

広がらず吸収窩形成活性が低下していた。この小型の TRAP 陽性細胞は TUNEL 陽性で、NFATc1 の核内移行がみられず、可溶性 RANKL50ng/ml の添加で形態が回復した。リコンビナント RANKL は MMP-13 と試験管内で incubation すると stalk region で 25-28 kDa に切断されたが、MMP-9 では切断できなかった。MMP-9&MMP-13 ダブル KO では、胎生期の血管侵入が相乗的に障害され、軟骨性骨原基の吸収不全により一次骨化が遅延していた。出生後は二次骨化中心での血管侵入がみられず、骨軟骨移行部で TRAP 陽性細胞が増加するにもかかわらず軟骨マトリックスの蓄積と肥大軟骨細胞層延長が生じ四肢短縮を呈した。また加齢にともない二次海綿骨の骨梁数増加、骨梁幅増大、骨髓腔狭小化がすすみ大理石骨病様の組織像となり、脾臓において vWF 陽性の巨核球の数が増加していた。一方、ADAM17、ADAM19KO は心奇形のため生後間もなく死亡したが、ADAM8、ADAM9、ADAM12、ADAM15KO、および ADAM9&15 ダブル KO、ADAM9&12&15 トリプル KO は生理的な条件下において明らかな表現系を認めなかった。

D. 考察

これら MMP、ADAM 遺伝子 KO の表現型から、MMP-9 と MMP-13 が胎生期の内軟骨性骨化におけるマトリックス改変と血管侵入に相乗的に関与していることが明らかになった。MMP-9KO の表現型は軟骨マトリックスにトラップされているヘパリン結合型 VEGF 放出の障害によるものと推測されている。膜型 RANKL は骨芽細胞のみならず肥大軟骨細胞にも発現すると考えられており、今回の結果から MMP-9 ではなく MMP-13 によって shedding を受けることで、軟骨吸収過程における血管侵入および破骨細胞、破軟骨細胞形成に paracrine に働く可能性がある。一方、ADAM ファミリーのうち ADAM17 は胎生致死のため表現型が不明であったが、過去の報告から胎生期の軟骨性骨原基への血管侵入の関与が示唆されている。そこで、ADAM17 コンディショナル KO の作製と平行して、MMP-13 および ADAM17 をターゲットに炎症性骨破壊における特定の標的シグナルを調節する新規選択的阻害剤の開発に着手している。

E. 結論

内軟骨性骨化における骨モデリングには MMP-9 と MMP-13 が相乗的に作用し、MMP-13 は膜型 RANKL を shedding することで、血管侵入および破骨細胞形成に関与する可能性が示唆された。ADAM8、ADAM9、ADAM12、ADAM15KO は表現型がみられず、ADAM17、ADAM19KO は致死性であるため硬組織における表現型は不明であった。

F. 健康危険情報

問題なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Horiuchi K, Zhou HM, Kelly K, Manova K, Blobel CP. Evaluation of the contributions of ADAMs 9, 12, 15, 17, and 19 to heart development and ectodomain shedding of neuregulins beta1 and beta2. *Dev Biol.* 2005 Jul 15;283(2):459-71.

2) Kelly K, Hutchinson G, Nebenius-Oosthuizen D, Smith AJ, Bartsch JW, Horiuchi K, Rittger A, Manova K, Docherty AJ, Blobel CP. Metalloprotease-disintegrin ADAM8: expression analysis and targeted deletion in mice. *Dev Dyn.* 2005 Jan;232(1):221-31.

2. 学会発表：なし

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

われわれは、関節リウマチ（Rheumatoid arthritis: RA）革新的治療法の開発を目指し、「なぜ滑膜細胞は過増殖するのか」という着眼点から研究を推進してきた。その過程で、滑膜細胞の増殖をつかさどる分子「シノビオリン（Synoviolin）」の発見に成功し、下記に示す研究成果を得た¹⁾。

1. シノビオリンは小胞体関連蛋白分解系に関わる新規 E3 ユビキチンリガーゼである。
2. シノビオリンは RA 患者の滑膜組織・培養滑膜細胞で過剰に発現している。
3. シノビオリン遺伝子過剰発現マウスは、滑膜の増生、骨・軟骨破壊といった RA に酷似した関節症の症状を示す。
4. シノビオリン遺伝子を半分に減らしたマウス（シノビオリン遺伝子ヘテロ欠損マウス）にコラーゲン誘導関節炎を適応したところ、関節炎の惹起に対し強い抵抗性を示した。

これらの結果は、シノビオリンの発現量が関節炎/関節症の発症と重症度に関与することを示している。この背景のもと、昨年より本研究班では、シノビオリン遺伝子の発現制御機構の解明を試み下記に示す研究成果を得た²⁾。

5. シノビオリンの転写活性化に重要なプロモーター上のコアエレメント EBS (Ets binding site) の決定。
6. EBS に結合する転写複合体の同定。
7. EBS デコイ核酸による RA 滑膜細胞増殖の制御。

以上 1~7 に示す結果にもとづいたシノビオリンの“量”の制御により、RA の治療的展開が可能であることが示唆される。そこで本年度は、シノビオリンの生物学的意義の検討に加え、その量的制御法の安全域の確立のため、シノビオリン欠損マウス (syno^{-/-}) を用いた解析を行った。

A. 研究目的

シノビオリンの量的制御による RA 治療の可能性を論理的・科学的に裏付ける (Proof of Concept: POC) ことを目的とする。

B. 研究方法

①syno^{-/-}の作出

シノビオリン遺伝子ヘテロ欠損マウス (syno^{+/-}) 同士を交配させ、得られた産仔および胎仔の尾もしくは羊膜を用いて、サザンブロッティング法もしくは PCR 法にて遺伝子型を同定した。

②syno^{-/-}の解析

野生型・syno^{+/-}・syno^{-/-}各遺伝子型マウスのパラフィン標本を作製し HE 染色を行い、組織学的検討を行った。

③造血能に関する検討

各遺伝子型由来造血幹細胞を用いて、それぞれの造血能を検討した。さらにパラフィン標本を用いて、造血のマーカー分子の免疫染色を行った（筑波大学 分子情報生体制御医学専攻 分子発生生物学 山本雅之教授らとの共同研究による）。

④マウス胎仔由来線維芽細胞 (Mouse embryonic fibroblast: MEFs) を用いた検討

各遺伝子型の 12.5 日齢胎仔より MEFs を採取し、細胞生物学的検討を行った。

⑤倫理面への配慮

動物実験において、動物組織を採取する場合には、文部科学省・動物実験指針および聖マリアンナ医科大学大学院・実験動物飼育管理研究施設 動物実験指針にしたがい、可能な限り麻酔下で行い実験動物に苦痛を与えないように配慮した。さらに、研究に使用した動物を処分する際は、必ず安楽死（過量の麻酔薬投与または頸椎脱臼等）させるよう十分に配慮した。

⑥遺伝子組換え実験

遺伝子組換え実験は、文部科学省が定めた指針および聖マリアンナ医科大学遺伝子組換え安全委員会が定めた指針にしたがい実施した。さらに本研究を含む研究の実施は、聖マリアンナ医科大学遺伝子組換え安全委員会により承認されている。

C. 研究結果

(1) *syno*^{-/-}は13.5日齢までに致死となる。

これまでに報告した *syno*^{+/-}同士を交配させ、得られた産仔 (P0) の遺伝子型を解析した結果、P0 では *syno*^{-/-}が得られなかった。次に10.5日齢から18.5日齢の胎仔を用いて同様に解析した結果、11.5日齢では *syno*^{-/-}は大多数得られたにもかかわらず (88.9%)、13.5日齢ではごくわずかの生存しか認められなかった (28.6%)。このことから *syno*^{-/-}は13.5日齢までに致死となることが明らかとなった³⁾。

(2) *syno*^{-/-}の致死の原因は肝臓の異常による貧血である。

正常なマウスの発生において *syno*^{-/-}が致死となる時期は、造血を営む場が卵黄嚢（一次造血）から胎仔肝臓（二次造血）へと移行する時期であり、これまでの報告からこの時期に致死となるマウスは造血系の障害により貧血・致死となるものが圧倒的に多い。そこで、*syno*^{-/-}の造血の状態を検討したところ、*syno*^{-/-}では野生型に比べ赤芽球数が減少しており、貧血を呈していることが明らかとなった。さらに、組織免疫染色による各造血マーカー分子の発現検討の結果により、*syno*^{-/-}の貧血は二次造血の異常に起因することを証明した³⁾。

次に、貧血の原因について詳細な解析を行った結果、*syno*^{-/-}由来造血幹細胞の *in vitro* での赤芽球分化能は障害されておらず、

むしろ造血を行う場である肝臓でのアポトーシスの亢進により二次造血が障害されていることを明らかとした³⁾。

(3) *syno*^{-/-} MEFs は小胞体ストレスに対し感受性を示す。

syno^{-/-}胎仔肝で亢進していたアポトーシスがどのような刺激によるものかを MEFs を用いて検討した結果、*syno*^{-/-}MEFs では Fas などの添加によっては、アポトーシス誘導能を示さなかったにもかかわらず、小胞体ストレスを負荷する薬剤を添加した場合においてのみアポトーシス誘導能を示すことが明らかとなった³⁾。シノビオリンは小胞体ストレスに応答する機構である ERAD (Endoplasmic Reticulum associated degradation) において機能する E3 ユビキチンリガーゼであるが^{1,4,6)}、もう1つの小胞体ストレス応答機構である UPR (Unfolded protein response) は *syno*^{-/-}では正常に機能していることを示した³⁾。以上のことから、*syno*^{-/-}では小胞体ストレス応答機構のうち ERAD のみが破綻することにより小胞体ストレスに対し感受性を示し、肝細胞でのアポトーシスを促した結果、貧血・致死となることが明らかとなった。

D. 考察

上記の結果より、*syno*^{-/-}は二次造血の異常による貧血で胎生致死となることが明らかとなった。またこれは赤芽球自体の分化異常によるものではなく、この時期に造血を行うナース細胞での特異的なアポトーシスの亢進によるものであるということを証明した³⁾。この結果を考察すると、「胎仔の発生」と「RA」という、一見すると全くその関連性が想定できない2つの現象が、実は共通性をもつのではないかと考えられる。すなわちこれらの事象を結ぶキーワードとは、「アポトーシス」と「ナーシング」である。前者に関してはこれまでの研究で、Fas/FasL システムの抑制が滑膜増殖をもたらす RA の発症に関与すると報告し、RA に対する抗 Fas 抗体の使用という画期的治療法が臨床応用も間近になっている (Arthritis Rheum 1995)。また後者に関しては、越智隆弘先生により、RA 患者の骨髄および滑膜を構成する間質細胞が特異なナ

ース細胞様機能によって増殖支持能を保有するという報告がなされている (Rheumatology 1999)。したがって syno-/-ではアポトーシスが亢進し、血球分化を支えるナーシング機能が低下することとは対照的に、シノビオリンが過剰に発現している RA 滑膜細胞では、アポトーシスが抑制され、血球細胞を抱き込んだナーシング機能が亢進する。このようにシノビオリンを軸に考えれば、syno-/-と RA、いいかえれば syno-/-の造血支持細胞と滑膜細胞とは両極に位置する存在であるといえる。

E. 結論

syno-/-の解析から、シノビオリンはアポトーシスとナーシングに広くかかわることが明らかとなった。今後、これらの知見をシノビオリン量の制御による RA 治療の開発に有意義に利用できることが明らかとなった。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Amano T, *et al.* "Synoviolin/Hrd1, an E3 ubiquitin ligase, as a novel pathogenic factor for arthropathy" *Genes Dev* 17: 2436-2449 (2003)
2. Tsuchimochi K, *et al.* "Identification of a Crucial Site for Synoviolin Expression." *Mol Cell Biol.* 25: 7344-56 (2005)
3. Yagishita N, *et al.* "Essential Role of Synoviolin in Embryogenesis" *J Biol Chem* 280:7909-7916 (2005)
4. Yagishita N, *et al.* "Role of synoviolin in rheumatoid arthritis: possible clinical relevance" *Future Rheumatol* 1:31-36 (2006)
5. Yamasaki S, *et al.* "Resistance to endoplasmic reticulum stress is an acquired cellular characteristic of rheumatoid synovial cells" *International Journal of Molecular Medicine* in pres 2006
6. Yamasaki S, *et al.* "Rheumatoid arthritis as a hyper-endoplasmic reticulum-associated degradation disease" *Arthritis Res Ther* 7: 181-186 (2005)
7. Sato T, *et al.* "Comparative Analysis of Gene Expression Profiles in Intact Versus

Damaged Regions of Human Osteoarthritic Cartilage" *Arthritis Rheum* 54: 808-817 (2006)

8. Aratani S, *et al.* "The nuclear import of RNA helicase A is mediated by importin- α 3" *Biochem Biophys Res Commun* 340:125-133 (2006)
9. Fujita H, *et al.* "Relevance of nuclear localization and functions of RNA helicase A" *Int J Mol Med* 15:555-560 (2005)

2. 学会発表

1. Nakajima T **ACR2005** "Novel Factor in Synovial Hyperplasia" San Diego, California 2005/11/12-17
2. Nakajima T **GARN MEETING 2005** "Impact of Synoviolin in Rheumatology and Developmental Biology" Vienna, Austria 2005/9/15-18
3. Nakajima T **EULAR2005** "Lesson from Rheumatoid Synovial cells -What Synoviolin tells us?-" Vienna, Austria 2005/6/8-11
4. Yagishita N *et al.* **JCR2005 (International)** "Lesson from Rheumatoid Synovial cells -What Synoviolin tells us?-" Yokohama, Japan 2005/4/17-21

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。

筋骨格の痛みに関する疫学的調査

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 講師

研究要旨：健康診断受診者約 5000 人を対象にした質問票調査をおこない、筋骨格の痛みの有訴率、QOL に対する影響、治療の割合等を検討した。30～69 歳の男女において、筋骨格の痛みの有訴率は男性 44.2%、女性 50.3%であり、部位別にみると、首・肩、腰でとくに高かった。痛みによる生活の支障は男性 9.2%、女性 12.0%にみられた。痛みがあるほど生活の支障があるほど QOL が低かったが、痛みの治療の割合は男性 15.7%、女性 18.6%であり、生活の支障がある痛みにおいても男性 31.4%、女性 37.4%にすぎなかった。QOL の維持向上を目指して、筋骨格系疾患に対する取り組みが期待される。

A. 研究目的

WHO は 2000 年より筋骨格系疾患に関する世界的プロジェクト—Bone and Joint Decade (BJD; 運動器の 10 年)を開始した。筋骨格系疾患は痛みや可動制限をとめない、日常生活を大きく妨げる原因になる。しかし、これまであまり注目されておらず、現状さえも十分把握されていない。そこで、まず、世界各国における現状の調査が必要である[1]。

日本の BJD に関する研究班(主任研究者 吉田勝美)は、2003 年 10 月、健康診断受診者約 3000 人を対象にした質問票調査をおこない、日本の成人の約 4 割が筋骨格の痛みを訴えていることを報告した[2-5]。そこで、詳細を明らかにするために、質問項目を追加して、調査地域を拡大して、あらためて質問票調査をおこない、筋骨格の痛みの有訴率、QOL に対する影響、治療の割合等を検討した。

B. 研究方法

新潟市(新潟県)、つくば市(茨城県)、さいたま市(埼玉県)、浜松市(静岡県)、福岡市(福岡県)の各健診施設において、2005 年 9～10 月、健康診断受診者(1 施設あたり 1000 名)を対象にした質問票調査を実施した。質問票は以下のような 3 部構成である。

①本人の属性

性、年齢、身長、体重、普段の生活の姿勢(座り仕事、立ち仕事、肉体労働)、利き手

②筋骨格の痛み

関節を中心にした全身 29 領域の筋骨格の痛み(最近 1 ヶ月のうち 1 週間以上継続するもの)の有無とそれによる仕事や日常生活の支障(以下、生活の支障)の有無(図 1)

③QOL

日本語版 EuroQol (EQ-5D) [6]

なお、本調査については、聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会の承認を受けた。

質問票を回収した 5652 名のうち必要な情報をもれなく回答した 30～69 歳の男女 4926 名を解析した。

● 筋骨格の痛みの有訴率

筋骨格の痛みについて全体および部位別(首・肩、腕・手、腰、股関節、膝関節、足)の有訴率を計算して、性、年齢、BMI(～18.5、18.6～24.9、25.0～)、普段の生活の姿勢の関係を調べた(χ^2 乗検定)。

● 筋骨格の痛みの QOL に対する影響

筋骨格の痛みの有無と生活の支障の有無により EuroQol の各ドメインおよびスコアを比較した(χ^2 乗検定および分散分析)。

● 痛みの治療の割合

筋骨格の痛みについて全体および部位別（首・肩、腕・手、腰、股関節、膝関節、足）の治療の割合を計算して、性、年齢、普段の生活の姿勢、生活の支障、痛みの部位数の関係を調べた（ χ^2 乗検定）。さらに、治療の有無により EuroQol の各ドメインおよびスコアを比較した（ χ^2 乗検定および分散分析）。

C. 研究結果

表 1 は筋骨格の痛みの有訴率である。筋骨格の痛みの有訴率は男性 44.2%、女性 50.3% であり、性差を有意に認めた（ $p < 0.001$ ）。男女とも年齢の関係（高年齢 > 低年齢）、普段の生活の姿勢の関係（肉体労働 > 立ち仕事 > 座り仕事）を有意に認めた。痛みによる生活の支障は男性 9.2%、女性 12.0% にみられた。

筋骨格の痛みは複数の領域にわたることも少なくなく、29 領域のうち 2 領域の痛みは男性 10.9%、女性 11.9%、3 領域以上の痛みは男性 11.9%、女性 18.1% にみられた。

表 2 は筋骨格の痛みの部位別の有訴率である。筋骨格の痛みの部位別の有訴率は男女とも 1 位 首・肩、2 位 腰であり、ほかの部位を大きく凌いだ。性差は腰以外で有意に認めた（ $p < 0.01$ ）。年齢の関係は腕・手、腰、股関節（女性）、膝関節、足、BMI の関係は膝関節（女性）、普段の仕事の姿勢の関係は腕・手（女性）、腰で有意に認めた。

表 3 は筋骨格の痛みと EuroQol の関係である。EuroQol のスコアは男女とも痛みなし > 生活の支障のない痛み > 生活の支障のある痛みの順であり、痛みがあるほど生活の支障があるほど QOL が低かった。

表 4 は痛みの治療の割合である。痛みの治療の割合は男性 15.7%、女性 18.6% であり、生活の支障がある痛みにおいても男性 31.4%、女性 37.4% にすぎなかった。

表 5 は痛みの部位別の治療の割合である。治療の割合が 5 割を超えたものは男性の足の生活の支障がある痛みだけにすぎなかった。

表 6 は痛みの治療の有無と EuroQol の関係である。EuroQol のスコアは治療なし > 治療ありであり、治療ありのほうが治療なしよりも QOL

が低かった。

D. 考察

健康診断受診者約 5000 人を対象にした質問票調査から、30～69 歳の男女において、筋骨格の痛みの有訴者はほぼ半数におよぶことが明らかにされた。この数値を平成 16 年 10 月 1 日現在推計人口[7]にあてはめると、日本の筋骨格の痛みの有訴率は男性 44.4%、女性 50.7% となる。平成 12 年第 5 次循環器疾患基礎調査[8]によれば、高血圧の有病率は 33.4%、高コレステロール血症の有病率は 31.5% である。また、平成 14 年糖尿病実態調査[9]によれば、糖尿病が強く疑われる人は 9.0% である。健診受診者を対象にした選択バイアスを考慮しても、筋骨格の痛みの有訴率はこれら有病率を大きく超えると考えられた。

今回の調査の対象は健診受診者であり、重度の障害（寝たきり、歩行困難等）を有する者を含まない。それにも係らず、筋骨格の痛みと EuroQol の関係を有意に認めた。ドメイン別にみると、「痛み／不快感」にかぎらず、「移動」「身の回りの管理」「普段の活動」「不安／ふさぎ込み」のすべてで有意差がみられ、筋骨格の痛みが QOL 全般にひろく影響することが明らかにされた。

その一方、痛みの治療の割合は高くなく、生活の支障がある痛みにおいても 4 割以下にすぎなかった。BJD の目的でもあるが、筋骨格系疾患による QOL の低下を防止するために、一般住民に対する啓蒙活動を通じて、筋骨格系疾患の重要性を知らしめ、セルフケアの自覚をうながす必要があると考えられた。今回の調査において治療ありのほうが治療なしよりも QOL が低かったが、治療ありのほうが治療なしよりも重症であるためか、治療の効果が十分得られていないためか、わからない。後者であるならば、医療従事者に対する啓蒙活動や効果的な治療法の開発もまた今後の課題にあげられる。

現在の疾病予防対策の中心は生活習慣病、とくに悪性腫瘍や循環器疾患のような致死性疾患におかれている。しかし、筋骨格系疾患は潜在患者数が多く、しかも QOL の低下の原

厚生労働科学研究補助金
分担研究報告書

因となることから、疾病予防対策のひとつに取り組む必要があると考えられた。

E. 結論

筋骨格の痛みは有訴者数が多く、しかも QOL の低下の原因となる。しかし、実際、治療を受けている者が少ない。QOL の維持向上を目指して、筋骨格系疾患に対する取り組みが期待される。

謝辞

調査実施協力施設は以下のとおりである。

1. 社団法人 新潟県健康管理協会
2. 財団法人 筑波メディカルセンター つくば総合健診センター
3. 医療法人財団 新生会 大宮共立病院総合健診プログラム
4. 社会福祉法人 聖隷福祉事業団 聖隷健康診断センター
5. 医療法人財団 博愛会 人間ドックセンターウエルネス笹岡

参考文献

[1] Bone and Joint Decade.

<http://www.bonejointdecade.org>

[2] 厚生科学研究費補助金 疾病・障害対策研究分野 免疫アレルギー疾患予防・治療研究「関節リウマチの疫学、患者の受療動態に関する研究(主任研究者 吉田勝美)」平成 16 年度総括報告書.

<http://mhlw-grants.niph.go.jp>

[3] Suka M, Yoshida K. Health examinations should expand their scope to musculoskeletal conditions: estimation of burden of musculoskeletal pain on AMHTS population in terms of prevalence and interference with daily activities. Health Evaluat Promot 2004;31:563-566.

[4] Suka M, Yoshida K. Musculoskeletal pain in Japan: prevalence and interference with daily activities. Modern Rheumatology 2005;15:41-47.

[5] Suka M, Yoshida K. Burden of musculoskeletal pain in Japan. Modern Rheumatology 2005;15:48-51.

[6] 池上直己, 福原俊一, 下妻晃二郎, 池田俊也 編. 臨床のための QOL 評価ハンドブック. 東京:医学書院, 2001 年.

[7] 総務省統計局. 平成 16 年 10 月 1 日現在推計人口.

<http://www.stat.go.jp/data/jinsui/2004np/index.htm>

[8] 厚生労働省. 平成 12 年第 5 次循環器疾患基礎調査.

http://www.dbtk.mhlw.go.jp/toukei/kouhyo/indexkk_18_1.html

[9] 厚生労働省. 平成 14 年糖尿病実態調査.

<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2004/03/s0318-15.html>

厚生労働科学研究補助金
分担研究報告書

図1 筋骨格の痛みに関する質問票に用いたマネキン図

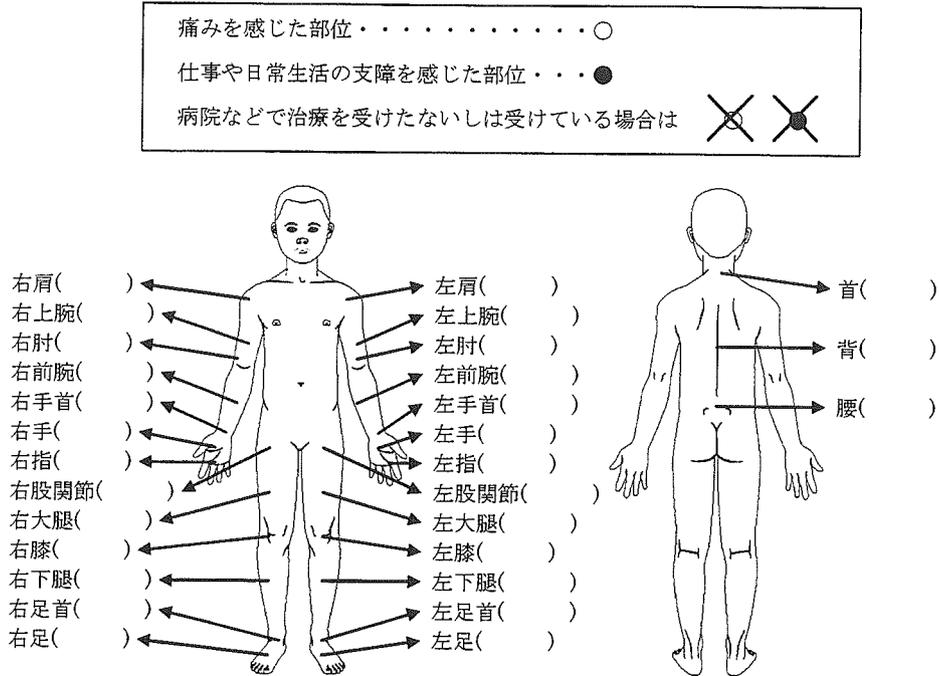


表1 筋骨格の痛みの有訴率

		N 痛み(生活の支障)		
		N	痛み	生活の支障
男性	全体	3041	1343 (123)	44.2%
	年齢			
	30-39	518	191 (16)	36.9% ***
	40-49	1116	479 (38)	42.9%
	50-59	1079	501 (52)	46.4%
	60-69	328	172 (17)	52.4%
	BMI			
	-18.5	88	43 (7)	48.9%
	18.6-24.9	2056	891 (83)	43.3%
	25.0+	897	409 (33)	45.6%
姿勢				
座り仕事	1926	829 (78)	43.0% **	
立ち仕事	805	348 (31)	43.2%	
肉体労働	310	166 (14)	53.5%	
女性	全体	1885	949 (114)	50.3%
	年齢			
	30-39	403	171 (15)	42.4% **
	40-49	707	358 (57)	50.6%
	50-59	577	313 (33)	54.2%
	60-69	198	107 (9)	54.0%
	BMI			
	-18.5	245	107 (14)	43.7%
	18.6-24.9	1417	729 (88)	51.4%
	25.0+	223	113 (12)	50.7%
姿勢				
座り仕事	1320	635 (73)	48.1% **	
立ち仕事	494	269 (36)	54.5%	
肉体労働	71	45 (5)	63.4%	

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (χ²乗検定による)

厚生労働科学研究補助金
分担研究報告書

表 2 筋骨格の痛みの有訴率(6 部位)

	N	首、肩			腕、手			腰		
		痛み(生活の支障)			痛み(生活の支障)			痛み(生活の支障)		
男性	全体	3041	723 (123)	23.8%	217 (38)	7.1%	685 (138)	22.5%		
	年齢									
	30-39	518	110 (16)	21.2%	15 (4)	2.9% ***	105 (20)	20.3%		
	40-49	1116	261 (38)	23.4%	71 (13)	6.4%	259 (54)	23.2%		
	50-59	1079	275 (52)	25.5%	96 (15)	8.9%	243 (51)	22.5%		
	60-69	328	77 (17)	23.5%	35 (6)	10.7%	78 (13)	23.8%		
	BMI									
	-18.5	88	26 (7)	29.5%	7 (1)	8.0%	24 (4)	27.3%		
	18.6-24.9	2056	485 (83)	23.6%	141 (28)	6.9%	441 (95)	21.4%		
	25.0+	897	212 (33)	23.6%	69 (9)	7.7%	220 (39)	24.5%		
	姿勢									
	座り仕事	1926	448 (78)	23.3%	126 (19)	6.5%	405 (86)	21.0% ***		
	立ち仕事	805	192 (31)	23.9%	61 (11)	7.6%	174 (27)	21.6%		
	肉体労働	310	83 (14)	26.8%	30 (8)	9.7%	106 (25)	34.2%		
女性	全体	1885	571 (114)	30.3%	189 (39)	10.0%	421 (90)	22.3%		
	年齢									
	30-39	403	113 (15)	28.0%	17 (4)	4.2% ***	81 (10)	20.1%		
	40-49	707	229 (57)	32.4%	80 (19)	11.3%	157 (39)	22.2%		
	50-59	577	181 (33)	31.4%	71 (11)	12.3%	137 (31)	23.7%		
	60-69	198	48 (9)	24.2%	21 (5)	10.6%	46 (10)	23.2%		
	BMI									
	-18.5	245	68 (14)	27.8%	19 (3)	7.8%	52 (7)	21.2%		
	18.6-24.9	1417	442 (88)	31.2%	146 (29)	10.3%	319 (74)	22.5%		
	25.0+	223	61 (12)	27.4%	24 (7)	10.8%	50 (9)	22.4%		
	姿勢									
	座り仕事	1320	385 (73)	29.2%	111 (24)	8.4% ***	274 (53)	20.8% *		
	立ち仕事	494	160 (36)	32.4%	62 (12)	12.6%	123 (33)	24.9%		
	肉体労働	71	26 (5)	36.6%	16 (3)	22.5%	24 (4)	33.8%		

	N	股関節			膝関節			足		
		痛み(生活の支障)			痛み(生活の支障)			痛み(生活の支障)		
男性	全体	3041	88 (14)	2.9%	195 (27)	6.4%	188 (32)	6.2%		
	年齢									
	30-39	518	10 (2)	1.9%	23 (1)	4.4% *	23 (3)	4.4% *		
	40-49	1116	30 (2)	2.7%	64 (11)	5.7%	57 (13)	5.1%		
	50-59	1079	35 (9)	3.2%	79 (13)	7.3%	79 (13)	7.3%		
	60-69	328	13 (1)	4.0%	29 (2)	8.8%	29 (3)	8.8%		
	BMI									
	-18.5	88	0 (0)	0.0%	3 (0)	3.4%	3 (1)	3.4%		
	18.6-24.9	2056	58 (11)	2.8%	129 (15)	6.3%	118 (23)	5.7%		
	25.0+	897	30 (3)	3.3%	63 (12)	7.0%	67 (8)	7.5%		
	姿勢									
	座り仕事	1926	52 (9)	2.7%	27 (16)	1.4%	121 (20)	6.3%		
	立ち仕事	805	25 (4)	3.1%	55 (8)	6.8%	43 (9)	5.3%		
	肉体労働	310	11 (1)	3.5%	113 (3)	36.5%	24 (3)	7.7%		
女性	全体	1885	86 (17)	4.6%	163 (36)	8.6%	153 (23)	8.1%		
	年齢									
	30-39	403	11 (0)	2.7% **	21 (3)	5.2% ***	20 (1)	5.0% ***		
	40-49	707	26 (8)	3.7%	46 (12)	6.5%	45 (8)	6.4%		
	50-59	577	33 (7)	5.7%	65 (15)	11.3%	62 (7)	10.7%		
	60-69	198	16 (2)	8.1%	31 (6)	15.7%	26 (7)	13.1%		
	BMI									
	-18.5	245	9 (0)	3.7%	15 (2)	6.1% **	13 (0)	5.3%		
	18.6-24.9	1417	64 (14)	4.5%	117 (28)	8.3%	119 (19)	8.4%		
	25.0+	223	13 (3)	5.8%	31 (6)	13.9%	21 (4)	9.4%		
	姿勢									
	座り仕事	1320	55 (11)	4.2%	105 (23)	8.0%	100 (11)	7.6%		
	立ち仕事	494	27 (6)	5.5%	49 (10)	9.9%	48 (12)	9.7%		
	肉体労働	71	4 (0)	5.6%	9 (3)	12.7%	5 (0)	7.0%		

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (χ²乗検定による)

厚生労働科学研究補助金
分担研究報告書

表 3 筋骨格の痛みと EuroQol の関係

				痛み					
				なし		生活の支障なし		生活の支障あり	
性別	N			1698		1039		304	
男性	ドメイン 移動	問題ない	1688	99.4%	1013	97.5%	278	91.4%	***
		問題ある	10	0.6%	26	2.5%	26	8.6%	
		寝たきり	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	
	身の回りの管理	問題ない	1697	99.9%	1036	99.7%	300	98.7%	***
		問題ある	1	0.1%	3	0.3%	4	1.3%	
		できない	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	
	普段の活動	問題ない	1690	99.5%	1024	98.6%	288	94.7%	***
		問題ある	8	0.5%	15	1.4%	15	4.9%	
		できない	0	0.0%	0	0.0%	1	0.3%	
	痛み/不快感	ない	1639	96.5%	731	70.4%	144	47.4%	***
		中程度	57	3.4%	302	29.1%	149	49.0%	
		ひどい	2	0.1%	6	0.6%	11	3.6%	
	不安/ふさぎ込み	ない	1588	93.5%	944	90.9%	268	88.2%	**
		中程度	108	6.4%	90	8.7%	34	11.2%	
		ひどい	2	0.1%	5	0.5%	2	0.7%	
スコア		平均(SD)	0.91(0.04)		0.87(0.09)		0.82(0.15)	***	
女性	ドメイン 移動	問題ない	927	99.0%	694	97.2%	213	90.6%	***
		問題ある	9	1.0%	18	2.5%	22	9.4%	
		寝たきり	0	0.0%	2	0.3%	0	0.0%	
	身の回りの管理	問題ない	935	99.9%	712	99.7%	231	98.3%	***
		問題ある	1	0.1%	0	0.0%	4	1.7%	
		できない	0	0.0%	2	0.3%	0	0.0%	
	普段の活動	問題ない	932	99.6%	701	98.2%	207	88.1%	***
		問題ある	4	0.4%	10	1.4%	28	11.9%	
		できない	0	0.0%	3	0.4%	0	0.0%	
	痛み/不快感	ない	873	93.3%	406	56.9%	84	35.7%	***
		中程度	62	6.6%	301	42.2%	141	60.0%	
		ひどい	1	0.1%	7	1.0%	10	4.3%	
	不安/ふさぎ込み	ない	840	89.7%	589	82.5%	190	80.9%	***
		中程度	94	10.0%	122	17.1%	43	18.3%	
		ひどい	2	0.2%	3	0.4%	2	0.9%	
スコア		平均(SD)	0.90(0.06)		0.84(0.12)		0.79(0.15)	***	

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001(ドメインはχ²検定による、スコアは分散分析による)

厚生労働科学研究補助金
分担研究報告書

表 4 痛みの治療の割合

		N	治療	
男性	全体	1343	211	15.7%
	年齢			
	30-39	191	20	10.5%
	40-49	479	76	15.9%
	50-59	501	83	16.6%
	60-69	172	32	18.6%
	姿勢			
	座り仕事	829	142	17.1%
	立ち仕事	348	46	13.2%
	肉体労働	166	23	13.9%
生活の支障				
なし	1039	114	11.0% ***	
あり	304	97	31.9%	
痛みの領域				
1領域	651	92	14.1%	
2領域	330	50	15.2%	
3領域以上	362	69	19.1%	
女性	全体	949	176	18.5%
	年齢			
	30-39	171	18	10.5% **
	40-49	358	65	18.2%
	50-59	313	66	21.1%
	60-69	107	27	25.2%
	姿勢			
	座り仕事	635	126	19.8%
	立ち仕事	269	43	16.0%
	肉体労働	45	7	15.6%
生活の支障				
なし	714	88	12.3% ***	
あり	235	88	37.4%	
痛みの領域				
1領域	382	49	12.8% ***	
2領域	225	40	17.8%	
3領域以上	342	87	25.4%	

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (χ²乗検定による)

表 5 痛みの治療の割合(6部位)

		生活の支障	N	治療	
男性	首、肩	全体	723	84	11.6%
		なし	600	53	8.8% ***
		あり	123	31	25.2%
	腕、手	全体	217	30	13.8%
		なし	179	18	10.1% ***
		あり	38	12	31.6%
	腰	全体	685	94	13.7%
		なし	547	58	10.6% ***
		あり	138	36	26.1%
	股関節	全体	88	9	10.2%
		なし	74	5	6.8% *
		あり	14	4	28.6%
膝関節	全体	195	29	14.9%	
	なし	168	20	11.9% **	
	あり	27	9	33.3%	
足	全体	188	27	14.4%	
	なし	156	10	6.4% ***	
	あり	32	17	53.1%	
女性	首、肩	全体	571	77	13.5%
		なし	457	40	8.8% ***
		あり	114	37	32.5%
	腕、手	全体	189	37	19.6%
		なし	150	22	14.7% ***
		あり	39	15	38.5%
	腰	全体	421	62	14.7%
		なし	331	33	10.0% ***
		あり	90	29	32.2%
	股関節	全体	86	21	24.4%
		なし	69	13	18.8% *
		あり	17	8	47.1%
膝関節	全体	163	23	14.1%	
	なし	127	12	9.4% **	
	あり	36	11	30.6%	
足	全体	153	28	18.3%	
	なし	130	18	13.8% ***	
	あり	23	10	43.5%	

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (χ²乗検定による)

厚生労働科学研究補助金
分担研究報告書

表 6 痛みの治療の有無とEuroQol の関係

痛み			治療			
			なし	あり		
全体	N		1905	387		
	ドメイン	移動	問題ない	1847 97.0%	351 90.7%	***
			それ以外	58 3.0%	36 9.3%	
	身の回りの管理	問題ない	1896 99.5%	383 99.0%		
		それ以外	9 0.5%	4 1.0%		
	普段の活動	問題ない	1865 97.9%	355 91.7%	***	
		それ以外	40 2.1%	32 8.3%		
	痛み／不快感	ない	1206 63.3%	159 41.1%	***	
		それ以外	699 36.7%	228 58.9%		
	不安／ふさぎ込み	ない	1663 87.3%	328 84.8%		
それ以外		242 12.7%	59 15.2%			
スコア		平均(SD)	0.85(0.11)	0.80(0.16)	***	
生活の支障なし	N		1551	202		
	ドメイン	移動	問題ない	1516 97.7%	191 94.6%	**
			それ以外	35 2.3%	11 5.4%	
	身の回りの管理	問題ない	1546 99.7%	202 100.0%		
		それ以外	5 0.3%	0 0.0%		
	普段の活動	問題ない	1531 98.7%	194 96.0%	**	
		それ以外	20 1.3%	8 4.0%		
	痛み／不快感	ない	1040 67.1%	97 48.0%	***	
		それ以外	511 32.9%	105 52.0%		
	不安／ふさぎ込み	ない	1357 87.5%	176 87.1%		
それ以外		194 12.5%	26 12.9%			
スコア		平均(SD)	0.86(0.10)	0.83(0.11)	***	
生活の支障あり	N		354	185		
	ドメイン	移動	問題ない	331 93.5%	160 86.5%	**
			それ以外	23 6.5%	25 13.5%	
	身の回りの管理	問題ない	350 98.9%	181 97.8%		
		それ以外	4 1.1%	4 2.2%		
	普段の活動	問題ない	334 94.4%	161 87.0%	**	
		それ以外	20 5.6%	24 13.0%		
	痛み／不快感	ない	166 46.9%	62 33.5%	**	
		それ以外	188 53.1%	123 66.5%		
	不安／ふさぎ込み	ない	306 86.4%	152 82.2%		
それ以外		48 13.6%	33 17.8%			
スコア		平均(SD)	0.82(0.21)	0.77(0.19)	***	

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (ドメインは χ^2 乗検定による、スコアは分散分析による)

新規抗リウマチ剤の臨床薬理学的評価
分担研究者 川合眞一 東邦大学医学部内科学講座（大森）膠原病科教授

研究要旨：

関節リウマチの病態形成機序が解明されるにしたがって、新規作用機序によるさまざまな新薬が開発されつつある。しかし、それらには基礎的および臨床的な評価、すなわち臨床薬理学的評価が必要である。そこで、以下のような検討を行った。

1. 研究分担者らは、以前より、ヒト関節滑膜細胞を利用して、さまざまな薬剤の *in vitro* の薬効評価を行ってきた。今回の研究班では、これらの *in vitro* 薬効評価法について、臨床応用を目的とした非臨床試験のスクリーニング系としての有用性を検討し、臨床薬理学的評価に用いる妥当性を検討することを目的とした。
2. 既に市販された抗リウマチ薬についても、さまざまな臨床使用上の問題点が指摘されている。まず、生物学的製剤であるインフリキシマブはわが国の治験で短期的な効果で承認されているが、1年間以上といった長期使用を評価した報告はないため、それを検証する臨床試験を計画した。また、世界的な標準薬であるメトトレキサートはわが国で既に承認されているが、以前より承認用量が海外の約半量であることが指摘されている。そのため、高用量の有効性と安全性を検証する臨床試験を計画した。

A. 研究目的：

関節リウマチの病態形成機序が解明されるにしたがって、新規作用機序によるさまざまな新薬が開発されつつある。しかし、それらには基礎的および臨床的な評価、すなわち臨床薬理学的評価が必要である。そこで、ヒト組織を利用した非臨床試験と2つの臨床試験を行うことにより、臨床薬理学的評価をし、抗リウマチ薬の臨床的エビデンスを明確にすることを今回の研究の目的とした。

B. 研究方法：

1. 新規抗リウマチ薬のヒト滑膜細胞を利用した薬効評価

分担研究者らは、東京工業大学の半田宏教授らとの共同研究により、ヒト関節滑膜細胞に対するアポトーシス誘導作用を指標に、TT101と命名したセレコキシブ類似の新規アポトーシス誘導薬を開発した。さらに、ヒト関節滑膜細胞の炎症性サイトカイン産生を指標として、新規抗リウマチ薬の薬効スクリーニングを行ってきた。今回の研究班では、これらの *in vitro* 薬効評価法について、臨床応用のための非臨床試験のスクリーニング系としての有用性を検討した。

関節リウマチ患者の関節手術に際し、患

者から得た関節組織を使用する。関節滑膜組織から、滑膜細胞および軟骨細胞を得た。細胞増殖の程度は、BrdUのDNA取り込み量を指標に検討した。また、アポトーシス誘導作用は、DNA断片化を指標に検討した。滑膜細胞は被験薬存在下CO₂インキュベーターにて培養し、断片化したDNA量をELISAにて測定し、さらに、TUNEL染色によりアポトーシスを確認した。また、各種サイトカイン・ケモカイン産生は各々のELISAキットにて測定した。それらを利用して、新規抗リウマチ薬のアポトーシス誘導作用や炎症性サイトカイン産生能を測定した。

（倫理面での配慮）

本研究計画は東邦大学医学部倫理委員会において承認を得た（No.16-002）。また、本研究の目的に関して十分な説明の後に、組織の研究利用に同意した患者の手術時に得られた関節組織から、検査などに使用する部分を除いた残余組織のみを研究に用いた。

2. 抗リウマチ剤の臨床薬理学的評価

1) インフリキシマブ長期使用時の安全性と有効性の検討

インフリキシマブは、わが国において1年以上の長期使用時の安全性を評価した臨床試験はない。このため、使用実態下調査

(オープン・プロスペクティブ試験)により、本剤を1年間投与した際の副作用発現状況(発現頻度、発現時期、種類、程度等)の把握を行うとともに有効性も調査し、安全性および有効性に影響を与える背景因子を解析する計画とした。

既存治療で効果不十分の関節リウマチ患者(目標200例)において、本剤3mg/kgを1回投与量とし、初回投与後2週および6週後に投与し、以降8週間隔で投与する。最終評価は54週時点とする。なお、本治療法はメトトレキサート併用を前提としているが、用量は特に規定せず、試験終了後に種々の条件を検討する。

(倫理面での配慮)

本研究は使用実態下調査であるため、一般診療におけるインフォームドコンセントの取得後に実施する。また、本研究計画については、各医療機関において定められた手続きに従う。

2) メトトレキサートの用量増加の臨床的有用性に関する検討

関節リウマチに対するメトトレキサートの週1回パルス療法は現在では世界の中心的な治療法であるが、わが国で承認された常用量は6mg/週であり、世界的な常用量の約半分量である。しかし、わが国にはそれを増量することに対する十分なエビデンスがないという理由で、現在のところ添付文書が改定される動きはない。そこで、今回の班研究では、メトトレキサートの6mg/週を超える用量の有効性と安全性を検討する臨床試験を、プラセボを対照とした二重盲検比較試験で計画する。

(倫理面での配慮)

本研究は適応用量拡大のための臨床試験であり、添付文書上の用法・用量外で、しかもプラセボを対照とした研究計画になる予定である。そのため、わが国のGCPおよびヘルシンキ宣言を遵守した計画を立案中である。

なお、1)の計画については製薬企業の協力、2)については製薬企業および厚生労働省・総合機構などの規制当局の協力を得ることにより、産・官・学が一体となって国民福祉に貢献する計画としたい。

C. 研究結果

1. 新規抗リウマチ薬のヒト滑膜細胞を利用した薬効評価

我々は、前述したように、東京工業大学の半田宏教授らとの共同研究により複数のセレコキシブの誘導体を作製した(特願2004-44561)。今回、新規アポトーシス誘導薬、TT101について詳細に検討した。(J Pharmacol Exp Ther 2005;314:796-803)。また、他の薬物についても、同じモデルまたはサイトカイン・ケモカイン産生能を指標にした検討を進めている。

2. 抗リウマチ剤の臨床薬理学的評価

1) インフリキシマブ長期使用時の安全性と有効性の検討

使用実態下調査による本研究を本年度より実施中であり、成果は来年度以降に解析する予定である。

2) メトトレキサートの用量増加の臨床的有用性に関する検討

本計画作成には、実施前に製薬企業および厚生労働省・総合機構などの規制当局との協議・調整が必要であり、現在それらを進めつつ臨床試験計画を作成中である。次年度中には実施に移したい。

D. 考察

分担研究者らは、選択的シクロオキシゲナーゼ(COX)-2阻害薬の1つであるセレコキシブは、滑膜細胞(*Arthritis Rheum* 2002;46:3159-3167)や大腸癌細胞(*FEBS Lett* 2002;531:278-284)に対して、特異的かつ強力にアポトーシスを誘導することを発見した。今回の研究で、ヒト滑膜細胞に対してセレコキシブよりも約10倍強力にアポトーシスを誘導する化合物、TT101の詳細な作用点を検討した。また、同時に、TT101が他の細胞系に対して作用するか否か、またサイトカイン・ケモカイン産生に及ぼす作用などの検討を進めている。

一方、抗リウマチ剤の臨床薬理学的評価に関する2件の臨床試験については、それぞれ進行中および計画中である。

E. 結論

ヒト滑膜細胞を用いて薬効評価を行う方法論を確立し、強力なアポトーシス誘導作

用を有する TT101 の作用点を検討した。また、既承認の抗リウマチ剤の臨床使用上の問題点を解決すべく臨床試験を計画し、一部実行している。

F. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 近藤啓文¹, 安倍 達², 橋本博史³, 村山隆司⁴, 川合眞一⁵

北里大学医学部内科¹, 埼玉医科大学総合医療センター², 順天堂大学医学部膠原病内科³, 城北病院⁴, 東邦大学大森病院膠原病科⁵

「関節リウマチにおける FK506 (タクロリムス) の有効性と安全性」第 49 回日本リウマチ学会総会学術集会/ワークショップ (W11-5), 2005 年 4 月 17-20 日, 横浜

- 2) 山本一彦¹, 川合眞一²

東京大学医学部アレルギーリウマチ内科¹, 東邦大学大森病院膠原病科²

「関節リウマチ・高齢患者における FK506 (タクロリムス) の有効性と安全性」第 49 回日本リウマチ学会総会学術集会/ワークショップ (W11-6), 2005 年 4 月 17-20 日, 横浜

- 3) 高木賢治¹, 川合眞一¹, 小笠原 孝²
東邦大学大森病院膠原病科¹, 都立大塚病院リウマチ膠原病科²

「特発性門脈圧亢進症を合併した混合性結合組織病の一例」第 49 回日本リウマチ学会総会学術集会/ポスター (PD3-k-066), 2005 年 4 月 17-20 日, 横浜

- 4) 村上洋介¹, 赤星 透², 遠藤平仁³, 近藤啓文³, 川合眞一⁴, 北里英郎¹

北里大学大学院医療系研究科環境微生物学¹, 北里大学医学部臨床検査診断学², 北里大学医学部内科学³, 東邦大学大森病院膠原病科⁴

「Prostaglandin E2 による Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 の発現制御」第 49 回日本リウマチ学会総会学術集会/ポスター

(PD5-s-114), 2005 年 4 月 17-20 日, 横浜

- 5) 川合眞一

東邦大学大森病院膠原病科

「選択的 COX-2 阻害薬の現状と将来」第 26 回日本炎症・再生医学会/教育講演(2), 2005 年 7 月 12-13 日, 東京

- 6) 井上幸恵¹, 林 智子¹, 千代田 健², 橋口正行¹, 角南由紀子², 田中孝典², 川合眞一³, 望月真弓¹

北里大学薬学部臨床薬学研究所センター医薬品情報分門¹, 医療法人相生会大崎クリニック², 東邦大学大森病院膠原病科³

「Methotrexate 作用点の各種関連酵素遺伝子の多形性に関する研究」第 26 回日本臨床薬理学会年会/ポスター(2P-065), 2005 年 12 月 1-3 日, 大分

- 7) 西尾信一郎, 楠 夏子, 秋元貴美子, 高木賢治, 川合眞一

東邦大学大森病院膠原病科

「低用量のインフリキシマブ投与により経過良好な関節リウマチ患者における薬物動態学的検討」第 26 回日本臨床薬理学会年会/ポスター (3P-039), 2005 年 12 月 1-3 日, 大分

- 8) 花田和彦¹, 山本なぎさ¹, 山中映里奈¹, 川合眞一², 緒方宏泰¹

明治薬科大学薬学部薬剤学¹, 東邦大学大森病院膠原病科²

「リウマチ膠原病疾患患者における α_1 酸性糖タンパク質の遺伝的多型の分布と濃度変動」第 26 回日本臨床薬理学会年会/ポスター (3P-039), 2005 年 12 月 1-3 日, 大分

- 9) 川合眞一

東邦大学大森病院膠原病科

シンポジウム: 分子標的療法の現状、問題点と将来像 「リウマチ膠原病疾患」第 26 回日本臨床薬理学会年会/シンポジウム (S11-3), 2005 年 12 月 1-3 日, 大分

2. 論文発表

- 1) Yamaguchi Y, Nagasawa T, Nakamura N, Takenaga M, Mizoguchi M, Kawai S, Mizushima Y, Igarashi R. Successful treatment of photo-damaged skin of nano-scale atRA particles using a novel transdermal delivery. *J Control Release*. 2005 May;104(1):29-40

- 2) Kojima F, Kato S, Kawai S. Prostaglandin E synthase in the pathophysiology of arthritis. *Fundam Clin Pharmacol* 2005 Jun;19(3):255-261

- 3) Kawai S, Kojima F, Kusunoki N. Recent advances in nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Allergol Int* 2005 Jun;54(2):209-215

- 4) Kino Y, Kojima F, Kiguchi K, Igarashi R, Ishizuka B, Kawai S. Prostaglandin E₂ production in ovarian cancer cell lines is regulated by cyclooxygenase-1, not cyclooxygenase-2. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005 Aug; 73(2):103-111
- 5) Kusunoki N, Ito T, Sakurai N, Suguro T, Handa H, Kawai S. A novel celecoxib derivative potently induces apoptosis of human synovial fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther* 2005 Aug; 314(2):796-803
- 6) Ichikawa Y, Saito T, Yamanaka H, Akizuki M, Kondo H, Kobayashi S, Oshima H, Kawai S, Hama N, Yamada H, Tsuneyo Mimori T, Amano K, Tanaka Y, Matsuoka Y, Yamamoto S, Matsubara T, Murata N, Asai T, Suzuki Y and MTX BUC Combination Study Group. Therapeutic effects of the combination of methotrexate and bucillamine in early rheumatoid arthritis: a multicenter, double-blind, randomized controlled study. *Mod Rheumatol* 2005 Oct; 15(10):323-328
- 7) Kohno S, Endo H, Hashimoto A, Hayashi I, Murakami Y, Kitasato H, Kojima F, Kawai S, Kondo H. Inhibition of skin sclerosis by 15deoxy Delta(12,14)-prostaglandin J(2) and retrovirally transfected prostaglandin D synthase in a mouse model of bleomycin-induced scleroderma. *Biomed Pharmacother* 2006 Jan; 60(1):18-25 [Epub 2005 Oct 25]
- 8) Murakami Y, Akahoshi T, Hayashi I, Endo H, Kawai S, Inoue M, Kondo H, Kitasato H. Induction of triggering receptor expressed on myeloid cells 1 in murine resident peritoneal macrophages by monosodium urate monohydrate crystals. *Arthritis Rheum* 2006 Feb; 54(2):455-462
- 9) Takenaga M, Yamaguchi Y, Ogawa Y, Kitagawa A, Kawai S, Mizushima Y, Igarashi R, Namae M, Komeda K. Administration of optimum sustained-Insulin release PLGA microcapsules to spontaneous diabetes-prone BB/WorTky rats. *Drug Deliv* 2006 Mar-Apr; 13(2):149-157
- 10) Kojima F, Kapoor M, Kawai S, Crofford LJ. New insights into eicosanoid biosynthetic pathways: implications for arthritis. *Expert Rev Clin Immunol* 2006 Mar; 2(2):277-291
- 11) Kawai S, Yamamoto K. Safety of tacrolimus, an immunosuppressive agent, in the treatment of rheumatoid arthritis in elderly patients. *Rheumatology (Oxford)* 2006 Apr; 45(4):441-444 [Epub 2005 Nov 1]
- 12) Kawai S, Sekino H, Yamashita N, Tsuchiwata S, Liu H, Korth-Bradley JM. The comparability of etanercept pharmacokinetics in healthy Japanese and American subjects. *J Clin Pharmacol* 2006 (in press)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
特になし
 2. 実用新案登録
特になし
 3. その他
特になし

軟骨の破壊修復制御バランス機構の解明と、破壊制御を目的とした滑膜局所療法

分担研究者 木村友厚 富山大学医学部整形外科 教授
研究協力者 杉森一仁、関 庄二、中村千恵子 富山大学医学部整形外科

研究要旨

関節リウマチなどによる関節破壊に対する治療は、新たな治療薬の導入とともに、疾患活動性の改善のみならず関節破壊の進行阻止まで実現可能な臨床目標となってきた。しかし荷重関節や大関節の破壊進行の十分な制御は未だ困難であり、さらに緩徐に進行性の軟骨破壊・変性の治療手段は皆無である。軟骨の破壊は、軟骨マトリックス代謝の catabolic phase と anabolic phase のバランス破綻にあるともいえる。このバランス破綻の詳細を明らかにすることが、軟骨破壊抑制の重要な鍵でもある。そこで、anabolic phase に抑制的に作用する分子の1つとして、まずマトリックス分子でもある CILP の関与を明らかにした。またこのようなマトリックス分子による catabolic phase と anabolic phase の制御には TGFβシグナルが関与しており、さらにそのシグナル伝達経路が smad シグナルに加え、他の non-smad 経路が重要である事を明らかにした。同時に non-smad シグナル伝達経路が、軟骨の分化とマトリックス産生、すなわち軟骨の修復を考える上でも、きわめて重要な pathway であることを解明した。

一方、滑膜細胞のエピジェネティクス制御による滑膜増殖抑制、さらにそれに続くマトリックス破壊制御を目指して、HDAC 阻害薬と超音波照射の併用による滑膜細胞制御を検討した。その結果、これらの併用により滑膜の細胞周期の変化と細胞活性の低下、ならびに細胞死が引き起こされることが明らかとなり、これを滑膜の局所制御療法として応用できる可能性を示した。

A. 研究目的

新たな治療薬の導入とともに、関節リウマチに対する治療は、疾患活動性の改善のみならず、寛解導入さらには関節破壊の進行阻止まで実現可能な臨床目標となってきた。しかし膝関節などの荷重関節の破壊進行の十分な制御は未だ困難であり、さらには変形性関節症に見られるような、緩徐に進行性の軟骨破壊・変性の治療手段は皆無である。したがって、このような関節軟骨破壊の予防とその制御手段の確立が必須である。

関節軟骨破壊の最も初期の過程は関節軟骨プロテオグリカンの分解消失である。これが放置されると、やがては軟骨コラーゲンの分解や破断が進行して軟骨破壊が非可逆的なものとなり、さらに関節破壊そのものが進行する。このようなプロテオグリカンやコラーゲンなどのマトリックスは、anabolic phase と catabolic phase の微妙

なバランスの上に立っているが、このバランスの詳細なメカニズムは不明であり、これを明らかにすることは、軟骨の初期破壊を防ぐ手段の開発の上で、非常に重要である。一方、catabolic phase を強力に抑制する実際的な手段の開発も、軟骨破壊を直接的に制御する上で重要である。

本研究の目的は、まず軟骨の anabolic/catabolic balance を fine tuning している分子を明らかにし、そのシグナル伝達経路を解明することにある。さらに別個の実験系として、関節軟骨破壊抑制のために、早期に実行可能な局所制御療法として、滑膜のエピジェネティクスを制御することにより軟骨に対する catabolic factor をコントロールし、関節軟骨の破壊阻止を目指そうとするものである。

B. 研究方法

1) 軟骨破壊変性の感受性遺伝子の探索研究の中で発見された cartilage intermediate layer protein (CILP) について、その機能的作用メカニズムを明らかにするために、髄核細胞を用いて CILP と増殖因子の結合の有無、それによる細胞内シグナル伝達の変化、さらに軟骨マトリックス遺伝子であるアグリカンや II 型コラーゲンの発現変化を検討した。これにはまず TGF β 添加により、アグリカンと II 型コラーゲン発現が増大することを確認した後に、この発現が CILP 遺伝子の導入発現により抑制されること、さらにこれがまず CILP と TGF β の結合により起こることを、コンペティターとして thrombospondin を用いた固相結合アッセイにより解析した。さらに TGF β および BMP シグナルが smad, Erk1/2, PI3K/Akt、を介してアグリカン発現を調節することを、軟骨細胞、髄核細胞、間葉系細胞において、siRNA またはそれぞれの阻害薬を用いて解析した。

2) 局所制御療法として、滑膜由来の catabolism を制御する有効な方法を検討するために、活動性 RA 患者より採取した培養ヒト RA 滑膜細胞 (RASf) を使用した。滑膜のエピジェネティクスを制御するために HDAC 阻害剤 (HDACi) として種々の濃度の trichostatin A (TSA) を RASf に添加した。TSA をより低濃度で安全に用いるために、TSA の滑膜細胞への取り込み促進を目指して、低強度超音波 (US) の併用効果を合わせて検討した。これには RASf に US (0, 0.1 または 0.2 W/cm²) を照射し、単独での温熱効果や細胞障害性を除外できる条件を検討した。続いて US 造影剤存在下で、TSA との US の両者併用による効果を、cell viability と flow cytometry による細胞周期を指標に解析した。また US 使用による遺伝子発現プロファイルの変化を解析した。

C. 研究結果

1) 最初に髄核細胞を用いた real-time PCR による検討で、TGF β によりアグリカン、II 型コラーゲン発現が顕著に増大することを確認した。一方 CILP 遺伝子の導入は、上記の発現を阻害し、CILP が細胞のマトリックス産生の anabolism を負に制御する分子であることが明らかになった。続いて CILP が TGF β シグナルに影響を及ぼすメカニズムを明らかにするために、CILP と TGF β の固相結合試験を行ったところ、CILP は TGF β と直接結合

することによりシグナル伝達を制御することが明らかとなった。さらに TGF β type I receptor kinase 阻害剤、smads に対する siRNA、PI3K 阻害剤、MEK1/2 阻害剤を用いた検討で、TGF β シグナルが smad に加えて、独立して PI3K、MEK1/2 経路を通じてアグリカン発現に関わることを解明した。

また未分化軟骨細胞や間葉系細胞からの軟骨分化過程における同様の解析においても、TGF β superfamily member である BMP2 シグナルが、type I, II receptor から smad を介する経路に加えて、PI3K/Akt から NF- κ B を介してアグリカン発現を促すこと。さらにこれらの経路に加えて、PI3K/Akt の活性化により IKK α の核内移行と核内蓄積が起これ、これにより軟骨の分化形質とマトリックス産生が誘導されることを始めて明らかにした。(CILP についての研究は理化学研究所、池川志郎先生との共同研究である)

2) 関節破壊の局所制御を目指すための滑膜細胞制御の in vitro 実験では、まず RASf への TSA 添加で、濃度依存性に RASf の cell viability は低下した。US 照射でも同様の効果を認めたが、TSA と US の併用で、有意に RASf の cell viability の低下を認めた。この結果は、全身・局所投与とともに、有効性ととも毒性が問題となりうる HDACi を、US 照射併用により細胞内取り込みを増加させ、より低濃度使用で効果発現が可能なことを示したものである。また flow cytometry による細胞周期の解析では、TSA と US の併用により、S 期細胞の減少と G2/M 期細胞の増加を認めた。

C. 結論

軟骨の破壊は、軟骨マトリックス代謝の catabolic phase と anabolic phase のバランス破綻によるが、この anabolic phase に抑制的に作用する分子の 1 つとして、マトリックス分子でもある CILP が関与することが明らかとなった。このようなマトリックス分子による catabolic phase と anabolic phase の制御には TGF β シグナルが関与しており、さらに smad シグナルに加えて、その他の non-smad シグナルの重要性が明らかとなった。同時にこれらの non-smad シグナルは、軟骨の分化とマトリックス産生、すなわち軟骨の修復を考える上でも重要な pathway であることが明らかとなった。

一方、HDACi と US 照射の併用により、in vitro

において滑膜細胞を制御できることを示した。現在、滑膜細胞制御の結果期待される MMP や ADAMTS などの軟骨マトリックス分解酵素発現パターンの変化も検索中である。これらをベースに in vivo の HDACI 関節内投与と関節外 US 照射により、局所の関節炎と関節破壊制御が可能となる可能性がある。さらに前記の各種シグナル伝達分子に対する siRNA の導入による制御の可能性が、今後の検討課題である。

D. 健康危惧情報

特になし

E. 研究発表

1. 学会発表

- ・杉森一仁、元村 拓、北島 勲、松井恒志、木村友厚：軟骨分化における BMP-2 と PI3K/Akt-NF- κ B シグナル活性化との関連：第 19 回日本軟骨代謝学会。はまぎんホール 3/3-4, 2006.
- ・関 庄二、川口善治、千葉一裕、三上靖夫、木澤秀樹、三尾 太、森 正樹、益田郁子、久保俊一、戸山芳昭、木村友厚、池川志郎：腰椎椎間板ヘルニアの発症メカニズムについて -CILP139T の TGF β 1 作用抑制を介する細胞外マトリックス発現制御の相違-：第 19 回日本軟骨代謝学会。はまぎんホール 3/3-4, 2006.
- ・Kimura T: Cell-based therapy for articular cartilage repair: 6th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium. Hawaii 12/2-6, 2005.
- ・Sugimori K, Motomura H, Matsui K, Kitajima I, Kimura T: BMP2 activates PI3K/Akt-NF- κ B signal transduction pathway in chondrogenesis. 52th Orthopaedic Research Society. Chicago, 3/19-22, 2006.
- ・Seki S, Kizawa H, Mori M, Mio F, Kawaguchi Y, Kimura T, Ikegawa S: Smad, Erk1/2 and PI3 kinase pathways regulate transforming growth factor- β -induced aggrecan gene expression in nucleus pulposus cells. 52th Orthopaedic Research Society. Chicago, 3/19-22, 2006.

2. 論文発表

- ・Seki S, Kawaguchi Y, Chiba K, Mikami Y, Kizawa H, Oya T, Mio F, Mori M, Miyamoto Y, Masuda I, Tsunoda T, Kamata M, Kubo T, Toyama Y, Kimura T, Nakamura Y, Ikegawa S. A functional SNP in CILP, encoding cartilage intermediate layer protein, is associated with susceptibility to lumbar disc disease. *Nature Genet* 37: 607-612, 2005.
- ・Aoki M, Kanamori M, Ohmori K, Takaishi M, Huh N, Nogami S, Kimura T. Expression of developmentally regulated endothelial cell locus 1 was induced by tumor-derived factors including VEGF. *Biochem Biophys Res Commun* 333: 990-995, 2005.
- ・Sugimori K, Matsui K, Motomura H, Tokoro T, Wang J, Higa S, Kimura T, Kitajima I. BMP-2 prevents apoptosis of the N1511 chondrocytic cell line through PI3K/Akt-mediated NF- κ B activation. *J Bone Mineral Metab* 23: 411-419, 2005.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

慢性関節リウマチの先端的治療に関する研究

分担研究者 植田弘師 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
分子薬理学分野教授

【研究要旨】

慢性疼痛は様々な疾患に付随されるものであるが、その痛みが著しく患者の QOL を損なうために、疼痛そのものを疾患として捉え、除去する必要がある。そこで、本研究では、線維筋痛症を含む中枢性疼痛の分子機構を基礎的解析から明らかにすることを目的としている。その結果、1) 末梢性神経因性疼痛原因分子であるリゾホスファチジン酸を疼痛伝達に関連のある視床内に投与することで、熱や機械刺激誘発性疼痛ならびに A 線維刺激誘発性反応の過敏現象が数日間において観察されることを見出した。2) 起炎物質であるリポポリサッカロイドの視床内投与によっては、そのような過敏現象は観察されず、むしろ、反応閾値の上昇、鈍麻状態になった。従って、リゾホスファチジン酸視床内投与モデルは、新たな中枢性疼痛の評価モデルとなりうると考えられた。また、この効果が炎症反応によるものではない可能性が示唆された。3) リゾホスファチジン酸の視床投与により、投与部位においてグリア細胞の活性化が観察された。このグリア細胞の活性化は末梢性神経因性疼痛時にも観察され神経因性疼痛との関与が注目されている現象であることから、中枢性疼痛のメカニズム解明の大きな手がかりとなりうるものと考えられる。

A. 研究目的

慢性疼痛は様々な疾患に付随されるものであるが、その痛みが著しく患者の QOL を損なうために、疼痛そのものを疾患として捉え、除去する必要がある。組織障害による炎症性疼痛や頭痛、腹痛などは多くが薬物療法により除痛されるのに対して、慢性疼痛あるいは難治性疼痛として挙げられる神経因性疼痛、慢性関節リウマチ、線維筋痛症などは作用機序の解明が完全でなく、有効な治療薬開発が見出されていない。なかでも、線維筋痛症は、病理組織学的異常や血液検査の異常所見を伴わないため、その原因が全く解明されていない。さらに、病態モデル動物が存在しないことから基礎的研究が追隨していないのが現状である。

そこで、新たな中枢性病態モデルを確立し、この作用機構を明らかにし、線維筋痛症に対する治療戦略を解明することを本研究の目的としている。また、病態時の痛みの評価法としては、これまでに熱や機械性の刺激が一般的に用いられてきた。これらの痛みはひとが感じる痛みとして評価するには適切であるが、同時に、様々な内在性発痛物質を産生・遊離する可能性があり、これらの分子群が各種知覚神経線維に反応する。従って、病態時の責任線維や責任分子を同定するという分子基盤

の解明には、これらの痛み刺激を評価法として用いることは適切とはいえない。そこで、各種知覚神経線維特異的の刺激誘発性反応評価法の確立も本研究の目的としている。

我々は、これまでに末梢性神経傷害誘発性の神経因性疼痛はリゾホスファチジン酸による脱髄に伴う痛み神経と触覚神経の脊髄後角付近での混線や、痛み関連分子の発現上昇に伴うことを報告している (Inoue et al., Nature Medicine, 10, 712-718, 2004)。一方、中枢性疼痛は痛みの伝達や制御に関わる領域の傷害によって誘発されるが、特に視床の傷害は痛みを誘発することが知られており、視床痛と呼ばれている。この視床部位は痛みの二次中継点であり、痛み神経と触覚神経が近接し、痛みの一次中継点である脊髄と類似した調節を担っていると考えられる。また、線維筋痛症が視床への電気刺激によって軽減されるとも言われている。これまでに、動物における定量的な全身性疼痛評価法を確立し、リゾホスファチジン酸の視床内投与による疼痛閾値変化が生じることを見出した。そこで、本年度はこのリゾホスファチジン酸の視床内投与誘発性過敏反応の分子メカニズムの解明を目指して、投与領域での可塑的変調を評価した。さらに、一般的な起炎物質の視床内投与による痛み変動についても評価し、リゾホ