

学位論文題名

Inhibition of Joint Inflammation and  
Destruction Induced by anti-type II Collagen  
Antibody-induced Arthritis in Mice due to Deletion of  
Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)

マクロファージ遊走阻止因子欠損モデルマウスにおける  
抗Ⅱ型コラーゲン抗体誘導関節炎の炎症と破壊の抑制機序

学位論文内容の要旨

【はじめに】

関節リウマチ(以下 RA)をはじめとする関節炎では、TNF- $\alpha$ をはじめとする種々の炎症性液性因子の関与が明らかとなっている。そのため、近年、関節炎に対し、これら炎症性液性因子を標的とする治療の開発がすすめられている。マクロファージ遊走阻止因子(以下 MIF)は、遅延型アレルギー反応に関与する液性因子として発見され、主にマクロファージの機能を活性化する免疫機能を有すると考えられてきた。その後、1989年にヒト MIF cDNA がクローニングされて以来、免疫応答のみならず、炎症をはじめとする種々の病態に関与することが明らかになってきた。(グルココルチコイドの抗炎症作用を抑制し炎症を惹起すること、Tリンパ球の活性化に必須な因子である)。我々は本 MIF が RA 患者の関節液中に MIF が高濃度に存在すること、さらに RA 滑膜細胞には正常滑膜細胞に比べて MIF による MMP 転写/発現の促進作用が高いことを報告してきた。しかし、RA 発症における MIF の意義はいまだ不明であった。本研究の目的はカクテル誘発関節炎モデルを用いて関節炎発症における MIF の意義を *in vivo* において検討することである。

【材料および方法】

実験動物としては6週齢の Balb/c wild type 雄マウスおよび同 MIF knock-out マウスを使用した。これら動物を無処置の wild type 群、抗 MIF 抗体を腹腔内投与した抗体投与群、knock-out 群の3群に分け、以下の関節炎誘発操作を行った。関節炎誘発操作は抗Ⅰ型コラーゲン抗体カクテルを 2mg 尾静脈注射した後、4日後にリポポリサッカライド(以下 LPS)を 50 $\mu$ g 腹腔内投与し行ない、カクテル投与後 14 日で関節炎の判定を行った。なお、抗体投与群はカクテル投与の2日前より2日毎に抗 MIF ポリクローナル抗体 200 $\mu$ g を腹腔内投与した。関節炎の判定には四肢の4足関節を HE 染色による histopathological score を用い評価した。Histopathological score は、滑膜が正常なものを 0 点、滑膜の軽度肥厚を認

めるものを 1 点、滑膜の高度な肥厚を認めるものを 2 点、パンヌス形成を認めるものを 3 点とし、四肢で合計 12 点として評価した。また、MIF 発現の検討を目的として、免疫染色ならびに RT-PCR を行った。

### 【結果】

肉眼的観察ではカクテル投与後、14 日において、少なくとも 1 関節以上に腫脹が認められたマウスは、wild type 群 9 匹中 8 匹、抗体投与群 9 匹中 5 匹、knock-out 群 9 匹中 4 匹であった。Histopathological score に関しては wild type 群では平均 7.9 点であったのに対し、抗体投与群 3.1 点、knock-out 群 2.2 点と、wild type 群は抗体投与群および knock-out 群に比し、有意に高い score であった。wild type 群の関節炎を発症した足関節の組織像では滑膜は肥厚し、滑膜細胞が増殖し、パンヌス形成による骨破壊も認められた。MIF に対する免疫染色では滑膜に増殖した滑膜細胞に MIF 発現を認めた。RT-PCR による検討では、wild type 群で関節炎発症の足関節滑膜では正常足関節滑膜に比し MIF mRNA 発現が亢進していた。

### 【考察】

本研究では受動的コラーゲン関節炎モデルであるカクテル誘発関節炎モデルにおける滑膜細胞にタンパクレベルおよび mRNA レベルで MIF 発現が亢進することを明らかにした。MIF は種々のストレスにより分泌されたグルコシルチコイドにより産生が亢進し、この産生亢進した MIF が炎症のイニシエーターとして TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインを誘導することが知られている。したがって、RA などの関節炎においても MIF は炎症イニシエーターとして発現している可能性が考えられた。また、抗体投与による MIF の中和あるいは knock-out mouse による MIF の欠損はカクテル誘発による関節炎ならび関節破壊を抑制した。我々は過去に MIF は AP-1 を介して MMP の転写/発現を亢進させることを報告した。したがって、MIF のプロテアーゼ産生亢進作用を阻止することで関節炎を抑制した可能性が考えられた。臨床との関連では、前述のように MIF は炎症性疾患において TNF- $\alpha$  より上流に位置する炎症イニシエーターと考えられている。したがって、MIF を標的とした治療戦略は抗 TNF- $\alpha$  抗体より効果的な治療効果を得ることが期待でき、今後、その治療法の確立が期待される。カクテル誘発関節炎モデルを用いて関節炎発症における MIF の意義を *in vivo* において検討した。その結果、カクテル誘発関節炎モデルにおける滑膜細胞ではタンパクレベルおよび mRNA レベルで MIF 発現が亢進していた。また、抗体投与による MIF の中和あるいは knock-out mouse による MIF の欠損はカクテル誘発による関節炎ならび関節破壊を抑制した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 岩 永 敏 彦

副 査 教 授 三 浪 明 男

副 査 教 授 安 田 和 則

学 位 論 文 題 名

## Inhibition of Joint Inflammation and Destruction Induced by anti-type II Collagen Antibody-induced Arthritis in Mice due to Deletion of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)

マクロファージ遊走阻止因子欠損モデルマウスにおける  
抗Ⅱ型コラーゲン抗体誘導関節炎の炎症と破壊の抑制機序

マクロファージ遊走阻止因子(以下 MIF)は、遅延型アレルギー反応に関与する液性因子として発見されたが、その後の研究で免疫応答のみならず、炎症をはじめとする種々の病態に関与することが明らかになってきた。申請者のグループは関節リウマチ (RA) 患者の関節液中に MIF が高濃度に存在すること、さらに RA 滑膜細胞には正常滑膜細胞に比べて MIF による MMP 転写/発現の促進作用が高いことを報告してきた。しかし、RA 発症における MIF の意義はいまだ不明であった。申請者の研究の目的はカクテル誘発関節炎モデルを用いて関節炎発症における MIF の意義を *in vivo* において検討することであった。

実験動物としては 6 週齢の Balb/c wild type 雄マウスおよび同 MIF knock-out マウスを使用した。これら動物を無処置の wild type 群、抗 MIF 抗体を腹腔内投与した抗体投与群、knock-out 群の 3 群に分け、以下の関節炎誘発操作を行った。関節炎誘発操作は抗Ⅱ型コラーゲン抗体カクテルを 2mg 尾静脈注射した後、4 日後にリポポリサッカライド(以下 LPS)を 50  $\mu$ g 腹腔内投与し、カクテル投与後 14 日で関節炎の判定を行った。なお、抗体投与群はカクテル投与の 2 日前より 2 日毎に抗 MIF ポリクローナル抗体 200  $\mu$ g を腹腔内投与した。関節炎の判定には四肢の 4 足関節を HE 染色による histopathological score を用い評価した。Histopathological score は、滑膜が正常なものを 0 点、滑膜の軽度肥厚を認めるものを 1 点、滑膜の高度肥厚を認めるものを 2 点、パンヌス形成を認めるものを 3 点とし、四肢で合計 12 点として評価した。足関節滑膜における MIF 発現は免疫組織染色ならびに半定量 RT-PCR で検討した。また mRNA レベルでの matrix metalloproteinase (MMP)-13 および macrophage inflammatory protein (MIP)-2 の発現を半定量 RT-PCR で評価した。

結果：肉眼的観察ではカクテル投与後、14 日において、少なくとも 1 関節以上に腫脹が認められたマウスは、wild type 群 9 匹中 8 匹、抗体投与群 9 匹中 5 匹、knock-out 群 9 匹中 4 匹であった。Histopathological score に関しては wild type 群では平均 7.9 点であったのに対し、抗体投与群 3.1 点、knock-out 群 2.2 点と、wild type 群は抗体投与群および knock-out 群に比し、有意に高い score であった。wild type 群の関節炎を発症した足関節の組織像では滑膜は肥厚し、滑膜細胞が増殖し、パンヌス形成による骨破壊も認められた。MIF に対する免疫染色では滑膜に増殖した滑膜細胞に MIF 発現を認めた。RT-PCR による検討では、wild type 群で関節炎発症の足関節滑膜では正常足関節滑膜に比し MIF mRNA 発現が亢進していた。wild type 群では足関節滑膜に MIF、MMP-13 および MIP-2 の発現亢進を認めたが、他の群ではこれらの発現が著しく抑制されていた。

本研究は受動的コラーゲン関節炎モデルであるカクテル誘発関節炎モデルにおける滑膜細胞にタンパクレベルおよび mRNA レベルで MIF 発現が亢進することを明らかにした。MIF は種々のストレスにより分泌されたグルココルチコイドにより産生が亢進し、この産生亢進した MIF が炎症のイニシエーターとして TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインを誘導することが知られている。したがって、RA などの関節炎においても MIF は炎症イニシエーターとして発現している可能性が考えられた。また、抗体投与による MIF の中和あるいは knock-out mouse による MIF の欠損はカクテル誘発による関節炎ならび関節破壊を抑制した。申請者は過去に MIF は AP-1 を介して MMP の転写/発現を亢進させることを報告した。したがって、MIF のプロテアーゼ産生亢進作用を阻止することで関節炎を抑制した可能性が考えられた。臨床との関連では、前述のように MIF は炎症性疾患において TNF- $\alpha$  より上流に位置する炎症イニシエーターと考えられている。したがって、MIF を標的とした治療戦略は抗 TNF- $\alpha$  抗体より効果的な治療効果を得ることが期待でき、今後、その治療法の確立が期待される。

口頭発表の後、副査の三浪教授より本モデルを選んだ理由や妥当性などについて、安田教授より本結果の臨床応用への戦略と問題点などについて、また主査の岩永教授より滑膜に存在する種々の細胞内における MIF の局在および抗 TNF  $\alpha$  抗体投与との比較などについて質問があったが、申請者は自己の研究結果と文献的考察に基づいて概ね妥当な回答を行った。

本研究は、MIF が RA モデルにおける炎症の発生と関節破壊の機序において重要な役割を果たすことを示し、また MIF が RA の治療における標的となりうる可能性を示した。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。