

研究種目：基盤研究(C)	
研究期間：2007～2008	
課題番号：19591173	
研究課題名（和文）	新規関節リウマチモデルマウスを用いた病態進行のメカニズム解明と治療法の検討
研究課題名（英文）	Mechanism of Disease Progression and Therapy in a Model Mouse (D1CC transgenic mouse) of Rheumatoid Arthritis
研究代表者	
金澤 智 (KANAZAWA SATOSHI)	
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教	
研究者番号：90347401	

研究成果の概要：新規トランスジェニックマウス（D1CC マウス）のホモ化（トランスジーンをホモに持つ）を試みた。Real-time PCR 法を用いる事でホモとヘテロマウスを同定する事が可能となり、ホモマウスを用いた系統維持が可能となった。また本マウスに抗リウマチ薬（推奨度 A）を投与する事で、関節炎の抑制効果が確認された（論文準備中）。加えて関節外病変として生じる間質性肺炎を組織学的に捉える事に成功した（論文準備中）。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：リウマチ学、関節リウマチ、モデルマウス、治療薬

1. 研究開始当初の背景

(1) RA の遺伝的背景として MHC クラス II DR1、DR4 等のサブタイプが RA 発症に関与することが、疫学的な解析により示唆されている。本申請において使用する D1CC トランスジェニックマウスは、MHC クラス II を関節軟骨部で特異的に発現させることで、

より RA 発症に近い疾病状態を誘発する新規 RA モデルマウスである (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 103:14465-70 (2006))。

(2) D1CC トランスジェニックマウスは、これまでのモデルマウスと異なり、その発症は慢性かつ進行性で、末期においては著明な関節破壊も引き起こす。病理組織学的

にも RA に酷似し、滑膜細胞の異常増殖、パ
ンヌス形成、肉芽腫様病変等に加え、関節
外病変も観察された。この為炎症過程と骨
破壊の過程を分け、炎症から骨破壊への移
行時の関節局所における細胞群の移り変わ
りやここで産生されるサイトカインの変化
など質的、動的な変化を解析することが可
能となるなど多くの利点を持つ。

(3) RA の発症には、遺伝的背景、感染病
原体、環境要因の 3 者が深く関わっている
と考えられる。しかし RA そのものを引き
起こす病原体あるいは環境要因に関しては、
膨大な研究努力にも関わらず、いまだその
実体は明らかとなっていない。一方遺伝的
背景および分子レベルでの病態に関する知
見、特に MHC クラス II の発現制御機構に
関する研究は、本研究を推進することが可
能な状態にある (Arthritis Res., 4 Suppl
3; S133-40 (2002))。例えば MHC クラス II
の発現を制御する転写因子群の解析が進み、
CIITA がマスタースイッチとして働くこと
が明らかとなった (Oncogene, 22;
5707-5711 (2003), Mol. Cell, 8; 327-337
(2001), Int Immunol, 13; 951-958 (2001),
Microbes and infection, 3; 467-473
(2001), Immunity, 12; 61-70 (2000),
Microbes and infection, 1; 863-869
(1999), Mol. Cell. Biol., 19; 941-947
(1999))。

(4) 加えて MHC クラス II 以外の RA 原因
遺伝子として PADI4, FCRL3 等新規タンパ
ク質の同定も進んでいる (Suzuki, A, Nat
Genet 24; 395-402 (2003), Yuta, K. et.
Al., Nat Genet 37; 478-84 (2005))。これ
までリウマチ様の症状を示すモデルマウス
として、CIA マウスが用いられてきた。し
かしながらこのマウスの RA 症状の進行に
は以下の様な問題点があった。

①一般的な RA が慢性的、進行的に進むの
に対し、CIA では炎症が急激に起こり炎症
過程と骨破壊の過程が混然と起こり、RA
発症過程の解析が困難である。

②急激な炎症の結果、骨破壊の過程で強い
リバウンド様の症状が観察され、結果的に
骨過形成がみられる。また骨粗鬆症の症
状が弱い。

③加えて関節リウマチにともなる合併症も
確認されていない。新規 D1CC マウスでは
これらの全ての点において改善、改良され
ている。また国内では、Zap70 に変異をも
つ SKG マウスの解析が進んでおり、関節リ
ウマチにおける T 細胞の RA における重
要性が解明されつつある (Sakaguchi N,
Nature, 426; 454-60 (2003))。一方 MHC
クラス II を介した抗原提示に着目したモ
デルマスの報告はなく、SKG マウスから得
られる解析結果と合わせることは、T 細胞
側と抗原提示側の両サイドからの知見を合
致させる事になり、免疫系の破綻のメカニ
ズムと RA 発症の詳細な関係を包括的に説
明することが期待される。

2. 研究の目的

(1) 異所的な MHC クラス II の発現が、関
節リウマチ (RA) の発症に強く関わる事を明
らかとする。特に MHC クラス II と RA 重篤
度との相関を明らかとする。新たにホモマ
ウスを作成し、これまでに解析が終了したヘ
テロマウスにおける結果とその発症過程、重
篤度を比較検討する。

(2) これまでの研究から慢性的、段階的
な RA 症状を観察すると炎症相、滑膜増生
相から関節破壊に至る過程で、特徴的な細
胞として、肥満細胞が上げられる。この肥
満細胞は、ほとんど炎症細胞系の数が減少
していく過程でも疾患部に特徴的に見られ、
抗原提示細胞化している可能性がある。実

際に肥満細胞欠損マウスを用いてのリウマチ様疾患の解析から、肥満細胞は関節リウマチの進行に不可欠である事が示されている (Lee, DM, Science, 297; 1689-92 (2002))。そこでこの肥満細胞が、関節破壊に至る過程の橋渡しをしていると仮定し、そのメカニズムを検討する。加えてリウマチ疾患での滑膜細胞の質的な変化 (Oncogene, 22; 7796-803 (2003)) を関節組織の抗体染色等を行い明らかとする。

(3) これまで RA 患者に対して使用されている既存製剤の効果、およびそれらの薬剤の併用効果などを D1CC マウスを用い検討する。この際、予防投与に加えて、発症後投与の検討も行う。最終的には新たな関節リウマチ製剤やリウマチ性骨粗鬆症製剤のスクリーニングや開発に利用していくことを目的とする。

(4) D1CC マウスでは、関節外病変として間質性肺炎が検出された。この間質性肺炎では、新たなエラスチックファイバーの合成が確認されただけでなく、II 型肺胞上皮細胞の増生がみられることから、今後血清中の KL-6 値などをモニターリングし、その病態変化を捉えることを目的とする。

3. 研究の方法

計画詳細に先立ち、簡単に D1CC マウスの特徴について記載する (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 103:14465-70 (2006))。通常野生型マウス (DBA/1 マウス) に Co12 を皮下注射した場合、約 60% 程度の RA 様症状の誘導率を観察できる。一方 D1CC マウスは常法で用いる Co12 濃度の 1/20 の皮下注射で約 90% の誘導率を示した。この結果 D1CC マウスは、Co12 に対し高感受性を有することが明らかとなった。この際 RA の進行は、既存の CIA マウスと比較して、より段階的、長期的に RA 症状が進み、最

終的にはより重篤になることが明らかとなった。野生型マウスでは、同じ低濃度の抗原による注射では、RA 発症は認めなかった。これらの知見を基に以下の様な点に着目し研究を進めていく。

(1) これまでの解析から MHC クラス II が RA 発症に関与することが明らかとなった。そこで遺伝子の重複度がどのような影響を持つのかを明らかとする。現在あるヘテロ型 D1CC マウスからホモ型マウスを作成する。ヘテロマウス同士を交配し得られた F1 マウスの中からホモ型のマウスを Western Blot を用い同定する。得られたホモ型マウスに低濃度の Co12 を注射し、ヘテロ型マウスと比較し、RA 発症の重篤度を検討する。

(2) 関節リウマチ発症において、特に炎症相から関節破壊に至る過程に着目し、好中球、T 細胞、B 細胞、マクロファージ、肥満細胞等の組織染色を行なう。パラフィン包埋および凍結切片を用い、特異的染色や抗体染色を行なう。合わせて炎症時の血液や関節液等を採取し、各種サイトカインや抗 CCP 抗体等を測定し RA 病態の経時的な変化を解析する。ただし炎症が長期にわたり骨破壊までを含めると症状が数ヶ月間に渡るため本年度は、主としてサンプリングを中心に進めていく。これらの組織染色のデータからこの過程における特徴的な動きを見せる細胞を明らかし、関節リウマチ進行のメカニズムを探る。また血清サンプルを使用し、各種液性因子、マーカーの濃度を測定し、特定細胞の活性化状態などを捉える。

(3) 現在特に注目の高い薬剤として各種の生物製剤が上げられる。これにいわゆる抗リウマチ薬として DMARDs、特にメソトレキセート (MTX) との併用で RA の治療に大きな効果

がある事が知られている。しかしながら他の DMARDs、ステロイド系薬剤、非ステロイド抗炎症薬 (NSAID)、FK506 等の免疫抑制剤、骨粗鬆剤等との併用を考える際、その効果を事前に適切なモデル動物系で検討する事は重要である。特に各薬剤のコンビネーションおよび投与量を変動させ、最適な条件を見いだす。各種薬剤投与後は、その治療経過を外見のおよび血清中の抗体価 (抗 CCP 抗体、抗 Co12 抗体等、初年度は (2) 同様サンプリングが中心となる。) をモニターリングする。また関節リウマチにおける関節外病変の一つまたおそらくは DMARDs の副作用として間質性肺炎およびその進行が上げられる。D1CC マウスは、関節外病変として間質性肺炎を示す利点を生かし、この点についても解剖および組織染色によりマウスの病態を検討する。

4. 研究成果

(1) 新規トランスジェニックマウス (D1CC マウス) のホモ化 (トランスジーンをホモに持つ) を試みた。D1CC マウス作成に用いたトランスジーンは、関節軟骨細胞特異的発現を示す 2 型コラーゲンプロモーター、エンハンサー制御下に、class II transactivator (CIITA) 遺伝子を配置したものである。異所的な CIITA の発現により MHCII の発現が誘導される。これまで関節炎の誘導実験では、ヘテロマウスを用いて来た。このヘテロマウスとは、ヘテロマウスに野性型マウスを交配するため、F1 においてヘテロマウスの出現頻度は、50%であった。そこで 1) 系統維持の効率化を図る (ホモマウスに野性型マウスを交配し、その子孫を 100%実験に使用する)、2) ホモマウスとヘテロマウスの表現系の違いを検討する、を目的として Real-time PCR 法によるトランスジーンの間定を試みた。現在 Real-time PCR 法の感

度は、0.5 遺伝子量の違いを検出する事ができる。ホモとヘテロマウス間の遺伝子量の違いは、1 すなわち PCR 上 1 サイクルの違いとなる。それぞれのマウスから得られたゲノム DNA 濃度を厳密に測定し、GAPDH 遺伝子を内在性コントロールとする事でホモマウス、ヘテロマウスの違いを同定する事が可能となった。このホモマウスに野性型マウスを交配し、ヘテロマウスを得て、関節炎の誘導実験を行った。これまでと同様に、低濃度のコラーゲン抗原誘導に関節炎が観察された。

(2) D1CC マウスは、これまでのモデルマウスと異なり炎症の進行が緩やか進むため、慢性的な病態を示す。この為抗リウマチ薬を投与した場合、1) 投与期間が長くできる、2) 病態進行のモニターリングが容易である、と考えられるためこれらの点について検討を加えた。今回の実験では、関節リウマチ薬として推奨度 A のサラゾスルファピリジンおよびメソトレキセートを経口投与した。投与量は、人に対する通常の投与量を参考に、体重辺り同等の投与量を基準とした。特にサラゾスルファピリジンは、2 倍量において顕著な抑制効果が確認された。この時の血清サンプルの採取が終了しているため、血清マーカーを測定し、論文を準備する予定である。

(3) 関節リウマチの関節外病変として、近年間質性肺炎発症が問題となっている。D1CC マウスの特徴の一つとして、関節炎発症後、間質性肺炎を示す事が上げられる。そこでまずこの病理像を組織学的解析した。D1CC マウスにおける間質性肺炎様の像は、これまでの解析から弾性繊維の発現亢進が見られていた。今回さらに間質性肺炎マーカー、KL6 および SP-D の発現が亢進している事が明らかとなった (論文準備中)。

(4) 今回のデータから本 D1CC マウスの販

売が決定し、免疫生物研究所より2009年度夏以降に上市することとなった。

免疫生物研究所ホームページ
<http://www.ibl-japan.co.jp/>

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1件)

金澤 智、関節リウマチおよび関節外病変を示す新規モデル動物(D1CC マウス)、化学工業、2008; 59: 934-940. 査読無し

[学会発表] (計9件)

①関節リウマチモデル動物(D1CC マウス)における炎症初期の滑膜細胞について、金澤 智、岡本 尚、第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会、口頭発表、2008年12月10日、神戸

②MAP 様キナーゼ NLK を介した新たな HIV 転写調節機構について、金澤 智、石谷 閑、石谷 太、松本 邦宏、岡本 尚、第56回日本ウイルス学会、口頭発表、2008年11月26日、大阪

③関節リウマチモデル動物(D1CC マウス)を用いた炎症初期における抗 CCP 抗体価の動態と滑膜細胞の病理組織学的変化、金澤 智、岡本 尚、第29回日本炎症・再生医学会、口頭発表、2008年7月8-10日、東京

④関節リウマチ様および関節外病変を示す新規モデル動物、金澤 智、新技術説明会、科学技術振興機構、口頭発表、2008年5月23日、東京

⑤新規関節リウマチモデル動物(D1CC マウス)を用いた抗リウマチ薬の有効性の検討、金澤 智、水野 伸弘、吉田 俊治、岡本 尚、第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会、口頭発表、2007年12月11日-15日、横浜

⑥MAP 様キナーゼ NLK による新規 HIV 転

写調節機構の解析、金澤 智、石谷 閑、石谷 太、松本 邦宏、岡本 尚、第21回日本エイズ学会、口頭発表、2007年11月28日-30日、広島

⑦関節リウマチ様および関節外病変を示す新規モデル動物、金澤 智、岡本 尚、科学技術振興機構(JST)、新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)、口頭発表、2007年9月12日、東京

⑧新規関節リウマチモデル動物(D1CC マウス)を用いた抗リウマチ薬の有効性の検討、金澤 智、水野 伸弘、吉田 俊治、岡本 尚、第28回日本炎症・再生医学会、口頭発表、2007年8月2-3日、東京

⑨動物モデルでの関節炎の解析(1)(ワークショップ)、CIITA トランスジェニックマウス(D1CC マウス)を用いた RA 治療薬の効果、金澤 智、水野 伸弘、吉田 俊治、岡本 尚、第51回日本リウマチ学会総会・学術集会、口頭発表、2007年4月26日-29日、横浜

[図書] (計0件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

該当なし

○取得状況 (計0件)

該当なし

[その他]

ホームページ

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/molgene.dir/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金澤 智 (KANAZAWA SATOSHI)

名古屋市立大学・大学院医学部研究科・助教
研究者番号: 90347401

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし