

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yagi S, Aihara K, Ikeda Y, Sumitomo Y, Yoshida S, Ise T, Iwase T, Ishikawa K, Azuma H, Akaike M, Matsumoto T. Pitavastatin, an HMG-CoA Reductase Inhibitor, Exerts eNOS-independent Protective Actions against Angiotensin II-Induced Cardiovascular Remodeling and Renal Insufficiency. *Circ Res* 102(1):68-76, 2008.
- 2) Aihara K, Azuma H, Akaike M, Ikeda Y, Sata M, Takamori N, Yagi S, Iwase T, Sumitomo Y, Sato T, Nakamichi Y, Yamamoto Y, Yoshimura K, Watanabe T, Nakamura T, Oomizu A, Tsukada M, Hayashi H, Sudo T, Kato S, Matsumoto T. Strain-dependent embryonic lethality and exaggerated vascular remodeling in heparin cofactor II-deficient mice. *J Clin Invest* 117:1486-9, 2007.
- 3) Matsumoto T, Kubodera N. ED-71, a new active vitamin D3, increases bone mineral density regardless of serum 25(OH)D levels in osteoporotic subjects. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103:584-6, 2007.
- 4) Obata T, Yokota I, Yokoyama K, Okamoto E, Kanezaki Y, Tanaka Y, Maegawa H, Teshigawara K, Hirota F, Yuasa T, Kishi K, Hattori A, Hashida S, Masuda K, Matsumoto M, Matsumoto T, Kashiwagi A, Ebina Y. Soluble insulin Receptor ectodomain is elevated in the plasma of patients with diabetes. *Diabetes* 56: 2028-35, 2007.
- 5) Sekimoto E, Ozaki S, Ohshima T, Shibata H, Hashimoto T, Abe M, Kimura N, Hattori K, Kawai S, Kinoshita Y, Yamada-Okabe H, Tsuchiya M, Matsumoto T. A single chain Fv diabody against HLA-A molecules specifically induces myeloma cell death in the bone marrow environment. *Cancer Res* 67:1184-92, 2007.
- 6) Tanaka Y, Abe M, Hiasa M, Oda A, Amou H,

Nakano A, Takeuchi K, Kitazoe K, Kido S, Inoue D, Moriyama K, Hashimoto T, Ozaki S, Matsumoto T. Myeloma cell-osteoclast interaction enhances angiogenesis together with bone resorption: a role for VEGF and osteopontin. *Clin Cancer Res* 13: 816-23, 2007.

- 7) Murakami H, Handa H, Abe M, Iida S, Ishii A, Ishikawa T, Ishida T, Oota M, Ozaki S, Kosaka M, Sakai A, Sawamura M, Shimazaki C, Shimizu K, Takagi T, Hata H, Fukuhara T, Fujii H, Miyata A, Wakayama T, Takatsuki K. Low-dose thalidomide plus low-dose dexamethasone therapy in patients with refractory multiple myeloma. *Eur J Haematol.* 79(3):234-239, 2007.
- 8) 赤池雅史, 松本俊夫. ステロイド過剰による NO bioavailability の低下と血管内皮機能障害. *CLINICAL CALCIUM* 17(6):864-870, 2007.

2. 学会発表

- 1) 赤池雅史 シンポジウム「大腿骨頭壊死症の病態解明」ステロイド性骨壊死と血管内皮障害 第34回日本股関節学会、金沢市、2007.10.11.
- 2) Yagi S, Aihara K, Akaike M, Ikeda Y, Sumitomo Y, Iwase T, Matsumoto T. A Novel eNOS-Independent Protective Action of Statin Against Angiotensin II-Induced Cardiovascular Remodeling and Renal Injury. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology Annual Conference 2007. Chicago USA, 2007.4.19-21.*
- 3) Yagi S, Aihara K, Ikeda Y, Sumitomo Y, Iwase T, Akaike M, Matsumoto T. Pitavastatin protects the cardio-renal system against angiotensin II-induced organ damage through eNOS-independent actions. *AHA Annual High Blood Pressure Research Conference. Tucson, USA. 2007.9.26-29.*
- 4) Yagi S, Aihara K, Ikeda Y, Sumitomo Y, Iwase T, Akaike M, Matsumoto T. Pitavastatin ameliorates angiotensin II-induced cardiorenal insufficiency in eNOS Knockout mice through attenuating rac-1-mediated oxidative stress. *American Heart Association Sessions 2007. Orland, USA.*

2007.11.3-7.

- 5) Akaike M, Aihara K, Ikeda Y, Yagi S, Ishikawa K, Sumitomo Y, Iwase T, Azuma H, Matsumoto T. Glucocorticoid-induced Vascular Endothelial Dysfunction and Hypertension is Ameliorated by vastatin, a HMG-CoA Reductase Inhibitor, through Increased Nitric Oxide Production. 71th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Kobe, 2007.3.15-17.
- 6) 赤池雅史、栗飯原賢一、八木秀介、池田康将、石川カズ江、住友由佳、岩瀬俊、松本俊夫。グルコシルコリチコイド誘発性高血圧に対するピタバスタチンの効果とその機序の検討。第30回日本高血圧学会学総会、宜野湾市、2007.10.25-27.
- 7) 八木秀介、栗飯原賢一、池田康将、伊勢孝之、住友由佳、岩瀬俊、赤池雅史、松本俊夫。Pitavastatin は angiotensin II による心腎障害を eNOS 非依存性に rac1 抑制による酸化ストレス抑制を介して改善する。第30回日本高血圧学会学総会、宜野湾市、2007.10.25-27.
- 8) 住友由佳、栗飯原賢一、伊勢孝之、八木秀介、岩瀬俊、赤池雅史、松本俊夫。レニン・アンジオテンシン活性下におけるヘパリンコファクターの心筋リモデリングへの影響。第30回日本高血圧学会学総会、宜野湾市、2007.10.25-27.

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) 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

- 3) Akaike M, Che W, Marmarosh NL, Ohta S, Osawa M, Ding B, Berk BC, Yan C, Abe J. The hinge-helix 1 region of peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPAR γ 1) mediates interaction with extracellular signal-regulated kinase 5 and PPAR γ 1 transcriptional activation: involvement in flow-induced PPAR γ activation in endothelial cells. *Mol Cell Biol* 24(19):8691-704, 2004.
- 4) Parmar KM, Larman B, Dai G, et al. Integration of flow-dependent endothelial phenotypes by Kruppel-like factor 2. *J Clin Invest* 116:49-58, 2006.
- 5) Sen-Banerjee S, Mir S, Lin Z, et al. Kruppel-like factor as a novel mediator of statin effects in endothelial cells. *Circulation* 112:720-726, 2005.

電磁場刺激によるステロイド投与後骨壊死発生予防効果

石田雅史、藤岡幹浩、栗林正明、久保俊一

(京都府立医大大学院医学研究科 運動器機能再生外科学)

ステロイド投与後に好発するステロイド性骨壊死(骨壊死)には根本的な治療法や確実な予防法が確立されていない。骨壊死の原因はステロイド投与後に生じる骨内の虚血である。骨折治療に臨床利用されて安全性が確認されている電磁場刺激が、血管新生作用と血管拡張作用によって骨内の虚血を抑制し、骨壊死の発生率と重症度を低下させると仮説を立てた。ステロイドを単独投与した家兔を40羽、ステロイド投与の前後に電磁場刺激を与えた家兔を40羽として両群における骨壊死組織像を比較検討した。電磁場刺激を与えた家兔ではステロイド投与後の骨壊死発生率が有意に低下していた。一方で骨壊死の大きさなどその他の組織所見には電磁場刺激の有無による有意差を認めなかった。電磁場刺激は骨壊死の重症度を低下させる作用はない可能性があるが、骨壊死の発生率を低下させることを示した。電磁場刺激は低侵襲なステロイド性骨壊死予防法として有望である。

1. 研究目的

骨壊死はステロイドの投与後に骨内が虚血に陥って発生すると考えられている。一方、骨折治療に広く臨床利用されて安全性が確認されている電磁場刺激が、血管新生促進作用と血管拡張作用をもつことが確認されている^{1,2)}。ステロイド投与に並行して電磁場刺激を与えることによって、骨内の虚血を抑制して骨壊死を予防する可能性があると考えた。本研究の目的は電磁場刺激がステロイド投与後骨壊死の発生率と重症度に対して影響を与えるかどうかを動物実験で検証することである。また、ステロイド投与後に生じる骨内虚血の原因のひとつと考えられている骨髄脂肪細胞径に対して電磁場刺激が与える影響も検討した^{3,4)}。

2. 研究方法

90羽の雌性日本白色家兔(28-32週齢、3.2-4.3kg)を以下の4群に分けた。(1)ステロイド単独投与群(40羽):1週間飼育した後にメチルプレドニゾロン(methylprednisolone: MPSL)を筋注射し、4週間飼育した。(2)ステロイド・電磁場刺激群(40羽):電磁場刺激を1日10時間家兔の両殿部に与えた後、MPSLを殿筋内に1回筋注射した。MPSL投与後も1日10時間の電磁場刺激を4週間与えた(図1)。(3)電磁場

刺激単独群(5羽):家兔の両殿部に1日10時間の電磁場刺激を5週間与えた。(4)無処置群(5羽):MPSLや電磁場刺激を与えずに5週間飼育した。

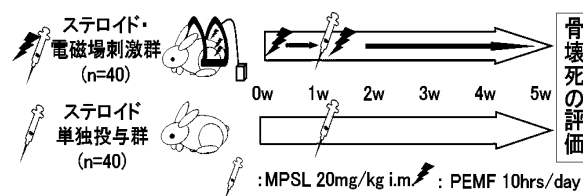


図1 スteroid・電磁場刺激群とステロイド単独投与群

ステロイドはパルス療法に相当する20mg/kgのMPSLを1回殿筋内に筋注射した⁵⁾。また、電磁場刺激は骨折の治療に臨床利用されているEBI Bone Healing System[®](Biomet Osteobiologics, Parsippany, NJ)を用いて発生させた。これはコイルに囲まれた領域に最大25Gの電磁場を15Hzで発生させる装置である。家兔の両大腿に電磁場刺激が与えられるようにコイルを設置して、骨折治療における投与条件に準じて1日10時間電磁場刺激を与えた。電磁場刺激を開始してから血管新生が認められるまで1週間を要するため、ステロイド投与1週間前から電磁場刺激の投与を開始した¹⁾。

骨壊死の有無を判定する組織学的検討は、MPSL

投与から4週後に行った。各群をペントバルビタールの大量投与によって安楽死させ、大腿骨の近位1/3と遠位1/3を採取した。それぞれの正中冠状断のヘマトキシリンエオジン染色組織標本を作製した。

全ての組織学的な評価は盲検化して二人の検者が行った。これまでの報告に従って、骨髓造血細胞と脂肪細胞の壊死を伴う骨梁内骨細胞の核の濃縮あるいは空胞化を呈する領域と、骨梁が存在しない部位でも骨髓造血細胞と脂肪細胞の広範な壊死を認める領域を骨壊死と判定した。骨細胞の空胞化と脂肪細胞の壊死のみを認め、骨髓造血細胞の壊死を認めない領域は骨壊死と判定しなかった。大腿骨の組織標本中に一つでも骨壊死領域を認めた家兎は骨壊死発生家兎とした⁵⁾。

まず、電磁場刺激の骨壊死予防効果を判定するためにステロイド単独投与群とステロイド・電磁場刺激群の骨壊死発生率を比較した。

次に骨壊死発生家兎を対象にして、骨壊死の重症度に影響を与える因子について検討した。ステロイド性骨壊死が多発することを電磁場刺激が抑制するかどうかを検討するために、各群の骨壊死発生家兎1羽あたりの骨壊死数を検討した。

電磁場刺激が骨壊死の大きさに対して影響を与えるかどうかを調べるために、骨壊死の面積占有率を測定した。骨壊死の占有率は、大腿骨近位1/3での骨壊死領域の面積を測定して大腿骨近位1/3の面積に対する割合を算出することで求めた。面積は顕微鏡からコンピューターに取り込んだ画像をNIH image software(US National Institutes of Health, Maryland)を用いて算出した。修復部は壊死組織には含めなかった⁵⁾。

電磁場刺激の骨壊死予防効果に部位による差異があるかどうかを検討するために、大腿骨近位1/3および遠位1/3のそれぞれで骨壊死を発生した家兎数を比較した。

電磁場刺激が骨壊死の修復過程に影響するかどうかを確認するために、ステロイド単独投与群とステロイド・電磁場刺激群において大腿骨組織標本で骨壊死修復反応としての添加骨形成の有無を比較した。

骨髓脂肪細胞に電磁場刺激が与える影響を評価するためにステロイド単独投与群とステロイド・電磁場刺激群における骨髓脂肪細胞径を算出して比較した。骨髓脂肪細胞径は、右大腿骨近位1/3の非壊死領域からランダムに選択した4部位(1部位 =

$25 \times 10^{-8} \text{m}^2$)の25個ずつの骨髓脂肪細胞の長径をNIH image softwareで測定した平均値とした⁶⁾。

統計学的検討は骨壊死発生率と部位ごとの骨壊死発生家兎数の比較を二乗検定、家兎1羽あたりの骨壊死発生数の比較をMann-Whitney U test、骨壊死の占有率の比較をunpaired t test、脂肪細胞径の比較をOne-way analysis of varianceとScheffe's post hoc testで判定した。p<0.05を統計学的有意とした。

3. 研究結果

ステロイド単独投与群40羽中26羽(65%)に骨壊死を認めた。一方、ステロイド・電磁場刺激群で骨壊死を認めたのは40羽中15羽(37.5%)であった。両群の骨壊死発生率に有意差を認めた(p=0.01)。また、電磁場刺激単独群、無処置群では骨壊死の発生を認めなかった。

続いて骨壊死を生じていた家兎における多発性についての検討を行った。骨壊死発生家兎1羽あたりの骨壊死発生数はステロイド単独群で 1.1 ± 0.3 個、ステロイド・電磁場刺激群で 1.2 ± 0.2 個であり、有意差を認めなかった。

骨壊死の大きさに関する検討では、骨壊死の大腿骨近位1/3における面積占有率は、ステロイド単独投与群では $2.8 \pm 1.9\%$ 、ステロイド・電磁場刺激群では $2.7 \pm 1.8\%$ であり、両群間に有意差を認めなかった。

部位による予防効果の差異の検討では、大腿骨近位1/3で骨壊死を発生した家兎はステロイド単独投与群の26羽中15羽(58%)、ステロイド・電磁場刺激群の15羽中10羽(67%)であり、大腿骨遠位1/3に骨壊死が発生していた家兎はステロイド単独投与群では26羽中14羽(54%)、ステロイド・電磁場刺激群では15羽中8羽(53%)であった。部位ごとの骨壊死発生家兎数で両群間に有意差を認めず、電磁場刺激の部位による骨壊死予防効果の差異は確認できなかった。

骨壊死の修復過程への影響については、ステロイド単独投与群およびステロイド・電磁場刺激群ともに添加骨形成を認めなかった。

骨髓脂肪細胞に電磁場刺激が与える影響に関して、骨髓脂肪細胞径はステロイド単独投与群で $61.0 \pm 4.5 \mu\text{m}$ 、ステロイド・電磁場刺激群で $56.9 \pm 5.4 \mu\text{m}$ 、電磁場刺激単独群で $46.1 \pm 3.4 \mu\text{m}$ 、

無処置群で $47.6 \pm 3.0 \mu\text{m}$ であった。ステロイド単独投与群は無処置群に比べて有意に骨髓脂肪細胞径が増大していた($p < 0.01$)。また、電磁場刺激の有無では脂肪細胞径に有意差を認めなかった($p = 0.43$)。

4. 考察

われわれは電磁場刺激が骨壊死の発生率、多発性、大きさ、発生部位、修復過程、また、骨壊死の発生機序の一つと考えられている骨髓脂肪細胞径に与える影響について検証した。

その結果、電磁場刺激が家兎における骨壊死の発生率を低下させることを確認した。ステロイド投与後の骨壊死に対して電磁場刺激がもつ予防効果に関しての報告はこれまでになく、本研究が初めてである。

家兎の骨壊死は、骨壊死が骨髓細胞壊死を周囲に伴う骨細胞の空胞化を伴い、その修復過程では肉芽組織と添加骨形成を示す。その組織学的な特徴はヒトの骨壊死と類似しており、ヒトのステロイド投与後の骨壊死の病態を反映するモデルとして多くの研究に用いられている。本研究で ION 発生抑制に対する有効性が確認できた電磁場刺激が、ヒトのステロイド投与後の骨壊死に対しても予防効果をもつ可能性がある。

本研究においては、電磁場刺激は骨壊死の個体あたりの発生数、大きさおよび発生部位に影響を与えず、修復を促進する所見も認めなかった。電磁場刺激を骨壊死の治療に試用したこれまでの臨床研究においても、その効果は評価が一定しておらず^{7,8)}、電磁場刺激が骨壊死の修復反応や、重症度には関連しない可能性がある。

骨壊死の発生に関与する可能性があるとして報告された骨髓脂肪細胞径に対しては、電磁場刺激の明らかな影響を認めなかった。そのため、本研究では電磁場刺激が骨壊死発生率を低下させる機序については明らかにできなかったが、骨髓脂肪細胞径への影響を介してではなく、電磁場刺激の持つ血管新生促進作用や血管拡張作用がステロイド投与後の骨内虚血を抑制して骨壊死率を低下させたと推察した。

5. 結論

本研究は電磁場刺激が家兎の骨壊死発生率を低下させることをはじめて示した。すでに臨床利用されている電磁場刺激を用いた研究結果であり、電磁場

刺激はヒトのステロイド性骨壊死に対する予防法としても有望であると考えられる。

6. 研究発表

1. 論文発表

Ishida M, Fujioka M, Takahashi K, Arai Y, Kubo T. Electromagnetic Fields: A Novel Prophylaxis for Steroid-induced Osteonecrosis, Clin Orthop Relat Res, in press.

2. 学会発表

石田雅史、藤岡幹浩、栗林正明、高橋謙治、新井祐志、久保俊一：電磁場刺激によるステロイド性骨壊死予防効果、第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会、浜松、2007.10.25-26.

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) Tepper OM, Callaghan MJ, Chang EI, Galiano RD, Bhatt KA, Baharestani S, Gan J, Simon B, Hopper RA, Levine JP, Gurtner GC. Electromagnetic fields increase in vitro and in vivo angiogenesis through endothelial release of FGF-2. FASEB J. 2004;18:1231-1233.
- 2) Smith TL, Wong-Gibbons D, Maultsby J. Microcirculatory effects of pulsed electromagnetic fields. J Orthop Res. 2004;22:80-84. Wang GJ, Lennox DW, Reger SI, Stamp WG, Hubbard SL. Cortisone-induced intrafemoral head pressure change and its response to a drilling decompression method. Clin Orthop Relat Res. 1981;159:274-8.
- 3) Miyanishi K, Yamamoto T, Irisa T, Yamashita A, Jinguishi 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)*. 2001;40:196-201.

- 4) Miyanishi K, Yamamoto T, Irida T, Yamashita A, Jingushi S, Noguchi Y, Iwamoto Y. Bone marrow fat cell enlargement and a rise in intraosseous pressure in steroid-treated rabbits with osteonecrosis. *Bone*. 2002;30:185-190.
- 5) Yamamoto T, Irida T, Sugioka Y, Sueishi K. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum*. 1997;40:2055-2064.
- 6) Shaw SL, Salmon ED, Quatrano RS. Digital photography for the light microscope: results with a gated, video-rate CCD camera and NIH-image software. *Biotechniques*. 1995;19:946-955.
- 7) Steinberg ME, Brighton CT, Bands RE, Hartman KM. Capacitive coupling as an adjunctive treatment for avascular necrosis. *Clin Orthop Relat Res*. 1990;261:11-18.
- 8) Massari L, Fini M, Cadossi R, Setti S, Traina GC. Biophysical stimulation with pulsed electromagnetic fields in osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88:56-60.

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実験

- 第2報 -

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)

前回我々は、日本白色家兎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。10羽で検討を行ったが前回は8羽までしか結果が出ていなかった。最終的には10羽中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。また抗8-OHdG抗体による免疫組織学的検討を行ったところ、酸化ストレス剤投与群で有意にその発現が亢進していた。血液学的検討では10羽全羽に高脂血症は呈しておらず、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⁾。免疫組織学的検討として、骨内での酸化ストレスの発生を確認するため、免疫組織学的に抗8-hydroxy-2'-deoxy-guanosineモノクローナル抗体(以下、抗8-OHdG抗体)を用いて各群の大腿骨の染色性について検討した。相対的に定量化するために大腿骨近位骨幹部における骨壊死周囲の組織を無作為に3視野選び、全細胞数に対する陽性細胞数の割合を算出し、陽性細胞率(%PC)として各群において比較検討を行った。

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

病理組織学的検討において、CTR群は、10羽全例で骨壊死を認めなかった。BSO群では、10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)。

免疫組織学的検討において、BSO群はCTR群と比較して骨髄造血細胞における抗8-OHdG抗体の

発現が明らかに亢進していた。%PC は CTR 群 $7.6 \pm 2.8\%$ 、BSO 群 $16.6 \pm 2.5\%$ であり、統計学的に有意差を認めた ($p < 0.05$)。(図 2a,b,c)

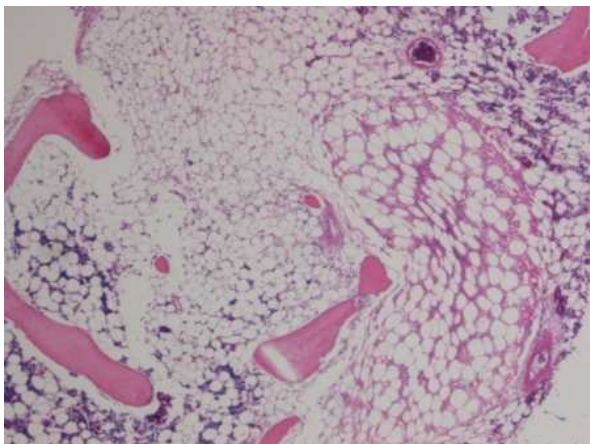


図 1: BSO 群(H-E 染色)

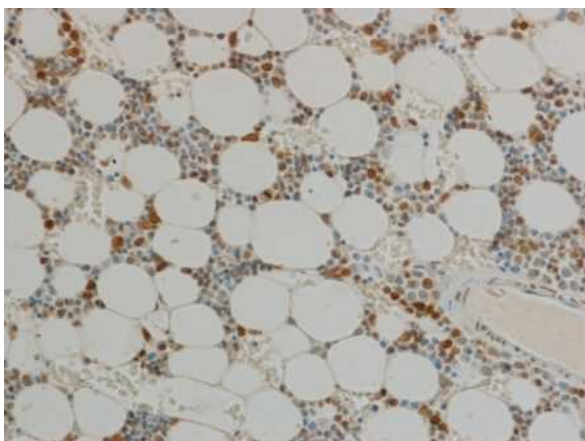


図 2a: BSO 群(免疫染色)

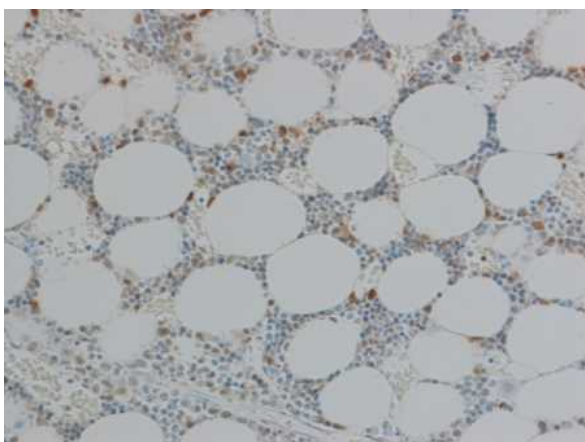


図 2b: CTR 群(免疫染色)

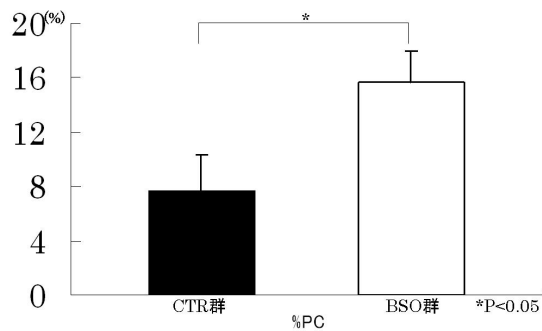


図 2c:陽性細胞率(%PC)

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 3)。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 4、図 5) 脂質代謝異常は生じていないと考えられた。

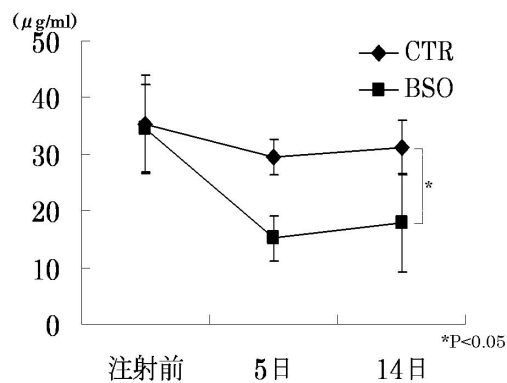


図 3: GSH

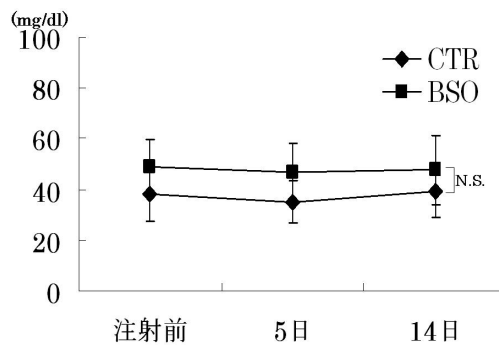


図 4: T-cho

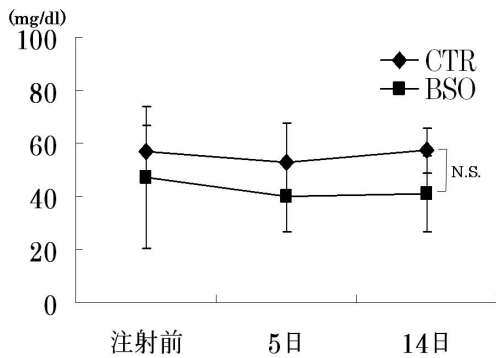


図 5: TG

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10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
なし

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

酸化誘発剤の単回投与によるラットにおける病理組織学的検討

中川慎太郎、市堰 徹、兼氏 歩、杉森端三、三秋恒平、
北村憲司、福井清数、三上友明、松本忠美（金沢医科大学 整形外科）

我々は、これまで酸化ストレスが骨壊死発生に関与していることを報告してきた。今回、酸化誘発剤を使用したラットモデルの改良を試み、buthionine sulphoximine (BSO)を単回投与することでラットに骨壊死ができるか検討した。

1. 研究目的

ステロイド性骨壊死の発生機序については諸説報告されているが、当科ではこれまで酸化ストレスに注目して研究を行ってきた。当科ではステロイド投与と家兎を用いた研究で大腿骨内ではステロイド投与後 3 日から 5 日の間に酸化ストレスが発生していること、ステロイド投与後に抗酸化剤として還元型グルタチオン（以下 GSH）を投与することにより骨壊死が抑制できることを報告した¹⁻²⁾。

これらの結果からステロイド投与後に酸化ストレスが発生し骨壊死につながるものと考え、家兎およびラットに対する酸化誘発剤 (Buthionine Sulfoximine: 以下 BSO) を 14 日間連続皮下投与することで骨壊死の発生を確認した³⁻⁴⁾。

しかしこれらのモデルでは BSO を 14 日間連続投与しているため、実際に骨壊死が一度のみの酸化ストレス曝露で発生するものなのか、また虚血などのイベントはいつ起こっているのかが不明瞭であった。また今後投与量の増加などを考慮した場合、皮下投与では限界がある。そこで今回我々はラットの腹腔内に酸化誘発剤を単回投与することにより骨壊死の発生および発生時期について検討した。

2. 研究方法

24 週齢の Wister 系ラットに BSO500mg/kg を 1 回のみ腹腔内投与した 29 匹を B 群、7 日間連続で腹腔内投与した 6 匹を 7B 群とした。BSO 投与当日を 0 日とし、B 群のうち投与後 1 日目、3 日目、7 日目、14 日目に腹部大動脈から採血を行った後に犠牲死としたものをそれぞれ B1 (5 匹)、B3 (5 匹)、B7 (10 匹)、B14

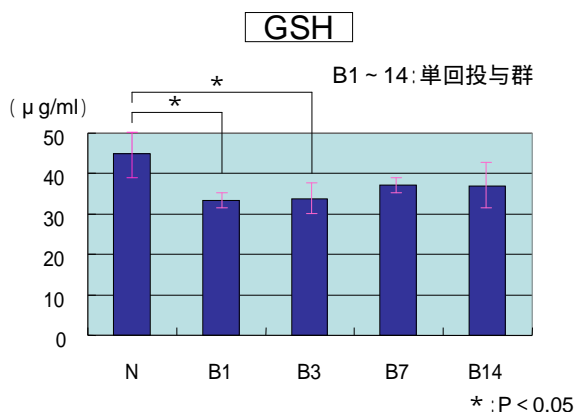
(9 匹) 群として両大腿骨を取り出した。7B 群は初回投与を 0 日とし、7 日目に B 群と同様に犠牲死として大腿骨を取り出した。腹腔内に生理食塩水を一回のみ投与し 7 日目、14 日目に犠牲死とした各 5 例を N 群とし検討に加えた。

病理組織学的検討として H-E 染色標本を作製し、大腿骨頭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学的定義に基づき検討した⁵⁾。また、酸化の指標として還元型グルタチオンを測定した。

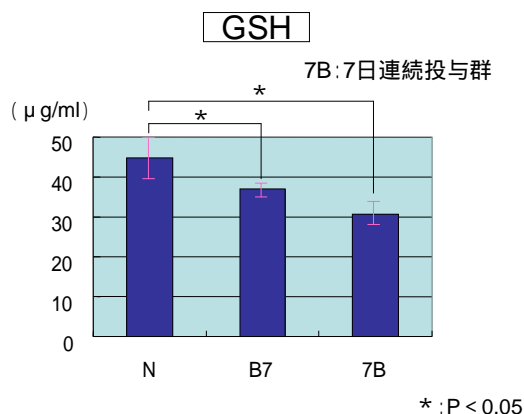
3. 研究結果

GSH は、B1・B3・B7・B14 群では N 群に比べ低下していた ($p < 0.05$) (図 1)。また B7 群に比べ 7B 群では GSH の低値を認めていた (図 2)。

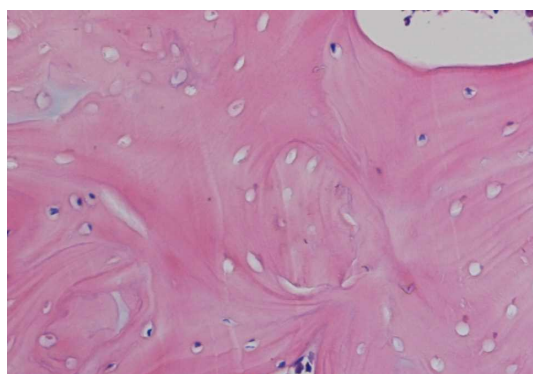
病理組織学的検討において、N 群では骨壊死を認めなかった。同様に B1 群、および B3 群でも骨壊死は認めなかった。B7 群において 10 匹中 4 匹の大腿骨頭に empty lacunae を認め骨壊死と判断した。B14 群で 9 匹中 3 匹、7B 群では 6 匹中 2 匹で同様に empty lacunae を認め、いずれも 30 ~ 40% に骨壊死が発生していた (図 3)。



(図 1)



(図 2)



(図 3)

各群の骨壊死発生率

	1日	3日	7日	14日
B群	0 / 5	0 / 5	4 / 10 (40%)	3 / 9 (33%)
7B群			2 / 6 (33%)	
14日 皮下群 ³⁾				3 / 7 (42%)

(表 1)

4. 考察

これまでに行ったラットに BSO を 14 日間連続皮下投与した実験では 7 匹中 3 匹 (42%) に大腿骨頭部の骨壊死を認めており³⁾、今回行った BSO 単回投与 B7 群とほぼ同様な発生率だった。また各群の壊死発生率についてはいずれも 30 ~ 40% であり、BSO の投与回数を増やすことによる骨壊死発生の増加は認めなかった。B7 群、B14 群間でも発生率の有意差はなかった(表 1)。

このことより、骨壊死に至る虚血等のイベントは、単回の酸化ストレス曝露のみで 7 日目までに発生し得ることがわかった。ラットでは、Osteocyte のアポトーシスは虚血から 12 時間ではじまり、96 時間で empty lacunae が出現したとの報告があり、諸家の報告でもおおむね 4 日 ~ 5 日で核の消失が見られるとの報告が見られる⁶⁻⁸⁾。

すなわち、今回のモデルで最初に骨壊死が確認さ

れた 7 日目より逆算すると、BSO 投与から 3 日目ころまでに骨壊死にいたるイベントが起こっていると推察できる。すなわち、薬剤投与から 3 日目ごろまでを重点的に検索することが壊死の発生過程の原因解明につながると思った。

5. 結論

ラットに酸化誘発剤を単回投与することで、ラットの大腿骨頭に骨壊死の発生を認めた。単回投与と連日投与で壊死発生率は変わらなかった。薬剤投与後 7 日で約 40% の骨壊死を認めたことから、骨内のイベントは酸化誘発剤投与から 3 日目頃までに発生していることが推察された。

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

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) Ichiseki T, Matsumoto T, Nishino M, Kaneuji A, Katsuda S. Oxidative stress and Vascular Permeability in steroid-induced osteonecrosis model. J Orthop Sci 9: 509-515, 2004
- 2) 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
- 3) Ichiseki T, Ueda Y, Kitamura K, Kaneuji A, Matsumoto T. Oxidative stress by glutathione Depletion induced osteonecrosis in rats. Rheumatology. 45: 287-290, 2006
- 4) 三秋恒平. 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実験. 金沢医科大学雑誌 31: 1-6, 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) Sato M, Sugano N, Ohzono K, Nomura S, Kitamura Y, Tsukamoto Y, Ogawa S. Apoptosis and expression of stress protein(ORP150, HO1) during development of ischaemic osteonecrosis in the rat. J.Bone and Joint Surg. 83-B(5): 751-759, 2001
- 7) Mary Catto. A Histological Study of Avascular Necrosis of the Femoral fracture. J.Bone and Joint Surg. 47-B(4): 749-776, 1965
- 8) 辻宗啓, 松野丈夫, 伊藤浩, 寺西正, 池田 仁,

吉木敬. 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死
調査研究班平成 15 年度研究報告書: 45-47,
2003

ラットの大腿骨頭壊死モデル作製

名越 智、岡崎俊一郎、加谷光規、館田健児、佐々木幹人、山下俊彦(札幌医大整形外科)

大腿骨頭壊死症に対する動物モデルは家兎を用いたものが主体で、人に発生する骨壊死と発生部位に違いが見られる。動物の扱いやすさからみると、小動物での大腿骨頭壊死のモデルが有用と考えられる。我々は、Wistar 系雄ラットに LPS、ステロイドを投与することにより人の大腿骨頭壊死症に類似した大腿骨頭壊死が大腿骨近位骨端部に生じることがわかり、人の骨壊死発生部位に極めて類似しており、今後の疾患の機序解明モデルとして有用であると考えられた。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症の発生要因に大量投与されたステロイドが挙げられている。その発生機序はまだ明らかではなく、人に発生する骨壊死と発生部位、病理組織が類似する動物モデルの開発が必要である。従来の動物モデルは、家兎での報告¹⁻⁴⁾が多く、骨壊死は生じるものの、壊死の部位が必ずしも骨端部ではなく、人での大腿骨頭壊死の発生様式とは異なることが多い。また、動物の扱いやすさを考えると、より小動物におけるモデルの作製が必要と考えられる。当科では、ステロイド投与を受ける疾患に SLE などの炎症性疾患が多いことに着目し、大腿骨頭壊死ラットモデルの作成を試みた。

2. 研究方法

Wistar 系雄ラット 10 週齢を用い、LPS 1.0mg/kg を 24 時間間隔で 2 回尾静脈より静注した。さらに methylprednisolone 20mg/kg を 24 時間間隔で 3 回筋注した。最終 methylprednisolone 注射後 1,2,3,4 週間で屠殺し、血液、臓器および両大腿骨を採取した。生化学的検査として血中トリグリセリド、総コレステロール濃度を測定し、血中サイトカイン濃度を測定した。大腿骨、肝臓および腎臓については組織染色を行った。

3. 研究結果

薬剤投与開始後より 14 日目までは体重減少を認めた(図 1)。14 日目以降に体重は増加に転じた。血中トリグリセリド値は有意に減少し、総コレステロールは有意に上昇した(図 2, 3)。ステロイド注射 1 週後に骨壊死が大腿骨頭骨端に認められた(図 4)。壊死部では、骨梁骨細胞の核の濃縮、偏在および、empty lacuna を認め

た(図 5)。同部位では骨髄細胞の壊死、変性も認めた。ステロイド注射 4 週間後には壊死部での肉芽組織の侵入が認められた(図 6)。骨壊死の主発生部位は大腿骨近位骨端部であった(表 1)。肝組織では一部脂肪変性を認めたが、肝細胞壊死や細胞浸潤像など明らかな肝障害は認められなかった。腎組織では腎盂腎炎を認め、周囲に炎症細胞浸潤が著明であった。

体重

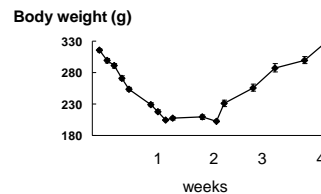


図1

TG

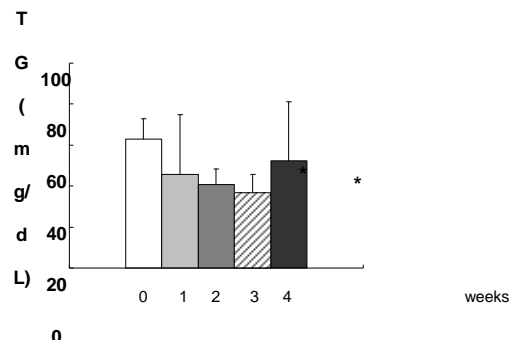


図2

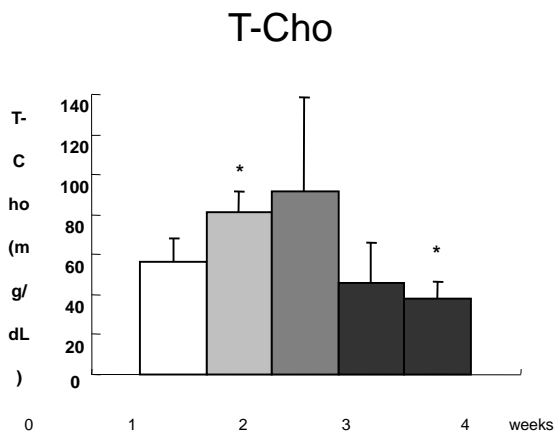


図3

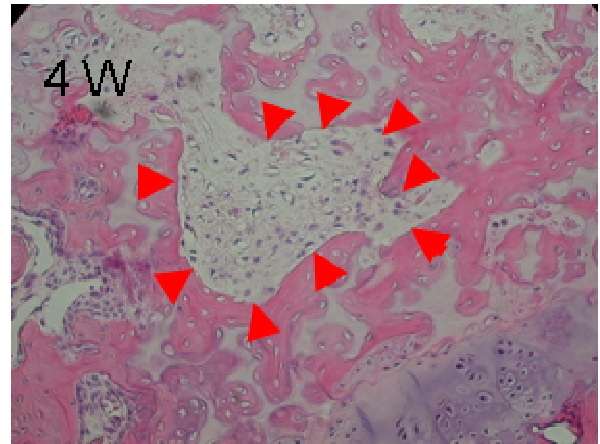


図6

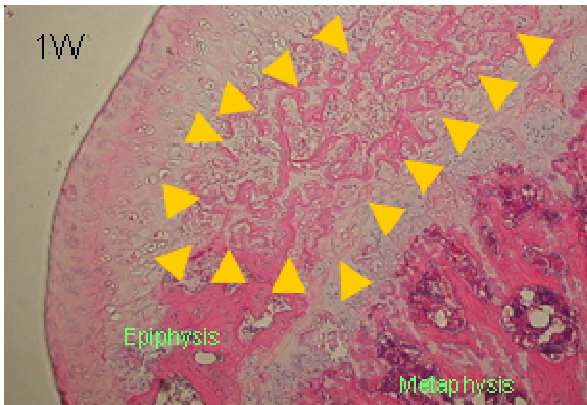


図4

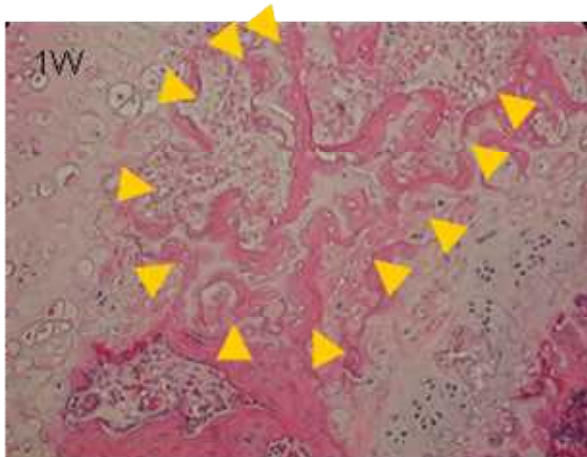


図5

表1

	Proximal epiphysis	Metaphysis
Cont	0/3	0
1w	1/3	0
2w	1/3	1/3
3w	2/3	0
4w	2/6	0

4. 考察

Yamamoto らは、家兎に LPS、ステロイドを投与することにより、大腿骨の骨壊死の動物モデルを作製した¹⁾。一方、小動物であるラットでの大腿骨頭壊死モデルに関しては、易卒中高血圧発症ラット(SHRSP)⁵⁾にステロイドを投与することにより骨壊死が生じることが報告されている。今回われわれは、実験しやすくするために、小動物であるラットに LPS、ステロイドを投与することにより、大腿骨頭壊死の小動物モデルを作製することができた。処置後 1 週から骨壊死が生じ、4 週で肉芽組織が侵入していたことから、壊死に対する修復機序が働くことがわかった。骨壊死の発生頻度は、約 33 - 66%であった。注入された LPS、メチルプレドニゾロンは肝臓で取り込まれ代謝されるが、組織学的に肝障害は認められなかった。このラットモデルでの骨壊死の発生部位は大腿骨

近位骨端部であり、人の骨壊死発生部位に極めて類似しており、今後の疾患の機序解明モデルとして有用であると考えられた。

5. 結論

LPS、ステロイドをラットに投与することによりヒトの大腿骨頭壊死症に類似した大腿骨頭壊死が大腿骨近位骨端部に生じることがわかった。

6. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
3. なし

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 1995(316):235-43.
- 2) Kabata T, Kubo 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.
- 3) Miyanishi K, Yamamoto T, Iriya 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, Sasaki 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) Hirano T, Iwasaki K, Oda J, Kumashiro T. Osteonecrosis of the femoral head in spontaneously hypertensive rats. Relation to ossific nuclei during growth. Acta Orthop Scand 1992;63(1):37-40., 2004

T2*強調 dynamic MRI による

ステロイド単独投与家兎骨壊死モデルの大腿骨血流評価

高尾正樹、菅野伸彦、西井 孝、坂井孝司、花之内健仁、中原一郎、塩見俊行、津田晃佑、
吉川秀樹 (大阪大学大学院医学研究科 整形外科)
中村宣雄 (協和会病院 整形外科)

以前われわれは T2*強調 dynamic MRI を用い、血清病家兎骨壊死モデルの大腿骨近位部の虚血変化を早期より鋭敏に検出できることを報告した。今回ステロイド家兎骨壊死モデルの大腿骨近位部において、骨、骨髄壊死発生過程にどの程度血流低下が起こっているかを検証する目的で、同モデルの大腿骨近位部の血流を T2*強調 dynamic MRI を用いて評価した。

1. 研究目的

われわれは以前家兎の大腿骨近位部の血流を T2*強調 dynamic MRI を用いて評価する手法を確立した¹⁾。本手法にて血清病家兎骨壊死モデルの大腿骨近位部の血流を評価し、馬血清投与後3日目の早期に、非造影 MRI や造影 MRI よりも鋭敏に壊死病変を虚血変化として検出できることを報告した¹⁾。本研究の目的はステロイド単独投与による家兎骨壊死モデルにおいてその骨、骨髄壊死発生過程における大腿骨近位部の血流変化を T2*強調 dynamic MRI を用いて評価することである。

2. 研究方法

28 週令以降のオスの日本白色家兎 33 羽に 20mg/kg のデボメドロール を1回右中殿筋内に筋肉注射し、投与後3日、1週、3週、6週、9週に両大腿骨近位部の MRI 撮影をおこなった。3日、1週、3週群はそれぞれ5羽10大腿骨、6週、9週群はそれぞれ9羽18大腿骨となった。コントロールとして3羽6大腿骨の MRI 撮影も行った。

0.4mmol の MRI 用造影剤(マグネピスト)を外側耳静脈より急速投与し、3秒に1回の間隔で T2*強調 MRI (TR/TE=30/20ms, flip angle=15°) を30回連続撮影した。1cm² の ROI を大転子先端より遠位 2.5cm の部分を中心に上下 1cm の範囲にとり、信号強度の変化を計測し最大の信号低下率を算出した(図1A)。

MRI 撮影後大腿骨近位 2/3 を摘出し、ホルマリン固定、EDTA 脱灰後、その冠状断面のヘマトキシリンエオジン染色切片を作成した。骨髄壊死、骨壊死、修復組織の有無を評価し、修復層を含めた病変の大きさを計測した。骨髄壊死は脂肪細胞の虚脱、骨髄造血細胞の核の破碎様変化を伴うもの、骨壊死は骨髄壊死に囲まれた骨梁骨細胞の空胞化、修復組織は骨髄壊死周囲の肉芽組織、添加骨形成と定義した。

3. 研究結果

ステロイド投与後3週で10大腿骨中4大腿骨に修復反応の乏しい骨髄壊死を認めた。6週で18大腿骨中3大腿骨に骨髄病変を認め、1例は修復反応のない骨髄壊死、1例は修復組織に囲まれた骨髄壊死、1例は肉芽組織に置換された骨髄病変であった。9週では18大腿骨中7大腿骨に骨髄病変を認め、6大腿骨には修復を伴う骨髄壊死、1大腿骨には肉芽組織に置換された骨髄病変を認めた。骨壊死は認めなかった。骨髄病変の面積の平均は 4.4mm² (0.32-20.2 mm²) で、各群で統計学的な有意差は認めなかった。

T2*強調 dynamic MRI 上、大腿骨の造影効果を示す ROI 内の一過性信号低下を3日、1週、3週、6週の全ての大腿骨で認めた(図 1B)。この一過性信号低下を認めない虚血パターンは9週群の1大腿骨の

みに認めた(図2)。壊死面積は6.2mm²であった。

各群の最大信号低下率では、6週、9週群でコントロールと比べ有意に値が小さかったが、各郡内で骨髓壊死の有無による有意な相違は認めなかった(図3)。

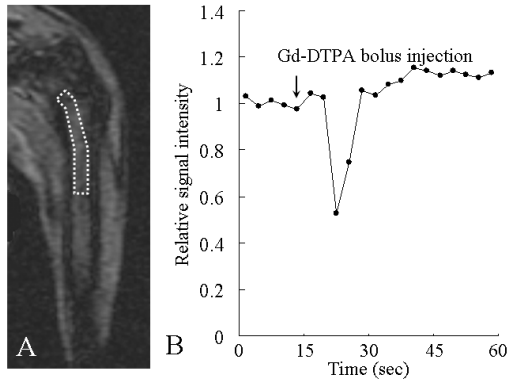


図1. A. ステロイド単独投与後3週の家兎大腿骨近位のT2*強調dynamic MRI。破線領域内が血流評価のROIである。B. 造影剤急速投与後のROI内の信号強度の変化。頸部内側に骨髓壊死を認めたが、T2*強調dynamic MRI上造影効果を示す一過性の信号強度低下を認めた。

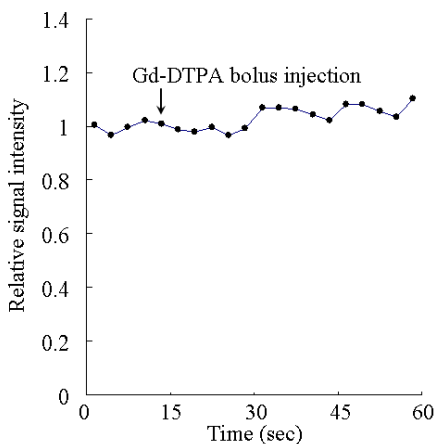


図2. ステロイド単独投与後9週の家兎のT2*強調dynamic MRIのROI内の信号強度変化。病理組織上大腿骨頸部内側に骨髓壊死を認めた。T2*強調dynamic MRIでは造影剤による一過性信号低下は認めず、唯一虚血パターンを示した。

4. 考察

T2*強調dynamic MRIを用いた血清病家兎骨壊死モデルの大腿骨近位部の血流評価では、馬血清投与後3日目で83%、1週で92%、3週で100%の感度で

壊死病変を虚血パターンとして検出できた¹⁾。今回、ステロイド単独投与による家兎骨壊死モデルの大腿骨近位部の血流評価を同じ手法を用いて評価したが、ステロイド投与後6週まで虚血変化は検出できなかった。

ステロイド単独投与の家兎骨壊死モデルにおける骨循環評価としては、宮西らがhydrogen washout techniqueを用い大転子下2.5cmにドリルホール作成しセンサーを挿入、ステロイド投与後2週で骨壊死発生例(両大腿骨、上腕骨)に有意な骨髓内圧上昇および血流低下を検出したと報告している³⁾。われわれはこの血流評価領域の設定に準じ、ROIを大転子遠位2.5cmの部位を中心に上下1cmに設定し、T2*強調dynamic MRIにて血流評価を行った。病理組織検査上、3週、6週、9週群に骨髓壊死の発生を認めたが、T2*強調dynamic MRIで虚血パターンを認めたものは9週群の1例のみであった。このことはステロイド単独投与家兎骨壊死モデルにおいて、大腿骨近位部の血流変化が小さいことを示していると考えられる。

T2*強調dynamic MRIでは最大信号低下率がROIの血液量を反映するが、6週、9週群でコントロールと比べ最大信号低下率の統計的に有意な低下を認めた。Wangらは家兎の大腿骨頭内圧を12.25mgのメチルプレドニゾロンを連日投与して計測し、初回投与後6週以降に骨頭内圧の上昇を認めたと報告している³⁾。今回の6週以降の最大信号低下率の低下は骨髓内圧上昇による血流低下を反映したものと考えられるが、病理組織学的な壊死発生のタイミングよりは遅れて出現しており、また骨髓壊死の有無でも有意な差を認めておらず、同モデルにおける骨髓壊死発生とは直接的な関連を認めない変化と考えられた。

5. 結論

ステロイド単独投与家兎骨壊死モデルの大腿骨近位部の虚血変化をT2*強調dynamic MRIを用いて評価した。病理組織検査上、ステロイド投与後3、6、9週の家兎に骨髓壊死の発生を認めたが、T2*強調dynamic MRIにて虚血パターンを認めたものはステロイド投与後9週の骨壊死発生例6大腿骨中1大腿骨のみであった。ステロイド単独投与による家兎の大腿骨近位部の血流変化は小さいと考えられた。

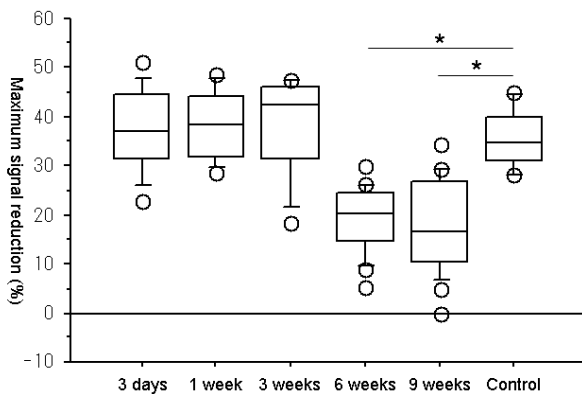


図3. 各群の最大信号低下率

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

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) 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. 2003;21:341-51.
- 2) Miyanishi K, Yamamoto T, Irida T, Yamashita A, Jingushi S, Noguchi Y, Iwamoto Y. Bone marrow fat cell enlargement and a rise in intraosseous pressure in steroid-treated rabbits with osteonecrosis. Bone. 2002;30:185-90.
- 3) Wang GJ, Lennox DW, Reger SI, Stamp WG, Hubbard SL. Cortisone-induced intrafemoral head pressure change and its response to a drilling decompression method. Clin Orthop Relat Res. 1981;159:274-8.

マウス骨細胞アポトーシスにおける p53 の関与

田中 栄 (東京大学医学部附属病院 整形外科)
大熊千晶、懸田健史 (順天堂大学医学部 整形外科)

研究要旨: 特発性大腿骨頭壊死の分子メカニズムを解明するためには適切な動物モデル、特に遺伝子操作が容易なマウスモデルの作成が有用である。われわれはこれまでの研究においてマウス尾部結紮による新しい骨壊死モデルを作成、組織像を検討し、骨壊死が阻血・再還流障害によるアポトーシス細胞死を起こし、その結果として細胞死に至る可能性を報告した。また p53 が骨細胞アポトーシスに関与している可能性を報告した。今年には p53 の役割についてさらに詳細に検討した。

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、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、何らかの原因で大腿骨頭部の阻血が生じ、骨細胞および骨髄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細胞壊死に至る分子メカニズムは不明なままである。

われわれは本研究班においてマウス尾部結紮・再還流によって結紮遠位部に骨壊死が生じること、さらにその組織像を解析し、時系列に沿って骨細胞がアポトーシス細胞死を生じ、その後ネクローシス細胞死が見られ、さらに新生骨の出現と破骨細胞数の増加がみられることを報告した。またこのとき結紮遠位部で p53, TRAILR2/DR5, Bax などのアポトーシス関連遺伝子が上昇することを明らかにした。本年の研究班では p53 の役割についてさらに検討した。

2. 研究方法

MLO-A5 細胞を用いた検討

マウス前骨細胞株細胞 MLO-A5 細胞は Lynda Bonewald 博士 (University of Missouri, School of Dentistry) から提供された。遺伝子の導入はアデノウイルスベクターによっておこなった。P53 を発現するアデノウイルスベクターは齋藤らの方法を用いて構築した。

3. 研究結果

アデノウイルスベクターを用いて MLO-A5 細胞に p53 遺伝子を強発現することが可能であった。このとき MLO-A5 細胞において Caspase-3 の活性化が見られ、形態的にもアポトーシスが生じていた。また TRAILR2, Bax 発現の誘導も観察された。(図 1)

4. 考察

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。われわれは、尾部結紮再還流による骨壊死動物モデルを作成し、昨年の本研究班で結紮遠位部において p53 の発現が上昇することを報告した。今回は前骨細胞株細胞 MLO-A5 を用いて、p53 の過剰発現がアポトーシスを誘導することを明らかにした。今後組織の p53 による免疫染色や p53 ノックアウトマウスでの骨壊死モデルの組織検討を用いることによって、p53 遺伝子の骨壊死への関与を解析し、またこれを実際の臨床例と照らし合わせることによって ION の分子メカニズムに迫ることが可能であると考えられる。

5. 結論

マウス結紮再還流による骨壊死モデルにおける p53 発現誘導は骨細胞アポトーシスに関与している可能性が示唆された。

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.* 2007, 9:382-396.
- 2) Kono SJ, Oshima Y, Hoshi K, Bonewald LF, Oda H, Nakamura K, Kawaguchi H, Tanaka S. Erk pathways negatively regulate matrix mineralization. *Bone.* 2007, 40:68-74.
- 3) Suematsu A, Tajiri Y, Nakashima T, Taka J, Ochi S, Oda H, Nakamura K, Tanaka S, Takayanagi H. Scientific basis for the efficacy of combined use of antirheumatic drugs against bone destruction in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2007, 17:17-23.
- 4) Hiramatsu K, Asaba Y, Takeshita S, Nimura Y, Tatsumi S, Katagiri N, Niida S, Nakajima T, Tanaka S, Ito M, Karsenty G, Ikeda K. α -glutamyltransferase as a pathogenic factor of bone and joint disease. *Endocrinology* 2007, 48:2708-2715.
- 5) Kawamura N, Kugimiya F, Oshima Y, Ohba S, Ikeda T, Saito T, Shinoda Y, Kawasaki Y, Ogata N, Hoshi K, Akiyama T, Chen WS, Hay N, Tobe K, Kadowaki T, Azuma Y, Tanaka S, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. 2007. Akt1 in osteoblasts and osteoclasts controls bone remodeling. *PLoS ONE* 2007, 2:e1058.
- 6) Wakeyama H, Akiyama T, Takahashi K, Amano H, Kadono Y, Nakamura M, Oshima Y, Itabe H, Nakayama KI, Nakayama K, Tanaka S. Negative feedback loop in the Bim-caspase-3 axis regulating apoptosis and activity of osteoclasts. *J Bone Miner Res* 2007, 22:1631-1639.
- 7) Miyazaki T, Yamamoto S, Tanaka S. Molecular mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis. *Future Rheumatology* 2007, 2:61-72.
- 8) Tanaka S. Signaling axis in osteoclast biology and therapeutic targeting in the

RANKL/RANK/OPG system. *Am J Nephrol* 2007, 27:466-478.

- 9) Hikita A, Tanaka S. Ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. *Adv Exp Med Biol.* 2007;602:15-21.

2. 学会発表

- 1) A New York Academy of Sciences Meeting "Skeletal development and remodeling in health, disease & aging" (2007.5.18-21) New York: Session I, BONE CELL FORMATION AND FATE "Regulation of the life and death of the osteoclast"
- 2) 25th Annual Meeting of the Japanese Society for Bone and Mineral Research ANZBMS-JSBMR, Joint Symposium 1-4(2007.7.20) "Role of Bcl-2 Family on Skeletal Integrity"
- 3) 第80回日本整形外科学会学術集会 (2007.5.24) 教育研修講演「骨関節破壊を標的にした関節リウマチ治療戦略」
- 4) 第80回日本整形外科学会学術集会 (2007.5.24) パネルディスカッション7:生物学的製剤の功罪と外科療法「生物学的製剤時代の関節破壊と骨破壊制御」
- 5) 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19年度 第1回会議 研究成果報告会(2007.7.7)京都 「マウス骨壊死モデルの解析」
- 6) 日本内分泌学会サマーセミナー (2007.7.17) "Molecular biology of the skeletal development" Overview
- 7) 第33回リウマチ中央教育研修会(2007.7.28)「関節リウマチの骨・軟骨破壊」
- 8) 第28回 日本炎症・再生医学会(2007.8.3)ワークショップ15「新規分子を標的とした炎症制御」
- 9) 第22回 日本整形外科学会基礎学術集会 (2007.10.25)浜松 シンポジウム2 骨免疫学「関節リウマチにおける骨破壊の機序」
- 10) 平成19年度 リウマチ・アレルギー相談員養成研修会(2007.11.7)新宿 「リウマチの外科治療・リハビリ」
- 11) 第35回日本リウマチ・関節外科学会(2007.11.9) シンポジウム1 人工膝関節の機種選択と限界