

再発性多発軟骨炎における疾患活動性マーカーの探索研究

研究分担者 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）は全身の軟骨組織における再発性の炎症を特徴とする難治性疾患である。これまで RP の疾患活動性や治療効果判定を評価する検査に関しては、C 反応性タンパク質（以下 CRP）や抗 typeII コラーゲン抗体が用いられている。しかし、これらは正常範囲内にあっても軟骨破壊が進行することも多く、より感度に優れた疾患活動性マーカーの同定の必要性が高い。そこで本研究では、より優れた RP の疾患活動性マーカーを同定することを目的とし、活動性 RP 患者、非活動性 RP 患者および健常者血清中の 28 種類のマーカー候補分子を測定した。その結果、可溶性 TREM-1 (sTREM-1)、インターフェロン γ 、CCL4/MIP-1 β 、VEGF および MMP-3 が健常者よりも RP 患者で有意に高値を示すことが分かり、両者を分ける感度と特異度において sTREM-1 が最も優れていた。また既存マーカーである CRP、COMP、抗 typeII コラーゲン抗体は活動性 RP 患者群よりも非活動性 RP 患者群で高値を示す傾向はあるものの有意差を認めないのに対し、sTREM-1 は活動性 RP 患者群において有意に高値を示した。以上より、可溶性 TREM-1 は既存のマーカーよりも優れた RP の疾患活動性マーカーになる可能性が示唆された。今後はこの可溶性 TREM-1 の治療応答性マーカーとしての有用性を検討する必要がある。

A. 研究目的

再発性多発軟骨炎（以下 RP）は、原因不明の稀な難治性疾患である。その病態は全身の軟骨組織およびムコ多糖を多く含む組織における寛解と再発を繰り返す炎症によって特徴づけられる。耳介の発赤・腫脹・疼痛、鞍鼻、関節の腫脹・疼痛、嗄声、咳嗽、眼痛、難聴、眩暈など多彩な症状を示し、気道病変や血管炎により予後不良な例が存在する。RP のような慢性疾患では疾患の活動性を正しく評価し、それに応じた治療を行うことが長期予後を改善するためには重要である。これまで RP 患者の疾患活動性は CRP や抗 type II コラーゲン抗体によって評価されており、急性期には多くの RP 患者で高値を認める。しかしながら、

CRP が正常範囲内にある症例でも軟骨の破壊・線維化が進む例も多く、CRP では疾患活動性の評価が困難な面がある。また抗 type II コラーゲン抗体も疾患活動性との相関が報告されているが、陽性者は RP 患者の 30~50% にすぎず、感度・特異度もあまり高くないという報告もある。そこで、本研究はより優れた RP の疾患活動性マーカーを同定することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 本研究では Damiani による診断基準を用いて診断された RP 患者 15 名と年齢、性別を合わせた健常者 16 名を対象とした (表 1)。まず RP 患者において上昇するサイトカイン

およびケモカインを特定する目的で、両群の血清を用いて、以下の項目を測定した。

IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF, IFN γ , GM-CSF, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CXCL10/IP-10, vascular endothelial growth factor (VEGF), CX3CL1/Fractalkine の測定には Cytometric Bead Array Flex set system (BD Biosciences) を用いた。IL-17, matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-2, MMP-3, MMP-13, 可溶性 TREM-1 (sTREM-1), cartilage oligomeric matrix protein (COMP) および抗 typeII コラーゲン抗体は ELISA を用いて、測定を行った。CRP 濃度 (CRP および高感度 CRP) は三菱化学メディエンスにおいて N-Latex CRPII キットを用いた nephelometry によって測定された。

両群の比較は Welch の t 検定によって行い、さらに感度・特異度を解析するために Receiver operating characteristic (ROC) 解析も実施した。

(2) 上記のマーカー候補分子の中で、疾患活動性と関連があるものを探索する目的で、15名の RP 患者を活動性と非活動性の2群に分け、すべてのマーカー候補分子についてこの両群で比較した。活動性 RP とする基準は耳介、鼻、気管の3か所のうち、2か所以上の軟骨炎を認める例および1か所とその他2つの症状(眼の炎症、関節炎、又は聴覚・前庭症状)を有する例とした。この基準において活動性 RP 患者8名、非活動性 RP 患者7名となり、この両群の比較を Welch の t 検定によって実施した。

(3) RP 患者血清中で有意に上昇の認められた sTREM-1 の疾患特異性を調べるために、HTLV-1 関連脊髄症 (HAM)、全身性強皮症 (PSS)、全身性エリテマトーデス (SLE)、関節リウマチ (RA) の患者血清を用いて、sTREM-1 濃度を測定し、比較解析を行った。統計学的には

クラスカル・ウォリス検定を行い、対照となる健常者群との多重比較は Dunn の事後検定によって実施した。

(4) RP 患者の病変部における TREM-1 発現の有無と局在を調べるために、免疫組織染色を行った。コントロールとして非特異的な炎症による肉芽組織を使用した。

(倫理面への配慮)

臨床検体の収集に際しては、本学の生命倫理委員会で承認された(承認番号:第1625号)同意書を用いて、不利益や危険性の排除などに関するインフォームドコンセントを行った。また検体は、提供者を特定できないように個人情報管理者が連結不可能匿名化により番号化し、患者の人権擁護に努めた。

C. 研究結果

(1) 28種類のマーカー候補分子を測定した結果、sTREM-1、IFN γ 、CCL4/MIP-1 β 、VEGF およびMMP-3が健常者群よりもRP患者群で有意に高値を示すことが分かった(表2)。この5つの分子をROC曲線によって解析すると、sTREM-1が健常者とRP患者を分ける感度・特異度に最も優れていた(ROC曲線下面積 = 0.93; 95%信頼区間 0.85 - 1.00; $p < 0.0001$) (図1)。sTREM-1のカットオフ値を158pg/mlとすると、感度は86.7%、特異度は86.7%であった。

(2) 28種類のマーカー候補分子を活動性RP患者群と非活動性RP患者群で比較すると、RPのマーカーとして報告のあるCRP、COMPおよび抗typeIIコラーゲン抗体は確かに活動性RP患者において高値を示すが、非活動性RP患者群との比較において有意差を示すことができなかった。それに対して、sTREM-1は活動性RP患者群において有意に高値を示した($p = 0.0403$) (表3)。

(4) 血清 sTREM-1 値は健常者と比較して、

HAM および PSS では有意差を認めなかったが、SLE および RA は RP と同様に有意に高値を示した (図 2)。

(5) TREM-1はRP患者の病変部にある軟骨細胞上では検出されず、病変部にある炎症性肉芽組織の血管内皮細胞において発現していることが明らかになった (図 3)。

D. 考案

28 種類の RP マーカー候補分子の中から sTREM-1 が RP の疾患活動性マーカーとして優れていることがわかった。それは血清 sTREM-1 濃度によって、健常者と RP 患者を明確に選別できるだけでなく、活動性 RP および非活動性 RP も分けることが可能であったためである。ただし RP 以外にも SLE や RA 患者においても高値を示したため、診断マーカーとしては不適切であると考えられた。

TREM-1は免疫グロブリンスーパーファミリーの一員で、主に好中球、単球/マクロファージの細胞膜上に発現していることが知られるが、本研究により RP 病変部では血管内皮細胞でも発現することが確認された。sTREM-1 は当初、細菌感染症において血清中で高値を示すことが報告され、その後、RA などの非感染性の慢性炎症性疾患においても高値を示すことが報告された。本研究より、sTREM-1 が慢性炎症性疾患でも RP、RA および SLE では高値を示すが HAM や PSS で高値を示さなかったことから、すべての慢性炎症性疾患で上昇する訳ではないことが判明した。TREM-1 は炎症性メディエーターの分泌を誘導し、炎症を増悪させる作用を持つことから、RP の病態に関与している可能性が示唆される。

RP の疾患活動性マーカーとして報告のある COMP (軟骨基質の構成成分の 1 つ) に関して、本研究では活動性 RP と非活動性 RP 間で有意差を認めなかったが、軟骨基質分解酵素である血清 MMP-3 レベルとの高い相関 (図 4) が

認められ、COMP や MMP-3 は軟骨破壊の指標としての意義が想定された。

E. 結論

本研究により CRP, COMP および抗 type II コラーゲン抗体よりも優れた RP の疾患活動性マーカーとして血清 sTREM-1 を同定することができた。今後は RP 患者の血清 sTREM-1 レベルの経時的な変化、特に治療応答性マーカーとしての有用性を検討する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato T, Konomi K, Fujii R, Aono H, Aratani S, Yagishita N, Araya N, Yudoh K, Beppu M, Yamano Y, Nishioka K and Nakajima T. Prostaglandin EP2 receptor signalling inhibits the expression of matrix metalloproteinase 13 in human osteoarthritic chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 70 (1): 221-226, 2011
- 2) Sato T, Fujii R, Konomi K, Yagishita N, Aratani S, Araya N, Aono H, Yudoh K, Suzuki N, Beppu M, Yamano Y, Nishioka K, Nakajima T. Overexpression of SPACIA1/SAAL1, a new gene that is involved in synoviocyte proliferation, accelerates the progression of synovitis in mice and humans. *Arthritis Rheum* 63 (12): 3833-3842, 2011
- 3) Sato T, Yamano Y, Ando H, Tomaru U, Shimizu Y, Okazaki T, Nagafuchi H, Shimizu J, Ozaki S, Miyazawa T, Yudoh K, Oka H, Suzuki N. Serum level of soluble triggering receptor

- expressed on myeloid cells 1 (sTREM-1) as a biomarker of disease activity in relapsing polychondritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, submitted.
- 4) 鈴木登、遊道和雄、岡寛、山野嘉久. 再発性多発軟骨炎 リウマチ科 45(5):510-514, 2011.
2. 学会発表
- 1) Yamano Y. The contribution of Asian researchers to the field of rheumatology. *Tokyo-Shanghai Workshop on Rheumatology 2011*. November 2011, Tokyo.
- 2) 岡寛、山野嘉久、遊道和雄、清水潤、鈴木登：再発性多発軟骨炎 31 例の患者の実態調査. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 神戸, 2011
- 3) 山野嘉久、佐藤知雄、外丸詩野、岡崎貴裕、永渕裕子、尾崎承一、清水潤、遊道和雄、岡寛、鈴木登：再発性多発軟骨炎患者における血清中の可溶性 TREM-1 濃度の上昇. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 神戸, 2011
- G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
なし

表 1 被験者の臨床情報

	健常者		RP 患者					
	(n = 16)		全例(n = 15)		活動性(n = 8)		非活動性(n = 7)	
年齢(年)	40.5	[27-67]	47	[10-81]	50.5	[10-74]	44	[27-81]
女性の割合	50.0%		53.3%		50.5%		57.1%	
罹病期間(年)			5	[1-19]	12	[4-19]	4	[1-8]
耳介軟骨炎			46.7%		62.5%		28.6%	
鼻軟骨炎			40.0%		62.5%		14.3%	
気管軟骨炎			66.7%		87.5%		42.9%	
耳症状			53.3%		87.5%		14.3%	
関節炎			46.7%		75.0%		14.3%	
眼の炎症			33.3%		50.0%		14.3%	

表 2 被験者健常者とRP患者におけるマーカー候補分子の血清濃度の比較

マーカー候補	単位	健常者(n = 16)		RP 患者(n = 15)		P 値
sTREM-1	pg/ml	92.48	± 56.45	281.87	± 150.42	0.0002
IFN-γ	pg/ml	検出できず		5.65	± 6.25	0.0035
MIP-1β	pg/ml	64.38	± 66.03	133.76	± 68.13	0.0075
VEGF	pg/ml	131.03	± 104.66	267.46	± 187.03	0.0212
MMP-3	ng/ml	35.96	± 29.23	243.12	± 313.50	0.0229
IP-10	pg/ml	154.72	± 91.72	229.50	± 114.03	0.0552
RANTES	ng/ml	2.70	± 1.43	37.66	± 15.66	0.0582
hs-CRP	ng/ml	0.04	± 0.05	0.30	± 0.50	0.0643
IL-17A	pg/ml	1.17	± 1.52	0.33	± 0.79	0.0673
TNF	pg/ml	検出できず		0.76	± 2.01	0.1646
IL-4	pg/ml	検出できず		0.80	± 2.13	0.1671
IL-6	pg/ml	検出できず		1.27	± 3.38	0.1686
COMP	ng/ml	14.38	± 4.28	24.33	± 26.72	0.1750
αCOLII Ab	U/ml	51.75	± 37.95	263.93	± 577.87	0.2109
MMP-13	ng/ml	0.31	± 0.04	0.28	± 0.09	0.2367
MMP-2	ng/ml	125.01	± 10.45	133.01	± 28.45	0.3191
IL-1α	pg/ml	検出できず		0.54	± 2.09	0.3343
IL-1β	pg/ml	検出できず		0.58	± 2.24	0.3343
IL-10	pg/ml	検出できず		0.69	± 2.69	0.3343
IL-12p70	pg/ml	検出できず		0.35	± 1.36	0.3343
Fractalkine	pg/ml	検出できず		6.55	± 25.38	0.3343
IL-8	pg/ml	12.93	± 11.52	16.24	± 7.05	0.3413
MMP-1	ng/ml	5.19	± 3.15	4.30	± 3.67	0.5129
MCP-1	pg/ml	67.08	± 43.78	72.29	± 59.36	0.7842

表3 活動性RP患者と非活動性RP患者におけるマーカー候補分子の血清濃度の比較

マーカー候補	単位	活動性 RP (n=8)	非活動性 RP (n=7)	P値
sTREM-1	pg/ml	353.39 ± 158.03	200.14 ± 95.11	0.0403
VEGF	pg/ml	339.19 ± 218.10	185.48 ± 106.88	0.1066
hs-CRP	ng/ml	0.48 ± 0.64	0.10 ± 0.08	0.1342
TNF	pg/ml	1.43 ± 2.65	検出できず	0.1708
IL-6	pg/ml	2.38 ± 4.45	検出できず	0.1752
IL-17A	pg/ml	0.05 ± 0.14	0.71 ± 1.14	0.2129
MMP-3	ng/ml	334.71 ± 400.33	138.44 ± 135.59	0.2254
MMP-1	ng/ml	5.35 ± 4.35	3.07 ± 2.51	0.2658
MMP-13	ng/ml	0.30 ± 0.11	0.26 ± 0.05	0.3469
IL-1 α	pg/ml	1.01 ± 2.86	検出できず	0.3506
IL-1 β	pg/ml	1.09 ± 3.07	検出できず	0.3506
IL-10	pg/ml	1.30 ± 3.68	検出できず	0.3506
IL-12p70	pg/ml	0.66 ± 1.87	検出できず	0.3506
Fractalkine	pg/ml	12.29 ± 34.75	検出できず	0.3506
MMP-2	ng/ml	139.68 ± 25.79	125.38 ± 31.39	0.3589
COMP	ng/ml	30.26 ± 35.31	17.56 ± 10.53	0.3598
IP-10	pg/ml	251.14 ± 110.78	204.78 ± 121.20	0.4563
IFN- γ	pg/ml	4.54 ± 7.29	6.93 ± 5.06	0.4703
α COLII Ab	U/ml	382.34 ± 808.48	162.44 ± 311.65	0.5525
IL-8	pg/ml	17.31 ± 6.34	15.01 ± 8.11	0.5571
MCP-1	pg/ml	80.59 ± 78.04	62.80 ± 30.33	0.5660
MIP-1 β	pg/ml	141.68 ± 90.46	124.71 ± 33.26	0.6332
IL-4	pg/ml	0.83 ± 2.36	0.76 ± 2.02	0.9509
RANTES	ng/ml	37.87 ± 17.21	37.42 ± 15.05	0.9585

図1 RP マーカー候補分子の ROC 解析

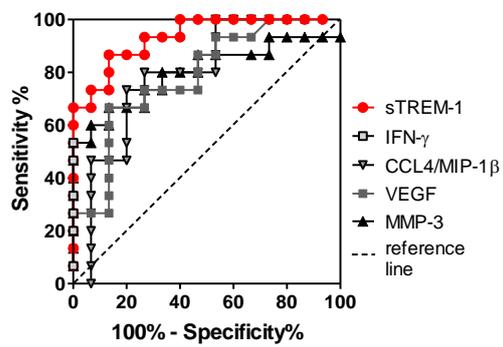


図2 各種炎症性疾患における sTREM-1 濃度

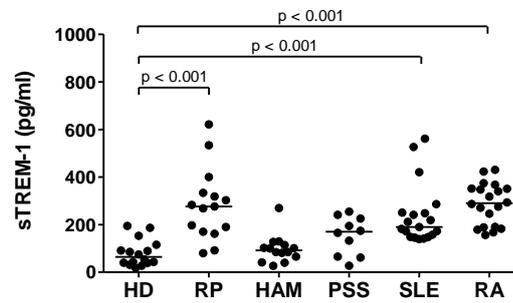


図3 RP 患者の軟骨炎病変部における TREM-1 の局在

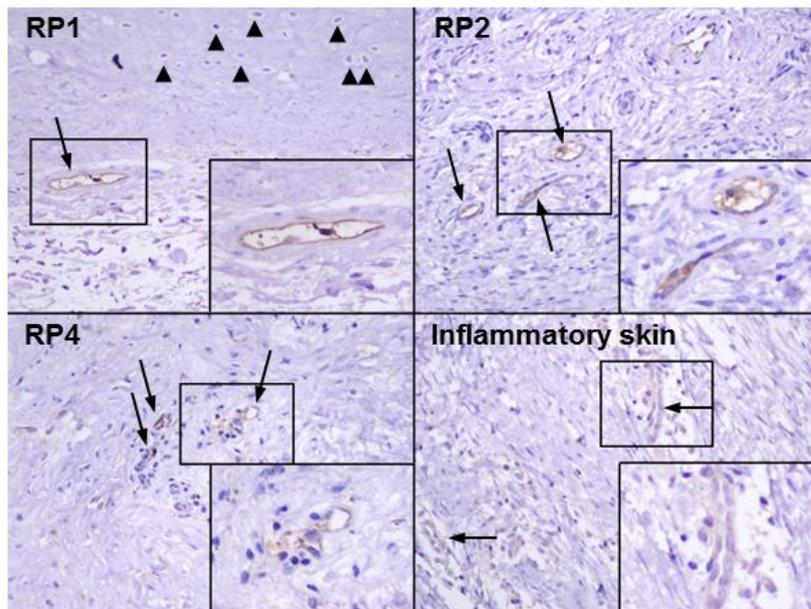


図4 RP 患者血清における COMP 濃度と MMP-3 濃度の相関性

