

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	阿部麻美
学位論文題目			
HTLV-I LTR-env-pX 遺伝子導入ラットにおける関節炎発症ならびに持続機序に関する検討			
未公表			
研究目的			
<p>ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型(HTLV-I)は成人 T 細胞性白血病(ATL)の原因ウイルスである。HTLV-I 遺伝子の env-pX 領域がコードする p40Tax(Tax)は宿主細胞の遺伝子発現,分子の働きを制御することが知られている。env-pX 遺伝子を導入した HTLV-I LTR-env-pX 遺伝子導入ラット(env-pX ラット)は全身臓器細胞に構成遺伝子発現が確認され関節リウマチ類似の関節炎など collagen vascular disease を発症,末梢リンパ球は疾患発症前から過剰免疫反応を起こしやすい状態にある。このラットの関節炎発症機序を明らかにするため正常同系ラットと共に collagen type II(CII)による疾患誘導を行い,また双方間で脾細胞及び骨髓細胞の置換,疾患誘導し比較検討した。滑膜線維芽細胞のサイトカイン産生について解析した。</p>			
材料・方法			
1.実験動物,飼育条件			
<p>北海道大学附属動物実験施設で交配繁殖させた WKAH ラット,北海道大学分子病理学講座で作製した WKAH 系 env-pX ラットの雄(生後 6 週から 8 週齢)を使用した。</p>			
2. CII による関節炎誘導			
<p>Cellmatrix type II をエマルジョン化,疾患未発症 env-pX ラット, WKAH ラットの尾根部に皮内注射した。免疫後 2, 4, 8, 12 週後に屠殺,病理組織学的検討を行った。</p>			
3. 病理組織学的解析			

足関節を脱灰，固定後，切片を作製し koizumi<sup>1</sup> らの評価法を改変，(inflammatory cell infiltration. 0: none, 1: mild, 2: moderate, 3: severe . synovial lining cell proliferation. 0: 1~2 層, 1: 3~4 層, 2: 5~6 層, 3: 7 層以上 . stromal cell proliferation. 0: none, 1: neovascularization, 2: granulation , 3: pannus , 4: pannus+periarticular myxoedema . Fibrosis. 0: none, 1: mild , 2: moderate, 3: severe )とし，スコア化した。

#### 4. 脾細胞移入 (SCT) 及び骨髄細胞移入 (BMT)

env-pX ラット，WKAH ラットから脾細胞，また骨髄細胞を採取し，ガンマ線照射した env-pX ラット，WKAH ラットに採取した脾細胞，骨髄細胞を注射した。4 週後生存例を用いた。

#### 5. SCT, BMT 後の CII 関節炎誘導

このラットに CII 免疫，2 週後から関節径を計測した。4, 8, 12, 16 週後に屠殺，病理組織学的検討を行った。

#### 6. RF

屠殺時に採取した血中の RF を測定した。

#### 7. 滑膜線維芽細胞の培養，サイトカイン測定

肉眼的関節炎発症，未発症の env-pX ラット，WKAH ラットの足関節周囲滑膜組織から滑膜線維芽細胞を分離培養した。培養上清の IL-1 $\alpha$ ，IL-1 $\beta$ ，IL-2，IL-6，TNF- $\alpha$ ，IFN- $\gamma$  を ELISA で測定した。また，IL-6 は RNA を抽出，cDNA に転写，PCR real time analysis にて解析した。

### 結果

#### 1. env-pX ラット，WKAH ラットの CII 関節炎誘導

どちらも CII 免疫後 10 日から足関節腫脹が認められた。3 週後は，env-pX ラットで有意に強く 8 週以後次第に増加した。WKAH ラットは 12 週後も同程度であった。病理組織学的スコアは炎症細胞浸潤が 2 週で双方同程度，4 週以後 env-pX ラットで持続したが，WKAH ラットで減少した。滑膜間質増生は 4 週以後 env-pX ラットで強かった。

## 2. SCT, BMT 後の CII 関節炎誘導

12 週までの足関節径は, リンパ球ドナーが env-pX ラット (nBMT, nSCT) はドナーが WKAH ラット (eBMT, eSCT) に比べ高く推移した. 12 週以降は eBMT で関節径増加が認められた. 病理組織学的スコアは 4 週で炎症細胞浸潤は nBMT, nSCT, eBMT の順に強く, eSCT で弱かった. 以降 16 週に nBMT, nSCT, eSCT は漸減, eBMT は増加傾向がみられ, 滑膜間質因子も同様であった.

## 3. RF

env-pX ラット, WKAH ラットで RF 産生が見られた. リンパ球ドナーが env-pX ラットの nBMT, nSCT で陽性が認められ, WKAH ラットに比し有意に高かった.

## 4. 滑膜線維芽細胞のサイトカイン産生

env-pX ラットの滑膜線維芽細胞で IL-6 の有意な産生が認められた.

### 考察

本研究では関節腫脹及び組織学的変化を定量的評価し env-pX ラットが CII 誘導関節炎が強いことを示した. CII に対する免疫反応が env-pX ラットで亢進するという菅谷ら<sup>2</sup>の実験結果を支持する. WKAH ラットの炎症細胞浸潤は 4 週をピークに消退するが, env-pX ラットは 4 週後も持続, 増強した. さらに脾細胞または骨髓細胞を置換, 関節炎誘導すると, 12 週まで env-pX ラット由来リンパ球を持つ nBMT, nSCT は env-pX ラットと同様, 強い関節腫脹を示し, WKAH ラット由来リンパ球を持つ eBMT, eSCT は WKAH ラットと同程度の関節腫脹であった. CII 免疫後早期の env-pX ラットの強い関節腫脹には, env-pX 遺伝子発現するリンパ球が重要な役割を果たす. 中丸ら<sup>3</sup>は env-pX ラットのリンパ球が疾患発症前から易活性化状態にあり, env-pX 導入遺伝子産物の Tax がリンパ球活性化の接着分子発現異常を媒介していると示した. 今回 env-pX ラット, nBMT, nSCT の強い関節腫脹の個体に, 関節周囲 myxoid な浮腫性変化が認められた. env-pX 遺伝子発現するリンパ球は, 細胞接着分子, 血管透過性調節する液性因子発現に異常がある可能性がある. また, RF の結果から, env-pX 遺伝子発現リンパ球は CII 免疫に際し RF 産生に関与してい

ることが示唆された。

eBMT は 12 週以後も炎症細胞浸潤が持続した。この実験に先立つ予備実験で、関節炎発症 env-pX ラット局所浸潤リンパ球の関節内移入で WKAH ラットに一過性の関節炎誘導し、疾患発症前の env-pX ラットは持続性関節炎が誘導された。これより、env-pX 遺伝子発現する関節組織側要因が炎症細胞浸潤の持続に重要な役割を果たしている可能性がある。そこで滑膜線維芽細胞の特性を比較検討した。IL-6 の発現が env-pX ラットで有意に高かった。IL-6 は B 細胞分化活性化誘導、T 細胞増殖、活性化、細胞障害性 T 細胞への分化、好中球の浸潤、破骨細胞活性化による骨吸収促進、局所浸潤した炎症細胞を持続的に留めておく作用を持つ。Tax による IL-6 の発現亢進も示されており、env-pX ラット、eBMT では env-pX 遺伝子発現する滑膜細胞が IL-6 を産生、炎症細胞を局所浸潤させている。

eSCT では組織学的関節炎の程度が有意に弱く、正常ラット脾細胞中に免疫反応抑制作用を持つ細胞があるという樋口らの観察結果を支持している。eSCT は正常胸腺で分化成熟した T リンパ球が含まれるが、eBMT では正常骨髄由来の未熟 T リンパ球は、env-pX 遺伝子を発現する胸腺で分化成熟する。免疫反応抑制作用の機能獲得、発揮のために正常胸腺で分化成熟する必要があり、env-pX 遺伝子発現の胸腺で成熟した場合、その機能喪失が推測される。富居らは正常骨髄由来の未熟 T リンパ球が env-pX 遺伝子発現する胸腺フレームワーク通過により、正常血管構成分子を標的とする自己反応性 T リンパ球として末梢に出現と示した。免疫反応抑制性 T リンパ球の分化成熟が env-pX 遺伝子発現する胸腺では正しく遂げられないと考えられる。

#### 結論

env-pX ラットはヒト自己免疫疾患のプロトタイプモデルである。CII 誘導関節炎や RF 産生に、env-pX 遺伝子発現のリンパ球が重要で、炎症持続には関節組織側の env-pX 遺伝子も重要である。炎症細胞浸潤の持続誘導因子に、env-pX ラット由来滑膜細胞産生の IL-6 が示唆され、env-pX ラットでは胸腺で分化成熟する免疫反応抑制細胞に機能不全があり、関節炎発症や持続に関与している可能性がある。




#### 引用文献

1. Koizumi F (1999) Synovitis in rheumatoid arthritis: scoring of characteristic histopathological features. *Pathol. Int.* 49:298-304
2. Sugaya T, Ishizu A, Ikeda H, Nakamaru Y, Fugo K, Higuchi M, Yamazaki H, Imai K, Yoshiki T (2002): Clonotypic analysis of T cells accumulating at arthritic lesions in HTLV-I env-pX transgenic rats. *Exp Mol Pathol* 72:56-61
3. Nakamaru Y, Ishizu A, Ikeda H, Sugaya T, Fugo K, Higuchi M, Yamazaki H, Yoshiki T (2001): Immunological hyperresponsiveness in HTLV-I LTR-env-pX transgenic rats. a prototype animal model for collagen vascular and HTLV-I-related inflammatory disease. *Pathobiology* 69:11-18

#### 参考文献

1. Fugo K, Ishizu A, Ikeda H, Hayase H, Sugaya T, Higuchi M, Tsuji M, Abe A, Suzuki A, Shibata M, Takahashi T, Yoshiki T (2002): The role of the thymus in development of necrotizing arteritis in transgenic rats carrying the env-pX gene of human T cell leukemia virus type I. *Am J Pathol* 161:755-761

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	阿部 麻美
<p>審査委員長 <u>松野 文丸</u> </p> <p>審査委員 <u>若宮 伸隆</u> </p> <p>審査委員 <u>立野 正敏</u> </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>HTLV-I LTR-env-pX 遺伝子導入ラットにおける関節炎発症ならびに持続機序に関する検討</p>			
<p>関節リウマチは自己免疫疾患の中でも罹患患者の多い、頻度の高い疾患である。しかし未だはっきりした病態は分かっていない。成人 T 細胞性白血病 (ATL) の原因ウイルスであるヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-I) の遺伝子のうち env-pX 領域がコードする p40Tax (Tax) は宿主細胞の遺伝子の発現や分子の働きを制御することが知られており、主たる病原性分子と考えられている。env-pX 遺伝子を導入した HTLV-I LTR-env-pX 遺伝子導入ラット (env-pX ラット) は全身臓器細胞に構成的に導入遺伝子の発現が確認され、関節リウマチ類似の関節炎など様々な collagen vascular disease を発症する。</p> <p>本論文ではこのラットに認められる関節炎の発症機序並びに持続機序を明らかにすることにより、関節リウマチの発症、炎症持続原因について検討したものである。</p> <p>正常同系ラット及び env-pX ラット、また双方間で血液細胞を置換したラットに対して collagen type II (CII) による免疫を行い、疾患発症及び持続について定時関節径計測、病理学的並びに血清学的解析を施行した。その結果 CII により誘導される関節炎は正常ラットでは一過性であったのに対し env-pX ラットの方が強く、持続性であった。また env-pX ラット由来のリンパ球を持つ正常ラットでは、CII 投与後 env-pX ラットと同様の強い関節腫脹が認められたのに対し、正常ラット由来のリンパ球を持つ env-pX ラットでは、CII により誘導される関節腫脹の程度は正常ラットと同程度であった。env-pX ラット由来のリンパ球を持つ正常ラットでは RF (リウマトイド因子) が有意に陽性であった。</p>			

更に env-pX ラット, 正常同系ラットの関節滑膜から fibroblast を分離培養し, サイトカイン産生性について解析している。env-pX ラットの fibroblast では正常ラットに比べ IL-6 の産生が亢進していた。

本ラットに CII を免疫して誘導される強い関節炎の発症や RF の産生には, env-pX 遺伝子を発現するリンパ球が重要な役割を果たしていると考えられ, 一方, その炎症の持続には関節組織側における env-pX 遺伝子の存在も重要と思われた。炎症細胞浸潤の持続を誘導している因子として, env-pX ラット由来の滑膜細胞が産生する IL-6 の重要性が示唆された。従って, 関節リウマチで認められる慢性進行性関節炎では, 活性化リンパ球のみならず, サイトカイン産生性の亢進した関節組織なども関与していると考えられる。

本研究は, 関節リウマチ類似疾患発症ラットを使って関節炎発症, 持続機序の解析をした最初の報告である。得られた知見は今後, 関節リウマチの治療法に役立つ可能性があり, 臨床的にも意義深く価値あるものと考えられた。

また, 論文提出者に対する試問審査においても, 適切かつ論理的回答がなされ, 関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。

以上の内容から, 本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。