

(別添1)

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

関節リウマチ・骨粗鬆症の重症化防止治療開発に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 越智 隆弘

平成20(2008)年3月

(別添2)

## 目 次

I. 総括研究報告書	
関節リウマチ・骨粗鬆症の重症化防止治療開発研究.....	1
越智 隆弘	
II. 分担研究報告	
1. 関節リウマチにおける骨粗鬆症に関する研究.....	5
西沢 良記	
2. 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.....	8
吉川 秀樹	
3. 関節リウマチの重症度(病型)予後診断法としての Clq 値に関する研究.....	10
島岡 康則	
4. 関節リウマチにおける線維芽細胞様細胞の由来、特徴に関する研究.....	13
字月 美和	
5. ナース細胞の病態解明.....	15
大和谷 厚	
6. RA ナース細胞により惹起される自己反応性リンパ球の増殖に関する研究.....	16
前田 朋子	
7. 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：骨髄細胞の B 型滑膜細胞様細胞への分化能に関する研究.....	18
広畑 俊成	
8. MMP12 遺伝子改変マウスによる解析研究.....	22
山村 研一	
9. RANKL 依存性破骨細胞分化における TGF- $\beta$ の役割に関する研究.....	24
田中 栄	
10. RA に対する脂肪細胞分泌因子(アディポネクチン)の抗炎症・骨吸収抑制作用検討と治療薬開発に関する研究.....	28
前田 和久	
11. DNase II 遺伝子欠損による関節炎発症機序の解明に関する研究.....	29
長田 重一	
12. 関節リウマチの炎症性骨破壊および滑膜異常における LIGHT の役割に関する研究.....	31
鈴木 隆二	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷.....	37

(別添3)

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)

総括研究報告書

主任研究者：越智 隆弘

分担研究者

西沢 良記 大阪市立大学医学部内科 教授、  
島岡 康則 行岡病院 副院長、  
大和谷 厚 大阪大学医学部保健学 教授、  
広畑 俊成 北里大学膠原病・感染内科 教授、  
田中 栄 東京大学医学部整形外科 講師、  
長田 重一 京都大学医学部 教授、

吉川 秀樹 大阪大学医学部整形外科 教授、  
宇月 美和 岩手医科大学病理学 講師  
前田 朋子 塩野義製薬研究所 室長  
山村 研一 熊本大学発生医学研究センター 教授、  
前田 和久 大阪大学内分泌代謝内科 助手、  
鈴木 隆二 国立病院機構相模原病院  
臨床研究センター 研究室長、

研究協力者

中山 久徳 国立病院機構相模原病院 内科医員、  
中田 研 大阪大学整形外科 講師  
京極 方久 東北大学名誉教授

橋本 淳 大阪大学整形外科 助教授  
蝦名 耕介 大阪大学整形外科 大学院博士課程

**研究要旨** 関節リウマチ(RA)に発症する骨粗鬆症(RA・骨粗鬆症)の、I)治療疫学的研究として、ビスホスホン酸治療の有効性を示すとともに、進行例に対しての連通多孔体人工骨充填手術の有効性を示した。重症化の予後診断指標としてのRA患者血清中Clq値の有意性を示し、更にエピトープ解析を進め、診断薬開発へと進めている。II)重症化機序解明と治療法開発研究として、1)特異的病巣を形成するナース様細胞(RA-NLC)の病理・病態学的解析研究を進めて、マクロファージ系や分化能に富む骨髄系などに的を絞っての解析結果を得、更に、CD34骨髄細胞からのナース様細胞分化研究を進めた。またAdiponectinやOsteopontin中和抗体によるRA-NLC機能抑制現象の解析から新規創薬への手がかりを得るとともに、DNase II 遺伝子抑制による関節炎発症機序解明も進めている。併せて、2)破骨細胞病態解明研究を進めた。RA特異的RANKL非依存性破骨細胞病態解明目的のMMP12遺伝子改変マウス開発を進めるとともに、RANKL依存性破骨細胞に関しては、SB431542およびTβRII<sup>DN</sup>の導入による分化抑制解析から創薬の手がかりを得た。III)RA骨髄特異的遺伝子解析により得たSHIPS-1、LIGHT、AREG、GranulinなどのRA患者病態解明とともに、遺伝子改変マウス作成による病態解明から治療薬開発研究へと進めている。

A. 研究目的

関節リウマチ(以下RAと略す)患者の重要な骨破壊機序として顕著な骨粗鬆症発症を見出し、その臨床実態と、特異な骨髄病態機序解明、RA病因解明を目指し、RA重症化予防から根治療法開発へと進めることが目的である。本研究は広範な関連研究を集約するもので、以下の構成より成る。

I) RA・骨粗鬆症の治療疫学的研究；1) RA・骨粗鬆症の薬物治療戦略確立研究、2)人工骨によるRA患者の脆弱骨再生研究、3) RA重症化の早期予後診断薬開発研究、II) RA重症化機序解明と治療法開発研究；1) ナース様細胞(線維芽細胞様細胞；FLC)病態解明研究：①滑膜線維芽細胞様細胞の由来、特性に関する研究、②滑膜(ナース様)細胞特定目的の病理・病態学的解析研究、③骨髄細胞からのナース様細胞分化機序解明研究、2) 破骨細胞病態解明研究；①RA破骨細胞特異的MMP12について、②RANKL依存性破骨細胞のRA病態解明、③アディポネクチンによるRA特異的破骨細胞抑制研究、④DNase II 遺伝子抑制による関節炎発症機序解明研究、III) RA骨髄細胞からの新規病因遺伝子解明とRA完治治療薬開発研究(i) SHIPS-1、ii) LIGHT、iii) AREG(amphiregulin)；①新規物質病態解明研究、②遺伝子変異による病態解明研究

B. 研究方法

I) RA・骨粗鬆症の治療疫学的研究：

- 1) RA・骨粗鬆症の薬物治療法確立研究(西澤分担研究者)；薬物治療効果は主としてビスホスホン酸製剤投与を中心に、日本骨粗鬆症学会の基準に基づいてRA骨粗鬆症治療効果について検討した。
- 2) 人工骨によるRA患者の脆弱骨再生研究(吉川分担研究者)；新たに開発した人工骨(連通多孔体人工骨)の適応を決めるRA患者の基礎的および臨床的研究を、OA患者を比較対照として多数例に進めた。
- 3) RA重症化の早期予後診断薬開発研究(島岡分担研究者)；抗Clqモノクロー抗体を得てELISAキット完成し、血清Clq値と臨床評価との比較検討を進め、各抗体が反応するエピトープ解析を進めている。

II) RA重症化機序解明と治療法開発研究：

- 1) ナース様細胞(線維芽細胞様細胞)病態解明研究：  
① 滑膜線維芽細胞様細胞の由来、特性に関する研究(宇月分担研究者)；放射線照射後のC5

7BL/6マウスにGFPトランスジェニックマウス由来の骨髄細胞を移植しての関節炎発症研究。

- ② 滑膜（ナース様）細胞特定目的の病理・病態学的解析研究（宇月分担研究者、吉川分担研究者、大和谷分担研究者）：i) ナース細胞膜抗原（CD68, 106, 157など）を用いての免疫染色及び免疫電顕解析。ii) RA滑膜細胞に対し、抗 Osteopontin 抗体を添加抱き込み現象抑制の解析。
  - ③ 骨髄細胞からのナース様細胞分化機序解明研究（広畑分担研究者）：骨髄CD34+細胞より誘導したCD15+細胞および骨髄中に存在する形質細胞様樹状細胞（pDC）について、FLCへの分化能解析研究。
  - ④ DNase II 遺伝子抑制による関節炎発症機序解明（長田分担研究者）：DNA II 欠損による関節炎発症マウスの腹腔マクロファージを抗原として、ハムスターを免疫し、アポトーシス細胞の貪食を阻害するモノクローナル抗体を同定、この抗体が認識するたんぱく質を発現クローニング法で同定した。
- 2) 破骨細胞病態解明研究：
- ① RA破骨細胞特異的なMMP12について（山村分担研究者、吉川分担研究者）：RA特異的破骨細胞が発現するMMP12の病態解明の為、相同組換えベクターを作製しES細胞に導入しキメラマウスを得る。
  - ② RANKL依存性破骨細胞のRA病態解明（田中分担研究者）：マウス骨髄細胞を可溶性RANKLおよびM-CSFで刺激することによる破骨細胞系によるTGF- $\beta$ の特異的阻害薬効果を検討。また破骨細胞前駆細胞にレトロウイルスベクターによってTBRII<sup>DN</sup>を導入し、TGF- $\beta$ シグナル抑制の効果を検討した。
  - ③ アディポネクチンによるRA特異的破骨細胞抑制研究（前田和久分担研究者、吉川分担研究者）：RAモデルマウス肝臓にアディポネクチンを過剰発現させ、抗炎症・骨吸収抑制作用を検討した。
- Ⅲ) RA骨髄細胞からの病因遺伝子（SHIPS-1、LIGHT、AREG(amphiregulin、) 解明と治療法開発研究：
- ① RA骨髄中に見出した新規物質病態解明研究（鈴木分担研究者、前田分担研究者）：各遺伝子に対する蛋白合成、モノクロー抗体作成、ELISA系作製し、各物質のin vitro及び、in vivo 効果の解析。

- ② RA骨髄中に見出した新規物質遺伝子変異による病態解明研究（山村分担研究者）：各遺伝子に対してCAGGSプロモータを接続したコンストラクトを作製し、トランスジェニックマウスを作製する。

### C. 研究結果

#### I) RA・骨粗鬆症の治療疫学的研究：

- 1) RA・骨粗鬆症の薬物治療法確立研究（西澤分担研究者）：腰椎または大腿骨の骨密度低下RA症例に生物学的製剤などによる強力な炎症抑制によって骨代謝改善は得られても骨密度増加はなく、骨密度はビスホスホン酸を投与したときに有意の増加が得られた。
- 2) 脆弱骨補強目的の人工骨開発、治療研究（吉川分担研究者）：関節部近傍の骨端部に顕著な骨吸収があるときに連通多孔体人工骨の充填手術により強固な骨が再生することを多数例に認めた。
- 3) RA重症化の早期予後診断指標の新規確立研究（島岡分担研究者）：RA患者血清中のClq値は骨粗鬆症も含めての重症化と有意に相関する。更に、抗Clq抗体が認識するエピトープ解析を進めている。

#### II) RA重症化機序解明と治療法開発研究：

- 1) ナース様細胞（線維芽細胞様細胞；FLC）病態解明研究：
  - ④ FLCの由来、特徴に関する研究（宇月分担研究者）：関節炎誘導マウスの滑膜組織内に緑色蛍光を有する円形や紡錐形など多彩な細胞が多数認められた。対照群では末梢血顆粒球のみが陽性であった。
  - ⑤ 滑膜（ナース様）細胞特定目的の病理・病態学的解析研究（宇月分担研究者、吉川分担研究者、大和谷分担研究者）：i) RAの滑膜組織FLCの特徴はHLA-DRやCD106が陽性を示すほかに、CD68やCD11bなどのマクロファージ系やCD14の骨髄系などが陽性となり、電子顕微鏡的には1)粗面小胞体が発達し、蛋白合成の盛んなFLC様の細胞、ii)ライソゾームや突起を持つマクロファージ系の細胞のいずれかでRA発症早期から認められ、Osteopontin中和抗体により、抱き込み現象が有意に抑制された。
  - ⑥ 骨髄細胞からのナース様細胞分化機序解明研究（広畑分担研究者）：RA患者骨髄CD34+細胞からFLC様細胞への分化能はOA患者に比して有意に亢進していた。RA患者骨髄CD34+細胞より誘導したCD15+細胞、また RA骨髄由来のpDCからFLC様細胞への分化能には有意差を認めな

かった。

- ⑦ DNase II 遺伝子抑制による関節炎発症機序解明（長田分担研究者）、マウス腹腔内のアポトーシス細胞の貪食を阻害する抗体（Kat5-18）が認識する膜蛋白、Tim4をマウスL細胞に発現させるとアポトーシスの貪食は亢進した。また、Tim4の細胞外領域はphosphatidylserineに高い親和性を持った。

## 2) 破骨細胞病態解明研究：

- ① 遺伝子改変マウスによるMMP12遺伝子の病態解析研究（山村分担研究者、吉川分担研究者）：相同組換えベクターにC57BL/6由来のRENKAES細胞を用いて相同組換えを行い、1クローンを得た。ここからFLPを導入し、7つのクローンを得た。現在、キメラマウス作製中である。
- ② RANKL依存性破骨細胞のRA病態解明（田中分担研究者）：SB431542およびTβRII<sup>DN</sup>の導入はマウス破骨細胞分化を抑制した。いくつかの遺伝子の発現はTGF-βの投与で誘導され、TβRII<sup>DN</sup>の発現によって抑制された。CX3CR1の発現抑制によってTGF-βによる破骨細胞分化促進作用がキャンセルされた。
- ③ アディポネクチンによるRA特異的破骨細胞抑制研究（前田和久分担研究者、吉川分担研究者）：i) コラーゲン誘導性関節炎モデルマウスにアディポネクチンを過剰発現させると関節炎の発症及び重症化、及び関節炎に伴う傍関節の骨吸収も抑制された。ii) ヒトの生理的濃度のリコンビナントアディポネクチンは、RA特異的破骨細胞の増殖・分化・貪食能を有意に抑制した。

## Ⅲ) RA骨髄細胞からの病因遺伝子解明と治療法開発研究：

- 1) 骨髄中に見出した新規物質病態解明研究（鈴木分担研究者、前田分担研究者）：
- ① SHIPS-1: Anti-SHIPS-1mAbはマウス骨髄の破骨細胞形成と、脾細胞のIL-1β, IL-2, IL-12, IFN-γ, TNF-αを有意に抑制し、CIAマウス関節部の炎症、骨と軟骨の破壊を有意に減少させた。
- ② LIGHT: RA滑膜のLIGHT依存性増殖およびIL-8とMCP-1の産生誘導、ICAM-1の発現誘導は共にsiLTβRで抑制された。LIGHTによるRA滑膜細胞増殖と機能はNF-κB阻害剤のPDCTで阻害された。
- ③ AREG: 用量依存的にIL-6, IL-8, GM-CSF, VEGFを発現し、定量PCRによる滑膜組織におけるVEGF、AR

EG mRNAの発現、そしてELISAによる関節液中VEGF、AREG濃度ともに、両者は強い相関関係を示した。

- 2) RA骨髄中に見出した新規物質遺伝子変異による病態解明研究（山村分担研究者）：5つのリウマチ関連遺伝子のトランスジーンを作製を終了し、現在、トランスジェニックマウスの作製を行っている。また、多くのパーツを連結して相同組換え用のベクターを作製した。

## D. 考察

### I) RA・骨粗鬆症の治療疫学的研究：

- 1) RA患者に対して強力な薬物治療により炎症抑制を達成しても、併発する骨粗鬆症部位の骨密度増加は得られず、ビスフォスホン酸製剤などの骨量増加目的の薬物投与が必要である。
- 2) RA骨粗鬆症が進行し、骨折が懸念される重症RA症例に対して連通多孔体人工骨を充填することにより脆弱骨が補強されるのみでなく、強い新生骨が再生する。
- 3) 抗C1qを用いての血清検査により、重症RA患者の早期予後診断と治療方針判定は可能となるが、各種の抗C1q抗体が共通に認識しているエピトープの解析を進め、治療法開発への可能性を検討している。

### II) RA重症化機序解明と治療法開発研究：

- 1) ナース様細胞（線維芽細胞様細胞）病態解明に関して、マウスでの実験系では、炎症性滑膜組織内で増殖するFLCが骨髄由来のものであることが証明された。ヒトRA滑膜のFLCは線維芽細胞系あるいはマクロファージ系、またはその中間の特徴を持ち、骨髄マーカーも陽性となることから、様々な方向に分化しうる細胞と思われる。その起源としては、RA骨髄CD34+細胞からの分化が重要な候補と考えられる。
- 2) RA特異的に分化・増殖するRANKL非依存的破骨細胞が特異的に発現するMMP12の解明は是非必要であり、遺伝子改変マウスによる病態解析研究を進めている。一方、RANKL依存性破骨細胞分化にはTGF-βが必須と判明した。また、Osteopontin、adiponectinにも関節炎発症、破骨細胞分化抑制作用が認められた。

### Ⅲ) RA骨髄細胞からの病因遺伝子解明と治療法開発研究：

RA骨髄細胞の特異的遺伝子解析（鈴木分担研究者、山村分担研究者）：RA骨髄細胞からの当面の候補遺伝子を、SHIPS-1、LIGHT/TNFSF14、AREGに的を絞った。順次、該当蛋白を獲得し解析を進めているが、いずれもRA病態形成に重要な物質と考えられて、遺伝子改変

マウスでの解析が鍵を握る。

## E. 結論

### I) RA・骨粗鬆症の治療疫学的研究：

RA治療の重要な柱である骨関節破壊治療として、炎症抑制と共に骨密度増加目的の薬物治療が必要である。RA骨粗鬆症進行症例には、連通多孔体人工骨充填による骨補強・新生骨再生が適応される。重症化の予後診断が出来れば早期での治療方針判断出来るが、血中C1q値は予後診断薬になると考え、開発を進める。

### II) RA重症化機序解明と治療法開発研究：

ナース様細胞（線維芽細胞様細胞）はRA病態を作り出す鍵となる細胞であるが、様々な方向に分化しうる骨髄由来の比較的未分化な細胞と考えられ、RA骨髄CD34+細胞からの分化の可能性に富む。ナース細胞発生機序に関しては血球細胞核のアポトーシス抑制も視野に入れている。ナース様細胞、破骨細胞病態ともに分化・増殖に関わる各種因子が新たに見出され、創薬への可能性に富んでいる。

### III) RA骨髄細胞からの病因遺伝子解明と治療法開発研究：

RA骨髄中に見出した新規物質であるSHPS-1、LIGHT、AREGともにRA発症に関連し、診断・根治療法開発の鍵になる可能性があり、更なる精査を続ける必要がある。

## F. 健康危険情報

なし

(別添4)

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

主任研究者 : 越智 隆弘



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 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）患者における非外傷性新規椎体骨折発症率は腰椎または大腿骨の骨密度がYAM値に対してグルココルチコイドがプレドニゾン換算で7.5mg/日以上を12ヶ月投与されている患者では約85%以下に低下している症例に、それ以外では約80%以下に低下している症例にビスホスホン酸を投与したとき非投与群に対して腰椎骨密度は増加し新規椎体骨折は有意に抑制された。エチドロネート投与群では非投与群の骨折率に比して44%、アレンドロネート投与群では11%、リセドロネート投与群では12%にまでに減少した。また、RA特有の傍関節性骨粗鬆症である橈骨遠位端の海綿骨部分での骨密度はアレンドロネート内服により骨密度は増加することより炎症関節破壊防止にも有用なことが示唆された。生物学的製剤であるインフリキシマブ治療により十分な炎症コントロールを行い、日常生活動作（HAQスコア）が改善しても橈骨骨密度は低下し続けた（ $p=0.028$ ）。

以上から、RA患者では骨密度が比較的維持された骨減少症の時期からビスホスホン酸による早期の治療導入が椎体骨折の抑止につながることを示された。非椎体の非外傷性骨折についてはその骨折率が極端に少ないことから、今後、早期治療やビスホスホン酸の有用性を検討するうえで症例を増やした検討が望まれる。

骨折抑制の有用性のデータより、RA患者骨粗鬆症の薬物治療をYAM値80%以下で始めるという治療開始基準を設けた。この早期の時点でRAでの骨粗鬆症の診断、ビスホスホン酸をはじめとする骨粗鬆症治療薬の投与を開始可能足らしめるこの治療開始基準の今後の検証が望まれる。

A. 研究目的

関節リウマチ（RA）では、発症早期から骨粗鬆症が進行することが示唆されている。また、原発性骨粗鬆症にはまれな椎体、大腿骨頸部以外の非外傷性脆弱性骨折が高頻度に認められる。これらにはRAの炎症や身体活動性に及ぼす影響などが関与することが考えられている。従ってRA患者における治療戦略として、疾患活動性のコントロールからのアプローチと骨粗鬆症治療薬を用いたアプローチが考えられ、それぞれの効果について検討する必要がある。

B. 研究方法

骨密度の測定方法

外来通院中のRA患者において全身性骨粗鬆症の指標として腰椎（L-BMD）、橈骨遠位1/3（R-BMD）及び大腿骨頸部

（N-BMD）をDXA法にて測定した。傍関節性骨粗鬆症の指標として、橈骨遠位端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。

新規骨折の判定

一年毎の胸腰椎単純レ線撮影について、日本骨粗鬆症学会の基準に基づいて、新規に認めた骨折から骨折発生率を求めた。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。

（研究1）ビスホスホン酸製剤や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  $\mu$ 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  $\mu$ g + カルシウム 800mg (80 例)、E4 群 エチドロネート 400mg/日  $\times$  2 週 (10~12 週間歇投与) + アルファカルシドール 0.5  $\mu$ g + カルシウム 800mg (77 例)、E2 群 エチドロネート 200mg/日  $\times$  2 週 (10~12 週間歇投与) + アルファカルシドール 0.5  $\mu$ g + カルシウム 800mg (72 例) D 群 アルファカルシドール 0.5  $\mu$ 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 ヶ月ごとに前述の如く腰椎・大腿骨骨密度測定、椎体骨折判定を行った。さらに薬剤開始時、3 ヶ月後、6 ヶ月後、12 ヶ月後、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。

(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

pQCT でとらえた橈骨遠位端の海綿骨部分での骨密度はインフリキシマブ治療により十分な炎症コントロールを行い、日常生活動作 (HAQ スコア) が改善しても低下し続けた ( $p=0.028$ )。一方、L-BMD、

N-BMD では減少は抑制された。生物学的製剤以外の抗リウマチ治療によりコントロールが安定している RA 症例ではアレンドロネート内服により L-BMD、N-BMD とともに橈骨遠位端の骨密度も増加した。

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。薬剤によるすなわち RA 患者における非外傷性新規椎体骨折発症率は腰椎または大腿骨の骨密度が YAM 値に対してグルココルチコイドがプレドニゾン換算で 7.5mg/日以上をすでに 12 ヶ月投与されている患者では約 85% 以下 (T 値 -1.0 未満) に低下している症例に、それ以外では約 80% 以下 (T 値 -1.5 未満) に低下している症例にビスホスホン酸を投与したとき非投与群に対して L-BMD は増加し骨吸収マーカー Bone alkaline phosphatase (BAP) (IU/L)、尿中 NTX/Cre 比 (NTx) (nmol BCE/mmol Cr) は著明に低下した。新規椎体骨折の抑制は 6 ヶ月以降顕著に認められ、新規骨折の発症率 (人/100 人・年) はコントロールの D 群では 16.8 であったが、アレンドロネート投与群 (A 群) は 1.8 で 11% に減少、リセドロネート投与群 (R 群) は 1.9 で 12% まで減少、E4 群 7.3、E2 群 8.7 で両者を合わせて 44% に減少した。

#### D. 考察

生物学的製剤による十分な炎症コントロールをもってしても骨代謝の改善は見られるが減少した骨密度を増加させることは困難である。しかし、ビスホスホン酸を投与すると、骨吸収マーカーが十分に低下し骨代謝回転が抑制され、それに伴い骨密度の上昇が認められ、これは傍関節性骨粗鬆症についても同様に増加することが確認された。RA 患者において高頻度に認められる非外傷性骨折 (脆弱性骨折) のうち、椎体についてはビスホスホン酸による治療が有効であることが確認されたが、その他の部位の骨折についても有効性が示唆された。

#### E. 評価

達成度について

RA に伴う脆弱性骨折について、RA 患者

における荷重骨での骨量測定による診断の有用性、ビスホスホン酸を骨減少症より早期に導入することが腰椎の骨折抑制に有用であることが証明された。したがって、RA 骨粗鬆症の治療開始基準を作成し、そのための基礎データ作成の目標が達せられたと考えられる。RA 骨粗鬆症の診断基準として、YAM 値 80%以下を RA での骨粗鬆症として診断し、ビスホスホン酸による治療開始を可能にさせる治療開始基準が策定できた。

研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

この研究は RA による二次性骨粗鬆症の治療について初めて大規模に行われた研究であり学術的・国際的意義は大きく、原発性骨粗鬆症から続発性骨粗鬆症に治療目標がシフトして来ていることから、その臨床的意義はきわめて大きいと考えられる。

今後の展望について

今回の結果より RA 患者における荷重骨での骨量測定による診断、YAM 値 80%以下を RA での骨粗鬆症として診断し、ビスホスホン酸による治療開始を可能足らしめる診療基準の有用性が示唆された。今後、この RA 患者での骨粗鬆症の治療開始診断の臨床的有用性確認のために、多施設前向き研究の推進が強く望まれる。

研究内容の効率性について

通常、長期間を要する研究が計画通り行われたことはきわめて効率的であったと考えられる。

結論

RA 患者では非椎体の非外傷性骨折についてもビスホスホン酸療法の有効性が示唆された。今後はこれらの結果をもとに RA 患者における骨粗鬆症の診断および治療開始基準の新たな作成し、非椎体骨折の治療戦略についての詳細な検討への発展が期待される。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Inaba, M., Tanaka, K., Goto, H., Sakai, S., Yamada, S., Naka, H., Imanishi, Y., Nishizawa, Y. Independent association of increased trunk fat with increased arterial stiffening in postmenopausal patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol, 34, pp290-5, 2007

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

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

関節リウマチ患者の Nurse 細胞と B 細胞の共培養により RA 病態特異的な液性因子が産生分泌され、RA-Nurse のみがこの因子に応答し、関節炎の重症化に関与することを明らかにした。RA 滑膜では Osteopontin の発現が高く、RA 病態重症化予防のターゲット分子候補であることが示された。関節破壊の防止を目的とした搔爬・人工骨移植術は臨床的に有用であり、関節リウマチの重症化防止の新規治療法と考えられた。

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。我々は Nurse 細胞による抱き込み現象（pseudoemperipolesis）により誘導される液性因子に着目し、RA 重症化機序を検討した。本研究では Nurse 細胞および B 細胞株の共培養上清（以下 CM: conditioned medium）を滑膜細胞に添加し、遺伝子発現変化を解析し、細胞間相互作用なしに液性因子により誘導される関節炎機序を検討した。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た。

B. 方法

1) RA 患者 4 名、非 RA 患者 4 名より滑膜細胞を採取し、B 細胞株（MC/Car）と共培養し、培養上清 CM を回収した。滑膜細胞培養 3 日後に培地を CM に交換し 2 日後、RNA 抽出し Real time PCR を行い、骨代謝・軟骨代謝・炎症に関係する 96 遺伝子について、発現レベル変化を解析した。得られた CM 中の IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$  の濃度を ELISA 法にて計測した。

2) OPN 抗体による抱き込み現象の抑制を検討した。RA 滑膜細胞に対し、抗 Osteopontin 抗体を添加 2 時間後、MC/Car を添加し 2 時間培養し、抱き込ま

れた MC/Car 細胞数を定量した。CM 非投与の滑膜細胞における Osteopontin 発現を Western Blot および免疫染色にて検討した。3) 人工骨による治療 関節近傍嚢胞性骨病変を有するリウマチ患者 20 例に対し、病巣搔爬および人工骨充填を行い、造影 MRI を含めた骨再生の画像評価を行った。

C. 結果

1) RA 滑膜由来共培養 CM で IL-6 が有意に上昇した。その他のサイトカインは RA/非 RA で有意差を認めなかった。MMP1 及び OPN の遺伝子発現レベルは RA 滑膜細胞で上昇した。MMP1 発現レベルは、RA/非 RA 由来のいずれの CM 刺激により上昇した。一方、Osteopontin 発現レベルは、RA/非 RA 由来いずれの CM 刺激も、RA 滑膜細胞で特異的に上昇し、非 RA 滑膜細胞では低下した。

2) RA 滑膜細胞には Osteopontin 陽性細胞が多く存在し、Osteopontin タンパク量も増加していた。非 RA 滑膜細胞での発現は少なかった。Osteopontin 中和抗体により、抱き込み現象が有意に抑制された。

3) 20 例中 19 例で、術後 6-12 ヶ月で良好な骨再生を認め人工骨の有用性が示された。造影 MRI においても、人工骨内部への骨再生が観察された。

D. 考察

RA 滑膜細胞と B 細胞の共培養上清は IL-6 が高く、さらに RA 滑膜細胞の Osteopontin 発現を刺激し、非 RA 滑膜細胞では Osteopont

in発現を抑制した。RA滑膜細胞ではOsteopontin発現陽性細胞が増加し、抱き込み現象はOsteopontin中和抗体にて抑制されたことから、Osteopontin分子のRA重症化への関与が示唆された。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-Nurse細胞とB細胞との共培養は、IL-6が高値を示し、RA病態特異的な液性因子が産生分泌され、RA-Nurseのみがこの因子に対して応答できるしくみを備えて関節炎の発症、重症化に関与することが示された。RA滑膜ではosteopontinの発現が高く、中和抗体による抑制が示されたことから、RA病態重症化予防のターゲット分子候補であることが示された。RA患者の関節近傍嚢胞性骨病変に対して、関節破壊の防止を目的とした掻爬・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。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 柏井将文、橋本淳、吉川秀樹：関節リウマチ, *The Bone*, 21: 123-128, 2007.
2. 富田哲也、吉川秀樹：NFκBをターゲットとした変形性関節症に対する治療法の開発、整形・災害外科, 50: 950-951, 2007.
3. 吉川秀樹：医工連携による次世代人工骨・人工関節の開発、生産と技術 59:86-88, 2007.
4. Ochi, T., Yoshikawa, H., Tososaki-maeda, T., Lipsky, P.E.: Mesenchymal stromal cells. Nurse-like cells reside in the synovial tissue and bone marrow in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 9:201, 2007.
5. Tsuboi, H., Nampei, A., Matsui, Y., Hashimoto, J., Kawai, S., Ochi, T., Yoshikawa, H.: Celecoxib prevents juxta-articular osteopenia and growth plate

destruction adjacent to inflamed joints in rats with collagen-induced arthritis. *Modern Rheumatology*, 17: 115-122, 2007.

6. Tanaka, H., Sugamoto, K., Sahara, W., Ono, T., Tomita, T., Hashimoto, J., Yoshikawa, H.: The mode of destruction in shoulders with rheumatoid arthritis based on radiographic findings. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, 16:539-543, 2007.
7. Liu, H., Sugamoto, K., Itohara, T., Tomita, T., Hashimoto, J., Yoshikawa, H.: In vivo tree-dimensional skeletal alignment analysis of the hindfoot valgus deformity in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Orthopaedic Research*, 25:330-339, 2007.
8. Kitamura T, Hashimoto J, Murase T, Tomita T, Hattori T, Yoshikawa, H., Sugamoto K.: Radiographic study of joint destruction patterns in the rheumatoid elbow. *Clinical Rheumatology*, 26:515-519, 2007.
9. Arimitsu, S., Murase, T., Hashimoto, J., Oka, K., Sugamoto, K., Yoshikawa, H., Moritomo, H.: A three-dimensional quantitative analysis of carpal deformity in rheumatoid wrists. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 89B:490-494, 2007.

#### 2. 学会発表

1. 第24回京都運動器疾患フォーラム（特別講演）：人工骨による骨再生：基礎から臨床へ（平成19年2月19日、京都）
2. 骨粗鬆症フォーラム2007（特別講演）：骨折からみた骨粗鬆症の新しい治療戦略：全身治療と局所治療（平成19年5月18日、札幌）
3. 第6回ASOS学術講演会（特別講演）：骨再生のための人工骨の開発と臨床応用（平成19年6月30日、大津）
4. 第29回日本バイオマテリアル学会（シンポジウム）、再生・医療機器開発一規制と認可のガイドライン：次世代人工骨の開発と課題（平成19年11月26日、吹田）
5. 第112回愛媛整形外科集談会（特別講演）：人工骨の開発と整形外科疾患への応用（平成19年12月15日、松山）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

関節リウマチの重症度(病型)予後診断法としてのClq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Clq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、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。平成18年度までの研究で、ハイブリドーマを作成し、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、Clq検出・定量する新たなサンドイッチ法を開発した。さらに、ここから有用な4種の抗体を選択し、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。

平成19年度は、分担研究者（鈴木ら）が、RA骨髓血を用いたgenechip解析で発現が高いと報告したGranulinにつき、モノクローナル抗体を取り、この抗体を用いて、サンドイッチELISA系を構築し、初めて、臨床サンプルを測定し、関節リウマチの重症度、末梢血中のClq値、Granulin値につき関連を検証した。

者血清135検体を、骨高度破壊を示す重症病型（多関節破壊型病型：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。

さらに、今年度は、RA骨髓血を用いたgenechip解析で発現が高いと報告されたgranulinにつき、バキュロ系で発現しマウスに免疫してモノクローナル抗体を取り、この抗体を用いて、サンドイッチELISA系を構築し、初めて、末梢血で臨床サンプルを測定した。

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Clq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、昨年度、分担研究者（鈴木ら）が、RA骨髓液を用いたgenechip解析で発現が高いと報告したGranulinにつき、初めて、臨床サンプルを測定し、関節リウマチの重症度、末梢血中のClq値、granulin値につき関連を検証した。

B. 研究方法

抗Clq抗体を産生するハイブリドーマを新たに作成し、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。

この抗体を、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。

この4種の抗体につき、さらにRA患

（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Clq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  $72.7 \pm 54.9$ , 赤沈  $34.6 \pm 25.5$  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  $88.9 \pm 100.4$ , CRP  $1.3 \pm 1.3$ , MMP-3  $172.4 \pm 130.1$ , 赤沈  $55.6 \pm 30.8$  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 $\pm$ 22であった。重症型病型では平均118-122 $\pm$ 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。

本研究で本年度初めてELISAにより測定されたRA患者の末梢血血清中のgranulin蛋白は、RA患者135検体中6検体に検出された。軽症病型(LES) 36検体中1検体でgranulinを検出し、重症病型(MES, MUD) 85検体中5検体 granulinを検出した。ただし、このうち1検体は、喉頭癌、肺癌併発例であった。

血清	性別	年齢	病型	granulin	RF	CRP	C1q	No drug
No.67	F	60	LES	55.6	8	0.0	80	No drug
No.80	F	64	MES	147.4	59	0.6	109	MTX 10mg/w, steroid 3.5mg/d
No.26	M	79	MES	21.6	103	3.1	120	MTX 4mg/w, steroid 5mg/d, 肺癌, 喉頭癌
No.141	F	29	MES	21.0	76	0.1	120	MTX 4mg/w, steroid 10mg/d, 15歳 onset RA
No.105	F	54	MES	22.8	151	0.7	125	MTX 4mg/w, steroid 2mg/d
No.71	F	56	MUD	63.7	59	2.6	130	tacrolimus 1.5mg/d, steroid 10mg/d, 胆石症

#### 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、および、その測定法は、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。

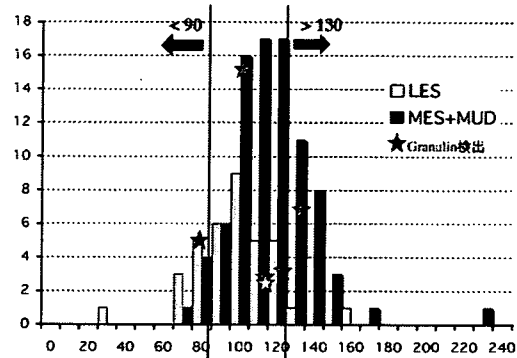
投薬内容や、変動する臨床検査値(CRPなど)に左右されない、RA重症度の指標が確立されることは、患者の予後判定をする上で非常に重要な知見であると考えられる。

また、今回はじめて、RA患者の、末梢血血清中でもgranulinが検出される例があることがわかった。ただし、granulinの検出とRAの関係、また重症度との関係は今後の検討を要する。

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。

#### <病型別C1q値の度数分布>



#### 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。granulinの検出とRAの関係、また重症度との関係は今後の検討を要する。

#### 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線維芽細胞様細胞の由来、特徴に関する研究  
分担研究者 宇月美和 岩手医科大学病理学第一講座 講師

**研究要旨** 関節リウマチ(RA)の病変部でより特異的とされる線維芽細胞様細胞(fibroblast like cell: FLC)について電子顕微鏡による検討をはじめ各種マーカーで検索した結果、FLCはマクロファージ系や線維芽細胞系、および両者の中間のような特徴を示していることが明らかとなった。上記の細胞は各種マーカーが陽性となったが、特にCD14やBST-1などの骨髄系マーカーが陽性であり、骨髄由来であることが示唆された。また、関節炎モデルマウスによる検討でも、関節炎局所には骨髄由来の細胞が増生していることが確認された。以上より、ヒトRAおよび関節炎マウスいずれの系でも骨髄由来の細胞が関節炎の発症や進行に参与する可能性が示された。

#### A. 研究目的

関節リウマチ(RA)の病理組織像の特徴は1)滑膜細胞の多層化、2)血管の増生、3)リンパ球浸潤、4)軟骨・骨破壊である。このうち1)-3)は他の関節炎においてもみられる変化であるが、本研究ではRAの病変部でより特異的とされる線維芽細胞様細胞(fibroblast like cell: FLC)について電子顕微鏡による検討をはじめ、各種マーカーや動物モデルを用いて、その由来や特徴を検討する。

#### B. 研究方法

(1)RA患者から得られた滑膜および骨破壊部のパンスを4%PFA/PBSで固定し、パラフィン包埋標本のほか、電子顕微鏡用標本を作成し、免疫組織化学による検討や超微形態的観察をおこなった。症例は比較的早期の症例から炎症の高度な症例、炎症が沈静化した症例など様々な炎症の程度の症例を用いた。また、超薄切片を用いた手法にて、酵素電顕を行い、各種マーカー陽性細胞の同定をおこなった。

(2)放射線照射後のC57BL/6マウスにGFPトランスジェニックマウス由来の骨髄細胞を移植し、生着を確認後に関節炎カクテルを投与し、関節炎を発症させた。その後、滑膜組織やパンスを観察し、移植された骨髄由来細胞の分布を検討した。

#### C. 研究結果

(1)RAの滑膜組織およびパンスでみられるFLCの特徴はHLA-DRやCD106が陽性を示すほかに、CD68やCD11bなどのマクロファージ系やCD14やBST-1(CD157)の骨髄系など多彩なマーカーが陽性となり、各種のサイトカインや蛋白分解酵素を産生していた。また、電子顕微鏡的には1)粗面小胞体が発達し、蛋白合成の盛んな線維芽細胞様の細胞、2)ライソゾームや突起を持つマクロファージ系の細胞、3)両者の中間の細胞であった。酵素電顕による検討ではHLA-DRやCD14、BST-1、CD106

陽性細胞はおもに上記1)2)であった。これらの細胞はRAの発症早期の段階から認められた。

(2)GFPマウス由来の骨髄細胞を移植したマウスの系では、関節炎誘導マウスの滑膜組織およびパンス内に緑色蛍光を有する細胞が多数認められ、形態学的には円形や紡錐形など多彩な像を示していた。対照群では末梢血中の細胞と思われる顆粒球のみが陽性であった。

#### D. 考察

ヒトRAの組織による検討では、FLCは線維芽細胞系あるいはマクロファージ系、またはその中間の特徴を持つものであったが、多様な蛋白を産生しており、多機能な細胞であることが示唆された。また、細胞表面マーカーによる検討では骨髄マーカーも陽性となることから、様々な方向に分化しうるものであると思われる。マウスでの実験系では、関節炎の炎症性滑膜組織内で増生する細胞が骨髄由来のものであることが証明されたが、ヒトのRAの発症にも骨髄由来の細胞が関与している可能性が示唆された。

#### E. 結論

FLCは、形態学的にも機能的にも由来の同定が難しい細胞であるが、骨髄マーカーが陽性になることやマウスでの実験結果から、様々な方向に分化しうる骨髄由来の細胞であることが明らかになった。今後は、この細胞に的を絞った検討が重要と思われ、電子顕微鏡や各種マーカーによる検索をすすめる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Miki Y, Suzuki T, Hatori M, Igarashi K, Aisaki KI, Kanno

J, Nakamura Y, Uzuki M, Sawai T, Sasano H: Effects of aromatase inhibitors on human osteoblast and osteoblast-like cells: A possible androgenic bone protective effects induced by exemestane. Bone.40: 876-887 (2007)

Rosenthal AK, Gohr CM, Uzuki M, Masuda I. Osteopontin promotes pathologic mineralization in articular cartilage. Matrix Biology. 26(2): 96-105, (2007)

徳永勢二、宇月美和、鎌滝章央、貝山 潤、嶋村 正：関節リウマチ患者の関節内でのヒアルロン酸分解酵素 (hyaluronidase) の発現と分布について. 岩手医誌. 59(2): 89-98 (2007)

宇月美和、佐々木喜子、澤井高志：関節リウマチ(RA)における軟骨・骨破壊の病理学的特徴. Clinical Calcium 17 (4): 474-483 (2007)

宇月美和、佐々木喜子、澤井高志：関節疾患の病理学的基礎. 臨床画像. 23(12): 1346-1361 (2007)

藤木和彦、池田美菜子、宇月美和、中村雅典、谷口顕：漢方製剤による免疫賦活. 日本臨床免疫学会会誌 30 巻 4 号 Page361 (2007)

藤木和彦、池田美菜子、中村雅典、宇月美和、谷口顕：十全大補湯による免疫賦活. 日本内科学会雑誌 96 巻 Suppl.

Page176 (2007)

## 2. 学会発表

Kumagai J, Uzuki M, Sawai T: Histology of the Traumatic Tom-Cuff Stumps. 10<sup>th</sup> International Congress of Shoulder and Elbow Surgery. Sep16-20, 2007; Bahia, Brazil.

宇月美和、徳永勢二、鎌滝章央、貝山 潤、吉田昌明、澤井高志：関節リウマチの滑膜組織におけるヒアルロン酸の代謝. (第51回日本リウマチ学会総会・学術集会 2007年4月26-29日、横浜)

徳永勢二、宇月美和、鎌滝章央、貝山 潤、嶋村 正、澤井高志：関節リウマチ患者の関節内でのヒアルロン酸分解酵素 (hyaluronidase) の発現について. (第51回日本リウマチ学会総会・学術集会 2007年4月26-29日、横浜)

宇月美和、徳永勢二、鎌滝章央、貝山 潤、北川広進\*、三好照三\*、澤井高志：滑膜組織におけるヒアルロン酸合成酵素と分解酵素の発現. (第96回日本病理学会総会 2007年3月13-15日、大阪)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## ナース細胞の病態解明

分担研究者 大和谷 厚 大阪大学大学院医学系研究科教授

研究要旨 関節リウマチ患者の腸骨から採取した骨髓、もしくは関節から採取した滑膜組織から、8系統のナース細胞の樹立ができ、これらを標準細胞として各研究者に供することが可能となった。これらの細胞の特性を解析することにより、関節破壊におけるナース細胞の役割が解明できるものと考えられた。

### A. 研究目的

関節リウマチでは、関節滑膜や骨髓中に存在する間質系細胞(ナース細胞)が骨破壊に強く関与していることが示されている。本研究は、まずナース細胞を樹立することを主たる目的としている。そして、骨髓組織におけるナース細胞を用いて、その関節破壊への関与をサイトカインやケミカルメディエーターの動態から明らかにする。

### B. 研究方法

#### 1. ナース細胞培養系の樹立

ナース細胞は、関節リウマチ患者の腸骨から採取した骨髓、もしくは関節から採取した滑膜組織から分離した。細胞は10% fetal calf serum [FCS; Hyclone, Logan, UT, USA], 100 units/ml of penicillin [Gibco BRL], そして100 µg/ml of streptomycin [Gibco BRL]を加えたDMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) [DMEM; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA]をメディウムとし、37°C/7.5%CO<sub>2</sub>で培養を行う。継代を重ねた後、B-cell lymphoma lineであるMC/carと共培養し、pseudoemperipolesis能(細胞抱き込み能)を持つことが確認されたものをナース細胞とした。

#### 2. 骨髓ナース細胞の骨吸収能アッセイ

96wellの破骨細胞活性アッセイ用基質プレート(OAAS)に、骨髓ナース細胞を5×10<sup>5</sup> cells/mlで播く。3日ごとにメディウムを交換し、14日後、破骨細胞活性アッセイ用基質プレートを目視、もしくは光学顕微鏡下で観察し、骨吸収能を調べる。また、TRAP染色を行う。

### C. 研究結果

#### 1. ナース細胞の樹立

pseudoemperipolesis能を確認するため、24well細胞培養皿に間葉系細胞を30,000 cells/mlの割合で播き、24時間後B-cell lymphoma lineであるMC/carを1×10<sup>6</sup>ずつ加え、6時間後、3つ以上抱き込みをしている細胞が、200以上存在する集団をナース細胞とした結果、滑膜からは5系統、骨髓からは3系統の細胞を樹立することができた。

#### 2. 骨髓ナース細胞の骨吸収能

これらのナース細胞を用い、骨吸収能を調べたところ、ナース細胞単独培養の条件下では骨吸収能が見られなかった。

### D. 考察

8系統のナース細胞の樹立ができ、これらを標準細胞として各研究者に供することが可能となったが、それぞれの系統についてさらに特性を解析していく必要があると考えられる。また、ナース細胞単独では骨破壊に影響を及ぼさないことが分かったので、今後、骨髓マクロファージなどが関節リウマチ患者の関節破壊に及ぼす影響などを、ナース細胞を用いて調べ、さらに、サイトカインやヒスタミンなどケミカルメディエーターの役割を解析していく。特にヒスタミンに関しては、新たに発見されたH4受容体との関連を精査する。

### E. 結論

8系統のナース細胞の樹立ができた。

### F. 健康危険情報

該当なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

準備中

#### 2. 学会発表

準備中

### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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

RA ナース細胞により惹起される自己反応性リンパ球の増殖に関する研究

分担研究者 鈴木 隆二

(独)相模原病院 臨床研究センター 病態総合研究部 診断・治療研究室長

分担研究者 前田 朋子

塩野義製薬株式会社 創薬研究所 ターゲット探索部門 主任研究員

研究要旨

RA ナース細胞由来抗原に反応する T 細胞が RA 患者末梢血中に高頻度に存在する可能性が示唆された。また、RA ナース細胞が特定の B 細胞を選択的に増殖・活性化する可能性が強まった。

A. 研究目的

RA ナース細胞が患者における異常な骨破壊と免疫応答を惹起する要因となっていることは、主任研究者をはじめ国内外の研究者により報告されている。今年度は RA ナース細胞が異常な免疫環境を構築する機序・機構を解明するために、RA 患者末梢血 T 細胞のナース細胞由来抗原への反応性、ナース細胞の存在下における健常人 B 細胞の増殖について以下の検討を実施した。

B. 方法

1) RA 患者末梢血の RA ナース細胞由来抗原に対する反応性の検討

(医)行岡病院よりインフォームドコンセントを経て採取された RA 患者末梢血 17 例および健常人ボランティア末梢血 10 例より ficoll 法にて末梢血単核球を分離した。抗原として、RA 滑膜組織由来 T 細胞の認識する抗原 A の C 末端より 265 残基までのリコンビナント蛋白を精製、抗原とし、抗原存在下における患者および健常人末梢血の増殖活性を 10%FBS/RPMI1640、7.5%CO<sub>2</sub> 存在下、72 時間培養後の 3H-thymidine の取り込みにより測定した。

2) 健常人 4 例の末梢血より B 細胞を分離し 10% FBS/45%RPMI1640/45%DMEM、7.5%CO<sub>2</sub> 存在下で RA ナース細胞との共培養を実施した。約 30 日間の共培養後、RA ナース細胞依存性に増殖した細胞株の培養上清に産生される免疫グロブリンの反応性を検討すると共に、株化細胞をさらにクローニングし、その VH レパトア解析を実施

した。

(倫理面への配慮)

RA 患者および健常人からの末梢血、RA 患者からの滑膜組織取得に当たっては、各研究実施施設における研究倫理委員会において事前に承認を受け、十分なインフォームドコンセントの下、提供者の自由意思に基づいた検体提供を受けた。

C. 結果

1) 10 例の健常人末梢血由来単核球は RA ナース細胞由来抗原に対し増殖活性を示さなかったのに対し、RA 患者末梢血由来単核球は 17 例中 14 例が中程度から強い増殖活性 (stimulation index:5.38-50.35) を示した。今までに解析した患者および健常人 HLA allele に共通の特徴は存在しなかった。

2) 健常人全例の末梢血 B 細胞は RA ナース細胞存在下で増殖した。ナース細胞依存性に増殖する B 細胞クローンの VH レパトア(現在解析中)は培養前と比較しオリゴクローナルとなる傾向を見出した。また、株化細胞の培養上清中のイムノグロブリンは、IgG/A/M であり、一部に RA ナース細胞に反応する自己抗体の存在を確認した。

D. 考察

RA ナース細胞由来抗原 A は、自己抗原として患者末梢血に認識される頻度が非常に高いことから(82.4%)、これに反応する T 細胞の頻度やそのマーカー・サイトカイン産生能等の機能に関する