

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

再発性多発軟骨炎患者の生体試料バンク整備と
疾患特異的バイオマーカーの解析

分担研究者 山野嘉久（聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター准教授）

研究要旨：再発性多発軟骨炎（relapsing polychondritis、以下 RP）は、原因不明で稀な難治性疾患であり、重症例では時に致死的となる。RP 患者の診療において、診断マーカー・疾患活動性や治療効果の判定指標マーカー・治療のための標的分子などを解明することは、RP 患者の診療を向上する為にも非常に重要であるが、国内外における病態研究は不十分であり、いまだ不明である。そこで本研究では、RP 患者の検体を収集・バンク化し病態研究を行う臨床試験に関する生命倫理委員会の承認を得て（承認番号：第 1625 号）、RP 患者の検体を収集・保存し、現時点で 16 名の患者由来血清、末梢血単核球、DNA を保存した。さらにその検体を用いて、RP 患者血清のサイトカイン・ケモカイン等に関する網羅的解析を行い、疾患特異的バイオマーカーや治療標的の候補となる分子を複数抽出し、特に、単球系・骨髄系の細胞由来因子の上昇を世界で初めて明らかにした（特許申請準備中）。

A. 研究目的

再発性多発軟骨炎（relapsing polychondritis、以下 RP）は、原因不明で稀な難治性疾患であり、重症例では時に致死的となる。本研究班で施行された RP に関する疫学調査等によって、RP 患者の診療の現状において、以下のような問題点が存在することが判明した。

- ①診断マーカーが存在しない為に、診断が遅れるケースがある。
- ②疾患活動性を評価する為の感度・特異度に優れたバイオマーカーが存在しないために、不十分な治療で放置され症状が進行している症例がある。

③治療はステロイドや免疫抑制剤などの非特異的な薬剤が使用されており、特異的な薬剤の開発が望まれる。

④関節リウマチなどに使用される抗 TNF- α 製剤や抗 IL-6 受容体抗体などの、抗サイトカイン療法の有効性が不明である。

このように、診断マーカー・疾患活動性や治療効果の判定指標マーカー・治療標的分子などを解明することは、RP の早期診断、重症度に応じた治療法の選択、治療予後改善、根本的な治療法の開発にとって必須な研究課題である。しかしながら、RP は希少疾患である為に系統的な研究を施行することは極めて困難であり、

国内外における研究は症例報告等の研究がほとんどであり、RP の病態はいまだ不明な点が多い。

そこで本研究では、RP の病態に関する研究を多数例で施行する体制を整備する為、RP 患者の検体を収集・バンク化する臨床試験に関する生命倫理委員会の承認を得ること。またその承認のもとに、RP 患者の検体を収集・保存し、RP 患者血清のサイトカイン・ケモカイン等に関する網羅的解析を行い、疾患特異的バイオマーカーや治療標的の候補となる分子を抽出することを目的とした。

B. 研究方法

RP 患者の検体（末梢血単核球細胞、血清、DNA、病理検査をした際の残存組織）を収集、バンク化し、それを用いて病態研究を行うことを目的とする臨床研究について、本学の生命倫理委員会の承認をまず得た（承認番号：第 1625 号）。末梢血単核球細胞（PBMC）は液体窒素内に、血清は -80 度に保存し、以下の実験を行った。

まず、活動性 RP 患者 1 例、非活動性 RP 患者 1 例、健常者コントロール 2 例の血清を用いて、Human Cytokine Array kit (R&D systems)にて 36 種類のサイトカイン・ケモカイン等の濃度を半定量的に網羅的にスクリーニングし、活動性 RP 患者で上昇している候補分子を抽出した。

次に、RP 患者 16 例、健常者コントロール 16 例の血清を用いて、ELISA 法やフローサイトメトリーによる cytokine beads array 法にて、25 種類のサイトカインやケモカイン、マトリックスメタロプロテ

イネースなどの炎症関連因子を定量的に測定した。さらに、RP 患者において統計学的有意に上昇していた分子について ROC 曲線を統計学的に算出して感度・特異度に関する順位付けを行い、より優れたバイオマーカーの同定を行った。

（倫理面への配慮）

臨床検体の提供に関しては、文書によるインフォームドコンセントにて許可を頂いた。検体は非連結匿名化して使用した。本研究は聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会の承諾を得て（承認番号：第 1625 号）行った。

C. 研究結果

本年度は、RP 患者 16 例（男性 8 例、女性 8 例）から、PBMC、血清、DNA を分離収集し保存することが出来た。

これらの検体（血清）を用いて、RP の新規バイオマーカーを同定する為にサイトカイン・ケモカインなどの解析を行い、その結果の一部を図 1 に示す。定量的に測定した 25 種類の項目の中で、5 因子（Factor 1 から Factor 5）が RP 患者群において統計学的に有意に上昇していた（特許申請の関係上、因子名を開示できない）。さらに、これらの因子の感度・特異度について ROC 曲線を用いて解析したところ（図 2）、Factor 1 が感度・特異度共に最も優れていた。この分子は単球系・骨髄系の細胞由来因子として知られており、RP 患者における解析の報告はこれまで存在しない。また図には示していないが、TNF- α や IL-6 の濃度に関しては、統計学的有意差は認められなかった。

D. 考察

RP は軟骨の炎症を主病態とするが、一般的な非特異的炎症マーカーである CRP の値は軟骨破壊が進行していても正常範囲内である症例が認められる。それらの症例の中には、CRP が正常値であるがために疾患活動性が低いと判断され、治療が積極的に施行されずに気道軟骨病変が進行してしまう症例も消して稀ではない。この現状は RP の診療において非常に重要な課題の一つであり、その解決のためには、より感度に優れた RP の新規バイオマーカーの同定が必要である。本研究では、サイトカイン・ケモカイン等の網羅的解析により、CRP よりも感度・特異度共に優れたマーカーを同定することが出来た。今後はさらに症例数を増やして検討し、さらに重症度との相関関係、障害部位(臓器)との相関関係、治療効果との相関関係などについての解析を実施し、有用性に関するエビデンスの蓄積が必要であると考えられる。

この分子の RP 患者における上昇は世界で初めての知見であり、CRP などの非特異的炎症マーカーとは異なり、単球系・骨髄系の細胞由来因子であるという点は、RP の病態を理解する上でも非常に重要な知見となる可能性が高い。局所病変における本分子の発現や分布などに関する解析により、本分子の RP 病態における役割を今後明らかにしていきたい。

また、本分子は RP の病態特異的な治療

の標的としても将来発展する可能性が期待される。今回の研究では、TNF- α や IL-6 も測定したが、RP 患者で高い症例は一部であり、当初期待された抗 TNF- α 抗体や抗 IL-6 受容体抗体などの製剤の有効性に関しては、今後慎重に判断する必要があるものと示唆された。一方で、本分子の発現はほとんどの RP 患者で亢進しており、治療標的の有用性に関する検討は重要であると思われる。

E. 結論

RP 患者の検体を収集・バンク化し病態研究を行う臨床試験に関する生命倫理委員会の承認を得て(承認番号: 第 1625 号)、RP 患者の検体を収集・保存し、現時点で 16 名の患者由来血清、末梢血単核球、DNA を保存した。さらにその検体を用いて、RP 患者血清のサイトカイン・ケモカイン等に関する網羅的解析を行い、疾患特異的バイオマーカーや治療標的の候補となる分子を複数抽出し、特に、単球系・骨髄系の細胞由来因子の上昇を世界で初めて明らかにした(特許申請準備中)。今後はさらに症例を蓄積し、病理学的検討、RP 患者診療における有用性、治療標的としての有用性などに関する検討を重ねていく研究の必要性が高い。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Oka H, Yamano Y, Shimizu J, Yudo K, Suka M, Suzuki N. Nationwide epidemiologic study of relapsing polychondritis in Japan; results of 239 cases. (submitted for publication).

2. 学会発表

1. 岡寛、遊道和雄、山野嘉久、鈴木登、尾崎承一、須賀万智. 本邦における再発性多発軟骨炎の疫学調査研究 102 例の報告、第 20 回日本リウマチ学会関東支部学術集会、2009 年 12 月.

2. 鈴木登、山野嘉久、岡 寛、遊道和雄. - 再発性多発性軟骨炎-治療研究中間報告会、2009 年 9 月 27 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：

本研究で同定した新規分子に関して、RP 患者における診断マーカー・疾患活動性マーカー・治療標的として特許申請準備中である。

2. 実用新案登録：なし

図 1 RP 患者における血清中の各種サイトカイン・ケモカインの定量的解析

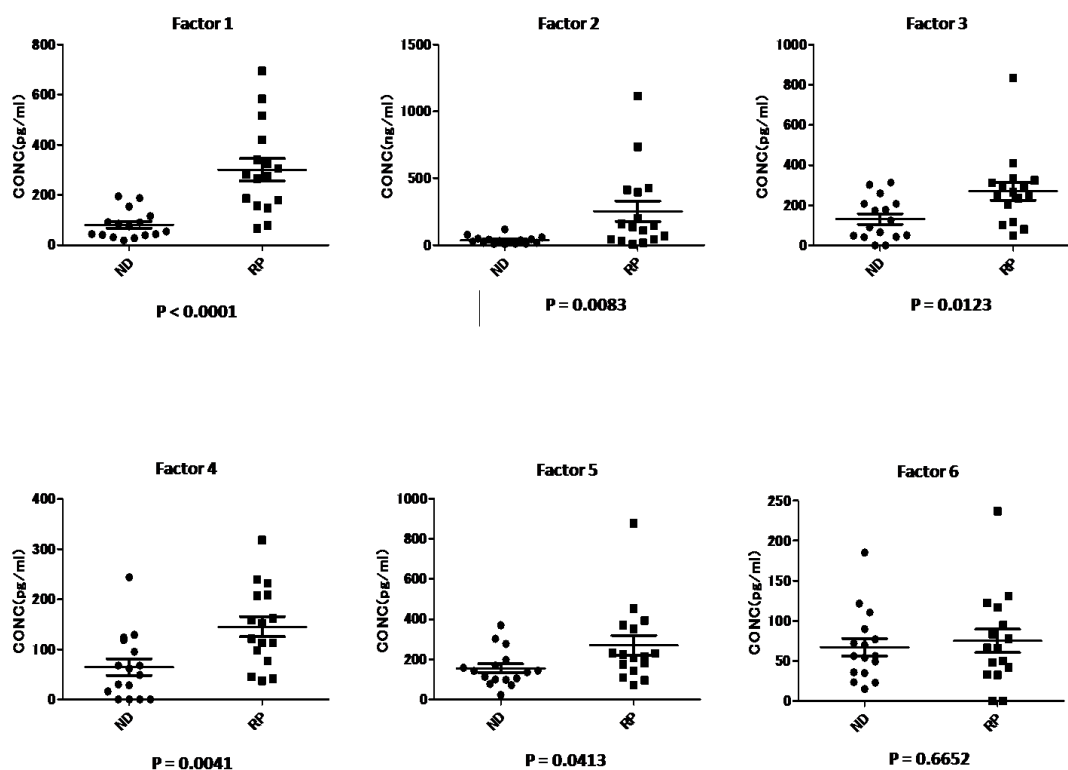


図2 RP患者血清中バイオマーカー候補因子のROC曲線による解析

