

Epstein-Barr virus 感染による
NOD/Shi-*scid* *IL-2rg*^{null} びらん性関節炎
マウスモデルにおけるヒト破骨細胞の検討
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系膠原病リウマチ学専攻

長澤 洋介

修了年 2016 年

指導教員 武井 正美

1. 背景

自己免疫疾患の発症機序はいまだ明らかではなく、病因として遺伝的素因や免疫異常とともに環境因子が関与すると考えられている。Epstein-Barr virus (EBV) は、関節リウマチ (RA) 、シェーグレン症候群、あるいは多発性硬化症といった自己免疫疾患の発症に関与する環境因子である可能性が示唆されている¹⁾。

EBV はヒト以外では新世界猿にしか感染しないウイルスで、動物モデルを使用した実験で検討することがこれまで困難であった。ヒト免疫化 NOD/Shi-*scid* *IL-2rg^{null}* マウス (以下 hNOG マウス) が開発されたことで、本マウスを用いて EBV 感染実験を行うことが可能となった。桑名らは、hNOG マウスに EBV を感染させるとびらん性関節炎が発症することを発見し、2011 年に報告した²⁾。

EBV 感染 hNOG マウスの膝関節組織では、RA に特徴的なパンス様肉芽組織が観察され、それと接して骨びらの形成が確認された。EBV 感染 hNOG マウスモデルの知見は、EBV が RA の一病因となる可能性を積極的に示すものと考えられた。しかし、本マウスモデルを RA の病態解明および新たな治療法の開発を行うためのモデルとするためには、EBV 感染によるびらん性関節炎の発

症機序を含め解明すべき点が多数残されている。

2. 本研究での検討項目

実験を積み重ねさらに研究を進めていくために、EBV 感染 hNOG マウスモデルにびらん性関節炎を高率に発症するのに適したプロトコールの確立を試みた。

本マウスモデルにおける課題として、膝関節以外の罹患関節の有無、特に組織学的検討が難しい小関節において検討を行う必要がある。これまでの組織標本を用いた手法とは異なる方法で骨びらんを評価する目的で、三次元での構造解析が可能となるマイクロ 3D-CT で膝関節を撮影し、組織学的所見との比較を行った。

骨びらん形成に最も重要な役割を担う破骨細胞を本マウスモデルで同定を行った。さらに、hNOG マウスはヒト免疫系細胞とマウス細胞とが混在することから、細胞がヒト由来かマウス由来かを明らかにするための免疫化学染色を行った。また、一般的に破骨細胞は、骨髄に存在する破骨細胞前駆細胞から分化するとされる³⁾。したがって、EBV 感染 hNOG マウスの骨髄から破骨細胞が分化誘導されるか、そしてその細胞の由来はヒトかマウスかを調べる目的で、本マウス骨髄細胞を培養し検討も行った。

RA の治療薬として臨床で使用されている生物学的製剤の、本マウスモデルに発症するびらん性関節炎に対する効果を検討した。今回は抗 IL-6 受容体抗体に着目し、抗体投与によるびらん性関節炎抑制効果に加えて関節近傍の骨量変化についても検討を行った。また、それと同時にマウスにおける代表的炎症マーカーである serum amyloid A (SAA) についても継時的に測定を行った。

3. 結果

EBV 感染後末梢血リンパ球中のヒト CD4 陽性細胞およびヒト CD8 陽性細胞の比率を継時的に flow cytometry で測定し、CD8 陽性細胞の比率が上昇し、CD4 陽性細胞の比率を上回る EBV 感染後 8 から 10 週間後に解剖を行った結果、EBV 感染 hNOG マウス全例に膝関節のびらん性関節炎の発症が確認された。

膝関節のマイクロ 3D-CT で観察した結果、EBV 感染 hNOG マウスの膝関節では、関節包骨付着部付近に骨びらんが観察されたが、EBV 未感染 hNOG マウスではまったく観察されなかった。

EBV 感染 hNOG マウスの膝関節組織切片に対して、tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色および抗 cathepsin K 抗体を用いた免疫染色を行い検討した。TRAP および cathepsin K は破骨細胞のマーカーであり、特に

cathepsin K 抗体にはヒト cathepsin K 特異的抗体を用いた。その結果、膝関節組織骨びらん部に多核細胞が存在し、TRAP 染色および抗ヒト cathepsin K 抗体を用いた免疫染色に陽性を示した。

また、In vitro で、破骨細胞前駆細胞を macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) および receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) 存在下で培養することによって破骨細胞が分化誘導されることが知られている⁴⁾。そのため、解剖時に得た EBV 感染 hNOG マウスの骨髄細胞を、ヒト M-CSF およびヒト RANKL 存在下で培養したところ、培養細胞に大型の多核細胞が認められた。この多核細胞を TRAP 染色、あるいは抗ヒト cathepsin K 抗体、さらにヒト由来細胞である確証を得るために、ヒトミトコンドリアに特異的な抗体で免疫染色を行った結果、骨髄培養で分化誘導された多核細胞は、TRAP 陽性、ヒト cathepsin K 陽性であり、加えてヒトミトコンドリアが陽性であった。

EBV 感染 hNOG マウスにヒト化抗ヒト IL-6 受容体抗体およびラット抗マウス IL-6 受容体抗体を、コントロール群にはヒト IgG とラット IgG をそれぞれ同時に投与した。結果は、抗 IL-6 受容体抗体投与によって膝関節の骨びらんは抑制されなかった。また、関節近傍の骨量を評価するため、大腿骨遠位部海綿骨

において、マイクロ 3D-CT から得られたデータをもとに TRI/3D-BON システムを用いて bone mineral density (BMD) 測定を行った。結果、抗 IL-6 受容体抗体投与群とコントロール群との間で BMD に差は認められなかった。しかし、組織学的に骨びらんが強かったマウスにおいて BMD が有意に低いことが証明された。さらに、炎症マーカーとして serum amyloid A (SAA) の継時的測定を行い検討したが、両群間で SAA 値に変動なく差が認められなかった。

4. 考察

今回の研究で、本マウスモデル全例に膝関節のびらん性関節炎発症を確認することができ、hNOG マウスでは EBV 感染を誘因としてびらん性関節炎が発症することを確証できた。CD8 陽性細胞の上昇は、過去の報告から^{5, 6)}EBV 感染 B 細胞を除去し感染細胞の増殖を阻止するために反応性に上昇してきたと考えられる。この結果から、びらん性関節炎が EBV 感染細胞の増殖反応に関連して起こるのか、あるいはそれに反応した CD8 陽性 T 細胞が関与するのか、あるいはまた両者ともに関与して起こるのか、など、今後の検討課題が浮かび上がった。

また、膝関節をマイクロ 3D-CT で観察した結果、組織所見と同様に RA に認

められる関節包骨付着部付近に骨びらんが形成されることが、より臨床に則した形で確認できた。この結果は、今までの組織学的解析のみならず、マイクロ3D-CT撮影による画像的解析によっても、骨びらんの観察が可能であることを示している。3D-CT撮影によって骨びらの程度を数値的に定量化できないかなど、現在その有用性について引き続き検討を行っている。

膝関節組織の組織化学染色結果から、膝関節骨びらん部に存在する多核細胞は、TRAP および cathepsin K 陽性であることから、破骨細胞と考えられる。さらには、組織切片で観察されるほとんどの多核細胞において、発現する cathepsinK がヒト特異的 cathepsinK 抗体に反応したことから、このマウスモデルの膝関節においては、骨びらん形成に関与する破骨細胞は、ヒト破骨細胞が主体であると考えられる。続いて、本マウスモデルでヒト破骨細胞がいかに動員されるかを検討するため、破骨細胞前駆細胞が存在するとされる骨髄を培養した。その結果、マウス骨髄培養細胞から TRAP 陽性、ヒト cathepsin K 陽性、そしてヒトミトコンドリア陽性を示す大型の多核細胞が得られたことから、ヒト破骨細胞が本マウス骨髄細胞から分化誘導されることが証明された。この結果と膝関節骨びらん部にヒト破骨細胞が存在することを合わせて考えると、

本マウスモデルでは、EBV 感染に関連する何らかの要因により、骨髄に存在するヒト破骨細胞前駆細胞を由来とするヒト破骨前駆細胞が膝関節局所に動員され、骨溶解能を持つ成熟ヒト破骨細胞へと分化し、骨びらんを形成した可能性が考えられる。ヒト化マウスにおいて、ヒト破骨細胞の存在を確認した報告は過去になく、これが最初の報告である。

RA 治療薬として使用されている生物学的製剤の中でも、今回は抗 IL-6 受容体抗体に着目し、本マウスモデルでの効果を検討したが、抗 IL-6 受容体抗体投与によって関節炎の抑制が認められなかった。この理由を、ヒト破骨細胞分化という観点から考察する。IL-6 は骨芽細胞の RANKL 発現を高めることによって破骨細胞分化を促進するという報告がある⁷⁾。今回本マウスモデルにおいて、ヒト IL-6 受容体およびマウス IL-6 受容体それぞれに対する抗体投与を行ったにも関わらず、骨びらんが観察されたことから、IL-6 が骨芽細胞の RANKL 発現を高めることによって、ヒト破骨細胞分化に大きく関与した可能性は低いと考えられる。また、骨びらの程度と関節近傍の骨量との間に関連性が示唆される結果が得られたことから、本マウスモデルの関節局所では破骨細胞が機能亢進状態にあることが推測される。骨粗鬆症治療薬として臨床でも使用されて

いる抗 RANKL 抗体投与による、びらん性関節炎および関節近傍の骨量低下に対する抑制効果についても、検討が必要である。

5. まとめ

今回 EBV 感染 hNOG マウスにおいて、末梢血中の CD8 陽性細胞の上昇を指標とすることによって全 15 例でびらん性関節炎発症を確認することに成功した。膝関節の組織所見に加えてマイクロ 3D-CT 解析を行った結果、RA と類似して関節包骨付着部付近に骨びらんが発症していることが明らかとなった。そして、本マウスモデルでは関節局所の骨びらん部にヒト破骨細胞が存在し、またそれは骨髄に生着したヒト破骨細胞前駆細胞から分化し、関節局所に誘導され、骨びらん形成に関わっていると考えられた。また、本マウスモデルでは抗 IL-6 受容体抗体投与によって関節炎を抑制できなかったことから、本マウスモデルでは IL-6 が病態形成に重要である可能性は低いと考えられた。さらに、骨びらんの程度が強いマウスにおいて大腿骨遠位部海綿骨の骨量低下が認められたことから、骨びらんの程度と関節近傍の骨量に関連がある可能性が示唆された。

本研究で、びらん性関節炎発症が EBV 感染 hNOG マウスで確実となるプロトコルが確立され、発症機序の解明を進めることができたことから、EBV と

RA の関連を、特にびらん性関節炎や骨粗鬆症への関与といった側面から解明するために、本マウスモデルを用いて研究を進める価値は十分高いと考えられる。

引用文献

1. 斎藤一郎. 自己免疫疾患 (関節リウマチ, シェーグレン症候群). 柳井秀雄, 清水則夫・編. EB ウイルス 第2版. 東京:診断と治療社; 2008.
2. Kuwana Y, Takei M, Yajima M, et al. Epstein-Barr virus induces erosive arthritis in humanized mice. PLoS One 2011;6:e26630.
3. Ibbotson KJ, Roodman GD, McManus LM, et al. Identification and characterization of osteoclast-like cells and their progenitors in cultures of feline marrow mononuclear cells. J Cell Biol 1984;99:471-480.
4. Takeshita S, Kaji K, Kudo A. Identification and Characterization of the New Osteoclast Progenitor with Macrophage Phenotypes Being Able to Differentiate into Mature Osteoclasts. J Bone Miner Res 2000;15:1477-1488.
5. Fujiwara S, Matsuda G, Imadome K. Humanized mouse models of epstein-barr virus infection and associated diseases. Pathogens 2013;2:153-176.
6. Yajima M, Imadome K, Nakagawa A, et al. T cell-mediated control of

Epstein-Barr virus infection in humanized mice. *J Infect Dis* 2009;200:1611-1615.

7. Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1143:123-150.