

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17984

研究課題名（和文）特発性大腿骨頭壊死症の発生・圧潰と自然免疫異常の関連

研究課題名（英文）Association of innate immune abnormalities with the development and collapse of idiopathic osteonecrosis of the femoral head.

研究代表者

清水 智弘 (Shimizu, Tomohiro)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：60784246

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：特発性大腿骨頭壊死症の骨壊死のスクリーニングとして、全身MRIを用いると、骨シンチと比較して無症候性の骨壊死を同定することが明らかとなり、有用な検査であることを証明した。特発性大腿骨頭壊死症では全例、大腿骨頭周囲組織の軟部組織に組織学的にNETsの発現を確認され、NETs強発現ラットモデルを作製すると、大腿骨頭周囲組織に臨床検体サンプルと同様にNETsの発現を確認できた。加えて、骨壊死と虚血のマーカーであるHIF1 α の発現陽性が一部確認することができた。コントロールでは確認できなかった。これらのことから、NETsの発現が大腿骨頭壊死症発生に関連することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性大腿骨頭壊死症 (ONFH) は国の定める難病であり、現在のところ発生及び圧潰のメカニズムは十分に解明されていない。本研究の目的は、疫学的にONFHと関連するSLEやネフローゼ症候群の発症に深い関わりを持つことが近年明らかとなった好中球トラップ (NETs) に注目し、ONFH発生とNETsの関連性を明らかにすることである。本研究は、人工股関節全置換術を行うONFH症例の臨床サンプルを用いて自然免疫異常とONFHの発生の関連を調査する前向き観察研究である。本研究によりONFHの発生メカニズムの一部が解明されれば、発生・圧潰予測因子の解明や予防法の確立につながり治療成績向上に繋がる。

研究成果の概要（英文）：Whole-body MRI proved to be a useful screening for osteonecrosis in idiopathic osteonecrosis of the femoral head, as it identified asymptomatic osteonecrosis compared to bone scintigraphy.

In all cases of idiopathic osteonecrosis of the femoral head, histological expression of NETs was confirmed in the soft tissues of the periprosthetic femoral head, and when a rat model with strong NETs expression was created, expression of NETs was confirmed in the periprosthetic femoral head tissue as in clinical specimen samples. In addition, osteonecrosis and positive expression of HIF1 α , a marker of ischemia, could be partially confirmed. This could not be confirmed in the controls.

These findings suggest that the expression of NETs is associated with the development of osteonecrosis of the femoral head.

研究分野：整形外科

キーワード：特発性大腿骨頭壊死症 好中球 全身MRI

1. 研究開始当初の背景

特発性大腿骨頭壊死症(ONFH)は、大腿骨頭の一部が血流の低下を引き起こすことによって骨頭が壊死する疾患である。壊死後に骨頭圧潰が生じると関節破壊障害を生じ、歩行障害などのADL障害を引き起こす。疫学的には大量ステロイド使用やアルコール多飲患者に多いことが分かっているが発生の原因は未だ不明で国の指定難病である。

申請者は片側 ONFH の症例でステロイド増量後に対側 ONFH が発生し、同時期に施行した肝生検でステロイド関連の脂肪肝が存在したことを報告した。これまでの諸家の動物実験による ONFH 発生は免疫異常を背景とし、ステロイドやアルコール投与によって引き起こされる脂質異常が関連することを支持する症例であった。一方で、実臨床においては疫学調査とゲノムワイド関連解析を用いた病態解析が行われているのみで、免疫・脂質代謝異常との関連性は明らかではない。特にアルコール関連では基礎疾患のない症例において出現することもあるため、ONFH 発生に何らかの自然免疫異常が存在する可能性があると考えられるが、未だ十分に分かっていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、自然免疫異常が ONFH の発生に関与するという仮説を立て、好中球細胞外トラップ(NETs)に注目した。NETs とは、活性化された好中球が自身の DNA に細胞質内抗菌蛋白をまぶして細胞外に放出することによって病原微生物をトラップし、効率良く殺菌する自然免疫システムであり、NETs の過剰形成がステロイド関連 ONFH の基礎疾患に頻度の高い全身性エリテマトーデス(SLE)やネフローゼ症候群と関連することが報告されている。本仮説を証明するため、人工股関節置換術 (THA) を受ける ONFH と変形性股関節症(OA)(=Control 群)患者を対象として、血清中の NETs 形成の違いや人工股関節手術で摘出される骨頭流入血管や壊死組織の NETs の発現を比較検討する。加えて、NETs 誘導による壊死が発生するかどうかの検証を行った。

3. 研究の方法

臨床情報、画像評価

基礎疾患、既往歴、薬歴、生活歴を診療情報から調査する。画像評価に関しては、壊死が他関節に出現するかを調査するため、全身 MRI(WB-MRI)と骨シンチを手術前に行った。

摘出骨頭と周辺組織の解析

人工股関節置換術において切除する大腿骨頭を用いる。骨頭流入する血管や組織の状況の評価するために、なるべく周囲組織を温存して行った。NETs の形成は、DAPI 染色により観察される細胞外 DNA に NETs 形成時に必ず産生されるシトルリン化ヒストンが共局在していることで免疫組織学的に確認した。脱灰操作を行い、HE 染色、骨芽細胞・破骨細胞・骨細胞の評価、骨頭内の NETs の発現の有無、骨壊死の評価として低酸素応答因子(HIF)、血管内皮細胞のマーカー(CD31 や endomucin)の免疫染色を行った。

NETs 強発現ラットモデルにおける骨壊死の評価

NETs が原因で壊死が出現するのか、ONFH の結果として骨頭周囲組織の血管に NETs が誘導されるのかに関しては、WKY ラットから NETs 誘導させ、尾静脈投与し、骨壊死の評価を行った。

4. 研究成果

股関節疾患の難病である ONFH をはじめとした骨壊死のメカニズム解明のための評価法として、全身 MRI が有用であることを示した

当院で症候性 ONFH を発症し手術を受けた患者計 46 例を本研究への参加対象とした。

WB-MRI で骨壊死病変を検出したのは、股関節が 46 例 82 関節、膝関節が 24 例 40 関節、足関節が 11 例 17 関節、肩関節が 5 例 9 関節、肘関節が 3 例 4 関節であった。評価した 152 関節のうち、WB-MRI は症候性骨壊死を 92 関節 (60.5%)、無症候性骨壊死を 60 関節 (39.5%) に検出した。46 例中 12 例は MRI で多発性骨壊死が検出された。

多発性骨壊死の全患者に、ステロイド治療歴がみられ、3 箇所未満の骨壊死症例よりもステロイド使用率が高かったが ($P = 0.035$)、ステロイドパルス療法歴とステロイド最大使用量には両群間に有意差はなかった。血液疾患患者では、多発性骨壊死の割合が多くみられた ($P = 0.015$)。また、年齢、性別、アルコール過剰摂取、喫煙状況にも両群間に有意差はなかった。

一方、WB-BS では、股関節 71 関節 46 例、膝関節 18 関節 16 例、足関節 21 関節 13 例、肩関節 30 関節 16 例、肘関節 7 関節 5 例で取り込み病変を検出した。股関節の骨壊死検出は WB-MRI と WB-BS の一致度が中程度で同等であったが、膝、足関節、肩、肘関節については一致度が低かった (図 1)。WB-BS は 76/147 関節 (51.7%) で症候性の取込み病変を検出した。WB-BS では WB-MRI で検出された症候性骨壊死を 82.6% (76/92) の関節で取込み病変として検出したが、WB-MRI で検出された無症候性骨壊死は 21.7% (13/60) の関節でしか取り込み病変として検出できなかった。

た。
 これまでの研究で、MRI は骨壊死の診断とその重症度の評価において、高い特異度と感度を持つゴールドスタンダードであると報告されていることを考慮すると、WB-MRI は多発性骨壊死のスクリーニングに有用で精確なツールであると考えられる。今回の研究では、WB-BS は WB-MRI による検出症例の 80% 以上で下肢の症候性骨壊死を検出できたが、上肢の無症候性骨壊死の検出にはあまり有効ではないことが判明した。これらの結果から、WB-BS は、圧潰前に "cold-in-hot " を呈す股関節以外の関節の骨壊死を検出することに有効ではないことが示唆された。過去の研究では、肩、股関節、膝、足関節のピンポイント骨スキャンの有効性が示されているものの、WB-BS は無症候性骨壊死を含む多発性骨壊死のスクリーニングに十分な解像度であるとは考えにくい。最近の研究では、圧潰前の骨壊死に対して、成長因子などを用いた再生治療が有効であることが示されている。したがって、無症候性骨壊死の早期診断が今後さらに重要となってくると考えられる。また、検査時間 (WB-MRI : 20-30 分、WB-BS : 注入後 4 時間)、費用 (WB-MRI : 200 ドル、WB-BS : 500 ドル)、放射線被曝を考慮すると、骨壊死のスクリーニングに WB-BS を使用することは慎重に検討されるべきであると思われる。

抽出骨頭と周辺組織の解析

ONFH 症例では全例、大腿骨頭周囲組織の軟部組織に組織学的に NETs の発現を確認することができた。一方で Control の変形性股関節症の大腿骨頭周囲の軟部組織には NETs の発現は確認することはできなかった。NETs 強発現ラットモデルにおいては、大腿骨頭周囲組織に臨床検体サンプルと同様に NETs の発現を確認できたが、NETs を発現させないコントロール群では周囲組織の NETs の発現は確認できなかった。大腿骨頭に着目すると、NETs 強発現させた群では、骨壊死と虚血のマーカーである HIF1 の発現陽性が一部確認することができた。コントロールでは確認できなかった。これらのことから、NETs の発現が大腿骨頭壊死症発生に関連することが示唆された。

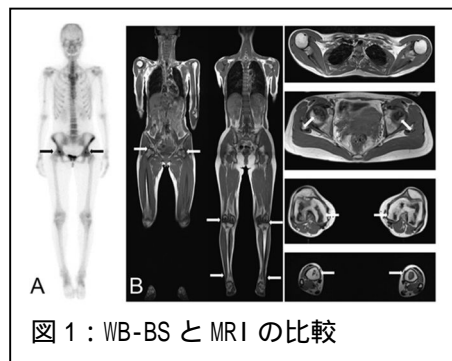


図 1 : WB-BS と MRI の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yokota Shunichi, Sakamoto Keita, Shimizu Yukie, Asano Tsuyoshi, Takahashi Daisuke, Kudo Kohsuke, Iwasaki Norimasa, Shimizu Tomohiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Evaluation of whole-body modalities for diagnosis of multifocal osteonecrosis-a pilot study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13075-021-02473-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nonokawa Mayu, Shimizu Tomohiro, Yoshinari Miku, Hashimoto Yamato, Nakamura Yusuke, Takahashi Daisuke, Asano Tsuyoshi, Nishibata Yuka, Masuda Sakiko, Nakazawa Daigo, Tanaka Satoshi, Tomaru Utano, Iwasaki Norimasa, Ishizu Akihiro	4. 巻 190
2. 論文標題 Association of Neutrophil Extracellular Traps with the Development of Idiopathic Osteonecrosis of the Femoral Head	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 2282 ~ 2289
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2020.07.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokota Shunichi, Shimizu Tomohiro, Matsumae Gen, Ebata Taku, Alhasan Hend, Takahashi Daisuke, Terkawi Mohamad Alaa, Iwasaki Norimasa	4. 巻 192
2. 論文標題 Inflammasome Activation in the Hip Synovium of Rapidly Destructive Coxopathy Patients and Its Relationship with the Development of Synovitis and Bone Loss	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 794 ~ 804
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2022.02.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------