

図4 女性患者における福岡県と当施設の60歳を境とした患者割合

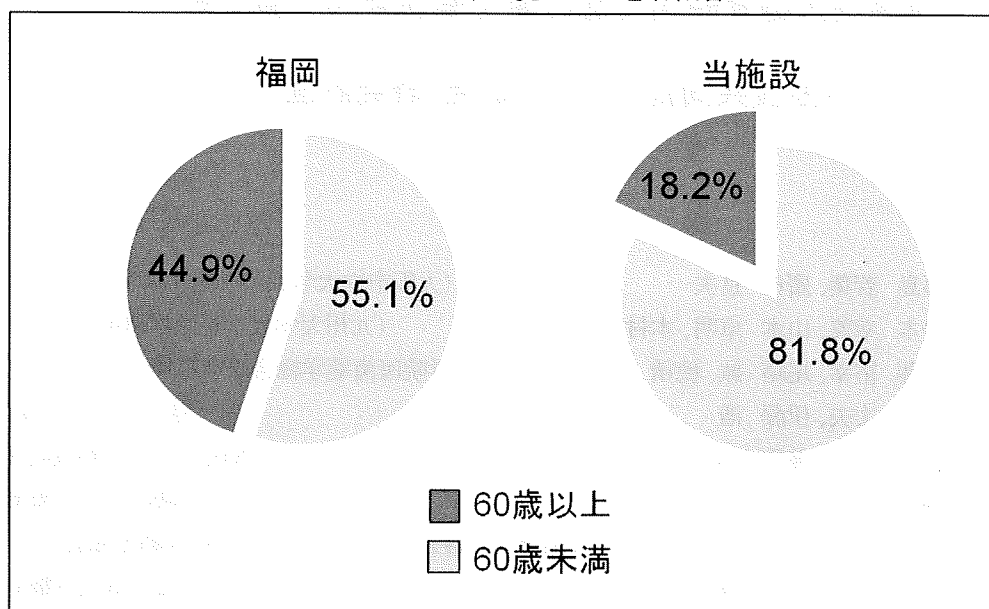


図5 本調査と他調査の比較

	福岡県	定点 モニタリング システム	全国 疫学調査
調査年	1999-2008	1997-2006	2004
調査単位	一県	多施設	全国
症例数	1,244	1,754	1,502
罹患率	2.49/100,000	-	1.74/100,000
男女比	61:39	63:37	59:41
男性ピーク年齢	40-50	30-40	40
女性ピーク年齢	50-70	20-50	30-50

特発性大腿骨頭壊死症の発生関連要因に関する

多施設共同症例・対照研究(研究計画)

福島 若葉、廣田 良夫	(大阪市立大学大学院医学研究科 公衆衛生学)
岩本 幸英、山本 卓明、本村 悟朗	(九州大学大学院医学研究院整形外科学)
進藤 裕幸、尾崎 誠、穂積 晃	(長崎大学大学院医歯薬学総合研究科構造病態整形外科学)
松野 丈夫、伊藤 浩	(旭川医科大学整形外科)
松本 忠美、兼氏 歩	(金沢医科大学運動機能病態学)
渥美 敬、中西 亮介	(昭和大学藤が丘病院整形外科)
久保 俊一、藤岡 幹浩	(京都府立医科大学大学院医学研究科運動器機能再生外科学)
中村 博亮、岩城 啓好	(大阪市立大学大学院医学研究科整形外科)
安永 裕司	(広島大学医歯薬学総合研究科人工関節・生体材料科学講座)
大園 健二、花之内 健仁	(関西労災病院整形外科)
長谷川 幸治	(名古屋大学大学院医学系研究科整形外科学)
菅野 伸彦、西井 孝、高尾 正樹	(大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学)
小林 千益	(諏訪赤十字病院整形外科)
田中 栄、伊藤 英也	(東京大学大学院医学系研究科整形外科学)
樋口 富士男、大川 孝浩	(久留米大学医学部附属医療センター整形外科)
小宮 節郎、有島 善也、石堂 康弘	(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科整形外科学)
山本 謙吾	(東京医科大学整形外科学)
帖佐 悦男	(宮崎大学医学部整形外科)
眞島 任史、高橋 大介	(北海道大学大学院医学研究科人工関節・再生医学)
須藤 啓広、新美 塁	(三重大学大学院医学系研究科整形外科学)
名越 智、岡崎 俊一郎	(札幌医科大学整形外科学)
高木 理彰、佐々木 幹	(山形大学医学部整形外科学)
稲葉 裕、小林 直美	(横浜市立大学医学部整形外科)
神野 哲也、古賀 大介	(東京医科歯科大学医学部付属病院整形外科)
西山 隆之	(神戸大学大学院医学系研究科整形外科学)
加来 信広	(大分大学医学部整形外科学)
加畑 多文	(金沢大学医学部医学系研究科機能再建学)
小平 博之	(信州大学医学部運動機能学)

わが国における特発性大腿骨頭壊死症(ION)の発生関連要因は、本研究班が過去3回にわたり実施してきた多施設共同症例・対照研究により系統的に解明されてきた。第1回目の研究では、ステロイド全身投与歴を有しないION患者を症例とし、飲酒および喫煙の即時効果と累積効果を明らかにした。第2回目は、SLE患者あるいは腎移植患者を対象としてステロイド投与量・投与方法の影響を詳細に検討し、1日平均投与量で最も鮮明な関連を認めることを示した。第3回目の研究では、誘因にかかわらず、総てのION患者を症例とすることで「ステロイド非投与に対する投与のリスク」を算出し、そのインパクトを明らかにした。一方、本研究班で運営している定点モニタリングシステム、あるいは2005年実施の全国疫学調査の集計結果によると、ステロイド全身投与

歴およびアルコール愛飲歴の両者を有しない症例が10%程度報告されている。しかし現状では、ステロイド・アルコール以外の要因の影響について、十分な論拠が蓄積されていない。

以上の背景を考慮し、研究班として実施する新たな多施設共同症例・対照研究を計画した。今回の主たる目的は、ステロイド・アルコール以外の要因も含めて幅広く調査することである。

本報告書では研究計画を提示する。なお、本計画は大阪市立大学大学院医学研究科倫理委員会で承認された。現在、本研究班班員が所属する27施設から参加の了承を得ている。今後、各施設で倫理審査申請を行い、次年度より対象者登録を開始する。

1. 研究目的

わが国における特発性大腿骨頭壊死症 (ION) の発生関連要因は、本研究班が過去3回にわたり実施してきた多施設共同症例・対照研究により、系統的に解明されてきた。第1回目の研究では、ステロイド全身投与歴を有しないION患者を症例とし、飲酒および喫煙の即時効果と累積効果を明らかにした^{1,2)}。第2回目は、SLE患者あるいは腎移植患者を対象としてステロイド投与量・投与法の影響を詳細に検討し、1日平均投与量で最も鮮明な関連を認めることを示した²⁻⁴⁾。第3回目の研究では、誘因にかかわらず、総てのION患者を症例とすることで「ステロイド非投与に対する投与のリスク」を算出し、そのインパクトを明らかにした⁵⁾。

一方、本研究班で運営している定点モニタリングシステム、あるいは2005年実施の全国疫学調査の集計結果によると、ステロイド全身投与歴およびアルコール愛飲歴の両者を有しない症例が10%程度報告されている^{6,7)}。しかし現状では、ステロイド・アルコール以外の要因の影響について、十分な論拠が蓄積されていない。

以上の背景を考慮し、研究班として実施する新たな多施設共同症例・対照研究を計画した。今回の主たる目的は、ステロイド・アルコール以外の要因も含めて幅広く調査することである。過去の研究と比較した特色は、以下の通りである。

1. 1施設あたり年間2セットの症例・対照を、前向きに継続して登録

従来の症例・対照研究における症例は、「過去〇〇年以内(あるいは〇〇年以降、現在まで)に診断されたION患者」のように、診断された期間を限って定義していた。

今回の症例・対照研究では、対象者の登録を前向きに継続するデザイン(prospective case-control study)を採用し、対象者数の拡大について柔軟性を持たせる。また、無理のない目標登録数の設定により、ION患者

が多い施設に負担が集中することを回避する。

2. 佐々木らの「自記式食事歴法質問票 (Self-administered diet history questionnaire, DHQ)」の使用

ION発生のメカニズムとしては、ステロイド投与に伴う酸化ストレスや脂質代謝異常の他、凝固能異常の関与が示唆されている。従って、抗酸化物質、脂質、ビタミンK等、食習慣の観点からも検証すべき仮説は多い。一方、過去3回にわたり実施してきた多施設共同症例・対照研究では、食習慣について詳細な検討が行われていない。また、過去の文献の系統的レビューの結果をみても、IONと食習慣の関連についての報告はない^{8,9)}。

今回、すでに妥当性が検証された佐々木らの質問票を使用することにより、食品・栄養素の両面から食習慣を調査し、発生メカニズム解明の一端に資する。

2. 研究方法

1. デザイン

多施設共同症例・対照研究

2. 参加施設

本研究班の班員が所属し、本研究への参加に同意した施設

3. 対象者

1) 症例設定

① 採用基準

- 参加施設の整形外科を初診した患者で、本研究班の診断基準により、初めてIONと確定診断された20~74歳の日本人。
- 他院で確定診断後に紹介受診した患者の場合は、確定診断が紹介受診前1ヵ月以内であるも

の。

② 除外基準

- ・ 二次性(症候性)大腿骨頭壊死症を有する者
- ・ アルコール性精神症状で入院歴がある者、認知症を有する者(質問票への回答内容の信頼性に影響するため)

2) 対照設定

① 対照の種類

病院対照のみとし、症例・対照比は 1:2 とする。

② 採用基準

- ・ 症例の初診日以降、同一施設を初診した日本人患者。
- ・ 各症例に対し、性、年齢(5 歳階級:20~24、25~29、…、70~74)が対応する患者 2 例。
- ・ 1 例は整形外科の患者、もう 1 例は他科(膠原病内科、総合診療科など)の患者から選出。

③ 除外基準

- ・ ION の既往がある者
- ・ 変形性股関節症を有する者(ION の進行例と鑑別困難な場合があるため)
- ・ 二次性(症候性)大腿骨頭壊死症を有する者
- ・ アルコール性精神症状で入院歴がある者、認知症を有する者(質問票への回答内容の信頼性に影響するため)

3) 症例・対照の登録期間および目標登録数

- ・ 参加施設における倫理審査承認後より登録を開始する。
- ・ 1 施設あたり年間 2 セット(2 症例・4 対照)を、前向きに継続して登録する。

4. 情報収集

1) 生活習慣・既往歴: 自記式質問票

系統的レビュー結果に基づき、過去に報告されている主要な関連要因を網羅

2) 食習慣: 佐々木らの「自記式食事歴法質問票(DHQ)」

3) 臨床情報

① 初診時の血液検査所見

通常の保険診療の範囲内で測定された、既存情報を利用

② ステロイド全身投与に関する情報

投与歴、対象疾患、投与期間、最高投与量、パルス有無、その後の ION 有無

③ ION 定点モニタリング新患調査票の記載内容(症

例のみ)

5. 統計解析

条件付き多重ロジスティック回帰モデルにより多因子の影響を補正し、ION に対する各要因の調整オッズ比を算出する。

(倫理面への配慮)

本研究計画は、調査事務局を置く大阪市立大学大学院医学研究科において倫理委員会の承認を得た(平成 21 年 11 月 26 日)。

3. 進捗状況等

本研究計画については、当初、血液試料を採取し、血清・血漿中の脂質代謝関連項目(アポリポ蛋白など)、抗カルジオリピン抗体、ATⅢなど、バイオマーカーを測定することも予定していた。しかし、①血液試料を採取する場合は対照を他科患者から登録することが困難になると予想されること、②血液試料採取の必要性および測定するバイオマーカー項目の明確化、③倫理面の確保、等について班員から意見が出された。より実行可能性の高い研究計画に向けて改訂を行った結果、血液試料は採取せず、質問票による情報収集のみ行うことで班員の合意を得た。

本研究計画が大阪市立大学大学院医学研究科の倫理委員会で承認された後、本研究班班員の所属施設を対象に参加を依頼した。平成 22 年 2 月 28 日現在、表 1 に示す 27 施設から参加の承諾を得ている。

今後、各施設で倫理審査申請を行い、次年度より対象者登録を開始する予定である。

表 1. 参加施設一覧(平成 22 年 2 月 28 日現在)

旭川医科大学	京都府立医科大学	東京大学
大分大学	久留米大学	長崎大学
大阪市立大学	神戸大学	名古屋大学
大阪大学	札幌医科大学	広島大学
鹿児島大学	昭和大学	北海道大学
金沢医科大学	信州大学	三重大学
金沢大学	諏訪赤十字病院	宮崎大学
関西労災病院	東京医科歯科大学	山形大学
九州大学	東京医科大学	横浜市立大学

4. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

5. 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

6. 参考文献

- 1) Hirota Y, Hirohata T, Fukuda K, et al.: Association of alcohol intake, cigarette smoking, and occupational status with the risk of idiopathic osteonecrosis of the femoral head. *Am J Epidemiol.* 137: 530-538, 1993.
- 2) Hirota Y, Hotokebuchi T, Sugioka Y: Idiopathic osteonecrosis of the femoral head; nationwide epidemiologic studies in Japan. *Osteonecrosis-Etiology, Diagnosis and Treatment*, ed. by Urbaniak JR and Jones JP Jr, American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont, Illinois, pp 51-58, 1997.
- 3) 廣田良夫, 竹下節子, 杉岡洋一, ほか: ステロイドの種々投与法と特発性大腿骨頭壊死症との関連—SLE患者における症例・対照研究. 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死症調査研究班平成7年度研究報告書, 17~22頁, 1996.
- 4) 廣田良夫, 佛淵孝夫, 竹下節子, ほか: ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生要因—腎移植患者における症例・対照研究. 厚生省特定疾患骨・関節系疾患調査研究班平成10年度研究報告書, 169~174頁, 1999.
- 5) Sakaguchi M, Tanaka T, Fukushima W, Kubo T, Hirota Y, for the Idiopathic ONF Multicenter Case-Control Study Group. Impact of oral corticosteroid use for idiopathic osteonecrosis of the femoral head: a nationwide multicenter case-control study in Japan. *J Orthop Sci* (in press).
- 6) Fukushima W, Fujioka M, Kubo T, Tamakoshi A, Nagai M, Hirota Y. Nationwide Epidemiologic Survey of Idiopathic Osteonecrosis of the Femoral Head. *Clin Orthop Relat Res* (in press)
- 7) 福島若葉, 廣田良夫, 藤岡幹浩, ほか: 定点モニタリングシステムによる特発性大腿骨頭壊死症の記述疫学—新患者についての10年間の集計—. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 特発性大腿骨頭壊死症の予防と治療の標準化を目的とした総合研究 平成20年度総括・分担研究報告書, 14~21頁, 2009.
- 8) 福島若葉, 阪口元伸, 廣田良夫. 特発性大腿骨頭壊死症の関連要因に関する系統的レビュー(中間報告). 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 特発性大腿骨頭壊死症の予防と治療の標準化を目的とした総合研究 平成19年度総括・分担研究報告書, 1~17頁, 2008.
- 9) 阪口元伸, 福島若葉, 廣田良夫. 特発性大腿骨頭壊死症の関連要因に関する系統的レビュー(続報). 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 特発性大腿骨頭壊死症の予防と治療の標準化を目的とした総合研究 平成20年度総括・分担研究報告書, 1~13頁, 2009.

特発性大腿骨頭壊死症定点モニタリングシステム

調査票書式の改訂

福島 若葉、廣田 良夫	(大阪市立大学大学院医学研究科 公衆衛生学)
岩本 幸英、山本 卓明、本村 悟朗	(九州大学大学院医学研究院整形外科学)
進藤 裕幸、尾崎 誠	(長崎大学大学院医歯薬学総合研究科構造病態整形外科学)
松野 丈夫	(旭川医科大学整形外科)
松本 忠美、兼氏 歩	(金沢医科大学運動機能病態学)
渥美 敬	(昭和大学藤が丘病院整形外科)
久保 俊一、藤岡 幹浩	(京都府立医科大学大学院医学研究科運動器機能再生外科学)
佛淵 孝夫、馬渡 正明	(佐賀大学医学部整形外科)
中村 博亮、岩城 啓好	(大阪市立大学大学院医学研究科整形外科)
安永 裕司	(広島大学医歯薬学総合研究科人工関節・生体材料学講座)
大園 健二	(関西労災病院整形外科)
長谷川 幸治	(名古屋大学大学院医学系研究科整形外科学)
菅野 伸彦、西井 孝	(大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学)
小林 千益	(諏訪赤十字病院整形外科)
田中 栄	(東京大学大学院医学系研究科整形外科学)
樋口 富士男	(久留米大学医学部附属医療センター整形外科)
小宮 節郎、有島 善也	(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科整形外科学)
山本 謙吾	(東京医科大学整形外科学)
帖佐 悦男	(宮崎大学医学部整形外科)
眞島 任史	(北海道大学大学院医学研究科人工関節・再生医学)
須藤 啓広	(三重大学大学院医学系研究科整形外科学)
名越 智	(札幌医科大学整形外科学)
高木 理彰	(山形大学医学部整形外科学)
稲葉 裕	(横浜市立大学医学部整形外科)
神野 哲也	(東京医科歯科大学医学部付属病院整形外科)
西山 隆之	(神戸大学大学院医学系研究科整形外科学)
加畑 多文	(金沢大学医学部医学系研究科機能再建学)
三木 秀宣	(国立病院機構大阪医療センター整形外科)
小平 博之	(信州大学医学部運動機能学)

本研究班では班員の所属施設を対象とした定点モニタリングシステムを1997年に開始し、本邦における特発性大腿骨頭壊死症(ION)の基本特性を明らかにしてきた。今回、モニタリングとしての意義をさらに高めるため、特に臨床情報項目について調査票書式を改訂した。

新患調査票については、確定診断時の画像所見に関する項目を現行のION診断基準に沿って改訂し、どのような所見の組み合わせで確定診断に至ったかを検討できる形式とした。また、ステロイド全身投与、アルコール愛飲については、期間・量の情報も収集することとした。手術調査票は、骨切り術あるいは骨移植術施行の

場合に術式の詳細を記載する形式としたことにより、特に骨切り術については本システムの情報だけで十分なモニタリングが可能と考えられる。

1. 研究目的

本研究班では班員の所属施設を対象とした定点モニタリングシステムを1997年に開始し¹⁾、本邦における特発性大腿骨頭壊死症(ION)の基本特性を明らかにしてきた。本システムの最大の長所は、過去5回にわたり実施されてきた全国調査²⁻⁷⁾のような多大な労力を要することなく、IONの臨床疫学特性を継続的に調査可能なところにある。本システムで使用している調査票の項目は、新たな病型・病期分類の導入などに伴う軽微な変更を数回行ったものの、基本的には1997年のシステム開始当時の書式を維持してきた。

今回、モニタリングとしての意義をさらに高めるため、特に臨床情報項目について書式を改訂したので報告する。

2. 研究方法

定点モニタリングシステムとは、IONの患者が集積すると考えられる特定大規模医療施設を定点として、新患および手術症例を報告し、登録するシステムである¹⁾。1997年6月に開始し、1997年1月以降の症例について報告を得ている。現在は本研究班員が所属する28施設の整形外科が参加し、新患および手術症例の情報をデータベースに蓄積している。

3. 結果

新患用調査票の新書式を資料1に示す。確定診断時の画像所見は、旧書式では「X線、骨シンチグラム、MRI、骨生検」の各項目について「正常、境界、異常、検査なし、判定不能、不明」のいずれかを選択する形式であった。しかし、実際は、本研究班が提唱した診断基準に基づき、主要所見5項目のうち2項目以上を満たす場合にIONと確定診断されている⁸⁾。そのため、新書式では、確定診断時に有した画像所見を列挙する形式とした。また、ステロイド全身投与歴「あり」の場合はステロイドの投与期間、最高投与量、パルス療法の有無を記載し、アルコール愛飲歴「あり」の場合はアルコールの種類、量、飲酒年数を記載することとした。

手術用調査票の新書式を資料2に示す。今回、骨切り術の場合は大腿骨頭前方回転骨切り術(ARO)、大腿骨頭後方回転骨切り術(PRO)などの詳細を、骨移植術

についても血管柄付き骨移植、遊離骨移植などの詳細を記載する形式とした。

4. 考察および結論

新患調査票については、確定診断時の画像所見項目の改訂により、実際の臨床現場で「どのような項目の組み合わせで確定診断に至ったか」を検討することができると考える。また、ステロイド投与とアルコール愛飲について期間、量などの情報も収集することにより、特定疾患治療研究事業の医療受給者証申請のために提出された臨床調査個人票の情報との比較が可能になる。

ION定点モニタリングシステムにより収集した情報は、全国疫学調査における報告新患症例の情報の約40%をカバーしていると考えられており、その効率の良さは過去の報告書に詳述の通りである⁹⁾。また、本システムはIONの患者が集積すると考えられる特定大規模医療施設を定点としているため、全国疫学調査結果と比較すると、報告手術症例における骨切り術施行の割合が高い⁹⁾。今回の手術用調査票の改訂により、特に骨切り術については本システムの情報だけで十分なモニタリングが可能になると考えられる。

5. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

5. 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

6. 参考文献

- 1) 廣田良夫, 竹下節子: 定点モニタリングによる特発性大腿骨頭壊死症の記述疫学研究. 厚生省特

- 定疾患骨・関節系疾患調査研究班平成10年度研究報告書, 175~177頁, 1999.
- 2) 二ノ宮節夫, 田川宏, 宮永豊, ほか: 特発性大腿骨頭壊死症に関する全国疫学調査最終結果報告. 厚生省特定疾患特発性非感染性骨壊死症調査研究班昭和52年度研究報告書, 19~25頁, 1978.
 - 3) 増田武志: 特発性大腿骨頭壊死症の疫学調査. 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死症調査研究班昭和58年度研究報告書, 63~65頁, 1984.
 - 4) 二ノ宮節夫, 小野啓郎: 特発性大腿骨頭壊死症に関する昭和62年疫学調査結果. 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死症調査研究班昭和63年度研究報告書, 269~271頁, 1989.
 - 5) 青木利恵, 大野良之, 玉腰暁子, ほか: 特発性大腿骨頭壊死症の全国疫学調査成績. 厚生省特定疾患難病の疫学調査研究班平成7年度研究業績集, 67~71頁, 1996.
 - 6) Hirota Y, Hotokebuchi T, Sugioka Y: Idiopathic osteonecrosis of the femoral head; nationwide epidemiologic studies in Japan. Osteonecrosis—Etiology, Diagnosis and Treatment, ed. by Urbaniak JR and Jones JP Jr, American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont, Illinois, pp 51–58, 1997.
 - 7) Fukushima W, Fujioka M, Kubo T, Tamakoshi A, Nagai M, Hirota Y. Nationwide Epidemiologic Survey of Idiopathic Osteonecrosis of the Femoral Head. Clin Orthop Relat Res (in press)
 - 8) Sugano N, Atsumi T, Ohzono K, Kubo T, Hotokebuchi T, Takaoka K. The 2001 revised criteria for diagnosis, classification, and staging of idiopathic osteonecrosis of the femoral head. J Orthop Sci. 2002;7:601-605.
 - 9) 福島若葉, 廣田良夫, 藤岡幹浩, ほか: 定点モニタリングシステムにより収集した特発性大腿骨頭壊死症の臨床疫学情報の特徴—全国疫学調査結果との比較—. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 特発性大腿骨頭壊死症の予防と治療の標準化を目的とした総合研究 平成18年度総括・分担研究報告書, 7~11頁, 2007.

特発性大腿骨頭壊死症(ION) 定点モニタリング(新患用)

施設名： _____

記入者氏名： _____

記入年月日： 平成 _____ 年 _____ 月 _____ 日

IDもしくはカルテ番号		性別	1. 男 2. 女
生年月	(1.明 2.大 3.昭 4.平) 年 月	推定発症年月	(1.昭 2.平) 年 月・不明・未発症
診断した医療機関	1. 貴施設 2. 他施設 3. 不明	確定診断年月	(1.昭 2.平) 年 月・不明
	右		左
IONの有無	1. なし(正常) 2. あり → (1. 今回、新たに確認 2. 過去に確認)	1. なし(正常) 2. あり → (1. 今回、新たに確認 2. 過去に確認)	
今回の確定診断時所見	1. X線所見(※): 骨頭圧潰または crescent sign(骨頭軟骨下骨折線)	1. X線所見(※): 骨頭圧潰または crescent sign(骨頭軟骨下骨折線)	
	2. X線所見(※): 骨頭内の帯状硬化像の形成	2. X線所見(※): 骨頭内の帯状硬化像の形成	
	3. 骨シンチグラム: 骨頭の cold in hot 像	3. 骨シンチグラム: 骨頭の cold in hot 像	
	4. MRI: 骨頭内帯状低信号域(T1 強調像)	4. MRI: 骨頭内帯状低信号域(T1 強調像)	
	5. 骨生検標本: 修復反応層を伴う骨壊死層像	5. 骨生検標本: 修復反応層を伴う骨壊死層像	
	(※)1.2. については、① 関節裂隙が狭小化していないこと、② 白蓋には異常所見がないこと、を要する		
病型分類(Type)	A・B・C-1・C-2・不明 判定不能(理由: _____)	A・B・C-1・C-2・不明 判定不能(理由: _____)	
病期分類(Stage)	1・2・3A・3B・4・不明 判定不能(理由: _____)	1・2・3A・3B・4・不明 判定不能(理由: _____)	
画像診断による大腿骨頭以外の骨壊死	1. あり [部位: ① 肩関節 ② 膝関節 ③ 足関節 ④ その他(_____)] 2. なし 3. 検査なし 4. 不明		
誘因	1. ステロイド全身投与歴あり 2. アルコール愛飲歴あり(種類: _____ 量: _____ 年数: _____)・不明 3. 両方あり 4. 両方なし		
ステロイド全身投与歴がある場合: その対象疾患(複数回答可)	1. SLE 2. RA 3. 多発性筋炎・皮膚筋炎 4. MCTD 5. シェーグレン症候群 6. その他の膠原病(_____) 7. ネフローゼ症候群 8. 腎炎 9. 腎移植 10. その他の臓器移植(_____) 11. 血小板減少性紫斑病 12. 再生不良性貧血 13. 肝炎 14. 喘息 15. 皮膚疾患 16. 眼疾患 17. 耳疾患 18. その他(_____) 19. 不明		
	疾患番号	: 上記より選択 (_____)	
	確定診断年	: (1.昭 2.平) _____ 年・不明	
	ステロイド	投与期間	: (_____)年(_____)か月・不明
		最高投与量	: (_____)mg/日・不明
		パルス投与	: なし・あり・不明

(送付先)〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町1-4-3 大阪市立大学大学院医学研究科公衆衛生学 廣田良夫
TEL : 06-6645-3756

新規 MR 転写共役因子 p120 の機能解析

加藤茂明^{1,2}、横田健一¹

(¹東京大学分子細胞生物学研究所、²(独)科学技術振興機構 (ERATO))

大腿骨頭壊死症の原因としてグルココルチコイドによる MR 活性化と血管内皮機能障害の関与が想定されている。その分子基盤を明らかにするため、我々は新たな MR 転写共役因子を探索し、その結果新規 MR 転写共役因子 p120 を同定した。p120 は MR とリガンド依存的に結合し、標的遺伝子のプロモータに動員され、ヒストン H3 のメチル化修飾を介して MR の転写活性を増強することで、病態生理に関与している可能性がある。

1. 研究目的

ステロイド長期投与群においては原因不明の無菌性大腿骨頭壊死という症状が生じることが知られており、ステロイドと大腿骨頭壊死との関連の解明は、この難病治療への突破口になる可能性が考えられる。血管内皮細胞においてグルココルチコイドは 11 β HSD2 による代謝を免れ、グルココルチコイド受容体 GR のみならずミネラルコルチコイド受容体 MR にも等親和性に結合し、血管内皮障害を惹起することで大腿骨頭壊死の病態生理に関与していると考えられるが、その分子メカニズムはほとんど明らかにされていない。そこで、MR の転写制御メカニズムを解明することにより大腿骨頭壊死の病態を明らかにする糸口を探すことを試みる。

2. 研究方法

生化学的手法を用いて、MR 結合因子の探索を行い、MALDI-TOF-MS を用いた候補蛋白の同定と機能解析を行う。

3. 研究結果

1) GST 融合 MR 蛋白質作成と核抽出液との反応

大腸菌に GST 融合 MR 蛋白質を合成させ、293F 細胞由来の核抽出液と反応させることで、MR 結合因子の探索をおこなった。

2) 結合因子の同定

上記の MR 結合候補因子を SDS-PAGE に展開し銀染色を行い、得られたバンドを切り出し MALDI-TOF-MS を用いて p120 を同定した。

3) 取得因子 p120 の機能解析

p120 は MR と結合すること、MR と細胞核内で共局在することが判明した。また p120 はリガンド依存的に MR 標的遺伝子プロモータに動員され、ヒストン H3 のメチル化修飾を介して MR 転写活性を増強することが判明した。

4. 考察

今回 MR の核における結合因子 p120 が MR の転写活性化を制御している可能性が示唆される結果を得た。今後は大腿骨頭における血管内皮における発現の確認をおこない、血管内皮障害を惹起するメカニズムを証明することで、MR の役割をより明らかにしたいと思っている。

5. 結論

MR の転写活性化を制御する MR 結合因子 p120 の同定に成功した。p120 はヒストン H3 のメチル化修飾を介して MR 転写活性を増強することで、大腿骨頭壊死の病態生理に関与している可能性がある。

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Imai Y, Kondoh S, Kouzmenko A, Kato S. Regulation of bone metabolism by nuclear receptors. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 310: 3-10.
- 2) Imai Y, Nakamura T, Matsumoto T, Takaoka K, Kato S. Molecular mechanisms underlying the effects of sex steroids on bone and mineral

metabolism. *J Bone Miner Metab* 2009; 27: 127-130.

- 3) Takada I, Kouzmenko AP, Kato S. Wnt and PPARgamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5: 442-447.
- 4) Takada I, Kouzmenko AP, Kato S. Molecular switching of osteoblastogenesis versus adipogenesis: implications for targeted therapies. *Expert Opin Ther Targets* 2009; 13: 593-603.
- 5) Iwasawa M, Miyazaki T, Nagase Y, Kato S, Nakamura K, Tanaka S, et al. The antiapoptotic protein Bcl-xL negatively regulates the bone-resorbing activity of osteoclasts in mice. *J Clin. Invest* 2009; 19: 3149-3159.
- 6) Shiizaki K, Hatamura I, Imazeki I, Kato S, Akizawa T, Kusano E, et al. Improvement of impaired calcium and skeletal homeostasis in vitamin D receptor knockout mice by a high dose of calcitriol and maxacalcitol. *Bone* 2009; 45: 964-971.

2. 学会発表

- 1) 横田健一、大竹史明、北川浩史、加藤茂明:ミネラルコルチコイド受容体(MR)による未知臓器障害メカニズムの解明、第82回日本内分泌学会学術総会、群馬、2009.4.23-25
- 2) Kenichi Yokota, Fumiaki Ohtake, Shigeaki Kato: Functional analysis of a novel MR co-activator P120、4th International Congress of Endocrinology (ICE 2010)、京都、2010.3.26-30

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

なし

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

血管内皮細胞障害を抑制する

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)

粟飯原賢一、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)

我々はこれまでに血管内皮細胞におけるグルココルチコイド(GC)受容体(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。一方、血管内皮細胞では GC の不活性化作用を有する 11β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 の発現が低いため、人における活性型内因性 GC であるコルチゾールや合成 GC であるメチルプレドニゾロンが GR のみならずミネラルコルチコイド受容体 (MR) に結合し、その作用を発揮する可能性がある。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、コルチゾールと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。さらにこれらの GC は superoxide 産生を亢進し、レドックス制御を受ける接着分子 VCAM-1 の発現を増加させるとともに、eNOS の発現と活性化を抑制したが、これらの作用は GR 阻害薬である RU486 ならびに MR 阻害薬であるスピロラクトンにより抑制された。血管内皮細胞での MR 阻害は血管内皮機能の改善を介して、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

我々はこれまでに選択的グルココルチコイド(GC)受容体(GR)合成リガンドであるデキサメザ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)の産生の低下を介して血管内皮機能障害を惹起し¹⁾、大腿骨頭壊死症を引き起こすことを提唱してきた²⁾。

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(ヒドロコルチゾン;HC)ならびにステロイドパルス療法において使用される合成 GC であるメチルプレドニゾロン(mPSL)は GR のみならず、ミネラルコルチコイド受容体(MR)への結合能を有する。上皮系細胞では 11β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 (11β -HSD2)がこれらの GC を不活性化することで MR 作用の発現を防いでいる³⁾。しかしながら、血管内皮細胞では 11β -HSD2 の発現がわずかであり、GC 過剰では血管内皮細胞の MR が活性化される可能性がある。

そこで本研究ではアルドステロン受容体拮抗薬に

よる MR 阻害が、グルココルチコイド誘発性血管内皮細胞障害を抑制するか否かについて検討した。

2. 研究方法

血管内皮細胞培養系はヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC, 三光純薬)を用い、培養液はプレットキット EGM-2 を HC 非添加で使用した。

1) GC による GR/MR 転写活性に及ぼす MR あるいは GR 阻害の影響

HUVEC 培養系に HC あるいは mPSL 10^{-7} M、 10^{-6} M、 10^{-5} M を添加し、GR/MR 応答配列による dual-luciferase reporter assay (SA Biosciences) を用いて 16 時間後に転写活性を測定した。HC あるいは mPSL 添加の 8 時間前にアルドステロン受容体拮抗薬であるスピロラクトン(Spi)あるいは GR 阻害薬である RU486 (Sigma)を 10^{-7} M、 10^{-6} M、 10^{-5} M で添加し、MR あるいは GR 阻害の影響をそれぞれ検討した。

2) GC による活性酸素産生に及ぼす MR あるいは GR 阻害の影響

HUVEC に HC あるいは mPSL 10^{-5} M を添加し、dihydroethidium(DHE)染色を用いて superoxide の産

生を評価した。さらに Spi あるいは RU486 10^{-5} M を添加しその影響を評価した。

3) GC による接着分子 VCAM-1 発現と eNOS 発現・活性化に及ぼす MR あるいは GR 阻害の影響

HUVEC に HC あるいは mPSL 10^{-7} M、 10^{-6} M、 10^{-5} M を添加し、ウェスタンブロッティングによりレドックス制御をうける接着分子 VCAM-1 の発現と eNOS 発現ならびに Ser1177 リン酸化を検討した。また、HC あるいは mPSL 添加の 8 時間前に Spi あるいは RU486 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) GC による GR/MR 転写活性に及ぼす MR あるいは GR 阻害の影響

HC および mPSL は濃度依存性に GR/MR 転写活性を亢進した。この作用は Spi あるいは RU486 により濃度依存性に抑制された(図 1)。

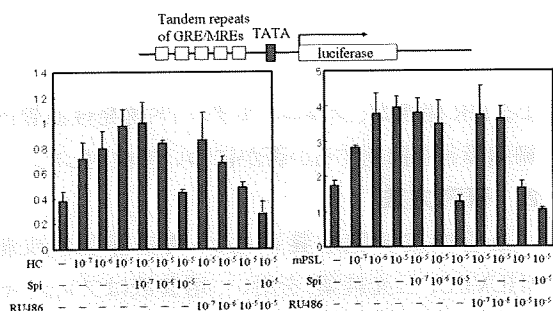


図1. グルコルチコイドによる転写活性亢進は MR および GR 阻害により抑制される

2) GC による活性酸素産生に及ぼす MR あるいは GR 阻害の影響

HC あるいは mPSL は superoxide 産生を増加させ、Spi あるいは RU486 はその作用を抑制した(図 2)。

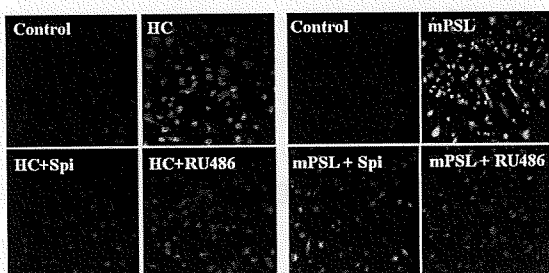


図2. グルコルチコイドによる活性酸素産生の増加は MR および GR の阻害により抑制される

3) GC による接着分子 VCAM-1 発現と eNOS 発現・活性化に及ぼす MR あるいは GR 阻害の影響

HC あるいは mPSL は濃度依存性に VCAM-1 の発現を亢進した。この作用は Spi あるいは RU486 により濃度依存性に抑制された(図 3、図 4)。

さらに HC あるいは mPSL は濃度依存性に eNOS の発現とリン酸化・活性化を抑制し、この作用は Spi あるいは RU486 により濃度依存性に抑制された(図 3、図 4)。

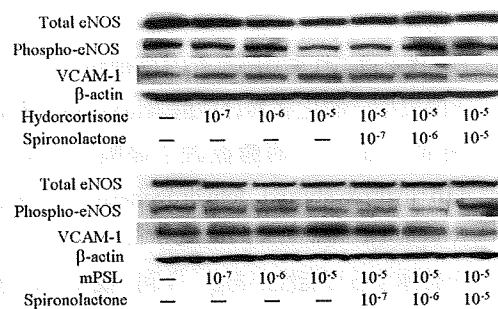


図3. グルコルチコイドによる eNOS の発現・活性化抑制と VCAM-1 発現亢進は MR 阻害により抑制される

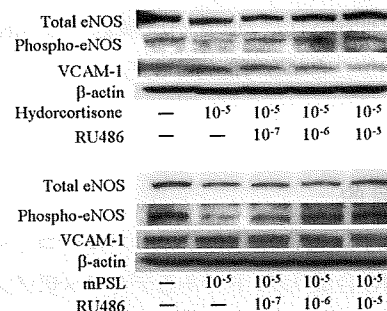


図4. グルコルチコイドによる eNOS 発現・活性化抑制と VCAM-1 発現亢進は GR 阻害により抑制される

4. 考察

近年、心血管病でのアルドステロン作用が注目されており⁴⁾⁶⁾、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、superoxide 産生を亢進し、レドックス制御をうける NF- κ B や AP-1 などの転写因子の活性化により VCAM-1 などの接着分子の発現を増加させ、さらに、NO 産生を減少させる作用も有し、このような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⁶⁾。

今回の我々の検討では、内因性ならびに合成 GC による GR/MR 転写活性は、GR 阻害のみならず、MR 阻害により有意に抑制された。さらにこれらの GC による血管内皮細胞での superoxide 産生増加が GR 阻害

と同様に MR 阻害により有意に抑制されたことから、GC による MR 活性化が酸化ストレス亢進に關与していると考えられる。さらに GC による濃度依存性の VCAM-1 の発現亢進ならびに eNOS 発現とリン酸化の抑制は、GR 阻害と同様に MR 阻害により濃度依存性に抑制された。これらの結果は、GC による血管内皮細胞での MR 活性化が酸化ストレス亢進や eNOS 発現・活性化の抑制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。臨床的には GR 阻害薬を使用することが困難である一方で、MR 阻害についてはエプレレノンなどの選択性の高い薬剤が臨床で使用可能となっており、このような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(図 5)。

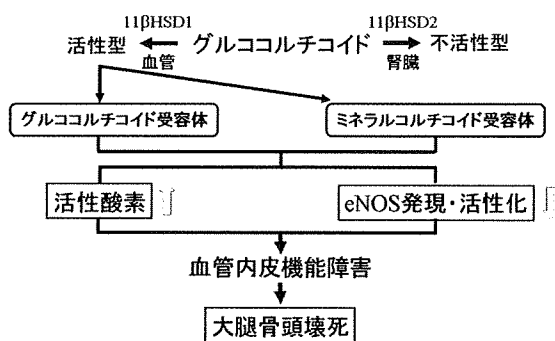


図5. グルココルチコイドはGRならびにMRを介して血管内皮機能を障害し、大腿骨頭壊死を惹起する

5. 結論

グルココルチコイド過剰は GR ならびに MR 活性化による酸化ストレス亢進と eNOS 発現および活性化抑制を介して血管内皮細胞障害を惹起する。血管内皮細胞における MR 作用の抑制は GC 誘発性血管内皮細胞障害を改善することから、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る。

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 赤池雅史, 松本俊夫. 大腿骨頭壊死症の最近の話題「ステロイド投与下におけるスタチンと血管内皮」. *整形・災害外科* 2009;52:957-963
- 2) Ikeda Y, Aihara KI, Yoshida S, Sato T, Yagi S, Iwase T, Sumitomo Y, Ise T, Ishikawa K, Azuma H, Akaike M, Kato S, Matsumoto T. Androgen-Androgen Receptor System Protects against Angiotensin II-Induced Vascular

Remodeling.

Endocrinology. 2009;150(6):2857-64

- 3) Aihara K, Azuma H, Akaike M, Kurobe H, Sumitomo Y, Yoshida S, Ise T, Iwase T, Ishikawa K, Sata M, Kitagawa T, Matsumoto T. Heparin Cofactor II Is an Independent Protective Factor Against Peripheral Arterial Disease in Elderly Subjects With Cardiovascular Risk Factors. *J Atheroscler Thromb*. 2009;16(2):127-34
 - 4) Aihara K, Azuma H, Akaike M, Sata M, Matsumoto T. Heparin cofactor II, a novel vascular remodeling factor: its clinical significance and molecular pathogenesis in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2009;16(5):523-31
 - 5) Kurobe H, Urata M, Ueno M, Ueki M, Ono S, Izawa-Ishizawa Y, Fukuhara Y, Lei Y, Ripen AM, Kanbara T, Aihara K, Ishizawa K, Akaike M, Gonzalez FJ, Tamaki T, Takahama Y, Yoshizumi M, Kitagawa T, Tomita S. Role of Hif-1 α in T cells as a negative regulator in development of vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(2):210-7
 - 6) Mihara M, Aihara K, Ikeda Y, Yoshida S, Kinouchi M, Kurahashi K, Fujinaka Y, Akaike M, Matsumoto T. Inhibition of Thrombin Action Ameliorates Insulin Resistance in Type 2 Diabetic *db/db* Mice. *Endocrinology*. 2010;151(2):513-9
- ### 2. 学会発表
- 1) 赤池雅史, 栗飯原賢一, 池田康将, 石川カズ江, 吉田守美子, 住友由佳, 八木秀介, 岩瀬 俊, 松本俊夫, 佐田政隆: グルココルチコイド誘発性血管内皮細胞障害におけるミネラルコルチコイド受容体の関与, 第 82 回日本内分泌学会学術総会. 前橋, 2009.4.23.
 - 2) 赤池雅史, 栗飯原賢一, 池田康将, 石川カズ江, 吉田守美子, 上田由佳, 八木秀介, 岩瀬 俊, 松本俊夫, 佐田政隆: ミネラルコルチコイド受容体を介したグルココルチコイド過剰による血管内皮細胞障害作用, 第 32 回日本高血圧学会総会. 大津, 2009.10.1.
 - 3) 栗飯原賢一, 藤中雄一, 木内美瑞穂, 吉田守美

- 子、鈴木麗子、倉橋清衛、遠藤逸朗、八木秀介、岩瀬俊、平田陽一郎、赤池雅史、佐田政隆、松本俊夫:内臓脂肪蓄積制御に関わる因子の臨床的検討、第 32 回日本高血圧学会総会。大津、2009.10.2.
- 4) 吉田守美子、栗飯原賢一、西尾 進、伊勢孝之、住友由佳、八木秀介、岩瀬 俊、山田博胤、赤池雅史、佐田政隆、松本俊夫:副腎アンドロゲン DHEAS の抗動脈硬化作用における性差の検討、32 回日本高血圧学会総会。大津、2009.10.2.
- 5) Sumitomo-Ueda Y, Aihara K, Ise T, Yoshida S, Yagi S, Iwase T, Akaike M, Sata M, Matsumoto T: Exacerbation of Angiotensin II-induced Cardiac Remodeling through Enhancement of NADPH oxidase-TGF- β 1 Pathway in Heparin Cofactor II-Deficient Mice, Scientific Sessions 2009, American Heart Association, Florida, 2009.11.16.

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) 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.

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

内橋和芳

(佐賀大学医学部 病因病態科学講座)

北島 将、河野俊介、重松正森、園畑素樹、馬渡正明、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 (ION) 発生の一因として、脂質代謝異常、脂肪細胞肥大による圧上昇、微小脂肪血栓などの関与が考えられている。今回の実験では、ヒト骨髄内脂肪組織をコラーゲングル 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、高濃度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、①年齢別の接着増殖率の違い、②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とし、③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¹。

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²。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グル 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 月までに当院で、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。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、コラーゲングルに包埋した。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。

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 (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前脂肪細胞 preadipocyte とし、デキサメサゾンおよびピタバスタチン投与による、前脂肪細胞の割合 (preadipocyte/ATDSC x 100%) の変化を検討した。

3. 研究結果

OA 群、ION 群ともに、①デキサメサゾン投与無しでは、脂肪組織片から脂肪滴を有しない ATDSC が新生した (図 2)。②デキサメサゾンの投与により、脂肪滴を有する前脂肪細胞が出現し、この脂肪滴は Oil red O 染色陽性であった (図 3)。③ ATDSC の数がピタバスタチンの濃度依存性に減少する傾向があり、高濃度 (10 μ M) の

ピタバスタチン投与により、ATDSC の新生が有意に減少した (図 4, 6)。④デキサメサゾン[®]の脂肪細胞分化誘導により出現した前脂肪細胞が、ピタバスタチンの投与により減少し、ATDSC 中に占める前脂肪細胞の割合が濃度依存性に低下する傾向を示した (図 5, 7)。

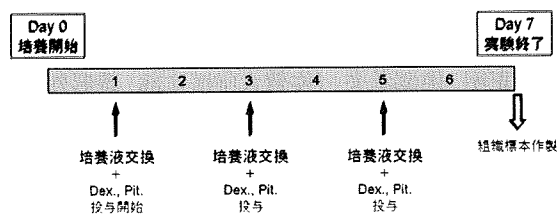


図 1 実験プロトコール

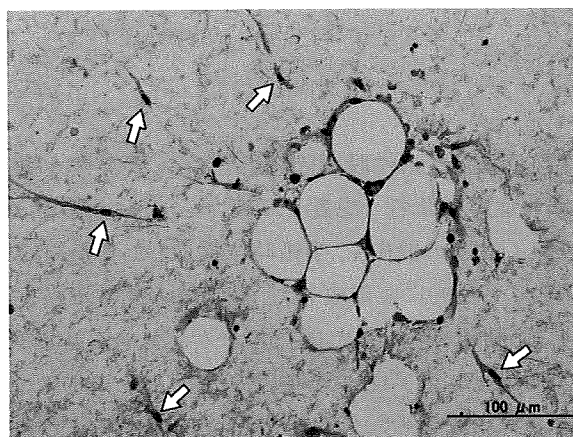


図 2 OA 症例1 Dex. (-)のHE染色標本
脂肪組織片の周囲に脂肪滴を有しない紡錘形細胞 (ATDSC: 矢印) が新生している

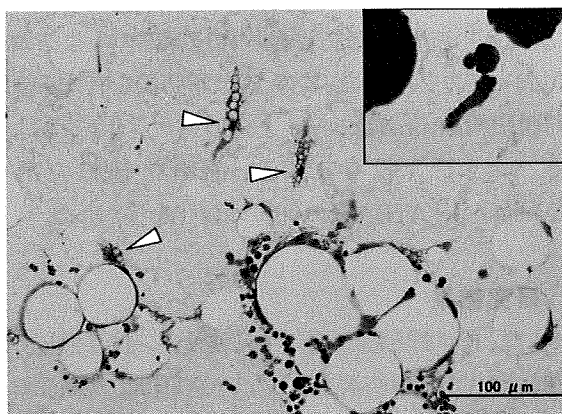


図 3 OA 症例 1 Dex 10 μ M 投与の H-E 染色標本 (挿入図は Oil red O 染色)
脂肪組織片の周囲に脂肪滴を有する前脂肪細胞 (矢頭) が新生している

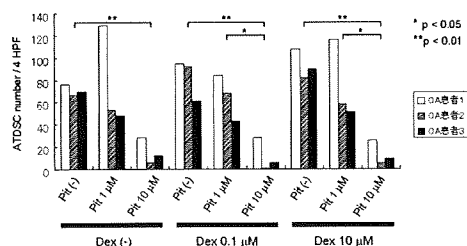


図 4 OA 症例における ATDSC の数

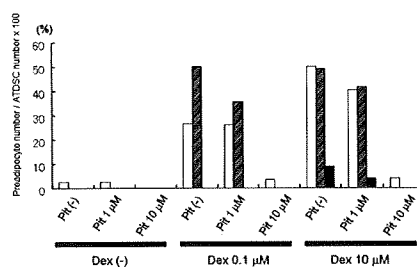


図 5 OA 症例における前脂肪細胞の割合

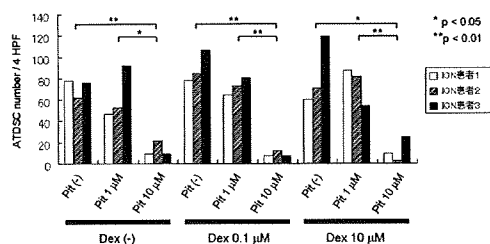


図 6 ION 症例における ATDSC の数

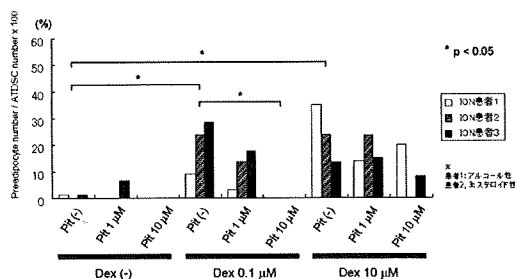


図 7 ION 症例における前脂肪細胞の割合

4. 考察

ヒト骨髄脂肪組織片を3次元培養すると、脂肪組織片周囲に紡錘形の ATDSC が出現し、これにステロイドを投与すると、ATDSC 中の前脂肪細胞の比率が増加した。

さらにピタバスタチンの投与により、ATDSC の数の減少および前脂肪細胞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。ただし、培養液中の 10 μ M は、血中濃度から換算すると極めて高濃度であり、ATDSC 自体の数も著減していることから骨髄脂肪組織の再生能の低下が危惧される。低濃度 (1 μ M) では効果が少なかったことから、通常投与量でのスタチンの脂肪細胞分化抑制を介した ION 予防効果は少ないと考えられる。今後、症例数を重ねるとともに、アディポサイトカインや酸化ストレスマーカーの発現など脂肪細胞の機能に着目した研究が必要と考える。

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、高濃度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あるが、至適濃度の検討、脂肪細胞の機能を含めた更なる研究が必要である。

6. 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

- 1) Kitajima M, Shigematsu M, Ogawa K, Sugihara H, Hotokebuchi T. Effects of glucocorticoid on adipocytes size in human bone marrow. *Med Mol Morphol* 40: 150-156, 2007
- 2) Inoue T, Node K. Statin therapy for vascular failure. *Cardiovas Drug Ther* 21: 281-295, 2007

間葉系幹細胞による骨芽細胞分化、破骨細胞分化抑制を介した

大腿骨頭壊死症の治療応用に関する研究

田中良哉、山岡邦宏、尾下浩一、岡田洋右、齋藤和義（産業医科大学 第一内科学）

特発性大腿骨頭壊死症(ION)は未だ原因、治療共に解明が進んでいない。一方、間葉系幹細胞を多く含む骨髄細胞の投与の ION に対する効果が動物モデルで報告される。本研究では、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を用いた骨芽細胞の分化誘導と治療応用を試みてきたが、平成 21 年度は間葉系幹細胞が破骨細胞の分化にも影響を及ぼす事を解明した。ヒト破骨細胞誘導系に間葉系幹細胞を添加すると破骨細胞の分化が抑制され、間葉系幹細胞が産生した osteoprotegerin が介在することが判明した。間葉系幹細胞は骨芽細胞への分化のみでなく破骨細胞分化抑制を有し、ION 治療への応用の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等の膠原病にしばしば併発する。ION の発症機序は未だ不詳であるが、循環障害に伴う骨組織の阻血性壊死が生じると考えられている。一方、治療としては手術による減圧や骨頭置換術に頼っているのが現状である。しかし、壊死に陥った骨頭に対しては、機能の改善は期待できず、「修復」を目指した治療ツールの開発が必須である。我々は、骨髄由来間葉系幹細胞の増幅系を整備し、臨床応用可能な培養系を確立し、骨頭の『修復』への応用を図るべく検討を開始した。平成 21 年度は、ヒト間葉系幹細胞からの骨芽細胞の誘導、及び、破骨細胞分化への影響について検討する事を目的とした

2. 研究方法

破骨細胞分化の評価には、健常人より末梢血単核球を採取し、破骨細胞分化誘導培地で 16 日間培養し、TRAP 染色陽性の多核細胞数(核 3 ヶ以上)を顕微鏡下で観察した。ヒト間葉系幹細胞と末梢血単核球は、細胞接着の要素を排除し可溶性因子の影響を検討する目的に、Transwell plate の下層に末梢血単核球、上層に間葉系幹細胞を撒き、共培養を行った。間葉系幹細胞は健常人骨髄より作成され、臨床試験に用いられているものを使用した(Osiris 社)。

3. 研究結果

ヒト間葉系幹細胞に骨芽細胞分化培地、IL-1 β を添加すると、培養 3 日目にアルカリフォスファターゼが陽性となり、11 日目でアザリンレッド陽性の石灰化が観察された。また、培養 7 日目において、RUNX2, RANKL, Wnt5a の mRNA の発現が亢進し、迅速で効率的な骨芽細胞分化が確認された。

次に、ヒト末梢血単核球を破骨細胞分化誘導培地で培養することにより 16 日目には 400~800 個の破骨細胞を認めた。しかし、破骨細胞分化は、Transwell を用いた間葉系幹細胞との共培養により著明に抑制され、抑制効果は間葉系幹細胞の細胞数依存的に増大した。また、間葉系幹細胞による破骨細胞分化誘導抑制に伴い Cathepsin K の発現も抑制された。

間葉系幹細胞による破骨細胞分化抑制作用は共培養のみならず、間葉系幹細胞の培養上清の添加によっても同様の現象が観察され、可溶性因子による分化抑制であることが明らかとなった。また、間葉系幹細胞が産生する可溶性因子探索の中で、RANKL のデコイ受容体として RANK-RANKL の相互作用を阻害する Osteoprotegerin (OPG) が多量に産生されていることが明らかとなった。また、共培養系への抗 OPG 抗体追加、または siRNA を用いた間葉系幹細胞における OPG 遺伝子発現抑制により破骨細胞分化抑制作用は低下し、破骨細胞数は減少した。