

表2 インフリキシマブ (レミケード) 投与の結果

No	レミケード投与回数 (3mg/kg)	ACR改善率	副作用の発現	副作用対策	継続
1	4回	70%	有→悪気、皮発疹(遅発性)、 注射部位反応	ロラタジン内服、インフリキシマ ブ投与日 (mPSL)静注	継続
2	4回	70%	有→発熱 (投与日)、 皮疹 (遅発性)	ロラタジン内服	継続
3	4回	50%	有→投与1週間後：単純ヘルペス	塩酸パラシクロピル点滴静注	継続
4	3回	70%	無し		継続
5	3回	50%	無し		継続
6	3回	70%	無し		継続
7	3回	50%	無し		継続
8	2回	70%	無し		継続
9	1回	70%	有→白血球減少 (顆粒球減少) (好酸球増多)	中止	中止
10	1回	50%	有→IHN内服後発疹	抗アレルギー剤内服 (塩酸オカパタイシン)	中止

サイトカインによるリウマチ破骨細胞の制御に関する研究

分担研究者 高柳 広 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子細胞機能学・特任教授

研究要旨

関節リウマチ(RA)骨破壊においては、破骨細胞による骨吸収の亢進が重要な役割を果たす。TNF ファミリーのサイトカインである RANKL(破骨細胞分化因子)は、破骨細胞分化誘導において必須の因子であるが、その細胞内シグナル伝達機構は不明の点が多く、リウマチ破骨細胞を特異的に抑制する有効な治療法は知られていない。本年度は、RANKL 応答遺伝子の網羅的解析を行って前年度に同定した転写因子 NFATc1(NFAT2)の病変部での発現や治療標的としての可能性を検討し、NFATc1 が骨破壊性疾患の治療標的として臨床的に高い意義をもつ可能性を明らかにした。また、破骨細胞分化の負の制御因子であるインターフェロンのシグナル伝達で重要な転写因子である Stat1 の欠損マウスの解析から、Stat1 が Runx2 依存性の骨形成抑制因子であることを解明し、骨形成の促進を目指した新たな治療戦略への道を開いた。

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)骨破壊で中心的な役割を果たす破骨細胞の分化誘導には、RANKL(破骨細胞分化因子)が重要である。しかし、その細胞内シグナル伝達機構は不明の点が多く、リウマチ破骨細胞を特異的に抑制する有効な治療法は知られていない。このため、RANKL 応答遺伝子の網羅的解析を行ってきた。本年度は、これまでに同定した RANKL シグナルを統合するマスター遺伝子である NFATc1 を標的とした治療の可能性と、骨吸収抑制因子インターフェロンの下流分子 IRF-9 および Stat1 の骨代謝における意義を検討した。

B. 研究方法

既存の抗リウマチ薬を用いて、破骨細胞分化系に対する作用をもとに、破骨細胞抑制効果の強い薬剤をスクリーニングし、その作用機序を検討した。特にこの中で破骨細胞分化抑制効果が強かったレフルノミドについて、詳細な検討を行った。まず、RANKL による破骨細胞分化培養系にレフルノミドを添加してその作用を調べた。また、その抑制標的とされるピリミジン合成経路の関与を検討した。さらに、レフルノミドによる RANKL シグナル抑制標的を GeneChip を用いて網羅的に検索した。また、従来レフルノミドは T 細胞が主な標的となることが知られてきた薬剤であるため、レフルノミドが生体内で T 細胞を介さず骨破壊を抑制する作用があるかどうか明らかにするために、Rag-2 欠損マウスを用いて炎症性骨破壊モデルを惹起し、レフルノミドで治療実験を行った。また、実際のリウマチ患者の骨破壊部の病理組織における NFATc1 発現を検討した。

一方、IRF-9 および Stat1 の骨代謝における意義を生体レベルで解明するため、両遺伝子の欠損マ

ウスの骨組織を形態学的に検討した。さらに、破骨細胞および骨芽細胞の培養系を用いて分子機構を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験、遺伝子組み換え実験に関する施設内委員会の承認に基づいて実験を遂行した。ヒト試料の使用にあたっては、インフォームドコンセントを徹底したが、DNA などの個人情報扱う実験は含まれていない。

C. 研究結果

既存の抗リウマチ薬の中で、臨床的に骨破壊抑制効果をもつレフルノミドが破骨細胞分化を強く抑制すること、レフルノミド存在下では RANKL による NFATc1 発現が特異的に抑制されており、骨破壊抑制効果と NFATc1 発現抑制効果が結びついていることが明らかになった。レフルノミドはピリミジン新生の必須酵素である dihydroorotate dehydrogenase (DHODH)を抑制し、RANKL によって活性化されるカルシウム経路—NFATc1 誘導を抑制した。さらに、Rag-2 欠損マウスを用いて炎症性骨破壊モデルを惹起し、Leflunomide で治療を行ったところ、骨破壊抑制効果と NFATc1 発現細胞数の低下が観察された。この結果は、の抗リウマチ薬が T 細胞などの免疫細胞を介さずに破骨細胞前駆細胞に直接作用して骨破壊を抑制する効果を発揮している可能性を示している。さらに、リウマチ患者の骨破壊部の病理組織を検討した結果、骨破壊部の破骨細胞に一致して強い NFATc1 の発現が確認されたことと合わせ、NFATc1 がリウマチ骨破壊の治療標的として有望であることを示唆している。

Stat1 欠損マウスおよび IRF-9 欠損マウスの骨組

織の検討を行ったところ、IRF-9 欠損マウスにおいては、IFNAR1 欠損マウスや IFN- β 欠損マウスと同様に、破骨細胞分化の亢進と骨量減少がみられ、IFN- β による破骨細胞分化抑制が解除された結果と一致する所見であった。一方、Stat1 欠損マウスにおいては、破骨細胞分化の亢進にもかかわらず、骨量が増大しているという意外な表現型を呈することが明らかになった。解析を進め、Stat1 欠損マウスにおいては、骨芽細胞による骨形成が亢進していることを見いだした。Stat1 欠損骨芽細胞は培養系においても分化亢進が著しかったが、この分化亢進は骨芽細胞分化で重要なサイトカインである骨形成因子 (BMP) -2 などの発現亢進によるものではなく、BMP-2 下流シグナルでの差異が原因であることが明らかになった。BMP-2 下流で活性化される転写因子 Smad や Runx2 の転写活性に対する Stat1 の意義を検討した結果、Stat1 欠損骨芽細胞においては、骨芽細胞分化を制御する重要な転写因子である Runx2 の活性が亢進していることが明らかになった。さらに、Stat1 は Runx2 と結合して、Runx2 の核移行を抑制することで機能を抑制していることが示された。Stat1 はリン酸化されて活性化することで IFN などのシグナルを伝達することが知られていたが、Runx2 の抑制においては、リン酸化とは無関係に細胞質において物理的に結合することで核移行を制御することが示唆された。以上より、Stat1 がユニークなメカニズムで Runx2 を介した骨形成を抑制する分子であることが明らかになった。これまでの骨疾患治療薬の多くは破骨細胞性骨吸収を標的にしてきたが、Stat1 による Runx2 抑制を標的とすれば、骨形成を促進する新しい骨破壊治療法に結びつく可能性が示唆された。

D. 考察

Leflunomide は破骨細胞を直接抑制して骨破壊抑制効果を発揮した。NFATc1 を標的とした RANKL シグナルの特異的な制御法が開発できれば、破骨細胞を効率良く制御する RA 治療薬の開発へ道を開く可能性がある。また、Stat1 が骨形成抑制因子であることが明らかになった。骨破壊治療においては、骨吸収抑制だけでなく、骨形成の促進も重要な要素であり、このメカニズムを利用した骨形成促進治療に道が開ける可能性がある。

E. 結論

RA 骨破壊において NFATc1 は有望な治療標的である。Stat1 を抑制すれば骨形成を促進することが可能である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

【雑誌】

(和文)

高柳広. 骨と免疫のクロストーク. 現代医療 (2004) 36, 697-704

高柳広. 免疫系シグナルによる破骨細胞分化制御. 生化学 (2003) 75, 1535-1540

高柳広. Osteoimmunology. 内科 (2004) 93, 223-228

高柳広. インターフェロンと RANKL シグナル制御. Molecular Medicine (2003) 40, 1332-1340

高柳広. 免疫と骨代謝のクロストーク. リウマチ (2003) 43, 624-31

高柳広. RANKL の骨吸収作用を制御する IFN- β と IFN- γ の役割. THE BONE (2003) 17, 51-59 (475-483).

高柳広. サイトカインシグナルのクロストーク: RANKL の制御系をモデルとして. 炎症と免疫 (2003) 11, 106-116

高柳広. 関節リウマチにおける骨破壊機序. クリニカルカルシウム (2003) 13, 16-23

高柳広. オステオイムノロジー. Molecular Medicine (2003) 40, 690-695

高柳広, 織田弘美. 関節炎とインターフェロン. リウマチ科 (2003) 29, 50-57

高柳広, 金宣和, 谷口維紹. サイトカインと骨代謝. 実験医学増刊号「シグナル伝達研究 2003」21, 91-96(209-214)

(欧文)

Koga T, Inui M, Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi E, Iwata T, Ohnishi H, Matozaki T, Kodama T, Taniguchi T, Takayanagi H, Takai T: ITAM-mediated costimulatory signals cooperate with RANKL for bone homeostasis. Nature (2004) (in press)

Urushibara M*, Takayanagi H*, Koga T, Kim S, Isobe M, Morishita Y, Nakagawa T, Kurosawa H, Taniguchi T: Antirheumatic drug, leflunomide, inhibits osteoclastogenesis by interfering with RANKL-stimulated induction of NFATc1. Arthritis Rheum (2004)50, 794-804

*Equal contributors

Kim S, Koga, T, Isobe M, Kern BE, Yokochi T, Chin YE, Karsenty G, Taniguchi T, Takayanagi H: Stat1

functions as a cytoplasmic attenuator of Runx2 in the transcriptional program of osteoblast differentiation. *Genes Dev* (2003)17, 1979-1991

【書籍】

高柳広：RANKLによる破骨細胞分化制御. *Annual Review 2004 免疫*. 奥村康、平野俊夫、佐藤昇志編、中外医学社：143-153頁、2003. 東京

高柳広：第一章 CIII 滑膜, 第一章 G 筋. 整形外科クルズス 改訂第4版. 津山直一他編著、南江堂：42-43, 63-65頁、東京

高柳広：破骨細胞活性化の分子機構. 先端医療シリーズ 19・アレルギー・リウマチ・膠原病「アレルギー・リウマチ・膠原病の最新医療」、先端医療技術研究所：235-241頁、2003. 東京

2. 学会発表

Hiroshi Takayanagi: Regulation of RANKL signaling in osteoimmunology. 2nd Wittgenstein Conference“ Bone and Cartilage in Health and Disease”. 2003.10.18, Vienna

Hiroshi Takayanagi: Regulation of RANKL signaling in arthritic bone destruction. 3rd Global Arthritis Research Network (GARN). 2003.9.15, Miyazaki

高柳広：骨と IFN 遺伝子. 日本骨形態計測学会、シンポジウム「ゲノムと骨」、2003.7.5、東京.
日本骨形態計測学会雑誌 13(2), S20 頁

高柳広：IFN と骨疾患治療薬. 第108回日本薬理学会関東部会、シンポジウム「新しい薬物標的を用いた骨疾患治療薬の開発」、2003.6.14、千葉.
日本薬理学雑誌 122(4), 22 頁

Hiroshi Takayanagi: Regulation of RANKL signaling in osteoclast differentiation. 1st joint meeting of International Bone and Mineral Society / Japan Bone and Mineral Society, Plenary lecture. 2003.6.3, Osaka

Hiroshi Takayanagi: The positive and negative regulation of RANKL signaling in osteoclastogenesis. 11th International Rheumatology Symposium. 2003.4.25, Tokyo

高柳広：Regulatory mechanism of RANKL signaling. 第3回 Bone Frontier Seminar、2003.2.22、熱海

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

関節リウマチの先端的治療に関する研究
分担研究者 妻木 範行 大阪大学大学院医学系研究科助手
骨・軟骨破壊に関する遺伝子制御

研究要旨

骨・軟骨破壊過程に見られる種々の遺伝子の発現制御の破綻を解明するために、本年度は骨・軟骨形成における Smad シグナルの役割について解析を行った。Smad シグナルを阻害すると軟骨の最終分化が抑えられ、また骨形成量が減少することが判明した。また骨形成因子を継続的に発現させると骨量が減少することも明らかとなった。

A. 研究目的

関節リウマチにおいて関節の骨・軟骨破壊が進む過程では、マトリックス蛋白やシグナル伝達に関する分子の遺伝子発現制御が破綻していると考えられる。骨・軟骨における遺伝子発現の統合的制御を担う因子として、骨形成因子(BMP)は重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら BMP は種々の組織で活性を持つ multifunctional な因子であり、骨・軟骨形成における BMP シグナルの生体での役割を調べることはとりわけ困難であった。本研究では組織特異的な遺伝子発現をもたらす promoter / enhancer を利用して、BMP による骨・軟骨形成の遺伝子制御機構を生体において解明し、関節リウマチにおける骨・軟骨破壊に関する遺伝子制御の理解につなげることが目的である。

B. 研究方法

組織特異的プロモーターを用い、軟骨あるいは骨特異的に BMP シグナルを活性化あるいは不活化させたトランスジェニックマウスを作製した。シグナルの不活化にはアンタゴニストである Noggin を発現させた。また細胞内シグナル伝達の遮断を狙い、抑制型 Smad である Smad6 を強制発現させた。軟骨特異的発現および骨特異的発現を得るために、XI 型コラーゲン遺伝子 promoter/enhancer と I 型コラーゲン遺伝子 promoter 配列をそれぞれ用いた。当動物実験については大阪大学医学部動物実験委員会の承認を受け、そのガイドラインに則って動物の苦痛軽減に努めている。

C. 研究結果

以前に我々は BMP シグナルを不活化すると軟骨の形成が認められず、軟骨の発生には BMP が必須であることを発見した。そして BMP の過剰発現では軟骨が増大し、分化が亢進することを示した。本年度は細胞内の BMP シグナルを伝えるメカニズムを解明するために、抑制型 Smad である Smad6 を内軟

骨性骨化の過程に強制発現させたトランスジェニックマウスを作製し、解析した。このマウスでは Smad シグナルの伝達が著しく障害されている。その結果、軟骨の肥大化が抑制され、マトリックス遺伝子である X 型コラーゲン遺伝子、オステオポンチン遺伝子の発現が低下した。そして著しく骨量が減少して骨粗鬆症様の変化が認められた。また BMP の骨形成に対する作用を解析するために、骨芽細胞に特異的に BMP4 を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製した。このマウスでは予想に反して骨量が著しく減少しており、骨構造の破綻が認められた。

D. 考察

本研究結果から BMP シグナルを操作することによって、実際に生体においても骨・軟骨の遺伝子発現が変化し、結果として軟骨分化の障害や骨量の減少がおきることが判明した。Smad シグナルの阻害により軟骨細胞の肥大化が抑えられたという所見は、関節軟骨の特性を保つメカニズムの解明に寄与する可能性がある。また骨組織における BMP の活性化は骨量の減少をもたらしたことは、従来の BMP は骨を形成するという考えと相反する。今後、血管形成の障害や破骨細胞の活性化などをこのマウス骨髄腔で検討する必要がある。

D. 結論

軟骨細胞で Smad シグナルを阻害すると軟骨の肥大化を抑制できた。このことは、永久軟骨としての関節軟骨が保持されるメカニズムの解明につながる。骨芽細胞で BMP シグナルを活性化し続けると、骨構造の破綻が起きることが判明した。

E. 健康危険情報 無し

F. 研究発表

1. 論文発表

Matsui Y, Chansky HA, Barahmand-Pour F,

Zielinska-Kwiatkowska A, Tsumaki N, Myoui A, Yoshikawa H, Yang L, Eyre DR., *COL11A2* collagen gene transcription is differentially regulated by EWS/ERG sarcoma fusion protein and wild-type ERG. *J. Biol. Chem.* 278: 11369-11375

Tsumaki N, Nakase T, Miyaji T, Kakiuchi M, Kimura T, Ochi T, and Yoshikawa H “BMP signals are required for cartilage formation and differently regulate joint development during skeletogenesis” *J Bone Miner Res* 17: 898-906 2002

Tanaka K, Tsumaki N, Kozak CA, Matsumoto Y, Nakatani F, Iwamoto Y, and Yamada Y “A Krüppel-Associated Box-Zinc Finger Protein, NT2, Represses Cell-Type-Specific Promoter Activity of the $\alpha 2(XI)$ Collagen Gene” *Mol Cell Biol.* 22: 4256-4267 2002

妻木範行 軟骨形成における XI 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子の役割と転写制御 *医学の歩み* 205:184-186 2003

2. 学会発表

12th International Rheumatology Symposium April 2003
Role of BMP Signals During Cartilage Formation and Joint Development

5th Pan-Pacific Connective Tissue Society Symposium June 2003
Role of BMP signals during development of cartilage and Bone

25th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research Sep. 2003
Overexpression of BMP4 in Osteoblasts Causes Severe Osteopenia in Transgenic Mice

3rd World Congress for Arthritis in “Summit” Sep. 2003
Role of bone morphogenetic protein signals during skeletal development

18 回 日本整形外科学会基礎学術集会
2003 年 10 月
骨形成における BMP の作用: BMP4 および Noggin を骨芽細胞に強制発現させたトランスジェニックマウスの解析

76 回日本整形外科学会学術集会

2003 年 5 月

低出力超音波パルス照射は hemicallotasis 法を用いた高位脛骨骨切り術における骨形成を促進する

4 回運動器科学研究会 2003 年 8 月

高位脛骨骨切術の工夫と軟骨形成における BMP シグナルの役割

F. 知的財産の出願・登録状況
該当なし

骨軟骨の分化誘導に関する研究

分担研究者：千葉 一裕 慶應義塾大学医学部整形外科 講師

研究協力者：高石 官成 慶應義塾大学医学部整形外科 助手

研究要旨：MMP-13 ノックアウトマウスを用いた骨軟骨形成機構の解析

A. 研究目的

胎生期における内軟骨性骨化過程では、間充織細胞の凝集、軟骨細胞の分化誘導を経て、軟骨膜から侵入する血管に付随して軟骨性骨原基に持ち込まれた破軟骨細胞と骨芽細胞によって、軟骨から骨への置換が開始するとされる。骨形成に必要な転写因子 Runx-2 の下流分子である MMP-13 の生体内における役割を明らかにする目的で、ノックアウトマウスを作製し、その表現型から骨軟骨形成機構について検討した。

B. 研究方法

16.5dpc マウス胎仔からクローニングした cDNA 断片を用いてスクリーニングしたマウス MMP-13 遺伝子のゲノムクローンから、酵素活性ドメインの 2/3 を置換したターゲティングベクターを作製した。電気穿孔法によりコンストラクトを ES 細胞に導入、相同組み換えコロニーを C57BL6 プラストシストに注入し、キメラを得て、生殖系列に乗った 3 系統について、ヘテロ同士の交配を行った。

（倫理面への配慮）

マウスを用いる実験に関しては、慶應義塾大学の実験動物に関する規則に則って計画し、遂行した。

C. 研究結果

ホモマウスは、胎生後期において一次骨化が遅延しており、長管骨では血管侵入の障害により肥大軟骨細胞層が延長し、骨髄腔には分解不全のマトリックスに囲まれる軟骨組織が島状に取り残され点在していた。二次骨化中心に

おいても、同様に血管侵入と骨髄腔の形成が遅延していたが、生後 8 週で、ワイルドタイプに追いついた。

D. 考察

本マウスの表現型は、過去に報告された MMP-9 ノックアウトマウスと似ており、遺伝子の重複性が考えられるが、産生細胞の局在が異なることから、石灰化軟骨マトリックスの分解における、複数の MMP 相互による潜在型酵素の活性化機序が予想される。現在、血管新生関連分子のリリースによる関与について検討を加えている。

E. 結論

MMP-13 は、肥大軟骨細胞、骨芽細胞によって分泌され、軟骨性骨原基のマトリックスを分解し、骨軟骨吸収の足場を作ることによって、血管内皮細胞と破軟骨細胞の動員を誘導する。

F. 健康危険情報

問題なし。

G. 研究発表

- 1.論文発表：現在、投稿準備中である。
- 2.学会発表：Loss of MMP-13 Delays Fetal Bone Formation. Takaishi H, Kimura T, Okada Y, D'Armiento J., 2003 MMP Gordon Research Conference

H. 知的財産権の出願・登録状況

予定していない。

核内 IC を用いたリウマチ滑膜細胞の病的状態の理解とその制御の基盤的研究

中島 利博

聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター ゲノム医科学研究部門 部門長/助教授

研究要旨

関節リウマチは、関節の慢性炎症と進行性関節破壊を特徴とし、関節破壊の中軸となる滑膜細胞は究極の関節リウマチ治療標的と考えられる。これまで、リウマチ滑膜細胞では NF- κ B をはじめとした多くの転写因子が活性化し、関節リウマチの病態に深く関与すると認識されている。本研究では CREB 結合蛋白質 (CBP) に代表される転写統合装置の機能異常がリウマチ滑膜細胞の転写亢進および同細胞の異常増殖に関与すると仮定し、本仮説の検証、さらには創薬開発を目的とする。CBP (CREB binding protein) 結合因子としてリウマチ滑膜細胞由来 cDNA ライブラリーより Notch1 を同定し、滑膜細胞増殖促進機能を解明した。さらに CBP を中心とした転写調節機構の研究から、CBP のアセチル化酵素活性を手がかりに核内アセチル化を検討し、滑膜細胞増殖に関与する転写調節機構について新たな知見を見出した。

A. 研究目的

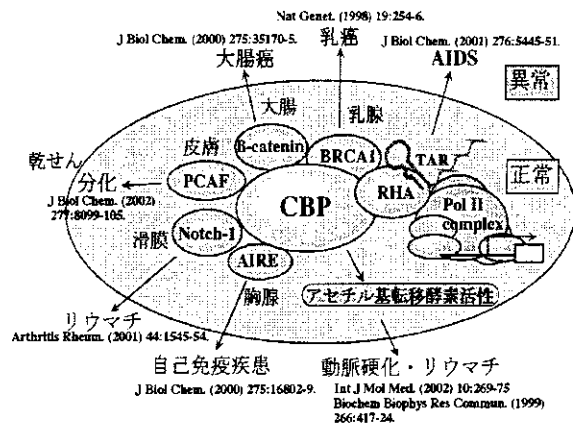
我々の研究室では CREB binding protein (CBP) に代表される転写コアクチベーターを中心として真核生物の転写調節機構解析を行っている。真核生物では DNA がヒストンに巻きついてヌクレオソーム構造を形成しているため転写が抑制されている。リモデリング複合体やアセチル基転移酵素 (Histone Acetyltransferase ; HAT) を介してヌクレオソーム構造が弛緩されると、その他の転写因子やメディエーター複合体を介して RNA Polymerase II (Pol II) を含む基本転写因子群がプロモーター上にリクルートされ転写が活性化される。

代表的なコアクチベーターである CBP は Protein kinase A 依存的に転写を活性化する転写因子 cAMP response element binding protein (CREB) と基本転写因子群を仲介する因子としてクローニングされた。CBP は Pol II 複合体をプロモーターにリクルートするだけでなく、内在の HAT 活性を介して転写を活性化する。その後の研究により、CREB だけでなくほとんどすべての転写因子が CBP に結合することが明らかになり、我々は同分子が核内シグナルの集積装置 (すなわち電化製品の IC に相当する) として作用するという概念を報告した。このことから我々はリウマチ滑膜細胞においても CBP が転写統合装置としての機能することにより遺伝子発現を調節していると考え、CBP を用いて滑膜細胞増殖における転写調節機構の解析を行なった (図)。

B. 研究方法

申請者は一貫として転写統合装置 CREB binding protein (以下、CBP) の研究を行い、同分子

をプローブとして用いた医学研究を展開している (図)。



リウマチ滑膜細胞における Notch-1 に関する研究はこの方法により解明された (図)。

ヒストン以外に多くの因子が CBP によってアセチル化されること、ヒストンのアセチル化の機能としてヌクレオソーム構造の変化以外にリン酸化やメチル化など他の修飾との組み合わせでシグナルとして働く (ヒストンコード) ことが報告されている。最近のタンパク質のアセチル化が細胞の増殖、分化およびアポトーシスに関与することが明らかにされた。そこで我々は CBP の HAT 活性にも注目して解析を行った。

一方、p53 は RA 患者においていくつかの変異が報告されていること、ノックアウトマウスではタイプ II コラーゲン誘導性関節炎に対して抵抗性が低下することからリウマチへの関与が示唆されている。そこで RA 滑膜細胞で認められた

核内でアセチル化されたタンパク質として p53 が存在するか特異抗体を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

I 研究等の対象とする個人の人権擁護

研究結果発表や出版に際しては個人が特定されないよう十分に配慮している。具体的には、研究責任者は、被験者のいかなる個人情報も漏出しないように細心の注意を払い、個人情報管理者を通じて試料等の匿名化を行い。検査実施者(申請者)に対しては登録記号のみで対応する。

II 研究等の対象者からのインフォームドコンセントを得る方法

全ての被験者には別紙の「説明文書」と「同意書」を渡し、内容を十分に説明した上で、その自由意思による同意を得ている。DNA、またはcDNAを用いて解析する場合も、項目を明確に記載し、被験者の同意が得られた項目に限って検討する。各項目については文書で詳細に説明し、被験者の理解が十分に得られるように努め、インフォームドコンセントを確保する。

III 研究等によって生ずる個人への不利益並びに危険性への配慮

(1) 不利益並びに危険性に対する配慮

検体の採取(採血など)に伴う肉体的苦痛、遺伝子解析への不安などの心理的問題、プライバシーの侵害が考えられる。採血は医師など法的に許可された者が携わり、採血時に不快感を訴えた場合は、ただちに採血を中止し、適切な処置を行う。また、遺伝子を解析することにより、後になって被験者が不安になったり、相談したいことができた場合は、まず主治医もしくはインフォームドコンセント担当者などに申し出てもらい相談を受ける。更に必要があれば、研究に直接関与しない第三者として遺伝カウンセリングの担当者に紹介し、カウンセリングを行う。プライバシーの侵害に対しては、前述した方法で個人情報を保護することで対処する。

(2) 診断及び検査前後の配慮

遺伝子検査を行うことで、遺伝性疾患を持つ家系に属することが明らかになり、被験者に不安あるいは精神的ストレスを与える可能性があるため、被験者に対する検査前後の配慮を十分に行う。被験者が本研究に協力する際などに、研究説明者(主治医あるいは研究責任者や研究分担者)に聞き難いことや相談しにくいことがあることも予想されるので、専門家によるカウンセリングを行う。

C. 研究結果

CBP の CH3 領域を用いた yeast two-hybrid

screening の結果、リウマチ滑膜細胞の cDNA ライブラリーから Notch-1 が得られた。Notch はショウジョウバエの神経組織の正常な発生に必須な因子として認知されているが、滑膜組織での発現を確認し、リウマチ滑膜組織では細胞質だけではなく核内にも発現が認め、それが約 60kDa の活性化 Notch-1 であることを見出した。この活性化 Notch-1 により NF- κ B を介して滑膜細胞の増殖が活性化している可能性を示した。Notch-1 はプレセニンによって切断され活性化する。そこで、プレセニンの酵素活性の競合的阻害作用を有するペプチド MW167 を用いて、滑膜細胞における Notch シグナルを阻害した。かつ MW167 は TNF α 処理による細胞増殖活性に対しては濃度依存的に抑制した。従って γ -secretase の阻害によりリウマチ患者に見られる滑膜細胞の増殖を抑制できるという可能性が示唆された。

また抗アセチル化リジン抗体を用いて RA 患者の滑膜細胞におけるアセチル化の検討を行った。滑膜組織の免疫染色の結果、リウマチ患者では変形性骨関節症(OA)の患者と比較して滑膜組織の核内のアセチル化が亢進していることが明らかになった。さらに滑膜細胞を用いたウェスタンブロッティングにおいて約 50 kDa バンドが認められ、このバンドは TNF α の刺激により増加した。そこで 53kDa のタンパク質が p53 であるかどうか特異抗体を用いて検討した結果、RA において p53 のアセチル化が亢進していることが明らかになった。p53 は転写因子としてアポトーシスや細胞増殖を調節しているため p53 の DNA 結合能に対する TNF α 刺激の影響をゲルシフトアッセイにより検討したところ、TNF α の濃度依存的に p53 は DNA に結合した。また滑膜細胞に CBP を強発現させたところアポトーシスが誘導された。以上のことから RA 滑膜細胞では TNF α 依存的な p53 のアセチル化の亢進と転写活性化能の低下によりアポトーシスが抑制され、このことが滑膜細胞の増殖の促進につながるという可能性が示唆された。

D. 結論

リウマチ患者において転写コアクチベーター CBP の基本転写因子群のリクルートおよび HAT 活性を介した転写調節機構が、滑膜細胞の増殖の制御に関与していることを示した。これらの経路における CBP の詳細な機能は明らかになっていないが、これらの転写調節機構の解析は滑膜細胞の調節機構の解明、さらには新たな治療ターゲットの開発につながると期待される。

E. 健康危険情報

特にありません。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tetsuya Amano, Satoshi Yamasaki, Naoko Yagishita, Kaneyuki Tsuchimochi, Hiroshi Shin, Ko-ichi Kawahara, Satoko Aratani, Hidetoshi Fujita, Lei Zhang, Rie Ikeda, Ryoji Fujii, Setsuro Komiyama, Kusuki Nishioka, Ikuro Maruyama, Akiyoshi Fukamizu and Toshihiro Nakajima. "Synoviolin/Hrd1, an E3 ubiquitin ligase, as a novel pathogenic factor for arthropathy" *Genes & Development* 17 : 2436-2449, 2003.
2. K. Abeyama, K. Kawahara, S. Iino, T. Hamada, S. Arimura, K. Matsushita, T. Nakajima, I. Maruyama "Antibiotic cyclic AMP signaling by "primed" leukocytes confers anti-inflammatory cytoprotection" *Journal of Leukocyte Biology* 74 : 1-8, 2003.
3. Ko-ichi Kawahara, Hisashi Kawabata, Satoko Aratani, Toshihiro Nakajima, "Hyper nuclear acetylation (HNA) in proliferation, differentiation and apoptosis" *Ageing Research Reviews Elsevier* 2 : 287-297, 2003.
4. Taniguchi, K. Kawahara, K. Yone, T. Hashiguchi, M. Yamakuchi, M. Goto, K. Inoue, S. Yamada, K. Ijiri, S. Matsunaga, T. Nakajima, S. Komiyama, I. Maruyama "High Mobility Group Box Chromosomal Protein 1 Plays a Role in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis as a Novel Cytokine" *Arthritis and Rheumatism* 48 : 971-981, 2003.
5. Shoko Nishimura, Nobuaki Maeno, Katsuhiko Matsuo, Toshihiro Nakajima, Isao Kitajima, Hidehiko Saito and Ikuro Maruyama "HUMAN LACTIFEROUS MAMMARY GLAND CELLS PRODUCE VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTHFACTOR (VEGF) AND EXPRESS THE VEGF RECEPTORS, Flt-1 AND KDR/Fik-1" *Cytokine* 18: 191-198, 2002.
6. S. Aratani, R. Fujii, H. Fujita, A. Fukamizu, T. Nakajima, "Aromatic residues are required for RNA helicase A mediated transactivation." *International Journal of Molecular Medicine* 12: 175-180, 2003.
7. H. Fujita, R. Fujii, S. Aratani, T. Amano, A. Fukamizu, T. Nakajima, "Antithetic Effects of MBD2a on Gene Regulation" *Molecular and Cellular Biology* 23: 2645-2657, 2003.
8. T. Hirose, R. Fujii, H. Nakamura, A. Aratani, H. Fujita, M. Nakazawa, K. Nakamura, K. Nishioka, T. Nakajima, "Regulation of CREB-mediated transcription by association of CDK4 binding protein p34 SEI-1 with CBP" *International Journal of Molecular Medicine* 11: 705-712, 2003.
9. N. Araya, K. Hirota, Y. Shimamoto, M. Miyagishi, E. Yoshida, J. Ishida, S. Kaneko, M. Kaneko, T. Nakajima, A. Fukamizu. "Cooperative Interaction of EWS with CREB-binding Protein Selectively Activates Hepatocyte Nuclear Factor 4-mediated Transcription." *J Biol Chem.* 278: 5427-5432, 2003.
10. M. Nakazawa, S. Aratani, M. Hatta, N. Araya, H. Daitoku, K. Kawahara, S. Watanabe, H. Nakamura, S. Yoshino, A. Fukamizu, K. Nishioka T. Nakajima. "TNF α induces acetylation of p53 but attenuates its transcriptional activation in rheumatoid synoviocytes" *International Journal of Molecular Medicine* 10: 269-275, 2002.
11. T. Imaizumi, S. Aratani, T. Nakajima, M. Carlson, T. Matsumiya, K. Tanji, K. Ookawa, H. Yoshida, S. Tsuchida, T. M. McIntyre, S. M. Prescott, G. A. Zimmerman, K. Satoh. "Retinoic Acid-Inducible Gene-1 Is Induced in Endothelial Cells by LPS and Regulates Expression of COX-2." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 292: 274-279, 2002.
12. Nguyen Ngoc Chau, H. Nakamura, M. Nakazawa, T. Hirose, T. Kobata, K. Nishioka, T. Nakajima. "Expression of HOXD9 in fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients." *International Journal of Molecular Medicine* 10: 41-48, 2002.
13. H. Kitagawa, J. Yanagisawa, H. Fuse, S. Ogawa, Y. Yogiashi, A. Okuno, H. Nagasawa, T. Nakajima T. Matsumoto, S. Kato. "Ligand Selective Potentiation of Rat Mineralocorticoid Receptor Activation Function-1 (AF-1) by ACBP-containing HAT complex." *Mol. Cell. Biol.* 22: 3698-3706, 2002.
14. H. Kawabata, K. Kawahara, T. Kanekura, N. Araya, H. Daitoku, M. Hatta, N. Miura, A. Fukamizu, T. Kanzaki, I. Maruyama, T. Nakajima. "Possible role of transcriptional coactivator P/CAF and nuclear acetylation in calcium induced keratinocyte differentiation." *J Biol Chem.* 277: 8099-8105, 2002.
15. H. Ishii, M. Nakazawa, S. Yoshino, H. Nakamura, K. Nishioka, T. Nakajima,

- "Expression of Notch homologues in the synovium of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patient." *Rheumatology International* 21:10-14, 2001.
16. H. Daitoku, J. Ishida, K. Fujiwara, T. Nakajima, A. Fukamizu. "Dimerization of small GTPase Rab5" *International Journal of Molecular Medicine* 8: 397-404, 2001.
17. S. Aratani, R. Fujii, T. Oishi, H. Fujita, T. Amano, T. Ohshima, M. Hagiwara, A. Fukamizu, and T. Nakajima. "Dual roles of RNA helicase A in CREB-dependent transcription." *Mol.Cell.Biol.* 21: 4460-4469, 2001.
18. M. Nakazawa, H. Ishii, H. Aono, M. Takai, T. Honda, S. Aratani, A. Fukamizu, H. Nakamura, S-I, Yoshino, T. Kobata, K. Nishioka, T. Nakajima "Role of Notch-1 intracellular domain in activation of rheumatoid synoviocytes." *Arthritis and Rheumatism* 44: 1545-1554, 2001.
19. R Fujii, M Okamoto, S Aratani, T Oishi, T Ohshima, K Taira, M Baba, A Fukamizu, T Nakajima "A role for RNA helicase A in TAR-dependent transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus type 1" *J Biol Chem.* 276: 5445-5451, 2001.
20. Nguyen Dinh Khoa, M Nakazawa, T Hasunuma, T Nakajima, H Nakamura, T Kobata, K Nishioka. "Potential role of HOXD9 in synoviocyte proliferation." *Arthritis and Rheumatism* 44: 1013-1021, 2001.
21. KP. Sarker, M. Nakata, I. Kitajima, T. Nakajima, I. Maruyama. "Inhibition of Caspase-3 Activation by SB203580, p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitor in Nitric Oxide-Induced Apoptosis of PC-12 Cells." *Journal of Molecular Neuroscience* 15: 243-250, 2001.
22. Ohshima T, Yoshida Y, Nakajima T, Yagami K, Fukamizu A. "Effects of interaction between parvovirus minute virus of mice NS1 and coactivator CBP on NS1-and p53 transactivation." *International Journal of Molecular Medicine* 7: 49-54, 2001.
23. Nakazawa M, Ishii H, Nakamura H, Yoshino S, Fukamizu A, Nishioka K, Nakajima T. "NFκB2 (p52) promoter activation via Notch signaling pathway in rheumatoid synoviocytes." *International Journal of Molecular Medicine* 7: 31-35, 2001.
- 2.学会発表
1th Gordon Conf.
Cartilage Biology & Pathology
2003/3/16-20 Ventura, Ca
- G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
- 1.特許取得
特にありません。
- 2.実用新案登録
特にありません。
- 3.その他
特にありません。

関節リウマチの先端的治療に関する研究班
（分担研究課題：増殖因子による軟骨修復機構）

分担研究者 開 祐司 京都大学再生医科学研究所教授

軟骨は無血管の特殊な結合組織で、胎生期の骨形成予定領域に軟骨性骨原基として広く出現する。しかし、軟骨性骨原基はやがて周囲組織からの血管の侵入をうけ、骨に置換される。このために成熟個体では、関節表面に関節軟骨としてわずかに残るのみとなる。しかし、可動関節表面の軟骨は、荷重を支えると同時に可動性を保障する機能を担っている。それにも関わらず、骨とは対照的に、その表面を覆う関節軟骨は再生能力に極めて乏しい。このため、関節軟骨が一旦損傷や壊死に陥ると進行性に組織破壊が起こる。本研究では、軟骨幹細胞株 ATDC5 細胞による *in vitro* 分化モデルと関節軟骨全層欠損による *in vivo* 軟骨再生モデルを駆使して、軟骨再生誘導の分子基盤とこれを応用した軟骨再生技術を開拓する。

これまでの研究により、関節軟骨全層欠損における軟骨修復においては、軟骨下骨の骨髄から供給される間葉系幹細胞の動員と活発な自己複製能の維持が軟骨再生誘導する決定的な要因であることが明らかとなった。一方、間葉系幹細胞は間充織凝集に始まる分化初期過程で、組織形成の「場」を境界を形作る。周囲組織との連関を再構築する必要がある組織再生においては、単に前駆細胞が分化細胞を生み出すのみならず、この分化「場」の境界形成が組織再生機序制御にとって重要な段階である。そこで本年度は、ATDC5 細胞による *in vitro* 幹細胞分化モデルを用いて、軟骨形成「場」の境界形成のメカニズムを Notch シグナルの面から分子レベルで解析することを試みた。

A. 研究目的

軟骨は無血管の特殊な結合組織で、間葉系細胞の軟骨分化により胎生期の骨形成予定領域に広く出現する。このようにして形成された軟骨性骨原基は、やがて骨に置換される。そのため、成熟個体の骨格では関節軟骨として骨端にわずかに残る。高い再生能力を有する骨に比べて、その表面を覆う関節軟骨は再生能力の極めて乏しい組織である。本研究では、軟骨・骨発生におけるシグナルネットワークをモデルに、関節軟骨の再生修復制御の分子基盤を確立する。本年度は、マウス EC 細胞株 ATDC5 による *in vitro* 培養系を駆使して、組織幹細胞の軟骨分化過程を制御するシグナルネットワークを分子レベルで解析してきた。これに基づいて、関節軟骨全層欠損の再生制御技術に関する基礎的研究を行ってきた。その過程で、Notch 1 の発現がマウス胎子の肢芽軟骨前駆細胞の間充織凝集部位 (E12.5) と軟骨細胞の成熟・肥大化部位 (E16.5) において観察された。そこで本研究では、軟骨初期分化における Notch シグナルの役割について検討した。

B. 研究方法

EGFP と Notch 1 の細胞質内ドメイン

(Notch-IC) の融合蛋白質 (EGFP-NIC) を既報 (JBMR, 17:231-9, 2002) の通りにアデノウイルス発現ベクターに組み込んだ。組換えアデノウイルスは、COS-TPC 法により調製した。培養 ATDC5 細胞から RNA 抽出キット (Amersham) により total RNA を抽出し、mRNA 抽出キット (Amersham) により poly A+ RNA に精製して Northern blot 解析に用いた。細胞内における Notch シグナルの活性化は、Western blot 法により HES-1 蛋白質を検出することにより行った。

C. 研究結果

ATDC5 細胞培養系の軟骨初期分化過程における Notch 1 mRNA の発現は、未分化細胞がコンフルエントに達する培養 3 日目から発現が認められ、細胞凝集領域が旺盛に作られる培養 6 日で最高レベルに達した後、徐々に低下した。Notch リガンドのうち Jagged1 と Jagged2 の発現は認められなかったが、Delta like-1 (Dll1) は、Notch の発現パターンと同様の時間経過をたどった。また、Notch シグナルの標的遺伝子の一つである HES-1 の発現が、Notch 1 遺伝子の発現に若干遅れて認められた。免疫組織染色では、軟骨分

化が進行しつつある細胞凝集領域に Notch 1 抗体陽性細胞の出現が検出された。

そこで、軟骨分化に対する Notch シグナルの作用を検定する目的で、Dll1 を構成的に発現するミエローマ細胞 D10 (JBC, 274: 7238-44, 1999) 上で ATDC5 細胞を培養した。その結果、Dll1 を発現していない SE1 細胞上で培養した ATDC5 細胞が Alcian blue 陽性の軟骨結節を作るのに対して、D10 上に培養した ATDC5 細胞では軟骨結節の形成が著しく阻害された。さらに、ATDC5 細胞に、EGFP と Notch-1 の細胞質内ドメイン(Notch-IC)の融合蛋白質(EGFP-NIC)をアデノウイルス発現ベクターにより強制発現させた。このとき、HES-1 の発現が Northern blot ならびに Western blot により確認された。アデノウイルスに未感染あるいは、 β -Galactosidase を発現するウイルスに感染させた細胞では、Alcian blue 陽性軟骨結節の出現が観察されるのに対して、EGFP-NIC を発現するウイルスに感染させた細胞では、初期軟骨分化が進行せず、軟骨結節の形成は認められなかった。

D. 考察

我々はすでに、ATDC5 の初期軟骨分化過程において、細胞凝集部位の形成とこれに続く凝集領域内での軟骨分化の進行が互いに独立したシグナルによって制御されていることを明らかにしてきた。特に後者が、前駆軟骨細胞が受容する BMP シグナルによって駆動されていることを報告した(Exp Cell Res, 241: 1-11, 1998; FEBS Lett, 469: 83-7, 2000)。一方、前者の細胞凝集領域の形成による軟骨分化「場」とその境界の形成に、Notch シグナルの関与が示唆された。さらに、軟骨幹細胞における Notch シグナルの活性化は、分化の進行に抑制的に作用することが判明した。

E. 結論

間葉系未分化細胞から軟骨細胞への分化初期過程において Notch シグナルが重要な役割をしていることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) N. Watanabe, Y. Tezuka, K. Matsuno, S. Miyatani, N. Morimura, M. Yasuda, R. Fujimaki, K. Kuroda, Y. Hiraki, N. Hozumi,

and K. Tezuka (2003) J. Bone Miner. Metab. 21: 344-352; Suppression of differentiation and proliferation of early chondrogenic cells by Notch.

- 2) T. Hayami, H. Funaki, K. Yaoeda, K. Mitui, H. Yamagiwa, K. Tokunaga, H. Hatano, J. Kondo, Y. Hiraki, T. Yamamoto, and N. Endo (2003) J. Rheumatol. 30: 2207-2217; Expression of the cartilage derived anti-angiogenic factor chondromodulin-I decreases in the early stage of experimental osteoarthritis.
- 3) K. Kusafuka, F. P. Luyten, R. De Bondt, Y. Hiraki, C. Shukunami, T. Kayano, and T. Takemura (2003) Virchows Arch. 442: 482-490; Immunohistochemical evaluation of cartilage-derived morphogenetic protein-1 and -2 in normal human salivary glands and pleomorphic adenomas.

2. 学会発表

- 1) S. Kudo, H. Mizuta, E. Nakamura, K. Takagi, and Y. Hiraki (2003) Eighth World Congress of the Osteoarthritis Research Society International (Berlin, Germany); PTH/PTHrP receptor (PTHR) expression of mesenchymal progenitor cells in repair of full-thickness defects of articular cartilage: its relationship to chondrogenic potential.
- 2) K. Sato, J. Kondo, H. Shibata, C. Shukunami, A. Takimoto, M. Nomizu, N. Nishi, and Y. Hiraki (2003) The 35th annual Meeting of Japanese Society for Connective Tissue Research & the 5th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium (Ube, Japan); Chondromodulin -I can be a substrate for matrix metalloproteinase-13.
- 3) Y. Nishizaki, C. Shukunami, and Y. Hiraki (2003) The 62nd Annual Meeting of Society for Developmental Biology jointly with The International Society of Developmental Biologists (Boston, USA); Cloning of Medaka (*Oryzias latipes*) Chondromodulin-I.

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
なし

新技術による創薬研究

(分担) 東京工業大学大学院生命理工学研究科 教授 半田宏

研究要旨

ナノアフィニティビーズによる薬剤レセプターの探索技術を開発している。さらに進化した新規機能性ビーズの開発を行っており、これら技術はこれからの創薬を含むバイオ産業に多大な貢献が期待される。

A. 研究目的

ポストゲノム時代になって、低分子化学物質を用いて生体反応の制御機構やネットワークを研究する「ケミカルジェネティクス」あるいは「ケミカルバイオロジー」と呼ばれる分野が大いに関心を集めるようになった。低分子化学物質である薬剤は生体内でレセプターと呼ばれる標的タンパク質に選択的に結合し、その機能や構造を変換し、それにより薬剤に特異的な効果が発揮される。ところが、薬剤とレセプターの相互作用を解析するのに、これまで数ミクロンサイズのアガロースビーズを担体としたアフィニティカラム法が常用されてきた。しかし、この従来法による解析では満足する成果が得られず、新規な技術開発が望まれる。そこで、新規のナノアフィニティビーズを構築して、その有効性を評価することにした。

B. 研究方法

(1)リガンドである薬剤をできるだけ多量にビーズ表面に固定化でき、非特異的吸着の少ない表面性状を持つナノサイズのビーズ担体を作製する。(2)高分子であるタンパク質が固定化された薬剤に結合できるように、適当な長さを持ち、しかも非特異的吸着の少ないリンカー（スペーサー）をビーズ表面に固定化する。(3)リンカーを介して、薬剤をビーズ表面に固定化する。(4)薬剤固定化ビーズを用いて、多彩なタンパク質を含む細胞粗抽出液から薬剤と選択的に結合するタンパク質をアフィニティ精製する条件を検

討する。(5)単離した薬剤結合タンパク質を同定する。(6)薬剤結合タンパク質が実際に薬効に関与し、薬剤に対するレセプターであることを証明すると共に、レセプターの関与する生体反応の制御機構やネットワークを解明する。

C. 研究結果

アフィニティ精製の担体として優れた機能を発揮するラテックスビーズ（SGビーズ）を構築した。リンカーを介して、多様な化学物質を固定化する技術を開発した。細胞粗抽出液からワンステップで薬剤レセプターを単離するシステムを開発した。単離したタンパク質を質量分析器で迅速に同定する技術を確立した。このアフィニティ精製システムの有効性や汎用性を検討するために、いくつかの薬剤のレセプターを単離・同定し、その機能や薬剤の阻害機構を明らかにしている。

D. 考察

薬剤レセプターを文字通り「一本釣り」でき、ケミカルバイオロジーの基幹となるナノビーズによるアフィニティ精製技術のプロトタイプを開発した。しかし、これは全て手作業で行われるために、多量のサンプルを同時に処理することができない。そこで、ロボットによる自動化を図るために新規ビーズの開発が必要になっている。

E. 結論

薬剤に対する標的タンパク質を単離・同定するプロトタイプを開発した。この技術により向上し、普及することが望まれている。このシステムは創薬だけでなく、毒性評価や有害物質除去等の技術開発にも有効であり、また、高機能性食品産業等にも多大な貢献が期待できる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T.Shimajima, M.Okada, T.Nakayama, H.Ueda, K.Okawa, A.Iwamatsu, H.Handa and H.Hirose. *Drosophila* FACT contributes to Hox gene expression through physical and functional interactions with GAGA factor. *Genes Dev.* 17, 1605-1616, 2003.
- 2) C-H.Wu, Y.Yamaguchi, L.Benjamin, M.Horvat-Gordon, J.Washinski, E.Enerly, A.Lambertsson, H.Handa and D.Gilmour. NELF and DSIF are implicated in causing promoter proximal pausing on the hsp70 promoter in *Drosophila*. *Genes Dev.*, 17, 1402-1414, 2003.
- 3) T.Narita, Y.Yamaguchi, K.Yano, S.Sugimoto, S.Chanarat, T.Wada, D-K.Kim, J.Hasegawa, M.Omori, N.Inukai, M.Endou, T.Yamada, and H.Handa. Human transcription elongation factor NELF: Identification of novel subunits and reconstitution of the functionally active complex. *Mol. Cell. Biol.*, 23, 1863-1873, 2003.
- 1) 半田宏、川口春馬、ナノアフィニティビーズのすべて 中山書店 (2003)
- 2) 半田宏 共訳 「ゲノム 2」 村松正實 監訳 メディカル・サイエンス・インターナショナル (2003)
- 3) 半田宏、アフィニティナノビーズの構築と創薬への応用 Bio ベンチャー、3:90-92 羊土社 (2003)

H. 知的財産の出願・登録状況

出願：平成 15 年 7 月 31 日 特願 2003-284352
有機物質とフェライトとの複合材料とその製造方法

出願：平成 15 年 10 月 30 日 特願 2003-371127

アフィニティクロマト方法及びアフィニティクロマト吸着体

厚生労働科学研究費補助金
分担研究報告書

関節リウマチの新規治療薬導入による医療経済効果

分担研究者 吉田勝美 聖マリアンナ医科大学予防医学教室 教授
研究協力者 須賀万智 聖マリアンナ医科大学予防医学教室 助手

研究要旨： 関節リウマチの新規治療薬導入による医療経済効果をマクロ経済的観点から試算した。2000年時点において、関節リウマチ患者数は311348人であり、うち、レフルノミドの投与対象患者数は64760人になると推計された。レフルノミド導入による障害損失年の減少はACR20を指標にしたとき3172YLD（5.8%減）、ACR50を指標にしたとき9394YLD（17.3%減）、ACR70を指標にしたとき12469YLD（23.0%減）、また、全体及び1患者あたりの医療費の削減はACR20を指標にしたとき136億円、21.0万円、ACR50を指標にしたとき403億円、62.2万円、ACR70を指標にしたとき535億円、82.6万円になると推計された。以上より、レフルノミド導入の経済的妥当性が示された。

A. 研究目的

レフルノミド（商品名アラバ）、エタナルセプト（商品名エンブレム）、インフリキシマブ（商品名レミケード）など、関節リウマチ（RA）の新規治療薬の申請、承認が相次いで、これら薬剤導入によるRA治療の発展が注目されている。

新規治療薬を導入するにあたり、従来の治療薬と新規治療薬との比較検討が求められる。とくに医療経済的側面からの評価は治療薬の利用可能性を表わし、新規治療薬導入の根拠になる。従来、限られた患者の情報を用いて「ミクロ経済的」評価が行われることが一般的である。しかし、国家単位の新規治療薬導入の効果を検討する場合、「マクロ経済的」評価が有用であると考えられる。また、DALYやQALYなど質的調整変数を指標にする一方、疾患内の重症度を補正することも評価の妥当性を高める。そこで、レフルノミドを例にあげ、RAの新規治療薬導入による医療経済効果を「マクロ経済的」観点から試算した。

B. 研究方法

1. 患者数とYLDの算出

平成11年患者調査[1]からRAの性、年齢、入院/外来別患者数をしらべ、平成11年10月1日現在推計人口[2]を除いて、RAの性、年齢、入院/外来別有病率を算出した。これら有病率を国立社会保障・人口問題研究所による将来推計人口[3]に

かけあわせ、2000年と2010年のRA患者数を算出した。

障害による損失年（YLD）は患者数と障害度の重み付け（治療ありは0.174）の積により時間割引や年齢補正なしに算出した[4]。

2. 重症度の補正

RA患者の重症度分布の情報は日本リウマチ財団リウマチ登録医を対象にした質問票調査から収集した[5]。診療形態と治療レベルにより3段階の重症度（通院群、入院維持群、入院要治療群）を定義して、3群の構成割合（%）とQOLスコア（0～16点）を求めた。3群の構成割合あるいは3群の構成割合とQOLスコアの積を係数にして、重症度別の患者数とYLDを算出した。

3. 効果単価の算出

厚生省研究班（主任研究者 長谷川敏彦）による日本の疾病負担の推計から1993年の日本のYLDの合計は5680.5である[6]。一方、同年の国民医療費は24兆3631億円である[7]。効果単価（万円/YLD）は国民医療費/YLDにより算出した。

4. レフルノミドの治療効果

コクランライブラリー[8]からRA患者におけるレフルノミドの治療効果に関するメタアナリシス[9]を参照した。観察期間は12ヶ月、対照群はプラセボ投与という設定において、アメリカリウマチ学会（ACR）評価基準による20%改善（ACR20）、50%改善（ACR50）、70%改善（ACR70）

を指標にしたオッズ比 (95%信頼区間) は 0.35 (0.22~0.55)、0.23 (0.13~0.40)、0.27 (0.14~0.53) である。これら数値を係数にして、レフルノミド導入による YLD や医療費の変化を算出した。

5. レフルノミド導入による医療経済効果

レフルノミドはメソトレキセート無効例が投与対象になる。そこで、中等症以上 (入院維持群と入院要治療群) が投与対象になると仮定して、レフルノミド導入による YLD や医療費の変化を算出した。

①レフルノミド導入による YLD の変化

$\Delta YLD = YLD * (1 - \text{オッズ比}) * \text{割引率}$ により算出した。YLD は入院維持群と入院要治療群の YLD の合計である。割引率は ACR 評価基準による改善度を質的補正するもので、ACR20 ならば 0.2、ACR50 ならば 0.5、ACR70 ならば 0.7 である。

②レフルノミド導入による医療費の変化

$\Delta \text{医療費} = \Delta YLD * \text{効果単価 (万円/YLD)}$ により算出した。さらに、入院維持群と入院要治療群の患者数の合計を除いて、1 患者あたりの医療費の変化を算出した。

6. 感度分析

以下の要因の変動が 1 患者あたりの医療費の変化の推計値にあたる影響を評価した。

①投与対象患者数

RA 患者のうちレフルノミドの投与対象の割合を 5~50% の範囲で動かした。

②治療効果

オッズ比を 0.1~0.6 の範囲で動かした。

③効果単価

先述の厚生省研究班による日本の疾病負担の推計から 1993 年の日本の DALY の合計は 12759.4 であり [6]、DALY の YLD/YLL 比を 1/5~5 の範囲で動かした。

C. 研究結果

RA 患者数は 2000 年 311348 人、2010 年 356793 人であり、10 年間あたり 14.6% の増加が見込まれた。

2000 年時点において、通院群は 246588 人 (79.2%)、入院維持群は 38296 人 (12.3%)、入院要治療群は 26456 人 (8.5%) であり、レフルノミドの投与対象患者数は 64760 人になると推計された。

レフルノミド導入による YLD の減少は ACR20 を指標にしたとき 3172YLD (5.8%減)、ACR50 を

指標にしたとき 9394YLD (17.3%減)、ACR70 を指標にしたとき 12469YLD (23.0%減) になると推計された。YLD と国民医療費から算出した効果単価は 428.9 万円/YLD であり、全体及び 1 患者あたりの医療費の削減は ACR20 を指標にしたとき 136 億円、21.0 万円、ACR50 を指標にしたとき 403 億円、62.2 万円、ACR70 を指標にしたとき 535 億円、82.6 万円になると推計された。

感度分析の結果を図 1~3 にしめした。投与対象患者数 (図 1) について、投与患者の割合が小さいほど 1 患者あたりの医療費の削減は大きい。治療効果 (図 2) について、治療効果が大きいほど 1 患者あたりの医療費の削減は大きい。効果単価 (図 3) について、効果単価が大きいほど 1 患者あたりの医療費の削減は大きい。医療政策的観点から操作しうる要因は投与対象患者数であるが、上記の推計値は比較的安定した数値であることがわかる。

D. 考察

レフルノミド導入による 1 患者あたりの医療費の削減は ACR20 を指標にしたとき 21.0 万円、ACR50 を指標にしたとき 62.2 万円、ACR70 を指標にしたとき 82.6 万円になると推計された。従来の治療とレフルノミドによる治療の差額がこれら数値を超えなければ、レフルノミド導入を推進する根拠になる。レフルノミドの薬価は 37 万円である。さらに、モニタリングの費用や副作用のスクリーニングの費用など、必要経費を考慮すべきであるが、概してレフルノミド導入の経済的妥当性が示された。

感度分析の結果によれば、医療政策的観点から費用対効果を高めるために、投与対象を吟味して、投与対象患者数を絞り込む必要があると考えられた。

本研究は RA の新規治療薬導入による医療経済効果を「マクロ経済的」観点から試算した。YLD を指標にしたことで、質的調整したアウトカムが得られ、また、国家単位の新規治療薬導入の効果を検討することができた。さらに、疾患内の重症度を補正したことで、評価の妥当性を高めることができた。医療保険財政の逼迫しているなかで、新規治療薬の保険適応を認めるかどうかは重要である。しかし、判断の根拠になる新規治療薬導入による医療経済効果の評価は十分行われていない。本研究の手法を応用することで、数多くのエビデンスを提供されることが期待される。

E. 結論

RA の新規治療薬導入による医療経済効果を「マクロ経済的」観点から試算した結果、レフルノミド導入の経済的妥当性が示された。

参考文献

- [1] 厚生省大臣官房統計情報部. 平成 11 年患者調査. 東京: 厚生統計協会, 2001.
- [2] 総務省統計局. 国勢調査報告. 平成 11 年 10 月 1 日現在推計人口.
- [3] 国立社会保障・人口問題研究所. 日本の将来推計人口 (平成 14 年 1 月推計). 東京: 厚生統計協会, 2002.
- [4] Murray CJ, Lopez AD (eds). The Global Burden of Disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020. Harvard: Harvard University Press, 1996.
- [5] 須賀万智, 吉田勝美. 関節リウマチと変形性関節症の疾病負担の評価—日本リウマチ財団リウマチ登録医を対象にした質問票調査. リウマチ 2002;42:786-794.
- [6] 福田吉治, 長谷川敏彦, 八谷寛, 田端航也. 日本の疾病負担と障害調整生存年 (DALY). 厚生指標 1999;46:28-33.
- [7] 国民衛生の動向 1995 年. 東京: 厚生統計協会, 1995.
- [8] コクランライブラリーのホームページ. <http://www.cochranelibrary.com>
- [9] Osiri M, Shea B, Robinson V, Suarez-Almazor M, Strand V, Tugwell P, Wells G. Leflunomide for treating rheumatoid arthritis. In: The Cochrane Library, Issue 4, 2003. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2003.

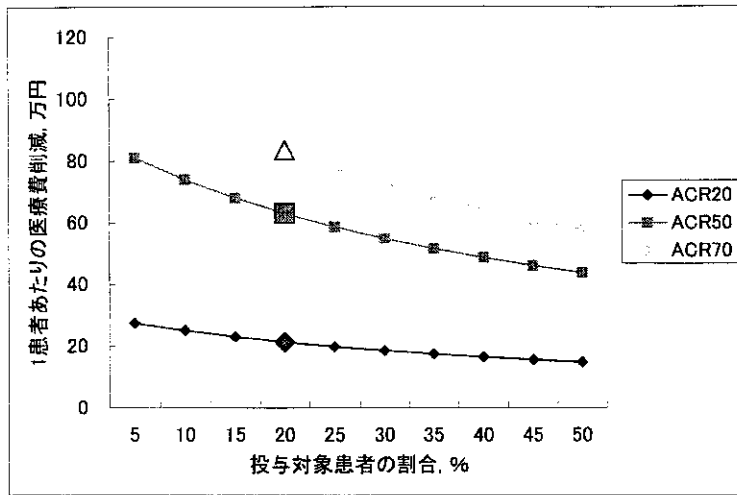


図1. 投与対象患者数に関する感度分析

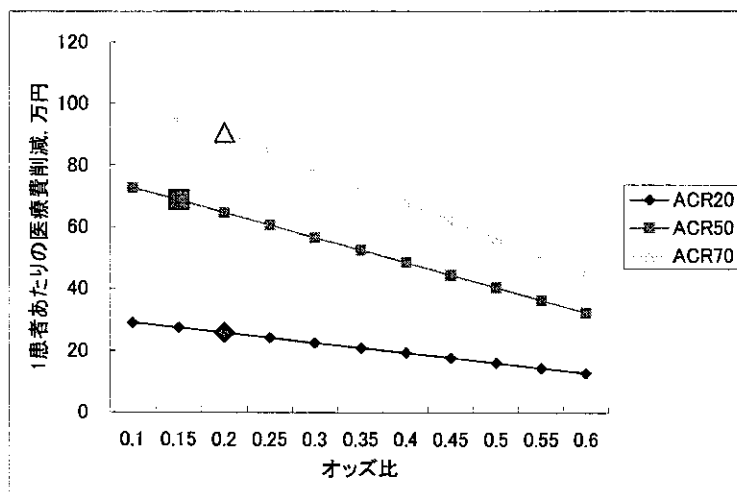


図2. 治療効果に関する感度分析

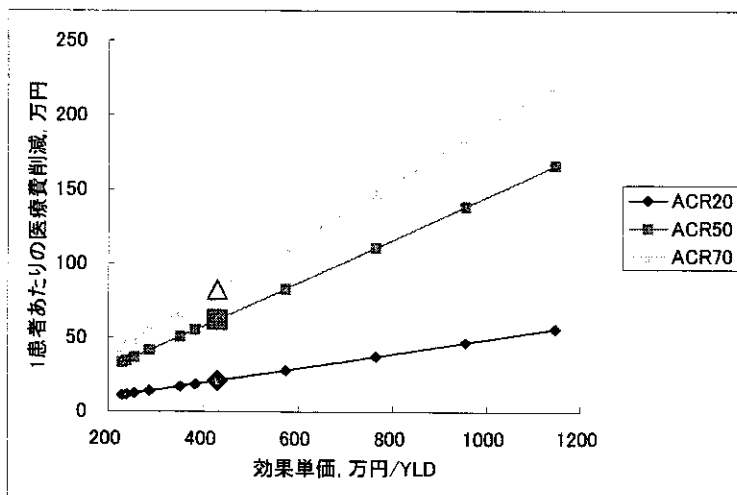


図3. 効果単価に関する感度分析

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Suka M, Yoshida K. The national burdens of rheumatoid arthritis and osteoarthritis in Japan: projections to the year 2010 with future changes in severity distribution. Modern Rheumatology 2004
(印刷中)

2. 学会発表

G. 知的所有権の取得など

1. 特許許可

2. 実用新案登録

3. その他