

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：34602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08437

研究課題名(和文)小児大腿骨頭壊死症に対する基礎研究

研究課題名(英文)Osteonecrosis of the femoral head in childhood

研究代表者

神谷 宣広 (Kamiya, Nobuhiro)

天理大学・体育学部・教授

研究者番号：50735876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：股関節の大腿骨頭が小児期に腐る病気(骨壊死)があります。骨頭が潰れる可能性があり小学生の学校活動が盛んな時期に運動や日常生活が大きく制限されます。100年以上前から報告されている病気ですが病気の原因が明らかでなく、治療に数年かかります。本研究では、この病気の子供たちの股関節液に炎症性物質であるインターロイキン6が多量に存在することを世界で初めて報告しました。また、骨壊死により壊れた細胞から出る細胞のゴミがインターロイキン6を増やす可能性を見つけました。このインターロイキン6の産生を減らすことにより、骨頭が潰れる本疾患の病態を改善できると考えています。

研究成果の概要(英文)：This study focuses on the pediatric osteonecrosis of the femoral head. In order to prevent a collapse of the femoral head, there is a strict limitation of school activity and daily life for children with this disease. Although this disease was first reported over 100 years ago, it still takes several years for the initial treatment. We found that interleukin-6 is abundantly expressed in the hip joint effusion and that some garbage from the dead cells can induce interleukin-6 as a disease mechanism. We think that inhibition of interleukin-6 can improve the disease condition especially for preventing the collapse.

研究分野：小児整形外科・骨代謝

キーワード：骨壊死 小児 インターロイキン6 大腿骨頭 ペルテス病 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

ペルテス病は国際的には LCPD(Legg-Calvé-Perthes disease)と言われ、3人の医師の名前(Arthur Legg, Jacques Calvé, Georg Perthes)にちなんでいる。100年以上前から治療法は大きく変わっておらず、基本的には免荷(装具治療など)と外科的手術(大腿骨・臼蓋の骨切り術)である。問題点としては、学童期の子供にとって治療期間が数年にわたることが多く、運動制限あるいは療育施設への入所期間が長いことが挙げられる。病態としては、大腿骨頭への血行不全が骨頭の圧潰をきたすことがわかっているが、その病態を引き起こすもとの原因は不明である。また、病態が進行して、骨頭の圧潰が進む症例とあるいは、病状が改善する症例との見極めは非常に困難であり、免荷期間の設定は長めになる傾向があると思われる。骨頭圧潰は手術の可能性を高め、将来の関節症を早期に引き起こすことが臨床的に知られている。

興味深いことにペルテス病罹患股関節には滑膜炎所見を併発することが報告されてきた。本研究ではこの滑膜炎所見に着目し、ペルテス病が炎症あるいは免疫と関連することを予想した。国際的にペルテス病は、小児期(男児:1/740、女児:1/3500出生)に大腿骨頭が変形・圧潰する難治性疾患である。ペルテス病の病態生理メカニズムは全く不明で、このため治療は遅れている。我が国における研究報告は皆無である。この問題を解決するため、申請者は2009年よりペルテス病研究に着手した。ヒト-動物-細胞の双方向的研究の結果、大腿骨頭の死細胞遊離分子メカニズム(特に、インターロイキン-6)に加えて骨 BMP メカニズムが、本疾患の病態進行に関与していると考えた。

2. 研究の目的

ペルテス病の病態生理メカニズムを明らかにすることを目的とした。特に、免疫学の観点から本疾患が炎症と関係していることを予想した。研究前予備データからインターロイキン6の関与が強いと予想されたため患者数を増やし統計学的に立証することを目指した。さらに、患者から得られた結果を動物モデルを用いて検証した。具体的には、申請者らが開発したネズミあるいはブタの骨壊死モデルを用いて、患者から得られた分子生物学的な変化を確認することを行った。さらには、治療法の開発に結び付く基礎的結果を収集することを目標とした。基本的戦略としては疾患病態に大きく影響する分子標的を同定し、今後の治療法の開発に役立てることであった。

3. 研究の方法

ペルテス病の病態として、死細胞遊離分子が炎症性サイトカインを誘発し骨吸収を促進するだけでなく、骨形成機能が障害されていることを想定し、ヒト-動物-細胞研究を相補的に進めた。

ヒト臨床研究: ペルテス病患者から関節液を採取し死細胞遊離分子 DAMPs、炎症性サイトカイン(インターロイキン-6を中心に)、骨誘導因子 BMP2、骨形成マーカーならびに吸収マーカーについてそれぞれ濃度を測定し健常群と比較検討した。

動物研究: ブタ骨壊死モデルならびにネズミ骨壊死モデルを用い、BMP2、インターロイキン-6(IL-6)、DAMPsの発現・局在を組織学的に検討した。動物へのBMP2投与によりその壊死組織像がどのように改善されるかもあわせて検討した。

細胞研究: 種々の細胞を用いて添加実験、阻害実験を行い、DAMPsが炎症性サイトカインを誘導すること、DAMPs、サイトカインが骨吸収を促進すること、さらにそれらがBMP2による骨形成誘導を阻害することを検討した。

4. 研究成果

ペルテス病の臨床研究: IL-6の関与

申請者らは、ペルテス病の病態の進行に滑膜の増生と関節液の貯留が関係し、さらには、生化学的アプローチにより炎症性サイトカイン IL-6が上昇していることを世界に先駆けて同定した(雑誌論文)。MRIの普及とともに関節液や滑膜の評価が注目され、特にガドリニウム造影により定量化が可能となった。ペルテス病患側股関節では、健側と比べ関節液貯留と滑膜増生が著明であった(図1)。

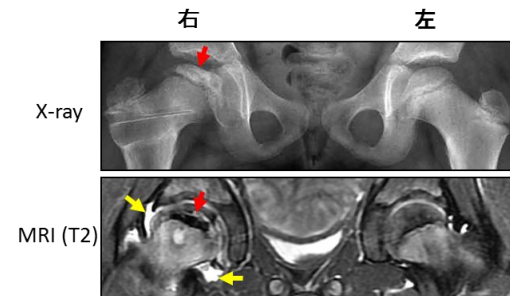


図1 ペルテス病における股関節液貯留像
右股関節(患側)において骨頭圧潰(赤矢印)ならびに関節液貯留(黄矢印)が認められた。左股関節(健側)

この所見は、ペルテス病滑膜炎や関節液の貯留が存在するという他研究者の報告に合致した。さらに、関節液中の炎症性起因物質を網羅的に測定すると、IL-6は健側の25倍に増加していた。また、この結果は、エライザ法により再確認された(図2)。

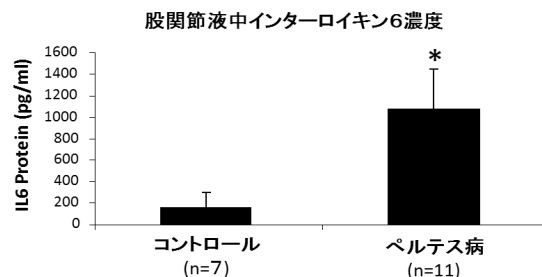


図2 ペルテス病股関節液中インターロイキン6 (IL-6) 濃度

ペルテス病股関節液中 IL-6 はコントロール群に比べると有意に上昇していた。

また、滑膜が造成する疾患として関節リウマチがよく知られているが、関節リウマチで特徴的な TNF-alpha, IL-1 beta, IL-17 などの炎症関連因子の上昇は、ペルテス病では認められなかった。このことより、同じ滑膜の増生がみられる両疾患において炎症に関連する分子プロファイルは異なり、両者が異なった病態であることは臨床経験に合致した。近年、遺伝子研究によりペルテス病患者において IL-6 遺伝子多型との関連性が報告されたことにも合致すると考えられた。以上のことより、IL-6 がペルテス病の病態に大きく関与する可能性が示唆された。

IL-6 の骨に対する作用

IL-6 の機能は、骨吸収を促進し、骨形成を阻害することが報告されていることから本研究でもその作用を検証した(結果未発表)。この IL-6 の作用はペルテス病の骨頭圧潰をきたす病態の理解に合致した。つまり、IL-6 の増加により、軟骨下骨(subchondral bone)において破骨細胞の働きが増強し、また、骨芽細胞の働きが减弱することが結果的に骨頭圧潰をきたす可能性がある(図3)。

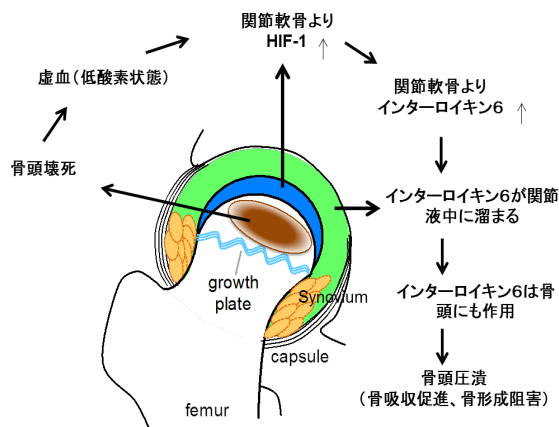


図3 IL-6 を介する骨頭圧潰の予想メカニズム

関節軟骨から虚血刺激によって産生された IL-6 が軟骨下骨の圧潰を引き起こす。

もし、この病態把握が正しいのであれば、増大した IL-6 の働きを抑えることが治療に直結する可能性がある。そこで申請者らは IL-6 を分子標的と考え、IL-6 レセプター中和抗体(商品名: トシリズマブ)に注目した治療を今後の展望として考えている。トシリズマブは生物学的製剤として関節リウマチに利用されており、その炎症抑制効果はリウマチ患者において実証されている。ペルテス病と関節リウマチは、根本的な病態は異なるが、IL-6 上昇という共通の現象に対しては、同じ生物学的製剤が有効であると予想する。しかしながら、トシリズマブがペルテス病に保険適応がないことを考慮すると、動物モデル

ルを用いた検証が必要になると考えられる。そこでペルテス病の動物モデルの解析と IL-6 の検証が必要であると考えた。

ペルテス病の動物モデル研究

ペルテス病の血行不全を模倣して、申請者らはブタの大腿骨頸部血管を結紮するモデルを使用してきた。このブタモデルにおいても IL-6 の著明な上昇が臨床症例と同様に確認された。興味深いことに IL-6 の主たる産生組織は滑膜よりむしろ関節軟骨であり、滑膜の炎症は続発的であると考えられた(雑誌論文)。トシリズマブにより滑膜組織の続発的炎症が抑制される可能性を得た。以上より、関節リウマチとペルテス病は IL-6 を産生する主たる組織が異なりその病態が異なるが、結果的にトシリズマブが炎症を抑える点では共通であると予測された。さらに、申請者らは遠位大腿骨骨端周囲血管の結紮により骨壊死を引き起こすネズミモデルを開発した(雑誌論文)。このネズミモデルにおいても、IL-6 の主たる産生組織は関節液に隣接する滑膜よりむしろ関節軟骨であることが示唆された。また、このネズミモデルにおいて活性型マクロファージや好中球が骨壊死部分に多く集積していることを発見した(雑誌論文)。この所見は、これら活性型マクロファージや好中球が IL-6 などの炎症性起因为物質の誘導や骨吸収の促進に影響していることを示唆していると考えられた。申請者らはこのネズミモデルにおいても、ペルテス病の臨床病態を反映しており、将来トシリズマブの有効性を検証することが可能であると考えている。これらブタやネズミのペルテス病動物モデルを用いた研究は、病態の理解だけでなく新規治療薬の開発と臨床応用に向けた基礎データとして不可欠であると考えられる。

細胞研究

申請者らは血行不良と IL-6 上昇の関係について、軟骨細胞を使った基礎研究を行った。その結果、血行不良によって生じる組織虚血状態に対して軟骨細胞が低酸素誘導因子(Hypoxia Inducible Factor; HIF)や活性酸素(Reactive Oxygen Species; ROS)の経路を介して IL-6 を産生することを報告した(図4)。

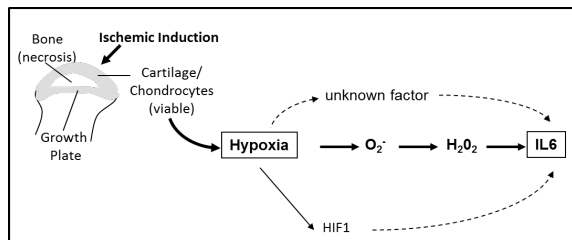


図4 骨壊死に隣接する関節軟骨は虚血刺激により IL-6 を産生する

虚血状態に瀕した関節軟骨は低酸素誘導因子(HIF1)や活性酸素の系(O₂⁻、H₂O₂)を介して IL-6 を産生する。

しかし、大部分が突発性に発症するペルテス病において依然として血行不良をきたすそもそもの原因は明らかでない。今後、その原因を明らかにすることにより、疾患特異的な分子マーカーを生化学的アプローチにより関節液や血液から同定可能としたいと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

神谷宣広、小児関節疾患における生化学的アプローチ-ペルテス病を中心に-、査読有、Bone Joint Nerve 7(4), 557-562, 2017

Yamaguchi R, Kamiya N, Adapala NS, Drissi H, Kim HK, HIF-1-Dependent IL-6 Activation in Articular Chondrocytes Initiating Synovitis in Femoral Head Ischemic Osteonecrosis, J Bone Joint Surg Am, 98(13):1122-31, 2016. PMID: 27385686

DOI:10.2106/JBJS.15.01209

査読有

Phipps MC, Huang Y, Yamaguchi R, Kamiya N, Adapala NS, Tang L, Kim HK, In Vivo Monitoring of Activated Macrophages and Neutrophils in Response to Ischemic Osteonecrosis in a Mouse Model, J Orthop Res, 34(2):307-13, 2016.

PMID: 26016440

DOI:10.1002/jor.22952

査読有

Kamiya N, Yamaguchi R, Aruwajoye O, Adapala NS, Kim, HK, Development of a Mouse Model of Ischemic Osteonecrosis. Clin Orthop Relat Res, 473(4):1486-98, 2015. PMID: 25666143

DOI:10.1007/s11999-015-4172-6

査読有

Kamiya N, Yamaguchi R, Adapala NS, Chen E, Neal D, O'Brien J, Thovesona A, Gudmundsson P, Brabhama C, Aruwajoye O, Drissi H, Kim HK, Legg-Calvé-Perthes Disease Produces Chronic Hip Synovitis and Elevation of Interleukin-6 in the Synovial Fluid, J Bone Miner Res, 30(6): 1009-1013. 2015. PMID: 25556551

DOI:10.1002/jbmr.2435

査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

Kamiya N, "My basic research in pediatric orthopaedics" Seoul National University Children's Hospital, 2016, June 1, Seoul, Korea

Kamiya N, "My basic research in pediatric orthopaedics" Severance Children's Hospital, 2016, May 31, Seoul, Korea

Yamaguchi R, Kamiya N, Kim H, HIF-1-dependent IL-6 activation in articular chondrocytes as a mechanism for the initiation of hip synovitis following ischemic osteonecrosis of the femoral head, The 27th Annual Meeting of the Japanese Pediatric Orthopaedic Association, Poster (EP-4), 2016, December 1-2, Miyagi, Japan (Selected as Best Poster Award)

Kamiya N, Basic research of Perthes disease, Oral (S1-3), The 27th Annual Meeting of the Japanese Pediatric Orthopaedic Association, 2016, December 1-2, Miyagi, Japan

Kamiya N, A report of 2015 KPOS-TPOS-JPOA Exchange Fellowship in Korea, Oral (F-2), The 27th Annual Meeting of the Japanese Pediatric Orthopaedic Association, 2016, December 1-2, Miyagi, Japan

Kamiya N, Legg-Calvé-Perthes Disease Produces Chronic Hip Synovitis and Elevation of Interleukin-6 in the Synovial Fluid, The 26th Annual Meeting of the Japanese Pediatric Orthopaedic Association, Poster (EP-10), 2015, December 4-5, Gifu, Japan (Selected as Best Poster Award)

神谷宣広、私の整形外科基礎研究 BMP、側弯症、Metachondromatosis、ペルテス病、NF1 など、第12回OBMMG、2015年7月25日、東京

神谷宣広、小児大腿骨頭壊死症に対する基礎研究(ペルテス病の分子レベルでの病態解析) 第54回日本小児股関節研究会、口演 04-17、2015年6月26日-27日、東京

〔図書〕なし

〔産業財産権〕なし

〔その他〕

神谷宣広、平成29年度岐整会学術奨励賞、Legg-Calvé-Perthes Disease Produces Chronic Hip Synovitis and Elevation of Interleukin-6 in the Synovial Fluid、岐阜大学整形外科同門会、2017年12月9日、岐阜

6 . 研究組織

(1)研究代表者

神谷 宣広 (KAMIYA, Nobuhiro)

天理大学・体育学部・教授

研究者番号：50735876

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者

Harry Kim

Texas Scottish Rite Hospital・Professor