

学 位 論 文 題 名

In Vivo Imaging of Particle-Induced Inflammation and Osteolysis in the Calvariae of NF κ B/Luciferase Transgenic Mice

(NF κ B/Luciferase トランスジェニックマウスを用いた

磨耗粉誘発性骨溶解のin vivoイメージング)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】人工関節置換術は関節機能を回復させ、活動的かつ生産的な生活を取り戻すことができ、リハビリテーション医学の見地からも重要な治療の1つと考えられているが、人工関節の耐用年数は一般に15年~20年と言われている。人工関節摺動面で発生したポリエチレン磨耗粉は骨溶解を引き起こし無菌性のインプラントの弛みを続発させる磨耗粉誘発性骨溶解を起こす。骨溶解は拡大しメカニカルストレスによって固定性を失い、再置換手術を余儀なくされる。骨溶解のプロセスはマクロファージが微粒子の磨耗粉の貪食し炎症誘発性のサイトカインとメディエーターの遊離を誘発し破骨細胞への分化を引き起こし、破骨細胞が働くことにより骨吸収が促進される。NF κ Bは炎症に関与する重要な情報伝達分子であり、炎症性メディエーターの産生と破骨細胞分化に関与することから、人工関節のインプラント周囲の骨溶解で重要な役割を演ずると考えられている。近年、in vivoにて蛍光あるいは発光を検出し、それらを定量化することを、高感度のイメージング技術が生物学領域において応用されている。本研究の目的はNF κ B/ルシフェラーゼトランスジェニックマウスを用いることにより微粒子誘発性頭頂骨溶解モデルにおける骨吸収をin vivoにて評価する手法を確立することである。

【材料と方法】7~8週令のNF κ B/ルシフェラーゼトランスジェニックマウスを実験動物として用いた。ポリエチレン粉(平均粒径7 μ m)を前述の実験動物の骨膜を剥離した頭頂骨に埋植した。対照群には頭頂骨の外科的展開のみを施行した。ポリエチレン粉5mg埋植後7日目に頭頂骨を摘出し、脱灰標本をHematoxylin-Eosin染色およびTartrate-resistant acid phosphatase染色を施し組織学的検討を行った。in vivoでの発光量の定量評価にはIVISイメージングシステムを用い、上記マウス頭頂骨溶解モデルの発光量の経時的変化の検討とポリエチレン粉の量依存性の検討を行った。また、頭頂骨におけるルシフェラーゼ活性分析とRT-PCRを用いて骨溶解関連遺伝子のNF κ B, TNF $\cdot\alpha$, RANKL, IL-1 β , COX-2のmRNAの発現を検討した。ポリエチレン粉埋植7日後に摘出した頭頂骨に対しては非脱灰標本による骨形態学的定量評価、つまり、破骨細胞数、破骨細胞面の周長、吸収面の周長に関し、骨形態計測を行った。

【結果】組織学的検討では、ポリエチレン粉5mgを埋植したマウスは埋植後7日目の頭頂骨の矢状縫合領域に広範囲の骨吸収が観察され、TRAP染色陽性の破骨細胞が多数認められた一方、対照群では骨吸収は観察されず破骨細胞は少数であった。In vivoでの発光量の経時的変化は、ポリエチレン粉5mgを埋植したNF κ B/ルシフェラーゼトランスジェニックマウスは埋植後、発光量は経時的に増加し7日目でピークに達したのに対し、対照群の発光量はわずかであり経時的な増加も認めなかった。埋植後7日目の発光量の量依存性の検討では、2mgを埋植した群で

発光は明らかとなり、5mg を埋植したマウスでピークに達し、10mg を埋植したマウスでは減少した。ポリエチレン粉 5mg を埋植したマウスの頭頂骨のルシフェラーゼ活性は、埋植後 7 日目、10 日目、14 日目に埋植後 0 日に比し、有意に増加し、7 日目にピークを認めた。また、*in vivo* 発光量と頭頂骨のルシフェラーゼ活性との間に有意の正の相関を認めた。骨吸収関連遺伝子の発現の検討では NF κ B の mRNA のレベルは埋植後 3 日目から 14 日目に有意に増加し、TNF- α 、RANKL、IL-1 β 、COX-2 の mRNA に関してもその発現は埋植後有意に増加した。また *in vivo* 発光量と mRNA のレベルの相関に関しては、これらの骨吸収メディエーターのすべての mRNA レベルと発光量との間には有意の正の相関を有していた。骨形態学的骨吸収を評価では、ポリエチレン粉埋植後 7 日目では、破骨細胞面数、破骨細胞面積、骨吸収面は有意に増加し、これら破骨細胞面数、破骨細胞面積、骨吸収面と *in vivo* における発光量との間には有意の正の相関性を有していた。

【結論】これまでの過去の研究により人工関節の摺動面で発生するポリエチレン摩耗粉の生物学的反応が骨溶解を引き起こし、THA の長期予後を左右する重要な因子の 1 つとなることが明らかになっている。つまり、摩耗により関節包内に貯まったポリエチレン摩耗粉はマクロファージに貪食され、この際マクロファージは種々のサイトカインを産生し、これらのサイトカインが破骨細胞の分化を促進して骨吸収が増大する。この骨吸収の増大がインプラント周囲骨組織の骨溶解を進行させ、THA の弛みが生じる主因となる。そこで研究者は NF κ B/ルシフェラーゼトランスジェニックマウスを用い、微粒子誘発性頭頂骨溶解モデルにおける *in vivo* 骨吸収評価を検討した。その結果、本評価系において *in vivo* 発光量は微粒子による頭頂骨の破骨細胞の出現および骨吸収の亢進とともに増加し、さらに発光量は局所ルシフェラーゼ活性を反映することが明らかとなった。また、頭頂骨骨溶解領域における骨吸収メディエーターの遺伝子発現を検討した結果、*in vivo* 発光量は TNF- α 、RANKL、IL-1 β 、COX-2 の遺伝子発現と強い正の相関を認めた。さらに骨形態学的検討により *in vivo* 発光量は破骨細胞数ならびに骨吸収域面積との間に有意の正の相関を示していた。以上により、NF κ B/ルシフェラーゼトランスジェニックマウスを用いた本頭頂骨溶解モデルは微粒子誘発性骨溶解現象の *in vivo* 評価手法として種々の治療効果を評価するために有用な評価系の 1 つと考えられた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	久下裕司
副査	教授	岩崎倫政
副査	教授	安田和則
副査	教授	生駒一憲

学位論文題名

In Vivo Imaging of Particle-Induced Inflammation and Osteolysis in the Calvariae of NF κ B/Luciferase Transgenic Mice

(NF κ B/Luciferase トランスジェニックマウスを用いた

磨耗粉誘発性骨溶解のin vivoイメージング)

人工関節置換後において摺動面で発生したポリエチレン磨耗粉は骨溶解を引き起こし、無菌性のインプラントの弛みを続発させる微粒子誘発性骨溶解を起こす。この治療は大きな臨床課題として認識されている。骨溶解の機序に関する最近の研究によれば、マクロファージが磨耗粉微粒子を貪食して炎症誘発性のサイトカインやメディエーターを産生し、それによって破骨細胞分化が促進され、その結果として破骨細胞による骨吸収が進行する。NF κ B は炎症に関与する重要な情報伝達分子であり、炎症誘発性のメディエーターの生産と破骨細胞形成を促進することから、人工関節のインプラント周囲の骨溶解で重要な役割を演ずるものと考えられている。申請者はこのNF κ Bに着目し、NF κ B/ルシフェラーゼトランスジェニックマウスを用いることによって、微粒子誘発性溶解モデルにおける骨吸収を in vivo 光イメージングにより評価する手法を開発するための基礎研究を行なった。

本研究では NF κ B/ルシフェラーゼトランスジェニックマウスの頭頂骨を外科的に露出した後、エンドトキシンプリーのポリエチレン粉(平均粒径 7 μ m)を埋植した後、in vivo にて IVIS イメージングシステムを用いて頭蓋骨部の発光量を 10 日間にわたって in vivo 計測した。その後、屠殺後に摘出した頭頂骨標本に対して脱灰標本における破骨細胞の組織学的観察(HE および TRAP 染色)を行い、またルシフェラーゼ活性を計測した、さらに NF κ B および骨吸収関連遺伝子発現を測定し、また非脱灰標本を用いた骨形態の計測を行って、それらの in vivo 発光量との相関性を検討した。

その結果、組織学的検討ではポリエチレン粉 5mg を埋植したマウスでは埋植後 7 日目の頭蓋骨の矢状縫合領域に広範囲の骨吸収が観察され、TRAP 染色陽性の破骨細胞が多数認められた。一方、頭蓋骨の外科的展開のみを行った sham マウスでは、骨吸収は観察されず破骨細胞は少数であった。5mg のポリエチレン粉を埋植後、in vivo 発光量は経時的に増加し 7 日目でピークに達し、その後に減少した。発光量は、埋植量 0.5mg から 5mg の間で埋植量依存性が認められた。さらに in vivo 発光量と頭蓋骨のルシフェラーゼ活性との間に有意の正の相関を認め、また NF κ B および骨吸収関連遺伝子である TNF $\cdot\alpha$ 、RANKL、IL-1 β 、COX-2 の mRNA 発現量と in vivo 発光量との間にも有意の正の相関を認めた。さらに骨形態学的検討では破骨細胞数、破骨細胞面積、骨吸収面積と in vivo 発光量との間に、有意の正の相関を認めた。本研究は、NF κ B/ルシフェラーゼトランスジェニックマウスにおいてポリエチレン粉埋植による in vivo 発光量は局所ルシフェラーゼ活性を反映し、頭蓋骨ポリエチレン粉埋植部における NF κ B および骨吸収メディエーターの遺伝子発現や形態学的骨吸収との間に有意の正の相関性を有することを明らかにし、NF κ B/ルシフェラーゼトランスジェニックマウスを用いた本頭蓋骨溶解モデルは微粒子誘発性骨溶解現象の in vivo 評価手法として種々の治療効果を評価するために有用であることを初めて示した。

口頭発表の後、生駒副査から骨表面における埋植ポリエチレン粉の分布状況、発光量が埋植後 5 日より 10 日で減少する理由、頭蓋骨と関節近傍骨との差異、このモデルの臨床応用の方向性、等について質問があった。ついで岩崎副査からこのモデルおよび臨床におけるポリエチレン粉の形状の差異とその効果、等について質問があった。主査はルシフェラーゼ量と発光量の相関に不均一性が存在する理由、NF κ B を微粒子誘発性溶解の指標に選んだ理由、等について質問を行った。安田副査からは本モデルにおいて in vivo 発光量の長期的変化に影響を与える因子、等について質問があった。いずれの質問に対しても申請者は、自己の研究結果と文献的考察に基づいて概ね妥当な回答を行った。

本研究は NF κ B/ルシフェラーゼトランスジェニックマウスを用いることによって、頭頂骨におけるポリエチレン粉誘発性骨融解を in vivo 光イメージングにより検出することが可能であることを初めて報告し、またこのモデルが微粒子誘発性骨溶解に対する種々の治療効果を評価するために有用な評価系になり得る可能性を示して国際的に高い評価を得た。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。