

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791576
 研究課題名（和文）VEGF 受容体機能の解析および受容体中和抗体による骨吸収抑制効果の検討
 研究課題名（英文）Analysis of VEGF receptors and effects of inhibiting bone resorption by receptor neutralizing antibodies
 研究代表者
 本川 雅英（MOTOKAWA MASAHIDE）
 広島大学・病院・助教
 研究者番号：90457268

研究成果の概要（和文）：

平成 20、21 年度の研究成果より、VEGF ファミリーのひとつである VEGF- C、D が破骨細胞誘導能を有し、Flt-4、Flk-1 の中和抗体によりこの誘導が抑制されることが *in vivo* および *in vitro* において明らかとなった。また、ヒト末梢血単核球に RANKL 存在下で VEGF-C、D を添加すると、成熟破骨細胞が象牙切片吸収能を示すことも明らかとなった。さらに、破骨前駆細胞において Flt-4、および Flk-1 の発現が確認され、破骨細胞誘導時のシグナル伝達経路の一部として MAPK 伝達系および NFκB の活性化が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We have shown that the number of osteoclasts in osteopetrotic (*op/op*) mice increased after injection of rhVEGF-D, but was significantly reduced by the injection of Flt-4 neutralizing antibodies. Activation of both Flt-4 and Flk-1 by VEGF-C and VEGF-D in the presence of receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) induces osteoclast differentiation in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) but not to the level observed when stimulating these receptors individually. Stimulating these receptors simultaneously induced increased dentine slices resorption by osteoclasts compared to controls. Moreover, we have shown Flt-4 expression was detected on osteoclast precursor cells (OCPs) at both gene and protein levels and stimulation of Flt-4 by rhVEGF-D may induce activation of mitogen activated protein kinase (MAPK) and NF-κB pathways for induction of osteoclast differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：歯科矯正学

1. 研究開始当初の背景

血管内皮細胞増殖因子(VEGF)は、1983年血管透過性因子(VPF)として Senger らにより最初に発見された分子量約 45000 の血管成長因子である (Senger *et al.*, *Science*, 219, 983-985, 1983)。その生物学的活性として、内皮細胞の増殖や血管透過性亢進に加えて、ヒト末梢血単球の遊走や (Barleon *et al.*, *Blood*, 87, 3336-3343, 1996; Clauss *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271, 17629-17634, 1996)、大理石骨病(*op/op*) マウスにおける破骨細胞の分化誘導能が報告されている(Niida *et al.*, *J. Exp. Med.*, 190, 293-298, 1999; Kaku *et al.*, *Biomed. Res.*, 21, 67-72, 2000)。また、我々の研究により、VEGF 受容体群の一つである Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1)のみと結合する胎盤成長因子 (PlGF) が同様に破骨細胞の分化誘導能を有すること、破骨細胞における Flt-1 の局在が免疫組織化学的に観察されたことから、VEGF と PlGF の細胞内情報伝達は Flt-1 を介して行われることが示唆された (Kaku *et al.*, *J. Dent. Res.*, 80, 1880-1883, 2001)。さらに、マウスの実験的歯の移動時に rhVEGF を投与することにより、歯槽骨圧迫側に出現する破骨細胞数が増加することが明らかにされ、さらに、rhVEGF 投与により歯の移動が促進されることが示された (Kohno *et al.*, *J. Dent. Res.*, 82, 177-182, 2003)。これらの一連の研究結果から、VEGF は破骨細胞の分化誘導を促すことにより骨代謝の一端を担うことが明らかとなった。

一方、VEGF ファミリーのサブタイプであるリンパ管内皮細胞増殖因子 (VEGF-C, VEGF-D) は、血管新生にも関与しており、その主要な受容体である Flt-4 の発現が、血管およびリンパ管内皮細胞において確認されている。しかしながら、骨代謝における両因子の関与については、従来まったく検討されておらず、その受容体と破骨細胞の関連についても明らかとなっていない。また、VEGF ファミリーによる血管およびリンパ管新生において主要な伝達経路として機能している Fetal liver kinase-1 (Flk-1)についても、骨代謝との関連については不明である。したがって、VEGF ファミリーと骨吸収の関係、さらには破骨細胞誘導におけるシグナル伝達経路の全容を解明することにより、血管およびリンパ管新生と骨代謝の関係についてより明確な見解が得られ、矯正歯科治療におけるより効果的な歯の移動や歯の移動後の歯槽骨吸収に起因する歯の後戻り防止策の有用な鍵になるものと考えられる。さ

らに、これらの知見は、さまざまな組織再生法によって創出された骨組織の吸収を防止する有効な手法を確立することにも資するものと期待される。

これらの研究成果を踏まえ、VEGF-C, VEGF-D が破骨細胞分化誘導能を有するか否かについて検討するとともに、VEGF ファミリーの受容体機能解析による破骨細胞誘導経路の解明、さらには VEGF ファミリーによる歯の移動促進、および破骨細胞誘導経路の効果的な抑制法の確立へと発展させることを目的とし、本研究プロジェクトを立案した。

2. 研究の目的

本研究は、VEGF ファミリーが破骨細胞分化誘導能を有するか否かについて検討するとともに、それらの受容体を特定し、破骨細胞分化誘導経路を効果的に遮断することにより発揮される骨吸収抑制効果を明らかにすることを目的とする。

VEGF, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E の受容体として Flt-1, Flt-4, Flk-1 が広く知られているため、本研究ではこれらの受容体に着目し、その機能を解析する。実験には、培養破骨前駆細胞を用い、受容体の発現を RT-PCR 解析、およびウェスタンブロット法により検討する。これにより、破骨前駆細胞に Flt-1, Flt-4, Flk-1 が発現しているか否かを明らかにした後、破骨前駆細胞への VEGF, VEGF-C, VEGF-D 投与が Flt-1, Flk-1, Flt-4 チロシンキナーゼ活性に与える影響を検討する。

我々の研究グループでは、大理石骨病マウス (*op/op* マウス) への VEGF, VEGF-E 投与が出現する破骨細胞数を増加させることをすでに明らかにした。そこで、VEGF-C, VEGF-D の投与を行い、出現する破骨細胞数の観察を行う。VEGF-C, VEGF-D の投与により、*op/op* マウスに破骨細胞が出現するならば、これらは受容体として Flt-4 と Flk-1 を介して破骨細胞を誘導していることが明らかとなる。次に、VEGF, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E の破骨細胞誘導能に与える Flt-1, Flt-4, Flk-1 中和抗体の影響を *op/op* マウスについて検討する。さらに、*op/op* マウスでは破骨細胞数が経年的に増加することが知られているため、血清中 VEGF, PlGF, VEGF-C, VEGF-D, OPGL 濃度の経年変化をモニターリングし、経年的に増加する *op/op* マウスの破骨細胞に対する Flt-1, Flt-4, Flk-1 中和抗体の影響を検討することにより、骨吸収の効果的な抑制法の確立を目指す。

3. 研究の方法 [平成 20 年度]

(1) 細胞培養

マウス破骨前駆細胞（プライマリーセル、北海道）を 10%牛胎児血清を含む α -MEM 中にて、現有の CO₂ インキュベータを用いて培養を行う。

(2) RT-PCR 解析

Quickprep total RNA extraction kit (Pharmacia Brotech, USA)、Oligo(dT)₂₀ primer (東洋紡績、大阪)、Rever Tra Ace- α first strand cDNA synthesis kit (東洋紡績、大阪) と現有の GeneAmp PCR system 9700 (PE Biosystems, Foster, USA) を使用し、マウス破骨前駆細胞における Flt-1, Flt-4, Flk-1 mRNA の発現について検討する。

(3) ウェスタンブロット解析

サンプルを現有のポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した後、ニトロセルロースメンブレン（第一化学薬品、東京）上に転写し、rabbit anti-Flt-4 および rabbit anti-Flk-1 polyclonal antibodies (LAB VISION, USA)、および抗ウサギ IgG (Kirkegard & Perry Laboratories inc., USA) を使用し、マウス破骨前駆細胞における Flt-1, Flt-4, Flk-1 蛋白発現について検討する。

(4) *op/op* マウスにおける rhVEGF-C, rhVEGF-D 投与による破骨細胞分化誘導の検討

B6C3Fe-a/a-*op*+ のブリーディングペア (Jackson Laboratory, USA) より得た生後 11 日齢の *op/op* マウスに、rhVEGF-C および rhVEGF-D (R&D Systems, USA) を単回腹腔投与し、エーテル麻酔下で、4%中性緩衝ホルマリンにて各個体の灌流固定を行う。そして、大腿骨を摘出し 14%EDTA(pH7.4) にて 14 日間脱灰を行い、脱水を経てパラフィン包埋を行う。その後、現有のロータリーミクロトームにより厚さ 7 μ m の連続縦断切片を作製し、破骨細胞検出のための酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色し、現有の光学顕微鏡にて破骨細胞数の算出を行う。

(5) *op/op* マウスにおける Flt-1, Flt-4, Flk-1 中和抗体投与により、VEGF ファミリーの破骨細胞誘導能に与える影響についての検討

11 日齢 *op/op* マウスに rhVEGF, rhVEGF-C, rhVEGF-D, rhVEGF-E を投与した後、Flt-1, Flt-4, Flk-1 中和抗体 (LAB VISION, USA) の投与を行い、エーテル麻酔下で、4%中性緩

衝ホルマリンにて各個体の灌流固定を行う。そして、大腿骨を摘出し 14%EDTA(pH7.4) にて 14 日間脱灰を行い、脱水を経てパラフィン包埋を行う。その後、現有のロータリーミクロトームにより厚さ 7 μ m の連続縦断切片を作製し、破骨細胞検出のための TRAP 染色し、現有の光学顕微鏡にて破骨細胞数の算出を行う。

4. 研究成果

本研究は、VEGF ファミリーが破骨細胞分化誘導能を有するか否かについて分子細胞学的に検討し、次いでそれらの受容体を特定し、これまでに我々の研究グループで行われた、大理石骨病マウス (*op/op* マウス) への VEGF, VEGF-E 投与が破骨細胞数に与える影響に関する検討を参照しながら、破骨細胞分化誘導経路を効果的に遮断することにより発揮される骨吸収抑制効果を組織学的または細胞生物学的に明らかにすることを目的としている。平成 20、21 年度の研究結果より、VEGF ファミリーのひとつである VEGF-D が *op/op* マウスにおいて、破骨細胞誘導能を有することが明らかとなった。また、ヒト末梢血単核球に RANKL 存在下で VEGF-D および他の VEGF 関連因子群をそれぞれ添加した群における誘導破骨細胞数は、非添加群と比較し有意に増加し、象牙切片の吸収能を示した。そして、Flt-4, Flk-1 の中和抗体を添加することにより、VEGF-C, D の破骨細胞誘導能は有意に抑制されることが示された。さらに、破骨前駆細胞において Flt-4、および Flk-1 の発現が確認され、破骨細胞誘導時のシグナル伝達経路の一部として MAPK 伝達系および NF κ B の活性化が示唆された。

これらの結果より、VEGF-D は VEGF-C と同様に血管新生とリンパ管新生の能力を併せ持つのみならず、他の VEGF ファミリーとほぼ同程度の破骨細胞誘導能を有することが示された事は、歯の移動に対する促進剤として、これまで報告された VEGF をはじめとし、VEGF ファミリー全体としての臨床応用の発展に非常に有意義であったと考えられる。また、Flt-4 についても破骨細胞誘導の経路である事が明確になったため、保定時の後戻りの抑制剤として、過去に報告された Flt-1、Flk-1 に加え Flt-4 の中和抗体の応用や、これらの受容体と VEGF ファミリーとの結合阻害剤としての臨床応用が期待される。

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 2 件)

① Natsumi Tsuka, Masahide Motokawa et al., *Fms-like tyrosine kinase (Flt)-4 signaling*

participates in osteoclast differentiation in osteopetrotic (*op/op*) mice. Biomedical research: 30(1); 31-37, 2009, 査読有り.

②柄なつみ VEGF-D の破骨細胞分化誘導能およびその誘導経路の解析. 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 展開医科学専攻 顎口腔頸部医科学講座 歯科矯正学分野 学位論文: 巻無し;1-49, 2009, 査読有り.

〔学会発表〕(計2件)

①柄なつみ、本川雅英 Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C,Dの破骨細胞の分化誘導および骨吸収能に及ぼす影響. 第68回日本矯正歯科学会大会, 2009年11月16日～18日, 福岡.

②柄なつみ、本川雅英 VEGF-Dの破骨細胞分化誘導能および受容体機能の解析. 第67回日本矯正歯科学会大会, 2008年9月15日～18日, 千葉.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本川 雅英 (MOTOKAWA MASAHIDE)

広島大学・病院・助教

研究者番号: 90457268

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: