

活性化血小板に結合することで単に抗血小板抗体として作用しているのかもしれない。そのため、抗CD40Lヒト化抗体と抗CD40L自己抗体の関連する臨床症状が異なる理由として認識するエピトープの違いや抗体の補体やFc受容体に対する親和性の差が考えられる。今後さらにこの点を追究することで、血栓塞栓症を起こさない抗CD40Lヒト化抗体の開発につながる可能性もある。

#### E 結論

CD40Lに対する自己抗体はSLE、PAPS、ITP患者血清中に検出され、血小板減少と強く関連した。抗CD40L自己抗体は活性化血

小板膜上への結合を介して、血小板クリアランスを亢進させる可能性が考えられた。

#### F 健康危険情報

なし

#### G 研究発表

##### 1 論文発表

なし

##### 2 学会発表

なし

#### H 知的所有権の出願 登録状況

なし

### 13. マクロファージ遊走阻止因子の制御による血栓傾向の治療

分担研究者 渥美 達也 (北海道大学大学院医学研究科 病態内科学講座 講師)

#### 研究要旨

血栓傾向は、全身性エリテマトーテス (SLE) や抗リン脂質抗体症候群 (APS) などの自己免疫疾患の予後を規定する重要な因子である。血栓傾向の制御は自己免疫性疾患の治療においても重要な役割を果たすと考えられる。我々は内皮細胞や単球系細胞の不適切な活性化による血栓傾向が自己免疫疾患の病態で重要であると考え、それを制御する方法を検討してきた。とりわけ外因系凝固因子のイニシエータである組織因子の発現が血栓イベントのひきかねとして極めて重要であるので、本年度はマクロファージ遊走阻止因子 (MIF) のblockadeによる組織因子発現抑制の可能性を検討した。[材料と方法] 単球系細胞としてU937および正常末梢血単核球 (PBMC) を、またヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた。これらの細胞を0-100mg/mlのモノクローナル抗ヒトMIF抗体で処理し、その後LPSを加えて発現した組織因子活性を、活性化第Ⅶ因子、活性化第Ⅴ因子、プロトロンヒン、カルニウムを加えて、トロンヒンシェネレーションを検出するクロモシェニノクアノセイで測定した。[結果] LPS (50-250ng/ml) 添加により、U937、PBMC、HUVECのいずれにも強い組織因子の発現が誘導された。しかし抗MIF抗体で処理したU937は、LPSを加えても新たな組織因子の発現はほとんどみられなかった。抗MIF抗体による処理でPBMCでも同様の効果が得られ、またHUVECでは組織因子発現が消失はしなかったものの有意に抑制された。[考察] MIFは、1966年にin vitroでマクロファージの動員を抑制する活性化T-cell由来のリンホカインとして報告されたが、のちの検討により致死的なエントトキニンノックを仲介したり、また免疫細胞の活性化やサイトカイン産生を促し、向炎症作用を示すことが報告された。現在ではMIFは炎症性疾患の抗サイトカイン療法のターゲットとして注目されている。本研究は、MIFの制御が組織因子を産生する単球系細胞血管内皮細胞のperturbationや不適切な活性化を抑制し、抗MIF抗体療法が血栓傾向の治療戦略のひとつとなる可能性を示す。

#### A 研究目的

血栓形成疾患では、単球系細胞や血管内皮細胞に発現する組織因子と第Ⅶ因子の相互作用からはじまる外因系凝固系の活性化が病態の中心のひとつである。外因系凝固

反応のひきかねである組織因子発現は、細胞の組織因子の発現によってのみ調節されており、他の酵素タンパクによる組織因子活性化のプロセスは不要である。すなわち、前駆体から酵素や補酵素によって活性化と

なる他の凝固因子とは対照的に、組織因子の発現は種々の刺激による細胞の活性化を直接反映する。組織因子が細胞表面に出現すると活性化凝固第Ⅷ因子と結合しtenaseとなって凝固第Ⅹ因子を活性化し、活性化凝固第Ⅹ因子は活性化凝固第Ⅴ因子を補酵素としてプロトロンヒンをトロンヒンへと活性化させる。産生されたトロンヒンはフィブリノーゲンをフィブリンへ変換し活性化凝固第Ⅷ因子によりフィブリン塊を形成させる。この外因系凝固反応は生理的には止血反応として極めて重要であるか、不適切な細胞活性化に伴う外因系凝固の活性化は血栓症を引き起こす。

マクロファーン遊走阻止因子 (MIF) は、1966年にin vitroでマクロファーンの動員を抑制する活性化T細胞由来のリンホカインとして報告された。1989年にDavidらにより114個のアミノ酸からなる分子としてMIFのcDNAがクローニングされ、さらに1993年にはNishihiraらによりMIFの立体構造が解析されてから、次第にMIFの生理的な意義が明らかになってきた。MIFは生物学的にサイトカインネットワークにおいてTNFやIFNより上流に位置し、その産生を促しているとき、すなわちMIFはクルコルチコイトの作用に拮抗して炎症を惹起すること、T細胞の活性化に必須な因子であることから、感染症や組織障害などの種々のストレスによる細胞の増殖や活性化にとってMIFは必須の分子であることが認識されるようになってきた。

最近MIF knockout mouseがエントトキシン刺激に対し抵抗性を示すことが報告された。さらにTNF knockout mouseを用いた敗血症の実験から、MIFはTNFの非存在下でも敗血症の増悪因子として機能する主要な分子であることが報告されている。これらの事実は、MIFが細菌感染症における免疫応答や炎症反応の主たるメディエーターのひとつであることを強く示唆し、MIF

は炎症性疾患の抗サイトカイン療法のターゲットとして注目されている。関節リウマチの滑膜炎やLPSによって引き起こされるseptic shockあるいはDICをMIFの中和抗体により制御する試みがなされている。

このことから、難治性の血栓傾向に伴う病態に対してMIFの制御による新規治療法の可能性を考えた。そこで、本研究は、MIFの制御が組織因子を産生する単球系細胞、血管内皮細胞の不適切な活性化を抑制し、抗MIF抗体療法が血栓傾向の治療戦略のひとつとなる可能性を示すことを目的とした。

## B 研究方法

モノクローナル抗MIF抗体 (クローン10G8D) 産生ハイブリトーマは、北海道大学大学院医学研究科分子生化学講座、西平順助教授により提供された。10G8D細胞をBalb/cヌートマウス腹腔内に接種し、腹水からモノクローナル抗体を調整した。

ヒト単球系cell lineであるU937、正常人末梢血単核球、およびヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を材料とした。これらの細胞をモノクローナル抗MIF抗体で1時間処理し、LPS (250ng/ml) を加えて組織因子を発現させた。活性化凝固第Ⅷ因子 (0.09 mg/ml) を20ml添加し、30分間インキュベートした。次に凝固第Ⅹ因子 (25mg/ml)、凝固第Ⅱ因子 (30mg/ml)、凝固第Ⅴ因子 (10pM/ml) を加え、2分後に25mMの塩化カルシウムを25ml添加した。20分後にトロンヒンに対する合成発色基質であるS-2238を添加して10分間静置した。その後各ウェルの405nmでの吸光度を測定した。

組織因子によるトロンヒン生成の指標として、トロンヒン活性比 (Thrombin activity ratio TAR) を次のように定義した。TAR = (各検体におけるOD) / (抗体非添加LPS無刺激の細胞で得られたOD)。また、LPSによる刺激の反応前後での組織因

了による1ロンビン活性の増加率の指標として、LPS反応比（LPS response ratio LRR）を次のように定義した。LRR = (各検体におけるLPS刺激後のOD) - (各検体におけるLPS刺激前のOD) / (抗体非添加LPS刺激後のOD) - (抗体非添加LPS刺激前のOD)。

(倫理面への配慮)

本年の研究には特に倫理的に問題となる課程は含まれない。

### C 研究結果

図1にU937におけるTARを示した。LPSの刺激により抗体非添加、マウス正常IgGでは、組織因子発現が有意に増加した(p=0.0021, p=0.0016)。LPS刺激後のTARは、抗体非添加細胞およびマウス正常IgG 100 mg/mlを添加した細胞と比較し、抗MIF抗体100mg/mlを添加した細胞で有意に低下していた。抗MIF抗体4mg/mlを添加した細胞では有意な組織因子抑制は認められな

かったか、20mg/mlおよび100mg/mlを添加した細胞では、刺激前またはコントロールIgG抗体添加細胞と比較して有意な組織因子発現の低下を認めた(図2)。

次にLPS刺激前後の組織因子活性の増加率であるLRRを検討した(図3)。対照抗体であるマウス正常IgGをいずれの濃度で添加してもLRRは抗体非投与細胞との差はなかったが、抗MIF抗体で処理した細胞は抗体非投与細胞または対照抗体添加細胞に比べてLRRは有意に低かった。

PBMCおよびHUVECを使用した場合もU937とほぼ同様に抗MIF抗体の処理によりLPSによって誘導される組織因子は抑制された(結果は示さず)。

### D 考察

単球系細胞および血管内皮細胞にモノクローナル抗MIF抗体を添加することにより、各細胞でLPSにより誘導される組織因子の発現が抑制されることが示された。

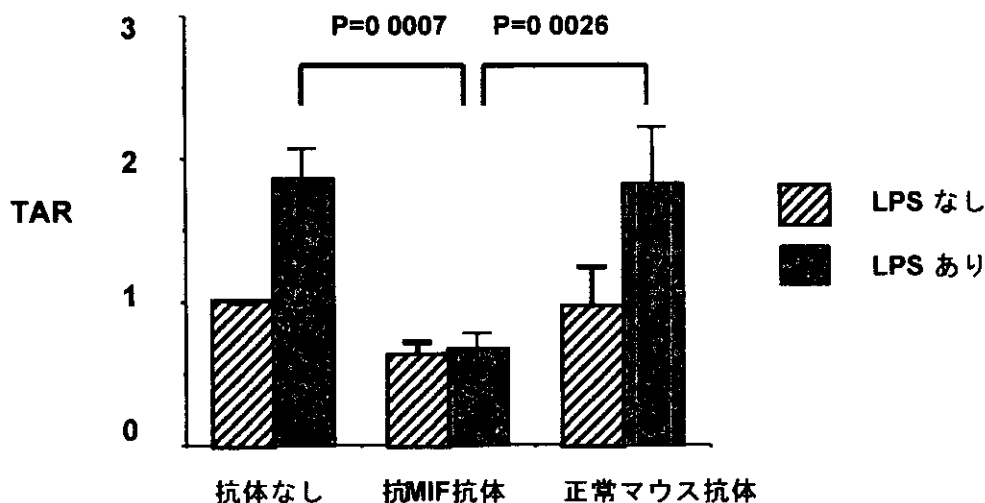


図1 U937における組織因子発現への抗MIF抗体の効果

U937細胞に抗MIF抗体(100mg/ml)、または正常マウスIgG(100mg/ml)、もしくは培養液のみを加えて1時間培養し、LPS(250ng/ml)を加えて6時間刺激した。1%BSA-5mM CaCl<sub>2</sub>-TBSをU937細胞に添加し、発現した組織因子活性を精製した凝固因子VIIa、V、X、プロトロンビンを加え、クロモシェニク基質S2238によって生成トロンビンを検出した。

TAR = (各検体におけるOD) / (抗体非添加でLPS無刺激の細胞で得られるOD)。(n=12)。

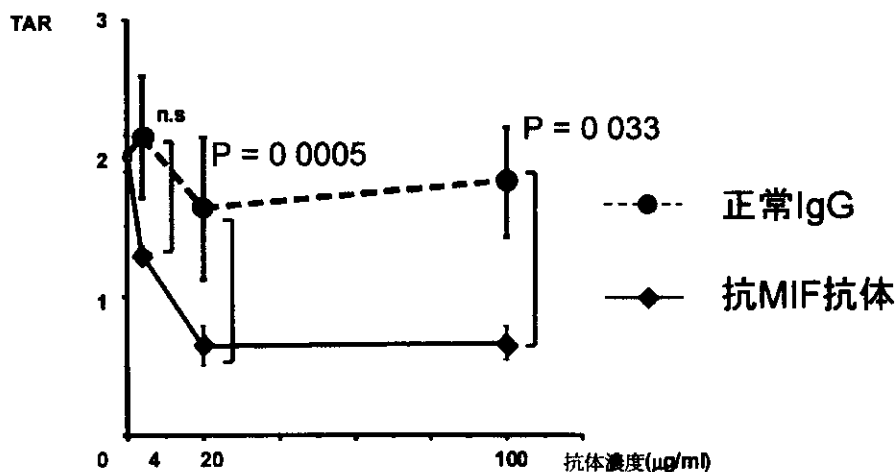


図2 U937における濃度と組織因子発現への効果  
同様にU937細胞を異なった濃度の抗MIF抗体または正常マウスIgGにて処理した。(n=12)

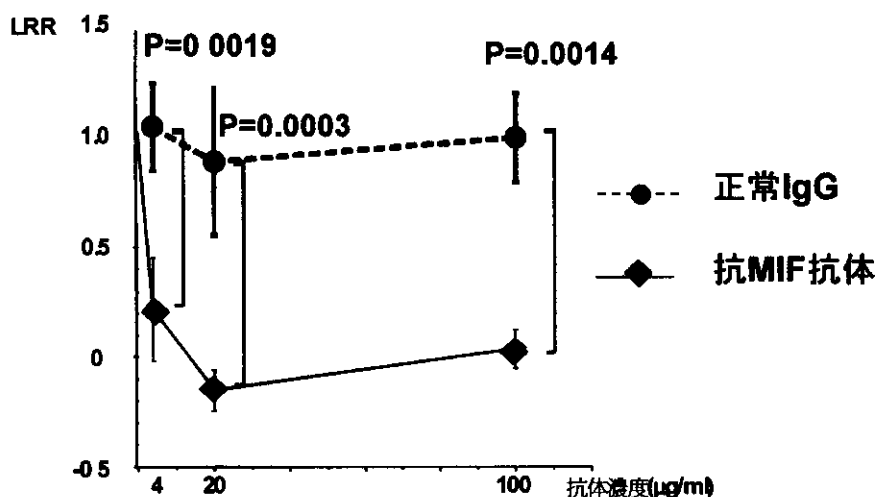


図3 U937における抗MIF抗体濃度と組織因子活性増加率の検討  
図2において測定した組織因子活性を、LPS刺激前後での組織因子活性の増加率によって検討した。  
LRRは以下の式によって求めた。  
LRR = (LPS刺激後の抗体添加細胞OD) - (LPS刺激前の抗体添加細胞OD) / (LPS刺激後の非添加細胞OD) - (LPS刺激前の非添加細胞OD)。

組織因子からはじまる外因系凝固反応は強力であり、過凝固状態かその病態の主座である静脈血栓のみならず、血小板血栓に引き続いて凝固反応が活性化される動脈血栓症の病態にも関与する可能性がある。MIFと組織因子の関連についてはこれまで報告がないか、MIFがエンドトキシンショックを増悪させること、septic shockのモデルマウスにおける抗MIF抗体の死亡率の

改善が報告されている。また、細胞内情報伝達においても線維芽細胞や滑膜細胞をMIFで刺激することによりmitogen-activated protein kinase (MAPK) を介してホスホリパーゼA2を活性化したり、Activating Protein-1 (AP-1) を介してmatrix metalloproteinasesの発現を上昇させることか報告されている。anti-sense MIFによりNFκBの活性化が抑制されるこ

とから、MIFの細胞内情報伝達にはNFκBが関与している可能性がある。これらのことより、MIFかAP-1やNFκBを介し組織因子の発現に関与していると考えられる。

ヘパリンやワルファリンに代表される凝固因子を抑制するこれまでの抗凝固療法とは異なり、抗MIF抗体による抗凝固療法は、今回の検討により、血管内皮細胞や単球系細胞の異常活性化自体を沈静化させ、凝固反応の引き金となる組織因子産生を抑制する可能性が示された。つまり、抗MIF抗体による抗凝固療法は、単純に過凝固を非特異的に抑制するばかりではなく、血栓を形成する病態の中心的な場である血管内皮細胞や単球系細胞の機能分子をターゲットにしている。これは病態の根本から疾患を改善しているという点で、特にこれまで治療困難とされた難治性のDICや劇症抗リン脂質抗体症候群などに対する新しい治療法として期待される。

## E 結論

単球系細胞および血管内皮細胞においてLPSにより誘導される組織因子発現が抗MIF抗体により抑制された。MIFは免疫疾患の合併症としての難治性血栓傾向に対する治療のあらたなターゲット分子となりうる。

## F 健康危険情報

本年度の研究からは該当無し。

## G 研究発表

### 1 論文発表

1) Oku K, Atsumi T, Furukawa S, Horita T, Sakai Y, Jodo S, Amasaki Y, Ichikawa K, Amengual O, Koike T Cerebral imaging by magnetic resonance imaging and single photon emission computed tomography in systemic lupus erythematosus with central nervous system involvement *Rheumatol* 42 773-7, 2003

2) Amengual O, Atsumi T, Koike T Specificities, properties and clinical significance of antiprothrombin antibodies *Arthritis Rheum* 48 886-95, 2003

3) Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA. Tissue factor in antiphospholipid syndrome Shifting the focus from coagulation to endothelium *Rheumatol* 42 1029-31, 2003

4) Kobayashi K, Kishi M, Atsumi T, Bertolaccini M, Makino H, Sakairi N, Yamamoto I, Yasuda T, Khamashta MA, Hughes GR, Koike T, Voelker DR, Matsuura E Circulating oxidized LDL forms complexes with beta 2-glycoprotein I implication as an atherogenic autoantigen *J Lipid Res* 44 716-26, 2003

5) Sakai Y, Atsumi T, Itoh T, Koike T Uveitis, pancarditis, haemophagocytosis, and abdominal masses *Lancet* 361 834, 2003

6) Yamada H, Atsumi T, Kato EH, Shimada S, Morikawa M, Minakami H Prevalence of diverse antiphospholipid antibodies in women with recurrent spontaneous abortion *Fertil Steril* 80 1276-8, 2003

7) Li N, Nakamura K, Jiang Y, Tsurui H, Matsuoka S, Abe M, Ohtsuji M, Nishimura H, Kato K, Kawai T, Atsumi T, Koike T, Shirai T, Ueno H, Hirose S Gain-of-function polymorphism in mouse and human Ltk implications for the pathogenesis of systemic lupus erythematosus *Hum Mol Genet* 13, 171-9, 2004

8) Das H, Atsumi T, Fukushima Y, Shibuya H, Ito K, Amasaki Y, Ichikawa K, Yamada Y, Koike T Specificity of anti-agalactosyl IgG antibodies for diagnosing rheumatoid arthritis *Clin Rheumatol* (in press)

9) Yasuda S, Atsumi T, Ieko M, Matsuura E, Kobayashi K, Inagaki J, Kato H, Tanaka H, Yamakado M, Akino M, Saitou H,

Amasaki Y, Jodo S, Amengual O, Koike T  
Nicked beta2-glycoprotein I A marker of  
cerebral infarct and a novel role in the  
negative feedback pathway of extrinsic  
fibrinolysis Blood (in press)

2 学会発表

1) Atsumi T, Ieko M, Jodo S, Amasaki Y,  
Koike T Sensitivity of semiquantitative  
lupus anticoagulant test for the diagnosis of  
antiphospholipid syndrome 19th Congress  
of The International Society on Thrombosis

and Haemostasis, Birmingham, UK, 12-18  
July 2003

H 知的財産権の出願 登録  
該当無し

I 謝辞

本研究は、北海道大学大学院医学研究  
科・病態内科学の大学院生、古川真先生の  
御協力および小池隆夫教授の御指導でおこ  
なわれた。各先生に深謝する。

## 14. ステロイド誘発性骨粗鬆症の発症に係わる遺伝子多型性の研究

分担研究者 熊谷 俊一（神戸大学大学院医学系研究科 臨床病態 免疫学 教授）

### 研究要旨

ステロイド長期投与中のSLE患者についてIL-6, COL1A 1およびTGF- $\beta$  1遺伝子の多型性を調べ、骨塩量との関連を検索した。TGF- $\beta$  1 promoter -509 C/Cか抵抗性の、IL-6 -634 G が感受性遺伝子の可能性があるが、より大規模の検討が必要である。

### A 研究目的

ステロイドの長期使用は骨粗鬆症をもたらす、骨折を誘発するなど患者さんのQOLを著しく障害している。プレトニソロンを5~7.5mg/日以上使用すると年間3-5%骨塩量が減少することか報告されている<sup>1)</sup>。我々の観察でもステロイドを長期使用中の患者の多くは骨塩量の低下を認めるが、同様の治療をしても骨塩量がほとんど低下しない患者が存在することに気がついた<sup>2)</sup>。

骨粗鬆症の原因についてはCa摂取や運動負荷あるいは女性ホルモンなどの環境因子とともに、数多くの遺伝子が骨塩量と関連するとの報告がある<sup>3)</sup>。原発性骨粗鬆症については、骨代謝関連遺伝子やサイトカイン遺伝子などの多型性との関連が報告されているか、ステロイド性骨粗鬆症での研究は数少ない。本研究はステロイド性骨粗鬆症の感受性あるいは抵抗性遺伝子を明らかにすることにより、ステロイド投与患者における骨粗鬆症の予防や治療法を確立することを目的とする。今回はまず全身性エリテマトーテス（SLE）を対象として、TGF- $\beta$ とIL-6の遺伝子多型性を検討した。そのうちステロイド長期服用中の患者について、骨塩量と遺伝子多型性との関連を検討した。

### B 研究方法

#### ① 遺伝子多型性の検策

SLE患者72名と健常人106名について、informed consentを得た上で末梢血よりDNAを抽出し、多型性を調べた。TGF- $\beta$  1遺伝子については、promoter -509 C→Tとexon 1 869 T→C（Leu→Pro）の多型性を、direct sequence 法で調べた。IL-6遺伝子については、promoter -174 G/Cの多型性はdirect sequence 法で、promoter -634 C→G部分の多型性は制限酵素 BsrBI を用いたPCR-RFLP 法で検討した。COL1A1 遺伝子イントロン1546のG/T変異については、direct sequence 法で調べた。

#### ② 骨塩量の測定

ステロイド服用中のSLE患者について、DXAによる骨密度を測定し、脊椎圧迫骨折の有無を調査し、ステロイド投与量や期間との関係、さらに骨折の有無やBMIや閉経などとの関係を調査した。

#### ③ 遺伝子多型性と骨塩量との関係の検策

ステロイドを長期服用しDXAによる骨密度測定を行った膠原病患者62名について、上記遺伝子多型性と骨密度との関連を検討した。



(倫理面への配慮)

本研究については平成12年11月神戸大学内倫理委員会の承認を受けている。研究の内容を充分患者さんに説明し、informed consentを文書で得た上で、患者さんから検体を頂き、多型性検出を行っている。

## C 研究結果

### ① SLE患者と正常人の比較

欧米人で原発性骨粗鬆症との関連が報告されているIL-6遺伝子promoter -174 G/CとCOL1A1遺伝子 Intron 1部位の遺伝子多型は本研究では見いだされず、日本人では頻度が低い稀な変異と考えられた。

TGF- $\beta$ 1 遺伝子のpromoter -509 T/C多型および exon 1 869 C/T 多型は強い連鎖不平衡にあったか、SLEと正常人との間で有意差は認めなかった(表1)。IL-6遺伝子のpromoter -634 は、SLE患者でC/C genotypeが多い傾向にあったが有意ではなかった(56.9% vs 44.1%, p=0.096)(表2)。

### ② 遺伝子多型性と骨塩量との関連

SLE患者40例を含む64例のステロイド長期服用中の膠原病患者について、TGF- $\beta$ 1 遺伝子のpromoter -509 T/C多型およびIL-6 遺伝子のpromoter -634 多型と、骨塩量との関連を検索した。

表3に示すように、TGF- $\beta$ 1 遺伝子

表1 Genotypic Frequencies of TGF- $\beta$ 1 gene in SLE patients

Subjects	n	TGF- $\beta$ 1 Promoter -509 (%)			Allele frequency (%)	
		C/C	C/T	T/T	C	T
Controls	106	17.0	54.7	28.3	44.3	55.7
SLE	72	18.1	54.2	27.8	45.1	54.9

Subjects	n	TGF- $\beta$ 1 Exon 1 869 (%)			Allele frequency (%)	
		T/T	T/C	C/C	T	C
Controls	106	17.0	54.7	28.3	45.1	54.9
SLE	68	19.1	55.9	25.0	47.1	52.9

表2 Genotypic Frequencies of IL-6 gene in SLE patients

Subjects	n	IL-6 Promoter -634 (%)			Allele frequency (%)	
		C/C	C/G	G/G	C	G
Controls	102	44.1	51.0	4.9	69.6	30.4
SLE	72	56.9*	38.9	4.3	76.4	23.6

\*p=0.096

promoter -509 C/C患者では有意に体重が多かった。TGF- $\beta$  産生量を増加させ、日本人の原発性骨粗鬆症で有意に多いとの報告がある-509 T allele については、骨塩量との有意の相関は認めなかったが、腰椎L2-L4のZスコアはC/C > C/T > T/Tの順に低下していた。また例数は少ないがC/Cの患者では圧迫骨折例が存在しなかった。

一方、IL-6遺伝子promoter -634のC/T多型については、日本人の原発性骨粗鬆症で有意に多いとされるG/Gの症例は2例と稀であったか、2例とも骨粗鬆症に罹患（Tスコア-2以下）であった。また腰椎L2-L4のZスコアはC/C > C/G > G/Gの順に低下していた（表4）。

#### D 考察

骨粗鬆症の原因についてはCa摂取や運動負荷あるいは女性ホルモンなどの環境因子とともに、骨代謝関連遺伝子やサイトカイン遺伝子などの関与が言われている。骨粗鬆症の候補遺伝子として、ヒタミンDレセプターやI型コラーゲン $\alpha$ 1 遺伝子（COL1A1）が注目されている。その他IL-6

やTGF $\beta$ などのサイトカインについても、その多型性と原発性骨粗鬆症との関連が報告されている。本研究は、ステロイドの長期大量使用が行われ骨折のリスクが高い膠原病患者について、骨塩量が低下と遺伝子多型性を比較検討することにより、ステロイド骨粗鬆症の感受性および抵抗性遺伝子を同定することを目指した。

TGF- $\beta$ はTGF- $\beta$ スーパーファミリーに属するサイトカインで、骨代謝をはじめ炎症、免疫、発癌、形態形成などの制御に広範かつ多彩な生物学的作用を発揮する。骨組織においては、骨芽細胞の増殖や骨基質産生を促すか、最近破骨細胞の分化促進にも関与していることが明らかにされた。ヒトのTGF- $\beta$  遺伝子はTGF- $\beta$  1, TGF- $\beta$  2, TGF- $\beta$  3 の3種のアイソフォームが同定されている。TGF- $\beta$  1遺伝子には多型性が存在し、原発性骨粗鬆症や強皮症などの自己免疫疾患との関連の報告もある。promoter region -509 C/T, exon 1 869 T/C 変異部分について、-509 T allele はTGF- $\beta$  産生量を増加させ、-509 T, 869 T alleleが日本人の原発性骨粗鬆症に有意に多いことが報告され

表3 Effects of TGF- $\beta$  1 promoter-509 genotypes on BMD and clinical features in autoimmune patients taking corticosteroid for a long period

Subjects	TGF- $\beta$ 1 promoter -509 C/T		
	C/C (n=6)	C/T (n=39)	T/T (n=17)
Age (year)	34.8	46.8	39.9
Height (cm)	161.2	154.4*	157.1
Weight (kg)	65.3**	51.6	50.4
L2-4 BMD (g/cm <sup>2</sup> )	1.009	0.896	0.910
Femoral BMD	0.763	0.700	0.734
Radial 1/3BMD	0.670	0.632	0.662
L2-4 T score	-0.154	-1.169	-1.019
L2-4 Z score	0.068	-0.385	-0.424
Fx History (%)	0	21.6	18.8
Average Steroid Dose (mg)	12.5	12.5	10.9
Period of Steroid Use (day)	1417	2676	2200

-509 T allele はTGF- $\beta$  産生量を増加させ、日本人の原発性骨粗鬆症で有意に多いとの報告がある。\*p<0.05, \*\*p<0.005

ている。今回の検討でもT/T genotypeは骨塩量が少ない一方で、C/Cは骨塩量も多く骨折例を認めなかった。C/C genotypeはTGF- $\beta$ 産生が少なく、体重が多く、骨粗鬆症や骨折に抵抗性の可能性が示唆された。

IL-6は、B細胞の抗体産生細胞への最終分化を誘導するB細胞分化因子であり、免疫、炎症、造血、骨代謝を調節する生体に不可欠なサイトカインである。しかし、一方でIL-6の過剰産生は自己免疫疾患の病態形成に関わっている。骨代謝においてはIL-6の刺激が骨芽細胞を刺激し、破骨細胞誘導因子を介して、破骨細胞分化に関与していると考えられている。

ヒトのIL-6遺伝子には多型性が存在し、原発性骨粗鬆症やSLEとの関連の報告もある。promoter region -634 C/G部分は、-634 G alleleが日本人の原発性骨粗鬆症に有意に多いことが報告されている。SLEでこの変異部分と疾患感受性の関連の報告はない。今回の報告でもG/G genotypeの2例はいずれもTスコアが-2以下で骨粗鬆症であった。またC/GはC/Cよりも骨塩量が少なく、-634 G alleleが骨粗鬆症感受性遺伝

子の可能性もあるが、より大規模の研究での証明が必要である。

骨粗鬆症に関わる遺伝子は多岐にわたり、かつ今回の研究でも日本人には稀な多型性があるなど多型性にも人種差があること、さらに疾患や食生活など他の多くの要因の影響を受けることから、ステロイド誘発性骨粗鬆症の遺伝的因子の解明には、母集団を大きくした研究が必要と考えている。このような研究の成果は、骨粗鬆症発症予測を可能とし、個々の患者に応じた効果的な治療や予防法の確立に結びつくものと確信している。

## E 結論

ステロイド長期投与中のSLE患者についてIL-6, COL1A 1およびTGF- $\beta$  1遺伝子の多型性を調べ、骨塩量との関連を検索した。TGF- $\beta$  1 promoter -509 C/Cが抵抗性の、IL-6 -634 Gが感受性遺伝子の可能性があるが、より大規模の検討が必要である。

## 引用論文

1) American Collage of Rheumatolgy Ad

表4 Effects of IL-6 promoter-634 genotypes on BMD and clinical features in SLE patients taking corticosteroid for a long period

Subjects	IL-6 promoter -634 C/G		
	C/C (n=36)	C/G (n=26)	G/G (n=2)
Age (year)	43.8	45.1	58.0
Height (cm)	156.1	155.5	149.0
Weight (kg)	52.5	53.0	45.0
L2-4 BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.922	0.898	0.750
Femoral BMD	0.721	0.707	0.509
Radial 1/3BMD	0.647	0.639	0.529
L2-4 T score	-0.939	-1.132	-2.469
L2-4 Z score	-0.199	-0.471	-0.814
Fx History (%)	12.1	23.1	100.0
Average Steroid Dose (mg)	13.6	9.8	7.5
Period of Steroid Use (day)	2275	2549	1505

-634 G alleleが日本人の原発性骨粗鬆症に有意に多いと報告されている

Hoc Comittee on glucocorticoid-induced osteoporosis Recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid induced osteoporosis 2001 update *Arthritis Rheum* 44 1496-1503, 2001

2) 中村知子ほか ステロイド骨粗鬆症における腰椎骨密度の維持・増加にはエチドロネート400mg投与が有用である *リウマチ* 42 666-675, 2002

3) Ralston, SH Genetic control of susceptibility to osteoporosis *J Clin Endocr Metab*, 87 2460-2466, 2002

#### F 研究発表

##### 論文発表

1) Nakamachi Y, et al Specific increase in enzymatic activity of adenosine deaminase 1 in rheumatoid synovial fibroblast *Arthritis Rheumat*, 48 668-674, 2003

2) Hatachi S, et al CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> T Cells Accumulate as Unique Anergic Cells in Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid *J Rheumatol*, 30 1410-1419, 2003

3) Kanagawa S, et al Association of the TAP2\*Bky2 allele with presence of SS-A/Ro and other autoantibodies in Japanese patients with systemic lupus erythematosus *Lupus*, 12 258-265, 2003

4) Nakazawa T, et al Adenosine downregulates cytokine-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 on rheumatoid synovial fibroblasts independently of adenosine receptor signaling *Drug Dev Res* 58 (4) 368-376, 2003

5) Kosaka H, et al Inhibition of the nucleoside transporter inhibits disease progression in the rat adjuvant-induced arthritis model *Drug Dev Res* 58 (4) 479-485, 2003

6) Tsuji G, et al Dermatomyositis and myelodysplastic syndrome with myelofibrosis responding to methotrexate therapy *Am J Hematol*, 74 175-178, 2003

## 15. 膠原病におけるステロイド誘発性骨粗鬆症に対するエチドロネート 間歇療法の検討（2年間の長期投与の検討の検討）

分担研究者 諏訪 昭（慶應義塾大学医学部 内科 助手）

### 研究要旨

【目的】本研究は、膠原病におけるステロイド誘発性骨粗鬆症に対するエチドロネート間歇療法の有効性を2年間の無作為前向き調査で検討することを目的とした。【方法】プレトニソロン75mg/日以上を最低90日間投与された膠原病患者102例を無作為に2群に層別化し、一方にエチドロネート200mg 2週間12週毎、アルファカルシトール0.75 $\mu$ g連日（エチドロネート群 [E群] 51例）、もう一方にアルファカルシトール0.75 $\mu$ g連日（コントロール群 [C群] 51例）を投与し、48、96週後の腰椎骨密度の変化をDEXA法（Norland XR-36）で比較検討した。さらに、新規脊椎骨折の発生の有無を胸腰椎X線写真で96週後に比較検討した。【結果】解析対象症例は、E群 30例、C群 29例であった。基礎疾患、投与前の年齢、骨密度等背景因子で両群間に差を認めなかった。E群では、48、96週後の骨密度平均変化率が投与前と比較してそれぞれ4.6%（ $P<0.001$ ）、3.5%（ $P<0.05$ ）と上昇した。一方、C群では、それぞれ1.7%（ $P<0.01$ ）、-0.5%（NS）であり、2群間の比較では、48、96週ともにE群の変化率の有意な増加を認めた（ $P<0.05$ ）。投与前骨密度で層別化すると、48週の骨粗鬆症例で骨密度の改善がより高度であった（E群 8.7%、C群 2.7%、 $P<0.01$ ）。96週の時点で、E群では、新規の骨折は認めなかったが、C群では閉経後の女性2例で認められた。【考察】今回の検討では、エチドロネート間歇療法での骨密度の有意な増加および96週後の新規骨折予防効果が認められ、膠原病患者のステロイド誘発性骨粗鬆症に対するエチドロネート間歇療法の2年間長期投与の有効性が示唆された。

### A 研究目的

副腎皮質ステロイド剤は、膠原病治療の上で重要な役割を果たしているが、長期使用による骨粗鬆症が問題となる。アメリカリウマチ学会では、膠原病患者における骨折予防の観点から骨粗鬆症のみならず、骨量減少症に分類される症例に対しても積極的な治療を推奨している。特に高齢者では、いったん骨折を生じると歩行不能や寝たきり状態となる危険性があり、さらなる骨粗

鬆症の進行や患者の生活の質（QOL）の低下をもたらす。そこで、骨吸収を抑制または骨形成を促進することで、骨代謝回転過程の負のバランスを補正し、骨密度を維持する目的で種々の薬剤がこれまで使用されている。それらは、カルシウム製剤、活性型ビタミンD製剤、カルシトニン、ビタミンK製剤、女性ホルモン製剤などであるが、これまでの報告で骨密度増加や骨折予防および副作用という観点で十分に満足できる

結果は得られていない。そこで、本研究は骨折予防の観点から、ステロイド投与中の膠原病患者を対象として、ヒスフォスフォネート製剤であるエチドロネートの間歇療法の有効性を2年間の無作為前向き調査で検討することを目的とした。

## B 研究方法

### I 対象

プレトニソロン7.5mg以上を最低90日間投与された膠原病患者102例を対象とした。

### II 方法

対象を、無作為にE群（エチドロネート投与群）とC群（コントロール群）に分けた。E群は、エチドロネート200mgを2週間服用後、10週間休薬の間歇投与とし、基礎治療としてアルファカルシトール0.75 $\mu$ gおよび乳酸カルシウム3gの連日服用とした。C群は、基礎治療のみとした。

評価は、DEXA法による腰椎の骨密度の変化率、新規脊椎骨折の発生率を比較検討した。骨折および骨粗鬆症の診断は、日本骨代謝学会の原発性骨粗鬆症の診断基準（1996年度改訂版）に準じた。統計学的解析では、対心のあるt検定、Studentのt検定を行った。

### (倫理面への配慮)

本研究開始時に、書面によるインフォームトコンセントを取得し、同意を得たうえでおこなった。万一、同意をしない場合でもそれによって不利益は受けないこと、同意後でも、随時これを撤回でき、不利益を受けることはないこととし、また、提供者のプライハニーは完全に守られ、研究結果を公表する場合でも氏名などの秘密は保持することとした。

## C 研究結果

### (1) 解析対象

試験開始後、E群21例、C群22例が途中で脱落し、解析対象症例は、各々30例、

29例であった。副作用は、E群の2例で認め、それぞれ頭痛 顔面紅潮だった。解析例の患者背景では、性別・閉経の有無 平均年齢・PSL総投与量 腰椎骨密度など両群間に差は認めなかった（表1）。

### (ii) 腰椎骨密度の推移

全症例の骨密度の平均変化率の推移を検討した（図1）。全症例では、E群では、投与前と比較して48週、96週ともに有意に骨密度変化率の増加を認めたが、C群では、96週で骨密度変化率は減少した。また、48週、96週ともにE群の変化率がC群よりも有意に高値だった。

男女 閉経前後での層別解析では、E群の場合、48週のすべての群で投与前と比較して骨密度の有意な増加を認めた。96週では、閉経前女性の骨密度変化率か、C群と比較して、有意に高値であった。（図2）。

表1 解析例の患者背景

解析例の背景	E群 (n=30)	C群 (n=29)	群間検定
性別 男性	4 (13%)	5 (17%)	NS
女性 閉経前	19 (63%)	16 (55%)	NS
閉経後	7 (23%)	8 (28%)	NS
平均年齢 (歳) 男性	49 $\pm$ 23	45 $\pm$ 17	NS
女性	42 $\pm$ 14	41 $\pm$ 12	NS
PSL総投与量 (mg)	2 016 $\pm$ 808	1 608 $\pm$ 720	NS
腰椎骨密度 (g/cm <sup>2</sup> )			
男性	0.92 $\pm$ 0.22	0.85 $\pm$ 0.14	NS
女性閉経前	0.89 $\pm$ 0.20	0.93 $\pm$ 0.14	NS
閉経後	0.77 $\pm$ 0.13	0.79 $\pm$ 0.13	NS
脊椎圧迫骨折例 (開始前)	5 (17%)	4 (14%)	NS

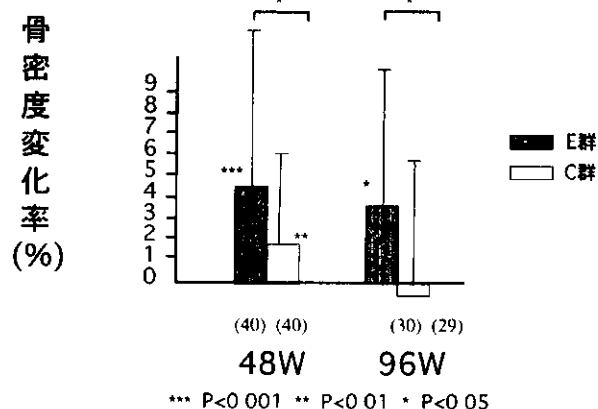


図1 骨密度変化率の推移（全症例）

骨密度で層別化した場合も、E群では、48週のすべての群で投与前と比較して骨密度の有意な増加を認め、特に骨粗鬆症例では最大の増加率を示した。また、48週のE群骨粗鬆症例の骨密度変化率が、C群よりも有意に高値だった(図3)。

次に、女性骨粗鬆症および骨減少症例の腰椎骨密度の推移を検討した(図4)。E群では、13例中11例(85%)で骨密度の増加を認めた。一方、C群では、増加率は軽度であり、10例中4例(40%)で骨密度の減少を認めた。

### (iii) 新規骨折の有無の検討

96週の時点で、新規脊椎骨折を検討した(表2)。E群では、新規の骨折は認めなかったか、C群では閉経後の女性2例で認めた。

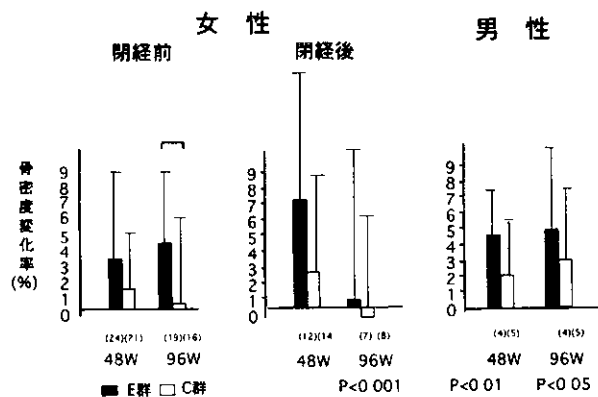


図2 男女 閉経前後別骨密度変化率の推移

### D 考察

副腎皮質ステロイド剤は、長期使用による種々の副作用かしばしば問題となり、そのひとつに、ステロイド誘発性骨粗鬆症がある。本研究では、ヒスフォスフォネート製剤であるエチドロネートの間歇療法(2年間の長期投与)か、ステロイド誘発性骨粗鬆症に対して骨量増加のみならず、骨折予防においても有効であることを明らかにした。

骨折および骨粗鬆症の診断は、日本骨代謝学会の原発性骨粗鬆症の診断基準(1996年度改訂版)を用いたか、この分類では、WHOの骨粗鬆症の診断基準であるYAMの-2.5SDと合致すること、この基準を用いた場合の原発性骨粗鬆症患者数は50歳以上の全女性の約24%と常識的な範囲となる点で妥当性がある。

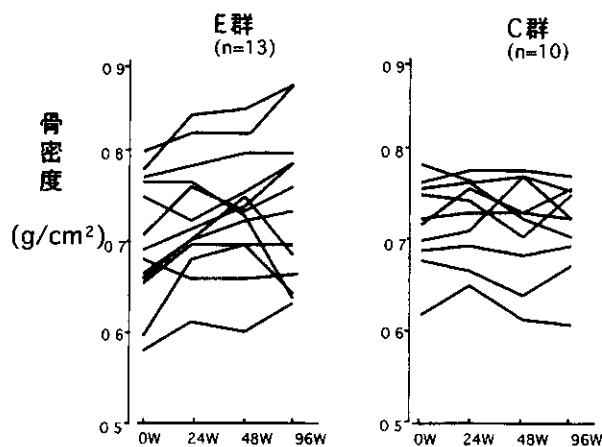


図4 女性 骨粗鬆+骨減少症例の腰椎骨密度の推移

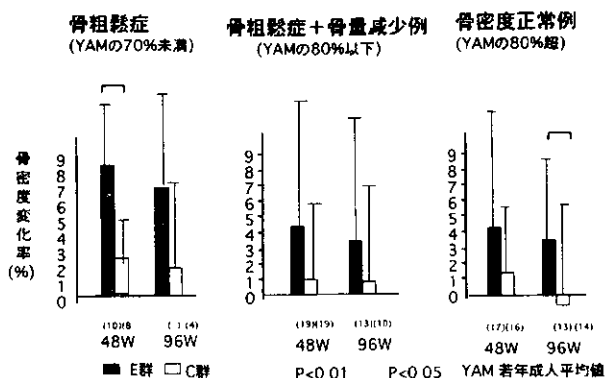


図3 骨密度で層別化した骨密度変化率の推移(女性)

表2 新規脊椎骨折の発生

	E群 (n=25)	C群 (n=27)
男性	0/3	0/5
女性		
閉経前	0/15	0/14
閉経後	0/7	2/8
合計脊椎骨折数	0	3

今回の検討では、エチトロネートは200mg/日2週間投与後10週間休薬とする方法で行った。また、対照群として、プラセボは倫理上の観点から使用せず、カルシウム製剤とこれまで骨折予防に対して有効性が報告されている活性型ビタミンD製剤であるアルファカルシトールの0.75 $\mu$ g/日を服用する群を用いた。用量に関しては、これまでの報告で0.75-1.0 $\mu$ g/日での有効性が認められているため、それと同等の用量を設定した。

全症例の96週後での骨密度変化率は、E群では投与前と比較して増加したか、C群では減少し、さらにE群との間で有意差を認めた。これまでの報告では、活性型ビタミンD投与群では骨密度は不変あるいは減少とする報告が多い。48週の検討では、投与前と比較して有意に上昇しており注目されたが、96週では、これまでの報告とほぼ同様の結果であり、活性型ビタミンD投与のみでは、骨密度増加作用は、不十分であることが示唆された。この点については、今後もさらなる症例の蓄積とより長期的な観察による十分な検討が必要と考えられた。

層別解析では、骨粗鬆症例の群で骨密度の増加が最大であった。これらの群では、骨代謝回転は負のバランスで骨吸収が著しいと考えられ、このような状態に対してエチトロネートの骨吸収抑制作用が骨代謝回転を正常化し、骨密度の増加をもたらすと考えられた。さらに、実際に各症例の骨密度の推移を女性骨粗鬆症および骨減少症例について検討したところ、E群では、ほぼ全例でその増加を確認できた。

骨粗鬆症に対する効果をみる上で一番重要なのは骨折の予防である。本研究では、胸腰椎圧迫骨折の有無で比較を行ったか、2年間の追跡調査でも、E群で新規骨折は認めず、今回の2年間の長期投与による検討においても、エチトロネートは活性型ビ

タミンD製剤を上回る骨折予防に対する有効性が示されたといえる。

また、C群でも、1年間での観察で新規骨折が認められた2例以外に、新規骨折を認めなかった。アルファカルシトール1 $\mu$ g/日投与で骨折予防に有効であったとする報告例もあり、C群もプラセボと比較すれば有効である可能性も示唆された。

今回、副作用の検討では、48週に認めたE群2例（頭痛および顔面紅潮）以外に、E群、C群ともに、新たな副作用の出現は認めず、2年間の長期投与での安全性が確認された。

これまで、閉経後骨粗鬆症患者を対象とした、7年間のエチトロネート間歇療法の有効性および安全性を検討した報告はあるか、ステロイド誘発性骨粗鬆症患者に対するそのような長期投与を検討した報告はなく、今後は、さらなる長期投与における有効性と安全性の確認が必要と考えられた。

なお、今回の検討では、プロトコール遵守例にかきって、検討をおこなったため、検討症例が各群30例、29例と少数であった。そのため、intent-to-treatによる分析で、再検討する必要があると考えられ、今後の課題である。

以上、今回の検討では、48、96週後骨密度の有意な増加および96週後での新規骨折予防を認め、2年間の長期投与においても、膠原病患者のステロイド誘発性骨粗鬆症に対するエチトロネート間歇療法の有効性および安全性が示された。特に、ステロイド投与中の骨粗鬆症例には、積極的にエチトロネートによる治療を行うべきであると考えられた。

## E 結論

- 1 ステロイド投与膠原病患者のエチトロネート間歇療法の2年間の長期投与による有効性を無作為前向き試験で検討した。
- 2 エチトロネート群では、投与前と比較



して投与後48週、96週ともに骨密度変化率は有意に増加し、さらにコントロール群との間に有意差を認めた。

3 骨粗鬆症例では、骨密度変化率の増加が著明であり、エチトロネート群では、投与前と比較して、48、96週ともに有意に増加していた。

4 新規脊椎骨折はC群で2例発生していたが、E群では認めなかった。

5 膠原病患者のステロイド誘発性骨粗鬆症に対するエチトロネート間歇療法の2年間の長期投与の有効性が示された。

#### F 健康危険情報

該当なし。

#### G 研究発表

論文発表  
該当なし。

#### 学会発表

該当なし。

#### H 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

##### 1 特許取得

該当なし。

##### 2 実用新案登録

該当なし。

##### 3 その他

該当なし。

〔Ⅳ〕

平成15年度業績目録

平成15年度 研究成果 (原著、総説)

著者氏名・発表論文名・学会雑誌名・発表年・巻号。最初と最後のページ

(主任研究者)

- 1 Kanagawa S, Morinobu A, Koshihara M, Kageyama G, Hayashi N, Yoshino S, Tokano Y, Hashimoto H, Kumagai S Association of the TAP2\*Bky2 allele with presence of SS- A/Ro and other autoantibodies in Japanese patients with systemic lupus erythematosus *Lupus*, 2003, 12 258-265
- 2 Yamada M, Yagita H, Inoue H, Takanashi T, Matsuda H, Munechika E, Kanamaru Y, Shirato I, Tomino Y, Matushima K, Okumura K, Hashimoto H Selective accumulation of CCR4+ T lymphocytes into renal tissue of patients with lupus nephritis *Arthritis Rheum*, 2003, 46 735-740
- 3 Tokano Y, Ogasawara H, Ando S, Fujii T, Kaneko H, Tamura N, Yano T, Hirokawa K, Fukazawa T, Murashima A, Kobayashi S, Sekigawa I, Takasaki Y, Iida N, Hashimoto H Cyclosporin A therapy for interstitial pneumonitis associated with rheumatic disease *Mod Rheumatol*, 2003, 12 305-310
- 4 Kobayashi S, Tamura N, Ikeda M, Sakuraba K, Matsumoto T, Hashimoto H Uveitis in adult patients with poststreptococcal reactive arthritis the first two cases reported associated with uveitis *HClin Rheum*, 2003, 21 533-535
- 5 Kogure T, Takasaki Y, Takeuchi K, Yamada H, Nawata M, Ikeda K, Matsushita M, Matsudaira R, Kaneda K, Terasawa K, Hashimoto H Autoimmune responses to proliferating cell nuclear antigen multiprotein complexes involved in cell proliferation are strongly associated with their structure and biologic function in patients with systemic lupus erythematosus *Arthritis Rheum*, 2003, 46 2946-2956
- 6 Bando H, Tamura N, Kobayashi S, Ohyanagi M, Ichimura Y, Tajima M, Haruta K, Hashimoto H Endothelial cell-binding antibodies in patients with systemic lupus erythematosus *Mod Rheumatol*, 2003, 13 44-49
- 7 Kusaoi M, Fukazawa T, Hirashima M, Morita Y, Yamaji C, Takai S, Takasaki Y, Hashimoto H A case of inclusion body myositis with systemic sclerosis *Mod Rheumatol*, 2003, 13 87-89
- 8 Ikeda K, Takasaki Y, Hirokawa K, Takeuchi K, Hashimoto H Clinical significance of antibodies to TS1-RNA in patients with mixed connective tissue disease *J Rheum*, 2003, 30 998-1005
- 9 Ichikawa Y, Kamatani N, Goto M, Kondo H, Saito T, Suzuki Y, Torikai K, Hashimoto H, Miyasaka N, Yamanaka H, Yamamoto K, Fukao A, Mizushima Y Phase II dose ranging study of leflunomide in Japan *J New Rem & Clin(新薬と臨床)*, 2003, 52 891-931
- 10 Kobayashi S, Yano T, Matsumoto Y, Numano F, Nakajima N, Yasuda K, Yutani C, Nakayama T, Tamakoshi A, Kawamura T, Ohno Y, Inaba Y, Hashimoto H Clinical and epidemiologic analysis of giant cell (temporal) arteritis from a nationwide survey in 1998 in Japan The first government-supported nationwide survey *Arthritis Rheum*, 2003, 49 594-598
- 11 Tsuchiya N, Kobayashi S, Kawasaki A, Kyogoku C, Arimura Y, Yoshida M, Tokunaga K, Hashimoto H Genetic background of Japanese patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis association of HLA-DRB1\*0901 with microscopic polyangiitis *J*

Rheum, 2003, 30 1534-1539

- 12 Nakiri Y, Kaneko H, Morimoto S, Suzuki J, Tokano Y, Hashimoto H Expression of NKB1 on peripheral T cells in patients with rheumatoid arthritis Clin Rheumatol, 2003, 22 305-308
- 13 Takaya M, Tamura N, Kato K, Kobayashi S, Haruta K, Tajima M, Hara M, Yang K, Tsuda H, Hashimoto H CD154 expression and mRNA stability of activated CD4-positive T cells in patients with systemic lupus erythematosus Mod Rheumatol, 2003, 13 220-226
- 14 Kobayashi S, Yano T, Inaba Y, Hashimoto H, Matsumoto Y, Tamakoshi A, Kawamura T, Ohno Y Ocular involvements of Japanese patients with giant cell arteritis from the first nation-wide survey (letter)
- 15 Kobayashi S, Tamura N, Ikeda M, Haruta K, Zhong B, Akimoto T, Tanaka M, Matsumoto T, Kawano T, Sakuraba K, Ichikawa G, Hashimoto H Poststreptococcal reactive arthritis and tonsillitis induced reactive arthritis International Congress Series, 2003, 1257 151-154
- 16 Kobayashi S, Tamura N, Makoto I, Haruta K, Tanaka M, Kawano T, Takaya M, Zhong B, Akimoto T, Sakuraba K, Matsumoto T, Hashimoto H Anterior uveitis and poststreptococcal reactive arthritis International Congress Series, 2003, 1257 231-234
- 17 Bando H, Kobayashi S, Matsumoto T, Tamura N, Yamanaka K, Yamaji C, Takasaki C, Takasaki Y, Hashimoto H Acute acalculous cholecystitis induced by mesenteric Inflammatory veno-occlusive disease (MIVOD) in systemic lupus erythematosus Clin Rheumatol, 2003, 22 447-449
- 18 Kobayashi S, Ishizuka S, Tamura N, Takaya M, Kaneda K, Hashimoto H Churg-Stauss syndrome (CSS) in a patient receiving pranlukast Clin Rheumatol, 2003, 22 491-492
- 19 Matsudaira R, Takeuchi K, Takasaki Y, Yano T, Matsushita M, Hashimoto H Relationships between autoantibody responses to deletion mutants of ki antigen and clinical manifestations of lupus J Rheum, 2003, 30 1208-1214
- 20 許 志泉, 戸叶嘉明, 松平 蘭, 金井美紀, 竹内 健, 高崎芳成, 橋本博史 シェークレン症候群における中国の診断基準の検討-感度と特異度について他の診断基準との比較 順天堂医, 2003, 48 495-504
- 21 許 志泉, 竹内 健, 松平 蘭, 金井美紀, 戸叶嘉明, 高崎芳成, 橋本博史 シェークレン症候群における抗SS-A/B抗体の二重免疫拡散法, ウェスタンブロット法の比較検討 日臨免会誌, 2003, 26 74-79
- 22 橋本博史 血管炎-アレルギー性肉芽腫性血管炎を中心として アレルキー, 2003, 52 481-484
- 23 橋本博史 血管炎の分類とANCA関連血管炎 リウマチ科, 2003, 29 217-221
- 24 橋本博史 アレルギー肉芽腫性血管炎 アレルキー科, 2003, 15 537-543
- 25 橋本博史 血管炎症候群の臨床 医学のあゆみ, 2003, 206 127-129
- 26 橋本博史 血管炎症候群-結節性多発動脈炎と顕微鏡的多発血管炎を中心に 今月の治療, 2003, 11 105-111

(分担当研究者)

- 1 Kondo H Editorial Autoimmune aspects of pulmonary hypertension in collagen vascular diseases Internal Med, 2003, 42 1163-1164
- 2 Okada J, Hamano Y, Kondo H Anti-U1RNP antibody and aseptic meningitis in connective tissue