

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461571

研究課題名(和文) 全身型若年性特発性関節炎の発症に関する分子免疫学的解析とその臨床応用

研究課題名(英文) Molecular and immunological analysis to clarify the pathogenesis of systemic juvenile idiopathic arthritis

研究代表者

清水 正樹 (Shimizu, Masaki)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：10401902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：全身型若年性特発性関節炎(s-JIA)および成人スティル病症例の血清サイトカインプロファイル解析およびNK細胞のIL-18応答性に関する経時的解析を行った。両疾患ともに血清IL-18濃度が異常高値を示し、IL-6優位群では関節炎症状が強く、IL-18優位群ではマクロファージ活性化症候群(MAS)の合併が多かった。NK細胞はs-JIAの急性期においてIL-18に対する応答性が低下するが、治療後血清IL-18濃度の低下に一致して反応性が回復した。抗体アレイによる網羅的発現プロファイル解析から、MASの発症にはIL-18/IFN γ がMAS発症に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We investigated serum cytokine profile in patients with systemic juvenile idiopathic arthritis (s-JIA) and adult onset Still's disease (AOSD). Furthermore, we sequentially analyzed NK cell activation upon IL-18 in these patients from active phase to remission. Serum IL-18 levels were extremely elevated in s-JIA and AOSD patients. IL-6 dominant subset was prone to arthritis, while IL-18 dominant subset was prone to develop macrophage activation syndrome (MAS). NK cell activation upon IL-18 was impaired in active phase and recovered after treatment as serum IL-18 levels decreased. Extensive cytokine profile analysis with antibody array revealed IL-18/IFN γ axis play a key role to develop MAS.

研究分野：小児リウマチ膠原病学

キーワード：マクロファージ活性化症候群 IL-18 全身型若年性特発性関節炎 成人スティル病 NK細胞 IFN-

1. 研究開始当初の背景

全身型若年性特発性関節炎 (s-JIA) は、弛張熱、皮疹、全身のリンパ節腫脹、脾腫大、漿膜炎を伴う関節炎である。疾患特異的なマーカーがなく臨床診断によるため、同様の臨床像を呈する川崎病などとの鑑別が困難な場合も多く、不必要な治療が続けられたり、治療が遅れ重篤な経過をたどる症例が存在するなど、临床上の大きな問題となっている。この問題の解決には疾患特異的なマーカーの開発が望まれる。s-JIA および MAS の病態には T 細胞やマクロファージの異常活性化とこれらの細胞から産生される炎症性サイトカインが深く関与していると考えられている。中でも IL-1, IL-6, IL-18 はその中心となるサイトカインであり、IL-1 や IL-6 を遮断する生物学的製剤の導入により劇的な効果を認めている。一方で一部の症例ではこれらの生物学的製剤による治療中に致死的な合併症であるマクロファージ活性化症候群 (MAS) の合併がみられ、またこれらの薬剤は全身症状をマスクするため、その発見を困難にさせてしまう欠点もあり、病態の整理が不十分な s-JIA に対して安全に使用するためには、正確な診断と適切な初期治療を行う指標が求められている。

2. 研究の目的

我々は s-JIA と同様の臨床像を呈する疾患 (川崎病など) において、サイトカイン動態は基礎疾患により異なり、s-JIA の基礎病態には IL-18 の過剰産生が関与していることを明らかにした (Shimizu M et al. Rheumatology. 2010;49:1645-53, Shimizu M et al. Clin Immunol. 2012;146:73-6) さらに我々は、治療により臨床症状や検査所見が正常化した inactive phase においてもマクロファージの活性化が持続しており、この時期には抗炎症に働く M2c マクロファージが優位に活性化され、炎症を終息させる働きをしていることを明らかにした (Shimizu M et al. Cytokine. 2012;60:226-32) 。わが国では TCZ が導入され、劇的な効果をあげている一方、抵抗性を示す症例も存在する。我々はトシリズマブ投与中に MAS を合併した症例を経験し、トシリズマブ投与例では、再燃時に臨床症状がマスクされ、CRP などの急性炎症反応も陰性のままであるが、IL-18 は異常高値を示し、このような症例の病態の評価、治療効果の判定に非常に有用であることを明らかにした (Shimizu M et al. Cytokine. 2012;58:287-94) 。s-JIA には臨床病型が異なる亜群が存在すること、また上述のごとく、治療に対する反応性の異なる亜群が存在する。我々は s-JIA 症例の初診時または再発時のサイトカインプロファイルを解析し、s-JIA にはサイトカインプロファイルのパターンの異なる 2 つの亜群が存在し、IL-6 優位群では関節炎症状が強い一方、IL-18 優位群では MAS の合併が多く、全身症状が優位であ

ることがわかり、臨床像の異なる亜群では、サイトカインプロファイルのパターンが異なり、臨床経過を予測する上で有用であることを明らかにした (Shimizu M et al. Cytokine. 2013;61:345-48) 。このように IL-18 を中心とするサイトカインプロファイルを用いた s-JIA に対する病態解析は、s-JIA の病態の理解のみならず、鑑別が困難な症例の適切な診断や、治療効果のモニタリング、MAS への移行の予知など、臨床的にも非常に有用である。

本研究では、我々の今までの研究成果とともに、病態に関与する免疫細胞、特に NK 細胞の詳細な解析と、網羅的なサイトカインプロファイル解析を通じて、s-JIA および MAS の炎症像を明らかにするとともに、病態に即した適切な初期治療の確立することを目的とする。また同様の病態を有していると考えられている成人スティル病 (AOSD) との異同についても合わせて検討する。

3. 研究の方法

s-JIA 症例の初発時あるいは再発時の血清中のサイトカイン濃度 (IL-18, IL-6, TNF-alpha, sTNFR1, sTNFR2, IL-10, HO-1, sCD163, angiopoietin-1,2 など) を ELISA 法で測定する。さらに上記以外のサイトカイン、ケモカイン、接着分子等の生理活性物質のプロファイルについて、抗体アレイシステムを用いて検討する。

急性期および寛解期の末梢血中の NK 細胞の recombinant IL-18 に対する反応性を検討する。具体的には、採血後速やかに末梢血単核球を分離し、0 ~ 100ng/ml の濃度の recombinant IL-18 で刺激し、37 °C 2 時間培養後に、CD56 陽性 NK 細胞における活性化抗原 CD69 の発現をフローサイトメトリー法で評価し、治療開始後の NK 細胞の IL-18 応答性の変化を観察した。

上記の検討について、s-JIA のみならず、AOSD 症例についても同様に解析した。

4. 研究成果

本研究により以下のことが判明した。

- (1) s-JIA にはサイトカインプロファイルのパターンの異なる 2 つの亜群が存在し、IL-6 優位群 (IL18/IL6<1000) では関節炎症状が強い一方、IL-18 優位群 (IL18/IL6>1000) では MAS の合併が多く、全身症状が優位であること、さらに血清 IL-18 濃度が MAS の発症予測に有用であり、IL-18>47750pg/ml で有意に MAS 発症が多いことが明らかになった。
- (2) 抗 IL-6 受容体抗体であるトシリズマブ (TCZ) による治療を受けた s-JIA20 例について、治療前に IL-18 優位のプロファイルを呈する症例では有意に治療中に MAS を合併する割合が高いことが明らかになった。
- (3) MAS では凝固機能障害を呈することが知

られているが、血管内皮細胞機能の維持の重要な役割を果たす angiopoietin-1 および 2 に注目し、MAS 症例における動態を詳細に解析した結果、angiopoietin による血管内皮細胞機能の破綻により MAS 病態が急速に進行すること、また angiopoietin2/1 比が MAS の病勢を示す有用なバイオマーカーとなることが明らかになった。

- (4) S-JIA と AOSD 症例のサイトカインプロファイルを比較検討し、両疾患はともに急性期の血清 IL-18 濃度が著明に高値であり、寛解期にも高値が持続する点が特徴的であり、AOSD においても IL-18 の過剰産生を背景とした自己炎症病態が深く関与していることが推測された。
- (5) S-JIA から MAS への病態移行を正確に診断することは困難であるが、血清 sTNFR1I/II 比および sCD163 濃度がそのバイオマーカーとして有用である可能性があることが分かった。
- (6) MAS を合併した s-JIA 症例において、血清 IL-18 濃度と NK 細胞の IL-18 に対する反応性を経時的に評価し、急性期には高 IL-18 血症の持続が NK 活性の低下を引き起こすとともに、治療により高 IL-18 血症が改善すると、IL-18 に対する反応性が回復することが明らかになり、IL-18 の過剰産生による二次的な NK 活性の低下が MAS 病態への進展に深く関与することが明らかになった。
- (7) MAS を合併した s-JIA 症例の急性期および MAS 合併時の血清中の 174 種のサイトカインについて抗体アレイを用いた発現プロファイル解析を行い、MAS 合併時には IL-18/IFN γ /IFN γ 誘導ケモカイン (CXCL9/MIG) 系が MAS 発症に重要な役割を果たしていることを明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

- 1) Shimizu M, Inoue N, Mizuta M, Nakagishi Y, Yachie A. Characteristic elevation of soluble TNF receptor II : I ratio in macrophage activation syndrome with systemic juvenile idiopathic arthritis. Clin Exp Immunol. 2018;191:349-355 (査読有)
- 2) Inoue N, Shimizu M, Tsunoda S, Kawano M, Matsumura M, Yachie A. Cytokine profile in adult-onset Still's disease: Comparison with systemic juvenile idiopathic arthritis. Clin Immunol. 2016;169:8-13 (査読有)
- 3) Tasaki Y, Shimizu M, Inoue N, Mizuta M, Nakagishi Y, Wada T, Yachie A. Disruption of vascular endothelial

homeostasis in systemic juvenile idiopathic arthritis-associated macrophage activation syndrome: The dynamic roles of angiopoietin-1 and -2. Cytokine. 2016;80:1-6. (査読有)

- 4) Shimizu M, Nakagishi Y, Inoue N, Mizuta M, Ko G, Saikawa Y, Kubota T, Yamasaki Y, Takei S, Yachie A. Interleukin-18 for predicting the development of macrophage activation syndrome in systemic juvenile idiopathic arthritis. Clin Immunol. 2015;160:277-81. (査読有)

[学会発表](計6件)

- (1) Mizuta M, Shimizu M, Inoue N, Nakagishi Y, Yachie A. Extensive serum cytokine analysis in patients with macrophage activation syndrome complicating systemic juvenile idiopathic Arthritis. 2017 ACR/ARHP annual meeting. 2017.11.5 San Diego, USA.
- (2) 井上なつみ、清水正樹、水田麻雄、中岸保夫、谷内江昭宏. 全身型若年性特発性関節炎に合併するマクロファージ活性化症候群における soluble TNFR II/II 比の臨床的有用性. 第 27 回日本小児リウマチ学会, 2017 年 10 月 6 日, 京都市
- (3) 高倉麻衣子、清水正樹、井上なつみ、水田麻雄、清水陽、犀川太、川野充弘、谷内江昭宏. 全身型若年性特発性関節炎における NK 細胞の IL-18 不応答性の経時的検討. 第 27 回日本小児リウマチ学会, 2017 年 10 月 6 日, 京都市
- (4) 作村直人、清水正樹、水田麻雄、伊良部仁、井上なつみ、中岸保夫、谷内江昭宏. 全身型若年性特発性関節炎における活動性指標としての血清可溶性 CD163 値の臨床的有用性. 第 27 回日本小児リウマチ学会, 2017 年 10 月 6 日, 京都市
- (5) Shimizu M, Inoue N, Mizuta M, Yachie A. Cytokine profile in adult-onset Still's disease: Comparison with systemic juvenile idiopathic arthritis. The 23rd Pres annual meeting, 2016.9.28, Genoa, Italy
- (6) Shimizu M. Clinical significance of cytokine profile with interleukin 18 and 6 in systemic juvenile idiopathic arthritis. 2014 ACR/ARHP annual meeting. 2014.11.16, Boston, USA.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.kanazawa-u.ac.jp/~med21/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水正樹 (Masaki Shimizu)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：10401902

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

井上なつみ (Inoue Natsumi)、水田麻雄 (Mao Mizuta)、高倉麻衣子 (Maiko Takakura)、作村直人 (Naoto Sakumura)、田崎優子 (Yuko Tasaki)、中岸保夫 (Yasuo Nakagishi)、谷内江昭宏 (Akihiro Yachie)