

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462368

研究課題名(和文) 関節リウマチにおける傍関節性骨粗鬆症と因子の探索 - ケモカインの役割 -

研究課題名(英文) Contributing factors to periarticular osteoporosis in rheumatoid arthritis

研究代表者

伊藤 宣 (ITO, Hiromu)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70397537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウス大腿骨の骨治癒において、ケモカインの一つMCP-1が骨傷後初期に発現し、この欠損および阻害によって骨治癒が遅延した。このことは、骨治癒にMCP-1が重要な役割を果たしていることを示す。

また関節リウマチ患者の前腕遠位端の骨密度は、前腕骨幹部の骨密度より減少しており、手部の関節破壊や上肢の機能障害は前腕遠位骨密度の予測因子であった。これらのことから、傍関節性骨粗鬆が重要である。

研究成果の概要(英文)：In bone healing of the mouse femur, MCP-1, a chemokine, was expressed in the early phase, and its blockade delayed bone healing. These results indicate MCP-1 plays an important role in the early phase of bone healing.

Bone mineral density (BMD) of the distal end of the forearm in patients with rheumatoid arthritis (RA) was lower than that of the shaft of the forearm, and joint destruction of the hand and functional disability of the upper hand were independent predictors for lower BMD of the forearm. Therefore, juxtaarticular osteoporosis has strong impact in the joint destruction and function in patients with RA.

研究分野：整形外科学、リウマチ学

キーワード：関節リウマチ 傍関節性骨粗鬆 ケモカイン 機能障害 骨治癒

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) の治療は、生物学的製剤の登場で大きく変わり、その活動性はかなりコントロールされ、寛解が現実的な治療目標となった。しかしこれらの薬剤の精力的な使用によっても、疾患活動性をコントロールできない患者は一定の割合で存在し、また合併症で既存の薬剤使用が充分できない患者も多く、そのような患者では、長期的な関節破壊の進行は避けられない。また十分に活動性がコントロールされている患者でも関節破壊が進む例も珍しくない。こうした点から、RA の関節破壊を防ぐ治療戦略において、抗サイトカイン治療、抗リンパ球治療とは異なる、新しい見地からの治療介入が求められている。

RA においては、滑膜、関節内の免疫細胞、関節軟骨、これを支える骨組織など、さまざまな組織、細胞の複雑な関連によって関節破壊が生じる。我々はこれまで、RA における滑膜細胞 (*Hiramitsu et al, Rheumatology 2006, Murata et al, Arthritis Res Ther 2011, Ishikawa et al, Arthritis Rheum 2012*)、免疫担当細胞 (*Hirota et al, J Exp Med 2007, Tanida et al, Cytokine 2011, 2012*) の役割、関節軟骨の変性 (*Nishitani et al, J Cell Biochem 2010*)、および骨治癒反応のメカニズムを明らかにしてきた (*Ito et al, Nat Med 2005, Kitaori et al, Arthritis Rheum 2009*)。これらの知見から、RA における関節軟骨変性や関節破壊には、関節内の細胞や因子だけでなく、関節を支える骨の脆弱性や因子が寄与していることが強く推論される。

RA では骨粗鬆を来たしやすきことはよく知られているが、関節破壊との関連について十分調査されていない。最近、抗 RANKL 抗体投与によって、手部全体の骨密度改善が bone erosion を改善したとする報告があるが、傍関節性骨粗鬆への影響および関節軟骨への効果については、その関連が充分明らかになったとはいえない。RA において、関節を支える傍関節性骨粗鬆の病態の解明と関節破壊に与える影響については、全身性骨粗鬆との違いも含めて最大の未解決の問題の一つである。この解明には、実際のヒト RA 患者の骨サンプルを用いて、その病態を分子生物学的、組織学的に詳細に検討し、さらに多数の RA 患者において、疾患活動性評価、関節破壊評価とともに、全身性及び傍関節性骨粗鬆の評価を行い、これらの関連を前向きに評価することが重要である。

特に我々は、これまで SDF-1/CXCR4、MCP-1/CCR2、CCL20/CCR6 などのケモカインシグナルが、骨、軟骨、滑膜など異なった組織で異なった作用を持ちながら関節破壊を司っている可能性を明らかにしている。これらの知見から、傍関節性骨粗鬆と関節破壊においてケモカインファミリーは非常に重要な役割を果たしていると推測される。すなわち、ヒト RA 患者のサンプルを用いて、

網羅的にケモカインを探索し、その役割を研究することが新しい治療の開発に重要と考えられる。

### 2. 研究の目的

RA における傍関節性骨粗鬆の分子生物学的メカニズムにおけるケモカインファミリーの役割、および傍関節性骨粗鬆の関節破壊に与える影響を明らかにする。

(1) RA における傍関節性骨粗鬆の病態におけるケモカインファミリーの役割を、網羅的・包括的な組織学的・分子生物学的研究から明らかにする。

マウスの骨治癒におけるケモカインの発現と機能を解析する。マウスの大腿骨に骨折を作成し、発現するケモカインを網羅的に解析する。特に骨折治癒の初期に強く発現したケモカインについて、機能解析を行う。

RA の人工膝関節置換術時に関節軟骨および海綿骨を含む軟骨下骨を採取する。変形性膝関節症に対する人工膝関節置換術時に採取したサンプルと比較して、組織学的に骨梁構造、破骨細胞数や形態などの違いを明らかにする。また骨密度、骨質の変化・異常を明らかにする。更に軟骨下骨の評価と、関節軟骨の組織学的評価の関連を調べる。

(2) RA における関節破壊に、全身性骨粗鬆と傍関節性骨粗鬆がどのように影響しているか、これにケモカイン濃度が関連しているのか、RA のコホートにおける横断的、縦断的な臨床データから明らかにする。

RA の疾患活動性や身体機能が、どの程度全身性骨粗鬆および傍関節性骨粗鬆に影響しているのか、逆に全身性骨粗鬆および傍関節性骨粗鬆が、疾患活動性や身体機能にどの程度影響をしているのか、横断的データ解析から明らかにする。また RA 患者の血清サンプルから、ケモカイン、サイトカインを測定し、疾患活動性、身体機能や、関節破壊の程度とともに、全身性骨粗鬆および傍関節性骨粗鬆と関連しているか調査する。全身性骨粗鬆および傍関節性骨粗鬆の程度が、関節破壊、すなわち joint space narrowing と bone erosion の進行とどの程度関連しているか、横断的データ解析から明らかにする。

(1) ~ (2) の関連を、縦断的データ解析から明らかにする。特に全身性骨粗鬆および傍関節性骨粗鬆の存在およびその程度が、その後の関節破壊の進行に関連するのかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) マウスの骨折治癒におけるケモカインの動きの解析およびヒト関節リウマチにお

ける傍関節骨粗鬆の構造学的および組織学的解析

マウスの大腿骨に骨折を作成し、髓内釘で固定する。術前および術後経時的に手術部組織から mRNA を抽出し、術前と比べて術後 2 日目に発現が上昇し、かつ術後 7 日目に減少するケモカインを網羅的に解析する。

特に発現が上昇していたケモカインの骨髄由来間葉系幹細胞の遊走に与える影響を migration assay で確認する。

このケモカインを発現しないノックアウトマウスにおいて骨折を作成し、野生型と比較する。

マウスの骨折モデルに、このケモカインの阻害薬を投与し、骨治癒反応を比較する。

RA および変形性膝関節症に対する人工膝関節置換術時に、関節軟骨と海綿骨を含む軟骨下骨を採取する。この組織をマイクロ CT で構造解析を行う。

また同時に組織学的解析を行い、ケモカインの発現を確認する。

(2) RA における全身性骨粗鬆と傍関節性骨粗鬆の関節破壊に与える影響の解析

京大病院リウマチセンターにおける関節リウマチの大規模コホートのデータから、

性別、年齢、身長、体重、家族歴、喫煙やアルコール摂取歴、既往歴、手術歴などの基礎データ

RA の発症年齢、薬剤使用歴、stage、class、薬剤使用歴などの RA に関する基礎データ

腫脹関節数、疼痛関節数、全身状態の患者評価 (VAS)、医師評価、炎症マーカー、これらを用いた疾患活動性評価、ADL・QOL 評価

血清学的マーカー、関節軟骨破壊の血清学的マーカー

両手、両足、両膝の X 線を用いた関節破壊の評価 (modified Sharp スコア：関節裂隙狭小化と骨びらん別に評価を行う) と傍関節性骨粗鬆の評価

骨粗鬆症についての薬剤使用歴、骨折既往歴、骨折についての家族歴など骨粗鬆症に関連する基礎データ

血中カルシウム、リン、骨吸収マーカー、骨形成マーカー、骨マーカー、骨質マーカー

腰椎、大腿骨近位部骨密度検査に加え、傍関節性骨粗鬆に対して橈骨遠位端の骨密度測定

特に橈骨遠位端では、関節近傍の骨密度と、関節から離れた部分の骨密度検査を同時に行い、関節破壊と、いずれが関係しているか統計学的に解析する。

これらのデータを集計し統計学的に解析する。これらの結果から横断的に、RA の全身性骨粗鬆および傍関節性骨粗鬆の程度と違

いについて、これらが RA 疾患活動性、身体機能、関節破壊 (軟骨破壊と骨びらん) に与える影響について統計学的に解析する。

#### 4. 研究成果

(1) マウスの骨折治癒におけるケモカインの働きの解析およびヒト関節リウマチにおける傍関節骨粗鬆の構造学的および組織学的解析

マウスの大腿骨の骨折治癒においては、monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) が特に骨折後初期に発現していた。MCP-1 はマウス骨髄由来間葉系幹細胞の遊走を誘導した。

MCP-1 およびその受容体 CCR2 の欠損マウスは骨折治癒が遅延し、また MCP-1 の阻害薬を、骨折後初期に投与すると、骨折治癒が遅延した。MCP-1 欠損マウスから採取した骨を移植しても、骨治癒は遅延していた。

ヒト RA の膝軟骨下骨は、変形性膝関節症のそれに比べて、骨粗鬆化が重度であることが示された。

これらのことから、骨治癒においては、特にその初期においてケモカイン MCP-1 が重要な働きを示すことが示され、ヒト RA の軟骨下骨においてもケモカインが重要な働きを担っている可能性が示された。

(2) A における全身性骨粗鬆と傍関節性骨粗鬆の関節破壊に与える影響の解析

計 370 名のデータが解析可能で、前腕の遠位端の骨密度 (BMDud) は、前腕骨幹遠位 1/3 のそれ (BMD1/3) より有意に減少していた。罹病期間の短い患者においても同様であった。

手部の関節破壊は BMD1/3 の独立した予測因子であり、また年齢および上肢の機能障害は BMDud および BMD1/3 の予測因子であった。

これらのことから、手部の関節破壊においては、傍関節性骨粗鬆が非常に重要であり、また関節破壊の予測因子になりうることが示された。

#### 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)

Iwata T, Ito H, Furu M, Hashimoto M, Fujii T, Ishikawa M, Yamakawa N, Terao C, Azukizawa M, Hamamoto Y, Mimori T, Akiyama H, Matsuda S. Periarticular osteoporosis of the forearm correlated with joint destruction and functional impairment in patients with rheumatoid arthritis. Osteoporos Int 2016 27(2), 691-701. 査読有 DOI

10.1007/s00198-015-3256-1  
Ishikawa M, Ito H, Kitaori T, Murata K, Shibuya H, Furu M, Yoshitomi H, Fujii T, Yamamoto K, Matsuda S. MCP/CCR2 signaling is essential for recruitment of mesenchymal progenitor cells during the early phase of fracture healing. PLoS ONE 9: e104954, 2014. 査読有 DOI:10.1371/journal.pone.0104954

〔学会発表〕(計9件)

伊藤宣、岩田崇裕、布留守敏、橋本求、藤井隆夫、松田秀一：早期関節リウマチにおける骨密度を用いた関節破壊予測。第17回日本骨粗鬆症学会 2015年9月17~19日 広島国際会議場(広島県広島市)

岩田崇裕、伊藤宣、布留守敏、橋本求、藤井隆夫、寺尾知可史、小豆澤勝幸、濱本洋輔、三森経世、松田秀一：関節リウマチにおける前腕の傍関節骨粗鬆は関節破壊と機能障害に相関する。第17回日本骨粗鬆症学会 2015年9月17~19日 広島国際会議場(広島県広島市)

T. Iwata, H. Ito, M. Furu, M. Hashimoto, T. Fujii, M. Ishikawa, N. Yamakawa, C. Terao, M. Azukizawa, Y. Hamamoto, T. Mimori, H. Akiyama, S. Matsuda: Periarticular osteoporosis of the forearm correlated with joint destruction and functional impairment in patients with rheumatoid arthritis. The Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2015, June 10-13, 2015, Italy (Rome)

伊藤宣、岩田崇裕、布留守敏、橋本求、藤井隆夫、石川正洋、山川範之、三森経世、松田秀一：早期関節リウマチにおける骨密度を用いた関節破壊予測。第59回日本リウマチ学会総会・学術集会 2015年4月23~25日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

岩田崇裕、伊藤宣、布留守敏、橋本求、藤井隆夫、石川正洋、小豆澤勝幸、濱本洋輔、三森経世、松田秀一：関節リウマチにおける橈骨遠位端の傍関節性骨粗鬆について。第17回比叡RAフォーラム 2014年9月20日 京都センチュリーホテル(京都府京都市)

伊藤宣、布留守敏、石川正洋、荻野博子、小豆澤勝幸、濱本洋輔、齋藤充、松田秀一：関節リウマチでは発症早期から手関節に傍関節性骨粗鬆がおこる。第87回日本整形外科学会学術総会 2014年5月22日~25日 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

伊藤宣、布留守敏、橋本求、藤井隆夫、三森経世、松田秀一：関節リウマチにおける傍関節性骨粗鬆症の関節破壊に与える影響について。第44回骨・カルシウム代謝研究会 2013年11月29日 ホテルグランヴィア京都(京都府京都市)

伊藤宣、布留守敏、石川正洋、荻野博子、齋藤充、松田秀一：関節リウマチでは発症早期から手関節に傍関節性骨粗鬆がおこる。第121回中部日本整形外科災害外科学会学術集会 2013年10月3~4日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

Ito H, Furu M, Hashimoto M, Fujii T, Yamakawa N, Terao C, Mimori T. THU0384 Juxtaarticular Osteoporosis Exists in the Wrist Joint from the Early Stage of Rheumatoid Arthritis The Annual European Congress of Rheumatology EULAR2013, June 12-15, 2013, Spain (Madrid)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

伊藤 宣 (ITO, Hiromu)  
京都大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：70397537

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし