

膠原病患者に合併する大腿骨頭壊死症の検討 —脊椎圧迫骨折との対比—

竹内 勤、亀田秀人、瀬田範之
(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)

高用量副腎皮質ステロイド治療を受ける膠原病患者を前向きに登録し、大腿骨頭壊死症の発症と、同じく QOL 障害が問題となる脊椎圧迫骨折の発症を同時に調査し、今回、両病態の臨床的特徴を比較検討した。脊椎圧迫骨折は、その発症と関連する患者要因が明らかとなったが、一方、大腿骨頭壊死症の発症は、大量副腎皮質ステロイド投与と、それに対する患者反応性、疾患が関与している可能性が示唆された。その分子機序を追及する事によって、新規治療の標的を明らかにすることが出来ると期待される。

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症は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。この病態の背景因子を探る目的で、高用量副腎皮質ステロイド治療を受ける膠原病患者を前向きに登録し、大腿骨頭壊死症の発症と、同じく QOL 障害が問題となる脊椎圧迫骨折の発症を同時に調査し、今回、両病態の臨床的特徴を比較検討した。

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・膠原病内科に入院した全身性エリテマトーデス患者でプレドニゾロン換算 0.6mg/kg 以上の副腎皮質ステロイドを投与され、その後、同施設あるいは慶應義塾大学病院で経過観察された症例を対象とした。60例が登録され、その後16例は3ヶ月以内に原疾患の活動性コントロールが困難であったため脱落し、44例が2年間のフォロー

を終了した。44例の対象症例は、全身性エリテマトーデス23例、多発性筋炎/皮膚筋炎14例、悪性関節リウマチ3例、成人スティル病2例、高安大動脈炎1例、再発性多発軟骨炎1例であった。

(2) 治療: 全症例がエチドロネート

(200mg/dx14d/3months)とアスパラ Ca(600mg/d)の投与を受けた。

(3) 検査: 血清 Ca, P, Osteocalcin、尿中 Ca, P, NTx, DEXA 法による L2-L4 の BMD (QDR-2000)、MRI による両側大腿骨頭の撮像を行った。

3. 研究結果・考察

患者背景: 男性8例、女性36例の患者背景に有意差はなく、女性の42%が閉経後であった(表1)。

BMD の推移: 前後像、側面像ともに、高用量副腎皮質ステロイド投与後、1年で有意の低下を認めた。一方、1年から2年目には BMD の低下は安定化し、1年目と2年目で低下傾向はあるものの有意な差は認めなかった(BMD: ベースライン 0.94g/cm²、1年目 0.88g/cm²、2年目 0.87g/cm²)。骨代謝マーカーも同様に、1年後に大きな変動を示すも、2年目には安定化した。

脊椎圧迫骨折: ベースラインで4例がすでに脊椎圧迫骨折(Vertebral Fracture: VF)を認め、この4例は全員が1年以内に新たなVFを認めた。ベースラインでVFのない40例は、1年目までに5例、2年目までに2例、合計11例でVFの新規発生を認めた。

表1 患者背景

gender	male: n=8	female: n=36	p value
postmenopausal	—	15 (41.7%)	—
age (year)	50.1 (37.1-63.1)	42.7 (36.5-48.8)	NS
body weight (kg)	58.1 (51.7-64.5)	53.3 (50.3-56.3)	NS
body mass index (kg/m ²)	21.0 (18.1-23.9)	22.4 (21.1-23.8)	NS
ever habitual drinking	1 (12.5%)	3 (8.3%)	NS
disease requiring high-dose GC			
SLE	3 (37.5%)	20 (55.6%)	NS
PM/DM	2 (25.0%)	12 (33.3%)	NS
rheumatoid vasculitis	2 (25.0%)	1 (2.8%)	NS
adult Still's disease	1 (12.5%)	1 (2.8%)	NS
Takayasu arteritis	0 (0%)	1 (2.8%)	NS
relapsing polychondritis	0 (0%)	1 (2.8%)	NS
preexistence of VF at entry (n)	0 (0%)	4 (11.1%)	NS
GC therapy before entry	2 (25.0%)	7 (19.4%)	NS
steroid pulse within 2 months	0 (0%)	6 (16.7%)	NS
maximum PSL dosage within 2 months (mg/kg/day)	0.85 (0.67-1.03)	0.94 (0.85-1.02)	NS
average PSL dosage in 2 years (mg/kg/day)	0.24 (0.18-0.30)	0.29 (0.26-0.31)	NS
BMD at entry (L2-4, AP view; g/cm ²)	0.97 (0.86-1.09)	0.94 (0.88-0.99)	NS
BMD at entry (L2-4, lateral view; g/cm ²)	0.72 (0.64-0.80)	0.69 (0.65-0.73)	NS
serum osteocalcin level at entry (ng/mL)	1.0 (-0.1-2.0)	1.5 (0.5-1.6)	NS
urinary NTx excretion at entry (nM/mM Cr)	85.0 (36.7-133.4)	103.7 (82.0-125.3)	NS

大腿骨頭壊死: 2例はすでにベースラインで大腿骨頭壊死(Osteonecrosis of the Femoral Head: OFH)を認めたため、以降の解析から除外した。9例の OFH の中で、自覚症状のある5例は、大量副腎皮質ステロイド開始後6ヶ月以内に発症し、また、OFHは、SLEが31.2%と頻度が高く、他疾患の10.5%を上回った。そのリスク比は8.4であった。

両病態の危険因子: 多変量解析による危険因子の解析を行った所、OFHの危険因子として、1.2mg/kg以上

の副腎皮質ステロイド投与 (リスク比:7.7, 95% CI: 1.3-45.5, p=0.02)、および1年目の15%以上のBMD低下 (リスク比:6.7, 95%CI:1.2-36.1, p=0.02)が抽出された。一方、VFでは、閉経後女性(リスク比:5.5, 95% CI: 1.3-23.6, p=0.02)、ベースラインBMD前後像が0.85g/cm²以下(リスク比:14.9, 95%CI: 2.9-76.4, p=0.0004)、ベースラインNTxが \geq 120nM/mM Cr以上(リスク比:5.4, 95%CI: 1.1-25.8, p=0.03)、ベースラインでの既存VFが、抽出された。

表2 脊椎圧迫骨折、大腿骨頭壊死発症例の臨床的特徴

	VF (+); n=11	VF (-); n=33	p value	OFH (+); n=9 bilateral: 6, right: 3 symptomatic: 5	OFH (-); n=32	p value
male	9.1%	21.2%	NS	0.0%	15.6%	NS
postmenopausal women	63.6%	24.2%	0.02	33.3%	37.5%	NS
SLE	27.3%	60.6%	NS	77.8%	46.9%	NS
age (year)	51.2 (40.3-62.1)	41.6 (35.3-47.9)	NS	37.7 (23.8-51.5)	44.5 (38.0-51.0)	NS
body weight (kg)	54.0 (48.5-59.6)	54.2 (51.0-57.5)	NS	52.3 (46.1-58.6)	54.8 (51.5-58.1)	NS
body mass index (kg/m ²)	22.4 (20.0-24.7)	22.1 (20.7-23.5)	NS	21.8 (19.0-24.5)	22.7 (21.3-24.1)	NS
ever habitual drinking	18.2%	6.1%	NS	11.1%	6.3%	NS
GC before entry	36.4%	15.2%	NS	11.1%	21.9%	NS
steroid pulse within 2 months	18.2%	12.1%	NS	33.3%	9.4%	NS
maximum PSL dosage within 2 months (mg/kg/day)	0.91 (0.76-1.06)	0.92 (0.83-1.01)	NS	1.09 (0.93-1.25)	0.87 (0.78-0.95)	0.02
average PSL dosage in 2 years (mg/kg/day)	0.28 (0.25-0.33)	0.28 (0.25-0.31)	NS	0.30 (0.25-0.36)	0.27 (0.24-0.30)	NS
preexistence of VF at entry	36.4%	0.0%	0.0003	11.1%	9.4%	NS
VF in 2 years	—	—	—	33.3%	25.0%	NS
OFH in 2 years	27.3%	20.0%	NS	—	—	—
BMD at entry (g/cm ² , AP view)	0.79 (0.69-0.88)	1.00 (0.95-1.04)	0.0004	1.01 (0.92-1.09)	0.92 (0.86-0.99)	NS
decrease in BMD in the first year (%; AP view)	8.8 (4.8-12.9)	7.3 (6.0-8.7)	NS	8.9 (5.6-12.3)	7.3 (5.7-8.9)	NS
BMD at entry (g/cm ² , lateral view)	0.61 (0.54-0.69)	0.72 (0.68-0.76)	0.01	0.73 (0.66-0.80)	0.68 (0.63-0.73)	NS
decrease in HMI in the first year (%; lateral view)	9.1 (2.7-15.5)	9.9 (6.6-13.2)	NS	16.4 (7.9-24.9)	8.2 (5.3-11.2)	0.03
serum osteocalcin level at entry (ng/mL)	0.9 (0.0-1.7)	1.1 (0.5-1.7)	NS	0.4 (-0.2-1.0)	1.2 (0.6-1.8)	NS
urinary NTx excretion at entry (nM/mM Cr)	137.6 (69.6-205.5)	89.0 (72.7-105.3)	0.03	89.4 (59.0-119.8)	103.8 (77.5-130.0)	NS

表3 両病態と危険因子—多変量ロジスティックモデル—

	VF			OFH		
	OR	95% CI	p value	OR	95% CI	p value
postmenopausal women vs. others	5.5	1.3-23.6	0.02	0.8	0.2-4.0	NS
maximum PSL dosage within 2 months: >1.2 mg/kg/day vs. ≤	0.5	0.0-4.2	NS	7.7	1.3-45.5	0.02
preexistence of VF at entry: (+) vs. (-)	∞	-	0.0004	1.2	0.1-13.2	NS
BMD of AP view at entry: <0.85 g/cm ² vs. ≥	14.9	2.9-76.4	0.0004	0.5	0.1-3.1	NS
decrease in BMD in the first year: > 15% vs. ≤	1.1	0.2-5.1	NS	6.7	1.2-36.1	0.02
urinary NTx excretion at entry: > 120 nM/mM Cr vs. ≤	5.4	1.1-25.8	0.03	0.90	0.2-5.6	NS

4. 結論

脊椎圧迫骨折は、その発症と関連する患者要因が明らかとなったが、一方、大腿骨頭壊死症の発症は、大量副腎皮質ステロイド投与と、それに対する患者反応性、疾患が関与している可能性が示唆された。その分子機序を追及する事によって、新規治療の標的を明らかにすることが出来ると期待される。

5. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* 19:162-169, 2010.
- 2) Suzuki K, Tamaru J, Okuyama A, Kameda H, Amano K, Nagasawa H, Nishi, E, Yoshimoto K, Setoyama Y, Kaneko K, Osada H, Honda N, Yasaki Y, Itoyama S, Tsuzaka K, and Takeuchi T. IgG4-positive multi-organ lymphoproliferative syndrome manifesting as chronic symmetrical sclerosing dacryo-sialo-adenitis with subsequent secondary portal hypertension and remarkable IgG4-linked IL-4 elevation. *Rheumatology*, 49:1789-91, 2010.
- 3) 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.
- 4) Yoshimoto K, Setoyama Y, Tsuzaka K, Abe T, and Takeuchi T. Reduced expression of TCR zeta is involved in the abnormal production of cytokines by peripheral T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol*. in press.

2. 学会発表

なし

6. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

7. 参考文献

- 1) Kameda H, Amano K, Nagasawa H, Ogawa H, Sekiguchi N, Takei H, Suzuki K, and Takeuchi T. Notable difference between the development of vertebral fracture and osteonecrosis of femoral head in patients treated with high-dose glucocorticoids for systemic rheumatic diseases. *Internal Med* 48:1931-8, 2009.

新規 MR 転写共役因子複合体によるエピゲノム修飾

加藤茂明、横田健一、今井祐記
(東京大学分子細胞生物学研究所)

特発性大腿骨頭壊死症 (ION)、中でもステロイド性 ION 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、転写を正に制御することが明らかとなった。さらに、その転写制御は、p120 がヒストンメチル化酵素である NSD1 と複合体を形成し、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あることを見出した。これらの分子メカニズムが大腿骨頭壊死症の病態生理に関与している可能性が考えられる。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症 (ION) の中でも、ステロイド投与により発症するステロイド性 ION の発症病態は不明であり、ステロイドと ION 発症との関連の解明は、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 11β HSD2 による代謝を免れ、グルココルチコイド受容体 (GR: Glucocorticoid Receptor) のみならずミネラルコルチコイド受容体 (MR: Mineralcorticoid Receptor) 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 による転写制御メカニズムを解明することにより、ION 発症病態を明らかにする糸口を探索すること目的とし、研究を遂行する。

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い、同定し得た因子を含む転写共役因子複合体の構成因子の同定ならびに機能解析を行う。

3. 研究結果

1) 取得因子 p120 の機能解析

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

索をおこなった結果同定し得た p120 が、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。この結果を元に、siRNA にて p120 遺伝子発現抑制を行ったところ、MR のリガンド依存的な標的遺伝子である ENaC α の発現誘導が抑制された。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。

2) p120 複合体の同定

FLAG-p120 安定発現株を樹立し、大量培養の後、FLAG-M2 agarose レジンを用いて p120 結合因子の精製を行い、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 NSD1 (Nuclear receptor binding SET domain protein 1) を同定した。

3) NSD1 の機能解析

NSD1 は、ヒストン H3 の 36 番目のリジン残基 (H3K36) のメチル化を担う酵素として同定されており、また様々な発育異常を伴う Sotos 症候群の原因遺伝子として報告されている¹⁾。これらの背景から、ENaC α プロモーター領域における H3K36me3 修飾をクロマチン免疫沈降反応 (ChIP: Chromatin Immunoprecipitation) にて検索したところ、通常条件では MR リガンド依存的にメチル化修飾の増強を認めるのに対し、p120 の siRNA による発現抑

制状態では、修飾強度が抑制された。

4. 考察

今回同定し得た p120 複合体には、NSD1 を含むことが明らかとなり、MR の核における結合因子 p120 と p120 の相互作用因子である NSD1 が協調的にエピゲノム修飾のひとつであるヒストンリジン残基のメチル化修飾を制御し、MR の転写活性化を調節している可能性が示唆される結果を得た。今後は血管内皮細胞において同様な分子メカニズムが存在するか否かの探索をおこない、血管内皮障害を惹起するメカニズムおよび ION 発症メカニズムにおける、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、NSD1 を含む複合体同定に成功した。MR/p120/NSD1 複合体は、リガンド依存的にヒストン H3K36 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(○特に本研究と関係するもの)

- 1) ○Baba A, Ohtake F, Okuno Y, Yokota K, Imai Y, Kato S, et al. Signal-sensing activation of a histone lysine demethylase complex. *Nat. Cell Biol.* 2010 (in press).
- 2) Akimoto C, Ueda T, Inoue K, Matsumoto T, Kitagawa H, Kato S, et al. Testis-specific protein on Y chromosome (TSPY) represses the activity of the androgen receptor in androgen-dependent testicular germ-cell tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010; 107: 19891-19896.
- 3) Youn MY, Takada I, Imai Y, Yasuda H, Kato S. Transcriptionally active nuclei are selective in mature multinucleated osteoclasts. *Genes to Cells* 2010; 15: 1025-1035.
- 4) ○Yokoyama A, Okuno Y, Chikanishi T, Sekine H, Fujiki R, Kato S, et al. KIAA1718 is a histone demethylase that erases repressive histone methyl marks. *Genes to Cells* 2010; 15: 867-873.
- 5) Matsuyama R, Takada I, Yokoyama A, Kouzu-Fujita M, Yano T, Kato S, et al. Double PHD fingers protein DPF2 recognizes acetylated histones and

suppresses the function of estrogen-related receptor alpha through histone deacetylase 1. *J. Biol. Chem.* 2010; 285: 18166-18176.

- 6) Ochiai E, Kitagawa H, Takada I, Takeyama K, Yamaoka K, Kato S, et al. CDP/cut is an osteoblastic coactivator of the vitamin D receptor (VDR). *J. Bone Miner. Res.* 2010; 25: 1157-1166.
 - 7) ○Imai Y, Kondoh S, Kouzmenko A, Kato S. Minireview: osteoprotective action of estrogens is mediated by osteoclastic estrogen receptor-alpha. *Mol. Endocrinol.* 2010; 24: 877-885.
 - 8) Chikanishi T, Fujiki R, Hashiba W, Sekine H, Yokoyama A, Kato S. Glucose-induced expression of MIP-1 genes requires O-GlcNAc transferase in monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010; 39: 865-870.
 - 9) ○Takada I, Tsuji N, Youn MY, Fujiyama S, Imai Y, Kato S, et al. Purification and identification of estrogen receptor alpha co-regulators in osteoclasts. *Ann. N Y Acad. Sci.* 2010; 1192: 201-207.
 - 10) Duteil D, Chambon C, Ali F, Kato S, Chambon P, Metzger D, et al. The transcriptional coregulators TIF2 and SRC-1 regulate energy homeostasis by modulating mitochondrial respiration in skeletal muscles. *Cell Metab.* 2010; 12: 496-508.
 - 11) Chambon C, Duteil D, Vignaud A, Kato S, Chambon P, Metzger D, et al. Myocytic androgen receptor controls the strength but not the mass of limb muscles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010; 107: 14327-14332.
 - 12) Miyauchi Y, Ninomiya K, Miyamoto H, Sakamoto A, Kato S, Miyamoto T, et al. The Blimp1-Bcl6 axis is critical to regulate osteoclast differentiation and bone homeostasis. *J. Exp. Med.* 2010; 207: 751-762.
 - 13) Son BK, Akishita M, Iijima K, Takeyama K, Kato S, Ouchi Y, et al. Androgen receptor-dependent transactivation of growth arrest-specific gene 6 mediates inhibitory effects of testosterone on vascular calcification. *J. Biol. Chem.* 2010; 285: 7537-7544.
- ##### 2. 学会発表
- 1) 横田健一、大竹史明、加藤茂明:新規 MR 転写共役因子 p120 の機能解析、第 28 回内分泌代謝学サ

マーセミナー.長崎、2010.7.9

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) Kurotaki N, Imaizumi K, Harada N, Masuno M, Kondoh T, Nagai T, Ohashi H, Naritomi K, Tsukahara M, Makita Y, Sugimoto T, Sonoda T, Hasegawa T, Chinen Y, Tomita Ha HA, Kinoshita A, Mizuguchi T, Yoshiura Ki K, Ohta T, Kishino T, Fukushima Y, Niikawa N, Matsumoto N. Haploinsufficiency of NSD1 causes Sotos syndrome. Nat Genet. 2002; 30: 365-366.

エプレレノンがグルココルチコイドによる血管内皮細胞での酸化ストレス増大と一酸化窒素産生低下を抑制する

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 医療教育学)

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)

血管内皮細胞では GC の不活性化作用を有する 11β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 の発現が低いいため、グルココルチコイドがグルココルチコイド(GC)受容体(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。我々はこれまでに GC による血管内皮細胞での GR ならびに MR の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)の発現および活性化低下を介して血管内皮機能を障害する結果、大腿骨頭壊死症を発症するという病態仮説を提唱してきた。さらに、我々は血管内皮細胞において GR 活性化による酸化ストレスの亢進と eNOS の発現および活性化の低下はピタバスタチンにより抑制されることを報告した。今回の研究ではヒト臍帯静脈血管内皮細胞培養系を用いた検討により、メチルプレドニゾロンによる転写活性の亢進、superoxide 産生の増加、ならびに eNOS の発現と活性化の抑制は、選択的 MR 阻害薬であるエプレレノンにより抑制されることを見出した。スタチンならびに MR 阻害薬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 の活性化は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・活性化減少を惹起し¹⁾²⁾、これらはピタバスタチンにより抑制されることを報告してきた³⁾。

一方、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(mPSL)は GR のみならず、ミネラルコルチコイド受容体(MR)に結合し、その活性化作用を有する。血管内皮細胞では 11β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 (11β -HSD2)の発現がほとんど無い⁴⁾ため、コルチゾールや mPSL は不活性化されず、血管内皮細胞の MR を活性化する可能性がある。

そこで本研究では選択的 MR 阻害薬であるエプレレノンが、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

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC, 三光純薬)を HC 非添加のプレットキット EGM-2 で培養した。

1) mPSL による GR/MR 転写活性亢進に及ぼすエプレレノンの効果

HUVEC に mPSL 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。mPSL 添加の 8 時間前にエプレレノンを 10^{-7} M、 10^{-6} M、 10^{-5} M で添加し、その効果を検討した。

2) mPSL による superoxide 産生亢進に及ぼすエプレレノンの効果

HUVEC に 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 mPSL 添加の 8 時間前にエプレレノン 10^{-5} M を添加しその効果を検討した。

3) mPSL による eNOS 発現・活性化低下に及ぼすエプレレノンの効果

HUVEC に mPSL 10^{-5} M を添加し、ウエスタンブロッティングにより eNOS 発現ならびに Ser1177 リン酸化を検討した。さらに mPSL 添加の 8 時間前にエプレレノン 10^{-7} M、 10^{-6} M を添加しその効果を検討した。

(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) mPSLによるGR/MR転写活性亢進に及ぼすエプレレノンの作用

mPSLによるGR/MR転写活性の亢進はエプレレノンにより濃度依存性に抑制された(図1)。

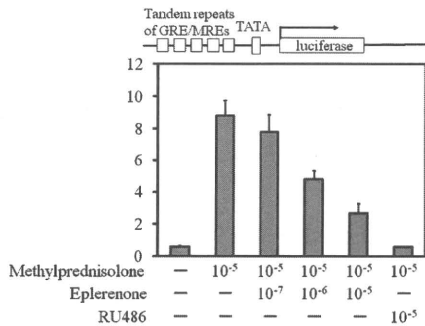


図1. グルコルチコイドによる転写活性亢進はMR阻害により抑制される

2) mPSLによるsuperoxide産生亢進に及ぼすエプレレノンの作用

mPSLによるsuperoxide産生の増加は、エプレレノンにより抑制された(図2)。

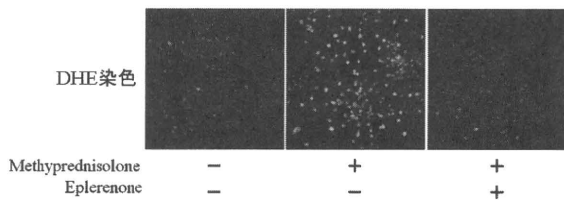


図2. グルコルチコイドによる活性酸素産生の増加はMR阻害により抑制される

3) mPSLによるeNOS発現・活性化低下に及ぼすエプレレノンの作用

mPSLによるeNOSの発現とリン酸化・活性化の抑制は、エプレレノンにより抑制された(図3)。

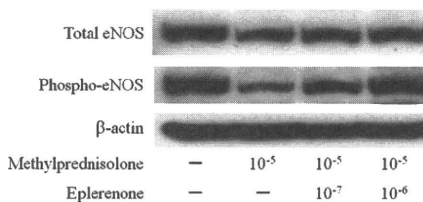


図3. グルコルチコイドによるeNOSの発現と活性化抑制はMR阻害により抑制される

4. 考察

近年、ミネラルコルチコイド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、血管内皮細胞でのMR活性化を介して、superoxide産生を亢進し、さらにNO産生を減少させ、血管内皮障害を惹起する可能性が指摘されている⁴⁾。

今回の我々の検討では、合成GCであるmPSLによるGR/MR転写活性は、選択的MR阻害薬であるエプレレノンにより有意に抑制された。さらにmPSLによる血管内皮細胞でのsuperoxide産生増加やeNOS発現とリン酸化の抑制も、エプレレノンにより抑制された。これらの結果は、mPSLは血管内皮細胞においてMR活性化により酸化ストレス亢進やeNOS発現・活性化の抑制をきたすこと、エプレレノンはその作用を抑制することを示すものである。一方、GRは血管内皮細胞の生存に必須であるため、現時点ではGR阻害薬を臨床応用することは困難であるが、我々はすでにピタバスタチンが、GR活性化による酸化ストレス亢進やeNOS発現・活性化低下を抑制することを見出している³⁾。エプレレノン⁵⁾ならびにピタバスタチンは、すでに循環器診療で広く用いられている薬剤であり、両剤の併用はGRならびにMR活性化による血管内皮細胞機能低下を効果的に改善し、大腿骨頭壊死症の予防・治療薬となる可能性がある(図4)。

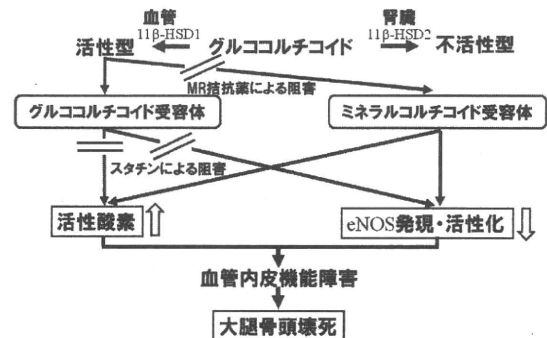


図4. グルコルチコイド誘発性大腿骨頭壊死症の発症機序仮説と予防・治療戦略

5. 結論

グル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。選択的MR阻害薬であるエプレレノンはGC誘発性血管内皮細胞障害を改善することから、ピタバスタチンとともにステロイド性大腿骨頭壊死症の新たな予防・治療薬の候補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. 特発性大腿骨頭壊死症の基本と up to date 病態 8. 実験的研究 ⑥血管内皮障害—nitric oxideの観点から— 久保俊一, 菅野伸彦(編) 金芳堂、東京、2010:141-146.
- 2) Yagi S, Akaike M, Aihara K, Ishikawa K, Iwase T, Ikeda Y, et al. eNOS-independent Protective Action of Statin Against Angiotensin II-induced Atrial Remodeling via Reduced Oxidant Injury. *Hypertension* 2010; 55:918-23.
- 3) Ikeda Y, Aihara K, Akaike M, Sato T, Ishikawa K, Ise T, et al. Androgen-androgen receptor system counteracts doxorubicin-induced cardiotoxicity in male mice. *Mol Endocrinol* 2010; 24:1338-48.
- 4) Yoshida S, Aihara K, Azuma H, Uemoto R, Sumitomo-Ueda Y, Yagi S, et al. Dehydroepiandrosterone sulfate is inversely associated with sex-dependent diverse carotid atherosclerosis regardless of endothelial function. *Atherosclerosis* 2010; 212:310-5.
- 5) Sumitomo-Ueda Y, Aihara K, Ise T, Yoshida S, Ikeda Y, Uemoto R, et al. Heparin Cofactor II protects against angiotensin II-induced cardiac remodeling via attenuation of oxidative stress in mice. *Hypertension* 2010; 56:430-6.
- 6) Ise T, Aihara K, Sumitomo-Ueda Y, Yoshida S, Ikeda Y, Yagi S, et al. Plasma heparin cofactor II activity is inversely associated with left atrial volume and diastolic dysfunction in humans with cardiovascular risk factors. *Hypertens Res* 2010 Nov 25. [Epub ahead of print]
- 7) Aihara K. Heparin cofactor II attenuates vascular remodeling in humans and mice. *Circ J* 2010;74:1518-23.
- 8) Hashizume S, Akaike M, Azuma H, Ishikawa K, Yoshida S, Sumitomo-Ueda Y, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor α in megakaryocytes reduces platelet-derived growth factor-BB in platelets. *J Atheroscler Thromb* 2011; 18:138-47.
- 9) Yagi S, Akaike M, Aihara K, Iwase T, Yoshida S, Sumitomo-Ueda Y, et al. High plasma aldosterone concentration is a novel risk factor of cognitive

impairment in patients with hypertension.

Hypertens Res 2011;34:74-8.

- 10) Aihara K, Ikeda Y, Yagi S, Akaike M, Matsumoto T. Transforming growth factor- β 1 as a common target molecule for development of cardiovascular diseases, renal insufficiency and metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract* 2010; Dec 28;2011:175381.

2. 学会発表

- 1) 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, 他: ピタバスタチンによる血管内皮細胞での一酸化窒素合成酵素の発現亢進作用とその機序の検討, 第33回日本高血圧学会総会, 福岡. 2010.10.15-17
- 2) Akaike M, Aihara K, Ikeda Y, Ishikawa K, Yoshida S, Ueda Y, et al. : Glucocorticoid Excess Causes Vascular Endothelial Cell Dysfunction through Activation of Mineralocorticoid Receptor, International Society of Heart Research 2010. Kyoto. 2010.5.16.

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) 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* 52:957-963, 2009.
- 4) Walker BR. Glucocorticoids and Cardiovascular Disease. *European Journal of Endocrinology* 157: 545-559, 2007.
- 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.

ヒト骨髓内脂肪組織と骨芽細胞の組織培養

北島 将、内橋和芳、河野俊介、馬渡正明
(佐賀大学 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、微小脂肪塞栓などの関与が着目されており、骨髓内脂肪細胞の役割も一つの要因として考えられている。我々は、ヒト骨髓内脂肪細胞の特徴を検討している。今回の研究の目的は、ヒト骨髓内脂肪組織と骨芽細胞とでコラーゲンゲル 3 次元培養を行い、co culture による脂肪細胞の観察を行なうことである。

1. 研究目的

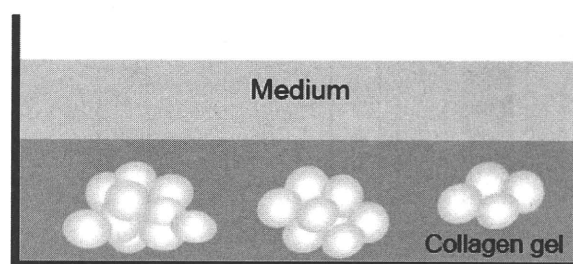
これまで、我々はヒト骨髓および皮下脂肪細胞の天井培養法、骨組織の器官培養法を用いて、ヒト脂肪細胞の特徴を検討してきた。年齢別の接着増殖率の違いでは、女性では高齢ほど接着増殖率が高いことが明らかとなった。ステロイド濃度別では、低濃度投与においては、接着増殖率、未熟脂肪細胞の増加を来し、ステロイド高濃度投与群においては、接着増殖率の低下、脂肪細胞径の増大が起こることなどを明らかにしてきた。このようなヒトでのステロイドに対する反応の差が、特発性大腿骨頭壊死症の発症の有無に関連している可能性がある。

今回は、ヒト骨髓脂肪細胞と骨芽細胞のコラーゲンゲル 3 次元培養を行い、ヒト骨髓脂肪細胞と他細胞との関連を調査し、ヒト骨髓脂肪細胞の特徴を明らかにすることである。

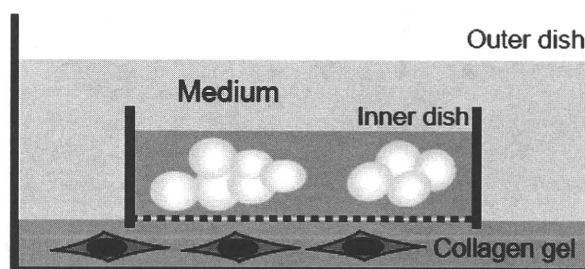
2. 研究方法

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 4 名 (60-71 歳、平均 65.5 歳) の手術時に採取した骨髓組織を洗浄し、可及的に血球成分、脂肪以外の間質細胞を除去した。PBS に入れ、10 分放置したあと、浮遊した脂肪組織を約 0.5mm に細切した。0.1ml の脂肪細胞組織を 1.0ml のコラーゲンゲルに包埋し、培養液を添加し培養した。培養液には Dexamethasone 10 μ m と 20mU/ml の insulin 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。H-E 染色標本により、脂肪組織片から新生する bone marrow stromal cells と脂肪滴を有する細胞を前脂肪細胞 preadipocyte とし前脂

肪細胞の割合を検討した。



Inner dish にヒト脂肪細胞組織 (bone marrow adipose tissue: BMAT) を包埋し、Outer dish に MC3T3-E1 骨芽細胞をそれぞれコラーゲンゲルに包埋し、その間を nitorcellulose membrane で隔て、outer dish に培養液を添加し、co culture を行った。脂肪組織片から新生する bone marrow stromal cells の数を測定した。

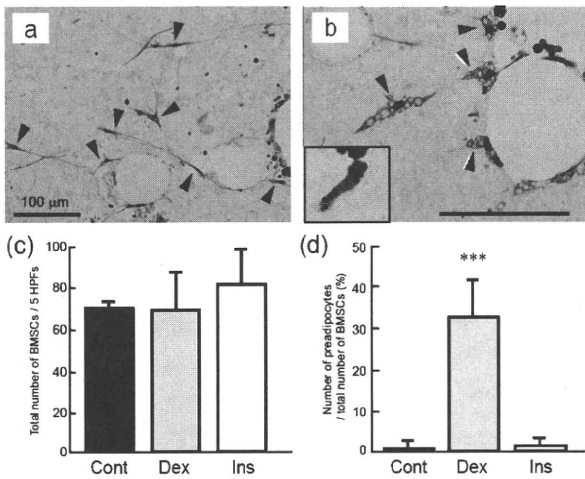


Inner dish : BMAT layer
Outer dish : Osteoblast layer

3. 研究結果

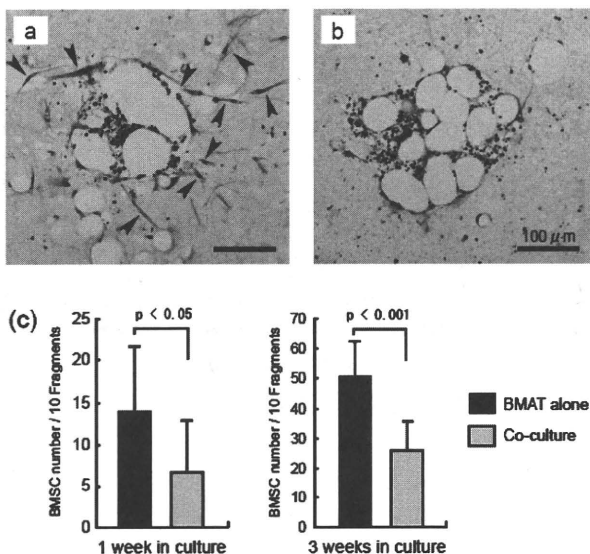
1 週後、脂肪細胞のみの培養では、脂肪細胞組織の周囲に脂肪滴を含まないBMSC が多数確認された(図 1 a,c)。しかし、BMSCの数は Dexametnasone を添加したものとは無添加のものとの差を認めなかった。Dexamethasone を添加した培養液では、脂肪滴を含んだ preadipocyteが増加していた(図 1 b,d)。insulineのみの添加では preadipocyte の数は変化を認めなかった。

図 1



骨芽細胞との co culture の結果を示す(図 2)。骨芽細胞と co culture しない場合は脂肪組織の周囲にBMSC Cが増加するが(図 2 a)、骨芽細胞と co culture した場合はBMSC の増殖が抑制されていることが分かった(図 2 b)。

図 2



4. 考察

脂肪細胞と骨芽細胞の co culture を行った。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BMSCが出現し、これにステロイドを投与すると、BMSC中の前脂肪細胞の比率が増加する。今回の研究では、ヒト骨髄内脂肪細胞のみの場合は、脂肪細胞周囲のBMSCは増殖し、骨芽細胞と co culture した場合はBMCSが抑制されることが分かった。

これまでに、脂肪細胞の天井培養を行い、Dexamethasone により接着増殖率が濃度依存的に変化することを報告した。低濃度では接着増殖率が増加し、高濃度では低下する。この理由として、ステロイド濃度の変化に応じて、脂肪細胞周囲の組織細胞が増殖 phase から分化 phase に切り替わることが考えられた。これに骨芽細胞の存在も、脂質代謝の変化に影響を与えていることが予想される。骨芽細胞の機能が弱ければ脂肪細胞への分化方向へ進みやすいと考えられる。骨芽細胞の機能が低い若年者では骨頭壊死が少なく、低下している高齢者では骨頭壊死が起きやすいことを示唆している可能性がある。

今回の研究はヒト由来の骨芽細胞ではないため、ヒトの個人差を検討するためには更なる培養系の確立が必要である。また、Dexamethasone の濃度による差、及び年齢、性別の差などヒト骨髄内細胞の特徴をさらに調査していく必要がある。

5. 結論

ヒト骨髄内脂肪組織と骨芽細胞とでコラーゲンゲル 3 次元培養を行い、co culture による脂肪細胞の観察を行なった。骨髄内脂肪組織の検討は骨芽細胞による影響も考慮する必要がある。

6. 研究発表

1. 論文発表

Uchihashi K, Aoki S, Shigematsu M, Sugihara H, Hotokebuchi T, Toda S. et al. Organotypic culture of human bone marrow adipose tissue. Pathol Int. 2010 Apr;60(4):259-67.

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) Sugihara H, Yonemitsu N, Miyabara S, Yun K. Primary cultures of unilocular fat cells: characteristics of growth in vitro and changes in differentiation properties. *Differentiation*. 1986; 31: 42-9.
- 2) Sugihara H, Funatsumaru S, Yonemitsu N, Miyabara S, Toda S, Hikichi Y. A simple culture method of fat cells from mature fat tissue fragments. *J Lipid Res*. 1989; 30: 1987-95.
- 3) Toda S, Uchihashi K, Aoki S, et al. Adipose tissue-organotypic culture system as a promising model for studying adipose tissue biology and regeneration. *Organogenesis*. 2009; 5: 43-9.

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ている。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。平成 22 年度は、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞は、IL-1 β 刺激下に於いて、迅速かつ効率的に骨芽細胞へ分化し、wnt5a/ror2 を介するシグナル伝達系が関与することが示された。今後は、治療応用を視野に入れ、モデル動物を用いて骨再生誘導法の確立、ION 治療への応用を目指す。

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、ヒト間葉系幹細胞による破骨細胞分化への影響について検討した。平成 22 年度は、ヒト間葉系幹細胞からの骨芽細胞の誘導系を確立すると共に、そのシグナル伝達を解明する事を目的とした

2. 研究方法

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)。骨芽細胞分化誘導培地に炎症性サイトカインを添加し、RUNX-2、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性、石灰化を指標に骨芽細胞分化を評価した。また、wnt5a や ror2 の siRNA を用いてこれらの遺伝子をノックダウンし、培養

後に mRNA を抽出してシグナル分子の関与を検討した。

3. 研究結果

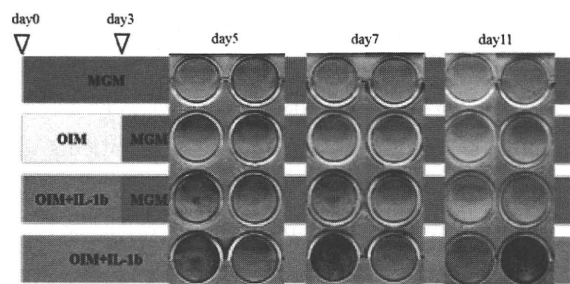
①ヒト間葉系幹細胞は、骨芽細胞分化培地に IL-1 β を添加することで培養 4 日目に ALP 陽性、10 日目でアザリンレッド陽性石灰化が観察された。

②IL-1 β を添加 7 日目では RUNX2, Bone sialoprotein, Osteocalcin 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。しかし、IL-6, TNF- α 、IL-17 ではこのような誘導効果は認めなかった。

③ヒト間葉系幹細胞に IL-1 β を添加すると、Wnt5a と受容体 Ror2 の mRNA 発現が著明に誘導された。

④ヒト間葉系幹細胞の ROR2 を siRNA で発現抑制すると ALP 活性や石灰化は阻害されたことから、IL-1 β による骨芽細胞誘導系には、non-canonical pathway を介すシグナル伝達を示された。

IL-1 β induced ALP and ARS in MSC culture



Stained by ALP (left wells) or alicizarin red S (right).

Sonomoto-K, Oshita-K, Yamaoka K (unpublished)

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。また、その機序は Wnt5a/ROR2 発現誘導およびその下流のシグナル経路が関与していると考えられる。現在、ラット異所性石灰化モデルにおいても MSC 播腫 PLGA の石灰化形成が観察され、骨再生治療の可能性を示す予備的成績を得た。一方、平成 21 年度には、ヒト骨髄由来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 における骨破壊の進行をヒト骨髄由来間葉系幹細胞が阻止できる可能性が示唆された。さらに、IL-1 β 依存的に誘導された骨芽細胞は、RANKL より OPG 産生が優位である可能性も示唆され、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を用いることで、破骨細胞分化・活性化を誘導することなく骨形成を誘導できる可能性が高く、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。ヒト骨髄由来間葉系幹細胞は、IL-1 β 刺激下に於いて、迅速かつ効率的に骨芽細胞へ分化し、wnt5a/ror2 を介するシグナル伝達系が関与することが示された。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) Oshita K, Yamaoka K, Udagawa N, Fukuyo S, Sonomoto K, Maeshima K, Kurihara R, Nakano K, Saito K, Okada Y, Chiba K, Tanaka Y. Human mesenchymal stem cells inhibit osteoclastogenesis through osteoprotegerin production. Arthritis Rheum (in press)
- 2) Nakano K, Yamaoka K, Hanami K, Saito K, Sasaguri Y, Yanagihara N, Tanaka S, Katsuki I, Matsushita S, Tanaka Y. Dopamine induces IL-6-dependent IL-17 production via D1-like receptor on CD4 naïve T-cells and a D1-like receptor antagonist SCH-23390 inhibits cartilage destruction in a human rheumatoid arthritis/SCID mouse chimera model. J Immunol (in press)
- 3) Iwata S, Saito K, Tokunaga M, Yamaoka K, Nawata M, Yukawa S, Hanami K, Fukuyo S, Miyagawa I, Kubo S, Tanaka Y. Phenotypic changes of lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus who are in longterm remission after B cell depletion therapy with rtuximab. J Rheumatol (in press)
- 4) 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 (2010) 49, 1447-1460
- 5) 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 (2010) 37, 512-520
- 6) 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 (2010) 69, 1286-1291
- 7) 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 (2010) 62, 952-959
2. 学会発表
- 1) Y. Tanaka. Clinical development and Phase III studies of tocilizumab. 7th International Congress on Autoimmunity, Ljubljana, Slovenia. 平成 22 年 5 月 5-9 日
- 2) Y Tanaka, M Suzuki, H Nakamura, S Toyoizumi, SH Zwillich. The oral JAK inhibitor tasocitinib (CP-690,550 (CP)) in combination with methotrexate (MTX) is efficacious in a dose-dependent manner in active rheumatoid arthritis (RA). The Annual European Congress of Rheumatology 2010, Rome, Italy. 平成 22 年 6 月 15-19 日
- 3) Y. Tanaka, T. Takeuchi, T. Mimori, N. Miyasaka, T. Koike. The possibility of maintaining low disease activity after discontinuation of infliximab in RA patients: An interim report for the second year of the RRR study. The Annual European Congress of Rheumatology 2010, Roma, Italy, 平成 22 年 6 月 15-19 日
- 4) Tanaka Y. Paradigm shift of the treatment of rheumatoid arthritis by TNF-targeting biologics. The 14th International Congress of Immunology (ICI), Kyoto. 平成 22 年 8 月 22-27 日
- 5) Tanaka Y. B cell depletion in systemic lupus erythematosus. The 14th International Congress of Immunology (ICI), Kyoto, 平成 22 年 8 月 22-27 日
- 6) Y Tanaka, M Harigai, T Takeuchi, H Yamanaka, N Ishiguro, K Yamamoto, TMU Rahman, T Yoshinari, N Miyasaka, T Koike. Golimumab, a Human Anti-TNF α Monoclonal Antibody Administered Subcutaneously Every Four Weeks in Patients with Active Rheumatoid Arthritis Despite Methotrexate Therapy: 24-Week Results of Clinical and Radiographic Assessments. The 74th National Meeting of American College of Rheumatology, Atlanta, USA, 平成 22 年 11 月 6-12 日
- 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、miR-210 の発現細胞は von Willebrand Factor (vWF)や VEGF によって染色され、血管内皮細胞といった血管系細胞であることが示唆された。また低酸素状態下の血管内皮細胞に miR-210 を over-expression させその影響を調べた。miR-210 は用量依存性に作用し低酸素状態下での細胞生存に関与している可能性がある。

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

subject	age	sex	Aetiology of ON	medical illness
ON1	56	male	steroid induced	CMV, 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		CRSII, anemia
OA2	63	female		none
OA3	74	male		CM
OA4	78	female		HT, HL, RD
OA5	73	female		HT, HL
OA6	63	female		DM, HL
OA7	53	female		HT
OA8	71	Female		cerebral infarction
OA9	76	female		HT
OA10	66	female		none

CRSII-Complete right bundle branch block HT-hypertension HL-hyperlipidemia
RD-renal dysfunction CM-obstructive ventilatory impairment DM-Diabetes mellitus
PE-pulmonary embolism SLE-systemic lupus erythematosus RA-rheumatoid arthritis

表 1: 臨床的背景

ON 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。ON 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

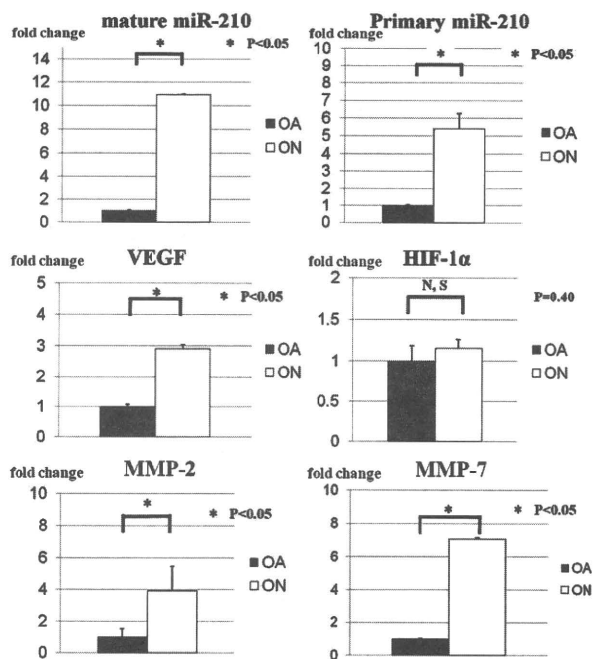


図1 Real-time PCR による定量評価

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。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-1 α では両群間に有意差は認められなかった。

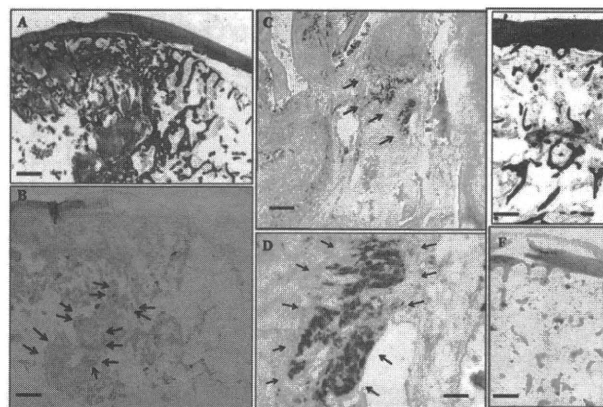


図2 組織学的評価 (HE 染色、ISH)

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 2A:HE 染色、図 2B-D:ISH)。OA 組織では mature miR-210 の発現は認められなかった(図 2E:HE 染色、図 2F:ISH)。黒矢印は mature miR-210 発現細胞。

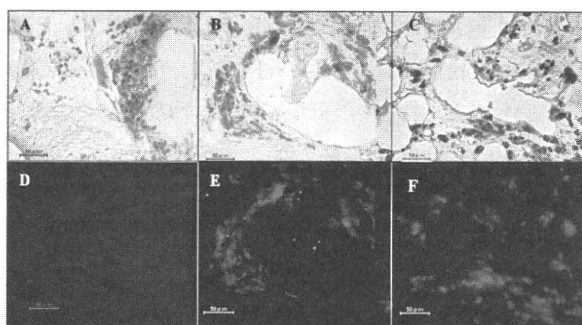


図3 組織学的評価 (免疫染色、ISH)

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(図 3A-C: ISH、図 3D: osteocalcin、E: VEGF、F: vWF)。

Group	route of transfection	transfected dose
Group A	control siRNA(-)	(-)
Group B	control siRNA(+)	40 nM/well
Group C	over-expression of miR-210	5 nM/well
Group D	over-expression of miR-210	20 nM/well
Group E	over-expression of miR-210	40 nM/well

表2 miR-210 の over-expression モデル

そこでわれわれは低酸素下での血管内皮細胞における miR-210 の機能評価を行うべく。表2の如く血管内皮細胞 (HUVEC; Human umbilical vein endothelial cells) に miR-210 を over-expression し低酸素状態(0.5% O₂)にしたところ、24 時間では酸素正常状態と低酸素状態では明らかな差は認められなかったが、48 時間モデルでは 20nM および 40nM over-expression させた群、72 時間モデルでは 40nM over-expression させた群のみ低酸素状態で生存することができなかった(図4)。

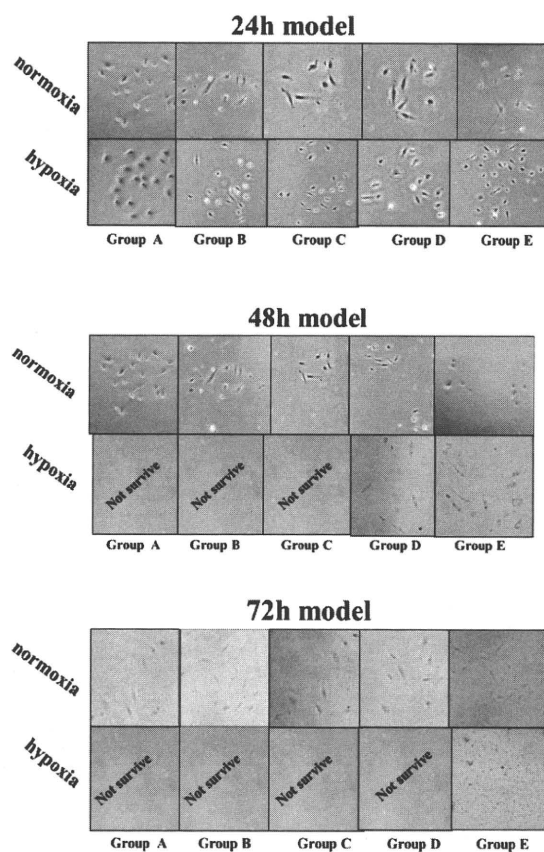


図4 HUVEC への miR-210 over-expression

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、骨壊死に関わっている可能性があり、今回我々は ON 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。

また低酸素状態下の HUVEC に miR-210 を over-expression させると、用量依存性に作用し低酸素状態下の細胞生存に関与している可能性が示唆され、miR-210 が治療ターゲットになりうると思われる。

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。また miR-210 は血管内皮細胞をターゲットにした治療に有用であると思われる。

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) 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.