

- vitamin D receptor gene causes enhanced thrombogenicity in mice. *J Biol Chem* 279: 35798–35802, 2004.
- 3) Takamori N, Azuma H, Kato M, Hashizume S, Aihara K, Akaike M, Tamura K, Matsumoto T.: High plasma heparin cofactor II activity is associated with reduced incidence of in-stent restenosis after percutaneous coronary intervention. *Circulation* 109:481–486, 2004.
 - 4) Ikeda Y, Aihara K, Sato T, Akaike M, Yoshizumi M, Suzaki Y, Izawa Y, Fujimura M, Hashizume S, Kato M, Yagi S, Tamaki T, Kawano H, Matsumoto T, Azuma H, Kato S. Androgen receptor gene knockout male mice exhibit impaired cardiac growth and exacerbation of angiotensin II-induced cardiac fibrosis. *J Biol Chem* 280: 29661–6, 2005.
 - 5) Kato M, Azuma H, Akaike M, Iuchi T, Aihara K, Ikeda Y, Fujimura M, Yoshida T, Yamaguchi H, Hashizume S, Matsumoto T. Aspirin inhibits thrombin action on endothelial cells via up-regulation of aminopeptidase N/CD13 expression. *Atherosclerosis* 183:49–55, 2005.
 - 6) Yoshida T, Azuma H, Aihara K, Fujimura M, Akaike M, Mitsui T, Matsumoto T. Vascular smooth muscle cell proliferation is dependent upon upregulation of mitochondrial transcription factor A (mtTFA) expression in injured rat carotid artery. *Atherosclerosis* 178: 39–47, 2005.
 - 7) Ito Y, Inoue D, Kido S, Matsumoto T. c-Fos degradation by the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in osteoclast progenitors. *Bone* 37:842–9, 2005
 - 8) Matsumoto T, Miki T, Hagino H, Sugimoto T, Okamoto S, Hirota T, Tanigawa Y, Hayashi Y, Fukunaga M, Shiraki M, Nakamura T. A new active Vitamin D, ED-71, increases bone mass in osteoporotic patients under Vitamin D supplementation: a randomized, double blind, placebo-controlled clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 5031–6, 2005.
 - 9) Nawata H, Soen S, Takayanagi R, Tanaka H, Takaoka K, Fukunaga M, Matsumoto T, Tanaka H, Fujiwara S, Miki T, Sagawa A, Nishizawa Y, Seino Y. Guidelines on the management and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis (2004 edition). *J Bone Miner Metab* 23: 105–9, 2005.
 - 10) Shibata H, Abe M, Hiura K, Wilde J, Moriyama K, Sano T, Kitazoe K, Hashimoto T, Ozaki S, Wakatsuki S, Kido S, Inoue D, Matsumoto T. Malignant B-lymphoid cells with bone lesions express receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and vascular endothelial growth factor to enhance osteoclastogenesis. *Clin Cancer Res* 11: 6109–15, 2005.
 - 11) Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Ishibashi-Ueda H, Yamagishi M, Miyatake K, Matsumoto T, Kangawa K. Adrenomedullin enhances angiogenic potency of bone marrow transplantation in a rat model of hindlimb ischemia. *Circulation* 111: 356–62, 2005.
 - 12) Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Murakami S, Matsumoto T, Kanagawa K, Kitamura S. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovasc Res* 66: 543–51, 2005.
 - 13) Abe M, Matsumoto T. Bone destruction in multiple myeloma. *Ann N Y Acad Sci.* 1068: 319–326, 2006
 - 14) Ikeda Y, Yagi S, Yamaguchi H, Fujimura M, Hashizume S, Aihara K, Akaike M, Azuma H, Matsumoto T. *Circulation Journal* 70: 1082–1085, 2006.
 - 15) 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, 栗飯原賢一, 井内貴彦, 池田康将, 山口普史, 加藤みどり, 橋詰俊二, 吉田智則, 藤村光則, 石川カズ江, 東 博之, 松本俊夫. Aspirin ameliorates impaired production of endothelial nitric oxide in glucocorticoid excess.

- 第 68 回日本循環器学会学術集会. 平成 16 年
- 2) 加藤みどり, 池田康将, 橋詰俊二, 山口普史, 吉田智則, 藤村光則, 栗飯原賢一, 赤池雅史, 東博之, 松本俊夫. Aspirin and Pitavastatin increase expression of aminopeptidase N/CD13 through the activation of Akt. 第 68 回日本循環器学会学術集会. 平成 16 年
 - 3) 栗飯原賢一, 東博之, 赤池雅史, 池田康将, 藤村光則, 橋詰俊二, 八木秀介, 加藤茂明, 松本俊夫. ヘパリンコファクターII 欠乏マウスにおける血管リモデリング異常の解析. 第 27 回日本血栓止血学会学術集会. 平成 16 年
 - 4) 栗飯原賢一, 東博之, 赤池雅史, 藤村光則, 吉田智則, 橋詰俊二, 加藤みどり, 山口普史, 池田康将, 周藤俊樹, 加藤茂明, 松本俊夫. ビタミン D-ビタミン D 受容体システムによる血液凝固調節作用の解析. 平成 16 年
 - 5) 赤池雅史, 加藤みどり, 石川カズ江, 八木秀介, 池田康将, 橋詰俊二, 藤村光則, 栗飯原賢一, 東博之, 松本俊夫. Pitavastatin inhibits TNF- α -induced NF- κ B transcriptional activation through BMK1/ERK5 activation in vascular endothelial cells. 第 69 回日本循環器学会学術集会, 横浜, 2005.3.20.
 - 6) 栗飯原賢一, 東博之, 赤池雅史, 藤村光則, 八木秀介, 橋詰俊二, 池田康将, 松本俊夫. Arterial cuff injury causes enhanced neointimal formation and increased adventitial area in heterozygous heparin cofactor II deficient mice. 第 69 回日本循環器学会学術集会, 横浜, 2005.3.19.
 - 7) 赤池雅史. ステロイド誘発骨壊死の病因病態仮説. 第 23 回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 2005.7.22.
 - 8) 八木秀介, 栗飯原賢一, 赤池雅史, 藤村光則, 池田康将, 橋詰俊二, 東博之, 松本俊夫. Pitavastatin は angiotensin II によるマウス冠動脈リモデリングを抑制する. 第 37 回日本動脈硬化学会総会, 東京, 2005.7.15.
 - 9) 赤池雅史, 八木秀介, 栗飯原賢一, 池田康将, 岩瀬俊, 橋詰俊二, 藤村光則, 東博之, 松本俊夫. HMG-CoA reductase inhibitor pitavastatin elicits its anti-inflammatory effect through activation of BMK1/ERK5 in vascular endothelial cells. AHA Scientific Sessions 2005, Dallas USA, 2005.11.13.
 - 10) 栗飯原賢一, 東博之, 赤池雅史, 池田康将, 藤村光則, 橋詰俊二, 岩瀬俊, 八木秀介, 松本俊夫. Heparin cofactor II plays a crucial role in fetal development and cuff-injured vascular remodeling in mice. AHA Scientific Sessions 2005, Dallas USA, 2005.11.16.
 - 11) 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
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) 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.

- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- elicits vascular endothelial dysfunction. *Circ Res* 92:81-7, 2003
- 2) Wallerath T, Witte K, Schafer SC, Schwarz PM, Prellwitz W, Wohlfart P, Kleinert H, Lehr HA, Lemmer B, Forstermann U. Down-regulation of the expression of endothelial NO synthase is likely to contribute to glucocorticoid-mediated hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:13357-62, 1999
- 3) Wallerath T, Godecke A, Molojavyi A, Li H, Schrader J, Forstermann U. Dexamethasone lacks effect on blood pressure in mice with a disrupted endothelial NO synthase gene. *Nitric Oxide* 10:36-41, 2004
- 4) Wolfrum S, Jensen KS, Liao JK. Endothelium-dependent effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:729-736, 2003
- 5) Schafer SC, Wallerath T, Closs EI, Schmidt C, Schwarz PM, Forstermann U, Lehr HA. Dexamethasone suppresses eNOS and CAT-1 and induces oxidative stress in mouse resistance arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H436-44, 2005
- 6) Zhang Y, Croft KD, Mori TA, Schyvens CG, McKenzie KU, Whitworth JA. The antioxidant tempol prevents and partially reverses dexamethasone-induced hypertension in the rat. *Am J Hypertens* 17:260-5, 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) Iuchi T, Akaike M, Mitsui T, Ohshima Y, Shintani Y, Azuma H, Matsumoto T. Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and

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) の発症過程には、血管障害に伴う組織疎血状態が関与し、高濃度のステロイド薬がその誘因となりえることが解明されてきた。我々も、ヒトの血管内皮細胞を用いて、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、G₀/M 期細胞減少、アポトーシスを誘導することを解明し、高濃度のステロイドが内皮アポトーシスを介する血管障害を惹起することを示した。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、血管内皮障害の制御に関しては既報が殆どなかったが、我々は C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) に着目し、CNP がステロイド誘発性の内皮障害に対して、強力な保護作用を有することを解明した。即ち、高濃度 GC により誘導された内皮細胞のアポトーシスは CNP によって確実に制御され、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による GC 高容量急速暴露が起因するとの臨床結果と併せて、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 形成に関与する事、また、CNP は高濃度 GC による内皮障害を制御し、IONF の治療・予防へ応用できる可能性が示唆された。以上の結果は、新たな観点からの臨床応用を期待させるものである。

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 の発症機序は未だ不詳であるが、共通して認められる組織学的所見から、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。我々は、高濃度ステロイド薬による血管内皮細胞での細胞周期、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を (HUVEC) 用いた。糖質コルチコイド (ステロイド薬) として、プレドニゾロン (PSL)、メチルプレドニゾロン (m-PSL)、デキサメタゾン (DEX) 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、フローサイトメトリーで検出した。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ト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トリーで検出した。

(倫理面への配慮)

特に該当せず。

3. 研究結果

- 1) 高濃度 m-PSL は、細胞周期の G0/G1 arrest を誘導した(ステロイド薬大量内服療法、即ち、PSL 60mg、m-PSL 48 mg、DEX 6mg で到達可能な血中濃度に該当する各々 $1 \mu\text{g/ml}$ 、 $1 \mu\text{g/ml}$ 、 10^{-10} M では、24 時間以内の血管内皮細胞(HUVEC)に対して何ら影響を与えなかった。しかし、ステロイドパルス療法で到達する血中濃度 PSL $100 \mu\text{g/ml}$ ($3 \times 10^{-6} \text{ M}$)、m-PSL $100 \mu\text{g/ml}$ 、DEX 10^{-8} M を添加し、PI で染色し、細胞周期を観察した所、G2/M 増殖期細胞の約 20%減少と A 期(PIvery low)アポトーシス細胞の 80%増加を認めた。
- 2) 高濃度 PSL 添加 12 時間以内に p21 の細胞内発現が著明に増強した(フローサイトメーター)。
- 3) 内皮細胞を PI/annexin V で二重染色し、早期アポトーシス細胞を検出した所、PSL $100 \mu\text{g/ml}$ 処理により約 12%から約 28%へ急増した。以上より、ステロイド薬は、血管内皮細胞の p21 の発現増強などを介して細胞周期を抑制し、アポトーシスを誘導する事が示唆された。

次に、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ン(m-PSL) $100 \mu\text{g/ml}$ を添加し、以下の結果を得た。

- 4) 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)。
- 5) 高濃度 m-PSL は、細胞周期の G0/G1 arrest を誘導した(PI 染色)。
- 6) 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)。
- 7) 高濃度 m-PSL は、Bax の細胞内発現を著明に増強させた。
- 8) 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)。
- 9) 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。
- 10) 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。
- 11) CNP は、bcl-2 発現を増強させた。
- 12) 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。

我々の結果より、CNP は高濃度 m-PSL により齎される IONF 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

IONF 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 IONF を発症した症例が全て、ステロイドパルス療法の既往があった事を臨床的に示しており、高濃度 GC 薬が血管障害を伴う IONF の発症に深く関与する事を強く裏付ける。しかし、GC 薬投与患者における IONF 発症機序および臨床的背景については現在まで不明である。

以上のような臨床結果を踏まえて、血管障害における GC 薬の関与について検討したところ、ステロイド薬大量内服療法で到達可能な濃度では内皮細胞に影響はないが、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、IONF 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、抗炎症作用を發揮し、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) Nakayamada S, Okada S, Saito K, Tanaka T. Etidronate prevents high-dose glucocorticoid-induced bone loss in premenopausal individuals with systemic autoimmune diseases. *J Rheumatol* (2004) 31: 163-6
- 2) Okada Y, Tsukada J, Nakano K, Tonai S, Mine S, Tanaka Y. Macrophage inflammatory protein-1 α induces hypercalcemia in adult T-cell leukemia. *J Bone Miner Res* (2004) 19: 1105-1111
- 3) Okada Y, Tanaka Y. Immune signals in the context of secondary osteoporosis. *Histol Histopathol* (2004) 19: 863-866
- 4) Nakano K, Okada Y, Saito K, Tanaka Y. Fibroblast growth factor-2 induces receptor activator of nuclear factor kappa B ligand expression and osteoclast maturation by binding to heparan sulfate proteoglycan on rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* (2004) 50: 2450-2458
- 5) Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Nakano K, Tanaka Y. Clinical relevance of expression of P-glycoprotein on peripheral lymphocytes to steroid-resistance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (2005) 52: 1676-1683
- 6) Sobue T, Naganawa T, Xiao L, Okada Y, Tanaka Y, Ito M, Okimoto N, Nakamura T, Coffin JD, Hurley MM. Over-expression of fibroblast growth factor-2 causes defective bone mineralization and osteopenia in transgenic mice. *J Cell Biochem* (2005) 95: 83-94
- 7) Saito K, Nawata M, Iwata S, Tokunaga M, Tanaka Y. Extremely high titre of antihuman chimeric antibody following re-treatment with rituximab in a patient with active systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* (2005) 44: 1462-1464
- 8) Tanaka Y, Nakayamada S, Okada Y. Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* (2005) 4: 325-328
- 9) Soen S, Tanaka Y. Glucocorticoid-induced Osteoporosis: Skeletal Manifestation of Glucocorticoid and 2004 Japan Society for Bone and Mineral Research-Proposed Guideline for Its Management. *Mod Rheumatol* (2005) 15: 163-168
- 10) Tanaka Y, Okada Y. Acro-osteolysis and symphalangism mutations. *J Bone Miner Res* (2005) 20: 160
- 11) Tokunaga M, Fujii K, Saito K, Nakayamada S, Tsujimura S, Nawata M, Tanaka Y. Down-regulation of CD40 and CD80 on B cells in patients with life-threatening systemic lupus erythematosus after successful treatment with rituximab. *Rheumatology* (2005) 44: 176-182
- 12) Nakayamada S, Kurose K, Saito K, Mogami A, Tanaka Y. Small GTP-binding protein rho-mediated signaling promotes proliferation of rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* (2005) 7: 476-484
- 13) Sakuma-Zenke M, Sakai A, Nakayamada S, Kunugita N, Uchida S, Tanaka S, Mori T, Tanaka Y, T Nakamura. Reduced expression of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in bone marrow cells in mice after unloading. *J Bone Miner Res* (2005) 20: 1002-1010
- 14) 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
- 15) 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
 - 16) 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
 - 17) 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
 - 18) 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
 - 19) 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)
 - 20) 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)
 - 21) 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)
 - 22) 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)
 - 23) 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)
2. 学会発表
 - 1) 田中良哉. 続発性骨粗鬆症の病態と薬物治療. 第 47 回日本リウマチ学会ランチョンセミナー (東京) 平成 15 年 4 月
 - 2) 田中良哉. 生物学的製剤. 第 48 回日本リウマチ学会総会学術集会(シンポジウム)岡山, 平成 16 年 4 月
 - 3) 田中良哉. 続発性骨粗鬆症の病態と治療. 第 3 回東京骨軟骨フォーラム(特別講演)東京, 平成 16 年 6 月
 - 4) Tanaka Y. New insights in secondary osteoporosis. Osteoporosis Forum 2004 in FUKUOKA(特別講演)福岡, 平成 16 年 6 月
 - 5) 田中良哉. 骨粗鬆症の病態と治療. 第 46 回日本老年医学会学術集会(ランチョンセミナー)幕張, 平成 16 年 6 月
 - 6) 田中良哉. 関節リウマチ治療のこれからの流れ. 第 32 回日本臨床免疫学会総会(教育講演)東京, 平成 16 年 10 月
 - 7) 田中良哉. 関節リウマチの内科的治療の進歩—抗サイトカイン療法によりブレイクスルーできるか—. 第 30 回日本内科学会九州支部主催生涯教育講演会(特別講演)宮崎, 平成 16 年 10 月
 - 8) 田中良哉. SLE の治療の進歩:新規生物学的製剤の可能性. 第 54 回日本アレルギー学会総会(シンポジウム)横浜, 平成 16 年 11 月
 - 9) 岡田洋右, 田中良哉. ステロイド性骨粗鬆症における一次予防. 第 6 回日本骨粗鬆症学会(シンポジウム)埼玉, 平成16年11月
 - 10) 田中良哉. 抗サイトカイン療法は関節リウマチ治療をブレイクスルーできるか. 第 15 回日本リウマチ学会関東支部学術集会(ランチョン教育講演)東京, 平成 16 年 12 月
 - 11) 田中良哉. 生物学的製剤と膠原病の臨床: 治療のブレイクスルーを目指して. 第 102 回日本内科学会総会(教育講演)大阪, 平成 17 年 4 月
 - 12) 田中良哉. 関節リウマチ治療の新展開. 平成 17 年度日本内科学会生涯教育講演会(教育講演)東京, 平成 17 年 5 月
 - 13) 田中良哉. 続発性骨粗鬆症、骨破壊は制御できる

か—TNF 阻害療法によるリウマチ治療のパラダイムシフト—。第 23 回日本骨代謝学会学術集会(ランチョン教育講演)大阪, 平成 17 年 7 月

- 14) 田中良哉、岡田洋右、名和田雅夫、中山田真吾、齋藤和義. RA の骨代謝異常と TNF α . 第 23 回日本骨代謝学会学術集会(シンポジウム)大阪, 平成 17 年 7 月
- 15) 田中良哉、辻村静代、齋藤和義. 膠原病治療に於ける薬剤抵抗性の臨床と基礎. 第 33 回日本臨床免疫学会総会(シンポジウム)京都, 平成 17 年 10 月
- 16) 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災害外科学会学術集会(教育講演), 大阪, 2006.4.7-8.
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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, 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

ステロイド投与による可溶性血管内皮プロテイン C 受容体 (EPCR) と 可溶性トロンボモジュリンの変動に関する検討

長澤浩平、小荒田秀一

(佐賀大学医学部膠原病リウマチ内科)

可溶性 EPCR は活性化プロテイン C を捕捉し、その抗凝固活性を抑制することで血栓形成に関与すると考えられる。膠原病患者 239 例で可溶性 EPCR と可溶性トロンボモジュリンを ELISA にて横断的に解析した。疾患活動期には可溶性 EPCR (22.6%)・可溶性トロンボモジュリン (22.2%) ともに上昇していた。ステロイド投与を行った 71 例の経時的解析において、SLE (47.3%) で可溶性 EPCR が上昇した (他疾患は 11.8%) が、可溶性 TM は変動がなかった。SLE では原疾患による血管内皮傷害に加え、ステロイド投与による可溶性 EPCR の増加が凝固系の機能亢進を起し、大腿骨頭壊死などの臓器虚血病態に関連する可能性がある。

1. 研究目的

血管内皮細胞上に存在する血管内皮プロテイン C 受容体 (EPCR) は、トロンボモジュリンとともに、プロテイン C を活性化プロテイン C に変換する。活性化プロテイン C は凝固因子である Va、VIIIa 因子を分解・不活化し、抗凝固作用を示し、EPCR は血栓形成を抑制する重要な因子であると考えられる (図 1)。

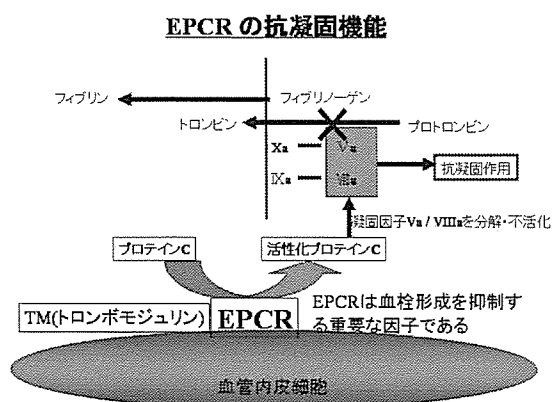


図1

膠原病による血管内皮傷害が起こると、血管内皮細胞上の膜型EPCRはメタロプロテイナーゼにより切断され、可溶性EPCRが産生される。血中に遊離したEPCRは、活性化プロテインCやプロテインCを捕捉し、活性化プロテインCの抗凝固作用を抑制すると想定される。この結果、血栓形成が助長され、大腿骨頭壊死などの臓器虚血による諸病態が引き起こされる可能性がある

(図 2)。また、ステロイド治療は、血栓形成のリスク・ファクターの一つである。

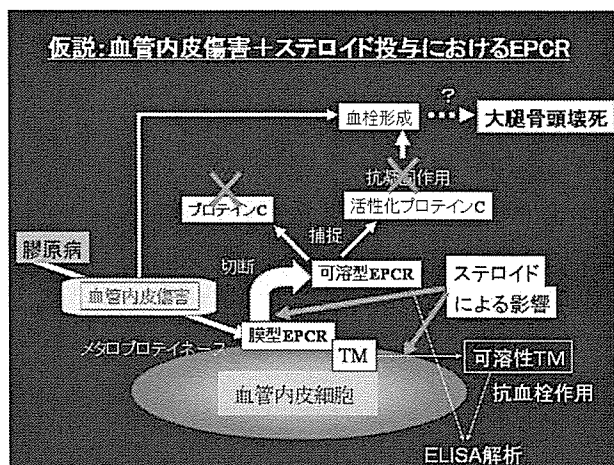


図 2

しかしながら、ステロイド治療によるEPCRを含むプロテイン C 経路に対する影響は解明されていない。

今回、可溶性 EPCR および、EPCR と密接に関連する血管内皮細胞上の抗凝固因子であるトロンボモジュリンについて ELISA 解析を行った。

2. 研究方法

解析は膠原病患者 239 例を対象とした。その内訳は、全身性エリテマトーデス (SLE) 患者 97 例、血管炎症候群 57 例、その他のリウマチ性疾患 85 例 (関節リウマチ 20 例、多発性筋炎 15 例、強皮症 12 例、成人スチル病

10 例、シェーグレン症候群8例、混合性結合組織病 5 例、皮膚筋炎4例、その他11例)、正常22例である。そのさいに、各疾患で、疾患活動期と寛解期に分け解析を行った。採血後直ちに患者血清を分離し、凍結保存後に一括して可溶型 EPCR および可溶型トロンボモジュリンを ELISA 法により解析した。また、上記疾患のうちプレドニゾロン換算1日 30mg 以上を使用した患者71例においステロイド治療開始前後のそれぞれの検査値の経時的解析を行った。

3. 研究結果

まず、膠原病患者における可溶型EPCR値の横断的解析を行った。いずれの疾患においても、可溶型EPCRの有意な上昇がみられた(SLE 7.7 ± 19.8 ng/ml, 血管炎 3.8 ± 16.7 ng/ml, その他 5.4 ± 23.0 ng/ml)が ($p < 0.05$)、それぞれの疾患の間で統計学的に有意差はみられなかった。正常者では、可溶型 EPCR の上昇を認めなかった(0.00 ± 0.02 ng/ml)(図3)。

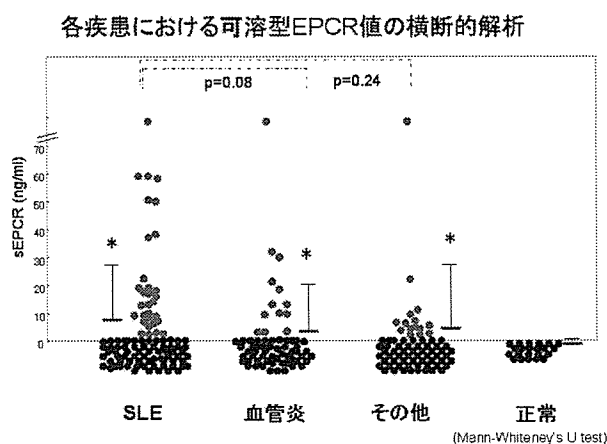


図3

つぎに各疾患における疾患活動性と可溶型EPCRの関連の解析を行った。活動性のある SLE 患者では非活動性患者に比して、可溶型 EPCR が有意に上昇していた($p=0.004$)。また、SLEの活動性患者では、血管炎、その他の膠原病の活動性患者と比較して有意な上昇が見られた。これに対して血管炎・その他の膠原病では、疾患の活動性と非活動性患者の間で有意な差を認めなかった(図4)。

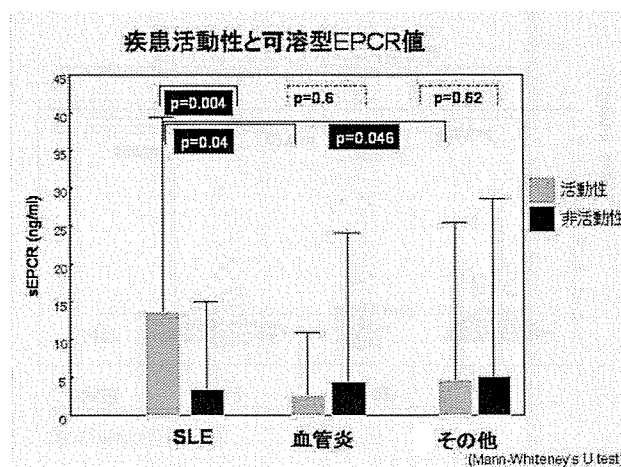


図4

各疾患における疾患活動性と可溶型 EPCR 陽性率(可溶型 EPCR > 0 ng/ml を陽性とした)の検討を行った。SLE患者では、活動性がある患者43例中、23例が陽性であり、53.5%という高い陽性率を示した。また、 χ^2 乗検定により疾患活動性と陽性率の間に有意な相関を認めた($p=0.00018$)。しかし、血管炎、その他のリウマチ性疾患では疾患活動性と陽性率の間に有意な相関はなかった(表2)。

表 1

Incidence of elevated sEPCR among the patients with rheumatic diseases					
	sEPCR	disease activity	total	p value	
SLE	(+)	23(23.7)	7(7.2)	30(30.9)	0.000018
	(-)	20(20.6)	47(48.5)	67(69.1)	
vasculitis	(+)	2(3.5)	6(10.5)	8(14.0)	0.59
	(-)	17(29.8)	32(56.1)	49(30.9)	
others	(+)	6(7.1)	10(11.8)	16(18.8)	0.97
	(-)	30(35.3)	39(45.9)	69(81.2)	
total	(+)	31(13.0)	23(9.6)	54(22.6)	0.005
	(-)	67(28.0)	118(49.4)	185(77.4)	

さらには、もう一つの血管内皮細胞由来の可溶性抗凝固因子である可溶型トロンボモジュリンについてELISA法により検討した。疾患別のトロンボモジュリン値の解析では、正常に比較して、SLE($p=0.025$)と血管炎($p=0.03$)で上昇が認められた(図5)。

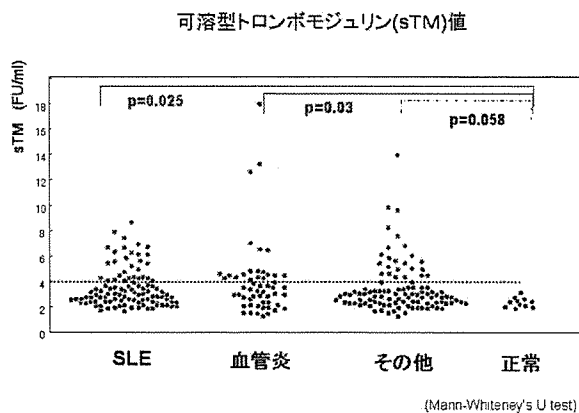


図5

各疾患における疾患活動性とトロンボモジュリン値の関連について検討を行った。いずれの疾患においても疾患活動性のある患者において、可溶性トロンボモジュリンの上昇がみられた。しかしながら、統計学的に有意差があったのは SLE 患者においてのみであり、各疾患の間で可溶性トロンボモジュリン値に有意差はなかった。また、どの疾患群においても、疾患活動性患者のトロンボモジュリンの平均値は正常値の範囲内にとどまっており、膠原病における活動性を反映する可溶性トロンボモジュリン陽性化の検出感度は低いと考えられた(図6)。

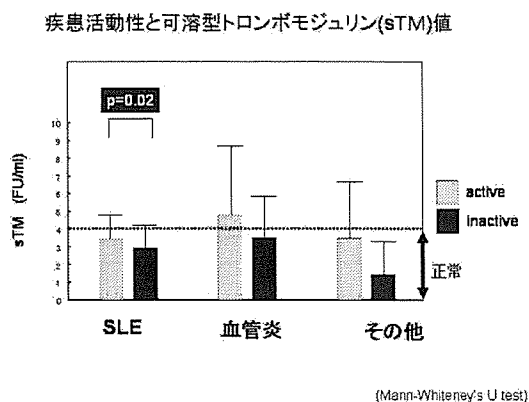


図6

可溶性 EPCR(22.6%)と可溶性トロンボモジュリン(22.2%)の陽性率については、全症例でみると両者で差はなかった。しかし、疾患別に見ると、可溶性 EPCR は SLEでの陽性率が高かったが、可溶性トロンボモジュリンでは疾患での差はみられなかった。したがって、可溶性EPCRの上昇は、SLEに特徴的であると考えられた。

また、可溶性 EPCR と可溶性トロンボモジュリンの間には有意な相関を認めなかった(図7)。

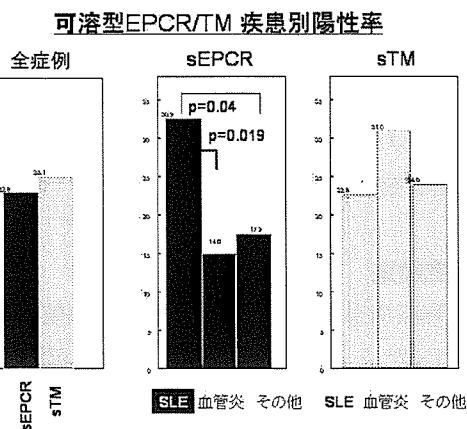


図7

可溶性 EPCR と可溶性トロンボモジュリンは、血管内皮障害を反映して上昇すると考えられるが、このように両者の疾患における動態は異なる挙動を示すことより、EPCR とトロンボモジュリンの調節機序は異なっている可能性が示唆された。

次に、ステロイドの影響をみるために、一日プレドニゾロン換算30mg以上のステロイド治療がなされた患者71例の可溶性EPCRと可溶性トロンボモジュリンの経時的変動を検討した。ステロイド投与による可溶性 EPCR の変動パターンは多様であったが、可溶性トロンボモジュリンは大きな変化が認められなかった(図8)。

治療前と治療後7日目の時点をもとにした可溶性 EPCR の変動については以下の4つのパターンに分類が可能であった。

- 1) 治療後に上昇
- 2) 持続して高値
- 3) 治療後に低下(正常化)
- 4) 正常値を維持

しかし、可溶性トロンボモジュリンに関しては、図8に示すように、可溶性 EPCR は変動しているにもかかわらず、ステロイド投与による変動はなく、分類はしえなかった。

ステロイド治療(PSL30mg/日以上)によるsEPCR/TMの変動

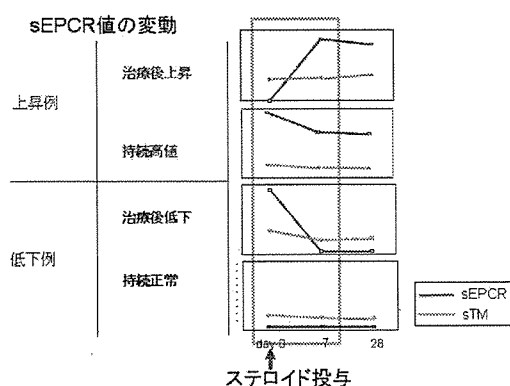


図8

ステロイド投与前および投与7日目での可溶性 EPCR の変動をもとに、それぞれの疾患で占める各分類の度数解析を試みた。SLEでは、治療後上昇する症例が6例、治療後も持続して高値を示す症例が3例というように、ステロイド治療後も可溶性EPCRの上昇を示す例が9/19例(47.3%)と多く占め、その他の膠原病では、4/34例(11.8%)のみが上昇を示した。血管炎では、5/18例(27.8%)に増加がみられた。このように、SLEでは、ステロイド投与により、可溶性EPCRの上昇する例が有意に多いことが示された($p < 0.05$)(表3)。

表 2

	SLE	vasculitis	others	total
elevated	9(47.3)	5(27.8)	4(11.8)	18(25.4)
increased	6	2	3	11
no change	3	3	1	7
normalized	10(52.6)	13(72.2)	30(88.2)	53(74.6)
decreased	1	3	3	7
no change	9	10	27	46
total	19	18	34	71

SLEにおける大腿骨頭壊死とsEPCRの関連について検討した。大腿骨頭壊死を起こした患者群22例中2例でsEPCRの上昇がみられた。大腿骨頭壊死を起こしていない患者では、28/75例、陽性率37.3%であり、大腿骨頭壊死発生群で有意に陽性率が低かった。ステロイド治療後に経時的に解析しえた症例は4例あるが、sEPCRがステロイド治療後に上昇あるいは、持続して陽性を示す症例が3例、75%と多くを占めていた。しかし、

解析症例数はまだ少数であり、今後、症例を増やしてさらに検討する必要がある。

4. 考察・結論

膠原病患者では可溶性 EPCR と可溶性トロンボモジュリン値が上昇することが示されたが、両者に関連性はなかった。ステロイド投与により、可溶性 EPCR のみ大きく変動し、可溶性トロンボモジュリンの変動は乏しかった。以上のことより、可溶性 EPCR と可溶性トロンボモジュリンは血管内皮細胞より産生される機序は同一ではなく、病態生理上も異なる意義を有することが示唆された。

今回の研究では、EPCR の多型性を解析していないため、EPCR の多型性が可溶性 EPCR の産生能に対してどのような影響を与えるのかという点に関して、今後検討が必要となる。

SLEでは、疾患活動期に可溶性EPCRの増加が特徴である。ステロイド投与により、可溶性 EPCR はさらに上昇する症例が多く、このことはSLEにおいて虚血による大腿骨頭壊死の発生の頻度が疾患特異的に高いことと関連している可能性も示唆される。SLEにおける大腿骨頭壊死の発生には、膠原病自体による血管内皮細胞傷害に加えて、ステロイド投与による可溶性 EPCR の上昇がプロテイン C 抗凝固経路を障害し、血栓形成が起りやすくなっている可能性もある。今後、解析数を増し、大腿骨頭壊死の発生や抗リン脂質抗体症候群との関連を検討する必要がある。また、治療に関しても、活性型プロテイン C の補充療法やメタロプロテアーゼ・インヒビターなどによる可溶性 EPCR の産生抑制などによる大腿骨頭壊死の予防法に対する試みも展望される。

5. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koarada S, Haruta Y, Mitamura M, Morito F, Tada Y, Ohta A, Nagasawa K. Ex vivo CD4(+) T-cell cytokine expression from patients with Sjogren's syndrome following in vitro stimulation to induce proliferation. *Rheumatology (Oxford)* 45:392-9, 2006
- 2) Tada Y, Koarada S, Tomiyoshi Y, Morito F, Mitamura M, Haruta Y, Ohta A, Nagasawa K. Role of inducible costimulator in the development of lupus in MRL/lpr mice. *Clin Immunol* 120:179-88, 2006

- 3) Nagasawa K, Tada Y, Koarada S, Tsukamoto H, Horiuchi T, Yoshizawa S, Murai K, Ueda A, Haruta Y, Ohta A. Prevention of steroid-induced osteonecrosis of femoral head in systemic lupus erythematosus by anti-coagulant. *Lupus* 15: 354-7, 2006
 - 4) Koarada S, Ide M, Haruta Y, Tada Y, Ushiyama O, Morito F, Ohta A, Nagasawa K. Two cases of antinuclear antibody negative lupus showing increased proportion of RP105-lacking B cells. *J Rheumatol.* 32(3): 562-4, 2005
 - 5) Nagasawa K, Tada Y, Koarada S, Horiuchi T, Tsukamoto H, Murai K, Ueda A, Yoshizawa S, Ohta A: Very early development of steroid-associated osteonecrosis of femoral head in systemic lupus erythematosus: prospective study by MRI. *Lupus* 14: 385-390, 2005
 - 6) Takahashi K, Hayashi S, Ushiyama O, Sueoka N, Fukuoka M, Nagasawa K: Development of microscopic polyangitis in patients with chronic airway disease. *Lung* 183: 273-281, 2005
 - 7) Koarada S, Wu Y, Fertig N, Sass DA, Nalesnik M, Todd JA, Lyons PA, Fenyk-Melody J, Rainbow DB, Wicker LS, Peterson LB, Ridgway WM. Genetic control of autoimmunity: protection from diabetes, but spontaneous autoimmune biliary disease in a nonobese diabetic congenic strain. *J Immunol.* 173:2315-23, 2004
 - 8) Koarada S, Wu Y, Yim YS, Wakeland EW, Ridgway WM. Nonobese diabetic CD4 lymphocytosis maps outside the MHC locus on chromosome 17. *Immunogenetics.* 56:333-7, 2004
 - 9) Koarada S, Haruta Y, Tada Y, Ushiyama O, Morito F, Ohta A, Nagasawa K. Increased entry of CD4+ T cells into the Th1 cytokine effector pathway during T-cell division following stimulation in Behcet's disease. *Rheumatology (Oxford).* 43:843-51. 2004
2. 学会発表
 - 1) 血管炎症候群における可溶性内皮プロテインC受容体の検討. 小荒田秀一, 多田芳史, 小荒田秀一, 春田善男, 三田村未央, 大田明英, 長澤浩平. 日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 Page135、横浜、2005.4.18.
- 6. 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
- 7. 参考文献**
- 1) Tsuneyoshi N, Fukudome K, Horiguchi S, Ye X, Matsuzaki M, Toi M, Suzuki K, Kimoto M. Expression and anticoagulant function of the endothelial cell protein C receptor (EPCR) in cancer cell lines. *Thromb Haemost* 85:356-61, 2001
 - 2) Boomsma MM, Stearns-Kurosawa DJ, Stegeman CA, Raschi E, Meroni PL, Kurosawa S, Cohen Tervaert JW. Plasma levels of soluble endothelial cell protein C receptor in patients with Wegener's granulomatosis. *Clin Exp Immunol.* 128:187-94, 2001

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点は細胞表面の嚢形成である。

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)

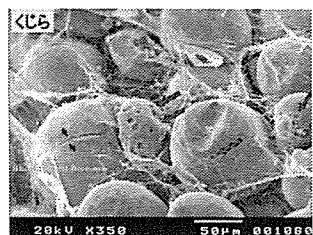


図1

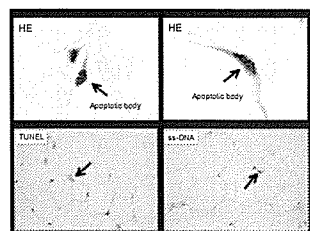
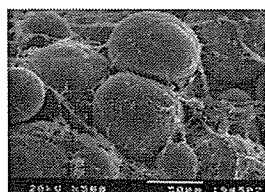


図2

2 ヒト脂肪細胞

培養前の骨髄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

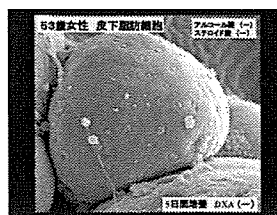
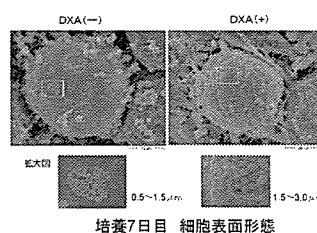


図4

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

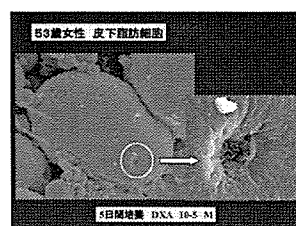


図6

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「ネクローシス」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髄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、これらの変化が骨髄のみならず皮下、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。

fever virus. J Virol Methods. 2004 Dec 15;122(2):165-70.

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-resolution 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

骨壊死動物モデル組織診断検討会の報告

高尾正樹、菅野伸彦、中村宣雄、坂井孝司（大阪大学 整形外科グループ）
岩切健太郎（大阪市立大学 整形外科グループ）
山本卓明、西田顕二郎（九州大学 整形外科グループ）
加畑多文（金沢大学 整形外科グループ）

骨壊死動物モデルの組織診断が複数の研究施設でどの程度一致しているか、またその組織診断基準の統一性がどの程度あるかを検証するため、2005年10月22日大阪市立大学整形外科医局にて大阪大学、大阪市立大学、九州大学、金沢大学の4施設の代表者が集まりそれぞれ7-11標本合計35標本を持参しそれぞれ組織診断を行った。その結果を報告する。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症の予防法確立および前臨床的検証のためには、壊死の起点が明らかな再現性の高い動物モデルによる実験が不可欠である。しかしながら、ステロイド単独投与による骨壊死動物モデルにおいては、その反応が動物種によっても異なり¹⁻³⁾、また、ウサギ骨壊死モデルにおいても、投与剤の種類や投与方法や観察時期によっても骨壊死発生頻度が異なる³⁻¹³⁾。骨壊死動物モデルの診断は、組織学診断であり信頼性が高いが、早期骨壊死の病理診断は必ずしも容易ではない^{5, 14-20)}。そこで、骨壊死動物モデルの組織診断が複数の研究施設でどの程度一致しているか、またその組織診断基準の統一性がどの程度あるかを検討するため、骨壊死動物実験モデルを手がけてきた4つの研究施設による組織診断検討会を行った。

2. 研究方法

4施設からウサギ近位大腿骨のHE標本を合計35枚用意した。

九州大学からは7枚のプレパラートが用意され、標本は10%中性ホルマリン固定後、蟻酸脱灰し(3日間)、4 μ mの厚みの薄切標本をHE染色したもので、ステロ

イド骨壊死モデル(20 mg/kg メチルプレドニゾロン(MP))が1枚、ステロイド骨壊死モデル(20 mg/kg MP および MP 投与 2 週間前からピタバスタチン 0.7mg/kg/day4 週間静注)6枚で、前者は骨壊死と診断され、後者のうち2枚が骨壊死と診断されたものであった。

大阪大学からは11枚で、標本は10%中性ホルマリン固定後、EDTA脱灰し、4 μ mの厚みの薄切標本をHE染色したもので、ウサギ血清病骨壊死モデルが1枚、ステロイド骨壊死モデル(20 mg/kg MP)が9枚、コントロール用無処置ウサギ標本1枚であった。ウサギ血清病骨壊死モデルの標本の診断は骨壊死で、ステロイド骨壊死モデル(20 mg/kg MP)ではステロイド投与後3日が1枚で正常と診断され、ステロイド投与後3週が8枚で、そのうち3枚を骨髄壊死、残り5枚は正常と診断した。

大阪市立大学からは8枚で、標本は10%中性ホルマリン固定後、蟻酸脱灰し、4 μ mの厚みの薄切標本をHE染色したもので、ステロイド骨壊死モデル(20 mg/kg MP一回筋注後3週)7枚とコントロール用無処置ウサギ標本1枚であった。ステロイド骨壊死モデルのうち4枚が骨壊死と診断されたもので、他の3枚は骨壊死なしと

判断したものであった。

金沢大学からは 9 枚で、標本は 10%中性ホルマリン固定後、EDTA 脱灰し、5 μ m の厚みの薄切標本を HE 染色したもので、ステロイド骨壊死モデル(4 mg/kg MP を週 1 回投与)が 8 枚とコントロール用生食注射ウサギ標本 1 枚であった。

ステロイド骨壊死モデルは、ステロイド 1 回投与後 1 週標本が 3 枚、2 回投与後 1 週標本が 1 枚、4 回投与後 1 週が 3 枚、16 回投与後 1 週が 1 枚であった。ステロイド 1 回投与標本のうち 2 枚が早期骨壊死、1 枚が骨髄壊死と診断され、2 回投与標本は骨壊死と診断されていた。4 回投与標本のうち 2 枚が骨壊死、1 枚が骨髄壊死と診断され、16 回投与標本は骨壊死と診断されていた。

各標本を盲目的に 4 施設ごとで観察し、骨髄所見、骨梁所見、総合診断の 3 項目を評価表に記入し、4 施設間の診断の一致度を検討した。診断所見が不一致したものについては、全員で討議し、その内容を記録した。

3. 研究結果

各施設の診断結果を表 1 に示す。完全に診断が一致したものは全 35 標本中 8 標本(22.9%)で、内訳は骨壊死と診断した 3 標本と正常と診断した 5 標本であった。3 施設で診断が一致したのは 9 標本(25.7%)で、内訳は 3 施設で骨壊死と診断した 6 標本、骨髄浮腫と診断した 1 標本、正常と診断した 2 標本であった。2 施設で診断が一致したものが最も多く 16 標本(45.7%)で、全く一致しなかったものは 2 標本(5.7%)であった。骨壊死と診断した施設と正常あるいは骨髄浮腫と診断した施設があった標本が 16 標本(45.7%)あった。骨髄壊死と診断した施設と正常あるいは骨髄浮腫と診断した施設があった標本が 2 標本(5.7%)あった。またすべての施設が壊死ありと判定したものの骨壊死と骨髄壊死の判定にわかれた標本が 7 標本(20%)あった。

このうち、骨壊死と骨髄壊死の診断に分かれた 7 標本中 2 標本(標本名;阪大(1)、九大(6))、骨壊死と診断した施設と正常あるいは骨髄浮腫と診断した施設がある 16 標本のうち 8 標本(標本名;九大(4)、阪大(3)、阪大(4)、市大(6)、市大(7)、金沢(2)、金沢(3)、金沢(5)) (このうち標本金沢(3)では施設間で全く診断が一致しなかった)、骨髄壊死と診断した施設と正常あるいは骨髄浮腫と診断した施設があった標本 2 標本のうち 1 標本(標本名;九大(1))について討議を行った。

骨壊死と骨髄壊死の診断に分かれた標本

標本名;阪大(1)

九州大、大阪市大で骨壊死と診断されていたが、九州大、大阪市大の診断定義として骨壊死と骨髄壊死とを区別していないことによる相違であった。

標本名;九大(6)(図 1)

九州大、大阪市大は骨壊死(骨髄壊死)の診断であったが、金沢大では骨壊死の診断であった。図 1 に占めす小骨梁の empty lacuna を陽性と診断した結果であった。

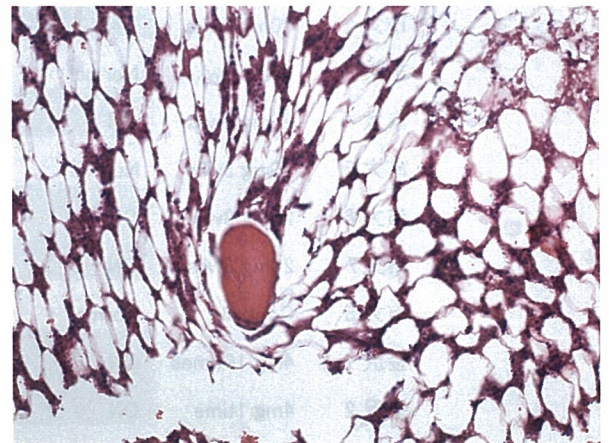


図 1. 標本名;九大(6) HE \times 100

表 1. 診断結果

標本名	Model	診断結果				所見の 一致数
		九州大学	大阪大学	大阪市大	金沢大学	
九大 1	Pitavastatin	Bleeding	Normal	Normal	MN	2
九大 2	Pitavastatin	Edema	Edema	ON	Edema	3
九大 3	Pitavastatin	Edema	Artifact	ON	MN	1
九大 4	Pitavastatin	ON	Edema	ON	MN	2
九大 5	Pitavastatin	Edema	Others	ON	Edema	2
九大 6	Pitavastatin	ON	MN	ON	ON	3
九大 7	20mg 2wks	ON	ON	ON	ON	4
阪大 1	20mg 3wks	ON	MN	ON	MN	2
阪大 2	20mg 3wks	Fat necrosis	Normal	Normal	Degeneration	2
阪大 3	20mg 3wks	Normal	Normal	ON	ON	2
阪大 4	20mg 3wks	ON	Edema	ON	Edema	2
阪大 5	20mg 3wks	Edema	Normal	ON	Edema	2
阪大 6	20mg 3wks	ON	MN	ON	MN	2
阪大 7	20mg 3wks	ON	MN	ON	Edema	2
阪大 8	20mg 3wks	Normal	Edema	ON	Edema	2
阪大 9	20mg 3days	Normal	Normal	Normal	Normal	4
阪大 10	SS model 3w	ON	ON	ON	ON	4
阪大 10	Control	Edema	Normal	Normal	Normal	3
市大 1	20mg 3wks	Normal	Normal	ON	Normal	3
市大 2	20mg 3wks	ON	MN	ON	ON	3
市大 3	20mg 3wks	Normal	Normal	Normal	Normal	4
市大 4	20mg 3wks	ON	MN	ON	ON	3
市大 5	20mg 3wks	Normal	Normal	Normal	Normal	4
市大 6	20mg 3wks	ON	Normal	Normal	ON	2
市大 7	20mg 3wks	ON	Normal	ON	ON	3
市大 8	Control	Normal	Normal	Normal	Normal	4
金沢 1	4mg 16times	ON	MN	ON	ON	3
金沢 2	4mg 1time	ON	Normal	Normal	ON	2
金沢 3	4mg 2times	Normal	Artifact	ON	ON	2
金沢 4	Control	Normal	Normal	Normal	Normal	4
金沢 5	4mg 1time	ON	Artifact	Normal	ON	2
金沢 6	4mg 4times	ON	MN	ON	ON	3
金沢 7	4mg 1time	Bleeding	Normal	Normal	MN	2
金沢 8	4mg 4times	Edema	Normal	ON	Congestion	1
金沢 9	4mg 4times	ON	ON	ON	ON	4

(ON : 骨壊死、MN : 骨髓壊死)

骨壊死と診断した施設と正常あるいは骨髄浮腫と診断した施設がある8標本

標本名;九大(4) (図2,3)

九州大、大阪市大が骨壊死(骨髄壊死)、金沢大が骨髄壊死、大阪大が骨髄浮腫の診断であった。1箇所
の骨髄領域のヘマトキシリン染色性の低下と間質成分の増加、造血細胞の核の破碎変化の解釈で診断が分
かれていた

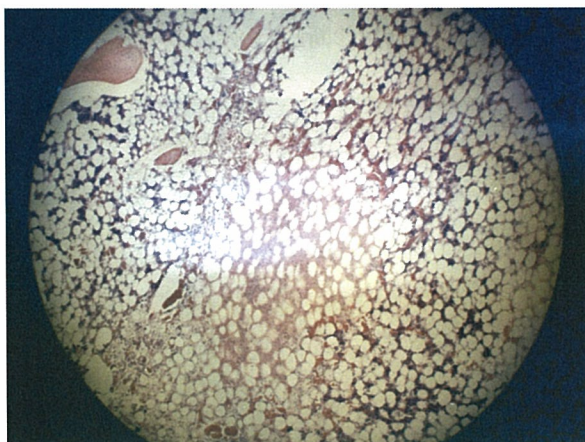


図2. 標本名;九大(4) HE ×40

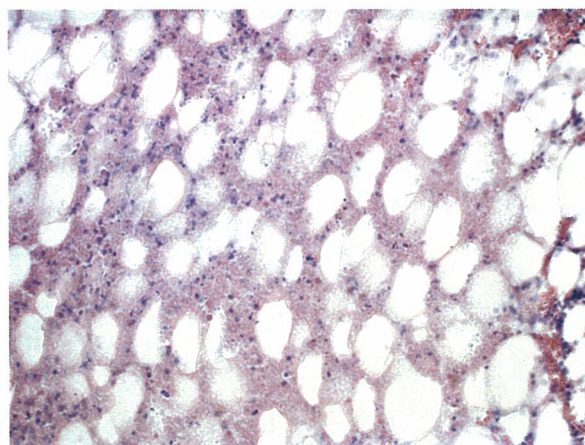


図3. 標本名;九大(4) HE ×100

標本名;阪大(3) (図4)

金沢大が骨壊死、大阪市大が骨壊死(骨髄壊死)、九州大、大阪大が正常との診断であった。周囲のヘマトキシリン染色性の低下と造血細胞の破碎変化、その中の小骨梁の empty lacuna を陽性とするかどうかで診断が分かれていた。

標本名;阪大(4) (図5)

九州大と大阪市大が骨壊死(骨髄壊死)の診断で、

金沢大と大阪大が骨髄浮腫の診断であった。図5に示す間質成分を necrotic debris とするか浮腫性変化とするかで診断が分かれていた。

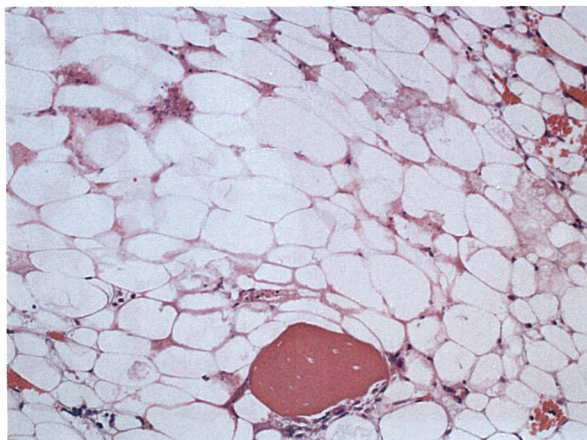


図4. 標本名;阪大(3) HE ×100

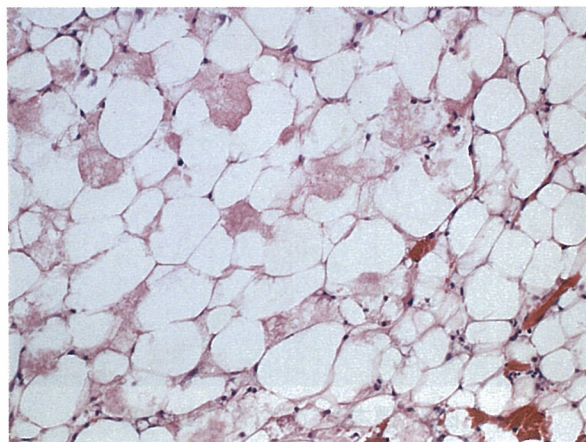


図5. 標本名;阪大(4) HE ×100

標本名;市大(6) (図6)

金沢大が骨壊死、九州大、大阪市大が骨壊死(骨髄壊死)の診断、大阪大が正常の診断であった。骨髄組織のヘマトキシリン染色性の低下、造血細胞の破碎変化を陽性とするかどうかという点と、骨壊死に関しては骨髄病変に接する皮質骨の部分的 empty lacuna を骨壊死とするかどうかで診断が分かれていた。

標本名;市大(7) (図7)

九州大、金沢大が骨壊死、大阪市大が骨壊死(骨髄壊死)、大阪大が正常の診断であった。骨髄壊死に関しては骨髄組織のヘマトキシリン染色性の低下、造血細胞の破碎変化を陽性とするかどうかで診断が分かれ