

参考文献

[1] Bone and Joint Decade.

http://www.bonejointdecade.org

[2] Suka M, Yoshida K. Musculoskeletal pain in Japan: prevalence and interference with daily activities. Modern Rheumatology 2005; 15: 41-47.

[3] Suka M, Yoshida K. Burden of musculoskeletal pain in Japan. Modern Rheumatology 2005; 15: 48-51.

[4] 池上直己, 福原俊一, 下妻晃二郎, 池田俊也 編. 臨床のための QOL 評価ハンドブック. 東京:医学書院, 2001年.

[5] 総務省統計局. 平成 16 年 10 月 1 日現在推計人口.
http://www.stat.go.jp/data/jinsui/2004np/index.htm

[6] 大日康史. QALY あたりの社会負担の上限に関する調査研究. 医療と社会 2003; 13: 121-129.

表 1 筋骨格の痛みの有訴率

	N	腰の痛み		股関節の痛み		膝関節の痛み		手(指)の痛み	
		N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)
男性 全体	3048	686	(22.5%)	60	(2.0%)	195	(6.4%)	74	(2.4%)
年齢									
30-39	519	105	(20.2%)	6	(1.2%)	23	(4.4%)	5	(1.0%)
40-49	1118	259	(23.2%)	24	(2.1%)	64	(5.7%)	24	(2.1%)
50-59	1083	244	(22.5%)	22	(2.0%)	79	(7.3%)	35	(3.2%)
60-69	328	78	(23.8%)	8	(2.4%)	29	(8.8%)	10	(3.0%)
BMI									
-18.5	88	24	(27.3%)	0	(0.0%)	3	(3.4%)	2	(2.3%)
18.6-24.9	2060	441	(21.4%)	40	(1.9%)	129	(6.3%)	52	(2.5%)
25.0+	900	221	(24.6%)	20	(2.2%)	63	(7.0%)	20	(2.2%)
姿勢									
座る、立つ	2738	580	(21.2%)	53	(1.9%)	168	(6.1%)	68	(2.5%)
肉体労働	310	106	(34.2%)	7	(2.3%)	27	(8.7%)	6	(1.9%)
女性 全体	1885	421	(22.3%)	69	(3.7%)	163	(8.6%)	90	(4.8%)
年齢									
30-39	403	81	(20.1%)	11	(2.7%)	21	(5.2%)	7	(1.7%)
40-49	707	157	(22.2%)	21	(3.0%)	46	(6.5%)	31	(4.4%)
50-59	577	137	(23.7%)	26	(4.5%)	65	(11.3%)	37	(6.4%)
60-69	198	46	(23.2%)	11	(5.6%)	31	(15.7%)	15	(7.6%)
BMI									
-18.5	245	52	(21.2%)	8	(3.3%)	15	(6.1%)	9	(3.7%)
18.6-24.9	1417	319	(22.5%)	52	(3.7%)	117	(8.3%)	66	(4.7%)
25.0+	223	50	(22.4%)	9	(4.0%)	31	(13.9%)	15	(6.7%)
姿勢									
座る、立つ	1814	397	(21.9%)	67	(3.7%)	154	(8.5%)	86	(4.7%)
肉体労働	71	24	(33.8%)	2	(2.8%)	9	(12.7%)	4	(5.6%)

a: p<0.01 (χ²乗検定, 男性対女性)

b: p<0.01, c: p<0.05 (χ²乗検定)

表 2 EuroQolスコアとドメインの分布

性別	N		痛みなし		腰の痛み		股関節の痛み		膝関節の痛み		手(指)の痛み	
			Mean(SD)	(%)	Mean(SD)	(%)	Mean(SD)	(%)	Mean(SD)	(%)	Mean(SD)	(%)
男性		EuroQolスコア	0.91	(0.05)	0.85	(0.11)	0.80	(0.16)	0.85	(0.11)	0.82	(0.18)
		ドメイン										
		移動	1692	99.4%	658	95.9%	52	86.7%	177	90.8%	71	95.9%
		良い	10	0.6%	28	4.1%	8	13.3%	18	9.2%	3	4.1%
		ふつう、悪い	1701	99.9%	683	99.6%	58	96.7%	194	99.5%	74	100.0%
		良い	1	0.1%	3	0.4%	2	3.3%	1	0.5%	0	0.0%
		ふつう、悪い	1694	99.5%	671	97.8%	54	90.0%	187	95.9%	72	97.3%
		良い	8	0.5%	15	2.2%	6	10.0%	8	4.1%	2	2.7%
		ふつう、悪い	1642	96.5%	426	62.1%	27	45.0%	113	57.9%	43	58.1%
		良い	60	3.5%	260	37.9%	33	55.0%	82	42.1%	31	41.9%
		不安/ふさぎ込み	1592	93.5%	624	91.0%	47	78.3%	175	89.7%	62	83.8%
		良い	110	6.5%	62	9.0%	13	21.7%	20	10.3%	12	16.2%
		ふつう、悪い										
女性		EuroQolスコア	0.90	(0.06)	0.82	(0.15)	0.80	(0.12)	0.80	(0.16)	0.83	(0.10)
		ドメイン										
		移動	927	99.0%	397	94.3%	60	87.0%	142	87.1%	87	96.7%
		良い	9	1.0%	24	5.7%	9	13.0%	21	12.9%	3	3.3%
		ふつう、悪い	935	99.9%	419	99.5%	68	98.6%	161	98.8%	90	100.0%
		良い	1	0.1%	2	0.5%	1	1.4%	2	1.2%	0	0.0%
		ふつう、悪い	932	99.6%	396	94.1%	62	89.9%	147	90.2%	86	95.6%
		良い	4	0.4%	25	5.9%	7	10.1%	16	9.8%	4	4.4%
		ふつう、悪い	873	93.3%	191	45.4%	25	36.2%	67	41.1%	36	40.0%
		良い	63	6.7%	230	54.6%	44	63.8%	96	58.9%	54	60.0%
		不安/ふさぎ込み	840	89.7%	340	80.8%	47	68.1%	136	83.4%	77	85.6%
		良い	96	10.3%	81	19.2%	22	31.9%	27	16.6%	13	14.4%
		ふつう、悪い										

a: p<0.01 (痛みなしに対する t 検定)

b: p<0.01, c: p<0.05 (痛みなしに対する χ²乗検定またはFisher直接確率検定)

F.研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

Suka M, Yoshida K. Lower back pain is a major health problem in Japan. Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (2006)

G.知的所有権の取得など

1.特許許可

2.実用新案登録

3.その他

新規抗リウマチ剤の臨床薬理学的評価に関する研究

分担研究者 川合眞一 東邦大学医学部内科学講座（大森）膠原病科教授

研究要旨：関節リウマチの病態形成機序が解明されるにしたがって、新規作用機序によるさまざまな新薬が開発されつつある。しかし、それらにはさまざまな段階での厳密な臨床薬理学的評価が必須である。そこで、以下のような検討を行った。

1. 研究分担者らは、以前より、ヒト関節滑膜細胞を利用してさまざまな薬剤の*in vitro*の薬効評価を行い、その研究過程でTT101という新規のアポトーシス誘導薬を発見した。今回の研究では、滑膜細胞に加えて癌細胞を利用した*in vitro*薬効評価法を用い、TT101の臨床薬理学的評価を行った。
2. 既に市販されている抗リウマチ剤についても、さまざまな臨床使用上の問題点が指摘されている。まず、生物学的製剤であるインフリキシマブはわが国の治験の短期的な有用性で承認されているが、1年間以上といった長期使用を評価した報告はないため、それを検証する臨床試験を実施中である。次に、世界的な標準薬であるメトトレキサート増量の臨床試験を計画している。また、わが国で2005年に承認されたタクロリムスおよび生物学的製剤であるエタネルセプトの臨床試験についてまとめ、その成績を公表した。

A. 研究目的

関節リウマチの病態形成機序が解明されるにしたがって新規作用機序によるさまざまな新薬が開発されつつあるが、それらにはさまざまな段階での臨床薬理学的評価が必須である。そこで、ヒト組織を利用した非臨床試験と臨床試験を行うことにより、種々の抗リウマチ剤を臨床薬理学的に評価し、基礎的・臨床的エビデンスを明確にすることを今回の研究の目的とした。

B. 研究方法

1. 新規抗リウマチ剤のヒト滑膜細胞・癌細胞株を利用した薬効評価

分担研究者らは、東京工業大学の半田宏教授らとの共同研究により、ヒト関節滑膜細胞に対するアポトーシス誘導作用を指標に、TT101と命名したセレコキシブ類似の新規アポトーシス誘導薬を開発した。さらに、ヒト関節滑膜細胞の炎症性サイトカイン産生を指標として、新規抗リウマチ薬の薬効スクリーニングを行ってきた。今回の研究班では、これらに加えて癌細胞株を用いた*in vitro*薬効評価法について、臨床応用のための非臨床試験のスクリーニング系としての有用性を検討した。

関節リウマチ患者の関節手術に際し、関節組織を得た。滑膜を定法にしたがって処理し、滑膜細胞を得た。また、大腸腺癌細胞株であるHT-29とSW480を用いて検討した。細胞増殖はBrdU

のDNA取り込み量、細胞死はWST-1測定法にて評価した。アポトーシス誘導作用はDNA断片化を指標に検討した。細胞は被験薬存在下CO₂インキュベーターにて培養し、断片化したDNA量をELISAにて測定し、さらに、形態学的にアポトーシスを確認した。また、各種サイトカイン・ケモカイン産生は各々のELISAキットにて測定した。それらを利用して、新規抗リウマチ薬などのアポトーシス誘導作用や炎症性サイトカイン産生能を測定した。

（倫理面への配慮）

本研究計画は東邦大学医学部倫理委員会において既に承認を得ている（No.16-002）。また、滑膜細胞に関しては、本研究の目的に関して十分な説明の後に、組織の研究利用に同意した患者の手術時に得られた関節組織の中で、検査などに使用する部分を除いた残余組織のみを研究に用いた。

2. 抗リウマチ剤の臨床薬理学的評価

1) インフリキシマブ長期使用時の安全性と有効性の検討

インフリキシマブは、わが国において1年以上の長期使用時の安全性を評価した臨床試験はない。このため、使用実態下調査（オープン・プロスペクティブ試験）により、本剤を1年間投与した際の副作用発現状況（発現頻度、発現時期、種類、程度等）の把握を行うとともに有効性も

調査し、安全性および有効性に影響を与える背景因子を解析する計画とした。

既存治療で効果不十分の関節リウマチ患者（目標200例）において、本剤3mg/kgを1回投与量とし、初回投与後2週および6週後に投与し、以後8週間隔で投与する。最終評価は54週時点とする。なお、本治療法はメトトレキサート併用を前提としているが、用量は特に規定せず、試験終了後に種々の条件を検討する。

（倫理面での配慮）

本研究は使用実態下調査であるため、一般診療におけるインフォームドコンセントの取得後に実施中である。また、本研究計画については、各医療機関において定められた手続きに従っている。

2) メトトレキサート増量の臨床的有用性に関する検討

関節リウマチに対するメトトレキサートの週1回パルス療法は現在では世界の中心的な治療法であるが、わが国で投与可能な用量の上限は8mg/週であり、世界的な常用量の約半分である。しかし、わが国にはそれを増量することに対する十分なエビデンスがないという理由で、現在のところ添付文書が改定される動きはない。現在、プラセボを対照とした二重盲検比較試験を製薬企業主導の治験として計画中である。

（倫理面での配慮）

本研究では、承認用量増加のためのプラセボを対照とした治験を行うべく交渉中である。ヘルシンキ宣言およびわが国のGCPを遵守した計画となる。

3) その他の抗リウマチ剤の臨床試験

2005年に承認されたタクロリムスおよびエタネルセプトに関しては、それぞれの治験を製薬企業と協力して進め、分担研究者はそれらの結果を公表した。

（倫理面での配慮）

本研究は、いずれも治験として企業主導で行われており、ヘルシンキ宣言およびわが国のGCPを遵守している。行政当局によるインスペクションも受けている。

C. 研究結果

1. 新規抗リウマチ剤のヒト滑膜細胞・癌細胞株を利用した薬効評価

前述したように、我々は東京工業大学の半田宏教授らと複数のセレコキシブの誘導体を作製した（特願2004-44561）。昨年度、新規アポトーシス誘導薬、TT101について滑膜細胞での結果を

報告したが、今年度は大腸腺癌細胞に対してもアポトーシス誘導作用があることを発見し、詳細に検討した。（*Anticancer Res* 2006;26:3229-3236）。また、他の薬物についても、同じモデルまたはサイトカイン・ケモカイン産生能を指標にした検討を進めている。

2. 抗リウマチ剤の臨床薬理学的評価

1) インフリキシマブ長期使用時の安全性と有効性の検討

使用実態下調査による本研究を実施中であり、来年度は中間解析結果を公表の予定である。

2) メトトレキサート増量の臨床的有用性に関する検討

当初、本研究班主導（医師主導）による治験を検討したが、実施体制・時期などで多くの問題点があり、さらに厚生労働省・規制当局との協議の結果、現在は製薬企業主導の治験として進めるべく交渉・計画中である。次年度中には実施したい。

3) その他の抗リウマチ剤の臨床試験

タクロリムスに関する第Ⅲ相比較試験（*J Rheumatol* 2006;33:2153-2161）、高齢者を対象としたオープン試験（*Rheumatology [Oxford]* 2006;45:441-444）をまとめ、公表した。また、エタネルセプトの健常人における代謝動態を検討し、米国と比較した（*J Clin Pharmacol* 2006;46:418-423）。

D. 考察

分担研究者らは、選択的シクロオキシゲナーゼ-2阻害薬のセレコキシブは、滑膜細胞や大腸腺癌細胞に対して、特異的かつ強力にアポトーシスを誘導することを発見した。その研究を進展させ、ヒト滑膜細胞に対してセレコキシブよりも約10倍強力にアポトーシスを誘導する化合物であるTT101を発見し、昨年度発表した（*J Pharmacol Exp Ther* 2005;314:796-803）。今年度の研究では、TT101が大腸腺癌細胞に対しても同様の作用を有することを発見した（*Anticancer Res* 2006;26:3229-3236）。近年、セレコキシブには大腸ポリープの再発抑制作用があることが証明された。その作用機序に関する詳細はなお不明であるが、TT101には抗リウマチ剤のみならず、一部の悪性腫瘍治療薬としての開発を期待している。

一方、抗リウマチ剤の臨床薬理学的評価に関する2件の臨床試験については、それぞれ進行中および計画中であり、未だ結果を考案する段階にない。

今年度にまとめた3件の臨床試験は、わが国のみならず海外への情報発信としても重要である。タクロリムスは代謝拮抗薬系の免疫抑制薬であるミゾリビンに比べ、関節リウマチの炎症症状に対して有意に勝る改善効果が認められた。また、高齢者では常用量の半分で治療を開始すると安全に使用できるというエビデンスが得られた。生物学的製剤であるエタネルセプトの健常人を対象とした薬物動態試験では、米国の健常人と同等の成績であった。現在、臨床使用上の用量・用法が検討されており、その基礎データとしても有用である。

E. 結論

ヒト滑膜細胞および大腸腺癌細胞株を用いて薬効評価を行う方法論を確立し、強力なアポトーシス誘導作用を有するTT101の作用を検討した。また、既承認抗リウマチ剤の臨床使用上の問題を解決すべく臨床試験を計画し、一部実施している。また、一部の既承認抗リウマチ薬の臨床試験成績を公表した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kohno S, Endo H, Hashimoto A, Hayashi I, Murakami Y, Kitasato H, Kojima F, Kawai S, Kondo H. Inhibition of skin sclerosis by 15deoxy Delta(12,14)-prostaglandin J(2) and retrovirally transfected prostaglandin D synthase in a mouse model of bleomycin-induced scleroderma. *Biomed Pharmacother* 2006;60(1):18-25
- 2) Murakami Y, Akahoshi T, Hayashi I, Endo H, Kawai S, Inoue M, Kondo H, Kitasato H. Induction of triggering receptor expressed on myeloid cells 1 in murine resident peritoneal macrophages by monosodium urate monohydrate crystals. *Arthritis Rheum* 2006;54(2):455-462
- 3) Takenaga M, Yamaguchi Y, Ogawa Y, Kitagawa A, Kawai S, Mizushima Y, Igarashi R, Namae M, Komeda K. Administration of optimum sustained-Insulin release PLGA microcapsules to spontaneous diabetes-prone BB/WorTky rats. *Drug Deliv* 2006;13(2):149-157
- 4) Kojima F, Kapoor M, Kawai S, Crofford LJ. New insights into eicosanoid biosynthetic pathways: implications for arthritis. *Expert Rev Clin Immunol* 2006;2(2):277-291
- 5) Kawai S, Yamamoto K. Safety of tacrolimus, an

immunosuppressive agent, in the treatment of rheumatoid arthritis in elderly patients.

Rheumatology (Oxford) 2006;45(4):441-444

- 6) Kawai S, Sekino H, Yamashita N, Tsuchiwata S, Liu H, Korth-Bradley JM. The comparability of etanercept pharmacokinetics in healthy Japanese and American subjects. *J Clin Pharmacol* 2006;46(4):418-423
 - 7) Kapoor M, Kojima F, Appleton I, Kawai S, Crofford LJ. Major enzymatic pathways in dermal wound healing: current understanding and future therapeutic targets. *Curr Opin Investig Drugs*. 2006;7(5):418-422
 - 8) Takagi K, Nishio S, Akimoto K, Yoshino T, Kawai S. A case of systemic sclerosis complicated by idiopathic portal hypertension: case report and literature review. *Mod Rheumatol* 2006;16(3):183-187
 - 9) Kusunoki N, Ito T, Sakurai N, Handa H, Kawai S. A celecoxib derivative potently inhibits proliferation of colon adenocarcinoma cells by induction of apoptosis. *Anticancer Res* 2006;26(5A):3229-3236
 - 10) Kawai S, Hashimoto H, Kondo H, Murayama T, Kiuchi T, Abe T. Comparison of tacrolimus and mizoribine in a randomized, double-blind controlled study in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2006;33(11):2153-2161
- ##### 2. 学会発表
- 1) 川合眞一, 高木賢治, 西尾信一郎, 秋元貴美子, 蓮沼智子, 桑名正隆, 平形道人, 鍋木淳一「全身性エリテマトーデス患者における血清レプチン濃度の増加」第103回日本内科学会総会, 2006年4月14-16日, 横浜
 - 2) 西尾信一郎, 秋元貴美子, 吉野 匠, 蓮沼智子, 高木賢治, 川合眞一「低用量インフリキシマブ投与で経過良好な関節リウマチ2症例における薬物動態の検討」第50回日本リウマチ学会総会, 2006年4月23-26日, 長崎
 - 3) 鎗田利香, 西尾信一郎, 高木賢治, 秋元貴美子, 窪田綾子, 勝呂 勝, 川合眞一「RA滑膜細胞の各種サイトカイン産生に及ぼすレプチンの影響」第50回日本リウマチ学会総会
 - 4) 鍋木淳一, 桑名正隆, 川合眞一, 池田康夫「SLEおよびSLE疑診例における血清Lp(a)濃度の臨床的意義」第50回日本リウマチ学会総会
 - 5) 橋本 淳, 宮坂信之, 山本一彦, 川合眞一, 竹内 勤, 吉川秀樹, 西本憲弘「ヒト化抗IL-6レセプター抗体(トシリズマブ)によるIL-6阻

- 害療法の関節リウマチに伴う骨粗鬆症に対する効果」第50回日本リウマチ学会総会
- 6) 西本憲弘, 橋本 淳, 宮坂信之, 山本一彦, 川合眞一, 竹内 勤, 村田紀和, van der Heijde D 「ヒト化抗IL-6レセプター抗体 (トシリズマブ) によるIL-6阻害療法の骨・関節破壊抑制効果の検討」第50回日本リウマチ学会総会
- 7) 西本憲弘, 山本一彦, 川合眞一, 竹内 勤, 東 純一, 宮坂信之 「ヒト化抗IL-6レセプター抗体 (トシリズマブ) によるMTX抵抗性関節リウマチ患者を対象とした第Ⅲ相試験」第50回日本リウマチ学会総会
- 8) 川合眞一 「会長講演：炎症制御薬の歴史・現状と将来展望」第27回日本炎症・再生医学会, 2006年7月11-12日, 東京
- 9) Kawai S, Yarita R, Kusunoki N, Kitahara K, Nishio S, Takagi K, Kakiuchi T, Suguro T “Leptin, An Adipocytokine, Stimulates Proinflammatory Cytokine Production in Rheumatoid Synovial Fibroblasts.” 70th. American College of Rheumatology (ACR) Basic Research Conference, Nov 10-11, 2006, Washington DC, USA.
- 10) Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Azuma J, Kishimoto T “Consistent Clinical Response Resulted from Three Japanese Randomized Controlled Trials of Tocilizumab, Humanized Anti-IL-6 Receptor Antibody, in Active Rheumatoid Arthritis (RA) Patients.” 70th. ACR Annual Scientific Meeting, Nov 11-15, 2006, Washington DC, USA.
- 11) Hashimoto J, Garner P, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Murata N, Yoshikawa H, Kishimoto T, Nishimoto N “Early Changes in Biochemical Markers of Cartilage Turnover and Synovial Inflammation Predict the Effects of Tocilizumab Monotherapy on One-Year Radiographic Progression in Patients with Early Rheumatoid Arthritis.” 70th. ACR Annual Scientific Meeting
- 12) 川合眞一 「ループス腎炎患者に対するFK506 (タクロリムス) のプラセボを対照とした二重盲検群間比較試験 (多施設共同試験)」第21回日本臨床リウマチ学会, 2006年11月21-22日, 東京
- 13) 川合眞一 「会長講演：関節リウマチ治療薬開発と臨床評価法の変遷、そして将来展望」第27回日本臨床薬理学会年会, 2006年11月29日-12月1日, 東京
- 14) 畑中晃子, 上野芳男, 松下清恵, 疋田真理, 黒川 實, 川合眞一 「当院で実施した治験のその後に関する検討」第27回日本臨床薬理学会年会
- 15) 井上幸恵, 林 智子, 橋口正行, 高木賢治, 川合眞一, 望月真弓 「関節リウマチに対するメトトレキサート反応性関連因子の特定と反応性の予測」第27回日本臨床薬理学会年会
- 16) 林 智子, 井上幸恵, 橋口正行, 高木賢治, 川合眞一, 望月真弓 「関節リウマチ患者におけるメトトレキサート-ポリグルタメート濃度と葉酸輸送担体、 γ -グルタミンヒドロラーゼ遺伝子型の関連性評価」第27回日本臨床薬理学会年会
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし (予定を含む)

新規抗リウマチ剤導入による破骨細胞制御メカニズムの分子レベルでの評価

分担研究者 高柳広 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子情報伝達学教授

研究要旨

抗リウマチ薬は、炎症や疼痛の改善において目覚ましい進歩を遂げたが、骨破壊による関節機能障害を効率よく防止することができない。このため、今なお多くの人工関節置換手術が施行されており、骨破壊の制御は関節リウマチの治療における最大の課題である。近年、関節リウマチ骨破壊の病態が次第に明らかになり、その病態に基づいて、生物学的製剤や新規抗リウマチ薬などの新しい治療薬が導入され、今後さらに先端的抗リウマチ薬の開発が計画されている。しかし、これらの新規抗リウマチ薬に関しても、骨破壊への作用を指標にして開発されたものではなく、骨破壊抑制効果やその作用機序は不明である。本研究においては、抗リウマチ薬によって骨破壊を確実に予防するための知見を得るため、骨吸収細胞である破骨細胞等に注目した基礎的な検討を行う。本年度は、特に、インターロイキン 17 を産生する T 細胞の破骨細胞誘導における病的意義を同定し、骨破壊病態を解明するとともに、抗リウマチ薬併用時の骨破壊抑制機序について解析を行った。

A. 研究目的

関節リウマチ (RA) 骨破壊においては、破骨細胞による骨吸収の亢進が重要な役割を果たす。近年、生物学的製剤や新しい抗リウマチ薬が導入されつつあるが、これらの新規抗リウマチ薬は免疫抑制や滑膜炎に重要な役割を果たすサイトカインを抑制する目的で開発されてきたため、骨破壊への作用を持つ場合であっても、その詳細な作用機序は明らかでない。そこで、骨破壊に直接関与する破骨細胞の分化や活性化に関わる分子機構を解明し、抗リウマチ薬がどのような分子機構で骨破壊を制御するのかを解明することで、効率よい骨破壊制御療法確立への科学的なエビデンスを構築することを目的とする。

B. 研究方法

1) 破骨細胞誘導性 T 細胞の同定：これまで、T 細胞は RANKL を発現して破骨細胞分化を誘導する能力を有するが、IFN- γ がその作用を打ち消し、多くの場合、破骨細胞分化抑制的に作用することが示されてきた。しかし、関節リウマチのような自己免疫性関節炎においては、T 細胞の活性化が骨吸収の亢進を引き起こすため、どのような T 細胞がどんなメカニズムで骨破壊を誘導するのかを明らかにすることが重要な課題となっていた。特に、関節リウマチは Th1 型の疾患であると考えられてきたにも関わらず、IFN- γ の強い破骨細胞分化抑制作用を考えると骨破壊を引き起こす T 細胞が Th1 細胞であるとは考えにくかったからである。従来の実験系では、T 細胞を CD3/28

抗体や PMA を用いて強く活性化し、破骨細胞への作用が検討されてきていたが、ここでは、Th1, Th2, Treg, Th17 細胞を培養系で厳密に分化させて、破骨細胞分化への作用を詳細に検討した。

(2) 抗リウマチ薬の併用による破骨細胞分化抑制効果：従来の抗リウマチ薬による骨破壊抑制効果には限界があるが、その多剤併用を行うと、骨破壊抑制効果が得られる場合があり、生物学的製剤の使用が不可能な症例などにおいては今なお抗リウマチ薬の重要性が高い。ここでは、広く用いられる抗リウマチ薬であるメソトレキセートの破骨細胞への作用を検討し、プシラミンやスルファサラゾピリジンを併用することで破骨細胞分化への作用がどのように変わるかを培養系で検討した。

(3) 破骨細胞を効率よく抑制するために、破骨細胞分化因子 RANKL のシグナル伝達機構を詳細に解析し、CaMKIV-CREB 経路の炎症性骨破壊の治療標的としての可能性を検討した。

C. 研究結果

1) Th1, Th2細胞はともに破骨細胞分化を強く抑制し、それぞれ IFN- γ , IL-4 が主たる抑制因子であることが明らかになった。Treg細胞は破骨細胞分化に対する作用があまり顕著でなかった。一方、IL-23によって誘導される Th17細胞は、破骨細胞分化に促進的であり、特に骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系を用いると、リコンビナントの RANKL がなくても破骨細胞分化を誘導することができた。Th17細胞は、Th1, Th2細胞とは異なる炎症性のサブセットとして最近注目

を集めているが、破骨細胞誘導性T細胞サブセットとして骨破壊に直接関与することが明らかになった。破骨細胞誘導性T細胞サブセットとしての機能は、局所炎症を惹起して周囲の間葉系細胞からのRANKLを誘導する作用が強い上、IFN- γ 産生がほとんどなく、自分自身もTh1, Th2細胞と比べて強くRANKLを発現するという3つの特性によるものであった。IL-23Aノックアウトマウス、IL-17ノックアウトマウスにおいて自己免疫反応非依存性の骨破壊モデルを惹起すると、WTマウスと比して強く破骨細胞形成と骨破壊が抑制された。また、関節リウマチの滑膜でのRANKL発現は、IL-23Aと相関が強くIL-12Bとは相関しないことが明らかになった。最近、自己免疫性関節炎や自己免疫性脳脊髄炎の発症プロセスにおいては、IL-12-IFN- γ 経路よりもIL-23-IL-17経路が重要であることが指摘されてきたが、これは骨破壊期においても同様に後者の経路が重要であり、IL-23-IL-17経路が有望な治療標的となることが示唆された。

(Sato et al. *J Exp Med* 203:2673-2682, 2006)

(2) メソトレキセートは単剤でも破骨細胞分化抑制作用を持つが、ブシラミンとスルファサラゾピリジンを併用すると単剤での効果が非常に少ない濃度範囲においても、比較的強い破骨細胞分化への抑制効果を示すことが明らかになった。この効果は破骨細胞分化誘導因子によって誘導される転写因子NFATc1の誘導阻害効果に基づく作用であった。また、ブシラミンは破骨細胞前駆細胞に作用しNFATc1誘導を阻害する作用が主体であったが、メソトレキセートとスルファサラゾピリジンは破骨細胞前駆細胞への作用以外にも、破骨細胞分化を支持する間葉系細胞からの破骨細胞分化因子RANKLの発現抑制を持つことが明らかになった。(Suematsu et al. *Mod Rheumatol* 17:17-23, 2007)

(3) CaMKIVノックアウトマウスでは破骨細胞分化が抑制され、骨量増加が観察された。CaMK阻害剤によって炎症性骨破壊モデルにおける破骨細胞の分化亢進と骨破壊が抑制され、治療標的となることが解明された。(Sato et al. *Nat Med*, 12, 1410-1416, 2006)

D. 考察

破骨細胞を誘導するT細胞の性状が解明されたことで、T細胞活性化と骨破壊を結ぶメカニズムの全容が解明された。Th17自体あるいはTh17を誘導する経路を阻害することで、炎症と骨破壊の両方を抑制する効率よい治療薬が開発できることが明らかになった。また、抗リウマチ薬の破骨細胞分化への抑制作用は単剤では比較的弱いが多剤併用すれば強い効果を持つことが明らかになり、多剤併用療法の骨破壊抑制効果のメカニズムの一端が解明された。

E. 結論

関節リウマチにおける破骨細胞誘導性T細胞がTh17であることを解明し、Th17の骨破壊の治療標的としての重要性を確立した。抗リウマチ薬の多剤併用療法は破骨細胞分化抑制効果をもつ。CaMKIV-CREB経路は炎症性骨破壊の治療標的となりうる。抗リウマチ薬併用は破骨細胞抑制効果を増強して骨破壊に

効果を示す。

F. 健康危惧情報なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sato, K., Suematsu, A., Nakashima, T., Takemoto-Kimura, S., Aoki, K., Morishita, Y., Asahara, H., Ohya, K., Yamaguchi, A., Takai, T., Kodama, T., Chatila, T. A., Bito, H., & Takayanagi, H. Regulation of osteoclast differentiation and function by the CaMK-CREB pathway. *Nat Med* 12,1410-1416(2006)

Suematsu, A., Tajiri, Y., Nakashima, T., Taka, J., Ochi, S., Oda, H., Nakamura, K., Tanaka S., and Takayanagi H. Scientific basis for the efficacy of combined use of antirheumatic drugs against bone destruction in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*, 17, 17-23(2007)

Negishi, H., Fujita, Y., Yanai, H., Sakaguchi, S., Ouyang, X., Shinohara, M., Takayanagi, H., Ohba, Y., Taniguchi, T., Honda, K. Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proc Natl Acad Sci* 103, 15136-41(2006)

Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Akira, S., Iwakura, Y., Cua, D. J., & Takayanagi, H. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 203, 2673-2682(2006)

Asagiri, M., Takayanagi, H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* 40, 251-264 (2007)

Takayanagi, H. Amazing multifunctionality of calcineurin and NFAT signaling in bone homeostasis. *BoneKey-osteovision* 3, 28-31(2006)

<http://www.bonekey-ibms.org/cgi/content/full/ibmske;3/9/28>

Commentary on: Winslow MM, et al. Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass. *Dev Cell* 10, 771-82 (2006)

Sato, K., Takayanagi, H. Osteoclasts, rheumatoid arthritis, and osteoimmunology. *Curr Opin Rheumatol* 18, 419-426 (2006)

2. 学会発表

Hiroshi Takayanagi. Molecular mechanism of osteoclast differentiation and osteoimmunology. INSERM The 2nd Annual Meeting of PRO-A, Institut Curie. 2007.1.25, Paris, France

佐藤浩二郎、末松綾子、岡本一男、岩倉洋一郎、三村俊英、高柳広. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that is responsible for inflammatory bone destruction 第36回日本免疫学会総会・会学術集会、2006.12.11、大阪

朝霧成挙、鎌野俊哉、國上敏浩、西川恵三、松浦正男、高柳広. Selective Inhibition of Cathepsin K ameliorates bone destruction and inflammation in autoimmune arthritis 第36回日本免疫学会総会・会学術集会、2006.12.13、大阪

越智小枝、篠原正浩、佐藤浩二郎、高柳広. Immunoreceptor signaling and TNF- α -induced acceleration of osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. 第36回日本免疫学会総会・会学術集会、2006.12.13、大阪

根岸英雄、柳井秀元、坂口信也、藤田靖之、篠原正浩、高柳広、大場雄介、谷口維紹、本田賢也. MyD88 依存的TLR下流シグナル経路におけるIRF-1の役割. 第36回日本免疫学会総会・会学術集会、2006.12.12、大阪

Hiroshi Takayanagi. The regulation of bone metabolism by the immune system. International Conference on Progress in Bone and Mineral Research 2006, The Austrian Society for Bone and Mineral Research, 2006.11.16, Vienna, Austria

Hiroshi Takayanagi. Regulation of osteoclastogenesis. JSPS Core-to-Core Program, The First International Workshop on Advanced Bone and Joint Science (ABJS) 2006, 2006.11.8, Tokyo

Hiroshi Takayanagi. Immunology in bone biology JSPS Core-to-Core Program, The First International Workshop on Advanced Bone and Joint Science (ABJS) 2006, 2006.11.6, Tokyo

Hiroshi Takayanagi. Immune Mechanisms in Osteoclastogenesis. 3rd IOF Asia-Pacific Regional Conference on Osteoporosis and 16th Annual Meeting of the Australian & New Zealand Bone & Mineral Society, 2006.10.23, Port Douglas, Australia

高柳広. RANKL・破骨細胞とOA. 第21回日本整形外科学会基礎学術集会、2006.10.19、長崎

高柳広. 炎症・免疫・骨破壊と創薬. 創薬薬理フォーラム第14回シンポジウム、2006.9.21、東京

Hiroshi Takayanagi. Transcription Factors in Osteoclast Differentiation. The 28th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2006.9.15, Philadelphia, U.S.A.

Hiroshi Takayanagi. Immune regulation of bone homeostasis. The 12th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress, 2006.8.4, Kuala Lumpur, Malaysia

S. Ochi, M. Shinohara, K. Sato, H. Takayanagi. Immunoreceptor signaling and TNF- α -induced acceleration of osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. The 12th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress, 2006.8.3, Kuala Lumpur, Malaysia

高柳広. 『DMARDs作用機序の解明』=骨・軟骨破壊抑制作用=. 第27回日本炎症・再生医学会ランチョンセミナー 2006.7.12、東京

高柳広. 破骨細胞分化シグナルと骨免疫学. 第27回日本炎症・再生医学会 2006.7.11、東京

高柳広. NFATによる骨免疫制御. 第24回日本骨代謝学会学術集会、2006.7.8、東京

佐藤浩二郎、朝霧成挙、古賀貴子、高柳広. カルシウムシグナル/NFATc1による運命決定. 第24回日本骨代謝学会学術集会、2006.7.6、東京

末松綾子、佐藤浩二郎、高柳広. CaMK/CREB経路による破骨細胞の分化と機能の制御. 第24回日本骨代謝学会学術集会、2006.7.6、東京

Hiroshi Takayanagi. Transcriptional regulation of osteoclastogenesis. 第24回日本骨代謝学会学術集会、2006.7.7、東京

Hiroshi Takayanagi. Novel signaling pathways and therapeutic targets in osteoclasts. 1st International Conference on Osteoimmunology, 2006.5.31, Crete, Greece

A. Suematsu, K. Sato, and H. Takayanagi. Regulation of Osteoclast differentiation and function by CAMK and CREB pathway. 1st International Conference on Osteoimmunology, 2006.5.28-6.2, Crete, Greece

T. Koga, K. Nakashima, H. Takayanagi .
Cooperative regulation of bone formation
by NFAT and Osterix. 1st International
Conference on Osteoimmunology,
2006.5.29, Crete, Greece

高柳広 . 骨免疫学の新展開 . 第 79 回日本整形外科学会学術総会教育研修、横浜、2006.5.21

Hiroshi Takayanagi . Mechanisms of
osteoclast activation by RANKL and
co-stimulatory ligands.
European Symposium on Calcified Tissues,
2006.5.12, Prague, Czech Republic

高柳広 . 関節リウマチ骨破壊と骨免疫学 . 第 1 回運動器疾患制圧研究会リウマチシンポジウム、東京、2006.4.26

高柳広 . RA における関節破壊機序と抗リウマチ薬の作用 . 第 50 回日本リウマチ学会総会・学術集会イブニングセミナー、長崎、2006.4.24

佐藤浩二郎、金ユンジ、森田育男、相馬邦道、高柳広 . 免疫受容体 OSCAR を介した NFATc1 シグナルの増幅経路は炎症性骨破壊の新たな治療標的となる . 第 50 回日本リウマチ学会総会・学術集会、長崎、2006.4.26

朝霧成挙、佐藤浩二郎、越智小枝、鎌野俊哉、高柳広 . NFATc1 の自己制御による発現増強は骨格形の恒常性維持に必須の役割を果たす . 第 50 回日本リウマチ学会総会・学術集会、長崎、2006.4.25

古賀貴子、中島和久、高柳広 . NFAT ファミリー転写因子を標的とした骨破壊制御 . 第 50 回日本リウマチ学会総会・学術集会、長崎、2006.4.25

Hiroshi Takayanagi . Regulation of bone metabolism by NFAT. International Symposium on Osteoporosis, Korean Society of Osteoporosis, Seoul, Korea, 2006.4.8

G. 知的財産権の出願・登録状況

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）
分担研究報告書

関節破壊制御を目的とした滑膜局所療法

分担研究者 木村友厚 富山大学医学部整形外科 教授
研究協力者 杉森一仁、関 庄二、中村千恵子 富山大学医学部整形外科

研究要旨

関節リウマチ（RA）治療において、生物学的製剤をはじめとする近年の治療法の導入により、疾患活動性制御に加えて手足の関節破壊の進行抑制にも大きな効果が認められるようになった。しかし機能障害に大きな影響を与える荷重関節について、その破壊進行が必ずしも抑制されておらず、これらの関節に対する何らかの介入が必要であり、荷重関節局所をターゲットとした治療が一つの課題である。われわれは早期臨床展開を念頭に、細胞周期制御やアポトーシス誘導作用を有するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤（HDACI）を投与し、さらにその効果増強をはかるために、臨床的に既に用いられている低強度超音波（US）を併用することにより、まず関節滑膜をターゲットとした局所制御が可能かどうかを検討した。その結果、低強度のUS照射により滑膜細胞の薬剤取り込みは短時間で増大し、HDACI添加では滑膜細胞活性の著しい低下が認められた。さらにHDACIによる細胞周期制御、すなわちS期細胞の減少とG0-G1/G2-M期細胞の増加、および細胞周期関連蛋白発現の変化は、低濃度のHDACI下においてもUSの併用により顕著に増大した。またHDACIとUSの併用により滑膜細胞に対するアポトーシス誘導率の増加を認めた。

これらの結果は、HDACIと既に臨床利用されているUSの併用が、まず関節局所で滑膜細胞をターゲットとした局所治療に有用となる可能性を示している。この結果に基づき、*in vivo*モデルにおいて、両者併用による膝・足関節炎と関節破壊の局所制御の検討を開始している。

A. 研究目的

関節リウマチ（RA）治療における生物学的製剤の導入は、疾患活動性制御に加えて、関節破壊の進行抑制の観点でも大きな成果をあげている。しかし手足の小関節破壊の進行が抑制される一方で、機能障害に大きな影響を与える荷重関節については、破壊進行が必ずしも抑制されていない。特に股関節や膝関節においては、それらの関節破壊の進行抑制について予見できないことが、すでに明らかになりつつある。従ってこれらの荷重関節の破壊制御には、追加的な治療手段の介入が必須であり、そのための一つとしての関節局所をターゲットとした治療の有用性が期待される。

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤（HDACI）は、

細胞周期制御やアポトーシス誘導作用を有し、細胞増殖制御に働くことが知られており、関節炎に対する有用な治療薬となる可能性が高い。このHDACIを関節内で、望むらくは低濃度で有効性を発揮させるためには、関節局所での分子導入促進を図る必要がある。本研究では、まず早期に臨床応用可能な関節滑膜増殖の局所制御を目指して、臨床的にも骨治療で用いられる低強度超音波（US）をHDACIと併用することにより、有効な滑膜細胞局所制御が可能かどうかを検討した。

B. 研究方法

関節局所治療のために、関節構成組織の中で、まず最初に滑膜組織をターゲットとした治療を

念頭に、活動性 RA 患者より採取した滑膜細胞 (RASf) を使用した。RASf に対する US の薬剤取り込み促進効果を明らかにするために calcein を添加し細胞内取り込みを検討した。また HDACI として種々の濃度の trichostatin A (TSA) を用い、cell viability、細胞周期、apoptosis 誘導に対する効果を検討した。

次に TSA および US の各々単独に加えて、これら両者の併用による効果を検討した。これには RASf に US (0, 0.1 または 0.2W/cm²) を照射し、続いて US 造影剤存在下で、TSA と US の両者併用による効果を cell viability で検討した。また flow cytometry により細胞周期を解析し、細胞周期関連遺伝子の発現を RT-PCR で検討した。RASf に対するアポトーシス誘導は annexin-V/propidium iodide のラベリングで解析した。

C. 研究結果

US 照射により RASf 細胞の薬剤取り込みは短時間で intensity-dependent に著しく増大し、0.2W/cm² 強度で約 40% の細胞が calcein を取り込んでいた。一方、TSA 単独添加により RASf の cell viability は dose-dependent に低下し、1 μ M TSA 存在下では 65% となった。TSA と 0.2W/cm² 強度の US の併用で、cell viability はさらに低下した。

細胞周期の変化については、RASf は TSA 添加で S 期細胞の減少と G0-G1 および G2-M 期細胞の増加を示した。US の併用により、RASf は低濃度 (0.1 μ M) の TSA 下においても、さらに S 期細胞の減少と G2-M 期細胞の増加を示した (図 1)。細胞周期関連遺伝子発現は、TSA 単独で dose-dependent に cyclin D, A, B の減少を示した。US の併用により cyclin A, B 発現はさらに低下したが、p21^{WAF1/cip1} には変化を認めなかった。さらに TSA 単独では 1 μ M 濃度でも RASf に対するアポトーシス誘導率が低いのに対して、US の併用では 72、96 時間後に 40 および 80% 以上の細胞にアポトーシスが誘導された。

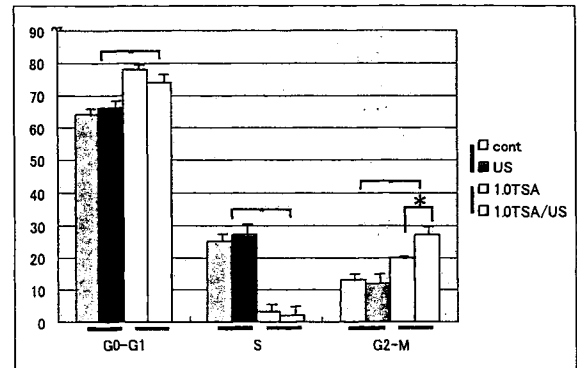


図 1. TSA と US による滑膜細胞周期の変化

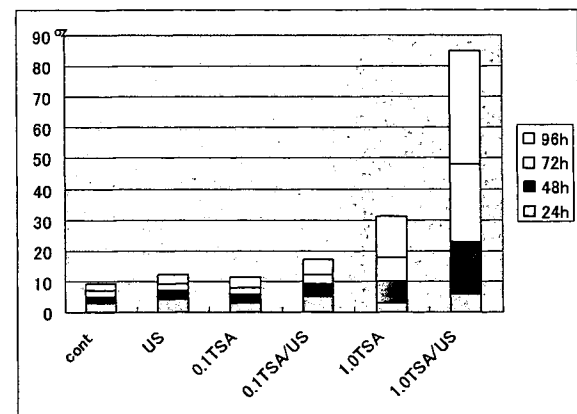


図 2. TSA と US による滑膜細胞 apoptosis

D. 考察

本研究結果は、エピジェネティクス制御薬である HDACI が滑膜細胞の活性を低下させ、また cell cycle arrest とアポトーシスを誘導することを示している。さらに既に臨床使用されているのと同強度の US の併用により、これらの効果を顕著に増強できた。すなわち HDACI と US の併用は、滑膜細胞をターゲットとした局所治療に有用となる可能性が高い。

E. 結論

HDACI と US 照射の併用による in vitro での滑膜細胞制御効果を示した。さらに in vivo モデルでの関節局所投与効果も予備的に確認しつつある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 学会発表

- Hori T, Kondo T, Zhao QL, Kanamori M, Kimura T: Anisomycin-induced apoptosis and its enhancement by mild hyperthermia. 4th Asian congress of Hyperthermic Oncology and 23th Japanese Congress of Hyperthermic Oncology, Nara, September, 2006.
- Sugimori K, Motomura H, Matsui K, Kitajima I, Kimura T: BMP-2 activates PI3K/Akt-NF- κ B signal transduction pathway in chondrogenesis. 52nd Annual Meeting of Orthopaedic Research society. Chicago, March, 2006.
- Seki S, Kizawa H, Mori H, Mio F, Kawaguchi Y, Kimura T, Ikegawa S: Smad, ERK1/2 and PI3 kinase pathways regulate transforming growth factor- β induced aggrecan gene expression in nucleus pulposus cells. 52nd Annual Meeting of Orthopaedic Research society. Chicago, March, 2006.
- Nakamura C, Matsushita I, Kosaka E, Kondoh T, Kimura T: Ultrasound-induced enhancement of histone deacetylase inhibition on rheumatoid synovial fibroblast. 53rd Annual Meeting of Orthopaedic Research society. San Diego, February, 2007.

2. 論文発表

- Matsushita I, Uzuki M, Matsuno H, Sugiyama E, Kimura T: Rheumatoid nodulosis during methotrexate therapy in a patient with rheumatoid arthritis. Mod Rheumatol. 2006; 16: 401-403.
- 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: 1063-1067.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

慢性疼痛の分子伝達

分担研究者 植田弘師 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
分子薬理学分野教授

【研究要旨】

女性に多く観察される慢性疼痛である線維筋痛症は、全身性に観察されるアロディニアを特徴とするが、その原因と病態メカニズムが全く解明されていない。本研究では同様の兆候を持つ神経因性疼痛モデルの分子機構を基礎として、線維筋痛症の病態機構と治療戦略を研究することを目的としている。本年度はこれまで解析を行ってきた神経因性疼痛の分子機構解明とは並行的に行ってきた線維筋痛症モデルの作成がその中心的成果である。多くの線維筋痛症が何らかのストレスに誘因されることを基礎に、低温- 常温を繰り返すSARTストレスモデルを検討した。その結果、全身性で雌性優位な慢性疼痛を見出すことができた。すでに適応が確認されているノイロトロピンに鎮痛効果を確認できたが、低用量モルヒネでは有効ではなかった。

A. 研究目的

本研究課題における達成目標は以下に示した2項目である。

1. 新しい動物実験モデルの作製。線維筋痛症において、全身の両側に痛みが発症することから、中枢性疾患であると位置づけられている。しかしながら、その発症機構については十分に理解されていない。この原因の一つに実験動物モデルが十分に確立されていないことがあげられる。そこで、「新しい動物実験モデルの作製」を第一の目的とする。
2. 線維筋痛症に対する治療戦略の基盤作り。第一に、①中枢性疼痛モデルにおける可塑的変調を評価する。次いで、②分子機構を明らかとする。さらに、③分子機構を標的として、鎮痛薬・阻害薬などを用いた検討を行う。これらのことより、「線維筋痛症に対する治療戦略を打ち立てること」を、第二の目的とする。

B. 研究方法

実験には全て C57BL/6J系雄性マウス 6週齢(20g前後)を使用した。疼痛閾値評価法としては、機械刺激誘発性疼痛試験(Digital von Frey)法、熱刺激誘発性疼痛試験(Thermal paw withdrawal)法及び化学刺激誘発性疼痛試験(Acetic acid-induced writhing)法を用いた。マウスSARTストレス型慢性疼痛モデルの作成
線維筋痛症に見られるストレス誘発性の全身性慢性疼痛モデルとして採用した。マウスを第1日目の16時30分に4℃に設定した低温室に入れ、第2日午前10時00分まで静置させる。続いて24℃で30分間静置させ、その後4℃で30分間、これを16時30分まで繰り返し、その後は4℃に放置する。第3日にも繰り返し、第4日10時00分に24℃に戻し、3時間後から疼痛試験を行った。対照となるマウスはこの期間中を通して24℃に放置した。初めて疼痛試験を行った日を疼痛試験第1日目とした。

(倫理面への配慮)

本研究は、長崎大学における動物実験指針に従って行った。

C. 研究結果

本研究結果としては、以下の項目からなる。

1. 一般行動観察
モデルマウスの一般行動をストレス期間及び負荷後において観察した。ストレス期間では、特に4℃下に放置した場合に、対照マウスと比較して摂食量が減少していた。しかし異常行動は見られなかった。また、ストレスを与えて数日経過した後にも異常行動は見られなかったが、2週間ほどするとモデルマウスの数匹においてストレス性の脱毛が見られた。
2. Digital von Frey 法による慢性疼痛の検出
機械的非侵害刺激に過剰に応答する行動は機械的アロディニアと呼ばれる。この試験法においては、プラスチックチップを足底部に押しやり、その回避応答までの重量閾値をデジタル測定することによるが、対照群マウスでは疼痛試験1日目において 9.5 ± 0.5 g (n=8)の閾値を示した。この値は疼痛試験12日まで有意に変化するものではなかった。これに対し、SARTストレスを処置したマウス群では疼痛試験1日目において 5.4 ± 0.2 g (n=12)と対照群と比較して有意に低下した。この過敏応答は疼痛試験12日まで有意に変化することはなかった。
3. Thermal paw withdrawal 法による疼痛の検出
Thermal paw withdrawal法は熱刺激に過剰に応答する行動を指標としている。この試験法はガラス板の上にマウスを置き、下から一定の熱刺激を与えた時の回避時間を測定する。この方法を用いた場合の対照群マウスでは疼痛試験1日目において 9.68 ± 0.8 秒(n=4)の閾値を示した。これに対してモデルマウスでは 5.72 ± 0.2 秒(n=6)を示し、対照群マウスに比べて有意に低下した。
4. Acetic acid-induced writhing 法による疼痛の検出

Acetic acid-induced writhing法は化学刺激により過剰に反応するライジング行動を指標としている。0.9%酢酸をマウスに腹腔内投与してからの20分間のライジング行動数を評価する。対照群マウスでは疼痛試験1日目において 29 ± 2 回($n=5$)の反応を示した。これに対してモデルマウスでは 49 ± 1 回($n=5$)を示し、対照群マウスに比べて有意に低下した。この試験法により、モデルマウスに見られた疼痛過敏反応は足底部だけではなく全身性に観察された。

D. 考察

前年度までの研究においては、末梢性神経因性疼痛モデルを参考にし、LPAを視床内に投与することによる全身性慢性疼痛モデル作成を行った。その特異性については現在もお解析検討中である。より多くの病態モデル作成を行い、本研究班で治療薬を用いた臨床解析の進行度と関連づけながら、こうしたモデルの正当性を検証してゆくことが本研究計画の特徴である。こうした視点から、今年度はSARTストレスマウスモデルの採用を試みた。このモデルについての正当性を示唆する理由は、単に繰り返しストレスによる慢性そして全身性疼痛が認められることにある。興味あるのは、過去の多くの研究では急性のストレスではむしろ鎮痛、すなわちストレスにより鎮痛効果が誘発されるという事実である。これはストレス時に放出されるACTHと共通の前駆体由来ペプチド、 β -エンドルフィンの効果によると説明されている。繰り返しストレスが生体保護機構の壁を打ち破り、基質的破綻が生じたと考えられることができるかも知れない。今回の実験成績で認められたDigital von Frey法による慢性疼痛は坐骨神経を部分結紮したときに観察されるほど強力なものであったことは驚くべきことである。逆に考えると、末梢性の神経傷害によっても同時に中枢性の病変が生じている可能性があることを示唆している。この考えは、機械的刺激のみならず熱刺激試験や化学刺激試験でも同程度強力な疼痛過敏が観察されたことから支持されるかも知れない。今年度はSARTストレスモデル確立に時間を要したが、十分薬理的解析に用いることができることが明らかになったことは大きい。昨年までのモデルと合わせ、慢性疼痛の全身性、性差、薬物応答性などを順次解析する予定である。

E. 結論

繰り返しストレスによる線維筋痛症様モデルマウスが作成できたので、臨床治療薬の効果と並行しながらこのモデルの適正を検証し、さらなる新しい動物モデル作成を通じて、総括的にこの病態解明と治療薬の探索を進めてゆかねばならない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujita R, Kiguchi N, UEDA H; LPA-mediated

demyelination in ex vivo culture of dorsal root. *Neurochem Int* 50(2)p351-5 2007 Jan

2. Inoue M, Yamaguchi A, Kawakami M, Chun J, UEDA H; Loss of spinal substance P pain transmission under the condition of LPA1 receptor-mediated neuropathic pain. *Mol Pain* 16;2:25 2006 Aug

3. Rashid MH, Furue H, Yoshimura M, UEDA H; Tonic inhibitory role of alpha4beta2 subtype of nicotinic acetylcholine receptors on nociceptive transmission in the spinal cord in mice. *Pain* 125(1-2)p125-35 2006 Nov

4. Matsumoto M, Inoue M, Hald A, Xie W, UEDA H; Inhibition of Paclitaxel-induced A-fiber-Hypersensitization by Gabapentin. *J Pharmacol Exp Ther* 318(2)p735-40 2006 Aug

5. Matsumoto M, Inoue M, Hald A, Yamaguchi A, UEDA H; Characterization of three different sensory fibers by use of neonatal capsaicin treatment, spinal antagonism and a novel electrical stimulation-induced paw flexion test. *Molecular Pain*16(1):16 2006 May 2

6. Matsumoto M, Inoue M, UEDA H; NSAID zaltoprofen possesses novel anti-nociceptive mechanism through blockage of B2-type bradykinin receptor in nerve endings. *Neurosci Lett* 397(3)p249-53 2006 Apr

2. 学会発表

国際学会 (招待講演)

1. UEDA H: Locus-specific rescue of opioid receptor
In 37th International Narcotic Research Conference Symposium, St.Paul, 2006, 7.

2. UEDA H: Molecular mechanisms of neuropathic pain - lysophosphatidic acid as the initiator, The International Conference -Synapses-Memory-Drug Addiction-Pain-, Toronto, 2006, 8.

3. UEDA H: Molecular mechanisms underlying neuropathic pain - identification of related nociceptive fibers and the initiator, lysophosphatidic acid, the Study of Pain's Annual "Pain Day", Toronto, 2006, 12.

国際学会 (一般講演)

1. H. UEDA, H. Matsunaga: Stress-Induced Non-

- Vesicular Release of FGF-1 Involvement of calcium-induced calcium release. 20th IUBMB(International Congress of Biochemistry and Molecular Biology) and 11th FAOBMB Congress,Kyoto,2006.6
2. H. Matsunaga, H. UEDA: Stress-Induced Non-Vesicular Release of FGF-1 Involvement of N-type calcium-channel activity in the stress-induced interaction of FGF-1 and S100A13. 20th IUBMB(International Congress of Biochemistry and Molecular Biology) and 11th FAOBMB Congress,Kyoto,2006.6
 3. M. Nishiyori, W. Xie, M. Matsumoto, M. Inoue, H. UEDA: Chronic Pain Blocks Morphine Tolerance, 37th International Narcotic Research Conference Symposium, St.Paul, 2006, 7.
 4. J. Nagai, M. Kurokawa, H. Takeshima, H. UEDA: Nociceptin Receptor (NOP) Defficient Mice Show Memory and Learning Enhancement in a Novel Kurobox Apparatus Using Stress-free Positive Cue Task, 37th International Narcotic Research Conference Symposium, St.Paul, 2006, 7.
 5. R. Yano, L. Ma, N. Kiguchi, M. Inoue, E. Shimoyama, H. UEDA: Cancer Pain Blocks Morphine Tolerance and Anti-opioid NMDA Epsironi (NR2A), 37th International Narcotic Research Conference Symposium, St.Paul, 2006, 7.
 6. T. Soda, J. Nagai, S. Kubo, H. Takeshima, H. UEDA: Enhanced Rewarding Effects to Morphine Addiction in Mice Defficient of Anti-opioid Nociceptin Receptor (NOP) Gene, 37th International Narcotic Research Conference Symposium, St.Paul, 2006, 7.
 7. M. Horiguchi, J. Nagai, S. Kubo, Y. Mishina, H. UEDA: Enhanced Release to Morphine TAddiction in Mice Defficient of Anti-opioid NMDA Epsironi (NR2A) Gene, 37th International Narcotic Research Conference Symposium, St.Paul, 2006, 7.
- 国内学会 (招待講演)
1. 植田 弘 師 : Molecular mechanisms for neuropathic pain -lysophosphatidic acid as the initiator、第 83 回日本生理学会大会、2006 年 3 月 (群馬)
 2. 植田弘師 : 脱髄性神経因性疼痛とリゾホスファチジン酸受容体機構、第 29 回日本神経科学大会、2006 年 7 月 (京都)
 3. 植田弘師、井上 誠、永井 潤 : Opioid Receptor Rescue to Identify the Specific Locus for Morphine Tolerance and Dependence by In Vivo Electroporation、第 28 回日本生物学的精神医学会、第 36 回日本神経精神薬理学会、第 49 回日本神経化学会大会合同年会、2006 年 9 月 (名古屋)
 4. 植田弘師 : 難治性神経因性疼痛の分子機構と治療への展望、第 21 回日本整形外科学会基礎学術集会出现島セミナー1、2006 年 10 月 (長崎)
- 国内学会 (一般講演)
1. 松本みさき、井上誠、Rashid, Md Harunor、植田弘師 : 神経因性疼痛機構の研究 第 1 報-モルヒネ先制鎮痛、第 79 回日本薬理学会、2006 年 3 月 (横浜)
 2. 山口明日香、井上誠、植田弘師 : 神経因性疼痛機構の研究 第 2 報-表面痛および内臓痛誘発性脊髄リン酸化 ERK、第 79 回日本薬理学会、2006 年 3 月 (横浜)
 3. 木口倫一、藤田亮介、植田弘師 : 神経因性疼痛機構の研究 第 3 報-組織片培養系におけるリゾホスファチジン酸誘発性脱髄現象、第 79 回日本薬理学会、2006 年 3 月 (横浜)
 4. 藤田亮介、植田弘師 : 脊髄後根神経線維の組織片培養におけるリゾホスファチジン酸誘発性脱髄現象、第 29 回日本神経科学大会、2006 年 7 月 (京都)
 5. 木口倫一、藤田亮介、植田弘師 : 脊髄後根神経培養における LPA 誘発性ミエリンタンパク質発現減少、第 29 回日本神経科学大会、2006 年 7 月 (京都)
 6. 松永隼人、植田弘師 : FGF-1 の極性を有さない非小胞性遊離機構とカルシウムイオンの関与、第 29 回日本神経科学大会、2006 年 7 月 (京都)
 7. 松下洋輔、井上 誠、馬 琳、木口 倫一、下山恵美、植田弘師 : がん性神経因性疼痛モデルにおけるモルヒネ鎮痛耐性形成欠如、第 27

- 回 鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム、
2006年9月（和歌山）
8. 松本みさき、井上 誠、Andreas Hald、謝
維嬌、植田弘師：抗がん剤誘発性 A 線維過敏応
答に対するギャバペンチン鎮痛効果、第 27 回
鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム、
2006年9月（和歌山）
9. 堀口 道子、植田弘師：ミクログリア特異的
なモルヒネによる脳由来栄養因子 (BDNF) 発現上
昇機構、第 59 回日本薬理学会西南部会、2006
年 11 月（沖縄）
10. 謝 維嬌、松本みさき、井上 誠、植田弘師
;Paclitaxel-induced A-fiber
hypersensitization and gabapentin
analgesia、第 59 回日本薬理学会西南部会、
2006年11月（沖縄）
11. 松本みさき、井上 誠、植田弘師：ニューロ
メーターを用いた新しい疼痛評価法による神経
因性疼痛責任線維の性格付け、第 59 回日本薬
理学会西南部会、2006年11月（沖縄）
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含
む）特になし

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

透析患者における線維筋痛症と多発性付着部炎に関する研究

分担研究者 浦野房三

長野県厚生連篠ノ井総合病院リウマチ膠原病センター・リウマチ科主任医長

研究要旨 長期間の透析患者で MMP-3 が高値を示す場合は何らかの臨床病態と関連している可能性が考えられる。透析に合併した線維筋痛症群（FM群）と透析患者で線維筋痛症を有しない群（非FM群）に対して、触診により腱・靭帯付着部炎（付着部指数）を評価した。また、両群に対して、ストレスに関する Cu, Zn-SOD, MDA-LDL, ペントシジンの測定を行い平均値の比較、および測定値相互の相関を検討した。

付着部指数はFM群では 34.467, 非FM群では 22.9 であり統計的に有意差はなかったが, ACR 圧痛点数についての比較ではFM群では 16.733, 非FM群では 10 と統計的に有意差がみられた ($p=0.0014$)。FM 群および非 FM 群 25 例全例の付着部指数と ACR 圧痛点数について Spearman 順位相関係数を求めると, $\rho=0.645$ ($p=0.0016$) と高い相関を認めたと。

Cu, Zn-SOD, MDA-LDL, ペントシジンに関して相関係数が有意であったものは付着部指数とペントシジンが -0.458 ($p<0.05$), Cu, Zn-SOD と MMP-3 が 0.426 ($p<0.05$), ペントシジンと MMP-3 が -0.456 ($p<0.05$) であった。付着部指数と MMP-3 の相関分析では Spearman 順位相関係数が $\rho=0.403$ ($p=0.048$) と有意であった。

A. 研究目的

当院人工腎センターで透析を受けている患者に対し、線維筋痛症の合併頻度を調査し、線維筋痛症(以下 FM と略)と診断された症例数は 71 例 (41%) であった。透析年数が長期になるに従い、FM の合併頻度が増加していた。一方、長期の透析患者において、MMP-3(Matrix Metalloproteinase-3)の増加が報告されており、透析患者で MMP-3 が高値を示す場合は何らかの臨床病態と関連している可能性が考えられる。昨年度は FM を有する透析患者と有しない透析患者にたいして MMP-3 の測定をおこなった。両群の平均値は健常者に比して有意に高値をしめしたが、両群間では有意差はなかった。

一方、長期にわたる透析患者の既往歴から、FM を有する患者はリウマチ性疾患合併

の頻度が有意に高いことが分かり、今回、リウマチ性疾患のひとつである多発性付着部炎の合併状況を調査した。

B. 研究方法

今回の調査は昨年度も調査に協力した FM を有する 40 代から 70 代までの女性透析患者 (FM 群)、および、FM を有しない同年代の女性患者 (非 FM 群) である。調査には実際に触診を施行し、炎症がみとめられる腱・靭帯付着部を評価した。評価方法に関して、診察部位は七川の提唱している部位 (烏口突起, 上腕骨外側上顆, 仙腸関節, 膝蓋骨下端, アキレス腱踵骨付着部) と MASES (Maaslicht Ankylosing Spondylitis Enthesitis Score) の評価部位 (上前腸骨棘, 腸骨稜, 第 2 および第 7 胸肋関節, 腰椎棘突起, 後上腸骨棘, アキレス

腱)である。指圧に対する反応状況を点数により評価した。スコアリングで、無痛は0点、軽度の圧痛は1点、通常の疼痛2点、高度の疼痛(疼痛のあまり声をあげる、態度で反応する)を3点として、総合点を計算し、これを付着部指数とした。また、これらのFM群(19例)と非FM群(18例)、そして当院の女性職員(12名)に対して、ストレスに関連した①Cu, Zn-SOD, ②MDA-LDL, ③ペントシジンの測定を行い透析患者の両群間の比較、および健常者と比較をおこなった。

C. 研究結果

直接診察した透析患者は既にFMと診断されている症例および非FMの症例であり、合計25例である。年齢は51歳から70歳、(平均年齢60.8歳)全例女性である。FM症例14例の診察で、多発性付着部炎が全くみられなかった症例は1例のみで、13例(92.8%)に多発性着部炎が確認された。付着部指数は最低0点、最高60点であった。疼痛点数の高い部位は胸肋関節であり、胸骨第2肋骨間関節が平均2.14、胸骨第7肋骨間関節は平均2.03、烏口突起が平均2.3と高値を示した。

付着部指数はFM群では34.467、非FM群では22.9であり統計的に有意差はなかったが、ACR圧痛点数についての比較ではFM群では16.733、非FM群では10と統計的に有意差がみられた($p=0.0014$)。FM群および非FM群25例全例の付着部指数とACR圧痛点数についてSpearman順位相関係数を求めると、 $\rho=0.645$ ($p=0.0016$)と高い相関を認めた。

Cu, Zn-SOD, MDA-LDL, ペントシジンに関してFM群と非FM群の平均値の比較ではCu, Zn-SODでFM群が297.48 ng/ml、非FM群が233.2 ng/mlであり、健常人は16.35 ng/mlであった。MDA-LDLではFM群が78.74 U/l、非FM群が83.5 U/l、健常人が125.87 U/lであった。ペントシジンではFM群が0.533 $\mu\text{g/ml}$ 、非FM群が0.609 $\mu\text{g/ml}$ 、健常人が0.039 $\mu\text{g/ml}$ であった。FM群と非FM群ではいずれも平均値に有意差は認められなかった。健常人との比較では、MDA-LDLの健常人平均値と非FM群平均値で有意差がみられなかったが、その他す

べての項目で、健常人に比して透析患者は有意に異常高値、あるいは低値であり、統計学的に有意差がみられた($p<0.05$)。

付着部指数Cu, Zn-SOD, MDA-LDL, ペントシジン、昨年度に測定した、MMP-3, MMP-6との相関分析を行った。相関係数が有意であったものは付着部指数とペントシジンが -0.458 ($p<0.05$)、Cu, Zn-SODとMMP-3が 0.426 ($p<0.05$)、ペントシジンとMMP-3は -0.456 ($p<0.05$)であった。付着部指数とMMP-3の相関係数は 0.375 であったが、Spearman順位相関では $\rho=0.403$ ($p=0.048$)と有意の相関が認められた。

D. 考察

昨年の調査で整形外科およびリウマチ性疾患の既往歴の頻度は腱鞘炎・付着部炎、関節炎および関節症、そして、頸椎捻挫・脊椎疾患がFM患者で高頻度であった。また、MMP-3は両群とも健常人に比して高い値を示しており、骨関節炎を生じやすい病態が顕著であることが推測されていたが、今回の調査でFMをきたす基盤には脊椎関節炎の根幹である多発性付着部炎が存在することが分かった。透析患者では続発性にFMを生じている症例が極めて多いと推測される。

今回の調査では付着部指数とMMP-3の相関分析で順位相関係数が $\rho=0.403$ ($p=0.048$)と有意であった。最近の免疫学的研究で透析患者のMMP-3が高値であることが報告されている。しかし、その現象を生ずる原因についてはコンセンサスが得られていない。今回の調査と昨年度の検査結果を合わせて検討することにより、ある程度の相関が示唆された。多発性付着部炎が透析患者のFMに多大な影響を与えていることが推定される。

また、アメリカリウマチ学会分類基準を参考にすると、疼痛がほとんどなく、FMではない透析症例に対して、ACRの圧痛点を確認したところ、平均10箇所の圧痛を認めた。また、FM症例と非FM症例を一群として、ACRの圧痛点数と付着部指数の相関分析を行ったところ有意な相関が認められた。非FM症例でも多発性付着部炎を有してい

る症例が相当数認められ, FM 症例と非 FM 症例との振り分けは疼痛状況が顕著で長期間認められるか,あるいは疼痛レベルが低く,短期間であるかなど自覚症状による側面が大きいと考えられる。

E. 結論

透析患者において FM は極めて高頻度に合併する。その基礎には多発性付着部炎が存在する可能性が高いといえる。FM 症例および非 FM 症例,ともに MMP-3 が高い値を示す症例が多く,両群では有意差がなかったが,多発性付着部炎をきたしている症例では MMP-3 が病態の一部を反映している可能性があると考ええる。

F. 健康危険情報

特に問題となる事例はなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 線維筋痛症診断における年代別の問題.
浦野房三 臨床リウマチ 18 巻 1 号 93-97
頁 2006 年

2) 線維筋痛症のトータルケア —透析患者の線維筋痛症の調査から— 浦野房三
Pharma Medica 24 巻 6 号 49-51 頁 2006 年

3) 女性の線維筋痛症と脊椎関節炎 浦野房三 医学のあゆみ 219 巻 401-405 頁, 2006 年

2. 学会発表

1) 線維筋痛症のトータルマネジメント
2006 年 3 月 21 日 東京都 線維筋痛症公開シンポジウム

2) 第 50 回日本リウマチ学会 透析患者における線維筋痛症の合併 2006 年 4 月 25 日 長崎市

3) 第 18 回中部リウマチ学会 脊椎関節炎に対する TNF 阻害薬の治療経験 2006 年 9 月 2 日 津市

4) 第 16 回日本脊椎関節炎研究会 脊椎関節炎に対する生物学的製剤の治療経験 2006 年 9 月 9 日 奈良市

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし