

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592287

研究課題名(和文)ステロイド誘発性大腿骨頭壊死の遺伝子修飾骨髄由来組織幹細胞の全身投与による予防

研究課題名(英文)The prevention of steroid-induced osteonecrosis by intravenous administration of BM-MSC

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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨細胞壊死の発生にはAngiogenesis-Osteogenesis coupling障害の成立が必要であることが考えられた。BM-MSCを用いて、ウサギ骨壊死モデルで細胞投与時期の検討を行い、ステロイド投与1日後静脈内投与が最も骨壊死予防効果が優れていることが明らかとなった。Ex vivo extended BM-EPCを用いたウサギ・ステロイド投与骨壊死モデルでの検討でも、同様、ステロイド投与1日後静脈内投与で高い骨壊死予防効果が得られることが示されたBM-MNCと比較し、ex vivo extended BM-MSCならびにBM-EPCでは壊死阻止作用があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：It was considered that formation of Angiogenesis-Osteogenesis coupling disturbance was necessary for occurrence of bone cell necrosis.

It was clear that prevention effect using BM-MSC was very high within 1 day after steroid administration. The effect of prevention in steroid-induced osteonecrosis rabbit models using Ex vivo extended BM-EPC was similar, and that an intravenous administration gives us the high osteonecrosis preventive effect indicated 1 day after steroid administration. And the prevention effects of steroid-induced osteonecrosis by using ex vivo extended BM-MSC and/or BM - EPC were higher than using BM-MNC. The formation of AOC disturbance plays the important role in the development of osteonecrosis, and we consider that this knowledge will be useful for future's study. Since it was clear that the problem in the prevention of osteonecrosis, however, we will continue this study.

研究分野：医歯薬学

キーワード：大腿骨頭壊死 angiogenesis 骨髄由来間葉系組織幹細胞 aquaporin 1 osteogenesis

1. 研究開始当初の背景

ステロイド性骨壊死は難治性疾患とされており、本疾患の機序解明と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線溶系異常説など様々な説が提唱されてきたが未だに詳細は不明の部分が多い。近年、我々は酸化ストレスに注目し、新たな角度から検討を行ってきた。また、機序解明および予防法の究明に必要なステロイド投与および酸化ストレス発生からの骨内の虚血 - 低酸素状態の発生の確認、発生時期について非常に早期の段階で発生することを確認した。その結果、ステロイド投与に伴う Angiogenesis-osteonegenesis coupling (AOC) の障害について検討を進めることによる機序解明および予防法の究明が重要と考えられた。

2. 研究の目的

大腿骨頭壊死は難治性疾患であり、一旦壊死に陥ってしまった場合、ADL は非常に障害されてしまうことから手術加療を要することが多い。

しかしながら、本疾患の機序に関しては、これまでの盛んな研究にもかかわらず、未だ解明には至っておらず、有効な予防法もはっきりしていないことが現状である。

従って、本疾患の機序解明と予防法の究明については非常に重要な課題とされている。

(1) これまで当科では近年様々な疾患での関与が認められている酸化ストレスに注目し、家兎およびラットにて動物モデルの作成を通して、ステロイド投与後早期に骨内での DNA 酸化傷害、抗酸化剤による骨壊死抑制の可能性および酸化ストレス単独誘発による骨壊死発生について報告した。また、近年、我々は酸化ストレス発生後早期の骨内での虚血 - 低酸素の発生を確認した。

これまでの報告で、本病態の最終的な原因は虚血 - 低酸素であることは意見の一致をみている。しかしながら、これまでの大腿骨頭壊死症に関する報告では虚血-低酸素が骨細胞自体にどのように作用するのかを示した報告はなく、ステロイドの骨細胞への直接作用と低酸素との関連もはっきりした指摘はない。一方、ステロイド添加による培養骨細胞でアポトーシスが生じていることが報告されているが、ネクローシスとの関連は報告がなく、多くの点が不明である。そのため実際にステロイドによる骨細胞死の形態や誘導因子、もしくは低酸素の影響について検討する必要があると考えられる。今回我々は、予防法の確立を目指し、まずは組織の低酸素、ステロイド添加における骨細胞壊死誘導について検討した。

(2) ステロイド誘発性大腿骨壊死と酸化ストレスの関係、生体内過酸化の標的が大腿骨血管内皮であること、さらに Vitamin E の抗過酸化作用を利用した壊死予防法を報告した。しかし、その予防効果は部分的で、

angiogenesis-osteogenesis coupling に着目した新たな予防法の確立が課題となった。今回、骨髄由来組織幹細胞 (BM-MSC) の傷害血管修復機能と細胞膜水分子チャネル aquaporin (AQP)1 が血管内皮と骨芽細胞の増殖、分化、細胞移動に関わる重要遺伝子であることに着目し、AQP1 遺伝子発現修飾 BM-MSC の全身投与による大腿骨頭壊死予防法の確立とその機序の分子レベルでの検証を目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス培養骨細胞である MLO-Y4 を用いて実験を行った。培養は 20%酸素環境下 (正常酸素環境下) 1%酸素(低酸素)環境下、デキサメサゾン 1 μ M (Dex)を添加したもの、低酸素環境下において Dex を添加したものをそれぞれ 24 時間培養し、総細胞数に対する細胞死の割合を測定した。次に骨代謝に関係している Wnt シグナルの抑制因子である Dickkopf-1(Dkk-1)を用いて、Dex 添加時や低酸素環境下における MLO-Y4 の Dkk-1 の発現を測定した。また Dkk-1 siRNA を用いて Dkk-1 をノックダウンし、細胞死の状態を確認した。すべての群で、細胞死の割合の測定には Apoptotic/Necrotic Cells Detection Kit を用いて蛍光免疫染色を行い、1 視野あたりの総細胞数に対するアポトーシス、ネクローシスの数の割合を測定した。また Dkk-1 siRNA の抑制効果を確認するため未転写のもの control、Dkk-1 siRNA を転写したものをそれぞれ細胞死の割合を測定し、ウエスタンブロットでも同様に行った。

(2) これまでのステロイド誘発大腿骨壊死に関する実験で確立した骨壊死動物実験モデルであるウサギ・ステロイド投与骨壊死モデル (Ichiseki T et al, Rheumatol 2005) と酸化ストレス単独誘発ラット骨壊死モデル (Ichiseki T et al, Arthritis Rheum 2011) を用い、BM-MNC、*ex vivo* extended BM-MSC、培養血管内皮前駆細胞 *ex vivo* extended BM-EPC、樹立 BM-MSC 株 4 種の細胞種と投与時期の違いによるステロイド誘発性大腿骨壊死の予防効果を比較検討した。樹立 BM-MSC にリポフェクション法による遺伝子導入より恒常的 GFP 発現 BM-MSC を作製し、骨壊死部への集積を検討した。

4. 研究成果

培養骨細胞を 24 時間低酸素環境下にさらした場合、アポトーシス、ネクローシスともに少なく、Dex 添加のみ (通常濃度の酸素下) でも同様であった。一方、低酸素環境下 + Dex 添加を行い、生体下での Angiogenesis-osteogenesis coupling (AOC) 障害に似た環境を再現したところ、有意に細胞死が増加した ($p < 0.01$)。特にネクローシスの割合が著しく増加した。また、Dkk-1 の発現は Dex 添加のみで著明な発現を認め、

Dkk-1 siRNA を転写することで有意に発現量が低下したことを確認した(p<0.01)。さらに Dkk-1 をノックダウンすることによって、細胞死自体の割合が有意に減少した(p<0.01)。これらのことから、Angiogenesis 障害もしくは Osteogenesis 障害のいずれかの単独では骨細胞壊死までは陥らないこと、骨細胞壊死の発生には AOC 障害の成立が必要であることが考えられた。従って、血管内皮・骨芽細胞の酸化ストレスからの保護と傷害細胞自身の修復に着目した新たな予防法の確立が重要と考えられた。

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 13 件)

Ueda S, Ichiseki T, Yoshitomi Y, Yonekura H, Ueda Y, Kaneuji A, Matsumoto T, Osteocytic cell necrosis is caused by a combination of glucocorticoid-induced Dickkopf-1 and hypoxia, Med Mol Morphol, 査読有、2014、[Epub ahead of print]、http://download.springer.com/static/pdf/682/art%253A10.1007%252Fs00795-014-0077-9.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Flink.springer.com%2Farticle%2F10.1007%2Fs00795-014-0077-9&token2=exp=1433231902~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F682%2Fart%25253A10.1007%25252Fs00795-014-0077-9.pdf%3ForiginUrl%3Dhttp%253A%252F%252Flink.springer.com%252Farticle%252F10.1007%252Fs00795-014-0077-9*~hmac=645a5c8b3e6524524aa92e5a4d4051d0c3db0529ddb900fec503860d1b40a645

兼氏 歩, 松本忠美, 股関節の疾患・機能の評価法とその活用、関節外科、2014、33(10月増刊):68-81、査読有

兼氏 歩, 市堰 徹, 福井清数, 高橋詠二, 松本忠美, 比江島欣慎、寛骨臼回転骨切り術後患者における評価 - JOA スコアと JHEQ の比較および満足度調査 -、Hip Joint、2014、40:41-43、査読無

A. Kaneuji, T. Sugimori, T. Ichiseki, K. Fukui, E. Takahashi, T. Matsumoto, Cementless anatomic total hip femoral component with circumferential porous coating for hips with developmental dysplasia: a minimum ten-year follow-up period, J Arthroplasty, 2013, 28:1746-1750、査読有、doi: 10.1016/j.arth.2013.06.030

兼氏 歩, 杉森端三, 市堰 徹, 福井清数, 松本忠美, 日本で開発されたセメントレス人工股関節ステムのコンセプトと中・長期成績 APS Natural-Hip stem の合併症調査と3種類のデザインにおける骨密度変化、中部整災誌、2013、56:19-20、査読無

植田修右, 兼氏 歩, 市堰 徹, 福井清

数, 松本忠美, 股関節結核後にハイブリッド人工股関節全置換術を行った一例、Hip Joint、2013、39:1199-1201、査読無

市堰 徹, 兼氏 歩, 杉森端三, 福井清数, 松本忠美, ステロイド性大腿骨頭壊死症に対する Bipolar 型人工骨頭置換術 平均 19.6 年の成績、関節外科、2013、32:694-698、査読有

兼氏 歩, 杉森端三, 市堰 徹, 福井清数, 松本忠美, スクリュー固定併用セメントレスカップを使用した第2世代 Anatomic stem の全例調査、日人工関節会誌、2013、43:3-4、査読無

T. Matsumoto, A. Kaneuji, Y. Hiejima, H. Sugiyama, H. Akiyama, T. Atsumi, M. Ishi, K. Izumi, T. Ichiseki, H. Ito, T. Okawa, K. Ohzono, H. Otsuka, S. Kishida, S. Kobayashi, T. Sawaguchi, N. Sugano, I. Nakajima, S. Nakamura, Y. Hasegawa, K. Fukuda, G. Fujii, Japanese Orthopaedic Association Hip Disease Evaluation Questionnaire (JHEQ): a patient-based evaluation tool for hip-joint disease. The Subcommittee on Hip Disease Evaluation of the Clinical Outcome Committee of the Japanese Orthopaedic Association, J Orthop Sci, 2012, 17:25-38、査読有、doi: 10.1007/s00776-011-0166-8

T. Ichiseki, A. Kaneuji, Y. Ueda, S. Kaneko, S. Ueda, T. Matsumoto, The initial phase of oxidative stress in a steroid-induced osteonecrosis rabbit model, Adv Biosci Biotechnol, 2012, 3:978-982、査読有、doi: 10.4236/abb.2012.327120

兼氏 歩, 福井清数, 市堰 徹, 高橋詠二, 松本忠美, FAI の診断と治療 日本人の FAI は変形性股関節症を発生させるか? Cross-over sign 陽性例の平均 20 年の観察、中部整災誌、2012、55:705-706、査読無

市堰 徹, 兼氏 歩, 杉森端三, 福井清数, 北村憲司, 松本忠美, VerSys Tapered Stem の中期成績 - 特に Stress Shielding に注目して -、日人工関節会誌、2012、42:131-132、査読無

兼氏 歩, 杉森端三, 市堰 徹, 福井清数, 松本忠美, ポーラスセメントレスカップを用いて行った THA 再置換術の全例調査における生存率、日人工関節会誌、2012、42:13-14、査読無

[学会発表](計 26 件)

植田修右, 市堰 徹, 兼氏 歩, 金子聖司, 松本忠美, 酸化誘発ラット大腿骨頭壊死モデルにおける組織低酸素、第 41 回日本股関節学会、2014 年 10 月 31 日、(京王プラザホテル新宿) 東京都新宿区

市堰 徹, 兼氏 歩, 福井清数, 高橋詠二, 植田修右, 松本忠美, 大腿骨頭壊死症と変形性股関節症による JHEQ の相違点と有用

性、第 41 回日本股関節学会、2014 年 10 月 31 日、(京王プラザホテル新宿) 東京都新宿区

植田修右、市堰 徹、兼氏 歩、松本忠美、ステロイド添加および低酸素環境による骨細胞死の誘導、第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会、2014 年 10 月 9 日、(城山観光ホテル) 鹿児島県鹿児島市

市堰 徹、兼氏 歩、植田修右、松本忠美、低酸素環境とステロイドが骨細胞に及ぼす影響、第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会、2014 年 10 月 9 日、(城山観光ホテル) 鹿児島県鹿児島市

S. Ueda, T. Ichiseki, A. Kaneuji, S. Kaneko, T. Matsumoto, 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (SFRR) 2014 Oxidative stress induced hypoxia in rat model、2014 年 3 月 23 日、(国立京都国際会館) 京都府京都市

A. Kaneuji, T. Sugimori, T. Ichiseki, K. Fukui, E. Takahashi, S. Ueda, R. Tsuda, T. Matsumoto American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) 2014 Annual Meeting, Joint preservation rate at 25 years after rotational acetabular osteotomy for development hip dysplasia、2014 年 3 月 11 日(New Orleans, USA)

市堰 徹、兼氏 歩、杉森端三、植田修右、松本忠美ステロイド性大腿骨頭壊死症に対する Bipolar Hemiarthroplasty 20 年以上経過例における検討、第 44 回日本人工関節学会、2014 年 2 月 21 日、(沖縄コンベンションセンター) 沖縄県宜野湾市

A. Kaneuji, T. Sugimori, T. Ichiseki, K. Fukui, E. Takahashi, T. Matsumoto, Orthopedics today Hawaii 2014, Asia-Pacific Poster Contest, Minimum ten-year results of a cementless anatomic total hip femoral component with circumferential porous coating for hips with developmental、2014 年 1 月 19 日(Maui, USA)

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細胞死の形態、第 40 回日本股関節学会学術集会、2013 年 11 月 29 日、(広島国際会議場) 広島県広島市

市堰 徹、兼氏 歩、植田修右、福井清数、松本忠美、ステロイド性大腿骨頭壊死症の機序と予防 - 酸化、虚血、骨代謝から複合的に考える -、第 40 回日本股関節学会学術集会、2013 年 11 月 29 日、(広島国際会議場) 広島県広島市

市堰 徹、兼氏 歩、松本忠美、ステロイド性添加および低酸素状況がもたらす骨細胞への影響 - Normoxia と Hypoxia での比較検討 -、第 40 回日本股関節学会学術集会、2013 年 11 月 29 日、(広島国際会議場) 広島県広島市

市堰 徹、兼氏 歩、金子聖司、植田修右、

福井清数、松本忠美、酸化ストレスから考えるステロイド性大腿骨頭壊死の病態、第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会、2013 年 10 月 17 日、(幕張メッセ) 千葉県幕張市

植田修右、市堰 徹、兼氏 歩、金子聖司、松本忠美、酸化誘発ラット大腿骨頭壊死モデルにおける組織低酸素、第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会、2013 年 10 月 17 日(幕張メッセ) 千葉県幕張市

植田修右、市堰 徹、兼氏 歩、金子聖司、松本忠美、酸化誘発ラット大腿骨頭壊死モデルにおける低酸素状態、第 66 回日本酸化ストレス学会学術集会、2013 年 6 月 13 日(ウインクあいち) 愛知県名古屋市

金子聖司、市堰 徹、兼氏 歩、植田修右、松本忠美、酸化誘発ラット大腿骨頭壊死モデルにおける HSP27 発現の検討、第 66 回日本酸化ストレス学会学術集会、2013 年 6 月 13 日、(ウインクあいち) 愛知県名古屋市

市堰 徹、兼氏 歩、福井清数、松本忠美、特発性大腿骨頭壊死症に対する大腿骨頭前方回転骨切り術の中期成績、第 86 回日本整形外科学会学術総会、2013 年 5 月 23 日、(広島グリーンアリーナ) 広島県広島市

兼氏 歩、市堰 徹、福井清数、北村憲司、中川慎太郎、三上友明、松本忠美、酸化ストレスによる骨壊死発生と抗酸化剤による骨壊死抑制、第 86 回日本整形外科学会学術総会、2013 年 5 月 23 日、(広島グリーンアリーナ) 広島県広島市

市堰 徹、兼氏 歩、金子聖司、福井清数、北村憲司、松本忠美、酸化誘発ラット大腿骨頭壊死モデルにおける Wnt pathway の関与、第 39 回日本股関節学会学術集会、2012 年 12 月 7 日、(朱鷺メッセ) 新潟県新潟市

金子聖司、市堰 徹、兼氏 歩、福井清数、松本忠美、酸化誘発ラット大腿骨頭壊死モデルにおける HSP27 発現の検討、第 39 回日本股関節学会学術集会、2012 年 12 月 7 日、(朱鷺メッセ) 新潟県新潟市

市堰 徹、兼氏 歩、福井清数、金子聖司、松本忠美、酸化誘発ラット大腿骨頭壊死モデルにおける早期の骨内虚血、第 40 回日本股関節学会、2012 年 11 月 8 日、(鹿児島市民文化ホール) 鹿児島県鹿児島市

①金子聖司、市堰 徹、兼氏 歩、福井清数、北村憲司、松本忠美、酸化誘発ラット大腿骨頭壊死モデルにおけるビタミン E 投与と骨内の虚血の検討、第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会、2012 年 10 月 26 日、(名古屋国際会議場) 愛知県名古屋市

②市堰 徹、兼氏 歩、金子聖司、福井清数、福井清数、北村憲司、杉森端三、松本忠美、ステロイド性家兎骨壊死モデルにおける生体内過酸化発生時期、第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会、2012 年 10 月 26 日、(名古屋国際会議場) 愛知県名古屋

③市堰 徹、兼氏 歩、杉森端三、福井清数、北村憲司、松本忠美、Glutathione 合成阻害による Redox 制御に伴う酸化誘発ラット

大腿骨頭壊死モデルの開発、第 119 回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会、2012 年 10 月 5 日、(フェニックスプラザ) 福井県福井市

②④市堰 徹, 兼氏 歩, 金子聖司, 三上友明, 松本忠美、抗酸化ビタミンを用いたステロイド性骨壊死予防、第 65 回日本酸化ストレス学会学術集会、2012 年 6 月 7 日、(あわぎんホール徳島県郷土文化会館) 徳島県徳島市

②⑤金子聖司, 市堰 徹, 兼氏 歩, 松本忠美、酸化誘発ラット大腿骨頭壊死モデルにおける骨内の HIF-1 の発現、第 65 回日本酸化ストレス学会学術集会、2012 年 6 月 7 日、(あわぎんホール徳島県郷土文化会館) 徳島県徳島市

②⑥兼氏 歩, 市堰 徹, 福井清数, 北村憲司, 中川慎太郎, 三上友明, 金子聖司, 松本忠美、特発性大腿骨頭壊死症に対する酸化ストレスの影響と抗酸化剤による予防、第 85 回日本整形外科学会学術総会、2012 年 5 月 17 日、(国立京都国際会館) 京都府京都市

〔図書〕(計 1 件)

市堰 徹, 他、診断と治療社, 東京酸化ストレスの医学(改定第 2 版)(内藤裕二, 豊國伸哉編) 2014, 382-388

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

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

松本 忠美 (MATSUMOTO, Tadami)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90173905

兼氏 歩 (KANEUJI, Ayumi)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00303305