

## 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、28 種類のマーカー候補分子を活動性 RP 患者と非活動性 RP 患者間で比較した。その結果、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。実際、活動性 RP 患者において sTREM-1 値の変動が治療に応答した臨床症状の変化と一致した例を認めた。以上から、sTREM-1 は RP の疾患活動性マーカーとして既存のマーカーよりも優れている可能性が示唆された。

### 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、昨年度までに RP を検出する感度のよいマーカーを同定する目的で 28 種類のマーカー候補分子の中から、健常者と比較して RP 患者血清で有意に高値を示す分子を探索し、可溶性 TREM-1 (sTREM-1)、インターフェロン $\gamma$ 、CCL4/MIP-1 $\beta$ 、VEGF および MMP-3 を同定した。今年度は、疾患活動性をより正確に反映するマーカーを同定することを目的として、以下の実験を行った。

### 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 名を以下の

criteria に従って、活動性と非活動性の 2 群に分け、マーカー候補分子をこの両群で比較した (表 1、表 2)。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。

測定した項目は以下の通りである。

IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF, IFN $\gamma$ , GM-CSF, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , 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。

(2) 血清 sTREM-1 値が RP の疾患活動性を反映し、治療に対して応答するかどうかを調べるために、メトトレキサートによる治療を開始した活動性 RP 患者において、臨床症状、治療内容、sTREM-1 値および CRP 値が経時的に得られた例があり、その結果を解析した。

(3) RP 患者において血清 sTREM-1 値が高値を示す機序を推定するため、健常者 2 名および RP 患者 2 名の末梢血単核球を用いて、5 つの各細胞群における膜型 TREM-1 の発現を解析・比較した。具体的には、フローサイトメトリーを用いて、CD4+T 細胞 (CD3+CD4+細胞)、

CD8+T 細胞 (CD3+CD8+細胞)、B 細胞 (CD3-CD19+細胞)、単球 (CD3-CD14+細胞) および NK 細胞 (CD3-CD56+細胞) における TREM-1 発現を解析した。

(4) RP 患者の病変部における膜型 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 2)。

(2) 図 1 に示すように、メトトレキサートによる治療を開始後、嗄声が改善すると同時に、720.5 pg/ml と異常高値を示していた sTREM-1 レベルが 106.6 pg/ml まで低下した。この値は我々が以前、決定した「健常者と RP 患者を判別するカットオフ」である 158 pg/ml を下回るレベルである。また、重要なことにメトトレキサート投与前、CRP 値は 0.41 mg/dl と正常値に近く、疾患活動性が捉えられていない状況においても、sTREM-1 値は異常高値を

示した。

(3) 図2に RP 患者1名の解析結果を示す。その結果から単球 (CD3-CD14+細胞) においてのみ、膜型 TREM-1 の発現レベルが高いことが判明した。そこで、RP 患者および健常者由来の単球上の膜型 TREM-1 発現レベルを比較したが、両者に発現の差を認めなかった(図3)。

(4) 膜型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4)。

#### D. 考案

昨年度までに健常者と比較して RP 患者血清で有意に高値を示す分子として、sTREM-1、インターフェロン $\gamma$ 、CCL4/MIP-1 $\beta$ 、VEGF および MMP-3 を同定していたが、その中で血清 sTREM-1 レベルは活動性 RP および非活動性 RP も区別することが可能であったため、RP の疾患活動性マーカーとして優れていることが明らかとなった。実際、活動性 RP 患者において sTREM-1 値の変動が治療に应答した臨床症状の変化と一致した例を認めた。これは血清 sTREM-1 が RP の疾患活動性マーカーだけでなく、治療応答マーカーである可能性も示唆するものである。

膜型 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、本研究では少なくとも単球を含む末梢血単核球において、健常者と RP 患者間で膜型 TREM-1 の発現量に差を認めなかった。しかし、RP 病変部の血管内皮細胞ではコントロールでは確認できない膜型 TREM-1 が発現していたことから、活動性の高い RP 患者における末梢血中の sTREM-1 の上昇は血管内皮細胞上の TREM-1 から切断・遊離されてくる可能性が考えられた。

#### 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。この血清 sTREM-1 レベルは RP の治療応答性マーカーとしての可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Tamai Y., Hasegawa A., Takamori A., Sasada A., Tanosaki R., Choi I., Utsunomiya A., Maeda Y., Yamano Y., Eto T., Koh K., Nakamae H., Suehiro Y., Kato K., Takemoto S., Okamura J., Uike N., Kannagi M. Potential contribution of a novel Tax epitope-specific CD4+ T cells to graftversus-Tax effects in adult T-cell leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Immunology*, in press, 2013.

2) Sato T., Yamano Y., Tomaru U., Shimizu Y., Ando H., 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 as a biomarker of disease activity in relapsing polychondritis. *Modern Rheumatology*, in press, 2013.

3) Yagishita N., Aratani S., Leach C., Amano T., Yamano Y., Nakatani K., Nishioka K. and Nakajima T.

RING-finger type E3 ubiquitin ligase inhibitors as novel candidates for the treatment of rheumatoid arthritis.  
*Int. J. Mol. Med.*, 30:1281-1286, 2012.

なし

- G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）  
なし

2. 学会発表

表 1 被験 RP 患者の臨床情報

	RP 患者		
	全例(n = 15)	活動性(n = 8)	非活動性(n = 7)
年齢(年)	47 [10-81]	50.5 [10-74]	44 [27-81]
女性の割合	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 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

Biomarker candidates <sup>a</sup>	Units	Active RP (n=8)		Inactive RP (n=7)		P*
		Mean	± SD	Mean	± SD	
sTREM-1	pg/ml	353.39	± 158.03	200.14	± 95.11	<b>0.0403</b>
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	N.D.		0.1708
IL-6	pg/ml	2.38	± 4.45	N.D.		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 $\alpha$	pg/ml	1.01	± 2.86	N.D.		0.3506
IL-1 $\beta$	pg/ml	1.09	± 3.07	N.D.		0.3506
IL-10	pg/ml	1.30	± 3.68	N.D.		0.3506
IL-12p70	pg/ml	0.66	± 1.87	N.D.		0.3506
CX3CL1	pg/ml	12.29	± 34.75	N.D.		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
CXCL10	pg/ml	251.14	± 110.78	204.78	± 121.20	0.4563
IFN- $\gamma$	pg/ml	4.54	± 7.29	6.93	± 5.06	0.4703
CXCL8	pg/ml	17.31	± 6.34	15.01	± 8.11	0.5571
CCL2	pg/ml	80.59	± 78.04	62.80	± 30.33	0.5660
CCL4	pg/ml	141.68	± 90.46	124.7	± 33.26	0.6332
IL-4	pg/ml	0.83	± 2.36	0.76	± 2.02	0.9509
CCL5	ng/ml	37.87	± 17.21	37.42	± 15.05	0.9585
$\alpha$ COLII Ab <sup>b</sup>	U/ml	382.34	± 808.48	162.44	± 311.65	0.5525

RP, relapsing polychondritis; sTREM-1, soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1; VEGF, vascular endothelial growth factor; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; TNF, tumor necrosis factor; N.D., not detected; IL, interleukin; MMP, matrix metalloproteinase; CX3CL, chemokine (C-X3-C motif) ligand; COMP, cartilage oligomeric matrix protein; CXCL, chemokine (C-X-C motif) ligand; IFN, interferon; CCL, chemokine (C-C motif) ligand;  $\alpha$ COLII Ab, anti-type II collagen antibody

<sup>a</sup> IL-2, IL-5, GM-CSF, CCL3 の血清レベルはすべての症例において検出限界以下であった。

<sup>b</sup> 検体の不足により、本項目のサンプルサイズは以下の通り (active RP: n = 6, inactive RP: n = 7)。

\*ウェルヒの T 検定による。0.05 以下の P 値のみ太字で表示した。

図1 活動性RP患者における臨床経過とマーカーの経時的変化の一例

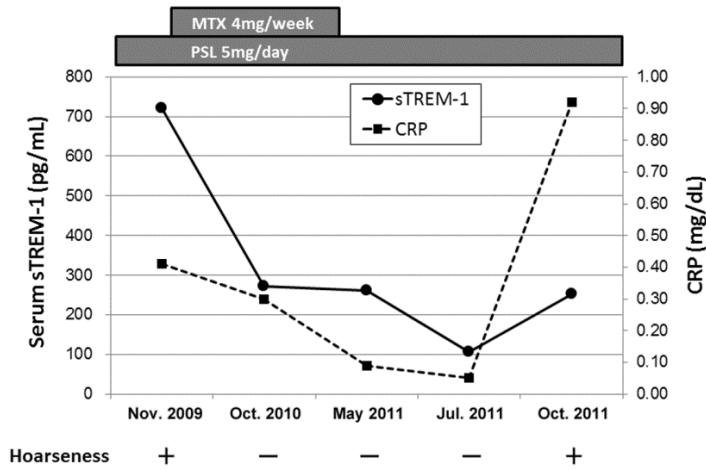


図2 末梢血単核球中のTREM-1の発現

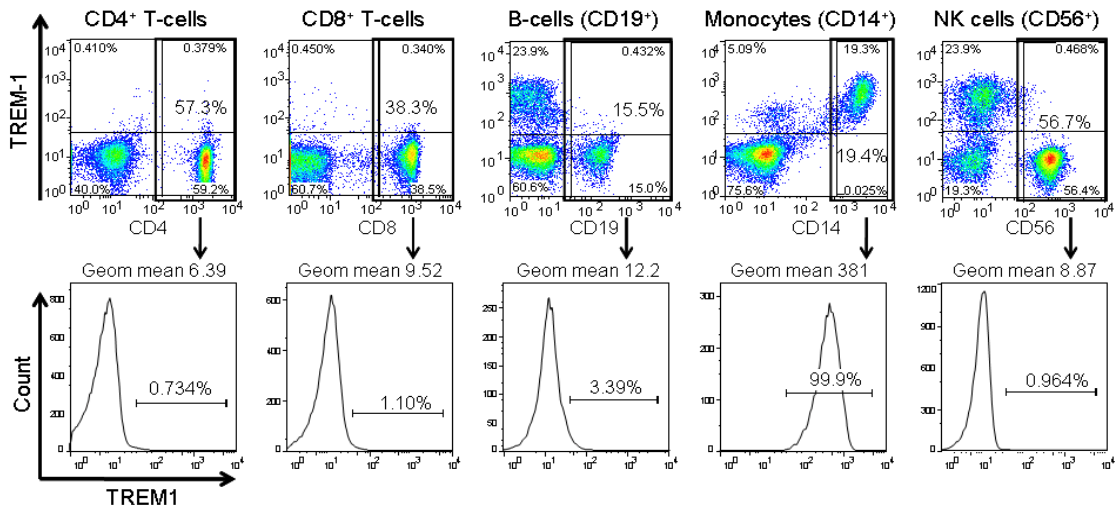


図3 健常者およびRP患者における単球上のTREM-1発現比較

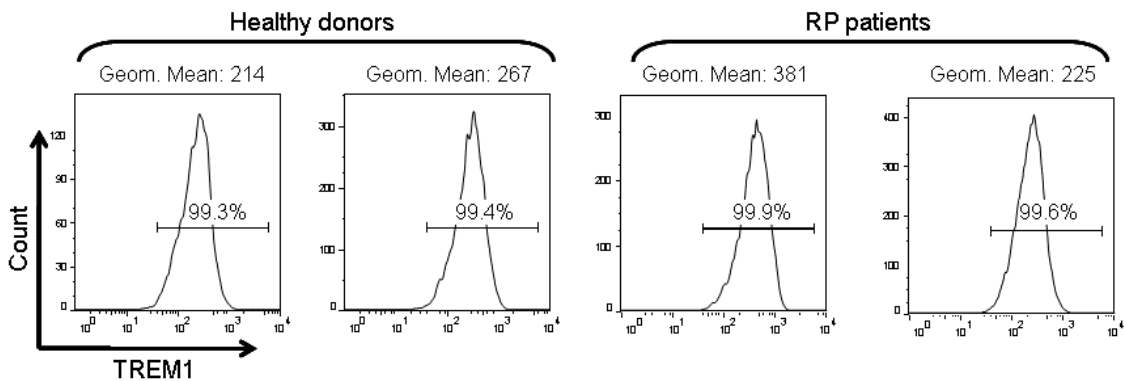


図4 RP 患者の軟骨炎病変部における TREM-1 の局在

