

学位論文

Vascular Endothelial Growth Factor
(VEGF) の破骨細胞分化誘導能

学位申請者 加来真人

広島大学歯学部歯科矯正学講座

主任：丹根一夫教授

1998年

目 次

1. 緒言	2
2. 材料ならびに方法	7
2.1. 実験動物	7
2.2. 各因子の投与	7
2.3. 組織標本の作製	9
2.4. 免疫組織化学的観察	9
2.5. Monoclonal anti-c- <i>fms</i> (AFS98) 及び各因子の投与	10
2.6. 遺伝子組換え型ヒトFlt-1 キメラ蛋白の投与	11
2.7. 統計処理	12
3. 結果	13
3.1. 各因子投与後の破骨細胞数	13
3.2. 破骨細胞における受容体の発現	18
3.3. 各因子に対するAFS98 の影響	19
3.4. Flt-1 キメラ蛋白の影響	21
4. 考察	22
4.1. VEGFの破骨細胞誘導能とその受容体について	22
4.2. VEGFの破骨細胞生存因子としての可能性について	24
4.3. <i>op/op</i> マウスに出現する破骨細胞について	26
4.4. 臨床的示唆	27
5. 総括	29
6. 謝辞	30
7. 文献	31

1. 緒言

破骨細胞は、造血幹細胞を起源とする骨吸収能を有する多核巨細胞である。骨組織は破骨細胞による骨吸収と、骨芽細胞による骨形成を生涯繰り返しながら維持されている。矯正歯科治療における歯の移動時に起こる歯槽骨内の組織変化も骨のリモデリングによるものであり、歯槽骨の圧迫側で吸収が、牽引側で新生骨の添加が起こることにより歯の移動を可能にしている。このように骨のリモデリングに対してその重要な役割を担う破骨細胞に関する基礎研究は、矯正歯科臨床においても重要であると考えられ、近年急速な展開を遂げている。なかでも先天性大理石骨病モデルマウスのひとつである osteopetrotic mouse (*op/op* マウス) は、*in vivo* における破骨細胞の分化の解明に有用であり、様々な実験系に用いられている。

大理石骨病は骨吸収能が低下し、骨吸収と骨形成の均衡が崩れ、骨髓腔に多量の骨梁が蓄積する代謝性骨疾患である。大理石骨病を引き起こす突然変異マウスは現在4種類知られており、それぞれの病因が異なっている。このうち *op/op* マウスでは、破骨細胞、単球及びマクロファージが欠損しており¹⁻³⁾、歯胚は形成されるものの、歯槽骨の吸収不全により歯の萌出が認められない。また、

頭蓋顎顔面領域の異常としては、ドームスカルと呼ばれる丸い頭蓋冠の形成や、咬筋⁴⁾、外側翼突筋の萎縮⁵⁾を呈している。Yoshidaら⁶⁾は、*op/op* マウスの macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) 遺伝子が突然変異を起こし、活性のあるM-CSFが産生されないことにより大理石骨病が発症することを明らかにした。また、Felixら⁷⁾、Kodamaら⁸⁾は、*op/op* マウスに recombinant human M-CSF (rhM-CSF) を連続投与することにより多数の破骨細胞を誘導させ、大理石骨病を完全に治癒させることに成功した。さらに、*in vitro* において破骨細胞の分化には、M-CSFの存在下で、骨髄細胞と間質細胞の接触が必要であることが明らかにされた⁹⁾。このように*op/op* マウスを対象とした研究により破骨細胞分化におけるM-CSFの役割が解明されていった。

一方、*op/op* マウスの大理石骨病は経年的に自然治癒し、生後6カ月経過時にはほぼ正常に近い骨髄腔形態を呈することが知られている^{10,11)}。造血幹細胞から破骨細胞への分化には多くの因子が関与しており、いずれの因子が欠落しても破骨細胞の欠損や機能異常による大理石骨病が発症する可能性がある。また、ひとつの因子が多種類の細胞に対し多様な活性を示すことや、異なる因子

が類似の機能を有することもよく知られている。したがって、何らかの因子がM-CSFの働きを代償することにより破骨細胞が正常に形成され、*op/op* マウスにおける大理石骨病が自然治癒していくものと考えられた。Nilssonら¹¹⁾は、M-CSFと一部類似した作用を持つgranulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)がその代償機能を果たしているものと考え、M-CSFとGM-CSFの二重ノックアウトマウスを作製し、欠損しているマクロファージの生後変化を観察した。同様の検討を行うために、Wiktor-Jedrzejczakら¹²⁾は*op/op* マウスにGM-CSFの連続投与実験を行った。その結果、GM-CSFはマクロファージの分化には不可欠であるが、破骨細胞の分化には必須ではなく、*op/op* マウス大理石骨病の自然治癒にGM-CSFは関与していないことが明らかとなった。加齢とともに*op/op* マウスM-CSF産生遺伝子が正常な機能を回復するとは考えにくく、さらに前述の点を併せ考えるならば、何らかの別の因子による回復機構の存在が強く示唆された。

骨の形態形成には、石灰化した軟骨原基への血管侵入が不可欠であり、頭蓋などの膜性骨の添加は血管付近で観察される¹³⁾。また、骨代謝を担う様々なサイトカインは血流によって搬送される。このように、血管と骨が極めて密接な関係にあることは周知の事

実である。近年、血管の新生には vascular endothelial growth factor (VEGF) が中心的な制御機構を有することが明らかにされた¹⁴⁻¹⁶⁾。当初、血管透過性亢進因子として見いだされた分子量 45KDa の VPF (vascular permeability factor)¹⁷⁾ は、後に同定された血管内皮細胞増殖因子 VEGF¹⁸⁾ と同一タンパク質であることが確認され¹⁶⁾、その主な生物学的活性は血管内皮細胞の増殖と透過性の制御にあることが明らかとなった¹⁴⁻¹⁶⁾。その受容体としては、現在 Flt-1^{19,20)} と Flk-1^{21,22)} の 2 種類が知られており、いずれもが基本的に血管内皮細胞に特異的に発現している。また、Flt-1 遺伝子は M-CSF の受容体である *c-fms* の遺伝子と構造類似性を示す¹⁹⁾。

一方、Clauss ら²³⁾、Barleon ら²⁴⁾ はヒト末梢血単球において Flt-1 が発現しており、VEGF がその遊走促進効果を有することを見いだした。さらに、Flt-1 を受容体とする placenta growth factor (PlGF) が胎盤より同定され²⁵⁾、VEGF と同様に血管内皮細胞の増殖、及び単球の遊走促進効果を有することが確認された^{23,24)}。

本研究では、Flt-1 遺伝子と *c-fms* 遺伝子の構造類似性が高いこと¹⁹⁾、ならびに Flt-1 が破骨細胞と系統的に近縁な細胞である単球

²⁶⁾に発現していること^{23,24)}に着目し, *op/op* マウスへの VEGF の投与実験により VEGF の破骨細胞分化誘導能とその機序を明らかにすることを目的とした。

2. 材料ならびに方法

2.1. 実験動物

本研究で用いたマウスは B6C3Fe-a/a-*op*/+ のブリーディングペア (Jackson Lab., Bar Harbor, ME, USA) より得たもので、本学動物実験施設において繁殖させ、生後 10 日前後における切歯萌出の有無によって *op/op* の判定を行った。離乳後の *op/op* マウスは、歯の未萌出のため粉末飼料 (CA1, 日本クレア, 東京) により飼育を行った。

2.2. 各因子の投与

1) rhM-CSF の投与

op/op マウスにおける破骨細胞の出現には 5 μ g の recombinant human macrophage colony-stimulating factor (rhM-CSF, Austral Biologicals, San Ramon, CA, USA) の単回投与が必要であると報告されている²⁷⁾。そこで 11 日齢の *op/op* マウスに 5 μ g^{8,27,28)} の rhM-CSF を単回腹腔投与し、その 3 日後に大腿骨における破骨細胞数の観察を行った。

2) rhVEGF の投与

11 日齢の *op/op* マウスに 5 μ g の recombinant human vascular endothelial growth factor (rhVEGF, Genzyme, Cambridge, MA, USA) を単回腹腔投与し、その 3 日後に大腿骨における破骨細胞数の観察を行った。また、その効果の用量依存性、及び出現する破骨細胞数の経日変化を検討するため、同日齢の *op/op* マウスにそれぞれ 1.5 μ g, 5 μ g, 15 μ g の rhVEGF を単回腹腔投与し、その 3 日後に同様の観察を行った群と、5 μ g の rhVEGF を単回腹腔投与し、その 3 日後、5 日後、及び 7 日後に観察を行った群を設定した。次に、日齢の差異による破骨細胞の出現様相を検討するため、30 日齢の *op/op* マウスに 5 μ g の rhVEGF を単回腹腔投与し、その 3 日後に出現する破骨細胞数を算定し、11 日齢群との比較を行った。

3) rhPlGF の投与

11 日齢の *op/op* マウスに 5 μ g の recombinant human placenta growth factor (rhPlGF, R&D systems, Minneapolis, MN, USA) を単回腹腔投与し、その 3 日後に大腿骨における破骨細胞数の観察を行った。

2.3. 組織標本の作製

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った。蒸留水により3時間洗浄後、大腿骨を摘出し14% EDTA (pH7.4) に14日間浸漬することにより脱灰を行い、エタノール脱水を経てパラフィン包埋を行った。ロータリーミクロトーム (HM315, MICROM Lab., Walldorf, Germany) により7 μ mの連続縦断切片を作製し、破骨細胞検出のための tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色を施し、ヘマトキシリンにて対比染色を行った。染色した切片の水洗、封入を行い、光学顕微鏡 (BH2-RFCA, オリンパス光学工業, 東京) にて大腿骨組織像の観察を行うとともに、一切片あたりの破骨細胞数を算出した。

2.4. 免疫組織化学的観察

30日齢の正常マウス (B6C3) をエーテル麻酔下で、periodate-lysine-8.0% paraformaldehyde (PLP) 固定液により灌流固定を行った。PBS (pH7.4, 4 $^{\circ}$ C) にて3時間洗浄した後、大腿骨を摘出し、前述の処置にしたがって、厚さ4 μ mの連続縦断切片を作製した。

免疫組織化学的検索に際しては、avidin-biotin-glucose-oxidase complex method (ABC法) を用いて Flt-1 及び Flk-1 の免疫染色を行った。一次

抗体には、ウサギ抗 Flt-1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 及びラット抗 Flk-1 抗体 (京都大学医学部分子遺伝子学教室片岡先生より提供) を使用し、それぞれ12時間反応させた。その後、ビオチン化二次抗体、ABC complex (Vectastain ABC キット, Vector Lab., Burlingame, CA, USA) を反応させ、グルコースオキシダーゼ基質キットにより5分間発色させた後、メチルグリーンによる対比染色を施した。その後、水洗、封入を行い光学顕微鏡により破骨細胞における Flt-1 及び Flk-1 の発現について観察を行った。

2.5. Monoclonal anti-*c-fms* (AFS98) 及び各因子の投与

Flt-1 と *c-fms* の遺伝子は高い構造類似性を示すことから¹⁹⁾、VEGF が *c-fms* を介して破骨細胞を誘導する可能性も考えられる。そこで、*c-fms* の中和抗体 AFS98^{29,30)} を *op/op* マウスに投与し、*c-fms* の活性を抑えたうえで破骨細胞誘導に対する各因子の影響を評価した。

まず、M-CSF の破骨細胞誘導を抑制するための AFS98 の必要量について検討した。11日齢の *op/op* マウスに、それぞれ500 μ g, 750 μ g, 1000 μ g の AFS98 を rhM-CSF 投与1時間前、及び24時間後の計2回投与し、その3日後に大腿骨に出現した破骨細胞数を観察した。これらの結果に基づき、rhVEGF 及び rhPIGF についても同様の手順

で検討を行った。

2.6. 遺伝子組換え型ヒト Flt-1 キメラ蛋白の投与

M-CSF は破骨細胞の分化に必須であるとともに生存因子であることが示されている^{31,32)}。一方, *op/op* マウスに投与された rhM-CSF は急速に排泄されるため³³⁾, rhM-CSF の追加投与がなければ破骨細胞は生存因子を失い死滅すると考えられる。そこで, M-CSF の非存在下における破骨細胞が VEGF により生存している可能性を検討するため, 以下の実験を行った。

11 日齢の *op/op* マウスに 5 μ g の rhM-CSF を単回投与し, 十分な数の破骨細胞が誘導されるよう 4 日間放置した後, 同マウスに VEGF 高親和性の recombinant human Flt-1/Fc chimera protein³⁴⁾ (Flt-1 キメラ蛋白, R&D systems, Minneapolis, MN, USA) 5 μ g を 12 時間毎に 2 日間腹腔投与した。また, コントロール群として, rhM-CSF 投与 5 日目から Flt-1 キメラ蛋白の代わりに 5 μ g のヒト IgG (ICN Biomedicals, Cambridge, MA, USA) を 12 時間毎に 2 日間腹腔投与した。さらに別の群として, rhM-CSF 投与から 5 日目に 5 μ g の rhM-CSF を再投与し, 同時に Flt-1 キメラ蛋白を同様に投与した。各群のマウスは最初の rhM-CSF 投与

から7日目に屠殺し，大腿骨に出現する破骨細胞数について観察を行った。

2.7. 統計処理

得られた各群の破骨細胞数について有意差の有無を検定した。検定には，パーソナルコンピュータ上で統計処理用ソフト Stat View J-4.11 (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, USA) を用い，分散分析の後，Scheffe 法により多重比較検定を行った。

3. 結果

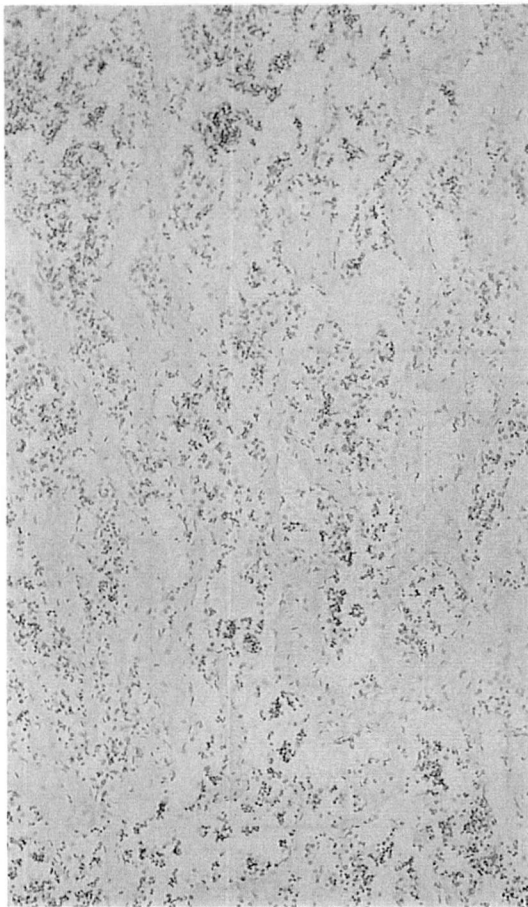
3.1. 各因子投与後の破骨細胞数

無処置 *op/op* マウスの大腿骨では、骨髓腔は骨梁で満たされ、出現する破骨細胞数は一切片あたり2, 3個であった。一方、rhM-CSF投与群では、一切片あたり約60個の破骨細胞が認められた(表1)。また、rhVEGF投与群では、rhM-CSF投与群よりは少ないものの、一切片あたり約40個の破骨細胞が出現し(表1)、M-CSFと同様に破骨細胞誘導能が明確に認められるとともに、骨髓腔の拡大も観察された(図1)。

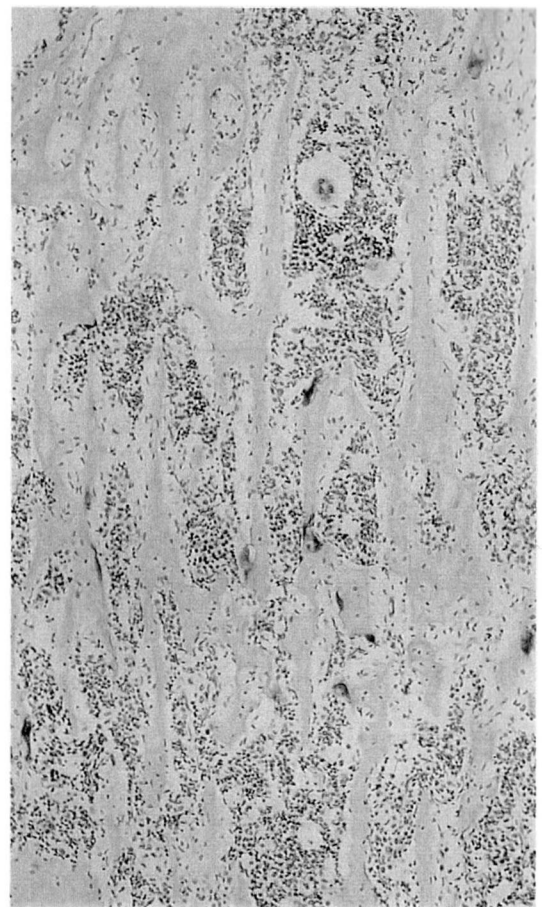
rhPlGF投与群についても、rhVEGF投与群とほぼ同数の破骨細胞の出現が認められた(表1)。

表1. 各因子投与3日後の*op/op* マウスの大腿骨一切片あたりの破骨細胞数 (n=3)

無処置 <i>op/op</i> マウス	3.3 ± 2.1
rhM-CSF 投与群	56.0 ± 2.9
rhVEGF 投与群	41.4 ± 4.2
rhPlGF 投与群	39.0 ± 4.7



無処置 *op/op* マウス



rhVEGF 投与 *op/op* マウス

図1 14日齢の無処置 *op/op* マウス，及び5 μ g rhVEGF 投与3日後の *op/op* マウスの大腿骨組織像（TRAP 染色）

無処置 *op/op* マウスの大腿骨には破骨細胞がほとんど存在せず，骨髓腔は多量の骨梁で満たされていた。これに対しrhVEGF 投与群では，多数の破骨細胞が出現し，骨髓腔の拡大が観察された。

rhVEGF の用量依存性について検討したところ、5 μ g、15 μ g 投与群では一切片あたり約40個の破骨細胞が出現し、両群間に有意差が認められなかったのに対し、1.5 μ g 投与群では出現した破骨細胞数は約20個と、他の2群より有意に小さい値を示した（図2）。

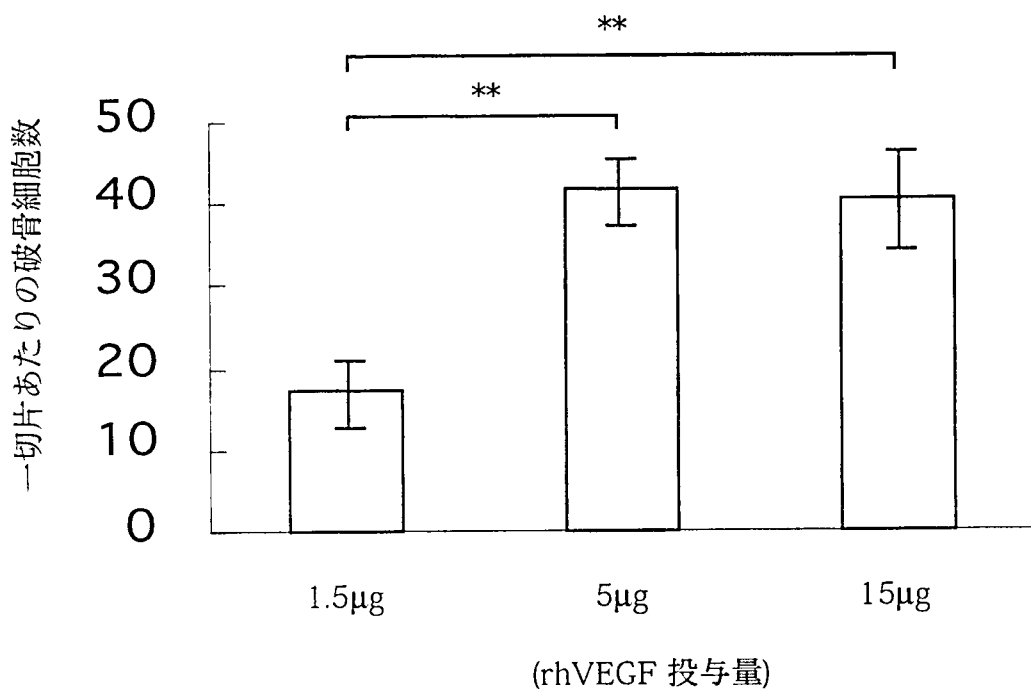


図2 rhVEGF の投与量と出現する破骨細胞数の関係
(rhVEGF を投与3日後の値, **: P<0.01, n=3)

rhVEGF 投与後の破骨細胞数の変化を見ると、経日的にわずかな減少を示すものの、投与後5日及び7日経過時においても破骨細胞は一切片あたり30個以上観察され、投与3日目に出現する破骨細胞数と比べて有意差は認められなかった（図3）。

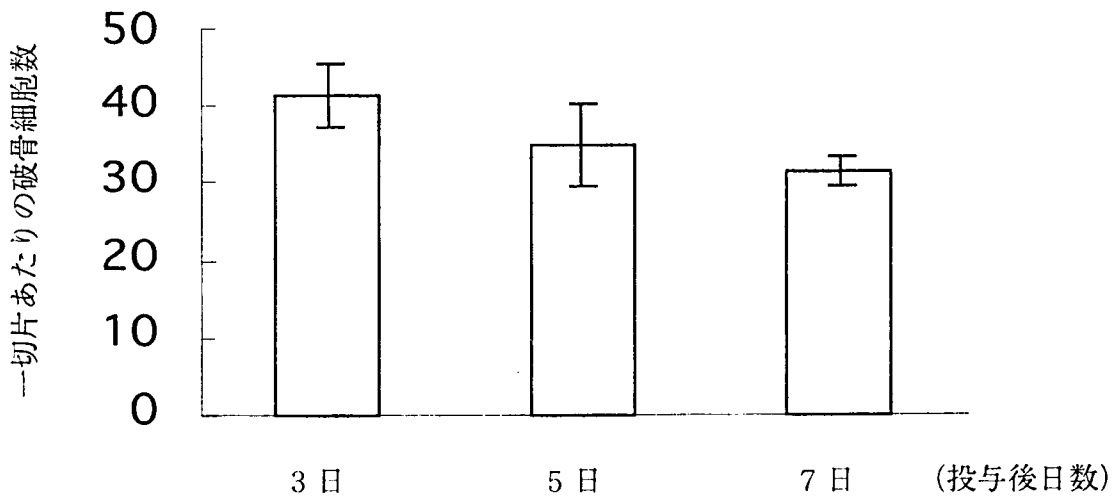


図3 5 μ g のrhVEGF により誘導された破骨細胞数の経日変化 (n=3)

また、30日齢の *op/op* マウスに5 μ g の rhVEGF を投与し、3日後（33日齢）に観察を行った群では約60個の破骨細胞が認められた。これは14日齢において出現した破骨細胞数の約1.5倍にあたり、有意に大きな値を示した（図4）。

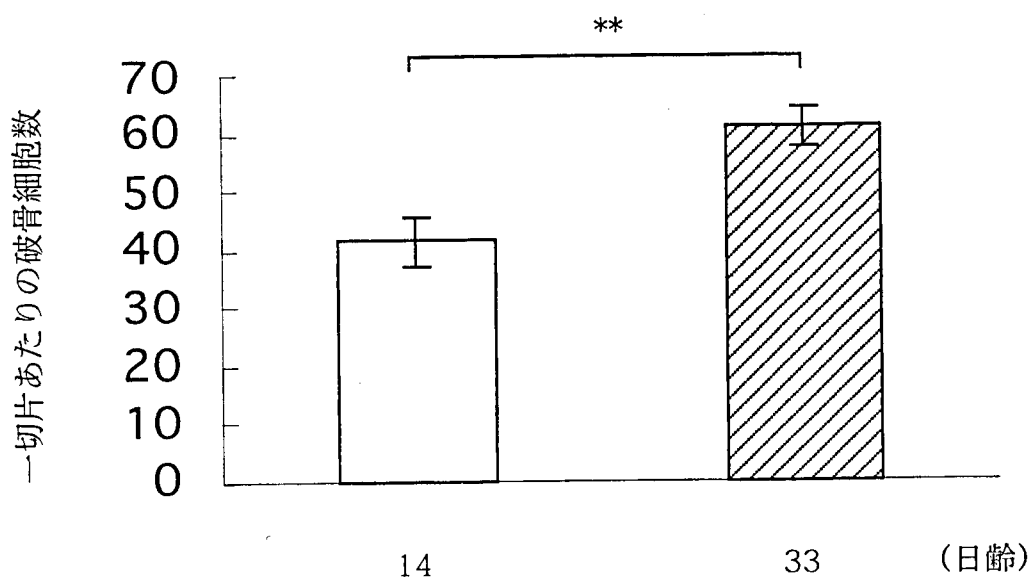


図4 *op/op* マウスの日齢とrhVEGF 投与後の破骨細胞数の変化 (5 μ g のrhVEGF を投与3日後の値, **: P<0.01, n=3)

3.2. 破骨細胞における受容体の発現

正常マウス破骨細胞におけるFlt-1とFlk-1の存在の有無を免疫組織化学的に検索した結果、Flt-1では陽性反応が認められ、ヒト末梢血単球と同様にFlt-1を発現していることが明らかとなった(図5a)。一方、Flk-1では陽性反応は認められなかった(図5b)。

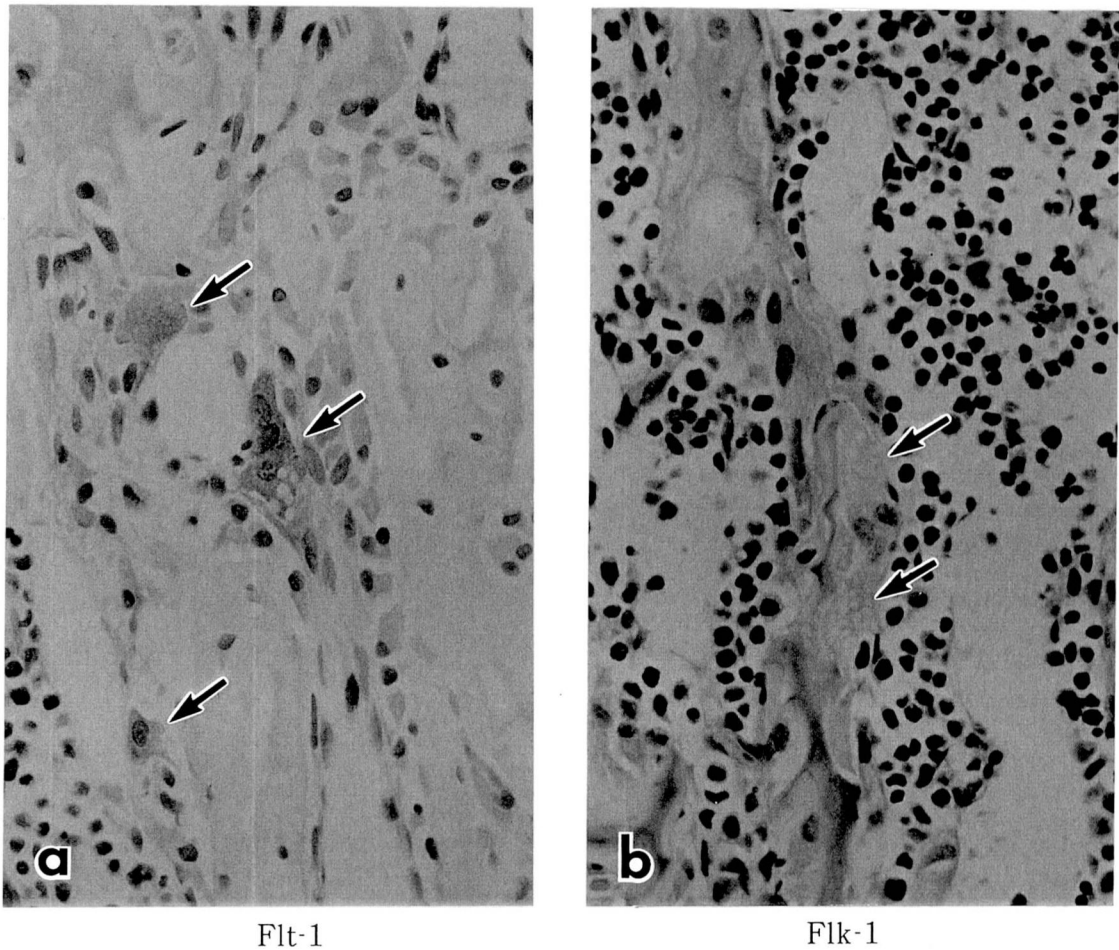


図5 正常マウスの破骨細胞におけるFlt-1 (a), 及びFlk-1 (b) の免疫染色
破骨細胞はFlt-1 陽性, Flk-1 陰性反応を示した。矢印：破骨細胞

3.3. 各因子に対する AFS98 の影響

op/op マウスにおける rhM-CSF の破骨細胞誘導能は AFS98 の投与量に依存して抑制され、AFS98 を 1 日 1000 μ g ずつ 2 日間、合計 2000 μ g 投与すると、誘導される破骨細胞数は AFS98 非投与の場合の約 1/3 に抑制された (図 6)。一方、同量の AFS98 を投与した rhVEGF 及び rhPIGF 投与群における破骨細胞数は AFS98 によりほとんど変化しなかった (図 7)。

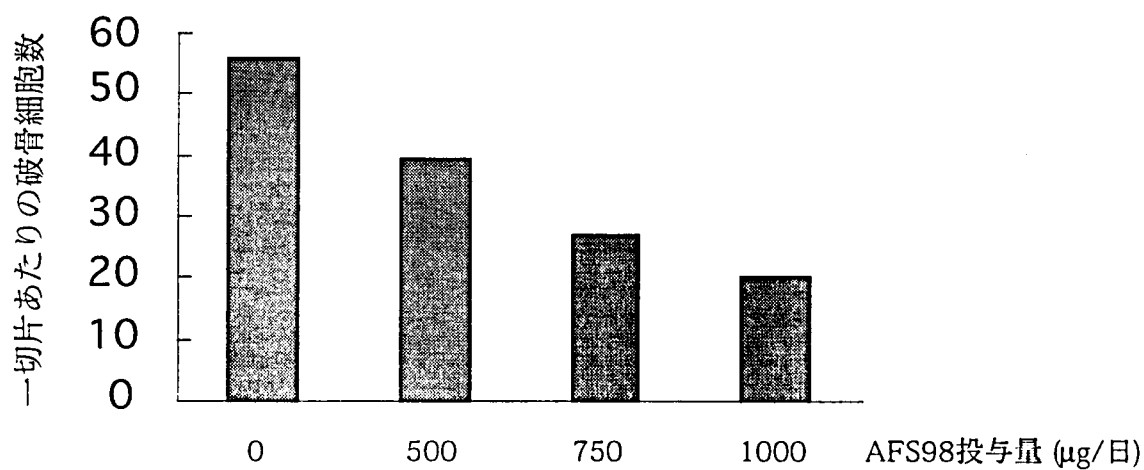


図 6 rhM-CSF の破骨細胞誘導能に対する*c-fms* 中和抗体 (AFS98) の影響 (n=1)

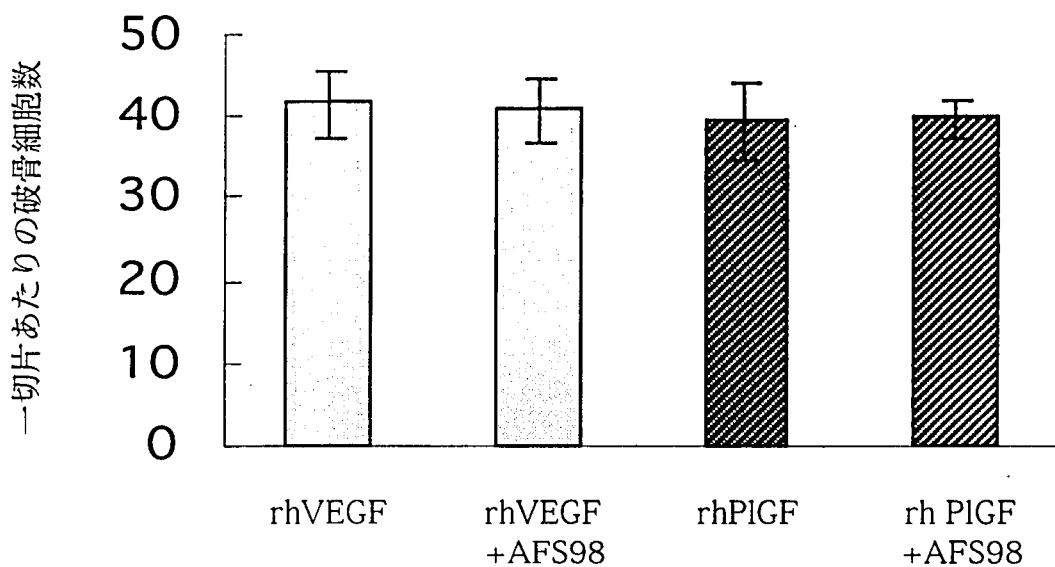


図 7 rhVEGF 及びrhPIGF の破骨細胞誘導能に対する *c-fms* 中和抗体 (AFS98) の影響 (n=3)

3.4. Flt-1 キメラ蛋白の影響

rhM-CSF 投与5日後からFlt-1 キメラ蛋白の投与を行い、7日後に観察を行った大腿骨の破骨細胞数は、同蛋白非投与群（rhM-CSF 単独投与後7日群，図8-A）の約1/4に減少した(図8-B)。一方，Flt-1 キメラ蛋白投与時にrhM-CSFを同時に再投与した群(図8-C)では，破骨細胞の減少は認められなかった。なお，コントロールとしてヒトIgGを投与した群では，破骨細胞数は全く変化しなかった（図8-D）。

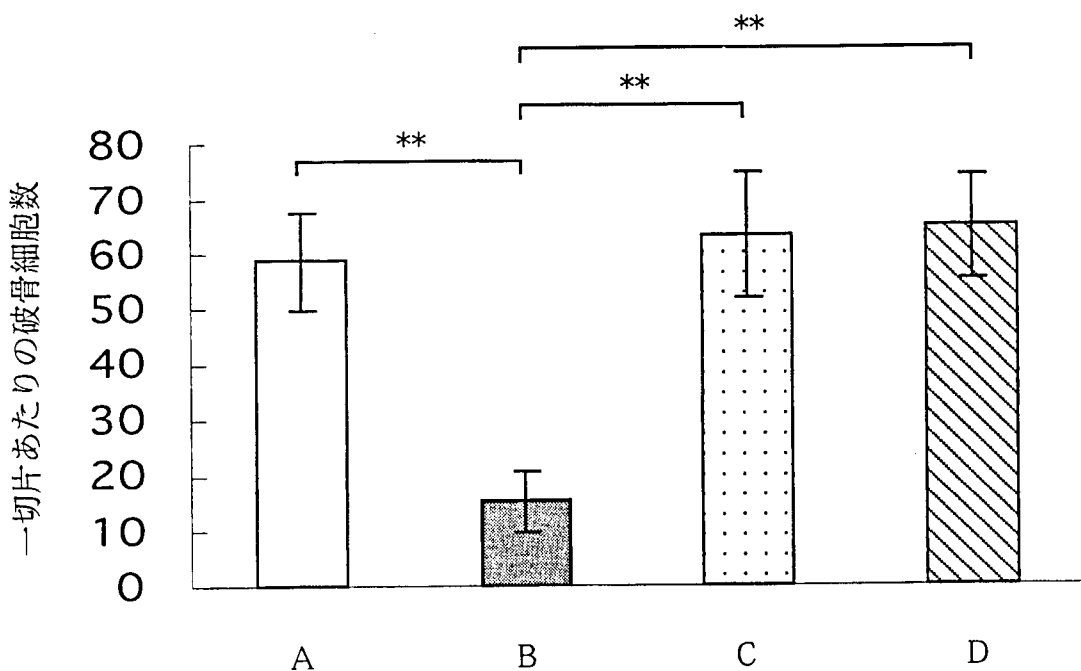


図8 rhM-CSF の破骨細胞誘導能に対するFlt-1キメラ蛋白の影響
 A: rhM-CSF単独投与 B: rhM-CSF+Flt-1キメラ蛋白
 C: rhM-CSF+Flt-1キメラ蛋白+rhM-CSF再投与
 D: rhM-CSF+ヒトIgG (**: P<0.01, n=3)

4. 考察

4.1. VEGFの破骨細胞誘導能とその受容体について

rhVEGF 及び rhPIGF を投与する *op/op* マウスの日齢については、*op/op* マウスの判定が可能で、破骨細胞がほとんど出現しない可及的に早い時期として、生後11日目^{8,27,28)}を設定した。この時期の *op/op* マウスには、破骨細胞はほとんど認められず^{8,27,28,35)}、rhVEGF 及び rhPIGF を投与することにより多数の破骨細胞の出現が認められた。また、誘導された破骨細胞は正常な機能を有し、骨髓腔内の骨梁の吸収像が観察されたことから、両因子の破骨細胞誘導能が明確となった。

VEGF の受容体としては Flt-1^{19,20)} と Flk-1^{21,22)} の2種類が知られている。このうち、Flt-1 遺伝子はヒト胎盤 cDNAライブラリーから単離された受容体型チロシンキナーゼで、M-CSF の受容体である *c-fms* の遺伝子と約60%の構造類似性を有することが報告されている¹⁹⁾。したがって、VEGF が破骨細胞を誘導する過程において、Flt-1, Flk-1, *c-fms* のいずれかと結合するものと考えられた。この点を明確にするために受容体として Flt-1 のみを有し、VEGF と53%

の相同性を示す rhPIGF^{25,36,37)} の投与を行った結果、rhVEGF 投与と同様の効果が認められた。さらに、免疫組織化学染色により破骨細胞が Flt-1 を発現していることが明らかとなったことから、VEGF と PIGF の両因子により出現した破骨細胞は Flt-1 を受容体として誘導された可能性が高いと考えられた。しかし、VEGF が *c-fms* を介して破骨細胞を誘導した可能性も否定できないため、*c-fms* の中和抗体 AFS98^{29,30)} を *op/op* マウスに投与し、*c-fms* の活性を抑えたうえで rhVEGF 及び rhPIGF の破骨細胞誘導に対する影響を検討した。その結果、AFS98 投与により rhM-CSF が誘導する破骨細胞数は、rhM-CSF 単独投与時の約 1/3 に減少したが、rhVEGF と rhPIGF の破骨細胞誘導能に対して AFS98 は全く影響を及ぼさないことが明らかとなった。したがって、VEGF 及び PIGF が *c-fms* と結合するシグナル伝達経路は、ここでは機能していないものと考えられた。

rhVEGF 及び rhPIGF の投与量については、過去の報告における rhM-CSF の投与量²⁷⁾にもとづいて、一頭体につき 1.5 μ g, 5 μ g, 15 μ g とし、それぞれの量を単回腹腔投与し破骨細胞誘導能の用量依存性を検討した。その結果、rhVEGF を 1.5 μ g 投与した場合は少数の破骨細胞しか出現しなかったが、5 μ g 及び 15 μ g の投与により多数の

破骨細胞が誘導され， rhM-CSF の用量依存性²⁷⁾ と類似した結果が得られた。また， rhM-CSF と同様に破骨細胞誘導に必要な rhVEGF の最小用量はほぼ5 μ g であることが示唆された。

4.2. VEGF の破骨細胞生存因子としての可能性について

op/op マウスに5 μ g の rhM-CSF を投与した場合， TRAP 陽性破骨細胞が多数出現する^{8,27,28)}。その数は投与後3日から4日目で最大に達し，投与後7日経過時には破骨細胞数は依然として最大値と同程度の値を示し²⁸⁾，投与後25日経過時においても少数ではあるが破骨細胞が生存することが確認された²⁷⁾。一方， *in vitro* における単離破骨細胞は， M-CSF 無添加の場合48時間後にはほとんど死滅するが， M-CSF を添加した場合には破骨細胞数は減少しないことから， M-CSF は破骨細胞の分化に必須であるとともに生存因子であることが示された^{31,32)}。また，体内に入った rhM-CSF はすみやかに代謝され，投与後3日までにその90%が尿中に排泄されることから³³⁾， rhM-CSF 投与7日経過時には *op/op* マウスの体内から rhM-CSF はほとんど排泄されているものと考えられる。従って， rhM-CSF 投与7日目に観察された破骨細胞はM-CSF 以外の因子により生

存していることが示唆された。

本研究において、rhM-CSF 投与後5日目からFlt-1 キメラ蛋白³⁴⁾を投与すると破骨細胞数の有意な減少が認められたが、ヒトIgGの同時投与による影響は全く受けなかった。この理由としては、内因性のVEGFが投与したFlt-1 キメラ蛋白と結合し、新たに誘導された多数の破骨細胞を生存させるのに必要なVEGFが不足したことが考えられ、VEGFが破骨細胞の生存因子として機能していることが示唆された。また、Flt-1 キメラ蛋白の投与と同時にrhM-CSFの再投与を行った群では破骨細胞数が減少しなかったことから、VEGFが不足しても、追加投与されたrhM-CSFが破骨細胞を生存させていると考えられ、M-CSFの生存因子としての機能が確認された。

rhVEGF 投与後の破骨細胞数の経日的変化として、投与後7日経過時においても破骨細胞が多数観察され、投与3日後の値との有意差は認められなかった。rhVEGFもrhM-CSFと同様に体内に入った後はすみやかに代謝され³³⁾、排泄されることから、rhVEGF投与7日目に観察された破骨細胞は、rhM-CSF投与の場合と同様に、内因性のVEGFによって生存しているものと考えられる。

4.3. *op/op* マウスに出現する破骨細胞について

従来の報告において、*op/op* マウスに自然に出現する破骨細胞についてさまざまな検討がなされているが、いまだその解明には至っていない。Nilsson ら¹¹⁾は、この現象をM-CSF と一部類似した作用を持つGM-CSF の代償機能によるものと考え、M-CSF とGM-CSF の二重ノックアウトマウスを作製した。M-CSF^{-/-}GM-CSF^{-/-} マウスは若齢において大理石骨病の所見を呈するが、成長するに従い *op/op* マウスと同様にマクロファージや骨髄細胞の顕著な増加を示した。また、Wiktor-Jedrzejczak ら¹²⁾は *op/op* マウスにGM-CSF を3週間連続投与した結果、あらゆる臓器のマクロファージレベルが正常マウスと同程度になるものの、破骨細胞の増加は認められず、骨吸収は起こらないことを報告した。これらの結果は、GM-CSF がマクロファージの分化には必要であるが、破骨細胞の分化には必須ではなく、*op/op* マウスにみられる大理石骨病の加齢に伴う治癒現象にGM-CSF は関与していないことを示すものである。

現在、PIGF は胎盤と臍帯動脈のみにその発現が認められていることから³⁸⁾、*op/op* マウスにおいて自然に出現する破骨細胞は、VEGF によって誘導されている可能性が強く示唆された。また、rhVEGF を30日齢の *op/op* マウスに投与した結果、11日齢マウスに

投与した場合と比べて、誘導された破骨細胞数は約1.5倍に増加したが、これは過去に著者らがrhM-CSFについて検討した結果と類似していた³⁵⁾。30日齢の無処置 *op/op* マウスでは破骨細胞はほとんど認められないが、この時期を境に徐々に破骨細胞は出現する³⁵⁾。従って、*op/op* マウスの30日齢はまさにVEGFの体内濃度が上昇し始める時期に合致し、投与したrhVEGFやrhM-CSFとの相乗効果により破骨細胞数が増加したものと考えられる。このことから、*op/op* マウスでは、加齢とともにM-CSFの欠損を代償するために内因性VEGFの活性が上昇しているものと推測されるが、この点については今後さらに検討が必要と考えられる。

4.4. 臨床的示唆

従来、多くの腫瘍におけるVEGFの産生が正常組織に比べて高いとの報告¹⁴⁻¹⁶⁾がなされている。また最近、VEGFとその受容体をコントロールすることにより、病的血管新生の抑制や疾患の進行を遅らせる試みがなされている。そのひとつに、動物実験においてVEGFの特異抗体による抗腫瘍効果が報告されており³⁹⁾、臨床応用が待たれるところである。

また、矯正歯科治療におけるさまざまな機械的刺激により誘導さ

れる破骨細胞は、プロスタグランジン⁴⁰⁾や活性型ビタミンD₃ (1,25(OH)₂D₃)⁴¹⁾などの化学物質の併用により相乗的に増加し、歯の移動が促進されることが報告されている。本研究により、VEGFが破骨細胞の分化誘導因子のひとつであることが明らかとなったため、歯の移動に対するVEGFの効果や歯周組織に産生されるVEGFと歯の後戻りとの関係がさらに解明されるならば、歯の移動の促進剤や保定時の歯の後戻りの抑制剤としての臨床応用も十分期待される。

5. 総括

VEGF の破骨細胞の分化誘導能及びその機序を検索する目的で、*op/op* マウスを対象として破骨細胞の分化誘導実験を行い、以下の所見が得られた。

1. 無処置 *op/op* マウスでは破骨細胞はほとんど認められなかったが、rhVEGF 及び rhPIGF 投与群では多数の破骨細胞が誘導された。
2. 免疫染色法により破骨細胞に Flt-1 受容体の発現が明らかとなった。
3. *c-fms* の活性を抑制する中和抗体によって、rhM-CSF 投与群は破骨細胞の著明な減少を示したが、rhVEGF と rhPIGF 投与群では破骨細胞誘導能はほとんど影響を受けなかった。
4. rhM-CSF 投与後 5 日目及び 6 日目に VEGF 高親和性の Flt-1 キメラ蛋白を投与し、その 7 日後に観察された破骨細胞数は、rhM-CSF 単独投与後 7 日目に観察された破骨細胞数のほぼ 1/4 の値を示した。

以上の結果より、VEGF と PIGF は破骨細胞誘導能を有することが明らかとなった。また、その伝達経路には Flt-1 が介在している可能性が強く示唆された。さらに、M-CSF の非存在下では破骨細胞は VEGF により生存していると考えられ、破骨細胞生存因子としての VEGF の機能が確認された。

6. 謝辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御教示、御支援ならびに御校閲を賜りました広島大学歯学部歯科矯正学講座主任、丹根一夫教授に心より感謝の意を表します。また、本論文の作成にあたり、御教示いただきました本学部口腔解剖学第一講座前田憲彦教授、口腔生化学講座加藤幸夫教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の計画、遂行において御指導を頂きました本学部口腔解剖学第一講座新飯田俊平博士、歯科矯正学講座河田俊嗣博士、貴重な御助言を頂いた昭和大学歯学部歯科薬理学教室天野均博士、多大な御支援を頂いたバイエル製薬株式会社小玉博明博士、京都大学医学部分子遺伝子学教室西川伸一教授ならびに教室員の方々に深く御礼申し上げます。

最後に本研究の遂行に御協力、御理解を頂きました歯科矯正学講座の皆様には感謝いたします。

7. 文献

- 1) Marks, S. C., Jr. and Lane, P. W. : Osteopetrosis, a new recessive skeletal mutation on chromosome 12 of the mouse. *J. Hered.*, 67, 11-18, 1976.
- 2) Marks, S. C., Jr. : Morphological evidence of reduced bone resorption in osteopetrotic (*op*) mice. *Am. J. Anat.*, 163, 157-167, 1982.
- 3) Wiktor-Jedrzejczak, W., Ahmed, A., Szczylik, C. and Skelly, R. R. : Hematological characterization of congenital osteopetrosis in *op/op* mouse. Possible mechanism for abnormal macrophage differentiation. *J. Exp. Med.*, 156, 1516-1527, 1982.
- 4) Maeda, N., Kawata, T., Yoshiko, Y., Hosoi, M., Suemune, S., Okada, N. and Tanne, K. : Postnatal changes in the masseter muscle of the toothless (*op/op*) mouse with less-developed periodontal ligaments. *Biomedical Res.*, 15, 255-261, 1994.
- 5) Kawata, T., Niida, S., Kawasoko, S., Kaku, M., Fujita, T., Sugiyama, H. and Tanne, K. : Morphology of the mandibular condyle in "toothless" osteopetrotic (*op/op*) mice. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.*, 17, 198-203, 1997.
- 6) Yoshida, H., Hayashi, S-I., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T., Shultz, L. D. and Nishikawa, S-I. : The murine

mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature*, 345, 442-444, 1990.

7) Felix, R., Cecchini M. G. and Fleisch, H. : Macrophage colony-stimulating factor restores *in vivo* bone resorption in the *op/op* osteopetrotic mouse. *Endocrinology*, 127, 2592-2594, 1990.

8) Kodama, H., Yamasaki, A., Nose, M., Niida, S., Ohgame, Y., Abe, M., Kumegawa, M. and Suda, T. : Congenital osteoclast deficiency in osteopetrotic (*op/op*) mice is cured by injections of macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.*, 173, 269-272, 1991.

9) Kodama, H., Nose, M., Niida, S. and Yamasaki, A. : Essential role of macrophage colony-stimulating factor in the osteoclast differentiation supported by stromal cells. *J. Exp. Med.*, 173, 1291-1294, 1991.

10) Begg, S. K., Radley, J. M., Pollard, J. W., Chisholm, O. T., Stanley, E. R. and Bertoncello, I. : Delayed hematopoietic development in osteopetrotic (*op/op*) mice. *J. Exp. Med.*, 177, 237-242, 1993.

11) Nilsson, S. K., Lieschke, G. J., Garcia-Wijnen, C. C., Williams, B., Tzelepis, D., Hodgson, G., Grail, D., Dunn, A. R. and Bertoncello, I. : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is not responsible for the correction of hematopoietic deficiencies in the maturing *op/op* mouse. *Blood*, 86, 66-72, 1995.

- 12) Wiktor-Jedrzejczak, W., Urbanowska, E. and Szperl, M. : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor corrects macrophage deficiencies, but not osteopetrosis, in the colony-stimulating factor-1-deficient *op/op* mouse. *Endocrinology*, 134, 1932-1935, 1994.
- 13) Moore, K. L. : *The Developing Human*. 4th ed., W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 334-336, 1988.
- 14) Ferrara, N., Houck, K., Jakeman, L. and Leung, D. W. : Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr. Rev.*, 13, 18-32, 1992.
- 15) Shibuya, M. : Role of VEGF-Flt receptor system in normal and tumor angiogenesis. *Adv. Cancer Res.*, 67, 281-316, 1995.
- 16) Mustonen, T. and Alitalo, K. : Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J. Cell Biol.*, 129, 895-898, 1995.
- 17) Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S. and Dvorak, H. F. : Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 219, 983-985, 1983.
- 18) Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W.-J., Goeddel, D. V. and Ferrara, N. : Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 246, 1306-1309, 1989.
- 19) Shibuya, M., Yamaguchi, S., Yamane, A., Ikeda, T., Tojo, A.,

Matsushime, H. and Sato, M. : Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (*flt*) closely related to the *fms* family. *Oncogene*, 5, 519-524, 1990.

20) De Vries, C., Escobedo, J. A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N. and Williams, L. T. : The *fms*-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, 255, 989-991, 1992.

21) Millauer, B., Wизigmann-Voos, S., Schnürch, H., Martinez, R., Möller, N. P. H., Risau, W. and Ullrich, A. : High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*, 72, 835-846, 1993.

22) Terman, B. I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M. E., Dimitrov, D., Armellino, D. C., Gospodarowicz, D. and Böhlen, P. : Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 187, 1579-1586, 1992.

23) Clauss, M., Weich, H., Breier, G., Knies, U., Röckl, W., Waltenberger, J. and Risau, W. : The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. *J. Biol. Chem.*, 271, 17629-17634, 1996

24) Barleon, B., Sozzani, S., Zhou, D., Weich, H. A., Mantovani, A. and Marmé, D. : Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1.

Blood, 87, 3336-3343, 1996.

25) Maglione, D., Guerriero, V., Viglietto, G., Delli-Bovi, P. and Persico, M. G. : Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 9267-9271, 1991.

26) Gothlin, G. and Ericsson, J. .L. E. : The osteoclast. review of ultrastructure, origin, and structure-function relationship. Clin. Orthop. Relat. Res., 120, 201-231, 1976.

27) Kodama, H., Ymasaki, A., Abe, M., Niida, S., Hakeda, Y. and Kawashima, H. : Transient recruitment of osteoclasts and expression of their function in osteopetrotic (*op/op*) mice by a single injection of macrophage colony-stimulating factor. J. Bone Miner. Res., 8, 45-50, 1993.

28) Niida, S., Amizuka, N., Hara, F., Ozawa, H. and Kodama, H. : Expression of Mac-2 antigen in the preosteoclast and osteoclast identified in the *op/op* mouse injected with macrophage colony-stimulating factor. J. Bone Miner. Res., 9, 873-881, 1994.

29) Sudo, T., Nishikawa, S., Ogawa, M., Kataoka, H., Ohno, N., Izawa, A., Hayashi, S-I. and Nishikawa, S-I. Hierarchical relation of c-kit and c-fms in intramarrow production of CFU-M. Oncogene, 11, 2469-2476, 1995.

30) Hayashi, S-I., Miyamoto, A., Yamane, T., Kataoka, H., Ogawa, M.,

Sugawara, S., Nishikawa, S., Nishikawa, S-I., Sudo, T., Yamazaki, H. and Kunisada, T. : Osteoclast precursors in bone marrow and peritoneal cavity. J. Cell. Physiol., 170, 241-247, 1997.

31) Fuller, K., Owens, J. M., Jagger, C. J., Wilson, A., Moss, R. and Chambers, T. J. : Macrophage colony-stimulating factor stimulates survival and chemotactic behavior in isolated osteoclasts. J. Exp. Med., 178, 1733-1744, 1993.

32) Amano, H., Yamada, S. and Felix, R. : Colony-stimulating factor-1 stimulates the fusion process in osteoclasts. J. Bone Miner. Res., (in press)

33) 野上俊彦, 大久保雅啓, 松野匡佑, 花村卓司, 稲原弘久, 山田宗夫, 柳内延也 : P-100 の吸収, 分布, 代謝, 排泄, 基礎と臨床, 22, 15-29, 1988.

34) Aiello, L. P., Pierce, E. A., Foley, E. D., Takagi, H., Chen, H., Riddle, L., Ferrara, N., King, G. L. and Smith, L. E. H. : Suppression of retinal neovascularization *in vivo* by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 10457-10461, 1995.

35) Kaku, M., Kawata, T., Kawasoko, S., Fujita, T., Tokimasa, C., Niida, S. and Tanne, K. : Osteoclast appearance in developmental stages of different bones after a single injection of macrophage colony-stimulating factor in

op/op mice. Biomedical Res., 19, 77-81, 1998.

36) Park, J. E., Chen, H. H., Winer, J., Houck, K. A. and Ferrara, N. : Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, *in vitro* and *in vivo*, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. J. Biol. Chem., 269, 25646-25654, 1994.

37) Sawano, A., Takahashi, T., Yamaguchi, S., Aonuma, M. and Shibuya, M. : Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. Cell Growth Differ., 7, 213-221, 1996.

38) Hauser, S. and Weich, H. A. : A heparin-binding form of placenta growth factor (PlGF-2) is expressed in human umbilical vein endothelial cells and in placenta. Growth Factors, 9, 259-268, 1993.

39) Kondo, S., Asano, M. and Suzuki, H. : Significance of vascular endothelial growth factor / vascular permeability factor for solid tumor growth, and its inhibition by antibody. Biochem. Biophys. Res. Commun., 194, 1234-1241, 1993.

40) Yamasaki, K., Shibata, Y., Imai, S., Tani, Y., Shibasaki, Y. and Fukuhara, T. : Clinical application of prostaglandin E₁ (PGE₁) upon orthodontic tooth movement. Am. J. Orthod., 85, 508-518, 1984.

41) Collins, M. K. and Sinclair, P. M. : The local use of vitamin D to

increase the rate of orthodontic tooth movement. Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop., 94, 278-284, 1988.