

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591769

研究課題名（和文） 関節リウマチの生物学的製剤治療による骨軟骨修復因子に関する研究

研究課題名（英文） Study of factors related to repair of bone and cartilage by biologics for rheumatoid arthritis

研究代表者

神戸 克明 (KANBE KATSUAKI)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70366326

研究成果の概要：関節リウマチ（RA）に対して生物学的製剤インフリキシマブ使用中の骨髄中に、細胞成分に富む隔壁の肥厚を発見し、これを thickness of interstitial septum (TIS) と名づけ、tumor necrosis factor- (TNF-), interleukin-6(IL-6)、receptor activator of nuclear (kappa) B ligand (RANKL)、osteoprotegerin (OPG)、osteopontin(OPN)陽性細胞をコントロール群と比較してすべて有意な増加を認めた。従ってインフリキシマブにより組織学的に RA の骨髄中に骨代謝の活性化を認める変化を見出した。さらに TIS 中に CD68 や CD4 陽性細胞が多数みられ、細胞性免疫の活性化も認められた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	800,000	240,000	1,040,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	1,500,000	450,000	1,950,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：臨床、再生医学、関節リウマチ、生物学的製剤、手術

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)の治療が生物学的製剤により大きく変化してきている。その大きな理由の一つとして、いままでの治療薬にないリウマチの骨関節破壊抑制および修復効果が見られているためである。しかしながら、関節リウマチの骨関節破壊修復については一

部レントゲン写真やMRIなどでの骨びらんや骨萎縮の修復がみられているのみで実際の組織での修復の報告はない。生物学的製剤使用中の人工関節置換術時に採取した骨軟骨組織よりいままでにない軟骨下骨や骨髄の組織学的変化を我々は経験している。実際の臨床において関節リウマチの骨関節破壊修

復は可能であるのか、さらにどのような修復がみられるのか組織学的に検証した。

(1) 関節リウマチの骨関節破壊の原因について

関節リウマチの病態が現在までのところすべて明らかにされていないのは周知のところであるが、どこまで分かっているところまで分からないかを明解にすることは必要である。関節リウマチの病変の場が関節を中心にありそれが全身の免疫学的異常に関わることは臨床の場でも経験する。すなわち関節滑膜の性状の病的変化に注目すべきと考え、17例の関節滑膜切除時に採取滑膜所見を組織学的に滑膜増生、乳頭状、血管増生、フィブリン析出、リンパ球浸潤の5項目で患者の罹患期間を従属変数にとった重回帰分析により有意に乳頭状滑膜が早期関節リウマチに関連していることをつきとめた ($P=0.018$)。関節破壊を起こす時期は発症して5年以内に75%であるとされることから、罹患期間の少ない時期に多くみられるこの乳頭状滑膜に骨関節破壊の原因があることも理論的に考えられる。しかしながら乳頭状滑膜がどのようにして骨関節破壊を起こすかはサイトカインやケモカインおよび Matrix metalloproteinase などの液性因子のほか滑膜内の破骨細胞の存在あるいは分化促進、さらには形態学的に関節周囲の関節包付着部の軟骨欠損部いわゆるペアエリアに入り込みやすいことも考えられる。これらの入り込んだ乳頭状滑膜がやがて骨びらんを進展させ骨関節破壊を促進する。リウマチが発症して早期の関節でCRP上昇が持続する症例では特に乳頭状滑膜の増生がみられる。さらにリウマチが進行していても関節変形が少なく骨破壊が少ない関節でCRP上昇が見られる症例では乳頭状滑膜がみられる。すなわち乳頭

状滑膜は発症罹患期間に統計学的には有意に関係するが、個々の関節破壊の進行の早期と関係があると考えられる。よって骨破壊をくいとめて個々の関節破壊進行をとめるには乳頭状滑膜増生を抑制することが鍵となる。

(2) 骨修復について

生物学的製剤使用中の人工関節置換術時に通常の関節リウマチの骨と比較して非常に硬い骨切りを経験したことがある。ステロイドを長期に使用している症例では認めにくい生物学的製剤とMTX併用の骨組織ではマクロで骨組織が硬化しているばかりか組織学的に類骨の増生を認めた。多数に増えた類骨の周囲には破骨細胞の少数化と骨芽細胞の配列が確認された。しかしこれらが石灰沈着して本当の骨組織になるには6ヶ月から1年は要すると思われる。生物学的製剤によりなぜこのような変化を起こすかは不明であるが、理由の一つとして直接的な骨代謝に与える影響を否めない。生物学的製剤による骨破壊修復は手足指関節にみとめられることが多く、大関節の膝、股、肩関節には改善をみとめるのが非常に難しい。生物学的製剤使用患者の手足の末梢血管は拡張していることは临床上経験する。それにより血行回復し手の腫脹が改善する。骨折の治癒機転は骨折部位の血腫形成からなる。血腫中の未分化間葉系細胞から骨芽細胞や破骨細胞が分化して骨形成が始まる。関節リウマチではこの血腫にかわる末梢血管拡張が未分化間葉系細胞の寄与に貢献している可能性がある。これは末梢の手足の骨関節破壊は修復しやすいが膝や肩などの大関節破壊は治りにくいという臨床経験に合致する。

RAにおける生物学的製剤の骨軟骨破壊抑制効果のメカニズムを解明することは临床上

意義があり、さらなる薬剤開発の発展につながる。また生物学的製剤の治療で骨軟骨破壊の抑制、さらに改善の研究は独創性がありさらに意義があると考えられる。

2. 研究の目的

関節リウマチ(RA)に対する生物学的製剤の骨軟骨破壊抑制効果のメカニズムを解明することは本研究の特色である。生物学的製剤の治療で骨軟骨破壊の抑制、さらに改善の研究は独創性があると考えられる。すべての症例で生物学的製剤使用により骨関節破壊が抑制されることは困難であり、どのようなRA症例において骨関節破壊が抑制されるかを統計解析および組織学的に明らかにすることおよび、生物学的製剤治療により骨軟骨がどこまで修復されるかを明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

近年、関節リウマチ(RA)の治療において生物学的製剤インフリキシマブが使用されているが、最も重要な効果として骨関節破壊の抑制あるいは改善効果がある。しかしそのエビデンスは手足のレントゲン上 Sharp score の改善で主に評価される。本研究において生物学的製剤により骨組織に変化が実際に起きているか否かについて組織学的に解析した。生物学的製剤インフリキシマブ使用中、人工膝関節置換術時に採取した 10 例、平均年齢 65.3 歳、平均 MTX4.8 mg/week、平均ステロイド量 3.8 mg/day とコントロール群としてインフリキシマブ非使用中の骨組織 10 例、平均年齢 67.6 歳、平均 MTX5.2 mg/week、平均ステロイド量 4.0 mg/day の H.E. 染色および tumor necrosis factor- (TNF-), interleukin-6 (IL-6)、receptor activator of nuclear (kappa) B ligand (RANKL)、

osteoprotegerin (OPG)、osteopontin (OPN) の免疫染色を検討した。

4. 研究成果

(1) 骨髄組織の変化について

インフリキシマブ使用中の骨組織において骨髄中に、細胞成分に富む隔壁の肥厚を発見し、これを thickness of interstitial septum (TIS) と名づけ、TNF- , IL-6、RANKL、OPG、OPN 陽性細胞をコントロール群と比較してすべてに有意な増加を認めた。以上より生物学的製剤インフリキシマブにより組織学的に RA の骨髄中に骨代謝の活性化を認める変化を見出した(Kanbe K, Inoue K, Inoue Y, Suzuki Y. Histological changes in bone marrow after treatment of infliximab for rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol. 27: 497-501, 2008.)。さらに TIS 中に含まれる骨髄細胞には CD68 陽性細胞が多数みられ、インフリキシマブにより骨髄幹細胞から組織球への分化促進が考えられ現在 CD14 の発現の確認と骨髄幹細胞培養にてインフリキシマブ添加による CD68 陽性細胞分化促進の確認を遂行している。RA に対する骨髄変化についてインフリキシマブによる影響は組織学的な解明をほぼ達成できている。

(2) 関節軟骨の修復経過について

関節軟骨は血管、リンパ管および神経組織を欠いているため、その損傷では通常の組織にみられるような、組織の壊死と炎症に引き続く細胞増殖、細胞分化による修復という過程をたどらない。まず軟骨損傷後まもなくフィブリン様組織が欠損部を充填し深部には毛細血管の増生がみられる。その後主に紡錘形の未分化間葉系細胞により充填され、リンパ球や多核巨細胞も観察される。損傷縁の関節軟骨には細胞の壊死と思われる empty lacuna が認められ、少し離れた部位では軟骨細胞が

増殖し、cluster 形成される。修復組織の表面には陥凹がある。そのあと修復組織表面には約1ヶ月でほとんど陥凹がみられず、底部には骨組織の形成が認められ、毛細血管は消失する。修復組織中の細胞は全般的にまるみを帯び、軟骨細胞様となる。やがて修復軟骨の細胞密度は減少し周囲にこれらの細胞が中間層にも認められる。Tide mark が出現してくる。損傷後3ヵ月して修復組織は非損傷部の関節軟骨の軟骨下骨より上方に位置するが、Tide mark はほぼ同じ高さに位置し、石灰化層もみられる。全般的に修復細胞周囲基質には異調染色が観察され、組織学的に硝子軟骨に近い形態をとる。次に、細胞密度の減少と損傷縁の関節軟骨に接する部分における修復組織面の不整化が認められる。約1年で修復組織の細胞密度はさらに低くなり、Tide mark および修復組織下骨組織の関節面へ向かう上昇がみられる。

一般的に骨髄に達しない関節軟骨層内の損傷(部分欠損)では損傷縁の関節軟骨の軟骨細胞の代謝亢進が一時的に認められることがあるが、たとえ小さな損傷であっても損傷部はそのまま残存する。骨髄に達する損傷(全層欠損)では環境の違いにより、線維組織、線維軟骨あるいは硝子軟骨により修復される。

生物学的製剤により軟骨が修復されたという報告はいまのところない。しかしMMP-3の臨床的な改善やMRIによる関節裂隙の輝度変化は軟骨修復の可能性を示唆するものである。関節リウマチの骨関節破壊の本当の意味での修復は軟骨修復にあると考えられる。関節軟骨が修復しないかぎり関節の疼痛や機能障害は継続し人工関節を余儀なくせざるをえない。将来的にどの生物学的製剤がより関節軟骨を修復できるのかその評価法もふくめて幅広く検討していく余地がある。現在

のところレントゲン上骨びらん修復の機序解明や軟骨組織の修復については報告はない。本研究のより軟骨組織についてMTX使用軟骨組織をcontrolとしてプロテオグリカン、type II collagenについて発現パターンに変化がみられ、プロテオグリカンは軟骨下層に、type II collagenは軟骨表層に生物学的製剤インフリキシマブを使用下においては発現増強がみられた。現在血清軟骨代謝マーカーやMMP-3との変化比較を解析中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計13件9,10以外すべて査読あり)

- 1) Kanbe K, Inoue K, Inoue Y, Suzuki Y. Histological analysis of synovium in cases of effect attenuation associated with infliximab therapy in rheumatoid arthritis. Clin Rheum 27: 777-781, 2008.
- 2) Kanbe K, Inoue K, Inoue Y, Suzuki Y. Histological changes in bone marrow after treatment of infliximab for rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol. 27: 497-501, 2008.
- 3) Suzuki Y, Inoue K, Inoue Y, Kanbe K. Histological analysis of synovium by treatment of etanercept for rheumatoid arthritis. International J Rheumatic Disease, 2008 in press.
- 4) Sekine C, Inoue K, Chiba J, Inoue Y, Kanbe K. Changing of bone resorption marker by treatment with infliximab for rheumatoid arthritis. Tokyo Wom Med Univ 78:260-265, 2008.

- 5) Inoue Y, Inoue K, Kanbe K. Efficacy of holmium: yttrium-aluminium-garnet (Ho: YAG) laser therapy for arthroscopic synovectomy of rheumatoid arthritis. Tokyo Wom Med Univ 78:111-118, 2008.
- 6) Kanbe K, Yang X, Wei L, Sun C, Chen Q. Pericellular matrilins regulate activation of chondrocytes by cyclic load-induced matrix deformation. J Bone Miner Res. 22:318-28,2007.
- 7) Inoue Y, Inoue K, Chiba J, Suzuki Y, Kanbe K. Histological change of synovium and clinical efficacy of arthroscopic synovectomy for effect attenuation by etanercept in rheumatoid arthritis. J Tokyo Wom Med Univ 77:558-566,2007.
- 8) 神戸克明、井上和彦、千葉純司、井上靖雄、鈴木祐孝. 関節リウマチに対するインフリキシマブによる寛解導入療法. 日本リウマチ関節外科学会誌 26:393-401, 2007.
- 9) 神戸克明、井上和彦. 関節リウマチの骨・関節破壊：骨関節破壊と QOL. Clinical; Calcium 17:10-15, 2007.
- 10) 神戸克明. 関節リウマチの骨・関節破壊：骨関節破壊修復. Clinical; Calcium 17:105-109, 2007.
- 11) Kanbe K, Inoue K, Xiang C, Chen Q. Identification of clock as a mechano-sensitive gene by large-scale DNA microarray analysis: down-regulation in osteoarthritic cartilage. Modern Rheumatology 16:131-6, 2006.
- 12) Kanbe K, Inoue K. Efficacy of arthroscopic synovectomy for the effect attenuation cases of infliximab in rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol. 25:877-881,2006.
- 13) Wei L, Sun X, Kanbe K, Wang Z, Sun C, Terek R, Chen Q. Chondrocyte death induced by pathological concentration of chemokine stromal cell-derived factor-1. J Rheumatol 33:1818-26,2006.
- 〔学会発表〕(計 18 件)
- 1) 神戸克明、井上和彦、千葉純司、早田浩一朗、井上靖雄 生物学的製剤効果不十分例に対する関節鏡視下滑膜切除の有効性. 第 82 回日本整形外科学会学術集会 H21.5.14-17.福岡
- 2) 神戸克明. 滑膜切除の今後の展望. 第 53 回日本リウマチ学会 H21.4.23-26.東京
- 3) 神戸克明. 生物学的製剤による骨髄組織の解析 第 53 回日本リウマチ学会 H21.4.23-26.東京
- 4) 神戸克明. 生物学的製剤と手術療法、滑膜および骨組織. 第 53 回日本リウマチ学会 H21.4.23-26.東京
- 5) 神戸克明. 生物学的製剤と滑膜病理 第 53 回日本リウマチ学会 H21.4.23-26.東京
- 6) 亀田秀人、神戸克明、佐藤絵里、植木幸孝、斉藤一義他. メトトレキサートは効果不十分例においてもエタネルセプト開始時に中止せず継続した方が良好な関節破壊の阻止と身体機能の改善が得られる (JESMR 試験 52 週の結果から). 第 53 回日本リウマチ学会 H21.4.23-26.東京
- 7) 神戸克明. 関節リウマチの生物学的製剤による寛解導入療法 ランチタイムセミ

- ナー 5 第 36 回日本関節病学会、
H20.11.7-8.神戸
- 8) 神戸克明、井上和彦、千葉純司、鈴木祐孝、井上靖雄。早期 RA に対するインフリキシマブ治療。第 36 回日本関節病学会、H20.11.7-8.神戸
- 9) Katsuaki Kanbe, Kazuhiko Inoue, Yasuo Inoue, Yutaka Suzuki. Rheumatoid factor is associated with sustaining remission after discontinuation of infliximab for rheumatoid arthritis. EULAR Congress, Paris France, 11-14 June, 2008.
- 10) 神戸克明、井上和彦、千葉純司、鈴木祐孝、井上靖雄。関節リウマチにおける関節鏡視下画像診断。第 52 回日本リウマチ学会総会 H20.4.20-23.札幌
- 11) 神戸克明、井上和彦、千葉純司、井上靖雄、早田浩一郎。関節リウマチに対するインフリキシマブによる寛解持続因子。第 52 回日本リウマチ学会総会 H20.4.20-23.札幌
- 12) 神戸克明、井上和彦、千葉純司、井上靖雄、早田浩一郎。関節リウマチに対するタクロリムスによる治療成績。第 52 回日本リウマチ学会総会 H20.4.20-23.札幌
- 13) 神戸克明。RA 治療における積極的な生物学的製剤の使用について。2nd Sapporo Orthopedics lecture H20.2.16. 札幌。
- 14) Katsuaki Kanbe, Kazuhiko Inoue, Junji Chiba, Yasuo Inoue. Risk factors of infection after orthopaedic surgery with infliximab for rheumatoid arthritis. EULAR Congress, Barcelona Spain, 13-16 June, 2007.
- 15) 神戸克明、井上和彦、千葉純司、井上靖雄、鈴木祐孝。関節リウマチに対する生物学的製剤と手術治療。第 80 回日本整

- 形外科学会学術総会、H.19.5.24-7.神戸
ポートピア、神戸
- 16) 神戸克明、井上和彦、千葉純司、井上靖雄、鈴木祐孝。関節リウマチに対する生物学的製剤と手術治療。第 80 回日本整形外科学会学術総会、H.19.5.24-7.神戸
ポートピア、神戸
- 17) 神戸克明、井上和彦、千葉純司、井上靖雄、高山篤、早田浩一郎。関節リウマチに対するインフリキシマブによる治療成績。第 51 回日本リウマチ学会、H19.4.26-29.パシフィコ横浜、横浜市
- 18) Katsuaki Kanbe, Kazuhiko Inoue. Ho-YAG laser treatment in shoulder arthroscopic synovectomy of rheumatoid arthritis. 14th European Rheumatoid Arthritis Surgical Society (ERASS) meeting, Pfaffikon/Zurich, Switzerland, on May 25-26, 2006.

〔図書〕(計 1 件)

著者：神戸克明、監修：井上和彦
関節リウマチに対するインフリキシマブの使い方。ベクトルコア社。2008.3.10.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神戸 克明 (KANBE KATSUAKI)
東京女子医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70366326

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし