

(2) 分担研究者報告書

(平成15年度)

I) RA 患者の骨粗鬆症の臨床疫学的研究

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臨床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 医師
研究協力者 橋本 淳 大阪大学 整形外科 講師
研究協力者 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
研究協力者 安藤貴信 国立療養所盛岡病院 整形外科 医長

研究要旨：関節リウマチ（RA）患者では骨折を容易に起こす重症骨粗鬆症が高率にみられる。RA 以外の膠原病や原発性骨粗鬆症の患者と RA 患者を比較することにより RA における骨粗鬆症の臨床的実態の解析を試みた。その結果、RA において骨粗鬆症が高頻度かつ重症化する原因は加齢やグルココルチコイド使用といった個々の要因では説明し難く、複数の要因が絡む病態の複雑さと、RA 特有の骨破壊亢進のメカニズムの存在にあると考えられた。

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)患者では骨粗鬆症を合併する頻度が高く、その程度も激しく、脆弱性骨折をきたしやすい。昨年度の本研究にて、RA 患者の 53.3%が骨粗鬆症と診断され(但し、ここで骨粗鬆症とは、DXA 法による腰椎、大腿骨頸部あるいは大腿骨近位部のいずれかの骨密度が YAM 70%未満と定義した)、19.3%に椎体骨折を、9.9%には2椎体以上の多重骨折を認め、これが既報の一般人口の有病率に比して高率であることを明らかにした。RA では、1)加齢、2)グルココルチコイド(GC)の使用、3)身体活動性の低下、4)炎症性サイトカインなどによる破骨細胞の活性化・作用の亢進、そして 5)その他の要因(内分泌環境の異常、栄養吸収障害、低体重など)が骨粗鬆症の病態をより複雑化させている。こうした多因子を紐解いて、他の膠原病で見られる骨粗鬆症や原発性骨粗鬆症と比較し RA 患者の骨粗鬆症が重症化する原因について検討する。

B. 研究方法

対象は、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)。DXA 法にて腰椎、大腿骨頸部及び大腿骨近位部の骨密度を、更に CXD 法にて第 2 中手骨骨密度を測定した。骨代謝マーカーとしては BAP と尿 NTX を、RA の指標としては CRP および RF を測定した。比較対照として、A 群) 内科、整形外科通院中の膠原病でない女性患者で腰椎及び大腿骨頸部の骨密度を測定した 336 例(平均 61.4±9.0 歳)、B 群) BP 投与歴のない RA 以外の膠原病の女性患者 144 例(平均 58.1±13.6 歳)、C 群) 整形外科通院中の膠原病でない女性患者で第 2 中手骨の骨密度を測定した 532 例(平均 70.9±10.4 歳)の 3 群を設定した。

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

①A群との比較：骨粗鬆症有病率は各年代ともRA群の方が高かった。RA群はA群より大腿骨頸部骨密度が有意に低く(0.58/0.60: $p < 0.05$)、腰椎骨密度も低い傾向がみられた(0.80/0.83)。

②B群との比較：両群とも70%の患者にGCが投与されていた。RA群はB群に比べGC総投与量が少なく(PSL換算9.1g/14.1g)、投与期間が短く(1816.7日/2252.7日)及び日平均投与量も少ない(4.8mg/16.4mg)にもかかわらず、大腿骨頸部(Z-score: -0.64/-0.17: $p < 0.01$)、大腿骨近位部(-0.76/-0.20: $p < 0.01$)と中手骨骨密度(同年代比0.71/0.92: $p < 0.01$)はより低く、骨代謝マーカーも高値であった(BAP: 29.7/23.1 : $p < 0.01$, 尿NTX: 67.2/50.4: $p < 0.01$)。

③C群との比較：年齢を調整し両群の中手骨密度を比較したところRA群の方が有意に低値であった(1.53/1.92: $p < 0.01$)。

④RA群において、CRPと尿NTXには正の相関($r = 0.208, p < 0.01$)がみられたが、CRPとBAPとは負の相関($r = -0.153, p < 0.01$)であった。更に、MMP-3と血清NTXとの間にも正の相関($r = 0.227, p = 0.04$)がみられたが、BAPとは相関はみられなかった。また、RFと骨代謝マーカー間には有意な相関はみられなかった。

D. 考察

各年代別に比較してもRA以外の疾病患者より骨粗鬆症の有病率が高いことからRA患者に骨粗鬆症が多いことは加齢要因のみでは説明できない。GC投与により骨減少に拍車がかかることは明らかであるが、より多くGCを投与する膠原病患者に比べRA患者の骨減少や代謝マーカーの亢進が著明であることからGC誘発性骨粗鬆症もRAの骨粗鬆症の一部を説明するに過ぎない。更に、一般内科や整形外科に通院中の患者群と比較してもRA患者は骨密度の低下がある。ある程度身体活動性が低下していると考えられる

対象と比べてもRA群での骨粗鬆症は重症であることを示唆している。また、炎症性マーカーであるCRPやMMP-3とNTXが正相関を示したことより、炎症の増悪は骨吸収亢進と深く関与していると想定される。

RA患者にみられる骨粗鬆症は加齢やGC使用、身体活動性の低下という個々の成因ではその重症化の理由を説明することは難しい。これは多因子が絡み合った複雑な病態である他に、RAの疾患自体に破骨細胞の働きを亢進させる特異的なメカニズムが存在することが示唆される。

E. 結論

RA患者にみられる骨粗鬆症は加齢やGC使用、身体活動性の低下という個々の成因ではその重症化の理由を説明することは難しい。これは多因子が絡み合った複雑な病態である他に、RAの疾患自体に破骨細胞の働きを亢進させる特異的なメカニズムが存在することが示唆される。

研究発表

1. 論文発表

臨床リウマチ (14 ; 139-147, 2002)

2. 医学雑誌

medical forum CHUGAI (7 ; 2-8, 2003)

実験治療 (671 ; 22-26, 2003)

3. 学会発表

第46,47,48(予定)回 日本リウマチ学会

第20回 日本骨代謝学会

国際骨代謝学会、日本骨代謝学会合同集会

第4,5回 日本骨粗鬆症学会

第57,58回 国立病院療養所総合医学会

第31回 日本臨床免疫学会

関節リウマチ・骨粗鬆症患者の疫学と病態解明に関する研究

分担研究者 吉川 秀樹

所属機関名・職名 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

研究要旨

－基礎研究－

関節リウマチ（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－

栄養学的な背景が均一化されているビタミンD投与中でかつ罹病期間が7年以上のRA患者を対象として、RAの病型評価、ステロイド投与の有無の調査を行なった上で、末梢骨と中枢骨の両方の骨密度の変化の調べを、RA患者の骨密度変化に関与する因子を縦断的研究で検討した。その結果、ビタミンD服用中であっても末梢骨骨密度は減少傾向にあり、大腿骨に比較して手関節近傍の末梢骨骨密度の減少が有意に強いことが明らかとなった。また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唆された。

－基礎研究－

A. 研究目的

関節リウマチ（RA）では、進行性の骨・関節破壊が臨床上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。今までにRA間質系細胞がリンパ球を維持させることを報告し、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。さらにこのRA間質系細胞は末梢血中の単球を支持し、単核のTRAP陽性細胞へと分化誘導することを見いだした。そこで、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および、この細胞の骨軟骨破壊への関与を明らかにする目的で以下の検討を行なった。

B, C. 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 陽性単球（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 (VD_3 , PTH, PGE_2 , Ca^{2+}) 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。

D. 考察

今回の結果より RA 間質系細胞は、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 Nusantara の組織学的検討で Nusantara 組織内に多数の単核の TRAP 陽性細胞が存在し、また Nusantara 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ている。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る。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) から破骨細胞への分化には、骨芽細胞や T 細胞などが発現する RANKL 刺激により行なわれている可能性を考えている。

現在、RA 間質系細胞の支持活性の検討として、CD14+PBMC を維持すること、破骨細胞前駆細胞に分化することから、その一つの因子として M-CSF に着目し、この中和抗体を用いて支持活性に及ぼす影響を検討している。また、RA 間質系細胞によって誘導されてくる破骨細胞の RA 病態に対する関与、すなわち、軽症病型、重症病型それぞれの CD14+PBMC を用いて、それらから誘導されてくる破骨細胞の誘導能や骨吸収能の差異について検討を進めている。

E. 結論

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 —

A. 研究目的

関節リウマチ (RA) ではこの疾患に特徴的な傍関節性の骨粗鬆症に加えて全身性の中枢骨の骨粗鬆症もみられる。従って原発性骨粗鬆症で一般的に行なわれる腰椎と大腿骨の骨密度評価だけではその RA に伴う二次性骨粗鬆症の病態を評価することは困難であり、多数の部位の骨密度評価に基づいた検討を必要とする。一方 RA に伴う二次性骨粗鬆症には加齢や閉経といった因子だけではなく、RA の重症度やステロイドの使用の有無など多くの因子が関与する。これまでに我々は、RA で見られる骨密度減少には RA の破壊関節数で分類した病型 (重症型、軽症型) が強く関与していることを明らかにし、RA の骨密度の評価検討を行なう際には破壊関節数による病型分類も同時に行なうことの重要性を確認している。

このように、RA の二次性骨粗鬆症の病態評価を行なう上で、通常の原因性骨粗鬆症の病態評価で確立されてきた方法だけでは不十分であるがために、十分な検討がなされる機会が少なく、RA 患者の骨密度減少がどの部位にどのような因子の影響を受けて生じているのかいるのかは明らかでない。

そこで今回我々は、全身の関節破壊の評価に基づく RA の病型評価、ステロイド投与の有無の調査を行なった上で、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、骨密度減少に関与する因子を検討した。

B. C. 研究方法、研究結果

罹病期間が 7 年以上で全身関節の破壊関節数による病型分類が可能な閉経後女性 RA 患者を対象とした。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。症例数は50名、平均年齢64.2±9.1歳、平均罹病期間19.1±8.6年であった。骨密度はDXA(Lunar社製DPX-L)にて腰椎、大腿骨を、pQCT(ScancoMedical社製Densiscan-1000)にて橈骨、脛骨遠位の海面骨及び皮質骨部を測定した。各患者の重症度を全身関節の破壊関節数により2つに分け、越智の分類によるLES(less erosive subset)を軽症型、MES(more erosive subset)、MUD(mutilated disease)を重症型とした。ステロイド使用中の患者は32名で平均投与量はprednisolon4.99±2.02mgであった。骨密度の平均追跡期間は7.2±2.1ヶ月であった。

・末梢骨と中枢骨の比較

腰椎、大腿骨BMDの平均変化率は0.13±4.01%、0.29±4.23%で平均的には減少は明らかでなかった。pQCTで測定したBMD変化率は橈骨遠位海綿骨部-0.63±14.8、橈骨遠位皮質骨海面骨部-2.07±4.72、橈骨骨皮質部-1.94±3.67、脛骨遠位海綿骨部-2.17±12.6、脛骨遠位皮質骨海面骨部-0.77±4.03、脛骨骨皮質部-1.11±2.92であった。大腿骨骨密度と橈骨遠位、橈骨骨皮質、脛骨骨皮質骨密度の減少率に有意の差が見られた。つまりビタミンD服用中であっても末梢骨骨密度のは減少傾向にあり、大腿骨と末梢骨骨密度の減少速度に有意差が見られることが明らかとなった。

・病型間比較

短期間の経過ではあるがこれらの変化率を重症病型と軽症病型間での比較を行なったが脛骨遠位海綿骨部で重症病型の方が減少率の大きい傾向が見られたが、いずれの部位も2群間で有意差は見られなかった。

・ステロイドの影響

ステロイド使用の有無の2群間で比較すると使用群に比較して非使用群は橈骨遠位海綿骨部で有意に減少率が大きいことが明らかとなった。つまりステロイドを使用している群の方が橈骨遠位海綿骨骨量は減少しにくいことが明らかとなった。さらにステロイド服用量、年齢、罹病期間、重症度病型の4つを説明変数として、各部位の骨密度を目的変数とした重回帰分析を行なったところ、腰椎骨密度でのみステロイドの服用量が骨密度変化率と負の関連にあることが明らかとなった。つまりステロイド服用量が多いほど腰椎骨密度減

少が大きいことが明らかとなった。他のどの部位も平均7.2ヶ月の期間の骨密度変化にどの因子も有意な関連が見られなかった。

D. 考察

平均7.2ヶ月間の短期間の縦断的調査であるが、罹病期間7年以上の閉経後の女性RA患者のみの比較的均質な対象での検討により、末梢骨の傍関節性骨減少のほうが中枢骨より減少速度が速いことが明らかとなった。また重症度の違いでは重症病型のほうが脛骨遠位骨密度が重症病型で減少しやすい傾向が見られたが7.2ヶ月の経過では有意な差ではなかった。一方、ステロイドの使用がない例では使用例に比較して橈骨遠位海綿骨骨密度減少が大きく、一方腰椎ではステロイド使用量と骨密度の変化率に有意の負相関が明らかとなった。つまり、ステロイドの骨密度への影響は関節近傍の海綿骨には維持的に作用し、腰椎では骨密度減少をもたらすという部位による差が明らかとなった。ステロイドの抗炎症効果に伴い関節近傍の海綿骨には維持的に作用するが、関節から離れた腰椎ではステロイド性骨粗鬆症がみられるという可能性が考えられた。

E. 結論

RAの患者の二次性骨粗鬆症は、これまでに明らかとなっている重症病型と軽症病型での差にとどまらず、腰椎や大腿骨近位などの中枢骨と手関節・足関節近傍の末梢骨の部位によって経時的な骨減少率やステロイドの影響が異なることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 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.

Tanaka, S., Tatsumi, K., Tomita, T., Kimura, M., Takano, T., Yoshikawa, H.,

Amino, N.: Novel autoantibodies to pituitary gland specific factor 1a in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 42:353-356, 2003.

Nakase, T., Miyaji, T., Tomita, T., Kaneko, M., Kuriyama, K., Myoui, A., Sugamoto, K., Ochi, T., Yoshikawa, H.: Localization of bone morphogenetic protein-2 in human osteoarthritic cartilage and osteophyte. *Osteoarthritis Cartilage*, 11:278-284, 2003.

Fujii, M., Tomita, T., Nakanishi, K., Kaneko, M., Hayashida, K., Sugamoto, K., Ochi, T., Yoshikawa, H.: The value and limitation of gadopentetate-enhanced magnetic resonance imaging in detecting the condition of anterior cruciate ligament in rheumatoid knee: comparative study with histology. *European Radiology*, 13:1728-1734, 2003.

Nishikawa, M., Myoui, A., Tomita, T., Takahi, K., Nampei, A., Yoshikawa, H.: Prevention of the onset and progression of collagen-induced arthritis in rats by the potent p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor FR167653. *Arthritis and Rheumatism*, 48:2670-2681, 2003.

Nishikawa, M., Tomita, T., Fujii, M., Watanabe, T., Hashimoto, J., Sugamoto, K., Ochi, T., Yoshikawa, H.: Total ankle replacement in rheumatoid arthritis. *International Orthopaedics*, in press

Tomita, T., Hashimoto, H., Yoshikawa, H.: Gene therapy for arthritis. *Current Drug Targets*, 4:609-612, 2003.

Mukai, Y., Hosono, N., Sakaura, H., Ishii, T., Fuchiya, T., Fujiwara, K., Fuji, T., Yoshikawa, H.: Laminoplasty for cervical myelopathy caused by subaxial lesions in

rheumatoid arthritis. *Journal of Neurosurgery*, 100:S7-12, 2004.

2. 学会発表
未

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

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

早期リウマチ患者における橈骨遠位端海綿骨と踵骨での骨密度の著明な低下に関する研究

研究協力者 西沢 良記 所属機関名・職名 大阪市立大学大学院医学研究・教授

研究要旨

関節リウマチ (RA) による続発性骨粗鬆症は発症部位により全身性と傍関節性骨粗鬆症とに大別されるが、両者の発現時期、発症機序は異なると考えられるため検討を加えた。発症1年以内の女性早期 RA 患者において、pQCT (Startec XCT-960) 法により橈骨遠位端 4%部の海綿骨部と皮質骨部、20%部の骨塩量を測定した。腰椎骨密度及び踵骨音響的骨評価値 (OSI) を QDR 4500A および Acoustic Osteo-Screener (AOS-100) で測定した。RA 患者では橈骨遠位端 4%部の海綿骨部の骨密度が健常人に比し有意に低下していた ($p < 0.0001$)。同部位の皮質骨密度、橈骨遠位端 20%部および腰椎の骨密度には差は認めなかった。踵骨 OSI は RA 患者で低下を認めた ($p < 0.05$)。RA 患者の 4%部の海綿骨と RA 炎症マーカーである血清 CRP, ESR, および RF との間には負の相関が認められた。それら炎症マーカーと踵骨骨密度との間には相関関係は認められなかったが、RA 患者の日常身体活動性の指標である M-HAQ との間には負の相関傾向を認めた。関節リウマチの早期では、手関節近傍の橈骨遠位端の海綿骨、および踵骨の骨量喪失が有意に認められた。橈骨遠位端の海綿骨量の喪失およびは RA の疾患活動性と関連し、RA に伴う関節炎がその主たる原因と考えられ、荷重骨である踵骨の骨密度低下は身体活動性の低下が主因と考えられた。

A. 研究目的

関節リウマチ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傍関節性骨粗鬆症とに大別される。両者の発現時期、発症機序は異なると考えられる。早期 RA 患者において、個々の部位で骨密度を測定し、炎症の程度や身体活動性との関連を検討することにより、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。

B. 研究方法

発症1年以内の女性早期 RA 患者 30 名 (平均年齢 52.1 ± 11.9 才)、女性健常人 26 名 (平均年齢 50.4 ± 13.8 才) において、pQCT (Startec XCT-960) 法により橈骨遠位端 4%部の海綿骨部と皮質骨部、20%部の骨塩量を測定した。腰椎骨密度及び踵骨音響的骨評価値 (OSI) を QDR 4500A および Acoustic Osteo-Screener (AOS-100) で測定した。これらの骨密度計測値と疾患活動性臨床評価値として血清

C 反応蛋白 (CRP), 血沈 (ESR), リウマトイド因子 (RF), 血清免疫グロブリン IgG, IgA, IgM, 血小板数, 血清アルブミン値, 及び身体活動性 M-HAQ スコアとの関連を検討した。

(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、予測されう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。

C. 研究結果

RA 患者群、健常群において年齢、体格に有意な差はなかった。RA 患者では橈骨遠位端 4%部の海綿骨部の骨密度が健常人に比し有意に低下していた ($p < 0.0001$)。同部位の総・皮質骨密度、20%部および腰椎の骨密度には差は認めなかった。踵骨 OSI は RA 患者で低下を認めたが、その差は比較的軽微であった ($p < 0.05$)。RA 患者の 4%部の海綿骨と RA 炎症マーカーである血清 CRP, ESR, および RF との間には負の相関が認められた。それらマーカーと踵骨骨密度との間には相関関係は認められなかったが、RA 患者の日常身体活動性の指標である M-HAQ との間には負の相関傾向を認めた。

D. 考察

関節リウマチの早期では、手関節近傍の橈骨遠位端の海綿骨、および踵骨の骨量喪失が有意に認められた。橈骨遠位端の海綿骨量の喪失は RA の疾患活動性と関連し、RA に伴う関節炎がその主たる原因と考えられた。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に作用していることが示唆された。一方、荷重骨である踵骨の中央部の骨密度低下は身体活動性の低下が主因と考えられた。

E. 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、今回、早期 RA においても、全身性の骨粗鬆症に先んじて既に有意な骨密度の減少が認められること、炎症が強く関与することが明らかになった。従って、積極的な続発性骨粗鬆症に対する対策が RA の予後改善に重要であると考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Inaba, M., Nagata, M., Goto, H., Kumeda, Y., Kobayashi, K., Nakatsuka, K., Miki, T., Yamada, S., Ishimura, E., Nishizawa, Y. Preferential reductions of paraarticular trabecular bone component in ultradistal radius and of calcaneus ultrasonography in early-stage rheumatoid arthritis. *Osteoporos Int* 14: 683-7, 2003

2. 学会発表

Preferential bone loss in paraarticular distal radius and calcaneus in early-stage rheumatoid arthritis
第 47 回日本リウマチ学会総会・学術集会
2003 年 4 月 24 日～26 日 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況（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

II) RA 骨吸収亢進病態解明研究

ヒト破骨細胞形成に関する研究

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

研究要旨：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。末梢血単核細胞より得られた CD14 陽性細胞を用いて、試験管内でヒト破骨細胞が効率的に形成されることが明らかとなった。末梢血 CD14 陽性細胞から破骨細胞への分化誘導には、RANKL とともに M-CSF が必要であった。マウスの破骨細胞と比較したところ、ヒト破骨細胞形成も p38MAPK の特異的阻害剤である SB203508 により強力に抑制され、TGF- β により促進された。PGE₂ は RANKL が誘導するマウスの破骨細胞形成を促進したが、ヒト破骨細胞形成を抑制した。また、カルシトニンはヒト破骨細胞が形成するアクチンリングを効率よく破壊した。

A. 研究目的

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 は RANKL-RANK を介さず直接破骨細胞の分化を誘導することを明らかにした。また、IL-1 は RANKL-RANK を介さず直接破骨細胞の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、マウスの細胞を用い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。関節リウマチや骨粗鬆症の発症機構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。

B. 研究方法

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酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (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。更に、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、TGF- β 、PGE₂ 等を添加して、ヒト破骨細胞形成を観察した。CD14 陽性細胞の PGE₂ レセプター (EP1, EP2, EP3, EP4) の発現は RT-PCR にて解析した。また、ヒト破骨細胞が形成するアクチンリングに対するカルシトニンオ効果を、ウナギカルシトニン (Elcatonin) とヒトカルシトニンを用いて解析した。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。

C. 結果

(1)CD14 陽性細胞を RANKL と M-CSF の存在下で7日間培養すると、効率よく TRAP 陽性ならびにビトロネクチンレセプター陽性の単核および多核細胞に分化した。(2)CD14 陽性細胞は TNF α

と M-CSF の存在下でも、RANKL と M-CSF の場合と同様に破骨細胞に分化した。(3)CD14 陽性細胞を RANKL と M-CSF の存在下に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。(4)p38MAPK

(mitogen-activated protein kinase) の特異的阻害剤である SB203508 は、RANKL と M-CSF が誘導する TRAP とビトロネクチンレセプター陽性の破骨細胞の形成を抑制した。

(5)TGF- β は、RANKL と M-CSF が誘導する破骨細胞の形成を抑制した。(6)CD14 陽性細胞は EP2 と EP4 を発現していたが、EP1 と EP3 を発現していなかった。(7)PGE₂ は、RANKL と M-CSF が誘導する破骨細胞形成を抑制した。

(8)RANKL と M-CSF が誘導する破骨細胞形成を、EP2/EP4 アゴニストは抑制したが、EP3 と EP1 のアゴニストは抑制しなかった。

(9)PGE₂ は、TNF α と M-CSF が誘導する破骨細胞形成も抑制した。(10)CD14 陽性細胞から形成された破骨細胞は培養ディッシュ上でアクチンリングを形成し、カルシトニン処理によりアクチンリングは速やかに消失した。(11) ヒト破骨細胞のアクチンリングを破壊する効果において、ウナギカルシトニンはヒトカルシトニンよりも 100 倍以上強かった。

D. 考察

末梢血単核細胞より得られた CD14 陽性細胞を用いて、試験管内でヒト破骨細胞が効率的に形成された。末梢血 CD14 陽性細胞から破骨細胞への分化誘導には、RANKL と M-CSF が必要であった。また、マウスの破骨細胞形成と同様に、TNF α も破骨細胞形成を促進した。ヒト破骨細胞形成も p38MAPK の特異的阻害剤 SB203508 により強力に抑制された。また、TGF- β はヒト破骨細胞形成を促進した。これらの結果はマウスの破骨細胞で得られた結果と同様であった、しかし、PGE₂ による作用はマウスの場合と逆だった。一方、ヒト破骨細胞が形成するアクチンリングの破壊を指標としたカルシトニンの効果は、マウスの破骨細胞に対するカルシトニン効果と同様であった。また、マウスの場合と同様に、ヒト破骨細胞においても、カルシトニンは cAMP-PKA

(protein kinase A) 系を介してアクチンリングを破壊する可能性が示された。以上のように、

今回の実験結果は、ヒト破骨細胞とマウスの破骨細胞の分化を誘導するシグナル系に若干違いがあることを示唆しており、今後の詳しい解析が必要であると考えられる。また、リウマチなどの炎症性骨吸収に COX2 阻害剤を利用するときにはこれらの知見を考慮する必要があるかもしれない。

E. 結論

末梢血単核細胞より得られた CD14 陽性細胞を用いて、試験管内でヒト破骨細胞が効率的に形成されることが明らかとなった。マウスの破骨細胞と比較したところ、ヒト破骨細胞形成も p38MAPK の特異的阻害剤である SB203508 により強力に抑制され、TGF- β により促進された。PGE₂ は RANKL が誘導するマウスの破骨細胞形成を促進したが、ヒト破骨細胞形成を抑制した。また、カルシトニンはヒト破骨細胞の形成するアクチンリングを効率よく破壊した。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

和文総説など

1. 高橋直之：骨吸収：福永仁夫編「実践・骨代謝マーカー」メディカルレビュー社、東京、pp39-52, 2003.
2. 小林泰浩、高橋直之：破骨細胞の分化と活性制御、宮坂信之、野田政樹、西岡久寿樹（編）「骨・関節疾患」朝倉書店、東京、pp51-55, 2003.
3. 小林泰浩、宇田川信之、高橋直之：骨吸収調節機構、最新医学、58:2631-2639, 2003.
4. 宇田川信之、高橋直之：図説：ビスフォスホネートの作用機序、日本臨床 61:178-179, 2003.
5. 高橋直之、小林泰浩、宇田川信之：骨吸収を促進する炎症性サイトカインと細菌菌体成分の作用機構、エンドトキシン研究 6:36-42, 2003.
6. 山下照仁、高橋直之：骨吸収・骨形成のメカニズム、Hormone Frontier in Gynecology, 10:341-346, 2003.
7. 溝口利英、高橋直之：RANKL/RANK 系に

- よる骨吸収の制御. 治療学 37:1242-1246, 2003.
8. 奥村茂樹, 宇田川信之, 高橋直之: 概論破骨細胞の分化・骨吸収調節機構, 日本臨床 62(増刊 2):90-96, 2004.
 9. 宇田川信之, 中村美どり, 高橋直之: 破骨細胞分化因子 RANKL, 日本臨床 62 (増刊 2) : 97-101, 2004.
 10. 中道裕子, 高橋直之: 骨のリモデリングと骨粗鬆症, カレントセラピー 22:214-217, 2004.
- 原著論文
1. Nakamichi Y, Shukunami C, Yamada T, Aihara K, Kawano H, Sato T, Nishizaki Y, Yamamoto Y, Shindo M, Yoshimura K, Nakamura T, Takahashi N, Kawaguchi H, Hiraki Y, Kato S: Chondromodulin I is a bone remodeling factor. *Mol Cell Biol* 23:636-644, 2003.
 2. Itoh K, Udagawa N, Kobayashi K, Suda K, Li X, Okahashi N, Nishihara N, Takahashi N: LPS promotes the survival of osteoclasts via Toll-like receptor 4, but cytokine production of osteoclasts in response to LPS is different from that of macrophages. *J Immunol* 170:3688-3695, 2003.
 3. Takahashi N, Sasaki T, Tsouderos Y, Suda T: Strontium ranelate inhibits osteoclastic bone resorption. *J Bone Miner Res* 18:1082-1087, 2003.
 4. Takami M, Suda K, Sahara T, Itoh K, Nagai K, Sasaki T, Udagawa N, Takahashi N: Involvement of vacuolar H⁺-ATPase in specific incorporation of risedronate into osteoclasts. *Bone* 32:341-349, 2003.
 5. Takahashi N, Udagawa N, Tanaka S, Suda T: Generating murine osteoclasts from bone marrow. *Methods Mol Med* 80:129-144, 2003.
 6. Nakagawa H, Takami M, Udagawa N, Sawae Y, Suda K, Sasaki T, Takahashi N, Wachi M, Nagai K, Woo JT: Destruixins, cyclodepsi-peptides, block the formation of actin rings and prominent clear zones and ruffled borders in osteoclasts. *Bone* 33:443-455, 2003.
 7. Li X, Udagawa N, Takami M, Sato N, Kobayashi Y, Takahashi N: p38 MAPK is crucially involved in osteoclast differentiation but not in cytokine production, phagocytosis or dendritic cell differentiation of bone marrow macrophages. *Endocrinology* 144: 4999-5005, 2003.
 8. Nakamura M, Udagawa N, Matsuura S, Mogi M, Nakamura H, Horiuchi H, Saito N, Hiraoka BY, Kobayashi Y, Takaoka K, Ozawa H, Miyazawa H, Takahashi N: Osteoprotegerin regulates bone formation through a coupling mechanism with bone resorption. *Endocrinology* 144:5441-5449, 2003.
 9. Suda K, Udagawa N, Sato N, Takami M, Itoh K, Woo JT, Takahashi N, Nagai K: Suppression of osteoprotegerin expression by PGE₂ is crucially involved in LPS-induced osteoclast formation. *J Immunol* 172:2504-2510, 2004.
2. 学会発表
1. 高橋直之: p38 MAPK-mediated signals are crucially involved in osteoclast differentiation (シンポジウム, 第 76 回日本薬理学会・第 80 回日本生理学会同一会, 福岡, 2003 年 3 月 25 日)
 2. 高橋直之: 骨吸収の分子メカニズム (シンポジウム, 第 26 回日本医学会総会, 福岡, 2003 年 4 月 5 日)
 4. Takahashi N: Regulatory mechanism of osteoclast differentiation and function (招待講演, 3rd Yonsei Dental Symposium, Seoul, 韓国 2003 年 1 月 21 日)
 5. 高橋直之: 破骨細胞の骨吸収を抑制するカルシトニンの作用機構 (オーバービュー, 第 3 回カルシトニン/副甲状腺ホルモン研究会, 東京, 2003 年 12 月 13 日)
 6. 高橋直之: 破骨細胞を調節するシグナル伝達系と骨・歯周疾患における骨破壊 (特定領域研究「骨格系の制御プログラムと疾患」班会議, 2004 年 1 月 23 日)
- H. 知的財産の出願・登録状況
特記事項無し。

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

ヒト破骨細胞誘導系の確立と破骨細胞特異的遺伝子の探索に関する研究

分担研究者 鈴木 隆二 所属機関名・職名 国立相模原病院臨床研究センター・室長
研究協力者 前田 朋子 所属機関名・職名 塩野義製薬創薬研究所・主席研究員

研究要旨：我々は、関節リウマチ(rheumatoid arthritis, RA)患者の骨髄および滑膜組織にナース細胞(RA ナース細胞)が高率に存在する事、細胞間相互作用(pseudoemperipolesis)によりリンパ球を活性化し、ナース細胞自身もサイトカインの産生の亢進など活性化が起こる事を報告してきた。今回、我々は、RA に特徴的に存在する RA ナース細胞の単球への影響を観る目的で、健常人末梢血単球と RA ナース細胞との共培養を試みた。RA ナース細胞非存在下で健常人末梢血単球は死滅するが、共培養を行った細胞は細胞質に富み、3ヶ月以上にわたり RA ナース細胞上で増殖し、酒石耐性酸フォスファターゼ(tartrate-resistant acid phosphatase; TRAP)陽性であった。RA ナース細胞との共培養で単球から増殖し変化したこの TRAP 陽性単核球を純粋に分離した後、IL-3, IL-5, IL-7 および GM-CSF の添加により速やかに(72 時間)多核の破骨細胞に分化成熟した。以上から、我々は、RA ナース細胞上でヒト破骨細胞前駆細胞の純粋培養と分離に成功した。さらに、これら前駆細胞から RANKL+M-CSF 誘導系以外の骨吸収能を有する細胞の分化成熟系を見出す事に成功した。純粋分離された破骨細胞前駆細胞の性状解析および純粋な成熟破骨細胞の分化成熟系は、今まで不可能であったヒト破骨細胞の分子レベルでの解析を可能にした。そこで、それぞれの分化段階で発現している遺伝子の解析を行い、ヒト破骨細胞に選択的に発現する新規遺伝子の探索を可能とした。今回、テトラスパンファミリーに属する新規分子を同定し、それに対する抗体の作成に成功した。以上から、ヒトの破骨細胞の多様性を明らかにするとともに、破骨細胞特異的マーカーの探索に成功し、これらを用いた新たな細胞生物学的検討が新規診断および治療に可能性を開いた。

A. 研究目的

我々は、RA における高度な骨-関節破壊の発症・進行機序を明らかにするために、RA 患者関節液および健常人末梢血単球より破骨細胞前駆細胞の単離と純粋培養系を確立し、そのサイトカインによる成熟破骨細胞への分化系を解析し、破骨細胞の多様性の存在を確認するとともに、破骨細胞特異的遺伝子の検出と解析を行い、ヒトにおける破骨細胞の多様性の存在と RA における骨-関節破壊における破骨細胞の生物学的意義を検討した。

B. 研究方法

RA ナース細胞：RA 患者の関節滑膜を酵素処理して得られた線維芽細胞様細胞は D-MEM 培地にて培養した。培養され

た細胞は pseudo-emperipolesis 能を有する RA ナース細胞である。

破骨細胞前駆細胞の純培養：RA 患者由来滑液および健常人末梢血由来単球は CD14 マイクロビーズにより CD14 陽性単核細胞として単離した。これら細胞は RA ナース細胞の単層培養と共培養した。培養後 2～3 週間後、増殖した単核球について TRAP 染色、FACS によるマーカーの検出を行った。

成熟破骨細胞の分化：RA ナース細胞上で増殖した単核球は半浮遊で弱く RA ナース細胞と接着し、比較的簡単に純粋単離する事が可能である。これら細胞について各種サイトカインを添加することにより成熟破骨細胞へと分化誘導が惹起されるか検討を行った。分化誘導された成熟破骨細胞については、既知のマーカーの検出と破骨能

の検討を行った。

特異的遺伝子の解析：関節液由来 CD14 陽性単核細胞、破骨細胞前駆細胞および成熟破骨細胞から mRNA を回収し、differential display により各細胞が特異的に発現する遺伝子の解析を行った。

(倫理面への配慮)

本実験に給した臨床サンプルは、全て説明と同意の上入手した。

C. 研究結果

1. RA ナース細胞による CD14 陽性細胞の維持： RA ナース細胞との共培養で増殖する細胞は分離直後の CD14 陽性細胞と比較して細胞質に富んだ単核球に変化する。これらの単球(様細胞)は 3 ヶ月以上にわたりナース細胞上で増殖し、TRAP 陽性で、貪食能を有していたが単球とは明らかに異なる細胞に分化し、CD14 陽性ではあるが RA ナース細胞との共培養下で CD11a, CD35, CD86 などが陰性に成る事が確認された。また、CD1a, CD83 陰性であり樹状細胞とも異なる細胞であることが示唆された RA ナース細胞との共培養後約 3 週間で、98% 以上の単球由来細胞がこのような分化を遂げる事が明らかになった。

2. TRAP 陽性単核球の破骨細胞様細胞への分化： TRAP 陽性単核球は破骨細胞前駆細胞の可能性が考えられた。本細胞を共培養系から単離し、種々のサイトカインによりこの細胞を刺激する事により単独培養下において多核細胞へと分化するか否かを検討した。TRAP 陽性単核球は IL-3, IL-5, IL-7 あるいは GM-CSF の存在下に全ての細胞が多核巨細胞へと分化した。これらサイトカインにより分化した多核巨細胞は、象牙切片上において吸収能を有していた。これらの分化は、各サイトカイン特異的中和抗体や、各サイトカイン受容体に対する抗体存在下に阻害された。また、近年、マウスの破骨細胞系で極めて重要とされている RANKL(receptor activator of NF- κ B) と M-CSF の共存条件下では、上記サイトカインと比較して約 50% 程度の fusion index を認めるにとどまった。また、この破骨細胞はアクチンリングを有し、カルシトニン受容体や

MMP-9, carbonic anhydrase II など、従来の破骨細胞にあるとされる分子の存在も確認された。以上から、RA ナース細胞との共培養で分化増殖する CD14 陽性 TRAP 陽性単核細胞はヒト破骨細胞前駆細胞であり、上記サイトカインの存在かで成熟破骨細胞に分化することが明らかになった。

3. 我々の破骨細胞と従来の破骨細胞の相違： 破骨細胞の機能として MMP 産生について検討を行った。我々が記載した破骨細胞は MMP-9 と MMP-12 を高産生していることが確認された。一方、RANKL+M-CSF 誘導破骨細胞は MMP-9 は発現しているが MMP-12 の発現は確認されなかった。そこで、RA 患者の骨破壊部位の連続組織切片を作成し、MMP-9 と MMP-12 について免疫組織染色を行った。その結果、MMP-12 陽性および MMP-12 陰性の染色像を示す破骨細胞の存在を確認した。以上から、破骨細胞の多様性もしくは RA 患者においては異なる破骨細胞の存在が示唆された。

4. 破骨細胞特異的遺伝子の探索： 上記の解析結果から、我々は、ヒト破骨細胞系の全てを純粋培養系として試験内で操作する事が可能となった。従来から破骨細胞の同定に必要な特異的マーカーは存在していない。そこで、これら破骨細胞前駆細胞、成熟破骨細胞に特異的に発現する遺伝子の発現を differential display 法により行った。その結果、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、および 15 の破骨細胞前駆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、本遺伝子は成熟破骨細胞にのみ特異的に発現し、末梢単球や破骨細胞前駆細胞には発現が確認されない事、他の組織にも殆ど全く発現が観察されない事が確認されたため、7-44 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。この抗体はヒトおよびマウスの破骨細胞を特異的に認識する事がウエスタンブロッティングおよびヒト骨破壊部位における免疫組織染色で確認された。

D. 考察

RA において、このような破骨細胞前駆細胞が大量に存在し、これが RA 特有な線維芽細胞である RA ナース細胞によって維

持され、RA の炎症時に存在するサイトカインのみで最終分化できるという知見は、今までのマウスを中心とする骨代謝の流れとは異なる。我々は、RA 病態の観察から RA ナース細胞の存在と、その病態形成と慢性化に伴う病態維持にその細胞の重要性を指摘してきた。今回、我々は RA の骨破壊に関わる破骨細胞の誘導機構について検討を行った結果、ヒトにおいては破骨細胞誘導系に多様性があり、従来マウス系でよく理解された RANKL+M-CSF 誘導系以外にも、既知のサイトカインで最終分化誘導ができる事を明らかにした。さらに、本実験系により、従来未解決であった単球-前駆破骨細胞-成熟破骨細胞の各分化段階を詳細に解析し、特異的遺伝子を見出す事が可能となったと同時に、RA 骨関節破壊の病態解明にも新たな知見を加えることができるものがある。今後はより多くの新規破骨細胞特異的遺伝子を見出すための解析が可能である。

E. 結論

RA 病態の形成とその維持に重要に関わる RA ナース細胞は、T 細胞、B 細胞、骨髄球と特徴的な細胞間相互作用を示すことを報告してきた。今回、RA ナース細胞は RA の高度な骨関節破壊に関与する破骨細胞の分化と成熟に深く関わる事を明らかにした。さらに、ヒト破骨細胞系の全分化段階を試験管内で操作することを可能とした結果、ヒト破骨細胞に特異的に発現する新規 4 回膜貫通型レセプターの単離に成功した。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsuboi, H., Y. Matsui, K. Hayashida, S. Yamane, M. Maeda-Tanimura, A. Nampei, J. Hashimoto, R. Suzuki, H. Yoshikawa and T. Ochi.

Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive cells in rheumatoid synovium may induce the destruction of articular cartilage.

Annals of Rheumatic Diseases 2003 Mar;62(3):196-203.

Yoshida, T., Y. Tsuruta, M. Iwasaki, S. Yamane, T. Ochi and R. Suzuki.

SRCL/CL-P1 Recognizes GalNAc and a Carcinoma-Associated Antigen, Tn Antigen
J Biochem 1 2003 Mar;133(3):271-7.

Takano, H., T. Tomita, T. Toyosaki-Maeda, M. Maeda-Tanimura, H. Tsuboi, H. Yoshikawa, T. Takahashi, R. Suzuki and T. Ochi.

Comparison of the activities of multinucleated bone-resorbing giant cells derived from CD14-positive cells in the synovial fluids of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patient

Rheumatol in Press, 2004.Feb,3

2. 学会発表

未

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

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

関節リウマチにおける osteoclastogenesis に関わる分子に関する研究

研究協力者 佐伯 行彦 所属機関名・職名 国立大阪南病院・臨床研究部長

研究要旨

骨吸収性疾患の原因分子のひとつとして注目されている、オステオポンチン（OPN）の関節リウマチ（RA）における osteoclastogenesis への関与を明らかにするために、RA の疾患モデルであるマウスカラーゲン誘導関節炎（CIA）を用いてその osteoclastogenesis への OPN の関与を検討した。CIA を誘導したマウスの関節炎局所から分離した細胞を 7 日間培養すると過去の報告のとおり spontaneously に活性化した破骨細胞（TRAP 陽性、Pit assay 陽性）が誘導された。一方、CIA を誘導しなかったマウスでは誘導されなかった。この関節炎局所から分離した活性化破骨細胞を誘導する細胞においては RANKL の発現の亢進がみられ、OPG の発現は低下していた。さらに、OPG を添加することでこの *in vitro* の osteoclastogenesis は抑制された。このことから、この CIA の関節炎局所では RANKL/OPG 系の osteoclastogenesis が存在することが示唆された。さらに、この関節炎局所から分離した活性化破骨細胞を誘導する細胞においては OPN の産生の亢進が認められ、OPN の中和抗体により、この osteoclastogenesis は抑制された。そして、CIA を誘導した OPN ノックアウトマウス由来の細胞に OPN を加えると濃度依存的に osteoclastogenesis は増進した。また、ストローマ細胞（ST-2）に OPN 存在下で培養すると活性化 VitD/デキサメサゾンと同程度 RANKL の発現の亢進がみられ、OPG は低下した。以上のことから、関節炎局所では osteoclastogenesis が亢進し、関節局所で産生された OPN はこの osteoclastogenesis に対して positive に作用していることが明らかになった。また、この OPN の osteoclastogenesis に対する positive 作用の一部は RANKL/OPG 系を介したものであることが示唆された。

A. 研究目的

関節リウマチ（RA）において临床上最も重大な問題である骨破壊は病理学的検討などから破骨細胞による骨吸収の亢進が主たる原因と考えられている。したがって、RA における破骨細胞の誘導・活性化（osteoclastogenesis）の分子機構を明らかにすることは、骨破壊の診断・治療の開発に不可欠である。今年度は、骨吸収性疾患の原因分子のひとつとして注目されている、オステオポンチン（OPN）の RA の osteoclastogenesis への関与を明らかにするために、RA の疾患モデルであるマウスカラーゲン誘導関節炎（CIA）を用いて osteoclastogenesis における OPN の影響を検討した。

B. 研究方法

（1）CIA の関節炎局所での *in vivo* osteoclastogenesis の評価；鈴木らの方法（*J Rheumatol* 25:1154-60,1998）に従い、CIA を誘導したマウスの関節炎を惹起している部位より細胞を分離、7 日間 *in vitro* で培養し、活性化した破骨細胞（TRAP 染色陽性で Pit assay 陽性の細胞）の数を測定した。

（2）OPN の定量は ELISA 法（OPN-ELISA kit, IBL）を用いた。

（3）RANKL, OPG (osteoprotegerin) の mRNA の定量は、定量的 real-time PCR 法を用いた。

（倫理面への配慮）

マウスの実験においては、国立大阪南病院動物実験指針に従い実施した。

C. 研究結果

(1) 関節局所での osteoclastogenesis の亢進 ; CIA を誘導したマウスの関節局所では、活性化した破骨細胞 (TRAP 陽性、Pit assay 陽性) が存在した。一方、CIA を誘導しなかったマウスの関節では、活性化された破骨細胞は存在しなかった。また、関節炎を惹起している部位から分離した細胞では、RANKL の発現が亢進し、OPG の発現の低下が認められた。この実験系において、OPG の添加により、濃度依存的に活性化した破骨細胞の数は減少した。

(2) 関節炎局所での OPN 産生の増加と OPN の osteoclastogenesis における positive 効果 ; 関節炎を惹起している部位から分離した細胞の培養上清中には、OPN が有意に増加していた。OPN の中和抗体の添加により濃度依存的に活性化した破骨細胞は有意に減少した。また、OPN ノックアウトマウス由来の細胞に OPN を添加すると濃度依存的に活性化した破骨細胞は有意に増加した。

(3) OPN はストローマ細胞において RANKL の発現を亢進し、OPG の発現を低下させる ; ストローマの cell line (ST-2) に OPN 存在下で培養すると、活性化 VitD/デキサメサゾンと同程度、RANKL の発現が亢進し、OPG の発現は低下した。

D. 考察

関節炎局所では osteoclastogenesis が亢進している。OPN は関節炎局所で産生され、osteoclastogenesis に対して positive に作用している。この OPN の osteoclastogenesis に対する positive 効果の一部は RANKL/OPG system を介したものである。

E. 結論

OPN は関節炎の osteoclastogenesis において positive 因子である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamaguchi N, Saeki Y et al.(8,last). Synergistic effect on the attenuation of collagen induced arthritis in tumor necrosis factor receptor I (TNFR1) and interleukin 6 double knockout mice. J Rheumatol 30(1):22-7, 2003 Jan
2. Ishii T, Saeki Y et al. (8,last). A case of multicentric Castleman's disease demonstrating severe eosinophilia and enhanced production of interleukin-5. Eur J Haematol 70(2):115-8, 2003 Feb
3. Ishii M, Saeki Y et al.(9,last). Possibility of preventive treatment for EBV-associated NK cell-lineage proliferative disorders. Intern Med 42(3):250-4, 2003 Mar
4. Saeki Y, et al.(20,1st). Enhanced production of osteopontin (OPN) in multiple myeloma (MM): Clinical and pathogenic implications Br J Haematol 123(2):263-70, 2003 Oct
5. Ishii T, Saeki Y et al.(12,last). Mice with osteopontin deletion remain predisposed to collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum. 2004 Feb;50(2):669-71
6. Ishii T, Saeki Y et al.(12,last). Osteopontin(OPN) as a positive regulator in the osteoclastogenesis of arthritis. Biochem Biophys Res Commun (in press)

2. 学会発表

1. 第 47 回 日本リウマチ学 H15.4.24. 東京
美馬 亨、大島至郎、石井泰子、石田哲士、前田 晃、小松原良雄、七川勸次、行岡正雄、南平昭豪、橋本英雄、菅本一臣、片田圭宣、清水正敏、川瀬一郎、佐伯行彦
W 27-2-O/P
ムチランス型関節リウマチ (RA) の骨髄におけるオステオポンチン (OPN) 産生の亢進
2. 67th American College of Rheumatology 2003, Oct Orland, USA.

Tabunoki Y, Edano T,
Murakami K, Kobayashi H,
Koshi T, Ohkuchi M, Ohshima S,
Mima T, Ishii T, Hattori Y, Saeki Y.
Anti-arthritic Effects of a Novel
Anti-cytokine Low Molecular Weight
Compound, K-832. Arthritis Rheum
48(9):S555, 2003

3. Ishii T, Ohshima S, Ishida T,
Mima T, Tabunoki Y, Kobayashi H,
Maeda M, Uede T, Liaw L, Kinoshita
N, Kawase I, Saeki Y.
Osteopontin(OPN)-Deletion Remains
Predisposed to Collagen-Induced
Arthritis(CIA). Arthritis Rheum
48(9):S555, 2003

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

1. 抗オステオポンチン抗体
出願番号 特願 2001-107578
特願 2001-290700
PCT/JP02/03382
2. ミエローマ系腫瘍予防・治療剤
及びその診断法
出願番号 特願 2002-076501
PCT/JPO3/03314
3. オステオポンチン産生抑制方法
60・490.950（米国仮出願）

2. 実用新案登録

特記すべきことなし。

3. その他

特記すべきことなし。