

Table 1**Effects of co-culture on production of cytokines from rheumatoid arthritis nurse-like cells (RA-NLCs)**

	Cytokines in cell culture supernatant (pg/ml) ^a								IgM (μg/ml) ^a		
	IL-1α	IL-1β	IL-6	IL-7	IL-8	G-CSF	GM-CSF	TNFα	TNFβ	Experiment 2	Experiment 3
Cytokine production from RA-NLCs derived from synovium and immunoglobulin from B cells ^b [6]											
RA-SNCs	<5.0	<10.0	2,200		4,300	460	40	<5.0	<5.0	<1.5	<1.5
B cells	<5.0	<10.0	<10.0		<10.0	<10.0	<2.5	<5.0	<5.0	1.8	2.7
B cells + RA-SNCs (separated) ^c	<5.0	<10.0	1,800		3,900	510	30	<5.0	<5.0	<1.5	<1.5
B cells + RA-SNCs	<5.0	153	15,900		34,500	2,400	740	690	<5.0	5.6	8.6
Cytokine production from RA-NLCs derived from bone marrow cells ^d [5]											
RA-BMNC-1 cell line	-	-	38,250	-	1,480	-	150	-			
+ MC/car cell line	-	320	89,015	-	33,510	755	915	275			
+ Molt-17 cell line	-	235	78,750	-	10,615	540	355	255			

RA-BMNCs, cytokine production from RA-NLCs derived from bone marrow cells; RA-SNCs, cytokine production from RA-NLCs derived from synovium; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor; -, not detectable.

^aThe amount of each cytokine and IgM in the culture supernatant was measured with an enzyme-linked immunosorbent assay kit. ^bB-cell clones (1×10^5) and RA-SNC3 (5×10^4) were cultured under the indicated conditions for 3 days in 24-well plates. ^cB-cell clones were cultured in a Millicell culture insert. ^dRA-BMNC cells (3×10^4 cells/well) were inoculated and cultured overnight, and 1×10^6 cells MC/car cells or Molt-17 cells were added to the culture. After 5 days of incubation, the culture supernatants were collected and the amount of each cytokine in the culture supernatant was measured with an enzyme-linked immunosorbent assay kit.

Expression of MMP-2, MMP-9, and MMP-12 was increased in both TRAP(+) mononuclear and multinucleated cells after differentiation by culture with RA-NLCs, and these cells could induce cartilage degeneration *in vitro* by a mechanism that was completely blocked by inhibitors of MMP-2 and MMP-9. Although MMP-2 expression was significantly increased in TRAP(+) mononuclear cells, expression of MMP-9 and MMP12 was also higher in TRAP(+) multinucleated cells [27]. Of note, both TRAP(+) mononuclear and multinucleated cells differentiated by culture with RA-NLCs specifically expressed MMP-12 [27], whereas multinucleated cells expressing MMP-12 were clearly found near the bone erosions (S Yamane, M Maeda-Tanimura, Y Shimaoka, M Yukioka, T Toyosaki-Maeda, S Ishida, N Yamane, Y Tsuruta, T Itoh, N Fukui, *et al.*, unpublished observation). RA-NLCs were therefore found to promote the differentiation of CD14(+) monocytes in a characteristic two-step differentiation process into multinucleated osteoclast-like cells with the capacity to degrade bone and cartilage.

Although TNF [28], IL-1 [29], macrophage colony-stimulating factor, and RANKL [30] are very important factors for developing osteoclasts, the RANKL-independent two-step differentiation of CD14(+) monocyte supported by RA-NLCs [10,26] may be an alternative pathway to develop multinucleated osteoclast-like cells specifically in RA. Beside the destruction of bone tissue by osteoclasts or osteoclast-like cells, we could confirm that FSCs from RA patients inoculated *in vivo* showed aggressive behavior, invading

cartilage as reported previously [31-33], although we have not yet confirmed that pure RA-NLC lines have such function.

Comparison of the properties of RA nurse-like cells and fibroblast-like synoviocytes

A considerable amount of work has characterized another population of cells found in the rheumatoid synovium, namely fibroblast-like synoviocytes. The cells are thought to play a role in rheumatoid pathogenesis, especially because of their capacity to contribute to tissue damage [31-33]. RA-NLCs, however, have a number of specific attributes that suggest they may play a unique role in RA pathogenesis (Table 2).

Mechanisms of progressive proliferation of fibroblastic stromal cells specifically found in joint

To explain the remarkable proliferation of synovial tissue in the RA patient, various mechanisms have been reported such as the involvement of protooncogenes [34], inflammatory cytokines [35], and perturbations of Fas-mediated apoptosis [36]. As a mechanism specifically found in the synovial space but not in the bone marrow, we found that the interference with Fas-mediated apoptosis could upregulate specifically the growth of synovial FSCs [37,38]. In this regard, soluble Fas ligand was found to inhibit competitively the Fas-Fas ligand-mediated apoptosis [37] of FSCs bearing Fas. The levels of human soluble Fas ligand in synovial fluid from RA patients were found to be significantly higher than those from osteoarthritis patients.

Table 2

Comparison of the properties of rheumatoid arthritis nurse-like cells and fibroblast-like synoviocytes

Property	Rheumatoid arthritis nurse-like cells	Fibroblast-like synoviocytes
Pseudoemperipolesis	+	-
Constitutive expression of CD106	+	-
Enhanced expression of CD106 and CD157 by IFN γ	+	-
Promote B-cell differentiation	+	-
Promote differentiation of osteoclast-like cells from CD14(+) monocytes	+	-
Inhibit lymphocyte apoptosis	+	-

In contrast, soluble Fas ligand was not detected in the peripheral blood, and also not in bone marrow blood in RA patients [38]. This mechanism, therefore, could at least partially upregulate the FSC growth in synovial tissue, but not in bone marrow.

Conclusion

A specific population of FSCs, RA-NLCs reside in both the bone marrow and synovium of RA patients and have the functional capacity to interact with lymphocyte and monocyte populations, inducing cellular differentiation and biologic activities that mimic pathophysiologic features of rheumatoid inflammation. These findings suggest that RA-NLCs may play an essential role in the development of local immune and inflammatory responses in the synovium and the bone marrow. RA-NLCs could therefore be central elements in the pathologic events in RA and might be appropriate targets for therapeutic intervention in RA.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

The work reported here has been supported in part by a grant-in-aid from the Health Science Research grant from the Ministry of Health and Welfare of Japan. The authors are grateful for the great collaboration and support of the people listed in each paper related to this review. Among them, we are especially grateful to Dr T Kishimoto, Dr T Hirano, Dr S Nagata, Dr T Suda, Dr M Miyasaka, Dr T Kaisho, and Dr K Ishihara of Osaka University Medical School, and to Dr R Suzuki and Miss T Uchida of the Research Center, Sagami National Hospital.

References

- Eisenberg RA, Cohen PL: **The role of immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatic disease.** In *Primer on the Rheumatic Diseases*. 10th edition. Edited by Schumacher HR, Klippel JH, Koopman WJ. Atlanta: Arthritis Foundation; 1993:27-35.
- Genant HK: **Radiology of rheumatic diseases.** In *Arthritis and Allied Conditions*. 9th edition. Edited by McCarty DJ. Philadelphia: Lea & Febiger; 1979:70-130.
- Trentham D, Townes A, Kang A: **Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis.** *J Exp Med* 1977, **146**: 857-868.
- Nakagawa S, Toritsuka Y, Wakitani S, Denno K, Tomita T, Owaki H, Kimura T, Shino K, Ochi T: **Bone marrow stromal cells contribute to synovial cell proliferation in rats with collagen induced arthritis.** *J Rheumatol* 1996, **23**:2098-2103.
- Tomita T, Takeuchi E, Toyosaki-Maeda T, Oku H, Kaneko M, Takano H, Sugamoto K, Ohzono K, Suzuki R, Ochi T: **Establishment of nurse-like stromal cells from bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: indication of characteristic bone marrow microenvironment in patients with rheumatoid arthritis.** *Rheumatology* 1999, **38**:854-963.
- Takeuchi E, Tomita T, Toyosaki-Maeda T, Kaneko M, Takano H, Hashimoto H, Sugamoto K, Suzuki R, Ochi T: **Establishment and characterization of nurse cell-like stromal cell lines from synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**:221-228.
- 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, **102**:606-618.
- Wekerle H, Ketelsen UP: **Thymic nurse cells - Ia bearing epithelium involved in T-lymphocyte differentiation?** *Nature* 1980, **283**:402-404.
- Wekerle H, Ketelsen UP, Ernst M: **Thymic nurse cells. Lymphoepithelial cell complexes in murine thymuses: morphological and serological characterization.** *J Exp Med* 1980, **161**: 925-944.
- Toyosaki-Maeda T, Takano H, Tomita T, Tsuruta Y, Maeda-Tanimura M, Shimaoka Y, Takahashi T, Iton 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**:306-310.
- De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP: **Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane.** *Arthritis Rheum* 2001, **44**:1928-1942.
- De Bari C, Dell'Accio F, Vanlauwe J, Eyckmans J, Khan IM, Archer CW, Jones EA, McGonagle D, Mitsiadis TA, Pitzalis C, Luyten FP: **Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**:209-221.
- Jones EA, English A, Henshaw K, Kinsey SE, Markham AF, Emery P, McGonagle D: **Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor**

This review is part of a series on
Mesenchymal stromal cells
edited by Steffen Gay.

Other articles in this series can be found at
[http://arthritis-research.com/articles/
review-series.asp?series=ar_Mesenchymal](http://arthritis-research.com/articles/review-series.asp?series=ar_Mesenchymal)

- cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum* 2004, **50**:817-827.
14. Jones EA, English A, Kinsey SE, Straszynski L, Emery P, Ponchel F, McGonagle D: Optimization of a flow cytometry-based protocol for detection and phenotypic characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Cytom Part B (Clin Cytom)* 2006, **70B**:391-399.
 15. Kaisho T, Oritani K, Ishikawa J, Tanabe M, Muraoka O, Ochi T, Hirano T: Human bone marrow stromal cell lines from myeloma and rheumatoid arthritis that can support murine pre-B cell growth. *J Immunol* 1992, **149**:4088-4095.
 16. Kaisho T, Ishikawa J, Oritani K, Inazawa J, Tomizawa H, Muraoka O, Ochi T, Hirano T: BST-1, a surface molecule of bone marrow stromal cell lines that facilitates pre-B-cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, **91**:5325-5329.
 17. Lee BO, Ishikawa K, Denno K, Kobune Y, Itoh M, Muraoka O, Kaisho T, Sasaki T, Ochi T, Hirano T: Elevated levels of the soluble form of bone marrow stromal cell antigen 1 in the sera of patients with severe rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996, **39**:629-637.
 18. Ishihara K, Hirano T: BST-1/CD157 regulates the humoral immune responses in vivo. *Chem Immunol* 2000, **75**:235-255.
 19. 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, **164**:1110-1116.
 20. Takeuchi E, Tanaka T, Umemoto E, Tomita T, Shi K, Takahi K, Suzuki R, Ochi T, Miyasaka M: VLA-4-dependent and -independent pathways in cell contact-induced proinflammatory cytokine production by synovial nurse-like cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res* 2002, **4**:1-8.
 21. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ: Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* 2000, **96**:2655-2663.
 22. Tsukada N, Burger JA, Zvaifler NJ, Kipps TJ: Distinctive features of 'nurselike' cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002, **99**:1030-1037.
 23. Nishio M, Endo T, Tsukada N, Ohata J, Kitada S, Reed JC, Zvaifler NJ, Kipps TJ: Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1 α . *Blood* 2005, **106**:1012-1020.
 24. Burger JA, Zvaifler NJ, Tsukada N, Firestein GS, Kipps TJ: Fibroblast-like synoviocytes support B-cell pseudoemperipolesis via a stromal cell-derived factor-1 and CD106 (VCAM-1)-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2001, **107**:305-315.
 25. Ohata J, Zvaifler NJ, Nishio M, Boyle DL, Kalled SL, Carson DA, Kipps TJ: Fibroblast-like synoviocytes of mesenchymal origin express functional B cell-activating factor of the TNF family in response to proinflammatory cytokines. *J Immunol* 2005, **174**:864-870.
 26. Tsuboi H, Udagawa N, Hashimoto J, Yoshikawa H, Takahashi N, Ochi T: Nurse-like cells from patients with rheumatoid arthritis support the survival of osteoclast precursors via macrophage colony-stimulating factor production. *Arthritis Rheum* 2005, **52**:3819-3828.
 27. Tsuboi H, Matsui Y, Hayashida K, Yamane S, Maeda-Tanimura M, Nampei A, Hashimoto J, Suzuki R, Yoshikawa H, Ochi T: Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive cells in rheumatoid synovium may induce the destruction of articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 2003, **62**:196-203.
 28. Boyce BF, Li P, Yao Z, Zhang Q, Badell IR, Schwartz EM, O'Keefe RJ, and Xing L: TNF α and pathologic bone resorption. *Keio J Med* 2005, **54**:127-131.
 29. Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross P, Teitelbaum SL: IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 2005, **115**:282-290.
 30. Saïdenberg-Kermanac'h N, Cohen-Solal M, Bessis N, De Vernejoul MC, Boissier MC: Role for osteoprotegerin in rheumatoid inflammation. *Joint Bone Spine* 2004, **71**:9-13.
 31. Gay S, Gay RE, Koopman WJ: Molecular and cellular mechanism of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction? *Ann Rheum Dis* 1993, **52**:39-47.
 32. Firestein GS: Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum* 1996, **39**:1781-1790.
 33. Shigeyama Y, Pap T, Kunzler P, Rethage J, Simmen B, Gay RE, Gay S: Rheumatoid arthritis (RA) synovial fibroblasts express osteoclast differentiating factor (ODF) mRNA at sites of joint destruction [abstract]. *Arthritis Rheum* 1999, **42**:283.
 34. Gay S, Gay RE: Cellular basis and oncogene expression of rheumatoid joint destruction. *Rheumatol Int* 1989, **9**:105-113.
 35. Farahat MN, Yanni G, Poston R, Panayi GS: Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1993, **52**:870-875.
 36. Nagata S, Suda T: Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today* 1995, **16**:39-43.
 37. Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T, Nagata S: Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med* 1997, **186**:2045-2050.
 38. Hashimoto H, Tanaka M, Suda T, Tomita T, Hayashida K, Takeuchi E, Kaneko M, Takano H, Nagata S, Ochi T: Soluble fas ligand in the joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998, **41**:657-662.

Independent Association of Increased Trunk Fat with Increased Arterial Stiffening in Postmenopausal Patients with Rheumatoid Arthritis

MASAAKI INABA, KAZUMASA TANAKA, HITOSHI GOTO, SHINREI SAKAI, SHINSUKE YAMADA, HIROSHI NAKA, YASUO IMANISHI, and YOSHIKI NISHIZAWA

ABSTRACT. *Objective.* We recently reported increased arterial thickening and stiffening in patients with rheumatoid arthritis (RA) to which inflammation and increased bone resorption contributed. The current study examined the possible involvement of trunk fat in increased arterial stiffening in postmenopausal patients with RA.

Methods. RA patients (n = 30) and healthy controls (n = 30), all postmenopausal women, were examined for body adiposity and brachial-ankle pulse wave velocity (baPWV) by dual-energy x-ray absorptiometry and waveform analyzer, respectively. Subjects having other diseases and predisposed to atherosclerosis were excluded. Trunk:peripheral fat ratio was calculated as the fat mass of the trunk divided by the sum of the fat mass of arms and legs. Bone mineral density (BMD) at ultradistal radius was measured by peripheral quantitative computed tomography. Inflammation markers and bone resorption markers were also measured.

Results. Age, body mass index, and systolic blood pressure (BP) of RA patients were 60.8 ± 9.8 years, 22.5 ± 3.3 , and 129.6 ± 20.8 mm Hg, respectively, which did not differ from data from healthy controls. Duration of RA was 10.4 years with mean daily dose of prednisolone 3.02 ± 3.85 mg. RA patients exhibited a significantly greater trunk:peripheral fat ratio (1.041 ± 0.253 vs 0.839 ± 0.223 ; $p < 0.001$) and baPWV value (1544.7 ± 304.9 vs 1373.8 ± 256.1 ; $p < 0.005$) than healthy controls. In RA patients, age ($r = 0.588$, $p < 0.001$), systolic BP ($r = 0.553$, $p < 0.005$), trabecular BMD at ultradistal radius ($r = -0.346$, $p = 0.061$), and trunk:peripheral fat ratio ($r = 0.366$, $p = 0.046$) were correlated with baPWV. Trunk:peripheral fat ratio did not differ significantly between RA patients with and those without prednisolone treatment. In multiple regression analysis that included age, systolic BP, and trunk:peripheral fat ratio as independent variables, the trunk:peripheral fat ratio emerged as an independent factor significantly associated with baPWV in RA patients. When trabecular BMD at ultradistal radius was inserted in place of trunk:peripheral fat ratio, it emerged as a factor that was significantly associated with baPWV.

Conclusion. We showed that increased trunk fat was significantly and independently associated with increased arterial stiffening in postmenopausal patients with RA. (J Rheumatol 2007;34:290-5)

Key Indexing Terms:

RHEUMATOID ARTHRITIS
PULSE WAVE VELOCITY

ATHEROSCLEROSIS
METABOLIC SYNDROME

ARTERIAL STIFFENING
CENTRAL OBESITY

Large epidemiological studies showed that one of the most important causes of death in patients with rheumatoid arthritis (RA) is cardiovascular disease¹⁻³. We recently reported that RA prevalence by itself is a risk factor for accelerated athero-

sclerosis by cross-sectional⁴ or longitudinal study⁵, and that RA inflammation and enhanced bone loss, particularly at the paraarticular trabecular component, is responsible for the increased arterial wall thickening and stiffening^{5,6}. Recently, evidence has accumulated that excess body fat, particularly visceral fat, is associated with the prevalence of the metabolic syndrome that increases cardiac risk^{7,8}. Obesity might also promote preclinical atherosclerotic changes by a direct effect on vascular physiology^{9,10}. We have reported that bone loss at weight-bearing bones, such as calcaneus, was significantly associated with impairment of physical activity in patients with RA, where it occurs preferentially^{4,11}, as well as in healthy subjects¹². Therefore, the reduction of calcaneus osteo-sono index might result from the impairment of physical activity in patients with RA. It has been increasingly recognized that visceral obesity is intimately involved in the pro-

From the Department of Metabolism, Endocrinology and Molecular Medicine, Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan.

M. Inaba, MD, PhD, Associate Professor; K. Tanaka, MD, Research Associate; H. Goto, MD, PhD, Lecturer; S. Sakai, MD, Research Associate; S. Yamada, MD, PhD, Research Associate; H. Naka, MD, Research Associate; Y. Imanishi, MD, PhD, Lecturer; Y. Nishizawa, MD, PhD, Full Professor, Department of Metabolism, Endocrinology and Molecular Medicine.

Address reprint requests to Dr. M. Inaba, Department of Metabolism, Endocrinology and Molecular Medicine, Osaka City University Graduate School of Medicine, 1-4-3 Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan. E-mail: inaba-m@med.osaka-cu.ac.jp

Accepted for publication October 10, 2006.

Personal non-commercial use only. The Journal of Rheumatology Copyright © 2007. All rights reserved.

gression of atherosclerosis due partly to the lack of physical activity¹³. RA patients' physical activity decreases as joint destruction progresses¹⁴, and thus the loss of muscle mass is assumed to occur preferentially in the limb region as a result of impaired joint function. Although computed tomography is the gold standard to measure visceral fat mass, the amount of radiation exposure is too great for use in the general population. Alternatively, dual-energy x-ray absorptiometry (DEXA) allows us to determine the fat mass separately in trunk and peripheral regions; the resultant trunk:peripheral fat ratio provides a clinically relevant measure of central obesity¹⁵.

These assumptions prompted us to examine whether patients with RA exhibited increased trunk:peripheral fat ratio, and to determine the involvement of central obesity in development of increased arterial wall stiffening in RA.

MATERIALS AND METHODS

Subjects. The subjects were all postmenopausal women, comprising 30 patients with RA and 30 healthy controls; all provided written informed consent to the study protocol. RA patients were recruited from the Outpatient Rheumatology Clinic at Osaka City University Hospital, and were diagnosed according to the 1987 revised criteria of the American College of Rheumatology (formerly the American Rheumatism Association)¹⁶. Healthy controls were selected from participants in a Local Health Check Program at Osaka City University Hospital. The study was approved by the Institutional Review Board of Osaka City University Graduate School of Medicine.

To avoid confounding by other known risk factors for atherosclerosis, both groups were selected on the basis of the following exclusion criteria: (1) hypertension, defined as blood pressure > 150/90 mm Hg, or use of antihypertensive medication; (2) hyperlipidemia, as diagnosed by the NCEP ATP III criteria¹⁷ [total cholesterol > 240 mg/dl, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol > 160 mg/dl, high-density (HDL) cholesterol < 35 mg/dl, or triglyceride > 150 mg/dl], or use of lipid-lowering medication; (3) diabetes mellitus, based on a history of diabetes or the expert committee criteria¹⁸, or use of antidiabetic medication; (4) history of ischemic heart disease or cerebrovascular events; and (5) receiving hormone replacement therapy. Further, to avoid the effect of joint destruction on ultradistal radius bone mineral density (BMD) by peripheral quantitative computerized tomography (pQCT), RA patients whose bone structure of distal radius was destroyed as shown by radiographic examination were also excluded. All 30 RA patients were receiving multiple medications — 19 taking nonsteroidal antiinflammatory drugs, 13 methotrexate (MTX), 4 actarit, 1 salazosulfapyridine, 3 bucillamine, 5 MTX supplemented with folate, and 15 low-dose prednisolone (2 patients taking 1.0 mg/day, 2 patients 3.0 mg/day, 1 patient 4.0 mg/day, 6 patients 5.0 mg/day, 1 patient 6.0 mg/day, 1 patient 7.5 mg/day, and 2 patients 10.0 mg/day).

Measurement of clinical variables. Blood was collected after an overnight fast at the time of PWV measurement. A morning void urine sample, which subjects were asked to bring to the hospital, was also used. Blood samples were immediately centrifuged and the resultant serum samples were stored at -70°C until analyzed. Laboratory variables relevant to RA activity [erythrocyte sedimentation rate (ESR), platelet count, serum C-reactive protein (CRP), and rheumatoid factor (RF)] were measured by routine methods in RA patients. Serum levels of total cholesterol, triglyceride, and HDL cholesterol were determined using an autoanalyzer. LDL cholesterol was calculated by the formula of Friedewald, *et al*¹⁹. Urinary excretion of deoxypyridinoline and N-terminal telopeptide was measured as bone resorption marker, as described²⁰.

Measurement of body fat by DEXA. The percentage of body fat of the total body, trunk, arms, and legs was measured by DEXA (QDR-4500A, Hologic, Waltham, MA, USA)^{21,22} (Figure 1). Fat from arms and legs was first

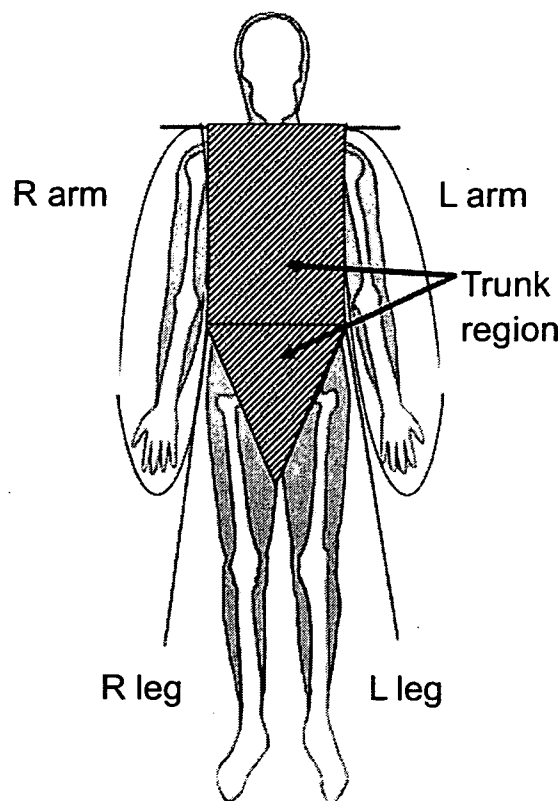


Figure 1. Estimation of trunk:peripheral fat ratio. Fat from both arms and legs was first summed to estimate peripheral fat. A trunk:peripheral fat ratio variable was created by dividing trunk regional fat (g) by peripheral regional fat (g).

summed to estimate peripheral fat, and a trunk:peripheral fat ratio variable was created by dividing trunk regional fat (g) by peripheral regional fat (g), as described¹⁵. The precision of measurements of fat mass are 1.5%, 0.8%, and 1.1% for the arms, legs, and trunk, respectively, according to the report of the manufacturer.

Measurement of arterial stiffening by PWV. PWV was measured as an index of arterial stiffening as reported^{6,23}. Resting blood pressure was determined in the right arm with a sphygmomanometer after at least 15 min of supine rest at the time of PWV measurement. The systolic blood pressure was taken upon appearance of Korotkoff sounds, and the diastolic blood pressure upon disappearance of such sounds. Results are reported as the average of 3 measurements. PWV was measured in the supine position after 5 min of bed rest, using an automatic waveform analyzer (model BP-203RPE; Colin, Komaki, Japan). Pressure waveforms of the brachial and tibial arteries were recorded by an oscillometric method, using occlusion/sensing cuffs adapted to both arms and both ankles. Pressure waveforms of the femoral arteries were recorded using multi-element tonometry sensors placed at the femoral artery. The electrocardiogram was monitored with electrodes placed on both wrists. Heart sounds S1 and S2 were detected by a microphone positioned at the left edge of the sternum at the third intercostal space. The waveform analyzer measures time intervals between S2 and the notch of the brachial pulse wave (Thb), between pulse waves of the femoral arteries (Tcf), and between pulse waves of the femoral and tibial (ankle) arteries (Tfa). Estimates of the path lengths of the heart-carotid (Dhc), heart-brachial (Dhb), heart-femoral (Dhf), and femoral-ankle (Dfa) segments were obtained based on the subject's height (HT, in cm), using the following formulas: $Dhc = 0.2437 \times HT - 18.999$; $Dhb = 0.2195 \times HT - 2.0734$; $Dhf = 0.5643 \times HT - 18.381$; $Dfa = 0.2486 \times HT + 30.709$. PWV was calculated for each arterial segment as the

path length divided by the corresponding time interval. Reproducibility of the PWV measurement was evaluated by repeated measurements in 17 healthy subjects on 2 different occasions. The coefficients of variation were 1.9% for baPWV and 3.3% for faPWV^{21,24}.

Measurement of BMD by pQCT. pQCT measurements were performed at 4% to the ulnar length proximal to the end of the radius (ultradistal site) with a single CT slice 2.5 mm thick on the nondominant side, using an XCT-960 scanner (Stratec Inc., Pforzheim, Germany) as described¹¹. Briefly, the bone mineral content (mg/mm), cross-sectional bone area, and BMD (mg/cm³) were determined at the ultradistal site for the entire cross-section, as well as for the trabecular compartment. After determination of the entire bone contour, the outer 65% of voxels were concentrically peeled off. The remaining 35% of voxels were defined as the trabecular region, while the peeled-off area was defined as the cortical plus the subcortical area²⁵. Image processing and calculation of numerical values were performed using the manufacturer's software. The precision of the pQCT procedure ranged from 1% to 2%, depending upon the variable being assessed²⁶.

Statistical analysis. Variables with a normal distribution were expressed as mean \pm SD, and differences between mean values were examined by Student's t test. Variables showing a non-normal distribution were summarized as median and range, and a nonparametric Mann-Whitney U-test was used to evaluate the differences between the median values. Linear regression analysis was performed to examine univariate correlation, and multiple linear regression analysis to assess independent associations between variables. Variables with skewed distributions were subjected to univariate and multivariate regression models after log-transformation of the data. P values < 0.05 were considered statistically significant. Statistical analysis was performed with StatView 5.0 for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

RESULTS

Clinical characteristics of patients and controls. Clinical characteristics of the RA patients and healthy controls are shown in Table 1. The mean duration of RA was 10.4 ± 14.3

months (range 0.33–50 mo), with daily dose of prednisolone 3.02 ± 3.85 mg (range 0–15 mg). There was no significant difference between the 2 groups in age, body mass index, or systolic blood pressure, although trunk:peripheral fat ratio, faPWV, and baPWV were all significantly greater in RA patients than in controls. Trunk:peripheral fat ratio did not differ significantly between RA patients using and those not using steroid therapy (data not shown).

Factors correlated with PWV in RA patients. In RA patients, age ($r = 0.588$, $p < 0.001$) and systolic blood pressure ($r = 0.553$, $p = 0.0015$) showed a significant and positive correlation with baPWV, as reported⁶ (Table 2). Trabecular, but not total, BMD at ultradistal radius showed a tendency to a negative correlation with baPWV ($r = -0.346$, $p = 0.061$), essentially as previously reported¹¹. Of interest, the trunk:peripheral fat ratio showed a significant and positive correlation with baPWV ($r = 0.366$, $p = 0.046$).

Multiple regression analysis of factors associated with the level of PWV. Next, we tried to elucidate the factor independently associated with increased PWV value in RA patients. In multiple regression analysis that included age, systolic blood pressure and trunk:peripheral fat ratio as independent variables, the trunk:peripheral fat ratio and systolic blood pressure emerged as independent factors significantly associated with baPWV in RA patients. When trabecular or total BMD at ultradistal radius was inserted in place of the trunk:peripheral fat ratio, trabecular, but not total BMD, emerged as a significant factor (Table 3).

Table 1. Clinical characteristics of healthy controls and patients with RA.

Clinical Variables	Controls	RA Patients
No. of subjects	30	30
Age, yrs	65.6 ± 10.8	60.8 ± 9.8
Body mass index, kg/m ²	22.8 ± 4.1	22.5 ± 3.3
Systolic BP, mm Hg	139.3 ± 20.8	129.6 ± 20.8
Total cholesterol	210.3 ± 35.8	203.9 ± 35.9
HDL cholesterol	56.6 ± 16.3	63.5 ± 14.8
Triglyceride	113.0 ± 48.5	104.7 ± 36.1
Trunk:peripheral fat ratio	0.839 ± 0.223	1.041 ± 0.253
baPWV, cm/s	1373.8 ± 256.1	1544.7 ± 304.9
pQCT		
Total BMD at ultradistal radius (Z score, %)	101.2 ± 13.6	93.3 ± 26.0
Trabecular BMD at ultradistal radius (Z score, %)	121.2 ± 33.4	83.3 ± 45.0
RA duration, mo	—	10.4 ± 14.3
Prednisolone, mg/day	—	3.02 ± 3.85
CRP, mg/dl	ND	1.0 (0.1–8.0)
RF, IU/ml	ND	151.1 (9–1270)
ESR, mm/h	ND	49 (8–110)
Platelets ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	ND	26.3 (17.2–56.1)
DPD/Cre, nmol/mmol Cr	ND	7.9 (4.8–21.2)
NTX/Cre, nmol BCE/mmol Cr	ND	69.5 (29.3–153.9)

Values are shown as mean \pm SD. Values of CRP, RF, ESR, platelets, DPD, and NTX are median (range). ND: not determined. HDL: high density lipoprotein; BP: blood pressure; CRP: C-reactive protein; ESR: erythrocyte sedimentation rate; DPD: deoxypyridinoline; NTX/Cre, N-terminal telopeptide/creatinine ratio; baPWV: brachial-ankle pulse wave velocity; pQCT: peripheral quantitative computerized tomography.

Table 2. Univariate analysis of factors correlated with baPWV in patients with RA.

	baPWV	
	r	p
Age	0.588	0.0006*
Systolic blood pressure	0.553	0.0015*
RA duration	0.156	0.564
Total BMD at the ultradistal radius	-0.237	0.208
Trabecular BMD at the ultradistal radius	-0.346	0.061
Trunk:peripheral fat ratio	0.366	0.046**

* p < 0.01, ** p < 0.05.

DISCUSSION

Our study showed that trunk:peripheral fat ratio was significantly greater in patients with RA than in healthy controls, and that increased trunk:peripheral fat ratio in RA patients was independently associated with increased arterial stiffening observed in those patients. These data showed that an increase of abdominal fat might contribute to the increased arterial stiffening in RA patients, and also probably to increased cardiovascular mortality.

Inflammatory disease activity in RA is frequently accompanied by loss of body cell mass, known as rheumatoid cachexia²⁷. This condition may manifest as low BMI and can also potentially contribute to excess cardiovascular burden. Recently, an epidemiological study confirmed that low BMI is associated with a significantly increased cardiovascular death rate²⁸, although no data were shown on RA disease activity. When the treatment of RA is not sufficient to suppress disease activity, patients with RA should lose body weight due to persistence of RA-associated inflammation. Since sustained inflammation is known to accelerate atherosclerosis in RA patients, those patients should have higher cardiovascular risk. We examined RA patients with their RA activity almost controlled, as reflected by their serum median CRP levels around 1.0 mg/dl, thanks to the introduction of MTX into the RA therapeutic regimen. Therefore, the effect of RA inflammation on atherosclerosis should have been attenuated in the patients enrolled in this study. As RA activity has been con-

trolled, patients might easily gain body weight to develop central obesity, leading to increased arterial stiffening. These data raise the possibility that recent improvements of RA disease control by new therapeutic regimens may induce patients to gain body weight preferentially in the trunk region and to develop metabolic syndrome, which might contribute to the increased arterial stiffening, and possibly to the increased cardiovascular risk in patients. Although the metabolic syndrome is defined as those having abdominal circumference > 90 cm, RA patients in our study did not show such a great circumference on the basis of their normal BMI of 22.5 ± 3.3 . However, the older age of patients with RA might play a role in development of central obesity. Further, the smaller amounts of muscle due to ethnic variation may be partly responsible.

Trunk fat is known as a risk factor for chronic diseases including metabolic syndrome, such as diabetes mellitus and cardiovascular diseases²⁹. Although overall obesity increases the cardiovascular risk, central adiposity contributes to it to a greater extent by several specific mechanisms³⁰. Trunk adipose tissue is reported to secrete various adipocytokines³¹ that may induce endothelial dysfunction, impaired metabolic state³², and atherogenic serum lipid profile³³, to increase cardiovascular risk³⁴. Excess subcutaneous trunk fat and abdominal adiposity have also been shown to induce insulin resistance to enhance atherosclerosis^{35,36}.

An exercise intervention study reported a greater reduction in total abdominal and subcutaneous abdominal fat in the exercise weight-loss group than in the diet weight-loss group³⁷. Another study clearly showed that mean BMI, the percentage of body fat, and the waist:hip ratio were significantly lower for each increasing physical activity level³⁸, suggesting that impaired physical activity often observed in patients with RA might enhance deposition of adipose tissue in the trunk region. Supporting this notion is our previous finding that bone mass at calcaneus was preferentially reduced even in the early stage of RA¹¹, and that this had a significant negative correlation with the score on the modified Health Assessment Questionnaire⁴, suggesting that impairment of patients' physical activity occurs even in the early stage of RA.

Our study confirmed our previous finding⁶ that trabecular

Table 3. Multiple regression analysis to evaluate the association of bone status and other risk factors with baPWV in patients with RA. Standard regression coefficients (B) are given.

Independent Variables	baPWV		
	Model 1	Model 2	Model 3
Age	0.270	0.386**	0.270**
Systolic blood pressure	0.325*	0.336	0.294
Trabecular bone density at the ultradistal radius	-0.328*		
Total bone density at the ultradistal radius		-0.083	
Trunk:peripheral fat ratio			0.321**
R ²	0.514*	0.315*	0.423**

* p < 0.01, ** p < 0.05. R², multiple coefficient of determination.

bone loss, but not cortical bone loss, at the paraarticular ultradistal radius was associated with increased arterial wall stiffening. The reduction of physical activity in patients with RA might cause loss of muscle mass in the limb region, as described³⁹. Glucocorticoid is known to increase visceral fat, as observed in Cushing syndrome, since fat cells in the abdominal region have been thought to be more sensitive to hormonal factors than fat cells in other regions⁴⁰. However, the effect of glucocorticoid in increasing abdominal fat could be negated in patients with RA receiving low-dose prednisolone, since no essential difference was observed in the trunk:peripheral fat ratio between RA patients with and those without prednisolone therapy. The limitation of our study is that it is not possible to conclude that the increased fat was involved in the development of increased arterial stiffening in postmenopausal patients with RA, since the study design was cross-sectional. Thus, a longitudinal study is needed to draw conclusions about the significance of central obesity in arterial stiffening in RA.

In summary, postmenopausal patients with RA who had success with drug treatment had significantly higher trunk:peripheral fat ratios that were independently associated with increased baPWV values; these findings suggest that increased trunk fat, as well as paraarticular bone loss, might be involved in the increased arterial stiffening in postmenopausal patients with RA.

REFERENCES

- Pham T, Gossec L, Constantin A, et al. Cardiovascular risk and rheumatoid arthritis: clinical practice guidelines based on published evidence and expert opinion. *Joint Bone Spine* 2006;73:379-87.
- Goodson N, Marks J, Lunt M, Symmons D. Cardiovascular admissions and mortality in an inception cohort of patients with rheumatoid arthritis with onset in the 1980s and 1990s. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1595-601.
- Maradit-Kremers H, Nicola PJ, Crowson CS, Ballman KV, Gabriel SE. Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Arthritis Rheum* 2005;52:722-32.
- Kumeda Y, Inaba M, Goto H, et al. Increased thickness of the arterial intima-media detected by ultrasonography in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:1489-97.
- Nagata-Sakurai M, Inaba M, Goto H, et al. Inflammation and bone resorption as independent factors of accelerated arterial wall thickening in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:3061-7.
- Tanaka K, Inaba M, Goto S, et al. Paraarticular trabecular bone loss at the ultradistal radius and increased arterial stiffening in postmenopausal patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2006;33:652-8.
- Hutley L, Prins JB. Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome. *Am J Med Sci* 2005;330:280-9.
- Behn A, Ur E. The obesity epidemic and its cardiovascular consequences. *Curr Opin Cardiol* 2006;21:353-60.
- Bonora E. The metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Ann Med* 2006;38:64-80.
- Singhal A. Endothelial dysfunction: role in obesity-related disorders and the early origins of CVD. *Proc Nutr Soc* 2005;64:15-22.
- Inaba M, Nagata M, Goto H, et al. Preferential reductions of paraarticular trabecular bone component in ultradistal radius and of calcaneus ultrasonography in early-stage rheumatoid arthritis. *Osteoporos Int* 2003;14:683-7.
- Yamada S, Inaba M, Goto H, et al. Associations between physical activity, peripheral atherosclerosis and bone status in healthy Japanese women. *Atherosclerosis* 2006;188:196-202. Epub 2005 Nov 28.
- Robinson LE, Graham TE. Metabolic syndrome, a cardiovascular disease risk factor: role of adipocytokines and impact of diet and physical activity. *Can J Appl Physiol* 2004;29:808-29.
- Odegard S, Landewe R, van der Heijde D, Kvien TK, Mowinckel P, Uhlig T. Association of early radiographic damage with impaired physical function in rheumatoid arthritis: a ten-year, longitudinal observational study in 238 patients. *Arthritis Rheum* 2006;54:68-75.
- Novotny R, Daida YG, Grove JS, Le Marchand L, Vijayadeva V. Asian adolescents have a higher trunk:peripheral fat ratio than Whites. *J Nutr* 2006;136:642-7.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24.
- Fedder DO, Koro CE, L'Italien GJ. New National Cholesterol Education Program III guidelines for primary prevention lipid-lowering drug therapy: projected impact on the size, sex, and age distribution of the treatment-eligible population. *Circulation* 2002;105:152-6.
- Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2003;26 Suppl 1:S5-20.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
- Maeno Y, Inaba M, Okuno S, Yamakawa T, Ishimura E, Nishizawa Y. Serum concentrations of cross-linked N-telopeptides of type I collagen: new marker for bone resorption in hemodialysis patients. *Clin Chem* 2005;51:2312-7.
- Okabe R, Inaba M, Sakai S, et al. Increased arterial stiffening and thickening in the paretic lower limb in patients with hemiparesis. *Clin Sci Lond* 2004;106:613-8.
- Inaba M, Nishizawa Y, Mita K, et al. Poor glycemic control impairs the response of biochemical parameters of bone formation and resorption to exogenous 1,25-dihydroxyvitamin D3 in patients with type 2 diabetes. *Osteoporos Int* 1999;9:525-31.
- Nagasaki T, Inaba M, Kumeda Y, et al. Increased pulse wave velocity in subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:154-8.
- Kimoto E, Shoji T, Shinohara K, et al. Preferential stiffening of central over peripheral arteries in type 2 diabetes. *Diabetes* 2003;52:448-52.
- Lochmuller EM, Lill CA, Kuhn V, Schneider E, Eckstein F. Radius bone strength in bending, compression, and falling and its correlation with clinical densitometry at multiple sites. *J Bone Miner Res* 2002;17:1629-38.
- Ashizawa N, Nonaka K, Michikami S, et al. Tomographical description of tennis-loaded radius: reciprocal relation between bone size and volumetric BMD. *J Appl Physiol* 1999;86:1347-51.
- Walsmith J, Roubenoff R. Cachexia in rheumatoid arthritis. *Int J Cardiol* 2002;85:89-99.
- Kremers HM, Nicola PJ, Crowson CS, Ballman KV, Gabriel SE. Prognostic importance of low body mass index in relation to cardiovascular mortality in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004 Nov;50:3450-7.
- Donahue RP, Abbott RD. Central obesity and coronary heart disease in men. *Lancet* 1987;1:821-4.
- Keller KB, Lemberg L. Obesity and the metabolic syndrome. *Am*

- J Crit Care 2003;12:167-70.
31. Matsuzawa Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Lett* 2006;580:2917-21. Epub 2006 Apr 21.
 32. Pietilainen KH, Bergholm R, Rissanen A, et al. Effects of acquired obesity on endothelial function in monozygotic twins. *Obesity Silver Spring* 2006;14:826-37.
 33. Adiels M, Taskinen MR, Packard C, et al. Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia* 2006;49:755-65.
 34. Steffes MW, Gross MD, Lee DH, et al. Adiponectin, visceral fat, oxidative stress, and early macrovascular disease: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study. *Obesity Silver Spring* 2006;14:319-26.
 35. Misra A, Vikram NK. Insulin resistance syndrome (metabolic syndrome) and obesity in Asian Indians: evidence and implications. *Nutrition* 2004;20:482-91.
 36. Burchfiel CM, Curb JD, Arakaki R, et al. Cardiovascular risk factors and hyperinsulinemia in elderly men: the Honolulu Heart Program. *Ann Epidemiol* 1996;6:490-7.
 37. Ross R, Janssen I, Dawson J, et al. Exercise-induced reduction in obesity and insulin resistance in women: a randomized controlled trial. *Obes Res* 2004;12:789-98.
 38. Holcomb CA, Heim DL, Loughin TM. Physical activity minimizes the association of body fatness with abdominal obesity in white, premenopausal women: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Am Diet Assoc* 2004;104:1859-62.
 39. Westhovens R, Nijs J, Taelam V, Dequeker J. Body composition in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1997;36:444-8.
 40. Klotkiewski M, Sjostrom L, Bjorntorp P, Smith U. Regional adipose tissue cellularity in relation to metabolism in young and middle-aged women. *Metabolism* 1975;24:703-10.

②関節リウマチ

Bone quality in rheumatoid arthritis

柏井 将文・橋本 淳・吉川 秀樹

Masafumi Kashii, Jun Hashimoto(助教授), Hideki Yoshikawa(教授) / 大阪大学大学院医学系研究科医学部器官制御外科(整形外科)

関節リウマチ(RA)は続発性骨粗鬆症の原因の一つであり、RAに続発する骨粗鬆症は傍関節性骨粗鬆症と全身性骨粗鬆症に分けられる。ステロイド非使用のRA患者に続発する骨粗鬆症は高回転型の骨代謝動態を示すことが多い。現在、臨床的に骨強度を評価し得るパラメーターとしては骨密度、骨代謝マーカーを用いた骨代謝回転評価、マクロレベルでの構造特性があるが、それ以外の臨床的に骨強度評価の不可能なパラメーターは骨質という概念でまとめられている。近年になり、RA続発の骨粗鬆症での骨質変化についての検討がいくつか報告されるようになってきたが、今後のさらなる検討が待たれる。

key words

関節リウマチ
全身性骨粗鬆症
傍関節性骨粗鬆症
骨密度
骨代謝回転

はじめに

関節リウマチ(RA)は、傍関節性骨粗鬆症(juxtaarticular osteoporosis)や全身性骨粗鬆症(generalized osteoporosis)といった続発性骨粗鬆症の原因疾患であることが知られており、脆弱性骨折が多いため骨質低下の存在が指摘されている^{1)~3)}。2000年のNIH(National Institute of Health)コンセンサス会議にて、「骨粗鬆症は骨強度の低下によって骨折のリスクが増大する骨疾患であり、骨強度は骨密度と骨質の両者を反映する」と定義され、その内容は2001年のJAMA誌に掲載された⁴⁾。それ以降、骨質が新しいパラダイムとして注目され、さまざまな議論を呼んでいる。

骨強度は構造特性(ジオメトリー、微細構造)と材料特性(ミネラル・コラーゲン・マイクロダメージ)により決定されるものであり、これらの諸特性は骨代謝(骨モデリング・骨リモデリング)によって制御されている。現在、臨床的に骨強度を評価し得るパラメーターとしては、骨密度、骨代謝マーカーを用いた骨代謝回転評価、マクロレベルでの構造特性があるが、それ以外の臨床的に骨強度評価の不可能なパラメーターは骨質という概念でまとめられ、その中で重要な位置にあるのがミクロレベルでの構造特性と材料特性である(表1)。

近年、骨微細構造評価や石灰化度・コラーゲン架橋の解析など、RAに続発する骨粗鬆症の骨質評価が進められ

ている。ステロイド性骨粗鬆症と骨質との関連については他稿に譲ることとし、本稿においてはステロイド非使用のRAに合併する骨粗鬆症の研究から得られた骨質に関する知見について記載する。

骨代謝動態と関節リウマチ

炎症関節局所にみられる傍関節性骨粗鬆症はX線写真上早期に認められる変化であり、滑膜組織などより産生される炎症性サイトカイン(IL-1, IL-6, TNF- α など)や閉経による骨吸収亢進、局所の不動による骨形成低下が関与している³⁾⁵⁾。一方、全身性骨粗鬆症は多因子が関与し、より複雑な骨代謝動態を示す。炎症性サイトカ

表1 骨強度の規定因子

1. 骨量
2. 骨質
①構造特性
・マクロレベル：サイズ，形状，皮質骨幅
・ミクロレベル：海綿骨梁の微細構造，皮質骨多孔性
②材料特性
・無機成分：総石灰量，石灰化度，結晶サイズ
・有機成分：コラーゲンタイプ，コラーゲン架橋状況(成熟度)
・マクロダメージ，マイクロクラック
・材料異方性：コラーゲン/ミネラル配向度

骨強度は骨量と骨質より構成され、骨質は構造特性と材料特性に大別される。しかしながら、これらの諸特性だけでは骨強度を説明するには不十分であり、材料組織化・異方化の概念の導入が必要である。

イン、閉経、各種ホルモン異常などが骨吸収亢進に関与し、ステロイド投与、不動などが骨形成低下に関与している³⁾⁵⁾。ステロイド非使用のRA患者の大半が閉経後骨粗鬆症同様に高回転型骨代謝動態を示す⁶⁾。骨吸収マーカーに関しては、尿中デオキシピリジノリン、尿中NTxの増加が活動期RAにて認められるとの報告が多く、血中IL-6、CRP値、RA活動性と骨吸収マーカーが相関すると報告されている⁷⁾。したがって、RAでは骨代謝動態の高回転化により、骨密度減少、吸収窩拡大、骨微細構造の劣化が引き起こされ骨強度の低下をきたす。

骨質と関節リウマチ

RAに合併する骨粗鬆症とその骨質に関する検討はこれまであまり行われていなかったが、近年徐々に検討されつつある。RAにおける骨質の研究について、以下に紹介する。

1. 骨の構造特性

マイクロCTの開発が進み、三次元的に骨梁微細構造を定量的に解析することが可能となり、骨折抑制効果への骨微細構造変化の寄与の重要性が認識されるようになってきた。海面骨梁の数・幅・連結性などは力学的応力に適応した構造を示し、骨強度に対して大きく寄与している。Garcia-Miguelらは、ステロイド非使用のRA患者14例と年齢・性別を合わせたコントロール群14例より腸骨を採取し、マイクロCTにて解析を行った⁸⁾。その結果、RA群では有意な海綿骨量の低下、骨梁幅の低下、骨梁連結性の低下が認められ、RA群の海綿骨微細構造が低下していることが明らかになった。

2. 骨の材質特性

1) ミネラル

骨基質内の石灰化量・石灰化度・結晶サイズなどが骨強度に関与する。高代謝回転状態の骨では、新しい骨単位

の形成が多いため、石灰化度が低いことが知られている。しかし、骨基質内の石灰化度の不均一性は高い。骨基質内の石灰化度の分布幅は広すぎても狭すぎても骨強度が低下する。石灰化度が高いほど骨硬度は高まるが、同時に石灰化度が均一化すると、あるレベル以降“硬いが脆い骨”となり骨強度は低下する⁹⁾。

斎藤らは、RA患者12例および年齢・性別を合わせたコントロール群10例より大腿骨頸部骨を採取し、石灰化度分布およびカルシウム(Ca)、リン(P)含有量についての検討を行った¹⁰⁾。その結果、RA群ではコントロール群に比べて、低石灰化度骨の含有量が高く、低・高石灰化度分画のCa、P含有量は海綿骨では低下した。RA群の海綿骨では、高骨代謝回転動態を反映した結果、二次石灰化度が低下していることが明らかになった。

2) コラーゲン

材料学的には、骨は繊維強化型複合材料に分類される。二つ以上の異なる特性をもつ素材を複合化することにより、それぞれのもつ素材の欠点が補われ、それらよりも優れたあるいは全く新しい機能を発揮させることが可能である。繊維状の材料は、強度の寸法効果*により極めて高い強度を発現させることが可能である。繊維の集合体は引張荷重に対しては非常に強いが、単なる集合体では圧迫荷重、捻りモーメン

*：細くなると材料的強度が増加する。材料はサイズが小さくなるほど強度が増す。

ト、曲げモーメントに対しては抵抗できない。そのため、最も高い強度を生み出す繊維状の材料を構造材料として用いるには、マトリックスとの複合化が必須となる。骨の場合、コラーゲン線維が「繊維状の材料」に相当し、その質(コラーゲン架橋量、架橋種類)・量が骨強度に関与する。

斎藤らは、前述の RA 群とコントロール群にて、ミネラルの検討に加えコラーゲン量、コラーゲン架橋量(生理的架橋、非酵素的糖化架橋)についても検討を行った¹⁰⁾。架橋分析の結果、生理的架橋については皮質骨・海綿骨での成熟架橋量に差が認められなかったのに対し、未熟架橋は RA 群で低下していた。さらに、RA 群では非酵素的糖化架橋(advanced glycation end products : AGEs)が増加し、コラーゲン脆弱指数が増加した。TNF- α が生理的架橋形成を阻害することや、AGEs が酸化ストレスで誘導されることが知られており、これらの知見より局所のサイトカインがコラーゲンの質を悪化させる可能性があることが示唆される。

関節リウマチの骨粗鬆症に対する治療

RA 患者における骨質を規定する諸因子に関する検討についていくつか紹介したが、現時点では、臨床上骨質を直接評価し得るパラメーターはなく、骨代謝マーカ―を用いた骨代謝回転動態評価が行われている。

1. 関節リウマチのコントロール

RA の活動性を制御することにより、傍関節性骨粗鬆症を予防し治療することが可能である。また、RA に合併する全身性骨粗鬆症患者では、不動などで身体活動性が低下することにより、主に大腿骨頸部や踵骨など荷重部で骨量減少が進行することが知られている。そのため、全身性骨粗鬆症の予防・治療に際しては、身体活動性の保持・改善が重要であり、適切な運動療法や関節リウマチ治療薬による治療が必要となる。

現在、最も広く使用されているメトトレキサート(MTX)の投与により、骨吸収マーカ―が低下し、RA の活動性を制御することにより骨粗鬆症が予防されることが示されている¹¹⁾¹²⁾。インフリキシマブのような TNF- α を直接阻害する薬剤も、RA の活動性を制御することにより骨吸収マーカ―を低下させ、大腿骨頸部や腰椎の骨密度を増加させることが示されており、RA 患者における骨粗鬆症の予防・治療が期待できる¹³⁾¹⁵⁾。また、ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体(トシリズマブ)についても、近年その骨代謝動態に対する効果が報告されている¹⁶⁾¹⁷⁾。西本らは、トシリズマブ4mg/kg あるいは8mg/kg の4週間に1回投与を52週間行った群において、骨形成マーカ―である PICP、オステオカルシンの有意な上昇と骨吸収マーカ―である尿中デオキシピリジノリンの有意な低下を認めたことを報告している(表2)。さらに橋本らは、トシリズマブ8mg/kg の4週間に1回投与を52週間行った群では MTX を中心

とした既存治療群に比較して腰椎・大腿骨頸部の骨密度の低下が有意に抑制されることを明らかにした。トシリズマブは既存治療群に比して骨粗鬆症進行を予防し、この効果はステロイド減量、歩行能力改善、RA の活動性の抑制、のいずれの関与も推測される。骨質を規定する諸因子が骨リモデリング・骨モデリングにより制御されていることから考えると、関節リウマチ治療薬により骨代謝動態を改善させることで、骨質が改善・保持される可能性がある。

2. 骨吸収治療薬

現在、原発性骨粗鬆症に対して明らかな骨折抑制効果のエビデンスをもつ薬剤として、ビスフォスフォネート製剤、選択的エストロゲン受容体モジュレーターがある。高骨代謝回転動態を示す骨粗鬆症に対し骨吸収抑制剤を投与すれば、劣化した骨微細構造が改善し骨基質骨石灰化度が上昇する¹⁸⁾。また、骨吸収抑制剤投与によるこれらの骨質を規定する諸因子を改善することにより、骨強度が上昇することが知られている。

RA に続発する全身性骨粗鬆症に対するビスフォスフォネート投与の有効性について多くの報告がなされている¹⁹⁾²⁰⁾。しかしながら、報告のほとんどはステロイド投与を受けている患者を含めているため、純粋にステロイドフリーの RA 患者における全身性骨粗鬆症へのビスフォスフォネート投与の効果については完全に立証されていない。なお、ステロイドフリー

表2 ヒト化抗IL-6レセプター抗体(トシリズマブ)の骨代謝動態に対する効果

	プラセボ (n = 54)	4mg/kg (n = 54)	8mg/kg (n = 55)
オステオカルシン (ng/mL)			
ベースライン	5.8±2.8	5.7±2.8	5.1±2.2
12週間投与後	6.2±3.1	6.6±3.1*	6.5±2.7*
PICP (ng/mL)			
ベースライン	135.4±65.7	127.0±63.5	117.2±47.7
12週間投与後	144.3±77.8	146.4±70.6*	166.4±78.7*
尿中ピリジノリン (μmol/mol Cr)			
ベースライン	60.3±32.6	58.8±32.7	58.5±29.8
12週間投与後	62.6±30.9	49.0±29.5*	47.4±24.2*
尿中デオキシピリジノリン (μmol/mol Cr)			
ベースライン	7.8±3.4	7.6±3.5	7.4±3.1
12週間投与後	7.6±3.8	6.6±3.2*	6.9±3.1*

* : p < 0.05 vs. 各項目ベースライン値 (t 検定), 平均値±標準偏差で表示。
PICP : I型プロコラーゲン-C-プロペプチド

(文献16)より一部改変して掲載)

のRAモデル動物においては、骨吸収マーカーの低下および骨微細構造の保持が認められ、ビスフォスフォネートの有効性が示されている²¹⁾²²⁾。また、ビスフォスフォネート投与は実験上RAの炎症抑制効果を示し、さらに傍関節性骨粗鬆症への有効性が動物実験で示されている²¹⁾²³⁾。しかしながら、RA患者の傍関節性骨粗鬆症に対するビスフォスフォネート投与の効果についての報告は少なく、またその規模も小さいことから、RA患者におけるRAの炎症抑制効果や傍関節性骨粗鬆症への有効性に関して結論を出すまで

にはいまだ検討を必要とする。

おわりに

関節リウマチ、特にステロイド非使用の関節リウマチ患者に合併する骨粗鬆症と骨質に関して概説した。骨質の概念そのものがクローズアップされるようになって間もないためか、RAに合併する骨粗鬆症とその骨質に関する検討は少ない。RA患者における骨質の変化について、関節リウマチ治療薬や骨吸収抑制剤の骨質への効果についての今後の検討が待たれる。

また、骨質そのものについても完全に全貌がつかまれているわけではない。骨はマクロレベルからナノレベルまで精緻に制御された複合材料であり、積層化や繊維強化などさまざまな組織化形態を取ることで、加えられた応力に対して最適な材料を構築している²⁴⁾。力学的応力に適応するべく皮質骨・海綿骨を異方化させるメカニズムについてはほとんどわかっていないが、材料異方性は骨強度に対して極めて強い影響を与えることが知られている²⁵⁾²⁶⁾。身近な例で例えれば、鉄筋コンクリート材は内部の鉄筋の走行方向の違いに

よりその力学特性は大きく異なることと同様である。現在、骨質は構造特性と材料特性に大きく二別されているが、これらの特性だけでは骨強度を説明するには不十分であり、材料組織化・異方化の観点からの骨質に対するアプローチも必要である。

文 献

- 1) Gough AKS, Lilley J, Eyre S, et al : Generalized bone loss in patients with early rheumatoid arthritis. *Lancet* **344** : 23-27, 1994
- 2) Dequeker J, Maenaut K, Verwilghen J, et al : Osteoporosis in rheumatoid arthritis ; a review. *Clin Exp Rheumatol* **13** (Suppl.12) : S21-26, 1995
- 3) Sambrook PN : The skeleton in rheumatoid arthritis ; common mechanisms for bone erosion and osteoporosis? *J Rheumatol* **27** : 2541-2542, 2000
- 4) NIH Consensus Development Panel : Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA* **285** : 785-795, 2001
- 5) Deodhar AA, Woolf AD : Bone mass measurement and bone metabolism in rheumatoid arthritis ; a review. *Br J Rheumatol* **35** : 309-322, 1996
- 6) al-Awadhi AM, Olusi SO, al-Zaid NS, et al : Urine levels of type 1 collagen cross-linked N-telopeptides and deoxypyridinoline correlate with disease activity in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* **16** : 569-572, 1998
- 7) Gough A, Sambrook P, Devlin J, et al : Osteoclastic activation is the principal mechanism leading to secondary osteoporosis in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **25** : 1282-1289, 1998
- 8) Garcia-Miguel J, Wright AC, Perez-Edo L, et al : Bone microarchitecture changes in rheumatoid arthritis assessed by 3D micro-CT. 28th annual meeting of the ASBMR abstracts : S109 F-327, 2006
- 9) Boivin G, Meunier PJ : Methodological considerations in measurement of bone mineral content. *Osteoporos Int* **14** (Suppl.5) : 22-28, 2003
- 10) 斎藤 充, 田中孝昭, 曾雌 茂 : 関節リウマチ患者における骨質因子としての骨石灰化度とコラーゲン架橋形成. 第23回日本骨代謝学会学術集会プログラム抄録 : 167 O-25, 2005
- 11) Gough AK, Peel NF, Eastell R, et al : Excretion of pyridinium crosslinks correlates with disease activity and appendicular bone loss in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **53** : 14-17, 1994
- 12) Kollerup G, Hansen M, Horslev-Petersen K : Urinary hydroxypyridinium cross-links of collagen in rheumatoid arthritis. Relation to disease activity and effects of methylprednisolone. *Br J Rheumatol* **33** : 816-820, 1994
- 13) Ostanek L, Pawlik A, Brzosko I, et al : The urinary excretion of pyridinoline and deoxypyridinoline during rheumatoid arthritis therapy with infliximab. *Clin Rheumatol* **23** : 214-217, 2004
- 14) Lange U, Teichmann J, Muller-Ladner U, et al : Increase in bone mineral density of patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF- α antibody ; a prospective open-label pilot study. *Rheumatol* **44** : 1546-1548, 2005
- 15) Torikai E, Kageyama Y, Takahashi M, et al : The effect of infliximab on bone metabolism markers in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol* **45** : 761-764, 2006
- 16) Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, et al : Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin 6 receptor antibody. *Arthritis Rheum* **50** : 1761-1769, 2004
- 17) 橋本 淳, 宮坂信之, 山本一彦, 他 : ヒト化抗IL-6レセプター抗体(トシリズマブ)治療は関節リウマチ患者にみられる骨粗鬆症進行を防止する. 第24回日本骨代謝学会学術集会プログラム抄録 : 188 O-96, 2006
- 18) Boivin GY, Chavassieux PM, Santora AC, et al : Alendronate increases bone strength by increasing the mean degree of mineralization of bone tissue in osteoporotic

柏井 将文(Masafumi Kashii)

1976年 和歌山県生まれ
 2000年 大阪大学医学部医学科卒業
 2000~2004年 大阪大学医学部付属病院・信州大学医学部
 付属病院・市立豊中病院に勤務
 2004年~ 大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科
 (整形外科)



- women. *Bone* **27** : 687-694, 2000
- 19) Eggelmeijer F, Papapoulos SE, van Paassen HC, et al : Increased bone mass with pamidronate treatment in rheumatoid arthritis. Results of a three-year randomized, double-blind trial. *Arthritis Rheum* **39** : 396-402, 1996
- 20) Frediani B, Falsetti P, Baldi F, et al : Effects of 4-year treatment with once-weekly clodronate on prevention of corticosteroid-induced bone loss and fractures in patients with arthritis ; evaluation with dual-energy X-ray absorptiometry and quantitative ultrasound. *Bone* **33** : 575-581, 2003
- 21) Herrak P, Gortz B, Hayer S, et al : Zoledronic acid protects against local and systemic bone loss in tumor necrosis factor-mediated arthritis. *Arthritis Rheum* **50** : 2327-2337, 2004
- 22) Itoh F, Aoyagi S, Kusama H, et al : Effects of clodronate and alendronate on local and systemic changes in bone metabolism in rats with adjuvant arthritis. *Inflammation* **28** : 15-21, 2004
- 23) Richards PJ, Williams AS, Goodfellow RM, et al : Liposomal clodronate eliminates synovial macrophages, reduces inflammation and ameliorates joint destruction in antigen-induced arthritis. *Rheumatol* **38** : 818-825, 1999
- 24) Nakano T, Kaibara K, Tabata Y, et al : Unique alignment and texture of biological apatite crystallites in typical calcified tissues analyzed by microbeam X-ray diffractometer system. *Bone* **31** : 479-487, 2002
- 25) Martin RB, Burr DB, Sharkey NA : Mechanical properties of Bone. In *Skeletal tissue mechanics*, New York, Springer-Verlag, 127-180, 1998
- 26) Kashii M, Hashimoto J, Nakano T, et al : Bisphosphonate treatment promotes bone formation with less anisotropic microstructure during intramembranous ossification. 28th annual meeting of the ASBMR abstracts **S46** : 1171, 2006

NF κ B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

富田 哲也* 吉川 秀樹

はじめに

本格的な高齢化社会を迎え変形性関節症 (osteoarthritis ; OA) は増加の一途をたどっている。末期には関節変形と共に疼痛が増悪し、関節機能の著しい低下に伴い日常生活活動能力が障害される。関節軟骨の加齢的影響、力学的ストレスなど様々な因子がその病態に関与していると考えられ、精力的に研究が行われているが、未だその病態は完全には解明されず、有効な保存療法も数少ないのが現状である。近年 OA においても炎症性サイトカインや matrix metalloproteinase (MMPs) の産生がその病態の進行に重要な役割を果たしていることが明らかにされ、関節局所でこれらの因子をコントロールする必要性が提唱されている¹⁾。その中で転写調節因子 nuclear factor κ B (NF κ B) が重要な治療上のターゲットとして考えられている²⁾。NF κ B は不活化の状態ではその制御抑制因子 I κ B と複合体を形成し核外に存在するが、活性化刺激により I κ B がリン酸化され、NF κ B が核内へ移行し標的遺伝子の発現を活性化する。

NF κ B デコイ型核酸医薬

われわれは 1990 年代後半より転写調節因子レベルでの制御を目的としたデコイ型核酸医薬による治療法を考案し研究してきた。デコイとは元来“おとり”という意味で、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行うものである。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へ導入する。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結合阻害による

プロモーター活性の低下である。これまでに炎症性関節炎モデル、ヒト関節リウマチ滑膜細胞等での有効性を明らかにしてきた³⁾⁴⁾。今回前十字靭帯切除変形性関節症モデルラットを用いた検討では、6回連続で膝関節内に naked NF κ B デコイ型核酸医薬を局所投与したところ、組織学的に関節軟骨の変性の進行が有意に抑制された。関節軟骨の変性進行に重要な役割を果たすと考えられている炎症性サイトカイン (IL-1 β , TNF α) の発現は、naked NF κ B デコイ型核酸医薬投与群で PBS あるいは scrambled デコイ型核酸医薬投与群に比べ、関節軟骨中および滑膜中で有意に抑制されていた。本実験では関節内局所投与された NF κ B デコイ型核酸医薬の大部分が関節滑膜に導入されていたことを考慮すると、関節軟骨中での炎症性サイトカイン発現レベルの低下は滑膜よりのこれらサイトカイン発現コントロールによる二次的な影響と考えられた。現時点では in vivo では正常軟骨組織にはベクター無しでは、高い導入効率は期待できず、より変性初期の関節軟骨細胞をターゲットにするには、導入方法について検討が必要である。一方変性軟骨細胞には naked でもある程度導入可能であり現在その効果を検討中である。次いでヒト関節軟骨細胞を用いた三次元培養に IL-1 β を添加した系での、NF κ B デコイ型核酸医薬の影響を検討した。この系では IL-1 β 添加により NF κ B が活性化することがすでに証明されている。NF κ B デコイ型核酸医薬添加によりヒト培養軟骨細胞中の IL-1 β および MMP-1 の遺伝子レベルでの発現は有意に抑制された。また細胞基質の産生は IL-1 β 添加により有意に低下していたが、NF κ B デコイ型核酸医薬添加によりその産生量は正常軟骨細胞のレベルに回復した。これらの結果よりヒト関節軟骨細胞に対しても NF κ B デコイ型核酸医薬は有効であることが示唆された。

* Tetsuya TOMITA et al, 大阪大学大学院医学系研究科, 器官制御外科学

図1 NFκBデコイ型核酸医薬の作用機序

NFκB デコイはその特定の結合部位に競合的に結合し、NFκB の結合阻害によるプロモーター活性の低下を生じさせ、その下流に存在する遺伝子発現を制御する。

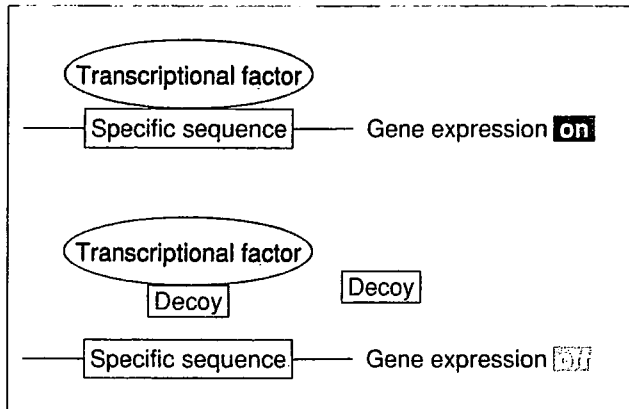
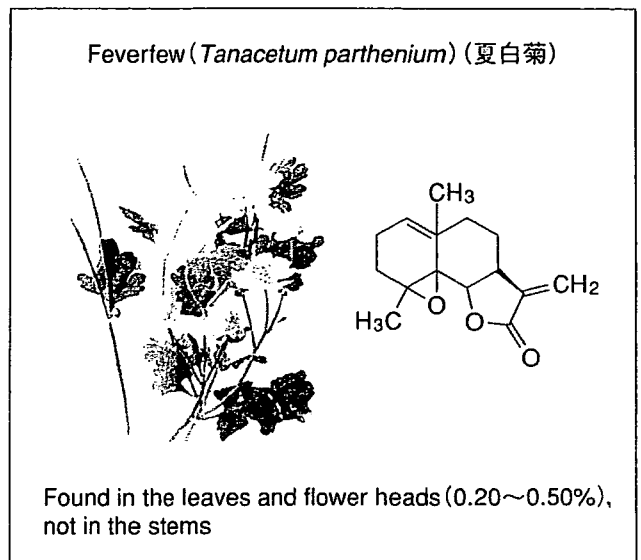


図2 Parthenolide の構造



Parthenolide

Parthenolide は古来偏頭痛に効果があるとされているハーブの一種である feverfew (夏白菊) より抽出合成された低分子化合物で、抗炎症作用を持つことが知られている。近年その作用機序が NFκB の結合抑制であることが示された。当教室の岸田ら⁵⁾はマウス骨肉腫細胞の肺転移を parthenolide が NFκB の down regulation により抑制することを証明した。われわれは parthenolide の炎症性関節炎や OA の治療補助としてのポテンシャルを検討している。parthenolide を上記のヒト関節軟骨三次元培養に IL-1β を添加した系で検討したところ、軟骨細胞中の IL-1β および MMP-1, -3 の遺伝子レベルでの発現は有意に抑制された。現在 in vivo での効果を検討中である。

治療上のターゲットとしての NFκB

NFκB が様々な疾患でその病態形成に重要な役割を果たしていることは明らかにされている。また近年の分子生物学的手法により様々な NFκB の阻害ステップや阻害剤が報告されている。しかし現時点ではまだ臨床の場に応用されたものはなく、今後ヒトへの臨床応用という観点よりの安全性、有効性等の十二分な検討が必要である。この点においてはすでに他疾患でヒトへの投与が行われて

いるデコイ型核酸医薬と共に parthenolide のような低分子化合物は臨床応用が期待される。一方 OA の病態という観点からは、より本体的な病的ターゲットが明らかになり、その治療法が開発されることが当然望まれるが、それまで手をこまねいているのではなく、少しでも OA の進行に対し抑制効果が期待できるのであれば、NFκB をターゲットにした治療法を開発する意義はあると考えられる。

文 献

- 1) Pelletier J-P et al : Osteoarthritis, an inflammatory disease ; potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum* 44 : 1237-1247, 2001
- 2) Roman-Blas JA et al : NF-κB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 14 : 839-848, 2006
- 3) Tomita T et al : In vivo transfection of NFκB decoy oligodeoxynucleotides suppressed the severity of collagen-induced arthritis as a gene therapy. *Arthritis Rheum* 42 : 2532-2542, 1999
- 4) Tomita T et al : Transcription factor decoy for NFκB inhibits cytokine and adhesion molecule expression in synovial cells derived from rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 39 : 749-757, 2000
- 5) Kishida Y et al : Parthenolide, a natural inhibitor of Nuclear Factor-κB, inhibits lung colonization of murine osteosarcoma cells. *Clin Cancer Res* 13 : 59-67, 2007

医工連携による次世代人工骨・人工関節の開発



研究ノート

吉川 秀樹*

Development of new bone substitute and prosthesis by medicine-engineering cooperation

Key Words : Bone, Substitute, Prosthesis, hydroxyapatite

骨組織は、骨折の治癒現象に代表されるように、本来豊かな再生能力を有している。しかし、骨腫瘍の切除後や、重度の粉碎骨折などで生じた大きな骨欠損に対しては、自家骨では対応できず、人工骨を用いた骨の再生医療が必要となる。また、人口の高齢化に伴い、変形性関節症が増加し、人工関節の置換を余儀なくされる患者さんが増加しつつある。しかし、現在の人工関節では長期の耐久性には未だ問題があり、しばしば再置換術が必要となる。骨は力学的強度を必要とする組織であり、骨・関節の再生/修復には、骨との結合が良好な人工骨と、骨と親和性のある新しい人工関節の開発が必要である。

連通多孔体人工骨の開発

人工骨は、1) 移植骨採取の侵襲がない、2) 任意の量、形状を調節できる。3) 生体との適合性がよい、4) 免疫反応がないなどの利点を有するが、一方では、1) 力学的強度が弱い、2) 骨細胞の侵入が困難である、3) 高価であるなどの問題点も有している。今日まで人工骨として、アルミナ、ジルコニア、バイオガラス、ハイドロキシアパタイトなど様々な素材が使用されてきた。中でも、ハイドロキシアパタイトはヒトの骨の無機質成分に近く、その優れた生体親和性、骨伝導能から人工骨として最も適していると考えられる。しかし、既存のハイドロキシアパタイトは、気孔と気孔が組織侵入に十分

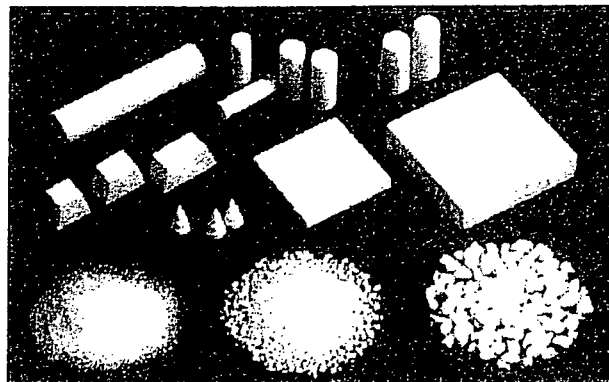


図1 骨再生のための新規人工骨 (NEOBONE)

なサイズの連通孔でつながっておらず、内部まで骨形成は期待できなかった。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人工骨となり、臨床使用には適さない。著者らは、力学的強度を有し、かつ骨細胞や骨増殖因子の導入が可能な骨補填材料として、気孔間連通構造を有する新規ハイドロキシアパタイトを開発した(図1)。“起泡ゲル化技術”による新規多孔体ハイドロキシアパタイト (NEOBONE) は、ほぼ球形で比較的均一のサイズの気孔が秩序良く配列し、ほぼ全気孔が気孔間連通孔で連絡している(図2左)。連通孔径分布は10-80 μm (平均40 μm) にあり、気孔の90%が細胞や組織が十分通過できる大きさの連通孔でつながっており、気孔の内部に骨髄幹細胞、血管、BMPなどの



*Hideki YOSHIKAWA
1954年9月生
1979年大阪大学医学部医学科
現在、大阪大学大学院医学系研究科、整形外科、教授、医学博士、骨軟部腫瘍外科
TEL 06-6879-3550
FAX 06-6879-3559
E-mail : yhideki@ort.med.osaka-u.ac.jp

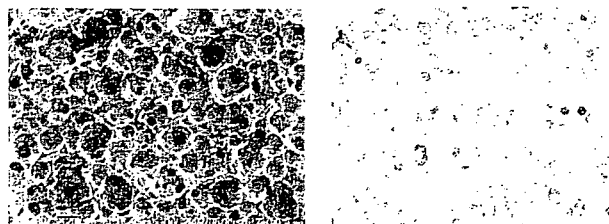


図2 左：NEOBONEの内部微細構造(走査電顕像)
右：ウサギ大腿骨に移植後6週の組織像

増殖因子/サイトカインや遺伝子の導入が可能である。力学的強度は初期圧縮強度で12Mpaであり優れた数値を示した。ウサギ大腿骨にNEOBONEを移植した際に、移植後わずか6週間で直径6mmの円柱の深層にまで気孔間連通孔を経て、豊富な血管新生を伴う、新生骨、新生骨髄が観察され、優れた骨再生能を示した(図2右)。また、この骨新生に伴い圧縮強度は移植後9週で初期強度の3倍に達した。2003年9月に、薬事認可を受け、臨床使用が可能となり、関節リウマチ、骨粗鬆症、骨腫瘍、骨折などの骨欠損部に使用されている。医療材料として発売後も副作用を示さず、術後3~6ヶ月で良好な骨形成を認めた(図3)。今回開発した新規多孔体ハイドロキシアパタイトは気孔間連通構造を有するため、容易に中心部まで血管・骨組織が侵入すること、今後の増殖因子や細胞の導入にも有用であることから、骨組織の再生医療のための優れた担体と考えられた1)。



図3 左：17才，男子，大腿骨骨巨細胞腫（術前）
右：術後3ヶ月での骨形成

レーザー微細加工技術を用いた人工関節の開発

人工関節手術は、変形性関節症や関節リウマチにより関節機能を失った患者さんに対する機能再建法として大きく貢献してきた。しかし、高齢化社会では、人工関節の寿命が重大な問題となりつつある。なかでも最大の問題点は、人工関節の金属と骨組織の間で生じるゆるみである。ゆるみにより、臨床的には痛みを生じ、歩行困難となり、最終的には再人工関節置換手術を余儀なくされる。金属/骨の十分な固着力を得るには、1960年代より、骨セメントによる接着が行われてきた。しかし、再手術時の除去の困難さ、細胞毒性の問題等から、近年では、直接金属に金属粒子やハイドロキシアパタイトを噴霧し

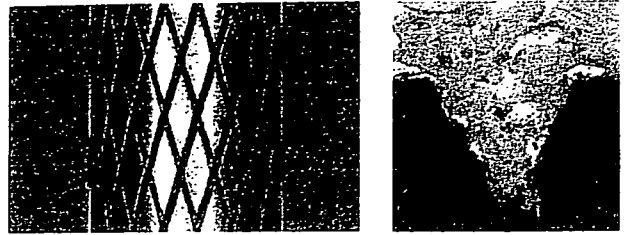


図4 左：レーザーによる金属表面微細加工
右：ウサギ大腿骨に移植後4週の組織像

て、表面に凹凸を作り臨床使用されてきた。しかし、微粒子の剥離や、均一な表面形状の制御が困難であることなど問題点を残してきた。著者らは、レーザーによる微細表面加工技術を用い、CoCr合金、Ti合金などの金属表面にコンピューター制御により溝構造を作成し、骨組織との固着力をさらに強化することを試みた。金属円柱片(直径:5mm、長さ:15mm)を作成し、表面にYAGレーザーによって格子状の溝形状を作成した(溝幅:500 μ m、深さ500 μ m)(図4左)。溝の交差角度は70度、溝間隔は3mmであった。対照群として現在臨床使用されている手法で金属サンプル表面にポーラスコーティングしたものを用い、各サンプルをウサギの大腿骨顆部に挿入設置した。術後4週での組織学的検討では、溝の深部まで良好な骨形成を認めた(図4右)。さらに金属骨間力学的固着強度評価を押し抜き強度実験で行った。ウサギ大腿骨内に挿入した金属片を大腿骨ごと術後4週で摘出し、島津社製(EHF-F01)マテリアルテストマシンを用いて金属を5mm/分の速さで押し、金属と骨との間に動きが生じた瞬間の力を計測した。その結果、従来のポーラスコーティング法より約2倍の固着力を獲得した2)。また、このレーザーによる溝加工はコンピューター制御により任意の溝幅、溝深さ、溝パターンを

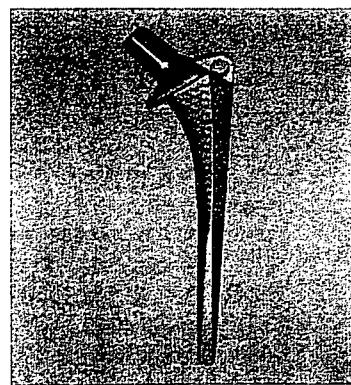


図5 レーザー表面加工人工股関節(ヒト用試作品)

決定できるため、最適な骨組織の侵入条件や強度を決定することが可能である。本技術は、コーティングではなく人工関節自体への加工という全く新しい製造概念であり、異物を添加しない人体に親和性のある人工関節として、臨床応用が期待される。現在、ヒト用試作品を作成し、強度試験などの前臨床試験を行っている (図5)。

今回開発した、人工骨、人工関節は、いずれも単一の素材からなり、骨組織との親和性も高く、人体にやさしい医療材料と考えることができる。これら骨再生、骨との固着性に優れた医療材料の臨床使用により、早期の骨再生、長期の耐久性が得られ、骨関節疾患の術後早期社会復帰、寝たきり老人の減少

などが期待できる。医療費の削減に結びつくだけでなく、生体材料産業の活性化、人工臓器産業の開拓などにより大きな経済効果があると考えられる。

文 献

1. Yoshikawa, H., et al.: Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *J Artif Org*, 8 : 131-136, 2005.
2. Hirao, M., et al.: Macro-structural effect of metal surfaces treated using computer-assisted yttrium-aluminum-garnet laser scanning on bone-implant fixation. *J Biomed Mat Res*, 73A : 213-222, 2005.

