

Original articles

Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is highly expressed in osteocytes in human bone

AKIHIDE NAMPEI¹, JUN HASHIMOTO¹, KENJI HAYASHIDA¹, HIDEKI TSUBOI¹, KENRIN SHI¹, ISAMU TSUJI⁴, HIDEAKI MIYASHITA⁴, TAKAO YAMADA⁴, NAOMICHI MATSUKAWA², MASAYUKI MATSUMOTO³, SHIGETO MORIMOTO³, TOSHIO OGIHARA², TAKAHIRO OCHI¹, and HIDEKI YOSHIKAWA¹

¹Department of Orthopaedics, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita 565-0871, Japan

²Department of Geriatric Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

³Department of Geriatric Medicine, Kanazawa Medical University, Kanazawa, Japan

⁴Pharmaceutical Research Division, Takeda Chemical Industries, Osaka, Japan

Abstract The matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) gene is highly expressed in tumors that cause oncogenic hypophosphatemic osteomalacia (OHO). MEPE is also known as one of the bone-tooth matrix proteins and is associated with bone mineralization. We developed a rabbit polyclonal antibody directed against recombinant human MEPE (rhMEPE) after cloning its cDNA from the cDNA library of a nasal tumor tissue causing OHO. Using this antibody, we analyzed the distribution of MEPE in human bones by immunohistochemistry. In bone specimens from normal subjects, MEPE was predominantly expressed by osteocytes and not by osteoblasts. In bone specimens from patients with osteomalacia, however, MEPE was focally expressed by deeply located osteocytes. We also compared the MEPE positivity of osteocytes in mineralized bone and non-mineralized osteoid obtained from patients with osteomalacia and osteoporosis. Among osteomalacia patients, MEPE positivity was seen in $87.5 \pm 8.6\%$ of the osteocytes from mineralized bone compared with $7.8 \pm 6.4\%$ of those from osteoid. Among osteoporosis patients, MEPE positivity was found in $95.3 \pm 0.5\%$ of the osteocytes from mineralized bone compared with $4.9 \pm 5.7\%$ of those from osteoid. MEPE was mainly expressed by osteocytes embedded in the matrix of mineralized bone from patients with osteomalacia or osteoporosis. Our data provide the first histological evidence that MEPE is predominantly expressed by osteocytes in human bone, with significant expression by osteocytes within mineralized bone.

Key words MEPE · osteocyte · immunohistochemistry · mineralization · human

Introduction

Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is a glycosylated protein that was originally cloned from the

tumors of patients with oncogenic hypophosphatemic osteomalacia (OHO) [1]. Because of its high expression in tumors that cause OHO, MEPE is regarded as a candidate phosphatonin, a putative humoral factor causing hypophosphatemic osteomalacia [2]. The MEPE gene has similarities with the genes of bone-tooth mineral matrix phosphoglycoproteins called SIBLINGs (small integrin-binding ligand with N-linked glycosylation) which contain RGD sequences that have been proposed as essential for integrin-receptor interactions [3]. This group of proteins includes osteopontin (OPN), dentin sialo phosphoprotein (DSPP), dentin matrix protein 1 (DMP1), and bone sialo protein (BSP).

MEPE also appears to be associated with the mineralization of bone. Petersen et al. [4] reported that osteoblast/osteocyte factor 45 (OF 45), which is identical to MEPE, was specifically expressed in bone tissue and that its expression was increased during matrix mineralization mediated by rat bone marrow-derived osteoblasts. They also showed that this protein was highly expressed by osteocytes embedded within the bone matrix. Argiro et al. [5] reported that murine MEPE mRNA was expressed by fully differentiated osteoblasts in vitro and that its expression was markedly increased during murine osteoblast-mediated matrix mineralization in normal and Hyp mice. Recently, Gowen et al. [6] reported that OF 45 knockout mice showed an increase in bone mass due to an increase in osteoblast numbers and activity. These findings suggest that MEPE may have a direct influence on bone metabolism, not only on renal phosphate handling but also on the mineralization of osteoid.

Although MEPE expression at the protein level has been demonstrated in mice [6] and rats [4], MEPE expression in human bone remains unproven. We developed a rabbit polyclonal antibody directed against recombinant human (rh)MEPE, which was obtained by the expression of MEPE cDNA in *Escherichia coli*. In

Offprint requests to: J. Hashimoto
(e-mail: junha@ort.med.osaka-u.ac.jp)

Received: May 23, 2003 / Accepted: September 12, 2003

this study, we demonstrated the expression of MEPE histologically in bone tissue from normal subjects, patients with several types of osteomalacia (OHO, Fanconi's syndrome, and vitamin D-deficient rickets), and patients with osteoporosis.

Subjects, materials, and methods

Preparation of polyclonal anti-MEPE antibody

We constructed a cDNA library from the nasal tumor of a patient with OHO [7], and cloned human MEPE cDNA using primers designed from the reported MEPE DNA sequence [1]. Then we obtained rhMEPE by expression in *E. coli* and developed a rabbit polyclonal antibody against rhMEPE. Briefly, a rabbit was immunized with rhMEPE (1 mg) in Freund's complete adjuvant (Wako, Osaka, Japan) injected at multiple subcutaneous sites on the back and intramuscularly into both thighs. After 2, 4, 6, and 8 weeks, the rabbit was given a half dose (0.5 mg) of rhMEPE in Freund's incomplete adjuvant (Wako). One week after the final booster injection, the rabbit was killed to obtain 70 ml of antiserum. The anti-serum had a titer of around 10^6 – 10^7 when assayed by enzyme immunoassay (EIA), using horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG (Wako). The anti-serum (6 ml) was diluted twofold with MAPSII binding buffer (Bio-Rad Laboratories, Tokyo, Japan), and applied to a column of Protein A-Sepharose FF (1.6×5.0 cm, 10 ml; Amersham Biosciences, Tokyo, Japan). An IgG fraction was eluted from the column with MAPSII elution buffer (Bio-Rad Laboratories), followed by neutralization. After dialysis against phosphate-buffered saline (PBS), the IgG fraction was chromatographed on a column of MEPE-coupled NHS-Hitrap (1 ml, containing 3 mg of coupled rhMEPE; Amersham Biosciences). The specific antibody fraction was eluted with 0.5 M NaCl–0.1 M glycine-HCl (pH 2.7). After neutralization and dialysis against PBS, the affinity-purified anti-MEPE IgG fraction was stored at 4°C until use. Starting from 6 ml of anti-serum, 16 mg of rabbit polyclonal anti-MEPE antibody was obtained. To confirm the specificity of this anti-rhMEPE antibody, a Western blot was performed of a crude cell lysate of *E. coli* expressing rhMEPE, using anti-MEPE IgG and HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Wako) as the primary and secondary antibodies, respectively. To confirm the detectability of rhMEPE expressed by a mammalian host, immunoblotting with the anti-MEPE antibody of the culture medium of rhMEPE-transfected Chinese hamster ovary (CHO) cells was also performed.

Clinical profile of the subjects

Samples of normal bone tissue were obtained intraoperatively from two patients: intact bone was obtained from a site away from a traumatic fracture of the tibia in a healthy 18-year-old man (NC1), and intact fibula was obtained from a 2-year-old boy who underwent below-knee amputation for fibrosarcoma of the tibia (NC2). Informed consent was obtained in both cases.

Iliac bone samples affected by osteomalacia (OM1-4; $n = 4$) and osteoporosis (OP1-4; $n = 4$) were obtained from patients who were diagnosed on the basis of bone mineral density, laboratory data, and iliac bone biopsy findings. Of the patients with osteomalacia, two had OHO (OM1, 2), one had Fanconi's syndrome (OM3), and one had vitamin D-deficient rickets (OM4). The clinical characteristics of all patients are summarized in Table 1.

Preparation of specimens

Paraffin sections

Decalcified paraffin sections were prepared for immunohistochemistry to detect MEPE. Bone samples from NC1, NC2, and OM1 were fixed in 4% paraformaldehyde (pH 7.4) at 4°C for 24 h, decalcified in 20% ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) (pH 7.4), dehydrated through an ethanol series, and finally embedded in paraffin. The specimens were then cut into serial sections (5- μ m-thick) on a microtome, mounted on slides, and prepared for immunohistochemistry. One of the sections was stained with hematoxylin and eosin to assess the histological features of each bone specimen.

Methylmethacrylate (MMA) sections

Sections were also prepared from undecalcified tissue to distinguish between the calcified and noncalcified areas. Iliac bone samples from the four osteomalacia patients (OM1-4) and the four osteoporosis patients (OP1-4) were fixed in 70% ethanol, prestained with Villanueva bone stain for 7 days, dehydrated through an ethanol and acetone series, and embedded in MMA, as described [8]. To distinguish noncalcified osteoid as Villanueva-positive areas, dry sections (5- μ m-thick) were cut, using a Jung Supercut 2065 Microtome (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) equipped with a tungsten carbide knife. For immunohistochemistry, serial wet sections (5- μ m-thick) were cut with the same machine while applying 30% ethanol to the block and knife. These sections were carefully stretched using 70% ethanol, mounted on gelatin-coated slides, using a mixture of carboic acid crystals and glycerol, flattened with a rubber roller, pressed with a slide press, and dried on a hot plate at 40°C.

Table 1. Characteristics of patients

Patient	Age (years)	Sex	Diagnosis	Bone histomorphometric data				Serum data					
				OS/BS (%)	O.Th (μm)	MAR ($\mu\text{m}/\text{day}$)	Calcium (8.4–10.0 mg/dl)	Phosphorous (2.9–4.8 mg/dl)	ALP (69–135 IU/l)	1,25(OH) ₂ vitD (20–60 pg/ml)	25(OH)vitD (10–55 pg/ml)		
NC1	18	M	Tibial fracture	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NC2	2	M	Amputation	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
OM1	53	F	Oncogenic osteomalacia	83.6	42.8	CND	8.5	1.8	356	12.5	12.5	NA	NA
OM2	58	F	Oncogenic osteomalacia	80.1	38.0	CND	8.0	1.6	472	18.0	18.0	29	29
OM3	35	F	Fanconi's syndrome	90.2	50.0	CND	8.2	2.4	947	9.2	9.2	24	24
OM4	53	F	Vitamin D deficiency	97.3	117.5	CND	7.1	2.4	264	23.5	23.5	16	16
OP1	53	M	Osteoporosis	16.7	10.2	0.78	8.3	4.6	118	61.3	61.3	6	6
OP2	54	F	Osteoporosis	20.2	9.4	NM	8.9	4.6	101	61.7	61.7	21	21
OP3	65	M	Osteoporosis	12.1	13.1	0.66	9.8	3.6	147	67.4	67.4	25	25
OP4	45	F	Osteoporosis	20.2	9.4	0.61	9.4	4.9	99	66.0	66.0	NA	NA

OS/BS, osteoid surface/bone surface; O.Th, osteoid thickness; MAR, mineral apposition rate; CND, calculation not done; NM, no measurement; NA, not available; NC, normal control; OM, osteomalacia; OP, osteoporosis

Immunohistochemical staining

Paraffin-embedded tissue sections were deparaffinized, and MMA-embedded sections were deacrylated twice in acetone, for 8 min each time, and then decalcified in 20% EDTA (pH 7.4) for 1 h. After being rinsed with water for 10 min, the sections were incubated in 0.3% H₂O₂ in 90% methanol for 30 min at room temperature to block endogenous peroxidase activity, and then the sections were incubated in 10% normal goat serum to minimize nonspecific background staining. Next, the rabbit polyclonal antibody directed against human MEPE was applied to each section, followed by incubation overnight at 4°C. An isotype-matched IgG was used for control staining. Detection was then performed using the streptavidin biotin-peroxidase complex technique (Histofine SAB-PO Kit; Nichirei, Tokyo, Japan) before the sections were developed in 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) and counterstained with hematoxylin.

Analysis of MEPE expression by osteocytes

MEPE expression by osteocytes was analyzed in mineralized bone and non-mineralized osteoid from all bone samples. Sections immunostained for MEPE, as well as Villanueva-stained MMA-embedded sections, were examined under a light microscope (ECLIPSE E1000; Nikon, Tokyo, Japan). Five randomly chosen visual fields within the trabecular bone area were examined at 200 \times magnification. The number of osteocytes was counted in the mineralized and non-mineralized areas of the Villanueva-stained section. Then the number of MEPE-positive cells was counted in the immunostained serial section in the areas that corresponded to those characterized as mineralized or non-mineralized by Villanueva staining. Subsequently, the ratio of MEPE-positive osteocytes to the total number of osteocytes in the mineralized bone and the non-mineralized osteoid was calculated. Values for results are presented as means \pm SDs. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U-test, and statistical significance was established at the $P < 0.05$ level.

Results

Western blotting of rhMEPE using the anti-MEPE polyclonal antibody

The specificity of the anti-MEPE antibody was examined by the Western blotting of both a crude lysate of *E. coli* expressing rhMEPE and of the culture medium of CHO cells transfected with a MEPE expression plasmid (Fig. 1). When the *E. coli* lysate was tested, rhMEPE

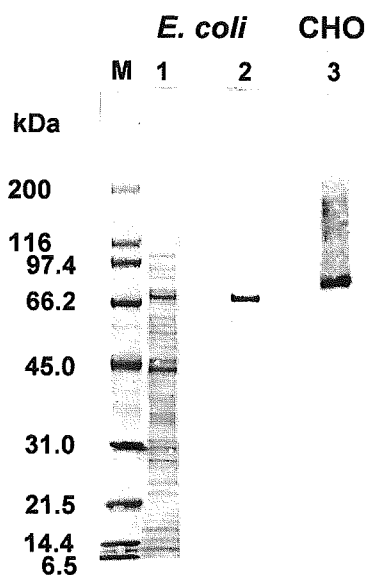


Fig. 1. Western blot analysis of recombinant human matrix extracellular phosphoglycoprotein (rhMEPE) expressed in *Escherichia coli* and Chinese hamster ovary (CHO) cells. A cell lysate prepared from *E. coli* expressing rhMEPE was stained with Coomassie Blue (lane M, molecular weight markers; lane 1, the *E. coli* lysate) and the lysate was also immunostained (lane 2) with anti-MEPE antibody. Culture medium from CHO cells transiently expressing rhMEPE was also analyzed by Western blotting (lane 3)

immunoreactivity was visualized as a single band at 67 kDa (lane 2; Fig. 1), demonstrating high specificity of the anti-MEPE antibody. When CHO cells were tested, a secreted protein of 70 kDa was selectively detected (lane 3; Fig. 1), confirming the specificity of the antibody. A broad, faint band was also observed at 100–150 kDa, indicating the secretion of heavily glycosylated forms of MEPE by the CHO transfectants.

Uniform MEPE expression in normal bone

MEPE expression was examined in normal bone tissue. Figure 2 shows MEPE expression in adult bone (NC1, tibial fracture), and Fig. 3 shows its expression in bone from a child (NC2, intact fibula). MEPE was strongly expressed by osteocytes in both cortical bone and trabecular bone (Fig. 2B, F), but it was not expressed by osteoblasts (Fig. 3C). Strong MEPE expression was observed in dendritic processes, as well as in the pericellular bone matrix of these bone-embedded osteocytes (Fig. 2D, H).

Focal MEPE expression in bone from osteomalacia patients

Bone specimens from osteomalacia patients were also examined. Figure 4 shows the bone specimen from a patient with OHO (OM1). MEPE expression was predominant in the osteocytes of cortical bone, although focal expression was also seen in trabecular bone (Fig. 4B); expression was more abundant in the central area

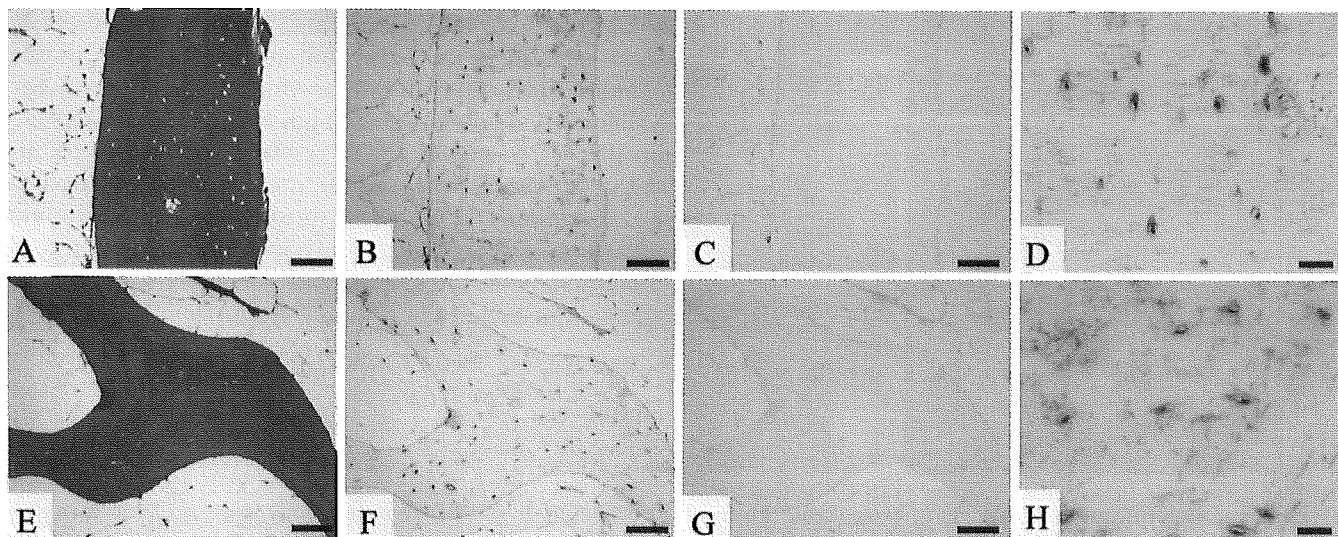


Fig. 2. Immunohistochemical detection of MEPE in normal human bone tissue (subject, NC1); **A–D** cortical bone; **E–H** trabecular bone from the tibia. **A,E** Staining with H&E. **B,D,F,H** Immunolocalization of MEPE; **C,G** negative control, and **D,H** higher magnifications of **B** and **F**, respectively. **B,F**

MEPE is uniformly expressed by osteocytes embedded in the matrix of both cortical and trabecular bone. **D,H** The dendritic processes and pericellular bone matrix of osteocytes are also positive. Bar, 100 μm in **A–C** and **E–G**; bar, 20 μm in **D** and **H**

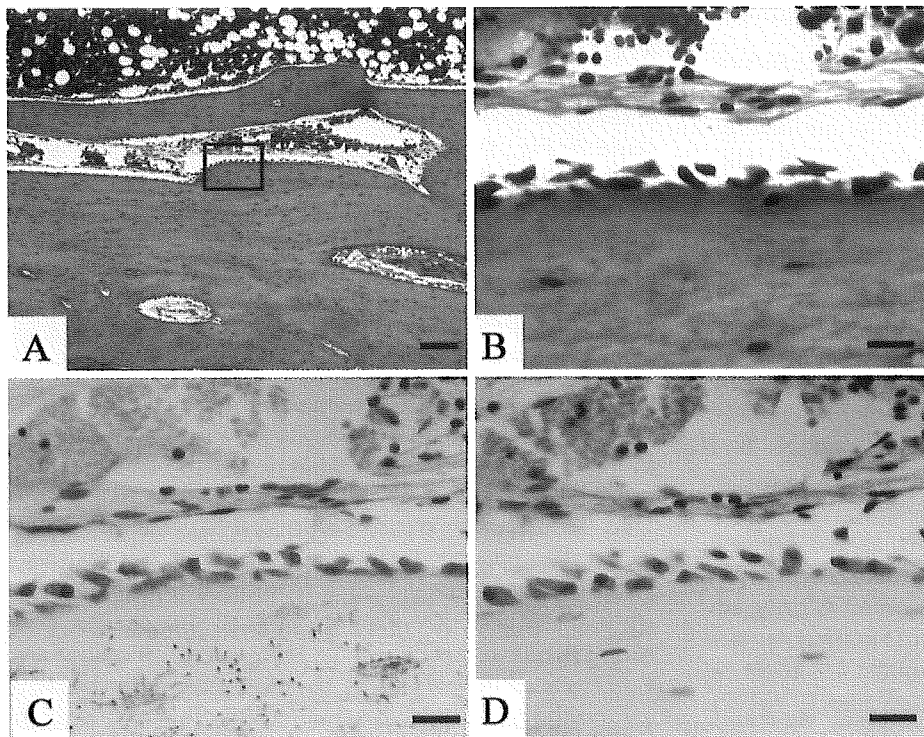


Fig. 3. Immunohistochemical detection of MEPE in immature bone (subject, NC2); **A, B** H&E staining; **C** anti-MEPE antibody; **D** negative control. **B** Higher magnification of the boxed area in **A**. **C** Osteoblasts are not stained, but osteocytes, pericellular bone matrix, and dendritic processes are stained, as was the case in mature bone (Fig. 2). Bar, 150 μ m in **A**; bar, 20 μ m in **B-D**

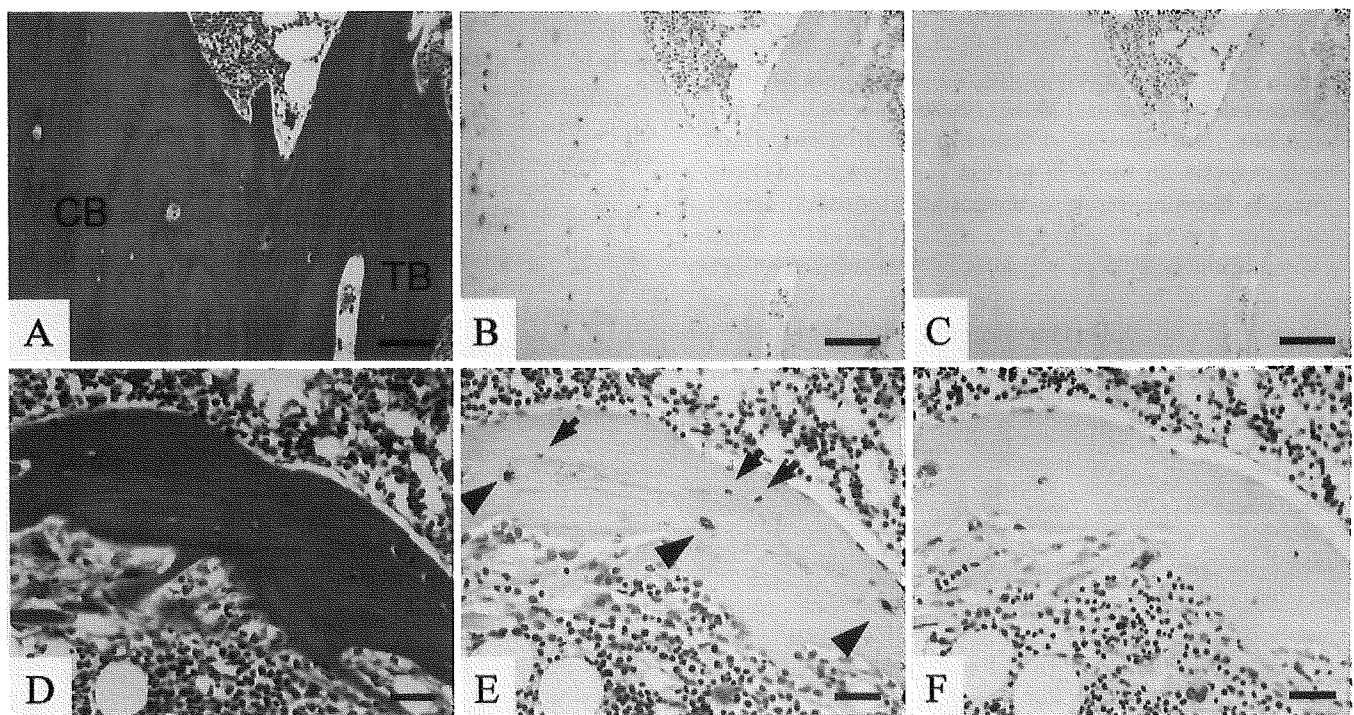


Fig. 4. Immunolocalization of MEPE in bone tissue from a patient with osteomalacia (OM1); **A, D** H&E; **B, E** anti-MEPE antibody; **C, F** negative control. **B** MEPE is expressed heterogeneously by osteocytes, and there is more positive staining in

cortical bone (*CB*) than in trabecular bone (*TB*). **E** In trabecular bone, MEPE-positive cells are more abundant in the central area (*arrowheads*) than at the boundary zone (*arrows*). Bar, 100 μ m in **A-C**; bar, 40 μ m in **D-F**

of bone than at the boundary zone, which could be regarded as osteoid (Fig. 4E).

Abundant MEPE expression in mineralized bone in patients with osteomalacia and osteoporosis

To assess the expression of MEPE in osteoid, we performed Villanueva staining and MEPE immunostaining of bone specimens from osteomalacia patients, using serial sections. In the specimen from osteomalacia patient 1 (OM1), Villanueva staining revealed prominent osteoid at the boundaries of trabecular bone (Fig. 5A, B), and MEPE expression was mainly observed in the Villanueva-unstained mineralized bone area (Fig. 5C). In the other three osteomalacia patients, similar findings were obtained. In order to make a comparison with the pattern of MEPE localization in patients with osteoporosis, iliac bone specimens from the four osteoporosis patients were examined by the same method (Fig. 6). MEPE-positive osteocytes were mainly observed in the mineralized bone area (Fig. 6C), as was the case in the osteomalacia patients. All four osteoporosis patients showed a similar pattern of MEPE expression.

The MEPE-positive osteocyte ratio was calculated separately for mineralized bone and non-mineralized osteoid. In mineralized bone from the osteomalacia and osteoporosis patients, MEPE positivity was seen in $87.5 \pm 8.6\%$ and $95.3 \pm 0.5\%$ of the osteocytes, respectively (Table 2). In contrast, in the osteocytes in the non-mineralized osteoid of osteomalacia patients, MEPE positivity was shown in $7.8 \pm 6.4\%$, while in the osteocytes in osteoid from osteoporosis patients MEPE positivity was shown in $4.9 \pm 5.7\%$ (Table 2). These findings show that there is significantly increased MEPE expression in the osteocytes within mineralized bone ($*P < 0.05$) in both osteomalacia and osteoporosis patients, and that there are no significant differences in MEPE expression between these two metabolic bone diseases.

Discussion

In the present study, we developed a rabbit polyclonal antibody that targeted rhMEPE expressed in *E. coli* and then used it to prepare an affinity-purified anti-MEPE antibody. Specific detection of crude rhMEPE from *E. coli* and CHO cells by Western blotting with the anti-MEPE antibody (Fig. 1) demonstrated its high specificity for MEPE. The difference in the molecular weight of MEPE obtained from *E. coli* and CHO transformants suggested that glycosylation of this molecule occurred in CHO cells.

Using this antibody, we investigated the distribution of MEPE in normal human bone by immunohistochem-

istry and recognized its predominant expression in bone-embedded osteocytes, a finding compatible with the results already obtained in mice [6] and rats [4]. Furthermore, MEPE expression was observed in the dendritic processes and pericellular bone matrix of the osteocytes, but not in osteoblasts.

Previous *in vitro* studies have suggested a correlation between MEPE expression and bone mineralization. Petersen et al. [4] showed that MEPE mRNA was expressed by fully differentiated osteoblasts and that its expression increased markedly during osteoblast-mediated mineralization of the bone matrix. Argiro et al. [5] reported a correlation between MEPE expression and bone mineralization after the addition of glycerophosphate to osteoblast culture medium. We found abundant MEPE expression by osteocytes in mineralized bone matrix, but more limited expression in non-mineralized osteoid (Figs. 5, 6), using a previously reported combination of histomorphometry and immunohistochemistry [8]. In normal bone, the non-mineralized osteoid area is too small to allow the detection of osteocytes in the non-mineralized matrix by standard histological examination. This may account for the fact that previous immunohistochemical studies of normal rodent bone did not detect osteocytes without MEPE expression. Our results, combined with previous *in vitro* data, suggest that MEPE is strongly expressed during the mineralization of bone as osteoblasts undergo maturation into osteocytes. However, it is not clear whether MEPE expression precedes the onset of mineralization of the bone matrix or whether it is preceded by mineralization.

Osteocytes are easily defined by their location and typical stellate morphology, and they have a relatively small number of organelles, which are necessary for the production and secretion of bone matrix [9,10]. Several non-collagenous matrix proteins have been found in and around osteoblasts and osteocytes, including OPN [11–16], osteocalcin [17–19], BSP [20–22], biglycan [23–25], osteonectin [26], and DMP1 [27–29]. These proteins are thought to play various roles in promoting bone mineralization [30] and in facilitating the attachment of osteocytes to the bone matrix [31], and genetic studies with knockout animal models have supported such hypotheses [32–36]. Some of these proteins belong to the SIBLING family, sharing many characteristic motifs and structural features (such as the RGD motif and ASARM motif encoded on chromosome 4q), and are considered to have similar functions [3]. Because most of these proteins are expressed by both osteocytes and osteoblasts, few osteocyte-specific markers have been established, apart from DMP1 [29] and several monoclonal antibodies directed against avian osteocytes (mAb OB7.3 [37], mAb OB37.11 [38], and mAb SB5 [39]). Recently, mAb OB7.3 was shown to target

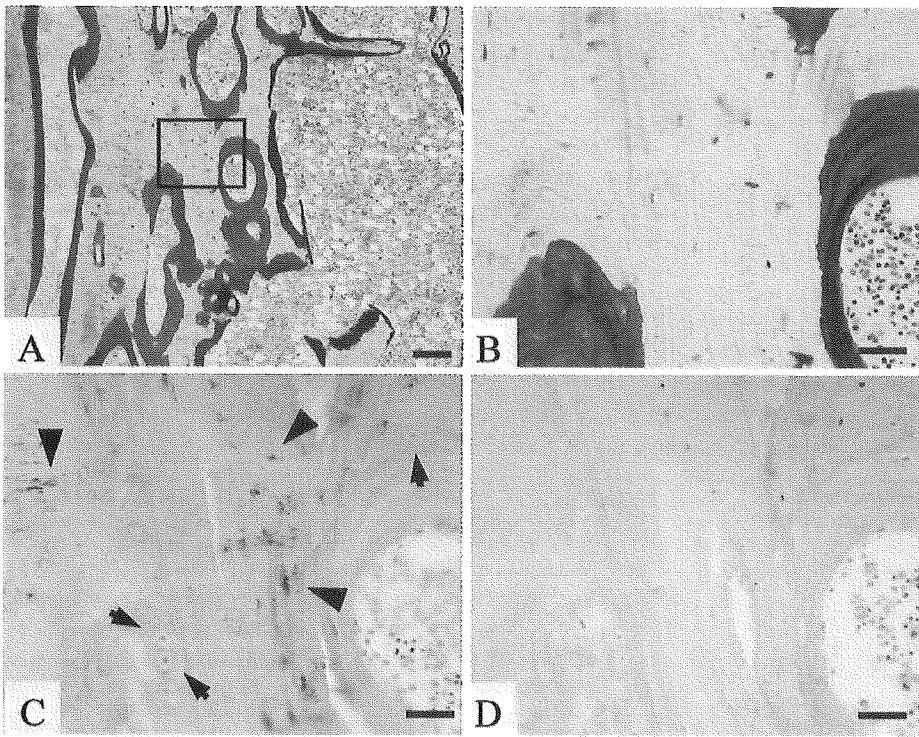


Fig. 5. Immunolocalization of MEPE in osteocytes of iliac bone tissue from a patient with oncogenic hypophosphatemic osteomalacia (OHO; OM1); **A,B** Villanueva bone stain; **C** anti-MEPE antibody; **D** negative control. **B** Higher magnification of the boxed area in **A**. **A** Abundant Villanueva-positive osteoid area is observed. **C** MEPE is expressed by osteocytes within the Villanueva-unstained mineralized bone area (arrowheads) and is not expressed by osteocytes within the osteoid (arrows). Bar, 150 μ m in **A**; bar, 40 μ m in **B-D**

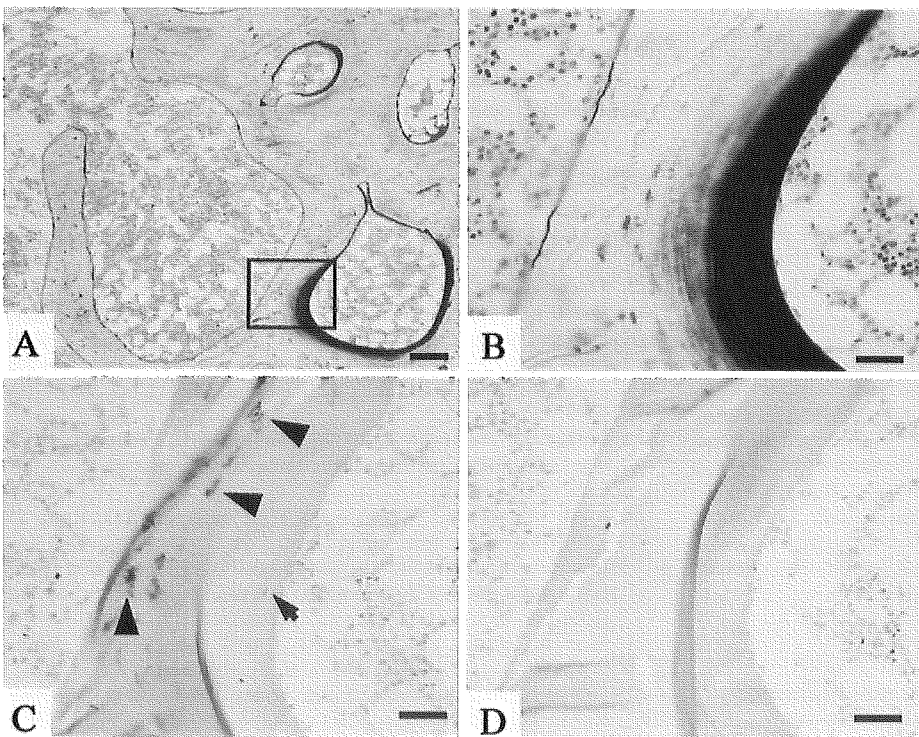


Fig. 6. Immunolocalization of MEPE in osteocytes of iliac bone tissue from a patient with osteoporosis (OP1); **A,B** Villanueva bone stain; **C** anti-MEPE antibody; **D** negative control. **B** Higher magnification of the boxed area in **A**. **A** The Villanueva-positive osteoid area is very small. **C** An osteocyte within the osteoid does not express MEPE (arrow), but osteocytes within mineralized bone express MEPE (arrowheads), as was the case in osteomalacia bone (Fig. 5). Bar, 150 μ m in **A**; bar, 40 μ m in **B-D**

the *Phex* (phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome) protein [40]. MEPE has already been shown immunohistochemically to be expressed by rodent osteocytes, and we also demonstrated here that it is expressed predominantly in

human osteocytes, but not in osteoblasts. These findings raise the possibility that MEPE is one of the specific markers for osteocytes.

We were unable to detect a difference in the distribution of MEPE between OHO and non-OHO bone

Table 2. Number of matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE)-positive osteocytes and MEPE positivity in bone tissue of osteomalacia and osteoporosis patients

Patient	Mineralized bone			Osteoid		
	Total OCY	MEPE(+) OCY	Positivity (%)	Total OCY	MEPE(+) OCY	Positivity (%)
OM1	88	66	75.0	52	9	17.3
OM2	223	211	94.6	104	5	4.8
OM3	191	173	90.6	74	3	4.1
OM4	127	114	89.8	83	4	4.8
Mean ± SD value			87.5 ± 8.6			7.8 ± 6.4*
OP1	156	148	94.9	6	0	0
OP2	147	121	96.0	9	1	11.1
OP3	61	58	95.1	6	0	0
OP4	164	156	95.1	12	1	8.3
Mean ± SD value			95.3 ± 0.5			4.9 ± 5.7*

Number of osteocytes is the total value in five examined fields

OCY, number of osteocytes; MEPE(+) OCY, number of MEPE-positive osteocytes; positivity, the ratio of MEPE-positive osteocytes/total osteocytes

Asterisk indicates significant difference between positivity in mineralized bone and in osteoid, calculated by Mann-Whitney *U*-test (**P* < 0.05)

(Table 2), or between osteoporosis and osteomalacia (Figs. 5 and 6, Table 2), so it remains unclear whether MEPE has a direct effect on bone metabolism in patients with osteomalacia. Further investigations are therefore needed to assess the influence of MEPE on bone metabolism in osteomalacia.

In summary, we demonstrated MEPE expression by osteocytes in human bone histologically, using a new rabbit polyclonal anti-rhMEPE antibody. We also investigated MEPE expression in bone from patients with osteomalacia and osteoporosis, and found that it was abundant in osteocytes within mineralized bone in both these diseases.

References

- Rowe PS, de Zoysa PA, Dong R, Wang HR, White KE, Econs MJ, Oudet CL (2000) MEPE, a new gene expressed in bone marrow and tumors causing osteomalacia. *Genomics* 67:54–68
- De Beur SM, Finnegan RB, Vassiliadis J, Cook B, Barberio D, Estes S, Manavalan P, Petroziello J, Madden SL, Cho JY, Kumar R, Levine MA, Schiavi SC (2002) Tumors associated with oncogenic osteomalacia express genes important in bone and mineral metabolism. *J Bone Miner Res* 17:1102–1110
- Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS (2001) Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun* 280:460–465
- Petersen DN, Tkalcevic GT, Mansolf AL, Rivera-Gonzalez R, Brown TA (2000) Identification of osteoblast/osteocyte factor 45 (OF45), a bone-specific cDNA encoding an RGD-containing protein that is highly expressed in osteoblasts and osteocytes. *J Biol Chem* 275:36172–36180
- Argiro L, Desbarats M, Glorieux FH, Ecarot B (2001) Mepe, the gene encoding a tumor-secreted protein in oncogenic hypophosphatemic osteomalacia, is expressed in bone. *Genomics* 74:342–351
- Gowen LC, Petersen DN, Mansolf AL, Qi H, Stock JL, Tkalcevic GT, Simmons HA, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, Ke HZ, McNeish JD, Brown TA (2003) Targeted disruption of the osteoblast/osteocyte factor 45 gene (OF45) results in increased bone formation and bone mass. *J Biol Chem* 278:1998–2007
- Kawai Y, Morimoto S, Sakaguchi K, Yoshino H, Yotsui T, Hirota S, Inohara H, Nakagawa T, Hattori K, Kubo T, Yang J, Fujiwara N, Ogihara T (2001) Oncogenic osteomalacia secondary to nasal tumor with decreased urinary excretion of cAMP. *J Bone Miner Metab* 19:61–64
- Derckx P, Nigg AL, Bosman FT, Birkenhager-Frenkel DH, Houtsmuller AB, Pols HA, van Leeuwen JP (1998) Immunolocalization and quantification of noncollagenous bone matrix proteins in methylmethacrylate-embedded adult human bone in combination with histomorphometry. *Bone* 22:367–373
- Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ (1994) Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* 55:287–299
- Nijweide PJ, Burger EH, Klein-Nulend J (2002) The osteocyte. In: Bilezikian J, Raisz L, Rodan G (eds) *Principles of Bone Biology*, 2nd edn. Academic, San Diego, pp 93–107
- Fisher LW, Hawkins GR, Tuross N, Termine JD (1987) Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. *J Biol Chem* 262:9702–9708
- Franzen A, Heinegard D (1985) Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J* 232:715–724
- Mark MP, Butler WT, Prince CW, Finkelman RD, Ruch JV (1988) Developmental expression of 44-kDa bone phosphoprotein (osteopontin) and bone gamma-carboxyglutamic acid (Gla)-containing protein (osteocalcin) in calcifying tissues of rat. *Differentiation* 37:123–136
- Mark MP, Prince CW, Oosawa T, Gay S, Bronckers AL, Butler WT (1987) Immunohistochemical demonstration of a 44-KD phosphoprotein in developing rat bones. *J Histochem Cytochem* 35:707–715
- Prince CW, Oosawa T, Butler WT, Tomana M, Bhowan AS, Bhowan M, Schrohenloher RE (1987) Isolation, characterization, and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone. *J Biol Chem* 262:2900–2907
- Young MF, Kerr JM, Termine JD, Wewer UM, Wang MG, McBride OW, Fisher LW (1990) cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics* 7:491–502

17. Boivin G, Morel G, Lian JB, Anthoine-Terrier C, Dubois PM, Meunier PJ (1990) Localization of endogenous osteocalcin in neonatal rat bone and its absence in articular cartilage: effect of warfarin treatment. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 417:505–512
18. Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM (1975) Direct identification of the calcium-binding amino acid, gamma-carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:3925–3929
19. Ohta T, Mori M, Ogawa K, Matsuyama T, Ishii S (1989) Immunocytochemical localization of BGP in human bones in various developmental stages and pathological conditions. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 415:459–466
20. Chen J, Zhang Q, McCulloch CA, Sodek J (1991) Immunohistochemical localization of bone sialoprotein in foetal porcine bone tissues: comparisons with secreted phosphoprotein 1 (SPP-1, osteopontin) and SPARC (osteonectin). *Histochem J* 23:281–289
21. Chen JK, Shapiro HS, Wrana JL, Reimers S, Heersche JN, Sodek J (1991) Localization of bone sialoprotein (BSP) expression to sites of mineralized tissue formation in fetal rat tissues by in situ hybridization. *Matrix* 11:133–143
22. Oldberg A, Franzen A, Heinegard D (1988) The primary structure of a cell-binding bone sialoprotein. *J Biol Chem* 263:19430–19432
23. Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG (1990) Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J Histochem Cytochem* 38:1549–1563
24. Ibaraki K, Termine JD, Whitson SW, Young MF (1992) Bone matrix mRNA expression in differentiating fetal bovine osteoblasts. *J Bone Miner Res* 7:743–754
25. Ingram RT, Clarke BL, Fisher LW, Fitzpatrick LA (1993) Distribution of noncollagenous proteins in the matrix of adult human bone: evidence of anatomic and functional heterogeneity. *J Bone Miner Res* 8:1019–1029
26. Jundt G, Berghauer KH, Termine JD, Schulz A (1987) Osteonectin—a differentiation marker of bone cells. *Cell Tissue Res* 248:409–415
27. D'Souza RN, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T, Kulkarni AB, MacDougall M (1997) Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (*Dmp1*) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo. *J Bone Miner Res* 12:2040–2049
28. MacDougall M, Gu TT, Luan X, Simmons D, Chen J (1998) Identification of a novel isoform of mouse dentin matrix protein 1: spatial expression in mineralized tissues. *J Bone Miner Res* 13:422–431
29. Toyosawa S, Shintani S, Fujiwara T, Ooshima T, Sato A, Ijuhin N, Komori T (2001) Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 16:2017–2026
30. Robey PG (1996) Vertebrate mineralized matrix proteins: structure and function. *Connect Tissue Res* 35:131–136
31. Aarden EM, Nijweide PJ, van der Plas A, Alblas MJ, Mackie EJ, Horton MA, Helfrich MH (1996) Adhesive properties of isolated chick osteocytes in vitro. *Bone* 18:305–313
32. Delany AM, Amling M, Priemel M, Howe C, Baron R, Canalis E (2000) Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *J Clin Invest* 105:915–923
33. Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G (1996) Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382:448–452
34. Rittling SR, Matsumoto HN, McKee MD, Nanci A, An XR, Novick KE, Kowalski AJ, Noda M, Denhardt DT (1998) Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *J Bone Miner Res* 13:1101–1111
35. Xu T, Bianco P, Fisher LW, Longenecker G, Smith E, Goldstein S, Bonadio J, Boskey A, Heegaard AM, Sommer B, Satomura K, Dominguez P, Zhao C, Kulkarni AB, Robey PG, Young MF (1998) Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nat Genet* 20:78–82
36. Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT, Noda M (1999) Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:8156–8160
37. Nijweide PJ, Mulder RJ (1986) Identification of osteocytes in osteoblast-like cell cultures using a monoclonal antibody specifically directed against osteocytes. *Histochemistry* 84:342–347
38. Nijweide PJ, van der Plas A, Olthof AA (1988) Osteoblastic differentiation. *Ciba Found Symp* 136:61–77
39. Bruder SP, Caplan AI (1990) Terminal differentiation of osteogenic cells in the embryonic chick tibia is revealed by a monoclonal antibody against osteocytes. *Bone* 11:189–198
40. Westbroek I, De Rooij KE, Nijweide PJ (2002) Osteocyte-specific monoclonal antibody MAb OB7.3 is directed against Phex protein. *J Bone Miner Res* 17:845–853

特集：ビスホスホネート製剤の最新情報

7. 続発性骨粗鬆症の予防と治療

2) リウマチ患者に続発する骨粗鬆症

Hashimoto Jun

橋本 淳

7. 続発性骨粗鬆症の予防と治療

2) リウマチ患者に続発する骨粗鬆症

Hashimoto Jun

橋本 淳*

*大阪大学医学部整形外科

●●●
はじめに

骨粗鬆症に伴う椎体や大腿骨近位部の骨折がQOLを下げることは、広く認知されてきている。関節リウマチ(RA)でも二次性骨粗鬆症が生ずることが知られ、特に重症病型では強い骨粗鬆症を来し、その結果生ずる種々の骨折は、RA患者の身体機能を低下させる要因の1つとなっている。したがって、RA患者の治療を行う上で炎症のコントロール、関節破壊の抑制、破壊関節の機能回復に加えて、骨折に伴う機能障害の予防と治療も同時に必要である。RAにみられる二次性骨粗鬆症では、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も増加する。骨折部位の多様性という点で、RAに伴う骨粗鬆症はその臨床像が原発性骨粗鬆症やステロイド性骨粗鬆症とは大きく異なる。しかるに、この点に関して一般的な理解はまだ十分とは言えず、原発性骨粗鬆症やステロイド性骨粗鬆症でみられる臨床所見の範疇での理解に基づく、椎体や大腿骨頸部骨折のみに注目した解析も多い。RAの二次性骨粗鬆症の最終像である骨折がどのようなものであるかの理解が不足していると、RA患者のQOL維持を目指した骨粗鬆症の予防や治療を考える上で、回り道となる危険がある。

そこで本稿では、RA患者に続発する骨粗鬆症の治療を考える上での基本情報として、RA骨粗鬆症の最終症状である骨折の臨床像も含めて概説する。

●●●
RA患者にみられる骨病変

RA患者でみられる骨病変は、3つの様式に分類して把握すると理解しやすい¹⁾。傍関節性骨粗鬆症、全身性骨粗鬆症と、炎症を持続している関節にみられるpannusによる骨破壊である。さらに、若年性RAのように成長軟骨が残存している場合には成長軟骨障害も来し^{2,3)}、これを含めて4つの様式として把握できる。

傍関節性骨粗鬆症とpannusによる骨破壊は、関節の破壊・変形、関節機能障害に深く関与し、炎症性サイトカインの関与が強い病変である。全身性骨粗鬆症は、傍関節性骨粗鬆症と重なりながら、全身いたるところの骨脆弱性骨折を来し、運動機能障害の原因となる。全身性骨粗鬆症は、運動機能障害に伴う廃用性骨粗鬆症とステロイド使用の影響^{4,5)}に加え、重症病型にみられる疾患特異的な影響⁶⁾の関与も考えられる。成長軟骨障害は、関節の内外反変形、関節変形やそれに伴う可動域制限の原因となる。

RAにみられる二次性骨粗鬆症は、このような疾患に伴う骨病変の病態の1つとしてとらえられる。

●●●
RA患者がどのような骨折で機能障害に至るか

RA患者にみられる骨折は、臨床的に大きく分けて日常生活動作で生ずる骨脆弱性骨折や軽微な外傷に伴う骨折、関節破壊に関連する骨折、手術操作に伴う骨折、術後の骨折と4つに分けてとらえると理解しやすい。いずれをとっても、骨折の治療に至るまでの安静

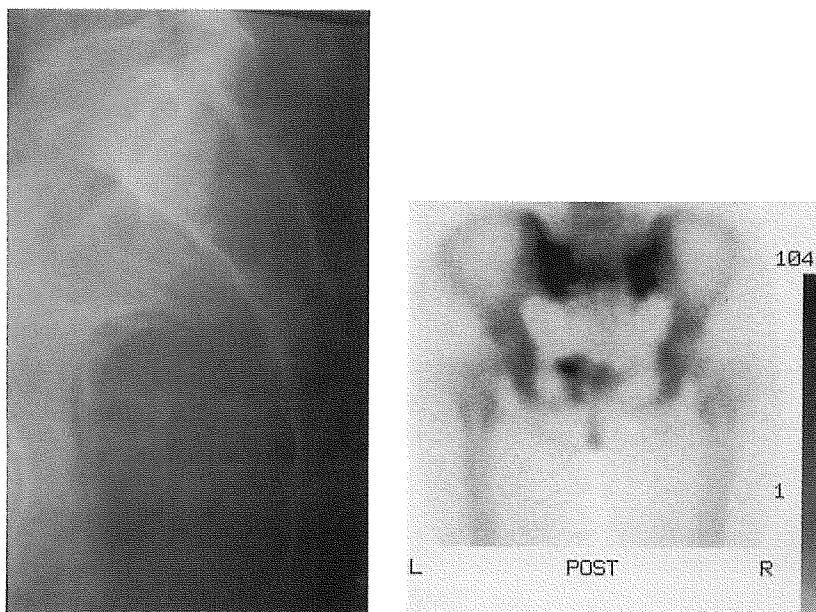


図1 RA(55歳, 女性)

罹病期間4年, 多関節破壊型, class III, prednisolone 10 mg/day服用中.
誘因なく臀部痛出現, つかまり歩きの状態となった. 疼痛出現4週後のX線像上, 確
認困難であるが, 仙骨に骨折線. 疼痛出現10週後の骨シンチグラフィー上, 仙骨骨折に
特徴的なH型の集積と併発した左恥骨体部の骨折部の集積増加を認める.

に伴う運動機能障害の進行や, 残存変形に伴う機能障
害をもたらす結果となる. また, いずれも骨の脆弱性
を基盤としているが, それに加えて軽微な外傷, 関節
変形に伴う一部の骨への応力集中, 手術操作に伴う外
力, 手術後の急速な歩行量増加などの要因が加わり生
ずる.

特別な外力なく骨強度が脆弱なゆえに日常生活の生
理的なストレスのみで生ずる骨折は, 骨脆弱性骨折:
insufficiency fractureと呼ばれる. この骨脆弱性骨折:
insufficiency fractureは, Pentecostらが1964年に正常
強度の骨に生ずるfatigue fractureとともにstress frac-
tureの1つとして定義し, また腫瘍性病変による脆弱
骨に生ずるpathologic fractureと区別して語彙を用い
る必要性を提唱している⁷⁾. RAでは, このような転倒
などの外力もなく起こる骨脆弱性骨折が多く⁸⁻¹¹⁾, RA
に伴う骨折を考える上で, 骨脆弱性骨折が起こりやす
いことの認識は重要である.

図1は, 骨脆弱性骨折として頻度の高い仙骨骨折の
例である. 臀部の疼痛で歩行困難となった例であるが,
仙骨, 腸骨の局所圧痛と典型的な骨シンチグラフィー
上のH型の集積増加¹²⁾で診断できるが, 単純X線像で
は骨折線をとらえることは不可能である. 図2も骨脆
弱性骨折として頻度の高い恥骨の骨折である. 単純X
線像上とらえることは不可能である恥骨上枝の骨折も,

MRIではinsufficiency fractureの典型的な像として, 容
易にとらえることが可能である. このように, 骨脆弱
性骨折は特別な外力なく生じているがゆえに骨折部の
ずれがなく, X線像は診断上無力であることが多い.
鑑別診断の1つとして疑った上での注意深い診察と適
切な画像検査が必要である.

関節破壊に関連する骨折としては, 関節破壊の一因
となる関節面の陥凹と, 関節破壊に伴う変形の結果生
ずる骨折が挙げられる. 図3は, 関節面の陥凹骨折と
外反した膝関節の遠位に, 外反ストレスによる脛腓骨
の骨幹部骨折を生じた例である. 図4は足関節, 距骨
下関節の外反変形に伴い, 腓骨外果骨折を生じた例で
ある. 図4のような関節近傍の骨折は, 関節炎の増悪
として扱われ, 骨折の診断に至らないことも多い. い
ずれも一時的な局所安静が早期治療に必要であり, 的
確な骨折の診断が必要である.

手術操作に伴う骨折は, 人工関節置換術などの手術
の合併症として起こるもので, 通常安静により骨癒合
が得られるので, 最終的には人工関節置換術による利
益を得られるが, リハビリテーションの遅れをもたら
す.

術後の骨折は, 図2の症例のように下肢の人工関節
置換術により急速な歩行能力の回復が得られたことに
より, 下肢や骨盤の脆弱性骨折を起こすもので, 特に



図2 RA(77歳, 女性)

多関節破壊型, class III, 罹病期間6年. prednisolone 10 mg/day服用中.

両側人工関節置換術(TKA)後, 長距離歩行が可能となった. TKA後8カ月時, 左股部痛出現し, 1週後より歩行困難となった. 疼痛出現2週後X線像では骨折線は確認困難であるが, 同時期のMRIでは左恥骨上枝にinsufficiency fractureを示すT1, T2-weighted imagesでの低信号域を認める.

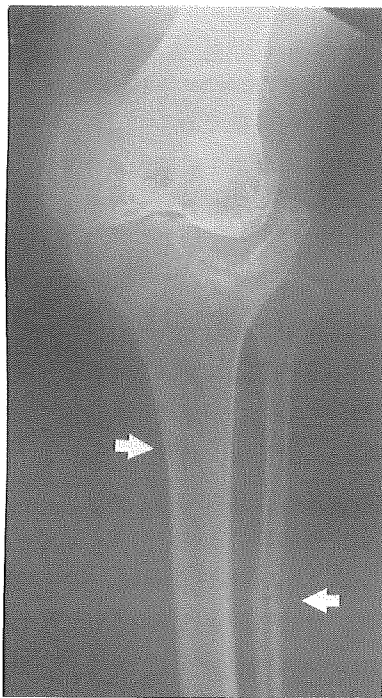


図3 RA(73歳, 女性)

多関節破壊型, class III, 脛骨外側関節面の圧潰と外反膝に伴う脛腓骨骨幹部の骨折を認める(矢印).

歩行能力が長期に障害されていた例でみられる.

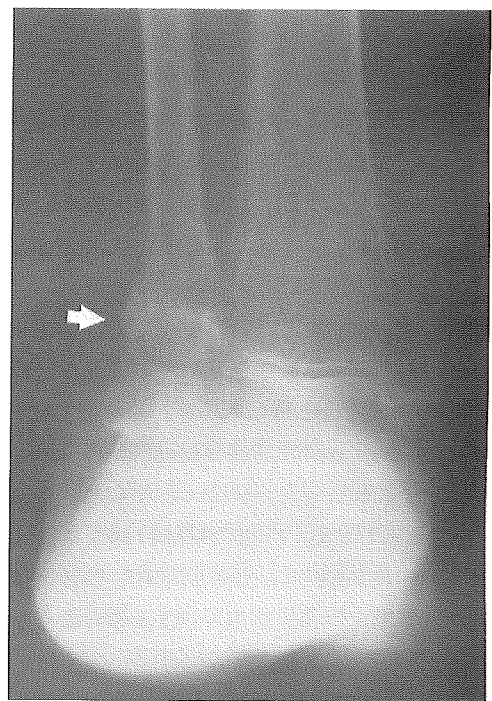


図4 RA(65歳, 女性)

多関節破壊型, class II, 後足部の外反により腓骨外果骨折を起こした.

●●●●
● RA患者ではどのような部位に
● 骨折が多いか

RA患者にみられる骨折を, 大腿骨頸部や椎体骨折以外も含めて調査した報告は極めて少ないが, 全身の

表1 関節リウマチに伴う骨粗鬆症でみられる骨折

部位	骨折数
肋骨, 頸椎	24
上腕骨(骨幹部)	13
肩	8
肘	7
手関節	12
手	12
脊椎	46
骨盤	15
下肢(骨幹部)	22
股関節	26
膝	6
足, 足関節	33
その他	2
合計	226

(文献14より引用)

いたるところに骨折が生じることが報告されている^{13,14)}。表1は、Michelらの報告しているRA患者でみられる骨折の部位と頻度であるが¹⁴⁾、退行期骨粗鬆症とは全く異なる分布を示す。RA患者も加齢やステロイドの影響の下に骨粗鬆症を生じているので、椎体骨折もみられるが、骨折好発部位が椎体骨折、大腿骨頸部骨折に限定されず骨幹部の骨折や骨盤の骨折など、全身いたるところに骨折が生じることが、RA患者の骨折の特徴といえる。骨粗鬆症治療のend pointである骨折防止を考える際に、RA患者では椎体骨折や大腿骨頸部骨折だけに注目することは不十分であることが理解できる。一方、骨脆弱性骨折に関する認識が次第に広まりつつあるが、RA患者で骨脆弱性骨折も含めてその頻度を調査した報告はない。

われわれが最近行った、209名(平均年齢60.4±11.5歳、男性31名、女性178名、平均罹病期間14.5±10.2年)の定期的通院中のRA患者で、骨脆弱性骨折の診断も行える対応のもとで骨折発生状況に関する前向き検討をした結果、全骨折の71%が軽微な外傷歴もない日常生活動作内での骨折である骨脆弱性骨折であり、全骨折の36%が骨折時に単純X線像上全く所見がなく、MRIや骨シンチグラフィーで画像診断される骨折であることが明らかとなった。また、骨折部位は骨盤の骨脆弱性骨折を多くとらえたためか、骨盤の骨折がMichelらの報告の約3倍の頻度であった以外は、全身様々な部位に骨折が生じることが、これまでの報告と一致した結果であった。骨脆弱性骨折診断時は局所の安静が必要であり、診断が遅れることで骨折部の転位、変形、他

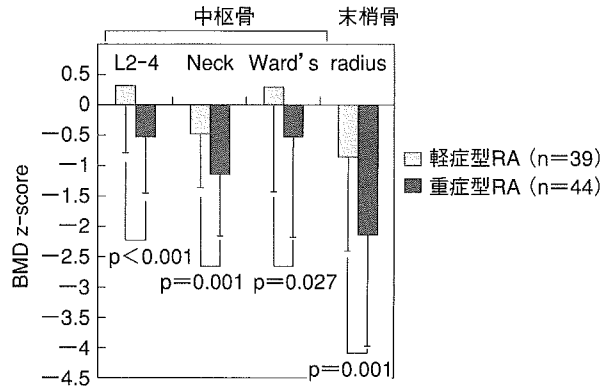


図5 重症型RA患者と軽症型RA患者の骨密度比較

の部位の骨折を引き起こすことになるため、正確な早期診断は、RA患者のQOL維持を目指す上で極めて重要である。

以上の点より、RA患者では骨脆弱性骨折を含めた骨折の診断精度を上げつつ、全身にわたる骨折のリスクを念頭に置いた二次性骨粗鬆症の予防と治療を考えることが必要である。

●●● どのようなRA患者で骨粗鬆症を注意すべきか

骨密度の低下は骨折の最大の決定因子であるが、RA患者でみられる骨密度減少に影響する因子は、年齢、RAの重症度、RAの罹病期間、関節炎の活動性、性別、閉経の有無、ステロイドの使用、低栄養など、原発性骨粗鬆症や他のステロイド性骨粗鬆症に比較して極めて多い。また、末梢骨か中枢骨か、部位によっても大きく異なる。

図5は、RA患者を全身の関節破壊の広がり进行评估してRAの重症度分類を行うOchiの分類¹⁵⁾で、MUD、MES、LESと分け、MUD、MESを重症病型、LESを軽症病型として分けた場合の、腰椎、大腿骨、前腕の骨密度のz-scoreを示す。重症病型では腰椎、大腿骨、橈骨遠位いずれもz-scoreは低下しているのに対して、軽症病型ではその低下は橈骨遠位のみ限定され、腰椎、大腿骨の低下はみられない。このことは、重症病型で全身性骨粗鬆症がみられることを意味する。

Sambrookらは、運動機能障害別に腰椎骨量を検討し、骨量が運動機能障害の程度に逆相関することを明らかにしている¹⁶⁾。Hooymanらは、RAでみられる骨折のリスクはSteinbrockのstageがclass IからIVへと悪化し、運動機能障害が強いほど高いことを報告してい

る¹³⁾。またMagaroらは全身性の骨粗鬆症はステロイド剤、不動化、年齢、閉経、活動性の低下が因子となり生ずることを報告している¹⁷⁾。このように、運動機能障害が強く不動性骨減少を来しやすい重症型RAでは、骨密度が低いといえる。ShibuyaらもOchiの分類でみたRAの重症病型、lean body massの低値、長い罹病期間が全身性骨粗鬆症の危険因子になることを報告している¹⁸⁾。また、手と足のX線像上、関節破壊が強いRA患者の方が全身性骨粗鬆症が強いことも報告されている¹⁹⁾。評価方法や評価項目の差により報告による差はあるが、重症で運動機能障害の強い例で全身性の骨粗鬆症が多いことは共通した結果である。また、前述したわれわれの骨折の検討でも、骨折発生に關与する因子はステロイドの使用量と身体機能であった。

これらのことを総合すると、RA患者に特異的な危険因子としては重症型、運動機能の低下例、ステロイド使用例の3点が重要と考えられる。

●●● RA患者でみられる骨粗鬆症の評価として ●●● どの部位の骨密度測定が必要か

原発性骨粗鬆症では、腰椎と大腿骨近位部の骨密度測定が基本となっているが、前述したように骨折が椎体と大腿骨頸部に限局しない点より、この2部位の測定での評価が十分と考えることは困難である。全身様々な部位に骨折を来す骨粗鬆症であるので、多部位の測定が望まれる。

この点を踏まえ、末梢骨(脛骨遠位、橈骨遠位)と中枢骨の骨密度減少の違いを最近われわれは検討した。罹病期間が7年以上で、活性型ビタミンD製剤のみ服用中のRA患者51名の骨密度の変化を縦断的に調査した結果、腰椎、大腿骨骨密度に比べ、橈骨遠位、脛骨遠位の骨密度の方が減少速度が速く、また腰椎、大腿骨と末梢骨骨密度の変化率には相関がないことが明らかとなった。さらに、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、部位による差も明らかとなった。

このような点から、骨密度測定は末梢骨と中枢骨の骨減少は別の動きをしており、一方で他方の測定に代用することは不可能である。それゆえ、RAでは末梢骨と中枢骨両者の測定が必要であるが、しかし、いずれの部位を測定するに当たっても、経過とともに関節破壊や変形により同一関心領域：ROI(region of inter-

est)の設定が困難になること、関節の可動域制限や疼痛により同じ測定姿勢がとれなくなることなど、長期的・経時的な評価は必ずしも容易ではない。この傾向は、骨粗鬆症の評価と治療が必要な重症病型RAの患者に強い。初めはできる限り多くの複数部位、複数方法で評価を始め、その後患者の状況に合わせ正確な評価が可能な方法を継続して行うことが、長期的経過をみる上では必要である。

●●● どのような治療が現在可能か

治療に関しては、運動機能低下を最小限にとどめるべく、まずRAの病勢コントロールが必須である。次に一般的な留意点としては、栄養学的な治療(CaあるいはビタミンDの補充)、ステロイドの減量、歩行能力低下への早い対応(リハビリテーション、手術適応の判断)の3点が挙げられる。

RA患者では、血清Caが低めであることが報告されており²⁰⁾、またステロイド投与による腸管からのCa吸収率低下作用への対応として、栄養学的なCaの補充やビタミンDの投与が従来行われてきている。しかし、この方法でRAに伴う骨粗鬆症が予防できたとする報告はなく、骨粗鬆症の予防的治療として十分なものではない。

第2点目のステロイドに関しては、Laanらの罹病早期のRA患者でのprednisoloneの腰椎骨密度への影響の検討では、7.5 mg/dayでも減少がみられ、prednisolone投与の中止により回復性があることを示している²¹⁾。したがって、運動機能低下に影響しない範囲でのprednisoloneの投与量減量を模索することには、常に留意が必要である。

第3点目の歩行能力低下への早い対応として、炎症性の疼痛から関節構造破綻に伴う物理的な疼痛主体になってきた場合は、タイミングよく手術適応を判断して歩行能が強く障害された状況が長期化しないようにする必要がある。これはEBMとなるデータの得られにくい点であるが、RA患者の治療上、重要である。

早期のRA患者では、運動療法を行うことで骨密度減少を少なくできることの報告がされており^{22,23)}、運動機能維持を図ることは重要である。この運動機能維持自体がRA患者の治療目的であるので、運動療法、薬物療法、手術療法いずれも的確な方法で行うことが重要である。最近、生物学的製剤によるRA治療が可能となり、強力なRAの病勢のコントロールも可能となっ

てきた。このような治療により、RAに伴う骨粗鬆症自体も抑制されることが期待されている。一方、骨粗鬆症治療薬としてRAを対象としてalendronateでの検討がなされ、bisphosphonateの有用性が確認されてきている。Yilmazらは、罹病期間平均8年強、methotrexate 7.5 mg/week, prednisolone 7.5 mg/dayで治療中のRA患者44名でのCa剤と、alendronateとCa剤併用の比較を6カ月行い、L1-4腰椎、L2腰椎の骨密度はalendronate群で有意に増加したと報告しているが²⁴⁾、閉経後骨粗鬆症患者での腰椎骨密度増加率に比較して増加率が悪いこと、大腿骨の骨密度の有意な増加は確認されなかったなど、RAでの骨粗鬆症治療の難しさを考えさせる結果である。

●

RAに伴う二次性骨粗鬆症では、全身の様々な部位に骨折を来すことと、X線像上とらえにくい骨脆弱性骨折の様式をとることが多いので、原発性骨粗鬆症やステロイド性骨粗鬆症とは異なる臨床像を呈する。骨脆弱性は運動機能障害の強い重症型RAやステロイド使用例に強く、このようなRA患者の運動機能維持、QOL維持のためには、RAに対する薬物療法、理学療法、手術療法と同時に、骨折の的確な診断・治療と、骨折防止のための早期からの骨密度評価と骨粗鬆症の予防的治療が重要である。

●

- 文 献
- 1) Sambrook, P. N. : The skeleton in rheumatoid arthritis : common mechanisms for bone erosion and osteoporosis? *J. Rheumatol.* **27**(11) : 2541-2542, 2000
 - 2) Simon, S., Whiffen, J. and Shapiro, F. : Leg-length discrepancies in monoarticular and pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis. *J. Bone Joint Surg. Am.* **63**(2) : 209-215, 1981
 - 3) Takahi, K., Hashimoto, J., Hayashida, K. et al. : Early closure of growth plate causes poor growth of long bones in collagen-induced arthritis rats. *J. Musculoskel. Neuron. Interact.* **2**(4) : 344-351, 2002
 - 4) Sambrook, P. N., Eisman, J. A., Champion, G. D. et al. : Determinants of axial bone loss in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **30**(7) : 721-728, 1987
 - 5) Gough, A. K., Lilley, J., Eyre, S. et al. : Generalised bone loss in patients with early rheumatoid arthritis. *Lancet* **344**(8914) : 23-27, 1994
 - 6) Toritsuka, Y., Nakamura, N., Lee, S. B. et al. : Osteoclastogenesis in iliac bone marrow of patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **24**(9) : 1690-1696, 1997
 - 7) Pentecost, R. L., Murray, R. A. and Brindley, H. H. : Fatigue, insufficiency, and pathologic fractures. *JAMA* **187** : 1001-1004, 1964
 - 8) Alonso-Bartolome, P., Martinez-Taboada, V. M., Blanco, R. et al. : Insufficiency fractures of the tibia and fibula. *Semin. Arthritis Rheum.* **28**(6) : 413-420, 1999
 - 9) Fam, A. G., Shuckett, R., McGillivray, D. C. et al. : Stress fractures in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **10**(5) : 722-726, 1983
 - 10) Young, A., Kinsella, P. and Boland, P. : Stress fractures of the lower limb in patients with rheumatoid arthritis. *J. Bone Joint Surg. Br.* **63-B**(2) : 239-243, 1981
 - 11) West, S. G., Troutner, J. L., Baker, M. R. et al. : Sacral insufficiency fractures in rheumatoid arthritis. *Spine* **19**(18) : 2117-2121, 1994
 - 12) Jones, D. N. and Wycherley, A. G. : Bone scan demonstration of progression of sacral insufficiency stress fracture. *Australas Radiol.* **38**(2) : 148-150, 1994
 - 13) Hooyman, J. R., Melton, L. J. 3rd., Nelson, A. M. et al. : Fractures after rheumatoid arthritis. A population-based study. *Arthritis Rheum.* **27**(12) : 1353-1361, 1984
 - 14) Michel, B. A., Bloch, D. A., Wolfe, F. et al. : Fractures in rheumatoid arthritis : an evaluation of associated risk factors. *J. Rheumatol.* **20**(10) : 1666-1669, 1993
 - 15) Ochi, T., Iwase, R., Yonemasu, K. et al. : Natural course of joint destruction and fluctuation of serum C1 q levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **31**(1) : 37-43, 1988
 - 16) Sambrook, P. N., Eisman, J. A., Champion, G. D. et al. : Determinants of axial bone loss in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **30**(7) : 721-728, 1987
 - 17) Magaro, M., Tricerri, A., Pian, D. et al. : Generalized osteoporosis in non-steroid treated rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* **11**(2) : 73-76, 1991
 - 18) Shibuya, K., Hagino, H., Morio, Y. et al. : Cross-sectional and longitudinal study of osteoporosis in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* **21**(2) : 150-158, 2002
 - 19) Forsblad D'Elia, H., Larsen, A., Waltbrand, E. et al. : Radiographic joint destruction in postmenopausal rheumatoid arthritis is strongly associated with generalised osteoporosis. *Ann. Rheum. Dis.* **62**(7) : 617-623, 2003
 - 20) Scott, D. L., Farr, M., Hawkins, C. F. et al. : Serum calcium levels in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **40**(6) : 580-583, 1981
 - 21) Laan, R. F., van Riel, P. L., van de Putte, L. B. et al. : Low-dose prednisone induces rapid reversible axial bone loss in patients with rheumatoid arthritis. A randomized, controlled study. *Ann. Intern. Med.* **119**(10) : 963-968, 1993
 - 22) Hakkinen, A., Sokka, T., Kautiainen, H. et al. : Sus-

- tained maintenance of exercise induced muscle strength gains and normal bone mineral density in patients with early rheumatoid arthritis : a 5 year follow up. *Ann. Rheum. Dis.* **63**(8) : 910-916, 2004
- 23) de Jong, Z., Munneke, M., Lems, W. F. et al. : Slowing of bone loss in patients with rheumatoid arthritis by long-term high-intensity exercise : results of a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum.* **50**(4) : 1066-1076, 2004
- 24) Yilmaz, L., Ozoran, K., Gunduz, O. H. et al. : Alendronate in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate and glucocorticoids. *Rheumatol. Int.* **20**(2) : 65-69, 2001

骨粗鬆症治療

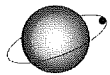
別刷

TNF- α

小池達也

KOIKE Tatsuya

(大阪市立大学大学院医学研究科リウマチ外科学)



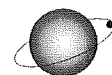
はじめに

Tumor necrosis factor (TNF)が、はじめて論文に登場したのは今から30年ほど前のことで、名前が示すとおり、*in vivo*における腫瘍壊死誘導物質として同定された。その後、リンパ球が産生する細胞障害性因子として知られていたlymphotoxin (LT)と蛋白一次構造に高い類似性があることや共通のレセプターを介して作用発現すること、さらに染色体上で遺伝子が近接することから、発生学的に同一の遺伝子から進化したと考えられるに至った。そこで、TNFをTNF- α とし、LTをTNF- β とするように名称が統一された。TNF- α がマクロファージや繊維芽細胞から、TNF- β がリンパ球から産生されるという違いはあるが、その生物活性はほぼ同じである。

その後、これらのサイトカインと類似の構造と機能を有する物質がつつぎとつぎと同定され、現在ではTNFスーパーファミリーとして、19種類以上が知られている。発見の経緯から、TNF関連の臨床応用で最も期待されたことは、TNFの抗癌剤としての利用である。しかし、TNFの腫瘍細胞に対する障害性は、正常細胞に対しても認められ、生体に投与した際には副作用が前面に出てしまい、臨床

応用は困難であった。悪性腫瘍の末期状態である悪液質の原因物質がTNFであることから、この結果は容易に想像できる。現在では、同じくTNFスーパーファミリーの1つであり、腫瘍細胞にのみ障害性を示すTRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand, 別名Apo2L)に抗癌剤としての期待がかかっている。

一方、TNFの作用を阻害することを目的とした抗TNF療法は、炎症性疾患の治療において劇的な効果を示し、関節リウマチ(RA)やクローン病(CD)治療の歴史に新しいページを開いた。

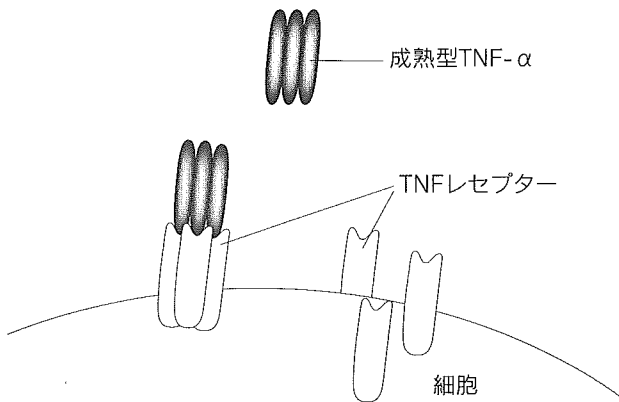


TNF-TNFR (receptor) 系

TNF- α はさまざまな細胞(マクロファージ、単球、T細胞、B細胞)で産生され、26 kDaの膜蛋白として存在する。これが炎症などの刺激を受け、メタロプロテアーゼにより細胞外ドメインが分離され、17 kDaの成熟型可溶性TNF- α として細胞外環境に放出される。成熟型TNF- α は常に三量体の形をとり、レセプター結合部位は隣接する二つの鎖のあいだに形成される溝として存在するため、1つのTNF- α 三量体は3カ所のレセプター結合部位を有する。1つのレセプターと結合してもシグナルは伝達されず、2つあるいは3つのレセプターと結合する必要がある(図①では3つのレセプターと結合している)。レセプターには、55 kDa(TNFR1)と75 kDa(TNFR2)の2種類があり、TNF- α もTNF- β もどちらにも結合する(図②)。レセプターの細胞外ドメインは相同性が高いが、

関連語

- ・ 炎症性サイトカイン
- ・ 関節リウマチ
- ・ 抗TNF療法



図① TNFとレセプター

成熟型可溶性TNF- α は、膜蛋白として生成されたTNF- α がプロテアーゼにより分離され、細胞外に放出される。細胞外では三量体として存在し、2~3個のレセプターと結合する。

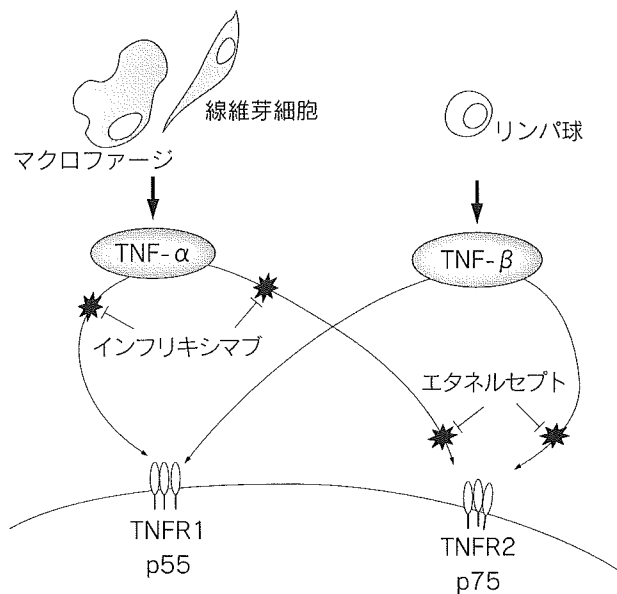
シグナル伝達を担う細胞内ドメインは両者で異なり、機能の差につながっている。

TNFがTNFR1に結合すると、図③に示すように、TNFレセプターファミリーに特徴的な「死のドメイン」を介してアポトーシスが誘導される。同様にTNFレセプターファミリーに共通のシグナル伝達因子であるTNF receptor associated factors (TRAFs)のうち、TRAF2を介するシグナルは分化誘導につながり、アポトーシスには抑制的に作用する。TNFスーパーファミリーの一員で、破骨細胞の分化活性因子として同定されたRANK (receptor activator of nuclear factor- κ B)-RANKL (RANK ligand)系では、TRAF2やTRAF6を含んだ複数のTRAFを介して、破骨細胞の分化および活性化が制御されている。破骨細胞の分化にはTRAF2が、活性化にはTRAF6が重要であるが、炎症性サイトカインのもう一方の雄であるインターロイキン-1 (IL-1)はTRAF6を介するシグナル伝達をおこなう。TNF- α がTRAF2を、IL-1がTRAF6を介するシグナル伝達をおこなうなら、両者が存在する炎症の場では破骨細胞の分化も活性化も促進可能であり、RAに伴う骨破壊を考えるうえで興味深い。



抗TNF- α 療法

生理的条件下では、TNFはマクロファージや好中球を



図② TNF- α 、 $-\beta$ とTNFR1、2の関係

TNF- α はさまざまな細胞で産生され、TNFの2種類のレセプターのいずれにも結合する。TNF- β はリンパ球より放出され、やはり両方のレセプターに結合しうる。抗TNF製剤であるインフリキシマブとエタネルセプト(図④参照)は、図の部位でTNFの作用をブロックする。

活性化することにより防御的炎症反応に関与している。また、各種接着因子の発現を高めることにより炎症担当細胞の血管外浸潤をもコントロールしている。RAは滑膜増生と関節破壊を特徴とする疾患であり、真の原因は今も不明であるが、その病勢の進展に各種サイトカインが関与していることに疑いはない。滑膜増生や軟骨破壊に最も大きな役割を果たしているのは、IL-1とTNF- α であるが、他のサイトカインの誘導を含めて、TNFがカスケードの最上流に位置していると考えられている。in vitroの実験系では、IL-1のほうが劇的な作用を示すのに対して、後述するように生体に抗IL-1や抗TNFを投与した際に、後者のほうがより効果的である理由は、このヒエラルキーにある。

現在、臨床で用いられている抗TNF療法としては、キメラ型(ヒトとマウス)抗TNF- α モノクローナル抗体を用いるものとヒトIgG1Fc部分とTNFR2の細胞外ドメインの融合蛋白を用いる方法とが実施されている(後者は、2004年春の時点でわが国では未承認)(図④)。前者が一般名インフリキシマブ(商品名レミケード®)で、TNF- α