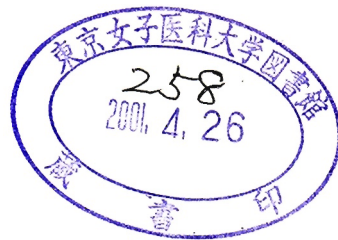


腎不全・腎透析患者の骨組織形態計測、サイトカイン発現、
骨代謝因子受容体多型の分析

課題番号：10671389

平成十年度～平成十二年度科学研究費補助金（基盤研究（C）（2）一般）研究成果報告書

平成十三年三月



研究代表者 加藤 義治
(東京女子医科大学医学部整形外科)



腎不全・腎透析患者の骨組織形態計測、サイトカイン発現、
骨代謝因子受容体多型の分析

課題番号：10671389

平成十年度～平成十二年度科学研究費補助金（基盤研究（C）（2）一般）研究成果報告書

平成十三年三月

研究代表者 加藤義治
（東京女子医科大学医学部整形外科）

研究組織

- 研究代表者 : 加藤 義治 (東京女子医科大学医学部整形外科)
研究分担者 : 伊藤 俊一 (東京女子医科大学医学部整形外科)
研究分担者 : 和田 啓義 (東京女子医科大学医学部整形外科)

研究経費

平成十 年度	1,900 千円
平成十一年度	500 千円
平成十二年度	500 千円
計	2,900 千円

研究発表

1. 学会誌等

1. 加藤義治 透析アミロイドーシス：予防と治療－整形外科的治療、腎と透析、47巻6号、1999年12月
2. 加藤義治、金谷幸一 慢性腎不全のすべて：腎移植－特発性大腿骨頭壊死、腎と透析、2000年49巻増刊号、2000年11月
3. 加藤義治 整形外科手術の周術期管理－透析患者手術の周術期管理 別冊整形外科腎と透析、40巻（印刷中）、2001年10月予定

2. 口演発表

東儀 洋、加藤義治 合成コルチコイド誘発性骨粗鬆症患者の骨折の有無と骨代謝マーカー
第2回骨粗鬆症学会、2000年10月

3. 出版物

加藤義治 糖尿病性腎症の治療－合併症をどう扱うか：骨病変、中外医学社、1999年7月

腎不全・腎透析患者の骨組織形態計測、サイトカイン発現、骨代謝因子受容体多型の分析

【目的】

血液透析技術（以下 HD）の進歩により、HD 患者の生命予後が飛躍的に延びるようになった。そのため、長期 HD 患者における腎性骨異常症（renal osteodystrophy；以下 ROD）、破壊性脊椎骨関節症（Destructive Spondyloarthropathy；以下 DSA）、透析関節症、絞扼性神経障害などの合併症が、現在重要な問題となっている。しかし、ROD、DSA など透析骨症の病態解析は未だ不十分であるため、対症療法しか行えない場合も少なくない。これら透析骨症の病態解析には、従来の病理学的アプローチに加え、分子骨代謝的アプローチおよび骨代謝因子受容体の多型を含めた総括的研究が不可欠である。以上より腎不全・腎透析患者の骨組織形態計測、サイトカインの発現、骨代謝因子受容体多型の分析を総括的に行うことにより、ROD、DSA など透析骨症の病態を明らかにする。

【対象および方法】

1. 骨組織形態計測

当教室で独自に開発したシステム（論文 1,2）により、骨の静的・動的骨動態の解析より、線維性骨炎、骨軟化症、骨低形成・無形成症の亜型を含む分類を確立し、健常若年女性と比較検討した。具体的には、腸骨より採取した骨の骨形態計測で、これまでの手動測定に替え、ニレコ社製自動画像解析装置 Lusex F を使用し、当教室で開発した骨形態計測ソフトで測定した。本法により、より速い、正確なしかも自動的な計測が可能となった。染色は、static parameter を Vilanueva Goldner 染色（図 1）で、dynamic parameter を Vilanueva Bone Stain 染色を行った（表 1）。実際の測定したパラメーターは Frost, Recker らの提唱した structural, static, basic dynamic および derived dynamic の各パラメーター（表 2）で、さらにアルミニウム（Al）染色（Maloney 染色）の標識率も算出した（図 2）。dynamic parameter を測定するため、手術前にテトラサイクリン（以下 Tc）の 2 回投与（3 日投与—7 日休薬—3 日投与—7 日休薬）を施行した（図 2）。総合評価として線維性骨炎型、低形成・無形成型、骨

軟化症型に分類し、各種病態解析を行った。対象は、健常若年女性 (control) 21 例、HD 患者で線維性骨炎型 (24 例)、低形成・無形成型 17 例、骨軟化症型 6 例である。

2. 骨構成細胞のサイトカイン発現

採取腸骨の骨髓細胞、骨芽細胞などから分泌される各種サイトカインを逆転写酵素を用いて、RNA を鋳型とした DNA の合成反応(逆転写反応)をあらかじめ行い、その DNA をあらためて鋳型として Polymerase Chain Reaction (PCR) を行った。この RT-PCR 法により骨髓中のきわめて微量なサイトカインの mRNA の発現を調べることができる。対象サイトカインは IL- α 、IL- β 、TNF- α 、TNF- β さらに IL-6 であり、正常および HD 患者の各骨病態別に、各々のサイトカインの関与 (%) を確認し、これらサイトカインの中で、最も信頼性の高いマーカーを検出した。具体的には採取した骨髓を -80° で保存し、micro fast track kit を使用し mRNA を抽出した。抽出した mRNA に各種 buffer、試薬、primer を加え、cDNA を合成し、PCR を行なった。増幅条件は、denaturation 94°C 、30 秒、アニリング 60°C 、30 秒、extension 72°C 、90 秒で 40 サイクルである。さらに PCR の産物が、確実にそのサイトカインであることを確認するため、DNA を 1 本鎖にしてスポットし、UV クロスリンクでメンブレンに固定し、ドットプロットハイブリダイゼーションを行なった。PCR の positive control は β アクチンである。対象は、健常女性 21 例、HD 患者で線維性骨炎型 13 例、低形成・無形成型 10 例、骨軟化症型 3 例であった。

3. 骨代謝因子受容体多型の分析

HD 患者のうち、特に DSA 患者に着目し、その患者の静脈より採取した血液の遺伝子多型の分析を行った。対象は、X 線像で確実に軟骨篩板および椎体に破壊が認められ、DSA と判定された 51 例で、検討した代謝因子は骨粗鬆症の危険因子としての Vitamin D3 受容体(以下 VDR)、透析アミロイドーシスの発症危険因子と考えられている ApoproteinE 遺伝子多型 (以下 ApoE) である。方法は、VitD3 受容体多型は末梢白血球からゲノム DNA を抽出し、Morrisonらのプライマーを用いて PCR-RFLP 解析により判定した。遺伝子を切断する制限酵素は Bsm I である。ApoE 遺伝子多型も同様の方法で判定した。

【結果】

1. 骨組織形態計測所見（表 3、表 4）

実際に測定した一次パラメーターから計算された二次パラメーターのうち、BV/TV は線維性骨炎型、骨軟化症型で大きく、低形成・無形成型は対照群とほぼ同一であった。OV/BV、OS/BS は当然、骨軟化症型が最も高値で、高骨代謝回転の線維性骨炎型も高値であった。同様に骨代謝回転を表す Ob.S/BS、ES/BS、Oc.S/BS も線維性骨炎型で圧倒的に高値であり、ついで対照群、低形成・無形成型、骨軟化症型の順であった。骨石灰化速度は線維性骨炎型で最も高く、対照群がそれに続き、骨軟化症型、低形成・無形成型ではきわめて低かった。Al 陽性率は低形成・無形成型がきわめて高く、線維性骨炎型はその 1/4、骨軟化症型は 1/20 であった。以上より、組織学的に分類される線維性骨炎型、骨軟化症型、低形成・無形成型の特徴をまとめると、線維性骨炎型は骨芽細胞、破骨細胞の形成、成熟は高率で、その骨構成細胞の活性も高いため、類骨の生成、骨石灰化速度も速い、きわめて高骨代謝回転の組織である。骨軟化症型は、類骨は形成されるが、骨構成細胞の形成、活性は低く骨石灰化速度も遅い低骨代謝回転骨である。特徴的なのは低形成・無形成型で、骨組織（骨量）の少ない、類骨量および類骨表面が少ない、骨石灰化速度も遅い、きわめて低骨代謝回転の組織であった。これは、Al 陽性率がきわめて高いことと関連がある可能性が高い。

2. 骨構成細胞のサイトカイン発現（表 5）

測定した IL- α 、IL- β 、TNF- α 、TNF- β 、IL-6 のうち、各病態別に明確な差異がでたのは IL- β のみであった。IL- β では、線維性骨炎型のみ全例に発現しており、control を含めた他群では、発現率は低かった。IL- α も同様に、線維性骨炎型で高率に発現したが、低形成・無形成型、骨軟化症型でも多く発現した。TNF- α 、TNF- β 、IL-6 の発現をみると control を含め、すべての群で高率に発現しており、IL-6 にいたっては、全症例で発現がみられ、群別での違いは、全くみられなかった。結局、群別の有意差があったものは IL- β のみであった。

3. 骨代謝因子受容体多型の分析

全 51 例の ApoE の結果は、E3/3 : 37/51 例 (72.5%)、E3/4 : 12/51 例

(23.5%)、E2/3 : 2/51 例 (4.0%) と E3/3 が圧倒的に多かった。一方 VDR 受容体遺伝多型は、BB 型 : 3/51 例 (5.9%)、Bb 型 : 15/51 例 (29.4%)、bb 型 : 33/51 例 (64.7%) と bb 型が多かった。この結果からは、ApoE は E3/3 型、VDR は bb 型が本症を引き起こしやすいように思われる。また両受容体の組み合わせとしては、E3/3 ・ bb 型が 28/51 例 (54.9%) と約半数を占め、以下 E3/3 ・ Bb 型 : 9/51 例 (17.6%)、E3/4 ・ Bb 型 : 6/51 例 (11.8%)、E3/4 ・ bb 型 : 3/51 例 (5.9%)、E3/4 ・ BB 型 : 3/51 例 (5.9%)、E2/3 ・ bb : 2/51 型例 (3.9%) であった。

【考察】

長期 HD 患者における腎性骨異栄養症(ROD)、脊椎骨関節症(DSA)、透析関節症、絞扼性神経障害などの合併症が、現在重要な問題となっている。これらの合併症は、長期にわたる Ca 代謝異常の結果として発症し、骨痛、脊髄症・神経根症 (筋力低下、知覚麻痺)、易骨折性、骨の変形、成長障害、腱断裂などのため、HD 患者の生活の質(quality of life ; QOL)に多大な影響をおよぼすため、それぞれの病態解析が望まれている。研究者は、これら合併症の病態解析には、分子骨代謝的アプローチおよび骨代謝因子受容体の総括的研究が不可欠であることを痛感し、HD 患者の骨組織形態計測、サイトカインの発現、骨代謝因子受容体多型の分析を総括的に行ってきた。骨組織形態計測は静的・動的骨動態の解析より、線維性骨炎、骨軟化症、骨無形成症の亜型を含む詳細な分類の完成ができ、サイトカインの発現は IL-1、TNF- α 、TNF- β 、IL-6、 β 2MG の健常者および骨形態計測で分類された各病態別の発現より、その病態による細胞分化が明らかとなる。さらに骨代謝因子受容体多型の分析では、DSA における、VDR、ApoE の遺伝子多型の関与が明らかとなり、原因因子の解明につながる。上記所見を総括的に判定することにより、各合併症の特徴的な病態が明らかにされ、病態に応じた治療および予防が可能と考え、検討してきた。以下、それぞれの項目につき考察を加える。

1. 骨形態計測所見

腎性骨異栄養症患者の腸骨骨生検標本を NIRECO 社製 Luxex F という real time image analyzer を導入し、自動的骨形態計測を行った。control として、これまで日本人健常若年女性では困難であった骨形態計測に使用される腸骨骨

標本の採取が、寛骨臼回転骨切り術の際の移植骨で十分に代用されることを研究代表者：加藤が明らかにし、健常日本人女性の骨形態計測がはじめて可能となり、確実な control study が出来るようになった。そして腎性骨異栄養症患者の腸骨標本の分析を行い、より詳細な硬組織学的分類（線維性骨炎型、無形成骨型、骨軟化症型）を完成させるに至った。その結果、今回示した健常成人女性の骨形態計測値は Recker、Verdi、今野らの計測値と類似し、日本人若年女性の標準値として考えてよい。また腎性骨異栄養症患者の硬組織学的に分類される線維性骨炎、低形成・無形成骨、骨軟化症のそれぞれの組織学的意味を考察すると、線維性骨炎は、骨構成細胞の分化・誘導が促進され、類骨の形成・石灰化の促進した高骨代謝回転骨である。低形成・無形成骨は、骨量、類骨量、類骨表面が少なく、骨石灰加速度も遅い、いわゆる骨粗鬆症の状態である。この原因として、Al 陽性率がきわめて高かったことより、Al が沈着したために、Ca が石灰化前線に十分沈着できず、このような状態に至ったものと推察される。骨軟化症は、全体の Al 陽性率は低形成・無形成骨より低いですが、前述の Al 沈着による、石灰化前線への Ca 沈着がさらに高度に阻害され、これになんらかの骨代謝阻害因子が加わり、重度石灰化抑制に陥った状態と考えられる。実際には同一 HD 患者でも、これら組織所見、ひいては骨代謝回転が、程度の差こそあれ、同時に存在したり、時期に応じて出現しては、変化していると考えられる。

2. 骨構成細胞のサイトカイン発現

骨では、骨構成細胞による骨吸収、骨形成が常時連鎖的に行なわれ（骨改造現象：bone remodeling）、骨基質の恒常性が保たれ、骨組織が維持される。この骨改造現象は、各種サイトカインやホルモンなどの液性因子と細胞表面に発現する接着分子の影響下に、骨構成細胞間同士および細胞と細胞外基質間の相互作用により行なわれる。Ralston は閉経後骨粗鬆症の骨髄における骨吸収性サイトカインの産生を、正常人ならびにホルモン補充療法を受けている患者と比較した研究で、骨生検で得られた骨髄細胞より RNA を抽出し、Reverse transcriptase poly merase chain reaction (RT-PCR 法)により、各種サイトカインの mRNA 発現率を比較したところ、IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 の mRNA の発現率が有意に高いと報告した。IL-1 は in vivo および in vitro において強力な骨吸収活性を示すがその作用機構として、PGE₂ の産生の亢進、

コラゲナーゼ産生の促進、IL-6,IL-11 など他の骨吸収性サイトカインの産生促進などが考えられる。IL-1 が骨芽細胞に作用すると IL-6,IL-11,LIF などの産生が著しく亢進し、これらのサイトカインは、破骨細胞分化誘導能を有し、IL-1 の骨吸収活性発現に関与していると考えられる。また、PTH は、間接的に破骨細胞を刺激して骨芽細胞からのサイトカインの産生を調節しているとされ、MC3T3-E1 細胞を刺激してサイトカインの発現を調べると、IL-6,LIF の mRNA の発現が高かったとの報告もある。PTH と IL-1 との関係についての報告はないが、PTH は骨芽細胞や、ストローマ細胞を介して間接的に破骨細胞性骨吸収を促進するが、その際のメディエーターとして PGE₂,IL-6,LIF,DIF などが考えられている。PGE₂ は IL-1 β により用量依存性に誘導されたり、IL-6 は IL-1 と併用添加により相乗的な骨吸収性の増大が認められたり、IL-1 により IL-6 の産生が増大したり、IL-6 は IL-1 を介した機構により、破骨細胞の分化を促進することが示唆されることより、IL-1 が骨の微小環境下においてさまざまな作用機序においてサイトカインネットワークに影響をおこし、強力な骨吸収活性をおこす可能性がある。以上の報告から、腎性骨異栄養症、特に高骨代謝回転骨である線維性骨炎では、これらサイトカインが高値を示すとい仮定のもと、採骨標本の一部を RT-PCR 法により、分子骨代謝学的解析を行った。その結果、control に比し、確かに線維性骨炎では、健常若年女性に比し IL-1 β が高率に発症した。しかし、他の IL-1 α 、TNF- α 、TNF- β は、同様の方法で調べるも、control と有意差は認められなかった。これは、PCR があくまでも定量検査ではなく、定性検査であることより、より微量のサイトカインを発現させてしまい、その差を検出することが出来なかったためと思われる。PCR の限界と考えられる。

3. 骨代謝因子受容体遺伝子多型の分析

腎性骨異栄養症の脊椎病変である破壊性脊椎関節症 (DSA) は、時に重度の脊椎不安定症に基づく重篤な脊髄症を呈し、治療に難渋する 경우가少なくない。我々は、この DSA の X 線像の発症・進行過程の検討より、骨粗鬆症患者において進行してく場合が多いことを見出した。そのため、 β 2-microglobulin (以下 β 2-mg) が引き金となって、発生・進行していくのではないかとの前提のもと、骨代謝受容体多型の分析を検討すべきとの考えに至った。すなわち、 β 2-mg の組織沈着性を ApoE genotype で、骨粗鬆症の遺伝子素因をビタミン

D受容体遺伝子（以下VDR）で分析した。その結果、現在のところ、ApoEの結果は、E3/3が圧倒的に多く、bb型が多かった。この結果からは、ApoEはE3/3型、VDRはbb型が本症を引き起こしやすいように思われるが、それぞれは日本人の正常人比率と変わりはない。また両者の組み合わせとしては、E3/3・bbが約半数を占め、本症の遺伝子素因とも考えられるが、解釈は慎重でなければならないが、この結果からは、ApoEはE3/3型、VDRはbb型が本症を引き起こしやすいように思われる。本結果から、E3/3・bb型がDSA発症・進行の遺伝子素因として最も可能性が高いと考えられる。

【結論】

1. 腎不全・腎透析患者の骨組織形態計測、サイトカイン発現、骨代謝因子受容体多型の分析を行った。
2. 骨組織形態計測所見では、線維性骨炎型、低形成・無形成型、骨軟化症型に分類され、それぞれ高骨代謝回転、骨粗鬆症様低骨代謝回転、重度石灰化障害の所見を呈していた。
3. 各種サイトカイン発現では、線維性骨炎で、IL-1 β が高率に発症した。
しかし、他のサイトカインはcontrolと有意差は認められず、PCRの限界と考えられた。
4. 骨代謝因子受容体多型の分析 E3/3・bb型がDSA発症・進行の遺伝子素因として最も可能性が高いと考えられる。

表1. 測定標本の染色・項目

- ・ Vilanueva Goldner 染色 : static parameter
 - Tissue Volume (TV) Osteoblast Surface (Ob.S)
 - Bone Volume (BV) Eroded Surface (ES)
 - Osteoid Volume (OV) Osteoclast Surface (Oc.S)
 - Bone Surface (BS) Osteoclast Number (N.Oc)
 - Osteoid Surface (OS)

- ・ Vilanueva Bone Stain : dynamic paramter
 - Single labelled surface (sLS) , Double labelled surface (dLS)

- ・ Al 染色 (Maloney) : Al 染色陽性率、陽性面

表2. 測定項目

自動測定項目	手動を要する項目 (カットのみ)
Tissue Volume (TV)	Osteoblast Surface (Ob.S)
Bone Volume (BV)	Eroded Surface (ES)
Osteoid Volume (OV)	Osteoclast Surface (Oc.S)
Bone Surface (BS)	
Osteoid Surface (OS)	
Al 染色面	Osteoclast Number (N.Oc)

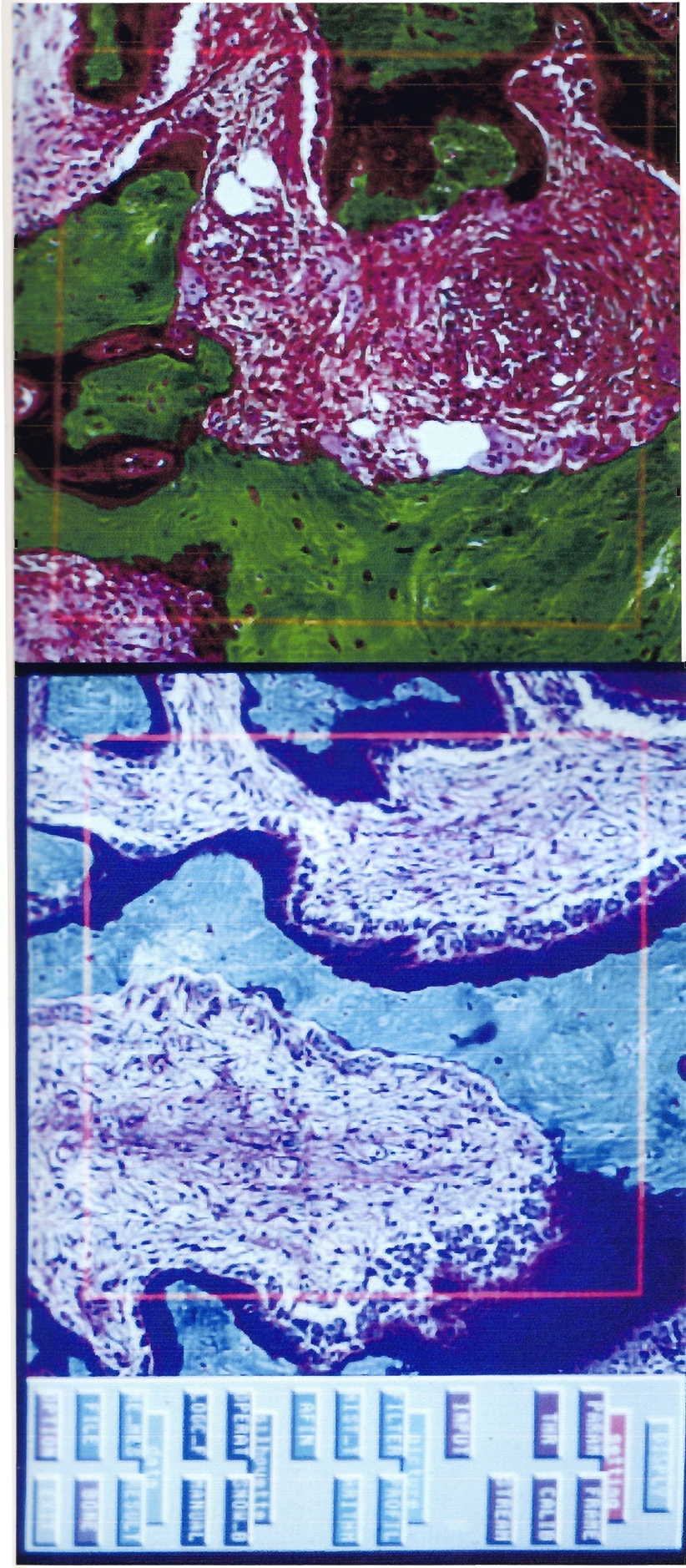
Single labelled surface (sLS)
Double labelled surface (dLS)

表3. 対照群と骨軟化型の二次パラメーター

	control	Osteomalacia
BV/TV (%)	16.1 ± 8.7	32.4 ± 16.9
OV/BV (%)	3.75 ± 3.86	46.5 ± 25.1
OS/BS (%)	20.7 ± 12.4	67.3 ± 23.5
Ob.S/BS (%)	7.48 ± 8.67	6.95 ± 4.15
ES/BS (%)	5.46 ± 6.37	1.02 ± 0.99
Oc.S/BS (%)	1.10 ± 3.23	0.63 ± 2.77
MAR(μm/day)	0.56 ± 0.16	0.12 ± 0.16
AI陽性率 (%)	0	0.8±0.62

表4. 線維性骨炎型と無形成型の二次パラメーター

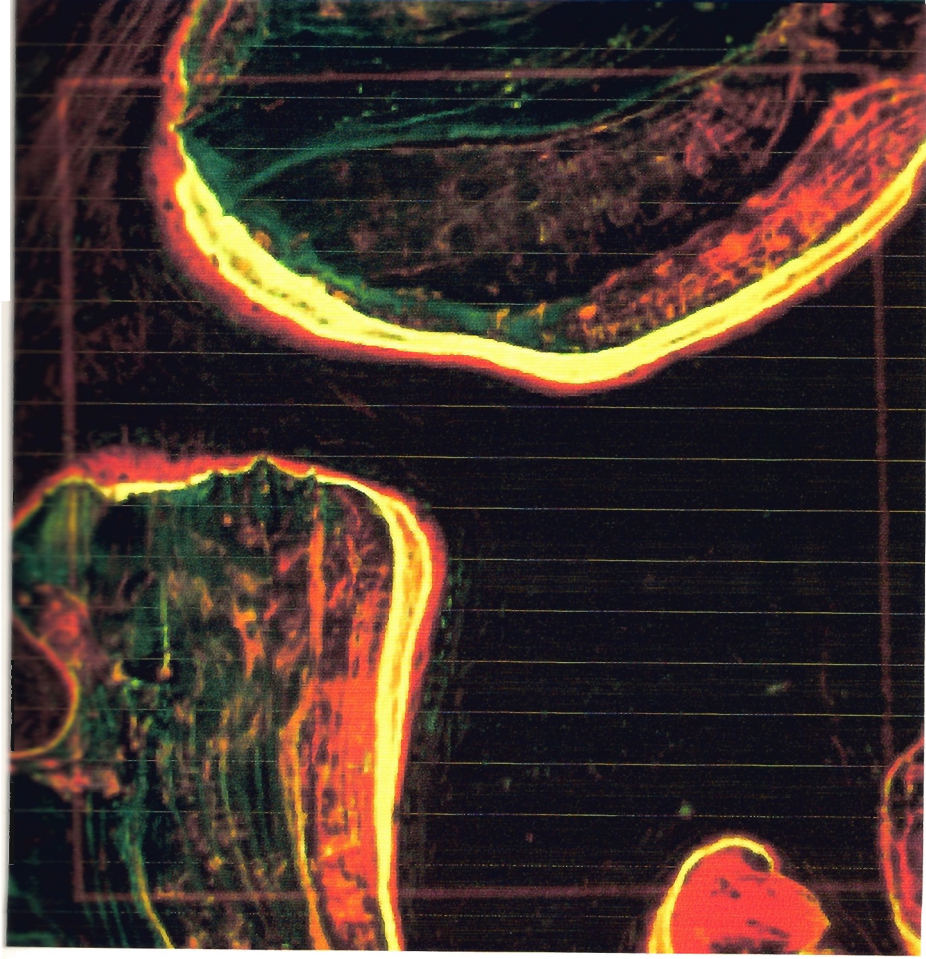
	Osteitis fibrosa	Mild and Aplastic bone
BV/TV (%)	36.4 ± 18.4	16.1 ± 10.7
OV/BV (%)	29.7 ± 18.0	3.75 ± 5.26
OS/BS (%)	31.7 ± 8.82	20.7 ± 12.4
Ob.S/BS (%)	27.7 ± 9.80	7.48 ± 11.1
ES/BS (%)	16.4 ± 5.36	5.46 ± 8.17
Oc.S/BS (%)	4.09 ± 4.67	1.01 ± 2.36
MAR(μm/day)	1.78 ± 0.86	0.16 ± 0.38
AI陽性率 (%)	4.36 ± 6.83	16.4 ± 18.9



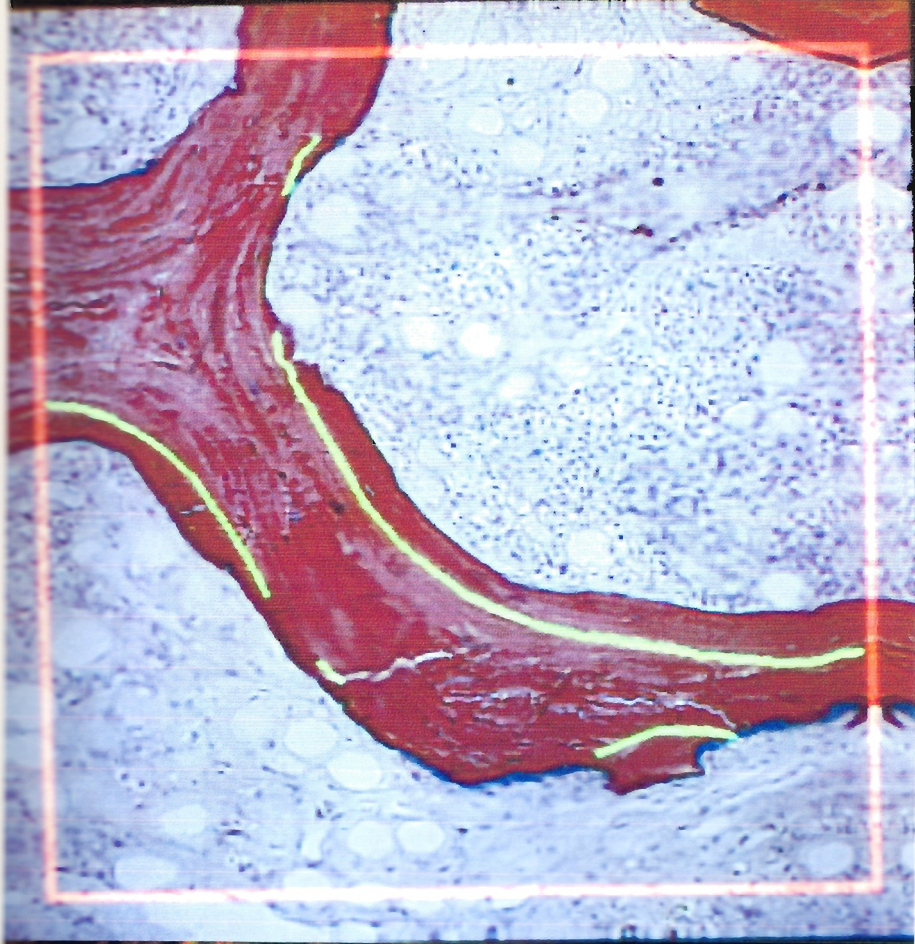
(a)

(b)

図1.(a):自動計測画面。(b)Vilanova Goldner 染色:線維性骨炎の標本。
高骨代謝回転の組織像である。



(a) Vilanueva bone stain



(b) Al染色

図2.(a) Vilanueva bone stain: 蛍光標識標本。Tcの明瞭な二重標識が認められる。
(b) Al染色: 石灰化前線にAlの沈着が認められる。

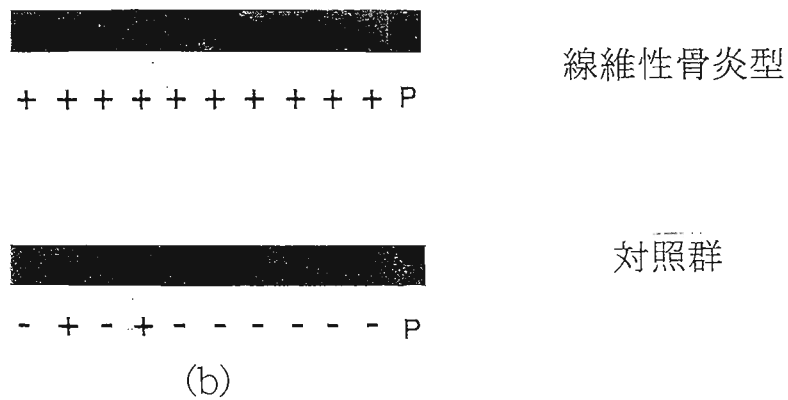
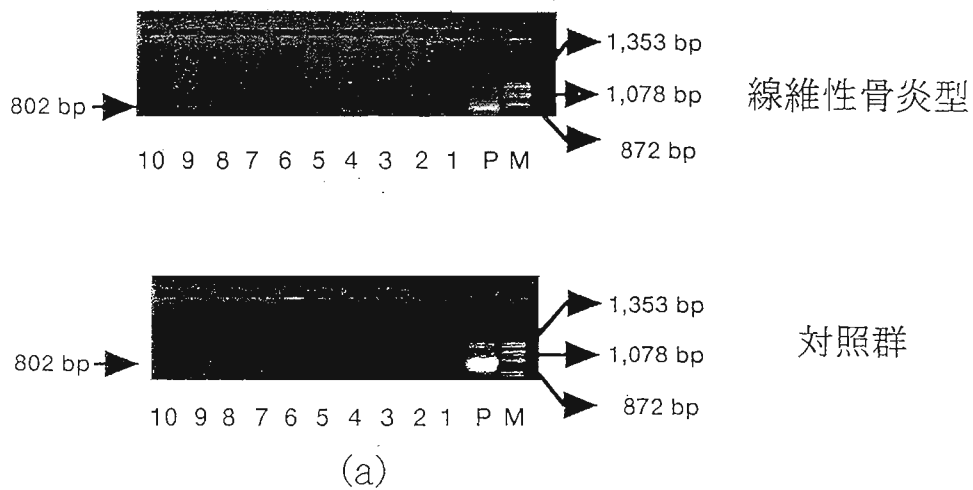
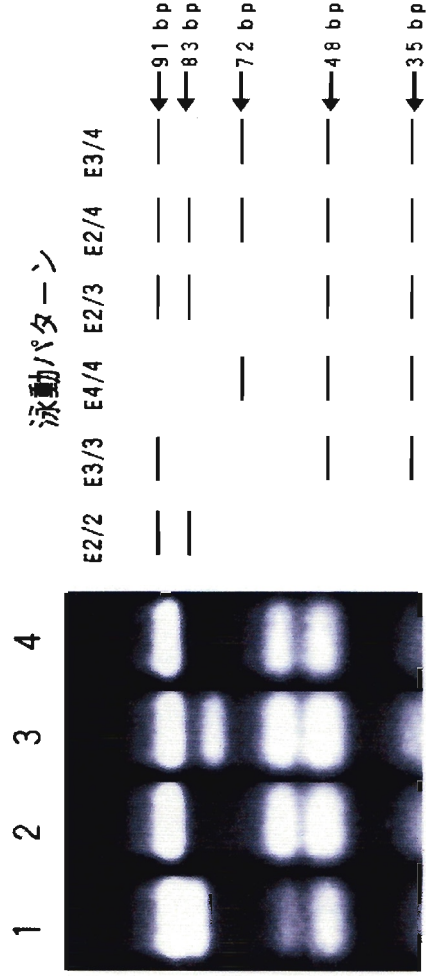


図 3.(a)RT-PCR 法による IL-1 β の発現。(b) IL-1 β のドットハイブリダイゼーション。両者とも線維性骨炎では 100%、対照群では 20%の陽性率を示した

表 5.RT-PCR法による各種サイトカインの発現率

	control	osteitis fibrosa	mild & aplastic bone	osteomalacia
IL-1 α	12/21	11/13	6/10	2/3
IL-1 β	3/21	13/13	3/10	0/3
TNF- α	20/21	12/13	10/10	3/3
TNF- β	18/21	11/13	8/10	2/3
IL-6	21/21	13/13	10/10	3/3

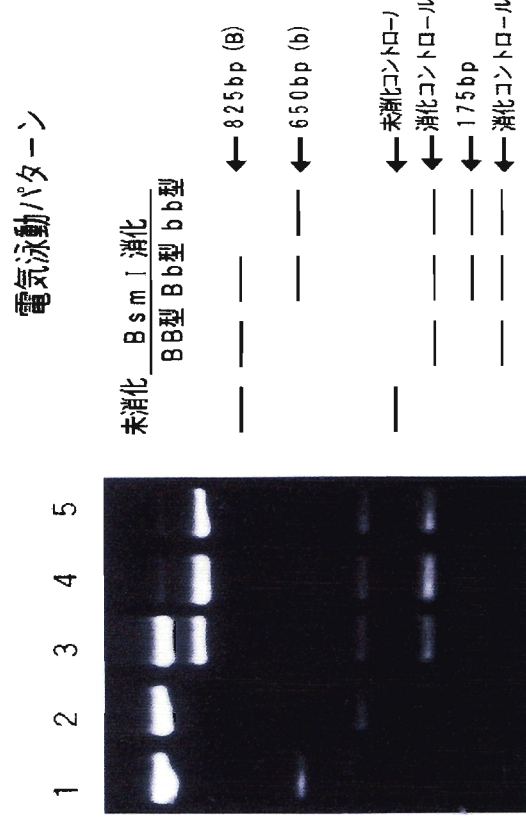
ApoE DNA PCR



- 1: E2/3型コントロール
- 2: E3/3型コントロール
- 3: E3/4型コントロール
- 4: 検体

E3/3型ホモ接合体と判定

VitD receptoe DNA



- 1: 未消化DNA
- 2: BB型コントロール
- 3: Bb型コントロール
- 4: bb型コントロール
- 5: 検体

bb型ホモ接合体と判定

図4.代表的骨代謝因子受容体遺伝子多型(ApoE、VitD)の分析

【参考文献: key 論文のみ】

[組織骨形態計測]

1. Recker RR, Kimmel DB, Parfitt AM et al: Static and Tetracycline-based bone histomorphometric data from 34 normal postmenopausal females. *J Bone Miner Res* 3: 133-144, 1988
2. Vedi S, Compston JE, Webb A et al: Histomorphometric analysis of bone biopsies from the iliac crest of normal British subjects. *Metab Bone Dis Rel* 4: 231-236, 1982
3. Vedi S, Compston JE, Webb A et al: Histomorphometric analysis of dynamic parameters of trabecular bone formation in the iliac crest of normal British subjects. *Metab Bone Dis Rel* 5: 69-74, 1983
4. 今野俊幸: 人腸骨の組織形態計測学的研究. *日整会誌* 61: 1081-1091, 1987
5. Tanizawa T, Takahashi H, Itoh A et al: Bone histomorphometry in chronic renal failure. *J Bone Miner Met* 11(Suppl 2): S47-S52, 1993

[サイトカイン発現]

1. Ralston SH: Analysis of gene expression postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 9(6): 883-890, 1994
2. Klein-Nulend J, Pibeam CC, Harrison JR et al: Mechanism of regulation of prostaglandin production by parathyroid hormone, interleukin-1, and cortisol in cultured mouse parietal bones. *Endocrinology* 128: 2503-2510, 1991
3. Grebfield EM, Gornik SA, Horowitz MC et al: Regulation of cytokine expression in osteoblasts by parathyroid hormone: Rapid stimulation of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor mRNA. *J Bone Miner Res* 8: 1163-11, 1993

[骨代謝因子受容体多型]

1. Morrison NA, Qi JC et al: Prediction of bone density from Vitamin D receptor alleles.
Nature 367: 284-287, 1994

2. 本多佐保 他：慢性関節リウマチ(RA)に続発したアミロイドーシスにおける ApoE の遺伝子型と免疫組織学的検討. リウマチ 38(2), 342-348, 1998