

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591779

研究課題名(和文) 軟骨下骨組織の健全化による関節疾患の予防・治療に関する研究

研究課題名(英文) Prevention and treatment of joint diseases by normalization of the subchondral bone

研究代表者

豊島 良太 (TESHIMA RYOTA)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：50144671

研究成果の概要(和文)：

関節炎における骨関節破壊の予防と治療法について検討した。
 関節リウマチにおける転倒と骨折の頻度を検討し、転倒50%/年、骨折2.5%/年の結果を得た。
 関節炎モデル動物に対するラロキシフェンとエタネルセプトの効果を検討し、前者は関節炎と骨量減少を抑制し、後者は骨修復をもたらすという結果を得た。関節リウマチの軸椎垂直亜脱臼の病態を検討し、垂直亜脱臼は環椎外側面の水平化と軸椎外側関節面の沈下によって発生することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

Prevention and treatment of joint destruction due to arthritis were studied.

A prospective 1-year study showed that incidences of fall and fracture were 50% and 2.5% in women with rheumatoid arthritis (RA), respectively. Effect of raloxifene and etanercept on joint destruction in rats with collagen-induced arthritis was investigated. Raloxifene could suppress arthritis and bone loss and etanercept could promote bone formation. Development of vertical subluxation(VS) of the axis in patients with RA was investigated using CT. VS could be induced by destruction of the lateral mass of the atlas and axis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：軟骨下骨組織、関節軟骨、関節リウマチ、関節破壊、骨脆弱性、コラーゲン誘発関節炎

1. 研究開始当初の背景

軟骨下骨組織は、関節軟骨石灰化層に接する軟骨下骨終板と、これを支えるように連なる海綿骨梁からなる。関節に加わった応力は、先ず関節軟骨で一部が吸収され、残りの大部分は軟骨下骨に分散伝達される。そして、軟

骨下海綿骨梁が歪むことによって吸収緩和される。軟骨下海綿骨梁の剛性が高く、その歪みが少ない場合には、軟骨に大きな応力が加わり軟骨損傷をもたらす。逆に、剛性が低く、その歪みが大きい場合にも、軟骨下骨の骨折が発生し、軟骨は損傷される。このよう

に関節軟骨の形態と機能の維持には、軟骨下骨が重要な役割を担っているにも拘わらず、取り扱いや解析の難しい組織であるため、多くの不明な点が残されている。

これまで、我々は関節の構造に関して専門誌に報告してきた。さらに、変形性関節症自然発症モルモットにおける変形性関節症 (osteoarthritis, OA) の発症及び進展と軟骨下骨の関わりについて報告した (Muraoka T, Teshima R, et al: Role of subchondral bone in osteoarthritis development. A comparative study of two strains of guinea pigs with and without spontaneously occurring osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 56:3366-74, 2007)。この研究によって OA 発症前の軟骨下骨は骨萎縮の病態に、そして OA 発症後の進展時には骨硬化の病態にあることを明らかにした。

また、骨吸収抑制薬であるビスホスホネート製剤が OA の進展予防に有効であるとの報告や軟骨下骨脆弱性骨折の報告が相次ぎ、OA や骨粗鬆症における軟骨下骨の構造と代謝の重要性が再認識されている。関節リウマチにおいても膝関節の変形は脛骨顆部の軟骨下骨の圧潰によって発生し、骨粗鬆化の程度と密接に関係することを明らかにした (Kikkawa T, Teshima R, et al: Knee deformity in rheumatoid arthritis is closely correlated with generalized osteoporosis. *Mod Rheumatol*, 18:45-51, 2008)。これらの研究を発展させ、軟骨下骨を健常状態に保つことによって関節疾患の予防・治療に資する目的で本研究を行った。

2. 研究の目的

関節炎の罹患によって骨粗鬆症そして骨脆弱性を来すため、関節炎患者では健常対照者に比べて骨折頻度が高いと報告されている。しかし、関節炎患者では転倒のリスクも高く、これが高い骨折頻度に寄与している可能性もあり、基本データとして関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) の転倒頻度の前向き研究を行った(1)。

次に、関節炎による骨関節破壊の、薬物による予防と治療効果を実験的に検討した(2), (3)。

さらに、脊髄圧迫を来し治療に難渋する RA の軸椎垂直亜脱臼の原因となる環軸関節の破壊の病態を検討した(4)。

(1) RA の転倒と骨折頻度

RA 患者は、多関節の痛みや機能障害、筋力低下などのため転倒しやすいと言われていいる。しかし、RA の転倒頻度やその危険因子に関する報告は少なく、前向き調査は未だみられない。本研究では、RA 患者の転倒について、

1 年間にわたる前向き調査を行い、その転倒頻度と危険因子を検討した。

(2) ラロキシフェンの関節炎と骨関節破壊に対する効果

RA の発症率は女性が男性の 3~4 倍で、関節炎症状は妊娠中には軽減し出産後に悪化することから、その病勢に女性ホルモンが深く関与していることが知られている。また、RA では骨密度低下によって骨折や関節破壊のリスクが高くなるが、これに女性ホルモンの欠乏が加わるとリスクはさらに増すため、RA の骨粗鬆症の治療は重要な臨床的命題である。

選択的エストロゲン受容体モジュレーターの一つであるラロキシフェン (raloxifene, RAL) は、広く臨床で用いられている閉経後骨粗鬆症の治療薬であるが、近年、実験動物の関節炎症状を抑制するといういくつかの報告がある。本研究では、RA の動物モデルとして確立されているコラーゲン誘発関節炎 (collagen-induced arthritis, CIA) ラットの関節炎および骨密度に対する RAL の効果を、卵巣摘出 (ovariectomy, OVX) と非摘出の状態に分けて検討した。

(3) エタネルセプトの関節炎による骨関節破壊に対する効果

RA において、TNF 阻害薬により X 線学的に骨破壊の修復が得られるという臨床的な報告が散見されるが、その修復機序の詳細は不明である。そこで、RA モデルである CIA ラットを用いて、エタネルセプト (etanercept, ETN) の関節破壊の修復について検討した。

(4) RA の環軸関節破壊の病態

RA を対象に頭蓋底から上位頸椎の CT 解析を行い、軸椎垂直亜脱臼の進行と環軸椎外側塊の破壊の関連を検討した。

3. 研究の方法

(1) RA の転倒と骨折頻度

対象は、鳥取大学医学部附属病院に通院中の、米国リウマチ学会分類基準を満たす 50 歳以上の女性で、自立歩行可能な 84 名である。転倒を「意図せずに足底以外の身体の一部が地面に接触すること」と定義し、カレンダー形式の自己記入式調査票を配布して、1 月毎に回収した。調査期間は 1 年間とし、期間中の転倒の有無で転倒群と非転倒群とに分けて以下の項目について比較検討した。患者背景として、年齢、身長、体重、既往歴、骨関節手術歴、functional class (機能分類)、stage (病期分類)、罹病期間を、薬物として、骨粗鬆治療薬、抗リウマチ薬、ステロイド、降圧利尿薬、抗不安薬、睡眠薬の内服の有無

を、RAの病勢として、腫脹・疼痛関節数、CRP、赤沈を、日常生活動作の指標として modified Health Assessment Questionnaire (mHAQ) スコアを、調査した。身体機能評価では functional reach test、最大1歩幅、5 m 歩行時間、踏み台昇降能力、立位片脚起立時間、握力、ライフコーダによる運動量・歩数、開眼での重心動揺検査によるバランス能力を評価した。さらに、二重エネルギーX線吸収測定法を用いて、骨密度、筋肉量、体脂肪率を測定した。

それぞれの項目について2群間の比較を行った後、有意差のみられた項目について多変量解析を行った。

(2) ラロキシフェンの関節炎と骨関節破壊に対する効果

実験には7か月齢の雌SDラットを用い、①コントロール (n=10)、②CIA+OVX+RAL (n=13)、③CIA+OVX+vehicle (n=11)、④CIA+sham+RAL (n=10)、⑤CIA+sham+vehicle (n=12)の5群を作製した。

II型コラーゲンによる感作の1週後にOVXまたは疑似手術 (sham surgery, sham) を行い、その後、RALまたはvehicle (Veh) を3週間経口投与し、感作後4週で屠殺した。屠殺まで1週毎に体重測定と四肢の関節炎評価 (後足部腫脹、関節炎スコア) を行った。屠殺後にX線像によって足部の関節破壊を評価し、peripheral quantitative computed tomography による大腿骨骨幹部および骨幹端部の骨密度と血中IL-6の測定を行った。また膝関節の非脱灰標本作製し、骨形態計測学的ならびに病理組織学的評価 (滑膜および関節軟骨の面積の計測) を行った。

(3) エタネルセプトの関節炎による骨関節破壊に対する効果

実験動物は、6か月齢雌のSDラットを用いて、①コントロール (C群、n=15)、②CIA+Vehicle (CIA群、n=21)、③CIA+ETN (ETN群、n=21)の3群を作製した。ETN群には、3mg/kgを週3回皮下投与した。

3群について、感作後7、14、21日に大腿骨遠位と脛骨近位の骨組織よりtotal RNAを抽出し、TNF- α 、RANKL、OPG、DKK-1、Wnt-1、TRAPのmRNAの発現を、RT-PCR法で定量した。

組織学的検討はCIA群 (n=10) とETN群 (n=10) を作製し、感作後8週の時点で大腿骨内側顆の中央を通る硬組織標本作製し、浸潤した炎症性肉芽であるパンス面積、パンスに接する骨表面に存在する破骨細胞数、類骨面・量、ラベリング面を計測した。

(4) RAの環軸関節破壊の病態

RA患者80例、原発性骨粗鬆症 (Osteoporosis, OP) 患者28例を対象とした

(全例女性)。RAは軸椎垂直亜脱臼 (vertical subluxation, VS) の有無 (VS: Redlund-Johnell (R-J) 値 < 29mm) により、2群に分けた。VS(+)群は10例、VS(-)群は70例であった。調査項目は、年齢、身長、体重、骨密度 (DEXA; 腰椎・大腿骨) である。越智の分類による病型分類では、少関節型が52例 (内VSは5例)、多関節型が28例 (内VSは5例) であった。ステロイド使用例は45例 (内VSは7例) であった。全例に対して頸椎の単純X線とCTを行った。歯突起に平行な reconstruction coronal view において、歯突起長、環椎・軸椎の外側塊の高さ (C1-LMH, C2-LMH)、軸椎椎体の高さ (C2-BH)、後頭環軸関節と外側環軸関節の角度 (C1-FA)、外側環軸関節と軸椎底面の角度 (C2-FA) を計測した。

また、VS(-)群16例とOP群10例に対して3DTBSAS (TEIJIN, Pharma, Tokyo, JAPAN) を用いて環椎、軸椎、C1-2の体積 (V-C1, V-C2, V-C1-2) を測定した。

4. 研究成果

(1) RAの転倒と骨折頻度

期間中の全調査票を回収できた84名中80名 (95%) について検討を行った。年間の転倒は40名 (50.0%) にみられ、複数転倒は26名 (32.5%)、骨折は2名 (2.5%) であった。

転倒群と非転倒群の比較では、転倒群でclassの進行例が多く (p=0.012)、ステロイドと降圧利尿薬を内服している割合が有意に高かった (p=0.02, p=0.002)。患者背景と薬物では、その他に有意差はみられなかった。RAの病勢では、転倒群で腫脹関節数が有意に多く (p=0.008)、mHAQスコアが高かった (p=0.03)。身体機能評価では、転倒群で立位片脚起立時間が有意に短く (p=0.008)、踏み台昇降能が劣っていた (p=0.02)。ライフコーダで評価した運動量・歩数には両群間に有意差を認めなかった。重心動揺検査では転倒群で外周面積が有意に大きかった (p=0.0003)。骨密度、筋肉量、体脂肪率には有意差を認めなかった。

多重ロジスティック回帰分析では、腫脹関節数、降圧利尿薬内服、立位片脚起立時間低値、重心動揺面積高値がそれぞれ独立した転倒の危険因子であった。

本研究によって得られたRA患者の転倒率は50%であった。これは前向き研究としては初の報告である。65歳以上の一般人の転倒頻度は国内では10~20%と報告され、それに比べ非常に高率であった。一方、海外でのRA患者の後ろ向き研究による報告は30~50%であり、それに比べて本結果は同等かやや高値であった。これは患者の記憶に委ねる後ろ向き調査では過小評価される傾向にあるた

めと推察された。

転倒とその要因について有意差のみられた項目について検討した。降圧利尿薬は起立性低血圧を引き起こす恐れがあるため、一般的に転倒の危険因子とされる。6つの身体テストではいずれの検査結果も転倒群で劣る傾向にあり、立位片脚起立時間や踏み台昇降能に有意差がみられ、転倒群ではバランス能力が低いと考えられた。転倒群で重心動揺面積が有意に大きいことからバランス能力低下が裏付けられた。

これまでの一般高齢者での転倒予防に関する研究から、転倒危険因子の評価やそれに基づいた予防プログラムが転倒防止に有用であることが知られている。RA患者ではそれらに加え、薬物による適切なRAの病勢のコントロールと内服薬の副作用に配慮することが転倒と骨折の予防に有用であると考えられた。

(2) ラロキシフェンの関節炎と骨関節破壊に対する効果

後足部腫脹、関節炎スコアおよび関節破壊の程度はRAL投与により抑制される傾向にあり、sham群に比べOVX群でその効果は大きかった。関節内の滑膜増殖は、OVX群、sham群ともVeh群に比べてRAL投与群で有意に抑制されていた ($p < 0.05$)。OVX群、sham群ともRAL投与によって関節炎に伴う骨密度低下と皮質骨厚の減少が抑制されていた ($p < 0.05$)。

骨形態計測学的解析ではOVX群、sham群ともVeh群に比べてRAL投与群で骨吸収パラメーター(破骨細胞数、破骨細胞面、骨吸収面)が有意に低値であった ($p < 0.0001$)。

血中IL-6は各群間に有意差を認めなかった。

RAL投与によりOVX群、sham群ともに関節炎が抑制されることが明らかとなった。RALの抗炎症作用機序については、エストロゲンの作用機序と同様にいまだ十分には明らかにされておらず、RALがproinflammatory cytokineの調節酵素であるCOX-2やiNOSなどを抑制するとの報告があるにとどまる。近年、滑膜細胞内のエストロゲンレセプター(estrogen receptor, ER)の存在が確認されていることから、RALが滑膜細胞ERに直接作用して、その増殖を抑制し、滑膜炎が抑制された可能性が考えられる。

一方、RALの骨に対する主な作用機序は、エストロゲンと同様に破骨細胞性骨吸収の抑制と報告されている。したがって、エストロゲン欠乏状態にない卵巣非摘出CIAラットに対するRALの効果は大きくないと予測していたが、RAL投与によりOVX群、sham群ともに骨密度低下が抑制され、卵巣非摘出CIAラットでは卵巣摘出ラットと同様に、RALによる破骨細胞性骨吸収が強く抑制されること

が明らかとなった。これらの結果から、CIAではエストロゲンレベルが低下している可能性、そしてRALの閉経前ヒトRAに対する有効性が示唆された。

(3) エタネルセプトの関節炎による骨関節破壊に対する効果

感作後のいずれの時点においてもTNF- α 、RANKL、OPG、TRAPの発現にCIA群とETN群の間に有意差を認めなかった。DKK-1の発現は、7、14日の時点で、ETN群で有意に低く、21日でも低い傾向にあった。Wnt-1の発現は7日の時点でETN群が有意に高く、14、21日でも高い傾向にあった。

組織学的には、パンス面積、破骨細胞数にCIA群とETN群の間に有意差を認めなかったが、類骨面・量、ラベリング面はETN群で有意に高値を示した。パンス面積と破骨細胞数に差がなく、RANKL、OPGの発現に両群間で差がなかったことと一致する所見であった。

以上の結果から、ETNがDKKの発現を抑制することにより、Wntのup regulationが起こり、続いて β カテニンの脱リン酸化そして骨芽細胞の分化が促進され、類骨形成と石灰化という修復反応が発生したと考えられた。

(4) RAの環軸関節破壊の病態

年齢はOP群とVS(+)群に比べてVS(-)群で有意に低く、身長・体重はVS(+)群で他の2群に比べて有意に小さかった。腰椎・大腿骨骨密度はOP群で他の2群に比べて低値を示したが、VSの有無では有意差を認めなかった。RA罹病期間はVS(+)群でVS(-)群に比較して有意に長かった。DASはVSの有無では有意差を認めなかった。C2-LMH、C1-LMH、C1-FAはVS(+)群のみ有意に低値を示した。また、C2-LMH、C2-BH、C1-LMH、C1-FA、VC1-2はR-J値と正の相関を示し、CRPと罹病期間はR-J値と負の相関を示した。C2-LMHとC1-LMH、C2-LMHとC1-FA、C1-LMHとC1-FAは正の相関を示した。V-C1は、C1-LMH、V-C2、V-C1-2と正の相関を示した。

(5) まとめ

①前向き調査によるRA患者の転倒頻度は50%で、一般人と比べて高い値であった。腫脹関節数、降圧利尿薬内服、立位片脚起立時間低値、重心動揺面積高値が独立した転倒の危険因子であった。したがって、転倒はRAの多関節障害によるバランス能力の低下と降圧利尿薬の副作用に起因する可能性が示唆され、転倒と骨折の予防には、適切なRA病勢のコントロールとともに内服薬の副作用に配慮することが重要である。

②ラロキシフェンは、エストロゲン欠乏状

態と同様、エストロゲン充足状態においても関節リウマチモデル動物の関節炎と骨密度低下を抑制する。

③エタネルセプトは、関節リウマチモデル動物の骨破壊部の DKK 発現の抑制によって、破壊された軟骨下骨組織において骨形成を促進し、骨修復をもたらす。

④関節リウマチの環軸関節炎によって発生する軸椎垂直亜脱臼 は、環椎・軸椎外側塊の圧壊、特に環椎外側関節面の水平化と軸椎外側関節面の沈下により進行する。

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2件)

- ①Hayashi I, Hagino H, Okano T, Enokida M, Teshima R: Effect of raloxifene on arthritis and bone mineral density in rats with collagen-induced arthritis. *Calcified Tissue International*, 2011;88:87-95. 査読有り
- ②Hayashibara M, Hagino H, Katagiri H, Okano T, Okada J, Teshima R: Incidence and risk factors of falling in ambulatory patients with rheumatoid arthritis: a prospective 1-year study. *Osteoporosis International*, 2010; 21: 1825-1833. 査読有り

[学会発表] (計2件)

- ①Tanida A, Kishimoto Y, Okano T, Hagino H, Teshima R: Etanercept promotes bone formation via suppression of Dickkopf-1 expression in rats with collagen-induced arthritis, 7th Combined meeting of the Orthopaedic Research Societies, Kyoto International Conference Center, 平成22年10月16-20日
- ②土海敏幸, 萩野浩, 永島英樹, 岸本勇二, 豊島良太: 関節リウマチにおける軸椎垂直性亜脱臼 vertical subluxation の進行と環椎/軸椎外側塊の破壊, 第25回日本整形外科学会基礎学術集会, 京都市, 国立京都国際会館, 平成22年10月14-15日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊島 良太 (TESHIMA RYOTA)
鳥取大学・医学部・教授
研究者番号: 50144671

研究協力者

林 育太 (大学院生)
林原 雅子 (大学院生)
谷田 敦 (大学院生)
土海 敏幸 (大学院生)