

厚生労働科学研究費補助金

—厚生労働省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

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 越智隆弘

平成17(2005)年3月

厚生労働科学研究費補助金

—厚生労働省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

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 越 智 隆 弘

平成17(2005)年3月

目 次

I. 総括研究報告	3
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 越智隆弘 (資料) 研究計画書 組織図 患者様への説明・同意文書 倫理委員会承認書類	
II. 分担研究報告書	
I) RA 患者の骨粗鬆症の臨床疫学的研究	33
1. 関節リウマチにおける骨粗鬆症に関する研究 大阪市立大学大学院医学研究科 教授 西沢良記	
2. 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 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 吉川秀樹	
3. 関節リウマチ患者の骨粗鬆症評価における大腿骨骨密度測定的重要性に関する研究 国立病院機構相模原病院 リウマチ科 医師 中山久徳	
II) RA 骨吸収亢進病態解明研究	45
1. ヒト破骨細胞形成に関する研究 松本歯科大学・総合歯科医学研究所 教授 高橋直之	
2. ナース細胞機能に関わる分子の探索：ナース細胞で発現する新規遺伝子#4-14(SRCL)の機能解析に関する研究 国立病院機構相模原病院臨床研究センター 室長 鈴木隆二	
3. 関節リウマチの破骨細胞活性化亢進(とくに細胞融合による多核巨細胞化)の分子機構の解明に関する研究 国立病院機構大阪南医療センター 臨床研究部長 佐伯行彦	
4. 可溶性 RANKL 産生に関与する分子の網羅的検索に関する研究 東京大学医学部附属病院整形外科 講師 田中栄	
5. 骨髄脂肪蓄積細胞および分泌因子からの病態解明に関する研究 大阪大学大学院医学系研究科 教授・生命機能研究科 教授 下村伊一郎	
6. 関節リウマチ滑膜の血管新生における骨髄の役割に関する研究 帝京大学医学部内科 助教授 広畑俊成	
III) RA の病因解明研究	67
1. Epstein-Barr ウイルスの関節リウマチ骨髄での病的意義 日本大学医学部内科学講座血液膠原病部門 武井正美	
2. 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 大阪大学微生物病研究所 教授 野島博	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	77
IV. 研究成果の刊行物	85

I 平成16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 独立行政法人国立病院機構相模原病院・病院長

研究要旨：平成 16 年度の研究成果をまとめる。本研究は、RA 患者の臨床疫学、病態解明研究、病因解明研究を骨・関節破壊の角度から進めたものである。臨床疫学研究は骨粗鬆症という視点から、病態解明、病因解明研究は、従来からの厚生科学研究の成果をあげてきた骨髄病態解明の視点に重点をおいた。I) 臨床疫学研究； ①RA 患者には、一般高齢者に比べて、有意に高頻度、高度に骨粗鬆症と骨折が起きる。②RA 患者の骨密度は腰椎のみでなく、股関節や手首など傍関節部の評価が必要である。③RA 早期には手関節部の海綿骨に、炎症指数と相関する骨密度減少が認められ、適切な評価部位である。II) RA 病態解明研究； 1) RA 特異的破骨細胞形成の病態研究；異常活性化した単球が、ナース細胞機能を持つ線維芽細胞様細胞で構成される病巣によって維持、活性化され、骨破壊を導く病態を解明した。①ナース細胞特異的遺伝子解明、②CD14(+)細胞から前破骨細胞分化に到る過程解明、③破骨細胞特異的遺伝子解明を進めた。2) 既知の破骨細胞の RA 病態解明研究；①ヒト破骨細胞系樹立と PGE2、PTH などの効果解明。②RANKL shedding メカニズム解明、③破骨細胞 3) 骨髄内脂肪組織の骨破壊への影響、4) 病巣への血管侵入機序解明研究、III) RA 病因解明研究； 1) RA 患者骨髄液の選択的トランスクリプトーム解析により得た、RA 骨髄特異的遺伝子と、ヒト以外の（感染病原体の可能性のある）遺伝子を対象にした病因、病態解明研究。2) EBV の角度からの再検討。

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	独立行政法人国立病院機構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
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	独立行政法人国立病院機構大阪南医療センター 臨床研究部 部長

研究協力者：

中山 久徳	独立行政法人国立病院機構相模原病院リウマチ内科医員
前田 朋子	塩野義製薬株式会社創薬研究所 主任研究員
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
小田 剛紀	独立行政法人国立病院機構大阪南医療センター
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	独立行政法人国立病院機構盛岡病院整形外科 部長

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、高度な骨粗鬆症と引き続き起きる骨折が、関節機能障害に併せ発症していることが認識され始め、大きな社会問題として注目され始めた。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となっている。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、新たに、重度な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浮き彫りにされてきた。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3項目の柱に分けて、相互に関連しながら遂行してきた。I) RA患者の骨粗鬆症の臨床疫学的研究、II) RA患者の骨吸収亢進病態解明研究、III) RAの病因解明研究。

B. 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ド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、ビ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。これに関しては、両群の年齢を補正してZ scoreを用いて比較した。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、大阪市立大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が重症病型か軽症かは関節破壊の広がりでも評価した。

II) RA骨粗鬆症病態解明研究

患者試料； RA患者の手術前に十分なインフォームド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。ナース細胞樹立と遺伝子解析； 骨髄血の付着性細胞を採取して単クローン化し、特異的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。遺伝子解析にあたっては、RA-NLCと非RA-NLC細胞との間でcDNA subtractionを行い約400個のクローンにつき解析を行い、NLCで発現しているスカベンジャーレセプター様遺伝子(#4-14)を同定して解析を進めた。

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抗体ビーズとMACS Separatorを使い、CD14陽性細胞を分取した。

ヒト破骨細胞の樹立； 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 染色及びビトロネクチンレセプター (CD61) 抗体を用いた免疫染色により破骨細胞を検出した。また、CD14 陽性細胞を象牙切片上に撒き、M-CSF や RANKL の存在下で培養した後、象牙切片上の吸収窩を観察した。また、TGF β 、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。

骨髄脂肪蓄積細胞分泌因子採取； RA および OA 患者の手術時採取試料より、脂肪蓄積細胞分画を採取して total RNA を抽出し、RT-PCR 法にて約 30 種の遺伝子を採取して解析した。これらの遺伝子から発現される骨髄脂肪蓄積細胞分泌因子のうち破骨細胞抑制活性を検討した。

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、正常繊維芽細胞、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。次いで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繊維芽細胞由来の 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。同様にして、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。この中から RA 特異的な遺伝子解明と、人以外 (ウイルスの) の遺伝子も採取して発病との関連を解析する。

C. 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

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より、むしろ、大腿骨頸部や手首に顕著な骨密度減少が認められるのが特徴であることを明示した。

- ① 非 RA 高齢者骨密度、非 RA 膠原病患者骨密度との Z score の比較研究；西沢分担研究者は RA 患者に発症する骨粗鬆症は pQCT 法により、手首では早期から明らかであり、海綿骨の骨密度変化は RA の炎症指標と相関していることを明らかにした。そして全国津々浦々で測定可能な方法として CXD 法での評価を検討した。CXD 法による第二中手骨での骨密度は、同部の X 線所見変化が現れる前に明瞭な低下があり、有効な指標になることが明示された。中山研究協力者は RA 患者は非 RA 高齢者に比べ、腰椎 (-0.2+1.0/-0.1+1) では有意差なしであったが、大腿骨頸部 (-0.5+1.3/0.0+1.0)、大腿骨近位部全体 (-0.6+1.2/0.0+1.1) であり、RA 患者は非 RA 高齢者に比べ高度の有意差 ($p < 0.001$) で低値を示した。第 2 中手骨の骨密度も有意に低値であった ($p < 0.01$)。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。
- ② RA の重症度 (病型) との関連；吉川分担研究者は 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。一定期間 (7.7 ヶ月) での骨密度減少は、腰椎、大腿骨では有意差は見られなかったが、手関節部では有意の骨密度減少が認められた。
- 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、従来の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 (西沢分担研究者) 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た。

II) RA 骨粗鬆症病態解明研究

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常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が、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きた。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 14 年度に始まった本研究班では、RA 患者に特異的に認められる線維芽細胞様細胞（ナース細胞）、破骨細胞分化誘導の分子生物学的機序解明、破骨細胞の特性解明を進めるとともに、この破骨細胞系とマウスとの異同などの詳細解析に的を絞った。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。本研究の生体内の場である骨髄に見られる脂肪組織が骨吸収機序に及ぼす影響も研究の視野に入れてきた。この目的で、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。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ってきた。

① ナース細胞の分子生物学的解析；RA 患者病巣（骨髄、滑膜）の主要構成細胞である線維芽細胞様細胞（ナース細胞；RA-NLC）の主要機能である細胞の抱き込み(pseudoemperipolesis)に引き続く諸種の血球系細胞の反応などは既に報告してきた。RA の慢性病巣形成のキーを持つ細胞としての RA-NLC 機能も既に報告してきた。RA 特有のこの細胞を標的に治療法開発を進める一歩として、RA-NLC の特異抗原を探した。RA-NLC と非 RA-NLC 細胞との間での cDNA subtraction による約 400 個のクローンから選んだスカベンジャーレセプター様遺伝子(#4-14)を同定して解析を進めた。#4-14/SRCL は 472 アミノ酸残基から成

り、スカベンジャーレセプター(SRA)とはアミノ酸レベルで 27%相同であった。NLC 以外にはヒト血管内皮細胞で発現していた。発現する生理学的活性の解析を進めている。

②破骨細胞の研究；

(i) RA 患者特異的な破骨細胞分化について；

(A) 前破骨細胞への分化；RA 患者骨髄の未分化細胞から特異な破骨細胞分化を試みた。RA 患者骨髄単核球のうち約 80%の CD14(+)細胞が存在し、その半数が CD11a(-)であり、GM-CSF 刺激により TRAP(+)多核巨細胞になる。CD14(-)細胞のうち CD64(+)細胞は RA-NLC との共培養により、約 4 週間で、その 90%近くが CD14(+)CD11a(-)TRAP(+)の多核巨細胞になった。

(B) RA 特異的破骨細胞分化；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 のコード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トティングおよび免疫組織染色で確認された。これをターゲットに RA による骨吸収抑制治療薬の開発に向かう。

(ii) 非 RA 対照の破骨細胞について；

(A)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

かつビ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 β は促進し、SB203508 は阻害した。

(B) TNF α と M-CSF の添加により、ヒト破骨細胞は誘導された。

(C) PGE $_2$ は RANKL と M-CSF によるマウス破骨細胞形成を促進するが、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一つの現象である。

③ 骨髄脂肪蓄積細胞および分泌因子の骨吸収機序に対する効果； RA 患者の脂肪蓄積細胞分画に発現される骨髄脂肪蓄積細胞分泌因子を採取し検索を進め、その一つが、RA 特有の破骨細胞形成を完全に阻害した。骨髄脂肪組織の病態機序解明を進めるとともに、創薬への検討を進めている。

④ 病巣への血管新生； 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。

Ⅲ) RA の病因解明研究；

① 関節リウマチ特異的遺伝子の解明

(i) RA-1； RA 患者の約 80%の患者が非 RA 対照の約 30 倍の高値の発現量を示した。RA の重症度と関連しているようだ。

(ii) RA-5； RA 患者の約 60%の患者が非 RA 対照の約 20 倍の高値の発現量を示した。RA の重症度と関連しているようだ。

(iii) RA-9； RA 患者の約 60%の患者が非 RA 対照の約 20 倍の高値の発現量を示した。

② 膠原病遺伝子の解明

RA-8； RA 以外の膠原病にも発現している遺伝子。

③ ヒト以外の遺伝子の発現

Human genome 煮登録されていない遺伝子が十数種類単利されているが、その一つは RA 骨髄液特異的に発現されており、病因微生物の可能性もあり、今後と

も検索を続ける。

④ EBV と RA；

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。

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原発性骨粗鬆症による骨粗鬆症より明らかに顕著な骨粗鬆症が認められた。RA 特徴的な骨粗鬆症部位は股関節、手関節などの関節近傍であり、一方、腰椎は非 RA 対照との有意差が明瞭でない。従って、RA 患者の骨密度評価は、加齢により骨密度が低下する腰椎骨と、RA 特徴的な骨粗鬆症部位としての大腿骨頸部あるいは近位部、そして手首などの骨密度測定が必要となる。RA 患者特有の骨密度低下は手関節海綿骨に先ず有意になり、炎症反応値と相関する。薬物治療の効果は手関節海綿骨で判別しやすいと考えられる。ステロイド投与は骨密度減少に影響を及ぼすことは明瞭と考えられるが、RA 患者疾患特有の骨吸収レベルに対して、ステロイド投与がどの程度の影響を及ぼしているかの判断は困難である。

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が、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。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一様なものでなく、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が示された。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が、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が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

- 1、RA 患者には疾患特異的に骨粗鬆症が広く認められる。骨量の減少は、原発性骨粗鬆症と異なって、腰椎より、むしろ大腿骨近位部に特徴的で診断時に留意が必要である。骨折頻度も高く、今後のRA 対策として重要な事項が明示された。
- 2、RA 患者の骨脆弱性を引き起こすのは骨髄病態によると考えられる。いわゆるマース細胞と破骨細胞の分子病態機序解明が新たに推進されたが、創薬への更なる研究が急がれる。
- 3、RA 病態、あるいはRA そのものを引き起こしている可能性のある候補遺伝子が抽出された。原因遺伝子特定が緊急課題となった。

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

研究責任者（所属・職名・氏名）

国立相模原病院臨床研究センター・センター長・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が、関節リウマチに伴う骨髄病態によって、加齢に依るものより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・外とも未解明であり、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依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球細胞と、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。種々の血球細胞と線維芽細胞様間質細胞ともに造血系の腸骨骨髄に於いて異常活性化され、更に全身性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が考えられている。

軽症リウマチに見られるリンパ球系機能亢進に、更に機能亢進誘発の閾値が高い破骨細胞や骨髄球系細胞などの異常増殖・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症の状態に陥り、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。

更に、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化因子(ODF)に依存しないことが判明し、分化段階でODFに依存する既知の破骨細胞とは異種の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は異なるものならば、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ている。

「リウマチの主病巣が骨髄」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、日米の共同研究体制で解明を急ぐことがNIHの主任研究者であるリプスキー博士などから求められている。以上のような背景のもと、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

関節リウマチ患者は世界中で人口の0.5- 1%の発症があるといわれ、日本では約70万人の発症とされている。社会の高齢化に伴い、加齢だけではお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し社会問題になりかけている。本研究ではこの関節リウマチ・骨粗鬆症更に対照疾患としての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いる。

- (1) 疫学的実態調査研究： 関節リウマチ患者には、加齢という要因だけでは考えられない顕著な骨量減少がおきることが予備研究により認められている。この実態を国立相模原病院、東京大学整形外科教室、大阪大学整形外科教室などの国公立診療・研究施設が共同で実態調査する。
- (2) 骨形成・吸収の分子生物学的研究： 関節リウマチ患者では、骨髄中の線維芽細胞様間質細胞に支持され分化してくる新規未知のODF非依存性破骨細胞の顕著な分化がおきていることが見いだされた。従来から知られていた既知破骨細胞との比較の上で、関節リウマチ患者の破骨細胞研究が急務である。既知の破骨細胞に関しての著明な研究で知られる松本歯科大学、東京大学整形外科のグループと、新たな破骨細胞を進めてきた国立相模原病院、大阪大学整形外科のグループとが共同で関節リウマチをめぐる破骨細胞動態の解明を基本に、関節リウマチ・骨粗鬆症そして対照疾患である変形性関節症などの骨形成・吸収病態解明の研究を上記施設などの国公立診療・研究施設が共同で進める。本研究推進には手術時切除組織片、骨髄血、末梢血などの確保が必要である。
- (3) 骨髄病態研究： 関節リウマチの主病巣としての骨髄研究を続けてきたが、特に本研究では未知の破骨細胞等々における血液細胞の増殖・分化などの異常亢進と、慢性化に必須の線維芽細胞様間質細胞分化・機能亢進誘発に関わる骨髄細胞病態の研究を進める。更に視点を広げて、加齢や関節リウマチに伴う骨髄変化（脂肪髄など）と骨粗鬆症、関節破壊病態との関連などを広く検討する。国立相模原病院、国立大阪南病院、大阪大学生命機能研究科、米国国立研究所(NIH)、市立池田病院、行岡病院、協和会病院、武田薬品工業株式会社研究所などの国公立診療・研究施設が共同で解明研究を進める。この目的には関節リウマチ、変形性関節症、骨粗鬆症その他の手術時に切除した組織片、骨髄血、末梢血などの確保が必要である。
- (4) 関節リウマチの病因解明の研究： 関節リウマチの諸病態を引き起こす原因（病因）として諸研究が成されてきたが、本研究では特に、EBウイルスによる細胞生物学的病態解明研究および患者骨髄血中、末梢血中のウイルス由来mRNA検索を進めるものである。国立相模原病院、帝京大学内科、日本大学、大阪大学微生物研究所などの国公立診療・研究施設が共同で解明研究を進める。この目的には、リウマチ患者の手術時切除組織片、骨髄血、末梢血などの確保が必要であり、遺伝要素検索研究のために担当基幹施設における倫理委員会の承認が必要となる。
- (5) 高度な骨・関節破壊発生の力学的機序の研究： 高度な骨粗鬆症の骨がどのような機序で骨・関節あるいは脊椎破壊に陥ってゆくかをバイオメカニクス面から解析して再建治療の基本論を得る。慶応大学整形外科、大阪大学整形外科などの国公立診療・研究施設が共同で解明研究を進める。
- (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。これは武田薬品工業株式会社研究所で行う。また、発症している骨粗鬆症に対する対症療法として人

工骨およびその使用形態開発研究を進める。これは大阪大学整形外科が開発研究を進める。これらの研究目的には、本研究班で確保できるあらゆる検体あるいは細胞、蛋白、遺伝要素を治療研究開発グループに供給する必要がある。

本研究の目的

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。

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、末梢血など。
- (2) 試料等の保存： 取得後 -80°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蛋白・遺伝子サンプルはコード番号を付け、鍵付き冷凍庫に保管する。また、試料のデータは電子媒体で管理し、共同研究機関および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： 取得試料を公知の手法により細胞生物学的解析する。
- (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。

研究期間

2002年7月25日 ～ 2005年7月31日

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蛋白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。

本研究協力依頼の対象症例選択基準

- (1) 対象疾患： 研究協力施設において手術が行われた関節疾患症例を対象とする。
- (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が臨床的に診断され、機能再建目的などで手術を受ける患者のうち、手術時切除標本、骨髓液、血液などの試料を採取し研究目的で用いることに関して文書で説明し、本人（本人死亡の場合には代諾者）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： 該当無し。

(5)検査および評価項目： 該当無し。

(6)モニタリング： 該当無し。

(7)除外基準：

- HBs抗原、抗体いずれかが陽性である患者
- HCV抗体またはHCV-RNA陽性である患者
- その他、健康人に重篤な感染症を引き起こす可能性のある患者
- 主治医が本研究遂行上、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、骨髓血、末梢血などの試料に関して本研究への使用を依頼し関連する書類を手渡す。患者が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出する。

(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は創薬研究に資す。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。

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。研究実施終了後に共同研究機関との協議の上、全ての試料および試料から得られた細胞・蛋白・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。保存の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封容器に廃棄するか、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

データの集積および解析

(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的評価基準による。

(2)患者およびデータの取扱い： データ解析の後、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。

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もとに公表する。

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) 説明項目等： 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)
 - A. 手術時切除組織片、骨髓血、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の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。
 - B. 本研究から得られた結果をもとに国公立（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。
 - C. 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。
 - D. 遺伝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。
 - E. 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。
 - F. 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。
 - G. 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、試料提供についての同意を依頼する。患者本人が試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。既に採取保存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。説明文書を同意書（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、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研究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が、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。

研究資金の調達方法

厚生科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患・治療・研究事業)その他の研究費

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。

- (1)疫学的実態調査研究： 国立相模原病院（越智隆弘センター長）、東京大学整形外科学教室（中村耕三教授）、大阪大学整形外科学教室（吉川秀樹教授）などの国公立診療・研究協力施設。
- (2)破骨細胞の分子生物学的研究： 国立相模原病院（越智隆弘センター長）、松本歯科大学（高橋直之教授）、東京大学整形外科学教室（中村耕三教授）、大阪大学整形外科学教室（吉川秀樹教授）などの国公立診療・研究協力施設。
- (3)骨髄病態研究： 国立相模原病院（越智隆弘センター長）、大阪大学整形外科学教室（吉川秀樹教授）、大阪大学生命機能研究科（下村伊一郎教授）、国立大阪南病院（米延策雄副院長）、市立池田病院（島岡康則部長）、行岡病院（行岡正雄院長）、協和会病院（中村宣夫部長）、武田薬品工業株式会社（鈴木隆二主席研究員）などの国公立診療・研究協力施設、および米国国立研究所(NIH) (Dr Peter Lipsky)。
- (4)関節リウマチ病因解明の研究： 国立相模原病院（越智隆弘センター長）、国立大阪南病院（米延策雄副院長）、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（広畑竣成助教授）、日本大学内科（武井正美教官）などの国公立診療・

研究協力施設。

- (5)骨粗鬆症に関わるバイオメカニクス解析研究： 慶応大学整形外科（戸山芳昭教授）、大阪大学整形外科学教室（吉川秀樹教授）などの国公立診療・研究協力施設。
- (6)根治薬剤開発研究： 武田薬品工業株式会社（鈴木隆二主席研究員）
- (7)骨強化人工骨開発研究： 大阪大学整形外科学教室（吉川秀樹教授）

臨床担当研究者：施設名

研究者名

解析担当者：施設名

研究者名

文献

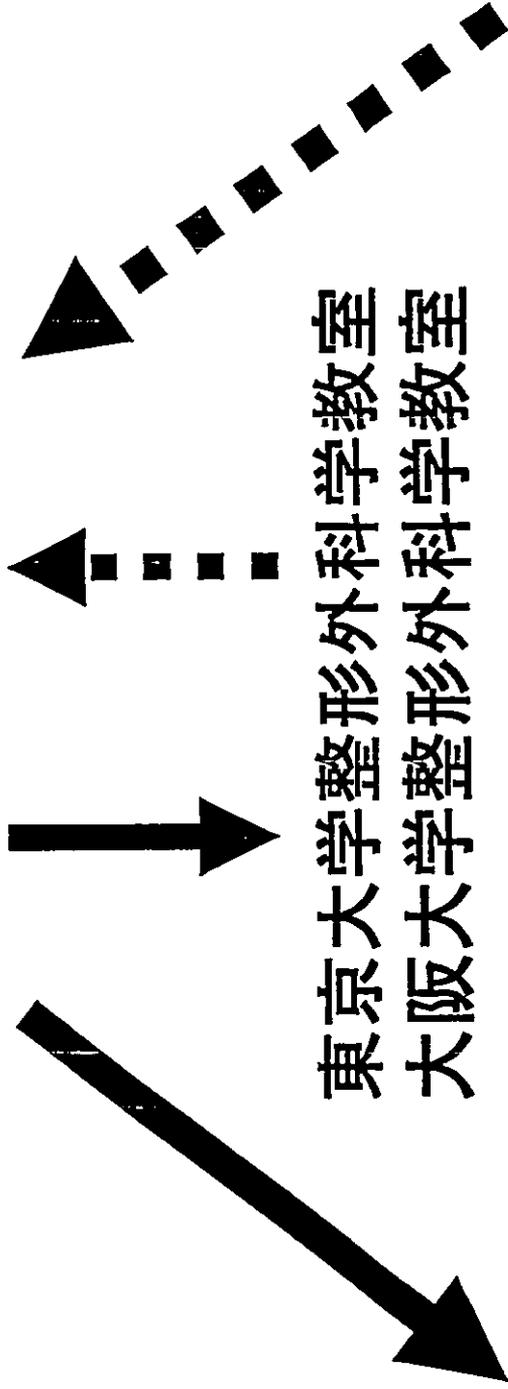
- (1) Toyosaki-Maeda T, Takano H, Tomita T, Tsuruta Y, Maeda-Tanimura M, Shimaoka Y, Takahashi T, Itoh T, Suzuki R, Ochi T: Differentiation of monocytes into multinucleated giant bone-resorbing cells: two-step differentiation induced by nurse-like cells and cytokines. Arthritis research. 2001 Vol. 3 Number. 5. 2001
- (2) Hayashida K, Shimaoka Y, Ochi T, Lipsky PE. Rheumatoid arthritis synovial stromal cells inhibit apoptosis and up-regulate Bcl-xL expression by B cells in a CD49/CD29-CD106-dependent mechanism. J Immune. Jan 15; 164(2): 1110-6. 2000
- (3) Tomita T, Takeuchi E, Toyosaki-Maeda T, Oku H, Kaneko M, Takano H, Sugamoto K, Ohzono K, Suzuki R, Ochi T. : Establishment of nurse-like stromal cells from bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: indication of characteristic bone marrow microenvironment in patients with rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford). Sep; 38(9): 854-63. 1999
- (4) Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ: Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. Endocr Rev 20:345-357, 1999
- (5) Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Higashio K, Martin TJ, Suda T: Tumor necrosis factor a stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANKL interaction. J Exp Med, 191:275- 286, 2000
- (6) Kotake S, Udagawa N, Hakoda M, Mogi M, Yano K, Tsuda E, Takahashi K, Furuya T, Ishiyama S, Kim KJ, Saito S, Nishikawa T, Takahashi N, Togari A, Tomatsu T, Suda T, Kamatani N: Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients. Arthritis Rheum, 44:1003-1012, 2001

その他、多数あり。

(7) Hirohata S, Yanagida T, Nagai T, Sawada T, Nakamura H, Yoshino S, Tomita T, Ochi T: Induction of fibroblast-like cells from CD34+ progenitor cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. *J. Leukoc. Biol.* 70:413-421, 2001

(8) Hirohata S, Yanagida T, Nakamura H, Yoshino S, Tomita T, Ochi T.: Bone marrow CD34+ progenitor cells from rheumatoid arthritis patients support spontaneous transformation of peripheral blood B cells from healthy individuals. *Rheumatol. Int.* 19:153-159, 2000

国立相模原病院臨床研究センター



松本歯科大学
大阪大学生命機能研究科
帝京大学内科
日本大学内科
武田薬品工業株式会社
米国立研究所(NIH)

国立大阪南病院
市立池田病院
行岡病院
協和会病院

患者資料の提供

研究目的での資料の供給

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、武田薬品工業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。