

**Epstein-Barr virus 感染による NOD/Shi-scid IL-2r<sup>gnull</sup>  
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**  
**Human osteoclastogenesis in Epstein-Barr virus-induced erosive arthritis of  
humanised NOD/Shi-scid/IL-2R $\gamma^{\text{null}}$  mice**

長澤洋介<sup>1)</sup>、井汲菜摘<sup>1)</sup>、野崎高正<sup>1)</sup>、猪股弘武<sup>1)</sup>、吉田広人<sup>1)</sup>、今留謙一<sup>1)</sup>、北村 登<sup>1)</sup>、岩田光浩<sup>1)</sup>、藤原成悦<sup>1)</sup>、武井正美<sup>1)</sup>

Yosuke NAGASAWA<sup>1)</sup>, Natsumi IKUMI<sup>1)</sup>, Takamasa NOZAKI<sup>1)</sup>, Hirotake INOMATA<sup>1)</sup>, Hiroto YOSHIDA<sup>1)</sup>, Kenichi IMADOME<sup>1)</sup>, Noboru KITAMURA<sup>1)</sup>, Mitsuhiro IWATA<sup>1)</sup>, Shigeyori FUJIWARA<sup>1)</sup>, Masami TAKEI<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>日本大学医学部 内科学系血液膠原病内科学分野

**[要旨]**

Epstein-Barr virus (EBV)は、関節リウマチ(RA)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。今回ヒト(h)免疫化 NOD/Shi-scid IL-2 $\gamma^{\text{null}}$  マウス(以下 hNOG マウス)に EBV を感染させ、びらん性関節炎モデルを発症させ、骨びらん局所に存在する破骨細胞の同定と由来を検討した。びらん性関節炎発症 hNOG マウスは EBV 感染後の末梢血中の CD4/8 の比を解析することにより、より高率にびらん性関節炎を発症することが確認され、骨びらんをマイクロ 3D-CT を用いて 3 次元的に証明した。さらに骨びらんを来す破骨細胞を同定するため骨びらんを来した病理組織標本をヒト cathepsin K に対するモノクローナル抗体と tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP)で染色し、組織中に存在する破骨細胞がヒト由来であることを証明した。さらに hNOG マウスの骨髓中有核細胞を macrophage colony-stimulating factor(M-CSF)および receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand(RANKL)添加で培養し、多核の破骨細胞を分化誘導し、培養細胞を TRAP 染色、抗ヒト cathepsin K 抗体および抗ヒトミトコンドリア抗体を用いた免疫染色を行い、陽性でこの細胞がヒト由来であることを証明した。このモデルマウスはヒトの破骨細胞でのびらん性関節炎を起こした初めてのモデルで、今後の病態解明、治療薬の開発につながるものと思われた。

**[背景および目的]**

Epstein-Barr virus (EBV)は、関節リウマチ(RA)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。EBV はヒト以外新世界サルにしか感染しないため、動物実験が困難だが、ヒト免疫化マウスの開発によってマウスを用いた EBV 感染実験が可能となった。桑名らは、hNOG マウスに EBV を感染させると膝関節にびらん性関節炎を発症することを報告した。<sup>1)</sup> しかし、発症機序を含めて解明すべき点が多数残されている。

- (1) 高率にびらん性関節炎を発症させるための条件  
桑名らの報告によると、EBV 感染 hNOG マウスの関節炎発症率は約 65%であった。関節炎発症には何が必要であるのか条件検討が必要と考えられた。
- (2) 膝関節の三次元構造  
桑名らの報告では、関節炎の評価は関節組織切片による組織学的評価のみである。関節の三次元構造を画像検査的手法で評価できないか方法の検討が必要と考えられた。
- (3) 骨びらん部局所に存在する破骨細胞の同定と由来  
本研究はヒト免疫化マウスを使用しており、免疫細胞においてはヒト細胞とマウス細胞が混在していると考えられる。EBV は前述のようにヒト細胞にしか感染しないため、びらん性関節炎の発症にはヒト免疫細胞が関わっていると予想される。このことを確認するため、骨びらん部局所において骨破壊を行っている破骨細胞がヒト細胞由来であるのか、あるいはマウス細胞由来であるのか検討が必要と考えられた。
- (4) 抗 IL-6 受容体抗体投与によるびらん性関節炎抑制効果  
桑名らの報告では、EBV 感染 hNOG マウスに発症するびらん性関節炎は RA に類似した特徴を持っている。そこで、実際に RA 治療薬として臨床使用されている抗ヒト IL-6 受容体抗体製剤の投与を EBV 感染 hNOG マウスに行い、関節炎抑制効果があるか確認することを計画した。

#### [方法]

- (1) 高率にびらん性関節炎を発症させるための条件  
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 陽性細胞の比率に着目し、EBV 感染によって上昇する CD8 陽性細胞の比率が CD4 陽性細胞の比率を上回る EBV 感染後 8 から 10 週間経過した後に解剖を行い、関節炎の発症率を検討する。
- (2) 膝関節の三次元構造  
EBV 感染 hNOG マウスの膝関節をマイクロ 3D-CT 撮影し、画像検査においても RA と類似した特徴を有しているか評価する。
- (3) 骨びらん部局所に存在する破骨細胞の同定と由来  
EBV 感染 hNOG マウスの膝関節組織切片に対して破骨細胞のマーカーである tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) の染色を行い、破骨細胞の存在を確認する。加えて、ヒト cathepsin K に対するヒト特異抗体を用いて免疫染色を行い、骨びらん部局所においてヒト破骨細胞の存在を確認する。また、破骨細胞の前駆細胞は骨髄に存在し<sup>2</sup>、破骨細胞前駆細胞は M-CSF および RANKL の刺激を受けて破骨細胞に分化する<sup>3</sup>ことが知られている。そのため、ヒト M-CSF およびヒト RANKL 存在下で EBV 感染 hNOG マウスの骨髄細胞を培養し、培養細胞に対して TRAP 染色を行

い、破骨細胞の存在を確認する。加えて、cathepsin K およびミトコンドリアに対するヒト特異抗体を用いた免疫染色を行い、ヒト破骨細胞の存在を確認し、EBV 感染 hNOG マウスの骨髄にヒト破骨細胞の前駆細胞が存在するかどうか検討を行う。

(4) 抗 IL-6 受容体抗体投与によるびらん性関節炎抑制効果

EBV 感染 hNOG マウスにおいて、対照群にはラット抗ヒトおよびラット抗マウス IL-6 受容体抗体製剤をコントロール群にはラット IgG を投与する。

**[結果]**

- (1) EBV 感染後 8 から 10 週間の時点で解剖を行い、膝関節切片を組織学的に評価した結果、15 頭の EBV 感染 hNOG マウス全例において大腿骨遠位部後面関節辺縁の滑膜起始部にびらん性関節炎が確認された。一方で、10 頭の EBV 非感染 hNOG マウスにおいてはいずれにおいても関節炎は確認されなかった。
- (2) マイクロ 3D-CT 検査の結果、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確認されたが、EBV 非感染マウスでは認められなかった。
- (3) EBV 感染 hNOG マウスの膝関節組織骨びらん部には多核細胞が複数存在し、それらの多核細胞は TRAP 染色で陽性を示し、抗ヒト cathepsin K 抗体を用いた免疫染色に陽性を示した。また、EBV 感染 hNOG マウスの骨髄細胞をヒト M-CSF およびヒト RANKL 存在下で培養して得た培養細胞中には大型の多核細胞が認められ、それらの細胞は TRAP 染色陽性、抗ヒト cathepsin K 抗体および抗ヒトミトコンドリア抗体を用いた免疫染色に陽性を示した。
- (4) 5 頭の対照群マウスも 5 頭のコントロール群マウスも。全例で骨びらんが観察され、抗ヒト IL-6 受容体抗体製剤投与によって骨びらは抑制されなかった。

**[考察]**

- (1) EBV 感染 hNOG マウス における末梢血中の CD8 陽性細胞の上昇は 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など、今後の検討課題となった。
- (2) 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 撮影による画像検査的手法によっても骨びらんの観察および評価が可能であることを示している。
- (3) 膝関節組織の組織化学染色結果から、膝関節骨びらん部局所に存在する多核細胞は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、EBV 感

染 hNOG マウスにおいて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、EBV 感染 hNOG マウスの骨髄細胞培養の結果、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。このことは、ヒト破骨細胞が EBV 感染 hNOG マウスの骨髄細胞から分化誘導されたことを示す。膝関節骨びらん部局所に存在するヒト破骨細胞は、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から分化し、膝関節局所に動員され、骨びらんを形成した可能性が考えられる。

- (4) 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、EBV 感染 hNOG マウスに発症するびらん性関節炎へ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は認められなかった。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<sup>4)</sup>。今回 EBV 感染 hNOG マウスに対して、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。

#### [結論]

今回我々は EBV 感染 hNOG マウスによるびらん性関節炎の証明とびらん性関節炎を骨破骨細胞がヒト由来であることを証明した。このモデルマウスはヒトの破骨細胞でのびらん性関節炎を起こした初めてのモデルで、今後の病態解明、治療薬の開発につながるものと思われた。

#### [参考文献]

- <sup>1)</sup>Kuwana Y, Takei M, Yajima M, et al: Epstein-Barr virus induces erosive arthritis in humanized mice. PLoS One. 2011; 6: e26630.
- <sup>2)</sup>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.
- <sup>3)</sup>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.
- <sup>4)</sup>Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. Ann N Y Acad Sci. 2008; 1143: 123-150.