
学位論文

関節炎モデルマウスを用いた RANKL 刺激樹状細胞移入による免疫抑制機能の解析

大嶋 淳

キーワード：自己免疫疾患，関節リウマチ，樹状細胞，MRL/lpr マウス，DBA/1J マウス，オステオimmunロジー

Immunosuppressive Function of Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL)-stimulated Dendritic Cells (DCs) for Autoimmune Lesions in Arthritis Models

Jun OSHIMA

Abstract: The pathogenic mechanism of rheumatoid arthritis (RA) is unclear. Many immune cells including T, B cells, and dendritic cells (DCs), or osteoclasts play crucial roles in the development of RA through complex crosstalk between immune and skeletal systems. In this study, the immunoregulatory effect of receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)-activated dendritic cells on autoimmune arthritis was analyzed using arthritis models such as MRL/lpr and DBA/1J mice. Three times repeated transfer of RANKL and collagen II-stimulated bone marrow DCs into arthritis models resulted in the regulation of RA via the suppression of T helper function including cell proliferation and Th1 cytokine production. Moreover, the apoptosis of peripheral T cells was increased by the direct interaction of RANKL-activated DCs. These results indicate that activated DCs might play pivotal roles in the pathogenesis of RA through the RANKL-mediated pathway.

緒 言

自己免疫疾患とは、本来は細菌・ウイルスや腫瘍などの自己と異なる成分を認識し排除するための免疫系が、自己自身の正常な細胞や組織に対してまで反応し攻撃を加えることで発症する疾患の総称で、現在、全体で約80種類以上にものぼるとされ、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus : SLE と略) や関節リウマチ (rheumatoid arthritis : RA と略) に代表される全身性 (系統的) 自己免疫疾患と橋本甲状腺炎、シェーグレン症候群に代表される臓器特異的自己免疫疾患の2つに大別されている¹⁾。

RA は多発性関節炎を主症状とする原因不明の難治性

疾患であり、30-50歳代の女性に好発することが知られている^{2,3)}。RA の病態は関節滑膜に初発し、進行するとともに軟骨、骨への侵襲、関節組織の破壊および変形を引き起こす。また、RA 患者の約60%に顎関節症状を伴い、病変が進行すると、関節軟骨の破壊により咬合異常や顎関節強直症を引き起こすことが知られている^{4,5)}。RA 滑膜組織における病理組織学的特徴として、血管増生、リンパ球浸潤、滑膜増殖などがあげられ、これらの病変が進行するとパンヌスと呼ばれる病変が形成される。パンヌスは、炎症性細胞浸潤、線維芽細胞、豊富な小血管などから構成される肉芽組織であり、これらが軟骨・骨に進入し、様々な炎症性サイトカインを産生する

ことによって、関節組織破壊を起こすことが報告されている⁶⁻⁹⁾。

近年、ある種の免疫担当細胞が破骨細胞分化因子 [receptor activator of NF- κ B (κ B) ligand : RANKL] とその受容体 (receptor activator of NF- κ B : RANK) および“おとり”受容体である破骨細胞形成抑制因子 [osteoclast inhibitory factor (ODF) / osteoprotegerin (OPG)] を介して、骨代謝の調節に大きな影響を及ぼすことが明らかにされ、RA における骨病変の発症機序を解明するうえで注目されている¹⁰⁻¹⁵⁾。RA 患者および関節炎疾患モデルマウスの関節病変において RANKL を高発現している活性化 T リンパ球が破骨細胞前駆細胞に直接作用し、破骨細胞の分化を促進していることが報告されている^{16, 17)}。また、RA の滑膜線維芽細胞も RANKL を介して破骨細胞を誘導することが示され、RANKL/RANK シグナルが RA における骨破壊に重要であることが明らかにされている^{18, 19)}。T 細胞上に発現する樹状細胞活性化因子として既に報告されていた TRANCE (Tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine) と RANKL は、同一の分子であることが明らかとなり、RANKL は樹状細胞 (dendritic cell : DC) の分化誘導にも深く関わっていることが示されている^{20, 21)}。

DC は、抗原提示細胞 (antigen presenting cells : APC) の中でも特に抗原提示の中樞を成し、免疫反応の増強、制御に重要な役割を担っており、DC は多くのサイトカインや細菌成分などによって様々な過程を経て分化、成熟する事が知られている^{22, 23)}。DC の分化、成熟過程において細胞表面上に、主要組織適合抗原複合体 (major histocompatibility complex : MHC)、共刺激分子の B7ファミリーに属する CD80 (B7-1)、CD86 (B7-2)、細胞接着分子などを強発現し、強力な APC となり各種の抗原を処理したうえで提示し、末梢 T 細胞を活性化しうる状態となる^{22, 23)}。

RA の疾患モデル動物としては、自然発症型である MRL/lpr マウス、BXSb マウス、SKG マウス、免疫誘導型として DBA/1J マウスを用いたコラーゲン誘導性関節炎 (collagen induced arthritis : CIA)、およびアジュバント関節炎などがあり²⁴⁻²⁷⁾、MRL/lpr マウスは lpr (lymphoproliferation) という遺伝子名で示されるように異常 T 細胞の増殖による全身のリンパ節腫脹と脾腫、多発性関節炎、糸球体腎炎、動脈炎など多発性自己免疫病変の出現を特徴とし²⁸⁾、原因遺伝子 lpr は細胞死のシグナルを伝達する Fas 遺伝子をコードする遺伝子に変異していることが明らかにされている²⁹⁾。膝関節においては生後 3-4 ヶ月頃より滑膜への単核細胞浸潤、滑膜の肥厚などが出現し、5-6 ヶ月になると軟骨・骨破壊を伴いリウマチ様関節炎はピークを迎える。血清中には多彩な自己抗体の出現が認められ、約半数は 7-8 ヶ月で重篤な免疫複合型糸球体腎炎 (ループス腎炎) を発症して死に至る³⁰⁾。この MRL/lpr マウスは RA, SLE の他、シェー

グレン症候群、血管炎などの自己免疫疾患の自然発症モデルとして用いられている³¹⁻³³⁾。また、免疫誘導型である DBA/1J マウスは、RA 患者の血清や関節液中にコラーゲン、特に関節軟骨に豊富に存在する II 型コラーゲンに対する抗体が検出されることに基づき、Courtenay らが II 型コラーゲンにて 2 回感作することによりヒト RA に類似した多発性関節炎を発症することを見出した実験動物モデルであり³⁴⁾、現在 RA 病態や病因の解析に広く用いられている。

本研究では、RANKL 刺激を介した DC の活性化と RA 病変との関係を解析するために、自然発症型 RA モデル MRL/lpr マウスおよび免疫誘導型である DBA/1J マウスを用い、RA 病態における RANKL を介した DC の活性化と T 細胞機能との関係を明らかにし、RA の病態の発症機序における DC の免疫調節的役割を検討した。

実験材料と実験方法

1. 実験動物

MRL/Mpj-lpr/lpr (MRL/lpr と略) マウス、MRL/Mpj-+/+ (MRL+/+ と略) マウス、DBA/1JNCrlj (DBA/1J と略) マウスは日本チャールズリバーより購入し、放射線滅菌飼料 CL-2 (日本クレア、東京)、滅菌水を常時与え、SPF (Specific pathogen-free) 下で飼育した。

2. コラーゲン関節炎誘導法

凍結乾燥ウシ関節由来 II 型コラーゲン (コラーゲン技術研修会、東京) を 0.02 M Tris-0.15 M NaCl (pH 8.0) 緩衝液にて 4 mg/ml の濃度で 4 °C、24 時間反応させ溶解した。完全アジュバント (Freund's complete adjuvant : FCA) (Difco, Detroit, MI, USA) を等量加え油中水型エマルションを作製し、生後 7 週齢雌 DBA/1J マウスを用い尾根部皮下に、0.1 ml (200 μ g) 初回感作を行った。初回感作後 21 日目に不完全アジュバント (Freund's incomplete adjuvant : FIA) (Difco) を用い同様の手法で追加免疫し、その後、手指の腫脹を Wood の方法³⁵⁾ に準じ以下に示すスコアを四肢で合計し手指腫脹スコアとした。

スコア 0 : 症状を認めない。

スコア 1 : 四肢の指など小関節が 1 本のみ発赤腫脹。

スコア 2 : 小関節 2 本以上、あるいは手首や足首などの比較的大きな関節が発赤腫脹。

スコア 3 : 1 本の手や足全体が発赤腫脹。

スコア 4 : 1 本の手や足の全体的な腫脹が最大限に達している。

3. マウス樹状細胞誘導法

マウス大腿骨骨髓腔から骨髓細胞を採取し、洗浄後、10% (容量/容量; 以下 V/V と略) 胎児ウシ血清 (fetal calf serum : FCS) 含有の RPMI1640 培地 (日本水産、東京) にて 1×10^6 /ウエルの細胞密度になるように調製

し、24穴プラスチックプレート (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) に全量 2 ml にて播種した。1 ng/ml のマウスリコンビナント interleukin-4 (IL-4) (和光純薬, 大阪) および 10 ng/ml のマウスリコンビナント granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) (PeproTech, London, UK) を添加し、37°C にて 7 日間培養後、骨髓由来樹状細胞 (bone marrow dendritic cell: BMDC) を得た。さらに DC 成熟化のために 100 ng/ml のマウスリコンビナント RANKL (PeproTech) および 50 µg/ml の II 型コラーゲン (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) を添加後、72 時間の培養により、活性化樹状細胞へと誘導した。DC の活性化状態は、フローサイトメトリー (Fluorescence Activated Cell Sorting: 以下 FACS と略 後述) にて解析を行い、各実験に用いた。

4. 移入方法

1) MRL/lpr

生後 6 週齢 雌 MRL/lpr マウスを用い単径部皮下に 1 匹あたり 1×10^6 個/100 µl の MRL/lpr マウス BMDC を 2 日おきに繰り返し 3 回移入した。

2) DBA/1J

生後 7 週齢 雌 DBA/1J マウスを用い II 型コラーゲン追加免疫の 2 日, 4 日, 6 日前に単径部皮下に 1 匹あたり 1×10^6 個/100 µl の DBA/1J マウス BMDC を繰り返し 3 回移入した。

5. 実験群

MRL/lpr マウス生後 6 週齢において RANKL および II 型コラーゲンにて刺激した DC を 3 回移入したマウス (以下 MRL/lpr RANKL/C II DC 3 回移入群と略) ($n = 48$), 無刺激の DC を 3 回移入したマウス (以下 MRL/lpr 無刺激 DC 3 回移入群と略) ($n = 37$), および対照群として無処置マウス (以下 MRL/lpr 無処置群と略) ($n = 48$) を用いて DC 移入後 8 週・12 週において種々の解析を行った。

DBA/1J マウス生後 7 週齢において RANKL および II 型コラーゲン刺激した DC を 3 回移入したマウス (以下 DBA/1J RANKL/C II DC 3 回移入群と略) ($n = 8$), II 型コラーゲンにて刺激した DC を 3 回移入したマウス (以下 DBA/1J C II DC 3 回移入群) ($n = 4$), RANKL 刺激した DC を 3 回移入したマウス (以下 DBA/1J RANKL DC 3 回移入群) ($n = 7$), および無処置マウス (以下 CIA 群と略) ($n = 8$) を用いて最終 DC 移入後 6 日目において解析を行った。

6. 移入 DC の分布状況

移入 DC の分布状況を明らかにするため、RANKL および II 型コラーゲンにて 72 時間刺激した DC を 5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate (以下 CFSE と略) (Molecular Probes, Eugene, Oregon) にて標識し、MRL +/+ マウス

尾根部皮下に 1×10^6 個/100 µl の細胞数で 2 日おきに 3 回移入し、移入後 2 日目に単径部リンパ節、脾臓、その他全身のリンパ節、胸腺を採取し、各臓器における DC の分布を FACS にて確認した。

7. 病理組織学的検討

各群マウスを経時的に屠殺し、全身各臓器を採取した。軟組織は 10% 中性ホルマリン液にて固定した。膝関節は 4% パラホルムアルデヒド (Merck Schardt, München, Germany), 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 4°C にて 72 時間固定した。その後、エタノールにて脱水し、クロロホルムにて脱脂を行い、再び加水した後、20% エチレンジアミン四酢酸 (pH 7.4: 片山科学, 大阪) 中で 4°C にて 2 週間脱灰した。エタノールにて脱水、軟パラフィン包埋後、4 µm の組織切片を作製しヘマトキシリン・エオジン染色 (以下 HE 染色と略) を施した。関節病変の組織学的評価は Edwards 等の分類³⁶⁾ に準じ、以下に示す所見を各 1 ポイントとし、その合計ポイントを関節炎スコアとした。

- ・関節滑膜の過形成および滑膜の増殖
- ・関節の線維化
- ・関節軟骨および骨の増生
- ・関節軟骨および関節骨破壊
- ・リンパ球浸潤

8. フローサイトメトリー (FACS) 解析

各群マウスを屠殺後、直ちに脾臓および単径部リンパ節を摘出し、2% (V/V) FCS 含有 PBS 中でホモジナイズし、トリス塩化アンモニウム溶液 (Tris-HCl, pH 8.0 および 0.83% 塩化アンモニウム 1:9 混合溶液) 処理により溶血させ、洗浄後 1×10^6 個に調節した。また、培養した樹状細胞は回収後、 5×10^5 個に調節し、以下に示す各種抗体と反応させた後に、細胞自動解析装置 (EPICS, Coulter, Minami, FL, USA) を用いて解析した。

- ・Phycoerythrin (以下 PE と略) 標識抗マウス CD4 (L3T4) モノクローナル抗体 (BD Pharmingen, San Diego, CA)
- ・Fluorescein isothiocyanate (以下 FITC と略) 標識抗マウス CD8 (Ly2) モノクローナル抗体 (BD Pharmingen)
- ・FITC 標識抗マウス CD11c モノクローナル抗体 (BD Pharmingen)
- ・PE 標識抗マウス MHC Class II モノクローナル抗体 (BD Pharmingen)
- ・PE 標識抗マウス CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) モノクローナル抗体 (BD Pharmingen)

9. 細胞増殖反応

単径部リンパ節細胞からイムノマグネットビーズ (DynaL A.S, Oslo, Norway) を用いて分離した T 細胞を

10% (V/V) FCS 含有 RPMI1640 培地浮遊液とし、 1×10^5 / ウェルで抗 T cell receptor β (以下: TCR β と略) 抗体 (eBioscience, San Diego, CA, USA) および抗 CD28 抗体 (eBioscience) を固相化した 96 穴マイクロタイタープレート (Nunc A/S) に分注後、37 °C にて 48、72 時間培養し、最終 20 時間におけるトリチウムチミジン (NEN Life Science Products, Boston, MA, USA) の取り込みをオートマチックシンチレーションカウンター (Aloka, CA, USA) にて計測し、T 細胞増殖反応の評価を行った。

10. 酵素免疫測定法

(ELISA; Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

1) 各種サイトカイン

プレート上に固相化された抗 CD3 抗体 (Ceder lane Laboratories Ltd., Ontario, Canada) にて活性化された脾細胞の培養上清中のサイトカイン (interferon- γ 以下 IFN- γ と略、IL-2, IL-4, IL-10) の検出をマウス Th1/Th2 ELISA kit (eBioscience) を用い通常に従い 2 段階サンドイッチ法にて行った。

2) 抗 II 型コラーゲン抗体

1 M 酢酸にて 1 mg/ml に希釈した非熱処理 II 型コラーゲンを、さらに 0.1 M Sodium carbonate buffer で 10 μ g/ml に希釈し、100 μ l を 96 穴マイクロタイタープレート (Nunc A/S) に加え、4 °C で一晩固相化した。0.05% (V/V) Tween20 含有 PBS (以下 T-PBS と略) で洗浄後、10% ウシ血清アルブミン (以下 BSA と略) (Sigma) 溶液 170 μ l / ウェルを加え、室温で 2 時間静置し非特異的反応を除去した。T-PBS で洗浄後、1% (重量/容量、以下 W/V と略) BSA 含有 T-PBS で 100 倍に希釈した各マウス血清 100 μ l / ウェルを加え、37 °C で 1 時間静置した。T-PBS で洗浄後、1.4 μ g/ml に希釈したペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗マウス IgG 抗体 (Serotec, 札幌) を 100 μ l / ウェル加え、37 °C で 1 時間反応させ、T-PBS で洗浄後、過酸化水素水を含む α -フェニレンジアミン (Sigma, Inc.) 溶液を基質液とし発色反応後、490 nm での吸光度をオートマチックマイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) にて測定した。

11. Annexin V によるアポトーシス細胞の検出

単径部リンパ節細胞のアポトーシスの検出は、イムノマグネットビーズ (DynaL A.S) を用いて分離した T 細胞を 1×10^5 / ウェルで抗 TCR β 抗体 (eBioscience) および抗 CD28 抗体 (eBioscience) にて固相化した 96 穴マイクロタイタープレート (Nunc A/S) に分注後、37 °C にて 48 時間培養し、Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Bio Vision, Mountain View, CA, USA) を用いて行った。細胞を PBS にて洗浄後、 $1 \times$ binding buffer を添加し、さらに 5 μ l FITC 標識 Annexin V 混合液を添加した。室温、遮蔽下で 5 分間反応後、FACS にてアポトーシス細胞を検出した。

12. DC および T 細胞の共培養系

マウス骨髄由来樹状細胞を 5×10^4 , 1×10^5 , 2.5×10^5 / ウェルにて培養し、RANKL および II 型コラーゲンにて 48 時間刺激後、イムノマグネットビーズ (DynaL A.S) を用いて単径部リンパ節より分離した 5×10^4 個の T 細胞と BMDC とを、16 時間おきにウェル交換し、計 3 回相互作用するように共培養した。48 時間後、T 細胞を回収し Annexin V によるアポトーシス細胞の検出と、抗マウス Bcl-xL (BD Pharmingen), Bcl-2 (BD Pharmingen) モノクローナル抗体を用いて抗アポトーシス分子の発現について FACS 解析を行った。データは FACS 解析ソフトウェア (Flowjo) (Tree star, Inc., Ashland, OR) を用い解析した。

13. 統計学的検索

関節炎のスコア、FACS 解析、ELISA 法、細胞増殖反応におけるデータは平均 \pm 標準偏差で表し、Student's t-test を用いて統計学的処理を実施し、 $p < 0.05$ 以下にて有意とした。

結 果

1. RANKL および II 型コラーゲンによる樹状細胞の活性化

一般に CD4 陽性ヘルパー T 細胞の抗原認識には抗原提示細胞上の MHC クラス II 分子および共刺激分子の発現が不可欠であることが知られている^{20, 37)}。そこで、RANKL および II 型コラーゲン刺激による MRL/lpr マウスの BMDC 表面の MHC クラス II 分子 (I-A^b) 発現、共刺激分子 (CD80, CD86) の発現について FACS 解析にて比較検討したところ、RANKL および II 型コラーゲン刺激によって無刺激時および II 型コラーゲン単独刺激時と比較し、より強い MHC クラス II 分子発現および共刺激分子の発現が認められた (図 1 A)。

2. 活性化 DC 移入 MRL/lpr マウスにおける膝関節病変の変化

1) 活性化 DC 繰り返し移入プロトコール

MRL/lpr マウスに生後 6 週齢にて活性化 DC を単径部皮下に 1×10^6 個の細胞数で 2 日おきに繰り返し 3 回移入し、移入後 8 週および 12 週にて解析を行ったプロトコールを示す (図 1 B)。

2) 病理組織学的変化

関節炎自然発症モデルである MRL/lpr マウスに生後 6 週齢にて、RANKL および II 型コラーゲンにより活性化した DC を繰り返し移入し、移入後 8 週、12 週にて病理組織学的評価を行った。無処置群、無刺激 DC 3 回移入群では経時的にリウマチ様関節炎の病態が増悪しているのに対し、RANKL/C II DC 3 回移入群では移入後 12 週において有意な関節炎スコアの低下がみられた (図 2 A)。無処置群、無刺激 DC の 3 回移入群および

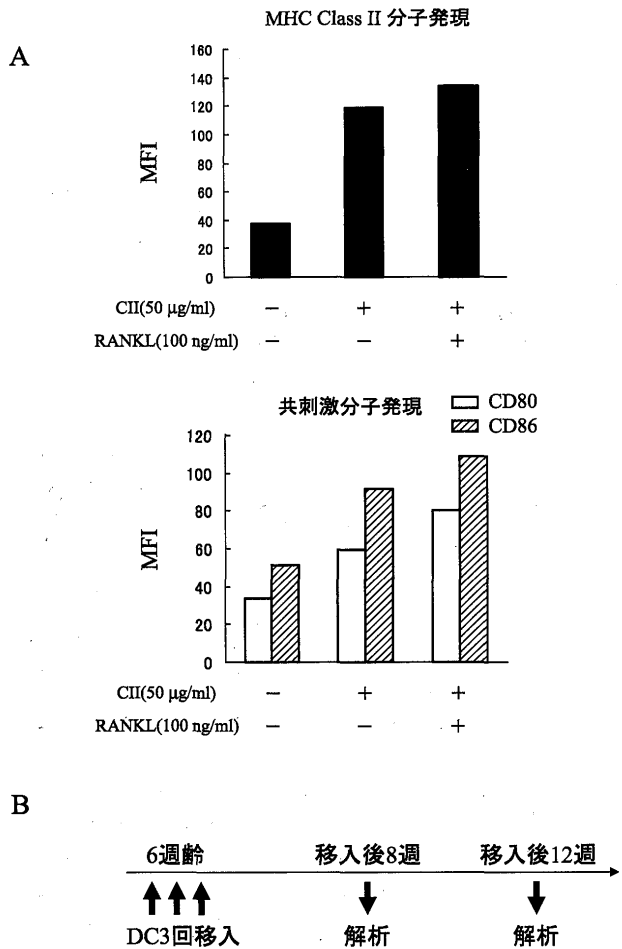


図1 細胞移入に用いた BMDC の FACS 解析
 (A) DC 表面の MHC クラス II 分子発現, 共刺激分子 (CD80, CD86) 発現について FACS 解析にて検索し, 平均蛍光強度 (MFI: mean fluorescence Intensity) で示す。RANKL および II 型コラーゲン刺激によって無刺激時と比較し, より強い MHC クラス II 分子発現および共刺激分子の発現が認められた。
 (B) MRL/lpr マウスに 6 週齢にて RANKL および II 型コラーゲン刺激 DC を短期に 3 回移入し, 移入後 8 週, 12 週にて解析を行ったプロトコルを示す。(無処置群 n = 48, 無刺激 DC 3 回移入群 n = 37, RANKL/C II DC 3 回移入群 n = 48)

RANKL/C II DC 3 回移入群における移入後 12 週の膝関節での病理組織像を示す (図 2 B)。無処置群 (図 2 B-a), 無刺激 DC 3 回移入群 (図 2 B-b) の対照群では, 滑膜増殖やリンパ球浸潤および骨・軟骨破壊などの病態増悪が認められるのに対し, RANKL/C II DC 3 回移入群 (図 2 B-c) により膝関節の病態抑制効果がみられた。

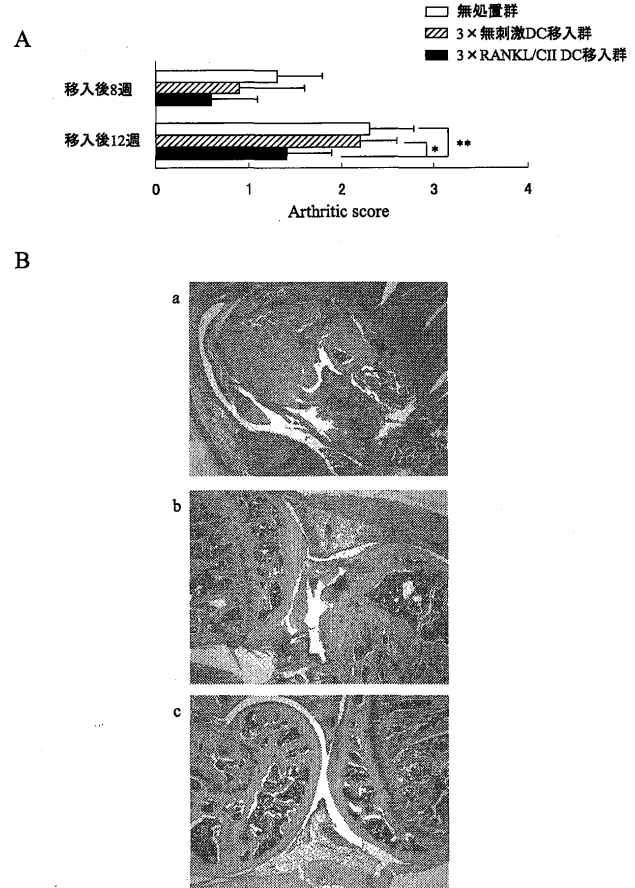


図2 活性化 DC 移入マウスによる膝関節病変への影響
 (A) 膝関節における病理組織学的評価を Carl らの方法に準じたスコアで示す。RANKL および II 型コラーゲン刺激により活性化した DC を 3 回移入した MRL/lpr マウスの関節病変は無処置群と比較し, 関節炎スコアの有意な低下を認めた。各数値は平均値±標準偏差で表示した。(*P<0.05, **P<0.01, Student's t-test, 各群 n = 10)
 (B) 無処置群および無刺激 DC の 3 回移入群, RANKL および II 型コラーゲン刺激 DC の 3 回移入群における移入 12 週後の代表的な膝関節 HE 像を示す。他の 2 群と比較して RANKL および C II 刺激 DC の 3 回移入マウスでは関節炎の病態抑制傾向が認められた。a: 無処置群, b: 無刺激 DC 3 回移入群, c: RANKL/C II DC 3 回移入群 (a~c: ×40)

3. 活性化 DC 移入による免疫系への影響

活性化 DC を繰り返し移入することによる, 病態抑制の機序について検討を加えたところ活性化 DC の移入後 12 週で, MRL/lpr マウスの特徴である脾腫および単径部リンパ節腫脹の軽減, および湿重量の有意な減少が観察された (図 3)。

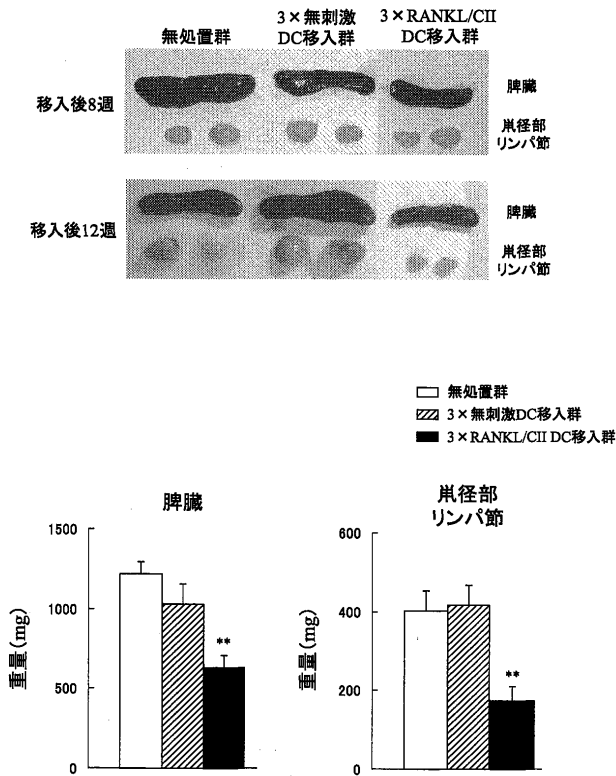


図3 活性化DCの繰り返し移入による免疫系への影響
 (A) DC移入後8週、12週の各群における脾臓および単径部リンパ節の代表的な肉眼像を示す。RANKLおよびII型コラーゲンで刺激した活性化DC 3回移入群において、移入後12週で脾腫および単径部リンパ節腫脹の軽減が認められた。
 (B) DC移入後12週における、各群の脾臓および単径部リンパ節の湿重量を示す。無処置群、無刺激DC 3回移入群と比較して、RANKLおよびII型コラーゲン刺激DCの3回移入群では有意な湿重量の低下が観察された。各数値は平均±標準偏差で表示した。(**P < 0.01, Student's t-test, 各群 n = 6 ~ 8)

4. 活性化DCの繰り返し移入による脾臓および単径部リンパ節細胞数の変化

脾腫および単径部リンパ節腫脹の軽減が認められたことから、脾臓、単径部リンパ節における、CD4、CD8陽性T細胞およびB細胞数をFACSにより検討し、無処置群細胞数に対する活性化DC移入群の細胞数の増減を示す(図4)。移入後12週において、脾臓、および単径部リンパ節におけるCD4、CD8陽性T細胞およびB細胞数の減少がみられ、特にT細胞における細胞数の減少が認められた。

5. 移入した活性化DCの各臓器における分布状況

繰り返し移入したDCのレシピエントでの分布状況を

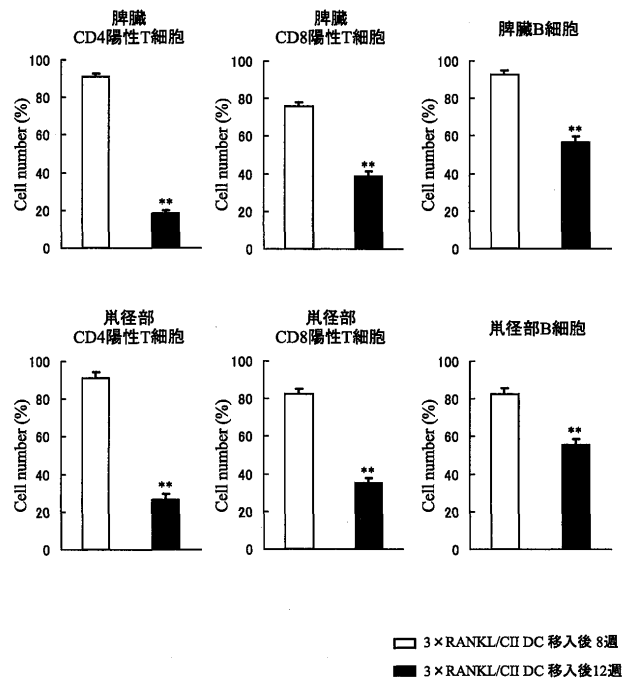


図4 活性化DC移入後による脾臓、単径部リンパ節細胞数の変化
 無処置群およびRANKLおよびII型コラーゲン刺激DCの3回移入群における脾臓・単径部リンパ節のCD4、CD8陽性T細胞、およびB細胞数をFACSにより検討を行った。各数値は無処置群細胞数を100%とし、各群の細胞数の割合を示す。活性化DC繰り返し移入後12週において、いずれも有意な細胞数の減少が見られ、特にCD4、CD8陽性T細胞数の減少が認められた。各数値は平均±標準偏差で表示した。(**P < 0.01, Student's t-test, 各群 n = 5)

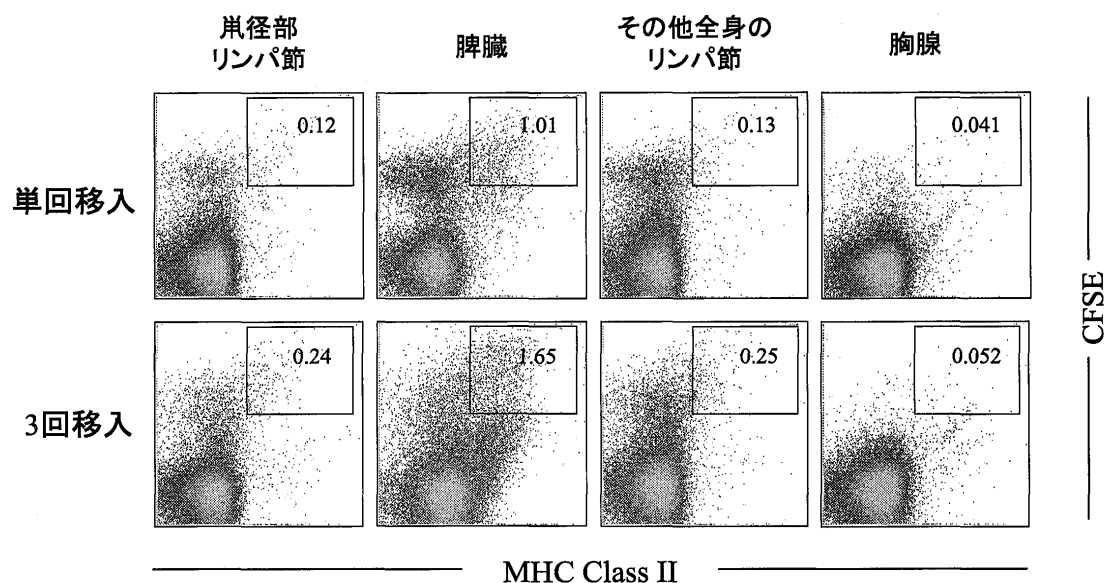
明らかにするため、MRL + / +, MRL/lpr マウス骨髓細胞からDCを培養し、RANKLおよびII型コラーゲンにて3日間刺激を行った後、得られた活性化DCをCFSEで標識し、MRL + / +マウス尾根部皮下に1×10⁶個の細胞数で移入を行い、移入2日後に単径部リンパ節、脾臓、その他リンパ節、および胸腺におけるDCの分布をFACSにて確認した。MRL + / +マウスのDCでは単回移入と比較して3回移入を行うことで、単径部リンパ節でのDC集積が0.12%から0.24%と2倍であるのに対し、MRL/lprマウスのDCでは3回移入することで、0.52%から3.78%と約7倍のDCの集積を認めた(図5)。

6. 活性化DCの繰り返し移入による末梢リンパ球への影響

1) T細胞増殖能への影響

DCの移入による末梢のT細胞への影響を知るために、無処置群および活性化DC 3回移入群の単径部リンパ節

MRL+/+DC移入



MRL/lpr DC移入

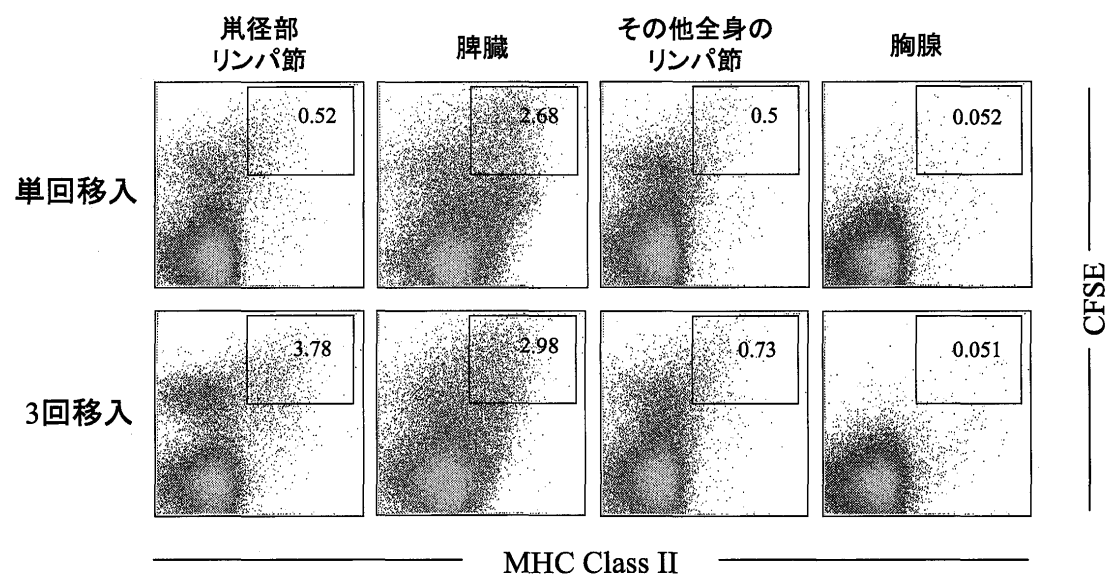


図5 移入 DC のレシピエントにおける各臓器での集積

活性化 DC 繰り返し移入による、各臓器における移入した DC の分布状況を明らかにするため、CFSE 蛍光色素にて DC を標識し移入後、各臓器における CFSE 陽性細胞を FACS により解析した。MRL+/+マウスの DC では単回移入と比較して3回移入を行うことで、鼠径部リンパ節での DC の集積が2倍であるのに対し、MRL/lprマウスの DC では3回移入することで、鼠径部リンパ節に約7倍と顕著な DC の集積を認めた。パネル縦軸は CFSE の蛍光強度、横軸は PE 標識した MHC クラス II の蛍光強度を示す。各パネルは3回の実験の代表的な結果を示す。

細胞を抗 TCR β 抗体および抗 CD28 抗体で刺激し48時間、72時間でのトリチウムチミジンの取り込みによる T 細胞増殖能を検討したところ、無処置群では濃度依存

的に増殖能の上昇がみられるのに対し、活性化 DC を繰り返し移入した群では増殖能の著しい低下が認められた(図6A)。

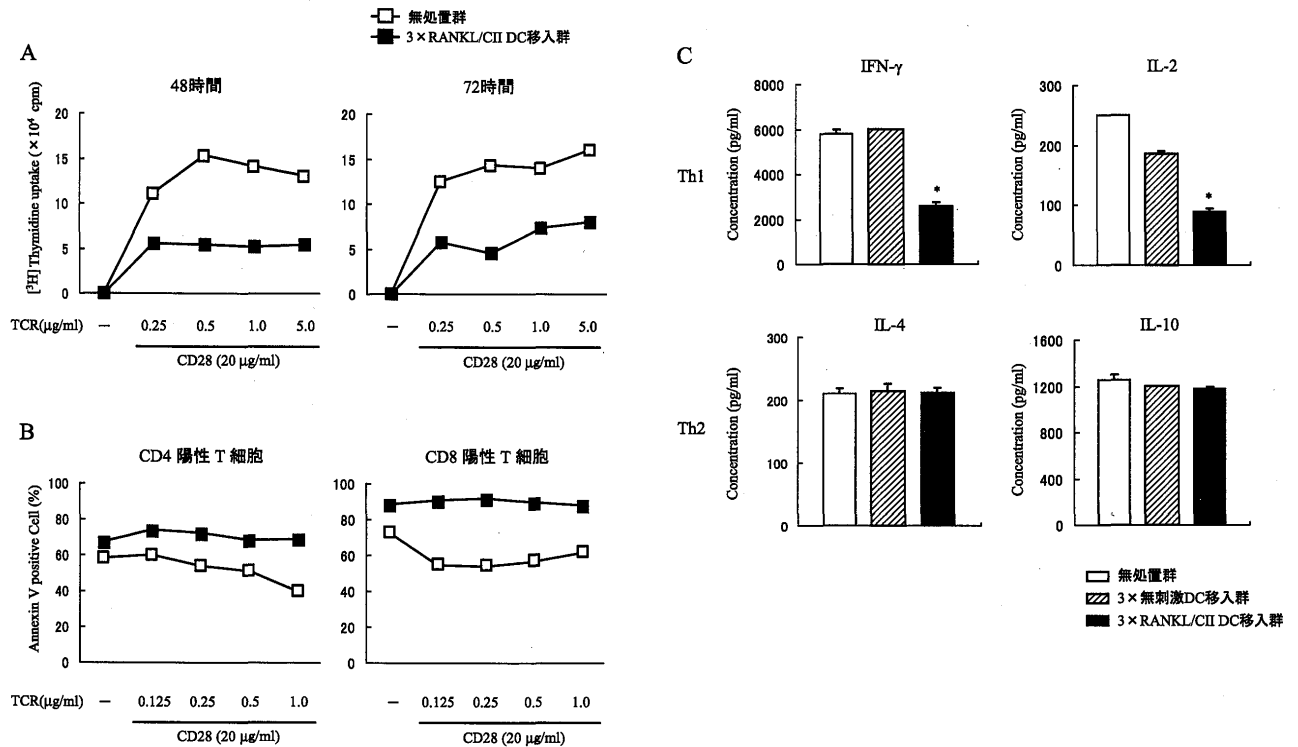


図6 活性化DCの繰り返し移入による末梢T細胞への影響

(A) 無処置群, RANKL および II 型コラーゲン刺激した DC の 3 回移入群の単径部リンパ節細胞より回収した T 細胞を抗 TCR β (0~5.0 μ g/ml) および抗 CD28 (20 μ g/ml) 抗体にて 48, 72 時間刺激し, T 細胞の増殖能についてトリチウムチミジンの取り込みにて検索したところ, 48, 72 時間ともに無処置群と比較して活性化 DC 繰り返し移入群では, T 細胞増殖能の著しい低下が認められた。

(B) 同様に無処置群, RANKL および II 型コラーゲン刺激した DC の 3 回移入群の単径部リンパ節から分離した T 細胞を, 抗 TCR β (0~5.0 μ g/ml) および抗 CD28 (20 μ g/ml) 抗体で 48 時間刺激し T 細胞アポトーシスについて Annexin V Apoptosis Detection Kit を用い FACS により解析したところ, 無処置群と比較して活性化 DC 繰り返し移入群で CD4, CD8 陽性 T 細胞ともにアポトーシスの亢進を認めた。

(C) 脾細胞培養上清中におけるサイトカイン産生能

固相化抗 CD3 抗体にて活性化された各群の脾細胞培養上清中のサイトカイン産生量を ELISA 法にて評価した。無処置群, 無刺激の DC を 3 回移入した群と比較して RANKL および II 型コラーゲンにより刺激した DC の 3 回移入群の培養上清中に IFN- γ , IL-2 の産生低下が認められた。各数値は 3 ウェル平均土標準偏差で表示した。(* $P < 0.05$, Student's t-test)

(A), (B), (C) ともに, 3-5 回の実験の代表的結果を示す。

2) T 細胞アポトーシスへの影響

さらに, 単径部リンパ節細胞を抗 TCR β 抗体および抗 CD28 抗体で 48 時間刺激し, 末梢 T 細胞のアポトーシスについても FACS で確認したところ, 無処置群と比較して活性化 DC 移入群において CD4, CD8 陽性 T 細胞ともにアポトーシスの亢進が認められた (図 6 B)。

したがって, DC の繰り返し移入により末梢の T 細胞は増殖能が抑制され, アポトーシスに陥りやすい状態にあることが示された。

3) T 細胞におけるサイトカイン産生への影響

抗 CD3 抗体で刺激を加えた各マウスの脾細胞の培養上清におけるサイトカイン産生能についても ELISA 法

にて検出した結果, 対照群と比較して活性化 DC の繰り返し移入群で Th1 型のサイトカインである IFN- γ , IL-2 の有意な産生低下が認められた (図 6 C)。

7. リウマチ様関節炎マーカーへの影響

関節軟骨の主な構成成分である II 型コラーゲンは RA の自己抗原のひとつと考えられており, RA 患者および RA モデルの血中において高レベルのコラーゲン抗体が認められることが報告されている^{38, 39)}。そこでマウス血清中の抗 II 型コラーゲン抗体を ELISA 法にて検出した。対照群と比較して, 活性化 DC の繰り返し移入群では移入後 12 週において抗 II 型コラーゲン抗体レベルの有意な

低下が認められた (図7)。

8. *In vitro* における DC と T 細胞との共培養

RANKL および II 型コラーゲンによって活性化した BMDC と T 細胞との関係を検討するために, *in vitro* で BMDC と T 細胞を共培養させ, T 細胞のアポトーシスへの影響について確認した。その結果, MRL/lpr マウスの T 細胞と RANKL および II 型コラーゲンにて刺激した DC を 3 回共培養することで, 対照 T 細胞のアポトーシスと比較し, MRL/lpr マウス CD4 陽性 T 細胞のアポトーシスの亢進を認め (図8), さらに T 細胞における抗アポトーシス分子である Bcl-xL, Bcl-2 発現について FACS により検討したところ, MRL +/+ DC と繰り返し共培養した MRL/lpr マウスの CD4 陽性 T 細胞における Bcl-xL, Bcl-2 発現が上昇しているのに対し, MRL/lpr DC と繰り返し共培養した MRL/lpr マウス CD4 陽性 T 細胞では両者の発現抑制が認められた (図9)。

9. コラーゲン誘導性関節炎モデルへの DC 移入

DBA/1J マウスは II 型コラーゲンにて 2 回感作することでヒト関節リウマチに類似した病態を示すことが知られており³⁴⁾, RA の免疫誘導モデルとして広く利用されている。そこで, 実験的に関節炎を誘導することが出来る DBA/1J マウスを用い, MRL/lpr マウスで観察された DC 移入による病態抑制効果が得られるか否かを検討した。

DBA/1J マウス骨髄細胞から GM-CSF および IL-4 存在下で 7 日間培養し, 得られた DC を II 型コラーゲンのみ, RANKL のみ, または, II 型コラーゲンおよび RANKL にて 3 日間刺激し, DBA/1J マウス 2 回目感作の 2 日, 4 日, 6 日前に各 DC を 1×10^6 個 / 100 μ l の細胞数で単径部皮下に 3 回移入した。最終 DC 移入後 6 日目における DBA/1J マウス後足の肉眼像を示す。対照群である CIA (関節炎誘導のみ) 群, C II 刺激 DC の 3 回移入群, および RANKL 刺激 DC の 3 回移入群では, 発赤・腫脹が小関節および足関節部分にまで見られるのに対し, RANKL/C II 刺激 DC の 3 回移入群では小関節の腫脹が認められるのみで関節の腫脹の軽減が観察された (図10A)。マウス手指の腫脹スコアを経時的に評価したところ, 他の 3 群と比較して RANKL/C II 刺激 DC の 3 回移入群において, 手指腫脹スコアの有意な減少が認められた (図10B)。

また, 足関節における病理組織学的検討を行った結果, RANKL および II 型コラーゲン刺激 DC を繰り返し移入した群において, 対照群と比較して関節炎の病態抑制傾向を示し, 関節炎スコアでも有意な低下を認めた (図11A, B)。

したがって, コラーゲン誘導性関節炎モデルにおいても MRL/lpr マウスと同様に活性化 DC の繰り返し移入により関節炎病変を制御しうることが明らかとなった。

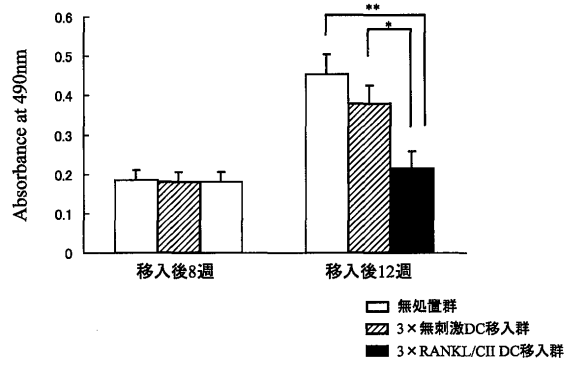


図7 活性化 DC の繰り返し移入による血清中抗コラーゲン抗体価の変化
無処置群, 無刺激 DC 3 回移入群, RANKL および II 型コラーゲン刺激 DC の 3 回移入群における血清中抗 II 型コラーゲン抗体価を ELISA 法にて検出した。DC 移入後12週で無処置群, 無刺激 DC 3 回移入群と比較して RANKL および II 型コラーゲン刺激 DC の 3 回移入群では抗 II 型コラーゲン抗体レベルの有意な減少が認められた。(*P < 0.05, **P < 0.01, Student's t-test, 各群 n = 10)

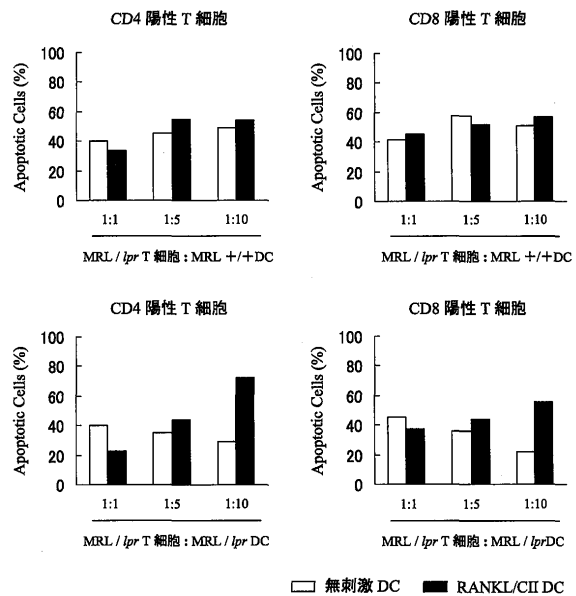


図8 *In vitro* における DC を介した T 細胞のアポトーシス
MRL +/+, MRL/lpr マウスの BMDC を用い, 無刺激又は, RANKL および II 型コラーゲンにて活性化した。MRL/lpr 単径部リンパ節細胞から分離した T 細胞と, 16時間おきにそれぞれ活性化 DC と共培養を行った。T 細胞数を一定とし, DC の細胞数を 1 : 1, 1 : 5, 1 : 10 とした。計48時間での T 細胞のアポトーシスについて Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit を用い, FACS により検討した。MRL/lpr マウスの T 細胞と活性化した MRL/lpr マウス BMDC の共培養にて CD4 陽性 T 細胞のアポトーシス亢進を認めた。3 回の実験の代表的な結果を示す。

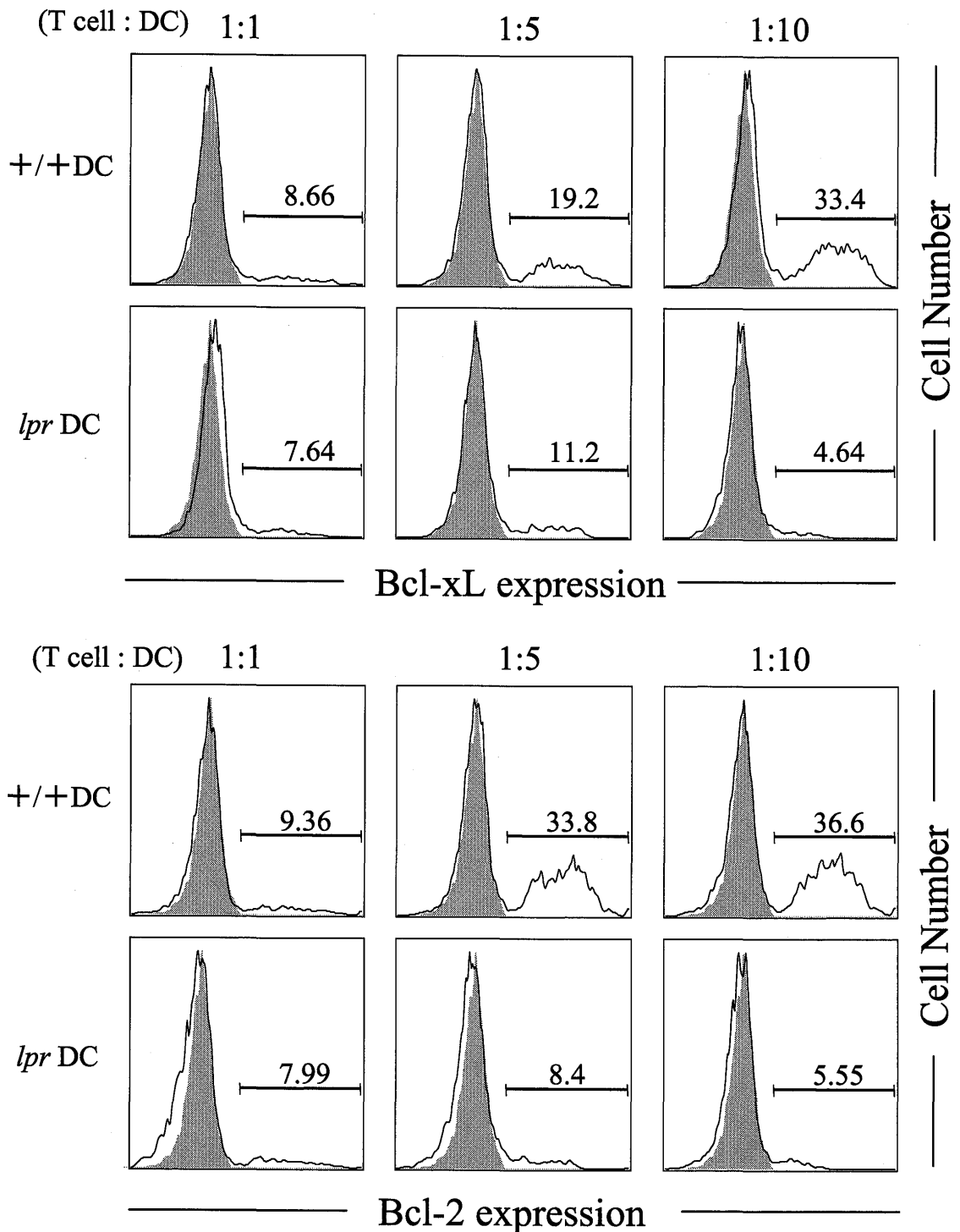
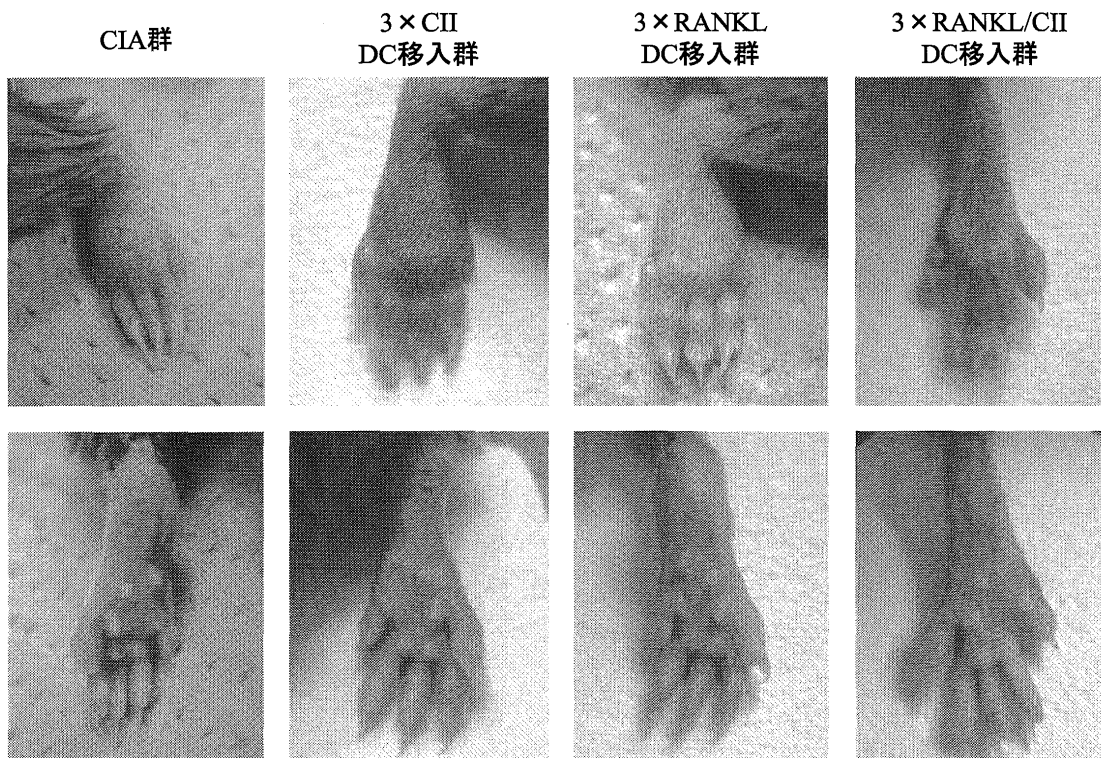


図9 DCを介したT細胞のアポトーシスにおける抗アポトーシス分子発現変化

(A) 活性化MRL +/+, MRL/*lpr* マウスのBMDCおよびMRL/*lpr* マウスのT細胞との共培養を行い, CD4陽性T細胞における抗アポトーシス分子である細胞内Bcl-xL, Bcl-2発現についてFACSで検討した。得られたT細胞を3%パラホルムアルデヒドにて固定後, サポニン処理を行い, 1次抗体として抗マウスBcl-xL, Bcl-2, 2次抗体としてPE標識抗ラットIgGを用い, FACSにて解析したところ, MRL +/+マウスDCと共培養したMRL/*lpr* マウスのCD4陽性T細胞と比較して, MRL/*lpr* マウスDCと共培養したMRL/*lpr* マウスCD4陽性T細胞ではBcl-xL, Bcl-2の発現抑制が認められた。3回の実験の代表的結果を示す。横軸上段はFITC標識したBcl-xL, 下段はFITC標識したBcl-2の蛍光強度を示し, 縦軸はすべて相対的細胞数を示す。

A



B

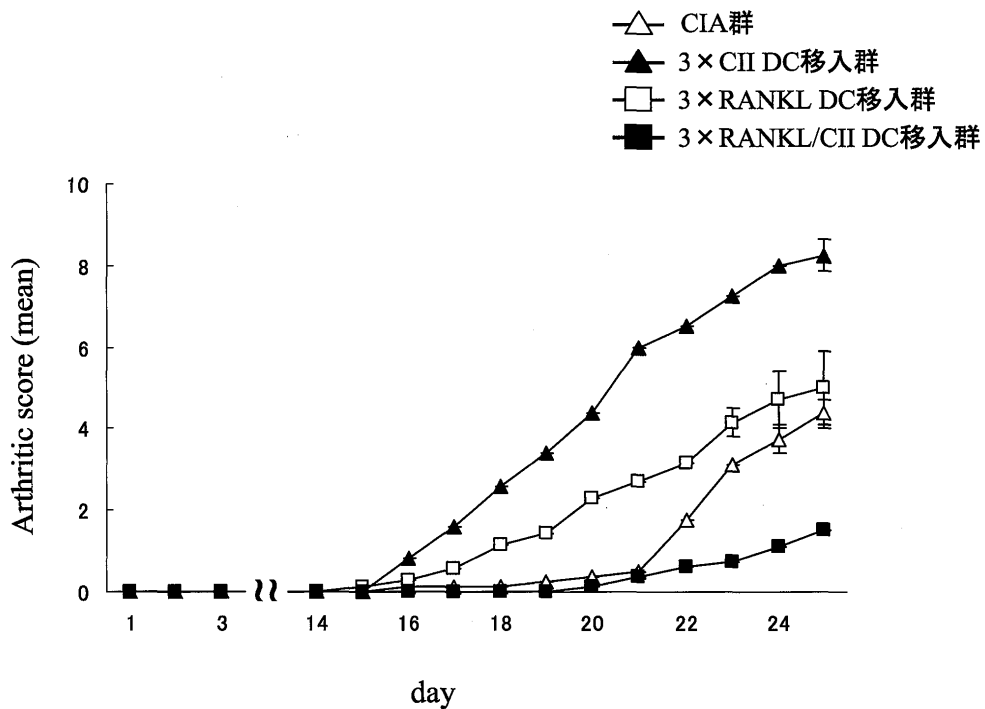


図10 DBA/1J マウスにおける活性化 DC の 3 回移入による関節病変の経時的変化

- (A) DBA/1J マウス各群の代表的な後足の肉眼像を示す。他の 3 群と比較して、DBA/1J RANKL および II 型コラーゲン刺激 DC の 3 回移入群において、手指の腫脹の軽減が観察された。(CIA 群 $n = 8$, CII DC 3 回移入群 $n = 4$, RANKL DC 3 回移入群 $n = 7$, RANKL/CII DC 3 回移入群 $n = 8$)
- (B) 手指における腫脹の評価を Wood らの分類に準じたスコアで示す。RANKL および II 型コラーゲン刺激により活性化した DC 3 回移入 DBA/1J マウス手指の腫脹は他の 3 群と比較し、著しい軽減を認めた。各数値は平均 ± 標準偏差で表示した。

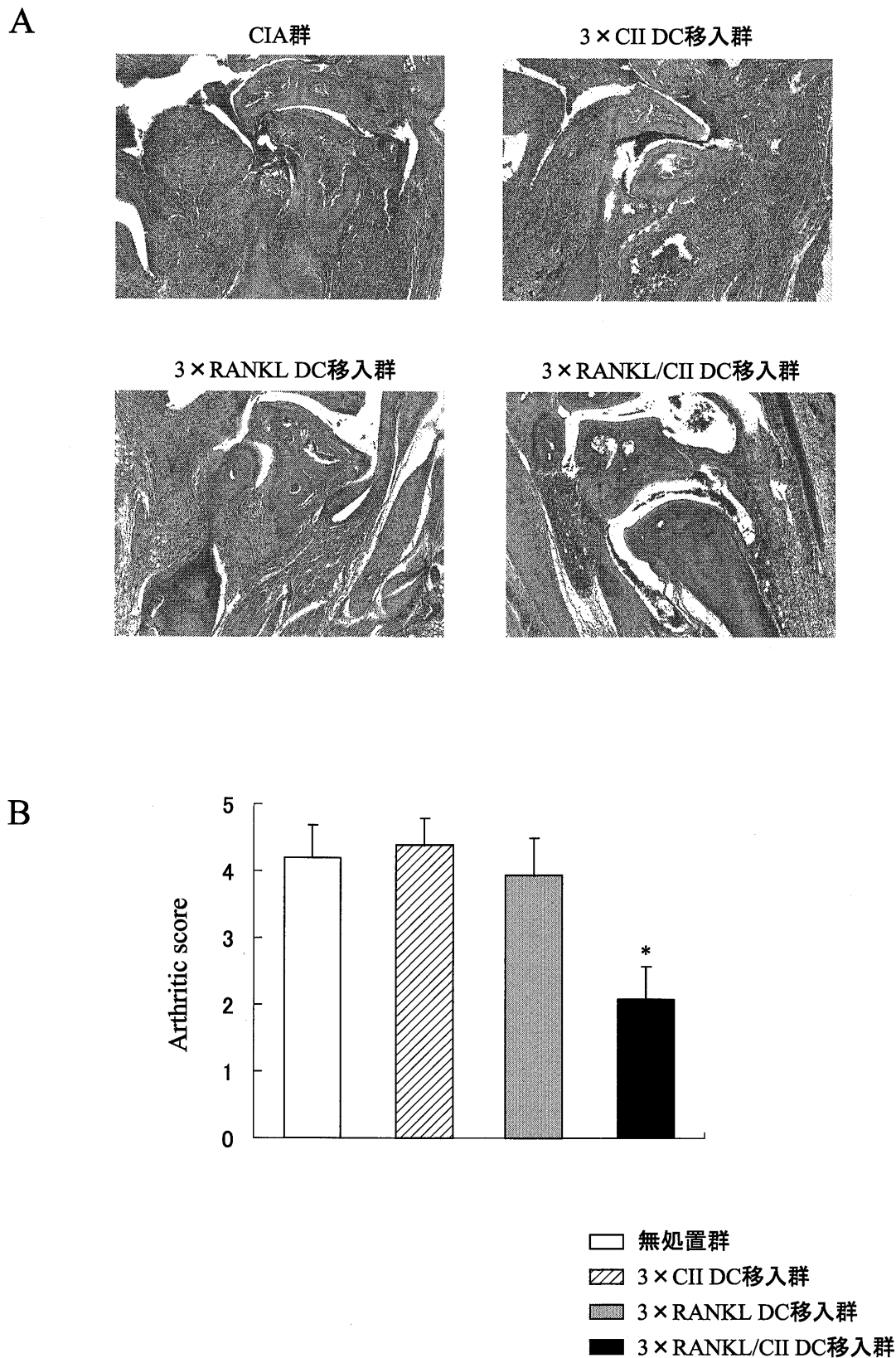


図11 活性化DC 3回移入DBA/1Jマウスにおける関節病変の病理組織学的検討

(A) 無処置群および各活性化DC 3回移入群における代表的な足関節のHE像を示す。他の3群と比較してRANKLおよびII型コラーゲン刺激DC 3回移入マウスでは関節炎の病態抑制傾向を認める。写真は各群の代表例を示す。

(B) 関節炎スコアにおいても有意な低下を認めた。各数値は平均±標準偏差で表示した。

(* $P < 0.05$, Student's t-test)

考 察

自己免疫疾患は染色体上の複数の遺伝子座の働きと、環境要因とが相俟っておこる多因子性疾患とされている。遺伝的要因として組織適合遺伝子複合体 (MHC; major histocompatibility complex) 分子をはじめとする様々な遺伝子群が関与していることが知られている⁴²⁻⁴⁶⁾。RA は全身性の自己免疫疾患であり、最も頻度の高い膠原病である。RA 初期の病態は多関節における自己反応性 T 細胞を主体とした炎症性細胞浸潤を伴う滑膜細胞の異常増殖として特徴づけられている。この滑膜細胞の異常増殖はやがて軟骨・骨破壊を引き起こす要因となり、全身の骨関節機能の破綻を招く。現在までに RA の病因を解明するため数多くの研究がなされてきたが、標的自己抗原、病態進展機序を含めて病因の本体に関しては殆ど明らかにされていない。

RA の自然発症型疾患モデルである MRL/lpr マウスのリウマチ様関節炎は 5-6 ヶ月齢にて軟骨破壊を伴う免疫複合体の沈着、滑膜細胞の著明な増殖、マクロファージ・好中球の浸潤などヒト RA に類似の病態を示す²⁴⁾。また、免疫誘導型モデルである DBA/1J マウス関節炎症状は II 型コラーゲンによる初感作から 3-5 週後に大部分発症し、2 回目感作から約 5-7 日でピークに達することが知られており³⁴⁾、自然発症型 MRL/lpr マウスと同様、ヒト RA 病態に非常に類似していることから、現在、RA 病態解析に広く用いられている。本研究において MRL/lpr マウスおよび DBA/1J マウスに抗原提示能が上昇した活性化 DC を繰り返し移入することにより、対照の MRL/lpr マウス、DBA/1J マウスと比較し自己免疫性関節炎は病態抑制傾向を示すことが判明した。

In vivo における活性化 DC と T 細胞機能をさらに詳細に解析すると、Fas 遺伝子欠損のため脾腫およびリンパ節腫脹を特徴とする MRL/lpr マウスにおいて活性化 DC を繰り返し移入することにより、脾臓、単径部リンパ節ともに有意な湿重量の低下、細胞数の減少が認められた。その機序のひとつとして、T 細胞の増殖能が無処置群と比較し著しく低下し、さらに T 細胞のアポトーシスにおいては無処置群と比較して著しく亢進していることが挙げられる。さらに、in vitro における DC と T 細胞の共培養により CD4 陽性 T 細胞のアポトーシスの亢進、抗アポトーシス分子である Bcl-xL, Bcl-2 の発現抑制が確認されたことから、活性化 DC を介して末梢の T 細胞の活性化が抑制され、アポトーシスが亢進し脾腫や単径部リンパ節腫脹が軽減した可能性が示唆された。正常の個体には末梢レベルにおいて免疫学的寛容 (トレランス) が成立しており、その機序に関しては、クローン除去、アナジー、サプレッションなどの機序が想定されている⁴⁹⁻⁵⁴⁾。何らかの要因によりトレランスの破綻が生じ自己免疫疾患が誘導されるものと考えられ、その発症・進展には自己成分に反応する自己免疫性 T 細胞が中心的な役割を果たしていることが知られている。末

梢トレランスの維持には活性化 T 細胞に対する除去機構が必須とされ、activation-induced cell death (AICD) と称されている⁵⁵⁾。AICD は主として末梢 CD4 陽性 T 細胞上の Fas/FasL 経路を介した T 細胞のアポトーシスによって制御されているものと理解されている⁵⁶⁾。今回、RANKL および C II 刺激した DC を短期に繰り返し移入することにより、末梢 T 細胞に対して活性化 DC により強く抗原提示が行われた結果、活性化した T 細胞の除去機構が亢進したものと考えられる。また、MRL/lpr マウスは Fas 欠損マウスであることから Fas/FasL 以外の経路を介して T 細胞アポトーシスが起きている可能性が示唆された。

一方、RA における自己抗原の一つに関節軟骨のおもな構成蛋白質である II 型コラーゲンが報告されており^{38, 39)}、実際、RA 患者の血清中において高いレベルの抗 II 型コラーゲン抗体が認められている⁴¹⁾。今回、対照群と比較し RANKL および II 型コラーゲンで活性化した DC を繰り返し 3 回移入することで、血清中の抗 II 型コラーゲン抗体レベルの有意な低下が認められたことから、活性化 DC により何らかの機序を介して自己抗体の産生が抑制されることが示された。

従来、関節破壊の機序としては、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) などのタンパク分解酵素が関与すると考えられてきたが⁵⁷⁻⁵⁹⁾、関節破壊の解明が進むにつれ、関節破壊に直接関与する細胞は、免疫反応により活性化した滑膜細胞から誘導される破骨細胞や樹状細胞であることが明らかになってきた¹⁸⁻²⁰⁾。近年、破骨細胞の形成と機能を抑制する TNF 受容体ファミリーに属する分泌蛋白として OPG が単離された⁴⁷⁾。さらに、OPG が結合するリガンドとして TNF ファミリーに属する膜結合蛋白質である ODF が同定され、ほぼ同時期に同定された RANKL/TRANCE/osteoprotegerin ligand (OPGL) と同一のものであることが明らかになった^{10, 11)}。RANKL/ODF の受容体はすでに報告されていた receptor activator of NF- κ B (RANK) であることが証明され¹³⁾、また、RANKL 遺伝子欠損マウスの報告より、RANKL は破骨細胞のみならずリンパ節の発生、リンパ球の分化および樹状細胞の活性化にも重要な役割を果たしていることが明らかとなり、免疫系における RANKL の重要性が注目されている¹⁵⁾。RANKL がクローニングされた後、リウマチ骨破壊の病態の理解は、急速に進展することとなった。炎症性骨疾患を免疫と骨代謝のクロストークととらえる視点は、オステオイムノロジー (骨免疫学) と位置づけられており¹⁸⁾、RA に代表される免疫系による骨代謝制御異常を理解していくために、今後さらなる発展が期待される分野となっていった。現在のところ RA の治療法としては TNF 阻害剤や IL-6 の受容体に対する拮抗剤など、薬物による治療法が臨床応用されている^{60, 61)}。また、今回の実験結果と同様に活性化 DC の繰り返しの移入により、自己免疫疾患として知

られている多発性硬化症のモデルである実験的脳脊髄炎 (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: EAE) において著明な病態の抑制がみられたという報告がなされており⁴⁸⁾, RA をはじめとする自己免疫疾患の治療に対する DC を中心とした細胞療法へ向けた基礎的な研究も多数報告され始めてきた⁶²⁻⁶⁴⁾。

今後、自己免疫性関節炎において樹状細胞、破骨細胞および T 細胞を中心とした免疫担当細胞によって調節・制御され、関節破壊に関与する分子群の同定や、活性化リンパ球・滑膜細胞上の RANKL 発現増強を介した破骨細胞形成・活性化のメカニズムを解明することが重要な検討課題である。これらのアプローチによって関節リウマチを含む自己免疫疾患発症におけるメカニズムの分子論的解明がなされるものと考えられる。

結 語

関節リウマチ疾患モデルマウスに RANKL および II 型コラーゲンにて活性化した DC を繰り返し移入することにより以下のことが明らかとなった。

- (1) MRL/lpr マウスの BMDC を RANKL および II 型コラーゲン刺激によって活性化することにより DC の抗原提示能は増強し、繰り返し移入することで単径部リンパ節への顕著な集積が確認された。
- (2) MRL/lpr マウスおよび DBA/1J マウスにおける、RANKL および II 型コラーゲン刺激 DC の 3 回移入群では対照群と比較し、自己免疫性関節病変の著明な病態抑制が観察された。
- (3) MRL/lpr マウスにおいて RANKL および II 型コラーゲン刺激 DC の繰り返し移入により、脾腫および単径部リンパ節腫脹の軽減が認められた。これは、T 細胞、B 細胞の細胞数の減少、中でも CD4 陽性 T 細胞の減少によることが明らかとなった。
- (4) MRL/lpr マウスにおける活性化 DC の繰り返し移入により、T 細胞での Th1 型サイトカインの産生の抑制、細胞増殖能の低下およびアポトーシスの亢進が確認された。
- (5) In vitro での DC と T 細胞の共培養において MRL/lpr マウス T 細胞と DC を繰り返し共培養させることにより、T 細胞アポトーシスの亢進および抗アポトーシス分子である Bcl-xL, Bcl-2 の発現抑制が認められた。
- (6) 自己免疫性関節炎の病態形成における DC を介した T 細胞の活性化機構に RANKL シグナルが重要な役割を果たしていることが示された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導・御校閲を賜りました徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔顎顔面矯正学分野 森山啓司教授に深甚なる謝意を表し

ますとともに、本研究の実施に際して終始御指導、御助言および御校閲を戴きました口腔分子病態学分野 林良夫教授に厚く御礼申し上げます。また御校閲・御助言を賜りました分子薬理学分野 吉本勝彦教授に深く感謝いたします。また研究の円滑な遂行のため終始御協力戴いた歯科矯正学講座の教室員の方々、および終始特別のご配慮を戴いた口腔分子病態学分野の教室員の方々に深謝致します。

参考文献

- 1) Zouali M, Kalsi J and Isenberg D: Autoimmune disease at molecular level. *Immunol Today* 14, 473-476 (1993)
- 2) Whitacre CC, Reingold SC and O'Looney PA: A gender gap in autoimmunity. *Science* 283, 1277-1278 (1999)
- 3) Kwok CK, Venglish C, Lynn AH, Whitley DM, Young E and Chakravarti A: Age, sex, and the familial risk of rheumatoid arthritis. *Am J Epidemiol* 144, 15-24 (1996)
- 4) Celiker R, Gokce-Kutsal Y and Eryimaz M: Temporomandibular joint involvement in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 24, 22-25 (1995)
- 5) Koh ET, Yap AU, Koh CK, Chee TS, Chan SP and Boudville IC: Temporomandibular disorder in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 26, 1918-1922 (1999)
- 6) Harris ED Jr: Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Am J Med* 80, 4-10 (1986)
- 7) Cunnane G, Hummel KM, Muller-Ladner U, Gay RE and Gay S: Mechanism of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 46, 1-7 (1998)
- 8) Bresnihan B: Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 26, 717-719 (1999)
- 9) Arend WP, Dayer JM: Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor α in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38, 151-160 (1995)
- 10) Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J and Boyle WJ: Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93, 165-176 (1998)
- 11) Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinoshita M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N and Suda T: Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 3597-602 (1998)
- 12) Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L,

- Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P and Boyle WJ: Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89, 309-319 (1997)
- 13) Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, Morinaga T and Higashio K: RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 253, 395-400 (1998)
- 14) Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D and Galibert L: A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390, 175-179 (1997)
- 15) Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos A J, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ and Penninger JM: OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397, 315-323 (1999)
- 16) Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL Fish E, Boyle WJ and Penninger JM: Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 402, 304-330 (1999)
- 17) Horwood NJ, Kartsogiannis V, Quinn JM, Romas E, Martin TJ and Gillespie MT: Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 265, 144-150 (1999)
- 18) Takayanagi H, Iizuka H, Juji T, Nakagawa T, Yamamoto A, Miyazaki T, Koshihara Y, Oda H, Nakamura K and Tanaka S: Involvement of receptor activator of nuclear factor κ B ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43, 259-269 (2000)
- 19) Romas E, Bakharevski O, Hards DK, Kartsogiannis V, Quinn JM, Ryan PF, Martin TJ and Gillespie MT: Expression of osteoclast differentiation factor at sites of bone erosion in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 43, 821-826 (2000)
- 20) Steinman RM: The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9, 271-296 (1991)
- 21) Josien R, Li Li HL, Ingulli E, Sarma S, Wong BR, Vologodskaja M, Steinman RM and Choi Y: TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 191, 495-501 (2000)
- 22) Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252 (1998)
- 23) Pierre G, Jenny V, Laurence Z, Clotilde T and Sebastian A: Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20, 621-667 (2002)
- 24) Koopman W J and Gay S: The MRL-lpr/lpr mouse: A model for the study of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol Suppl* 75, 284-289 (1988)
- 25) Boissier MC, Carlioz A and Fournier C: Experimental autoimmune arthritis in mice. II. Early events in the elicitation of the autoimmune phenomenon induced by homologous type II collagen. *Clin Immunol Immunopathol* 48, 225-237 (1988)
- 26) Murphy ED and Roths JB: Genetic control of autoimmune disease. Elsevier North-Holland, New York, 207 (1978)
- 27) Yoneda T, Ishimaru N, Arakaki R, Kobayashi M, Izawa T, Moriyama K and Hayashi Y: Estrogen deficiency accelerates murine autoimmune arthritis associated with RANKL-mediated osteoclastogenesis. *Endocrinology* 145, 2384-91 (2004)
- 28) Snathers PA, Santoro TJ, Chused TM, Reeves JP and Steinberg AD: Studies of lymphoproliferation in MRL-lpr/lpr mice. *J Immunol* 133, 1955-1961 (1984)
- 29) Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA and Nagata S: Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356, 314-317 (1992)
- 30) Takahashi S, Nose M, Sasaki J, Yamamoto T and Kyogoku M: IgG3 production in MRL/lpr mice is responsible for development of lupus nephritis. *J Immunol* 147, 515-519 (1991)
- 31) Bartlett RR, Popovic S and Raiss RX: Development of autoimmunity in MRL/lpr mice and the effects of drugs on this murine disease. *Scand J Rheumatol Suppl* 75, 290-299 (1988)
- 32) Hayashi Y, Haneji N and Hamano H: Cytokine gene expression and autoantibody production in Sjögren's syndrome of MRL/lpr mice. *Autoimmunity* 23, 269-277 (1996)
- 33) Yanagi K, Haneji N, Hamano H, Takahashi M, Higashiyama H and Hayashi Y: In vivo role of IL-10 and IL-12 during development of Sjögren's syndrome in MRL/lpr mice. *Cell Immunol* 168, 243-250 (1996)
- 34) Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, Martin A, Mosdale B: Immunisation against heterologous Type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* 283, 666-8 (1980)

- 35) Wood FD, Pearson CM, Tanaka A: Capacity of mycobacterial wax D and its subfractions to induce adjuvant arthritis in rat. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 35, 456-67 (1969)
- 36) Carl K E, Tong Z, Jun Z, Tari J, Mamata D, Richard EL, David RB, Terry LB, Horst B, and John DM: Inhibition of superantigen-induced proinflammatory cytokine production and inflammatory arthritis in MRL-lpr/lpr mice by a transcriptional inhibitor of TNF- α . *J Immunol* 157, 1758-1772 (1996)
- 37) Taams LS, van Eden W and Wauben MH: Antigen presentation by T cells versus professional antigen-presenting cells (APC): differential consequences for T cell activation and subsequent T cell-APC interactions. *Eur J Immunol* 29, 1543-1550 (1999)
- 38) Trentham DE, D ynesius-Trentham RA, Orav EJ, Combitchi D, Lorenzo C, Sewell KL, Hafler DA and Weiner HL: Effects of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis. *Science* 261, 1727-1730 (1993)
- 39) Fujii K, Tsuji M, Kitamura A and Murota K: The diagnostic significance of anti-type II collagen antibody assay in rheumatoid arthritis. *Int Orthop* 16, 272-276 (1992)
- 40) Ferraccioli G, Karsh J and Osterland CK: Immunochemical analyses of components of immune complexes in the sera of patients with autoimmune diseases. *J Rheumatol* 10, 881-888 (1983)
- 41) Shen Z, Reznikoff G, Dranoff G and Rock KL: Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol* 158: 2723-2730 (1997)
- 42) Reich EP, Sherwin RS, Kanagawa O and Lareway CA Jr: An explanation for the protective effect of the MHC class II I-E molecule in murine diabetes. *Nature* 341, 326-328 (1989)
- 43) Zamvil SS, Mitchell DJ, Lee N E, Moore AC, Waldor M K, Sakai K, Pothbard JB, McDevitt HO, Steinman L and Acha OH: Predominant expression of a T cell receptor V β gene subfamily in autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 167, 1586-1596 (1987)
- 44) Kotzin BL and Palmer E: The contribution of NZW gene to lupus-like disease in (NZBxNZW) F1 mice. *J Exp Med* 165, 1237-1251 (1987)
- 45) Hashimoto Y, Maxam AM and Greene MI: T-cell antigen-receptor genes in autoimmune mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 7865-7869 (1986)
- 46) Wucherpfenning KW, Newcombe J, Li H, Keddy C, Cuzner ML and Hafler DA: T cell receptor V α -V β repertoire and cytokine gene expression in active multiple sclerosis lesions. *J Exp Med* 175, 993-1002 (1992)
- 47) Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelly M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Benett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattiston W, Campbell P and Boyle WJ: Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89,309-319 (1997)
- 48) Menges M, Rossner S, Voigtlander C, Schindler H, Kukutsch NA, Bogdan C, Erb K, Schuler G and Lutz MB: Repetitive injections of dendritic cell matured with tumor necrosis factor α induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med* 195, 15-21 (2002)
- 49) Bretscher P: The two-signal model of lymphocyte activation twenty-one years later. *Immunol Today* 13, 74-76 (1992)
- 50) Schwartz RH: Acquisition of immunologic self tolerance. *Cell* 57, 1073-1081 (1988)
- 51) Oliveria-dos-Santos AJ, Ho A, Tada Y, Lafaille JJ, Tonegawa S, Mak TW and Penninger JM: CD28 costimulation is crucial for the development of spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 162, 4490-4495 (1999)
- 52) Fraser JD, Irving BA, Crabtree GR and Weiss: Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* 251, 313-316 (1991)
- 53) Thompson CB, Lindsten T, Ledbetter JA, Kunkel SL, Young HA, Emerson SG, Leiden JM and June CH: CD28 activation pathway regulates the production of multiple cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 86,1333-1337 (1989)
- 54) Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S. de Varies JE and Roncarolo MG: CD4+T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737-742 (1997)
- 55) Brunner T, Mogil RJ, LaFace D: Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 373, 441-444 (1995)
- 56) Hamad AR, Schneck JP: Antigen-induced cell death is upregulated by CD4 expression. *Int Rev Immunol* 20, 535-546 (2001)
- 57) Gravalles EM, Darling JM, Ladd AL, Katz JN and Glimcher LH: In situ hybridization studies of stromelysin and collagenase messenger RNA expression in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 34, 1076-1084 (1991)
- 58) Feldmann M and Maini RN: The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*

- (Oxford) 38, 3-7 (1999)
- 59) Feldmann M, Brennan FM and Maini RN: Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 14, 397-440 (1996)
- 60) Charles P, Elliott MJ, Davis D, Potter A, Kalden JR, Antoni C, Breedveld F C, Smolen J S, Eberl G, deWoody K, Feldmann M and Maini RN: Regulation of cytokines, cytokine inhibitors, and acute-phase proteins following anti-TNF- α therapy in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 163, 1521-1528 (1999)
- 61) Nishimoto N, Yoshizaki K, Maeda K, Kuritani T, Deguchi H, Sato B, Imai N, Suemura M, Kakehi T, Takagi N and Kishimoto T: Toxicity, pharmacokinetics, and dose-finding study of repetitive treatment with the humanized anti interleukin 6 receptor antibody MRA in rheumatoid arthritis. Phase I/II clinical study. *J Rheumatol* 30, 1426-1435 (2003)
- 62) Zhang HG, Liu D, Heike Y, Yang P, Wang Z, Wang X, Curiel DT, Zhou T, and Mountz JD: Induction of specific T-cell tolerance by adenovirus-transfected, Fas ligand-producing antigen presenting cells. *Nature Biotechnol* 16, 1045-1049 (1998)
- 63) Zhang HG, Yang P, Xie J, Liu Z, Liu D, Xiu L, Zhou T, Wang Y, Hsu HC, and Mountz JD: Depletion of collagen II-reactive T Cells and blocking of B cell activation prevents collagen II-induced arthritis in DBA/1j mice. *J Immunol* 168, 4164-4172 (2002)
- 64) Liu Z, Xu X, Hsu HC, Tousson A, Yang PA, Wu Q, Liu C, Yu S, Zhang HG, and Mountz JD: C II-DC-AdTRAIL cell gene therapy inhibits infiltration of CII-reactive T cells and CII-induced arthritis. *J Clin Invest* 112, 1332-1341 (2003)