内皮細胞 (ISOS-1 細胞) と共存培養しても産生は亢進しなかった。PECAM-1 を発現する血管内皮細胞との共存培養による骨芽細胞の ALP 産生増加は、PECAM-1 抗体の培養液への添加により用量依存性に抑制された。

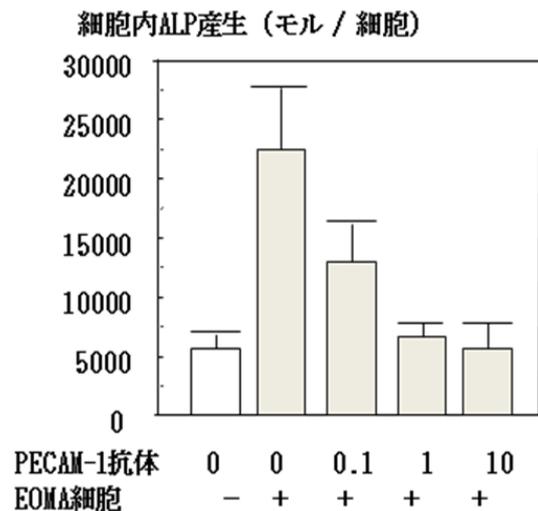


図 3. 骨芽細胞が産生する ALP
骨芽細胞 (MC3T3-E1) は血管内皮細胞 (EOMA) と共存培養することで ALP 産生が有意に亢進し、PECAM-1 抗体の添加により用量依存性に抑制される。平均値±標準誤差で示す。

(4) ビタミン A 欠乏マウスを用いた実験

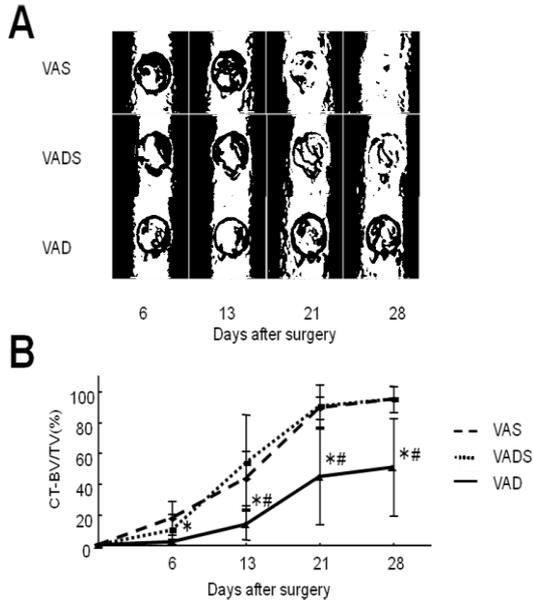


図4. ビタミン A 欠乏マウスでは骨・骨髄損傷後の皮質骨修復が遅延する

(A) 骨損傷部のマイクロ CT 像、(B) 横軸に損傷後の日数を、縦軸に皮質骨領域の骨量 (CT.BV/TV) を表したグラフを示す。VAS : vitamin A-sufficiency、VADS : vitamin A-deficiency and sufficiency、VAD : vitamin A-deficiency、* : $p < 0.05$ vs. VAS、# : $p < 0.05$ vs. VADS

皮質骨領域の修復状態をマイクロ CT により定量的に評価した。VAD (ビタミン A 欠乏) 群では VAS (ビタミン A 充足) 群や VADS (ビタミン A 欠乏・充足) 群と比べて損傷後の CT.BV/TV (cortical bone volume/tissue volume、%) が低下していた (図4)。

一方、損傷部の海綿骨領域において、VAD 群は VAS 群や VADS 群と比べて海綿骨量 (BV/TV : bone volume/tissue volume) が減少し、骨梁表面の骨芽細胞数 (Ob.N/BS : osteoblast number/bone surface) が減少していた (図5)。

損傷部のビタミン A 欠乏マウスでは、HIF と VEGF の mRNA 発現が低下していた。VEGF シグナルの下流に位置する BMP-2 の発現も低下し、一連の骨形成系シグナル (dlx5、msx2、osterix、colla1、osteocalcin) が低下していた (図6)。

ビタミン A 欠乏マウスに BMP-2 を補充することによりこの骨形成遅延と骨・骨髄損傷修復遅延が正常レベルに回復した。

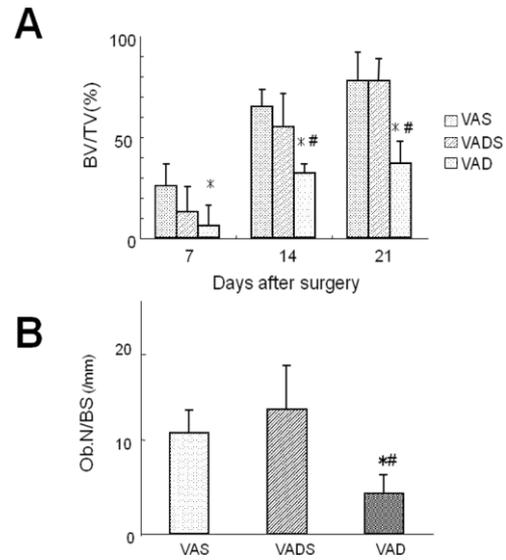


図5. ビタミン A 欠乏マウスでは海綿骨量が減少し骨梁表面の骨芽細胞数が減少している

(A) 骨損傷部の海綿骨量 (BV/TV)、(B) 骨芽細胞数 (Ob.N/BS) を表したグラフを示す。VAS : vitamin A-sufficiency、VADS : vitamin A-deficiency and sufficiency、VAD : vitamin A-deficiency、* : $p < 0.05$ vs. VAS、# : $p < 0.05$ vs. VADS

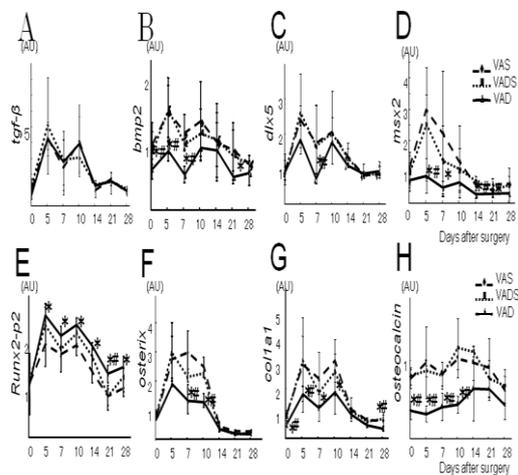


図6. 骨損傷部での遺伝子発現

(A) TGF-β、(B) BMP-2、(C) Dlx5、(D) Msx2、(E) Runx2-p2、(F) Osterix、(G) Col1a1、(H) Osteocalcin の mRNA 発現を quantitative RT-PCR で調べたグラフを表す。VAS : vitamin A-sufficiency、VADS : vitamin A-deficiency and sufficiency、VAD : vitamin A-deficiency、* : $p < 0.05$ vs. VAS、# : $p < 0.05$ vs. VADS

これらの結果から、ビタミン A 欠乏マウスでは、HIF や VEGF などの血管関連因子とともに BMP-2 や Osteocalcin などの骨形成因子が低下していた。このマウスにおける骨・骨髄損傷後の修復過程における海綿骨量減少、皮質骨修復遅延は、骨髄細胞における BMP-2 遺伝子発現の低下と関連していることが明らかとなった。

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 11 件)

- ① Katae Y, Tanaka S, Sakai A, Nagashima M, Hirasawa H, Nakamura T: Elcatonin injections suppress systemic bone resorption without affecting cortical bone regeneration after drill-hole injuries in mice. *Journal of Orthopaedic Research*, 査読有、27 巻 12 号、2009、1652-1658
- ② Menuki K, Mori T, Sakai A, Sakuma M, Okimoto N, Shimizu Y, Kunugita N, Nakamura T: Climbing exercise enhances osteoblast differentiation and inhibits adipogenic differentiation with high expression of PTH/PTHrP receptor in bone marrow cells. *Bone*, 査読有、43 巻 3 号、2008、613-620
- ③ Sabanai K, Tsutsui M, Sakai A, Hirasawa H, Tanaka S, Nakamura E, Tanimoto A, Sasaguri Y, Ito M, Shimokawa H, Nakamura T, Yanagihara N: Genetic disruption of all NO synthase isoforms enhances BMD and bone turnover in mice in vivo: involvement of the renin-angiotensin system. *Journal of Bone and Mineral Research*, 査読有、23 巻 5 号、2008、633-643
- ④ Otomo H, Sakai A, Uchida S, Tanaka S, Watanuki M, Moriwaki S, Niida S, Nakamura T: Flt-1 tyrosine kinase-deficient homozygous mice result in decreased trabecular bone volume with reduced osteogenic potential. *Bone*, 査読有、40 巻 6 号、2007、1494-1501

[学会発表] (計 24 件)

- ①□ Sakai A, Menuki K, Nakamura T: Skeletal loading enhances osteoblast differentiation and inhibits adipogenic differentiation in bone marrow cells. *International Society for Fracture*

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

- ②□ Tanaka K, Tanaka S, Sakai A, Hirasawa H, Katae Y, Nakura N, Menuki K, Yamane H, Sabanai K, Shimizu Y, Nakamura T: Vitamin A deficiency delays healing process after cortical bone and bone marrow injury. *The 17th Scientific Meeting International Bone and Mineral Society*, Montreal, Canada (Montreal Convention Centre), 2007 年 6 月 28 日
- ③□ Sakai A: Changes of osteoblast development after unloading and reloading in murine models. *International symposium*, 第 24 回日本骨代謝学会、東京都 (東京ファッションタウン)、2006 年 7 月 6 日

[図書] (計 1 件)

- (1) 酒井昭典: 1 章 骨構造と機能 細胞とその機能、最新整形外科学大系 1 運動器の生物学と生体力学、総編集 越智隆弘、専門編集 中村利孝、吉川秀樹、中山書店、東京、2008 年 9 月 10 日発行、7-11

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
酒井 昭典 (SAKAI AKINORI)
産業医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90248576
- (2) 研究分担者
中村 利孝 (NAKAMURA TOSHITAKA)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：50082235
(H19→H20：連携研究者)
沖本 信和 (OKIMOTO NOBUKAZU)
産業医科大学・医学部・助手
研究者番号：70330991
(H18)