

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23856

研究課題名（和文）破壊性関節炎・付着部炎モデルマウスを用いた病態機序の解明と治療標的の探索

研究課題名（英文）Elucidation of pathological mechanism and research for therapeutic targets using inflammatory arthritis and enthesitis model mice.

研究代表者

泉山 拓也（Izumiyama, Takuya）

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：00844276

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：McH-Ipr/Ipr-RA1マウスに対して、抗IL-17A抗体を使用し、付着部炎、付着部骨化の抑制効果の検討を開始したが、十分な効果が得られなかった。そのため対象を脊椎関節炎に類似した所見を生じるSKG/jclマウスに切り替えて検討した。抗IL-17A抗体をCurdlan投与当日に400µg、投与2日後に400µg、以後は400µgを毎週投与とし、コントロール群はマウスIgG1を同量で投与した。関節炎スコアにおいては開始3週から6週までで治療群とコントロール群間で有意な差が生じたが、以降は差がみられなくなった。HE染色でもそれを反映して有意な差がみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎関節炎は多彩な臨床像を示す自己免疫疾患群であり、ADLを損なう不可逆性の変化を避けるために有効な治療を確立することが求められる。我々は破壊性関節炎と骨化性付着部炎、関節強直を自然発症するMcH-Ipr/Ipr-RA1マウス、およびSKG/jclマウスを使用して抗IL-17A抗体での治療を介して脊椎関節炎の病態解明、動物モデルの確立、および新規治療の開発を目的として研究を行なった。関節炎、椎体炎、仙腸関節炎などの病変の誘発とその画像的な評価および同定、さらに抗体による治療効果などに関して有用な知見が得られ、今後の脊椎関節炎の研究に寄与する重要な研究となった。

研究成果の概要（英文）：We started to examine the effect of anti-IL-17A antibody on McH-Ipr / Ipr-RA1 mice to suppress enthesitis and ossification, but no sufficient effect was obtained. Therefore, we switched the mice to SKG / jcl mice that affected similar to spondyloarthritis. The anti-IL-17A antibody was administered at 400 µg on day 0, 400 µg on day 2, and 400 µg weekly thereafter, and the same amount of mouse IgG1 was administered in the control group. There was a significant difference in arthritis score between the treatment group and the control group from 3 to 6 weeks after the first administration, but no difference was observed thereafter. HE staining also did not show a significant difference.

研究分野：関節リウマチ、脊椎関節炎

キーワード：脊椎関節炎 McH-Ipr/Ipr-RA1マウス SKG/jclマウス 抗IL-17A抗体 破壊性関節炎 骨化性付着部炎

1. 研究開始当初の背景

強直性脊椎炎や乾癬性関節炎に代表される脊椎関節炎は、滑膜炎、骨びらん、骨新生、付着部炎、関節強直などの多彩な臨床像を示す自己免疫疾患群である。なかでも付着部炎、骨化病変の形成に関しては、未だ不明な点が多い。脊椎関節炎の罹患患者は全国で約3万人で、関節リウマチに比して医療者側の認知度が低く、腰痛などの体軸性病変、末梢の付着部炎が存在しても適切な診断をうけ早期治療介入するのが難しいとされている。強直が進行すると診断が容易となるが、その時点で治療介入しても強直の改善は困難である。強直性脊椎炎においては抗 TNF- α 抗体製剤での疼痛改善効果、末梢関節炎の抑制効果は明らかにされているが、骨化を伴う付着部炎や脊椎強直の抑制効果は確立されていない。また抗 IL-17A 抗体製剤での脊椎強直の抑制効果についての報告もあるが、骨化性付着部炎を抑制するメカニズムや有望な治療ターゲットは現在のところは明らかにされていない。骨化・強直のメカニズムを明らかにして椎体・関節炎の強直が生じる前に早期に診断し、有効な治療を開始することは、我々の喫緊の課題であるといえる。

2. 研究の目的

骨化を伴う付着部炎を自然に発症する RA1 マウスを使用し、IL-17A および IL-22、IL-23、RANKL などの筋腱付着部の骨化に関するシグナルの関連を明らかにし、それらのシグナル阻害効果の解析を通して、付着部炎や強直のメカニズムを解明し、強直を伴う付着部炎の新規治療の開発に寄与することである。

3. 研究の方法

- (1) 本研究ではオスの RA1 マウスを使用し、8 週齢から治療介入を行い、16 週で効果判定を行う。治療群は抗 IL-17A 抗体、抗 IL-17A 抗体 + 抗 RANKL 抗体とする予定である。抗 IL-17A 抗体は 17F3 を使用し、抗 RANKL 抗体は OYC1 を使用する。マウス IgG アイソタイプ抗体投与群をコントロール群とする。抗 IL-17A 抗体は 100 μ g を週に 2 回経腹腔内投与する。抗 RANKL 抗体は 8 週齢で 100 μ g を腹腔内投与で 1 回のみ投与する。
- (2) 関節炎・付着部炎の評価は下記の項目について行う。8 週、16 週における 2 名の検者による滑膜炎組織評価スコアの計測、免疫染色による IL-17A、IL-22、IL-23 の発現の評価、10 週、12 週における ELISA による血中 SAA と TNF- α 、IL-17A の測定、12 週における ICG 内包リポソームを用いた In Vivo Imaging System (IVIS) による関節炎の評価、12 週での RT-PCR による TNF- α 、IL-17A、IL-22、IL-23 の炎症性サイトカイン評価、RANKL、スクレロステチンの発現解析、16 週齢での CT による足部の骨びらんの骨欠損部、付着部骨化病変の評価、並びに脛骨近位部での骨量、骨密度評価により評価を行う。

4. 研究成果

破壊性関節炎と骨化性付着部炎、関節強直を自然発症する McH-*Ipr/Ipr*-RA1 マウス (RA1 マウス) に対して、抗 IL-6 抗体の投与を 10 週齢から 20 週齢まで投与して、関節炎および付着部炎に対する効果を検討した。治療群には抗 IL-6 抗体である MR-16 を毎週投与した。14 週、17 週、20 週齢のマウスの足関節および足根骨について病理学的に検討を行なったところ、それぞれの週例において関節炎について抑制効果を得られたが、靭帯付着部の骨増殖性変化に対しては優位な改善効果がみられなかった。上記の研究成果は 2019 年に報告した (Izumiyama T, et al. BMC Musculoskelet Disord. 2019)。次に抗 IL-17A 抗体を使用して RA1 マウスに対する付着部炎、付着部骨化の抑制効果の検討を開始したが、予備実験において十分な効果が得られなかった。そのため対象を SKG/jcl マウスに切り替え、抗 IL-17A 抗体の抑制効果を検討した。SKG/jcl マウスは Curdlan を投与す

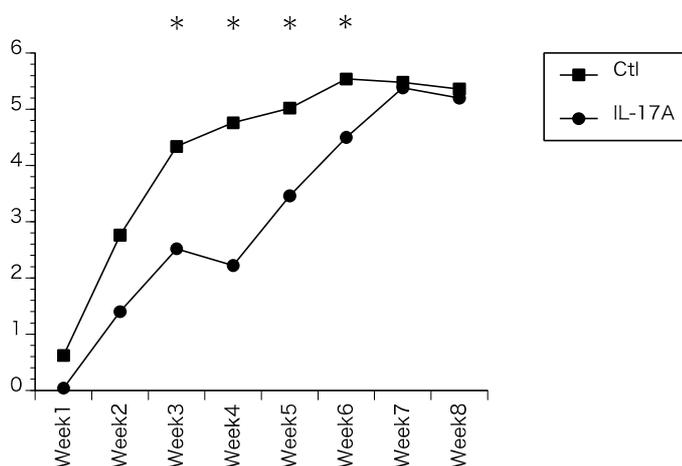


図1

ることにより脊椎関節炎に類した所見を生じることが Benham ら (Benham H, et al. Arthritis Rheumatol. 2014) や Yoshitomi ら (Yoshitomi H, et al. J Exp Med. 2005) によって確立されているマウスである。抗 IL-17A 抗体は 17F3 を Curdlan 投与当日に 400 μ g、投与 2 日後に 400 μ g、以後は 400 μ g を毎週投与とした。評価は 関節炎スコアおよび HE 染色における付着部骨化お

よび関節炎の抑制効果の検討、②MRIでの仙腸関節炎および付着部炎の抑制効果の検討、③CTでの骨破壊および付着部骨化の検討、について検証、解析を行った。関節炎スコアにおいてはCurdlan開始3週から6週まで治療群とコントロール群間で有意な差が生じたが、以降は差がみられなかった。(図1、図2)HE染色でもそれを反映して有意な差がみられなか

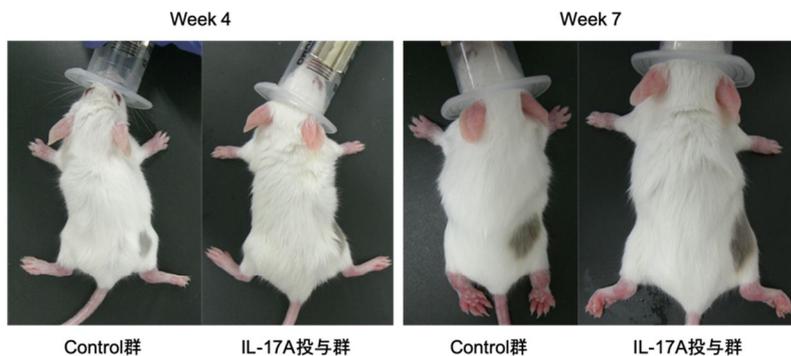


図2 左図：4週目の代表的マウス画像。Control群に比しIL-17A抗体投与群では関節炎が抑制されている
右図：7週目の同じマウスの画像。Control群とIL-17A抗体投与群での差異がなくなっている

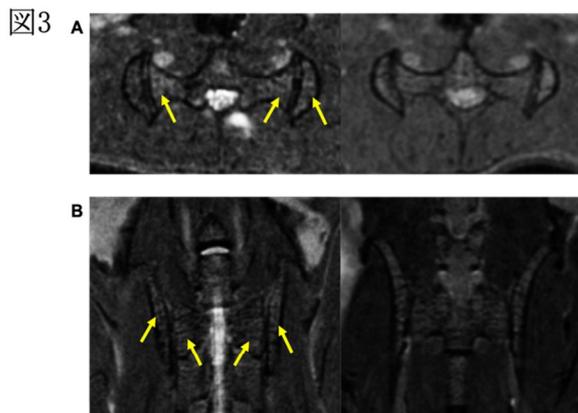


図3 (A) Curdlan投与後8週のSKGマウスの仙腸関節MRI軸位断、脂肪抑制T2強調画像。左がコントロール群、右がIL-17A抗体治療群。コントロール群の仙腸関節周囲に高信号領域(矢印)があり、仙腸関節炎を示しているが、治療群では抑制されている。
(B) Curdlan投与後8週のSKGマウスの仙腸関節MRI冠状断、脂肪抑制T2強調画像。左がコントロール群、右がIL-17A抗体治療群。コントロール群の仙腸関節周囲に高信号領域(矢印)があり、仙腸関節炎を示しているが、治療群では抑制されている。

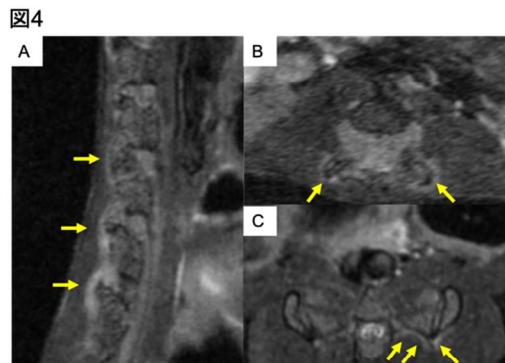


図4 (A) Curdlan投与後14週のSKGマウスの腰椎MRI軸位断、脂肪抑制T2強調画像。後方の椎間関節に高信号領域(矢印)がみられる
(B) Curdlan投与後14週のSKGマウスの腰椎MRI冠状断、脂肪抑制T2強調画像。後方の椎間関節に高信号領域(矢印)がみられる
(C) Curdlan投与後20週のSKGマウスの腰椎MRI冠状断、脂肪抑制T2強調画像。仙腸関節後方に高信号領域(矢印)がみられるが、骨内には信号変化がない

った。MRIでは投与後7週以降のコントロール群のマウスで軽度の仙腸関節炎が認められた(図3)が、以後20週まで仙腸関節炎は強い進展はみられず、治療群と明らかな差異はみられなかった。24週、26週での検討では、仙腸関節の炎症は進展せず、椎体炎もみられなかったが、椎間関節の多数の炎症が明らかになった(図4)。体軸のCTでは両群で明らかな骨新生はみられなかった。以上の結果より単回のCurdlanによるブーストでは脊椎炎や仙腸関節炎などの体軸性関節炎にまで至る例は多くないことが明らかになり、また抗IL-17A抗体は相当量を投与しないと関節炎の抑制は難しい可能性が示唆された。今後の課題として、仙腸関節および椎体炎・椎体付着部炎を安定してきたような免疫反応の強化を行い、脊椎関節炎の体軸性関節炎モデルを安定して構築すること、そして末梢関節炎および体軸性関節炎を抑制しうる治療薬の検討が必要であり、現在も研究を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Izumiyama Takuya, Mori Yu, Mori Shiro, Mori Naoko, Kodama Tetsuya, Itoi Eiji	4. 巻 20
2. 論文標題 The effect of anti-IL-6 receptor antibody for the treatment of Mch-lpr/lpr-RA1 mice that spontaneously developed destructive arthritis and enthesitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Musculoskeletal Disorders	6. 最初と最後の頁 286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12891-019-2664-3	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 -

〔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
---------	---------