

度は海綿骨の数倍程度で荷重部での単独使用には不十分、⑥連通気孔構造のため、深部気孔内への細胞の導入が容易である、といったことが挙げられる。これらの特性を理解した上で、われわれが積極的にネオボーン®を使用しているのが、これまで人工骨があまり適用されず自家骨が主として用いられてきた楔状矯正骨切り術^{11),12)}、関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) を中心とする母床骨の状態が悪い疾患での手術 (関節固定術や大きな軟骨下嚢腫を伴う TKA <total knee arthroplasty> など)、偽関節手術 (自家骨と併用または単独で)¹³⁾ などである。これらの領域では現在も自家骨移植が標準的治療であるが、自家骨移植のために、腸骨などから移植片を採取する手技は余分な術創を作るだけでなく、出血および手術時間を増大し、術後の執拗な痛み、骨折、神経損傷など合併症を高率に引き起こすことが知られており^{14),15),16)}、代用できる場合はできるだけ人工骨を用いるべきである。また自家骨を移植片として用いる楔開き矯正骨切り術では、術中に加工を行う必要があるため正確な移植片を得ることが困難である。ネオボーン®の場合、患部の術前 CT (computed tomography) データなどに基づいて術前に正確な移植片の作成が可能であり、海綿骨の数倍の圧縮強度を有し、さらにブロック体でも bone ingrowth が期待できることから、矯正骨切り術において有用性が高いと考えている^{11),12)}。図 3-a, b, c は 48 歳女性、橈骨遠位端骨折の保存的治療後の変形治療であるが、術前の CT から再構成した三次元画像において、楔開き骨切り術のシミュレーションを行い、楔状の移植片の形状を決定した。この形状の三次元データに基づき、切削ラピッドプロトタイピング (RP) の手法を用いて、ネオボーン®の直方体ブロックから移植用の楔状ブロック体を削り出した。近年の工業製品は CAD (computer-aided designing) すなわちコンピューター上でデザインされるが、切削 RP とはその試作品を、三次元 CAD データを元にコンピューター制御でプラスチックなどをドリルで削って作成する方法である。この方法で作成した楔状ブロックは、術中一切加工せずに骨切り部にフィットし正確な矯正が得られた。10 カ月後の X 線像では移植したブロックの圧潰はなく矯正位が保たれ、完全な骨癒合が得られていた。

RA の骨は骨粗鬆化が強いため、人工関節置換術や関節固定術を行う場合、手術部位の骨の脆弱性や骨欠損が問題となるだけでなく、自家骨移植のための採骨部でも同様に質のよい移植骨を大量に採取することは困

難である。また、RA の患者はしばしば繰り返し多数の手術を必要とするため、むやみに自家骨を大量採取することは避ける必要がある。図 3-d, e はそれぞれ 77 歳女性の距骨下関節破壊、および 60 歳女性の RA の手関節、母指 MP 関節破壊に対し、ネオボーン®顆粒を使用して関節固定術を行った例である。ネオボーン®はこのように RA の関節固定においてもよく母床骨と一体化し、かつ吸収性が低いため、長期にわたって安定した固定が得られる。また骨破壊が強い RA や関節直下の嚢胞性変化により大きな骨欠損を伴う RA に対する人工関節置換術においても、われわれは骨欠損の補填に、ネオボーン®を局所で得られる自家骨に併用して用いている。

骨折遷延治療の標準的治療は自家骨移植であるが、ここでも自家骨の小片にネオボーン®の顆粒を混ぜて使用することにより、自家骨の使用量が減らせる利点がある¹³⁾。図 3-f, g, h は 36 歳男性の下腿骨開放骨折後遷延治療の症例であるが、自家腸骨より得た海綿骨小片とネオボーン®顆粒を混合し、偽関節部分の骨内外に移植したところ、良好な骨形成が起こり、術後約 1 年で創外固定を除去し、全荷重歩行が可能となった。このようにわれわれはネオボーン®の特徴を利用してこれまで人工骨が敬遠されていた領域で、ネオボーン®単独または自家骨と併用での使用を試みており、症例数はまだ少ないが良好な印象を得ている⁹⁾。

骨再生医療の scaffold としての有用性

もう 1 つの新たな試みは、再生医療への応用である。IP-CHA の連通性に優れた気孔には、血管や新生骨など再生に必要な組織の侵入が容易なだけでなく、液体に浮遊させた細胞や骨形成因子 (bone morphogenetic protein: BMP) 溶液の導入が容易であり、骨の再生医療における間葉系幹細胞や BMP などの“足場 (scaffold)”として有用であると考えられる。これまでにわれわれは、基礎実験において間葉系幹細胞を用いた系¹⁷⁾や BMP を用いた系^{18),19)}でその有用性を証明してきた。これらの実験結果を得て、われわれは大阪大学医学部附属病院未来医療センターの臨床研究プロジェクトとして、良性骨腫瘍および骨腫瘍類似疾患の患者を対象に、「自家骨髄由来培養細胞導入人工骨による骨疾患の治療」を開始している。局麻下に骨髄穿刺を行い、患者腸骨より 15-50 ml の骨髄液を得る。骨髄細胞を、15% 自己血清を含む α MEM 培地で 2-3 週間ほど培養すると、紡錘形の付着性細胞が増殖してくる。この細胞

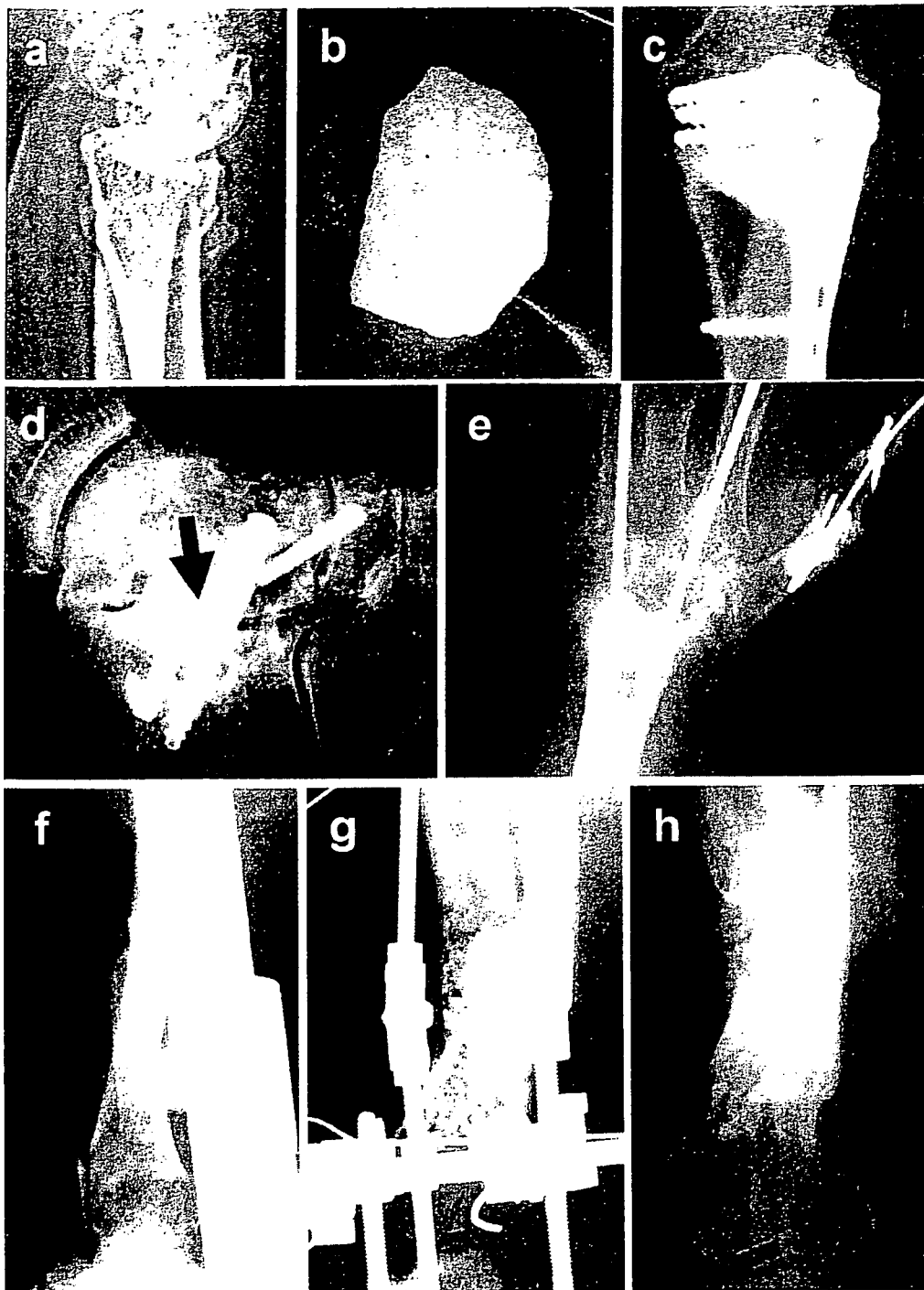


図3 ネオボーン®の臨床応用.

(a), (b), (c) 48歳女性, 橈骨遠位端骨折変形治癒に対する楔開き矯正骨切り術. (a)術前の単純X線側面で背屈変形を認める. (b)切削ラピッドプロトタイピングの手法を用いて作成した楔状スペーサー. (c)正確な矯正が得られ, 術後10カ月のX線では完全な骨癒合が得られている.

(d), (e) 関節リウマチに対する関節固定術. (d)77歳女性, 自家骨を用いず距骨下関節固定術を施行, 術後7カ月で良好な固定が得られている. (e)60歳女性, ネオボーン®単独で手関節および母指MP関節固定術を行った. 術後3年のX線像でもネオボーン®の吸収はほとんど見られず, 安定した固定が保たれている.

(f), (g), (h) 36歳男性, 下腿骨開放骨折後遷延治癒の症例. (f)初期治療として創外固定が行われたが遷延治癒となった. (g)自家腸骨より得た海綿骨小片とネオボーン®顆粒を混合し, 偽関節部分の骨内外に移植した. (h)良好な骨形成が起り, 術後約1年で創外固定を除去し, 全荷重歩行が可能となった.

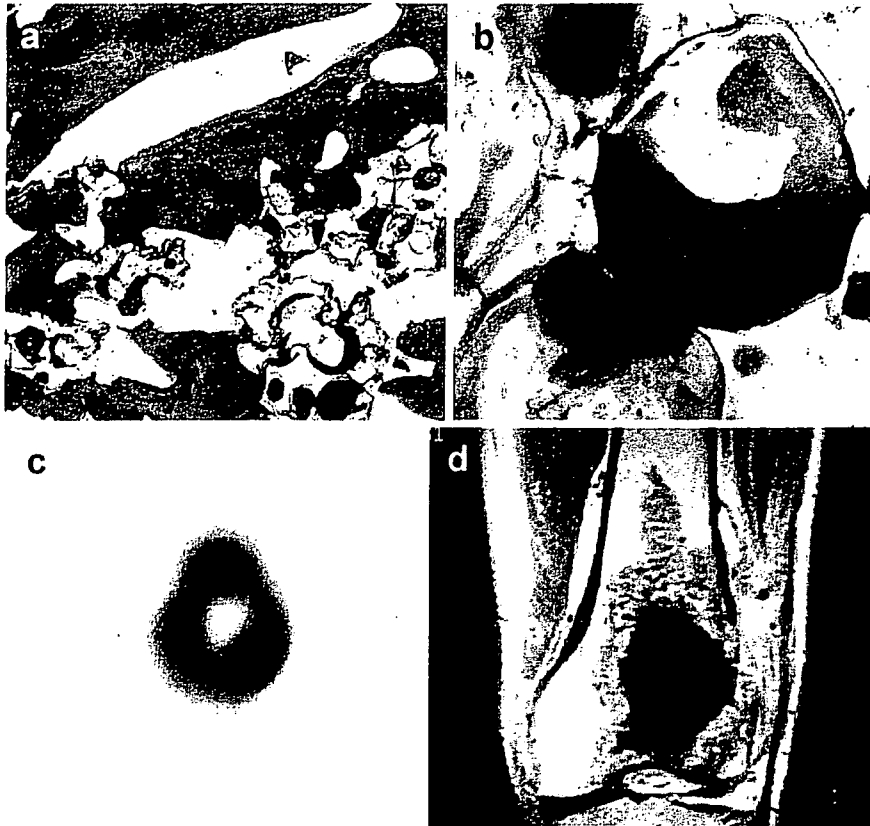


図4 臨床例における骨形成の評価。

(a), (b) ネオポーン®移植後7カ月, 抜釘時に得られた組織の非脱灰硬組織切片トルイジンブルー染色像では顆粒の周辺(a), および気孔内(b)に豊富な新生骨が観察される。

(c), (d) ネオポーン®移植後, 2カ月での画像評価。(c) $^{99m}\text{Tc-MDP}$ による骨シンチの SPECT 像では, ネオポーン®移植部の周辺部にリング状の取り込みが見られ, 周辺部から骨形成が始まっているのがわかる。(d) 造影 MRI においても, 周辺部がリング状に造影され, 周辺部から血液供給が再開している。

は約 90%が増殖能と骨芽細胞など間葉系細胞への分化能を維持する間葉系幹細胞である。この細胞の浮遊液に、ネオポーン®を1晩浸すと気孔内に細胞が導入され気孔壁に付着する。これをさらに約2週間、アスコルビン酸、 β -グリセロリン酸、デキサメサゾンを添加した15%自己血清を含む α MEMで培養し骨芽細胞へ分化誘導したのち、手術で骨欠損部に移植している。この方法は将来的には、骨形成にとってきわめて不利な条件の病巣、たとえば悪性腫瘍切除後や外傷、骨髄炎などによる巨大な骨欠損を機能的に再建するための新しい治療法として期待している。

気孔内骨形成の臨床評価—ヒトでも 気孔内骨形成は起きているか？

先に述べたように、動物実験ではブロック体においても良好な気孔内への新生骨侵入が確認されているが、

ヒトの臨床例における気孔内骨侵入は評価が困難である。これまでに少数の症例で抜釘時や再手術時にネオポーン®移植部の一部の組織が得られており、顆粒周囲や気孔内に新生骨が形成されている像が得られている(図4-a, b)が、実際にどれだけの範囲に骨形成が起きているのかは、小さな生検材料による組織学的検討では知ることができない。患者の経過観察中に人工骨移植部の骨形成の状態をその範囲を含めて低侵襲的に判定する方法として、われわれは $^{99m}\text{Tc-MDP}$ SPECT およびガドリニウム造影 MRI に注目している(図4-c, d)。造影 MRI では、大腿骨近位の骨腫瘍に対しネオポーン®顆粒充填後、10カ月程度で充填部全領域が造影されるようになり、血行が再開していた²⁰⁾。この MRI で造影される領域が、骨形成が起きている領域と一致するかどうかは今後の検討を要する。

ま と め

IP-CHA/ネオポーン®は、骨補填材としてこれまで臨床現場で実績を積み重ねてきた多孔体 HA 人工骨の三次元的気孔構造を制御することにより改良した新しい多孔体人工骨である。その最大の特徴は、気孔が細胞や組織が通過するのに十分な大きさの気孔間連通孔で連続していることであり、それと同時に臨床的に骨補填材として使用可能な強度を有している。経時的 X 線変化で評価した移植部の骨形成は従来の多孔体 HA 人工骨に比べ速やかであり、これまでに自家骨移植が標準的治療で人工骨が使われなかった領域にまで適応できる可能性をもつ。また、ネオポーン®が骨再生の scaffold として応用できる可能性を臨床試験で検討している。このような人工骨の適応拡大や骨再生医療の発展は、自家骨採取を最小限に減らすことにつながり、また将来的に難治性・大型骨欠損に対するより機能的な再建を可能にすると考えられる。

物質・材料研究機構生体材料研究センター 田中順三主任研究員、菊池正紀研究員、生駒俊之研究員、国立病院機構相模原病院 越智隆弘院長、産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門 大串始先生、大阪市立大学整形外科 高岡邦夫教授をはじめ、本研究にご協力・ご指導いただいた多くの先生方に深謝いたします。

文 献

- 1) Ayers RA, Simske SJ, Nunes CR, et al. Long-term bone ingrowth and residual microhardness of porous block hydroxyapatite implants in humans. *J Oral Maxillofac Surg* 1998; 56: 1297-301.
- 2) 日比敦夫, 石川忠也, 浅野昌育他. 良性骨腫瘍に対するハイドロキシアパタイト充填後の成績不良例についての検討. *整形外科* 1994; 45: 1423-8.
- 3) Kamegaya M, Shinohara Y, Shinada Y, et al. The use of a hydroxyapatite block for innominate osteotomy. *J Bone Joint Surg Br* 1994; 76: 123-6.
- 4) Uchida A, Araki N, Shinto Y, et al. The use of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumor surgery. *J Bone Joint Surg Br* 1990; 72: 298-302.
- 5) 吉田行雄, 松井宣夫, 大塚隆信. 骨腫瘍および腫瘍類似疾患に対する合成水酸化アパタイトの長期成績. *関節外科* 1995; 14: 1379-85.
- 6) Matsumine A, Myoui A, Kusuzaki K, et al. Calcium hydroxyapatite ceramic implants in bone tumor surgery. A long-term follow-up study. *J Bone Joint Surg Br* 2004; 86: 719-25.
- 7) Yoshikawa H, Uchida A. Clinical application of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumor surgery. In: Wise DL, editor. *Biomaterials and bioengineering handbook*. New York: Marcel Dekker; 2000. p.433-55.
- 8) Tamai N, Myoui A, Tomita T, et al. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnected porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. *J Biomed Mater Res* 2001; 59: 110-7.
- 9) Myoui A. Three-dimensionally engineered hydroxyapatite ceramics with interconnected pores as a bone substitute and tissue engineering scaffold. In: Yaszemski MJ, Trantolo DJ, Lewandrowski K, et al, editors. *Biomaterials in orthopedics*. New York: Marcel Dekker; 2003. p.287-300.
- 10) 名井陽, 古野雅彦, 荒木信人他. 連通気孔を有する新規ハイドロキシアパタイトセラミックスの優れた骨伝導能. *臨床整形外科* 2001; 36: 1381-8.
- 11) 村瀬剛, 森友寿夫, 後藤晃他. 肘過伸展外反変形に対して 3D コンピューターシミュレーションを用いて尺骨矯正骨切り術を行った一例. *日本肘関節学会雑誌* 2004; 11: 53-4.
- 12) 村瀬剛, 海渡貴司, 名井陽他. CT データに基づく 3D-CAD を利用したハイドロキシアパタイトインプラントの術前モデリング. *日整会誌* 2005; 79: S205.
- 13) 中瀬尚長, 藤井昌一, 早石泰久他. 開放骨折後の骨欠損に対する新規ハイドロキシアパタイトセラミックスの使用効果. *別冊整形外科【骨・軟骨移植最近の知見】* 2005; 47: 192-8.
- 14) Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, et al. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop* 1996; 329: 300-9.
- 15) Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine* 1995; 20: 1055-60.
- 16) Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 1989; 3: 192-5.
- 17) Nishikawa M, Myoui A, Ohgushi H, et al. Bone tissue engineering using novel interconnected porous hydroxyapatite ceramics combined with marrow mesenchymal cells: Quantitative and three-dimensional image analysis/ceramic construct: comparison with marrow mesenchymal cell/ceramic composite. *Cell Transplant* 2004; 13: 367-76.
- 18) Kaito T, Myoui A, Takaoka K, et al. Potentiation of the activity of bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration by

- a PLA-PEG/hydroxyapatite composite. *Biomaterials* 2005; 26: 73-9.
- 19) Akita S, Tamai N, Myoui A, et al. Capillary vessel network integration by inserting a vascular pedicle enhances bone formation in tissue-engineered bone using interconnected porous hydroxyapatite ceramics. *Tissue Eng* 2004; 10: 789-95.
- 20) 中紀文, 荒木信人, 橋本伸之他. 造影 MRI を用いた人工骨内への血管侵入度評価. *日整会誌* 2005; 79: S580.

はじめに

関節リウマチ (RA) では、関節炎のみならず、引き続き生じる骨関節破壊が関節機能障害をもたらし、臨床的大きな問題となる。関節破壊は軟骨破壊、靭帯破壊、骨破壊が生じる結果であるが、これらには増殖滑膜組織の浸潤を特徴とする¹⁾。

一方、RA は続発性骨粗鬆症を生じる代表疾患であり、いったん骨破壊が生じると日常生活レベルの低下へと直結し、近年 RA 治療において炎症を抑えるのみならず、骨粗鬆症進行の防止も重要と考えられている。RA に伴う骨粗鬆症は、罹患関節周囲にみられる傍関節性骨粗鬆症と、全身性骨粗鬆症に分けることができ、前者の原因として炎症性サイトカイン、局所の不動など、後者の原因として炎症性サイトカイン、不動、ホルモン異常、ステロイド性などが挙げられる。とくに傍関節性骨粗鬆症においては、炎症の持続に伴い急速な骨破壊を生じるが、その中心的な役割を担っているのは破骨細胞である。

破骨細胞は造血系由来の多核細胞であり、最大の特徴は骨吸収能を有していることである²⁾。その分化には骨芽細胞やストローマ細胞が産生する receptor activator of NF κ B ligand (RANKL) の刺激が必要であり³⁾、RA においては、増殖滑膜中での RANKL 発現亢進による破骨細胞性骨破壊について報告されている⁴⁻⁶⁾。そこで、最近われわれが明らかにした増殖滑膜および、これらの細胞と破骨細胞分化に関わる知見を紹介しながら、その関わりについて述べる。

1. RA 増殖滑膜に関して

RA 病巣に存在する線維芽細胞様滑膜細胞の増殖は関節内だけでなく、関節近傍の骨髓内にもみられ、ラットを用いた関節炎モデルで、その関節炎発症時に線維芽細胞様間質細胞が関節軟骨と関節包付着部の間のいわゆる bare area を通り、骨髓内から関節内に侵入し増殖滑膜を形成することを明らかにしてきた。また、手術時に採取した RA 患者関節滑膜お

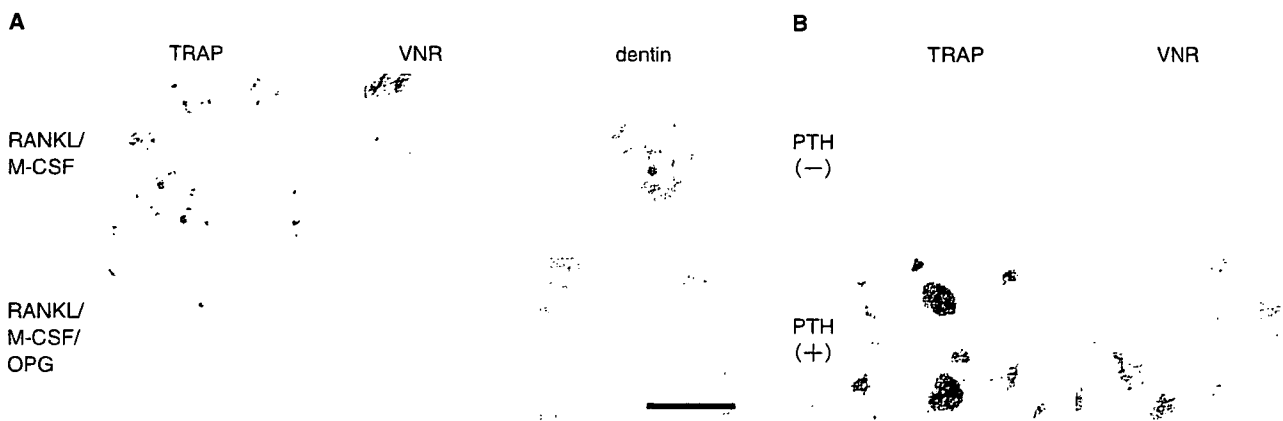


図1 TRAP 陽性単核細胞の破骨細胞への分化

RA ナース細胞との共存培養で末梢血単球から分化した TRAP 陽性単核細胞は RANKL/M-CSF 刺激にてピトロネクチンレセプター (VNR) 陽性、dentin にて pit formation を認め、骨吸収能を有する破骨細胞へ分化する (A)。TRAP 陽性単核細胞は SaOS4/3 細胞との共存培養でも PTH 存在下で破骨細胞に分化する (B)。これらは osteoprotegerin (OPG) により抑制される (A, B)。 (Bar = 100 μ m)

PTH
(+)
OPG

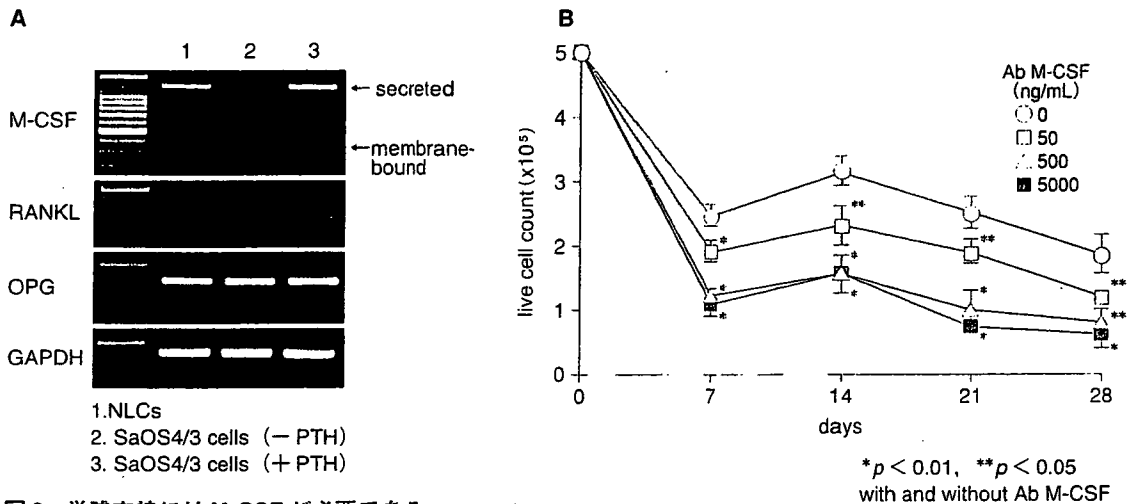


図2 単球支持にはM-CSFが必要である

SaOS4/3細胞ではPTH刺激でRANKLおよびM-CSFの発現亢進がみられた。RAナース細胞(NLCs)ではRANKLの発現は認められなかったが、恒常的なM-CSFの発現がみられた。OPGはいずれにおいても恒常的に発現していた(A)。RAナース細胞による単球支持はM-CSF中和抗体添加により完全に抑制された(B)。

よび骨髄から得られる線維芽細胞様間質細胞は、両者の膜抗原や産生サイトカインがほとんど同じであり、同じ起源と考えられる^{7,8)}。また、これらの間質細胞はリンパ球と共培養すると、リンパ球を抱き込み(抱き込み現象: pseudoemperipolesis)維持、増殖させる。このような機能はかつてマウスの胸腺細胞で確認されている現象で、抱き込み機能をもつ細胞はナース細胞とよばれている⁹⁾。われわれはRA増殖滑膜病巣における炎症の慢性・遷延化の原因となる細胞の一つに、RAナース細胞を考えている。

2. RAナース細胞と破骨細胞性骨破壊の関わり

ヒト破骨細胞は*in vitro*で、末梢血単球(CD14陽性細胞)からRANKL/M-CSF刺激にて誘導される¹⁰⁾。またPTH/PTHrPの刺激にてRANKL/M-CSFを発現し、その結果破骨細胞分化支持能を有する骨芽細胞株である、SaOS4/3細胞との共存培養でも末梢血単球は破骨細胞へと分化する^{11,12)}。

近年RAナース細胞と末梢血単球を共存培養すると、単球は維持され、破骨細胞マーカー因子の一つである、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP)陽性単核細胞に分化することが明らかとなった¹³⁾。このTRAP陽性単核細胞は末梢血単球同様、RANKL/M-CSFの刺激にて骨吸収能をもった破骨細胞

に分化し、また、SaOS4/3細胞との共存培養でも破骨細胞へと分化することが判明した(図1)。つまり、RAナース細胞は単球の破骨細胞への分化能を失わせることなく、破骨細胞前駆細胞へと分化させ維持していることが明らかとなった。そこで、RAナース細胞の単球支持能について、SaOS4/3細胞における単球支持能と比較検討したところ、SaOS4/3細胞ではPTH刺激でRANKLおよびM-CSFの発現亢進がみられた。一方、RAナース細胞ではRANKLの発現は認められなかったが、恒常的なM-CSFの発現がみられ、RAナース細胞による単球支持はM-CSF中和抗体添加により完全に抑制された(図2)。したがって、RAナース細胞による単球支持にはM-CSFがkeyであることが明らかとなった。また、これらの結果より、RAナース細胞は単球を破骨細胞前駆細胞へと誘導するが、成熟破骨細胞への分化誘導能はないことが示唆される。さらに、RA患者組織を用いて増殖滑膜による骨破壊部位を組織学的に検討したところ、病変部位にはM-CSF陽性細胞が多数存在し、その周囲にはTRAP陽性細胞、CD68陽性細胞が多数分布していることがわかった(図3)。以上の結果より、RAナース細胞は骨破壊病巣部位において、破骨細胞へと分化しうる前駆細胞を多数維持することにより、骨破壊病態に強く関わっているこ

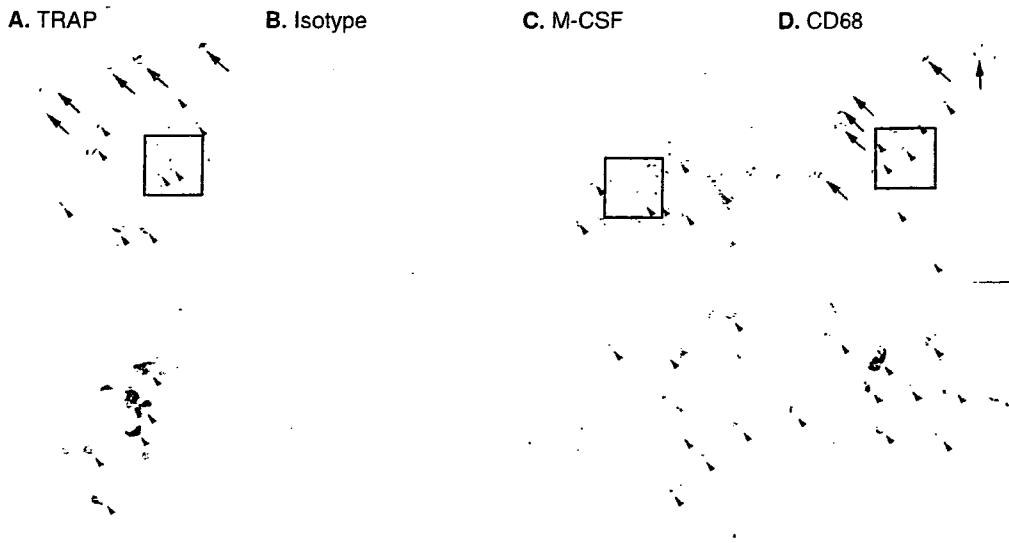


図3 骨破壊部位には TRAP 陽性細胞と M-CSF 陽性細胞が存在する

RA 増殖滑膜による骨破壊部位を組織学的に検討。病変部位には M-CSF 陽性細胞 (C) が多数存在し、その周囲には TRAP 陽性細胞 (A)、CD68 陽性細胞 (D) が多数分布している。(Bar=100 μ m)

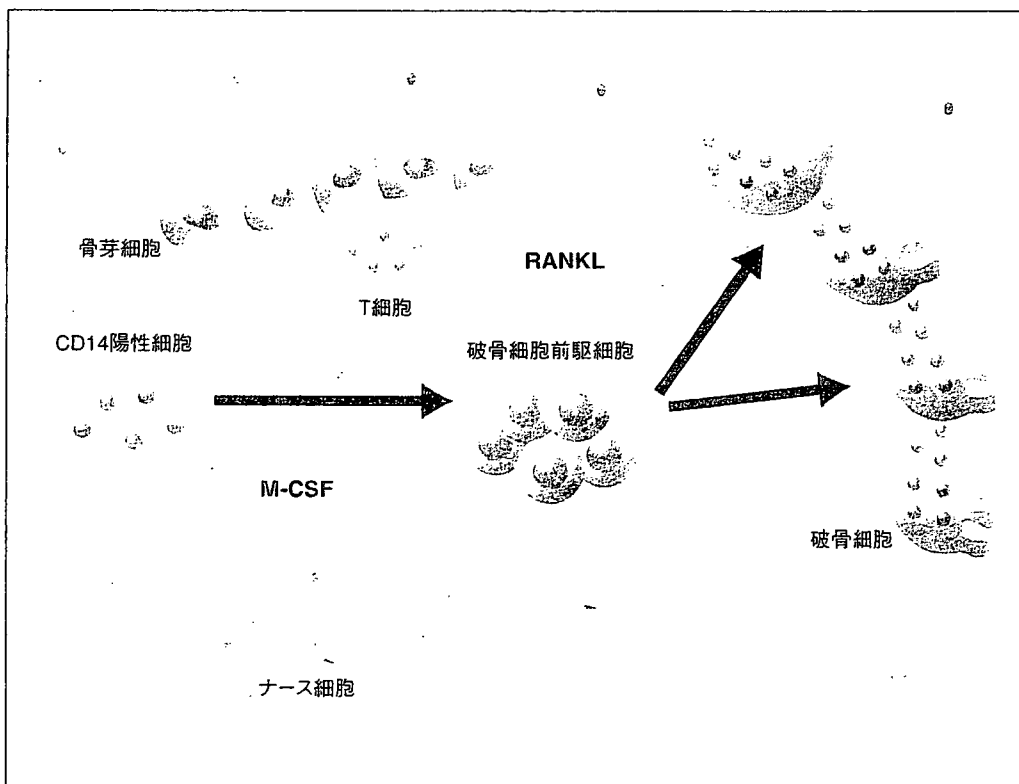


図4 RA ナース細胞の骨破壊への関わり

RA ナース細胞は骨破壊病巣部位において、破骨細胞へと分化しうる前駆細胞を多数維持することにより、骨破壊病態に強く関わっていると考えられる。そして、RA ナース細胞により維持された破骨細胞前駆細胞は、周囲に存在する骨芽細胞や T 細胞で産生が亢進している RANKL 刺激により破骨細胞に分化し、骨破壊を起こしていると考えられる。

とが考えられる。そして、RA ナース細胞により維持された破骨細胞前駆細胞は、周囲に存在する骨芽細胞やT細胞での産生が亢進しているRANKL刺激により破骨細胞に分化し骨破壊を起こしていると考えられている(図4)¹⁴⁾。

おわりに

RAにおける骨粗鬆症について、とくに傍関節性骨粗鬆症における臨床病態についてわれわれの知見をもとに述べた。昨今生物学的製剤の登場でRA治療体系が大きく変わろうとしている。しかし、現時点ではRAの治癒は困難であり、骨破壊の進行を遅らせることは可能と予想されるが、完全に防止することは困難である。われわれは、M-CSFを阻害することによりRAによる骨破壊を抑制できる可能性を報告した¹⁵⁾。今後、炎症を強力に抑制するとともに、骨破壊を抑制する治療法開発が重要と考える。

文献

- 1) Tak PP and Bresnihan B. The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis: advances from synovial biopsy and tissue analysis. *Arthritis Rheum* 2000, 43(12): 2619-2633.
- 2) Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000, 289(5484): 1504-1508.
- 3) Suda T, Takahashi N, Udagawa N, *et al.* Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 1999, 20(3): 345-357.
- 4) Gravallese EM, Manning C, Tsay A, *et al.* Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum* 2000, 43(2): 250-258.
- 5) Takayanagi H, Iizuka H, Juji T, *et al.* Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000, 43(2): 259-269.
- 6) Shigeyama Y, Pap T, Kunzler P, *et al.* Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000, 43(11): 2523-2530.
- 7) Takeuchi E, Tomita T, Toyosaki-Maeda T, *et al.* Establishment and characterization of nurse cell-like stromal cell lines from synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999, 42(2): 221-228.
- 8) Tomita T, Takeuchi E, Toyosaki-Maeda T, *et al.* 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 (Oxford)* 1999, 38(9): 854-863.
- 9) Wekerle H and Ketelsen UP. Thymic nurse cells—Ia-bearing epithelium involved in T-lymphocyte differentiation? *Nature* 1980, 283(5745): 402-404.
- 10) Nicholson GC, Malakellis M, Collier FM, *et al.* Induction of osteoclasts from CD14-positive human peripheral blood mononuclear cells by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL). *Clin Sci (Lond)* 2000, 99(2): 133-140.
- 11) Matsuzaki K, Katayama K, Takahashi Y, *et al.* Human osteoclast-like cells are formed from peripheral blood mononuclear cells in a coculture with SaOS-2 cells transfected with the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor gene. *Endocrinology* 1999, 140(2): 925-932.
- 12) Itoh K, Udagawa N, Matsuzaki K, *et al.* Importance of membrane- or matrix-associated forms of M-CSF and RANKL/ODF in osteoclastogenesis supported by SaOS-4/3 cells expressing recombinant PTH/PTHrP receptors. *J Bone Miner Res* 2000, 15(9): 1766-1775.
- 13) Toyosaki-Maeda T, Takano H, Tomita T, *et al.* Differentiation of monocytes into multinucleated giant bone-resorbing cells: two-step differentiation induced by nurse-like cells and cytokines. *Arthritis Res* 2001, 3(5): 306-310.
- 14) Tsuboi H, Udagawa N, Hashimoto J, *et al.* Nurse-like cells from patients with rheumatoid arthritis support survival of osteoclast precursors via macrophage-colony stimulating factor production. *Arthritis Rheum* 2005, 52(12): 3819-3828.
- 15) Ando W, Hashimoto J, Nampei A, *et al.* Imatinib mesylate inhibits osteoclastogenesis and joint destruction in rats with collagen-induced arthritis (CIA). *J Bone Miner Met* 2006. (in press)

関節リウマチ中下位頸椎病変に対する 椎弓形成術——上位頸椎固定例と非固定例での比較*

向井克容
細野昇
坂浦博伸
藤原桂樹
富士武史
吉川秀樹**

[別冊整形外科 50 : 108~112, 2006]

はじめに

関節リウマチ (RA) における中下位頸椎病変は上位頸椎病変と比較して頻度が低いものの、軽度のすべりでも重篤な脊髄症を惹起する可能性があり、軽視できない病態である。また、病変が多椎間にわたることも多く、その手術的治療についても上位頸椎と比べ議論の余地が大きい。中下位頸椎病変に対する手術的治療に関する過去の報告では固定術をすすめるものがほとんどであるが¹⁻³⁾、固定隣接椎間での不安定性出現の問題や、全頸椎固定による頸椎可動域 (ROM) 消失が関節機能の低下した RA 患者の日常生活動作に及ぼす影響も懸念される。われわれは、比較的軽度な RA 中下位頸椎病変に伴う脊髄症に対しては、頸椎椎弓形成術を積極的に行ってきた⁴⁾。しかし、RA 頸椎病変は上位頸椎での発生頻度が高く、中下位頸椎のみにリウマチ性変化をきたすことは少ないため⁵⁾、上位頸椎固定と同時にあるいは上位頸椎固定後に中下位頸椎の治療が必要になることも多い。上位頸椎固定が中下位頸椎アライメントや中下位頸椎病変の進行に関与するとの報告^{6,7)}もあるが、上位頸椎固定が中下位頸椎の手術成績に与える影響については不明である。

本研究の目的は RA 中下位頸椎病変に対する椎弓形成術の術後成績を上位頸椎固定例と非固定例で比較し、中下位頸椎病変に対する椎弓形成術に上位頸椎固定が与える影響について検討することである。

I. 対象および方法

1990~2000 年に RA 中下位頸椎病変に対して手術的治療を行った 79 例のうち、インストゥルメントを用いて固定術を行った症例が 47 例、椎弓形成術を行った症例が 32 例あった。椎弓形成術を行った 32 例のうち、1 年以上追跡が可能であった 30 (男性 11, 女性 19) 例を対象とした。椎弓形成術は原則的に、① 軸椎下亜脱臼が比較的軽度で後彎変形を伴わず、② 主症状が脊髄症状であり、強い頸部痛を伴わない症例に対して行われた。手術時年齢は平均 63.9 (46~82) 歳であった。30 例全例に 3 mm 以上の軸椎下亜脱臼を認めた。椎弓形成術単独施行例が 18 例 (L 群)、上位頸椎固定と椎弓形成術を併用した症例が 12 例 (U 群) あった。U 群のうち 2 例は上位頸椎固定術後の中下位頸椎病変に対する椎弓形成術であった。椎弓形成術においては蝶番側の骨溝に骨細片 (bone chip) を移植した。上位頸椎の固定範囲は C1-C2 固定が 6 例、O~C2 (C3) 固定が 6 例で、これら 12 例においては脊髄症の責任高位は全例、軸椎下亜脱臼レベルであった。外固定については、椎弓形成術単独例はフィラデルフィアカラーを術後 1 ヶ月、上位頸椎同時固定例ではハローベストを術後 1~2 ヶ月使用した。RA 病型については術前に越智らの分類に準じ、ムチランス型、非ムチランス型の 2 型に分類した (L 群: ムチランス型 8 例, 非ムチランス型 10 例, U 群: ムチランス型 4 例, 非ムチランス型 8 例)。各群におけるムチランス型と非ムチランス型の比に有意差はなかった。以上の症例に対し、画像評価および臨床評価を行い、L 群と U 群のあいだで比較を行った。画像評価は、単純 X 線前後屈側面像

Key words

RA, laminoplasty, subaxial subluxation, upper cervical fusion

* Comparison of laminoplasty for rheumatoid subaxial lesions with and without upper cervical fusion

** Y. Mukai: 住友病院整形外科 (〒530-0005 大阪市北区中之島 5-3-20); Dept. of Orthop. Surg., Sumitomo Hospital, Osaka); N. Hosono (部長): 大阪厚生年金病院整形外科; H. Sakaura: 大阪大学整形外科; K. Fujiwara (部長): 大阪府立急性期・総合医療センター整形外科; T. Fuji (部長): 大阪厚生年金病院整形外科; H. Yoshikawa (教授): 大阪大学整形外科.

でのすべり椎間数 (3 mm 以上), すべり量, C2~C7 間の頸椎 ROM を計測し, 側面中間位で C2~C7 間の前弯角を計測した. 臨床評価は, 術直前, 術後 6 ヶ月, 最終追跡時における神経症状および頸部痛を Ranawat らの分類¹⁾で評価し, さらに歩行機能については 0~4 (0: 支持なしで屋外歩行可能, 1: 支持があれば屋外歩行可能, 2: 歩行は屋内のみ, 3: 移動に車椅子要, 4: 寝たきり) の 5 段階で評価した. 術後経過観察期間は平均 3.5 (1~9) 年であった. 統計分析には χ^2 検定, paired t 検定, Mann-Whitney U 検定, repeated measure ANOVA を用い, 危険率 5%未満を有意差ありとした.

II. 結 果

1. 画像評価

L 群および U 群における術前すべり椎間数と, もっともすべりが大きい椎間でのすべり量は表 1 のとおりであり, 両群間で軸椎下亜脱臼の程度に有意差はなかった. 最終追跡時, L 群 6 例 (33%), U 群 2 例 (17%) においてすべりの増悪を認めた. これら 8 例のうち 6 (L 群 4, U 群 2) 例はムチランス型 RA であった. 頸椎 ROM は, L 群では術前平均 29.0° (6°~63°) から最終追跡時平均 11.1° (0°~31°) に減少し, U 群では術前平均 29.1° (11°~41°) から最終追跡時平均 11.8° (0°~30°) に減少した. すべりの増悪, 頸椎 ROM 変化とも両群間に有意差を認めなかった. 頸椎自然癒合のため ROM が消失した症例が 5 (L 群 3, U 群 2) 例あった. C2~C7 間の前弯角は, L 群では術前平均 22.8° (5°~63°) から最終追跡時平均 21.9° (-3°~72°) と変化が少なかったのに対し, U 群では術前平均 19.6° (-4°~42°) から最終追跡時平均 9.2° (-8°~23°) と前弯減少が大きかったが, 両群間で統計学的な有意差はなかった.

2. 臨床評価

術前頸部痛は L 群 8 (Ranawat 分類 grade 1: 3, grade 2: 4, grade 3: 1) 例, U 群 8 (grade 1: 2, grade 2: 6, grade 3: 0) 例に認めた. これら術前頸部痛を認めた 16 例のうち 10 (L 群 4, U 群 6) 例で最終追跡時 1 段階以上の疼痛改善が得られたが, 残る 6 (L 群 4, U 群 2) 例は術前と変化がなかった. U 群の 1 例のみに術後疼痛の悪化を認めた.

L 群の術前神経症状は Ranawat 分類 class IIIA が 8 例, class IIIB が 10 例であったが, そのうち 15 例において術後 1 段階以上の改善を認め, 12 例で最終追跡時まで神経症状の改善が維持されていた. U 群では術前 class IIIA が 9 例, class IIIB が 3 例であったが, そのうち 9 例において術

表 1. 各群における術前 RA 病型分類と軸椎下亜脱臼

	L 群 (n=18)	U 群 (n=12)
非ムチランス型/ムチランス型	10/8	8/4
すべり椎間数		
1 椎間	15	7
2 椎間	2	3
3 椎間	1	1
4 椎間		1
すべり量		
3~5 mm	15	11
5 mm<	3	1

後 1 段階以上の改善を認め, 8 例で最終追跡時まで神経症状の改善が維持されていた. Ranawat の class 分類の改善が得られなかった症例が L 群, U 群合わせて 6 (L 群 3, U 群 3) 例あったが, そのうち 5 (L 群 2, U 群 3) 例において 1 段階以上の歩行機能改善が得られていた. 経過中, 神経症状の再悪化を 5 (L 群 3, U 群 2) 例に認め, このうち 4 例はムチランス型 RA であった. 神経症状の改善・維持に関しては L 群と U 群とで有意差を認めなかった.

III. 症例提示

症例 1. 47 歳, 女 (図 1). 非ムチランス型 RA.

垂直亜脱臼に対し O~C3 の固定を施行したが, 術後 6 年で C4/C5 レベルでの亜脱臼による脊髄症状が発症したため椎弓形成術を施行した. 神経症状は Ranawat 分類では術前 class IIIA から術後 class IIIA と変化しなかったが, 歩行機能については 1 段階の改善が得られ, 術後 3 年の最終追跡時まで維持されていた. X 線像上, 最終追跡時には C4/C5 椎体間は自然癒合して安定化し, アライメントの悪化やほかのレベルでの亜脱臼の進行も認めない.

症例 2. 66 歳, 男 (図 2). 非ムチランス型 RA.

環軸椎前方亜脱臼と C3/C4, C4/C5 レベルでの亜脱臼を認め, 軸椎下亜脱臼による脊髄障害を呈していた. Magerl 法による環軸椎固定と椎弓形成術を同時に施行し, 神経症状は術前 class IIIA から術後 class II に改善し, 術後 3 年の最終追跡時まで神経症状の改善は維持されていた. 最終追跡時における X 線像では, 術前と比較してアライメントに変化はなく, 軸椎下亜脱臼の進行も認めない.

IV. 考 察

RA 中下位頸椎病変は滑膜炎および靭帯付着部炎によ

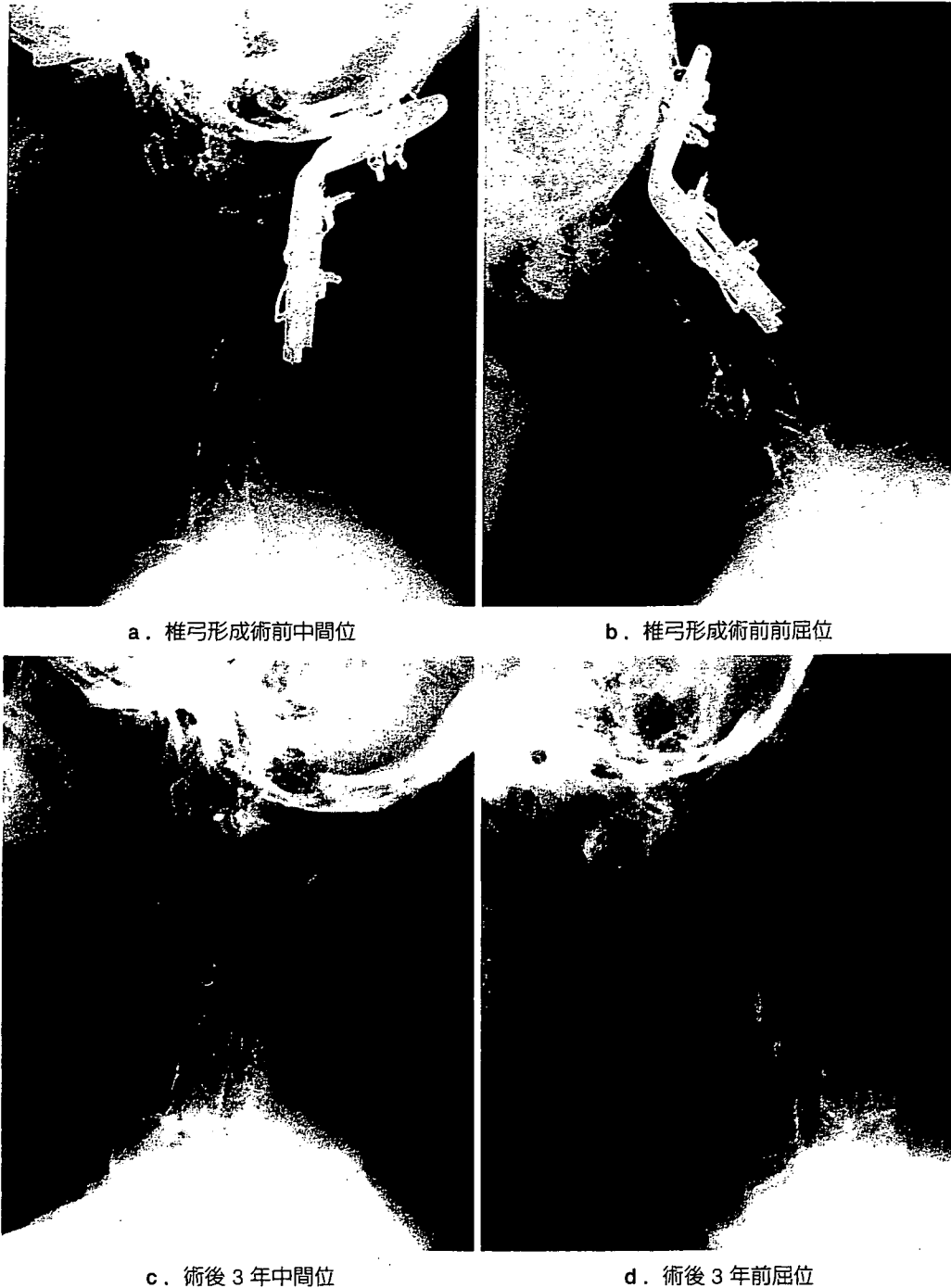


図1. 症例1. 47歳, 女. 非ムチランス型RA. X線像

り, ①椎間関節の破壊, ②黄色靭帯の炎症性肥厚および椎弓の破壊, ③棘突起の侵食・菲薄化, ④棘上・棘間靭帯の機能不全および断裂, ⑤椎間板・椎体終板の破壊などの変化で脊椎支持組織が全周性に破綻して亜脱臼をきたし, さらに脊柱管の發育性狭窄や脊柱管内リウマチ性肉芽形成なども相まって圧迫性脊髓障害をきたす病態である. RA中下位頸椎病変治療についての過去の報告は固定術に関するものがほとんどであり¹⁻³⁾, その治療においては強固な固

定が不可欠と一般的に考えられてきた. したがって, 椎弓形成術が中下位頸椎病変に対して行われることは少なく, 中下位頸椎病変に対する椎弓形成術を詳細に検討した報告もきわめて少ない^{4,7)}.

われわれは以前から, 比較的軽度な中下位頸椎病変による脊髓症に対しては, 内固定材料を用いた固定術と比べて簡便で侵襲も少ない椎弓形成術を積極的に行ってきた. 比較的軽度な中下位頸椎病変による脊髓症に対しては, 非ム



a. 術前中間位

b. 術後3年中間位

図2. 症例2. 66歳, 男. 非ムチランス型RA. X線像

チランス型である限り椎弓形成術で良好な成績が期待できるが、ムチランス型の場合にはたとえ術前の頸椎病変が軽度であっても、成績不良であることをすでに報告している⁴⁾。中下位頸椎病変には上位頸椎の不安定性を合併する症例も多く、上位頸椎固定の併用を必要とする場面しばしば遭遇する。上位頸椎固定のさいには軸椎から頸部伸筋群を剝離する必要があり、後方支持組織が脆弱なRA頸椎においては筋剝離による影響も考慮する必要がある。上位頸椎固定が中下位頸椎アライメントや中下位頸椎病変の進行に影響を与えるとの報告もあり⁸⁾、上位頸椎固定を行った場合には中下位頸椎病変に対する手術は内固定材料を併用した強固な固定を行わないと、アライメントやすべりの悪化を生じるのではないかと懸念があった。

今回の検討では、L群とU群との比較ですべりの増悪や頸椎ROM変化に有意差はなく、上位頸椎固定が椎弓形成術後の不安定性増悪因子とはなっていなかった。また頸椎アライメントに関しては、統計学的有意差はなかったもののL群よりU群のほうが術後前弯減少が強かった。一方、神経症状の改善・維持については両群間で有意差はなく、U群における前弯減少は神経症状に影響を与えるほどのものではなかったといえる。すべり増悪例の75%、神経症状再悪化例の80%はムチランス型RAであり、成績不良因子としては上位頸椎固定の有無ではなく、RA重症度が関与していた。頸椎ROMが消失していた症例があったが、蝶番側の骨溝への骨細片移植がROM消失にどの程度関与

しているかは不明である。骨癒合は骨移植部以外の椎弓間や椎体間などにさまざまな程度で自然癒合として認められたが、骨癒合の発生部位、発生範囲、癒合隣接椎間での変化に一定の傾向はみられなかった。蝶番側への骨移植が必要か否かについては今後の検討を要するが、ムチランス型以外のほとんどの症例ではX線像上の安定性と日常生活に支障がない程度のROM温存の両者を獲得できた。頸部痛に関しては、U群のほうが疼痛改善がよい傾向にあったが、これは頸部痛の原因として上位頸椎での不安定性の関与が大きいため、上位頸椎固定により疼痛の改善が得られたことが原因と考えられる。またL群で頸部痛が改善しなかった4例中3例は、術前頸部痛がgrade1の軽い頸部痛であった。

上位頸椎不安定性と中下位頸椎病変による脊髄症が並存する場合に、中下位頸椎にどのような術式を選択しうることについてはこれまで報告がなかった。自験例における術前軸椎下垂脱臼は、大半の症例において5mm以下、2椎間までであり、この程度のすべりであれば非ムチランス型である限り上位頸椎固定を併用しても椎弓形成術で良好な成績が期待できる。

ま と め

1) RA中下位頸椎病変に対する椎弓形成術の成績を、椎弓形成術単独群と上位頸椎固定併用群で比較し、上位頸椎

固定が椎弓形成術の成績に与える影響について検討した。

2) 上位頤椎固定群では椎弓形成術単独群と比べて、すべりの増悪, ROM 変化, 前弯減少などの X 線変化に統計学的有意差はなく, また神経症状の改善・維持に関しても両群間で有意差を認めなかった。

3) 比較的軽度な中下位頤椎病変に対しては, 非ムチランス型である限り上位頤椎固定を併用しても椎弓形成術で良好な成績が期待できる。

文 献

- 1) Ranawat CS, O'Leary P, Pellici P et al : Cervical spine fusion in rheumatoid arthritis. *J Bone Joint Surg* **61-A** : 1003-1010, 1979
- 2) Santavirta S, Konttinen YT, Sandelin J et al : Operations for the unstable cervical spine in rheumatoid arthritis ; sixteen cases of subaxial subluxation. *Acta Orthop Scand* **61** : 106-110, 1990

- 3) Olerud C, Larsson BE, Rodriguez M : Subaxial cervical spine subluxation in rheumatoid arthritis. *Acta Orthop Scand* **68** : 109-115, 1997
- 4) Mukai Y, Hososno N, Sakaura S et al : Laminoplasty for cervical myelopathy caused by subaxial lesions in rheumatoid arthritis. *J Neurosurg* **100** : 7-12, 2004
- 5) Fujiwara K, Owaki H, Fujimoto M et al : A long-term follow-up study of cervical lesions in rheumatoid arthritis. *J Spinal Disord* **13** : 519-526, 2000
- 6) Yoshimoto H, Ito M, Abumi K et al : A retrospective radiographic analysis of subaxial sagittal alignment after posterior C1-C2 fusion. *Spine* **29** : 175-181, 2004
- 7) Suda Y, Saitou M, Shioda M et al : Cervical laminoplasty for subaxial lesion in rheumatoid arthritis. *J Spinal Disord Tech* **17** : 94-101, 2004
- 8) Matsunaga S, Onishi T, Sakou T : Significance of occipitoaxial angle in subaxial lesion after occipitocervical fusion. *Spine* **26** : 161-165, 2001

* * *

ORIGINAL ARTICLE

Wataru Ando · Jun Hashimoto · Akihide Nampei
Hideki Tsuboi · Kosuke Tateishi · Takeshi Ono
Norimasa Nakamura · Takahiro Ochi · Hideki Yoshikawa

Imatinib mesylate inhibits osteoclastogenesis and joint destruction in rats with collagen-induced arthritis (CIA)

Received: July 27, 2005 / Accepted: January 6, 2006

Abstract Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) is a key factor for osteoclastogenesis at the bone-pannus interface in patients with rheumatoid arthritis as well as a receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL). Imatinib mesylate inhibits the phosphorylation of *c-fms*, a receptor for M-CSF. The present study investigates the effect of imatinib mesylate on joint destruction in rats with collagen-induced arthritis (CIA) and on osteoclastogenesis in vitro. Imatinib mesylate (50 or 150 mg/kg), dexamethasone, or vehicle was administered daily to CIA rats for 4 weeks from the onset of arthritis. Hind-paw swelling and body weight were measured weekly. At weeks 2 and 4, the metatarsophalangeal (MTP) joints and the ankle and subtalar joints were radiographically and histologically assessed. The effect of imatinib mesylate on osteoclast formation from rat bone marrow cells with M-CSF and soluble RANKL (sRANKL) in vitro was also examined. Radiographic assessment showed that 150 mg/kg imatinib mesylate suppressed the destruction of the MTP and the ankle and subtalar joints at week 2, and MTP joint destruction at week 4 in CIA rats, although hind-paw swelling was not suppressed. The number of TRAP-positive cells at the bone-pannus interface was significantly reduced in the group administered with 150 mg/kg imatinib mesylate compared with that given vehicle at week 4. Imatinib mesylate dose-dependently inhibited the proliferation of M-CSF-dependent osteoclast precursor cells in vitro as well as osteoclast formation induced by M-CSF and sRANKL. These findings suggest that imatinib mesylate could prevent joint destruction in patients with rheumatoid arthritis.

Key words imatinib mesylate · M-CSF · osteoclast · CIA · rheumatoid arthritis

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic and progressive inflammatory disease that is associated with joint destruction. Histopathological characterization of bone erosion in patients with RA and in animal models of inflammatory arthritis such as collagen-induced arthritis (CIA) has provided powerful evidence that bone-resorbing osteoclasts play an important role in the structural joint damage involved in inflammatory arthritis [1].

Imatinib mesylate is a signal transduction inhibitor that specifically targets a set of protein tyrosine kinases, for example, *abl*, *c-kit*, and platelet-derived growth factor receptor (PDGF-R) [2–4]. Imatinib mesylate is widely administered to treat chronic myeloid leukemia (CML) [2] and *c-kit*-positive gastrointestinal stromal tumors [5]. Miyachi et al. recently reported that imatinib mesylate effectively treats not only CML but also concomitant RA [6]. Eklund and Joensuu also showed that imatinib mesylate might have considerable antirheumatic benefits [7].

A therapeutic dose of imatinib mesylate inhibits the phosphorylation of *c-fms*, a receptor for macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) [8] that is an essential factor for osteoclast formation [9–12]. Osteoclast precursors express receptor activator of NF- κ B (RANK) and differentiate osteoclasts in the presence of receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and M-CSF [13–15]. RA synovial tissues produce M-CSF, RANKL, and various cytokines that could increase osteoclast formation or activity, including interleukin 1- α (IL-1 α) and - β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-6, IL-11, and IL-17 [16–19]. We recently demonstrated that M-CSF secreted by RA synovial cells might play an important role in the pathogenesis under which osteoclast precursors are maintained [20]. Thus, we postulated that imatinib mesylate has an antibone-resorptive effect in RA. Therefore, this study

W. Ando · J. Hashimoto (✉) · A. Nampei · H. Tsuboi · K. Tateishi · T. Ono · N. Nakamura · H. Yoshikawa
Department of Orthopaedics, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita 565-0871, Japan
Tel. +81-6-6879-3552; Fax +81-6-6879-3559
e-mail: junha@ori.med.osaka-u.ac.jp

T. Ochi
National Hospital Organization, Sagami National Hospital,
Sagamihara, Japan

investigated the effect of imatinib mesylate on arthritis and joint destruction in rats with CIA and on osteoclastogenesis in the presence of M-CSF and sRANKL *in vitro*.

Materials and methods

Materials

We purchased the listed reagents from the following suppliers: imatinib mesylate (Gleevec) from Novartis (Basel, Switzerland), bovine type II collagen from Cosmo Bio (Tokyo, Japan), dexamethasone and Freund's incomplete adjuvant from Sigma (St. Louis, MO, USA), recombinant human (rh) M-CSF and rh-sRANKL from PeproTech EC (London, UK), alpha-minimum essential medium (α -MEM) and penicillin/streptomycin from Gibco BRL Life Technologies (Rockville, MD, USA), and fetal bovine serum (FBS) from HyClone (Logan, UT, USA). Lewis rats were purchased from Clea Japan (Tokyo, Japan). All procedures complied with the Osaka University Medical School Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals.

Induction of CIA in rats

We induced CIA using the described modified method [21,22]. In brief, 6-week-old female Lewis rats were intradermally sensitized under anesthesia with 0.5 mg bovine type II collagen in 0.5 ml 0.1 M acetic acid at 4°C and emulsified in 0.5 ml cold Freund's incomplete adjuvant. Seven days later, the rats received an intradermal booster injection of half the volume used for sensitization.

Experimental protocol

We investigated whether imatinib mesylate prevents arthritis and joint destruction *in vivo* in 34 rats with induced CIA. Immediately after hind-paw swelling was visually obvious in all the rats (at 14 days after initial sensitization), 9 rats per group received 50 or 150 mg/kg imatinib mesylate in 0.05% methylcellulose/phosphate-buffered saline (PBS) daily *p.o.*, and 8 rats per group received either daily dexamethasone (5 mg/kg in 0.05% methylcellulose/PBS; positive control) or vehicle (0.05% methylcellulose/PBS; negative control) *p.o.* until death. Three rats from each group were killed 2 weeks later and the remainder 4 weeks later.

The rats were weighed and hind-paw swelling was measured weekly using a plethysmometer (model TK-101 CMP; Unicom, Chiba, Japan).

Radiologic and histological analysis

At the end of the experiments (week 2 and 4), the hind paws were visualized by imaging on high-speed radiographic film (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan), using the MX-20 Specimen Radiography System (Faxitron X-ray, Wheeling, IL, USA). Radiographic scoring criteria were assessed accord-

ing to a modified method [23], using the following scale: 0, no bone erosion; 1, light (shape of ankle and subtalar joints, or metatarsal head maintained) bone erosion; 2, severe (disordered ankle and subtalar joints or metatarsal head) bone erosion; and 3, ankle and subtalar joints or metatarsal head missing.

The metatarsophalangeal (MTP) joints were fixed with 4% paraformaldehyde, decalcified with ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), and embedded in paraffin; 4- μ m sections were stained with hematoxylin and eosin. To investigate the activity of osteoclastic bone resorption *in vivo*, sections were visualized using a tartrate-resistant acid phosphate (TRAP) staining kit (Hokudo, Sapporo, Japan). Osteoclasts (TRAP-positive multinucleate cells containing three or more nuclei) located at the site of bone destruction were counted.

Osteoclast differentiation assay

Osteoclast differentiation *in vitro* proceeded as described [24]. Bone marrow cells isolated from 5-week-old female Lewis rats were seeded at a density of 5×10^6 in 10-cm Petri dishes and incubated in α -MEM containing 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, and 100 ng/ml M-CSF. After a 3-day incubation, nonadherent cells were removed from the cultures by pipetting. Adherent cells (3×10^5) were seeded again in 10-cm culture dishes and incubated in the same medium including 100 ng/ml M-CSF. Cells maintained in M-CSF for an additional 3 days were used as osteoclast precursors and seeded at a density of 1×10^4 /well in 48-well plates in the presence of M-CSF (100 ng/ml) and sRANKL (100 ng/ml). Cultures were incubated in quadruplicate with changes of medium on days 2 and 4, and then osteoclast formation was evaluated on day 5. Imatinib mesylate (0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, and 4 μ M) was added to some cultures during this period, and then the cells were fixed and stained using a TRAP staining kit. Multinucleated TRAP-positive cells with three or more nuclei were counted as mature osteoclasts under a microscope (Eclipse TE 300; Nikon, Tokyo, Japan).

The effect of imatinib mesylate on the calcified matrix resorption activity of osteoclast-like cells was assessed using calcium hydroxyapatite-coated slides (BD BioCoat Osteologic; BD Biosciences, Bedford, MA, USA). Imatinib mesylate (1 μ M) was added at day 5 when osteoclasts had already differentiated in the presence of M-CSF and sRANKL. After an additional 5 days of culture with imatinib mesylate, the cells were removed by vigorous washing, and osteological slides were observed by light microscopy (SMZ-U; Nikon) at 1 \times magnification. The total resorption area on photographs was evaluated using the image analysis software Win ROOF version 3.0 (Mitani, Fukui, Japan).

Proliferation assay of osteoclast precursors

Cell proliferation was evaluated by counting cells and using the Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System (Takara

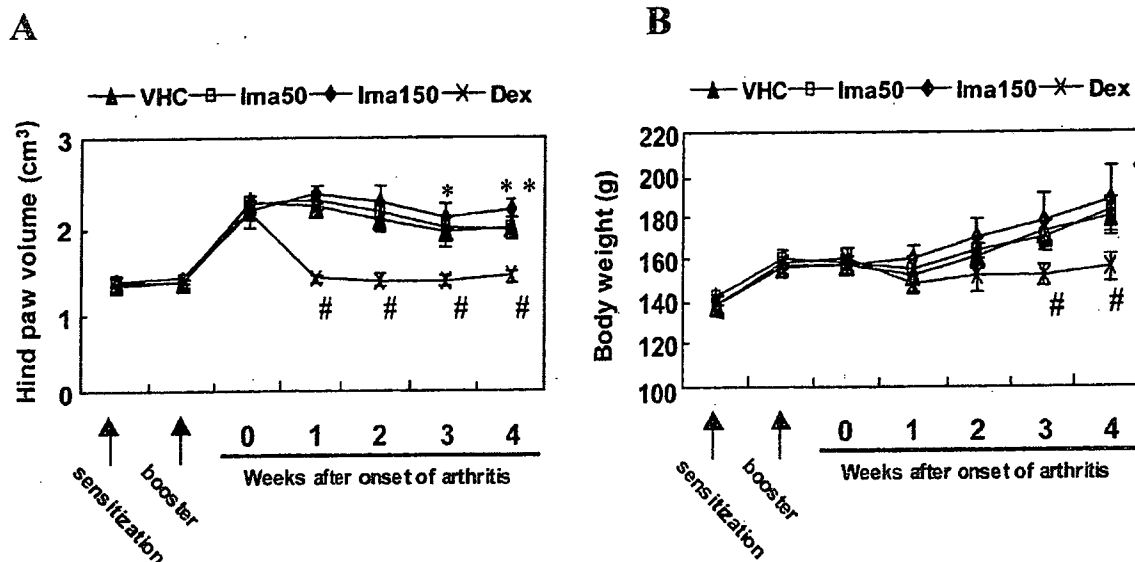


Fig. 1. Paw volume and body weight. Serial measurements of hind-paw volume (A) and body weight (B) in collagen-induced arthritis (CIA) rats administered with 50 mg/kg imatinib mesylate (Ima50; $n = 6$),

150 mg/kg imatinib mesylate (Ima150; $n = 6$), dexamethasone (Dex; $n = 5$), and vehicle (VHC; $n = 5$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; # $P < 0.001$, compared with vehicle. Bars mean \pm SD

Bio, Otsu, Japan) as described in the supplied protocol. M-CSF-dependent osteoclast precursors collected from bone marrow as described above or fresh adherent cells obtained from bone marrow cells of the same rats were seeded at a density of 5.0×10^3 /wells in 96-well plates in medium with or without M-CSF, respectively. Imatinib mesylate was added to a final concentration of 0–4 μ M as described in quadruplicate, and cells were incubated for 2 or 5 days. The cells were harvested with trypsin-EDTA and counted using a hemocytometer. In other wells, the cell proliferation reagent WST-1 (10 μ l/well) was added at each time point and the cells were incubated for 2 h. Absorbance of the extracted products was measured at 440 nm using a Viento spectrophotometer (Dainippon, Osaka, Japan).

Statistical analysis

Data were statistically analyzed using an unpaired t test, the Mann-Whitney U test, and analysis of variance with Fisher's protected least significant difference test. StatView version 5.5 software performed statistical calculations (SAS Institute, Cary, NC, USA), and a P value of 0.05 indicated statistical significance.

Results

Effect of imatinib mesylate in CIA rats

The increased paw swelling induced in CIA rats was decreased by dexamethasone to the levels before clinical onset of arthritis. However, imatinib mesylate (50 or 150 mg/kg)

could not reduce paw swelling (Fig. 1A). Moreover, the paws of rats given 150 mg/kg imatinib mesylate were more swollen than those of rats given vehicle at weeks 3 ($P = 0.011$) and 4 ($P = 0.005$).

The rats stopped growing at 3 weeks after sensitization, but growth resumed after the administration of either imatinib mesylate (50 or 150 mg/kg) or vehicle (Fig. 1B). In contrast, growth did not resume in CIA rats given dexamethasone. Gains in body weight during the last 2 weeks significantly differed between the groups given dexamethasone and the other three groups ($P < 0.001$).

Radiographic assessment

Radiographic examination showed that 150 mg/kg imatinib mesylate reduced destruction of the ankle and subtalar joints (Fig. 2A) and the MTP joints (Fig. 3A) at week 2. At week 4, radiographic destruction was reduced in the MTP joint but not in the ankle and subtalar joints. Imatinib mesylate at 50 mg/kg slightly inhibited destruction of the MTP joint at weeks 2 and 4, but not that of the ankle and subtalar joints. Dexamethasone almost completely prevented the destruction of both the MTP and the ankle and subtalar joints at weeks 2 and 4. The radiographic scores of the ankle and subtalar joint destruction (Fig. 2B) were significantly lower in rats given 150 mg/kg (1.50 ± 0.55) than 50 mg/kg (2.67 ± 0.52) of imatinib mesylate or vehicle (2.50 ± 0.55) at week 2 ($P = 0.010$ compared with vehicle). However, the three groups did not differ significantly at week 4. The mean radiographic scores of 0.20 \pm 0.41 (week 2) and 1.08 \pm 0.56 (week 4) for MTP joint destruction (Fig. 3B) in rats given 150 mg/kg imatinib mesylate were significantly lower than those of 1.45 \pm 0.89 (week 2) and 2.18 \pm 0.69

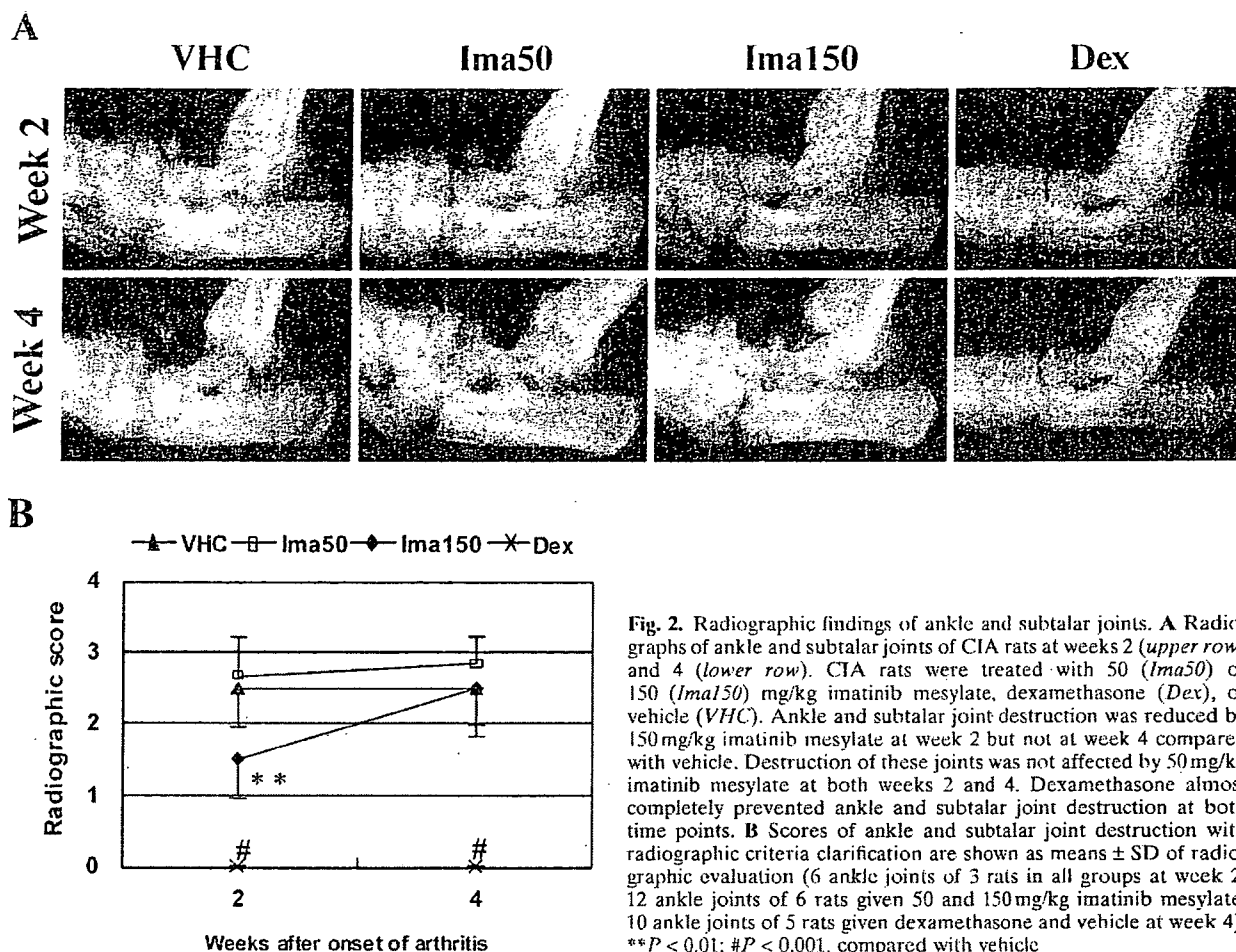


Fig. 2. Radiographic findings of ankle and subtalar joints. **A** Radiographs of ankle and subtalar joints of CIA rats at weeks 2 (*upper row*) and 4 (*lower row*). CIA rats were treated with 50 (*Ima50*) or 150 (*Ima150*) mg/kg imatinib mesylate, dexamethasone (*Dex*), or vehicle (*VHC*). Ankle and subtalar joint destruction was reduced by 150 mg/kg imatinib mesylate at week 2 but not at week 4 compared with vehicle. Destruction of these joints was not affected by 50 mg/kg imatinib mesylate at both weeks 2 and 4. Dexamethasone almost completely prevented ankle and subtalar joint destruction at both time points. **B** Scores of ankle and subtalar joint destruction with radiographic criteria clarification are shown as means \pm SD of radiographic evaluation (6 ankle joints of 3 rats in all groups at week 2; 12 ankle joints of 6 rats given 50 and 150 mg/kg imatinib mesylate; 10 ankle joints of 5 rats given dexamethasone and vehicle at week 4). ** $P < 0.01$; # $P < 0.001$, compared with vehicle

(week 4) in rats given vehicle ($P = 0.004$ and < 0.001 at weeks 2 and 4, respectively). The MTP joint destruction scores of 1.10 ± 0.55 and 1.80 ± 0.84 at weeks 2 and 4, respectively, in rats given 50 mg/kg imatinib mesylate were also lower than those of the control group given vehicle, but the differences did not reach statistical significance. The scores of the group treated with dexamethasone were 0.00 ± 0.00 and 0.04 ± 0.20 on the same respective days. These values from the groups treated with dexamethasone were significantly lower than those of the other groups ($P < 0.001$).

Histological assessment

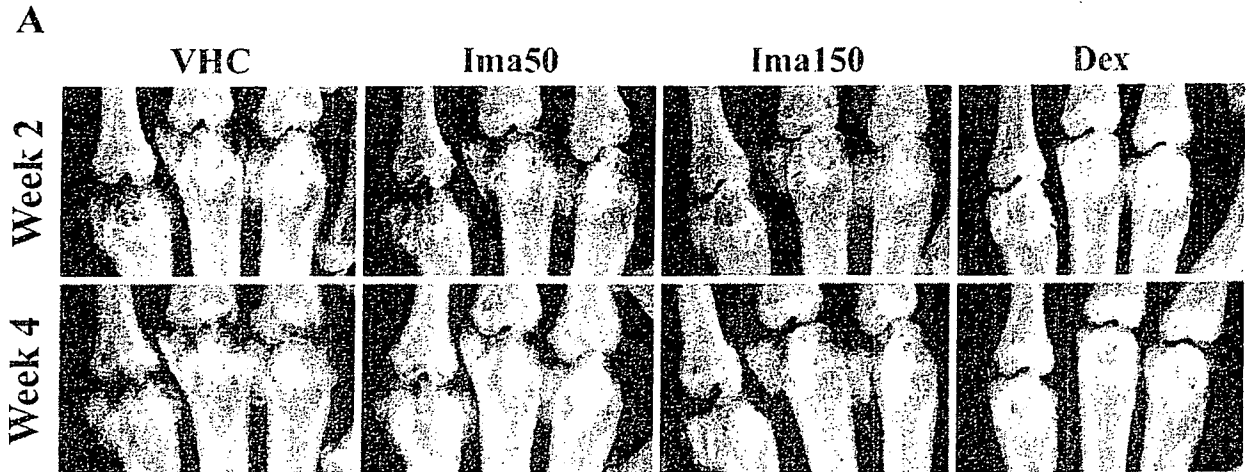
Histological assessment revealed severe destruction in the MTP joints of rats given vehicle at week 2 (Fig. 4A). Synovitis, pannus formation, and articular cartilage and bone destruction with severe infiltration of neutrophils and lymphocytes characterized this lesion.

In the group given 150 mg/kg imatinib mesylate, less pannus had formed than in the group given vehicle at both weeks 2 and 4 (Fig. 4B), although synovitis developed at the joint space similarly to that in the group given vehicle. The number of TRAP-positive multinucleated cells (Fig. 4C) at the bone-pannus interface was significantly reduced in the

group given 150 mg/kg imatinib mesylate (28.1 ± 14.9 , $P = 0.028$) compared with that of the group given vehicle (77.0 ± 24.9). In the group given 50 mg/kg imatinib mesylate, although less pannus had formed at week 2, the amount formed at week 4 was identical to that of the group given vehicle, and the number of TRAP-positive multinucleated cells did not significantly differ (55.0 ± 20.8 , $P = 0.245$). Synovitis, pannus formation, and joint destruction did not develop in the group given dexamethasone.

Imatinib mesylate inhibits proliferation of osteoclast precursors maintained by M-CSF

Imatinib mesylate dose-dependently inhibited the proliferation of osteoclast precursor cells in the presence of M-CSF (Fig. 5). After culture with imatinib mesylate for 2 days, the relative changes in the number of M-CSF-dependent osteoclast precursors (pre-OC) caused by 1 and 2 μ M imatinib mesylate were 61.2% and 36.9%, respectively. On the other hand, those of fresh adherent bone marrow cells (BM cells) were 87.0% and 80.1%, respectively (Fig. 5A). The WST-1 assay revealed that the relative absorbance of pre-OC was reduced to 65.8% and 19.5% by 1 μ M and 2 μ M imatinib mesylate, respectively. In contrast,



B

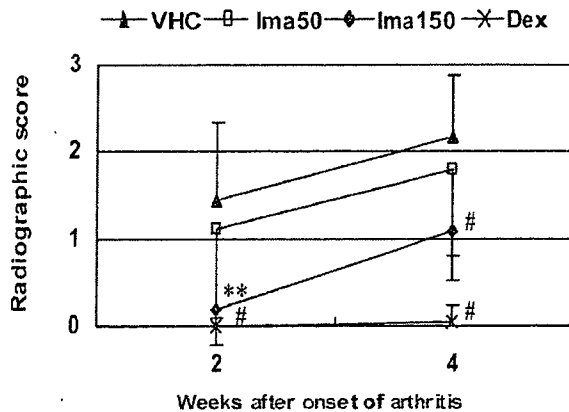


Fig. 3. Radiographic evaluation of metatarsophalangeal (MTP) joints. **A** Radiographs of MTP joints in CIA rats at weeks 2 (*upper row*) and 4 (*lower row*) treated with 50 (*Ima50*) or 150 (*Ima150*) mg/kg imatinib mesylate, dexamethasone (*Dex*), or vehicle (*VHC*). Shape of metatarsal heads was preserved at weeks 2 and 4 by 150 mg/kg imatinib mesylate and at week 2 by 50 mg/kg imatinib mesylate compared with vehicle. Sesamoid bone was deviated by MTP joint swelling in rats given imatinib mesylate as well as by vehicle. Dexamethasone almost completely prevented destruction of MTP joints at both weeks. **B** Scores of MTP joint destruction with modified radiographic criteria clarification are shown as means \pm SD of radiographic evaluation (30 MTP joints of 3 rats in all groups at week 2; 60 MTP joints of 6 rats given 50 or 150 mg/kg imatinib mesylate; 50 MTP joints of 5 rats given dexamethasone and vehicle at week 4). ** $P < 0.01$; # $P < 0.001$ compared with vehicle

that of BM cells was reduced to 84.5% and 82.0% by 1 and 2 μ M imatinib mesylate, respectively (Fig. 5B). After culture with imatinib mesylate for 5 days, the growth of M-CSF-dependent osteoclast precursors maintained with M-CSF was reduced to 20.5% by 1 μ M and was abrogated by 2 μ M imatinib mesylate (Fig. 5C).

Imatinib mesylate inhibits osteoclast formation

Imatinib mesylate dose-dependently inhibited osteoclast formation (Fig. 6A). The numbers of osteoclasts at day 5 were significantly reduced to 286.8 ± 59.8 ($P = 0.016$), 146.3 ± 75.1 ($P = 0.009$), and 5.5 ± 3.7 ($P < 0.001$) cells/48 wells after 5 days exposure to 0.25, 0.5, and 1 μ M imatinib mesylate, respectively, compared with the nontreated group (403.5 ± 37.6 cells/48 wells). Cells did not change into TRAP-positive osteoclasts after exposure to concentrations of imatinib mesylate above 2 μ M.

Imatinib mesylate does not influence osteoclastic bone resorption activity

Resorption areas in hydroxyapatite-coated slides after day 5 when osteoclasts had already differentiated were not reduced by imatinib mesylate. Resorption areas at day 10 with and without imatinib mesylate did not differ significantly ($12.9\% \pm 6.2\%$ and $13.1\% \pm 3.4\%$, respectively; see Fig. 6B).

Discussion

We are the first to reveal the positive effects of imatinib mesylate on joint destruction in arthritis model rats and a suppressive effect on osteoclastogenesis in vitro. Miyachi et al. [6] found that imatinib mesylate was therapeutically effective in a patient with RA. Eklund and Joensuu [7] also showed that imatinib mesylate was clinically effective in three patients with RA and postulated that one mechanism of action against arthritis is KIT receptor inhibition on mast cells. The present study found that imatinib mesylate alone

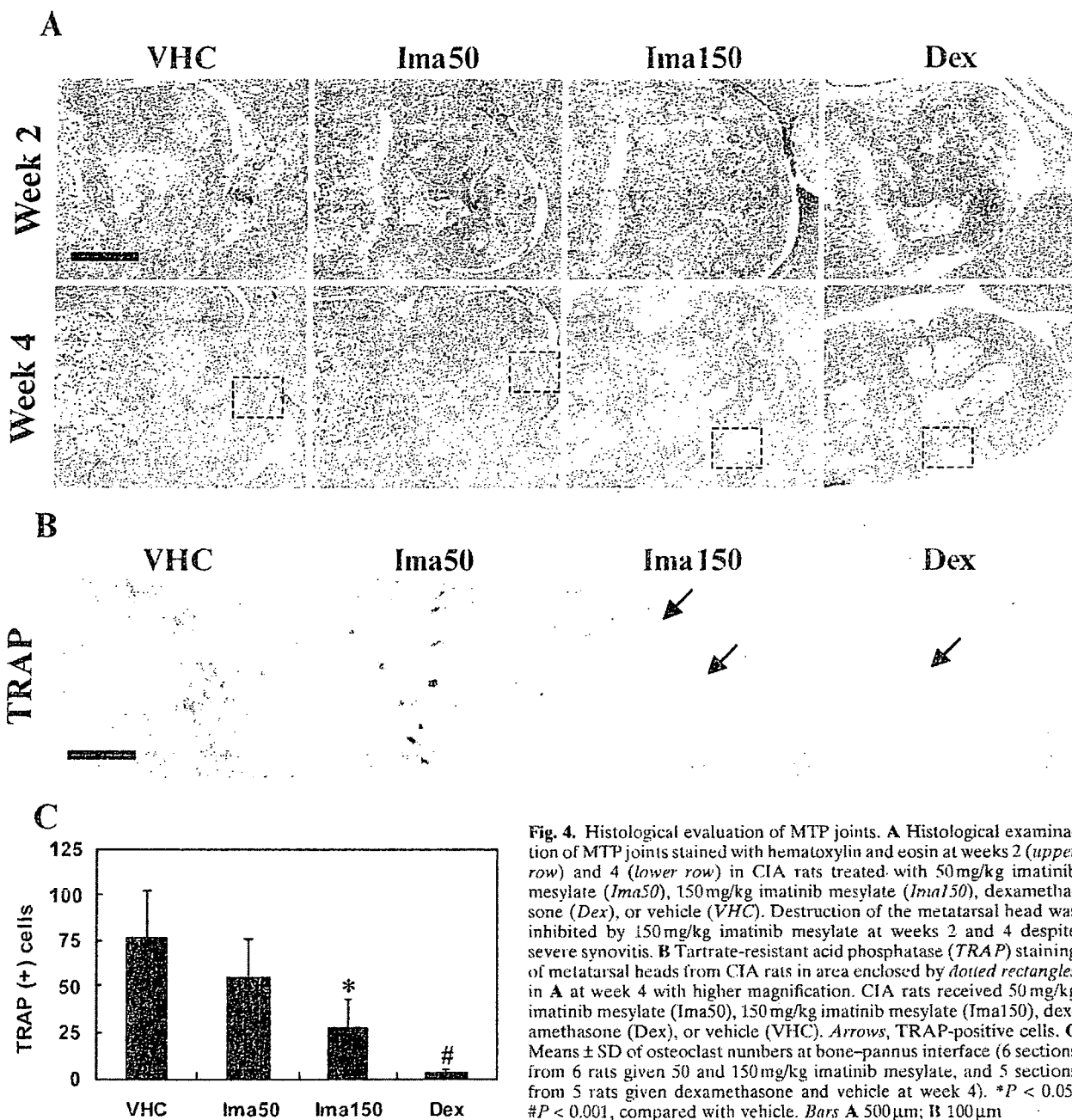


Fig. 4. Histological evaluation of MTP joints. **A** Histological examination of MTP joints stained with hematoxylin and eosin at weeks 2 (upper row) and 4 (lower row) in CIA rats treated with 50 mg/kg imatinib mesylate (*Ima50*), 150 mg/kg imatinib mesylate (*Ima150*), dexamethasone (*Dex*), or vehicle (*VHC*). Destruction of the metatarsal head was inhibited by 150 mg/kg imatinib mesylate at weeks 2 and 4 despite severe synovitis. **B** Tartrate-resistant acid phosphatase (*TRAP*) staining of metatarsal heads from CIA rats in area enclosed by dotted rectangles in **A** at week 4 with higher magnification. CIA rats received 50 mg/kg imatinib mesylate (*Ima50*), 150 mg/kg imatinib mesylate (*Ima150*), dexamethasone (*Dex*), or vehicle (*VHC*). Arrows, *TRAP*-positive cells. **C** Means \pm SD of osteoclast numbers at bone-pannus interface (6 sections from 6 rats given 50 and 150 mg/kg imatinib mesylate, and 5 sections from 5 rats given dexamethasone and vehicle at week 4). * $P < 0.05$; # $P < 0.001$, compared with vehicle. Bars **A** 500 μ m; **B** 100 μ m

did not improve inflammation in an animal model of RA but inhibited joint destruction and reduced the numbers of osteoclasts at the bone-pannus interface. This finding invokes the question of why imatinib mesylate was reasonably effective against clinical RA. All RA patients who were treated with imatinib mesylate in previous studies [6,7] received concomitant antiinflammatory drugs including glucocorticoids. However, the protective effect of glucocorticoids against joint destruction is not clear. Kirwan described that low-dose glucocorticoids administered for less than 2 years inhibits joint destruction [25], but Paulus et al. reported that glucocorticoid alone does not protect against joint destruction in RA patients [26]. Therefore, we specu-

lated that the remarkable antirheumatic effects in the clinical setting reported by others [6,7] are the result of synergy between the antiinflammatory action of glucocorticoid and the antiosteoclastogenic effect of imatinib mesylate.

The cytokine M-CSF is essential for osteoclast formation [27]. We recently demonstrated that nurse-like cells established from RA synovium [28,29] secrete M-CSF, maintain osteoclast precursors for long periods, and might play an important role in the pathogenesis of joint destruction [20]. Imatinib mesylate is a tyrosine kinase inhibitor that inhibits *bcr-abl* expressed by CML progenitors, as well as PDGF and *c-kit*, which is a tyrosine kinase transmembrane