

表 1. 症例, 対照間の一般特性比較

	症例	対照	<i>p</i> *
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 ²)	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。

* χ^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)	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i>
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)。

腎移植後大腿骨頭壊死症発生率の最近 20 年間の動向

後藤 毅、藤岡幹浩、高橋謙治、上島圭一郎、栗林正明、柴谷匡彦、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)

われわれは 1988 年から腎移植症例を対象に特発性大腿骨頭壊死症(以下 ION)のスクリーニングを行っている。本研究では 1988 年から 2007 年の 20 年間の ION 発生率およびステロイド投与量を調査した。ION 発生率は低下しており、ステロイド投与量も減少していた。また、最近使用されているステロイド投与プロトコールの症例では発生例はなかった。ステロイド投与量の減少が発生率の低下に反映された可能性があると考えている。

1. 研究目的

われわれは 1988 年から腎移植症例を対象に ION のスクリーニングを行っている。平成 12 年度の班研究において、大阪大学と京都府立医科大学の二施設で腎移植症例を対象に統計学的に解析し、ステロイド総投与量が ION 発生に影響していることを確認した¹⁾。また、術後早期のステロイド量が ION 発生に影響していることを報告した²⁾。本研究の目的は調査開始時から 20 年間の ION 発生率およびステロイド投与量を調査することである。

2. 対象および方法

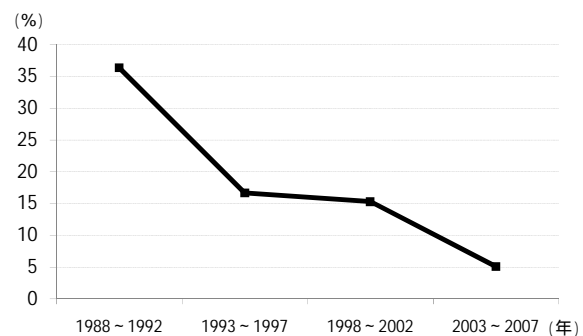
対象は 1988 年 1 月から 2007 年 12 月までに京都府立医大付属病院移植外科で腎移植を施行された 424 例のうち、追跡可能であった 297 例(追跡率 70.0%)である。男性が 189 例で女性が 98 例、移植時年齢は 4 ~ 65 (平均 37.3)歳であった。

ION 発生の有無は MRI で判断した。ION 発生率および術後 8 週間のステロイド投与量を調査した。発生率と投与量を 5 年毎の 4 期間に区切って調査した。また、現在までに使用されたステロイド投与プロトコールは 4 種類であり、プロトコール別の発生率および術後 8 週間の投与量も調査した。

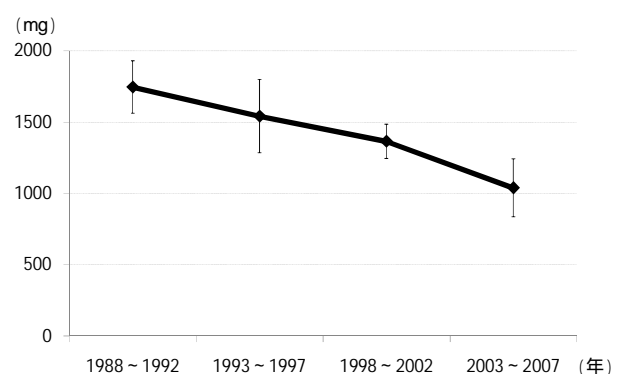
3. 研究結果

1988 年から 5 年毎の発生率は 36.4%、16.7%、15.3%、5.1%で最近 5 年間での減少が著明であった(図 1)。それぞれの期間における 1 例あたりの術後 8 週間の投与

量は 1747.3mg、1542.3mg、1376.3mg、1039.7mg であった(図 2)。



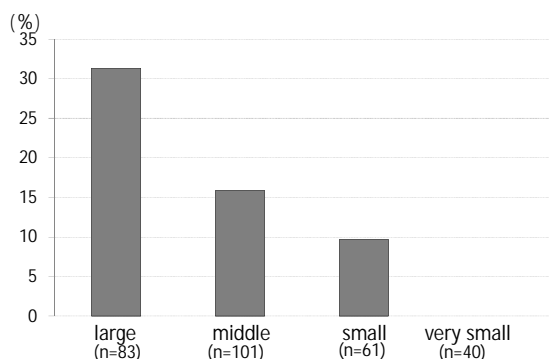
(図 1) 5 年毎の ION 発生率



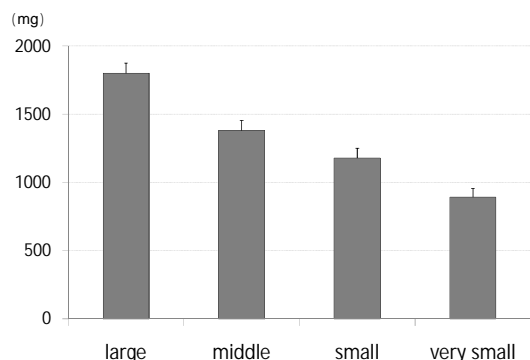
(図 2) 5 年毎のステロイド投与量

プロトコールの変更とともに投与量は減少しており、現在までに使用された 4 つのプロトコールを large、middle、small、very small とした。プロトコール別の発生率は 31.3%、15.8%、9.6%、0%で、very small での発生例

はなかった(図 3)。プロトコール別の 1 例あたりの投与量は 1800.4mg、1380.1mg、1178.7mg、891.8mg であった(図 4)。



(図 3) プロトコール別の ION 発生率



(図 4) プロトコール別のステロイド投与量

4. 考察

5 年毎およびプロトコール別での ION 発生率は低下しており、ステロイド投与量も減少している。併用免疫抑制剤や症例の背景因子を含めた多変量解析が必要であるが、ステロイド投与量の減少が発生率の低下に反映された可能性があると考えている。Very small の症例数は 40 で、大きな母集団で発生例がないことを確認できた。今後も調査を継続し、多変量解析でステロイド投与量と ION 発生との関係を検討する。

5. 結論

腎移植症例を対象として ION 発生率、ステロイド投与量を調査した。発生率は減少しており、very small の症例での発生例はなかった。今後、ステロイド投与量と ION 発生との関連について多変量解析を行う。

6. 研究発表

1. 著書

なし

2. 研究発表

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

- 久保俊一, 柴谷匡彦, 藤岡幹浩, 中村文紀, 上島圭一郎, 濱口裕之, 小嶋晃義, 浅野武志, 坂井孝司, 菅野伸彦, 西井 孝, 大園健二: 2 施設間における腎移植後大腿骨頭壊死症の比較. 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 12 年度報告書: 84-86, 2001
- 柴谷匡彦, 藤岡幹浩, 新井祐志, 上島圭一郎, 高橋謙治, 浅野武志, 末原 洋, 平田哲朗, 石田雅史, 中村文紀, 濱口裕之, 小嶋晃義, 阪尾 敬, 栗林正明, 齋藤正純, 今井 寛, 久保俊一, 福島若葉, 廣田良夫: 腎移植後大腿骨頭壊死症の統計解析. 骨・関節系調査研究班特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会平成 17 年度報告書: 14-16, 2006

肝移植後の大腿骨頭軟骨下脆弱性骨折の一例

岩崎賢優、山本卓明、本村悟朗、池村 聡、岩本幸英 (九州大学 整形外科)

53 歳女性、肝移植後 7 週から右股関節部痛のため歩行困難となった。股関節単純 X 線にて骨頭上外側に軽度の圧潰像を認めた。MRIT1 強調画像にて、骨頭軟骨下に途絶・蛇行した中枢凸のバンド像を認めた。また造影 MRI にてバンドとその中枢部に造影効果を認めた。以上より大腿骨頭軟骨下脆弱性骨折(SIF)と考え、保存的加療を行った。現在は症状消失し骨頭の圧潰進行も認めていない。

1. 研究目的

大腿骨頭軟骨下脆弱性骨折 (SIF) は、骨脆弱性を有する高齢女性や腎移植後などに発生することが報告されている^{1,2,3,4)}。肝移植後に発生した SIF に関して詳細に検討した報告はない。今回我々は肝移植後に発生した SIF を経験したので報告する。

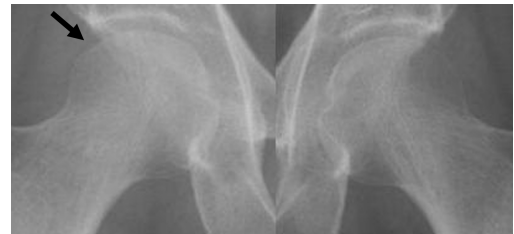


図 1

2. 研究方法および結果

症例は 53 歳女性、1995 年から原発性胆汁性肝硬変の加療を行っていた。2007 年 8 月に長男をドナーとした生体肝移植を行い、術後はステロイドと免疫抑制剤を使用した。移植後 7 週から特に誘因なく右股関節痛を自覚し、当科を紹介受診した。右股関節痛のため歩行困難、スカルパ三角部の圧痛あり、身長 148 cm 体重 52 kg、BMI (body mass index) 23.7kg/m²、大腿骨近位部の骨塩定量では BMD (bone mineral density) 0.788g/cm²、T-Score は 0.7 で骨量減少を認めなかった。JOA score は右 42、左 62 点。関節可動域は右の伸展・内外旋で制限を認めた。初診時股関節単純 X 線写真では、正面像にて右大腿骨頭上外側に約 1.3 mm の圧潰 (矢印) を認めた (図 1)。発症から 3 週後の股関節 MRI では、右大腿骨頭上部に T1 強調画像で低信号、T2 強調画像で高信号の領域を認める。また T1 強調画像では骨頭軟骨下にバンド像 (矢印) を認め、バンド像は上方凸、蛇行と途絶を認める (図 2A,B)。頸軸に平行な断面においても、T1 強調画像で骨頭軟骨下にバンド像 (矢印) を認め、バンド像は上方凸、蛇行と途絶を認める (図 1C)。造影 MRI においては、バンド像の中枢および末梢に造影効果を認める。(図 2D)。

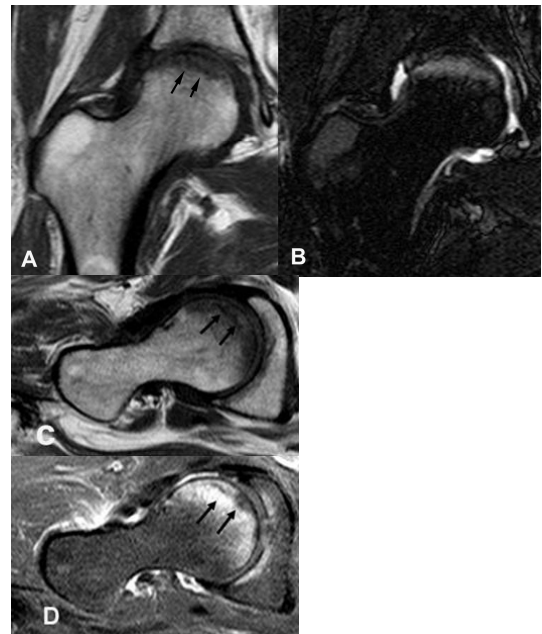


図 2

理学所見および画像所見から、SIF と診断し、発症から 6 週間の免荷による保存的治療を行い、症状は消失した。発症後 4 ヶ月の股関節単純 X 線にて、骨頭圧潰は進行していない (図 3)



図3

3. 考察

肝移植後の骨折の発生頻度は、Guichelaar らが肋骨・骨盤・大腿骨骨折の合計は、移植から1年以内が30%、8年以内が46%と報告している⁵⁾。慢性肝障害と肝移植後の大量ステロイド投与による骨脆弱性のため、骨折の頻度は高い。SIFについては報告例が少なく、発生頻度は明らかではない。一方で、肝移植後の大腿骨頭壊死症の発生頻度は2~8%と報告されている^{6,7)}。

慢性肝障害による骨密度低下については、骨吸収増加と骨形成低下の両方が関与しているとの報告がある⁸⁾。

肝移植後患者においては、慢性肝障害と移植後の大量ステロイド投与による骨脆弱性があり、肝移植後の股関節痛については大腿骨頭壊死症に加えてSIFも考慮すべきと考える。両者の鑑別にはMRI T1におけるバンド像の形状と、造影MRIでの造影効果の有無が有用である^{2,4)}。すなわち、大腿骨頭壊死ではバンド像は末梢凸で滑らかであるが、SIFでは中枢凸で途絶や蛇行を認める。また大腿骨頭壊死ではバンドの中枢に造影効果を認めないが、SIFではバンドの中枢に造影効果を認める。

4. 結論

生体肝移植後に発生したSIFを経験した。移植患者は骨脆弱性を有しているため、肝移植後の股関節痛では、大腿骨頭壊死症に加えて、SIFも考慮する必要があると考える。

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) Rafii M, Mitnick H, Klug J, Firooznia H. Insufficiency fracture of the femoral head: MR imaging in three patients. *AJR Am J Roentgenol* 1997;168:159-63.
- 2) Yamamoto T, Bullough PG. Subchondral insufficiency fracture of the femoral head: a differential diagnosis in acute onset of coxarthrosis in the elderly. *Arthritis Rheum* 1999;42:2719-23.
- 3) Vande Berg BC, Malghem J, Goffin EJ, Duprez TP, Maldague BE. Transient epiphyseal lesions in renal transplant recipients: presumed insufficiency stress fractures. *Radiology* 1994;191:403-7.
- 4) Ikemura S, Yamamoto T, Nakashima Y, Shuto T, Jinguishi S, Iwamoto Y. Bilateral subchondral insufficiency fracture of the femoral head after renal transplantation: a case report. *Arthritis Rheum* 2005;52:1293-6.
- 5) Guichelaar MM, Schmoll J, Malinchoc M, Hay JE. Fractures and avascular necrosis before and after orthotopic liver transplantation: long-term follow-up and predictive factors. *Hepatology* 2007;46:1198-1207.
- 6) Lieberman JR, et al. Symptomatic osteonecrosis of the hip after orthotopic liver transplantation. *J Arthroplasty* 2000;15:767-71.
- 7) Papagelopoulos PJ, Hay JE, Galanis EC, et al. Total joint arthroplasty in orthotopic liver transplant recipients. *J Arthroplasty* 1996;11:889-92.
- 8) Maalouf NM, Sakhaee K. Treatment of Osteoporosis in Patients with Chronic Liver Disease and in Liver Transplant Recipients. *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2006;9:456-63.

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⁽¹⁾、脂質代謝異常⁽²⁾、酸化障害⁽³⁾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。⁽⁴⁾ 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。

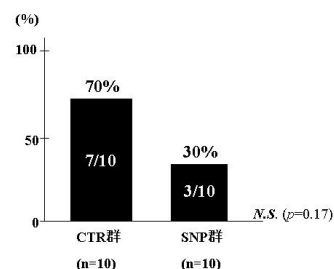
2. 研究方法

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⁽⁵⁾。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

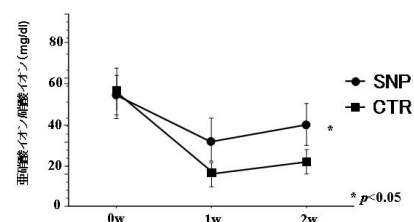
骨壊死発生率は、CTR 群で 10 羽中 7 羽の 70% であったのに対し、SNP 群では 10 羽中 3 羽の、30% であり、両群間には有意な差は認められなかった (Fig.1)。

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)

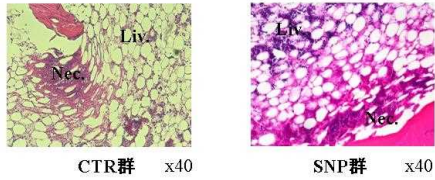
Figure 2



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⁽¹⁾、脂質代謝異常⁽²⁾、酸化障害⁽³⁾、そしてNO産生低下⁽⁴⁾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

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。SHRSP/Ngsk および 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 plasminogen activate inhibitor type1 (PAI-1)免疫染色を行い、Steroid Hormone 投与群におけるラット間比較では SHRSP/Ngsk おける PAI-1 が強い発現を呈していた。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骨髓脂肪細胞を用いて、ヒト骨髓脂肪細胞初代培養系において Steroid Hormone 添加による各種 adipokine の遺伝子発現、また特に 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。脂肪細胞と adipokine 特に 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

は単なるスパ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。骨髓の脂肪髓化とともに骨髓脂肪細胞から産生、分泌される各種 adipokine は paracrine mechanism 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 に影響を与えることが判っている。

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、ヒト骨髄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：

大腿骨頸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髄液を採取し、骨髄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。

(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%CO₂ 濃度下で 24 時間 incubate した。この実験系において 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。

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

培養細胞に Simvastatin (Sim) 10 μM、さらにその 12 時間後に Dexamethasone (Dex) 1 μM を添加し、PAI-1・アディポネクチン・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。

骨髄脂肪細胞と骨代謝の研究について

(免疫染色)

骨髄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)

ヒト骨髄脂肪細胞における RANKL、OPG、M-CSF の遺伝子発現、および Dexamethasone、TNF-α 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)

骨髄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、長崎大学大学院医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、骨化障害がおこり、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^{1,2)}。

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³⁾。故に至的條件 (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⁴⁾。(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、様々なサイトカインを産生し、それらのうち特に PAI-1 が壊死への関与が平成 19 年度の研究で強く示唆している。(図 1)

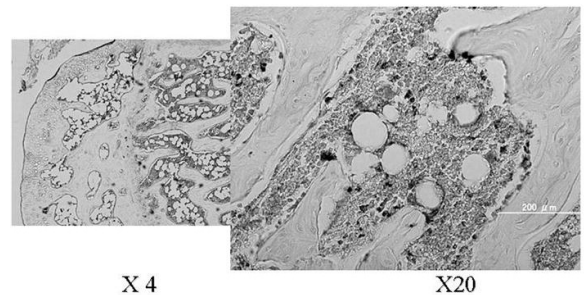


図1. SHRSP大腿骨頭のPAI-1免疫染色

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⁵⁾。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、ステロイド性的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 +	91.3 (42/46) (%)		40.8 (29/71) (%)

A : P<0.0001, B : P=0.0261, C : P<0.0001, D : P=0.0004

ヒト骨髄脂肪細胞の各種 adipokine の遺伝子発現および定量について検討：

ヒト骨髄脂肪細胞でも adiponectin、leptin、TNF、PAI-1、TNF、PAI-1 の発現を認めた。また脂肪特異的転写因子である PPAR² の発現を確認した。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。また PAI-1 の発現は時間依存性に増加し、Dexamethasone 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。

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

1. 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。

2. 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。

3. 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)。

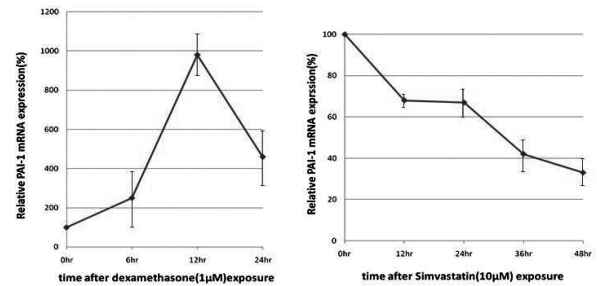


図2 PAI-1の経時的変化 (real time RT-PCR)

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)。

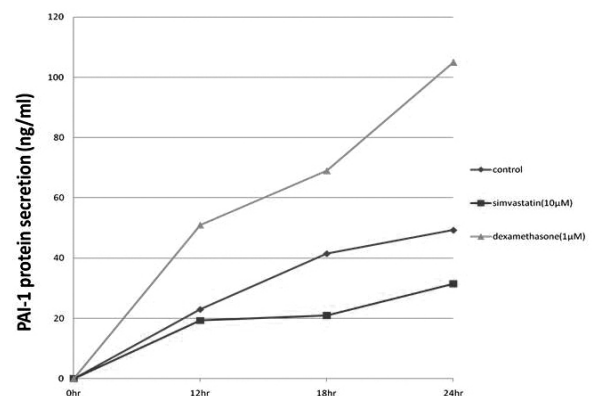


図3 PAI-1タンパク分泌 (ELISA)

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)。

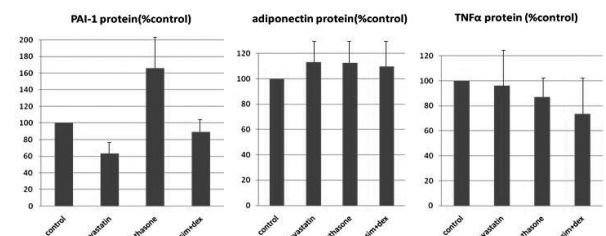


図4 PAI-1, adiponectin, TNF α タンパク分泌 (10 μ M simvastatin, 1 μ M dexamethasone) (ELISA)

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)。

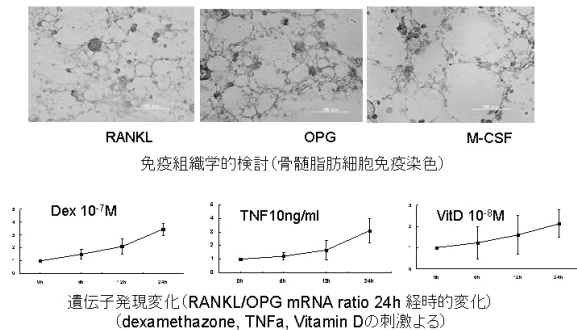


図5. 骨髄脂肪細胞と骨代謝との関係
(脂肪細胞の破骨細胞分化促進能について)

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)。

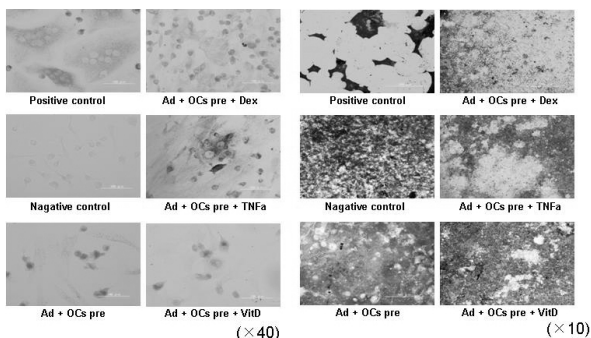


図6. 骨髄脂肪細胞との共培養による破骨細胞前駆細胞の分化
(TRAP染色およびVon Kossa染色)

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⁶⁾、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。

ヒト骨髄脂肪細胞の各種 adipokine の遺伝子発現および定量について検討：

GC が PAI-1 の遺伝子発現および分泌を増強させることは各種報告で明らかにされている^{7,8)}。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、Steroid Hormone 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 Steroid Hormone 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。過剰の Steroid Hormone 投与による骨髄脂肪細胞の機能変化は大腿骨頭壊死の重要な発生要因として考えられる。即ち Steroid Hormone 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、結果的に動脈血流が減少する。さらには Steroid Hormone 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

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

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^{9,10,11)}。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。

ヒト骨髄脂肪細胞での adipokine の分泌研究について

PAI-1 は大腿骨頭壊死症に関する cytokine と考えられた。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

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) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 後藤久貴, 尾崎誠, 坂本和隆, 穂積晃, 進藤裕幸, 骨髄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. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Miyanishi K. et al. Risk factors for dysbaric osteonecrosis. *Rheumatology* 2006; 45:855-858.
11. Nisida K. et al. Pitavastatin may reduce risk of steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Clinical Orthopaedics Related Research* 2008; 466:1054-1058.

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 μ 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 α 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 α)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 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、Adiponectin、leptin、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¹⁻³。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adipokine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^{4,5}、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、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℃、5% CO₂ 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認を得て開始し、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)。

	匹数	週齢(wks)	壊死	
SHRSP/Ngsk		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 α 、PAI-1、TNF β 、PAI-1 の発現を認め¹。また脂肪特異的転写因子である PPAR γ 2 の発現を確認した(Fig. 2)。

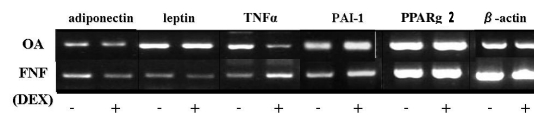


Fig. 2

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¹(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 10⁻⁶m/l (M)で最も強かった(Fig. 5A, B)。

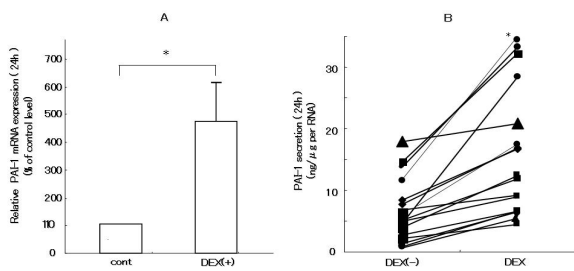


Fig. 3A, B

今回の実験では、TNF α 、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。

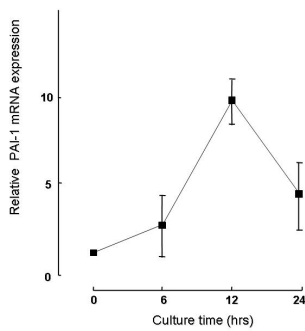


Fig. 4

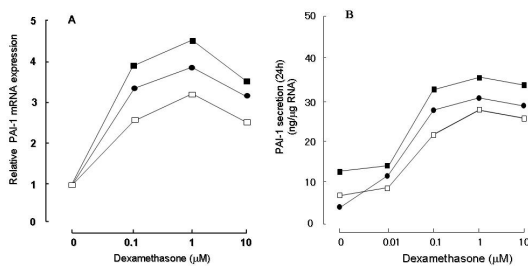


Fig. 5A, B

(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)。

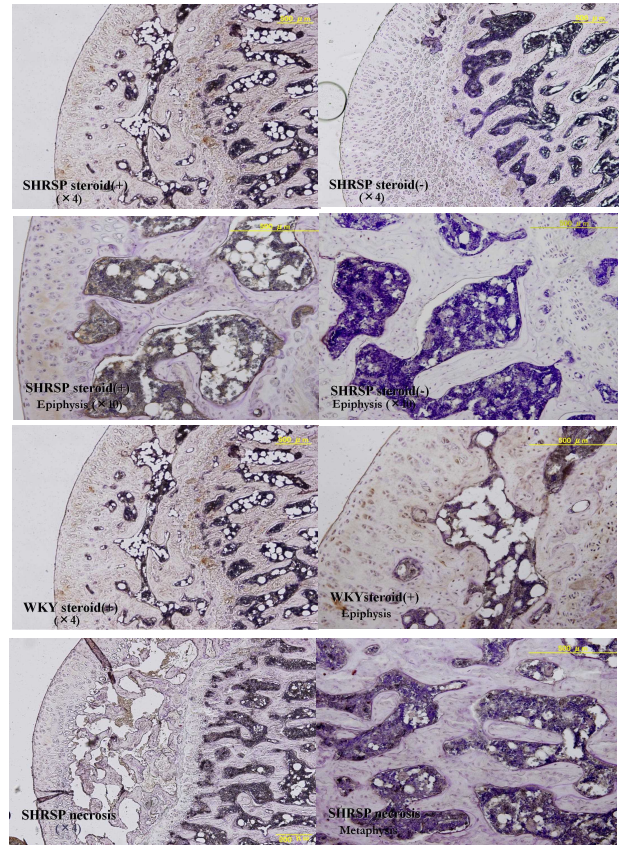


Fig.6

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⁴。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各種報告で明らかにされている^{6, 7}。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 α や IL1 や IL 6 や 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⁸。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)。

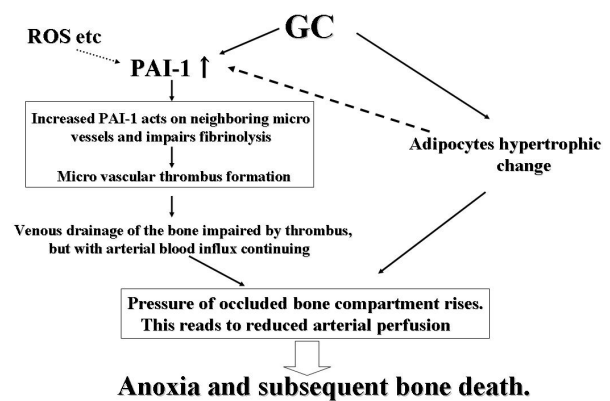


Fig. 7

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 29th Annual
Meeting, Honolulu, Hawaii, U.S.A., 2007.9.16

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
[The role of AGEs for the pathogenesis of osteopenia in diabetes mellitus]
[Diabetic osteopathy]
Osteoprotegerin serum levels in children with type 1 diabetes: a potential modulating role in bone status. *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.
- 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.