

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—

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（H14-免-010）

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 越 智 隆 弘

平成 16 年 3 月

# I 平成 15 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（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）  
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 平成 14 年度からの研究成果をまとめる。1)臨床疫学研究から関節リウマチ患者には非 RA 対照者の加齢に伴うデータより、明らかに顕著な骨粗鬆症が認められること、骨密度低下は非 RA 対照者の腰椎により、股関節や手首など傍関節部に観察されるのが特徴であることが判明した。RA の重症度が要因である可能性が示唆された。2) RA ナース細胞と CD14 陽性細胞によるヒト破骨細胞の高純度培養系を確立し、RANKL+M-CSF が関与しない破骨細胞分化誘導系が RA の骨破壊に観察される事を明らかにした。さらに、本培養系を用い Differential display により破骨細胞特異的に発現する 4 回膜貫通型新規タンパクをコードする遺伝子の単離に成功した。3) RA および OA 患者についての選択的トランスクリプトーム解析のために、健康人の血液細胞特異的に転写誘導される遺伝子群を単離する事に成功し Gene-chip 解析系を確立した。

分担研究者

吉川 秀樹	大阪大学大学院医学系研究科 教授
野島 博	大阪大学微生物病研究所難治疾患バイオ分析部門 教授
下村 伊一郎	大阪大学大学院生命機能研究科 教授
高橋 直之	松本歯科大学総合歯科医学研究所 教授
広畑 俊成	帝京大学医学部内科学膠原病リウマチ科 助教授
田中 栄	東京大学医学部付属病院整形外科・脊椎外科 助手
鈴木 隆二	国立相模原病院臨床研究センター診断治療研究室 室長
武井 正美	日本大学医学部内科学講座内科一部門 助手

研究協力者

西沢 良記	大阪市立大学大学院医学系研究科 教授
佐伯 行彦	国立大阪南病院臨床研究部 部長
行岡 正雄	行岡病院 病院長
島岡 康則	市立池田病院整形外科 部長
中村 宣雄	協和会病院整形外科 部長
前田 朋子	塩野義製薬株式会社創薬研究所 主任研究員
桃原 茂樹	東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター 講師
安藤 貴信	国立療養所盛岡病院整形外科 部長
中山 久徳	国立相模原病院リウマチ内科 医員

**A 研究目的**

社会の高齢化を迎え、加齢に伴う骨粗鬆症、骨折、続発する機能障害が増し、社会のおよび医療経済的問題も大きく、その予防や治療に国家的対応が迫られている。その中でも、従来免疫異常の克服を治療目標にされてきた関節リウマチ (RA)患者には 非 RA 対照のいわゆる原

発性骨粗鬆症に比して更に高頻度、高度な骨粗鬆症が、関節機能障害に併せ発症することが認識され始め、社会問題を大きくしている。そのような背景から RA の病因・病態解明、そして治療法開発研究は急務である。従来、滑膜における免疫異常機序解明を目標に世界中で諸研究が進められながら未解明の現状に対して 骨粗鬆症という

特徴的な臨床症状を引き起こす骨髄を重要な場とした組織破壊の病因 病態解明という新たな突破口が得られたと考えられる。この問題解明が本研究の重要な主目的である。本研究では、研究目的を以下の 4 項目の柱に分けて遂行している。Ⅰ) RA 患者の骨粗鬆症の臨床疫学的研究、Ⅱ) RA 骨粗鬆症病態解明研究、Ⅲ) RA の病因解明研究。

## B 研究方法

臨床研究から分子生物学的研究まで広範な分担研究者および研究協力者連携の下、調査研究に関して必要なインフォームト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た。

### Ⅰ) 関節リウマチ患者に発症する骨粗鬆症の臨床疫学的研究

分担研究者、研究協力者の多施設において、RA 患者と対照群との比較研究を行った。①多数患者の疫学的調査は国立相模原病院を中心に行われ ヒスフォスフォネート(BP)未投与の女性 RA 患者 609 例(平均 60.6±10.1 歳)を対象に、非 RA 高齢者、非 RA 膠原病患者などとの比較研究を行った。②RA 自然経過の病型別検討は大阪大学付属病院で長期(平均 19.1+6.6 年)経過観察された 50 症例を対象にした。③ステロイド投与の影響については多施設でも検討しているが、大阪市立人学でステロイド長期(平均 10.2mg/日 X 7.7 年)投与症例と閉経後女性(294 名)の腰椎椎体骨折の比較研究が行われた。骨密度(BMD)は腰椎、大腿骨頸部 大腿骨近位部あるいは第 2 中手骨などを対象に、DXA 法、CXD 法 あるいは pQCT 法にて測定した。踵骨音響的骨評価(OSI)は AOS-100 で測定した。骨代謝マーカーとしては BAP と尿 NTX などを、RA 活動性の指標としては CRP、ESR および RF を測定した。RA か重症病型か軽症かは関節破壊の広がりて評価した。

### Ⅱ) RA 骨粗鬆症病態解明研究

RA 患者の手術前に十分なインフォームトコンセントと必要な同意文書を得た患者から 末梢血、あるいは手術目的の麻酔下で骨髄血を採取した。血液から赤血球分画を除いた後、各細胞を採取した。ナース細胞樹立、骨髄血の付着性細胞を

採取して単クローン化し、特異なナース細胞機能をもった線維芽細胞様細胞を選別した。鈴木分担研究者がこれにあたり 必要とする分担研究者に供給した。ヒト末梢血 CD14 陽性細胞、ヒト末梢血より Ficoll Paque 遠心法で単核細胞を分取した。更に CD14 抗体ヒースと MACS-Separator を使い、CD14 陽性細胞を分取した。

ヒト破骨細胞の研究に関しては、①ナース細胞との共培養を使った系、ヒト末梢血 CD14 陽性細胞をナース細胞と 4 週間 共培養すると TRAP 陽性単核細胞に分化する。これに conditioned medium を加えて培養すると多核で骨吸収能をもつ巨細胞(破骨細胞様細胞)が形成される。②ナース細胞との共培養を使わない系、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。また、各種の造血因子による破骨細胞形成を観察した。

破骨細胞の検討、破骨細胞のマーカーと考えられる TRAP 染色及びヒ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 象牙切片上の吸収窩を観察した。また、TGF $\beta$ 、PGE $_2$ 、p38MAPK の特異的阻害剤である SB203508 を添加して、ヒト破骨細胞形成を解析した。

### Ⅲ) RA の病因解明研究

骨髄細胞研究あるいはウイルス学的研究に関しては昨年報告と同様の細胞学的解析方法で行われた。患者の骨髄血の選択的トランスクリプトームからの解析研究が主体であるが 健康人の血液細胞 正常線維芽細胞 RA 患者(約 80 人分)および OA 患者(約 70 人分)の血液 骨髄液を個別に採取し、全 mRNA を抽出 精製して患者由来の cDNA ライブラリーを作成する。次に段階的サブトラクション法を用い 健康人の血液細胞 cDNA ライブラリーから正常線維芽細胞由来の mRNA を差し引くことにより、血液細胞特異的に転写誘導される遺伝子群(PREB Predominantly expressed in blood cells)を包括的に単離する。同様に、RA 患者骨髄液 cDNA ライブラリーから OA 患者骨髄液細胞由来の mRNA を差し引くことにより RA 患者骨髄液にお

いて特異的に転写誘導される遺伝子群 (AURA Augmented transcription in RA patients) を包括的に単離した。

## C 研究結果

### I) 関節リウマチ患者に発症する骨粗鬆症の臨床疫学的研究

平成 14 年度までの研究で RA 患者には非 RA 高齢者に比べ 高頻度 高度な骨粗鬆症が認められ 高齢者の骨密度減少の特徴部位である腰椎と並んで、大腿骨頸部や手首に顕著な骨密度減少が認められることを報告してきた。本年は厳密な比較のために対象症例を整備して検討を続けた。①非 RA 高齢者、非 RA 膠原病患者等との比較研究(中山研究協力者)、RA 患者は非 RA 高齢者に比べ、腰椎骨密度(0.80/0.83) 大腿骨頸部骨密度ともに有意に低く(0.58/0.60  $p < 0.05$ )、第 2 中手骨の骨密度も有意に低値であった(1.53/1.92  $p < 0.01$ )。RA 患者は非 RA 対照に比べ、骨代謝マーカー(BAP 29.7/23.1  $p < 0.01$ )、尿 NTX (67.2/50.4  $p < 0.01$ )とも有意に高値であった。②RA の重症度(病型)との関連(吉川分担研究者)、平成 14 年度までの研究で RA 患者の骨粗鬆症は重症病型に、また腰椎椎体より関節近傍の骨端部に特徴的に認められることが示されたか、病型間の骨密度減少は短期間(平均 7.2 ヶ月)の経過では有意差は認めなかった。③副腎皮質ホルモン剤投与患者、副腎皮質ホルモン剤投与 RA 患者では国立相模原病院、阪大病院の調査で、従来報告同様の骨密度低値傾向が認められた。しかし、ステロイド投与量の多い膠原病患者より非ステロイド投与 RA 患者のほうが骨密度が低いこと 更に大阪市立大学(西沢研究協力者)の調査結果では、RA でステロイド長期投与患者では非投与患者に比べて椎体骨折の頻度に優位差はなく、ステロイド投与症例の骨密度低下は、薬物投与の要因より 疾患あるいは RA 重症度に関連する要因である可能性があり、引き続きの検討が必要と考えられる。

### II) RA 骨粗鬆症病態解明研究

本研究開始以前の厚生科学研究で、RA の骨髄には RA 病巣を形成する線維芽細胞様細胞(ナース細胞)と ナース細胞に支持される異常活性化した血球系細胞と

から成る恒定的な病巣が認められること。軽症病型 RA ではリンパ球などの免疫系細胞の活性化が顕著であるか、重症病型 RA では更に破骨細胞や骨髄球系細胞の異常活性化も併せ認められることを報告していた。そして平成 14 年度までの当研究班報告で特に顕著な骨粗鬆症を示す重症病型 RA では破骨細胞系の異常亢進が認められ、その破骨細胞は従来知られていたものと異なり RANKL 非依存性細胞であり 腸骨骨髄と傍関節部骨端部骨髄に分化・増殖が認められることを報告していた。平成 15 年度は、RA 患者に認められる、この破骨細胞系とマウスとの異同と ヒト細胞の詳細解析に的を絞った。以下に略記する破骨細胞機序の背景として 下村分担研究者はヒト骨髄脂肪が如何に骨吸収機序に影響するかの解明目的で、脂肪細胞で発現の見られる既知の分泌因子、特に骨形成にかかわる分泌因子の探索をおこない、さらに DNA マイクロアレイ解析法を導入し 骨代謝に関わる新たな分泌因子の同定を進めている。また、田中分担研究者はナース細胞制御を遺伝子導入にて試みている。

ヒト破骨細胞の研究に関しては、①CD14 陽性単球様細胞からのヒト破骨細胞形成と マウス破骨細胞との比較(高橋分担研究者)、(1)ヒト破骨細胞形成 CD14 陽性細胞は M-CSF と RANKL の存在下で TRAP 陽性かつピトロネクチンレセプター陽性の単核並びに多核細胞に分化した。この細胞誘導を TGF $\beta$  は促進し、SB203508 は阻害した。(2) TNF $\alpha$  と M-CSF の添加により、ヒト破骨細胞は誘導された。(3)PGE $_2$  は RANKL と M-CSF によるマウス破骨細胞形成を促進するか ヒト破骨細胞の誘導を濃度依存的に抑制した。マウスとヒトの破骨細胞の反応が異なることを示す 2 つの現象である。②ナース細胞との共培養を使った RA 破骨細胞の特性(鈴木分担研究者)、CD14 陽性単球様細胞を 4 週間 ナース細胞と共培養して得た TRAP 陽性単核細胞は IL-3、IL-5、IL-7、GM-CSF および RANKL、M-CSF それぞれの刺激により TRAP carbonic anhydrase II、カルシトニンレセプター等を発現する多核巨細胞へと分化した。また この多核巨細胞はウシ骨スライスや象牙切片上に吸収窩を形成したことより 骨吸収能を持つ成熟破骨細胞であり、CD14 陽性

単球様細胞は前駆破骨細胞であることが示唆された。これら前駆破骨細胞及び成熟破骨細胞の性状解析と特異的に発現する遺伝子の解析を differential display 法により行ったところ、既知・新規遺伝子合わせておよそ 20 の成熟破骨細胞特異的遺伝子 およそ 15 の前駆破骨細胞特異的遺伝子を見出した。このうち新規であった 4 回膜貫通型の膜タンパク 7-44 に関してさらに解析を行ったところ、7-44 は成熟破骨細胞にのみ特異的に発現し、末梢血単球や前駆破骨細胞には発現していないこと 他組織にも全く発現が認められないことが確認されたため、7-44 のコートする膜タンパクに対しポリクローナル抗体を作成した。この抗体はマウスおよびヒトの破骨細胞を特異的に認識することがウェスタンブロッティングおよび免疫組織染色で確認された。

### III) RA の病因解明研究

骨髄を場とする RA 病因解明研究として 広畑分担研究員は RA 患者骨髄 CD34+細胞から CD14+/HLA DR 陽性細胞への分化、更に CD31+細胞(血管内皮前駆細胞)、vWF+細胞(血管内皮細胞)への分化も有意に亢進していることから、RA 関節滑膜における血管新生及び血管内皮細胞の活性化において 当初からの仮説通りに骨髄 CD34+細胞の異常が深く関与することを示した。また、武井分担研究者は RA 骨髄中には EBV に対する CTL 活性が増加しており、EBV への感染制御が活発に行われていることを見出した。

野島分担研究者はこれまでに、263 種類の PREB 遺伝子群を単離することに成功した。血液細胞から作製した 1 次差分化 cDNA ライブラリーをランダムに 500 クローン選ひ段階的サブトラクションを 3 段階行い、3 次差分化まで 1830 個の cDNA をノーサンブロット解析し 320 種類の PREB 遺伝子を全て取り終えこれ以上新たな cDNA が出現しない状態に到達した。最終的に約 263 種類の cDNA を PREB 遺伝子として登録した。各 PREB について最適プローブとなる特異的な塩基配列を用い 多数の RA 患者(約 80 人分)および OA 患者(約 70 人分)について選択的トランスクリプトーム解

析を行い RA 患者骨髄液細胞特異的に転写誘導される遺伝子群を包括的に単離しつつある。

## D 考察

### I) 関節リウマチ患者に発症する骨粗鬆症の臨床疫学的研究

RA 患者には加齢に伴うこと起因するよりも明らかに顕著な骨粗鬆症が認められ、骨密度低下は腰椎に加えて 股関節などの傍関節部にも認められるのか特徴的である。骨密度低下は関節破壊の顕著な重症病型の罹病早期に急速に進むか、長期経過では経年的骨密度減少に病型間の有意差は明らかでないようだ。ステロイド投与が骨密度減少の要因と考えられているか ステロイド投与が要因か ステロイド投与を必要とする RA 重症度が要因かは不明確である。ステロイド長期投与患者の腰椎圧迫骨折発現が加齢による骨粗鬆症症例と有意差がないことも含頭に置き RA による骨粗鬆症をどのように評価し、どのように考えるべきかの結論を出す必要がある。

### II) RA 骨粗鬆症病態解明研究

RA 病態は異常活性化した血球系細胞か、やはり異常活性化した線維芽細胞様細胞(ナース細胞)による病巣で維持され慢性的な炎症と組織破壊が引き起こされるものであることは前期厚生科学研究プロジェクトで明らかにしてきたが 免疫亢進機序と組織破壊機序を説明できる普遍的な病態と言える様だ。血球細胞の中でも破骨細胞活性化による骨粗鬆症は、その意味で定型的な RA 症状といえるようだ。

ヒト破骨細胞の研究に関しては、RA 患者に特徴的に見出された破骨細胞様細胞は従来、マウスなどの系で確立された常識である「RANKL 依存性」ではなかったことから破骨細胞は 様なものでなく、正常代謝と RA、またマウスやラットの実験系とヒトでは異なり得ることか示された。RA の重要病態である骨粗鬆症あるいは骨関節破壊を選択的に抑える治療法へも結び付く研究として、今後、精力的に進める。

### III) RA の病因解明研究

骨髄におけるウイルス学的研究も視野に置きながら進めているか 本年度は患者の骨髄血の選択的トランスクリプトームからの解析研究に重点をおいた。RA 骨髄に見出される遺伝子群を包括的に解明することにより、原因遺伝子を捕らえることかでき

ると考えている。平成 16 年以後の病因研究に結び付けてゆく方向で 詳細な研究を続けたい。

#### **E 結論**

RA 患者に認められる骨粗鬆症は疾患特徴的に広く認められる臨床症状であるようた。その重要な誘因となる破骨細胞分化は従来知られているものと異なり破骨細胞の多様性が示された。未解明部分の解明を進める中で、未解明の RA 病因 病態解明、完治療法開発への途が開けそうた。

# 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 (H14 免・010)

## 研究責任者 (所属・職名・氏名)

国立相模原病院・病院長・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か、関節リウマチに伴う骨髄病態によって、加齢によるものよりも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・外とも未解決であり、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よ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液細胞と、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。種々の血液細胞と線維芽細胞様間質細胞はともに造血系の腸骨骨髄において異常活性化され、さらに全身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を考えられる。軽症リウマチに見られるリンパ球系機能亢進に、さらに機能亢進誘発の閾値が高い破骨細胞や骨髄球細胞など異常増殖 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。さらに、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解因子 (RANKL) に依存しないことが判明し、分化段階で RANKL に依存する既知の破骨細胞とは異なる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る。

「リウマチの王病巣が骨髄」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、日本の共同研究体制で解明を急ぐことが NIH の主任研究員である Lipsky 博士などからも求められている。以上のような背景のもの、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

関節リウマチは世界中で人口の0.5-1%の発症があるとされ、日本では約70万人の発症と言われている。社会の高齢化に伴い、加齢だけでは起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加し社会問題に成っている。本研究はこの関節リウマチ 骨粗鬆症、さらに対照疾患として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きた。

1) 疫学的研究 申請者らは平成15年度までの当該厚生科学研究により、関節リウマチ(RA)特有の顕著な骨量減少の実態調査研究を進めてきた。平成16年度にはこれを発展させ、原発性骨粗鬆症との比較の上で、RA骨粗鬆症の特異的病態解明とともに、その評価基準診断基準を明示する。

2) RA骨粗鬆症発症機序解明研究 申請者らは平成15年度までに、RA患者特異的な骨吸収機序を見出し、破骨細胞は従来知られてきた細胞のみでなくRA特異的なものがある、またヒトのものは、従来知られてきたマウスやラットのものとは異なる特性があるらしい事が解明された。平成16年度にはこの研究を発展させ、多様な破骨細胞、特にRA破骨細胞の特異性の研究と、それを維持させるナース細胞の詳細研究を進める。更に視点を広げて、加齢やRAに伴う骨髄変化(脂肪髄など)と骨粗鬆症やRA病態維持との関連を分子生物学的レベルまで進める。

3) RAの病因解明の研究 平成15年度に野島分担研究者によって、RA骨髄中の遺伝子のほぼ全体が選択的トランスクリプトーム法で解析されたか、平成16年度には破骨細胞やナース細胞誘導に必須の遺伝子を選択し、病因解明に迫る。併せ、ウイルス学的角度からの研究も進める。

4) 治療法開発の研究 RA特異的な破骨細胞、および支持するナース細胞を抑制する治療法、更に、遺伝子解析結果によって、病因に対する根治療法開発研究へも進めることも考える。

## 本研究の目的

社会の高齢化を迎え、加齢に伴う骨粗鬆症、骨折、続発する機能障害が増し、社会的および医療経済的問題も大きく、その予防や治療に国家的対応が迫られている。その中でも、従来免疫異常の克服を治療目標にされてきた関節リウマチ(RA)患者には、非RA対照のいわゆる原発性骨粗鬆症に比して更に高頻度、高度な骨粗鬆症か、関節機能障害に併せ発症することか認識され始め、社会問題を大きくしている。そのような背景からRAの病因・病態解明、そして治療法開発研究は急務である。従来、滑膜における免疫異常機序解明を目標に世界中で諸研究が進められながら未解明の現状に対して、骨粗鬆症という特徴的な臨床症状を引き起こす骨髄を重要な場とした組織破壊の病因・病態解明という新たな突破口が得られたと考えられる。この問題解明が本研究の重要な主目的である。

## 研究期間

2002年7月25日 ～ 2005年7月31日

## 研究状況および前年度までの実績

- 1) 疫学的研究 申請者は平成14年度まで、阪大グループとして予備研究を行ってきたか、国立相模原病院や他施設での多数患者の研究結果も平成15年度までに加え得た。
- 2) 破骨細胞の研究 申請者らは関節リウマチ血液から骨髄間葉系細胞を用いて未知の(RANKL 非依存性の)破骨細胞樹立に成功し既知の破骨細胞との比較研究を行ってきた。平成15年度まで進めた厚生科学班研究により、RAに認められる新たな破骨細胞の実態解明が進んだ。
- 3) 骨髄病態研究 申請者らはリウマチ患者の主病巣は骨髄にあり、関節は二次的病巣との考えに基づき、活性化した各種血球細胞に依って作られる病態と、活性化した線維芽細胞様細胞による諸細胞機能の維持について長く日本発オリジナルの研究を続けたか、脂肪髄などの骨髄病態と骨粗鬆症あるいは炎症持続との関連研究の準備が平成15年度になされた。
- 4) 病因研究 申請者らのRA骨髄病因研究からウィルス関与の可能性を強く示唆するデータをj得て研究企画を進めているか、平成15年度に野島分担研究者により、RA骨髄の遺伝子のほぼ全体が登録された。病因遺伝子解明に進める準備状態かてきた。
- 5) 治療法開発の研究 破骨細胞、ナース細胞抑制による治療薬開発を進める基礎研究は大幅に進んでいる。

## 研究方法

平成16年度の研究はI)関節リウマチ患者に発症する骨粗鬆症の臨床疫学的研究、II)RA骨粗鬆症病態解明研究、そしてIII)病因解明研究の3本柱で当初の研究計画達成に向かう。

I) 関節リウマチ患者に発症する骨粗鬆症の臨床疫学的研究 最も基本的な研究計画は、RAに認められる顕著な骨粗鬆症を、加齢に伴う原発性骨粗鬆症との関連の上で、どのように評価し、診断するかの基準を決めることである。原発性骨粗鬆症研究の造詣が深い西沢教授には分担研究者に加わっていたたき、今までの研究結果の不十分な項を班研究体制で補いながら、本年度末には、RA骨粗鬆症の臨床実体解明とともに、評価基準、診断基準を決定する。その基礎データは、RA、非RA対照、重症度との関連研究、ステロイド使用の有無、評価は骨密度、骨代謝マーカー、RA臨床検査値、などである(西沢分担研究者、吉川分担研究者、中山研究協力者、桃原研究協力者、安藤研究協力者など)。

II) RA骨粗鬆症病態解明研究 特に破骨細胞研究に於いて、4回膜貫通型蛋白関連研究を一つの重点研究にしたいこともあり、佐伯氏を分担研究者に加えたい。

①CD14陽性単球様細胞からのヒト破骨細胞形成と、マウス破骨細胞との比較(高橋分担研究者)、ヒトCD14陽性細胞から分化した破骨細胞の特性を、既知破骨細胞特性と比較検討

する。マウスやラットで従来知られてきた特性とヒト破骨細胞の特性比較（高橋分担研究者、吉川分担研究者など）。

②ナース細胞との共培養で分化した RA 破骨細胞の特性に関する研究 RA 特異的に増殖する破骨細胞と、従来知られていた破骨細胞との比較検討を続ける。RA 患者に増加している破骨細胞と非 RA 破骨細胞との細部にわたる比較検討を進める。RA 破骨細胞と高齢者破骨細胞との比較検討、患者の中にも正常代謝系のものと RA 特異的なものとかあるのではないかの検討が行なわれる。特に 4 回膜貫通型の膜タンパクでは特異的なデータが期待できる（鈴木分担研究者、佐伯分担研究者、前田研究協力者など）。

③ナース細胞機能の解明研究 抗ナース細胞抗体を用いての細胞機能検討。ナース細胞と健常人あるいは RA からの CD14 陽性細胞との反応比較により RA 特異的な機能解明などか進められる（鈴木分担研究者、佐伯分担研究者、前田研究協力者など）。

④RA 骨髄細胞機能に対する骨髄内脂肪の効果 高齢者の骨髄は通常脂肪髄であるか、これか骨粗鬆症形成あるいは骨吸収機序にどのような効果をもたらしているかの解析研究（下村分担研究者）。

### Ⅲ) 病因解明研究

RA 骨髄細胞からの、諸異常細胞誘導は検討し続ける。（鈴木分担研究者、広畑分担研究者、前田研究協力者など）野島分担研究者は平成 15 年度までに選択的トランスクリプトーム解析を行い、RA 患者骨髄液細胞に転写誘導される特異的遺伝子群の単離に成功し、引き続き包括的に単離を行い、RA 原因遺伝子の解明を目指す。

### Ⅳ) 治療法開発の研究

平成 14 年度から 3 年間根治療法として間葉系細胞を抑える新薬開発企画を進める（鈴木分担研究者、前田研究協力者）。

## 予想される成果

高齢者社会に於ける、RA 患者などの生活機能病についての基礎的、臨床的、疫学的解明、再建治療の基本コンセプトとしての骨関節破壊様式の解明、根治治療開発、機能障害再建などの課題を解決する社会的必要性は大きく、成果として機能障害患者減少の社会的恩恵は大きい。更に、本研究は RA の未解明病因・病態解明と予防法、根治療法開発へつながるものである。

## 倫理面への配慮

関節リウマチ患者への十分なインフォームドコンセントや倫理面へは十分に配慮して研究を進める。「患者さんへの説明・同意文書」および「国立相模原病院倫理委員会判定通知書」を別紙に添付した。

## 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。

**I) 疫学的実態調査研究** 国立相模原病院(越智隆弘病院長、中山久徳医師)、大阪市立大学第二内科学教室(西沢良記教授)、東京大学整形外科学教室(田中栄助手)、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。

**II) RA 骨粗鬆症病態解明研究** 国立相模原病院(越智隆弘病院長、鈴木隆二室長)、松本歯科大学総合歯科医学研究所(高橋直之教授)、東京大学整形外科学教室(田中栄助手)、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。大阪大学生命機能研究科(下村伊一郎教授)、市立池田病院(島岡康則部長)、行岡病院(行岡正雄病院長)、協和会病院(中村宣夫部長)、塩野義製薬株式会社(前田朋子主任研究員)などの国公私立診療・研究協力施設、および米国国立衛生研究所(NIH)(Peter Lipsky 主任研究員)。

**III) 病因解明研究** 国立相模原病院(越智隆弘病院長、鈴木隆二室長)、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)、帝京大学内科学教室(広畑竣成助教授)、日本大学内科学教室(武井正美助手)などの国公私立診療・研究協力施設、および米国国立衛生研究所(NIH)(Peter Lipsky 主任研究員)。

**IV) 治療法開発の研究** 国立相模原病院(越智隆弘病院長、鈴木隆二室長)、塩野義製薬株式会社(前田朋子主任研究員)。

## 発表業績

別紙参照(研究成果の刊行に関する一覧表)

## 本研究を遂行するに必要なヒト臨床サンプルの取り扱いに関して

本研究とは、「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 (H14-免-010)」を言う。

### ヒト臨床サンプルを用いる理由と目的

本研究では関節リウマチ・骨粗鬆症の臨床疫学的の実態調査に始まり、腸骨骨髓細胞を用いて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、その結果に基づき基本的治療法開発を急ぐことである。

### 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。

### 臨床サンプルを用いた試験方法

- 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、末梢血を用いる。
- 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タンパク・遺伝子サンプルはコート番号を付け、鍵付き冷凍庫に保存する。また、試料は電子媒体で管理し、共同研究機関の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 取得試料を公知の方法により細胞生物学的解析を行う。
- 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。

### ヒト臨床サンプルを用いた本研究から予想される結果

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タンパク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。

## 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下に公表する。

## 本研究協力依頼の対象疾患選択基準

- 1) 対象疾患 研究協力施設において治療目的で手術が行われた関節疾患症例を言う。
- 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か診断され、機能再建目的などで手術を受ける患者のうち、手術時切除試料・骨髓液・血液などの試料を採取して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 該当なし。
- 5) 検査および評価項目 該当なし。
- 6) モニタリング 該当なし。
- 7) 除外基準 ①HBs 抗原・抗体いずれか陽性である患者。②HCV 抗体またはHCV RNA 陽性である患者。③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。④主治医か本研究遂行上、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・骨髓液・末梢血など試料に関して本研究へのしよを依頼し関連する書類を手渡す。患者か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供する。
- 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)し個人情報の流失を防ぐ。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、すべての試料および試料から得られた細胞・タンパク・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。保存に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閉容器に廃棄するか、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。

## データの蓄積および解析

- 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評価基準による。
- 2) 患者およびデータの取り扱い データ解析後、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。

## 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 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)。
  - ① 手術時切除組織片・骨髓液 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。
  - ② 本研究から得られた結果を基に国公立(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。
  - ③ 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。
  - ④ 遺伝子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。
  - ⑤ 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。
  - ⑥ 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。
  - ⑦ 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、試料提供について同意を依頼する。患者本人が資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。説明文書と同意書(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に、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

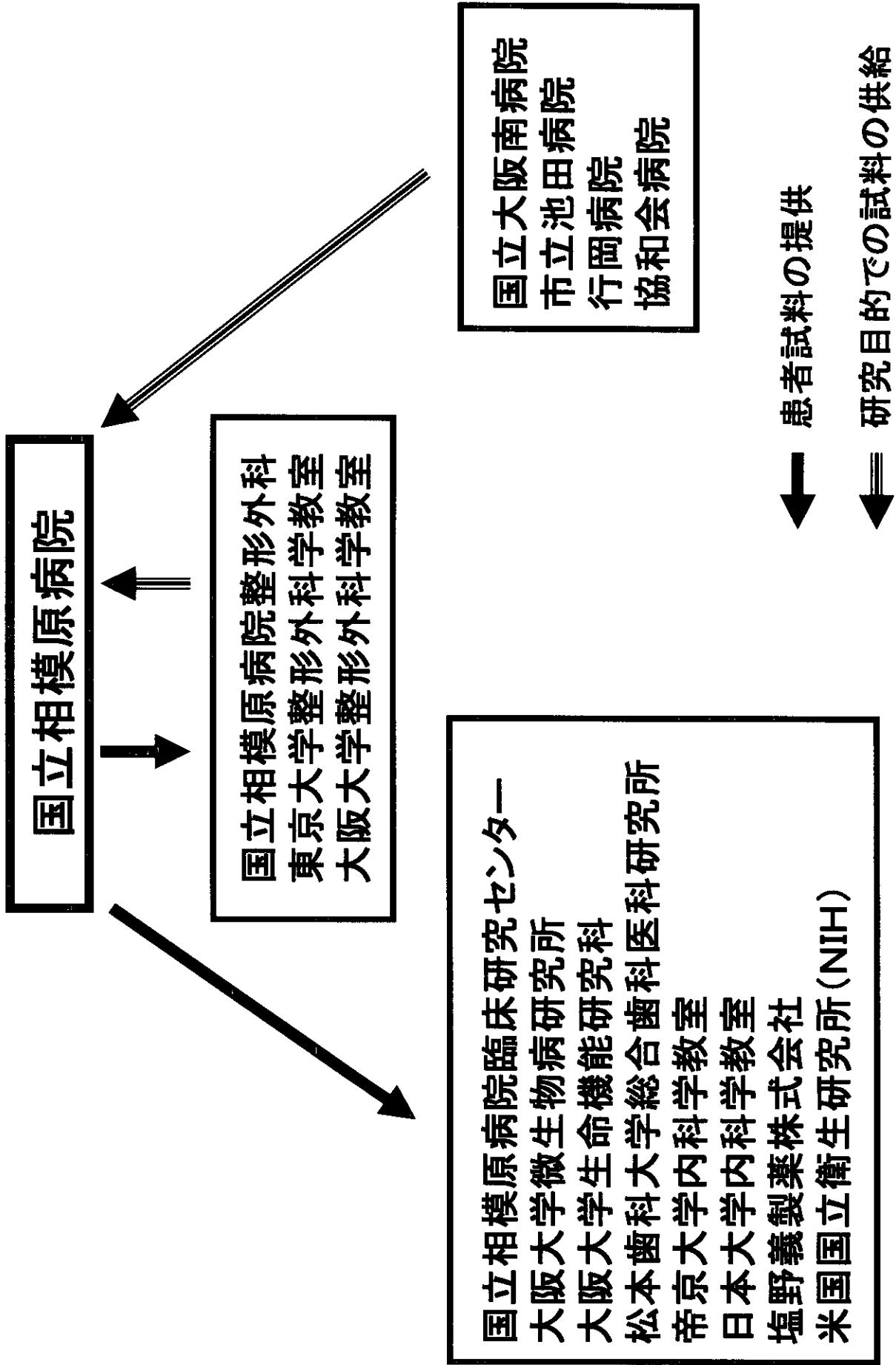
個々の試料提供者の遺伝情報が明らかになった場合、試料提供者が自ら遺伝情報の開示を希望している場合には開示し、試料採取施設の研究責任者あるいは本研究の総括責任者である越智隆弘が説明にあたる。

### 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か、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。



# 研究組織図



## 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に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くだ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、塩野義製薬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、従来の解析では病因・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、従来の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

研究協力で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。研究協力で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、あなたに御願っているか

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でない場合に限り、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

発か期待されます。

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、骨髄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、骨髄液  
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。したか  
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。