

令和 6 年 4 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15411

研究課題名（和文）新規反応性関節炎モデルマウスの創出と病態メカニズムの解析

研究課題名（英文）Establishing a Novel Mouse Model of Reactive Arthritis and Investigating Its Pathomechanisms

研究代表者

太田 光俊（Ota, Mitsutoshi）

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：60849149

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）：反応性関節炎（ReA）はサルモネラなどによる消化管感染などの後に発症する無菌性関節炎として知られているが、その病態メカニズムは不明で明確な診断基準はなく、治療についても定まっていない。本研究の目的は、新規ReAモデルマウスを作成し、病態メカニズムを解明するとともに、診断に有用なバイオマーカーを同定することであった。

本研究の具体的な成果は、慢性炎症モデルマウス（F759マウス）を用い、新規ReAモデルマウスの作成に成功したこと、サルモネラ経口感染後の血清エクソソームがReAを引き起こすことを示したこと、そのエクソソームを精査し、ReAの診断に有用なバイオマーカーの同定に迫ったことである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

反応性関節炎（ReA）は、サルモネラなど特定の感染症後に発症する関節の炎症で、その原因や治療法は明確にされていませんでした。本研究では新しいモデルマウスを開発し、ReAがどのようにして発症するのかを科学的に解明しました。特に、感染後の体の変化を追跡し、病気の発症に関わる重要な因子を特定したことにより、ReAの診断が容易になり、早期に適切な治療を開始できるようになることが期待されます。この成果は、国内外の多くのReA患者にとって、生活の質を大きく改善する手助けになるものです。

研究成果の概要（英文）：Reactive arthritis (ReA) is known as a sterile arthritis that occurs following gastrointestinal infections such as those caused by Salmonella, yet its pathogenic mechanisms remain unclear, there are no definitive diagnostic criteria, and treatments are not well established. The purpose of this study was to create a novel ReA mouse model and elucidate its disease mechanisms, as well as identify biomarkers useful for diagnosis.

The specific outcomes of this study were: (1) the successful creation of a novel ReA model using the chronic inflammation model mouse (F759 mouse), (2) demonstrating that serum exosomes following oral Salmonella infection can induce ReA, and (3) analyzing these exosomes to approach the identification of biomarkers that are useful for the diagnosis of ReA.

研究分野：免疫学

キーワード：反応性関節炎 エクソソーム 炎症 免疫

1. 研究開始当初の背景

反応性関節炎 (ReA) は「他部位の感染後または感染中に発症する関節炎で、関節からは細菌を検出できない関節炎」(Ahvonen, et al. Acta Rheumatol Scand, 1969) として報告された。原因となる先行感染としては消化器や泌尿生殖器に対する、サルモネラ、エルシニア、赤痢菌、カンピロバクター、クラミジア感染などの関与が報告されている (Braun, et al. J Rheumatol, 2000)。しかし、明確な診断基準や診断方法は未だ存在していない (Hannu, et al. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2006)。また治療方法についてもコンセンサスが得られておらず、治療に難渋する例も多くあり、特にサルモネラ等による消化管感染が未だ多い発展途上国では大きな問題となっている。その原因としては、再現性の高い動物モデルが存在せず、病態が未だ不明で、診断に有用なバイオマーカーが発見できていないためであると、我々は考えた。そこで、新規動物モデルを創出するにあたり、我々は ReA の特徴を、2 つに分けて考えた。先行感染の後に時間を空けて発症する。遠隔臓器 (関節) で炎症が起こる。時間を空けて発症するということから、我々は長期に渡って持続した慢性炎症が表出した可能性を考えた。これまでに我々は、慢性炎症モデルマウス (F759 マウス) (Ohtani, et al. Immunity, 2000, Atsumi, et al. J Exp Med, 2002) の解析を通じて、「IL-6 アンプ」のメカニズムを明らかとしてきた (図1) (Ogura, et al. Immunity, 2008, Murakami, et al. J Exp Med, 2011, Arima, et al. Cell, 2012, Tanaka, et al. J Immunol, 2018 共同著者, Tanaka, et al. J Immunol, 2018 共同著者)。端的に述べると、「IL-6 アンプ」は非免疫系細胞がその中心となり、NF- κ B 経路と STAT3 経路が同時に活性化されることで種々の炎症性サイトカイン、ケモカイン、増殖因子などを相乗的、持続的に分泌し、慢性炎症性疾患を引き起こすというものである。このメカニズムは多くの動物モデルや実際のヒト疾患において、病態に関与していることが明らかとなっており、新たな治療標的として提案しているものである。よって、F759 マウスは ReA モデルマウスを創出するに当たって、有用であると考えた。一方、遠隔臓器に影響を与える生体物質にはどのようなものがあるだろうか。ReA の先行感染として種々の細菌が挙げられており、しかも感染から時間をおいて関節炎という同一の表現型を示すことから、既知のサイトカイン等が単独の原因になるとは考えにくい。そこで今回我々が着目したのはエクソソームである。ヘリコバクター・ピロリの胃への感染が、心血管疾患や糖尿病、パーキンソン病などの、遠隔臓器での疾患を引き起こすメカニズムとして、病因物質である CagA を含有するエクソソームが関与している可能性が報告されている (Shimoda, et al. Sci Rep, 2016)。この報告は我々に、細菌由来の病因物質が、エクソソームを介して遠隔臓器である関節に炎症を惹起するという発想を抱かせるに十分なものであった。本研究の学術的問いは、「先行する消化管感染が、どのようにして遠隔臓器である関節に炎症を引き起こすのか」であり、その答えとして我々は「消化管感染に起因したエクソソームが、炎症回路の活性化を通して関節炎を引き起こす」という仮説を立てた。再現性の高い ReA モデルマウスを新規に創出し、そのメカニズムを解析することで我々の仮説を検証し、ReA の病態解明と、診断に有用なバイオマーカーの発見に繋げていくこととした。

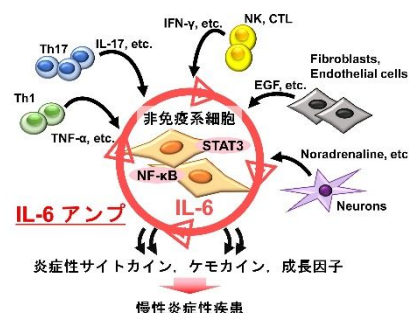


図1. IL-6 アンプの概要

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) F759 マウスを用いて、新たな ReA モデルマウスを作成する。(2) サルモネラ感染後の血清エクソソームが、ReA を引き起こすかどうかを精査する。(3) 創出したモデルマウスを用いて、エクソソームによる IL-6 アンプを介した ReA の発症メカニズムを解明する。(4) エクソソームを精査し、ReA の診断に有用なバイオマーカーを明らかにする。ことである。

3. 研究の方法

- (1) F759 マウスを用いて、新たな ReA モデルマウスを作成する。
F759 マウスにサルモネラを経口感染させ、足関節における炎症を検出するために、摘出した足関節を用いて qPCR と免疫組織染色を行った。またクリニカルスコアでの評価も同時に行った。
- (2) サルモネラ経口感染後の血清エクソソームが、ReA を引き起こすかどうかを精査する。
サルモネラ経口感染後の F759 マウスの血清エクソソームを抽出し、未感染 F759 マウスに投与することで関節炎が引き起こされるかどうかを、qPCR、免疫組織染色及びクリニカルスコアで評価した。
- (3) 創出したモデルマウスを用いて、エクソソームによる炎症回路を介した ReA の発症メカニズムを解明する。
足関節における滑膜細胞において IL-6 アンプが活性化している可能性が考えられたことから、IL-6 アンプが存在することを既に我々が明らかにしている、マウス血管内皮細胞株 BC-

1 に対して、培養液中にサルモネラ経口感染後 F759 血清エクソソームを添加し、qPCR、ELISA で炎症回路の活性化を評価した。またその活性化メカニズム解析については、IL-6 アンブの NF- κ B 経路・STAT3 経路のいずれが関与しているのか、qPCR でそれぞれの標的遺伝子の発現を解析するとともに、NF- κ B 経路・STAT3 経路に対するインヒビターを用いた実験を行うことで明らかにした。

- (4) エクソソームを精査し、ReA の診断に有用なバイオマーカーを明らかにする
サルモネラ経口感染後 F759 マウスの血清エクソソームと未感染 F759 マウスの血清エクソソームの含有物質に対して質量分析を行った。その違いを明らかにすることは、病因物質を明らかとすることであり、診断に有用なバイオマーカーたりうるものと考えた。

4. 研究成果

- (1) F759 マウスのサルモネラ経口感染後に、遠隔臓器である足関節において IL-6 mRNA の発現は上昇し、リン酸化 STAT3 (p-STAT3) は増強し、クリニカルスコアは増悪した (図 2)。これは、消化管感染が遠隔臓器である足関節での IL-6 アンブの活性化をもたらし、関節炎を発症させることを示すものであった。よって、F759 マウスを用いた新規 ReA モデルマウスの創出がなされたと結論付けた。

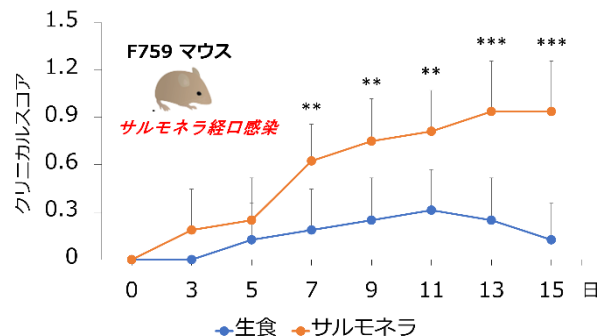


図2. 新規 ReA モデルマウスの創出

- (2) サルモネラ経口感染後の血清エクソソームを抽出し、未感染 F759 マウスに投与したところ、関節炎が惹起され、クリニカルスコアの増悪が見られた (図 3a)。また摘出した足関節において、IL-6 mRNA の発現上昇と p-STAT3 の増強が見られた。このことからサルモネラ経口感染後の血清エクソソームが、新規 ReA モデルマウスにおいて関節炎を引き起こすことが明らかとなった。

- (3) BC-1 に対して、培養液中にサルモネラ経口感染後 F759 血清エクソソームを添加し、qPCR、ELISA で IL-6 アンブの活性化を評価したところ、IL-6 アンブの NF- κ B 経路が関与していることが明らかになった (図 3b)。さらに、NF- κ B 経路に対するインヒビターを用いた実験を行ったところ、IL-6 アンブの活性化が抑制されることが示された (図 3c)。

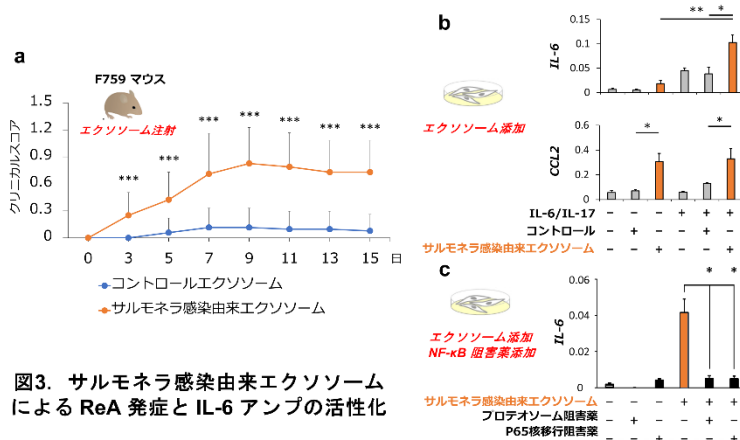


図3. サルモネラ感染由来エクソソームによる ReA 発症と IL-6 アンブの活性化

- (4) サルモネラ経口感染後 F759 マウスの血清エクソソームと未感染 F759 マウスの血清エクソソームの含有物質に対して質量分析を行ったところ、ReA 病因物質候補分子 Salmo-1 を発見した。(3)と同様の実験を、Salmo-1 を用いて行ったところ、qPCR、ELISA で IL-6 アンブの活性化が確認された (図 4)。このことから Salmo-1 が ReA 発症において、臨床的な意義を持つ可能性が示唆された。今後さらなる精査を進めて特異抗体の作成を行い、診断に有用なバイオマーカーとして応用していきたい。

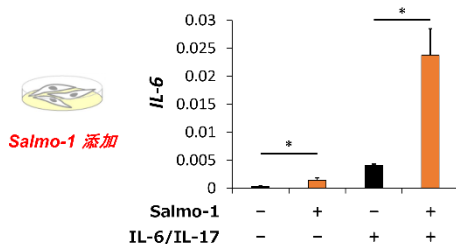


図4. ReA 病因物質候補分子 Salmo-1 の影響

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------