

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
分担研究報告書

再発性多発軟骨炎の診断と治療体系の確立
—再発性多発軟骨炎における血清サイトカイン測定の意義—

研究分担者 清水 潤 聖マリアンナ医科大学免疫学・病害動物学

研究要旨：再発性多発軟骨炎（relapsing polychondritis、以下 RP）は、全身の軟骨に炎症を来たしうる原因不明の難治性疾患である。本邦における患者数は 500 人程度と推察され、疫学・病態研究が端緒についたばかりであり、診断・治療指針は未確立である。

われわれは新規活動性指標の探索の一端として、RP患者血清の網羅的検討より血清sTREM-1レベルが有用であることを発見し報告した。昨年度は治療介入を見据えて、リンパ球機能より簡便な方法で評価しようと試みた。一般にヒトの自己免疫症候群は、細胞性免疫の抑制を要するTh1タイプの疾患と、自己抗体の上昇が顕著となる液性免疫が主体のTh2優勢タイプに2分される。この免疫所見をもとに治療方針を立てるためであるが、これにはこのタイプの規定には血中のサイトカインという物質の濃度を参考にする。RPの結果はTh1優勢タイプであった。

本年度はRP患者会の協力を得て、さらにサンプルを収集し上記所見の再検査を実施した。さらに同時に収集した、患者臨床情報との比較検討を試みた。その結果は、患者9症例のサンプルすべてのサイトカイン濃度が測定感度以下であった。患者臨床情報より、9症例ともに臨床的に寛解状態にあり、疾患活動性を示すものではないかと考えられた。

今後さらに症例を積み重ねTh1/Th17という自己免疫疾患における代表的な疾患パラメーターを解析し、治療指針確立の一助とすることを目的とする。

A.研究目的

i)研究の背景

再発性多発軟骨炎の疫学調査

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る。本邦における疫学情報や病態研究は不十分であり、かつ診断・治療のための指針が作成されていない。その為、認知度が低く診断が見過ごされているケースも多く、気道軟骨病変などの臓器病変を伴う患者の予後は極めて不良であり、診断、治療法の確立が急務である。

我々は平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業[課題名：再発性多発軟骨炎の診断と治療体系の確立]において、RP に対する患者実態・疫学調査(RP 239 症例)を行ない、本邦の患者実態として、本邦全体の患

者数がおおよそ 500 人程度と推察されること、発症年齢は 3 歳より 97 歳まで多年齢層にわたり、平均は 52.7 歳であること、男性と女性の割合がほぼ同じであること、重症例となりやすい気道病変を持つ患者の割合が 50%程度になることを明らかにした。治療においては、気道病変はステロイド単独治療ではその病勢を抑えられないため、免疫抑制剤(メソトレキセート)が必要となることを発見した(文献 1)。

そこで現在免疫抑制剤を用いた臨床試験を計画しており、そのため新たな患者登録・追跡システムが必要となった。その際、適切かつ正確な臨床検査データの収集と、疾患機序解明のための新規疾患パラメーターの開発が不可欠である。

ii) 本年度研究の目的=新規疾患パラメーターの開発の継続

a) 単球性因子 TREM-1 (文献 1)

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 γ 、CCL4/MIP-1 β 、VEGF および MMP-3 を同定した。その中でも血清 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り、RP の疾患活動性マーカーとして優れていることを発見した。

b) 血清サイトカイン

ヒトの免疫機能は、自然免疫と獲得免疫にてなりたっており、上記 a) の TREM-1 は主に自然免疫の作用によるバイオマーカーである。さらに自然免疫に加えて獲得免疫の異常を研究することは治療効果を上昇させるために重要なことと考える。近年、様々なヒト免疫疾患において Th1 細胞および Th17 細胞という獲得免疫の主要な細胞に異常がみられることが報告されている。昨年度はこの細胞群の維持に必須であるサイトカインの血中濃度を測定した。

獲得免疫の要である T 細胞は、生体の局所にあわせた機能の発揮のため、網内系においていくつかのサブセットに分化する。Th1 細胞/Th2 細胞/Th17 細胞は、代表的な炎症惹起性のサブセ

ットと考えられており、それぞれ細胞内寄生菌排除、抗体産生による細胞外寄生菌排除、真菌排除を任務とすると考えられている。その任務を遂行するにあたって必要となるのがサイトカインである。Th1 細胞/Th2 細胞/Th17 細胞は、それぞれ IL-12、IL-4、IL-23 というサイトカインを要する。炎症を惹起するためにそれぞれのリンパ球が分泌する物質もサイトカインであり、IFN γ 、IL-4、IL-17 によって適切な免疫反応を起こすことによって外敵を排除する。

ヒト免疫疾患ではこれらのサイトカインが異常に分泌される状態と考えられている。代表的な疾患は Th1 細胞/Th2 細胞/Th17 細胞の異常の順で、関節リウマチ/SLE/炎症性腸疾患とされている(文献 2~5)。この疾患概念にてすべての免疫疾患において、おおよその治療指針が考えられている。

25 年度は疾患および健常者血清中の IFN γ 、IL-12、IL-17 および IL-23 濃度を観察し、生体内での T 細胞分化誘導環境を検討した。

対象は RP6 例、健常者 8 例、疾患コントロールとしてベーチェット病 4 例。それぞれのキットを用い測定した。

RP において Th1 細胞が産生する IFN γ の上昇、Th1 細胞の維持に重要な IL-12 の低下がみられ、Th1 細胞の過剰な活性化とそのネガティブフィードバックが考察された(図 1)。

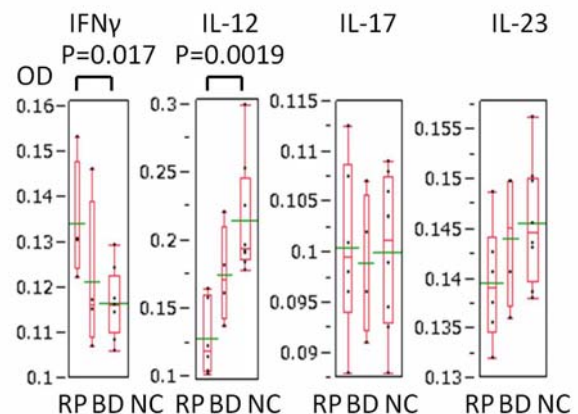


図1 RP、ベーチェット病(BD;疾患コントロール)、健常者(NC)の血中Th1/Th17細胞関連サイトカイン濃度

さらにそのIFN γ 濃度はIL-23濃度と正相関(P=0.028)を示した(図2)。IL-23がその活性に重要に関与するTh17細胞もTh1細胞機能を介して、二次的にRPの病態形成に関わることが示唆される。

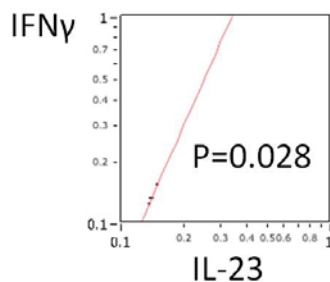


図2 RPにおける血中サイトカイン濃度の相関検討

iii) 期待される研究成果

- ①RPの病態・病勢を的確に反映する、簡便な検査法の確立。
- ②RPに有効性が高いと考えられるメソトレキサート(MTX)治療の前向き研究における評価方法の確立。
- ③情報収集の多元化による、患者訴えの綿密な収集。

B. 平成26年度研究結果

i) RP患者会

RPの患者会は平成24年10月に前身の「患者支援の会」を引き継ぐ形で発足した。以後、患者会総会の開催に合わせて、特に血清や血球の組織バンクへの登録につき支援をお願いしてきた。今回の解析サンプルについても平成26年6月開催の総会の開催時にご協力いただいた検体9検体である。性別は男性3症例、女性6症例。平均

年齢は46.9 \pm 15.6(SD)才であった。同時に臨床情報もご提供いただいたが、9症例中PSL、MTXの投薬を受けているものがそれぞれ5症例および2症例であり、全員が外来通院中。気道病変を認めるものが2症例で、寛解中と考えられる症例が3症例あった。

ii) J-RARE

これは希少疾患を対象とした、患者自身が健康情報や医療情報を入力する患者情報登録サイト(患者レジストリ)である。本研究班は厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「患者支援団体等が主体的に難病研究支援を実施するための体制構築に向けた研究(JPA研究班)」とともに上記患者主体レジストリ立ち上げを目指してきたが、平成25年9月26日より運営を開始した。現在登録を進めている段階であり、今後さらに研究をすすめる必要がある。しかしながらその理念からは上記i)のような患者基本情報だけではなく、患者・医師間のリアルタイム連結による、臨床サンプルの収集を可能にする。

iii) RP血清中Th1/Th17細胞関連サイトカイン濃度の検討

血清IFN γ 濃度の測定のみ実施したが、今回の検討では9症例すべてが測定感度以下という結果であった。

疾患の活動性を示すものと考えている。

C. 倫理面への配慮

i) 臨床試験の実施について

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。

ii) 被験者の同意取得方法

患者が研究に参加を希望する際、被験者（あるいは法定代理人）から文書による同意を取得した。同意取得に当たっては、臨床試験審査委員会の承認を受けた同意説明文書を用いて、担当医師から研究の目的、方法、プライバシーに関する遵守事項、同意しない場合でも不利益を受けないこと、同意した場合でも随時これを撤回できること、被験者の人権保護など必要な事項について被験者（あるいは法定代理人）に十分説明し、被験者の自由意思による同意を文書で得ることとした。

iii) 中止・脱落基準

研究に同意した患者が自由意思で撤回を希望した場合は、この患者を対象とした研究を中止することとした。

iv) 生体試料提供者の人権擁護について

患者の生体試料の一部を用いて研究を実施する場合は、研究機関の生命倫理委員会の許可と指導のもとに、研究代表者の責任において秘密保持を厳守する予定である。被験者からの同意取得の後に収集された試料は、個人情報管理者により、まず連結可能匿名化の方法によって試料番号が付与され、研究実施者は匿名化（番号化）された試料のみを受け取るため、提供者を特定できない。また、いかなる研究成果の公表においても個人名およびそれを想起させることのないように留意することとした。

D. 結語

今回の結果からは、血清サイトカイン濃度はRP重症度判定に応用できる可能性が示唆された。さらにTh2細胞/Th17細胞関連のサイトカイン濃度も検討し、病態・病勢の機序についても研究をすすめる。

E. 健康危険情報

特記事項なし。

F. 文献

- 1) Hiroshi Oka, Yoshihisa Yamano, Jun Shimizu, Kazuo Yudoh, Noboru, Suzuki. A large-scale survey of patients with relapsing polychondritis in Japan. Inflammation and Regeneration. In press.
- 2) Shimizu J, Izumi T, Arimitsu N et al (2012) Skewed TGF β /Smad signalling pathway in T cells in patients with Behçet's disease. Clin Exp Rheumatol 30:S35-39
- 3) Shimizu J, Takai K, Fujiwara N et al (2012) Excessive CD4+ T cells co-expressing interleukin-17 and interferon- γ in patients with Behçet's disease. Clin Exp Immunol 168:68-74
- 4) Shimizu J, Izumi T, Suzuki N (2012) Aberrant Activation of Heat Shock Protein 60/65 Reactive T Cells in Patients with Behcet's Disease. Autoimmune Dis. doi:10.1155/2012/105205
- 5) Shimizu J, Kaneko F, Suzuki N (2013) Skewed helper T cell responses to IL12 family cytokines produced by antigen presenting cells and the genetic background in Behcet's Disease. Genet Res Int. doi:10.1155/2013/363859

G. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特記事項なし。