

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592159

研究課題名(和文)ヒスタミンH2受容体拮抗薬の腱石灰化抑制機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of tendon calcification inhibition mechanism of histamine H2-receptor antagonist

研究代表者

山本 健一 (Yamamoto, Kenichi)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：90583162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：ヒスタミンH2受容体拮抗薬(H2ブロッカー)が異所性骨化や石灰沈着性腱炎の治療に奏功するという報告があるがその基礎的研究報告はなく、メカニズムは不明。本研究ではH2ブロッカーを介した腱の石灰化抑制のメカニズムを基礎的に調査した。H2ブロッカーの中でも力価の高いファモチジンを選択し、in vitroで腱由来細胞TTD6と骨芽細胞系細胞MC3T3-E1においてファモチジンが石灰化抑制することを確認。次にin vivoでアキレス腱が異所性石灰化するTTWマウスを用い、ファモチジンが異所性石灰を抑制することを証明。以上よりファモチジンが異所性石灰化に対する治療薬として基礎的にもその効果が証明された。

研究成果の概要(英文)：Although there are many clinical reports that histamine H2-receptor antagonists (H2 blockers) is effective for the treatment of calcific tendinitis and ossification differentiation previously, there is no report about the basic research, the mechanism. We investigated the basic mechanisms of calcification inhibition of the tendon through the H2 blockers in this study. We selected the famotidine for H2 blocker and administrated to the osteoblast cell line MC3T3-E1 and tendon-derived cell lines TTD6 and confirmed that famotidine suppressed the calcification in vitro. Next we demonstrated that by using a mouse TTW, ectopic calcification occurs in the Achilles' tendon in vivo and famotidine suppressed the ectopic calcification. The effect of famotidine for ectopic calcification was also demonstrated on basic medicine.

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：異所性石灰化 異所性骨化 H2ブロッカー 石灰化抑制 t t w

1. 研究開始当初の背景

石灰沈着性腱炎とは肩関節や股関節の腱板にカルシウム塩が沈着し、急性の激痛または慢性疼痛を伴う炎症を生じる病態で、人口の 2.7-7.5%に発生するとされ、日常診療でも頻りに遭遇する疾患である。本症の発症メカニズムについては、未だ明らかにされていないが、Uthoff は組織の酸素分圧低下により腱が線維軟骨へと変性し、その周囲が石灰化すると報告しており、また Refior らは、その腱組織の線維軟骨化を確認した。また関節周囲に認められる石灰化の成分は、ハイドロキシアパタイトではなくカルボン酸アパタイトであることが報告されている。

シメチジン・ラニチジン・ファモチジンなどに代表される、ヒスタミン H₂ 受容体拮抗薬(H₂ ブロッカー)は、临床上、主に消化性潰瘍治療剤として使用されているが、1979年の Sherwood の報告(N Engl J Med 1979 Jan 25;300(4):200-1)以来、副甲状腺機能亢進症や透析患者の異所性石灰沈着症に対しても使用されている。H₂ ブロッカーが石灰化に及ぼす作用については、1979年に Sherwood らが原発性上皮小体機能亢進症にシメチジンを投与し、上皮小体ホルモン(PTH)と血中 Ca 濃度が正常化したという報告があり、これが最初のものである(N Engl J Med 30:200-201,1979)。その後、腎透析患者における二次性上皮小体機能亢進症において、シメチジンが血中 PTH 濃度を低下させる可能性が報告されている(N Engl J Med 302:671-674,1980)。近年、特に肩関節に主にみられる石灰沈着性腱炎にも有効であるという報告が散見されている。従来から石灰沈着性腱炎に対して行われている NSAIDs の経口投与や水溶性ステロイド剤関節腔内注射、外科的石灰摘出術に加えて、H₂ ブロッカーの経口投与の併用により、沈着した石灰化物の吸収を促進するというものである。

わが国でも临床上、石灰沈着性腱炎に対する H₂ ブロッカー投与の有効性に関していくつか報告されており、疼痛改善と単純 X 線像での石灰沈着の縮小が認められている(整形外科 50:1439-1441,1999)。その作用機序としては、上皮小体のヒスタミン H₂ 受容体への直接作用などが指摘されている(整形外科 46:1549-1554,1995)。しかしながら、これらに対する基礎的研究は現在のところほとんど行われておらず、細胞レベル・分子レベルでの詳細な作用機序の解明が待たれるところである。申請者も整形外科医として臨床医療に携わってきた中で、石灰沈着性腱炎に対する H₂ ブロッカーの臨床的效果については日々実感していたところであるが、その裏付けとなる基礎的データの報告がほとんどないこと、さらに腱の石灰化の機序についても不明な点が多いことなどに注目し、ヒスタミンの石灰化への

の関与と骨軟骨代謝の解明も視野に入れた本研究を計画するに至った。

2. 研究の目的

本研究は、まず临床上経験されている石灰沈着性腱炎に対するヒスタミン H₂ 受容体拮抗薬(H₂ ブロッカー)の石灰化抑制機構について、基礎医学的にその効果を検証し、石灰化抑制の作用点をも含め解明することである。また、ヒスタミン自体の、腱板など関節周囲組織や関節外軟部組織に対する石灰化促進への関与についても検討することにより、石灰沈着性腱炎の治療に対してのエビデンスを確立するのみならず、生体における石灰沈着症のメカニズムの解明につなげることを目指している。

3. 研究の方法

(1) 各種細胞(骨芽系細胞 MC3T3-E1、腱細胞 TTD6、軟骨系細胞 ATD6 など)におけるヒスタミン H₂ 受容体の解析

(2) 上記細胞の石灰化誘導培養系における、H₂ ブロッカーの石灰化抑制効果を解析

(3) アキレス腱の自然石灰化を起こす特徴を持つ遺伝子改変マウス - tip toe mouse(TTW/Jic-ICR (ttw/ttw) mouse:TTW マウス)を用い、H₂ ブロッカーによる石灰化抑制についての解析

(4) ヒスタミンノックアウトマウスと TTW マウスを交配により生まれる複合変異マウスにおけるアキレス腱石灰化の程度についての解析

(5) H₂ ブロッカーによる石灰化抑制の作用点の解明

以上を総合的に検討することにより、現在臨床現場において石灰沈着性腱炎に対し経験的に有効とされ、使用されているヒスタミン H₂ 受容体拮抗薬の作用機序を細胞レベル・分子レベルで明らかにし、治療効果へのエビデンスを与えることが本研究の第一の目的である。同時にヒスタミンの石灰化に対する生物学的関与についても解明し、その骨軟骨代謝における役割とその作用メカニズムについても明らかにしたいと考えている。

in vitro では、各種細胞におけるヒスタミン H₂ 受容体の発現解析と、各種細胞の石灰化に対する H₂ ブロッカーの影響を調べ、かつヒスタミン自体が細胞を石灰化させるかどうかを検討する。in vivo では主にアキレス腱の石灰化をおこす TTW/Jic-ICR (ttw/ttw) mouseへの H₂ ブロッカー投与の効果を観察し、効果が認められた場合は、その過程を組織学的に詳細に検討する。最後に、ヒスタミンの骨軟骨代謝における役割を遺伝学的に証明するため、ヒスタミンノックアウトマウスと TTW マウスを交配により生まれる複合変異マウスにおけるアキレス腱石灰化の程度について解析する。

平成 23 年度の計画

1) in vitro

背景と目的:

「石灰化に対する H₂ ブロッカーの効果」と

「ヒスタミンの石灰化における役割」を明らかにするため、まず *in vitro* で石灰化した細胞に対する H2 ブロッカーの影響を調べ、かつヒスタミン自体が細胞を石灰化させるかどうかについて検討する必要がある。

対象と方法:

各種細胞における histamine receptor の発現を確認するとともに、それらを石灰化させ、H2 ブロッカーの石灰化抑制を評価。

1. 骨芽系細胞 MC3T3-E1 を 24-well に 5000 cells/well で播種、培養液は石灰化誘導培地と、石灰化誘導培地に bone morphogenic protein 2(BMP2)を 2 ng/ml 混合したものを用意。それぞれに H2 ブロッカーとして Famotidine 0, 20 n, 200 n, 2 μ , 20 μ , 200 μ (g/mL) を添加し 3 週間培養し Von Kossa 染色と ALP 染色を行い、RT-PCR で Osteocalcin (OC)、Collagen type 1, 10 (Col1, 10) の発現を調べる (Biochem Biophys Res Commun. 2007 Jun 15; 357(4): 854-60)。

2. 腱細胞 TTD6 についても同様に石灰化誘導培地、石灰化誘導培地+BMP2 (2ng/mL) に Famotidine 0, 20 n, 200 n, 2 μ , 20 μ (g/mL) を添加し ALP 染色を行い、Osteocalcin 発現を RT-PCR にて調査 (Experimental Cell Research 287 (2003) 289-300)。

3. 石灰化細胞 ATD6 については 20 日間 DMEM にて培養し、Famotidine 0, 20 n, 200 n, 2 μ , 20 μ (g/mL) を添加し Pi 添加により石灰化させ Alizarin 染色し、RT-PCR にて OC の発現を調べる (J Bone Miner Res. 2003 August ; 18(8): 1430 - 1442, Experimental Cell Research 287 (2003) 289-300)。

ヒスタミンによる石灰化誘導効果の解析についても H2 ブロッカーの石灰化抑制の評価と同様に MC3T3-E1、TTD6、ATD6 を用い評価を行う。

右に腱細胞 TTD6 を使用した予備検討で得られた結果を示す。TTD6 を 10 nM, 100 nM の Famotidine で処理し、軟骨細胞の肥大化マーカーである、10 型コラーゲンとオステオカルシンの mRNA の発現を調べた。どちらの発現も Famotidine 処理によって、抑制されており H2 ブロッカーの石灰化抑制効果を示唆している (* < 0.05)。

平成 24 年度以降の計画

2) *in vivo*

背景と目的: 石灰沈着性腱炎に対する H2 ブロッカーの石灰化抑制のメカニズムを明らかにするため、アキレス腱の自然石灰化をおこす TTW/Jic-ICR (ttw/ttw) mouse (Nat Genet. 1998 Jul ; 19(3): 271-3) にヒスタミン H2 受容体拮抗薬を投与し、アキレス腱の石灰化が抑制されるかを調査する。また、ヒスタミンの骨軟骨代謝における役割を遺伝学的に証明するため、ヒスタミンノックアウトマウスと TTW マウスを交配により生まれる複合変異マウスにおけるアキレス腱石灰化の程度について解析する。

対象と方法

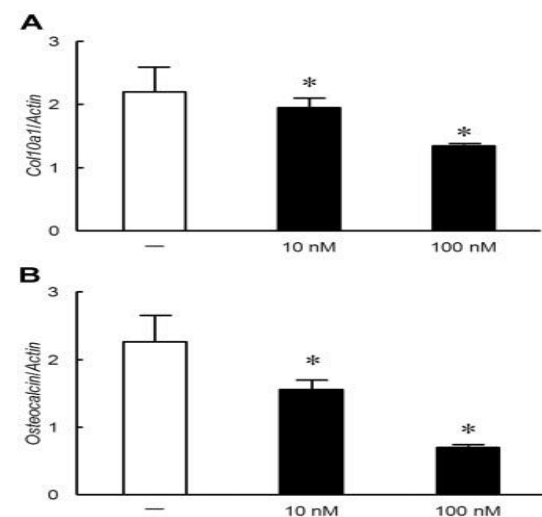
1. 生後 4 週齢の TTW/Jic-ICR (ttw/ttw) mouse 24 匹に、Famotidine を濃度 4.57 mg/L (*) で飲水に混和し、投与後 4 週 (8 週齢), 8 (12), 11 (15), 14 (18), 17 (21) で採材し μ CT で腱の石灰化量の増減につき評価する。また、組織切片についても評価する。((*) 水分摂取量約 3.5 mL/日・匹 (20 g) famotidine のヒト最大投与量 40mg/day = 16.0 μ g/20 g から計算)。

2. Histamine knockout mouse と TTW mouse を交配し、1. と同様に μ CT で腱の石灰化量の増減につき評価し、組織切片についても評価する。

上記 1) *in vitro*、2) *in vivo* の実験結果に基づき、石灰沈着性腱炎に対する H2 受容体拮抗薬の作用点の解明とヒスタミンの石灰化に対する関与についての解明を行う。

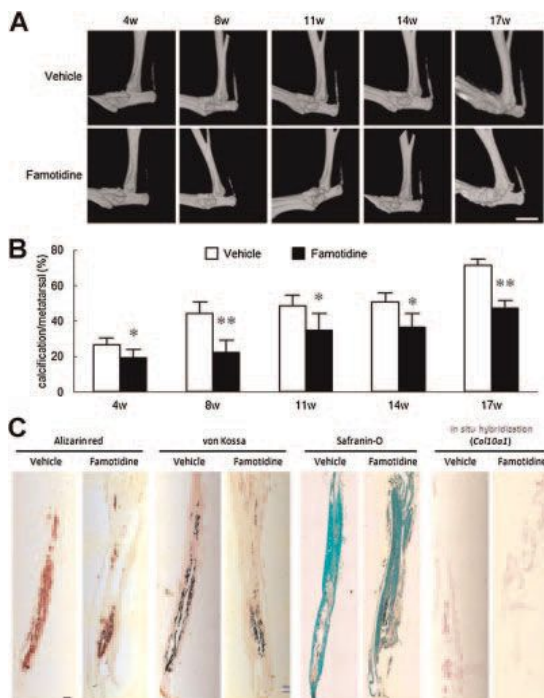
4. 研究成果

石灰沈着性腱炎は整形外科外来において日常的に経験する疾病である。本研究は、これに対する治療のうち特に石灰化を抑制し、かつ吸収させるという効果が臨床経験されている、H2 ブロッカーについての基礎的研究である。本研究の学術的特色としては、これまでの報告が臨床経験の報告が主であったのに対し、本研究では、*in vitro* 実験として、石灰化させた各種細胞を用い、*in vivo* 実験として TTW/Jic-ICR (ttw/ttw) mouse を用いることにより、H2 ブロッカーの石灰化抑制の効果を基礎的に解明しようとする点にある。



この H2 ブロッカーを用いた保存的治療については、いまだ認知していない整形外科医も少なからず存在する。この現状において、本研究のメカニズムを基礎的に解明することは、臨床医学で効果が認められている治療法に基礎医学的エビデンスを添えることとなる。したがって、本研究が達成されれば、本治療法がエビデンスを有するものとして受け入れられ、H2 ブロッカーの薬効として新たに腱の石灰化抑制に対する効果が追加されることが期待される。これにより、本治療法が、従来の治療法よりも患者の疼痛を軽減さ

せるだけでなく、早期治療と早期の社会復帰を提供できる保存的治療として、広く臨床家に選択される機会が増えると予想される。この点において、社会的な貢献度とインパクトは大きいと考えている。



また、これまでに詳細に検討されてこなかった、ヒスタミンの異所性石灰化への関与の解明についても研究の対象としていることも本研究の独創的な点である。石灰沈着性腱炎のみならず、異所性石灰化に対しても石灰化抑制的に作用するとすれば、既に報告されている副甲状腺機能亢進症や透析患者の異所性石灰沈着症に対しての使用についてもエビデンスが確立され、救済できる患者は飛躍的に伸びる可能性がある。さらにヒスタミンが石灰化を促進するといった傾向が確認できれば、骨軟骨代謝のメカニズム解明の一助となる可能性もあると思われる。

前骨芽細胞株である MC3T3-E1 細胞を用いた予備検討では、BMP2 の石灰化誘導効果に対して、H2 ブロッカーは抑制的に、ヒスタミンは促進的に作用していることがすでに確認されている。したがって本研究は、臨床現場で経験上認められている、H2 ブロッカー投与による腱周囲石灰化組織の早期治療と沈着した石灰化物の吸収に関する傾向や報告を細胞生物学レベルで裏付けるだけでなく、その作用メカニズムに関する分子細胞生物学的なエビデンスを与える可能性が非常に高いと期待される。

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 1 件)

Yamamoto K, Hojo H, Koshima I, Chung U, Ohba S. Famotidine suppresses osteogenic differentiation of tendon cells in vitro and pathological calcification of tendon in vivo.

J Orthop Res. 2012 Dec;30(12):1958-62. doi: 10.1002/jor.22146. Epub 2012 May 16.

〔学会発表〕(計 1 件)

IOF/ESCEO 2012.3.23

Famotidine suppresses osteogenic differentiation of tendon cells in vitro and pathological calcification of tendon in vivo.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 健一 (YAMAMOTO, Kenichi)

東京大学・工学系研究科・特任研究員

研究者番号: 90583162

(2) 研究分担者

鄭 雄一 (TEI, Yuichi)

東京大学・工学系研究科・教授

研究者番号: 30345053

(3) 連携研究者

光嶋 勲 (KOSHIMA, Isao)

東京大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 60101804

(3) 連携研究者

大庭 伸介 (OHBA, Shinsuke)

東京大学・工学系研究科・特任准教授

研究者番号: 20466733

(3) 連携研究者

矢野 文子 (YANO, Ayako)

東京大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号: 80529040