

骨における血管新生と線溶系

帖佐直幸*, 石崎 明



帖佐直幸

Angiogenesis and fibrinolytic system on osteogenesis

Naoyuki CHOSA, Akira ISHISAKI

2000年 北海道大学大学院地球環境科学研究科博士課程単位取得満期退学
同年 岩手医科大学歯学部口腔生化学講座 助手
2007年 岩手医科大学歯学部口腔生化学講座 助教
博士 (地球環境科学)

Key words: plasmin, alpha-2 antiplasmin (A2AP), plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor (PAI-I), vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor- β (TGF- β), hepatocyte growth factor (HGF)

1. 血管新生と線溶系

骨は血管分布の非常に高い組織であり, そのモデリング・リモデリングには血管新生が密接に関連している. 血管新生には血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor ; VEGF), トランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor ; TGF)- β , 塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor ; bFGF), 肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor ; HGF), アンジオポイエチン (angiopoietins ; Ang)-1, 血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor ; PDGF)-BB, インスリン様増殖因子 (insulin-like growth factor ; IGF)-1, -2, ニューロトロフィン (neurotrophins ; NGF) などのサイトカインや, 低酸素誘導転写因子 (hypoxia-inducible transcription factor ; HIF), など様々な因子が関与していることが知られている¹⁾.

血管新生において最も重要な因子のひとつである VEGF は, 分泌後, 不活性型 VEGF として細胞外マトリックス (ECM) にトラップされ, プラスミンによって切断, 活性化される. 我々は, これまでにプラスミンの特異的な阻害因子である α 2-プラスミンインヒビター (alpha-2

antiplasmin ; A2AP) 遺伝子ノックアウトマウス²⁾の解析により, A2AP の欠損によるプラスミン活性の上昇が VEGF の過剰な活性化を引き起こし, 結果的に生存率の低下を招くことを報告してきた^{3) 4)}. VEGF は血管内皮細胞以外にも骨芽細胞や肥大化軟骨細胞などからも産生されることが明らかとなっており, 骨のモデリング・リモデリングにも関与していることが示唆されている⁵⁾.

骨組織において最も豊富なサイトカインのひとつである TGF- β も, 不活性型の前駆体として分泌, ECM にトラップされ, プラスミンによって切断, 活性化される. TGF- β は骨芽細胞の増殖や分化を促進するとともに骨芽細胞の成熟や石灰化を抑制することが知られているが, さらには血管新生にも関与することが明らかになっている.

一方, 成熟肝細胞の増殖因子として発見された HGF は⁶⁾, 最近の研究によって血管形成促進因子としても認識され^{7) 8)}, 脳梗塞における虚血領域への血流確保のための血管新生療法への応用が模索されている. HGF もまた, 不活性型の前駆体が ECM にトラップされ, ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (uPA) によって切断, 活性化される.

VEGF, TGF- β および HGF は ECM にトラップされた不活性型前駆体がプラスミンまたはプラ

*岩手医科大学歯学部口腔生化学講座 [〒 020-8505 岩手県盛岡市内丸 19-1]

Department of Biochemistry, Iwate Medical University School of Dentistry

[19-1 Uchimaru, Morioka, Iwate 020-8505, Japan]

Tel: 019-651-5111 (4430) Fax: 019-654-4147 e-mail: nchosa@iwate-med.ac.jp

スミノゲンアクチベーターといった線溶系の酵素によって切断、活性化され、さらには血管新生ならびに骨のモデリング・リモデリングにおいても重要な役割を担っていると考えられている。本稿では血管新生における VEGF, TGF- β , HGF の機能および骨における血管新生の役割を解説する。

2. 軟骨内骨化と血管新生

骨の形成には膜性骨化と軟骨内骨化がみられるが、長官骨で多くみられる軟骨内骨化における血管新生の概略を図 1 に示す。

軟骨内骨化では、最初に間葉系幹細胞が凝集して中心部では軟骨細胞に、辺縁部では軟骨膜細胞に分化して骨の原基が形成される。軟骨は軟骨細胞の急速な増殖や軟骨基質の分泌に伴って成長していくが、やがて増殖を止めて肥大軟骨細胞となる。肥大軟骨は VEGF をはじめとした様々な生理活性物質を分泌して周囲に骨や血管を誘導し、血管侵入とそれに続く骨髄形成を促す。さらに、血管侵入とともに入ってきた破軟骨細胞は石灰化した軟骨基質を分解し、骨膜から血管とともに侵入してきた骨芽細胞が骨基質を産生して一次海綿骨が形成される^{9) 10)}。

このように軟骨内骨化では軟骨形成と骨形成、

さらには血管形成が密接に相互作用してすすんでいる。そのなかでも肥大軟骨細胞は周囲の組織に骨と血管を誘導しており、骨形成において中心的な役割を担っていると考えられている。

3. VEGF による血管新生

VEGF は血管透過性の亢進と血管内皮細胞の増殖を促進する因子として知られているが、これ以外にもアポトーシスや細胞遊走の制御にも関与することが明らかになっている。前述のように、VEGF は肥大軟骨細胞や骨芽細胞などからも産生されることが知られており、骨のモデリング・リモデリングにも関与していることが示唆される⁵⁾。

ヒトの VEGF には、スプライシングによってアミノ酸数が 121 個 (VEGF₁₂₁)、165 個 (VEGF₁₆₅)、189 個 (VEGF₁₈₉)、206 個 (VEGF₂₀₆) の 4 種類が存在する¹¹⁾。そのうちアミノ酸が 189 個と 206 個で構成される VEGF は不活性型の VEGF として ECM にトラップされる。これらの VEGF はプラスミンにより切断され、活性化することが知られている^{12) 13)} (図 2A)。

VEGF は細胞膜上に存在する VEGF 受容体 (vascular endothelial growth factor receptor ; VEGFR)-2 (VEGFR-2, KDR/Flk-1) および VEGFR-1 (Flt-1) に結合し、受容体のチ

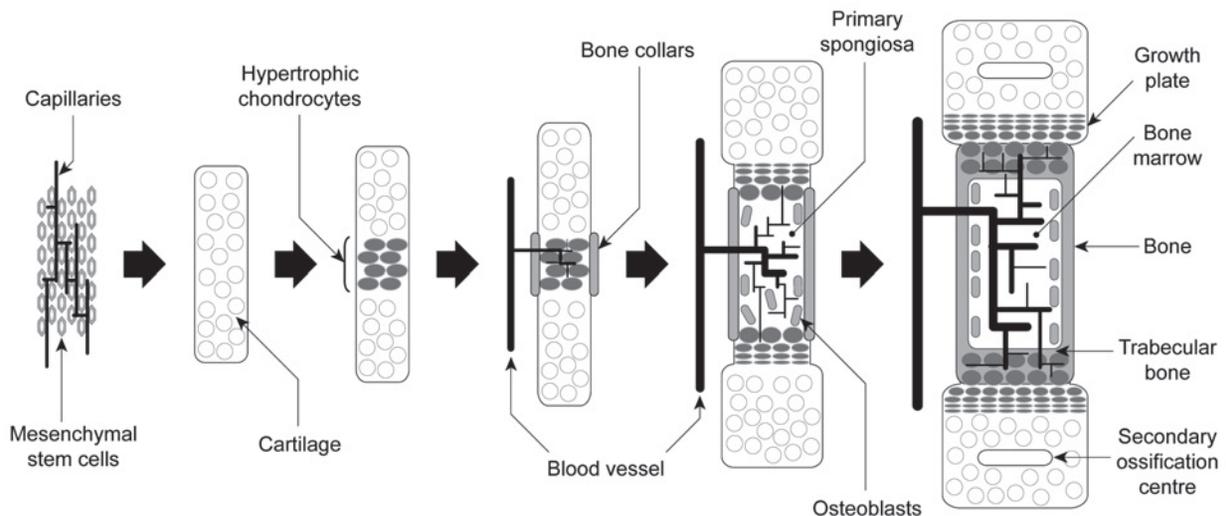


図 1 軟骨内骨化における血管新生の概略

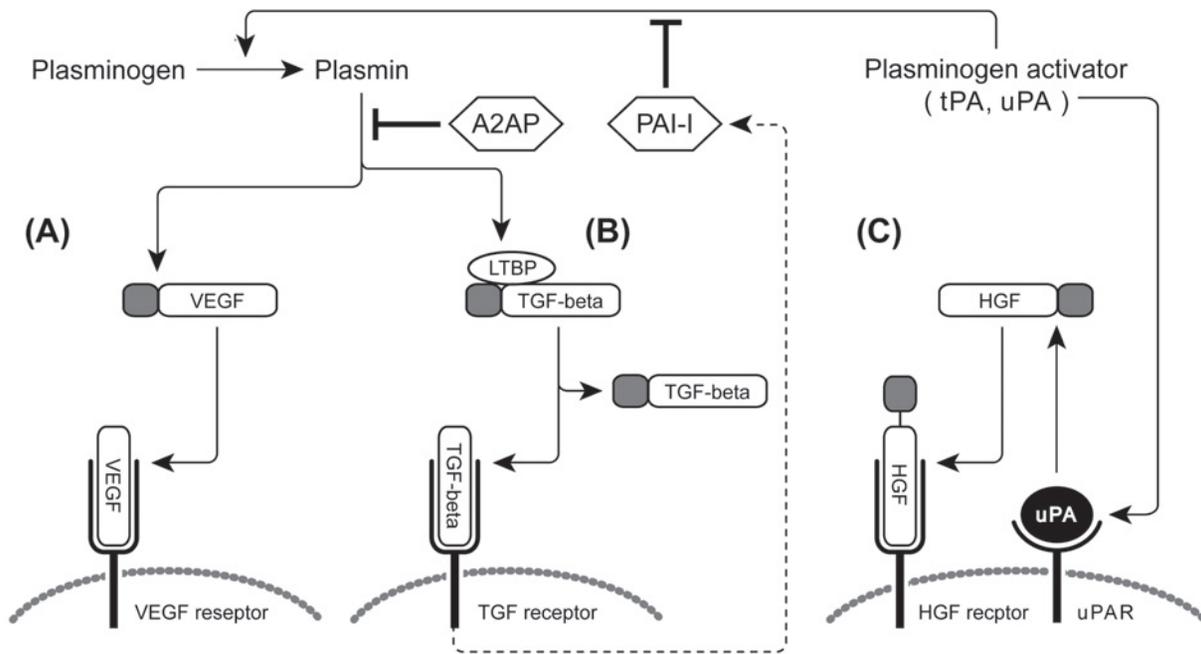


図2 線溶系酵素による VEGF (A), TGF- β (B) および HGF (C) の活性化の模式図

ロシンキナーゼが活性化して細胞内にシグナルが伝達され、細胞の機能や構造に変化を与える。VEGFR-2はほとんど全ての内皮細胞表面に発現して血管新生、脈管形成に働いているが、VEGFR-1は特定の内皮細胞のみで発現して血管新生の他、単球走化作用などにも関与する。VEGFの効果はその受容体であるVEGFRが発現している血管内皮細胞のみならず、同様にVEGFRが発現している単球、神経細胞、軟骨細胞、骨芽細胞においても発揮される¹⁴⁾⁻¹⁶⁾。

VEGF-VEGFRを介したシグナル伝達は、血管新生のみならず骨髄からの造血幹細胞のリクルート、単球の遊走、ニューロンの保護、骨形成を引き起こすことが知られている^{14) 15) 17) 18)}。肥大軟骨細胞はVEGFのみならず、その受容体であるVEGFRも発現しており¹⁶⁾、オートクリン/パラクリン的に血管新生を促進すると考えられている¹⁹⁾。さらに、VEGFは骨における血管新生を促進するとともに骨のリモデリングをも促進する²⁰⁾。ごく最近、VEGFR-1欠損マウスは骨形成が抑制され、その結果骨量が減少することが報告されたことから²¹⁾、VEGF-VEGFRを介したシグナル伝達系は骨形成・骨吸収にも関与すること

が示唆される。

一方、肥大軟骨細胞におけるVEGFの発現制御の分子メカニズムは明らかになっていない。しかしながら骨芽細胞の分化を制御する転写因子Runx2を欠損するマウスにおいて、軟骨における血管新生が阻害されることが観察されることから²²⁾、Runx2は骨分化のみならず骨における血管形成にも関与することが考えられる。

4. TGF- β による血管新生

TGF- β は正常な線維芽細胞の増殖を促進する因子として分離されたが、その後の研究で上皮細胞、血管内皮細胞、血球細胞、リンパ球などの多くの細胞にたいして増殖抑制因子として作用することが知られている。TGF- β は骨組織において最も豊富なサイトカインのひとつであり、骨芽細胞の増殖や分化を促進するとともに骨芽細胞の成熟や石灰化を抑制する。

TGF- β は不活性型の前駆体として産生され、結合タンパクであるlatent TGF- β binding protein (LTBP)がジスルフィド結合した状態で分泌される^{23) 24)}。このTGF- β -LTBP複合体

はECMにトラップされて、必要な際に活性化される²⁵⁾。プラスミンは不活性型TGF- β 前駆体を切断することにより活性型TGF- β を遊離する。さらにプラスミンは、ECMにトラップされているTGF- β -LTBP複合体のLTBPを切断することにより組織液中に不活性型の複合体としてTGF- β を遊離させることもできる^{26) 27)} (図2B)。

プラスミンによるTGF- β の負の制御機構としてプラスミノゲンアクチベーターインヒビター(PAI-I)の役割が明らかになっている。プラスミンによって活性化されたTGF- β がTGF- β 受容体に結合すると、PAI-Iの発現が誘導される²⁸⁾。PAI-Iはプラスミノゲンアクチベーターの活性を阻害することにより、プラスミンの生成を抑制し、その結果、活性型TGF- β の生成が抑制されてTGF- β による刺激は減弱する。

多くの細胞でTGF- β のシグナルはTGF- β I型受容体ALK5を介して伝達される。しかしながら血管内皮細胞ではTGF- β I型受容体ALK1も発現しており、TGF- β はこれら2つの異なるI型受容体に結合し、シグナルを伝達する²⁹⁾。ALK1経路は、血管内皮細胞の遊走および管腔形成に必要なinhibitor of DNA binding 1 (Id1)の発現を誘導し、これにより血管新生を活性化する。Id1は筋細胞の分化調節転写因子であるMyoDの働きを抑制するが、特に血管内皮細胞においてはその増殖や遊走を促進することが知られている。一方、ALK5経路は、血管内皮細胞においてPAI-Iやフィブロネクチン等の発現を誘導し、血管新生にたいして抑制的に働くと考えられている。

ALK1は細胞内情報伝達因子であるSmad1とSmad5をリン酸化し、ALK5はSmad2とSmad3をリン酸化することにより、細胞内にシグナルを伝える。また、ALK1シグナル伝達には、キナーゼ活性をもつALK5がALK1とヘテロ複合体を形成することが不可欠で、ALK5を欠損させるとALK1を介するシグナルも消失する。

TGF- β はプラスミンにより活性化され、血管内皮細胞の増殖や遊走を正または負の方向に制御する。TGF- β は骨組織において最も豊富なサイトカインのひとつであることから、骨芽細胞の増

殖や分化のみならず、骨における血管新生にも大きく影響していると考えられる。

5. HGFによる血管新生

HGFは肝細胞に特異的な増殖因子として発見されたが、その後、肝細胞のみならず様々な細胞にたいして細胞増殖促進、細胞運動促進、抗アポトーシス、形態形成誘導、血管新生の促進など多様な生理活性を有していることが明らかになった。正常細胞においては上皮系細胞の多くがHGFの標的細胞となり得るが、間葉系に由来する細胞においても血管内皮細胞、軟骨細胞、筋衛星細胞などの細胞が標的細胞となることが報告されている。HGFは間葉系細胞からも分泌され、細胞の増殖や分化を調節することが知られており、骨形成における血管新生への関与が示唆される。

HGFは、不活性型の前駆体として細胞から分泌された後、細胞外でuPAにより切断され、ジスルフィド結合を介したヘテロダイマーの活性型HGFとなる³⁰⁾。uPAは当初、ヒトの尿中から発見されたが、最近では血中や細胞間基質中にその存在が確認されている。また、uPAは血管内皮細胞膜上に存在するuPA受容体(uPAR)に結合して細胞膜上にトラップされることが明らかになっている³¹⁾。さらに、HGFは血管新生時に認められる血管内皮細胞周囲のECMリモデリングに必須なマトリックスメタロプロテアーゼの産生ならびに活性化を促進することも明らかにされている³²⁾。これらのことから、血管内皮細胞上でuPARにトラップされたuPAは、細胞周囲に存在するHGF前駆体を切断、活性化し、その活性型HGFが血管内皮細胞上のHGF受容体(c-met)に結合することにより、血管内皮細胞による血管形成を誘導するものと考えられる (図2C)。

最近、骨芽細胞や血管内皮細胞あるいは平滑筋細胞などに分化し得る骨髄由来間葉系幹細胞が、血行性に体内の各組織に運ばれ、組織や器官の再生に働くと考えられている。しかしながら、血中の間葉系幹細胞が血管壁を越えて血管周囲組織に浸潤するメカニズムは明らかとされていなかった。Sonらは、骨髄由来間葉系幹細胞がc-metや

間質細胞由来因子 (stromal cell-derived factor 1; SDF-1) 受容体 CXCR4 を細胞膜上に発現しており, 基底膜様マトリゲル中の HGF や SDF-1 の濃度勾配に従い, 高濃度側に向かって間葉系幹細胞がゲル内浸潤するということを明らかにした³³⁾. これらの結果は, 血管内皮細胞や平滑筋細胞から分泌される HGF によって, 血中に存在する間葉系幹細胞の血管外浸潤が誘導される可能性を示唆するものである. 軟骨内骨化における肥大軟骨層への血管侵入の際にも, 同様に HGF が働き, 血管内の間葉系幹細胞が骨髄側に移行する可能性が考えられる. このように, HGF は軟骨内骨化における骨髄内部での間葉系幹細胞の動員に, ポジティブな影響を及ぼしている可能性が示唆される.

6. おわりに

これまでに述べてきたように, 線溶系を構成する酵素およびその阻害因子は VEGF や TGF- β , さらには HGF などへの作用を介して, 血栓形成や血管内皮の修復以外にも血管新生や骨のモデリング・リモデリングにも深く関与していることが示唆される. VEGF, TGF- β , HGF とともに ECM にトラップされた不活性型前駆体がプラスミンまたはプラスミノゲンアクチベーターといった線溶系の酵素によって活性化されることから, それらの特異的な阻害因子である A2AP や PAI-I の役割も重要であると考えられる.

ごく最近, 間葉系幹細胞が脂肪細胞や骨芽細胞へと分化する初期の段階に PAI-I を分泌することが示された³⁴⁾. さらに, プラスミノゲンアクチベーターが破骨細胞による骨吸収に関与することも明らかになってきている³⁵⁾. これらのことからプラスミンや A2AP, さらにはプラスミノゲンアクチベーターや PAI-I など線溶系の酵素群およびその酵素活性を調節する阻害因子は, 骨のモデリング・リモデリングに深く関与していることが示唆され, まますます興味深いといえる.

文 献

- 1) Madeddu P: Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration. *Exp Physiol* **90** : 315-326, 2005.
- 2) Okada K, Lijnen HR, Dewerchin M, Belayew A, Matsuo O, Collen D, Bernaerts R: Characterization and targeting of the murine alpha2-antiplasmin gene. *Thromb Haemost* **78** : 1104-1110, 1997.
- 3) Matsuno H, Kozawa O, Yoshimi N, Akamatsu S, Hara A, Mori H, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Uematsu T: Lack of alpha2-antiplasmin promotes pulmonary heart failure via overrelease of VEGF after acute myocardial infarction. *Blood* **100** : 2487-2493, 2002.
- 4) Matsuno H, Ishisaki A, Nakajima K, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Kozawa O: Lack of alpha 2-antiplasmin promotes re-endothelialization via over-release of VEGF after vascular injury in mice. *Blood* **102** : 3621-3628, 2003.
- 5) Maes C, Stockmans I, Moermans K, Van Loooveren R, Smets N, Carmeliet P, Bouillon R, Carmeliet G: Soluble VEGF isoforms are essential for establishing epiphyseal vascularization and regulating chondrocyte development and survival. *J Clin Invest* **113** : 188-199, 2004.
- 6) Nakamura T, Nishizawa T, Hagiva M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S: Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* **342** : 440-443, 1989.
- 7) Mikroulis D, Papanas N, Maltezos E, Bougioukas G: Angiogenic growth factors in the treatment of peripheral arterial disease. *Curr Vasc Pharmacol* **5** : 195-209, 2007.
- 8) Nomi M, Miyake H, Sugita Y, Fujisawa M, Soker S: Role of growth factors and endothelial cells in therapeutic angiogenesis and tissue engineering. *Curr Stem Cell Res Ther* **1** : 333-343, 2006.
- 9) Chung UI: Essential role of hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development. *Endocr J* **51** : 19-24, 2004.
- 10) Kronenberg HM: Developmental regulation of the growth plate. *Nature* **432** : 332-336, 2003.
- 11) Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA: The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* **266** : 11947-11954, 1991.
- 12) Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N: Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* **267** : 26031-26037, 1992.
- 13) Park JE, Keller GA, Ferrara N: The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* **4** : 1317-1326, 1993.
- 14) Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **9** : 669-676, 2003.
- 15) Storkebaum E, Carmeliet P: VEGF: a critical player in neurodegeneration. *J Clin Invest* **113** : 14-18, 2004.
- 16) Bluteau G, Julien M, Magne D, Mallein-Gerin F, Weiss P, Daculsi G, Guicheux J: VEGF and VEGF receptors are differentially expressed in chondrocytes. *Bone* **40** : 568-576, 2007.
- 17) Geiger F, Bertram H, Berger I, Lorenz H, Wall O, Eckhardt C, Simank HG, Richter W: Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects. *J Bone Miner Res* **20** : 2028-2035, 2005.
- 18) Peng H, Usas A, Olshanski A, Ho AM, Gearhart B, Cooper GM, Huard J: VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *J Bone Miner Res* **20** : 2017-2027, 2005.
- 19) Petersen W, Tsokos M, Pufe T: Expression of VEGF121 and VEGF165 in hypertrophic chondrocytes of the human growth

- plate and epiphyseal cartilage. *J Anat* **201** : 153-157, 2002.
- 20) Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Jr., Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van BN, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH: Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** : 9656-9661, 2002.
 - 21) Otomo H, Sakai A, Uchida S, Tanaka S, Watanuki M, Moriwaki S, Niida S, Nakamura T: Flt-1 tyrosine kinase-deficient homozygous mice result in decreased trabecular bone volume with reduced osteogenic potential. *Bone* **40** : 1494-1501, 2007.
 - 22) Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ: *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* **89** : 765-771, 1997.
 - 23) Kanzaki T, Olofsson A, Morén A, Wernstedt C, Hellman U, Miyazono K, Claesson-Welsh L, Heldin CH: TGF-beta 1 binding protein: a component of the large latent complex of TGF-beta 1 with multiple repeat sequences. *Cell* **61** : 1051-1061, 1990.
 - 24) Miyazono K, Olofsson A, Colosetti P, Heldin CH: A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *EMBO J* **10** : 1091-1101, 1991.
 - 25) Dallas SL, Miyazono K, Skerry TM, Mundy GR, Bonewald LF: Dual role for the latent transforming growth factor-beta binding protein in storage of latent TGF-beta in the extracellular matrix and as a structural matrix protein. *J Cell Biol* **131** : 539-549, 1995.
 - 26) Taipale J, Miyazono K, Heldin CH, Keski-Oja J: Latent transforming growth factor-beta 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF-beta binding protein. *J Cell Biol* **124** : 171-181, 1994.
 - 27) 宮園浩平: TGF- β とその受容体. *日本薬理学雑誌* **107** : 133-140, 1996.
 - 28) Sato Y, Tsuboi R, Lyons R, Moses H, Rifkin DB: Characterization of the activation of latent TGF-beta by co-cultures of endothelial cells and pericytes or smooth muscle cells: a self-regulating system. *J Cell Biol* **111** : 757-763, 1990.
 - 29) Goumans MJ, Lebrin F, Valdimarsdottir G: Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF- β receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med* **13** : 301-307, 2003.
 - 30) Naldini L, Vigna E, Bardelli A, Follenzi A, Galimi F, Comoglio PM: Biological activation of pro-HGF (hepatocyte growth factor) by Urokinase is controlled by a stoichiometric reaction. *J Biol Chem* **270** : 603-611, 1995.
 - 31) Pepper MS, Montesano R, Mandriota SJ, Orci L, Vassalli JD: Angiogenesis: a paradigm for balanced extracellular proteolysis during cell migration and morphogenesis. *Enzyme Protein* **49** : 138-162, 1996.
 - 32) Wang H, Keiser JA: Hepatocyte growth factor enhances MMP activity in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **272** : 900-905, 2000.
 - 33) Son BR, Marquez-Curtis LA, Kucia M, Wysoczynski M, Turner AR, Ratajczak J, Ratajczak MZ, Janowska-Wieczorek A: Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells* **24** : 1254-1264, 2006.
 - 34) Chiellini C, Cochet O, Negroni L, Samson M, Poggi M, Ailhaud G, Alessi MC, Dani C, Amri EZ: Characterization of human mesenchymal stem cell secretome at early steps of adipocyte and osteoblast differentiation. *BMC Mol Biol* **9** : 26, 2008.
 - 35) Everts V, Daci E, Tigchelaar-Gutter W, Ho eben KA, Torrekens S, Carmeliet G, Beertsen W: Plasminogen activators are involved in the degradation of bone by osteoclasts. *Bone* **43** : 915-920, 2008.