

# COMP 遺伝子変異に伴う多発性骨端異形成症の 1 例

## — 一家系内調査による遺伝子検査の有用性 —

坂本悠磨、山本卓明、岩本幸英  
楫野良知、加畑多文、土屋弘行  
池川志郎

(九州大学大学院医学研究院 整形外科)  
(金沢大学 整形外科)  
(理化学研究所 統合生命医科学研究センター 骨関節疾患研究チーム)

多発性骨端異形成症と診断された正常身長(-1.8 SD)の患者において COMP 遺伝子変異 c.1467C>A (p.Asn489Lys)を同定した。患者家系内には、患者を含め合計 5 人がこの変異を有していた。5 人全員が何らかの股関節症状を有していたが、低身長は妹に認めるのみだった(-3.8 SD)。遺伝子検査は、患者の確定診断および家族のスクリーニングに有効であると考えられた。

### 1. 研究目的

多発性骨端異形成症(multiple epiphyseal dysplasia: MED)は、COMP 遺伝子や IX 型コラーゲン遺伝子などの変異による単一遺伝子病である<sup>1)</sup>。股関節においては、骨端の障害により、しばしば大腿骨頭壊死様の X 線像を呈する。MED と大腿骨頭壊死は、低身長や家族歴、他関節の異常の有無、X 線上の特徴などにより鑑別できるとされるが、鑑別が困難な場合もある<sup>2)</sup>。本研究の目的は、MED と診断された症例において原因遺伝子を同定し、さらに遺伝子検査を含めた家系内調査を行うことである。

### 2. 研究対象

発端者は身長 148 cm(-1.8 SD)の 28 歳女性。両股関節痛があり、X 線上は大腿骨頭壊死様の形態異常を呈したが(図 1)、骨頭扁平化と同部位での関節裂隙開大、さらに関節軟骨の肥厚を認め、大腿骨頭骨化障害が疑われた。さらに全身の骨 X 線撮影により、膝関節部の低形成、両手足の短指症を認め、MED が疑われた(脊椎に明らかな所見なし)。家系内には股関節症状を有する者が集積していた。なお、本家系例は、金沢大学整形外科の楫野良知先生、加畑多文先生、土屋弘行先生より御提供いただいた。

### 3. 研究方法

発端者および家族(父、母、弟、妹、娘、息子

の 6 人)より唾液を取得し、DNA を抽出した。発端者において全 Exon 解析を行い、MED の原因遺伝子の変異を検索した。さらに、家系内の変異保持者を同定し、その臨床情報を検証した。

### 4. 研究結果

図 2 と表 1 に患者家系図と聞き取り調査による臨床情報を載せた。発端者の全エクソン解析により、COMP 遺伝子の変異 c.1467C>A (p.Asn489Lys)を同定した。この変異は、MED を引き起こす変異として、すでにデータベースに登録されていた<sup>3)</sup>。同変異を、父、弟、妹、息子の 4 人に認めた。4 人とも何らかの股関節症状を有していたが、低身長は妹に認めるのみだった(-3.8 SD)。

### 5. 考察

COMP 遺伝子変異には好発部位があり、ほとんどは calmodulin-like repeat 内にある<sup>4),5)</sup>。自験例に認めた変異も、この領域内に位置していた。

COMP 遺伝子変異による表現型には、対立遺伝子異質性がある。具体的には、偽性軟骨無形成症と MED の表現型を取りうる。これまでの報告では、p.Asn489Lys は MED とされている<sup>1),5)</sup>。本研究においても同変異の表現型は MED であり、過去の報告と一致していた。よって、p.Asn489Lys は偽性軟骨無形成症ではなく MED の表現型を呈すると推測される。

また、COMP 遺伝子変異は常染色体優性遺伝形式

で遺伝する。それゆえ、基本的には変異保持者は病的表現型を呈する。実際に、変異保持者である発端者の父には、大腿骨頭扁平化や膝顆間部低形成など、発端者と同様のレントゲン所見を認めた。また、今回の家系内調査により、発端者の長男が MED である可能性が濃厚となった。患者・家族への説明には十分な配慮が必要となるが、病気の原因が明確になることで、1) 正確な病態・予後・遺伝性を説明できる、2) 股関節を含めた全身の骨関節の適切なフォローが可能となる、など、患者が受ける利益は大きいと思われる。

MED など骨端異形成を呈する骨系統疾患は ION の除外診断に含まれている<sup>6), 7)</sup>。両者の鑑別が困難な場合もしばしばある<sup>2)</sup>。そのような場合に、遺伝子検査が確定診断のための有効なツールになる可能性が示唆された。

## 6. 結論

正常身長で、変形性股関節症もしくは大腿骨頭壊死様の X 線像を呈した MED 症例を経験した。家系内調査により、計 5 人に *COMP* 遺伝子変異を同定した。

遺伝子検査は、患者の確定診断および家族のスクリーニングに有効である。

## 7. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) 坂本悠磨、山本卓明、楫野良知、加畑多文、土屋弘行、岩本幸英: *COMP* 遺伝子変異に伴う多発性骨端異形成症の 1 例—家系内調査による遺伝子検査の有用性、第 41 回日本股関節学会。東京、2014.11.01

## 8. 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

## 9. 参考文献

- 1) Briggs MD, Chapman KL. Pseudoachondroplasia

and multiple epiphyseal dysplasia: mutation review, molecular interactions, and genotype to phenotype correlations. *Hum Mutat.* 2002 May;19(5):465-478.

- 2) 馬渡正明, 佛淵孝夫, 林和生, 野口康男, 神宮司誠也, 杉岡洋一. 大腿骨頭壊死症と鑑別を要する骨端部骨化障害について. *Hip joint.* 1995 Sep;21:607-613.
- 3) Human Gene Mutation Database <http://www.biobase-international.com/product/hgmd>
- 4) Ikegawa S, Ohashi H, Nishimura G, Kim KC, Sannohe A, Kimizuka M, Fukushima Y, Nagai T, Nakamura Y. Novel and recurrent COMP (cartilage oligomeric matrix protein) mutations in pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia. *Hum Genet.* 1998 Dec;103(6):633-638.
- 5) Briggs MD1, Brock J2, Ramsden SC2, Bell PA1. Genotype to phenotype correlations in cartilage oligomeric matrix protein associated chondrodysplasias. *Eur J Hum Genet.* 2014 Nov;22(11):1278-1282.
- 6) Sugano N, Atsumi T, Ohzono K, Kubo T, Hotokebuchi T, Takaoka K. The 2001 revised criteria for diagnosis, classification, and staging of idiopathic osteonecrosis of the femoral head. *J Orthop Sci.* 2002;7(5):601-605.
- 7) Sugano N, Kubo T, Takaoka K, Ohzono K, Hotokebuchi T, Matsumoto T, Igarashi H, Ninomiya S. Diagnostic criteria for non-traumatic osteonecrosis of the femoral head: a multicentre study. *J Bone Joint Surg Br.* 1999;81:590-595.
- 8) Kishiya M, Nakamura Y, Ohishi H, Furukawa K, Ishibashi Y. Identification of a novel COL2A1 mutation (c.1744G>A) in a Japanese family: a case report. *J Med Case Rep.* 2014 Aug 14;8:276.

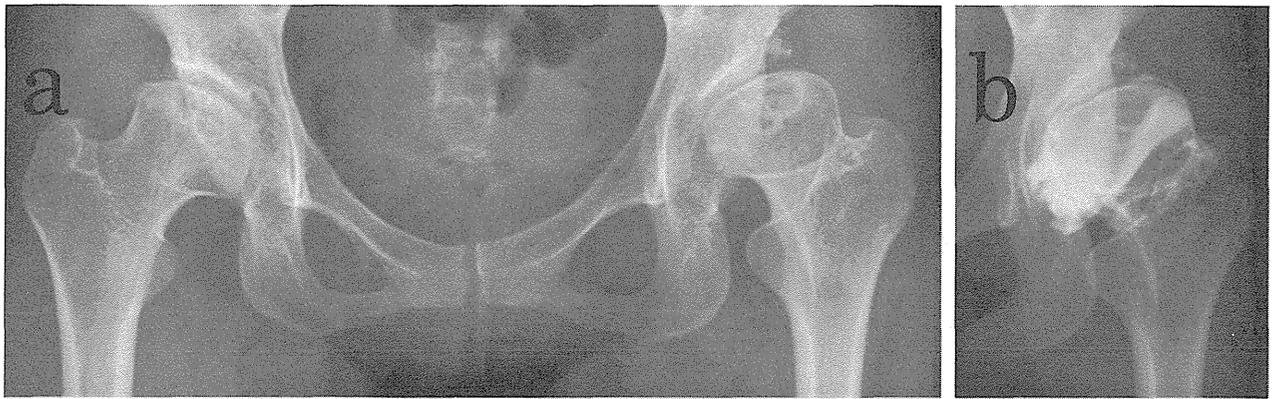


図1. 発端者の a)両股関節正面, b)股関節造影. 両側骨頭は扁平化しており、硬化像を認める。白蓋形成不全・OAに伴う cystや大腿骨頭壊死が鑑別にあがったが、関節裂隙の開大と、同部の関節軟骨肥厚を認め、骨端異形成に伴う骨化障害と考えられた。

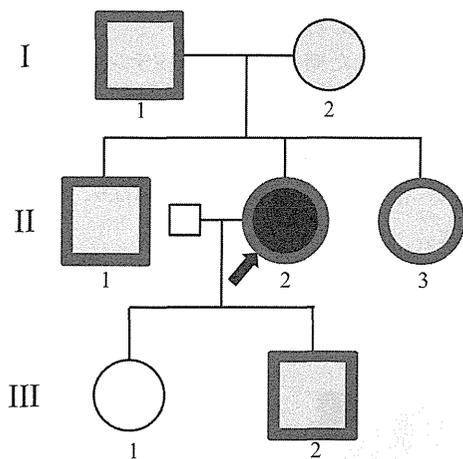


図2. 家系図(黒矢印が発端者)

<表現型・股関節所見> 黒塗り: MED, 灰塗り: 股関節所見あり

<COMP 遺伝子変異> 太枠: あり, 細枠: なし

表1. 聞き取り調査による患者家族情報(太字は COMP 遺伝子変異ありの症例)

ID	続柄 年齢	身長 標準偏差	股関節痛	その他アンケート情報
I-1	父 56歳	163 cm -1.0 SD	なし※1	・ 膝関節, 足関節痛, 短い手 ※1: 股関節の変形を指摘
I-2	母 51歳	146 cm -1.9 SD	あり	・ 股関節痛は40代後半から
II-1	兄 30歳	160 cm -1.9 SD	あり	・ 短い手指
II-2	発端者 27歳	148 cm -1.8 SD	あり	・ 膝関節痛, 短い手指・足趾
II-3	妹 23歳	140 cm -3.8 SD	あり	・ 膝関節痛, 短い手指・足趾
III-1	長女 6歳	121 cm +0.7 SD	なし	・ 特記なし
III-2	長男 4歳	98 cm -1.2 SD	なし※2	※2: 発端者が見ている 股関節が気になる
(-)	祖父 83歳	163 cm +0.5 SD	なし	・ 特記なし
(-)	祖母 79歳	140 cm -1.6 SD	あり	・ 両側人工股関節

標準偏差の算出には 平成24年厚生労働省国民健康栄養調査のデータを使用

# ピタバスタチンによる血管内皮機能維持および虚血臓器保護の多面的効果

栗飯原賢一、吉田守美子（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）  
 松本俊夫（徳島大学藤井節郎記念医科学センター）

我々は、グルココルチコイド過剰は活性酸素産生増大と一酸化窒素(NO)産生抑制による血管内皮機能の障害を惹起し、特発性大腿骨頭壊死発症要因の一となる事を提唱してきた。そこで我々は、CYP代謝の影響を受けにくい脂溶性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、グルココルチコイド過剰モデルマウスにおいて、活性酸素産生抑制作用に加え、一酸化窒素NOのbioavailabilityを改善させる事を報告してきた。また重度の血管内皮機能不全を呈するeNOS欠損マウス後肢虚血モデルを用いて検討した結果、ピタバスタチンは、骨格筋におけるAMPK・JNKおよびBcl2-Bax経路の制御を介して虚血に対する組織耐性を増す事に加え、抗アポトーシス遺伝子群の発現を増強させる事が明らかになった。さらに、*in vitro*の研究結果では、ピタバスタチンは、他のスタチンに比較して、血管内皮機能維持に深く関わるERK5をより強力に活性化することが明らかになり、特発性大腿骨頭壊死発症予防のための基盤薬となる可能性が示唆された。

## 1. 研究目的

我々は、ステロイド過剰状態が、血管内皮細胞の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) を活性化し、活性酸素の産生増加と内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の発現およびリン酸化抑制を生じることを示してきた。<sup>1)2)</sup> その結果、血管内皮機能障害に基づく循環障害が生じ、ステロイド過剰による特発性大腿骨頭壊死発症要因の一つとなり得る事を提唱してきた。その一方で、このグルココルチコイド過剰による血管内皮機能障害は、脂溶性スタチンであるピタバスタチンの先行投与により抑制できることをこれまで報告してきた<sup>3)</sup>。(図1-4)。

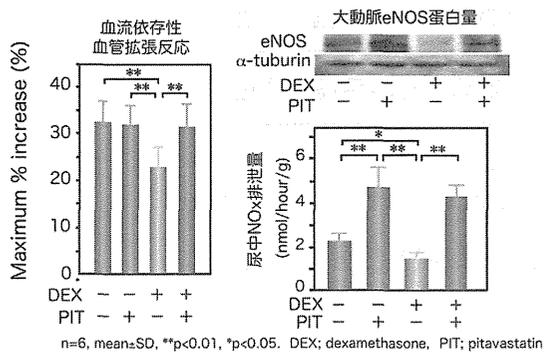


図 1. ピタバスタチンによるデキサメサゾン過剰マウスにおける血管内皮機能障害の改善効果

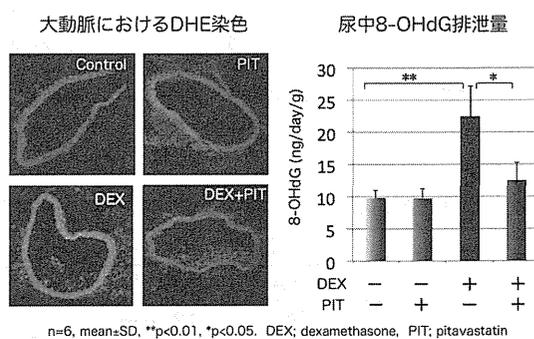


図 2. ピタバスタチンによるデキサメサゾン過剰マウスにおける酸化ストレスの抑制効果

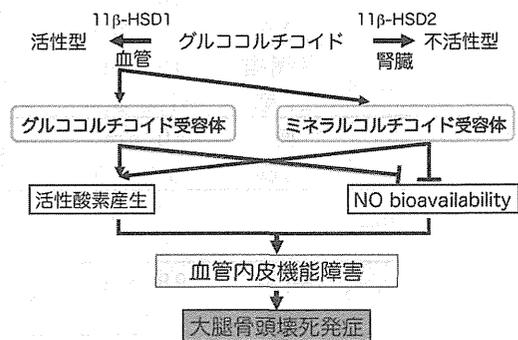


図 3. グルココルチコイド過剰による血管内皮機能障害を介した特発性大腿骨頭壊死発症仮説

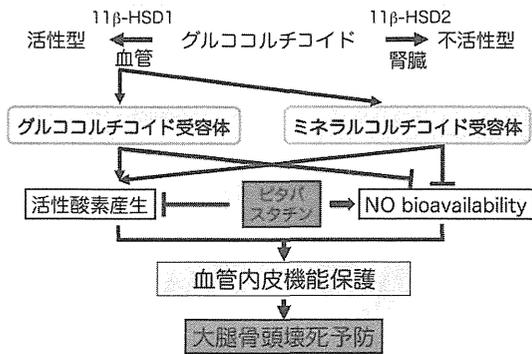


図 4. グルココルチコイド誘発性大腿骨頭壊死に対するピタバスタチンの発症予防仮説

また eNOS 欠損マウスを用いたこれまでの研究から、スタチンの虚血組織保護効果の発現には eNOS の活性化が重要な役割を果たすことが知られている。<sup>4)</sup>

一方、我々はピタバスタチンが、eNOS 非依存的にアンジオテンシン II 過剰状態においては、心血管・腎リモデリング保護作用を有することを明らかにしており、心血管ストレスの種類によっては、ピタバスタチンの効果発現に差異があることが判明した。<sup>5)</sup>そこで、グルココルチコイド過剰における重篤な血管内皮機能障害のモデルとして eNOS 欠損マウスを用い、虚血組織におけるピタバスタチンの効果を検証した。また、*in vitro* の解析において、ピタバスタチンの血管内皮機能活性化機構の詳細について検証した。

## 2. 研究方法

### I. eNOS 欠損マウスの後肢虚血モデル作成とピタバスタチンの代謝に及ぼす影響

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採血し、脂質プロファイル、血糖値を測定した。また試験開始1週間後に、ピタバスタチン投与および非投与群の2群にて、麻酔管理下に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動静脈を剥離除去した。手術後の虚血後肢の肉眼変化を検証した。

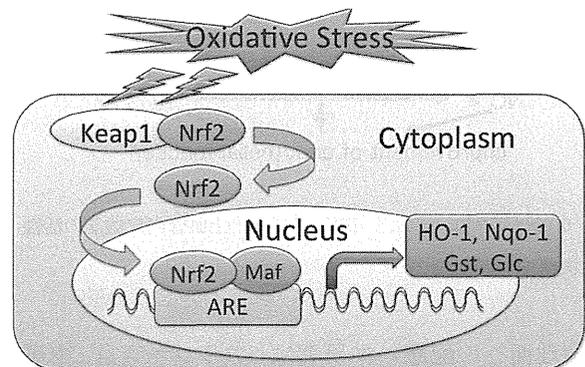
### II. 虚血および非虚血肢の採取およびアポトーシス制御関連因子の発現・活性化の検討

虚血手術 24 時間後に、安楽死させたマウスの虚血

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 PCR array および Western blot さらには、虚血組織を免疫染色にて評価した。

### III. 血管内皮細胞におけるグルココルチコイド過剰状態での Nrf2/HO-1 経路の動態およびピタバスタチンの効果の検証

NF-E2-related factor 2 (Nrf2) は、塩基性ロイシンジッパー構造をもつ転写調節因子である。Nrf2 は活性酸素および活性窒素種などの様々な反応性分子種により活性化されて、標的遺伝子の転写を増強する事が知られている。その Nrf2 の標的遺伝子としては、親電子性物質を直接解毒するグルタチオン-S-トランスフェラーゼ、ヘムオキシゲナーゼ (HO-1) やキノンオキシドレダクターゼをはじめ、酸化ストレス防御遺伝子群の発現を統一的に制御している(図 5)。



Nrf2: NF-E2-related factor 2, Keap 1:kelch-like ECH-associated protein 1  
Gst: glutathione S-transferase, Glc: glutamate-cysteine ligase, HO-1: heme oxygenase 1  
ARE: antioxidant response element, Nqo-1: NAD(P)H quinone oxioeductase 1

図 5. Nrf2 による酸化ストレス防御遺伝子群の活性化

我々は、この Nrf2 に注目し、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を用い、強力な抗酸化作用を有するスルフォラファンやデキサメサゾン、ピタバスタチン、メバロン酸、ゲラニルゲラニルピロリン酸(GGPP)、ファルネシルピロリン酸(FPP)の添加による Nrf2 の転写活性を Luciferase reporter assay にて検討し、さらに Nrf2 の標的分子で、レドックス制御分子である HO-1 蛋白発現を、Western blot で確認した。

### IV. 血管内皮細胞におけるスタチン別の ERK5 転写活性化能の検証

MAP kinase (mitogen-activated protein kinase: MAPK) は、広く真核生物に保存されたセリン/スレオ

ニンキナーゼであり、細胞外シグナルを核内へと伝える鍵分子とである。古典的MAPKであるERK1・2やストレス活性化キナーゼ (stress-activated protein kinase, SAPK) であるJNK1・2・3、ならびにp38  $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma \cdot \delta$ 、さらに最近その機能解析が精力的に進められているERK5サブファミリーの4つのグループが、主要なMAPKサブファミリーとして知られている。このうち、ERK5は、血管内の流血で生じる層流(シアストレス)によって活性化され、Nrf2の転写活性を調節することが、知られている(図6)。そこで、我々はHUVECを用いて、スタチンによるERK5の転写活性亢進効果を、ピタバスタチンとその他の日常診療で用いられているアトルバスタチン、シンバスタチン、フルバスタチンの計4種のスタチンについて、Luciferase reporter assayにて評価した。

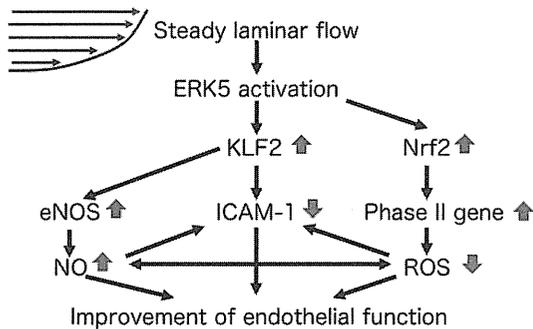


図 6. シヤストレスによる ERK5 の活性化と血管内皮機能の活性化機構

(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 eNOS 欠損マウスの虚血肢の壊死を抑制する

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 (data not shown)。eNOS 欠損マウスの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色化が見られた。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週間までの間は軽微であり、虚血肢の壊死脱落の頻度は統計学的有意に抑制された(図 7, 8)。

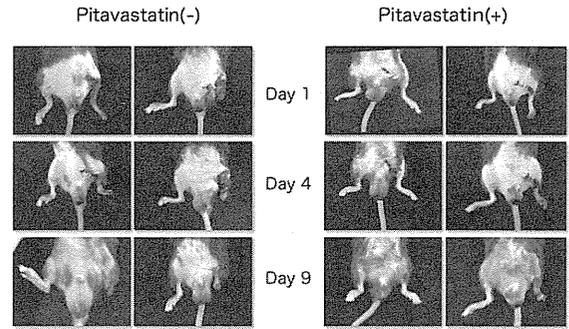


図 7. ピタバスタチンの有無による後肢の虚血変化外観

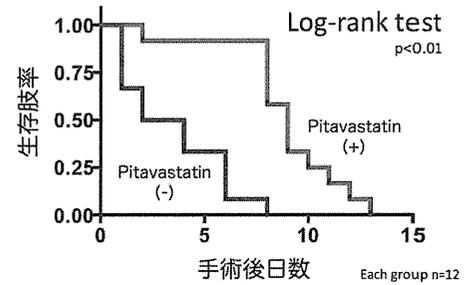


図 8. ピタバスタチンの有無による虚血後肢の生存率

#### II. ピタバスタチンは eNOS 欠損マウスの虚血肢の組織壊死を抑制する

採取した虚血肢を TUNEL 染色して、アポトーシスの程度について、2 群間で評価したが、vehicle 群では、著しい骨格筋壊死に伴い骨格筋細胞が融解したため、TUNEL 染色性が低下しており、むしろ TUNEL 陽性細胞はピタバスタチン投与群に多く見られた(図 9)。

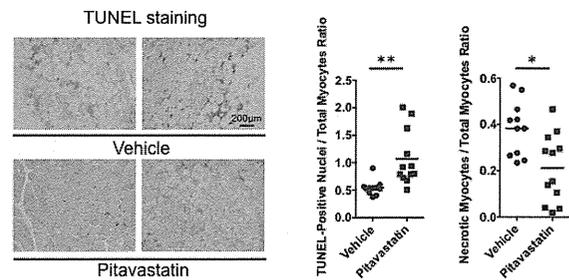


図 9. Vehicle 群の虚血肢に見られた著しい組織壊死

また採取した虚血肢から抽出した cDNA および蛋白を用い、血管新生や 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 PCR array および Western blot により検証した。その結果、ピタバスタチンによって抗アポトーシス制御因子群の発現亢進が確認できた(Table)。

Table. PCR array システムによる Vehicle 群とピタバスタチン群による相対的な抗アポトーシス遺伝子群の発現解析

Gene Symbol	Description	Fold Change (Pitavastatin/Vehicle)	95% CI	p-value
Api5	Apoptosis inhibitor 5	1.46	(1.19, 1.73)	0.003328
Atf5	Activating transcription factor 5	2.03	(1.79, 2.27)	0.000002
Bcl2l1	Bcl2-like 1	2.67	(1.98, 3.36)	0.000021
Bcl2l2	Bcl2-like 2	2.04	(1.53, 2.55)	0.000544
Dad1	Defender against cell death 1	1.52	(1.35, 1.69)	0.000022
Prdx2	Peroxioredoxin 2	1.84	(1.60, 2.08)	0.000002

Western blot の解析の結果、Bcl2/Bax 比、AMPK のリン酸化が増強される一方、JNK のリン酸化は抑制されていた(図 10)。

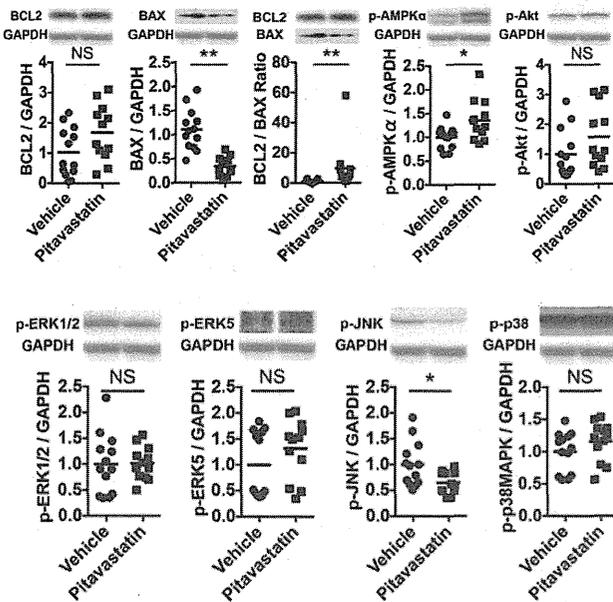


図 10. ピタバスタチンによる eNOS 欠損マウス虚血肢の Cell Survival および抗アポトーシス因子の発現およびリン酸化調節

以上のことから、ピタバスタチンは著しい血管内皮障害状態における虚血組織において多くの鍵分子の発現やリン酸化制御を介して、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。

### III. ピタバスタチンは血管内皮細胞においてデキサメサゾンによる抗酸化能の抑制を改善する

HUVEC に、抗酸化作用を有するフィトケミカルのスルフォラファンを添加すると、Nrf2 の転写活性は増強されたが、デキサメサゾンの添加によって抑制された(図 11)。ピタバスタチンの投与はデキサメサゾンによ

る Nrf2 の転写抑制を回復させたが、その効果は、FPP の投与では阻害されなかったもののメバロン酸や GGPP の投与でキャンセルされた(図 11)。

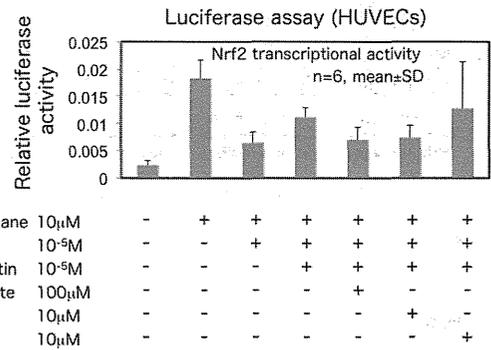


図 11. 血管内皮細胞におけるデキサメサゾン、ピタバスタチンなどの Nrf2 の転写調節における効果

同様の結果は、Nrf2 の標的分子である HO-1 の蛋白発現量においても観察された(図 12)。以上のことから、デキサメサゾンによって抑制されたレドックスシステムである Nrf2-HO-1 経路において、ピタバスタチンは Rho/Rac 経路阻害作用を介して回復させている可能性が示された。

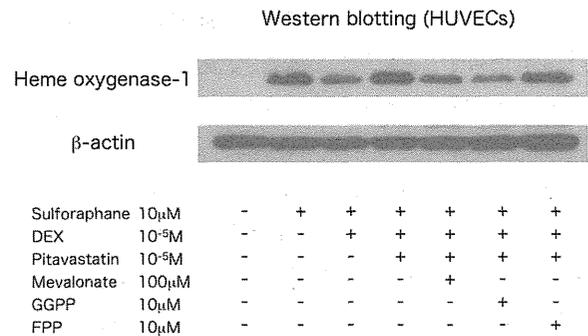


図 12. 血管内皮細胞におけるデキサメサゾン、ピタバスタチンなどの HO-1 発現における効果

### IV. ピタバスタチンは血管内皮細胞における ERK5 の転写活性を最も効果的に促進する

4 種のスタチンを用いたシェアストレスをかけていない状態の HUVEC における ERK5 の転写活性の検討では、ピタバスタチンが最も効果的に ERK5 の転写活性を促進しており(図 13)、他のスタチンに比較して、Nrf2 を介した抗酸化能および eNOS の活性化を通じて、NO bioavailability の維持に優れている事が示唆された。

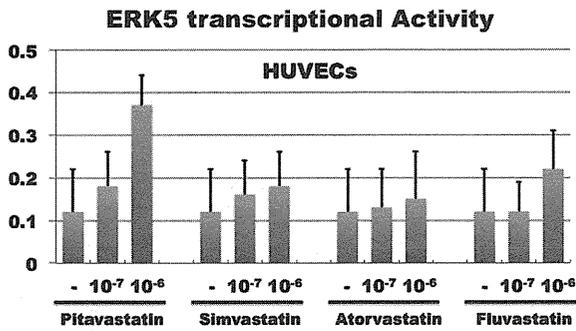


図 13. 各種スタチンによる血管内皮細胞における ERK5 の転写活性促進効果

#### 4. 考察

現時点では、特発性大腿骨頭壊死症に対する有効かつ確実な一次予防法は未確立であり、著しく患者の ADL を損なう本症の発症予防および病態進展阻止は、重要な解決すべき臨床課題である。有効な治療法の開発のためには、その病態機序の把握は必須であるが、我々は本症において生ずると予測される血流循環障害と組織壊死変化に注目してきた。

生体内での活性酸素産生の増大は、血管内皮機能障害を惹起し、循環障害を引き起こす。我々は、本班会議研究において、グルココルチコイド過剰は、GR や MR の活性化を介して、血管組織の活性酸素増大をもたらすことを示してきた。このことから、特発性大腿骨頭壊死の発症予防のためには、活性酸素産生抑制あるいは、レドックス機構の活性化による活性酸素の消去により、血管内皮機能を維持する事が重要と考えられる。<sup>1)-3)</sup> 本班会議の研究結果から我々は、グルココルチコイド過剰状態では、生体内スカベンジャー機構である Nrf2/HO-1 経路が抑制されている事を見いだした。また、ピタバスタチンが、グルココルチコイド過剰で抑制された Nrf2/HO-1 経路を活性化することで、スカベンジャー機能を回復させる事が明らかとなった。HUVEC を用いた検討で、このピタバスタチンの還元能増強効果は Rho/Rac 経路抑制を介している可能性が示されたが、このことは、グルココルチコイド過剰で生じた血管機能障害に対するピタバスタチンの抑制効果が、これまで基礎および臨床的なエビデンスが集積されて来た、いわゆるスタチンの多面的心血管保護作用の共通基盤を介したものであることを暗示しているものと考えられた。

また血流のシェアストレスによって誘導される血管壁での ERK5 の活性化は、eNOS の活性化や Nrf2 の活性化を介して、血管内皮機能を維持するための重

要な役割を担っていると考えられる。HUVEC を用いた検討では、ピタバスタチンが、他のスタチンに比較して強力な ERK5 の転写活性を有している事が明らかになったが、この事は薬剤選択を考慮する上で、貴重なエビデンスとなると思われる。

また、本研究結果より、ピタバスタチンは重篤な虚血組織において、血管内皮機能の保持・改善による循環維持効果を有するのみならず、Bcl2/Bax 比の上昇、AMPK の活性化および JNK リン酸化の抑制、抗アポトーシス遺伝子群の発現増強などを介して、虚血組織の保護をもたらす事が明らかになった。我々は、前述のように特発性大腿骨頭壊死の発症には、血管内皮機能障害によって生じた大腿骨頭領域の循環障害とそれに引き続いて生じる不可逆的な虚血組織傷害が重要であると推察している。特発性大腿骨頭壊死の発症予防が完全にできなくとも、循環障害で生じた大腿骨頭壊死範囲の縮小化は、免荷での保存的治療による手術回避や、手術時の侵襲低減など、大きなメリットをもたらす事が予想できる。このことから、ステロイドパルス療法などの治療が前もって予定されている場合は、ピタバスタチンの先行投与による骨頭部の循環障害予防と虚血組織耐性をあらかじめ高めておくことは、有効な治療法となる可能性がある。

本研究によって得られた知見から、重篤な血管内皮機能障害の条件下において見られたピタバスタチンによる組織虚血耐性増強および血管内皮機能の保護による末梢循環維持という作用は、特発性大腿骨頭壊死の発症予防および進展阻止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思われる(図 14)、今後本班会議で進める予定の介入試験において、ピタバスタチンは重要な役割を果たすものと推察している。

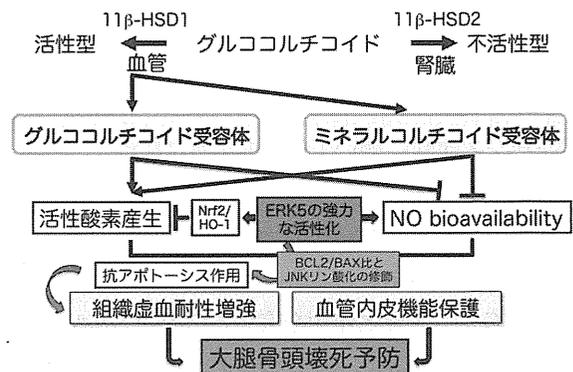


図 14. ピタバスタチンによる特発性大腿骨頭壊死の発症および病態進展阻止効果のまとめ

## 5. 結論

ピタバスタチンはグルココルチコイド過剰に陥る前段階での投与によって、循環虚血壊死組織の保護作用を発揮し、さらに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するという多面的効果を有する。したがってピタバスタチンは、特発性大腿骨頭壊死症予防および病態進展阻止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

- 1) Kinouchi M, Aihara K, Fujinaka Y, Yoshida S, Ooguro Y, Kurahashi K, Kondo T, Aki N, Kuroda A, Endo I, Matsuhisa M, Matsumoto T. Diabetic conditions differentially affect the endothelial function, arterial stiffness and carotid atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2014;21:486-500.
2. Heo KS, Cushman HJ, Akaike M, Woo CH, Wang X, Qiu X, Fujiwara K, Abe J. ERK5 activation in macrophages promotes efferocytosis and inhibits atherosclerosis. *Circulation.* 2014;130:180-191.
3. Le NT, Takei Y, Izawa-Ishizawa Y, Heo KS, Lee H, Smrcka AV, Miller BL, Ko KA, Ture S, Morrell C, Fujiwara K, Akaike M, Abe J. Identifying ERK5 transcriptional activators by high throughput screening, and the crucial role of endothelial ERK5 in statins and anti-malarial agents-induced vaso-protective effects. *J Immunol.* 2014;193:3803-3815.

### 2. 学会発表

- 1) 粟飯原賢一、吉田守美子、池田康将、上元良子、石川カズ江、赤池雅史、松本俊夫: 動脈硬化および虚血に対するeNOS非依存的なピタバスタチンの臓器保護効果の検討: 第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会. 東京. 2014.7.10.
- 2) 粟飯原賢一、吉田守美子、大黒由加里、倉橋清衛、近藤剛史、遠藤逸朗、松本俊夫: アンジオテンシン受容体拮抗薬およびカルシウム拮抗薬併用による心筋リモデリング抑制の長期効果: 第37日本高血圧学会総会: 横浜. 2014.10.18.

## 7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 8. 参考文献

- 1) Iuchi T, Akaike M, Mitsui T, et al. Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and elicits vascular endothelial dysfunction. *Circ Res.* 2003;92:81-87.
- 2) 赤池雅史, 松本俊夫. ステロイド過剰による NO bioavailability の低下と血管内皮機能障害. *CLINICAL CALCIUM.* 2007;17:864-70.
- 3) 赤池雅史, 松本俊夫. 大腿骨頭壊死症の最近の話題「ステロイド投与下におけるスタチンと血管内皮」. *整形・災害外科* 52:957-963, 2009.
- 4) Landmesser U, Engberding N, Bahlmann FH, et al. Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2004;110:1933-1939.
- 5) Yagi S, Aihara K, Ikeda Y, 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.

# ヒト間葉系幹細胞を用いた大腿骨頭壊死症の治療応用に関する研究

田中良哉、張香梅、山形薫、園本格士朗、中山田真吾(産業医科大学医学部第1内科学講座)

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。我々は、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞から骨芽細胞、骨細胞、及び、軟骨細胞、内軟骨骨化への分化のメカニズム、および、全身性免疫応答の抑制作用を明らかにした。また、間葉系幹細胞はナノファイバーを scaffold として用いることによって、移植部位への局在性が保たれて骨が細胞への効率的な分化が誘導されるとともに、TGF- $\beta$  等の産生が誘導され、免疫抑制作用が発揮された可能性が示された。以上より、間葉系幹細胞は、大腿骨頭壊死症の局所治療・再生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ある。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 $\beta$ -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・誘導系を確立してきた。また、コラーゲン誘導関節炎(CIA)発症ラットモデルを用いた in vivo 実験から、ポリ乳酸ナノファイバー(PLGA)が間葉系幹細胞を用いた局所治療の scaffold として有望であることを見出した。

今年度は、ナノファイバー scaffold がヒト骨髄由来間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化、免疫制御に及ぼすメカニズムに関して、in vitro および CIA モデルラットを用いた in vivo の解析にて明らかにし、壊死に陥った大腿骨頭の修復・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

ヒト骨髄由来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)。

間葉系幹細胞をナノファイバー(ポリ乳酸ファイバー; PLGA)に播種し、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、DMP-1 発現、石灰化を指標に骨芽細胞、更に、骨細胞への分化を評価した。

間葉系幹細胞を播種したナノファイバー scaffold を 24 時間培養後、CIA ラット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

ナノファイバーに播種した間葉系幹細胞を骨芽細胞分化培地で培養したところ、7 日目に RUNX2、SOX9 の発現、14 日後にプロテオグリカン、II 型コラーゲン産生が観察され、von Kossa 陽性となった。28 日後に骨細胞マーカー DMP-1 の発現、紡錘状から突起を持つ骨細胞様へ形態変化し、骨細胞への分化が示唆された。56 日後には石灰化が観察された。間葉系幹細胞単独ではこのような変化は認められなかった。また、ナノファイバー播種間葉系幹細胞からは、3 日以内に IL-10 や

TGF- $\beta$  の産生が誘導された。さらに、乳酸を用いた *in vitro* 検討より、乳酸は間葉系幹細胞の増殖を抑制し、RUNX2、SOX9 発現を上昇させることが明らかとなり、PLGA-NF が間葉系幹細胞に乳酸と 3 次元環境を提供することで骨芽、骨、軟骨細胞分化を誘導している機序が考えられた。

一方、ナノファイバーシートに播種したヒト間葉系幹細胞をラット関節近傍に移植すると、関節炎、骨破壊が臨床的、構造的、病理学的に抑制された。一方、MSC 単独で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。ナノファイバー播種間葉系幹細胞治療群では関節局所の IL-1 $\beta$ 、IL-6 発現や所属リンパ節腫大、加えて脾腫および血清抗 II 型コラーゲン抗体産生が抑制され、また、リンパ節の T 細胞の増殖、IL-2、IL-17、IFN- $\gamma$  の産生が阻害された。さらに、GFP で標識した間葉系幹細胞はナノファイバー移植部に留まり、その局所で産生される TGF- $\beta$  や IL-10 等の抑制性サイトカインにより免疫応答が抑制されたと示唆された。即ち、間葉系幹細胞は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。また、ポリ乳酸ナノファイバー(PLGA)は生体内で分解され消失する性質などからすでに一部で臨床応用されている担体(scaffold)である。今回の検討から、ナノファイバーは間葉系幹細胞の骨芽細胞、さらには骨芽細胞への分化を促進すると共に、軟骨細胞分化の促進を介して内軟骨性骨化を誘導した可能性が考えられ、他の疾患への応用も期待される結果である。さらに、ナノファイバーによる間葉系幹細胞の石灰化誘導は IL-1 $\beta$  で促進されることも明らかとなり、すでに報告した免疫抑制作用増強効果とあわせ、炎症性疾患への応用も期待が高まる。

一方、CIA ラットにおいては、ナノファイバー(PLGA)

播種間葉系幹細胞の関節近傍への移植により、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。

以上より、間葉系幹細胞は、ナノファイバー播種により、移植局所での間葉系幹細胞の局在性を高め、内軟骨性骨化から骨細胞への分化を効率的に誘導する可能性と、これが局所炎症により増幅される可能性が明らかとなった。さらに、TGF- $\beta$  の産生等を誘導して、免疫抑制作用が発揮された可能性が示された。以上より、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞は、大腿骨頭壊死症の局所治療ツールとしての有望性が示唆された。壊死した骨組織の再生・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

*in vitro*、及び、CIA ラットモデルでの解析により、ナノファイバー(PLGA)に播種したヒト骨髄由来間葉系幹細胞は、骨芽細胞、骨細胞への分化能、破骨細胞、内軟骨性骨化の能力、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解明された。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) Kondo M, Yamaoka K, Sakata K, Sonomoto K, Lin L, Nakano K, Tanaka Y. IL-6/STAT3 signaling pathway contributes to chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum* (in press)
- 2) Iwata S, Nakayamada S, Fukuyo S, Kubo S, Yunoue N, Wang S-P, Yoshikawa M, Saito K, Tanaka Y. Activation of Syk in peripheral blood B cells in patients with rheumatoid arthritis: A potential target

for abatacept therapy. Arthritis Rheum (in press)

- 3) Tanaka Y, Hirata S, Kubo S, Fukuyo S, Hanami K, Sawamukai N, Nakano K, Nakayamada S, Yamaoka K, Sawamura F, Saito K. Discontinuation of adalimumab after achieving remission in patients with established rheumatoid arthritis: 1-year outcome of the HONOR study. Ann Rheum Dis
- 4) Zhang X, Yamaoka K, Sonomoto K, Kaneko H, Satake M, Yamamoto Y, Kondo M, Zhao J, Miyagawa I, Yamagata K, Fukuyo S, Okada Y, Tanaka Y. Local delivery of mesenchymal stem cells with poly-lactic-co-glycolic acid nano-fiber scaffold suppress arthritis in rats. Plos ONE (2014) 9(12):e114621
- 5) Kubo S, Yamaoka K, Kondo M, Yamagata K, Zhao J, Iwata S, Tanaka Y. The JAK inhibitor tofacitinib reduces the T cell stimulatory capacity of human monocyte-derived dendritic cells. Ann Rheum Dis (2014) 73, 2192-2198
- 6) Tanaka Y, Martin Mola E. Can IL-6-targeting catch up TNF-targeting in rheumatoid arthritis: from studies of olokizumab, sarilumab and sirukumab. Ann Rheum Dis (2014) 73, 1395-1397
- 7) Wang S-P, Iwata S, Nakayamada S, Sakata K, Yamaoka K, Tanaka Y. Tofacitinib, a Jak inhibitor, inhibits human B cell activation in vitro. Ann Rheum Dis (2014) 73, 2213-2215
- 8) Kondo M, Yamaoka K, Tanaka Y. Acquiring chondrocyte phenotype from human mesenchymal stem cells under inflammatory conditions. Int J Mol Sci (2014) 15, 21270-21285
- 9) Fukuyo S, Yamaoka K, Sonomoto K, Oshita K, Okada Y, Saito K, Yoshida Y, Kanazawa T, Minami Y, Tanaka Y. IL-6-accelerated calcification by induction of ROR2 in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells is STAT3-dependent. Rheumatology (2014) 53:1282-1290

## 2. 学会発表

- 1) Xiangmei Zhang, Kunihiro Yamaoka, Koshiro Sonomoto, Hiroaki Kaneko, Makoto Satake, Yuka Yamamoto, Masahiro Kondo, Jidong Zhao, Shunsuke Fukuyo, Yosuke Okada and Yoshiya Tanaka: Mesenchymal stem cells in combination with nano-fiber scaffold efficiently suppressed collagen-induced arthritis in rats、第32回日本骨代謝学会. 大阪、2014.7.24-28

## 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

# ステロイド誘発性骨壊死マウスモデル確立の試み

今井祐記

(愛媛大学プロテオサイエンスセンター 病態生理解析部門)

ステロイド性大腿骨頭壊死症病態の詳細な分子メカニズムを理解する事は、その予防法開発につながる期待できる。原疾患治療のためのステロイド作用と骨頭壊死を惹起するステロイド作用との分子レベルのメカニズムの相違を明らかにするためには、生体内ステロイド作用を分子生物学的に理解する必要がある。このためには、遺伝子改変マウスを用いた遺伝学的手法が有効と考えられるが、適切なマウスモデルが存在しないため、その確立を試みた結果、ウサギモデルと同様のメチルプレドニゾン筋注では、マウス骨壊死の誘発を認めなかったため、デキサメサゾン内服を行ったところ、明らかな骨壊死を認めなかったものの、骨髓内血栓形成や大腿骨頭2次骨化中心形成不全をなどの表現型を認めた。週齢や投与期間など方法の修正を試みることにより、モデル確立方法を検索する。

## 1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症 (ION) の中でも、ステロイド誘発性大腿骨頭壊死は医原性疾患であり、自己免疫疾患を含めたステロイド療法を必要としている原疾患の治療とともに、その予防が必要である。しかしながら、本病態の詳細な分子基盤の大部分は不明である。その理由の一つとして、これまでに確立されたステロイド誘発性骨壊死動物モデルはウサギやラットに限られており、遺伝学的手法として最も有利であるマウスモデルが存在しないことが挙げられる。そこで、本研究では、マウス遺伝学的手法に頻用されている系統である C57BL/6(B6) マウスでの、ステロイド誘発性骨壊死モデルの作出を試みる事を目的とする。

## 2. 研究方法

前年度の研究結果から、ウサギおよびラットモデルで骨壊死誘発可能なステロイド筋肉注射による方法では、マウスにおいて骨壊死発生は認めなかった事から、BALB マウスのみで報告のある<sup>1)</sup>デキサメサゾン (DEX) 内服法にて、骨壊死発生を試みる。C57BL6 の4週齢雄マウスに対し、葉酸不含有飼料および5 mg/ml の DEX 含有水 (n=15) または通常水 (n=5) による飼育を6又は12週間継続する。DEX 投与終了後、犠牲死の後、大腿骨を摘出し、4%パラホルムアルデヒドにて固定。脱灰後、パラフィン切片を作成し、H&E 染色にて顕微鏡下に組織像を観察した。

## 3. 研究結果

DEX 投与群では、6週までに2匹が死亡した。また DEX 群では、対照群と比較して有意な体重減少を認めた。組織像から、大腿骨頭および遠位骨端に明らかな骨壊死像 (empty lacuna や骨髓壊死) を認めなかった。しかしながら、DEX 群において、13匹中9匹に骨髓内静脈の怒張ならびに血栓の形成を認めた。加えて、12週間投与群においても、明らかな骨壊死像を認めなかったものの、DEX 投与群では全例で骨頭骨端部では軟骨組織が残存し肥大軟骨細胞のみを認める2次石灰化中心の形成不全を認めた。

## 4. 考察

過去の報告で BALB マウスに認められた DEX 内服によるステロイド性骨壊死誘導法では、今回の実験結果からは骨壊死発生を認めなかった。原因として、元来ウサギおよびラットモデルにおいてもステロイド誘発性骨壊死の発生率が低いこと、今回の DEX 投与群ではマウスの死亡率が高かったことから、骨壊死を捉えきれていない可能性がある。死亡の原因として、SPF 環境での飼育にも関わらず DEX 投与による易感染性からの日和見感染症による死亡が考えられるため、抗生剤内服を追加する必要がある。また、骨壊死は認めなかったものの、血栓形成や血管侵入障害によると考えられる骨頭軟骨の石灰化不全が DEX 群にのみ認められたことから、本法では骨壊死の前

病態である血管障害誘発までは至っていると推察できる。適切なDEX投与時期を検索する事でステロイド誘発性骨壊死発生を捉え、モデル確立に近づく事ができると考えられる。

## 5. 結論

4週齢オス C57BL6 マウスに対するDEX内服法では、6及び12週間の投与では、ステロイド誘発性骨壊死モデルの確立はできなかつたものの、血栓形成などの前病態の再現は可能であった。投与法を更に検索することでモデル確立につなげる事が期待できる。

## 6. 研究発表

- 1) Omata Y, Yasui T, Hirose J, Izawa N, [Imai Y](#), et al.  
Genome-wide comprehensive analysis reveals critical cooperation between Smad and c-Fos in RANKL-induced osteoclastogenesis.  
J Bone Miner Res. 2014 Nov 27. doi: 10.1002/jbmr.2418. [Epub ahead of print]
- 2) Yano K, Yasuda H, Takaoka K, Takahashi M, Nakamura H, [Imai Y](#), Wakitani S.  
Fate, origin and roles of cells within free bone grafts.  
J Orthop Sci. 2014 Nov 20. [Epub ahead of print]
- 3) Yu TY, Kondo T, Matsumoto T, Fujii-Kuriyama Y, [Imai Y](#).  
Aryl hydrocarbon receptor catabolic activity in bone metabolism is osteoclast dependent in vivo.  
Biochem Biophys Res Commun. 2014 Jul 18; 450(1):416-22. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.114.
- 4) Shimizu K, Uematsu A, [Imai Y](#), Sawasaki T.  
Pctaire1/Cdk16 promotes skeletal myogenesis by inducing myoblast migration and fusion.  
FEBS Lett. 2014 Aug 25;588(17):3030-7. doi: 10.1016/j.febslet.2014.05.060.
- 5) Enoki Y, Sato T, Tanaka S, Iwata T, Usui M, et al.  
Netrin-4 derived from murine vascular endothelial cells inhibits osteoclast differentiation in vitro and prevents bone loss in vivo.  
FEBS Lett. 2014 Jun 27;588(14):2262-9. doi: 10.1016/j.febslet.2014.05.009.

- 6) Ipulan LA, Suzuki K, Sakamoto Y, Murashima A, [Imai Y](#), Omori A, Nakagata N, Nishinakamura R, Valasek P, Yamada G.

Non-myocytic androgen receptor regulates the sexually dimorphic development of the embryonic bulbocavernosus muscle.

Endocrinology. 2014 Jul;155(7):2467-79. doi: 10.1210/en.2014-1008.

- 7) Inoue K and [Imai Y](#).  
Identification of Novel Transcription Factors in Osteoclast Differentiation using Genome-wide Analysis of Open Chromatin Determined by DNase-seq.  
J Bone Miner Res. 2014 Aug;29(8):1823-32. doi: 10.1002/jbmr.2229.
- 8) Kondoh S, Inoue K, Igrashi K, Sugizaki H, Shirode-Fukuda Y, Inoue E, Yu T, Takeuchi J, Kanno J, Bonewald L, [Imai Y](#).  
Estrogen receptor  $\alpha$  in osteocytes regulates trabecular bone formation in female mice.  
Bone. 2014 Mar;60:68-77. doi: 10.1016/j.bone.2013.12.005.

## 7. 知的所有権の取得状況

なし

## 8. 参考文献

- 1) Yang L, Boyd K, Kaste SC, Kamdem Kamdem L, Rahija RJ, et al.  
A mouse model for glucocorticoid-induced osteonecrosis: effect of a steroid holiday.  
J Orthop Res. 2009;27(2):169-75.

# 低酸素環境下における骨代謝障害は骨細胞壊死を誘導する

植田 修右、市堰 徹、兼氏 歩、松本 忠美 (金沢医科大学 整形外科)

我々はステロイド性家兎や酸化誘発ラットモデルを用いて酸化ストレスの発生や酸化誘発剤を用いて骨壊死の誘発実験などを行い、低酸素状態の発生について報告してきた。また酸化誘発ラットモデルにおいて Dickkopf-1(Dkk-1)が骨壊死に関与していることを報告した。今回は vivo の実験系では困難である低酸素環境や壊死の誘因因子について、培養骨細胞を用いた vitro の実験を行い、検討した。

## 1. 研究目的

これまで我々はステロイド性家兎から酸化誘発ラットモデルより酸化ストレスの発生や酸化誘発剤による骨壊死の誘発実験などを行い、組織の低酸素状態を報告してきた<sup>1)</sup>。また、一方近年ステロイド投与での Dickkopf-1(Dkk-1)の発現が報告されており、我々も酸化ラット骨壊死モデルにおいて Dkk-1が骨壊死に関与していることを示した。そこで、低酸素環境とステロイド添加に伴う骨細胞死誘導および Dkk-1 の関与について今回 vitro において検討した。

## 2. 研究方法

マウス培養骨細胞である MLO-Y4 を用いて実験を行った。培養は 20%酸素環境下(正常酸素環境下)、1%酸素(低酸素)環境下、デキサメサゾン 1 $\mu$ M (Dex)を添加したもの、低酸素環境下において Dex を添加したものをそれぞれ 24 時間培養し、総細胞数に対する細胞死の割合を測定した。

次に Wnt シグナルの抑制因子である Dickkopf-1(Dkk-1)を用いて、Dex 添加時や低酸素環境下における MLO-Y4 の Dkk-1 の発現を測定した。また Dkk-1 siRNA を用いて Dkk-1 を knockdown し、細胞死の状態を確認した。すべての群で、細胞死の割合の測定には Apoptotic/Necrotic Cells Detection Kit を用いて蛍光免疫染色を行い、1 視野あたりの総細胞数に対するアポトーシス、ネクロシスの数の割合を測定した。また Dkk-1 siRNA の抑制効果を確認するため未導入のものと control、Dkk-1 siRNA を導入したものをそれぞれ細胞死の割合を測定し、ウェスタンブロットでも同様に行った。

## 3. 研究結果

低酸素環境下のみ、あるいは Dex 添加のみでは細胞死がわずかに上昇するのみであった。一方、低酸素環境下+Dex 添加群では有意に細胞死が増加した( $p<0.01$ )。特にネクロシスの割合が著しく増加していた。Dkk-1 の発現は Dex 添加のみで著明な発現を認め、Dkk-1 siRNA を導入することで有意に発現量が低下したことを確認した( $p<0.01$ )。さらに Dkk-1 を knockdown することによって、細胞死自体の割合が有意に減少した( $p<0.01$ )。

## 4. 考察

本検討から、低酸素環境下のみでは細胞死に陥る細胞は少なく、その形態のほとんどはアポトーシスであることが示された。また、ステロイド単独でも低酸素環境下同様アポトーシスが主であり、ネクロシスまで陥る細胞は少なかった。このことからステロイド添加のみでは骨細胞壊死誘導作用は少ないことが考えられた。

今回検討した Dkk-1 は Wnt シグナルに関与しており、骨形成を抑制するとされている因子であり、本実験ではステロイド添加骨細胞で Dkk-1 の発現増加を認めた。すなわちステロイドの骨細胞への直接作用として骨細胞壊死誘導作用は少ないものの骨代謝性障害が惹起されることは確認できた。この 2 つの因子については、すでに動物実験や臨床例でも報告されており、骨壊死との関連が深いことが vitro でも示された。また本検討では骨細胞にステロイドを添加し、さらに低酸素環境下にするすることで vivo におけるステロイド投与の生体環境に近づけた。本実験からステロイド

性骨壊死の発生機序は、ステロイドの直接作用による骨細胞の代謝性障害、および低酸素環境下であること(すなわち血管、血流障害)のすくなくとも 2 つの条件がそろったときにはじめて骨壊死が成立することが示された<sup>2)</sup>。さらに Dkk-1 siRNA により細胞死を有意に抑制することを認めたことから、Dkk-1 に着目することで、低酸素から骨壊死につながる重要な因子であり、今後臨床でも大腿骨頭壊死症発生予防につながる可能性が十分に考えられた。

## 5. 結論

ステロイドによる酸化ストレスおよび骨代謝障害は *in vitro* でも確認できた。ステロイドの直接作用に低酸素環境を加えることにより骨細胞死が有意に増加した。ステロイドによって発現する Dkk-1 を knockdown することで骨細胞死が抑制できる可能性が示された。

## 6. 研究発表

### 1. 論文発表

Ueda S, Ichiseki T, Yoshitomi Y, Yonekura H, Ueda Y, Kaneuji A, Matsumoto T. Osteocytic cell necrosis is caused by a combination of glucocorticoid-induced Dickkopf-1 and hypoxia. *Med Mol Morphol*. 2014 May 13.

### 2. 学会発表

- 1) 植田修右、市堰徹、兼氏歩、松本忠美:ステロイド添加および低酸素状況がもたらす骨細胞への影響 —Normoxia と Hypoxia での比較検討—、第 40 回日本股関節学会。広島、2013.11.29
- 2) 植田修右、市堰徹、兼氏歩、松本忠美:ステロイド添加および低酸素環境による骨細胞死の誘導、第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会。鹿児島、2014.10.9

## 7. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許の取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 8. 参考文献

- 1) Ichiseki T, Kaneuji A, Ueda Y, Nakagawa S, Mikami T, Fukui K, Matsumoto T. Osteonecrosis development in a novel rat model characterized by a single application of oxidative stress. *Arthritis Rheum*. 2011 Jul;63(7):2138-41.
- 2) Ueda S, Ichiseki T, Yoshitomi Y, Yonekura H, Ueda Y, Kaneuji A, Matsumoto T. Osteocytic cell necrosis is caused by a combination of glucocorticoid-induced Dickkopf-1 and hypoxia. *Med Mol Morphol*. 2014 May 13.

# 電磁場刺激後の家兎ステロイド性骨壊死モデルにおける

## 大腿骨内の血流評価

池上 徹, 上島圭一郎, 石田雅史, 齊藤正純, 生駒和也, 林 成樹, 藤岡幹浩, 久保俊一  
(京都府立医大大学院 運動器機能再生外科学(整形外科))  
松田 修  
(京都府立医大大学院 免疫学)

電磁場刺激によるステロイド性骨壊死の予防機序を明らかにするため、Dynamic contrast enhanced MRI を用いて、電磁場刺激を行った家兎ステロイド性骨壊死モデルの大腿骨内の血流を評価した。対照群ではステロイド投与後に有意に大腿骨内の血流低下が生じたが、電磁場刺激群では有意な血流変化はなかった。ステロイド投与後早期に生じる骨内の血流低下が電磁場刺激により抑制されることが、ステロイド性骨壊死の予防機序の一つであると考えた。

### 1. 研究目的

骨壊死の発生には阻血が大きく関与していると考えられている。基礎研究ではステロイド投与後ごく早期から血管新生因子の発現や DNA の酸化障害など、骨内で阻血の影響が生じていることが明らかになっている。われわれは家兎ステロイド性骨壊死モデルにおけるステロイド投与後の大腿骨内の血行動態を dynamic contrast enhanced MRI (DCE-MRI) を用いて *in vivo* で評価し、大腿骨内の血流がステロイド投与後早期に実際に低下していることを示した<sup>1)</sup>。ステロイド性大腿骨頭壊死症の予防には、ステロイド投与後早期に生じる血流低下を抑制する必要があると考えられる。これまでにステロイド性骨壊死予防の研究が行われており、抗酸化作用や抗凝固作用を有する薬剤や電磁場刺激などの物理刺激が予防に効果があったと報告されている。われわれは家兎ステロイド性骨壊死モデルにおいて、電磁場刺激が骨壊死の発生率を低下させることを報告した<sup>2)</sup>。しかし、電磁場刺激が骨内の血流に与える影響は明らかになっていない。本研究の目的は DCE-MRI を用いて、電磁場刺激後の家兎ステロイド性骨壊死モデルの大腿骨内の血行動態を *in vivo* で評価することである。

### 2. 研究方法

28 週齢以上の雄性日本白色家兎 15 羽(無処置群:

n=7、電磁場刺激群:n=8)の右殿筋内に methylprednisolone acetate (MPSL) 20mg/kg を投与し骨壊死モデルを作成した。EBI Bone Healing System® (Biomet Osteobiologics, Parsippany, NJ) を用いて電磁場刺激を行った。家兎の骨盤から両大腿部を覆うことができるようにケージにコイルを設置して、1 日 10 時間電磁場刺激を与えた。電磁場刺激はステロイド投与の 1 週間前から開始した。

MR 装置は Agilent 社製動物用横置き型 MRI system、7.04T を使用した。家兎をイソフルラン吸入麻酔下に腹臥位とし、MR 装置に固定した。Spoiled gradient echo 法を用いた DCE-MRI で両股関節と大腿骨骨幹部を含む画像(図 1)を 40 回連続で撮像した。10 回目撮像時に 0.2 mmol/kg の MRI 用造影剤 (gadolinium diethylenetriaminepenta-acetic acid: Gd-DTPA) を外側耳静脈から急速静注した。撮像時期は、電磁場刺激開始前、ステロイド投与直前とステロイド投与後 1、5、10、14 日目とした。

#### ① DCE-MRI 評価方法

大腿骨近位部の骨壊死好発部位に region of interest(以下 ROI)を設定した(図 1)。撮像開始時の信号強度(signal intensity: SI)を基準に relative intensity (RI)を次の式で算出した。

$$RI(t)=SI(t)/SI(0)$$

(RI(t):時間 t における relative intensity、

SI(t): 時間 t における SI、SI(0): 時間 0 における SI)  
RI(t)の値を経時的にプロットして time signal intensity  
curve を作成した(図 2)。

40 回連続で撮像した RI(t)の値を造影剤投与前の 10  
回の a 相、造影剤投与直後に SI が増加しつつある時  
期の 15 回の b 相と造影剤投与後定常状態となった  
15 回の c 相に分けた。

time signal intensity curve から以下の評価を行った。

I. c 相の平均 RI(t)を a 相の平均 RI(t) で割った値を  
enhancement ratio(ER) とした。

II. 造影剤投与直後の time signal intensity curve の  
傾きを initial slope(IS)とした。

III. b 相の RI(t)の値を総和した値を area under the  
curve (AUC)とした。

## ② 統計学的評価

ER,IS および AUC において、各群内でステロイド投  
与直前の値とステロイド投与後に最少となった日の値  
を Wilcoxon signed-rank test で統計学的に評価した。  
次に両群間で各撮像日における ER,IS および AUC  
を Mann-Whitney U test で統計学的に評価した。P <  
0.05 を統計学的に有意差ありと判定した。

## 3. 研究結果

### I. 大腿骨内の DCE-MRI の結果

#### ① ER の変化

電磁場刺激群において、1週間の電磁場刺激後  
に 16 大腿骨中 10 大腿骨で ER が上昇したが、残り  
の 6 大腿骨では低下した。刺激前後の値は統計学的  
に有意差はなかった。ステロイド投与前の値と投与後  
の最小値の比較では、無処置群の ER はステロイド投  
与前(1.41±0.11)と比較してステロイド投与後  
(1.31±0.16)に有意に低下した(P<0.05)。一方、電  
磁場刺激群の ER はステロイド投与前(1.47±0.11)と  
比較してステロイド投与後(1.48±0.18)に有意な変化  
はなかった(図 3)。ER が最も低下した時期は、無処置  
群ではステロイド投与後 1 日目が 3 大腿骨(21%)、5 日  
目が 7 大腿骨(50%)、10 日目が 4 大腿骨(29%)で 14  
日目が 0 大腿骨(0%)であった。電磁場刺激群ではス  
テロイド投与後 1 日目が 4 大腿骨(25%)、5 日目が 3  
大腿骨(19%)、10 日目が 2 大腿骨(12%)で 14 日目が 7  
大腿骨(44%)であった。各撮像日における ER は電  
磁場刺激群の方がステロイド投与直前から 10 日目まで  
有意に高値であった(図 4)。

#### ② IS の変化

電磁場刺激群において、1週間の電磁場刺激後に  
16 大腿骨中 10 大腿骨で IS が上昇したが、残りの 6  
大腿骨では低下した。刺激前後の値は統計学的に  
有意差はなかった。ステロイド投与前の値と投与後の  
最小値の比較では、無処置群の IS はステロイド投与  
前( $2.41 \times 10^{-2} \pm 0.59 \times 10^{-2}$ )と比較してステロイド投与  
後 ( $1.31 \times 10^{-2} \pm 0.52 \times 10^{-2}$ )に有意に低下した  
(P<0.01)。電磁場刺激群の IS はステロイド投与前  
( $2.67 \times 10^{-2} \pm 0.75 \times 10^{-2}$ )と比較してステロイド投与後  
( $1.80 \times 10^{-2} \pm 0.95 \times 10^{-2}$ )に有意に低下した(P<0.05)  
(図 5)。IS が最も低下した時期は、無処置群ではステ  
ロイド投与後 1 日目が 1 大腿骨(7%)、5 日目が 8 大  
腿骨(57%)、10 日目が 4 大腿骨(29%)で 14 日目が 1 大  
腿骨(7%)であった。電磁場刺激群ではステロイド投与後  
1 日目が 3 大腿骨(19%)、5 日目が 3 大腿骨(19%)、10  
日目が 3 大腿骨(19%)で 14 日目が 7 大腿骨(43%)であ  
った。各撮像日における IS は電磁場刺激群の方がス  
テロイド投与直前から 10 日目まで有意に高値であ  
った(図 6)。

#### ③ AUC の変化

電磁場刺激群において、1週間の電磁場刺激後に  
16 大腿骨中 10 大腿骨で AUC が上昇したが、残りの  
6 大腿骨では低下した。刺激前後の値は統計学的に  
有意差はなかった。ステロイド投与前の値と投与後の  
最小値の比較では、無処置群の AUC はステロイド投  
与前(20.0±1.8)と比較してステロイド投与後  
(17.9±0.8)に有意に低下した(P<0.01)。一方、電  
磁場刺激群の AUC はステロイド投与前(21.1±2.2)と  
比較してステロイド投与後(19.8±2.5)に有意な変化は  
なかった(図 7)。AUC が最も低下した時期は、無処置  
群ではステロイド投与後 1 日目が 2 大腿骨(14%)、5 日  
目が 9 大腿骨(65%)、10 日目が 2 大腿骨(14%)で 14  
日目が 1 大腿骨(7%)であった。電磁場刺激群ではス  
テロイド投与後 1 日目が 3 大腿骨(19%)、5 日目が 3  
大腿骨(19%)、10 日目が 2 大腿骨(12%)で 14 日目が 8  
大腿骨(50%)であった。各撮像日における AUC は電  
磁場刺激群の方がステロイド投与直前から 5 日目ま  
で有意に高値であった(図 8)。



図1 dynamic contrast-enhanced MRI の画像  
点線: 大腿骨壊死好発部位に設定した region of interest

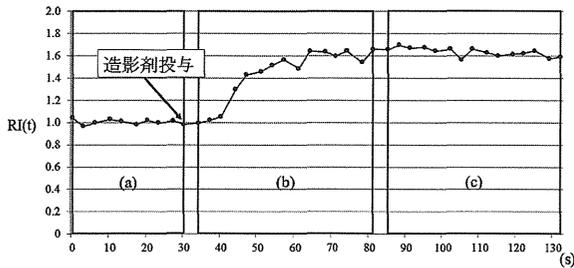


図2 time signal intensity curve  
(a): 造影剤投与前 10 回、(b): 造影剤投与直後に SI が増加しつつある時期の 15 回、(c): 造影後定常状態となった 15 回

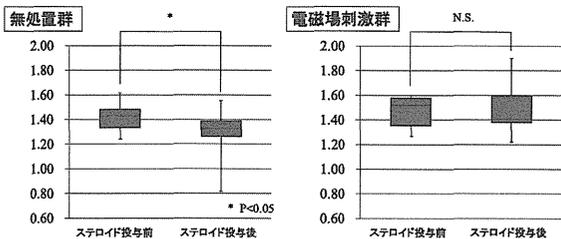


図3 各群におけるステロイド投与前後の ER の変化

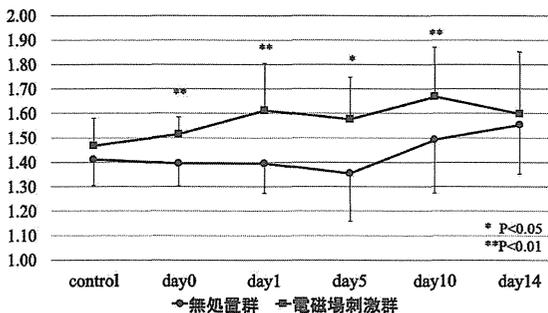


図4 両群の各撮像日における ER の変化

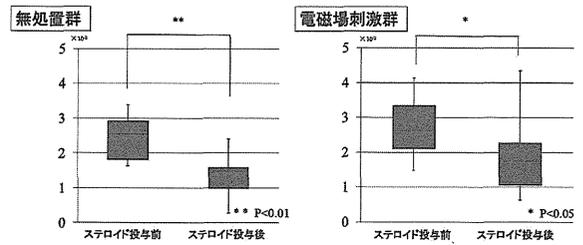


図5 各群におけるステロイド投与前後の IS の変化

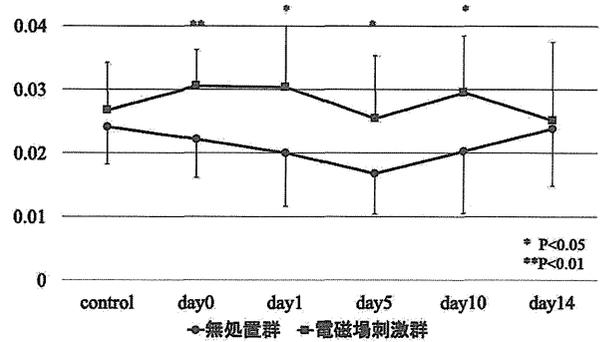


図6 両群の各撮像日における IS の変化

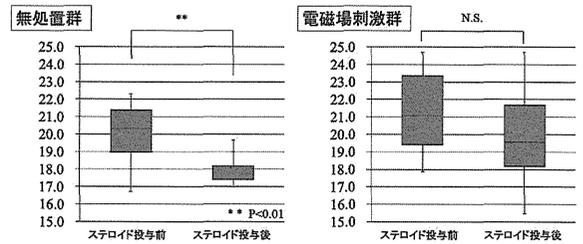


図7 各群におけるステロイド投与前後の AUC の変化

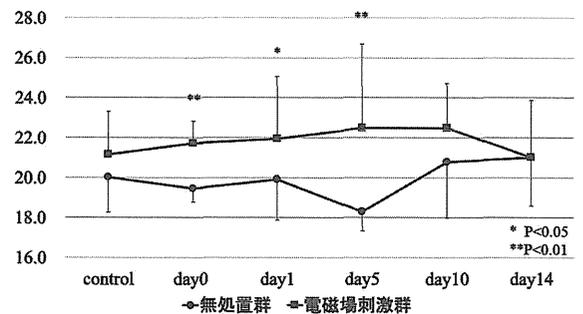


図8 両群の各撮像日における AUC の変化

#### 4. 考察

ステロイドの骨への影響として、血管内皮障害、血管内圧上昇、血管新生抑制および血管再生抑制などが明らかとなっている。Kabata らはステロイド投与後 3-5 日で骨髄造血細胞に VEGF が発現することを報告しており、Ichiseki らはステロイド投与後 5 日目ま

で骨内細胞の DNA 酸化障害が生じていることを報告している<sup>3)、4)</sup>。したがって、ステロイド投与後ごく早期から骨内の阻血につながるイベントが生じていると考えられる。われわれは DCE-MRI を用いた大腿骨の血行動態評価でステロイド投与後に血流が低下すること、および血流低下時期はステロイド投与後ごく早期であることを明らかにした<sup>1)</sup>。ステロイド性骨壊死を防ぐにはステロイド投与後早期に生じる血流低下を予防する必要がある。

電磁場刺激の効果は局所的であり全身状態に影響を与えないことから骨折の安全な治療法として広く用いられている。電磁場刺激の骨癒合促進機序として、*in vitro*で骨芽細胞において transforming growth factor (TGF)  $\beta$  1、bone morphogenetic protein(BMP)2 および BMP4 などの血管新生促進作用をもつ成長因子の発現が亢進することが明らかにされている。われわれは *in vivo*で電磁場刺激をマウスに 1 週間与えることによって、その骨内で fibroblast growth factor-2、angiopoietin-2 などの血管新生因子の発現が亢進することを報告した<sup>5)</sup>。さらに Smith らは *in vivo*において電磁場刺激が血管拡張作用をもつことを示した。

これらの理由から、電磁場刺激がステロイド性骨壊死の予防や治療に有効に働くのではないかと考えられ、研究が進められている。Ishida らは家兎において電磁場刺激がステロイド性骨壊死の発生率を低下させることを報告した<sup>2)</sup>。Ding らはラットにおいて電磁場刺激がステロイド性骨壊死の予防に効果があると報告し、骨壊死予防機序に血清脂質レベルの減少と TGF- $\beta$  1 の発現亢進が関連していると報告した。しかし、電磁場刺激がステロイド投与後早期の骨内の血流へ与える影響については明らかになっていない。

本研究では電磁場刺激が骨内の血流へ与える影響を明らかにするために電磁場刺激後の大腿骨内の血行動態を DCE-MRI で検討した。ステロイドを投与する前に 1 週間電磁場刺激を行うことにより統計学的には有意差はなかったが ER、IS および AUC がいずれも上昇した個体が多かった(16 大腿骨中 10 大腿骨)。無処置群と電磁場刺激群の各撮像日における ER、IS および AUC の比較では電磁場刺激後に電磁場刺激群の 3 つのパラメーター全てが無処置群よりも統計学的に有意に高値であった。さらに、ステロイド投与後に血流が最小となる日の平均は無処置群より電磁場刺激群のほうが遅かった。これらの結果から、電磁場刺激の血管新生促進作用や血管拡張作用が

ステロイド投与後早期に生じる血流低下を抑制することが骨壊死の抑制機序の一つであると考えた。

IS は造影剤が骨髄へ流入する際速度を反映していると考えられる。今回の研究では無処置群で生じたステロイド投与後の ER および AUC の低下が電磁場刺激群では起こらなかったのに対して、IS のみ電磁場刺激群においても低下した。電磁場刺激が血管新生を促した結果、血流量を改善させたが血流速度には影響を与えなかった可能性がある。

電磁場刺激後の骨内の血行動態を MRI で評価した研究は過去にない。MRI の利点は同一個体に繰り返し実施可能であり、同一個体の経時的な変化を観察可能であることである。この実験ではステロイド性骨壊死の予防処置を行った後に *in vivo*で経時的に骨内の血行動態を評価できた。この方法は今後のステロイド性大腿骨頭壊死症の予防法開発に役立つ可能性がある。今後、電磁場刺激の刺激条件、刺激部位および治療期間を含めた最適条件の確立が課題である。

## 5. 結論

- ① 家兎ステロイド性骨壊死モデルに電磁場刺激を行い、DCE-MRI を用いて大腿骨内の血流変化を評価した。
- ② ステロイド投与後に無処置群では有意に血流が低下した。それに対して電磁場刺激群では有意な変化は認めなかった。
- ③ ステロイド投与後早期に生じる血流低下を抑制することが電磁場刺激の骨壊死抑制機序の一つであると考えた。

## 6. 研究発表

### 1. 論文発表

Hayashi S, Fujioka M, Ikoma K, et al. Evaluation of femoral perfusion in a rabbit model of steroid-induced osteonecrosis by dynamic contrast-enhanced mri with a high magnetic field MRI system. J Magn Reson Imaging 2014; in press. doi: 10.1002/jmri.24632.

### 2. 学会発表

- 1) Akira Ikegami, Keiichiro Ueshima, Kazuya Ikoma, Mikihiro Fujioka, Masazumi Saito, Shigeki Hayashi, Masashi Ishida, Masaaki Kuribayashi, Osam Mazda, Toshikazu Kubo: Femoral perfusion