

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 24 年度博士課程入学

氏名 村上 康平

指導教員名 松木 直章

論文題目 イヌの特発性多発性関節炎の病態生理に関する研究

結論

イヌの多発性関節炎 (polyarthritis) はいくつかの疾患に分類される。ヒトの関節リウマチのように関節構造の破壊を伴う多発性関節炎、筋炎を伴う多発性関節炎、全身性紅斑性狼瘡の一徴候としての多発性関節炎などが知られており、これら既知の関節炎に当てはまらない場合は特発性多発性関節炎 (idiopathic polyarthritis: IPA) と診断される。

イヌの IPA は非びらん性の多発性関節炎を特徴とし、著しい全身性の炎症反応を伴う疾患である。IPA は免疫介在性疾患だと考えられているが、詳細な病因・病態は不明である。過去の病理組織学的な研究から、IPA のイヌでは関節内に (1) 免疫複合体が存在すること、(2) 好中球が高度に浸潤すること、(3) lining layer の消失や間質の壊死を伴う重度な滑膜の障害が起こること、が特徴である。

本論文の一連の研究は、上記 3 つの病理組織学的所見と関連する臨床病理学的変化を探索したものである。第 1 章では、IPA 症例の血漿および滑液中の免疫複合体を探索し、治療に伴う変動も検討した。第 2 章では、IPA における滑膜組織への好中球浸潤のメカニズムを明らかにするために、ヒトの好中球走化因子である CXC-Ligand 8 (CXCL8) および単球走化因子である

CC-Ligand 2 (CCL2) の滑液中濃度を検討した。また、これらケモカインが IPA のイヌの関節への好中球集簇に与える影響を *in vitro* で評価した。第 3 章では、滑膜の障害に伴う滑膜バリア機能の低下を検討した。健康なイヌの滑膜は、高分子の血漿蛋白質の滑液への侵入を制限する半透過性バリア機能をもつ。しかし滑膜が炎症により障害を受けると、その機能が失われて血漿蛋白質が滑液中に流入し、滑液総蛋白質濃度は上昇すると考えられる。そこで、IPA のイヌの滑液総蛋白質濃度を検討し、IPA の臨床診断に対する有用性を考察した。

第 1 章: イヌの特発性多発性関節炎における血漿・滑液中の C3-IgG 複合体の検出

補体 C3 は自然免疫の中心的な役割を担っており、分解されながら活性化して様々な機能を発揮する。C3 の機能の一つに免疫グロブリンとの結合がある。C3 分解産物と IgG の複合体は、ヒトの関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡、シェーグレン症候群など関節炎を主徴とする膠原病患者の血中で増加することが知られている。そこで本章では、IPA のイヌにおける血漿・滑液中の C3-IgG 免疫複合体の存在を検討した。

抗 C3 抗体を用いたイムノブロットでは、IPA のイヌの血漿中に C3 の全長蛋白質と考えられる見かけ上 250 kDa のバンドが検出された。さらに、IPA のイヌでは 250 kDa よりも高分子量の位置に複数のバンドが認められた。その後、ニトロセルロース膜から抗 C3 抗体を除去して、抗 IgG 抗体を反応させたところ、IPA のイヌの 69% (22 頭/ 32 頭) では 250 kDa よりも高分子量側に抗 C3 抗体と抗 IgG 抗体の両方が反応するバンドが確認され、C3 と IgG で構成される複合体であることが示唆された。これらのバンドは、治療により滑液中に炎症細胞が認められなくなった症例では減弱もしくは消失した。一方、抗 C3 抗体と抗 IgG 抗体の両方が反応するバンドは、健康なイヌでは認められず (0 頭/ 14 頭)、非関節炎の疾患対照のイヌの血漿中では 24% (4 頭/ 17 頭) で認められた。さらに滑液を用いて同様の検討を行うと、IPA のイヌでは 92% (22 頭/ 24 頭) で抗 C3 抗体と抗 IgG 抗体の両方が反応するバンドが認められた。特に、血漿中に抗 C3 抗体と抗 IgG 抗体の両方が反応するバンドを認めた IPA のイヌでは、全頭で滑液中にも同じバンドが検出された。一方、健康なイヌの滑液中に同様の反応を示すバンドは認められなかった (0 頭/ 6 頭)。以上より、イヌではヒトと同様に、血中に C3 または C3 分解産物と IgG の複合体が存在した。また、それらは滑液中でより高率に認められたことから、主に関節腔内で生成されている可能性が示された。また、この C3-IgG 複合体は IPA の疾患活動性と関連しており、IPA の病態に関与する可能性が示された。

第2章:滑液中 CXCL8 と CCL2 のイヌの特発性多発性関節炎の病態への関与

IPA のイヌでは、滑膜組織で好中球が増加すると同時に、滑液中でも好中球が増加する。しかし、好中球が関節に集簇するメカニズムはわかっていない。ヒトの関節リウマチでは CXCL8 が滑液中で増加し、好中球走化因子として病態に関わっている。さらに最近、関節リウマチ患者の好中球は、単球走化因子である CCL2 の受容体 (CCR2) を発現し、CCL2 に反応して遊走することが報告された。したがって、CXCL8 や CCL2 がイヌの IPA で好中球走化因子として作用している可能性が考えられた。そこで本章では、IPA のイヌで認める関節への好中球浸潤における CXCL8 および CCL2 の役割を評価した。

健康なイヌ、骨関節症および IPA のイヌの滑液で走化性試験を行うと、IPA 症例の滑液は有意に多形核白血球の遊走を促進した。また IPA のイヌの滑液中では CXCL8 だけでなく CCL2 も、健康なイヌよりも有意に増加しており、骨関節症のイヌよりも増加傾向にあった。次に、免疫細胞化学で健康なイヌの末梢血を調べたところ、CCR2 は多形核白血球に発現しており、単球では認められなかった。定量的 PCR でも、CCR2 の mRNA 発現は多形核白血球が単球よりも有意に高かった。さらに、健康なイヌの多形核白血球は組換えイヌ CXCL8 と同様に、組換えイヌ CCL2 にも反応して遊走した。従って、イヌの多形核白血球は生理的な状態で CCR2 を発現しており、CCL2 が多形核白血球走化因子として機能することがわかった。ここで、CXCL8 および CCL2 が IPA の病態に及ぼす影響を調べるために、CXCL8 の非競合阻害薬 (repertaxin) と CCR2 のアンタゴニスト (MK-0812) を用いて走化性試験を行った。その結果、多形核白血球の IPA のイヌの滑液への遊走は repertaxin 単独や MK-0812 単独では有意に抑制されなかった。しかし、repertaxin と MK-0812 を併用すると IPA のイヌの滑液への遊走は有意に抑制された。以上より、CXCL8 と CCL2 が IPA のイヌの滑液中で増加しており、これらが共に関節への好中球の集簇に寄与していると考えられた。

第3章:イヌの特発性多発性関節炎におけるグルココルチコイド療法に伴う滑液総蛋白質濃度の変化

IPA の診断基準として、滑液塗抹検査で白血球数の増加が確認され、他の関節炎が否定されることがコンセンサスになっている。しかし、検査時に既にグルココルチコイドが投与されているイヌでは、滑液中に白血球が認められないことがあり、IPA の診断を難しくしている。ところで、健康なイヌの滑液中の蛋白質濃度は一定に保たれているが、関節リウマチなど種々の関節疾患では、滑膜の損傷に伴って血漿蛋白質が流入し、滑液中の蛋白質は増加する。従って IPA でも滑液蛋白質は増加すると予想されるが、まだ検証されていない。また滑液総蛋白質濃度と治療との関連もわかっていない。そこで本章では IPA のイヌでの治療前後の滑液総蛋白質濃度の変化を検討した。

治療前の IPA のイヌ ($n=19$)、グルココルチコイドで治療され、滑液中に炎症細胞が認められなくなった IPA のイヌ ($n=12$)、臨床的に健康なイヌ ($n=10$) を組み入れた。これらのイヌの滑液総蛋白質濃度を Bradford 法で測定したところ、治療前の IPA のイヌは、健康なイヌよりも有意に滑液総蛋白質濃度は高かった。興味深いことに、治療後の IPA のイヌの滑液総蛋白質濃度も、健康なイヌよりも有意に高かった。このことから、滑液総蛋白質濃度はグルココルチコイド投与中のイヌで IPA 診断マーカーになる可能性が示された。この可能性を検証するために治療後の IPA のイヌに加え、疾患対照として関節炎以外の疾患に罹患したイヌ ($n=34$) を組み入れ、ROC 曲線を描いた。その結果、滑液総蛋白質濃度の IPA 診断における曲線下面積は 0.93 であった。滑液総蛋白質濃度のカットオフ値を 2.1 g/dL とすると、IPA に対する感度は 100%、特異度は 67% であった。以上より、グルココルチコイド投与中のイヌでは滑液総蛋白質濃度を調べるのが IPA の診断に有用であると考えられた。

総括

一連の研究成果より、イヌの IPA の病態生理の一端を明らかにすることができた。すなわち、(1) 血漿・滑液中の C3-IgG 免疫複合体の増加、(2) 滑液中 CXCL8・CCL2 濃度の増加が引き起こす好中球浸潤、(3) 滑液総蛋白質濃度の上昇が IPA のイヌで認められた。これらの結果から、IPA の病態について以下の様に推察される。まず何らかの原因により、IPA のイヌの関節局所で C3-IgG 複合体が増加する。増加した C3-IgG 複合体は滑膜に沈着し、Fc γ 受容体を介して主に滑膜細胞を活性化する。活性化した滑膜細胞は CXCL8 や CCL2 を産生し、それらケモカインは好中球を関節に集簇させる。集簇した好中球は、滑膜を傷害し、滑液総蛋白質濃度は増加する。

本研究によって明らかとなった知見は、イヌの IPA の病態生理の理解につながると同時に、IPA の診断や治療に対して臨床的有用性をもつと考えられる。すなわち、C3-IgG 複合体は IPA のイヌの血漿中で高率に認められ、治療に反応して減少する。従って、IPA の診断マーカー、治療マーカーとして有用となる可能性がある。さらに、CXCL8 と CCL2 の受容体を阻害することで、イヌの多形核白血球の遊走を抑制できた。従って、これらケモカイン受容体を標的とした薬剤は、イヌの IPA に対する有効な治療法となる可能性がある。さらに滑液総蛋白質濃度を測定することは、グルココルチコイドが投与されているイヌで IPA を診断あるいは除外することを容易にすると考えられる。

本論文における一連の研究は、イヌの IPA の病態生理について重要な知見を提供するものであり、新規診断法ならびに新規治療法の確立につながるものと考えられる。