

4. 考察

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞は骨芽細胞や軟骨細胞に分化可能な多分化能を持つだけでなく、骨髄や脂肪組織に存在し、in vitro における自己複製能に優れていることから、入手が容易で倫理的問題を伴わず、今後の再生医療における重要なツールとして注目されている。今回、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞から骨芽細胞の増幅・誘導系を確立した。殊に、IL-1 β の添加により迅速、かつ、効率的な骨芽細胞への分化が誘導され、石灰化が引き起こされたと考えられる。今後、この性質を利用し、in vivo における骨化、石灰化の誘導、また骨細胞への分化の可能性を探る予定である。

一方、間葉系幹細胞から産生される OPG が RANKL 依存性の破骨細胞分化を阻害したことから、ION における骨壊死の進行を間葉系幹細胞が阻止できる可能性が示唆された。間葉系幹細胞による OPG 産生を介した破骨細胞分化抑制作用が初めて明らかとなり、壊死部における骨形成・再生に、有利な好条件を提供するとも考えられる。

最近、モデル動物や患者検体を用いた検討により、骨壊死局所の間葉系幹細胞の分化・増殖異常が関与しているとすると報告された。また、骨壊死局所への間葉系幹細胞移植のパイロットスタディでは、16 ヶ月後に壊死部における骨石灰化と臨床症状の改善が得られており、新しい治療選択肢として現実味を帯びてきている。間葉系幹細胞は血管新生因子を産生し、また、免疫抑制効果を有するとも報告され、その移植は、ION の進行抑制において骨頭部への血流改善と骨壊死修復の観点からは目的にかなった細胞療法と考えられる。今後、間葉系幹細胞から3次元骨再生系を確立して動物モデルへ応用し、壊死骨の再生の臨床開発を目指す予定である。

5. 結論

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞からの骨芽細胞の増幅・誘導系を確立した。さらに、間葉系幹細胞は、Osteoprotegerin の産生などを介した破骨細胞分化抑制によって骨壊死の進行を制御できる可能性が示され、新規治療法の可能性が示唆された。今後は、動物モデルへ応用し、壊死骨の再生の臨床開発を目指す。

6. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka Y, Takeuchi T, Mimori T, Saito K, Nawata

M, Kameda H, Nojima T, Miyasaka N, Koike T. Discontinuation of infliximab after attaining low disease activity in patients with rheumatoid arthritis, RRR (remission induction by remicade in RA) study. *Ann Rheum Dis* (in press)

2. Sawamukai N, Yukawa s, Saito K, Nakayamada S, Kambayashi T, Tanaka Y. Mast cell-derived tryptase inhibits apoptosis of human rheumatoid synovial fibroblasts via rho-mediated signaling. *Arthritis Rheum* (in press)

3. Suzuki K, Saito K, Tsujimura S, Nakayamada S, Yamaoka K, Sawamukai N, Iwata S, Nawata M, Tanaka Y. A calcineurin inhibitor, tacrolimus overcomes treatment-unresponsiveness mediated by P-glycoprotein on lymphocytes in refractory rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* (in press)

4. Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Tanaka Y. Etanercept overcomes P-glycoprotein-induced drug resistance in lymphocytes of patients with intractable rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* (in press)

5. Ikenouchi-Sugita A, Yoshimura R, Kishi T, Umene-Nakano W, Katsuki A, Saito K, Iwata H, Tanaka Y, Nakamura J. No association between BDNF^{Val66Met} polymorphism and emergence of psychiatric symptoms in systemic lupus erythematosus. *World J Biol Psychiatry* (in press)

6. Choo Q-Y, Ho PC, Tanaka Y, Lin H-S. Histone deacetylase inhibitors MS-275 and SAHA induced growth arrest and suppressed lipopolysaccharide-stimulated NF- κ B p65 nuclear accumulation in human rheumatoid arthritis synovial fibroblastic E11 cells. *Rheumatology* (in press)

7. Suzuki K, Nakawaga H, Kameda H, Amano K, Kondo T, Itoyama S, Tanaka Y, Takeuchi T. Severe acute thrombotic exacerbation in two cases with anti-phospholipid syndrome after retreatment with rituximab in phase I/II clinical trial for refractory systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* (2009) 48, 198-199

8. Komano Y, Harigai H, Koike R, Sugiyama H, Ogawa J, Saito K, Sekiguchi N, Inoo M, Onishi I, Ohashi H, Amamoto F, Miyata M, Ohtsubo H, Hiramatsu K, Iwamoto M, Minota S, Matsuoka N, Kageyama G,

- Imaizumi K, Tokuda H, Okochi Y, Kudo K, Tanaka Y, Takeuchi T, Miyasaka N. Pneumocystis pneumonia in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab: a retrospective review and case-control study of 21 patients. *Arthritis Care Research* (2009) 61, 305-312
9. Koike T, Harigai M, Inokuma S, Inoue, Ishiguro N, Ryu J, Takeuchi T, Tanaka Y, Yamanaka H, Fujii K, Freundlich B, Suzukawa M. Post-marketing surveillance of the safety and effectiveness of etanercept in Japan. *J Rheumatol* (2009) 36, 898-906
10. Iwata S, Saito K, Yamaoka K, Tsujimura S, Nawata M, Suzuki K, Hanami K, Tanaka Y. Effects of anti-TNF- α antibody infliximab in refractory entero-Beçet's disease. *Rheumatology* (2009) 48, 1012-1013
11. Nakano K, Higashi T, Takagi R, Hashimoto K, Tanaka Y, Matsushita S. Dopamine released by dendritic cells polarizes Th2 differentiation. *Int Immunol* (2009) 21, 645-654
- Nakayama S, Fujimoto T, Nonomura A, Saito K, Nakamura S, Tanaka Y. Usefulness of initial histological features for stratifying Sjogren's syndrome responders to mizoribine therapy. *Rheumatology* (2009) 48: 1279-82

2. 学会発表

1. Y. Tanaka, T. Takeuchi, T. Mimori, N. Miyasaka, T. Koike. Discontinuation of infliximab therapy is possible after acquiring remission in patients with rheumatoid arthritis (RA): first report on RRR (remission induction by remicade in RA) study. The Annual European Congress of Rheumatology 2009, Copenhagen 平成 21 年 6 月
2. Y. Tanaka, M. Suzuki, H. Nakamura, S. Toyozumi, S. H. Zwillich. The oral Jak inhibitor CP-690,550 in combination with methotrexate is efficacious, safe and well tolerated in Japanese patients with active rheumatoid arthritis with an inadequate response to MTX alone. The Annual European Congress of Rheumatology 2009, Copenhagen 平成 21 年 6 月
3. Tanaka Y. Rheumatoid arthritis in the context of bone disease: a recent paradigm shift of the disease

control. The 6th International Bone Biology Forum, Susono 平成 21 年 8 月

4. Y. Tanaka, T. Takeuchi, T. Mimori, N. Miyasaka, T. Koike. Can infliximab discontinue after attaining remission in patients with RA?: An interim report on RRR (remission induction by remicade in RA) study. The 4th Asian Congress on Autoimmunity, Singapore 平成 21 年 9 月

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

特発性大腿骨頭壊死症における

microRNA の発現

山崎啓一郎(広島大学大学院整形外科)

安永裕司(広島大学大学院人工関節・生体材料学)

低酸素状態は組織に対する主要なストレスのうちの一つであり、心疾患、不整脈、糖尿病、壊死といった病態において重要事項である。大腿骨頭壊死症(ION)においてもその病態に低酸素状態が深く関係することが予想される。また non-coding RNA の一つである microRNA がさまざまな疾患の病態に関わっている事がわかってきており、本研究では血管新生に関係すると言われている microRNA-210(miR-210)に着目し、ION 患者10例(ON 群)を対象に変形性股関節症患者10例(OA 群)と比較検討を行った。Mature および primary miR-210 では ON 群の方が OA 群より優位に発現していた。Matrix metalloproteinase (MMP)-2, -7, Vascular endothelial growth factor(VEGF)では ON 群の方が OA 群より優位に発現していたが、hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α では両群間に有意差は認められなかった。ION において miR-210 の発現が認められ、骨壊死の病態になんらかの関係があることが示唆された。

1. 研究目的

低酸素状態は組織に対する主要なストレスのうちの一つであり、心疾患、不整脈、糖尿病、壊死といった病態において重要事項である。大腿骨頭壊死症(ION)においてもその病態に低酸素状態が深く関係することが予想される。RNA は遺伝情報を DNA からタンパク質に伝令する機能がその主体であると唱えるセントラルドグマが常識であり、遺伝子の半分以上を占める non-coding RNA はジャンク、ガラクタとされてきた¹⁻³⁾。しかしながらこの non-coding RNA の一つである microRNA がさまざまな疾患の病態に関わっている事がわかってきた⁴⁻⁶⁾。本研究の目的は血管新生に関係すると言われている microRNA-210(miR-210)に着目し、ION におけるその発現を検討することである。

2. 研究方法

(表 1)。

subject	age	sex	Aetiology of ON	medical illness
ON1	56	male	steroid induced	OVI, PE, HL, toxicodermatitis
ON2	32	male	steroid induced	Liver dysfunction
ON3	54	female	steroid induced	SLE
ON4	55	female	steroid induced	renal transplantation
ON5	45	male	alcohol associated	none
ON6	46	male	alcohol associated	none
ON7	42	female	Idiopathic	SLE, RA
ON8	52	male	alcohol associated	stasis ulcer, varix of lower leg
ON9	69	female	Idiopathic	brain infarction
ON10	45	male	alcohol associated	none
OA1	71	male		CRBBB, anemia
OA2	63	female		none
OA3	74	male		OVI
OA4	73	female		HT, HL, RD
OA5	73	female		HT, HL
OA6	63	female		DM, HL
OA7	83	female		HT
OA8	71	Female		cerebral infarction
OA9	76	female		HT
OA10	66	female		none

CRBBB: Complete right bundle branch block, HL: hypertension, HT: hyperlipemia, RD: renal dysfunction, OVI: obstructive ventilatory impairment, DM: diabetes mellitus, PE: pulmonary embolism, SLE: systemic lupus erythematosus, RA: rheumatoid arthritis

表 1: 臨床的背景

ION に対して施行された手術の際、切除された骨頭より壊死骨を含む骨組織を en bloc に採取し、これより RNA を精製し、real-time PCR を用いて mature および primary miR-210、低酸素状態の際に発現がみられる Matrix metalloproteinase (MMP) -2, -7, VEGF (vascular endothelial growth factor)、hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α の発現を確認し、変形性股関節症(OA)に対して施行された手術の際、切除された骨頭より RNA を精製し、同様にして mature および primary miR-210、MMP-2,-7, VEGF、HIF-1 α の発現を確認し両群

間で比較検討した。ION 連続切片で、ヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)、*in situ* hybridization (ISH)、osteocalcin, von Willebrand factor(vWF)および VEGF の免疫染色(IHC)を行い、組織学的評価を行った。

(統計解析)

統計学的有意差の検討には Mann Whitney U test を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究を開始するにあたり、広島大学における臨床研究倫理審査委員会の承認を得た。

3. 研究結果

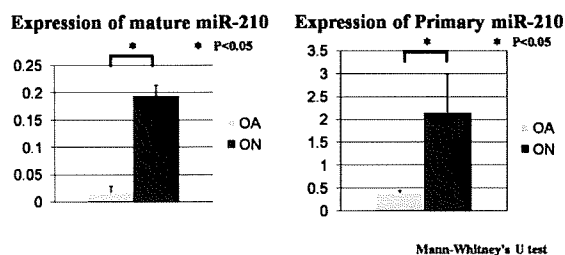


図1 Mature および primary miR-210 では ON 群の方が OA 群より優位に発現していた。

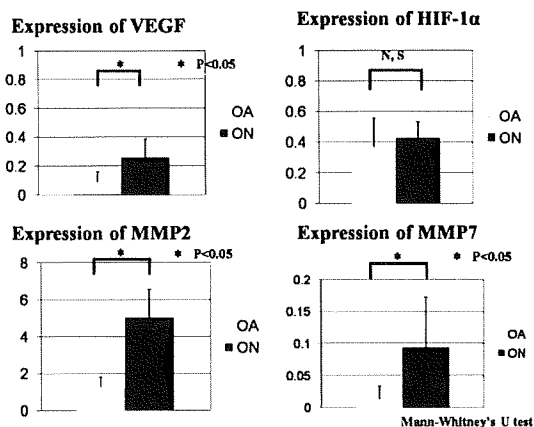


図2 VEGF、MMP2 および MMP7 では ON 群の方が OA 群より優位に発現していた。HIF-1α では両群間に有意差は認められなかった。

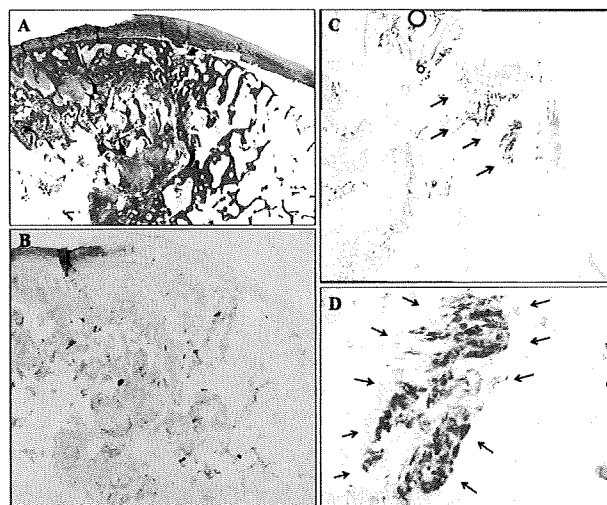


図3A-D 壊死組織周囲に mature miR-210 発現細胞を有意に発現していた(図 3A:HE 染色, 図 3B-D:ISH)。黒矢印は mature miR-210 発現細胞。

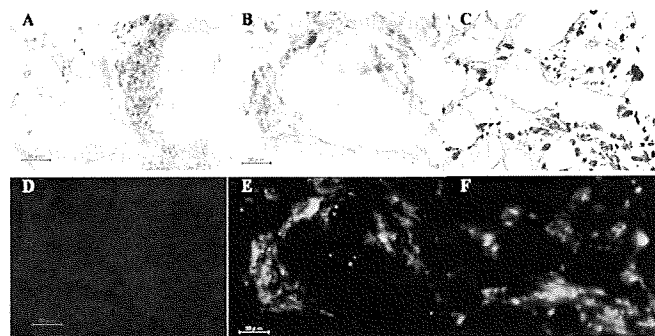


図4 免疫染色にてこれらの細胞は osteocalcin の発現はなく、VEGF および vWF を発現しており、骨芽細胞や骨細胞ではなく血管内皮細胞などの血管形成に関与する細胞であることが示された。

4. 考察

低酸素状態は組織に対する主要なストレスのうちの一つであり、心疾患、不整脈、糖尿病、壊死といった病態において重要事項である。またマクロファージはそのような低酸素状態または虚血状態におかれた組織で増加し、いくつかの転写因子を過剰発現させてそれに応答している。Kulshreshthaらは低酸素状態で miR-210 が誘導されることを報告している⁷⁾。Fasanaro らは、miR-210 が心血管形成と血管リモデリングにおける極めて重要な役割を担っているとされている Ephrin-A3(EFNA3)を直接標的とし、この発現を抑制することを報告した⁸⁾。また彼らは miR-210 による EFNA3 の発現抑制は虚血への血管応答に関与するという考えを示している。したがって、ION においても、この miRNA-210 の発現がみられ、骨壊死にかかわっている可能性があり、今回我々は ION 患者における miRNA-210 の発現を解析し検討した。

ON 群では OA 群に比較し、有意に miRNA-210 が発現しており、miR-210 発現細胞は VEGF および vWF を発現しており、骨芽細胞や骨細胞ではなく血管内皮細胞などの血管形成に関与する細胞であることが示唆され、miR-210 は ION の病態に関与していると考えられる。

5. 結論

ION 患者10例および OA 患者10例を対象に、miRNA-210 の発現の検討を行った結果、ON 群では OA 群に比較し、有意に miRNA-210 が発現しており、miR-210 は ION の病態に関与していることが示唆された。

6. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

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. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004;431:350-5.
2. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-97.
3. Farh KK, Grimson A, Jan C, Lewis BP, Johnson WK, Lim LP, et al. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* 2005;310:1817-21.
4. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005 Jun 9; 435(7043):834-8.
5. Marcucci G, et al. MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Engl J Med*. 2008 May 1; 358(18):1919-28.
6. Pfeffer S, et al. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*. 2004 Apr 30; 304(5671):734-6.
7. Kulshreshtha R, et al. A microRNA signature of hypoxia.

Mol Cell Biol. 2007 Mar;27(5):1859-67.

8. Fasanaro P, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J Biol Chem*. 2008 Jun 6;283(23):15878-83.

大腿骨頸部内側骨折における虚血後修復反応の組織学的検討

坂井孝司、中村宣雄、岩名大樹、北田誠、西井 孝、高尾正樹、吉川秀樹、菅野伸彦

(大阪大学大学院医学系研究科 整形外科)

大腿骨頭における虚血後修復反応を調査するため、大腿骨頸部骨折の大腿骨頭 36 関節を調査した。TRAP 陽性細胞は 9 関節 (25%) で retinaculum、円靭帯周囲、骨折部近傍に見られた。HIF-1 α は 13 関節 (36%) に発現し、proangiogenic factor である VEGF は 30 関節 (83%)、FGF-2 は 25 関節 (69%) に発現し、いずれも骨折部近傍に存在した。TRAP 陽性細胞や HIF-1 α の発現は Garden stage3 例で多く、骨折型による血流障害の影響が示唆された。

1. 研究目的

障害された骨における修復過程では osteogenesis と angiogenesis が密接に関わっている。我々は特発性大腿骨頭壊死症における修復反応として、TRAP 陽性細胞、HIF-1 α 、VEGF、FGF-2 陽性細胞が、境界域に多く発現し、X線学的病期と関連があることを報告した¹⁾。但し特発性大腿骨頭壊死症の修復反応をヒト組織で検討する際、人工股関節置換術時に大腿骨頭を採取するため、stage 進行例が多く壊死発生後長期経過しており、早期の修復反応を捉えられない。また動物モデルでは、ヒトの骨壊死との異動が常に問題となる。そこで今回虚血後の修復反応を大腿骨頸部内側骨折症例を対象として検討した。

2. 研究方法

対象は35例36関節(男性6例、女性29例)で、平均78歳(58-94歳)、受傷後手術までの期間は平均8日(1-23日)であった。Garden stage3 が9関節、stage4 が27関節で、2例で bisphosphonate を使用していた。

手術時に摘出した大腿骨頭組織について、ホルマリン固定し冠状断にてスラブを作成し、EDTA による脱灰後、HE 染色、TRAP 染色を施行した。さらに抗 HIF-1 α 抗体(monoclonal rabbit IgG)、抗 VEGF 抗体(monoclonal rabbit IgG)、抗 FGF-2 抗体(polyclonal rabbit IgG)による免疫染色を施行し、TRAP 陽性細胞、HIF-1 α 、VEGF、FGF-2 各々の発現について円靭帯近傍、retinaculum 近傍、骨折部近傍の各領域における分布状況と分布密度を調査した。なお転移性

臼蓋骨腫瘍で広範切除を施行した切除骨頭をコントロールとした。分布密度に関しては、陽性細胞数を40倍の視野で計測し、grade0、grade1、grade2、grade3の4段階で評価した。さらに組織学的所見とGarden stage、受傷から手術までの期間との関連を調査した。

3. 研究結果

TRAP 陽性細胞は9関節(25%)で陽性であった。円靭帯近傍(grade1: 6関節、grade2: 1関節)、retinaculum 近傍(grade1: 2関節、grade2: 1関節)、骨折部近傍(grade1: 2関節、grade2: 2関節)で見られた。コントロールでも円靭帯近傍(grade1)およびretinaculum 近傍(grade1)に陽性細胞を認めた。

HIF-1 α は13関節(36%)で骨折部近傍の血管内皮細胞で陽性であった。grade1 が10関節、grade2 が2関節、grade3 が1関節で、コントロールは陰性であった。VEGF は30関節(83%)で骨折部近傍の浮腫様組織で陽性であった。全例 grade1 で、コントロールは陰性であった。FGF-2 は25関節(69%)で骨折部近傍の骨髄細胞で広く陽性であった(grade1: 15関節、grade2: 5関節、grade3: 2関節)。また円靭帯近傍(grade1: 1関節、grade2: 3関節)、retinaculum 近傍(grade1: 1関節、grade2: 2関節)でも発現が見られた。

Garden stage3 例/4例と組織所見の比較(表1)では、HIF-1 α 発現は stage3 例で有意に多かった。TRAP 陽性細胞、VEGF と FGF-2 発現については stage3 例と4例で差を認めなかった。

受傷後手術までの日数が3日以内の例・3日を越える例と組織所見の比較(表2)では、HIF-1 α で受傷後3日以内で陽性例が多い傾向があり、TRAP陽性細胞、VEGFとFGF-2発現については差を認めなかった。

表1 Garden stage 3例とstage 4例の比較

		grade0	grade1	grade2	grade3	p value
TRAP	stage 3	6	2	1	0	N.S.
	stage 4	21	4	2	0	
HIF-1 α	stage 3	3	4	1	1	0.046
	stage 4	20	6	1	0	
VEGF	stage 3	3	6	0	0	N.S.
	stage 4	5	24	0	0	
FGF-2	stage 3	3	4	2	0	N.S.
	stage 4	8	12	5	2	

(Chi-square test)

表2 受傷後日数 \leq 3日例と $>$ 3日例の比較

		grade0	grade1	grade2	grade3	p value
TRAP	\leq 3日	4	2	1	0	N.S.
	$>$ 3日	23	4	2	0	
HIF-1 α	\leq 3日	2	3	1	1	0.05
	$>$ 3日	21	7	1	0	
VEGF	\leq 3日	2	5	0	0	N.S.
	$>$ 3日	4	25	0	0	
FGF-2	\leq 3日	0	5	2	0	N.S.
	$>$ 3日	11	11	5	2	

(Chi-square test)

4. 考察

TRAP陽性細胞は、大腿骨頸部骨折例ではcontrolと同様に円靭帯、retinaculum近傍に存在し、また骨折部近傍にも存在していた。円靭帯やretinaculumの血流によりrecruitされているTRAP陽性細胞が、骨折受傷後は血流途絶により減少すると考えられた。またGarden stage3例ではstage4例と比べて陽性例が多く、骨折の重症度により血流障害の程度が異なり、Garden stageによって差が見られたと考えられた。

HIF-1 α は組織の阻血状態の結果生じる細胞内低酸素状態において誘導される特異的転写因子である²⁾。大腿骨頭壊死症の抗HIF-1 α 抗体による免疫染色では、修復層においてFlk-1陽性の内皮細胞由来の細胞で陽性となる²⁾。今回の検討でも骨折部近傍の血管内皮細胞に発現し、Garden stage3例、受傷後3日以内で多く見られ、骨折型による血流障害、受傷後からの期間との関連から、受傷後早期に多く

発現している可能性が示唆された。

VEGFはproangiogenic growth factorで、骨細胞を刺激し骨の修復を促進する³⁾。低酸素下ではHIF-1 α 、HIF-2 α が核へ移行して作用し、VEGF-Aの転写を誘導する。またFGF-2は虚血下でVEGFと同等に血管新生を誘導する³⁾。VEGFは骨折部近傍の浮腫様組織に、FGF-2は骨髄細胞に広く発現し、特発性大腿骨頭壊死症でのreparative interfaceと同様の所見であった¹⁾。Garden stageや受傷後からの期間とは関連が見られなかったが、systemicには長管骨の骨折後2週でVEGF・FGF2の血中濃度が増加するとの報告もあり^{4),5)}、局所所見との差異がみられた。

5. 結論

大腿骨頸部内側骨折の大腿骨頭では、TRAP陽性細胞は円靭帯、retinaculumや骨折部近傍に存在した。HIF-1 α 、VEGF、FGF-2はいずれも骨折部近傍に発現し、HIF-1 α は血管内皮に、VEGFは浮腫領域に、FGF-2は骨髄細胞に広く見られた。TRAP陽性細胞やHIF-1 α の発現はGarden stage3例で多く、骨折型による血流障害の影響が示唆された。

6. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

1. 坂井孝司 中村宣雄 岩名大樹 北田誠 西井孝 高尾正樹 吉川秀樹 菅野伸彦 大腿骨頸部内側骨折における修復反応の組織学的検討第24回日本整形外科学会基礎学術集会、横浜 2009.11.6

2. Sakai T Nakamura N Iwana D Kitada M Nishii T Takao M Yoshikawa H Sugano N Reparative reaction in human femoral neck fracture. ARCO 2009.横浜 2009.11.19

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) Li W, Sakai T, Nishii T, Nakamura N, Takao M, Yoshikawa H, Sugano N. Distribution of TRAP Positive Cells and Expression of HIF-1 α , VEGF, and FGF-2 in the Reparative Reaction in Patients with Osteonecrosis of the Femoral Head. *J Orthop Res* 27:694-700,2009
- 2) Okada Y, Tanikawa T, Iida T, Tanaka Y. Vascular injury by glucocorticoid; involvement of apoptosis of endothelial cells. *Clin Calcium* 17:872-877, 2007.
- 3) Carano RAD, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discovery Today* 8:980-989, 2003.
- 4) Sarahrudi K, Thomas A, Braunsteiner T, Wolf H, Vecsei V, Aharinejad S. VEGF serum concentrations in patients with long bone fractures: a comparison between impaired and normal fracture healing. *J Orthop Res* 27:1293-1297, 2009.
- 5) Weiss S, Zimmermann G, Pufe T, Varoga D, Henle P. The systemic angiogenic response during bone healing. *Arch Orthop Trauma Surg* 129: 989-997, 2009.

特発性大腿骨頭壊死症における修復反応に対する組織学的検討

坂井孝司、西井 孝、中村宣雄、高尾正樹、吉川秀樹、菅野伸彦

(大阪大学大学院医学系研究科 整形外科)

特発性大腿骨頭壊死症例 51 関節を対象に、修復過程を明らかにするため、TRAP 陽性細胞の発現様式と、HIF-1 α と proangiogenic growth factor である VEGF、FGF-2 の発現様式を免疫染色にて調査し、これまでにえられた所見と、X 線学的病期、病型、ステロイド使用の関係について検討した。TRAP 陽性細胞は、病早期では円靭帯や retinaculum 付着部周囲に見られ、病期の進行に伴い修復域全体にわたり新生骨梁周囲に見られるようになり、発現密度と病期には相関がみられた。HIF-1 α 、VEGF、FGF-2 のいずれも境界域に存在し、HIF-1 α は主に血管内皮細胞や骨細胞で発現が見られ、VEGF は浮腫領域に、FGF-2 は修復域から正常域にかけて広く見られた。HIF-1 α の発現と病期には相関がみられ、FGF-2 の発現は手術時ステロイド使用例で有意に減少していた。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症(ONFH)の修復過程を明らかにするため、大腿骨頭組織における TRAP 陽性細胞の発現様式と HIF-1 α と proangiogenic growth factor である VEGF、FGF-2 の発現様式を調査し、これまでにえられた組織学的所見と X 線学的病期、病型、ステロイド使用の関係について検討した。

2. 研究方法

対象は当科にて特発性大腿骨頭壊死症と診断した 42 例 51 関節、男性 18 例、女性 24 例、診断時平均 48 歳(22-80 歳)であった。関連因子はステロイド 35 関節、アルコール 15 関節、狭義の特発性 1 関節であった。X 線学的病期は Stage1 が 1 関節、Stage2 が 3 関節、Stage3A が 9 関節、Stage3B が 21 関節、Stage4 が 17 関節であった。病型は typeC1 が 14 関節、typeC2 が 37 関節であった。手術時に摘出した大腿骨頭組織について、ホルマリン固定し冠状断にてスラブを作成し、6 関節は非脱灰、45 関節は EDTA による脱灰後、HE 染色、TRAP 染色を施行した。脱灰した 45 関節に対し抗 HIF-1 α 抗体(monoclonal rabbit IgG)、抗 VEGF 抗体(monoclonal rabbit IgG)、抗 FGF-2 抗体(polyclonal rabbit IgG)による免疫染色を施行し、TRAP 陽性細胞、HIF-1 α 、VEGF、FGF-2 各々の発現について壊死域、境界域、正常域の各

領域における分布状況と分布の密度、また組織所見が X 線学的病期、病型、ステロイド使用との関連があるかを調査した。境界域は fibrous area、transitional area、edematous area の 3 つに分類して評価した。また分布密度に関しては、陽性細胞数を 40 倍の視野で計測し、grade0、grade1、grade2、grade3 の 4 段階で評価した。

3. 研究結果

TRAP 陽性細胞、HIF-1 α 、VEGF、FGF-2 発現の分布を図 1 に示す。TRAP 陽性細胞は全例で境界域に見られた。さらに retinaculum 付着部や円靭帯近傍にも見られた。病期が進行するにつれて境界域で見られる範囲が広がっていた。TRAP 陽性多核細胞は壊死骨梁周囲、新生骨梁周囲のいずれにも存在した。Stage が進行するにつれて壊死骨梁が少なくなり、新生骨梁周囲で見られる細胞が多くなっていた。

HIF-1 α は 45 関節中 41 関節(91%)で境界域の近位側の fibrosis area と transitional area の血管内皮細胞に発現が見られた。VEGF は 45 関節中 42 関節(93%)で reparative interface zone の遠位側にあたる edematous area で陽性であった。FGF-2 は 45 関節中 43 関節(95%)で reparative interface zone 及び正常域で広く陽性であった。

X 線学的病期と組織所見の比較(表 1)では、

TRAP 陽性細胞の分布と HIF-1 α 発現は stage III/IV 例で有意に多かった。VEGF と FGF-2 については stage I/II と stage III/IV 例で差を認めなかった。病型と組織所見の比較(表 2)では、C1 例と C2 例で差を認めなかった。

またステロイド関連と組織所見の比較(表 3)では、ステロイド関連例と非ステロイド関連例で差を認めなかったが、手術時にステロイドを使用していた例と非使用例(表 4)では、FGF-2 発現に有意差を認め、ステロイド使用例で明らかに発現が少なかった。

図1 TRAP陽性細胞、HIF-1 α 、VEGF、FGF-2の分布

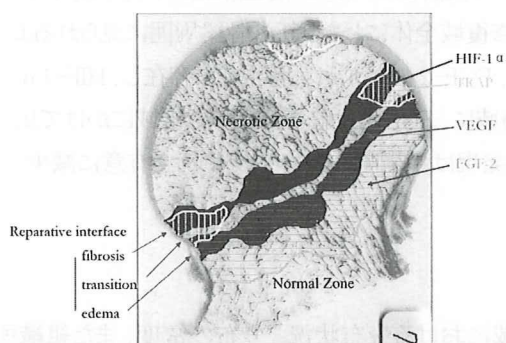


表1 X線学的病期と組織評価の比較

		grade0	grade1	grade2	grade3	p value
TRAP	stage I/II	0	3	1	0	0.035
	stage III/IV	0	9	20	18	
HIF-1 α	stage I/II	0	1	3	0	0.025
	stage III/IV	2	21	14	4	
VEGF	stage I/II	1	0	2	1	N.S.
	stage III/IV	2	19	12	8	
FGF-2	stage I/II	1	0	2	1	N.S.
	stage III/IV	1	13	23	4	

(Chi-square test)

表2 病型と組織評価の比較

		grade0	grade1	grade2	grade3	p value
TRAP	C1	0	8	16	13	N.S.
	C2	0	4	5	5	
HIF-1 α	C1	1	17	11	2	N.S.
	C2	3	5	4	2	
VEGF	C1	1	16	8	6	N.S.
	C2	2	3	6	3	
FGF-2	C1	1	10	18	2	N.S.
	C2	1	3	7	3	

(Chi-square test)

表3 ステロイド関連例と組織評価の比較

		grade0	grade1	grade2	grade3	p value
TRAP	steroid+	0	7	13	16	N.S.
	-	0	5	8	2	
HIF-1 α	steroid+	3	15	9	4	N.S.
	-	1	7	6	0	
VEGF	steroid+	3	12	10	6	N.S.
	-	0	7	4	3	
FGF-2	steroid+	2	8	18	3	N.S.
	-	0	5	7	2	

(Chi-square test)

表4 手術時ステロイド使用例と組織評価の比較

		grade0	grade1	grade2	grade3	p value
TRAP	steroid+	0	3	7	2	N.S.
	-	0	9	14	16	
HIF-1 α	steroid+	2	3	3	2	N.S.
	-	2	19	12	2	
VEGF	steroid+	0	4	3	3	N.S.
	-	3	15	11	6	
FGF-2	steroid+	3	7	0	0	0.005
	-	1	6	23	5	

(Chi-square test)

4. 考察

実験的外傷性骨壊死モデルにおける TRAP 陽性細胞の分布については報告されているが¹⁾、特発性大腿骨頭壊死症の骨頭組織に対する臨床例での TRAP 染色の報告はこれまでにない。本研究において、Stage3A のような圧潰が軽度のみ生じている例では境界域の軟骨下領域(retinaculum 付着部周囲)や円靭帯付着部周囲のみに TRAP 陽性細胞が存在することから、TRAP 陽性細胞が血流によって recruit され、Stage3B、Stage4 と病期が進むにつれて骨頭中央の境界域へも存在が広がっていくと考えられた。

HIF-1 α は組織の阻血状態の結果生じる細胞内低酸素状態において誘導される特異的転写因子である²⁾。大腿骨頭壊死症の抗 HIF-1 α 抗体による免疫染色では、修復層において Flk-1 陽性の内皮細胞由来の細胞で陽性となる²⁾。内皮細胞でのアポトーシスを引き起こし、高濃度のグルココルチコイドとともに血管損傷を引き起こして骨壊死発生に関連すると考えられている。本研究では境界域の壊死域側に存在する細胞に発現が見られた。血管周囲にもみられ、内皮細胞由来の細胞と考えられた。

VEGF は proangiogenic growth factor で、骨細胞を刺激し骨の修復を促進する³⁾。低酸素下では HIF-1

α 、HIF-2 α が核へ移行して作用し、VEGF-Aの転写を誘導する³⁾。Radkeらは、特発性大腿骨頭壊死症のcore biopsyの組織に対する抗VEGF抗体による免疫染色を施行し、浮腫領域に陽性であったと報告し⁴⁾、本研究の結果と一致している。

FGF-2は、虚血条件下でVEGFと同等に血管新生を誘導し、成熟度の高い血管新生が誘導される。Nakamaeらは、血管束移植とFGF-2投与によって壊死骨でのangiogenesisが促進されると報告している⁵⁾。本研究ではFGF-2は境界域で、血管壁や骨髄細胞に広く発現が見られ、手術時にステロイドを使用した例で明らかに発現が少なかった。これはステロイドによる修復反応の阻害を示す事例と考えられるが、今後の更なる検証が必要であると考えられた。

VEGF、FGF-2の発現とX線学的病期との関連は明確ではなかった。本研究では骨壊死が発生してから、ほとんどの例で圧潰をきたして手術の適応となるまで長期間が経過した症例を対象としており、決して早期からの修復反応をみているわけではない。早期からの修復反応におけるHIF-1 α 、VEGF、FGF-2の発現を検討するため、現在大腿骨頸部骨折例を対象として調査を進めている。

5. 結論

TRAP陽性細胞は、病早期では円靭帯やretinaculum付着部周囲に見られ、病期の進行に伴い修復域全体にわたって新生骨梁周囲にみられた。HIF-1 α 、VEGF、FGF-2のいずれも境界域を中心に存在することが確認され、HIF-1 α は壊死域に近接する修復域近位に、VEGFは浮腫領域に、FGF-2は修復域から正常域にかけて広く見られた。HIF-1 α の発現と病期には相関がみられ、FGF-2の発現は手術時ステロイド使用例で有意に減少していた。

6. 研究発表

1. 論文発表

Li W, Sakai T, Nishii T, Nakamura N, Takao M, Yoshikawa H, Sugano N. Distribution of TRAP Positive Cells and Expression of HIF-1 α , VEGF, and FGF-2 in the Reparative Reaction in Patients with Osteonecrosis of the Femoral Head. J Orthop Res 27:694-700,2009

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) Kim HKW, Randall TS, Bian H, Jenkins J, Garces A, Bauss F. Ibandronate for prevention of femoral head deformity after ischemic necrosis of the capital femoral epiphysis in immature pigs. J Bone Joint Surg Am 87-A: 550-557, 2005.
- 2) Okada Y, Tanikawa T, Iida T, Tanaka Y. Vascular injury by glucocorticoid; involvement of apoptosis of endothelial cells. Clin Calcium 17:872-877, 2007.
- 3) Carano RAD, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. Drug Discovery Today 8:980-989, 2003.
- 4) Radke S, Battmann A, Jatzke S, Eulert J, Jakob F, Schutze N. Expression of the angiogenic proteins CYR61, CTGF, and VEGF in osteonecrosis of the femoral head. J Orthop Res 24:945-952, 2006.
- 5) Nakamae A, Sunagawa T, Ishida O, Suzuki O, Yasunaga Y, Hachisuka H, Ochi M. Acceleration of surgical angiogenesis in necrotic bone with a single injection of fibroblast growth factor-2 (FGF-2). J Orthop Res 22:509-513, 2004.

アルコールに起因する大腿骨頭壊死症に対する検討

伊藤英也、田中 栄

(東京大学医学部附属病院整形外科・脊椎外科)

アルコール愛飲歴はステロイド全身投与歴に次ぎ大腿骨頭壊死症(ION)に関与していることが知られているが、アルコール起因についての疫学、病態についての研究、報告はステロイド性に比べ少なく今後の課題である。当院整形外科外来受診中でアルコールが起因していると考えられる大腿骨頭壊死患者20例についてその臨床病態について検討をおこなった。臨床背景等であきらかな傾向はつかめなかったが特徴的な経過を示す症例があり調査項目を再検討し症例数を増やすことで病態解明に結びつく研究が可能であると考えられた。

1. 研究目的

広義の特発性大腿骨頭壊死の約3割にアルコール愛飲歴があることが知られているがアルコール起因の骨頭壊死については疫学、病態について不明な点が多い。アルコール関連骨頭壊死の臨床病態をあきらかにするために必要な調査事項、臨床背景を把握することが今回の研究の目的である。

2. 研究方法

対象は2009年6月から10月に当院整形外科外来受診した骨頭壊死患者で毎日アルコールを摂取し、ステロイドの全身投与歴のない20例。内訳は男性15例、女性5例 平均年齢54歳、経過観察期間は平均6.4年であった。初診時画像所見、発症年齢、アルコール摂取量、両側発症例の分布、臨床経過、合併症を検討した。また長期経過で特徴的な経過、画像所見を示した2症例を検討した。

3. 研究結果

初診時画像所見骨頭壊死関節は全部で28関節であったが、手術症例の割合が多いため病型分類ではtypeC1、C2の割合が多かった。(表1)両側発生は20例中8例であった。発症年齢は平均48歳で、アルコール1日摂取量は日本酒換算で平均3.8合であった。発症までのアルコール摂取量を飲酒歴と1日摂取量をかけた値Aで概算すると平均は81でAが100以上と50以下で両側例、片側例とも差がなかった。発症年齢と両側例の割合にも差がみられなかった。

(表3)

臨床経過治療法と病型分類は(表4)に示すとおりである

合併症はDM2例、胃潰瘍2例、痛風2例、腎不全1例、アルコール性肝障害1例であった。精神科治療薬や睡眠導入剤を常用しているものが5例。手術症例(24例)の術後合併症は術後せん妄1例で感染、脱臼、DVTはなかった。

	1	2	3A	3B	4
A	0	0	0	0	0
B	0	1	0	0	0
C1	1	3	4	0	0
C2	0	0	5	10	3

表1 初診時画像所見

	片側	両側
A>100	4	3
A<50	4	3

発症までの飲酒歴(年)×アルコール摂取量(合)
=A 6~266(平均81)

表2 発症までの飲酒量と片側、両側発生

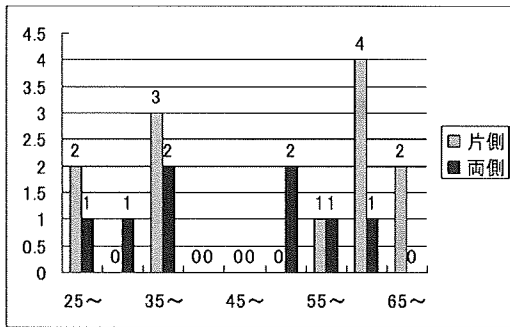


表3 発症年齢別人数

	B	C1	C2
保存療法	1	3	2
杉岡式	0	2	5
内反骨切り	0	1	2
人工骨頭	0	0	2
THA	0	1	8

表4 病型分類と臨床経過(治療法)

症例検討

症例1 39歳男性 27歳時アルコール多飲歴5年で両側の骨頭壊死を発症左は杉岡式の骨切りをうけた。初診時 typeB、stage 2 で軽度疼痛があった。(図1) アルコール摂取は継続しているが10年後の現在壊死範囲の縮小と疼痛の軽快がみられている。(図2)

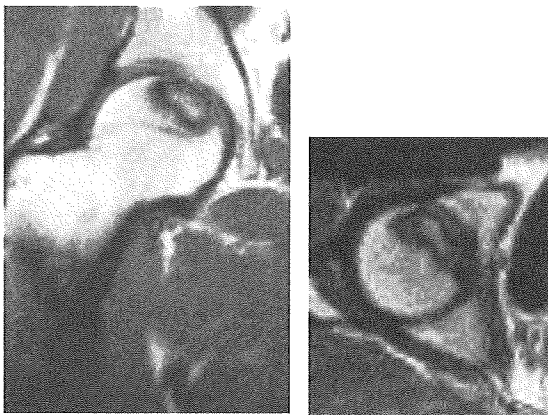


図1 MRI(初診時)

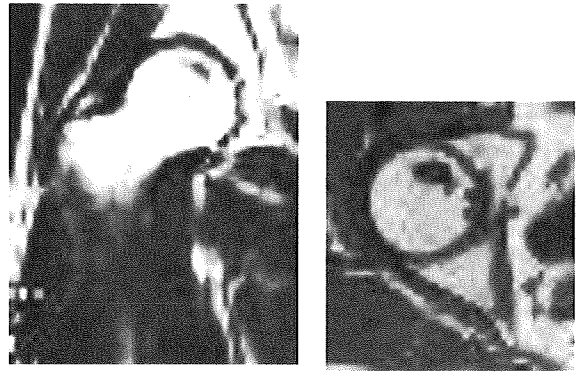


図2 MRI(10年後)

症例2 70歳、男性。59歳時に左の骨頭壊死を発症、61歳で人工股関節をうけた。当時右には臨床症状なく画像所見も正常であったが9年後に右股関節痛が出現、X線で骨頭壊死を疑う所見がみられた。1日日本酒5合の飲酒を続けている。対側関節の再発症例と考えられる。



図3 X線(左人工股関節全置換直後)



図4 X線(左人工股関節全置換9年後)

4. 考察

IONの発症にアルコール摂取量が関与しているとの報告がある。しかし積算量、1日あたりの摂取量、アルコール濃度、種類、食事との関連など発症に関して強く影響する因子については不明な点が多い。また発症後にアルコール摂取を続けたときの再発、増悪に関する病態についても不明である。アルコール性の骨頭壊死の研究は多くの基礎実験や臨床研究の報告のあるステロイド性の骨頭壊死にくらべ少ない。この理由として基礎実験では動物実験モデル作成が困難であることやアルコール愛飲者の外来フォローの継続や飲酒量等の正確な把握などステロイド性にくらべ不利な点もあり臨床研究が難しいことがあげられる。しかし難病である骨頭壊死症の原因の約3割をしめるアルコールの関与に関する研究は今後すすめなければならぬ課題である。今回我々のおこなった調査では症例数が少なく発症に関する傾向をつかむことはできなかった。若年者で比較的短い飲酒歴で発症することがある一方、数十年の飲酒歴で突然発症する場合もある。また飲酒量(積算量)と両側、片側罹患にかんしても差がみられなかったことから単に飲酒量が多いことだけが発症に関与しているわけではないことが推測される。脂質代謝や遺伝学的素因など内因的な要素が関与している可能性もあり発症には複雑なメカニズムが働いているのかもしれない。アルコール摂取量についても今後はいろいろな観点で調査する必要があるだろう。また症例で示したように壊死範囲の縮小や対側での再発などの経過をとるものがあることがわかった。これらの症例を蓄積することで不明であった病態解明に結びつくヒントが得られる可能性はあると考えられる。

5. 結論

アルコールに起因していると考えられる大腿骨頭壊死症20例の臨床的背景(アルコール摂取量、両側発生等)を調査したが一定の傾向はえられなかった。しかし長期間での壊死の縮小や対側関節での再発など特徴的な経過を示す症例もあり、今後調査症例数を増やすとともに調査項目を検討することで病態解明に結びつく研究が可能であると考えられた。

6. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

8. 参考文献

- 1) Lynne C. Jones, David S. Hungerford.
Osteonecrosis: etiology, diagnosis, and treatment: Current Opinion in Rheumatology 2004 16:443-449
- 2) 福島若葉、廣田良夫、藤岡幹浩、久保俊一、玉腰暁子. 特発性大腿骨頭壊死症の全国疫学調査-二次調査最終結果- 厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書

高用量ステロイド療法を受けた膠原病患者における

大腿骨頭壊死発生のリスク因子に関する研究

天野宏一(埼玉医科大学総合医療センター リウマチ・膠原病内科)

亀田秀人(慶應義塾大学医学部 リウマチ内科)

膠原病に用いられる高用量ステロイド療法に合併する大腿骨頭壊死の予防のため、44例の患者に etidronate を併用し2年間観察。継続できた41例で解析し9例の大腿骨頭壊死が発生。リスク因子を多変量解析した結果 1.2 mg/kg/day 以上の最大ステロイド量と1年後の骨密度低下(>15%)が抽出された。

1. 研究目的

膠原病治療では現在でも高用量ステロイド療法が標準的治療である。その中で最も臨床的に問題となる有害事象は大腿骨頭壊死である。本研究は大腿骨頭壊死の発生の現状を調べ、それに関わるリスク因子を明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

膠原病の治療のため prednisolone 換算 0.5 mg/kg 以上のステロイド薬を投与された44例の患者を登録し、etidronate(200 mg/day X 14日, 3ヶ月毎)¹⁾およびCa製剤(600 mg/day)を併用し、prospective に2年間経過観察し、骨密度(Hologic QDR-2000)、骨代謝マーカー(血清および尿中のCaおよびリン濃度、血清 osteocalcin、尿中 NTx)を測定。大腿骨頭壊死はMRIで評価。統計学的解析は JMP software version 7.0.1 を用いて施行。

3. 研究結果

44例中開始時すでに大腿骨頭壊死が認められた2例と評価不能1例を除いた41例中、2年間で9例に大腿骨頭壊死が発生。基礎疾患ではSLEで22例中7例(31.8%)、非SLE19例中2例(10.8%)でSLEが有意に多かった。大腿骨頭壊死発生群9例と非発生群32例と比較すると、初回ステロイド投与量が1.2 mg/kg/day以上だった症例の割合は、発生群が非発生群より有意に多かった(OR=7.7, 95%CI: 1.3~45.5)。発生群と非発生群のBMD(lateral view)はbaselineでは差はなかったが、

2年後に発生群で16.4%低下したのに対し、非発生群では8.2%に留まり、低下率では有意な差が認められた。特に最初の1年で15%以上BMDが低下した患者の割合ではORが6.7(95%CI: 1.2~36.1)と有意であった。

4. 考察

高用量ステロイド療法に伴う大腿骨頭壊死の発生は従来からよく知られており、特に基礎疾患がSLEの場合に多い^{2, 3)}。その危険因子としてステロイドの投与量などが指摘されてきたが^{4, 5)}、本研究においても再確認された。さらにlateral view BMDの変化が重要であること⁶⁾も改めて示された。腰椎のlateral view BMD変化と大腿骨頭壊死との関連については今までに報告がなく、本研究で得られた新知見である。

高用量ステロイド療法を膠原病(特にSLE)患者に施行する場合、大腿骨頭壊死の発生防止のためには、使用するステロイド量を必要最小限とするよう努めるとともに、国内外のガイドライン^{7, 8)}にも明記されているように、alendronate⁹⁾や risedronate¹⁰⁾などのBMD低下防止作用の強い製剤を積極的に併用する必要があると思われる。今後、BMD低下防止対策によって大腿骨頭壊死発生が防止できるかどうか prospective に検証する必要がある。

5. 結論

高用量(prednisolone 換算 0.5 mg/kg 以上)のステロイド療法を膠原病患者に行う場合、大腿骨頭壊死の発生の危険因子は、①基礎疾患がSLEであること、②初回

(再増量)治療時のステロイド量が多いこと、③1年間のBMD 低下率が大きいこと、の3つが重要な危険因子であった。

6. 研究発表

1. 論文発表

1) Kameda H, Amano K, Nagasawa H, et al.: Notable difference between the development of vertebral fracture and osteonecrosis of the femoral head in patients treated with high-dose glucocorticoids for systemic rheumatic diseases. Intern Med 2009; 48: 1931-1938

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) Sato S, Ohson Y, Suwa A, et al.: Effect of intermittent cyclical etidronate therapy on corticosteroid-induced osteoporosis in Japanese patients with connective tissue disease: 3 year follow up. J Rheumatol 30: 2673-2679, 2003
- 2) Abu-Shakra M, Buskilla D, Shoenfeld Y: Osteonecrosis in patients with SLE. Clin Rev Allergy Immunol 25: 13-23, 2003
- 3) Oinuma K, Harada Y, Nawata Y, et al.: Osteonecrosis in patients with systemic lupus erythematosus develops very early after starting high dose corticosteroid treatment. Ann Rheum Dis 60: 1145-1148, 2005
- 4) Mont MA, Glueck CJ, Pacheco IH, et al.: Risk factors for osteonecrosis in patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 24: 654-662, 1997
- 5) Gladman DD, Urowitz MB, Chaudhry-Ahluwalia V, et al.: Predictive factors for symptomatic osteonecrosis in patients with systemic lupus

erythematosus. J Rheumatol 28: 761-765, 2001

- 6) Reid IR, Evans MC, Stapleton J: Lateral spine densitometry is a more sensitive indicator of glucocorticoid-induced bone loss. J Bone Miner Res 7: 1221-1225, 1992
- 7) American College of Rheumatology ad hoc Committee on Glucocorticoid-induced Osteoporosis. Recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. Arthritis Rheum 44: 1496-1503, 2001
- 8) Nawata H, Soen S, Takayanagi R, et al.: The Subcommittee to Study Diagnostic Criteria for Glucocorticoid-induced Osteoporosis: Guidelines on the management and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis of the Japanese Society for Bone and Mineral Research (2004). J Bone Miner Metab 23: 105-109, 2005
- 9) Okada Y, Nawata M, Nakayamada S, et al.: Alendronate protects premenopausal women from bone loss and fracture associated with high-dose glucocorticoid therapy. J Rheumatol 35: 2249-2254, 2008
- 10) Mok CC, Tonk KH, To CH, et al.: Risedronate for prevention of bone mineral density loss in patients receiving high-dose corticosteroids: a randomized double-blind placebo-controlled trial. Osteoporosis Int 19: 937-941, 2008

ステロイド応答性の基礎的研究、予防法の開発(遺伝子解析)

池川志郎 (理化学研究所・ゲノム医科学研究センター)

ステロイド応答性を始めとする、特発性大腿骨頭壊死症の遺伝的要因を解明し、効果的な予防法の開発を目指す。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症の遺伝的要因を解明する。

2. 研究方法

連鎖解析 (linkage analysis)、相関解析 (association analysis)などの医科遺伝学 (medical genetics)的手法を用いて、特発性大腿骨頭壊死症の発症、進展に関与する遺伝子を同定する。

3. 研究結果

連鎖解析、相関解析のための大腿骨頭壊死症の症例の整理(診断方法、診断基準の決定等)、臨床情報、DNA サンプルの収集を開始した。

4. 考察

従来の疫学的研究、医科遺伝学的は、特発性大腿骨頭壊死症の発症、進展には遺伝的要因が関与することを示唆してきた。特発性大腿骨頭壊死症の家族内発症については、多くの報告が有り、我々のグループを含めたいくつかのグループが、疾患遺伝子として、II型コラーゲン遺伝子 (COL2A1)の変異を同定している(参考文献 1-3)。

5. 結論

特発性大腿骨頭壊死症の発症、進展には遺伝的要因が関与すると考えられる。

6. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) Shiro Ikegawa. Integrated approach toward bone & joint diseases using human and mouse genetics.8th

Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium, Yokosuka, June 4, 2009

- 2) Shiro Ikegawa. From mouse to human, from monogenic to polygenic disease. Gordon Research Conference on Cartilage Biology & Pathology, Les Diablerets, June 8, 2009

- 3) Shiro Ikegawa. Genetics study of skeletal dysplasias focusing on the relation with common diseases. International Symposium on Cartilage Biology, Larissa, June 18, 2009

- 4) Shiro Ikegawa. Common polymorphisms and risk for degenerative joint diseases in human populations. The 9th Biennial Meeting of International Skeletal Dysplasia Society, Boston, July 19, 2009

- 5) Shiro Ikegawa. Integrated approach toward bone & joint diseases using human and mouse genetics. The 9th Annual Meeting of East Asian Union of Human Genetics Societies, Seoul, November 19, 2009

- 6) Shiro Ikegawa. Genomic analysis of bone and joint diseases-An integrated approach toward bone & joint diseases using human and mouse genetics. Raine Visiting Professor Lecture, Perth, November 27, 2009

- 7) Shiro Ikegawa. Genomic analysis of bone & joint diseases-integrated approach of human & mouse genetics toward disease genes & molecular pathogenesis of the diseases. Sichuan Academy of Medical Sciences, Chendo, February 8, 2010

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) Liu YF, Chen WM, Lin YF, Yang RC, Lin MW, Li LH, Chang YH, Jou YS, Lin PY, Su JS, Huang SF, Hsiao KJ, Fann CS, Hwang HW, Chen YT, Tsai SF. Type II collagen gene variants and inherited osteonecrosis of the femoral head. *N Engl J Med* 2005;2;352(22):2294-2301.
- 2) Miyamoto Y, Matsuda T, Kitoh H, Haga N, Ohashi H, Nishimura G, Ikegawa S. A recurrent mutation in type II collagen gene causes Legg-Calvé-Perthes disease in a Japanese family. *Hum Genet* 2007;121(5):625-629.
- 3) Su P, Li R, Liu S, Zhou Y, Wang X, Patil N, Mow CS, Mason JC, Huang D, Wang Y. Age at onset-dependent presentations of premature hip osteoarthritis, avascular necrosis of the femoral head, or Legg-Calvé-Perthes disease in a single family, consequent upon a p.Gly1170Ser mutation of COL2A1. *Arthritis Rheum* 2008;58(6):1701-1706.

全身性エリテマトーデス患者に合併する 大腿骨頭壊死症の病態関連分子の探索

竹内 勤(慶應義塾大学医学部 リウマチ内科)

瀬田範行(慶應義塾大学医学部 リウマチ内科)

天野宏一(埼玉医科大学総合医療センター リウマチ・膠原病内科)

大腿骨頭壊死症は、SLE に高頻度に出現する。この病態に免疫学的機序が関与する可能性を想定し、患者末梢血を用いて網羅的遺伝子発現解析を前向きに実施して、大腿骨頭壊死症発症と関連する異常分子の探索を試みた。本年度はその基礎的研究結果を報告する。

1. 研究目的

全身性エリテマトーデス(SLE)に合併する大腿骨頭壊死症は、患者 QOL を著しく低下させる合併症で、その病態に関して多くの検討がなされ、高用量の副腎皮質ステロイド治療、高脂血症、過凝固状態、抗リン脂質抗体など、多岐にわたる要因の関与が明らかにされている。特に、先の研究班で行った多施設共同試験では、高脂血症改善を期待してスタチンによる大腿骨頭壊死症予防効果が検証された。残念ながら予防投与の有無にかかわらず大腿骨頭壊死症の発生は 25～26%であった。依然として主要な病態が不明であり、特に SLE に高頻度に出現する機序に関しては依然として明らかとなっていない。この病態に免疫学的機序が関与する可能性を想定し、患者末梢血を用いて網羅的遺伝子発現解析を前向きに実施して、大腿骨頭壊死症発症と関連する異常分子を探索する。

2. 研究方法

- 1) 対象: 埼玉医科大学総合医療センターリウマチ・膠原病内科、あるいは慶應義塾大学病院リウマチ内科に入院した初発の全身性エリテマトーデスで無治療の症例を対象とした。臨床データは、副腎皮質ステロイド、免疫抑制薬投与前、投与後1年間観察し、大腿骨頭壊死症の診断は、投与前、投与6ヶ月後、1年後に単純 X 線像、単純 MR 画像を撮影して行う。
- 2) 末梢血リンパ球サブセット分離: 文書で同意を取得

後、末梢血を採取し、FACS Aria で CD4+T 細胞、CD8+T 細胞、CD19+B 細胞、CD14+単球を分離した後、その純度が 95%以上である事を確認した。

- 3) 網羅的遺伝子発現解析: 各細胞分画別に Affimetrix Human Genome U133 plus2.0 チップを用いて健常人6人に対する遺伝子発現比を解析した。

3. 研究結果

- 1) 無治療、活動性 SLE3例の臨床症状: 症例1は19歳女性で、5ヶ月前に関節痛で発症し、ループス腎炎、ループス腹膜炎合併、腎生検 WHOIII、抗 dsDNA 高値、抗 CL 抗体陽性。症例2は29歳女性で、1ヶ月前に多関節炎で発症し、ループス腎炎(WHOII)、多関節炎を共に、抗 dsDNA 抗体高値、抗 SS-A 抗体陽性。症例3は75歳男性で、3ヶ月前から出現した体重減少で発症、大量胸水、記名力低下を呈する CNS ループス症例で、抗 dsDNA 抗体高値、抗 Sm 抗体、抗 SS-A 抗体陽性。全例、ステロイド大量投与を受け、症例1は IVCY、症例2はタクロリムスを併用。現在、治療開始後の画像検査を予定中。
- 2) 末梢血リンパ球分離: 症例1 (CD4+T 5×10^5 , CD8+T 8.6×10^5 , CD19+B 6.5×10^5 , CD14+単球 5×10^5)、症例2 (CD4+T 9.4×10^5 , CD8+T 4×10^5 , CD19+B 2.9×10^5 , CD14+単球 2×10^5)、症例3 (CD4+T 9.2×10^5 , CD8+T 5.2×10^5 , CD19+B 6.5×10^5 , CD14+単球 7.2×10^5)と十分な終了が得られた。

- 3) 健常人シグナルの平均3倍以上、1/3以下の遺伝子を抽出した。発現亢進している遺伝子は、CD4+T細胞 155、CD8+T細胞 238、CD19+B細胞 2854、CD14+単球 2805であった。サイトカイン、シグナル伝達分子、転写因子、細胞接着分子に加え、トロンボスポンジン1、トロンボモジュリン、コアグレーション因子IIIなどが、B細胞、単球で高発現している事が明らかとなった。このうち、トロンボスポンジン1は、症例1のB細胞で健常人に比べ1000倍近い高発現を認めたものの、症例2、3では正常の数倍程度にとどまった。一方、トロンボモジュリンは、3例とも、健常人の30倍以上の高値を示し、特に症例2では1000倍に達した。コアグレーション因子IIIも症例1、2で高値を呈していた。

5. 結論

今後、大腿骨頭壊死症の発生を慎重に観察しながら、網羅的遺伝子発現解析によって明らかとなった発現亢進分子、発現低下分子の動態との関連を追及する事によって、原因不明な本疾患の病態と関連する分子異常を明らかにする手がかりとなると考えられる。

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki K, Nagasawa H, Kameda H, Amano K, Kondo T, Itoyama S, Tanaka Y, Takeuchi T: Severe acute thrombotic exacerbation in two cases with anti-phospholipid syndrome after retreatment with rituximab in phase I/II clinical trial for refractory systemic lupus erythematosus, *Rheumatology*,48(2): 198-9, 2009
- 2) Suzuki K, Kameda H, Amano K, Nagasawa H, Sekiguchi H, Nishi E, Ogawa H, Tsuzaka K, and Takeuchi T. Single Center Prospective Study for Efficacy and Safety of Tacrolimus in Rheumatoid Arthritis. *Rheumatology Int* 2009;29:431-6
- 3) Takeuchi T, Miyasaka N, Inoue K, Abe T, and Koike T. Tlmpact of trough serum level on radiographic and clinical response to infliximab plus methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: results from the RISING study. *Mod Rheumatology* 2009;19:478-87

- 4) Tanino M, Matoba R, Nakamura S, Kameda H, Amano K, Okayama T, Nagasawa H, Suzuki K, Matsubara K, and Takeuchi T. Prediction of efficacy of anti-TNF biologic agent, infliximab, for rheumatoid arthritis patients using a comprehensive transcriptome analysis of white blood cells. *Biochem Biophys Research Comm* 2009;387: 261-265
- 5) Ogawa H, Kameda H, Amano K, and Takeuchi T. Efficacy and safety of cyclosporine A in patients with refractory systemic lupus erythematosus in a daily clinical practice. *Lupus* 2010;19:162-169,
- 6) Suzuki K, Kameda H, Amano K, Nagasawa H, Takeii H, Nishi E, Okuyama A, Tsuzaka K, and Takeuchi T. Single center prospective study of tacrolimus efficacy and safety in the treatment of various manifestations in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology Int*, in press.

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

なし