

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591457

研究課題名(和文) ヒト化(NOG)マウスにおけるEBV感染びらん性関節炎モデルの検討

研究課題名(英文) EBV induced erosive arthritis in humanized NOG mouse

研究代表者

武井 正美 (TAKEI, Masami)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：30179600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：市販凍結臍帯血幹細胞移植ヒト免疫化NOGマウスに Epstein Barr virus(EBV)を感染させ、ほぼ100%びらん性関節炎を発症するマウスモデルの作成を行うことができた。このマウスの骨髄をヒトM-CSF、ヒト RANKL下で培養することで、抗ヒトカテプシンK抗体陽性、TRAP陽性の多核細胞が出現する。組織でも同様な細胞がびらん部骨周囲に認められ、ヒト破骨細胞の誘導をEBV感染が引き起こす可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：NOG mice are injected with human CD34+ stem cells from cord blood (LONZA) intravenously. Erosive arthritis was observed histologically at the high rate of almost 100%. Human cathepsin K stain and TRAP of multinuclear cells that exist in bone erosion were positive. Multinucleated giant cells resemble osteoclasts are observed in cultured bone marrow cells with human RANKL and M-CSF. Human cathepsin K, mitochondria stain and TRAP were all positive in these multinucleated cells.

研究分野：膠原病リウマチ学

キーワード：関節リウマチ EBウイルス びらん性関節炎 破骨細胞 NOGマウス ヒト化マウス

1. 研究開始当初の背景

NOD-SCID(NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ)(NOG)マウスにヒト CD34 陽性細胞を移植し、ヒト化免疫マウスを作製し、Epstein-Barr ウイルス (EBV) 感染により関節リウマチ (RA) でも認められるピラン性関節炎モデルの作成に成功した。(Kuwana, et al. PlosOne 2011;6:e26630) このモデルでは関節の骨ピランを起こしている骨病変局所に破骨細胞様多核細胞が認められる。さらに、罹患関節近傍の骨髄に CD4 陽性 T 細胞の強い浸潤を認める。また、EBV 特異的細胞障害性 T 細胞の誘導に深く関与する signaling lymphocytic-activation molecule (SLAM) associated protein (SAP) mRNA の発現が RA 患者末梢血 T 細胞では低く、その cDNA には変異がない事を見出している (Takei M, et al. Int Immunol 2001;13:559)。

2. 研究の目的

本研究では、RA の病因に基づく新規根治的治療法を開発することを最終目的とし、今回は、本モデルマウスを RA 様ピラン性関節炎の治療介入実験へ応用可能とするために、本モデルに確実かつ安定したピラン性関節炎を発症するための条件を検討するとともに、ピラン性関節炎の発症機構を解析し、本モデルをピラン性関節炎の有用な治療モデルとして確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) EBV感染ヒト化NOGマウスを用いたピラン性関節炎モデルの作製 (簡便・確実・安定したモデル作製)

ヒト免疫機構を有するヒト化NOGマウスを簡便、確実かつ安定して作製する条件を検討する。移植するヒトCD34陽性造血幹細胞は、市販されている細胞を用い、マウス尾静脈より注入し移植を行う。また、EBVとRAの関連の深いことが報告されているHLA-DR4のハプロタイプを有する幹細胞を優先して使用するとともに、本HLA-DR4ハプロタイプ以外の細胞を移

植するマウスに発症するピラン性関節炎との比較検討を行う。遺伝子改変マウスの飼育は本学遺伝子組換え実験安全委員会許可のもと、日本学医学部感染ゲノムセンター実験動物施設の使用の許可を得て行う。

(2) 本マウスにおけるEBVの再活性化を示す抗体価の動向・EBVウイルス量の測定および関節組織でのEBV感染の検討

ヒト化NOGマウスのEBVの感染成立後、マウス末梢血中に存在するEBVウイルス各種特異抗体を酵素抗体法で測定し、さらにEBVウイルス量をreal time PCRで定量する。加えて、滑膜組織や骨髄でのEBV感染をEBER-1 in situ hybridization法ならびにウイルス量の定量をreal time PCRで行う。

(3) 本モデルマウス罹患関節の画像解析

ピラン性関節炎病変部を3D-CTを用いて解析し、骨ピランの程度、範囲を含めた関節炎の三次元的画像解析を行う。

(4) ピラン性関節炎発症におけるヒトあるいはマウス由来破骨細胞の関与についての検討

ピラン性関節炎局所組織における破骨細胞の組織学的検討を行う。また、本マウス骨髄細胞をヒトM-CSFおよびヒトRANKL存在下で培養し、破骨細胞が誘導されるか否か、かつ誘導される破骨細胞がヒト由来かマウス由来かを検討する。破骨細胞は、TRAPおよびヒトカテプシンKをそれぞれ染色し評価を行う。

4. 研究成果

(1) 市販の凍結ヒト CD34 陽性臍帯血幹細胞 (LONZA 社) を移植し NOG マウスのヒト免疫化を行ったところ、良好で安定した生着率 (末梢血単核球中 CD45 陽性細胞%で評価) を得ることができた。本ヒト化 NOG マウスに EBV を感染させると、ほぼ HLA-DR4 ハプロタイプに関わらず、100%のマウスで RA 様ピラン性関節炎が発症した。そして、末梢血ヒ

トリンパ球 T 細胞マーカーの変動が発症時期を推定できるマーカーであることがわかった。

(2)EBV 感染後のウイルス学的検索では、びらん性関節炎発症と相関する明らかな要素は認められなかった。また、関節炎組織で EBER-1 陽性細胞が検出された。

(3)3D-CT を用いた関節画像で、明らかな骨ビランを描出することができ、骨ビランの程度を評価できることがわかった。

(4)このマウスの骨髄をヒト M-CSF、ヒト RANKL 下で培養することで、抗ヒトカテプシン K 抗体陽性、TRAP 陽性の多核細胞が誘導された。関節炎局所ビラン部骨周囲組織でも同じく抗ヒトカテプシン K 抗体陽性、TRAP 陽性の多核細胞が認められたことから、ヒト破骨細胞が EBV 感染により誘導されビラン性関節炎を起こした可能性が示唆された。

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6件)

北村登, 武井正美 関節リウマチと帯状疱疹: 頻度とリスクマネジメント リウマチ科 2015; 53(2) 210-215 (査読無)

Kobayashi H, Kobayashi Y, Giles JT, Yoneyama K, Nakajima Y, Takei M. Tocilizumab Treatment Increases Left Ventricular Ejection Fraction and Decreases Left Ventricular Mass Index in Patients with Rheumatoid Arthritis without Cardiac Symptoms: Assessed Using 3.0 Tesla Cardiac Magnetic Resonance Imaging. J Rheumatol. 2014 Oct;41(10):1916-21. (査読有)

Kobayashi Y, Hatta Y, Ishiwatari Y, Kanno H, Takei M. Human parvovirus B19-induced aplastic crisis in an adult patient with hereditary spherocytosis: a case report and review of the literature. BMC Res Notes. 2014 Mar 11;7:137. (査読有)

武井正美 関節リウマチの原因としての Epstein-Barr ウイルス 日大医学雑誌 73(1):45-49,2014. (査読有)

武井正美: 関節リウマチの早期診断とリスク管理 東京都医師会雑誌 2013;66:137-141 (査読無)

武井正美, 野崎高正, 猪股弘武, 桑名慶和, 北村登, 白岩秀隆, 井汲菜摘, 長澤洋介, 澤田滋正: ウイルスと自己免疫疾患原因としての Epstein-Barr ウイルスの可能性 大医学雑誌 71:302-310,2012. (査読有)

[学会発表](計2件)

Y Nagasawa, N Ikumi, T Nozaki, H Inomata, K Imadome, N Kitamura, M Iwata, S Fujiwara, M Takei. Human Osteoclasts Are Mobilized in Erosive Arthritis of Epstein-Barr Virus-Infected Humanized NOD/Shi-Scid/IL2R null Mice. American College of Rheumatology Annual Meeting. ACR 2014.11.15 Boston (米国)

北村登, 武井正美 ウイルス再活性化(ヘルペス属を中心に)シンポジウムリウマチ性疾患の感染症マネージメント 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会 2014.4.23 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

武井 正美 (TAKEI, Masami)

日本大学・医学部・教授

研究者番号: 30179600

(2)研究分担者

白岩 秀隆 (SHIRAIWA, Hidetaka)

日本大学・医学部・助教

研究者番号: 20451338

(3)連携研究者

北村 登 (KITAMURA, Noboru)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号: 40349999

岩田 光彦 (IWATA, Mitsuhiro)

日本大学・医学部・兼任講師

研究者番号: 50193751

井汲 菜摘 (IKUMI, Natsumi)

日本大学・医学部・専修医

研究者番号: 50727857