

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17000

研究課題名（和文）ビスホスホネート製剤が骨特異的血管および血管周囲細胞に及ぼす影響

研究課題名（英文）Biological effects of bisphosphonates on bone-specific blood vessels and perivascular cells

研究代表者

山本 知真也（Yamamoto, Tomomaya）

北海道大学・歯学研究院・招へい教員

研究者番号：50928299

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、破骨細胞抑制に作用するビスホスホネートが、骨組織に存在する骨特異的血管や周囲細胞に与える影響、および、骨特異的血管と骨芽細胞系細胞の相互作用に対するビスホスホネートの作用を明らかにする目的で、ビスホスホネート製剤であるアレンドロネートを投与したマウスの微細構造学的解析を行った。その結果、アレンドロネートを投与により、骨特異的血管の管腔径狭小や血管壁の形態異常が認められるとともに、破骨細胞が完全に抑制される以前から骨芽細胞抑制が生じており、骨特異的血管と骨芽細胞のinteractionが存在する可能性が推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、骨粗鬆症治療薬として用いられるビスホスホネート製剤（アレンドロネート）が、従来報告されていた破骨細胞のみならず、骨特異的血管や骨芽細胞系細胞に対しても抑制的に作用する可能性が示唆された。このことは、これまで破骨細胞抑制一辺倒で考えられていたビスホスホネート製剤の作用機序に一石を投じるものである。また、骨芽細胞抑制については、ビスホスホネート製剤の直接作用であるのか、あるいは、骨特異的血管を介した間接作用であるのか、今後検討してゆく必要があると思われる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to determine the effects of bisphosphonates, which act in osteoclast suppression, on bone-specific blood vessels and surrounding cells in bone tissue, and on the interaction between bone-specific blood vessels and osteoblast lineage cells. In order to verify this issue, we performed histochemical analysis of mice treated with alendronate, one of the bisphosphonates. As a result, alendronate administration resulted in small and shrunken endomucin-positive bone-specific blood vessels, which showed irregular shapes and small protrusions from the vascular endothelial cells. In addition, the inhibition of the osteoblasts occurred in the alendronate-treated bone tissue, even in the absence of completely reduced osteoclast activity. Therefore, it seems likely that there may be an interaction between bone-specific blood vessels and osteoblasts.

研究分野：組織学、骨代謝学、微細構造学

キーワード：ビスホスホネート 骨特異的血管 骨芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管は骨でも重要な組織であり、骨芽細胞系細胞や骨髄間質細胞に関わる可能性が論じられてきた。近年、骨組織では、CD31 強陽性/endomucin 強陽性骨特異的血管が発見され、骨芽細胞分化・骨形成誘導に寄与する可能性が報告されている (Kusumbe et al., Nature, 2014)。研究代表者らが、それを追従したところ、長管骨の骨幹端、特に骨・軟骨移行部に多数の CD31/endomucin 陽性骨特異的血管を認め、その多くが EphB4 陽性静脈であり、CD31/endomucin 陽性および EphB4 陽性静脈系血管の周囲には ephrinB2 陽性骨芽細胞が近接することを明らかにした (Tsuchiya, Yamamoto et al., Microscopy, 2020)。このことから、正常状態における骨特異的血管と骨芽細胞系細胞との間には様々な細胞間コミュニケーション、すなわち、骨血管連関が示唆された。

一方、骨吸収抑制剤であるビスホスホネートは破骨細胞の細胞骨格の障害やアポトーシスを誘導する。その機序として、Ras, Rac, Rho などの低分子 GTP 結合蛋白のプレニル化がビスホスホネートの geranylpyrophosphate の合成障害で抑制されることが原因と推察されている。しかし、この機序は、血管内皮細胞・血管平滑筋細胞を含めた全ての細胞において、細胞内にビスホスホネートが入り込めば同様の効果が示されると推測される。破骨細胞のみならず、血管内皮細胞・平滑筋細胞も物質の取り込みを盛んに行う細胞であることから、血液中のビスホスホネートを取り込み、本剤の影響を受ける可能性がある。これらの背景をもとに、本研究では、1) ビスホスホネートの骨特異的血管と血管平滑筋などの周囲細胞に対する微細構造学的解析、また、2) 骨特異的血管と骨芽細胞系細胞の相互作用に対するビスホスホネートの細胞学的メカニズムについて解析を行うこととした。

2. 研究の目的

前述の通り、ビスホスホネートは破骨細胞に取り込まれ細胞内で細胞骨格の障害やアポトーシスを誘導することが知られている。一方で、CD31/endomucin 陽性骨特異的血管や血管平滑筋などの周囲細胞は飲み込み作用を介してビスホスホネートを取り込む可能性が高い。そこで本研究では、従来、破骨細胞抑制に注目されてきたビスホスホネートにおける骨特異的血管への作用に焦点を当てて解析することを目的とした。具体的には、(1) ビスホスホネートの骨特異的血管と血管平滑筋などの周囲細胞に対する微細構造学的解析、また、(2) 骨特異的血管と骨芽細胞系細胞の相互作用に対するビスホスホネートの細胞学的メカニズムについて検索を進める。

3. 研究の方法

本研究では、従来、破骨細胞抑制に注目がよせられていたビスホスホネートの作用を、骨特異的血管に焦点をあててモデル動物実験を中心に解析・展開することとした。

そこで、具体的な方法として、生後 8 週齢の ICR マウスにビスホスホネート製剤であるアレンドロネート (1 mg/kg、アレンドロネート群) または、溶媒 (生理食塩水、コントロール群) を 10 日間連日皮下投与した後、paraformaldehyde 溶液にて固定し、大腿骨・脛骨を採取した。これらサンプルを EDTA 溶液にて脱灰した後、パラフィンや Epoxy 樹脂に包埋し、各種組織化学や透過型電子顕微鏡観察などの組織学的・微細構造学的解析に供した。また、一部のサンプルから total RNA を抽出し cDNA に逆転写後、遺伝子発現解析を行った。

解析項目として、パラフィン切片では、H-E 染色、endomucin, CD31, α SMA, 組織非特異型アルカリホスファターゼ (tissue nonspecific alkaline phosphatase: TNALPase), PHOSPHO1, ENPP1, podoplanin の免疫組織化学、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP) 酵素組織化学を行い、光学顕微鏡で観察した。また、Epoxy 樹脂準超薄切片は toluidine blue 染色・光学顕微鏡観察するとともに、超薄切片を酢酸ウラニル・クエン酸鉛染色した後、透過型電子顕微鏡にて観察した。また、大腿骨・脛骨から抽出した total RNA を用いて、GATA2, Acta2 (α SMA), Cdh5 (VE-cadherin), VEGF, PDGFbb, VASH1/2 の遺伝子発現を検索した。

4. 研究成果

(1) ビスホスホネートの骨特異的血管と血管平滑筋などの周囲細胞に対する微細構造学的解析

アレンドロネートを投与したマウス的大腿骨骨幹端部では、コントロールマウスと比較して、網目状の骨梁が増加し、アレンドロネートによる骨量増加作用が得られていた。コントロールマウス的大腿骨では、骨梁間に大きな管腔を有する多数の endomucin 陽性骨特異的血管が認められたのに対し、アレンドロネート投与マウスでは endomucin 陽性を示す血管は管腔径が小さ

くなり、血管壁が一部不連続を示していた(図1)。endomucin 陽性血管数および管腔面積・管腔径を計測したところ、アレンドロネート投与マウスとコントロールマウスで、endomucin 陽性血管の数は変わらないものの、管腔面積や管腔径(長径および短径)は、いずれもアレンドロネート投与マウスで有意に減少していた。また、これらの影響は、成長板軟骨直下骨梁周囲よりも、骨幹寄りの骨梁周囲でより著明に認められた。透過型電子顕微鏡で血管の微細構造観察を行ったところ、アレンドロネート投与マウスでは、血管内皮細胞の管腔面に多数の突起構造や exosome 様の小胞が観察され、アレンドロネートが骨特異的血管の微細構造変化を誘導する可能性が推測された。これらを踏まえて、血管管腔の維持・形成ならびに血管新生

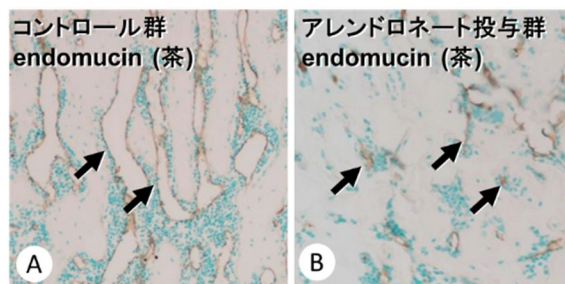


図1 コントロールマウス(A)およびアレンドロネート投与マウス(B)大腿骨骨幹端における endomucin 免疫染色像(茶色)。アレンドロネート投与マウスでは、endomucin 陽性血管(矢印)の管腔径が減少し、血管壁は一部不連続を示していた。

に関わる遺伝子群(GATA2, Acta2: α SMA, Cdh5: VE-cadherin, VEGF, PDGFbb, VASH1/2)の発現を解析したところ、血管内皮細胞間の接着因子である Cdh5 (Ve-cadherin) の発現は、コントロールマウスとアレンドロネート投与マウスで変わらなかった。一方、骨特異的血管のマーカーである Endomucin は血管壁の三次元的な管腔形態維持に関与すること、また、その転写因子として Gata2 が知られている。アレンドロネート投与マウスでは、Endomucin や Gata2、さらには、血管平滑筋細胞のマーカーである Acta2 (α SMA)、血管新生抑制因子である Vash1 の発現が上昇していた。これらのデータを合わせて考えると、アレンドロネート投与により血管新生が抑制される一方、血管の形態異常を修復しようとする機構が働いている可能性が推測される。ビスホスホネートは、Rho family (Rho, Cdc42, Rac) や Ras をターゲットとして細胞骨格の再構築や細胞接着に関与することから、前述した考察を補強するデータとして、アレンドロネート投与マウスの血管内皮細胞や血管平滑筋細胞における細胞骨格関連因子(Rho/Ras, actin filament, podoplanin/CD44)や細胞接着因子(VCAM-1/VE-cadherin)の局在変化を明らかにする必要があると考えられ、現在、検索を進めている。

(2) 骨特異的血管と骨芽細胞系細胞の相互作用に対するビスホスホネートの細胞学的メカニズム

骨芽細胞の活性化は、破骨細胞とのカップリングに依存するが、一方で、endomucin 陽性骨特異的血管が骨芽細胞の活性化に関与する可能性も報告されている(Kusumbe et al., Nature, 2014)。そこで、アレンドロネート投与後における骨芽細胞、破骨細胞の挙動を組織学的に解析した。その結果、コントロールマウスと比較して、アレンドロネート投与マウスでは、TRAP 陽性破骨細胞が減少し、一部アポトーシス像を示すものの、破骨細胞は完全に消失していなかった。このことから、本投与量・期間のアレンドロネート処方では破骨細胞が完全に抑制されておらず、破骨細胞と骨芽細胞のカップリングと、それに続く骨芽細胞活性化は維持されていると推測された。これらを踏まえて、骨芽細胞系細胞の検索を行ったところ、ALP 陽性骨芽細胞系細胞(骨芽細胞および前骨芽細胞)と PHOSPHO1 陽性骨芽細胞(骨基質石灰化を行っている骨芽細胞)の領域は、コントロールマウスと比較して、アレンドロネート投与マウスで著しく減少していた。特に、endomucin 陽性血管への影響が大きい骨幹部では、ALP 陽性/PHOSPHO1 陽性骨芽細胞がほとんど認められなかった。さらに、アレンドロネート投与マウスでは、コントロールマウスに比べて、podoplanin 陽性を示し骨細胞に分化しつつある骨芽細胞や DMP1 陽性骨細胞も著明に減少していた。

(3) まとめと考察

今回の結果から、アレンドロネート投与によって骨特異的血管は血管壁の形態異常や管腔の狭小化などの異常を示し、正常な管腔形態を維持できなくなっていると推測された。一方で、Gata2 や Endomucin、Vash1 などの遺伝子発現が上昇していることから、1つの可能性として、アレンドロネートによって生じた血管の形態異常を修復するフィードバック機構が働いていると考えられた。一方、今回の解析で用いたアレンドロネート投与マウスでは、破骨細胞が完全に抑制されていないにも関わらず、骨特異的血管異常および骨芽細胞・骨細胞抑制が認められたことから、骨特異的血管と骨芽細胞の interaction、すなわち「骨・血管連関」が生じている可能性も推測される。今後は、破骨細胞によるカップリングの影響を完全に排除した状態、すなわち、Rankl 遺伝子欠損マウスなどの破骨細胞欠如マウスにアレンドロネートを投与する実験や、正常マウスに対するアレンドロネートの投与量・投与期間を再考した追加実験、また、培養血管内皮細胞や血管平滑筋細胞へのアレンドロネート添加実験等を行い、骨特異的血管・骨芽細胞の interaction について、解析を進めてゆきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 9件／うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Maruoka Haruhi, Zhao Shen, Yoshino Hirona, Abe Miki, Yamamoto Tomomaya, Hongo Hiromi, Haraguchi-Kitakamae Mai, Nasoori Alireza, Ishizu Hotaka, Nakajima Yuhi, Omaki Masayuki, Shimizu Tomohiro, Iwasaki Norimasa, Luiz de Freitas Paulo Henrique, Li Minqi, Hasegawa Tomoka | 4. 巻 64 |
| 2. 論文標題 Histochemical examination of blood vessels in murine femora with intermittent PTH administration | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences | 6. 最初と最後の頁 329 ~ 336 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2022.05.003 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Maruoka Haruhi, Hasegawa Tomoka, Yoshino Hirona, Abe Miki, Haraguchi-Kitakamae Mai, Yamamoto Tomomaya, Hongo Hiromi, Nakanishi Ko, Nasoori Alireza, Nakajima Yuhi, Omaki Masayuki, Sato Yoshiaki, Luiz de Freitas Paulo Henrique, Li Minqi | 4. 巻 64 |
| 2. 論文標題 Immunolocalization of endomucin-reactive blood vessels and -smooth muscle actin-positive cells in murine nasal conchae | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences | 6. 最初と最後の頁 337 ~ 345 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2022.05.001 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Yamamoto Tomomaya, Maruoka Haruhi, Hongo Hiromi, Yoshino Hirona, Haraguchi-Kitakamae Mai, Liu Xuanyu, Yao Qi, Li Minqi, Amizuka Norio, Hasegawa Tomoka | 4. 巻 65 |
| 2. 論文標題 Early gene expression profiles of anabolic and catabolic molecules in murine bone after a single PTH injection | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences | 6. 最初と最後の頁 395 ~ 400 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2023.08.003 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Yamamoto Tomomaya, Abe Miki, Hongo Hiromi, Maruoka Haruhi, Yoshino Hirona, Haraguchi-Kitakamae Mai, Udagawa Nobuyuki, Li Minqi, Amizuka Norio, Hasegawa Tomoka | 4. 巻 65 |
| 2. 論文標題 Differential osteoblastic activity in primary metaphyseal trabecular and secondary trabeculae of c-fos deficient mice | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences | 6. 最初と最後の頁 265 ~ 272 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2023.08.002 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Mae Takahito, Hasegawa Tomoka, Hongo Hiromi, Yamamoto Tomomaya, Zhao Shen, Li Minqi, Yamazaki Yutaka, Amizuka Norio | 4. 巻 59 |
| 2. 論文標題 Immunolocalization of Enzymes/Membrane Transporters Related to Bone Mineralization in the Metaphyses of the Long Bones of Parathyroid-Hormone-Administered Mice | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Medicina | 6. 最初と最後の頁 1179 ~ 1179 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/medicina59061179 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Miyamoto Yukina, Hasegawa Tomoka, Hongo Hiromi, Yamamoto Tomomaya, Haraguchi-Kitakamae Mai, Abe Miki, Maruoka Haruhi, Ishizu Hotaka, Shimizu Tomohiro, Sasano Yasuyuki, Udagawa Nobuyuki, Li Minqi, Amizuka Norio | 4. 巻 65 |
| 2. 論文標題 Histochemical assessment of osteoclast-like giant cells in Rankl-/- mice | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences | 6. 最初と最後の頁 175 ~ 185 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2023.04.003 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Muneyama Takafumi, Hasegawa Tomoka, Yimin, Yamamoto Tomomaya, Hongo Hiromi, Haraguchi-Kitakamae Mai, Abe Miki, Maruoka Haruhi, Ishizu Hotaka, Shimizu Tomohiro, Sasano Yasuyuki, Li Minqi, Amizuka Norio | 4. 巻 65 |
| 2. 論文標題 Histochemical assessment on osteoclasts in long bones of toll-like receptor 2 (TLR2) deficient mice | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences | 6. 最初と最後の頁 163 ~ 174 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2023.04.002 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Hasegawa Tomoka, Tokunaga Shin, Yamamoto Tomomaya, Sakai Mariko, Hongo Hiromi, Kawata Takehisa, Amizuka Norio | 4. 巻 164 |
| 2. 論文標題 Evocalcet Rescues Secondary Hyperparathyroidism-driven Cortical Porosity in CKD Male Rats | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Endocrinology | 6. 最初と最後の頁 bqad022 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endocr/bqad022 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Hongo Hiromi, Yokoyama Ayako, Yamada-Sekiguchi Tamaki, Yamamoto Tomomaya, Yoshino Hirona, Abe Miki, Haraguchi-Kitakamae Mai, Luiz de Freitas Paulo Henrique, Hasegawa Tomoka, Li Minqi | 4. 巻 64 |
| 2. 論文標題 Histochemical assessment on osteocytic osteolysis in lactating mice fed with a calcium-insufficient diet | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences | 6. 最初と最後の頁 422 ~ 430 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2022.09.003 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Moritani Yasuhito, Hasegawa Tomoka, Yamamoto Tomomaya, Hongo Hiromi, Yimin, Abe Miki, Yoshino Hirona, Nakanishi Ko, Maruoka Haruhi, Ishizu Hotaka, Shimizu Tomohiro, Takahata Masahiko, Iwasaki Norimasa, Li Minqi, Tei Kanchu, Ohiro Yoichi, Amizuka Norio | 4. 巻 64 |
| 2. 論文標題 Histochemical assessment of accelerated bone remodeling and reduced mineralization in Il-6 deficient mice | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences | 6. 最初と最後の頁 410 ~ 421 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2022.10.001 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 長谷川智香、山本知真也、本郷裕美、宮本幸奈、宗山昂史、福田千恵、津田英資、網塚憲生 |
| 2. 発表標題 破骨細胞の分化・機能に対するRANKL/Siglec-15の作用について |
| 3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 長谷川智香、山本知真也、本郷裕美、福田千恵、津田英資、網塚憲生 |
| 2. 発表標題 モデリングまたは骨リモデリング領域における破骨細胞の機能と分化メカニズム |
| 3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山本知真也、崔 佳昕、石 硯、劉 軒宇、北構-原口真衣、本郷裕美、網塚憲生、長谷川智香 |
| 2. 発表標題 アレンドロネートの投与量の違いによる破骨細胞と骨芽細胞の抑制効果における組織学的解析. |
| 3. 学会等名 第42回日本骨代謝学会 |
| 4. 発表年 2024年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |