

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

(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。一方 r-BMD はレ線ステージの進行が見られない時期から既に著明に低下していた。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 ALP、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。

D. 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。

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、早期 RA においては、全身性の骨粗鬆症に先ん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、炎症が強くと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。

(健康危険情報)

特記事項無し

F. 研究発表

1. 論文発表

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 16:64-70 2004

2. 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

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

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・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 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

－検討1－

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
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患者の末梢骨と中枢骨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、腰椎骨密度はステロイド服用により減少するが、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。

－検討2－

関節リウマチ患者骨粗鬆症に伴う骨折発生頻度と発生に関わる因子解析を目的とした前向き検討

3ヶ月以内毎に定期的通院しているRA患者209名を対象として、脊椎・大腿骨頸部以外の骨折と、X線像上診断困難な脆弱性骨折も含めた骨折の発生頻度とその発生に関与する因子を前向き調査で検討した。その結果、骨折発生率は0.198骨折/人・年という極めて高頻度であることが明らかとなった。さらに、骨折は下肢骨、骨盤を含めて全身さまざまな部位にみられ、71%は日常生活動作で発生した脆弱性骨折であった。骨折発生には身体機能とステロイド服用量が有意の影響因子であった。RA患者の身体機能維持のためには関節破壊防止に加え、これまでの認識以上に骨折防止のための早期対応が重要であることが明らかとなった。

－検討1－

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

A. 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。

B. 研究方法

検討1、2とも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。

C. 研究結果

・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 $-2.1 \pm 4.8\%$ 、橈骨骨幹部 $-2.4 \pm 4.8\%$ 、脛骨骨幹部 $-1.2 \pm 3.3\%$ 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

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の継続投与例では観察期間中骨密度が減少したのに対して、ビタミンD新規投与

例では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
多重回帰分析により橈骨骨密度の変化率に対する有意の影響力が示された因子は、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。

D. 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。

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。

E. 結論

罹病期間が7年以上の閉経後女性RA患者では、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。また限定的ではあるがビタミンD服用の骨密度維持への有用性が確認できた。

－検討2－

関節リウマチ患者骨粗鬆症に伴う骨折発生頻度と発生に関わる因子解析を目的とした前向き検討

A. 研究目的

RAで椎体・大腿骨頸部以外の四肢を含めたさまざまな部位に骨折がみられることは過去に後ろ向きの病歴調査により明ら

かにされている。しかしこのような全身さまざまな部位の骨折を含めた骨折発生率を明らかにした報告はない。また、著しい二次性骨粗鬆症が生ずることの多いRAでは日常生活動作中に生ずる脆弱性骨折がしばしば起こることが認識されてきているが、このような脆弱性骨折の診断は簡単ではなくこれを含めて発生率を検討した報告は全

くない。この研究は、RA患者で脊椎、大腿骨頸部以外の骨折や脆弱性骨折も含めた骨折の発生頻度とその発生に関する因子を前向き調査で明らかことを目的とした。

B. 研究方法

アメリカリウマチ学会の診断基準を満たすRA患者で長くとも3ヶ月毎に定期的通院している患者209名(平均年齢60.4 ± 11.5才、男31女178、平均罹病期間14.5 ± 10.2年)を対象とし9ヶ月間調査した。骨折の診断は、臨床症状、単純X線像を用い、単純X線上診断不可能な場合はMRI、骨シンチ、CTあるいは単純X線上の経時的変化で画像上確認した。骨折発生に関する因子として、年齢、性、機能分類(class)、ステロイド使用量、投与期間、骨粗鬆症薬使用の有無・投与期間、下肢手術の有無・回数、CRP、骨代謝マーカー(BAP、DPD)との関与を検討した。解析はSPSS11.5Jを用いてロジスティック回帰分析を行なった。

C. 研究結果

調査期間の9ヶ月間に22名31骨折が発生し、骨折発生率は0.198骨折/人・年であった。骨折は椎体、骨盤、肩、大腿骨遠位など全身さまざまな部位にみられた。22名のうち32%が複数骨折例、31骨折のうち71%は日常生活動作で発生した脆弱性骨折であった。36%は疼痛発症時に単純X線像上確認不可能であった。骨折発生に関する因子として単変量回帰では年齢、機能分類、ステロイドの服用量・投与期間が関与していたが、多重回帰では身体機能とステロイド服用量が有意の影響因子であった。

D. 考察

平均年齢60歳のRA患者で0.198骨折/人・年と非常に高頻度に骨折を合併することが明らかとなった。また脆弱性骨折と単純X線像上確認できない骨折が多いことが明らかとなった。骨折はMichelらの過去の報告と同様に全身さまざまな部位にみられたが、我々の検討では骨盤骨折の頻度が多く、これはMRIや骨シンチによりX線像上診断困難な脆弱性骨折を診断しえたことによると考えられた。

骨折発生に関する因子はステロイドの使用量と身体機能であった。

E. 結論

RA患者に見られる骨折は極めて高頻度に生じており、外傷もなく生ずる脆弱性骨折が多いことが明らかとなった。RA患者の身体機能維持のためには関節破壊防止に加え、これまでの認識以上に骨折防止のための早期対応が重要であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

Nishikawa, M., Tomita, T., Fujii, M., Watanabe, T., Hashimoto, J., Sugamoto, K., Ochi, T., Yoshikawa, H.: Total ankle replacement in rheumatoid arthritis. *International Orthopaedics*, 28:123-126, 2004.

Nampe, A., Hashimoto, J., Hayashida, K., Tsuboi, H., Shi, K., Tsuji, I., Miyashita, H., Yamada, T., Matsukawa, N., Matsumoto, M., Morimoto, S., Ogihara, T., Ochi, T., Yoshikawa, H.: Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is highly expressed in osteocytes in human bone. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 22:176-184, 2004.

Horiki, M., Imamura, T., Okamoto, M., Hayashi, M., Murai, J., Myoui, A., Ochi, T., Miyazono, K., Yoshikawa, H., Tsumaki, N.: Smad6/Smurf1 overexpression in cartilage delays chondrocyte hypertrophy and causes dwarfism with osteopenia. *Journal of Cell Biology*, 65:433-45, 2004.

Horiki, M., Nakase, T., Myoui, A., Sugano, N., Nishii, T., Tomita, T., Miyaji, T., Yoshikawa, H.: Localization of RANKL in

osteolytic tissue around a loosened joint prosthesis. Journal of Bone and Mineral Metabolism, 22:346-351, 2004.

Akita, S., Tamai, N., Myoui, A., Nishikawa, M., Kaito, T., Takaoka, K., Yoshikawa, H.: Capillary vessel network integration by inserting a vascular pedicle enhances bone formation in tissue-engineered bone using interconnected porous hydroxyapatite ceramics. Tissue Engineering, 10:789-795, 2004.

Nishikawa, M., Myoui, A., Ohgushi, H., Ikeuchi, M., Tamai, N., Yoshikawa, H.: Bone tissue engineering using novel interconnected porous hydroxyapatite ceramics combined with marrow mesenchymal cells: Quantitative and three-dimensional image analysis. Cell Transplantation, 13:367-376, 2004.

Kawakami, H., Sugano, N., Yonenobu, K., Yoshikawa, H., Ochi, T., Hattori, A., Suzuki, N.: Effects of rotation on measurement of lower limb alignment for knee osteotomy. Journal of Orthopaedic Research, 22:1248-1253, 2004.

Tsumaki, N., Kakiuchi, M., Sasaki, J., Ochi, T., Yoshikawa, H.: Low-intensity pulsed ultrasound accelerates maturation of callus in patients treated with opening-wedge high tibial osteotomy by hemicallotaxis. Journal of Bone and Joint Surgery, 86A:2399-2405, 2004.

Hirohata, S., Yanagida, T., Nampei, A., Kunugiza, Y., Hashimoto, H., Tomita, T., Yoshikawa, H., Ochi, T.: Enhanced generation of endothelial cells from CD34+ cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis: Possible role in synovial neovascularization. Arthritis and Rheumatism, 50:3888-3896, 2004.

玉井宣行、名井陽、荒木信人、秋田鐘弼、中瀬尚長、海渡貴司、村瀬剛、上田孝文、越智隆弘、吉川秀樹: 新規全気孔連通型 HA 多孔体 NEOBONE を用いた骨欠損に対する治療, 関節外科, 23:100-107, 2004.

樋口周久、吉川秀樹: 骨形成因子(BMP)、骨粗鬆学-基礎・臨床研究の新しいパラダイム-, 日本臨床, 62:52-56, 2004.

玉井宣行、名井陽、橋本英雄、西川昌孝、藤井昌一、中瀬尚長、橋本淳、上田孝文、越智隆弘、吉川秀樹: 人工骨材料と骨・関節修復、新規全気孔連通型 HA 多孔体 NEOBONE を用いた骨・関節修復, 分子リウマチ, 1:107-112, 2004.

橋本英雄、富田哲也、梶座康夫、吉川秀樹、森下竜一: NFκB デコイを用いた変形性関節症の治療, 整形・災害外科, 47: 1028-1029, 2004.

西川昌孝、名井陽、富田哲也、高樋康一郎、南平昭豪、吉川秀樹: 関節炎における骨・関節破壊進行と p38MAPK, 整形・災害外科, 47:1422-1423, 2004.

名井陽、吉川秀樹: 連通多孔体型ハイドロキシアパタイトの開発と再生医療への展開, 骨・関節・靭帯, 17:1205-1215, 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

研究課題名：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の
重要性に関する研究

研究協力者 中山久徳 国立病院機構相模原病院 リウマチ科 医師

研究要旨：関節リウマチ (RA) 患者において ADL や QOL 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実態を明らかにする臨床研究を行っている。RA 患者では腰椎に比して大腿骨骨密度の低下が著しく、特徴的である。RA による関節障害のため年齢に比して身体活動性が低下することが原因と考えられる。そのため 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。

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)患者は続発性骨粗鬆症を惹き起こす代表的疾患であり、脆弱性骨折をきたし患者の ADL を一層低下させる。これまでの本班研究にて、当科 675 人の RA 患者の横断研究にて、53.3% が骨粗鬆症と診断され、19.3% に椎体骨折を、9.9% には多重骨折を認め、これが既報の日本人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てきた。原発性骨粗鬆症では腰椎骨密度を測定することにより骨粗鬆症の診断をすることが一般的である。しかし、RA では身体活動性の低下による骨密度低下の要素も強く、これを反映する大腿骨の骨密度測定も重要と考えられた。そこで RA 患者の骨粗鬆症評価における大腿骨骨密度測定の意義について検討した。

B. 研究方法

対象は、ビスフォスフォネート未投与の女性 RA 患者 609 例 (平均 60.6±10.1 歳)。DXA 法 (QDR-4500A, Hologic) にて腰椎(LS)、大腿骨頸部(FN)及び大腿骨

近位部全体(TH)の骨密度を測定した。椎体骨折は胸腰椎 X 線写真にて判定した。比較対象として、RA 以外の膠原病 (nonRA/CTD) の女性患者 144 例 (平均 58.1±13.6 歳) も検討に加えた。

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

①RA 患者の骨粗鬆症および椎体骨折の有病率の年代別検討：加齢に伴い骨粗鬆症、椎体骨折有病率とも上昇した。65 歳以上の高齢者では 50% 以上が骨粗鬆症を合併し、75 歳以上では約 70% に達した。椎体骨折を有する患者は 65 歳以上で 30%、75 歳以上で 50% に及んだ。原発性骨粗鬆症の診断基準でもある LS 骨密度が成人女性平均(YAM)70%未満の割合は 75 歳以上では 40% を占めたがこれは椎体骨折有病率の 50% を下回ってい

た。一方、FNあるいはTHのいずれかがYAM70%未満となる割合は75歳以上では約80%であり椎体骨折有病率より高率であった。

②RA群とnonRA/CTD群との比較：RA群はnonRA/CTD群に比して骨粗鬆症が多くみられる(RA:53.3%, nonRA:35.9%, $p<0.001$)。年齢を考慮し両群のBMD Z scoreを比較すると、RA群ではLS:-0.2±1.0, FN:-0.5±1.3, TH:-0.6±1.2、一方nonRA/CTD群ではLS:-0.1±1.1, FN:0.0±1.2, TH:0.0±1.1であった。FNおよびTHのZ scoreではRA群はnonRA/CTD群に比べて有意($p<0.001$)に低値であるが、LSでは有意な差は認められなかった。

③骨密度Z scoreのRA Stage, Class別分散分析：骨密度Z scoreのRA Stage別分散分析では、どの部位の骨密度Z scoreもStageが進むにつれて低下する傾向がみられるが、p値はLS:0.185, FN:<0.001, TH:<0.001であり、大腿骨でStageの進行による有意な低下がみられた。RA Class別分散分析も同様にClassが進むにつれZ scoreは低下する傾向がみられるものの、有意な低下はFN($p<0.001$)とTH($p<0.001$)であり、LS($p<0.121$)では有意差はみられなかった。

④骨密度T scoreを目的変数とした重回帰分析：FNおよびTHのT scoreを目的変数とすると年齢、体重、ステロイド投与の有無以外にRAのStage、ClassやRAの炎症マーカーであるCRPが説明因子として抽出されたが、LSではこれらのRAに関わる因子は抽出されなかった。

D. 考察

RAでは、加齢、グルココルチコイド(GC)の使用、身体活動性の低下、炎症など複数の成因が骨粗鬆症の病態をより複雑化、重症化させている。QOLを低下さ

せる骨折を予防するためにはより早い段階から骨折リスクの高い患者に対しての骨粗鬆症治療が必要である。しかし、腰椎骨密度のみで骨粗鬆症判定をすると、75歳以上では骨粗鬆症と診断されるより多くの患者が既に椎体骨折を有しており骨粗鬆症診断が骨折予防に繋がらない。大腿骨骨密度で診断すればこうしたこと回避し得る。また、RA患者はより多くのGCを投与されているnonRA/CTD患者に比して骨粗鬆症が多くみられるが、これはRA患者のFNやTHの骨密度が有意に低下しているためであり、LS骨密度では有意な差はみられない。また、RAの病期や機能障害度の進行につれて大腿骨骨密度は腰椎に比べて明らかな低下を示す。さらに、RAの病期や機能障害度は大腿骨骨密度低下の説明因子として抽出されるが、腰椎骨密度低下は説明し得ない。以上より、RAの骨粗鬆症は多因子によるが、中でも関節障害による身体活動性低下が大きく寄与しており、これは大腿骨骨密度の低下に如実に現れていると考えられる。

E. 結論

RAに特徴的な骨密度の低下は腰椎よりむしろ大腿骨近位部がより強く反映しており、RA患者の骨粗鬆症判定には大腿骨近位部の骨密度の評価が重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

・中山久徳、當間重人ほか. 末期関節リウマチにおける骨粗鬆症および椎体骨折：臨床リウマチ. 14；139-147, 2002

・中山久徳 関節リウマチとステロイド性骨粗鬆症：Osteoporosis Japan 12(2) 144-149, 2004.

・中山久徳 関節リウマチ患者の骨粗鬆症の臨床的実態とその治療：Osteoporosis Japan 12(2) 184, 2004.

・Nakayama H, Hagiwara F, Tohma S.

Bone mineral density and frequency of osteoporosis and vertebral fractures in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50 S498,2004

・ Nakayama H, Hagiwara F, Tohma S. The efficacy of alendronate, risedronate and etidronate in treatment of osteoporosis and in reducing the risk of vertebral fractures of rheumatoid arthritis patients(fracture intervention trial). *Arthritis Rheum* 50 S498,2004

2. 学会発表

・ 中山久徳、萩原 太、當間重人、越智隆弘ほか. リウマチ疾患においてグルココルチコイドが骨代謝に及ぼす影響に関する検討. 2004/4/17 第 48 回日本リウマチ学会

・ 中山久徳、萩原 太、當間重人、越智隆弘ほか. 関節リウマチ患者に対する各種骨粗鬆症薬介入の効果 (第 2 報) . 2004/4/17 第 48 回日本リウマチ学会

・ 中山久徳、萩原 太、當間重人、越智隆弘ほか. 関節リウマチ患者にみられる骨粗鬆症の臨床的実態. 2004/8/6 第 22 回日本骨代謝学会

・ 中山久徳、萩原 太、當間重人、越智隆弘ほか. 関節リウマチ患者に対する各種骨粗鬆症薬介入の効果 (2 年間の成績、新規骨折抑制効果と脱落率) . 2004/8/7 第 22 回日本骨代謝学会

・ 中山久徳、萩原 太、當間重人、越智隆弘ほか. 関節リウマチ患者にみられる骨粗鬆症の臨床的実態とその治療. 2004/9/4 第 14 回日本リウマチ学会近畿支部学術集会

・ Nakayama H, Hagiwara F, Tohma S. Bone mineral density and prevalence of osteoporosis and vertebral fractures in Japanese patients with rheumatoid

arthritis. 2004/9/11 APLAR (Jeju, Korea)

・ Nakayama H, Hagiwara F, Tohma S. Bone mineral density and frequency of osteoporosis and vertebral fractures in Japanese patients with rheumatoid arthritis. 2004/10/16 ACR (Sanantonio, USA)

・ Nakayama H, Hagiwara F, Tohma S. The efficacy of alendronate, risedronate and etidronate in treatment of osteoporosis and in reducing the risk of vertebral fractures of rheumatoid arthritis patients (fracture intervention trial). 2004/10/16 ACR (Sanantonio, USA)

・ 中山久徳、萩原 太、當間重人、越智隆弘ほか. 関節リウマチと骨粗鬆症. 2004/11/19 第 6 回日本骨粗鬆症学会

・ 中山久徳、萩原 太、當間重人、越智隆弘ほか. 関節リウマチ患者に対する各種ビスフォスフォネート製剤介入の効果. 2004/11/20 第 6 回日本骨粗鬆症学会

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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：PGE₂は、骨芽細胞の破骨細胞分化因子(RANKL)を誘導することは広く知られているが、破骨細胞前駆細胞に対しても強力に作用する。今回我々は、マウスとヒト破骨細胞形成における PGE₂ の作用を解析し、マウスとヒトの破骨細胞形成に対して、PGE₂は異なる作用を有することを明らかにした。PGE₂は、RANKL が誘導するマウス破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を促進した。PGE₂は、マウス破骨細胞前駆細胞のシグナル伝達因子 TAK1 (TGF-β activated kinase 1) のリン酸化を誘導して、RANKL 誘導性の破骨細胞形成を促進した。一方、ヒト破骨細胞前駆細胞の培養系において、PGE₂は RANKL が誘導するヒト破骨細胞形成を強力に抑制した。ヒト破骨細胞前駆細胞は、PGE₂に反応して、破骨細胞形成を抑制する新規のサイトカインを産生することが示された。

A. 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-κB ligand)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 (receptor activator of NF-κB) 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。

我々は、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子(TNF-α)とインターロイキン 1 (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、いくつかの疑問点が残る。とりわけ、プロスタグランジン E₂ (PGE₂)の作用機構に差異がある可能性が指摘される。PGE₂は骨芽細胞の RANKL 発現を誘導することは広く知られているが、破骨細胞前駆細胞に対しても強力に作用する。マウス

の破骨細胞培養系では、PGE₂は cAMP 依存性タンパク質リン酸化酵素 PKA の活性化を介し、RANKL が誘導するマウス破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化を、更に促進する。一方、リウマチ患者に PG 合成酵素 (COX2) 阻害剤を投与しても、骨吸収抑制が認められにくいことも知られる。今回我々は、マウスとヒト破骨細胞形成における PGE₂ の作用を解析した。

B. 研究方法

(1)ヒト破骨細胞の形成実験：ヒト末梢血より、Ficoll-Paque 遠心法で単核細胞を分取した。CD14 抗体ビーズ使い、ヒト末梢血単核細胞より CD14 陽性細胞を分取し、破骨細胞前駆細胞として用いた。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。また、ヒト副甲状腺ホルモン(PTH)受容体を発現させた SaOS4/3 細胞と CD14 陽性細胞の共存培養を行った。ヒト破骨細胞形成に及ぼす PGE₂ の作用を解析した。

(2)マウス破骨細胞の形成実験：8週齢マウスから得た骨髄細胞を M-CSF の存在下で培養して得られた骨髄由来マクロファージ、およびマクロファージ細胞株 RAW264 細胞を、破骨細胞前駆細胞として用いた。骨髄由来マクロファージあるいは RAW264 細胞

を RANKL の存在下あるいは非存在下で 7 日間培養した。PGE₂ の作用機構の解明は、PGE₂ 受容体の解析、シグナル伝達系の解析、各種遺伝子の強制発現等により行った。破骨細胞形成を評価するため、培養後、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色、あるいはビトロネクチン染色を施した。

(倫理面への配慮)

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を得た。また、マウスの飼育や処置などは、松本歯科大学動物管理委員会の管理の下で行った。

C. 研究結果

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。骨髄マクロファージと RAW264 細胞は、PGE₂ 受容体 EP2 と EP4 を発現していた。PGE₂ による破骨細胞形成促進効果は、cAMP 依存性タンパク質リン酸化酵素 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。③412 番目の Ser を Ala に置換した S412A-TAK1 を発現させた RAW264 細胞では、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、CD14 陽性細胞は EP2 と EP4 を発現しており、PGE₂ は CD14 陽性細胞における cAMP 産生を促進した。⑤PTH 受容体を導入したヒト骨芽細胞株 SaOS4/3 細胞と CD14 陽性細胞の共存培養系において、PTH はヒト破骨細胞形成を促進した。この PTH 誘導性破骨細胞形成も PGE₂ は強力に抑制した。⑥CD14 陽性細胞は PGE₂ に反応して、強力な破骨細胞形成抑制因子を産生した。この抑制因子は、ヒト破骨細胞のみならずマウス破骨細胞形成も強力に抑制した。⑦CD14 陽性細胞が産生する破骨細胞形成抑制因子は、破骨細胞形成を抑制することが知られている既知のサイトカイン (GM-CSF, IL-4, INF- γ) ではなく、新規のサ

イトカインである可能性が示された。

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。昨年報告したように、マウスの破骨細胞形成と同様に、ヒト破骨細胞形成も p38 mitogen-activated protein kinase の特異的阻害剤である SB203508 により強力に抑制されるため、ヒト破骨細胞形成もマウスと同様なシグナル系が重要な役割を有していると考えられた。しかし本実験より、マウスとヒトの破骨細胞形成に対して、PGE₂ は逆の作用を有することが示された。マウスの場合、破骨細胞前駆細胞の TAK1 をリン酸化して RANKL 誘導性の破骨細胞形成を促進した。一方、ヒトの破骨細胞前駆細胞は PGE₂ に反応して破骨細胞形成を抑制する新規のサイトカイン (破骨細胞形成抑制因子) を産生する可能性が示された。現在そのサイトカインの同定を行っている。これら知見は、骨吸収を抑制することを目的に、COX2 阻害剤をヒトに投与しても、骨吸収抑制が認められにくいことと一致するかもしれない。

E. 結論

PGE₂ は、マウスとヒト破骨細胞形成に対して、逆の作用を有していた。マウスの場合、破骨細胞前駆細胞の TAK1 をリン酸化して、RANKL 誘導性破骨細胞形成を促進した。一方、ヒトの破骨細胞前駆細胞は、PGE₂ に反応して、破骨細胞形成を抑制する新規サイトカインを産生することが示された。

(健康危険情報)

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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

- (3):214-217, 2004.
4. 高橋直之、小澤英浩：抗 RANKL 抗体 AMG162 による骨粗鬆症の治療、*Clinical Calcium*, 15(1): 43-48, 2005.
 5. 溝口利英、高橋直之：目で見る Bone Biology「破骨細胞の分化と機能調節機構」骨粗鬆症治療, 4(1):2-5, 2005.
 6. 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.
 7. Sato N, Suda K, Takahashi N, Nakamura M, Kobayashi Y, Takada H, Shibata K, Takeda K, Akira S, Noguchi T, Udagawa N.: MyD88 is an essential molecule in osteoclastogenesis induced by lipopolysaccharide, diacyl lipopeptide and IL-1 α , and MyD88 knockout mice exhibit a low turnover osteoporotic phenotype. *J Exp Med* 200:601-611, 2004.
 8. Kobayashi Y, Mizoguchi T, Take I, Kurihara S, Udagawa N, Takahashi N: Cyclic AMP/protein kinase A signals enhance osteoclastic differentiation through TAK1 in osteoclast precursors. *J Biol Chem*, in press, 2005
 9. Mizoguchi T, Nagasawa S, Takahashi N, Ygasaki H, Ito M: Dolomite supplementation improves bone metabolism through modulation of calcium-regulating hormone secretion in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab*, in press, 2005.
 10. Namikawa T, Terai H, Suzuki E, Hoshino M, Toyoda H, Nakamura H, Takahashi N, Nimomiya T, Takaoka K: Experimental spinal fusion with recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered by a synthetic polymer and beta-tricalcium phosphate in a rabbit model. *Spine*, in press, 2005.
 11. Takahashi N, Udagawa N, Kobayashi Y, Suda T: Generation of osteoclasts in vitro, and assay of osteoclast activity. In "Arthritis Research: Methods and Protocols" ed by Cop A, Humana Press, Totowa, New Jersey, in press, 2005.
2. 学会発表
 1. 高橋直之：細菌感染と骨吸収（シンポジウム、第 77 回日本細菌学会総会、大阪、2004 年 4 月 3 日）
 2. 高橋直之：カルシトニン受容体のシグナル伝達系、（ランチョンセミナー、第 22 回日本骨代謝学会学術集会、大阪、2004 年 8 月 7 日）
 3. Naoyuki Takahashi : Inflammation and osteoclastogenesis. (16th International Congress of International Anatomy Association, Kyoto, Japan, August 25, 2004)
 4. Naoyuki Takahashi: Role of MyD88-mediated signals in osteoclast differentiation and function (The 11th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress, Jeju, Korea, September 15, 2004)
 5. 高橋直之、佐藤信明、宇田川 信之：炎症性骨吸収における MyD88 シグナルの重要性、(第 41 回日本口腔組織培養学会、東京、2004 年 11 月 20 日)
 6. 高橋直之：破骨細胞形成に及ぼす PGE₂ の作用の解析（越智班、班会議、東京、2004 年 11 月 30 日）
 7. 高橋直之：歯科矯正における骨吸収調節機構：PGE₂ と骨吸収（新潟大学大学院セミナー、新潟、2004 年 12 月 13 日）
 8. Naoyuki Takahashi: Mechanism of bone resorption induced by bacterial components（International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai、仙台、2005 年 2 月 3 日）
 9. 高橋直之：炎症性骨吸収の誘導機構（特定領域研究「骨格系の制御プログラムと疾患」班、公開シンポジウム、東京、2005 年 2 月 19 日）
- G. 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
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

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

分担研究者 鈴木 隆二

所属機関名・職名 (独)国立病院機構相模原病院臨床研究センター・室長

研究要旨 関節リウマチ(RA)患者の骨髄および滑膜にはナース細胞が存在する事を報告してきた。今回、ナース細胞に特異的に発現する遺伝子を探索目的に、2種類の cDNA subtraction 法を行った。その結果、ナース細胞に発現が確認された #4-14/SRCL は #4-14/SRCL はスカベンジャーレセプター(SRA)とアミノ酸レベルで 27%の相同性が認められた。また C 型レクチン領域のみのサーチではマクロファージガラクトースレクチン(ML)と 40%程度の相同性が認められたハイブリットタイプの構造を示していた。今回、この分子の発現細胞の解析と機能解析を行い、本分子が本分子もナース細胞における抗原取り込みや、血管内皮における細胞接着に関与している可能性がある結果を得た。

A. 研究目的

我々は、関節リウマチ(RA)の骨髄・滑膜組織に存在が確認されたナース様細胞 (RA ナース細胞) が、RA 病態の形成と維持(慢性化)に深く関与する事を報告してきた。 RA ナース細胞は、「リンパ球の抱き込み (pseudoemperipolexis)」という特徴的な機能を有し、この細胞間相互作用により、リンパ球系および骨髄球系の免疫担当細胞の維持・活性化を担い、免疫機能の維持、調節に深く関係していると考えられている。このような RA ナース細胞機能を分子レベルで理解するために、ナース細胞の機能に特異的な分子を同定し、RA 関連原因分子の探索をおこなった。

B. 研究方法

ナース細胞と非ナース細胞との間で二種類 cDNA subtraction 法(I-RDA 法および SSH-RDA 法)より得られた約 400 個のクローンにつき解析を行い、ナース細胞で発現している新規スカベンジャーレセプター様遺伝子(#4-14)を同定した。以下今までに得られた #4-14 の機能解析の結果について報告する。なお、本遺伝子は C 型レクチンを持つ新規スカベンジャーレセプターファミリー SRCL(BBRC、2001、280、p1028) として報告されたた

め、ここでは #4-14/SRCL のように併記した。(倫理面への配慮) 本研究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

#4-14/SRCL の構造: #4-14/SRCL は 472 アミノ酸残からなり、そのアミノ酸配列の特徴から 5 つのドメイン構造を有する。N 末端より順に細胞質、膜貫通、coiled-coil、コラーゲン、および C タイプレクチン領域からなっていた。細胞質領域にはエンドサイトーシスシグナル(YXXF)が存在し、coiled-coil 領域には疎水性アミノ酸の周期的繰り返しからなるヘプタドリピートが存在し、#4-14/SRCL の 3 量体形成能が示唆された。その疎水性部位の一部に SRA 等でも保存されているヒスチジン残基が 4 個所存在しており、リソソームでのリガンド解離に関与することが報告されている。 #4-14/SRCL のコラーゲン領域中には 49 回の GXX の繰り返しが存在し、その中にリジン、アルギニンリッチ領域が 3 箇所存在し、陰性荷電を持つタンパク質等を取り込むことが示唆された。C 末端のレクチン領域はアミノ酸配列の特徴 (QPD モチーフ) から、Ca²⁺ 依存的にガラクトース (Gal) やグルコース (Glc) のような糖鎖を認識することが予想された。 #4-14/SRCL のアミノ酸配列のデータベースサーチによると、 #

4-14/SRCL はスカベンジャーレセプター (SRA) とアミノ酸レベルで 27% の相同性が認められた。また C 型レクチン領域のみのサーチではマクロファージガラクトースレクチン (ML) と 40% 程度の相同性が認められた。

#4-14/SRCL の発現解析：各種細胞における #4-14/SRCL の発現を調べた。ナース細胞では、胸腺ナース (Hs67)、皮膚ナース (HSN27E、SK-LMS-1) や RA 滑膜ナース細胞 (RA189SM) で発現しており、非ナース細胞では繊維芽細胞様細胞 Hs683 を除き、ほとんどの細胞株 (繊維芽細胞系、上皮細胞系、リンパ球系) で発現していなかった。またヒトプライマリー細胞である胎盤静脈 (HUVEC)、心臓冠動脈 (HCAEC) および大動脈血管内皮細胞 (HAEC) で発現していた。なお、その発現は 100ng/ml の LPS 刺激 8 時間では変化しなかった。ヒト組織では心臓、胎盤、小腸、睾丸、卵巣等で発現していたが、脳、肝臓、末梢血リンパ球では発現していなかった (Fig. 2C)。血管に富む肝臓では発現していないので、#4-14/SRCL はすべての血管内皮細胞では発現しておらず、心臓等の血管内皮細胞等でのみ発現していると考えられる。

#4-14/SRCL による変性 LDL や変性 BSA の取り込み：SRA のリガンドであることが判明している種々の変性タンパク質分子 (DiI 標識アセチル化 LDL、DiI 標識酸化 LDL、DiI 標識糖化 BSA、FITC 標識フォルマリン処理 BSA 等) を作製し、全長 #4-14/SRCL または SRA を大量発現させた 293E 細胞および COS-7、CHO 細胞で、これらのリガンドの取り込みを調べた。SRA ではすべてについて取り込み活性が確認できたが、#4-14/SRCL 大量発現細胞ではまったく取り込み活性が認められなかった。これらのことから #4-14/SRCL は血管内皮細胞において、従来のスカベンジャーレセプターとは異なるリガンドを認識することが示唆された。

#4-14/SRCL のエンドサイトーシス能：#4-14/SRCL は細胞質領域にエンドサイトーシスシグナル (YXXF) を持つことから、#4-14/SRCL のエンドサイトーシス能を調べた (Fig. 4)。方法としては、#4-14/SRCL の C 末端の myc タグを付けたキメラ遺伝子 (#4-14/SRCLmyc) を 293E

細胞に発現させ、抗 myc 抗体の取り込みを、4℃ または 37℃ で調べた。結果は、Fig. 4A に示したように 4℃ では細胞膜が染色され、37℃ では抗体が細胞内に取り込まれ、細胞内が染色された。これを FACS で定量化した結果、陽性細胞が 1% 程度から 37% に上昇した。

次に #4-14/SRCL のレクチン領域はマクロファージガラクトースレクチン (ML) と 40% 程度の相同性があるので、マンノース (Man)、グルコース (Glu) 等のいくつかの糖鎖を結合させたポリアクリルアミド粒子の取り込みを #4-14/SRCL または ML 発現細胞で調べた。糖鎖が N アセチルガラクトサミン (GalNAc) の場合にのみ #4-14/SRCL を大量発現させた 293E 細胞で取り込み活性が確認され、Man、Glu の場合には取り込まなかった。陽性コントロールの ML も同様に GalNAc を取り込んだ。Fig. 4C に GalNAc についての結果を示した。

#4-14/SRCL のレクチン領域の機能解析：#4-14/SRCL のレクチン領域の機能解析のために、レクチン領域の N 末端に IgG のシグナル配列、C 末端にアルカリフォスファターゼ (AP) を融合させたキメラ遺伝子 (LEC-AP) を 293E 細胞に発現させ、その上清の AP 活性を定量し、インビトロ結合実験に使用した。#4-14/SRCL のレクチン領域のリガンド特異性を詳細に検討するため、インビトロで GalNAc ゲルとの結合実験およびその競合阻害実験を行った。1 mM の Ca^{2+} イオン存在下で LEC-AP はインビトロで GalNAc ゲルと結合した。この結合は 5 mM EDTA 存在化でほぼ完全に阻害されることから、 Ca^{2+} 依存的であった。また単糖の GalNAc、D、L 型フコース、D 型ガラクトース、メチル D ガラクトース (各 100 mM) で完全に阻害された (Fig. 6A)。GalNAc、D 型ガラクトース、D 型フコースの 50% 阻害濃度 (IC50) はそれぞれ 6 mM、16 mM、12 mM であった。次に各種二糖での競合阻害実験を行った。その結果、 β -ラクトースで IC50 は 1 mM であった。メリビオース、スクロース等では 1 桁高かった (Fig. 6C)。多糖類ではガラクトタンが IC50 が 1mg/ml であった。これらの結果からある種のガラクトースの多糖体にも結合しうることが示唆された。次に T 抗原 (Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr)、Tn 抗原 (GalNAc- α -Ser/Thr) による競合阻害実験を行った。なお、これらの抗原はあ

る種のガン細胞の表面に発現しており、MLが認識することで、マクロファージによるガン細胞認識において機能していることが示唆されている。そこで、これらの糖鎖によるGalNAc-ゲルとの結合に対する競合阻害実験を行った結果、IC50はT抗原が約1mM、Tn抗原が約0.5mMであった。したがって#4-14/SRCLは、これらの抗原も効率よく認識することが示された。最近の報告によると、コレクチンファミリーのC1qやマンノース結合レクチン(MBL)がアポトーシス細胞の細胞表面の泡構造(Bleb)に特異的に結合することで、これらの細胞のファゴサイトによる認識、除去に積極的に機能していることが報告されている。(J. Immunol., 2001, 166, p3231 & J. Exp. Med., 2001, 194, p781)そこで、#4-14/SRCLのC型レクチン領域がアポトーシス細胞(Jurkat)に結合するか否か調べた結果、コントロールとして用いたDCIRとよばれるNK細胞が発現しているC型レクチンSEAPキメラ(DCIR-SEAP)あるいはSEAP単独ではほとんど結合しなかったが、LEC-APは未処理のJurkat細胞に特異的に結合した(Fig. 8A None)。この結合は20mM EDTA存在下で完全に阻害されたことからカルシウム依存的であると考えられる。しかし100mMのGalNAcではまったく阻害されず、糖鎖認識部位とは異なる領域で結合していると考えられた。次に0.3mMのH₂O₂で24時間処理し、アポトーシスを誘導したJurkat細胞に結合するか否かを調べた結果、未処理のJurkat細胞と比較して20倍程度結合が上昇した(Fig. 8A H₂O₂)。

この結合はdI-dC、ゲノムDNA、プラスミドDNA、ポリI、デキストラン硫酸等の陰性荷電で阻害されたが100mMのGalNAcでは阻害されなかった(Fig. 9)。さらに、#4-14/SRCLのレクチン領域がアポトーシス細胞のどこに結合しているか視覚化するために、LEC-APのAP部分をEGFPと置き換え、LEC-EGFPを作製し、293E細胞で発現させ、その上清を用いて細胞結合実験を行った。その結果、未処理Jurkat細胞にはまったく結合しなかったが、H₂O₂処理Jurkat細胞にはほぼ100%の細胞に結合した。結合場所は不均一で、パッチあるいはモザイク状に結合

していた。今後、この結合している場所がアポトーシス細胞特有の表面Blebなのか否か調べる予定である。

#4-14/SRCLのコラーゲン領域の機能解析：#4-14/SRCLのコラーゲン領域には3個所の陽性荷電のクラスターがあり、リガンド結合部位と考えられている。最近の報告で#4-14/SRCL発現細胞がグラム陰性細菌(大腸菌)、陽性細菌(黄色ブドウ球菌)、出芽酵母に結合することが報告されている。この結合特性、認識リガンド、認識部位を特定するため、インビトロ結合系の構築を行った。LEC-APと同様に分泌させるため、シグナル配列をN末端につけて、さらに三量体形成能を持たせるためにコイルドコイル領域を含むコラーゲン領域のC末端にAPをつないだキメラを作製し(COL-AP)、これを293E細胞で発現させ、その培養上清をアッセイに使用した。上記COL-APを発現させた培養上清で各種細菌およびヘパリンゲルとの結合実験、および種々の陰性荷電分子による競合阻害実験を行った。SEAPのみではほとんど結合しなかったが、COL-APは大腸菌、黄色ブドウ球菌何れにも結合した。この結合は陰性荷電粒子のフコイダン、ポリグルタミン、デキストラン硫酸、ヘパリンで阻害され、さらにグラム陽性細菌の細胞壁成分であり、この菌のエンドトキシンでもあるペプチドグリカンの結合しているリポテイコ酸(LTA)(1mg/ml)ではほぼ完全に競合阻害された。一方、大腸菌の細胞壁成分のLPSでは阻害されなかった。なお、COL-APはヘパリンゲルとも結合し、この結合はヘパリン(100μg/ml)では阻害されたが、LTA(100μg/ml)ではほとんど阻害されなかったことより、ヘパリンと細菌またはLTAとの結合部位が異なることが示唆された。さらにLTAのIC50を決定した結果、COL-APと黄色ブドウ球菌との結合の競合阻害から求めたLTAのIC50は約10μg/mlであった(Fig. 12)。この濃度はSRAの場合とほぼ同程度であった(4μg/ml:PNAS, 1994, 91, p1863)。これらの結果から#4-14/SRCLが黄色ブドウ球菌を認識するリガンドはLTAであることが示唆された。次に、細胞外マトリックスの主要成分であるグリコサミノグリカンのコンドロイチン硫酸(CS)A、B、Cおよびヘパラン硫酸(HS)によるCOL-APと黄色ブドウ球菌との結合の競合阻害実験を行った。その結果、CS-B(別名デルマタ

ン硫酸)が特異的に結合を阻害した。IC50値は100 μ g/mlでほぼ完全に阻害できた。CS-Bは血管壁等に多く存在し、特に損傷部位血管内皮細胞で発現され、創傷液(wound fluid)中濃度は15-65mg/mlであることが報告(JBC, 1998, 273, p28116)されているので、#4-14/SRCLは生理的にもCS-Bをリガンドとする可能性があり、可溶性CS-B含有プロテオグリカンが血管内皮細胞表面に保持する場合に機能している可能性等が考えられる。さらに、これら細菌およびヘパリンゲルの結合部位を決定するため、コラーゲン領域を順次欠損させた分泌型APキメラ遺伝子を作製し、これらを293E細胞で発現させ、培養上清を細菌等との結合実験に使用した。なお、3個所の陽性荷電領域を図中+で示した。細菌(大腸菌、黄色ブドウ球菌)との結合実験では、両者ともR25で50%程度結合活性が低下し、R24で完全に結合能を失った。しかし、ヘパリンゲルとの結合はR24では上昇しており、R23で完全に消失した。R25、R24間の領域は3番目の陽性チャージの下流領域で、アミノ酸配列はGDPGPPGPPGKEGLPGPQであった。R24、R23間は3番目の陽性チャージ領域と一致し、そのアミノ酸配列は、GERGGKGSKGSQGPKGSRGSPGKPPGPGPSであった。この結果から細菌とヘパリンゲルとの結合部位は異なることが判明し、さらに1、2番目のチャージはこれらのリガンド認識には関係がないことが判明した。

D. 考察

①二種類cDNA subtraction法によって、ナース細胞に選択的に発現しているスカベンジャーレセプターが単離された。本分子はスカベンジャーレセプター(SRA)とそのアミノ酸レベルで27%相同を有すとともに、C型レクチン領域のみのサーチではマクロファージガラクトースレクチン(ML)と40%程度の相同が認められる、ハイブリッドタイプの非常にユニークな構造を示している。

②発現細胞の解析からナース細胞と血管内皮細胞にその発現が確認され、これらの細胞で、如何なる機能に関与するかであるが、細胞接着や抗原の取り込みをす

ることが知られ、本分子もナース細胞における抗原取り込みや、血管内皮における細胞接着に関与している可能性がある。

E. 結論

ナース細胞に発現する新規遺伝子を単離した。今後は、①. 細胞とLEC-APとの結合において、アポトーシス細胞上の結合部位の決定。②. 固相化#4-14/SRCLとCS-Bまたは細胞との結合等の解析を介してCS-Bとの結合の生理的意味の解明。③. コラーゲン領域の細菌等結合部位の詳細な解明。④. X型PLA₂等による変成LDLの取込み。を行いこれらの解析を介してナース細胞や血管内皮細胞で発現する#4-14/SRCLの生理的役割を理解し、創薬研究の糸口となる研究に発展させていきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

SRCL/CL-P1 recognized GalNAC and a carcinoma-associated antigen, Tn antigen.

J Biochem. 2004 Mar;133(3):271-7

Takano H, Tomita T, Toyosaki-Maeda T, Maeda-Tanimura M, Tsuboi H, Takeuchi E, Kaneko M, Shi K, Takahi K, Myoui A, Yoshikawa H, Takahashi T, Suzuki R, Ochi T.

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

Rheumatology(Oxford).2004Apr;43(4):435-41

2. 学会発表

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

ヒトナース細胞特異的遺伝子(特許出願中)

2. 実用新案登録

3. その他

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)
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
分担研究報告書

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

分担研究者氏名 佐伯行彦 国立病院機構 大阪南医療センター 臨床研究部長

研究要旨：これまでの研究結果から、関節リウマチ (RA) の骨破壊は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。また、破骨細胞の活性化過程において、複数の破骨細胞が融合し、多核巨細胞を形成する形態的変化をすることが知られている。この細胞融合による多核巨細胞化は破骨細胞の骨吸収能の獲得 (増幅) と密接な関連があるものと考えられているが、その分子機構はまったく明らかにされていない。一方、最近、膜4回貫通型蛋白質スーパーファミリー (TM4SF) あるいは tetraspanin スーパーファミリーとよばれる分子群 (CD9、CD63、CD81、CD82 など) が種々の細胞融合に関わっていることが報告されている。本年度は、破骨細胞の細胞融合に実際に、tetraspanin の中の CD9 が関与しているかどうかを破骨細胞の前駆細胞であるマウス単球系セルライン、RAW246.7 細胞の実験系を用いて検討した。その結果、RAW246.7 細胞は細胞表面に CD9 を発現し、破骨細胞への分化誘導の主たるシグナルである RANKL の添加によりその発現が up-regulate された。また、RAW246.7 細胞の細胞表面の CD9 は細胞融合後細胞内へ取り込まれた (internalization)。さらに、CD9 に対する中和抗体の添加により、RAW246.7 細胞の細胞融合、破骨細胞への分化・活性化 (骨吸収能) が有意に抑制された。以上のことから、tetraspanin CD9 は、破骨細胞の分化活性化過程において、細胞融合による多核巨細胞化に関与していることが示唆された。また、破骨細胞前駆細胞の細胞融合による多核巨細胞化は、骨吸収能の獲得 (増幅) に重要な形態的変化である可能性が示唆された。

A. 研究目的

これまでの研究結果から、関節リウマチ (RA) の骨破壊は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。また、RA 患者由来の関節炎局所の (滑膜組織や関節液から分離した) 細胞を *in vitro* で培養すると多数の骨吸収能を有する活性化した破骨細胞が無刺激下で誘導されることから、RA の関節局所では破骨細胞の活性化が亢進していることが示唆される。また、破骨細胞の活性化過程において、複数の破骨細胞が融合し、多核巨細胞を形成する形態的変化をすることが知られている。この細胞融合による多核巨細胞化は骨吸収能の獲得 (増幅) に密接な関連があるものと考えられているが、その分子機構はまったく明らかにされていない。

一方、最近、膜4回貫通型蛋白質スーパーファミリー (TM4SF) あるいは tetraspanin スーパーファミリーとよばれる分子群 (CD9、CD63、CD81、CD82 など) が精子と卵子、筋芽細胞など種々の細胞融合に関わっていることが報告されている。

本研究では、破骨細胞の細胞融合に関わる分子 (とくに CD9、CD81 などの TM4SF) の同定とその分子の細胞融合過程での動的解析を目的とする。本研究の成果は、破骨細胞の活性化機構の解明だけでなく、その制御法の開発は RA の骨破壊の新たな治療法あるいは治療薬の開発に繋がることを期待できる。本年度は、破骨細胞の細胞融合に実際に、tetraspanin の中の CD9 が関与しているかどうかを破骨細胞の前駆細胞であるマウス単球

系セルライン、RAW246.7細胞の実験系を用いて検討した。

B. 研究方法

破骨細胞の前駆細胞であるマウス単球系セルライン、RAW246.7細胞を用いて以下の実験を行った。

- (1) RAW246.7細胞でのCD9の発現をFACSで確認した。
- (2) RANKL刺激によるCD9の発現の亢進をWestern Blot法で検討した。
- (3) RAW246.7細胞の破骨細胞への分化/活性化実験系で抗CD9中和抗体の破骨細胞分化、細胞融合(多核巨細胞化)への影響(抑制作用の有無)を検討した。

尚、本研究は培養細胞(セルライン)を用いたin vitroの実験であり、人権擁護上の配慮や実験動物に対する動物愛護上の配慮については格別必要ではなく、倫理面での問題は無いものと考えられる。

C. 研究結果

- (1) RAW246.7細胞でのCD9の発現
FACSの結果、RAW246.7細胞表面にはCD9が恒常的に発現していることが確認された。また、Western Blotの結果、RANKL刺激によりCD9の発現が増幅されることが明らかになった。さらに、単細胞の時に細胞表面に発現していたCD9は、細胞融合後、多核巨細胞の表面から細胞内へ取り込まれた(internalization)。
- (2) 抗CD9中和抗体の破骨細胞分化、細胞融合(多核巨細胞化)への影響
抗CD9中和抗体添加により濃度依存的に細胞融合(細胞融合インデックスによる評価)は最大60%抑制され、成熟活性化した破骨細胞(TRAP陽性多核巨細胞)への分化も有意に抑制された。

D. 考察

RAW246.7細胞は細胞表面にCD9を発現し、破骨細胞への分化誘導の主たるシグナルであるRANKLの添加によりその発現がup-regulateされた。また、RAW246.7細胞の細胞表面のCD9は細胞融合後表面から細胞内へ取り込まれた(internalization)。さらに、CD9に対する中和抗体の添加により、RAW246.7細胞の細胞融合、破骨細胞への分化・活性化(骨吸収能)が有意に抑制された。以上のことから、tetraspanin CD9は、破骨細胞の分化活性化過程において、細胞融合による多核巨細胞化に関与していることが示唆された。また、破骨細胞前駆細胞の細胞融合による多核巨細胞化は、骨吸収能の獲得(増幅)に重要な形態的変化である可能性が示唆された。

E. 結論

tetraspanin CD9は、破骨細胞の分化活性化過程において、細胞融合による多核巨細胞化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

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) Ishii T, Ohshima S, Ishida T, Mima T, Tabunoki Y, Kobayashi, Maeda M, Uede T, Liaw L, Kinoshita N, Kawase I, **Saeki Y.**
Osteopontin as a positive regulator in the osteoclastogenesis of arthritis.
Biochem Biophys Res Commun 316(3): 809-15, 2004
- (2) Ishii T, Ohshima S, Ishida T, Kawase I, Mima T, Tabunoki Y, Kobayashi, Maeda M, Uede T, Liaw L, Kinoshita N, **Saeki Y.**
Mice with osteopontin deletion remain predisposed to collagen-induced arthritis.
Arthritis Rheum 50(2): 669-73, 2004

(3) 佐伯行彦

骨吸収性疾患におけるオステオポンチン

IRYO 58(6): 335-40, 2004

2. 学会発表

(1) 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 as a positive regulator in the osteoclastogenesis of arthritis.

2004 Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatism, San Antonio, USA, October 16-21, 2004 (Arthritis Rheumatism 50:S367)

(2) 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 2004年4月15-17日、岡山市

WO37-4 難治性関節リウマチに対する抗

TNF α 療法の有効性について 美馬 享、梅下光子、片田圭宣、東 直人、木田 博、原田芳徳、佐伯行彦

WP10-7 著明な好酸球増多およびIgE上昇を伴った原発性 Sjogren 症候群の一例

東 直人、木村淑美、有本啓恵、原田芳徳、木田 博、梅下光子、美馬 享、片田圭宣、佐伯行彦

CR17-5 インフリキシマブが血管炎に対して有効であった関節リウマチの一例

梅下光子、美馬 享、片田圭宣、東 直人、木田 博、原田芳徳、佐伯行彦

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願中

発明の名称：全身性エリテマトーデス (SLE) 患者血液細胞での発現亢進をしている AILE 遺伝子群