

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03148

研究課題名（和文）カニクイザルにおけるコラーゲン誘導関節炎発症の分子機序の解明

研究課題名（英文）Study on molecular mechanism of collagen-induced arthritis in cynomolgus monkeys

研究代表者

椎名 隆（Shiina, Takashi）

東海大学・医学部・教授

研究者番号：00317744

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、カニクイザルにおけるコラーゲン誘導関節炎（CIA）発症の分子機序を遺伝学的、免疫学的および病理学的手法を用いて解明した。その結果、これまで不明であったCIAと感受性を示す主要組織適合性複合体（MHC）アレルを同定したこと、その多型は関節リウマチの感受性HLAアレルの特徴とよく類似したこと、このアレルを有する個体は、Ⅱ型コラーゲンに特異的なTh1型のIgG1抗体を多く産生し、CIAの炎症をより強く誘導することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題により長年に渡り不明であったCIAと感受性を示すMHC多型が同定され、関節リウマチと類似した遺伝学および免疫学特徴が見出された点に学術的意義があり、他のHLA関連疾患モデルの作出のための貴重な基礎的データを取得できたと考えられる。このMHC多型に基づくCIAモデルの作出から、個体数削減と再現性を重視した非臨床試験への展開、関節リウマチの治療法開発に関する斬新なシーズの創生等が将来的に期待される。

研究成果の概要（英文）：The development of a collagen-induced arthritis model (CIA) using cynomolgus macaques has been reported about 30 years ago, but its association with major histocompatibility complex (MHC) polymorphism has not been investigated in detail. In this study, we elucidated the molecular mechanism of the CIA onset in the macaques using genetic, immunological and pathological techniques. We identified a CIA-susceptible MHC class II allele by DNA typing of the MHC genes and revealed that the allele has the identical amino acid motif sequence as rheumatoid arthritis-sensitive human leukocyte antigen (HLA) alleles. Furthermore, individuals that have the MHC allele suggested to be produced a large amount of type II collagen-specific Th1 type IgG1 antibody and more strongly induced inflammation of CIA.

研究分野：免疫遺伝学

キーワード：カニクイザル 疾患モデル MHC 関節リウマチ コラーゲン誘導関節炎

1. 研究開始当初の背景

哺乳綱霊長目オナガザル科マカク属に属するカニクイザルやアカゲザルは形態(目、指紋、掌紋、内臓及び歯式等)生理(内分泌及び代謝等)知能ならびに疾患等においてヒトとの間に類似性または近似性が認められ、ヒトと最も近縁な実験動物の一種として種々の医学研究に頻りに利用されている。その反面、遺伝学的背景については不明なことが多く、今後、特定の遺伝子あるいはゲノム領域の遺伝子多型を考慮したモデル動物を作製するためには、その遺伝学的背景を明確にする必要があると考えられる。

遺伝的背景の中でも、数多くの疾患感受性や移植の成否を規定する主要組織適合性複合体(major histocompatibility complex; MHC)遺伝子群における多型情報基盤整備のニーズは高い。このMHC遺伝子群がコードするMHC分子は、免疫上の自己から非自己を識別し免疫応答を開始させる重要な役割を担っており、ヒトの場合、MHC遺伝子群はヒトゲノムで比類なき高度な多型(>20,000アレル)を有し、特定のMHC多型が100を超える種々の疾患との関連性を示す。そこで申請者は、カニクイザルにて革新的なMHCタイピング技術を開発し、5,500個体に及ぶDNA検査から多数のMHC統御カニクイザル(MHC統御ザル)を検出した。MHC統御ザルは、前述のMHCの特徴から「移植モデル」や「疾患モデル」への使用が期待される。「移植モデル」として、パーキンソン病、加齢黄斑変性、心筋症、心筋梗塞のiPS細胞移植や子宮や皮膚の臓器移植に使用されており、いずれもドナーとレシピエント間のMHC多型の一致・不一致が移植成績に大きく影響を及ぼすことが実証されている。このように、カニクイザルにおける遺伝学的統御に基づく「移植モデル」は確立されたと判断できるが、この次の段階として、MHC多型の統御に基づく「疾患モデル」を開発し、それを治療法の開発に繋げることが多くの研究施設から要望されている。

申請者は、「疾患モデル」を開発する疾患として、関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis; RA)のサルモデルであるコラーゲン誘発関節炎(Collagen induced Arthritis; CIA)に着目した。RAは、自己免疫が主に手足の関節を侵し、これにより関節痛、関節の変形が生じる炎症性自己免疫疾患である。血管、心臓、肺、皮膚、筋肉等の全身臓器にもしばしば症状が及ぶ。疫学調査から、人口の0.4~0.5%、30歳以上の1%が発症するとされており、女性は男性よりも約3倍の高い発症率を有する。これまでに数多くの抗リウマチ薬(DMARDs)や抗サイトカイン療法が開発されてきたが、今後も完全治癒を目指した創薬の開発が進められると考えられる。その場合、ヒトに最も近縁な実験動物であるマカク属サル(アカゲザル・カニクイザル)を用いた新薬の薬効試験や毒性試験が臨床研究前に求められる選択肢の一つである。実際、これらサルにおけるCIAモデルは、病像および免疫学的観点からRAにと極めて類似した病態が観察されること注目されている(1,2)。ところが、カニクイザルではコラーゲンを接種させたメスの全個体がCIAを発症するものの、その重症度に個体差が大きく、RAモデルとして求められる均質なCIA発症個体の準備には、必要以上の個体数のコラーゲン接種を実施しなくてはならない(3)。RAとMHCとの関連に関する報告として、RAはヒトのMHC領域に位置するHLA-DRB1遺伝子の特定のアレルやNFKBIL1遺伝子と強い関連性を示す多数の報告がある(4-6)。一方、アカゲザルにおけるCIAモデルは1980年代から作出されており、CIAとMHC領域との関連性は報告されているものの(7)、当時のMHC解析技術の解像度の低さからCIAと関連するMHCアレルは同定されておらず、そのため感受性を示すMHCアレルがCIAを発症する分子機序は全く解明されていない。

2. 研究の目的

本課題では、RAモデルであるCIAを例として、そのモデルザルの作出によるCIA発症の分子機序を解明することを目的とする。具体的には、遺伝学、免疫学および病理学の多面的な解析から、CIAを用いた感受性/抵抗性MHCアレルの同定とヒトの感受性アレルとの比較解析、遺伝子発現量の変化とCIA重症度との相関解析等を実施する。また、感受性/抵抗性個体間のコラーゲンに対する抗体産生能や炎症部位の病理組織学的比較、サイトカイン、免疫細胞等の経時的変化の解析を実施する。

3. 研究の方法

(1)CIAモデルの作出、評価および血液試料の準備: フィリピン産のメスのカニクイザル9個体を対象にCIAの惹起物質としてフロイントの完全アジュバントと共にウシ型コラーゲンを背部皮下に接種した。指骨関節を中心とした64関節における腫脹スコアを接種後3週目、6週目および9週目に測定し、重症個体、軽症個体および無症状個体の3種類に分類した。免疫学的・病理学的解析用の血液試料を型コラーゲン接種前後に採血した。

(2)CIA モデルの遺伝学的解析： カニクイザル MHC 遺伝子 (*Mafa* 遺伝子: *Mafa-A*, *Mafa-B*, *Mafa-E*, *Mafa-I*, *Mafa-DRB*, *Mafa-DQB1* および *Mafa-DPB1*) の DNA タイピングを次世代シーケンシングにより実施し、前項の腫脹スコアにより分類した重症群と軽症群間、あるいは発症群と無症状群との間で比較解析を行い、Ⅱ型コラーゲンに対して感受性を示す *Mafa* アレルを特定した。その感受性アレルが CIA 発症に及ぼす影響力を推察するために、RA に対して感受性を示すヒト MHC (human leucocyte antigen; HLA) アレルに関する既知情報を含めて評価した。解剖時(接種後 9 週目)に得た末梢血由来の RNA を用いてカニクイザルのマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、遺伝子発現が発症群と無症状群との間で異なる遺伝子を同定した。

(3) CIA モデルの免疫学的解析： 血清中のⅡ型コラーゲンに対する IgG 抗体をサンドイッチ ELISA 法を用いて測定し、抗体産生量を発症群と無症状群との間で比較解析した。炎症症状、関節炎症状、末梢血中のⅡ型コラーゲン抗体の上昇を確認した後、X 線撮影装置、CT 装置または MRI 装置により関節を撮影し、CIA 発症をモニターした。経時的に得た末梢血を用いて白血球数、ヘモグロビン量、血小板数および C-反応性タンパク質 (CRP) 量を測定し、発症群と無症状群との間で比較解析した。また、フローサイトメトリー (FCM) を用いて、マイナーポピュレーションを含めた末梢血細胞の経時的な変化を観察した。末梢血由来の細胞をⅡ型コラーゲンと共培養し、Ⅱ型コラーゲンに対して反応する細胞のサイトカイン産生 (IFN- γ および IL-4) を ELISPOT 法により検出した。

(4) CIA モデルの病理学的解析：Ⅱ型コラーゲンの接種後 9 週目に供試個体の解剖により採取した膝関節組織を用いて病理組織的に検討した。具体的には、HE 染色による病理組織診断、免疫染色により T リンパ球 (CD4、CD8)、B リンパ球 (CD20)、形質細胞 (CD138)、単球・マクロファージ (CD14、CD68、HLA-DR) を同定し、その浸潤細胞数を測定し、発症群と無症状群との間で比較した。

4. 研究成果

(1) 腫脹スコアに基づく CIA モデルの重症度への分類：カニクイザル 9 個体にⅡ型コラーゲンを接種し、腫脹スコアを接種後 3 週目、6 週目および 9 週目に測定した結果、腫脹スコアの基準値 (15pts 以上) を示した 3 個体を CIA 発症群と定義した。本研究では、33% (3/9 個体) の CIA 発症率であったが、既報の発症率 73% よりも極めて低い発症率を示した (3)。この値は産地間の違い、すなわち本研究で用いたフィリピン産と既報で用いたカンボジア産との間の遺伝的背景の違いを反映している可能性が考えられた。

CIA 発症 3 個体のうち、2 個体は比較的高い腫脹スコア (接種後 9 週目で 41pts および 78pts) を、また残りの 1 個体は基準値をやや超える腫脹スコア (接種後 9 週目で 20pts) をそれぞれ示したことから、比較的高い腫脹スコアを示した 2 個体を重症個体、基準値をやや超える腫脹スコア 1 個体を軽症個体と定義した。

(2) CIA と関連する MHC 多型の特徴：供試 9 個体を用いて *Mafa* 遺伝子の DNA タイピングを行った結果、特定の *Mafa* クラス アレルである *Mafa-DRB1*10:05*、*Mafa-DRB1*03:17:02*、*Mafa-DQB1*18:27* および *Mafa-DPB1*08:04* が重症 2 個体のみを検出された。過去に実施した *Mafa* クラス 遺伝子の多型解析から、それらアレルから推定される *Mafa* ハプロタイプは、*Mafa-Class II#17* であると考えられた (8)。これに対して、*Mafa* クラス 遺伝子 (*Mafa-A*, *Mafa-B*, *Mafa-E* および *Mafa-I*) における CIA の重症度と関連するアレルやハプロタイプは供試個体全てに認められなかった。

Mafa-Class II#17 を構成するアレルのうち、*Mafa-DRB1*10:05* は RA の感受性 HLA アレルである *HLA-DRB1*04:01* や *HLA-DRB1*04:05* と同一の shared epitope を有していた。shared epitope は、HLA-DRB 遺伝子がコードするアミノ酸配列の第 67~74 残基に RA に感受性あるいは抵抗性を示すアレルに共通性が認められ、病因となる抗原提示が RA の発症要因であると考えられている。したがって、カニクイザルの CIA に感受性を示す MHC 遺伝子は RA と同様に *MHC-DRB* 遺伝子であること、*Mafa-DRB1*10:05* は CIA の重症化に関与する可能性があること、shared epitope は種を超えても関節炎の発症に関与することが示唆された。

(3) 発症個体と無症状個体との間の遺伝子発現量の特徴：接種後 9 週目における CIA 発症群 3 個体と無症状群 5 個体を用いたマイクロアレイ解析を実施した結果、両者間の転写レベルが 10 倍以上異なる 22 個の遺伝子を特定した。この中には *Mafa-DRB1* や *Mafa-DPA1* などの DR 分子や DP 分子をコードする遺伝子が含まれていたが、DQ 分子をコードするクラス II 遺伝子である *Mafa-DQA1* や *Mafa-DQB1* の発現変動は認められなかった。20 個の遺伝子のうち、4 個は RA 患者の滑液や腫瘍間質において高発現を示すテネイシン、線維芽細胞様滑膜細胞における 1-インテグリン機能や細胞接着の調節など RA と関連する機能をもつ遺伝子であり、いずれも CIA 発症群が無症状群よりも高

い発現レベルを示した。

(4) 発症群と無症状群との間の免疫学的、病理学的特徴：経時的に得た末梢血を用いて白血球数、ヘモグロビン量、血小板数およびC-反応性タンパク質（CRP）量を測定した結果、白血球数とCRP値や血小板数はパラレルに変化する傾向があったこと、全個体で貧血が進行していたこと、接種後3～6週目のCRP値が高値であった個体は発症する傾向にあった。また、T細胞数やB細胞数の経時変化をFCMにより観察したが、重症度を示唆する有意な細胞数の変化は認められなかった。さらには、15%程度の体重は減少が全個体に観察され、特に重症個体の減少率は高かった。

供試9個体の血清を用いて型コラーゲンに対するIgG抗体価をELISA法により比較解析した結果、CIA発症群個体ではIgG抗体価の上昇が接種後3週目に観察された。これに対して、無症状群個体ではIgG抗体価の上昇が接種後3週目に認められないか、認められても抗体価は低値であった。

解剖時に採取した膝関節の組織病理組織診断を行った結果、発症個体の関節には、軟骨のびらんと破壊および好中球浸潤を伴う滑膜炎が観察された（図1）。また、接種9週目の血漿を用いて単離したIgG + IgMカクテル抗体を用いた組織免疫染色とELISA解析を行った。組織免疫染色では、いずれの関節標本においても硝子軟骨が染色され、重症度とは関係なく、いずれの個体においても硝子軟骨に対する自己抗体が産生されていた。ELISAの結果では、IgG濃度に個体差は認められなかったが、IgM濃度は無症状個体で高い傾向を示した。したがって、無症状個体ではIgMからIgGへのクラススイッチが遅い可能性が示唆された。さらに、IgGサブクラス解析により、IgG1（Th1タイプ）濃度が重症度と相関した。したがって、Mafa-Class II#17を有する個体は、Th1型の型コラーゲン特異的なIgG1抗体を多く産生し、CIAの炎症をより強く誘導することが示唆された。

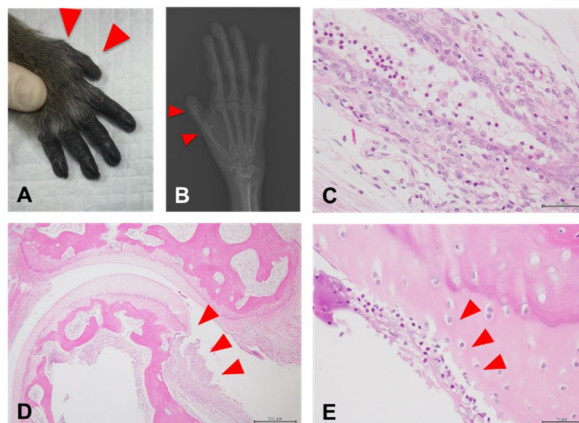


図1. CIA重症個体に病理組織診断
A. 母指の腫脹、B. X線写真、C. 好中球浸潤を伴う滑膜炎、
D&E. 好中球による滑膜破壊像（矢頭）

<引用文献>

1. British J Rheumatology 37: 239-245, 1998
2. Arthritis & Rheumatism 41: 507-514, 1998
3. Arthritis & Rheumatism 32: 748-758, 1989
4. Clin. Exp. Immunol. 124: 142-149, 2001
5. Genomics 71: 263-270, 2001
6. Am J Hum Genet. 72: 303-312, 2003
7. J Exp Med. 175: 933-937, 1992
8. Immunogenetics 66: 219-230, 2014.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 17件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Ishigaki Hirohito, Pham Van Loi, Terai Jun, Sasamura Takako, Nguyen Cong Thanh, Ishida Hideaki, Okahara Junko, Kaneko Shin, Shiina Takashi, Nakayama Misako, Itoh Yasushi, Ogasawara Kazumasa	4. 巻 30
2. 論文標題 No Tumorigenicity of Allogeneic Induced Pluripotent Stem Cells in Major Histocompatibility Complex-matched Cynomolgus Macaques	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Transplantation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0963689721992066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kisu Iori, Ishigaki Hirohito, Shiina Takashi et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Clinical features of irreversible rejection after allogeneic uterus transplantation in cynomolgus macaques	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13910
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-70914-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kisu Iori, Ishigaki Hirohito, Shiina Takashi et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 First Successful Delivery after Uterus Transplantation in MHC-Defined Cynomolgus Macaques	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 3694 ~ 3694
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm9113694	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shiina, Blancher	4. 巻 8
2. 論文標題 The Cynomolgus Macaque MHC Polymorphism in Experimental Medicine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 978 ~ 978
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells8090978	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Shiina Takashi, Suzuki Shingo, Congy-Jolivet Nicolas, Aarnink Alice, Garchon Henri-Jean, Dereuddre-Bosquet Nathalie, Vaslin Bruno, Tchitchek Nicolas, Desjardins Delphine, Autran Brigitte, Lambotte Olivier, Theodorou Ioannis, Le Grand Roger, Blancher Antoine	4. 巻 9
2. 論文標題 Cynomolgus macaque IL37 polymorphism and control of SIV infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-44235-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 de Groot NG, Otting N, Maccari G, Robinson J, Hammond JA, Blancher A, Lafont BAP, Guethlein LA, Wroblewski EE, Marsh SGE, Shiina T, Walter L, Vigilant L, Parham P, O'Connor DH, Bontrop RE	4. 巻 72
2. 論文標題 Nomenclature report 2019: major histocompatibility complex genes and alleles of great and small ape and old and new world monkey species	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunogenetics	6. 最初と最後の頁 25-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 石垣宏仁、寺井淳、仲山美沙子、伊藤靖、小笠原一誠
2. 発表標題 カニクイザルを用いた組織適合抗原複合体一致他家iPS細胞移植においてteratomaは形成されない
3. 学会等名 第109回 日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirohito Ishigaki, Cong Thanh Nguyen, Misako Nakayama, Yasushi Itoh, Kazumasa Ogasawara
2. 発表標題 Donor lymphoid cells remain in the skin graft until 14 days after allogeneic transplantation in macaques
3. 学会等名 第48回 日本免疫学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	伊藤 靖 (Itoh Yasushi) (90324566)	滋賀医科大学・医学部・教授 (14202)	
研究 分担者	石垣 宏仁 (Ishigaki Hirohito) (90432301)	滋賀医科大学・医学部・助教 (14202)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	伊藤 さやか (Ito Sayaka)	東海大学・医学部・研究技術員 (32644)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------