

個人試料解析研究 説明・同意書

病院長様

患者氏名 _____ 印

患者試料解析研究名：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

説明内容：

- ☐ あなたの試料解析研究の目的と方法
- ☐ 予想される結果と危険性
- ☐ 試料提供に同意しない場合でも不利益を受けないこと
- ☐ 同意した後でも随時これを撤回できること
- ☐ 個人情報の保護のためにとられる措置
- ☐ 現状に応じた変更の可能性（医学上の立場）
- ☐ その他

,提供を合意した試料：・手術時切除組織（ ）・骨髓液(5・10ml)()・血液(5・10ml)()

上記の患者試料解析研究について担当医師から説明を受け理解しましたので、その実施に同意します。

患者署名： _____

署名年月日： 平成 年 月 日

生年月日： 明・大・昭・平 年 月 日生（ 才）

現住所：

親族署名： _____（続柄 _____）

署名年月日： 平成 年 月 日

生年月日： 明・大・昭・平 年 月 日生（ 才）

現住所：

私は、今回の患者試料解析研究について上記項目を説明し、同意が得られたことを認めます。

担当医師署名： _____

署名年月日： 平成 年 月 日

個人試料解析研究 説明・同意書

病院長様

患者氏名 _____ 印

患者試料解析研究名：関節リウマチの薬物治療法再検に関する研究

説明内容：

- ☐ あなたの試料解析研究の目的と方法
- ☐ 予想される結果と危険性
- ☐ 試料提供に同意しない場合でも不利益を受けないこと
- ☐ 同意した後でも随時これを撤回できること
- ☐ 個人情報の保護のためにとられる措置
- ☐ 現状に応じた変更の可能性（医学上の立場）
- ☐ その他

解析研究を合意した試料：血液（5・10 ml）

上記の患者試料解析研究について担当医師から説明を受け理解しましたので、その実施に同意します。

患者署名： _____

署名年月日： 平成 年 月 日

生年月日： 明・大・昭・平 年 月 日生 （ 才）

現住所：

親族署名： _____（続柄 _____）

署名年月日： 平成 年 月 日

生年月日： 明・大・昭・平 年 月 日生 （ 才）

現住所：

私は、今回の患者試料解析研究について上記項目を説明し、同意が得られたことを認めます。

担当医師署名： _____

署名年月日： 平成 年 月 日

- 注1) A3版の両面印刷をし、書類を一体化すること。
- 注2) 本書は2部作成し、担当医師1部・患者さん1部を保有するものとする。
- 注3) 書類がA3版の両面以上にわたる場合は割印で一体化すること。
- 注4) 全項目について記載すること。

1, 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

2, 代表者名

越智 隆弘 国立相模原病院臨床研究センター センター長

3, 共同研究者

国立相模原病院臨床研究センター関係者	臨床研究センター	センター長
中村耕三教授	東京大学整形外科学教室	教授
吉川秀樹教授	大阪大学整形外科学教室	教授
戸山芳昭教授	慶応大学整形外科	教授
高橋直之教授	松本歯科大学	教授
下村伊一郎教授	大阪大学生命機能研究科	教授
野島博教授	大阪大学微生物病研究所	教授
広畑竣成助教授	帝京大学内科	助教授
武井正美講師	日本大学内科	講師
米延策雄副院長	国立大阪南病院	副院長
島岡康則部長	市立池田病院	部長
行岡正雄院長	行岡病院	院長
中村宣夫医長	協和会病院	部長
鈴木隆二主席研究員	武田薬品工業株式会社	主席研究員

概要

(1) 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。

(2) 対象および方法

(1)疫学の実態調査研究：加療中の関節リウマチ患者の骨量減少の実態調査。(2)骨形成・吸収の分子生物学的研究：関節リウマチ患者に起きる骨粗鬆症の原因である骨形成・吸収の分子生物学的研究を行う。手術時採取の患者試料解析予定。(3)骨髓病態研究：関節リウマチ患者の骨髓病態研究を進める。関節リウマチなどの手術時切除の組織片、骨髓血、末梢血などを研究試料とする。(4)関節リウマチの病因解明の研究：関節リウマチ病因研究としてEBウイルスに的を絞った研究をする。手術時切除組織片、骨髓血、末梢血などの遺伝要素検索を含む解析研究を行う。(5)骨・関節破壊発生の力学的機序の研究：バイオメカニクス解析を進める。(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。また骨粗鬆症に対する人工骨開発・使用研究を進める。この目的には、手術時切除の組織片、骨髓血、末梢血などを研究試料とするとともに、本研究班で確保した検体、細胞、蛋白、遺伝要素を集約し供給する必要がある。

(3) 実施場所及び実施期間

実施場所：(1)疫学的実態調査研究：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。(2)骨形成・吸収の分子生物学的研究：国立相模原病院、東京大学整形外科、大阪大学整形外科、松本歯科大学など。(3)骨髄病態研究：国立相模原病院、大阪大学整形外科学教室、大阪大学生命機能研究科、米国国立研究所(NIH)、武田薬品工業株式会社研究所など。この目的の試料確保は国立相模原病院、大阪大学整形外科学教室、国立大阪南病院、市立池田病院、行岡病院、協和会病院などである。(4)関節リウマチの病因解明の研究：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。(5)骨・関節破壊発生の力学的機序の研究：慶応大学整形外科、大阪大学整形外科など。(6)治療法開発の研究：武田薬品工業株式会社研究所で新薬開発を進める。また大阪大学整形外科で人工骨開発・使用研究を進める。

実施期間：平成14年7月25日から平成17年3月31日

(4) 審査を希望する理由

疫学研究から出発するが、病因・病態・治療法開発研究の中で患者試料（手術時切除組織片、骨髓血、末梢血など）を研究対象にすること、また病因研究の中で遺伝要素を解析すること、そして共同研究施設間で患者試料（連結可能匿名化）を共有して解析研究するなどのため、研究内容の妥当性の承認を得ることが必要である。

5 倫理的配慮

(1) 人権の擁護

(A) 十分なインフォームドコンセント：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、同意書で承諾が得られた症例から試料を得る。

(B) 症例の匿名登録：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。本研究では試料と提供者との対応付けは出来ない。

(C) 試料提供の自由：この研究への試料提供は自由で、提供に承諾しなくても不利益を受けないこと、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、その他のプライバシーや医療記録が守秘されることなどを明確に文書で示し了解を得ること。

(D) 研究結果の発表：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が、全ての研究課題において患者さん個人を特定するような発表は行わない。

(2) 個人への利益・不利益

この研究では、多くの方々の御協力を得て関節リウマチなどの病的組織、骨髓液、血液などを総合的に調べるもので、患者さん個人試料の解析結果から有益な結果が得られる可能性は低く、患者さん自身には利益は無い。また、試料は手術時に摘出・採取されたものをを用いるか、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。

(3) 医学的貢献度

本研究は関節リウマチの病態、特に加齢により顕著な骨粗鬆症に陥った患者病態、病因を解明し根本的治療法開発に役立てるもので、医学上・医療上貢献度は大きい。

（４） 同意を求める方法

研究内容に関して、その概要、意義、必要性、利益および不利益を十分に説明した上で同意を得る。特に遺伝子関連研究においては、厳格に文書で説明を行い、署名でもって同意を求める。

6 その他の参考事項

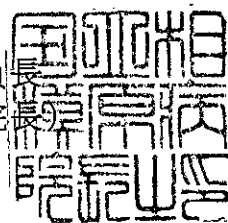
本研究は平成２年以來の厚生科学研究、平成８年以來の医薬品機構研究の結果に基づき、続けられる企画の研究である。

倫理委員会審査判定通知書

平成14年 7月 25日

所 属 国立相模原病院 臨床研究センター
官職・名 臨床研究センター長 越 智 隆弘 殿

倫理委員会委員長
(国立相模原病院)



受付番号：3

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

代表者名：越智 隆弘（国立相模原病院 臨床研究センター長）

上記課題について、平成14年7月24日の倫理委員会において審議し、下記のとおり判定したので通知する。

記

判 定	条件付承認
理 由	<p>① 提供者個人の人権擁護、権利の保持に特段の配慮をして、インフォームドコンセントに関する書類も説明文も渡して十分読んでいただき、その上で納得（文書による同意書）していただく等の確認を行うこと。</p> <p>② データの利用に関しては、目的方法を限定し、患者さんに不利益にならず、個人が特定されず、情報が漏れないように取扱すること。</p> <p>③ 文部科学省、厚生労働省告示第二号の疫学研究に関する倫理指針に基づき実施すること。</p>

Ⅱ 平成 14 年度分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：関節リウマチ患者に発症する骨粗鬆症の疫学的実態に関する研究

研究協力者 中山久徳 国立相模原病院 リウマチ科 医員
共同研究者 當間重人 国立相模原病院臨床研究センターリウマチ性疾患研究部部長
共同研究者 西野仁樹 国立相模原病院 リウマチ科 医員
共同研究者 萩原 太 国立相模原病院 リウマチ科 医員
共同研究者 渡辺淳子 国立相模原病院臨床研究センター研究員
共同研究者 早川洋美 国立相模原病院臨床研究センター研究員
共同研究者 野中孝夫 国立相模原病院 放射線科副技師長

研究要旨：関節リウマチ（RA）患者において ADL を著しく低下させる原因となる骨粗鬆症および椎体骨折の疫学的実態を横断研究により明らかにした。その結果、原発性骨粗鬆症に比べて各年代とも RA 患者の骨粗鬆症の有病率が高いことが示された。更に RA の病期、機能障害度やグルココルチコイドの使用状況が骨粗鬆症の発症に及ぼす影響についても検討した。また、椎体骨折の予防の観点から、RA 患者の骨粗鬆症診断にあたっては腰椎だけでなく大腿骨近位部も含めた骨密度評価が重要であると考えられた。

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)では疾患自体やグルココルチコイド(GC)の内服あるいは身体活動性の低下などによる二次性骨粗鬆症が多くみられ脆弱性骨折を来しやすい。これは原疾患が改善した後も患者の ADL を著しく損なう難治性合併症である。しかし本邦ではこれまで RA 患者における骨粗鬆症に関する報告は乏しい。今回、当院症例にて RA 患者における骨粗鬆症及びこれによる椎体骨折の実態を明らかにする。

B. 研究方法

対象はビスフォスフォネート製剤の投与歴のない RA 患者 623 症例（女性 561 例,25-88 歳、男性 62 例,47-84 歳）。DXA 法にて腰椎、大腿骨(大腿骨頸部及び大腿骨近位部全体)の骨密度を、更に CXD 法にて

第 2 中手骨骨密度を測定した。椎体骨折は胸腰椎単純 X 線写真にて判定した。骨粗鬆症の診断は日本骨代謝学会診断基準（2000 年改訂版）に準じた。すなわち、脆弱性骨折が認められるか、あるいは腰椎骨密度が若年成人平均値(YAM)の 70%未満であるときに骨粗鬆症と診断した。骨代謝マーカーとしては尿 NTX と BAP を測定した。また比較のため非膠原病患者 56 例及び RA 以外の膠原病患者 134 例に対しても同様の測定を行った。

本研究での検討項目は全て通常の診療行為の範囲内で調べられており、結果についても患者のプライバシーに十分配慮し倫理的に問題はないが、他の関連研究も含めて院内の倫理委員会の承諾済みである。

C. 研究結果

RA 患者のうち 217 例(34.8%)は骨粗鬆症と診断された。また、114 例(18.3%)は椎体骨折を有しており、56 例(9.0%)は 2 椎体以上の多重骨折であった。加齢とともに骨粗鬆症及び椎体骨折は多くみられ、各々の有病率は 50 歳以上では 41.3%, 20.6%, 60 歳以上では 53.7%, 29.4%, 70 歳以上では 61.6%, 41.4%であった。また RA の病期や機能障害度が進むにつれ骨粗鬆症、椎体骨折とも高率になった。非 RA 対照との比較では、大腿骨骨密度の z score は RA 患者で有意($p<0.001$)に低いが、腰椎では明瞭な差は認めなかった。RA 患者の中手骨骨密度は非 RA 患者に比べ有意($p<0.001$)に低値であった。NTX、BAP はいずれも RA 症例は非 RA 対照に比べ有意($p<0.001$)に高値であった。椎体骨折あり群となし群との比較では、あり群はなし群に比べ大腿骨骨密度の z score が低く($p<0.001$)、腰椎では有意差は認めなかった。各骨代謝マーカーはあり群で高値であった($p<0.001$)。GC は 430 例(69.0%)に使用されており、GC 投与群は非投与群に比べ骨粗鬆症(36.7%, 25.4%; $p<0.01$)、椎体骨折(20.0%, 14.5%; $p=0.101$)とも高率であった。GC 投与期間が長く、総投与量や一日投与量が多いほど各有病率とも上昇する傾向がみられた。

D. 考察

原発性骨粗鬆症に関しては、「50 歳以上の日本人の女性での有病率は 26.3% (福永 2002)」との報告がある。今回の検討によると 50 歳以上の女性 RA 患者の骨粗鬆症の有病率は 41.3%であり原発性骨粗鬆症を上回った。また、日本人女性の年代別の骨密度が骨粗鬆症域の患者の割合の年代別統計 (山本 1999) と比較しても、RA 患者は各年代にわたり一般人口に比して骨粗鬆症が高率であることが示された。原発性骨粗鬆症の診断において重要視されている腰椎骨密度は年齢を補正した z score で比較すると RA 症例と他疾患症例間に有意な

差はなかった。一方、大腿骨あるいは中手骨骨密度は高度の有意差で RA 症例で低下していた。更に、椎体骨折の有無での比較において両群の z score は大腿骨では有意差を認めるが腰椎では認めなかった。RA 患者では年齢相応者に比べて椎体骨折が頻繁に認められることを考えると、骨折を事前に予測する指標を確立することが重要であるが、この指標として大腿骨骨密度は腰椎骨密度より優れているが示唆された。従って RA における骨粗鬆症の診断にあたっては腰椎のみならず大腿骨および中手骨の骨密度も考慮すべきと考えられる。仮に「脆弱性骨折があるか、腰椎あるいは大腿骨骨密度のいずれかが YAM の 70%未満のとき骨粗鬆症とする」と、今回検討した RA 患者のうち 333 例 (53.5%) が骨粗鬆症と診断された。骨代謝マーカーも骨折予測する有効な指標となる可能性がある。今後は RA の骨粗鬆症を独自の基準によりの確に診断し、早期から骨粗鬆症の進行に歯止めをかける治療を開始することによって骨粗鬆症による骨折をどれだけ抑制できるかを前向きに検証することが課題である。

E. 結論

RA 患者では一般人口に比して骨粗鬆症が高頻度に認められた。椎体骨折は骨粗鬆症合併例の半数以上にみられ高リスクである。RA 患者には腰椎のみならず、大腿骨や中手骨など他部位の骨密度も加味し、骨代謝マーカー値も反映させた RA 独自の診断基準が必要であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

臨床リウマチ (14 ; 139-147, 2002)

2. 学会発表

第 46,47 回 日本リウマチ学会

第 20 回 日本骨代謝学会

第 4 回 日本骨粗鬆症学会

第 57 回 国立病院療養所総合医学会

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
（分担）研究報告書

ヒト破骨細胞形成に関する研究

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

研究要旨：骨吸収を司る破骨細胞の分化と機能は骨芽細胞/骨髄間質細胞により調節されている。末梢血単核細胞より得られた CD14 陽性細胞を用いて、試験管内でヒト破骨細胞が効率的に形成されることが明らかとなった。末梢血 CD14 陽性細胞から破骨細胞への分化誘導には、RANKL とともに M-CSF が必要であった。一方、形成される破骨細胞の数は少ないものの、M-CSF のみを添加した群においても、破骨細胞様細胞が出現した。マウスの破骨細胞形成と同様に、ヒト破骨細胞形成も p38MAPK の特異的阻害剤である SB203508 により強力に抑制された。ヒト破骨細胞にも p38MAPK シグナル系が重要な役割を有していることが、示唆された。

A. 研究目的

骨吸収を司る破骨細胞の分化と機能は骨芽細胞/骨髄間質細胞により調節されている。最近、骨芽細胞/骨髄間質細胞の細胞膜上に発現し破骨細胞の分化と機能を調節する破骨細胞分化因子(RANKL, receptor activator of NF- κ B)がクローニングされ、骨芽細胞/骨髄間質細胞による破骨細胞の分化と機能誘導機構が解明された。破骨細胞とその前駆細胞は RANKL の受容体 RANK を発現し、細胞間接触を介して RANKL を認識し破骨細胞に分化する。また、骨芽細胞/骨髄間質細胞が産生する Osteoprotegerin(OPG)は RANKL のデコイ受容体として RANKL 作用を抑制する。我々は、炎症性サイトカインである TNF α と IL-1 は RANKL-RANK を介さず直接破骨細胞の分化と骨吸収活性を誘導することを明らかにした。これらの知見は全て、マウスの細胞をもちいた解析より得られたものである。従来より、ヒト骨髄細胞や造血系細胞を用いた培養系でヒト破骨細胞の形成機構は研究されてきたが、多くの疑問点が残っている。関節リウマチやこと粗鬆症の発症機序の解明と治療法の確立のためにも、ヒト破骨細胞の形成系の確立は急務である。本研究では、ヒト破骨細胞培養系を確立し、ヒト破骨細胞の分化と機能調節系を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ヒト末梢血より Ficoll-Paque 遠心法で単核細胞

を分取した。ヒト末梢血単核細胞を CD14 抗体ビーズとインキュベートした後に、MACS Separator を使い、CD14 陽性細胞を分取した。CD14 陽性細胞をマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) や RANKL の存在下あるいは非存在下で 7 日間培養した。培養後、破骨細胞のマーカーと考えられる TRAP 染色及びビトロネクチンレセプター (CD61) 抗体を用いた免疫染色により破骨細胞を検出した。また、CD14 陽性細胞を象牙切片上に撒き、M-CSF や RANKL の存在下で培養した後、象牙切片を Mayer's Hematoxylin 染色に供し、吸収窩を観察した。また、p38MAPK の特異的阻害剤である SB203508 を添加して、ヒト破骨細胞形成における p38MAPK の役割を解析した。なお、ヒト末梢血採取に当たっては、十分なインフォームドコンセントの下で行われた。

C. 結果

(1)CD14 陽性細胞は M-CSF 非添加群では殆んど増殖せず、M-CSF は CD14 細胞の増殖に必要な因子であることが明らかとなった。(2)RANKL 単独添加群においても、CD14 細胞の増殖は認められなかった。(3)CD14 陽性細胞は、M-CSF と RANKL の存在下で TRAP 陽性かつビトロネクチンレセプター陽性単核並びに多核細胞に分化した。(4)M-CSF のみを添加した群において、わずかなではあるが、TRAP 陽性でビトロネクチンレセプター陽性の破骨細胞様細胞がコロニーを形成して出現した。(5)CD14 陽性細胞を RANKL と

M-CSF の存在下において象牙切片上で培養すると、象牙切片上に多数の吸収窩が認められた。(6)p38MAPK の特異的阻害剤である SB203508 は、RANKL と M-CSF が誘導する TRAP 陽性破骨細胞の形成を抑制した。

D. 考察

末梢血単核細胞より得られた CD14 陽性細胞を用いて、試験管内でヒト破骨細胞が効率的に形成されることが明らかとなった。末梢血 CD14 陽性細胞から破骨細胞への分化誘導には、RANKL とともに M-CSF が必要であった。また、マウスの破骨細胞形成と同様に、ヒト破骨細胞形成も p38MAPK の特異的阻害剤 SB203508 により強力に抑制された。ヒト破骨細胞にも p38MAPK シグナル系が重要な役割を有していることが示唆された。一方、形成される破骨細胞の数は少ないものの、M-CSF のみを添加した群においても、破骨細胞様細胞が出現した。この破骨細胞様細胞が本来の破骨細胞と同一のものか否か今後の研究から明らかにされるであろう。以前より、破骨細胞やその前駆細胞は RANKL mRNA を発現していることが知られていたが、活性ある RANKL が発現しているかは不明であった。今回の実験結果は、末梢血 CD14 陽性細胞自身が活性を有する RANKL を発現していることを示唆しており、今後の詳しい解析が必要であると考えられる。

E. 結論

末梢血単核細胞より得られた CD14 陽性細胞を用いて、試験管内でヒト破骨細胞が効率的に形成されることが明らかとなった。ヒト破骨細胞形成に p38MAPK シグナル系が重要な役割を有していることが示された。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

和文総説など

- 1) 宇田川信之、小竹 茂、鎌谷直之、高橋直之、須田立雄:骨吸収における TNF 関連サイトカインの役割ー慢性関節リウマチにおける骨吸収機構の解明を目指してー、リウマチ、42:3-12、2002

- 2) 宇田川信之、高橋直之:破骨細胞の分化と機能発現における RANKL の役割、日本臨床 60:672-678、2002
- 3) 宇田川信之、高橋直之:破骨細胞の分化と骨吸収のメカニズム-歯周病における骨吸収機構の解明を目指して-、炎症と免疫 10:229-238、2002
- 4) 宇田川信之、須田幸治、高橋直之:サイトカインによる破骨細胞の分化、Annual Review 免疫 2003 pp93-104、2002
- 5) 小林泰浩、宇田川信之、高橋直之:破骨細胞の形成と機能を調節する炎症性サイトカインとリポ多糖 (LPS) の作用機構、実験医学、20:2482-2487、2002
- 6) 高橋直之:最新用語解説「OPG」骨粗鬆症治療、1:56-57、2002
- 7) 高橋直之:カラーアトラス「破骨細胞の形成のメカニズム」骨粗鬆症治療、1:2-3、2002
宇田川信之、高橋直之:図説:ビスフォスホネートの作用機序、日本臨床 61:178-179、2003
- 8) 小林泰浩、高橋直之:骨吸収の調節機構 (OPG, RANKL, RANK の相互作用)、日本臨床 61:200-206、2003
- 9) 高橋直之:カラーアトラス&レビュー「三次元断層画像にみる骨構造に及ぼすリゾドロネートの作用」骨粗鬆症治療、2:2-3、2003

原著論文

- 1) Takahashi N, Udagawa N, Takami N, Suda T: Cells of bone: Osteoclast generation. In Principles of bone biology, ed by Raisz LG, Rodan GA, Bilezikian JP, Academic Press, San Diego, pp109-126, 2002
- 2) Katagiri T, Takahashi N: Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. Oral Diseases, 8:147-159, 2002
- 3) Li X, Udagawa N, Itoh K, Suda K, Murase Y, Nishihara T, Suda T, Takahashi N: p38 MAP kinase-mediated signals are required for inducing osteoclast differentiation but not for osteoclast function. Endocrinology 143:3105-3113, 2002
- 4) Udagawa N, Kotake S, Kamatani N, Takahashi N, Suda T: The molecular mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis. Arthritis Research 4:281-289, 2002.
- 5) Katagiri T, Imada M, Yanai T, Suda T, Takahashi N, Kamijo R: Identification of a BMP-responsive Element in the Id1 gene. Genes Cells 7:949-960, 2002
- 6) Nakanishi Y, Shukunami C, Yamada T, Aihara K, Kawano H, Sato T, Nishizaki Y, Yamamoto Y, Shindo M, Yoshimura K, Nakamura T, Takahashi N, Kawaguchi H, Hiraki Y, Kato S. Chondromodulin I is a bone remodeling factor. Mol Cell Biol

23:636-644,2003

- 7) Itoh K, Udagawa N, Kobayashi K, Suda K, Li X, Okahashi N, Nishihara N, Takahashi N: LPS promotes the survival of osteoclasts via Toll-like receptor 4, but cytokine production of osteoclasts in response to LPS is different from that of macrophages. J Immunol, 170:3688-3695, 2003
- 8) Takahashi N, Sasaki T, Tsouderos Y, Suda

T: Strontium ranelate inhibits osteoclastic bone resorption. J Bone Miner Res, in press.

- 9) Takami M, Suda K, Sahara T, Itoh K, Nagai K, Sasaki T, Udagawa N, Takahashi N: Involvement of vacuolar H^+ -ATPase in specific incorporation of risedronate into osteoclasts. Bone, In press.

H. 知的財産の出願・登録状況

特記事項無し。

病的状態で見られる破骨細胞の特性の解析

分担研究者 吉川 秀樹 大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学（整形外科） 教授

研究要旨

関節リウマチや骨巨細胞腫では、過剰な骨吸収が見られ、その骨破壊機序に、病的な破骨細胞様多核巨細胞の関与が示唆されている。しかし、これらの病的巨細胞の形成機序、骨破壊機序は未だ不明である。本研究では、関節リウマチのみならず骨巨細胞腫にみられる骨吸収異常亢進の病態でも、通常の破骨細胞とは異なる誘導・活性化の制御を受ける病的な破骨細胞様細胞が関与している可能性を明らかにした。

A. 研究目的

関節リウマチ（RA）では関節軟骨下に線維芽細胞様間質細胞の著しい増殖とともに、非常に核数の多い巨大な細胞の形成とこれによる骨吸収が観察され RA の骨破壊の病態に関与すると考えられる。骨吸収の異常亢進が見られる病態では、病的な破骨細胞様細胞の出現が関与している可能性を明らかにする目的で、RA 以外にも病的な破骨細胞様細胞の出現が見られる骨巨細胞腫（GCT）に関して検討を行なった。GCT の TRAP 陽性破骨細胞様多核巨細胞は非常に通常の破骨細胞に比較して核数が多く巨大である点で、RA で見られる TRAP 陽性破骨細胞様多核巨細胞と類似性を有する。従って、GCT を破骨細胞様巨細胞による骨破壊が著明にかつ病的に亢進した状態ととらえ、その巨細胞形成の病的メカニズムを明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

RANKL、OCIF、および RANKL のレセプターである RANK（receptor activator of NF- κ B）の mRNA の発現を GCT 14 例の切除組織で RT-PCR 法にて検討した。また、ヒト GCT 細胞の培養を行い、形態学的観察、アルカリフォスファターゼ、TRAP の発現、mRNA による RT-PCR により RANKL、RANK、OCIF の遺伝子発現を検定した。続いて、GOS 細胞が破骨細胞様巨細胞の形成を支持する

かを検討するため、ヒト末梢血より CD14 陽性単核細胞を分離し、GOS 細胞と共培養した。さらに ELISA にて GOS 細胞の培養上清の M-CSF、GM-CSF、VEGF、OCIF を定量した。

C. 研究結果

GCT 14 例中全例で RANKL の mRNA の発現が見られ、OCIF、RANK は GCT 14 例中 12 例ずつに発現と認められた。RANKL に対する in situ hybridization では、RANKL は多核巨細胞、類円型単核細胞に発現が見られた。GCT 培養細胞では 2-3 回の継代で巨細胞が消失し、多角形 紡錘形で単核の細胞のみとなった。この培養細胞（GOS 細胞）はアルカリフォスファターゼ陰性、TRAP 陰性であった。しかし、GOS 細胞より分離した mRNA による RT-PCR では RANKL 陰性、RANK 陰性、OCIF 陽性であった。CD14 陽性単核細胞と GOS 細胞の共培養の結果、多数の TRAP 陽性多核巨細胞が形成された。また、GOS 細胞の培養上清（GOS-CM）存在下でヒト末梢血単球と単独培養すると同様に多数の TRAP 陽性多核巨細胞が形成され、dentin 上では吸収窩を形成することが走査電顕にて確認された。RT-PCR でヒト末梢血単球は RANKL 陰性であったが、この多核巨細胞は RANKL を発現していた。GOS 細胞の培養上清には、ELISA にて多量の M-CSF、GM-CSF、VEGF、OCIF が含まれていた。

D. 考察

ヒト骨巨細胞腫で全例に RANKL の mRNA が発現し

ていることより RANKL が GCT における破骨細胞様巨細胞の形成に関与している推測されるが、骨巨細胞腫由来細胞の培養上清が末梢血単球を TRAP 陽性で吸収窩を形成する破骨細胞様多核巨細胞に分化させたことは、このような病的骨破壊の場合においては、通常の骨芽細胞・間質細胞の膜結合型 RANKL や OCIF による破骨細胞形成・活性化の制御から逸脱した“病原破骨細胞”の形成機構が存在している可能性を示唆する。

E. 結論

RA だけではなく GCT にみられる骨吸収異常亢進の病態でも、通常の破骨細胞とは異なる誘導・活性化の制御を受ける病的な破骨細胞様細胞の出現が関与している可能性を明らかにした。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 妻木範行、中瀬尚長、宮地高弘、越智隆弘、吉川秀樹：軟骨形成における BMP の役割、骨・関節・靱帯、15:255-260, 2002.
- 2) 吉川秀樹：BMP の応答制御機構の解析、The Bone、16:85-89, 2002.
- 3) 富田哲也、高橋康一郎、越智隆弘、吉川秀樹：IL6、病型と関節破壊予測因子、Medical Practice、19:1149-1151, 2002.
- 4) 玉井宣行、西川昌孝、名井陽、吉川秀樹：新規人工骨の開発と骨組織の Tissue engineering の試み、関節外科、21:1272-1278, 2002.
- 5) 吉川秀樹、名井陽、玉井宣行、西川昌孝、海渡貴司：骨軟骨の再生医学、ゲノム医学、2:651-656, 2002.
- 6) 玉井宣行、名井陽、富田哲也、中瀬尚長、吉川秀樹：連通気孔構造を有する新規多孔体ハイドロキシアパタイトセラミックスその優れた微細構造と骨伝導能、Orthopaedics Ceramic Implants、21:21-24, 2002.
- 7) Tamai, N., Myoui, A., Tomita, T., Nakase, T., Tanaka, J., Ochi, T., Yoshikawa, H.: Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. Journal of Biomedical Material Research, 59:110-117, 2002.
- 8) Tomita, T., Nakase, T., Kaneko, M., Shi, K., Takahi, K., Ochi, T., Yoshikawa, H.: Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer enhances production of matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. Arthritis and Rheumatism, 46:373-378, 2002.

9) Tsumaki, N., Nakase, T., Miyaji, T., Kakiuchi, M., Kimura, T., Ochi, T., Yoshikawa, H.: Bone morphogenetic protein signals are required for cartilage formation and differently regulate joint development during skeletogenesis. Journal of Bone and Mineral Research, 17:898-906, 2002.

10) Nakase, T., Ariga, K., Meng, W., Iwasaki, M., Tomita, T., Myoui, A., Yonenobu, K., Yoshikawa, H.: Distribution of genes for parathyroid hormone (PTH)-related peptide, Indian hedgehog, PTH receptor and patched in the process of experimental spondylosis in mice. Journal of Neurosurgery, 97:82-87, 2002.

11) Takahi, K., Hashimoto, J., Hayashida, K., Shi, K., Takano, H., Tsuboi, H., Matsui, Y., Nakase, T., Tomita, T., Ochi, T., Yoshikawa, H.: Early closure of growth plate causes poor growth of long bones in collagen-induced arthritis rats. Journal of Musculoskeletal Neuronal Interaction, 2:344-351, 2002.

12) Takahi, K., Tomita, T., Nakase, T., Kaneko, M., Takano, H., Myoui, A., Hashimoto, J., Ochi, T., Yoshikawa, H.: Tumor necrosis factor- α converting enzyme expression in the joints of rheumatoid arthritis patients. Journal of Musculoskeletal Research, 6:63-71, 2002.

13) Higuchi, C., Myoui, A., Hashimoto, N., Kuriyama, K., Yoshioka, K., Yoshikawa, H., Itoh, K.: Continuous inhibition of MAPK signaling promotes the early osteoblastic differentiation and mineralization of the extracellular matrix. Journal of Bone and Mineral Research, 17:1785-1794, 2002.

14) Kuriyama, K., Higuchi, C., Tanaka, K., Yoshikawa, H., Itoh, K.: A novel anti-rheumatic drug, T-614, stimulates osteoblastic differentiation in vitro and bone morphogenetic protein-2 induced bone formation in vivo. Biochemical and Biophysical Research Communications, 299:903-909, 2002.

2. 学会発表

1. 厚生労働省厚生科学研究公開シンポジウム「リウマチ性疾患制圧に向けて」：骨再生のための新規人工骨の開発、平成14年1月(東京)
2. 日本セラミックス協会2002年年会(戦略フォーラム「臨床から見た生体材料―骨・軟骨」)：多孔体セラミックスによる骨形成、平成14年3月(吹田)
3. 第20回組織再生材料研究会：運動機能の再建、生体材料による局所治療の重要性、平成14年8月(つくば)
4. 第67回和歌山臨床整形外科医会秋期研修会(特別講演)：外来における骨腫瘍の画像診断、平成14年10月(和歌山)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 「骨欠損治療および骨損傷の治療促進剤」出願番号2002年特願 第181016号

2.「生体用セラミックス」 出願番号 2002 年特
願 第 268292 号

厚生科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究班）

分担研究報告書

破骨細胞の生存調節と骨リモデリングに関する研究

田中 栄 東京大学医学部附属病院 整形外科・脊椎外科助手

研究要旨：破骨細胞は骨吸収を担う中心的な細胞であり、骨粗鬆症、あるいは関節リウマチの骨関節破壊において重要な役割を果たすことが知られている。本研究においてわれわれは破骨細胞の生存、細胞死において低分子量Gタンパク質である Rac1 が重要な役割を果たすことを明らかにした。Rac1 をターゲットにした薬剤は骨代謝調節剤として有用であると考えられる。

A. 研究目的

骨組織は成長を終えてからも休みなく新陳代謝を行っており、骨吸収と骨形成がバランスを取ることで生体におけるホメオスタシスを保っている。この骨代謝の生体内におけるバランスが骨吸収側（負）に傾くと骨強度の減少をきたし、易骨折性をきたす、すなわち骨粗鬆症と呼ばれる状態になる。骨粗鬆症の原因としては閉経後のエストロゲン欠乏、加齢によるものなどの一次的要因や、ステロイド投与などの二次的要因が挙げられる。また関節リウマチにおいてもごく初期から関節近傍を中心として骨粗鬆症が認められ、関節リウマチにおける骨関節破壊に重要な役割を果たしていることが知られている。つまり骨粗鬆症とは「一次的、二次的要因により骨代謝のバランスが骨吸収側に傾き、骨強度が減少し、骨折しやすくなった状態」と定義することができる。1990年代にはいり、骨組織のカルシウム濃度、いわゆる骨密度の正確な測定が可能になったことが骨粗鬆症の診断学、疫学、治療学を大きく変えたといわれている。すなわち骨粗鬆症の診断基準が定められ、それまでの方法に比して比較的容易に骨粗鬆症の診断が可能となったこと、そして骨密度の変化によって治療効果を客観的に定量できる

ようになったことは、近年の evidence-based medicine (EBM) の概念の確立ともあいまって、さまざまな骨粗鬆症治療薬の開発へとつながった。現在骨粗鬆症治療法として、ビスフォスフォネートを中心に据えた治療法がグローバルスタンダードとして確立されようとしている。アレンドロネート、リゼドロネートをはじめとしたビスフォスフォネートは、膨大な基礎研究データの蓄積に加え、大規模かつ広範な臨床研究から骨密度増加のみならず、脊椎骨折、大腿骨頸部骨折の予防効果も確立されたという点で、これまでに類を見ない画期的な治療薬であるといえる。ビスフォスフォネート以外に実際に臨床で用いられているエストロゲン、ラロキシエンも、その作用機序は骨吸収の抑制であると考えられており、現在使用されている骨粗鬆症治療薬のほとんどは骨吸収抑制剤であるといえる。しかしながらこのような治療コンセプトに不安がないわけではない。ビスフォスフォネートは、破骨細胞にアポトーシスを誘導することにより強力に骨吸収を抑制し、骨代謝回転を低下させる。骨組織に蓄積して効果を発揮するというビスフォスフォネートの特徴から、このような低代謝回転は薬物投与中止後もかなり長期間持続すると考えられており、長期におよ

ぶ低代謝回転の持続が本当に骨組織にとって有害ではないのか？という問題は、特に比較的若年の患者を治療するには重要なポイントになってくると考えられる。このような視点から、骨組織に対してアナボリックな作用を有する治療薬の開発が望まれているのも事実である。

本研究ではビスフォスフォネートの画期的な成功にかんがみ、その欠点を補うような骨粗鬆症治療薬の開発を目指すものである。すなわち破骨細胞へのアポトーシス誘導の分子メカニズムを明らかにし、これをターゲットにした、短期作用型治療薬の開発である。

B 研究方法

破骨細胞としては、マウス骨芽細胞と骨髓細胞の共存培養系において活性型ビタミン D3 の存在下で得られた破骨細胞様細胞 (osteoclast-like cell, OCL) を用いた。組換えアデノウイルスベクターは Clontech のキットを用いて作成した。作成したアデノウイルスベクターは、低分子量 G タンパク Rac1 シグナルを負に調節するドミナントネガティブ型 Ras ウイルス (RacDN ウイルス)、および正に調節する恒常活性型ウイルス (RacCA ウイルス) である。まずこれらのウイルスによる OCL への遺伝子導入効率を、特異的な抗体を用いたウェスタンブロットによって調べた。破骨細胞生存率の変化は、マウス共存培養系において、破骨細胞の形成後に骨芽細胞を酵素処理によって取り除き、その後の破骨細胞の生存を TRAP 染色によって調べることによって行った。

C. 研究結果

RacDN, RacCA ウイルスによって OCL に効率

よくこれらの遺伝子の導入が可能であった。RacCA の発現は OCL の生存を有意に促進し、RacDN の発現は生存を抑制した。Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) は強力な破骨細胞のサバイバル因子であるが、OCL の M-CSF 刺激によって急速な Rac1 の活性化が認められた。また M-CSF 刺激は OCL における ERK, Akt の活性化を誘導するが、アデノウイルスによる RacDN の発現によって Akt の活性化はほぼ完全に抑制された。一方 ERK の活性化は変化しなかった。

以上の結果から、Rac1 は破骨細胞において M-CSF シグナルの下流分子として重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

D. 考察および結論

ビスフォスフォネートの画期的な成功をかんがみると破骨細胞の生存・アポトーシスのシグナル伝達機構は骨粗鬆症治療の有効なターゲットになりうると考えられる。低分子量 G タンパクは細胞のさまざまな機能に関与するが、アレンドロネート、リセドロネートなどアミノビスフォスフォネートの分子標的である可能性が示唆されている。本研究においてわれわれは Rho ファミリーの低分子量 G タンパクである Rac1 が破骨細胞生存において重要な役割をはたしていることを明らかにした。今後 Rac1 の発現・活性化を調節するような薬剤を開発することにより、破骨細胞の生存調節が可能となり、より安全で有効な骨粗鬆症治療薬の開発につながるものと考えられる。

E. 結論

Rac1 は破骨細胞の生存に重要な役割を果たす。これをターゲットにした創薬は新しい

骨粗鬆症治療薬として有望である。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Mochizuki T, Asai A, Saito N, Tanaka S, Katagiri H, Asano T, Nakane M, Tamura A, Kuchino Y, Kitanaka C, Kirino T: Akt protein kinase inhibits non-apoptotic programmed cell death induced by ceramide. *J Biol Chem* 2002, 277:2790-2797
- 2) Nakamura I, Kadono Y, Takayanagi H, Jimi E, Miyazaki T, Oda H, Nakamura K, Tanaka S, Rodan GA, Duong LT: IL-1 Regulates Cytoskeletal Organization in Osteoclasts Via TNF Receptor-Associated Factor 6/c-Src Complex. *J Immunol* 2002, 168:5103-5109
- 3) Onodera S, Nishihira J, Iwabuchi K, Koyama Y, Yoshida K, Tanaka S, Minami A: Macrophage migration inhibitory factor up-regulates matrix metalloproteinase-9 and -13 in rat osteoblasts. Relevance to intracellular signaling pathways. *J Biol Chem* 2002, 277:7865-7874
- 4) Yamamoto A, Miyazaki T, Kadono Y, Takayanagi H, Miura T, Nishina H, Katada T, Wakabayashi K, Oda H, Nakamura K, Tanaka S: Possible involvement of IkappaB kinase 2 and MKK7 in osteoclastogenesis induced by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand. *J Bone Miner Res* 2002, 17:612-621
- 5) Ioku K, Kawachi G, Fujimori H, Goto S, Fujiwara K, Watanabe M, Oda H, Tanaka S, Matsumoto T: Analysis of apatite in phyma calcified in vivo. *Trans Materials Res Soc Japan* 2002, 27:455-457.
- 6) Nakamura K, Oda H, Tanaka S, Kuga Y, Yamamoto M, Nishikawa T, Fuji T, Shimizu M: Usefulness of absorbable screws in the Sauvé-Kapandji procedure for rheumatoid wrist reconstruction. *Mod Rheumatol* 2002, 12:144-147
- 7) Worland RL, Jessup DE, Johnson GVV, Alemparte JA, Tanaka S, Rex FS, Keenan J: The effect of femoral component rotation and asymmetry in total knee replacements. *Orthopedics* 25: (10) 1045-1048, 2002
- 8) Houle EF, Rousseau S, Morrice N, Luc M, Mongrain S, Turner CE, Tanaka S, Moreau P, Huot J: RK mediates phosphorylation of tropomyosin-1 to promote cytoskeleton remodeling in response to oxidative stress. Impact on membrane blebbing. *Mol Biol Cell* In press.
- 9) Miyazaki T, Neff L, Tanaka S, Horne WC, Baron R: Regulation of cytochrome c oxidase activity by c-Src in osteoclasts. *J Cell Biol* In press.
- 10) Tanaka S: Adenovirus vector-mediated gene transduction for the treatment of bone and joint destruction of rheumatoid arthritis. *In* "Tissue Engineering and Biodegradable

- Equivalents.” eds. by Lewandrowski, Trantolo, Gresser, Yaszemski, and Altobelli.. Marcel Dekker, Inc. pp467-482, 2002.
- 11) Juji, T., Hertz, M., Aoki, K., Horie, D., Ohya, K., Gautam, A., Mouritsen, S., Oda, H., Nakamura, K., Tanaka, S. A novel therapeutic vaccine approach, targeting RANKL, prevents bone destruction in bone-related disorders. *J. Bone Miner. Metabolism*. 20:266-268, 2002.
 - 12) Takahashi, N., Udagawa, N., Tanaka, S., and Suda, T. 2002. Generation of murine osteoclasts from bone marrow. *In* “Methods in Molecular Medicine”. In press.
 - 13) Tanaka S, Nakamura I, Inoue J-I, Oda H, Nakamura K. Signal transduction pathways regulating osteoclast differentiation and function. *J Bone Miner Metabolism*. 2003 In press.
 - 14) 田中 栄 破骨細胞およびその前駆細胞への遺伝子導入 *日本骨代謝学会雑誌* 19:76-79, 2002
 - 15) 田中 栄 知っておきたい 200 words RANKL-RANK *医学のあゆみ* 200:1052, 2002
 - 16) 田中 栄 骨粗しょう症の新しい治療 *最新医学* 57:1515-1523, 2002
 - 17) 田中 栄 RANKL ワクチンによる新しい骨代謝疾患治療 *CLINICAL CALCIUM* 2:932-934, 2002
 - 18) 田中 栄 破骨細胞性骨吸収の制御 *Medical Science Digest* 28:446-449, 2002
 - 19) 緒方 徹、山本真一、田中 栄、中村 耕三 脊髄損傷修復の試み *整形災害外科* 45:1273-1277, 2002
 - 20) 門野夕峰、高柳 広、田中 栄 破骨細胞の分化、機能、生存における RANKL/RANK シグナル～IFN シグナルとのクロストークを含めて～ *実験医学* (増刊) 20:2477-2481, 2002
 - 21) 田中 栄 特集 あらたな TNF/TNF 受容体ファミリーと疾患 関節疾患治療への応用 *医学のあゆみ* 203:493-494, 2002
 - 22) 秋山 達、田中 栄 骨形成・骨吸収のシグナル伝達と創薬 *実験医学* 20:2616-2620, 2002
 - 23) 瀬戸宏明、田中 栄、黒澤 尚、中村 耕三 滑膜炎と分化異常 腎と骨代謝 16:21-26, 2003
 - 24) 田中 栄 関節リウマチにおける骨関節破壊メカニズム *Rheumatology Clinical Update* 9:38-39, 2003
- 学会発表
- 1) The 11th International Rheumatology Symposium (2002.4.23) Kobe:
 - 2) A therapeutic vaccine approach to inhibit pathological bone destruction.
The 3rd International Workshop on Musculoskeletal and Neuronal Interactions (2002. 5.31) Corfu, Greece: Adenovirus vector-mediated ALK gene transduction to synovial cells induces chondrogenic differentiation.
 - 3) Osteoporosis Excellence Meeting (2002.11.15-19) New York: A therapeutic vaccine approach to inhibit pathological bone destruction
 - 4) セルサイクル研究会 (2002. 6.4) 福岡 破骨細胞の分化と活性化の分子メカニズム
 - 5) 第 22 回 日本骨形態計測学会 (2002.6.27-29) 東京 特別講演「骨関節疾