

「DBA/1JNCrlj 雌性マウスを用いた II 型コラーゲン誘発関節炎モデルの作製と、Methotrexate による関節炎予防効果の検討」

島根大学医学部薬理学教室 新堀智子、塩田直孝、奥西秀樹

背景

DBA/1JNCrlj マウスは、コラーゲン誘発性関節炎を安定して発症するマウスとして汎用されている。通常雄性マウスが使用され、雌性マウスが利用されることは希であった。これは雄性マウスが雌性マウスに比べより発症率や重症度が高いとの先行研究の結果によると考えられる(1-3)。しかしヒトの関節リウマチは、圧倒的に女性で多く発症し(4)、さらにはエストロゲン等の性ホルモンが関節炎の病態に重要な役割を果たすことも報告されている(3, 5)。以上のことから雌性マウスを用いての関節炎モデル動物の作製はより臨床に近いモデルとして、期待される。今回、我々は DBA/1JNCrlj の雌性マウスを用いて、コラーゲン誘発性関節炎モデルの作製を検討したので以下の通り報告する。

2. 方法

実験動物：

5 週齢の DBA/1JNCrlj 雌性マウス(日本チャールス・リバー株式会社)を 1 週間馴化飼育後、実験に供した。飼育条件は床敷使用ケージで群飼育(3-4 匹/ケージ)した。

コラーゲン誘発関節炎モデルの作製と Methotrexate による発症抑制効果の検討:

6 週齢の DBA/1JNCrlj 雌性マウスにウシの II 型コラーゲンを免疫して関節炎を誘発した。Bovine type II collagen(Sigma C7806)を 10 mM acetic acid で溶解し 2mg/ml の溶液を調整した(常温、overnight)。その後、Freund's complete adjuvant (Difco 263810)と1対1で混合し、エマルジョンを作製した。マウス1匹あたり 0.1 ml のエマルジョンを尾根部皮内に少量ずつわけて注入した。3 週間後に同様に追加免疫を実施して、コラーゲン誘発性関節炎を発症させた(図 1)。追加免疫(ブースト)を実施した翌日より(関節腫脹が始まる前)、Methotrexate (MTX : 和光純薬工業 139-13571) 1 mg/kg を 1 日 1 回、4 週間経口投与した(図 1)。MTX は、0.1N NaOH に溶解して 20 mg/ml の stock 溶液を作製したのち、経口投与の所定の濃度となるよう、生理食塩水で希釈して作製した。

実験における群構成：

Normal 群:無処置の正常群(n=6)

Vehicle 群:関節炎を誘導し、対照溶媒(生理食塩水)のみを投与した群(n=13)

MTX 群:関節炎を誘導し、MTX を投与した群(n=12)

Clinical score：

追加免疫後、1日1回 Clinical score を測定した。Clinical score の判定は以下の基準を用いた。手足ごとに計測し、合計点を1匹の個体の測定値とした(正常0から最高12)。

Score 0：正常

Score 1：1指に腫脹もしくは変形を認める

Score 2：2指以上に腫脹もしくは変形を認めるが、全指には及ばない

Score 3：全指に腫脹もしくは変形を認める

X-ray score：

追加免疫4週間後、深麻酔にてマウスを安楽死させ、手足を採取してX線写真を撮影した。X-ray score は以下の基準で測定した。手足ごとに5カ所のMP関節、9カ所のPIPおよびDIP関節、手根骨(全15カ所)の中で変形を認めた箇所数を測定し、合計点を1匹の個体の測定値とした(正常0から最高60)。

組織学的解析：

H&E染色およびAzan染色を実施し、組織学的解析を行った。

3. 結果

体重(図2)

Normal 群、Vehicle 群、MTX 群の各群間における体重の差は認められなかった。

Clinical Score(図3)

Vehicle 群は追加免疫実施後、徐々にスコアが上昇し、4週間経過した時点では約6.7点となった。関節炎の発症率は13匹中13匹と100%であった。一方MTX投与群は、Vehicle 群に比較し関節炎の発症進展が著しく抑制され、4週間経過後もスコアは2点に到達しなかった。MTX投与群の発症率も12匹中7匹(約60%程度)と低かった。Normal 群のスコアは0点で、自然発症性の変化は認められなかった。

X-ray score (図 4)

Vehicle 群において、指関節の著しい破壊が認められた。MTX 群では、指関節の破壊が有意に抑制されていた。Normal 群では関節の破壊や変形は全く認められなかった。

組織学的解析 (図 5)

Vehicle 群では滑膜組織に著しく炎症性細胞が浸潤し、滑膜の増殖性変化が認められた。また骨や軟骨の顕著な破壊もみられた。MTX 群では Vehicle 群で認められた滑膜組織への著しい炎症細胞の浸潤および滑膜の増殖性変化が抑制され、軽度に細胞浸潤を認める程度で Normal 群の組織像に非常に近い状態であった。

4. 結論

DBA/1JNCrljの雌性マウスにおいても雄性マウスと同様に顕著なコラーゲン誘発関節炎を発症することがわかった。また、関節炎の標準治療薬である MTX の予防的投与は、関節炎の進展を有意に抑制したことから、薬効評価系として有用であると考えられた。今回、雄性マウスと雌性マウスを直接比較していないが、雄性マウスにおいてしばしば認められる自然発症性の骨変化は (6)、雌性マウスでは全く認められなかった。自然発症性の骨変化は、薬物評価においてバラツキの原因になり、このような自然発症性の骨変化を認めない雌性マウスは、雄性よりもより有用な関節炎モデル動物であると考えられた。またヒトにおいて、関節リウマチの患者は、女性の方が圧倒的に多いことから、今回の結果から、雌性マウスでの関節炎は臨床に近似したモデルとして有用性が期待できる。

5. 参考文献

1. Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, Martin A, Mosedale B. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature*. 1980;283:666-668.
2. Holmdahl R, Jansson L, Gullberg D, Rubin K, Forsberg PO, Klareskog L. Incidence of arthritis and autoreactivity of anti-collagen antibodies after immunization of DBA/1 mice with heterologous and autologous collagen II. *Clin Exp Immunol*. 1985;62:639-646.
3. Holmdahl R, Jansson L, Andersson M. Female sex hormones suppress development of collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum*. 1986;29:1501-1509.
4. Joseph A, Brasington R, Kahl L, Ranganathan P, Cheng TP, Atkinson J. Immunologic rheumatic disorders. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125:S204-S215.
5. Islander U, Jochems C, Lagerquist MK, Forsblad-d'Elia H, Carlsten H. Estrogens in rheumatoid arthritis; the immune system and bone. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;335:14-29.
6. Holmdahl R, Jansson L, Andersson M, Jonsson R. Genetic, hormonal and behavioural influence on spontaneously developing arthritis in normal mice. *Clin Exp Immunol*. 1992;88:467-472.

図説明

図 1: 実験プロトコール

6 週齢の DBA/1JNCrlj 雌性マウスを用いて、コラーゲン誘発性関節炎モデルを作製した。2 回目のコラーゲン免疫を実施後、MTX あるいは対照溶媒を 1 日 1 回、4 週間経口投与した。

図 2: 体重

Normal 群、Vehicle 群、MTX 群、各群の体重の経時的変化を示す。平均値 ± 標準誤差 (n 数、Normal 群 6 匹、Vehicle 群 12 匹、NTX 群 13 匹)

図 3: Clinical score

Normal 群、Vehicle 群、MTX 群各群において、両手足の腫脹を肉眼的に評価した clinical score の経時的変化を示す。平均値 ± 標準誤差 (n 数、Normal 群 6 匹、Vehicle 群 12 匹、NTX 群 13)。* $P < 0.05$ 対 MTX 群。右の写真は、Vehicle 群、MTX 群のそれぞれ代表的な足を示す。

図 4: X-ray score

Normal 群、Vehicle 群、MTX 群各群の両手足の X 線写真を撮影し、関節の破壊度を評価した X-ray score の結果を示す。平均値 ± 標準誤差 (n 数、Normal 群 6 匹、Vehicle 群 12 匹、NTX 群 13)。* $P < 0.05$ 対 MTX 群。右の写真は Vehicle 群、MTX 群のそれぞれ代表的な手足の X 線写真を示す。

図 5: 組織学的解析

Normal 群、Vehicle 群、MTX 群各群の H&E 染色の代表的な手の指関節の写真を示す。

図 6: 関節炎マウス全身写真

コラーゲン誘発性関節炎を誘発したマウス (2 回目のコラーゲン免疫実施後、4 週間経過した時点) の代表的な全身写真を示す。

図 1：実験プロトコール

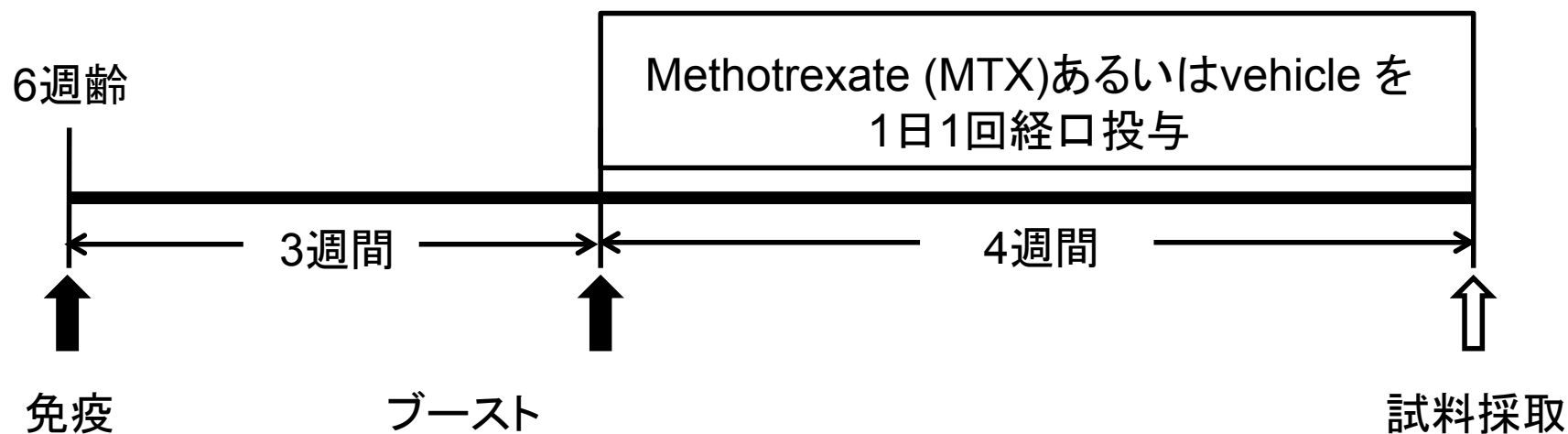
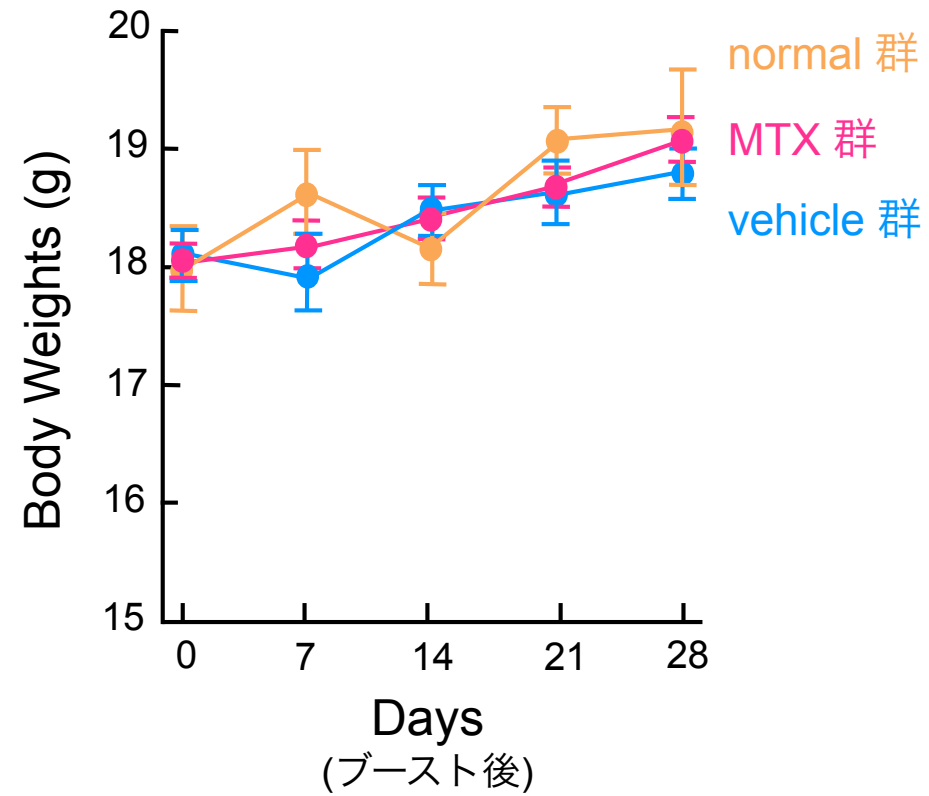


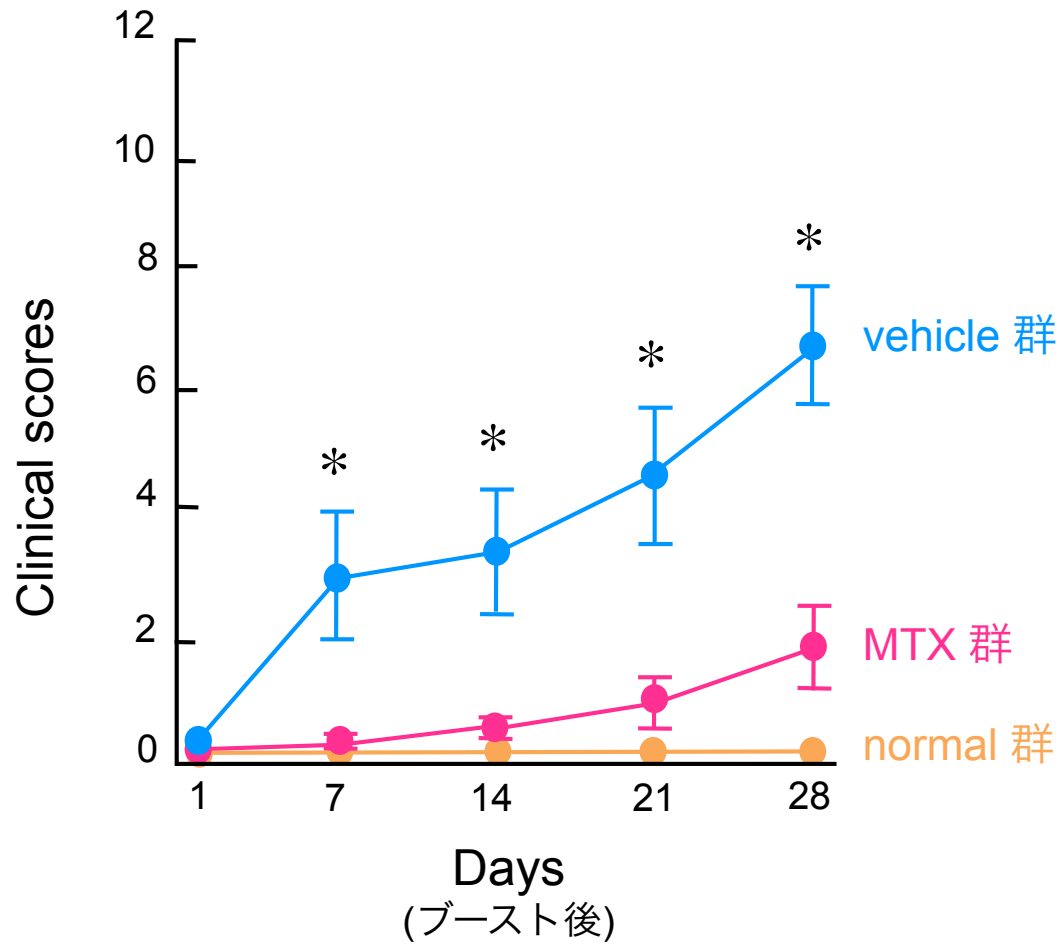
図 2：体重



群分け

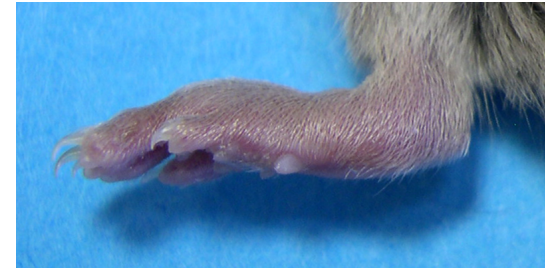
- normal群 : 処置をしていない正常群
- vehicle群 : 関節炎マウスに対照溶媒を投与した群
- MTX群 : 関節炎マウスにMTXを投与した群

図 3 : Clinical score



* P<0.05 vs. MTX群

vehicle 群



MTX 群



図 4 : X-ray scores

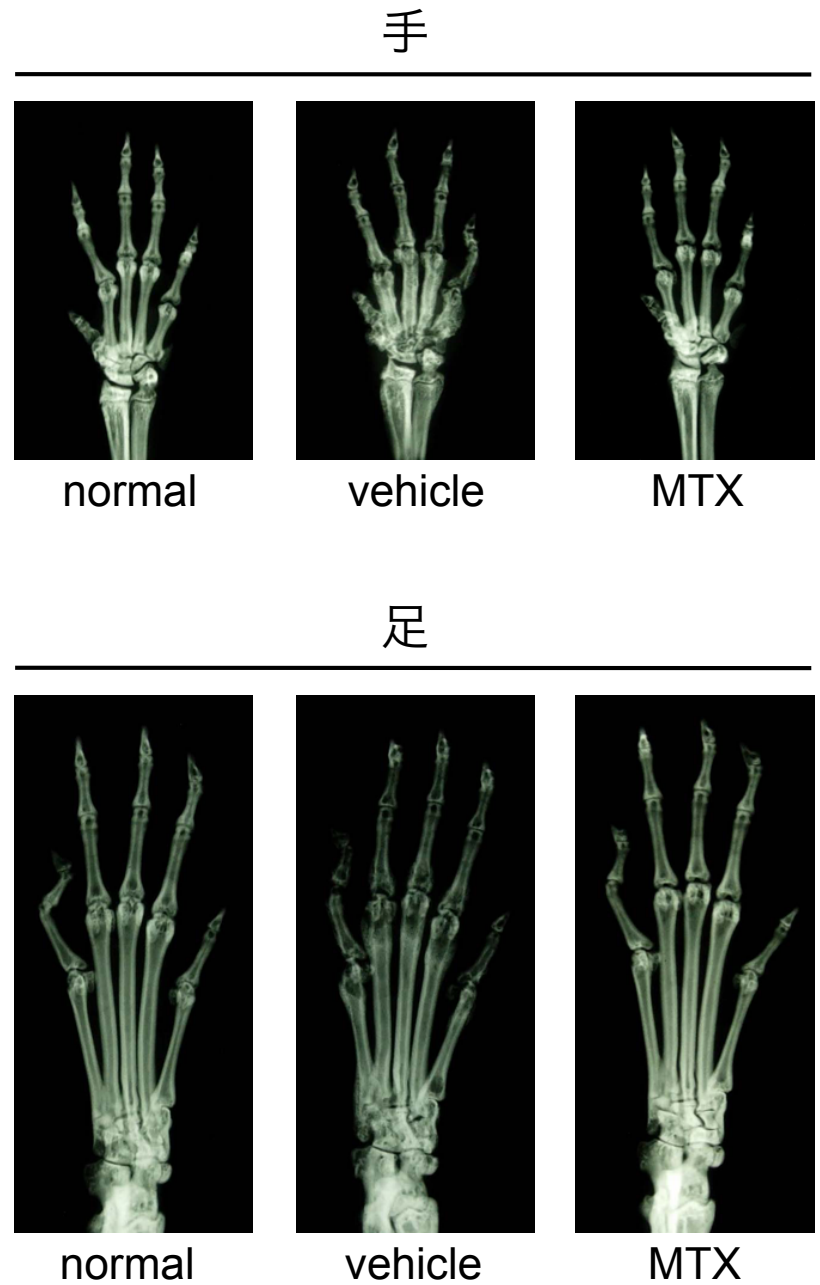
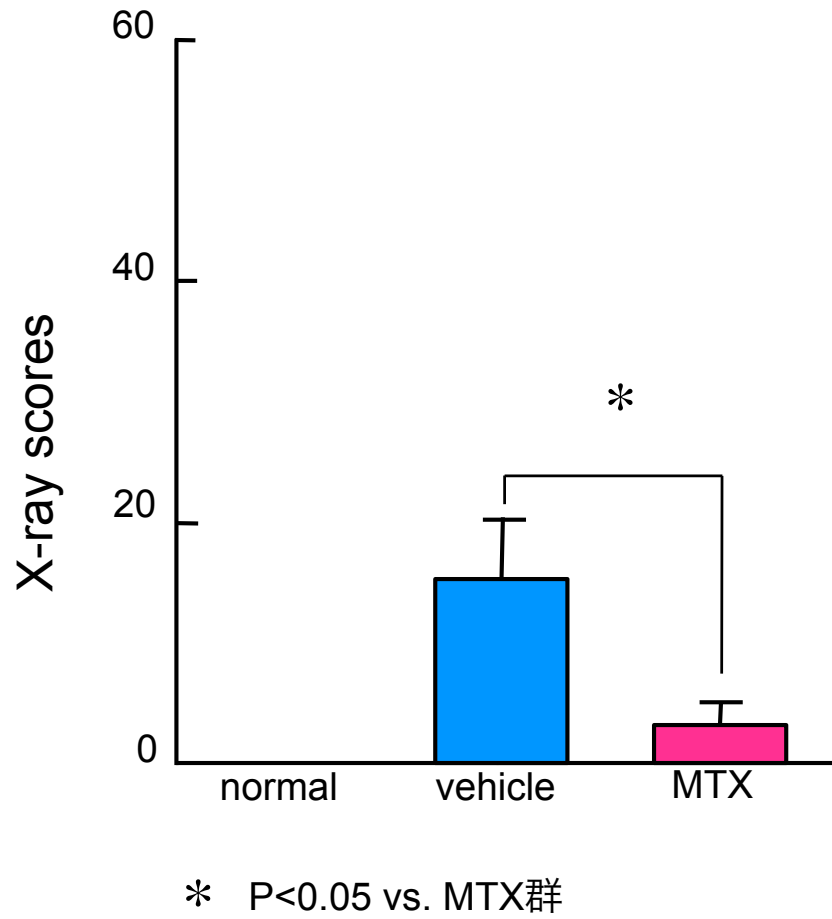
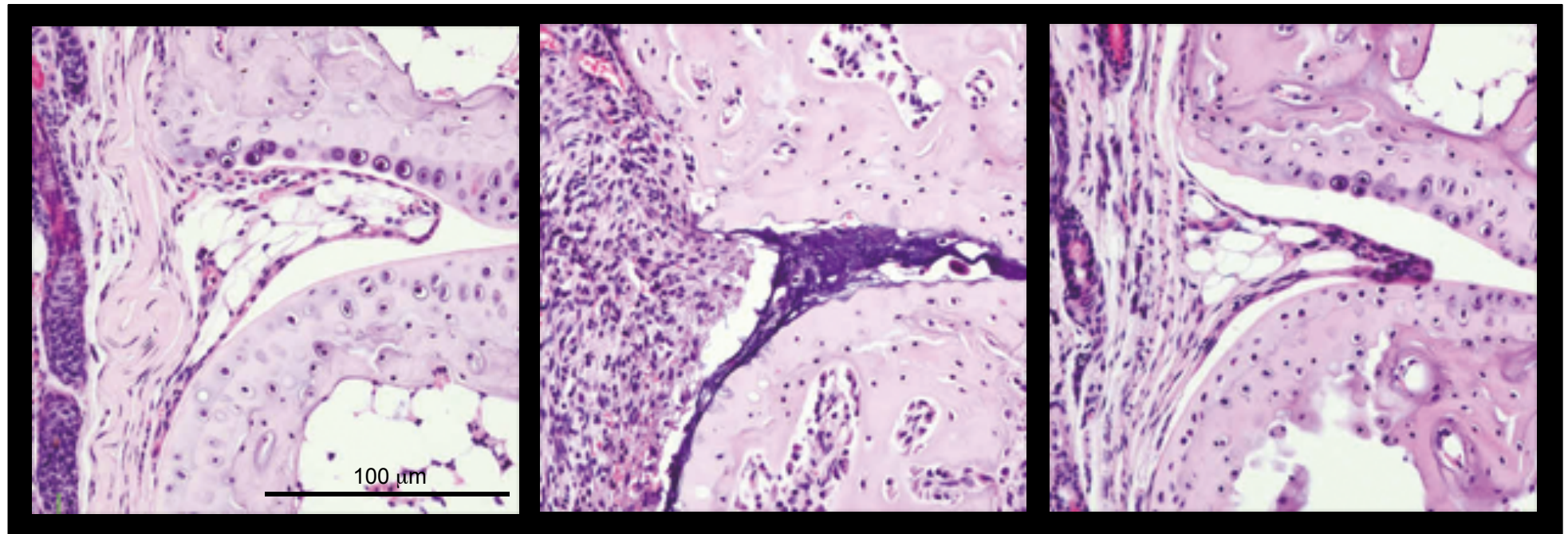


図 5：組織学的解析



normal

vehicle

MTX

図 6：関節炎マウス全身写真

