

解明された。DKO 細胞では、RANKL によるカルシウムシグナル活性化とNFATc1誘導が障害されており、DAP12とFcR γ を介した……シグナルが破骨細胞分化に必須なカルシウムシグナルを引き起こすのに必須であることが明らかになった。

D. 考察

従来、破骨細胞の分化には、RANKL と M-CSF があれば必要十分であると考えられてきたが、この研究によって、この二つの経路以外に、破骨細胞分化に必須のシグナルを伝える第三の受容体群が存在することが明らかになった。これらの受容体は、単独で破骨細胞分化を誘導することはできないが、破骨細胞分化に必須のため、破骨細胞分化における RANKL の共刺激分子(補助シグナル)の役割を担っていると考えられる。新たな制御受容体とシグナル経路の同定により、破骨細胞を標的とした関節疾患および骨疾患の治療に新しい可能性が開けると考えられる。

E. 結論

破骨細胞の分化における RANKL の共刺激分子を同定した。この共刺激分子は、RA 骨破壊における有望な治療標的となりえる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Gohda, J., Akiyama, T., Koga, T., Takayanagi, H., Tanaka, S. and Inoue, J. RANK-mediated amplification of TRAF6 signaling leads to NFATc1 induction during osteoclastogenesis. *EMBO* 24(4),790-799(2005)

Takatsuna, H., Asagiri, M., Kubota, T., Oka, K., Osada, T., Sugiyama, C., Saito, H., Aoki, K., Ohya, K., Takayanagi, H. and Umezawa K.

Inhibition of RANKL-induced Osteoclastogenesis by (-)-DHMEQ, a Novel NF- κ B Inhibitor, through Downregulation of NFATc1. *J Bone Mineral Res* 20(4):653-662(2005)

Matsumoto, M., Kogawa, M., Wada, S., Takayanagi, H., Tsujimoto, M., Katayama, S., Hisatake, K., Nogi, Y. Essential role of p38 MAP kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. *J Biol Chem.* 279(44),45969-79 (2004)

Koga, T., Inui, M., Inoue, K., Kim, S., Suematsu, A., Kobayashi, E., Iwata, T., Ohnishi, H., Matozaki, T., Kodama, T., Taniguchi, T., Takayanagi, H.*, and Takai, T.* Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature*

428,758-763 (2004) *Corresponding authors

Urushibara, M.*, Takayanagi, H.*, Koga, T., Kim, S., Isobe, M., Morishita, Y., Nakagawa, T., Loeffler, M., Kodama, T., Kurosawa, H., and Taniguchi, T. The antirheumatic drug leflunomide inhibits osteoclastogenesis by interfering with receptor activator of NF- κ B ligand-stimulated induction of nuclear factor of activated T cells c1. *Arthritis Rheum* 50(3), 794-804 (2004) *Equal contributors

Takayanagi, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodontal Res* (in press)

Takayanagi, H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med* 83(3), 170-179(2005)

Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T. and Taniguchi, T. Stat1-mediated cytoplasmic attenuation in osteoimmunology. *J Cell Biochem* 94, 232-240(2005)

高柳 広：関節リウマチにおける骨破壊の分子機構
内科、95 (2) 338-342、2005

高柳 広：免疫系と骨代謝
日本臨床、63 増刊 1、87-95、2005

高柳 広：関節リウマチにおける軟骨破壊の分子機構
内科、95 (1) 136-139、2005

高柳 広：骨免疫学 オステオイムノロジー
感染炎症免疫、34 (4) 22-32、2004

高柳 広：RANKL による破骨細胞分化制御と関節リウマチ
免疫 2005 Molecular Medicine 臨時増刊号、vol. 41、p343-351、2004

高柳 広：運動器の形成・維持・老化にかかわる遺伝子制御ネットワークの解明
ゲノムネットワーク、蛋白質核酸酵素 2004 年 12 月増刊、49 (17) 2943-2949、2004

高柳 広：オステオイムノロジー
細胞工学、23 (12) 1424-1430、2004

高柳 広：Stat1 と Runx ファミリー転写因子：自己免疫疾患における役割
分子リウマチ、1 (3) 168-175、2004

高柳 広：骨免疫制御とサイトカイン
分子細胞治療、3 (4) 52-60、2004

高柳 広：ITAM を介した共刺激シグナルと RANKL による骨代謝の維持機構
実験医学、22 (12) 1726-1729、2004

高柳 広：破骨細胞活性化
医学のあゆみ、209 (10) 771-778、2004

高柳 広：RA における免疫系と骨代謝の相互作用
分子リウマチ、6 (2) 74-81、2004

高柳 広：破骨細胞活性化と人為的制御
臨床免疫、41 (3) 284-290、2004

高柳 広：骨免疫学の世界- 骨疾患と免疫異常
(編集主幹および「はじめに」)
医学のあゆみ、208 (11) 899、2004

金宣和、高柳広：IFN-Stat シグナルと骨代謝
医学のあゆみ、208 (11) 920-925、2004

高柳 広：骨と免疫のクロストーク
現代医療、36 (3) 697-704、2004

2. 学会発表

高柳 広：骨免疫制御における RANKL の補助シグナル
第 27 回日本分子生物学会、2004. 12. 8、神戸

高柳 広：炎症性骨破壊と破骨細胞の制御
日本リウマチ学会関東支部ランチョンセミナー、
2004. 12. 4、東京

高柳 広：Regulation of RANKL by NFAT and ITAM
signal in osteoclast differentiation
第 34 回日本免疫学会総会・学術集会、2004. 12. 2、札幌

乾匡範、古賀貴子、井上和也、谷口維紹、高柳広、高井俊行
アダプター分子 DAP12 および FcR γ を介する ITAM シグナルは破骨細胞分化に必須である
第 34 回日本免疫学会総会・学術集会、札幌、2004. 12. 2

高綱大士、長田年弘、杉山千枝、朝霧成拳、高柳広、梅沢一夫
NF κ B 阻害剤 DHMEQ による破骨細胞分化と活性化の抑制
第 34 回日本免疫学会総会・学術集会、札幌、2004. 12. 2

高柳 広：関節リウマチ骨破壊の制御
日本整形外科学会リウマチ研修会、2004. 11. 28、東京

高柳 広：骨免疫学における破骨細胞分化の制御機構
第 52 回国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 総会・学術大会、2004. 11. 27、東京

高柳 広：破骨細胞分化の制御メカニズム
Bone & Joint Research Club 「骨と関節の代謝調節を考える基礎の会」、2004. 11. 14、木更津

高柳 広：骨免疫学の新展開
第 8 回 Omiya Forum on Rheumatoid Arthritis、
2004. 11. 12、大宮

高柳 広：RA 骨破壊と破骨細胞の制御
第 4 回リウマチ性疾患と骨粗鬆症治療研究会、
2004. 11. 5、熊本

高柳 広：破骨細胞を制御する新たな免疫シグナル
バイオサイエンスシンポジウム、2004. 10. 29、湘南

高柳 広：破骨細胞の起源と分化誘導機構—創薬の観点から—
第 19 回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー「骨・軟骨研究の最前線—新たな治療を目指して—」、
2004. 10. 26、東京

高柳 広：Regulation of osteoclastogenesis by RANKL and ITAM signals
Bone Biology Forum、2004. 10. 22、静岡

高柳 広：骨免疫学への遺伝子チップ応用
第 32 回日本臨床免疫学会総会、2004. 10. 8、東京

H. Takayanagi: Integration of RANKL Signaling by NFATc1 in Osteoclastogenesis.
26th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, 2004.10.3, Seattle

T. Koga, M. Inui, A. Suematsu, T. Taniguchi, T. Takai, H. Takayanagi: ITAM-mediated costimulatory signals cooperate with RANKL for osteoclastogenesis
26th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, 2004.10.3, Seattle (Young Investigator's Award)

H. Takayanagi: Novel regulators of RANKL-induced osteoclastogenesis
The 11th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress, 2004.9.15, Jeju Island, Korea

古賀貴子、乾匡範、末松綾子、谷口維紹、高井俊行、高柳広

ITAMを介した共シグナルはRANKLによる破骨細胞分化に必須である

第22回日本骨代謝学会、大阪、2004.8.6

高柳 広：RANKLシグナル制御と骨免疫学

第8回 Molecular Cardiovascular Conference、2004.9.4、北海道

高柳 広：破骨細胞をターゲットとした炎症性骨破壊の制御

第25回日本炎症・再生医学会ランチョンセミナー、2004.7.13、東京

高柳 広：Costimulatory signals in osteoclast differentiation

第1回 ABJS 国際ワークショップ骨と関節の先端的疾患分子医科学、2004,6,22、東京

H. Takayanagi: Leflunomide inhibits bone destruction by interfering with RANKL signaling and osteoclastogenesis
Annual European Congress of Rheumatology "EULAR 2004", 2004.6.11, Berlin

高柳 広：破骨細胞分化を制御する新たな免疫シグナル

第13回東京免疫フォーラム、2004.5.18、東京

高柳 広：関節破壊の分子機序解明によるRA治療の新時代-新規DMARDレフルノミドの破骨細胞への直接作用と骨破壊抑制-

第48回日本リウマチ学会総会ランチョンセミナー、2004.4.15、岡山

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

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

関節リウマチの先端的治療に関する研究

分担研究者 妻木 範行 大阪大学大学院医学系研究科助手
骨・軟骨破壊に関する遺伝子制御

研究要旨

骨・軟骨における遺伝子発現の統合的制御を担う分子として、骨形成因子(BMP)は重要な役割を果たしていると考えられている。組織特異的 promoter/enhancer 配列を用いて、骨・軟骨形成における BMP シグナルの生体での役割を解析した。抑制型 Smad である Smad6 を軟骨細胞特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製・解析することで、BMP の細胞内シグナル伝達を担う Smad シグナルは軟骨細胞の肥大化とそのマーカー遺伝子の発現を制御していることが判明した。この知見を本に、肥大化しない関節軟骨細胞の形質維持のメカニズムの解明を進めたい。また変形性膝関節症で見られる骨欠損に対して、仮骨延長と超音波刺激を組み合わせて骨組織の修復を試みる臨床研究を行った。

A. 研究目的

関節リウマチや変形性関節症などにおける骨・軟骨破壊の進行過程では、マトリックス蛋白やシグナル伝達に関する分子の遺伝子発現制御が破綻していると考えられる。骨・軟骨における遺伝子発現の統合的制御を担う分子として、骨形成因子(BMP)は重要な役割を果たしていると考えられている。BMP のシグナルは細胞内では主に Smad 蛋白によって担われている。しかしながら BMP や Smad は種々の組織で活性を持つ multifunctional な因子であり、骨・軟骨形成における BMP シグナルの生体での役割を調べることはとりわけ困難であった。本研究では組織特異的な遺伝子発現をもたらす promoter / enhancer を利用して、BMP による骨・軟骨形成の遺伝子制御機構を生体において解明し、関節リウマチにおける骨・軟骨破壊に関する遺伝子制御の理解につなげることが目的である。また破壊変性の結果生じる骨欠損に対し、仮骨延長と超音波刺激を組み合わせて骨組織の修復を試みる。

B. 研究方法

組織特異的プロモーターを用い、軟骨あるいは骨特異的に BMP シグナルを活性化あるいは不活化させたトランスジェニックマウスを作製した。細胞内 BMP シグナル伝達の遮断を狙い、抑制型 Smad である Smad6 を骨格特異的に強制発現させた。軟骨特異的発現および骨特異的発現を得るために、XI 型コラーゲン遺伝子 promoter/enhancer と I 型コラーゲン遺伝子 promoter 配列をそれぞれ用いた。当動物実験については大阪大学医学部動物実験委員会の承認を受け、そのガイドラインに則って動物の苦痛軽減に努めている。また膝関節骨欠損に対して片側仮骨延長法を用いた高位脛骨骨切手術を行い、超音波照射による延長仮骨骨形成に対する促進効果を判定した。

C. 研究結果

以前に我々は BMP シグナルを細胞外で不活化すると軟骨の形成が認められず、軟骨の発生には BMP が必須であることを発見した。今回作製した Smad6

を内軟骨性骨化の過程に強制発現させたトランスジェニックマウスでは、Smad シグナルの伝達が著しく障害されていた。その結果、軟骨の肥大化が抑制され、マトリックス遺伝子である X 型コラーゲン遺伝子、オステオポンチン遺伝子の発現が低下した。そして骨量が減少し骨粗鬆症様の変化が認められた (*J Cell Biol.* 2004;165:433-445)。また膝関節近傍の骨欠損に対し、延長仮骨の成熟に超音波刺激が有効であることが判明した (*J Bone Joint Surg Am.* 2004;86:2399-2405)。

D. 考察

本研究結果から BMP シグナルを操作することによって、実際に生体においても骨・軟骨の遺伝子発現が変化し、結果として軟骨分化の障害や骨量の減少がおきることが判明した。Smad シグナルの阻害により軟骨細胞の肥大化が抑えられたという所見は、関節軟骨の特性を保つメカニズムの解明に寄与する可能性がある。また関節近傍の骨欠損に対して仮骨延長法によって骨を作り、超音波刺激により成熟を促すことで骨組織の修復の促進が期待できる。このメカニズムを今後、遺伝子発現レベルで解析したい。

D. 結論

軟骨細胞で Smad シグナルを阻害すると軟骨の肥大化を抑制できた。このことは、永久軟骨としての関節軟骨が保持されるメカニズムの解明につながる。また仮骨延長と超音波刺激の組み合わせは、骨欠損修復に対して有効である。

E. 健康危険情報 無し

F. 研究発表

1. 論文発表

Horiki, M., Imamura, T., Okamoto, M., Hayashi, M., Murai, J., Myoui, A.,

Ochi, T., Miyazono, K., Yoshikawa, H., and Tsumaki, N.: Smad6/Smurf1 overexpression in cartilage delays chondrocyte hypertrophy and causes dwarfism with osteopenia. *J Cell Biol.* 165(3): 433-445, 2004.

Tsumaki, N., Kakiuchi, M., Sasaki, J., Ochi, T., and Yoshikawa, H.: Low-intensity pulsed ultrasound accelerates maturation of callus in patients treated with opening-wedge high tibial osteotomy by hemicallotaxis. *J Bone Joint Surg Am.* 86-A(11): 2399-2405, 2004.

2. 学会発表

1. 妻木範行, 岡本美奈, 村井純子, 岩井貴男, 吉川秀樹: 骨・軟骨形成における BMP シグナルの作用: 第 3 回 Annual Meeting of Japan Conference on bone and Joint Diseases 12/4, 2004
2. 妻木範行: XI 型コラーゲン遺伝子の転写制御と骨格形成における BMP の役割. 第 4 回骨発生・再生研究会 11/12, 2004
3. 妻木範行: 軟骨形成における BMP シグナルの役割. 第 5 回運動器科学研究会. 8/27-28, 2004
4. 妻木範行, 垣内雅明, 佐々木次郎, 越智隆弘, 吉川秀樹: 延長仮骨治癒過程における低出力超音波パルス照射の影響. 第 17 回日本創外固定・骨延長学会学術集会 8/14-15, 2004
5. 妻木範行: Overexpression of BMP4 in osteoblasts causes severe osteopenia in transgenic mice. 骨カルシウム懇話会 3/12-13, 2004
6. J. Murai, M. Horiki, H. Yoshikawa, and N. Tsumaki: Overexpression of BMP4 in Osteoblasts Inhibits Trabecular Bone Formation. 5th International Conference on Bone

- Morphogenetic Proteins 9/12-16,
2004
7. N. Tsumaki, M. Horiki, J. Murai,
T. Iwai, and H. Yoshikawa: Role
of BMP signaling in endochondral
bone formation. 5th International
Conference on Bone Morphogenetic
Proteins 9/12-16, 2004
 8. M. Horiki, N. Tsumaki, A. Myoui,
T. Imamura, H. Yoshikawa:
overexpression of smad6 in
chondrocytes distinctively
disturbs terminal
differentiation of chondrocytes
and causes osteopenia in
transgenic mice. 51st Annual
Meeting of the Orthopaedic
Research Society 3/7-10, 2004
 9. J. Murai, N. Tsumaki, M. Horiki,
Y. Hashimoto, K. Kuriyama, H.
Yoshikawa: Overexpression of
BMP4 in osteoblasts causes
osteopenia in transgenic mice.
Frontiers of Skeletal Biology
3/20-24, 2004
 10. Horiki, M., Imamura, T., Okamoto,
M., Hayashi, M., Murai, J., Myoui,
A., Ochi, T., Miyazono, K.,
Yoshikawa, H., and Tsumaki, N.:
Smad6/Smurf1 overexpression in
cartilage delays chondrocyte
hypertrophy and causes dwarfism
with osteopenia. Frontiers of
Skeletal Biology 3/20-24, 2004

F. 知的財産の出願・登録状況
該当なし

破骨細胞アポトーシスにおける small G protein の役割に関する研究

分担研究者 田中 栄

所属機関名・職名 東京大学医学部附属病院整形外科 講師

研究要旨 破骨細胞は生理的な骨吸収のみならず、病的な骨破壊においても中心的な役割を果たす細胞である。その寿命は短く、いったん分化すると生体内では2週間程度でアポトーシスによって細胞死にいたる。本研究においてわれわれは破骨細胞の細胞死において small G protein である Rac1 が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

A. 研究目的

関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) における骨破壊には破骨細胞による骨吸収が重要な役割を果たしている。破骨細胞は最終分化した増殖能のない細胞であり、一旦分化すると receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) やマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) などの生存因子が存在しないと速やかに細胞死に至る。破骨細胞の細胞死はアポトーシスによるものであることが報告されている。アポトーシスは「プログラムされた細胞死」とも呼ばれ、細胞への様々な刺激、あるいはストレスなどによって誘導され、DNA の断片化を特徴とする静かな細胞死である。近年破骨細胞の細胞死はアポトーシスによることが明らかになってきたが、このように骨代謝の要ともいえる破骨細胞がなぜアポトーシスに陥りやすいのか、またその分子メカニズムはいかなるものか、などについてはほとんど明らかになっていないのが現状である。ビスフォスフォネートは強力な骨吸収抑制作用を有する骨粗鬆症治療薬であるが、その作用メカニズムとして破骨細胞のアポトーシス誘導が知られている。われわれはこれまでに small G protein のひとつである Ras が破骨細胞の生存に重要であり、Ras の活性を抑制する dominant negative Ras 遺伝子の導入によって破骨細胞は速やかにアポトーシスに陥り、Ras-ERK 経路を活性化する constitutively active MEK1 の導入によってアポトーシスが強力に抑制されることを明らかにした。やはり small G protein である Rho ファミリーに属する Rac1 はラメリポディアの形成などアクチン細胞骨格の制御に

重要な働きをすると考えられているが、ある種の細胞ではアポトーシスシグナルに関与することが明らかになっている。本研究の目的は破骨細胞のアポトーシスにおける small G protein、なかでも Rho, Rac, Cdc42 といった Rho ファミリーの役割を明らかにすることである。

B. 研究方法

ドミナントネガティブ型 Rho, Rac1, Cdc42 を発現するアデノウイルスベクターは Clonetech のキットを用いて作成した。破骨細胞はマウス骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養において活性ビタミン D3 とプロスタグランジン E2 の存在下で形成された破骨細胞様細胞を使用した。破骨細胞へのアデノウイルスの感染、破骨細胞の生存アッセイ、破骨細胞による骨吸収アッセイはこれまでに報告したのと同様の方法を用いた (Miyazaki et al., J Cell Biol 2000, 148:333-342)。破骨細胞の motility はビデオマイクロスコープを用いて定量した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトサンプルを用いるものではないが、候補遺伝子が得られた場合、そのヒト細胞での作用を確認する必要がある。その際、個人情報、その外部への持ち出しを厳重に禁止し、遺伝子解析に使用する検体、試料はコード化し匿名とする。また、生命倫理に関してはこの研究の趣旨を充分説明し提供者の自由意思によるインフォームド・コンセントを取得するものとする。

C. 研究結果

ドミナントネガティブ型 Rho, Rac1 を発現した破骨細胞では骨吸収能の低下が認められ、ドミナントネガティブ Rac1 を発現した場合には破骨細胞のアポトーシスの促進が認められた。一方でドミナントネガティブ型 Cdc42 の発現は破骨細胞の活性、生存に影響を及ぼさなかった。ドミナントネガティブ型 Rac1 は M-CSF による Akt の活性化を抑制するとともに破骨細胞の生存延長効果を失わしめた。ドミナントネガティブ型 Rac1 を発現した細胞では細胞の motility の低下が認められた。

D. 考察

Small G protein はさまざまな細胞機能に関与することが明らかになっている。Rac1 はこれまで細胞膜の ruffling を制御し、細胞の走化性、遊走性を制御することが報告されているが、細胞の種類によってはアポトーシスを調節していることが明らかになっている。本研究においてわれわれは、アデノウイルスベクターによる遺伝子導入システムを用いて、Rac1 が M-CSF シグナルの下流分子として機能し、破骨細胞の骨吸収能を調節するのみならず、その生存、細胞の motility に重要な役割を果たしていることを明らかにした。現在最も使用されている骨粗鬆症治療薬であるビスフォスフォネートは破骨細胞のアポトーシスを誘導して作用することが明らかになっているが、その骨への貯留性、骨代謝の長期間抑制が問題となっており、新たな骨粗鬆症治療薬の開発が望まれている。ビスフォスフォネートの破骨細胞アポトーシス誘導作用が small G protein の C 端の prenylation の抑制を介することが報告されており、Rac1 がビスフォスフォネートのターゲット分子の一つである可能性が示唆されている。今後ビスフォスフォネートの作用機序の解明も含め、Rac1 の作用をさらに検討することにより、破骨細胞のアポトーシスメカニズムを詳細に明らかにすることが可能であり、これによって新たな骨吸収治療剤の開発が可能になると考えられる。

E. 結論

Small G protein の一つである Rac1 が破骨細胞の細胞機能、細胞死に重要な役割を果たしていることが明らかになった。今後 Rac1 をターゲットにした骨吸収抑制剤の開発が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

英文原著

- 1) Ohazama A, Courtney J-M, Naito A, Tanaka S, Inoue J, Sharpe PT. Traf6 is essential for murine tooth cusp morphogenesis. *Dev Dyn* 2004 229, 131-135.
- 2) Seto H, Kamekura S, Miura T, Yamamoto A, Chikuda H, Ogata T, Hiraoka H, Oda H, Nakamura K, Kurosawa H, Chung U, Kawaguchi H, Tanaka S. Distinct Role of Smad Pathways and p38 Pathways in Cartilage-specific Gene Expression in Synovial Fibroblasts. *J Clin Invest* 2004, 113, 718-726.
- 3) Miyazaki T, Sanjay A, Neff L, Tanaka S, Horne WC, Baron R. Src kinase activity is essential for osteoclast function. *J Biol Chem*, 2004, 279, 17660-6.
- 4) Setoguchi K, Misaki Y, Kawahata K, Shimada K, Juji T, Tanaka S, Oda H, Shukunami C, Nishizaki Y, Hiraki Y, Yamamoto K. Chondromodulin-I, a cartilage-derived angiogenesis inhibitory factor, suppresses T cell response; an implication of a therapeutic potential for the treatment of arthritis. *Arthritis Rheum* 2004, 50, 828-839.
- 5) Song X, Tanaka S, Cox D, Lee SC. Fc receptor signaling in primary human microglia: differential roles of PI3K and Ras/ERK MAP kinase pathways in phagocytosis and chemokine induction. *J Leukoc Biol*. 2004, 75:1147-1155.
- 6) Ogasawara T, Katagiri M, Yamamoto A, Hoshi K, Takato T, Nakamura K, Tanaka S, Okayama H, Kawaguchi H. Osteoclast Differentiation by RANKL Requires NF-kappaB-Mediated Downregulation of Cyclin-Dependent Kinase 6 (Cdk6). *J Bone Miner Res*. 2004, 19:1128-1136.
- 7) Ogata T, Iijima S, Hoshikawa S, Miura T, Yamamoto S, Oda H, Nakamura K, Tanaka S. Opposing Erk and Akt pathways control Schwann cell myelination. *J Neuroscience* 2004, 24:6724-32.
- 8) Ikeda F, Nishimura R, Matsubara T,

Tanaka S, Inoue J, Reddy SV, Hata K, Yamashita K, Hiraga T, Watanabe T, Kukita T, Yoshioka K, Rao A, Yoneda T. Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. *J Clin Invest* 2004, 114:475-484.

9) Kwak HB, Lee SW, Jin HM, Ha H, Lee SH, Takeshita S, Tanaka S, Kim HM, Kim HH, Lee ZH. Monokine induced by interferon-gamma is induced by receptor activator of nuclear factor B ligand and involved in osteoclast adhesion and migration. *Blood*. 2004 Dec 7; [Epub ahead of print]

10) Yagishita N, Ohneda K, Amano T, Yamasaki S, Sugiura A, Tsuchimochi K, Shin H, Kawahara K, Ohneda O, Ohta T, Tanaka S, Yamamoto M, Maruyama I, Nishioka K, Fukamizu A, Nakajima T. Essential Role of Synoviolin in Embryogenesis. *J Biol Chem* 2004 Dec 20; [Epub ahead of print]

11) Gohda J, Akiyama T, Koga T, Takayanagi H, Tanaka S and Inoue JI. RANK-mediated amplification of TRAF6 signaling leads to NFATc1 induction during osteoclastogenesis. *Embo J* in press.

英文総説

1) Tanaka S. Molecular mechanism of life and death of the osteoclast. *Int J Oral Biol* 2004 in press

2) Tanaka S. Intracellular signal transduction pathways: good therapeutic targets for joint destruction in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatology* 2005 in press

和文総説

1) 田中 栄「RANKL を標的とした骨粗鬆症の分子治療」*医学のあゆみ* 208:343-347, 2004

2) 宮崎 剛、田中 栄「TNF- α 」*日本臨床* 62 suppl 2:112-115, 2004

3) 十字琢夫、田中 栄「RANKL ワクチンによる新しい骨代謝疾患治療」*日本臨床* 62 suppl 2:799-802, 2004

4) 秋山 達、田中 栄「破骨細胞アポトーシスと骨吸収能の制御」*Medical Science Digest* 30:42-43, 2004

5) 田中 栄「五十肩」*Medical Practice* 21:346-347, 2004

6) 田中 栄「生物製剤による骨粗鬆症治療」*整形・災害外科* 47:279-284, 2004

7) 田中 栄「RANKL と炎症性骨破壊」*医学のあゆみ* 208:931-934, 2004

8) 田中 栄「RANKL 制御とosteoprotegerinによる骨・関節疾患治療」*分子リウマチ* 1:89-93, 2004

9) 田中 栄「遺伝子導入による滑膜細胞制御」*臨床免疫* 41:534-537, 2004

10) 福田 明、田中 栄「OA と破骨細胞～OA 治療薬のあらたなターゲット～」*医学のあゆみ* 211:285-288, 2004

2. 学会発表

1) 茨城県保険医協会・県南地区医師会 学術講演会(2004.5.25)土浦 「運動器疾患の治療戦略」

第 21 回日本 TDM 学会・学術大会ランチョンセミナー(2004.6.6)大阪 「骨破壊をターゲットにした新しい骨代謝疾患治療法の開発」

2) 第30回 日本整形外科スポーツ医学会 学術集会(2004.7.3)東京 シンポジウム III 関節軟骨修復術の基礎と臨床 “Molecular mechanism of joint destruction and possible therapeutic approach toward cartilage repair”

3) 大阪整形外科症例検討会 特別講演(2004.7.10)大阪 「骨破壊をターゲットにした関節リウマチ治療戦略」

4) エビスタ販売記念講演(2004.7.24)盛岡 「骨粗鬆症治療の新世紀～Is the paradigm shifting?～」

5) 第 22 回日本骨代謝学会(2004.8.7)大阪 シンポジウム II 関節リウマチと変形性関節症における骨破壊分子メカニズムと治療 「関節炎における骨破壊メカニズムとその制御」

6) 第 1 回 横浜骨粗鬆症研究会(2004.9.9)横浜 「骨粗鬆症治療薬の最新の話」

7) 第53回日本口腔衛生学会・総会(2004.9.19)盛岡 シンポジウム D 保健生態系で考えるフッ化物応用 「フッ化物と全身の健康」

- 8) 日本医師会生涯教育制度適合学術集会(2004.10.7)大分「骨粗鬆症治療の新世紀」
- 9) 第19回日本整形外科基礎学術集会(2004.10.22)東京 教育研修講演「関節破壊の分子メカニズムとその治療戦略」
- 10) ハイペン発売10周年記念講演会(2004.10.28)神戸 特別講演「関節リウマチの新しい治療戦略」
- 11) Bone and Joint Research Club～骨と関節の代謝調節を考える基礎の会～(2004.11.13-14)かずさ 特別セッション「細胞内シグナル伝達をターゲットにした疾患治療法の開発～新しい時代の創薬をめざして～」 「細胞内シグナル伝達をターゲットにした骨関節疾患治療戦略」
- 12) 千葉県医師会講演会(2004.11.17)千葉「骨粗鬆症の臨床アップデート～整形外科の立場から～」
- 13) 第2回医療フォーラム 骨と関節疾患制御の新世紀(2004.11.26)東京「変形性関節症」
- 14) 大阪大学 COE シンポジウム(2004.12.3)大阪「破骨細胞のアポトーシスと活性化のメカニズム」
- 15) 厚生労働省難治性疾患研究事業 骨・関節系調査研究班 特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会 平成16年度第2回会議 研究成果報告会(2004.12.4)京都「新たなマウス骨壊死モデル作成の試み」

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。) なし

骨軟骨マトリックス破壊機構に関する研究 -MMP-13 ノックアウトマウスを用いた解析-

分担研究者：千葉 一裕 慶應義塾大学医学部整形外科 助教授

研究協力者：高石 官成 慶應義塾大学医学部整形外科 助手

研究要旨：肥大軟骨細胞、骨芽細胞において特異的に発現するコラゲナーゼである MMP-13 のノックアウト (KO) マウスを作製し、その表現型から骨軟骨形成におけるマトリックス改変機構について解析した。KO マウスは内軟骨性骨化の遅延と破骨細胞の機能不全による遅発性の大理石骨病を呈したことから、本酵素は骨軟骨吸収の足場をつくり、血管内皮細胞と破軟骨細胞を動員するだけでなく、生理活性物質の遊離を介して間接的に破骨細胞の機能を調節し、骨代謝に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

A. 研究目的

胎生期における内軟骨性骨化過程では、間充織細胞の凝集、軟骨細胞の分化誘導を経て、軟骨膜から侵入する血管に付随して軟骨性骨原基に持ち込まれた破軟骨細胞と骨芽細胞によって、軟骨から骨への置換が開始するとされる。今回、われわれは骨形成に必須な転写因子 Runx-2 の下流分子である MMP-13 の KO マウスを作製し、その表現型から骨モデリング、骨リモデリングにおける本酵素の役割について検討した。

B. 研究方法

16.5dpc マウス胎仔からクローニングした cDNA 断片を用いてマウス MMP-13 遺伝子をスクリーニングし、酵素活性ドメインの 2/3 を d2EGFP と pGKNeo で置換したターゲティングベクターを作製した。電気穿孔法により ES 細胞に導入後、相同組み換えコロニーを C57BL/6 ブラストシストに注入し、生殖系列に乗った 3 系統から KO マウスを作出し、組織学的解析をおこなった。Runx2 を導入した肋軟骨細胞と HUVEC を用いて共存培養をおこない、肥大軟骨が誘導する血管新生について検討した。またカルバリア由来骨芽細胞と骨髄細胞を用いて共存培養をおこない、骨芽細胞の膜表面に発現するシグナル分子の shedding と破骨細胞形成を検討した。

さらに 12 週齢で OVX または Sham 手術をおこない、硬組織切片を作製し骨形態計測を施行した。

（倫理面への配慮）

マウスを用いる実験に関しては、慶應義塾大学の実験動物に関する規則に則って計画し、遂行した。

C. 研究結果

KO マウスでは、胎生後期における一次骨化開始が遅延し肥大軟骨細胞層が延長しており、骨髄腔には分解不全のマトリックスに囲まれる軟骨組織が島状に取り残され点在していた。二次骨化中心においても、同様に血管侵入と骨髄腔の形成が遅延していたが、生後 8 週でワイルドタイプに追いついた。TUNEL 染色によるアポトーシスや in situ hybridization による軟骨分化マーカーの局在に差を認めなかったが、胎生期中足骨を PECAM と TRAP の二重染色で経時的に観察すると、KO マウスでは軟骨膜に局在する血管内皮細胞と破軟骨細胞の軟骨性骨原基への侵入が遅れており、最終分化した肥大軟骨細胞に MMP-9 の強い染色性を認めた。長管骨成長板の軟骨移行部においては、一次骨梁の石灰化軟骨コアの吸収不全を補おうとして、TRAP 陽性、MMP-9 陽性の破骨細胞数が代償性に増えていた。また Runx2 を導入した肥大軟骨ペレットをマトリゲル内で HUVEC と共存培養すると、KO

マウスではペレット周囲の血管内皮細胞の引き込みが遅れていた。また KO では遅発性の大理石骨病を呈し、増加した骨量は OVX による高代謝回転誘導に抵抗性であった。骨形態計測では、Sham 群、OVX 群ともに、骨形成率には差を認めなかったが、KO では骨吸収面が有意に減少し、結果として二次海綿骨量が 4 倍に増加していた。さらに KO 由来骨芽細胞では可溶性 RANKL の放出が低下し、共存培養において形成された破骨細胞は小型で大きく広がらない傾向がみられ、吸収窩形成活性が低下していた。

D. 考察

近年、基質特異性の異なる種々の分泌型 MMP がインテグリンや膜結合型タンパクと結合することによって細胞膜上に集積し効果的に働く機序が予想されている。本マウスの表現型から、MMP-13 が内軟骨性骨化におけるマトリックス改変と血管侵入に密接に関与していることが明らかになった。ペレット培養の結果から、軟骨性骨原基への血管侵入開始には、肥大軟骨細胞自身が MMP-13 を分泌して石灰化マトリックスを除去するだけでなく、血管新生誘導分子を活性化する機序が考えられた。一方、骨形態計測と破骨細胞形成の結解析結果から、骨リモデリング過程においては、骨芽細胞が産生した MMP-13 がオステオイドを除去し骨吸収の足場を作るだけでなく、生理活性物質の遊離を介して間接的に破骨細胞の機能を調節していることが示唆された。

また、本 KO マウスの表現型は、過去に報告された MMP-9 KO マウスと似ており、遺伝子の重複性が考えられ、産生細胞の局在が異なることから、骨軟骨マトリックスの分解における、複数の MMP 相互による潜在型酵素の活性化機序が予想される。現在、MMP-9 と MMP-13 のダブル KO マウスを作製し、関節炎モデル、変形性関節症モデル、骨折モデルを用いて、病態形成や組織修復における本酵素の役割を詳細に解析している。

E. 結論

MMP-13 は、骨リモデリング過程において、肥大軟

骨細胞によって分泌され、軟骨性骨原基を分解し骨吸収の足場を作ることによって、血管内皮細胞と破骨細胞の動員を誘導する。一方、骨リモデリング過程においては、骨芽細胞によって分泌され、オステオイドを除去し骨吸収の足場を作るだけでなく、生理活性物質の遊離放出を介して間接的に破骨細胞の機能を調節し、骨代謝に重要な役割を果たす。

F. 健康危険情報

問題なし。

G. 研究発表

1. 論文発表：現在、投稿準備中である。
2. 学会発表：Loss of MMP-13 Delays Fetal Bone Formation. Takaishi H, Kimura T, Okada Y, D'Armiento J., 2003 MMP Gordon Research Conference

H. 知的財産権の出願・登録状況

予定していない。

関節リウマチの先端的治療に関する研究

中島 利博

聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター ゲノム医科学研究部門 教授

研究要旨

我々は、関節を構成する3つの主たるコンポーネント（骨・軟骨・滑膜）の一つである滑膜細胞の細胞生物学的系譜を系統的に探索してきた。その過程で、滑膜細胞の増殖を司る分子シノビオリン（Synoviolin: Syno）を発見した。Synoの関節炎における特徴として、

1. 関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis: RA) 患者の滑膜組織で過剰に発現している (RAにおける over-expression)
2. 同分子の過剰発現マウスは、滑膜の増生、骨、軟骨破壊などリウマチ患者組織に酷似した所見を認める (gain-of-functionによる関節炎の発症)
3. Synoの遺伝子を半分に減らした個体 (Synoヘテロ欠損マウス) に、コラーゲン誘導関節炎を適応したところ、同マウスは関節炎の惹起に対して抵抗性を示した (loss-of-functionによる関節炎への抵抗性)

これらの結果は、Synoの発現量は少なくともマウスでの関節炎/関節症の発症に関与し、その発現量を制御することで、リウマチ滑膜細胞の過増殖を抑制が可能であることを示し、これを標的とした新規治療の強い可能性を示唆している。

そこで、本研究ではSynoの発現制御機構を明らかにするために、遺伝子発現の初期反応である転写レベルからアプローチを試みた。結果として、Synoの転写制御に重要なコアドメインの同定に成功し、さらに、同部位へのデコイ核酸がSynoの発現を抑制することによって、RA滑膜細胞増殖を抑制することを見出した。Synoの生物学的機能を考慮すると、本研究は全く新しいRAに対する新規治療法の開発における有効な知見となる。

A. 研究目的

高齢化社会の進展に伴い、運動器の健康は生命の質に直結する重大な関心事となりつつある。運動器疾患は高齢者の寝たきりを招く主要原因の一つであり、医療経済的にも焦眉の急であると考えられる。特に、WHOが、2000年より「骨関節の10年」を設定し、運動器の研究や治療への社会的関心を広める必要性を強調しているように、運動器疾患制御の分子基盤の解明は世界的な要請ともいえる。

運動器のなかでも、関節はヒトの高度な運動機能を実現する鍵となる器官であり、関節の中で可動性を有する滑膜関節の機能維持は、現代社会の日常生活において、益々その意義を高めている。この関節を冒す重要な疾患として関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis: RA) が挙げられる。関節リウマチは頻度が高く（全人口の0.8%）、難治性かつ慢性の進行性病態であ

り、さらにその多くが若年発症であるため、個人の生活のみならず産業的、経済的にも深刻な社会的負担を課すことになる。従って、関節リウマチの根絶を目指す治療法の確立は、単に医学的見地からの必要性のみならず、社会的要求が極めて大きい。

この状況に対して、これまでにないアプローチでRAの根治を目指した治療法の確立を目指し、新規RA原因遺伝子であるシノビオリン (Synoviolin: Syno) を治療標的と定め、その制御によるRA治療法の研究開発を目的としている。

B. 研究方法

要旨に示すとおり、我々はSynoの発現量は関節炎の発症と密接な関連があることを証明した（論文発表4参照）。この科学的根拠をもとに、転写制御によるSynoの発現量をコントロールする目的で、

- ① 「Synoプロモーターの解析」

②「デコイ核酸によるシノビオリン発現制御と滑膜細胞増殖抑制」という2層性の研究を推し進めている。

① Syno プロモーターの解析

Syno プロモーターの転写調節領域を検索するため、マウスの Syno 遺伝子上流 4.5k のゲノムを使用したレポータープラスミドを作製し、培養細胞を用いた検討を実施した。レポーター遺伝子としては、Luciferase を使用した。種々の欠質変異体を用いることにより、プロモーターの転写調節領域の探索を実施した。

② デコイ核酸の選定およびその評価

デコイ核酸は、転写調節領域の転写因子結合部位と同じ配列を含む短い核酸であり、転写因子の転写調節領域への結合を阻害することで遺伝子発現を抑制する。Syno の転写調節領域を標的としたデコイ核酸を設計し、RA 滑膜細胞の増殖活性を指標としてデコイ核酸の選定を行なった。

③ 倫理面への配慮、組み換え DNA 実験

ヒト滑膜組織に関しては、当施設倫理委員会の方針に準じ、書面によるインフォームドコンセントを得たもののみを使用した。DNA を用いた実験は、文科省が定めた DNA 実験指針に従った。

C. 研究結果

① Syno のコアプロモーターは EBS である。

レポータープラスミドのゲノム部分を少しずつ削っていったところ、S の翻訳開始点から -84 ~ -73bp の部位にその転写活性化能を担う部位が存在することを同定した。この部位は、マウスゲノムとヒトゲノムとの間でよく保存されており、バイオインフォマティクスによる転写因子結合部位の予測から、Ets binding site (EBS) の存在が見出された。さらに、EBS に 1 塩基変異を入れ、レポーター・アッセイを行ったところ、その転写活性化能は約 12% まで低下した。従って、EBS をブロックするデコイ核酸の導入により、強力に Syno の発現が抑制され、それによってもたらされる滑膜細胞の過増殖抑制、ひいては RA の根治へと結びつくと思定された。この結果をもとに、次の実験を行った。

② EBS に対するデコイ核酸は、Syno の発現および滑膜細胞増殖を抑制する。

Syno プロモーターの転写因子結合部位 (EBS) を標的としたデコイ核酸を設計し、この核酸が RA 滑膜細胞の増殖にどのような影響を与えるかを検討した。RA 滑膜細胞にデコイ核酸をトランスフェクション処理により導入後、Syno の蛋白発現量をウェスタンブロッティング法で確認した。デコイ導入による Syno 発現抑制が確認された滑膜細胞の細胞増殖率は Alamar blue assay により測定した。その結果、デコイ核酸による Syno 発現抑制により、RA 滑膜細胞の増殖の有意な減少が確認された。

D. 結論

Syno の発現量を規定するプロモーターの中心的転写調節領域の発見と、それを標的としたデコイ核酸による滑膜細胞の増殖抑制効果を証明した。この発見は滑膜の恒常性維持、および関節リウマチの発症メカニズムの解明のみならず、RA の滑膜細胞の異常増殖をターゲットとした革新的な関節リウマチ治療薬の研究開発につながるものと考えられる。

本研究を含む我々の Syno に関する一連の研究成果は、関節リウマチ滑膜細胞の増殖が Syno を中心とした小胞体蛋白の分解機能と品質管理機能の亢進により制御されるという、全く新しい RA の疾患概念を提唱しうるものである。また、これまでに検討されたことのない機構を標的としているので、RA 根治を目指した新規治療法に関する研究分野の開拓を推し進めるものである。

E. 健康危惧情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujita H, Ohshima T, Oishi T, Aratani S, Fujii R, Fukamizu A, Nakajima T. Relevance of nuclear localization and functions of RNA helicase A. *Int J Mol Med.* 15,555-60, 2005.
- 2) Yagishita N, Amano T, and Nakajima T. Essential role of synoviolin in

- embryogenesis. *J Biol Chem.* 280, 7909-16, 2004.
- 3) Tsuchimochi K, Yagishita N, Amano T, and Toshihiro Nakajima. Regulation of Synoviolin Expression via its two core promoter elements. *M.C.B. revised*
 - 4) Daitoku H, Hatta M, Matsuzaki H, Aratani S, Ohshima T, Miyagishi M, Nakajima T, Fukamizu A. Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 10042-7, 2004.
 - 5) H. Fujita, T. Nakajima. Antithetic Effects of MBD2a on Gene Regulation. *Molecular and Cellular Biology* 23 : 2645-2657, 2003.
 - 6) Amano T and Toshihiro Nakajima. Synoviolin/Hrd1, an E3 ubiquitin ligase, as a novel pathogenic factor for arthropathy. *Genes Dev.* 17 : 2436-2449, 2003.
 - 7) Kawahara K, Kawabata H, Aratani S, Nakajima T. Hyper nuclear acetylation (HNA) in proliferation, differentiation and apoptosis. *Ageing Research Reviews Elsevier.* 2: 287-297, 2003.
 - 8) Taniguchi N, Kawahara K, Nakajima T, Maruyama I. High Mobility Group Box Chromosomal Protein 1 Plays a Role in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis as a Novel Cytokine. *Arthritis and Rheum* 48: 971-981, 2003.
 - 9) Aratani S, Fujii R, Nakajima T. Aromatic residues are required for RNA helicase A mediated transactivation. *International Journal of Molecular Medicine,* 12: 175-180, 2003
 - 10) Fujita H, Fujii R, Aratani S, Amano T, Fukamizu A, Nakajima T. Antithetic effects of MBD2a on gene regulation. *Mol Cell Biol.* 23:2645-57, 2003.
 - 11) Araya N, Hirota K, Shimamoto Y, Miyagishi M, Yoshida E, Ishida J, Kaneko S, Kaneko M, Nakajima T, Fukamizu A. Cooperative interaction of EWS with CREB-binding protein selectively activates hepatocyte nuclear factor 4-mediated transcription. *J Biol Chem.* 278:5427-32, 2003.
2004. *Arthritis Res Ther* 2004, 6(Suppl 3):6.
- 2) 土持兼之、西岡久寿樹、中島利博 Synoviolin 転写制御による滑膜増殖制御の検討。第 48 回日本リウマチ学会 岡山 2004 年 4 月。
 - 3) 山崎聡士、西岡久寿樹、中島利博 Synoviolin による滑膜細胞増殖メカニズムの解析。第 48 回日本リウマチ学会 岡山 2004 年 4 月。

H.知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

- 1.特許取得
特にありません。
- 2.実用新案登録
特にありません。
- 3.その他
特にありません。

2、学会発表

- 1) Nakajima T, Nishioka K. Hyper-ERAD: a novel pathomechanism for rheumatoid arthritis. *Global Arthritis Research Network (GARN): 4th World Congress on Arthritis in Montreal, Canada, September*

レフルノミド導入に関するマクロ経済的評価

分担研究者 吉田勝美 聖マリアンナ医科大学予防医学教室 教授

研究協力者 須賀万智 聖マリアンナ医科大学予防医学教室 助手

研究要旨：既存の統計資料を活用して、レフルノミド導入に関するマクロ経済的評価を実施した。レフルノミド導入による疾病負担の医療費の軽減は、レフルノミド治療と従来治療の効果の差を障害による損失年（YLD）で表わし、効果単価で換算した。レフルノミド導入による診療コストの増加は、リウマチ専門医を対象にした質問紙調査をおこない、レフルノミド治療の際のスクリーニング、モニタリング、副作用発生時の処置に関する費用を算出した。レフルノミド導入による疾病負担の医療費の軽減はACR20で123.1億円、ACR50で375.7億円、ACR70で526.0億円であった。レフルノミド導入による診療コストの増加は74.3億円であった。医療経済の観点から、副作用による脱落や薬剤費以外の経費を考慮しても、レフルノミド導入は妥当であると考えられた。

A.研究目的

新規治療薬を導入するにあたり、従来の治療薬と新規治療薬との比較検討が求められる。医療財政が逼迫している現状において、費用対効果（cost-effectiveness）が治療法を選択する1つの尺度になる。

近年、関節リウマチ（RA）の治療のあり方が見直されており、レフルノミド（商品名アラバ）、エタナルセプト（同エンブレム）、インフリキシマブ（同レミケード）など、新規治療薬の有効性が注目されている[1]。そこで、レフルノミド導入が国レベルで与える医療経済効果を検討した。前回の解析では、①既存の統計資料を活用、②質的調整変数（障害による損失年；YLD）を採用、③重症度を補正してマクロ経済的評価を実施したが、副作用による脱落や薬剤費以外の経費（スクリーニング、モニタリング、副作用発生時の処置など）を考慮しておらず、レフルノミド導入の効果を過大評価していると考えられた。今回の解析では、これらの負の影響を加味したマクロ経済的評価を実施した。

B.研究方法

(1)レフルノミド導入による疾病負担の医療費の

軽減

レフルノミド治療と従来治療の効果の差をYLDで表わし、効果単価（428.9万円/YLD）で換算した[2]。YLDは患者数と障害度の重み付けの積であり[3]、患者数は患者調査の総患者数と国勢調査の2000年の推計人口を用いて求めた。投与対象のYLDは、投与対象を中等症以上（20.8%）に定め、重症度別の構成割合とQOLスコアの積を係数にして求めた。副作用による脱落を差し引き、レフルノミド治療と従来治療の効果比を掛けた。レフルノミド治療と従来治療の効果比は臨床試験US301（観察期間12ヶ月）[4]のACR20、ACR50、ACR70の対プラセボのオッズ比（前から0.32、0.17、0.17）を用いた。副作用脱落率は同試験の数値（レフルノミド22.0%、プラセボ8.5%）をあてはめた。

(2)レフルノミド導入による診療コストの増加

リウマチ専門医数名を対象にして、レフルノミド治療の際のスクリーニング、モニタリング、副作用発生時の処置に関する質問紙調査をおこない、レフルノミド治療と従来治療の診療コスト（12ヶ月間）の差と副作用（肝機能障害、高血圧、下痢、発疹）発生時の診療コストを求

厚生科学研究補助金 分担研究報告書

めた。副作用発生率はアラバ錠®の市販後全例調査(2003年8月18日～2004年7月23日)の数値をあてはめた。

C. 研究結果

レフルノミド導入による疾病負担の医療費の軽減は、ACR20で123.1億円(1患者あたり19.0万円)、ACR50で375.7億円(1患者あたり58.0万円)、ACR70で526.0億円(1患者あたり81.2万円)であった。

表1にレフルノミド治療と従来治療におけるスクリーニングとモニタリングに関する費用を示した。レフルノミド治療の診療コスト(12ヶ月)は、レフルノミドの薬剤費を含めない場合で33.5億円、レフルノミドの薬剤費を含めた場合で95.6億円であった。従来治療の診療コスト(12ヶ月)は、薬剤費を含めない場合で22.8億円であった。

表2にレフルノミド治療における副作用発生時の処置に関する費用を示した。副作用発生時の診療コストは、肝機能障害が0.67億円、高血圧が0.34億円、下痢が0.22億円、発疹が0.04億円、クエストランによる薬物除去が0.19億円、あわせて1.5億円であった。

レフルノミド治療による診療コストの増加は、レフルノミドの薬剤費(12ヶ月間)が62.1億円、レフルノミド治療と従来治療の診療コスト(12ヶ月間)の差が10.7億円、副作用発生時の診療コストが1.5億円、あわせて74.3億円であった。

D. 考察

既存の統計資料を活用して、レフルノミド導入に関するマクロ経済的評価を実施した。レフルノミド導入による疾病負担の医療費の軽減はレフルノミド治療による診療コストの増加を上まわり、医療経済の観点から、レフルノミド導入は妥当であると考えられた。

今回の解析は、副作用による脱落や薬剤費以外の経費が考慮されており、前回の解析にくらべ、評価の精度が向上している。副作用は肝機能障害、高血圧、下痢、発疹の4つに限定したが、その他の副作用の発生率はどれも3%以下である。しかも、「副作用発生時の診

療コスト」が「レフルノミド治療による診療コストの増加」に占める割合は数%であり、その他の副作用を追加しても、レフルノミド導入に関する評価は変わらないと考えられる。

レフルノミド治療による診療コストは、レフルノミドの薬剤費が65%占めており、削減が難しい。その一方、レフルノミドに対する感受性が低い者や副作用のリスクが高い者をスクリーニングして、投与対象を見極めることで、費用対効果が高められると考えられる。今後、医療政策的観点から、投与対象の条件を明確にする研究の推進が期待される。

E. 結論

副作用による脱落や薬剤費以外の経費を考慮しても、レフルノミド導入のマクロ経済的妥当性が示された。

参考文献

- [1] 越智 隆弘, 山本 一彦, 龍 順之助. 関節リウマチの診療マニュアル(改訂版)－診断のマニュアルとEBMに基づく治療ガイドライン. 東京: (財)日本リウマチ財団, 2004
- [2] 須賀万智, 吉田勝美. 既存の統計資料を用いた推計によるマクロ的医療経済効果の評価－関節リウマチの新規治療薬導入. 厚生省の指標 2005 (in press)
- [3] Murray CJ, Lopez AD (eds). The Global Burden of Disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020. Harvard: Harvard University Press, 1996.
- [4] Strand V, Cohen S, Schiff M, Weaver A, et al. Treatment of active rheumatoid arthritis with Leflunomide compared with placebo and Methotrexate. Arch Intern Med 1999; 159: 2542-2550.

厚生科学研究補助金
分担研究報告書

表1 スクリーニングとモニタリングに関する費用

(1)レフルノミド治療				
	単価	スクリーニング 回数	モニタリング	
			0~3ヶ月 回数	4~12ヶ月 回数
再診料	720	1	5	9
血算	500	1	5	9
生化学	1400	1	5	9
肝炎ウイルス	2000	1	0	0
CRP	200	1	5	9
RAHA	360	1	5	9
胸部XP	3500	1	0	0
心電図	1500	1	0	0
処方料	570	1	5	9
費用合計(円)		10750	18750	33750
患者全体の費用合計(円)	696170000		947118750	1704813750
(2)従来治療				
	単価	スクリーニング 回数	モニタリング	
			0~3ヶ月 回数	4~12ヶ月 回数
再診料	720	1	2	9
血算	500	1	2	9
生化学	1400	1	2	9
肝炎ウイルス	2000	0	0	0
CRP	200	1	2	9
RAHA	360	1	2	9
胸部XP	3500	0	0	0
心電図	1500	0	0	0
処方料	570	1	2	9
費用合計(円)		3180	6360	28620
患者全体の費用合計(円)	205936800		376868160	1695906720

厚生科学研究補助金
分担研究報告書

表2 副作用発生時の処置に関する費用

	単価	肝機能障害 回数	高血圧 回数	下痢 回数	発疹 回数	クエストラン 薬物除去
治癒までの期間(週数)		8	8	2	2	
再診料	720	4	4	2	1	
血算	500	0	0	1	0	
生化学	1400	4	1	0	0	
内分泌	2600	0	1	0	0	
CRP	200	0	0	1	0	
便培養	3000	0	0	1	0	
胸部XP	3500	0	1	0	0	
心電図	1500	0	1	0	0	
処方料	570	4	4	2	1	
費用合計(円)		10760	14160	6280	1290	6200
発生率		9.7%	3.7%	5.4%	5.3%	4.8%
患者全体の費用合計(円)		67583560	33927360	21961160	4427280	19269600

厚生科学研究補助金
分担研究報告書

F.研究発表

1.論文発表

- ① Suka M, Yoshida K. The national burdens of rheumatoid arthritis and osteoarthritis in Japan: projections to the year 2010 with future changes in severity distribution. *Modern Rheumatology* 2004;14:285-290.
- ② Suka M, Yoshida K. Cost-effectiveness of Leflunomide in the treatment of rheumatoid arthritis in Japan: macro-level economic evaluation using disability-adjusted life years. *Expert Rev Pharmacoeconomics Outcomes Res* 2004;4:617-622.
- ③ 須賀万智, 吉田勝美. 既存の統計資料を用いた推計によるマクロ的医療経済効果の評価－関節リウマチの新規治療薬導入. *厚生指標* 2005;52:26-30.

2.学会発表

- ① 吉田勝美, 須賀万智. 最近のリウマチ医療に関する経済的課題－新規治療薬導入による医療経済効果. 第48回日本リウマチ学会 (2004)
- ② Suka M, Yoshida K. Leflunomide is a cost-effective treatment for rheumatoid arthritis. *EULAR* (2004)

G.知的所有権の取得など

- 1.特許許可
- 2.実用新案登録
- 3.その他