



Title	股関節疾患の病態と治療に関する研究
Author(s)	横田, 隼一
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第15475号
Issue Date	2023-03-23
DOI	10.14943/doctoral.k15475
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/90062
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 : 2793
File Information	YOKOTA_Shunichi.pdf



[Instructions for use](#)

学 位 論 文

股関節疾患の病態と治療に関する研究
(Studies on mechanism and treatment of hip joint diseases)

2023年3月

北 海 道 大 学

横田 隼一
Shunichi Yokota

学 位 論 文

股関節疾患の病態と治療に関する研究
(Studies on mechanism and treatment of hip joint diseases)

2023年3月

北 海 道 大 学

横田 隼一
Shunichi Yokota

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	7 頁
略語表	10 頁
緒言	13 頁
第一章	
緒言	16 頁
方法	18 頁
結果	20 頁
考察	24 頁
第二章	
緒言	26 頁
方法	27 頁
結果	30 頁
考察	37 頁
第三章	
緒言	39 頁
方法	40 頁
結果	45 頁
考察	54 頁
第四章	
緒言	56 頁
方法	58 頁

結果	62 頁
考察	72 頁
結論	75 頁
謝辭	77 頁
利益相反	78 頁
引用文献	79 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Tomohiro Shimizu, Shunichi Yokota, Kosuke Kimura, Tsuyoshi Asano, Hirokazu Shimizu, Hotaka Ishizu, Norimasa Iwasaki, Daisuke Takahashi

Predictors of cartilage degeneration in patients with subchondral insufficiency fracture of the femoral head: a retrospective study

Arthritis Research & Therapy. Jun 22;22(1):150, 2020

2. Shunichi Yokota, Keita Sakamoto, Yukie Shimizu, Tsuyoshi Asano, Daisuke Takahashi, Kohsuke Kudo, Norimasa Iwasaki, Tomohiro Shimizu

Evaluation of whole-body modalities for diagnosis of multifocal osteonecrosis—a pilot study

Arthritis Research & Therapy. Mar 11;23(1):83, 2021

3. Shunichi Yokota, Gen Matsumae, Tomohiro Shimizu, Tomoka Hasegawa, Taku Ebata, Daisuke Takahashi, Cai Heguo, Yuan Tian, Hend Alhasan, Masahiko Takahata, Ken Kadoya, Mohamad Alaa Terkawi, Norimasa Iwasaki.

Cardiotrophin Like Cytokine Factor 1 (CLCF1) alleviates bone loss in osteoporosis mouse models by suppressing osteoclast differentiation through activating interferon signaling and repressing the nuclear factor- κ B signaling pathway

Bone. Dec 153:116140, 2021

4. Shunichi Yokota, Tomohiro Shimizu, Gen Matsumae, Taku Ebata, Hend Alhasan, Daisuke Takahashi, Mohamad Alaa Terkawi, Norimasa Iwasaki.

Inflammasome Activation in the Hip Synovium of Rapidly Destructive Coxopathy Patients and Its Relationship with the Development of Synovitis and Bone Loss

The American Journal of Pathology. May 192(5):794-804, 2022

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 横田 隼一、清水 智弘、木村 洋介、浅野 毅、石津 帆高、高橋 大介、岩崎 倫政
大腿骨軟骨下脆弱骨折における軟骨変性の予後予測
第48回日本関節病学会、2020年10月30日-31日、兵庫県神戸市
2. 横田 隼一、清水 智弘、坂本 圭太、清水 幸衣、浅野 毅、高橋 大介、工藤 與亮、岩崎 倫政
全身MRI・骨シンチグラフィーを用いた特発性大腿骨頭壊死症患者の多発骨壊死の評価
第139回北海道整形災害外科学会学術集会、2021年1月30日-31日、北海道札幌市
3. Shunichi Yokota, Tomohiro Shimizu, Taku Ebata, Gen Matsumae, Hend Alhasan, Daisuke Takahashi, Alaa Terukawa, Norimasa Iwasaki
Detection of inflammasome and pyroptosis activation markers in synovial tissues of patients with Rapidly Destructive Coxopathy: An insight into pathophysiology of disease
Orthopedic Research Society 2021 Annual Meeting, February 12-16 VIRTUAL
4. 横田 隼一、清水 智弘、坂本 圭太、清水 幸衣、中村 夢志郎、浅野 毅、高橋 大介、工藤 與亮、岩崎 倫政
全身MRI・骨シンチを用いた特発性大腿骨頭壊死症患者の多発骨壊死の評価
第30回日本リウマチ学会北海道・東北支部学術集会、2021年2月13日-14日、秋田県秋田市
5. 横田 隼一、清水 智弘、木村 洋介、石津 帆高、浅野 毅、高橋 大介、岩崎 倫政
大腿骨軟骨下脆弱骨折における軟骨変性の予後予測

第 94 回日本整形外科学会学術総会、2021 年 5 月 20 日-21 日、福岡県福岡市

6. 横田 隼一、清水 智弘、坂本 圭太、清水 幸衣、浅野 毅、高橋 大介、工藤 與亮、岩崎 倫政

全身 MRI・骨シンチグラフィを用いた特発性大腿骨頭壊死症患者の多発骨壊死の評価

第 94 回日本整形外科学会学術総会、2021 年 5 月 20 日-21 日、福岡県福岡市

7. 横田 隼一、清水 智弘、松前 元、江畑 拓、Hend Alhasan、高橋 大介、照川 Alaa、岩崎 倫政

急速破壊型股関節症におけるインフラマソームによる滑膜炎関与の検証

第 140 回北海道整形災害外科学会学術集会、2022 年 6 月 5 日-6 日、北海道札幌市

8. 横田 隼一、清水 智弘、松前 元、江畑 拓、Hend Alhasan、高橋 大介、照川 アラー、岩崎 倫政

急速破壊型股関節症におけるインフラマソームによる滑膜炎関与の検討

第 36 回日本整形外科学会基礎学術集会、2022 年 10 月 14 日-15 日、三重県伊勢市

9. 横田 隼一、清水 智弘、中村 夢志郎、宮崎 拓自、浅野 毅、高橋 大介、岩崎 倫政

全身 MRI・骨シンチグラフィを用いた特発性大腿骨頭壊死症患者の多発骨壊死の評価

第 48 回日本股関節学会、2021 年 10 月 22 日-23 日、奈良県奈良市

10. 横田 隼一、清水 智弘、中村 夢志郎、宮崎 拓自、高橋 要、高橋 大介、岩崎 倫政

急速破壊型股関節症におけるインフラマソームによる滑膜炎関与の検討

第 48 回日本股関節学会、2021 年 10 月 22 日-23 日、奈良県奈良市

11. 横田 隼一、清水 智弘、中村 夢志郎、宮崎 拓自、浅野 毅、高橋 大介、岩崎 倫政

全身 MRI・骨シンチグラフィを用いた特発性大腿骨頭壊死症患者の多発骨壊死の評価

第 49 回日本関節病学会、2021 年 11 月 5 日-6 日、Web 開催

12. Shunichi Yokota, Tomohiro Shimizu, Gen Matsumae, Taku Ebata, Hend Alhasan, Daisuke Takahashi, Alaa Terukawa, Norimasa Iwasaki
Association between inflammasome activation in hip synovium and development of synovitis and bone loss in rapidly destructive coxopathy (RDC)
Orthopedic Research Society 2022 Annual Meeting, February 4-8 Tampa, Florida
13. Shunichi Yokota, Gen Matsumae, Tomohiro Shimizu, Taku Ebata, Hend Alhasan, Daisuke Takahashi, Alaa Terkawi, Norimasa Iwasaki
Cardiotrophin Like Cytokine Factor 1 (CLCF1) Alleviates Excessive Bone Loss And Osteoclast Differentiation Through Activating Interferon Signaling And Repressing The Nuclear Factor- κ B Signaling Pathway
Orthopedic Research Society 2022 Annual Meeting, February 4-8 Tampa, Florida
15. 横田隼一、清水智弘、松前元、高橋大介、照川アラー、岩崎倫政
関節リウマチと酷似する急速破壊型股関節症におけるインフラマソーム滑膜炎の比較検討
第 66 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2022 年 4 月 25 日-26 日、神奈川県横浜市
16. 横田 隼一、清水 智弘、中村 夢志郎、宮崎 拓自、高橋 大介、岩崎 倫政
急速破壊型股関節症におけるインフラマソーム滑膜炎の関与について
第 95 回日本整形外科学会学術総会、2022 年 5 月 19 日-22 日、兵庫県神戸市
17. 横田 隼一、照川 ヘンド、清水 智弘、高橋 大介、照川 アラー、岩崎 倫政
CLCF1 のインターフェロニンシグナル活性化を伴う骨粗鬆症における骨量減少抑制効果の検討
第 141 回北海道整形災害外科学会、2022 年 7 月 3 日
18. 横田 隼一、松前 元、照川 ヘンド、西田 善郎、清水 智弘、高橋 大介、照川 アラー、岩崎 倫政
CLCF1 の骨代謝へ与える影響と、新規骨粗鬆症治療薬としての可能性
第 40 回日本骨代謝学会学術集会、2022 年 7 月 22 日-23 日
19. 横田 隼一、松前 元、江畑 拓、照川 ヘンド、塩田 惇喜、西田 善郎、北原 圭

太、徳廣 泰貴、清水 智弘、高橋 大介、照川 アラー、岩崎 倫政
CLCF1 投与によるインターフェロンシグナルの活性化を介した骨粗鬆症モデルマウスの骨量減少抑制効果について
第 37 回日本整形外科学会基礎学術集会、2022 年 10 月 13 日-14 日、宮崎県宮崎市

20. 横田 隼一、清水 智弘、小川 拓也、宮崎 拓自、高橋 大介、岩崎 倫政
急速破壊型股関節症における NLRP3 インフラマソーム経路を介した高度滑膜炎関与の検証
第 50 回日本関節病学会、2021 年 10 月 21 日-22 日、新潟県新潟市
21. 横田 隼一、清水 智弘、小川拓也、宮崎 拓自、高橋 大介、岩崎倫政
急速破壊型股関節症における NLRP3 インフラマソームによる高度滑膜炎関与の検証
第 49 回日本股関節学会、2021 年 10 月 28 日-29 日、山形県山形市
22. Shunichi Yokota, Tomohiro Shimizu, Gen Matsumae, Taku Ebata, Hend Alhasan, Daisuke Takahashi, Alaa Terukawa, Norimasa Iwasaki
Synovitis with Inflammasome signaling in Rapidly Destructive Coxopathy
Orthopedic Research Society, 2022 Annual Meeting, February 4-8, Tampa, Florida
23. Shunichi Yokota, Tomohiro Shimizu, Taku Ebata, Gen Matsumae, Hend Alhasan, Daisuke Takahashi, Alaa Terukawa, Norimasa Iwasaki
Cardiotrophin Like Cytokine Factor 1 (CLCF1) alleviates excessive bone loss and osteoclast differentiation through activating interferon signaling and repressing the nuclear factor- κ B signaling pathway.
Orthopedic Research Society, 2022 Annual Meeting, February 4-8, Tampa, Florida
24. 横田隼一、清水智弘、松前元、高橋大介、照川アラー、岩崎倫政
関節リウマチと酷似する急速破壊型股関節症におけるインフラマソーム滑膜炎の比較検討
第 66 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2022 年 4 月 25-27 日、神奈川県横浜市
25. 横田隼一、清水智弘、中村夢志郎、宮崎拓自、高橋大介、岩崎倫政
急速破壊型股関節症におけるインフラマソーム滑膜炎の関与について

第 95 回日本整形外科学会学術総会、2022 年 5 月 19-22 日、兵庫県神戸市

26. 横田隼一、松前元、江畑拓、照川ヘンド、清水智弘、高橋大介、照川アラー、岩崎倫政
CLCF1 のインターフェロンシグナル活性化を伴う骨粗鬆症における骨量減少抑制効果の検討
第 141 回北海道整形災害外科学会、2022 年 7 月 2-3 日、北海道札幌市
27. 横田隼一、松前元、照川ヘンド、西田善郎、清水智弘、高橋大介、照川アラー、岩崎倫政
Effect of CLCF1 on bone metabolism and its potential role as a novel osteoporosis drug
第 40 回日本骨代謝学会学術集会、2022 年 7 月 22 日
28. 横田 隼一、松前 元、江畑 拓、照川 ヘンド、塩田 惇喜、西田 善郎、北原 圭太、徳廣 泰貴、清水 智弘、高橋 大介、照 川アラー、岩崎 倫政
CLCF1 投与によるインターフェロンシグナルの活性化を介した骨粗鬆症モデルマウスの骨量減少抑制効果について
第 37 回日本整形外科学会基礎学術集会、2022 年 10 月 13-14 日、宮崎県宮崎市
29. 横田 隼一、清水 智弘、小川 拓也、宮崎 拓自、高橋 大介、岩崎 倫政
急速破壊型股関節症における NLRP3 インフラマソーム経路を介した高度滑膜炎関与の検証
第 50 回日本関節病学会、2022 年 10 月 21-22 日、新潟県新潟市
30. 横田 隼一、清水 智弘、小川 拓也、宮崎 拓自、高橋 大介、岩崎 倫政
急速破壊型股関節症における 3 インフラマソーム経路を介した高度滑膜炎関与の検証
第 49 回日本股関節学会学術集会、2022 年 10 月 28-29 日、山形県山形市

要旨

【背景と目的】

運動器の中で最も荷重がかかり、関節破壊や骨脆弱性の影響が強いのは股関節である。股関節の最も一般的な運動器疾患として、変形性股関節症(osteoarthritis: OA)が挙げられる。OAは様々な原因により関節軟骨に摩耗・変性が生じて、骨の変形、関節破壊が起こった状態で、人工関節置換術による外科的治療が唯一の根本的治療法である。OAの他の股関節疾患として、特発性大腿骨頭壊死症(osteonecrosis of femoral head: ONFH)、大腿骨頭軟骨下脆弱性骨折(subchondral insufficiency fracture: SIF)、急速破壊型股関節症(rapidly destructive coxopathy: RDC)があり、これらも外科的治療法以外に有効な根本的治療法は確立されておらず、治療が長期化すると患者 QOL (quality of life)の著しい低下を招く。股関節は骨脆弱性の影響を強く受ける部位であり、高齢者の骨粗鬆症を背景とした大腿骨近位部などの股関節周囲の骨折も、手術や長期入院による社会経済的な問題になっている。

本研究では、ADL (activities of daily living) や QOL に直接的にかかわる股関節周囲の疾患(ONFHをはじめとした骨壊死、SIF、RDC、骨粗鬆症)に焦点を当て、臨床研究・臨床サンプルを用いた病態解析、分子生物学的なアプローチによる基礎研究を統合し、股関節疾患の病態解明と新規治療法の検証を行うことを目的とした。具体的には、①ONFHの病態解明の足掛かりとして多発骨壊死の診断ツールの評価をすること。②SIFのOA進行の予後関連因子を検証すること。③RDCの分子免疫学的アプローチにより病態解明すること。④免疫学的なアプローチで同定した、抗炎症に関与する免疫細胞由来因子である Cardiotrophin-like cytokine factor 1 (CLCF1)の病的骨吸収への治療効果を検証することである。

【方法と結果】

① 全身 MRI (whole-body magnetic resonance imaging: WB-MRI) と全身骨シンチグラフィ (whole-body bone scan : WB-BS) の比較検討

ONFHと診断された患者に対して、WB-MRIとWB-BSを行い、全身の関節で骨壊死の検出率を比較した。WB-MRIでは検出できた無症候性の骨壊死について、WB-BSでは検出率が低かった。WB-MRIによって被曝がなく短時間かつ低コストで全身の骨壊死を一度に評価可能であり、骨壊死診断ツールとして有用であると同時に診断率が上昇することで、骨壊死の臨床像の把握や病態解明に大きく寄与すると考えられた。

② SIF が股関節の変性に与える影響とその予後予測因子

SIFと診断された41例44股関節を対象に後方視的に、X線写真による関節裂隙幅

(joint space width : JSW)の経過と、骨代謝マーカーや MRI 画像所見との関連性を検証した。JSW は初診時と最終評価時で有意に減少し、JSW は MRI バンド長、血清 1 型プロコラーゲン-N-プロペプチド(intact type 1 procollagen-N-propeptide: P1NP)、骨型酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (tartrate resistant acid phosphatase 5b: TRACP-5b)と関連しており、SIF が JSW 縮小により OA の原因となること、P1NP、TRACP-5b が SIF の予後予測因子として有用であり、局所の重症度を反映している可能性が示唆された。

③ RDC における NLRP3 (NOD-like receptor family protein 3) インフラマソーム滑膜炎 関与の検討

患者から採取した股関節滑膜組織の病理組織学的変化と遺伝子発現について、OA、ONFH と比較検討した。RDC 滑膜において、OA、ONFH にはない微小骨片粒子が散見され、その周囲に炎症細胞浸潤と NLRP3 インフラマソーム関連マーカー、破骨細胞が有意に多くみられた。遺伝子解析や関節環境を模倣した共培養でも同様の結果であり、NLRP3 インフラマソーム活性化により破骨細胞分化が亢進されることも確認された。RDC では SIF 微小骨片に対する NLRP3 インフラマソームを介した高度滑膜炎が生じて、破骨細胞分化が亢進し、関節全体の病的骨吸収を伴う関節破壊に至ると考えられた。

④ CLCF1の骨粗鬆症に対する治療効果の検討

骨粗鬆症は骨脆弱性により股関節に骨折をきたし、SIF や RDC の病因ともなる疾患である。卵巣摘出による骨粗鬆症モデルマウスにおいて免疫細胞由来因子 CLCF1 が骨量減少抑制効果を有することが確認された。In vitro においても破骨細胞分化抑制効果がみられ、骨芽細胞の分化抑制効果は示さなかった。バイオインフォマティクスを用いた解析により CLCF1の骨粗鬆症の治療効果とメカニズムについて検証したところ、CLCF1 は、インターフェロンシグナル活性化を介して nuclear factor-kappa B (NF-κB)シグナルを抑制することにより、破骨細胞分化と骨吸収を抑制して、骨粗鬆症の新規治療ターゲットとなり得ることが新たに示された。

【考察】

- ① WB-MRI で検出された無症候性骨壊死は、症候性骨壊死に比べ、WB-BS では検出困難である可能性があり、コスト、検査時間、放射線被曝を考慮すると、WB-MRI が多発性骨壊死の評価に有用であることが示唆された。WB-MRI を用いることで、これまでよりも短時間で低侵襲にスクリーニングが可能になることから、これまで診断できていなかった無症候性骨壊死を数多く診断し、骨壊死についての臨床像やリスク因子の評価研究に大きく寄与することができ、難病とされる骨壊死の病態解明の基盤となるものであると考えられた。

- ② SIF は関節裂隙狭小化および OA の原因となりうる。SIF の予後予測因子としての MRI 所見に加え、先に述べた骨代謝マーカーも JSW の変化と同様に関連しており、これらのパラメータが SIF の予後予測に有用であることが示唆された。骨代謝マーカーはバンド長と関連する傾向があることを考えると、局所の重症度を反映している可能性がある。
- ③ これまで詳細なメカニズムが不明であった稀な疾患である RDC の病態について、NLRP3 インフラマソーム活性化を伴った高度滑膜炎が関与することを初めて示した。NLRP3 インフラマソーム活性化を介する高度な炎症反応を制御することで、RDC における急速な関節破壊を抑制できる可能性が示唆された。
- ④ 抗炎症作用に関連する免疫由来因子に着目したアプローチで、CLCF1 が骨粗鬆症に対して治療効果を有し、新規治療ターゲットとなる可能性について示した。CLCF1 の作用メカニズムとして、IFN シグナルを活性化し、NF- κ B シグナルを抑制することにより、破骨細胞分化と骨吸収を抑制することが判明しており、今後は副作用などの安全性について検討が必要である。

【結論】

股関節疾患における新規診断ツールの有用性、病態メカニズム解明、新規治療薬の効果検証という一連の研究を行った。股関節が ADL や QOL に与える影響ははかりしれず、これらの研究によって、現在根本的には是正することが難しい股関節周囲疾患を制御するための研究基盤となり得るものである。

略語

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

AC	acetabular
ADAMTS	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
ADL	activities of daily living
Alum	aluminium Hydroxide
α -MEM	alpha Modified Eagle Minimum Essential Medium
ANOVA	analysis of variance
ATP	adenosine triphosphate
BMD	bone mass densitometry
BMI	body mass index
BSA	bovine serum albumin
CASP	caspase
CE	center-edge
CLCF1	cardiotrophin-like cytokine factor
CRP	c-reactive protein
CTX-1	cross-linked C-terminal telopeptides of type I collagen
DEG	differentially expressed genes
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immune-sorbent assay
FBS	fetal bovine serum
GSDMD	gasdermin D
HE	hematoxylin and Eosin
HRP	horseradish peroxidase
IFN- γ	interferon gamma
IL	interleukin
IRF-1	interferon regulatory factor 1
JSW	joint space width
KL	Kellgren and Lawrence
L-Glu	L-glutamic acid
LPS	lipopolysaccharide
MAPK	mitogen-activated protein kinase

MCSF	macrophage colony stimulating factor
MMP	matrix metalloproteinase
MRI	magnetic resonance imaging
NFATc1	nuclear factor of activated T cells 1
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
NLRP3	NOD-like receptor family protein 3
NTX-1	cross-linked N-telopeptide of type I collagen
OA	osteoarthritis
ON	osteonecrosis
ONFH	osteonecrosis of femoral head
OPG	osteoprotegerin
OVX	ovariectomy
P1NP	intact type 1 procollagen-N-propeptide
PACS	picture archiving and communication system
PBS	phosphate buffered saline
PMA	phorbol myristate acetate
PPARG	peroxisome proliferator activated receptor gamma
PS	penicillin-streptomycin
QOL	quality of life
RA	rheumatoid arthritis
RANKL	receptor activator of NF- κ B ligand
RDC	rapidly destructive coxopathy
RNA-seq	RNA-sequencing
SIF	subchondral insufficiency fracture
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1
STIR	short tau inversion recovery
T1WI	T1-weighted imaging
T2WI	T2-weighted imaging
THA	total hip arthroplasty
TNALP	tissue-nonspecific alkaline phosphatase
TNF	tumor necrosis factor
TNFSF14	TNF superfamily member 14
TRACP-5b	tartrate resistant acid phosphatase 5b
TRAF	TNF-receptor associated factors
TRAP	tartrate-resistant acid phosphatase

TYMP	thymidine phosphorylase
WB	weight-bearing
WB-BS	whole-body bone scan
WB-MRI	whole-body MRI
WBC	white blood cell
hFLS	human fibroblast-like synoviocytes
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction

緒言

近年、平均寿命の延伸を達成しつつあり、今後健康寿命の延伸が重要な課題となっている。特に、本邦では急速な高齢化社会が到来しており、自立した生活を送れない要介護状態の人口が急増し、医療経済をひっ迫している。その健康寿命の延伸を阻害している原因の一つが運動器疾患であり、関節破壊や骨脆弱性による骨折が、患者の活動度(activities of daily living: ADL)や生活の質(quality of life: QOL)を著しく低下させる事態を招いている。

運動器の中で最も荷重がかかり、関節破壊や骨脆弱性の影響が強いのは股関節である。股関節が罹患する最も一般的な運動器疾患として、変形性股関節症(osteoarthritis: OA)が挙げられる。OAは様々な原因により関節軟骨に摩耗・変性が生じて、骨の変形、関節破壊が起こった状態であり、人工関節置換術による外科的治療が唯一の根本的治療法である。OAの他の股関節疾患として、大腿骨頭壊死症(osteonecrosis of femoral head: ONFH)、大腿骨頭軟骨下脆弱性骨折(subchondral insufficiency fracture: SIF)、急速破壊型股関節症(rapidly destructive coxopathy: RDC)があり、これらについても外科的治療法以外に有効な根本的治療法は確立されておらず、治療が長期化すると患者QOLの著しい低下を招いてしまう。股関節は骨脆弱性の影響を強く受ける部位であり、高齢者の骨粗鬆症を背景とした大腿骨近位部をはじめとした股関節周囲の骨折も、手術治療や長期入院を余儀なくされ、社会経済的にも大きな問題となっている。すなわち、関節の破壊や股関節に影響を及ぼす骨脆弱性を予防、治療することは、本邦における生産年齢・人口の拡大による生産性の上昇つながら、多大な経済的効果を生むことが期待できる。そこで本研究では、ADLやQOLに直接的にかかわる股関節周囲の疾患(ONFHをはじめとした骨壊死、SIF、RDC、骨粗鬆症)に焦点を当て、臨床研究・臨床サンプルを用いた病態解析、分子生物学的なアプローチによる基礎研究を統合し、股関節疾患の病態解明と新規治療法の検証を行った。

ONFHは股関節疾患の難病のひとつであり、ステロイドやアルコール多飲による骨頭への栄養微小血流の低下による骨壊死と考えられているが、その発生メカニズムは不明である(Zhao et al., 2020)。20-40代の青・壮年期に好発して労働能力を著しく低下させることから、早期に適切な診断を行なって治療に結びつけることが重要である。骨壊死は、肩、膝、足関節など股関節以外の様々な関節も罹患することが知られており、3箇所以上の異なる解剖学的部位が罹患するものを多発性骨壊死と定義される((LaPorte et al., 1998)。多発性骨壊死はONFHの約3%にみられることが報告されているが、血液疾患を原疾患としても

つ症例ではさらに多くの有病率が報告されており(Albano et al., 2017a)、骨壊死に特徴的な病態や正確な疫学については不明である。ONFH の中で重篤である多発骨壊死の発生機序を明らかにすることにより、難病である ONFH の発生機序解明につながることを期待される。本研究では、ONFH を含めた全身の骨壊死について、病態を解明するための評価法確立の目的で、全身 MRI を用いた検証を行った。

SIF は、近年、大腿骨頭圧潰の原因として認識されるようになった股関節疾患であり、骨粗鬆症による大腿骨頭の脆弱化が原因であり、ONFH との関連も報告されている(Bangil et al., 1996; Yamamoto et al., 2000; Yamamoto, 2012)。SIF は非荷重などの保存加療により治癒する症例もあるが(Rafii et al., 1997; Hagino et al., 1999)、大腿骨頭の圧潰による著明な疼痛をきたして、手術による外科的治療を余儀なくされる(Motomura et al., 2002)。しかし、SIF が股関節の変性に及ぼす影響や関節の変性変化を予測する予後因子は不明である。本研究では、SIF 発生後の股関節の関節裂隙狭小化の自然経過を評価して変性変化に与える影響を調べ、骨代謝マーカーと MRI 所見との関連性を検証した。

RDC は、6 から 12 ヶ月以内に急速に股関節の破壊が生じる稀な疾患である(Postel and Kerboull, 1970)。痛みを中心とした臨床症状は、画像上は股関節に異常がない初期段階から始まり、関節破壊の進行とともに症状が急速に増悪し、大腿骨頭と寛骨臼の病的骨吸収がみられ、脚短縮や激しい痛みによって日常生活動作が制限される(Lequesne, 1970)。この段階では保存的治療では改善は難しく、人工股関節全置換術(total hip arthroplasty: THA) が唯一の治療選択肢となる(Kuo et al., 2009)。RDC は SIF を契機に発症することや炎症反応の関与が報告されているが、その詳細な病態については不明である。本研究では、OA、ONFH、RDC の診断で手術となった患者の滑膜臨床サンプルを用いて、臨床研究と分子生物学的な基礎研究を融合させたアプローチで RDC に特徴的な病態の検証を行った。

骨粗鬆症は、加齢や閉経などによって骨強度の低下により骨折のリスク(特に股関節周囲の骨折リスク)が増大した病態と定義される(Rachner et al., 2011)。高齢化社会において骨粗鬆症を背景とした股関節周囲の骨折患者数は増大傾向であり、SIF や RDC とも密接な関係があることから、股関節周囲疾患のひとつとも考えられる。股関節に多大な影響をもつ骨粗鬆症の治療を行い、骨脆弱性を予防是正することは非常に重要である(Reginster and Burlet, 2006)。骨粗鬆症には現在いくつかの治療薬が上市されているが、骨脆弱性を完全にコントロールできておらず、そのメカニズムについても完全には解明されていない。そこで本研究は、閉経後の骨粗鬆症と血中での発現が相関するとされている Cardiotrophin-like

cytokine factor 1 (CLCF1)に焦点をあて、バイオインフォマティクス、分子生物学的なアプローチを用いて、骨粗鬆症に与える影響とそのメカニズムを調べ、治療ターゲットとしての有用性について検証した。

これら一連の研究は、患者 ADL に直結する骨粗鬆症も含めた股関節周囲疾患の病態解明や新規治療開発の研究基盤を形成するための統合的な研究である。

第一章

特発性大腿骨頭壊死症の病態解明 —全身 MRI を用いた骨壊死評価—

緒言

骨壊死は、様々な要因で引き起こされる血液供給不足による骨細胞の壊死を特徴とする(Matthews et al., 2022)。肩、膝、足関節など様々な関節が罹患するが、大腿骨頭の壊死である ONFH が最も多く、今後も増加すると予測されている(Jacobs, 1978; Mont and Hungerford, 1995; Fukushima et al., 2010)。多発性骨壊死は、3 つ以上の異なる解剖学的部位が罹患する稀な疾患であり、骨壊死患者全体の約 3% に発生する(LaPorte et al., 1998)。

画像検査は、骨壊死の診断と病変の重症度の評価に用いられており、病初期では X 線が用いられることが多いが、X 線での異常所見は虚血性変化による壊死が完成した後に発現するため、初期の骨壊死は通常検出することができない(Grigoriu et al., 1985; An et al., 2019)。全身骨シンチグラフィ(whole-body bone scan: WB-BS)は、骨壊死の診断において X 線よりも感度が高く(Alavi et al., 1977; Gregg and Walder, 1980; Conklin et al., 1983)、多発性骨壊死のスクリーニングにも使用できるが(An et al., 2019; Minoves et al., 1998)、症候性骨壊死の診断に対する WB-BS の感度は低いとする報告も存在する(Assouline-Dayane et al., 2002; Mont et al., 2008)。一方、magnetic resonance imaging (MRI) は、骨壊死の診断とその重症度評価のためのゴールドスタンダードであり、高い特異度と感度を有する(Fordyce and Solomon, 1993; Petrigliano and Lieberman, 2007)。従来の MRI は、スキャン数が限られており、コストが高いため、すべての関節を評価することは困難であった(An et al., 2019)。全身 MRI (Whole-body: WB-MRI) が、関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA)、脊椎関節炎、多発性筋炎、皮膚筋炎などの炎症性疾患評価の目的で臨床的に使用されるようになってきており(O'Connell et al., 2002; Cantwell et al., 2005)、ステロイドで治療している血液疾患患者の骨壊死病変の早期発見にも有用であることが報告されている(Albano et al., 2017b; Zhen-Guo et al., 2017)。MRI が骨壊死の早期発見において高い精度を持つことを考慮すると、WB-MRI は 1 回の検査で骨壊死について全身を評価することができ、これまで診断できていなかった骨壊死が診断可能となり、骨壊死患者の臨床像や病態について新たな知見が得られる可能性がある。

しかし、多発性骨壊死の診断における WB-MRI の有用性を支持する報告や、WB-MRI と WB-BS を比較した研究は存在しない。そこで本研究では、WB-BS と比較することにより WB-MRI の多発性骨壊死診断の有用性を検討し、WB-MRI を用いることで ONFH を伴う

多発性骨壊死患者の特徴を明らかにすることを目的とした。

方法

対象患者

この横断的研究は、ヘルシンキ宣言の倫理基準に従って実施され、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会(#020-0059)により承認されたものである。すべての患者は本研究について説明を受け、その発表に同意した。2019年4月から2020年10月までに当院で症候性 ONFH を発症し手術を受けた患者計 46 例を本研究への参加対象とした。全患者は、菅野らが報告した診断基準に従って、3 例の整形外科医により ONFH と診断された (Sugano et al., 1999)。さらに、全患者は術前に WB-MRI と WB-BS が施行された。年齢、性別、体格指数 (BMI)、ステロイド投与歴、アルコール過剰摂取、喫煙を含む患者の臨床データは、医療記録から収集した。アルコール過剰摂取は、ONFH の危険因子であることが知られている週 400mL 以上のアルコール摂取と定義された (Matsuo et al., 1988)。

WB-MRI

1.5-T MRI システム (Magnetom Avanto; Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) を用いて WB-MRI を実施した。T1 強調像 (T1-weighted imaging: T1WI) (TR 600~800 ms, TE 14 ms、スライス厚 6 mm、axial 像スライスギャップ 12 mm、coronal 像スライスギャップ 3 mm) を頸部から足関節まで入るように撮像した。総スキャン時間は 20-25 分であった。骨壊死は、圧潰前は無症状で、T1WI で帯状のパターンが特徴的であるが、圧潰後は骨髄浮腫や関節液貯留により痛みなどの症状を伴うようになる。本研究では、無症状の骨壊死を評価するのに有用な T1WI を選択し、すべて入院中に実施された。

WB-BS

555 MBq テクネシウム-99 m ヒドロキシメチレンジホスホネート (Tc-99 m HDP) を注射して 4 時間後に WB-BS を実施した。デュアルヘッドガンマカメラシステム (ECAM, Siemens Healthcare) を用いて画像が取得され、Siemens ESOFTE Workstation で解析された。

画像解析と評価

12 年の経験を持つ 2 人の認定放射線科医によって、臨床情報がブラインドされた状態で WB-MRI および WB-BS の画像が評価された。骨壊死は、MRI で帯状低信号により区切られる軟骨下または髄内領域と定義された。WB-BS での取込みを示す骨領域は、視覚的に取込みの程度が高度なものを取込みありと評価した (An et al., 2019)。

統計解析

多発性骨壊死と3箇所未満の骨壊死症例の特徴を比較するために、連続変数とカテゴリ

一変数は、それぞれ t 検定とピアソンのカイ二乗検定で分析した。P 値<0.05 を有意ありとした。解析の再現性と正確さを評価するために、一致率については Cohen カッパ係数を算出して検証した。

結果

患者臨床データ

患者の臨床情報を表 1 に示した。46 例中 36 例がプレドニゾロンなどのステロイド療法を受けていた。この 36 例のうち、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、多発性筋炎などの膠原病が 2 例、血液悪性腫瘍が 6 例、アレルギー性疾患が 4 例、肺炎が 2 例、その他の疾患 4 例であった。36 例中 15 例がステロイドパルス療法を受け、平均最大投与量は 1 日 50.8mg (9-90mg) であった。アルコール過剰摂取と喫煙はそれぞれ 19 例と 28 例であった。

表 1 患者臨床データ

46 patients	
Age, years	47.1 (16.0)
Sex, male: female	23: 23
Steroid use, cases	36
Comorbidity for steroid use, cases	
Collagen disease	21
Hematologic malignancy	6
Allergy	4
Pneumonia	2
Others	4
Steroid pulse therapy, cases	15
Mean maximum steroid dose, mg	50.8 (17.5)
Alcohol abuse, cases	19
Smoking, cases	28

数値は平均値(標準偏差)で表示

WB-MRI

WB-MRI で骨壊死病変を検出したのは、股関節が 46 例 82 関節、膝関節が 24 例 40 関節、足関節が 11 例 17 関節、肩関節が 5 例 9 関節、肘関節が 3 例 4 関節であった(表 2)。評価した 152 関節のうち、WB-MRI は症候性骨壊死を 92 関節(60.5%)、無症候性骨壊死を 60 関節(39.5%)に検出した(表 3)。46 例中 12 例は MRI で多発性骨壊死が検出された。

表2 WB-MRI で検出された骨壊死と WB-BS で検出された取込み病変の比較

	ON detected by WB-MRI		Uptake lesions by WB-BS		κ statistic
	Patient #	Joint #	Patient #	Joint #	
Hip joint	46	82	46	71	0.584
Knee joint	24	40	16	18	0.069
Ankle joint	11	17	13	21	0.135
Shoulder joint	5	9	16	30	0.244
Elbow joint	3	4	5	7	0.067
Total		152		147	
Multifocal cases	12		14		

ON: osteonecrosis (骨壊死) #: number (数)

表3 症候性と無症候性に分けた場合の WB-MRI と WB-BS の比較

	WB-MRI			WB-BS		
	Joint #	Sympt. #	Asympt. #	Joint #	Sympt. #	Asympt. #
Hip joint	82	74	8	71	68	3
Knee joint	40	13	27	18	5	13
Ankle joint	17	2	15	21	2	19
Shoulder joint	9	4	5	30	4	26
Elbow joint	4	0	4	7	0	7
Total	152	92	60	147	76	71

Sympt: symptomatic (症候性) Asympt: asymptomatic (無症候性) #: number (数)

多発性骨壊死と特徴

表4は、WB-MRI で検出された多発性骨壊死と3箇所未満の骨壊死症例の臨床情報を比較したものである。多発性骨壊死の全患者に、ステロイド治療歴がみられ、3箇所未満の骨壊死症例よりもステロイド使用率が高かったが($P = 0.035$)、ステロイドパルス療法歴とステロイド最大使用量には両群間に有意差はなかった。血液疾患患者では、多発性骨壊死の割合が多くみられた($P = 0.015$)。また、年齢、性別、アルコール過剰摂取、喫煙状況にも両群間に有意差はなかった。

表4 多発性骨壊死と3箇所未満の骨壊死の比較

	Multifocal ON (N = 12)	Oligofocal ON (N = 34)	P-value
Age, years	42.6 (12.2)	48.7 (16.9)	0.875
Sex, male: female	4:8	15:19	0.179
Steroid use, cases	12	24	0.034
Steroid pulse therapy, cases	6	9	0.135
Mean maximum steroid dose, mg	58.0 (20.1)	47.5 (15.8)	0.198
Collagen disease, cases	6	15	0.725
Hematologic disease, cases	4	2	0.015
Alcohol abuse, cases	5	14	0.976
Smoking, cases	6	22	0.370

数値は平均値(標準偏差)で表示 ON:osteonecrosis(骨壊死)

WB-BS

一方、WB-BS では、股関節 71 関節 46 例、膝関節 18 関節 16 例、足関節 21 関節 13 例、肩関節 30 関節 16 例、肘関節 7 関節 5 例で取り込み病変を検出した(表 2)。股関節の骨壊死検出は WB-MRI と WB-BS の一致度が中程度で同等であったが、膝、足関節、肩、肘関節については一致度が低かった(表 2)(図 1)。WB-BS は 76/147 関節(51.7%)で症候性の取込み病変を検出した(表 3)。WB-BS では WB-MRI で検出された症候性骨壊死を 82.6%(76/92)の関節で取込み病変として検出したが、WB-MRI で検出された無症候性骨壊死は 21.7%(13/60)の関節でしか取り込み病変として検出できなかった。

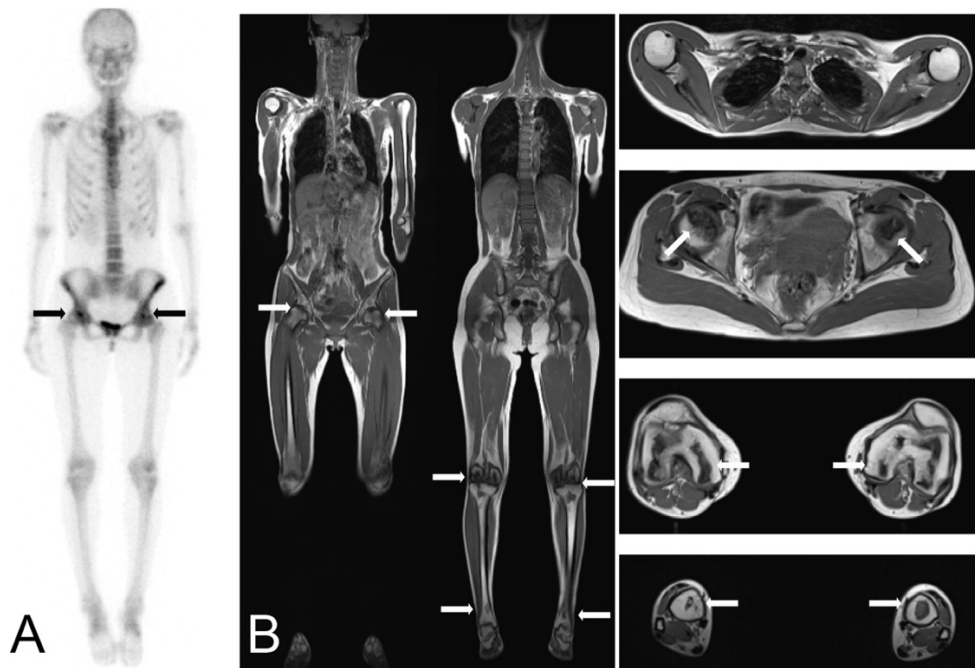


図 1 強皮症でステロイド使用歴のある 38 歳の女性における両側の股関節、膝関節、足関節の骨壊死 A 全身骨シンチグラフィー。矢印は両側股関節の取込み領域を示す。 B coronal および axial 全身 MRI。矢印は両側の股関節、膝関節、足関節の骨壊変部位を示す。

検者間誤差

WB-MRI および WB-BS による骨壊死検出における 2 名の評価者の検者間誤差はそれぞれ 0.742 (良好) および 0.554 (中程度) であった。同じ患者について診断が異なる場合、放射線科医と整形外科医は、その部位を骨壊死として診断するかを討議し最終的に同意して決定がなされた。

考察

本研究では WB-MRI と WB-BS による骨壊死の検出を比較した。本研究の限界は、確定診断のための骨生検を行わなかったことであり、本研究では各モダリティの感度および特異性を評価できなかった点である。しかし、これまでの研究で、MRI は骨壊死の診断とその重症度の評価において、高い特異度と感度を持つゴールドスタンダードであると報告されていることを考慮すると(Fordyce and Solomon, 1993; Petrigliano and Lieberman, 2007)、WB-MRI は多発性骨壊死のスクリーニングに有用で精確なツールであると考えられる。今回の研究では、WB-BS は WB-MRI による検出症例の 80%以上で下肢の症候性骨壊死を検出できたが、上肢の無症候性骨壊死の検出にはあまり有効ではないことが判明した。これらの結果から、WB-BS は、圧潰前に"cold-in-hot"を呈す股関節以外の関節の骨壊死を検出することに有効ではないことが示唆された(Sugano et al., 1999)。過去の研究では、肩、股関節、膝、足関節のピンポイント骨スキャンの有効性が示されているものの(Sakai et al., 2001)、WB-BS は無症候性骨壊死を含む多発性骨壊死のスクリーニングに十分な解像度であるとは考えにくい。最近の研究では、圧潰前の骨壊死に対して、成長因子などを用いた再生治療が有効であることが示されている(Kuroda et al., 2016; Tomaru et al., 2017)。したがって、無症候性骨壊死の早期診断が今後さらに重要となってくると考えられる。また、検査時間(WB-MRI:20-30 分、WB-BS:注入後 4 時間)、費用(WB-MRI:200 ドル、WB-BS:500 ドル)、放射線被曝を考慮すると、骨壊死のスクリーニングに WB-BS を使用することは慎重に検討されるべきであると思われる。

本研究では、多発性壊死患者の臨床的特徴についても検討した。本研究における多発性壊死の発生率(26.0%)は、以前に報告されたものよりも高かった(LaPorte et al., 1998; An et al., 2019)。この相違は、WB-MRI の感度が高く、無症状の壊死を検出できることに起因している可能性がある。WB-MRI は、最近、多発性筋炎/皮膚筋炎患者の 20%(15 人中 3 人)(Zhen-Guo et al., 2017)、化学療法を受けたホジキンリンパ腫患者の 86%(7 人中 6 人)で多発性壊死を検出したと報告されている(Albano et al., 2017a)。これらの報告と一致するように、今回の研究では、血液疾患を有する ONFH 患者が高い頻度で多発性壊死を有していることが示された。全身性エリテマトーデスを含む結合組織疾患、腎移植、白血病、HIV、凝固障害、鎌状赤血球症などの臨床的危険因子がある場合、多発性壊死の発生率は高い(An et al., 2019; González García et al., 2012; Sun et al., 2016)。今回の研究では、さまざまな合併症と症候性 ONFH を持つ患者が含まれているため、今後の研究では、各併存症を持つ患者の多発性壊死の発生率を調査する必要がある。

先行研究(El Gamal et al., 2016)と同様に、本研究では、ステロイド関連 ONFH 症例に多発

性骨壊死が発生することが示された。Zhangらの報告に反して、我々は、多発性壊死と3箇所未満の骨壊死の患者の間で、最大ステロイド投与量に有意差を認めなかった(Zhang et al., 2008)。これは、Zhangらが重症急性呼吸器症候群の患者を研究対象としていたため、対象患者の相違によるものの可能性が考えられる。したがって、今後の研究では、多発性壊死の発生率とステロイド使用などの関連する危険因子との関連についても、統一した条件下で調査する必要がある。

本研究にはいくつかの研究限界があった。第一に、サンプルサイズが小さく、多発性壊死と他の様々な併存疾患を持つ患者を含んでいたことである。多発性壊死の危険因子を検出するために、WB-MRIを用いたより大規模で縦断的なコホート研究を実施する必要がある。第二に、本研究では骨生検や病理学的な検証を行っていない。SIFやRDCなどの他の疾患が壊死と誤診された可能性がある。第三に、本研究は、外科的処置のために入院した症候性ONFH患者のみを対象として実施されたものであるためし、選択バイアスも存在する。

結論として、WB-MRIで検出された無症候性骨壊死は、症候性骨壊死に比べ、WB-BSでは検出困難である可能性があり、コスト、検査時間、放射線被曝を考慮すると、WB-MRIが多発性骨壊死の評価に有用であることが示唆された。WB-MRIを用いることで、これまでよりも短時間で低侵襲にスクリーニングが可能になることから、これまで診断できていなかった無症候性骨壊死を数多く診断し、骨壊死についての臨床像やリスク因子の評価研究に大きく寄与することができ、難病とされる骨壊死の病態解明の基盤となるものである。

第二章

骨折を基盤として関節変性をきたす病態解明

—SIF が関節変性に与える影響—

緒言

SIF は、近年、ONFH の鑑別疾患であり、大腿骨頭圧潰の原因として認識され、股関節の変性につながる事が知られている(Bangil et al., 1996; Yamamoto and Bullough, 1999; Yamamoto et al., 2000)。SIF の正確な有病率は不明であるが、病理組織学的な再評価を行った過去の研究では、術前に OA と診断された患者の 6.3% (7349 例中 460 例)、ONFH 患者の 11.1% (369 例中 41 例) に SIF が観察されることが示されている(Yamamoto et al., 2008)。SIF は、安静、非荷重、牽引などの保存療法で治癒する症例もあるが(Bangil et al., 1996; Rafii et al., 1997; Hagino et al., 1999)、THA などの手術が必要な圧潰例も多数報告されている(Yamamoto and Bullough, 1999; Yamamoto et al., 2000; Motomura et al., 2002; Sonoda et al., 2017)。一方、原発性 OA の原因が軟骨下骨の変化に関係しているという報告があるが(Suri and Walsh, 2012; Li et al., 2013)、SIF が股関節の変性に与える影響や SIF の関節変性に関する予後因子は不明である。

SIF は年齢や活動レベルの異なる成人において報告されており(Yamamoto et al., 2007; Iwasaki et al., 2011; Yoon et al., 2014)、これまでの研究では、THA の危険因子は、女性(Yamamoto et al., 2014)、高齢発症(Miyanishi et al., 2010)、長さ(Iwasaki et al., 2012)、部位(Iwasaki et al., 2016)、バンドパターン(Sonoda et al., 2016)と報告されている。一方、骨粗鬆症による骨脆弱化は SIF の最も重要な原因と考えられるが(Yamamoto, 2012)、別の研究では SIF とコントロールの間で骨密度測定(bone mass densitometry: BMD)に差がないと報告されている(Ishihara et al., 2010)。骨強度は、骨量、形状、骨代謝、骨微小構造、および石灰化の程度と分布を含む骨質によって決定される(Ammann and Rizzoli, 2003)。ある報告では、骨折の修復過程を通じて骨代謝マーカーのレベルが変化し、それは骨折の大きさと治癒時間に依存すると報告されている(Cox et al., 2010)。

本研究では、(1) SIF は関節腔裂隙の狭小化を誘発して OA を生じる、(2) 骨代謝異常と MRI 所見は SIF の予後を予測し、重症度を反映しうる、という仮説をたて、(1) SIF 発生後の関節裂隙の自然経過を調べること、(2) 関節裂隙の狭小化と骨代謝マーカーおよび MRI 所見の関連性を調べることを本研究の目的とした。

方法

対象患者

本後ろ向き研究は、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会(#015-0206)により承認されたものである。2010年1月から2019年12月の間に北海道大学病院を受診し、MRIで大腿骨頭のバンドパターンを認めた患者238名(401股関節)のうち、44例47股関節(男性10例、女性34例)がSIFと診断された。診断基準は過去に報告されている基準に基づいて(Yamamoto and Bullough, 1999; Yamamoto et al., 2001; Yamamoto et al., 2002)、明らかな外傷歴なく発現した股関節痛、X線で正常または大腿骨頭の圧潰、関節裂隙狭小化、および/または大腿骨頭上部の帯状硬化を示すもの、MRIで大腿骨頭および/または頸部の骨髄浮腫、MRIのT1WIで関節面に凸で軟骨下骨と平行にみられる低信号バンドパターンが認められるものとした。ガドリニウム造影MRIの造影効果で、SIFとONFHを鑑別した。本研究では、臼蓋(acetabular: AC)を含む急速な関節破壊を示した3例3関節は除外した。

保存加療

SIFと診断された患者のうち、股関節痛後3ヶ月以内に診断できた患者は、6週間松葉杖での非荷重を指導され(Ikemura et al., 2016)、2週間ごとに外来通院診療が行われた。診断が遅れたもの、コンプライアンスが悪い患者には、保存療法を行うことはできなかった。

患者臨床データ

年齢、性別、体格指数(body mass index: BMI)などの患者データ、発症から初診までの期間、ステロイド投与歴やアルコール過剰摂取、骨粗鬆症治療薬の使用に関するデータは、カルテから収集された。保存療法が可能な患者、およびフォローアップ期間内にTHAが必要とされた患者に関するデータも同様に収集した。THAの適応は、非ステロイド性抗炎症薬の服用にかかわらず、持続的な痛みと日常生活動作の障害がある症例とした。アルコール過剰摂取は、ONFHの危険因子として報告されている週400mL以上のアルコール摂取と定義された(Matsuo et al., 1988)。

X線評価

X線写真の撮影は、研究期間を通して同様の手法で行われた。標準化されたビーム位置とX線透過率が採用された。全患者のX線写真は、画像保存通信システム(picture archiving and communication system: PACS)を使用して、前後方向で評価された。本研究では、初診時のCE(center-edge)角と縦方向の関節裂隙(joint space width: JSW)を調査した(図2A)。JSW解析では、AC関節面と大腿骨頭部に任意に設定した3点を通過する同心

円を描いた(図 2A の円 A、円 B)。それぞれの円の交点と、両側の涙痕を結ぶ線(図 2A の線 A)に対して垂直に大腿骨頭の中心を通る線(図 2A の O)間の距離を測定した。2 名の評価者の間で JSW の検者間誤差は 0.768 であった。

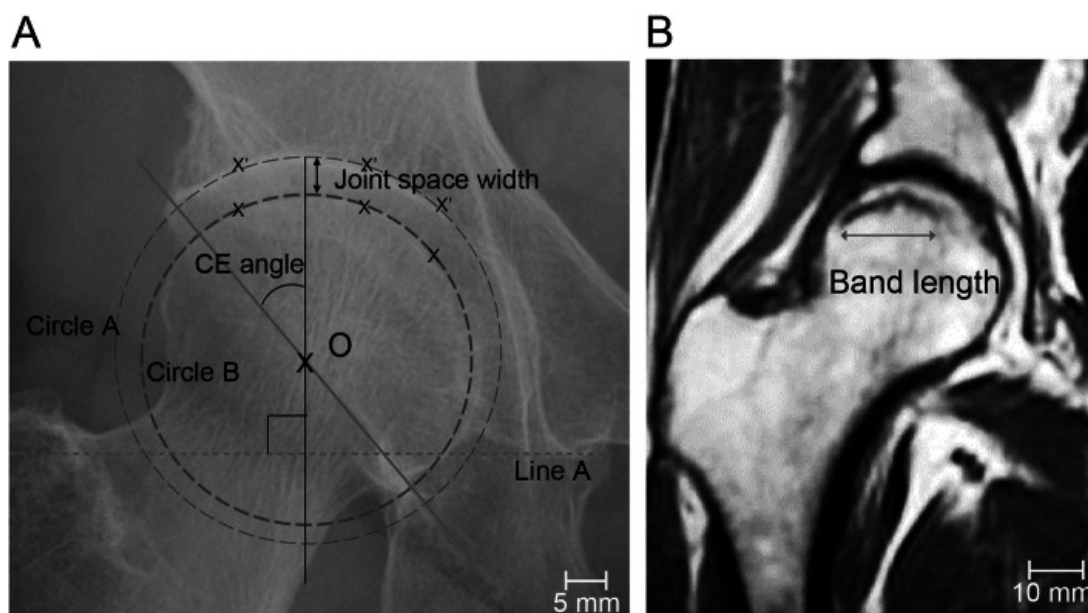


図 2 X 線評価 A 股関節の評価に使用した X 線指標を示す。O=大腿骨頭の中心、線 A=両側の涙点を結ぶ線、円 A=臼蓋関節面に任意に設定した 3 点を通る円、円 B=大腿骨頭に任意に設定した 3 点を通る円。B MRI の T1WI で、低信号のバンド長の測定。スケールバー:10mm。CE:center-edge

MRI 評価

本研究では、初診後 1 週間以内に 1.5T システムで、5mm スライス厚にて MRI 検査を行った。T1WI、T2 強調像(T2-weighted imaging: T2WI)と short tau inversion recovery (STIR) を coronal、axial 断面にて全例に施行した。バンド長は、過去の報告と同様に、T1WI coronal で最も長いバンドが検出されたスライスで測定した(Iwasaki et al., 2012)(図 2b)。評価者 2 名の間でバンド長の検者間誤差は 0.836 であった。

骨代謝マーカー

骨粗鬆症に関連した骨代謝の生化学的マーカーを調べるため、空腹時採血を行い、intact type 1 procollagen-N-propeptide (P1NP) および tartrate resistant acid phosphatase-5b (TRACP-5b)を調べた。CTX-1 (cross-linked C-terminal telopeptides of type I collagen)や NTX-1 (cross-linked N-telopeptide of type I collagen)などの I 型コラーゲン由来のペプチドは腎臓から排泄されるため、腎機能障害により影響を受ける可能性があり、本研究では、

PINP と TRACP-5b の血清レベルを検討した。血清 PINP は Electrochemiluminescence immunoassay で、血清 TRACP-5b は enzyme immunoassay (株式会社エスアールエル) で、MRI 施行により診断が確定した後に測定された。

骨密度(bone mass densitometry: BMD)

腰椎(LS、L2-L4)および大腿骨頸部の BMD は DXA (Discovery A、Hologic Japan) により、MRI 施行により診断が確定した後に測定された。

統計解析

THA を要した患者と保存的治療で治癒した患者の差、および荷重制限を遵守できた患者とできなかった患者の差を比較するために、カイ二乗検定または独立 t 検定を使用した。THA のリスク因子を特定するために Cox 回帰分析が行われた。線形回帰モデルは年齢、性別、BMI、骨粗鬆症治療で調整した。さらに、JSW、バンド長、骨代謝マーカースの変化との関連を明らかにするため、発症から診断までの期間を設定した。統計解析はすべて SPSS Statistics version 23.0 (IBM Corporation, Armonk) を用いて行い、p 値 0.05 未満を統計学的に有意とした。

結果

患者臨床データ

患者の臨床データを表 5 に示す。44 関節中 18 関節が 6 週間の荷重制限を完遂することができた。荷重制限を完遂できなかった 6 関節は診断遅延症例である。骨粗鬆症療治療を受けた 7 例のうち、1 例はミドロン酸を毎月投与し、他は活性型ビタミン D3 による治療を行っていた。股関節 44 関節中 15 関節 (14 例) が THA を要した。SIF の診断から THA までの平均期間は 10.5 ヶ月 (範囲;2-54 ヶ月) であった。10 関節 (9 例) に寛骨臼形成不全 (CE < 20 度) を認めた。

表 5 患者臨床データ

41 patients, 44 hips	
Age, years	61.6 (2.3)
Sex, male: female	8: 33
Body mass index, kg/m ²	25.5 (0.8)
Period from onset to first visit, months	2.2 (0.4)
Follow-up period, months	26.6 (2.3)
Glucocorticoid use, cases	9
Alcohol abuse, cases	6
Anti-osteoporosis therapy, cases	7
Weight-bearing limitation, hips	18
Total hip arthroplasty, hips	15

数値は平均値 (標準誤差) で表示

JSW の変化

患側の JSW は、初診時から最終フォローアップの間で有意に減少した ($P < 0.001$) (図 3)。健側では、初診時から最終フォローアップ時まで、JSW に有意な差は認められなかった。患側 JSW の変化は、バンド長 ($\beta = 0.499$, $P < 0.001$) (図 4A)、血清 P1NP (図 4B) ($\beta = 0.564$, $P < 0.001$)、TRACP-5b (図 4C) ($\beta = 0.452$, $P = 0.004$) と関連していた。さらに、血清 P1NP と TRACP-5b のレベルは、バンド長と関連する傾向があった (それぞれ $\beta = 0.376$, $P = 0.035$, および $\beta = 0.268$, $P = 0.140$) (Fig. 5A, B)。

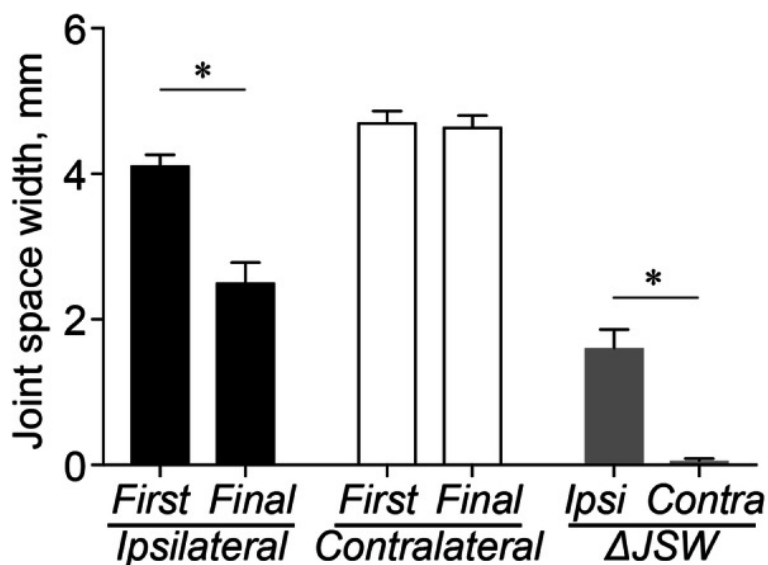


図 3 関節裂隙の幅 (joint space width: JSW) の比較。

患側 (Ipsilateral) と健側 (Contralateral) の平均 JSW と初診時 (First) から最終フォローアップ (Final) 時までの JSW の変化。*: $P < 0.05$

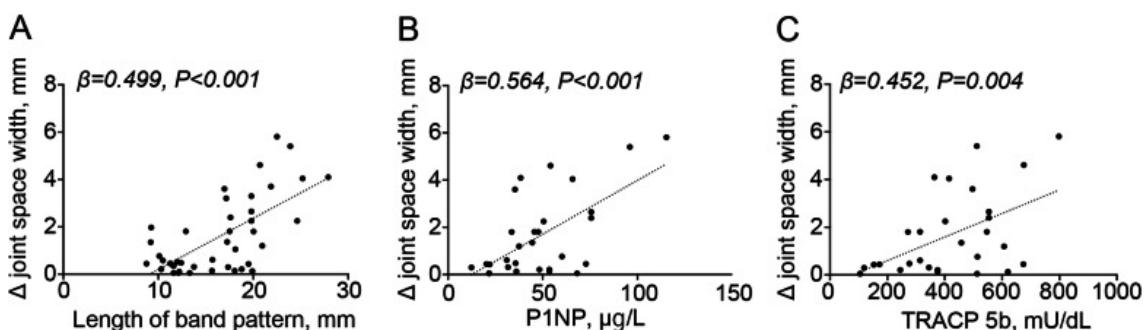


図 4 関節裂隙の幅 (joint space width: JSW) の変化との関連性。

a バンド長、 b P1NP、 c TRACP-5b に対する JSW 変化の散布図。

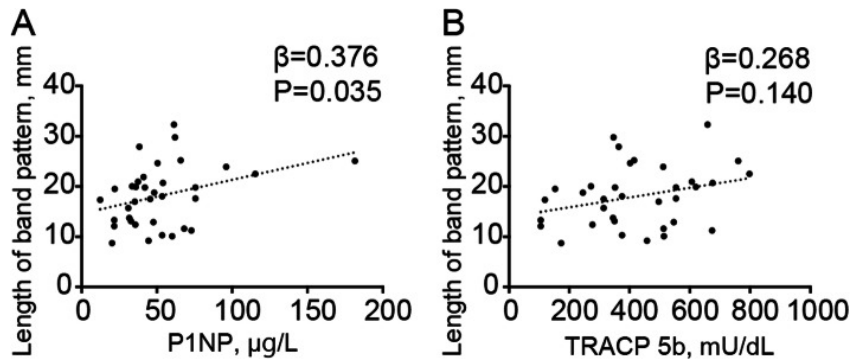


図5 バンド長と骨代謝マーカースとの関連性。

a P1NP b TRACP-5 に対するバンド長の散布図。

非荷重保存加療

荷重制限を完遂できた患者(非荷重完遂群: WB limitation)とできなかった患者(非荷重非完遂群: Non-WB limitation)の臨床・X線所見の比較を表6に示した。WB limitation群はNon-WB limitation群に比べ、若年、疼痛発生から受診までの期間が短く、THA率が低く、JSWの変化も小さかった。

表6 荷重制限完遂と非完遂群の比較

	WB limitation (18 hips)	Non-WB limitation (26 hips)	P value
Male: Female	5:13	3:23	0.170
Age, years	53.8 (4.3)	67.2 (2.0)	0.003
BMI, kg/m ²	26.4 (1.8)	25.1 (1.1)	0.525
Period from pain onset to visit, months	1.1 (0.2)	2.5 (0.4)	0.008
Osteoporosis therapy, case (%)	1 (5.6 %)	6 (22.2 %)	0.118
Total hip arthroplasty, case (%)	3 (16.7%)	12 (46.2%)	0.042
Radiography findings			
JSW at the first visit, mm	4.15 (0.19)	4.25 (0.21)	0.785
Changes in JSW, mm	1.12 (0.36)	2.24 (0.36)	0.039

Center-edge angle, degree	25.9 (1.6)	24.2 (1.4)	0.428
---------------------------	------------	------------	-------

WB: weight-bearing (荷重) BMI: body mass index (ボディマス指数) JSW: joint space width (関節裂隙幅) 数値は平均値(標準誤差)で表示

THA 例の特徴

THA を受けた患者 (THA 群) と受けなかった患者 (非 THA 群) の臨床所見、画像評価、骨代謝マーカーの比較を表 7 に示した。非 THA 群は THA 群に比べ、若年 ($P = 0.028$)、疼痛発症から受診までの期間 ($P = 0.002$)、荷重制限の割合 ($P = 0.042$) が高かった。初診時の JSW と CE 角は、両群間に有意差は認められなかった。THA 群では、初診時から最終フォローアップ時まで の JSW の変化が非 THA 群よりも有意に大きかった ($P < 0.001$) (図 6A、C、D、F)。また、THA 群は非 THA 群に比べ、バンド長が長く ($P < 0.001$) (図 6B、E)、バンドが AC 端を超える割合が高く ($P = 0.006$)、AC に信号変化をきたす割合が有意に大きい ($P < 0.001$) ことが確認された。BMD では両群間に有意差は認められなかったが、THA 群では非 THA 群に比べ P1NP ($P = 0.002$)、TRACP-5b ($P = 0.001$) レベルが高かった。

表 7 THA 施行例と未施行例の比較

	THA (15 hips)	Non-THA (29 hips)	P value
Male: Female	3:12	5:24	0.822
Age, years	69.6 (2.2)	57.8 (3.1)	0.014
BMI, kg/m ²	24.9 (1.5)	26.0 (1.4)	0.593
Osteoporosis therapy, case (%)	2 (13.3 %)	5 (17.2 %)	0.737
Period from pain onset to diagnosis, months	3.8 (1.0)	1.3 (0.2)	0.002
Weight-bearing limitation, case (%)	3 (20.0 %)	15 (51.7 %)	0.042
Radiography findings			
JSW at the first visit, mm	4.26 (0.28)	4.18 (0.18)	0.793
Changes in JSW, mm	3.79 (0.36)	0.75 (0.15)	<0.001

Center-edge angle, degree	25.3 (1.6)	24.7 (1.4)	0.786
MRI findings			
Band length, mm	23.3 (1.1)	14.2 (0.7)	<0.001
Band over the edge of AC, case (%)	10 (66.7 %)	7 (24.1 %)	0.006
Intensity change of AC, case (%)	14 (93.3 %)	6 (20.7 %)	<0.001
YAM, %			
Lumbar	93.9 (4.8)	92.6 (3.6)	0.824
Femoral neck	80.2 (2.7)	82.0 (2.3)	0.632
Bone metabolic marker			
P1NP, µg/ml	73.0 (11.1)	39.7 (3.7)	0.002
TRACP-5b, mU/dL	549.7 (40.6)	342.4 (38.1)	0.001

THA: total hip arthroplasty (人工股関節全置換術) BMI: body mass index (ボディマス指数)
AC: acetabulum (寛骨臼) YAM: young adult mean (若年成人平均値)

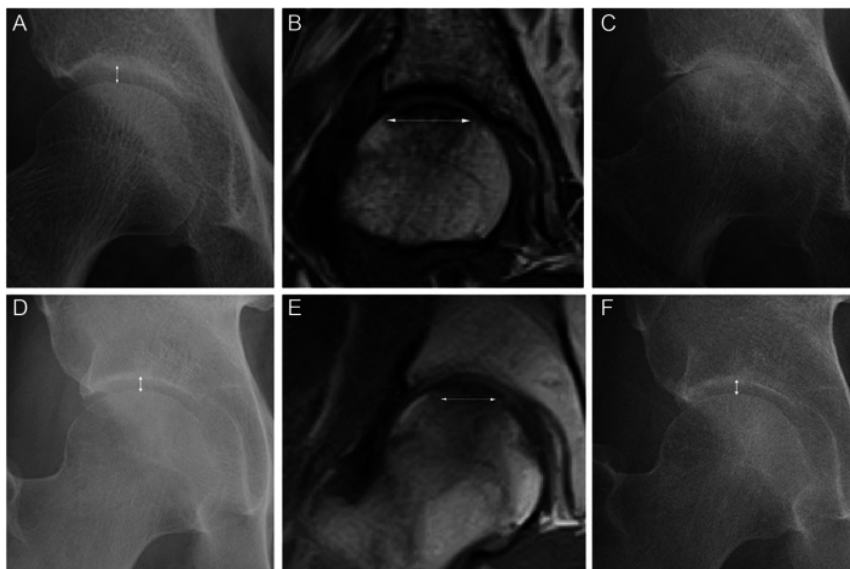


図6 A 股関節痛を有する68歳女性の初診時の股関節X線写真。B 同じ週の股関節のT1WI (MRI)画像。C 最終フォローアップ時の股関節X線写真。D 股関節痛を有する47歳男性の初診時の股関節X線写真。E 同じ週の股関節のT1WI (MRI)画像。F 最終フォ

ローアップ時(初診から3年後)の股関節X線写真。関節裂隙狭小化の進行は見られない。

THA のリスク因子

単変量解析では、年齢、疼痛発生から受診までの期間、MRI 所見、骨代謝マーカーが THA の予測因子として同定された。さらに、年齢、性別、BMI、骨粗鬆症治療、発症から受診までの期間を調整した Cox 比例ハザードモデルでも、MRI 所見が THA を予測する因子となった(表 8)(図 7)。

表 8 SIF における THA 予測因子に関する単変量および多変量 Cox 回帰分析

Variables	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	P value	HR	95% CI	P value	HR	95% CI
Sex	0.493	1.56	0.438-5.557			
Age	0.020	1.07	1.011-1.129			
BMI	0.659	0.98	0.889-1.077			
Osteoporosis therapy	0.665	0.72	0.161-3.208			
Period from onset to diagnosis	0.021	1.28	1.038-1.578			
Weight-bearing limitation	0.107	0.35	0.099-1.251	0.581	0.66	0.151-2.888
MRI findings						
Band length	<0.001	1.30	1.152-1.455	0.001	1.34	1.130-1.590
Band over the edge of AC	0.014	3.87	1.317-11.375	0.027	4.08	1.172-14.223
Intensity change of AC	0.001	28.85	3.677-226.286	0.004	23.85	2.684-211.877
Bone metabolic marker						
P1NP, µg/ml	0.018	1.013	1.002-1.024	0.098	1.01	0.998-1.024
TRACP-5b, mU/dL	0.007	1.005	1.001-1.008	0.116	1.00	0.999-1.007

多変量解析では、年齢、性別、骨粗鬆症治療、疼痛発現からの期間を調整した。

HR: hazard ratio (ハザード比) CI: confidence interval (信頼区間)

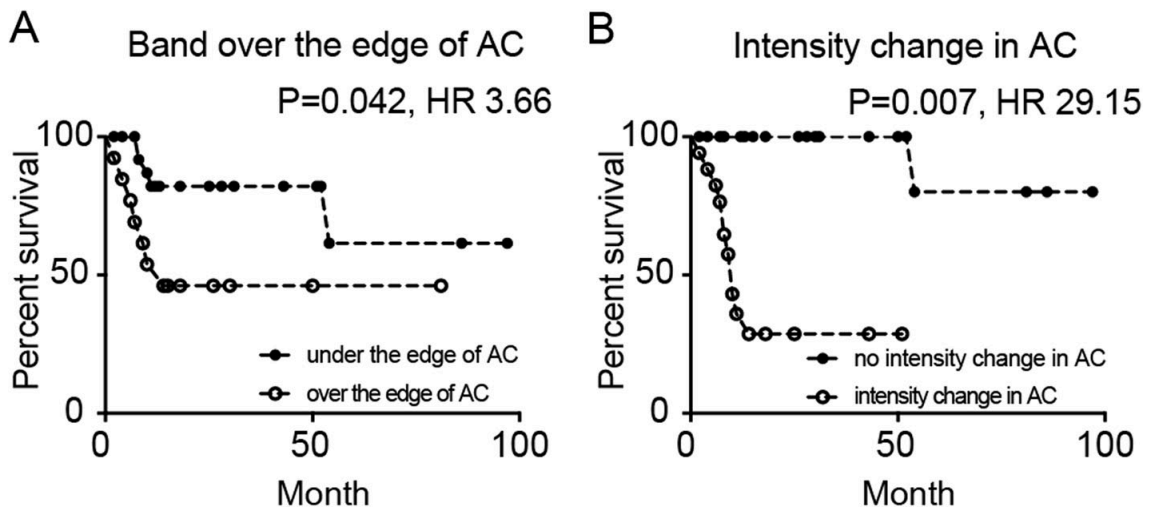


図7 THA 施行をエンドポイントとする Kaplan-Meier 曲線。

A. MRI のバンドパターンが寛骨臼外縁を超えるものと超えないものの比較。 B. MRI のバンドパターンが寛骨臼外縁を超えないもので、寛骨臼側の信号変化の有無での比較。

AC: acetabulum (寛骨臼) HR: hazard ratio (ハザード比)

考察

本研究では、SIF は JSW が初診時から最終フォローアップ時まで有意に減少し、約 3 分の 1 の患者が THA を要した。これは、SIF が関節裂隙狭小化を経て関節に変性変化を生じて OA の原因となりうることを示唆している。SIF は荷重負荷の制限により治癒する症例もあるため(Yamamoto and Bullough, 1999; Vande Berg et al., 1994; Song et al., 2004)、すべての患者において保存療法が第一選択であると思われる。本研究の多変量 Cox 回帰分析では、荷重制限は THA を防ぐことはできないが、関節裂隙狭小化の進行を抑えることができることが示された。さらに、非荷重完遂群と非完遂群で年齢や疼痛発生から受診までの期間が有意に異なることを考慮すると、SIF では早期発見、治療が重要であることが明らかである。高齢で視力やバランスが低下しているなど、非荷重のために外来ではなく入院での治療も検討する必要があると考えられる。

本研究の結果、骨代謝マーカーとバンド長が JSW の変化と関連しており、これらのパラメータが SIF 患者の関節圧潰の予測因子となる可能性が示唆された。本研究の MRI 所見は、臨床転帰と MRI の関連性に関する過去の報告(Iwasaki et al., 2016; Ikemura et al., 2016)と一致しており、診断時のバンド長や信号変化の位置などの MRI 所見は、圧潰の予後予測だけでなく関節変性の高い予後予測指標となる可能性が示唆された。また、血清 P1NP と TRACP-5b は関節裂隙狭小化と関連しており、骨代謝マーカーのレベルが SIF 患者の OA 予測因子となる可能性が示唆された。血清 P1NP と TRACP-5b はバンド長と関連する傾向があることを考えると、骨代謝マーカーは骨折の重症度を反映している可能性がある。一方、本研究では血清 P1NP と TRACP-5b のみを調査したため、今後、骨特異的アルカリホスファターゼ、オステオカルシン、CTX-1 および NTX-1 などの他の骨代謝マーカーと SIF 患者の関節裂隙狭小化との関連について検討する必要があると思われる。

多くのグループが骨粗鬆症患者における SIF の発生を報告しているが(Bangil et al., 1996; Yamamoto and Bullough, 1999; Hagino et al., 1999; Motomura et al., 2002)、本研究では平均 BMD は骨粗鬆症の診断基準を満たさなかった。また、若年成人や青年を対象としたいくつかの報告では、活動レベルが SIF の発生に関連していなかったとされている(Iwasaki et al., 2011; Ishizu et al., 2022)。したがって、SIF 患者における骨粗鬆症に関連した発生メカニズムや関節裂隙狭小化については、依然として不明な点が多い。これまでの報告とは異なり、本研究で検証された平均 CE 角は、寛骨臼形成不全の基準($CE < 20^\circ$)を満たしていない(Ishihara et al., 2010)。さらに、本研究における CE 角は、JSW の変化や臨床転帰と関連しなかった。最近の研究では、SIF は骨形態変形や臼蓋関節唇損傷と関連することが報告されている(Uchida et al., 2018)。したがって、寛骨臼形成不全や大腿骨臼蓋インピンジメ

ントなどの異常な形態によって引き起こされる股関節の不安定性は、SIF の発生と予後に影響を与える可能性がある。本研究では臼蓋関節唇損傷について調査していないが、今後の研究では関節唇損傷と SIF の予後との関連について検討する必要がある。

本研究にはいくつかの限界がある。第一は、SIF の発生時期である。SIF は通常、外傷の既往がなく発生するため、正確な発生時期を明らかにすることは困難である。第二は、JSW の測定方法である。本研究では、図2 に示す手法に従って JSW を検討し、この手法は再現性が高いと判断した。しかし、今後の研究では、コンピュータを用いた X 線定量法による JSW の測定に取り組む必要がある。第三に、JSW の追跡期間が短い(平均 25.4 ヶ月)ことである。したがって、今後、より長い追跡期間において、予後予測因子と JSW の変化との関係を検証する研究が必要である。

結論として、SIF は関節裂隙狭小化および OA の原因となりうる。SIF の予後予測因子としての MRI 所見に加え、先に述べたように、骨代謝マーカーも JSW の変化と同様に関連しており、これらのパラメータが SIF の予後予測に有用であることが示唆された。骨代謝マーカーはバンド長と関連する傾向があることを考えると、局所の重症度を反映している可能性がある。

第三章

骨折を基盤として関節破壊をきたす疾患の病態解明

—RDC における NLRP3 インフラマソームを介した高度滑膜炎関与の検証—

緒言

RDC は、1970 年に初めて報告された原因不明の希少疾患である(Postel and Kerboul, 1970)。X 線写真上正常と思われる早期から痛みを中心とした臨床症状が現れ、MRI では大腿骨側のみに異常信号変化がみられるが、進行とともに大腿骨頭と寛骨臼両方の病的骨吸収を伴って関節全体が破壊され、症状が増強する。股関節破壊の進行は、脚短縮や激しい痛みを生じて日常生活動作の制限を伴い(Lequesne, 1970)、保存療法では治療困難で、THA が唯一の治療法となる(Kuo et al., 2009)。

RDC の詳細な病態は不明であるが、初期の MRI 所見と一致して、SIF を契機として RDC を生じることが提唱されている(Yamamoto and Bullough, 2000)。さらに、滑膜炎の炎症が RDC の病態に関与することが近年報告されており(Menkes et al., 1976)、これらの知見は、RDC の X 線写真の特徴が、大腿骨側の病変である SIF を契機としながら、大腿骨頭と寛骨臼の両方で起こる急速な骨吸収で、敗血症性関節炎や RA に伴う炎症性骨溶解と類似する点とも合致する(Shu et al., 2014; Hart and Fehring, 2016)。

自然免疫細胞は、外的環境因子によるダメージを感知し、nod-like receptor family protein 3(NLRP3)インフラマソームや nuclear factor-kappa B (NF- κ B)シグナルを刺激して慢性炎症を引き起こすことが知られている(Lamkanfi and Dixit, 2014)。これは、カスパーゼ-1 の活性化につながり、その後の炎症性サイトカイン interleukin (IL)-1 β や IL-18 の活性化を促進する。活性化されたカスパーゼ-1 は、ガスデルミン D (gasdermin D: GSDMD)を切断することによってパイロプトーシスとして知られる細胞死を誘発し、その結果、細胞膜に溶解孔を形成し、最終的に細胞膜の透過性バリアの破壊と細胞内内容物の放出を引き起こす(Bergsbaken et al., 2009)。パイロプトーシスを生じた細胞から放出される炎症性分子は滑膜炎の機能を変化させ、関節の軟骨や骨の代謝を障害する(Hamasaki et al., 2021)。OA、RA、痛風関節炎などでは、NLRP3 インフラマソームシグナルによって活性化された滑膜炎の関与が報告されており(Spel and Martinon, 2020)、RDC の発症と進行における NLRP3 インフラマソームシグナルの役割を検証することは、RDC の病態解明につながると考えられる。

本研究の目的は、RDC 進行における NLRP3 インフラマソームシグナル関与の可能性を検証するために、RDC 滑膜炎を採取し OA や ONFH における滑膜炎と比較検討することである。

方法

対象患者

本研究は、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会(#020-0059)に従って実施された。すべての患者はこの研究について説明を受け、公表に同意した。本研究では、2018年9月から2021年3月までに有症状のOA、ONFHまたはRDCを有し、THAを受けた患者計218名を対象とした。136名のOA患者のうち、骨切り術後(N=7)、大腿骨短縮骨切り術併用(N=4)、Kellgren and Lawrence(KL)グレード4例(N=90)に分類されるもの、また研究参加を拒否したその他の9例など110例が除外された。ONFH患者については、両股関節罹患の患者(N=4)、骨切り術後の患者(N=4)、滑膜炎を認めない患者(N=4)、研究への参加を拒否したその他の患者(N=4)、計16例が除外された。RDCは合計12名の患者が本研究に登録された。このようにして、OA(n=26)、ONFH(n=26)、RDC(n=12)の合計64名が最終的に研究対象となり、検証を行なった。診断名、年齢、性別、体格指数(BMI)、ステロイド投与歴、アルコール過剰摂取、喫煙などの患者データは、医療記録から入手した(表9)。腰椎(LS, L2-L4)と大腿骨頸部の骨密度(BMD)を二重エネルギーX線吸収法(DXA;Discovery A, Hologic社, 東京, 日本)により評価した。

表9 患者臨床データ

	OA (N=26)	ONFH (N=26)	RDC (N=12)	OA vs ONFH	ONFH vs RDC	OA vs RDC
Age (years)	66.8±1.8	54.4±2.4	75.0±2.5	p<0.001	p<0.001	p=0.075
Sex M:F	8:20	12:14	5:7	p=0.080	p=0.080	p=0.240
BMI (kg/m ²)	27.2±0.93	24.3±0.87	22.0±0.90	p=0.030	p=0.353	p=0.003
PINP (mg/mL)	52.5±5.6	46.4±7.0	94.2±16	p=0.821	p<0.001	p=0.005
TRACP-5b (mU/dL)	457±32	424±41	564±47	p=0.117	p=0.006	p=0.233
WB (Cell/mL)	6050±326	7135±414	6250±733	p=0.140	p=0.429	p=0.957
CRP (mg/dL)	0.13±0.03	0.35±0.16	0.38±0.11	p=0.338	p=0.988	p=0.414
HbA1c %	6.1±0.15	5.5±0.10	5.7±0.13	p=0.004	p=0.556	p=0.248
BMD(L) (g/cm ²)	1.01±0.04	0.90±0.04	0.81±0.05	p=0.170	p=0.337	p=0.015
BMD(FN) (g/cm ²)	0.73±0.03	0.72±0.04	0.60±0.04	p=0.983	p=0.150	p=0.121

Hypertension	17 (65.4%)	2 (7.7%)	5 (41.7%)	p<0.001	p=0.012	p=0.169
Hyperlipidaemia	10 (38.5%)	1 (3.9%)	3 (25.0%)	p=0.048	p<0.001	p=0.416
Diabetes mellitus	9 (37.5%)	1 (10%)	1 (8.3%)	p=0.003	p=0.565	p=0.065
Thyroid disease	5 (19.2%)	2 (7.7%)	1 (8.3%)	p=0.223	p=0.946	p=0.392
Steroid	7 (26.9%)	21(80.8%)	1 (8.3%)	p<0.001	p<0.001	p=0.191
Alcohol abuse	4 (15.4%)	9 (34.6%)	2 (16.7%)	p=0.109	p=0.256	p=0.920
Smoking	9 (37.5%)	18(69.2%)	6 (50.0%)	p=0.025	p=0.253	p=0.473

血液サンプル採取

手術前に患者から空腹時採血を行い、P1NP や TRACP-5b などの骨粗鬆症に関連する骨代謝マーカー、白血球 (white blood cell: WBC) や C-reactive protein (CRP) などの炎症指標、数ヶ月にわたる血糖値変化を反映する HbA1c を検査した。その後、血液サンプルを 3000×g、4°C で 30 分間遠心分離し、血清を採取して -80°C で保存した。

滑膜採取と組織染色

THA を受けた OA、ONFH、RDC 患者の股関節から滑膜組織を採取した。滑膜組織はホルマリンで固定、パラフィンに包埋し、ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin : HE, Wako) で染色するために 3 μm 厚のスライスに切り分けた。これらの標本を、tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP, Wako) (Blumer et al., 2012) 染色、および CD68 (Dako Agilent)、NF-κB p65 (Sigma-Aldrich)、NLRP3 (Novus Biologicals) および GSDMD (Cell signaling) 標的抗体を使用して染色した。シグナルは、horseradish peroxidase (HRP) 標識ストレプトアビジン特異抗体で増幅した後、HE で対比染色した。

滑膜組織からの滑膜細胞単離

OA、ONFH、RDC 患者の股関節から採取した滑膜組織を細かくきざみ、1% トリプシン ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 溶液 (GE Healthcare) で、37°C 恒温槽で 30 分間消化させ、滑膜細胞を単離した。分離した細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline: PBS) で洗浄し、10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS)、1% ペニシリン/ストレプトマイシン (penicillin-streptomycin: PS)、および 1% L-グルタミン (L-glutamic acid: L-Glu) を補充した alpha Modified Eagle Minimum Essential Medium (α-MEM) 含有成長培地に懸濁し、75 cm² 培養フラスコ中、加湿 5% CO₂ で 37°C において 5 日間培養を行った (Costar、

Cambridge)。培養液は毎日新鮮な培地を補充し、その都度付着した細胞を氷冷した PBS で 2 回洗浄した。5 日後、1% トリプシン EDTA 溶液で 5 分間処理し、氷冷 PBS で 3 回洗浄して接着細胞を回収した。細胞カウントし、 1×10^5 個の細胞をエッペンドルフチューブに入れ、RNA 抽出と遺伝子発現解析に用いた。コントロールとして、ヒト線維芽細胞様滑膜細胞 (human fibroblast-like synoviocytes: hFLS) (Cell Applications,) を使用した。滑膜細胞直接刺激モデルでは、hFLS を増殖培地で 3 継代まで維持し、その後 1.25×10^5 細胞を 24 ウェルプレート上に 2.5×10^5 細胞/ウェルの密度で播種した。リポポリサッカライド (lipopolysaccharide LPS; 100 ng/ml) + 100 mg/ml 水酸化アルミニウム (aluminium hydroxide: Alum, InvivoGen) またはアデノシン adenosine triphosphate (ATP) 5 mM (Thermo Scientific) で 3 時間処理し、NLRP3 インフラマソーム経路で細胞を刺激した。24 時間培養後、quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) による遺伝子発現解析のために hFLS を採取した。

qRT-PCR による遺伝子解析

同数の細胞を TRIzol (Invitrogen) で溶解し、クロロホルム (Wako) を加えて相分離し、RNA 精製を行った。NucleoSpin® RNA (Takara,) を用いて水層から RNA を精製し、GoScript™ reverse transcriptase kit (Promega) を用いて逆転写を行った。qRT-PCR は、SYBR Premix Ex Taq™ II (Takara) を用いて、表 10 に示す特異的プライマーを用いて Thermal Cycler Dice System 2 (Takara) 上で行った。各標的遺伝子の遺伝子発現量は、 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法²¹を用いて算出した。

表 10 qRT-PCR に用いられたプライマー

Target	Forward	Reverse
b-actin	5'-CCTCACCCCTGAAGTACCCA-3'	5'-TCGTCCAGTTGGTGACGAT-3'
IL-1b	5'-GCAGAAGTACCTGAGCTCGC-3'	5'-ATAGCAAATCGGCTGACGGT-3'
TNF-a	5'-GCCCATGTTGTAGCAAACCC-3'	5'-TATCTCTCAGCTCCACGCCA-3'
NLRP3	5'-AGAAGCTCTGGTTGGTCAGC-3'	5'-GAGTCTGGTCAGGAATGGC-3'
GSDMD	5'-GCTCCATGAGAGGCACCTG-3'	5'-TTCTGTGTCTGCAGCACCTC-3'
MMP-3	5'-TCCTACTGTTGCTGTGCGTG-3'	5'-CCCTTGCAGCTCCATCCAAT-3'
MMP-9	5'-GTACTCGACCTGTACCAGCG-3'	5'-AGAAGCCCCACTTCTTGTCG-3'
ADAMTS4	5'-CAGTCAGGCTCCTTCAGGAAA-3'	5'-TGCTGCCGACAAGAATGTG-3'
ADAMTS5	5'-CCAGGATCTGCTTTCGTGGT-3'	5'-TCCAAATGCACTTCAGCCAC-3'
RANKL	5'-ATCTGGCCAAGAGGAGCAAG-3'	5'-GGGAACCAGATGGGATGTCG-3'

CASP 1	5'-ATCCGTTCCATGGGTGAAGG-3'	5'-TGTTTCAGCACCCCTTGTCTGT-3'
CASP 4	5'-AGGGAATCTGCGGAACTGTG-3'	5'-GGCAGTTGCGGTTGTTGAAT-3'
CASP 5	5'-TGCTAAAGAACAACGTGGCTG-3'	5'-ACTGGTCGACTTTTTGATCCGT-3'

interleukin: IL tumor necrosis factor: TNF matrix metalloproteinase: MMP

a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs: ADAMTS receptor activator of NF- κ B ligand: RANKL caspase: CASP

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

市販の ELISA キット (R&D Systems) を用いて、製造者の指示に従って、マトリックスメタロペプチダーゼ-3 (matrix metalloproteinase: MMP-3), MMP-9, a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS-5) の血清レベルを測定した。キットの検出限界 (感度) は、MMP-3 および MMP-9 が 31.3 pg/ml, ADAMTS5 が 125 pg/ml であった。また、hFLS 培養の上清中の IL-1 β のレベルは、市販の ELISA キット (BioLegend) を用いて、製造者の説明書に従って測定された。このキットの検出限界は 2.0 pg/ml であった。

イムノブロット解析

RIPA 溶解バッファー (ATTO) を用いて氷上で細胞を溶解し、抽出したタンパク質を標準的な SDS-PAGE とウェスタンブロット分析 (ATTO) の手順でアッセイした。Pro-IL-1 β は特異抗体 (Cell signaling) で検出し、シグナルは Ez WestLumi Plus (ATTO) により検出した。

マクロファージ—滑膜細胞、滑膜細胞—破骨細胞前駆体共培養モデル

ヒト単球細胞株 THP-1 (理化学研究所) を 10% FBS、1% PS、1% L-Glu を含む α -MEM 培地で、37°C、5% CO₂ 加湿下で培養した。THP-1 細胞は 24 ウェルプレートに 2.5 \times 10⁵ cells/well の密度で播種し、5 ng/ml phorbol myristate acetate (PMA, Sigma-Aldrich) 添加の同培地で 48 時間マクロファージに分化させた。その後、接着した細胞を PBS で 3 回洗浄し、10 μ M NLRP3 インフラマソーム阻害剤 (S3680; Selleck) で前処理し、LPS; 100 ng/ml + 100 mg/ml Alum (InvivoGen)、または 5 mM ATP (Thermo Scientific) で 3 時間刺激した。刺激した THP-1 マクロファージを氷冷した PBS で 3 回洗浄し、新鮮な増殖培地を加えた。並行して、hFLS を増殖培地で継代 3 まで維持し、その後 1.25 \times 10⁵ 個の細胞を 0.4 μ m 孔サイズのトランスウェルインサートに播種して、24 ウェルプレートで培養した。次に、刺激された THP-1 マクロファージ培養物に hFLS を含むインサートを移して 24 時間培養し、qRT-PCR による遺伝子発現解析のために hFLS を採取した。滑膜細胞-破骨細胞前駆体共培養モデル

ルの確立のために、健康なドナーから得た血液サンプルからヒト単球を分離し、10% FBS、1% PS、1% L- Glu を含む α -MEM 培地で 37°C、加湿 5% CO₂ で培養して、破骨細胞前駆体を調製した。健康なドナーから得たヒト単球を、25 ng/ml の macrophage colony stimulating factor (MCSF、PeproTech) を添加した同じ培地で 3 日間培養した。次に、25 ng/ml の MCSF に 50 ng/ml の Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL、PeproTech) 溶液を添加した同じ培地で 24 時間培養して破骨細胞前駆細胞を得た。その後、破骨細胞前駆細胞を氷冷した PBS で 3 回洗浄し、上記モデルのように調製した刺激 hFLS と 9 日間共培養した。培養液は 2 日おきに新鮮な培養液を補充した。分化した細胞は、TRAP キット (Sigma) を用いて製造者の指示に従って染色し、核が 3 個以上ある TRAP 染色された細胞を破骨細胞と同定した。すべての *in vitro* 実験は、再現性のあるデータを得るために、少なくとも 2 回、各グループ 3 well で行った。

統計解析

統計解析は、GraphPad Software (GraphPad Software Inc, La Jolla,) を用いて行った。性別および合併症の状態に基づく群間差は、Pearson のカイ二乗検定で分析した。群間差の解析には、One-way analysis of variance: (ANOVA)、Tukey の多重比較検定を用いた。結果は、* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ のとき、統計的に有意であるとみなした。

結果

患者臨床データ

患者の臨床データから、WBC や CRP などの全身性炎症関連因子は 3 疾患間で有意差は認められなかった(表 9)。また、RDC 症例では顕著な特徴は認められなかったが、OA 症例、ONFH 症例に比べ、P1NP、TRACP-5b などの骨代謝マーカーが高く、BMD が低い傾向が見られた(表 9)。MMP-3、MMP-9、ADAMTS-5 はキットの検出限界以下であった。これらの所見は、RDC の病態が炎症の発生を含む股関節の局所的な変化に依存している可能性が高く、RDC は炎症と骨の脆弱性の発生を含む股関節の局所的な変化に依存しているという仮説と一致するものであった。

RDC 滑膜組織における炎症性マクロファージと TRAP 陽性細胞の検出

RDC において関節内で起こる病理学的プロセスを理解するために、滑膜組織を組織学的に調べ、その変化を OA および ONFH 患者におけるものと比較した。特に、骨や軟骨の組織由来の微粒子は、RDC 患者の滑膜組織のみで観察された(図 7A)。また、すべての試料で単核球の浸潤の増加が認められ、慢性炎症の発生が示唆された(図 7A)しかし、RDC 症例の滑膜では、OA 症例や ONFH 症例に比べ、NF- κ B⁺細胞の著しい増加が認められ、炎症が進行していることが示唆された(図 7B)。慢性炎症は破骨細胞分化を促進することから、滑膜組織を TRAP で染色し、分化した破骨細胞の検出を試みた。興味深いことに、すべての RDC 患者の滑膜組織には TRAP⁺多核細胞が存在したが、OA 患者および ONFH 患者の滑膜組織には存在しなかった(図 7B)。また、各疾患 4 つの臨床サンプルにおいて、NF- κ B⁺細胞および TRAP⁺多核細胞の数を定量した。RDC の滑膜組織では、OA や ONFH の組織と比較して、これらの細胞数が有意に増加していた(図 7C)。

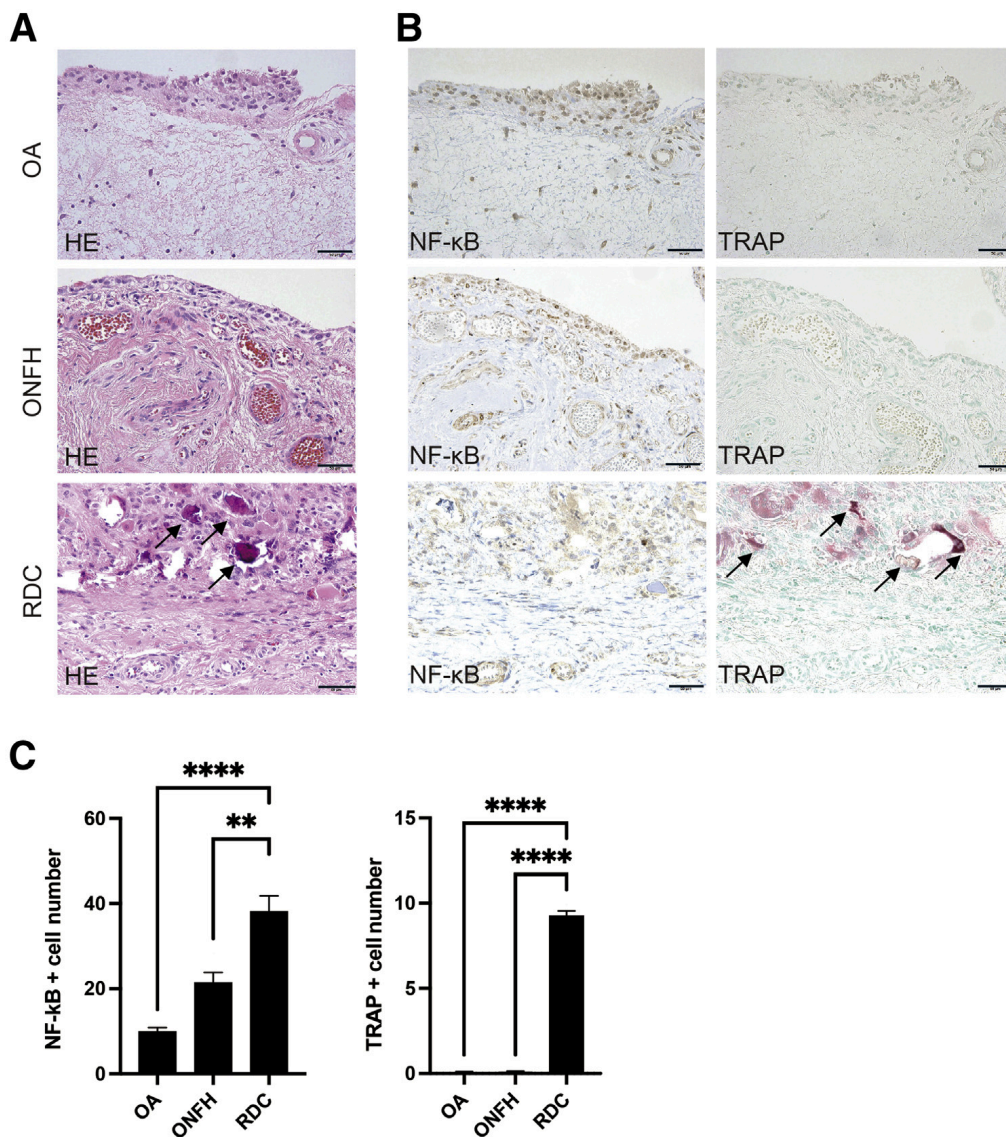


図 7 滑膜組織における炎症性マクロファージと TRAP 陽性細胞の検出。OA、ONFH、RDC から採取した滑膜組織の組織学的解析。A: HE 染色切片画像 B: NF-κB、TRAP に対する抗体による免疫染色切片画像。C: 組織の切片における抗体による染色細胞の定量化。One-way ANOVA、Tukey 多重比較検定により解析。矢印は骨片を示す。

** : $p < 0.01$, **** : $p < 0.0001$ スケールバー: 50 μm 。

RDC 滑膜組織におけるインフラマソーム活性化マーカーの検出

RDC 患者の滑膜組織には骨・軟骨の微粒子が存在し、これが浸潤マクロファージに危険信号を發して慢性炎症を引き起こす可能性があることから、滑膜組織における NLRP3、NF-κB、GSDMD などのインフラマソーム活性化マーカーの発現をさらに検討した。その結果、RDC の滑膜組織では、OA や ONFH の患者に比べて、これらすべてのマーカーの発現が高く、NLRP3⁺/GSDMD⁺細胞の大部分は CD68⁺細胞であった (図 8A)。さらに、滑膜細

胞のほとんどが NLRP3 抗体で染色されており、これらの細胞でインフラマソームの活性化が起こっていることが示唆された(図 8A)。さらに重要なことは、RDC の滑膜組織では、OA や ONFH の患者と比較して、NLRP3⁺細胞、GSDMD⁺細胞、CD68⁺細胞の数が著しく増加していたことである(図 8B)。これらの結果は、RDC 患者の滑膜組織が、マクロファージや滑膜細胞におけるインフラマソームシグナルの活性化、破骨細胞分化を伴う局所炎症の増加に代表される特有の組織的特徴を示し、本疾患の病態を反映していると考えられる。RDCの病態とインフラマソーム活性化の関連を確認するため、患者の滑膜組織から滑膜細胞を分離し、遺伝子発現解析を実施した。その結果、RDC 患者の滑膜細胞では、NLRP3、GSDMD、IL-1 β などのインフラマソーム活性化マーカーの発現が、健常者、OA、ONFH 患者の滑膜細胞に比べて有意に高いことが判明した。また、滑膜細胞は、TNF- α 、MMP3、MMP9、RANKL などの滑膜炎や破骨細胞分化に関与するマーカーの発現が上昇していた(図 9)。これらのことから、RDC 患者の滑膜組織に骨・軟骨の微粒子が存在すると、マクロファージや滑膜細胞のインフラマソーム活性化が起こり、炎症性および破骨細胞形成に関与するサイトカインの産生が維持され、大腿骨頭や寛骨臼が消失する可能性があることが示唆された。

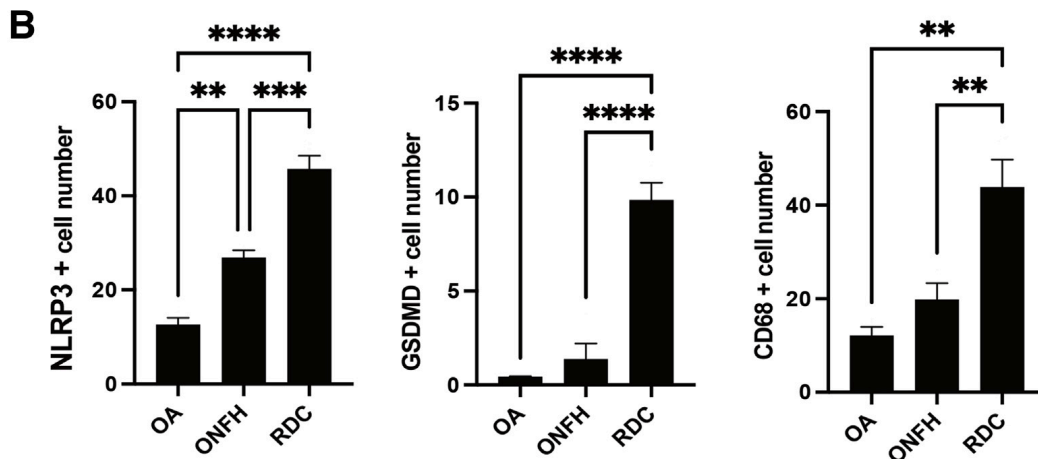
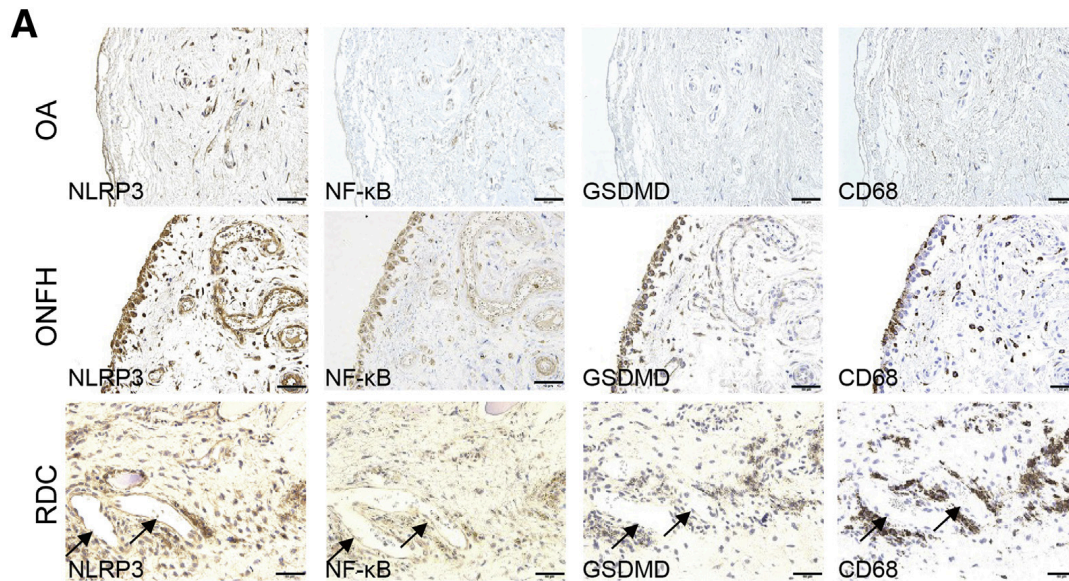


図 8 滑膜組織におけるインフラマソーム活性化関連マーカーの免疫組織染色。OA、ONFH、RDC と診断された患者から採取した滑膜組織の組織学的解析。A: NLRP3、NF- κ B、GSDMD、CD68 抗体で染色した切片画像。B: 組織の切片における抗体による染色細胞の定量化。One-way ANOVA、Tukey 多重比較検定により解析。矢印は骨片を示す。
 : $P < 0.01$, *: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$ 。スケールバー: 50 μ m

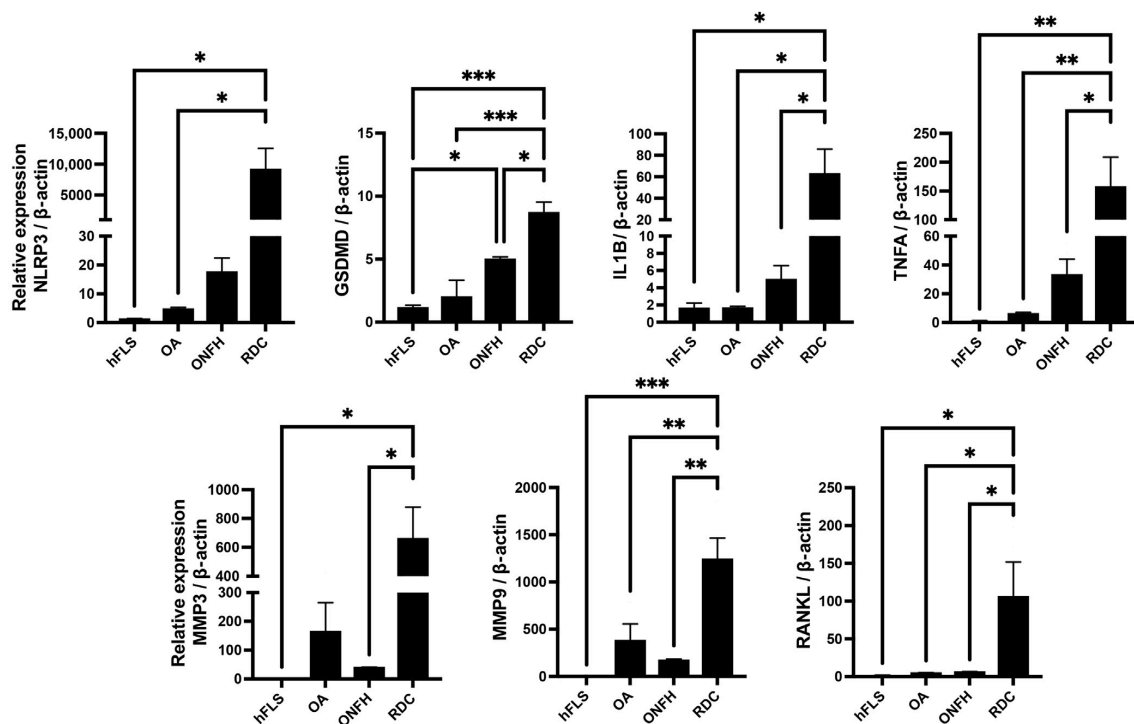


図9 qRT-PCRによる臨床サンプルの滑膜細胞におけるインフラソーム関連マーカーと炎症マーカーの検証。One-way ANOVA、Tukey 多重比較検定により解析。

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ 。

インフラソーム活性化と破骨細胞分化の関連性

マクロファージにおける NLRP3 インフラソームの活性化が滑膜細胞による炎症性および破骨細胞分化に関連するサイトカインの産生を促進するという仮説を確認するために、これらの細胞間の相互作用を検証した。THP-1 細胞株マクロファージを LPS と Alum または ATP で刺激してインフラソームを活性化した後、hFLS と 24hr 共培養した。臨床滑膜サンプルの結果と一致し、活性化 THP-1 と共培養した hFLS では、NLRP3、GSDMD、IL-1 β 、TNF- α 、ADMTS4、ADMTS5、MMP3、MMP9、RANKL の遺伝子発現が著しく上昇した(図 10A、図 11)。同様に、これらの細胞は、CASP1、CASP4、CASP5 の発現の有意な増加を示し、分泌された IL-1 β のレベルの上昇を伴っていたが、pro-IL-1 β の発現は認められなかった(図 10A、B)。ことから、canonical および non-canonical インフラソーム経路が活性化されていることが示唆された。これらの知見を裏付けるために、THP-1 を、インフラソーム活性化に曝す前に、特異的 NLRP3 インフラソーム阻害剤である S3680 で前処理し、その後 hFLS と共培養した。インフラソーム阻害剤で前処理すると、炎症性サイトカインやインフラソーム関連因子の発現が低下する傾向があり(図 12)、滑膜細胞が RDC における炎症増幅の役割を担っている可能性が示唆された。さらに、刺激した hFLS が破骨細胞の分化に及ぼす影響を調べるために、in vitro 共培養モデルを構築した。興味深いことに、

刺激した hFLS と共培養したヒト破骨細胞前駆細胞では、非刺激 hFLS と共培養したものに比べて、TRAP 陽性細胞の数が増加した(図 13)。これらの結果から、滑膜におけるインフラマソームの活性化は、関節の滑膜炎と破骨細胞の分化を促進することが明らかとなった。

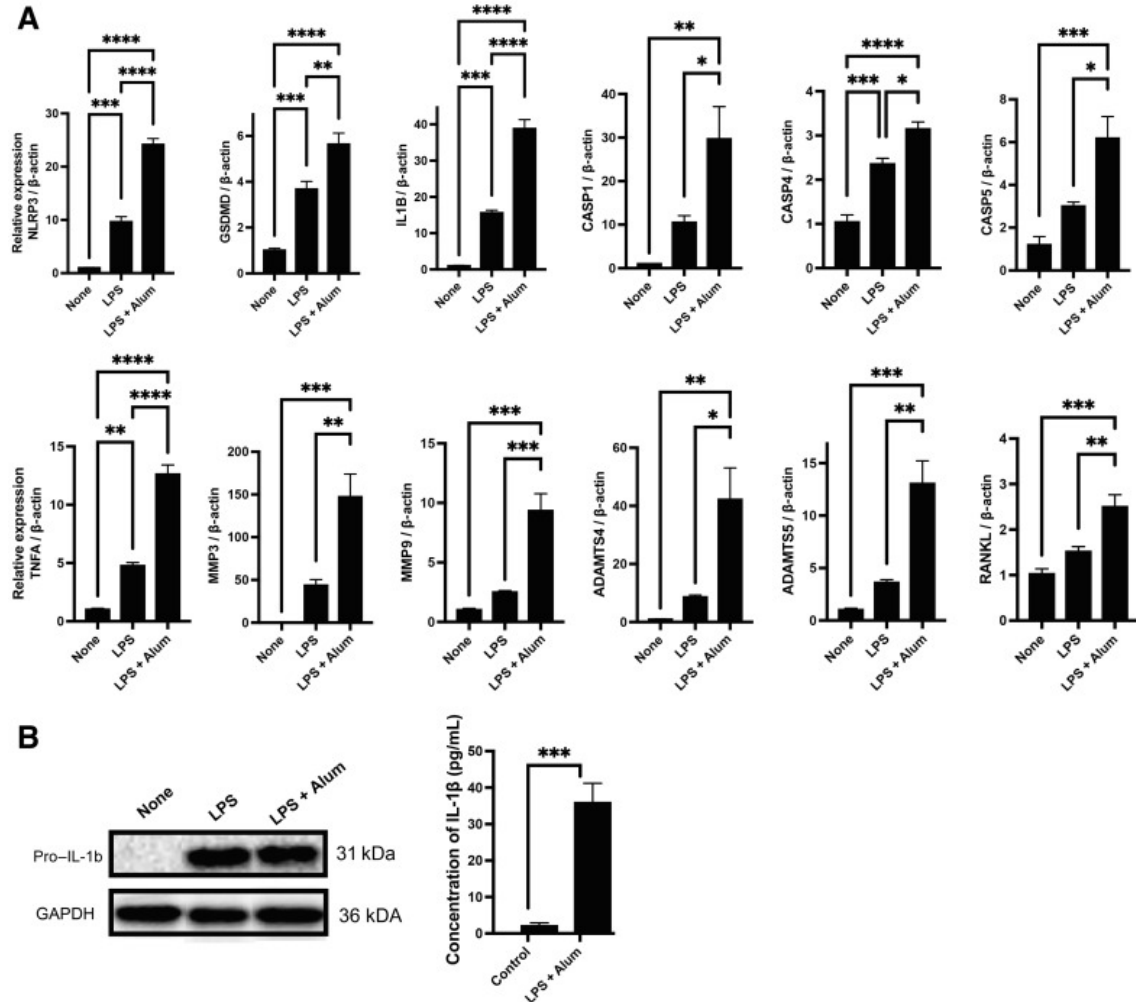


図 10 マクロファージにおけるインフラマソーム活性化が滑膜細胞における炎症発生に与える影響。A: LPS または LPS + Alum で刺激した THP-1 細胞と共培養した hFLS おける炎症マーカーおよびインフラマソーム活性化マーカーの発現を qRT-PCR で検証。One-way ANOVA、Tukey 多重比較検定により解析。B: LPS または LPS + Alum で刺激した THP-1 細胞と共培養した hFLS における細胞内 pro-IL-1 β をウェスタンブロット(左パネル)、分泌 IL-1 β を ELISA (右パネル)により分析。

*: P < 0.05, **: P < 0.01, ***: P < 0.001 ****: P < 0.0001

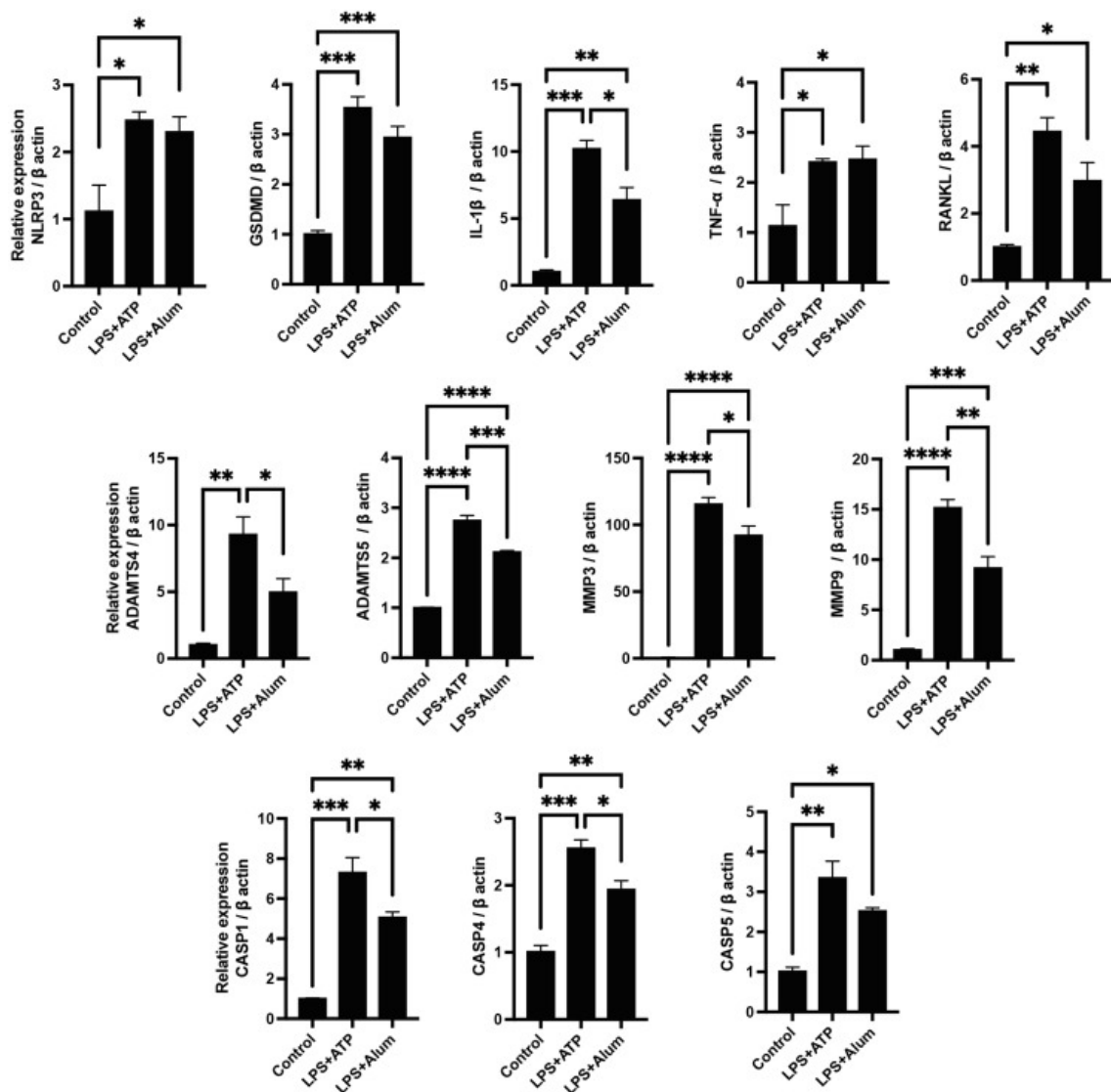


図 11 滑膜細胞における炎症マーカーおよびインフラソーム活性化マーカーの遺伝子発現を qRT-PCR で解析。THP-1 細胞を LPS-ATP または LPS-Alum で刺激し、hFLS と共培養。One-way ANOVA、Tukey 多重比較検定により解析。

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ ****: $P < 0.0001$

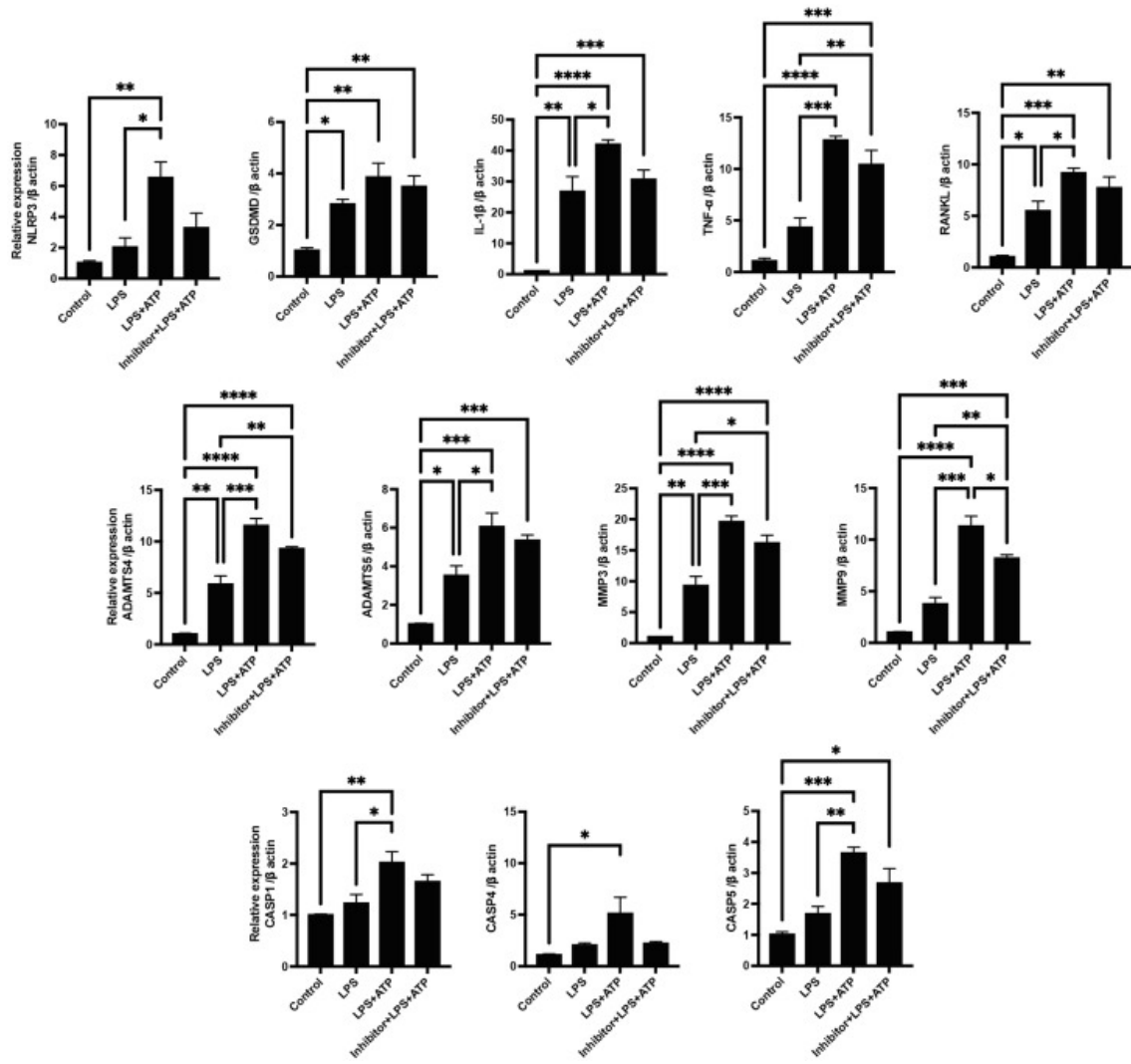


図 12 滑膜細胞における炎症マーカーおよびインフラマソーム関連マーカーの遺伝子発現を qRT-PCR で解析。THP-1 細胞をインフラマソーム阻害剤である S3680 で前処理し、LPS-ATP で刺激した後、hFLS と共培養。One-way ANOVA、Tukey 多重比較検定により解析。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ ****: $P < 0.0001$

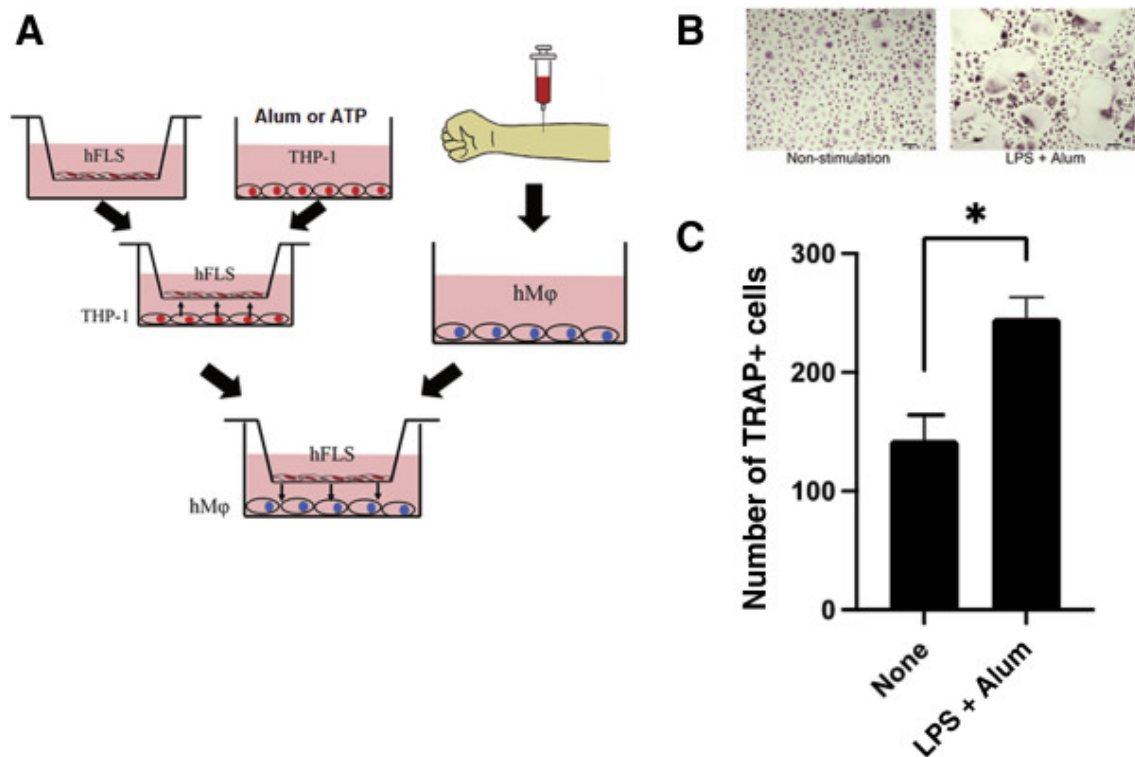


図 13 インフラマソーム経路で活性化された THP-1 と共培養された滑膜細胞による破骨細胞分化の誘導。A: 刺激された hFLS と破骨細胞前駆細胞を、トランスウェルシステムを用いて共培養した in vitro モデル。刺激された hFLS は破骨細胞分化が促進。B: TRAP 染色した細胞画像。C: 刺激された hFLS との共培養後の破骨細胞前駆体における TRAP+細胞の定量化。有意差は t-検定で判定。*: $P < 0.05$ 。スケールバー: 100 μ m

考察

RDC の関節破壊を治療で防ぐことができないのは、本疾患の病態生理が完全に理解されていないためである。SIF と炎症が主要な病因であることを示唆する証拠が蓄積されているにもかかわらず、RDC を引き起こすメカニズムに関する全体的な知見はまだ完全には得られていない(Yamamoto and Bullough, 2000; Abe et al., 2014; Shimizu et al., 2020)。本研究では、RDC においてインフラマソーム活性化と滑膜炎および病的骨吸収の関連性を検討した。まず RDC 患者の滑膜における病理組織学的変化とインフラマソーム活性化マーカーの遺伝子発現を調べ、臨床的に関連する股関節疾患である OA や ONFH の結果と比較検討した。次に、関節環境を模倣した共培養モデルを作成し、マクロファージと滑膜細胞におけるインフラマソーム活性化が滑膜炎の進行と骨破壊に与える影響を検証した。

RDC の滑膜では、マクロファージ浸潤や破骨細胞の増加など、OA や ONFH の関節とは異なる特有の組織学的特徴を示していた。さらに、RDC 患者の滑膜細胞は、高度滑膜炎とインフラマソーム関連マーカー、炎症性サイトカイン、マトリックスメタロプロテアーゼを発現していた。過去の報告では、OA の関節症性変化は数年以上かけて進行し(Zhao et al., 2020)、ONFH での関節破壊は OA よりは比較的短い数年以内の期間に生じるとされている(Kloen et al., 2002; Jawad et al., 2012)。これと RDC で著明な炎症性変化がみられた本研究の結果を踏まえると、滑膜の炎症の程度が股関節の破壊スピードと相関している可能性が示唆される。

また、RDC 患者の滑膜では、骨や軟骨に由来する微粒子の周囲に浸潤した炎症性マクロファージや破骨細胞の増加がみられ、これは関節リウマチ RA や敗血症性関節炎の特徴に類似している(Allard-Chamard et al., 2020; Mbalaviele et al., 2017)。RDC の初期病変は大腿骨側のみであるが、RA や敗血症性関節炎に類似するほどの高度な関節炎によって寛骨臼側にも病変が波及して病的骨吸収が生じているものと考えられる(Postel and Kerboul, 1970)。しかし、RA や敗血症とは対照的に、RDC では血中の炎症性マーカーのレベルの上昇はなく、RDC は全身性の炎症反応ではなく、あくまで SIF によって生じた微粒子に反応した局所の炎症反応であることが示された。

インフラマソームは、細胞内の複合タンパクシグナル伝達プラットフォームであり、カスパーゼ-1 の酵素活性に依存して GSDMD の切断を活性化し、その結果、細胞膜に孔様構造を生成し、炎症性サイトカインを放出する。RDC 患者の滑膜におけるインフラマソームの活性化は、SIF の微小骨片などの損傷組織が関節内に遊離され、マクロファージなどの自然免疫細胞がこれらの物質を感知して貪食し、NLRP3 インフラマソームシグナルが活性化されているものと考えられる。NLRP3 インフラマソームの活性化が持続すると、滑膜中のパイロプトーシス細胞が増加し、滑膜細胞の急速な増殖と刺激が促進されて炎症を増幅させ、破骨細胞分化亢進と局所的な病的骨吸収を生じ、関節破壊を引き起こす。RA では、インフ

ラマソームの活性化による関節炎が骨びらんと関連していることが示されており(Spel and Martinon, 2020; Jin et al., 2011)、RDC は RA と同様にインフラマソームの活性化に関連した高度炎症とそれによって破骨細胞分化が亢進することにより病的骨吸収が生じて関節破壊が生じることが示唆された。これらの知見と、骨基質成分が NLRP3 インフラマソームを活性化し、破骨細胞の分化を促進するというこれまでの報告から(Alippe et al., 2017)、SIF の骨折片から生じた骨基質片に対する高度な炎症反応によって、RDC が発症し、SIF に対する滑膜の炎症が低度で骨折に修復起点がはたらくと、関節軟骨の損傷、骨棘の形成、数年にわたる硬化を誘発し、結果として OA を引き起こすのではないかと考えられる。

本研究の主な限界は、サンプルサイズ、特に RDC 症例が少ないことと、SIF 後の OA 症例が適切なコントロールとして対象となっていない点である。しかし、無症状の早期段階での SIF を診断してサンプルを得ることは非常に困難である。さらに、RDC 患者の臨床サンプルからの滑膜細胞が破骨細胞分化を促進することを示すデータがないことも制限事項の一つである。しかし、本研究では、臨床サンプルの滑膜細胞が破骨細胞分化関連因子を発現し、関節環境を模倣した共培養システムにおいて、活性化された滑膜細胞が *in vitro* で破骨細胞分化を促進することを明確に示している。

結論として、これまで詳細なメカニズムが不明であった稀な疾患である RDC の病態について、本研究では NLRP3 インフラマソーム活性化を伴った高度滑膜炎が関与することを初めて示した。NLRP3 インフラマソーム活性化を介する高度な炎症反応を制御することで、RDC における急速な関節破壊を抑制できる可能性が示唆された。

第四章

股関節疾患の原因となる骨脆弱性に対する新規治療ターゲットの探索 —CLCF1の骨粗鬆症に対する治療効果検証—

緒言

骨は代謝の活発な組織であり、骨リモデリングと呼ばれる骨吸収と骨形成の連続的なサイクルに依存している。骨リモデリングは、サイトカイン、ホルモン、成長因子などの多様な因子によって厳密に制御されており、生涯を通じて骨基質の継続的な吸収と形成を行っている生理学的・病理学的な状態である。破骨細胞の活性化によるリモデリング亢進は、骨微細構造の乱れ、骨密度と骨強度の低下をもたらす、骨粗鬆症と呼ばれる骨量の減少をきたし、股関節周囲の骨折やSIF、RDCなどを引き起こしやすくなる(Rachner et al., 2011)。骨粗鬆症は、現在の治療法では骨の脆弱化を完全に治療することができないという事実に加えて、社会経済的にも大きな負担となっており、直接的な医療費(長期看護-入院治療)や、機能障害や生産性の低下などの間接的な面で、世界の社会や医療サービスに大きな影響を与えている(Reginster and Burlet, 2006)。

骨粗鬆症の病因は非常に多様であり、病的な骨量減少を引き起こす様々なホルモン、遺伝、機械的、代謝的な要因を含む多因子性である(Takayanagi, 2009; Clowes et al., 2005; Ginaldi et al., 2005)。リンパ球やマクロファージなどの免疫細胞は、骨を形成する骨芽細胞と骨を吸収する破骨細胞のバランスを変化させることにより、骨リモデリングに影響を与える多くのメディエーターを放出する。これらのメディエーターのうち、RANKL は、NF- κ B および mitogen-activated protein kinase (MAPK)シグナル経路と転写因子 nuclear factor of activated T cells 1 (NFATc1)を活性化することにより、骨髄系細胞を骨吸収性破骨細胞に分化させる破骨細胞分化のマスターレギュレーターである。さらに、炎症性サイトカインであるTNF- α 、IL-1 β 、IL-17、TNF superfamily member 14 (TNFSF14)、thymidine phosphorylase (TYMP) などが破骨細胞分化や骨吸収の活性化に関与していることが示唆されている(Knowles and Athanasou, 2009; Matsumae et al., 2021; Terkawi et al., 2018)。一方で、いくつかの免疫細胞由来の因子は、破骨細胞分化と病的骨吸収を抑制するフィードバック阻害系として働くことが知られており、免疫経路のさらなる解明は、骨粗鬆症の新規治療法を発見するための重要な手がかりとなる(Takayanagi, 2009; Clowes et al., 2005; Ginaldi et al., 2005)。

CLCF1 は、IL-6 ファミリーに属する免疫細胞由来のサイトカインであり、加齢に伴う骨髄

系細胞の発生・分化を促進するなど、免疫制御に重要な役割を果たしている(Senaldi et al., 2002; Pasquin et al., 2018; Pasquin et al., 2019)。CLCF1 は、運動ニューロンの生存を制御するなど強力な神経栄養因子として知られている(Forger et al., 2003; Uemura et al., 2002)。さらに、CLCF1 が骨代謝の制御に関与していることを示す報告が増えており、CLCF1 遺伝子変異は頭部や脊椎の筋骨格系の異常と関連している(Sims, 2015)。同様に、CLCF1 の循環リンパ球および単球における発現レベルの低下は、閉経後の骨粗鬆症と相関していることが報告されており(Chen et al., 2021)、CLCF1 は破骨細胞の活性化を強く阻害する resolving マクロファージに高発現していることが明らかになっている(Stables et al., 2011; Viniegra et al., 2018)。したがって CLCF1 は骨粗鬆症に対して抑制的にはたらき、治療ターゲットとなり得るものである。

本章の研究目的は、CLCF1 について骨粗鬆症に伴う骨吸収を抑制する新規治療ターゲットとしての機能を検証することである。

方法

マウス骨粗鬆症モデルと骨形態測定

動物実験は、北海道大学大学院医学研究院附属動物実験施設委員会の承認を得て実施した(no.17-0085 & 18-0171)。SFF-BALB/c 12 週齢雌マウス(CLEA)に 100 mg/kg のケタミンと 10 mg/kg のキシラジンを腹腔内注射することで麻酔をかけ、卵巣摘出(ovariectomy: OVX)を行った。卵巣摘出したマウスを無作為に 2 つのグループ(PBS と CLCF1、各グループ 8 匹)に分けた。CLCF1(My BioSource)を 100 μ l の PBS に溶解したもの、または同量の PBS を週に 3 回、腹腔内に投与した。投与は手術の 3 日後に開始し、4 週間継続した。その後、マウスに麻酔をかけ、頸椎脱臼により安楽死させた。大腿骨を単離し、10% ホルマリン(Wako)で 24 時間固定した後、マイクロ CT(R_mCT2; Rigaku)を用いて、10 μ m の等方性の解像度で、X 線エネルギーは 80kV、80mA でスキャンした。骨体積あたりの骨表面(BS/BV)、組織体積あたりの骨体積(BV/TV)、海綿骨数(Tb.N)、厚さ(Tb.Th)および間隙(Tb.Sp)、体積性骨密度(vBMD)などのパラメーターは、TRI/3D-BON(Ratoc System Engineering)を用いて測定した。骨の組織形態解析のため、固定した大腿骨を EDTA (pH 7.0)で 3 週間脱灰し、パラフィンに包埋した後、5 μ m 厚の縦断面を作成し、破骨細胞を観察するためにメチルグリーンのカウンターステインを用いて TRAP(Sigma)で染色した。二次海綿骨領域における破骨細胞数/骨表面(N.Oc/B.Pm)は、ImageJ(NIH)のソフトウェアを用いて測定した。成長板の近位 250 μ m を一次海綿骨領域、成長板の近位 250 μ m から 1000 μ m を二次海綿骨領域と定義した。骨芽細胞は、tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNALP)に対する特異的な抗体で染色した(Hasegawa et al., 2019) (Oda et al., 1999)。まず、0.3% のペルオキシダーゼを含むメタノールで 30 分間インキュベートした後、1% bovine serum albumin (BSA; Serologicals Proteins Inc.)で 30 分間インキュベートした。次に、切片を TNALP に対するウサギのポリクローナル抗血清(1:100)と室温(RT)で 2~3 時間インキュベートし(Oda et al., 1999)、続いて HRP 標識抗ウサギ IgG (Dako)を 1:100 の希釈で 1 時間インキュベートした。その後、3, 3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩(Dojindo Laboratories)を基質として処理し、シグナルを検出した。最後に、切片をメチルグリーンで対比染色し、顕微鏡で観察して、骨周囲径あたりの骨芽細胞数(N/mm)を定量した。

頭頂骨骨粗鬆症モデルでは、SPF-8 週齢の雄の C57BL/6 マウス(CLEA)の頭頂骨に、0.1 mg/kg の CLCF1(My BioSource)と 0.1 mg/kg のマウス用 RANKL(Biolegend)、または 0.1 mg/kg の RANKL 単独を 100 μ l PBS に溶解したものを皮下注射した(1 グループ 7 匹)。対照マウスには 100 μ l の PBS を投与した(4 匹)。注射は 5 日間毎日行い、7 日目に頭頂骨を採取してマイクロ CT 解析を行った(R_mCT2)。頭頂骨表面の骨吸収領域を ImageJ (NIH)ソフトウェアでパーセンテージとして計算し、骨の組織形態分析を行った(Matsumae et al., 2021) (Tian et al., 2020)。別の実験では、単層タイプのコラーゲンスポンジ(PELNAC)に、

4 μg の組換えマウス RANKL(Biolegend)、さらに 4 μg の CLCF1(My BioSource)を加えて、あるいは加えずに、合計 50 μl の PBS したものを浸して、頭頂骨に移植した。対照マウスには PBS を染み込ませたスポンジを移植した(1 グループ 4 匹)。4 日目に RNA 抽出と遺伝子発現解析のために頭頂骨を採取した(Hasegawa et al., 2019; Matsumae et al., 2021; Tian et al., 2020)。

qRT-PCR による遺伝子解析

組織を液体窒素中で組織ホモジナイザー (Power Masher II、Nippi)を用いて細かくした後、TRIzol Reagent (Invitrogen)を用いて溶解し、RNA を抽出した。DNA-free RNA は、RNeasy Plus Mini kit のカラム(Qiagen)で精製し、0.5 μg の RNA を GoScript™ 逆転写酵素キット (Promega)を用いて逆転写した。cDNA は、SYBR Premix Ex Taq™ II (Takara)を用いて、各遺伝子に特異的なプライマーでアッセイした。遺伝子発現量は、 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法で算出した。

マクロファージフェノタイプ

ヒトサンプル使用に関するプロトコルは、北海道大学病院の研究倫理審査委員会で承認され(#016-0002)、研究に使用する前にインフォームドコンセントを取得した。単球 (CD14+) は、密度勾配遠心法 (Ficoll-Paque™ PLUS: GE Healthcare) および MACS Pan monocyte isolation kit (Miltenyi Biotec)を用いて健康なドナーの血液から単球 (CD14+) を分離し、10% 熱不活化 FBS (Nichirei Biosciences)、1% PS (Wako)、1% L-Glu (Wako)、25 ng/ml の MCSF (Peprotech) 25 ng/ml を添加した α -MEM を用いて、5% CO_2 を含む 37°C の加湿下で 6 日間培養した(Terkawi et al., 2018)。その後、M1 マクロファージには 100 ng/ml の LPS (Sigma) + 100 ng/ml のリコンビナントヒト interferon gamma (IFN- γ)、M2 マクロファージには 200 ng/ml の IL-4 (Peprotech) + 10 ng/ml の IL-10 (Biolegend)を用いて 48 時間刺激した。炎症収束期のマクロファージを促進することが知られている Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARG)アゴニストである Rosiglitazone (AdipoGen Life Science)を 100 ng/ml の濃度で他の刺激とともにマクロファージに同時添加した(Stables et al., 2011) (Vinięra et al., 2018)。さらに、10% FBS、1% PS (Wako)、1% L-Glu (Wako)を含む α -MEM 培地で培養したヒト単球細胞株 THP1 (理化学研究所、埼玉)を 48 ウェルプレートに 1×10^5 細胞/ウェルの密度で播種し、5 ng/ml の PMA (Sigma)を添加した同じ培地で 48 時間、マクロファージに分化させた。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、100 ng/ml のヒト組換え CLCF1 (R&D system) で 30 分、60 分、180 分刺激した。最後に、細胞を収穫してウェスタンブロット分析を行った。

破骨細胞分化アッセイと骨吸収アッセイ

破骨細胞の分化および骨吸収のアッセイは、それぞれ RANKL 投与と象牙質切片を用

いて行った(Tian et al., 2020)。単球は、密度勾配遠心分離法(Ficoll-Paque™ PLUS: GE Healthcare)を用いて健康なドナーの血液から分離し、その後、MACS Pan monocyte isolation kit(Miltenyi Biotec, Auburn)を用いて分離した。CD14⁺細胞(3×10⁴)を96ウェルプレートまたは象牙質スライス(Wako)に播種し、MEM(Sigma)に10% 熱不活化 FBS(Nichirei)、1% PS(Wako)、1% L-Glu(Wako)、25 ng/ml MCSF(Peprotech)、50 ng/ml receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand(RANKL, Peprotech)を添加した MEM(Sigma)を含む分化培地で培養した。ヒト CLCF1(R&D system)を異なる濃度(25、50、100、200 ng/ml)で培養単球に添加した。培養液は3日ごとに成長因子を添加した新鮮な培地に定期的に補充した。8日目に Leukocyte acid phosphate TRAP kit(Sigma)を用いて細胞を染色し、3個以上の核を持つ細胞を破骨細胞とした。21日目の象牙質スライスを20 mg/ml ペルオキシダーゼ標識小麦胚芽アグルチニン(Sigma)と3、3'-ジアミノベンジジン(0.1% H₂O₂を含む PBS 中 0.52 mg/mL)で染色し、共焦点顕微鏡を用いて骨吸収ピットの観察を行った。全骨表面積に対する吸収された骨表面の割合を求めた(ImageJ)。阻害試験は、データの再現性を高めるため、3重のウェル/スライスで少なくとも2回実施した。さらに、破骨細胞アッセイは、RAW 264.7 マウス細胞株(理研バイオリソース研究センター)を用いて行った。1×10⁴個の細胞を、50 ng/ml の組換えマウス RANKL(Biolegend)および100 ng/ml の組換えマウス CLCF1(My BioSource)を添加した増殖培地で3日間培養した。3日目に TRAP キット(Sigma)を用いて細胞を染色し、破骨細胞数を定量化した。STAT1 を阻害するために、50 ng/ml の RANKL(Peprotech)および100 ng/ml の CLCF1 に曝す前に、細胞を1 μM の Fludarabine(Cayman Chemical)で1時間前処理した。破骨細胞は TRAP キット(Sigma)で染色し、培養8日目に定量化した。

骨芽細胞石灰化アッセイ

ヒト初代胎児骨芽細胞(hFOB)は Cell Applications より購入し、成長培地(Cell Applications; San Diego)で4継代まで増殖させた。1×10⁴の細胞を、ポジティブコントロールとして用いた50 ng/ml の TNF-α(Peprotech)または100 ng/ml の CLCF1(R&D system 社)を添加した骨芽細胞分化用培地(Cell Applications)で21日間培養した。培養液は3日ごとに新鮮な培地で定期的に補充した。骨芽細胞の石灰化アッセイでは、次に MgCl₂ と CaCl₂(Sigma)を含む PBS で細胞を洗浄し、10% ホルマリン中性緩衝液(Wako)を用いて固定し、アリザリンレッド-S と BCIP/NBT 溶液(Wako)で染色した。データの再現性を高めるため、実験は3つのウェルで2回行った。一方、hFOB(1×10⁵)を分化用培地(Cell Applications)で14日間培養し、分化させた。その後、50 ng/ml TNF-α(Peprotech)または100 ng/ml CLCF1(R&D system)で48時間刺激し、最後に細胞を採取して qRT-PCR で遺伝子発現を調べた(Tian et al., 2020)。

RNA-seq (RNA-sequence)とバイオインフォマティクス解析

ヒト単球は、100 ng/mlCLCF1 (R&D system)の存在下または非存在下で、分化誘導培地で8日間培養した。RNAは、RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen)を用いて、メーカー推奨の方法に従って細胞から抽出した。高品質のライブラリのみをNovaSeq 6000 (Illumina)にかかった。各ペアエンドリードデータの3'末端塩基をfastpでトリミングした。平均3300万個の100bpのペアエンドリードを、STARソフトウェアを用いてヒトゲノム(GRCh38)にアラインメントしてマッピングし、RSEMを用いて遺伝子発現レベルを定量した。有意に発現した遺伝子はDESeq2 Wald検定(Rソフトウェアパッケージ)を用いて解析し、有意差は多重検定により p 値 <0.05 の閾値で判定した。有意に分化した遺伝子は、Database for Annotation Visualization and Integrated Discovery online tools (DAVID: <https://david.ncifcrf.gov/>)を用いてGene Ontology、パスウェイのエンリッチメント解析を行った。Network-based gene enrichment NET-GE analysis tool (<http://net-ge.biocomp.unibo.it/enrich>)を用いて、最も有意に濃縮されたものを可視化した($p \leq 1e-05$)。RNA-seqデータは、GEO (Gene Expression Omnibus)データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)にて、アクセッション番号GSE171542 および GSE177024 で公開されている。

イムノブロット解析

RIPA 溶解バッファー (ATTO)を用いて氷上で細胞を溶解し、抽出したタンパク質をSDS-PAGE およびウェスタンブロット分析の標準手順(ATTO)で測定した。ターゲット異的な抗体で検出し、シグナルはEz WestLumi Plus (ATTO)検出した。各ターゲットのバンド密度と β アクチンのバンド密度をもとに、ImageJ (NIH)を用いて相対強度を定量した。

統計解析

統計解析は、グループ間の差を比較するためにOne-way ANOVA、Tukeyの多重比較検定を用いて、独立した2グループ間の比較にはStudentのt検定を用いた(GraphPad Software, La Jolla)。結果は、平均値 \pm 標準誤差(SEM)で示し、 $p < 0.05$ のときに統計的に有意差ありとした。

結果

マクロファージの異なるサブタイプにおける CLCF1 の発現

CLCF1 の発現上昇は、成長因子を用いて *in vitro* で分化させたヒトのマクロファージの表現型で初めて確認された。注目すべきは、M1 および M2 を含むすべての表現型で CLCF1 の高い発現が検出されたことであり、M2 およびロシグリタゾン投与された細胞では CLCF1 の発現が増加する傾向が見られた(図 14)。これらの結果は、CLCF1 がマクロファージによって産生され、炎症収束期のマクロファージでアップレギュレートされるという概念を支持するものである。

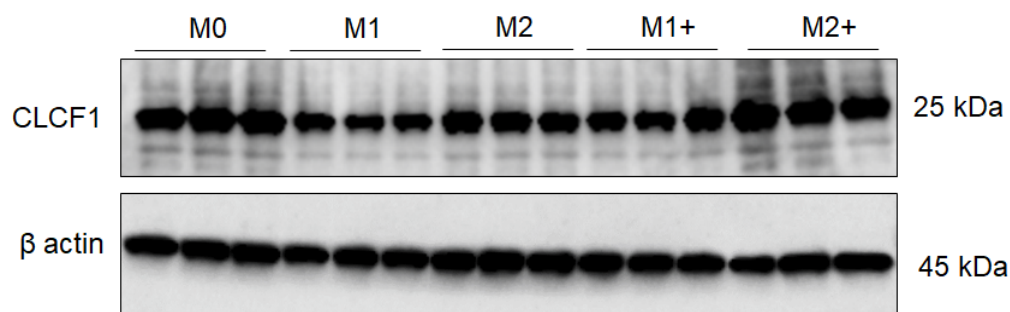


図 14 ヒトマクロファージの表現型における CLCF1 の発現。ヒトマクロファージを分化させ、溶解した後、ウェスタンブロット分析によるタンパク質解析を行った。CLCF1 や β -actin などのターゲットタンパク質は、特定の抗体を用いて検出された。

+:Rosiglitazone 投与

CLCF1 は卵巣摘出(OVX)骨粗鬆症モデルマウスの骨量減少を抑制

骨粗鬆症における CLCF1 の機能を検証するため、OVX および頭頂骨の骨粗鬆症モデルにおいて、病的な骨量減少に対する CLCF1 投与の効果を調べた。卵巣摘出後、CLCF1 を週 3 回 4 週間投与した後、大腿骨を採取し、骨微細構造を評価した。その結果、CLCF1 を投与したマウス的大腿骨では、PBS を投与した OVX マウスと比較して、BV/TV、BS/TV、vBMD などの骨密度と関連したパラメータのレベルが高く、海綿骨梁の数と厚さ Tb.N、TBsp が増加し、海綿骨梁の間隔 TBpf が減少していることから、OVX による骨量減少が抑制されていることが明らかになった(図 15A-C)。マイクロ CT による観察結果と同様に、組織形態学的にも、OVX マウスでは TRAP 陽性の多核破骨細胞が増加していた。さらに CLCF1 投与により、大腿骨の一次および二次海綿骨領域における TRAP 陽性破骨細胞の数が有意に減少していた(図 15D、E)。さらに、TNALP 抗体を用いた免疫組織化学的分析では、この治療によって骨芽細胞の数に有意な変化はみられなかった(図 16)。

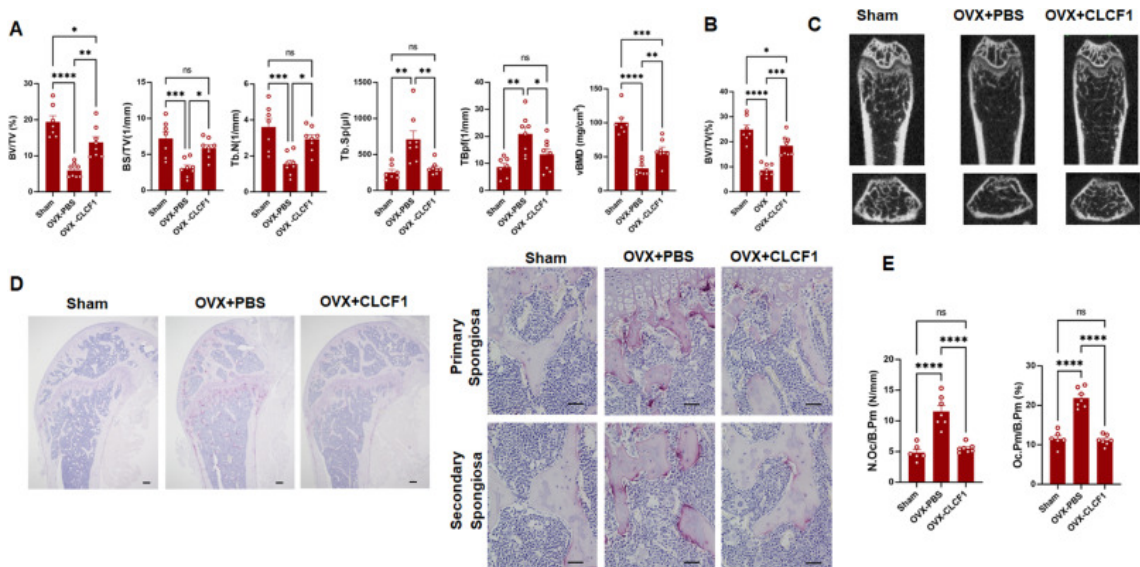


図 15 CLCF1 投与により、OVX マウスモデルにおける骨量減少と破骨細胞分化を抑制。

A) マウスの大腿骨の微小構造のパラメータは、BV/TV:骨体積あたりの骨表面、BS/TV:組織体積あたりの骨体積、Tb.N:海綿骨数、Tb.Sp:海綿骨間隙、TBpf:骨パターンファクター、vBMD:体積性骨密度。B) 大腿骨海綿骨の BV/TV。8 サンプルの平均値±標準誤差の(SEM)を表し、有意差は One-way ANOVA、Tukey の多重比較検定により判定。C) 大腿骨のマイクロ CT 画像。下段は海綿骨を示す。D) 大腿骨の組織形態学的解析。画像はマウスの TRAP 染色切片の代表例。右図は、一次および二次海綿体の TRAP 染色切片。スケールバー:100 μ m E) 大腿骨表面における破骨細胞の数と大きさの定量化。

*: P < 0.05 ** : P < 0.01 ***: P < 0.001 ****: P < 0.0001

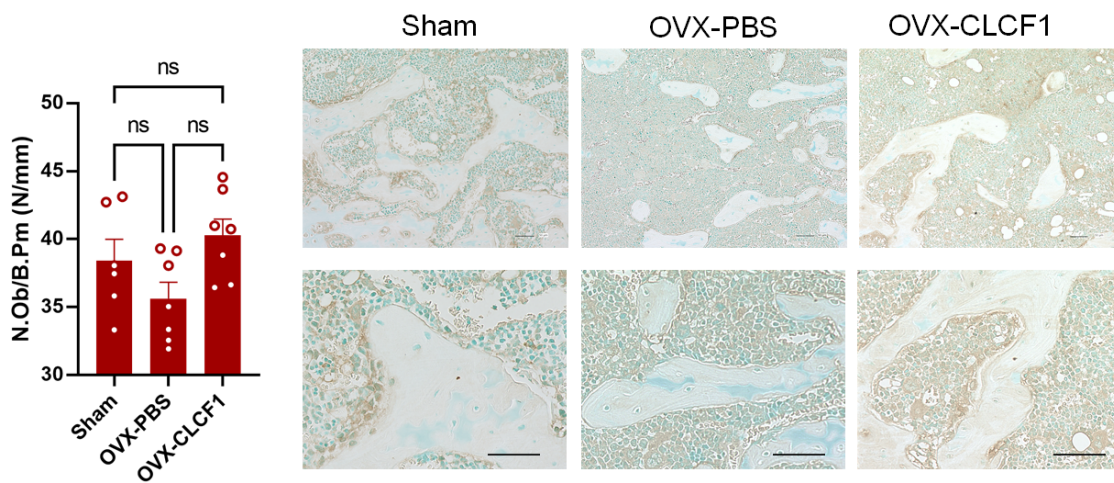


図 16 TnALP 抗体で染色した活性骨芽細胞の組織像。左側のパネルは、各群の骨芽細胞

胞の定量化。有意差は One-way ANOVA、Tukey の多重比較検定により判定。右図は、大腿骨組織の染色切片の代表的画像。スケールバー:100 μm ns:有意差なし

頭頂骨骨粗鬆症モデルにおいても、OVX モデルでの結果と同様に、CLCF1 を投与すると、骨量の減少が有意に抑制され、骨組織における TRAP 陽性の破骨細胞の分化亢進が抑制された(図 17A、B)。

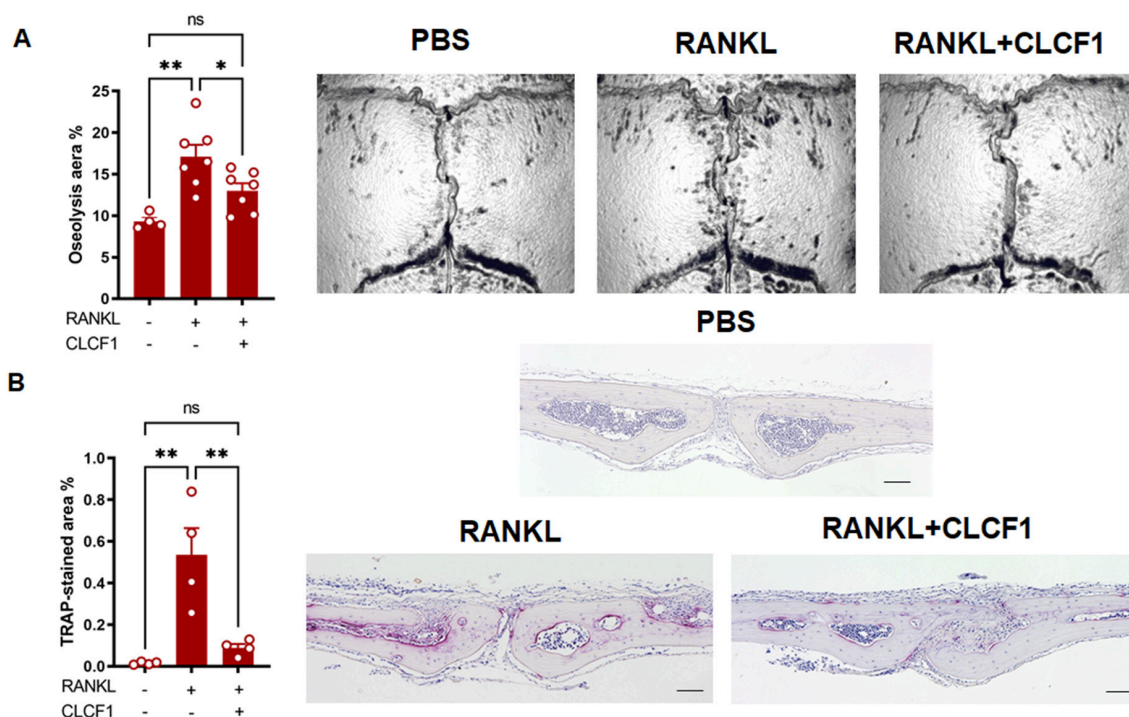


図 17 CLCF1 投与により、RANKL 誘発頭頂骨局所骨量吸収モデルにおいて、骨量減少と破骨細胞分化を抑制。A) RANKL 投与による頭頂骨表面での溶骨性病変。左図は、マウスの頭頂骨組織の骨溶解部位の定量解析。右側は、頭頂骨組織の代表的画。有意差は One-way ANOVA、Tukey の多重比較検定により判定。B) 頭頂骨組織の組織形態学的解析、TRAP 染色陽性領域の定量的解析、TRAP 染色切片の代表画像。

*: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$ ***: $p < 0.001$ ns: 有意差なし スケールバー:100 μm 。

4 μg の CLCF1 を添加した、または非添加の 4 μg の RANKL を染み込ませたスポンジを頭頂骨の表面に移植し、4 日後に骨組織における破骨細胞分化に関連する遺伝子発現を測定した。その結果、NFATc1 の発現は、RANKL+CLCF1 を染み込ませたスポンジを使用したマウスでは、RANKL を染み込ませたスポンジを使用したマウスに比べて有意に減少した(図 18)。TRAP、CTSK、MMP9 などの他の破骨細胞マーカーの発現も、

RANKL+CLCF1 を浸したスポンジを受けたマウスでは減少する傾向が見られた(図 18)。これらの結果から、CLCF1 は、骨量減少や破骨細胞分化を抑制することで、骨粗鬆症に対して効果を有することが示唆された。

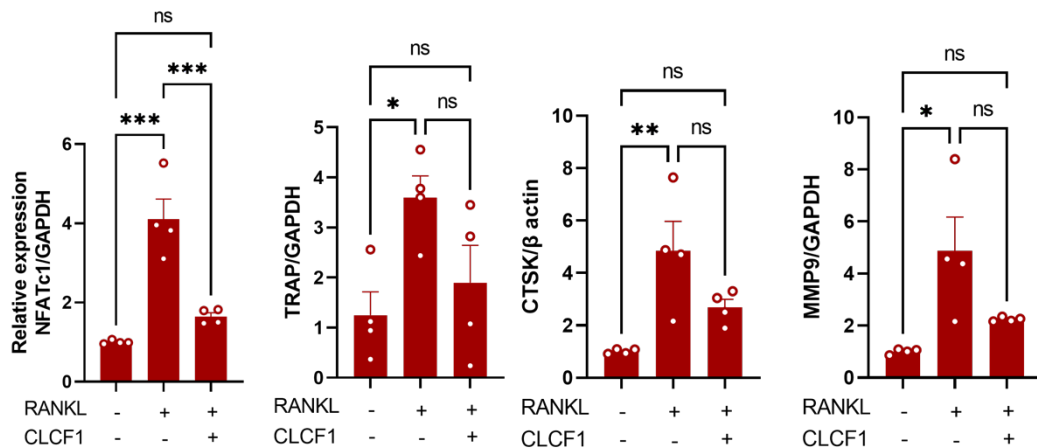


図 18 qRT-PCR による頭頂骨モデルにおける破骨細胞分化関連マーカーの遺伝子発現。GAPDH の発現量に対する各標的遺伝子の相対発現量。

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ ns: 有意差なし

CLCF1 は *in vitro* で破骨細胞分化を抑制する

RANKL で刺激したヒト単球を、CLCF1 の存在下または非存在下で、それぞれ 8 日間および 21 日間培養した。RANKL で刺激したヒト単球に CLCF1 を添加すると、破骨細胞の分化が著しく阻害された(図 19、20)。さらに、100 ng/ml の CLCF1 を投与した細胞の象牙質スライス上の骨吸収領域は、破骨細胞数の減少により、RANKL のみを投与した細胞よりも有意に小さかった (図 19B)。なお、CLCF1 の受容体成分の 1 つである CNTFR が破骨細胞の前駆細胞に発現していた (図 21)。

CLCF1 は骨芽細胞分化を抑制しない

CLCF1 が骨芽細胞の分化とミネラル化に及ぼす影響をさらに調べるために、初代骨芽細胞を 100 ng/ml の CLCF1 の存在下または非存在下で、骨芽細胞分化用培地で 21 日間分化させた後、カルシウム沈着量を定量するためにアリザリンレッド-S で染色し、アルカリホスファターゼ活性を測定するために BCIP/NBT で染色した。TNF- α 処理とは対照的に、染色した細胞の色濃度がコントロールの Mock 骨芽細胞と同様であったことから CLCF1 は骨芽細胞の分化に悪影響を及ぼさないことが示された(図 19 C)。同様に、

CLCF1 投与細胞では、RUNX2、ALP、OCN、COL1、VEGFA などの骨芽細胞同化因子 (骨ミネラル化関連分子) の遺伝子発現がわずかに増加していた (図 19D)。これらの結果から、CLCF1 は *in vitro* で骨芽細胞の分化に悪影響がないことが示された。

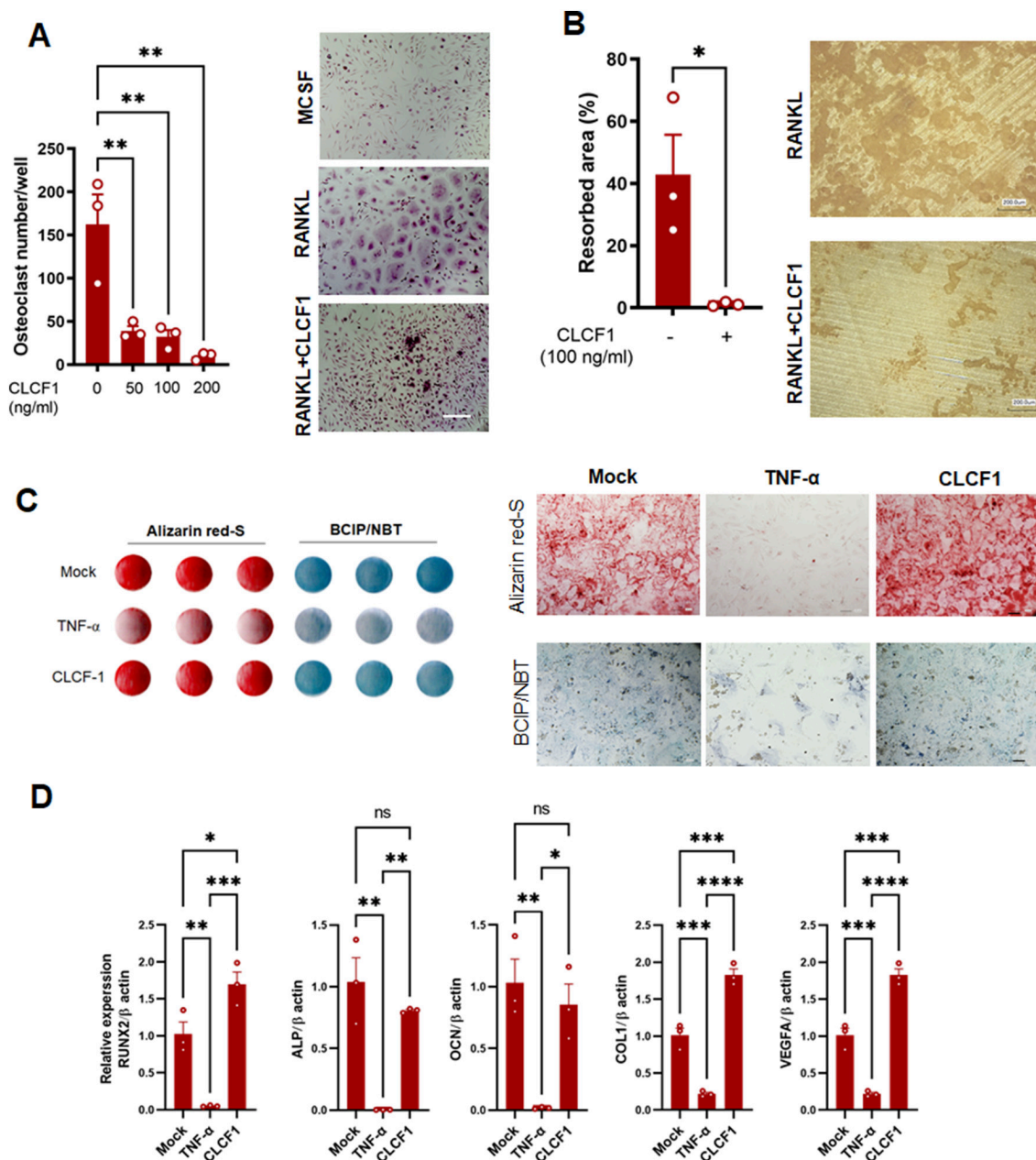


図 19 破骨細胞および骨芽細胞の分化に対する CLCF1 の *in vitro* での効果検証。
 A) RANKL 刺激により誘導される破骨細胞分化の定量化。ヒト単球を異なる濃度の CLCF1 投与下に RANKL で刺激した後、破骨細胞検出のために TRAP で染色。破骨細胞 (TRAP 染色細胞) の平均数±標準誤差。右図は、TRAP 染色した細胞の代表画像。 B) 象牙質スライスにおける吸収領域の定量化。ヒト単球を RANKL 存在下に 100 ng/ml CLCF1

投与し、21 日間象牙質スライス上で培養。 C) 骨芽細胞分化および石灰化アッセイ。細胞は 100 ng/ml CLCF1 存在下で 21 日間培養した後、アリザリンレッド S と BCIP/NBT で染色。左側は 96 ウェルプレートで染色した細胞、右側は高倍率で染色した細胞の代表画像。 D) 刺激された骨芽細胞における qRT-PCR による遺伝子発現解析。結果は、 β -actin の発現量に対する各標的遺伝子の相対発現量 \pm 標準誤差。

*: $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$ *** : $P < 0.001$ **** : $P < 0.0001$

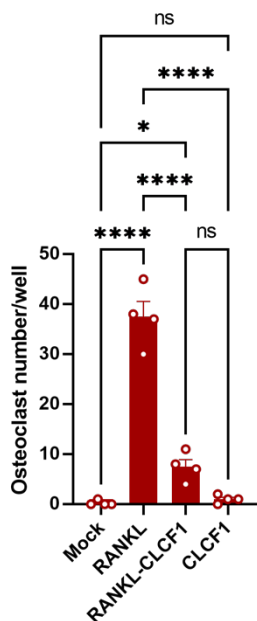


図 20 RAW 264.7 マウス細胞株を用いた破骨細胞分化アッセイ。細胞は、CLCF1 投与または非投与下に、RANKL で 3 日間刺激後に染色。TRAP 陽性破骨細胞数 \pm 標準誤差。*: $p < 0.05$ 、****: $P < 0.0001$ ns 有意差なし

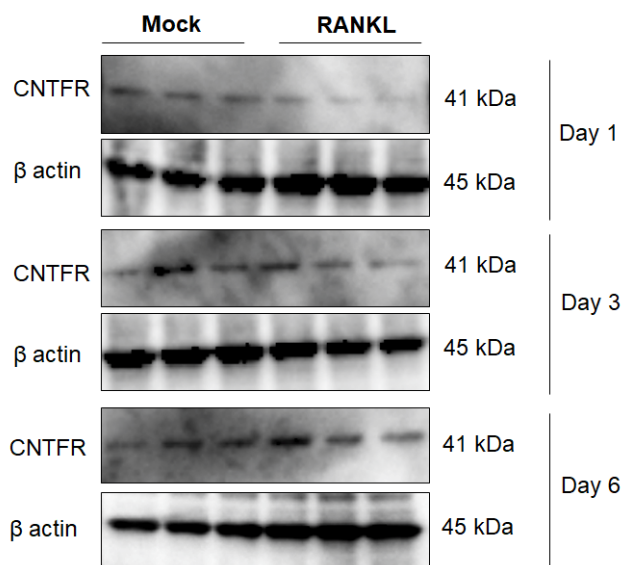


図 21 破骨細胞前駆細胞における CLCF1 の受容体成分の 1 つである CNTFR の検出。 RNAKL で刺激したヒトマクロファージを RANKL で刺激後 1、3、6 日目に回収し、ウェスタンブロッティングで解析。

CLCF1 の破骨細胞分化抑制効果への IFN シグナル関与

CLCF1 が破骨細胞の分化を阻害するメカニズムを解明するために、CLCF1 を投与して分化させた破骨細胞を対象に、RNA-seq による遺伝子発現解析を行った。CLCF1-RANKL を投与したマクロファージと、MCSF を投与したマクロファージ (Mock マクロファージ) および RANKL を投与したマクロファージ (成熟破骨細胞) と比較して、発現変動遺伝子 Differentially expressed genes (DEG) を検証した (図 22A)。また、パスウェイエンリッチメント解析の結果、RANKL 投与細胞の DEG は、主に破骨細胞の分化と NF- κ B シグナルの経路に集積していたが (図 22B)、CLCF1 を添加すると、破骨細胞分化関連マーカーや、RANKL による破骨細胞分化のマスターレギュレーターである NFATc1 など、RANKL 刺激によって誘導される転写因子の発現が低下することが明らかになった (図 22B、C)。さらに、CLCF1 の抑制メカニズムを明らかにするために、MCSF または RANKL が投与された細胞と比較して CLCF1-RANKL が投与された細胞に含まれる 297 個の DEG をベン分析によって同定し、ネットワークベースの遺伝子濃縮 NET-GE 分析を行った (図 22D、E)。その結果、インターフェロンシグナルで DEG が最も有意に濃縮されていることが明らかになった (図 22E、F)。RNA-seq の結果と同様に、CLCF1-RANKL 投与の細胞では、インターフェロン制御因子 1 (Interferon regulatory factor 1: IRF1) およびリン酸化された Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) のタンパク質レベルが劇的に上昇していた (図 22G)。同様に、IRF1 とリン酸化された STAT1 の細胞内タンパク質レベルは、CLCF1 刺激後 1 時間という早い段階で上昇した (図 22H、I)。

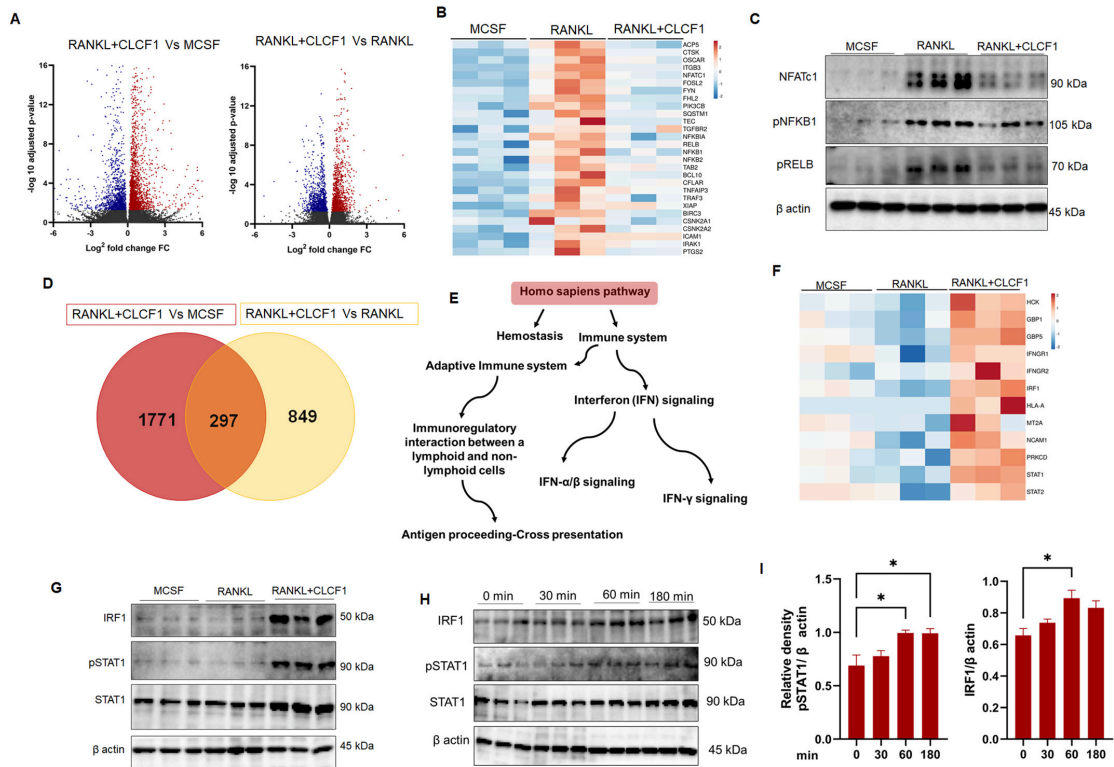


図 22 CLCF1 は IFN シグナルを活性化することにより破骨細胞形成を抑制

A) 分化破骨細胞における遺伝子変化についてのボルケーノプロット解析。対照細胞は、M-CSF 単独または RANKL を含む培地で培養。試験細胞は、CLCF1 を含む MCSF + RANKL を含む培地で 8 日間培養 (n = 3)。赤プロットはアップレギュレートされた遺伝子、青プロットはダウンレギュレートされた遺伝子 ($p < 0.05$)、グレープロットは有意に制御されていない遺伝子。B) 破骨細胞分化と NF- κ B 経路にクラスター化した遺伝子を、エンリッチ KEGG パスウェイデータベースに基づいてヒートマップ解析で解析。C) 破骨細胞分化に関与する選択された分子についてのウェスタンブロット解析。D) 破骨細胞分化において有意に発現が増加している遺伝子の数のベン図解析。E) Reactome アノテーションデータベースに基づく NET-work 遺伝子エンリッチメント解析のための有向非巡回グラフ。F) IFN シグナル伝達経路にクラスター化した遺伝子のヒートマップ解析。G) ウェスタンブロット解析による INF シグナル伝達経路に関わる分子の発現。H) CLCF1 によって刺激された THP1 マクロファージの STAT1 および IRF1 の発現を、異なる時点でウェスタンブロット解析。I) pSTAT1 および IRF1 について、検出されたバンドの相対強度の定量化。有意差は One-way ANOVA、Tukey の多重比較検定により解析。*: $p < 0.05$

これらの知見と同様に、RANKL-CLCF1 を浸したスポンジを包埋されたマウス頭頂骨では、対照群に比べて *Irf1* と *Stat1* の遺伝子発現が増加していた(図 23)。

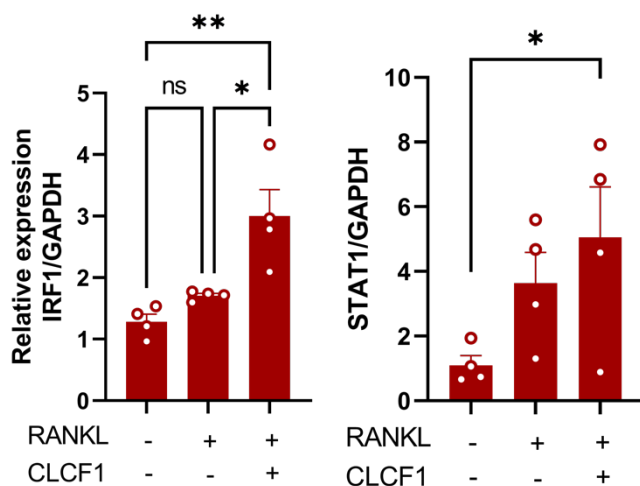


図 23 qRT-PCR で解析したスポンジ移植マウスの頭頂骨における IFN 関連分子の遺伝子発現量。*: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$ ns: 有意差なし

IFN シグナルを制御する主要な転写因子として STAT1 が重要であることから、CLCF1 の抑制効果が STAT1 によって媒介されているかどうかを検討した。注目すべきは、STAT1 阻害剤である fludarabine を 1 時間前に投与すると、*in vitro* での破骨細胞分化に対する CLCF1 の阻害効果が実質的に消失したことである(図 24)。また、RANKL による刺激を受けた細胞の破骨細胞数は、阻害剤の存在下でも非存在下でも有意な差は見られなかった(図 24)。これらの結果を総合すると、CLCF1-IFN 軸は破骨細胞分化の負の制御因子として働き、骨のホメオスタシス維持に必須である可能性が示唆された。

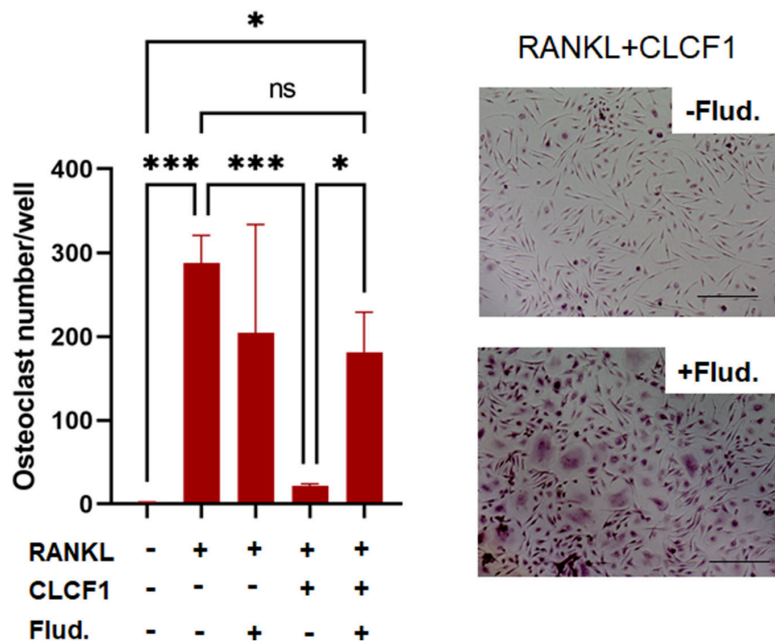


図 24 STAT1 アンタゴニスト存在下での破骨細胞分化に対する CLCF1 の抑制効果。CLCF1 および Fludarabine(Flud.)存在下で、RANKL 刺激で誘導された破骨細胞の定量化。右図は、CLCF1 と Flud を併用した破骨細胞と併用しない破骨細胞の代表画像。

*: $p < 0.05$ ***: $p < 0.001$ ns: 有意差なし

考察

現在、閉経後の女性の骨粗鬆症治療に使用されている薬剤は一定の効果が得られてはいるが、長期間の使用に伴う副作用や、骨の脆弱化を治療できないケースが多く報告されていることから、より安全で効果的な治療法の開発が求められている。骨粗鬆症やその他の骨疾患における病的な骨吸収の治療には、破骨細胞分化におけるサイトカインを制御することが効果的であるとするエビデンスが増えてきている。閉経後は、組織のホメオスタシス調節を行う免疫系バランスの乱れが生じる。CLCF1 は閉経後の骨粗鬆症に関連する免疫関連因子であり、その発現低下は骨量の減少と相関していることや(Chen et al., 2021)、CLCF1 に変異を有するトランスジェニックマウスは頭部と脊椎の筋骨格系異常を示すことから、CLCF1 が骨代謝の調節に関与していることが示唆されている(Sims, 2015)。本研究では、骨粗鬆症に伴う骨吸収に対する CLCF1 の機能を検証した。

CLCF1 を投与することで、骨粗鬆症マウスモデルにおいて、破骨細胞の分化を抑制することで、骨量減少を低下させる効果があることが明らかになった。同様に、CLCF1 は、RANKL 刺激によって誘導される破骨細胞の分化を抑制し、象牙質スライス上の細胞の骨吸収活性を抑制した。CLCF1と同じく IL-6 ファミリーのメンバーである IL-27 は、ヒト破骨細胞前駆体における AP-1 (c-Fos および c-Jun) や NFATc1 などの破骨細胞転写因子の発現を抑制することにより、*in vitro* および *in vivo* の両方で破骨細胞の分化と骨量減少を抑制することが示されている(Tian et al., 2020; Shukla et al., 2017; Terkawi et al., 2019)。Furukawaらは、IL-27 の抑制効果は、c-Fos と NFATc1 を負に制御する STAT1 を活性化する能力に依存していることを報告しており(Kallioliias et al., 2010)、これは CLCF1 投与により STAT1 の発現が増加し、破骨細胞の転写因子のレベルが低下することを示した本研究の結果と合致する。

我々の研究におけるもう一つの重要な発見は、CLCF1 が破骨細胞前駆体において IFN シグナルを誘発することである。一般的に、IFN を介したシグナル伝達経路は破骨細胞の分化において抑制的な役割を果たしている。IFNAR1、IFN β 、IFN γ 、IRF1、STAT1、IFNGR1 などの IFN シグナル成分を欠くマウスは、野生型マウスに比べて骨密度が低下し(Zhao and Ivashkiv, 2011; Takayanagi et al., 2002a)、IFN シグナル成分を欠く細胞は、WT マウス由来の細胞と比べて、*in vitro* で破骨細胞分化が亢進する(Takayanagi et al., 2002b; Place et al., 2021; Laroche et al., 2011)。IFN を介したシグナル伝達経路による破骨細胞分化の抑制は、RANK シグナルの下流にある TNF-receptor associated factors 6 (TRAF6)を介したシグナル伝達の抑制に依存しており、その結果、c-Fos、NF- κ B が抑制され、JNK シグナル伝達経路が活性化される(Zhao and Ivashkiv, 2011; Takayanagi et al., 2002b)。さらに臨

床試験において、肥満細胞症に続発する骨量減少の患者の治療に低用量のインターフェロンによる治療で患者の骨密度を著しく増加させ、骨折のリスクを減少させることが報告されている(Laroche et al., 2011)。また、CLCF1 の刺激により高度にアップレギュレートされることが判明した STAT1 と IRF1 は、IFN シグナル伝達経路の重要な調節因子であり、ヒト単球を STAT1 阻害剤であるフルダラビンで前投与すると、*in vitro* での CLCF1 の効果が消失したことから、CLCF1 による破骨細胞分化の抑制機構には、少なくとも IFN シグナル伝達経路が関与していると考えられる(Salem et al., 2014)。また、我々の結果と一致して、CLCF1 の関連分子である IL-27 は、IFN シグナルに依存したメカニズムで、マウスのコラーゲン誘発関節炎における破骨細胞分化および骨溶解を強力に抑制することが報告されている(Park et al., 2012)。

破骨細胞の分化は、主に RANKL シグナルを介した正規的な経路に依存している。RANKL は RANK と結合し、TRAF を動員し、MAPKs および NF- κ B シグナル伝達経路活性化を介して、破骨細胞分化に不可欠な転写因子である c-Fos および NFATc1 を活性化する。オステオプロテジェリン (Osteoprotegerin: OPG) は、RANKL の可溶性デコイ受容体であり、RANKL に結合して上流のシグナル伝達経路を遮断することにより、このプロセスの主要な負の制御因子として機能しています。実際、RANKL-RANK-OPG 軸の発見により、正規の経路の上流で RANKL とその受容体の相互作用を阻害することにより、骨粗鬆症の治療薬が開発されるに至った。IFN- β も破骨細胞形成の負の制御因子であり、成熟破骨細胞から産生され、破骨細胞前駆細胞の c-Fos の発現を抑制することにより破骨細胞の分化を強く阻害する(Zhao and Ivashkiv, 2011; Takayanagi et al., 2002b)。したがって、IFN シグナリングを引き起こすことができる分子は、骨粗鬆症の新規治療薬としての有力な候補になり得る。

本研究では、CLCF1 は骨芽細胞分化において抑制効果を示さなかったが、これらの結果は、CLCF1 が間葉系幹細胞骨芽細胞およびマウス初代頭蓋骨骨芽細胞の分化を抑制するという過去の報告とは異なる(Nahlé et al., 2019; McGregor et al., 2010)。この2つの知見の相違は、タンパク質の投与量、刺激、曝露時間、実験に使用した細胞の種類の違いに起因すると思われる。しかし、Duque らは、CLCF1 刺激と関連することが判明しているインターフェロンシグナルの活性化が、*in vivo* での骨芽細胞による骨形成を促進し、卵巣摘出マウスの骨粗鬆症を改善することを示している(Duque et al., 2011)。したがって、CLCF1 の骨リモデリングや骨粗鬆症における役割を正確に理解するためには、コンディションノックアウトマウスや CLCF1 に対する機能ブロック抗体を用いたさらなる研究が必要である。

結論として、これまでの骨粗鬆症治療薬とは異なる抗炎症作用に関連する免疫由来因子に着目したアプローチで、CLCF1が骨粗鬆症に対して治療効果を有し、新規治療ターゲットとなる可能性について示した。CLCF1の作用メカニズムとして、IFNシグナルを活性化し、NF- κ Bシグナルを抑制することにより、破骨細胞分化と骨吸収を抑制することが判明しており、今後は副作用などの安全性について検討が必要である。

結論

- 股関節疾患の難病である ONFH をはじめとした骨壊死のメカニズム解明のための評価法として、全身 MRI が有用であることを示した
- 全身 MRI は感度、費用、検査時間、放射線被曝の点で優れた骨壊死診断ツールである
- 全身 MRI によってこれまで診断できていなかった無症候性の骨壊死の診断が容易となり、骨壊死についての臨床像やメカニズムについての評価研究に大いに寄与するものである
- SIF は関節裂隙狭小化が進行することで、股関節の変性変化をもたらす OA の原因となる
- SIF の股関節の変性変化に対する予後予測因子として、骨代謝マーカーが今回新たに明らかになり、局所の重症度を反映している可能性がある
- RDC の新規メカニズムを、臨床滑膜検体を用いて、OA、ONFH と比較することで明らかにした
- RDC の新たなメカニズムとして、NLRP3 インフラマソーム活性化を介した高度滑膜炎が関与することが示された
- SIF を契機として発症する RDC は、SIF の微小骨片に反応して、NLRP3 インフラマソームを介した滑膜炎による破骨細胞分化を亢進が生じることにより、著明な骨吸収を伴った急速な股関節破壊につながることを示唆された
- 股関節疾患の原因となる骨粗鬆症の治療について、これまでとは異なる免疫学的なアプローチで骨脆弱性を是正できる可能性が示された
- 免疫由来因子である CLCF1 は、IFN シグナルを活性化し、NF- κ B シグナルを抑制することにより、破骨細胞分化と骨吸収を抑制することで、骨粗鬆症の新規治療ターゲットとなり得るものである。

本研究は、人々の暮らしに直結する運動器疾患の中でも、特にADLを大きく左右する股関節疾患における、難病に対する新規診断評価ツールの提示、治療法検討のための予後予測因子や不明であったメカニズムを明らかにしたものである。また股関節疾患と直結する骨脆弱性をきたす骨粗鬆症に対して、免疫学的なアプローチでCLCF1が新規治療ターゲットとなり得るものを示した。

本研究をさらに発展させるためには、他の股関節疾患のメカニズム解明においても同様に行い、病態の相違点や共通点など結びつきを明らかにして、関節破壊を予防し関節温存が可能な治療法確立に結びつくような研究が望まれる。またCLCF1の骨粗鬆症以外の骨脆弱性を病態とする疾患への効果や、副作用、長期使用の是非などを含めた、薬剤としての有用性、安全性をより多面的に評価する必要があると考えられる。

謝辞

本論文は、筆者が北海道大学大学院 医学研究科 医学専攻 機能再生医学講座 整形外科学分野博士課程の在学中に行った研究をまとめたものです。稿を終えるにあたり、終始研究のご指導を頂きました整形外科学分野教授 岩崎倫政先生、同助教 照川アラ一先生および北海道大学病院 整形外科 助教 清水智弘先生に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、骨形態学的評価に関するご助言をいただきました北海道大学大学院 医学研究科 医学専攻 機能再生医学講座 整形外科学教室 准教授 高畑雅彦先生、バイオインフォマティクス解析に関する機器の提供並びにご助言を頂きました同特任准教授 角家健先生、組織作成および組織学的病態の解釈にご助言・ご指導頂いた北海道大学大学院歯学研究科 硬組織発生生物学教室 准教授 長谷川智香先生、検体採取にご尽力を頂いた北海道大学病院 整形外科 講師 高橋大介先生に心よりの感謝を申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、数々のご助言、ご協力、ご支援頂きました北海道大学大学院 医学研究科 医学専攻 機能再生医学講座 整形外科学教室の教官各位、教室員の皆様に深い感謝の意を表します。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Abe, H., Sakai, T., Ando, W., Takao, M., Nishii, T., Nakamura, N., Hamasaki, T., Yoshikawa, H., and Sugano, N. (2014). Synovial joint fluid cytokine levels in hip disease. *Rheumatology (Oxford)* 53, 165-172.

Alavi, A., McCloskey, J.R., and Steinberg, M.E. (1977). Early detection of avascular necrosis of the femoral head by 99m technetium diphosphonate bone scan: a preliminary report. *Clin Orthop Relat Res*, 137-141.

Albano, D., Patti, C., La Grutta, L., Grassedonio, E., Mulè, A., Brancatelli, G., Lagalla, R., Midiri, M., and Galia, M. (2017a). Osteonecrosis detected by whole body magnetic resonance in patients with Hodgkin Lymphoma treated by BEACOPP. *Eur Radiol* 27, 2129-2136.

Albano, D., Patti, C., Lagalla, R., Midiri, M., and Galia, M. (2017b). Whole-body MRI, FDG-PET/CT, and bone marrow biopsy, for the assessment of bone marrow involvement in patients with newly diagnosed lymphoma. *J Magn Reson Imaging* 45, 1082-1089.

Alippe, Y., Wang, C., Ricci, B., Xiao, J., Qu, C., Zou, W., Novack, D.V., Abu-Amer, Y., Civitelli, R., and Mbalaviele, G. (2017). Bone matrix components activate the NLRP3 inflammasome and promote osteoclast differentiation. *Sci Rep* 7, 6630.

Allard-Chamard, H., Carrier, N., Dufort, P., Durand, M., de Brum-Fernandes, A.J., Boire, G., Komarova, S.V., Dixon, S.J., Harrison, R.E., Manolson, M.F., *et al.* (2020). Osteoclasts and their circulating precursors in rheumatoid arthritis: Relationships with disease activity and bone erosions. *Bone Rep* 12, 100282.

Ammann, P., and Rizzoli, R. (2003). Bone strength and its determinants. *Osteoporos Int* 14 *Suppl* 3, S13-18.

An, Y.S., Park, S., Jung, J.Y., Suh, C.H., and Kim, H.A. (2019). Clinical characteristics and role of whole-body bone scan in multifocal osteonecrosis. *BMC Musculoskelet Disord* 20, 23.

Assouline-Dayana, Y., Chang, C., Greenspan, A., Shoenfeld, Y., and Gershwin, M.E. (2002).

Pathogenesis and natural history of osteonecrosis. *Semin Arthritis Rheum* 32, 94-124.

Bangil, M., Soubrier, M., Dubost, J.J., Rami, S., Carcanagues, Y., Ristori, J.M., and Bussiere, J.L. (1996). Subchondral insufficiency fracture of the femoral head. *Rev Rhum Engl Ed* 63, 859-861.

Bergsbaken, T., Fink, S.L., and Cookson, B.T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol* 7, 99-109.

Blumer, M.J., Hausott, B., Schwarzer, C., Hayman, A.R., Stempel, J., and Fritsch, H. (2012). Role of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in long bone development. *Mech Dev* 129, 162-176.

Cantwell, C., Ryan, M., O'Connell, M., Cunningham, P., Brennan, D., Costigan, D., Lynch, T., and Eustace, S. (2005). A comparison of inflammatory myopathies at whole-body turbo STIR MRI. *Clin Radiol* 60, 261-267.

Chen, X., Li, J., Ye, Y., Huang, J., Xie, L., Chen, J., Li, S., Chen, S., and Ge, J. (2021). Association of cardiotrophin-like cytokine factor 1 levels in peripheral blood mononuclear cells with bone mineral density and osteoporosis in postmenopausal women. *BMC Musculoskelet Disord* 22, 62.

Clowes, J.A., Riggs, B.L., and Khosla, S. (2005). The role of the immune system in the pathophysiology of osteoporosis. *Immunol Rev* 208, 207-227.

Conklin, J.J., Alderson, P.O., Zizic, T.M., Hungerford, D.S., Densereaux, J.Y., Gober, A., and Wagner, H.N. (1983). Comparison of bone scan and radiograph sensitivity in the detection of steroid-induced ischemic necrosis of bone. *Radiology* 147, 221-226.

Cox, G., Einhorn, T.A., Tzioupis, C., and Giannoudis, P.V. (2010). Bone-turnover markers in fracture healing. *J Bone Joint Surg Br* 92, 329-334.

Duque, G., Huang, D.C., Dion, N., Macoritto, M., Rivas, D., Li, W., Yang, X.F., Li, J., Lian, J., Marino, F.T., *et al.* (2011). Interferon- γ plays a role in bone formation in vivo and rescues osteoporosis in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res* 26, 1472-1483.

El Gamal, T.A., El-Bakoury, A., Hawkins, A., Ed AlTayeb Mussa, M., Er Ahmed Sweed, T., and Eh Samir Ansara, S. (2016). Bilateral Osteonecrosis of the Femoral and Humeral Heads after Short Term Corticosteroid Therapy. A Case Study. *Ortop Traumatol Rehabil* 18, 187-190.

Fordyce, M.J., and Solomon, L. (1993). Early detection of avascular necrosis of the femoral head by MRI. *J Bone Joint Surg Br* 75, 365-367.

Forger, N.G., Prevette, D., deLapeyrière, O., de Bovis, B., Wang, S., Bartlett, P., and Oppenheim, R.W. (2003). Cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor 1 is an essential trophic factor for lumbar and facial motoneurons in vivo. *J Neurosci* 23, 8854-8858.

Fukushima, W., Fujioka, M., Kubo, T., Tamakoshi, A., Nagai, M., and Hirota, Y. (2010). Nationwide epidemiologic survey of idiopathic osteonecrosis of the femoral head. *Clin Orthop Relat Res* 468, 2715-2724.

Ginaldi, L., Di Benedetto, M.C., and De Martinis, M. (2005). Osteoporosis, inflammation and ageing. *Immun Ageing* 2, 14.

González García, A., Sifuentes Giraldo, W.A., Blázquez Cañamero, M., Ahijón Lana, M., Navas Elorza, E., and Vázquez Díaz, M. (2012). Multifocal osteonecrosis associated with human immunodeficiency virus infection. *Reumatol Clin* 8, 361-364.

Gregg, P.J., and Walder, D.N. (1980). Scintigraphy versus radiography in the early diagnosis of experimental bone necrosis, with special reference to caisson disease of bone. *J Bone Joint Surg Br* 62-b, 214-221.

Grigoriu, V., Stefaniu, A., and Fică, N. (1985). [Evolution of a bronchial foreign body (a tooth chip)]. *Rev Chir Oncol Radiol O R L Oftalmol Stomatol Otorinolaringol* 30, 311-314.

Hagino, H., Okano, T., Teshima, R., Nishi, T., and Yamamoto, K. (1999). Insufficiency fracture of the femoral head in patients with severe osteoporosis--report of 2 cases. *Acta Orthop Scand* 70, 87-89.

Hamasaki, M., Terkawi, M.A., Onodera, T., Homan, K., and Iwasaki, N. (2021). A Novel Cartilage Fragments Stimulation Model Revealed that Macrophage Inflammatory Response Causes an Upregulation of Catabolic Factors of Chondrocytes In Vitro. *Cartilage* 12, 354-361.

Hart, G., and Fehring, T. (2016). Rapidly destructive osteoarthritis can mimic infection.

Arthroplast Today 2, 15-18.

Hasegawa, T., Yamamoto, T., Sakai, S., Miyamoto, Y., Hongo, H., Qiu, Z., Abe, M., Takeda, S., Oda, K., de Freitas, P.H.L., *et al.* (2019). Histological Effects of the Combined Administration of Eldecalcitol and a Parathyroid Hormone in the Metaphyseal Trabeculae of Ovariectomized Rats. *J Histochem Cytochem* 67, 169-184.

Ikemura, S., Mawatari, T., Matsui, G., Iguchi, T., and Mitsuyasu, H. (2016). Clinical outcomes in relation to locations of bone marrow edema lesions in patients with a subchondral insufficiency fracture of the hip: a review of fifteen cases. *Br J Radiol* 89, 20150750.

Ishihara, K., Miyanishi, K., Ihara, H., Jingushi, S., and Torisu, T. (2010). Subchondral insufficiency fracture of the femoral head may be associated with hip dysplasia: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res* 468, 1331-1335.

Ishizu, H., Shimizu, T., Kaibara, T., Asano, T., Terkawi, M.A., Takahashi, D., and Iwasaki, N. (2022). Bilateral subchondral insufficiency fractures of the femoral head in a normally active adolescent patient: A case report. *J Orthop Sci* 27, 492-494.

Iwasaki, K., Yamamoto, T., Motomura, G., Ikemura, S., Mawatari, T., Nakashima, Y., and Iwamoto, Y. (2012). Prognostic factors associated with a subchondral insufficiency fracture of the femoral head. *Br J Radiol* 85, 214-218.

Iwasaki, K., Yamamoto, T., Motomura, G., Karasuyama, K., Sonoda, K., Kubo, Y., and Iwamoto, Y. (2016). Common site of subchondral insufficiency fractures of the femoral head based on three-dimensional magnetic resonance imaging. *Skeletal Radiol* 45, 105-113.

Iwasaki, K., Yamamoto, T., Motomura, G., Mawatari, T., Nakashima, Y., and Iwamoto, Y. (2011). Subchondral insufficiency fracture of the femoral head in young adults. *Clin Imaging* 35, 208-213.

Jacobs, B. (1978). Epidemiology of traumatic and nontraumatic osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res*, 51-67.

Jawad, M.U., Haleem, A.A., and Scully, S.P. (2012). In brief: Ficat classification: avascular

necrosis of the femoral head. *Clin Orthop Relat Res* 470, 2636-2639.

Jin, C., Frayssinet, P., Pelker, R., Cwirka, D., Hu, B., Vignery, A., Eisenbarth, S.C., and Flavell, R.A. (2011). NLRP3 inflammasome plays a critical role in the pathogenesis of hydroxyapatite-associated arthropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 14867-14872.

Kallioulas, G.D., Zhao, B., Triantafyllopoulou, A., Park-Min, K.H., and Ivashkiv, L.B. (2010). Interleukin-27 inhibits human osteoclastogenesis by abrogating RANKL-mediated induction of nuclear factor of activated T cells c1 and suppressing proximal RANK signaling. *Arthritis Rheum* 62, 402-413.

Kloen, P., Leunig, M., and Ganz, R. (2002). Early lesions of the labrum and acetabular cartilage in osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br* 84, 66-69.

Knowles, H.J., and Athanasou, N.A. (2009). Canonical and non-canonical pathways of osteoclast formation. *Histol Histopathol* 24, 337-346.

Kuo, A., Ezzet, K.A., Patil, S., and Colwell, C.W., Jr. (2009). Total hip arthroplasty in rapidly destructive osteoarthritis of the hip: a case series. *Hss j* 5, 117-119.

Kuroda, Y., Asada, R., So, K., Yonezawa, A., Nankaku, M., Mukai, K., Ito-Ihara, T., Tada, H., Yamamoto, M., Murayama, T., *et al.* (2016). A pilot study of regenerative therapy using controlled release of recombinant human fibroblast growth factor for patients with pre-collapse osteonecrosis of the femoral head. *Int Orthop* 40, 1747-1754.

Lamkanfi, M., and Dixit, V.M. (2014). Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 157, 1013-1022.

LaPorte, D.M., Mont, M.A., Mohan, V., Jones, L.C., and Hungerford, D.S. (1998). Multifocal osteonecrosis. *J Rheumatol* 25, 1968-1974.

Laroche, M., Livideanu, C., Paul, C., and Cantagrel, A. (2011). Interferon alpha and pamidronate in osteoporosis with fracture secondary to mastocytosis. *Am J Med* 124, 776-778.

Lequesne, M. (1970). [Rapid destructive coxarthrosis]. *Rhumatologie* 22, 51-63.

Li, G., Yin, J., Gao, J., Cheng, T.S., Pavlos, N.J., Zhang, C., and Zheng, M.H. (2013). Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes. *Arthritis Res Ther* 15, 223.

Matsumae, G., Shimizu, T., Tian, Y., Takahashi, D., Ebata, T., Alhasan, H., Yokota, S., Kadoya, K., Terkawi, M.A., and Iwasaki, N. (2021). Targeting thymidine phosphorylase as a potential therapy for bone loss associated periprosthetic osteolysis. *Bioengineering & Translational Medicine*.

Matsuo, K., Hirohata, T., Sugioka, Y., Ikeda, M., and Fukuda, A. (1988). Influence of alcohol intake, cigarette smoking, and occupational status on idiopathic osteonecrosis of the femoral head. *Clin Orthop Relat Res*, 115-123.

Matthews, A.H., Davis, D.D., Fish, M.J., and Stitson, D. (2022). Avascular Necrosis. In *StatPearls* (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.).

Mbalaviele, G., Novack, D.V., Schett, G., and Teitelbaum, S.L. (2017). Inflammatory osteolysis: a conspiracy against bone. *J Clin Invest* 127, 2030-2039.

McGregor, N.E., Poulton, I.J., Walker, E.C., Pompolo, S., Quinn, J.M., Martin, T.J., and Sims, N.A. (2010). Ciliary neurotrophic factor inhibits bone formation and plays a sex-specific role in bone growth and remodeling. *Calcif Tissue Int* 86, 261-270.

Menkes, C.J., Simon, F., Delrieu, F., Forest, M., and Delbarre, F. (1976). Destructive arthropathy in chondrocalcinosis articularis. *Arthritis Rheum* 19 *Suppl* 3, 329-348.

Minoves, M., Riera, E., Costansa, J.M., Bassa, P., Setoain, J., and Domenech, F.M. (1998). Multiple aseptic bone necrosis detected by Tc-99m MDP bone scintigraphy in a patient with systemic lupus erythematosus on corticosteroid therapy. *Clin Nucl Med* 23, 48-49.

Miyaniishi, K., Ishihara, K., Jingushi, S., and Torisu, T. (2010). Risk factors leading to total hip arthroplasty in patients with subchondral insufficiency fractures of the femoral head. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 18, 271-275.

Mont, M.A., and Hungerford, D.S. (1995). Non-traumatic avascular necrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Am* 77, 459-474.

Mont, M.A., Ulrich, S.D., Seyler, T.M., Smith, J.M., Marker, D.R., McGrath, M.S., Hungerford, D.S., and Jones, L.C. (2008). Bone scanning of limited value for diagnosis of symptomatic oligofocal and multifocal osteonecrosis. *J Rheumatol* 35, 1629-1634.

Motomura, G., Yamamoto, T., Miyanishi, K., Shirasawa, K., Noguchi, Y., and Iwamoto, Y. (2002). Subchondral insufficiency fracture of the femoral head and acetabulum : a case report. *J Bone Joint Surg Am* 84, 1205-1209.

Nahlé, S., Pasquin, S., Laplante, V., Rousseau, F., Sharma, M., and Gauchat, J.F. (2019). Cardiotrophin-like cytokine (CLCF1) modulates mesenchymal stem cell osteoblastic differentiation. *J Biol Chem* 294, 11952-11959.

O'Connell, M.J., Powell, T., Brennan, D., Lynch, T., McCarthy, C.J., and Eustace, S.J. (2002). Whole-body MR imaging in the diagnosis of polymyositis. *AJR Am J Roentgenol* 179, 967-971.

Oda, K., Amaya, Y., Fukushi-Irié, M., Kinameri, Y., Ohsuye, K., Kubota, I., Fujimura, S., and Kobayashi, J. (1999). A general method for rapid purification of soluble versions of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins expressed in insect cells: an application for human tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *J Biochem* 126, 694-699.

Park, J.S., Jung, Y.O., Oh, H.J., Park, S.J., Heo, Y.J., Kang, C.M., Kwok, S.K., Ju, J.H., Park, K.S., Cho, M.L., *et al.* (2012). Interleukin-27 suppresses osteoclastogenesis via induction of interferon- γ . *Immunology* 137, 326-335.

Pasquin, S., Laplante, V., Kouadri, S., Milasan, A., Mayer, G., Tormo, A.J., Savin, V., Sharma, M., Martel, C., and Gauchat, J.F. (2018). Cardiotrophin-like Cytokine Increases Macrophage-Foam Cell Transition. *J Immunol* 201, 2462-2471.

Pasquin, S., Tormo, A., Moreau, J., Laplante, V., Sharma, M., Gauchat, J.F., and Rafei, M. (2019). Cardiotrophin-Like Cytokine Factor 1 Exhibits a Myeloid-Biased Hematopoietic-Stimulating Function. *Front Immunol* 10, 2133.

Petrigliano, F.A., and Lieberman, J.R. (2007). Osteonecrosis of the hip: novel approaches to

evaluation and treatment. *Clin Orthop Relat Res* 465, 53-62.

Place, D.E., Malireddi, R.K.S., Kim, J., Vogel, P., Yamamoto, M., and Kanneganti, T.D. (2021). Osteoclast fusion and bone loss are restricted by interferon inducible guanylate binding proteins. *Nat Commun* 12, 496.

Postel, M., and Kerboull, M. (1970). Total prosthetic replacement in rapidly destructive arthrosis of the hip joint. *Clin Orthop Relat Res* 72, 138-144.

Rachner, T.D., Khosla, S., and Hofbauer, L.C. (2011). Osteoporosis: now and the future. *Lancet* 377, 1276-1287.

Rafii, M., Mitnick, H., Klug, J., and Firooznia, H. (1997). Insufficiency fracture of the femoral head: MR imaging in three patients. *AJR Am J Roentgenol* 168, 159-163.

Reginster, J.Y., and Burlet, N. (2006). Osteoporosis: a still increasing prevalence. *Bone* 38, S4-9.

Sakai, T., Sugano, N., Nishii, T., Haraguchi, K., Yoshikawa, H., and Ohzono, K. (2001). Bone scintigraphy for osteonecrosis of the knee in patients with non-traumatic osteonecrosis of the femoral head: comparison with magnetic resonance imaging. *Ann Rheum Dis* 60, 14-20.

Salem, S., Gao, C., Li, A., Wang, H., Nguyen-Yamamoto, L., Goltzman, D., Henderson, J.E., and Gros, P. (2014). A novel role for interferon regulatory factor 1 (IRF1) in regulation of bone metabolism. *J Cell Mol Med* 18, 1588-1598.

Senaldi, G., Stolina, M., Guo, J., Faggioni, R., McCabe, S., Kaufman, S.A., Van, G., Xu, W., Fletcher, F.A., Boone, T., *et al.* (2002). Regulatory effects of novel neurotrophin-1/b cell-stimulating factor-3 (cardiotrophin-like cytokine) on B cell function. *J Immunol* 168, 5690-5698.

Shimizu, T., Yokota, S., Kimura, Y., Asano, T., Shimizu, H., Ishizu, H., Iwasaki, N., and Takahashi, D. (2020). Predictors of cartilage degeneration in patients with subchondral insufficiency fracture of the femoral head: a retrospective study. *Arthritis Res Ther* 22, 150.

Shu, J., Ross, I., Wehrli, B., McCalden, R.W., and Barra, L. (2014). Rapidly destructive inflammatory arthritis of the hip. *Case Rep Rheumatol* 2014, 160252.

Shukla, P., Mansoori, M.N., Kakaji, M., Shukla, M., Gupta, S.K., and Singh, D. (2017).

Interleukin 27 (IL-27) Alleviates Bone Loss in Estrogen-deficient Conditions by Induction of Early Growth Response-2 Gene. *J Biol Chem* 292, 4686-4699.

Sims, N.A. (2015). Cardiotrophin-like cytokine factor 1 (CLCF1) and neuropoietin (NP) signalling and their roles in development, adulthood, cancer and degenerative disorders. *Cytokine Growth Factor Rev* 26, 517-522.

Song, W.S., Yoo, J.J., Koo, K.H., Yoon, K.S., Kim, Y.M., and Kim, H.J. (2004). Subchondral fatigue fracture of the femoral head in military recruits. *J Bone Joint Surg Am* 86, 1917-1924.

Sonoda, K., Motomura, G., Ikemura, S., Kubo, Y., Yamamoto, T., and Nakashima, Y. (2017). Favorable Clinical and Radiographic Results of Transtrochanteric Anterior Rotational Osteotomy for Collapsed Subchondral Insufficiency Fracture of the Femoral Head in Young Adults. *JB JS Open Access* 2, e0013.

Sonoda, K., Yamamoto, T., Motomura, G., Karasuyama, K., Kubo, Y., and Iwamoto, Y. (2016). Fat-suppressed T2-weighted MRI appearance of subchondral insufficiency fracture of the femoral head. *Skeletal Radiol* 45, 1515-1521.

Spel, L., and Martinon, F. (2020). Inflammasomes contributing to inflammation in arthritis. *Immunol Rev* 294, 48-62.

Stables, M.J., Shah, S., Camon, E.B., Lovering, R.C., Newson, J., Bystrom, J., Farrow, S., and Gilroy, D.W. (2011). Transcriptomic analyses of murine resolution-phase macrophages. *Blood* 118, e192-208.

Sugano, N., Kubo, T., Takaoka, K., Ohzono, K., Hotokebuchi, T., Matsumoto, T., Igarashi, H., and Ninomiya, S. (1999). Diagnostic criteria for non-traumatic osteonecrosis of the femoral head. A multicentre study. *J Bone Joint Surg Br* 81, 590-595.

Sun, W., Shi, Z., Gao, F., Wang, B., and Li, Z. (2016). The pathogenesis of multifocal osteonecrosis. *Sci Rep* 6, 29576.

Suri, S., and Walsh, D.A. (2012). Osteochondral alterations in osteoarthritis. *Bone* 51, 204-211.

Takayanagi, H. (2009). Osteoimmunology and the effects of the immune system on bone. *Nat*

Rev Rheumatol 5, 667-676.

Takayanagi, H., Kim, S., Matsuo, K., Suzuki, H., Suzuki, T., Sato, K., Yokochi, T., Oda, H., Nakamura, K., Ida, N., *et al.* (2002a). RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature* 416, 744-749.

Takayanagi, H., Kim, S., and Taniguchi, T. (2002b). Signaling crosstalk between RANKL and interferons in osteoclast differentiation. *Arthritis Res 4 Suppl 3*, S227-232.

Terkawi, M.A., Hamasaki, M., Takahashi, D., Ota, M., Kadoya, K., Yutani, T., Uetsuki, K., Asano, T., Irie, T., Arai, R., *et al.* (2018). Transcriptional profile of human macrophages stimulated by ultra-high molecular weight polyethylene particulate debris of orthopedic implants uncovers a common gene expression signature of rheumatoid arthritis. *Acta Biomater* 65, 417-425.

Terkawi, M.A., Kadoya, K., Takahashi, D., Tian, Y., Hamasaki, M., Matsumae, G., Alhasan, H., Elmorsy, S., Uetsuki, K., Onodera, T., *et al.* (2019). Identification of IL-27 as potent regulator of inflammatory osteolysis associated with vitamin E-blended ultra-high molecular weight polyethylene debris of orthopedic implants. *Acta Biomater* 89, 242-251.

Tian, Y., Terkawi, M.A., Onodera, T., Alhasan, H., Matsumae, G., Takahashi, D., Hamasaki, M., Ebata, T., Aly, M.K., Kida, H., *et al.* (2020). Blockade of XCL1/Lymphotactin Ameliorates Severity of Periprosthetic Osteolysis Triggered by Polyethylene-Particles. *Front Immunol* 11, 1720.

Tomaru, Y., Yoshioka, T., Sugaya, H., Aoto, K., Wada, H., Akaogi, H., Yamazaki, M., and Mishima, H. (2017). Hip preserving surgery with concentrated autologous bone marrow aspirate transplantation for the treatment of asymptomatic osteonecrosis of the femoral head: retrospective review of clinical and radiological outcomes at 6 years postoperatively. *BMC Musculoskelet Disord* 18, 292.

Uchida, S., Noguchi, M., Utsunomiya, H., Kanezaki, S., Mori, T., Matsuda, D.K., and Sakai, A. (2018). Hip arthroscopy enables classification and treatment of precollapse subchondral insufficiency fracture of the femoral head associated intra-articular pathology. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 26, 2527-2535.

Uemura, A., Takizawa, T., Ochiai, W., Yanagisawa, M., Nakashima, K., and Taga, T. (2002). Cardiotrophin-like cytokine induces astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells via activation of STAT3. *Cytokine 18*, 1-7.

Vande Berg, B.C., Malghem, J., Goffin, E.J., Duprez, T.P., and Maldague, B.E. (1994). Transient epiphyseal lesions in renal transplant recipients: presumed insufficiency stress fractures. *Radiology 191*, 403-407.

Viniegra, A., Goldberg, H., Çil, Ç., Fine, N., Sheikh, Z., Galli, M., Freire, M., Wang, Y., Van Dyke, T.E., Glogauer, M., *et al.* (2018). Resolving Macrophages Counter Osteolysis by Anabolic Actions on Bone Cells. *J Dent Res 97*, 1160-1169.

Yamamoto, T. (2012). Subchondral insufficiency fractures of the femoral head. *Clin Orthop Surg 4*, 173-180.

Yamamoto, T., and Bullough, P.G. (1999). Subchondral insufficiency fracture of the femoral head: a differential diagnosis in acute onset of coxarthrosis in the elderly. *Arthritis Rheum 42*, 2719-2723.

Yamamoto, T., and Bullough, P.G. (2000). The role of subchondral insufficiency fracture in rapid destruction of the hip joint: a preliminary report. *Arthritis Rheum 43*, 2423-2427.

Yamamoto, T., Iwamoto, Y., Schneider, R., and Bullough, P.G. (2008). Histopathological prevalence of subchondral insufficiency fracture of the femoral head. *Ann Rheum Dis 67*, 150-153.

Yamamoto, T., Karasuyama, K., Iwasaki, K., Doi, T., and Iwamoto, Y. (2014). Subchondral insufficiency fracture of the femoral head in males. *Arch Orthop Trauma Surg 134*, 1199-1203.

Yamamoto, T., Nakashima, Y., Shuto, T., Jingushi, S., and Iwamoto, Y. (2007). Subchondral insufficiency fracture of the femoral head in younger adults. *Skeletal Radiol 36 Suppl 1*, S38-42.

Yamamoto, T., Schneider, R., and Bullough, P.G. (2000). Insufficiency subchondral fracture of the femoral head. *Am J Surg Pathol 24*, 464-468.

Yamamoto, T., Schneider, R., and Bullough, P.G. (2001). Subchondral insufficiency fracture of the femoral head: histopathologic correlation with MRI. *Skeletal Radiol 30*, 247-254.

Yamamoto, T., Takabatake, K., and Iwamoto, Y. (2002). Subchondral insufficiency fracture of the femoral head resulting in rapid destruction of the hip joint: a sequential radiographic study. *AJR Am J Roentgenol* 178, 435-437.

Yoon, P.W., Kwak, H.S., Yoo, J.J., Yoon, K.S., and Kim, H.J. (2014). Subchondral insufficiency fracture of the femoral head in elderly people. *J Korean Med Sci* 29, 593-598.

Zhang, N.F., Li, Z.R., Wei, H.Y., Liu, Z.H., and Hernigou, P. (2008). Steroid-induced osteonecrosis: the number of lesions is related to the dosage. *J Bone Joint Surg Br* 90, 1239-1243.

Zhao, B., and Ivashkiv, L.B. (2011). Negative regulation of osteoclastogenesis and bone resorption by cytokines and transcriptional repressors. *Arthritis Res Ther* 13, 234.

Zhao, D., Zhang, F., Wang, B., Liu, B., Li, L., Kim, S.Y., Goodman, S.B., Hernigou, P., Cui, Q., Lineaweaver, W.C., *et al.* (2020). Guidelines for clinical diagnosis and treatment of osteonecrosis of the femoral head in adults (2019 version). *J Orthop Translat* 21, 100-110.

Zhen-Guo, H., Min-Xing, Y., Xiao-Liang, C., Ran, Y., He, C., Bao-Xiang, G., Li-Guo, Y., Kai-Ning, S., Chan, Q., and Guo-Chun, W. (2017). Value of whole-body magnetic resonance imaging for screening multifocal osteonecrosis in patients with polymyositis/dermatomyositis. *Br J Radiol* 90, 20160780.