

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か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かあります。

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かありますが、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かありますが、試料提供者にはこれについても権利かありません。

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かあります。

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、あなたか同意してくたされれば、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

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 病院長

3. 共同研究者

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ハイオ分析部門 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	塩野義製菓株式会社創菓研究所 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

4. 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) 対照及び方法

(1) 疫学的実態調査研究 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研究 関節リウマチ病因研究としてEB ウィルスに的を絞った研究をする。手術時切除組織片、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 ハ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口骨関節・使用研究を進める。この目的には、手術時の組織片、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) 実施場所及び研究期間

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) 骨髓病態研究 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)、塩野義薬品研究所など。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、市立他田病院、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、大阪大学微生物病研究所など。(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 塩野義製薬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口骨関節・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か、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をするなどのため、研究内容の妥当性の承認を得ることか必要である。

5. 倫理的配慮

(1) 人権擁護

(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か臨床的に診断され 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。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、提供に許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か、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。特に遺伝し関連研究においては、厳格に文書で説明を行い、署名をもって同意を求める。

6 その他の参考事項

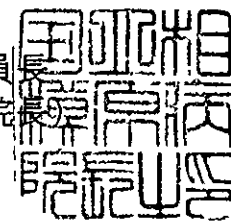
本研究は平成 2 年以來の厚生科学研究、平成 8 年以來の医薬品機構研究の結果に基づき、続けられる企画の研究である。

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とき、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 テ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 15 年度 分担研究報告書

D) RA 患者の骨粗鬆症の臨床疫学的研究

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臨床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 医師

研究協力者 橋本 淳 大阪大学 整形外科 講師

研究協力者 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

研究協力者 安藤貴信 国立療養所盛岡病院 整形外科 医長

研究要旨 関節リウマチ（RA）患者では骨折を容易に起こす重症骨粗鬆症が高率にみられる。RA以外の膠原病や原発性骨粗鬆症の患者とRA患者を比較することによりRAにおける骨粗鬆症の臨床的実態の解析を試みた。その結果RAにおいて骨粗鬆症が高頻度かつ重症化する原因は加齢やグルココルチコイド使用といった個々の要因では説明し難く、複数の要因が絡む病態の複雑さとRA特有の骨破壊亢進のメカニズムの存在にあると考えられた。

A 研究目的

関節リウマチ(RA)患者では骨粗鬆症を合併する頻度が高く、その程度も激しく、脆弱性骨折をきたしやすい。昨年度の本研究にて、RA患者の53.3%が骨粗鬆症と診断され(但し、ここで骨粗鬆症とは、DXA法による腰椎、大腿骨頸部あるいは大腿骨近位部のいずれかの骨密度がYAM 70%未満と定義した)、19.3%に椎体骨折を、9.9%には2椎体以上の多重骨折を認め、これが既報の一般人口の有病率に比して高率であることを明らかにした。RAでは、1)加齢、2)グルココルチコイド(GC)の使用、3)身体活動性の低下、4)炎症性サイトカインなどによる破骨細胞の活性化・作用の亢進、そして5)その他の要因(内分泌環境の異常、栄養吸収障害、低体重など)が骨粗鬆症の病態をより複雑化させている。こうした多因子を紐解いて、他の膠原病で見られる骨粗鬆症や原発性骨粗鬆症と比較しRA患者の骨粗鬆症が重症化する原因について検討する。

B 研究方法

対象は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)。DXA法にて腰椎、大腿骨頸部及び大腿骨近位部の骨密度を、更にCXD法にて第2中手骨骨密度を測定した。骨代謝マーカーとしてはBAPと尿NTXを、RAの指標としてはCRPおよびRFを測定した。比較対照として、A群)内科、整形外科通院中の膠原病でない女性患者で腰椎及び大腿骨頸部の骨密度を測定した336例(平均61.4±9.0歳)、B群)BP投与歴のないRA以外の膠原病の女性患者144例(平均58.1±13.6歳)、C群)整形外科通院中の膠原病でない女性患者で第2中手骨の骨密度を測定した532例(平均70.9±10.4歳)の3群を設定した。

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か、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

①A群との比較 骨粗鬆症有病率は各年代ともRA群の方が高かった。RA群はA群より大腿骨頸部骨密度が有意に低く(0.58/0.60 $p<0.05$)、腰椎骨密度も低い傾向がみられた(0.80/0.83)。

②B群との比較 両群とも70%の患者にGCが投与されていた。RA群はB群に比べGC総投与量が少なく(PSL換算9.1g/14.1g)、投与期間が短く(1816.7日/2252.7日)及び日平均投与量も少ない(4.8mg/16.4mg)にもかかわらず 大腿骨頸部(Z score -0.64/0.17 $p<0.01$)、大腿骨近位部(-0.76/-0.20 $p<0.01$)と中手骨骨密度(同年代比0.71/0.92 $p<0.01$)はより低く、骨代謝マーカーも高値であった(BAP 29.7/23.1 $p<0.01$, 尿 NTX 67.2/50.4 $p<0.01$)。

③C群との比較 年齢を調整し両群の中手骨密度を比較したところRA群の方が有意に低値であった(1.53/1.92 $p<0.01$)。

④RA群において、CRPと尿NTXには止の相関($r=0.208, p<0.01$)がみられたか、CRPとBAPとは負の相関($r=-0.153, p<0.01$)であった。更に、MMP-3と血清NTXの間にも止の相関($r=0.227, p=0.04$)がみられたか、BAPとは相関はみられなかった。またRFと骨代謝マーカー間には有意な相関はみられなかった。

D 考察

各年代別に比較してもRA以外の疾病患者より骨粗鬆症の有病率が高いことからRA患者に骨粗鬆症が多いことは加齢要因のみでは説明できない。GC投与により骨減少に拍車かかかすることは明らかであるが、より多くGCを投与する膠原病患者に比べRA患者の骨減少や代謝マーカーの亢進が著明であることからGC誘発性骨粗鬆症もRAの骨粗鬆症の一部を説明するに過ぎない。更に、一般内科や整形外科に通院中の患者群と比較してもRA患者は骨密度の低下がある。ある程度身体活動性が低下していると考えられる

対象と比べてもRA群での骨粗鬆症は重症であることを示唆している。また、炎症性マーカーであるCRPやMMP-3とNTXが止相関を示したことより、炎症の増悪は骨吸収亢進と深く関与していると想定される。

RA患者にみられる骨粗鬆症は加齢やGC使用、身体活動性の低下という個々の成因ではその重症化の理由を説明することは難しい。これは多因子が絡み合った複雑な病態である他に、RAの疾患自体に破骨細胞の働きを亢進させる特異的なメカニズムが存在することか示唆される。

E 結論

RA患者にみられる骨粗鬆症は加齢やGC使用、身体活動性の低下という個々の成因ではその重症化の理由を説明することは難しい。これは多因子が絡み合った複雑な病態である他に、RAの疾患自体に破骨細胞の働きを亢進させる特異的なメカニズムが存在することか示唆される。

研究発表

1 論文発表

臨床リウマチ (14, 139-147, 2002)

2 医学雑誌

medical forum CHUGAI (7, 2-8, 2003)

実験治療 (671, 22-26, 2003)

3 学会発表

第46,47,48(予定)回 日本リウマチ学会

第20回 日本骨代謝学会

国際骨代謝学会 日本骨代謝学会合同集会

第4,5回 日本骨粗鬆症学会

第57,58回 国立病院療養所総合医学会

第31回 日本臨床免疫学会

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

関節リウマチ 骨粗鬆症患者の疫学と病態解明に関する研究

分担研究者 吉川 秀樹

所属機関名・職名 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

－基礎研究－

関節リウマチ（RA）間質系細胞に支持誘導された破骨細胞様細胞の誘導機序の解明及び RA の病態への関与を検討した。その結果 M-CSF 及び OPG が恒常的に発現しつつも RANKL を発現しない RA 間質系細胞が CD14+PBMC を生存維持させ破骨細胞前駆細胞へと誘導することか明らかとなった。これは RA 間質系細胞が破骨細胞前駆細胞の reservoir として骨破壊の病態に関与していることを示唆する。

－臨床研究－

栄養学的な背景が均一化されているビタミンD投与中であつ罹病期間が7年以上のRA患者を対象として、RAの病型評価、ステロイド投与の有無の調査を行なった上で末梢骨と中枢骨の両方の骨密度の変化の調へをRA患者の骨密度変化に関与する因子を縦断的研究で検討した。その結果、ビタミンD服用中であっても末梢骨骨密度は減少傾向にあり、大腿骨に比較して手関節近傍の末梢骨骨密度の減少が有意に強いことが明らかとなった。また腰椎骨密度の減少はステロイド服用により悪化するか、手関節近傍の末梢骨の骨密度はむしろステロイド服用により維持されるように影響していることが示唆された。

－基礎研究－

A 研究目的

関節リウマチ（RA）では進行性の骨関節破壊が臨床的にもっとも問題となるか、近年骨破壊の中心を担っているのか破骨細胞であることか明らかになってきている。今までにRA間質系細胞がリンパ球を維持させることを報告し、RAではこの間質系細胞が何らかの病態形成を担っていると考えられる。さらにこのRA間質系細胞は末梢血中の単球を支持し単核のTRAP陽性細胞へと分化誘導することを見つけた。そこでRA間質系細胞に支持され誘導されたこれらの単核TRAP陽性細胞の誘導機序の解明および、この細胞の骨軟骨破壊への関与を明らかにする目的で以下の検討を行なった。

B C 研究方法 研究結果

単核のTRAP陽性細胞が破骨細胞前駆細胞かどうか？
末梢血 CD14 陽性単球（CD14+PBMC）は

M-CSF 非存在下では維持生存できないが RA 間質系細胞と共存培養することにより長期間維持されるとともに単核のTRAP陽性細胞（TPMoC）へと分化する。今回の検討では、TPMoCはRANKL及びM-CSF存在下で効率よく破骨細胞に分化しTPMoCは破骨細胞前駆細胞であることか明らかとなった。したがって、RA間質系細胞はCD14+PBMCの生存維持を支持しつつ破骨細胞前駆細胞へと誘導し、さらにその状態で長期間維持することか判明した。

RA 間質系細胞の CD14+PBMC の支持活性についての検討

骨芽細胞株（SaOS細胞）とその支持能を比較したところ、RA間質系細胞は4週間以上の支持活性を認めたが、骨芽細胞株には認められなかった。

RA 間質系細胞が TPMoC から破骨細胞分化への制御に関与するか？

RA 間質系細胞での RANKL M-CSF、OPG の発現を検討した。M-CSF 及び OPG が RA 間質系

細胞から恒常的に発現していることが確認され。一方 RANKL 誘導因子 (VD_3 、PTH、 PGE_2 、 Ca^{41}) による刺激下でも RA 間質系細胞は RANKL を発現しなかった。RA 間質系細胞に支持された破骨細胞前駆細胞は破骨細胞に分化せず単核の前駆細胞の状態にとどまるか、この現象に RANKL 発現せず OPG を恒常的に発現している RA 間質系細胞の関与が考えられた。

D 考察

今回の結果より RA 間質系細胞は、CD14+PBMC を生存維持させ破骨細胞前駆細胞へと誘導することが明らかとなった。同時に、OPG を発現し破骨細胞までは分化させず前駆細胞の状態を維持していることが判明した。一方 RA 患者パックスの組織学的検討でパックス組織内に多数の単核の TRAP 陽性細胞が存在し、またパックスと骨の界面では多核の TRAP 陽性破骨細胞が存在することを確認している。これらの事実から RA 間質系細胞は増殖滑膜が骨に侵入している骨破壊病巣部滑膜内で、破骨細胞へと分化しうる前駆細胞を多数維持する reservoir として骨破壊の病態に関与していることが推測される。RA 間

質系細胞の間に維持されている破骨細胞前駆細胞 (単核の TRAP 陽性細胞) から破骨細胞への分化には、骨芽細胞や T 細胞などが発現する RANKL 刺激により行なわれている可能性を考えている。

現在、RA 間質系細胞の支持活性の検討として CD14+PBMC を維持すること、破骨細胞前駆細胞に分化することから、その一つの因子として M-CSF に着目し、この中和抗体を用いて支持活性に及ぼす影響を検討している。また、RA 間質系細胞によって誘導されてくる破骨細胞の RA 病態に対する関与、すなわち、軽症病型、重症病型それぞれの CD14+PBMC を用いて、それらから誘導されてくる破骨細胞の誘導能や骨吸収能の差異について検討を進めている。

E 結論

M-CSF 及び OPG が恒常的に発現しつつも RANKL を発現しない RA 間質系細胞が CD14+PBMC を生存維持させ破骨細胞前駆細胞へと誘導することが明らかとなった。これは RA 間質系細胞が破骨細胞前駆細胞の reservoir として骨破壊の病態に関与していることを示唆する。

—臨床研究—

A 研究目的

関節リウマチ (RA) ではこの疾患に特徴的な傍関節性の骨粗鬆症に加えて全身性の中枢骨の骨粗鬆症もみられる。従って原発性骨粗鬆症で一般的に行なわれる腰椎と大腿骨の骨密度評価だけではその RA に伴う二次性骨粗鬆症の病態を評価することは困難であり、多数の部位の骨密度評価に基づいた検討を必要とする。一方 RA に伴う二次性骨粗鬆症には加齢や閉経といった因子だけでなく、RA の重症度やステロイドの使用の有無など多くの因子が関与する。これまでに我々は RA で見られる骨密度減少には RA の破壊関節数で分類した病型 (重症型、軽症型) が強く関与していることを明らかにし、RA の骨密度の評価検討を行なう際には破壊関節数による病型分類も同時に行なうことの重要性を確認している。

このように、RA の二次性骨粗鬆症の病態評価を行なう上で、通常の原因性骨粗鬆症の病態評価で確立されてきた方法だけでは不十分であるかために、十分な検討がなされる機会が少なく、RA 患者の骨密度減少かどの部位にとどのような因子の影響を受けて生じているのか、いるのかは明らかでない。

そこで今回我々は全身の関節破壊の評価に基づく RA の病型評価、ステロイド投与の有無の調査を行なった上で、末梢骨と中枢骨の両方の骨密度の変化を縦断的に調査し、骨密度減少に関与する因子を検討した。

B C 研究方法、研究結果

罹病期間が 7 年以上で全身関節の破壊関節数による病型分類が可能な閉経後女性 RA 患者を対象とした。また骨粗鬆症治療薬として bisphosphonate 投与中の患者は除外し、活性型ビタミン D 製剤服用中の患者のみを対象

象とした。症例数は50名、平均年齢64.2±9.1歳、平均罹病期間19.1±8.6年であった。骨密度はDXA (Lunar社製DPX-L)にて腰椎、大腿骨を、pQCT (ScancoMedical社製Densiscan-1000)にて橈骨、脛骨遠位の海面骨及び皮質骨部を測定した。各患者の重症度を全身関節の破壊関節数により2つに分け、越智の分類によるLES (less erosive subset) を軽症型、MES (more erosive subset)、MUD (mutilated disease) を重症型とした。ステロイド使用中の患者は32名で平均投与量はprednisolon 4.99±2.02 mgであった。骨密度の平均追跡期間は7.2±2.1ヶ月であった。

末梢骨と中枢骨の比較

腰椎 大腿骨 BMD の平均変化率は0.13±4.01%、0.29±4.23%で平均的には減少は明らかでなかった。pQCTで測定したBMD変化率は橈骨遠位海綿骨部 -0.63±14.8、橈骨遠位皮質骨海面骨部 -2.07±4.72、橈骨皮質骨部 -1.94±3.67、脛骨遠位海綿骨部 -2.17±12.6、脛骨遠位皮質骨海面骨部 -0.77±4.03、脛骨皮質骨部 -1.11±2.92であった。大腿骨骨密度と橈骨遠位、橈骨皮質、脛骨皮質骨密度の減少率に有意の差が見られた。つまりビタミンD服用中であっても末梢骨骨密度のは減少傾向にあり、大腿骨と末梢骨骨密度の減少速度に有意差が見られることが明らかとなった。

病型間比較

短期間の経過ではあるかこれらの変化率を重症病型と軽症病型間での比較を行なったか脛骨遠位海綿骨部で重症病型の方が減少率の大きい傾向が見られたか、いずれの部位も2群間で有意差は見られなかった。

ステロイドの影響

ステロイド使用の有無の2群間で比較すると使用群に比較して非使用群は橈骨遠位海綿骨部で有意に減少率が大きいことが明らかとなった。つまりステロイドを使用している群の方が橈骨遠位海綿骨骨量は減少しにくいことが明らかとなった。さらにステロイド服用量、年齢、罹病期間、重症度病型の4つを説明変数として、各部位の骨密度を目的変数とした重回帰分析を行なったところ、腰椎骨密度でのみステロイドの服用量が骨密度変化率と負の関連にあることが明らかとなった。つまりステロイド服用量が多いほど腰椎骨密度減

少か大きいことが明らかとなった。他のどの部位も平均7.2ヶ月の期間の骨密度変化にどの因子も有意な関連が見られなかった。

D 考察

平均7.2ヶ月間の短期間の縦断的調査であるか、罹病期間7年以上の閉経後の女性RA患者のみの比較的均質な対象での検討により、末梢骨の傍関節性骨減少のほうか中枢骨より減少速度が速いことが明らかとなった。また重症度の違いでは重症病型のほうが脛骨遠位骨密度か重症病型で減少しやすい傾向が見られたか7.2ヶ月の経過では有意な差ではなかった。一方ステロイドの使用かない例では使用例に比較して橈骨遠位海綿骨骨密度減少か大きく、一方腰椎ではステロイド使用量と骨密度の変化率に有意の負相関が明らかとなった。つまりステロイドの骨密度への影響は関節近傍の海綿骨には維持的に作用し、腰椎では骨密度減少をもたらすという部位による差が明らかとなった。ステロイドの抗炎症効果に伴い関節近傍の海綿骨には維持的に作用するか、関節から離れた腰椎ではステロイド性骨粗鬆症かみられるという可能性か考えられた。

E 結論

RAの患者の二次性骨粗鬆症はこれまでに明らかとなっている重症病型と軽症病型での差にととまらず、腰椎や大腿骨近位などの中枢骨と手関節、足関節近傍の末梢骨の部位によって経時的な骨減少率やステロイドの影響が異なることが明らかとなった。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

1 論文発表

Tsuboi, H, Matsui, Y, Hayashida, K, Yamane, S, Maeda-Tanimura, M, Nampei, A, Hashimoto, J, Suzuki, R, Yoshikawa, H, Ochi, T Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive cells in rheumatoid synovium may induce the destruction of articular cartilage *Annals of Rheumatic Diseases* 62:196-203, 2003

Tanaka, S, Tatsumi, K, Tomita, T, Kimura, M, Takano, T, Yoshikawa, H,

Amino, N Novel autoantibodies to pituitary gland specific factor 1a in patients with rheumatoid arthritis Rheumatology (Oxford) 42 353 356, 2003

Nakase, T, Miyaji, T, Tomita, T, Kaneko, M, Kuriyama, K, Myoui, A, Sugamoto, K, Ochi, T, Yoshikawa, H Localization of bone morphogenetic protein 2 in human osteoarthritic cartilage and osteophyte Osteoarthritis Cartilage, 11 278-284, 2003

Fujii, M, Tomita, T, Nakanishi, K, Kaneko, M, Hayashida, K, Sugamoto, K, Ochi, T, Yoshikawa, H The value and limitation of gadopentetate-enhanced magnetic resonance imaging in detecting the condition of anterior cruciate ligament in rheumatoid knee comparative study with histology European Radiology, 13:1728-1734, 2003

Nishikawa, M, Myoui, A, Tomita, T, Takahashi, K, Nampei, A, Yoshikawa, H Prevention of the onset and progression of collagen-induced arthritis in rats by the potent p38 mitogen activated protein kinase inhibitor FR167653 Arthritis and Rheumatism, 48 2670-2681, 2003

Nishikawa, M, Tomita, T, Fujii, M, Watanabe, T, Hashimoto, J, Sugamoto, K, Ochi, T, Yoshikawa, H Total ankle replacement in rheumatoid arthritis International Orthopaedics, in press

Tomita, T, Hashimoto, H, Yoshikawa, H Gene therapy for arthritis Current Drug Targets, 4 609 612, 2003

Mukai, Y, Hosono, N, Sakaura, H, Ishii, T, Fuchiya, T, Fujiwara, K, Fuji, T, Yoshikawa, H Laminoplasty for cervical myelopathy caused by subaxial lesions in

rheumatoid arthritis Journal of Neurosurgery, 100 S7-12, 2004

2 学会発表
未

H 知的財産権の出願 登録状況（予定を含む。）

1 特許取得
なし
2 実用新案登録
なし
3 その他
特になし

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

早期リウマチ患者における橈骨遠位端海綿骨と踵骨での骨密度の著明な低下に関する研究

研究協力者 西沢 良記 所属機関名・職名 大阪市立大学大学院医学研究・教授

研究要旨

関節リウマチ (RA) による続発性骨粗鬆症は発症部位により全身性と傍関節性骨粗鬆症とに大別されるか、両者の発現時期、発症機序は異なると考えられるため検討を加えた。発症1年以内の女性早期 RA 患者において pQCT (Startec XCT-960) 法により橈骨遠位端 4%部の海綿骨部と皮質骨部 20%部の骨塩量を測定した。腰椎骨密度及び踵骨音響的骨評価値 (OSI) を QDR 4500A および Acoustic Osteo-Screener (AOS-100) で測定した。RA 患者では橈骨遠位端 4%部の海綿骨部の骨密度が健常人に比し有意に低下していた ($p < 0.0001$)。同部位の皮質骨密度 橈骨遠位端 20%部および腰椎の骨密度には差は認めなかった。踵骨 OSI は RA 患者で低下を認めた ($p < 0.05$)。RA 患者の 4%部の海綿骨と RA 炎症マーカーである血清 CRP ESR および RF との間には負の相関が認められた。それら炎症マーカーと踵骨骨密度との間には相関関係は認められなかったか RA 患者の日常身体活動性の指標である M-HAQ との間には負の相関傾向を認めた。関節リウマチの早期では 手関節近傍の橈骨遠位端の海綿骨、および踵骨の骨量喪失が有意に認められた。橈骨遠位端の海綿骨量の喪失およびは RA の疾患活動性と関連し、RA に伴う関節炎かその主たる原因と考えられ、荷重骨である踵骨の骨密度低下は身体活動性の低下が主因と考えられた。

A 研究目的

関節リウマチは続発性骨粗鬆症の主たる原因疾患の一つである。発症部位により全身性と傍関節性骨粗鬆症とに大別される。両者の発現時期 発症機序は異なると考えられる。早期 RA 患者において、個々の部位で骨密度を測定し、炎症の程度や身体活動性との関連を検討することにより 各部位での骨粗鬆症発症時期やその主たる発症機序の特徴について検討した。

B 研究方法

発症1年以内の女性早期 RA 患者 30 名 (平均年齢 52.1 ± 11.9 才)、女性健常人 26 名 (平均年齢 50.4 ± 13.8 才) において、pQCT (Startec XCT-960) 法により橈骨遠位端 4%部の海綿骨部と皮質骨部 20%部の骨塩量を測定した。腰椎骨密度及び踵骨音響的骨評価値 (OSI) を QDR 4500A および Acoustic Osteo-Screener (AOS-100) で測定した。これらの骨密度計測値と疾患活動性臨床評価値として血清

C 反応蛋白 (CRP)、血沈 (ESR)、リウマトイド因子 (RF) 血清免疫グロブリン IgG、IgA IgM 血小板数、血清アルブミン値、及び身体活動性 M-HAQ スコアとの関連を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は大阪市立大学附属病院の倫理委員会に諮問し承認を受けた。本研究についての目的 意義、方法 予測される有用性または危険性について文書および口頭で十分な説明を行い 自由意志により参加に同意した者を被験者とした。同意は文書により得た。実施責任者および分担者は被験者情報を責任を持って管理し ハッキングに対処しネットワークとは独立したコンピューターにて情報管理し、また 他機関や他人よりいかなる要請があっても、倫理委員会の許可なく被験者の個人情報を公開せず、その取り扱いには細心の注意を払った。患者に実施事項 (本研究の意義、目的、方法、患者が被り得る不利益および危険性) についての説明文書を作成し、実施責任者

あるいは分担者か文書と口頭にて十分に説明をした後、その内容を理解してもらった上で同意書への記載を依頼した。以上より、倫理面の問題は無いと判断した。

C 研究結果

RA患者群、健常群において年齢、体格に有意な差はなかった。RA患者では橈骨遠位端4%部の海綿骨部の骨密度が健常人に比し有意に低下していた($p < 0.001$)。同部位の総・皮質骨密度、20%部および腰椎の骨密度には差は認めなかった。踵骨OSIはRA患者で低下を認めたが、その差は比較的軽微であった($p < 0.05$)。RA患者の4%部の海綿骨とRA炎症マーカーである血清CRP、ESR、およびRFとの間には負の相関が認められた。それらマーカーと踵骨骨密度との間には相関関係は認められなかったか、RA患者の日常身体活動性の指標であるM-HAQとの間に負の相関傾向を認めた。

D 考察

関節リウマチの早期では、手関節近傍の橈骨遠位端の海綿骨、および踵骨の骨量喪失が有意に認められた。橈骨遠位端の海綿骨量の喪失はRAの疾患活動性と関連し、RAに伴う関節炎がその主たる原因と考えられた。関節炎部の炎症細胞より産生される骨吸収促進作用のある炎症性サイトカイン濃度が局所的に増加し骨代謝の影響を受けやすい海綿骨に作用していることが示唆された。一方、荷重骨である踵骨の中央部の骨密度低下は身体活動性の低下が主因と考えられた。

E 結論

RA患者では炎症関節の傍関節部の骨粗鬆症が強いことか特徴であるか、今回、早期RAにおいても、全身性の骨粗鬆症に先んじて既に有意な骨密度の減少が認められること、炎症が強く関与することか明らかになった。従って、積極的な続発性骨粗鬆症に対する対策がRAの予後改善に重要であると考えられる。

F 健康危険情報

特記事項無し

G 研究発表

1 論文発表

Inaba, M Nagata M Goto H Kumeda Y Kobayashi, K Nakatsuka K Miki T Yamada S Ishimura E Nishizawa Y Preferential reductions of paraarticular trabecular bone component in ultradistal radius and of calcaneus ultrasonography in early-stage rheumatoid arthritis Osteoporos Int 14 683-7 2003

2 学会発表

Preferential bone loss in paraarticular distal radius and calcaneus in early-stage rheumatoid arthritis 第47回日本リウマチ学会総会・学術集会 2003年4月24日～26日 東京

H 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

- 1 特許取得
該当無し
- 2 実用新案登録
該当無し
- 3 その他
特記事項無し

II) RA 骨粗鬆症病態解明研究

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 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か明らかとなった。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。マウスの破骨細胞と比較したところ、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、TGF- β により促進された。PGE₂ は RANKL が誘導するマウスの破骨細胞形成を促進したが ヒト破骨細胞形成を抑制した。また カルトニンンはヒト破骨細胞が形成するアクチンリンクを効率よく破壊した。

A 研究目的

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)がクローニクされ、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 のテコイ受容体として 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 は RANKL-RANK を介さず直接破骨細胞の分化を誘導することを明らかにした。また IL-1 は RANKL-RANK を介さず直接破骨細胞の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、マウスの細胞を用い得られたものである。従来、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。関節リウマチや骨粗鬆症の発症機構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 抗体ヒ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酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (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。更に 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 TGF- β 、PGE₂ 等を添加して、ヒト破骨細胞形成を観察した。CD14 陽性細胞の PGE₂ レセプター (EP1, EP2, EP3, EP4) の発現は RT-PCR にて解析した。また ヒト破骨細胞が形成するアクチンリングに対するカルトニン効果 ウナキカルシトニン (Elcatonn) とヒトカルシトニンを用いて解析した。なお ヒト抹消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 陽性細胞を RANKL と M-CSF の存在下で7日間培養すると 効率よく TRAP 陽性ならびにヒトロネクチンレセプター陽性の単核および多核細胞に分化した。(2)CD14 陽性細胞は TNF α

と M-CSF の存在下でも、RANKL と M-CSF の場合と同様に破骨細胞に分化した。(3)CD14 陽性細胞を RANKL と M-CSF の存在下に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。(4)p38MAPK

(mitogen-activated protein kinase) の特異的阻害剤である SB203508 は、RANKL と M-CSF が誘導する TRAP とピトロネクチンレセプター陽性の破骨細胞の形成を抑制した。

(5)TGF- β は、RANKL と M-CSF が誘導する破骨細胞の形成を抑制した。(6)CD14 陽性細胞は EP2 と EP4 を発現していたか、EP1 と EP3 を発現していなかった。(7)PGE₂ は RANKL と M-CSF が誘導する破骨細胞形成を抑制した。

(8)RANKL と M-CSF が誘導する破骨細胞形成を、EP2/EP4 アゴニストは抑制したか、EP3 と EP1 のアゴニストは抑制しなかった。

(9)PGE₂ は、TNF α と M-CSF が誘導する破骨細胞形成も抑制した。(10)CD14 陽性細胞から形成された破骨細胞は培養ディノシュ上でアクチンリングを形成し、カルシトニン処理によりアクチンリングは速やかに消失した。(11) ヒト破骨細胞のアクチンリングを破壊する効果において、ウナギカルシトニンはヒトカルシトニンよりも 100 倍以上強かった。

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 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、TNF α も破骨細胞形成を促進した。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。また TGF- β はヒト破骨細胞形成を促進した。これらの結果はマウスの破骨細胞で得られた結果と同様であった、しかし、PGE₂による作用はマウスの場合と逆だった。一方、ヒト破骨細胞が形成するアクチンリングの破壊を指標としたカルシトニンの効果は、マウスの破骨細胞に対するカルシトニン効果と同様であった。また、マウスの場合と同様に、ヒト破骨細胞においても カルシトニンは cAMP-PKA

(protein kinase A) 系を介してアクチンリングを破壊する可能性が示された。以上のように

今回の実験結果は ヒト破骨細胞とマウスの破骨細胞の分化を誘導するシグナル系に若干違いがあ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。また、リウマチなどの炎症性骨吸収に COX2 阻害剤を利用するときにはこれらの知見を考慮する必要があるかもしれない。

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か明らかとなった。マウスの破骨細胞と比較したところ、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 TGF- β により促進された。PGE₂は RANKL が誘導するマウスの破骨細胞形成を促進したが、ヒト破骨細胞形成を抑制した。また、カルシトニンはヒト破骨細胞の形成するアクチンリングを効率よく破壊した。

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 高橋直之 骨吸収 福永仁夫編「実践 骨代謝マーカー」メディカルレビュー社、東京 pp39-52, 2003
- 2 小林泰浩、高橋直之 破骨細胞の分化と活性制御 呂坂信之、野田政樹 西岡久寿樹(編)「骨 関節疾患」朝倉書店、東京 pp51-55, 2003
- 3 小林泰浩、宇田川信之 高橋直之 骨吸収調節機構 最新医学、58 2631-2639, 2003
- 4 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
- 5 高橋直之 小林泰浩、宇田川信之 骨吸収を促進する炎症性サイトカインと細菌菌体成分の作用機構、エントトキシン研究 6 36-42, 2003
- 6 山下昭仁、高橋直之 骨吸収・骨形成のメカニズム、Hormone Frontier in Gynecology, 10 341-346, 2003
- 7 溝口利英、高橋直之 RANKL/RANK 系に