

# SLEにおけるステロイド性大腿骨頭壊死症の疾患関連SNPsの探索

宮本健史、藤江厚廣、金治有彦、船山 敦、戸山芳昭 (慶應義塾大学医学部 整形外科)

特発性大腿骨頭壊死症は、ステロイドの大量投与やアルコールの多飲などの背景因子に発症することが知られているが、未だ原因が同定されていない。原因遺伝子の同定は、特発性大腿骨頭壊死症の疾患発症予防などの対策開発に役立つと考えられる。

## 1. 研究目的

本研究では特発性大腿骨頭壊死症の中でも SLE に対してステロイドの大量投与療法を受けることにより発症する疾患関連遺伝子 SNPs を同定することを目的としている。

## 2. 研究方法

SLE に対してステロイドのパルス療法や大量投与療法を受けた患者のうち、本研究に同意して頂ける患者から採血し DNA を抽出、genome wide association study を実施する。本研究は慶應義塾大学医学部の倫理委員会の承認を受けて実施されている。

## 3. 研究結果

genome wide association study を実施するため、学内および一部の共同研究施設において倫理委員会の申請を行い、承認を受けている。まだ結果が出る段階には至っていない。

アルコールもステロイドとならんで大腿骨頭壊死症の発症の誘因になることが知られている。我々は、アルコール代謝の過程で発生するアセトアルデヒドを分解するのに必須の酵素である aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) の変異が骨の脆弱性を誘発することを見出した(論文発表1)。

骨頭壊死症における骨頭圧壊に対しては人工関節置換術が用いられることも少なくないが、骨頭圧壊部に対し人工骨などを充填する手術も試みられている。人工骨はサイズが大きくなった場合は移植部からの宿主由来の細胞の人工骨への侵入が起りにくくなり、生体親和性の点で問題が起こる。我々は、人工骨である beta-tricalcium phosphate ( $\beta$ TCP) を用いた解析により、

人工骨を用いた骨補填の際に成長因子である platelet derived growth factor BB (PDGFbb) を添加することで、ホストの細胞の人工骨への侵入を劇的に増やし、生体親和性を亢進させることを見出した(論文発表2)。

## 4. 考察

SNPs の手法を用いてステロイドによる大腿骨頭壊死症発症に関与する疾患関連遺伝子を同定する場合には、検体数の確保と各々の検体に関する臨床情報の正確さが何より大切であると考えられる。

## 5. 結論

引き続きSNPs解析に供する検体と臨床情報の収集に務めることが重要である。

## 6. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Hoshi H, Hao W, Fujita Y, Funayama A, Miyauchi Y, Hashimoto K, Miyamoto K, Iwasaki R, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto H, Yoshida S, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Kitagawa K, Nakayama KI, Kawamoto T, Sano M, Fukuda K, Ohsawa I, Ohta S, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Toyama Y, Miyamoto T. Aldehyde-stress resulting from Aldh2 mutation promotes osteoporosis due to impaired osteoblastogenesis. J Bone Miner Res 2012; 27: 2015-2023.
- 2) Yoshida S, Iwasaki R, Kawana H, Miyauchi Y, Hoshi H, Miyamoto H, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Kobayashi T, Sato Y, Miyamoto K, Morioka H, Matsumoto M, Chiba

K, Toyama Y, Nakagawa T, Miyamoto T. PDGFBB promotes PDGFR  $\alpha$ -positive cell migration into artificial bone in vivo. Biochem Biophys Res Commun 2012; 421: 785-789.

2. 学会発表

なし

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

8. 参考文献

なし

# 全身性エリテマトーデス患者に好発する大腿骨頭壊死症の背景となる

## 免疫関連遺伝子の発現異常に関する解析

竹内 勤 (慶應義塾大学医学部 リウマチ内科)

鈴木勝也 (慶應義塾大学医学部 リウマチ内科)

大腿骨頭壊死症は、SLE に高頻度に出現することからこの病態に免疫学的機序が関与する可能性を想定し、SLE 患者末梢血を用いた網羅的遺伝子発現解析を前向きに実施して、発症の背景となる SLE 特有の免疫関連遺伝子の発現を検討した。大腿骨頭壊死症の発症の背景にある SLE に特有な免疫異常に関わる分子群および経路として、プロテアソーム関連遺伝子群、HLA クラス I 遺伝子群、熱ショック蛋白ファミリー群が抽出された。RNAseq の結果からは、SLE 特異的特異的な 9 遺伝子が抽出された。このうち著明に発現亢進している遺伝子として SDC1 が抽出された。大腿骨頭壊死症の発症に SLE 特有の免疫異常および微小血管内皮障害の関与も考えられ、これらの異常がどのように病態に関わるかを今後さらに検討することが重要と考えられた。

### 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。

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が、予防投与の有無にかかわらず大腿骨頭壊死症の発生は 25~26% と高頻度であった。依然として主要な病態が不明であり、とりわけステロイド性のなかでも、特に SLE に高頻度に出現する機序に関しては、血管炎の関与の可能性については推察されているものの依然として明らかとなっていない。

この SLE における大腿骨頭壊死症の病態に SLE 特有の免疫学的機序が関与する可能性を想定し、患者末梢血を用いた網羅的遺伝子発現解析を前向きに実施することにより、SLE に高頻度に合併するステロイド性の大腿骨頭壊死症の発症の背景に

ある SLE に特有な免疫異常に関わる分子群および経路を探索することを本年度の目的とした。

### 2. 研究方法

1) 未治療活動性 SLE 患者末梢血の亜分画別の網羅的遺伝子発現の統合解析

未治療活動性 SLE 3 例、健常人 6 例プールの末梢血からの末梢血を CD4+、CD8+、CD19+、CD14+ 細胞に分離後、DNA マイクロアレイを用いて、網羅的に遺伝子発現量を同定した。クラスター解析、差次的遺伝子発現解析、Gene Ontology 解析、パスウェイ解析、ネットワーク解析を施行した。

2) SLE 患者末梢血におけるハイスループットシーケンサーを用いたトランスクリプトームワイド解析 (RNAseq)

SLE 3 例、関節リウマチ(RA) 3 例、健常人(HC) 6 例の計 12 検体の末梢血より Total RNA を抽出。Total RNA から poly A 鎖(+)RNA を精製および数百 bp 程度に断片化した後、ランダムヘキサマーを用いて 2 本鎖 cDNA を合成。両末端に解析用のア

アダプターを付加し、鋳型となる cDNA ライブラリーを作製。SLE、RA 各 3 例、HC6 例はサンプル混合とし、合計7検体を Genome Analyzer IIX(Illumina)を用いて、ペアエンドシーケンシングを行った。塩基配列データを取得し、ヒトゲノム配列をリファレンス配列としてマッピングした。データはゲノムブラウザにインポートし、周辺の既公開ゲノムアノテーションとともにマッピングし比較解析を行った。

(倫理面への配慮)

倫理委員会承認の同意書の取得が得られた検体を用い、連結可能匿名化状態で解析施行。

検体提供者のプライバシーについて最大限配慮を行った。

### 3. 研究結果

#### 1) 未治療活動性 SLE 患者末梢血の亜分画別の網羅的遺伝子発現の統合解析

SLE 患者群の遺伝子発現は、健常人と比較して IFN signature を含め多数の差異が認められた。

IFN 誘導遺伝子の発現を亜分画別に比較すると、上昇する遺伝子の種類が大きく異なっていたことから、SLE 活動期において誘導されている経路が、細胞群により異なる可能性が示唆された。

次に Gene Ontology 解析を行ったところ、各亜分画において免疫系に関与する遺伝子群を中心に多数抽出された。統合解析結果の一例としては、

SLE 患者群の CD14+および CD19+の亜分画では、プロテアソーム関連遺伝子群、HLA クラス I 遺伝子群、熱ショック蛋白ファミリー群の統計学的に有意な発現上昇が認められた。

Gene Ontology の Enrichment analysis の結果、下記の GO term に関する遺伝子を抽出。これらの GO term で、チップに搭載されているプロテアソーム関連、HLA クラス I、熱ショック蛋白遺伝子群を網羅。CD14+および CD19+群で SLE の患者で発現が亢進。

#### 2) SLE 患者末梢血におけるハイスループットシーケンサーを用いたトランスクリプトームワイド解析 (RNAseq)

SLE3 例、RA3 例、HC の 7 レーンおよびコントロール(φ X)のいずれも、総リードペア 5000-6000 万リードのデータが取得でき、平均 depth も 30 前後と十分なカバレッジを持つデータが得られた。各リードよりアダプター配列をトリミングの後、TopHat によりヒトゲノム(UCSC hg19)にマッピング。エキソン情報は、UCSC RefGene (RefSeq 由来)を参照し、エキソンごと、サンプルごとにリードカバレッジを算出したところ、一例として SLE サンプルに特異的な 9 遺伝子が抽出された。また、マイクロアレイにて抽出した免疫プロテアソームに関しても SLE では HC に比し高いカバレッジが得られ、その再現性が確認できた。

Category	GO ACCESSION	GO Term	CD4_up	CD8_down	CD8_up	CD14_down	CD14_up	CD19_down	CD19_up
MHCI関連	GO:0002474	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I					CD14_up		CD19_up
	GO:0042824	MHC class I peptide loading complex					CD14_up		
	GO:0042612	MHC class I protein complex							CD19_up
	GO:0032393	MHC class I receptor activity					CD14_up		CD19_up
熱ショック蛋白	GO:0031072	heat shock protein binding					CD14_up		
プロテアソーム	GO:0043161	proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process					CD14_up		
	GO:0000502	proteasome complex					CD14_up		
ユビキチン	GO:0006511	ubiquitin-dependent protein catabolic process					CD14_up	CD19_up	

表 1 SLE 末梢血におけるプロテアソーム関連遺伝子群、HLA クラス I 遺伝子群、熱ショック蛋白ファミリー群の発現比較

#### 4. 考察/結論

1) SLE 末梢血 CD14+および CD19+細胞では、IFN シグナルの活性化に続き、プロテアソームにより内因性抗原の分解が促進され、HLA クラス I 分子による抗原提示の誘導が亢進していることが示唆された。発現上昇を認めたプロテアソームには、構成型プロテアソームに加え、免疫プロテアソームも含まれ、SLE における抗原のプロセッシングの質的变化をきたす一因として関与している可能性も考えられた。

発現が亢進していたプロテアソームは、新たな治療標的分子の候補として期待されるが、今後さらに症例数を増やした解析や蛋白レベルの検討が必要と考えた。

未治療活動性 SLE の検体を用いて亜分画ごとの遺伝子発現を統合解析することにより、末梢血全体での一般的な解析では埋もれてしまっていた本疾患の特徴の一端を明らかにできた。このアプローチがもたらす情報は、SLE の大腿骨頭壊死難治性病態の解明およびその治療標的を考える上で有用と考えられた。

2) RNAseq 法は一塩基レベルで遺伝子解析できる強力な手法である。今回はパイロット研究として試みたが、膨大なデータを実際に扱うこととなり、目的に適した解析法の選択や偽陽性等の判別など、今後引き続き検討すべき課題も多く見つかった。

3) これまでの結果から大腿骨頭壊死症の発症の背景にある SLE に特有な免疫異常に関わる分子群および経路として、プロテアソーム関連遺伝子群、HLA クラスI遺伝子群、熱ショック蛋白ファミリー群が抽出された。

さらに RNAseq の結果からは、SLE 特異的に 250 倍以上に発現亢進している遺伝子として SDC1 が抽出された。SDC1 は Type I transmembrane heparan sulfate proteoglycan で、形質細胞、pDC の表面マーカー分子としても知られている。SLE で

はこれらの細胞の活性化が分子病態と関連しており、興味深いことに、SLE の病的 T 細胞モデルである TCR $\alpha$  改変 T 細胞におけるマイクロアレイ解析で SDC1 は発現亢進遺伝子として抽出され、蛋白レベルでも亢進していた。最近 SDC1 の重要な機能として、血管新生において、VEGF シグナルに SDC1-インテグリン-IGF1R のコンプレックスが関与しているとの報告があるが、SLE では血清中の VEGF が亢進していることが知られており、微小血管内皮障害の進展への関与も考えられた。

大腿骨頭壊死症の発症に SLE 特有の免疫異常および微小血管内皮障害の関与も考えられ、今後、これらの異常がどのように病態に関わるかをさらに検討することが必要と考えられた。

#### 5. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Takeuchi T, Suzuki K, Kondo T, Yoshimoto K, and Tsuzaka K. CD3 z defects in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 71:i78-i81, 2012.
- 2) Takeuchi T and Suzuki K. CD247 variants and single nucleotide polymorphisms observed in systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology (Oxford)* in press.
- 3) 倉沢隆彦、鈴木勝也、竹内勤: 特集 自己免疫疾患の最近の話題と展望 マイクロアレイを用いた自己免疫疾患の解析 *Pharma Medica* vol.31 No.1 メディカルレビュー 2013

##### 2. 学会発表

- 1) 鈴木勝也、瀬戸山由美子、近藤恒夫、吉本桂子、亀田秀人、天野宏一、竹内勤: 未治療活動性 SLE 末梢血亜分画における遺伝子発現の統合解析、2012 年 4 月 27 日、第 56 回日本リウマチ学会学術集会、東京
- 2) 近藤恒夫、鈴木勝也、近藤恒夫、吉本桂子、亀田秀人、竹内勤、天野宏一: カルシニューリ

ン阻害薬による全身性エリテマトーデス患者  
TCRと鎖発現の回復効果、第 56 回日本リウ  
マチ学会学術集会、2012 年 4 月 27 日、東京

- 3) 鈴木勝也、瀬戸山由美子、近藤恒夫、吉本  
桂子、亀田秀人、天野宏一、竹内勤: 未治療  
活動性 SLE 末梢血垂分画における遺伝子発  
現の統合解析、2012 年 9 月 27 日、第 40 回  
日本臨床免疫学会総会、東京
- 4) 鈴木勝也、竹下勝、竹内勤: 関節リウマチの  
新たなバイオマーカー、第 2 回 TNF 療法研究  
会、2012 年 10 月 18 日、東京
- 5) Suzuki K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Kameda  
H, Takeuchi T. Integrative gene expression  
analysis in subpopulation of peripheral blood  
mononuclear cells from untreated active sys-  
temic lupus erythematosus patients 2012 年 12  
月 7 日、第 41 回日本免疫学会学術集会、神戸
- 6) Suzuki K , Takeuchi T. Applicaon of tran-  
scriptomics for systemic lupus erythematosus  
pathogenesis analysis 2012 年 12 月 12 日、第  
35 回日本分子生物学会年会、福岡

## 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

なし

# 破骨細胞分化における動的クロマチン構造変換

今井祐記、井上和樹  
(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)における骨破壊は、破骨細胞分化亢進による過剰な骨吸収が関与している可能性が考えられる。これまでに破骨細胞分化を担う転写因子が同定され、破骨細胞分化における転写制御ネットワークの一端が解明されつつあるものの、その全貌の解明には至っていない。そこで、我々は、近年、次世代シーケンサーを用いた DNase シーケンスにより、破骨細胞分化を制御する転写制御ネットワークの解明と、分化制御を担う転写因子を探索・同定を試みた。その結果、我々は、破骨細胞特異的な DNaseI hypersensitive site(DHS)を同定することに成功した。さらに、バイオインフォマティクス解析により、破骨細胞特異的な DHS に結合する転写因子の同定に成功した。今回の結果より、DNase シーケンスが破骨細胞分化の転写制御ネットワークの解明に有用であることが示唆された。本手法により、破骨細胞分化の分子基盤を明らかにすることにより、大腿骨頭壊死症における骨破壊の病態生理の解明に繋が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)における骨破壊は、破骨細胞分化亢進による過剰な骨吸収が関与している可能性があることから、破骨細胞分化の分子基盤を解明することが ION における骨破壊に対する治療に繋がると考えられる。これまで、AP-1 や NFATc1 など破骨細胞分化を制御する転写因子が同定され、破骨細胞分化における転写制御ネットワークの一端が解明されつつあるものの、その全貌の解明には至っていない。そこで、我々は、近年、急速な技術革新を遂げている次世代シーケンサーを用いて、破骨細胞分化を制御する転写制御ネットワークの解明と、分化制御を担う転写因子を探索・同定することを目的とし、研究を遂行する。

## 2. 研究方法

破骨細胞分化は、転写制御因子群による破骨細胞分化関連遺伝子の転写活性化により規定されると考えられる。転写が活性化している遺伝子領域は、クロマチン構造が弛緩し、ヌクレアーゼである DNaseI に対して高い感受性を示す。このようなクロマチン領域は DNaseI hypersensitive site(DHS)と呼ばれる。我々は、破骨細胞分化を制御する DHS を、次世代シーケンサーを用いたゲノムワイドアプローチ(DNase シーケンス)により探索・同定を行う。さらに、DNase シーケンスによって得られた

データをバイオインフォマティクスにより解析することで、DHS に結合し、細胞分化を制御する転写因子の探索・同定を行う。

## 3. 研究結果

### 1) DNaseI 濃度の検討

破骨細胞分化モデルとしては、Raw264 細胞を用い、RANKL 投与後24時間の変化を検討した。DNase シーケンスを実施するにあたり、最も重要となるのは、細胞種に応じた適切な DNaseI 濃度の選択である。そこで、Raw264 細胞から抽出した核を、DNaseI 濃度0~6 unit の間で様々な濃度で処理後、qPCR により NFATc1 プロモーター領域の DHS の変化を測定した。その結果、DNaseI 濃度が2 unit が最適であることがわかった。

### 2) DNase I シーケンスによる DHS の同定

RANKL 非投与 Raw264 細胞と RANKL 投与 Raw264 細胞の各々より核を抽出し、DNaseI にて処理後、アガロース電気泳動により100-500 bp のサイズのゲノム DNA を抽出した。得られたゲノム DNA を、次世代シーケンサーillumina Hiseq2000 システムに供して、シーケンス解析を行った。得られたデータは、Bowtie を用いてアライメントし、MACS を用いてピークコーリングを行った。その結果、RANKL 非投与細胞では、14919 サイト、

RANKL 投与細胞では、13545 サイトの DHS を同定することができた。RANKL 投与細胞で同定された 13545 の DHS の中でも、5411 サイトは RANKL 投与細胞特異的な DHS であることも明らかとなった。

### 3) バイオインフォマティクス解析による DHS 結合転写因子の探索・同定

RANKL 投与細胞特異的な 5411 の DHS には、破骨細胞分化を制御する転写因子が結合していると推測される。そこで、5411 の DHS の中に、多く共通するような転写因子結合 DNA 配列をバイオインフォマティクス解析により抽出した。RANKL 投与により発現上昇する遺伝子の転写開始点上流 500bp 以内に存在する DHS を選択し、DNA モチーフ解析ソフト SeqPos を用いて解析した結果、既知の転写因子である Fos や Jun, JunD を同定することができた。さらに、これまで破骨細胞分化との関連が知られていない転写因子群も同定された。

## 4. 考察

次世代シーケンサーを用いた DNase シーケンスにより、破骨細胞分化を制御する DHS の同定に成功し、DHS に結合する転写因子群の同定に成功した。今回、破骨細胞分化制御において既知の転写因子群の同定に成功したことから、本手法によりさらに未知の転写因子の同定が可能となると考えられる。今後は、同定された転写因子が破骨細胞分化を制御するか否かの詳細な解析を行い、ION における骨破壊の分子基盤の解明を行い、ION の病態解明につなげたいと考えている。

## 5. 結論

次世代シーケンサーを用いた DNase シーケンスにより、破骨細胞分化を制御する DHS の同定に成功した。さらに、バイオインフォマティクス解析により DHS に結合する転写因子群の同定に成功した。本手法を用いることにより破骨細胞分化を担う新規転写因子の同定と、転写制御ネットワークの解明が可能となり、ION における骨破壊の病態解明につながる可能性がある。

## 6. 研究発表

### 1. 論文発表(○特に本研究と関係するもの)

#### 1) Yamamoto Y, ..., Imai Y.

Vitamin D receptor in osteoblasts is a negative regulator of bone mass control  
Endocrinology (in press)

#### 2) Okuno Y, ..., Imai Y.

Epigenetic Regulation of Adipogenesis by PHF2 Histone Demethylase  
Diabetes. (in press)

#### 3) ○Imai Y et al.

Nuclear Receptors in Bone Physiology and Diseases  
Physiol Rev. (in press)

#### 4) ○Youn MY, ..., Imai Y.

JMJD5, a JmjC-domain-containing protein, negatively regulates osteoclastogenesis through facilitating NFATc1 protein degradation. J Biol Chem. 2012 Apr 13;287(16):12994-3004.

## 2. 学会発表

### 1) Kazuki Inoue and Yuuki Imai,

Dynamic Changes of Chromatin Accessibility During Early Osteoclastogenesis, 2012 ASBMR annual meeting, Minneapolis, MN, USA

## 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



# 間葉系幹細胞の骨芽細胞分化促進作用を介した大腿骨頭壊死治療の可能性に 関する研究

田中良哉、山岡邦宏、園本格士朗、張香梅、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の病態として滑膜の炎症と間葉系幹細胞の異常が報告されている。研究者らは、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、IL-1 刺激により迅速かつ効率的に骨芽細胞へ分化し、wnt5a/ror2 シグナル伝達系の関与を解明した。今年度は、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を用いて大腿骨頭壊死症の局所治療の可能性を検討した。間葉系幹細胞をから骨芽細胞への分化、石灰化誘導は、scaffold としてポリ乳酸ナノファイバー(PLGA)を用いると顕著に増強した。間葉系幹細胞を PLGA に播種してコラーゲン誘導関節炎動物モデルへ移植したところ、関節炎、関節破壊、2 次リンパ組織のずれもが抑制され、抑制性サイトカインの産生が示唆された。以上、PLGA を用いた間葉系幹細胞を移植は、骨芽細胞誘導、破骨細胞抑制、免疫抑制作用を介して骨再生を効率的に誘導することが示され、大腿骨頭壊死症の局所治療ツールとしての臨床応用の可能性が示唆された。

## 1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症は、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。発症機序は未だ不詳であるが、壊死に陥った骨頭の機能改善は期待できず、「修復」を目指した治療ツールの開発が必須である。また、本疾患の病態として間葉系幹細胞の異常が示され、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。これまで研究者らは、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、IL-1 $\beta$ -wnt5a/ror2 シグナル経路を介する迅速かつ効率的な骨芽細胞の増幅・誘導系を確立した。現在、斯様な増幅系を整備し、臨床応用可能な培養系を確立し、「骨頭修復」への応用を図るべく検討中である。平成 24 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の解明、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。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 ナノファイバーシートに播種したヒト間葉系幹細胞をコラーゲン誘導関節炎モデルラットの罹患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。一方、間葉系幹細胞単独あるいはナノファイバー単独を関節内や腹腔内に投与しても殆ど抑制効果を示さなかった。

② ナノファイバーに播種した間葉系幹細胞で治療した群では関節局所の IL-1 $\beta$ 、IL-6 発現や所属リンパ節腫大、さらに脾腫および血清抗 II 型コラーゲン抗体産

生が抑制され、局所の治療効果のみならず全身性免疫応答の抑制作用を持つことが示された。また、ナノファイバー播種移植した間葉系幹細胞からは TGF- $\beta$  が産生され、免疫、炎症抑制作用に介在する事が示唆された。

#### 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、コラーゲン誘発関節炎モデルにおいて、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞をナノファイバー (PLGA) に播種して、関節近傍へ移植することにより、関節炎と関節破壊の抑制が示された。関節内投与ではこれらの効果は認められず、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り局所効果が発揮されたと考えられた。また、ナノファイバー播種間葉系幹細胞は TGF  $\beta$  産生誘導等を介して、骨芽細胞、軟骨細胞の分化誘導能のみならず、顕著な免疫抑制効果を有する事が示された。さらに、オステオプロテグリン産生増強を介して破骨細胞分化を制御した。以上、間葉系幹細胞は、ナノファイバー播種により、骨芽細胞誘導のみならず、破骨細胞抑制、免疫抑制作用を介して骨再生を効率的に誘導することが示され、大腿骨頭壊死症の局所治療ツールとしての臨床応用の可能性が示唆された。壊死になった骨組織の再生・修復を目指し、治療ツールとしての実践的展開を検討していく予定である。

#### 5. 結論

ナノファイバー (PLGA) 播種ヒト骨髄由来間葉系幹細胞は、骨芽細胞や軟骨細胞への分化誘導、破骨細胞の分化制御、全身性免疫応答の抑制作用を併せ持ち、壊死になった骨組織の再生・修復を目指す上で有効なツールである事が明らかになった。今後、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) Sonomoto K, Yamaoka K, Oshita K, Fukuyo S, Zhang X, Nakano K, Okada Y, [Tanaka Y](#). IL-1  $\beta$  induces differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts via the Wnt5a/Ror2

pathway. Arthritis Rheum (2012) 64, 3355-3363

- 2) Maeshima K, Yamaoka K Kubo s, Nakano K, Iwata S, Saito K, Ohishi M, Miyahara H, Tanaka S, Ishi K, Yoshimatsu H, [Tanaka Y](#). A JAK inhibitor tofacitinib regulates synovitis through inhibition of IFN- $\gamma$  and IL-17 production by human CD4+ T cells. Arthritis Rheum (2012) 64, 1790-1798
- 3) Iwata S, Saito K, Hirata S, [Tanaka Y](#). Phenotypic changes of lymphocyte in a patient with IgG4-related disease after corticosteroid therapy. Ann Rheum Dis (in press)
- 4) [Tanaka Y](#). Next stage of RA treatment: TNF-inhibitor-free remission will be a possible treatment goal? Ann Rheum Dis (in press)
- 5) Kameda H, Kanbe K, Sato e, Ueki Y, Saito K, Nagaoka S, Hidaka T, Atsumi T, Tsukano M, Kasama T, Shiozawa S, [Tanaka Y](#), Yamanaka H, Takeuchi T. A merged presentation of clinical and radiographic data using probability plots in a clinical trial, the JESMR study. Ann Rheum Dis (in press)
- 6) Takeuchi T, Harigai M, [Tanaka Y](#), Yamanaka H, Ishiguro N, Yamamoto K, Miyasaka N, Koike T, Kanazawa M, Oba T, Yoshinari T, Baker D, and the GO-MONO study group. Golimumab monotherapy in Japanese patients with active rheumatoid arthritis despite prior treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs: results of the Phase 2/3, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled GO-MONO study through 24 weeks. Ann Rheum Dis (in press)
- 7) van der Heijde D, [Tanaka Y](#), Fleischmann R, Keystone E, Kremer J, Zerbini C, Cardiel MH, Cohen S, Nash P, Song YW, Tegzová D, Wyman BT, Gruben D, Benda B, Wallenstein G, Krishnaswami S, Zwillich SH, Bradley JD, Connell CA and the ORAL Scan investigators. Tofacitinib (CP-690,550) in patients with rheumatoid arthritis on methotrexate: 12 month data from a 24 month Phase 3 randomized radiographic study. Arthritis Rheum (in press)
- 8) [Tanaka Y](#), Maeshima Y, Yamaoka K. In vitro and in vivo analysis of a Jak inhibitor in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis (2012) 71, i70-i74

- 9) Iwata S, Saito K, Tokunaga M, Tanaka Y. B-cell or T-cell-dominant recurrence after rituximab therapy in patients with SLE. *Ann Rheum Dis* (2012) 71, 1749–1750
- 10) Tanaka Y, Harigai M, Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Yamamoto K, Mitasaka N, Koike T, Kanazawa M, Oba T, Yoshinari T, Baker D and the GO-FORTH study group. Golimumab, a human anti-TNF- $\alpha$  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* (2012) 71, 817–824
- 11) Iwata S, Yamaoka K, Niino H, Nakano K, Wang S-P, Akashi K, Tanaka Y. Amplification of toll-like receptor-mediated signaling through Syk in human B cell activation. *J Allergy Clin Immunol* (2012) 129, 1594–1601
- 12) Sawamukai N, Satake A, Schmidt AM, Lamborn IT, Tanaka Y, Kambayashi T. Cell autonomous role of TGF $\beta$  and IL-2 receptor in CD4+ and CD8+ inducible regulatory T cell generation during graft-versus-host disease. *Blood* (2012) 119: 5575–83

## 2. 学会発表

- 1) Y. Tanaka. The Maximization of Efficacy of Tocilizumab for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. The 8th International Congress on Autoimmunity, Granada, Spain. May/2012
- 2) Tanaka Y, Harigai M, T. Takeuchi, Yamanaka H, Ishiguro N, Yamamoto K, Kanazawa M, Yoshinari T, Baker D, Miyasaka N, Koike T. 52-week results of clinical, radiographic and pharmacokinetic assessments: golimumab, a human anti-TNF monoclonal antibody, administered subcutaneously every four weeks in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy. The Annual European Congress of Rheumatology 2012, Berlin, German, Jun/2012

## 3. 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

## 4. 参考文献

なし

# 大腿骨頭の血流は加齢とステロイド量により変化する

## — SLE における Dynamic MRI —

中村 順一、岸田 俊二、高橋 和久  
(千葉大学大学院医学研究院 整形外科)

SLE19 例 19 股に対して Dynamic MRI をステロイド投与開始から 1 年間、経時的に通算 78 回撮像した。ステロイド投与後 1 か月で成長軟骨の血流は小児の方が思春期・成人より有意に多かった(54.2%対 18.6%,  $p=0.007$ )。ステロイド投与後 4 ヶ月で大腿骨頭の血流は小児の方が成人より有意に多かった(52.8%対 12.7%,  $p=0.011$ )。部位別には骨端部(44.8%対 19.9%,  $p=0.011$ )、成長軟骨(90.2%対 17.9%,  $p=0.011$ )、骨幹端部(61.7%対 21.0%,  $p=0.019$ )であった。重回帰分析では骨頭血流は年齢とステロイド投与後日数が影響していた( $[\text{peak \% enhancement}] = 0.14 \times [\text{ステロイド投与後日数}] - 3.6 \times [\text{年齢}] + 72.8$ ,  $R^2=0.562$ ,  $p=0.001$ )。

### 1. 研究目的

全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus: SLE)における骨壊死の発生にはステロイド投与時年齢が関与すると報告した<sup>1)</sup>。大腿骨頭壊死症の病態はいまだ不明であるが、血流障害が関与しているという説がある。一般に成長期にある小児は成人に比べ骨への血流が豊富であるとされる<sup>2)</sup>。したがって、年齢による大腿骨頭壊死の発生頻度の違いは大腿骨近位部の血行動態の違いによる可能性がある。大腿骨頭の血流評価にはさまざまな方法が報告されているが<sup>3-8)</sup>、Dynamic MRI は被爆の心配がなく、低侵襲の検査である。本研究の目的は Dynamic MRI を用いて、ステロイド投与開始後早期における SLE の大腿骨近位部の血行動態を検討することである。

### 2. 研究方法

#### MRI 撮像条件

GE 社製 1.5 Tesla MRI(Sigma Horizon 1.5T ver.9.1: GE Medical Systems, Milwaukee, Wisconsin)にて撮像した。撮像条件は Spoiled Gradient Recalled acquisition in the steady state (SPGR)、repetition times (TR) 45.0 ms、echo times (TE) minimum full、slice thickness 7.5 mm、flip Angle 60°、image matrix 256 × 128 とした。股関節は内外転中間位で膝蓋骨正方向位とした。撮像部位は一回の検査につき一関節とし、股関節の冠状断像から大腿骨頸部軸を通る断面像で評価した。造影剤は

ガドペンテ酸メグルミン (マグネビスト®)を 0.2ml/kg 投与した。造影剤注入前を 0 秒とし、注入開始から 5 分後までは 30 秒間隔、以後 60 秒間隔で 15 分後まで撮影し、合計 22 スライスを撮像した。データ解析は GE 社製 Advantage workstation 4.0 を用いた。Region of Interest (ROI)については、内側大腿回旋動脈、大腿骨頭(大腿骨頸部、骨幹端部、成長軟骨、骨端部)を設定した。血流の指標としては% enhancement を採用した。これは造影効果によりベースラインからどれだけ信号変化を生じたかを示しており、Peak %enhancement は血流を反映する<sup>9)</sup>。対象は SLE 患者であり、ステロイド投与開始から 1 年間、同一患者を経時的に Dynamic MRI で評価した。

### 3. 研究結果

症例は SLE 患者 19 例 19 股(右 18 股、左 1 股)であり、小児 5 例、思春期・成人 14 例であった。SLE 発症時年齢はそれぞれ平均 9.6 歳(7-14 歳)と 29.0 歳(15-55 歳)であり、最大ステロイド投与量はプレドニン換算でそれぞれ平均 46.0mg/日(30-60 mg/日)と 54.4mg/日(40-60 mg/日)であった。体重換算するとそれぞれ平均 1.58mg/kg/日と平均 1.07mg/kg/日であった。1 カ月後(25.0mg 対 45.2mg,  $p=0.001$ )と 4 ヶ月後の投与量(15.3mg 対 22.0mg,  $p=0.038$ )は小児で有意に少なかったが、体重換算すると有意差は認めなかった。Dynamic MRI の総検査回数は 78 回であった。

1 ヶ月後における大腿骨近位部の血流は、小児が成長軟骨で有意に高かった(54.2%対 18.6%,  $p=0.007$ )。

ステロイド投与後 4 ヶ月で大腿骨頭の血流は小児の方が成人より有意に多かった(52.8%対 12.7%,  $p=0.011$ )。部位別には骨端部(44.8%対 19.9%,  $p=0.011$ )、成長軟骨(90.2%対 17.9%,  $p=0.011$ )、骨幹端部(61.7%対 21.0%,  $p=0.019$ )であった。一方、内側大腿回旋動脈の血流は変化がなかった。

重回帰分析では骨頭血流は年齢とステロイド投与後日数が影響していた( $[\text{peak \% enhancement}] = 0.14 \times [\text{ステロイド投与後日数}] - 3.6 \times [\text{年齢}] + 72.8$ ,  $R^2=0.562$ ,  $p=0.001$ )。

ステロイド投与開始からの日数と大腿骨頭血流の関係は正の相関を認めた(図 1)。年齢と骨頭血流の関係は、負の相関を認め、加齢に伴って血流が低下することが示唆された(図2)。

図 1 (論文発表 1 より引用)

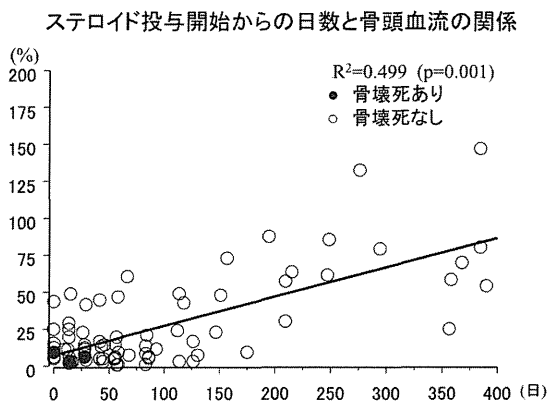
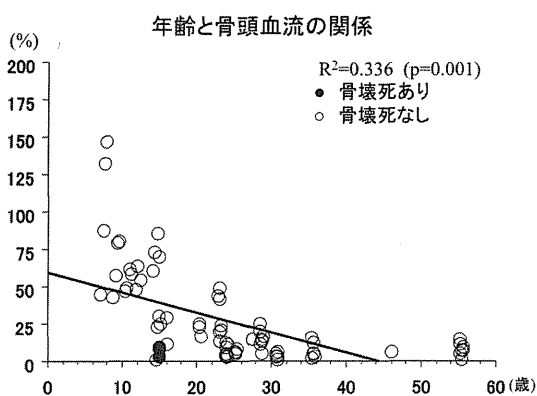


図 2 (論文発表 1 より引用)



#### 4. 考察

大腿骨頭の血流評価法には髄内圧測定法<sup>3)</sup>、電解式水素クリアランス法<sup>4)</sup>、血管造影<sup>5)</sup>、Dynamic MRI<sup>6-7)</sup>、positron emission tomography (PET)<sup>8)</sup>など、さまざまな方法が報告されている。髄内圧測定法と電解式水素クリアランス法は骨頭内に直接プローベを挿入して測定する必要があるため侵襲が大きい。血管造影は栄養血管の走行や途絶の有無など詳細な評価が可能であるが、放射線被曝の問題がある。PET はリアルタイムに動脈採血が必要であることや、CT や放射性同位体の必要性がある。Dynamic MRI は現在臨床応用可能な血流評価法の中では最も低侵襲である。大腿骨近位部の peak % enhancement の正常値については、Covaらが成犬の大腿骨頭は平均 63%、大腿骨頸部は平均 83%であったと報告している<sup>6)</sup>。ヒトでは Morita らの健常成人 5 例(30-48 歳、全例女性)の報告によると、大腿骨頭は約 20%、大腿骨頸部は約 100%とされる<sup>7)</sup>。

Atusmi らはステロイド歴のある 22 股の血管造影から、ステロイド投与により大腿骨頭の血流が低下し虚血を生じると述べており、血流が回復しない場合に大腿骨頭壊死を生じる可能性を示唆した<sup>5)</sup>。本研究では、ステロイド大量投与により大腿骨近位部の血流は一旦低下し、ステロイド投与開始からの日数が経つにつれて血流が回復することが示唆された。また、小児では大腿骨近位部の血流が豊富であることが示唆された。血流の違いが小児 SLE における大腿骨頭壊死の発生頻度の低さに関与しているのではないかと推測される。一方、内側大腿回旋動脈の血流は変化しなかった。つまり、骨髄内の血流とは異なり、骨外の血流は変化しないことを示しており、これらの結果はステロイド性骨壊死症の病態を考える上で非常に興味深い。

本研究の limitation として、倫理的な問題から小児ではステロイド投与前の Dynamic MRI を撮影できなかったことが挙げられる。また、大腿骨頸部軸に沿った断面で評価する場合は一回の検査で一骨頭しか評価できないことが挙げられる。

#### 5. 結論

大腿骨頭内の血流は加齢とステロイド量により変化することが示唆された。

#### 6. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nakamura J, Ohtori S, Watanabe A, Nakagawa K,

Inoue G, Kishida S, Harada Y, Suzuki M, Takahashi K. Recovery of the blood flow around the femoral head during early corticosteroid therapy: Dynamic MRI in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 2012;21:264-70.

## 2. 学会発表

- 1) Nakamura J, Miura Y, Ikenoue S, Kishida S, Harada Y, Shigemura T, Takeshita M, Saisu T, Takahashi K: Blood supply of proximal femur during steroid therapy in SLE patients using dynamic MRI. 77<sup>th</sup> Annual Meeting of American Academy of Orthopaedic Surgeons. New Orleans, LA. 2010.3.9-13
- 2) 中村 順一、重村 知徳、三浦 陽子、池ノ上 純男、岸田 俊二、竹下 宗徳、高澤 誠、山本 晋士、中嶋 隆行、原田 義忠、高橋 和久。Dynamic MRI を用いた、ステロイド投与開始後 1 年間の大腿骨頭の血流解析。第 83 回日本整形外科学会学術総会。東京、2010.5.27-31

## 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  
日本リウマチ学会若手リウマチ医トレーニングプログラム

## 8. 参考文献

- 1) Nakamura J, Saisu T, Yamashita K, Suzuki C, Kamegaya M, Takahashi K. Age at time of corticosteroid administration is a risk factor for osteonecrosis in pediatric patients with systemic lupus erythematosus: A prospective magnetic resonance imaging study. *Arthritis Rheum*. 2010; 62: 609-615.
- 2) Moore SG, Dawson KL. Red and yellow marrow in the femur: age-related changes in appearance at MR imaging. *Radiology* 175:219-223, 1990.
- 3) Zizic TM, Hungerford DS, Stevens MB. Ischemic bone necrosis in systemic lupus erythematosus. I.

The early diagnosis of ischemic necrosis of bone. *Medicine* 59:134-142, 1980.

- 4) Whiteside LA, Lesker PA, Simmons DJ. Measurement of regional bone and bone marrow blood flow in the rabbit using the hydrogen washout technique. *Clin Orthop* 122:340-346, 1977.
- 5) Atsumi T, Kuroki Y. Role of impairment of blood supply of the femoral head in the pathogenesis of idiopathic osteonecrosis. *Clin Orthop* 277:22-30, 1992.
- 6) Cova M, Kang Y, Tsukamoto H, et al. Bone marrow perfusion evaluated with gadolinium-enhanced dynamic fast MR imaging in a dog model. *Radiology* 179:535-539, 1991.
- 7) Morita F, Nakano Y, Ishii T. Development of detection method of early stage nontraumatic osteonecrosis of the femoral head by dynamic MRI. *日放技誌*1999;46:413-421
- 8) Kubo T, Kimori K, Nakamura F, et al. Blood flow and blood volume in the femoral heads of healthy adults according to age: measurement with positron emission tomography (PET). *Ann Nucl Med* 15:231-235, 2001.

# 血管内皮機能障害を背景にした重症下肢虚血モデルにおける

## ピタバスタチンの臓器保護効果の検討

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）  
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）

我々はこれまでに、グルココルチコイド過剰状態が、血管内皮細胞での酸化ストレスの産生亢進と内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)の発現およびリン酸化低下を生じ、血管内皮機能障害を来すことで、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。また HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるピタバスタチンは血管内皮細胞においてグルココルチコイド受容体およびミネラルコルチコイド受容体活性化による酸化ストレス産生を抑制し、eNOS の発現およびリン酸化の障害を回復させることを、本班会議において報告してきた。特発性大腿骨頭壊死症では、血管内皮機能障害によって引き起こされる虚血環境下での組織耐性が、壊死病変の進展度に大きく影響すると考えられるが、我々は今回新たにピタバスタチンが、内皮機能障害を背景とする重症虚血モデルにおいて組織耐性を増す事を見だし特発性大腿骨頭壊死病変の進展予防効果をもたらす新たな効果を示す結果を得た。

### 1. 研究目的

我々はヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVECs)やグルココルチコイド過剰マウスモデルを用いた検討により、血管内皮細胞におけるグルココルチコイド受容体(GR)およびミネラルコルチコイド受容体(MR)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・リン酸化低下を惹起し<sup>1)2)</sup>、この変化が、血管内皮機能障害に基づく循環障害を引き起こすことを示して来た。そしてこの血管内皮機能障害が、特発性大腿骨頭壊死発症において、主要な原因の一つとなる事を提唱してきた。

またこのグルココルチコイド過剰によってもたらされる活性酸素産生の増加や一酸化窒素(NO) bioavailability の低下によって引き起こされる血管内皮機能障害の大部分が、脂溶性で CYP 代謝をほとんど受けない HMGCoA 還元酵素阻害薬(Vascular Statin とも称される)であるピタバスタチンの先行投与により抑制されることを in vivo および in vitro の検証結果から、本班会議においてこれまで報告してきた<sup>3)</sup>。(図 1,2,3)。

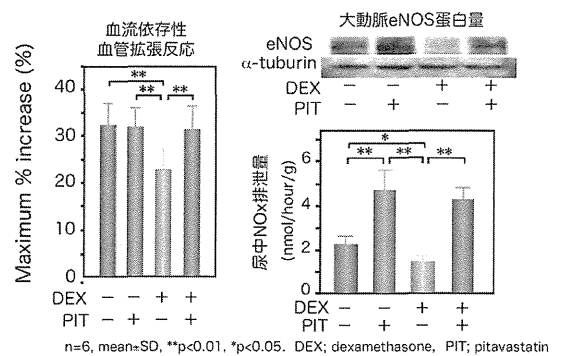


図1. ピタバスタチンによるデキサメサゾン過剰マウスにおける血管内皮機能障害の改善効果

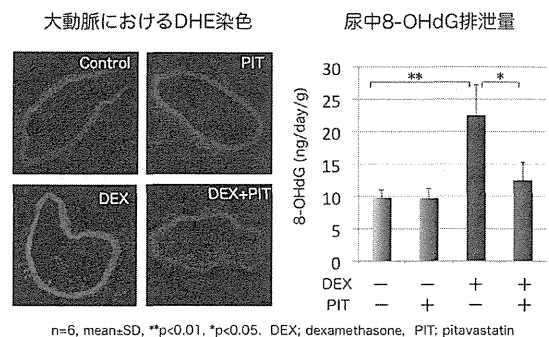


図 2. ピタバスタチンによるデキサメサゾン過剰マウスにおける酸化ストレスの抑制効果

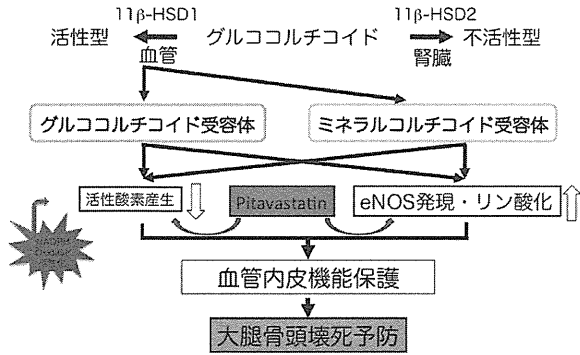


図3. グルココルチコイド誘発性大腿骨頭壊死に対するピタバスタチンの発症予防仮説

一方、特発性大腿骨頭壊死は、血管内皮機能障害を背景とした重篤な組織虚血によって、骨壊死を来す。完全に特発性大腿骨頭壊死を予防する方策が、確立していない現況において、発症後の壊死範囲の進展予防ならびに縮小化は、患者のADLやQOLの維持に重要であると考えられる。

今回我々は、特発性大腿骨頭壊死の病態疑似モデルとして、eNOS欠損マウスの下肢虚血モデルを作成し、ピタバスタチンによる虚血組織保護効果の有無およびその作用機序について検討する事とした。

## 2. 研究方法

### I. ピタバスタチンの脂質・糖代謝に対する効果検証

12週齢のeNOS欠損マウス(C57BL6/Jバックグラウンド)を2群に分け、1群にはピタバスタチンを飲水中に溶解させ、0.3mg/kg/dayの投与を1週間行なった。1週間後に2群のマウスを16時間絶食にした後に、麻酔下にマウス下大静脈より22G針にて、ヘパリン化血漿を採取。冷却遠心分離後に、総コレステロール、HDLコレステロール、中性脂肪、血糖値を測定し、群間比較を行なった。

### II. eNOS欠損マウスの下肢虚血モデルの作成

試験開始1週間後、ピタバスタチン投与および非投与群の2群にて図4のごとく、左側後肢の皮膚を切開し、大腿動静脈を剖出した。そして鼠径靭帯直下の部分で大腿動静脈を結紮し、さらにその遠位側の側副結構路を全て結紮後、動静脈を剥離除去。手術後の虚血後肢の肉眼変化を、経日的に評価し、壊死脱落の頻度を検証した(図4)。

大腿動静脈起始部を結紮し全分枝を結紮後、動静脈を摘出除去。

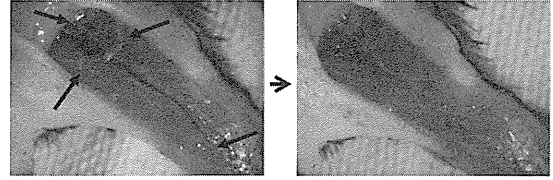


図4.マウス後肢の虚血モデル作成概略図

## III. 虚血および非虚血肢の採取およびアポトーシス制御関連因子の発現・活性化の検討

虚血手術24時間後に安楽死後のマウスの虚血肢ヒラメ筋組織を採取し、ピタバスタチン投与および非投与群の2群間における血管新生、Cell Survivalおよびアポトーシス制御関連因子の発現および活性化をreal-time PCRおよびWestern blotにて評価した。

(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. ピタバスタチンはマウス血漿の脂質および糖代謝に影響を与えない

ピタバスタチン投与1週間後の空腹時採血による脂質および血糖値については2群間で明らかな差を認めなかった(図5)。

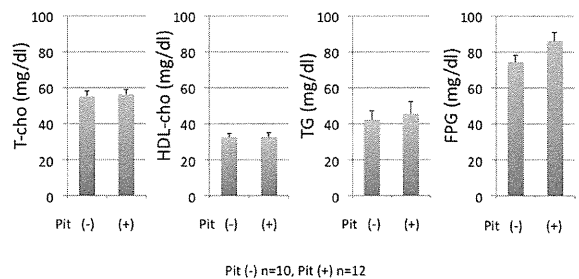


図5. ピタバスタチン(Pit)の有無による脂質および血糖値

### II. ピタバスタチンはeNOS欠損マウス虚血肢の壊死を抑制する

eNOS欠損マウス虚血手術翌日に虚血肢には著しい浮腫と血行障害による皮膚の暗赤化が見られた。その後、虚血肢の壊死脱落は、比較的早期に見られ



たが、ピタバスタチンの先行投与群では、その変化が術後1週間までの間、軽微であり、虚血肢の壊死脱落の頻度は抑制された(図6, 7)。

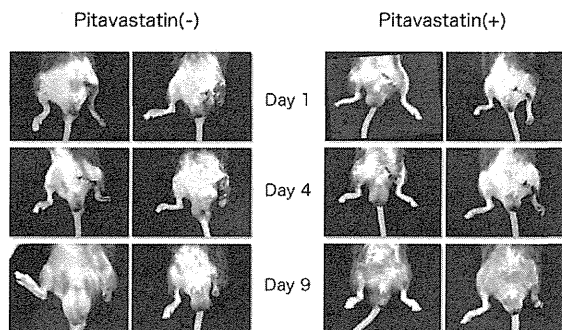


図6. ピタバスタチン(Pit)の有無による後肢の虚血変化外観

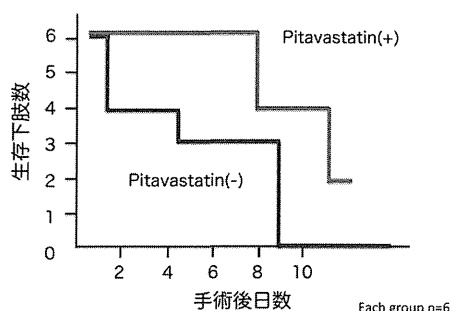


図7. ピタバスタチン(Pit)の有無による虚血後肢の生存率

### III. ピタバスタチンはeNOS欠損マウスの虚血肢のアポトーシスを抑制する

採取した虚血肢より mRNA を抽出し、real time PCR 法にて、血管新生、Cell Survival およびアポトーシス制御関連因子の発現について検証した。その結果、Hif1  $\alpha$  の発現量に差異がなかったものの、VEGF の発現量はピタバスタチン投与群で 2 倍に増加していた(図8)。その他 Caspase 群については差異を認めなかった。

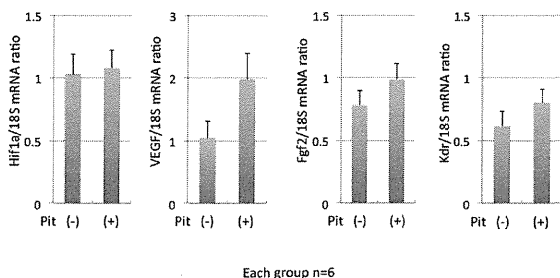


図8. 虚血肢における血管新生、Cell Survival およびアポトーシス制御関連因子の発現 (Real Time PCR)

また同時に蛋白抽出もを行い、Western blot により、血管新生、Cell Survival およびアポトーシス制御関連因子の発現およびリン酸化について検証した。その結果、Bcl2/Bax 比、AMPK のリン酸化が、ピタバ

スタチンで増強される他、JNK のリン酸化は抑制されており、総じて血管新生や Cell Survival の保持、アポトーシス抑制に働いている事が示された(図9)。

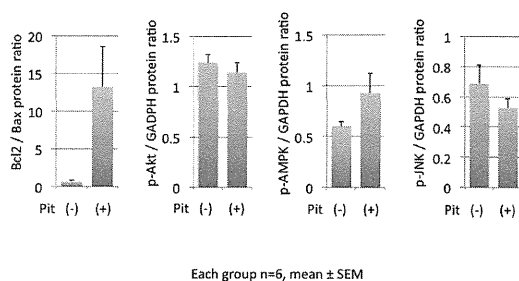


図9. 虚血肢における血管新生、Cell Survival およびアポトーシス制御関連因子の発現とリン酸化 (Western blot)

### 4. 考察

特発性大腿骨頭壊死の病態解析における本研究班の知見の蓄積にて、グルココルチコイド過剰状態によって引き起こされる血管内皮機能障害が、その特発性大腿骨頭壊死の主要な病態原因の一つである事が明らかになって来た。したがって、特発性大腿骨頭壊死発症予防ならびに病態進展予防のためには、大腿骨頭およびその周囲の栄養血管における血管内皮機能の維持が極めて重要である。

これまでの我々の検討から、ピタバスタチンは直接的に、血管内皮細胞における eNOS の発現やリン酸化の亢進によって NO の産生を高めるだけでなく、組織での活性酸素産生を抑制することで、NO の消去を防ぎ、結果として NO bioavailability の保持に有用である事が明らかになって来た<sup>45)6)</sup>。このことはステロイド・パルス療法などの治療に先だって、ピタバスタチンを投与する事により、大腿骨頭およびその周囲栄養血管の循環保持効果を得る事が出来ると考えている。

それに加え、今回我々は、ピタバスタチンの先行投与が、不可逆な虚血によって特発性大腿骨頭壊死を来した場合でも、アポトーシスや Cell Survival、血管新生関連因子の制御を通じて、その病巣領域拡大を抑制する可能性を見いだした。この事は、股関節症の保存的な治療期間の延長効果や、骨頭壊死範囲を小さくすることで将来の手術治療などにおいて従来よりも術式の難易度を低下させ得る可能性を示唆している。このピタバスタチンによる Dual Effect ともいべき効果は、本症予防および治療における基盤薬物としての有用性を示しているものとする(図10)。

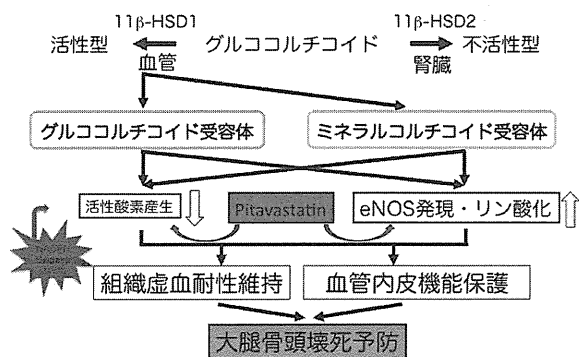


図 10. ピタバスタチンは特発性大腿骨頭壊死の発症および病態進展阻止の Dual Effect を有する

## 5. 結論

ピタバスタチンはグルココルチコイド過剰によって生じる血管内皮機能の低下を予防し、虚血によって壊死に陥る組織保護作用の 2 つの効果を有しており、特発性大腿骨頭壊死症治療の基盤薬物になる事が示唆された。

## 6. 研究発表

### 1. 論文発表

- Ikeda Y, Aihara K, Yoshida S, Iwase T, Tajima S, Izawa-Ishizawa Y. et al. Heparin cofactor II, a serine protease inhibitor, promotes angiogenesis via activation of the AMP-activated protein kinase-endothelial nitric-oxide synthase signaling pathway. *J Biol Chem.* 2012;287:34256-63.
- Yagi S, Aihara K, Ikeda Y, Akaike M, Sata M, Matsumoto T. Effects of statins on cardiorenal syndrome. *Int J Vasc Med.* 2012;2012:162545. Review.
- Ikeda Y, Aihara K, Yoshida S, Akaike M, Matsumoto T. et al. Effects of androgens on cardiovascular remodeling. *J Endocrinol.* 2012;214:1-10. Review.

### 2. 学会発表

- 吉田守美子、栗飯原賢一、近藤絵里、近藤剛史、倉橋清衛、木内美瑞穂 他:糖尿病は HDL コレステロールによる血管内皮機能改善効果を減弱させる:第 85 回日本内分泌学会学術総会. 名古屋. 2012.4.20.
- 栗飯原賢一:血管形態と機能解析からみた頸動脈硬化の性差と副腎アンドロゲン DHEAS の抗動脈硬

化作用.:第 44 回日本動脈硬化学会総会・学術集会. 福岡. 2012.7.20.

- Yoshida S, Aihara K, Ise T, Ueda Y, Ikeda Y, Iwase T. et al.:Androgen receptor is required for cellular survival and angiogenesis in response to ischemia via activation of VEGF receptor signaling pathway regardless of sex. Scientific Sessions 2012, American Heart Association. Los Angeles. 2012. November 6.

## 7. 知的所有権の取得状況

- 特許の取得  
なし
- 実用新案登録  
なし
- その他  
なし

## 8. 参考文献

- Iuchi T, Akaike M, Mitsui T, et al. Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and elicits vascular endothelial dysfunction. *Circ Res.* 2003;92:81-7
- 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.* 2007;17:864-70
- 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.
- Yagi S, Aihara K, Ikeda Y, Sumitomo Y, Yoshida S, Ise T. et al. Pitavastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, exerts enos-independent protective actions against angiotensin II-induced cardiovascular remodeling and renal insufficiency. *Circ Res.* 2008;102:68-76
- Yagi S, Aihara K, Ikeda Y, Akaike M, Sata M, Matsumoto T. et al. Effects of statins on cardiorenal syndrome. *Int J Vasc Med.* 2012;2012:162545.
- Yagi S, Akaike M, Aihara K, Iwase T, Ishikawa K, Yoshida S, et al. Effect of low-dose (1 mg/day) pitavastatin on left ventricular diastolic function and albuminuria in patients with hyperlipidemia. *Am J Cardiol.* 2011;107:1644-9.

# 内分泌器官としての骨髄脂肪細胞

## ～各種アディポカインの血中及び骨髄液中濃度の比較検討～

福島達也、穂積晃、後藤久貴、津田圭一、尾崎 誠  
(長崎大学大学院 整形外科)

我々は骨髄脂肪細胞の内分泌機能についてこれまで報告してきた。In vitro において骨髄脂肪細胞へのデキサメサゾン負荷により PAI-1 の遺伝子発現、分泌量が増加することがわかり、骨内血行動態にステロイドが影響することが示唆された。今回 in vivo での PAI-1 を含めたアディポカインの分泌量を調査することを目的とし、ステロイド内服群とコントロール群とでヒト骨髄液と血液中の PAI-1、Adiponectin、Leptin の量を測定してそれぞれ比較検討した。いずれのアディポカインも血液中、骨髄液中ともステロイド内服群の方がコントロール群より高い傾向にあった。さらに血液-骨髄液での比較においては Adiponectin、Leptin では有意差を認めなかったが、PAI-1 では明らかに骨髄液中の量が多かった。PAI-1 は血液中より骨髄液中の濃度が高く、骨髄内ではステロイド投与により血行動態に影響を受けやすい可能性が考えられる。

### 1. 研究目的

特発性骨壊死はその病態はいまだ不明な点が多い。血液凝固系異常による血栓形成、各種酸化ストレスによる血管内皮細胞の障害、脂質代謝異常、脂肪細胞増大に伴う骨内圧の上昇などの関与が示唆されてはいるもののその詳細なメカニズムは依然として解明されていない<sup>1)</sup>。近年、脂肪細胞は様々な生理活性物質を産生し、重要な役割を果たす生体内最大の内分泌器官であることが知られている。現在皮下脂肪や内臓脂肪に関する各種研究は多くなされ、脂肪細胞からのアディポカインの分泌異常が様々な生活習慣病発症の引き金になっていることが明らかになってきている。一方、骨髄内に大量に存在する骨髄脂肪細胞の骨代謝に及ぼす影響については未だ不明な点が多く、その報告も極めて少ない。骨髄脂肪組織は骨内環境を制御する内分泌器官で各種骨疾患の発生に関与していると我々は考えている。

現在までに in vitro での研究を行い、各種研究結果を報告してきた。ステロイドホルモンがアディポカインの一つである PAI-1 の遺伝子発現及び分泌量を増加させることは報告されているが、我々の調査で骨髄脂肪細胞においてもその遺伝子発現、分泌量が増加することがわかった(図 1)<sup>2)</sup>。Dexamethasone 負荷により 24 時間

で PAI-1 の分泌が約 2.5 倍増加すること、また HMG-CoA 還元酵素阻害薬の一つである simvastatin が骨髄脂肪細胞由来の PAI-1 発現、分泌を抑制することを証明した(図 2)<sup>3)</sup>。このことからステロイドが骨内血行動態に影響し、大腿骨頭壊死発生に関与していると推察する。今回 in vivo における PAI-1 分泌量を調査することを目的とした。

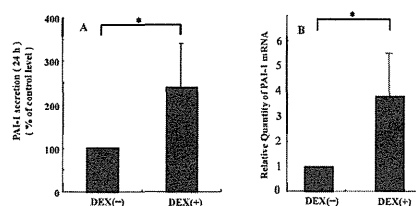


図1 PAI-1 の蛋白分泌とmRNA

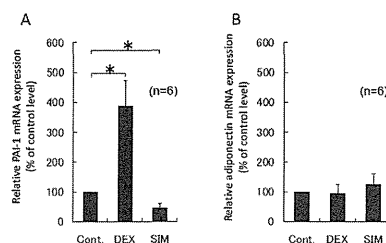


図2 simvastatin による抑制

## 2. 研究方法

対象はステロイド投与中(S群) 10例およびコントロール患者(C群) 19例の大腿骨人工骨頭置換術、人工股関節置換術を受けた患者で、関節リウマチ、脂質代謝異常、B型及びC型肝炎ウイルス陽性などの患者は除外した。S群は男性1例、女性9例で平均年齢54(29~80)歳、ステロイド内服量はプレドニゾン換算で平均9.8mg(2.5~22.5)、基礎疾患は大腿骨頭壊死9例、変形性股関節症1例であった。C群は男性5例、女性14例で平均年齢62(43~71)歳、基礎疾患は変形性股関節症17例、アルコール壊死1例、外傷性壊死1例であった。

大腿骨人工骨頭置換術もしくは人工股関節置換術の手術中に静脈血及び骨髄液を採取し、遠心分離にて血漿に分離し、plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)、adiponectin、Leptinの各種アディポカイン分泌量の測定(ELISA)を行い、それぞれの群で血中と骨髄中の量を比較検討した。

## 3. 研究結果

Adiponectinは血液と骨髄液中いずれもS群がC群よりやや高値を示したが、有意差なく血液-骨髄液間においても有意差認めなかった(図3)。LeptinはS群がC群より2倍以上と明らかに高値を示したが、血液-骨髄液間においては有意差認めなかった(図4)。PAI-1は骨髄液中の濃度は血液中の濃度に比べ、tPA・PAI-1複合体は約3倍、total PAI-1は約4倍と著明に高値であった。S群ではC群に比べ血液中のtotal PAI-1は明らかに上昇しており、骨髄液中のPAI-1も有意差は認めないが、上昇傾向にあった(図5)。

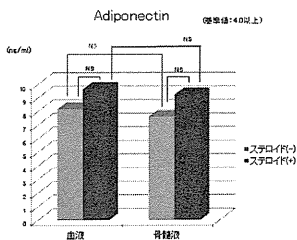


図3 Adiponectinの血液-骨髄液、S-C群間比較

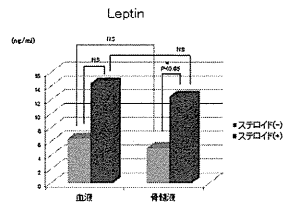


図4 Leptinの血液-骨髄液、S-C群間比較

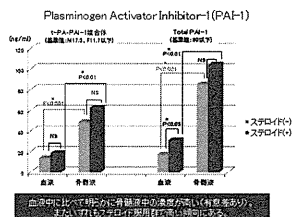


図5 PAI-1の血液-骨髄液、S-C群間比較

## 4. 考察

Adiponectinは動脈硬化抑制作用<sup>4)</sup>を有し、骨代謝においては破骨細胞の分化を抑制し、骨芽細胞の分化を促進するとされている<sup>5)</sup>。Leptinは逆に動脈効果促進作用があるとされるが<sup>6)</sup>、骨代謝においてはAdiponectin同様に骨芽細胞への作用による石灰化や増殖分化を促進するとされる<sup>7)</sup>。PAI-1は血栓症や心血管疾患との関連性があるといわれ<sup>8)</sup>、骨への影響については大腿骨頭壊死の危険因子で<sup>9)</sup>、グルココルチコイドが高いほどPAI-1増加し骨壊死の要因となっていると考えられている<sup>10)</sup>。

今回の結果ではAdiponectin、Leptinについてはいずれも血液-骨髄液間で差はなく、特に骨内動態への関与が高いことは示唆されなかった。ただ、Leptinについては明らかにS(+)群で高値を示しており、血液と骨髄液いずれにもステロイドによる影響を及ぼしやすいと考える。詳細な作用機序を解明するには今後さらなる検討が必要である。一方でPAI-1は明らかに血液-骨髄液間では血液中に比べ骨髄液中に多く、さらにS群がC群より高い傾向にあった。このことは閉鎖空間である骨内環境の方がより血行動態への関与、ステロイド等による影響を受けやすい可能性が考えられる。我々のin vitroでの調査ではdexamethasone負荷による骨髄脂肪細胞でのPAI-1分泌が増加することは証明されており、in vivoでも矛盾しない結果が得られた。骨壊死にPAI-1が関与している可能性があり、今後検体数を増やしてさらなる検討をしていく予定である。