

7: あなたに試料の解析結果を御伝えする場合もあり得ます

この研究では、4. で申していますように、個人試料の解析結果だけからでは、各人の治療などに有益な結果が出る可能性は極めて低いので、試料提供者に解析結果を開示することはありません。ただし、偶然に重大な病気との関係が見つかり、あなたやあなたの家族又は血縁者がその結果を知ることが有益であると判断され、当院の生命倫理委員会等も同様に考えた場合に限り、担当医師からあなたやあなたの家族又は血縁者に、その結果の説明を受けるかどうかについて問い合わせることがあります。

8: 研究結果から特許権などが生じたとき

患者さんからの試料解析の結果として特許権などが生じる可能性があります。その権利は、国または該当研究を行った研究者あるいは研究施設に属し、試料提供者には属しません。また、その特許権などにより経済的利益が生じる可能性があります。資料提供者にはこれについても権利がありません。

9: 研究結果の公表

多くの方々のご協力によって得られた試料の解析結果は、誰のものであるか分からないようにした上で、学会や学術雑誌、データベース上などで公に公表されることがあります。

10: 試料等の保存、使用及び破棄の方法

ご提供いただいた試料は、当院または独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センターにおいて厳重に保管し、本研究のために使用されます。しかし、もし、あなたが同意していただければ、将来の研究のための貴重な資源として研究終了後も保管させていただきます。この場合も、6の項で説明した方法により、誰の試料か分からないようにしたまま、試料を使い切るまで保管します。資料を破棄する場合は、匿名のまま密封容器に破棄するか又は焼却処分します。将来、試料を医学研究に用いる場合には、改めて研究計画書を提出し、当院の生命倫理委員会等の承認を受けます。

11: 試料等の提供は無償・無報酬

試料の解析研究は研究費によって行われますので、あなたが費用を負担することはありません。また、この研究への協力に対して、あなたへの報酬は支払われません。

12: 担当医師及び連絡先

施設研究者氏名：

連絡先：

個人試料解析研究 説明・同意書 1

病院長 殿

患者氏名 _____ 印

患者試料解析研究名：関節リウマチ・骨粗鬆症患者の重症化防止治療開発研究

説明内容：

- あなたの試料解析研究の目的と方法
- 予想される結果と危険性
- 試料提供に同意しない場合でも不利益を受けないこと
- 同意した後でも随時これを撤回できること
- 個人情報の保護のためにとられる措置
- 現状に応じた変更の可能性(医学上の立場)
- その他

提供を合意した試料：

手術時切除組織()・骨髓液(5 - 10m l)()・滑液(5 - 10m l)()・血液(5 - 10m l)()・尿(5 - 10m l)()

上記の患者試料解析研究について担当医師から説明を受け理解しましたので、その実施に同意します。

患者署名： _____

署名年月日： 平成 年 月 日

生年月日： 明・大・昭・平 年 月 日生 (才)

現住所：

親族署名： _____ (続柄 _____)

署名年月日： 平成 年 月 日

生年月日： 明・大・昭・平 年 月 日生 (才)

現住所：

私は、今回の患者試料解析研究について上記項目を説明し同意が得られたことを認めます。

担当医師署名： _____

署名年月日： 平成 年 月 日

個人試料解析研究 説明・同意書 2

病院長 殿

患者氏名 _____ 印

患者試料解析研究名：関節リウマチの薬物治療法再検に関する研究

説明内容：

- あなたの試料解析研究の目的と方法
- 予想される結果と危険性
- 試料提供に同意しない場合でも不利益を受けないこと
- 同意した後でも随時これを撤回できること
- 個人情報の保護のためにとられる措置
- 現状に応じた変更の可能性(医学上の立場)
- その他

解析研究を合意した試料：血液(5 - 10m l) ()・尿(5 - 10m l) ()

上記の患者試料解析研究について担当医師から説明を受け理解しましたので、その実施に同意します。

患者署名： _____

署名年月日： 平成 年 月 日

生年月日： 明・大・昭・平 年 月 日生 (才)

現住所：

親族署名： _____ (続柄 _____)

署名年月日： 平成 年 月 日

生年月日： 明・大・昭・平 年 月 日生 (才)

現住所：

私は、今回の患者試料解析研究について上記項目を説明し同意が得られたことを認めます。

担当医師署名： _____

署名年月日： 平成 年 月 日

同意書用注意事項

- 注1) A3版の両面印刷をし、書類を一体化すること。
- 注2) 本書は2部作成し、担当医師1部・患者さん1部を保有するものとする
こと。
- 注3) 書類がA3版の両面以上にわたる場合は割印で一体化すること。
- 注4) 全項目について記載すること。

独立行政法人国立病院機構相模原病院倫理委員会申請書

1: 課題名

関節リウマチ・骨粗鬆症患者の重症化防止治療開発研究

2: 代表者名

越智 隆弘 独立行政法人国立病院機構相模原病院 病院長

3: 共同研究者

分担研究者

吉川 秀樹	大阪大学大学院医学系研究科 教授
島岡 康則	行岡病院 副院長
西沢 良記	大阪市立大学大学院医学系研究科 教授
広畑 俊成	北里大学医学部膠原病・感染内科学教室 教授
宇月 美和	岩手以下大学病理第一講座 講師
山村 研一	熊本大学発生医学研究センター 教授
田中 栄	東京大学医学部附属病院整形外科・脊椎外科 講師
鈴木 隆二	相模原病院臨床研究センター診断治療研究室 室長
前田 和久	大阪大学内分泌代謝内科学教室 助手
前田 朋子	塩野義製薬株式会社医薬研究開発本部創薬研究所 主任研究員

4: 概要

1) 目的

本件研究では、関節リウマチ・骨粗鬆症の臨床疫学の実態調査に始まり、腸骨骨髄細胞を用いての関節リウマチの原因、病態解明及び変形性関節症などの対象疾患との比較検討の上で遺伝要素解析を含む組織破壊機序解明と、その結果に基づく根本的治療法開発を急ぐことである。

2) 対照及び方法

(1) 疫学的実態調査研究；加療中の関節リウマチ患者の骨量減少の実態調査。(2) 骨形成・吸収の分子生物学的研究；関節リウマチ患者に起きる骨粗鬆症の原因である骨形成・吸収の分子生物学的研究を行う。手術時採取の患者試料解析予定。(3) 骨髄病態研究；関節リウマチ患者の骨髄病態研究を行う。手術時切除の組織片、骨髄血、抹消血などを研究試料とする。(4) 関節リウマチの病因解明研究；関節リウマチの病因研究としてEBウイルスに的を絞った研究をする。手術時切除組織片、抹消血などの遺伝要素検索を含む解析研究を行う。(5) 骨・関節破壊発生の力学的機序の研究；バイオメカニク解析を進める。(6) 治療法開発の研究；根治療法として破骨細胞あるいは間葉系細胞を抑える新薬開発を進める。また骨粗鬆症に対する人工骨・使用研究を進める。この目的には手術時の組織片、骨髄血、抹消血などを研究試料とするとともに、本研究班で確保した検体、細胞、蛋白、遺伝要素を集約し、供給する必要がある。

3) 実施場所及び研究機関

(1) 疫学的実態調査研究；国立病院機構相模原病院、大阪市立大学第二内科、東京大学整形外科教室、大阪大学整形外科教室など。

(2) 骨形成・吸収の分子生物学的研究；国立病院機構相模原病院、東京大学整形外科、大阪大学整形外科教室、愛媛大学など。

(3) 骨髄病態研究；国立病院機構相模原病院、大阪大学整形外科学教室、大阪大学生命機能研究科、米国国立研究所（NIH）、塩野義製薬研究所など。この目的の試料確保は国立病院機構相模原病院、大

阪大学整形外科教室、行岡病院、協和会病院などである。

(4) 関節リウマチの病因解明の研究；国立病院機構相模原病院、北里大学医学部膠原病・感染内科学、日本大学、大阪大学微生物研究所など。

(5) 骨・関節破壊発生の力学的機序の研究；大阪大学整形外科など。

(6) 治療法開発の研究；塩野義製薬株式会社研究所で新薬開発を進める。また、大阪大学整形外科で人工骨・使用研究を進める。

4) 審査を希望する理由

疫学研究から出発するが、病因・病態・治療法開発研究の中で患者試料（手術時切除組織片、骨髓液、滑液、尿など）を研究対象にすること、また病因研究の中で遺伝要素をすすめるなどのため、研究内容の妥当性の承認を得ることが必要である。

5：倫理的配慮

1) 人権擁護

(1) 十分なインフォームドコンセント；関節リウマチ及び骨粗鬆症、変形性関節症などの対象疾患であることが臨床的に診断され、機能再建目的などで手術を受ける患者のうち、手術時切除標本、骨髓液、血液などの試料を採取し研究目的で用いることに関して、同意書で承諾が得られた症例から試料を得る。

(2) 症例の匿名登録；研究試料を得た時点で該当施設にて試料の名前を暗号化（連結可能匿名化）し、個人情報流出を防ぐ。その後、本研究総括事務局である国立病院機構相模原病院に匿名登録、保存した後に、適切な共同研究施設へ必要分のみ送られる。本研究では試料と提供者との対応付けは出来ない。

(3) 試料提供の自由；この研究への資料提供は自由で、提供に承諾しなくても不利益を受けないこと、試料提供に同意した場合でも随時これを撤回できること、その他のプライバシーや医療記録が守秘されることなどを明確に文書で示し了承を得ること。

(4) 研究結果発表；研究成績は共同研究者全員のものとし、本研究に参加した研究者の合意のもとに公表するが、全ての研究課題において患者さん個人を特定するような発表は行わない。

2) 個人への利益・不利益

この研究では、多くの方々のご協力を得て関節リウマチなどの病的組織、骨髓液、血液などを総合的に調べるもので、患者さん個人試料の解析結果から有益な結果が得られる可能性は低く、患者さん自身には利益は無い。また、試料は手術時に摘出・採取されたものをを用いるか、通常の処置時に採取される髄液・血液・尿を使用するため、危険性及び不利益は無い。

3) 医学的貢献度

本研究は関節リウマチ病態、特に加齢により顕著な骨粗鬆症に陥った患者病態、原因を解明し根治療法に役立てるもので、医学上・医療上貢献度は大きい。

4) 同意を求める方法

研究内容に関して、その概要、意義、必要性、利益及び不利益を十分に説明した上で、同意を得る。特に遺伝子関連研究においては、厳格に文書で説明を行い、署名でもって同意を求める。

6：その他の参照事項

本研究は平成2年以來の厚生科学研究、平成8年以來の医薬品機構研究の結果に基づき、続けられる企画の研究である。

Ⅱ. 平成18年度 分担研究報告書

A) RA・骨粗鬆症の臨床的研究

- 1) RA重症化の早期診断マーカー開発研究
- 2) 薬物治療法確立研究
- 3) 人工骨開発適用研究

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

関節リウマチの重症度(病型)予後診断法としてのC1q値に関する研究

分担研究者：島岡 康則
行岡医学研究会 行岡病院 副院長

関節リウマチの重症度、とくに骨破壊の指標を得ることは重要である。以前より、C1q値と関節破壊の重症度に関連がある（越智ら）ことは指摘されていたが、測定のための抗体がポリクローナル抗体であったり、モノクローナル抗体であっても認識部位、また測定方法の不安定などの理由により、良い結果が再現されなかった。

今回、新たにハイブリドームを作成し、10種類のモノクローナル抗体と2種のポリクローナル抗体を得た。それぞれの抗体により抗体固相を調整し、C1q検出・定量する新たなサンドイッチ法を開発した。まず、これら12種類の抗体を、関節リウマチ（以下RAと略す）35検体によりスクリーニングし、安定した値を示し、しかも他の臨床検査地に影響されない4種の抗体を選び出した。さらに、この4種の抗体を使って、RA患者血清135検体を解析した。いずれの抗体についても、RA軽症型病型と、RA重症型病型で有意に異なる値を示すことがわかった。

A. 研究目的

関節リウマチの重症度、とくに骨破壊の指標を得るために、新たに抗C1q抗体を作成し、安定した測定系を開発することを目的とした。

さらにRA重症度判定の有効性を検証し、予後判定、治療への応用を検討した。

B. 研究方法

抗C1q抗体を産生するハイブリドームを新たに作成し、10種類のモノクローナル抗体と2種のポリクローナル抗体を得た。それぞれの抗体により抗体固相を調整し、共通の酵素標識抗体にて検出・定量するサンドイッチ法を開発した。

まず、これら12種類の抗体を、関節リウマチ（以下RAと略す）35検体によりスクリーニングし、安定した値を示し、しかも他の臨床検査地に影響されない4種の抗体を選び出した。

さらに、新たなRA患者血清135検体を、骨高度破壊を示す重症病型（多関節破壊

破壊型病型：MES、および、ムチランス型病型：MUD）と骨破壊のほとんど認めない軽症型病型（少関節破壊型病型：LES）とに分類し、この4種の抗体がRA骨破壊の重症度を、判定する指標となるかを検証した。

（倫理面への配慮）

患者に文書で同意を得るとともに、各検体は無記名にて番号のみで管理し、コンピューター上でのみ、臨床データと照合できるように配慮した。

C. 研究結果

新たな抗体によるC1q値は、RFとの相関係数は0.28-0.30であったが、CRP、MMP-3、赤沈との相関はいずれも0.07以下で、まったく相関を示さないと考えられた。

軽症型病型36検体で、平均年齢55.1歳、検査値平均はRF 58.9±76.4, CRP 0.8±1.4, MMP-3 72.7±54.9, 赤沈 34.6±25.5 であった。重症型病型は85検体で、平均年齢59.7歳、検査値平均はRF 88.9±100.4, CRP 1.3±1.3, MMP-3 172.4±130.1, 赤沈55.6±30.8 であった。

今回作成した抗体によるC1q値は、軽症型病型では各抗体とも平均102-105±22であった。重症型病型では平均118-122±24であった。これら抗体がRAの重症度分類の指標になるかを検討するために、統計学的検定を行うと、抗体No.33 ($p=0.0028$)、No.40 ($p=0.0001$)、No.54 ($p=0.0006$)、No.76 ($p=0.0005$)と、いずれの抗体についても、軽症型病型と、重症型病型で有意に異なる値を示した。

通常用いられる臨床検査地についても同様の有意差検定を行ったが、RF ($p=0.25$)、CRP ($p=0.10$)、MMP-3 ($p=0.04$)、赤沈 ($p=0.03$)であり、いずれも重症度を判定するに有意ではなかった。

	C1q				RF	CRP	MMP-3	KL-6
	No.33	No.40	No.54	No.76				
LES	104 ± 22 (35 - 157)	102 ± 21 (59 - 169)	102 ± 22 (42 - 185)	105 ± 21 (42 - 173)	59 ± 76 (0 - 344)	0.8 ± 1.4 (0.0 - 6.6)	72 ± 54 (13 - 173)	250 ± 46 (208 - 300)
MES	118 ± 19	120 ± 22	119 ± 27	122 ± 26	82 ± 100	1.3 ± 1.3	172 ± 150	300 ± 16
MUD	(82 - 208)	(79 - 233)	(80 - 274)	(80 - 252)	(0 - 476)	(0.1 - 5.5)	(35 - 491)	(205 - 700)
P =	0.00275	0.00009	0.00060	0.00055	0.1049	0.0978	0.0365	0.147

D. 考察

越智らによるRA病型分類は、RAの骨破壊の重症度をもとにした分類であり、本研究でのC1q値もRA骨破壊の重症度の指標となると考える。

今回、新たに開発された抗C1q抗体、測定法は、これまで临床上使われてきた検査 (CRP, MMP-3, RF, 赤沈など) に比較して、格段にRA重症度判定に有効であった。

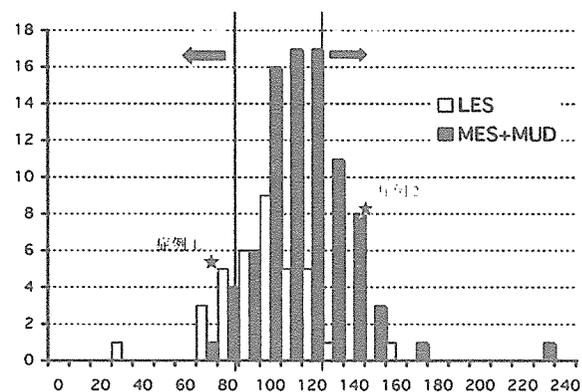
投薬内容や、変動する臨床検査値(CRPなどに左右されない、RA重症度の指標が確立されることは、患者の予後判定をする上で非常に重要な知見であると考ええる。

現在、RA患者の破壊関節部位や広がり、破壊関節数と、本研究で作成された測定法でのC1q値との関係の検討を進めている。また、認識エピトープの解析を進めており、RA重症化のメカニズムについて解明することができればRA重症化予防にもつながると考える。

E. 結論

今回新たに作成された抗C1q抗体及び測定法は、臨床検査上、最も有意にRA重症度を判定する指標であった。

<病型別C1q値の度数分布>



F. 健康危険情報

(総括研究報告書に記載とする。)

G. 研究発表

1. 論文発表

1)

Nakamura N, Shimaoka Y, Tougan T, Onda H, Okuzaki D, Zhao H, Fujimori A, Yabuta N, Nagamori I, Tanigawa A, Sato J, Oda T, Hayashida K, Suzuki R, Yukioka M, Nojima H, Ochi T.

Isolation and expression profiling of genes upregulated in bone marrow-derived mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients. DNA Res. 2006 Aug 31;13(4):169-83.

2)

Toyosaki-Maeda T, Takano H, Tomita T, Tsuruta Y, Maeda-Tanimura M, Shimaoka Y, Takahashi T, Itoh T, Suzuki R, Ochi T.

Differentiation of monocytes into multinucleated giant bone-resorbing cells: two-step differentiation induced by nurse-like cells and cytokines.

Arthritis Res. 2001;3(5):306-10.

- 3)
Hayashida K, Shimaoka Y, Ochi T, Lipsky PE.
Rheumatoid arthritis synovial stromal cells inhibit apoptosis and up-regulate Bcl-xL expression by B cells in a CD49/CD29-CD106-dependent mechanism.
J Immunol. 2000 Jan 15;164(2):1110-6.
- 4)
Shimaoka Y, Attrep JF, Hirano T, Ishihara K, Suzuki R, Toyosaki T, Ochi T, Lipsky PE.
Nurse-like cells from bone marrow and synovium of patients with rheumatoid arthritis promote survival and enhance function of human B cells.
J Clin Invest. 1998 Aug 1;102(3):606-18.
- 5)
Miyashita T, McIlraith MJ, Grammer AC, Miura Y, Attrep JF, Shimaoka Y, Lipsky PE.
Bidirectional regulation of human B cell responses by CD40-CD40 ligand interactions.
J Immunol. 1997 May 15;158(10):4620-33.
- 6)
Imanaka T, Shichikawa K, Inoue K, Shimaoka Y, Takenaka Y, Wakitani S.
Increase in age at onset of rheumatoid arthritis in Japan over a 30 year period.
Ann Rheum Dis. 1997 May;56(5):313-6.
- 7)
Tomita T, Shimaoka Y, Kashiwagi N, Hashimoto H, Kawamura S, Lee SB, Nakagawa S, Shiho O, Hayashida K, Ochi T.
Enhanced expression of CD14 antigen on myeloid lineage cells derived from the bone marrow of patients with severe rheumatoid arthritis.
J Rheumatol. 1997 Mar;24(3):465-9.
- 8)
Tomita T, Kashiwagi N, Shimaoka Y, Ikawa T, Tanabe M, Nakagawa S, Kawamura S, Denno K, Owaki H, Ochi T.
Phenotypic characteristics of bone marrow cells in patients with rheumatoid arthritis.
J Rheumatol. 1994 Sep;21(9):1608-14.
- 9)
Tanabe M, Ochi T, Tomita T, Suzuki R, Sakata T, Shimaoka Y, Nakagawa S, Ono K.
Remarkable elevation of interleukin 6 and interleukin 8 levels in the bone marrow serum of patients with rheumatoid arthritis.
J Rheumatol. 1994 May;21(5):830-5.
- 10)
Ochi T, Tomita T, Kimura T, Azuma F, Owaki H, Wakitani S, Shimaoka Y, Ono H.
A concept to make schedules of therapies based on the natural courses of patients with rheumatoid arthritis
Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi.1994 Jan;68(1):50-61.
- 11)
Owaki H, Yukawa K, Ochi T, Shimaoka Y, Ono K.
Facs analysis of myeloid differentiation stages in epiphyseal bone marrow, adjacent to joints affected with rheumatoid arthritis.
Scand J Rheumatol. 1991;20(2):91-7.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
主任研究者の指示のもとに検討中である。
 2. 実用新案登録
主任研究者の指示のもとに検討中である。

関節リウマチにおける骨粗鬆症に関する研究

分担研究者 西沢良記 所属機関名・職名 大阪市立大学大学院医学研究科・教授

研究要旨

関節リウマチ(RA)による続発性骨粗鬆症は全身性と疾患特異的な傍関節性骨粗鬆症に分類される。前者は脆弱性骨折の発症に関与し RA 患者の機能予後と身体活動性低下に伴う生命予後の悪化に関与するため、その治療法の確立が重要である。今回、既存の骨粗鬆症治療薬であるビスホスホン酸についてその新規骨折発症抑制効果を骨粗鬆症合併 RA 患者 400 例について 36 ヶ月にわたって前向きに検討した。また、傍関節骨粗鬆症について橈骨遠位端海綿骨骨密度と動脈壁硬化度(stiffening)との関係を検討した。第二、第三世代のビスホスホン酸であるアレンドロネート、リセドロネートの投与により骨代謝回転の正常化、腰椎骨密度の増加をみとめ、新規椎体骨折発症率は 2 人/100 人・年以下に減少した。これはビスホスホン酸非投与群に比べ各々 89%、88%の抑制効果であり、有用性が確認された。また RA 罹患と疾患特異的な傍関節性骨粗鬆症が動脈壁硬化(stiffening)の進行に関与していることが明らかになった。

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)は続発性骨粗鬆症の主たる原因疾患の一つである。発症部位により全身性と傍関節性に大別され後者は疾患特有のものとされており、発現時期、発症機序は異なる。すなわち、傍関節性骨粗鬆症は関節炎症に主に起因し、早期に発症すること、全身性骨粗鬆症は疾患活動性に加えて身体活動性の低下が関与を示す点などである。これまで RA 患者の 53.3%に全身性骨粗鬆症が見られ、19.3%に椎体骨折が認められること、何れの年齢層においても骨粗鬆症の有病率は一般人口に比べきわめて高いこと、疾患の進行に伴い重症化することを報告した。また昨年度は、閉経後女性 RA 患者においてビスホスホネートの BMD 上昇効果は腰椎でより顕著で、その効果と動脈硬化の改善効果は関連したことから、RA 患者での全身性骨粗鬆症抑制が、RA 患者での動脈硬化の予防につながる可能性を報告した。今回は RA 患者に対して各世代のビスホスホネート製剤の骨量増加効果および新規骨折予防効果について検証を試みた。また、RA の予後に影響すると考えられている動脈硬化症と疾患特異的な傍関節骨粗鬆症との関係に関して血管壁硬化度に

ついて検証した。

B. 研究方法

(1)ビスホスホネート製剤や HRT による治療歴のない RA 患者においてグルココルチコイド (GC) 治療歴のある例では T 値-1.0 未満、GC 治療歴のない例では T 値-1.5 未満、もしくは脆弱性骨折の既往のある例、400 例を対象として A 群アレンドロネート 5mg/日+ 活性型ビタミン D3 (アルファカルシドール) 0.5 μ g+カルシウム 800mg (77 例)、R 群 リセドロネート 2.5mg/日+アルファカルシドール 0.5 μ g+カルシウム 800mg (80 例)、E4 群エチドロネート 400mg/日×2 週 (10~12 週間歇投与)+アルファカルシドール 0.5 μ g+カルシウム 800mg (77 例)、E2 群 Etidronate 200mg/日×2 週 (10~12 週間歇投与)+アルファカルシドール 0.5 μ g+カルシウム 800mg (72 例)D 群アルファカルシドール 0.5 μ g +カルシウム 800mg (94 例) 5 群に無作為に割り付けて骨粗鬆症治療薬介入の効果を 36 ヶ月間にわたり前向きに観察・比較検討した。薬剤開始時、6 ヶ月後と以降 12 ヶ月ごとに DXA 法による腰椎・大腿骨骨密度測定、CXD 法により第二中手骨骨密度測定および胸腰椎単純 X 線写真による椎体骨折判定を

行った。さらに薬剤開始時、3ヵ月後、6ヵ月後、12ヵ月後、以降12ヶ月ごとに骨代謝マーカー（血清BAP、尿中NTx）を測定した。新規椎体骨折発生率について100人・年あたりの発生数を検討した。

(2) 高血圧、高脂血症など動脈硬化に影響を及ぼす疾患を有さない閉経後の47例の女性RA患者と54例の健常者において検討した。動脈壁硬化度の指標としてpulse wave velocity (PWV)をColin社製BP-203 RPEにより定量した。傍関節性骨粗鬆症の指標として、遠位4%部をStratec peripheral quantitative computed tomography (pQCT)を皮質骨部と海綿骨部とに分けて定量した。さらに、全身性骨粗鬆症の指標として踵骨osteo-sono index (OSI)をAOS-100にて定量した。さらに疾患活動性の指標としてCRP、ESR、血小板、RFを、骨代謝マーカーとして尿中NTxを測定し各々の相関につき検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は大阪市立大学附属病院の倫理委員会に諮問し承認を受けた。本研究についての目的、意義、方法、予測される有用性または危険性について文書および口頭で十分な説明を行い、自由意志により参加に同意した者を被験者とした。同意は文書により得た。実施責任者および分担者は被験者情報を責任を持って管理し、ハッキングに対処しネットワークとは独立したコンピューターにて情報管理し、また、他機関や他人よりいかなる要請があっても、倫理委員会の許可なく被験者の個人情報公開せず、その取り扱いには細心の注意を払った。患者に実施事項（本研究の意義、目的、方法、患者が被り得る不利益および危険性）についての説明文書を作成し、実施責任者あるいは分担者が文書と口頭にて十分に説明をした後、その内容を理解してもらった上で同意書への記載を依頼した。以上より、倫理面の問題は無いと判断した。

C. 研究結果

(1) 5群間の患者背景因子（年齢、性、閉経、BMI、Stage、Class、疾患活動性、開始時のBAP・NTx、胸椎・大腿骨骨密度、既存骨折の有無、GC投与量）に有意差は

なかった。A群、R群において腰椎骨密度はD群に比べて有意に増加し、大腿骨骨密度はA群において有意に増加した。第2中手骨密度には有意な変化は認められなかった。BAP、NTxは著明に低下した。薬剤による新規椎体骨折の抑制は6ヶ月以降顕著に認められた。新規骨折の発症率（人/100人・年）はA群1.8、R群1.9、E4群7.3、E2群8.7、D群16.8であった。

(2) RA患者でのfemoral-ankle (fa)PWVとbrachial-ankle (ba)PWVは1124 (range 880-1429) cm/sec、1539 (range 946-2501) cm/secで、健常者の982 (range 739-1442) cm/sec、1322 (range 1031-2212) cm/secに比し、有意な上昇が認められた。RA患者群と対照群において血圧、年齢、喫煙の有無で補正した多変量解析ではRA罹患は独立した動脈壁効果(stiffening)の危険因子であった。RA患者群において橈骨遠位端の海綿骨部の骨密度はfaPWV、baPWVと有意な負の相関を認めた。橈骨遠位端の海綿骨の骨密度はRA患者で健常者に比べて有意な低下を認め、多変量解析で橈骨海綿骨骨密度の低下がRA患者の動脈壁硬化進展の独立した危険因子であった。

D. 考察

RA患者におけるビスホスホン酸の骨折抑制効果は活性型ビタミンD、カルシウムのみとの投与に比較して顕著に見られた。特にアレンドロネート投与群、リセドロネート投与群においては新規骨折発症率がそれぞれ89%、88%に抑制された。エチドロネート投与群では約50%の抑制にとどまった。これらは骨密度増加、骨代謝マーカー改善においても同様の結果であった。これらのことから、骨密度の低下の顕著なRA患者においては第二、第三世代のビスホスホン酸製剤を用いた積極的な骨粗鬆症の治療が患者の機能予後、さらに生命予後の改善につながると考えられた。また、骨代謝回転の亢進が見られる症例ではより早期の治療開始の必要性が示唆されたため、今後、治療開始のタイミングの検討が必要であることが示唆された。

RAでの動脈硬化病変の進行について動脈壁硬化度(stiffening)においてもRA罹患が危険因子であり疾患特異的な橈骨遠位端海綿骨の傍関節性骨粗鬆症の進展が関与することが明らかとなった。関節破壊につ

ながる傍関節性骨粗鬆症の進行抑制に注目した治療が RA 患者の生命予後の改善に寄与する可能性が示唆された。

E. 結論

RA 患者での全身性骨粗鬆症において第二世代、第三世代ビスホスホン酸による腰椎新規骨折の発症抑制効果が明らかとなった。また疾患特異的な傍関節性骨粗鬆症が動脈壁硬化(stiffening)の進行に関与していることが明らかになった。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

山田真介, 稲葉雅章, 後藤仁志, 田中一匡, 酒井真礼, 白川久美, 今西康雄, 西沢良記. アレンドロネート投与後の骨量改善に伴う動脈硬化進展に及ぼす影響について. *Osteoporosis Japan* 14, 39-41, 2006

田中一匡, 稲葉雅章, 櫻井真由美, 山田真介, 酒井真礼, 後藤仁志, 西沢良記. 関節リウマチ患者では傍関節性骨粗鬆症の進展が末梢の動脈硬化進展に関与する. *Osteoporosis Japan*, 14, 291-293, 2006

Yamada, S., Inaba, M., Goto, H., Nagata, M., Kumeda Y., Imanishi Y., Emoto, M., Ishimura E., Nishizawa, Y. Associations between physical activity, peripheral atherosclerosis and one status in healthy Japanese women. *Atherosclerosis*, 188, pp196-202, 2006.

Tanaka, K. Inaba, M. Goto, H. Nagata-Sakurai, M. Sakai, S. Yamada, S. Ueda, M. Ishimura, E. Nishizawa, Y. Paraarticular trabecular bone loss at the ultradistal radius and increased arterial stiffening in postmenopausal patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 33, 652-8, 2006

2. 学会発表

骨粗鬆症・骨代謝 関節リウマチ患者に

おける骨粗鬆症治療薬投与後の骨量改善に伴う動脈硬化の進展に及ぼす影響について
第 50 回日本リウマチ学会総会・学術集会
2006 年 4 月 23-26 日 長崎市

関節リウマチの臨床 関節リウマチ患者の動脈硬化進展における内臓脂肪増加の関与に関する検討

第 50 回日本リウマチ学会総会・学術集会
2006 年 4 月 23-26 日 長崎市

関節リウマチ(RA)患者の動脈硬化進展における内臓脂肪増加の関与に関する検討

第 79 回日本内分泌学会学術総会
2006 年 5 月 19-21 日 神戸市

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
該当無し
2. 実用新案登録
該当無し
3. その他
特記事項無し

関節リウマチにおける骨粗鬆化の病態解明と重症化防止治療法の開発

分担研究者 吉川 秀樹

所属機関名・職名 大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学（整形外科）・教授

研究要旨

関節リウマチの骨粗鬆化に深く関与する Nurse 細胞の起源や局在を明らかにし、その病態解析を行った。ヒト RA 滑膜中に存在する RA-Nurse 細胞は、RA 病態特異的な液性因子を産生分泌し、関節炎の発症、増悪に関与していることが示された。RA 患者の関節近傍嚢胞性骨病変に対して、人工骨移植術を施行し、臨床的有用性を示した。関節リウマチの重症化を予測し、正確な予後診断を可能とするため、血中 C1q 値の新規定量システムの開発に成功した。

A. 研究目的

関節リウマチ（RA）では、関節滑膜や骨髄中に存在する間質系細胞（Nurse 細胞）が骨破壊病態に強く関与していることが示されている。本研究では、ヒト滑膜組織やヒト骨髄組織における、Nurse 細胞の起源、局在、機能を明らかにし、その病態解明を行う。また、連通多孔体人工骨を用い、RA 患者の脆弱化した骨の再生と骨粗鬆症の重症化防止を試みる。さらに、関節リウマチの重症化を予測し正確な予後診断を可能とするため、血中 C1q 値の新規定量システムの開発を試みる。

B. 方法

1) Nurse 細胞の起源の可能性として、まず組織球を候補と考え、そのマーカーである CD68（KP1 或いは PGM1）抗体などの関連モノクロー抗体を用いて、ヒト関節滑膜、骨髄に対し免疫組織染色を行った。さらに関節リウマチの重症化予測因子としての C1q と Nurse 細胞の関連を検討するため免疫組織染色を行った。

2) RA-Nurse細胞、OA培養細胞、外傷患者培養細胞とB細胞をそれぞれ2日間共培養し、培養上清（3群；RA-sup、OA-sup、外傷-sup）をRA-Nurse細胞、OA培養細胞、外傷培養細胞それぞれに添加した。2日間の

培養後に各細胞よりRNA抽出cDNA合成し、リアルタイムPCRアレイを用いて発現遺伝子の解析を行った。

3) 関節近傍嚢胞性骨病変を有するリウマチ患者12例に対し、病巣搔爬と人工骨充填を行った。

4) 血中 C1q 値の高感度測定系の開発のため、新規モノクロー抗体の作製を行った。

C. 結果

1) RA患者の滑膜新生血管周囲の紡錘形細胞群の一部にCD68陽性細胞の存在を認めた。骨髄では、CD68陽性

細胞が、洞血管内皮近傍に存在することが示された。C1qの発現は、滑膜細胞全体に弱陽性、多くの組織球に陽性であった。

2) RA-Nurse細胞では、RA-sup添加によってのみIL-1、MMPs、CD44、SMAD4などの遺伝子発現の上昇がみられた。OA培養細胞、外傷培養細胞では、RA-sup添加にてもこれらの遺伝子の発現は認められなかった。

3) 12例中11例で、術後3-6ヶ月で良好な骨再生を認め人工骨の有用性が示された。

4) モノクローナル抗体を用いて血中C1q値を測定した結果、患者血清で測定可能であること、測定値とRA重症度との相関を認めた。

D. 考察

滑膜内の新生血管周辺にはCD68陽性細胞が存在し、骨髄由来細胞である可能性が示唆

された。また滑膜組織でのC1q発現細胞を確認した。RA培養上清のみがRA-Nurse細胞で特異的に、CD44、IL-1 \cdot 、MMPs、SMAD4などの炎症関連遺伝子を誘導することから、RA-Nurse細胞とB細胞との共培養によりRA特異的な液性因子が培養上清中に存在することが示唆された。さらに、これらRA特異的な液性因子に対して、RA-Nurse細胞のみが反応しうしくみを持っていることが示されたことから、RA Nurse細胞は、autocrineまたはparacrineにより、これら液性因子を介して、RAの関節破壊に機能的に関与していることが考えられた。RA病変への人工骨移植は、病巣の除去と骨再生の両面の効果があり臨床経過は良好であり、関節リウマチ・重症化の予防に有用な骨再生治療となる可能性が示された。

E. 結論

RA滑膜、骨髄に存在するRA-Nurse細胞は、RA病態特異的な液性因子を産生分泌し、関節炎の発症、増悪に関与していることが示された。RA患者の関節近傍嚢胞性骨病変に対する人工骨移植術は臨床的に有用であり、関節リウマチ・骨粗鬆症の重症化防止の新規治療法として期待できる。モノクローナル抗体を用いたC1q値の測定は、RA重症化の予測に有用である。

(倫理面への配慮)

患者本人への組織学的検討の意義と有用性について十分なインフォームドコンセントを得ている。人工骨移植による骨移植は、厚生労働省の認可を受けており、保険診療として行っており、倫理的問題はないと考える。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 妻木範行、村井純子、岩井貴男、岡本美奈、吉川秀樹：BMPシグナルと骨形成・骨吸収、*The Bone*, 20: 343-348, 2006.
2. 名井陽、玉井宣行、荒木信人、藤井

昌一、富田哲也、古野雅彦、吉川秀樹：連通気孔構造を有するハイドロキシアパタイト人工骨の臨床応用、物理学的特性・臨床的特徴・問題点、*H整会誌*, 80:262-269, 2006.

3. 坪井秀規、吉川秀樹：関節リウマチにみられる骨粗鬆症の臨床病態、*Rheumatology*, 13: 22-25, 2006.

4. 向井克容、細野昇、坂浦博伸、藤原桂樹、富士武史、吉川秀樹：関節リウマチ中下位頸椎病変に対する椎弓形成術、*別冊整形外科*, 50:108-112, 2006.

5. Ando, W., Hashimoto, J., Nampei, A., Tsuboi, H., Tateishi, K., Ono, T., Nakamura, N., Ochi, T., Yoshikawa, H.: Imatinib mesylate inhibits osteoclastogenesis and joint destruction in rats with collagen-induced arthritis (CIA). *J Bone Miner Metabol*, 24:274-282, 2006.

6. Hirao, M., Tamai, N., Tsumaki, N., Yoshikawa, H., Myoui, A.: Oxygen tension regulates chondrocyte differentiation and function during endochondral ossification. *J Biol Chem*, 281:31079-3192, 2006.

7. Hirohata, S., Miura, Y., Tomita, T., Yoshikawa, H., Ochi, T., Chiorazzi, N.: Enhanced expression of mRNA for nuclear factor κ B1(p50) in CD34+ cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. *Arthr Res Ther*, 8:R54, 2006.

8. Kaito, T., Mukai, Y., Nishikawa, M., Ando, W., Yoshikawa, H., Myoui, A.: Dual hydroxyapatite composite with porous and solid parts: Experimental study using canine lumbar interbody fusion model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 78:378-84, 2006

9. Kawane, K., Ohtani, M., Miwa, K., Kizawa, T., Kanbara, Y., Yoshioka, Y., Yoshikawa, H., Nagata, S.: Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature*, 443:998-1002, 2006.

10. Kunugiza, Y., Tomita, T., Tomita, N., Morishita, R., Yoshikawa, H.: Inhibitory effect of ribbon-type NF κ B decoy oligodeoxynucleotides on osteoclast induction and activity in vitro and in vivo. *Arthr Res Ther* 8:R103, 2006.

11. Matsubara, T., Myoui, A., Ikeda, F., Yoshikawa, H., Yoneda, T.: Critical role of cortactin in actin ring formation and osteoclastic bone resorption. *J Bone Miner Metabol*, 24:368-372, 2006.
12. Nakase, T., Yoshikawa, H.: Potential roles of bone morphogenetic proteins (BMPs) in skeletal repair and regeneration. *J Bone Miner Metabol*, 24:425-433, 2006.
13. Okamoto, M., Murai, J., Yoshikawa, H., Tsumaki, N.: Bone morphogenetic proteins in bone stimulate osteoclasts and osteoblasts during bone development. *J Bone Miner Res*, 21:1022-33, 2006.
14. Sakaura, H., Hosono, N., Mukai, Y., Fujii, R., Yoshikawa, H.: Paraparesis due to exacerbation of preexisting spinal pseudoarthrosis following infliximab therapy for advanced ankylosing spondylitis. *Spine J*, 6:325-329, 2006.
15. Shi, K., Hayashida, K., Hashimoto, J., Sugamoto, K., Kawai, H., Yoshikawa, H.: Hydroxyapatite augmentation for bone atrophy in total ankle replacement in rheumatoid arthritis. *J Foot Ankle Surg*, 45:316-321, 2006.
16. Tomita, T., Kunugiza, Y., Tomita, N., Takano, H., Morishita, R., Kaneda, Y., Yoshikawa, H.: E2F decoy oligodeoxynucleotide ameliorates cartilage invasion by infiltrating synovium derived from rheumatoid arthritis. *Int J Molecul Med*, 18:257-265, 2006.

2. 学会発表

1. 第16回 Sapporo Orthopaedic Seminar (特別講演): 骨再生のための人工骨の開発と骨疾患治療への応用 (平成18年2月11日、札幌)
2. 第25回中部日本整形外科災害外科学会ランチョンセミナー: 骨再生: 基礎研究から臨床応用へ (平成18年4月7日、大阪)
3. 鹿児島県整形外科教育研修会: 人工骨による骨再生: 基礎研究から臨床応用へ (平成18年4月15日、鹿児島)

島)

4. 三木・飯野メモリアルレクチャー、東北大学整形外科同窓会 (招待講演): 骨再生: 基礎研究から臨床応用へ (平成18年6月10日、仙台)
5. 第58回発生工学・疾患モデル研究会: 骨再生医療の現状と展望 (平成18年8月9日、東京)
6. 鳥取県西部医師会学術講演会: 骨粗鬆症治療への新しいアプローチ - 全身治療と局所治療 (平成18年9月7日、米子)
7. 第28回日本バネマテリアル学会大会 (シンポジウム): 骨補填・再生材料の現状と展望 (平成18年11月27日、東京)
8. 骨粗鬆症フロンティア学術講演会: 骨粗鬆症治療の新しい治療戦略 - 全身治療と局所治療 (平成18年12月8日、札幌)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

「徐放用容器」出願者: (株) エムエムティー、吉川秀樹、越智隆弘、発明者: 吉川秀樹、越智隆弘
平成17年4月22日 特許第3671132号

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

B) 重症化機序解明と治療法開発研究

- 1) ナース細胞(線維芽細胞様細胞)病態解析研究
 - ①未分化骨髄からのナース細胞分化機序解明研究
 - ②滑膜細胞の病理学的特性解析研究
- 2) 骨吸収機序解析研究
 - ①骨吸収の病態解析研究
 - ②遺伝子改変マウスによるRA患者のMMP12遺伝子病態解析研究
 - ③RANKL依存性破骨細胞におけるRANKL切断活性の意義
 - ④脂肪組織によるRA特異的破骨細胞抑制効果

関節リウマチの病態形成における骨髄異常の役割について：
骨髄 CD34+細胞の Krüppel-like factor 5(KLF-5) mRNA の発現の異常に関する研究

分担研究者 広畑 俊成 北里大学医学部膠原病・感染内科学・教授

研究要旨

関節リウマチ(RA)骨髄 CD34+細胞は(SCF+GM+)TNF- α の存在下において、線維芽細胞様細胞への分化が亢進していること、さらにこのTNF- α に対する異常反応性の1つの機序としてRA骨髄CD34+細胞のNF κ B1(p50)mRNAの発現の亢進が関与することを我々は報告してきた。近年、Krüppel-like Factor 5(KLF-5)はNF κ B1と協同してPDGF-A遺伝子の発現を上昇させることが注目されている。今回我々は、RA骨髄CD34+細胞のKLF-5 mRNAの発現について検討した。RA患者骨髄CD34+細胞においてはKLF-5 mRNAの発現がOA患者に比して有意に亢進していた。MTXあるいはステロイドの投与の有無により、骨髄CD34+細胞のKLF-5 mRNAの発現に差を認めなかった。また骨髄CD34+細胞のKLF-5 mRNAの発現と血清CRP値の間に有意な相関はなかった。以上の結果より、RA骨髄CD34+細胞では、NF κ B1(p50)mRNAとともにKLF-5 mRNAの発現の亢進がそのTNF- α に対する反応性の異常に関与する可能性が示唆された。こうしたKLF-5 mRNAの発現の亢進はPDGF-Aの発現を増強することにより、骨髄CD34+細胞の線維芽細胞様細胞への分化を促進するものと考えられる。

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)は関節滑膜の増殖による骨破壊を主徴とする原因不明の炎症性疾患である。関節滑膜を構成する主要な細胞として、マクロファージ様のA型滑膜細胞と線維芽細胞様のB型滑膜細胞が存在することが知られている。A型滑膜細胞は骨髄に由来することが明らかにされているが、B型滑膜細胞の由来についてはよく知られていなかった。我々は、RA骨髄CD34+細胞は(SCF+GM)+TNF- α の存在下において、OA骨髄CD34+細胞に比し効率的にMMP-1を産生する線維芽細胞様細胞に分化すること、さらにこのTNF- α に対する異常反応性の1つの機序としてRA骨髄CD34+細胞のNF κ B1(p50)mRNAの発現の亢進が関与することを明らかにした。近年、Krüppel-like Factor 5(KLF-5)はNF κ B1と協同してPDGF-A遺伝子の発現を上昇させることが注目されている。今回我々は、RA骨髄CD34+細胞のKLF-5 mRNAの発現について検討した。

B. 研究方法

RA患者51例、OA患者31例の腸骨骨髄液よりmagnetic beadsを用いてCD34+細胞を精製した。精製CD34+細胞よりmRNAを抽出し、オリゴdTプライマー法によりcDNAを合成し、Realtime PCRによりKLF-5のmRNAを定量した。データは β -actinのmRNAのcopy数に対する比として求めた。

(倫理面への配慮)

患者には研究内容及び検体採取の方法・危険性等を説明し、インフォームドコンセントを文書で取得した上で検体の提供を受けた。検体については連結匿名化に

てプライバシーの保護をはかった。

C. 研究結果

RA患者骨髄CD34+細胞においてはKLF-5 mRNAの発現がOA患者に比して有意に亢進していた(図1)。メトトレキサート(MTX)あるいはステロイドの投与の有無により、RA患者骨髄CD34+細胞のKLF-5に対するmRNAの発現に差を認めなかった(図2)。またRA患者骨髄CD34+細胞KLF-5 mRNAの発現と血清CRP値の間に有意な相関はなかった(図3)。

D. 考察

以上の結果より、RA骨髄CD34+細胞では、NF κ B1(p50)とともにKLF-5 mRNAの亢進がそのTNF- α に対する反応性の異常に関与する可能性が示唆された。さらにこうした異常は治療薬や全身の炎症反応による二次的な異常ではなく、RA固有の異常であると考えられる。このような骨髄CD34+レベルでのNF κ B1およびKLF-5 mRNAの発現異常がTNF- α に対する反応性の異常をきたし、これによりB型滑膜細胞様細胞の分化が亢進し、関節破壊につながってゆくものと考えられる。すなわち、KLF-5 mRNAの発現亢進により、PDGF-Aの発現が増強し、これにより骨髄CD34+細胞の線維芽細胞様細胞への分化を促進するものと考えられる。

今後、骨髄CD34+細胞のこうしたNF κ B1・KLF-5 mRNAの発現亢進の機序を解明してゆく必要がある。

E. 結論

RA骨髄CD34+細胞におけるNF κ B1(p50)mRNAの発現増強がRAの病因と関連していることが考えられる

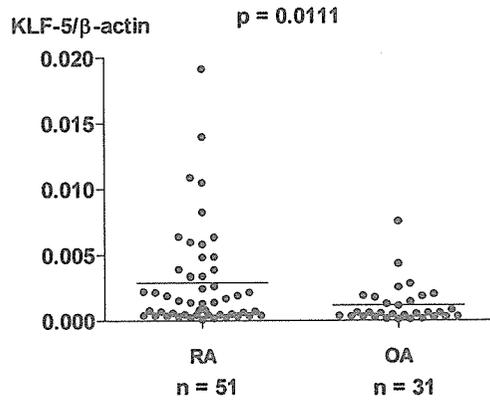


図1 RAおよびOAにおける骨髓CD34+細胞中のKLF-5のmRNAの発現:
データはβ-actin mRNAコピー数に対する比で示す

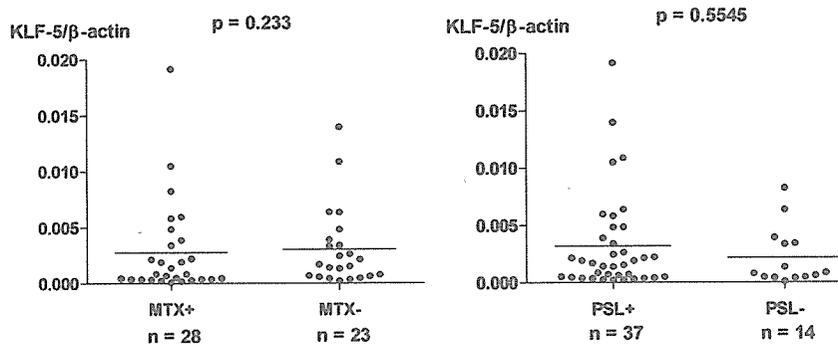


図2 RAの治療薬剤と骨髓CD34+細胞KLF-5 mRNAの発現:
データはNFκB1/β-actin mRNA比を示す

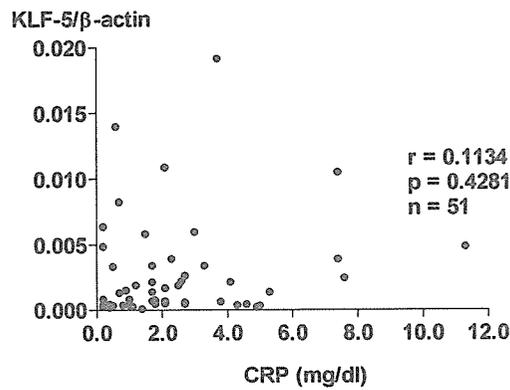


図3 RA 骨髓CD34+細胞のKLF-5のmRNAの発現と血清CRPレベルの関係