

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19591746

研究課題名（和文） 磨耗粉により生じるオステオライシスにおける MIF の関与と DNA ワクチンによる制御

研究課題名（英文） Role of MIF in wear particle-induced osteolysis and its regulation by MIF-DNA vaccination

研究代表者

小野寺 伸 (ONODERA SHIN)

北海道大学・大学院医学研究科・助教 研究者番号：00359481

研究成果の概要：

- 人工関節置換術後に問題となる磨耗粉誘発性骨溶解（オステオライシス）における、マクロファージ遊走阻止因子（MIF）の関与をマウス頭頂骨オステオライシスモデルを用いて検討した。チタン粉負荷により MIF mRNA の発現は亢進し、MIF ノックアウトマウスでは野生型マウスに比べ炎症性サイトカイン発現亢進・オステオライシスともに有意に少なかった。
- MIF 中和抗体を惹起する MIF DNA ワクチン接種により炎症性サイトカイン発現亢進は若干抑制されたが有意差はなかった。
- ポリエチレン粉負荷による炎症を NF κ B/luciferase トランスジェニックマウスを用いて in vivo イメージングにより可視化した。発光定量値は炎症性サイトカイン mRNA 相対量、骨吸収マーカー値と正の相関を示し、このシステムは各種 particle の炎症・骨吸収惹起性やオステオライシスの薬物療法の in vivo 評価に有用と思われた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：マクロファージ遊走阻止因子・磨耗粉・骨溶解・DNA ワクチン・in vivo イメージング

1. 研究開始当初の背景

(1) 人工関節置換術は現在広く行なわれ、生体材料分野の発展に伴い、人工関節の耐久性も向上してきた。しかし、人工関節置換術後に生じる磨耗微粒子に由来する骨溶解（オステオライシス）及びこれに続くインプラントのゆるみは大きな問題となっている。このオステオライシスの原因として、人工関節の摺動面より生じた磨耗微粒子が滑膜の細胞を刺激して、TNF- α や IL-1 などの骨吸収性サイトカイン等の産生をうながし、これらは骨芽細胞・ストローマ細胞による破骨細胞分化を促して、インプラント周囲の、関節液・磨

耗粉がアクセスしうる部位でのオステオライシスを生じさせるという機序が提唱されている。マクロファージ遊走阻止因子（MIF）は炎症・細胞増殖・血管新生などにおいて重要な役割を果たす因子として注目されている。我々は MIF に着目し、種々の病態における骨吸収への本因子の関与について一連の研究を行ってきた。

(2) サイトカインの活性を抑制するにあたり、中和抗体を用いた治療法はすでに抗 TNF- α 抗体の臨床応用などがなされているが、重篤な副作用、コスト高、および抗-抗体の産

生による効果の減弱等の問題点も指摘されている。サイトカインの活性を抑えるのに、中和抗体の外部からの投与に替わる方法として、変異サイトカインをワクチンとして投与することにより生体内に抗サイトカイン自己抗体を惹起する能動的抗体療法の試みがなされている。われわれはMIFに対する中和抗体を生体内に生成させるMIF-DNAワクチンを開発し、この接種によりマウス関節炎、骨粗鬆症、および敗血症モデルの発症・程度が有意に抑えられることを報告した。

(3) 近年、蛍光や発光を高感度で検出するin-vivoイメージング技術が急速な進歩を遂げている。しかしながら摩耗粉刺激に由来する炎症及びオステオライシスの評価に関し、イメージングを用いた報告はほとんどない。Nuclear factor kappa B (NF κ B)は炎症をつかさどる代表的転写調節因子である。現在ほとんどの炎症性サイトカインはNF κ Bにより何らかの転写制御を受けることが判明しており、また破骨細胞分化の機序にもNF κ Bは大きく関与し、オステオライシスの病態においてNF κ Bは重要な役割を果たすと言える。われわれはここに着目し、NF κ B/luciferaseトランスジェニックマウス(以下NF κ B/lucマウス)の頭頂骨上に摩耗粉を負荷することにより、生じる炎症反応を可視化する可能性を着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の3つである。

- (1) チタン粉がもたらす骨吸収におけるマクロファージ遊走阻止因子(MIF)のin vivoでの関与を検討すること。
- (2) MIF-DNA ワクチン(MIF-DV)接種の磨耗粉誘発オステオライシモデルに対する効果を検討すること。
- (3) NF κ B/lucマウスに摩耗粉を負荷することにより、生じる炎症反応を可視化すること、および可視化した発光の定量値が実際の炎症反応を反映するかを検討すること。

3. 研究の方法

以下すべての動物実験は北海道大学動物実験委員会の承認後、同ガイドラインに従い施行された。

(1)

①実験材料 Johnson Matthey Chemicals (Ward Hill, MA, USA)よりチタン粉を入手し、乾燥・紫外線滅菌施行後に使用した。

②マウス頭頂骨骨吸収モデル

全身麻酔下にて6-7週齢の雌Balb/Cマウスの頭頂骨の骨膜を剥離し、同皮質骨上に30mgチタン粉を散布し、皮膚を閉創した。対照としてチタン粉を散布せず同処置を行ない

Sham手術とした。また8週令野生型(WT、Balb/C)およびMIFノックアウトマウス(MIF-KO)を用い上記モデルにて反応を比較検討した。

③評価

処置後1週間にて以上の動物を屠殺し、ホルマリン固定標本をhematoxylin/eosin(HE)染色、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP)染色、MIFに対する免疫染色を行なった。また、頭頂骨を摘出しリアルタイムPCRにてMIF、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、RANKLのmRNA発現を検討した。内部コントロールとしGlyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)を用いた。

(2)

MIF DNA ワクチン(MIF DV)および、コントロールワクチン(CV)としてプラスミド単独を用いた。これらを生後4週令Balb/Cマウスに接種し、6週後に頭頂骨上に5mgのポリエチレン粉(PE)負荷ないしはsham手術を施行し、CV-sham群、CV-PE群、MIF DV-sham群、MIF DV-PE群の4群に分け、手術後1週間にて屠殺しリアルタイムPCRにより骨吸収因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、COX-2)mRNAの定量を行った。ポリエチレン磨耗粉として、Ceridust 3615 (Clariant Japan, 平均粒径7 μ m)を滅菌乾燥させて用いた。

(3)

①マウス

NF κ B/lucマウスは米国Caliper Lifesciences社より購入した。

②マウス頭頂骨磨耗粉負荷モデル

ポリエチレン粉はIIで使用したのを用いた。生後7-8週令のNF κ B/lucマウスを用い、全身麻酔下に頭頂骨上にポリエチレン磨耗粉5mgを負荷後、皮膚を縫合した。

③イメージングおよびアッセイ

マウスはd-ルシフェリン溶液2mgを尾静脈より注射後、IVIS imaging system(200 series, XENGEN)により頭部の化学発光の検出・定量を行った。この後、頭頂骨を摘出し、一部はルシフェラーゼ活性検出キット(Picagene)によりルシフェラーゼ活性を、一部はリアルタイムPCRにより骨吸収性因子(TNF- α 、IL-1 β 、RANKL、COX-2)およびGAPDHのmRNAを定量した。骨形態計測は、摘出頭頂骨の矢状縫合中央部にて前額面の非脱灰研磨標本作製し、Villanueva bone stain染色を施したのち破骨細胞数、破骨細胞面、eroded surfaceの算定を行った。

④統計

統計学的にはANOVAおよび相関分析を用いた。いずれもp<0.05をもって有意差ありとした。

4. 研究成果

(1)

①sham では炎症組織形成、MIF 陽性細胞、および破骨細胞形成を認めなかった (図 1 A, C, E)。一方チタン粉負荷後 7 日において、炎症性線維組織の過形成がチタン粉と頭頂骨の間に観察された (図 1 B)。これら炎症性線維組織内には MIF 陽性細胞 (図 1 D) および TRAP 陽性である破骨細胞が多数認められた (図 1 F)。

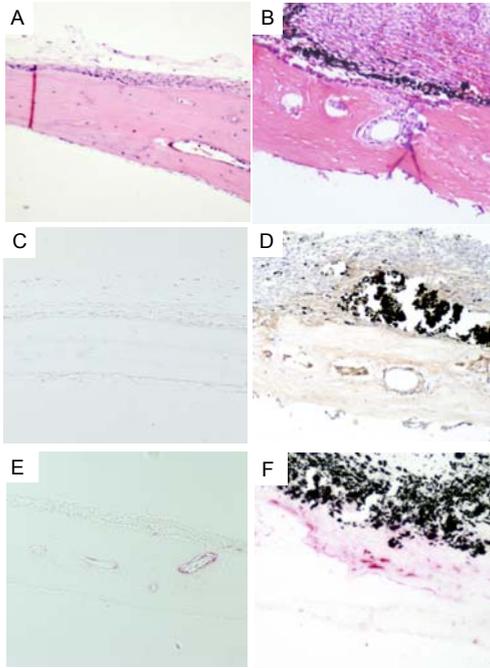


図 1. チタン粉負荷後 7 日目の組織像。(A) HE 染色, sham (B) HE 染色, チタン粉負荷 (C) MIF 免疫染色, sham (D) MIF 免疫染色, チタン粉負荷 (E) TRAP 染色, sham (F) TRAP 染色, チタン粉負荷

②チタン粉投与後の頭頂骨では MIF, TNF- α , IL-1 β , IL-6, RANKL の mRNA 発現が有意に亢進していた増加した (図 2 A-E)

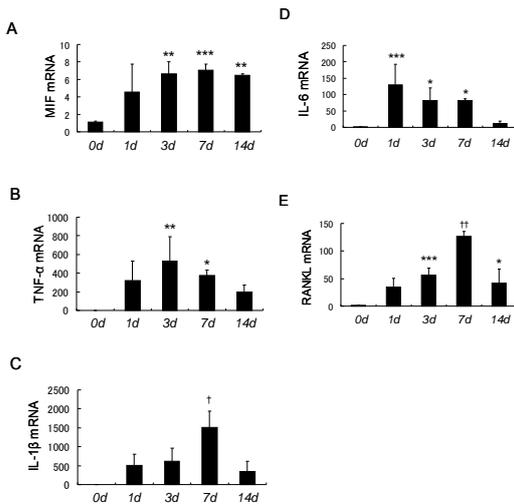


図 2. リアルタイム RT-PCR。(A) MIF mRNA (B) TNF- α mRNA (C) IL-1 β mRNA (D) IL-6 mRNA (E) RANKL mRNA

③WT マウスに認めた TRAP 陽性細胞の出現は MIF-KO ではほとんど認めなかった。また WT のチタン粉-頭頂骨界面における肉芽腫性癒痕組織は免疫組織学的に IL-1 β および RANKL 陽性であったが、これらの染色性は MIF-KO では弱かった (図 3 A-F)。

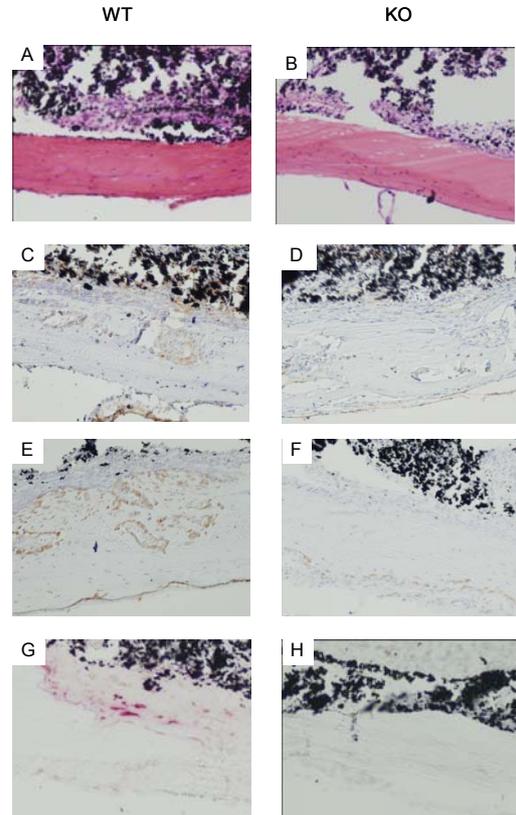


図 3. チタン粉負荷後 7 日目の組織像。(A, B) HE 染色 (C, D) IL-1 β 免疫染色 (E, F) RANKL 免疫染色 (G, H) TRAP 染色

④同様に摘出頭頂骨のリアルタイム PCR 解析において IL-1 β および RANKL mRNA 発現は MIF-KO は WT に比べ有意に低かった (図 4 A, B)。

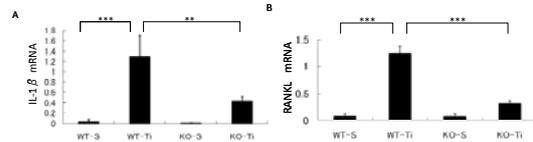


図 4. リアルタイム RT-PCR (A) IL-1 β mRNA (B) RANKL mRNA

⑤摘出した頭頂骨を MMA にて包埋後非脱灰標本を作製し、矢状縫合部を除いた、チタン粉を含む界面の肉芽腫性癒痕組織と接する頭頂骨表面における、単位面積あたりの骨吸収面・破骨細胞数・および破骨細胞面を比較したところ、いずれも WT に比べ MIF-KO では有意に低値であった (図 5 A-C)。

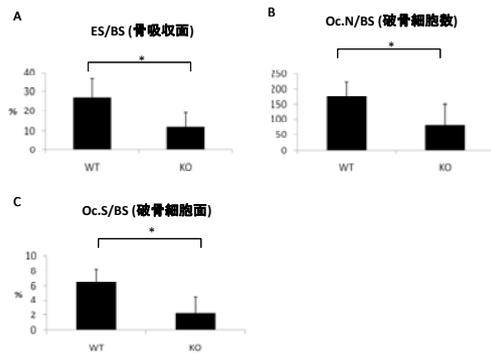


図 5. 骨形態計測. (A) ES/BS (B) Oc. N/BS (C) Oc. S/BS

(2)

CV 群では PE 負荷により mRNA は有意な増加を示した。MIF-DV 群ではこの増加は CV 群に比べ抑制傾向を示したが CV 群との間に有意差はなかった。磨耗粉誘発性オステオライシスモデルにおける骨吸収因子誘導に対する MIF-DV 接種は予防効果は若干あるが統計的に有意ではなかった(図 6A-D)。

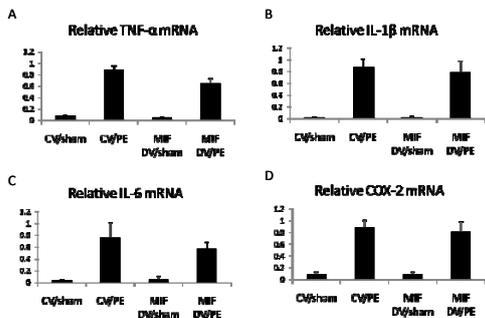


図 6. リアルタイム RT-PCR (A) TNF- α mRNA (C) IL-1 β mRNA (D) IL-6 mRNA (E) COX-2 mRNA

(3)

①ポリエチレン粒子 5mg 負荷後 7 日目のマウスの頭頂骨を組織学的に検討したところ、中央部前額断面像において矢状縫合部を中心とした線維性の肉芽組織の形成を認め、これは主に骨表面に接した部位での破骨細胞の形成を伴っていた(図 7A, B)。

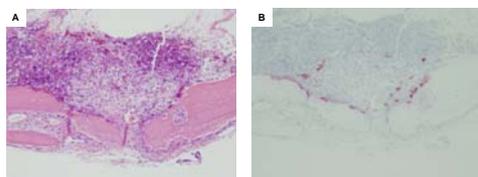


図 7. NF κ B/luc マウスに対しポリエチレン粉負荷後 7 日目の組織像。(A) HE 染色。(B) TRAP 染色。

②ポリエチレン粉負荷後 7 日目にバイオイメージングで検討したところ、頭部に化学発光を認めた(図 8A)。5mg 負荷後経時的に発光量を追跡したところ、SHAM 群と比べ負荷後 3 日

目より発光量は有意に増加し、発光量は負荷後 7 日目で最大であった(図 8B)。ポリエチレン粉負荷量を変化させたところ、2mg 以上の負荷により発光量は有意に増加し、5mg 投与群が最も発光量が多かった(図 8C, D)。

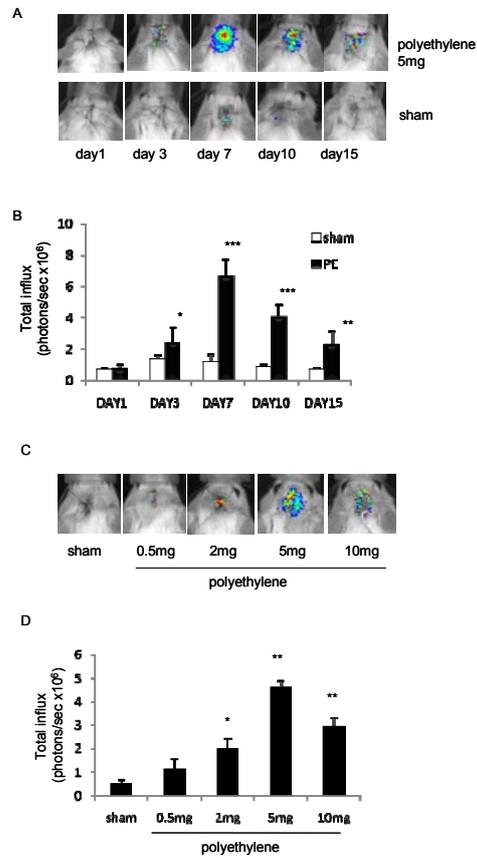


図 8. (A) 5mg ポリエチレン粉負荷後各時期に施行した in vivo イメージング。(B) (A) の定量解析(* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$)。 (C) 各量のポリエチレン粉負荷後 7 日目に施行した in vivo イメージング。(D) (C) の定量解析(* $p = 0.0005$, ** $p < 0.0001$)。

③IVIS による化学発光の定量値と実際の頭頂骨のルシフェラーゼ活性は有意な相関を認め、発光定量値はルシフェラーゼ活性を反映していることが判明した(図 9A, B)。

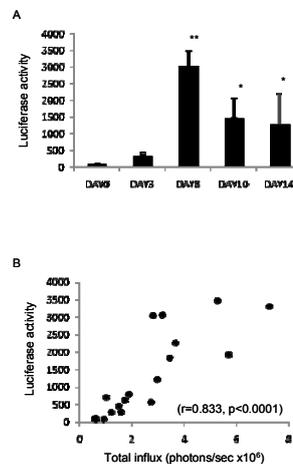


図 9. (A) 頭頂骨のルシフェラーゼアッセイ (* p<0.05, **p<0.0001). (B) 発光定量値とルシフェラーゼ活性の相関(r=0.833, n=19, p<0.0001).

④骨吸収因子の mRNA は、すべて経時的に有意な上昇を示した。発現量のピークは、負荷後 8 日—10 日であった (図 10A)。これら骨吸収因子の mRNA 発現量と化学発光のイメージング定量値はいずれも正の相関を認め (図 10B)、発光定量値は骨吸収因子 mRNA 発現量を反映することが示された。

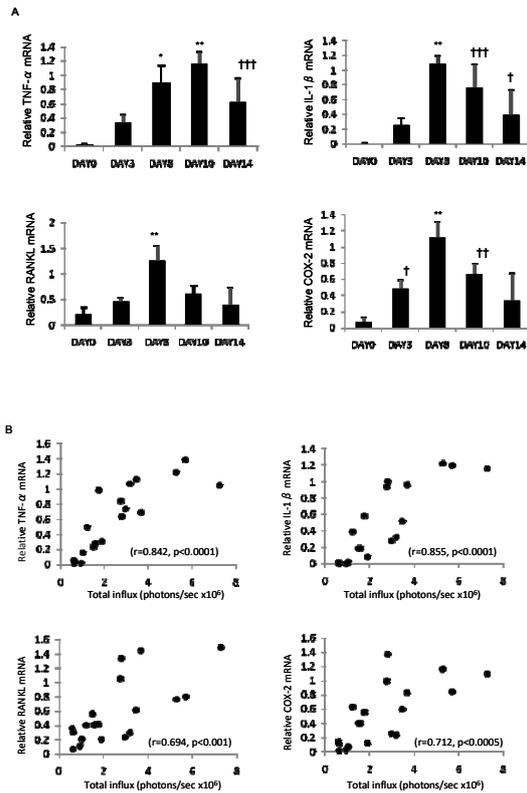


図 10. (A) ポリエチレン粉負荷後各時期に採取した頭頂骨の骨吸収因子(TNF- α , IL-1 β , COX-2, RANKL) mRNA (\dagger p<0.05, $\dagger\dagger$ p<0.01, $\dagger\dagger\dagger$ p<0.005 *p<0.0005, ** p<0.0001)。 (B) 発光定量値と各骨吸収因子 mRNA の相関 (TNF- α ; r=0.842, p<0.0001, IL-1 β ; r=0.855, p<0.0001, RANKL; r=0.694, p<0.001, COX-2; r=0.712, p<0.0005)。

⑤破骨細胞数、破骨細胞面、eroded surface はすべて負荷ポリエチレン量に量依存的に増加した (図 11A)。これらはすべて化学発光のイメージング定量値と正の相関を認め、発光定量値は骨吸収量を反映することが示された (図 11B)。

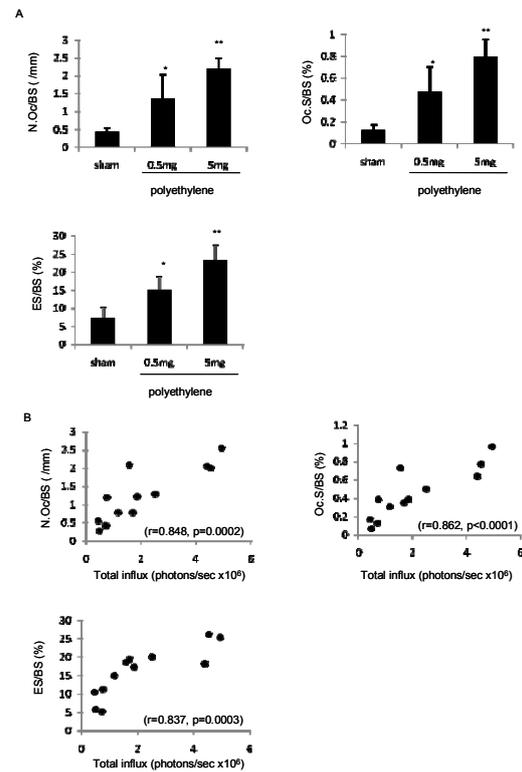


図 11. (A) ポリエチレン粉負荷後 7 日目に回収した頭頂骨を骨形態計測により測定した骨吸収マーカー値 (N.Oc/BS, Oc.S/BS, ES/BS. *p<0.05, ** p<0.005). (B) 発光定量値と骨吸収マーカー値の相関 (N.Oc/BS; r=0.848, p=0.0002, Oc.S/BS; r=0.862, p<0.0001, ES/BS; r=0.837, p=0.0003)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11件)

1. Onodera J, Onodera S, Kondo E, Betsuyaku T, Yasuda K. A soluble factor (EMMPRIN) in exudate influences knee motion after total arthroplasty. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.** 17(3), 298-304, 2009 査読有
2. Nishio Y, Koda M, Hashimoto M, Kamada T, Koshizuka S, Yoshinaga K, Onodera S, Nishihira J, Okawa A, Yamazaki M. Deletion of macrophage migration inhibitory factor attenuates neuronal death and promotes functional recovery after compression-induced spinal cord injury in mice. **Acta Neuropathol** 117(3), 321-8, 2009 査読有
3. Yasuda K, Kitamura N, Gong JP, Arakaki K, Kwon HJ, Onodera S, Chen YM, Kurokawa T, Kanaya F, Ohmiya Y, Osada Y. A Novel Double-Network Hydrogel Induces Spontaneous Articular Cartilage Regeneration in vivo in a Large Osteochondral Defect. **Macromol Biosci.**

- 9(4), 307-316, 2008 査読有
4. Tohyama S, Onodera S, Tohyama H, Yasuda K, Nishihira J, Mizue Y, Hamasaka A, Abe R, Koyama Y; A novel DNA vaccine targeting macrophage migration inhibitory factor improves the survival of mice with sepsis **Gene Therapy** 15(23), 1513-1522, 2008 査読有
 5. Onodera S, Oshima S, Nishihira J, Yasuda K, Tohyama H, Irie K, Koyama Y. Active immunization against macrophage migration inhibitory factor using a novel DNA vaccine prevents ovariectomy-induced bone loss in mice. **Vaccine** 26(6), 829-836, 2008 査読有
 6. Miyatake S, Tohyama H, Kondo E, Katsura T, Onodera S, Yasuda K. Local administration of interleukin-1 receptor antagonist inhibits deterioration of mechanical properties of the stress-shielded patellar tendon. **J Biomech.** 41(4), 884-889, 2008 査読有
 7. Tanabe Y, Yasuda K, Azuma C, Taniguro H, Onodera S, Suzuki A, Chen YM, Gong JP, Osada Y.: Biological responses of novel high-toughness double network hydrogels in muscle and the subcutaneous tissues. **J Mater Sci Mater Med.** 19(3), 1379-1387, 2008 査読有
 8. Okamoto S, Tohyama H, Kondo E, Anaguchi Y, Onodera S, Hayashi K, Yasuda K.: Ex vivo supplementation of TGF-beta1 enhances the fibrous tissue regeneration effect of synovium-derived fibroblast transplantation in a tendon defect: a biomechanical study. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.** 16(3), 333-339, 2008 査読有
 9. Yasuda K, Onodera S, Kondo E, Kitamura N, Inoue M. Total knee arthroplasty with cruciate-retention type alumina ceramic condylar prosthesis. **Techniques in Knee Surgery** 6(4), 213-219, 2007 査読有
 10. Atsumi T, Cho YR, Leng L, McDonald C, Yu T, Danton C, Hong EG, Mitchell RA, Metz C, Niwa H, Takeuchi J, Onodera S, Umino T, Yoshioka N, Koike T, Kim JK, Bucala R.: The Proinflammatory Cytokine Macrophage Migration Inhibitory Factor Regulates Glucose Metabolism during Systemic Inflammation. **J Immunol.** 179(8), 5399-5406, 2007 査読有
 11. Yasuda K, Sakai T, Kondo E, Onodera S.: Bleeding from the bone marrow enhances remodeling of the in situ frozen-thawed anterior cruciate ligament. **Clin Biomechanics** 22(8), 941-949, 2007 査読有

[学会発表] (計 6件)

1. Onodera S: Development of a novel DNA vaccine targeting macrophage migration inhibitory factor and its efficacy on murine models of inflammatory diseases. 2nd World Conference on Magic Bullets, October 4, 2008, Nurnberg, Germany
2. 小野寺 伸: 新規DNAキャリア分子を用いたアンチセンス核酸療法の確立とその関節炎モデルマウスに対する効果. 第23回 日本整形外科学会基礎学術集会, 2008年10月25日, 京都市
3. 小野寺 伸: 関節リウマチに対するアンチセンスストラテジー. 「β1,3グルカンと核酸医薬DDSおよび免疫学との接点」第1回研究会, 2008年7月22日, 札幌市
4. 小野寺 伸: 卵巣摘出後骨粗鬆症に対するMIF-DNAワクチンの効果. 第22回 日本整形外科学会基礎学術集会 シンポジウム, 2007年10月25日, 浜松市
5. Onodera S: A NOVEL THERAPEUTIC DNA VACCINE TARGETING MACROPHAGE MIGRATION INHIBITORY FACTOR PROTECTS JOINTS AGAINST INFLAMMATION AND DESTRUCTION IN MURINE MODELS OF ARTHRITIS. AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY 10TH ANNUAL MEETING, June 1, 2007, Seattle, USA
6. 小野寺 伸: マウス卵巣摘出骨粗鬆症に対するMIF-DNAワクチンを用いた新規能動的抗体療法. 第7回 北海道整形外科 オステオポロシスセミナー, 2007年6月30日, 札幌市

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野寺 伸 (SHIN ONODERA)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 00359481

(2) 研究分担者

小山 芳一 (YOSHIKAZU KOYAMA)

北海道情報大学・経営情報学部・教授

研究者番号: 90186841

入江 一元 (KAZUHARU IRIE)

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号: 70223352

(3) 連携研究者

なし