



Title	Antigen Induced Arthritis (AIA) Can Be Transferred by Bone Marrow Transplantation : Evidence That Interleukin 6 Is Essential for Induction of AIA
Author(s)	小林, 秀之
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44680
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照ください 。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	こ ばやし ひで ゆき 小 林 秀 之
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 18018 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 15 年 4 月 28 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Antigen Induced Arthritis (AIA) Can Be Transferred by Bone Marrow Transplantation: Evidence That Interleukin 6 Is Essential for Induction of AIA (AIA は骨髄移植によりトランスファーできる: IL-6 が AIA の誘導に必須であるという証明)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 川 瀬 一 郎 (副査) 教 授 平 野 俊 夫 教 授 吉 川 秀 樹

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

1. Antigen-induced arthritis (AIA) の発症における骨髄細胞 (BMC) の役割を検討するために、AIA の発症前、発症後各病期における炎症性サイトカイン (THF α 、IL-1 β 及び IL-6) の骨髄での発現を経時的に観察した。
2. 免疫した発症前のマウス (ワイルドタイプ; IL-6+/+ 及び IL-6 ノックアウト; IL-6 $-/-$) より分離した BMC を放射線照射した非免疫マウスに移入し、発症の有無を検討した。

[方法]

1. マウス

M. Kopf 博士より供与された IL-6 ノックアウトマウスを、AIA に感受性を持つ C57BL/6 の系統に 8 世代バッククロスした。また、同週齢のワイルドタイプマウスをコントロールとして用いた。

2. AIA の誘導

2 mg/mL のメチル化 BSA (mBSA) を等量のフロインドの完全アジュバントとエマルジョン化し、尾根部に皮内投与すると共に百日咳菌死菌 (2×10^9 cells/mL) 100 μ L を腹腔内投与した。さらに、7 日後に同じ方法で追加感作を行い、21 日後に麻酔下にて右膝関節腔内に 10 mg/mL の mBSA を 10 μ L 投与して AIA を誘導した。

3. 骨髄におけるサイトカインの免疫組織化学染色

AIA を誘導する前 (初回感作後 21 日) と誘導後 1、3、7、10、21 及び 28 日にマウスを麻酔下にて解剖した。膝関節を固定、脱灰後、パラフィン切片を作製し、ABC 法により骨髄における IL-6、TNF α 及び IL-1 β の免疫組織化学染色を行い、光学顕微鏡下で 500 個の骨髄細胞における、それぞれのサイトカインの陽性細胞率を算出した。

4. 骨髄細胞からの T 細胞 (CD4+)、B 細胞 (CD45R+) の除去方法

骨髄細胞からイムノマグネティック法 (MiniMACS magnetic Separation System, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) により CD4+T cells と CD45+B cells の除去を行った。

5. 骨髄移植

骨髄移植に際しては、追加免疫の14日後に、IL-6+/+及びIL-6-/-の雄性マウス(10-12週齢)をドナーとした。麻酔下にて無菌的に大腿骨と脛骨を採取し、それぞれの骨髄細胞を集めた。そして、致死量に近い9.8 Gyの放射線を照射したIL-6+/+の雌性マウスに、IL-6+/+及びIL-6-/-の雄性マウスの骨髄細胞をそれぞれ静脈内投与により移植した。T細胞(CD4+)、B細胞(CD45R+)を除去した骨髄細胞も同様に移植した。骨髄移植が成功したか否かは、雌のレシピエントマウスにおいて、male-antigenを確認することにより行った。

5. 病理組織学的検査ですが、関節炎の発症は、mBSAを膝関節内に投与した7日後に採取した膝関節の病理組織標本(HE染色)により判定した。病理組織所見のスコアは、Brakertzらの方法に従い0から4に分類し、スコア2以上をarthritisと判定した。

[成績]

1. IL-6は骨髄において、特にAIAの発症直前、関節炎の進行期に強い発現が認められました。一方、TNF α は全病期をとおしてごくわずかな発現しか認められず、IL-1 β はほとんど検出されなかった。
2. 骨髄細胞移入実験では、発症前のワイルドタイプマウスより分離したBMCを移入された放射線照射マウスはすべて典型的なAIAを発症した。しかし、免疫したIL-6ノックアウトマウスからの骨髄を移入された放射線照射マウスでは、有意な関節炎の発症は認められなかった。T細胞(CD4+)を除去した骨髄細胞、あるいはT細胞(CD4+)とB細胞(CD45R+)の両方を除去した骨髄細胞を移植した場合にも関節炎の発症が認められた。

[総括]

本研究により、AIAの発症にはBMCが重要な役割を果たしていること、またIL-6は発症期に必須であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、リウマチの関節炎モデルの一つであるantigen induced arthritis(AIA)の発症における骨髄細胞(BMC)の役割を検討するために、AIAの発症前、発症後各病期における炎症性サイトカイン(TNF α 、IL-1 β 及びIL-6)の骨髄での発現を経時的に観察した。また、免疫したAIAの発症前のマウス(ワイルドタイプ; IL-6+/+及びIL-6ノックアウト; IL-6-/-)より分離したBMCを放射線照射した非免疫マウスに移入し、AIAの発症の有無を検討した。

IL-6ノックアウトマウスは、AIAに感受性を持つC57BL/6の系統に8世代バッククロスした。AIAの誘導は、Brackertzらの方法に従った。骨髄におけるサイトカインの発現は、免疫組織化学的に検討した。骨髄移植に際しては、追加免疫の14日後に、IL-6+/+及びIL-6-/-の雄性マウスをドナーとした。そして、致死量に近い9.8 Gyの放射線を照射したIL-6+/+の雌性マウスに、IL-6+/+及びIL-6-/-の雄性マウスのBMCを静脈内投与により移植した。一部のT細胞(CD4+)とB細胞(CD45R+)を除去したBMCも同様に移植した。骨髄移植が成功したか否かは、雌のレシピエントマウスにおいて、male-antigenを確認することにより行った。関節炎発症についての病理組織学的検査は、mBSAを膝関節内に投与した7日後に採取した膝関節組織標本をもとに、Brackertzらの方法に従って判定した。

その結果、IL-6は骨髄において、特にAIAの発症直前、関節炎の進行期に強い発現が認められた。一方、TNF α は全病期をとおしてごくわずかな発現しか認められず、IL-1 β はほとんど認められなかった。また、骨髄細胞移入実験では、AIA発症前のワイルドタイプマウスより分離した骨髄細胞を移入された放射線照射マウスはすべて典型的なAIAを発症することが明らかになった。一部のT細胞(CD4+)とB細胞(CD45R+)のを除去した骨髄細胞を移入した場合にも関節炎の発症は若干弱くなったが認められた。しかし、免疫したIL-6ノックアウトマウスからの骨髄を移入された放射線照射マウスでは、有意な関節炎の発症は認められなかった。

以上より、AIAの骨髄移植においては、わずかに残存したT細胞による抗原特異的なmemory transferに加えて、IL-6産生細胞による強力な炎症惹起機構の両者が重要な役割を果たしていると考えられる。

本研究は、学位に値するものと考ええる。