Interleukin 12 によるマウスコラーゲン 誘導関節炎の抑制

山崎純子・笠間 毅・三輪裕介・羽入田芳生・波多野好美^{*1)},
小林和夫^{*2)}, 根岸雅夫・井出宏嗣・足立 満^{*1)}

The suppression of murine type II collagen-induced arthritis by interleukin 12

In the present study, we examined the effect of interleukin 12(IL-12) on the evolution of murine type II collagen-induced arthritis(CIA). CIA mice injected intraperitoneally with IL-12 (500 ng/mouse/d) demonstrated delayed onset and reduced severity of arthritis. Although IL-12 administration augmented lymphocyte proliferation and interferon- γ production against specific and non-specific stimulation, anti-collagen antibody production was significantly suppressed in CIA, as compared with control mice. Since IL-12 induced the production of serum tumor necrosis factor(TNF)- α and corticosterone, the suppression of CIA by IL-12 may, in part, depend upon the augmentation of serum corticosterone, induced by endogenous TNF- α .

These data suggest that IL-12 is an important immunomodulator of the pathogenesis of CIA, which acts by regulating not only the humoral and cellular immune responses, but also the expression of immunoregulatory mediators.

Rec. 4/10/1997, Acc. 5/1/1997, pp 549~555

*Jyunko Yamazaki • Tsuyoshi Kasama • Yusuke Miwa •
Michio Hanyuuda • Yoshimi Hatano^{*1)}, Kazuo Kobayashi^{*2)},
Masao Negishi • Hirotsugu Ide • Mitsuru Adachi^{*1)}*

key words : IL-12, collagen-induced arthritis, corticosterone, TNF- α , inflammation

慢性関節リウマチ(RA)は関節の炎症性病変, すなわち関節滑膜の増殖, 軟骨, 骨の破壊性病変を中心とした全身性慢性炎症性疾患であるが, 原因ならびにその根本的治療に関してはさまざまなアプローチにもかかわらず現在までも不明である¹⁾. マウスあるいはラットにII型コラーゲンをアジュバントとともに免疫することにより, ヒトのRAに類似の関節病変が誘導されることが1980年前後に報告されて以来, このモデル動物(コラーゲン誘導関節炎:CIA)を用いた関節炎発

症の研究がさまざまな方面より行われている^{2,3)}. この関節炎は第一にコラーゲンに対する細胞性および液性免疫反応により進行し, その病変形成にはさまざまな因子の関与が報告されている. その一つとしてサイトカインの関与もヒトのRA同様に考えられている.

Proinflammatory cytokinesであるinterleukin(IL)-1, TNF- α , あるいはIL-6などは関節炎の発症およびその経過に対して正の方向に作用し, IL-1 receptor antagonist(IL-1 ra), 可溶性TNF receptorなどは負, すなわち関節炎を抑制する方向に働くと考えられている. さらに, 筆者らは最近マクロファージおよび好中球に対するchemokineであるそれぞれmacrophage inflammatory protein(MIP)-1 α , MIP-2がマウスCIAの発症および経過に対してともに重要であ

^{*1)} The First Department of Internal Medicine, Showa University School of Medicine 昭和大学医学部第一内科学教室

^{*2)} National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 国立感染症研究所ハンセン病研究センター
Offprint requests to : Tsuyoshi Kasama, The First Department of Internal Medicine, Showa University School of Medicine, 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142, Japan

表 1 Effect of IL-12 on the % incidence and mean arthritis index of arthritis in mice with developing CIA

Days after collagen challenge	% incidence		Mean arthritis index	
	PBS vehicle	IL-12	PBS vehicle	IL-12
24	0	0	0	0
28	8.3	0	0.1	0
32	33.3	0	0.6	0
36	41.7	8.3	1.5	0.1
40	50.0	8.3	1.9	0.2
44	58.3	25.0	2.2	0.2
48	75.0	41.7	2.5	0.7
52	83.3	50.0	2.9	1.5
56	83.3	50.0	3.0	2.5
60	83.3	66.7	3.1	2.5

IL-12 or PBS vehicle were administered ip daily on days 24-33 after primary immunization. Data represent a total of twelve mice per time points. The determination of the onset and severity of the joint inflammation were done every four days from time of initial collagen challenge. The arthritis incidence differed significantly between the control group and those given 500 ng of IL-12 on days 32 to 44 ($p < 0.05$). The severity of arthritis differed significantly between the control group and those given 500 ng of IL-12 on days 32 to 44 ($p < 0.05$).

り、また Th2 サイトカインである IL-10 が CIA 発症に対する *in vivo* における抑制因子であることを報告した⁴⁾。このように、CIA の発症およびその経過において複雑なサイトカイン-ネットワークが形成されていることが推測されている。

NK 細胞に対する活性化因子として分離、クローニングされた IL-12 はマクロファージなどの抗原提示細胞より産生され、NK 細胞のみならず T 細胞に作用しその増殖および活性化に関与している^{5,6)}。さらに IL-12 は T 細胞から interferon (IFN)- γ を誘導し Th1 優位の反応を起こし、各種感染症に対して防御的に働き、また *in vivo* での抗腫瘍作用も確認されている^{5,6)}。また、ある種の自己免疫疾患の実験モデル、すなわちインスリン依存性糖尿病(NIDDM)のモデル動物である NOD マウス、あるいはマウスの実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)では IL-12 の投与によりその発病を早めることが報告されている^{7,8)}。このように IL-12 は、生体内においてさまざまな反応あるいは病態に関与していると考えられている。筆者らは RA の実験モデルであるマウス CIA における IL-12 の役割、すなわち IL-12 の投与がそ

の経過にどのような影響を与えるかを検討するため以下の実験を行った。

材料と方法

(1) 関節炎(CIA)の発症およびその評価

CIA は 8～10 週齢の雌の DBA/1 J mice (Jackson Lab., USA) に 100 μ g の Chicken II 型コラーゲン (Sigma chemical) と CFA (Difco Lab.)、および 21 日後に IFA (Difco Lab.) とともにマウス背部に免疫することにより発症させた⁴⁾。関節炎の発症(% incidence)は肉眼的に二つ以上の関節の腫脹、発赤をもって発症とした。関節炎の程度は関節の腫脹、発赤および変形などをもとにしておのおのの四肢あたり 0～3 点、すなわちマウスあたり最大 12 点のスコアの平均(mean arthritis index)としてあらわした⁴⁾。

(2) IL-12 の投与方法

マウス recombinant IL-12 (比活性; 4.6×10^6 units/mg protein) は Stanley F. Wolf 博士 (Genetics Institute, Inc., Cambridge, MA) より供与されたものを使用した。未処理 DBA/1 J マウス血清(1%)を混和した PBS 溶液(PBS vehi-

表 2 Effect of IL-12 on levels of anti-collagen antibody titer and lymphocyte proliferation

Treatments	Anti-collagen antibody	Lymphocyte proliferation		
		(-)	ConA	Collagen
PBS vehicle	123.8±14.0	247.0±24.0	9239.0±420.0	1271.0±354.0
IL-12 (500 ng/mouse)	55.5±8.9*	23361.3±495.7*	315286.3±20271.5*	31188.3±965.2*

IL-12 or PBS vehicle were administered ip daily on days 24-33, and scarified at day 36 after primary immunization. Data represent a total of six mice. Levels of anti-collagen (IgG) antibodies were expressed as the mean U/ml±SEM. Spleen cells (2×10^5 cells/well) were incubated with medium alone or ConA ($5 \mu\text{g/ml}$), or type II collagen ($10 \mu\text{g/ml}$) for 3 days, and [^3H] thymidine incorporation was measured. The data were expressed as the mean cpm±SEM. Levels of anti-collagen antibodies differed significantly between the groups of PBS vehicle IL-12-treated mice (* $p < 0.05$). Splenocyte proliferations differed significantly between the groups of PBS vehicle and IL-12-treated mice (* $p < 0.05$).

cle)に溶解した IL-12 (500 ng/0.5 ml/mouse),あるいはコントロール群として PBS vehicle のみを初回免疫後 24 日から 33 日まで CIA および正常マウスに連日腹腔内投与した。

(3) 血清抗コラーゲン抗体および脾細胞増殖反応の測定

抗コラーゲン IgG 抗体は ELISA 法にて測定した。ELISA プレート各 well を $50 \mu\text{l}$ の Chicken II 型コラーゲン ($20 \mu\text{g/ml}$) にてコーティングした後マウス希釈血清 ($100 \mu\text{l/well}$) を添加, インキュベーション後, $50 \mu\text{l/well}$ の peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG を加え洗浄, さらに発色原を添加し 490 nm にて吸光度を測定し, 同時に測定したマウス抗 II 型コラーゲン血清 (100 U/ml と規定) より抗コラーゲン抗体価を算出した。

脾細胞増殖反応は, マウス脾細胞における [^3H] thymidine の取り込みにより測定した。マウス脾細胞を 1×10^6 cells/ml (RPMI 1640/10% FBS) となるように, 96-well (増殖反応) プレートおよび 24-well (サイトカイン測定) プレートに浮遊させ, Con A ($5 \mu\text{g/ml}$) および II 型コラーゲン ($10 \mu\text{g/ml}$) にて刺激, 72 時間後に液体シンチレーションカウンターを用いて [^3H] thymidine (比活性: 5 Ci/mmol , Amersham) の取り込みを測定した。またサイトカイン測定のため上清を分離, 保存した。

(4) サイトカインおよび血清コルチコステロン測定

IFN- γ , TNF- α , およびコルチコステロン濃度の測定は市販の測定キット (IFN- γ ; Endogen, TNF- α ; PerSeptive Diagnostics, コルチコステロン; ICN Biomedicals) にて測定した。検出感度はそれぞれ 15 pg/ml , 4.3 pg/ml , 12.5 ng/ml であった。

(5) 統計処理

CIA の発症率 (% incidence), および重症度 (mean arthritis index) の検定はそれぞれ χ^2 test, および Mann-Whitney U test を用いて行った。また, その他の検定には Student's t-test を用いて行い, $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

(1) CIA の発症率および重症度に及ぼす IL-12 の影響

CIA は, コントロール群 (溶媒投与群) では初回免疫後 28 日頃より発症しはじめ, 52 日頃にピーク (83.3% : % incidence) となった。一方, IL-12 投与群では 36 日頃よりわずかに関節炎が認められはじめたが, その発症のピークは 60 日後と遅く, また発症率も 66.7% と低かった (表 1)。関節炎の肉眼的重症度 (mean arthritis index) は, IL-12 投与群ではコントロール群に比し第 32 日から 44 日において有意差をもって抑制された (表 1)。また, 正常 DBA/1J マウスでは, IL-12 投与によっ

図 1 Effect of IL-12 on IFN- γ production by splenocytes

Mice (n=6) were injected with IL-12 (500 ng/mouse) or PBS vehicle, as described. On day 36 after immunization, mice were sacrificed, and spleen cells (1×10^6 cells/ml) were incubated with medium alone (-) or Con A ($5 \mu\text{g/ml}$), or type II collagen ($10 \mu\text{g/ml}$) for 3 days, and supernatants were collected. Samples were assessed for IFN- γ levels using ELISA.

Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Levels of IFN- γ differed significantly between the groups of PBS vehicle and IL-12-treated mice (* $p < 0.05$).

図 2 Effect of IL-12 on serum corticosterone levels

Mice (n=6) were injected with IL-12 (500 ng/mouse) or PBS vehicle, as described. On day 36 after immunization, mice were sacrificed, and serum was collected. Samples were assessed for corticosterone levels using ELISA.

Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Levels of corticosterone differed significantly between the control group and the group treated with 500 ng of IL-12 (* $p < 0.05$).

でも関節炎を含めた異常は認められなかった (data not shown).

(2) 液性免疫および細胞性免疫に及ぼす IL-12 の影響

CIA の発症には、コラーゲンに対する T 細胞および B 細胞の反応が重要な役割を担っていると考えられている^{3,9,10}。そこで筆者らは、これらの反応が IL-12 投与によりどのように制御されるかを検討した。初回免疫後第 36 日後に血清および脾細胞を分離し、血清抗コラーゲン IgG 抗体価および脾細胞の特異的および非特異的刺激による増殖反応を検討した。表 2 に示すとおり抗コラーゲン IgG 抗体価は、IL-12 処理群ではコントロール群 (123.8 U/ml) に比し 55.5 U/ml と有意な低下を認めた。また脾細胞の増殖反応は無刺激、ConA および type II コラーゲンのいずれにおいても反応の高度な亢進を認めた。

IL-12 (500 ng/mouse/d) の投与によって CIA の発症率および重症度は抑制されたが、サイトカイン産生に対する影響を検討する目的で脾細胞由来 IFN- γ を測定した (図 1)。脾細胞の増殖反応と同様に IL-12 を投与されたマウスの脾細胞は無刺激、ConA および type II コラーゲンのいずれの刺激においてもコントロール群に比し著しい IFN- γ 産生の増加を認めた。

(3) 血清コルチコステロンおよび TNF- α 産生に及ぼす IL-12 の影響

IFN- γ は CIA に対して主に正の方向、すなわち発症において必要な因子と考えられており^{11,12}、またリンパ球の反応亢進、すなわち Th 1 優位の反応系も CIA に対して正の方向に働くと考えられている³。筆者らの結果では、IL-12 投与による *in vitro* の反応系の結果は主に CIA の経過を増悪させるような方向となったが、実際の *in vivo* の結果はその反対であり、CIA の関節炎症は IL-12 投与により軽快した。このような相矛盾す

図3 Effect of IL-12 on serum TNF- α levels

Mice (n=6) were injected with IL-12 (500 ng/mouse) or PBS vehicle, as described. On day 36 after immunization, mice were sacrificed, and serum was collected. Samples were assessed for TNF- α levels using ELISA.

Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

る結果を得たため、筆者らは IL-12 投与によりマウス生体内に CIA の関節炎症を抑制するような因子が誘導されたのではないかと考え、血清中の副腎皮質ホルモンであるコルチコステロンを測定した(図2)。図2に示すとおり血清コルチコステロンは IL-12 投与によりコントロール群(88.4 ng/ml)に比し 212.2 ng/ml と有意に誘導された。以上の結果より、IL-12 投与による CIA 炎症の抑制はその一部として抗コラーゲン抗体産生抑制のほかに新しく誘導されたコルチコステロンによるのではないかと考えられた。

つぎに IL-12 によるコルチコステロンの誘導の機序を検討した。コルチコステロン、すなわち副腎皮質ホルモンの *in vivo* における誘導に関しては、さまざまな経路が存在していると考えられている。その一つの可能性として TNF- α の産生を検討した。血清 TNF- α は図3に示すとおりコントロール群(102.7 pg/ml)に対し IL-12 投与群では統計学的に有意差は認めなかったが 154.9 pg/ml と増加しており、この TNF- α の増加によりコルチコステロンが誘導されたのではないかと考えられた。

以上の結果より、IL-12 の投与は生体内に液性

免疫系および細胞性免疫系反応、IFN- γ および TNF- α などのサイトカイン、さらにはコルチコステロンなどの炎症調節因子の発現を惹起して複雑に CIA の炎症を制御していると考えられた。

考 察

IL-12 は *in vitro*, *in vivo* とともにさまざまな作用を示し、炎症および免疫反応を種々の方向より調節していると考えられている。筆者らは RA の実験モデルである CIA の関節炎の発症、およびその経過が IL-12 の投与により抑制されることを示した。この抑制は抗コラーゲン抗体産生抑制のほかにその一部として TNF- α を介して誘導されたコルチコステロンによると考えられた。

今回の筆者らの実験結果では、IL-12 の投与によりコントロール群に比し II 型コラーゲンに対する IgG 抗体の産生抑制が認められた(表2)。この結果は、Hess らの IL-12 の CIA への投与実験¹³⁾の結果と同様であった。すなわち Hess らはこの報告において、今回の筆者らと同様な結果、すなわち CIA の関節炎の発症およびその経過が IL-12 の投与により抑制されることを報告しており、その機序としてこの抗コラーゲン IgG 抗体の産生抑制が重要であると結論している。

一方、今回の報告において、筆者らは他の要因である IFN- γ 、および細胞性免疫の関連する脾細胞の特異的(コラーゲン)、および非特異的(ConA)刺激に対する反応性亢進を認めた(表2)。このコラーゲンに対する細胞性免疫、すなわち T 細胞系の役割については以前よりその重要性が報告されており、CIA を発症しているラットの脾およびリンパ節細胞を同系 rat (Wister/Lewis rat) に移入することにより関節炎を発症させること¹⁴⁾、また CIA マウスへの IFN- γ の投与により関節炎が増悪することなどが報告されている^{11,12)}。

以上のように、コラーゲンに対する細胞性免疫の反応性亢進は CIA における関節炎発症の正の因子と考えられるが、筆者らの実験結果では IL-12 の投与により細胞性免疫の反応性は亢進したが実際の関節炎は抑制された(表1, 2)。そこで筆

者らはコラーゲンに対する IgG 抗体の産生抑制のほか、他の抑制因子の関与の存在を推測した。副腎皮質ホルモンは生体内に存在する強力な免疫、ならびに炎症抑制作用をもつ物質であるが、筆者らはマウスの副腎皮質ホルモンである内因性コルチコステロンが IL-12 により誘導され関節炎を抑制したのではないかと考えた。図 2 に示すように、血清コルチコステロンは IL-12 投与マウスにおいてコントロール群に比し有意に増加していた。

Orange らは実験的に作成したウイルス (LCM virus) 感染マウスに IL-12 を投与したところ、血清 TNF- α および血清コルチコステロンレベルの著しい増加を認めたが、このコルチコステロンの増加は抗 TNF 中和抗体の併用投与により解除されるため、IL-12 により誘導された TNF を介しての作用と考えられた¹⁵⁾。サイトカインと下垂体-副腎皮質系のループについては以前よりさまざまな研究がなされており、特に TNF を介する機序についてもその可能性は示唆されている¹⁶⁾。筆者らの実験結果においても抗 TNF 中和抗体投与による検討は行わなかったが、Orange らの結果と同様な機序、すなわち内因性 TNF- α を介して血清コルチコステロンが誘導され、抗コラーゲン抗体の産生抑制との相乗効果として CIA の発症、およびその程度が抑制されたのではないかと考えられた。

IL-12 の *in vitro*, *in vivo* における役割についてはさまざまな方向から検討が進められており、その多種多様な活性、特に抗腫瘍および抗微生物効果については現在ヒトおよびマウスを中心に研究が進められている。また最近、DBA/1 マウスに作成された IL-12 の knock out マウスでは CIA の関節炎症が抑制されることが報告された¹⁷⁾。したがって今回筆者らが示した実験結果などをあわせると、IL-12 が生体内において炎症性および抗炎症性生理活性物質を機能的に誘導して炎症、あるいは免疫反応を制御している可能性が示唆された。さらに炎症性疾患、特にヒト RA を中心とした関節炎症の病因解明およびその治療戦略上においても、IL-12 の位置づけのさらなる検討が必要

と考えられる。

なお、本研究の一部は、財団法人上原記念生命科学財団からの研究助成費により行った。またマウス recombinant IL-12 を供与していただいた Genetics Institute 社に深謝いたします。

文 献

- 1) Harris ED Jr: Rheumatoid arthritis: Pathophysiology and implications for therapy. *N. Engl. J. Med.* 322: 1277-1289, 1990.
- 2) Stuart JM, Townes AS, Kang AH: Collagen autoimmune arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* 2: 199-218, 1984.
- 3) Holmdahl R, Andersson M, Goldschmidt TJ, Gustafsson K, Jansson L, Mo JA: Type II collagen autoimmunity in animals and provocations leading to arthritis. *Immunol. Rev.* 118: 193-232, 1990.
- 4) Kasama T, Strieter RM, Lukacs NW, Lincoln PM, Burdick MD, Kunkel SL: Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis. *J. Clin. Invest.* 95: 2868-2876, 1995.
- 5) Trinchieri G: Interleukin-12: A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 251-276, 1995.
- 6) Hendrzak JA, Brunda MJ: Interleukin-12: Biologic activity, therapeutic utility, and role in disease. *Lab. Invest.* 72: 619-637, 1995.
- 7) Trembleau S, Penna G, Bosi E, Mortara A, Gately MK, Adorini L: Interleukin 12 administration induces T helper type 1 cells and accelerates autoimmune diabetes in NOD mice. *J. Exp. Med.* 181: 817-821, 1995.
- 8) Leonard JP, Waldburger KE, Goldman SJ: Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12. *J. Exp. Med.* 181: 381-386, 1995.
- 9) Holmdahl R, Mo J, Nordling C, Larsson P, Jansson L, Goldschmidt T, Andersson M, Klareskog L: Collagen induced arthritis: An experimental model for rheumatoid arthritis with involvement of both DTH and immune complex mediated mechanisms. *Clin. Exp. Rheumatol.* 7: 51-55, 1989.
- 10) Stuart JM, Dixon FJ: Serum transfer of collagen-induced arthritis in mice. *J. Exp. Med.* 158: 378-392, 1983.
- 11) Nakajima H, Takamori H, Hiyama Y, Tsukada W: The effect of treatment with interferon-gamma on type II collagen-induced arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 81: 441-445, 1990.
- 12) Boissier M-C, Chiochia G, Bessis N, Hajnal J, Garotta G, Nicoletti F, Fournier C: Biphasic effect of interferon- γ in murine collagen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.* 25: 1184-1190, 1995.

- 13) Hess H, Gately MK, Rude E, Schmitt E, Szeliga J, Germann T : High doses of interleukin-12 inhibit the development of joint disease in DBA/1 mice immunized with type II collagen in complete Freund's adjuvant. *Eur. J. Immunol.* 26 : 187-191, 1996.
- 14) Trentham DE, Dynesius RA, David JR : Passive transfer by cells of type II collagen-induced arthritis in rat. *J. Clin. Invest.* 62 : 359-366, 1978.
- 15) Orange JS, Salazar-Mather TP, Opal SM, Spencer RL, Miller AH, McEwen BS, Biron CA : Mechanism of interleukin 12-mediated toxicities during experimental viral infections : Role of tumor necrosis factor and glucocorticoids. *J. Exp. Med.* 181 : 901-914, 1995.
- 16) Sharp BM, Matta SG, Peterson PK, Newton R, Chao C, Mcallen K : Tumor necrosis factor- α is a potent ACTH secretagogue : Coparison to interleukin-1 β . *Endocrinology* 124 : 3131-3133, 1989.
- 17) McIntyre KW, Shuster DJ, Gillooly KM, Warrior RR, Connaughton SE, Hall LB, Arp LH, Gately MK, Magram J : Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in interleukin-12-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 26 : 2933-2938, 1996.