

骨のリモデリングに及ぼす活性型ビタミン D の作用機序

血管形成と骨形成の関連

課題番号：09671077

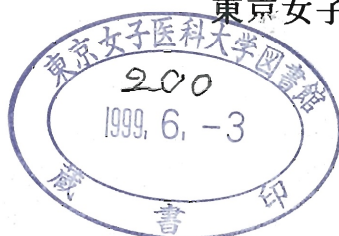
平成9年度～10年度科学研究費（基盤研究C（2））
研究成果報告書

平成11年3月

研究代表者：佐藤幹二

東京女子医科大学内分泌センター

内科助教授



はしがき

研究組織

研究代表者：佐藤幹二（東京女子医科大学内科2助教授）
（研究者番号 60138857）

研究分担者：なし

研究協力者：王大申（東京女子医科大学、内科2
研究生、研究者番号 99999999）

研究経費

平成9年度：170万円

平成10年度：120万円

研究発表

（1）学会誌など

1. Wang DS, Miura M, Demura H, Sato K. Anabolic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells. *Endocrinology* 138 : 2953 - 2962, 1997.
2. Wang DS, Sato K, Demura H, Kato Y, Maruo N, Miyachi Y. Osteo-anabolic Effects of Human Growth Hormone with 22K- and 20K Daltons on Human Osteoblast-like Cells. *Endocrine J* 46 (1) 125 - 132, 1999.

（2）口頭発表

1. 王大申、佐藤幹二、三浦雅一、出村博。活性型ビタミンD破骨細胞の血管内皮細胞増殖因子（VEGF）を促進し、VEGFは血管内皮細胞VEGF受容体の発現を促進することにより、骨形成促進的に作用する。第70回日本内分泌学会総会口演。日本内分泌学会雑誌73：189(抄録)、1997。
2. 王大申、佐藤幹二、丸尾直子、出村博。分子量20-Kdのヒト成長ホルモン（20K-hGH）のヒト骨芽細胞に及ぼす骨代謝促進作用：22K-hGHとの比較検討。日本骨代謝学会雑誌16：284(演題#284)、1998。

（3）出版物：なし

骨のリモデリングに及ぼす活性型ビタミン D の作用機序

血管形成と骨形成の関連

はじめに

骨粗鬆症の治療に本邦ではビタミン D が広範に使用されているが、その作用機序には不明な点が多い。我々は、これまで活性型ビタミン D (1,25-(OH)₂D₃) はヒト骨芽細胞の血管内皮細胞増殖刺激因子 (VEGF) の産生を促進することを見いだした (1)。VEGF は血管内皮細胞膜上にある 2 種類の VEGF 受容体 (type I; FLT、type II; KDR) を刺激して、血管内皮細胞の増殖を刺激する (2)。

ところで、骨組織中では、骨芽細胞と血管内皮細胞は組織学的にも接触して存在していることが多く、骨形成は常に血管の近傍で生じている。つまり、骨形成 (osteogenesis) と血管形成 (angiogenesis) との間には密接な関係があると推測されてきたが、これまでこれらの細胞間相互作用については全く不明であった。

そこで我々はヒト骨芽細胞 (HOB) とヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) の共培養系を用いて、1,25-(OH)₂D₃ が骨芽細胞機能に及ぼす影響を検討し、特に骨芽細胞の産生する VEGF が HUVEC 細胞の VEGF 受容体にどのような影響を及ぼすかを検討した。

さらに、軟骨細胞や骨芽細胞の成長を促進するヒト成長ホルモン (hGH) が同様に VEGF/VEGF 受容体系を介して骨形成促進的に作用しているか否かを検討した。

実験方法

ヒト骨芽細胞としては既報のごとく、代謝性骨疾患のない正常人海綿骨由来の骨芽細胞 (HOB) を使用した。ヒト血管内皮細胞は市販のヒト臍帯静脈由来の血管内皮細胞 (HUVEC) を使用した。

HOBは10%FCS含有の α -MEMで培養した。HUVECはVEGFを含有した添付の培養液で継代したあと、10%FCS含有の α -MEMで短期間、培養した。また、HOBとHUVECが接触した状態で培養するときは、subconfluentになったHOB(4~6万/24穴)にほぼ同数のHUVECを添加して培養した。HUVECは、VEGFを含まない培養液中で培養すると2-3日ほどで死滅してしまうが、骨芽細胞と共培養した場合には、骨芽細胞の分泌するVEGFにより刺激されるため、数日間以上も生存しうる。

また、一部の実験では、HOBとHUVECが接触しないように、24穴ディッシュにcell insertを入れて培養した。骨芽細胞のアルカリ・フォスファターゼ(AI-P)活性や[³H]thymidineの取り込みは既報のごとく行った(1)。

なお、VEGF受容体(KDR、Flt)の発現量の検討は、Nomuraらの報告したquantitative RT-PCR法に準じて行った(3)。

実験結果

A) HOBとHUVEC共培養下でのAI-P活性

HOBはアルカリ・フォスファターゼ(AI-P)活性を有するが、HUVECはほとんどAI-P活性を発現していなかった。1,25-(OH)₂D₃はHOB単独でもアルカリ・フォスファターゼ(AI-P)活性を刺激するが、HUVEC細胞と共培養した場合にはさらにAI-P活性刺激作用を増強した(図1)。

一方、VEGFは骨芽細胞のAI-P活性を直接刺激する作用はないが、両細胞を共培養した場合にはAI-P活性を刺激した。なお、VEGFは単独でHUVEC細胞の増殖を刺激するが、HOBの増殖は刺激しない。しかし、両細胞を共培養すると、VEGFは相乗的に作用して両細胞の増殖([³H]thymidineの取り込み)を促進した。

なお、HUVECとHOBをcell insertを用いて互いに直接接触しないようにして培養すると、1,25-(OH)₂D₃はHUVECの増殖を直接刺激する作用はないが、HOB共存下ではHUVECの増殖を有意に促進した。

一方、VEGFはHOBのAI-P活性を直接刺激する作用はなかったが、HUVECの共存下ではHOBのAI-P活性を有意に促進した。したがって、両細胞は細胞同士が接触することではなく、液性因子を介して、相互にanabolicな作用を発揮していることが推測された。

HOBは10%FCS含有の α -MEMで培養した。HUVECはVEGFを含有した添付の培養液で継代したあと、10%FCS含有の α -MEMで短期間、培養した。また、HOBとHUVECが接触した状態で培養するときは、subconfluentになったHOB(4~6万/24穴)にほぼ同数のHUVECを添加して培養した。HUVECは、VEGFを含まない培養液中で培養すると2-3日ほどで死滅してしまうが、骨芽細胞と共培養した場合には、骨芽細胞の分泌するVEGFにより刺激されるため、数日間以上も生存しうる。

また、一部の実験では、HOBとHUVECが接触しないように、24穴ディッシュにcell insertを入れて培養した。骨芽細胞のアルカリ・フォスファターゼ(AI-P)活性や $[^3\text{H}]$ thymidineの取り込みは既報のごとく行った(1)。

なお、VEGF受容体(KDR、Flt)の発現量の検討は、Nomuraらの報告したquantitative RT-PCR法に準じて行った(3)。

実験結果

A) HOBとHUVEC共培養下でのAI-P活性

HOBはアルカリ・フォスファターゼ(AI-P)活性を有するが、HUVECはほとんどAI-P活性を発現していなかった。1,25-(OH) $_2$ D $_3$ はHOB単独でもアルカリ・フォスファターゼ(AI-P)活性を刺激するが、HUVEC細胞と共培養した場合にはさらにAI-P活性刺激作用を増強した(図1)。

一方、VEGFは骨芽細胞のAI-P活性を直接刺激する作用はないが、両細胞を共培養した場合にはAI-P活性を刺激した。なお、VEGFは単独でHUVEC細胞の増殖を刺激するが、HOBの増殖は刺激しない。しかし、両細胞を共培養すると、VEGFは相乗的に作用して両細胞の増殖($[^3\text{H}]$ thymidineの取り込み)を促進した。

なお、HUVECとHOBをcell insertを用いて互いに直接接触しないようにして培養すると、1,25-(OH) $_2$ D $_3$ はHUVECの増殖を直接刺激する作用はないが、HOB共存下ではHUVECの増殖を有意に促進した。

一方、VEGFはHOBのAI-P活性を直接刺激する作用はなかったが、HUVECの共存下ではHOBのAI-P活性を有意に促進した。したがって、両細胞は細胞同士が接触することではなく、液性因子を介して、相互にanabolicな作用を発揮していることが推測された。

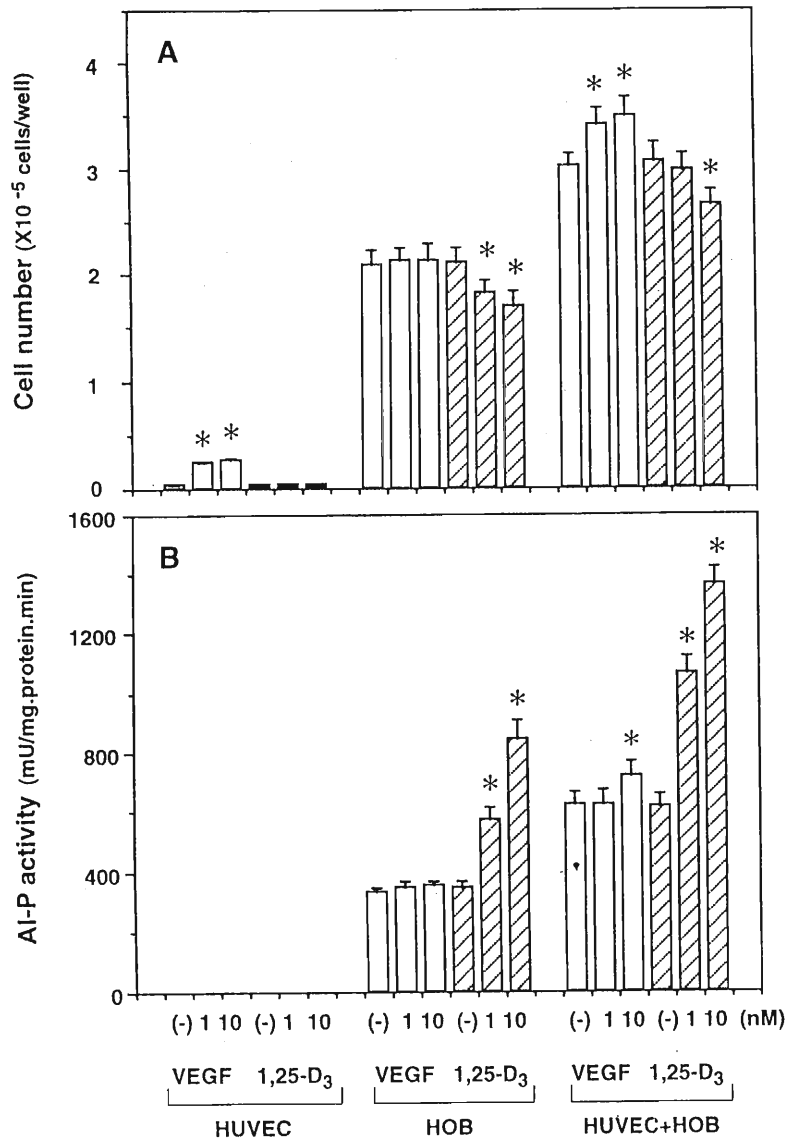


図1：ヒト骨芽細胞(HOB)とヒト血管内皮細胞 (HUVEC) の単独および共培養下における VEGF および活性型ビタミン D[1,25-(OH)2D3] の作用

VEGF は HUVEC 細胞の増殖を促進するが、HOB の増殖を促進しない。1,25-(OH)2D₃ は HUVEC には無効であるが、HOB のアルカリ・フォスファターゼ (AL-P) 活性を促進する (HOB の細胞数は減少する)。HUVEC を単独で培養した場合には AL-P 活性は認められない。しかし、両細胞を共培養した場合には、VEGF は細胞数を有意に増加させ、また AL-P 活性も促進した。さらに、1,25-(OH)2D₃ の AL-P 促進作用は共培養条件下では著しく増強された。

B) HOB 培養上清中の HUVEC 増殖刺激活性

HOB 細胞の培養上清には HUVEC の細胞増殖刺激活性があり、それは VEGF 抗体により部分的に阻止された。

C) HUVEC 培養上清中の HOB 増殖および AI-P 活性

HUVEC 細胞の培養上清には HOB の細胞増殖刺激活性が認められた。それは抗 IGF-1 抗体や BQ123 (endothelin-1 受容体の antagonist) により部分的にはあるが阻害された。

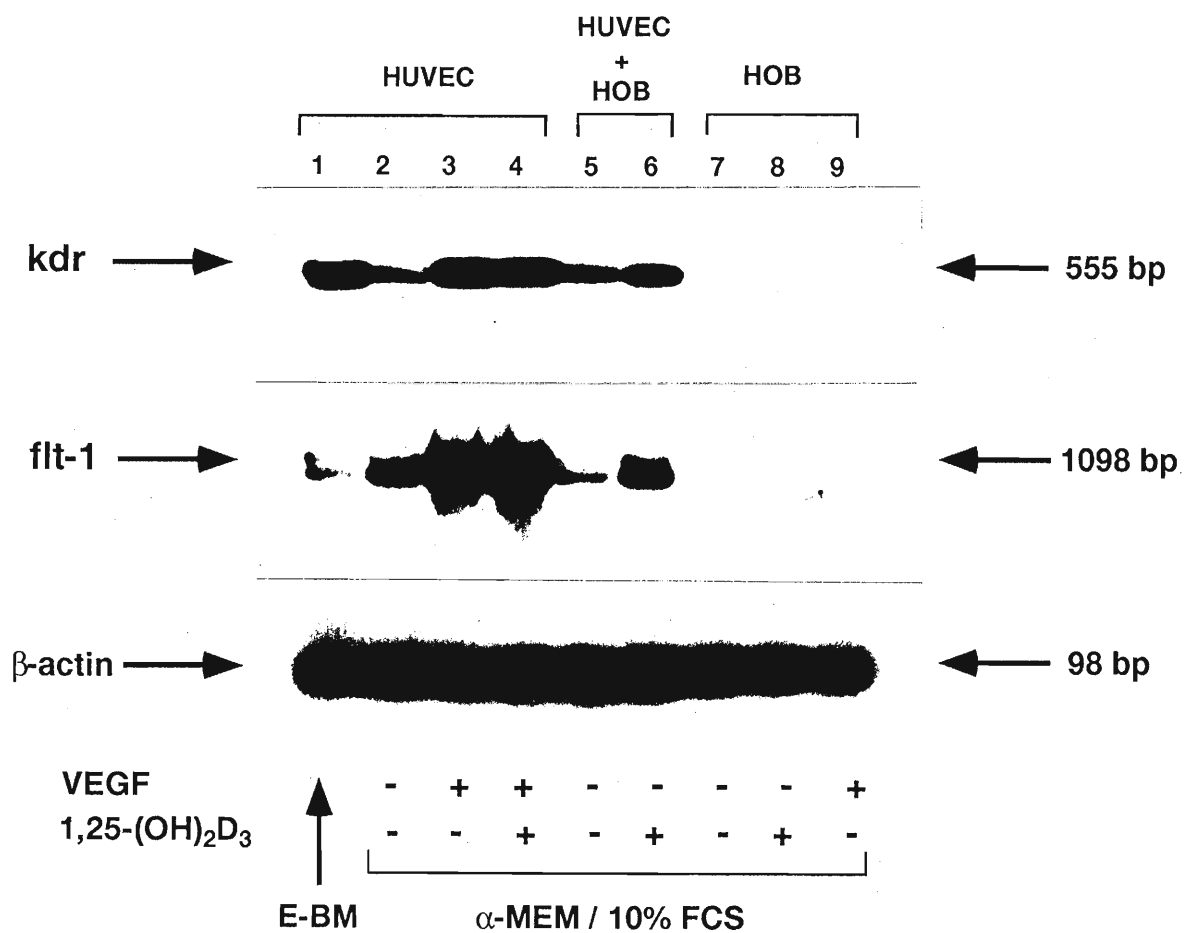


図 2 : ヒト骨芽細胞と血管内皮細胞における VEGF 受容体の発現

ヒト骨芽細胞 (HOB) とヒト血管内皮細胞 (HUVEC) を単独、または共培養(HOB+HUVEC) しておいて、total RNA を抽出後に RT-PCR を行ったもの。HUVEC は VEGF 受容体 (KDR, FLT) を発現しているが、HOB には発現していない。VEGF 受容体の発現は VEGF により刺激される (lane 3)。1,25-(OH)₂D₃ は HUVEC の VEGF 受容体遺伝子の発現を促進しないが、共培養した場合には VEGF 受容体遺伝子の発現を増強する (lane 6)。

D) Quantitative RT-PCR法による VEGF 受容体の発現の検討

さらに quantitative RT-PCR法により、1,25-(OH)₂D₃ の VEGF 受容体に及ぼす影響を検討してみると、(A) VEGF 受容体は HUVEC には発現しているが、HOB には発現していない (図 2)。(B) HUVEC は VEGF の存在下でのみ、VEGF 受容体を発現して増殖できる、(C) HOB と HUVEC を共培養しておき、1,25-(OH)₂D₃ を添加すると、VEGF 受容体の発現が促進された。

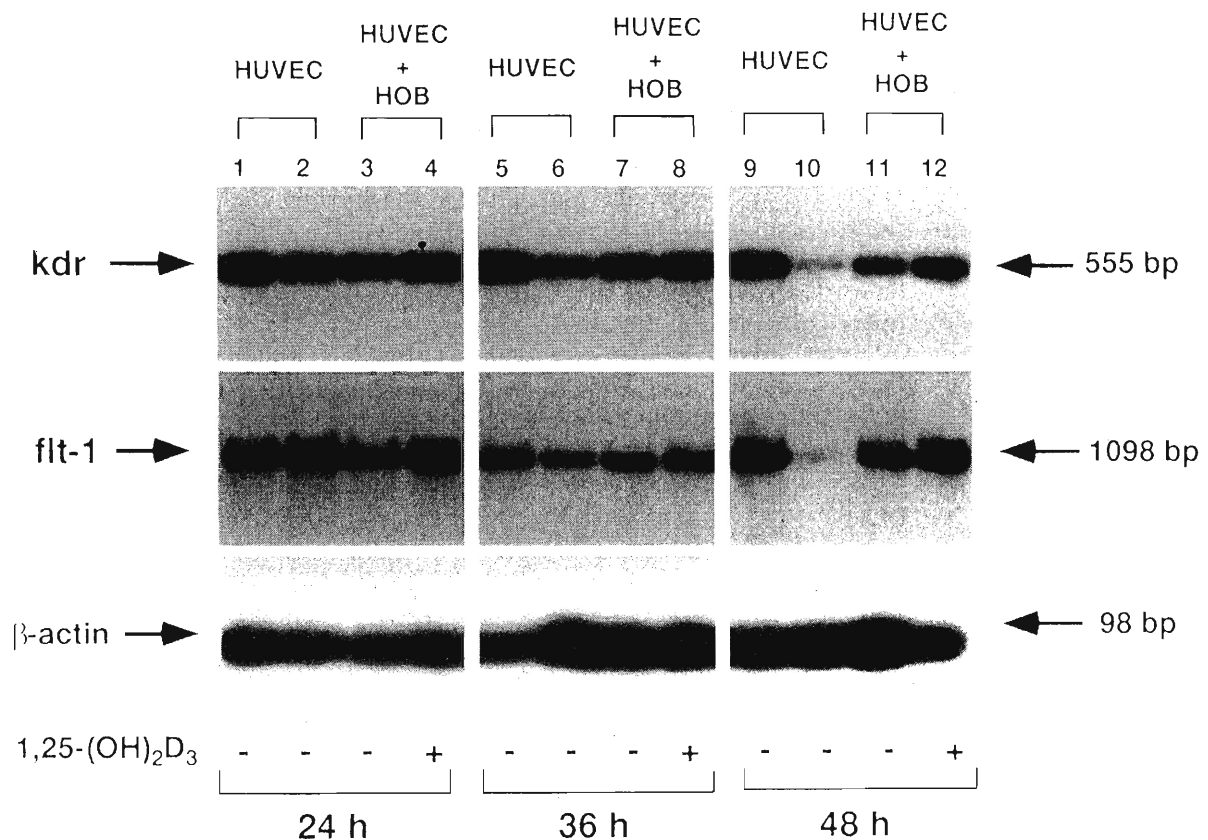


図 3 : ヒト血管内皮細胞と骨芽細胞を共培養した場合の VEGF 受容体遺伝子の発現に及ぼす 1,25-(OH)₂D₃ の作用

HUVEC を VEGF を含んだ培養液で培養すると、VEGF 受容体遺伝子の発現は 48 時間以上にわたり持続している (lanes 1, 5, 9)。しかし VEGF を含んでいない培養液で培養するとその発現は徐々に減少してしまう (lanes 2, 6, 10)。HUVEC と HOB を一緒に VEGF を含まない培養液で培養すると、VEGF 遺伝子の発現は 48 時間以上にわたり維持されているが (lanes 3-4, 7-8, 11-12)、1,25-(OH)₂D₃ の添加により VEGF 受容体遺伝子の発現はさらに増強される (lanes 4, 8, 12)。

考案

一般に、骨形成は血管内皮細胞の近傍に生じることが知られている。また、血管内皮細胞と骨芽細胞を一緒にして Boyden chamber 内に入れて、ラットの腹腔内に投与すると、骨形成が起ることも知られている(4)。

今回、我々の invitro での共培養系により、活性型ビタミン D は骨芽細胞に作用して VEGF mRNA の産生を促進し(1)、細胞外に分泌された VEGF は paracrine 的に作用して、血管内皮細胞の受容体を刺激すること(図 2)、刺激された血管内皮細胞は VEGF 受容体 (Flt、KDR) の発現を促進すること、活性化された血管内皮細胞は細胞増殖促進的に作用すると同時に、IGF-1 や endothelin-1 などの骨芽細胞の成長因子を産生することを見出した(5)。これらの成長因子は骨代謝に anabolic な作用を発揮するホルモンである。したがって、1,25-(OH)₂D₃ による骨形成促進作用は、骨芽細胞とその近傍に存在する血管内皮細胞の相互作用により促進されると推測される (図 4)。

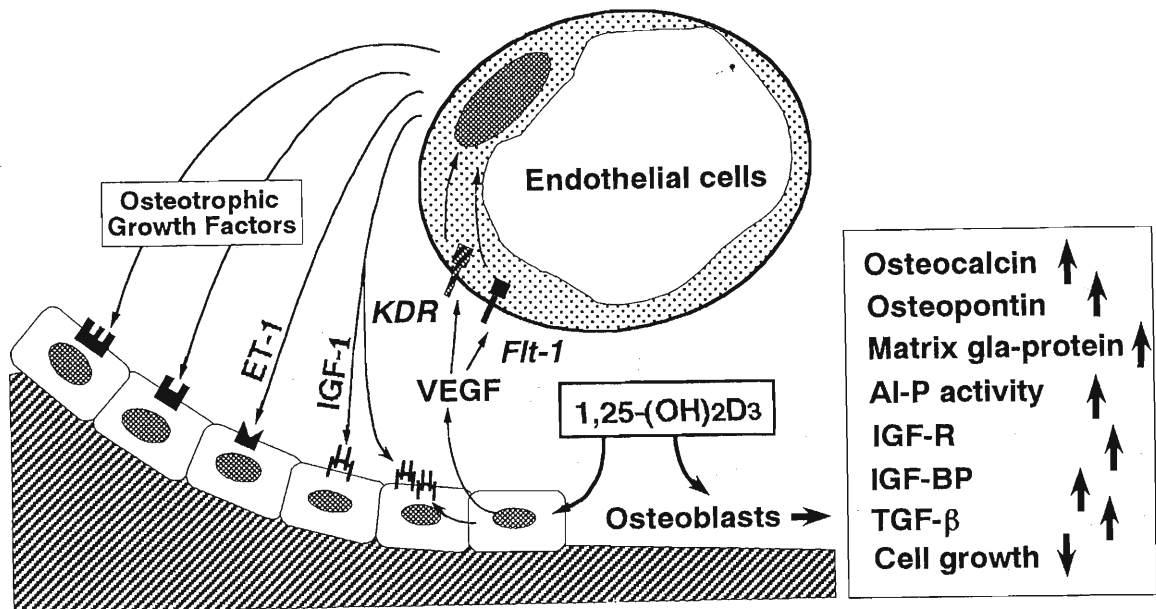


Fig 4 : Hypothesis of Anabolic Effects of 1,25-(OH)₂D₃ on Osteoblasts in the Presence of Endothelial Cells (5)

最近、骨粗鬆症の治療薬としてビタミン D が本邦のみならず、欧米でも注目されてきている。我々の今回の *in vitro* での新知見は、*in vivo* における骨のリモデリングをある程度、反映しているものと思われ、ビタミン D の骨代謝における anabolic 作用機序の一端を解明したものと推測される。

近年、血管形成と血管造成因子 (angiogenesis factors) の機序が遺伝子レベルで次々と解明されてきており、血管形成と腫瘍の増殖および骨転移の機序が注目されている (6)。今回の我々の *in vitro* での新知見は、骨形成のメカニズムに血管内皮細胞系とのあいだに相互作用があることを立証したものである。このような相互作用機序は、悪性腫瘍細胞の骨転移などにも関与しているものと思われ、今後はこの方面の検討を進めていきたい。

文献

1. Wang DS, Yamazaki K, Nohtomi K, et al. Increase of vascular endothelial growth factor mRNA expression by 1,25-dihydroxy-vitamin D3 in human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 11: 472 - 479, 1996.
2. Ferrara N, Davis-Smyth T. The Biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Rev* 18 : 4- 25, 1997.
3. Nomura M, Yamagishi S, Harada S, et al. Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes. *J Biol Chem* 270 : 28316 - 28324, 1995.
4. Villanueva JE, Nimni ME. Promotion of calvarial cell ontogenesis by endothelial cells. *J Bone Miner Res* 5 : 733 - 739, 1990.
5. Wang DS, Miura K, Demura H, Sato K. Anabolic effects of 1,25-(OH)₂D₃ on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and growth factors produced by endothelial cells. *Endocrinology* 140: 2953 - 2962, 1997.
6. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: Molecular and Biological Aspects. In :Vascular Growth Factors and Angiogenesis. Claesson-Welsh L (ed.), Springer Verlag, Berlin, p.1-30,1999.

(派生的な仕事)

ヒト成長ホルモン (hGH) のヒト骨芽細胞における骨形成促進作用
: 22Kd-hGH と 20Kd-hGH との比較検討

上記の仕事がまとまった後、骨形成促進作用の最も強力な hGH も 1,25-(OH)₂D₃ と同様な機序により、骨形成促進的に作用するのではないかと推測された。そこで、HOB 細胞に hGH (22Kd および 20-Kd) を添加して培養し、^[3H]thymidine の取り込み、アルカリ・フォスファターゼ活性、osteocalcin 産生および interleukin-6 の産生に及ぼす影響を検討した。

結果は、20Kd-hGH (これは血中に 10%ほど存在) も 22Kd-hGH と同様に、ヒト骨芽細胞の増殖および分化を促進する作用があることが判明した。また、興味深いことには、両 hGH は、骨吸収促進性のある interleukin-6 (IL-6) の産生を遺伝子レベルで刺激した。したがって、hGH は、骨吸収を促進すると同時に、骨形成を促進して、骨のリモデリングを亢進させる性質があるものと推測された。なお、hGH には、骨芽細胞に作用して IGF-1 の産生を促進する作用があることが判明している。したがって、hGH は 1,25-(OH)₂D₃ と同様に、VEGF/VEGF 受容体系を介して骨形成に促進的に作用している可能性があり、現在、検討中である。なお、この仕事の前半は、Endocrine Journal 誌に受理された。まだ、別刷りが届いていないので、preprint*を添付しました。

* Wang DS, Sato K, Demura H, Kato Y, Maruo N, Miyachi Y.
Osteo-anabolic Effects of Human Growth Hormone with 22K- and 20K
Daltons on Human Osteoblast-like Cells. Endocrine J 46 (1) 125 – 132, 1999.

(付記) 我々は、現在、血管形成促進因子の阻害法を開発して、悪性腫瘍の骨転移および甲状腺癌未分化癌の新しい治療法を確立することに研究テーマを発展させつつあります。