

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659198

研究課題名（和文） 関節強直を規定する皮膚炎と関節強直の病態連携分子メカニズムの解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism of pathogenic network for the onset of joint ankylosis with psoriatic dermatitis

研究代表者

小野 栄夫 (ONO MASAO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20302218

研究成果の概要（和文）：強直性脊椎炎、乾癬性関節炎などの強直性疾患は進行性の難病に位置づけられており、他の関節変形性疾患に準じる治療は効果的ではない。新たな治療の開発に向けては、本疾患特有の病態を十分に解明し、適切な強直症疾患モデルを用いての治療実験が必要である。本研究以前に強直症モデル動物（マウス）の開発に取り組んできた。本研究では、自然発症強直症モデルマウスを用いて、強直症に関連する遺伝素因、発症の性差における精巢の役割、病態発生の経時変化を明らかにし、さらに、抗 IL-17 抗体全身投与の治療有効性を実証した。

研究成果の概要（英文）：Ankylosing arthropathy, such as ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, and so forth, are intractable joint diseases with present therapeutic approaches to other arthropathic disorders. To develop a new effective approach to ankylosing arthropathy, it is necessary to clarify an essential pathogenic mechanism of ankylosis and to obtain evidence for efficacy of a new therapeutic approach in an animal disease model. My previous study had characterized a proper mouse model for the study of human ankylosing diseases. The present study using experimental strains of mice with spontaneous onset of ankylosis showed genetic association of the ankylosis onset, pathogenic contribution of testis to male preponderance of this onset, histopathological characteristics of early to late phases after the ankylosis onset, and therapeutic efficacy of anti-IL-17 administration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：強直症、皮膚炎、IL-17、疾患モデル、治療実験、抗サイトカイン療法

1. 研究開始当初の背景

(1) 関節は、荷重ストレスに対する優れた耐容性を持ち、陸生哺乳動物の十全な生命活動を支える重要な器官である。関節の機能性・恒常性維持には、特化した修復・再生機構が必要とされている。一方、関節は感染性関節炎（痛）、乾癬性関節炎、関節リウマチ、

強直性脊椎炎などのように全身性疾患における病態発現の主座にもなる。単に痛みにとどまるものから、関節破壊、関節強直に至るものまで、全身性疾患に伴う関節病態は様々な形で現れる。我々は、多様な関節病態を代表的疾患（例えば、関節リウマチ）の理解から帰納的に捉えるだけでなく、病態ネットワークの概念の中で新たな病態関連分子を

想定し、この多様性に迫る必要性を感じている。

(2) 強直症は、関節及び関節周囲組織の骨化により関節機能の荒廃に至る疾患群である。欧米に発症が多く、著しく QOL 障害を来す疾患として問題にされる。我々はこれまでに、病理組織学的にヒト強直性疾患に類似した病態を自然発生するマウスに見出し、強直症モデルとして解析してきた^{1, 2}。この強直症モデルは、腱付着部炎を初期病変とし、そこから異所性軟骨増殖性病変、軟骨内骨化、そして関節変形・機能障害に至る。また、この強直症は雄のみに発症し、炎症性皮膚病変を常に合併した。さらに当モデルを用いた遺伝連鎖解析を行い、第 7 染色体上の FGFR2 遺伝子座に強直症発症との強い連鎖を同定した。

(3) 以上の知見から、強直症の発生と 1. 雄性要因 (性ホルモン環境、行動様式、Y 染色体)、2. 皮膚病変、3. FGFR2 遺伝多型との関連性を想定した。FGF ファミリーに属する keratinocyte growth factor (KGF) が FGFR2 のリガンドとして皮膚創傷治癒に働く既成事実から、皮膚・関節病態連携メカニズムの解明と治療開発を KGF-FGFR2 機軸に据えた。

2. 研究の目的

以上の研究背景より、次の 3 点について明らかにすることを本研究の目的とした。

(1) 雄性要因について、精巣摘出、個別飼育、Y 染色体の入れ替え (コンジェニック系統) による影響を明らかにする。

(2) FGFR2 の役割については、関節病変局所の FGFR2 発現を明らかにし、FGFR2-Fc による FGFR2 シグナル抑制の強直症発症に対する効果をマウス個体レベルで明らかにする。

(3) IL-17 の役割については、強直症モデルマウスを用いて、抗 IL-17 抗体による予防、治療効果を検証する。

3. 研究の方法

(1) 平成 23 年度

①強直症発症に関する非遺伝要因 (性ホルモン環境、飼育環境など) の検討

強直症発症に対する去勢による男性ホルモンの除去、個別飼育による喧嘩行動の抑制の影響を、病理組織学的に強直症を定量して評価する。

②当モデルマウスの染色体の解析

当モデルマウスは、MRL/rpl と C3H/lpr を始祖とするリコンビナント系統である。各始祖系統に由来する染色体モザイク状態をマイクロサテライト解析により明らかにする。

③可溶性 FGFR2 と KGF の発現 DNA 構築の作製

皮膚・関節病態連携を実証するために、KGF 遺伝子発現 DNA 構築を作製する。FGFR2 の各スプラス・バリエントを再生皮膚組織、新生仔骨組織より RT-PCR 法によりクローニングし、マウス IgG3-Fc 部分との融合遺伝子 (マウス体内では安定に発現し、Fc 受容体を介した代謝を免れるタンパク産生する) を発現ベクターに導入する。尚、発現ベクターの骨格には、研究連携者の開発した生体内長期発現ベクターを用いる。

④Y 染色体コンジェニック系統マウスの作製

MXC. Ank マウスは、従来、C3H/lpr 由来の Y 染色体を有する。我々は以前より、強直症抑制効果を賦与すると仮定した MRL/rpl 由来の Y 染色体を MXC. Ank マウスにコンジェニック法で導入しており、現在、N6 世代に到達している。これを継続し、N8 系統の Y 染色体コンジェニック系統を MXC. Ank 背景に樹立する。

(2) 平成 24 年度

①可溶性 FGFR2 を利用した強直症治療実験

②KGF 強制発現による強直症誘発実験

③Y 染色体コンジェニック系統マウスの検体を用いて、強直症病態解析、遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

自然発症強直症モデルマウス (McC-ank) と、既存の乾癬性強直症モデルマウス (DBA1) マウスを用いて、強直症病態の遺伝的要因、性差の要因、病態発生の経時変化、抗 IL-17 抗体全身投与の治療有効性について、次の 4 点を明らかにした。

なお、①可溶性 FGFR2 を利用した強直症治療実験、②KGF 強制発現による強直症誘発実験については、施設の震災復旧の遅れなどにより、現在にわたり進行中である。

(1) McC-ank マウスの Y 染色体 (C3H/HeJ 由来) を 12 世代以上の戻し交配により、他の系統由来の Y 染色体 (MRL/Mp) に入れ替え、Y 染色体コンソミックマウスを作製した。McC-ank とコンソミック McC-ank の両系統における強直症発症の経過観察を行ったところ、強直症

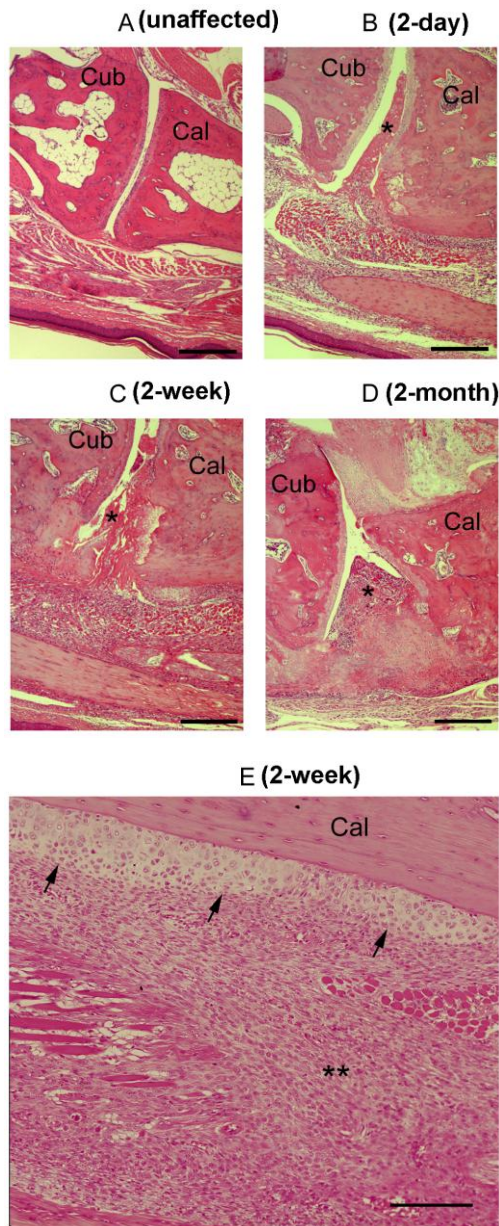
発症頻度ならびに強度に違いがないことが分かった。

(2) 雄性発症のメカニズムをさらに検討するため、発症前McC-ankマウスに対して精巣摘除を施行し、強直症発症の経過観察を行った。その結果、精巣摘除群では強直症発症が顕著に抑制されることが分かった。

(3) 病態発生の経時変化として、初期に発赤を伴う足関節の腫脹とともに同部位の腱附着部、足底腱板下の浮腫性炎症が出現し、腫脹2週間後には同炎症部位に軟骨増殖性変化から軟骨内骨化、さらに2ヶ月後には関節強

直が完成することが分かった(図1)。

図1 McC-ankの強直症病変経時変化(足根部、ヘマトキシリンエオジン染色)。(A) 発症前の足根部。強直症病変は認められない。(B) 足根部腫脹の2日後。足根部の足底腱板周囲に浮腫が認められる。足根部関節腔にフィブリン様物質の滲出が認められる。(C) 腫脹の2週間後。足底腱板下に細胞増殖像が認められる(Eは拡大像)。(D) 腫脹の2ヶ月後。足底腱板下、関節腔に骨化病変(強直)が認められる。(E) (C)の足底腱板と踵骨の間に見られる軟骨芽様細胞の増殖と骨膜軟骨仮性(矢印)。スケール:A-Dは500マイクロ、Eは200マイクロ。



(4) 強直症自然発症マウスDBA1に対して、抗IL-17抗体の全身投与を行った。その結果、本抗体の発症前投与(図2)と発症後投与(図3)で有意な発症抑制効果が認められた。

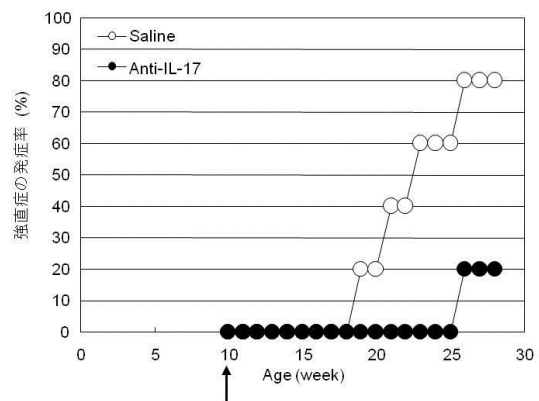


図2 発症率で見た強直症自然発症モデル(DBA1)における抗IL-17抗体全身投与(発症前投与)の強直症抑制効果。矢印は投与開始時点を示す。投与は200 μ g/匹の用量で週一回、腹腔内投与で行った。

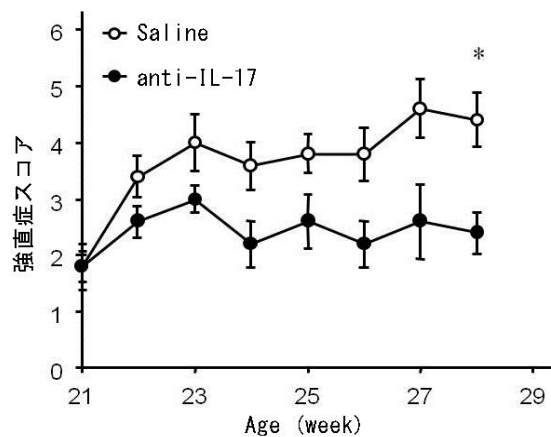


図3 強直症発症強度で見た強直症自然発症モデル (DBA1) における抗IL-17抗体全身投与 (発症後投与) の強直症抑制効果。投与は200 μ g/匹の用量で週一回、腹腔内投与とし、発症初期の20週齢から開始した。* $p < 0.05$, Student's t-test.

以上より、強直症は浮腫性の急性反応に引き続き、腫脹後2週間で足根部腱附着部、足底腱板における軟骨芽細胞様の細胞の著明な増殖と同時に骨化が始まり、数か月で関節強直が完成する病態進展様式が明らかとなった。さらに、強直症罹患率の性差は精巣由来のホルモンによること、強直症の治療には抗IL-17抗体が有効であることが示唆された。

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5件)

(1) Shirai T, Fujii H, Ono M, Nakamura K, Watanabe R, Tajima Y, Takasawa N, Ishii T, Harigae H. A novel autoantibody against fibronectin leucine-rich transmembrane protein 2 expressed on the endothelial cell surface identified by retroviral vector system in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2012 Jul 2;14(4):R157. 査読有

(2) Nakanome A, Brydun A, Matsumoto M, Ota K, Funayama R, Nakayama K, Ono M, Shiga K, Kobayashi T, Igarashi K. Bach1 is critical for the transformation of mouse embryonic fibroblasts by Ras(V12) and maintains ERK signaling. *Oncogene* 2012 Jul 30. doi: 10.1038. 査読有

(3) Sato-Hayashizaki A, Ohtsuji M, Lin Q, Hou R, Ohtsuji N, Nishikawa K, Tsurui H, Sudo K, Ono M, Izui S, Shirai T, Takai T, Nishimura H, Hirose S. Presumptive role of 129 strain-derived Sle16 locus in rheumatoid arthritis in a new mouse model with Fc γ receptor type IIb-deficient C57BL/6 genetic background. *Arthritis Rheum* 63:2930-2938 (2011). 査読有

(4) Rabieyousefi M, Soroosh P, Satoh K, Date F, Ishii N, Yamashita M, Oka M, McMurtry IF, Shimokawa H, Nose M, Sugamura K, Ono M. Indispensable roles of OX40L-derived signal and epistatic genetic effect in immune-mediated pathogenesis of spontaneous pulmonary hypertension. *BMC Immunol* 12:67-78 (2011). 査読有

(5) Horie S, Watanabe Y, Ono M, Mori S, Kodama T. Evaluation of antitumor effects following tumor necrosis factor- α gene delivery using nanobubbles and ultrasound. *Cancer Sci* 102:2082-2089 (2011). 査読有

[学会発表] (計2件)

①海老原伸、小野栄夫：動物モデルの関節強直症に対する抗IL-17抗体投与の抑制効果 第40回日本免疫学会総会・学術集会 2011年11月28日(幕張メッセ)

②海老原伸、小野栄夫：動物モデルの関節強直症に対する抗IL-17抗体投与の予防・治療効果 第55回日本リウマチ学会総会・学術集会 2011年7月18日(神戸国際センター)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 栄夫 (ONO MASAO)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20302218

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：