

図4 女性患者における福岡県と当施設の60歳を境とした患者割合

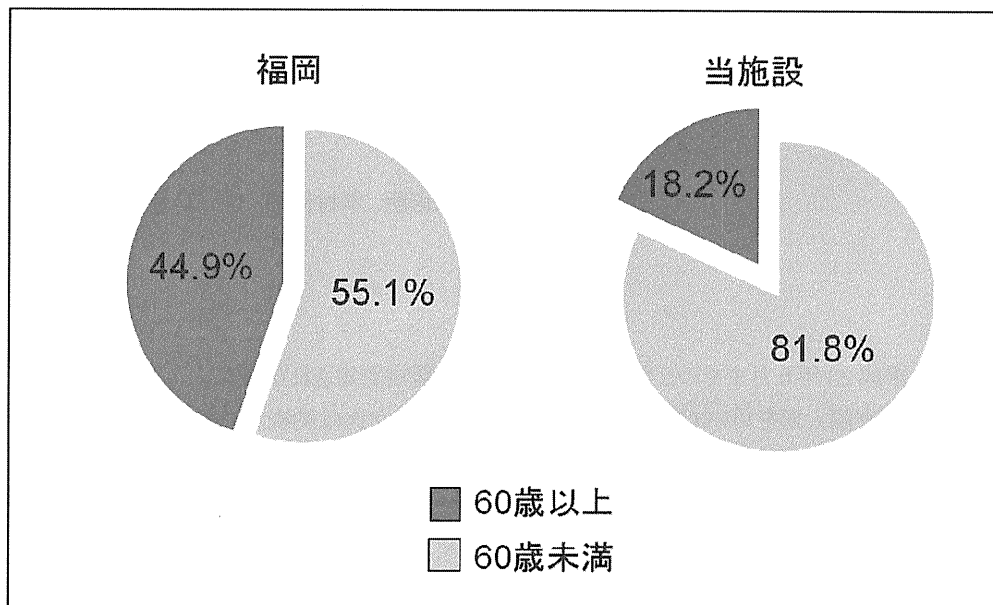


図5 本調査と他調査の比較

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

臨床調査個人票を用いた特発性大腿骨頭壊死症患者の疫学的調査

山口亮介、山本卓明、本村悟朗、岩崎賢優、趙嘎日達、岩本幸英
(九州大学 整形外科)

平成21年7月から平成23年6月までの2年間に、福岡県にて新規認定された特発性大腿骨頭壊死症患者218人について、臨床調査個人票を用いて記述疫学調査を行った。男女比は約6:4であった。平均年齢は53.3歳で、男性は40-50代、女性は50-60代にピークを認めた。誘因は、「ステロイド全身投与歴あり」31%、「アルコール愛飲歴あり」38%、「両方あり」6%、「両方なし」25%であった。ステロイド投与対象疾患はSLEが13%と最も多かった。治療では保存療法が48%、手術が44%であった。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症 (ION) は、難治性疾患罹患患者への医療費助成制度である特定疾患治療研究事業において特定疾患に指定されており、病歴、所見、治療について医師により記載された臨床調査個人票をもとに各道府県で認定が行われている。

我々は過去に臨床調査個人票を用いて、平成11-20年の福岡県における新規ION認定患者における性・年齢分布を調査した結果、10年間で1244人(男:女=6:4)が新たに認定され、日本人口における年齢調整罹患率は年間人口10万人あたり2.51人であることを推定した¹⁾。しかし、誘因、治療法などの詳細な項目に関する検討は行われていなかった。

本調査の目的は、臨床調査個人票を用いて、福岡県におけるION患者の記述疫学調査を行うことである。

2. 研究方法

福岡県で平成21年7月から平成23年6月2年間に福岡県で新規に認定されたION患者を調査対象とした。臨床調査個人票から、性別、年齢分布、社会活動、日常生活、家族歴などの特定疾患基本情報、診断時所見、病期、病型などの画像所見、治療法や誘因、さらにステロイド対象疾患やステロイド使用量、期間、アルコール量、期間について調査を行った。

3. 研究結果

男女比は約6:4で、平均年齢は53.3歳であった(表1)。男性は40-50代、女性は50-60代にピークを認めた

(図1)。

特定疾患基本情報では、就労や就学、家事労働などの社会活動をしている割合が高く、日常生活はやや不自由だが独力の割合が高かった(図2, 3)。ほとんどの患者では家族歴は認められないか不明であったが、6人に家族歴が認められた。内訳は母1人、配偶者3人であり、残り2人は同居家族構成を記載されたものであった(図4)。

罹患側は右167人、左149人とやや右が多かった(図5)。画像所見としては、「MRI」、「帯状硬化像」、「圧潰」の順に認められる所見が多く、病期の進行順序と一致していた(図6)。病期は「stage 3」が最も多く、病型では「type C-2」が最も多かった(図7, 8)。

治療では保存療法が48%、手術が44%であり、手術法としては、「人工関節置換術」が最も多かった(図9)。

誘因は、「ステロイド全身投与歴あり」31%、「アルコール愛飲歴あり」38%、「両方あり」6%、「両方なし」25%であった(図10)。平均ステロイド量は160mgで、ステロイド使用期間は「五年以内」が最も多く、平均4.5年であった(図11)。ステロイド使用疾患としては、「SLE」が13%と最も多く、ついで「ネフローゼ」、「皮膚疾患」が多かった。その他の疾患も多く、突発性難聴、骨髄移植、スティル病などが認められた(図14)。アルコール量としては日本酒換算「2合以下」が多く、最小0.5合、最大7合、平均2.6合であった。平均アルコール期間は24年であった(図12)。

全体では、片側罹患53%、両側罹患47%であったが、誘因別に見ると、「アルコール愛飲歴あり」は全体と同様

の傾向であったが、「ステロイド全身投与歴あり」「両方あり」では、60%以上が両側罹患例であった。一方、「両方なし」では、片側罹患が78%と多かった。

「両方なし」症例に限定した場合、男女比は4:6であり、男性は20-60歳代に分布しているのに対して、女性は40-80歳代に分布していた(図13)。

表1 性別人数と平均年齢

	男性	女性
人数	139人	79人
比	64%	36%
平均年齢	50.2歳	58.9歳
年齢幅	18-82歳	22-85歳

図1 年齢分布

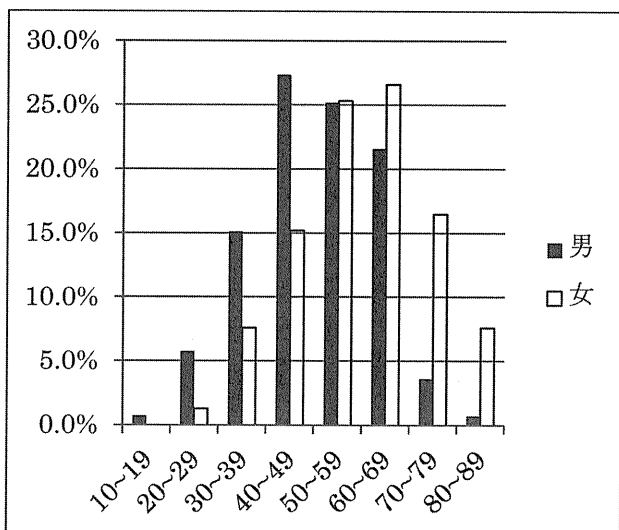


図2 社会活動

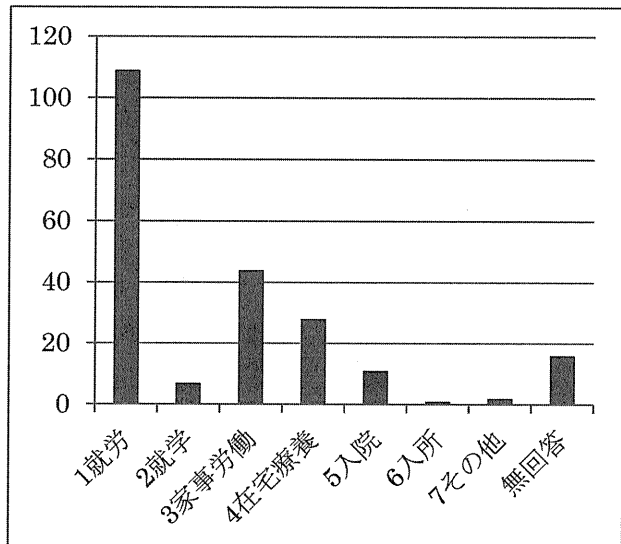


図3 日常生活

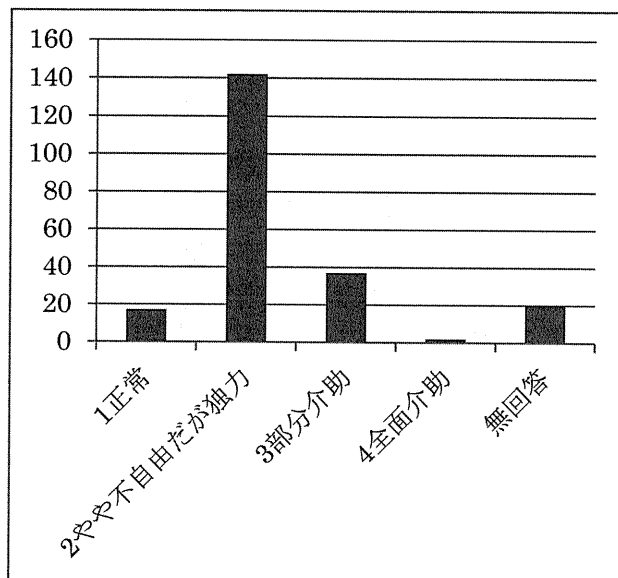


図4 家族歴

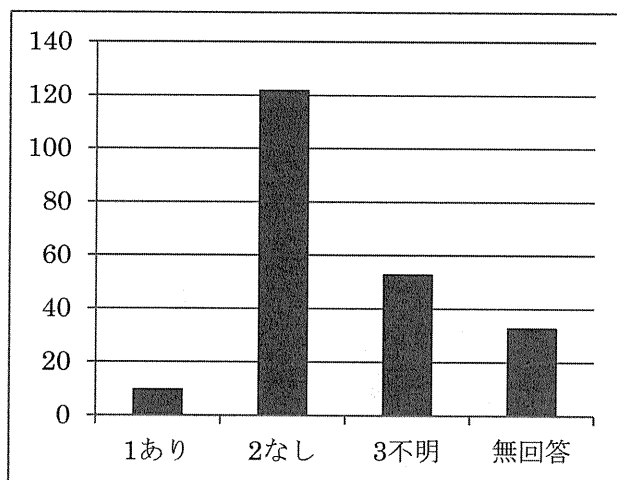


図5 罹患側

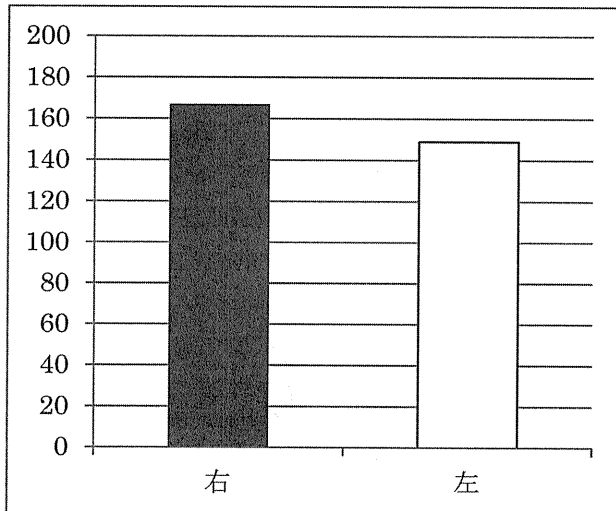


図6 画像所見

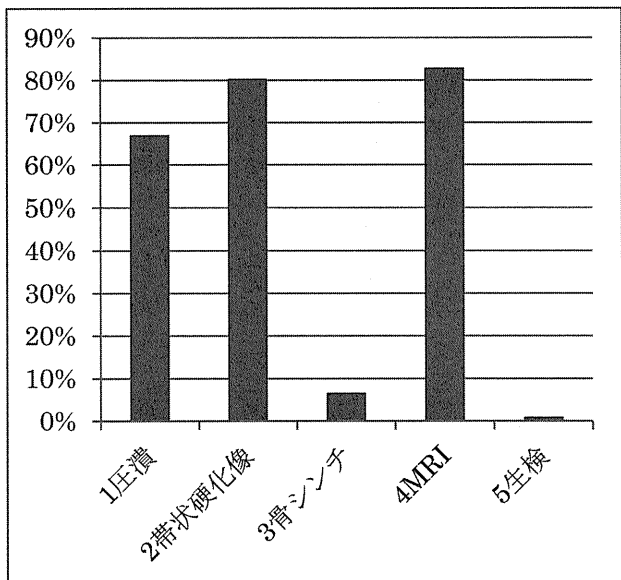


図9 手術法

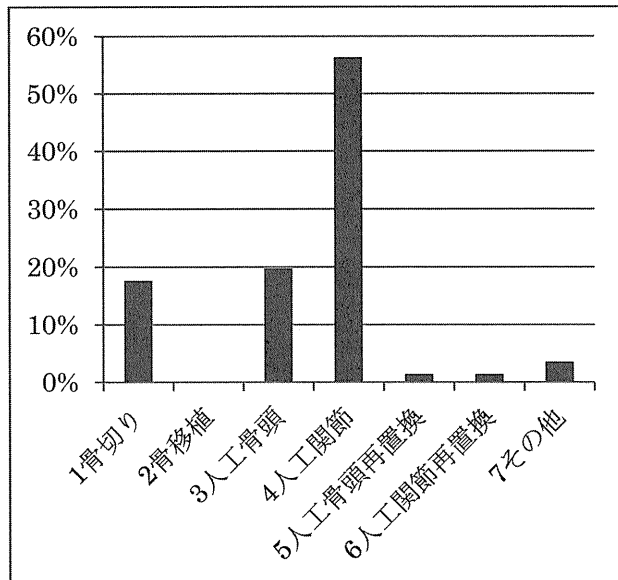


図7 病期

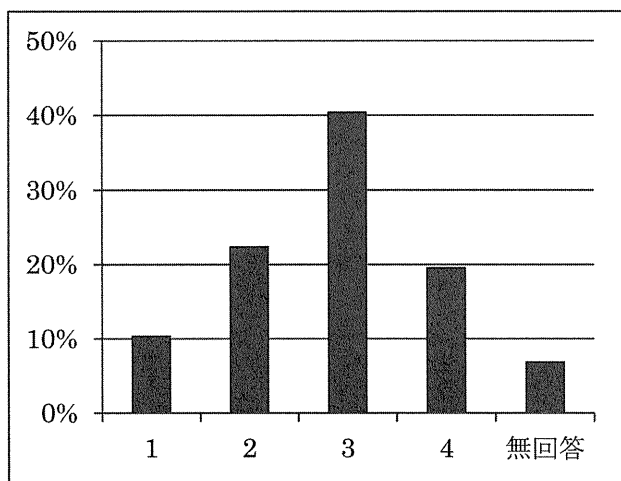


図10 誘因

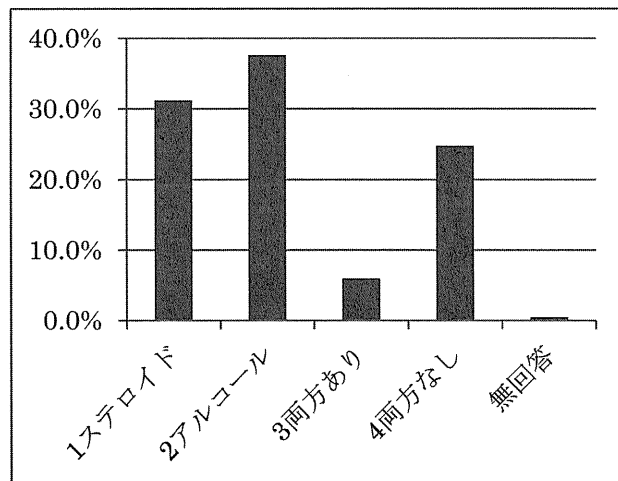


図8 病型

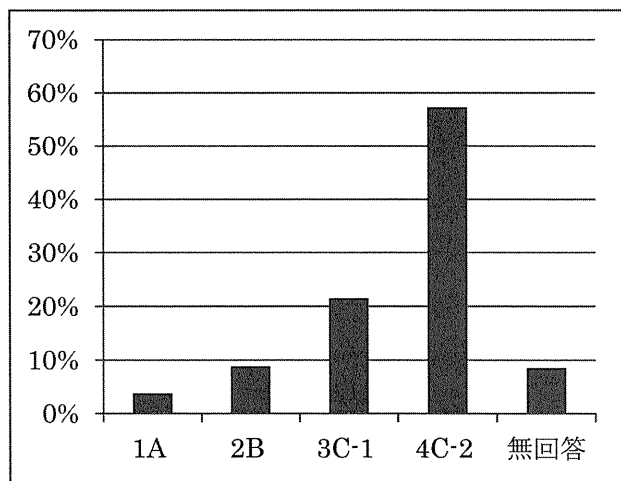


図11 ステロイド使用期間

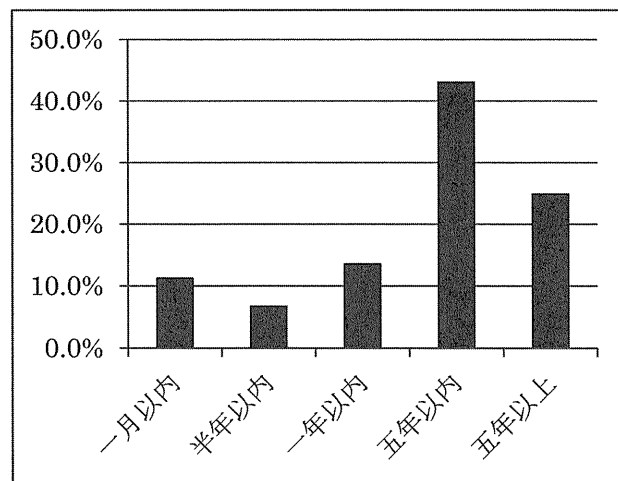


図 12 アルコール量

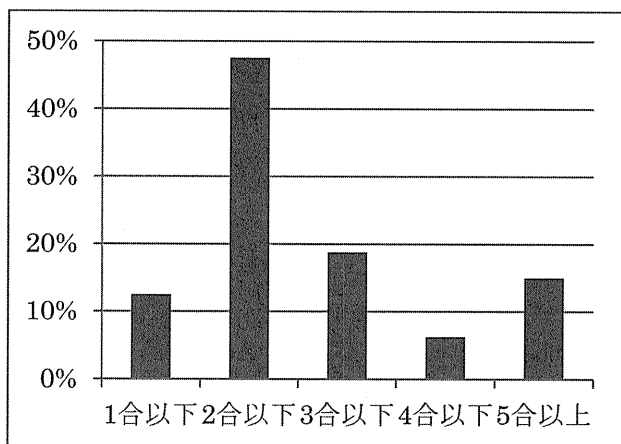
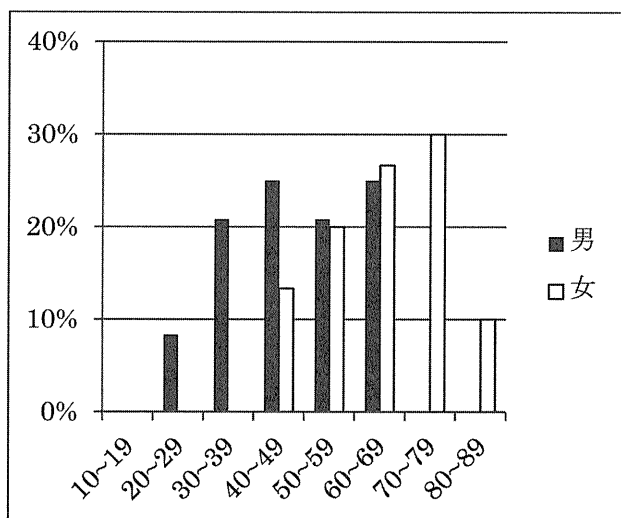


図 13 誘因「両方なし」症例の年齢分布



4. 考察

わが国における ION の疫学調査として、これまでに全国疫学調査、定点モニタリング調査が行われてきた²⁻⁵⁾。一方、ION は特定疾患治療研究事業において特定疾患に指定されており、臨床調査個人票に基づいて医療費受給のための登録認定が行われている。厚生労働省特定疾患の疫学に関する研究班は、この臨床調査個人票データに基づいて特定疾患全体の受給動向について経年的に報告している^{6, 7)}。また、いくつかの特定疾患では、臨床調査個人票を用いた詳細な疫学調査が報告されており、大野らは特発性間質性肺炎の全国疫学調査結果を報告し⁸⁾、松永らは鹿児島県における頸椎後縦靭帯骨化症患者の実態調査結果を報告している⁹⁾。我々は過去に臨床調査個人票を用いて福岡県における新規 ION 認定患者の性・年齢分布を調査し、日本人口における年齢調整罹患率が年間人口 10 万人あたり 2.51 人であることを推定したが¹⁾、本調査では、ION

に関するさらに詳細な記述疫学調査を行った。

本調査によって、臨床調査個人票の記載項目である患者基本情報、画像所見、治療法、誘因についての詳細な調査結果が得られた。本調査結果をこれまでの ION 疫学調査を比較すると、性比や病期、病型などの多くの点で類似した結果が得られたが、年齢分布や誘因などはやや異なっていた。その要因としては、ION 患者動向の経年的な変化、他の特定疾患同時罹患患者の除外、他疾患の混入などが影響しているかもしれない。特に誘因「両方なし」症例は片側罹患例、女性が多く、年齢層も高いという結果であり、大腿骨頭脆弱性軟骨下骨骨折症例が混入されている可能性も考えられる。

臨床調査個人票を用いた疫学調査の利点としては、厚生労働省データベースの既存情報が利用できる簡便性、全国規模や地域ごとの患者特性の把握が可能な点、さらに経年的な変化の調査が可能な点などが考えられる。調査結果の取り扱い、解釈については、注意を要する点があるものの、臨床調査個人票を用いた記述疫学調査は、ION 患者特性の把握に有用な調査法の一つになりうると考えられた。

5. 結論

福岡県にて新規認定された特発性大腿骨頭壊死症患者について、臨床調査個人票を用いて記述疫学調査を行った。本調査法は、ION 患者特性の把握に有用な調査法の一つになりうると考えられた。

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 Rheuma. 2011 Oct;63(10):3169-73.
2. 学会発表

- 1) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura G, Nakashima Y, Mawatari T, Ikemura S, Iwasaki K, Zhao G: A Fact-Finding Study on Idiopathic Osteonecrosis of the Femoral Head Based on Clinical Research Forms of the Specified Disease Treatment Research Program. The 15th International Symposium on Bone Circulation. ARCO 2009 November 17-19, 2009, Yokohama, Japan
- 2) 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
- 3) 山口亮介、山本卓明、中島康晴、馬渡太郎、本村悟朗、池村聡、藤井政徳、岩本幸英: 強彎ノミを用いた寛骨臼移動術のX線学的検討. 第36回日本股関節学会学術集会 2009.10.30,31 京都
- 4) 山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩本幸英: 福岡県における特発性大腿骨頭壊死症の発生率. 第37回日本股関節学会学術集会 2010.10.1,2 福岡
- 5) 山口亮介、山本卓明、本村悟朗、池村聡、岩本幸英: MRIでdouble low-intensity bandsを呈した大腿骨頭壊死症例. 第37回日本股関節学会学術集会 2010.10.1,2 福岡
- 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: 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.
- 7) 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.
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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

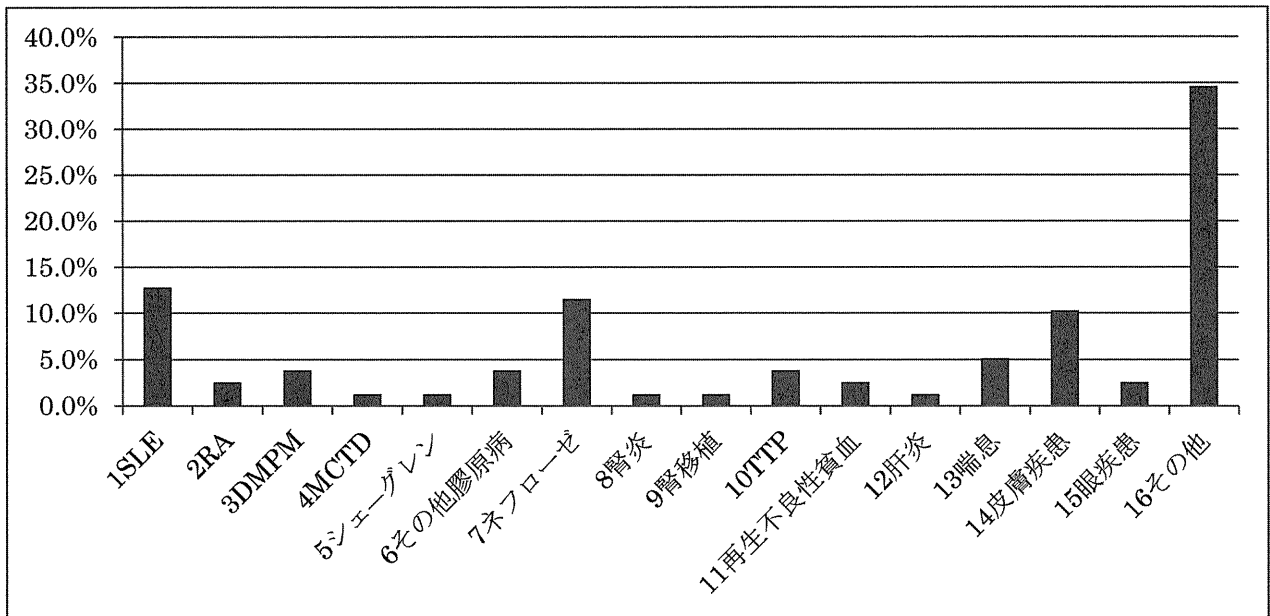
8. 参考文献

- 1) Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura T, Ikemura S, Iwamoto Y. Incidence of Non-Traumatic Osteonecrosis of the Femoral Head in the Japanese Population. Arthritis & Rheumatism. 2011 in press
- 2) Matsuo K, Hirohata T, Sugioka Y, Ikeda M, Fukuda A. Influence of alcohol intake, cigarette smoking, and occupational status on idiopathic osteonecrosis of the femoral head. Clin Orthop Relat Res 1988;234:115-23.
- 3) Hirota Y, Hirohata T, Fukuda K, Mori M, Yanagawa H, Ohno Y, et al. Association of alcohol intake, cigarette smoking, and occupational status with the risk of idiopathic osteonecrosis of the femoral head. Am J Epidemiol 1993;137(5):530-8.
- 4) Fukushima W, Fujioka M, Kubo T, Tamakoshi A,

Nagai M, Hirota Y. Nationwide epidemiologic survey of idiopathic osteonecrosis of the femoral head. Clin Orthop Relat Res. 2010 Oct;468(10):2715-24.

- 5) Sakaguchi M, Tanaka T, Fukushima W, Kubo T, Hirota Y; Idiopathic ONF Multicenter Case-Control Study Group. Impact of oral corticosteroid use for idiopathic osteonecrosis of the femoral head: a nationwide multicenter case-control study in Japan. J Orthop Sci. 2010 Mar;15(2):185-91
- 6) 永井正規, 柴崎智美, 玉腰暁子編:全国疫学調査のまとめ. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 特定疾患の疫学に関する研究班, 2006.
- 7) 永井正規, 太田晶子, 仁科基子, 柴崎智美編:電子入力された臨床調査個人票に基づく特定疾患医療受給者調査報告書. 厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 特定疾患の疫学に関する研究班, 2005.
- 8) 大野彰二, 中屋孝清, 坂東政司, 杉山幸比古:臨床調査個人票に基づく特発性間質性肺炎の全国疫学調査. 日呼吸会誌 45(10):759-65, 2007.
- 9) 松永俊二, 林協司, 米和徳, 小宮節郎:頰椎後縦靱帯骨化症の特定疾患申請に関する実態調査. 臨床整形外科 40(3):253-6, 2005.

図14 ステロイド使用疾患



その他 27 例 (35%) 内訳

- 突発性難聴 5
- 骨髄移植 3
- 腸疾患 3
- 間質性肺炎 3
- スティル病 2
- 顔面神経麻痺 2

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、井上和樹、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 および p150 をそれぞれ同定した。P120 はヒストンメチル化酵素 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 の転写活性を担うことを明らかにした。一方、p150 は MR とリガンド依存的に結合し、MR 転写活性を負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、p150 がクロマチンリモデリング複合体 NuRD と MR のアダプターとして機能することにより、転写活性を抑制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、LC-MS/MS を用いた候補蛋白の同定と機能解析を行い、同定し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ーに動員され、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 複合体の同定と機能解析

FLAG-p120 安定発現株を樹立し、大量培養の後、FLAG-M2 agarose レジンをを用いて 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。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。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。

3) 取得因子 p150 の機能解析

FLAG-MR 安定発現 HEK293F 細胞より核抽出液を取得し、FLAG-M2 agarose レジンによるアフィニティ精製を行い、MR 結合因子を LC-MS/MS により探索をおこなった結果、同定し得た p150 が、リガンド依存的に MR と結合すること、また、ラット腎組織において MR と p150 が細胞核内で共局在することが判明した。さらに、shRNA にて p150 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 SGK および ENaC α の発現誘導が増強された。

4) p150 複合体の同定と機能解析

FLAG-p150 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 p150 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 LC-MS/MS を用いて、Mi-2、MTA1、HDAC2、RbAp48 など主要な NuRD 複合体構成因子を同定することに成功した。さらに、グリセロール密度勾配遠心法により、p150 複合体をサイズ分画したところ p150 複合体が約1メガ Da の複合体を形成することを見出した。HEK293F 細胞に p150 を過剰発現させ、アルドステロン処理を行い、MR と NuRD 複合体構成因子 Mi2、MTA1 の共免疫沈降を行ったところ、内在性の MR と Mi2 および MTA1 の相互作用の増強が確認された。また、MR を用いたルシフェラーゼアッセイにおいて、shRNA により Mi2 遺伝子発現抑制することにより、p150 による MR 転写抑制が一部解除されることを見出した。

4. 考察

本研究では MR 相互作用因子複合体として p120 複合体および p150 複合体の同定に成功した。p120 複合体は、ヒストンメチル化酵素 NSD1 を構成因子として含み、MR 標的遺伝子プロモーターのヒストン H3K36 のメチル化修飾の制御を介して MR の転写活性を調節する可能性が示唆された。一方、p150 複合体は、クロマチンリモデリング複合体 NuRD の主要構成因子を含むことが明らかとなり、p150 がクロマチンの構造調節を介したエピゲノム制御により、MR の転写抑制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 の転写活性化因子 p120 および転写抑制因子 p150 が、各々 MR/p120/NSD1 複合体および MR/p150/NuRD 複合体を形成することにより、リガンド依存的にエピゲノム調節を担い、MR 転写活性を制御することで、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) ○Imai Y, Kondoh S, Kouzmenko A, Kato S. Regulation of bone metabolism by nuclear receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2009; 310:3-10.
- 2) ○Imai Y, Nakamura T, Matsumoto T, Takaoka K, Kato S. Molecular mechanisms underlying the effects of sex steroids on bone and mineral metabolism. *J. Bone Miner. Metab.* 2009; 27:127-130.
- 3) ○Takada I, Kouzmenko AP, Kato S. Wnt and PPARgamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2009; 5:442-447.
- 4) ○Takada I, Kouzmenko AP, Kato S. Molecular switching of osteoblastogenesis versus adipogenesis: implications for targeted therapies. *Expert. Opin. Ther. Targets* 2009; 13:593-603.
- 5) ○Iwasawa M, Miyazaki T, Nagase Y, Kato S, Nakamura K, Tanaka S, et al. The antiapoptotic protein Bcl-xL negatively regulates the bone-resorbing activity of osteoclasts in mice. *J. Clin. Invest.* 2009; 119:3149-3159.
- 6) ○Shiizaki K, Hatamura I, Imazeki I, Kato S, Akizawa T, Kusano E, et al. Improvement of impaired calcium and skeletal homeostasis in vitamin D receptor knockout mice by a high dose of calcitriol and maxacalcitol. *Bone* 2009; 45:964-971.

- 7) 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.
- 8) OYoun 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.
- 9) OYokoyama 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.
- 10) Matsuyama R, Takada I, Yokoyama A, Kouzu-Fujita M, Yano T, Kato S, et al. Double PHD fingers protein DP2 recognizes acetylated histones and suppresses the function of estrogen-related receptor alpha through histone deacetylase 1. *J. Biol. Chem.* 2010; 285:18166-18176.
- 11) 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.
- 12) OImai 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.
- 13) 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.
- 14) OTakada 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) Fujiki R, Hashiba W, Sekine H, Yokoyama A, Imai Y, Kato S, et al. GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. *Nature* 2011 (in press).
- 20) Yokoyama A, Katsura S, Ito R, Sekine H, Fujiki R, Kato S, et al. Multiple post-translational modifications in hepatocyte nuclear factor 4 α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011; 410:749-753.
- 21) Ohtake F, Fujii-Kuriyama Y, Kawajiri K, Kato S. Cross-talk of dioxin and estrogen receptor signals

through the ubiquitin system. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2011; 127:102-107.

- 22) ○Kato S, Yokoyama A, Fujiki R. Nuclear receptor coregulators merge transcriptional coregulation with epigenetic regulation. *Trends Biochem. Sci.* 2011; 36:272-281.
- 23) ○Imai Y, Kouzmenko A, Kato S. Targeting Fas/FasL signaling, a new strategy for maintaining bone health. *Expert Opin. Ther. Targets* 2011; 15:1143-1145.
- 24) Kitagawa H, Fujiki R, Yoshimura K, Oya H, Kato S. Williams syndrome is an epigenome-regulator disease. *Endocr. J.* 2011; 58:77-85.
- 25) Takahashi S, Watanabe T, Okada M, Inoue K, Imai Y, Kato S, et al. Noncanonical Wnt signaling mediates androgen-dependent tumor growth in a mouse model of prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011; 108:4938-4943.
- 26) ○Baba A, Ohtake F, Okuno Y, Yokota K, Imai Y, Kato S, et al. PKA-dependent regulation of the histone lysine demethylase complex PHF2-ARID5B. *Nat. Cell Biol.* 2011; 13:668-675.
- 27) Ishiguro K, Kim J, Fujiyama-Nakamura S, Kato S, Watanabe Y. A new meiosis-specific cohesin complex implicated in the cohesin code for homologous pairing. *EMBO Rep.* 2011; 12:267-275.
- 28) Murashima A, Miyagawa S, Ogino Y, Nishida-Fukuda H, Araki K, Kato S, et al. Essential roles of androgen signaling in Wolffian duct stabilization and epididymal cell differentiation. *Endocrinology* 2011; 152:1640-1651.
- 29) ○Okamoto M, Murai J, Imai Y, Ikegami D, Kamiya N, Kato S, et al. Conditional deletion of

Bmpr1a in differentiated osteoclasts increases osteoblastic bone formation, increasing volume of remodeling bone in mice. *J. Bone Miner. Res.* 2011; 26:2511-2522.

2. 学会発表

- 1) 横田健一、大竹史明、北川浩史、加藤茂明:ミネラルコルチコイド受容体(MR)による未知臓器障害メカニズムの解明、第82回日本内分泌学会学術総会、群馬、2009.4.24.
- 2) Yokota, K., Ohtake, F., Kato, S.: Functional analysis of a novel MR co-activator P120, 4th International Congress of Endocrinology (ICE 2010)、京都、2010.3.29.
- 3) 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.
- 4) Yokota, K., Ohtake, F., Shibata, H., Ito, H., Kato, S.: Functional analysis of a novel MR co-regulator p150. The 5th International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest in Okinawa、沖縄、2011.10.24.

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

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の 治療応用に関する研究

田中良哉、山岡邦宏、岡田洋右、齋藤和義（産業医科大学医学部第一内科学）

特発性大腿骨頭壊死症は未だ原因、治療共に解明が進んでいないが、その病態形成過程に滑膜の炎症と間葉系幹細胞の異常の関与が報告されている。また、間葉系幹細胞を多く含む骨髄細胞の投与の大腿骨頭壊死症に対する効果が動物モデルで報告される。本研究に於いては、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を用いて、骨芽細胞、軟骨細胞への分化誘導機構を研究してきた。まず、ヒト間葉系幹細胞における骨芽細胞誘導メカニズムを解明し、IL-1 刺激下で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。また、ヒト破骨細胞誘導系に間葉系幹細胞を添加すると破骨細胞の分化が抑制され、間葉系幹細胞が産生した osteoprotegerin が介在することが判明した。さらに、コラーゲン誘導関節炎発症ラットにおけるナノファイバーを用いたヒト間葉系幹細胞の投与方法と治療効果を検討し、骨再生誘導法の確立、治療応用を目指した。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症は、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。特発性大腿骨頭壊死症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、ヒト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。今年度は、ヒト間葉系幹細胞における骨芽細胞誘導メカニズム、破骨細胞分化への影響、及び、コラーゲン誘導関節炎発症ラットにおけるナノファイバーを用いたヒト間葉系幹細胞の投与方法と治療効果を検討し、壊死に陥った骨組織の修復・再生を目指した前臨床的な基盤の確立を目的とした。

2. 研究方法

ヒト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。

破骨細胞分化の評価には、健常人より末梢血単核球を採取し、破骨細胞分化誘導培地で 16 日間培養し、TRAP 染色陽性の多核細胞数(核 3 ヶ以上)を顕微鏡下で観察した。ヒト間葉系幹細胞と末梢血単核球は、細胞接着の要素を排除し可溶性因子の影響を検討する目的に、Transwell plate の下層に末梢血単核球、上層に間葉系幹細胞を撒き、共培養した。

また、ヒト間葉系幹細胞を播種したポリ乳酸ファイバー(ナノファイバー)を 24 時間培養後、コラーゲン誘導関節炎発症前の関節近傍に移植し、間葉系幹細胞を直接関節内投与したラットと病理組織標本、軟部 X 線、micro CT を比較検討した

3. 研究結果

①ヒト骨髄由来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。IL-1 β の効果は、TNF、IL-6、IL-17 より強力であった。IL-1 β を添加後 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。

②IL-1 β で刺激したヒト間葉系幹細胞では、Wnt5a とその受容体 Ror2 の mRNA 発現の亢進が観察され、Wnt5a または ROR2 を siRNA で発現抑制すると石灰化は阻害されたことから、non-canonical pathway を介すシグナル伝達が示された。一方、IL-1 β による canonical pathway の活性化は観察されなかった。

③ヒト末梢血単核球を破骨細胞分化誘導培地で培養することにより16日目には400~800個の破骨細胞を認めた。しかし、破骨細胞分化は、Transwell を用いた間葉系幹細胞との共培養により著明に抑制され、抑制効果は間葉系幹細胞の細胞数依存的に増大した。また、間葉系幹細胞による破骨細胞分化誘導抑制に伴い Cathepsin K の発現も抑制された。

④間葉系幹細胞による破骨細胞分化抑制作用は共培養のみならず、間葉系幹細胞の培養上清の添加によっても同様の現象が観察され、可溶性因子による分化抑制であることが明らかとなった。また、間葉系幹細胞が産生する可溶性因子探索の中で、RANKL のデコイ受容体として RANK-RANKL の相互作用を阻害する Osteoprotegerin が多量に産生されていることが明らかとなった。また、共培養系への抗 Osteoprotegerin 抗体追加、または siRNA を用いた間葉系幹細胞における Osteoprotegerin 遺伝子発現抑制により破骨細胞分化抑制作用は低下し、破骨細胞数は減少した。

⑤コラーゲン誘導関節炎ラットを用いた検討では、ヒト間葉系幹細胞を直接関節内投与しても無治療群と相違を認めなかったが、ヒト間葉系幹細胞をナノファイバーに播種して関節近傍に移植すると、関節炎スコアの低下、軟部 X 線、microCT、組織学的評価における骨破壊の進展抑制が観察された。

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 C は、IL-1 β などの炎症性サイトカインの存在下において骨芽細胞へ分化可能であり、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。即ち、ヒト骨髄由来

間葉系幹細胞からの分化誘導には、non-canonical pathway の関与が初めて示された。

一方、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞から産生される Osteoprotegerin が RANKL 依存性の破骨細胞分化を阻害したことから、特発性大腿骨頭壊死症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。ヒト骨髄由来間葉系幹細胞による Osteoprotegerin 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。研究者らは、コラーゲン誘導関節炎ラットにおいては、関節内投与と比較してヒト骨髄由来間葉系幹細胞播種ポリ乳酸ファイバー(ナノファイバー)による関節炎発症抑制作用と石灰化形成が観察された。これらの結果より、間葉系幹細胞を用いた関節炎治療では、直接の関節内投与より、ナノファイバーを足場として関節近傍に間葉系幹細胞をとどめる事による関節炎発症や関節破壊の抑制の可能性が示唆された。また、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、特発性大腿骨頭壊死症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、マトリゲルやナノファイバーを用いて間葉系幹細胞からの3次元骨再生系を確立し、間葉系幹細胞からの骨修復・再生系を動物モデルへ応用し、壊死になった骨組織の修復・再生を目指した治療ツールとしての展開を検討していく予定である。

5. 結論

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。また、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。さらに、ナノファイバーを用いたヒト間葉系幹細胞の投与方法と治療効果を検討

し、生体内における骨再生誘導法の基礎を確立した。
今後は、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, Maeshima Y, Yamaoaka K. In vitro and in vivo analysis of a Jak inhibitor in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* (in press)
2. Takeuchi T, Tanaka Y, Amano K, Hoshi D, Nawata M, Nagasawa H, et al. Clinical, radiographic, and functional effectiveness of tocilizumab for rheumatoid arthritis patients – REACTION 52-week study –. *Rheumatology* (in press)
3. Koike T, Harigai M, Inokuma S, Ishiguro N, Ryu J, Tanaka Y, Ito K, et al. Postmarketing Surveillance of Tocilizumab for Rheumatoid Arthritis in Japan – Interim Analysis of 3,881 Patients. *Ann Rheum Dis* (in press)
4. Tanaka Y, Harigai M, Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Yamamoto K, et al. Golimumab, a human anti-TNF- α monoclonal antibody, injected subcutaneously every 4 weeks in Japanese patients with active rheumatoid arthritis in combination with methotrexate: results of the Phase 2/3, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled GO-FORTH study through 24 weeks. *Ann Rheum Dis* (in press)
5. Tak PP, Mease PJ, Genovese MC, Kremer J, Haraoui B, Tanaka Y, Bingham III CO, et al. Efficacy and safety of ocrelizumab in patients with active rheumatoid arthritis with an inadequate response to at least one TNF inhibitor: results from the phase III SCRIPT trial. *Arthritis Rheum* (in press)
6. Harigai M, Tanaka Y, Maisawa S; on behalf of the JA21963 study group. Safety and efficacy of various dosages of ocrelizumab in Japanese rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to methotrexate therapy: a placebo-controlled, double-blind, parallel-group study. *J Rheumatol* (in press)
7. ○Maeshima K, Yamaoaka K, Kubo S, Nakano K, Iwata S, Tanaka Y, et al. A JAK inhibitor tofacitinib regulates synovitis through inhibition of IFN- γ and IL-17 production by human CD4+ T cells. *Arthritis Rheum* (in press)
8. ◎ Oshita K, Yamaoka K, Udagawa N, Fukuyo S, Sonomoto K, Tanaka Y. Human mesenchymal stem cells inhibit osteoclastogenesis through osteoprotegerin production. *Arthritis Rheum* (2011) 63, 1658–1667
9. ○Nakano K, Yamaoka K, Hanami K, Saito K, Sasaguri Y, 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* (2011) 186, 3745–3752
10. Kameda H, Kanbe K, Sato E, Ueki Y, Saito K, Tanaka Y, et al. Continuation of Methotrexate (MTX) Resulted in Better Clinical and Radiographic Outcomes than Its Discontinuation upon Commencing Etanercept in Patients with Rheumatoid Arthritis: 52-Week Results from the JESMR Study. *J Rheumatol* (2011) 38, 1585–1592
11. Iwata S, Saito K, Tokunaga M, Yamaoka K, Nawata M, Tanaka Y. Phenotypic changes of lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus who are in longterm remission after B cell depletion therapy with rituximab. *J Rheumatol* (2011) 38, 633–641
12. Komano Y, Tanaka M, Nanki T, Tanaka Y, Miyasaka N, Harigai M, et al. Incidence and risk factors for serious infection in rheumatoid arthritis patients treated with tumor necrosis factor (TNF) inhibitors; a report from the registry of Japanese Rheumatoid Arthritis Patients for Long-Term Safety (REAL). *J Rheumatol* (2011) 38, 1258–1264
13. Tanaka Y, Suzuki M, Nakamura H, Toyozumi S, Twillich S. Phase 2 study of tofacitinib (CP-690,550) combined with methotrexate in patients with rheumatoid arthritis and inadequate response to methotrexate. *Arthritis Care Res* (2011) 63, 1150–1158

14. ○ 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
 15. Suzuki K, Saito K, Tsujimura S, Nakayamada S, Yamaoka K,, 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
 16. Tanaka Y, Takeuchi T, Mimori T, Saito K, Nawata M, Kameda H, et al. 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
 17. ○ 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
 18. Komano Y, Harigai H, Koike R, Sugiyama H, Ogawa J, Tanaka Y, et al. 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
 19. Koike T, Harigai M, Inokuma S, Inoue, Ishiguro N, Tanaka Y, et al. Post-marketing surveillance of the safety and effectiveness of etanercept in Japan. *J Rheumatol* (2009) 36, 898-906
 20. Iwata S, Saito K, Yamaoka K, Tsujimura S, Nawata M, Tanaka Y. Effects of anti-TNF- α antibody infliximab in refractory entero-Beçet's disease. *Rheumatology* (2009) 48, 1012-1013
 21. 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
 22. Nakayamada 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. Tanaka Y. In vivo and in vitro analysis of a Jak inhibitor in RA. Advances in Targeted Therapies 2011, Dubrovnik
 2. Tanaka Y. Is biologic-free remission possible in patients with RA? Advances in Targeted Therapies 2011, Dubrovnik
 3. Y. Tanaka, S. Hirata, M. Nawata, S. Kubo, K. Saito. Discontinuation of adalimumab after attaining remission in patients with rheumatoid arthritis. The Annual European Congress of Rheumatology 2011, London, England
 4. Y. Tanaka, M. Harigai, T. Takeuchi, H. Yamanaka, N. Ishiguro, K. Yamamoto, et al. Golimumab, a human anti-TNF- α monoclonal antibody administered subcutaneously every four weeks as monotherapy in patients with active rheumatoid arthritis despitemethotrexate therapy: 4-week results of clinical and radiographic assessments. The Annual European Congress of Rheumatology 2010, London, England
 5. Y. Tanaka. Clinical development and Phase III studies of tocilizumab. 7th International Congress on Autoimmunity, Ljubljana, Slovenia, 2010.
 6. Y Tanaka, M Suzuki, H Nakamura, S Toyozumi, 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.
 7. 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,
 8. Tanaka Y. Paradigm shift of the treatment of

rheumatoid arthritis by TNF-targeting biologics.
The 14th International Congress of Immunology
(ICI), Kyoto, 2010.

9. Tanaka Y. B cell depletion in systemic lupus erythematosus. The 14th International Congress of Immunology (ICI), Kyoto, 2010
10. 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, 2010
11. 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
12. 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

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

グルココルチコイド過剰誘導血管内皮機能障害に対する酸化ストレス抑制を介した 治療法の探索

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、吉田守美子、松本俊夫 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 生体情報内科学)

我々は、グルココルチコイド過剰により、血管内皮細胞でグルココルチコイド受容体(GR)ならびにミネラルコルチコイド受容体(MR)が病的活性化にされることに注目して来た。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は、GR/MR 転写活性の亢進、NADPH oxidase の活性化を介した superoxide 産生の増加、ならびに eNOS の発現と活性低下をもたらすことで、血管内皮機能を低下させることを明らかにし、この血管内皮機能障害が、大腿骨頭壊死症発症に寄与するという病態仮説を提唱してきた。その治療法探索において我々は、HMGCoA 還元酵素阻害薬(スタチン)であるピタバスタチンに注目し、ピタバスタチンが血管内皮細胞において GR 活性化による酸化ストレス産生を抑制し、eNOS の発現および活性化の低下を回復させることを報告した。また、不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸(EPA)はスタチンとの併用で付加的な冠動脈疾患抑制効果を示すことが知られており、我々は EPA も酸化ストレス抑制作用を有していることを見いだした。さらに我々は、選択的 MR 阻害薬であるスピロラクトンやエプレレノンがグルココルチコイド過剰による活性酸素産生や eNOS の発現および活性抑制状態を解除することを見出した。このように、スタチン・EPA・MR 阻害薬の combination therapy は酸化ストレスの抑制を介した血管内皮機能の改善によって大腿骨頭壊死症予防に寄与する可能性がある。

1. これまでの研究成果と研究目的

我々はこれまでに選択的グルココルチコイド(GC)受容体(GR)合成リガンドであるデキサメザゾンを用いた検討により、血管内皮細胞における GR の活性化が、活性酸素の産生増加と内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)の発現減少による一酸化窒素(NO)の産生の低下を介して血管内皮機能障害を惹起し¹⁾、大腿骨頭壊死症を引き起こすことを提唱してきた²⁾。

またこの GC 過剰における血管内皮機能障害の病態治療として HMGCoA 還元酵素阻害薬(スタチン)であるピタバスタチンに我々は注目してきた。本班会議においてピタバスタチンは GC 過剰誘導下の活性酸素産生抑制や血管内皮細胞における eNOS の発現およびリン酸化維持に有効であることを報告してきた。さらに我々はそのピタバスタチンの GC 過剰による酸化ストレス産生抑制効果を生み出す key molecule として NADPH oxidase の主要なコンポーネントである Rac-1 に注目し、GC 過剰状態における Rac-1 の活性化およびピタバスタチン投与の影響について検証す

ることとした。

これまでの大規模臨床研究の結果から、スタチンによる心血管イベント抑制作用のエビデンスは豊富であり、本病態の予防および改善に寄与することが期待されるが、 ω 3 系不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸(EPA)はスタチンに追加することで、冠動脈疾患の更なる抑制に効果を発揮することが日本人を対象とした大規模臨床試験で証明されている³⁾。したがって EPA をスタチンに上乘せすることで GC 過剰における血管内皮細胞の保護効果を更に高めることが出来る可能性がある。そこで我々は動物の酸化ストレス負荷モデルにおける EPA の効果について検証を行なうこととした。

一方、人における活性型内因性グルココルチコイドであるコルチゾール(ハイドロコルチゾン;HC)ならびにステロイドパルス療法において使用される合成 GC であるメチルプレドニゾロン(mPSL)は GR のみならず、ミネラルコルチコイド受容体(MR)への結合能を有する。上皮系細胞では 11β -hydroxysteroid

dehydrogenase 2 (11 β -HSD2)がこれらの GC を不活性化することでMR作用の発現を防いでいる¹⁵⁾。しかしながら、血管内皮細胞では 11 β -HSD2 の発現がわずかであり、GC 過剰では血管内皮細胞の MR が活性化される可能性がある(図 1)。そこで本研究ではアルドステロン受容体拮抗薬による MR 阻害が、グルココルチコイド誘発性血管内皮細胞障害を抑制するかどうかについて検討を行なうこととした。

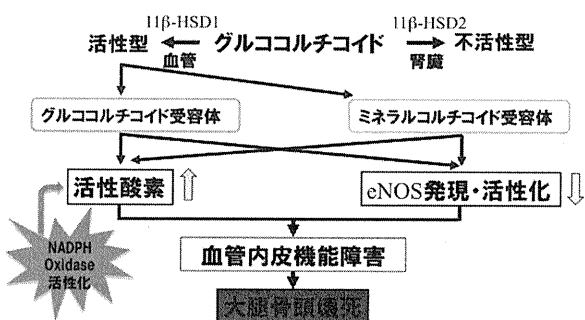


図 1. GR と MR の活性化を介した GC 過剰状態による大腿骨頭壊死の発症機序仮説

2. 研究方法

I. GC 過剰の血管内皮細胞における Rac-1 の活性化とピタバスタチンの効果に関する検討

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

HUVEC にピタバスタチン(NK104)10⁻⁵M の添加群および非添加群の 2 群作成し、更にデキサメサゾン(SIGMA D4902)10⁻⁵M の添加群、非添加群の 2 群を組み合わせ、合計 4 群のプレートを作成した。ピタバスタチンの添加はデキサメサゾン添加に先行して 16 時間行ない、その後、デキサメサゾン添加を行なった。細胞の回収はデキサメサゾン添加 2 時間後に行なった。

回収後の細胞の蛋白抽出後に、pull down assay によって Rac-1 活性化について評価した。

II. エイコサペンタエン酸 (EPA) による酸化ストレス抑制作用と心血管臓器保護効果

8 週齢の C57BL/6J マウスを用い、EPA を除した餌と 5% の EPA-rich な餌の 2 群に分けて 1 週間給餌した後に、強力な酸化ストレスを生じさせるアンジオテンシン II (Ang II) を浸透圧ミニポンプにて (2.0mg/kg/day)、2 週間投与行ない、Ang II 投与終了後にマウスを sacrifice して、採血および胸腹部大動脈を採取した。

血液検体は血糖や一般脂質および脂肪酸分画の評価の他、酸化還元能を d-ROM, BAP テストにて測定評価した。

大動脈切片は病理組織学的検討に加え、一部は RT-PCR にて NADPH oxidase component mRNA の発現量検討に加え、pull down assay による Rac-1 活性化について評価した。

III. GC 過剰状態における血管内皮細胞 MR の作用

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

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

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

2) GC による活性酸素産生に及ぼす MR あるいは GR 阻害の影響

HUVEC に HC あるいは mPSL 10⁻⁵M を添加し、dihydroethidium (DHE) 染色を用いて superoxide の産生を評価した。さらに Spi あるいは RU486 10⁻⁵M を添加しその影響を評価した。

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

HUVEC に HC あるいは mPSL 10⁻⁷M、10⁻⁶M、10⁻⁵M を添加し、ウエスタンブロッティングによりレドックス制御をうける接着分子 VCAM-1 の発現と eNOS 発現ならびに Ser1177 リン酸化を検討した。また、HC あるいは mPSL 添加の 8 時間前に Spi あるいは RU486 10⁻⁷M、10⁻⁶M、10⁻⁵M を添加しその影響を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言、徳島大学遺伝子組み換え実験安全管理委員会規定ならびに徳島大学倫理委員会規定に基づき施行した。

3. 研究結果

I. GC 過剰の血管内皮細胞における Rac-1 の活性化とピタバスタチンの効果に関する検討

HUVEC にデキサメサゾンを追加した場合は著明に Rac-1 の活性化が見られた。一方、ピタバスタチンの添加は、デキサメサゾンの添加の有無に関わらず Rac-1 の活性化を抑制したが、デキサメサゾン添加群においては、デキサメサゾン非添加群とほぼ同様のレベルまで Rac-1 の活性化を抑制していた(図2)。

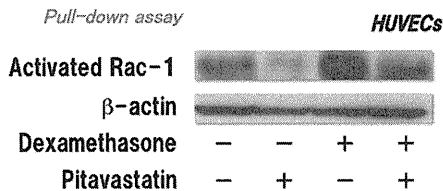


図2. デキサメサゾンはヒト血管内皮細胞において Rac-1 の活性化を来し、ピタバスタチンはそれを抑制する

II. エイコサペンタエン酸 (EPA) による酸化ストレス抑制作用と心血管臓器保護効果

1) EPA による脂質プロファイルの変化

EPA 投与後の脂質プロファイルは主に総コレステロール、中性脂肪(TG)、HDL コレステロールの低下が有意に見られ、逆に EPA/AA 比の有意な上昇が見られた。

2) EPA は Ang II 負荷による大動脈中膜および外膜肥厚を抑制する

マッソントリクローム染色では、Ang II 負荷により大動脈中膜および外膜肥厚が増大したが、EPA はそのいずれも抑制効果を示した(図3)。

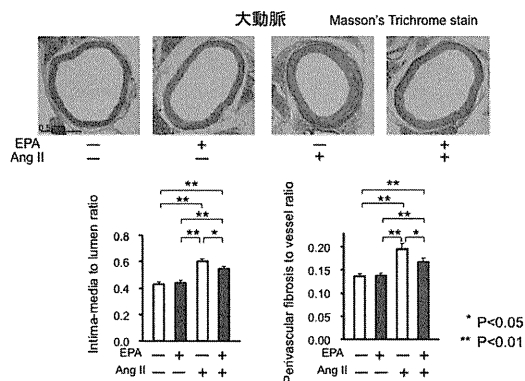


図3. EPA は Ang II 負荷によるマウス大動脈リモデリングを抑制する

3) EPA は Ang II 負荷による酸化ストレスを抑制する

血中の活性酸素マーカーである d-ROM 値は Ang II 負荷により増大し、EPA 投与により抑制された。一方還元能マーカーである BAP は Ang II 負荷 EPA

投与群でわずかながらにベース状態からの増加があり、BAP/d-ROM 比は Ang II 負荷時に低下するが、EPA は BAP/d-ROM 比の低下を抑制した。

4) EPA は Ang II による大動脈 NADPH oxidase の活性化を抑制する

Ang II は大動脈組織における NADPH oxidase のコンポーネントである p22phox や p67phox の mRNA を増大させたが、EPA 投与はそれらを抑制した。また Ang II 投与により大動脈の Rac-1 が活性化されたが、EPA 投与はそれを抑制した(図4)。

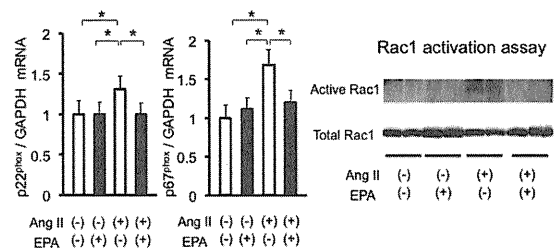


図4. EPA は Ang II 負荷によるマウス大動脈の NADPH oxidase の活性化を抑制する

III. GC 過剰状態における血管内皮細胞 MR の作用

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

HC および mPSL は濃度依存性に GR/MR 転写活性を亢進した。この作用は Spi あるいは RU486 により濃度依存性に抑制された(図5)。

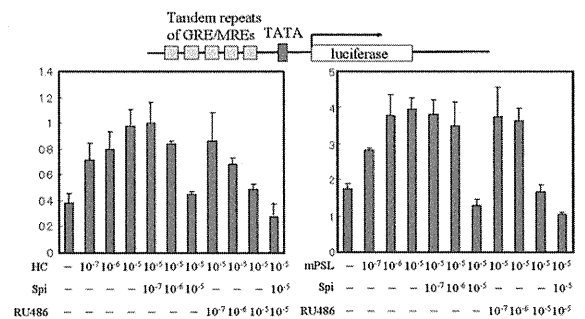


図5. GC 過剰による転写活性亢進は GR および MR 阻害により抑制される

2) GC による活性酸素産生に及ぼす MR あるいは GR 阻害の影響

HC あるいは mPSL は superoxide 産生を増加させ、Spi あるいは RU486 はその作用を抑制した(図6)。