

3, この研究への御協力をお願いするにあたって

関節リウマチ、骨粗鬆症さらに対照疾患としての変形性関節症などの関節疾患で未だ不明の、なぜ病気が起きるのかの原因、なぜ高度な骨・関節破壊や骨粗鬆症が起きるのかの病態を解明して、その結果に基づいて根本的治療薬を開発するために、国内外の有力な研究者による研究班が作られました。

あなたは関節疾患に罹って手術を受けられますが、その時に切除した病的な部分を研究材料として使わせて頂きたいと共に、血液（5-10ml）と腸骨骨髓血（5-10ml）を採取してあなたに起きている病変を正確に把握させて頂きたいのです。

次に、あなたに研究への御協力をお願いするに当たって御理解頂きたい事項について順次御説明します。

1) 研究協力はあなたの任意ですし、撤回もできます

研究協力に同意されるかどうかは任意です。あなたの自由意志で決めて下さい。研究協力に同意されてもされなくても、当院では同じように最善の医療を提供します。

一旦同意された場合でも不利益を受けることなく、いつでも一方的に文書により同意を撤回することが出来ます。その場合は提供いただいた組織、血液、腸骨骨髓液や研究結果は破棄され、診療記録もそれ以降は本研究のために用いられることはありません。ただし同意を撤回したとき既に研究結果が論文などで公表されていた場合や試料等が誰のものか完全に分からないようにする連結不可能匿名化されていた場合など、研究結果を破棄できない場合があります。

2) なぜ、あなたに御願しているか

この研究では、関節リウマチや変形性関節症などの関節疾患で手術を受けられる方に研究の協力をお願いしています。

3) 代諾者が選定されることもあり得ます

患者本人が不幸にして既に死亡している場合でも、御本人に生前頂いた医学研究に対するインフォームドコンセントおよび御自身の組織を提供する意思が明らかな場合に限り、代諾者に手術時試料を用いての研究に対する協力・同意をお願いしています。

4) 研究の方法、期間、試料等の種類

方法：手術時に切除した関節病変組織、血液、腸骨骨髓液から病理学所見、細胞、蛋白、遺伝子発現などを解析し、関節疾患の病因、骨・関節破壊機序、炎症持続や関節破壊の重症度、疾患の予後とどのような関係があるのかを検討し、その結果に基づいて根本的治療薬開発へと研究を進めます。

期間：平成14年7月25日(申請が許可された時点)から平成17年3月31日までを予定しています。

試料：手術切除された病的組織、腸骨骨髓血と血液を使用します。

5) 予想される研究結果

関節リウマチに伴う骨・関節破壊、高度な骨粗鬆症の原因が解明されて画期的治療薬開

発が期待されます。

6) 研究責任者の氏名、職名及び所属名：

病院名・役職名

氏名

4 試料等を提供した人にとって予想される結果と、危険、利益及び不利益について

提供いただいた病的組織は、治療の一環として行われる外科手術の時に摘出した組織を用いますので、この研究によって提供者に負担が掛かることは一切ありません。血液は血管から、骨髓血は手術時に腸骨穿刺させて戴きますので痛みも危険もありません。

この研究では、多くの方々の協力を得て、関節リウマチなどの病的組織、血液、骨髓液などを総合的に調べるものです。この結果、なんらかの結果が見出されたとしても、その意義を明らかにし、実際に応用するには、更に多くの研究の積み重ねが必要です。したがって、あなたからの試料の解析結果だけからでは、あなたの治療などに有益な結果が出る可能性は極めて低いので、あなた御自身に利益はありません。

この研究では、研究者が誰の試料を解析しているか分からないように、6の項で述べる匿名化などを行なって、個人情報を厳重に管理します。万一、試料解析の結果によって将来の就職・結婚・保険への加入などに関して、思いがけない不利益が生じる可能性がないように厳密な注意を払う為です。

5 あなたが研究計画などを見ることができます

あなたが希望すれば、個人情報の保護や研究の独創性の確保に支障を来さない範囲内で、この研究計画の内容を見ることができます。

6 あなたの個人情報は保護されています

試料解析の結果は、他人に漏れないように取扱いを厳重にしています。解析の開始前に、あなたの検査結果や診療情報からは住所、名前等が削られ、代わりに新しい符号がつけられます。これを暗号化といいます。

新しい符号とあなたとを結びつける対応表は、当院の研究責任者が厳重に管理します。これを連結可能匿名化といいます。こうすることによって、あなたの試料解析を行なう者には符合しか分からず、誰の試料を解析しているのか分かりません。ただし、結果を本人に説明する場合には、研究責任者がこの符号を元に戻します。

また採取した組織を他施設で解析する場合には、一旦国立相模原病院臨床研究センターに集め、本研究班全体としての匿名登録した上で必要な研究機関に送り共同研究を進めることとなります。その過程でも一貫して、あなたの試料の解析を行なう者には符合しか分からず、誰の試料を解析しているのか分かりません。

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が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があります。

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があります、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があります、試料提供者にはこれについても権利がありません。

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があります。

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、あなたが同意していただければ、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 国立相模原病院臨床研究センター センター長

3, 共同研究者

国立相模原病院臨床研究センター関係者	臨床研究センター	センター長
中村耕三教授	東京大学整形外科学教室	教授
吉川秀樹教授	大阪大学整形外科学教室	教授
戸山芳昭教授	慶応大学整形外科	教授
高橋直之教授	松本歯科大学	教授
下村伊一郎教授	大阪大学生命機能研究科	教授
野島博教授	大阪大学微生物病研究所	教授
広畑峻成助教授	帝京大学内科	助教授
武井正美講師	日本大学内科	講師
米延策雄副院長	国立大阪南病院	副院長
島岡康則部長	市立池田病院	部長
行岡正雄院長	行岡病院	院長
中村宣夫医長	協和会病院	部長
鈴木隆二主席研究員	武田薬品工業株式会社	主席研究員

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) 対象および方法

(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の研究：関節リウマチ病因研究としてEBウイルスに的を絞った研究をする。手術時切除組織片、骨髓血、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：バ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工骨開発・使用研究を進める。この目的には、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) 実施場所及び実施期間

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)骨髄病態研究：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)、武田薬品工業株式会社研究所など。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、市立池田病院、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：武田薬品工業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工骨開発・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が、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するなどのため、研究内容の妥当性の承認を得ることが必要である。

5 倫理的配慮

(1) 人権の擁護

(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、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が、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の病態、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。特に遺伝子関連研究においては、厳格に文書で説明を行い、署名でもって同意を求める。

6 その他の参考事項

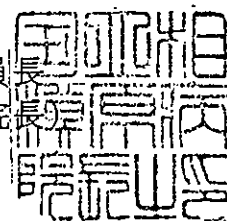
本研究は平成2年以来の厚生科学研究、平成8年以来の医薬品機構研究の結果に基づき、続けられる企画の研究である。

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だき、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 デ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 分担研究報告書 (3年総合)

I) RA 患者の骨粗鬆症の臨床疫学的研究

研究課題：関節リウマチにおける骨粗鬆症に関する研究

分担研究者：所属機関 大阪市立大学大学院医学研究科
氏名 西沢良記

1 研究目的

関節リウマチ(RA)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局所性に大別され後者の中で傍関節性骨粗鬆症が特徴的とされている。これらの発現時期、発症機序は異なると考えられる。従ってRA患者の病期、活動性および測定部位をかえることにより詳細な病態の検討が可能であると考えられる。昨年度は、早期RA患者において、すでに橈骨遠位端の海綿骨骨密度が他の部位に先んじて著明に減少しており炎症マーカーと負の相関をしめし、炎症性骨吸収因子の影響を受けていることを明らかにした。今回は、活動期のRAにおいてレ線像の進行度と骨密度の関係をCXD法を用いて検討した。さらに、疾患活動性のコントロールが安定した症例において各部位での骨密度と身体活動性の関係を検討した。以上より、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。

2 研究方法

(1) 外来通院中の疾患活動性の認められる女性RA患者62例において帝人社製ボナライザーIIを用い、両手第二中手骨骨密度(m-BMD)および橈骨遠位端骨密度(r-BMD)を測定し、握力、X線ステージとの相関を検討した。さらに外来通院中の女性RA患者、50例、平均年齢、 56.6 ± 13 才(18-72)において、m-BMDを測定し、その年間減少率とESR、CRP、血清AL-P値、尿中カルシウム・クレアチニン比(U-Ca/U-Cre)などの疾患活動性および骨代謝パラメータおよびADL(日本リウマチ学会薬効判定委員会の評価表を使用)、握力などの上肢機能の指標との相関を検討した。

(2) 外来通院中の炎症コントロール良好(CRP < 1.0mg/dl)な女性リウマチ患者41例(年齢 57.2 ± 10.7 歳)において腰椎(L-BMD)、橈骨遠位1/3(R1/3-BMD)及び大腿骨頸部(N-BMD)をQDR-4500にて測定し関節障害度の指標であるLarsen's damage scoreと身体活動性の指標であるHAQ scoreとの相関を検討した。

(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開示せず、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が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。

3 研究結果

(1) RA患者のBMDは健常者に比し著明に減少していた。測定間のCV値は3%以内であった。m-BMDはレ線ステージと有意な負の相関を示し($R = -0.35$, $P < 0.01$)、機能障害程度に比例した荷重の減少が皮質骨の減少に反映していると考えられた。r-BMDは握力と正の相関を示した($R = 0.22$, $P < 0.05$)。海綿骨優位の橈骨は炎症などの骨代謝に影響する因子をよく反映することより、ここでの握力の低下は強い炎症による疼痛などを反映している可能性が考えられた。また左右差の著しい群では特にレ線ステージに左右差があるものが多かった。RA患者のmBMDは測定時点のESR、CRPとは有意な相関を示さなかったが、mBMD年間減少率は追跡期間の平均ESR($R = 0.69$, $P < 0.0001$)、平均CRP($R = 0.57$, $P < 0.0001$)と有意な相関を示した。一方、骨代謝の指標と考えられる平均AL-P、平均U-Ca/U-Creとは相関はみられなかった。さらに、mBMD年間減少率はADL($R = 0.36$, $P = 0.028$)および握力の低下率($R = 0.51$, $P = 0.001$)とも有意な相関を示し、骨代謝の変化よりも疾患活動性にともなう機能障害による荷重の減少などの局所的な因子を反映していると考えられた。

(2) 日常生活動作レベルを反映するHAQ scoreはN-BMDと有意な負の相関($R = -0.95$, $P < 0.05$)を示したが、R-BMD、L-BMDとは相関は見られなかった。関節破壊の進行度(疾患の重症度)を示すLarsen's damage scoreと骨密度との相関は見られなかった。

4 考察

早期 RA における pQCT による検討と同様、進行期の CXD 法による検討においても海綿骨優位である橈骨遠位端骨密度はレ線ステージが進行し関節障害が見られる以前より強く進行していることが明らかになった。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の多い橈骨遠位端により大きく作用していることが示唆された。一方、中手骨の骨密度は、皮質骨有意な部位であり機械的刺激の影響をより強く反映するため、レ線ステージの進行とそれに伴う手指機能の低下に伴い徐々に低下すると考えられた。RA では大腿骨頸部、踵骨の骨密度低下において身体活動性の低下が関与したが、腰椎においては身体活動性を反映しなかった。健常者では身体活動性と腰椎骨密度が有意に相関するが、RA 患者ではこれとは異なり、単なる重力による荷重ではなく筋力を使った荷重運動がより重要な役割を果たしていることが示唆された。また、RA では心血管病変による死亡率が健常人に比して高いことが知られているが、RA 罹患が頸動脈の内膜中膜肥厚度に対して独立した危険因子であること、さらに RA における動脈硬化の進行度が傍関節部骨密度と負の相関を示すことを見い出しており、このことから、RA において傍関節性骨粗鬆症の進行を抑制することは心血管障害の抑制につながる可能性があると考えられる。

5 評価

1) 達成度について

計画した目標において必要十分な研究結果が得られたと考えられる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

これまで経験的にとらえられていた RA 患者における骨粗鬆症の特徴が科学的に明確になった。世界に先駆けた研究結果であり RA のみならず続発性骨粗鬆症の研究、対策の発展に及ぼす意義は大きいと考えられる。

3) 今後の展望について

RA 患者の骨粗鬆症の病態が明らかになったことからそれらの発症機序、対策、さらには血管合併症、生命予後との関連などについての研究を展開できるものと考えている。

4) 研究内容の効率性について

研究はプロトコール通り行われ、効率的に統計解析に必要な十分なデータの集積が行われたと考えられる。

6 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が特徴であるが、早期 RA においては、全身性の骨粗鬆症に先じて既に有意な骨傍関節部の骨密度の低下が認められること、炎症が強く関与することが明ら

かになった。一方、四肢、手足部の骨密度は、躯幹部の骨密度と異なり身体活動性の影響を強くうけることが明らかになった。さらに傍関節部骨粗鬆症は動脈硬化の危険因子であることも示唆され、早期からの積極的な RA の疾患コントロールと続発性骨粗鬆症に対する対策が RA 患者の予後改善に重要であると考えられる。

7 研究発表

1) 国内

口頭発表	3 件
原著論文による発表	0 件
それ以外 (レビュー等) の発表	0 件
そのうち主なもの 論文発表	

学会発表

踵骨音響的骨評価値 (OSI) はリウマチ患者において ADL の低下に伴い早期より減少する
第 6 回日本骨粗鬆症学会
2004 年 11 月 19 日 さいたま市

コントロールの安定した関節リウマチ (RA) 患者における骨密度とそれに影響を及ぼす因子の検討
第 6 回日本骨粗鬆症学会
2004 年 11 月 19 日 さいたま市

関節リウマチ患者の骨量の低下と動脈硬化の関連性
第 6 回日本骨粗鬆症学会
2004 年 11 月 19 日 さいたま市

(著者・題名・発表誌名・巻・頁・発行年等も記入)

2) 海外

口頭発表	0 件
原著論文による発表	3 件
それ以外 (レビュー等) の発表	0 件
そのうち主なもの 論文発表	

Kumeda, Y., Inaba, M., Goto, H., Nagata, M., Henmi, Y., Furumitsu, Y., Ishimura, E., Inui, K., Yutani, Y., Miki, T., Shoji, T., Nishizawa, Y. Increased thickness of the arterial intima-media detected by ultrasonography in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 46(6): 1489-97, 2002

Nagata-Sakurai, M., Inaba, M., Goto, H., Kumeda, Y., Furumitsu, Y., Inui, K., Koyama, H., Emoto, M., Ishimura, E., Shoji, T., Nishizawa, Y. Inflammation

and bone resorption as independent factors of accelerated arterial wall thickening in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 48(11): 3061-7, 2003

Yamada, S., Inaba, M., Goto, H., Nagata, M., Ueda, M., Nakatuka, K., Tahara, H., Yokoyama, H., Emoto, M., Shoji, T., Nishizawa, Y. Significance of intima-media thickness in femoral artery in the determination of calcaneus osteo-sono index but not of lumbar spine bone mass in healthy Japanese people. Osteoporos Int 2004 in press

学会発表

(著者・題名・発表誌名・巻・頁・発行年等も記入)

8 知的所有権の出願・取得状況 (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

研究課題: 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

分担研究者: 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

－基礎研究－

関節リウマチ(RA) 滑膜間質系細胞の破骨細胞分化誘導を介した骨破壊機序の解明

1. 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が、近年骨破壊の中心を担っているのが破骨細胞であることが明らかになってきている。これまでに RA 間質系細胞は末梢血中の単核を支持し、単核の TRAP 陽性細胞へと分化誘導することを見だし、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。今回の研究では、この 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と、この細胞の骨軟骨破壊への関与を明らかにすることを目的とした。

2、3. 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 陽性単核(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が明らかとなった。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が判明した。

・ 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(VD₃、PTH、PGE₂、Ca²⁺)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が、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。

・RA 間質系細胞の CD14+PBMC を維持に M-CSF が必要か？

RA 間質系細胞による CD14 維持は M-CSF 中和抗体で抑制された。

・RA 骨破壊病巣部の免疫組織染色学的検討
M-CSF 陽性細胞が多数存在し、同部で monocyte/macrophage(CD68 陽性細胞)が多数認められた。

4. 考察

今回の結果より RA 間質系細胞は、M-CSF を恒常的に発現しつつ 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で維持していることが判明した。一方、RA 患者パンスの組織学的検討でパンス組織内に多数の単核の TRAP 陽性細胞が存在し、またパン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た。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た。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)が、骨芽細胞や T 細胞などが発現する RANKL 刺激により破骨細胞への分化する細胞としてパンス組織での急速な骨破壊に関与していると考えられる。

－臨床研究－

関節リウマチ(RA)患者の末梢骨、中枢骨の骨密度変化に関する縦断的研究

1. 研究目的

RAに見られる二次性骨粗鬆症は、全身性骨粗鬆症と傍関節性骨粗鬆症が重なりながら、全身いたる部位の骨折のリスクが増加する。しかしRA患者の骨密度減少に関与する因子は年齢、罹病期間、体格指数(BMI: body mass index)、全身の関節破壊の評価に基づくRAの病型評価、運動機能分類(class)、ステロイド投与の有無、ステロイド服用量、骨粗鬆症治療薬、閉経の有無、炎症マーカー(CRP)など極めて多岐にわたり、RA患者での骨密度減少に影響する因子の体系的な理解がされるに至っていない。この研究では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、それぞれの骨密度減少に関与する因子を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

臨床的な経過を詳細に評価する検討方法を取り、患者に特別に負担を強いる研究ではなかったが、そのデータ取り扱いにあたりプライバシーの保護に細心の注意を払い、基本データベースの保存はパスワード設定ファイルとし、データ解析は匿名化を行なったデータで行なった。

罹病期間が7年以上の閉経後女性RA患者51名(平均年齢62.5±9.1歳、罹病期間7.0 - 42.3年・平均18.6年、ステロイド使用中31名)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とした。ビタミンDの非投与患者に対しては新たにビタミンD投与開始を行い観察した。骨密度はDXA(Lunar社製DPX-L)にて腰椎、大腿骨を、pQCT(ScancoMedical社製Densiscan-1000)で橈骨、脛骨の遠位及び骨幹部を、平均追跡期間7.7±2.5ヶ月で2回測定した。

3. 結果

・末梢骨と中枢骨の比較

腰椎、大腿骨では7.7ヶ月間に有意な骨密度減少はみられなかった。一方、pQCTで測定した末梢骨骨密度では橈骨遠位-2.1±4.8%、橈骨骨幹部-2.4±4.8%、脛骨骨幹部-1.2±3.3%の有意な減少が見られた。橈骨と脛骨の末梢骨間には減少率に有意な

正相関が見られたが、大腿骨と末梢骨、腰椎と末梢骨間には骨密度減少率の相関は見られず、末梢骨の骨密度の変化と、中枢骨の骨密度の変化は独立していた。

・中枢骨骨密度変化に影響する因子の検討
年齢、BMI、RA罹病期間、RA重症度、運動機能分類(class)、観察期間中のステロイド服用の有無、ステロイドの1日服用量、ビタミンD投与状況(新規投与開始例か継続投与例か)、CRPを説明変数として、腰椎、大腿骨の骨密度変化率に対する影響を検討した。多重回帰分析により有意な影響力が示された因子は、ステロイドの1日服用量とビタミンDの投与状況の二因子のみであった。つまりステロイドの1日服用量が多いほど腰椎の骨密度の減少は大きかった。またビタミンDの新規投与例では、継続投与例では腰椎骨密度が減少するのは逆に、腰椎骨密度の増加が見られた。

・末梢骨骨密度変化に影響する因子の検討
多重回帰分析により有意の影響力が示された因子は、橈骨骨密度の変化率に対するステロイドの使用の有無のみであった。ステロイド使用例では橈骨の骨密度減少率が有意に小さかった。

4. 考察

罹病期間7年以上の閉経後の女性RA患者では、傍関節性の末梢骨の方が中枢骨より減少速度が速く、また末梢骨と中枢骨の骨密度の変化率は独立していることが明らかとなった。この骨密度の減少率に対していずれの部位もステロイドの服用が大きな影響力を持っていたが、その影響は腰椎と橈骨では逆の方向性であることが明らかとなった。橈骨の傍関節性骨粗鬆症はRAの炎症性変化に伴う骨粗鬆症が主体であり、腰椎の骨密度減少は炎症性とは異なる骨密度減少であることが考えられた。両者の差異が明瞭となったことはRAの二次性骨粗鬆症の診断と治療体系の構築を考える上で、極めて有用な結果であると考えられる。

ビタミンDの新規投与患者では腰椎骨密度の維持効果がみられた。一方継続投与例ではこの維持効果は見られなかった。ビタミンDはRAに伴う炎症や廃用性の骨量低下を阻止するまでの長期的骨量維持効果は期待しにくい、投与初期には基本的な栄養補充効果としての効果が得られると考えられた。

5. 評価

1)達成度について

基礎的な検討と臨床的な検討のいずれも当初の予定の検討が期間内に一定の結果を得るまで終了した。

2)研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

今回の検討ではいずれも学術的に新しい事実を見出すことができ、現在論文投稿準備中である。基礎検討の結果から示された、骨破壊病巣部滑膜内で、RA 間質系細胞が破骨細胞へと分化しうる前駆細胞を多数維持し reservoir として骨破壊に寄与している可能性は、これに基づく新たな治療戦略が発想でき、その検討を開始している。多様な病態を呈する RA 患者すべての治療を成功させるためには、RA の治療法の多様性、多重性が必要となることを予想しており、関節破壊に至る過程のこれまでとは異なるステップをたたく治療法開発につながると考えている。

臨床的検討は、原発性骨粗鬆症とは異なる RA 独特の骨減少様式を明らかにしたもので、混沌としていた骨密度測定部位の意味付けを明らかとし、RA に伴う二次性骨粗鬆症の診断と治療の体系を構築する上で有用な結果となった。

3)今後の展望について

治療法の多様性と多面性が必要になることが予想される関節リウマチの治療法の新たな一方法開発への発展を視野に置き、基礎検討でえられた結果を基に新しい発想で関節炎の治療に関する CIA ラットを用いた実験的検討を行なっている。また臨床的検討の結果得られたステロイドの骨密度に対する影響を異なる面から評価すべく、骨粗鬆症の最終像である骨折に関するステロイドの影響の検討を RA 患者で進めている。

4)研究内容の効率性について

基礎的検討は期間中専属研究者 1 名がこの研究に専念し、極めて効率的に研究を進めることができた。臨床検討は多数の患者の詳細な経過調査を前向き検討で行なったが、予定の期間内に統計学的意味のある結果が得られる症例数に達し、効率的に行なうことができた。

6. 結論

－基礎研究－

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－

罹病期間が7年以上の閉経後女性 RA 患者を対象として、末梢骨と中枢骨の骨密度変化率に関与する因子を縦断的研究で検討した。その結果、末梢骨と中枢骨の骨密度は独立して変化していること、腰椎骨密度の減少はステロイド服用により悪化するが、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された。さらにビタミンD服用の骨密度維持への限定的な有用性が確認できた。

7. 研究発表

1)国内

口頭発表	15 件
原著論文による発表	8 件
それ以外(レビュー等)の発表	3 件

そのうち主なもの

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.

学会発表

Nurse-like cells from patients with rheumatoid arthritis support survival of osteoclast precursors via macrophage-colony stimulating factor production. Tsuboi H., Udagawa N., Hashimoto J., Yoshikawa H., Takahashi N., Ochi T. 26th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Seattle, Oct 1-5, 2004.

8.知的財産権の出願・取得状況

1. 特許取得	なし
2. 実用新案登録	なし
3. その他	特になし

II) RA 骨吸収亢進病態解明研究

研究課題：ヒト破骨細胞形成に関する研究

分担研究者：所属機関 松本歯科大学・総合歯科医学研究所
氏名 高橋 直之

1 研究目的

骨吸収を司る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。最近、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)がクローニングされ、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のデコイ受容体として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 とIL-1はRANKL-RANKを介さず直接破骨細胞の分化と骨吸収活性を誘導することを明らかにした。これらの知見は全て、マウスの細胞をもちいた解析より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。とりわけ、PGE₂の作用機構に差異がある可能性が指摘される。関節リウマチやこと粗鬆症の発症機序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。また、マウスとヒト破骨細胞形成におけるPGE₂の作用を解析を通して、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。

2 研究方法

ヒト破骨細胞の形成に関しては、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抗体ビ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を添加して、ヒト破骨細胞形成における

p38MAPKの役割を解析した。一方、マウスの骨髄細胞をM-CSFの存在下で培養し、骨髄由来マクロファージを調製した。骨髄由来マクロファージをRANKLとM-CSFの存在下で更に培養し破骨細胞への分化を促した。マウスとヒトの破骨細胞形成に関してPGE₂の作用機構を、PGE₂受容体の解析、シグナル伝達系の解析、PGE₂受容体の強制発現等を介して行った。なお、ヒト末梢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。

3 研究結果

(1)ヒト破骨細胞形成に関する研究：①ヒトCD14陽性細胞はM-CSF非添加群では殆んど増殖せず、M-CSFはCD14細胞の増殖に必要な因子であることが明らかとなった。RANKL単独添加群においても、CD14細胞の増殖は認められなかった。②CD14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単核並びに多核細胞に分化した。M-CSFのみを添加した群において、わずかではあるが、TRAP陽性でビトロネクチンレセプター陽性の破骨細胞様細胞がコロニーを形成して出現した。③CD14陽性細胞をRANKLとM-CSFの存在下におい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。④p38MAPKの特異的阻害剤であるSB203508は、RANKLとM-CSFが誘導するTRAP陽性破骨細胞の形成を抑制した。

(2)ヒトとマウスの破骨細胞に対するPGE₂の作用：①マウスの骨髄マクロファージやマクロファージ細胞株RAW264細胞をRANKLで処理すると破骨細胞に分化する。この破骨細胞形成をPGE₂は濃度依存的に促進した。この促進効果はPGE₂受容体EP2とEP4を介するもので、cAMP依存性タンパクリン酸化酵素PKAの活性化により誘導された。②RANKシグナルを伝達する分子を解析し、TGF- β activated kinase 1 (TAK1)がPKAがリン酸化するモチーフ(RRXS)を有することを見出した。TAK1はPGE₂刺激でリン酸化され、H89(PKA阻害剤)はそのリン酸化を抑制した。③RRXSモチーフ412番目のSerをAlaに置換したS412A-TAK1を発現させたRAW細胞では、RANKLが誘導する破骨細胞形成におけるPGE₂の促進作用が消失した。④PGE₂はRANKLおよびM-CSFが誘導するヒトCD14陽性細胞から破骨細胞への分化を強力に抑制した。H89はPGE₂による抑制作用を解除した。また、