

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16217

研究課題名(和文) マイコプラズマ感染関節リウマチマウスモデルの滑膜組織変化と獲得免疫関与の検討

研究課題名(英文) Histological changes of the synovial tissues and involvement of acquired immunity in a murine model for rheumatoid arthritis induced by infection with *Mycoplasma fermentans*.

研究代表者

矢作 綾野 (Yahagi, Ayano)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：10584873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Gp130F759はIL-6受容体gp130の信号異常により関節リウマチ(RA)様関節炎を自然発症する。RA発症との関連が示唆される *Mycoplasma fermentans* の発症誘導機構について未発症のgp130F759への感染モデルを用いて解析した。滑膜線維芽細胞(FLS)を可視化するCol1a1-ECFP/gp130F759に感染させると、FLSは滑膜表面および滑膜下線維化層全体で検出された。また感染後の自然免疫系と獲得免疫系の階層性を明らかにするため、中和抗体(T、B、好中球)投与による細胞除去を行った。その結果、好中球除去のみが関節炎発症を完全に抑制し、T、B細胞数の増加も抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチの関節破壊発生前に自然免疫が関与する時期と獲得免疫の免疫寛容が破綻する時期の2病相の存在が認識されている。遺伝子改変マウス関節炎モデルに低病原性微生物を感染させる実験系で、好中球が関節炎発症促進及び獲得免疫系細胞の増加に必須であることを証明した。関節リウマチを始めとする全身性自己免疫疾患の発症機構において同様の微生物-自然免疫-獲得免疫の連関の存在が示唆され、新たな治療標的を提供する。

研究成果の概要(英文)：Using knock-in mice gp130F759 having the mutant gp130Y759F, we established an arthritis model, in which development of arthritis is accelerated by systemic infection with *Mycoplasma fermentans* (Mf) at 3 M.O., much earlier than spontaneous arthritis. To detect fibroblast-like synoviocytes(FLS), we crossed Col1a1-ECFP mice with gp130F759 to make Col1a1-ECFP/gp130F759. Increases of FLS after infection were detected in superficial lining and sublining of the synovium but phospho-stat3 was not detected. We examined which immune system, innate or acquired, plays critical roles in the earliest phase of arthritis induced by Mf infection. To deplete T, B cells or neutrophils, monoclonal antibodies were injected intraperitoneally 9 days after infection. Only depletion of neutrophils prevented both development of arthritis and increases of synovial T and B cells in the knee, suggesting critical and pre-requisite roles of neutrophils in transition from innate to immune systems before onset of RA.

研究分野：実験動物学、免疫学、リウマチ・膠原病学、細菌学

キーワード：関節リウマチ gp130F759 *Mycoplasma fermentans*感染 自然免疫 獲得免疫 関節滑膜組織

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチは有病率 1% を占める慢性炎症性自己免疫疾患であり、滑膜細胞の異常増生と関節・骨の破壊を特徴とする。多因子疾患であり遺伝的要因と環境要因の複合により自己免疫異常が生じる。TNF や IL-6 の作用を抑制する生物学的製剤の導入により関節リウマチの寛解率は劇的に増加した。近年、臨床的関節炎の発症前に、自然免疫系が関与する時期と獲得免疫系の免疫寛容が破綻する時期の 2 病相の存在が認識され、骨びらの発生阻止を治療目標として発症前及び最初期の病態が注目されている。しかし、ヒトで発症前の病態を解析することは困難である。IL-6 ファミリーサイトカインに共通の受容体サブユニット gp130 に点変異を持つノックインマウス gp130F759 は関節リウマチ様の自己免疫性関節炎を 8 ヶ月齢から自然発症する。関節リウマチの病因としての関連性が示唆される病原体の中で *Mycoplasma(M.) fermentans* に注目した。*Mycoplasma* は大きさ 300 nm の濾過性微生物で細胞壁を持たない原核生物である。マウスに関節炎を惹起する *M. arthritidis* はスーパー抗原 *Mycoplasma arthritidis* mitogen (MAM) によって誘導される強い免疫反応を介して (*Cellular Microbiology*, 8:414, 2006) 反応性関節炎様の病態に関与する。

しかし、大部分の関節リウマチにおいて明確な先行感染症の自覚はない。肺炎を起こす病原性の強い *M. pneumoniae* よりむしろ、尿道などに常在する病原性の低い *M. fermentans* に関節リウマチとの関連が報告されている。*M. fermentans* 固有の遺伝子が PCR 法により関節リウマチ患者の関節液、関節滑膜組織、末梢血液中に 20~40% の陽性率で検出されるとの報告 (*J Clin Microbiol*, 38:90, 2000)、*M. fermentans* 固有の脂質成分が関節リウマチ患者の関節組織から検出されること (*BBRC*, 369:561, 2008)、*M. fermentans* 特異的抗原に結合する抗体が関節リウマチ患者血清中に存在するといった報告 (*J Rheumatol*, 27:2747, 2000) から、関節リウマチとの関連性が示唆される。しかし、*M. fermentans* 感染から関節リウマチ発症にいたる分子機構に関しては、動物モデルによる実験的な証明はまだない。我々は関節リウマチ発症との関連が示唆される *M. fermentans* を未発症の gp130F759 へ経静脈的接種することにより 1 ヶ月後に関節可動域制限と滑膜増生を誘導する誘発関節炎モデルを確立し解析を行ってきた。しかしながら、血行性感染から関節炎発症までの過程における自然免疫系と獲得免疫系の連関機構は明らかでない。

2. 研究の目的

遺伝子素因としてのサイトカイン受容体変異を持つ gp130F759 に、環境因子として低病原性細菌を感染させたマウスモデルにおいて、感染症と関節炎発症・病態の関連性を明らかにする。

- (1) 滑膜組織造血・非造血系細胞における病変の時間空間的解析を行う。
- (2) *M. fermentans* 感染後の獲得免疫系の関与を検討する
- (3) *M. fermentans* 感染関節リウマチの治療の検討を行ない、微生物を起因とした関節リウマチ症例に対する発症予防法や新規治療法の開発に役立てられることを期待する。

3. 研究の方法

(1) 関節滑膜はマクロファージ様と線維芽細胞様の 2 種類の滑膜細胞により構成される。関節リウマチにおいては滑膜細胞の増生・滑膜の肥厚といった関節病変を呈する。Type1 コラーゲン 1 の遺伝子発現レポーターマウス Col1a1-EGFP (*Nat Commun*, 9:300, 2018) と gp130F759 を交配し Col1a1-EGFP/gp130F759 を作出した。感染 1 ヶ月後の滑膜組織 (膝・後肢関節) を川本テープ法にて薄切し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて線維芽細胞様滑膜細胞の局在を確認した。さらに、リン酸化 STAT3 (pSTAT3) に対する抗体を用いて染色し、IL-6 信号伝達系が活性化されている細胞の局在について共焦点レーザー顕微鏡で解析した。

(2) *M. fermentans* 感染 gp130F759 の滑膜において感染 10 日後に好中球、B および T 細胞数は最大値となった。そこで自然免疫系と獲得免疫系の階層性を明確にするため、*M. fermentans* 感染 9 日後の gp130F759 に抗 Gr-1 モノクローナル抗体、抗 CD79b モノクローナル抗体、および抗 CD4、CD8 モノクローナル抗体混合物でそれぞれ好中球、B 細胞および T 細胞を除去し、感染 1 か月後まで関節炎発症の有無、滑膜における細胞数を計測し、フローサイトメトリーを用いて免疫担当細胞の分画を計測した。

(3) マイコプラズマ肺炎の治療等には抗生剤 (マクロライド系、ニューキノロン系) 投与が知られている。そこで低病原性の *M. fermentans* に対する抗生剤の投与により関節炎発症を抑制できるのか、検討した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

非感染の野生型及び gp130F759 の滑膜表層に ECFP は検出されなかった。*M. fermentans* を Col1a1-ECFP/gp130F759 に感染させると、ECFP 陽性細胞を滑膜表層及び滑膜下線維化層全体に認められたマウスと認めないマウスが存在した。pSTAT3 陽性細胞は滑膜表層や線維化層の一部に認められた。線維化層内の ECFP 陽性細胞と pSTAT3 陽性細胞は共局在しなかった。さらに ECFP 陽性細胞を認めないマウスは野生型マウスと同様に滑膜表層細胞のみが pSTAT3 陽性であった。

M. fermentans 感染における関節炎惹起での自然あるいは獲得免疫の関与を検討するため、*M. fermentans* 感染後抗体を投与し、感染 1 か月後まで関節炎発症の有無を検討した。その結果、感染 1 ヶ月後の関節滑膜細胞総数は抗体による B あるいは T 細胞除去により減少したものの、四肢の関節可動域に軽微な制限を認め、関節炎を完全に抑制することはできなかった。しかし、好中球除去では、関節滑膜細胞総数の増加と関節炎発症は完全に阻止された。興味深いことに好中球の除去により、B、T 細胞数の増加も完全に阻止された。このことは、*M. fermentans* 感染誘発関節炎において自然免疫系の好中球の増加が関節炎発症に必須であり、その後の獲得免疫系細胞増加の前提条件であることを示している。

感染後、様々な日程で 1 日 0.2mg のレボフロキサシンを 5 日間連続して経口投与した。感染 1 ヶ月後の関節炎の程度を検討したところ、関節炎スコアの低下が認められた。しかし、抗生剤投与時期により治療効果が異なることも判明した。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

関節炎マウスモデルの報告は国内・国外で多数あるが、前臨床期に着目した研究は殆どない。私たちは gp130F759 の関節炎自然発症における最初期病変を先駆的に解析してきた。臨床的に明確な関節炎の兆候を認めない 5 ヶ月齢の関節において好中球が増加し、滑膜組織で血管新生、滑膜肥厚、線維化等の変化が生じていること、*Il6* 及び *Padi4*^{*} の発現がそれぞれ滑膜の非血液系及び血液系細胞で増加することを明らかにした。さらに試験管内の解析で gp130F759 の滑膜線維芽細胞で産生増強した IL-6 が好中球に PAD4 (*Padi4* の産物) の産生を誘導することを示し、関節リウマチにおいても同様に、前臨床期の病態として IL-6-PAD4 軸が作動している可能性を提唱した (Yahagi *et al.*, *RMD Open*, 5:e000853, 2019)。

自然経過の最初期病変の解析では発症・経過の個体差のために、自然免疫系と獲得免疫系の明確な階層性を捉えることは困難であった。しかし、*M. fermentans* 感染誘発関節炎の系では、複数のマウスにおいて接種から同期して病態が進行すると考えられ、本課題では、抗体による自然免疫系及び獲得免疫系細胞の選択的除去により好中球の関節炎発症における重要性と獲得免疫応答の前提条件としての役割を明らかにすることができた。自己免疫疾患の自己免疫現象発生の契機となりえる感染症から自然免疫系を活性化する機序の可能性の一つを提唱する点で、関節リウマチの最初期病態の理解と早期介入療法の開発に繋がる貴重な知見が得られた。

^{*} *Padi4*; *Peptidyl arginine deiminases type 4*, タンパク質中のアルギニン残基をシトルリンに転換する脱イミノ酵素。関節リウマチではシトルリン化されたペプチドに対する自己抗体 (anti-citrullinated peptide antibody; ACPA) が臨床的関節炎発症前から血清中に検出される。関節リウマチの疾患感受性遺伝子の一つである (*Nat Genet*, 34:395, 2003)。

(3) 今後の展望

私たちは、サイトカイン受容体の点変異という明確な分子異常を原因とする自己免疫性関節炎マウスモデルを用いて、環境因子としての感染症が自己免疫疾患の発症や病態形成に及ぼす影響を免疫学的、病理学的手法を用いて明らかにしてきた。*M. fermentans* 感染による誘発関節炎が好中球の増加に依存して発症することは、関節リウマチ最初期病変における関与が示唆される自然免疫の重要性の証明になる。これは種を越えてヒトの全身性自己免疫疾患の発症機構及び病態についての普遍的な理解をもたらす知見である。私たちの実験結果に基づき、今後、この機序が関節リウマチにおいても成立するか否かを検証し、発症予防法や新規治療法の開発に役立てられることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yahagi Ayano, Saika Taro, Hirano Hiroyasu, Takai-Imamura Miwa, Tsuji Fumio, Aono Hiroyuki, Iseki Masanori, Morita Yoshitaka, Igarashi Hideya, Saeki Yukihiro, Ishihara Katsuhiko	4. 巻 5
2. 論文標題 IL-6-PAD4 axis in the earliest phase of arthritis in knock-in gp130F759 mice, a model for rheumatoid arthritis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 RMD Open	6. 最初と最後の頁 e000853-e000853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/rmdopen-2018-000853	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yang Qianting, Liao Mingfeng, Wang Wenfei, Zhang Mingxia, Chen Qi, Guo Jiubiao, Peng Bin, Huang Jian, Liu Haiying, Yahagi Ayano, Xu Xingzhi, Ishihara Katsuhiko, Cooper Andrea, Chen Xinchun, Cai Yi	4. 巻 10
2. 論文標題 CD157 Confers Host Resistance to Mycobacterium tuberculosis via TLR2-CD157-PKCzeta-Induced Reactive Oxygen Species Production	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e01949-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.01949-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Ayano Yahagi, Taro Saika, Masanori Iseki, Katsuhiko Ishihara
2. 発表標題 IL-6-PAD4 axis: IL-6 dependent PAD4 production in neutrophils at the earliest phase of arthritis in gp130F759
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese for Immunology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayano Yahagi, Yujiro Yokoyama, Noritaka Tsunematsu, Masanori Iseki, Katsuhiko Ishihara
2. 発表標題 CX3CR1-eGFP+ macrophage-like synoviocytes in gp130F759, a mouse model for rheumatoid arthritis
3. 学会等名 The 26th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢作 綾野、井関 将典、石原 克彦
2. 発表標題 関節リウマチ (RA) モデルgp130F759の最初期変化とM. fermentansの影響
3. 学会等名 第34回自己免疫研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayano YAHAGI, Taro SAIKA, Hiroyasu HIRANO, Masanori ISEKI, Katsuhiko ISHIHARA
2. 発表標題 Accelerated onset of arthritis by systemic infection of Mycoplasma fermentans in the knock-in mice gp130F759
3. 学会等名 IMMUNOLOGY 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔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
研究協力者	石原 克彦 (Ishihara Katsuhiko)	川崎医科大学・免疫学・教授 (35303)	