

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791580
 研究課題名 (和文) 破骨細胞分化誘導に対する血管内被細胞増殖因子受容体機能の解析
 研究課題名 (英文) Analysis of functional VEGF receptor for osteoclast differentiation
 研究代表者 加来 真人 (MASATO KAKU)
 広島大学・病院・助教
 研究者番号：10325194

1. 研究成果の概要：rhVEGF-E の投与により、*op/op* マウスの大腿骨に多数の破骨細胞の出現が観察された。VEGF165 投与により正常マウスの上顎切歯骨歯根膜内に出現する破骨細胞数は、Flt-1、および Flk-1 中和抗体の投与によって有意に抑制された。また、Flt-1 と Flk-1 中和抗体の同時投与により抑制が前進し、単独投与群との間に有意差を認めた。以上の結果から、歯の移動時の歯周組織内において VEGF と M-CSF の発現が亢進し、破骨細胞の分化誘導を主体とした骨改造に大きな影響を及ぼすことが示唆された。また、VEGF は Flt-1、および Flk-1 両受容体を介して破骨細胞の分化誘導を行うことが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	570,000	3,770,000

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：破骨細胞、VEGF、Flt-1、Flk-1、*op/op* マウス

1. 研究開始当初の背景

血管内皮細胞増殖因子 (Vascular endothelial growth factor; VEGF) は、Senger らによって血管透過性亢進因子として見出された分子量 45kDa の蛋白質 (Senger *et al.*,

1983) で、血管新生、および血管透過性を制御することが明らかにされた (Leung *et al.*, 1989; Houck *et al.*, 1991)。また、個体発生時 (Dumont *et al.*, 1995) や炎症などの病的状態下 (Brown *et al.*, 1992; Yeo *et al.*,

1993; Dvorak *et al.*, 1995) では、血管新生を介した組織の新生・修復等の重要な生物学的活性を果たすことが知られている。さらに、その受容体として *fms*-like tyrosine kinase (Flt-1) (Shibuya *et al.*, 1990; de Vries *et al.*, 1992)、fetal liver kinase (Flk-1) (Terman *et al.*, 1992; Millauer *et al.*, 1993) の 2 種類のレセプターを有し、いずれもが血管内皮細胞に発現していることが報告されている。両受容体の働きについては、Flt-1 および、Flk-1 受容体ノックアウトマウスを用いた検討によって、Flk-1 が主に内皮細胞の増殖促進機能を、Flt-1 が過剰増殖した内皮細胞のさらなる増殖の抑制機能を担っていることが明らかとなった (Shalaby *et al.*, 1995; Fong *et al.*, 1995; Ferrara *et al.*, 1996)。

骨形成の主たる様式である軟骨内骨化においては、骨膜から石灰化軟骨への新生血管の侵入が認められ、さらに、骨代謝に関与する様々なサイトカインが血流を介して搬送されることから、血管新生と骨代謝の関連性が古くから示唆されてきた。一方、大理石骨病 (*op/op*) マウスを用いた最近の研究において、リコンビナントヒト (rh) VEGF 投与により多数の破骨細胞が誘導されることが明らかとなり、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) と同様に (Kodama *et al.*, 1991)、VEGF の破骨細胞分化誘導能が示された (Niida *et al.*, 1999; Kaku *et al.*, 2000)。また、マウスの歯の移動実験において、歯周組織内の骨芽細胞に VEGF が発現し、rhVEGF の投与により破骨細胞数が有意に増加するとともに、歯の移動が促進することが実証された (Kaku *et al.*, 2001; Kohno *et al.*, 2003)。さらに、骨芽細胞における Flt-1、Flk-1 の両受容体の発現が確認されるとともに、VEGF が骨芽細胞の遊走活性を促進することが報

告されており、VEGF が骨形成にも関与していることが明らかとなった (Mayr-Wohlfart *et al.*, 2002)。このような一連の研究により、骨代謝の過程における VEGF の役割が徐々に明らかにされてきた。

VEGF の破骨細胞分化誘導機序についても、これまで様々な報告がなされてきた。Niida らは、VEGF の構造類似体で、受容体として Flt-1 のみを有する placenta growth factor (PlGF) を *op/op* マウスに投与することにより破骨細胞が誘導されること、正常マウスの破骨細胞上に Flt-1 が発現することを明らかにした (Niida *et al.*, 1999)。また、その起源が破骨細胞と同じ単球やマクロファージが Flt-1 を発現し、VEGF が両者の遊走促進機能を有することが報告されている (Barleon *et al.*, 1996; Clauss *et al.*, 1996; Neufeld *et al.*, 1999)。これらのことから、VEGF は Flt-1 を介して破骨細胞の分化誘導を促進していると考えられてきた。一方、Nakagawa らは、遺伝子、および蛋白レベルで、成熟破骨細胞上の Flt-1 と Flk-1 の局在を見出し、VEGF が破骨細胞の生存因子として機能していることを明らかにした (Nakagawa *et al.*, 2000)。この報告から、VEGF は Flt-1 および Flk-1 両受容体を介して破骨細胞の分化誘導を促すことが推察されるものの、この点についての検討は行われておらず、未だその詳細は不明である。血管新生における Flt-1、Flk-1 両受容体を介した VEGF の機能については、これまでの研究によりその作用機序が解明されているが (Shalaby *et al.*, 1995; Fong *et al.*, 1995; Ferrara *et al.*, 1996)、VEGF とその受容体を制御することにより病的血管新生が抑制され、抗腫瘍効果が発揮されることが最近の研究により報告されている (Takahashi and Mai, 2001; Bocci

et al., 2004; Hinoda *et al.*, 2004; Bjorndahl *et al.*, 2004)。したがって、破骨細胞の分化を制御する受容体機構を解明することは、骨代謝疾患の治療 (Coetzee and Kruger *et al.*, 2004; Hofbauer and Schoppert *et al.*, 2004) に対してきわめて有用と考えられる。

一方、矯正歯の移動においては、歯周組織内に IL-1 β 、TNF- α などの様々な炎症性サイトカインが発現し、骨のリモデリングに影響を与えていることが明らかにされている (Uematsu *et al.*, 1996)。しかしながら、VEGF と骨のリモデリングとの関わりについては、現在まで動物実験における検討が行われているのみで、ヒトの骨代謝に対する関与についてはまったく明らかにされていない。また、この点の解明は VEGF を介した骨代謝と血管新生の関わりを明らかにし、骨代謝疾患の治療に資すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトの骨代謝における VEGF の関与を明らかにすることを目的として、矯正歯科治療のための歯の移動を行っている患者の歯周組織内における VEGF の発現様相についての検討を行った。また、破骨細胞誘導における VEGF の受容体経路を解明するために、VEGF ファミリーのひとつで Flk-1 のみと結合することが明らかな VEGF-E (Ogawa *et al.*, 1998) を *op/op* マウスに投与し、誘導される破骨細胞の観察を行った。さらに、その受容体機構をより明確にするために、VEGF による破骨細胞誘導に対する両受容体中和抗体の抑制作用について検討を行った。

3. 研究の方法

実験には、培養破骨前駆細胞を用い、両受容

体の発現を RT-PCR、および Western Blotting 法により検討する。これにより、まず、破骨前駆細胞に Flt-1 と Flk-1 が発現しているか否かを明らかにする。また、VEGF ファミリーのひとつである rhVEGF-E は Flk-1 のみを受容体として機能することから、大理石骨病マウス (*op/op* マウス) に VEGF-E の投与を行い、出現する破骨細胞の観察を行う。VEGF-E の投与により、*op/op* マウスに破骨細胞が出現するならば、VEGF は受容体として 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。さらに、VEGF165 の破骨細胞誘導能に与える Flt-1、および Flk-1 中和抗体の影響を *op/op* マウスを用いて検討する。

4. 研究成果

矯正歯科治療患者の歯根膜腔内における VEGF の発現、および破骨細胞誘導における受容体機能について検討を行い、以下の所見が得られた。

(1). 矯正歯科治療患者における GCF 中の VEGF、M-CSF の発現量は、歯の移動開始 1 日後で 51.1、16.7 pg/ml、7 日後で 50.3、15.7 pg/ml となり、それぞれ開始直前の 21.8、11.5 pg/ml と比較して有意に大きな値を示した。

(2). RT-PCR 解析、および Western blot 法により、前破骨細胞における Flt-1、Flk-1 受容体の遺伝子および蛋白発現が明らかとなった。

(3). rhVEGF-E の投与により、*op/op* マウスの大腿骨に多数の破骨細胞の出現が観察された。

(4). rhVEGF165 投与により正常マウスの上顎切歯歯根膜内に出現する破骨細胞数の増加は Flt-1、および Flk-1 中和抗体の投与によって有意に抑制された。また、Flt-1 と Flk-1 中和抗体の同時

投与によりさらに抑制され、単独投与群との間に有意差を認めた。

以上の結果から、人為的な歯の移動における歯周組織内で VEGF と M-CSF の発現が亢進し、破骨細胞の分化誘導を主体とした骨改造への両因子の関与が強く示唆された。また、VEGF は Flt-1、および Flk-1 両受容体を介して破骨細胞の分化誘導機能を発揮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 2 件)

① Kaku, M., Motokawa, M., Tohma, Y., Tsuka, N., Koseki, H., Ohtani, J., Fujita, T., Kawata, T., and Tanne K. : VEGF and M-CSF levels in periodontal tissue during tooth movement.

Biomed. Res., 29, 181-187, 2008. (査読あり)

② Tohma, Y., Kaku, M., Motokawa, M., Lin, Y., Kamata, H., Tai, M., Tsuka, N., Koseki H., Ohtani J., Fujita, T., Kawata, T. and Tanne K. : VEGF Induces Osteoclast Differentiation via Flt-1 and Flk-1. Biomed. Res. 19, 151-156, 2008. (査読あり)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加来 真人 (MASATO KAKU)
広島大学・病院・助教
研究者番号 : 1 0 3 2 5 1 9 4

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者