

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010年度～2011年度

課題番号：22791390

研究課題名（和文）特発性大腿骨頭壊死症発生における自然免疫シグナリングの役割

研究課題名（英文）Role of innate immune signaling in the development of idiopathic osteonecrosis of the femoral head

研究代表者

岡崎 俊一郎（OKAZAKI SHUNICHIRO）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：70404647

研究成果の概要（和文）：本研究では、特発性大腿骨頭壊死症の発生機序解明を目的とし、その基盤となる特発性大腿骨頭壊死症動物モデルの確立およびその発生機序における自然免疫シグナリングの役割を明らかとするため研究を行った。その結果、（1）ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生に荷重は関与していないこと、（2）世界初のアルコール性大腿骨頭壊死症動物モデルの確立、（3）ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生には、**toll-like receptor** のリガンドが必要であること、（4）ステロイド性大腿骨頭壊死症は、ステロイド投与による転写制御因子活性の変動により発生すること、（5）臨床例の検討から、ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生には、ステロイド投与後の肝機能の変化により予測可能であることを明らかとした。これらの結果は、特発性大腿骨頭壊死症の発生機序解明に有用な情報と考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aims of present study were to establish animal models of idiopathic osteonecrosis, and to clarify role of innate immune signaling in the development of idiopathic osteonecrosis of the femoral head. As a result, we could clarify these insights as follows: (1) weightbearing dose not contribute to the development of corticosteroid-induced osteonecrosis of the femoral head, (2) we could developed animal model of alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head, (3) activation of innate immune signaling via toll-like receptor is require to develop corticosteroid-induced osteonecrosis of the femoral head, (4) relative differences in the activation of IRF7 and NF- κ B lead to the development of osteonecrosis of the femoral head, (5) absence of any response to corticosteroid therapy in the liver may be implicated in the pathogenesis of osteonecrosis of the femoral head in clinically. These results will help us in the future to elucidate the pathogenesis of idiopathic osteonecrosis of the femoral head.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：関節病学

1. 研究開始当初の背景

特発性大腿骨頭壊死症は、大腿骨頭の無腐性、虚血性壊死によって関節荷重部に圧潰を生じ、2 次的に変形性関節症をきたす疾患であるが、その発生機序は未だに不明であり、厚生労働省の難治性特定疾患に指定されている。

特発性大腿骨頭壊死症の発生の背景因子についてはいろいろと明らかにされてきており、大きくステロイド性、アルコール性、および狭義の特発性に分類されている。ステロイド性大腿骨頭壊死症は自己免疫疾患など、その治療にステロイド剤を使用する内科疾患に多く認められ、全身性エリテマトーデス (SLE) は最も頻度の高い疾患となっている。

SLE の病態は多臓器障害と免疫異常を特徴とした全身性炎症性疾患である。われわれは炎症に着目し、2009 年に lipopolysaccharide(LPS) 投与による炎症を基盤としたステロイド誘発大腿骨頭壊死症ラットモデルを世界で初めて作成するのに成功し報告した。このモデルでは LPS を 2 回投与したのち、methylpredonisolone を 3 回投与することで、大腿骨頭壊死症を引き起こすことができ、その機序に少なくとも脂質代謝異常が関与すること、自然免疫機構の toll-like receptor 4(TLR4) を介するシグナル伝達機構が関与すること、T 細胞の活性化因子である IL-2 が誘導されていることなどを明らかにした。

一方、アルコール性大腿骨頭壊死症はアルコール多量摂取者に発生の報告が多い。アルコール多量飲酒者ではアルコール性肝

炎の発生を多く認め、その機序は腸管透過性の亢進により TLR4 のリガンドの一つである lipopolysaccharide の血中濃度が上昇し発生するとされている。また、Toll-like receptor 4 signaling pathway は脂質代謝機構にも関与し、酸化ストレスとの関わりが報告されている。ステロイド性大腿骨頭壊死発生にも酸化ストレスの関与が指摘されており、ラットにグルタチオン合成阻害剤を投与することによって大腿骨頭壊死が発生したとの報告されているが、アルコール性大腿骨頭壊死症動物モデルの報告はなされていない。

2. 研究の目的

本研究では、ステロイド性大腿骨頭壊死症モデルを用い大腿骨頭壊死症の発生機序に迫る。つまり、骨頭壊死に至る機構として、特発性大腿骨頭壊死症の発生に関与が疑われる Toll-like receptor 4 signaling pathway を中心とした酸化ストレスの関与、脂質代謝系等の役割を明らかにし、ステロイド治療を必要とする患者へのステロイド性大腿骨頭壊死症の発生予防への応用を探る。さらに、アルコール大量摂取者におけるアルコール性大腿骨頭壊死症の発生メカニズム、予防法を検討する。

また、特発性骨壊死の多くが股関節に発生すると報告されている。股関節はヒトにおいて最大の荷重関節であり、特発性大腿骨頭壊死症の発生に荷重の影響があると考えられることから、荷重の関与を明らかにする。

3. 研究の方法

1) ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生における荷重の影響

Wistar 系雄性ラットを荷重群と非荷重群に分け、非荷重群は Wronski らの報告を一部改変し後肢懸垂を行い、後肢を完全免荷とした。懸垂開始と同日より、両群ともに既報に従い 24 時間間隔で LPS を 2 回静注したのち、メチルプレドニゾロンを 3 回筋注し、ステロイド性大腿骨頭壊死症モデルを作製した。最終メチルプレドニゾロン投与後 3 週後に屠殺し、上腕骨および大腿骨を採取した。固定・脱灰後に組織染色を行い、上腕骨頭壊死および大腿骨頭壊死の発生頻度の比較を行った。

2) アルコール性大腿骨頭壊死症動物モデル作製

Wistar 系雄性ラットを 5%アルコール群およびコントロール群に分け、アルコール性肝障害を誘発する Lieber liquid diet 法に従い pair fed feeding を行った。5%アルコール liquid diet 投与後 1、2、3、4、6 週後に屠殺し、血液、肝臓、大腿骨を採取した。生化学的肝機能および脂質検査を行った。骨および肝臓は組織染色を行った。

3) ステロイド性大腿骨頭壊死症と自然免疫機構の関係

Wistar 系ラットを用い生理食塩水または TLR4、TLR7、TLR9 のいずれかのリガンドを単回投与したのち、さらにステロイドの単回投与を行い、大腿骨頭壊死の発生頻度

を組織学的に検討した。また、生化学的検査、転写制御因子活性および炎症性サイトカイン濃度を測定した。

4) ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生におけるステロイドの作用

Wistar 系ラットを用い TLR4 または 7 のリガンドを単回投与したのち、methylpredonisolone もしくは生理食塩水の単回投与をおこなった。転写制御因子 NF- κ B、IRF7 の活性、血中炎症性サイトカイン濃度について検討した。

5) ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生要因としての肝臓機能

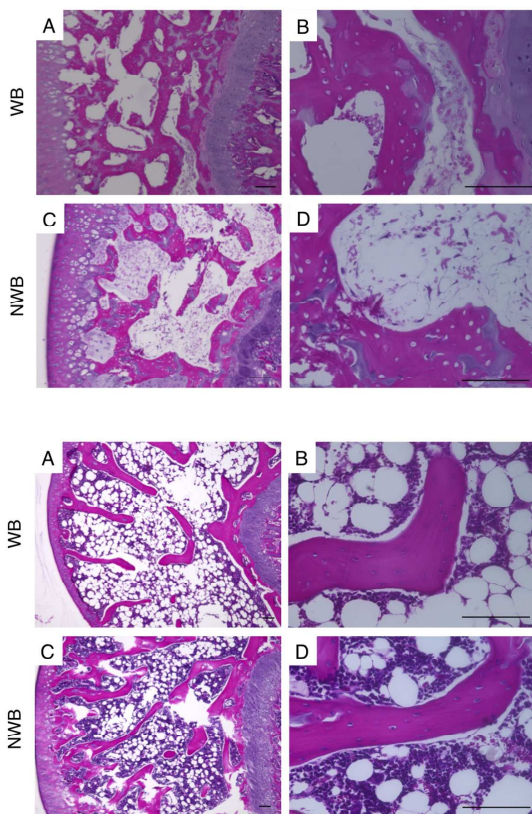
2005 年 1 月から 2010 年 1 月にかけて、当院第一内科において自己免疫疾患に対してステロイド大量療法を施行し、施行後およそ 3 カ月において両股関節 MRI を施行し、追跡調査しえた 58 例を対象とした。MRI 像により大腿骨頭壊死の有無を評価し、壊死発生群および壊死非発生群に分け、年齢、BMI、原疾患、一日最大ステロイド投与量、ステロイド大量療法施行後の 3 カ月間の血液生化学検査の推移について比較検討した。

4. 研究成果

1) ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生における荷重の影響

荷重群では 64% に大腿骨頭壊死の発生を認め、非荷重群においても 55% の大腿骨頭壊死の発生を認め、両群間に統計学的な有意差を認めなかった。また、上腕骨頭

においては、両群ともに上腕骨頭壊死の発生を認めなかった。

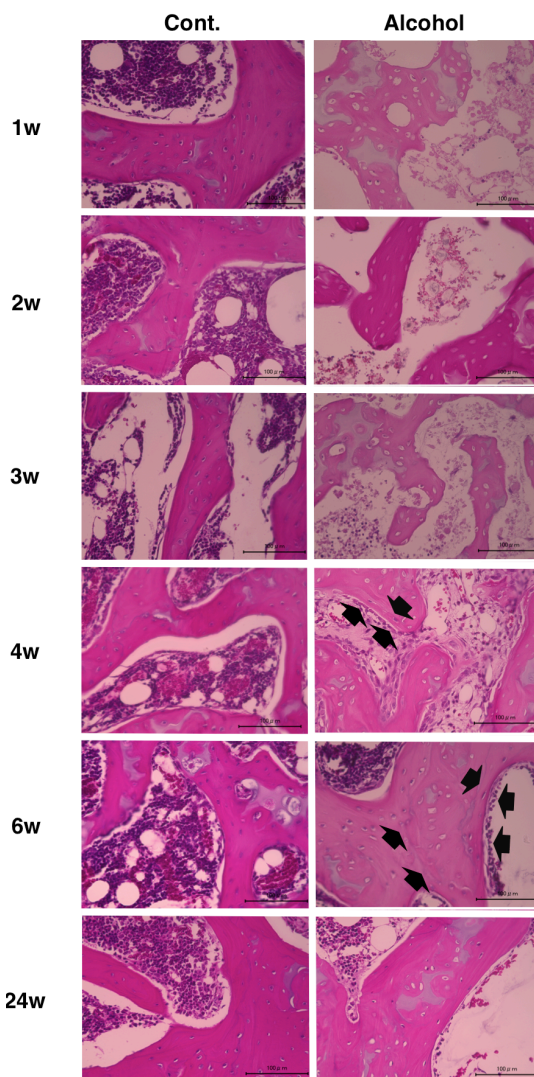


本研究の結果より、ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生において、股関節への荷重の影響がないことが明らかとなった。さらに、本研究によりステロイド性大腿骨頭壊死症の発生機序解明にラットモデルは有用な動物モデルであることが示唆された。(論文投稿中)

2) アルコール性大腿骨頭壊死症動物モデル作製

大腿骨頭壊死の発生を1、2週で37.5%に、3、4週で50%に認めた。組織学的には骨梁骨細胞の核の空胞化を認め、その周囲に骨髓壊死を伴っていた。また、4週以降では添加骨形成を認め、修復反応と考

られた。



肝臓では1週より軽度の脂肪肝を認め、経時的に悪化を認めた。生化学検査では1週より肝機能障害、脂質代謝異常を認めた。本研究では、liquid diet 法による慢性アルコール摂取によってラット大腿骨頭壊死モデルを作製した。アルコール性肝障害の発生機序に Toll-like receptors signaling が重要な役割を果たすと報告されている。本研究においても脂肪性肝障害、生化学的肝機能障害を伴って、大腿骨頭壊死症の発生を認めた。以上のことから、アルコール性大腿骨頭壊死症の発生機序に脂肪性肝障害

の発生に寄与する toll-like receptors signaling pathway の関与が示唆された。
(論文投稿中)

3) ステロイド性大腿骨頭壊死症と自然免疫機構の関係

ステロイド単独投与群での大腿骨頭壊死の発生は認めなかったが、いずれの ligand およびステロイド投与群では、大腿骨頭壊死症の発生を認め、その発生率は 30~50% であった。

Table 2. Incidence of ONFH 14 days after methylprednisolone treatment

	Saline	LPS	Imiquimod	CpG-C
ONF	0/6	3/6	3/6	2/6
p value		p<0.05	p<0.05	p=0.12

Chi-square test V.S Group SM

脂質代謝異常、転写制御因子活性異常および血中炎症性サイトカインの発現異常を認めた。

ステロイド性大腿骨頭壊死症の多くの背景疾患の病態には TLRs の関与が報告されている。本研究においても、生理食塩水及びステロイド投与群では大腿骨頭壊死症の発生を認めなかったが、TLRs の ligand 投与後にステロイドを投与することによって大腿骨頭壊死症の発生を認めた。この結果から、その発生には TLRs を介した自然免疫機構が重要な役割を果たすことが示唆された。また、ステロイド性大腿骨頭壊死症はステロイド病と考えられているが、免疫疾患である可能性が示唆された。

(論文投稿中)

4) ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生におけるステロイドの作用

ラットモデルにおいては、大腿骨頭壊死症は 3 日以内に発生し、薬剤投与早期の反応が大腿骨頭壊死症発生に重要であると考えられた。転写制御因子活性は TLR のリガンドおよび生理食塩水を投与した群で活性化が認められ、血中 IFN α 濃度が高値を示した。一方で、TLR のリガンドおよびステロイドを投与した群では、NF- κ B の活性がステロイド投与後 1 日で有意に低下を示したが、IRF7 の活性に変化を認めなかった。

抗炎症作用はステロイド剤の主たる薬理作用と考えられている。本研究においても、TLR のリガンド投与後にステロイドを投与することによって、24 時間後では NF- κ B の活性が有意に低下していた。また、IRF7 の活性に変化が認められなかったことから、転写制御因子活性の変動によって、大腿骨頭壊死症が発生することが示唆された。(論文投稿中)

5) ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生要因としての肝臓機能

GOT、GPT は非発生群でステロイド投与直後に上昇を示したが、発生群では上昇を認めなかった。GOT、GPT は投与直後から 1 週間で、発生群で有意に低値を示した。LDH は発生群で 2 週で有意に低値を示した。TG、T-cho はステロイド投与後より両群ともに上昇を認めたが、両群間に有意差は認めなかった。 γ -GTP および ALP では両群間に有意差を認めなかった。以上より、ステロイドに対する肝臓の反応性の違いがステロイド性大腿骨頭

壊死症の発生要因の一つであることが示唆された。また、ステロイド投与後1週間が壊死発生に重要な時期であることが示唆された。

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1件)

①High risk of osteonecrosis of the femoral head in autoimmune disease patients showing no immediate increase in hepatic enzyme under steroid therapy

S Okazaki, S Nagoya, M Yamamoto, K Tateda, H Takahashi, T Yamashita, H Matsumoto Rheumatology International (Clinical and Experimental Investigations) in press 査読有り
10.1007/s00296-011-2295-y

[学会発表] (計10件)

①ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生における荷重の影響 岡崎俊一郎ら 第26回日本整形外科学会基礎学術集会 2011年10月20日 前橋

②アルコール性大腿骨頭壊死症動物モデル作製 岡崎俊一郎ら 第26回日本整形外科学会基礎学術集会 2011年10月20日 前橋

③ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生における荷重の影響 岡崎俊一郎ら 第47回日本股関節学会 2011年10月7日 鹿児島

④アルコール性大腿骨頭壊死症動物モデル作製 岡崎俊一郎ら 第47回日本股関節学会 2011年10月7日 鹿児島

⑤ステロイド性大腿骨頭壊死症発生における自然免疫シグナリングの役割 岡崎俊一郎ら 第39回日本臨床免疫学会総会 2011年9月15日 東京

⑥ MyD88 independent pathway promotes development of alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head. OKAZAKI S et al. Research Society on Alcoholism meeting2011 2011年6月27日 アトランタ 米国

⑦アルコール性大腿骨頭壊死症と肝機能障害の関係 岡崎俊一郎ら 第94回日本法医学会総会 2011年6月17日 福島

⑧ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生における荷重の影響 岡崎俊一郎ら 第121回北海道整形災害外科学会 2011年6月12日 旭川

⑨アルコール性大腿骨頭壊死症動物モデル作製 岡崎俊一郎ら 第121回北海道整形災害外科学会 2011年6月12日 旭川

⑩ステロイド誘発大腿骨頭壊死症の発生要因の検討 -肝臓機能と大腿骨頭壊死- 岡崎俊一郎ら 第84回日本整形外科学会学術総会 2011年5月 online

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 俊一郎 (OKAZAKI SHUNICHIRO)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：70404647

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：