

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861327

研究課題名(和文) 大腿骨頭壊死モデルラットを用いたステロイド性骨壊死発症超早期における病態解明

研究課題名(英文) The pathogenesis of steroid induced osteonecrosis at early onset using an osteonecrosis model rat

研究代表者

後東 知宏 (GOTO, Tomohiro)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・特任講師

研究者番号：10420548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ステロイド性骨壊死ラットモデルに関して、ステロイド最終投与後7日で組織学的にempty lacunaeの存在で骨壊死を確認できた。しかし、動物モデルでの壊死発生率は一定せず、安定した動物モデル作成にはさらなる至適条件の検索が必要であると思われた。HIF-1aの免疫染色を行ったところ、壊死部周辺の境界領域での出現が一部確認できた。動物用MRIでの解析は、ラット大腿骨で解析が可能と思われる解像度を得ているが、壊死発生とMRIにて描出が可能となる時期との時間差あり、さらなる検討が必要である。Hypoxia probe を使用したin vivoバイオイメージングでの陽性所見は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：The presence of osteonecrosis was confirmed by detecting empty lacunae in histology of some specimens seven days after the last steroid administration. However, the occurrence of osteonecrosis in animal models was not constant. The positive HIF-1a was partially seen in the boundary region of the peripheral necrotic area. In MRI analysis, we have obtained enough resolution to analyze the occurrence of osteonecrosis in rat femur. However, alternative time differences between the occurrence of necrosis and detecting these lesions in MRI make difficult to do further analysis. In bio-imaging using Hypoxia probes, the positive findings in the steroid osteonecrosis rat model could not be obtained. Since it was observed variation in the creation of steroidal osteonecrosis rat model, confirmation of necrosis by image only appears to be incorrect. Thus currently, it is necessary to create more stable animal models in carrying forward this experiment.

研究分野：医歯薬学

キーワード：大腿骨頭壊死 ステロイド

### 1. 研究開始当初の背景

大腿骨頭壊死症は、大腿骨頭の循環障害による阻血性疾患とされている。大腿骨頭の虚血に続発する骨壊死の結果、骨頭の圧壊に伴う股関節の不可逆性変化を引き起こし、著しい機能障害をもたらす。不可逆性変化を起こした股関節は、変形性股関節症へと進展し、若年者でも人工股関節手術を余儀なくされる状況に陥ってしまう恐れがある。つまり、大腿骨頭壊死症に対する有効な予防法や治療法はいまだにないのが現状であり、特定疾患に認定された難病である。本邦での疫学調査によると、大腿骨頭壊死症の年間新患数は2000人を超えており、その罹患年齢のピークは男性40歳代、女性30歳代と若年者に多いことが特徴である。大腿骨頭壊死症に至る原因としてステロイドが関連しているものが過半数を超えており、若年者に多く見られる膠原病等に対するステロイド療法における重大な合併症となっている。



(大腿骨頭壊死の経過：壊死発症後徐々に圧潰を生じ、不可逆性の変形を呈する)

大腿骨頭壊死症の発生機序として、これまでの手術検体を利用した microangiography による詳細な検討により最終的には阻血性の壊死であることはコンセンサスが得られている。しかし、阻血に至る原因として、血管内皮障害、脂質代謝異常、骨芽細胞のアポトーシス、酸化ストレスや骨髄浮腫等の微小環境変化が提唱されているが、具体的な病態解明にはいまだ至っていない。病態解明がすすまない最大の要因として、壊死発症時あるいは発症前病変の検出が困難である点が挙げられる。つまり、従来から用いられている画像的病巣検出方法(X線、骨シンチ、MRI等)では、すでに壊死に陥った後の変化しか捉えることができない、つまり、発症から診断までの時間差が大きいことが課題であると考えられる。また、モデル動物を用いた実験において、組織学的検討が数多くなされているが、いずれも壊死発生後の変化しか捉えられていないこと、さらに組織を採取するためには個体を屠殺する必要があるため、発症から壊死に至る過程の経時的な解析が困難であり、病態解明が進んでいない大きな要因である。従って、今後より詳細な病態解明を追求するためには、壊死発生超早期あるいは前病変を捉えることが必要であると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究ではステロイド骨壊死モデル動物において、バイオイメーキング法を用いて *in*

*vivo* での骨壊死発症過程を経時的に解析し、従来法では探知できなかった発症超早期の変化を分子レベルで解明することを目的とする。骨壊死は最終的には骨組織の阻血すなわち血流障害で壊死に至ることが判明している。つまり、壊死発生には先行する局所の組織低酸素状態が生じると考えられる。そこで、局所の低酸素状態をバイオイメーキング法にて経時的に観察し、低酸素状態から最終的に組織壊死に至る過程を見極め、低酸素となった組織における実際の血流評価と局所の細胞機能(主に骨芽細胞のアポトーシス、増殖能等)や骨内微小環境(酸化ストレス等)との相互作用を経時的に検討する。また、壊死発生前段階において、局所の血流障害が先行して起こっているのか、あるいは骨芽細胞のアポトーシスや酸化ストレス等の微小環境変化が先行して起こっているかを検証し、疾患発生の on set の検討をする。本実験系では、解析に際して動物を屠殺する必要がないため、疾患の発生から進行までの経時変化を観察することができる点で非常に有用と思われる。分子レベルでの解析は各時点での組織を採取し、(その際には屠殺が必要であるが)解析をすすめる予定である。

#### 従来の病巣検索方法

画像検索  
(X線、CT、MRI、骨シンチ等)

・いずれの手法も壊死発生後の変化(壊死発生前段階あるいは超早期の病変をとらえることはできない)

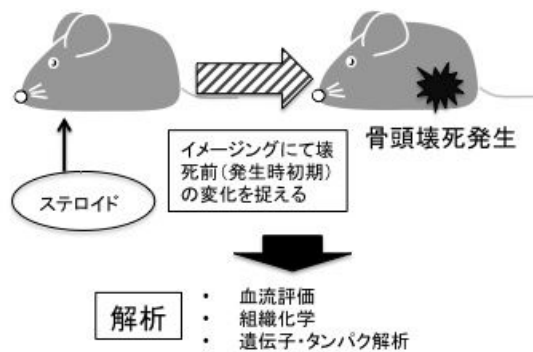
組織学的手法

・屠殺する必要あり  
・壊死発生後の変化  
・壊死発生前の変化を認めても、最終的に壊死に陥るかどうかかわからない

### 3. 研究の方法

ラットを用いたステロイド誘発大腿骨頭壊死モデルを作成し、ステロイド最終投与から経時的に *in vivo* バイオイメーキング法により骨内信号変化を探知する。バイオイメーキングは、低酸素を感知する Hypoxia probe (IVIP-HD: *in vivo* imaging for hypoxia detection using HIF-1 $\alpha$ )を使用し、骨内低酸素状態出現時の骨内血流評価を行う。バイオイメーキング法にて異常信号を示した組織を採取し、主に局所細胞のアポトーシスに焦点をあてて、病理組織学的解析および分子生物学的解析を行う。

(1)ラットを用いたステロイド誘発大腿骨頭壊死モデルの作成：経静脈的に LPS:リポポリサッカライド(2 mg/kg)を2日間連日投与後、翌日よりステロイドとして mPSL:メチルプレドニゾロン(20 mg/kg)を筋肉注射で3日間連日投与する。骨頭壊死発症の確認は、動物用MRI装置(7テスラ)にて骨壊死を検索する。



(2) Hypoxia probe を使用した *in vivo* バイオイメージング: Hypoxia probe を経静脈的に投与し、組織の低酸素環境を感知する。イメージング装置として IVIS Spectrum (Caliper 社)を使用する。イメージングを行う時期は詳細な検討を要するが、本モデルにおける動物用 MRI 装置での壊死発症時期との兼ね合いで条件を決定する。

(3) 病理組織学および分子生物学的解析  
イメージングにて信号変化を示した部位を採取し、各種抗体を用いた免疫組織学的検索等の組織学的解析および分子生物学的解析を行う。主には、アポトーシス関連や酸化ストレス関連の分子をターゲットとして考えている。

#### 4. 研究成果

ステロイド性骨壊死ラットモデルは、リポポリサッカライド (2 mg/kg, 2 日間) の静脈投与後、メチルプレドニゾロン (20 mg/kg, 3 日間) の筋肉注射で作成した。ステロイド最終投与後 7 日目の一部の検体で、組織学的に empty lacunae の存在で骨壊死を確認できた。しかし、動物モデルでの壊死発生は一定せず、安定した動物モデル作成にはさらなる至適条件の検索が必要であると思われた。HIF-1a の免疫染色では、壊死部周辺境界領域での出現が確認できたが、壊死前病変と思われる部位の判定が現在のところ困難であり、境界領域の詳細な解析には至っていない。MRI での画像解析について、動物用 MRI を用いて骨内の解析可能な高解像度が得られた。しかし、壊死発生と MRI にて描出可能となる時期との時間差や壊死発生のばらつきが大きく、さらなる条件決定および解析を進行中である。Hypoxia probe を使用した *in vivo* バイオイメージングは、ステロイド性骨壊死ラットモデルでの陽性所見は得られなかった。先に述べたようにステロイド性骨壊死ラットモデルの作成にばらつきを認めたため、画像のみでの壊死発生の確認が不正確であると思われる。よって現在のところ、コントロール群との比較検討は困難であり、壊死が発生した時点での予備実験を詳細に検討する必要があると思われた。今後の課題として安定したモデル動物の作成・条件決めが必須課題となる。

これまでの他の報告を参考に、ステロイド投与骨壊死動物モデル以外に、酸化ストレスによる骨壊死モデル、アルコールモデル、外傷モデル等も視野に入れ、まずは高頻度に安定したモデルの作成から条件検討をすすめる必要があると思われる。これまでの経験をもとにさらなる検証を進めていく予定である。

#### 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 5 件)

Goto T, Hamada D, Mineta K, Tonogai I, Egawa H, Matsuura T, Takahashi M, Higashino K, Sakai T, Suzue N, Takata Y, Nishisho T, Goda Y, Sato R, Tezuka F, Kondo K, Takeuchi M, Sugiura K, Sairyo K: State of the Art in Arthroscopic Hip Surgery. Journal of Medical Investigation, 61:226-232, 2014, 査読有

Goto T, Hamada D, Iwame T, Suzue N, Takeuchi M, Egawa H, Sairyo K: Medial Patellofemoral Ligament Reconstruction for Patellar Dislocation due to Rupture of the Medial Structures after Total Knee Arthroplasty: a case report and review of the literature. Journal of Medical Investigation, 61, 409-412, 2014, 査読有

Mineta K, Goto T, Hamada D, Tsutsui T, Tonogai I, Suzue N, Matsuura T, Higashino K, Sakai T, Takata Y, Nishisho T, Sato R, Goda Y, Higuchi T, Hama S, Kimura T, Nitta A, and Sairyo K. Efficacy of hip arthroscopy in the diagnosis and treatment of synovial osteochondromatosis: a case report and literature review. Journal of Medical Investigation, 61, 436-441, 2014, 査読有

Tonogai I, Goto T, Hamada D, Iwame T, Yoshioka S, Tsutsui T, Goda Y, Egawa H, Sairyo K. Bilateral Atypical Fractures in a

Patient with Multiple Myeloma Treated with Intravenous Bisphosphonate Therapy. Case Reports in Orthopedics, vol.2014:452418, 4 pages, 2014, 査読有

Tamaki Y, Goto T, Hamada D, Nishisho T, Yukata K, Naoto S, Egawa H, Sairyo K. Massive Femoral Osteolysis Secondary to Loosening of a Cemented Roughened Long Stem: a case report. Case Reports in Orthopedics, vol.2014:840267, 4 pages, 2014, 査読有

〔学会発表〕(計6件)

1. 後東知宏, 浜田大輔, 筒井貴彦, 峯田和明, 西良浩一: 寛骨臼回転骨切り術前後における3次元画像評価, 第41回日本股関節学会, 京王プラザホテル(東京都) 2014年10月31日-11月1日
2. T. Goto, K. Mineta, D. Hamada, K. Sairyo: Accuracy of CT based navigation system for cementless acetabular component placement in revision total hip arthroplasty. Asia pacific orthopaedic association, October 23-25, 2014, Pattaya (Thailand)
3. 後東知宏, 峯田和明, 浜田大輔, 筒井貴彦, 西良浩一: CT画像を用いた白蓋縁骨化の評価, 第6回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会, 広島国際会議場(広島県・広島市) 2014年7月24-26日
4. 後東知宏, 峯田和明, 浜田大輔, 江川洋史, 西良浩一: CTを用いた大腿骨頸部嚢胞性病変の形態学的検討, 第87回日本整形外科学会総会, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市) 2014年5月22-25日
5. T. Goto, K. Mineta, D. Hamada, H. Egawa, K. Sairyo: Correlation between bone apposition of the acetabular rim and morphological indicators of femoroacetabular impingement: CT analysis in the Japanese asymptomatic population. 2014 Osteoarthritis Research Society International, April 24-27, 2014, Paris (France).
6. T. Goto, H. Egawa, D. Hamada, T. Takasago, Y. Tamaki, N Yasui: Computed tomography analysis of herniation pits in the general population in Japan. The 59st Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, January 26-29, 2013, San Antonio (USA)

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
後東知宏 (GOTO, Tomohiro)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・特任講師  
研究番号: 10420548