

平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
関節リウマチの先端的治療に関する研究班
線維筋痛症の治療法に関する研究

分担研究者 土井 永史 東京大学医学部精神医学教室

研究要旨

線維筋痛症とは、米国で体幹部の特異的な圧痛点を有し、種々の精神症状を呈する疾患として 1970 年代から注目されてきている疾患である。患者数は徐々に増加し、2003 年の米国リウマチ学会の発表では、全米で 360 万人以上にも達すると報告されている。本邦でも近年、線維筋痛症に対して注目が集まってきている。多様な筋骨格系の痛みを主体とした慢性疼痛に加え、不眠や抑うつ状態など種々の精神症状を伴う。その症状により、生活機能障害を症例も少なくない。多くが慢性の経過を辿るが未だ原因や予後も明らかにされていないため病因の解明、治療の確立が強く期待されている。

治療は現在、種々の鎮痛剤や神経節ブロックや抗うつ薬の有効性が報告されているが、一定の成果を得ていないのが現状である。これまでに薬物治療抵抗性のうつ病や慢性疼痛患者においては電気痙攣療法(ECT)の効果が報告されている。特に視床の血流の低下を認めた神経因性疼痛に対しての ECT の有効性の報告があり、線維筋痛症も抑うつ状態と慢性疼痛を伴うため、ECT による治療効果が期待できると推測される。今回われわれは脳血流 SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography)にて視床部位の血流低下を認め、薬物治療抵抗性の抑うつ状態を伴ったが、うつ病の診断基準を満たさなかった線維筋痛症患者に対しての ECT の有効性を検討した。

A. 研究目的

線維筋痛症は、三ヶ月以上続く広範囲の疼痛と、特異的な圧痛点を有し、疲労感や、不眠、不安感など種々の精神症状を伴う疾患である。難治性の抑うつ状態を伴うことも多く、抗うつ薬に治療抵抗性であるため症状が遷延し生活機能障害をも引き起こす例も少なくない。治療はこれまでに種々の鎮痛剤や神経節ブロックや抗うつ薬の有効性が報告されているが、一定の評価を得ていないのが現状である。これまでに薬物治療抵抗性のうつ病や慢性疼痛患者においては電気痙攣療法(ECT)の効果が報告されている。特に視床の血流の低下を認めた慢性疼痛症例に対しての ECT の有効性の報告があり、線維筋痛症も抑うつ状態と慢性疼痛を伴うため、ECT による治療効果が期待できると推測される。今回われわれは脳血流 SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography)にて視床部位の血流低下を認め、治療抵抗性の抑うつ状態を伴った線維筋痛症患者に対しての ECT の有効性を検討した。

B. 研究方法

(1)対象患者は 1990 年のアメリカリウマチ学会の線維筋痛症診断基準を満たし、うつ状態はあるものの DSM IV の major depressive episode の診断基準を満たさなく、抗うつ薬や睡眠導入薬などの向精神薬を用いても疼痛が改善せず生活機能障害を呈した薬物治療抵抗症例を対象とした。さらに SPECT を用いて ^{99m}Tc-ECD Patlak プロット法にて脳血流を測定し、3DSRT にて解析し、視床の血流量を小脳と比較し、正常と比べて低下している男女計 15 名を対象とした。ECT は 1 日 1 回の隔日施行で 1 クール 6 回施行した。疼痛評価として治療前後で、VAS(Visual Analog Scale)、圧痛点を行い、また治療前後で BDI(Beck's depression inventory)を用い抑うつ状態も同時に評価し比較検討した。同時に SPECT も前後で施行し症状との関連を検討した。
(2)発表は対象患者の人権擁護上個人の特特定性が生じないように配慮した。通電療法を用いた本研究では、個人及びどの家族等の関係者に対する不利益として、この治療によって症状が改善されない場合

がある点が挙げられる。また通電療法による有害事象として、徐脈、血圧上昇、頻脈、不整脈、頭蓋内圧上昇、朦朧状態、せん妄、健忘、躁転、頭痛、吐き気、筋肉痛などがあり、稀に死亡に至る例もある。ただし、死亡率は米国の調査では1万人に1人、8万人に1件であり、麻酔単独による死亡事故の確率よりも低い。しかしこのような不利益を考慮しても、薬物治療抵抗性の重症例に対しては迅速な効果が得られ有益性が高いこと予測される。本研究では事前に診療を担当する医師から患者および家族に対しての文書および口頭で利益、不利益の説明を行い十分な納得を得て同意を得た上で行った。

C. 結果

ECTにより、VAS および圧痛点は著明に減少し、疼痛は改善を認めた。また SPECT の結果においても優位に視床の血流の上昇を認めた。抑うつ状態は改善傾向を認めたが、SDS、BDI とともに ECT 前後で有意差は認めなかった。

D. 考察

疼痛の改善と SPECT の結果が相関することより、重度の精神症状を伴う線維筋痛症では視床周辺の循環代謝が低下しており、ECT はこれを改善することによって治療効果を発揮すると考えられた。疼痛および ADL の改善に伴い抑うつ状態の改善を認めた。しかし、ECT 前後で抑うつ状態に有意差を認めなかったことや、抑うつ状態の変化のなかった症例でも鎮痛効果を認めたことより、ECT による痛みの改善は抑うつ状態の改善に伴う二次的効果ではないと考えられた。線維筋痛症の疼痛機序には視床周辺の機能低下が関与していることが示唆された。また重症の線維筋痛症に対し視床周辺の機能の改善を介した ECT の奏効機序が示唆された。今後抑うつ状態を伴わない線維筋痛症における ECT の治療効果の検討を行っていく必要があると考えられた。

E. 健康危惧情報

特になし

F. 研究発表

Electroconvulsive therapy improves severe pain associated with Fibromyalgia
Usui C., Doi N., Nishioka M., Komatsu H., Yamamoto R., Ohkubo T., Ishizuka T., Shibata N., Hatta K., Miyazaki H., Nishioka K., Arai H.:
Pain. 2006 Apr;121(3):276-80. Epub 2006 Feb 21

2. 学会発表

土井永史、鮫島達夫、加藤進昌、臼井千恵
慢性疼痛における ECT
第 49 回日本リウマチ学会 4/17-20, 2005

G. 知的財産権の出願・取得状況

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

厚生労働科学研究補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

関節リウマチ及び線維筋痛症の寛解導入を目的とした新規医薬品の
導入・開発及び評価に関する包括的研究

平成18年度 研究報告書

主任研究者 西岡 久寿樹

平成19（2007）年 4月

遺伝子改変動物による新規抗リウマチ剤開発とその評価

分担研究者 岩倉洋一郎（東京大学医科学研究所 教授）

我々は、これまでに発症メカニズムの異なる2種類の関節リウマチモデルマウスを作製することに成功した。このうち、HTLV-I トランスジェニックマウスはIL-6を欠損させると発症が強く抑制されるが、TNF α を欠損させても全く影響を受けない。ところがIL-1レセプターアンタゴニスト(Ra)欠損マウスは全く逆のサイトカイン依存性を示す。現在、TNFを標的とした生物製剤の有効性が注目されているが、この治療に全く反応しない、いわゆるnon-responderが存在することが問題となっている。我々は、動物モデルの有用性を活用し、サイトカイン依存性のメカニズムを解析するとともに、non-responder特異的な遺伝子を探索した。さらに両モデルマウスで共通に発現変動をした遺伝子の欠損マウスを作製したところ、関節炎を自然発症するマウスを見いだした。また、別の2種類のマウスではCIAに抵抗性になっていた。これらの遺伝子は関節炎治療薬の標的となる可能性が示された。

A. 研究目的

我々はこれまでに発生工学手法を用い、HTLV-Iトランスジェニック (Tg) マウスとIL-1Ra欠損 (KO) マウスの2種類の関節炎モデルマウスを独自に開発した。これらのモデルマウスの関節炎発症機構を解析するなかで、2種類のモデルマウスが同様の病態を示すにもかかわらず、IL-1RaKOマウスはTNFの欠損により関節炎の発症がほぼ完全に抑えられるのに対し、HTLV-I Tgマウスでは関節炎発症率に全く影響を及ぼさないことを見いだした。逆にHTLV-I-TgマウスはIL-6欠損により強く発症が抑制されるのに対し、IL-1RaKOマウスでは全く影響を受けなかった。本研究では両モデルマウスにおけるサイトカイン依存性の分子機構を明らかにすることを第一の目的としている。また、リウマチ患者のなかで、抗TNF抗体治療に対するresponderとnon-responderとの間で、モデルマウスで見いだされた遺伝子発現と同様な特徴があるかどうかを検討し、最終的に抗TNF治療開始前に効果を予測する検査法を開発することを目的とする。また、関節炎発症時に発現変化の見られた遺伝子と関節炎発症との関連を解明することにより、新たな治療薬の標的となる遺伝子を探索する。

B. 研究方法

HTLV-I Tg, IL-1RaKOマウスはそれぞれ8世代以上BALB/cマウスに戻し交配した。関節部位およびPBMCからmRNAを調製し、アフィメトリクス社のGene Chipを用いて解析した。さらに、発現変動の見られた遺伝子について新たにKOマウスを作製し、関節炎の病態形成に対する影響を検討した。

C. 研究結果および考察

1. マイクロアレイで発現変化の認められた遺伝子をクラスタリング解析したところ、HTLV-I-TgマウスとIL-1RaKOマウスで共通に発現上昇する遺伝子や、それぞれのモデルで特徴的に発現変動する遺伝子があることがわかった。現在これらの遺伝子の解析を行っている。

2. 両モデルで共通に発現亢進の見られた遺伝子のうち、5種類の遺伝子欠損マウスを作製した。その中で、解析の先行しているDectin-1KOマウス、及びT細胞特異的CXCR4KOマウスを用いてコラーゲン関節炎の誘導を行ったところ、それぞれ有意に発症率が低下することが明らかとなった。現在その発症抑制のメカニズムについて検討を行っている。
3. Dectin-1と同じC型レクチンファミリーに属するDCIRを欠損させたところ、これらのマウスが自己抗体の産生を伴う自己免疫を発症し、関節炎や唾液腺炎を自然発症することを見いだした。この結果は、DCIRが免疫系の抑制因子として重要な役割を果たしていることを示唆する。

E. 結論

我々が開発した独自のモデルをマイクロアレイで解析することにより、病態形成に関与する可能性のある遺伝子を多数同定した。そのうちいくつかの遺伝子について欠損マウスを作製し、実際病態形成に関与することを明らかにした。これらの遺伝子は関節リウマチの新たな治療薬の標的として、非常に有望である。

G. 研究発表

1. 論文発表
 1. Shimizu, M., Shimamura, M., Owaki, T., Asakawa, M., Fujita, K., Kudo, M., Iwakura, Y., Takeda, Y., Mizuguchi, J., and Yoshimoto, T. Antiangiogenic and antitumor activities of IL-27. *J. Immunol.*, 176, 7317-7324 (2006).
 2. Kotani, M., Hirata, K., Ogawa, S., Habiro, K., Araki, M., Ishi, T., Ishida, Y., Tanuma, S., Tanabe, K., Toma, Horai, R., Iwakura, Y., and Abe, R. Presence of CD28-dependent and independent pathways in autoimmune arthritis developed in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. *Arth. Rheum.*, 54, 473-481 (2006).
 3. Matsuki, T., Nakae, S., Sudo, K., Horai, R., and Iwakura, Y. Abnormal T cell activation caused by the imbalance of the IL-1/IL-1 receptor antagonist

- system is responsible for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int. Immunol.*, 18, 399-407 (2006).
4. Ishigame, H., Nakajima, A., Saijo, S., Komiyama, Y., Mastuki, T., Nakae, S., Horai, R., Kakuta, S., and Iwakura, Y. The role of TNF α and IL-17 in the development of excess IL-1 signaling-induced inflammatory diseases in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Ernst Schering Res. Found. Workshop*, 56, 129-153 (2006).
 5. Vonk, A. G., Netea, M. G., van Krieken, J. H., Iwakura, Y., van der Meer, J. W. M., and Kullberg, J. B. Endogenous interleukin-1 α and interleukin-1 β are crucial for host defense against disseminated candidiasis. *J. Infect. Dis.*, 193, 1419-1426 (2006).
 6. Nambu, A., Nakae, S., and Iwakura, Y. IL-1 β , but not IL-1 α , is required for antigen-specific T cell activation and the induction of local inflammation in the delayed-type hypersensitivity responses. *Int. Immunol.*, 18, 701-712 (2006).
 7. O'Sullivan, B. J., Thomas, H. E., Pai, S., Santamaria, P., Iwakura, Y., Steptoe, R. J., Kay, T. W. H., and Thomas, R. IL-1 β breaks tolerance through expansion of CD25⁺ effector T cells. *J. Immunol.*, 176, 7278-7287 (2006).
 8. Iwakura, Y., and Ishigame, H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J. Clin. Invest.*, 116, 1218-1222 (2006).
 9. Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., and Iwakura, Y. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 177, 566-573 (2006).
 10. Murakami, M., Iwai, S., Hiratsuka, S., Yamauchi, M., Nakamura, K., Iwakura, Y., and Shibuya, M. Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocyte/macrophage. *Blood*, 108, 1849-1856 (2006).
 11. Fujikado, N., Saijo, S., and Iwakura, Y. Identification of arthritis-related gene clusters by microarray analysis of two independent mouse models for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 8, R100, 1-13 (2006).
 12. Furuta, T., Kikuchi, T., Iwakura, Y., and Watanabe, N. Protective roles of mast cells and mast cell-derived tumor necrosis factor in murine malaria. *J. Immunol.*, 177, 3294-302 (2006).
 13. Voronov, E., Dayan, M., Zinger, H., Gayvoronsky, L., Lin, J. P., Iwakura, Y., Apte, R. N., and Mozes, E. IL-1 β -deficient mice are resistant to induction of experimental SLE. *Eur. Cytokine Netw.*, 17, 109-116 (2006).
 14. Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Shizuo, A., Iwakura, Y., Cua, D. J., and Takayanagi, H. T_H17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J. Exp. Med.*, 203, 2673-2682 (2006).
 15. Ito, R., Shin-Ya, M., Kishida, T., Urano, A., Takada, R., Sakagami, J., Imanishi, J., Kita, M., Ueda, Y., Iwakura, Y., Kataoka, K., Okanoue, T., and Mazda, O. Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 146, 330-338 (2006).
 16. Tsurutani, N., Yasuda, J., Yamamoto, N., Choi, B., Kadoki, M., and Iwakura, Y. Nuclear import of the pre-integration complex is blocked upon infection by HIV-1 in mouse cells. *J. Virol.*, 81, 677-688 (2007).
 17. Saijo, S., Fujikado, N., Furuta, T., Chung, S., Kotaki, H., Seki, K., Sudo, K., Akira, S., Adachi, Y., Ohno, N., Kinjo, T., Nakamura, K., Kawakami, K., and Iwakura, Y. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nature Immunol.*, 8, 39-46 (2007).
 18. Hirota, K., Hashimoto, M., Yoshitomi, H., Tanaka, S., Nomura, T., Yamaguchi, T., Iwakura, Y., Sakaguchi, N., and Sakaguchi, S. T cell self-reactivity forms cytokine milieu for spontaneous development of IL-17⁺ helper T cells that cause autoimmune arthritis. *J. Exp. Med.*, 204, 41-47 (2007).
 19. Nigrovic, P. A., Binstadt, B. A., Monach, P. A., Johnsen, A., Gurish, M., Iwakura, Y., Benoist, C., Mathis, D., and Lee, D. M. Mast cells contribute to initiation of autoantibody-mediated arthritis via IL-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.
 20. Nakamatsu, M., Yamamoto, N., Nakasone, C., Kinjo, T., Miyagi, K., Uezu, K., Nakamura, K., Nakayama, T., Taniguchi, M., Iwakura, Y., Kaku, M., Fujita, J., and Kawakami, K. Role of interferon-gamma in Val14⁺ natural killer T cell-mediated host defense against *Streptococcus pneumoniae* infection in murine lungs. *Microbes Infect.*, in press.
 21. Sugihara, T., Sekine, C., Nakae, T., Kohyama, K., Harigai, M., Iwakura, Y., Matsumoto, Y., Miyasaka, N., and Kohsaka, H. A new murine model defines critical mediators in the pathology and treatment of polymyositis. *Arthritis Rheum.*, in press.
 22. Adachi, K., Soeta-Saneyoshi, C., Sagara, H., and Iwakura, Y. A crucial role of *Bysl* in mammalian preimplantation development as an integral factor for 40S ribosome biogenesis. *Mol. Cell. Biol.*, in press.
 23. Nakae, S., Iwakura, Y., Suto, H., and Galli, S. J. Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell-differentiation by IL-17. *J. Leu. Biol.*, in press.
 24. Ashino, T., Arima, Y., Shioda, S., Iwakura, Y., Numazawa, S., and Yoshida, T. Effect of interleukin-6 on CYP3A11 and metallothionein-1/2 expression in arthritic mouse liver. *Eur. J. Pharm.*, in press.
 25. Onodera, S., Ohshima, S., Tohyama, H., Yasuda, K., Nishihira, J., Iwakura, Y., Matsuda, I., Minami, A., and Koyama, Y. A novel DNA vaccine targeting macrophage migration inhibitory factor protects joints from inflammation and destruction in murine models of arthritis. *Arthritis Rheum.*, 56, 521-530 (2007).

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

関節リウマチ及び線維筋痛症の寛解挿入を目的とした新規医薬品の導入・開発及び評価に関する包括的研究班

(抗リウマチ薬剤導入による軟骨細胞分化と再生)

分担研究者 妻木 範行 大阪大学大学院医学系研究科助手

研究要旨 関節リウマチの治療において機能回復を目指すには、骨欠損の回復と骨質の改善が必要である。変性破壊した骨組織を修復するには、内軟骨性骨化の過程を修復過程に再導入する必要があると考え、我々は内軟骨性骨化を誘導する活性を持つ骨形成因子(BMP)に着目した。まず BMP の内軟骨性骨化における作用を解析するために、軟骨、骨において BMP シグナルを活性化あるいは抑制したトランスジェニックマウスを作製し、その骨組織を解析した。BMP には骨芽細胞と破骨細胞を刺激してリモデリングを促進し、強い骨を形成する作用があることが判明した。そして多量の BMP を長期に骨に投与すると、骨吸収が促進されて骨量が低下しうることが判明した。

A. 研究目的

関節リウマチでは活発な炎症により、関節部の骨破壊と骨質の低下を伴う。関節リウマチにおいて寛解導入と機能回復を目指すには、骨欠損の回復と骨質の改善が必要である。さらに関節リウマチでは骨質の低下に伴って、骨折が多く見られしかも治療に難渋することが多い。骨形成因子(BMP)は内軟骨性骨化を誘導する蛋白であり、遷延性偽関節を早期に治癒させる薬剤として米国で使用されている。四肢・脊椎の骨組織は内軟骨性骨化で形成される。関節リウマチにおいて変性破壊した骨組織を修復するには、内軟骨性骨化の過程を修復過程に再導入する必要がある。我々はそのための薬剤として BMP およびその関連物質に注目した。BMP の内軟骨性骨化における作用を解析するために、軟骨、骨において BMP シグナルを活性化あるいは抑制したトランスジェニックマウスを作製し、その骨組織を解析した。さらにマウス骨折モデルにおいて種々の治癒過程に BMP を投与し、骨修復に与える影響を検討した。

B. 研究方法

骨あるいは軟骨特異的に BMP シグナルを活性化あるいは抑制したトランスジェニックマウスを作製し、その骨形成を解析した。BMP シグナルを抑制するために、細胞外で BMPs 2, 4, 7 のアンタゴニストとして働く noggin を用いた。Type XI コラーゲン(Col11a2)プロモーター制御下で軟骨特異的に BMP4 を過剰発現させたトランスジェニックマウス(Col11a2-Bmp4)、そして Type I コラーゲン(Col1a1)プロモーター制御下で、骨特異的に noggin を過剰発現させたトランスジェニックマウス(Col1a1-noggin)と BMP4 を過剰発現させたトランスジェニックマウス(Col1a1-Bmp4)を其々作製し、その骨組織を wild-type マウス(WT)と比較して解析した。またマウス骨折モデルの治癒の過程に BMP を投与し、仮骨を解析した。8週齢マウス脛骨髄内に 30G ワイヤーを通し、3点 bending device にて骨幹部骨折を起こした。3日後および16日後に、recombinant human BMP4 を 5・gあるいは PBS を投与した。骨折後 21 日目

に sacrifice し、脛骨のマイクロ CT 撮影と組織学的解析を行った。

C. 研究結果

軟骨で BMP4 を過剰発現させて BMP シグナルを活性化したトランスジェニックマウス (Coll1a2-Bmp4) では、軟骨が増大し、それを鋳型に形成される骨梁も太くなった。

骨で BMP シグナルを抑制したトランスジェニックマウス (Coll1a1-noggin) では著名な破骨細胞性骨吸収の減少と軽度の骨形成の低下を認めた ($n = 6, p < 0.05$)。そして骨量は増大したものの、woven であり 60% に骨折を認めた。このマウスから培養した骨芽細胞の石灰化能は低下していたが、BMP の投与により回復した。逆に BMP4 を過剰発現させたトランスジェニックマウス (Coll1a1-Bmp4) では骨梁がほとんど消失し、破骨細胞が顕著に増加した。これらの現象は骨折モデルの治癒過程でも再現した。即ち、骨折後早期の BMP 投与で有意に大きな仮骨が形成され、一方後期の投与では仮骨は一時的に吸収され小さくなった ($n = 5, p < 0.05$)。

D. 考察

Coll1a1-noggin トランスジェニックマウスの結果から BMP の骨における生理機能は破骨細胞とリモデリングを刺激して、強い骨を形成することと考えた。Coll1a1-Bmp4 トランスジェニックマウスの結果は、多量の BMP を長期に骨に投与すると、骨吸収が促進され、骨量の低下をきたすことを示唆する。Coll1a2-Bmp4 トランスジェニックマウスの結果から、軟骨形成期に BMP を投与すると結果的に骨組織の回復を得られることが示唆された。これらの知見は骨折治癒過程にも当てはまった。

D. 結論

BMP の骨における生理機能は破骨細胞とリモデリングを刺激して、強い骨を形成することである。多量の BMP を長期に骨に投与すると、骨量の低下をきたす。関節リウマチにおける骨質の改善、骨欠損の修復、骨折の治療に、BMP を用いて治療を考えていく場合、これらの点に留意すべきであることが判明した。

E. 健康危険情報 無し

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Okamoto, M., Murai, J., Yoshikawa, H., and Tsumaki, N.: Bone morphogenetic proteins in bone stimulate osteoclasts and osteoblasts during bone development. *J Bone Miner Res*, 21(7): 1022-1033, 2006.
2. Sugiki, T., Uyama, T., Toyoda, M., Morioka, H., Kume, S., Miyado, K., Matsumoto, K., Saito, H., Tsumaki, N., Takahashi, Y., Toyama, Y., and Umezawa, A.: Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. *J Cell Biochem*, in press, 2006.
3. Hirao, M., Tamai, N., Tsumaki, N., Yoshikawa, H., and Myoui, A.: Oxygen tension regulates chondrocyte differentiation and function during endochondral ossification. *J Biol Chem*, 281(41): 31079-31092, 2006.
4. 妻木範行, 吉川秀樹: 遺伝子改変マウスを用いた BMP シグナルによる骨・軟骨形成機構の解析. *Arthritis*, 4(1), 4-9, 2006.
5. 妻木範行: 最新原著レビュー 低出力超音波パルス照射は片側仮骨延長法を用いた高位脛骨骨切り術における延長仮骨治癒を促進する. *整形外科*, 57, 1531-1535, 2006.
6. 妻木範行: 軟骨・骨形成における骨形成因子 (BMP) シグナルの役割. *Clinical Calcium*,

- 16(4): 138-142, 2006.
7. 妻木範行, 村井純子, 岩井貴男, 岡本美奈, 吉川 秀樹: BMP シグナルと骨形成・骨吸収. *The Bone*, 20, 343-348, 2006.
 8. 妻木範行, 吉川秀樹: 骨格発生における BMP と関連分子群の生物活性. *Clinical Calcium*, 16(5): 67-72, 2006.
2. 学会発表
1. J. Murai, H. Yoshikawa and N. Tsumaki: Identification of a CTCF-binding site between the *Rxb* and the *Col11a2* genes and its functions., Frontiers of skeletal biology Eleventh and Valedictory Workshop on Cell Biology of Bone and Cartilage in Health and Disease, Davos, Switzerland, March 18 - 21, 2006
 2. J. Murai, H. Yoshikawa, N. Tsumaki: Regulation of the *Col11a2* expression through the histone modification., 28th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Sep 15-19, 2006, Philadelphia, Pennsylvania, USA
 3. T. Iwai, J. Murai, H. Yoshikawa, N. Tsumaki: Role of Smad7 during Endochondral Bone Formation., Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Sep 15-19, 2006, Philadelphia, Pennsylvania, USA
 4. Murai J, Okamoto M, Iwai T, Yoshikawa H, Tsumaki N.: Generation of conditional transgenic mice for BMP4 in bone., 6th International Conference on Bone Morphogenetic Proteins, Oct 11-15, 2006, Cavtat/Dobrovnik
 5. N. Tsumaki, J. Murai, T. Iwai, M. Okamoto, H. Yoshikawa: BMP SIGNALING AND ENDOCHONDRAL BONE FORMATION., 6th International Conference on Bone Morphogenetic Proteins, Oct 11-15, 2006, Cavtat/Dobrovnik
 6. T. Iwai, J. Murai, H. Yoshikawa, N. Tsumaki: Smad7 overexpression inhibits cellular differentiation at multiple steps during endochondral bone formation., 6th International Conference on Bone Morphogenetic Proteins, Oct 11-15, 2006, Cavtat/Dobrovnik
 7. N. Tsumaki, R. Katayama, T. Kimura, H. Yoshikawa: ROLES OF GDF5 IN CARTILAGE FORMATION AND REPAIR, 1st International Conference on the Biology and Therapeutic Potential of GDF5, 2006 10/23-25, Boston
 8. 岩井貴男, 妻木範行, 村井純子, 名井陽, 吉川秀樹: 低出力超音波刺激とハイドロキシアパタイト多孔体における骨新生, 第9回 超音波骨折治療研究会 2006年1月21日 大阪
 9. 村井純子, 吉川秀樹, 妻木範行: *Rxb* / *Col11a2* locusにおけるCTCF結合領域の同定とその機能解析, 第19回日本軟骨代謝学会, 2006年3月3日-4日 横浜(はまぎんホールヴィアマール)
 10. 村井純子, 吉川秀樹, 妻木範行: Analysis of histone acetylation around the *Rxb* / *Col11a2* locus, 第38回日本結合組織学会, 2006年5月11日-12日 群馬県前橋(前橋昇降会議所会館)
 11. 妻木範行, 海渡貴司, 岩井貴男, 村瀬剛, 名井陽, 吉川秀樹: 連通気孔を有する3D-CAD 人工骨を用いた高位脛骨骨切術の短期成績, 第79回日本整形外科学会, 2006年5月18-21日, 横浜
 12. 妻木範行, 内側型変形性膝関節症治療の現状と将来, 第24回日本骨代謝学会イブニングセミナー, 2006年7月6-8日東京(東京ファッショントウン)
 13. 岩井貴男, 村井純子, 吉川秀樹, 妻木範行: 軟骨 Smad7 コンディショナルトランスジェニックマウスの作製と解析, 第24回日

本骨代謝学会, 2006年 7 月 6-8 日東京
(東京ファッションタウン)

F. 知的財産の出願・登録状況
該当なし

14. 村井 純子、吉川 秀樹、妻木 範行:
XI 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子発現とヒストン修飾の解析, 第 24 回日本骨代謝学会, 2006 年 7 月 6 日-8 日 東京(東京ファッションタウン)
15. 岡本美奈、村井純子、吉川秀樹、妻木範行: 骨組織において BMP は骨形成と骨吸収を促進する—Noggin 骨組織過剰発現トランスジェニックマウスの解析—, 第 13 回 BMP 研究会, 2006 年 7 月 9 日, 東京
16. 村井純子, 岡本美奈, 吉川秀樹, 妻木範行: *Col11a2/Rxb* locus の遺伝子発現制御,
第 7 回運動器科学研究会, 2006 年 8 月 25-26 日, 大津
17. 岩井貴男、村井純子、吉川秀樹、妻木範行: 軟骨 Smad7 コンディショナルトランスジェニックマウスの作製と解析, 2006 年 8 月 25-26 日, 大津
18. 妻木範行: 骨・軟骨形成における BMP の役割, 第 3 回骨と関節の代謝調節を考える基礎の会, かずさ, 2006 年 9 月 30 日-10 月 1 日
19. 妻木範行, 村井純子, 岩井貴男, 岡本美奈, 吉川秀樹: 内軟骨性骨化における BMP シグナルの役割と XI 型コラーゲン遺伝子プロモーター, 第 21 回日本整形外科学会基礎学術集会 2006 年 10 月 19-20 日, 長崎
20. 岩井貴男、村井純子、吉川秀樹、妻木範行: 軟骨形成における Smad7 の役割の解析, 第 21 回日本整形外科学会基礎学術集会 2006 年 10 月 19-20 日, 長崎
21. 岩井貴男、妻木範行、村井純子、名井陽、吉川秀樹: ハイドロキシアパタイト多孔体内骨新生に対する低出力超音波刺激の影響, 第 26 回 整形外科セラミック・インプラント研究会 2006 年 12 月 2 日 東京

膜型M-CSFシェディングの分子機構に関する研究

分担研究者：千葉 一裕 慶應義塾大学医学部整形外科 助教授
研究協力者：高石 官成 慶應義塾大学医学部整形外科 助手
堀内 圭輔 慶應義塾大学抗加齢医学講座 講師

研究要旨：膜型M-CSFのshedding活性が、ADAM17 (-/-) 由来のMEFで著しく低下しており、MMPインヒビターおよびTIMP3によって阻害されることから、ADAM17が膜型M-CSFの可溶化に関与していることが明らかになった。また、非切断型の膜型M-CSFはClathrin依存性にinternalizationされ、細胞内で分解されることが示された。すなわち、膜型M-CSFはsheddingとendocytosisという異なった機序により修飾を受け、膜表面での蛋白量が調節されることが示唆された。

分担研究者氏名・所属機関名および所属機関における職名

（分担研究者の場合は、省略）

A. 研究目的

慢性関節リウマチの病態が分子レベルで解明され、標的シグナルを抑制する治療法の開発が進み、さまざまな生物学的製剤が臨床応用できるようになってきた。M-CSF（マクロファージコロニー刺激因子）はRANKL（TRANCE, OPGL, ODF）とともに破骨細胞分化に必須の支持細胞由来の分子であり、その機能の詳細な解明は骨粗鬆症、炎症性骨破壊、癌骨転移などの病態を理解するうえで欠かせない。M-CSFは分泌型蛋白としてだけでなく細胞膜に結合した膜型蛋白としても合成されるが、膜型M-CSFの転写後機能調節に関しては不明な点が多い。本研究の目的はこの膜型M-CSF転写後の機能調節を細胞レベルで明らかにすることである。

B. 研究方法

膜型M-CSFをRT-PCRにてクローニングし、これにAlkaline Phosphatase, GFP, HAなどのタグを付け、COS7、ADAM17 (-/-) 由来MEF、ストローマ細胞であるST2、骨芽細胞様細胞であるMC3T3E-1に発現導入した。導入後、phorbol 12-myristate 13-acid (PMA) 刺激およびGM6001 (Metalloproteinase Inhibitor) またはTIMP1, 2, 3存在下にてshedding assayをおこない、膜型M-CSFの切断機構について解析した。また、HAタグを付けたM-CSFを導入したCOS7細胞に抗体を反応させ、4%PFA固定後に免疫染色をおこない、共焦点顕微鏡で膜型M-CSFの動態を観察した。

（倫理面への配慮）

慶應義塾大学の組み換えDNA委員会および実験

動物に関する規則にそって計画し遂行した。

C. 研究結果

Alkaline Phosphataseを付加した膜型M-CSFをCOS7に導入したところ、膜型M-CSFは蛋白分解酵素により細胞膜から切断され可溶性となることが観察された。このshedding活性はMMPインヒビターであるGM6001に感受性が認められ、ST2およびMC3T3E-1においても同様な活性が確認された。また膜型M-CSFのshedding活性は、ADAM17 (-/-) 由来のMEFで著しく低下しており、TIMP1やTIMP2ではなくTIMP3によって阻害されたことから、ADAM17が膜型M-CSFの可溶化に関与していることが示唆された。さらに ST2細胞をPTH(100ng/ml)で刺激することによって膜型M-CSFのshedding活性が亢進したが、 $1, 25(OH)_2D_3$ ($10^{-8}M$) + PGE2 ($10^{-6}M$) 刺激ではそのshedding活性はわずかであった。細胞染色により膜型M-CSFは膜表面に局在することが確認されたが、一方で小胞体、ゴルジ体と考えられる細胞内器官にも強い染色が認められた。さらに蛋白分解を受けなかった膜型M-CSFは細胞膜上に留まらずendocytosisによって動的に細胞内に取り込まれることが観察された。

D. 考察

膜型M-CSFはPMA刺激によって可溶型に放出され、そのshedding活性はADAM17依存性であり、非切断型の膜型M-CSFはClathrin依存性にinternalizationされ、細胞内で分解されることが明らかになった。すなわち、膜型M-CSFはsheddingとendocytosisという異なった機序により修飾を受け、膜表面での蛋白量が調節されることが示唆された。細胞間相互作用を介したこれらの転写後調節がM-CSF依存性細胞や破骨細胞前駆細胞の分化に与える影響について検討中である。

E. 結論

膜型M-CSFはsheddingによる可溶化およびendocytosisによりその細胞膜上の発現レベルが能動的に調節されている。

F. 健康危険情報

問題なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ogawa Y, Chiba K, Matsumoto M, Nakamura M, Takaishi H, Toyama Y. Postoperative factors affecting neurological recovery after surgery for cervical spondylotic myelopathy. J Neurosurg Spine. 2006 Dec;5(6):483-7.
- 2) Chiba K, Ogawa Y, Ishii K, Takaishi H, Nakamura M, Maruiwa H, Matsumoto M, Toyama Y. Long-term results of expansive open-door laminoplasty for cervical myelopathy--average 14-year follow-up study. Spine. 2006 Dec 15;31(26):2998-3005.
- 3) Ishii K, Chiba K, Maruiwa H, Nakamura M, Matsumoto M, Toyama Y. Pathognomonic radiological signs for predicting prognosis in patients with chronic atlantoaxial rotatory fixation. J Neurosurg Spine. 2006 Nov;5(5):385-91.
- 4) Seki S, Kawaguchi Y, Mori M, Mio F, Chiba K, Mikami Y, Tsunoda T, Kubo T, Toyama Y, Kimura T, Ikegawa S. Association study of COL9A2 with lumbar disc disease in the Japanese population. J Hum Genet. 2006;51(12):1063-7.
- 5) Qi X, Matsumoto M, Ishii K, Nakamura M, Chiba K, Toyama Y. Posterior osteotomy and instrumentation for thoracolumbar kyphosis in patients with achondroplasia. Spine. 2006 Aug 1;31(17):E606-10.
- 6) Matsumoto M, Nojiri K, Chiba K, Toyama Y, Fukui Y, Kamata M. Open-door laminoplasty for cervical myelopathy resulting from adjacent-segment disease in patients with previous anterior cervical decompression and fusion. Spine. 2006 May 20;31(12):1332-7.
- 7) Morisue H, Matsumoto M, Chiba K, Matsumoto H, Toyama Y, Aizawa M, Kanzawa N, Fujimi TJ, Uchida H, Okada I. A novel hydroxyapatite fiber mesh as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances bone union in rat posterolateral fusion model. Spine. 2006 May 15;31(11):1194-200.
- 8) Fukuda K, Okada Y, Yoshida H, Aoyama R, Nakamura M, Chiba K, Toyama Y. Ischemia-induced

disturbance of neuronal network function in the rat spinal cord analyzed by voltage-imaging.

Neuroscience. 2006 Jul 21;140(4):1453-65.

- 9) Matsumoto M, Chiba K, Ishii K, Watanabe K, Nakamura M, Toyama Y. Microendoscopic partial resection of the sacral ala to relieve extraforaminal entrapment of the L-5 spinal nerve at the lumbosacral tunnel. Technical note. J Neurosurg Spine. 2006 Apr;4(4):342-6.
- 10) Horikoshi T, Maeda K, Kawaguchi Y, Chiba K, Mori K, Koshizuka Y, Hirabayashi S, Sugimori K, Matsumoto M, Kawaguchi H, Takahashi M, Inoue H, Kimura T, Matsusue Y, Inoue I, Baba H, Nakamura K, Ikegawa S. A large-scale genetic association study of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. Hum Genet. 2006 Jul;119(6):611-6.
- 11) Horiuchi K, Le Gall S, Schulte M, Yamaguchi T, Reiss K, Murphy G, Toyama Y, Hartmann D, Saftig P, Blobel CP. Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx. Mol Biol Cell. 2007 Jan;18(1):176-88.
- 12) Kosaki N, Takaishi H, Kamekura S, Kimura T, Okada Y, Minqi L, Amizuka N, Chung UI, Nakamura K, Kawaguchi H, Toyama Y, D'Armiento J. Impaired bone fracture healing in matrix metalloproteinase-13 deficient mice. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Mar 23;354(4):846-51.
- 13) Morioka H, Yabe H, Kaneko S, Takaishi H, Ueda T, Watanabe M, Kobayashi K, Toyama Y. Large chondrosarcoma of the rib invading the mediastinum and the spine. J Thorac Cardiovasc Surg. 2006 Oct;132(4):986-7.

2. 学会発表

- 1) 堀内圭輔, 高石官成, 戸山芳昭; 第24回日本骨代謝学会. 抄録集 p161, 2006年
- 2) 高石官成, 戸山芳昭; 第24回日本骨代謝学会. 抄録集 p168, 2006年
- 3) 加藤雅敬, 高石官成, 松本守雄, 千葉一裕, 戸山芳昭; 第24回日本骨代謝学会. 抄録集 p204, 2006年

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

予定していない。

2. 実用新案登録

予定していない。

3. その他

厚生労働科学研究補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）

関節リウマチの寛解導入を目的とした新規医薬品の導入・開発及び評価に関する包括的研究

中島 利博

聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター ゲノム医科学研究部門 教授

研究要旨

われわれはすでに新規 E3 ユビキチンリガーゼ シノビオリンを同定し、RA の原因遺伝子であることを報告した（参考文献 1-5）。今年度は、その基質を探索することを目的とした。

シノビオリン遺伝子欠損マウス由来の mouse embryonic fibroblasts (MEFs) とその比較対象である同腹の野生型マウス由来の MEFs よりタンパク質を抽出し、二次元電気泳動法によりプロテオミクス解析を行った。とくに本研究ではシノビオリン欠損 MEFs にて蓄積している分子に関して同定した。その結果、驚くべきことにアンチオンコ遺伝子産物 p53 がシノビオリンによりユビキチン化され、かつ同分子の量と質の両面での制御にシノビオリンが細胞質、とりわけ小胞体でかかわっていることが世界で初めて明らかとなった。さらに、ショウジョウバエを用いた遺伝学的解析により、本調節機構は生体内で p53 による細胞の増殖・死に関与することが証明された。

以上の結果から、RA の滑膜細胞 anti-apoptotic 分子であるシノビオリンが ER ストレスとともに p53 のシグナルを介して RA を引き起こすという斬新なモデルを提唱することとなった。また、本モデルは RA に留まらず、がん・動脈硬化などの増殖性疾患に一般に展開可能であることは自明である。

また、蛋白分解の基盤研究の面でもシノビオリンの双方向的シグナル調節機構は今後、多大なる貢献を予想させる発見であろう。

われわれのシノビオリンという独自にクローニングした分子の研究成果は、ついに RA のみならず、がんなどへの大きな展開を見せることとなった。さらに、同分子を標的とすることにより革新的 RA 治療が可能となることの理論構築がなされた。

A. 研究目的

関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis; RA) は、Quality of life を侵す代表的な疾患であり、その罹患率も高いことから、わが国にとって重大な疾患の 1 つであるといえる。RA の病理学的側面としては滑膜細胞の過増殖が知られているが、これがなぜ引き起こされるのかは未だ明らかとなっていない。この原因を解明するために一連の研究を行い、新規 E3 ユビキチンリガーゼ シノビオリンを同定し、RA の原因遺伝子であることを報告した（参考文献 1-5）。今年度は、その基質を探索することを目的とした。

シノビオリン遺伝子欠損マウス由来の mouse embryonic fibroblasts (MEFs) とその比較対象である同腹の野生型マウス由来の MEFs よりタンパク質を抽出し、二次元電気泳動法によりスポットを比較し、差があったもの、とくにこの場合はシノビオリン欠損 MEFs にて蓄積している分子に関して同定する。

(2) その他 常方に従い、in vitro ならびに in vivo で (1) で得られた候補分子がシノビオリンの基質であるか否かを検証した。さらに、ショウジョウバエの遺伝学的アプローチを用いその生物学的意義を検証した。

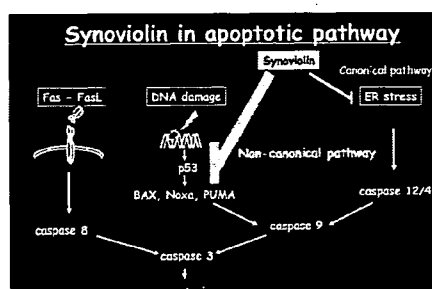
B. 研究方法

(1) トランスクリプトーム シノビオリン

C. 結果

驚くべきことにアンチオンコ遺伝子産物

p53 がシノビオリンによりユビキチン化され、かつ同分子の量と質の両面での制御にシノビオリンが細胞質、とりわけ小胞体でかかわっていることが世界で初めて明らかとなった。さらに、ショウジョウバエを用いた遺伝学的解析により、本調節機構は生体内で p53 による細胞の増殖・死に関与することが証明された。



D. 考察

以上の結果から、シノビオリンが①ER ストレスシグナル、とともに ②p53 依存性シグナル

の双方向的アポトーシスシグナル系を調整して滑膜細胞の過増殖を、ひいては RA を引き起こすという斬新なモデルを提唱することとなった。このモデルにより長らく不明であったリウマチ滑膜細胞の増殖メカニズムにシノビオリンが中心的役割を担っていることが明らかとなった。また、蛋白分解の基盤研究の面でもシノビオリンの双方向的シグナル調節機構は今後、多大なる貢献を予想させる発見であろう。

E. 結論

われわれのシノビオリンという独自にクローニングした分子の研究結果は、ついに RA のみならず、がんなどへの大きな展開を見せることとなった。さらに、同分子を標的とすることにより革新的 RA 治療が可能となることの理論構築がなされた。

F. 健康危惧情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Amano T, *et al.* "Synoviolin/Hrd1, an E3 ubiquitin ligase, as a novel pathogenic factor for arthropathy" *Genes Dev* 17: 2436-2449 (2003)
2. Tsuchimochi K, *et al.* "Identification of a Crucial Site for Synoviolin Expression." *Mol Cell Biol* 25: 7344-56 (2005)
3. Yagishita N, *et al.* "Essential Role of Synoviolin in Embryogenesis" *J Biol Chem* 280:7909-7916 (2005)
4. Yagishita N, *et al.* "Role of synoviolin in rheumatoid arthritis: possible clinical relevance" *Future Rheumatol* 1:31-36 (2006)
5. Yamasaki S, *et al.* "Resistance to endoplasmic reticulum stress is an acquired cellular characteristic of rheumatoid synovial cells" *International Journal of Molecular Medicine* in pres 2006
6. Yamasaki S, *et al.* "Rheumatoid arthritis as a hyper-endoplasmic reticulum-associated degradation disease" *Arthritis Res Ther* 7: 181-186 (2005)
7. Sato T, *et al.* "Comparative Analysis of Gene Expression Profiles in Intact Versus Damaged Regions of Human Osteoarthritic Cartilage" *Arthritis Rheum* 54: 808-817 (2006)
8. Aratani S, *et al.* "The nuclear import of RNA helicase A is mediated by importin- α 3" *Biochem Biophys Res Commun* 340:125-133 (2006)
9. Fujita H, *et al.* "Relevance of nuclear localization and functions of RNA helicase A" *Int J Mol Med* 15:555-560 (2005)

2. 学会発表

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

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
特にありません。
2. 実用新案登録
特にありません。
3. その他
特にありません。

破骨細胞アポトーシスにおける Bcl-2 family の役割に関する研究(第2報)

分担研究者 田中 栄

所属機関名・職名 東京大学医学部附属病院整形外科 講師

研究要旨 破骨細胞は生理的な骨吸収のみならず、病的な骨破壊においても中心的な役割を果たす細胞である。その寿命は短く、いったん分化すると生体内では2週間程度でアポトーシスによって細胞死にいたる。本研究においてわれわれは破骨細胞特異的 *bcl-x* 遺伝子ノックアウトマウスを作成し、その細胞死、活性化における役割を検討した。

A. 研究目的

関節リウマチ(rheumatoid arthritis, RA)における骨破壊には破骨細胞による骨吸収が重要な役割を果たしている。破骨細胞は最終分化した増殖能のない細胞であり、一旦分化するとreceptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)やマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)などの生存因子が存在しないと速やかに細胞死に至る。破骨細胞の細胞死はアポトーシスによるものであることが報告されている。アポトーシスは「プログラムされた細胞死」とも呼ばれ、細胞への様々な刺激、あるいはストレスなどによって誘導され、DNAの断片化を特徴とする静かな細胞死である。近年破骨細胞の細胞死はアポトーシスによることが明らかになってきたが、このように骨代謝の要ともいえる破骨細胞がなぜアポトーシスに陥りやすいのか、またその分子メカニズムはいかなるものか、などについてはほとんど明らかになっていないのが現状である。本研究においてわれわれは破骨細胞アポトーシスおよび活性化におけるBcl-xの役割をin vitroのみならずin vivoで検討した。*bcl-x* 遺伝子から産生されるBcl-xLはBcl-2ファミリーに属する代表的なアポトーシス抑制因子であるが、*bcl-x* 遺伝子ノックアウトマウスは神経系および血球系の異常によって胎生13日で致死となる。Bcl-xの破骨細胞における役割を明らかにするためにCre-loxPシステムを用い、その解析を行った。

B. 研究方法

まず*bcl-x*遺伝子にloxPサイトを導入したマウス(*bcl-x* flox/floxマウス)を作成し、これと破骨細胞特異的にCreを発現するcathepsin K gene

locus-knock-inマウスを掛け合わせることで破骨細胞特異的*bcl-x*ノックアウトマウスを作成した。このマウスを用いて、in vitro, in vivoで破骨細胞のアポトーシス、骨吸収能を検討した。破骨細胞はマウス骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養において活性ビタミンD3とプロスタグランジンE2の存在下で形成された破骨細胞様細胞、あるいはマウス骨髄細胞をRANKLおよびM-CSFの存在下で培養して作成した破骨細胞様細胞を使用した。破骨細胞へのレトロウイルス感染は定法に従っておこなった。

C. 研究結果

破骨細胞特異的*bcl-x*ノックアウトマウスは概観上異常を認めないが、骨組織においては破骨細胞数が減少しているとともに骨量の減少が認められた。in vitroにおける解析では、*bcl-x*遺伝子の欠損によって成熟破骨細胞の生存期間は短縮するとともにカスパーゼの活性化を認め、アポトーシスを起こしやすくなっていること、その一方で骨吸収能は亢進していることが明らかになった。このような破骨細胞の以上はレトロウイルスによる*bcl-xL*遺伝子の導入によってrescueされた。

D. 考察

Bcl-xLはantiapoptotic Bcl-2 familyに属し、血球系の細胞、あるいは神経細胞をはじめとしたさまざまな細胞のsurvivalに関与することが明らかになっている。本研究によって、Bcl-xLは破骨細胞の生存のみならず活性化においても重要な役割を果たすことが明らかになった。現在骨粗鬆症治療剤として使用されているビスフォスフォネートは破骨細胞のアポトーシスを誘導することによって骨吸収を抑制すること

が知られている。今後破骨細胞におけるBcl-xLの役割をさらに詳細に明らかにすることによって、より効率のよい骨吸収抑制剤の開発へとつながることが期待される。

E. 結論

Antiapoptotic Bcl-2 family である Bcl-xL が破骨細胞の細胞死のみならず活性化に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

英文原著・総説

1. Fukui N, Ikeda Y, Ohnuki T, Hikita A, Tanaka S, Yamane S, Suzuki R, Sandell JL, Ochi T. Pro-inflammatory cytokine TNF- α induces BMP-2 in chondrocytes via mRNA stabilization and transcriptional up-regulation. *J Biol. Chem* 2006 Jul 11; [Epub ahead of print]
2. Hikita A, Yana I, Wakeyama H, Nakamura M, Kadono Y, Oshima Y, Nakamura K, Seiki M, Tanaka S. Negative Regulation of Osteoclastogenesis by Ectodomain Shedding of Receptor Activator of NF- κ B Ligand. *J Biol. Chem* 2006 281:36846-36855
3. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, Tanaka S, Kodama T, Akira S, Iwakura Y, Cua DJ, Takayanagi H. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 2006, 203:2673-2682.
4. Sawada Y, Tamada M, Dubin-Thaler BJ, Cherniavskaya O, Sakai R, Tanaka S, Sheetz MP. Force Sensing by Mechanical Extension of the Src Family Kinase Substrate p130Cas. *Cell*. 2006, 127:1015-26.
5. Tanaka S, Suzuki H, Yamauchi H, Nakamura I and Nakamura K. Signal transduction pathways of calcitonin/calcitonin receptor regulating cytoskeletal organization and bone-resorbing activity of osteoclasts. *Cellular and Molecular Biology* 2006, 52: 19-23.
6. Ogata T, Yamamoto S, Nakamura K and Tanaka S. Signaling Axis in Proliferation and Differentiation of Schwann Cell. *Mol Neurobiol*. 2006, 33:51-62.
7. Miyazaki T, Tanaka S, Sanjay A, Baron R. The role of c-Src kinase in the regulation of osteoclast function. *Mod Rheumatol* 2006, 16:68-74.
8. Tanaka S, Miyazaki T, Fukuda A, Akiyama T, Kadono Y, Wakeyama H, Kono S, Hoshikawa S, Nakamura M, Oshima Y, Hikita A, Nakamura K. Molecular mechanism of the life and death of the osteoclast. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1068:180-186.
9. Miyazaki T, Yamamoto S, Tanaka S. Molecular mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis. *Future Rheumatology* 2007, 2:61-72.
10. Yang CS, Lee JS, Song CH, Hur GM, Lee SJ, Tanaka S, Akira S, Paik TH, Jo EK. Protein kinase C zeta plays an essential role for Mycobacterium tuberculosis-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in monocytes/macrophages via Toll-like receptor 2. *Cell Microbiol*. 2007, 9:382-396.
11. Kono SJ, Oshima Y, Hoshi K, Bonewald LF, Oda H, Nakamura K, Kawaguchi H, Tanaka S. Erk pathways negatively regulate matrix mineralization. *Bone*. 2007, 40:68-74.
12. Suematsu A, Tajiri Y, Nakashima T, Taka J, Ochi S, Oda H, Nakamura K, Tanaka S, Takayanagi H. Scientific basis for the efficacy of combined use of antirheumatic drugs against bone destruction in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2007, 17:17-23.

和文原著・総説

1. 永瀬雄一、田中 栄「代謝性骨疾患 その他 大理石骨病」別冊日本臨床「内分泌症候群(第2版)」pp152-155, 2006.
2. 緒方徹、山本真一、中村耕三、田中 栄

- 「シュワン細胞の分化と細胞内シグナル系」生体の科学 57:219-223, 2006.
3. 宮崎 剛、田中 栄「関節リウマチと破骨細胞」炎症と免疫 14:632-638, 2006
 4. 田中 栄「関節炎における免疫学と骨代謝学の接点」ホルモンと臨床 54:779-782, 2006.
 5. 金子雅子、泉亮良、原慶宏、田中栄、中村耕三「手術治療により発作頻度が著明に減少した多発巨大痛風結節の1例」関東整形災害外科学会誌 37:261-266, 2006
 6. 田中 栄「関節炎における免疫学と骨代謝学の接点」ホルモンと臨床 54:779-782, 2006

国際会議招待講演

1. 1st International conference on osteoimmunology: Interactions of the immune and skeletal systems (2006.5.28-6.2) Crete, Greek, Session I. Transcription factors and signals for the osteoimmune system: Part I “Regulation of ectodomain shedding of RANKL”
2. 2006 International Symposium of Dental Research Institute, Seoul National University (2006.9.29) Session I : Bone Biology “Regulation of chondrogenic differentiation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis”
3. 3rd IOF ASIA-PACIFIC REGIONAL CONFERENCE ON OSTEOPOROSIS AND 16th ANNUAL MEETING OF THE ANZ BONE & MINERAL SOCIETY (2006.10.23-26) Workshop B. Inter and intracellular signaling “Signals in Life and Death of the Osteoclast”
4. 第4回抗サイトカイン療法研究会 (2006.4.15) 岐阜「関節リウマチにおける骨破壊メカニズムと治療戦略」
5. 第79回日本整形外科学会学術集会 (2006.5.18-21) 横浜 シンポジウム2 関節リウマチの診断と治療の新展開 「関節リウマチにおける関節破壊の分子メカニズム」
6. 佐賀県臨床整形外科医会 (2006.6.8) 佐賀 特別講演「骨吸収抑制剤を用いた骨粗鬆症の治療体系」
7. 日本医師会生涯教育講座 (2006.6.15) 骨粗鬆症をめぐる最近の話題「新しい骨粗鬆症治療薬とその作用機序」
8. 第29回 日本骨・関節感染症学会 (2006.6.17) 東京 主題1 人工関節感染の予防と対策 「可動型セメントスパーサーを用いた感染人工膝関節の二期的再置換術」
9. 第24回 日本骨代謝学会学術集会 (2006.7.6-8) 東京 シンポジウム3 免疫と骨代謝の接点: 基礎から臨床へ 「Therapeutics modulating osteoclast biology- 抗 RANKL 療法などによる新展開 -」
10. 第32回 リウマチ中央教育研修会 (2006.7.22) 東京「関節リウマチの骨・軟骨破壊」
11. 運動器疾患/骨・関節フォーラム (2006.8.5) 岡山 講演2「骨折予防の観点に基づく最新の骨粗鬆症治療方針」
12. Bone & Joint Research Club～第3回 骨と関節の代謝調節を考える基礎の会～ (2006.9.30-10.1) かつさ 特別セッション:【基礎から臨床応用】「破骨細胞をターゲットにした関節リウマチ治療戦略」
13. 整形外科疾患学術講演会 (2006.10.4) 川崎 「関節リウマチにおける骨破壊メカニズム」
14. 第107回 中部日本整形外科災害外科学術集会 (2006.10.7) うずしおセミナー5 「骨関節破壊を標的にした関節リウマチ治療戦略」
15. 第16回 日本小児リウマチ学会総会・学術集会 (2006.10.8) ランチョンセミナー2 「骨関節破壊を標的にした関節リウマチ治療戦略」
16. 港区医師会外科整形外科医会 学術講演会 (2006.10.11) 特別講演 「骨吸収抑制剤による骨粗鬆症治療」
17. 骨粗鬆症学術講演会 (2006.10.31) 町田 「骨吸収抑制剤を用いた骨粗鬆症の治療」
18. 平成18年度 リウマチ・アレルギー相談員養成研修会 (2006.11.9) 新宿 「リウマチ外科治療・リハビリ」

19. 東京大学生命科学研究ネットワークシンポジウム(2006.11.25)東京「破骨細胞アポトーシス制御の分子メカニズム」
20. 第27回 日本臨床薬理学会年会(2006.12.1)東京 シンポジウム12 炎症制御における分子標的療法「RANKLをターゲットにした骨関節疾患治療戦略」
21. 第6回 日本整形外科学会リウマチ認定医研修会(2006.12.3)東京「RAの最新研究」
22. 第17回 日本リウマチ学会関東支部学術集会(2006.12.7)東京 ノーンタイムレクチャー2「関節リウマチにおける骨破壊メカニズム」
23. 臨床骨代謝フォーラム(2007.1.27)大宮「骨形成とビスフォスフォネート製剤」
24. 昭和大学セミナー(2007.2.6)東京「Bcl-2ファミリーの骨組織における役割」
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
特になし

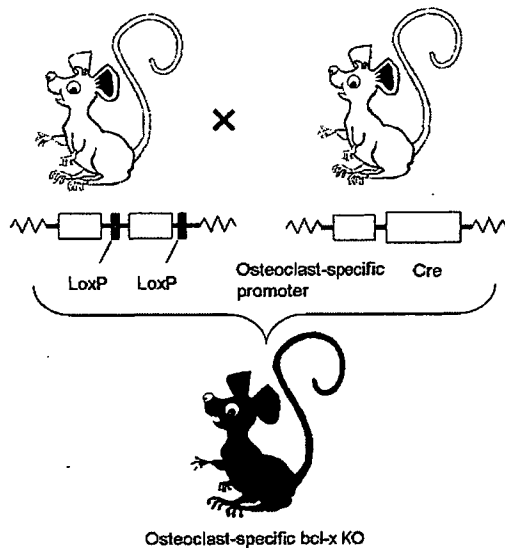


図1：破骨細胞特異的 bcl-x 遺伝子ノックアウトマウスの作成

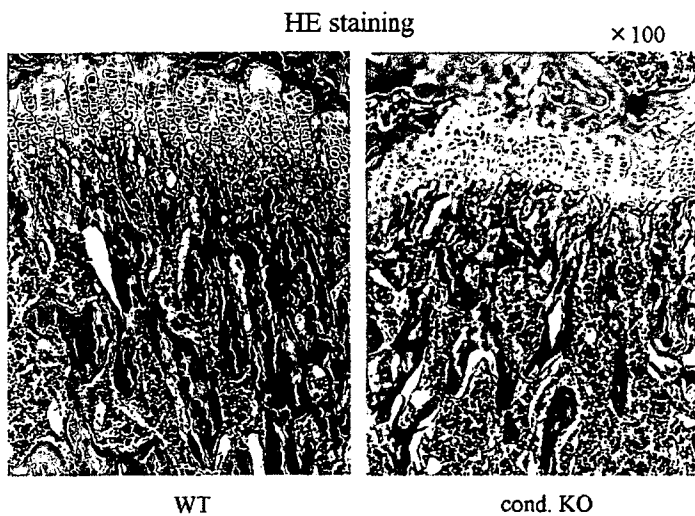


図2：wild type(左)および破骨細胞特異的 bcl-x ノックアウトマウス(右)の骨組織

筋骨格の痛みによる疾病負担の評価推計

分担研究者 吉田勝美 聖マリアンナ医科大学予防医学教室 教授

研究協力者 須賀万智 聖マリアンナ医科大学予防医学教室 講師

研究要旨：健康診断受診者約 5000 人を対象にした質問票調査のデータを用いて、腰、股関節、膝関節、手(指)の 4 部位について、(1)有訴者の QOL の特徴を調べ、(2)日本の成人における推計有訴者数と推計損失 Quality adjusted life year (QALY) を求め、それに相当する推計コストを算出した。日本の成人における筋骨格の痛みによる QOL 損失は大きく、筋骨格の痛みを回復するために掛けうるコストは部位別にみても 100 億円を超えると推計された。

A. 研究目的

筋骨格系疾患に関する世界的プロジェクトとして Bone and Joint Decade (BJD; 運動器の 10 年) が展開されている[1]。

日本の BJD に関する質問票調査は 2003 年と 2005 年に行った。2003 年の第 1 回調査(健診受診者約 3000 人)のデータを用いて、日本の成人の約 4 割が筋骨格の痛みを訴えていることを報告した[2,3]。本研究では、質問項目を追加して調査地域を拡大して行った 2005 年の第 2 回調査(健診受診者約 5000 人)のデータを用いて、有訴率が最も高い「腰」、変形性関節症(OA)で障害されやすい「股関節」「膝関節」、関節リウマチ(RA)で障害されやすい「手(指)」の 4 部位について、(1)有訴者の QOL の特徴を調べ、(2)日本の成人における推計有訴者数と推計損失 Quality adjusted life year (QALY) を求め、それに相当する推計コストを算出した。

B. 研究方法

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

①本人の属性

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

②筋骨格の痛み

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

③QOL

日本語版 EuroQol (EQ-5D)[4]

なお、本調査については、聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会の承認を受けた。

本研究では、質問票を回収した 5652 名のうち必要な情報をもれなく回答した 30～69 歳の男女 4933 名を対象にした。腰、股関節、膝関節、手(指)の 4 部位について、男女ごとに、以下の解析を実施した。

● 筋骨格の痛みの有訴率

全体および年齢、Body mass index (BMI)、普段の生活の姿勢別の有訴率を求め、 χ^2 乗検定により比較した。

● EuroQol スコアとドメインの分布

筋骨格の痛みの訴えない 2638 名を対照(コントロール)として、有訴者とコントロールにおける EuroQol スコアとドメインの分布を調べ、t 検定と χ^2 乗検定(5 以下のセルがある場合、Fisher 直接確率検定)により比較した。

- 日本の成人における推計有訴者数、推計損失 QALY、推計コスト

対象集団の性年齢別有訴率を平成16年10月1日現在推計人口[5]にかけあわせ、日本の成人(30~69歳)における推計有訴者数を計算した。有訴者とコントロールのEuroQolスコアの差を推計有訴者数にかけあわせ、推計損失QALYを計算した。質問票調査は「最近1ヶ月」の「1週間以上」の痛みについて質問しているため、回答した状態が(1)1年以上持続している、(2)3ヶ月以内回復している、あるいは1ヶ月ごと反復している、(3)1ヶ月以内回復しているという3パターンを設定した。

過去の研究において、1QALY回復するために掛けうるコストはどのくらいが妥当であるか検討されており、アメリカでは5万ドル、カナダでは2万カナダドル、イギリスでは3万ポンド、オーストラリアでは3万6千オーストラリアドル、日本では中央値として100万円[6]のように報告されている。本研究では、日本の結果にもとづいて、「1QALY=100万円」として推計コストを計算した。

C. 研究結果

表1は筋骨格の痛みの有訴率である。腰の痛みの有訴率は男女とも2割以上であり、肉体労働で有意に高かった。性、年齢、BMIによるちがいは認められなかった。股関節、膝関節、手(指)の痛みの有訴率はいずれも1割未満であり、女性で有意に高かった。年齢依存性の増加は膝関節と手(指)、BMI依存性の増加は膝関節で有意であった。

表2はEuroQolスコアとドメインの分布である。EuroQolスコアは4部位とも男女とも有訴者のほうがコントロールよりも有意に低かった。ドメイン別にみると、有訴者とコントロールの間の差は痛み/不快感以外のドメインにおいても認められ、とくに股関節の痛みの不安/ふさぎ込みで顕著であった。

日本の成人(30~69歳)における推計有訴者数は、腰の痛みが男性765.4万人(22.3%)、女性778.4万人(22.3%)、股関節の痛みが男性65.5万人(1.9%)、女性137.5万人(3.9%)、膝関節の痛みが男性222.8万人(6.5%)、女

性336.6万人(9.7%)、手(指)の痛みが男性79.6万人(2.3%)、女性174.8万人(5.0%)であった。推計損失QALY(×1000)は(3)の設定(1ヶ月以内回復している)が最小、(1)の設定(1年以上持続している)が最大となり、腰の痛みが90.2~1082.0、股関節の痛みが17.5~209.6、膝関節の痛みが39.2~470.3、手(指)の痛みが16.2~194.0であった。推計コストは腰の痛みが902億円以上、股関節の痛みが175億円以上、膝関節の痛みが392億円以上、手(指)の痛み162億円以上であった。

D. 考察

健康診断受診者約5000人を対象にした質問票調査のデータを用いて、日本の成人における筋骨格の痛みによるQOL損失の大きさを定量評価した。調査の対象は健診受診者であり、重度の障害(寝たきり、歩行困難、など)を有する者を含まない。それにも係らず、筋骨格の痛みはQOL全般にひろく影響して、甚大な損失をもたらしていることが明らかにされた。

現在の疾病予防対策の中心は悪性腫瘍や心血管疾患におかれている。しかし、筋骨格の痛みを回復するために掛けうるコストは部位別にみても100億円を超えると推計され、今後、十分な対応を検討すべきである。

E. 結論

日本の成人における筋骨格の痛みによるQOL損失は大きく、筋骨格の痛みを回復するために掛けうるコストは部位別にみても100億円を超えると推計された。

謝辞

調査実施協力施設は以下のとおりである。

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