

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09523

研究課題名(和文) 関節炎モデルマウスにおけるCD206陽性M2マクロファージの役割の検討

研究課題名(英文) The role of CD206 positive M2 macrophages in collagen antibody induced arthritis (CAIA)

研究代表者

篠田 晃一郎 (SHINODA, Koichiro)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：40377312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチにおけるM2マクロファージの役割を検討する事は本疾患の治療を選択する上で極めて重要である。本研究では、関節炎モデルマウスを用い、関節炎局所における、CD206陽性マクロファージの局在を病理学的に検討する事が出来た。興味深いことに罹患関節において、破骨細胞および滑膜type A細胞にCD206の発現が観察出来た。CD206陽性M2マクロファージは抗炎症性マクロファージとの想定とは異なる結果であり有用であった。

研究成果の概要(英文)：Examining the role of M2 macrophages in rheumatoid arthritis (RA) is extremely important in selecting treatment for this disease. In this study, it was possible to investigate the localization of CD206 positive macrophages in arthritis locally using arthritis model mice. Interestingly, CD206 expression could be observed in osteoclasts and synovial type A cells in arthritic joints. CD206 positive M2 macrophages might had different role in RA from the assumption of anti-inflammatory roles of M2 macrophages.

研究分野：Rheumatology

キーワード：rheumatoid arthritis M2 macrophage

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は持続性の増殖性滑膜炎を呈し、早期より関節破壊を来す予後不良の疾患である。RA の滑膜組織には種々の炎症細胞浸潤が認められるが、滑膜に浸潤するマクロファージは、炎症性サイトカインを産生し、RA の病態形成において中心的役割を果たしている。マクロファージは古典的な炎症性の M1、抗炎症性の M2 マクロファージという2つの極性を持った種類が存在し、リウマチ患者の滑膜では M1 マクロファージが主体であると考えられている。M2 マクロファージの役割についてはヒトのみならず関節炎マウスモデルにおいても、未だ知られておらず、その役割を明らかにすることには、関節リウマチの病態解明のためにきわめて有用である。

2. 研究の目的

本研究では、CD206 が、M2 マクロファージの特異的マーカーであることを利用し、ジフテリア毒素の投与により人為的に CD206 陽性細胞を減らすことが可能な遺伝子組み換えマウス (以下、CD260DTR-Tg マウス) を用いる。すなわち CD260DTR-Tg マウスに関節炎を誘導する実験系において、ジフテリア毒素の投与を行い、M2 マクロファージを除去することによる関節炎の発現の変化を観察する。具体的には、関節炎発症課程、及び、関節炎の修復課程における M2 マクロファージの役割を段階的に検討する。

3. 研究の方法

実験 1) コントロールマウスへのジフテリア毒素の投与

1. ジフテリア毒素の投与方法

オス CD206DTR-Tg マウス、野生型マウスに対して、-72hr、-24h の2回、ジフテリア毒素を 15 µg/kgBW 量で腹腔内投与する (苦痛のカテゴリー-C)。すでに当研究室において、本投与量がマウスの生存に影響を与えず、肺組織の CD206 陽性細胞数を 90% 程度減少させることを確認しており、本投与量を用いる。しかし、CD206DTR-Tg マウスのなかでジフテリア毒素に対する感受性がとくに高い個体があり体重が減少傾向となる場合がある。ジフテリア毒素投与前に感受性が高い個体を判別する手法はないため、投与後に体重を細かに観察し、1 週間以内で 10% 以上となる急速な体重減少を認める場合は、人道的エンドポイントとして炭酸ガスと頸椎脱臼の併用により安楽死させる (苦痛のカテゴリー-B)。

2. 評価方法

ジフテリア毒素による関節組織の CD206 陽性細胞への影響を検討するため、上記処置後、DAY0 の段階で評価する。具体的には、ペントバルビタール 120mg/kg を腹腔内注射し安楽死させ、その後、後ろ足を足関節直上より切断し凍結保存する (苦痛のカテゴリー-B)。骨、関節、滑膜組織について CD206 他、M2

マクロファージ特異的マーカーについて、免疫組織染色、ウエスタンブロットリング、qPCR などによる生化学実験を行う。同様に得られる滑膜組織については、細胞分画をフローサイトメトリーなどで解析する。これらの実験により、滑膜組織において、どの程度 CD206 陽性細胞の除去が行われているのか確認する。

実験 2) 関節炎発症における CD206 陽性細胞の影響の検討

- 1 関節炎誘導 実験 1 で準備した、ジフテリア毒素あるいは PBS を投与された、オス CD206DTR-Tg マウス、野生型マウスに対して、DAY 0 に抗 2 型コラーゲン抗体カクテル (ArthroGen-CIA® Arthritogenic Monoclonal Antibody) を 2mg、尾静脈より注射し、72hr 後に LPS 50 µg を腹腔内に注射する (苦痛のカテゴリー-C)。なお、ジフテリア毒素は、DAY0 及び、DAY2 及び DAY4 に投与し、関節炎発症のピーク直前である DAY6 に最終評価を行う。なお、関節炎により軽度のストレスと痛みがマウスに被ると予想されるため鎮痛処置としてペントバルビタール 50mg/kg を腹腔内投与する (苦痛のカテゴリー-C)。

- 2 関節炎評価

関節炎の発症の違いについて、毎日臨床スコアを測定する。臨床スコアの基準はすでに確立されている以下の基準を用いる。手足ごとに測定し、合計点を一匹の個体の測定値とした (正常 0、から最高 12)。DAY 6 に最終評価を行う。

Score0: 正常

Score1: 1 指に腫脹ないしは変形を認める

Score2: 2 指以上に腫脹ないしは変形を認めるが全指に及ばない

Score3: 全指に腫脹ないしは変形を認める

試験終了時 (DAY8) にペントバルビタール 120mg/kg を腹腔内注射し安楽死させる。両側の後足を足関節直上より切断し、凍結保存する (苦痛のカテゴリー-B)。骨、関節、滑膜組織について免疫組織染色、ウエスタンブロットリング、qPCR などによる生化学実験を行う。また、滑膜組織のみを取り出し、細胞分画をフローサイトメトリーなどで解析する (苦痛のカテゴリー-B)。

実験 3) 関節炎修復機転における CD206 陽性細胞の影響の検討

- 1 関節炎誘導

オス CD206DTR-Tg マウス、野生型マウスに対して、DAY 0 に抗 2 型コラーゲン抗体カクテル (ArthroGen-CIA® Arthritogenic Monoclonal Antibody) を 2mg、尾静脈より注射し、72hr 後に LPS 50 µg を腹腔内に注射する (苦痛のカテゴリー-C)。関節炎が修復機転を迎える、DAY8、DAY10 に、ジフテリア毒素を 15 µg/kgBW 量で腹腔内投与する (苦痛

の 카테고리-C)。関節炎が修復する DAY12 に最終評価を行う。なお、関節炎により軽度のストレスと痛みがマウスに被ると予想されるため鎮痛処置としてペントバルビタール 50mg/kg を腹腔内投与する（苦痛のカテゴリ-C）。

- 2 関節炎評価

関節炎の発症の違いについて、毎日臨床スコアを測定する。臨床スコアの基準はすでに確立されている以下の基準を用いる。手足ごとに測定し、合計点を一匹の個体の測定値とした（正常 0、から最高 12）。DAY 12 に最終評価を行う。

Score0: 正常

Score1: 1 指に腫脹ないしは変形を認める

Score2: 2 指以上に腫脹ないしは変形を認めるが全指に及ばない

Score3: 全指に腫脹ないしは変形を認める

試験終了時（DAY8）にペントバルビタール 120mg/kg を腹腔内注射し安楽死させる。両側の後足を足関節直上より切断し、凍結保存する（苦痛のカテゴリ-B）。骨、関節、滑膜組織について免疫組織染色、ウエスタンブロッティング、qPCR などによる生化学実験を行う。また、滑膜組織のみを取り出し、細胞分画をフローサイトメトリーなどで解析する（苦痛のカテゴリ-B）。

4. 研究成果

関節炎モデルマウスの誘導：当初、三協ラボ C57BL6JmsSlc マウス（雄）をコントロールマウスとして用い実験を検討していたが、同マウスでの関節炎の誘導率は、抗体カクテルを用いても 0%であった。LPS 投与量を増量したが、マウスへの負荷が大きく、同マウスでの実験は困難と考えられた。そこで、クレアの C57BL6J Jcl マウス（雄）を用いたところ、同マウスを用いて、関節炎発症に成功したため、同マウスで関節炎の評価を行った（図 1：A: 関節炎像と、B: 関節炎スコア：縦軸が関節炎スコア）。

【図 1A】

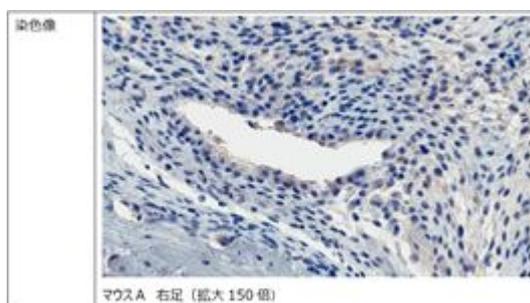


【図 1B】 関節炎スコア



病理学的検討では、図 2 の様に、滑膜腔を取り囲むように CD206 陽性滑膜細胞が存在し、一部破骨細胞にも CD206 の染色性が認められる。

【図 2】



本来であれば CD206DTR-Tg マウスにおいて、DTR（ジフテリア毒素）投与後のマウスに関節炎を誘導する研究へ進む予定であったが、そもそもコントロールとなる三協ラボの C57BL6JmsSlc マウス（雄）においての関節炎の誘導が困難であり、これ以降の研究は継続出来なかった。LPS 増量により、関節炎を誘発することが、出来るマウスも存在したが、死亡率も高く、実験継続困難と判断した。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：
国内外の別：
〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠田 晃一郎 (SHINODA, Koichiro)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・
助教
研究者番号：40377312

(2) 研究分担者

多喜 博文 (TAKI, Hirofumi)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・
准教授
研究者番号：10240780

朴木 博幸 (HOUNOKI, Hiroyuki)
富山大学・附属病院・助教
研究者番号：90512088