

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21006

研究課題名（和文）骨粗鬆症治療薬による骨特異的血管および血管周囲細胞の作用メカニズム

研究課題名（英文）Biological function of osteoporotic drugs on bone-specific blood vessels and perivascular cells

研究代表者

丸岡 春日（Maruoka, Haruhi）

北海道大学・歯学研究院・助教

研究者番号：40962577

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ALN投与マウスでは、骨特異的血管の管腔径や面積の減少が認められ、血管内皮細胞が血管内腔に向かって多数の小胞や小突起を形成させており、ALNによる血管壁の微細構造変化が示唆された。ALN投与マウスの骨組織では、血管壁の三次元的な管腔形態維持に関わるEndomucinやその転写因子、血管新生抑制因子の発現が上昇していたことから、血管の微細構造異常や血管新生の抑制が生じる一方、これら異常を修復する機構が働いている可能性が示唆された。さらに、ALN投与マウスではALP陽性/PHOSPHO1陽性骨芽細胞が著明に減少していたことから、ALNが骨特異的血管や骨芽細胞にも影響を与え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

現在用いられているPTHやビスホスホネート、活性型ビタミンD3製剤などの骨粗鬆症治療薬は、破骨細胞などの骨の細胞群への作用ばかりが目目されてきた。本研究では、骨粗鬆症治療薬の血管や血管周囲細胞に対する作用ならびに、薬剤が作用した血管・血管周囲細胞による骨芽細胞系細胞への影響を明らかにし、骨血管連関および骨代謝調節機構のメカニズムに焦点をあてることにより、骨粗鬆症治療薬の新規作用解明に取り組んでおり、高い学術的独創性と創造性に富んでいると思われる。ゆえに本研究開発により、骨粗鬆症治療薬の新規開発が進み、超高齢化社会となった現在において、健康寿命の延伸に寄与できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In the ALN administrated mice, the diameter and area of bone-specific blood vessels were decreased, and vascular endothelial cells formed numerous reticulum and microtubules toward the vascular lumen. It suggests that ALN causes microstructural changes in the vascular wall. The upregulation of endomucin, its transcription factors, and angiogenesis inhibitory factors, which are involved in maintaining the three-dimensional luminal morphology of the vascular wall, in bone tissue from ALN-administrated mice. It indicates that, while abnormal vascular microstructure and angiogenesis are suppressed, a repair mechanism may be at work to correct these abnormalities. In addition, ALP-positive/PHOSPHO1-positive osteoblasts were markedly decreased in ALN-administrated mice, suggesting that ALN may also affect 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：血管連関 ビスホスホネート 活性型ビタミンD 骨特異的血管 血管周囲細胞

## 1. 研究開始当初の背景

近年、骨組織において CD31 陽性/endomucin 陽性骨特異的血管が存在することが報告された (Nature 2014)。CD31 陽性/endomucin 陽性骨特異的血管は、従来報告されてきた血管機能のみならず、Notch/Hif1 $\alpha$  システムによる骨芽細胞分化・骨形成誘導に寄与する可能性 (Stem Cell Int, 2017; Nature Commun, 2017) や、endomucin を介した CD34 陰性/c-Kit 陽性/Sca-1 陽性 /Lin 陰性造血幹細胞の維持 (J Exp Med, 2015) などを担うことが報告されている。研究代表者が所属する研究室では、CD31 陽性/endomucin 陽性血管が EphB4 陽性を示し、ephrinB2 陽性骨芽細胞に近接すること (Microscopy, 2020) を見出しており (図 1) CD31 陽性/endomucin 陽性骨特異的血管と骨芽細胞系細胞における細胞間コミュニケーション (骨血管連関) の存在を推測している。また、骨格発生・成長期の血管周囲には、血管平滑筋細胞や周皮細胞のみならず、未分化間葉系細胞が存在する可能性が報告されており (J Exp Med, 2013) 血管および血管周囲細胞群による骨代謝調節機構が示唆される。

本研究の先行研究として、研究代表者は、骨粗鬆症治療薬として用いられる副甲状腺ホルモン (PTH) の骨特異的血管に対する作用 (血管数・管腔径の増加)、骨芽細胞系細胞および血管周囲細胞 (血管平滑筋細胞、周皮細胞、ストローマ細胞) への作用、そして、PTH 作用により血管周囲細胞が骨芽細胞系細胞へ分化する可能性を報告してきた (Maruoka et al., J Oral Biol, 2022)。一方、現在、本邦で用いられる骨粗鬆症治療薬として、PTH のほかビスホスホネートや活性型ビタミン D3 製剤などが挙げられ、これらは骨の細胞群に対して異なる作用を示す。ビスホスホネートは、破骨細胞内に取り込まれ、メバロン酸カスケードを抑制することで、破骨細胞の細胞骨格の阻害やアポトーシスを誘導すること、また、活性型ビタミン D3 製剤では、破骨細胞抑制と骨芽細胞によるモデリング誘導が報告されている。また、血管や血管周囲細胞には、飲み込み作用やビタミン D 受容体が発現することから、PTH のみならず、ビスホスホネートや活性型ビタミン D3 製剤もまた、血管や血管周囲細胞に影響を及ぼす可能性が推測される。

そこで、本研究では、1) ビスホスホネートや活性型ビタミン D3 製剤の血管や血管周囲細胞に対する作用、2) これら薬剤が作用した血管・血管周囲細胞による骨芽細胞系細胞への影響について、動物モデルを用いた *in vivo* 画像イメージング解析を中心に進める。これまで、両治療薬の作用は、破骨細胞など骨の細胞群ばかりが注目されてきたが、血管周囲細胞および血管周囲細胞に対する作用を明らかにすることで、これらの骨粗鬆症治療薬による骨血管連関および骨代謝調節機構のメカニズムに焦点をあてた解析を行う。

## 2. 研究の目的

前項で述べた通り、骨吸収抑制剤であるビスホスホネート剤、あるいは、骨吸収抑制とミニモデリングを誘導する活性型ビタミン D3 製剤の作用は、破骨細胞や骨芽細胞など骨の細胞群に対しての検索がほとんどであり、骨特異的血管および血管周囲細胞に及ぼす作用、ま

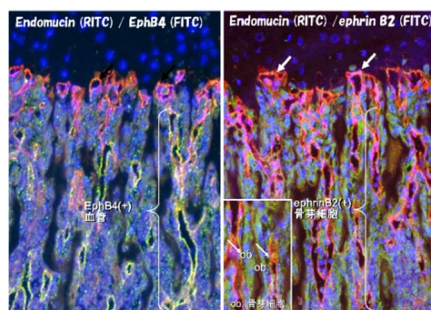


図 1 : 大腿骨骨幹端の endomucin/EphB4 の二重蛍光染色 (左) および endomucin/ephrinB2 の二重蛍光染色 (右)。endomucin 陽性血管は EphB4 陽性静脈系であり、ephrinB2 陽性骨芽細胞に近接して存在する。

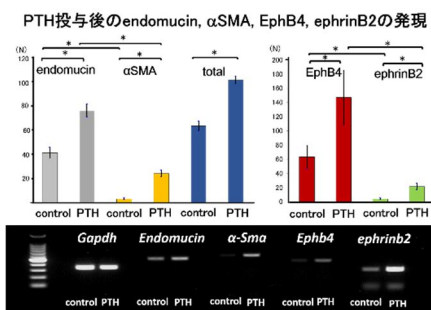
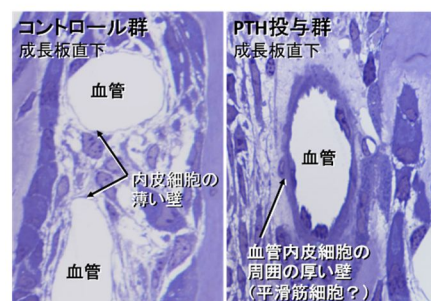


図 2 : PTH 投与により、血管管腔壁の増大が認められる (上図)。また、PTH 投与後には endomucin 陽性血管、 $\alpha$ SMA 陽性血管、EphB4 陽性血管がそれぞれ増加するとともに、これらの遺伝子発現も上昇する (下図)。

た、血管系を介した骨代謝調節機構については不明な点が多い。これらを踏まえ、本研究では、動物モデルを用いた *in vivo* イメージング解析にて、ビスホスホネートや活性型ビタミン D3 製剤の血管や血管周囲細胞に対する作用、ならびに、これら薬剤が作用した血管・血管周囲細胞による骨芽細胞系細胞への影響について明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、ビスホスホネート、活性型ビタミン D それぞれにおける骨特異的血管や血管周囲細胞への作用、および、血管・血管周囲細胞を介した骨代謝調節機構の可能性について、以下の2種類の実験系を構築し、検索を行った。

#### 実験

生後 8 週齢 ICR マウスに、ビスホスホネート(アレンドロネート)1000mg/kg、または、溶媒(生理食塩水)を 1 日 1 回の投与頻度で 10 日間にわたって皮下投与し、大腿骨を採取した。ALN 投与群および溶媒投与(コントロール)群において、血管関連因子(endomucin,  $\alpha$ SMA), 骨芽細胞・骨細胞関連因子(Alkaline Phosphatase: ALP, PHOSPHO1, DMP1, podoplanin), 破骨細胞(酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ: TRAP), 未分化間葉系細胞関連因子( $\alpha$ SMA, c-kit)などの各種免疫組織化学・酵素組織化学や透過型電子顕微鏡による微細構造解析を実施するとともに、血管管腔径・数の計測・統計処理や、血管新生・管腔維持に関する遺伝子群(*Gata2*, *Acta2* ( $\alpha$ SMA), *Cdh5*(VE-cadherin), *Vegf*, *Pdgfb*, *Hif1a*, *Vash1/2* 等)の発現について RT-PCR や real-time PCR を用いて検索した。

#### 実験

生後 16 週齢雌性 Wistar ラットに、卵巣摘出術を施行したのち、活性型ビタミン D 製剤(エルデカルシトール)90ng/kg、または、溶媒(生理食塩水)を 1 日 1 回 12 週間にわたって経口投与し、大腿骨・脛骨を採取した。溶媒投与群、エルデカルシトール投与群において、実験と同様の解析を行った(活性型ビタミン D 製剤による骨量増加作用は、マウスよりもラットで著明に認められることから、同実験系はマウスではなくラットを用いた)。

### 4. 研究成果

骨吸収抑制剤であるアレンドロネートをマウスに投与したところ、コントロール群と比較して、大腿骨骨幹端部に存在する endomucin 陽性骨特異的血管の数は変わらないものの、血管の管腔径や面積は減少しており、血管腔の狭小化が生じていた(図3)。また、このような血管異常は、骨幹端部よりも骨幹部の血管で認められた。アレンドロネート投与マウスの血管の微細構造を観察したところ、血管壁の厚みが増す一方、血管内腔に向かって伸びる多数の小胞や小突起が認められたことから、血管壁の微細構造異常が強く示唆された。

次に、血管新生・管腔維持に関する遺伝子群の発現解析を行った。本研究において骨特異的血管のマーカーとして用いている endomucin の機能として、血管壁の三次元的な管腔形態維持が挙げられている。アレンドロネート投与マウスでは、*Endomucin* やその転写因子である *Gata2*、血管新生抑制因子 *Vash1* の遺伝子発現が上昇していたことから、血管の微細構造異常や血管新生の抑制が生じる一方、これら異常を修復する機構が働いている可能性が示唆された。

さらに、骨の細胞群への影響を検索したところ、コントロールマウスに比較して、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。一方、ALP 陽性/PHOSPHO1 陽性骨芽細胞は、ALN 投与で著明に減少していた。特に骨特異的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。このことから、アレンドロネートが、破骨細胞のみならず endomucin 陽性骨特異的血管や骨芽細胞にも影響を与える可能性が推測された。今後は、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,

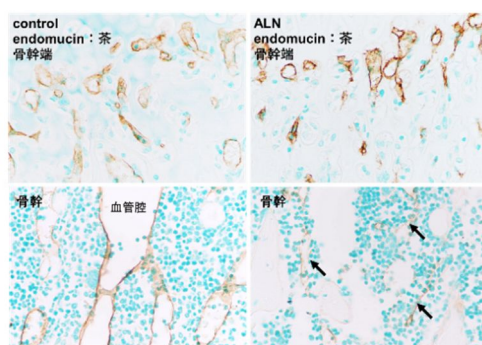


図3：コントロール(左図)およびアレンドロネート(ALN)投与マウス(右図)大腿骨骨幹端における endomucin 免疫染色像(茶色)。アレンドロネート投与マウスでは、endomucin 陽性血管(矢印)の管腔径が減少し、血管壁は一部不連続を示していた。なお、このような血管異常は、骨幹端部(上段)よりも骨幹部(下段)で著明に認められた。

podoplanin/CD44) や細胞接着因子 (VCAM-1/VE-cadherin) の局在変化、さらには、血管周囲におけるストローマ細胞や骨芽細胞系細胞におけるカップリングや分化関連因子 (ephrinB2/EphB4, notch/HIF1 $\alpha$ , Runx2/Osterix/ALP, Ki67/PCNA)、細胞増殖 (BrdU の取り込み) を解析することで、骨血管連関および血管系から骨芽細胞系細胞への転換に対する影響を中心に検索を進める。

なお、活性型ビタミン D 製剤を投与したラットでも、上記と同様の解析を行ったものの、今回の実験系においては、骨の血管系に明らかな変化が認められなかった。骨組織では、骨芽細胞のみならず、血管内皮細胞や周囲細胞にもビタミン D 受容体が発現することが報告されていることから、今後、投与量や投与期間等を検討し、解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 0件）

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------