

血管内皮機能を標的とした特発性大腿骨頭壊死症の予防・治療法の検討

ピタバスタチンならびにスピロラク톤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過剰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。グルココルチコイド受容体 (GR)に選択性が高いデキサメサゾンを用いたグルココルチコイド過剰マウスにおける検討では、HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるピタバスタチンが大動脈における活性酸素の産生抑制と内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)の発現増加を介して NO 産生を増加させ、内皮依存性血管拡張反応の障害を改善することを報告した。また、培養血管内皮細胞を用いた検討では、ピタバスタチンがコレステロール非依存的な多面的作用によりグルココルチコイドによる eNOS mRNA の不安定化を改善するとともに、ERK5-KLF2 経路の活性化により eNOS プロモーター活性を亢進し、eNOS 蛋白発現を増加させることを報告した。一方、ミネラルコルチコイド受容体(MR)への結合性も有するメチルプレドニゾロンを用いた血管内皮細胞培養系における検討では、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톤により抑制された。これらの結果はグルココルチコイド過剰が GR のみならず MR の活性化を介して血管内皮細胞機能を障害することを示唆するものであり、HMG-CoA 還元酵素阻害薬ならびにアルドステロン拮抗薬は NO bioavailability の増加を介してグルココルチコイド過剰による血管内皮機能障害を改善し、ステロイド性大腿骨頭壊死症の予防・治療薬となる可能性がある。

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。我々はグルココルチコイド過剰による酸化ストレス亢進と内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)の発現減少による NO bioavailability の低下が血管内皮機能障害を惹起することを報告し¹⁾、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²⁾。

我々はグルココルチコイド受容体 (GR)に選択性が高いデキサメサゾン(DEX)を用いたグルココルチコイド過剰マウスにおいて、血圧上昇、内皮依存性血管拡張反応減弱、eNOS 発現の減少が HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるピタバスタチンにより改善することを見出し、本剤が大腿骨頭壊死症の予防・治療薬となる可能性を報告した。さらにヒト臍帯静脈血管内

皮細胞(HUVEC) の培養系において、ピタバスタチンがコレステロール非依存的な多面的作用を介して eNOS 蛋白発現を増加させることを報告した。そこで平成 19 年度はピタバスタチンによる eNOS 発現増加の機序についてさらに検討した。

一方、プレドニゾロン(PSL)やメチルプレドニゾロン(mPSL)はミネラルコルチコイド受容体(MR)への結合性も有するが、腎尿管細胞などの上皮系細胞では 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 (11 β -HSD2)により不活性化されるため、MR 作用はきわめて弱い³⁾。しかしながら、11 β -HSD2 の発現がわずかである血管内皮細胞では、PSL や mPSL の高用量投与により MR が活性化される可能性がある。そこで新規予防・治療法の開発を目的として、平成 20 年度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 活性化の意義についてさらに検討を加えた。

2. 研究方法

平成 19 年度

DEX による eNOS 発現抑制作用に及ぼすピタバスタチンの効果とその分子機構について血管内皮細胞培養系を用いて検討した。

1) eNOS mRNA の発現ならびに安定性に及ぼすピタバスタチンの作用

HUVEC にピタバスタチン 10^{-5} M を添加し、その 12 時間後に DEX 10^{-6} M を添加し、DEX 添加 16 時間後に real time PCR 法により、eNOS の mRNA 量を測定した。さらに actinomycin D を添加し、eNOS mRNA の安定性について解析した。

2) ERK5 活性に及ぼすピタバスタチンの作用

我々は MAPK ファミリーのひとつである ERK5 の C 末端領域に転写活性領域があることに着目し、Gal4-DNA 結合ドメインと ERK5 との融合蛋白を発現するベクターを作成し、dual-luciferase reporter gene assay により培養細胞での ERK5 活性を高感度で定量的に評価できるシステムを開発した⁴⁾。このシステムを用いて、HUVEC においてピタバスタチン、アトロバスタチンおよびシンバスタチンが ERK5 活性に及ぼす作用を解析した。また、コレステロール合成経路の中間産物であるメバロン酸 $100\mu\text{M}$ 、ゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) $10\mu\text{M}$ 、ファルネシルピロリン酸 (FPP) $10\mu\text{M}$ をピタバスタチンと同時に添加し ERK5 活性に及ぼす影響について解析した。

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

近年、Zn フィンガー型転写因子である KLF2 が eNOS の発現調節を含む血管内皮細胞機能維持に重要な役割を果たしていることが報告され、その発現は ERK5 により制御されていることが明らかにされた⁵⁾。そこで KLF2 プロモーター(-157 および-924)を組み込んだ luciferase reporter vector を作成し、dual-luciferase reporter assay を用いて、bovine arterial endothelial cell (BAEC) (Cell Systems, USA) の培養系において KLF2 プロモーター活性に及ぼすピタバスタチンの作用について検討した。

平成 20 年度

mPSL を用いて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 活性化の意義について HUVEC を用いて検討を行った。

1) mPSL による GR 転写活性に及ぼすスピロラクトン

の作用

mPSL 1、10、 $100\mu\text{g/ml}$ 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、mPSL 添加の 8 時間前にスピロラクトン 10^{-7} M、 10^{-6} M、 10^{-5} M を添加し、その影響を検討した。

2) mPSL による活性酸素産生に及ぼすスピロラクトンの作用

mPSL $100\mu\text{g/ml}$ を添加し、dihydroethidium(DHE) 染色を用いて superoxide の産生を評価した。さらにスピロラクトン 10^{-5} M を添加しその影響を評価した。

3) mPSL による接着分子 VCAM-1 発現に及ぼすスピロラクトンの作用

mPSL 1、10、 $100\mu\text{g/ml}$ 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、mPSL 添加の 8 時間前にスピロラクトン 10^{-7} M、 10^{-6} M、 10^{-5} 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

平成 19 年度

1) eNOS mRNA の発現ならびに安定性に及ぼすピタバスタチンの作用

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

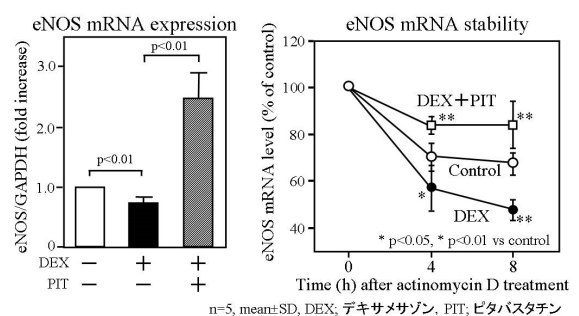


図 1. ピタバスタチンはグルココルチコイドによる eNOS mRNA の不安定化を改善する

2) ERK5 活性に及ぼすピタバスタチンの作用

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

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

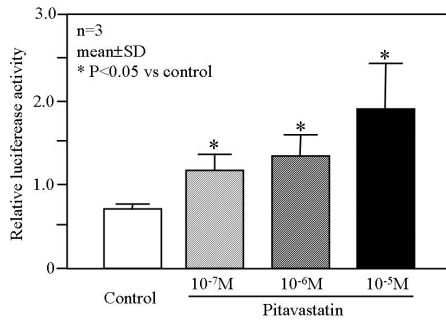


図2. ピタバスタチンは用量依存的にERK5を活性化する

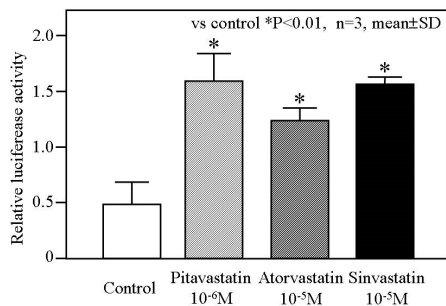


図3. HMG-Co還元酵素阻害薬はERK5を活性化する

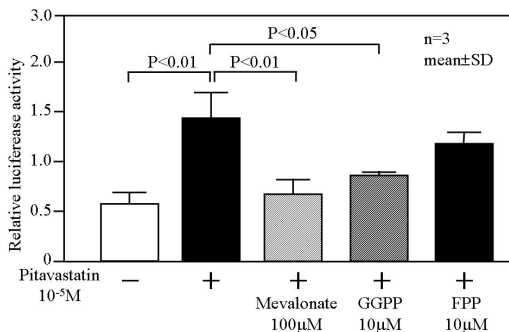


図4. ピタバスタチンによるERK5の活性化作用はメバロン酸あるいはゲラニルゲラニルピロリン酸により消失する

3) KLF2 プロモーター活性に及ぼすピタバスタチンの作用

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

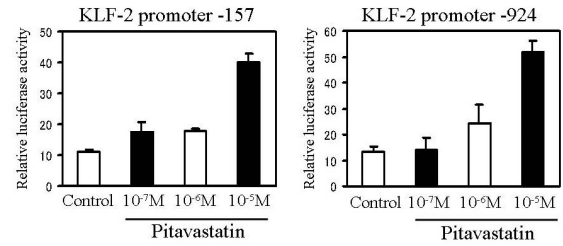


図5. ピタバスタチンはKLF2プロモーター活性を亢進する

平成 20 年度

1) mPSL による GR 転写活性に及ぼすスピロラクソンの作用

mPSL は濃度依存的に GR 転写活性を有意に亢進した。この作用はスピロラクソンにより濃度依存的に有意に抑制された (図 6)。

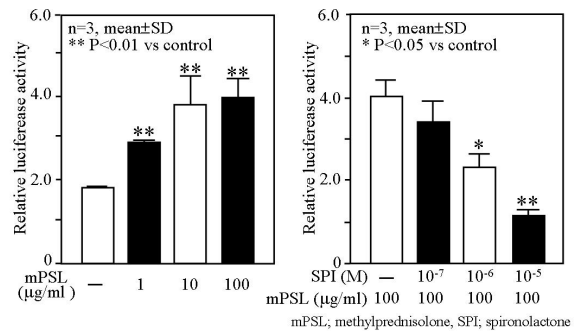


図6. メチルプレドニゾンによる転写活性亢進はミネラルコルチコイド受容体阻害により抑制される

2) mPSL による活性酸素産生に及ぼすスピロラクソンの作用

mPSL は superoxide 産生を有意に増加させ、スピロラクソンはその作用を有意に抑制した (図 7)。

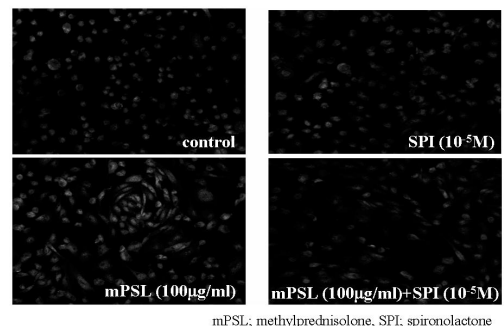


図7. メチルプレドニゾンによる活性酸素産生の増加はミネラルコルチコイド受容体阻害により抑制される

3) mPSL による接着分子 VCAM-1 発現に及ぼすスピロラクソンの作用

mPSL は濃度依存的に VCAM-1 の発現を有意に亢進した。この作用はスピロラクソンにより濃度依存的に有意に抑制された (図 8)。

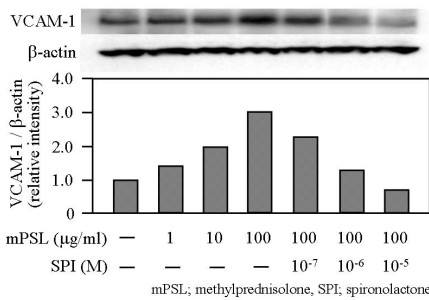


図8. メチルプレドニゾンによるVCAM-1発現の亢進はミネラルコルチコイド受容体阻害により抑制される

4. 考察

我々はこれまでにグルコルチコイド過剰が酸化ストレス亢進とNO産生低下によるNO bioavailabilityの低下を介して血管内皮機能障害を引き起こすことを報告し¹⁾、このようなグルコルチコイド誘発性血管内皮機能障害が大腿骨頭壊死症の予防ならびに治療の標的となりうる可能性を提唱してきた²⁾。さらに、強力なコレステロール低下作用に依存せず、血管内皮細胞への多面的保護作用を有するHMG-CoA還元酵素阻害薬⁶⁾に着目し、グルコルチコイド誘発性血管内皮機能障害に及ぼす作用を検討してきた。DEXによるグルコルチコイド過剰マウスを用いたこれまでの検討では、血圧上昇、内皮依存性血管拡張反応の低下、NO産生および大動脈でのeNOS発現の低下および活性酸素産生増加は、ピタバスタチンの前投与によりいずれも改善することを見出ししている。さらに、HUVEC培養系を用いた検討では、ピタバスタチンはコレステロール合成経路のイソプレノイド中間体であるGGPPの産生抑制を介してDEXによるeNOS蛋白発現の抑制を改善することを報告した。

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

今回の検討ではピタバスタチンのERK5活性化作用は濃度依存的であり、臨床的な薬物血中濃度においてもERK5を活性化することが確認された。また、同じスタチンであるアトロバスタチンおよびシンバスタチンにおいても同程度のERK5活性化作用がみられた

ことから、この作用はスタチンのclass effectと考えられる。さらにメバロン酸やGGPPの培養液への添加によりピタバスタチンのERK5活性化作用が消失し、FGFはこれに影響を与えなかったことから、ピタバスタチンの多面的作用のひとつであるGGPP産生の低下がERK5活性化に関与していると考えられる。近年、ERK5活性化による転写因子KLF2発現の亢進は、eNOS発現増加を含め、抗炎症、抗血栓、血管トーン制御などの血管内皮細胞機能の最も重要な制御機構として非常に注目されている⁵⁾。本研究ではピタバスタチンがKLF2プロモーター活性を濃度依存的に亢進することが示された。これらの成績はERK5-KLF2経路の活性化がピタバスタチンによるeNOSプロモーター活性亢進の機序であることを強く示唆するものである。

これまでの検討はグルコルチコイド過剰としてDEXを用いているため、主にGRを介する血管内皮細胞障害に関するものであった。一方、近年の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⁷⁾⁸⁾。アルドステロンは腎尿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-κB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⁹⁾。

我々のmPSLを用いた検討では、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mPSL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、mPSL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、mPSLによるMR活性化が酸化ストレスを亢進すると考えられる。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、mPSLは濃度依存的に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、mPSL 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。mPSL 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 11 β HSD2 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 9)。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。

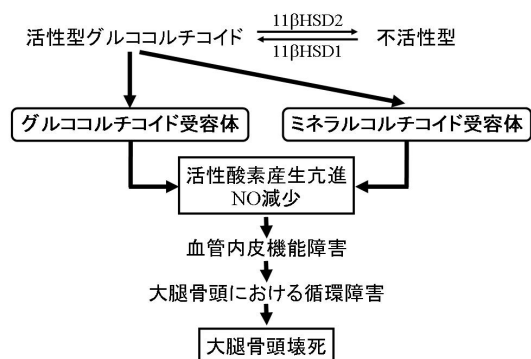


図9. 大腿骨頭壊死症の病因・病態仮説

5. 結論

ピタバスタチンはDEXによるGR活性化を介した血管内皮機能障害に対して、酸化ストレスの抑制やeNOS mRNAの安定性改善とeNOSプロモーター活性亢進に基づくNO産生の増加などの多面的直接作用を発揮する。特にそのNO産生増加作用はERK5-KLF2経路の活性化によると考えられた。さらに、mPSL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ことが明らかとなった。グルココルチコイド誘発性血管内皮機能障害はGRのみならずMRを介しており、ピタバスタチンならびにアルドステロン受容体拮抗薬は血管内皮機能の改善を介して大腿骨頭壊死症の治療・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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.

- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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*. Orlando, 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 statin, 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, 粟飯原賢一, 八木秀介, 池田康将, 石川カズ江, 住友由佳, 岩瀬俊, 松本俊夫. グルココル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, 粟飯原賢一, 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, 粟飯原賢一, 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.
- 9) 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. *72th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society*, Fukuoka,

2008.3.28-30.

- 10) Yagi S, Aihara K, Ikeda Y, Ise T, Yoshida S, Sumitomo Y, Iwase T, Akaike M, Matsumoto T. An eNOS-independent Protective Action of Pitavastatin against Angiotensin II-induced Cardiorenal Damage through Attenuating Rac-1-mediated Oxidative Stress. 72th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Fukuoka, 2008.3.28-30.
- 11) 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.
- 12) Yagi S, Aihara K, Ishikawa K, Ise T, Yoshida 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.
- 13) 赤池雅史、八木秀介、栗飯原賢一、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.
- 14) 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 attenuating Rac-1-mediated oxidative stress. 第31回日本高血圧学会総会、札幌市、2008.10.9-11.
- 15) 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.

- 16) 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 II-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, 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) 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) 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.

- 5) 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.
- 6) Wolfrum S, Jensen KS, Liao JK. Endothelium-dependent effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:729-736, 2003.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Leopold JA, Dam A, Maron BA, Scribner AW, Liao R, Handy DE, Stanton RC, Pitt B and Loscalzo J. 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。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。

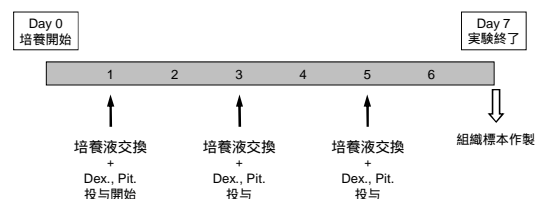


図1 実験プロトコール

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)。

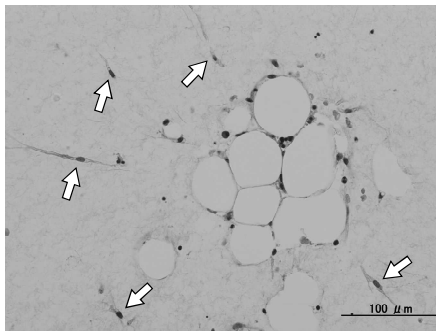


図2 OA症例1 Dex. (-)のH-E染色標本
脂肪組織片の周囲に脂肪滴を有しない紡錘形細胞 (MSC: 矢印) が新生している。

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)。

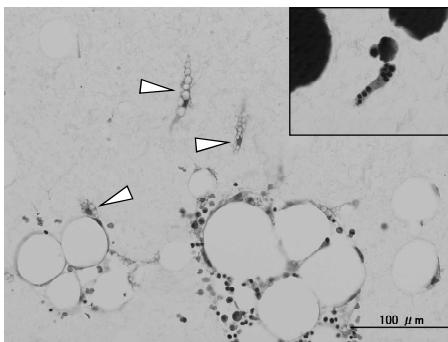


図3 OA症例1 Dex. 10μM投与のH-E染色標本 (挿入図はOil red O染色)
脂肪組織片の周囲に脂肪滴を有する未熟脂肪細胞 (IA: 矢頭) が新生している。

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)。

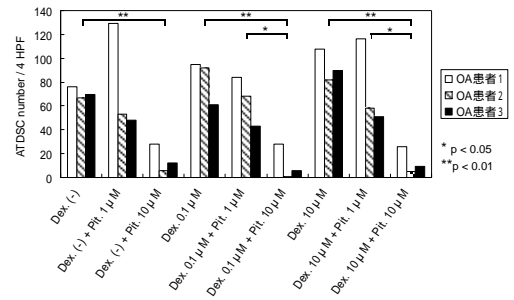


図4 OA症例におけるATDSCの数

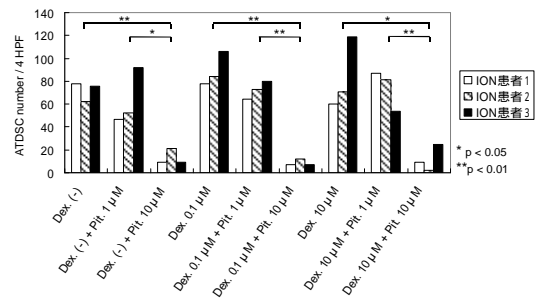


図5 ION症例におけるATDSCの数

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)。

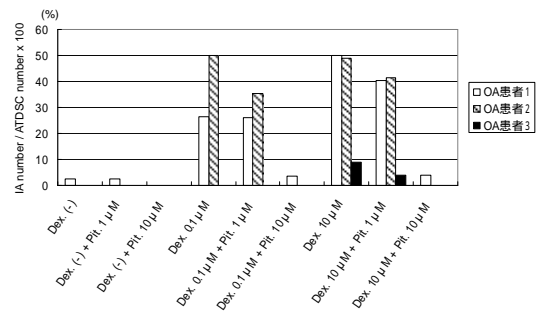


図6 OA症例における未熟脂肪細胞の割合

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.

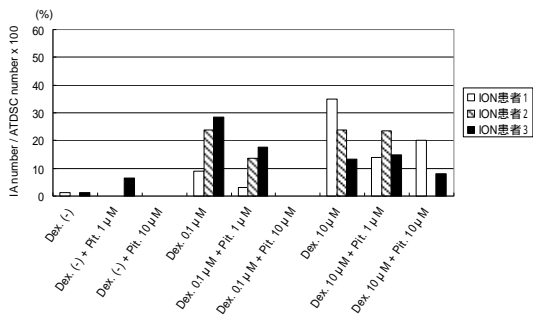


図7 ION症例における未熟脂肪細胞の割合

(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.

大量ステロイド薬誘発性血管内皮細胞障害・アポトーシスの

CNP による制御に関する研究

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、血管障害の関与があることが示唆されている。高濃度の糖質コルチコイド(GC)は内皮細胞の増殖活性抑制、G₂/M 期細胞減少、アポトーシスを誘導し血管障害を惹起することを解明した。さらにそのアポトーシス誘導の機序として Bax 発現誘導、Bcl-2 発現低下による caspase-9、3/7 の誘導が関与することを明らかにした。一方、内皮細胞保護作用が報告されている C 型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)は、細胞内 cGMP 濃度の上昇を介して PKG を活性化すること、CNP によるアポトーシス阻害は PKG 阻害薬で解除されること、cGMP/PKG 活性化薬(dipyridamole)が細胞内 cGMP 濃度を上昇させアポトーシスを阻害することを明らかにした。以上より、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¹⁾。症例対照研究や疫学研究により、ステロイド薬がIONの発症要因の約6割を示すことが明らかになり、我々も、ステロイドパルス療法後にIONが生じ易いことを報告してきた²⁾。

一方、IONの発症機序は未だ不詳であるが、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³⁾。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^{4,5)}。

さらに、高濃度の糖質コルチコイドによる血管障害の可能性が、我々を含めた複数の施設から報告されるが、ステロイド薬が骨頭の阻血状態を引き起こす機序は十分に解明されておらず、さらには、骨頭壊死の予防・治療は全く確立されていない。我々は、高濃度ステロイド薬による血管内皮細胞での細胞周期、アポトーシス誘導機構を解明するとともに、虚血状態における血管内皮障害を抑制することが報告されているナトリウム利尿

ペプチドの一つであるCNP(C-type natriuretic peptide)およびその下流シグナルであるcGMP/PKGシグナルの関与についてcGMP/PKG活性化薬(dipyridamole)を用いて高濃度ステロイド薬により惹起される血管内皮細胞障害に対する血管障害予防効果およびその作用機序について検討した。

2. 研究方法

血管内皮細胞として、臍帯静脈由来内皮細胞を(HUVEC)用いた。糖質コルチコイド(ステロイド薬)として、プレドニゾロン(PSL)、メチルプレドニゾロン(m-PSL)、デキサメタゾン(DEX)を使用した。細胞増殖は、TetraColor Oneを用いて吸光度計で測定した。細胞周期はpropidium iodide(PI)染色後、フローサイトメトリーで検出した。細胞のアポトーシスは、PI染色及びannexin V/PI染色後のフローサイトメトリーにより検出した。caspase-3/7、9活性については、ルミノメーターで検出した。p21、Bax、bcl-2等の細胞質内蛋白質は細胞をホルマリン及びサポニンで処理後に抗体で染色しフローサイトメトリーで検出した。

3. 研究結果

1) 高濃度 m-PSL は、細胞周期の G0/G1 arrest を誘導した(ステロイド薬大量内服療法、即ち、PSL

60mg、m-PSL 48 mg、DEX 6mg で到達可能な血中濃度に該当する各々 $1 \mu\text{g/ml}$ 、 $1 \mu\text{g/ml}$ 、 10^{-10} M では、24 時間以内の血管内皮細胞(HUVEC)に対して何ら影響を与えなかった。しかし、ステロイドパルス療法で到達する血中濃度 PSL $100 \mu\text{g/ml}$ ($3 \times 10^{-6} \text{ M}$)、m-PSL $100 \mu\text{g/ml}$ 、DEX 10^{-8} M を添加し、PI で染色し、細胞周期を観察した所、G2/M 増殖期細胞の約 20%減少と A 期(PI - very low) アポトーシス細胞の 80%増加を認めた。

- 2) 高濃度 PSL 添加 12 時間以内に p21 の細胞内発現が著明に増強した(フローサイトメーター)。内皮細胞を PI/annexin V で二重染色による早期アポトーシス細胞を検出した所、PSL $100 \mu\text{g/ml}$ 処理により約 12%から約 28%へ急増し、p21 発現増強を介して細胞周期を抑制し、アポトーシスを誘導すると示された。
- 3) 次に、血管内皮細胞(HUVEC)に、ステロイドパルス療法で到達する血中濃度に該当するメチルプレドニゾロン(m-PSL) $100 \mu\text{g/ml}$ を添加し、以下の結果を得た。高濃度 m-PSL は、HUVEC 細胞内での p21 の発現を著明に増強させ、細胞周期の G0/G1 arrest を誘導し、早期アポトーシス細胞を誘導した。さらに、高濃度 m-PSL は、Bax の細胞内発現、及び、caspase-3/7、9 活性を増強させた。
- 4) CNP (100pg/ml) は、高濃度 m-PSL により惹起された p21 発現を低下させ、G0/G1 arrest を抑制した。
- 5) CNP は、高濃度 m-PSL により惹起された Bax 発現増強を抑制し、bcl-2 発現を増強させた。
- 6) CNP は高濃度 m-PSL により誘導された caspase-3/7、9 の活性を低下させ、アポトーシスを抑制した。
- 7) cGMP/PKG 活性化薬(dipyridamole)も、高濃度 m-PSL により惹起された viability 低下を抑制し、caspase-3/7、9 活性増強を介するアポトーシス誘導を抑制した。
- 8) 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。また、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、血管内皮細胞の増殖活性抑制、G0/G1 arrest、アポトーシスを誘導し、その機序として Bax 発現誘導による caspase-9、3/7 の誘

導が関与することが明らかとなった。一方、CNP は細胞内 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、CNP の下流シグナルである 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³⁾。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²⁾。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ことを明らかにした。

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^{6,7)}。今回、高濃度 m-PSL によって誘導された血管内皮細胞のアポトーシスを、CNP を前投与し Bax/Bcl-2 の不均衡を是正することにより制御できる機序が解明された。これまでに、CNP 遺伝子導入により血管再生の促進、ICAM-1、VCAM-1 発現抑制、マクロファージ浸潤減少、NO 産生亢進等の作用も報告されており、血管調節のみならず血管構築をも制御し、抗炎症作用を発揮し、血管障害における予防・治療に応用できる可能性が示唆されている。しかし残念ながら、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。我々は今回、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を明らかにし、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

高濃度ステロイド薬は血管内皮細胞のアポトーシス誘導による血管障害を介して ION 形成に関与するが、CNP は抗アポトーシス作用によりその血管内皮障害を制御できる可能性が示唆された。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) Sawamukai N, Saito K, Yamaoka K, Nakayamada S, Ra C, Tanaka Y. Leflunomide inhibits PDK1/Akt pathway and induces apoptosis of human mast cells. *J Immunol* (2007) 179: 6479-84
- 2) Nishida K, Okada Y, Nawata M, Saito K, Tanaka Y. Anti TNF- antibody increases serum adiponectin in humans. *Endocrine J* (in press)
- 3) Nakano K, Okada Y, Saito K, Tanikawa R, Sawamukai N, Sasaguri Y, Kohro T, Wada Y, Kodama T, Tanaka Y. Rheumatoid synovial endothelial cells produce macrophage-colony stimulating factor leading to osteoclastogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* (2007) 46: 597-603
- 4) Nakayamada S, Saito K, Nakano K, Tanaka Y. β 1 integrin transduces an activation signal in T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (2007) 56, 1559-1568
- 5) Tokunaga M, Saito K, Kawabata D, Imura Y, Fujii T, Nakayamada S, Tsujimura S, Nawata M, Iwata S, Azuma T, Mimori T, Tanaka Y. Efficacy of rituximab (anti-CD20) for refractory systemic lupus erythematosus involving the central nervous system. *Ann Rheum Dis* (2007) 66, 470-475
- 6) Yamaoka K, Saito K, Nakayamada S, Yamamoto M, Tanaka Y. Clinical images: Takayasu's arteritis.

Arthritis Rheum (2007) 56, 2466

- 7) Kishikawa H, Okada Y, Kawahara T, Saito K, Tanaka Y. A case of blue rubber bleb nevus syndrome treated by etidronate. *J Bone Miner Metab* (2007) 25: 138-141
- 8) Hirai F, Nakayamada S, Okada Y, Saito K, Kurose H, Mogami A, Tanaka Y. Small GTPase Rho signaling is involved in α 1 integrin-mediated up-regulation of intercellular adhesion molecule 1 and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand on osteoblasts and osteoclast maturation. *Biochem Biophys Res Commun* (2007) 356: 279-285
- 9) Nakano K, Saito K, Mine S, Matsushida S, Tanaka Y. CD44 signaling up-regulates Fas Ligand expression on T cells leading to activation-induced cell death. *Apoptosis* (2007) 12, 45-54
- 10) Mine S, Iida T, Tabata T, Okada Y, Tanaka Y. Increased esophageal mucosal/submucosal blood flow in patients with gastroesophageal reflux disease: Normalization by treatment with a proton pump inhibitor. *J Gastroenterol Hepatol* (2007) 23, 303-309
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) Takizawa Y, Inokuma S, Tanaka Y, Saito K, Atsumi T, Hirakata M, Kameda H, Hirohata S, Kondo H, Kumagai S, Tanaka Y. Clinical characteristics of cytomegalovirus infection in rheumatic diseases: multicentre survey in a large patient population. *Rheumatology* (2008) 47, 1373-1378
- 19) Okada Y, Nawata M, Nakayama 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)
- (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

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

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、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、菅野伸彦 (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き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 のデポメドロールを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4.4mm (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、各群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)。

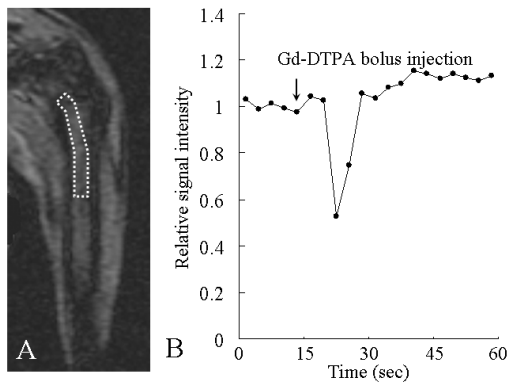
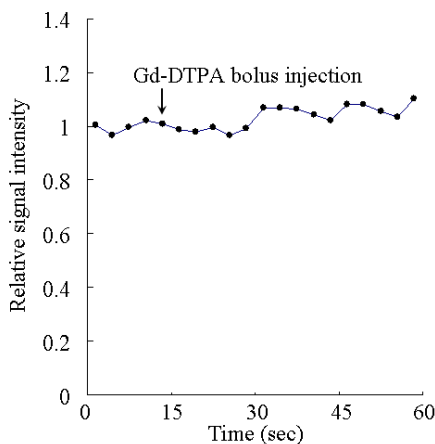


図1. A. ステロイド単独投与後3週の家兎大腿骨近位のT2*強調 dynamic MRI。破線領域内が血流評価のROIである。B. 造影剤急速投与後のROI内の信号強度の変化。頸部内側に骨髓壊死を認めたが、T2*強調 dynamic MRI 上造影効果を示す一過性の信号強度低下を認めた。

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学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も考えられるが、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。

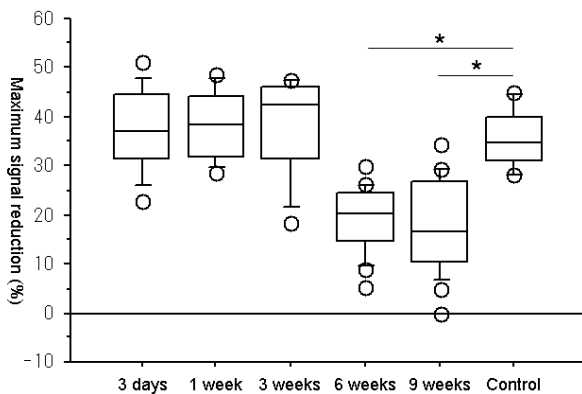


図3. 各群の最大信号低下率

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.

ステロイド性骨壊死家兎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)

我々はこれまで、血管内皮細胞の反応性および骨髓内微小血管の血管運動性に注目して研究を行ってきた。現在我々は、骨にシールドされた環境が骨髓と脳に特徴的であることに注目し、骨髓内血流の研究を進めている。しかし骨髓内血流を再現性よく定量的に評価することにはいまだ成功していない。そこで今回壊死発生の病態解析を行うにあたり、骨髓内循環を評価する指標として骨髓内圧に注目し検討を行った。

1. 研究目的

我々は以前よりステロイド性大腿骨頭壊死症の原因として、骨髓内微小循環に注目してきた。我々の考えている仮説を示す(図1)。一酸化窒素や super oxide に関連した血管内皮障害などの結果、血管の透過性が亢進し、髄内浮腫をきたし、間質圧が上昇。その結果、血管の collapse をきたし、更に間質圧が上昇する悪循環のサイクルが出現するというものである。しかしながら骨髓内血流を再現性よく定量的に評価することにはいまだ成功していない。そこで現在我々が注目しているのは、骨髓の解剖学的特徴である。硬い皮質骨に囲まれた環境は、骨髓および脳に特徴的な特殊な環境と考えられる。脳の局所循環においては Monro-Kellie の法則により脳内の総容積は一定に保たれている。例えば血管が拡張すれば血液容積が増すため、これに対抗して脳脊髄圧が上昇し血管を外側から圧迫し血管を収縮させている。つまりは頭蓋内の血管容積の増減、すなわち頭蓋内循環の変化と脳内圧は密接な関係があることが分かっている。我々は脳の局所循環と同様に、骨髓内循環も骨髓内圧と密接な関係があると考えた。つまり骨髓内圧を評価することで骨髓内微小循環の変化が評価できると考えた。そこで我々は家兎骨髓内圧の測定可能な実験系を確立し、骨髓内圧が動脈圧、静脈圧の変化に対しどういった反応をするのか、また骨髓内循環の変化はステロイド投与後どの時点で発生しているのか、さらに骨髓内循環の環境を変化させることで壊死発

生に変化が生じるかについて検討を行った。

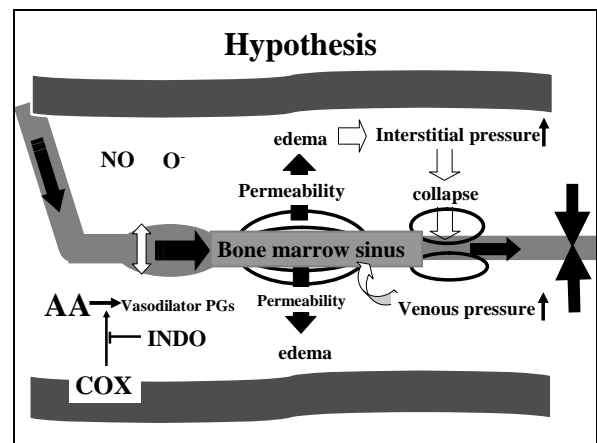


図1: 仮説

2. 研究方法

実験1: 日本白色家兎、オス、3.0kg を使用。麻酔は全身麻酔。右頸動脈、左大腿静脈、右大腿骨での圧を3チャンネルで同時計測できるポリグラフシステムを用い計測を行った。NE3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を耳静脈から投与し動脈圧を上昇させ、また腹部圧迫によって下大静脈を閉塞させることで下肢静脈圧を上昇させ、このときの家兎大腿骨骨髓圧の変化を調べた。

骨髓圧の計測方法だが、右大腿を外側切開し、筋間を分け、大腿骨外側骨皮質を露出。1.5mm エアードリルで開窓を行い、ここに 4Fr アンギオカテーテルを髄腔内に挿入し、周囲をポーンワックスでシールドしたのち、切開した筋膜を縫合。アンギオカテーテルをポリグラフシステムに接続し、骨髓圧を測定した。

カテーテル挿入による骨髄圧測定位置は大腿骨骨幹部中央部とした。この方法により再現性よく家兔大腿骨髄圧が測定できることを確認した(図2)。

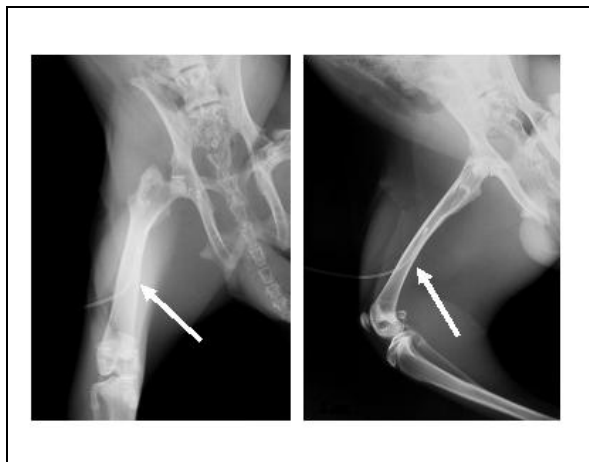


図2: アンジオカテーテル挿入後の家兔大腿骨 X線

実験2: 日本白色家兔、オス、3.0kg 前後を使用。ポリグラフシステムを用いて、動脈圧、静脈圧、骨髄圧を同時に計測した。コントロール群とメチルプレドニゾン 20mg/kg 投与群で比較を行った。メチルプレドニゾン投与群では、投与後24時間、48時間、72時間でそれぞれ計測を行った。

実験3: はじめに家兔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 エアードリルで骨髄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ジ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)。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。

はじめに家兔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 羽の家兔から 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¹⁾。

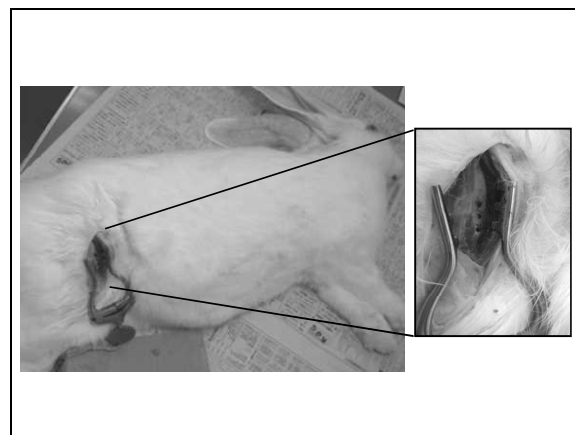


図3

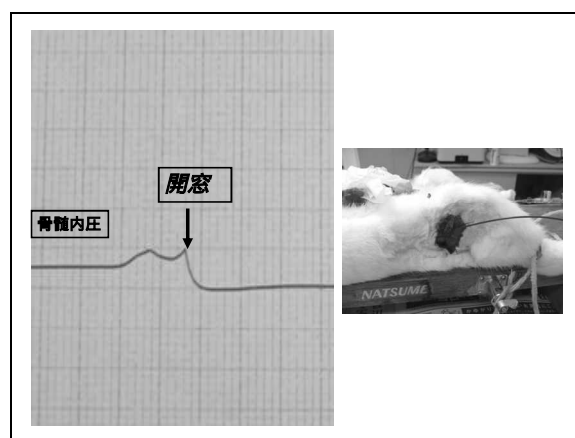


図4

3. 研究結果

実験1: 代表的な圧波形を示す。NE3 μ g/kg 投与を行うと、NE 投与と同時に動脈圧(収縮期圧)は 110 から 230mmHg まで上昇した。また静脈圧もこれに同期するように 5 ~ 10mmHg に軽度の上昇を観察した。また、骨髄圧は NE 投与直後に軽度上昇、その後 2 分ほどで 75mmHg までピークの上昇を認め、その後ゆっくりと戻っていった。すべての家兔で同様のパターンを観察した(図5)。

下大静脈圧迫では下肢静脈圧は 5 ~ 18mmHg に急峻な上昇を認め、これに伴い骨髄圧も 50 ~ 85mmHg 上昇を認めた。動脈圧は軽度の上昇を認めるのみであった。下大静脈の圧迫においても全ての家兔で同様のパターンを示した(図6)。

今回の結果では動脈、静脈圧を上昇させた際の骨髄内圧の反応が明らかに異なっていた。圧の上昇の程度で見ると、静脈圧の上昇の影響が強いと考えられた。