

# 虚血性骨壊死におけるインターロイキン 6 の役割の検討

黒柳 元 (名古屋市立大学大学院医学系研究科 整形外科)  
神谷宣広 (天理大学 体育学研究)  
山口亮介 (九州大学大学院医学系研究科 整形外科)  
Harry K. W. Kim (テキサススコティッシュライト小児病院 整形外科)

インターロイキン 6 (Interleukin-6; IL-6) は炎症反応の重要な因子であり、大腿骨頭壊死の発症に関与することが報告されているが分子レベルでの病態の詳細は明らかでない。骨壊死動物モデルにはラット、豚などが存在するが、骨壊死マウスモデルは遺伝子改変マウスを使用できる利点がある。今回我々は IL-6 遺伝子ノックアウトマウスを使用して阻血性骨壊死に関する IL-6 の役割を検討したので報告する。

## 1. 研究目的

我が国では大腿骨頭壊死は広く知られているが、有効な治療法がないため難病指定を受けている。大腿骨頭壊死の原因は外傷、血液凝固系異常による血栓形成、血管閉塞、喫煙などが報告されているが、未解明である(文献 1)。細胞生物学的観点からは、骨壊死発生後に壊死に陥った細胞から放出される high mobility group box-1 (HMGB1) を代表とする damage-associated molecular patterns (DAMPs) が pattern recognition receptors (PRRs) 受容体に結合して、免疫系細胞から炎症性サイトカインの放出を促進し、炎症を慢性化することが病態に深く関与していると報告されている(文献 2)。TSRH 研究グループは大腿骨遠位端へ血流を供給している血管 4 本を選択的に遮断し虚血性骨壊死を確実に誘導する世界初の骨壊死マウスモデルを開発している(文献 3)。同グループは小児骨壊死患者(ペルテス病)の造影 MRI で滑膜炎が慢性化し、関節液検体中の interleukin (IL)-6 が非常に亢進していることを報告している(文献 4)。また、ペルテス病患者では破骨細胞と骨芽細胞の骨形成のカップリング機構が破綻していることも報告した(文献 1)。骨折初期などで生じる急性炎症は骨リモデリングにおいて不可欠であることが知られているが、IL-6 などの炎症性サイトカインの存在下では炎症が慢性化し、骨リモデリングが阻害され、骨折治癒が遅れることが知られている。

本研究は IL-6 遺伝子ノックアウトマウス(IL-6 KO) を使用して阻血性骨壊死における IL-6 の役割の検討を行った。

## 2. 研究方法

生体内における IL-6 の骨壊死への機能解析のため IL-6 遺伝子ノックアウトマウス(IL-6KO, n=25)に骨壊死を誘導し、野生型マウス(B6, n=29)と比較することで、IL-6 欠損が骨壊死にどのように影響するのかを検討する。カルセイン二重標識を行い石灰化速度や骨形成率といった動的パラメータを検討し、マイクロ CT を用いて骨密度や骨梁構造などの骨強度に関連する因子を検討する。病理像では H&E 染色、von Kossa 染色及び TRAP 染色を行い骨芽細胞や破骨細胞による骨形成能及び骨吸収能について検討する。

## 3. 研究結果

術後 4 週の検体を用いた IL-6 免疫染色では、野生型マウスでは骨壊死術後 4 週後、IL-6 の発現が増強していた。一方、IL-6KO では IL-6 の発現は認めなかった。

術後 4 週の検体を用いたマイクロ CT による解析では、野生型マウスではコントロール群と比較して骨壊死手術群で骨量が低下した。一方、IL-6 KO では野生型マウスと比較して骨壊死後の骨量が上昇してい

ることを見出した。

骨形成パラメータに関しては、野生型マウスではコントロール群(非手術側)と比較して、手術側の骨形成(骨芽細胞の数と骨形成率)の低下を認めた。野生型マウスとIL-6 KOのコントロール群では骨形成に差はなかった。しかし、IL-6 KOでは野生型マウスと比較して、優位に骨壊死後における骨形成が上昇していた。

骨吸収パラメータに関しては、IL-6 KOでは野生型マウスと比較して優位に骨壊死後の破骨細胞の数が上昇していた。

#### 4. 考察

野生型マウスとIL-6 KOを比較すると、骨量に関して差がないことが知られている。今回の研究結果でも、非手術側では、野生型マウスとIL-6 KO間で骨量、骨形成、骨吸収パラメータなどの変化は認めなかった。以上のことから、IL-6は生理的な状況下では骨代謝には影響しないと考えられた。

一方、IL-6 KOを使用した関節炎マウスモデルでは関節炎と骨破壊を抑制することが報告されている。今回の結果では、野生型マウスでは骨壊死によってIL-6の発現が亢進し、骨リモデリングを抑制し、骨量低下を起こした。しかし、IL-6 KOでは骨壊死後の骨リモデリングが亢進し、骨量低下を抑制していると考えられた。IL-6は骨壊死などの慢性炎症の病態においては、骨リモデリングを抑制し、骨量低下を引き起こすターゲット分子であることが示唆された。

#### 5. 結論

骨壊死におけるIL-6の機能が解明されれば、骨壊死後の骨量低下を制御しうる可能性があり、新たな治療薬開発などの可能性を秘めていると思われた。

#### 6. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yamaguchi R, Kamiya N, Kuroyanagi G, Ren Y, Kim HKW. Development of a murine model of ischemic osteonecrosis to study the effects of aging on bone repair. J Orthop Res. 2021 Dec;39(12):2663-2670.
- 2) Kamiya N, Kuroyanagi G, Aruwajoye O, Kim HKW. IL6 receptor blockade preserves articular

cartilage and increases bone volume following ischemic osteonecrosis in immature mice. Osteoarthritis Cartilage. 2019 Feb;27(2):326-335.

- 3) Kuroyanagi G, Adapala NS, Yamaguchi R, Kamiya N, Deng Z, Aruwajoye O, Kutschke M, Chen E, Jo C, Ren Y, Kim HKW. Interleukin-6 deletion stimulates revascularization and new bone formation following ischemic osteonecrosis in a murine model. Bone. 2018 Nov;116:221-231.
- 4) Kamiya N, Yamaguchi R, Aruwajoye O, Kim AJ, Kuroyanagi G, Phipps M, Adapala NS, Feng JQ, Kim HK. Targeted Disruption of NF1 in Osteocytes Increases FGF23 and Osteoid With Osteomalacia-like Bone Phenotype. J Bone Miner Res. 2017 Aug;32(8):1716-1726.

##### 2. 学会発表

- 1) Kuroyanagi G, Yoshihara H, Yamada K, Takada N, Matsui N, Murakami H. Surgical treatment with bioactive, bioresorbable raw particulate unsintered hydroxyapatite/poly-L-lactide screws for lateral tibial condylar fractures. The 29th Korean-Japanese Combined Orthopedic Symposium, 2019, Pyeongchang, Korea.
- 2) Kuroyanagi G, Adapala NS, Yamaguchi R, Kim HK. Interleukin-6 inhibits osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells and decreases bone formation following ischemic osteonecrosis. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2017 Annual Meeting, 2017, Denver, USA.
- 3) Kuroyanagi G, Adapala NS, Kim HK. Toll-Like Receptor 4 Activation Inhibits Osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells and decreases bone formation following ischemic osteonecrosis. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2017 Annual Meeting, 2017, Denver, 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**

- 1) Kim HK. Pathophysiology and new strategies for the treatment of Legg-Calvé-Perthes disease. *J Bone Joint Surg Am.* 94: 659-669, 2012. Review
- 2) Adapala NS, et al. Necrotic bone stimulates proinflammatory responses in macrophages through the activation of toll-like receptor 4. *Am J Pathol.* 186: 2987-2999, 2016.
- 3) Kamiya N, et al. Development of a mouse model of ischemic osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res.* 473: 1486-1498, 2015.
- 4) Kamiya N, et al. Legg-Calvé-Perthes disease produces chronic hip synovitis and elevation of interleukin-6 in the synovial fluid. *J Bone Miner Res.* 30: 1009-1013, 2015.