

200921030A

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

膝痛の診断・治療に関する調査研究
－関節マーカーを用いた早期診断と
予後予測の確立に関する研究－

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山田 治基

平成 22 (2010) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

膝痛の診断・治療に関する調査研究
－関節マーカーを用いた早期診断と予後予測の確立に関する研究－

区分	氏名	所属	職名
研究代表者	山田治基	藤田保健衛生大学医学部整形外科	教授
研究分担者	馬淵昭彦	東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野	准教授
	石黒直樹	名古屋大学大学院医学系研究科機能構築医学	教授
	宗田 大	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 運動器外科学	教授
	岩崎倫政	北海道大学病院整形外科上肢の外科、再生医学	准教授
	福井尚志	独立行政法人 国立病院機構相模原病院臨床研究 センター 病態総合研究部	研究部長

目 次

I. 総括研究報告 ----- 7

膝痛の診断・治療に関する調査研究

－関節マーカーを用いた早期診断と予後予測の確立に関する研究－

研究代表者 山田治基（藤田保健衛生大学医学部整形外科 教授）

研究協力者 森田充浩（藤田保健衛生大学医学部整形外科 講師）

伊達秀樹（藤田保健衛生大学医学部整形外科 助教）

II. 分担研究報告

1. 一般住民における血清ヒアルロン酸値の年齢分布と変形性膝関節症との関連 ----- 26

研究分担者 馬淵昭彦（東京大学大学院 医学系研究科国際保健学専攻 人類遺伝学分野 准教授）

研究協力者 吉村典子（東京大学大学院 22 世紀医療センター 関節疾患総合研究講座 特任准教授）

阿久根徹（東京大学大学院 22 世紀医療センター 臨床運動器医学講座 特任准教授）

岡 敬之（東京大学大学院 22 世紀医療センター 関節疾患総合研究講座 特任助教）

村木重之（東京大学大学院 22 世紀医療センター 臨床運動器医学講座 特任助教）

2. 関節マーカーを用いた早期診断と予後予測の確立に関する研究に関する研究 ----- 30

研究分担者 石黒直樹（名古屋大学大学院医学系研究科機能構築医学専攻運動・形態外科学講座
整形外科 教授）

3. 関節液中間葉幹細胞による解析 ----- 33

研究分担者 宗田 大（東京医科歯科大学 大学院 運動器外科学 教授）

4. 軟骨に特異的な糖鎖マーカーによる解析 ----- 35

研究分担者 岩崎倫政（北海道大学病院整形外科 講師）

5. 複数の既知マーカーの組み合わせによる変形性関節症の病態評価

およびバイオマーカーの関節組織における発現の検討 ----- 36

研究分担者 福井尚志（（独）国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 研究部長）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 43

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 53

I. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
平成21年度総括研究報告書

膝痛の診断・治療に関する調査研究
—関節マーカーを用いた早期診断と予後予測の確立に関する研究—

研究代表者 山田 治基 藤田保健衛生大学整形外科 教授

研究協力者 森田 充浩 藤田保健衛生大学整形外科 講師

研究協力者 伊達 秀樹 藤田保健衛生大学整形外科 助教

研究要旨

変形性関節症（osteoarthritis, OA）は運動器に原発する疾患としては高齢者における身体的不自由を来す頻度が最も高いものであり、本邦には定義にもよるが約2000万人の患者が存在するとされている。OAは関節軟骨に初発する疾患であるが、初期には軟骨を含めて自己修復の期待できる疾患であり高度な機能低下を来す前に早期診断できれば本症に起因する将来の要介護者を効果的に減少させ得る。OAの早期診断法として、従来から用いられていたX線は、軟骨破壊を検知する能力が低い。最近では、MRIを用いた画像診断法が盛んに報告されているが、OA患者数を勘案すると効率、コストなどの面での大きな制約が存在する。OAの診断、評価法として関節を構成する軟骨・骨・滑膜の代謝をリアルタイムで反映する関節マーカーはOAの早期診断、病態評価、将来の進行予知などに有用とされている。関節マーカーはOAのような患者数の膨大な疾患における早期診断手法としては極めて有利である。

本研究班では関節マーカーについての有用性を二つの方面より行っている。まず本邦における大規模住民コホートにより抽出されたデータベースと検体をもとに関節マーカーによるOAの早期診断における有用性を検証した結果、II型コラーゲンの分解マーカーであるCTX-IIおよび軟骨のマイナー蛋白であるCOMPの血清中濃度がX線上のOA病期と高度に相関している事が明かとなった。軟骨マトリックスの分解フラグメントがOAの病態に密接に反映しており血中マーカーによるOA病態評価が可能であることを本邦での大規模コホートを使用してはじめて明らかにした。平成21年度にはH20年度の山村部の住民864人（男性318名、女性544名、年齢23-90歳）に加えて和歌山県大地町漁村部の住民826名（男性277名、女性549名、年齢23-94歳）を新たに対象に対象に加え合計1600余名にのぼる大規模コホートに対するマーカー測定を施行した。また測定マーカーも従来の3種に加えて蛋白分解酵素であるMMP-3（matrix metalloproteinase-3）、関節軟骨基質構成物質であるヒアルロン酸HA（hyaluronan）、II型コラーゲン合成マーカーであるCPII（procollagen type II c-p ropeptide）の測定を施行し、合計6種のマーカー測定を施行した。

平成21年度研究においては、2つの大規模住民コホートにおいて等しく血清COMPと血清HA、尿CTX-Iが膝OAや腰SPの臨床病期と正の相関を示すことを見出すことに成功した。またOA病態の進行が身体機能低下と相関することが示された。両コホートともに非常に精度の高い相関データが得られており、経年調査結果の追加と初回実施結果の統計解析、および身体機能評価項目の強化により、要介護となり得る有症患者の早期評価につながる指標を見出すことができる可能性があると考えている。

さらにOA病態を特異的に反映する新規マーカーの開発、検証を行い診断及び評価に関する有用性を調査した。ポストゲノムとして注目されている糖鎖のN-glycanを関節マーカーとして応用するための基礎的研究としてマウス軟骨中のN型糖鎖構造解析を行いOA早期より糖鎖構造が変化していることを証明し変化しているN型糖鎖を同定した。この糖鎖構造の変化を生じさせる糖鎖関連酵素の同定にも成功した。本結果よりN型糖鎖がOAの発症もしくは発症後早期の病態に深く関与しておりOA早期マーカーとしての有用性が示唆された。平成21年度はヒトOA軟骨において変化するN型糖鎖を同定し、ヒト血清の解析に関して解析条件の設定が終了し実際に血清中のN型糖鎖解析を行える段階に到達した。

II型コラーゲンフラグメントであるC2Cによる初期病態の検討については、生活習慣病の予防のための生活習慣を持つ群と持たない群において軟骨の変性および関節機能をC2Cを用いて比較する検討を行った。生活習慣病の予防、改善と運動器機能の維持を両立することが非常に重要であり、生活習慣病に対しての予防的運動習慣をもつグループと持たないグループとで膝関節機能および画像評価、QOL評価、関節マーカー（軟骨の基質分解産物）の測定を経時的に行い、関節から見た適正な運動習慣を検討すること、関節マーカーの有用性を評価した。

関節液中の間葉幹細胞の解析をOA早期発症の検知と進行予測に応用する研究ではコロニー形成細胞は正常膝にはほとんど存在せず前十字靭帯損傷膝やOA膝には数多く存在し、とくに前十字靭帯損傷膝では関節軟骨の損傷・変性の程度とコロニー形成細胞数が正の相関を示していた。前十字靭帯損傷膝の関節液中には正常膝よりも多くのコロニー形成細胞が存在し、滑膜由来の間葉幹細胞の特徴を有することを報告した。本研究では、前十字靭帯損傷膝、及び変形性膝関節症膝の関節液中の間葉幹細胞を定量し、関節鏡評価による軟骨変性度や、レントゲンによる重症度と相関するかを解析した。さらに、変形性膝関節症の関節液中に存在する間葉幹細胞の遺伝子プロファイルを解析した。本結果は関節液中のコロニー形成細胞は関節軟骨の損傷・変性の程度を予測するための指標となる新規の評価法としての可能性を示唆している。

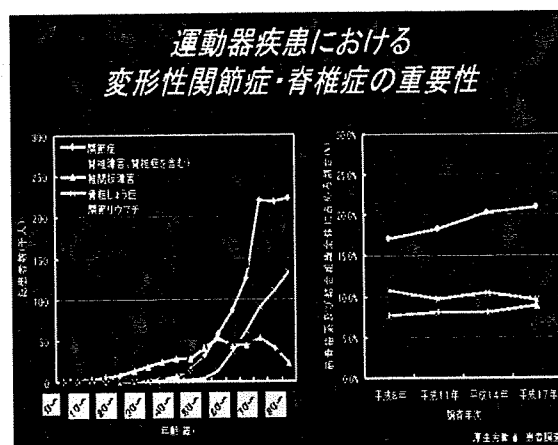
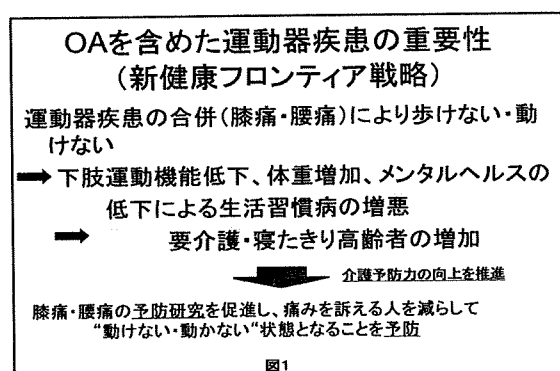
既存マーカーの効率的組み合わせと病態との相関を検討することでOA重症化の予測を行う研究では本年度は膝OA症例を対象に病態と臨床所見の経時的変化を知り検体を収集するためのフォローアップを継続し、現在までに膝OA症例43例86関節について2年間のフォローを終えるなど順調にOA症例の増加、経過データが集積されている。また既知マーカーのOA関節各組織における発現を解析するために、OA軟骨と滑膜についてcDNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行い、さらにいくつかの遺伝子についてはレーザー・マイクロディセクションとqPCRによる発現解析を行った。

現在までに測定を終えた因子について、因子の組み合わせによる高齢対照群とOA症例の識別を試みたところ、血清のCOMP、アグリカン、KSの3因子の組み合わせで両群がきわめて高い精度で区別できるという結果を得ている。OAの病態との相関が既に報告されている複数の因子を同時に測定し組み合わせることによってOAの病態をより高い精度で反映する指標を確立することを最終目標としている。

以上の2方面からの研究によりOAの早期診断を可能とし、積極的な予防策を講じることによって将来の要介護者を減少させることに有用な臨床的な支援ツールの作成を目標としている。

A. 研究目的

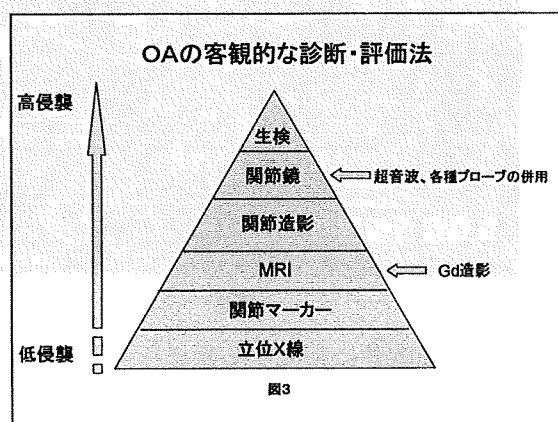
「新健康フロンティア戦略」では変形性関節症（osteoarthritis, OA）など生活機能低下を来す疾患に働き盛りの時期から備える介護予防力育成に対する取り組みが急務であるとしている（図1）。OAは初期には自己修復の期待できる疾患であり高度な機能低下を来す前に早期診断できれば将来の要介護者を効果的に減少させ得る。OAの診断、評価は画像により行われてきたが、過去の変形の蓄積である画像のみに依存しては従来の診断能力の域を出る事が困難である。関節を構成する軟骨・骨・滑膜の代謝をリアルタイムで反映する諸分子は関節マーカーと総称されOA診断法の一つとして認識されつつあるが、単一マーカーの単発的研究に終始しておりOAの早期診断、重症化予測についての大規模かつ組織的な研究は国内外を通じてない。OAの重度の関節変形に起因する起立歩行障害は身体活動の低下とともに生活機能全般を脅かす最大の要因であるにも関わらず、正確な病態診断と重症化予測手段が確立していない。本邦には定義にもよるが約2000万人の患者が存在するとされており、医療機関を受診する運動器疾患の患者のなかでも主要な位置を占めており、その患者数は毎年、増加し続けている（図2）。



OAは関節軟骨に初発する疾患であるが、初期には軟骨を含めて自己修復の期待できる疾患であり高度な機能低下を来す前に早期診断できれば本症に起因する将来の要介護者を効果的に減少させ得る。OAの早期診断法として、従来から用いられていたX線は、軟骨破壊を検知する能力が低い。最近では、MRIを用いた画像診断法が盛んに報告され

ているが、OA患者数を勘案すると効率、コストなどの面での大きな制約が存在する。OAの診断、評価法として関節を構成する軟骨・骨・滑膜の代謝をリアルタイムで反映する関節マーカーはOAの早期診断、病態評価、将来の進行予知などに有用とされている。関節マーカーはOAのような患者数の膨大な疾患における早期診断手法としては極めて有利である（図3）。

本研究の目的は大規模住民コホートにより抽出されたデータベースと検体試料をもとに関節マーカーによるOAの早期診断における有用性を検証し、併せて既発症患者を対象として重症化予測での有用性を検討することにある。さらにOA病態を特異的に反映する新規マーカーの検証を行い診断及び評価に関する有用性を調査する。以上の2方面からの研究によりOAの早期診断を可能とし、積極的な予防策を講じることによってOAに起因する将来の要介護者を減少させることに有用な臨床的な支援ツールの作成を目標としている。



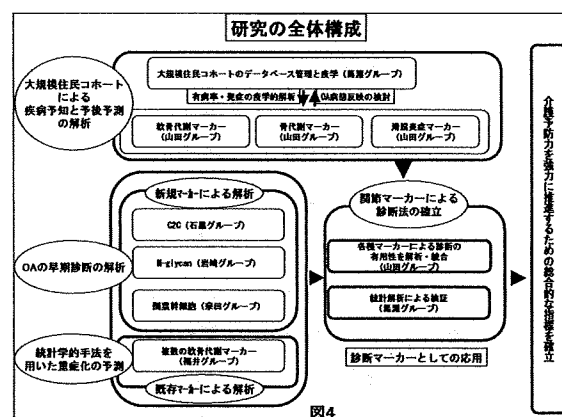
B. 研究方法

本研究班の全体構成を図4に示す。

研究組織は平成20年度と同一である。

1) 大規模住民コホートから抽出した臨床データベースの管理と疫学（馬淵）

2) 同コホートから採取した臨床検体における各種マーカーの測定と臨床症状との相関、評価（山田）により関節マーカーのOAにおける基準値の設定や病態との相関を明らかにし早期診断における有用性を検証する。平行して新規マーカーの検証については既発症OA患者を対象として、3) ポストゲノムとして注目されている糖鎖のN-glycanを用いた検証（岩崎）、4) II型コラーゲンフラグメントであるC2Cによる初期病態の把握（石黒）、5) OAを誘発する膝前十字靭帯断裂例を対象とした関節液中の間葉幹細胞の解析（宗田）にて早期発症の検知と進行予測に関する評価を実施するとともに、既存マーカーの効率的組み合わせと病態との相関を検討すること（福井）で重症化の予測を行う。



1. 大規模住民コホートにおける関節マーカーの検討

A. 大規模コホートの管理、観察

従来行ってきた和歌山県山村部の住民に加えて平成21年度是和歌山県の一漁村民民（826人）を対象として、問診票調査、運動機能調査、および膝X線撮影を含む大規模な骨関節疾患予防検診をおこなった（ベースライン調査）。膝OAの診断は、両膝立位正面X

線像上のKellgren-Lawrence (KL) スケールを用いて整形外科医が分類し、重症側のKLグレードが2以上を膝OAありとし、一般住民におけるX線上的変形性膝関節症の有病率を推定した。血清HAを測定するために、同意を得られた対象者の血液を採取した。全対象者の血液は午前9時～午後3時までに採取し、採取後12時間以内に血清分離、-80℃の冷凍庫で保管し、後日、血清HA値をELISA法を用い測定した。

B. 大規模住民コホートに対する各種関節マーカーの測定

初年度調査検討した和歌山県日高川町（美山村）山村部の住民864人（男性318名、女性544名、年齢23-90歳）に加えて今年は和歌山県大地町漁村部の住民826名（男性277名、女性549名、年齢23-94歳）を対象とした（図5）。コホート調査内容としては腰痛、職業歴、家族歴、既往歴、嗜好品（たばこ、コーヒー、食事、飲酒）、身長体重を含む身体状況、服薬、栄養調査、関節障害、股関節の状況、介護状況、精神状況、認知機能、QOL（SF-8、EQ5D）、下肢機能（WOMAC）、転倒の有無など約400項目にわたる問診票調査、運動機能調査（6m歩行所要時間）、膝および腰のX線撮影をベースライン調査として行っている。膝痛の有無を医師が診察にて問診し、過去1ヶ月に持続的疼痛があるものを膝痛ありとした。OAの診断は両膝立位正面と腰椎側面X線画像上でKellgren-Lawrence (KL) スケールを用いて整形外科医が分類し、膝では重症側の、腰椎では最重症椎間のKLグレードが2以上をOAありとして一般住民のX線上的変形性膝関節症、変形性脊椎症の有病率を推定した。今年度の研究対象であるコホート住民826名

から採取した血清、尿検体より各種関節マーカーを測定しOAの病態進行と関節マーカーとの関係を調査した。今年度測定した関節マーカーはヒト軟骨のマイナー蛋白であるCOMP (cartilage oligomeric matrix protein) とII型コラーゲンの特異的分解産物であるCTX-II (cross-linked type II collagen C-telopeptide)、同じくI型コラーゲンの特異的分解産物であるCTX-I、蛋白分解酵素であるMMP-3 (matrix metalloproteinase-3)、関節軟骨基質構成物質であるヒアルロン酸HA (hyaluronan)、II型コラーゲン合成マーカーであるCPII (procollagen type II c-propeptide) の6種である。

Results

MORBIDITY PREVALENCE RATE (MPR)

Knee OA : Miyama 58.7-60.7%
Tajiri 28.5-29.4%

SP : Miyama 62.8%
Tajiri 61.5%

KNEE OA AND SPONDYLOSIS

	X-L grade	0	1	2	3	4	MPR (%)
Miyama	Knee OA	77	279	359	37	50	58.7
	(R062/L062)	67	272	355	120	48	60.7
Miyama	SP (064)	99	282	275	186	102	62.8
Tajiri	Knee OA	333	266	126	77	33	28.5
	(R024/L020)	310	269	126	82	33	29.4
Tajiri	SP (026)	5	313	179	187	142	61.5

図5

2. 新規マーカーの開発

1) 糖鎖のN-glycanを関節マーカーとして応用する研究

平成20年度ではマウスOA軟骨のN型糖鎖構造解析を行い、OAの発症・進行に伴い、変化するN型糖鎖とその変化に関連する糖鎖関連酵素を同定するため、in vitro/in vivo 評価系によりマウス正常およびOA軟骨のN型糖鎖構造解析を行い、OA軟骨において変化している糖鎖を同定した。平成21年度では、ヒト正常群およびOA群の軟骨お

よび血清を採取し、そのN型糖鎖構造解析を行い、OA群において変化している糖鎖を同定した。ヒトで同定されたN型糖鎖に注目し、マウスOAモデルにおいてOA発症に関連した機能解析を行った。

2) 新規のII型コラーゲン由来フラグメントであるC2Cによる膝機能評価

岐阜県中津川市での2003-5年におけるヘルスアップ事業に参加し、その後も運動教室への参加を継続している33名、ヘルスアップ事業で教室への参加をせず、現在も参加していない20名を調査の対象とした。調査項目は、1) 2003-5年におけるBMI、脂質代謝マーカー (Total HDL LDL cholesterol, 中性脂肪) 糖質代謝マーカー (HbA1c) の推移、2) 現在のBMI, Total HDL LDL cholesterol, 中性脂肪、HbA1cの測定、3) 膝立位レントゲン撮影 (コンピュータ画像診断ソフトK OACAD によるデジタルデータの解析: 関節裂隙の測定など)、4) 質問紙を用いてQOL (SF-8)、膝関節機能 (WOMAC) 評価、および運動習慣、食習慣の把握である。2-4の項目について1年後に再度調査を行い、経時的変化を観察する予定である。

3) 関節液中の間葉幹細胞の解析

前十字靭帯再建術時に関節液を穿刺し、関節鏡視による軟骨の変性度をスコア化した。正常膝および変形性膝関節症膝から関節液を穿刺した。関節液は細胞成分を14日間培養後、コロニー数を測定した。変形性膝関節症に対して人工膝関節置換術を施行した際に、関節液、滑膜、骨髓液を採取した。それぞれの間葉幹細胞の遺伝子プロファイルを求め、クラスター解析を行なった。

4) 既存マーカーの効率的組み合わせによるOA病態評価と重症化の相関の検討

膝関節OAの症例50例を目標に2年間にわたって6ヶ月ごとに血液 (血清、血漿)、尿、画像 (片脚立位、膝伸展位と45度屈曲位での単純X-p前後像)、専用のチャートによる臨床所見、Japanese Knee Osteoarthritis Measure (JKOM; Akai M, et al. *J Rheumatol* 2005) による患者の自覚的な愁訴を記録した。個々の症例におけるOAの重症度と2年間の進行の速度を単純X-pで評価し、これと血液、尿中の既知マーカーの変動を関連付けてROC (Receiver Operating Characteristic) 解析を行うことによってOAの病態と最もよく相関するバイオマーカー2~4個の組み合わせを見出し、これらによる病態の評価指数を確立した。この対照として比較的若年の健常者30名 (若年対照群)、およびより高齢の健常者30名 (高齢対照群) の二群を設定し、それぞれにおいて血液と尿を採取する。計測を予定する既知マーカーは以下に示す19項目 (血液15項目、尿4項目) で、測定はLuminexあるいは市販および自家作製のELISAキットにより行うこととした。

□ 血液: MMP-3、MMP-8、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2、COMP、ヒアルロン酸、CPII (C-terminal propeptide of type II collagen)、CIIANP (N-terminal propeptide of type IIA collagen)、YKL-40、高感度CRP、アグリカン*、セラタン硫酸 (KS) *、PGE2、CS 846、pyridinoline (PYD)

□ 尿: CTX-II (C-terminal crosslinking telopeptide of type II collagen)、CII neo-epitope (CIINE)、アグリカン*、セラタン硫酸*

(*: 血液、尿の両方で測定。)

また既知マーカーのOA関節各組織における発現を解析するために、OA軟骨と滑膜についてcDNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行い、さらにいくつかの遺伝子についてはレーザー・マイクロダイセクションとqPCRによる発現解析を行った。

(倫理面への配慮)

ヒトを対象とする臨床的研究および実験動物を使用する基礎的研究ともに各研究機関の倫理審査委員会へ研究内容を提出の上、許可を得た後に施行している。よって倫理面への配慮は十分になされている。当該研究期間に倫理的な問題の発生は報告されていない。

C. 研究結果

1. 大規模住民コホートにおける関節マーカの検討

A. 和歌山県の漁村住民(826人)に対する検討

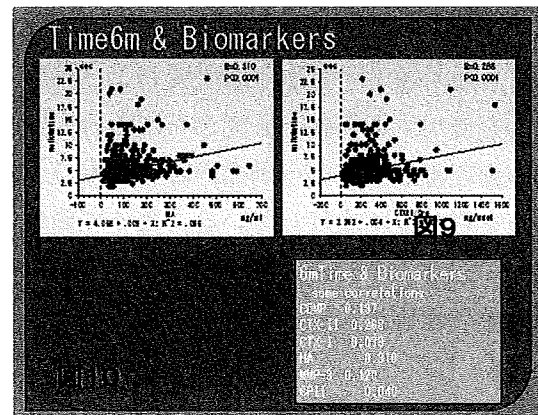
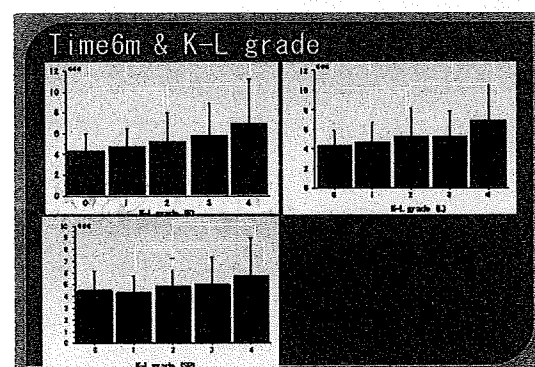
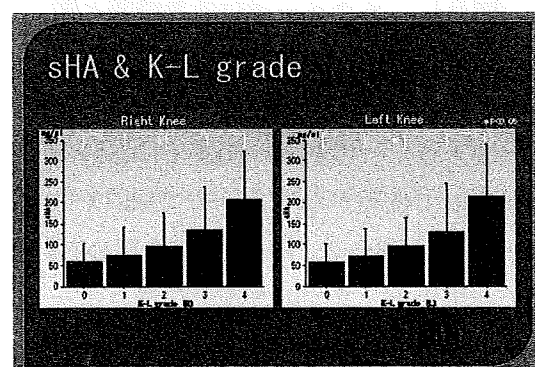
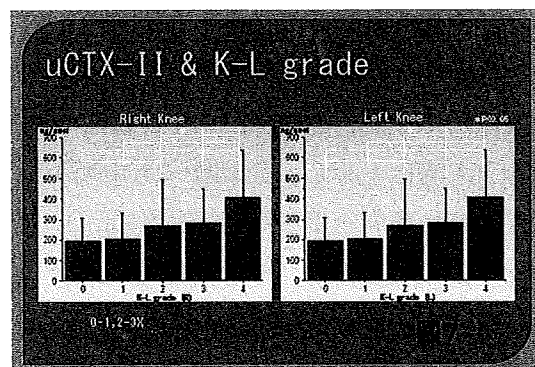
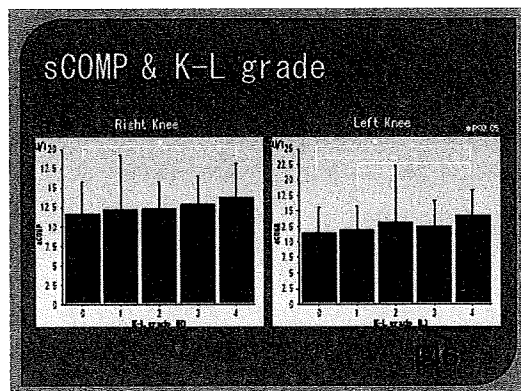
本集団において血中HA濃度の平均値をみると、82.4 (標準偏差77.2) ng/mLとなった。血中HA濃度は、男女差は認められないが、年齢とともに高くなる傾向にあった。KLグレード別の血中HA濃度の分布ではKLグレードが上がるにつれて血中HA値が高いことがわかった。本集団の膝X線でKL2以上となる膝OAの割合は男性で23.8%、女性で37.8%であり、女性に有意に高かった($p<0.001$)。ここで膝OAの有無を目的変数とし、血清HA値を説明変数とし、性、年齢、body mass index (Kg/m^2) を調整したロジスティック回帰分析をおこなうと、血清HAは膝OAの有無と有意な関連を示した (HAの1標準偏差の上昇に対してオッズ比1.32、95%信頼区間1.06-1.65、 $p<0.05$)。

B. 大規模住民コホートに対する各種関節マーカの測定

山村コホートである日高川町美山村の膝OAの有病率は59.7% (58.7~60.7%)、脊椎症(SP)の有病率は62.8%であったのに対し、

漁村コホートである大地町の膝OAの有病率は29.0% (28.5~29.4%)、SPの有病率は61.5%であった (図5)。大地町コホートについてK-Lグレードと各関節症マーカとの関係の代表例を示す (図6~8)。血清COMPは左右膝関節ともK-Lグレードとおおむね正の相関を示していた。また尿CTX-IIと血清HAもK-Lグレードによる臨床病期ときれいな正相関を示した。一方、血清MMP-3は初期と末期で高い状態であった。CP-IIは初期および中期で上昇する傾向を示したものの相関性は低かった。尿CTX-Iは中期で高い傾向を示した。一方腰椎SPについて、血清COMPは病期後半で上昇傾向を示したものの、尿CTX-IIは末期で、尿CTX-Iは初期で高い傾向を示すなど変動を認めた。血清HAは病期とともに上昇し、血清MMP-3も中期から末期で高い傾向を示したBMIの間に正の相関をみとめたものの、BMIと関節マーカの間には相関性を認めなかった。6m歩行所要時間とK-Lグレードには正の相関を認めた (図9)。また6m歩行所要時間と関節マーカの間には血清HA、尿CTX-II、血清COMPにおいて弱いながら相関関係を認めた (図10)。性別との関連では血清COMPと血清HAで性差がなく、一方で尿CTX-I、尿CTX-II、血清MMP-3、CPIIで性差を認めた。以上の結果から、2つの大規模住民コホートにおいて等しく血清COMPと血清HA、尿CTX-Iが膝OAや腰SPの臨床病期と正の相関を示すことを見出すことに成功した。またOA病態の進行が身体機能低下と相関することが示された。両コホートともに非常に精度の高い相関データが得られており、経年調査結果の追加と初回実施結果の統計解析、および身体機能評価項目の強化により、要

介護となり得る有症患者の早期評価につながる指標を見出すことができる可能性があることが示唆された。



2. 新規マーカーの開発

1) 糖鎖のN-glycanを用いた検証

平成20年度ではマウスOAの発症早期から軟骨中のN型糖鎖構造に変化を認め、変化しているN型糖鎖が同定され、その糖鎖変化を生じさせる軟骨細胞上の糖鎖関連酵素遺伝子も同定された。平成21年度ではヒトOA軟骨において変化するN型糖鎖を同定した。また、マウスでのOA発症におけるこの糖鎖の機能も証明した。ヒト血清の解析に関しては解析条件の設定が終了し、実際に血清中のN型糖鎖解析を行える段階に到達した。現在、各群20-30程度の血清サンプルの採取は終了している。平成22年度ではこれらヒトの検体を用いた解析に着手する予定である。

2) II型コラーゲンフラグメントであるC2Cによる初期病態の把握

今年度は運動教室参加を継続しているグループ33名のベースライン調査を行った。ヘルスアップ事業による2年間の介入時に明らかに糖、脂質代謝マーカーの改善、BMIの改善が得られており、終了から4年たった現在もその状況がほぼ維持されていることが確認された。KOACADによる膝X線計測からも膝関節にも強度の変形もなく、WOMACから膝関節機能も良好か軽度障害程度で

あることがわかった。運動習慣は週1回の運動教室のみ11名、1時間週2回程度10名、1時間週3回以上11名であった。ベースラインにおいて、尿中関節マーカーC2C（尿中クレアチニンにより補正）は、BMIと生の相関を示した（ $r=0.392$, $p=0.02$ ）他のWOMAC点数、KOACAD計測値との相関は見られなかった。

3) 関節液中の間葉幹細胞の解析

前十字靭帯損傷膝の軟骨変性スコアと間葉幹細胞数は相関した。（ $n=19$, $r=0.645$, $p<0.002$ ）。変形性膝関節症のレントゲンによる重症度が増すに従い、間葉幹細胞数は増加した（ $n=50$, $p<0.05$ ）。変形性膝関節症の関節液中に存在する間葉幹細胞の遺伝子プロファイルは、骨髓液中に存在するものよりも、滑膜由来のものに類似していた。

4) 既存マーカーの効率的組み合わせによるOA病態評価と重症化の相関の検討

現在までに膝OA症例43例86関節について2年間のフォローを終えた。これらの症例から得た6ヵ月ごとの血液、尿とX-p像を解析した。また若年対照群29例（平均53.7歳）および高齢対照群30例（平均69.8歳）から血液、尿を採取してこれについても解析を行った。なお高齢対照については問診、理学所見とレントゲンにより膝関節に異常のないことを確認している。X-p上のOAの重症度とマーカーの関連を検討したところ、血清中のCOMP、YKL-40、ヒアルロン酸、PYD、尿中のCIINEについて若年または高齢対照群とOA例の間に有意の差が観察された。さらに現在までに測定を終えた因子について、因子の組み合わせによる高齢対照群とOA症例の識別を試みたところ、血清のCOMP、ア

グリカン、KSの3因子の組み合わせで両群がきわめて高い精度で区別できるという結果を得た。今回対象としたOA症例の中で、フォロー期間中に左右の膝のいずれかに裂隙狭小化が生じた症例が22症例あった。これら（進行群）とそれ以外の症例（非進行群）の間で種々のマーカーの計測値を2種の統計モデルで比較したところ、表1に示す因子が2群間で有意に異なるという結果が得られた。これらの組み合わせでOAの進行症例と非進行例を区別できるかについては次年度に検体の計測が全項目について終了してから検討を行う予定である。またマーカーのOA関節における発現の検討も、次年度に有用なマーカーが確認された後に行う予定である。

D. 考察

本研究では1) 大規模地域住民コホートに対する関節マーカーによるOAの病態評価と発症予知（早期診断）、2) 既発症OA患者を対象とした新規の関節マーカーの開発と検証（既存マーカーの効率的組み合わせと病態との相関を含む）を柱としている。地域コホートについては概ね3年間におけるOA発症、重症化を経時的に検討し、計画的に複数のマーカー測定を順次行い3年終了時に発症予知が可能か否かを明らかにする。総計約1600名にのぼる大規模住民コホートに対し複数の関節マーカーを応用した研究は国内外とも報告がない。OAの病態を反映する新規マーカーによる重症化予知と並んで本邦の人口構成を考慮した大規模住民コホートにおけるOA発症予知の意義は極めて大きい。平成22年度は大規模コホートに対して順次、2回目の直接検診が行われ、観察期間中のOA発症例や重症化例が検出される見込みであり、baseline時のマーカー

によるコホート内でのOA発症予知力が検証される。また身体活動性の指標となるWOMACや歩行能力等の因子解析を強化して生物学的マーカーとの相関性を解析することにより、介護指標となる運動能力との関連が解明できることが予想される。

新規マーカーについては軟骨変性に極めて特異性の高い糖鎖であるN-glycanによる解析、関節液中に浮遊する間葉系細胞に対する表面抗原・骨軟骨分化能に対する解析、プロテアーゼ分解によるII型コラーゲン断片アミノ酸配列を特異的に認識するC2Cなどの新規マーカーによる解析に着手している。N-glycanの分析についてはヒトOAの発症においてN型糖鎖が重要な機能を担っている可能性が示された。血清中においても同様のN型糖鎖変化が生じている可能性があり、これを証明することでN型糖鎖もしくは関連酵素がOAマーカーになりうる可能性がある。また、同定された糖鎖が同時に治療ターゲットになりうる可能性も示唆された。関節液中に存在する間葉幹細胞についての検討では、その数は関節軟骨の変性に応じて増加することが示された。間葉幹細胞は軟骨分化能を有し、組織障害部位に接着する。今回の結果は関節液中の間葉幹細胞が軟骨変性を自己修復する機構の存在を示唆する。関節液から間葉幹細胞を解析することにより、その自然経過を予測することができるかが今後の検討課題である。新規II型コラーゲン由来フラグメントであるC2Cについては、6年にわたる運動教室参加を継続しているグループ33名への調査経過から本研究における運動介入による生活習慣病に対する予防効果は明らかである。このグループにおける軟骨、関節機能評価の経時的増悪傾向がなければ、この運動習慣は適切なものと考えられた。さらに運動

習慣を有しないグループと比較することにより、軟骨、関節機能の増悪に対するリスク因子（体重増加など）についても検討することが可能と考えられる。複数の既知マーカーの組み合わせによる進行予知については本年度に得られた結果のみでもOA症例と高齢対照群を高い精度で見出せるマーカーの組み合わせが見出された。次年度は検体の解析をさらに進め、OAの進行例と非進行例の間で有意の差がある因子を特定し、それらの組み合わせによってOAの進行例が識別可能かを明らかにする予定である。また次年度はこれらのマーカーについてOA軟骨と滑膜における発現を検討し、マーカーの測定値がOAの重症度、あるいは進行速度と関連して変化する機序を明らかにすることも予定する。

OAに関する他の研究（画像、バイオメカ、疫学）などとの乗り入れについては、画像に関する長寿科学研究グループに属している島根大学医学部整形外科内尾教授のもとで3テスラMRIを用いたOAの画像診断症例の検体を本研究班（藤田保健衛生大学整形外科）で測定したり、膝X線画像をコンピューターを用いたCOACADによって病期判定し、マーカー計測結果と対比するなどの共同体制が整えられつつあり、画像診断グループとの共同研究が行われている。また、分担研究者間の共同研究についても、東京大学のグループが管理するコホートの一部を使用して名古屋大学が新規のC2Cマーカーを測定する計画が実行されつつある。これらの相互乗り入れ研究、班内での共同研究は単独では得られないマーカー研究における新知見、新発展を生む母床となるものと期待されている。

E. 結論

1. 本邦における大規模コホートを使用した研究結果は関節マーカーが膝OAの病態評価に有用であることを明らかに示した。

2. ヒトOA軟骨中でN型糖鎖構造は変化しており、マウスOAモデルによりこの変化がOA発症のメカニズムに深く関与している可能性が示された。

3. 新規II型コラーゲン由来フラグメントであるC2Cについては、6年にわたる運動教室参加を継続しているグループ33名への調査経過から関節マーカーの意義を検証するとともに、このグループの運動習慣の関節に対する影響を検証することができた。データ集積が順次開始され次年度内にベースラインサンプルの集積が可能となった。

4. 関節軟骨の変性に伴い、関節液中の間葉幹細胞は増加した。変形性膝関節症においても、関節液中の間葉幹細胞は滑膜由来のものに類似した。

5. 既知の複数のバイオマーカーの組み合わせによるOAの病態指数の確立を目指してOA症例のフォローアップを開始して検体と臨床情報を集積し、検体の解析を進めた。解析中途の段階でOA症例と同等の年齢の健康対照者を高い確度で区別しうるマーカーの組み合わせが見出された。OAの進行を予想するマーカーの組み合わせについては次年度の検討課題である。

F. 健康危険情報

本研究のなかには積極的な介入を伴う臨床研究はない。当該研究期間中に研究対象者への健康危険に関する情報、報告はない

G. 研究発表

1. 論文発表

a) 雑誌 (原著)

1. 森田充浩 山田治基 伊達秀樹 OAの関節軟骨変性の評価：バイオマーカー
メディカルビュー社 東京 THE BONE
23:49 2009
2. 森田充浩 山田治基 伊達秀樹 変形性関節症の生物学的マーカー 黒沢尚
運動器慢性疾患に対する運動療法 金原出版株式会社 東京 56-61 2009
3. 森田充浩 山田治基 変形性関節症(OA)の病理, 病態 関節外科-基礎と臨床-
メディカルビュー社 東京 28:29-33 2009
4. 森田充浩 山田治基 伊達秀樹 吉村典子 変形性関節症の関節マーカー
医薬ジャーナル社 大阪
Clinical Calcium 2009 34-39 2009
5. 山田治基 森田充浩 伊達秀樹 変形性関節症に対するサプリメントの位置付けについて-患者および整形外科医に対するアンケート調査から-
関節の外科36:113-120 2009
6. 山田治基 森田充浩 伊達秀樹 血液・尿化学検査免疫学的検査 -その数値をどう読むか-第7版(1) II 生化学的検査[1] E. 糖質・糖代謝関係 アグリカン, グリコサミノグリカン(GAG) 日本臨床67
巻増刊号8別冊 735-737 2009
7. 森田充浩 山田治基 骨・関節疾患77
のための解剖生理 南山堂東京薬局 2010年3月増刊号・病気と薬 パーフェクトBOOK2010 1090-1092 2010
8. 山田治基 森田充浩 伊達秀樹 関節症の診断、評価における生化学マーカー

一の有用性 老年医学
48:369-371 2010

9. 森田充浩 山田治基 特集 リウマチ性疾患における骨・軟骨病変と治療 変形性関節症における関節マーカーと臨床応用 リウマチ科
43:(in printing) 2010
10. Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Mabuchi A, Kinoshita H, Yoshida M, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T: Epidemiology of lumbar osteoporosis and osteoarthritis and their causal relationship - Is osteoarthritis a predictor for osteoporosis, or vice-versa?: The Miyama Study, *Osteoporos Int* 20, 999-1008, 2009
11. Muraki S, Akune T, Oka H, Mabuchi A, Akune T, En-yo Y, Yoshida M, Saika A, Nakamura K, Kawaguchi H, Yoshimura N: Association of occupational activity with radiographic knee osteoarthritis and lumbar spondylosis in the elderly of population-based cohorts: the ROAD study. *Arthritis Care & Research (Arthritis Rheum)* 61:779-786, 2009
12. Muraki S, Oka H, Mabuchi A, Akune T, En-yo Y, Yoshida M, Saika A, Suzuki T, Yoshida H, Ishibashi H, Yamamoto S, Nakamura K, Kawaguchi H, Yoshimura N: Prevalence of radiographic lumbar spondylosis and its association with low back pain in the elderly of population-based cohorts: the ROAD study. *Ann Rheum Dis* 68, 1401-1406, 2009
13. Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Mabuchi A, En-yo Y, Yoshida M, Saika A, Suzuki T, Yoshida H, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T: Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis and osteoporosis in Japanese men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. *J Bone Miner Metab* 27, 620-628, 2009
14. Oka H, Akune T, Muraki S, Mabuchi A, En-yo Y, Yoshida M, Saika A, Saiki S, Nakamura K, Kawaguchi H, Yoshimura N: Low dietary vitamin K intake is associated with radiographic knee osteoarthritis in the Japanese elderly: Dietary survey in a population-based cohort of the ROAD study. *J Orthopaedic Science* 14, 687-692, 2009
15. Muraki S, Oka H, Mabuchi A, Akune T, En-yo Y, Yoshida M, Saika A, Suzuki T, Yoshida H, Ishibashi H, Yamamoto S, Nakamura K, Kawaguchi H, Yoshimura N: Prevalence of radiographic knee osteoarthritis and its association with knee pain in the elderly of Japanese population-based cohorts: the ROAD (research on osteoarthritis against disability) study. *Osteoarthritis Cartilage* 17, 1137-1143, 2009
16. Muraki S, Akune T, Oka H, Mabuchi A, En-yo Y, Yoshida M, Saika A, Suzuki T, Yoshida H, Ishibashi H, Tokimura F, Yamamoto S, Nakamura K,

- Kawaguchi H, Yoshimura N: Health-related quality of life with vertebral fracture, lumbar spondylosis and knee osteoarthritis in Japanese men: The ROAD Study. Archives Osteoporos, in press
17. Masayo Kojima, Toshihisa Kojima, Naoki Ishiguro, Takeshi Oguchi, Michinari Oba, Hiroki Tsuchiya, Fumiaki Sugiyura, Toshiaki A Furukawa, Sadao Suzuki, Shinkan Tokudome. Psychosocial factors, disease status, and quality of life in patients with rheumatoid arthritis. Journal of Psychosomatic Research. 67(5):425-31, 2009
 18. Yuji Hirano, Toshihisa Kojima, Yasuhide Kanayama, Hisato Ishikawa, Naoki Ishiguro. A case of lung tuberculosis in a patient with rheumatoid arthritis treated with infliximab after anti-tuberculosis chemotherapy with isoniazid. Modern Rheumatology. 19(3):323-8, 2009
 19. T Kojima, M Kojima, K Noda, N Ishiguro, AR Poole. Influences of menopause, aging, and gender on the cleavage of type II collagen in cartilage in relationship to bone turnover. Menopause 15:133-137, 2008
 20. Y Hirano, N Ishiguro, M Sokabe, M Takigawa, K Naruse. Effects of tensile and compressive strains on response of a chondrocytic cell line embedded in type I collagen gel. J Biotechnol 133:245-252, 2008
 21. J Wasa, Y Nishida, Y Suzuki, S Tsukushi, Y Shido, K Hosono, Y Shimoyama, S Nakamura, N Ishiguro. Differential expression of angiogenic factors in peripheral nerve sheath tumors. Clin Exp Metastasis 25:819-825, 2008
 22. 石黒直樹. 《特集／関節リウマチの新しい治療方針》Ⅱ関節リウマチの最新薬物療法と理学療法 1. 薬物療法の基本原則と効果判定法. 整形外科. 59:870-875, 2008
 23. 石黒直樹. リウマチ性疾患. 整形外科 59:740-747, 2008
 24. 石黒直樹、小嶋俊久、杉浦文昭、土屋廣起、石川尚人. 関節リウマチ治療の新展開. 日本整形外科学会雑誌. 82:224-229, 2008
 25. Nobunori Takahashi, Toshihisa Kojima, H Ogawa, Naoki Ishiguro. Correlation between parathyroid hormone, bone alkaline phosphatase and N-terminal peptide of type I collagen in diabetic and non-diabetic haemodialysis patients. Nephrology. 12:539-545, 2007
 26. Koshima H, Kondo S, Mishima S, Choi HR, Shimpo H, Sakai T, Ishiguro N: Expression of interleukin-1beta, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2 in a rotator cuff tear in rabbits. J Orthop Res. 25:92-97, 2007
 27. H Kitoh, T Kitakoji, H Tsuchiya, M Katoh, N Ishiguro. Transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma in distraction osteogenesis of the long

- bones. *Bone* 40:522-528, 2007
28. Ichinose S, Muneta T, Koga H, Segawa Y, Tagami M, Tsuji K, Sekiya I. Morphological differences during in vitro chondrogenesis of bone marrow-, synovium-MSCs, and chondrocytes Laboratory Investigation 2009
 29. Tohyama H, Yasuda K, Minami A, Majima T, Iwasaki N, Muneta T, Sekiya I, Yagishita K, Takahashi S, Kurokouchi K, Uchio Y, Iwasa J, Deie M, Adachi N, Sugawara K, Ochi M. Atelocollagen-associated autologous chondrocyte implantation for the repair of chondral defects of the knee: a prospective multicenter clinical trial in Japan. *J Orthop Sci.* 2009 Sep;14(5):579-88.
 30. Sekiya I, Tang T, Hayashi M, Morito T, Ju YJ, Mochizuki T, Muneta T. Periodic knee injections of BMP-7 delay cartilage degeneration induced by excessive running in rats. *J Orthop Res.* 2009
 31. Yamazaki J, Muneta T, Ju YJ, Sekiya I. Differences in kinematics of single leg squatting between anterior cruciate ligament-injured patients and healthy controls. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2009
 32. Horie M, Sekiya I, Muneta T, Ichinose S, Matsumoto K, Saito H, Murakami T, Kobayashi E. Intra-articular Injected synovial stem cells differentiate into meniscal cells directly and promote meniscal regeneration without mobilization to distant organs in rat massive meniscal defect. *Stem Cells.* 2009 Apr;27(4):878-87.
 33. Koga H, Engebretsen L, Brinchmann JE, Muneta T, Sekiya I. Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2009 Mar 31.
 34. Horie M, Sekiya I, Nakamura T, Tanaka H, Maekawa K, Muneta T, Kobayashi E. In vivo pharmacokinetics of ketoprofen after patch application in the Mexican hairless pig *Biopharmaceutics & Drug Disposition* (in press)
 35. Ezura Y, Sekiya I, Koga H, Muneta T, Noda M. Methylation status of CpG-islands in the promoter regions of signature genes during chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells *Arthritis Rheum.* 2009
 36. Mochizuki T, Sugaya H, Uomizu M, Maeda K, Matsuki K, Sekiya I, Muneta T, Akita K. Humeral insertion of the supraspinatus and infraspinatus. New anatomical findings regarding the footprint of the rotator cuff. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am.* 2009 Mar 1;91 Suppl 2 Pt 1:1-7.
 37. 岩崎倫政、他：糖鎖による軟骨細胞機能制御の可能性—軟骨変性に伴うN-結合型糖鎖の変化より—。遺伝子医学MOO

- K別冊. p55-59, 2009
38. Fukui N, Ikeda Y, Tanaka N. The Use of Laser Capture Microdissection on Adult Human Articular Cartilage for Gene Expression Analysis. In. Laser Microdissection: Methods and Protocols, Second Edition. Graeme I Murray (ed). Springer Verlag (in press).
 39. Ishida S, Yamane S, Fukui N, et al. (13名中10番目) The interaction of monocytes with rheumatoid synovial cells is a key step in LIGHT-mediated inflammatory bone destruction. *Immunology* 128(1 Suppl): e315-24.
 40. Hikita A, Tanaka N, Fukui N, et al. (10名中ラスト) Involvement of a disintegrin and metalloproteinase 10 and 17 in shedding of tumor necrosis factor- α . *Biochemistry and Cell Biology* 2009;87(4):581-93.
 41. Mitomi H, Fukui N, Tanaka N, et al. (7名中2番目) Aberrant p16(INK4a) methylation is a frequent event in colorectal cancers: prognostic value and relation to mRNA expression and immunoreactivity. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2010;136(2):323-31.
 42. Fukui S, Ogawa K, Ohtsuka M, Fukui N. Effect of communication skills training on nurses' detection of patients' distress and related factors after cancer diagnosis: a randomized study. *Psychooncology*. 2009;18(11):1156-64.
 43. Nakajima M, Takahashi A, Fukui N, et al. (18名中10番目) New sequence variants in HLA class II/III region associated with susceptibility to knee osteoarthritis identified by genome-wide association study. *PLoS One*. 2010;5(3):e9723.
 44. 福井尚志. I. 身体活動の基礎 身体活動と筋骨格系. 身体活動・運動と生活習慣病 運動生理学と最新の予防・治療 2009;67:42-7.
2. 学会発表
 - a) 国際学会等
 1. M Morita, H Yamada, N Yoshimura, H Date, H Oka, S Muraki, T Akune, H Kawaguchi, K Nakamura, Evaluation of the usefulness of biomarkers in knee osteoarthritis or lumbar spondylosis in mass cohort study of Japan 2009 OA Biomarkers Global Initiative Meeting (Bethesda, USA) 2009. 4. 23-25
 2. Hiroshi Kitoh, Motoaki Kawasumi, Naoki Ishiguro. Distraction osteogenesis of the lower limbs with transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma. 54 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2008. 3. 2-3. 5, San Francisco (USA)
 3. Hiroshi Kitoh, Naoki Ishiguro. Transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma during distraction osteogenesis-clinical and experimental study

dy-. 15 Triennial Congress of Asia Pacific Orthopaedic Association. 2007. 9. 9-9. 13, Seoul (Korea)

4. Masayo Kojima, Toshihisa Kojima, Naoki Ishiguro, Takeshi Oguchi, Michinari Oba, Hiroki Tsuchiya, Fumiki Sugiura, Shinkan Tokudome. Psychological factors and disease status in rheumatoid arthritis patients. 19 World Congress on Psychosomatic Medicine. 2007. 8. 26-8. 31, Quebec (Canada)

b) 国内学会、学術講演、シンポジウム等

1. 森田充浩 山田治基 吉村典子 伊達秀樹 岡敬之 村木重之 阿久根徹 川口浩 中村耕三 地域住民コホートにおける変形性膝関節症および腰部変形性脊椎症の病期と生物学的マーカーとの関係 第22回日本軟骨代謝学会 (名古屋) 2009. 3. 6-7
2. 森田充浩 山田治基 吉村典子 伊達秀樹 岡敬之 村木重之 阿久根徹 川口浩 中村耕三 地域住民コホートにおける変形性膝関節症の病期と生物学的マーカーとの関係 第14回日本関節症研究会学術集会 (横浜) 2009. 5. 23
3. 森田充浩 山田治基 吉村典子 伊達秀樹 岡敬之 村木重之 阿久根徹 川口浩 中村耕三 地域住民コホートにおける変形性膝関節症および腰部変形性脊椎症の病期と生物学的マーカーとの関係 -第2報- 第23回日本軟骨代謝学会 (鹿児島) 2010. 4. 2-3
4. 森田充浩 山田治基 関節リウマチに対する生物学的製剤の使用経験 -4製剤使用の観点から- 第114回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会 (名古屋) 2010. 4. 9-10
5. 山田治基 森田充浩 伊達秀樹 吉村典子 岡敬之 阿久根徹 村木重之 馬淵昭彦 川口浩 中村耕三 関節マーカーによる変形性関節症の診断、評価 第82回日本整形外科学会学術集会 (福岡) 2009. 5. 15
6. 伊達秀樹 山田治基 森田充浩 金治有彦 安藤謙一 田島香里 増田広之 変形性股関節症における血清COMP・HA値の検討 第14回日本関節症研究会学術集会 (横浜) 2009. 5. 23
7. 伊達秀樹 山田治基 森田充浩 金治有彦 早川和恵 田島香里 増田広之 血清COMP・HAによる変形性膝関節症の病態評価とOA進行予知 第37回日本関節病学会 (横浜) 2009. 11. 19-20
8. 平野裕司、小嶋俊久、金山康秀、塩浦朋根、林真利、石黒直樹. 呼吸器に問題をもつ関節リウマチ患者に対するタクロリムス投与の効果と安全性 第53回日本リウマチ学会 2009. 4. 23-4. 26 (東京)
9. 石黒直樹、小嶋俊久、Poole Robin. 変形性関節症の病態と治療: 治療法のupdate to date. 第82回日本整形外科学会学術総会. 2009. 5. 14-5. 17 (福岡)
10. 石黒直樹、小嶋俊久、Robin Poole: The relationship between the cleavage of type II collagen by collagenase and cartilage destruction in osteoarthritis 第52回日本リウマチ学会 2008. 4. 20-4. 23 (札幌)