

令和元年6月12日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10162

研究課題名(和文) 乾癬モデルマウスを用いた乾癬性関節炎の発症機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of disease development in psoriatic arthritis using psoriatic model mouse

研究代表者

中島 英貴 (NAKAJIMA, HIDEKI)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師

研究者番号：70314995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：乾癬モデルマウスの足趾にジニトロフルオロベンゼン(DNFB)を塗布したところ、持続的な関節腫脹が生じ、組織学的に著明な付着部炎を認めた。このDNFB誘発関節炎モデルにおける関節での炎症性サイトカインの遺伝子発現を検討すると、TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β 、IL12p35、IL-17A、IL-17Fの発現が増加していた。皮膚病変におけるIL-17AおよびTNF- α 、LRGの増加が、DNFB誘発の関節炎・付着部炎の発症のトリガーになることが推測される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乾癬性関節炎の発症機序は現在まで明らかではないが、今回の乾癬モデルマウスを使った実験により関節表面の皮膚病変が、関節腫脹や付着部炎を誘導することを証明した。乾癬病変におけるサイトカインの増加が、腱を通じて関節腔および腱付着部まで影響を及ぼし炎症の悪化と腱の肥厚を誘導することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Repetitive DNFB painting on hind paws of K5.Stat3C mice resulted in prominent joint swelling. Alternatively, LRG deletion induced a significant decrease in joint swelling and foot pad thickness in K5.Stat3C mice after chronic CHS. Histological finding revealed that chronic CHS caused subcutaneous and peri-tendinous infiltration of inflammatory cells at day 7, and then provoked enthesitis involving periarticular muscle at day 14. Chronic CHS induced an upregulation of LRG, IL-1 β , TGF- β , IL-6, IL-12p35, IL-17A and IL-17F in articular and periarticular tissues of K5.Stat3C mice paws at day 7. In contrast, K5.Stat3C:LRG $^{-/-}$ mice displayed downregulation of TNF- α and IL-17A compared with K5.Stat3C:LRG $^{+/+}$ mice. Collectively, these results show that chronic DNFB application on paws of K5.Stat3C mice can induce enthesitis through upregulation of LRG, inflammatory cytokines and IL-17 in K5.Stat3C mice.

研究分野：乾癬

キーワード：乾癬モデルマウス K5.Stat3 DNFB 付着部炎 乾癬性関節炎 TNF- α LRG

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乾癬性関節炎(psoriatic arthritis: PsA)は、関節炎の発症前に乾癬病変がみられるのが約70%と多いが、皮疹のない関節炎先行型も10%程度みられており、皮膚症状と関節炎の因果関係が未だ明らかではない。我々の PET-CT を用いた乾癬および PsA 患者における関節炎の評価では、関節痛などの自覚症状がなくても、関節や付着部に炎症が画像上認められることが明らかになっており、全身性炎症性疾患として乾癬と PsA を捉える必要がある。関節リウマチ(rheumatoid arthritis: RA)と比較して、早期に急速に進行することは稀で、徐々に進行するために患者も医師も症状に気付かず、関節破壊と癒合が生じて変形をきたしてしまうことが多い。リウマトイド因子や抗 CCP 抗体などの自己抗体が RA において高率であるが PsA では低頻度であること、抗リウマチ薬や生物学的製剤の治療効果が PsA と RA で差があることから、PsA と RA は異なる病態であることが推測されているものの、詳細は未だ明らかではない。

我々は、Wnt- カテニン経路による骨形成と PsA との関連に注目している。Wnt- カテニン経路は間葉系幹細胞からの骨芽細胞と骨細胞への分化を促進し、分化した骨細胞は Dickkopf-1 (DKK-1)やスクレロスチンを分泌して Wnt シグナルを抑制する。PsA 患者血清において、DKK-1 とスクレロスチンを測定したところ、DKK-1 は PsA 患者において乾癬患者および健常人よりも有意に上昇していたが、スクレロスチンは乾癬患者が PsA 患者および健常人よりも有意に高値を示していた。また PsA 患者に対する TNF 阻害薬の投与により、DKK-1 は低下したがスクレロスチンは変化しないことを確認した。このことから PsA 患者の腱や靭帯の線維芽細胞や骨細胞から TNF- 刺激により DKK-1 が過剰に産生されることが、PsA 発症機序に関与している可能性が考えられる。スクレロスチンと乾癬患者におけるメタボリックシンドロームとの関連を調べると、スクレロスチンは血糖値と HbA1c と有意な正の相関を認めたことから、インスリン抵抗性における Wnt シグナルの減弱とスクレロスチンとの関連が示唆された。よって乾癬と PsA における Wnt- カテニン経路には明らかな差異があり、PsA 発症に DKK-1 活性化が関与していることをマウスモデルで明らかにする必要があると考えた。

乾癬モデルマウスである K5-Stat3C トランスジェニックマウスの耳介や背部皮膚にフォルボールエステルを塗布すると乾癬様皮膚病変を生じるが、足趾に塗布すると乾癬様皮膚病変とともに PsA の指趾炎でみられるソーセージ様腫脹が足趾に生じ、さらに PsA でみられる付着部炎が腫と足底にみられることを確認している。これを皮膚炎誘発の関節炎モデルとして確立し、コラーゲン誘発関節炎モデルと比較検討することで、いまだ未解決である PsA と RA の発症機序の違いを解明できると考えている。

2. 研究の目的

乾癬性関節炎は、欧米では脊椎関節炎に分類されているが、欧米人で高率に認められる HLA-B27 の陽性率は日本人において低く、T 細胞の活性化機序が MHC class I 抗原以外に存在し、Th-17 細胞が発症に関与することが考えられる。また我々は、乾癬性関節炎において Wnt- カテニン経路の抑制因子である Dickkopf-1 が、TNF- 依存性に上昇していることを確認している。Th-17 細胞と Wnt- カテニン経路の関連は未だ明らかになっていない。今研究において、乾癬モデルマウスから乾癬性関節炎モデルとしての皮膚炎誘導性関節炎マウスと関節リウマチモデルとしてのコラーゲン誘導性関節炎マウスを樹立し、両者を比較検討することにより、乾癬性関節炎における Th-17 細胞と Wnt- カテニン経路の関連を解明する。

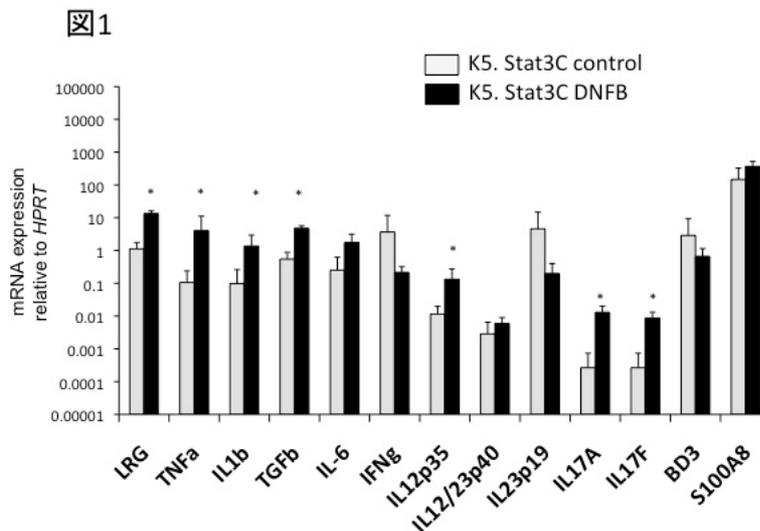
3. 研究の方法

乾癬モデルマウスの K5.Stat3C トランスジェニックマウス足趾にフォルボールエステルを週 3 回塗布し、乾癬様病変と足趾腫脹を生じさせ、経時的に関節腫脹と変形を観察する。さらに K5.Stat3C トランスジェニックマウスの尾部にchicken II 型コラーゲンと Complete Freund's adjuvant を皮内注射し、3 週後にもう一度注射して、関節腫脹の出現を観察する。

4 . 研究成果

関節リウマチモデルとして、B6 マウスにchicken コラーゲンと完全フロイントアジュバントを投与し関節腫脹が出現するかどうかを観察したが、関節腫脹は認められなかった。コラーゲン誘発性関節炎モデルは、やはりHLA Class II 拘束性であり、DBA/1 マウス以外には発症しにくいことが明らかになった。

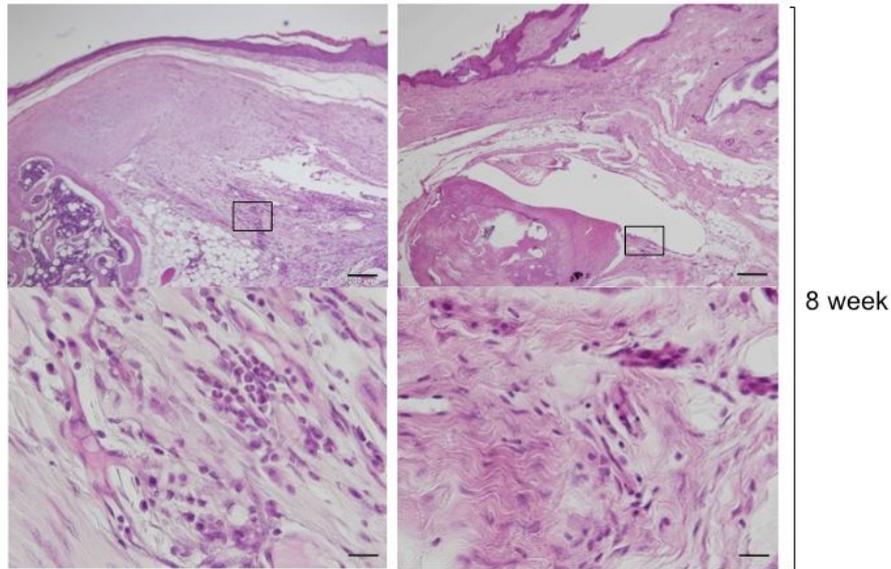
また、乾癬性関節炎モデルとして、乾癬モデルマウスのStat3C 遺伝子導入マウスの足趾にフォルボールエステルを塗布して関節腫脹の出現を観察したが、1ヶ月目までは関節腫脹がみられるものの、2ヶ月目には腫脹が消失することから一過性の関節炎であることが判明した。そのため感作物質をジニトロフルオロベンゼン (DNFB) に変更したところ、持続的な関節腫脹が生じ、組織学的にもフォルボールエステルよりも著明な付着部炎を認めた。DNFBを反復塗布すると、1 週後にPsA の指趾炎でみられるソーセージ様腫脹が生じ、2週後にはPsA でみられる付着部炎が足関節に出現することを組織学的に確認した。さらに塗布8週後には腱付着部の炎症細胞浸潤とともに腱の著明な肥厚が生じた。このDNFB 誘発関節炎モデルにおける関節での炎症性サイトカインの遺伝子発現を検討すると、TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β 、IL12p35、IL-17A、IL-17F の発現が増加していた(図1)。



乾癬モデルマウスの K5.Stat3C トランスジェニックマウスとロイシンリッチ α -2グリコプロテイン(LRG) KOマウスを交配させ、K5.Stat3C: LRG (+/-) マウスを作成し、LRG KO マウスにバッククロスさせてK5.Stat3C: LRG (-/-) マウスを得た。K5.Stat3C: LRG (-/-)マウスの足趾にDNFBを反復塗布すると、組織学的には腱や筋肉の骨付着部における好中球、リンパ球浸潤は減少し、DNFB塗布8週後の足趾の組織学的所見においても腱の肥厚は認められなかった(図2)。

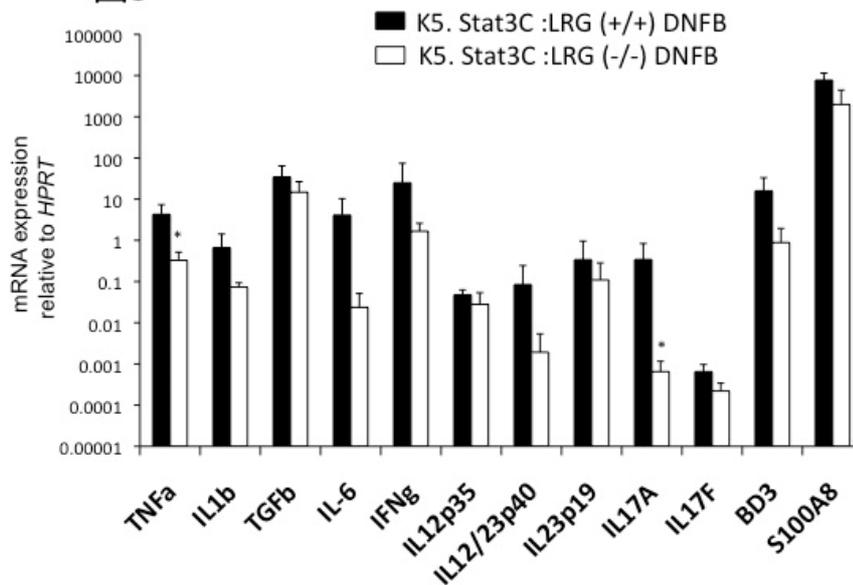
図2 K5.Stat3C: LRG+/+

K5.Stat3C: LRG -/-



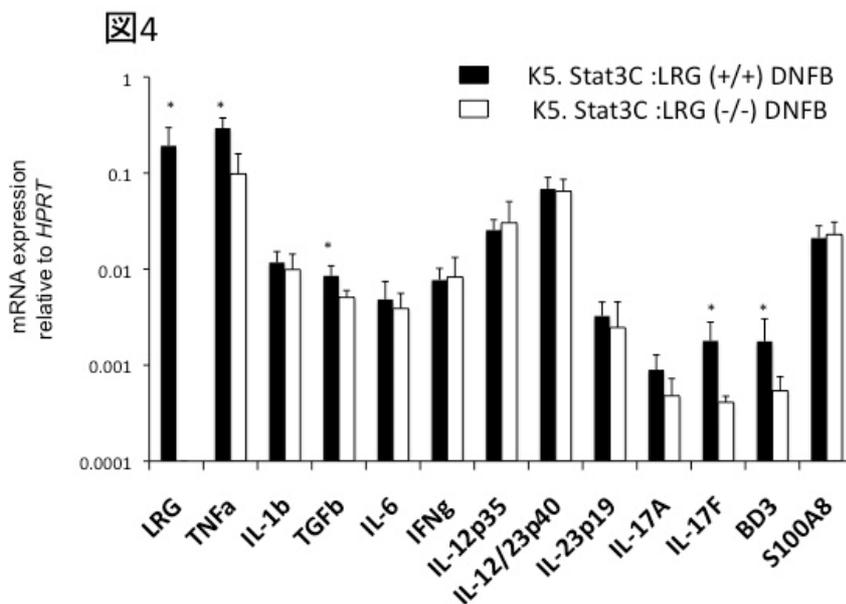
DNFB反復塗布したK5.Stat3C: LRG (-/-) マウスの足趾におけるサイトカインの遺伝子発現は、K5.Stat3C: LRG (+/)と比較すると、TNF- とIL-17A の発現が低下しており、LRG はPsA の発症にTNF- カスケードならびにTh17 経路を介して関与することが明らかになった(図3)。

図3



K5.Stat3C マウスの足趾に0.5% DNFB を2週間塗布後に単径リンパ節を摘出し、乾癬関連遺伝子の発現を検討したところ、K5.Stat3C: LRG (-/-)においてはK5.Stat3C: LRG (+/)と比較してTNF-alpha, IL-17F, BD3 の発現が有意に低下していた。DNFB 塗布部の足趾では、K5.Stat3C: LRG (-/-)においてTNF-alpha, IL-17A の発現が有意に低下していたことから、関節炎・付着部炎の発

症機序としてTNF-alpha, LRG が、炎症局所ならびに所属リンパ節に共通して関与していることが推測される(図4)。



接触皮膚炎を起こす他の物質としてオキサゾロン、FITC (Fluorescein isothiocyanate)、TNCB (2,4,6-trinitro-1-chlorobenzene) を用いて接触皮膚炎誘発性の関節炎・付着部炎が誘導できるか試みたものの、DNCB でみられた関節炎・付着部炎は認められなかった。高濃度(0.5%) DNCB は単回塗布でも一週間以上遷延する接触皮膚炎を生じ、病変部ではIL-17A の発現が上昇していることが報告されており、皮膚病変におけるIL-17AおよびTNF-alpha, LRG の増加が、DNFB 誘発の関節炎・付着部炎の発症のトリガーになることが推測される。

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〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：佐野栄紀

ローマ字氏名：SANO, SHIGETOSHI

所属研究機関名：高知大学医学部

部局名：教育研究部医療学系臨床医学部門

職名：教授

研究者番号(8桁): 80273621

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：中島喜美子

ローマ字氏名： NAKAJIMA, KIMIKO

部局名：教育研究部医療学系臨床医学部門

職名：准教授

研究者番号(8桁): 20403892

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。