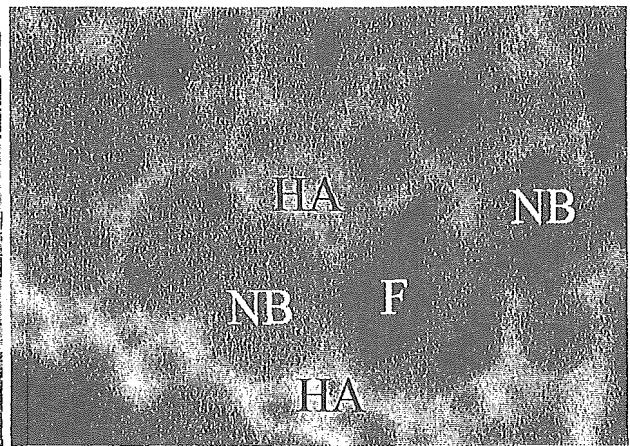
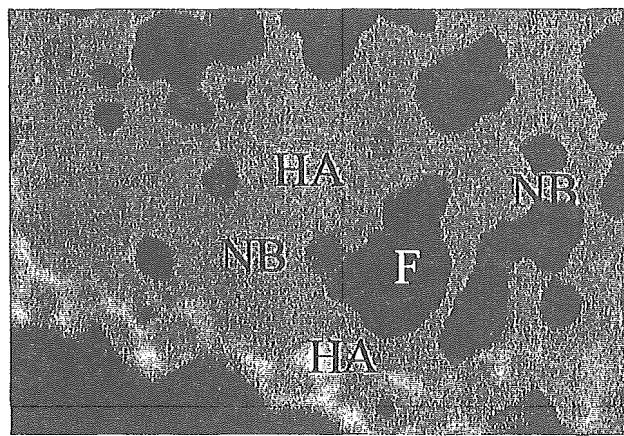


a. NEOBONE®培養人工骨移植後8週目の組織像 (HE染色, 100倍)



b. マイクロCT



c. コンピュータによる新生骨領域抽出像

図6. NEOBONE®培養人工骨内新生骨のマイクロCT評価. マイクロCT (b) はグレースケールで表現されるが, これを組織像と比較して閾値を決定することにより HA, 新生骨 (NB), 軟部組織 (F) を区別することができる. コンピュータソフトにより中間色の新生骨領域を c のようにオレンジ色に変換した.

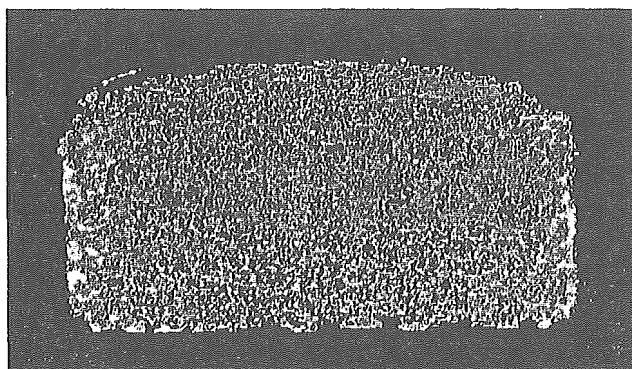


図7. 移植後8週目のNEOBONE®培養人工骨中央での新生骨分布 (白色: HA, オレンジ色: 図6で示した新生骨). 表面だけでなく中央の気孔内にも新生骨が確認される.

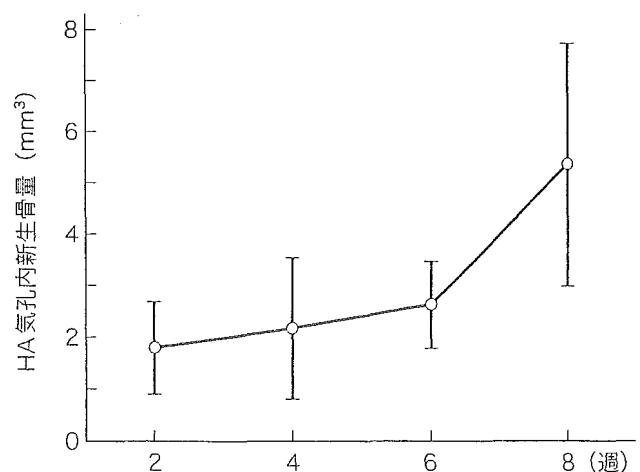


図8. NEOBONE®培養人工骨内新生骨量の経時変化. 新生骨量は移植後経時的に増加している.

表 1. マイクロ CT による培養人工骨内新生骨量測定

	数	気孔内新生骨量 (mm ³)
NEOBONE [®] 培養人工骨	5	5.35±2.36
HA-A 培養人工骨	5	1.88±0.89*
HA-B 培養人工骨	5	1.57±0.60**
HA-C 培養人工骨	5	0.52±0.30**

数値は平均±標準偏差 (SD) にて表示

p*<0.05, *p*<0.01 vs NEOBONE[®] 培養人工骨

や血管を含む近隣組織の進入を容易にし、骨再生組織工学の担体として優れた HA と考えられる。

われわれは生化学的評価において NEOBONE[®] 培養人工骨内で MMCs の骨芽細胞への分化を確認した。また今回、従来の組織学的評価に加え、新たなマイクロ CT による三次元評価を行ったが、NEOBONE[®] 培養人工骨内で豊富な新生骨が均一な分布で形成されていることが確認された。対照的にほかの日本の合成多孔体 HA を担体とする培養人工骨では、組織学的にもマイクロ CT 分析でも一部の骨形成しか示さなかった。



ま と め



連通多孔体構造を有する NEOBONE[®] は骨再生のための担体として骨再生をサポートする能力に優れていることに加え、加工、培養、手術などによる取り扱い性も良好であり、今後の骨再生医療の現場においてきわめて有用な材料になると考えられる。

文 献

1) Tamai N, Myoui A, Tomita T et al : Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction *in vivo*. J Biomed Mater Res 59 : 110-117, 2002

2) Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI : Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. J Orthop Res 7 : 568-578, 1989

3) Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI : Repair of bone defects with marrow and porous ceramic. Acta Orthop Scand 60 : 334-339, 1989

4) Ohgushi H, Okumura M : Osteogenic capacity of rat and human marrow cells in porous ceramics. Acta Orthop Scand 61 : 431-434, 1990

5) Ohgushi H, Dohi Y, Tamai S et al : Osteogenic differentiation of marrow stromal stem cells in porous hydroxyapatite ceramics. J Biomed Mater Res 27 : 1401-1407, 1993

6) Ohgushi H, Dohi Y, Katsuda T et al : *In vitro* bone formation by rat marrow cell culture. J Biomed Mater Res 32 : 333-340, 1996

7) Ohgushi H, Dohi Y, Yoshikawa T et al : Osteogenic differentiation of cultured marrow stromal stem cells on the surface of bioactive glass ceramics. J Biomed Mater Res 32 : 341-348, 1996

8) Ohgushi H, Yoshikawa T, Nakajima H et al : Al₂O₃ doped apatite-wollastonite containing glass ceramic provokes osteogenic differentiation of marrow stromal stem cells. J Biomed Mater Res 44 : 381-388, 1999

9) Ohgushi H, Caplan AI : Stem cell technology and bioceramics ; from cell to gene engineering. J Biomed Mater Res 48 : 913-927, 1999

10) Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH : Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from marrow of young adult rats. Cell Tissue Res 254 : 317-330, 1988

11) Yoshikawa T, Ohgushi H, Tamai S : Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. J Biomed Mater Res 32 : 481-492, 1996

12) Nishikawa M, Myoui A, Ohgushi H et al : Bone tissue engineering using novel interconnected porous hydroxyapatite ceramics combined with marrow mesenchymal cells ; quantitative and three-dimensional image analysis. Cell Transplant 13 : 367-376, 2004

* * *

NF- κ B 阻害による関節破壊制御

富田哲也* 梶座康夫* 橋本英雄* 吉川秀樹*

関節リウマチの臨床的に進行する関節破壊が大きな問題となっている。関節破壊機序は完全には解明されていないが、TNF- α 、IL-1 β などの炎症性サイトカインの産生増加や破骨細胞の活性化などが明らかにされている。これら炎症性サイトカインの遺伝子発現を調節しているのが転写因子 NF- κ B である。関節リウマチ罹患関節局所の増殖滑膜において NF- κ B の発現亢進が報告されている。われわれは転写因子レベルでの制御を目的としておとり（デコイ）型核酸医薬による治療法を考案した。これは特定の転写調節因子の結合部位の結合を阻害し、活性化される遺伝子群の発現抑制あるいは発現増強をおこなうものである。本稿では、関節リウマチの炎症関節局所治療という観点より核酸医薬の可能性について概説する。

はじめに

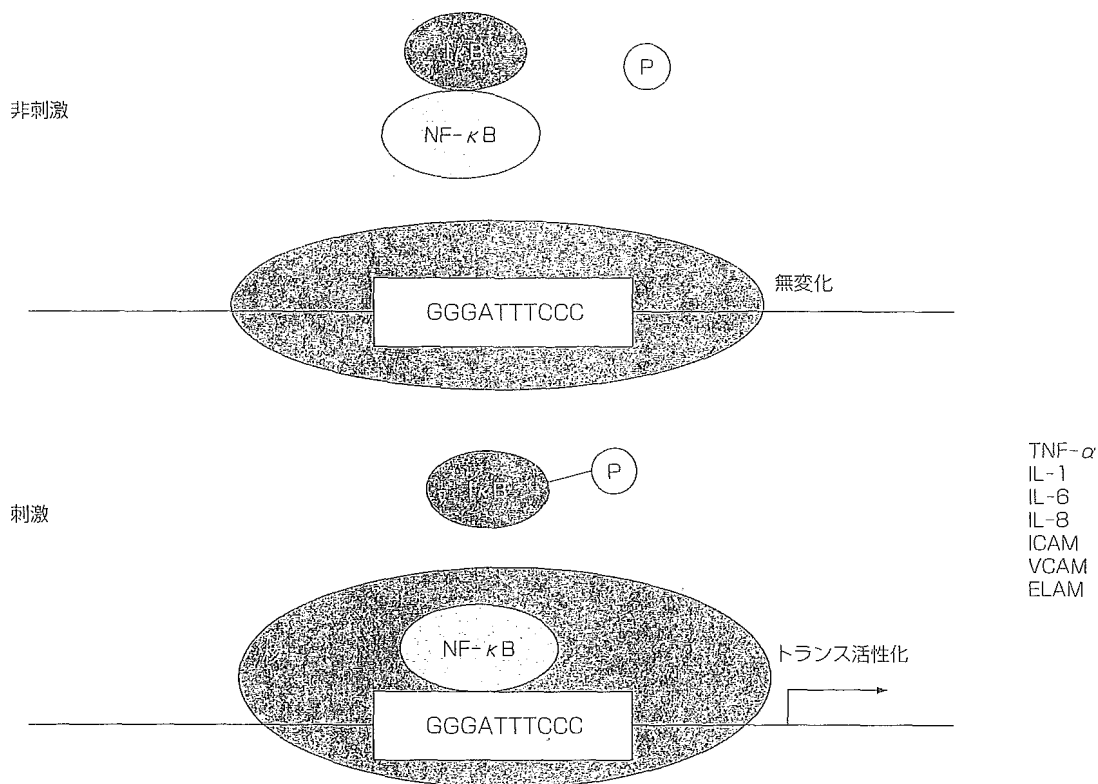
関節リウマチ（rheumatoid arthritis：RA）は慢性炎症性疾患であり、経時的に進行する関節破壊が臨床で大きな問題となっている。既存の薬剤では関節破壊抑制効果はほとんど認められなかったが、抗体療法に代表される生物学的製剤の出現により関節破壊の進行を抑制できる可能性が報告されるようになってきた。とくに腫瘍壊死因子- α （tumor necrosis factor- α ：TNF- α ）やインターロイキン（IL）-1 をターゲットとした抗体療法はヒ

トでもその有効性が示されている¹⁻⁴⁾。最近ではこれら生物学的製剤やさまざまな抗 RA 薬、免疫抑制薬、非ステロイド性抗炎症薬（nonsteroidal anti-inflammatory drugs：NSAIDs）などの組み合わせにより、従来の薬剤に抵抗性の RA でも血清学的には炎症反応がある程度コントロールされるようになってきている。しかしこのような状態でも全身のいくつかの関節は関節腫脹が持続したりあるいは再発し、経時的に関節破壊が進行し外科的処置が必要になる患者は決して少なくない。また抗体療法にも投与法、効果持続、コスト、重篤な副作用などさまざまな問題点が残存しているのが現状である⁵⁾。したがって腫脹関節局所での骨・軟骨破壊進行の抑制が可能な治療法の開発は必須と考えられる。RA の特徴の 1 つは、関節局所における細胞浸潤と血管新生を伴う滑膜増殖である。RA の関節破壊機序ははまだ完全には解明されていないが、増殖滑膜は関節破壊に重要な役割を果たしていると考えられている。関節局所では IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカインや ICAM-1 などの接着因子、マトリックスメタロプロテアーゼ（matrix metalloproteinase：MMP）などの過剰

Key Words

rheumatoid arthritis
decoy oligodeoxynucleotides
NF- κ B
transcriptional factor

* TOMITA Tetsuya, KUNUGIZA Yasuo, HASHIMOTO Hideo, YOSHIKAWA Hideki/大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科（整形外科）学



図④ NF- κ B の活性化機序
 未刺激状態では NF- κ B は I κ B と結合している。刺激を受けると I κ B がリン酸化され、NF- κ B は核内へ移行し、結合部位に結合することにより活性化され、さまざまな因子の遺伝子発現を活性化する。

産生や破骨細胞の誘導促進、活性化が RA の骨・軟骨破壊に関与している。

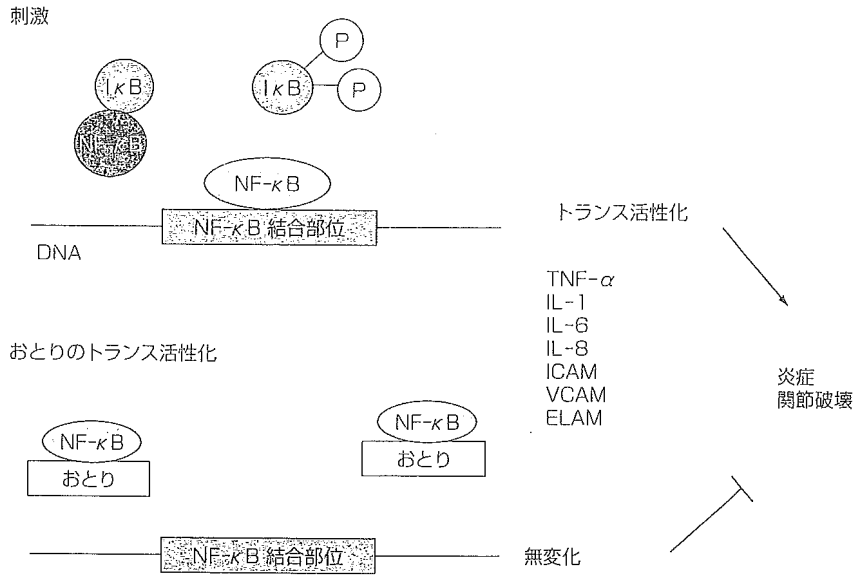
われわれはこれらの因子の発現を制御している転写制御因子 nuclear factor- κ B (NF- κ B) に着目した。NF- κ B は免疫グロブリン κ 鎖遺伝子が成熟 B 細胞特異的に発現するために必要なエンハンサー領域に結合する転写因子として同定され、p 50 と p 65 のヘテロ二量体であることが明らかになっている。不活化の状態ではその抑制因子 I κ B と複合体を形成し、細胞質に存在するが、細胞外からの活性化刺激により I κ B のリン酸化が起こり I κ B はプロテアソームにより分解される。I κ B が分解されることにより、NF- κ B は核内へ移行しその標的遺伝子の発現を活性化する⁹⁷⁾ (図④)。

RA 増殖滑膜細胞での NF- κ B の活性化が報告され、さまざまな炎症性サイトカインや接着因子の発現が亢進し病態形成や関節破壊における NF- κ B の重要性が示唆された⁹⁾⁻¹¹⁾。そこでわれわれは転写因子レベルでの制御を目的としておとり (デコイ) 型核酸医薬による治療

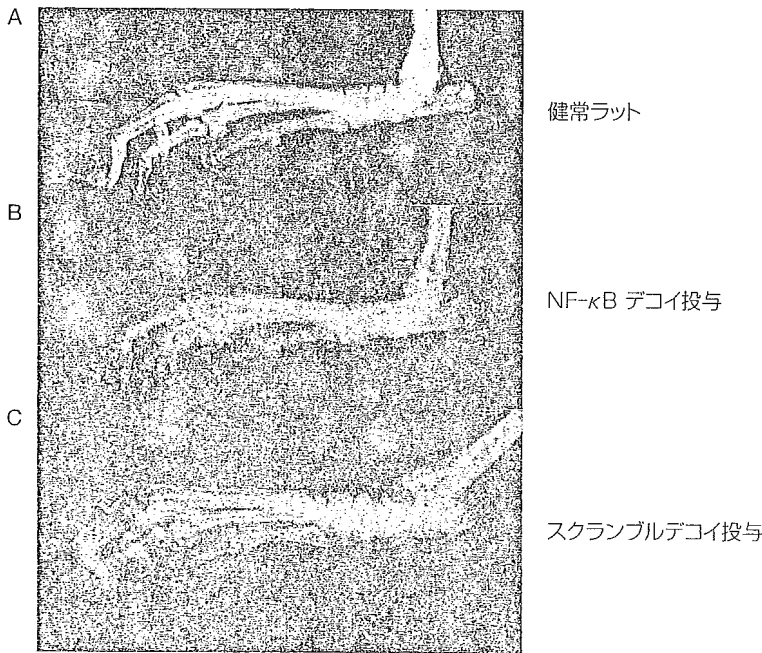
法を考案した¹²⁾。これは特定の転写調節因子の結合部位の結合を阻害し、活性化される遺伝子群の発現抑制あるいは発現増強をおこなうものである。そのため転写調節因子の結合部位を含む短いオリゴヌクレオチドを合成し、二重鎖核酸にしたのち細胞内に導入する。そのメカニズムは明らかであり転写調節因子の結合部位への競合的結合阻害によるプロモータ活性の低下である¹³⁾(図⑤)。

Ⅰ. コラーゲン誘導関節炎における関節破壊抑制効果

コラーゲン誘導関節炎 (collagen induced arthritis : CIA) モデルを用いて NF- κ B デコイによる治療効果を検討したところ、NF- κ B デコイ関節内投与により X 線学的、組織学的に明らかに関節破壊抑制効果が認められた (図⑥, ⑦)。本検討では明らかに関節炎発症後に、NF- κ B デコイを関節内投与したが、臨床的にも関節腫脹は投与後 2 週より改善した。その機序を検討する目的で、



図② おとり型核酸医薬（デコイ）の作用機序
NF-κB デコイはその特定の結合部位に競合的に結合し、NF-κB の結合阻害によるプロモータ活性の低下を生じさせる。



図③ NF-κB デコイ足関節内投与後7週のX線像
A：健康ラットの足関節 X線像
NF-κB デコイ投与 (B) ではスクランブルデコイ投与 (C) にくらべ明らかに関節破壊が抑制されている。

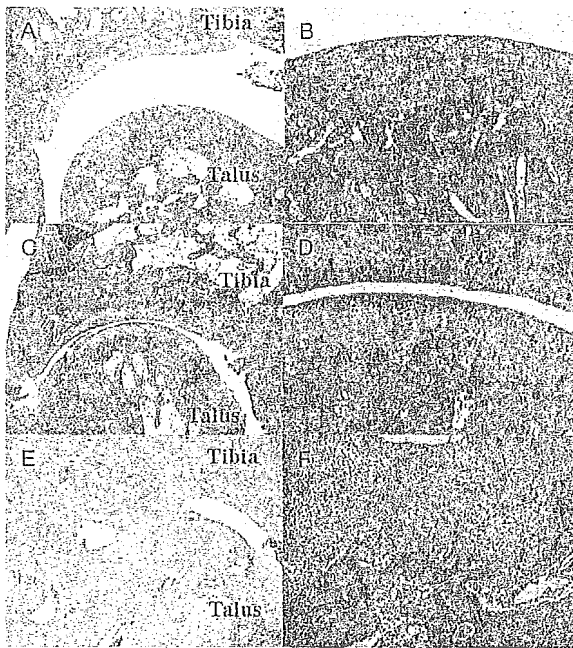
デコイ投与後1週および7週での関節滑膜中のIL-1β, TNF-α濃度を測定した。どちらの時期においても関節滑膜中のIL-1β, TNF-α濃度はNF-κBデコイ投与群でスクランブルデコイ投与群、未治療群にくらべ明らかに抑制されていた¹⁴⁾(図④)。すなわちNF-κBデコイ投与によりNF-κBの活性化が阻害されその下流にあ

るIL-1β, TNF-αの遺伝子発現が抑制されたと考えられる。

2. ヒトRA滑膜組織での検討

ヒトRA滑膜組織や滑膜細胞を用いてNF-κBデコ

13(97)



健全ラット

NF-κB デコイ投与

スクランブルデコイ投与

図4 NF-κB デコイ足関節内投与後7週の組織像

A, B: 健全ラットの足関節組織像
 NF-κB デコイ投与 (C, D) では関節軟骨の菲薄化は認められるがほぼ全周にわたり関節軟骨は温存されている。スクランブルデコイ投与 (E, F) では著しい関節破壊が認められる。
 (A, C, E×40倍, B, D, F×100倍)

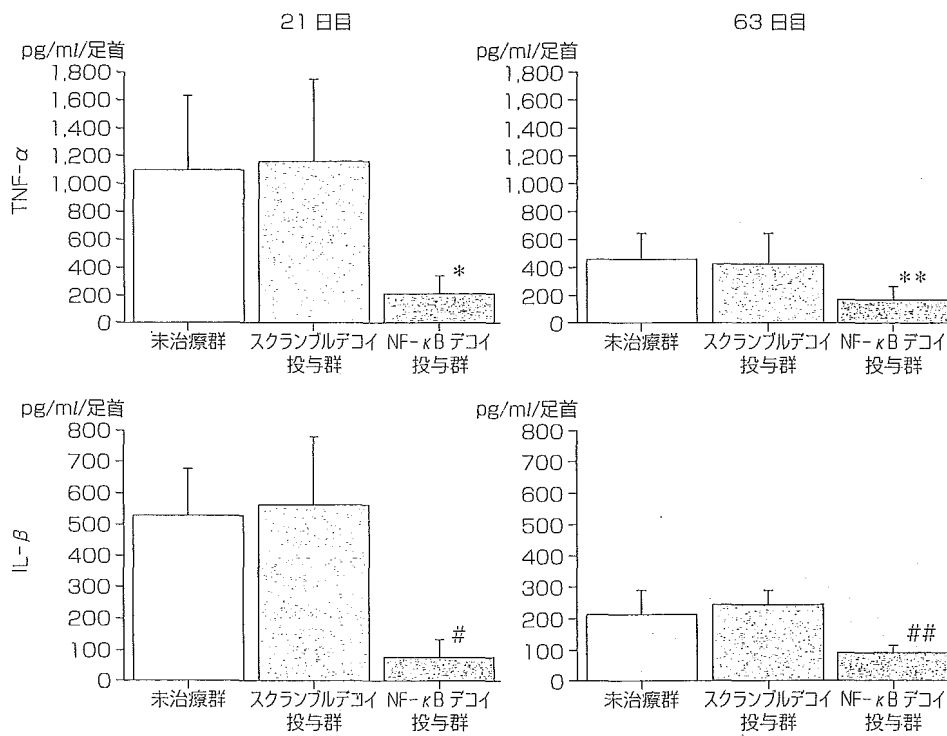


図5 関節滑膜中のIL-1β, TNF-α濃度
 21日目(デコイ投与後1週), 63日目(デコイ投与後7週)とも関節滑膜中のTNF-α, IL-1β濃度はNF-κBデコイ投与群で有意に抑制されていた。

***, #, ## p<0.01 vs スクランブルデコイ

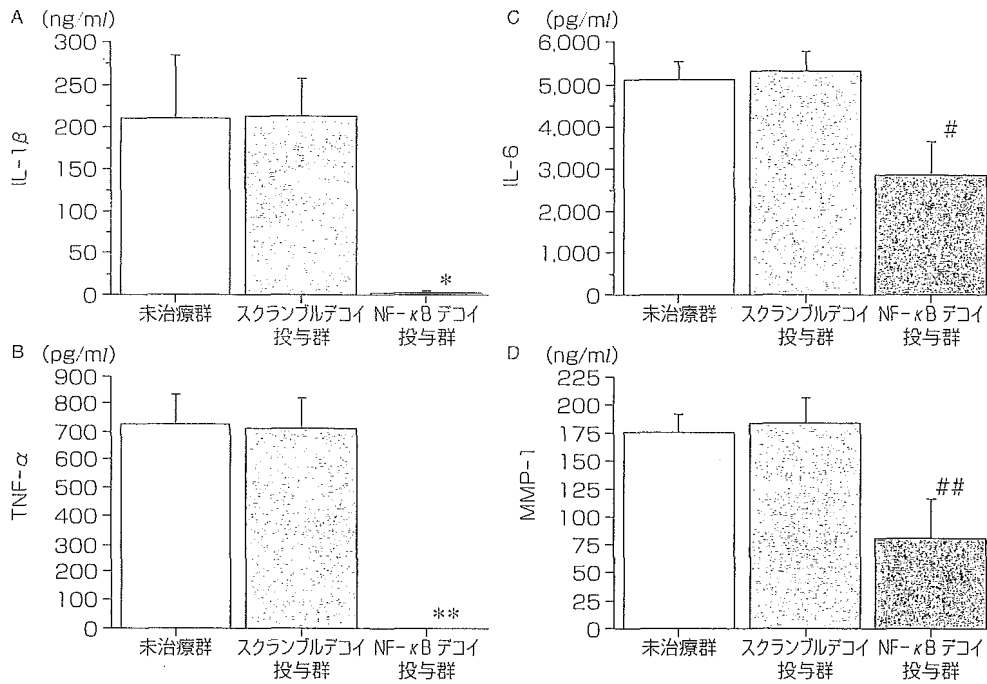


図6 ヒト RA 滑膜組織に対する NF-κB デコイの影響

A : IL-1β

B : TNF-α

C : IL-6

D : MMP-1

***p<0.01 vs スクランブルデコイ, ##p<0.05 vs スクランブルデコイ

イの効果について検討した¹⁵⁾。滑膜組織器官培養系で、NF-κB デコイを滑膜組織に導入し、滑膜組織からの IL-1β, TNF-α, IL-6, MMP-1 の産生を測定した(図 6)。これらの産生は NF-κB デコイ導入群でスクランブルデコイ導入群, 未治療群にくらべて有意に抑制された。血管新生などに重要な役割を果たすと考えられている接着分子である ICAM-1 の滑膜組織中での発現についても検討したが、その発現も NF-κB デコイ導入により明らかに抑制された。これらの抑制効果はとくに IL-1β, TNF-α で顕著であった。IL-1β, TNF-α が NF-κB デコイによりその発現がほとんど抑制されるのに対し、IL-6, MMP-1 では発現抑制は約 60%程度であった。これは IL-6, MMP-1 発現に AP-1 や NF-IL-6 など他の転写調節因子の関与が存在するためと考えられた。培養滑膜細胞に対しては NF-κB デコイ導入による細胞増殖抑制効果も示されている。これは炎症性サイトカインの発現低下に伴う二次的な効果と考えられた。

3. サル CIA での関節破壊抑制効果

ついで臨床応用を想定し前臨床研究として、サル CIA における NF-κB デコイによる関節破壊抑制効果を検討した。これまでは核酸医薬の導入効率をあげるため HVJ リポソーム法を用いてきたが、臨床応用を考えた場合、とくに致死的ではない疾患である関節炎へのベクターの使用は時期尚早と判断し、本研究ではベクターを使用せず、naked で核酸医薬を直接関節内へ複数回投与した。

Naked でデコイを関節投与した際の関節滑膜での分布について検討した。感作後腫脹が認められた関節に FITC ラベルした NF-κB デコイを投与したところ関節滑膜および関節軟骨細胞の核内に NF-κB デコイが認められ、少なくとも 7 日間は極端な輝度の低下は認められなかった。

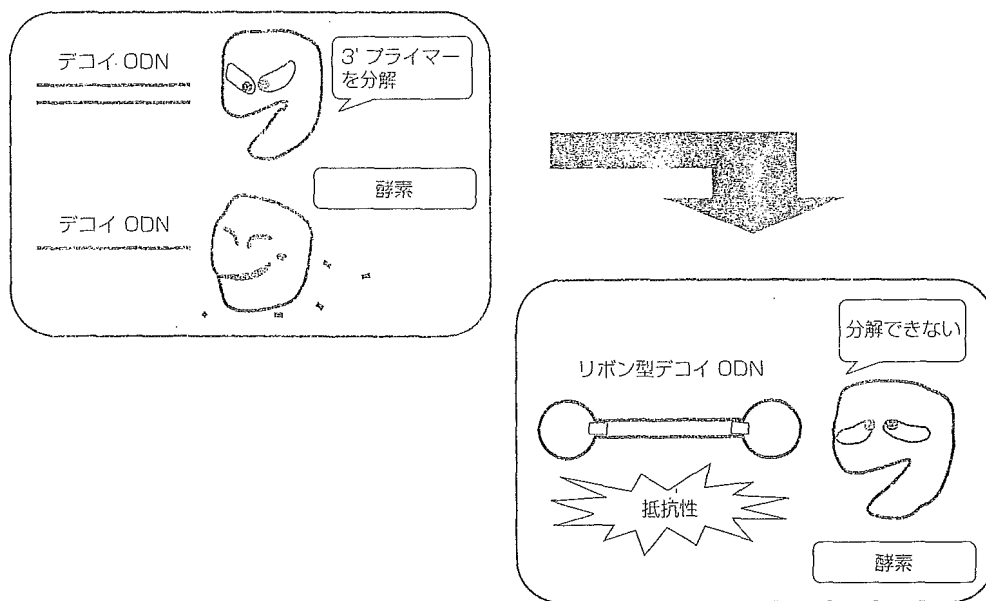


図7 リボン型デコイ

NF- κ B デコイを手関節に1週ごとに合計8回関節内投与したところ、X線学的に明らかにNF- κ B デコイ投与群で未治療群にくらべ関節破壊の進行が抑制された。組織学的にもNF- κ B デコイ投与群で滑膜増殖、関節軟骨変性破壊の抑制が認められた。

NF- κ B デコイを膝関節に投与し4週ごとにおこなった関節鏡検査ではNF- κ B デコイ投与群で経時的に滑膜増殖の抑制が認められ、採取した関節滑膜中のIL-1 β 、TNF- α レベルは有意に低下していた。また投与を中止した関節では関節滑膜の増殖の再発が認められた。

安全性の面では2週ごとに血清学的検討をおこなったが、核酸医薬投与が原因と考えられる異常値の出現は認めなかった(第49回 Orthopaedic Research Society, Annual Meeting, New Orleans, USAにて発表)。さらに毒性試験としてコラーゲン関節炎を発症したサルに両手、膝、足関節の合計6関節に2週ごとに連続5回の投与をおこなったが(治療的投与の90倍以上の濃度)血清学的、組織学的に明らかな異常は認められなかった。

4. 改良型デコイとしてのリボン型デコイ

核酸医薬の臨床応用を考える場合、問題となるのがその安定性および投与方法である。現在はS化修飾により

安定化させているが、nakedで投与した場合にはベクター使用時に比べより高い濃度が必要となり、連続、大量投与された場合、その腎毒性が懸念される。この点を改良する目的でS化修飾の割合を減少させるようなデコイ、つまり天然型オリゴでも耐性を示すようなデコイの開発が進められている。これまでのデコイの両断端にループ構造を有するリボン型デコイである(図7)。両断端にループ構造をもたせることで酵素耐性が上昇することが示されている¹⁶⁾。

5. 破骨細胞誘導、活性化の抑制

破骨細胞はRAの骨破壊でのkey playerであり、破骨細胞の骨吸収活性をコントロールすることはRAの骨破壊を抑制するうえで非常に重要と考えられる。上記リボン型NF- κ B デコイの破骨細胞誘導、活性化に対する影響をラット骨髄細胞を用いて検討した。ラット大腿骨より非付着系の骨髄細胞をM-CSF、RANKL存在下に培養するとTRAP陽性多核細胞が誘導される。リボン型NF- κ B デコイ添加によりTRAP陽性多核細胞数は有意に減少した。さらにヒドロアパタイトコーティングティッシュ上で1週間、ラット大腿骨由来非付着系骨髄細胞をM-CSF、RANKL存在下に培養し多核細胞が

多数出現した状態でリボン型 NF- κ B デコイを添加するとヒドロアパタイト吸収面積は有意に減少した (8th American Society for Gene Therapy にて発表)。これらの作用は従来の S 化デコイにくらべリボン型デコイで有意に増強していた。NF- κ B デコイには破骨細胞誘導抑制作用と成熟破骨細胞活性化抑制作用の両方が認められ、関節炎局所での関節破壊の抑制に寄与していると考えられる。

おわりに

現在臨床の現場では持続あるいは再発する関節腫脹に対しステロイドの関節内投与がおこなわれている。しかしステロイドを使用した場合、全身や関節局所の骨、軟部組織への影響が懸念され投与量、投与回数が制限されることは多い。NF- κ B デコイはその作用機序が一部ステロイドと類似しておりさらに血清中では非常に不安定であり分解されやすい性質をもつ。このため関節局所に使用した場合、全身へ及ぼす影響はステロイドにくらべはるかに少ないと考えられている。基本的に細胞核内での発現は一過性であり、その影響が永続するわけではなくこの点で、生体に対するメリットとまた治療を考えたうえでは症状が改善するまではくり返し投与が必要になるというデメリットが共存する。また転写調節因子レベルでの制御であるため、その下流に存在する遺伝子の発現には蛋白レベルでおこなうよりより有効であると考えられる。もちろん再発をくり返すあるいは改善しない滑膜炎に対しては外科的滑膜切除も有効な治療法であり、このような滑膜炎に対し、まったく治療法がないわけではないが、手指関節などの小関節では滑膜切除後の関節可動域の減少などの可能性があるのも事実である。また一度変性が進行した関節変化は一般的には不可逆変化であり、薬剤の関節内投与により症状が改善し関節変化の進行が抑制できれば、患者の負担も少なく、より非侵襲的な治療法の開発は時代のニーズと考えられる。

心血管系の分野ではすでに冠動脈拡張後の再狭窄の予防に対し米国とわが国で細胞周期調節因子である E2F に対するデコイの投与がヒトでおこなわれており、2002 年には弘前大学でアトピー性皮膚炎に対する NF- κ B

デコイの臨床研究が開始された。これまでのところ核酸医薬投与に起因すると考えられる重篤な有害事象は報告されていない。これらの結果をふまえわれわれは大阪大学医学倫理委員会に RA に対する NF- κ B デコイ関節内投与の探索的臨床研究を申請し、臨床研究を開始した。ヒト関節リウマチでの安全性の確立、有効性については今後の更なる詳細な検討が必要である。



文 献

- 1) Criscione LG, St Clair EW : Tumor necrosis factor- α antagonists for the treatment of rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol* 14 : 204-211, 2002
- 2) Taylor PC : Anti-cytokines and cytokines in the treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des* 9 : 1095-1106, 2003
- 3) Bathon J, Martin RW, Fleishman RM *et al* : A Comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 343 : 1586-1593 2003
- 4) Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M *et al* : Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* 36 : 1681-1690, 1993
- 5) Bresnihan B, Cunnane G : Infection complications associated with the use of biologic agents. *Rheum Dis Clin North Am* 29 : 185-202, 2003
- 6) Sen R, Baltimore D : Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47 : 921-928, 1986
- 7) Collart MA, Baeuerle P, Vassalli P : Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages : involvement of four kappaB-like motifs and constitutive and inducible form of NF-kappaB. *Mol Cell Biol* 10 : 1498-1506, 1990
- 8) Fujisawa K, Aono H, Hasunuma T *et al* : Activation of transcription factor NF-kappaB in human synovial cells in response to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* 39 : 197-203, 1996
- 9) Handel ML, McMorrow LB, Gravalles EM : Nuclear factor-kappaB in rheumatoid synovium. Localization of p50 and p65. *Arthritis Rheum* 38 : 1762-1770, 1995
- 10) Williams RO, Feldmann M, Maini RN : Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 9784-9788, 1992
- 11) Marok R, Winyard PG, Coumbe A *et al* : Activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB in

- human inflamed synovial tissue. *Arthritis Rheum* 39 : 583-591, 1996
- 12) Morishita R, Sugimoto T, Aoki M *et al* : *In vivo* transfection of cis element "decoy" against nuclear factor kappaB binding site prevents myocardial infarction. *Nat Med* 3 : 894-899, 1997
- 13) Tomita N, Morishita R, Tomita T *et al* : Potential therapeutic application of decoy oligonucleotides. *Curr Opin Mol Ther* 4 : 166-170, 2002
- 14) Tomita T, Hashimoto H, Tomita N *et al* : *In vivo* direct gene transfer into articular cartilage by intraarticular injection mediated by HVJ (Sendai virus) and liposomes. *Arthritis Rheum* 40 : 901-906, 1997
- 15) Tomita T, Takano H, Tomita N *et al* : Transcription factor decoy for NFkappaB inhibits cytokine and adhesion molecule expression in synovial cells derived from rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 39 : 749-757, 2000
- 16) Tomita N, Tomita T, Yuyama K *et al* : Development of novel decoy oligonucleotides : advantages of circular dumb-bell decoy. *Curr Opin Mol Ther* 5 : 107-112, 2003

骨・軟骨の再生医療

中村 憲正* 吉川 秀樹**

I. 骨の再生医学

1. 骨伝導, 骨誘導のための足場としての人工骨の開発

骨組織の再生医療のためには細胞の足場としての新規人工骨の開発が必須である。近年, 自家骨に代わるバイオマテリアルとして, ハイドロキシアパタイトセラミック (HA) が広く臨床応用されている¹⁾。しかし, 市販の多孔体 HA は, 気孔と気孔が組織侵入に十分なサイズでつながっておらず, 内部まで骨形成は期待できない。一方, 従来の製法で連孔構造を求めると, 細胞の侵入は良好であるが 2~3 MPa 程度の力学的強度に劣る HA となり, 臨床使用には適さない。筆者らは, 力学的強度を有し, かつ幹細胞や骨増殖因子の導入が可能な骨補填材料として, 気孔関連構造を有する新規ハイドロキシアパタイトを開発した。“超泡ゲル化技術”による新規多孔体 HA (NEO BONE[®]) (図1) は, ほぼ球形で比較的均一のサイズの気孔が秩序よく配列し, ほぼ全気孔が気孔関連通路で連絡している。連通孔径分布は 10~80 μm (平均 40 μm) にあり, 気孔の 90% が細胞は組織が十分に通過できる大きさの連通孔でつながっており, 気孔の内部に骨髄間質細胞, 血管, BMP などの増殖因子/サイトカインや遺伝子の導入が可能である。実際, この気孔の内部にラット骨髄間質細胞を注入し, 任意の部位に骨形成を惹起することに成功している (図2)。力学的強度は初期圧縮強度で 10 MPa 以上であり優れた数値を示した。ウサギ大腿骨に NEO BONE[®] を移植した際に, 移植後わずか 6 週間で直径 6 mm の円柱の深層にまで気孔関連通路を経て, 豊富な血管新生を伴う, 新生骨・新生骨髄が観察され, 優れた

骨伝導を示した²⁾ (図3)。この NEO BONE[®] は臨床試験 62 例を終了し, 現在, 厚生労働省より認可を受け商品化されている。現在, NEO BONE[®] 内にヒト骨髄間質細胞を導入した後, デキサメサゾン等を用いて ex vivo で骨芽細胞に分化させるハイブリッド型自家骨の作製に成功し, 臨床試験を行っている。血管や BMP の導入による更なる骨再生の促進も可能であることも証明され, 今後は先端医療としての骨組織の Tissue Engineering (組織工学) が可能になるとと思われる。

2. BMP の骨再生への応用

BMP は筋肉その他の部位に広く存在する間葉系細胞に作用し, 骨芽細胞や軟骨細胞へ分化誘導させ, 最終的に骨組織を形成する作用を有する³⁾。BMP の骨再生への応用法としては以下の 3 点が挙げられる。

1) BMP 遺伝子の使用

BMP 遺伝子そのもの (naked plasmid) や BMP 遺伝子を組み込んだ種々のベクターを骨再生が必要な局所の細胞 (筋細胞など) に導入し, その細胞に BMP を強制的に合成させ, 局所的に骨形成を促進させる方法が考えられる⁴⁾。遺伝子導入法, 遺伝子発現制御など検討されるべき問題はありますが, 今後の分子生物学的研究の発展により臨床応用が期待されている。

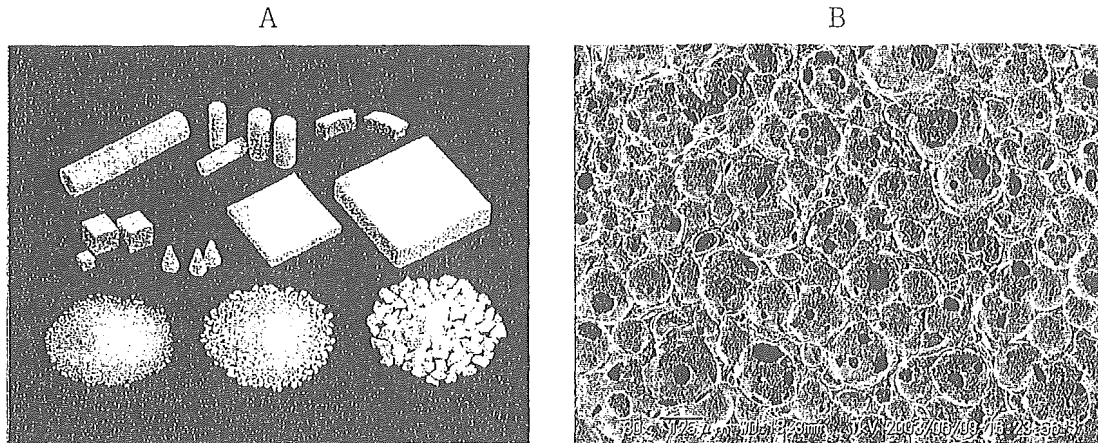
2) 合成 BMP の使用

BMP を局所で有効作用させ, 骨の量や形態を制御するためには優れた担体が必要である。現在, その担体としては牛皮コラーゲン⁵⁾ やポリ乳酸などの合成ポリマー⁶⁾⁷⁾ が用いられている。しかし, これらの担体には力学的強度がないこと, コラーゲンには免疫原性があり感染の危険性があることなどの問題点がある。BMP をより有効に臨床応用するためには合成ポリマーなどの液性担体と上述の NEO BONE[®] のような固形担体の複合が必須であると考えられる。つまり, BMP/液性担体/固

*大阪大学医学部付属病院未来医療センター

大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学(整形外科)

**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



A. 肉眼像 B. 走査顕微鏡での内部気孔と連通行

図 1 NEO BONE®

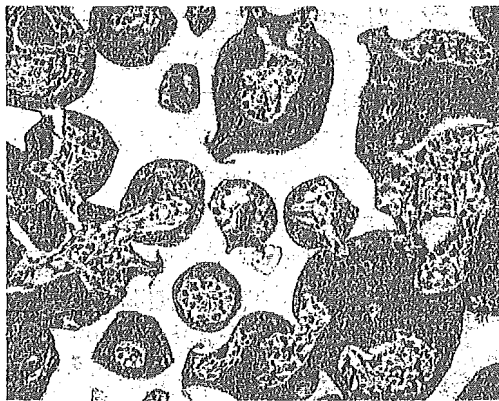


図 2 ラット骨髄幹細胞と NEO BONE® 複合体を筋肉内移植後 4 週の組織像

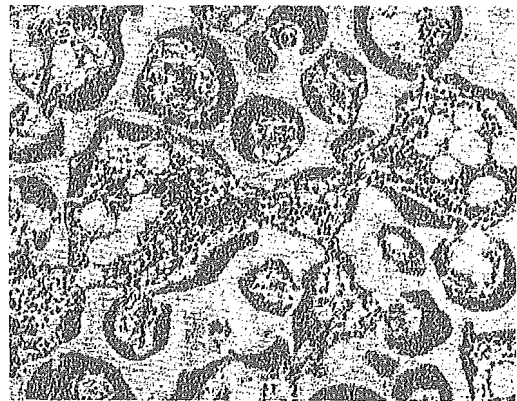


図 3 NEO BONE® をウサギ大腿骨遠位骨幹端に移植後 6 週の組織像

形生体材料の複合によって、力学的強度を有し骨形成活性をもった新しい人工生体材料の開発が必要であると考えられる。

3) 組織工学への BMP の応用

骨髄間質細胞や骨膜の骨形成細胞を患者本人から採取し、*ex vivo* で培養増殖させそれを多孔体生体材料の孔内へ封入し、骨形成が必要な部位に移植する Tissue Engineering が試みられている。しかし、ヒトでは採取できる骨形成細胞の数に制限がある。そこで BMP を用い、骨髄間質細胞や骨膜細胞に含まれる間葉系細胞をより選択的に骨形成細胞に分化・増殖させて、より多くの細胞を短期間に得る方法が考えられる。このように BMP を Tissue Engineering に応用し、より有効な骨再生/骨修復を得ることが期待されている。

3. BMP の活性制御

合成ヒト BMP (rhBMP-2) を用いたヒトでの臨床試験の結果、骨形成能は乏しく特に高齢者で

はほとんど効果を示さなかった。また mg 単位の多量の BMP を必要とするため、副作用が危惧され臨床での実用化はいまだになされていない。ヒトで BMP を有効に作用させる、あるいは BMP の使用量を減少させるためには BMP の活性促進薬の開発が必須である。BMP の *in vivo* における生物活性の促進は、酸、エストロゲン、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アクチン結合蛋白であるカルポニン、Rho キナーゼ (ROCK) 阻害剤 (Y27637) 抗リウマチ薬である T-614 などにより可能である。BMP のヒトでの骨再生医療には、上記の人工骨の担体としての使用に加えて、これらの BMP の活性促進薬の併用が必要ではないかと考えている。

II. 軟骨の再生医学

近年のスポーツ人口の増加に伴い関節軟骨損傷が著しく増加しているが、径 10mm を超える軟骨損傷については自然修復が期待しにくいとされる。

これら若年者～成人の軟骨損傷に対しては軟骨下骨よりの骨髄細胞を誘導するための骨孔作製（ドリリング、マイクロフラクチャー法）や、健常部の骨軟骨柱を採取し欠損部に移植するという自家骨軟骨移植術（モザイクプラスティー）が行われている。しかし小さな軟骨欠損に対しては良好な成績が得られているものの、広範な軟骨損傷や変形性関節症による高齢者の軟骨変性の修復にはこれらの方法では対応しきれないのが現状である。関節軟骨の修復能力は骨と比較して著しく劣り、成人では完全な硝子軟骨で修復されることは期待しがたい。その理由のひとつとしては、欠損部に供給される前駆細胞数が十分でないことが考えられる。したがって軟骨再生には、軟骨細胞や間葉系間質細胞を用いた種々の Tissue Engineering の試みがなされてきた。

1. 自家骨軟骨細胞移植による関節軟骨の再生

米国 Genzyme 社は、1997年、整形外科分野での関節軟骨の再生を目指した自家軟骨細胞培養・移植法を開発し、FDA の認可を受け商品化した (Carticel[®])。実際には、各医療施設において、膝関節損傷患者に対し関節鏡視下に非荷重部から軟骨組織を採取する。軟骨組織はボストンの Genzyme 社に送られ、酵素処理により消化され、軟骨細胞が分離・培養される。約3週間後に元の医療施設に返送され、同じ患者に移植手術が行われるシステムである⁸⁾。欠損部の変性した軟骨を除去し脛骨前面より採取した骨膜を欠損部に縫着し、骨膜下に自家培養軟骨細胞を注入する方法である。累積患者数は10,000例を超えており、臨床評価としてはある程度の良好な成績が報告されている。しかしこれらの報告はコントロール群を持たない評価法であり、さらに最近の Randomized study では、軟骨移植群とドリリング群間で優位な臨床成績の差は認められなかったとの報告がなされており⁹⁾、本治療の有用性の評価はまだ確立されていない。さらに、組織レベルやMRIなどによる客観的評価も十分になされていないこと、感染のリスク、など検討されるべき問題点も多く残されている。またヒト軟骨細胞は増殖速度が遅く10倍程度しか増えないため、健常軟骨を大きく採取する必要があり、軟骨採取部の障害についても検討が必要である。

2. 自家骨髄間葉系幹細胞による関節軟骨の再生

骨髄あるいは骨膜に存在する間葉系細胞中には、

軟骨細胞中には、軟骨前駆細胞が含まれている。そこで、十分な前駆細胞を軟骨欠損部に供給するために骨髄間質細胞を *in vitro* で増殖させ、軟骨欠損部に移植することにより軟骨再生を促進できる可能性がある。Wakitani らはウサギの骨髄間葉系細胞を採取し *in vitro* で増殖させた後、I型コラーゲン・ゲル内に埋植し、大腿骨内顆荷重部に作成した6×3×3 mmの軟骨欠損部に充填した。移植後2週で、移植細胞は軟骨組織に分化し、軟骨欠損部全域に再生軟骨が認められた。24週後には軟骨下骨は完全に修復され、関節軟骨は軟骨として残存した。現在、変形性膝関節症患者に対して臨床試験が試みられている。すなわち高位脛骨骨切術の手術後3週間前に本人の腸骨から骨髄細胞を採取し、培養増殖させた後、コラーゲン・ゲル内に包埋し、軟骨変性部に移植する。コラーゲン・ゲルの表面は手術時に採取した本人の脛骨骨膜により被覆する。術後33週で関節鏡視下に確認できた症例では正常軟骨よりやや軟らかいが、一部に硝子軟骨による再生が観察できた¹⁰⁾。しかし、移植部と健常部との境界の再生は不十分であり、今後も検討が必要である。軟骨再生医療の評価は主に臨床症状の改善で行われており、今後軟骨の再生医療が実施された場合、再生軟骨のマトリックス成分の評価、力学試験による強度検定、MRI その他の客観的・非侵襲的評価が必要であると考える。

お わ り に

軟骨の再生医学の現状と今後の臨床応用への可能性について述べた。骨という力学的強度を必要とする組織再生には、NEO BONE[®]のような優れた生体材料の開発が必須である。また、その特長である連通気孔構造を生かしてBMPなどの分化/増殖因子や骨形成性細胞を気孔内に導入した生体活性型の人工骨開発への応用が期待される。軟骨の再生については、骨と比べ、いまだに臨床応用が遅れているのが現状であり、より優れた細胞導入法の開発が今後も必要である。BMPなどの分化/増殖因子を併用した新しい治療法の開発も必要であると考える。近年骨髄以外の間葉系組織にも多分化能・自己複製能を有する体性幹細胞が存在することが報告されており、より安全で簡便な細胞採取法やバイオリクター等を用いた大量培養法についても研究が進められている。今後、組織工学・分子生物学の進歩により、移植細胞の

純化・培養の技術, 新しい担体, 活性促進薬の開発がなされ, 骨・軟骨の Tissue Engineering がさらに発展することが期待される。

References

- 1) Yoshikawa, H., Uchida, A.: Clinical application of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumor surgery. In: "Handbook of Biomaterials Engineering". (DL Wised.) Marcel Dekker Inc, New York, pp.433-455, 1999.
- 2) Tamai, N., Myoui, A., Tomita, T. et al.: Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structures exhibits superior osteoconductin in vivo. J Biomed Mater Res, 59: 110-117, 2002.
- 3) Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J. et al.: Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. Science, 242: 1528-1534, 1988.
- 4) Service, R. F.: Tissue engineers build new bone. Science, 289: 1498-1500, 2000.
- 5) Takaoka, K., Kozuka, M., Nakahara, H.: Telo-peptide-depleted bovine skin collagen as a carrier for bone morphogenetic protein. J Orthop Res, 9: 902-907, 1991.
- 6) Miyamoto, S., Takaoka, K., Okada, T. et al.: Polylactic acid-polyethylene glycol block copolymer. A new biodegradable synthetic carrier for bone morphogenetic protein. Clin Orthop, 294: 333-343, 1993.
- 7) Saito, N., Okada, T., Horiuchi, H. et al.: A biodegradable polymer as a cytokine delivery system for inducing bone formation. Nat Biotechnol, 19: 332-335, 2001.
- 8) Minas, T., Nehrer, S.: Current concepts in the treatment of articular cartilage defects. Orthopedics, 20: 525-538, 1997.
- 9) Knutsen, G., Engebretsen, L., Ludvigsen, T. C., Drogset, J. O., Grontvedt, T., Solheim, E., Strand, T., Roberts, S., Isaksen, V., Johansen, O.: Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. J Bone Joint Surg Am, 86-A: 455-464, 2004.
- 10) Wakitani, S., Imoto, K., Yamamoto, T. et al.: Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. Osteoarthritis Cartilage, 10: 199-206, 2002.

MAPK阻害薬による関節炎の治療

西川昌孝* 名井 陽* 富田哲也*
 高樋康一郎* 南平昭豪* 吉川秀樹*

p 38 MAPK は TNF- α , IL-1 β や RANK リガンドの共通の細胞内シグナル伝達分子であり, RA での骨関節破壊に重要な役割を担っていると考えられている. 今回, RA の動物モデルである CIA ラットに対して p 38 MAPK 阻害薬である FR 167653 を投与することにより著しい関節炎・骨関節破壊抑制効果を得ることができた. このモデルにおいて p 38 MAPK 阻害薬は複数の炎症性サイトカインの産生を抑制し, また破骨細胞分化抑制を介して骨関節破壊を直接抑制することがわかった. また骨髄リンパ球に対しても何らかの影響を及ぼしていることも示唆された.

はじめに

関節リウマチ (rheumatoid arthritis : RA) などの慢性進行性多関節炎の骨・関節破壊には腫瘍壊死因子- α (tumor necrosis factor- α : TNF- α), インターロイキン (IL)-1 β , IL-6, IL-8 などの炎症性サイトカインやこれらのサイトカインから誘導される蛋白分解酵素が重要である. また最近, これらに加えて RANK リガンドや TNF- α により誘導される破骨細胞による骨破壊も RA の骨・関節破壊において重要な役割を示していることが

報告されている¹⁾²⁾. p 38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) は TNF- α , IL-1 β や RANK リガンドの共通の細胞内シグナル伝達分子であり³⁾, RA での骨関節破壊に重要な役割を担っていると考えられている. 本稿では p 38 MAPK 阻害薬の, 関節炎に伴う骨関節破壊の抑制効果および RA 治療への応用の可能性を検討する.

1. p 38 MAPK 阻害薬によるコラーゲン関節炎ラットでの骨関節破壊抑制

コラーゲン関節炎 (collagen-induced arthritis : CIA) は多発性関節炎のモデルとして広く用いられており, 多くの組織病理学的所見が RA と共通している⁴⁾. CIA はウシコラーゲンタイプ II と Freund's 不完全アジュバントを 6 週齢雌のルイスラットに感作させることにより誘導した⁵⁾. 今回, p 38 MAPK 選択的阻害薬である FR 167653 を CIA ラットに連日皮下投与し, 予防投与モデルと治療投与モデルという 2 つの異なった投与モデルで検討をおこなった.

Key Words

関節リウマチ
 CIA ラット
 p 38 MAPK
 TNF- α
 IL-1 β

* NISHIKAWA Masataka, MYOUI Akira, TOMITA Tetsuya, TAKAHI Koichiro, NAMPEI Akihideo, YOSHIKAWA Hideki/大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学整形外科

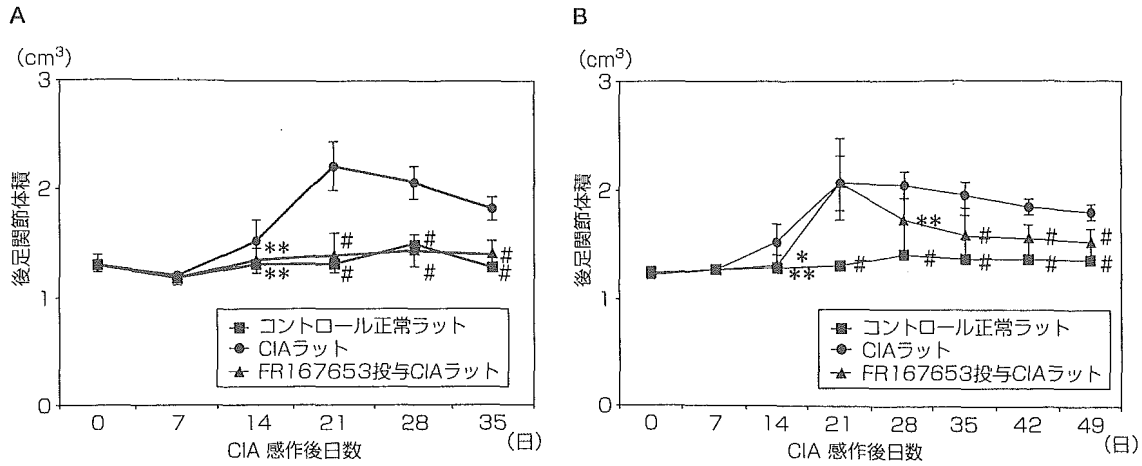


図4 CIA ラットの足関節体積の経時的変化 (Nishikawa M *et al*, 2003¹⁰⁾より改変引用)

A: 予防投与モデル

B: 治療投与モデル

予防投与モデル, 治療投与モデルの両群において p 38 MAPK 阻害薬である FR 167653 の投与によって関節炎の発症およびその進行が著しく抑制された。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.0001$

予防投与モデルでは 32 mg/kg の FR 167653 をレントゲン感作日から 4 週間連日皮下投与をおこなった。コントロールである p 38 MAPK 阻害薬投与なしの CIA ラットでは 21 日目までに最大の足関節腫脹が生じその後徐々に減少したが、阻害薬を投与したほとんどのラットでは足関節腫脹はみられなかった(図4)。CIA ラットの足関節のレントゲン検査では活発な関節炎や骨破壊を示す重度の骨吸収や骨びらんがみられた。組織学的には CIA ラットでは関節軟骨の消失と炎症性細胞の浸潤, TRAP 陽性破骨細胞数の増加がみられた(図2)。治療投与モデルでは関節炎発症後の 21 日目から同様に p 38 MAPK 阻害薬を 4 週間連日皮下投与した。このモデルでも阻害薬は CIA ラットの足関節腫脹をほぼ正常レベルまで減少させる有意な効果を示した(図4)。投与群のレントゲン, 組織学的所見(図3), TRAP 陽性破骨細胞数は CIA ラット群にくらべて著しく改善していた。

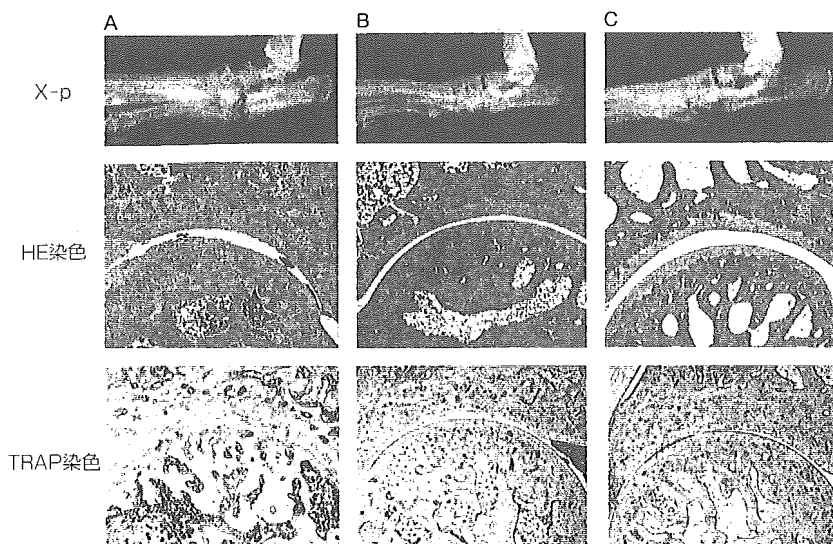
2. 炎症性サイトカイン産生抑制

p 38 MAPK 阻害薬の全身および関節局所における影響を検討するために予防投与群での血清および組織中の炎症性サイトカイン濃度を測定した。CIA ラットでは血

清中 TNF- α , IL-1 β 濃度と足関節での骨軟部組織中の IL-1 β 濃度が上昇していた。しかし p 38 MAPK 阻害薬の投与群ではいずれも著しく低値を示し炎症性サイトカイン産生が抑制されていることが確認された(図4)。このことにより p 38 MAPK 阻害薬は炎症性サイトカインの産生を抑制することにより関節炎症状を改善していることが示唆された。

3. 破骨細胞分化に対する抑制効果

p 38 MAPK 阻害薬による CIA ラットの *in vivo* での破骨細胞数減少のメカニズムを明らかにするためにマクロファージコロニー刺激因子 (macrophage-colony stimulating factor : M-CSF) 存在下での可溶性 RANK リガンドおよび TNF- α による *in vitro* での破骨細胞分化誘導実験をおこなった⁹⁾。可溶性 RANK リガンドによるラット骨髄細胞からの TRAP 陽性多核細胞形成は p 38 MAPK 阻害薬により濃度依存的にほぼ完全に阻害された。またこの p 38 MAPK 阻害薬は RANK リガンドの選択的デコイであるオステオプロテゲリン (osteoprotegerin : OPG) 存在下での TNF- α による TRAP 陽性多核細胞形成をも同様に阻害した (図5)。これらの



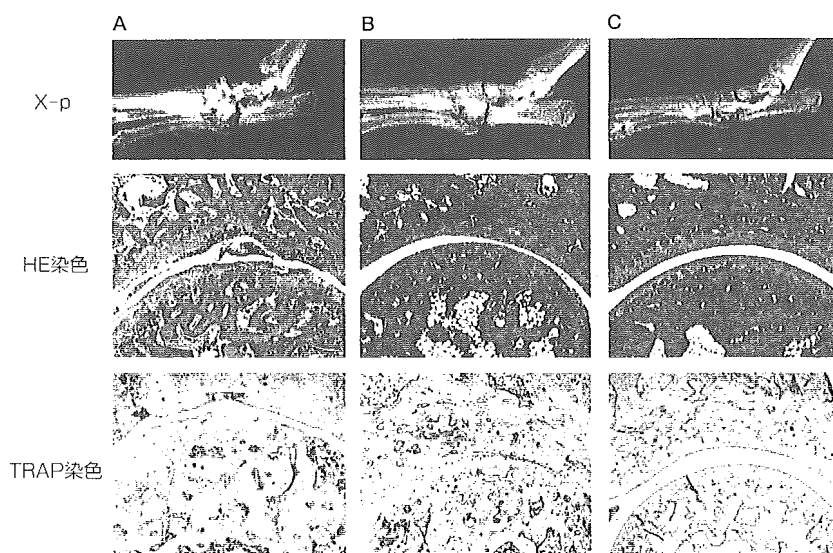
図② 予防投与モデルにおける骨関節所見 (Nishikawa M *et al*, 2003¹⁰⁾より改変引用)

A : CIA ラット

B : FR 167653 投与 CIA ラット

C : コントロール正常ラット

CIA ラットの足関節の X-p, HE 染色, TRAP 染色では活発な関節炎や骨破壊を示す重度の骨吸収や骨びらんがみられた。これに対し FR 167653 投与 CIA ラットではほぼ正常ラットと応用の所見であった。



図③ 治療投与モデルにおける骨関節所見 (Nishikawa M *et al*, 2003¹⁰⁾より改変引用)

A : CIA ラット

B : FR 167653 投与 CIA ラット

C : コントロール正常ラット

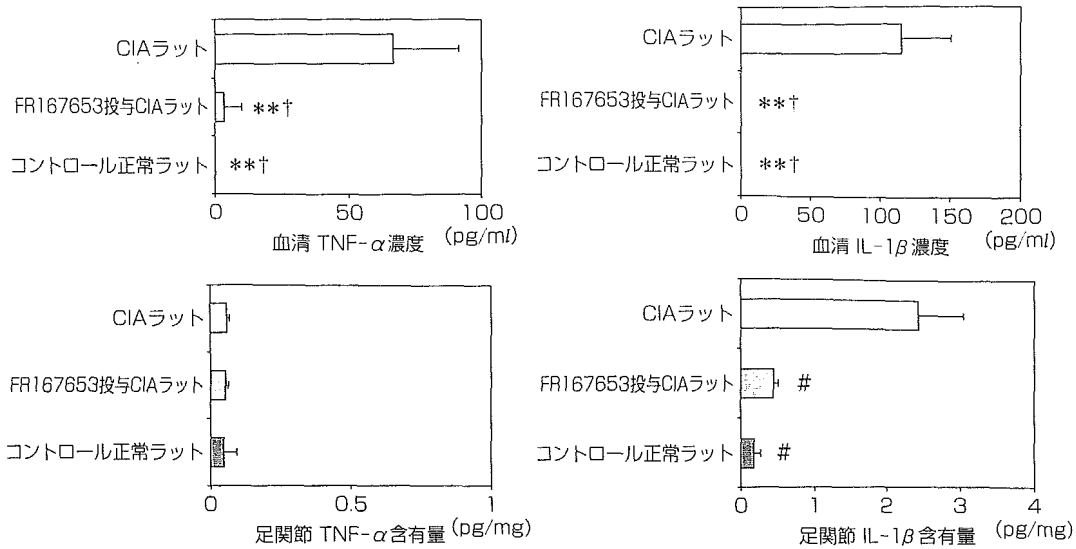
予防投与モデルと同様に FR 167653 投与ラットでは骨関節破壊は著しく抑制されていた。

データは p 38 MAPK 阻害薬がおそらく破骨細胞前駆細胞に対する作用によりこれらの独立した 2 つの経路の破骨細胞形成を直接的に阻害することを示していると考えられる。

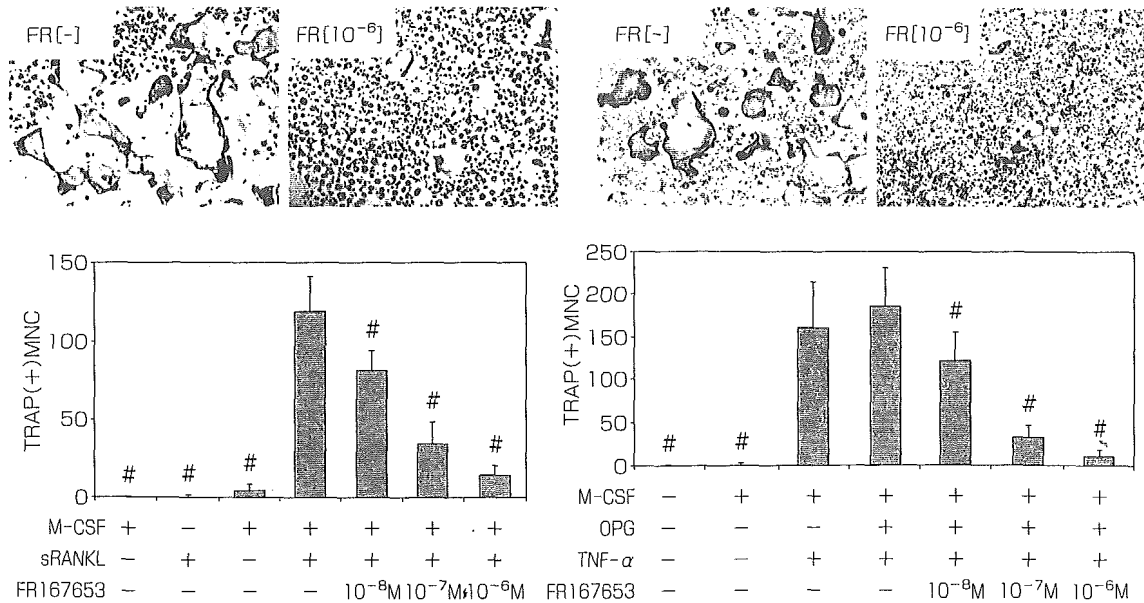
4. p 38 MAPK 阻害薬の骨髄リンパ球に対する影響

過去に骨髄中での CD 4⁺T 細胞の増加が RA や CIA の病因に関連している可能性が報告されているが^{87)~9)}, 今回骨髄リンパ球に対する p 38 MAPK 阻害薬の影響を

検討するために予防投与モデルラットの骨髄細胞で FACS 解析をおこなった。その結果, CD 4⁻CD 8⁺T 細胞の割合が CIA ラットで有意に増加しており, p 38 MAPK 阻害薬投与群ではその割合はほぼ正常ラットと同レベルであった。この結果は CD 4⁻CD 8⁺T 細胞が CIA の発症に何らかの役割を果たしており, p 38 MAPK 阻害薬の投与により局所骨髄への CD 4⁻CD 8⁺T 細胞の蓄積が阻害された可能性を示している。



図④ 予防投与モデルにおける血清および組織中の炎症性サイトカイン濃度 (Nishikawa M *et al*, 2003¹⁰⁾より改変引用)
 p 38 MAPK 阻害薬である FR 167653 の投与によって血清中 TNF- α , IL-1 β 濃度と足関節での骨軟部組織中の IL-1 α 濃度が低下していた。
 **p<0.01, †p<0.0001
 †測定限界値以下の値は統計処理のため 0.0 として扱った。



図⑤ 予防投与モデルにおける血清および組織中の炎症性サイトカイン濃度 (Nishikawa M *et al*, 2003¹⁰⁾より改変引用)
 可溶性および TNF- α によるラット骨髄細胞からの TRAP 陽性多核細胞形成は p 38 MAPK 阻害薬である FR 167653 により濃度依存的にほぼ完全に阻害された。
 †p<0.0001

5. RA 治療へ展望

われわれは p38 MAPK 阻害薬である FR 167653 がラットにおける CIA の発症を完全に抑制し、また関節炎発症後でも著しく関節炎を改善し骨・関節破壊を抑制させることを初めて証明した¹⁰⁾。CIA ラットの体内では炎症性サイトカインの産生が増加しており、さらにそれらの炎症性サイトカインが他の炎症性サイトカインの産生を促す悪循環メカニズムが生じている。p38 MAPK 阻害薬は直接的に炎症性サイトカインの産生を抑制するだけでなく、これらの悪循環メカニズムをも阻害することにより血清および組織中の炎症性サイトカイン濃度を減少させたと考えられる。またこれらの炎症性サイトカインの産生抑制は間接的に炎症性サイトカインによる破骨細胞分化を抑制するが、p38 MAPK 阻害薬は破骨細胞前駆細胞への直接作用によっても破骨細胞分化を抑制することから、これらの協調作用により強力に骨破壊が抑制されたと考えられる。また CD4⁺CD8⁺T 細胞が CIA の発症に何らかの役割を果たしており、FR 167653 の投与により局所骨髄への CD4⁺CD8⁺T 細胞の蓄積が阻害された可能性も考えられる。p38 MAPK 阻害薬である FR 167653 は CIA ラットにおいて関節炎の発症を阻害し関節破壊の進行を抑制した。これらの結果は、RA において p38 MAPK が重要な治療ターゲットになりうる可能性を示している。

おわりに

近年、RA の治療において抗 TNF- α 抗体を中心とした生物学的製剤が使用されすぐれた成績が報告されている^{11)~15)}。しかし、これらの製剤は高価であり、投与に際しても入院加療が必要なことも少なくない。また、これらの蛋白製剤に対する自己抗体が体内で産生された結果、効果が減弱したりアレルギー反応を生じることも報告されている^{16)~18)}。これに対して今回使用した FR 167653 などの合成低分子シグナル作動薬は製造コストが安価であり、自己抗体産生のリスクも少ない。RA 治療において生物学的製剤とならんでこのような p38

MAPK 阻害薬が重要な治療薬になりうる可能性があると考えられる。



文 献

- 1) Kong YY, Feige U, Sarosi I *et al* : Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* **402** : 304-309, 1999
- 2) Romas E, Gillespie MT, Martin TJ : Involvement of receptor activator of NF κ B ligand and tumor necrosis factor- α in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone* **30** : 340-346, 2002
- 3) Suzuki M, Tetsuka T, Yoshida S *et al* : The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-6 and IL-8 production from the TNF- α - or IL-1 β -stimulated rheumatoid synovial fibroblast. *FEBS Lett* **465** : 23-27, 2000
- 4) Trentham DE, Townes AS, Kang AH : Autoimmunity to type II collagen : an experimental model of arthritis. *J Exp Med* **146** : 857-868, 1977
- 5) Tomita T, Takeuchi E, Tomita N *et al* : Suppressed severity of collagen-induced arthritis by *in vivo* transfection of nuclear factor κ B decoy oligodeoxynucleotides as a gene therapy. *Arthritis Rheum* **42** : 2532-2542, 1999
- 6) Takeshita S, Kaji K, Kudo A : Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts. *J Bone Miner Res* **15** : 1477-1488, 2000
- 7) Tada Y, Ho A, Koh DR *et al* : Collagen-induced arthritis in CD4⁻ or CD8⁻ deficient mice : CD8⁺T cells play a role in initiation and regulate recovery phase of collagen-induced arthritis. *J Immunol* **156** : 4520-4526, 1996
- 8) Larsson P, Goldschmidt TJ, Klareskog L *et al* : Oestrogen-mediated suppression of collagen-induced arthritis in rats : Studies on the role of the thymus and peripheral CD8⁺T lymphocytes. *Scand J Immunol* **30** : 741-747, 1989
- 9) Ehinger M, Vestberg M, Johnsson AC *et al* : Influence of CD4 or CD8 deficiency on collagen-induced arthritis. *Immunology* **103** : 291-300, 2001
- 10) Nishikawa M, Myoui A, Tomita T *et al* : Prevention of the onset and progression of collagen-induced arthritis in rats by the potent p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor FR 167653. *Arthritis Rheum* **48** : 2670-2681, 2003
- 11) Moreland LW, Baumgartner SW, Schiff MH *et al* :

- Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human necrosis factor receptor (p 75)-Fc fusion protein. *N Eng J Med* **337** : 141-147, 1997
- 12) Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR *et al* : Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **41** : 1552-1563, 1998
 - 13) Maini R, St Clair EW, Breedveld F *et al* : Infliximab (chimeric anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate : a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet* **354** : 1932-1939, 1999
 - 14) Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M *et al* : Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor α (cA 2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* **344** : 1105-1110, 1994
 - 15) Cohen S, Hurd E, Cush J *et al* : Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with methotrexate : results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* **46** : 614-624, 2002
 - 16) Bemelmans MH, Gouma DJ, Buurman WA : Influence of nephrectomy on tumor necrosis factor clearance in murine model. *J Immunol* **150** : 2007-2017, 1993
 - 17) Lipsky PE, Kavanaugh A : The impact of pharmacoeconomic considerations on the utilization of novel anti-rheumatic therapies. *Rheumatology (Oxford)* **38** (Suppl) : 41-44, 1999
 - 18) Kalden JR : How do the biologics fit into the current DMARD armamentarium? *J Rheumatol* **62** (Suppl) : 27-35, 2001