

- C-telopeptide in patients with rapidly destructive osteoarthritis of the hip. *Int Orthop*. 2005; 29: 1-5.
- 15) Garnero P, Conrozier T, Christgau S, Mathieu P, Delmas PD, Vignon E. Urinary type II collagen C-telopeptide levels are increased in patients with rapidly destructive hip osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2003; 62: 939-43.
- 16) 坂井孝司、阿部裕仁、安藤渉、高尾正樹、西井孝、原口圭司、三木秀宣、李勝博、大園健二、吉川秀樹、菅野伸彦. 大腿骨頭軟骨下骨折、急速破壊型股関節症の組織学的検討 特発性大腿骨頭壊死症との比較. 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診断・治療・予防法の開発を目的とした全国学際的研究 平成 22 年度総括・分担報告書;94-6.

股関節疾患における関節液中骨軟骨代謝マーカー

山口亮介、山本卓明、本村悟朗、中島康晴、馬渡太郎、糸川高史、池村聡、岩崎賢優、趙嘎日達、岩本幸英
(九州大学 整形外科)

特発性大腿骨頭壊死症 (ION)、臼蓋形成不全に続発した変形性股関節症 (OA)、急速破壊型股関節症 (RDC) は関節症進行時の臨床像や経過が異なり、各疾患で骨代謝、軟骨代謝が異なっている可能性が考えられる。そこで、当施設にて手術中に採取した ION 群 70 例、OA 群 20 例、RDC 群 21 例の関節液中における骨代謝マーカー (BAP、TRACP-5b)、軟骨代謝マーカー (MMP-3、ケラタン硫酸) を比較検討した。ION 群は他疾患と比較して、BAP、MMP-3、ケラタン硫酸が有意に高値であった。RDC 群は他疾患と比較して TRACP-5b が有意に高値であったが、OA 群はいずれもが低値であった。一方 ION 群内の stage ごとの比較では、BAP が stage 3A、3B に比較して stage 4 では有意に低下していた。各疾患における人工関節症例のみの比較では、BAP に群間差は認められなかったが、他項目は全体の結果と同様の結果であった。関節液中骨代謝、軟骨代謝マーカーの違いが、各疾患の関節症進行の病態を表す一つの指標であると考えられた。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症 (ION) では、骨頭壊死骨の圧潰を起因として数か月～数年で関節症が進行する一方、臼蓋形成不全に続発した変形性股関節症 (OA) では、関節軟骨の摩耗、変性により数年～数十年かけて関節症が進行し、急速破壊型股関節症 (RDC) では関節破壊像を呈し、数週～数か月で急速に関節症が進行する。各股関節疾患では関節症進行の病態における骨代謝、軟骨代謝が異なっている可能性が考えられる。

本研究の目的は、各股関節疾患の関節液を用いて骨代謝、軟骨代謝マーカーを比較検討することである。

2. 研究方法

2008 年 10 月から 2010 年 6 月の間に、当施設で手術を施行し、関節液を採取できた ION 群 70 例 (平均年齢 47 歳、男性 43 例女性 27 例)、OA 群 20 例 (平均年齢 56 歳、男性 2 例女性 18 例)、RDC 群 21 例 (平均年齢 70 歳、男性 2 例女性 19 例) を対象とした。手術内容は、ION 群が骨切り術 30 例 (前方回転骨切り 29 例、後方回転骨切り 1 例)、人工物置換 40 例 (人工骨頭置換 29 例、人工関節置換 11 例) であり、OA 群が骨切り術 7 例 (全例寛骨臼移動術)、人工物置換 13 例 (全例人工関節置換)、RDC 群は全例人工関節置換が行われた。

関節液は、手術時に関節包内に注射器を刺入して採

取し、12000rpm で 5 分間遠心分離を行い、血球成分を除いて -80℃ で凍結保存した。保存した関節液を生理食塩水で 3 倍、10 倍、100 倍、1000 倍に希釈し、各検査試薬に適した希釈液を用いて測定した。

調査項目は、骨代謝マーカーとして、骨形成マーカーである骨型アルカリフォスファターゼ (BAP)、破骨細胞活性マーカーである酒石酸耐性酸性フォスファターゼ (TRACP-5b) を測定した。また軟骨代謝マーカーとして、軟骨破壊マーカーである軟骨基質破壊酵素 MMP-3、軟骨分解産物であるケラタン硫酸を測定した。

各項目を One-way ANOVA で検定し、各群間は Tukey-Kramer HSD test による多重比較を行った。

3. 研究結果

BAP は、OA 群、RDC 群より ION 群が有意に高値であった (図 1)。TRACP-5b は、ION 群、OA 群より RDC 群が有意に高値であった (図 2)。MMP-3、ケラタン硫酸は、OA 群、RDC 群より ION 群が有意に高値であった (図 3, 4)。

一方 ION 群内の stage ごとの比較では、BAP が stage 3A、3B に比較して stage 4 では有意に低下していたが、他項目は有意な差が認められなかった。各疾患における人工関節症例のみの比較では、BAP に群間差は認められず、他項目は全体結果と同様であった (図 5-8)。

図1 BAP

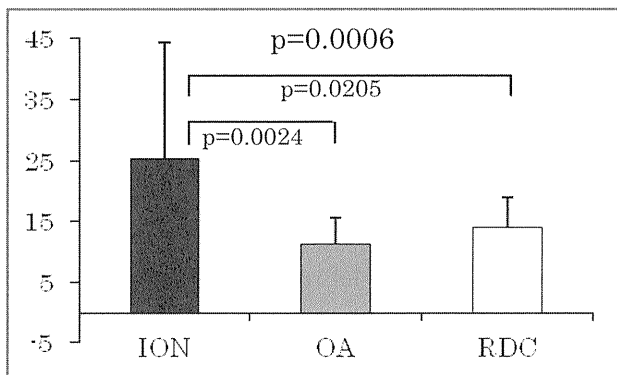


図5 人工関節症例におけるBAP

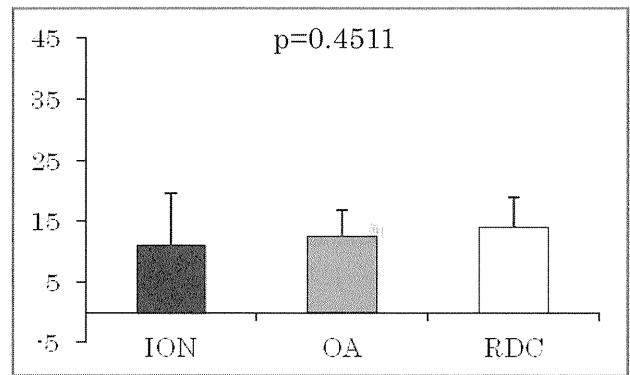


図2 TRACP-5b

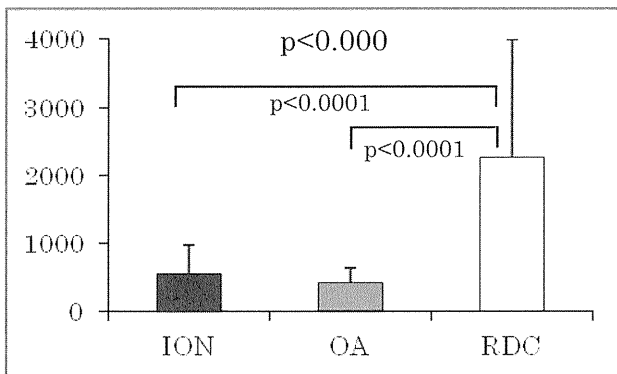


図6 人工関節症例におけるTRACP-5b

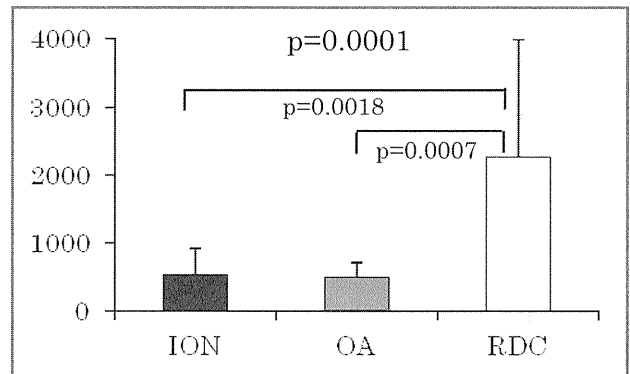


図3 MMP-3

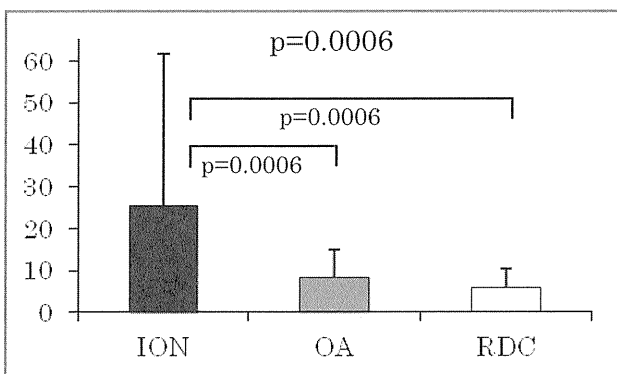


図7 人工関節症例におけるMMP-3

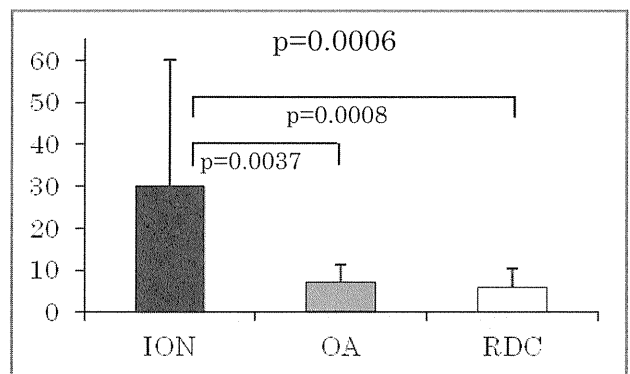


図4 ケラタン硫酸

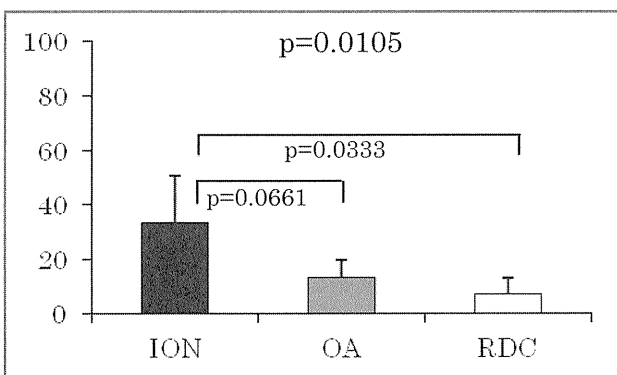
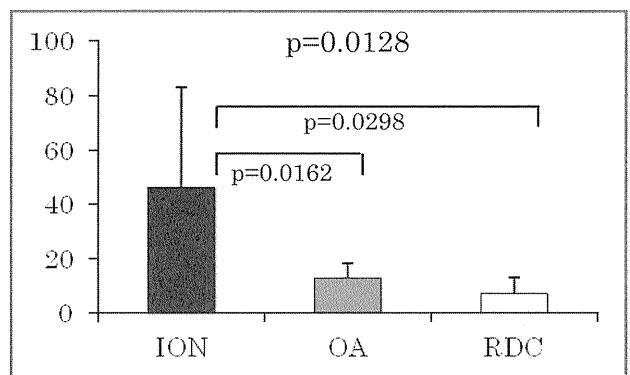


図8 人工関節症例におけるケラタン硫酸



4. 考察

本研究において、ION 群では骨形成方向の骨代謝が認められたが、比較的強い軟骨代謝も同時に認められた。一方 OA 群は、骨代謝、軟骨代謝とも相対的に低値であった。ION は骨頭壊死骨の圧潰を起因として関節症が進行し、OA は軟骨の摩耗変性により関節症が進行する。大腿骨頭壊死症と変形性股関節症の関節液中軟骨代謝マーカーに関しては、C 末端 type II procollagen、MMP-3 が大腿骨頭壊死症で高値であったという報告¹⁾や、ケラタン硫酸が大腿骨頭壊死症で高値であったという報告²⁾がある。本研究でも同様の結果であり、進行した症例でも同じ傾向であった。関節症進行という観点からは、ION と OA の軟骨代謝の違いも臨床経過の違いに関与している可能性が示唆される。

RDC 患者では OA 患者と比較して、血清中、関節滑膜中 MMP-3、-9 が高値であったと報告されている³⁾。本研究では、RDC 群、OA 群ともに軟骨代謝は低値であり両群で明らかな差は認められなかったが、RDC 群は破骨細胞活性が非常に高値であった。RDC は骨頭や臼蓋の急速な破壊像を呈して関節症が進行する疾患であるが、その進行には軟骨代謝だけでなく、破骨細胞活性が関与している可能性が示唆される。

大腿骨頭壊死症の関節液中軟骨代謝マーカーに関する報告で、MMP-3 や TIMP-1 は後期 stage よりも初期 stage の方が高値であり、早期 stage における骨切り術が重要であることが報告されている⁴⁾。本研究における ION 群内の stage ごとの比較では、軟骨代謝マーカーに有意な群間差は認められなかったが、骨形成マーカー BAP は stage 3B までは保たれ、stage 4 では低下するという結果であった。骨切り術を考慮する際や骨頭のリモデリングを期待する症例では、早期に手術を行う重要性を示唆する結果であると考えられた。

本研究では、ION 群や OA 群には複数 stage の症例が含まれており、全体の群間差に影響している可能性が考えられる。そこで人工関節症例のみに限定して各群を比較検討した結果、BAP は群間差が認められなかったが、他項目は全体の群間差と同様の傾向であった。これらの結果から、人工関節が必要な股関節終末像は各疾患で異なり、関節液中骨代謝、軟骨代謝が関節症進行の病態に関与している可能性が示唆された。

5. 結論

ION、OA、RDC において関節液中骨代謝、軟骨代謝マーカーは各疾患で異なり、関節症進行の病態を表す

一つの指標であると考えられた。

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura G, Ikemura S, Iwamoto Y. MRI-detected Double Low-Intensity Bands in Osteonecrosis of the Femoral Head. *J Orthop Sci.* 2011 Jul;16(4):471-5
- 2) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura T, Ikemura S, Iwamoto Y. Effects of an Antiplatelet Drug on the Prevention of Steroid-Induced Osteonecrosis in Rabbits. *Rheumatology (Oxford).* 2011 Jul 8 in press
- 3) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura T, Ikemura S, Iwamoto Y. Incidence of Non-Traumatic Osteonecrosis of the Femoral Head in the Japanese Population. *Arthritis Rheum.* 2011 Oct;63(10):3169-73.

2. 学会発表

- 1) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura G, Ikemura S, Iwasaki K, Zhao G, Iwamoto Y. Effects of an Antiplatelet Agent on the Prevention of Steroid-Induced Osteonecrosis in Rabbits. *ORS Annual meeting 2011. January 13-16, 2011, Long Beach, CA, USA*
- 2) 山口亮介、山本 卓明、本村 悟朗、池村聡、岩崎賢優、趙ガリダ、岩本幸英: ステロイド性骨壊死家兎モデルにおける抗血小板薬の骨壊死発生予防効果. 第 84 回日本整形外科学会学術総会 2011.5.12-15 横浜.
- 3) 山口亮介、山本卓明、中島康晴、馬渡太郎、糸川高史、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、岩本幸英: 一過性大腿骨頭萎縮症の骨頭内発生部位. 第 84 回日本整形外科学会学術総会 2011.5.12-15 横浜.
- 4) 山口亮介、山本卓明、中島康晴、馬渡太郎、糸川高史、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、岩本幸英: 一過性大腿骨頭萎縮症における骨髄浮腫像の発生部位. 第 121 回西日本整形・災害外科学会学術集会 2011.6.11,12 福岡
- 5) 山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、趙ガリダ、岩本幸英: 成熟度の異なる家兎におけるステロイド性骨壊死発生率の差. 第 38 回日本股関節学会 2011.10.7,8 鹿児島

- 6) 山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、趙ガリダ、岩本幸英: 家兎における抗血小板薬のステロイド性骨壊死発生抑制効果. 第 38 回日本股関節学会 2011.10.7,8 鹿児島
- 7) 山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、趙ガリダ、岩本幸英: 未成熟及び成熟家兎におけるステロイド性骨壊死の検討. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会 2011.10.20,21 群馬
- 8) 山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、趙ガリダ、岩本幸英: 抗血小板薬によるステロイド性骨壊死予防効果の検討. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会 2011.10.20,21 群馬
- 9) 山口亮介、山本卓明、中島康晴、馬渡太郎、糸川高史、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、岩本幸英: 一過性大腿骨頭萎縮症の MRI における骨髄浮腫像の検討. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会 2011.10.20,21 群馬

Lark MW, Sugioka Y, Iwamoto Y. Markers of joint tissue turnover in joint fluids from hips with osteonecrosis of the femoral head. J Orthop Res. 2000 Sep;18(5):728-33.

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) Iwase T, Hasegawa Y, Ishiguro N, Ito T, Iwasada S, Kitamura S, Iwata H. Synovial fluid cartilage metabolism marker concentrations in osteonecrosis of the femoral head compared with osteoarthritis of the hip. J Rheumatol. 1998 Mar;25(3):527-31.
- 2) Kato S, Yamada H, Terada N, Masuda K, Lenz ME, Morita M, Yoshihara Y, Henmi O. Joint biomarkers in idiopathic femoral head osteonecrosis: comparison with hip osteoarthritis. J Rheumatol. 2005 Aug;32(8):1518-23.
- 3) Masuhara K, Nakai T, Yamaguchi K, Yamasaki S. Significant increases in serum and plasma concentrations of matrix metalloproteinases 3 and 9 in patients with rapidly destructive osteoarthritis of the hip. Arthritis Rheum. 2002 Oct;46(10):2625-31.
- 4) Jingshi S, Lohmander LS, Shinmei M, Hoerrner LA,

大腿骨頭壊死症と変形性股関節症における関節液中骨軟骨代謝マーカー

山口亮介、山本卓明、本村悟朗、中島康晴、馬渡太郎、糸川高史、池村聡、岩崎賢優、趙嘎日達、岩本幸英
(九州大学 整形外科)

変形性股関節症では関節軟骨の摩耗、変性により数年～数十年かけて病態が進行する一方、大腿骨頭壊死症では圧潰を起因として数か月～数年で進行する。両疾患では骨代謝、軟骨代謝の病態が異なっている可能性が考えられる。そこで当施設にて手術中に採取した関節液を用いて、両疾患における骨代謝、軟骨代謝マーカーを比較検討した。骨代謝マーカー(BAP、TRACP)、軟骨代謝マーカー(MMPs、ケラタン硫酸等)とも、大腿骨頭壊死症において高値であった。大腿骨頭壊死症では圧潰を起因として、骨代謝だけでなく軟骨代謝も亢進し、関節破壊が進行している可能性が示唆された。

1. 研究目的

臼蓋形成不全に続発する変形性股関節症では、関節軟骨の摩耗、変性により数年～数十年かけて病態が進行する一方、特発性大腿骨頭壊死症では、圧潰を起因として数か月～数年で進行する。両疾患では関節症進行時における骨代謝、軟骨代謝の病態が異なっている可能性が考えられる。

本研究の目的は、特発性大腿骨頭壊死症と変形性股関節症の関節液中における骨代謝・軟骨代謝マーカーを比較検討することである。

2. 研究方法

Stage 3Aもしくは3Bの特発性大腿骨頭壊死症に対して手術を施行された24例(ON群)と初期～末期の変形性股関節症に対して手術を施行された17例(OA群)を対象とした。関節液は、手術時に関節包を展開した上で、関節包内に注射器を刺入して採取した。採取した関節液は12000rpmで5分間遠心分離を行い、沈殿した血球成分を除いて-80℃で保存した。保存した関節液を生理食塩水で3倍、10倍、100倍、1000倍に希釈し、検査試薬に適した希釈液を用いて測定した。

骨代謝マーカーとして、骨形成マーカーである骨型アルカリフォスファターゼ(BAP)、破骨細胞マーカーである酒石酸耐性酸性フォスファターゼ(TRACP)を測定した。また軟骨代謝マーカーとして、軟骨破壊マーカーである Matrix Metalloproteinase-3, -9 (MMP-3、MMP-9)、軟骨分解産物であるケラタン硫酸、コンドロイ

チン硫酸(C6S)を測定した。測定には市販されている各ELISA kitを用いた。

3. 研究結果

骨代謝マーカーであるBAP、TRACPともにON群が有意に高値であった(図1、2)。

軟骨代謝マーカーは、MMP-3、ケラタン硫酸、コンドロイチン硫酸がONにおいて有意に高値であった(図3、5、6)。MMP-9は有意な差は見られなかった(図4)。

図1 BAP

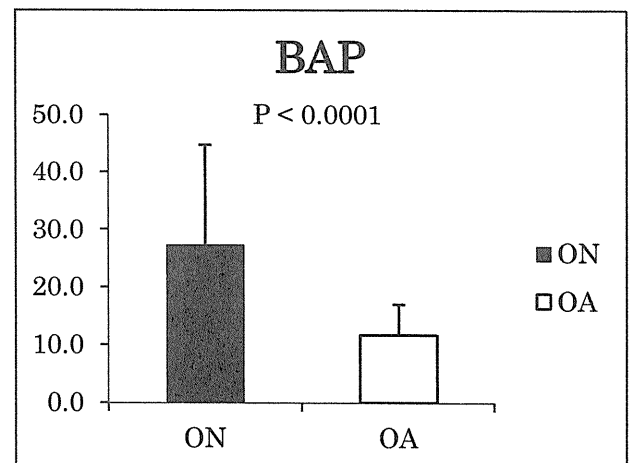


図 2 TRACP

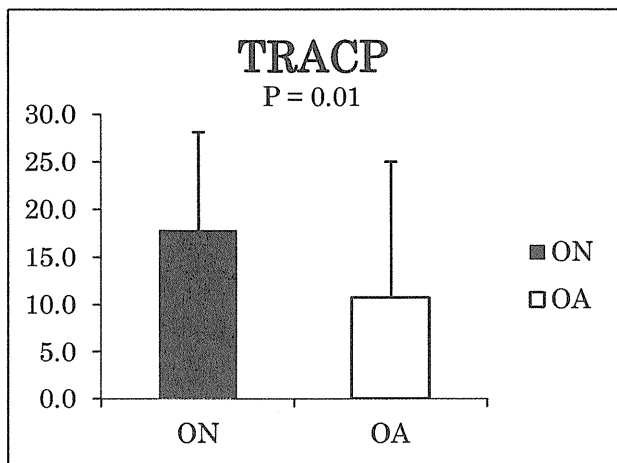


図 5 ケラタン硫酸

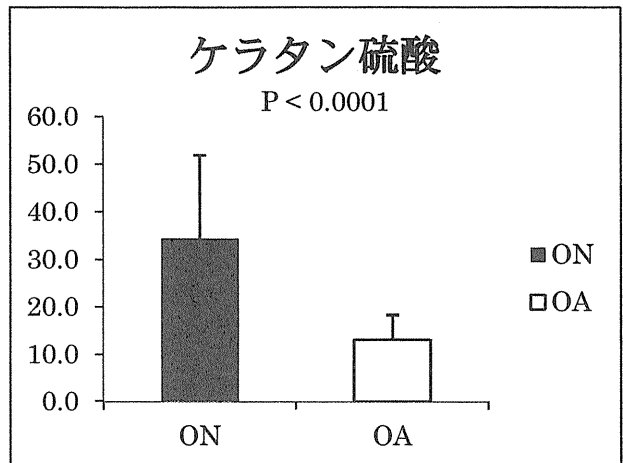


図 3 MMP-3

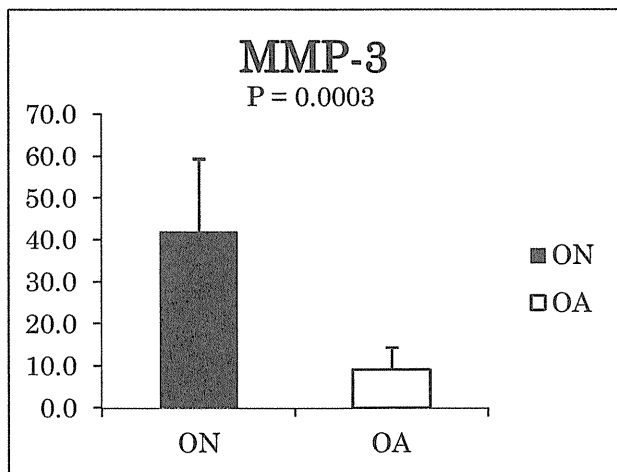


図 6 コンドロイチン硫酸

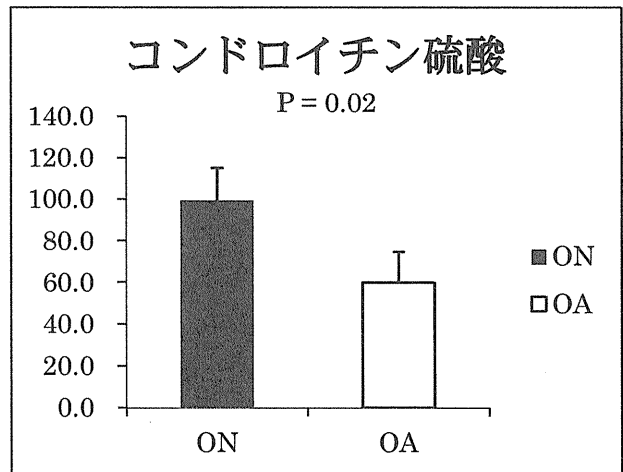
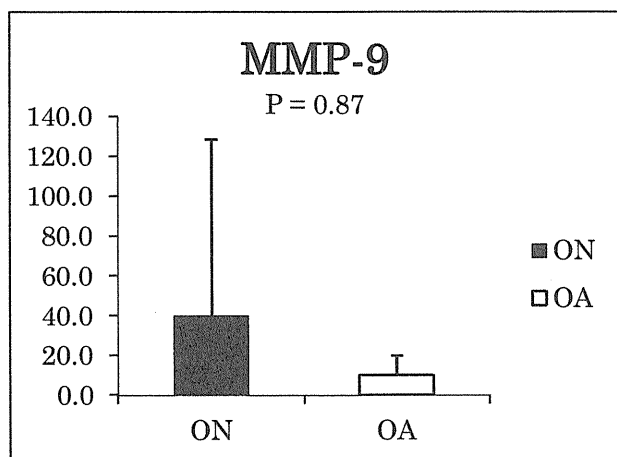


図 4 MMP-9



4. 考察

大腿骨頭壊死症と変形性股関節症の関節液中軟骨代謝マーカーに関する報告では、C 末端 type II procollagen、MMP-3 が大腿骨頭壊死症で高値であったという報告¹⁾や、ケラタン硫酸が大腿骨頭壊死症で高値であったという報告²⁾がある。本研究においても、MMP-3、ケラタン硫酸、コンドロイチン硫酸が ON 群で高値であり、過去の報告と同様であった。大腿骨頭壊死症は変形性関節症と比較して、より軟骨代謝マーカーが高値であると考えられる。

一方、関節液中骨代謝マーカーに関しては、大腿骨頭壊死症と変形性股関節症の比較に関する報告は認められていないが、本研究では、骨形成マーカー、破骨細胞マーカーとも ON 群が有意に高値であった。骨折治癒過程などで骨代謝回転が亢進した状態では、両マーカーとも高値であることが知られており³⁾、特発性大腿骨頭壊死症では軟骨代謝に加え、骨代謝回転も亢

進していると考えられた。骨代謝、軟骨代謝の差が特発性大腿骨頭壊死症と変形性股関節症の関節症進行の違いに関与している可能性がある。

5. 結論

特発性大腿骨頭壊死症は臼蓋形成不全に続発する変形性股関節症に比べ、骨代謝、軟骨代謝マーカーとも高値であった。

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura G, Ikemura S, Iwamoto Y. MRI-detected Double Low-Intensity Bands in Osteonecrosis of the Femoral Head. *J Orthop Sci.* 2011 Jul;16(4):471-5
- 2) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura T, Ikemura S, Iwamoto Y. Effects of an Antiplatelet Drug on the Prevention of Steroid-Induced Osteonecrosis in Rabbits. *Rheumatology (Oxford).* 2011 Jul 8 in press
- 3) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura T, Ikemura S, Iwamoto Y. Incidence of Non-Traumatic Osteonecrosis of the Femoral Head in the Japanese Population. *Arthritis Rheum.* 2011 Oct;63(10):3169-73.

2. 学会発表

- 1) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura G, Ikemura S, Iwasaki K, Zhao G, Iwamoto Y. Effects of an Antiplatelet Agent on the Prevention of Steroid-Induced Osteonecrosis in Rabbits. *ORS Annual meeting 2011.* January 13-16, 2011, Long Beach, CA, USA
- 2) 山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、趙ガリダ、岩本幸英: ステロイド性骨壊死家兎モデルにおける抗血小板薬の骨壊死発生予防効果. 第84回日本整形外科学会学術総会 2011.5.12-15 横浜.
- 3) 山口亮介、山本卓明、中島康晴、馬渡太郎、糸川高史、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、岩本幸英: 一過性大腿骨頭萎縮症の骨頭内発生部位. 第84回日本整形外科学会学術総会 2011.5.12-15 横浜.
- 4) 山口亮介、山本卓明、中島康晴、馬渡太郎、糸川高史、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、岩本幸英:

一過性大腿骨頭萎縮症における骨髄浮腫像の発生部位. 第121回西日本整形・災害外科学会学術集会 2011.6.11,12 福岡

- 5) 山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、趙ガリダ、岩本幸英: 成熟度の異なる家兎におけるステロイド性骨壊死発生率の差. 第38回日本股関節学会 2011.10.7,8 鹿児島
- 6) 山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、趙ガリダ、岩本幸英: 家兎における抗血小板薬のステロイド性骨壊死発生抑制効果. 第38回日本股関節学会 2011.10.7,8 鹿児島
- 7) 山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、趙ガリダ、岩本幸英: 未成熟及び成熟家兎におけるステロイド性骨壊死の検討. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会 2011.10.20,21 群馬
- 8) 山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、趙ガリダ、岩本幸英: 抗血小板薬によるステロイド性骨壊死予防効果の検討. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会 2011.10.20,21 群馬
- 9) 山口亮介、山本卓明、中島康晴、馬渡太郎、糸川高史、本村悟朗、池村聡、岩崎賢優、岩本幸英: 一過性大腿骨頭萎縮症のMRIにおける骨髄浮腫像の検討. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会 2011.10.20,21 群馬

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) Iwase T, Hasegawa Y, Ishiguro N, Ito T, Iwasada S, Kitamura S, Iwata H. Synovial fluid cartilage metabolism marker concentrations in osteonecrosis of the femoral head compared with osteoarthritis of the hip. *J Rheumatol.* 1998 Mar;25(3):527-31.
- 2) Kato S, Yamada H, Terada N, Masuda K, Lenz ME, Morita M, Yoshihara Y, Henmi O. Joint biomarkers in idiopathic femoral head osteonecrosis: comparison with hip osteoarthritis. *J Rheumatol.* 2005 Aug;32(8):1518-23.

- 3) Cox G, Einhorn TA, Tzioupis C, Giannoudis PV.
Bone-turnover markers in fracture healing. J Bone
Joint Surg Br. 2010 Mar;92(3):329-34.

股関節疾患における大腿骨頭の組織学的検討

—特発性大腿骨頭壊死症との比較—

坂井孝司、西井孝、高尾正樹、阿部裕仁、安藤渉、田村理、中村宣雄、大園健二、菅野伸彦
(大阪大学大学院医学研究科 整形外科)

大腿骨頭軟骨下骨折では組織学的に軟骨下骨梁骨折周囲の仮骨に沿って、関節リウマチでは関節軟骨下骨梁に沿って TRAP 陽性細胞を認めた。急速破壊型股関節症では軟骨下領域に TRAP 陽性細胞の集簇を認め、また RANKL は骨梁にそった lining cell や線維組織内の細胞に多く発現し、骨破壊に関与している可能性が示唆された。

1. 研究目的

骨脆弱性素因を有さない例も含めた骨頭下軟骨下骨折(SFFH)は、軽微な外傷あるいは誘因なく発症し、MRI で骨頭荷重部に局所的異常信号領域や骨頭内浮腫像を認めると報告され、骨頭壊死症の鑑別疾患の一つとなっている^{1)~4)}。

一方 Postel らは6-12か月で股関節の破壊が進行し、激しい股関節痛をきたす疾患群を急速破壊型股関節症(RDC)として報告した⁵⁾。RDC は大腿骨頭壊死症の鑑別診断の一つで、種々の mechanical factor やサイトカインとの関わりが報告されている^{6)~10)}。何らかの initial episode に引き続き osteoclast が活性化し骨破壊に関わっている。

本研究の目的は、昨年度に引き続き SFFH, RDC のみならず関節リウマチ(RA)も含めた股関節疾患について、大骨頭組織を対象に、主に HE 染色以外の組織学的な特徴を明らかにすることである。

2. 研究方法

対象は、SFFH10 関節、RDC45 関節、RA12 関節と前回よりも症例数が増加し、これまでに報告してきた ION51 関節¹¹⁾と比較した。大腿骨頭組織を作成し、HE, TRAP 染色を行い TRAP 陽性細胞の分布や集簇の有無について調査した。40 倍の視野で 50 個以上の TRAP 陽性細胞を認めた場合集簇とした。また抗 RANKL, MMP-9, CD-68 抗体による免疫染色を行った。

3. 研究結果

肉眼的所見では、SFFH で軟骨下骨梁の骨折、RDC では関節面の著明な破壊と線維性肉芽組織、RA では関節面に存在する線維性肉芽組織、ION では修復領域で区画された黄色調の壊死領域が認められた。HE 染色所見について、SFFH では軟骨下骨梁の骨折とその周囲に仮骨形成を認めたが、ION と異なり壊死領域が存在しなかった。また周囲に bone marrow edema を認め、軟骨は残存していた。RDC では関節面の広範な骨梁破壊と線維性肉芽組織、ION では壊死、修復、正常領域に区画されていた。

TRAP 染色では、SFFH で TRAP 陽性細胞は、軟骨下骨梁骨折周囲に存在する仮骨周囲にそって存在した。陽性細胞は多核細胞が多く osteoclast と思われた。RDC では、TRAP 陽性細胞は、軟骨下領域の線維性組織・骨梁周囲に集簇し、陽性細胞について、多核細胞は osteoclast と思われたが、単核細胞も多く存在した。TRAP 陽性細胞は SFFH10 例中 8 例に存在したが、集簇は認めなかった。RA では 12 例中 11 例(92%)に TRAP 陽性細胞が存在し、そのうち 3 例に集簇を認めた。RDC では 35 例(78%)で TRAP 陽性細胞の集簇を認め、特徴的であった。なお ION では全例に TRAP 陽性細胞を認めたが、集簇は認めなかった。

免疫染色について、SFFH 例では、10 例中 RANKL 陽性は 2 例(20%)で、MMP-9, CD68 の発現を破骨細胞と思われる多核細胞に各々 7 例、10 例で認めた。RA では 3 例(25%)で RANKL の発現を認め、MMP-9, CD68

の発現を各々11例(92%)、12例(100%)に認めた。RDCでは35例(78%)でRANKLの発現を認め、MMP-9、CD68の発現を41例(93%)に認めた。なおIONではRANKLの発現をStage3B1例に、MMP-9、CD68の発現を10例(20%)に認めたのみであった。

4. 考察

HE所見では、SFFHでは軟骨下骨梁の骨折とその周囲に仮骨形成を認めたが、壊死領域が存在せず山本らの報告¹²⁾と同様の所見であった。軟骨は残存していた。RAでは関節面に対する線維性肉芽組織の侵入、RDCでは関節面の広範な骨梁破壊と線維性肉芽組織、IONでは壊死、修復、正常領域に区画され、鑑別可能であった。

TRAP陽性細胞の集簇については以前に発表したOA、RA、大腿骨頸部骨折との比較¹³⁾でもRDCで特徴的であった。TRAP陽性細胞は、RA滑膜において関節軟骨の破壊を誘導する可能性が報告されており¹⁴⁾、RDCでも軟骨下領域に集簇を認め、骨破壊に関与している可能性があった。

RANKLはRAの骨破壊に関与しており、破骨細胞の前駆細胞表面のRANKと結合し破骨細胞分化を促進するといわれている。RDC例でも骨梁周囲や線維性組織内に多く発現し、骨破壊に関与している可能性が示唆された。

5. 結論

SFFHでは軟骨下骨梁骨折周囲の仮骨に沿って、RAでは軟骨下骨梁に沿ってTRAP陽性細胞を認めた。RDCでは軟骨下領域にTRAP陽性細胞の集簇を認め、またRANKLは骨梁にそったlining cellや線維組織内の細胞に多く発現し、骨破壊に関与している可能性が示唆された。

6. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 坂井孝司 西井孝 高尾正樹 阿部裕仁 安藤渉 田村理 中村宣雄 大園健二 吉川秀樹 菅野伸彦 大腿骨頭軟骨下骨折と急速破壊型股関節症の組織学的検討 第38回日本股関節学会(平成23年10月7日・8日鹿児島)

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得

該当なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

8. 参考文献

- 1) Song WS, Yoo JJ, Koo KH, Yoon KS, Kim YM, Kim HJ. Subchondral fatigue fracture of the femoral head in military recruits. J Bone Joint Surg Am 86-A: 1917-24, 2004.
- 2) Kim JW, Yoo JJ, Min BW, Hong SH, Kim HJ. Subchondral fracture of the femoral head in healthy adults. Clin Orthop Relat Res 464:196-204, 2007.
- 3) Yamamoto T, Nakashima Y, Shuto T, Jingushi S, Iwamoto Y. Subchondral insufficiency fracture of the femoral head in young adults. Skeletal Radiol 36:S38-42, 2007.
- 4) Ishihara K, Miyanishi K, Ihara H, Jingushi S, Torisu T. Subchondral insufficiency fracture of the femoral head may be associated with hip dysplasia: a pilot study. Clin Orthop Relat Res 468:1331-5, 2010.
- 5) Postel M and Kerboull M. Total prosthetic replacement in rapidly destructive arthrosis of the hip joint. Clin Orthop Relat Res 72:138-144, 1970.
- 6) Komiya S, Inoue A, Sasaguri Y, Minamitani K, Morimatsu M. Rapidly destructive arthropathy of the hip. Studies on bone resorptive factors in joint fluid with a theory of pathogenesis. Clin Orthop Relat Res 284:273-82, 1992.
- 7) Tamai M, Sagawa K, Kawabata R, Inoue A, Itoh K. Production of IL-6 by T cells from the femoral head of patients with rapidly destructive coxopathy (RDC). Clin Exp Immunol 103:506-13, 1996.
- 8) Sugano N, Ohzono K, Nishii T, Sakai T, Haraguchi K, Yoshikawa H, Kubo T. Early MRI findings of rapidly destructive coxopathy. Magnetic Resonance Imaging 19:47-50, 2001.
- 9) Masuhara K, Nakai T, Yamaguchi K, Yamasaki S, Sasaguri Y. Significant increases in serum and plasma concentrations of matrix metalloproteinases 3 and 9 in patients with rapidly destructive

- osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheumatism* 46:2625-31, 2002.
- 10) Yamamoto T, Takabatake K, Iwamoto Y. Subchondral insufficiency fracture of the femoral head resulting in rapid destruction of the hip joint: a sequential radiographic study. *AJR* 178:435-7, 2002.
 - 11) 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
 - 12) Yamamoto T, Iwamoto Y, Schneider R, Bullough PG. Histopathological prevalence of subchondral insufficiency fracture of the femoral head. *Ann Rheum Dis* 67:150-3, 2008.
 - 13) 坂井孝司 菅野伸彦 中村宣雄 安藤渉 西井孝 高尾正樹 山村在慶 岩名大樹 花之内健仁 吉川秀樹 急速破壊型股関節症におけるTRAP陽性細胞の発現様式 *Hip Joint* 34:755-7, 2008.
 - 14) Tsuboi H, Matsui Y, Hayashida K, Yamane S, Maeda-Tanimura M, Nampei A, Hashimoto J, Suzuki R, Yoshikawa H, Ochi T. Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive cells in rheumatoid synovium may induce the destruction of articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 62:196-203, 2003.

特発性大腿骨頭壊死症における TRAP 陽性細胞発現の検討

坂井孝司、西井 孝、高尾正樹、安藤渉、阿部裕仁、田村理、仲宗根哲、三木秀宣、中村宣雄、大園健二、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 85 関節を対象に、TRAP 陽性細胞の発現と種々の因子との関連を明らかにするため、TRAP 陽性細胞の組織学的所見と、X 線学的病期、病型、年齢、性別、骨壊死関連因子、手術時ステロイド使用の有無との関係について検討した。TRAP 陽性細胞は、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ったが、発現の細胞数と stage 4 を含めた病期に関連は見られなかった。手術時ステロイド使用例で TRAP 陽性細胞発現数は減少している傾向がみられたが、病型、年齢、性別、骨壊死関連因子とは関連はみられなかった。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症(ONFH)の修復過程と種々の因子との関係を明らかにするため、大腿骨頭組織における TRAP 陽性細胞発現様式を症例数を増やして調査し、組織学的所見と X 線学的病期、病型、年齢、性別、骨壊死関連因子、手術時ステロイド使用の有無と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 73 例 85 関節、男性 26 例、女性 47 例、診断時平均 48 歳(22-79 歳)で、34 関節を新たに追加して検討した。関連因子はステロイド 63 関節、アルコール 20 関節、狭義の特発性 2 関節であった。X 線学的病期は Stage3A が 16 関節、Stage3B が 31 関節、Stage4 が 38 関節であった。病型は typeC1 が 25 関節、typeC2 が 60 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、79 関節は EDTA による脱灰後、HE 染色、TRAP 染色を施行した。TRAP 陽性細胞発現の壊死域、境界域、正常域の各領域における分布状況と分布の密度、また組織所見と、X 線学的病期、病型、年齢、性別、骨壊死関連因子、手術時ステロイド使用の有無との関係について調査した。陽性細胞の分布密度に関しては、陽性細胞数を 40-100 倍の視野で計測し、grade0、grade1、grade2、grade3 の 4 段階で評価した¹⁾。

3. 研究結果

TRAP 陽性細胞は 82 関節(96%)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、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。しかしながら、TRAP 陽性細胞の発現と stage の関連は見られなかった。また病型との関連もみられなかった(表 1)。

TRAP 陽性細胞の発現と、年齢、性別、関連因子には関連を認めなかったが、手術時ステロイド使用例で発現が少なくなっていた(表 2)。

表1 病期・病型とTRAP染色組織所見との比較

TRAP		grade0	grade1	grade2	grade3	p value
stage	3A	0	9	6	1	0.14
	3B	1	8	15	7	
	4	2	13	10	13	
type	C1	1	10	8	6	0.93
	C2	2	20	23	5	

(Chi-square test)

表2 各因子とTRAP染色組織所見の比較

TRAP		grade0	grade1	grade2	grade3	p value
性別	男	0	15	10	7	0.23*
	女	3	15	21	14	
年齢(歳)		51	51	49	47	0.61**
関連因子	ステロイド	3	19	22	19	0.20*
	アルコール	0	9	9	2	
	狭義特発性	0	2	0	0	
手術時ステロイド	+	2	6	13	3	0.04*
	-	1	24	18	18	

(*Chi-square test, **Kruskal-Wallis test)

4. 考察

これまで我々が報告しているとおり、実験的外傷性骨壊死モデルにおける TRAP 陽性細胞の分布²⁾と、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 染色の分布は類似している³⁾。すなわち、壊死領域ではみられず、reparative interface での発現を認め、新生骨梁周囲を中心に認められる。X 線学的病期と TRAP 陽性細胞の発現について、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が、今回の検討では stage3A、3B、4 と TRAP 発現の程度に関連性は見られなかった。その理由として、stage3B までは発現細胞も全体として多くなる傾向がみられたが、stage4 では、THA を行うまでに長年経過している例を中心に、TRAP 陽性細胞の発現が減少、または消失している例があるためと考えられた。

手術時ステロイド使用例で TRAP 陽性細胞の発現が有意に低下していた。これまでの検討⁴⁾では低下している傾向はみられていたが、サンプル数が少数であったため有意差は見られなかった。これまでの検討⁴⁾で、FGF-2 発現も手術時ステロイド使用例で有意に減少している結果がえられており、ステロイド使用による osteoclastogenesis や骨内血行動態を含めた修復反応への影響が考えられた。

5. 結論

TRAP 陽性細胞は、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が、陽性細胞数と X 線学的病期との間に相関は見られなかった。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

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) 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.
- 2) 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.
- 3) 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
- 4) 坂井孝司 西井孝 中村宣雄 高尾正樹 吉川秀樹 菅野伸彦 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. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服事業 特発性大腿骨頭壊死症の診断・治療・予防法の開発を目的とした全国学際的研究 平成 21 年度 総括・分担研究報告書 79-81, 2009.

デキサメサゾンによりヒト骨髓脂肪細胞から分泌される

Plasminogen activator inhibitor-1 はシンバスタチンにより抑制される

坂本和隆、尾崎誠、穂積晃、後藤久貴、福島達也、進藤裕幸
(長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 展開医療科学講座 構造病態整形外科)

我々は本研究会でデキサメサゾン負荷による骨髓脂肪細胞由来の PAI-1 分泌増加が骨壊死発生原因の1つであるとする報告を行ってきた。今回、ヒト骨髓脂肪細胞からの PAI-1 分泌におけるシンバスタチンの効果について検証を行った。40名の患者(男性6名、女性34名;52-81歳)より股関節手術の際に大腿骨より骨髓液を採取し、コラゲナーゼ処理後に骨髓脂肪細胞を抽出した。骨髓脂肪細胞にデキサメサゾンまたはシンバスタチンを添加し、PAI-1 mRNA を RT-PCR により測定した。溶液中の蛋白定量は ELISA により行った。PAI-1 mRNA はデキサメサゾンにより 388% ($p=0.002$)に増加、シンバスタチンにより 45% ($p=0.002$)に減少した。Total PAI-1 分泌はデキサメサゾンにより 166% ($p=0.001$)に増加、シンバスタチンにより 64% ($p=0.002$)に減少した。アディポネクチン mRNA と蛋白分泌については、デキサメサゾンとシンバスタチンによる大きな変化はみられなかった。デキサメサゾン投与前にシンバスタチンを投与することにより、PAI-1 分泌はコントロールの 89%に抑制された。今回の実験によりシンバスタチンは骨髓脂肪細胞の PAI-1 発現・分泌を抑制することによりステロイド性大腿骨頭壊死発生を予防している可能性があると考えられた。

1. 研究目的

大腿骨頭壊死症 (ONFH) はステロイドによる合併症のひとつであるが、その詳細な発生機序はいまだ不明である。脂質や蛋白質の代謝異常、耐糖能低下、血管壁の脆弱化はステロイドによる副作用として挙げられる。そのなかでも線溶系異常¹⁻³⁾、骨髓幹細胞の脂肪分化^{4,5)}、血管内皮細胞のアポトーシス^{6,7)}、脂肪細胞の肥大化⁸⁾、そして骨髓内圧上昇⁹⁾は大腿骨頭壊死症の原因に関係していると考えられている。

最近の研究では、内臓脂肪細胞がアディポカインと呼ばれる生物学的活性を有する物質を分泌すると報告されている^{10,11)}。骨髓内においても、アディポカインを産生する成熟脂肪細胞は大量に存在していると考えられる。骨髓脂肪細胞が receptor activator of NF κ -B ligand (RANKL)発現と破骨細胞分化に関わっている報告¹²⁾を我々は行っており、骨髓脂肪細胞は骨代謝においても重要な役割を担っている。

Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) は脂肪細胞から分泌されるアディポカインのひとつであり^{13,14)}、組織型 plasminogen activator (t-PA)に結合することで線

溶を阻害する。そのため PAI-1 は血栓症や凝固能異常の原因と考えられている。大腿骨頭壊死症患者の血中 PAI-1 増加についての報告¹⁵⁻¹⁸⁾やヒト骨髓脂肪細胞からの PAI-1 分泌がデキサメサゾンにより増加する報告¹⁹⁾は、PAI-1 と大腿骨頭壊死症の関連を示唆している。HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるスタチンは、脂質低下作用とともにステロイド性大腿骨頭壊死症に対する予防効果について報告されている²⁰⁻²³⁾。しかし、その予防効果のメカニズムについては明らかにされていない。

今回の研究目的は、ヒト骨髓脂肪細胞における PAI-1 発現・分泌におけるスタチンの作用を調査することである。

2. 対象および方法

対象:人工股関節手術を行った40患者(男性6名、女性34名、52-81歳)の大腿骨頸部より骨髓液を採取した。糖尿病、リウマチ、骨代謝障害やステロイド使用歴のある患者は除外した。採取した検体をコントロール群、デキサメサゾン群、シンバスタチン群を含む3~4群に分けた。各実験における患者の BMI と年齢について統計

学的有意差を認めなかった。研究内容は当施設の倫理規定とインフォームドコンセントにもとづいて行われた。

初代脂肪細胞の分離と培養: 骨髓液は 20mL の DMEM により希釈、0.1% コラゲナーゼで 37°C、1 時間、処理を行った。遠心分離を 5 分行い、上澄みより脂肪細胞層を注意深く吸引した^{12,19,24}。この手順を繰り返し行い、骨髓液からコラゲナーゼで脂肪細胞分離し、溶液に浮遊する脂肪細胞を遠心分離で抽出した。分離された脂肪細胞を 200 μ m ナイロンメッシュフィルターで濾し、3 回洗浄を行う。脂肪細胞を 5×10^6 ずつ分け、2mL DMEM を加え、15mL フアルコンチューブで培養した。培養は 5%CO₂、37°C 環境下に行い、1 μ M デキサメサゾン (Wako Pure Chemical Industry, Osaka, Japan) または 10 μ M シンバスタチン (Toronto Research Chemicals, Toronto ON, Canada) を添加した。

PAI-1 とアディポネクチン mRNA 遺伝子発現の測定: PAI-1 とアディポネクチン mRNA 発現を定量的 RT-PCR により測定した。Total RNA を RNeasy Mini Kit 250 (Qiagen, Chatsworth, CA) を用いて抽出し、100ng RNA を Taqman One Step PCR Master Mix Reagents kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) により逆転写した。プライマーは PAI-1 (SERPIN1, Hs00167155_m1)、アディポネクチン (ADIPOQ, Hs00605917_m1)、GAPDH (GAPDH, Hs99999905_m1) (Taqman Gene Expression Assay, Applied Biosystems) を使用した。PCR 定量には ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) を使用した。それぞれの mRNA 発現を GAPDH mRNA 発現と比較し、検討した。

PAI-1、アディポネクチン蛋白の測定: PAI-1 とアディポネクチン蛋白測定は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により行った。Total PAI-1 は LPIA-PAI test (Mitsubishi Chemical Yatron, Tokyo, Japan)、アディポネクチンは human adiponectin ELISA kit (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) により測定した。

統計的分析: 平均値、標準偏差を表示した。SPSS (Version 16.0) を使用、Mann-Whitney test を行い $P < 0.05$ を有意差とした。

3. 研究結果

デキサメサゾンとシンバスタチンによる PAI-1、アディポネクチン遺伝子発現を RT-PCR により測定した。PAI-1 mRNA はデキサメサゾンにより 388% ($p=0.002$) に上昇、シンバスタチンにより 45% ($p=0.002$) に低下した(図

1A)。アディポネクチン mRNA の変化には有意差はなかった(図 1B)。PAI-1 mRNA の経時的変化については、デキサメサゾンは 12 時間後をピークとして 490% ($p=0.001$) と著明に発現亢進(図 2A)、シンバスタチンは徐々に発現抑制し、48 時間後には 34% ($p=0.001$) に抑制した(図 2B)。

デキサメサゾンとシンバスタチンによる PAI-1、アディポネクチン蛋白分泌を検討するため培養 36 時間後に Total PAI-1 とアディポネクチン蛋白量を ELISA により測定した。PAI-1 分泌量はデキサメサゾンにより 166% ($P=0.001$) に増加、シンバスタチンにより 64% ($P=0.002$) に減少した。シンバスタチンを投与し、12 時間後にデキサメサゾンを添加した群の PAI-1 分泌量は 89% ($P=0.109$) に抑制されていた(図 3A)。アディポネクチン分泌では、デキサメサゾンとシンバスタチンは大きな変化を起こさなかった(図 3B)。

PAI-1 分泌量の経時的変化についても ELISA による測定を行った。サンプルをコントロール群(Cont.)、

12 時間後に 1 μ M デキサメサゾンを添加した群(DEX)、開始時に 10 μ M シンバスタチンを添加した群(SIM)、開始時に 10 μ M シンバスタチン、12 時間後に 1 μ M デキサメサゾンを添加した群(SIM+DEX)、の 4 群に分けた。

デキサメサゾンは 24 時間後に 136% (58.3ng/mL; $p=0.002$)、36 時間後に 167% (101.5ng/mL; $p=0.001$) に PAI-1 を増加させ、シンバスタチンは 24 時間後に 56.1% (24ng/mL; $p=0.002$)、36 時間後に 68.3% (41.5ng/mL; $p=0.002$) に PAI-1 を減少させていた。シンバスタチンの前処置により、デキサメサゾンの PAI-1 増加効果は見られなくなった(図 4)。

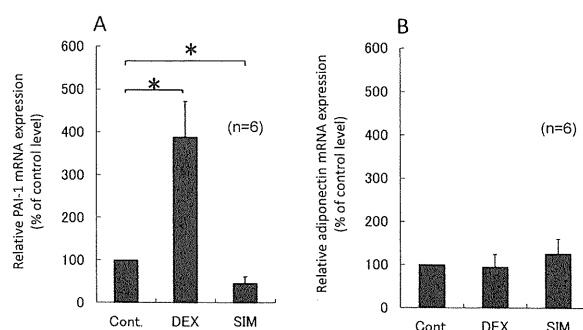


図 1A、B PAI-1 (A) とアディポネクチン(B) mRNA 発現。1 μ M デキサメサゾンと 10 μ M シンバスタチンを添加し、24 時間後に測定を行った。Cont. コントロール群; DEX

デキサメサゾン群;SIM シンバスタチン群。PAI-1 mRNA はデキサメサゾンにより上昇し、シンバスタチンにより低下した。コントロールを100%とし、平均値と標準偏差を示す。*P<0.05

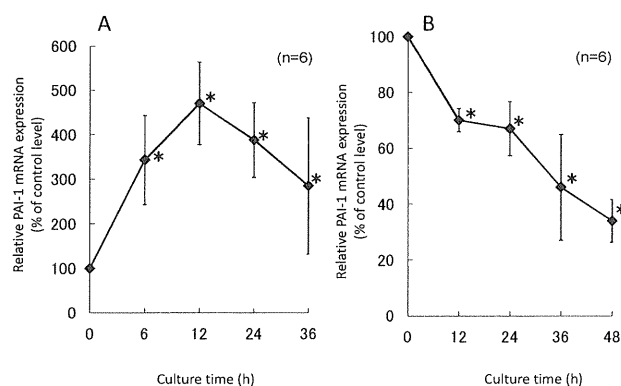


図 2A、B デキサメサゾン(A)とシンバスタチン(B)による PAI-1 mRNA の経時的変化。デキサメサゾンにより 12 時間後をピークに PAI-1 mRNA は上昇、シンバスタチンにより徐々に低下した。同時刻のコントロール群を 100%とし、平均値と標準偏差を示す。*P<0.05

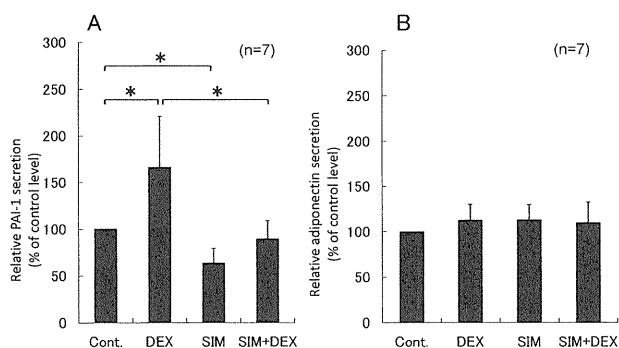


図 3A、B Total PAI-1 (A) とアディポネクチン(B)蛋白分泌。1 μ M デキサメサゾンと 10 μ M シンバスタチンを添加し、36 時間後に測定を行った。Cont.コントロール群; DEX デキサメサゾン群; SIM シンバスタチン群; SIM+DEX シンバスタチンを添加し、12 時間後にデキサメサゾンを添加した群。Total PAI-1 はデキサメサゾンにより増加、シンバスタチンにより減少。シンバスタチンで前処置することにより、デキサメサゾンの PAI-1 増加効果はみられなくなった。アディポネクチンは大きな変化を示さなかった。コントロールを 100%とし、平均値と標準偏差を示す。*P<0.05

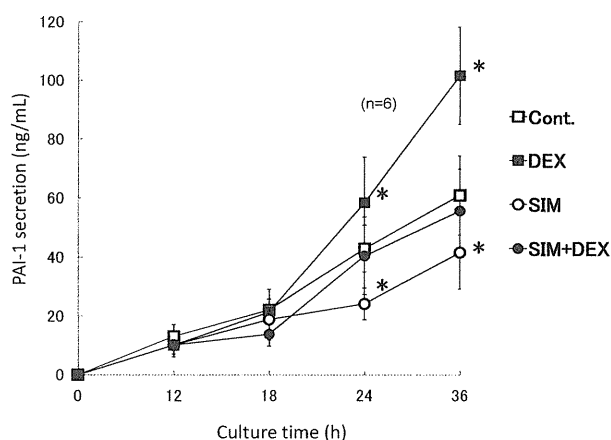


図 4 デキサメサゾンとシンバスタチンによる PAI-1 蛋白分泌の経時的変化。Cont.コントロール群; DEX 12 時間目にデキサメサゾンを添加した群; SIM 開始時にシンバスタチンを添加した群; SIM+DEX 開始時にシンバスタチン、12 時間目にデキサメサゾンを添加した群。シンバスタチンで前処置することにより、デキサメサゾンの PAI-1 増加効果はみられなくなった。PAI-1 分泌量 (ng/mL) の平均値と標準偏差を示す。*P<0.05 同時刻のコントロール群と比較を行った。

4. 考察

ステロイド性大腿骨頭壊死症の原因としては、血管内塞栓や血管外の脂肪蓄積による圧力が考えられている²⁵⁾。ステロイドは血管内皮に酸化ストレスを与え、血管内の過凝固や線溶低下^{6,7)}、骨髄細胞の脂肪分化促進や脂肪細胞の肥大化^{4,5,8)}に関与している。一方、スタチンはステロイドによる骨頭壊死を抑制し、骨髄脂肪細胞の肥大化を抑制したことが報告されている²⁶⁾。

内臓脂肪細胞はアディポカインを分泌し、メタボリック症候群に関与していることが報告^{10,11,13,14)}されているが、骨髄脂肪細胞の内分泌機能についての報告はほとんどみられない。ヒト骨髄脂肪細胞が RANKL を発現し、破骨細胞の分化を誘導すること¹²⁾、デキサメサゾンにより PAI-1 分泌が増加すること¹⁹⁾について我々は報告を行っており、骨髄脂肪細胞からの PAI-1 増加が骨内の血栓形成や血行障害に関与すると我々は推測している。

今回の実験からデキサメサゾンにより PAI-1 発現は促進され、シンバスタチンにより抑制されることが示された。PAI-1 mRNA はデキサメサゾンにより 12 時間後に著しく増加し、PAI-1 分泌も持続して増加がみられる。このことは、血中 PAI-1 増加と大腿骨頭壊死症に関する報告¹⁵⁻¹⁸⁾と矛盾はない。PAI-1 mRNA はシンバスタチンにより 48 時間かけて 38%まで抑制され、PAI-1 分泌も減少した。

さらに、シンバスタチンで前処理することにより、デキサメサゾンによる PAI-1 増加も抑制した。今回の結果は、スタチンによるステロイド性大腿骨頭壊死症の予防に関する報告²⁰⁻²³⁾を、裏付けることができるのではないかと考えている。

スタチンは動脈硬化症やメタボリック症候群を予防するとの報告がある²⁷⁻³²⁾。これらの報告では、スタチンによる PAI-1 mRNA 発現抑制が血管内皮細胞²⁹⁻³¹⁾や内臓・皮下脂肪細胞^{27,28)}でみられることが示されている。なお、PAI-1 発現は type-1 angiotensin II receptor (AT-1 レセプター)と、Rho pathway を介して活性化されるとの報告がある³³⁻³⁵⁾。さらに、スタチンはメバロン酸合成を阻害するため、その代謝産物であるゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) が減少、GGPP 合成阻害により Rho pathway の不活化が起こり、PAI-1 発現はスタチンにより抑制されると述べられている。骨髄脂肪細胞においても、PAI-1 mRNA 発現は AT-1 レセプターと Rho pathway を介して行われている可能性があると思われる。

ステロイドを不活化させる酵素である肝チトクローム P4503A (CYP3A) の低下が大腿骨頭壊死症患者にみられ^{36,37)}、シンバスタチンは CYP3A 活性を促進するため、ステロイド性大腿骨頭壊死症を防止するという報告³⁸⁾がある。今回はシンバスタチンを使用しているが、どのスタチンが PAI-1 分泌抑制に最も効果的であるかは、今後検討してゆく必要があると思われる。

アディポネクチンはインスリン感受性亢進、動脈硬化抑制など体全体の代謝に密接に関係しているアディポカインで、内臓脂肪量と相関している報告もみられる^{10,11)}。内臓脂肪細胞においてグルココルチコイドはレプシン発現を亢進し³⁹⁾、アディポネクチン発現を抑制する⁴⁰⁾。一方骨髄脂肪細胞では、デキサメサゾンはアディポネクチンと TNF- α 分泌を大きく変化させず¹⁹⁾、今回の実験においても、デキサメサゾンとシンバスタチンはアディポネクチン発現・分泌に明らかな変化を及ぼしていない。骨髄脂肪細胞は皮下・内臓脂肪細胞と異なる性質をもっている可能性が示唆された。

5. 結論

シンバスタチンはヒト骨髄脂肪細胞において、PAI-1 発現と蛋白分泌を抑制した。また、シンバスタチンを前投与することにより、デキサメサゾンによる PAI-1 発現と分泌増加を抑制することができた。今回の結果は、シンバスタチンによるステロイド性大腿骨頭壊死症の予防について、新たな見解をもたらすものであると考えている。

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakamoto K, Osaki M, Hozumi A, Goto H, Fukushima T, Baba H, Shindo H. Simvastatin suppresses dexamethasone-induced secretion of plasminogen activator inhibitor-1 in human bone marrow adipocytes. *BMC Musculoskelet Disord.* 2011 Apr 27;12(1):82.

2. 学会発表

- 1) 坂本和隆、尾崎誠、後藤久貴、穂積晃、進藤裕幸 : Simvastatin Down-regulates Plasminogen Activator Inhibitor-1 Secretion and Expression in Human Bone Marrow Adipocytes. 第 31 回 ASBMR. Denver, 2009.9.12

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

8. 参考文献

- 1) Glueck CJ, Fontaine RN, Gruppo R, Stroop D, Sieve-Smith L, Tracy T, Wang P: The plasminogen activator inhibitor-1 gene, hypofibrinolysis, and osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res* 1999, 366:133-146
- 2) Posan E, Szepesi K, Gaspar L, Csernatony Z, Harsfalvi J, Ajzner E, Toth A, Udvardy M: Thrombotic and fibrinolytic alterations in the aseptic necrosis of femoral head. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003, 14:243-248
- 3) Mont MA, Ulrich SD, Seyler TM: Role of thrombotic and fibrinolytic alterations in the pathogenesis and treatment of osteonecrosis. *J Rheumatol* 2007, 34:466-468
- 4) Yin L, Li YB, Wang YS: Dexamethasone-induced adipogenesis in primary marrow stromal cell cultures: mechanism of steroid-induced osteonecrosis. *Chi Med J* 2006, 199:581-588
- 5) Murata M, Kumagai K, Miyata N, Osaki M, Shindo H: Osteonecrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: effect of glucocorticoid. *J Orthop Sci* 2007, 12:289-295
- 6) Kerachian MA, Seguin C, Harvey EJ:

- Glucocorticoids in osteonecrosis of the femoral head: a new understanding of the mechanisms of action. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009, 114:121-128
- 7) Okada Y, Tanikawa T, Iida T, Tanaka Y: Vascular injury by glucocorticoid; involvement of apoptosis of endothelial cells. *Clin Calcium* 2007, 17:872-877
 - 8) Motomura G, Yamamoto T, Miyanishi K, Yamashita A, Sueishi K, Iwamoto Y: Bone marrow fat-cell enlargement in early steroid-induced osteonecrosis--a histomorphometric study of autopsy cases. *Pathol Res Pract* 2005, 200:807-811
 - 9) Miyanishi K, Yamamoto T, Irida T, Yamashita A, Jingushi S, Noguchi Y, Iwamoto Y: Bone marrow fat cell enlargement and a rise in intraosseous pressure in steroid-treated rabbits with osteonecrosis. *Bone* 2002, 30:185-190
 - 10) Waki H, Tontonoz P: Endocrine functions of adipose tissue. *Annu Rev Pathol* 2007, 2:31-56
 - 11) Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E: The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006, 64:355-365
 - 12) Hozumi A, Osaki M, Goto H, Sakamoto K, Inokuchi S, Shindo H: Bone marrow adipocytes support dexamethasone-induced osteoclast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2009, 382:780-784
 - 13) Lara-Castro C, Fu Y, Chung BH, Garvey WT: Adiponectin and the metabolic syndrome: mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2007, 18:263-270
 - 14) Alessi MC, Poggi M, Juhan-Vague I: Plasminogen activator inhibitor-1, adipose tissue and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol* 2007, 18:240-245
 - 15) Miyanishi K, Kamo Y, Ihara H, Naka T, Hirakawa M, Sugioka Y: Risk factors for dysbaric osteonecrosis. *Rheumatology (Oxf)* 2006, 45:855-858
 - 16) Kang P, Shen B, Yang J, Pei F: Circulating platelet-derived microparticles and endothelium-derived microparticles may be a potential cause of microthrombosis in patients with osteonecrosis of the femoral head. *Thromb Res* 2008, 123:367-373
 - 17) Van Veldhuizen PJ, Neff J, Murphey MD, Bodensteiner D, Skikne BS: Decreased fibrinolytic potential in patients with idiopathic avascular necrosis and transient osteoporosis of the hip. *Am J Hematol* 1993, 44:243-248
 - 18) Tan X, Cai D, Wu Y, Liu B, Rong L, Chen Z, Zhao Q: Comparative analysis of serum proteomes: discovery of proteins associated with osteonecrosis of the femoral head. *Transl Res* 2006, 148:114-119
 - 19) Hozumi A, Osaki M, Sakamoto K, Goto H, Fukushima T, Baba H, Shindo H: Dexamethasone-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression in human primary bone marrow adipocytes. *Biomedical Research* 2010, 31:281-286
 - 20) Motomura G, Yamamoto T, Miyanishi K, Jingushi S, Iwamoto Y: Combined effects of an anticoagulant and a lipid-lowering agent on the prevention of steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum* 2004, 50:3387-3391
 - 21) Pritchett JW: Statin therapy decreases the risk of osteonecrosis in patients receiving steroids. *Clin Orthop Relat Res* 2001, 173-178
 - 22) Pengde K, Hong G, Fuxing P, Bin S, Jing Y, Zongke Z: Effects of an anticoagulant and a lipid-lowering agent on the prevention of steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Int J Exp Path* 2010, 91:235-243
 - 23) Pengde K, Fuxing P, Bin S, Jing Y, Jingqiu C: Lovastatin inhibits adipogenesis and prevents osteonecrosis in steroid-treated rabbits. *Joint Bone Spine* 2008, 75:696-701
 - 24) Kitajima M, Shigematsu M, Ogawa K, Sugihara H, Hotokebuchi T: Effects of glucocorticoid on adipocyte size in human bone marrow. *Med Mol Morphol* 2007, 40:150-156
 - 25) Zhang G, Qin L, Sheng H, Wang XL, Wang YX, Yeung DK, Griffith JF, Yao XS, Xie XH, Li ZR, Lee KM, Leung KS: A novel semisynthesized small molecule icaritin reduces incidence of steroid-associated osteonecrosis with inhibition of both thrombosis and lipid-deposition in a dose-dependent manner. *Bone* 2009, 44:345-356
 - 26) Nishida K, Yamamoto T, Motomura G, Jingushi S, Iwamoto Y: Pitavastatin may reduce risk of steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Clin Orthop Relat Res* 2008, 466:1054-1058
 - 27) Laumen H, Skurk T, Hauner H: The HMG-CoA reductase inhibitor rosuvastatin inhibits plasminogen activator inhibitor-1 expression and secretion in human adipocytes. *Atherosclerosis* 2008, 196:565-573
 - 28) Li JQ, Zhao SP, Li QZ, Cai YC, Wu LR, Fang Y, Li P: Atorvastatin reduces plasminogen activator inhibitor-1 expression in adipose tissue of atherosclerotic rabbits. *Clin Chim Acta* 2006, 370:57-62
 - 29) Essig M, Nguyen G, Prie D, Escoubet B, Sraer JD, Friedlander G: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors increase fibrinolytic activity in rat aortic endothelial cells. Role of geranylgeranylation and Rho proteins. *Circ Res* 1998, 83:683-690
 - 30) Markle RA, Han J, Summers BD, Yokoyama T,

- Hajjar KA, Hajjar DP, Gotto AM Jr, Nicholson AC: Pitavastatin alters the expression of thrombotic and fibrinolytic proteins in human vascular cells. *J Cell Biochem* 2003, 90:23-32
- 31) Kunieda Y, Nakagawa K, Nishimura H, Kato H, Ukimura N, Yano S, Kawano H, Kimura S, Nakagawa M, Tsuji H: HMG CoA reductase inhibitor suppresses the expression of tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 induced by angiotensin II in cultured rat aortic endothelial cells. *Thromb Res* 2003, 110:227-234
 - 32) Sato Y, Dong J, Imagawa S, Ishimori N, Furumoto T, Tsutsui H, Sobel BE, Fujii S: Impact of statins on modulation by insulin of expression of plasminogen activator inhibitor type-1. *Coron Artery Dis* 2008, 19:355-361
 - 33) Kruithof EK: Regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 gene expression by inflammatory mediators and statins. *Thromb Haemost* 2008, 100:969-975
 - 34) Essig M, Vrtovsnik F, Nguyen G, Sraer JD, Friedlander G: Lovastatin modulates in vivo and in vitro the plasminogen activator/plasmin system of rat proximal tubular cells: role of geranylgeranylation and Rho proteins. *J Am Soc Nephrol* 1998, 9:1377-1388
 - 35) Ishibashi T, Nagata K, Ohkawara H, Sakamoto T, Yokoyama K, Shindo J, Sugimoto K, Sakurada S, Takuwa Y, Teramoto T, Maruyama Y: Inhibition of Rho/Rho-kinase signaling downregulates plasminogen activator inhibitor-1 synthesis in cultured human monocytes. *Biochim Biophys Acta* 2002, 1590:123-130
 - 36) Iwakiri K, Oda Y, Kaneshiro Y, Iwaki H, Masada T, Kobayashi A, Asada A, Takaoka K: Effect of simvastatin on steroid-induced osteonecrosis evidenced by the serum lipid level and hepatic cytochrome P4503A in a rabbit model. *J Orthop Sci* 2008, 13:463-468
 - 37) Kaneshiro Y, Oda Y, Iwakiri K, Masada T, Iwaki H, Hirota Y, Kondo K, Takaoka K: Low hepatic cytochrome P4503A activity is a risk for corticosteroid-induced osteonecrosis. *Clin Pharmacol Ther* 2006, 80:396-402
 - 38) Horsmans Y, Desager JP, van den Berge V, Abrassart M, Harvengt C: Effects of simvastatin and pravastatin on 6 beta-hydroxycortisol excretion, a potential marker of cytochrome P-450 3A. *Pharmacol Res* 1993, 28:243-248
 - 39) Halleux CM, Servais I, Reul BA, Detry R, Brichard SM: Multihormonal control of ob gene expression and leptin secretion from cultured human visceral adipose tissue: increased responsiveness to glucocorticoids in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83:902-910
 - 40) Degawa-Yamauchi M, Moss KA, Bovenkerk JE, Shankar SS, Morrison CL, Lelliott CJ, Vidal-Puig A, Jones R, Considine RV: Regulation of adiponectin expression in human adipocytes: effects of adiposity, glucocorticoids, and tumor necrosis factor alpha. *Obes Res* 2005, 13:662-669