

20020802

厚生労働科学研究費補助金

厚生労働科学特別研究事業

関節リウマチ・骨粗鬆症患者の疫学、病態解明と治療法開発に  
関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 越智 隆弘

平成15(2003)年 4月

## 目次

I. 総括研究報告	2
関節リウマチ・骨粗鬆症患者の疫学、病態解明と治療法開発に関する研究	
越智隆弘	
(資料)研究計画書	
組織図	
患者様への説明・同意文書	
個人試料解析研究 説明・同意文書	
倫理委員会承認書類	
II. 分担研究報告	27
1. 間接リウマチ患者に発症する骨粗鬆症の易学的実態に関する研究	28
中山久徳	
2. ヒト破骨細胞形成に関する研究	30
高橋直之	
3. 関節リウマチ・骨粗鬆症患者の疫学、病態解明と治療法開発に関する研究	33
吉川秀樹	
4. 破骨細胞の生存調節と骨リモデリングに関する研究	36
田中栄	
5. 関節リウマチ・骨粗鬆症患者の疫学、病態解明と治療法開発に関する研究	41
下村伊一郎	
6. RA 由来 B 細胞の性状解析	42
越智隆弘	
7. 関節リウマチの骨髄変化に関する研究	44
広畑俊成	
8. 関節リウマチの EB ウイルス制御機構の検討	47
武井正美	
9. 発現特化型トランスクリプトーム解析による慢性リウマチ原因遺伝子の探索に関する研究	54
野島博	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	55
IV. 研究成果の刊行物	63

# I 平成 14 年度総括研究報告書

(関節リウマチ・骨粗鬆症患者の疫学、病態解明と治療法開発に関する研究)

主任研究者 越智隆弘

厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業)  
総括研究報告書

関節リウマチ・骨粗鬆症患者の疫学、病態解明と治療法開発に関する研究

主任研究者 越智 隆弘 国立相模原病院病院長

研究要旨 1) 関節リウマチ患者のX線所見および骨量測定より、加齢による骨粗鬆症に比べて高頻度かつ高度な骨粗鬆発症していることが判明した。2) 加齢による骨粗鬆症では椎体の骨量に明確な減少症を認めるが、関節リウマチではむしろ大腿骨、中手骨に顕著な骨量減少を認め、関節リウマチ特異的な評価法確立が必要と考えられた。3) 関節リウマチ患者の骨髄には特異な破骨細胞と骨髄球形細胞の集積を認め、それぞれの細胞系の骨髄における特異な分化・増殖病態が認められた。4) 関節リウマチの特異な病態は骨髄あるいは滑膜にある線維芽細胞様細胞に認められたが、この分化異常の原因としてウイルス再検討の必要がある。

分担研究者

高橋直之  
松本歯科大学・総合歯科医学研究所 教授  
野島博 大阪大学微生物病研究所 教授  
吉川秀樹  
大阪大学大学院医学系研究科 教授  
下村伊一郎  
大阪大学大学院生命機能研究科 教授  
田中 栄 東京大学医学部附属病院 助手  
広畑俊成 帝京大学医学部 助教授  
武井正美 日本大学内科学 助手

研究協力者

中山久徳 国立相模原病院 医員  
鈴木隆二  
武田薬品工業(株)研究所 首席研究員  
中村宣雄 協和会病院 医長  
島岡康則 市立池田病院 部長  
行岡正雄 行岡病院 院長  
宮本寛治  
東京都立科学技術大学 大学院教授  
桃原茂樹  
東京女子医大リウマチ・痛風センター 講師

A. 研究目的

関節リウマチ患者は、非リウマチ高齢者に比べて明らかに高頻度かつ高度の骨粗鬆症と易骨折性が認められている。更に、成人発症関節リウマチ患者の中では約40%を占める重症関節リウマチ患者においては、若年成人でも高度な骨粗鬆症を引き起こしている。このような例では椎体骨折発症のみでなく、膝や股関節などの大関節破壊進行の原因になっている。このような臨床的実態解明を進めるとともに、昨年までの厚生労働科学研究としての関節リウマチ病態研究成果の進展として、関節リウマチ患者の骨髄に的を絞って病態解明研究、原因解明研究を進めて、予防方法、治療方法確立を進めることが主目的である。

B. 研究方法＝疫学研究から分子生物学的研究までの研究を前提に、各施設で倫理委員会の承認を得て、調査研究に必要なインフォームドコンセントを患者あるいは試料提供者から得て、以下の方法で研究を進めている。

1) 関節リウマチ患者に発症する骨粗鬆症の疫学的実態調査、診断方法解明の研究

国立相模原病院、大阪大学附属病院整形外科を受診している関節リウマチ患者(約1000例)を対象とした。日本骨代謝学会の診断基準に基づき骨粗鬆症を評価した。併せ、大腿骨、中手骨、

前腕骨等々の腰椎以外の部位の検討、諸方法による骨量の測定、諸種の骨代謝マーカーなどの検討を進めた。

## 2) 病態解明の研究

既に終了した厚生科学研究および医薬品機構基礎研究で解明された病態の一つとして、重症関節リウマチの関節病巣に破骨細胞分化因子(ODF)に依存せずに分化してくる、特異な破骨細胞があることが示されてきた。この分化を支持した線維芽細胞様細胞と、分化してくる破骨細胞の特性解明を主要課題とした。

### i) 線維芽細胞様細胞の研究

関節リウマチ病巣形成に必要なナース細胞が血球細胞を抱込んだときの活性化誘発機序解明も進めている。ナース細胞に抱込まれて活性化したB細胞はナース細胞の細胞質に対する抗体を作っている。この抗原(自己抗原)の解明も進めてきた。またナース細胞に抱込まれた CD14 陽性単球は TRAP 陽性単球に分化し、更に巨細胞が形成されてゆが、この機序解明の研究を活性化因子の面から進めている。

### ii) 破骨細胞関連の研究

重症関節リウマチに認められる RANKL(receptor activator of NF  $\kappa$  B ligand)非依存性破骨細胞の前駆細胞である TRAP 陽性単核球樹立および特性解明を進めた。また高橋直之分担研究者はヒト破骨細胞培養系を確立して病態解明を進めた。更に吉川秀樹分担研究者は巨細胞腫に見られる骨吸収性巨細胞の分化機序を調べた。

## 3) 病因解明の研究

骨髄中のウイルス特有の増殖因子存在の有無、腸骨骨髄ナース細胞のウイルス関連反応で調べられている。更に骨髄血中のウイルス由来の遺伝要素の有無が段階的サブトラクション法で進められている。

## C. 結果

### 1) 関節リウマチ患者に発症する骨粗鬆症の疫学的実態調査、診断方法解明の研究

国立相模原病院(中山久徳)の調査によると関節リウマチ患者で骨粗鬆症患者比率は原発性骨粗鬆症患者の発症比率(山本逸雄, 1999)に比べて明らかに高比率で、かつ高度であった。骨粗鬆症評価部位として腰椎の骨塩量を年齢補正すると(Zスコア)非関節リウマチ対照との比較では明瞭な有意差がでないが、大腿骨、中手骨、とう骨などでの骨量計測ではZ score でP値<0,001 で高度の有意差がでることから、関節リウマチの骨粗鬆症を評価するには日本骨代謝学会の「原発性骨粗鬆症の診断基準(2000 年度改訂版)」では不十分で、骨塩量評価は腰椎のみでなく大腿骨、中手骨、とう骨なども併せて評価すべき事が示唆され、次年度以後の重要な研究課題が示されている。吉川らの研究結果によると、原発性骨粗鬆症患者と高度の有意差を示すのは重症秒型の関節リウマチには若い成人にも起きている特徴的臨床症状という結果を示している。骨代謝マーカーや軟骨代謝マーカーの診断的価値については三施設で系統的に評価を続けて中期以上の追跡データで評価項目を決めることを企画している。

### 2) 病態解明の研究

関節リウマチの病態として腸骨骨髄中のいわゆるナース細胞機能を保有して諸種の活性化血球細胞を支持するナース機能を保有する繊維芽細胞様間質細胞の研究と、ナース細胞との共培養で前破骨細胞、更に破骨細胞に分化するCD14陽性単球系とに的を絞っている。

### i) 線維芽細胞様細胞の研究

関節リウマチ腸骨骨髄から得た CD34 陽性未分化細胞に GMCSF や TNF- $\alpha$ を加えて培養すると、骨髄や滑膜細胞から分離できるナース細胞機能をもった線維芽細胞様細胞が分化増殖してくる。さらに CD34 陽性未分化細胞に SCSF および GMCSF を加えて培養すると血管新生を誘導する Von Willebrand 因子が発現し、血管新生をも引き起こし得ることが示された。このようなナース細胞を分化させる各段階の表面抗原の変化と機能との関連を引き続き解明して、病態解明や治療ターゲットに用いることを企画している。この細胞によって病巣の血球細胞機能がかなりコントロールされている。例えば、この細胞と健常人 CD14 陽性単球とを

共培養すると約4週間後に TRAP 陽性単核細胞が分化してくるなどである。このような線維芽細胞様細胞の分化とナース細胞機能出現機序解明は次に大きく発展できる課題としている。このような CD34 細胞の生態的調節機序解明が下村伊一郎班員に分担されている。

#### ii) TRAP 陽性細胞の病態機能解明の研究

関節リウマチ腸骨骨髓から得た線維芽細胞様細胞と健常人 CD14 陽性単球を共培養することにより樹立に成功した TRAP 陽性単核細胞に組織破壊活性があるかを調べ、MMP-2, -9 はじめ多種の MMP が産生され明瞭な組織破壊活性が認められた。骨・軟骨破壊には重要な役割を果たしていると考えられた。更にこの細胞に IL-3, -5, -7, GM-CSF のいずれかを加えることにより単核球の細胞融合が起きて多核巨細胞が形成された。この細胞は非常に顕著な骨吸収活性を持っていることが証明された。重症関節リウマチ特有と考えられるこの細胞の誘導には ODF 添加を必要としないので、従来の破骨細胞との分別を正確に行い関節リウマチに伴う骨吸収機序を細胞レベルで行う強力手段として慎重な検討を続けている。高橋直之班員はヒト破骨細胞培養系を確立して RANKL 非依存性破骨細胞の有無に関しての検討を試みた。健常人末梢血から採取した CD14 陽性細胞培養系に M-CSF を加え、RANKL 添加あるいは非添加で7日間培養した。RANKL 非添加培養系でも、添加培養系に比べて少ない細胞数ではあるが、破骨細胞への分化を認めた。吉川秀樹班員は巨細胞腫(GCT)を数代培養して得た多角形ないし紡錘形細胞(GOS)を得て破骨細胞様巨細胞の支持能を調べた。GOS の mRNA による RT-PCR では RANKL 陰性、RANK 陰性、OCIF 陽性であった。この GOS 細胞培養上清存在下でヒト末梢血単球(CD14 陽性細胞)を共培養すると、多数の TRAP 陽性多核巨細胞が形成され、骨吸収能が認められた。

#### 3) 病因解明の研究

本研究の一つの課題として関節リウマチ患者骨髓の線維芽細胞様細胞のナース細胞機能保有機序を研究標的にしている。ナース細胞がB細胞を抱き込み機能亢進が起きるとき、B細胞はナース細胞の細胞質に対する抗体を産生する。この抗原物質は25あるいは50KDの蛋白であり、EF1- $\alpha$ と同定された。EF1- $\alpha$ は特異的とは言えないがウイルスの増殖因子として作用することが知られている。抱き込まれる細胞が培養前に EBV 陰性でも、培養後に EBV 陽性になっている例があることを、以前に島岡ら、広畑らが報告しているが、武井正美班員も改めて示した。次年度以後に成果が期待されるウイルスに関するもう一つの研究として、関節リウマチ骨髓血中の遺伝要素に関するライブラリー作成とともに、ウイルス由来の遺伝要素解明(野島博班員)が進められている。

#### D. 考察

関節リウマチ患者の臨床症状としての骨粗鬆症は高頻度に認められ、近年問題視されている加齢に伴う骨粗鬆症に比べて明らかに高度で椎体のみでなく関節周辺の骨折の原因ともなっている。関節リウマチの重傷度との関連は今後の検討課題であるが、関節リウマチ患者の骨粗鬆症の評価の検討が強く求められる。骨代謝マーカーや軟骨代謝マーカーも含めて関節リウマチ特有の評価基準が確立されるべきことが示され、次年度以後の課題にしたい。の必要性ががこれでよいのかが先ず問題であるが、年齢的な補正をした Z-score では腰椎では非リウマチ対照との間の有意差なく、むしろ大腿骨、様骨等々の Z-score で有意差が明らかであったことから、

既に終了した厚生科学研究および医薬品機構基礎研究で示された現象の一つであるが、重症関節リウマチで認められる分化・機能ともに亢進した破骨細胞には、破骨細胞分化因子(ODF)に依存せずに分化してくる特異な破骨細胞が多数存在している問題に対しても取り組んでいる。この細胞系は TRAP 陽性単核細胞にも組織破壊活性が認められ、骨・軟骨破壊には重要な役割を果たしていると考えられた。更にこの細胞から ODF 非添加で顕著な骨吸収活性を持つ多核巨細胞が形成された。吉川秀樹班員は巨細胞腫由来細胞の破骨細胞様巨細胞の支持能を調べて、各種病態による

多様な骨吸収性多核巨細胞形成経路の存在を示唆した。高橋直之班員がヒト破骨細胞培養系によって RANKL 非添加培養系でも、添加培養系に比べて少ない細胞数ではあるが、破骨細胞への分化を認めているが、関節リウマチにおける高度の骨吸収能を持つ破骨細胞様巨細胞の特性を解明することは急務である。

いわゆる関節リウマチの病因にも結びつき得るのが、線維芽細胞様細胞のナース細胞機能発現機序解明研究と考えている。ナース細胞と共培養した健常人B細胞や CD14 陽性細胞との反応ウイルスの関与を想定させる病態が見いだされてきた。次年度には病因ウイルスを積極的に探索できる課題を取り入れてゆくが、野島班員による段階的サブトラクション法は最も有力な手段の一つと考えられる。

E. 結論=1) 関節リウマチ患者のX線所見および骨量測定より、加齢による骨粗鬆症に比べて高頻度かつ高度な骨粗鬆症発症していることが判明した。2) 加齢による骨粗鬆症では椎体の骨量に明確な減少症を認めるが、関節リウマチではむしろ大腿骨、中手骨に顕著な骨量減少を認め、関節リウマチ特異的な評価法確立が必要と考えられた。3) 関節リウマチ患者の骨稜には特異な破骨細胞と骨髄球形細胞の集積を認め、それぞれの細胞系の骨髄における特異な分化・増殖病態が認められた。4) 関節リウマチの特異な病態は骨髄あるいは滑膜にある線維芽細胞様細胞に認められたが、この分化異常の原因としてウイルス再検討の必要がある。

# 研究計画書

## 課題名

関節リウマチ・骨粗鬆症患者の疫学、病態解明と治療法開発に関する研究

## 研究責任者 (所属・職名・氏名)

国立相模原病院臨床研究センター・センター長・越智 隆弘

## 本研究の背景

社会の高齢化に伴い、リウマチ患者にも加齢に伴い顕著になる骨粗鬆症と骨折、変形性関節症、そして続発する機能障害が注目され、その予防や治療に国家的対応が迫られてきた。従来周知されていなかったが、関節リウマチに伴う骨髄病態によって、加齢に依るものより高度な骨粗鬆症が発症し、骨折や続発する機能障害などにより社会問題を大きくしていることが知られ始めている。このような関節リウマチに伴う骨粗鬆症の基礎的、臨床的研究は国内・外とも未解明であり、緊急の課題となっている。

一方、越智らは厚生科学研究助成や医薬品機構研究助成などに依り関節リウマチの病態研究を続け、異常に機能亢進した種々の血球細胞と、これらを維持増殖させる線維芽細胞様間質細胞によりリウマチ病巣が構成され諸病態が形成されることを明らかにしてきた。種々の血球細胞と線維芽細胞様間質細胞ともに造血系の腸骨骨髄に於いて異常活性化され、更に全身性に広がる二次的病巣として、関節腔内に滑膜病巣が形成されることが考えられている。

軽症リウマチに見られるリンパ球系機能亢進に、更に機能亢進誘発の閾値が高い破骨細胞や骨髄球系細胞などの異常増殖・機能亢進が加わる重症リウマチでは特に骨吸収作用が亢進し、骨髄中の骨稜が著しく菲薄化し骨粗鬆症の状態に陥り、骨粗鬆症、椎体骨折、関節部の軟骨下骨圧潰を伴う大関節破壊などとして臨床的に認識されている。

更に、この重症リウマチ患者の骨髄に多数分化・増殖している破骨細胞の分化過程は破骨細胞分化因子(ODF)に依存しないことが判明し、分化段階でODFに依存する既知の破骨細胞とは異種の細胞であることが示され大きな課題を投げかけている。リウマチ患者で分化、増殖してくる破骨細胞が既知のものと異なるものならば、緊急に特性を解明してリウマチ骨髄における骨吸収を特異的に抑制する治療薬の開発が緊急課題と考えられている。

「リウマチの主病巣が骨髄」という考え方は厚生科学研究費や医薬品機構研究費などに支援された日本発の独創的な研究であり欧米からも評価され、日米の共同研究体制で解明を急ぐことがNIHの主任研究者であるリプスキー博士などから求められている。以上のような背景のもと、この研究を急ぎ、成果に基づき高い有効性を示す治療薬の開発研究が急がれている。



## 研究の概要

関節リウマチ患者は世界中で人口の0.5-1%の発症があるといわれ、日本では約70万人の発症とされている。社会の高齢化に伴い、加齢だけではおき得ない高度な骨粗鬆症に陥り重度な機能障害に陥る患者が増し社会問題になりかけている。本研究ではこの関節リウマチ・骨粗鬆症更に対照疾患としての変形性関節症の問題に関して臨床疫学から遺伝学的解析までを緊急課題として、以下のような研究者のサブグループを構成して推進することを企画している。

- (1) 疫学的実態調査研究： 関節リウマチ患者には、加齢という要因だけでは考えられない顕著な骨量減少がおきることが予備研究により認められている。この実態を国立相模原病院、東京大学整形外科学教室、大阪大学整形外科学教室などの国公私立診療・研究施設が共同で実態調査する。
- (2) 骨形成・吸収の分子生物学的研究： 関節リウマチ患者では、骨髄中の線維芽細胞様間質細胞に支持され分化してくる新規未知のODF非依存性破骨細胞の顕著な分化がおきていることが見いだされた。従来から知られていた既知破骨細胞との比較の上で、関節リウマチ患者の破骨細胞研究が急務である。既知の破骨細胞に関しての著明な研究で知られる松本歯科大学、東京大学整形外科のグループと、新たな破骨細胞を進めてきた国立相模原病院、大阪大学整形外科のグループとが共同で関節リウマチをめぐる破骨細胞動態の解明を基本に、関節リウマチ・骨粗鬆症そして対照疾患である変形性関節症などの骨形成・吸収病態解明の研究を上記施設などの国公私立診療・研究施設が共同で進める。本研究推進には手術時切除組織片、骨髄血、末梢血などの確保が必要である。
- (3) 骨髄病態研究： 関節リウマチの主病巣としての骨髄研究を続けてきたが、特に本研究では未知の破骨細胞等々における血液細胞の増殖・分化などの異常亢進と、慢性化に必須の線維芽細胞様間質細胞分化・機能亢進誘発に関わる骨髄細胞病態の研究を進める。更に視点を広げて、加齢や関節リウマチに伴う骨髄変化（脂肪髄など）と骨粗鬆症、関節破壊病態との関連などを広く検討する。国立相模原病院、国立大阪南病院、大阪大学生命機能研究科、米国国立研究所(NIH)、市立池田病院、行岡病院、協和会病院、武田薬品工業株式会社研究所などの国公私立診療・研究施設が共同で解明研究を進める。この目的には関節リウマチ、変形性関節症、骨粗鬆症その他の手術時に切除した組織片、骨髄血、末梢血などの確保が必要である。
- (4) 関節リウマチの病因解明の研究： 関節リウマチの諸病態を引き起こす原因（病因）として諸研究が成されてきたが、本研究では特に、EBウイルスによる細胞生物学的病態解明研究および患者骨髄血中、末梢血中のウイルス由来mRNA検索を進めるものである。国立相模原病院、帝京大学内科、日本大学、大阪大学微生物研究所などの国公私立診療・研究施設が共同で解明研究を進める。この目的には、リウマチ患者の手術時切除組織片、骨髄血、末梢血などの確保が必要であり、遺伝要素検索研究のために担当基幹施設における倫理委員会の承認が必要となる。
- (5) 高度な骨・関節破壊発生の力学的機序の研究： 高度な骨粗鬆症の骨がどの様な機序で骨・関節あるいは脊椎破壊に陥ってゆくかをバイオメカニクス面から解析して再建治療の基本論を得る。慶応大学整形外科、大阪大学整形外科などの国公私立診療・研究施設が共同で解明研究を進める。
- (6) 治療法開発の研究： 根治療法として破骨細胞あるいは間葉系細胞を抑える新薬開発を進める。これは武田薬品工業株式会社研究所で行う。また、発症している骨粗鬆症に対する対症療法として人

工骨およびその使用形態開発研究を進める。これは大阪大学整形外科が開発研究を進める。これらの研究目的には、本研究班で確保できるあらゆる検体あるいは細胞、蛋白、遺伝要素を治療研究開発グループに供給する必要がある。

## 本研究の目的

本研究では関節リウマチ・骨粗鬆症の臨床疫学の実態調査に始まり、腸骨骨髓細胞を用いての関節リウマチの病因、病態解明および変形性関節症など対照疾患との比較検討の上で遺伝要素解析を含む組織破壊機序解明と、その結果に基づく根本的治療法開発を急ぐことである。

## 試験方法

- (1) 試料の取得： 担当医師が治療を目的とした外科切除により取得した関節疾患組織とその周辺組織、同時に採取した骨髓血、末梢血など。
- (2) 試料等の保存： 取得後 $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存されたものを使用する。またそれらから調整された蛋白・遺伝子サンプルはコード番号を付け、鍵付き冷凍庫に保管する。また、試料のデータは電子媒体で管理し、共同研究機関および研究責任者および研究担当者以外は使用できない。
- (3) 細胞生物学的解析： 取得試料を公知の手法により細胞生物学的解析する。
- (4) 遺伝要素の解析： 切除された組織、同時に取得した骨髓血、末梢血などから公知の手法により遺伝子発現および gene chip による遺伝子解析を行う。

## 研究期間

2002年7月25日 ～ 2005年7月31日

## 予想される結果

病変部組織は正常組織と比較して、異なった多くの炎症性、組織破壊および細胞増殖に関与する蛋白と遺伝子の発現または抑制が観察されると予想される。これら正常時と異なった因子の発現状況と関節リウマチおよび骨粗鬆症、変形性関節症などの対照疾患の病態形成に対する関連性を比較することにより、根本的治療薬開発という本研究の目的が達成される。

## 本研究協力依頼の対象症例選択基準

- (1) 対象疾患： 研究協力施設において手術が行われた関節疾患症例を対象とする。
- (2) 選択基準： 関節リウマチおよび骨粗鬆症、変形性関節症などの対照疾患であることが臨床的に診断され、機能再建目的などで手術を受ける患者のうち、手術時切除標本、骨髓液、血液などの試料を採取し研究目的で用いることに関して文書で説明し、本人（本人死亡の場合には代諾者）から同意書で承諾が得られた症例。
- (3) 種類と数量： 採取試料は①関節切除標本、②骨髓液(5-10ml)、③血液(10ml)。年間200症例を予定。
- (4) 使用薬剤： 該当無し。

(5)検査および評価項目： 該当無し。

(6)モニタリング： 該当無し。

(7)除外基準：

- ・ HBs抗原、抗体いずれかが陽性である患者
- ・ HCV抗体またはHCV-RNA陽性である患者
- ・ その他、健常人に重篤な感染症を引き起こす可能性のある患者
- ・ 主治医が本研究遂行上、不相当と判断した患者

### 症例の登録方法

(1)患者の登録： 対象患者の適格条件を満たした患者に対し、切除後組織、骨髓血、末梢血などの試料に関して本研究への使用を依頼し関連する書類を手渡す。患者が試料の使用を同意した場合、同意書に署名し本研究責任医師に提出する。

(2)登録場所と方法： 先ず試料採取施設に匿名登録（連結可能匿名化）したうえで、本研究総括事務局である国立相模原病院に匿名登録される。

(3)割付方法： 該当なし。

### 試料等が必須である理由

患者臨床試料を用いて実施される本研究は、本疾患に特異的な病態機序に焦点を合わせて遂行される。その成果を標的とし最終的には創薬研究に資す。本疾患に完全に類似もしくは模倣した病態動物モデルは現状では無い。そのため、本疾患患者試料等を用いた病態解明アプローチ・創薬アプローチは、その目的に必須である。

### 試料等および遺伝情報の外部機関への提供、保存と廃棄

研究試料を得た時点で該当施設にて試料の名前を暗号化（連結可能匿名化）し個人情報の流出を防ぐ。その後、本研究総括事務局である国立相模原病院に匿名登録、保存した後に、適切な共同研究施設へ必要分のみ送られる。研究実施終了後に共同研究機関との協議の上、全ての試料および試料から得られた細胞・蛋白・遺伝子は国立相模原病院臨床研究センターに返却して保存する。それは本研究で得られた結果をさらに詳細に検討する際に使用する。保存の必要性が無いと判断された試料については匿名のまま密封容器に廃棄するか、または焼却処分する。

### ヒト細胞・遺伝子・組織バンクへの試料等の寄託

無し

### データの集積および解析

(1)関節疾患の活動性、重症度の評価： 臨床担当医師が、共同研究施設間で申し合わせた一定の臨床的評価基準による。

(2)患者およびデータの取扱い： データ解析の後、研究責任者が個人情報を一括管理し責任を持って個人情報を保護する。

(3)データ解析：

1. 症例登録状況の集計： 国立相模原病院臨床研究センターで行う
2. 疾患重症度などの評価： 国立相模原病院臨床研究センターでまとめた一定の評価基準による。
3. 安全性の解析： 国立相模原病院臨床研究センターでまとめた一定の評価基準による。

## 研究成果の発表

本試験計画に基づいて実施された研究成績は共同研究者全員のものとし、本研究に参加した研究者の合意のもとに公表する。

## 個人情報の保護の方法

本研究では個人情報保護のために試料と提供者との連結可能匿名化を実施し、試料と提供者との対応付けは出来ない。

## インフォームド・コンセントを取得するための手続きおよび方法

- (1) 説明項目等： 担当医師は患者本人の試料の使用に際し下記の内容を詳しく説明する。説明・同意文書は説明する時に患者本人に手渡す。(患者説明文書および同意書を添付)
- A. 手術時切除組織片、骨髓血、末梢血を解析する本研究は関節リウマチ患者、骨粗鬆症および変形性関節症などの対照疾患による骨関節破壊の原因、病態解明の研究、そして治療薬開発研究を行う目的であること。
  - B. 本研究から得られた結果をもとに国公立（製薬企業を含む）の外部研究機関で治療薬開発研究を行うこと。
  - C. 研究の成果が特許権など知的財産権を生み出した場合は、その権利が国あるいは研究に関わった研究機関に帰属し、試料等の提供者には帰属しないこと。
  - D. 遺伝情報を開示しない場合は、説明文書にその旨を記載してあること。
  - E. この研究への試料提供は自由で、提供に許諾しなくても不利益を受けないこと。
  - F. この研究への試料提供に同意した場合でも随時これを撤回できること。
  - G. その他のプライバシーや医療記録が守秘されること
- (2) 同意の取得： 説明を行った当日あるいは翌日以降、患者がこの研究の内容をよく理解したことを確認した上で、試料提供についての同意を依頼する。患者本人が試料提供に同意した場合は、説明文書に自筆による署名を得る。
- (3) 同意取得時期： 同意の取得は登録の前とする。
- (4) 既提供試料等の使用： 使用する。既に採取保存されている試料に関しては、本研究に対する同意が得られたのち登録する。

(5)同意書の保管・管理： 同意書は研究責任者が保管する。説明文書を同意書（コピー）は患者本人に手渡す。

### 予想される試料提供者に対する危険および不利益

試料は手術適応患者について手術時に摘出・採取されたものを用いる。また、通常の処置時に採取される滑液・血液を使用するため、危険性および不利益は無い。

### 遺伝子情報の開示に関する考え方

個々の試料提供者の遺伝情報が明らかになった場合、試料提供者が自ら遺伝情報の開示を希望している場合には開示し、試料採取施設の研究責任者あるいは本研究の総括研究責任者である越智隆弘が説明にあたる。

### 遺伝子カウンセリングの必要性

遺伝子発現に関して正常のそれとの比較検討である。多種多様な遺伝子の発現の差異が認められるものと予想されるが、それらの機能を明確にするには長期の詳細な解析が必要となる。現在までの研究結果から RA の遺伝素因の関与を予想させるそれは無い。以上から、遺伝子カウンセリングの必要性は無い。

### 研究資金の調達方法

厚生科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患・治療・研究事業)その他の研究費

### 研究組織

以下のような研究者のサブグループを構成して推進する。

- (1)疫学的実態調査研究： 国立相模原病院（越智隆弘センター長）、東京大学整形外科学教室（中村耕三教授）、大阪大学整形外科学教室（吉川秀樹教授）などの国公私立診療・研究協力施設。
- (2)破骨細胞の分子生物学的研究： 国立相模原病院（越智隆弘センター長）、松本歯科大学（高橋直之教授）、東京大学整形外科学教室（中村耕三教授）、大阪大学整形外科学教室（吉川秀樹教授）などの国公私立診療・研究協力施設。
- (3)骨髄病態研究： 国立相模原病院（越智隆弘センター長）、大阪大学整形外科学教室（吉川秀樹教授）、大阪大学生命機能研究科（下村伊一郎教授）、国立大阪南病院（米延策雄副院長）、市立池田病院（島岡康則部長）、行岡病院（行岡正雄院長）、協和会病院（中村宣夫部長）、武田薬品工業株式会社（鈴木隆二主席研究員）などの国公私立診療・研究協力施設、および米国国立研究所(NIH) (Dr Peter Lipsky)。
- (4)関節リウマチ病因解明の研究： 国立相模原病院（越智隆弘センター長）、国立大阪南病院（米延策雄副院長）、大阪大学微生物病研究所（野島博教授）、大阪大学整形外科学教室（吉川秀樹教授）、帝京大学内科（広畑竣成助教授）、日本大学内科（武井正美教官）などの国公私立診療・

研究協力施設。

- (5)骨粗鬆症に関わるバイオメカニクス解析研究： 慶応大学整形外科（戸山芳昭教授）、大阪大学整形外科学教室（吉川秀樹教授）などの国公立診療・研究協力施設。
- (6)根治薬剤開発研究： 武田薬品工業株式会社（鈴木隆二主席研究員）
- (7)骨強化人工骨開発研究： 大阪大学整形外科学教室（吉川秀樹教授）

臨床担当研究者：施設名

研究者名

解析担当者：施設名

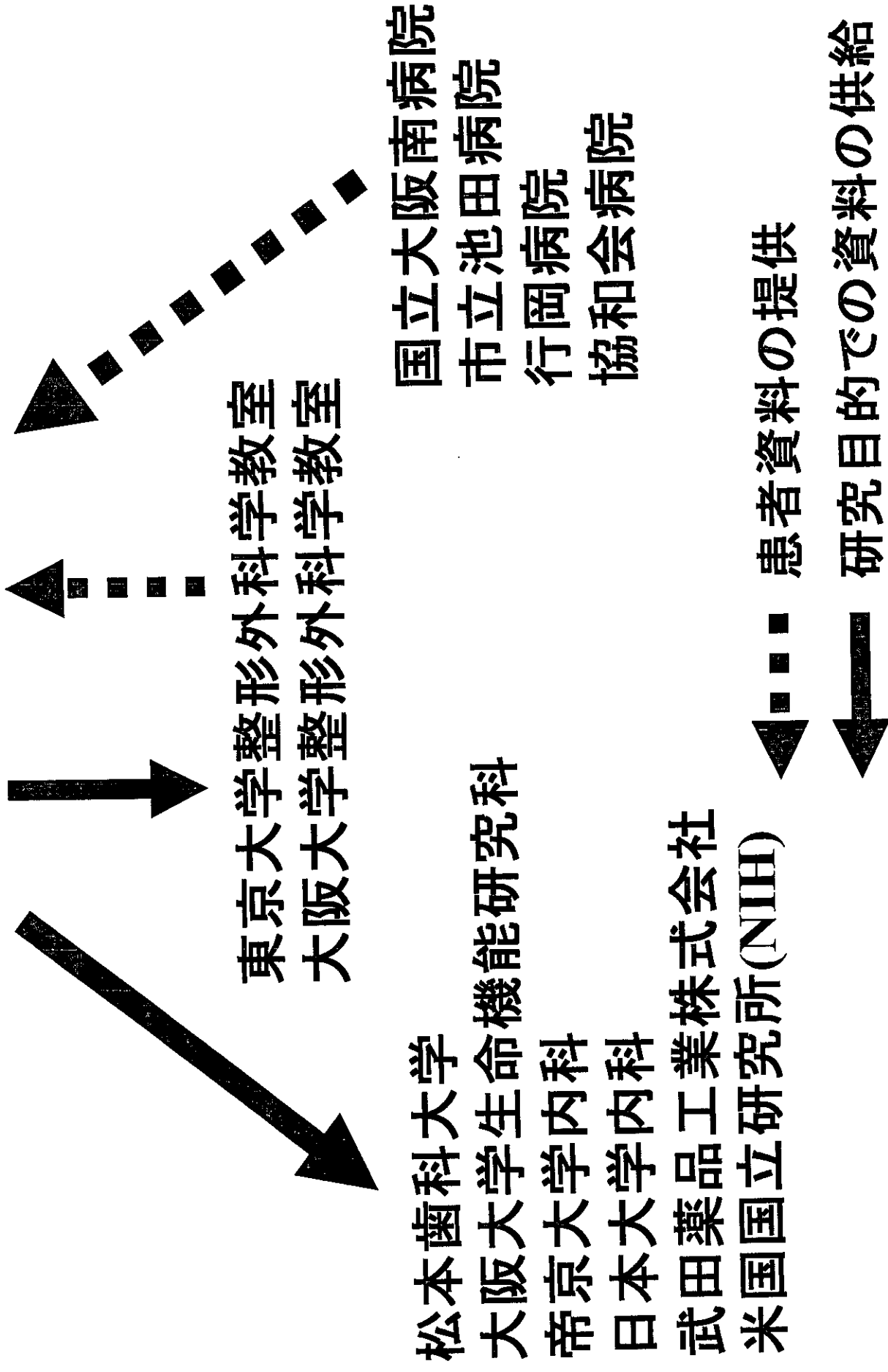
研究者名

## 文献

- (1) Toyosaki-Maeda T, Takano H, Tomita T, Tsuruta Y, Maeda-Tanimura M, Shimaoka Y, Takahashi T, Itoh T, Suzuki R, Ochi T: Differentiation of monocytes into multinucleated giant bone-resorbing cells: two-step differentiation induced by nurse-like cells and cytokines. *Arthritis research*. 2001 Vol. 3 Number. 5. 2001
  - (2) Hayashida K, Shimaoka Y, Ochi T, Lipsky PE. Rheumatoid arthritis synovial stromal cells inhibit apoptosis and up-regulate Bcl-xL expression by B cells in a CD49/CD29-CD106-dependent mechanism. *J Immune*. Jan 15; 164(2): 1110-6. 2000
  - (3) Tomita T, Takeuchi E, Toyosaki-Maeda T, Oku H, Kaneko M, Takano H, Sugamoto K, Ohzono K, Suzuki R, Ochi T.: Establishment of nurse-like stromal cells from bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: indication of characteristic bone marrow microenvironment in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. Sep; 38(9): 854-63. 1999
  - (4) Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ: Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20:345-357, 1999
  - (5) Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Higashio K, Martin TJ, Suda T: Tumor necrosis factor  $\alpha$  stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANKL interaction. *J Exp Med*, 191:275- 286, 2000
  - (6) Kotake S, Udagawa N, Hakoda M, Mogi M, Yano K, Tsuda E, Takahashi K, Furuya T, Ishiyama S, Kim KJ, Saito S, Nishikawa T, Takahashi N, Togari A, Tomatsu T, Suda T, Kamatani N: Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum*, 44:1003-1012, 2001
- その他、多数あり。

- (7) Hirohata S, Yanagida T, Nagai T, Sawada T, Nakamura H, Yoshino S, Tomita T, Ochi T: Induction of fibroblast-like cells from CD34+ progenitor cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. *J. Leukoc. Biol.* 70:413-421, 2001
- (8) Hirohata S, Yanagida T, Nakamura H, Yoshino S, Tomita T, Ochi T.: Bone marrow CD34+ progenitor cells from rheumatoid arthritis patients support spontaneous transformation of peripheral blood B cells from healthy individuals. *Rheumatol. Int.* 19:153-159, 2000

# 国立相模原病院臨床研究センター





## 患者さんへの説明・同意文書

### 研究課題名：関節リウマチ・骨粗鬆症患者の病態解明と治療法開発に関する研究

#### 1. 患者さんあるいは代諾者の方への御願い

この文書では、あなたに「関節リウマチなどの関節疾患に伴う骨・関節破壊や骨粗鬆症の病態解明と予防法・治療法開発研究」への御協力を御願いするため、研究の内容や研究協力を同意していただくための手続きなどについて御説明します。この説明を十分に理解し、研究に御協力頂ける場合には「関節リウマチ・骨粗鬆症の病態解明と治療法開発研究説明・同意書」に署名または記名・押印し、同意したことをはっきり示して下さるよう御願い申し上げます。

#### 2. この研究の目的とあらまし

関節リウマチは世界中で人口の約0.5・1%に発症し、日本でも50・70万人の患者がいると考えられています。慢性炎症持続と共に全身性の骨・関節破壊が進行し、更に加齢に伴って取り分け顕著な骨粗鬆症が進行するため、機能障害も重度で大きな社会問題になっています。リウマチの原因や、なぜ骨・関節破壊が進行するかという病態も尚不明ですが、近年、骨髄に重要な病巣があること、リウマチでは顕著な骨粗鬆症が進行し高度な骨・関節破壊の誘因になっていることなどが見いだされてきました。

今回、厚生労働省から研究費の支援を得て、日本の骨・関節・骨粗鬆症研究を活発に行ってきた国立相模原病院、東京大学整形外科教室、大阪大学整形外科学教室、大阪大学微生物病研究所、大阪大学生命機能研究科、国立大阪南病院、松本歯科大学、帝京大学内科学教室、日本大学内科学教室、市立池田病院、行岡病院、協和会病院、武田薬品工業株式会社研究所などの国公立および私立の医療・研究施設、および米国国立研究所(NIH)が加わった研究グループを作り関節リウマチに伴う骨・関節破壊の病態解明と予防法・治療法開発研究を進めることになりました。

既に、リウマチ骨髄には独得の病的変化が起き、特異な破骨細胞（骨を破壊する細胞）などが多数生じて骨・関節破壊、骨粗鬆症を引き起こしているらしいことなどが明らかにされてきました。手術時に切除する病変部分と併せて全身状態を知るために血液を採取して行う研究は長年行われましたが、従来解析では病因・病態は解明できませんでした。今回の研究班では、手術時切除の病変部分、血液そして骨髄病変を知るために骨髄液を採取して、従来解析方法とともに遺伝要素解析研究も含めて、広範な研究施設間協力で行う研究で大きな期待が寄せられています。

### 3. この研究への御協力をお願いするにあたって

関節リウマチ、骨粗鬆症さらに対照疾患としての変形性関節症などの関節疾患で未だ不明の、なぜ病気が起きるのかの原因、なぜ高度な骨・関節破壊や骨粗鬆症が起きるのかの病態を解明して、その結果に基づいて根本的治療薬を開発するために、国内外の有力な研究者による研究班が作られました。

あなたは関節疾患に罹って手術を受けられますが、その時に切除した病的な部分を研究材料として使わせて頂きたいと共に、血液（5-10ml）と腸骨骨髓血（5-10ml）を採取してあなたに起きている病変を正確に把握させて頂きたいのです。

次に、あなたに研究への御協力をお願いするにあたって御理解頂きたい事項について順次御説明します。

#### 1) 研究協力はあなたの任意ですし、撤回もできます

研究協力に同意されるかどうかは任意です。あなたの自由意志で決めて下さい。研究協力に同意されてもされなくても、当院では同じように最善の医療を提供します。

一旦同意された場合でも不利益を受けることなく、いつでも一方的に文書により同意を撤回することが出来ます。その場合は提供いただいた組織、血液、腸骨骨髓液や研究結果は破棄され、診療記録もそれ以降は本研究のために用いられることはありません。ただし同意を撤回したとき既に研究結果が論文などで公表されていた場合や試料等が誰のものか完全に分からないようにする連結不可能匿名化されていた場合など、研究結果を破棄できない場合があります。

#### 2) なぜ、あなたに御願しているか

この研究では、関節リウマチや変形性関節症などの関節疾患で手術を受けられる方に研究の協力をお願いしています。

#### 3) 代諾者が選定されることもあり得ます

患者本人が不幸にして既に死亡している場合でも、御本人に生前頂いた医学研究に対するインフォームドコンセントおよび御自身の組織を提供する意思が明らかなる場合に限り、代諾者に手術時試料を用いての研究に対する協力・同意をお願いしています。

#### 4) 研究の方法、期間、試料等の種類

方法：手術時に切除した関節病変組織、血液、腸骨骨髓液から病理学所見、細胞、蛋白、遺伝子発現などを解析し、関節疾患の病因、骨・関節破壊機序、炎症持続や関節破壊の重症度、疾患の予後とどのような関係があるのかを検討し、その結果に基づいて根本的治療薬開発へと研究を進めます。

期間：平成14年7月25日(申請が許可された時点)から平成17年3月31日までを予定しています。

試料：手術切除された病的組織、腸骨骨髓血と血液を使用します。

#### 5) 予想される研究結果

関節リウマチに伴う骨・関節破壊、高度な骨粗鬆症の原因が解明されて画期的治療薬開

発が期待されます。

6) 研究責任者の氏名、職名及び所属名：

病院名・役職名

氏名

4 試料等を提供した人にとって予想される結果と、危険、利益及び不利益について

提供いただいた病的組織は、治療の一環として行われる外科手術の時に摘出した組織を用いますので、この研究によって提供者に負担が掛かることは一切ありません。血液は血管から、骨髓血は手術時に腸骨穿刺させて戴きますので痛みも危険もありません。

この研究では、多くの方々の協力を得て、関節リウマチなどの病的組織、血液、骨髓液などを総合的に調べるものです。この結果、なんらかの結果が見出されたとしても、その意義を明らかにし、実際に応用するには、更に多くの研究の積み重ねが必要です。したがって、あなたからの試料の解析結果だけからでは、あなたの治療などに有益な結果が出る可能性は極めて低いので、あなた御自身に利益はありません。

この研究では、研究者が誰の試料を解析しているか分からないように、6の項で述べる匿名化などを行なって、個人情報に厳重に管理します。万一、試料解析の結果によって将来の就職・結婚・保険への加入などに関して、思いがけない不利益が生じる可能性がないように厳密な注意を払う為です。

5 あなたが研究計画などを見ることができます

あなたが希望すれば、個人情報の保護や研究の独創性の確保に支障を来さない範囲内で、この研究計画の内容を見ることができます。

6 あなたの個人情報は保護されています

試料解析の結果は、他人に漏れないように取扱いを厳重にしています。解析の開始前に、あなたの検査結果や診療情報からは住所、名前等が削られ、代わりに新しい符号がつけられます。これを暗号化といいます。

新しい符号とあなたとを結びつける対応表は、当院の研究責任者が厳重に管理します。これを連結可能匿名化といいます。こうすることによって、あなたの試料解析を行なう者には符合しか分からず、誰の試料を解析しているのか分かりません。ただし、結果を本人に説明する場合には、研究責任者がこの符号を元に戻します。

また採取した組織を他施設で解析する場合には、一旦国立相模原病院臨床研究センターに集め、本研究班全体としての匿名登録した上で必要な研究機関に送り共同研究を進めることとなります。その過程でも一貫して、あなたの試料の解析を行なう者には符合しか分からず、誰の試料を解析しているのか分かりません。

## 7 あなたに試料の解析結果を御伝えする場合もあり得ます

この研究では、4、で申していますように、個人試料の解析結果だけからでは、各人の治療などに有益な結果が出る可能性は極めて低いので、試料提供者に解析結果を開示することはありません。ただし、偶然に重大な病気との関係が見つかり、あなたやあなたの家族又は血縁者がその結果を知ることが有益であると判断され、当院の生命倫理委員会等も同様に考えた場合に限り、担当医師からあなたやあなたの家族又は血縁者に、その結果の説明を受けるかどうかについて問い合わせることがあります。

## 8 研究結果から特許権などが生じたとき

患者さんからの試料解析の結果として特許権などが生じる可能性があります。その権利は、国または該当研究を行った研究者あるいは研究施設に属し、試料提供者には属しません。また、その特許権などにより経済的利益が生じる可能性があります。試料提供者にはこれについても権利がありません。

## 9 研究結果の公表

多くの方々のご協力によって得られた試料の解析結果は、誰のものであるか分からないようにした上で、学会や学術雑誌、データベース上などで公に発表されることがあります。

## 10 試料等の保存、使用及び廃棄の方法

ご提供いただいた試料は、当院または国立相模原病院臨床研究センターにおいて厳重に保管し、本研究のために使用されます。しかし、もし、あなたが同意していただければ、将来の研究のための貴重な資源として研究終了後も保管させていただきます。この場合も、6の項で説明した方法により、誰の試料か分からないようにしたまま、試料を使い切るまで保管します。試料を廃棄する場合は、匿名のまま密封容器に廃棄するか又は焼却処分します。将来、試料を医学研究に用いる場合には、改めて研究計画書を提出し、当院の生命倫理委員会等の承認を受けます。

### 11 試料等の提供は無償・無報酬

試料の解析研究は研究費によって行なわれますので、あなたが費用を負担することはありません。また、この研究への協力に対して、あなたへの報酬は支払われません。

### 12 担当医師及び連絡先

施設研究者氏名：

連絡先：