

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10497

研究課題名(和文)ステロイド誘発骨壊死分子機構の実証：Cre依存性細胞特異的遺伝子欠損マウスの応用

研究課題名(英文) Demonstration of molecular mechanism of steroid-induced osteonecrosis

研究代表者

市堰 徹 (ICHISEKI, Toru)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30307631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Angiogenesis-osteogenesis coupling障害が発生してから12時間から24時間で骨細胞壊死に陥ることが考えられた。また、骨は、心臓、肝臓、腎臓、血管に比較し、壊死の誘因である酸化ストレスに陥りやすいこと、および、ステロイド投与により抗酸化酵素やミトコンドリア機能の有意な低下が示された。SMS-1/SMS-2ダブルノックアウトマウスの骨組織形成における組織学的検討により、長管骨と脊椎の成長板での骨芽細胞の配列異常による骨組織の低形成ならびに石灰化障害を認め、骨代謝、特に骨芽細胞の機能におけるスフィンゴミエリンの関与が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Twelve to 24 hours after the development of angiogenesis-osteogenesis coupling injury osteocytes were thought to have become necrotic. Also, bone as compared with heart, liver, kidney, and blood vessels was shown to be more susceptible to oxidative stress which is the instigator of necrosis, and showed a significantly greater decrease in antioxidant enzyme and mitochondrial function after steroid administration. The results of the histological study on bone tissue formation in the SMS-1/SMS-2 double knockout mouse revealed the presence of bone tissue hypoplasia and defective calcification due to osteoblast disarrangement in the long bone and spinal growth plate, implicating bone metabolism, especially sphingomyelin in osteoblast function.

研究分野：医歯薬学

キーワード：特異的スフィンゴミエリン合成酵素マウス ステロイド 血管内皮細胞 骨細胞 骨芽細胞 SM-1 SM-2 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

ステロイド誘発骨壊死は難治性疾患とされており、本疾患の機序解明や予防法の確立は非常に重要である。これまで脂質代謝障害や凝固専用系異常などが関与しているとされているが、いまだ詳細は不明のままである。これまで我々は、骨壊死と酸化ストレスとの関係について研究を行ない、ステロイド投与に伴う酸化ストレスが虚血低酸素や細胞傷害に重大な役割を果たしていることを見いだした。骨細胞にて行った実験では、低酸素環境下に加えてステロイド投与による osteogenesis 障害が骨細胞壊死の引き金になっている可能性を示した。これらのことから Angiogenesis-osteogenesis coupling (AOC) 障害が骨壊死における重大な要因であることが示唆された。

したがって、AOC 障害から壊死までの発生のタイミングについての検討、酸化ストレスやその制御にかかわる抗酸化酵素の状態および AOC 障害に伴う骨壊死発生の実証が緊急の研究課題となった。

さらに、細胞増殖、機能、細胞死に重要な役割を演じることが推定される細胞膜活性化脂質であるスフィンゴミエリンの骨形成、代謝や骨壊死における役割はこれまで知られていない。新たな骨壊死制御法の確立に向けて、その検討も重要な課題となった。

2. 研究の目的

ステロイド誘発骨壊死は難治性疾患であり、いったん壊死に陥ってしまった場合、ADL が非常に制限されてしまうことから手術的に加療を要することが多い。しかしながら、本疾患の機序や予防法については、これまでの様々な研究にかかわらず、いまだ詳細が解明されておらず、有効な予防法も確立していない。我々のこれまでの検討からステロイドに伴う酸化ストレスの関与や虚血低酸素および細胞障害が骨壊死の要因であることは

示唆することができた。また、骨細胞を使用した Vitro の実験で、低酸素環境下のみ、もしくはステロイド添加のみでは骨細胞壊死までは認めず、低酸素環境下でステロイドを添加する、いわゆる AOC 障害に似た環境下で骨細胞壊死まで陥ることを示した。これまで我々は骨に注目した実験を行っており、骨内における酸化ストレスの発生について示した。しかしながら、ステロイドは全身投与をしていることから、骨以外の臓器での酸化抗酸化の状態についても検討を加える必要があると考えられた。したがって、以下の検討をすすめることで、機序解明や予防法の確立に一步近づくことを目的とした。

(1) Vitro による AOC 障害発生から骨細胞壊死に陥るまでの時間

(2) ステロイド投与動物モデルにおける骨、心臓、腎臓、肝臓、血管における抗酸化酵素の状態と時間的経過

(3) Vivo による AOC 障害に伴う骨壊死発生の実証について：細胞生存・増殖と移動能の制御に関与する細胞膜スフィンゴミエリンの合成酵素遺伝子の血管内皮細胞、骨・骨芽細胞、マクロファージに各々特異的な Cre 依存性遺伝子欠損マウスを用い、ステロイド誘発骨壊死の標的細胞の特定、分子機構の解明とその骨壊死予防法確立への応用を目的とした。AOC の破綻に焦点をあて、血管内皮細胞、骨・骨芽細胞、マクロファージの機能に重要なスフィンゴミエリン合成酵素遺伝子の各細胞特異的なコンディショナルノックアウトマウスを用い、骨壊死におけるステロイドの標的細胞の特定を目指した。

3. 研究方法

(1) マウス培養骨細胞である ML0-Y4 を用いて研究を行った。先行研究で、1%酸素環境下およびデキサメサゾン (DEX) 1 μ M を添加することで骨細胞壊死が発生することが示されたことから同条件下に置いた後、1時間、

3 時間、6 時間、12 時間、24 時間での骨細胞の状態について検討した。すべての群で、細胞死の割合を測定するため、Apoptosis/Necrosis detection kit を用いて蛍光免疫染色を行い、1 視野当たりの総細胞数に対する apoptosis、necrosis の割合を算出した。各群で比較検討を行い、有意な Necrosis 細胞の増加を認めるタイミングについて検討を行った。

(2) これまでステロイド誘発骨壊死に関する実験で確立した骨壊死動物モデルであるステロイド投与家兎骨壊死モデルを使用し、骨、心臓、腎臓、肝臓、血管について検討を行った。まずステロイドを投与していない家兎(無処置)における各臓器の抗酸化酵素の状態について Catalase、SOD および酸化ストレスの発生に深く関与するミトコンドリア機能について TFAM を用いた検討を Western blot にて検討した。また、ステロイド投与後 5 日以内に酸化ストレスが発生することを先行実験で示していることから、ステロイド投与後 1 日、3 日、5 日、14 日における同因子の状態について Western blot にて検討した。

(3) ステロイド誘発大腿骨壊死に対する新規予防・治療戦略の確立に向け、標的細胞の特定とその分子機構の実証のため、骨形成におけるスフィンゴミエリンの役割を、骨・骨芽細胞に特異的な Cre 依存性スフィンゴミエリン合成酵素遺伝子欠損マウスを用い組織学的及び骨量の定量解析を用い検討する、血管内皮細胞、骨・骨芽細胞、マクロファージに各々特異的な Cre 依存性スフィンゴミエリン合成酵素遺伝子欠損マウスを用い、ステロイド短期大量投与と酸化ストレスによる大腿骨壊死は、血管内皮細胞、骨・骨芽細胞、マクロファージのどの細胞特異的遺伝子欠損マウスにおいて増強するか否かについて、各細胞特異的遺伝子欠損マウスからの培養血管内皮及び骨芽細胞において、

ステロイドと酸化ストレスは、アポトーシス、細胞増殖、移動能、細胞外基質産生のどの機能に影響を及ぼすか、について検討した。

4. 研究成果

(1) 培養骨細胞を AOC 障害に似た環境を再現したところ、1 時間、3 時間、6 時間と比較し、12 時間以降で骨細胞死の有意な増加を認めた ($p < 0.01$)。骨細胞死の割合に関しては、同様に 12 時間以降で Necrosis の割合が Apoptosis の割合よりも有意な増加を示した。したがって、骨細胞壊死の予防とするタイミングは少なくとも 12 時間以内を目安であることが考えられた。

(2) 無処置での骨、心臓、腎臓、肝臓、血管での抗酸化酵素及び TFAM は骨においてもともと少ないことが示された。したがって、他臓器と比較して骨内は様々な刺激により酸化ストレスに陥りやすい環境であることが考えられた。また、ステロイド投与により骨内の抗酸化酵素および TFAM (ミトコンドリア機能) は 3 日から 5 日でさらに有意な低下を認めた。

実験(1)(2)より虚血低酸素およびステロイド投与による生体内の過酸化状態がある一定期間継続した場合に骨壊死に至ることが判明した。

(3) 実験動物は血管内皮細胞、骨・骨芽細胞、マクロファージ各細胞特異的スフィンゴミエリン合成酵素欠損マウスを用いて、SMS-2 遺伝子欠損マウス(非致死)に SMS-1 遺伝子(この遺伝子欠損マウスは致死性)両端にジーンターゲティング法により loxP 配列を挿入し lox-flanked condition allele を有する遺伝子改変マウスを作製した。

骨芽細胞における SMS-1/SMM-2 の機能解析：骨芽細胞における SMS-1/SMS-2 の働きに関するデータはなく、ステロイド短期大量投与大腿骨壊死における SMS-1/SMS-2 の役割の解析の基礎データとして、骨芽細

胞における SMS-1/SMM-2 の in vitro での機能解析を行ない、以下の成績を得た。

SMS-1/SMS-2 コンディショニングダブルノックアウトマウスは、pigmy mouse 化を認めた。SMS-1 及び SMS-2 のコンディショナルノックアウトは、野生型との差異は認めなかった。SMS-1/SMS-2 ダブルノックアウトマウスの組織学的検討により、長管骨と脊椎の成長板での骨芽細胞の配列異常による骨組織の低形成を認めた。骨芽細胞の機能におけるスフィンゴミエリンの関与が明らかになった。

上記の成績を受け、大腿骨壊死におけるスフィンゴミエリンの役割の解明とその修飾による骨壊死制御法の確立のため、まず、マウスにおける骨壊死モデルの確立に着手した。これまで我々が作製した家兎およびラットにおける条件でモデル作成に取り掛かったが、家兎やラットのように再現性の良好な骨壊死モデルの条件設定に難渋した。現在もこの後の研究に応用可能な虚血条件やストレスの暴露条件を探索している。マウスでの有効な骨壊死実験モデルが確立できれば、スフィンゴミエリナーゼ遺伝子欠損マウスに加え、多くの遺伝子修飾マウスを用いた研究に応用可能なことが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

T. Ichiseki, S. Ueda, Y. Ueda, M. Tsuchiya, A. Kaneuji, N. Kawahara, Involvement of necroptosis, a newly recognized cell death type, in steroid-induced osteonecrosis in a rabbit model, International Journal of Medical Sciences, 査読有、2017、14(2):110-114

doi: 10.7150/ijms.17134

S. Ueda, M. Shimasaki, T. Ichiseki, Y. Ueda, M. Tsuchiya, A. Kaneuji, N. Kawahara, Prevention of glucocorticoid-associated

osteonecrosis by intravenous administration of mesenchymal stem cells in a rabbit model, BMC Musculoskelet Disord, 査読有、2017、18(1):480

doi: 10.1186/s12891-017-1837-1

市堰 徹, 植田修右, 土屋雅信, 兼氏 歩, 松本忠美, 川原範夫, ステロイド関連骨壊死に対する新たな予防の可能性、整形・災害外科、査読有、2017、60:1373-1377

S. Ueda, T. Ichiseki, Y. Ueda, A. Kaneuji, N. Kawahara, T. Matsumoto, The timing of glucocorticoid-induced osteocytic cell necrosis under hypoxia, Int J Clin Exp Pathol, 査読有、2016、9(7):7470-7475

S. Ueda, T. Ichiseki, Y. Yoshitomi, H. Yonekura, Y. Ueda, A. Kaneuji, T. Matsumoto, Osteocytic cell necrosis is caused by a combination of glucocorticoid-induced Dickkopf-1 and hypoxia, Med Mol Morphol, 査読有、2015、48:69-75 doi: 10.1007/s00795-014-0077-9

植田修右, 市堰 徹, 兼氏 歩, 松本忠美, 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、厚生労働科学研究委託費難治性疾患実用化研究事業 特発性大腿骨頭壊死症の治療法の確立と革新的予防法確立にむけた全国学際研究 平成 26 年度委託業務成果報告書、査読有、2015、45-46

[学会発表] (計 8 件)

市堰 徹, 植田修右, 土屋雅信, 兼氏 歩, 松本忠美, 川原範夫, 遺伝子修飾骨髄由来組織幹細胞の全身投与によるステロイド性骨壊死予防、第 90 回日本整形外科学会学術総会、2017

植田修右, 市堰 徹, 土屋雅信, 平田寛明, 兼氏 歩, 川原範夫, 家兎骨壊死モデルにおけるネクロトーシスの関与、第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会、2017

土屋雅信, 市堰 徹, 植田修右, 平田寛

明, 兼氏 歩, 川原範夫、ステロイド性家兔骨壊死モデルにおけるミトコンドリア障害の関与、第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会、2017

土屋雅信, 市堰 徹, 植田修右, 平田寛明, 兼氏 歩, 川原範夫、ステロイド性家兔骨壊死モデルにおける酸化障害の関与、第 44 回日本股関節学会学術集会、2017

市堰 徹, 植田修右, 兼氏 歩, 土屋雅信, 福井清数, 松本忠美, 川原範夫、ステロイド性骨壊死の予防 - 新たな 2 つの予防法の可能性 -、第 43 回日本股関節学会学術集会、2016

市堰 徹, 植田修右, 兼氏 歩, 土屋雅信, 福井清数, 松本忠美, 川原範夫、遺伝子修飾骨髄由来組織幹細胞の全身投与によるステロイド性骨壊死予防の可能性、第 43 回日本股関節学会学術集会、2016

市堰 徹, 植田修右, 土屋雅信, 兼氏 歩, 川原範夫、ステロイド性骨細胞壊死発生への新規細胞死 Necroptosis の関与、第 43 回日本肩関節学会、2016

植田修右, 市堰 徹, 兼氏 歩, 松本忠美、ステロイド性骨細胞壊死発生には低酸素環境の時間が関与する、第 42 回日本股関節学会学術集会、2015

植田 修右 (UEDA, Syusuke)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：10759583

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市堰 徹 (ICHISEKI, Toru)
金沢医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30307631

(2) 研究分担者

岡崎 俊朗 (OKAZAKI, Toshiro)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：40233308

上田 善道 (UEDA, Yoshimichi)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：50271375