

201025008 B (1/4)

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20年度～平成22年度 総合研究報告書

(1/4冊)

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
	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
	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

目 次

I. 総合研究報告	1
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および 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)	
2. 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	42
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)	
3. 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	49
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)	
4. 関節液中間葉幹細胞による解析	54
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)	
5. 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	58
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)	
6. 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	60
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)	

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
（総合）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衝撃吸収を担う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。

本研究の究極的な目的は将来、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) 本邦の大規模地域住民コホートに対する各種マーカーによる病態評価と早期診断を目指した将来的な OA 発症予知能力の検証、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新規のマーカーの能力を検証することにある。1) については大規模住民コホートを含む各種のコホートにより抽出されたデータベースと試料をもとにマーカーによる OA の早期診断における有用性を検証し、さらには将来的にマーカーを用いた実用的な介護予防を目指した診断支援ツールの開発に寄与することを目標とした。既発症 OA を対象とした新規マーカーの検証では、糖鎖である N-glycan を新規マーカーとして応用するためにヒト検体を使用した N-glycan の OA 病態における発現を検討する手法、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 receiver operating characteristic(ROC)解析統計を用いて効率的に組み合わせる手法、などの方面からマーカーを検証した。

大規模コホートに関しては和歌山県の山村及び漁村住民 1,690 人(男性 596 人、女性 1,094 人)を対象として行った骨関節疾患予防検診結果から、検診参加者の両膝立位正面 X 線像を Kellgren-Lawrence 重症度分類(K-L grade)を用いて整形外科医が分類し、さらに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測定した。地域コホートについては 3 年間の研究期間中に計画的にマーカー測定を行った。測定を終了し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)、血漿ペントシジンの7種である。

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。血清COMPは左右膝関節ともK-Lグレードと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正相関を示した。2つのコホートにおいて、レントゲン画像による病期と正相関が示されていたのは血清HAであったが、尿中CTX-IIと血清COMPも概ねほとんどの画像病期において正相関していたことから、複数マーカーによる病期把握が可能と考えられた。血清MMP-3は末期で高く、血清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が、これらのマーカーは膝OAの病期において初期では破壊と再生の両面が機能していること、中期では反応性の骨棘形成や骨硬化が生じること、末期直前では滑膜破壊とそれに伴う骨破壊の進行が示唆される点で有意義である。バイオマーカー同士の相関関係については尿CTX-IIと尿CTX-Iで相関性を認めただけでなく、血清HAと血清CTX-II、血清HAと血清MMP-3、血清HAと血清COMPでごく弱い正の相関を認めた。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。画像におけるOAとSPのK-Lグレードと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。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。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、血清CPIIで性差を認めた。血清COMPと血清HAは加齢との相関があるため年齢補正が必要であるが、性差を認めないことはこの2つのマーカー種が性ホルモンや骨代謝などの影響を受けにくいことを示しており、関節マーカーとしては大変有望な候補であることが示唆された。血漿ペントシジン濃度の平均値は男性0.064(標準偏差(SD)0.062) $\mu\text{g/mL}$ 、女性では0.057(0.031) $\mu\text{g/mL}$ であった。変形性膝関節症(KL \geq 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た($p<0.05$)。同様に膝の指標とも有意に関連していた($p<0.05$)。

新規マーカーであるC2Cによる解析については、生活習慣病に対する効果を得ている生活習慣を持つ群において経時的に、膝関節機能およびコンピューターによるレントゲン画像計測評価と関節破壊マーカー(II型コラーゲン分解産物:C2C)を用いた軟骨評価を行い、関節破壊マーカーの測定意義を検証した。さらなる新規骨軟骨マトリクスマーカーの開発としてカテプシンKによるコラーゲン分解産物の意義を検討した。軟骨基質分解産物であるC2Cは、参加継続群で低く、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。

さらに、関節裂隙の進行の多かった群で、有意にBaseline血中C2C濃度は高く、軟骨破壊

の進行予測因子となる可能性が示された。N型糖鎖構造解析を行った結果ではOA軟骨組織ではhigh-mannose型糖鎖が変化しており、OA血清中においても糖鎖構造の変化が認められることがはじめて明かとなった。以上の所見によりOAの病態においてhigh-mannose型糖鎖は重要な機能を担うとともにマーカーとして有用であることが示された。関節軟骨の変性と関節液中の間葉幹細胞数との関係について解析した結果、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ており、また膝OAではレントゲンによる重症度が増すと関節液中の間葉幹細胞数が増加することが明かとなった。また膝OAの関節液中に存在する間葉幹細胞は骨髄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ることが遺伝子プロファイリングにより示唆された。ROC解析統計を用いて測定するマーカー効率的に組み合わせる研究では、膝OAの症例約50例を対象にし、個々の症例を6ヶ月ごとにフォローして臨床所見を記録、レントゲンを撮影して血液、尿の検体を採取した。得られた血液、尿それぞれ約200の検体について計19項目のOAの既知マーカーを計測、その計測値を組み合わせることでOA症例と健常対照者の識別、OA症例の中でX-p上の軟骨変性の進行例と非進行例の識別、の2つを試みた。結果として血清中のヒアルロン酸、血清ピリジノリン、尿中II型コラーゲンの変性断片の3つの因子を組み合わせることで非常に高い精度でOA症例と高齢健常者を識別でき、さらにOA症例の中で末期の症例とそれ以外の症例を識別することができること、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検討した因子をどのように組み合わせても困難であることが明らかになった。OA症例の関節裂隙の狭小化の進行例と非進行例を識別しうる因子の確立は今後の課題と考えられた。本研究では本邦の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。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、将来の経年調査結果の追加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。新規関節マーカーについてはOA病態との関係についての有意義な結果が明らかとなり将来の臨床応用における有用性が示された。

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）。

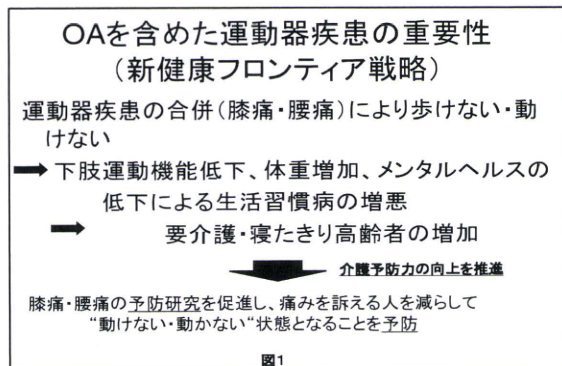


図1

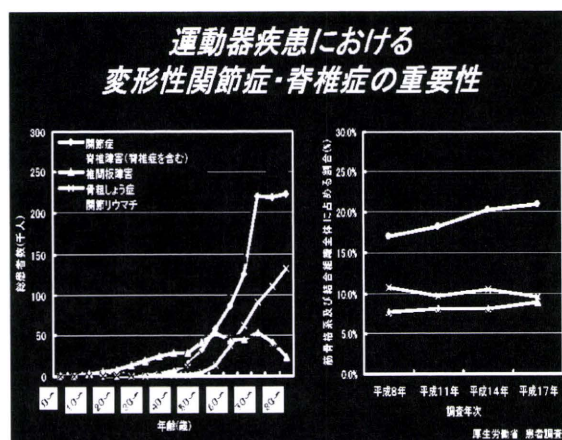
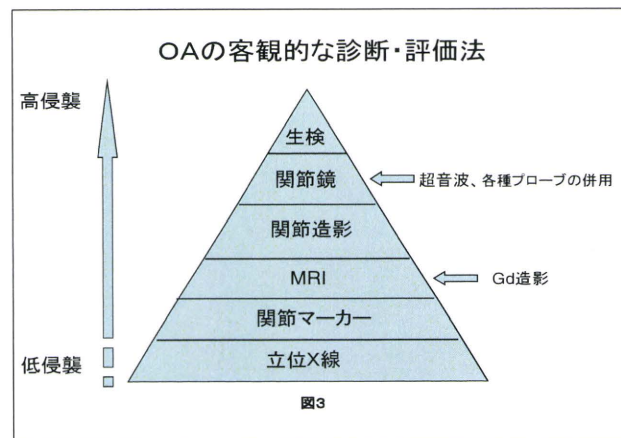
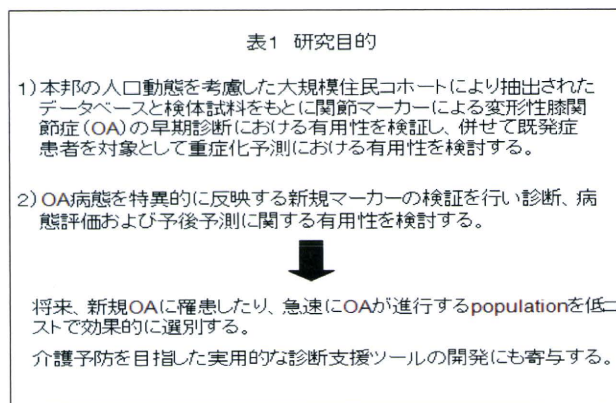
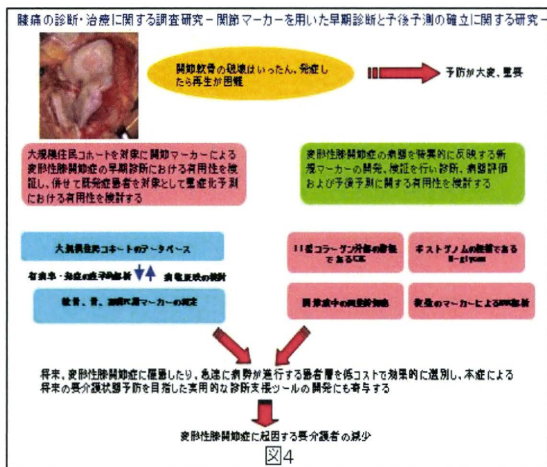


図2 運動器疾患の推移(厚生労働省資料より)

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（図4）。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（表1）。

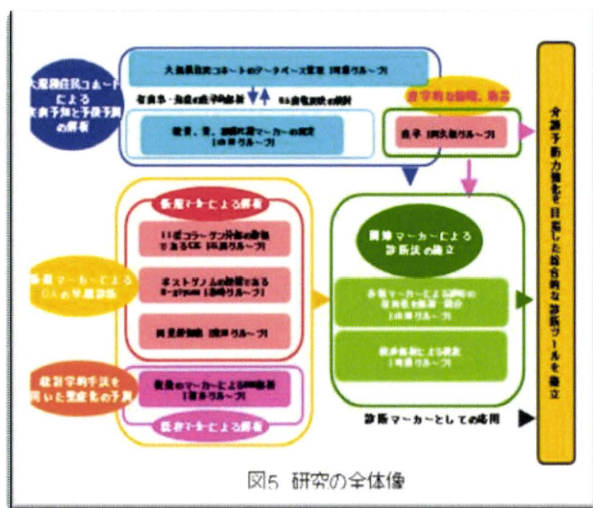




B. 研究方法

本研究班の全体構成を図5に示す。

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）および同コホートにおける疫学的アプローチ（阿久根）



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、馬淵、阿久根）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。

3)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

6)既存マーカーの効率的組み合わせと病態との相関をROC（Receiver Operating Characteristic）解析を用いて検討することでの重症化の予測（福井）を行った。

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

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。

(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) 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

研究対象であるコホート全住民 1,690 名（図 6）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。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)、血漿ペントシジン濃度である。これらの関節マーカーはこれまでも変形性関節症の進

行の予測が見込まれる可能性が報告されている点で特に有望なものを優先的に選択し本コホート研究に応用した。

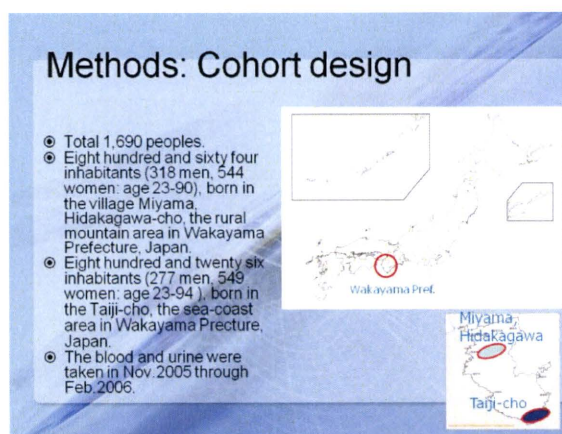


図 6: コホートデザイン

3) 糖鎖の N-glycan を用いた検証

A) 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。

B) ヒトで同定された N 型糖鎖に注目し、マウス OA モデルを用いて OA 発症に関連した糖鎖の機能解析を行う。具体的には同定した糖鎖および関連合成酵素の OA 進行過程における発現変化、軟骨細胞において関連合成酵素遺伝子の発現を調節することによる MMP 等の OA 関連タンパクの発現変化を明らかにする。

(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。

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

- A) 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。現状の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。
- B) 2003-5年におけるBMI, 脂質代謝マーカー (Total HDL LDL cholestrole, 中性脂肪) 糖質代謝マーカー (HbA1c) の推移 と現在のBMI, Total HDL LDL cholesterole, 中性脂肪, HbA1cの測定の比較。
- C) 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) (東京大学・吉村先生、岡先生との共同研究)
- D) 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
- E) 尿中および血清中C2CのELISAによる測定
尿中C2Cは尿中クレアチニン(Cre)により補正。
- F) 新規骨軟骨マトリクス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 (McGill Univ. Dr. Mort, Pooleらとの共同研究)。

(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。運動療法介入はすんでおり、任意に継続的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。

5) 関節液中の間葉幹細胞の解析

- A) 前十字靭帯再建術時に関節液を穿刺した。また関節鏡視による軟骨の変性度をスコア化した。
- B) 正常膝および変形性膝関節症膝から関節液を穿刺した。またレントゲンの立位正面像で重症度により3群に分けた。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。
- C) 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形態と遺伝子発現解析を行なった。

(倫理面への配慮)

前十字靭帯損傷膝からは関節鏡施行直前に関節液を採取した。変形性膝関節症の膝からは、ヒアルロン酸注射施行前、あるいは人工膝関節置換術時に関節液を採取した。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。

6) ROC 解析を用いた既存マーカーの効率的組み合わせと病態との相関

- A) 既知のバイオマーカーの組み合わせによるOAの病態評価法の確立
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する）

本研究では解析を（1）健常者と OA 症例の識別、（2）OA 症例の中で 10 症例の識別、（3）OA 症例の中でレントゲン上の進行を示す症例の識別、に役立つ因子の組み合わせを見出すことを具体的な目標に行った。いずれの解析においても ROC (Receiver Operating Characteristic) 解析を手法に

用いた。

B) 既知マーカーの OA 関節各組織における発現解析

本研究ではまた既知マーカーを含む OA 関節各組織における遺伝子発現の解析を cDNA マイクロアレイにより網羅的に行った。この解析では多数の症例について種々の遺伝子の発現をマイクロアレイにより網羅的に行い、遺伝子相互の発現レベルの関連を見出すことを試みた。研究期間終了までに滑膜については末期 OA 膝関節 20 関節（20 例）から滑膜を得て RNA を抽出して cDNA マイクロアレイ (Whole Human Genome, Agilent 社) による解析を終え、既知の OA マーカーと OA の進行に関連する可能性のある因子の発現の相関を検討した。

C) 本研究で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。

（倫理面の配慮）

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

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指標値

	男性		女性	
	平均	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 ($\text{KL} \geq 3$)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に関連 ($p < 0.05$)していることが明らかとなった。

2) 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7)。

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 7: OA と SP の有病率

両コホートにおいて SP の有病率はほぼ等しいのに対し、膝 OA の有病率が大きく異なる結果になったことは、ライフスタイルの違いが疾病に影響を及ぼしている可能性があり示唆に富む結果であった。特に山村部の膝 OA が約 60%で漁村部の約 30%に対し 2 倍近い差が出ている点について、地域特性もしくは職業特性による歩行負担が膝 OA 発症に大きく関与している可能性が示唆される。コホート全般について 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 8 ~ 13)。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。2つのコホートにおいて、レントゲン画像による病期ときれいな正相関が示されていたのは血清 HA であったが、尿中 CTX-II と血清 COMP も概ねほとんどの画像病期において正相関していたことから、複数マーカーによる病期把握が可能と考えられた。血清 MMP-3 は末期で高く、血清 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が、これらのマーカーは膝 OA の病期において初期では破壊と再生の

両面が機能していること、中期では反応性の骨棘形成や骨硬化が生じること、末期直前では滑膜破壊とそれに伴う骨破壊の進行が示唆される点で有意義である可能性が高い。バイオマーカー同士の相関関係については尿 CTX-II と尿 CTX-I で相関性を認めただほか、血清 HA と血清 CTX-II、血清 HA と血清 MMP-3、血清 HA と血清 COMP でごく弱い正の相関を認めた。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。画像における OA と SP の K-L グレードと 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。6 m 歩行所要時間と K-L グレードには正の相関を認めた (図 14)。また 6 m 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 15)。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、血清 CPII で性差を認めた。血清 COMP と血清 HA は加齢との相関があるため年齢補正が必要であるが、性差を認めないことはこの2つのマーカー種が性ホルモンや骨代謝などの影響を受けにくいことを示しており、関節マーカーとしては大変有望な候補であることが示唆された。

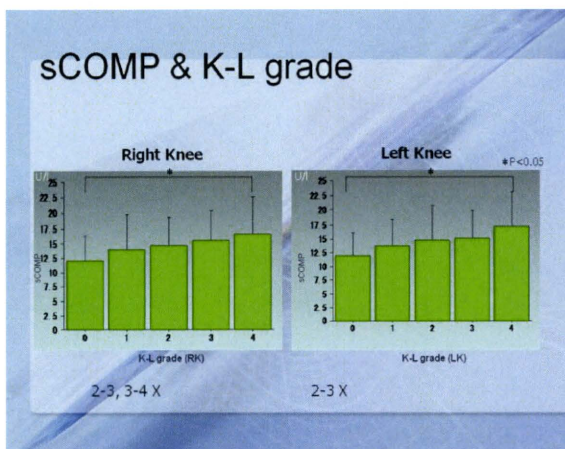


図 8：血清 COMP と K-L グレードの関係

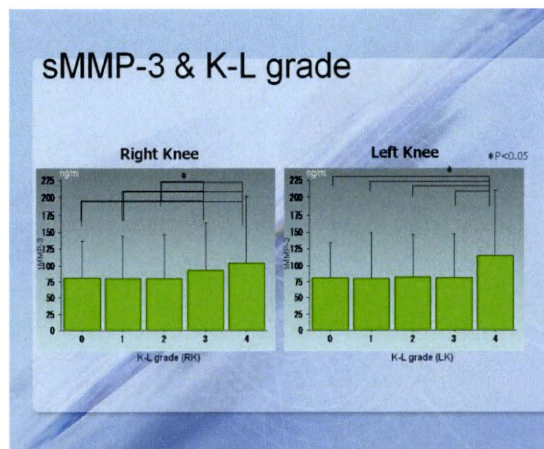


図 11：血清 MMP-3 と K-L グレードの関係

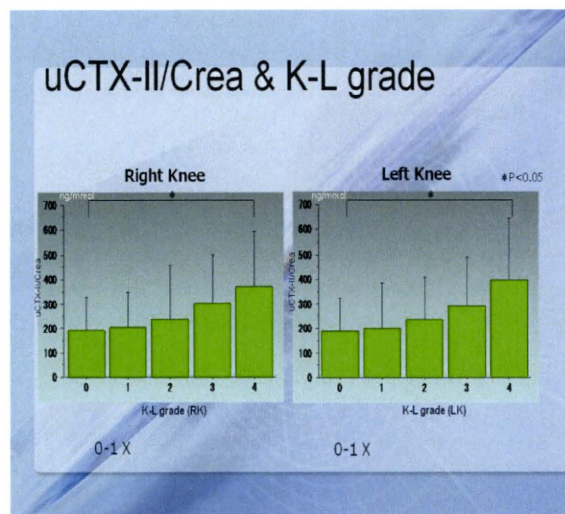


図 9：尿 CTX-II と K-L グレードの関係

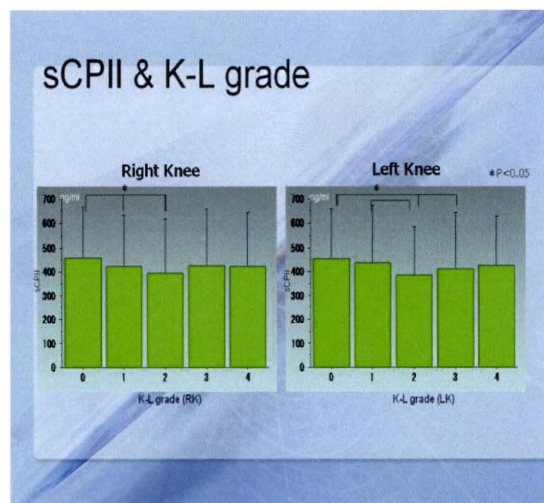


図 12：血清 CPII と K-L グレードの関係

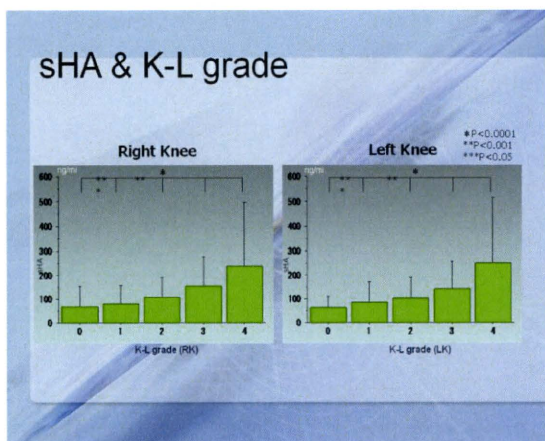


図 10：血清 HA と K-L グレードの関係

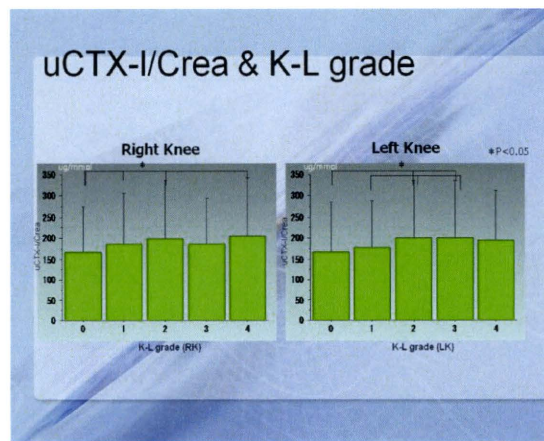


図 13：尿 CTX-I と K-L グレードの関係

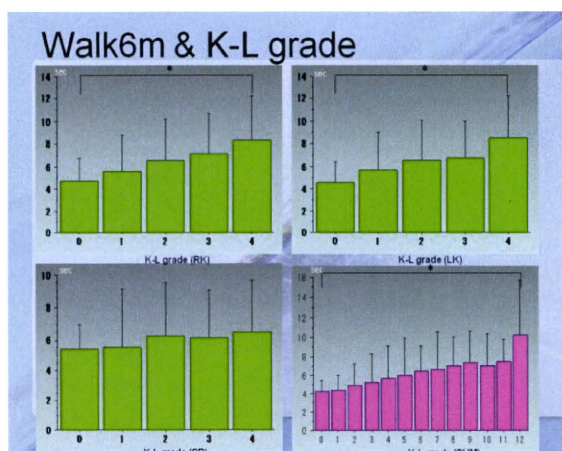


図 14：6 m 歩行所要時間 K-L グレードの関係

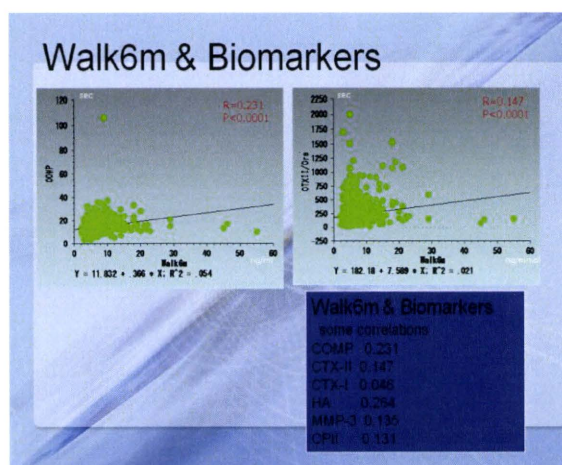


図 15：6 m 歩行所要時間と関節マーカーの関係

3) 糖鎖の N-glycan を用いた検証

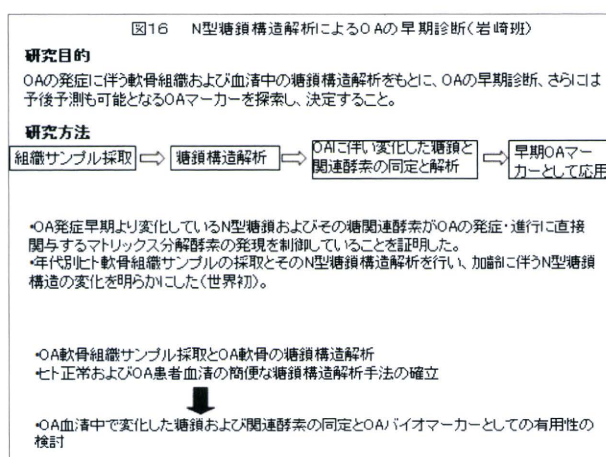
A) ヒト OA 軟骨において high-mannose 型糖鎖が変化していることが明らかとなった。OA 血清でも 1 部の N 型糖鎖構造が変化していることが確認された。

B) マウス OA モデルにおいて OA の進行に伴い同定された high-mannose 型糖鎖が変化し、その関連合成酵素の発現も変化していた。

C) 軟骨細胞を単離し、関連合成酵素遺伝

子の発現を調節することにより、サイトカイン刺激による軟骨細胞中の MMP-13 や ADAMTS5 の発現も変化した。

以上の結果より high-mannose 型糖鎖は軟骨細胞とサイトカインのシグナル伝達を制御していることが示唆された (図 16)。



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

A) 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 17)。
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。

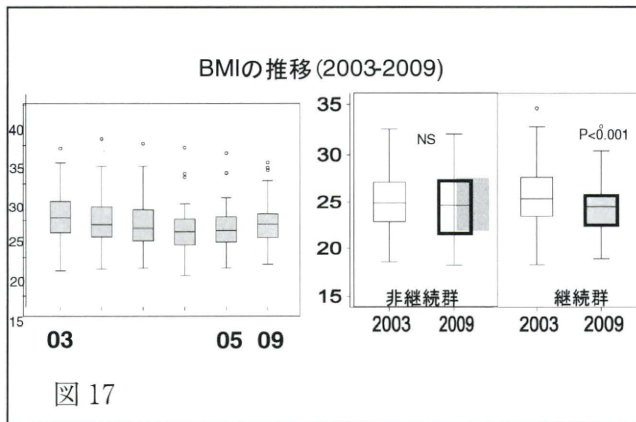


図 17

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。KOACAD の計測からは、膝関節に強度の変形はなく、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。

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(継続群 vs 非継続群 尿中C2C/Cre 0.078 μ g/ml vs 0.13 μ g/ml, $p=0.028$ 血中C2C 78.1 ng/ml vs 146.2ng/ml, $p<0.001$)。

継続群での1年後の膝関節レントゲン撮影の結果、左右ともに計測上は表5に示すように明らかな進行は無かった。

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

表 4

表5:運動教室参加継続群 膝関節画像評価の推移

	baseline		1年経過観察時		p-value
	mean	SD	mean	SD	
右					
最小幅(外側)	4.6	1.4	4.5	1.4	ns
最小幅(内側)	3.7	.9	3.6	.7	ns
FTA	177.8	3.4	178.9	3.5	.02
左					
最小幅(外側)	4.0	1.6	4.3	1.4	ns
最小幅(内側)	3.4	.8	3.4	.7	ns
FTA	177.6	3.3	177.5	3.7	ns

レントゲン画像計測にて内側関節裂隙狭小化が左右併せて 0.9mm (median) 以上進んだ群とそれ以下だった群でbaselineのC2C(尿中、血中)を比較すると0.9mm以上進んだ群では有意に血中C2C濃度が高かった(60.1 ng/ml vs 90.7 ng/ml, $p=0.04$ unpaired t-test)

B)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、年齢、BMIで補正後もC2Cは閉経に伴い有意に低下していたが($p<0.05$)、NTxおよびC1、2Kは閉経により有意に上昇していた($p<0.05$)。

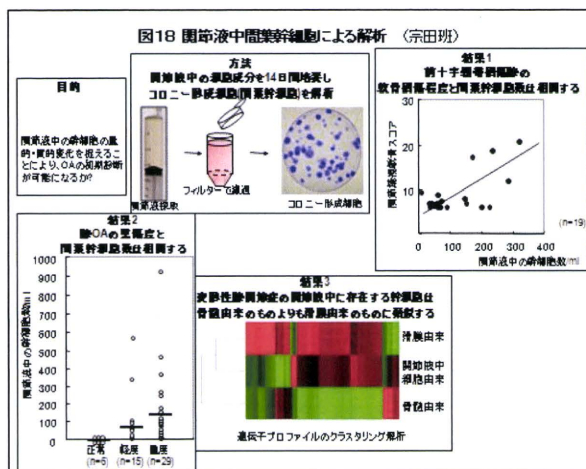
5) 関節液中の間葉幹細胞の解析

A)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, $r=0.645$ 、 $p<0.002$)。

B)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, $p<0.05$)。

C)変形性膝関節症の関節液中に存在する間葉幹細胞の形態及び遺伝子プロファイル

は、骨髄液中に存在するものよりも、滑膜由来のものに類似した (図 18)。



6) ROC 解析を用いた既存マーカーの効率적組み合わせと病態との相関

A) 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 19)。

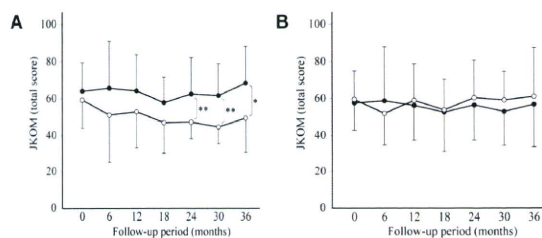


図 19. 関節裂隙の進行した症例 (●) と非進行例 (○) (A) および骨棘スコアの有意な増加がみられた症例 (●) とみられなかった症例 (○) (B) の JKOM スコアの経時的な変化。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ 。

B) 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) はじめに実際の計測結果を一部の因子について示す。ヒトから採取した検体の計測では、計測値に大きなばらつきが生じることが多いが本研究でも実際に計測した値には個体間で大きなばらつきが生じた (図 20)。このことを考慮して、病態との関連を検討する場合には計測値を対数変換した上で統計解析を行うこととした。

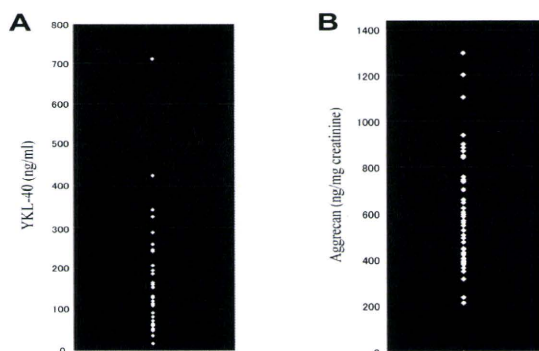


図 20. 採取した血液、尿検体における既知マーカーの計測。血清中 YKL-40 (A) および尿中 aggrecan (B) の計測結果を例として示す。大きな個体差が見られたため、以後の解析では測定値を対数変換したものをを用いた。なお尿中 aggrecan については尿中クレアチニン濃度で補正した値を示した。

(2)次に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 (図 2 1)

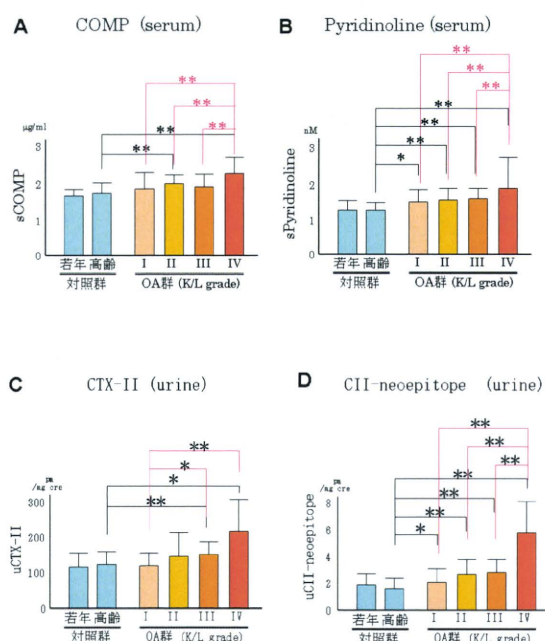


図 2 1. 血清中 COMP (A)、PYD(B)、尿中 CTX-II (C)、CIINE(D)の対照群と OA の各群における計測値の比較。*, p < 0.05; **, p < 0.01。

(3) OA 症例と高齢健常対照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 2 2 A)。また同じ 3 因子によって OA 症例の中で grade I-III 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 2 2 B)。

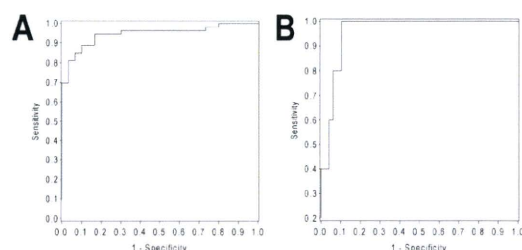


図 2 2. 多因子による OA 症例の識別。血清 PYD、血清 HA および尿中 CIINE の 3 因子の組み合わせによる OA 症例と健常者 (A)、OA 症例のうち K/L grade 1-III の症例と grade IV の症例(B)の識別能を ROC 解析によって検討した結果を示す。Area under the curve (AUC) の値はそれぞれ 0.946 および 0.958 であった。

(4)次に OA 症例の進行を予測する因子の組み合わせを探った。当初混合効果モデル、周辺モデルの二つの解析手法によって OA 症例の関節裂隙狭小化の進行例と非進行例の間に有意に異なる因子を選択したところ、それぞれ 7 個および 3 個の因子が選び出された。次にこの 2 つの解析で見出された合計 8 個の因子 (2 因子は両解析で共通して見出されたため 2 群間で有意差のある因子の合計は 10 個ではなく 8 個となる)をさまざまに組み合わせることで関節裂隙狭小化の進行例と非進行例の識別を試みたが、もっとも識別能が高かった血清中のケラタン硫酸 (KS) と II 型コラーゲン C 端プロペプチド (CIIP) の組み合わせでも感度 86.1%、特異度 36.8%に過ぎず、進行群、非進行群を臨床的に有用なレベルで識別することは困難と思われた (図 2 3)。

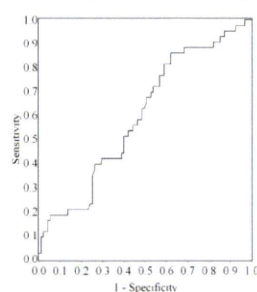


図 2 3. 多因子による膝 OA 進行例の識別。OA 症例のうち関節裂隙狭小化が生じた症例と生じなかった症例の血清 KS と CIIP による識別能を ROC 解析で検討した結果。AUC は 0.587 であった。

C) マイクロアレイによる OA 関節組織における遺伝子発現の網羅的解析

20 症例の滑膜のマイクロアレイのデータから症例間で既知の OA マーカーと OA の病態に關与する可能性のある因子（タンパク分解酵素と内因性阻害剤、サイトカイン、ケモカインおよびその受容体）の発現の相関を検討した。この結果、OA では滑膜において COMP と MMP-2 の発現、また YKL-40 と MMP-1、3 の発現がそれぞれ有意に相関するという結果を得た(図 2 4)。なおこの解析は現在も症例数を増やして継続中である。

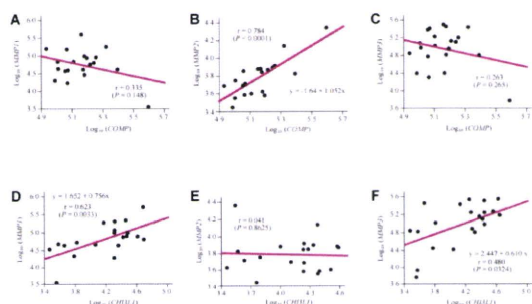


図 2 4. マイクロアレイの解析結果。20 例の滑膜における COMP と MMP-1~3 の発現 (A-C) および YKL-40 と MMP-1~3 の発現 (D-F) の相関を散布図で示した。COMP と MMP-2 (B), YKL-40 と MMP-1, 3 の間 (D, F) に有意の相関が見られた。

D. 考察

1) 大規模住民コホートに関する研究

これまで有訴症状患者において血清 COMP や尿 CTX-II、血清 HA が初期に高い症例では関節裂隙の狭小化の進行が早いとの報告があり、関節破壊による膝 OA の病期進行に対する予知能力が有る可能性が示唆されている。本研究における成果から、関節破壊の進行の予知について、画像診断との組み合わせや複数の関節マーカーの組み合わせを用いることにより、膝 OA や腰 SP の正確な病態把握や進行の予測を立てることが可能となり、治療介入への応用が

可能となると考えられる。全般を通じて、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-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。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、将来の経年調査結果の追加により、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。また、本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く必要がある。

2) 糖鎖の N-glycan を用いた検証

OA 軟骨中では high-mannose 型糖鎖が変化していることが明らかとなった。軟骨中または血清中でこの変化を確実に捉えことが出来れば疾患マーカーとして応用することが可能となる。また、同定した糖鎖は軟骨細胞—サイトカイン間のシグナル応答を調節し、OA の病態においても重要な機能的役割を果たしていると推測される。

3) 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

1 年ほどの短期間の介入で生活習慣をとらせ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することができる。これは、教室参加非継続群とのBMIの推移の対比で明確に示されていると考える。軟骨基質分解産物は、参加継続群で低く、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。

さらに、関節裂隙の進行の多かった群で、有意にBaseline血中C2C濃度は高く、軟骨破壊の進行予測因子となる可能性が示された。

新規マーカーとしての検討したカテプシン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。

4) 関節液中の間葉幹細胞の解析

関節液中に存在する間葉幹細胞の数は、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。

5) ROC解析を用いた既存マーカーの効率的組み合わせと病態との相関

本研究では既知のOAマーカーを複数組み合わせることによってOA症例の病態評価がより正確に行えるのではないかとという仮説を検証した。このために保存的に治療された膝OA症例を2年間にわたって追跡調査

し、レントゲンの変化を調べ、半年後とに採取された血液と尿に置いて既にOAの病態との関連が報告されている既知のマーカーを網羅的に計測した。その結果、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