

## 6 結論

①ヒト骨髄脂肪蓄積細胞は骨代謝に影響を及ぼすシグナル分子を積極的に生産している可能性がある。

②骨髄脂肪蓄積細胞が分泌する因子を中心に、マース様細胞に対する作用を検討するとともに、破骨細胞や骨芽細胞に対する効果を明らかにすることで、骨量減少疾患である骨粗鬆症や関節リウマチの病態解明および治療法への糸口を見つける。

## 7 研究発表

### 1) 国内

現在、上記項目に該当する事項はない。

### 2) 海外

口頭発表	0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	

① Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, Shimomura I. Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes*. 2003 Jul;52(7):1655-63.

② Oshima K, Nampei A, Matsuda M, Iwaki M, Fukuhara A, Hashimoto J, Yoshikawa H, Shimomura I. Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast. 投稿中

学会発表

現在、上記項目に該当する事項はない。

## 8 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

現在、上記項目に該当する事項はない。

研究課題：関節リウマチの骨髄変化に関する研究

分担研究者：帝京大学医学部内科  
広畑俊成

### 1 研究目的

関節リウマチ(RA)においては滑膜の異常増殖により関節破壊が惹起される。この滑膜の異常増殖においては血管新生が重要な役割を果たすことが明らかにされている。一方、RAにおいては骨髄の異常が病態形成上重要な役割を果たすことをこれまでに我々は明らかにしていた。近年、血管新生においても骨髄が深く関与することが明らかになっている。今回我々は、RA 骨髄幹細胞が血管新生において如何なる役割をはたすかについて検討を行なった。

### 2 研究方法

RA 患者、OA 患者より得られた骨髄血より magnetic beads により CD34+細胞を精製した。CD34+細胞を SCF(10ng/ml) + GM-CSF(1ng/ml) とともに 18 日培養後、各種表面抗原の発現を Flow cytometry にて解析し、上清中の TNF- $\alpha$ 、VEGF 濃度を ELISA にて測定した。一部の患者からは、滑膜も採取し、HE 染色と CD31 免疫染色を行った。さらに、骨髄 CD34+細胞より RNA を抽出し、cDNA を合成し、定量的 PCR により KDR(VEGFR2) の mRNA の発現の評価を行った。

(倫理面への配慮)

患者には研究内容及び検体採取の方法・危険性等を説明し、インフォームドコンセントを文書で取得した上で検体の提供を受けた。検体については連結匿名化にてプライバシーの保護をはかった。

### 3 研究結果

RA 患者骨髄 CD34+細胞からの CD14+細胞、CD14+/HLA-DR+細胞の分化能は対照群と有意差がなかったが、vWF+細胞および CD31+/vWF+細胞への分化能は RA において有意に亢進していた。骨髄 CD34+細胞からの vWF+細胞への分化能と TNF- $\alpha$  や VEGF の産生能との間には有意の相関は認められなかった。一方、滑膜の血管密度(MVD)は RA において有意に上昇していた。さらに、骨髄 CD34+細胞からの vWF+細胞への分化能と滑膜の MVD との間には有意の相関を認めた( $r=0.569$ 、 $p=0.021$ )。また、RA 骨髄 CD34+細胞は OA のそれに比し、KDR mRNA をより多く発現していた。

### 4 考察

以上の結果より、RA の関節滑膜の血管新生においては骨髄 CD34+細胞から分化する血管内皮細胞が関与する可能性が示唆された。骨髄 CD34+細胞からの血管内皮細胞への分化能の亢進はサイトカイン産生では説明できず、骨髄 CD34+細胞における KDR mRNA の発現の異常の関与が示唆された。

### 5 評価

#### 1) 達成度について

本研究は、関節リウマチの滑膜増殖において極めて重要な役割を果たす血管新生の機序の一部に骨髄 CD34+細胞の異常が関与することを証明し得た。さらに、その異常が骨髄 CD34+細胞の KDR mRNA の異常発現に起因することを証明したことから、当初の目的が 100% 達成されたと考えられる。

#### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

これまでも RA の病態に骨髄異常が関与することは報告されているが、幹細胞である骨髄 CD34+細胞レベルで遺伝子異常が存在することを証明したのは国内外でも初めてであり、RA の病因に一步迫るという意味でも学術的にも意義があり、国際的にも大きなインパクトがある。さらに、治療法の進歩にも寄与しうる可能性より、社会的意義も大きい。

#### 3) 今後の展望について

RA の骨髄 CD34+細胞レベルで遺伝子異常の詳細について、他の遺伝子の発現についても検討してゆく必要がある。さらに、これらの遺伝子異常が本当に RA の関節病変に関与するかもについても、別の方法論で検討してゆく必要がある。

#### 4) 研究内容の効率性について

提供された臨床検体より得られた情報を効率よく組み合わせることができたことにより、確度の高い結論が得られたと考えられる。

### 6 結論

RA 滑膜の血管新生さらに、RA の病態・病院においては骨髄 CD34+細胞の遺伝子発現の異常が関与すると考えられる。

### 7 研究発表

#### 1) 国内

口頭発表

6件

原著論文による発表 0件  
 それ以外（レビュー等）の発表 10件  
 そのうち主なもの  
 それ以外（レビュー等）の発表  
 ・広畑俊成 各論 骨・関節疾患 1.骨粗鬆症 2.関節  
 リウマチ 3.変形関節症「薬物療法学」石崎高志、鎌  
 滝哲也、望月真弓 編集、南江堂 205-219, 2003

## 2) 海外

口頭発表 9件  
 原著論文による発表 12件  
 それ以外（レビュー等）の発表 1件  
 そのうち主なもの  
 論文発表  
 ・Hirohata S, Ohshima N, Yanagida T, Aramaki K.  
 Regulation of human B cell function by  
 sulfasalazine and its metabolites. *Int Immunopharm*  
 2: 631-640, 2002.  
 ・Hirohata S, Yanagida T, Tomita T, Yoshikawa H, Ochi  
 T. Bone marrow CD34+ progenitor cells stimulated  
 with stem cell factor and GM-CSF have the capacity  
 to activate IgD- B cells through direct cellular  
 interaction. *J Leukoc Biol* 71: 987-995, 2002.  
 ・Takayanagi M, Haraoka H, Kikuchi H, Hirohata S.  
 Myocardial infarction caused by rheumatoid  
 vasculitis: histological evidence of the  
 involvement of T lymphocytes. *Rheumatol Int*  
 23:315-318, 2003  
 ・Iwaki-Egawa S, Matsuno H, Yudoh K, Nakazawa F,  
 Miyazaki K, Ochiai A, Hirohata S,  
 Shimizu M, Watanabe Y. High diagnostic value of  
 anticalpastatin autoantibodies in rheumatoid  
 arthritis detected by ELISA using human erythrocyte  
 calpastatin as antigen. *J Rheum* 31: 17-22, 2004  
 ・Hirohata S, et al. Enhanced generation of  
 endothelial cells from CD34+ cells of the bone  
 marrow in rheumatoid arthritis: its possible role  
 in synovial neovascularizations. 2004, in press.  
 それ以外（レビュー等）の発表  
 ・Hirohata S, Kikuchi H. Behçet' s disease.  
*Arthritis Res Ther* 5: 139-146, 2003  
 学会発表  
 ・Shibuya H, Nagai T, Yamamoto K, Ishii A, Hirohata  
 S. Differential regulation of Th1 responses and  
 CD154 expression in human CD4+ T cells by IFN- $\alpha$ .  
 66th Annual Scientific Meeting, American College of  
 Rheumatology, New Orleans, *Arthritis Rheum*  
 (Suppl.): S248, 2002.  
 ・Hirohata S, Yanagida T, Nampei A, Hashimoto H,

Tomita T, Yoshikawa H, Ochi T. Enhanced generation  
 of endothelial cells from CD34+ progenitor cells of  
 the bone marrow in rheumatoid arthritis. The 6<sup>th</sup>  
 Korea-Japan combined Meeting of Rheumatology,  
 p.39, 2003 Seoul Korea

・Hirohata S, Yanagida T, Nampei A, Hashimoto H,  
 Yoshikawa H, Mori T, Ochi T. Enhanced generation of  
 VEGF and soluble VCAM-1 from CD34+ progenitor cells  
 of the bone marrow in rheumatoid arthritis. 67th  
 Annual Scientific Meeting, American College of  
 Rheumatology, Orlando, *Arthritis Rheum (Suppl.)*:  
 S341, 2003.

・Hirohata S, Yanagida T, Kunugida Y, Hashimoto H,  
 Tomita T, Yoshikawa H, Ochi T. Enhanced generation  
 of endothelial cells from CD34+ cells of the bone  
 marrow in rheumatoid arthritis: its possible role  
 in synovial. 68th Annual Scientific Meeting,  
 American College of Rheumatology, San Antonio,  
*Arthritis Rheum (Suppl.)*: S1349, 2004.

## 8 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

- 1 特許取得  
骨髄液の再生方法（出願中）
- 2 実用新案登録  
該当なし
- 3 その他  
該当なし

### Ⅲ) RA の病因解明研究

研究課題：Epstein-Barr ウイルスの関節リウマチ骨髄での病的意義

分担研究者：武井正美：

所属機関 1、日本大学医学部内科学講座血液膠原病部門

2、帝京大学医学部内科学膠原病リウマチ科

3、国立相模原病院整形外科

4、日本大学医学部整形外科

（研究協力者） 山上賢治<sup>1)</sup> 猪股 弘武<sup>1)</sup> 白岩秀隆<sup>1)</sup> 三田村巧<sup>1)</sup> 広畑俊成<sup>2)</sup> 森俊仁<sup>3)</sup> 斉藤修<sup>4)</sup> 龍順之助<sup>4)</sup> 澤田滋正<sup>1)</sup>

## 1 研究目的

これまでEpstein-Barr ウイルス (EBV) と関節リウマチ (RA) の関連を明らかにするため PCR, in situ hybridization 法、組織染色を用いて RA の滑膜細胞に EBV が存在することを証明した。EBV 感染細胞は正常の免疫機能を有していればその再活性化は抑制され潜在感染として維持され疾患の発症は起こらない。上咽頭癌の様にウイルスに変異があり免疫監視機構から逃れている可能性や、RA で EBV 特異的 CTL 活性が低いとの報告もあり、RA 滑膜でこのような細胞の存在を許している可能性もある。我々は EBV 関連疾患としても知られる IgA 腎症の末梢白血球の RNA を用いた fluorescein differential display 法による解析で偶然に EBV 特異的 CTL を制御する遺伝子を発見し全 cDNA の sequence を行った（国際公開番号：W098-24899, H8, 12, 5）。この遺伝子が 1998 年 12 月に Nature で Sayo らの報告した小児期に EBV の致死感染を起すことで知られている X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP) の原因遺伝子と全く同一のものであった。我々はこの SAP/SH2D1A mRNA の発現が RA 患者 T 細胞で低いことを報告し、SAP/SH2D1A cDNA に XLP のような変異が存在しないことを報告した (Inter Immunol13, 559, 2001)。また、SAP/SH2D1A の promoter 領域と思われる 5'上流に存在する CAAT ボックス近傍に単遺伝子変異が存在する可能性を見だし、RA で EBV に対する感染防御機構が異常を起す原因として、SAP/SH2D1A 分子の機能異常がその原因の一つとして関与する可能性があることを見いだした。

RA と OA の骨髄細胞をインフォームドコンセント後に採取し、OA、RA の骨髄コロニー形成能を比較し、治療薬との関連性を検討した。また骨髄細胞の EBV に対する CTL の反応性を EBNA 3A ペプチドに対する T-Select MHC-Tetramer アッセイを用いて検討した。RA 患者の骨髄の CD34 陽性細胞と、正常人の EBV ウイルス陰性の B 細胞との共培養で得られた細胞株の CD15 陽性率を検索し、それぞれの細胞株と正常人 T 細胞とを反応させ、各種サイト

カインを計測し、その病的意義を考察した。

## 2 研究方法

### 1、RA 由来 EBV 採取

RA、正常人の口腔をくまなく綿棒で擦過し、2ml の生理食塩水に懸濁、DNA を抽出した。EBV 陰性正常人由来 B 細胞と RA 骨髄 CD34 陽性細胞との共培養で樹立した B 細胞株の DNA を抽出し、この細胞株の EBV が RA 骨髄由来であることを解析した。

### 2、EBNA3c の DNA の DNA 配列の検討

EBV 産生株として広く知られている B95-8 で EBNA3c が 39ヌクレオチドの3回の繰り返し数がウイルス株により異なっていることが報告されている。この部位の DNA 配列を検討するため EBNA3c 領域の DNA 配列を PCR 産物のダイレクトシーケンシング法にて ABI 社 DNA シーケンサー 377 (PE Applied Biosystem Inc., CA, USA) を使用して検討した。使用したプライマーは 5'-acgctcctctggatttaagtttaca (100621-100645), 5'-catatcctggatatgaagatgattgg (1000796-1000821) でシーケンシングプライマーも同じものを使用し BigDye, Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems Inc, CA, USA) を使用し DNA 配列を両方向で決定した。

### 3、RA 骨髄のコロニー形成

RA や OA の骨髄を人工関節置換術時にインフォームドコンセント後採取し、21G の注射針で骨髄細胞の固まりをほぐし、LSM 細胞分離液にて単核球を分離する。分離後  $1 \times 10^6$  /ml に調整した骨髄単核細胞液 0.3ml を 3ml のメチルセルロース培地に攪拌し 1.1ml を 35mm 培養皿 (3005) で、37°C、5%CO<sub>2</sub>、湿度 100%で培養し、14 日後 BFU-E、CFU-GM を目視にてカウントしコロニーを分離回収した。

### 4、EBV 関連 LMP2 の Realtime PCR

前記した骨髄由来細胞コロニーを採取し、DNA を抽出、ABI 社 7700 遺伝子増幅装置 (PE Applied Biosystems Inc, CA, USA) を使用し、定量 PCR を行った。感度は 50 コピー以下で行った。

### 5、CD15 陽性細胞の検討

健康成人の末梢血を採取し、中間層を回収し2回洗浄し、リンパ球を得、さらにMACS Pan T Cell Isolation Kit II (Mitenyi Biotec 社)を用いてT細胞を分離し、 $1 \times 10^6$  /ml に調整した。

RA患者の骨髄のCD34陽性細胞と正常人のEBV陰性のB細胞との共培養で得られた各細胞株(I/N、K、H/I)とRA末梢血から自然発生したEBV陰性B細胞株(I)、B-958由来EBVで芽球化した細胞株(H/B95-8)を $1 \times 10^6$  /ml に調整し、前出のT細胞とPHAを加え反応させ、サイトカイン(IFN- $\gamma$ 、IL-6、M-CSFなど)を計測した。50%NR取り込み法は細胞に段階希釈した検体を作用させた後ウイルスを感染させる。インターフェロン濃度により細胞の抗ウイルス状態が変化し、細胞変性(CPE)が起こる。この時ニュートラルレッド(NR)により生き残った細胞を染色し、抽出後OD492nmで吸光度を測定し定量曲線をプロットする。細胞コントロールとウイルスコントロールのOD値の中間点(50%)を示したインターフェロン希釈倍数の逆数をもってインターフェロン値とする。その他サイトカインの測定は酵素抗体法で行った。

#### 6. Cell Sorter(FCM)による骨髄CD34細胞のEBV陽性率

骨髄CD34分画のどの細胞にEBVが感染しているかを検討するためFCMでEBV核内蛋白やEBV由来RNAを単クローン抗体やEBER PNAプローブ(FITC標識)を用いて新たな検索法を開発し検討している。

(倫理面への配慮)

##### (1) 個人の人権擁護

診療情報を分析する場合には診療録や試料の整理簿から、住所、氏名、生年月日などを削り、代わりに新しく符号をつける。この符号を結びつける対応表は、医学部長を管理者として、日本大学医学部内にて厳重に保管する。このようにすることによって、遺伝子の分析結果が誰のものであるか、他の人には分からないようにする。

##### (2) 理解を求める方法

添付した同意文書を使用し、検体提供対象者に上記研究実施者または主治医より説明を行い理解と同意を求める。結果の説明は提供者が開示を求める場合、その研究成果と実施手順を上記のものが知的財産権に不都合を生じない方法で可能な限り開示する。

##### (3) 個人への利益及び不利益並びに危険性と医学上の貢献予測

遺伝子の分析研究の結果、偶然に他の病気との関係が見つかった時、患者本人、家族や血縁者がその結果を知ることが有益であると判断される場合に限り、診療を担当する医師から、その結果の説明につき照会する。研究の成果としては、このウイルスが広汎に難病とい

われる疾患群に関係しているため、その病因、病態にこのウイルスがどのように関わっているかを明らかにすることが期待できる。その結果、将来、同じような病気の診断や予防、治療などがより新たに効果的なものとして行われるようになる可能性がある。

#### 3 研究結果

RAの口腔由来EBNA3c領域の39ヌクレオチドの繰り返し数はOAのものと比較し偏りはなかった(RA7.0 $\pm$ 1.3, OA 6.7 $\pm$ 0.8)。この部位の塩基配列にRAで変異が認められそのアミノ酸にミスセンス変異によりこれまでの報告されていない異なったアミノ酸の配列が起こることが判明した。RA骨髄由来CD34細胞とEBV陰性末梢血由来B細胞と共培養し樹立されたEBV陽性B細胞株がHLAの遺伝子型の比較で正常者由来であることがわかった。そのEBVのEBNA3cのDNA配列がRA患者口腔由来のもの1つの塩基変異を除いて他はすべて一致し、その繰り返し構造の数も一致した。

RAとOAでのコロニー形成能の違いを見るためGM-CFU、E-BFUの数を比較した。この結果RAとOA患者ではGM-CFU、E-BFU形成能に大きな相違はなかった。また全体のコロニー数の関しても差は認めなかった。また、EBV LMP-2を検出するrealtimePCR法を用いて、骨髄コロニー中のEBウイルスの存在を検索したが、EBウイルスの存在は認められなかった。

一般にRA患者では末梢血におけるEBV特異的CTL活性が低い。RA患者の骨髄中のCTL活性をMHC-tetramer法を用いて検討した結果、RAでは6例中4例にEBNA3Aに対する特異的CTL細胞が検出されOA患者では3検体中1例のみに認められた。

正常者では、B細胞中のCD15陽性B細胞は2.65 $\pm$ 0.08 (maen $\pm$ SE)% (n=11)存在した。しかし、治療抵抗性で間質性肺炎を合併するRA患者の末梢血のCD15陽性B細胞は、上昇する傾向が認められた。

RA骨髄CD34細胞と正常EBV陰性B細胞と共培養して得られた各B細胞株(I/N、K、H/I)のCD15/CD19陽性率はそれぞれ3.7%、83.4%、85.8%であった。RA末梢血から自然発生したEBV陰性B細胞株(I)はCD15陰性でB-958由来EBVで芽球化した細胞株(H/B95-8)は約27%が陽性であった。各サイトカイン(IFN- $\gamma$ )の産生は50%NR取り込み法(活性)ではCD15陽性細胞の方が高値になる傾向が認められたが、EIA法(定量)ではCD15陽性細胞、陰性細胞の間で差は認めなかった。IL6はEBV陽性B細胞株との共培養で高値となり、M-CSFはRA由来EBV陽性B細胞株の共培養で高値を示した。

今回あらたに開発したFCMを利用した核内蛋白の検出でRA骨髄CD34細胞分画にEBVが存在する可能性を示した。

#### 4 考察

EBV はヘルペスウイルス群に属し DNA ウイルスである。DNA ウイルスはその配列に変異をあまり起こさないとされている。EBV ではタイプが 2 つ知られており RA 由来悪性リンパ腫ではその偏りが報告されている。また EBV 関連蛋白である latent membrane protein (LMP-1) の配列に欠失が存在することが上咽頭癌で報告されているがその後正常者の EBV にもその欠失の存在することが報告され病因との関連は不明である。EBNA3c 領域の RA 偏った DNA の変異はアミノ酸レベルでも変異を起こしているが、その生体内における影響は不明である。SLE や RA で以前より EBNA-1 の分子相同性による抗体が病態に結びつく可能性が議論されている。また EBNA3c 領域は細胞障害性 T 細胞の認識するエピトープが存在する部位でもあり、RA の滑膜中に EBNA3c に対する抗体が高頻度に存在することも知られている。このようなアミノ酸変異が RA での EBV 制御に影響を及ぼす可能性も検討しなくてはならない。

RA の骨髄由来細胞が EBV 感染に大きな役割を果たす可能性が報告されている。我々は骨髄 CD34 陽性細胞分画が RA 由来の EBV 感染に重要な役割を果たしている可能性を見いだした。この知見をさらに検討するため骨髄での CFU の形成能を検討した。骨髄幹細胞の両者への分化能には差を認めなかった。このコロニーに EBV が維持され得るか調べたが証明はできず分化能を有する骨髄 CD34 幹細胞には EBV は存在しなかった。しかし、今回開発した FCM を利用した核内蛋白発現を測定法で RA 骨髄 CD34 細胞に EBNA1 の発現が OA に比し高頻度に存在する可能性があることが示されたことは RA 骨髄での EBV 感染に主な役割を担っており、RA 骨髄で OA に比し活発に EBV に対する CTL 活性が引き起こされることにつながっているものと考えられる。この EBV 陽性 CD34 細胞分画はコロニー形成分化能を持たないことから proB 細胞分画に属することが考えられ今回開発した FCM を使用した方法でこの分画の特定を行う予定である。また、RA 骨髄 CD34 細胞との共培養で高頻度に樹立される CD15 陽性 B 細胞が T 細胞を刺激して IFN $\gamma$  の分泌が高くなる可能性があり EBV 陽性 B 細胞は IL-6 の産生を増強し、RA 由来 EBV 陽性 B 細胞は M-CSF の産生を増強する可能性があり RA での破骨細胞の分化誘導に EBV が関与する可能性が示唆され RA の骨粗鬆症の増悪の原因の一因となっている可能性が示された。

## 5 評価

### 1) 達成度について

RA 骨髄と EBV の関連性について研究を行った。RA と正常 B 細胞との共培養で得られた細胞株が CD15 を高率に発現していることを見いだしたことは、その病因を解明する上で重要なことと考えられた。また骨髄の採取に関しては、相模原病院や日本大学整形外科の手術の際に検体をいただいていたが統計処理に至るまで

の量にはならなかったため、今後も引き続き採取を続けデータの蓄積と検討が必要と考えられた。

### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

RA の病態に関して、EBV との関わりに関しては、遺伝子レベルまで解析が進み、病態との関連も骨髄幹細胞レベルまで進んでいる。さらにどのように免疫異常や骨代謝に関わっているのか、RA に特異的な病態の関連性に関する解析は必要と考えられた。これらの解明は、RA に留まらず EB ウイルス関連疾患の病態解明にもつながる可能性がある。

### 3) 今後の展望について

今後は CD15 陽性 B 細胞のナース細胞との共培養を行い、その関連性や生物活性を検討する予定である。また骨髄に関してはさらに整形外科との連携にて検体を集めデータの解析を進める必要がある。また RA 特異的な EBV についてはさらに他の構造蛋白に関しても解析を進める予定である。また RA 骨髄 CTL 活性に関しても症例を増やし他の CTL が認識する EBV 蛋白構造に対する反応性の検討が必要と思われる。

### 4) 研究内容の効率性について

骨髄の採取に関しては、症例がなければ必ずしも十分な検体が集まるとは限らないが、時間をかければ確実にデータが積み重ねられるので、今後の蓄積は必要と考えられる。またサイトカインの産生の検討に関しては、コントロールや細胞培養条件の設定に時間がかかってしまった。しかし今回の検討で得られた条件は、今後の研究にも活かせるものであり、引き続き検討を重ねる予定である。

## 6 結論

RA 口腔由来野生株の EBV の関連蛋白 EBNA3c の塩基配列に正常ではほとんど見られない変異が共通してみられ、ペプチドのミスセンス変異を伴っていた。骨髄 CD34 細胞と正常 EBV 未感染 B 細胞との共存培養して得られた EBV 陽性 B 細胞株の EBNA3c の配列がこの変異を持っており、この RA 患者口腔由来野生株の EBNA3c の配列と一つの塩基を除いて一致し、RA 骨髄の CD34 細胞分画に EBV の感染を引き起こす機序が存在する可能性が示唆された。RA 骨髄の GM-CSF, E-CSF コロニー形成能は OA に比し大きな差はなく、そのコロニー中には EBV の存在は証明できなかった。我々は活動性が高く間質性肺炎を合併する RA の末梢血に、CD15 陽性 B 細胞が検出されることを報告し、正常人の EBV 陰性の B 細胞と RA 患者の骨髄の CD34 陽性細胞との共培養で RA 由来 EBV 感染 CD15 陽性 B 細胞が高率に樹立されることが分かった。またそれら RA 由来 EBV 感染 CD15 陽性 B 細胞と正常人 T 細胞との共培養では CD15 陽性 B 細胞が T 細胞を刺激して IFN $\gamma$  の分泌が高くなる可能性があり EBV 陽性 B 細胞は IL-6 の産生を増強し、RA 由来 EBV 陽性 B 細胞は M-CSF の産生を増強する。これら破骨細

胞分化誘導に関与するサイトカインの産生を増強することはRAでの破骨細胞の分化誘導にEBVが関与する可能性が示唆している。さらにRAの骨髄ではEBVに対してのCTL活性が増加している、RAの骨髄でEBVの感染制御が活発に行われ、間接的にこのウイルスの再活性化が行われている可能性が示唆されその中心にEBV陽性のCD34細胞がいる可能性を示した。

## 7 研究発表

### 1) 国内

口頭発表	40件
原著論文による発表	0件
それ以外(レビュー等)の発表	9件
そのうち主なもの 論文発表	

1. Sawada S, Takei M.: Reactivation of immanent herpes group virus.

Internal Medicine 42(2):140-1, 2003

2. 三田村巧、武井正美、澤田滋正: ウイルスとリウマチ性疾患

日大医誌 62(12) 633-638, 2004

2. 武井正美、石渡哲義、三田村巧、山上賢治、澤田滋正: ヘルペスウイルス感染症の制御—Epstein-Barr ウイルス感染と免疫機構を支える遺伝子(SAP/SH2D1)

日大医誌 (in press)

### 学会発表

1. 山上賢治 武井正美 網康至 北村登 三田村巧 本田三男 澤田滋正: 病原性SHIV C2/1感染カニクイザルにおける早期骨髄幹細胞コロニー形成の障害と病態進行への関連性

第18回日本エイズ学会学術集会 2004年12月10日 静岡

2. 白岩秀隆、武井正美、野崎高正、猪股広武、吉川勉、東孝典、三田村巧、加藤真樹、山田耕一、斉藤一郎、林良夫、関直彦、澤田滋正: シェーグレン症候群疾患モデルマウスおよび患者唾液腺におけるPSP(parotid secretory protein)分子の発現

第13回日本シェーグレン症候群研究会 平成16年9月25日 佐賀

### 2) 海外

口頭発表	5件
原著論文による発表	7件
それ以外(レビュー等)の発表	2件
そのうち主なもの 論文発表	

1. Yamakami K, Honnda M, Takei M., Ami Y, Nishinarita S, Kitamura N, Sawada S, Horie T: Early Bone Marrow Hematopoietic Defect in SHIV C2/1- Infected

Macaques and Relevance to Advance of Disease

J Virology 78(20):10906-10910, 2004

2. Sawada S, Takei M. (Sawada and Takei were first authors): Possible involvement of Epstein-Barr virus and its regulatory gene in rheumatoid synovitis.

Autoimmun Rev. 2004 1:69-71.

### 学会発表

1. Sawada S Takei M.

Possible involvement of Epstein-Barr virus and its regulatory gene in rheumatoid synovitis: Epstein-Barr infection in rheumatic arthritis.

Autoimmune Rheumatic disease days -International symposium-in ATHENES-GREECE June 2004

2. Shiraiwa H Takei M Yoshikawa T Azuma T Kato M Mitamura K Saito I Hayashi Y Ueki T Kida A Seki N Sawada S: Detection of Up-regulated genes by in-house cDNA chips and lysosomal-associated protein transmembrane(Laptm5) molecule in salivary glands from model mice and in lip biopsy tissue from patients with Sjogren's syndrome.

ACR/ARHP annual scientific meeting in San Antonio 20th Oct. 2004 SanAntonio USA

## 8 知的所有権の出願・取得状況(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

研究課題：発現特化型トランスクリプトーム解析による慢性リウマチ原因遺伝子の探索に関する研究

分担研究者：所属機関 大阪大学微生物病研究所  
氏名 野島 博

## 1 研究目的

段階的サブトラクション法と名づけた独自の技術を応用して、血液細胞特異的に発現している遺伝子群（発現特化型 PREB cDNA）、および慢性リウマチ患者の骨髄液細胞において特異的に転写誘導されている遺伝子群（発現特化型 AURA cDNA）を包括的に単離し、それらを貼り付けたマイクロアレイを用いた選択的トランスクリプトーム解析、あるいはリアルタイムPCRによって、慢性リウマチ原因遺伝子を探索するとともに、慢性リウマチのRNA診断システムを構築すること。

## 2 研究方法

### (2-1) PREB 関連（血液細胞発現特化型 cDNA 群）

健康人の血液細胞発現特化型 cDNA 群（*PREB* : *predominantly expressed in blood cells*）の包括的単離とそれらを貼り付けた発現特化型 cDNA 群のマイクロアレイ作製を行った。このために、健康人の血液（男女同数8人分）をインフォームド・コンセントを採った上で採集した。健康人由来の全 RNA を1本のチューブに集め、オリゴdTカラムにより精製したポリA+RNAを用いて、cDNA ライブラリーを作成した。これと平行して正常ヒト繊維芽細胞（TIG-1）より mRNA を生成し、これをフォトビオチンによりビオチン化し、ヘルパーファージを用いて単鎖化した上記 cDNA ライブラリー（0次差分）とハイブリダイズさせて cDNA サブトラクションを実行した（1次差分）。こうして作成した1次差分化（*subtracted*）cDNA ライブラリーから500 クローン分のプラスミドDNAを番号をつけたうえで単離し、全ての塩基配列を決定した。ヒト全ゲノム塩基配列のバンクを検索し、ヒト由来の塩基配列であるかどうか確認した。ここでヒト由来以外の塩基配列でないことが分かったクローンについては感染体由来の cDNA である可能性が高い。塩基配列が重複していないクローンについては、挿入 cDNA を切り出すことのできるようにベクター内に設計して入れてある制限酵素（*EcoRI/NotI*）で切断して cDNA 部分を切り出し、標識してプローブとした。繊維芽細胞（左）と健康人血液細胞（右）の全 RNA を並べた短冊ノーザンプロットを200枚以上つくり、プローブとハイブリダイズさせて、健康人血液細胞特異的に発現されているクローンを選び出した。この cDNA をヒト健康人の血液細胞発現

特化型 cDNA 群（*PREB* *predominantly expressed in blood cells*）と称し、将来 cDNA マイクロアレイとして貼り付けてDNA診断に採用することにした。  
(2-1) RA 関連（慢性リウマチ患者発現特化型 cDNA 群）  
上述と同様のプロセスにより、70人分の慢性関節リウマチ患者（RA: Rheumatoid arthritis）の骨髄液細胞から、50名の変形性関節症（OA: Osteoarthritis）の骨髄液細胞を差し引くかたちの段階的サブトラクション法を行うことで慢性関節リウマチ患者の発現特化型遺伝子（cDNA）群（*AURA*: *Augmented in RA*）を包括的に単離した。この実験では、取りこぼしを防ぐために補完的にアジラント・テクノロジー社のDNAチップ（44,000種類におよぶヒト遺伝子の塩基配列の一部に対応するオリゴヌクレオチドが貼り付けてあるDNAマイクロアレイ）を用い、RAとOAの骨髄液細胞に由来 mRNA について、Cy3, Cy5 という2色の蛍光色素を使ったカラーズワップ法によるトランスクリプトーム解析も行った。こうして単離してきたRA骨髄液細胞に特異的に転写誘導されている遺伝子群が、各患者において病態と関連して転写誘導されているかを調べるため、主としてリアルタイムPCRによって発現量を包括的に比較検討した。

一方、全身性エリテマトーデス（SLE）、血管炎、自己免疫性血小板減少性紫斑病（ITP）という3種類の他の自己免疫疾患についても同様な段階的サブトラクション法とDNAチップ法による多数の患者の血液細胞特異的に転写誘導されている遺伝子群を包括的に単離し、主としてリアルタイムPCRによって各患者において病態と関連して転写誘導されているかどうかを調べた。

### （倫理面への配慮）

大阪大学微生物病研究所および患者骨髄液（血液）を採取した各部署・病院における倫理委員会の承認を受け、健康人および患者の血液採取は全て書面によるインフォームド・コンセントをとること、および得られた情報は倫理委員会の規定に従って匿名化するとともに、情報の遺漏を防ぐ手段を講じるなどする形で倫理面に配慮した。

## 3 研究結果

## (2-1) *PREB* 関連 (血液細胞発現特化型 cDNA 群)

これまでに、約300種類の *PREB* をクローニングすることに成功した。そこで、*PREB* 遺伝子の塩基配列の一部に対応するオリゴヌクレオチドを化学合成して貼り付けたDNAマイクロアレイを作製し、性能をテストしたところ、再現性のあるデータが取れたことから、これを用いてトランスクリプトーム解析を行った。まず、慢性関節リウマチ患者 (RA: Rheumatoid arthritis)、あるいは変形性関節症 (OA: Osteoarthritis) 患者から採取した骨髓液細胞由来の mRNA に対して Cy3, Cy5 を使ったカラスワップ法によるトランスクリプトーム解析を行い、ほぼすべて患者において共通に転写誘導もしくは転写抑制されている *PREB* 遺伝子群を選び出した。これらの中には共通の生理作用を持つ遺伝子群もあり、患者の病態との関連を踏まえて新しい慢性リウマチの診断マーカーとして展開させるべく、現在解析を進めている。さらに、これを基盤とした新しい血液診断システムの構築を目指してデータの蓄積を進めている。ちなみに、この成果は特許化するとともに、タカラバイオ (株) に事業移転して「健康診断用 *PREB*-DNA チップ」として商品化することに成功したことは特筆に価しよう。

## (2-1) RA 関連 (慢性リウマチ患者発現特化型 cDNA 群)

これまでに数多くの *AURA* 遺伝子をクローニングすることができたが、その約半数は機能解析がほとんど行われていない新規な遺伝子であった。これらについて、現在ひとつづつリアルタイムPCRによって各患者の骨髓液由来の mRNA に対して発現量の検定を行っている。これまで試した十数個の *AURA* 遺伝子はいずれも例外なく多くのRA患者で発現が上昇していたが、OA患者では健常人と同じ程度の発現しか検出されなかった。この結果は、これら *AURA* 遺伝子はらの病態マーカーとなりうることを示唆する。興味深いことに、そのうちの幾つかでは、骨髓液では転写誘導されているにもかかわらず、同じ患者の末消血では転写誘導されていないことである。この結果はRA発症における骨髓液の重要性を示唆している。現在、こうして得られた各患者における発現量と病態との関連付けを行っている。なかでも *AURA-AR* と仮称した遺伝子は機能解析があまり進んでいない分泌性の蛋白質をコードしている遺伝子であるため、血液中に分泌されている可能性が高い。現在、ELISAによって患者血清における蛋白質レベルを測定しており、この値とRA患者の病態の関連をつけることを目指して実験を進めている。

一方、大多数 (8割以上) のRA患者骨髓液で発現上昇がみられた *AURAB* と仮称した遺伝子は、他の炎症性自己免疫疾患であるSLEや血管炎患者で転写誘導されている遺伝子群のひとつとしてもクローニングされた患者特異的な遺伝子のひとつであった。実際、S

LEでは9割以上の患者の末消血液細胞で、血管炎でも約7割の患者の末消血液細胞で転写誘導されていた。この結果は *AURAB* が自己免疫疾患共通の原因遺伝子であることを示唆する。今後の検討課題である。

さらに興味深いことに、RA患者骨髓液細胞にヒト由来でない遺伝子が数種類見つかった。現在、ヒトの全ゲノム塩基配列は決定されているので、ヒト由来の遺伝子であればDNAバンクの検索で必ずひっかかるはずである。この遺伝子は100個以上のアミノ酸を持つタンパク質をコードするが、どのバンクでも相同性のある遺伝子は見つからない。これが、慢性関節リウマチの原因となる感染体由来なのか否かを調べるのが今後の大きな課題である。

## 4 考察

以上の結果は段階的サブトラクション法が自己免疫疾患の病因解明に新しい視点を与える可能性を強く示唆する。実際、これまでに単離してきたRA特異的な遺伝子群は対象として使ったOA患者由来の骨髓液細胞では全く転写誘導されていない。現在、病態との総合的、系統的な解析を進めてゆくためのツールが完成した段階であるので、これから着々と蓄積してゆくであろう診断データとの関連を示すデータの解析結果が楽しみである。

## 5 評価

### 1) 達成度について

300個もの血液細胞特異的な遺伝子群がクローニングできただけでなく、商品として実用化できたことは当初設定した目標をはるかに凌駕する高い達成度であると評価できる。さらに、RA特異的な遺伝子のみでなく、それらと関連する形での他の自己免疫疾患患者特異的な遺伝子群も次々と単離することができ、自己免疫疾患共通遺伝子の候補までクローニングできたことは、さらに高い達成度であると評価される。

### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究結果は以下の特色ある諸点において学術的・国際的・社会的な意義を持つ。①使用した段階的サブトラクション法は独自に開発した独創的な技術である。②すでに商品化に成功した *PREB*-DNA チップに搭載している遺伝子は半数が機能未知の新規遺伝子である。③すでに離してきたRA特異的に転写誘導されている遺伝子群は大半が今回初めて単離した未知遺伝子である。④世界で初めて慢性関節リウマチの病因となりうる感染体由来の可能性のあるヒト以外の遺伝子をRA患者骨髓液細胞において発見した。⑤自己免疫疾患共通遺伝子の可能性のある新規な *AURAB* 遺伝子を発見した。⑥上述のように類をみない独創性を持つため国内

外で類似の研究は無く、独自の位置付けがなされる。

### 3) 今後の展望について

上述の検討課題をひとつづつ着実に解決してゆくことで、RAの病因解明と、それに基づいた治療法の開発を進めること今後の展望とする。

### 4) 研究内容の効率性について

このような短期間に305個のPREB遺伝子の単離および100個以上のRA, SLE, 血管炎, ITP患者特異的な遺伝子群を単離してきたことは、本研究計画に配分された予算の額を考慮した上でも、この研究が非常に高い効率性を持つと評価できる。

## 6 結論

これまでに、約300種類の血液細胞特異的なPREB遺伝子をクローニングすることに成功し、これらを貼り付けたDNAマイクロアレイを作製して実用化するとともにRA患者における選択的トランスクリプトーム解析をおこなった。またRA患者特異的なAURA AURA遺伝子群も多数単離し、リアルタイムPCRによる各患者における発現量の検定と患者の病態との関連を解析した。本研究計画で得られた成果によって、RAの病因解明と、それに基づいた治療法の開発に一步近づいたと結論できる。

## 7 研究発表

### 1) 国内

口頭発表	8件
原著論文による発表	0件
それ以外(レビュー等)の発表	2件
そのうち主なもの 論文(レビュー)発表	

1) 野島 博: ポストゲノムの切り札となる段階的サブトラクション法、*実験医学*, 20:1442-1444, 2002.

2) 野島 博: 段階的サブトラクション法、*Medical Science Digest*, 29:6-7, 2003.

#### 学会発表

なし(特許取得を優先するため、知的優先権主張の支障となる国内学会発表は控えてきたため)。

### 2) 海外

口頭発表	0件
原著論文による発表	28件
それ以外(レビュー等)の発表	1件
そのうち主なもの 論文発表	

(1) Fujii, T., Tamura, K., Masai, K., Tanaka, H., Nishimune, Y. and Nojima, H.: Use of stepwise

subtraction to comprehensively isolate mouse genes whose transcription is upregulated during spermiogenesis. *EMBO Rep.* 3(4):367-372, 2002.

(2) Shimada, M., Nabeshima, K., Tougan, T. and Nojima, H.: The meiotic recombination checkpoint is regulated by checkpoint *rad+* genes in fission yeast. *EMBO J.*, 21 (11): 2807-2818, 2002.

(3) Ito, A., Jippo, T., Wakayama, T., Morii, E., Koma, Y.I., Onda, H., Nojima, H., Iseki, S., Kitamura, Y.: SgIGSF: a new mast-cell adhesion molecule used for attachment to fibroblasts and transcriptionally regulated by MITE. *Blood*, 101(4), 2601-2608, 2003.

(4) Nojima, H.: G1 and S-phase checkpoints, chromosome instability, and cancer. *In Methods in Molecular Biology, Checkpoint Controls and Cancer - Methods and Protocols.* Humana Press, pp.3-49, 2004.

#### 学会発表

なし

## 8 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

### 1 特許取得

1) 多段階差次的クローニング技術と細胞増殖制御遺伝子; (特願 2001-253536) 野島 博、藤井孝之、恩田弘明、科学技術振興事業団 【出願日】2001年(平成13年)7月27日

2) 末梢血液細胞に示差的に発現されている遺伝子群、およびそれを用いた診断方法とアッセイ方法、(特願 2003-319066) 野島博、(株) ジーンデザイン、科学技術振興事業団【出願日】2003年(平成15年)9月10日、【国際特許出願日】2004年(平成16年)9月9日、米欧19ヶ国出願中

### 2 実用新案登録

なし

### 3 その他

平成16年8月; この研究成果をタカラバイオ(株)に事業移転して「健康診断用PREB-DNAチップ」として商品化し、販売を開始した。

### Ⅲ 平成14年度研究報告書

## (1) 主任研究者 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)

(平成14年度)

厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業)  
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 国立相模原病院病院長

研究要旨 1) 関節リウマチ患者のX線所見および骨量測定より、加齢による骨粗鬆症に比べて高頻度かつ高度な骨粗鬆症発症していることが判明した。2) 加齢による骨粗鬆症では椎体の骨量に明確な減少症を認めるが、関節リウマチではむしろ大腿骨、中手骨に顕著な骨量減少を認め、関節リウマチ特異的な評価法確立が必要と考えられた。3) 関節リウマチ患者の骨髄には特異な破骨細胞と骨髄球形細胞の集積を認め、それぞれの細胞系の骨髄における特異な分化・増殖病態が認められた。4) 関節リウマチの特異な病態は骨髄あるいは滑膜にある線維芽細胞様細胞に認められたが、この分化異常の原因としてウイルス再検討の必要がある。

分担研究者

高橋直之

松本歯科大学・総合歯科医学研究所 教授

野島博 大阪大学微生物病研究所 教授

吉川秀樹

大阪大学大学院医学系研究科 教授

下村伊一郎

大阪大学大学院生命機能研究科 教授

田中 栄 東京大学医学部附属病院 助手

広畑俊成 帝京大学医学部 助教授

武井正美 日本大学内科学 助手

研究協力者

中山久徳 国立相模原病院 医員

鈴木隆二

武田薬品工業(株)研究所主席研究員

中村宣雄 協和会病院 医長

島岡康則 市立池田病院 部長

行岡正雄 行岡病院 院長

宮本寛治

東京都立科学技術大学 大学院教授

桃原茂樹

東京女子医大リウマチ・痛風センター 講師

A. 研究目的

関節リウマチ患者は、非リウマチ高齢者に比べて明らかに高頻度かつ高度の骨粗鬆症と易骨折性が認められている。更に、成人発症関節リウマチ患者の中では約40%を占める重症関節リウマチ患者においては、若年成人でも高度な骨粗鬆症を引き起こしている。このような例では椎体骨折発症のみでなく、膝や股関節などの大関節破壊進行の原因になっている。このような臨床的実態解明を進めるとともに、昨年までの厚生労働科学研究としての関節リウマチ病態研究成果の進展として、関節リウマチ患者の骨髄に的を絞って病態解明研究、原因解明研究を進めて、予防方法、治療方法確立を進めることが主目的である。

B. 研究方法＝疫学研究から分子生物学的研究までの研究を前提に、各施設で倫理委員会の承認を得て、調査研究に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ている。

1) 関節リウマチ患者に発症する骨粗鬆症の疫学的実態調査、診断方法解明の研究

国立相模原病院、大阪大学付属病院整形外科を受診している関節リウマチ患者(約1000例)を対象とした。日本骨代謝学会の診断基準に基づき骨粗鬆症を評価した。併せ、大腿骨、中手骨、

前腕骨等々の腰椎以外の部位の検討、諸方法による骨量の測定、諸種の骨代謝マーカークなどの検討を進めた。

## 2) 病態解明の研究

既に終了した厚生科学研究および医薬品機構基礎研究で解明された病態の一つとして、重症関節リウマチの関節病巣に破骨細胞分化因子(ODF)に依存せずに分化してくる、特異な破骨細胞があることが示されてきた。この分化を支持した線維芽細胞様細胞と、分化してくる破骨細胞の特性解明を主要課題とした。

### i) 線維芽細胞様細胞の研究

関節リウマチ病巣形成に必要なナース細胞が血球細胞を抱込んだときの活性化誘発機序解明も進めている。ナース細胞に抱込まれて活性化したB細胞はナース細胞の細胞質に対する抗体を作っている。この抗原(自己抗原)の解明も進めてきた。またナース細胞に抱込まれた CD14 陽性単球は TRAP 陽性単核球に分化し、更に巨細胞が形成されてゆくが、この機序解明の研究を活性化因子の面から進めている。

### ii) 破骨細胞関連の研究

重症関節リウマチに認められる RANKL(receptor activator of NF  $\kappa$  B ligand)非依存性破骨細胞の前駆細胞である TRAP 陽性単核球樹立および特性解明を進めた。また高橋直之分担研究者はヒト破骨細胞培養系を確立して病態解明を進めた。更に吉川秀樹分担研究者は巨細胞腫に見られる骨吸収性巨細胞の分化機序を調べた。

## 3) 病因解明の研究

骨髄中のウイルス特有の増殖因子存在の有無、腸骨骨髄ナース細胞のウイルス関連反応で調べられている。更に骨髄血中のウイルス由来の遺伝要素の有無が段階的サブトラクション法で進められている。

## C. 結果

### 1) 関節リウマチ患者に発症する骨粗鬆症の疫学的実態調査、診断方法解明の研究

国立相模原病院(中山久徳)の調査によると関節リウマチ患者で骨粗鬆症患者比率は原発性骨粗鬆症患者の発症比率(山本逸雄, 1999)に比べて明らかに高比率で、かつ高度であった。骨粗鬆症評価部位として腰椎の骨塩量を年齢補正すると(Zスコア)非関節リウマチ対照との比較では明瞭な有意差がでないが、大腿骨、中手骨、とう骨などでの骨量計測ではZ score でP値<0,001 で高度の有意差がでることから、関節リウマチの骨粗鬆症を評価するには日本骨代謝学会の「原発性骨粗鬆症の診断基準(2000 年度改訂版)」では不十分で、骨塩量評価は腰椎のみでなく大腿骨、中手骨、とう骨なども併せて評価すべき事が示唆され、次年度以後の重要な研究課題が示されている。吉川らの研究結果によると、原発性骨粗鬆症患者と高度の有意差を示すのは重症秒型の関節リウマチには若い成人にも起きている特徴的臨床症状という結果を示している。骨代謝マーカークや軟骨代謝マーカークの診断的価値については三施設で系統的に評価を続けて中期以上の追跡データで評価項目を決めることを企画している。

### 2) 病態解明の研究

関節リウマチの病態として腸骨骨髄中のいわゆるナース細胞機能を保有して諸種の活性化血球細胞を支持するナース機能を保有する線維芽細胞様間質細胞の研究と、ナース細胞との共培養で前破骨細胞、更に破骨細胞に分化する CD14 陽性単球系とに的を絞っている。

### i) 線維芽細胞様細胞の研究

関節リウマチ腸骨骨髄から得た CD34 陽性未分化細胞に GMCSF や TNF- $\alpha$ を加えて培養すると、骨髄や滑膜細胞から分離できるナース細胞機能をもった線維芽細胞様細胞が分化増殖してくる。さらに CD34 陽性未分化細胞に SCSF および GMCSF を加えて培養すると血管新生を誘導する Von Willebrand 因子が発現し、血管新生をも引き起こし得ることが示された。このようなナース細胞を分化させる各段階の表面抗原の変化と機能との関連を引き続き解明して、病態解明や治療ターゲットに用いることを企画している。この細胞によって病巣の血球細胞機能がかなりコントロールされている。例えば、この細胞と健常人 CD14 陽性単球とを

共培養すると約4週間後に TRAP 陽性単核細胞が分化してくるなどである。このような線維芽細胞様細胞の分化とナース細胞機能出現機序解明は次に大きく発展できる課題としている。このような CD34 細胞の生態的調節機序解明が下村伊一郎班員に分担されている。

#### ii) TRAP 陽性細胞の病態機能解明の研究

関節リウマチ腸骨骨髓から得た線維芽細胞様細胞と健常人 CD14 陽性単球を共培養することにより樹立に成功した TRAP 陽性単核細胞に組織破壊活性があるかを調べ、MMP-2, -9 はじめ多種の MMP が産生され明瞭な組織破壊活性が認められた。骨・軟骨破壊には重要な役割を果たしていると考えられた。更にこの細胞に IL-3, -5, -7, GM-CSF のいずれかを加えることにより単核球の細胞融合が起きて多核巨細胞が形成された。この細胞は非常に顕著な骨吸収活性を持っていることが証明された。重症関節リウマチ特有と考えられるこの細胞の誘導には ODF 添加を必要としないので、従来の破骨細胞との分別を正確に行い関節リウマチに伴う骨吸収機序を細胞レベルで行う強力手段として慎重な検討を続けている。高橋直之班員はヒト破骨細胞培養系を確立して RANKL 非依存性破骨細胞の有無に関しての検討を試みた。健常人末梢血から採取した CD14 陽性細胞培養系に M-CSF を加え、RANKL 添加あるいは非添加で7日間培養した。RANKL 非添加培養系でも、添加培養系に比べて少ない細胞数ではあるが、破骨細胞への分化を認めた。吉川秀樹班員は巨細胞腫(GCT)を数代培養して得た多角形ないし紡錘形細胞(GOS)を得て破骨細胞様巨細胞の支持能を調べた。GOS の mRNA による RT-PCR では RANKL 陰性、RANK 陰性、OCIF 陽性であった。この GOS 細胞培養上清存在下でヒト末梢血単球(CD14 陽性細胞)を共培養すると、多数の TRAP 陽性多核巨細胞が形成され、骨吸収能が認められた。

#### 3) 病因解明の研究

本研究の一つの課題として関節リウマチ患者骨髓の線維芽細胞様細胞のナース細胞機能保有機序を研究標的にしている。ナース細胞がB細胞を抱き込み機能亢進が起きるとき、B細胞はナース細胞の細胞質に対する抗体を産生する。この抗原物質は25あるいは50KDの蛋白であり、EF1- $\alpha$ と同定された。EF1- $\alpha$ は特異的とは言えないがウイルスの増殖因子として作用することが知られている。抱き込まれる細胞が培養前にEBV陰性でも、培養後にEBV陽性になっている例があることを、以前に島岡ら、広畑らが報告しているが、武井正美班員も改めて示した。次年度以後に成果が期待されるウイルスに関するもう一つの研究として、関節リウマチ骨髓血中の遺伝要素に関するライブラリー作成とともに、ウイルス由来の遺伝要素解明(野島博班員)が進められている。

#### D. 考察

関節リウマチ患者の臨床症状としての骨粗鬆症は高頻度に認められ、近年問題視されている加齢に伴う骨粗鬆症に比べて明らかに高度で椎体のみでなく関節周辺の骨折の原因ともなっている。関節リウマチの重傷度との関連は今後の検討課題であるが、関節リウマチ患者の骨粗鬆症の評価の検討が強く求められる。骨代謝マーカーや軟骨代謝マーカーも含めて関節リウマチ特有の評価基準が確立されるべきことが示され、次年度以後の課題にしたい。の必要性がこれでよいのかが先ず問題であるが、年齢的な補正をした Z-score では腰椎では非リウマチ対照との間の有意差なく、むしろ大腿骨、様骨等々の Z-score で有意差が明らかであったことから、

既に終了した厚生科学研究および医薬品機構基礎研究で示された現象の一つであるが、重症関節リウマチで認められる分化・機能ともに亢進した破骨細胞には、破骨細胞分化因子(ODF)に依存せず分化してくる特異な破骨細胞が多数存在している問題に対しても取り組んでいる。この細胞系は TRAP 陽性単核細胞にも組織破壊活性が認められ、骨・軟骨破壊には重要な役割を果たしていると考えられた。更にこの細胞から ODF 非添加で顕著な骨吸収活性を持つ多核巨細胞が形成された。吉川秀樹班員は巨細胞腫由来細胞の破骨細胞様巨細胞の支持能を調べて、各種病態による

多様な骨吸収性多核巨細胞形成経路の存在を示唆した。高橋直之班員がヒト破骨細胞培養系によって RANKL 非添加培養系でも、添加培養系に比べて少ない細胞数ではあるが、破骨細胞への分化を認めているが、関節リウマチにおける高度の骨吸収能を持つ破骨細胞様巨細胞の特性を解明することは急務である。

いわゆる関節リウマチの病因にも結びつき得るのが、線維芽細胞様細胞のナース細胞機能発現機序解明研究と考えている。ナース細胞と共培養した健常人B細胞や CD14 陽性細胞との反応ウイルスの関与を想定させる病態が見いだされてきた。次年度には病因ウイルスを積極的に探索できる課題を取り入れてゆくが、野島班員による段階的サブトラクション法は最も有力な手段の一つと考えられる。

E. 結論= 1) 関節リウマチ患者のX線所見および骨量測定より、加齢による骨粗鬆症に比べて高頻度かつ高度な骨粗鬆症発症していることが判明した。2) 加齢による骨粗鬆症では椎体の骨量に明確な減少症を認めるが、関節リウマチではむしろ大腿骨、中手骨に顕著な骨量減少を認め、関節リウマチ特異的な評価法確立が必要と考えられた。3) 関節リウマチ患者の骨髄には特異な破骨細胞と骨髄球形細胞の集積を認め、それぞれの細胞系の骨髄における特異な分化・増殖病態が認められた。4) 関節リウマチの特異な病態は骨髄あるいは滑膜にある線維芽細胞様細胞に認められたが、この分化異常の原因としてウイルス再検討の必要がある。

## (2) 分担研究者報告書

(平成14年度)

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）  
分担研究報告書

研究課題名：関節リウマチ患者に発症する骨粗鬆症の疫学的実態に関する研究

研究協力者 中山久徳 国立相模原病院 リウマチ科 医員  
共同研究者 當間重人 国立相模原病院臨床研究センターリウマチ性疾患研究部部长  
共同研究者 西野仁樹 国立相模原病院 リウマチ科 医員  
共同研究者 萩原 太 国立相模原病院 リウマチ科 医員  
共同研究者 渡辺淳子 国立相模原病院臨床研究センター研究員  
共同研究者 早川洋美 国立相模原病院臨床研究センター研究員  
共同研究者 野中孝夫 国立相模原病院 放射線科副技師長

研究要旨：関節リウマチ（RA）患者において ADL を著しく低下させる原因となる骨粗鬆症および椎体骨折の疫学的実態を横断研究により明らかにした。その結果、原発性骨粗鬆症に比べて各年代とも RA 患者の骨粗鬆症の有病率が高いことが示された。更に RA の病期、機能障害度やグルココルチコイドの使用状況が骨粗鬆症の発症に及ぼす影響についても検討した。また、椎体骨折の予防の観点から、RA 患者の骨粗鬆症診断にあたっては腰椎だけでなく大腿骨近位部も含めた骨密度評価が重要であると考えられた。

#### A. 研究目的

関節リウマチ(RA)では疾患自体やグルココルチコイド(GC)の内服あるいは身体活動性の低下などによる二次性骨粗鬆症が多くみられ脆弱性骨折を来しやすい。これは原疾患が改善した後も患者の ADL を著しく損なう難治性合併症である。しかし本邦ではこれまで RA 患者における骨粗鬆症に関する報告は乏しい。今回、当院症例にて RA 患者における骨粗鬆症及びこれによる椎体骨折の実態を明らかにする。

#### B. 研究方法

対象はビスフォスフォネート製剤の投与歴のない RA 患者 623 症例（女性 561 例,25-88 歳、男性 62 例,47-84 歳）。DXA 法にて腰椎、大腿骨(大腿骨頸部及び大腿骨近位部全体)の骨密度を、更に CXD 法にて

第 2 中手骨骨密度を測定した。椎体骨折は胸腰椎単純 X 線写真にて判定した。骨粗鬆症の診断は日本骨代謝学会診断基準（2000 年改訂版）に準じた。すなわち、脆弱性骨折が認められるか、あるいは腰椎骨密度が若年成人平均値(YAM)の 70%未満であるときに骨粗鬆症と診断した。骨代謝マーカーとしては尿 NTX と BAP を測定した。また比較のため非膠原病患者 56 例及び RA 以外の膠原病患者 134 例に対しても同様の測定を行った。

本研究での検討項目は全て通常の診療行為の範囲内で調べられており、結果についても患者のプライバシーに十分配慮し倫理的に問題はないが、他の関連研究も含めて院内の倫理委員会の承諾済みである。

#### C. 研究結果

RA 患者のうち 217 例(34.8%)は骨粗鬆症と診断された。また、114 例(18.3%)は椎体骨折を有しており、56 例(9.0%)は 2 椎体以上の多重骨折であった。加齢とともに骨粗鬆症及び椎体骨折は多くみられ、各々の有病率は 50 歳以上では 41.3%, 20.6%, 60 歳以上では 53.7%, 29.4%, 70 歳以上では 61.6%, 41.4%であった。また RA の病期や機能障害度が進むにつれ骨粗鬆症、椎体骨折とも高率になった。非 RA 対照との比較では、大腿骨骨密度の z score は RA 患者で有意( $p < 0.001$ )に低いが、腰椎では明瞭な差は認めなかった。RA 患者の中手骨骨密度は非 RA 患者に比べ有意( $p < 0.001$ )に低値であった。NTX、BAP はいずれも RA 症例は非 RA 対照に比べ有意( $p < 0.001$ )に高値であった。椎体骨折あり群となし群との比較では、あり群はなし群に比べ大腿骨骨密度の z score が低く( $p < 0.001$ )、腰椎では有意差は認めなかった。各骨代謝マーカーはあり群で高値であった( $p < 0.001$ )。GC は 430 例(69.0%)に使用されており、GC 投与群は非投与群に比べ骨粗鬆症(36.7%, 25.4%;  $p < 0.01$ )、椎体骨折(20.0%, 14.5%;  $p = 0.101$ )とも高率であった。GC 投与期間が長く、総投与量や一日投与量が多いほど各有病率とも上昇する傾向がみられた。

#### D. 考察

原発性骨粗鬆症に関しては、「50 歳以上の日本人の女性での有病率は 26.3% (福永 2002)」との報告がある。今回の検討によると 50 歳以上の女性 RA 患者の骨粗鬆症の有病率は 41.3%であり原発性骨粗鬆症を上回った。また、日本人女性の年代別の骨密度が骨粗鬆症域の患者の割合の年代別統計 (山本 1999) と比較しても、RA 患者は各年代にわたり一般人口に比して骨粗鬆症が高率であることが示された。原発性骨粗鬆症の診断において重要視されている腰椎骨密度は年齢を補正した z score で比較すると RA 症例と他疾患症例間に有意な

差はなかった。一方、大腿骨あるいは中手骨骨密度は高度の有意差で RA 症例で低下していた。更に、椎体骨折の有無での比較において両群の z score は大腿骨では有意差を認めるが腰椎では認めなかった。RA 患者では年齢相応者に比べて椎体骨折が頻繁に認められることを考えると、骨折を事前に予測する指標を確立することが重要であるが、この指標として大腿骨骨密度は腰椎骨密度より優れているが示唆された。従って RA における骨粗鬆症の診断にあたっては腰椎のみならず大腿骨および中手骨の骨密度も考慮すべきと考えられる。仮に「脆弱性骨折があるか、腰椎あるいは大腿骨骨密度のいずれかが YAM の 70%未満のとき骨粗鬆症とする」と、今回検討した RA 患者のうち 333 例 (53.5%) が骨粗鬆症と診断された。骨代謝マーカーも骨折予測する有効な指標となる可能性がある。今後は RA の骨粗鬆症を独自の基準によりの確に診断し、早期から骨粗鬆症の進行に歯止めをかける治療を開始することによって骨粗鬆症による骨折をどれだけ抑制できるかを前向きに検証することが課題である。

#### E. 結論

RA 患者では一般人口に比して骨粗鬆症が高頻度に認められた。椎体骨折は骨粗鬆症合併例の半数以上にみられ高リスクである。RA 患者には腰椎のみならず、大腿骨や中手骨など他部位の骨密度も加味し、骨代謝マーカー値も反映させた RA 独自の診断基準が必要であると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

臨床リウマチ (14 ; 139-147, 2002)

##### 2. 学会発表

第 46,47 回 日本リウマチ学会

第 20 回 日本骨代謝学会

第 4 回 日本骨粗鬆症学会

第 57 回 国立病院療養所総合医学会