

よびステロイド以外の要因の解明にもつなげたい。

## 2. 研究方法

### A. 対象

#### 1) 症例設定

**採用基準:** 本研究班が運営する「定点モニタリングシステム」にて報告された新患症例のうち、初診日が2002年1月以降の者とした。すなわち、2002年1月以降に協力機関の整形外科を初診し、特発性大腿骨頭壊死症診断基準(厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死症調査研究班、平成7年度報告書)により、初診日の過去1年以内に初めて診断が確定したものとした。

**除外基準:** 外傷性大腿骨頭壊死症、アルコール精神病による入院歴を有する者、潜水病あるいは潜函病などの減圧症が原因と推定される者、とした。

#### 2) 対照設定

**採用基準:** 症例の初診日(または確定診断日)以降、同一機関整形外科を初診した他疾患患者のうち、性、年齢(5歳階級)が対応する最初の5例までとした。病院対照のみとし、症例1例に対して対照5例までを選定した。

**除外基準:** 症例の除外基準に加え、変形性股関節症を除外した。

### B. 方法

#### 1) 情報収集

**臨床情報:** 「特発性大腿骨頭壊死症 患者 - 対照研究に関する調査票(医師記入)」により情報収集を行った。要約記入者は協力医師または臨床担当医師とした。

**疫学情報:** 「健康と生活習慣についての質問票(本人記入)」により郵送法にて情報収集を行った。flusher/non-flusherの判定はYokoyamaらの開発した2項目からなる質問<sup>5)</sup>にて行った。具体的には、少量の飲酒による顔面紅潮の有無を2つの時期(初めて飲んだ頃と現在)について質問し、「初めて飲んだ頃に顔が赤くなった」と答えた者は、現在の回答に拘らず flusher と判定、「両時期ともに顔が赤くならない」と答えた者を non-flusher と判定した。この判定法については、ALDH-2 遺伝子型を gold standard とした場合、感度 96%、特異度 80%とされている<sup>5)</sup>。

#### 2) 倫理的配慮

「疫学研究に関する倫理指針」<sup>6)</sup>に則り、参加拒否を可能とする必要があるため、意思表示を示す返信用ハガキを同封するとともに、拒否の場合でも一切不利益はないことを明示した。また、収集した情報の取扱いに当たっては、個人情報保護の観点より十分配慮した。なお、本研究は、

大阪市立大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得た。

#### 3) 統計学的解析

Conditional logistic regression model を用いて、オッズ比 (OR) と 95%信頼区間(95%CI)を算出した。

## 3. 研究結果および考察

症例73例、対照252例を解析対象とした多変量解析の結果は、平成18年度に報告済みである<sup>7)</sup>。しかし、上記解析を行った時点における臨床および疫学情報には、一部に記入もれ箇所を認めため、平成18年度~19年度にかけて欠損データを補完するための再調査を行った。

今回、欠損データの補完を終えた症例73例、対照250例を最終解析対象とし、既往歴および薬剤使用歴に焦点をあてた検討を行った。

#### 1) 症例・対照の一般特性(表1)

症例・対照の一般特性を表1に示す。現在の身長、体重、20歳時の体重、body mass index は、症例・対照間で有意差を認めなかった。1週間あたりの飲酒量および1日あたりの喫煙本数は症例の方が有意に多かった(ともに  $p=0.031$ )。

#### 2) 既往歴とIONリスク(表2)

単変量解析では、肝障害、高脂血症、痛風の既往の各ORが上昇し、境界域の有意差を認めた。多変量解析では、肝障害の既往のみがOR 4.03と有意な上昇を示した。

#### 3) 薬剤使用歴とIONリスク(表3)

単変量解析では情報収集した5種の薬剤すべてについて有意なORの上昇を認め、特にステロイド全身投与歴のORは14.3と著明に上昇した。多変量解析の結果でも、OR 31.2は際だっており、ステロイド非投与に対する投与のリスクが初めて推定された。

## 4. 結論

ステロイド投与・非投与にかかわらず、すべてのIONを対象とした症例・対照研究において、ステロイド非投与に対する投与のリスクが初めて推定された。また、肝障害の既往がIONのリスクファクターであることが示唆された。

## 5. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

## 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) Felson DT, Anderson JJ: A cross-study evaluation of association between steroid dose and bolus steroids and avascular necrosis of bone. Lancet, 1987; 1: 902-906.
- 2) Hirota Y, Hirohata T, Fukuda K, et al: Association of alcohol intake, cigarette smoking, and occupational status with the risk of idiopathic osteonecrosis of the femoral head. Am J Epidemiology, 1993; 137: 530-538.
- 3) 田中隆、山本博司、廣田良夫、竹下節子:特発性大腿骨頭壊死症定点モニタリング - 5年間の集計結果 - .厚生労働省特定疾患対策研究事業骨・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13年度研究報告書 .1-3, 2002
- 4) 田中隆、山本博司、廣田良夫、竹下節子:特発性大腿骨頭壊死症定点モニタリング - 5年間のまとめ - .厚生労働省特定疾患対策研究事業 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11~13年度研究報告書 .1-4, 2002
- 5) Yokoyama A, Muramatsu T, Ohmori T, et al: Reliability of flushing questionnaire and the ethanol patch test in screening for inactive aldehyde dehydrogenase-2 and alcohol-related cancer risk. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 1997; 6: 1105-1107.
- 6) 疫学研究に関する倫理指針 . 文部科学省、厚生労働省 . 2002年6月
- 7) 廣田良夫、田中隆、福島若葉、阪口元伸:特発性大腿骨頭壊死症の発生要因 多施設共同症例・対照研究 . 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 特発性大腿骨頭壊死症調査研究班 平成16~18年度総合研究報告書 .23-28, 2007

表 1. 症例, 対照間の一般特性比較

	症例	対照	p*
対象者数 (男/女)	73 (46/27)	250 (149/101)	0.600
年齢 (歳)	45.3 (20-79) Med=44	47.4 (18-79) Med=48	0.241
身長 (cm)	163.8 (141-182) Med=164.5	164.0 (125-186) Med=165.0	0.880
体重 (kg)	59.7 (40-91) Med=58	60.9 (41-95) Med=60	0.641
20 歳時体重 (kg)	55.3 (40-85) Med=55	56.6 (40-130) Med=55	0.387
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	22.2 (16.4-32.0) Med=22.0	22.5 (15.2-31.4) Med=22.2	0.502
1 週間のエタノール摂取量 (g/週)	262.5 (0-1579.2) Med=114.0	172.0 (0-3633.7) Med=54.0	0.031
1 日喫煙本数 (本/日)	14.1 (0-55) Med=15	11.5 (0-80) Med=1	0.031

特に記載がない限り、表中の数値は平均値 (範囲) を示す。Med:中央値。

\* $\chi^2$  検定、または Wilcoxon の順位和検定。

表 2 既往歴と特発性大腿骨頭壊死症

		症例	対照	Crude Odds Ratio		Adjusted Odds Ratio*	
		n (%)	n (%)	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
肝障害	+	7 (10)	13 (5)	2.42 (0.92-6.35)	0.072	4.03 (1.10-14.8)	0.035
	-	66 (90)	236 (95)	1		1	
肺炎	+	1 (1)	5 (2)	0.73 (0.08-6.81)	0.780		
	-	72 (99)	244 (98)	1			
高血圧	+	9 (12)	29 (12)	1.27 (0.53-3.00)	0.594		
	-	64 (88)	220 (88)	1			
糖尿病	+	2 (3)	14 (6)	0.55 (0.12-2.48)	0.440		
	-	70 (97)	234 (94)	1			
高脂血症	+	30 (42)	73 (30)	1.79 (1.00-3.20)	0.050	1.79 (0.78-4.12)	0.168
	-	42 (58)	174 (70)	1		1	
痛風	+	14 (19)	27 (11)	2.01 (0.96-4.20)	0.065	2.06 (0.70-6.10)	0.191
	-	58 (81)	221 (89)	1		1	

\*調整変数: 肝障害, 高脂血症, 痛風, 経口ステロイド使用歴, 喫煙 (pack-years), 飲酒 (drink-years).

表 3 薬剤使用歴と特発性大腿骨頭壊死症

		症例	対照	Crude Odds Ratio		Adjusted Odds Ratio*	
		n (%)	n (%)	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
胃腸薬	+	44 (62)	88 (36)	3.31 (1.81-6.05)	0.000	1.53 (0.60-3.92)	0.371
	-	27 (38)	158 (64)	1		1	
ビタミン剤	+	25 (36)	43 (18)	3.24 (1.71-6.16)	0.000	1.72 (0.55-5.35)	0.351
	-	45 (64)	200 (83)	1		1	
ステロイド (経口)	+	44 (62)	29 (13)	14.3 (6.36-32.2)	0.000	31.2 (7.93-122.7)	0.000
	-	27 (38)	210 (87)	1		1	
ステロイド (軟膏)	+	18 (26)	30 (13)	2.22 (1.14-4.30)	0.019	0.23 (0.05-0.96)	0.043
	-	52 (74)	207 (87)	1		1	
睡眠薬	+	19 (27)	38 (16)	2.41 (1.19-4.87)	0.014	1.87 (0.58-6.00)	0.294
	-	51 (73)	203 (84)	1		1	

\*調整変数：肝障害，高脂血症，痛風，表中に示す5種の薬剤使用歴，喫煙 (pack-years)，飲酒 (drink-years)。

# ステロイド性骨壊死発生に対する NO の影響についての検討

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

ステロイド性骨壊死家兎モデルにおいて、NO 発生剤である SNP (Sodium Nitroprusside) を投与することで、NO の骨壊死発生への影響について検討した。骨壊死発生率、血液データの結果について報告する。

## 1. 研究目的

ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生機序については、凝固異常<sup>(1)</sup>、脂質代謝異常<sup>(2)</sup>、酸化障害<sup>(3)</sup>などの関与が報告されている。また、過去の班会議において、Lipopolysaccharide(LPS)誘発家兎骨壊死モデルに対し NO ドナーである sodium nitroprusside(SNP)を投与すると、骨壊死発生率が有意に低下したと報告されており、NO も骨壊死発生に関与している可能性が示唆されている。<sup>(4)</sup> そこで今回、ステロイド性骨壊死家兎モデルに SNP を投与し、ステロイド性骨壊死発生に対する NO の影響について、予備実験を行った。

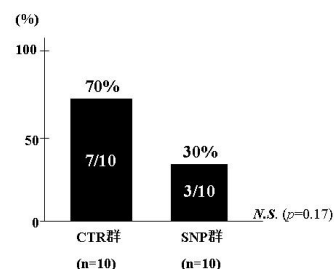
## 2. 研究方法

28 週齢以上の日本白色家兎 20 羽に、メチルプレドニゾロン(以下 MPSSL)20mg/kg を一回右臀筋内に注射した。これらを、ステロイド筋注前 1 週より筋注後 2 週まで SNP0.5mg/kg/day を毎日静脈注射した群 (SNP 群、n = 10 羽)と、ステロイドのみ投与した群 (CTR 群、n = 10 羽)の 2 群に分けた。各群を 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<sup>(5)</sup>。週に一回、AM8 ~ 9 時、SNP 投与前に採血を行い、硝酸イオン/亜硝酸イオン、各脂質系、および血小板の検査を行った。

## 3. 研究結果

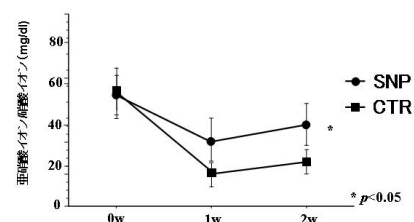
骨壊死発生率は、CTR 群で 10 羽中 7 羽の 70% であったのに対し、SNP 群では 10 羽中 3 羽の、30% であり、両群間には有意な差は認められなかった (Fig.1)。

Figure 1



血液データでは、硝酸イオン/亜硝酸イオンにおいて、SNP 群は CTR 群に比して有意な上昇を認めた。(Fig.2)

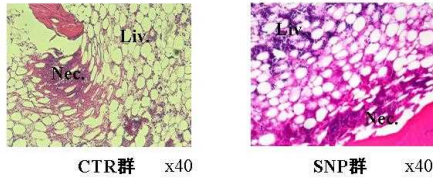
Figure 2



脂質系、血小板においては両群間に有意差は認められなかった。

各群における骨壊死発生家兎における病理像を供覧する。(Fig.3) 両群ともに、骨梁内骨細胞の Empty lacnae を認め、また著明な骨細胞の核濃縮を認めており、両群の壊死病理像は同様の所見を呈していた。

Figure 3



- 3) 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
- 4) 入佐隆彦、山本卓明、居石克夫 LPS誘発家兎骨壊死に及ぼすNOの影響 ION班会議、2000

#### 4. 考察

近年の家兎骨壊死モデルを用いた研究により、ステロイド性骨壊死の病因として、凝固能異常<sup>(1)</sup>、脂質代謝異常<sup>(2)</sup>、酸化障害<sup>(3)</sup>、そしてNO産生低下<sup>(4)</sup>などの多面的な要素が関与していることが報告されている。今回の予備的実験においては、NOドナーであるSNP投与により、骨壊死発生率の有意な低下は認めなかったが、今後nを増やし、ステロイド性骨壊死に対するNOの影響について検討をすすめていきたい。

#### 5. 結論

NO発生剤であるSNP投与群におけるステロイド性骨壊死発生率は30%であった。

#### 6. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### 7. 知的所有権の取得状況

なし

#### 8. 参考文献

- 1) Jones JP Jr. Intravascular coagulation and osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res.* 277:41-53,1992
- 2) Irisa T, Yamamoto T, Miyanishi K, Yamashita A, Iwamoto Y, Sugioka Y, Sueishi K. Osteonecrosis induced by a single administration of low-dose lipopolysaccharide in rabbits. *Bone.* 28(6):641-9,2001

# 大量ステロイド薬による血管内皮細胞障害に対する CNP による血管内皮細胞のアポトーシス制御機構の解明

田中良哉、岡田洋右、谷川隆久 (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 (ION) 発症には、高濃度糖質コルチコイド (GC) による血管内皮細胞のアポトーシスが関与することを報告してきた。今回、C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) が cGMP/PKG シグナルを抑制することによって GC による内皮細胞のアポトーシスを制御することを解明した。即ち、CNP は細胞内 cGMP 濃度の上昇を介して PKG を活性化すること、CNP によるアポトーシス阻害は PKG 阻害薬で解除されること、cGMP/PKG 活性化薬 (dipyridamole) が細胞内 cGMP 濃度を上昇させ、アポトーシスを阻害することを明らかにした。以上より、ION 発症に関与すると考えられる高濃度 GC による内皮細胞アポトーシス誘導による血管障害に対して、CNP は cGMP/PKG シグナルを介して抗アポトーシス作用を発揮することが分かり、CNP や cGMP/PKG 活性化薬が ION の治療薬となりう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<sup>1)</sup>。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後に ION が生じ易いことを報告してきた<sup>2)</sup>。

一方、ION の発症機序としては、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<sup>3)</sup>。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<sup>4,5)</sup>。

平成 19 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に対して、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) およびその下流シグナルである cGMP/PKG シグナルの関与について cGMP/PKG 活性化薬 (dipyridamole) を用いて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

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 µg/ml を添加すると、血管内皮細胞の増殖活性抑制、G0/G1 arrest、アポトーシスが誘導され、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を報告してきた。今回、メチルプレドニゾロン (m-PSL) 100 µg/ml を添加した状態に、内皮

細胞保護作用を持つ C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP)、その下流シグナルである cGMP/PKG シグナルによる血管内皮細胞障害抑制作用について検討し、以下の結果を得た。

- 1) 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。
- 2) 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。
- 3) CNP は、bcl-2 発現を増強させた。
- 4) 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。
- 5) 一方、cGMP/PKG 活性化薬 (dipyridamole) も、高濃度 m-PSL により惹起された viability 低下を抑制し、caspase-3/7、9 活性増強を介するアポトーシス誘導を抑制した。
- 6) また、CNP および dipyridamole による viability 低下抑制作用は、cGMP 阻害剤によって阻害された。
- 7) 更に、CNP および dipyridamole は細胞内 cGMP 濃度を上昇させた。

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 viability を caspase-9、3/7 を介するアポトーシスを誘導し低下させることが明らかとなった。一方、CNP は細胞内 cGMP 濃度の上昇を介して PKG を活性化すること、CNP によるアポトーシス阻害は PKG 阻害薬で解除されること、cGMP/PKG 活性化薬 (dipyridamole) が細胞内 cGMP 濃度を上昇させ、アポトーシスを阻害することが明らかとなった。

以上の結果より、CNP の抗アポトーシス作用は cGMP/PKG シグナルを介することが明らかとなり、CNP や cGMP/PKG 活性化薬 (dipyridamole) が高濃度 m-PSL における血管内皮細胞障害制御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<sup>3)</sup>。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<sup>2)</sup>。更に、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を報告した。

しかしながら、現在まで様々な増殖因子、抗凝固薬等による治療が試行されているが、明確に ION 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<sup>6,7)</sup>。今回の我々の結果、および現在までに報告されている 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 産生亢進等の作用により、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。しかしながら、CNP の半減期は非常に短く、現在も臨床応用されていないのが現状である。今回、その CNP の抗アポトーシス作用が cGMP/PKG シグナルを介することが明らかとなり、更に現在既に保険収載されている血管拡張薬である dipyridamole でも同様の作用が得られたことより、cGMP/PKG 活性化薬投与による ION の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 形成に関与するが、CNP や cGMP/PKG 活性化薬 (dipyridamole) はその抗アポトーシス作用により高濃度ステロイド薬による血管内皮障害を制御できる可能性が示唆された。CNP は未だ臨床での使用は不可能であるが、dipyridamole は既に保険収載されている血管拡張薬であり、今後の ION への治療、予防という治療応用への可能性が期待できる。

#### 6. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tsujimura S, Saito K, Nawata M, Nakayamada S, Tanaka Y. Overcoming drug resistance induced by P-glycoprotein on lymphocytes in patients with



- refractory rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* (in press)
- 2) Takeuchi T, Tatsuki T, Nogami N, Ishiguro N, Tanaka Y, Yamanaka H, Harigai M, Ryu J, Inoue K, Kondo H, Inokuma S, Kamatani N, Ochi T, Koike T. Post-marketing surveillance of the safety profile of infliximab in 5,000 Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* (in press)
  - 3) Sawamukai N, Saito K, Yamaoka K, Nakayamada S, Ra C, Tanaka Y. Leflunomide inhibits PDK1/Akt pathway and induces apoptosis of human mast cells. *J Immunol* (in press)
  - 4) Mine S, Iida T, Tabata T, Okada Y, Tanaka Y. Increased esophageal mucosal/submucosal blood flow in patients with gastroesophageal reflux disease: Normalization by treatment with a proton pump inhibitor. *J Gastroenterol Hepatol* (in press)
  - 5) Tanikawa R, Okada Y, Nakano K, Tanikawa T, Hosokawa R, Hirashima M, Yamauchi A, Tanaka Y. Interaction of galectin-9 with lipid rafts induces osteoblast proliferation through c-Src/ERK pathway. *J Bone Miner Res* (in press)
  - 6) Nishida K, Okada Y, Nawata M, Saito K, Tanaka Y. Anti TNF- $\alpha$  antibody increases serum adiponectin in humans. *Endocrine J* (in press)
  - 1) 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* (2007) 46: 597-603
  - 7) Nakayamada S, Saito K, Nakano K, Tanaka Y.  $\beta$ 1 integrin transduces an activation signal in T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (2007) 56, 1559-1568
  - 8) 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* (2007) 66, 470-475
  - 9) Yamaoka K, Saito K, Nakayamada S, Yamamoto M, Tanaka Y. Clinical images: Takayasu's arteritis. *Arthritis Rheum* (2007) 56, 2466
  - 10) Kishikawa H, Okada Y, Kawahara T, Saito K, Tanaka Y. A case of blue rubber bleb nevus syndrome treated by etidronate. *J Bone Miner Metab* (2007) 25: 138-141
  - 11) Hirai F, Nakayamada S, Okada Y, Saito K, Kurose H, Mogami A, Tanaka Y. Small GTPase Rho signaling is involved in  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin-mediated up-regulation of intercellular adhesion molecule 1 and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand on osteoblasts and osteoclast maturation. *Biochem Biophys Res Commun* (2007) 356: 279-285
  - 12) Tabata T, Mine S, Okada Y, Tanaka Y. Low molecular weight hyaluronan increases the uptaking of oxidized LDL into monocytes. *Endocrine J* (2007) 20:685-693
  - 13) Mori H, Okada Y, Tanaka Y. Etidronate for the treatment of progressive tumoral calcinosis in hemodialysis patients. *Internal Medicine* (2007) 46, 1485-1486
  - 14) 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* (2007) 12, 45-54
7. 知的所有権の取得状況
    1. 特許の取得
      - 1) 田中良哉. Fas抗原発現増強剤. 特開2003-171282
      - 2) 澤向範文、田中良哉. Akt シグナル経路の活性化阻害を目的として使用するレフルノミド. 特願2005-81972
      - 3) 田中良哉、中山田真吾. 骨粗鬆症治療剤. 特願2005-329298
    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) 新生忠司、岡田洋右、福島あゆみ、中山田真吾、齋藤和義、田中良哉. 特発性大腿骨頭壊死症とステロイド代謝の関連性・患者背景についての検

討. 臨床と研究 (2006) 83: 1833-1836

- 3) 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
- 4) Iida T, Mine S, Fujimoto H, Suzuki K, Minami Y, Tanaka T. Hypoxia-inducible factor-1a induces cell cycle arrest of endothelial cells. *Genes Cells* (2002) 7: 143-149
- 5) 岡田洋右, 谷川隆久, 飯田武, 田中良哉. ステロイド剤による血管内皮細胞障害～アポトーシス誘導～ *CLINICAL CALCIUM* (2007) 17:872-877
- 6) 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
- 7) 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

# ステロイド性骨壊死家兎モデルにおける骨髓内圧の検討

小平博之、小林千益  
堀内博志

(信州大学医学部運動機能学講座)  
(厚生連松代病院整形外科)

我々はこれまで、血管内皮細胞の反応性および骨髓内微小血管の血管運動性に注目して研究を行ってきた。現在我々は、骨にシールドされた環境が骨髓と脳に特徴的であることに注目し、骨髓内血流の研究を進めている。しかし骨髓内血流を再現性よく定量的に評価することにはいまだ成功していない。今回骨髓内循環を評価する指標として骨髓内圧に注目し、ステロイド剤投与にて骨髓内循環にどのような変化がどの時点で生じるかを、ステロイド投与家兎の大腿骨骨髓内圧を経時的に測定することで検討を行った。

## 1. 研究目的

我々は以前よりステロイド性大腿骨頭壊死症の原因として、骨髓内微小循環に注目してきた。我々の考えている仮説を図1に示す(図1)。一酸化窒素や super oxide に関連した血管内皮障害などの結果、血管の透過性が亢進し、髄内浮腫をきたし、間質圧が上昇。その結果、血管の collapse をきたし、更に間質圧が上昇する悪循環のサイクルが出現するというものである。しかしながら骨髓内血流を再現性よく定量的に評価することにはいまだ成功していない。そこで現在我々が注目しているのは、骨髓の解剖学的特徴である。硬い皮質骨に囲まれた環境は、骨髓および脳に特徴的な特殊な環境と考えられる。脳の局所循環においては Monro-Kellie の法則により脳内の総容積は一定に保たれている。例えば血管が拡張すれば血液容積が増すため、これに対抗して脳脊髄圧が上昇し血管を外側から圧迫し血管を収縮させている。つまりは頭蓋内の血管容積の増減、すなわち頭蓋内循環の変化と脳内圧は密接な関係があることが分かっている。我々は脳の局所循環と同様に、骨髓内循環も骨髓内圧と密接な関係があると考えた。つまり骨髓内圧を評価することで骨髓内微小循環の変化が評価できると考えた。前回の報告で我々は家兎骨髓内圧の測定可能な実験形を確立したことを報告した<sup>1)</sup>。その中で、下大静脈圧迫で下肢静脈圧は急峻な上昇を認め、これに伴い骨髓圧も急峻な上昇を認めた。つまり骨髓内のうっ血によって骨髓内圧が direct な影響を受けていることが示唆された。今回はステロイド剤

投与にて骨髓内循環にどのような変化がどの時点で生じるかを、ステロイド投与家兎の大腿骨骨髓内圧を経時的に測定することで検討を行った。

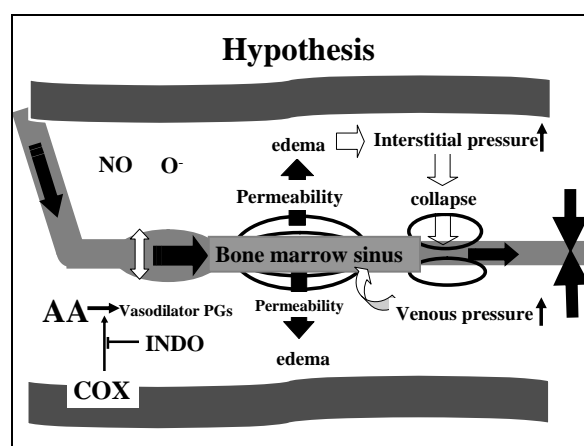


図1: 仮説

## 2. 研究方法

日本白色家兎、オス、3.0kg 前後を使用。麻酔はネンプタールを用いて全身麻酔とした。ポリグラフシステムを用いて、動脈圧、静脈圧、骨髓圧を同時に計測した。コントロール群とメチルプレドニゾロン 20mg/kg 投与群で比較を行った。メチルプレドニゾロン投与群では、投与後 24 時間、48 時間、72 時間でそれぞれ計測を行った。骨髓圧の計測方法は、大腿外側よりアプローチし、大腿骨外側まで展開。大腿骨遠位骨幹部に 1.5mm エアードリルにて開窓を行い、4Fr アンギオカテーテルを近位に向け挿入。これをポリグラフシステムに接続し、骨髓圧を計測した。

### 3. 研究結果

収縮期血圧が安定して 110mmHg 以上得られた兔を対象とした。代表的な圧波形を示す(図2)。ステロイド投与後 48 時間のものであるが、収縮期圧は 120 前後で安定、また静脈圧は 6~7mmHg でこれはどの兔でもほぼ同様の所見であった。また骨髄圧は計測開始(アンギオカテーテル挿入)から徐々に上昇し 10~15 分後に安定した。この例では骨髄圧は 85~95mmHg であった。

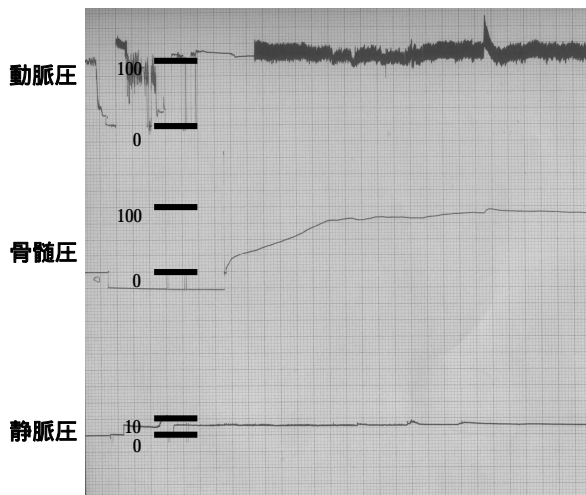


図2:圧波形

この方法でコントロール群 4 羽、ステロイド投与群は 24 時間が 3 羽、48 時間が 3 羽、72 時間が 3 羽、今回の研究対象とすることが出来た。結果をグラフに示す(図3)。コントロール群では骨髄内圧平均 59.25 (50~65)mmHg、24 時間群では 53.3(40~65)mmHg、48 時間群では 84(75~90)mmHg、72 時間群では 55 (50~60)mmHg と 48 時間群で骨髄内圧が高い傾向にあった。なお今回は対象が少なく、統計学的検討は行えなかった。

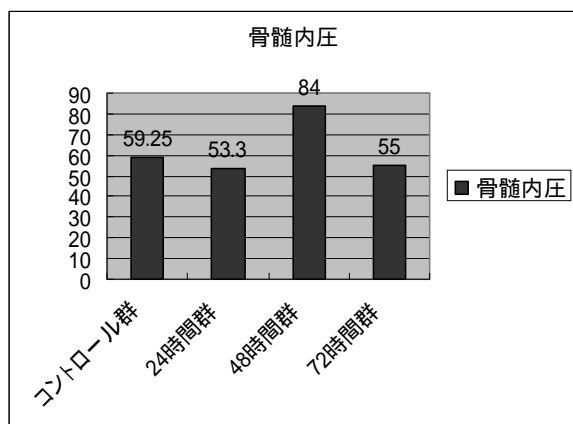


図3:結果

### 4. 考察

ステロイド性大腿骨壊死の原因として、大腿骨髄内の虚血発作との関連が示唆されている。柳下らは家兔では VEGF の発現がステロイド投与後 3 日で出現していると報告している<sup>7)</sup>。実際に骨髄内虚血が起こるにはそれ以前に何らかのイベントが必要であり、今回我々の研究では、家兔骨髄内圧がステロイド投与後 48 時間で上昇しており、これに矛盾しない結果であったと考える。また、骨髄内圧上昇の原因として、酸化ストレスによる血管内皮障害などによる、血管透過性の亢進、これに伴う骨髄内のうっ血などが考えられる。特に骨髄内のうっ血に関しては、我々は動脈圧の上昇に比べ静脈圧の上昇で急峻な骨髄内圧の上昇を認めたことを確認している。今後対象数を増やすとともに、これらの原因の検索を行っていく。

### 5. 研究発表

なし

### 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) 小平博之ほか: 家兔大腿骨における血行動態依存性骨髄内圧調節の検討、特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会、平成 18 年度研究報告書 44-45, 2007
- 2) 柳下信一ほか: ステロイド投与家兔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

# 内分泌器官としての骨髄脂肪細胞

## 各種 adipokine の遺伝子発現および

### グルココルチコイドによる PAI-1 分泌変化に関する検討

穂積 晃、尾崎 誠、熊谷謙治、坂本和隆、後藤久貴、進藤裕幸（長崎大学整形外科）

近年脂肪組織は内分泌臓器として捉えられ、その重要性が注目されている。しかし骨髄内に多量に存在する脂肪細胞については、これまでその生理機能に関する検討はあまり行われていない。今回われわれはヒト骨髄脂肪細胞初代培養系において glucocorticoid(GC)添加による各種 adipokine の遺伝子発現、また特に plasminogen activate inhibitor type1 (PAI-1) については、その分泌蛋白の定量を行い、その生理機能変化について検討した。さらに当科において壊死モデルとして使用している stroke prone spontanious hypertension rat Nagasaki(SHRSP/Ngsk) および Wister Kyoto rat (WKY) で steroid hormone 投与 非投与、壊死発生、非発生群の各 group より無作為抽出した摘出大腿骨頭標本の PAI-1 免疫染色を行った。

変形性股関節症、および大腿骨頸部骨折患者の prosthesis 挿入の際に採取した骨髄液より骨髄脂肪細胞を分離し浮遊培養による実験系とした。本実験系において Dexamethazone (DEX)(1  $\mu$ M) 添加群、非添加群において 24 hour の時点で RT-PCR 法により PPAR、adiponectin、leptin、PAI-1、TNF の mRNA の発現について比較検討し、さらに培養液中に放出された adiponectin、plasminogen activate inhibitor type 1 (PAI-1)、tumor necrosis factor alpha (TNF) については ELISA 法により比較定量した。全例において皮下、腹腔脂肪細胞と同様骨髄脂肪細胞においても各種 adipokine の発現を認めた。コントロール群と比較し DEX 添加群では PAI-1 に関しては mRNA の発現、分泌蛋白レベルともに明らかな増加を認めた。また SHRSP/Ngsk および WKY において steroid hormone 投与群では epiphysis、metaphysis 骨髄内の脂肪細胞の明らかな増加、膨化とともに脂肪細胞周囲および間質での PAI-1 の発現増強を認めた。

GC によって骨髄脂肪より産生される PAI-1 の急激な増加は骨内循環動態を悪化させ ION 発生の原因のひとつであると考えられる。

#### 1. 研究目的

近年脂肪組織は単なるエネルギーリザーバーではなく、種々の生理活性物質を産生する内分泌器官として捉えられるようになってきた。実際脂肪組織に発現する蛋白の 20～30% は分泌蛋白をコードしている遺伝子であり、アディポネクチン、レプチン、TNF、PAI-1 など一連の生理活性物質(adipokine) が脂肪細胞から産生、分泌され生体機能を調整していることが報告されている<sup>1-3</sup>。これらは、生理状況に応じて変化し、糖・脂質代謝や動脈壁の恒常性維持に重要な役割を果たしており、肥満・脂肪蓄積によるアディポカインの産生異常が、糖

尿病、高脂血症、高血圧、動脈硬化症といったいわゆるメタボリックシンドロームを引き起こす重要な risk factor となっていることが確立されている。

一方、骨髄内に多量に存在する脂肪細胞については、これまでその生理機能に関する検討はあまり行われていない。骨髄脂肪は加齢や GC 投与によりその量が増加することが臨床的に確認されており<sup>4,5</sup>、骨の脂肪髄化とともに骨髄脂肪細胞から産生、分泌される各種 adipokine はパラクラインメカニズムにより近傍に存在する各種細胞に影響を与えるものと考えられる。

一般に脂肪細胞はその肥大化により細胞の形質転

換を起こし、それ自身より分泌される adipokine の分泌バランスに変化が生じ身体の homeostasis に影響を与え、糖尿病をはじめとする代謝病を発生させることが判っている。今回、骨髄脂肪細胞に GC 投与による各種 adipokine の遺伝子発現および培養液中に放出された adipokine の定量を行い、その生理機能変化について調査した。さらに大腿骨頭壊死モデルとして用いている易卒中高血圧自然発症ラット(SHRSP/Ngsk)、およびウイスター京都ラット(WKY/Izm)の摘出大腿骨頭の PAI-1 免疫染色を行い steroid hormone 由来の大腿骨頭壊死発生における脂肪細胞の関与についても検討したので報告する。

## 2. 研究方法

### (実験 1)

(Materials; 骨髄脂肪細胞の採取)

大腿骨頸部骨患者(FNF)および変形性股関節症患者(OA)18 例 18 関節から大腿骨側 prosthesis 挿入の際に生じる骨髄液を使用した。平均年齢 74.9 才、男性 3 例、女性 15 例、(平均 BMI は 22.4)。基礎疾患として糖尿病、RA、明らかな骨代謝性疾患、および steroid hormone 投与歴のあるものは除外した。

(Cell culture)

髄液採取は手術時の大腿骨リーミングの際に生じてきた髄液を採取し、HAM F-12 nutrition mixture(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)を加えて清潔状態で保管し、酵素処理後、遠心操作を施行した。遠心操作で形成された上層の脂肪細胞層のみを採取し、HAM F-12 nutrition mixture にて希釈しさらに遠心操作施行し、この操作を数回繰り返すことで、脂肪細胞を分離した。

(Suspension Culture)

分離した脂肪細胞は十分に homogenize し 2 等分とし、Dexamethasone 添加群、非添加群(コントロール群)に分け、HAM F-12 nutrition mixture を加えて合計 5ml とした。それらを 50ml Falcon tube にて水平面より 15 度傾斜を加えた状態で 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 濃度下で 24 時間 incubate した。

上記の実験系において 24 時間にいたるまでの各種 adipokine の遺伝子発現、培養液中の分泌蛋白の定量を定量 PCR、ELISA にて測定した。

(ethics)

上記研究は、長崎大学医学部・歯学部附属病院倫理

委員会の承諾を得て開始し、個々の患者の同意を得た。

### (実験 2)

当科において大腿骨頭壊死モデルとして使用している SHRSP/Ngsk および WKY/Izm において steroid hormone 投与、非投与、壊死発生、非発生群の各群より無作為抽出した大腿骨頭標本で PAI-1 免疫染色を行った。実験飼育の詳細は Figure 1 に示す(Fig. 1)。

SHRSP/Ngsk	匹数	週齢(wks)		壊死	
		15	19	壊死数	%
control群	80	→	×	42	51.2
Steroid Hormone 投与群	62	↓	→	59	95.2
WKY/Izm					
control群	59	→	×	0	0
Steroid Hormone 投与群	20	↓	→	0	0

↓ Steroid hormone (Methylprednisolone) 5 mg bolus (20mg/Kg) im / sacrificed : ×

Fig. 1

## 3. 研究結果

(脂肪細胞における DEX の各種 adipokine の遺伝子発現および産生蛋白に及ぼす影響)

諸家の皮下および腹腔内臓脂肪における報告と同様に、骨髄脂肪細胞でも adiponectin、leptin、TNF、PAI-1 の発現を認めた<sup>1</sup>。また脂肪特異的転写因子である PPAR の発現を確認した(Fig. 2)。

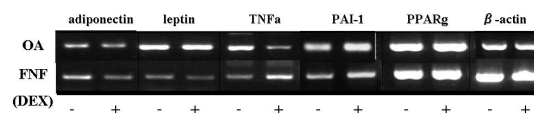


Fig. 2

DEX の影響について添加群ではコントロール群と比較し、PAI-1 は増強傾向を示し 24 時間の時点で遺伝子発現と分泌蛋白レベルはともに有意な増加を認めた(Fig. 3A、B)。また PAI-1 の発現は時間依存性に増加し、DEX 添加による発現増強効果は 12 時間に発現の peak がみられた(Fig4)。各種 DEX 濃度における反応性は 10<sup>-6</sup>mol/l (M) で最も強かった(Fig. 5A、B)。

今回の実験では、TNFα、Adiponectin、leptin に関しては症例によりばらつきが強く、一定の傾向は認めなかった。

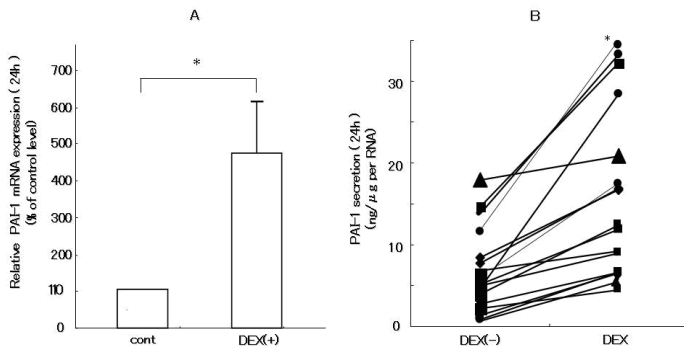


Fig. 3A, B

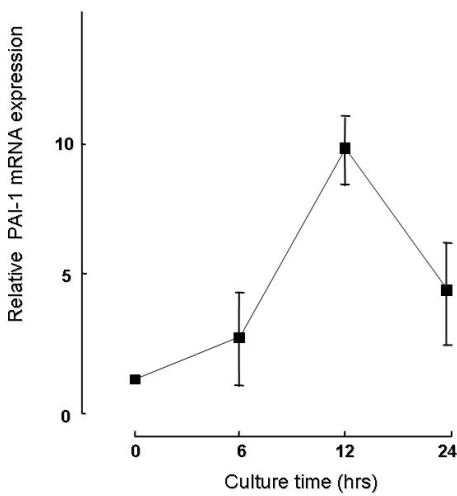


Fig.4

していた。そして脂肪細胞周囲および間質での PAI-1 の著しい発現を認めた。steroid hormone 投与群におけるラット間比較ではSHRSP/Ngsk における PAI-1 が強い発現を呈していた(Fig. 6)。

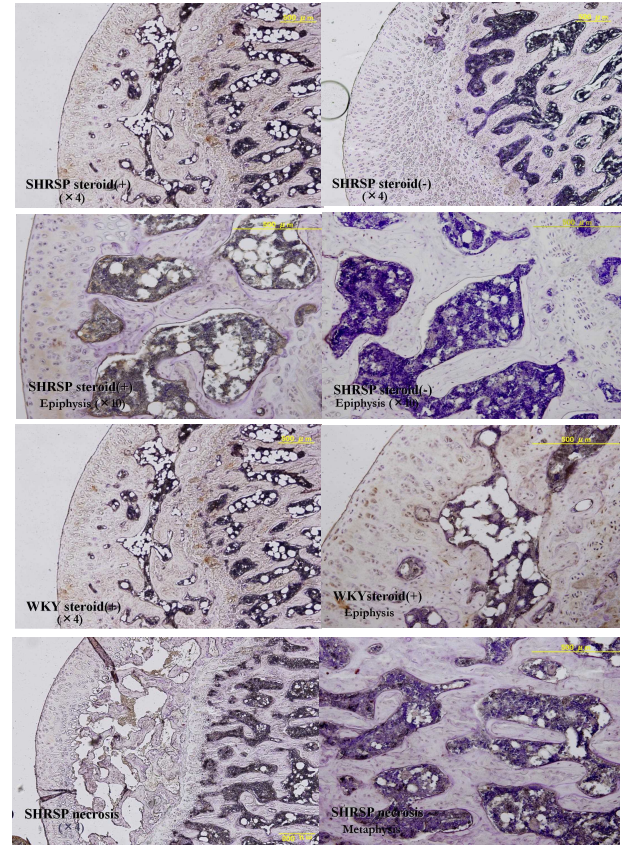


Fig.6

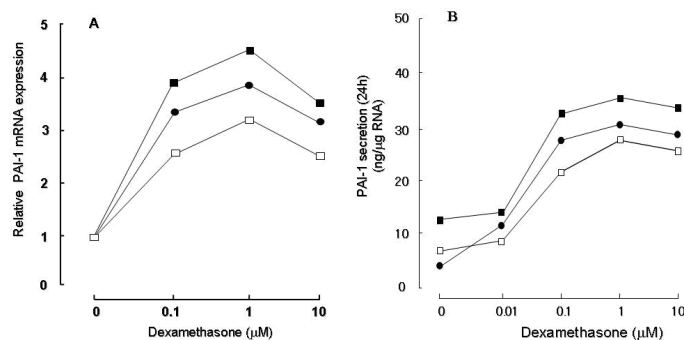


Fig. 5A, B

(SHRSP/Ngsk および WKYrat における PAI-1 免疫染色) SHRSP/Ngsk, WKY/Izm とも steroid hormone 投与群では壊死発生の有無にかかわらず Epiphysis と Metaphysis の骨髄内の脂肪細胞は、著明に増加・膨化

#### 4. 考察

現在脂肪細胞は各種生理活性物質を分泌し人体の代謝環境に重要な役割を果たしており、糖尿病をはじめ各種血管病変など様々な代謝疾患の原因の1つとして注目されている。

また従来、糖尿病あるいは糖代謝異常が骨代謝調節機構に様々な形で影響を及ぼすことが in vitro および in vivo で報告されてきた。その結果、insulin 作用不足によって細胞内代謝環境に大きな変化をもたらす可能性などが提唱されている<sup>4</sup>。しかし骨髄内に存在する脂肪細胞の各種 adipokine の発現に関する詳細な研究・報告およびその病態生理に関する報告は皆無である。

われわれは皮下や腹腔の脂肪組織に次ぐ、骨髄内脂肪細胞を第3の内分泌器官として位置付け、骨髄内で重要な役割を果たしているものと考え本研究を計画した。

PAI-1 は血栓傾向を促進する作用をもつ cytokine と

して様々な生理的变化に応じて皮下、内臓脂肪および血管内皮細胞から分泌調節されている。また GC が PAI-1 の遺伝子発現および分泌を増強させることはこれまでの報告で明らかにされている<sup>6,7</sup>。今回の研究で、骨髄脂肪細胞においてもその発現や分泌を認め、GC 投与 24 hour の時点で約 2.5 倍の分泌増加をみとめた。さらに GC 投与 rat においては骨髄内の明らかな PAI-1 発現の増強が確認された。また PAI-1 は脂肪細胞のほかにも、血管内皮細胞、マクロファージなどから分泌も確認された。骨髄内の閉鎖空間性や細胞多様性を考慮した場合、骨髄内部に外因性刺激が加わると、脂肪細胞や血管内皮細胞やマクロファージなどの各種隣接細胞間で TNF $\alpha$ 、IL1、IL 6、MCP-1 といった各種 cytokine の autocrine manner, paracrine manner による signal 伝達が生じ、相乗作用により骨髄内の PAI-1 濃度の上昇が生じたと考えられる。また過去の報告において抗凝固薬と抗高脂血症薬という異なる薬理作用の薬剤がそれぞれ単独で骨壊死抑制効果を示し、さらに 2 剤の併用で有意に骨壊死の発症予防効果を示している<sup>8</sup>。steroid hormone 投与による凝固異常および脂質代謝異常は ION 発生機序に深く関与している。今回の研究結果は壊死発生過程における重要な分子病態のひとつであると考えられる。

GC 投与による骨粗鬆症および大腿骨頭壊死の最も重要な発生要因として、骨髄脂肪細胞の機能変化によるものが考えられる。すなわち GC により脂肪細胞をはじめとする各種細胞からの PAI-1 の分泌が増加することにより線溶系の低下が生じ、微小血栓形成が生じる。微小血栓で静脈還流の減少が起こる一方で、動脈血の流入は持続し、骨髄内圧は上昇をきたし、結果的に動脈血流の減少する。さらには GC による脂肪細胞の肥大化が生じることにより adipokine の分泌バランスの変化を助長させ、持続的な骨内微小循環の抑制が生じた結果、骨壊死が発生するものと考えられる (fig. 7)。

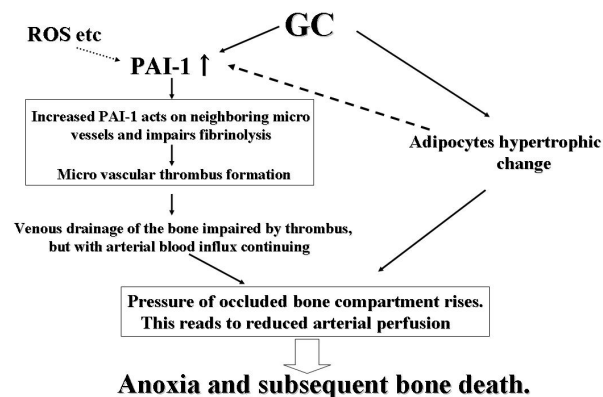


Fig. 7

## 5. 結論

骨髄脂肪細胞より分泌される PAI-1 は paracrine manner により骨の homeostasis に重要な役割を果たし、各種骨疾患の発生に重要な役割を担っていることが示唆された。更なる検討を加え、骨髄脂肪細胞の内分泌器官としての役割、特性が解明されることが期待される。

## 6. 研究発表

### 1. 論文発表

Murata M, Kumagai K, Miyata N, Osaki M, Shindo H. Osteonecrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: effect of glucocorticoid. J Orthop Sci. 2007; 12:289-295.

### 2. 学会発表

- 1) 穂積晃、尾崎誠、熊谷謙治、坂本和隆、後藤久貴、進藤裕幸: 内分泌器官としての骨髄脂肪細胞 Glucocorticoid による PAI-1 分泌変化に関する検討、第 33 回 日本整形外科基礎学術集会、静岡、2007.10.25.
- 2) 熊谷謙治、丹羽正美: SHRSP 大腿骨頭壊死 - 高齢ラットを対象にして -、第 44 回 高血圧関連疾患モデル学会学術総会、大阪市、2007.9.8.
- 3) Kenji Kumagai, Masato Tomita, Masahiko Suzuki, Masakazu Murata, Makoto Osaki, Noriaki Miyata, Akira Hozumi, Masami Niwa, and Hiroyuki Shindo: Osteonecrosis of Femoral Head in the Stroke Prone Spontaneously Hypertensive Rats - Especially in Old Rats, the 6th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies, Honolulu, Hawaii, U.S.A., 2007.10.12



- 4) Akira Hozumi, Makoto Osaki, Hiroyuki Shindo: Secretion of Adipokines and Hypertrophic Changes in Bone Marrow Adipocytes ASBMR 29<sup>th</sup> Annual Meeting, Honolulu, Hawaii, U.S.A., 2007.9.16
- 8) Motomura, G., et al., Combined effects of an anticoagulant and a lipid-lowering agent on the prevention of steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum*, 2004. 50(10): p. 3387-91.

## 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) Fasshauer, M., et al., Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 290(3): p. 1084-9.
- 2) Havel, P.J., Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes*, 2004. 53 Suppl 1: p. S143-51.
- 3) Kershaw, E.E. and J.S. Flier, Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89(6): p. 2548-56.
- 4) Hadjidakis, D.J., et al., Bone mineral density of both genders in Type 1 diabetes according to bone composition. *J Diabetes Complications*, 2006. 20(5): p. 302-7.
- 5) Gimble, J.M. and M.E. Nuttall, Bone and fat: old questions, new insights. *Endocrine*, 2004. 23(2-3): p. 183-8.
- 6) Halleux, C.M., et al., Hormonal control of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and production in human adipose tissue: stimulation by glucocorticoids and inhibition by catecholamines. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. 84(11): p. 4097-105.
- 7) Yamamoto, Y., et al., Dexamethasone increased plasminogen activator inhibitor-1 expression on human umbilical vein endothelial cells: an additive effect to tumor necrosis factor-alpha. *Pathobiology*, 2004. 71(6): p. 295-301.

# 血管内皮機能を標的とした特発性大腿骨頭壊死症の予防・治療法の検討

赤池雅史、栗飯原賢一、池田康将、八木秀介、松本俊夫

(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 生体情報内科学)

我々はこれまでにグルココルチコイド過剰マウスを用いた検討により、HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるピタバスタチンが大動脈における活性酸素の産生抑制と内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)の発現増加を介してNO産生を増加させ、グルココルチコイド過剰による内皮依存性血管拡張反応の障害を改善することを報告してきた。さらに昨年度は培養血管内皮細胞を用いた検討により、ピタバスタチンがコレステロール非依存的な多面的作用によりeNOSプロモーター活性の上昇を介して、eNOS蛋白発現を増加させることを報告した。今年度はピタバスタチンによるeNOS発現増加の機序についてさらに検討を加え、ピタバスタチンがグルココルチコイドによるeNOS mRNAの不安定化を改善するとともに、eNOSプロモーター活性の主要な調節系であるERK5-KLF2経路を活性化することを見出した。これらの結果はHMG-CoA還元酵素阻害薬が酸化ストレスの抑制とeNOS発現増加を介してNO bioavailabilityを増加させることにより、グルココルチコイド過剰による血管内皮機能障害を改善し、ステロイド性大腿骨頭壊死症の予防・治療薬となる可能性を示すものである。我々の確立した実験系はグルココルチコイド誘発性血管内皮機能障害に対して有効な薬剤の探索に有用であると考えられ、今後、さらに検討を進める予定である。

## 1. 研究目的

大腿骨頭における循環障害はグルココルチコイド過剰による大腿骨頭壊死症の発症機序として最も重要視されている。我々はこれまでにグルココルチコイド過剰による活性酸素の産生増加と内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)の発現減少による一酸化窒素(NO)の生物学的利用率(bioavailability)の低下が血管内皮機能障害を惹起することを報告し、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・治療標的となることを提唱してきた<sup>1)</sup>。

HMG-CoA還元酵素阻害薬(スタチン)は強力なコレステロール低下作用だけでなく、NAD(P)Hオキシダーゼの活性化抑制による活性酸素産生の抑制やeNOSの活性化ならびに発現増加によるNO産生増加などの血管系への直接的な多面的作用が注目されている<sup>2)</sup>。我々はこれまでにグルココルチコイド過剰マウスにみられる血圧上昇、内皮依存性血管拡張反応の減弱、および大動脈におけるeNOS発現の減少が、HMG-CoA還元酵素阻害薬であるピタバスタチンにより改善することを見出し、本剤がグルココルチコイド過剰による大腿骨頭壊死症の予防・治療

薬となる可能性を報告してきた。さらに昨年度はヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)の培養系においてピタバスタチンがコレステロール非依存的な多面的作用を介してeNOSプロモーター活性を上昇させ、eNOS蛋白発現を増加させることを報告した。そこで今年度はピタバスタチンによるeNOS発現増加の機序についてさらに検討した。

## 2. 研究方法

1) eNOS mRNAの発現ならびに安定性に及ぼすピタバスタチンの作用

HUVECの培養系にピタバスタチン $10^{-5}$ Mを添加し、その12時間後にデキサメサゾン(DEX) $10^{-5}$ Mを添加し、DEX添加16時間後にreal time PCR法により、eNOSのmRNA量を測定した。さらにactinomycin Dを添加し、eNOS mRNAの安定性について解析した。

2) ERK5活性に及ぼすピタバスタチンの作用

MAPKファミリーのひとつであるERK5のリン酸化・活性化は*in vitro* kinase assayあるいはリン酸化認識抗体を用いたウエスタンブロッティングにより評価されてきたが、手技が煩雑で、定量性、感度・精度の点で

不十分であり、ERK5 活性に影響を及ぼす薬剤のスクリーニングには不適であった。そこで我々は ERK5 の C 末端領域に転写活性領域があることに着目し、Gal4-DNA 結合ドメインと ERK5 との融合蛋白を発現するベクターを作成し、dual-luciferase reporter gene assay を用いることにより培養細胞における ERK5 活性を高感度で定量的に評価できるシステムを開発した<sup>3)</sup>。このシステムを用いて、HUVEC においてピタバスタチン、アトロバスタチンおよびシンバスタチンが ERK5 活性に及ぼす作用を解析した。また、コレステロール合成経路の中間産物であるメバロン酸 100 $\mu$ M、ゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) 10 $\mu$ M、あるいはファルネシルピロリン酸 (FPP) 10 $\mu$ M をピタバスタチンと同時に添加し ERK5 活性に及ぼす影響について解析した。

### 3) Krüppel-like factor 2 (KLF2) プロモーター活性に及ぼすピタバスタチンの作用

近年、Zn フィンガー型転写因子である KLF2 が eNOS の発現調節を含む血管内皮細胞機能維持に重要な役割を果たしていることが報告され、その発現は ERK5 により制御されていることが明らかにされた<sup>4)</sup>。そこで KLF2 プロモーター(-157 および-924)を組み込んだ luciferase reporter vector を作成し、dual-luciferase reporter assay を用いて、bovine arterial endothelial cell (BAEC) (Cell Systems, USA) の培養系において KLF2 プロモーター活性に及ぼすピタバスタチンの作用について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言、徳島大学遺伝子組み換え実験安全管理委員会規定、徳島大学医学部動物実験委員会規定ならびに徳島大学倫理委員会規定に基づき施行した。

## 3. 研究結果

### 1) eNOS mRNA の発現ならびに安定性に及ぼすピタバスタチンの作用

HUVEC における eNOS mRNA の発現量は DEX の添加により有意に減少したが、ピタバスタチンの添加により有意に増加した。eNOS mRNA の安定性は DEX 添加により有意に減少したが、この作用はピタバスタチンの添加により消失した(図 1)。

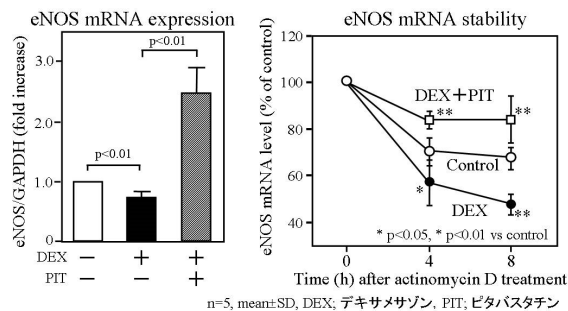


図1. ピタバスタチンはグルコルチコイドによるeNOS mRNAの不安定化を改善する

### 2) ERK5 活性に及ぼすピタバスタチンの作用

ピタバスタチンは濃度依存的に ERK5 を活性化した(図 2)。また、アトロバスタチンおよびシンバスタチンにおいてもピタバスタチンと同程度の ERK5 活性化作用が認められた(図 3)。

さらにメバロン酸ならびに GGPP の添加によりピタバスタチンの ERK5 活性化作用は完全に消失したが、FPP の添加では有意な変化がなかった(図 4)。

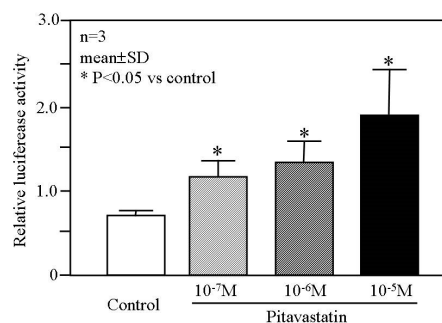


図2. ピタバスタチンは用量依存的にERK5を活性化する

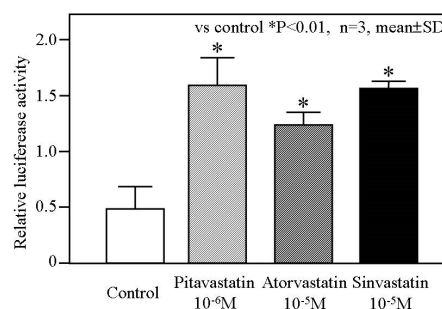


図3. HMG-Co還元酵素阻害薬はERK5を活性化する

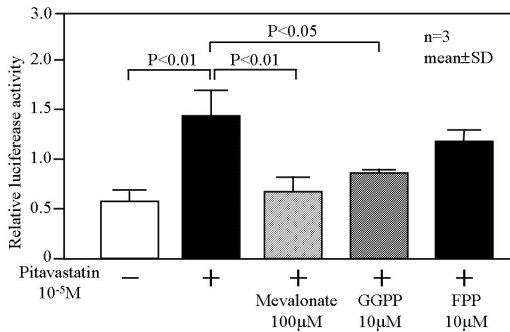


図4. ピタバスタチンによるERK5の活性化作用はメバロン酸あるいはゲラニルゲラニルピロリン酸により消失する

### 3) KLF2 プロモーター活性に及ぼすピタバスタチンの作用

BAEC の培養系においてピタバスタチンは KLF2 プロモーター活性を濃度依存的に有意に上昇させた(図5)。

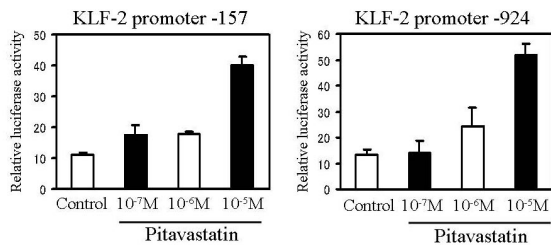


図5. ピタバスタチンはKLF2プロモーター活性を亢進する

## 4. 考察

我々はこれまでにグルココルチコイド過剰が酸化ストレス亢進と NO 産生低下による NO bioavailability の低下を介して血管内皮機能障害を引き起こすことを報告し<sup>1)</sup>、このような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の標的となりうる可能性を提唱してきた。さらに、強力なコレステロール低下作用に依存せず、血管内皮細胞への多面的保護作用を有する HMG-CoA 還元酵素阻害薬に着目し、グルココルチコイド誘発性血管内皮機能障害に及ぼす作用を検討してきた。グルココルチコイド過剰マウスを用いたこれまでの検討では、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 発現の低下および活性酸素産生増加は、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見出している。さらに、昨年度は HUVEC の培養系を用いた検討では、ピタバスタチン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 の産生抑制を介して DEX による eNOS 蛋白発現の抑制を改善することを報告した。

今回の検討では、ピタバスタチンは DEX による eNOS mRNA 発現量の減少を著明に改善した。我々は昨年度に、ピタバスタチンが eNOS プロモーター活性を亢進することを報告したが、今回の検討ではピタバスタチンが DEX による eNOS mRNA の不安定化を改善することも明らかとなり、ピタバスタチンは eNOS 遺伝子の転写亢進と eNOS mRNA の分解抑制の二つの機序を介して eNOS 蛋白発現量を著明に増加させると考えられる。

今回の検討で見出されたピタバスタチンの ERK5 活性化作用は濃度依存的であり、10<sup>-7</sup>M ~ 10<sup>-5</sup>M でみられており、臨床的な薬物血中濃度においても ERK5 を活性化することが確認された。また、同じスタチンであるアトロバスタチンおよびシンバスタチンにおいても同程度の ERK5 活性化作用がみられたことから、この作用はスタチンの class effect と考えられる。さらにメバロン酸や GGPP の培養液への添加によりピタバスタチンの ERK5 活性化作用が消失し、FPP はこれに影響を与えなかったことから、ピタバスタチンの多面的作用のひとつである GGPP 産生の低下が ERK5 活性化に関与していると考えられる。

近年、血管内皮細胞に対するシェアストレス刺激が ERK5 の活性化とそれによる MEF2C の活性化を介して KLF2 発現を亢進することが報告され、eNOS 発現増加を含め、抗炎症、抗血栓、血管トーン制御などの血管内皮細胞機能制御における最も重要な転写因子として非常に注目されている<sup>4)</sup>。また、HMG-CoA 還元酵素阻害薬が KLF2 発現を亢進させることも報告されている<sup>5)</sup>。本研究においてもピタバスタチンが KLF2 プロモーター活性を濃度依存的に亢進することが示された。これらの成績は ERK5-KLF2 経路の活性化がピタバスタチンによる eNOS プロモーター活性亢進の機序であることを強く示唆するものである。

## 5. 結論

グルココルチコイド過剰による血管内皮機能障害に対する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、すなわち eNOS mRNA の安定性の改善と ERK5-KLF2 経路の活性化を介した eNOS プロモーター活性亢進による NO 産生の増加に基づくことが示唆された。ピタバスタチンはグルココルチコイド誘発性血管内皮機能障害の改善を介して大腿骨頭壊死症の治療ならびに予防に有効である可能性がある。