

# グルココルチコイド誘発性血管内皮細胞障害に及ぼす

## アルドステロン受容体拮抗薬の効果

赤池雅史

(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 循環器内科学)

栗飯原賢一、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受容体 (GR) に選択性の高い合成リガンドであるデキサメサゾンを用いた検討により、血管内皮細胞における GR 活性化が酸化ストレスの亢進と内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)の発現低下を介して血管内皮機能を障害する結果、大腿骨頭壊死症を発症するという病態仮説を提唱してきた。さらに、HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるピタバスタチンが、コレステロール低下作用に依存しない多面的作用により NO bioavailability 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明らかにした。一方、血管内皮細胞ではグルココルチコイドの不活性化作用を有する 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 2 の発現が低いため、GR のみならずミネラルコルチコイド受容体 (MR) への結合能も有するステロイド剤の高用量投与によって MR が活性化される可能性がある。今回、我々はヒト臍帯静脈血管内皮細胞培養系を用いた検討により、メチルプレドニゾロンが濃度依存性に MR 転写活性を亢進させることを見いだした。さらにメチルプレドニゾロンは活性酸素産生と接着分子 VCAM-1 の発現を亢進させ、この作用はアルドステロン拮抗薬であるスピロラクトンにより抑制された。血管内皮細胞における MR 作用の阻害はグルココルチコイド誘発性血管内皮細胞障害の抑制を介して大腿骨頭壊死症の新たな予防・治療法となる可能性がある。

### 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。我々はこれまでに選択的グルココルチコイド受容体 (GR) 合成リガンドであるデキサメサゾンを用いた検討により、血管内皮細胞における GR の活性化が、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) の低下を介して血管内皮機能障害を惹起することを報告し<sup>1)</sup>、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>2)</sup>。さらに、HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (スタチン) であるピタバスタチンが、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によって、GR 活性化による血管内皮機能障害を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。

一方、人における活性型内因性グルココルチコイ

ドであるコルチゾールはミネラルコルチコイド受容体 (MR) に対しアルドステロンと同等の親和性を有している。その血中濃度はアルドステロンの 100 ~ 1000 倍高いが、腎尿細管細胞などの上皮系細胞では 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 2 (11 $\beta$ -HSD2) がコルチゾールを不活性化することで MR 作用の発現を防いでいる。自己免疫疾患治療において最も多く使用される合成グルココルチコイドであるプレドニゾンやメチルプレドニゾロンは MR への結合能を有するが、やはり 11 $\beta$ -HSD2 により不活性化されるため、水・ナトリウム貯留などのミネラルコルチコイド作用はきわめて弱い<sup>3)</sup>。しかしながら、血管内皮細胞では 11 $\beta$ -HSD2 の発現がわずかであり、さらに TNF $\alpha$  などの炎症性サイトカインがその発現を低下させるため、プレドニゾンやメチルプレドニゾロンの高用量投与においては血管内皮細胞の MR が活性化される可能性がある。

そこで本研究ではグルココルチコイド誘発性血管内皮細胞障害における MR 活性化の意義とアルドステロン受容体拮抗薬の効果について検討した。

## 2. 研究方法

### 1) メチルプレドニゾンによる GR 転写活性に及ぼすスピロラク톤の作用

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) 培養系にメチルプレドニゾン 1、10、100 $\mu$ g/ml を添加し GR 応答配列による dual-luciferase reporter assay を用いて添加 16 時間後に転写活性を測定した。また、メチルプレドニゾン添加の 8 時間前にスピロラク톤 10<sup>-7</sup>M、10<sup>-6</sup>M、10<sup>-5</sup>M を添加し、その影響を検討した。

### 2) メチルプレドニゾンによる活性酸素産生に及ぼすスピロラク톤の作用

HUVEC 培養系にメチルプレドニゾン 100 $\mu$ g/ml を添加し、dihydroethidium(DHE) 染色を用いて superoxide の産生を評価した。さらにスピロラク톤 10<sup>-5</sup>M を添加しその影響を評価した。

### 3) メチルプレドニゾンによる接着分子 VCAM-1 発現に及ぼすスピロラク톤の作用

HUVEC 培養系にメチルプレドニゾン 1、10、100 $\mu$ g/ml を添加し、ウエスタンブロッティングにより接着分子 VCAM-1 の発現を検討した。また、メチルプレドニゾン添加の 8 時間前にスピロラク톤 10<sup>-7</sup>M、10<sup>-6</sup>M、10<sup>-5</sup>M を添加しその影響を検討した。

(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) メチルプレドニゾンによる GR 転写活性に及ぼすスピロラク톤の作用

メチルプレドニゾンは濃度依存性に GR 転写活性を有意に亢進した。この作用はスピロラク톤により濃度依存性に有意に抑制された (図 1)。

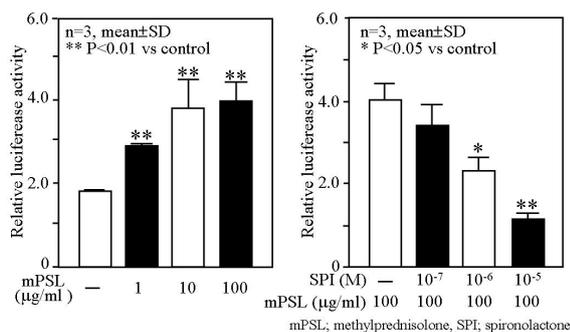
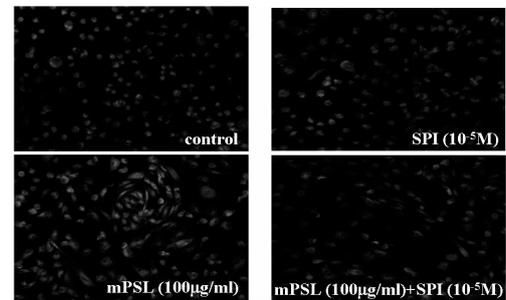


図1. メチルプレドニゾンによる転写活性亢進はミネラルコルチコイド受容体阻害により抑制される

### 2) メチルプレドニゾンによる活性酸素産生に及ぼすスピロラク톤の作用

メチルプレドニゾンは superoxide 産生を有意に増加させ、スピロラク톤はその作用を有意に抑制した (図 2)。



mPMSL; methylprednisolone, SPI; spironolactone

図2. メチルプレドニゾンによる活性酸素産生の増加はミネラルコルチコイド受容体阻害により抑制される

### 3) メチルプレドニゾンによる接着分子 VCAM-1 発現に及ぼすスピロラク톤の作用

メチルプレドニゾンは濃度依存性に VCAM-1 の発現を有意に亢進した。この作用はスピロラク톤により濃度依存性に有意に抑制された (図 3)。

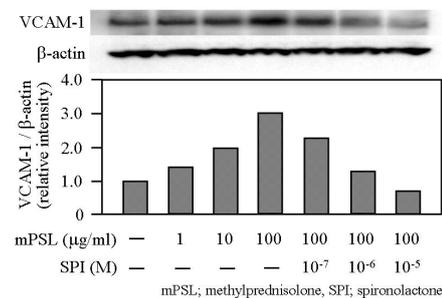


図3. メチルプレドニゾンによるVCAM-1発現の亢進はミネラルコルチコイド受容体阻害により抑制される

## 4. 考察

近年、大規模臨床試験の成績から、心血管病でのアルドステロン作用が注目されている<sup>4)5)</sup>。アルドステロンは腎尿細管細胞に対する水ナトリウム貯留作用だけでなく、血管系での MR 活性化を介して、NADPH oxidase からの superoxide 産生を亢進し、レドックス制御をうける NF- $\kappa$ B や AP-1 などの転写因子の活性化により MCP-1 などのケモカインや VCAM-1、ICAM-1 などの接着分子の発現を増加させる。さらに、活性酸素による NO の消去や eNOS の uncoupling を介して NO 産生を減少させる作用も有している。このようにアルドステロンは血管系への直接的作用によって血管内皮障害を引き起こすと考えられている<sup>6)</sup>。

今回の我々の検討では、メチルプレドニゾンによる

る GR 転写活性は、アルドステロン受容体拮抗薬であるスピロラクトンにより有意に抑制された。MR 応答配列は GR 応答配列と共通であることから、今回の結果は血管内皮細胞に及ぼすメチルプレドニゾロンの作用には MR を介する転写調節の関与が存在することを示すと考えられる。さらに DHE 染色による検討では、メチルプレドニゾロンによる血管内皮細胞での superoxide 産生増加がスピロラクトンによって抑制されたことから、メチルプレドニゾロンによる MR 活性化が酸化ストレス亢進に関連していると考えられる。血管内皮細胞における酸化ストレス亢進は様々な細胞障害をきたすが、今回我々は接着分子のひとつである VCAM-1 の発現について検討した。この結果、メチルプレドニゾロンは濃度依存性に VCAM-1 の発現を増加し、その作用はスピロラクトンにより完全に抑制された。血管内皮細胞における接着分子の発現は酸化ストレス亢進ならびに NO bioavailability 低下による血管内皮障害のひとつと考えられていることから、今回の結果は、メチルプレドニゾロンによる血管内皮細胞での MR 活性化が酸化ストレス亢進を介して血管内皮細胞機能を低下させることを示唆するものである。メチルプレドニゾロンは全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患に対するステロイドパルス療法で大量に投与されることが多いため、その血中濃度の上昇は 11βHSD2 の発現が乏しい血管内皮細胞において、GR のみならず MR も活性化し、活性酸素産生亢進による血管内皮細胞障害を介して大腿骨頭壊死症を惹起する可能性がある(図 4)。すなわち血管内皮細胞における MR 作用の制御はステロイド性大腿骨頭壊死症の新たな予防・治療の標的として今後注目すべきであり、アルドステロン受容体拮抗薬が大腿骨頭壊死症の予防・治療薬として有効である可能性があると考えられる。

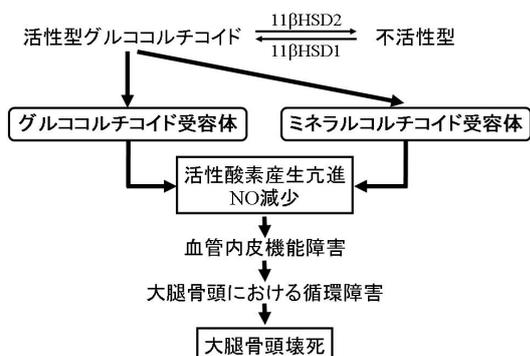


図4. 大腿骨頭壊死症の病因・病態仮説

## 5. 結論

メチルプレドニゾロンはMR活性化による酸化ストレス亢進を介して血管内皮細胞障害を惹起する。アルドステロン受容体拮抗薬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。

## 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) Yamaguchi H, Komamura K, Choraku M, Hirono A, Takamori N, Tamura K, Akaike M, Azuma H. Impact of serum insulin-like growth factor-1 on early prognosis in acute myocardial infarction. *Intern Med* 47(9):819-25, 2008.
- 3) Yagi S, Akaike M, Fujimura M, Ise T, Yoshida S, Sumitomo Y, Ikeda Y, Iwase T, Aihara K, Azuma H, Kurushima A, Ichikawa Y, Kitagawa T, Kimura T, Nishiuchi T, Matsumoto T. Infective endocarditis caused by lactobacillus. *Intern Med* 47(12):1113-6, 2008.
- 4) Endo I, Fukumoto S, Ozono K, Namba N, Tanaka H, Inoue D, Minagawa M, Sugimoto T, Yamauchi M, Michigami T, Matsumoto T. Clinical usefulness of measurement of fibroblast growth factor 23 (FGF23) in hypophosphatemic patients: proposal of diagnostic criteria using FGF23 measurement. *Bone* 42(6):1235-9, 2008.

### 2. 学会発表

- 1) Akaike M, Yagi S, Aihara K, Ikeda Y, Ishikawa K, Ise T, Yoshida S, Sumitomo Y, Iwase T, Abe J, Matsumoto T. HMG-CoA Reductase Inhibitor Pitavastatin Increases the Expression of Endothelial NOS through Activation of ERK5-KLF2 Pathway in Vascular Endothelial Cells. 72<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Fukuoka, 2008.3.28-30.

- 2) Yagi S, Aihara K, Ikeda Y, Ise T, Yoshida S, Sumitomo Y, Iwase T, Akaike M, Matsumoto T. An eNOS-independent Protective Avtion of Pitavastatin against Angiotensin II-induced Cardiorenal Damage through Attenuating Rac-1-mediated Oxidative Stress. 72<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Fukuoka, 2008.3.28-30.
  - 3) Akaike M, Aihara K, Yagi S, Ikeda Y, Ishikawa K, Ise T, Yoshida S, Sumitomo Y, Iwase T, Matsumoto T. Pitavastatin, an HMG-CoA Reductase Inhibitor, Prevents Glucocorticoid-induced Hypertension through Increased Nitric Oxide Production as a Pleiotropic Effect on Vascular Endothelial Cells. 22nd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension Berlin, Germany, 2008.6.14-19.
  - 4) Yagi S, Aihara K, Ishikawa K, Ise T, Yosihda S, Sumitomo Y, Ikeda Y, Iwase T, Soeki T, Akaike M, Matsumoto T. Pitavastatin prevents angiotensin II-induced atrial remodeling in eNOS knockout mice through attenuating Rac-1-mediated oxidative stress. 22nd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension Berlin, Germany, 2008.6.14-19.
  - 5) 赤池雅史、八木秀介、粟飯原賢一、石川カズ江、池田康将、吉田守美子、住友由佳、岩瀬 俊、阿部純一、松本俊夫、佐田政隆。ピタバスタチンはERK5-KLF2 経路の活性化を介して血管内皮細胞での一酸化窒素合成酵素の発現を亢進する。第 31 回日本高血圧学会総会、札幌市、2008.10.9-11.
  - 6) Yagi S, Akaike M, Aihara K, Ishikawa K, Ise T, Yoshida S, Sumitomo Y, Ikeda Y, Iwase T, Soeki T, Matsumoto T, Sata M. Pitavastatin exerts eNOS-independent protective effects against angiotensin II-induced atrial remodeling via attenuateing Rac-1-mediated oxidative stress. 第 31 回日本高血圧学会総会、札幌市、2008.10.9-11.
  - 7) Iwase T, Kurobe H, Akaike M, Nakano S, Yoshida S, Sumitomo Y, Yagi S, Aihara K, Ozaki S, Abe M, Yasui N, Matsumoto T, Kitagawa T, Sata M. Erythropoietin administration with autologous blood donation –a novel strategy to enhance mobilization of circulating progenitor cells. American Heart Association 2008 New Orleans, America, 2008.11.8-12.
  - 8) Yagi S, Akaike M, Aihara K, Ishikawa K, Ise T, Yoshida S, Sumitomo Y, Ikeda Y, Iwase T, Soeki T, Matsumoto T, Sata M. A novel eNOS-independent protective action of statin against angiotensin -induced atrial remodeling via attenuating Rac-1-mediated oxidative stress. American Heart Association 2008. New Orleans, America, 2008.11.8-12.
- 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, et al. Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and elicits vascular endothelial dysfunction. *Circ Res* 92:81-7, 2003
  - 2) 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.
  - 3) Walker BR. Glucocorticoids and Cardiovascular Disease. *European Journal of Endocrinology* 157: 545-559, 2007.
  - 4) Pitt B, Zannad F, Remme WJ, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *N Engl J Med* 341:709, 1999.
  - 5) Pitt B, Remme W, Zannad F, et al. Eplerenone, a Selective Aldosterone Blocker, in Patients with Left Ventricular Dysfunction after Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 348:1309, 2003.
  - 6) Leopold JA, Dam A, Maron BA, et al. Aldosterone impairs vascular reactivity by decreasing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Nat Med* 13:189, 2007.

# ION における脂肪細胞の役割に関する研究

## 第 8 報: 骨髄内脂肪組織由来間葉系細胞の脂肪分化に対するピタバスタチンの影響

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。近年、当班会議ではスタチンによる特発性大腿骨頭壊死症の予防効果について盛んに議論されているが、ヒト細胞を用いた実験はほとんどなされていない。今回の実験では、ヒト骨髄内脂肪組織をコラーゲンゲル 3 次元培養し、デキサメサゾンおよびピタバスタチンを投与した。その結果、デキサメサゾン投与により誘導される脂肪組織片由来間葉系細胞の脂肪細胞分化が、ピタバスタチンの投与によって抑制された。これまでスタチン系の薬剤が、血管内皮機能を改善することが知られていたが、骨髄脂肪組織に対しても、脂肪細胞分化抑制効果を有し、ION の予防・治療に有効である可能性が示唆された。

### 1. 研究目的

これまで、我々はヒト骨髄および皮下脂肪細胞の天井培養法、骨組織の器官培養法を用いて、年齢別の接着増殖率の違い、ステロイド低濃度投与では、接着増殖率、未熟脂肪細胞の増加を来し、ステロイド高濃度投与群では、接着増殖率の低下、脂肪細胞径の増大が起こることなどを明らかにしてきた。後 2 者の結果から、特発性大腿骨頭壊死症 (ION) の危険因子であるステロイド高濃度投与においては、増殖 phase から分化 phase に切り替わることが示唆された。

一方 HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるピタバスタチン (Pitavastatin) は、脂質低下作用とともに、近年、血管内皮機能の改善、抗酸化作用など、多面的な薬剤効果が注目されている。本研究班においても、ピタバスタチンがグルココルチコイド過剰による血管内皮機能低下を改善することが示されている。

今回我々は、ヒト骨髄脂肪組織のコラーゲンゲル 3 次元培養を行い、ステロイド投与による脂肪組織片由来間葉系細胞の脂肪細胞分化を観察するとともに、高脂血症治療薬であるピタバスタチン投与によって、ステロイド誘導性の脂肪細胞分化が抑制されるかについて検討を行った。

### 2. 研究方法

2008 年 4 月から 7 月までに佐賀大学で、人工股関節全置換術を行った変形性股関節症患者 3 名、特発性大腿骨頭壊死症患者 3 名 (患者 1: アルコール性、患者 2, 3: ステロイド性) の計 6 名を対象とした。手術時に採取した骨髄組織を洗浄し、可及的に血球成分、脂肪以外の間質細胞を除去し、脂肪組織片を得た後、コラーゲンゲルに包埋した。その後、図 1 のプロトコールに従って、Day 1、Day 3、Day 5 にデキサメサゾン (Dexamethasone) およびピタバスタチンを投与した。Day 7 にホルマリン固定し、組織標本を作製した。また、一部の標本において、脂肪染色 (Oil-red O 染色) を行った。

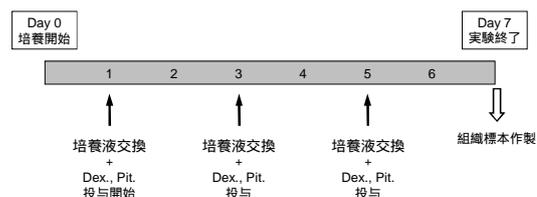


図 1 実験プロトコール

H-E 染色標本により、脂肪組織片から新生する紡錘形細胞を、adipose tissue derived stromal cell (以下 ATDSC) と定義し、脂肪組織片の辺縁部の 4 強拡大視野においてカウントした。このうち、脂肪滴を有する細胞を immature adipocytes (以下 IA)、脂肪滴を有しない細胞を mesenchymal spindle cell (以下 MSC) とし、デキサメサゾンおよびピタバスタチン投与による、これらの比率の変化を検討した。

### 3. 研究結果

コントロール群では、脂肪組織片から脂肪滴を有しない MSC が新生した (図 2)。

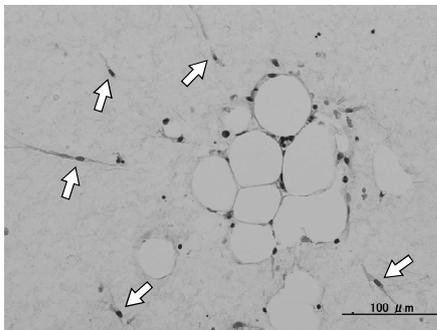


図2 OA症例 1 Dex. (-)のH-E染色標本  
脂肪組織片の周囲に脂肪滴を有しない紡錘形細胞(MSC: 矢印)が新生している。

ステロイド投与により、OA 群、ION 群とも脂肪滴を有する IA が出現し、この脂肪滴は Oil red O 染色陽性であった (図 3)。

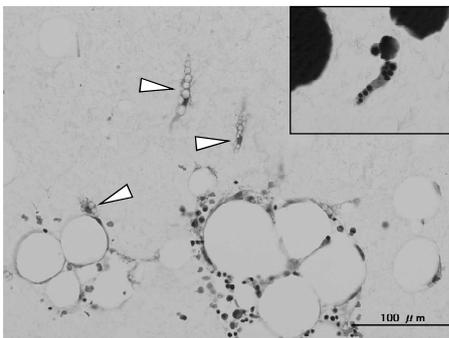


図3 OA症例 1 Dex. 10 μM投与のH-E染色標本 (挿入図はOil red O染色)  
脂肪組織片の周囲に脂肪滴を有する未熟脂肪細胞 (IA: 矢頭) が新生している。

高濃度のスタチン投与により、ATDSC の新生が減少した (図 4, 5)。

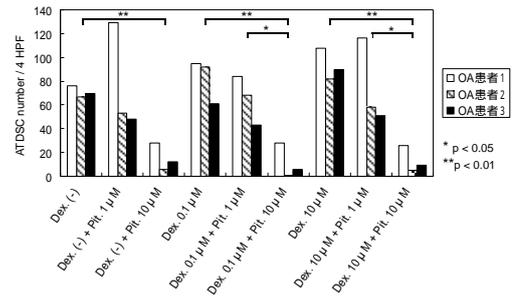


図4 OA症例におけるATDSCの数

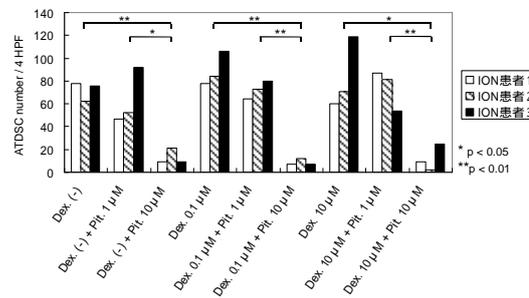


図5 ION症例におけるATDSCの数

ステロイド投与による IA の出現は、ION 群に比し OA 群で高い傾向を示した (図 6, 7)。

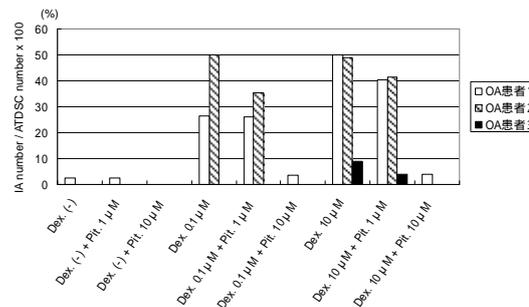


図6 OA症例における未熟脂肪細胞の割合

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.

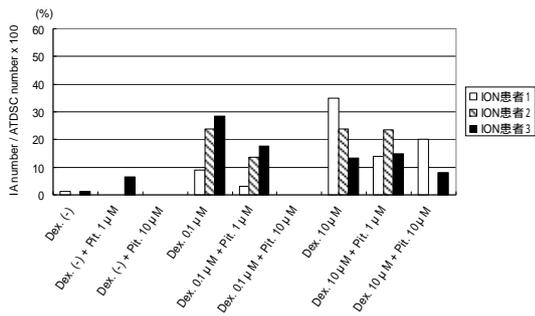


図7 ION症例における未熟脂肪細胞の割合

#### (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。

#### 4. 考察

ヒト骨髄脂肪組織片を3次元培養すると、脂肪組織片周囲にMSCを主体とするATDSCが出現し、これにステロイドを投与すると、ATDSC中のIAの比率が増加した。さらにピタバスタチンの投与により、ATDSCの数の減少およびIAの比率の低下がみられた。この結果は、ピタバスタチンが、ステロイドによる骨髄内間葉系幹細胞からの脂肪細胞分化亢進を抑制することを示している。今後、症例数を重ねるとともに、アディポサイトカイン、酸化ストレスマーカーなどの検索を行う。

#### 5. 結論

ステロイド投与により誘導される脂肪組織片由来間葉系細胞の脂肪細胞分化が、ピタバスタチンの投与によって抑制された。ピタバスタチンをはじめとするスタチン系の薬剤が、骨髄内間葉系細胞の脂肪細胞分化抑制を介して、特発性大腿骨頭壊死症の予防・治療に有効である可能性が示唆された。

#### 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

#### 7. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許の取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

#### 8. 参考文献

- 1) Ogawa K: High-resorption scanning electron microscopic evaluation of cell-membrane porosity by ultrasound. Med Electron Microsc. 2001 Dec;34(4):249-53.
- 2) Chang CJ, Shih WL, Yu FL, Liao MH, Liu HJ: Apoptosis induced by bovine ephemeral fever virus. J Virol Methods. 2004 Dec 15;122(2):165-70.

# 高濃度ステロイドによる血管内皮細胞アポトーシスにおける CNP 制御シグナルの 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 (IONF) 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し、C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) が GC による内皮細胞のアポトーシスを制御することを報告してきた。その制御機構として、高濃度 GC が血管内皮細胞の 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、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。以上より、CNP の抗アポトーシス作用は cGMP/PKG シグナルを介しており、実際の臨床で使用可能な cGMP/PKG 活性化薬が高濃度 GC により惹起される血管内皮細胞障害を制御できる可能性が示唆された。

## 1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症 (ION) は、大腿骨頭の循環障害による骨梁及び骨髄の阻血性の無菌性壊死で、全身性エリテマトーデス (SLE) 等の膠原病疾患にしばしば併発する<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の後に ION が生じ易いことを報告してきた<sup>2)</sup>。

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、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を介した血管障害に対して、ナトリウム利尿ペプチドの一つである CNP (C-type natriuretic peptide) が抗アポトーシス作用を発揮することを報告してきた。平成 20 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、CNP 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。

## 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  $\mu$ g/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  $\mu$ g/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)、および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。

CNP (100pg/ml) 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。

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を抑制した。

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。

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。

#### 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報告してきた<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。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>。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 活性化薬が高濃度ステロイド薬による血管内皮細胞障害を制御できる可能性が示唆された。

#### 5. 結論

CNP は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。また、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 活性化薬が高濃度ステロイド薬による血管内皮細胞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* (2008) 67, 380-388
- 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* (2008) 67, 189-195
- 3) 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* (2008) 23, 278-286

- 4) Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Tanaka Y. Bolus infusion of human urinary trypsin inhibitor improves intractable interstitial pneumonia in patients with connective tissue diseases. *Rheumatology* (2008) 47, 907-913
- 5) Nakano K, Higashi T, Hashimoto K, Takagi R, Tanaka Y, Matsushida S. Antagonizing dopamine D1-like receptor inhibits Th17 cell differentiation: Preventive and therapeutic effects on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochem Biophys Res Commun* (2008) 373, 286-291
- 6) Mototani H, Iida A, Nakajima M, Furuichi T, Miyamoto Y, Tsunoda T, Sudo A, Kotani A, Uchida A, Ozaki K, Tanaka Y, Nakamura Y, Tanaka T, Notoya K, Ikegawa S. A functional SNP in EDG2 increases susceptibility to knee osteoarthritis in Japanese. *Hum Mol Genet* (2008) 17, 1790-1797
- 7) Yoda A, Toyoshima K, Onishi N, Hazaka Y, Tsukuda Y, Tsukuda J, Kondo T, Tanaka Y, Minami Y. Arsenic trioxide augments chk2/p53-mediated apoptosis by inhibiting oncogene wip1 phosphatase. *J Biol Chem* (2008) 283, 18969-18979
- 8) Okada Y, Nawata M, Nakayamada S, Saito K, Tanaka Y. Commencing use of alendronate protects premenopausal women from bone loss and fracture associated with high-dose glucocorticoid therapy. *J Rheumatol* (in press)

## 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, 斎藤和義, 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

# SHRSP 大腿骨頭壊死研究及び ヒト大腿骨骨髓脂肪細胞研究

熊谷謙治、尾崎 誠、宮田倫明、穂積 晃、坂本和隆、後藤久貴、野崎義博、進藤裕幸  
(長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 発生分化機能再建学講座 構造病態整形外科)

大腿骨頭壊死研究の実験的研究は自然発症高血圧ラット(SHR)を用いたものと大腿骨骨髓脂肪細胞を用いたものの2系統で遂行している。

自然発症高血圧ラット(SHR)において、今回の発表は5年の節目でもあり、過去 10 年間の研究を統括し紹介するとともに今後の研究方向を定めることである。自然発症高血圧ラット(SHR)において、大腿骨頭壊死が発生し、組織学的に人間の大腿骨頭壊死と密接に類似していることを発見された。以来、我々は骨壊死の病因を調査するモデルとして利用、研究してきた。SHRSP 大腿骨頭壊死の研究は 1988 年から始まった。当初 SHR を使用し、その性状、特質を研究し、性差があること、骨頭流入血管の異常など明らかになり、また無荷重にすることで発生頻度が著減することが判明した。1998 年に脳卒中自然発症高血圧ラット(SHRSP)の骨頭研究が始まった。まず、診断基準を他種の動物実験や国際的に通用するものを作成し応用した。その結果、SHRSP おいて SHR より高頻度に、かつ定型的な大腿骨頭壊死が発生すること、15 週齢から 17 週齢に好発し、また Steroid Hormone の負荷で壊死の頻度が増加することも判明した。ほぼ生存限界の 40 週齢では、大腿骨頭壊死が少数ではあるが約 20 週齢以後にも壊死生じうることや、また組織学的進展が遅いことも示唆された。大腿骨頭壊死の原因病態の解明に関して、高脂血症のみでは壊死が発生しにくく、臨床研究や他種動物実験と同様に酸化ストレスや apoptosis も関与していた。最近の研究では Steroid Hormone 投与で脂肪細胞が増生するのみでなく、様々な cytokine を産生し、壊死への関与が示唆している。予防に関する研究では、SHR に warfarin 投与し、発生頻度が著減した。また抗凝固剤の pentosan 投与が有効であることが判った。

大腿骨頭や大腿骨頸部骨幹部から採取されたヒト骨髓脂肪細胞を用いて、脂肪細胞と adipokine 特に Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) の関係、HMG-CoA reductase inhibitor (statin) 系の製剤での PAI-1 分泌抑制、脂肪細胞と破骨細胞の相互関係などを検討し、statin で骨髓脂肪細胞の PAI-1 分泌は抑制された。また骨髓脂肪細胞は破骨細胞分化を促進していた。

## 1. 研究目的

動物実験に関する目的:

我々は骨壊死の病因を調査するモデルとして自然発症高血圧ラット(SHR)を使用し、大腿骨頭壊死の研究を進めてきた。過去約 10 年間 本班研究に個々バラバラに発表してきた内容を、統括し紹介するとともに今後の研究方向を定めること。

臨床材料を利用した vivo の実験に関する目的:

近年メタボリック症候群などで皮下脂肪や内臓脂肪は単なるスペーサーやエネルギー貯蔵庫ではなく、内分泌器官として注目されている。閉鎖空間である骨髓内に大量に存在する大腿骨骨髓脂

肪細胞に着眼し、大腿骨頭壊死への関与を様々な観点からみること。

また、昨年の研究で Steroid Hormone 投与によってヒトの骨髓脂肪細胞から大腿骨頭壊死症と密接に関係している PAI-1 の分泌が促進される結果を得ており、これを発展させて、骨髓脂肪細胞での Steroid Hormone 誘発 PAI-1 の分泌が HMG-CoA reductase inhibitor (simvastatin) で、抑制されるかどうか検討すること。特に adipokine は破骨細胞や骨芽細胞へ作用し骨代謝にも関与しており、ヒト骨髓脂肪細胞と骨代謝の関係について検討すること。

## 2. 研究方法

動物実験に関する方法:

我々が進めてきた大腿骨頭壊死の研究は、SHRSP 大腿骨頭壊死の研究は 1988 年から始まった。2000 年以降、SHR を用いた大腿骨頭壊死の研究再開し、厚生労働省研究班に参加時より以下の概ね 1 から 4 の方向で研究発表している。

1. 骨頭壊死の発生状態の確認
2. 壊死発生率を向上させる試み
3. ステロイド投与の影響、病態解析
4. 骨壊死発生の予防、抑制

この発表内容を、統括し紹介する。

臨床材料を利用した vivo の実験に関する目的:

大腿骨頭部骨折や変形性股関節症により大腿骨人工骨頭置換術や人工股関節置換術を受けた患者から大腿骨骨髓液を採取し、骨髓脂肪細胞をコラゲナーゼ処理にて分離し初代培養を行った。尚、当該の研究に影響が予測される関節リウマチ、大腿骨頭壊死症、Steroid Hormone 使用歴あり、血液透析などの患者は除外した。

Simvastatin での骨髓脂肪細胞での Steroid Hormone 誘発 PAI-1 の分泌抑制研究について培養細胞に Simvastatin (Sim) 10  $\mu$  M、さらにその 12 時間後に Dexamethasone (Dex) 1  $\mu$  M を添加し、PAI-1・adiponectin・TNF の遺伝子発現を Real time RT-PCR、タンパク分泌を ELISA で評価した。

骨髓脂肪細胞と骨代謝の研究について

(免染染色)

骨髓脂肪細胞の免疫染色を、抗 RANKL と抗 OPG と抗 M-CSF の 3 種のウサギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を使用し、行った。

(RT-PCR)

ヒト骨髓脂肪細胞における RANKL、OPG、M-CSF の遺伝子発現、および Dexamethasone、TNF- $\alpha$  24 時間後の発現変化を Real-Time RT-PCR 法により検討した。

(共培養)

骨髓脂肪細胞とヒト破骨細胞前駆細胞の共培養をおこない、TRAP 染色およびリン酸カルシウム薄膜での骨吸収能の検討をおこなった。

(倫理面への配慮)

本研究を開始するにあたり、長崎大学大学院歯薬学総合研究科における倫理審査委員会の承認を得た。また、患者に対して専用の同意書を作成し、文書による同意を得た。

統計解析

統計的有意差の検討には、Chi square test、Fisher's exact test、Wilcoxon's ranks sum test、Student T test、もしくは Mantel extension method を用いた。

## 3. 研究結果

動物実験に関する方法:

本教室の、Iwasaki、Hirano は SHR の大腿骨頭に無腐性壊死、骨化障害がおり、組織学的に人間の大腿骨頭壊死と密接に類似していることを発見し、1988 年より調査、研究をおこなってきた。

当初 SHR を使用し、その性状、特質を研究し性差があること、骨頭流入血管の異常など明らかになり、また無荷重にすることで発生頻度が著減することが判明した<sup>1,2)</sup>。

大腿骨頭壊死の班研究に加入するにあたり、特発性大腿骨頭壊死症のモデルとして SHR を使用する際、実験結果が安定していること薬物負荷などでより高頻度の壊死発生が望まれた。SHR と SHRSP (亜系間)でも発生頻度が異なる<sup>3)</sup>。故に至る条件 (発生時期、発生頻度、典型的壊死像検出) の検索が必要であった。そこで我々はまず、診断基準を他種の動物実験や国際的に通用するものを作成し応用した<sup>4)</sup>。(表 1)

表 1. 骨壊死の有無と脂肪細胞の増生、変性に関する Stage 分類(診断基準)

stage	Fatty degeneration (FG)	Myelocyte necrosis	Osteocyte necrosis	Appositional bone formation
FG	+	-	-	-
Early	+/-	+	-	-
Fresh	+/-	+	+	-
Old	+/-	-	+	+

1998 年に脳卒中自然発症高血圧ラット(SHRSP)の骨頭研究が始まった。SHRSP おいて SHR より高頻度に、かつ定型的な大腿骨頭壊死が発生すること、15 週齢から 17 週齢に好発し、また Steroid Hormone の負荷で壊死の頻度が増加することも判明した。また X 線による診断は壊死検出率が非常

に低いことも判明した。(表 2)

表2. SHRの大腿骨頭壊死発生頻度(%)

	週齢	骨頭数	X線の壊死数	組織学的壊死
SHR/Izm	10	6	0	17
	15	12	0	42
	17	12	0	58
SHR/NCrj	10	6	0	17
	15	6	0	67
SHRSP/NGsk	14	6	3	67
	15	4	0	25
SHRSP/Izm	17	14	6	64

ほぼ生存限界の 40 週齢では、大腿骨頭壊死が少数ではあるが約 20 週齢以後にも壊死生じることや、また組織学的進展が遅いことも示唆された。この週齢でも Steroid Hormone 投与で脂肪細胞を変化・変性させることや骨頭壊死を生じさせること、old necrosis の中に脂肪細胞の増加、変性 early necrosis を生じることが判明した。(表 3)

表3. 40週齢のSHRSP大腿骨頭壊死

Group	Control	Steroid Hormone
n	22	16
Normal	9	5
Fatty. Deg.	0	1
Early Nec.	4	1
Fresh Nec.	0	3
Old Nec.	9	6
Old Nec. Plus		F.D.=2 Early N.=1

大腿骨頭壊死の原因病態の解明に関して、高脂血症と大腿骨頭壊死の関連が SLE 患者での発生傾向から推察され、飼料に High fat high cholesterol (HFC) 食群を作製(表 4)、

表4. HFC食の組成 (%)

SP飼料	68
コレステロール	5
コール酸	2
牛脂粉末	25
L-NNA	0.006

(L-NNA : NG-nitro-L-arginine)

投与したが、高脂血症を呈し骨髄内の脂肪細胞は増生していたが、壊死の定義を満たす迄は至らなかった。Steroid Hormone 投与では SHRSP は壊死が生じる確率が高く、SHRSP の起源である WKY (ウイスター京都ラット) では同様の処置で発生していない。(表 5)

表5. subtype間の処置による骨頭壊死率の比較

群	SHRSP/NGsk		WKY/Izm	
	壊死骨頭数 / 全対象骨頭数	%	壊死骨頭数 / 全対象骨頭数	%
control群	42 / 80	51.2	1 / 60	1.6
HFC食群	42 / 72	58.4	1 / 40	2.5
Steroid Hormone群	59/62	95.2	0 / 20	0

単に高脂血症のみでは壊死が発生しにくく、Steroid Hormone 投与で臨床研究や他種動物実験と同様に大腿骨頭壊死が生じることから、酸化ストレスや apoptosis に関して調べた。酸化ストレスは Steroid Hormone 投与で著増し、apoptosis は壊死周囲や壊死の生じていない骨頭内にも観察された。最近の研究では Steroid Hormone 投与で脂肪細胞が増生するのみでなく、様々な cytokine を産生し、それらのうち特に PAI-1 が壊死への関与が示唆している。(図 1)

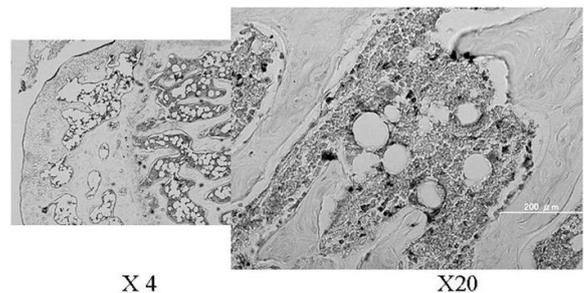


図1. SHRSP大腿骨頭のPAI-1免疫染色

予防に関する研究では、種々の薬剤の可能性が考案されているが、我々はまず、SHR に warfarin を投与し、大腿骨頭壊死の発生頻度が著減させた<sup>5)</sup>。更に抗凝固剤(ヘパリン類似物質)であり、抗酸化作用を有する pentosan を持続投与すると、高脂血症も改善し、Steroid 性の大腿骨頭壊死を減少させ、また自然発症の大腿骨頭壊死も減少させ酸化ストレスも組織学的に減少していた。(表 6)

表6. Pentosan投与による骨頭壊死率の比較

	PPS -	B	PPS +
Steroid -	30.4 (17/56) (%)		14.8 (10/71) (%)
Steroid +	A 91.3 (42/46) (%)		40.8 (29/71) (%)
C			
A : P<0.0001, B : P=0.0261, C : P<0.0001, D : P=0.0004			

Simvastatin でのヒト骨髄脂肪細胞での Steroid Hormone 誘発 PAI-1 の分泌抑制研究について

- Real time RT-PCR(10 μ M Simvastatin)  
Simvastatin により PAI-1 発現は 50% 以下に抑制された。adiponectin と TNF は発現が亢進される傾向がみられた。
- Real time RT-PCR(1 μ M Dexamethasone)  
Dexamethasone により PAI-1 発現は約 400% に亢進した。adiponectin と TNF は発現がやや抑制される傾向がみられた。
- PAI-1 経時的 Real time RT-PCR  
Dexamethasone は PAI-1 の発現をピークで約 1000% に増加させ、Simvastatin は 24 時間後 70%、48 時間後 30% と PAI-1 の発現を減少させた (図 2)。

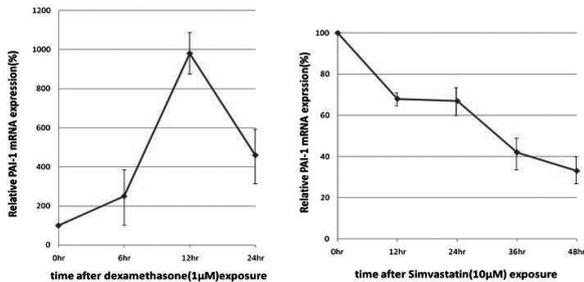


図2 PAI-1の経時的変化 (real time RT-PCR)

4. 経時的 PAI-1 蛋白分泌量

PAI-1 蛋白分泌量は投与後 24 時間で、Dexamethasone は 105ng/ml、コントロール 49 ng/ml、Simvastatin 32 ng/ml であった (図 3)。

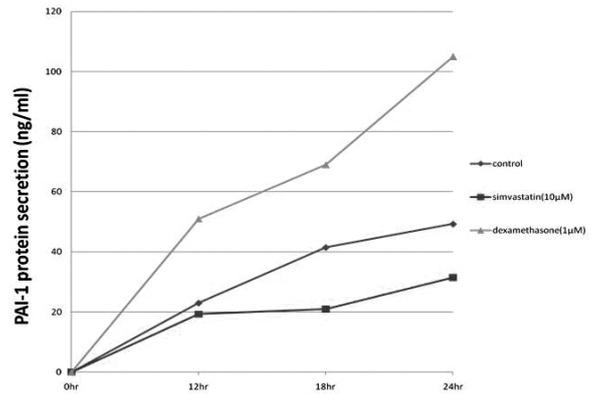


図3 PAI-1タンパク分泌 (ELISA)

5. PAI-1, adiponectin, TNF 蛋白分泌量

PAI-1 蛋白分泌量を Simvastatin で約 60% に、Dexamethasone は約 160% に変化させた。Simvastatin 投与 12 時間後に Dexamethasone を投与すると PAI-1 はコントロールと同程度またはそれ以下に抑えることができた。adiponectin は Simvastatin、Dexamethasone によりわずかに増加する傾向がみられた。TNF は Simvastatin、Dexamethasone によりわずかに減少する傾向がみられた (図 4)。

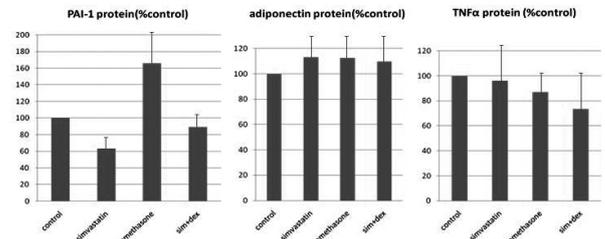


図4 PAI-1, adiponectin, TNF α タンパク分泌 (10 μ M simvastatin, 1 μ M dexamethasone) (ELISA)

骨髄脂肪細胞と骨代謝の研究について

ヒト骨髄脂肪初代培養細胞において RANKL、OPG、M-CSF 遺伝子はいずれも発現を認め、RANKL/OPG 比は時間とともに上昇した。また Dexamethasone、TNF 添加により RANKL 発現は有意に増加した (図 5)。

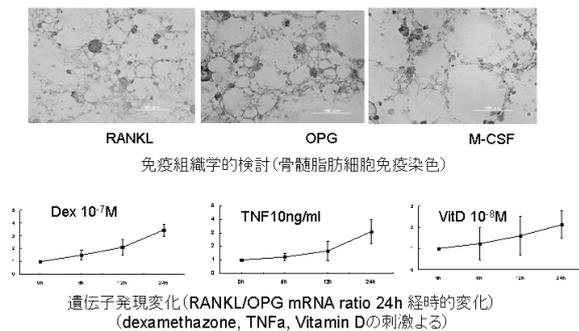


図5. 骨髄脂肪細胞と骨代謝との関係  
(脂肪細胞の破骨細胞分化促進能について)

共培養において破骨細胞前駆細胞は、一部多核化し骨吸収能をもつ TRAP 陽性細胞となった(図6)。

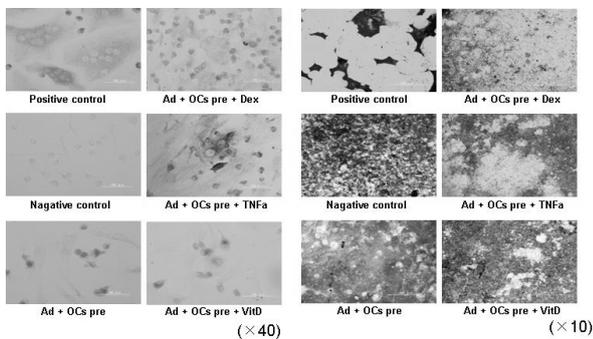


図6. 骨髄脂肪細胞との共培養による破骨細胞前駆細胞の分化  
(TRAP染色およびVon Kossa染色)

#### 4. 考察

特発性大腿骨頭壊死の原因は、未だ解明されていないが、血液凝固系異常による血栓形成、血管内皮細胞の異常、微小血管の破綻、脂質代謝異常による脂肪塞栓と脂肪細胞増大に伴う骨内圧の上昇などが想定、提唱されてきている。全身性エリテマトーデス、関節リウマチなどの膠原病、腎疾患、臓器移植後などの治療に用いられる大用量の Steroid Hormone 投与は、骨壊死に対する主な危険因子の 1 つと疫学的に実証されている。しかし、Steroid Hormone が骨壊死を誘発するメカニズムはまだ明らかでなく、予防処置も開発されていない現状である。

動物モデルを確立し、それを用いた Steroid Hormone の微小循環への作用、血管内皮機能傷害、脂肪細胞や骨細胞への影響に関する病態解析は重要である。本教室において、Iwasaki、Hirano らは SHR の大腿骨頭に無腐性壊死、骨化障害がおこることに着目し、1988 年より調査、研究をおこなってきた。

1. 骨頭壊死の発生状態の確認
2. 壊死発生率を向上させる試み
3. ステロイド投与の影響、病態解析
4. 骨壊死発生の予防、抑制

の検討項目に沿って、診断基準を確定し、好発種、好発週齢を明らかにし、Steroid Hormone で壊死が高率に誘発されること<sup>6)</sup>、他の動物種の実験と同様に壊死発生に酸化ストレスや apoptosis が関与していることを証明し、更に予防薬として warfarin、抗酸化作用を有する抗凝固剤の pentosan が有用であることを証明してきた。これらの結果は臨床に反映されることが期待される。また他の動物種の実験や臨床的検討がなされている抗高脂血症剤の有用性も現在実験中である。

Simvastatin でのヒト骨髄脂肪細胞での Steroid Hormone 誘発 PAI-1 の分泌抑制研究についてわれわれはこれまでに Steroid Hormone が骨髄脂肪細胞からの PAI-1 分泌を増加させること、大腿骨頭における循環障害の原因となりうることについて検討してきた。近年、大腿骨頭壊死症患者の risk factor として血中 PAI-1 の増加の報告がみられる。HMG-CoA reductase inhibitor は血管への多面的保護作用を有することから、大腿骨頭壊死症に対する治療薬・予防薬として注目されている<sup>7,8,9)</sup>。動物実験において、Steroid 性大腿骨頭壊死症を予防する報告は散見されるが、ヒト細胞についての効果はまだ明らかではない。

そこで、ヒト骨髄脂肪細胞を用いて、Dexamethasone・Simvastatin による cytokine の変化を検討した。PAI-1 は Dexamethasone により発現・分泌量ともに増加、Simvastatin により発現・分泌量ともに減少した。adiponectin は Dexamethasone により発現は低下するが、分泌は増加する傾向がみられた。また、Simvastatin により発現は亢進、分泌は増加する傾向がみられた。TNF は Dexamethasone により発現は低下、分泌は減少する傾向がみられた。また、Simvastatin により発現は亢進、分泌は減少する傾向がみられた。

Simvastatin を添加し、その後 Dexamethasone を添加した群では、PAI-1 上昇が抑えられている。このことは Simvastatin が Steroid Hormone 性大腿骨頭壊死症に対する治療・予防薬になりうることを示しており、さらに検討を重ねてゆく予定であ

る。

#### 骨髄脂肪細胞と骨代謝の研究について

破骨細胞分化の必須分子である RANKL は骨芽細胞や骨髄幹細胞に発現し、活性化 VitD3 や PTH などの刺激によりその発現が増加する。今回、ヒト骨髄脂肪細胞は骨芽細胞と同様に RANKL を発現し、その増加に伴い破骨細胞活性を直接的に促進することが明らかになった。これらはヒト骨髄脂肪細胞の骨代謝における重要性と、Steroid Hormone 骨粗鬆症や関節リウマチにおける骨吸収への関与の可能性を示している。

#### 5. 結論

1999 年からの SHR を用いた大腿骨頭壊死研究を総括した。SHRSP では Steroid Hormone で大腿骨頭壊死誘発され易いこと、酸化ストレスの関与や pentosan が予防薬として有望であることが判明した。

ヒト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。

Simvastatin でヒト骨髄脂肪細胞での Steroid Hormone 誘発 PAI-1 の分泌抑制研究について Simvastatin 投与により、Dexamethasone による骨髄脂肪細胞からの PAI-1 増加を抑制することが示された。

#### 骨髄脂肪細胞と骨代謝の研究について

ヒト骨髄脂肪細胞は骨芽細胞と同様に RANKL を発現し、その増加に伴い破骨細胞活性を直接的に促進することが判った。

#### 6. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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) Suzuki M, Kumagai K, Osaki M, Murata M, Tomita M, Miyata N, Hozumi A, and Niwa M, Osteonecrosis of Femoral Head in the Stroke

Prone Spontaneously Hypertensive Rats -Especially in Old Rats, *Clinical and Experimental Hypertension*, (in press, accepted on 12 May 2008)

##### 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、浜松市、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
- 5) K. Kumagai, M. Suzuki, M. Tomita, M. Murata, M. Osaki, N. Miyata, A. Hozumi, M. Niwa, H. Shindo, Osteonecrosis of Femoral Head in the Stroke Prone Spontaneously Hypertensive Rats - Especially in Old Rats, 13th International SHR Symposium, Prague, Czech Republic, 2008, *Physiological Research*, 57(3), 37-71, 2008
- 6) 熊谷謙治、丹羽正美, SHRSP 大腿骨頭壊死研究の途中経過, 第 44 回 高血圧関連疾患モデル学会, 平成 20 年 11 月 21-22 日、島根県出雲市
- 7) H. Goto, M. Osaki, K. Sakamoto, A. Hozumi, H. Shindo. Primary Human Bone Marrow Adipocytes Stimulate Osteoclast Differentiation The 30th American Society for

Bone and Mineral Research, Montreal, Canada, September 17, 2008

- 8) 後藤久貴、尾崎誠、坂本和隆、穂積晃、進藤裕幸、骨髓脂肪細胞は破骨細胞分化を促進する、第23回日本整形外科学会基礎学術集会 10月23-24日、京都

## 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. Hirano T, Iwasaki K, Sagara K, Nishimura Y, Kumashiro T. Necrosis of the femoral head in growing rats. Occlusion of lateral epiphyseal vessels. *Acta Orthop Scand*. 1989; 60:407-410.
2. Iwasaki K, Hirano T, Sagara K, Nishimura Y. Idiopathic necrosis of the femoral epiphyseal nucleus in rats. *Clin Orthop Relat Res*. 1992; 277:31-40.
3. Naito S, Ito M, Sekine I, Ito M, Hirano T, Iwasaki K, Niwa M. Femoral head necrosis and osteopenia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSPs). *Bone* 1993; 14:745-753.
4. Arlet, J Ed. A traumatic necrosis of the femoral head: general report. In: Schoutens, A, Arlet, J, Gardeniers, JWM, Hughes, SPF eds. *Bone circulation and vascularization in normal and pathological conditions*, Plenum, New York, 1993, 235.
5. Wada M, Kumagai K, Murata M, S-Yamashita Y, Shindo H. Warfarin reduces the incidence of osteonecrosis of the femoral head in spontaneously hypertensive rats. *J Orthop Sci*. 2004; 9:585-590.
6. 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.

7. Pengde Kang, Bin Shen, Jing Yang, Fuxing Pei. Circulating platelet-derived microparticles and endothelium-derived microparticles may be a potential cause of microthrombosis in patients with osteonecrosis of the femoral head. *Thrombosis Research* 2008; 4:001-7.
8. Miyanishi K. et al. Risk factors for dysbaric osteonecrosis. *Rheumatology* 2006; 45:855-858.
9. Nisida K. et al. Pitavastatin may reduce risk of steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Clinical Orthopaedics Related Research* 2008; 466:1054-1058.

# 家兎大腿骨壊死モデルにおける骨髓内循環の検討

小平博之、天正恵治  
堀内博志  
小林千益

(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)  
(諏訪赤十字病院整形外科)

我々はステロイドによって骨だけに壊死が生じる原因として、骨髓が皮質骨にシールドされた閉鎖空間となっており、人体の中で独特の構造となっている点に注目している。今回我々は開窓によって骨髓の環境を変化させることで、家兎ステロイド性骨壊死発生の頻度が変化するかを検討した。その結果から壊死発生の一因としてこういった骨の解剖学的特徴があげられると考えた。

## 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、髓内浮腫をきたし、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。そこで我々が注目してきた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研究を行ってきた。

以前の報告で我々は家兎骨髓内圧の測定可能な実験系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。また前回の報告で、ステロイド投与家兎の骨髓内圧の計測を行ったところ、ステロイド投与後48時間で骨髓内圧の上昇を認め(図2)、この時点で骨髓内に何らかの環境の変化が生じている可能性があることが示唆された<sup>2</sup>。

そこで今回は、家兎大腿骨壊死モデルで大腿骨を開窓し、骨髓内の環境を変化させることによって、壊死発生率が変化するのかを病理学的に検討を行った。

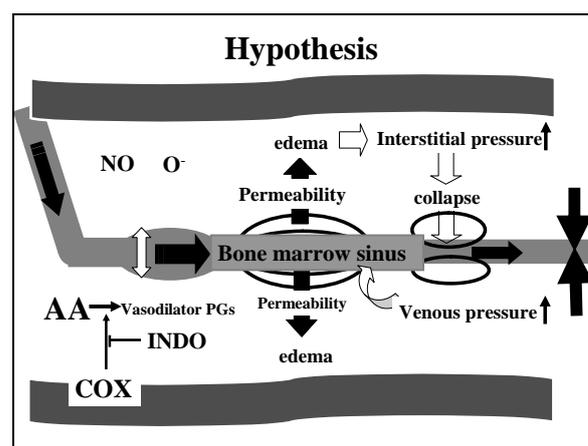


図1

## 2. 研究方法

我々ははじめに家兎大腿骨開窓モデルを作成した。これは右大腿骨遠位骨幹部に 1.5mm エアドリルで骨髓内を損傷しないように 3 箇所を開窓を行うもので

ある(図3)。開窓を行う際の骨髄内圧の変化を骨髄内にアンギオカテーテルを挿入し計測したところ、開窓によって骨髄内圧低下を認めた(図4)。

われわれはこの開窓モデルを用いてステロイドによる骨壊死発生率について検討を行った。はじめに家兎右大腿骨遠位骨幹部に3箇所開窓をおこない、開窓モデルを作成。続いてメチルプレドニゾン20mg/kgを一回殿筋内注射。開窓後4週間で犠牲死とし、両側の大腿骨を摘出した。8羽の家兎から16本の大腿骨を摘出し、開窓群8本、コントロール群8本について壊死発生の有無を病理学的に検討した。なおこの際開窓の影響を受ける大腿骨外側部は検討に含めなかった。骨壊死の病理学的診断は、骨髄造血細胞壊死および脂肪細胞壊死を伴う骨梁内骨細胞空胞化(empty lacunae)に基づいて行った<sup>3</sup>。

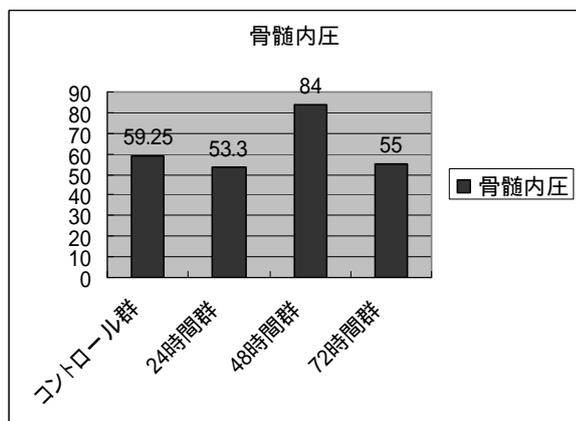


図2

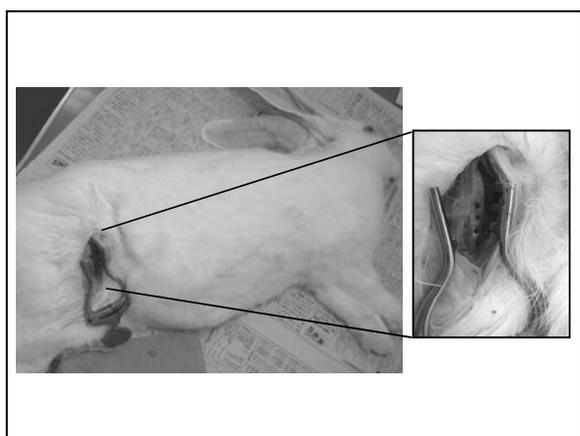


図3

### 3. 研究結果

壊死発生率は開窓群で8羽中2羽(25%)、コントロール群で8羽中6羽(75%)であり、有意な差を認め、開窓によって骨髄内環境を変化させることで骨壊死

発生の低下を認めた。このことから骨髄が皮質骨によってシールドされている環境がステロイド性骨壊死発生の誘因の一つになっている可能性が示唆された。

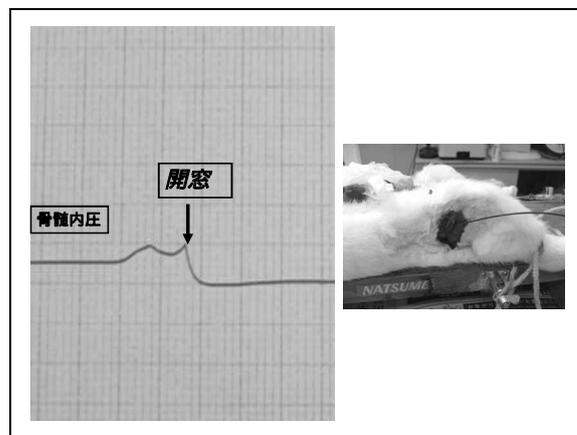


図4

### 4. 考察

我々の疑問のひとつになぜステロイド全身投与で壊死が骨にのみできるのか?といった問題がある。この理由として骨の解剖学的特徴、すなわち微小循環が類洞構造内で行われていることや、骨髄が皮質骨にシールドされており、閉鎖環境となっていることがあげられる。これまで我々は動脈系に注目した in vivo の血管運動性の解析を行ってきた<sup>4</sup>。今回のシリーズでは、先行実験でステロイド投与によって骨髄内圧が投与後48時間で上昇するといった現象を見出している。これらをふまえ、今回は皮質骨で閉鎖された環境を変化させることで骨髄内循環を変化させ、骨壊死発生に影響を与えるか検討した。その結果開窓によって壊死発生率が低下したことから、骨髄内循環の変化が生じていたことが推察された。ただし開窓によって臨床的に骨壊死予防効果があるといったことまでは現在考えておらず、また core decompression のように開窓によって治療を行うといったことも考えていない。

今回我々はステロイド性骨壊死発生の病態解析を行い、結果からは壊死発生の一因として骨の解剖学的特徴があげられると考えた。

### 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) 小平博之ほか: ステロイド性骨壊死家兔モデルにおける骨髄内圧の検討、特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会、平成 19 年度研究報告書 37-38, 2008
- 3) Sugano N et.al: Multicenter study of diagnostic criteria for nontraumatic osteonecrosis of the femoral head. J Bone Joint Surgery 81-B ;590-595, 1999
- 4) 堀内博志ほか: 家兔骨髄内微小循環系におけるステロイド剤の影響、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 68-69, 2007