

平成30年6月11日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15374

研究課題名(和文)成人スティル病におけるマクロファージの基礎・臨床からの統合的解析による病態解明

研究課題名(英文)Analysis of macrophages in Adult onset Still's disease

研究代表者

桐野 洋平(KIRINO, Yohei)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：50468154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では成人スティル病のマクロファージ活性化の指標としてのヘムオキシゲナーゼ(HO)-1および血清フェリチンの測定の意義を検討するために多施設共同研究をおこなった。AOSD患者146例より血清を得て、ELISA法を用いてこれらのタンパク質を定量した。その結果、血清HO-1>30.2 ng/ml、血清フェリチン819 ng/mlで、AOSD診断に対する感度・特異度ともに80%以上であることが判明した。また治療に応じてこれらの指標はともに低下したことから、AOSD診療における有益なバイオマーカーであることを提唱した。

研究成果の概要(英文)：In the current study, we collected sera from a total of 145 AOSD patients. These "AOSD" patients were further divided into active, remission, and relapse groups. Forty-six cases of systemic vasculitis, sepsis, etc. were included as disease controls. We found that serum ferritin and HO-1 levels were significantly higher in active and relapsed AOSD cases, and were reduced by the treatment. Although a significant correlation was found between serum ferritin and HO-1 levels, a discrepancy was found in some cases such as iron-deficiency anemia. ROC analysis identified optimal levels of serum ferritin (>819 ng/ml; sensitivity 76.1% and specificity 73.8%), and serum HO-1 (>30.2 ng/ml; sensitivity 84.8% and specificity 83.3%) that differentiated AOSD from controls. Interestingly, 88.9% of patients with AOSD who relapsed exceeded the cut-off value of serum HO-1, but only 50.0% exceeded serum ferritin, suggesting that serum HO-1 levels may be a convenient indicator of AOSD disease status.

研究分野：リウマチ・膠原病

キーワード：成人スティル病 マクロファージ ヘムオキシゲナーゼ1 フェリチン

1. 研究開始当初の背景

申請者は以前、血清ヘム分解酵素ヘムオキシゲナーゼ(HO)-1 が成人スティル病(AOSD)のバイオマーカーになることを報告した(Kirino et al, Arthritis Res Ther, 2005)。HO-1 によりヘムが分解され、2 価鉄となりフェリチンを誘導することからフェリチンと HO-1 には密接な関連がある。HO-1 とフェリチンはともに主にマクロファージ (M)に発現しており、その活性化を反映していると考えられる。血清 HO-1 上昇が認められるのは AOSD、血球貪食症候群、全身型若年性関節炎などのいわゆる M 活性化症候群(MAS)のみである。加えて、我々は種々の炎症性疾患モデルにおいて HO-1 誘導が治療として有望であること報告してきた(Kirino et al, JACI, 2008, Hama et al, Arthritis Rheum, 2012 など)。この HO-1 誘導の抗炎症メカニズムとして、近年発見された M2 M の機能増強が考えられる。HO-1 やフェリチンはともに CD163 陽性 M2M に高発現しており、IL-10 などのサイトカイン産生を介して抗炎症作用を発揮する。AOSD では M2M を分化誘導する M-CSF が血清中で著明に高値となっていることも M2M の関与を支持していた。

2. 研究の目的

以上述べた様に、AOSD は自己炎症性疾患に包含される原因不明の難治性疾患であり、M の異常活性化が病態の本質と考えられている。AOSD 患者血清で非常に高値となるフェリチン・HO-1・CD163 はいずれも抗炎症作用をもつ M2M に高発現しており、M2M の量的・機能的異常により AOSD に特徴的な病態が形成されている可能性がある。また小児炎症性疾患の遺伝学的解析から見出された *NLRP4* などの M に発現する自然免疫受容体遺伝子の変異・体細胞モザイクなどの異常が AOSD に関与している可能性もある。本研究では AOSD の臨床問題解決と発症機序解明に向け、M に焦点をあてて血清 M マーカーとされるフェリチン・HO-1・CD163 の AOSD 診断への有用性の検討、AOSD の M 機能解析、自然免疫系の遺伝子解析を統合的に行った。

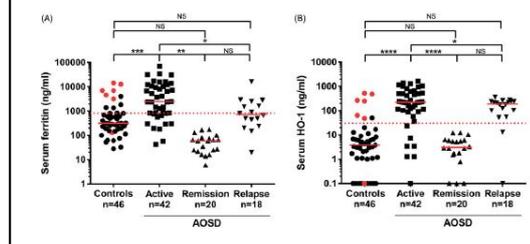
3. 研究の方法

国内の成人スティル病を多く診療している施設との共同研究を行った。本研究は横浜市立大学附属病院の倫理委員会の承認を得て行った。患者からは書面による同意書を得て、血清を採取した。成人スティル病は山口らの基準(Yamaguchi et al, J Rheumatol, 1992)を基に分類し、3 名のエキスパートがそれぞれ独立に診断・活動性に関して判定した。血清中の ferritin, HO-1 は ELISA 法を用いて測定した。山口らの基準に含まれている臨床情報、活動性などの変数と、エキスパートによる診断との関連を単変量・多変量解析によって解析した。

4. 研究成果

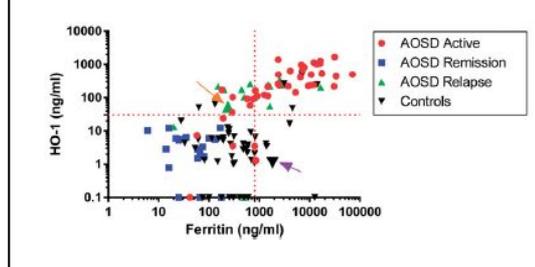
合計 145 例の AOSD 患者より血清を得た。これらをさらに詳細に臨床を確認した結果、88 例の確実例が本研究にエントリーした。さらに活動性評価によって、42 例の初発例、18 例の再燃例、20 例の寛解例に分類した。下に AOSD および対照の血清中の ferritin, HO-1 のデータを示す。図 1 で示したように、活動期および再燃 AOSD 患者では対照と比較して両者が高値であった。寛解例では低下していた。このことから血清 HO-1 と ferritin は AOSD のバイオマーカーであることが証明された。

図 1 成人スティル病における血清 HO-1(右)および ferritin 値(左) (Kirino et al, Mod Rheumatol, 2017 より引用)



次に、血清フェリチンと HO-1 との相関について検討した。図 2 で示したように、概ね相関していたが、鉄欠乏症の患者では血清 HO-1 は高値であったが、血清フェリチンは低値であった。このように血清フェリチンと HO-1 には一部乖離をみとめたことから、両方を測定することで感度・特異度が上昇することが示唆された。

図 2 成人スティル病における血清 HO-1 と ferritin との相関 (Kirino et al, Mod Rheumatol, 2017 より引用)



最後に、多変量解析によって、AOSD 診断における最も強い因子を抽出した(表 1)。表に示したように山口の基準に含まれる咽頭痛、発熱、関節痛などの臨床所見、血清 HO-1 および ferritin, CRP などの臨床検査値を単変量解析、多変量解析によって解析した。結果、血清 HO-1 が最も強いオッズをもって見いだされた。

表 1 成人スティル病診断に寄与する因子多変量解析 (Kirino et al, Mod Rheumatol, 2017 より引用)

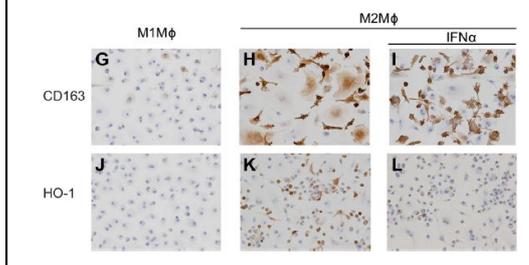
Table 2. Univariate and multivariate regression analysis assigning experts' diagnosis as a dependent variable.

Variables	p	OR	95% CI	
Univariate analysis				
Age	.016	0.97	0.95	0.99
Sex	.85	1.09	0.44	2.73
Fever >39 °C	NA	NA		
Arthralgia	.00033	8.71	2.67	28.4
Typical skin rash	NA	NA		
White blood cell count	.00017	6.00	2.36	15.3
Sore throat	3.4e ⁻⁷	15.7	5.45	45.3
Lymph node swelling or splenomegaly	.00029	9.33	3.27	26.6
Liver enzyme elevation	.011	3.36	1.32	8.58
RF/ANA negativity	.00043	5.50	2.13	14.2
Monocyte count	.91	1	0.99	1.00
Neutrophil count >7630/ μ l	8.4e ⁻⁷	16.9	5.49	52.1
Lymphocyte count	.22	1	1	1
AST (IU/l)	.77	1	0.99	1.01
ALT (IU/l)	.069	1.01	1	1.02
CRP (mg/dl)	.0021	1.11	1.04	1.18
Pleuritis	.87	0.91	0.28	2.95
Lymph node swelling	.000094	6.35	2.51	16.0
Splenomegaly	.049	2.39	1.00	5.71
Interstitial pneumonia	.42	0.59	0.16	2.17
Myalgia	.10	2.13	0.87	5.22
Serum ferritin >819 ng/ml	4e ⁻⁶	10.1	3.80	27.1
Serum HO-1 >30.2 ng/ml	1.15e ⁻⁸	27.8	8.89	87.3
Multivariate analysis				
HO-1 >30.2 ng/ml	.00074	547.2	5.43	55191
Neutrophil count >7630/ μ l	.0054	60.3	3.34	1086
RF/ANA negativity	.018	85.7	2.13	3454.8
Sore throat	.033	14.9	1.24	178.4

NA: not available. Variables included in the multivariate analysis are highlighted in bold fonts.

このように、AOSD において血清 HO-1 および ferritin が有用なバイオマーカーであることが判明し、診断への寄与も大きいことが証明された。今後はこれらのマーカーを山口の基準に含める意義があるか前向き研究がまたれる。さらに申請者らはヒト末梢血単球を G-CSF/M-CSF というサイトカインで刺激して、M1 および M2 マクロファージに分化させて、この HO-1 の発現がどのようになっているか調べた。その結果 M2 マクロファージにおいて CD163 と HO-1 が高発現していた。

図 3 ヒト末梢血単球由来マクロファージにおける CD163 と HO-1 の発現。Kishimoto et al, Arthritis Res Ther, 2018 より引用。



以上の成績を総合すると次の仮説が成り立つ。成人スティル病において、ウイルス感染症などの外的刺激によって、M2 マクロファージが優位な炎症が起きる。この細胞内に豊富に存在するフェリチンおよびマクロファージが放出されて、血清中の HO-1/ferritin が上昇する。今後 M2 マク

ロファージが AOSD においてどのような機能を担っているのか、さらなる機能解析を推進していきたい。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 3 件)

Kirino Yohei, Kawaguchi Yasushi, Tada Yoshifumi, Tsukamoto Hiroshi, Ota Toshiyuki, Iwamoto Masahiro, Takahashi Hiroki, Nagasawa Kohei, Takei Shuji, Horiuchi Takahiko, Ichida Hisae, Minota Seiji, Ueda Atsuhisa, Ohta Akihide, Ishigatsubo Yoshiaki. Beneficial use of serum ferritin and heme oxygenase-1 as biomarkers in adult-onset Still's disease: A multicenter retrospective study. Modern Rheumatology, 2017. (査読あり)

Kishimoto Daiga, Kirino Yohei, Tamura Maasa, Takeno Mitsuhiro, Kunishita Yosuke, Takase-Minegishi Kaoru, Nakano Hiroto, Kato Ikuma, Nagahama Kiyotaka, Yoshimi Ryusuke, Igarashi Kazuhiko, Aoki Ichiro, Nakajima Hideaki. Dysregulated heme oxygenase-1low M2-like macrophages augment lupus nephritis via Bach1 induced by type I interferons. Arthritis Research & Therapy, 20: 64, 2018. (査読あり)

Nakano Hiroto, Kirino Yohei et al. GWAS-identified CCR1 and IL10 loci contribute to M1-macrophage predominant inflammation in Behcet's disease. Arthritis Research & Therapy, 20: 64, 2018. (査読あり)

(学会発表) (計 2 件)

Yohei Kirino et al, Use of Including Serum Ferritin and Heme Oxygenase 1 in the Yamaguchi's Classification for Adult-Onset Still's Disease: A Multicenter Retrospective Study 米国リウマチ学会総会, San Diego, USA, 2017 年 11 月.

桐野洋平ら、成人スティル病における血清フェリチンとヘムオキシゲナーゼ1の診断への有用性: 多施設共同研究、日本リウマチ学会総会、博多、2017 年 4 月.

(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)

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者 桐野洋平(KIRINO, Yohei)
横浜市立大学・医学部・講師
研究者番号:50468154