

4. 考察

我々はこれまでに NO bioavailability の低下によるグルココルチコイド誘発性血管内皮機能障害が大腿骨頭壊死症の予防ならびに治療標的となりうる可能性を提唱し、強力なコレステロール低下作用だけでなく、血管への多面的保護作用を有するスタチンに着目し検討してきた。昨年度はグルココルチコイド過剰マウスを用いた検討により、グルココルチコイド過剰による血圧上昇、内皮依存性血管拡張反応の低下、NO 産生および大動脈での eNOS 発現の低下は、ピタバスタチンの前投与によりいずれも改善することを報告した。

HUVEC の培養系を用いた今回の検討では、ピタバスタチンは DEX による eNOS 蛋白発現の抑制を改善し、これは活性型 eNOS の発現増加を伴っていた。また、アトルバスタチンにも同様の作用が認められた。このような結果は、グルココルチコイド過剰マウスでみられたグルココルチコイド誘発性血管内皮機能障害に対するピタバスタチンの改善効果は、血管内皮細胞への直接的作用によるものであり、さらにこの作用はスタチンの class effect であることが示唆される。

スタチンは HMG-CoA 還元酵素を阻害することによりコレステロール合成を抑制するが、今回の検討ではコレステロール合成経路のイソプレノイド中間体である GGPP によって、ピタバスタチンの eNOS 発現増加作用が相殺された。このことはグルココルチコイドによる eNOS 発現抑制に及ぼすピタバスタチンの効果が、イソプレニル化阻害による Rho 阻害を介したものである可能性を示している。この点については今後 Rho 阻害薬の効果についても検討が必要である。

また、ピタバスタチンは eNOS プロモーター活性を有意に増加させたことから、eNOS 発現増加作用の機序のひとつとして eNOS 遺伝子の転写亢進が考えられる。しかしながら、今回の検討では DEX は HUVEC における eNOS プロモーター活性に影響を及ぼさなかったこと、DEX は eNOS mRNA の半減期を短縮させ、一方、DEX はその半減期を延長させることが報告されていることより、ピタバスタチンはグルココルチコイドによる eNOS mRNA の不安定化を改善することにより、eNOS 発現増加作用を発揮している可能性があり、検討が必要である。さらに今後は eNOS 発現とともに NO bioavailability を規定する重要な因子である酸化ストレスに及ぼすピタバスタチンの効果についても検討する予定である。

5. 結論

グルココルチコイド過剰による NO bioavailability の低下ならびに血管内皮機能障害に及ぼすピタバスタチンの効果は血管内皮細胞に及ぼす多面的直接作用による eNOS 発現増加を介するものであることが示唆された。ピタバスタチンは大腿骨頭壊死症の治療ならびに予防において有効である可能性がある。

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Abe M, Matsumoto T. Bone destruction in multiple myeloma. *Ann N Y Acad Sci.* 1068: 319-326, 2006
- 2) Ikeda Y, Yagi S, Yamaguchi H, Fujimura M, Hashizume S, Aihara K, Akaike M, Azuma H, Matsumoto T. *Circulation Journal* 70: 1082-1085, 2006.
- 3) Kawai S, Koishihara Y, Iida S, Ozaki S, Matsumoto T, Kosaka M, Yamada-Okabe H. Construction of a conventional non-radioisotope method to quantify HM1.24 antigens: Correlation of HM1.24 levels and ADCC activity of the humanized antibody against HM1.24. *Leukemia Research* 30:949-956, 2006.

2. 学会発表

- 1) 赤池雅史、松本俊夫 「ステロイド性骨壊死の病因・病態の新知見」(3)ステロイド剤と血管内皮依存性弛緩反応 第 21 回日本整形外科基礎学術集会、長崎、2006.10.19
- 2) 赤池雅史、松本俊夫 グルココルチコイド過剰による大腿骨頭壊死の病態—血管内皮機能との関連— 第 11 回日本関節症研究会学術集会、東京、2006.5.27.
- 3) Yagi S, Aihara K, Ikeda Y, Akaike M, Sumitomo Y, Iwase T, Azuma H, Matsumoto T. A novel eNOS-independent protective action of statin against angiotensin II-induced cardiovascular remodeling. *American Heart Association Scientific Sessions 2006, Chicago USA,* 2006.11.12.
- 4) Aihara K, Azuma H, Akaike M, Ikeda Y, Yagi S, Iwase T, Sumitomo Y, Sata M, Kato S, Matsumoto T. Heparin Cofactor II Deficiency Causes Accelerated Thrombosis and

Atherosclerosis in Mice. American Heart Association Scientific Sessions 2006, Chicago USA, 2006.11.12.

- 5) Yagi S, Aihara K, Ikeda Y, Akaike M, Sumitomo Y, Iwase T, Azuma H, Matsumoto T. HMG-CoA reductase inhibitor pitavastatin exerts eNOS-independent cardio-renal protective effects in angiotensin II-infused mice. International Symposium The kidney and hypertension, Sendai, 2006.10.20.
- 6) Aihara K, Akaike M, Ikeda Y, Fujimura M, Hashizume S, Iwase T, Yagi S, Kondo A, Azuma H, Matsumoto T. Valsartan Enhances Nitric Oxide Bioavailability and Reduces Arterial Stiffness in Patients with Essential Hypertension. 21st Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Fukuoka, 2006.10.15.
- 7) Akaike M, Aihara K, Yagi S, Ikeda Y, Ishikawa K, Iwase T, Hashizume S, Fujimura M, Azuma H, Matsumoto T. Pitavastatin ameliorates glucocorticoid-induced hypertension through increasing expression of endothelial nitric oxide synthase. 14th International Symposium on Atherosclerosis, Rome Italy, 2006.6.18.
- 8) Yagi S, Aihara K, Akaike M, Ikeda Y, Fujimura M, Hashizume S, Iwase T, Azuma H, Matsumoto T. Pitavastatin prevents angiotensin II-induced cardiovascular remodeling through regulation of oxidative stress and nitric oxide bioavailability in mice. 14th International Symposium on Atherosclerosis, Rome Italy, 2006.6.18.
- 9) Ikeda Y, Aihara K, Akaike M, Yagi S, Iwase T, Hashizume S, Fujimura M, Azuma H, Kato S, Matsumoto T. Acceleration of Angiotensin II-Induced Coronary Artery Remodeling in Androgen Receptor Knockout Male Mice. 70th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Nagoya, 2006.3.24.
- 10) Ikeda Y, Aihara K, Akaike M, Yamashita M, Yagi S, Iwase T, Hashizume S, Fujimura M, Azuma H, Kato S, Matsumoto T. Androgen-Androgen Receptor System Counteracts Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity through Attenuating Oxidative Stress-Induced

Mitochondrial Damage in Murine. 70th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Nagoya, 2006.3.24.

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

8. 参考文献

- 1) Iuchi T, Akaike M, Mitsui T, Ohshima Y, Shintani Y, Azuma H, Matsumoto T. Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and elicits vascular endothelial dysfunction. *Circ Res* 92:81-7, 2003
- 2) Wolfrum S, Jensen KS, Liao JK. Endothelium-dependent effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:729-736, 2003

大量ステロイド薬による血管内皮細胞障害に対する CNP の制御機構

田中良哉、岡田洋右、谷川隆久、廣瀬暁子（産業医科大学医学部第一内科学講座）

特発性大腿骨頭壊死症 (IONF) の発症には血管障害の関与があることが示唆されている。高濃度の糖質コルチコイド (GC) は内皮細胞の増殖活性抑制、G₂/M 期細胞減少、アポトーシスを誘導し血管障害を惹起することを解明した。さらにそのアポトーシス誘導の機序として Bax 発現誘導、Bcl-2 発現低下による caspase-9、3/7 の誘導が関与することを明らかにした。一方、内皮細胞保護作用が報告されている C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) は、高濃度 GC により誘導されたアポトーシスを制御し、その機序として PI3K を介した Bax/Bcl-2 の imbalance 是正が関与することが示唆された。以上より、IONF 発症には、ステロイドパルス療法などの高濃度 GC による内皮細胞アポトーシス誘導による血管障害が IONF 形成に関与するが、CNP はその内皮障害を制御し、IONF の治療・予防へ応用できる可能性が示唆された。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症 (ION) は、大腿骨頭の循環障害による骨梁及び骨髄の阻血性の無菌性壊死で、全身性エリテマトーデス (SLE) 等の膠原病疾患にしばしば併発する¹⁾。症例対照研究や疫学研究により、ステロイド薬が ION の発症要因の約 6 割を示すことが明らかになり、我々も、ステロイドパルス療法の後に ION が生じ易いことを報告してきた。

一方、ION の発症機序は不詳であるが、組織学的所見から、静脈系の循環障害に伴う組織の阻血状態と、阻血により齎される血管の再生或いは新生の遅延と障害が関与し、その結果、血管障害、組織壊死が生じると考えられている²⁾。我々も、組織阻血状態による細胞内酸素濃度低下によって誘導される転写因子 hypoxia-inducible factor (HIF)-1 の血管内皮細胞の細胞障害に於ける関与を報告してきた³⁾。

さらに、高濃度の糖質コルチコイドによる血管障害の可能性が、我々を含めた複数の施設から報告されるが、ステロイド薬が骨頭の阻血状態を引き起こす機序は十分に解明されておらず、さらには、骨頭壊死の予防・治療は全く確立されていない。平成 18 年度は、高濃度ステロイド薬による血管内皮細胞でのアポトーシス誘導機構を解明するとともに、虚血状態における血管内皮障害を抑制することが報告されているナトリウム利尿ペプチドの一つである CNP (C-type natriuretic peptide) による高濃度ステロイド薬により惹起される血管内皮細胞障

害に対する血管障害予防効果およびその作用機序についても検討した。

2. 研究方法

血管内皮細胞として、臍帯静脈由来内皮細胞 (HUVEC) を用いた。糖質コルチコイド (ステロイド薬) としては、メチルプレドニゾロン (m-PSL) を使用した。細胞増殖は、TetraColor One を用いて吸光度計で測定した。細胞周期は propidium iodide (PI) 染色後、フローサイトメリーで検出した。細胞のアポトーシスは、PI 染色及び annexin V/PI 染色後のフローサイトメリーにより検出した。caspase-3/7、9 活性については、ルミノメーターで検出した。p21、Bax、bcl-2 等の細胞質内蛋白質は細胞をホルマリン及びサポニンで処理後に抗体で染色しフローサイトメリーで検出した。

(倫理面への配慮)

特に該当せず。

3. 研究結果

血管内皮細胞 (HUVEC) に、ステロイドパルス療法で到達する血中濃度に該当するメチルプレドニゾロン (m-PSL) 100 μ g/ml を添加し、以下の結果を得た。

- 1) 高濃度 m-PSL は、HUVEC 細胞内での p21 の発現を著明に増強させた (フローサイトメータ)。
- 2) 高濃度 m-PSL は、細胞周期の G₀/G₁ arrest を誘

導した(Pi 染色)。

- 3) 高濃度 m-PSL は、早期アポトーシス細胞を著明に誘導した(Pi/annexin V 染色)。
- 4) 高濃度 m-PSL は、Bax の細胞内発現を著明に増強させた。
- 5) 高濃度 m-PSL は、caspase-3/7、9 活性を増強させた(ルミノメーター)。
- 6) CNP (100pg/ml) は、高濃度 m-PSL により惹起された p21 発現を低下させ、G0/G1 arrest を抑制した。
- 7) CNP は、高濃度 m-PSL により惹起された Bax 発現増強を抑制した。
- 8) CNP は、bcl-2 発現を増強させた。
- 9) CNP は高濃度 m-PSL により誘導された caspase-3/7、9 の活性を低下させ、アポトーシスを抑制した。

以上より、臨床で汎用されるステロイドパルス療法に代表されるような高濃度 m-PSL は、血管内皮細胞の増殖活性抑制、G0/G1 arrest、アポトーシスを誘導し、その機序として Bax 発現誘導による caspase-9、3/7 の誘導が関与することが明らかとなった。一方、CNP は高濃度 m-PSL により惹起された内皮細胞の細胞周期停止やアポトーシスを抑制した。

以上の結果より、CNP は高濃度 m-PSL により齎される ION 形成原因と推測されている血管内皮細胞障害を予防できる可能性が示唆された。

4. 考察

ION の発症過程に於いては、大腿骨頭における血行の途絶、あるいは虚血に起因する血管障害が関与すると考えられている。また、我々は、SLE 症例において ION を発症した全症例においてステロイドパルス療法の既往があった事を報告し、高濃度ステロイド薬による血管障害の関与を臨床的に示してきた。しかし、ステロイド薬投与患者における ION 発症機序については現在まで不明であった。

今回の結果より、ステロイドパルス療法で到達する濃度では、血管内皮細胞の p21 の発現増強などを介して細胞周期を停止し、Bax 発現増強による caspase-9、3/7 誘導によりアポトーシスが惹起される機序が明らかとなった。

一方、ION の発症過程では、静脈系循環障害に伴う組織阻血状態と血管再生や新生の障害により壊死が生じるとされており、阻血組織の病態や再生において血

管系は重要な役割を担う⁴⁾。現在まで様々な増殖因子、抗凝固薬等が試行されているが、明確に IONF 発症を予防することができた治療法はないのが現状である。

今回検討したナトリウム利尿ペプチドファミリーの一つである CNP は、脳、血管内皮細胞から分泌され、血管平滑筋細胞の増殖抑制、血管弛緩作用を持ち合わせているため、抗動脈硬化作用を期待されているペプチドである。また、近年、ウサギを用いた大動脈バルーン障害モデルにおいて、CNP 遺伝子導入による虚血誘導血管内皮細胞の再生促進、大動脈結紮後血管再生モデルにおける CNP による血管再生促進等が報告され、CNP による血管内皮再生作用も注目されている^{5,6)}。今回、高濃度 m-PSL によって誘導された血管内皮細胞のアポトーシスを、CNP を前投与し Bax/Bcl-2 の不均衡を是正することにより制御できる機序が解明された。これまでに、CNP 遺伝子導入により血管再生の促進、ICAM-1、VCAM-1 発現抑制、マクロファージ浸潤減少、NO 産生亢進等の作用も報告されており、血管調節のみならず血管構築をも制御し、抗炎症作用を発揮し、血管障害における予防・治療に応用できる可能性が示唆されている。現在、CNP は臨床試験段階にあり、将来的には、ステロイドパルス療法時に CNP の予防投与等を行うことにより、ION に於ける血管障害を制御できる可能性も考えられた。

5. 結論

高濃度ステロイド薬は内皮細胞のアポトーシス誘導による血管障害を介して ION 形成に関与し、CNP は高濃度ステロイド薬による血管内皮障害を制御することが可能であることが示唆され、ION への治療、予防という治療応用への可能性が示唆された。

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kishikawa H, Mine S, Kawahara C, Tabata T, Hirose A, Okada Y, Tanaka Y. Glycated albumin and cross-linking of CD44 induce scavenger receptor expression and uptake of oxidized LDL in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* (2006) 339: 846-851
- 2) Hurley MM, Okada Y, Xiao L, Tanaka Y, Ito M, Okimoto N, Nakamura T, Rosen CJ, Doetschman T, Coffin JD. Impaired bone anabolic response to parathyroid hormone in Fgf2^{-/-} and Fgf2^{+/-} mice.

- Biochem Biophys Res Commun* (2006) 341:989-994
- 3) Mine S, Okada Y, Tanikawa T, Kawahara C, Tabata T, Tanaka Y. Increased monocyte CCR2 expression and MCP-1 in patients with diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun* (2006) 344: 780-785
 - 4) Tsukamoto H, Nagafuji K, Horiuchi T, Miyamoto T, Aoki K, Takase K, Henzan H, Himeji D, Koyama T, Miyake K, Inoue Y, Nakashima H, Otsuka T, Tanaka Y, Nagasawa K, Harada M. A phase I-II trial of autologous peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of refractory autoimmune disease. *Ann Rheum Dis* (2006) 65: 508-514
 - 5) Wang B, Tsukada J, Higashi T, Mizobe T, Matsuura A, Mouri F, Sawamukai N, Ra C, Tanaka Y. Growth suppression of human mast cells expressing constitutively active c-kit receptors by JNK inhibitor SP600125. *Genes Cells* (2006) 11, 983-992
 - 6) Nakano K, Saito K, Mine S, Matsushida S, Tanaka Y. CD44 signaling up-regulates Fas Ligand expression on T cells leading to activation-induced cell death. *Apoptosis* (in press)
 - 7) Tsujimura S, Saito K, Kohno K, Tanaka Y. Fragmented hyaluronan induces transcriptional up-regulation of the multidrug resistance-1 gene in CD4+ T cells. *J Biol Chem* (in press)
 - 8) Mine S, Okada Y, Kawahara C, Tabata T, Tanaka Y. Serum hyaluronan concentration as a marker of angiopathy in patients with diabetes mellitus. *Endocrine J* (in press)
 - 9) Nakano K, Okada Y, Saito K, Tanikawa R, Sawamukai N, Sasaguri Y, Kohro T, Wada Y, Kodama T, Tanaka Y. Rheumatoid synovial endothelial cells produce macrophage-colony stimulating factor leading to osteoclastogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* (in press)
 - 10) Tokunaga M, Saito K, Kawabata D, Imura Y, Fujii T, Nakayamada S, Tsujimura S, Nawata M, Iwata S, Azuma T, Mimori T, Tanaka Y. Efficacy of rituximab (anti-CD20) for refractory systemic lupus erythematosus involving the central nervous system. *Ann Rheum Dis* (in press)
- 1) 田中良哉: TNF 阻害療法による関節リウマチ治療の新展開. 第 106 回中部日本整形外科学会災害外科学会学術集会(教育講演), 大阪, 2006.4.7-8.
 - 2) 田中良哉: 関節リウマチの早期治療戦略. 第 79 回日本整形外科学会学術総会(三四郎セミナー特別講演), 横浜, 2006.5.18-21
 - 3) 田中良哉: オーバービュー ～免疫系と骨代謝系の普遍性～. 第 24 回骨代謝学会学術集会(シンポジウム), 東京, 2006.7.6-8
 - 4) 田中良哉: 全身性エリテマトーデス. 第 27 回日本炎症・再生学会(シンポジウム), 東京, 2006.7.11-12
 - 5) 田中良哉: 自己免疫疾患に伴う全身の臓器障害とその克服. 第 34 回日本臨床免疫学会総会(シンポジウム), 東京, 2006.10.1-2
- 7. 知的所有権の取得状況**
1. 特許の取得
Fas 抗原発現増強剤(特許出願番号: 特開 2003-171282)
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし
- 8. 参考文献**
- 1) Mankin HJ. Nontraumatic necrosis of bone (Osteonecrosis). *N Engl J Med* (1993) 326:1473-1479
 - 2) Bejar J, Peled E, Boss JH. Vasculature deprivation--induced osteonecrosis of the rat femoral head as a model for therapeutic trials. *Theor Biol Med Model* (2005) 2:24
 - 3) Iida T, Mine S, Fujimoto H, Suzuki K, Minami Y, Tanaka T. Hypoxia-inducible factor-1 α induces cell cycle arrest of endothelial cells. *Genes Cells* (2002) 7: 143-149
 - 4) Drescher W, Schneider T, Becker C, Hobolth J, Ruther W, Hansen ES, Bunger C. Selective reduction of bone blood flow by short-term treatment with high-dose methylprednisolone. An experimental study in pigs. *J Bone Joint Surg Br* (2001) 83: 274-277
 - 5) Doi K, Ikeda T, Itoh H, Ueyama K, Hosoda K,

2. 学会発表

Ogawa Y, Yamashita J, Chun TH, Inoue M, Masatsugu K, Sawada N, Fukunaga Y, Saito T, Sone M, Yamahara K, Kook H, Komeda M, Ueda M, Nakao K. C-type natriuretic peptide induces redifferentiation of vascular smooth muscle cells with accelerated reendothelialization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2001) 21: 930-936

- 6) Ohno N, Itoh H, Ikeda T, Ueyama K, Yamahara K, Doi K, Yamashita J, Inoue M, Masatsugu K, Sawada N, Fukunaga Y, Sakaguchi S, Sone M, Yurugi T, Kook H, Komeda M, Nakano K. Accelerated reendothelialization with suppressed thrombogenic property and neointimal hyperplasia of rabbit jugular vein grafts by adenovirus-mediated gene transfer of C-type natriuretic peptide. *Circulation* (2002) 105: 1623-1626

IONにおける脂肪細胞の役割に関する研究

第7報;ステロイド投与下での骨髄内脂肪細胞の反応

重松正森、佛淵孝夫（佐賀大学医学部 整形外科）

特発性大腿骨頭壊死症発生機序の一因として、脂質代謝異常、脂肪細胞肥大等による圧上昇、脂肪塞栓など脂肪細胞との関与が提唱されている。これまで我々は骨髄培養により、ヒト骨髄内脂肪細胞とステロイドとの関連を調査、報告してきた。今回は走査型電子顕微鏡を用いた骨髄内成熟脂肪細胞の表面変化について報告する。注目すべき所見として、アポトーシス現象と脂肪細胞表面に多数の微細な脂肪滴出現が認められた。ヒト骨髄内では高濃度のステロイドにより、未熟脂肪細胞及び単胞性脂肪細胞の増加、脂肪細胞径の増大などの他に、アポトーシスの誘導および脂肪滴の細胞外過剰析出の可能性が示唆され、IONの発生に何らかの関与をしているのではないかと考えられた。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症の発生機序については様々な説が唱えられており、近年は脂質代謝や脂肪細胞の関与も注目されている。

これまで我々はヒト骨髄内脂肪細胞を培養し、投与されるステロイドの濃度により反応が異なることを報告してきたが、加えて脂肪細胞のアポトーシス誘導についての研究にも着手した。

現在、特発性大腿骨頭壊死症とアポトーシスの関係が注目され、ネクローシス(壊死)なのかアポトーシスであるのか意見の分かれるところである。一般に脂肪細胞のアポトーシスの確認は困難とされており、その理由は脂肪細胞が他の細胞と比較して体積が大きく、核が偏在しているため切片に現れることが非常に少ないことが挙げられる。2001年、Ogawaらはリンパ球を用いてアポトーシスを細胞表面から判断する方法を発表した。これによるとアポトーシスの特徴として2点が挙げられる。1点は細胞表面の陥凹であり、もう1点は細胞表面の膜形成である。

今回の研究目的は、1) 組織培養を行ない、ステロイド投与による骨髄内成熟脂肪細胞の表面の形態変化を調査すること、2) 脂肪細胞のアポトーシス検出方法を確認することである。

2. 研究方法

対象は、当科にて人工股関節置換術(以下 THA)を行った変形性股関節症(OA)症例である。デキサメタゾン(DEX)は $10^{-7}M$ 、 $10^{-5}M$ の濃度になるよう投与した。

1 クジラ脂肪細胞

一般に脂肪細胞はアポトーシスは非常に生じにくい。鯨の脂肪細胞はアポトーシスが比較的多いことが知られているため、日本鯨研究所に依頼し、8頭の内臓脂肪および皮下脂肪細胞を入手した。観察方法は後述するヒト脂肪細胞の観察に準じた。

2 ヒト脂肪細胞

実験方法としては、人工股関節全置換術(THA)手術時に骨髄組織および皮下脂肪組織を採取し、これを均等な大きさとし、培養液中で培養後、走査型電子顕微鏡にて観察した。

(倫理面への配慮)

研究の趣旨を説明した文書を作成した。骨髄内組織は普段は廃棄されるものである点、プライバシーは守られる点、拒否しても不利益は生じない点などを文書化した。術前説明の際、承諾を得た。

3. 研究結果

1 クジラ脂肪細胞

電子顕微鏡で観察すると、陥凹を示す脂肪細胞と嚢形成を示す脂肪細胞を認めた。その率は1%未満であった。この部位を切片にすると、apoptotic body を認め、また Tunnel 染色や short stranded DNAも陽性であった。これらの事よりこの所見を示す細胞はアポトーシスを起こしていることが再確認できた。(図1、2)

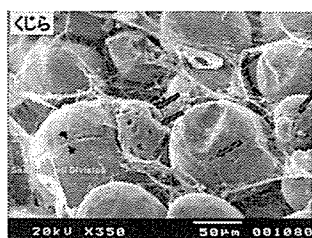


図1

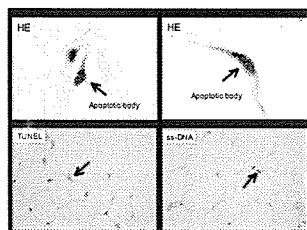
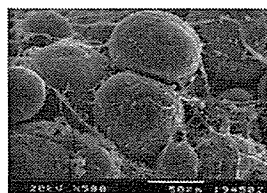


図2

2 ヒト脂肪細胞

培養前の骨髓内成熟脂肪細胞の表面は平滑であり細胞間隙は線維成分で占められていた(図3)。

ステロイド投与群では早期から(投与群:約3日目、非投与群:約7日目)周囲に脂肪滴をもった fibroblast like cell が増殖し、徐々に細胞間隙を占拠する像が認められた(図4)。これらは OIL RED O 染色で赤染することを確認した。脂肪滴の数はステロイド投与群により多く、脂肪滴の径はステロイド投与群(1.5~3.0 μm)がステロイド非投与群(0.5~1.5 μm)の約2倍であった。



培養前 細胞表面形態

図3

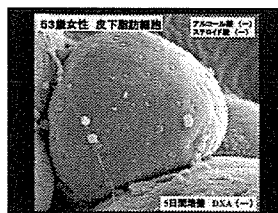
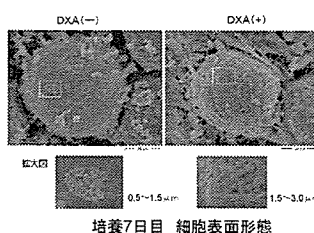


図4

図4 53歳女性。皮下脂肪細胞。明らかな所見は認めない。

アポトーシスに関しては、鯨脂肪細胞と同様の所見を認めた。しかし、現時点ではこれらの所見を示すものは DXA 10⁻⁵ M の高濃度ステロイド投与下だけであった。(図5、6、7)



培養7日目 細胞表面形態

図5

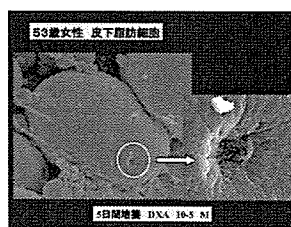


図6

図6 53歳女性(同上)。皮下脂肪細胞。DXA 10⁻⁵ M の濃度で細胞表面の陥凹像を認める。

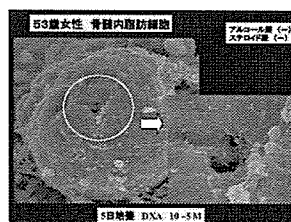


図7

図7 53歳女性(同上)。皮下脂肪細胞。DXA 10⁻⁵ M の濃度で細胞表面の陥凹像を認める。

4. 考察

本研究の発見として成熟脂肪細胞のアポトーシス現象と細胞表面に出現する微細な脂肪滴がある。これはステロイド投与群、非投与群の間に明らかな相違を認めた。どちらの現象も通常の病理組織検査では捉えることができないため注目されてこなかったものと考えられる。これまで大腿骨頭「壊死」、つまり「ネクロシス」とされていたものが、実は「アポトーシス」

であれば、諸家の今後の研究に大きな影響を与えることになると思われる。これら微細な脂肪滴が骨髓内に留まるなら低比重のため骨頭荷重部に集まり、何らかの作用を起こすという仮説、血管内流入による脂肪塞栓説とも関連付けられるかもしれない。また、これらの変化が骨髓のみならず皮下、内臓内の脂肪にも起こるとすれば、現在注目されている脂質代謝異常と深く関わる所見である。

5. 結論

- 1 脂肪細胞のアポトーシス検出法を確立した。
- 2 高濃度ステロイド投与下で、アポトーシス出現を認めた。
- 3 ステロイド非投与下ではアポトーシスは未だ検出していない。
- 4 成熟脂肪細胞の表面には微小の脂肪滴が多数確認された。
- 5 ステロイド投与により骨髄内脂肪細胞表面に多数の微細な脂肪滴産生を認めた。

6. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 - 1) 北島将、重松正森、小河賢司、肥後たかみ、杉原甫、佛淵孝夫: 大腿骨頭壊死の発生機序—ヒト未分化間葉系細胞のステロイドに対する反応、日本整形外科学会基礎学術集会、2004.

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

8. 参考文献

- 1) Ogawa K: High-resorption scanning electron microscopic evaluation of cell-membrane porosity by ultrasound. Med Electron Microsc. 2001 Dec;34(4):249-53.
- 2) Chang CJ, Shih WL, Yu FL, Liao MH, Liu HJ: Apoptosis induced by bovine ephemeral

日本白色家兎に対する酸化ストレス誘発剤を用いた骨壊死誘発

三秋恒平、兼氏 歩、市堰 徹、杉森端三、北村憲司、福井清数、松本忠美
(金沢医科大学 整形外科)

当科ではラットに酸化ストレス剤を投与することによって骨壊死が発生することを報告した。今回我々は同様に酸化ストレス誘発剤を投与することによって日本白色家兎に骨壊死が発生するかどうかを検討した。10羽で検討を行い、現在結果が出ているのは8羽であるが、3羽に骨壊死を認め、発生部位はステロイド性骨壊死の好発部位であった。また10羽全羽に高脂血症は呈していなかった。酸化ストレスが骨壊死発生に大きな関与を及ぼしていると考えた。

1. 研究目的

家兎大腿骨の血管内皮増殖因子(VEGF)やVEGF-mRNAの発現より虚血発作は、ステロイド投与後3日前後で生じることが報告されており¹⁾、また生体内酸化ストレスも、ステロイド投与後3~5日で大腿骨内で発生することが報告されている²⁾。我々はステロイド投与家兎に抗酸化剤である還元型グルタチオン(以下GSH)を投与することによって骨壊死発生が有意に抑制できることを報告した²⁻³⁾。また逆に、ラットに酸化ストレス誘発剤を投与することによって大腿骨頭に壊死を作製することに成功した⁴⁾。以上のことから酸化ストレスが骨壊死発生の原因である可能性が高いと考えてきた。

そこで、これまでステロイド性骨壊死モデルで使用してきた家兎においても酸化ストレス誘発剤を投与することで骨壊死が発生するか、またステロイド性骨壊死と同部位に発生するかを検討した。

2. 研究方法

体重約3.5kgの雌性日本白色家兎に酸化ストレス誘発剤であるButhionine-Sulfoximine(以下、BSO)500mg/kgを14日間連日静脈投与した10羽をBSO群、コントロールとして生食を14日間連日静脈投与した10羽をCTR群とした。投与開始前、投与開始5日目、14日目に採血を行い、14日目に犠牲死させ両側の大腿骨を摘出した。

病理組織学的検討としてH-E染色標本にて大腿骨近位骨幹部における骨壊死発生の有無について

検討した。骨壊死の定義は、病理組織学的定義に基づき判定した⁵⁾。血液生化学的検査は、抗酸化の指標として還元型グルタチオン(以下GSH)を、脂質系の指標として総コレステロール(以下T-cho)、トリグリセライド(以下TG)を測定した。

本研究のプロトコールは、金沢医科大学動物実験の指針に基づいて行った。

3. 研究結果

CTR群では、10羽全例で骨壊死を認めなかった。BSO群は、10羽中現在結果が出ているの8羽であるが、8羽中3羽にステロイド性骨壊死の好発部位である大腿骨近位骨幹部に骨壊死を認めた(図1)。

採血結果に関して、GSHはBSO群において5日目の値は注射前の値と比較して著明に低下しており、14日目の値は若干回復していた。これはラットで行った壊死誘発実験⁴⁾とほぼ同様な結果であり、また両群間で統計学的に有意差を認めた($p < 0.05$)(図2)。T-choとTGに関しては、ともに値の上昇を認めず、また両群間で統計学的に有意差はなく(図3、図4)脂質代謝異常は生じていないと考えられた。

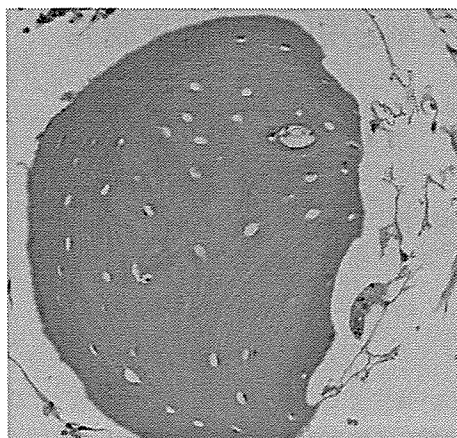


図 1:BSO 群

Empty lacunae を認める

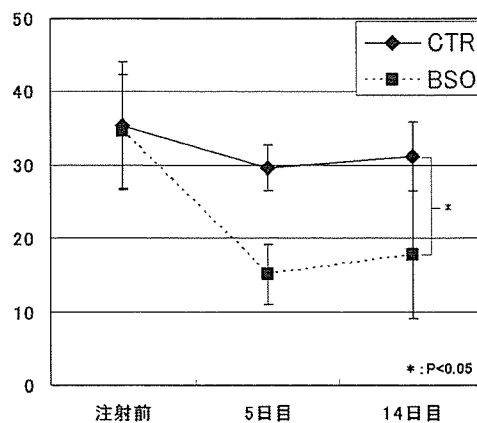


図 2:GSH

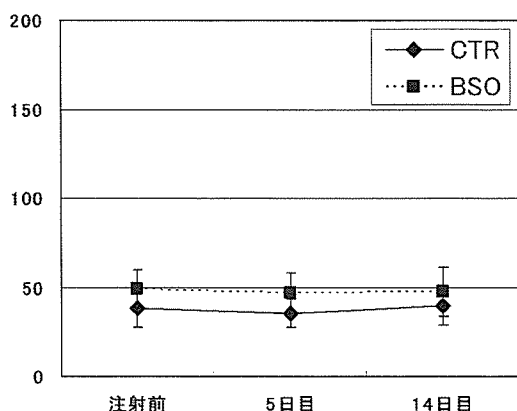


図 3:T-cho

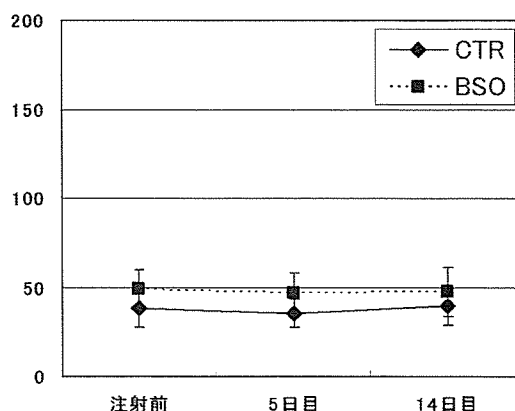


図 4:TG

4. 考察

ステロイド投与家兎で大腿骨の虚血発作は投与後3～5日と早期に生じている¹⁾。これまでの研究で、脂肪塞栓は8～14日後に⁶⁾、静脈還流障害は4週後に生じた報告があるが⁷⁾、ステロイド投与後3～5日で虚血発作が生じていることを考慮すると、これらの説は壊死の原因ではなく壊死の結果生じた現象であったと考えられる。また当科では、抗凝固剤の投与で骨壊死を抑制できなかったことを報告しており⁸⁾、壊死の原因としてこれらの説は考えにくい。

これまでの当科の研究においてステロイド投与家兎は、ステロイド投与後3～5日に酸化ストレスが発生していたこと、抗酸化剤投与で壊死を有意に抑制したことより酸化ストレスが壊死発生に関与すると考えた。

また、ステロイド以外に壊死を誘発する実験を行い、酸化ストレス誘発剤の投与によりラットのみでなく今回家兎でも3羽、ステロイド性骨壊死と同部位に骨壊死

を誘発した。また、いずれの動物もGSHは有意な低下を示したものの、T-cho、TGは高値を示さなかったことより、酸化ストレスが脂質代謝系を介さず直接壊死発生の原因である可能性が非常に高いと考えた。

5. 結論

酸化ストレス誘発剤投与の家兎8羽中3羽に骨壊死を認め、骨壊死発生部位はステロイド性骨壊死と同部位であった。生体内酸化ストレスが骨壊死発生の重要な原因であると考えた。

6. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

三秋恒平, 兼氏 歩, 市堰 徹, 北村憲司, 杉森端三, 福井清数, 松本忠美: 日本白色家兎に対する酸化ストレス誘発剤を用いた骨壊死誘発,

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

8. 参考文献

- 1) 柳下信一. ステロイド投与家兎骨壊死モデルにおける骨内の血管内皮増殖因子の発現について. 金沢大学十全医学会雑誌 115:10-20, 2006
- 2) Ichiseki T, Matsumoto T, Nishino M, Kaneuji A, Katsuda S. Oxidative stress and Vascular permeability in steroid-induced osteonecrosis model. J Orthop Sci. 9:509-15, 2004
- 3) 北村憲司. 常用量のグルタチオンによるステロイド性骨壊死の抑制効果の検討. 金沢医科大学雑誌 30:245-52, 2005
- 4) Ichiseki T, Ueda Y, Katsuda S, Kitamura K, Kaneuji A, Matsumoto T. Oxidative stress by glutathione depletion induces osteonecrosis in rats. Rheumatology(Oxford). 45:287-90, 2006
- 5) Yamamoto T, Iriya T, Sugioka T, Sueishi K. Effect of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissue: Corticosteroid-Induced Osteonecrosis in Rabbits. Arthritis Rheum. 40:2055-64, 1997
- 6) Fukui K, Kominami R, Shinohara H, Matsumoto T. Glucocorticoid Induces Micro-Fat Embolism in the Rabbits: A Scanning Electron Microscopic Study. J Orthop Res. 24:675-83, 2006
- 7) 西村立也. ステロイド投与家兎における静脈病変 -ステロイド性大腿骨頭症の病因病態に注目して-. 金沢大学十全医学会雑誌 104:121-31, 1995
- 8) 二見智子. ステロイド性骨壊死モデルにおける末梢血流改善薬および抗凝固薬の効果についての検討. 金沢医科大学雑誌 26:186-97, 2001

マウス骨壊死モデルの開発とその解析

田中 栄
大熊千晶、懸田健史

(東京大学医学部附属病院 整形外科)
(順天堂大学医学部 整形外科)

マウス尾部結紮・再還流を用いた簡便な骨壊死モデルを開発した。このモデルにおいては結紮8時間後に再還流を行うことによって、再還流7日目から結紮遠位部で骨細胞のアポトーシスが観察され、14日目には empty lacunae が観察された。一方結紮近位部の骨細胞には異常は認められなかった。本モデルは骨壊死のメカニズムとして阻血・再還流の可能性を示唆し、骨壊死の分子メカニズムの解明に役立つと考えられる。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死 (Idiopathic Osteonecrosis of the femoral head, ION) は壮年期成人に好発し、その罹患によって股関節が破壊され、起立歩行障害により QOL が著しく侵される疾患である。その真の原因は明らかではないが、主たるリスクファクターとしては、ステロイド剤の投与、アルコール愛飲などがあげられており、このような背景因子の元に、何らかの原因で大腿骨頭部の阻血が生じ、骨細胞の壊死が生じるものと考えられている。しかしながら阻血から骨細胞壊死に至る分子メカニズムは不明なままであり、そのことが疾患の有効な予防法、治療法の開発を困難なものにしている。

このような病態を解析するためには適当な動物モデルの開発がきわめて重要である。これまでにウサギを用いたステロイド骨壊死モデルが広く使われており、これによって多くの重要な知見が得られてきた。しかしながら骨壊死のメカニズムをさらに詳細に検討するためには、分子生物学的改変が容易であり、すべてのゲノムが明らかにされているマウスのモデルを作成することは、多くのメリットを有すると考えられる。われわれは本研究班において、マウス尾部結紮・再還流による簡便なマウス骨壊死モデルを作成した。本研究報告書ではその詳細について解説する。

2. 研究方法

1) マウス尾部結紮モデル

8週齢の ddy マウスを使用し、尾部を巻きワイヤーで

結紮し、2, 4, 8時間後に結紮を解除する。血流再開後、7日後に結紮部の近位、遠位部の尾椎を採取、ホルマリン固定を行い、EDTA 脱灰後、組織学的検討に供した。骨細胞アポトーシスは TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) 染色によって検討した。コントロールとしては結紮直後に sacrifice したものの、および結紮の近位部の骨組織を用いた。また結紮近位部および遠位部における遺伝子発現を real time PCR や PCR array によって検討した。

2) マウス尾部切断モデル

やはり8週齢のマウスの尾部を切断し、これを乾燥させないように湿潤な環境に保ち、2, 4, 8, 24時間後にホルマリン固定し、EDTA 脱灰後に組織学的に検討した。コントロールとしては切断直後に固定した組織を用いた。

3) 発現遺伝子の検討

マウス尾部結紮モデルを用い、結紮近位部および遠位部骨組織の RNA を抽出し、PCR array を用いて発現遺伝子を比較検討した。

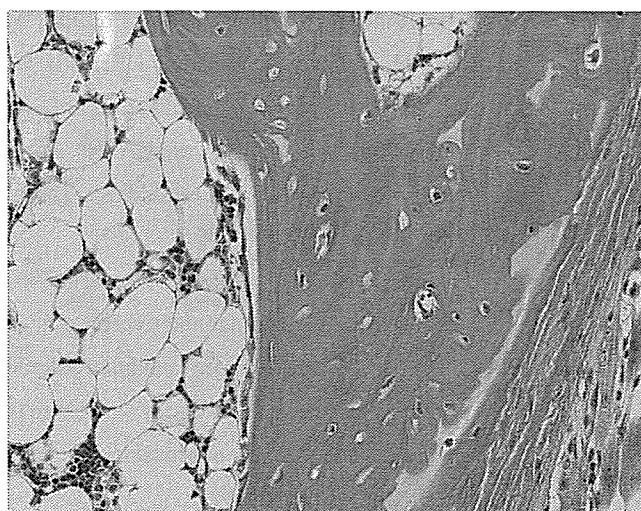
3. 研究結果

結紮モデルにおいて、2時間、4時間阻血の尾椎ではほとんど組織学的な異常は認められなかったが、8時間阻血尾椎では阻血遠位において empty lacunae の出現が認められた。また TUNEL 染色において陽性に染色される骨細胞の出現が認められた。一方結紮部の近位ではほとんど TUNEL 陽性細胞は

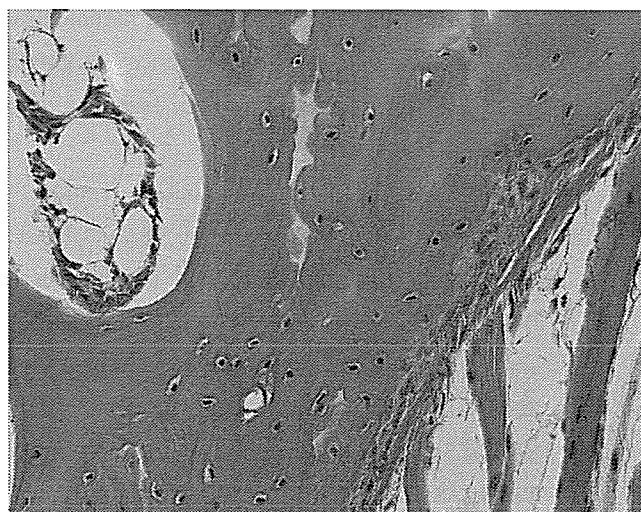
認めず、empty lacunae も認めなかった(図1)。

尾部切断モデルにおいては24時間後も明らかな empty lacunae の出現は認めなかったが、TUNEL 陽性細胞は多数観察された。マウス尾部結紮 8 時間後に再還流を行ったところ、再還流後 7 日目からアポトーシス陽性の骨細胞の出現が認められた。また再還流後 14 日目には多数の empty lacunae が(図1)、28 日目には旺盛な骨新生が認められ、ヒト ION の特徴的な組織像と一致した(図2)。再還流後 7 日目に結紮遠位で RANKL の発現上昇が認められ、14 日目、28 日目には破骨細胞数の増加が認められた。

PCR array を用いて結紮近位部および遠位部の発現遺伝子を比較検討したところ、p53, TRAIL receptor 遺伝子の発現が結紮遠位部で上昇していることが明らかになった。



結紮近位部



結紮遠位部

図1: 結紮・再還流後14日目の組織像。結紮遠位部で多数のempty lacunaeが観察される。



図2: 結紮・再還流後28日目の組織像。結紮遠位部で旺盛な骨新生が観察される。

4. 考察

細胞死には大きく分けて「ネクローシス」と「アポトーシス」という二つの形態が存在することが知られている。「ネクローシス」という言葉は外的な要因で細胞が死に至る過程を指しており、細胞質や細胞小器官(特にミトコンドリア)の崩壊が主であり、細胞核にはあまり変化が起こらないのが特徴である。一方の「アポトーシス」は細胞にプログラムされた死のことであり、細胞核の変化(DNAの断裂)が主であり、細胞質や細胞小器官(ミトコンドリアなど)にはあまり変化がない。ION の定義はあくまで臨床的なものであり、厳密な定義で細胞の「ネクローシス」が起こっていることを意味する訳ではない。実際に Manolagas らのグループは、ION における骨壊死に骨は骨細胞のアポトーシスが関与している可能性を示している。

本研究班においてわれわれは、「背景となるファクターがいかなるものであれ、ION の本体は大腿骨頭部の阻血であり、阻血によって誘導される骨・骨髄細胞へのダメージである」との仮説に基づき、確実に阻血時間、阻血の程度がコントロールできる骨壊死動物モデルの作成を試みた。また動物種としてマウスを選択することによって様々な遺伝子改変動物の利用、ゲノム情報の利用が可能になることが期待された。尾部結紮モデル、尾部切断モデルともに阻血の誘導は確実であり、阻血、あるいは再環流の時間も厳密にコントロールが可能である。

血流の遮断とそれに引き続く再還流による組織障害は ischemia reperfusion injury として脳、肺、腎臓、腸管などさまざまな臓器で報告されている。われわれが開発した尾部結紮再還流モデルにおいてはマウス

の尾部の8時間結紮し、その後血流を再開するという方法によって、結紮尾部に確実に虚血・再還流を起こすことが可能である。再還流後7日目からアポトーシスに陥った骨細胞の数が増加し、14日目には多数の empty lacunae が、そして28日目には骨細胞壊死部において旺盛な新生骨の形成が認められる。このモデルを用いることによって骨細胞が壊死に陥る際に変動する遺伝子の検索が可能である。われわれはPCR arrayを用いて結紮近位部、遠位部の発現遺伝子を比較検討した。その結果アポトーシス関連遺伝子として p53, TRAIL receptor の発現が結紮遠位部で上昇していることが明らかになった。TRAIL receptor の発現は p53 によって調節されることが知られており、阻血・再還流による p53 遺伝子の発現誘導が骨細胞アポトーシスに関与している可能性が示された。今後 p53 遺伝子ノックアウトマウスを用いた検討、臨床例の検討によって骨壊死の本質が明らかになることが期待される。

5. 結論

マウス尾部結紮・再還流を用いた簡便な骨壊死モデルを開発した。本モデルは骨壊死のメカニズムとして阻血・再還流の可能性を示唆し、骨壊死の分子メカニズムの解明に役立つと考えられる。

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Seto H, Kamekura S, Miura T, Yamamoto A, Chikuda H, Ogata T, Hiraoka H, Oda H, Nakamura K, Kurosawa H, Chung U, Kawaguchi H, Tanaka S. Distinct Role of Smad Pathways and p38 Pathways in Cartilage-specific Gene Expression in Synovial Fibroblasts. *J Clin Invest* 2004, 113, 718-726.
- 2) Setoguchi K, Misaki Y, Kawahata K, Shimada K, Juji T, Tanaka S, Oda H, Shukunami C, Nishizaki Y, Hiraki Y, Yamamoto K. Chondromodulin-I, a cartilage-derived angiogenesis inhibitory factor, suppresses T cell response; an implication of a therapeutic potential for the treatment of arthritis. *Arthritis Rheum* 2004, 50, 828-839.
- 3) Ikeda F, Nishimura R, Matsubara T, Tanaka S, Inoue J, Reddy SV, Hata K, Yamashita K, Hiraga

T, Watanabe T, Kukita T, Yoshioka K, Rao A, Yoneda T. Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. *J Clin Invest* 2004, 114:475-484.

- 4) Kwak HB, Lee SW, Jin HM, Ha H, Lee SH, Takeshita S, Tanaka S, Kim HM, Kim HH, Lee ZH. Monokine induced by interferon-gamma is induced by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and involved in osteoclast adhesion and migration. *Blood*. 2005, 105: 2963-2969.
- 5) Fukuda A, Hikita A, Wakeyama H, Akiyama T, Oda H, Nakamura K, Tanaka S. Regulation of osteoclast apoptosis and motility by small GTPase binding protein Rac1. *J Bone Miner Res* 2005, 20:2245-2253.
- 6) Hikita A, Kadono Y, Chikuda H, Fukuda A, Wakeyama H, Yasuda H, Nakamura K, Oda H, Miyazaki T, Tanaka S. Identification of an alternatively spliced variant of CAPRI as a possible regulator of RANKL shedding. *J Biol Chem* 2005, 280: 41700-41706.
- 7) Hu K, Yang J, Tanaka S, Gonias SL, Mars WM, Liu Y. Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression. *J Biol Chem* 2005, 281: 2120-2127.
- 8) Tanaka S, Takahashi N, Nakamura K, Suda, T. Role of RANKL in physiological and pathological bone resorption and therapeutics targeting RANKL-RANK signaling system. *Immunological Review* 2005, 108:30-49.
- 9) Fukui N, Ikeda Y, Ohnuki T, Hikita A, Tanaka S, Yamane S, Suzuki R, Sandell JL, Ochi T. Pro-inflammatory cytokine TNF-alpha induces BMP-2 in chondrocytes via mRNA stabilization and transcriptional up-regulation. *J Biol. Chem* 2006 Jul 11; [Epub ahead of print]
- 10) Yang CS, Lee JS, Song CH, Hur GM, Lee SJ, Tanaka S, Akira S, Paik TH, Jo EK. Protein kinase C zeta plays an essential role for Mycobacterium tuberculosis-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2

activation in monocytes/macrophages via Toll-like receptor 2. *Cell Microbiol.* 2006 Aug 22; [Epub ahead of print]

- 11) Hikita A, Yana I, Wakeyama H, Nakamura M, Kadono Y, Oshima Y, Nakamura K, Seiki M, Tanaka S. Negative Regulation of Osteoclastogenesis by Ectodomain Shedding of Receptor Activator of NF- κ B Ligand. *J Biol. Chem* 2006 Oct 3; [Epub ahead of print]
- 12) Kono SJ, Oshima Y, Hoshi K, Bonewald LF, Oda H, Nakamura K, Kawaguchi H, Tanaka S. Erk pathways negatively regulate matrix mineralization. *Bone.* 2006 Sep 13; [Epub ahead of print] 9. Tanaka S. Molecular mechanism of life and death of the osteoclast. *Int J Oral Biol* 2004, 29:121-126.
- 13) Ogata T, Yamamoto S, Nakamura K and Tanaka S. Signaling Axis in Proliferation and Differentiation of Schwann Cell. *Mol Neurobiol.* 2006, 33:51-62.
- 14) Miyazaki T, Tanaka S, Sanjay A, Baron R. The role of c-Src kinase in the regulation of osteoclast function. *Mod Rheumatol* 2006, 16:68-74.
- 15) Tanaka S, Miyazaki T, Fukuda A, Akiyama T, Kadono Y, Wakeyama H, Kono S, Hoshikawa S, Nakamura M, Ohshima Y, Hikita A, Nakamura K. Molecular mechanism of the life and death of the osteoclast. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1068:180-186.

2. 学会発表

- 1) 1st International conference on osteoimmunology: Interactions of the immune and skeletal systems (2006.5.28-6.2) Crete, Greek, Session I. Transcription factors and signals for the osteoimmune system: Part 1 "Regulation of ectodomain shedding of RANKL"
- 2) 2006 International Symposium of Dental Research Institute, Seoul National University (2006.9.29) Session I : Bone Biology "Regulation of chondrogenic differentiation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis"
- 3) 3rd IOF ASIA-PACIFIC REGIONAL

CONFERENCE ON OSTEOPOROSIS AND 16th ANNUAL MEETING OF THE ANZ BONE & MINERAL SOCIETY (2006.10.22-26) Port Douglas, Australia, "Signals in life and death of the osteoclast"

- 4) 田中 栄、大熊千晶 厚生労働省難治性疾患研究事業 骨・関節系調査研究班 特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会平成17年度 第2回 会議 研究成果報告会 (2005.12.3) 京都 「マウス骨壊死モデルの解析 第3報」
- 5) 第10回 骨代謝セミナー (2005.12.22) 東京 「関節リウマチにおける骨破壊のメカニズムと治療戦略」
- 6) 第6回 熊本骨折セミナー 学術講演会 (2006.1.7) 熊本 特別講演④「新しい骨粗鬆症治療薬とその作用機序」
- 7) 第9回 東北リウマチ医の会 (2006.1.22) 盛岡 特別講演「関節リウマチにおける骨破壊のメカニズム」
- 8) 第1回 岡山運動器疾患研究会 (2006.2.1) 岡山 特別講演「関節リウマチにおける骨破壊メカニズム」
- 9) 第10回 臨床応用を目指した三次元臓器造形研究会 (2006.2.4) 東京 「関節外科領域における3次元造形応用」
- 10) Stryker CAOS forum 2006 (2006.2.5) 京都 "TKA with navigation support"
- 11) Evista Web Conference (2006.2.16) 東京 「骨粗鬆症治療剤をどのように選択すべきか？」
- 12) 静岡東部脊椎・骨代謝カンファレンス (2006.2.23) 三島 特別講演「骨吸収抑制剤を中心とした新しい骨粗鬆症治療体系」
- 13) Medical Tribune 座談会 (2006.3.4) 札幌 「骨質からみた骨粗鬆症治療」
- 14) 第25回 城南・骨関節フォーラム (2006.3.11) 東京 「新しい骨粗鬆症の治療戦略」
- 15) 第10回 湘南産婦人科研修会 (2006.3.28) 茅ヶ崎 「骨吸収抑制剤を用いた骨粗鬆症の治療」
- 16) 焼津骨粗鬆症治療カンファレンス (2006.3.29) 焼津 「骨吸収抑制剤を中心とした新しい骨粗鬆症治療体系」
- 17) 第4回抗サイトカイン療法研究会 (2006.4.15) 岐阜 「関節リウマチにおける骨破壊メカニズムと治療戦略」

- 18) 第 79 回 日本整形外科学会 学術集会 (2006.5.18-21) 横浜 シンポジウム2 関節リウマチの診断と治療の新展開 「関節リウマチにおける関節破壊の分子メカニズム」
- 19) 佐賀県臨床整形外科医会 (2006.6.8) 佐賀 特別講演「骨吸収抑制剤を用いた骨粗鬆症の治療体系」
- 20) 日本医師会生涯教育講座 (2006.6.15) 骨粗鬆症をめぐる最近の話題「新しい骨粗鬆症治療薬とその作用機序」
- 21) 第 29 回 日本骨・関節感染症学会 (2006.6.17) 東京 主題1 人工関節感染の予防と対策 「可動型セメントスペーサーを用いた感染人工膝関節の二期的再置換術」
- 22) 第 24 回 日本骨代謝学会 学術集会 (2006.7.6-8) 東京 シンポジウム3 免疫と骨代謝の接点：基礎から臨床へ「Therapeutics modulating osteoclast biology- 抗 RANKL 療法などによる新展開 -」
- 23) 第 32 回 リウマチ中央教育研修会 (2006.7.22) 東京「関節リウマチの骨・軟骨破壊」
- 24) 運動器疾患/骨・関節フォーラム (2006.8.5) 岡山 講演2「骨折予防の観点に基づく最新の骨粗鬆症治療方針」
- 25) Bone & Joint Research Club～第3回 骨と関節の代謝調節を考える基礎の会～ (2006.9.30-10.1) かつさ 特別セッション:【基礎から臨床応用】「破骨細胞をターゲットにした関節リウマチ治療戦略」
- 26) 整形外科疾患学術講演会 (2006.10.4) 川崎 「関節リウマチにおける骨破壊メカニズム」
- 27) 第 107 回 中部日本整形外科災害外科・学術集会 (2006.10.7) うずしおセミナー5 「骨関節破壊を標的にした関節リウマチ治療戦略」
- 28) 第16回 日本小児リウマチ学会総会・学術集会 (2006.10.8) ランチョンセミナー2 「骨関節破壊を標的にした関節リウマチ治療戦略」
- 29) 港区医師会外科整形外科医会 学術講演会 (2006.10.11) 特別講演 「骨吸収抑制剤による骨粗鬆症治療」

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

8. 参考文献
なし

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
なし

ステロイド性骨壊死モデルにおける性差の検討 -第二報-

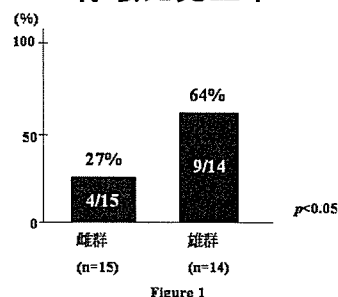
西田 顕二郎、山本卓明、池村 聡、神宮司誠也、岩本幸英 (九州大学整形外科)

ステロイド性骨壊死動物モデルでは、日本白色家兎の雄にメチルプレドニゾロン(以下 MPSSL) 20mg/kg を投与することで、約 7 割に骨壊死が発生すると報告されている。今回、ステロイド性骨壊死モデルにおける性差の影響を検討するため、28 週齢以上の日本白色雄家兎 14 羽、雌家兎 15 羽に MPSSL 20mg/kg の投与を行った。その結果、骨壊死発生率は、雄群は 64%(9/14 羽)であったのに対し、雌群では 27%(4/15 羽) と有意な壊死発生率の低下を認めた ($P < 0.05$)。

1. 研究目的

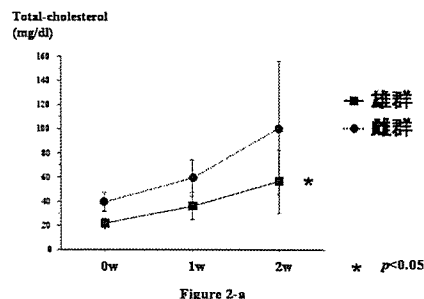
骨壊死動物モデルとして、今までに様々な種類のものが報告されている⁽¹⁻⁷⁾。しかし、それらのモデルでの雌雄は様々であり、同一モデルにおける骨壊死発生率の性差に関する報告はされていない。前回の班会議において我々は、preliminary な実験として日本白色雌家兎 6 羽に対し、20mg/kg の MPSSL を一回筋注投与したところ骨壊死発生率は 33%(2/6)であったと報告した。今回、実験数を増やし、ステロイド単独投与骨壊死モデルにおける性差の検討を行った。

骨壊死発生率



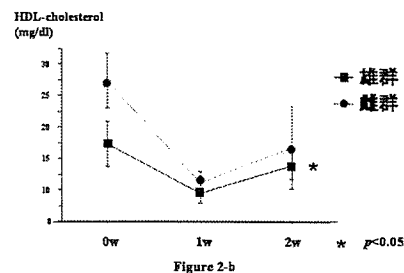
2. 研究方法

28 週齢以上の日本白色雄家兎 14 羽、雌家兎 15 羽に MPSSL 20mg/kg を一回右臀筋内に注射した。MPSSL 投与後 2 週で犠牲死とし、両大腿骨・上腕骨の近位 1/3 及び遠位部における骨壊死発生を病理学的に検討した。また、MPSSL 筋注投与開始時より週に一回、血液検査を行った。

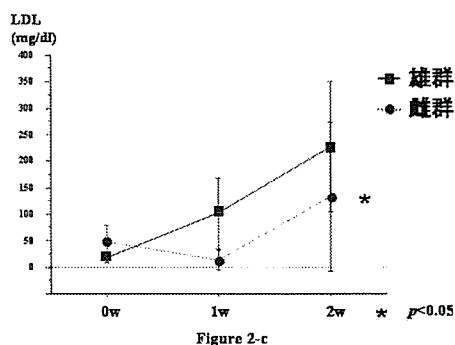


3. 研究結果

骨壊死発生率は、雄群は 64%(9/14 羽)であったのに対し、雌群では 27%(4/15 羽) と有意な壊死発生率の低下を認めた ($P < 0.05$) (Fig. 1)。血液生化学的には、T-chol および HDL-c が、雌群で有意 ($p < 0.05$) な上昇を認めた。また LDL については、雌群で有意 ($p < 0.05$) な低下を認めた (Fig. 2-a, b, c)。骨壊死の病理組織像においては、両群間で明らかな違いは認めなかった (Fig. 3-a, b)。



差関連因子についても、今後更なる検討が必要と考えられた。



雄群壊死発生家兔病理像

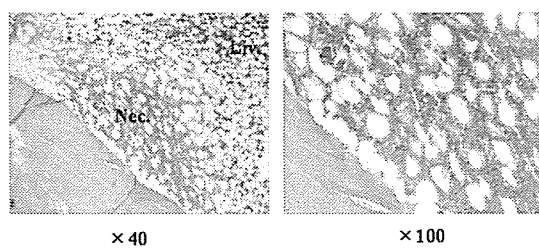


Figure 3-a

雌群壊死発生家兔病理像

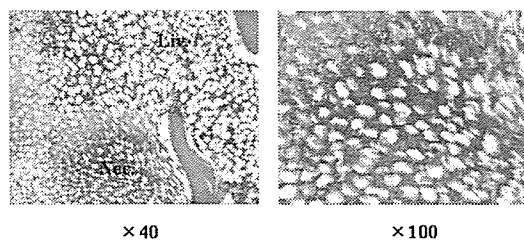


Figure 3-b

4. 考察

SLE 患者におけるステロイド治療後の壊死発生に関する報告として、男性では 60%(3/5 人)、女性では 20%(21/106 人)に発生したという報告があり、ステロイド治療後の骨壊死の発生は、より男性に生じやすい可能性がある⁽⁸⁻⁹⁾。また動脈硬化家兔モデルの性差についての報告の中で、性ホルモンの動脈硬化病変への関与や、血管内皮細胞からの NO 産出に性差が認められることなどが報告されている⁽¹⁰⁻¹¹⁾。今回我々の実験では、骨壊死発生に性差を認めたことより、性

5. 結論

ステロイド性家兔モデルにおける、骨壊死発生について性差を検討したところ骨壊死発生率は雄群で 64%であったのに対し、雌群では 27%と有意に低下していた。

6. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) ステロイド性骨壊死モデルにおける性差の検討
西田 顕二郎、山本 卓明、本村 悟郎、神宮司 誠也、岩本 幸英：第 33 回 日本股関節学会、東京、2006.10.27

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

8. 参考文献

- 1) Yamamoto T, Hirano K, Tsutsui H, Sugioka Y, Sueishi K. Corticosteroid enhances the experimental induction of osteonecrosis in rabbits with Shwartzman reaction. *Clin Orthop Relat Res.* 316:235-43, 1995
- 2) Yamamoto T, Irisa T, Sugioka Y, Sueishi K. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum.* 40(11):2055-64, 1997
- 3) Miyanishi K, Yamamoto T, Irisa T, Yamashita A, Jingushi S, Noguchi Y, Iwamoto Y. A high low-density lipoprotein cholesterol to high-density lipoprotein cholesterol ratio as a potential risk factor for corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Rheumatology (Oxford).* 40(2):196-201, 2001

- 4) Tsuji T, Sugano N, Sakai T, Yoshikawa H. Evaluation of femoral perfusion in a non-traumatic rabbit osteonecrosis model with T2*-weighted dynamic MRI. *J Orthop Res.* 21(2):341-51,2003
- 5) Kabata T, Kubo T, Matsumoto T, Nishino M, Tomita K, Katsuda S, Horii T, Uto N, Kitajima I. Apoptotic cell death in steroid induced osteonecrosis: an experimental study in rabbits. *J Rheumatol.* 27(9):2166-71,2000
- 6) Ichiseki T, Kaneuji A, Katsuda S, Ueda Y, Sugimori T, Matsumoto T. DNA oxidation injury in bone early after steroid administration is involved in the pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis. *Rheumatology (Oxford).* 44(4):456-60,2005
- 7) Nakata K, Masuhara K, Nakamura N, Shibuya T, Sugano N, Matsui M, Ochi T, Ohzono K. Inducible osteonecrosis in a rabbit serum sickness model: deposition of immune complexes in bone marrow. *Bone.* 18(6):609-15,1996
- 8) Nagasawa K, Ishii Y, Mayumi T, Tada Y, Ueda A, Yamauchi Y, Kusaba T, Niho Y. Avascular necrosis of bone in systemic lupus erythematosus: possible role of haemostatic abnormalities. *Ann Rheum Dis.* 48(8):672-6,1989
- 9) Oinuma K, Harada Y, Nawata Y, Takabayashi K, Abe I, Kamikawa K, Moriya H. Osteonecrosis in patients with systemic lupus erythematosus develops very early after starting high dose corticosteroid treatment. *Ann Rheum Dis.* 60(12):1145-8,2001
- 10) Pernille H, Heidi L. A, Gry A, Steen S. Gender gap in aortic cholesterol accumulation in cholesterol-clamped Rabbits. *Circulation.* 98(24):2731-7,1998
- 11) Hayashi T, Fukuto JM, Ignarro LJ, Chaudhuri G. Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(23):11259-63,1992