

201025008A

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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山田 治基

平成 23 (2011) 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国際保健学専攻 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 整形外科	教授
	宗田 大	東京医科歯科大学 大学院 運動器外科学	教授
	岩崎倫政	北海道大学大学院医学研究科整形外科学分野	准教授
	福井尚志	独) 国立病院機構相模原病院 臨床研究 センター長	研究部長
	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

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腰椎症との関連	38
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)	
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	41
研究分担者 石黒直樹 (名古屋大学大学院医学系研究科 整形外科 教授)	
3. 関節液中間葉幹細胞による解析	44
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. 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	47
研究分担者 岩崎 倫政 (北海道大学大学院医学研究科整形外科学分野准教授)	
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	49
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)	
6. 一般住民における血漿ペントシジン濃度と変形性膝関節症との関連	53
研究分担者 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)	
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)	
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)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	63
IV. 研究成果の刊行物・別刷	73

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
平成22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 教授

研究協力者 森田 充浩 藤田保健衛生大学 講師

研究協力者 伊達 秀樹 藤田保健衛生大学 助教

研究要旨

変形性関節症(osteoarthritis, OA)は運動器疾患の中で最も患者数が多い疾患であり、本邦の医療経済に与える影響も極めて大きい。OAは最近の厚生労働省の調査でも要介護となる原因疾患として21.5%を占め、骨折・転倒などとともに上位にあり、将来の要介護者を減少させるためにその対処が望まれる。OAの病態は初発病変である関節軟骨の変性・破壊を基盤とし、軟骨・骨の修復性変化である骨棘形成、関節腔内に放出された骨・軟骨デブリスによる軽度の二次的滑膜炎も加わる。円滑な可動性とともに関節の機能において関節軟骨は最も重要な組織である。単純X線、magnetic resonance imaging(MRI)などの画像を用いて関節軟骨の状態を評価することが一般的であるが、その感度や定量性および費用、侵襲性の点での問題が解決されていない。

関節軟骨、滑膜、軟骨下骨などの関節構成体の代謝を反映する分子である生物学的マーカーの測定は関節疾患における病態評価手法として有用であり、画像では得られない情報を得られる利点がある。マーカーの測定には関節液、血清および尿が用いられるがそれぞれ利点と欠点をもつ。関節液は目標とする関節における構成組織の代謝を正確に反映するが、侵襲的な関節穿刺を必要とし、かつ採取が困難な場合もある。血清や尿を用いた測定は目標とする関節以外の全身の諸関節の影響やマーカー分子が血中に移行した後の代謝による修飾を受けるといった欠点をもつが、採取が容易であるという大きな利点がある。膨大なOAの患者数を考慮し、汎用性という点を考慮し採取の容易な血清や尿中のマーカー測定が主流になりつつある。生物学的マーカーに現在、期待されているのは、単なる病態評価能力ではなく将来の進行予知、さらには抗OA薬の薬効評価などにおける実践的な応用である。いったん変性した軟骨を修復することは現在の医学でも極めて困難であること、OAの総患者数はその定義にもよるが、我が国では2000万人にものぼると考えられていることから、その発症の可能性の高いグループを病初期から簡易な手法で同定することは極めて重要であり、生物学的マーカーの果たす役割が期待されている。

本研究の目的は将来、要介護となる末期OA患者を減少させるためOAを発症、重症化するpopulationを特異的なマーカーにより早期に選別することにある。一旦、破壊された軟骨を再生する事は困難である現状を勘案すると、末期に至る症例をいかに鑑別し集約的治療を行うかが膝痛による要介護者を減少させるために不可欠である。本研究では、1) 大規模地域住民コホートに対してII型コラーゲンの特異的な分解産物であるCTX-II (cross-linked type II collagen C-telopeptide)、マイナー蛋白であるCOMP (cartilage oligomeric matrix protein) 等のマーカーによるOA発症予知(早期診断)、2) 既発症OA患者を対象として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、複数の軟骨マーカーを統計的手法を用いて効率的に組み合わせる手法、などによるOA重症化予知の2方面からマーカーを検証する。

地域コホートについては3年間に計画的にマーカー測定を行い、平成22年度は最終年度としてのマーカー測定を行った。マーカー種は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な分解産物であるCTX-II (cross-linked type II collagen C-telopeptide)、同じくI型コラーゲンの特異的な分解産物である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

山村コホートの膝OAの有病率は59.7% (58.7~60.7%)、腰変形性脊椎症(SP)の有病率は62.8%であったのに対し、漁村コホートの膝OAの有病率は29.0% (28.5~29.4%)、腰SPの有病率は61.5%であった。H20年から3年計画で測定した各種マーカーとX線病期との関係を検討した結果、血清COMP、尿CTX-II、血清HAはK-Lグレードによる膝OA病期と正の相関を示した。一方、血清MMP-3は末期、CP-IIは初期、尿CTX-Iは中期で高い傾向を示した。一方腰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の変動を認めた。6m歩行所要時間とK-Lグレードには正の相関を認めた。また6m歩行所要時間と関節マーカーの間には血清HA、尿CTX-II、血清COMPにおいて弱いながら相関を認めた。以上から、大規模住民コホートにおいて血清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。大規模コホートに関しては現時点で第二回目のfollow-up調査が終了し、今後、OAの発症、重症化例とベースライン時のマーカーとの関係が順次、明かとなってくると予想されるので今後も継続的な観察が必要である。

A. 研究目的

変形性関節症（OA）は関節軟骨の消失と関節炎症により疼痛の悪化と関節変形の増大をきたし、歩行能力の低下のみならず運動能力の低下からくる血液循環代謝機能の低下や肥満といったメタボリック症候群の誘因を招くなど、日常生活機能や生体維持機能を著しく低下させ、高齢者においては寝たきり状態に陥るなど、要介護人口を増加させる原因となっている。最近では変形性脊椎症と併せロコモティブ症候群と称して早期受診と治療対策に臨むよう啓蒙活動も行われている。OAは初期の段階から関節軟骨の障害をきたすのが特徴であるが、既存の画像検査ではその初期変化をリアルタイムに把握することは困難であり、関節構成体である軟骨や骨、滑膜の代謝状況を血液、尿、関節液などで直接計測し早期に異常を感知することが重要である。その際、測定ターゲットとなる標的分子を関節マーカーと称している。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最終目標としている。

B. 研究方法

本研究は以下の研究より構成される。

【大規模コホートについての研究】

- 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および血清清ヒアルロン酸値の年齢分布と変形性腰椎症（LS）との関連（馬淵）
- 2) 大規模住民コホートにおける血漿ペントシジン濃度と変形性膝関節症との関連（阿久根）
- 3) 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（山田）

【新規および既存マーカーの検証】

- 4) 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）
- 5) 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）
- 6) 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による早期発症の検知と進行予測に関する評価（宗田）
- 7) 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重症化の予測（福井）

（方法）

- 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および血清清ヒアルロン酸値の年齢分布と変形性腰椎症との関連

和歌山県の一漁村住民を対象として、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）。LSの診断は腰椎立位正面、側面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、最重症腰椎のKLグレードが 2以上をLSありとし、一般住民におけるX線上のLS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℃の冷凍庫で保管した。血清HA値はELISA法を用い、サンプルを一括で測定した。

（倫理面への配慮）

本研究は、「骨軟骨変性疾患の危険因子に関する研究」として平成17年11月28日東京大学医学部研究倫理審査委員会にて承認されている。また、本研究課題は、各種法律・政令・各省通達特に、疫学研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省告示第1号、平成17年一部改定）、臨床研究に関する倫理指針（平成16年厚生労働省告示第459号）および、東京大学医学部研究倫理審査委員会が定めた倫理規定を遵守して遂行した。研究遂行にあたり倫理面での問題はなかった。

1. 大規模住民コホートにおける血漿ペントシジン濃度と膝OAとの関連

山村部として和歌山県H町、漁村部として和歌山県T町を選び、各地域における1,690名の一般住民（男性596名、女性1,094名、平均年齢男性66.3歳、女性64.7歳）の参加を得て、膝の立位単純X線撮影および、生活習慣に関する問診票調査、運動機能調査、骨密度測定、血液・尿検査、整形外科医師による診察を行った（ベースライン調査）。

問診票は、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）転倒など約400項目からなる。

変形性膝関節症の診断は、立位正面単純X線像を整形外科医が読影し、Kellgren-Lawrence分類にてgrade 3以上のものを変形性膝関節症ありと診断した。また、膝レントゲン画像自動測定プログラムを使用して、変形性膝関節症の指標値として、内側膝関節裂隙幅最小値、内側膝関節裂隙面積、外側膝関節裂隙幅最小値、外側膝関節裂隙面積、脛骨内側骨棘面積を計測した。血漿ペントシジン濃度は、FSK pentosidine ELISA kit（伏見製薬所）を用いて測定した。変形性膝関節症の有無および各指標値と血漿ペントシジン濃度との関連を、ロジスティック回帰分析により検討した。

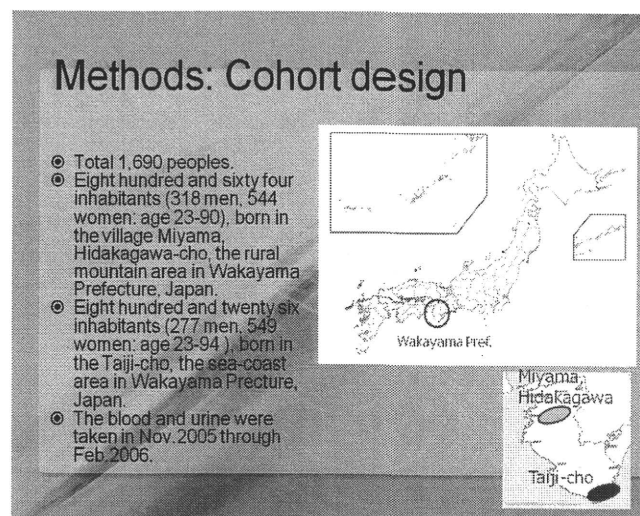
（倫理面への配慮）

本研究は、「骨軟骨変性疾患の危険因子に関する研究」として平成17年11月28日東京大学医学部研究倫理審査委員会にて承認されている。また、本研究課題は、各種法律・政令・各省通達特に、疫学研究に関する倫理指針（平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号）、臨床研究に関する倫理指針（平成20年厚生労働省告示第415号）および、東京大学医学部研究倫理審査委員会が定めた倫理規定を遵守して遂行した。研究遂行にあたり倫理面での問題はなかった。

2. 大規模コホートにおける各種マーカーの測定と臨床症状との相関評価 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) および次年度調査検討した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)の計1,690名のデータを総括し、統計的手法を用いて検討した(図1)。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線上の変性性膝関節症、変形性脊椎症の有病率を推定した。最終年度の研究対象であるコホート全住民1,690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。

(図1) コホートデザイン



4) 糖鎖のN-glycanを用いた検証

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する。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う。

(倫理面への配慮)

学内の倫理委員会の承認のもとに研究を施行した。

5) C2Cによる初期病態の把握

1: 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は、運動教室へ参加したが現在参加継続していない22名を調査の対象とした。調査項目は以下の項目である。2群間の比較を行い、運動教室参加の継続群では1年間での変化についても検討した。

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)の推移と現在のBMI, Total HDL LDL cholesterol, 中性脂肪、HbA1cの測定の比較。

2) 膝立位レントゲン撮影 (コンピュータ画像診断ソフトKOACAD によるデジタルデータの解析: 関節裂隙の測定など)

3) 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

2: 新規骨軟骨マーカーとしてカテプシンKによるコラーゲン分解産物の意義を検討については健常人140名(男69名 女性71名)について尿中のコラゲナーゼによるII型コラーゲン分解産物(C2C)、カテプシンKによるコラーゲン分解産物(C1, 2K)を測定、年齢、性別、閉経との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

実施施設において研究の倫理性について審査された。運動療法介入は継続的にすでにされているグループについての観察研究である。また、健常人のサンプルも任意の検診時に協力を依頼したものである。個人情報についても厳重に管理されている。

6) 関節液中の間葉幹細胞の解析

変形性膝関節症に対して人工膝関節置換術を施行時に関節液、滑膜、骨髓液を採取した。それぞれの細胞成分を14日間培養し、コロニー形成細胞をまとめて回収し、下記の4点に着目して解析した。

①細胞の形態

②マイクロアレイによる遺伝子プロファイルのクラスター解析(n=1)

③骨髓間葉幹細胞と比較し、滑膜間葉幹細胞と関節液間葉幹細胞での発現が高い遺伝子の抽出

④定量RT-PCRで確認(n=4)

(倫理面への配慮)

関節液、滑膜、骨髓液は人工膝関節置換術時に麻酔下にて採取した。本研究を施行するにあたり、本学の倫理委員会に承認を得

た。

7) 既存マーカーの効率的組み合わせと病態との相関

保存的な治療を受けた膝関節OAの症例43例を2年間にわたってフォローし、6ヶ月ごとに血液(血清、血漿)、尿、画像(片脚立位、膝伸展位と膝関節軽度屈曲位での単純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。

またこの対照として比較的若年の健常者群(若年対照群: 29例、平均53.7歳)、およびOA症例と同等の年齢の健常者群(高齢対照群: 30例、平均69.8歳)の二群を設けてそれぞれの被験者から血液と尿を単回採取した。これらの検体において以下に示す合計19項目(血液15項目、尿4項目)の既知マーカーをLuminexあるいは市販および自家作製のELISAキットにより行った。

□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)、CIANP (N-terminal propeptide of type IIA collagen)、YKL-40、高感度CRP、アグリカン*、ケラタン硫酸*、PGE2、CS846

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

(注: *の2項目については血液、尿の両方で測定。また尿中のマーカーについては尿中クレアチニン濃度で標準化した。)

本研究では解析を(1)健常者とOAの各グレードの識別に有用なバイオマーカーの組み合わせ(2)OA症例におけるレントゲン上の進行を示すバイオマーカーの組み合わせ、の

2通りの方向で行った。いずれの解析においてもROC (Receiver Operating Characteristic) 解析を行ってOAの病態または進行と関連する2~4個の因子の組み合わせを見出し、これらによる病態の評価法を確立した。本年度はまたフォローアップの際に得たデータから、保存的に治療された膝OA症例について臨床症状とレントゲン上のOA変化の進行の関連も検討した。

研究への参加に際しては患者本人に対して研究の目的、研究参加に伴う利益・不利益、得られた個人情報の保護など必要な情報を十分説明した上で、研究参加への同意を書面により得て行った。検体の解析は連結可能な形で匿名化して行い、個人情報は別に情報管理者を設定して管理した。

C. 研究結果

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および血清清ヒアルロン酸値の年齢分布と変形性腰椎症との関連

漁村において総数826人（男性277人、女性549人）が検診に参加し、膝X線撮影および血清HA値を測定した。

参加者の身体特性を（表1）に示す。

次にこの集団において血中HA濃度の平均値をみると、82.4（標準偏差77.2）ng/mLとなり、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。

LSのKLグレード別の血中HA濃度をみると、KL0, 1群では61.1ng/mLであるのに対して、KL2, 3, 4ではそれぞれ89.4、89.9、111.2ng/mLとなり、KLグレード0, 1群に対してKL2-4グレード群では有意にHA値が高いことがわかった（ $p < 0.01$ ）。

表1. 検診参加者の身体特性

	男性	女性
年齢 [歳]	62.6 (13.2)	60.8 (12.5)
身長 [cm]	165.8 (6.8)	153.2 (6.2)
体重 [Kg]	64.8 (11.0)	53.5 (8.8)
BMI [Kg/m ²]	23.5 (3.4)	22.8 (3.6)
喫煙率[%]	31.1	2.9
飲酒率[%]	63.2	24.2

BMI: body mass index

平均値（標準偏差）

この集団の腰椎X線でKL2以上となるLSの割合は男性で76.9%、女性で55.5%であり、女性に有意に高かった（ $p < 0.001$ ）。ここでLSの有無を目的変数とし、血清HA値を説明変数とし、性、年齢、体格指数（body mass index; Kg/m²）を調整したロジスティック回帰分析では、血清HA値はLSの有無と有意な関連をみとめなかった（HAの1ng/mLの上昇に対するオッズ比1.001、95%信頼区間0.998-1.003、 $p = 0.686$ ）

2) 大規模住民コホートにおける血漿ペントシジン濃度と変形性膝関節症との関連

参加者の身体特性を表に示す（表2）。平均年齢は男性66.3歳、女性64.7歳となっており、男性に有意に高い傾向にあった（ $p < 0.01$ ）。また身長も体重も男性の方が高く、体格指数も男性の方に高い傾向にあった（ $p < 0.05$ ）。地域別にみると、漁村の参加者の方が山村の参加者より年齢が若いことから、身長も体重も高い傾向にあったが（いずれも $p < 0.001$ ）、体格指数は地域による差を認めなかった。

表 2. コホート調査参加者の身体特性

	男性		女性	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
年齢 (歳)	66.3	11.7	64.7	12.1
身長 (cm)	163.4	7.2	150.7	6.9
体重 (kg)	62.2	10.9	52.0	8.8
体格指数 (kg/m ²)	23.2	3.2	22.9	3.5

表 3. 血漿ペントシジン濃度および膝レントゲン

	平均値	男性	女性	
		標準偏差	平均値	標準偏差
血漿ペントシジン濃度 (microg/ml)	0.064	0.062	0.057	0.031
内側最小関節裂隙 (mm)	3.00	1.02	2.47	1.04
内側関節裂隙面積 (mm ²)	104.2	32.5	82.3	31.3
外側最小関節裂隙 (mm)	4.32	1.12	3.76	1.16
外側関節裂隙面積 (mm ²)	130.8	31.5	101.7	28.9
骨棘面積 (mm ²)	1.91	5.29	4.74	10.2

次に男女それぞれにおける血漿ペントシジン値と膝指標値を測定したところ表3の通りとなった。血漿ペントシジン濃度は男性のほうが高く、膝の各指標値も男性のほうが高値を示したが、骨棘面積は女性のほうが高値であった。変形性膝関節症 (KL)≥3の有無を目的変数とし、ペントシジン値を説明変数として年齢、性、体格指数の交絡要因を調整したロジスティック回帰分析をおこなったところ、ペントシジン値は変形性膝関節症の有無と有意な関連を示し (p<0.05)、ペントシジン濃度が1標準偏差高くなると変形性膝関節症が1.2倍多いことが明らかとなった。同様に膝の指標とも有意な関連を示し

(p<0.05)、ペントシジン濃度が1標準偏差高くなると変形性膝関節症が1.2倍多いことが明らかとなった。

3) 大規模コホート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、両コホートを統括した膝OAの有病率は44.7% (44.0~45.4%)、SPの有病率は62.2%であった (図2)。コホ

ートについてK-Lグレードと各関節症マーカーとの関係の代表例を示す(図3~8)。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、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と関節マーカー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ーの間には血清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つの地域を統括した大規模住民コホート全体において血清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。非常に精度の高い相関データが得られており、今後の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。

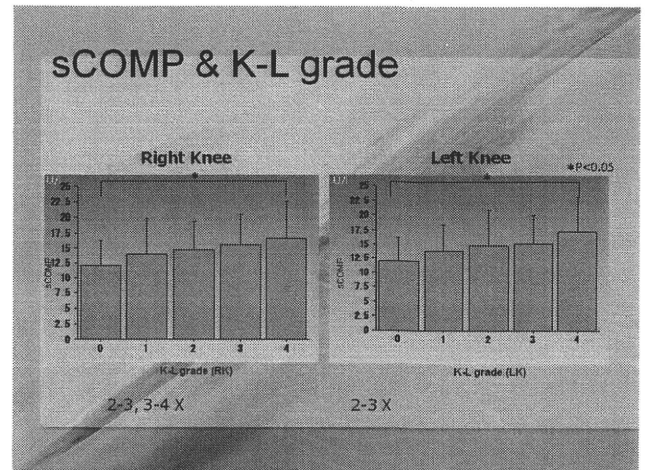
(図2) OAとSPの有病率

Results
Morbidity prevalence rate (MPR)
 • Knee OA : Miyama 58.7-60.7% SP : Miyama 62.8%
 Taiji 28.5-29.4% Taiji 61.5%

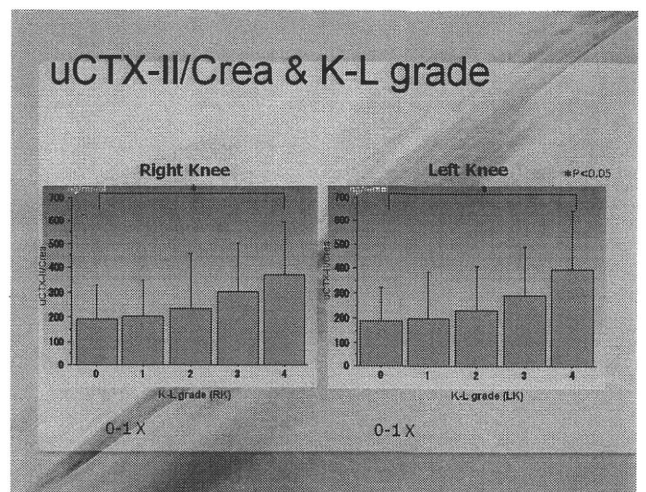
Knee OA and Spondylosis

	K-L Grade	0	1	2	3	4	MPR [%]
Miyama	Knee OA	77	279	359	97	50	58.7
	(R862/L862)	67	272	355	120	48	60.7
Miyama	SP (864)	39	282	275	166	102	62.8
Taiji	Knee OA	333	256	125	77	33	28.5
	(R824/L820)	310	269	126	82	33	29.4
Taiji	SP (826)	5	313	179	187	142	61.5
Total	Knee OA	410	535	484	174	83	44.0
	(R1686/L1682)	377	541	481	202	81	45.4
Total	SP (1690)	44	595	454	353	244	62.2

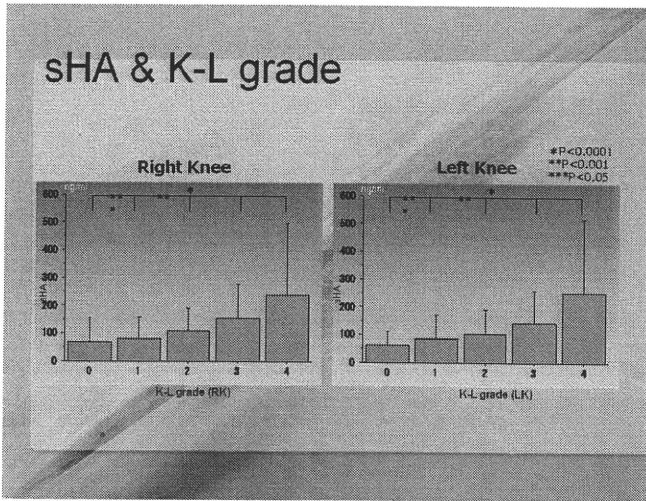
(図3) 血清COMPとK-Lグレードの関係



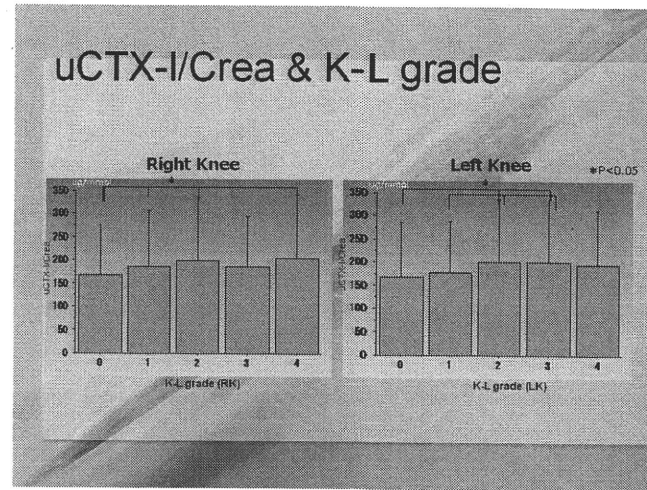
(図4) 尿CTX-IIとK-Lグレードの関係



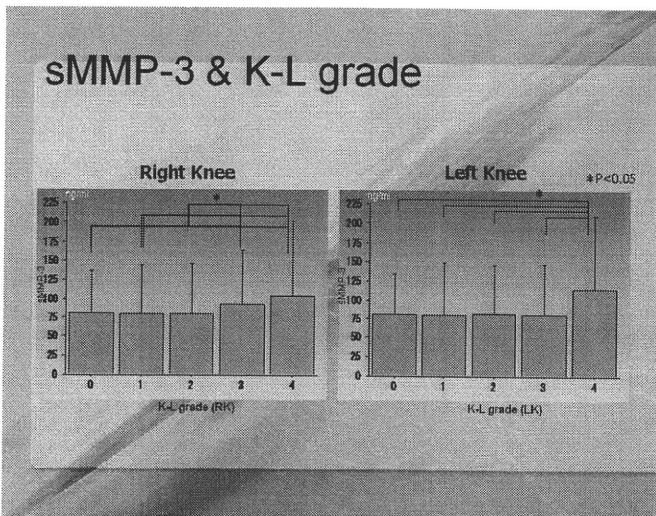
(図5) 血清HAとK-Lグレードの関係



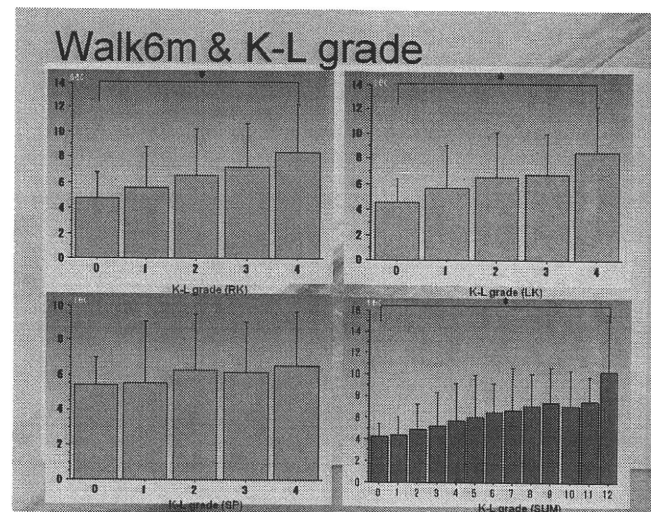
(図8) 尿CTX-IとK-Lグレードの関係



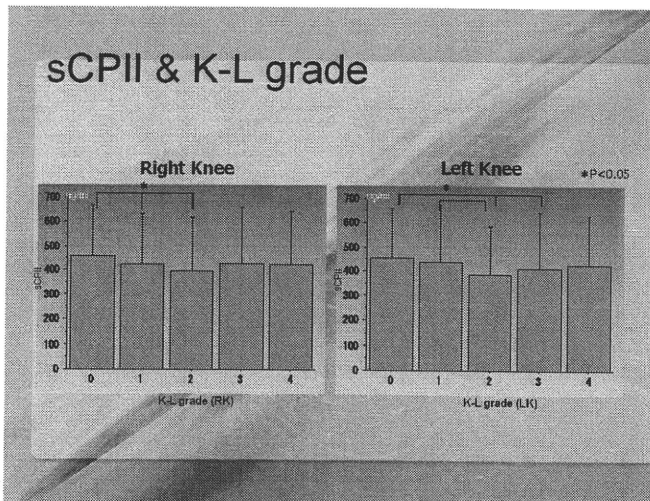
(図6) 血清MMP-3とK-Lグレードの関係



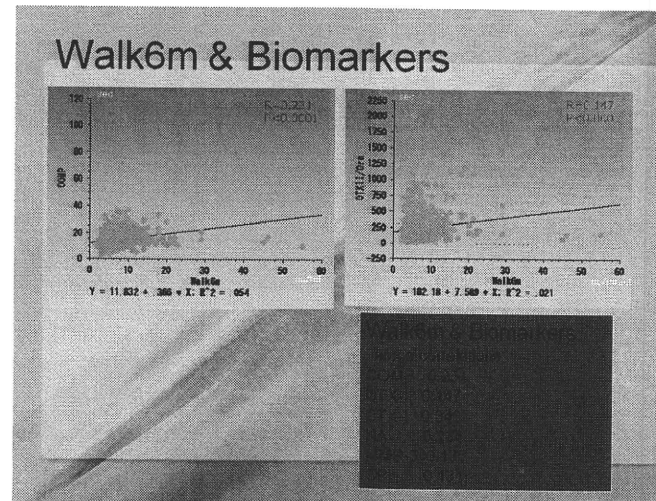
(図9) 6m歩行所要時間K-Lグレードの関係



(図7) 血清CPIIとK-Lグレードの関係



(図10) 6m歩行所要時間と関節マーカースの関係



4) 糖鎖のN-glycanを用いた検証

ヒトOA軟骨においてhigh-mannose型糖鎖が変化していることを明らかにした。OA血清中でも1部の糖鎖構造が変化していることを確認した。マウスOAモデルにおいて同定した糖鎖が軟骨におけるサイトカインやタンパク分解酵素の発現を制御していることが明らかになった。

5) C2Cによる初期病態の把握

1：今年度は、運動教室参加を継続していない22名を調査し、参加継続群33名と現在での比較を行った。ヘルスアップ事業による2年間の介入により55名で明らかに糖、脂質代謝マーカーの改善、BMIの改善が得られていたが、参加継続群は現在も運動教室参加時(2003年)より有意にBMI、脂質マーカーは改善、維持されていたが、非継続群ではBMI、中性脂肪では2003年と同等のレベルに戻っていることが確認された(図11)。

図11

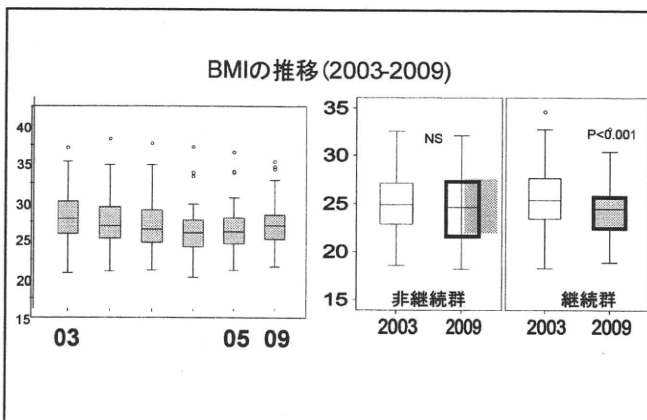


表4に示すようにKOACADの計測、WOMACから膝関節機能は参加継続群、非継続群で有意な差は認められなかった。

(表4)

膝 レントゲン計測 (KOACAD)と膝関節機能 (WOMAC)

	継続群		非継続群		p-value
	mean	SD	mean	SD	
KOACAD					
右					
最小幅(外側)	4.8	1.3	4.6	1.4	ns
最小幅(内側)	3.7	0.9	3.7	1.0	ns
FTA	178.1	3.3	177.7	4.0	ns
左					
最小幅(外側)	4.2	1.6	5.0	1.3	ns
最小幅(内側)	3.5	0.8	3.3	1.3	ns
FTA	177.6	3.2	176.5	4.0	ns
WOMAC					
pain	6.0	1.9	5.9	2.1	ns
stiffness	3.2	1.4	2.9	0.9	ns
physical function	19.8	5.2	20.3	5.2	ns

尿中、および血清中軟骨分解代謝マーカー(C2C)は参加群において有意に低かった。

2：男性においては尿中骨代謝マーカーNTxおよびC2C、C2Kは年齢による変動は認めなかった。女性においては、C2Cは閉経に伴い有意に低下していたが、NTxおよびC1、2Kは閉経により有意に上昇していた。

6) 関節液中の間葉幹細胞の解析

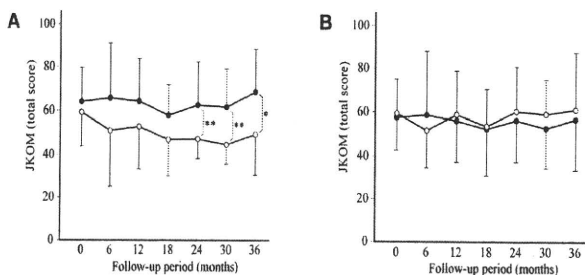
- ①関節液中の間葉幹細胞は骨髄間葉幹細胞よりも、細胞質が細く核が明確な点で、滑膜間葉幹細胞に形態が類似していた。
- ②関節液中の間葉幹細胞は骨髄液由来のものよりも滑膜由来のものに遺伝子プロファイルが類似した。
- ③滑膜/骨髄、関節液/骨髄の発現倍率変化が30以上で、滑膜/関節液の倍率変化が1.5以下の遺伝子はTNXB, IL13RA2, OLFML1, FBLN2, EPB41L3, TNFSF15, ACE, TNXA, PRG4, PLXDC1の10個であった。
- ④定量RT-PCRで遺伝子プロファイル解析結果を確認した。

7) 既存マーカーの効率的組み合わせと病態との相関

膝OA症例のX-p変化と症状の関連

はじめに膝OA症例のレントゲン上の変化と臨床所見の関連に関する結果を示す。今回対象とした症例の中で2年間経過をフォローした症例は43例86関節(平均71.2歳)であった。このうち2年のフォロー期間中に関節裂隙の狭小化が生じた症例は全体の22% (19関節)であり、骨棘スコアの増加が見られた症例は全体の61.6% (53関節)例であった。つぎにレントゲン上の変化と臨床所見の関連を検討したところ、関節裂隙狭小化が生じた症例ではJKOMスコアで評価した症状の強さが有意に強い傾向があること、しかしそのような傾向は骨棘成長の有無については見られないことが明らかになった。

図12. 関節裂隙の進行した症例(●)と非進行例(○) (A) および骨棘スコアの有意な増加がみられた症例(●)とみられなかった症例(○) (B) のJKOMスコアの経時的な変化。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ 。



2. 複数の既知マーカーの組み合わせによるOAの病態識別の試み

(1) OA症例と高齢対照群を識別できるマーカーの組み合わせを探索したところ、血清のデオキシピリジノリン (PYD)、ヒアルロン

酸 (HA)、尿中のII型コラーゲン変性断片 (CIINE) の3因子を組み合わせることによって高齢対照群とOA症例を感度86.8%、特異度90.0%で識別することができた(図13A)。また同じ3因子によってOA症例の中でgrade I-II Iの症例とgrade IVの症例を感度100%、特異度89.6%で識別することができた(図13B)

図13. 複数の既知マーカーの組み合わせによるOA症例の識別。血清PYD、血清HAおよび尿中CIINEの3因子の組み合わせによるOA症例と高齢対照群 (A)、OA症例の中でK/L grade 1-IIIの症例とgrade IVの症例(B)の識別能をそれぞれROC解析によって検討した結果を示す。Area under the curve (AUC) の値はそれぞれ0.946および0.958であった。

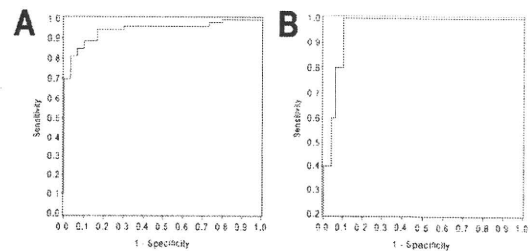
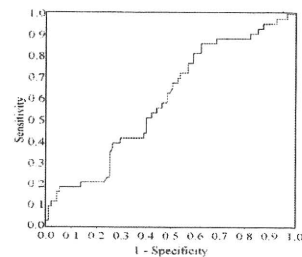


図14. 多因子による膝OA進行例の識別。OA症例のうち関節裂隙狭小化が生じた症例と生じなかった症例の血清KSとCII Pによる識別能をROC解析で検討した結果。AUCは0.587であった。



D. 考察

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および血清ヒアルロン酸値の年齢分布と変形性腰椎症(LS)との関連

LSは一般診療においてありふれた病態であるにもかかわらず、その早期発見や進行予測に有効なマーカーについてはまだ決め手にかけているのが現状である。我々は昨年度の研究報告において、血中HA濃度と膝OAとが関連することを明らかにしたが、今回はさらにLSとの関連を検討した。しかしながら腰椎のKLグレード別にみるとHA値には有意差が認められたが、性、年齢、BMIを調整するとその関連性は有意ではなくなった。膝OAと腰椎LSは有病率の性別分布や関連要因に異なりがあることも報告されており、膝OAと関連する血清HAがLSとの関連を認められなかったのは、これらの疾患の病態が異なる可能性もある。今後LSを感度良く検出する他のマーカーの検索とともに、血清HA値がLSの進行に影響を及ぼすかどうかについても検討していく予定である。

2) 大規模住民コホートにおける血漿ペントシジン濃度と変形性膝関節症との関連

本研究では、山村と漁村の1,690人からなる住民コホートのベースライン調査データを用いて、一般住民における血漿ペントシジン濃度を明らかにし、変形性膝関節症の有無および膝の各指標値とペントシジンとの関連を検討した。血漿ペントシジン濃度は、変形性膝関節症の有無および膝指標値と有意な関連があったことより、関節症マーカーとなりうる可能性が示唆される。今後のコホート

縦断データの解析を行うことにより、その有用性について検証し、また疫学的に影響を及ぼす要因についても明らかにしていきたい。

3) 大規模コホートにおける各種マーカーの測定と臨床症状との相関評価

本研究における地域コホートについては概ね3年間で計画的に複数のマーカー測定を順次、行った。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。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病態とマーカーとの関係に関する本研究の意義は極めて大きい。平成23年以降も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見込みである。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期待される。本研究では1600名にのぼる大規模住民コホート全体において血清COMPと血清HA、尿CTX-II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。CTX-IIとCTX-Iの間には有意の関係が認められた。この結果は軟骨の代謝と骨の代謝が連動していることを示唆している。OAの病態には軟骨下骨が大きく関与していることが知られていることから、両マーカーの相関は大変、示唆に富んだ結果である。ただし、最近では、骨組織内にもある程度のII型コラーゲンが存在し、骨吸収の過程でII型コラーゲンが遊離されてくる可能性も報告されてお

り、本研究結果におけるCTX-IIとCTX-Iの間の相関についての解釈には注意を要する。また本研究では膝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。今後の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。

一方、問題点として本研究でのコホートでは膝、脊椎などの複数の軟骨に変形性変化を有する例が多く、血清マーカーはこれらの複数の関節軟骨に由来するものであり、関心対象の関節の病態を特異的に反映しているかについてはさらなる検討が必要と思われた。すなわち、罹患関節数、その程度、さらには関節軟骨のvolumeなどの影響を血清マーカーは受けていることが予想される。本研究でのpreliminaryな結果では、両側膝のK-L gradeの総和に比例して血清COMP、CTX-IIなどが上昇することが判明しており、罹患関節数、重傷度と血清マーカーは良く相関すると考えられる。さらに脊椎には、関節軟骨と同様に関節突起部分に多くの軟骨組織を有しており、血清マーカーに対する影響も大きい。本研究でも膝OAを有している例は脊椎の変形性変化も同時に有している例が多く、脊椎の変形性変化の影響をどのように評価するかは今後の検討を要する。

4) 糖鎖のN-glycanを用いた検証

ヒトOAの発症ではhigh-mannose型糖鎖が重要な機能を担っている可能性が示された。血清中で、同定したN型糖鎖変化が生じている可能性がある。今後、さらに血清サンプル数を増やし解析を行うことで同定したN型糖鎖

もしくはその関連酵素がOAマーカーになりうる可能性がある。また、同定された糖鎖のOAの病態における機能も証明されたので、同時に治療ターゲットになりうる可能性も示唆された。

5) C2Cによる初期病態の把握

生活習慣をとらえることは困難であるが、6年という長期の観察期間から、本研究では運動教室参加継続群は運動習慣を含む非常に良い生活習慣を持っているということができる。教室参加非継続群との対比でより明瞭となったと考える。軟骨基質分解産物は、運動継続群で低く、いわゆる生活習慣病に対する効果を持つと考えられる生活習慣の維持が、軟骨について悪影響を持つことは少ないと考えられる。また、カテプシンKによるコラーゲン分解産物は閉経と関連し、NTXの変化と相関を示していることから、I型コラーゲン分解産物の代謝、骨代謝を反映している可能性が大きいと考えられた。

6) 関節液中の間葉幹細胞の解析

今回抽出した遺伝子は、in vitroでの検証であるが、関節液・滑膜由来の間葉幹細胞と骨髄間葉幹細胞を鑑別するin vivoマーカーとして有用である可能性がある。

7) 既存マーカーの効率的組み合わせと病態との相関

研究第3年度の本年はOA症例と対照群から得られた検体の解析結果から本来の目的である既知マーカーの組み合わせによってOAの病態評価が可能かという問いに対する回答を得るべく計測データの解析を行った。結論としてOA症例と健常者を識別することは

高い精度で可能であるが、OA症例の中で進行する症例（関節裂隙の狭小化が進む症例）と進行しない症例を識別することは今回検討した既知マーカーをどのように組み合わせても困難なことが明らかになった。一方でフォローアップの際に記録した臨床所見から膝OAの症例の中で関節裂隙の狭小化が進行する症例では強い痛みが持続する傾向があることが明らかになり、これは今後OAの病態を考える上で重要な手掛かりとなるのではないかと思われた。

OAの病態と関連する因子を見出すことが困難なことは周知の事実である。しかし今回の結果からOA症例と健常者を識別することは、複数の因子を組み合わせることによって相当に高い確度で可能であることがわかった。またOA症例の中でK/L分類でgrade IVに相当する末期の症例では一部の既知マーカーの値がより早期の症例と有意に異なっており、K/L grade IVの症例はgrade I～IIIの症例から3つの既知因子の組み合わせによって高い確度で識別された。このことは末期OAでは関節内に生じている変化がより早期のOA例とは異なっていることを示唆する。この知見はOAの病態を知る上で重要な手がかりの一つとなるのではないかと思われる。

一方今回の検討から、OA症例の中で関節裂隙が進行する症例を非進行例から見分けることは既知マーカーに頼る方法では極めて困難であると考えられた。OA症例の間には進行や症状に関して大きなheterogeneityがあり、これがOA治療薬を開発する際に大きな制約となっている。今後新規マーカーの探索も含めた新たな手法によってOAの進行例と非進行例を高い確度で区別できるようになることが望まれる。

E. 結論

1) 漁村住民からなる住民コホートのベースライン調査結果から、LSと血清HA濃度との関連を検討したが有意な関連は得られなかった。

2) 血漿ペントシジン高値は変形性膝関節症の有無や膝指標値と有意に関連しており、診断マーカー候補となりうる。

3) 総計約1600名にのぼる本邦の大規模住民コホートに対し6種類の関節マーカーを測定し、膝OA病期および腰SPとの関係を主に検討した。本コホートにおいて血清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。COMPとCTX-II、HAがOA病期と正の相関を示すことを見出し、これら複数の関節マーカーを用いることで、より確実なOA病態の診断手法となることが明らかとなった。以上の結果によりマーカーがOAの診断手段として有用である事が本邦の大規模コホートで初めて明らかとなった。

4) High-mannose型糖鎖はOAの病態において重要な機能を担っており、血清中でこの糖鎖の変化をとらえることでOAマーカーになりうる可能性がある。

5) いわゆる生活習慣病に対する効果を持つと考えられる生活習慣の維持している群について軟骨分解産物であるC2Cによる評価においては、このような生活習慣が維持されなかった群に比して良い状態にあると考えられた。新規マーカーであるC2C評価も加える

ことによる骨軟骨の代謝状態の把握は運動継続など健康状態維持のマーカーとしての可能性があると考えられる。

6) 変形性関節症膝の関節液中に存在する間葉幹細胞は、骨髄由来のものよりも滑膜由来のものに類似した。関節液・滑膜由来の間葉幹細胞で発現が強く、骨髄由来で弱い遺伝子を10個抽出した。

7) 既知の複数のバイオマーカーの組み合わせによる高い精度のOAの病態評価の可能性を目指してOA症例と対照群から血液、尿の検体を採取し、19項目に及ぶ既知マーカーを計測して種々の解析を行った結果、OA症例と健常対照者を高い精度で識別できる因子の組み合わせを見出した。しかしOA症例の中で関節裂隙の狭小化が進行する症例と進行しない症例の識別は今回計測した因子をどのように組み合わせても困難であることも明らかになった。信仰する可能性のあるOA症例を高い精度で識別できるマーカーの確立は今後の課題である。

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

1. 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 43:469-473 2010

2. 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－
中部整災誌 53:1273-1274 2010

3. 森田充浩 山田治基 伊達秀樹

特集 変形性膝関節症の治療戦略
診断 軟骨代謝マーカー、関節外科
29:995-999 2010

4. 加藤誠 森田充浩 金治有彦 中川雅人 安藤謙一 山田治基

口腔内常在菌 Streptococcus
gordonii による人工股関節遅発性感染
の1例
東海関節 2:59-62 2010

5. 加藤誠 金治有彦 森田充浩 中川雅人 安藤謙一 山田治基

フォンダパリヌクスナトリウム
1.5mg 製剤と 2.5mg 製剤の安全性と
有効性の比較－人工股関節置換術後
における D-dimer 値の推移を中心に
－ 東海関節 2:27-30 2010

6. 大石央代 早川和恵 伊達秀樹 前原一 之 中川研二 山田治基

TKA 後の DVT 予防に対する抗凝固剤の
使用経験－アリクストラ 2.5mg、1.5mg、
クレキサン、ノボ・ヘパリンの副作用、
血栓防止効果について検討－
東海関節 2:31-34 2010

7. 木村昌芳 安藤謙一 森田充浩 中川雅人 深谷英一 小崎直人 山田治基

Perthes 様変形による二次性股関節症
に合併した大腿骨頭壊死の1例
東海関節 2:73-76 2010