

令和元年6月19日現在

機関番号：23903

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07009

研究課題名(和文) 骨壊死におけるインターロイキン6の役割の検討とそれに基づく治療法の開発

研究課題名(英文) Role of interleukin-6 and the molecular mechanism in ischemic osteonecrosis of the femoral head

研究代表者

黒柳 元 (Kuroyanagi, Gen)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80790831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：インターロイキン6(Interleukin-6; IL-6)は炎症反応の重要な因子であり、大腿骨頭壊死の発症に關与することが報告されているが分子レベルでの病態の詳細は明らかでない。本研究ではIL-6遺伝子ノックアウトマウスを使用して虚血性骨壊死に關するIL-6の役割を検討した。その結果、IL-6遺伝子ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して骨壊死後の骨量低下を抑制することを見出した。その理由の一つとしてIL-6遺伝子ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して、優位に骨壊死後の骨リモデリングにおける骨芽細胞の数と骨形成率が増えていることを世界で初めて明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨壊死マウスモデルを用い、骨壊死における分子レベルでの病態解明及び分子標的治療薬の効果へ着目することが本研究の特色であり、極めて重要かつ独創的な点である。本研究により、骨壊死におけるIL-6の機能が解明されれば、骨壊死を制御しうる可能性があり、新たな治療薬開発などの可能性を秘めている。また、本邦では既に関節リウマチ患者などに対して抗ヒトIL-6受容体モノクローナル抗体(トシリズマブ)が使用され有効な成績が得られている。抗ヒトIL-6受容体モノクローナル抗体が大腿骨頭壊死患者に使用できれば、骨壊死の治療体系に大きな変化をもたらす可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Interleukin-6 (IL-6) is a pleiotropic cytokine and associated with the pathogenesis of femoral head deformity in patients with ischemic osteonecrosis of the femoral head.

The femoral head deformity results from increased bone resorption and decreased bone formation during the repair process. However, the role of IL-6 in the bone healing process following ischemic osteonecrosis is unknown. The purpose of this study was to determine the effects of IL-6 deletion on bone repair following ischemic osteonecrosis. As results, IL-6 knock-out mice show higher bone volume after ischemic osteonecrosis. In addition, IL-6 deletion increases the number of osteoblasts and new bone formation following ischemic osteonecrosis.

研究分野：整形外科

キーワード：インターロイキン6 虚血性骨壊死 大腿骨頭壊死 ペルテス病 骨形成 ノックアウトマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国では小児や成人において大腿骨が腐る(大腿骨頭壊死)は広く知られているが、有効な治療法がないため難病指定を受けている。大腿骨頭が阻血性の壊死をきたし、大腿骨頭の圧潰変形が生じると、二次性の変形性股関節症を誘発し股関節機能が失われることで日常生活活動(ADL)や生活の質(QOL)の増悪を招く。大腿骨頭壊死の原因は未だ解明されていないが、外傷、血液凝固系異常による血栓形成、血管閉塞、喫煙などが報告されている。細胞生物学的観点からは、骨壊死発生前に壊死に陥った細胞から放出される damage associated molecular patterns(DAMPs)が toll-like receptor 4(TLR4)を介したマクロファージでの innate immune system を引き起こし、インターロイキン-6(IL-6)などの炎症性サイトカインを増加させることが病態に深く関与していると報告されている。

申請者は2016年4月より Texas Scottish Rite Hospital for Children(TSRH)と共同研究を開始し、分子レベルでの骨壊死発症機序の解明とそれに基づく治療法の開発を行っている。TSRHはアメリカ合衆国、テキサス州、ダラスにある全米第1位の小児整形外科の専門病院で、年間2万人の小児外来患者を診察し4千件の手術を行っている。TSRHは小児整形外科の教科書として最も有名な“Tachdjian's Pediatric Orthopaedics”を執筆しており、ペルテス病(小児の大腿骨頭壊死)に使う Scottish Rite 器具も同施設で開発された。TSRHの共同研究責任者である Professor Harry Kim は小児股関節専門整形外科医であり、ペルテス病治療のスペシャリストである。International Perthes Study Group の理事としても世界的な評価を受けており、毎年多くの国際的学術誌に得られた知見を報告している。TSRH 研究グループは大腿骨遠位端へ血流を供給している血管の内4本の血管を選択的に遮断することにより虚血性骨壊死を確実に誘導する世界初の骨壊死マウスモデルの開発に成功している。さらに、同グループは小児骨壊死患者(ペルテス病)の関節液検体から IL-6 の関与についても報告している。IL-6 は炎症反応の重要な因子であることから、骨壊死発症の分子レベルでの病態解明には炎症との関連性が考えられるがその詳細は明らかとなっていない。

IL-6 は破骨細胞形成を促進し骨吸収因子として考えられてきたが、近年、骨芽細胞特異的 gp130 遺伝子欠損マウスを作成し解析した結果から、IL-6 が骨芽細胞における骨形成や骨強度の維持に重要な役割を果たしていることも報告されている。また、ペルテス病患者では骨吸収を行う破骨細胞と、骨芽細胞の骨形成のカップリング機構が破綻していることも報告されている。以上から、IL-6 が骨壊死を制御する骨芽細胞や破骨細胞の分化や細胞機能を調整している可能性は非常に高い。本研究では骨壊死における骨芽細胞と破骨細胞の増殖、分化等の細胞機能における IL-6 の役割を検討し、骨壊死の新たな治療法確立を目的とし、計画立案に至った。

2. 研究の目的

本研究では、生体内における IL-6 の骨壊死への機能解析のために、IL-6 欠損マウスに、骨壊死を誘導し、正常マウスと比較することで、IL-6 欠損が骨壊死にどのように影響するのかを詳細に検討する。

3. 研究の方法

1. 虚血性骨壊死の病巣部における IL-6 の発現解析

虚血性骨壊死を誘導したマウスモデルの病理像において、術後1週では血流の途絶と生細胞の消失が認められ、術後2週より病巣部への新生血管の形成とそれに伴う破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成が生じ、術後6週では病巣部は新しい骨髄に置換される。今回、IL-6 の発現を術後48時間後及び4週の虚血性骨壊死を誘導した野生型マウスモデルを用いて免疫組織化学法により解析する。

2. IL-6 遺伝子ノックアウトマウスを用いた骨壊死における IL-6 の役割の解析

上記1.の結果を踏まえ、生体内における IL-6 の骨壊死への機能解析のために、IL-6 遺伝子ノックアウトマウス(B6.129S2-Il6tm1Kopf/J)に骨壊死を誘導し、正常マウスと比較することで、IL-6 欠損が骨壊死にどのように影響するのかを詳細に検討する。

2-1. IL-6 遺伝子ノックアウトマウス(B6.129S2-Il6tm1Kopf/J)及び野生型マウスに骨壊死を誘導し、術後2週間で TUNEL 染色を用いて死細胞を同定し、IL-6 欠損が骨壊死の発生に影響するかどうかを検討する。

2-2. 上記実験動物にカルセイン二重標識を行い骨の組織学的形態計測法により石灰化速度や骨形成率といった動的パラメータを検討し、マイクロCTを用いて骨密度や骨梁構造などの骨強度に関連する因子について検討する。病理像では H&E 染色、von Kossa 染色及び TRAP 染色を行い骨芽細胞や破骨細胞による骨形成能及び骨吸収能について検討する。

4. 研究成果

(1) IL-6 の発現を術後48時間後及び4週の虚血性骨壊死を誘導した野生型マウスモデルを用いて免疫組織化学法により解析した。その結果、術後48時間後及び4週の両方で骨壊死の病巣部で IL-6 の発現は亢進していた。一方、手術をしていない骨端部では IL-6 の発現は低いことを確認した。

(2) IL-6 遺伝子ノックアウトマウス (B6.129S2-Il6tm1Kopf/J) 及び野生型マウスに骨壊死を誘導し、術後 2 週間で TUNEL 染色を用いて死細胞を同定し、IL-6 欠損が骨壊死の発生に影響するかどうかを解析した。その結果、percentage of TUNEL positive osteocytes は野生型マウス:82 ± 2%、IL-6 遺伝子ノックアウトマウス: 81 ± 4%と有意差を認めなかった。以上のことから、IL-6 欠損は骨壊死の発生には影響しないことを明らかとした。

(3) 虚血性骨壊死後に病巣部に新生血管が形成される割合と、新しい骨髄に置換される割合を術後 4 週の虚血性骨壊死を誘導した IL-6 遺伝子ノックアウトマウス (B6.129S2-Il6tm1Kopf/J) 及び野生型マウスを用いて H&E 染色により解析した。その結果、IL-6 遺伝子ノックアウトマウスは野生型マウスと比較して、新しい骨髄に置換される割合は高かった。以上のことから、骨壊死後に高発現する IL-6 を抑えることで新生血管が誘導され、新しい骨髄細胞の誘導が亢進することを明らかとした。さらに、新生血管マーカーである VEGF の発現を免疫組織化学法により解析すると、IL-6 遺伝子ノックアウトマウスは野生型マウスと比較して VEGF の発現も更新していることが明らかとなった。

(4) 上記実験動物にカルセイン二重標識を行い骨の組織学的形態計測法により石灰化速度や骨形成率といった動的パラメータを検討し、マイクロ CT を用いて骨密度や骨梁構造などの骨強度に関連する因子について解析した。カルセイン二重標識の結果から、IL-6 遺伝子ノックアウトマウスは野生型マウスよりも、Bone formation rate、Mineral apposition rate が優位に上昇していた。また、マイクロ CT の結果から、IL-6 遺伝子ノックアウトマウスは野生型マウスと比較して、Bone volume/total volume、Trabecular number、Trabecular separation が優位に上昇していた。次に、von Kossa 染色及び TRAP 染色を行い骨芽細胞や破骨細胞による骨形成能及び骨吸収能について解析した。その結果、IL-6 遺伝子ノックアウトマウスは野生型マウスよりも骨芽細胞の数及び破骨細胞の数が増加していた。

以上のことから、IL-6 遺伝子ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して骨壊死後の骨量低下を抑制することを見出した。その理由の一つとして IL-6 遺伝子ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して、優位に骨壊死後の骨リモデリングにおける骨芽細胞の数と骨形成率が増えていることを世界で初めて明らかとした。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

(1) Kawabata T, Otsuka T, Fujita K, Sakai G, Kim W, Matsushima-Nishiwaki R, **Kuroyanagi G**, Kozawa O, Tokuda H.

HSP70 Inhibitors Reduce The Osteoblast Migration By Epidermal Growth Factor.

Curr Mol Med. 査読有 18 巻, 2018, 486-495.

doi: 10.2174/1566524019666181213112847.

(2) Kawabata T, Tokuda H, Sakai G, Fujita K, Matsushima-Nishiwaki R, **Kuroyanagi G**, Otsuka T, Kozawa O.

HSP70 Inhibitor Suppresses IGF-I-Stimulated Migration of Osteoblasts through p44/p42 MAP Kinase.

Biomedicines. 査読有 6 巻, 2018, pii: E109.

doi: 10.3390/biomedicines6040109.

(3) Kamiya N, **Kuroyanagi G**, Aruwajoye O, Kim HKW.

IL6 receptor blockade preserves articular cartilage and increases bone volume following ischemic osteonecrosis in immature mice.

Osteoarthritis Cartilage. 査読有 27 巻, 2019, 326-335.

doi: 10.1016/j.joca.2018.10.010.

(4) **Kuroyanagi G**, Adapala NS, Yamaguchi R, Kamiya N, Deng Z, Aruwajoye O, Kutschke M, Chen E, Jo C, Ren Y, Kim HKW.

Interleukin-6 deletion stimulates revascularization and new bone formation following ischemic osteonecrosis in a murine model.

Bone. 査読有 116 巻, 2018, 221-231.

doi: 10.1016/j.bone.2018.08.011.

(5) **Kuroyanagi G**, Yoshihara H, Yamamoto N, Suzuki H, Yamada K, Yoshida Y, Otsuka T, Takada N.

Treatment of Lateral Tibial Condylar Fractures Using Bioactive, Bioresorbable Forged Composites of Raw Particulate Unsintered Hydroxyapatite/Poly-L-Lactide Screws.

Orthopedics. 査読有 41 巻, 2018, e365-e368.

doi: 10.3928/01477447-20180320-05.

(6) Tokuda H, **Kuroyanagi G**, Onuma T, Enomoto Y, Doi T, Iida H, Otsuka T, Ogura S, Iwama T, Kojima K, Kozawa O.

Ristocetin induces phosphorylated-HSP27 (HSPB1) release from the platelets of type 2 DM patients: Anti-platelet agent-effect on the release.

Biomed Rep. 査読有 41 卷, 2018.

doi: 10.3892/br.2018.1058.

(7) Kawabata T, Otsuka T, Fujita K, Kainuma S, Yamamoto N, **Kuroyanagi G**, Sakai G, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H.

Suppression by HSP90 inhibitors of BMP-4-stimulated osteoprotegerin synthesis in osteoblasts: Attenuation of p70 S6 kinase.

Mol Med Rep. 査読有 16 卷, 2017, 8507-8512.

doi: 10.3892/mmr.2017.7639.

(8) Kainuma S, Tokuda H, Yamamoto N, **Kuroyanagi G**, Fujita K, Kawabata T, Sakai G, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Otsuka T.

Heat shock protein 27 (HSPB1) suppresses the PDGF-BB-induced migration of osteoblasts.

Int J Mol Med. 査読有 40 卷, 2017, 1057-1066.

doi: 10.3892/ijmm.2017.3119.

(9) Sakai G, Otsuka T, Fujita K, Kainuma S, **Kuroyanagi G**, Kawabata T, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H.

Amplification by (-)-epigallocatechin gallate of prostaglandin F₂α-stimulated synthesis of osteoprotegerin in osteoblasts.

Mol Med Rep. 査読有 16 卷, 2017, 6376-6381.

doi: 10.3892/mmr.2017.7354.

(10) Fujita K, Tokuda H, Kainuma S, **Kuroyanagi G**, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Harada A, Kozawa O, Otsuka T.

Resveratrol suppresses thyroid hormone-induced osteocalcin synthesis in osteoblasts.

Mol Med Rep. 査読有 16 卷, 2017, 2881-2886.

doi: 10.3892/mmr.2017.6872.

(11) Fujita K, Otsuka T, Yamamoto N, Kainuma S, Ohguchi R, Kawabata T, Sakai G, **Kuroyanagi G**, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H.

(-)-Epigallocatechin gallate but not chlorogenic acid upregulates osteoprotegerin synthesis through regulation of bone morphogenetic protein-4 in osteoblasts.

Exp Ther Med. 査読有 14 卷, 2017, 417-423.

doi: 10.3892/etm.2017.4491.

(12) Fujita K, Tokuda H, **Kuroyanagi G**, Yamamoto N, Kainuma S, Kawabata T, Sakai G, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Otsuka T.

HSP90 inhibitors potentiate PGF₂α-induced IL-6 synthesis via p38 MAP kinase in osteoblasts.

PLoS One. 査読有 12 卷, 2017, e0177878.

doi: 10.1371/journal.pone.0177878.

(13) **Kuroyanagi G**, Tokuda H, Yamamoto N, Kainuma S, Fujita K, Ohguchi R, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Otsuka T.

Attenuation of prostaglandin E1-induced osteoprotegerin synthesis in osteoblasts by normoxic HIF inducers.

Mol Med Rep. 査読有 15 卷, 2017, 1847-1852.

doi: 10.3892/mmr.2017.6177.

(14) Fujita K, Tokuda H, Yamamoto N, Kainuma S, Kawabata T, Sakai G, **Kuroyanagi G**, Matsushima-Nishiwaki R, Harada A, Kozawa O, Otsuka T.

Incretins amplify TNF-α-stimulated IL-6 synthesis in osteoblasts: Suppression of the IκB/NF-κB pathway.

Int J Mol Med. 査読有 39 卷, 2017, 1053-1060.

doi: 10.3892/ijmm.2017.2892.

(15) **Kuroyanagi G**, Tokuda H, Yamamoto N, Kainuma S, Fujita K, Ohguchi R, Kawabata T, Sakai G, Matsushima-Nishiwaki R, Harada A, Kozawa O, Otsuka T.
(-)-Epigallocatechin gallate synergistically potentiates prostaglandin E2-stimulated osteoprotegerin synthesis in osteoblasts.
Prostaglandins Other Lipid Mediat. 査読有 128-129 巻, 2017, 27-33.
doi: 10.1016/j.prostaglandins.2017.02.001.

〔学会発表〕(計3件)

(1) **Kuroyanagi G**, Adapala NS, Kim HK
Toll-Like Receptor 4 Activation Inhibits Osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells and decreases bone formation following ischemic osteonecrosis
American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2017 Annual Meeting
2017年9月8日 The Colorado Convention Center (Denver, USA)

(2) **Kuroyanagi G**, Adapala NS, Yamaguchi R, Kim HK
Interleukin-6 inhibits osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells and decreases bone formation following ischemic osteonecrosis
American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2017 Annual Meeting
2017年9月8日 The Colorado Convention Center (Denver, USA)

(3) Kim HK, **Kuroyanagi G**, Yamaguchi Y, Adapala NS, Phipps M, Aruwajoye O
Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) Released Following Ischemic Osteonecrosis of the Femoral Head
American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2017 Annual Meeting
2017年9月8日 The Colorado Convention Center (Denver, USA)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）:

(2)研究協力者

研究協力者氏名：神谷宜広

ローマ字氏名：Kamiya Nobuhiro

研究協力者氏名：Harry Kim

ローマ字氏名：Harry Kim

研究協力者氏名：永谷裕子

ローマ字氏名：Nagaya Yuko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。