

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462357

研究課題名(和文) 関節リウマチ患者の骨質異常と脆弱性骨折リスク増加の病態

研究課題名(英文) Mechanisms of bone fragility in patients with rheumatoid arthritis

## 研究代表者

高畑 雅彦 (Takahata, Masahiko)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40374368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)患者の骨脆弱性と骨質異常の関連を手術時に採取した腸骨生検サンプルを用いて調査した。慢性的にステロイド剤を投与されているRA長期罹患患者では閉経後骨粗鬆症患者と比較して有意に力学的強度が低下しており、脆弱性骨折の既往も多かった。骨密度は二群間で有意差はなかったことから、対象症例における骨強度と靱性の低下は、骨微細構造の劣化や石灰化障害による骨質異常が原因であると考えられた。副次的な知見として、臨床骨折評価ツールであるFRAXスコアが、ステロイド剤を使用しているRA患者の骨折リスクの評価に有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the cause of increased fragility fracture risk in patients with rheumatoid arthritis (RA), we compared bone quality and quantity between RA patients and age and sex-matched postmenopausal non-RA patients using bone biopsy samples. Despite that there was no significant difference in bone mineral density between two groups, bone strength and toughness were significantly lower in RA group than in non-RA group. Deterioration in bone quality including the degree of mineralization and bone microstructure found in RA patients most likely associated with decreased bone mechanical properties.

研究分野：整形外科学 骨代謝学

キーワード：骨粗鬆症 関節リウマチ ステロイド 骨質異常

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) 患者では、主症状である関節の腫脹や骨・軟骨破壊以外に全身性の骨粗鬆症が生じる。その結果、年間 16% もの RA 患者が新規に骨折し (Nampei A. 2008), QOL 低下や要介護者増加の原因のひとつになっている。RA がとりわけ重篤な骨脆弱性をきたすのは、骨質異常を合併するためとされている。これは、骨密度から予測される以上に RA 患者の骨折率が高いことに基づくものであり、世界保健機構はとくに続発性骨粗鬆症患者の易骨折性を考える上で重要な概念である (Weinstein RS 2001, Angeli A 2006)。しかしながら、骨質には、骨微細構造や代謝回転、微小骨折の蓄積、コラーゲン老化架橋の増加、石灰化低下など多様な要素が含まれており、RA における骨質異常の詳細にはまだ不明の点が多く残されている。

このような背景のもと、申請者らは全身性炎症やステロイド剤による骨質劣化について動物モデルを用いて調査し、RA における易骨折性発生のメカニズムの解明に取り組んできた。RA モデル動物である腫瘍壊死因子遺伝子過剰発現 (TNFtg) マウスでは、炎症は主に骨微細構造を、ステロイドは主に骨の化学組成を変化させる傾向があり、異なる機序で骨に作用することにより骨強度を相加的に減少させることを明らかにしてきた。また、RA によくみられる脆弱性不完全骨折リスク増加に、石灰化障害やコラーゲン成熟障害による骨基質の物性の変化が関わっていることも明らかにしている。また、これらの現象を生物学的側面から解析し、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化抑制や、wnt シグナルを負に調節する Dickkopf-related protein 1 発現上昇などの機序が骨質劣化に関与することを明らかにしている。

これらの動物を用いた研究結果は、RA における骨質異常の病態を解明する上で重要な知見として注目されているが、治療法開発やより正確な骨折リスクの評価法開発のためには実際の患者においてどのような骨質異常が起こっているのか、またそれらの骨質異常がどのようにして発生するのかを明らかにする必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、RA 患者の骨折リスク診断法や治療法開発の研究基盤の確立を目指すことを目的に、RA 患者と非 RA 患者から提供を受ける骨生検試料を用いて以下の検討を行った。

- (1) RA 患者の骨基質の骨質異常の特徴を明らかにする。
- (2) 骨質異常がどの程度骨の強度低下に寄与しているかを明らかにする。
- (3) 患者背景や疾患情報、投与薬剤と骨質の関連を調査し、骨質劣化の危険因子を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 倫理規定

本研究は北海道大学病院自主臨床研究審査委員会承認 (012-0023) のもと実施した。

#### (2) 対象患者

北海道大学病院整形外科および研究協力施設において、骨、関節等の手術治療を受ける患者のうち、自家腸骨移植を必要とする患者を対象とする。対象群は関節リウマチおよびその類縁疾患による続発性骨粗鬆症患者とする。対照群は、関節リウマチのない原発性骨粗鬆症患者または骨量減少症患者とする。

#### (3) 被験者の診療情報

以下の項目について、被験者の診療録から情報を入手した。

患者基本情報：年齢、性別

疾患情報：疾患名、手術名、治療内容、合併症

血液検査結果：骨代謝マーカー

画像検査所見：単純 X 線写真による既存椎体骨折の有無、骨密度測定値 (Discovery A, Hologic Japan, Inc, Tokyo, Japan)

骨折リスクを予測する Kanis らが報告した FRAX® スコアを算出

#### (4) 検体の採取法

骨移植手術において自家腸骨を採取する際に、直径 6mm、深さ 1cm 程度の骨組織片を追加して採取した。

#### (5) マイクロ CT

骨検体をマイクロ CT (CT, R\_mCT2; Rigaku, Tokyo, Japan) を用いて 1 ピクセルあたり 20 μm の解像度で撮影した。骨微細構造の解析は TRI/3D-BON (Ratoc System Engineering 社, Tokyo, Japan) を用いて行った。骨構造解析を行う関心領域は皮質骨から 300 μm 離し、500 μm 四方を関心領域として計測を行った。

#### (6) 組織解析

採取した腸骨を 4% パラホルムアルデヒドで浸漬固定、EDTA 中性脱灰の後、通常にてパラフィン包埋した。パラフィン切片を 5mm の厚さに薄切後、切片をキシレンに浸してパラフィンを除去し、100%、95%、90%、80%、70% エタノールに順次浸して加水処理を行った。染色はヘマトキシリン・エオジン染色、骨芽細胞に発現するアルカリフォファターゼ (ALP) 免疫染色、酒石酸抵抗性産生フォスファターゼ (TRAP) 染色、骨細胞に特異的に発現するスクレロスチン抗体免疫染色を行った。

Von Kossa 染色は、ハーフカルノフスキーで浸漬固定し、四酸化オスミウムにて後固定を行った後、エポキシ樹脂に包埋した。切片は、500nm の厚さに薄切し、0.5% 硝酸銀水溶液により染色を行い、光学顕微鏡で観察を行った。

#### (7) マイクロインデンテーション試験による力学的強度の解析

実験系は自作のインデンテーション試験装置 (負荷機構 Instron 4411, 自動ステージ、

光学顕微鏡, 制御プログラム)を用いた. インデント先端形状は球状圧子で幅 500  $\mu\text{m}$  のものを用いた. 計測条件は皮質骨部を計測し以下の条件で行った.

- ・押し込み速度: 10  $\mu\text{m}/\text{min}$
- ・最大押し込み深さ: 5  $\mu\text{m}$
- ・サンプリング: 100 ms
- ・荷重-変位関係を記録
- ・負荷時の傾きより, 接触剛性を計算した.

#### (8) 統計分析

得られたデータは, 2 群間の検定には Student's T-test を用いて有意差検定を行い, 判定は P 値 < 0.05 で有意差ありとした. データは mean  $\pm$  SD で表した.

相関関数は, ピアソン相関係数を用いて行い, 判定は P 値 < 0.05 で有意差ありとした.

### 4. 研究成果

#### (1) 研究対象者の特性

対象患者と対照者の患者背景および疾患情報を示す (Table.1). RA 群と非 RA 群の平均年齢はそれぞれ 67.7 歳 (61-73 歳), 67.6 歳 (56-83 歳) であり, 年齢に有意差はなかった. RA 群は全例, ステロイドおよび抗リウマチ薬 (DMARDs), 生物製剤使用していた.

骨質異常に関係する因子のうち, 糖尿病 (DM) の合併を RA 群の 2 例, 非 RA 群の 4 例に認めた. 慢性腎臓病 (CKD) は大半の患者が罹患しており, ステージ 3 以上の患者は RA 群, 非 RA 群ともに 2 例であった. 骨粗鬆症治療薬は RA 群の 7 例が使用していたが, 非 RA 群では使用例はなかった.

RA の罹患年数は全例 10 年以上で, Steinbrocker 分類 stage3 および Larsen グレード 3 以上の関節破壊が進行し, 日常生活に障害を有する症例であった. すなわち, 身体活動性の低下した患者であった. 既存脆弱性骨折の数や程度は, 半定量的評価法 semi-quantitative (SQ) 法による椎体骨折の重傷度 (グレード 0-3) と長管骨の脆弱性骨折数を合わせたもの算出し, 脆弱性骨折指数とした. この脆弱性骨折指数は, 非 RA 群と比較して RA 群で有意に高値であった.

#### (2) 臨床的骨折リスク評価

DEXA 法にて腰椎および大腿骨頸部の骨密度を測定したが, 腰椎・大腿骨頸部ともに 2 群間で統計学的有意差はなかった.

世界保健機構 WHO の骨折リスク評価ツール FRAX<sup>®</sup> スコアで骨折リスクを評価した. FRAX<sup>®</sup> は大規模な前向きコホートの結果に基づいて決定した臨床的危険因子によって今後 10 年間に骨粗鬆症骨折が生じる確率を算出するものである. 骨密度に有意差がない群同士の比較においても, RA 群で主要骨粗鬆症性骨折および大腿骨頸部骨折の骨折リスクは有意に高く, 前述の脆弱性骨折指数とも相関した.

#### (3) RA 患者では骨代謝状態は抑制される

骨代謝状態を調査するために, 骨形成マ

ーカーとして骨型アルカリフォスファターゼ (BAP) を, 骨吸収マーカーとして酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ 5b (TRACP-5b) をそれぞれ測定した. RA 群は Non-RA 群と比較して BAP では差がないものの TRACP-5b の有意な抑制を認めており, 低骨代謝回転の傾向を示した (図 1A). 腸骨生検サンプルで免疫組織学的検討を行うと, ALP 陽性の成熟骨芽細胞の分布に関しては明らかな変化はみられなかったが, TRAP 陽性細胞の数は RA 群で少ない傾向があった. これは RA 群において骨吸収抑制剤使用例が多いことを反映していると考えられた (図 1B).

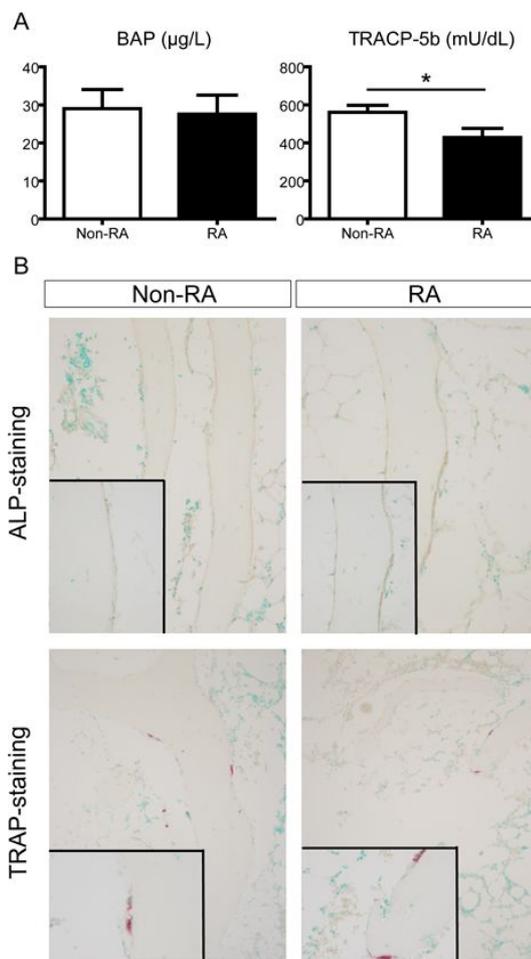


図 1. 骨吸収抑制剤を使用している RA 患者では骨吸収の抑制が起こる. (A) 骨形成マーカー (BAP) および骨吸収マーカー (TRACP-5b) (B) ALP 染色 (上段), TRAP 染色 (下段) の比較を示す. パネル左下に強拡大像を示す. Data represent means  $\pm$  SD \* p<0.05

#### (4) RA 患者では骨微細構造が劣化

骨微細構造を比較検討するために, 腸骨生検サンプルをマイクロ CT で撮像した. RA 群では非 RA 群と比較して明らかな骨梁幅の減少や骨梁間隙の拡大が観察された (図 2A). 三次元的形態計測による海綿骨構造の定量的評価を行ったところ, 組織量に対する海綿骨量, 骨梁幅, 骨梁数, 骨梁間幅の減少, 板

棒状指標、骨梁連結性などの骨微細構造のパラメータは RA 群で有意に劣化していることがわかった (図 2B)

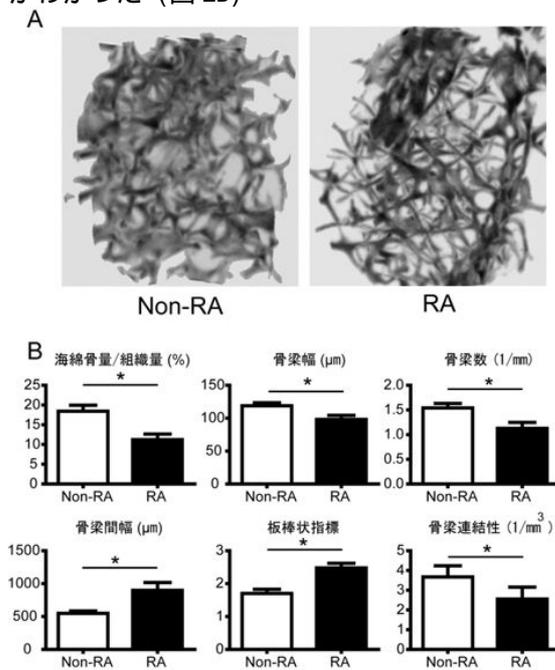


図 2. ステロイド投与中の RA の患者の骨微細構造は劣化 A) 非 RA 患者および RA 患者腸骨サンプルのマイクロ CT イメージ B) 海綿骨における骨微細構造の解析結果を示す .RA 群で有意な骨微細構造の劣化があった .Data represent means  $\pm$  SD , \*  $p < 0.05$

(5) RA 患者では力学的強度は有意に低下

力学的強度を評価するために、腸骨サンプルに対して、マイクロインデンテーション試験を行った .RA 群では非 RA 群と比較して、接触剛性の有意な低下を認めた .このことから、骨粗鬆症治療を行っていても、局所の力学的強度はステロイド投与を受けた RA 患者では有意に低下した (図 3) .

次に、これまで調査した骨密度、FRAX スコア、骨代謝マーカー、骨微細構造のパラメータが脆弱性骨折指数や接触剛性と相関があるかどうかを調査した .接触剛性と脆弱性骨折指数は有意に相関があった .DEXA 法を用いた骨密度の値は脆弱性骨折指数や接触剛性とは相関がなかった .FRAX スコアでは主要骨粗鬆症骨折のリスクと脆弱性骨折指数と接触剛性に相関があった .マイクロ CT で算出された微細構造のパラメータは RA 群と Non-RA 群では有意差はあったものの、脆弱性骨折指数とは必ずしも相関しなかったが、接触剛性とは骨連結性を除いて相関関係があった (表 1) .

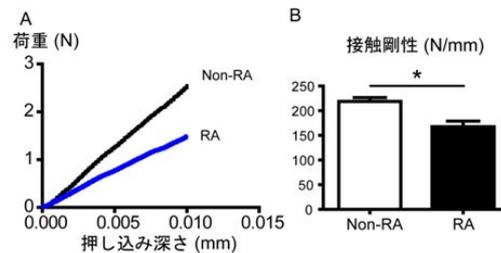


図 3(A) RA 群と非 RA 群の荷重変位曲線の比較 (B) 2 群間での接触剛性の比較 .RA 群で有意に低値であった .Data represent means  $\pm$  SD , \*  $p < 0.05$

	脆弱性骨折指数	接触剛性
脆弱性骨折指数		-0.5546 $p=0.011^*$
骨密度 腰椎	0.1134 $p=0.644$	0.0494 $p=0.841$
骨密度 大腿骨頸部	-0.1471 $p=0.549$	0.1780 $p=0.466$
FRAXスコア 主要骨粗鬆症骨折	0.5818 $p=0.007^*$	-0.7605 $p < 0.001^*$
FRAX 大腿骨頸部骨折	0.4062 $p=0.075$	-0.6866 $p < 0.001^*$
BAP	-0.0595 $p=0.803$	0.1267 $p=0.595$
TRAP-5b	-0.3063 $p=0.189$	0.3627 $p=0.116$
海綿骨量/組織量	-0.3621 $p=0.1167$	0.5971 $p=0.006^*$
骨梁幅	0.0649 $p=0.786$	0.5398 $p=0.014^*$
骨梁数	-0.4807 $p=0.032^*$	0.4694 $p=0.037^*$
骨梁間幅	0.4101 $p=0.072$	-0.4482 $p=0.048^*$
板棒状指標	0.5185 $p=0.019^*$	-0.6327 $p=0.003^*$
骨梁連結性	-0.2488 $p=0.2901$	0.1714 $p=0.470$

表 1. 上段 pearson r, 下段 p 値 \*:  $p < 0.05$

(6) RA 患者では骨細胞のアポトーシスと石灰化度の低下を生じる

力学的強度の低下のメカニズムを解明するために、組織的検討を行った .HE 染色では RA 群において空の骨小腔が多く、準超薄切片で骨細胞の形態を調査すると、RA 群では骨細胞が萎縮していた (図 4A) .骨細胞死が起こった後に残る空の骨小腔の割合を調査すると RA 群で有意に多かった .次に骨芽細胞分化を抑制するスクレロステンの発現を調査すると、スクレロステンの発現は RA 群で減少していたが、これは骨細胞のアポトーシスが多いことを反映していると考えられた (図 4B) .石灰化度の評価は Von Kossa 染色で行った .RA 群では骨梁の表面に石灰化度の低い領域があり、一見骨のように見える領域に

においても石灰化度が低下していた (図 5C) .

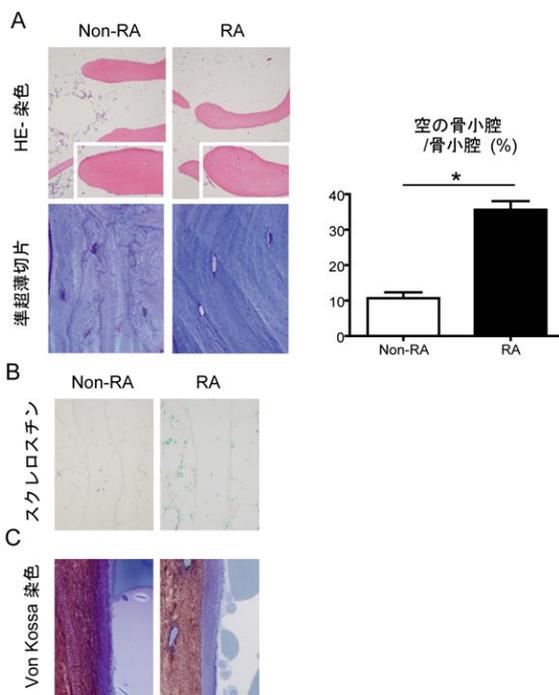


図5. ステロイド慢性使用しているRA患者では骨細胞のアポトーシスと石灰化度の低下を生じる。(A) 上段 HE 染色, 下段 準超薄切片を示す. HE 染色右下パネルに強拡大像を示す. 空の骨小腔の割合をグラフで示す. (B) スクレロステチンの発現の比較. (C) Von Kossa 染色における石灰化度の評価. RA 群では骨表面の石灰化度が低下している. Data represent means  $\pm$  SD, \*  $p < 0.05$

#### 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)

[学会発表](計 2 件)

1. 清水智弘, 高畑雅彦. 関節リウマチでは皮質骨の骨質劣化により早朝から骨脆弱性が生じる. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2015 年 10 月 22 日-23 日富山国際会議場 (富山県・富山市)

2. 清水智弘, 高畑雅彦. 関節リウマチでは早朝から関節近傍皮質骨の骨質異常と骨脆弱性が生じる. 第 33 回日本骨代謝学会. 2015 年 7 月 23 日-25 日, 京王プラザホテル(東京都・新宿区)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

高畑 雅彦 (TAKAHATA, Masahiko)  
北海道大学 大学院医学研究科 講師  
研究者番号: 40374368

##### (2)研究分担者

須田 廣美 (木村-須田) (SUDA, Hiromi)  
千歳科学技術大学 理工学部 教授

研究者番号: 00574857

東藤 正浩 (TODO, Msahiro)  
北海道大学 大学院工学研究院 准教授  
研究者番号: 10314402

網塚 憲生 (AMIDUKA, Norio)  
北海道大学 大学院歯学研究院 教授  
研究者番号: 30242431

#### (3)連携研究者

( )

研究者番号: