

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19402

研究課題名(和文) 免疫応答に着目した心臓サルコイドーシスに対する新規診断法およびリスク層別法の開発

研究課題名(英文) Emerging diagnostic methods and risk stratification for cardiac sarcoidosis

研究代表者

永井 利幸 (Nagai, Toshiyuki)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：00528218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：最終的な症例数として心臓サルコイドーシス(心サ症)症例連続95例と心サ症以外の非虚血性心筋症連続50例(対照群)を比較検討した。結果、非肉芽腫心筋組織切片への樹状細胞浸潤増加かつM2マクロファージ比の減少は、心サ症の診断において従来の報告より高い感度と極めて高い特異度を示し、樹状細胞とマクロファージフェノタイプは心サ症の診断における新たな病理組織学的マーカーになりうると考えられた。この新規診断補助法に関する論文は米国心臓協会の専門誌に掲載された(J Am Heart Assoc 2016;5:e004019)。

研究成果の概要(英文)：The numbers of dendritic cells (DC) and macrophages were investigated in 95 consecutive cardiac sarcoidosis (CS) patients and 50 patients with nonischemic cardiomyopathy as controls. In CS patients with and without myocardial granulomas, CD209+ DC and CD68+ macrophages were more frequently observed ( $P<0.01$ ) and CD163+M2 macrophages were less frequently observed ( $P<0.01$ ) in nongranuloma sections compared to controls. Furthermore, the combination of decreased CD163+M2/CD68+ macrophage ratio and increased number of CD209+ DC in nongranuloma sections of CS patients demonstrated high specificity (100%, 95% CI 92.7-100%) for CS diagnosis with each diagnostic criteria and the presence of myocardial granulomas. In conclusions, increased number of DC and decreased M2 among all macrophages in nongranuloma sections of myocardium showed high specificity for CS diagnosis, suggesting DC and macrophage phenotypes as histopathological surrogates for the diagnosis of CS.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心臓サルコイドーシス 免疫応答 マクロファージ 樹状細胞 病理組織診断

## 1. 研究開始当初の背景

わが国の難病に指定されている全身肉芽腫疾患であるサルコイドーシスの死因の約半数は心臓病変の合併によるものであり、心臓病変の適切な診断と治療が患者の予後改善のために極めて重要である。合併する心臓病変は心臓サルコイドーシスと称され、心筋組織内に非乾酪性類上皮細胞肉芽腫が形成される過程での局所炎症や間質線維化により、致死性不整脈による突然死、あるいは心室の拡大および収縮不全をきたす炎症性心筋疾患に分類される。本症はアクネ菌など何らかの抗原物質に暴露されて誘導される Th1 タイプの過敏性免疫反応に起因すると考えられているが、病因は依然不明である。我が国の統計では、心臓サルコイドーシスの5年生存率は約4割といわれており、同じく予後不良の難病である特発性拡張型心筋症の5年生存率が約6割であることを鑑みると、きわめて予後不良の疾患であることは明白である。しかしながら、本症診断の根幹を成す、心内膜心筋生検における非乾酪性類上皮細胞肉芽腫が認められる症例は心臓サルコイドーシスのわずか6割程度に過ぎず、残り約4割の症例は唯一有効性が示唆されている免疫抑制治療に踏み切れず、死亡後に心臓サルコイドーシスと診断される症例も少なからず存在する。このため、本症の確定診断においては、従来の診断基準のみでは限界と考えられている。さらに、免疫抑制療法の治療効果や予後は症例によって大きく異なり、それらの予測因子は未だに明らかでない。従来、サルコイドーシスにおける肉芽腫形成は活性化したマクロファージとTリンパ球の集積であると考えられていたが、近年、抗原提示細胞の一つである樹状細胞が類上皮細胞肉芽腫形成の上流で促進的役割を果たしていることが心臓外の病変(肺および皮膚)で報告された(AmJ Respir Cell Mol Biol 2010;42:32, HumPathol 2011; 42: 340)。したがって、心

臓サルコイドーシスにおいては、疾患活動性と心筋組織における樹状細胞の浸潤に正の相関があることが予想され、樹状細胞浸潤の評価は新たな診断法と免疫抑制療法への反応および予後予測におけるリスク層別化法の確立に有用である可能性があるが、現在まで国内外からの報告は皆無である。

## 2. 研究の目的

わが国の難病に指定されている原因不明の全身肉芽腫疾患であるサルコイドーシス(サ症)の死因の約半数は心臓病変の合併によるものである。ところが、現行の診断治療指針では心臓以外の臓器でサ症の確定診断が得られていなければ、臨床的に疑わしくとも心筋組織からの非乾酪性肉芽腫の証明なくして心臓サ症の確定診断を得ることは困難である。しかしながら、心内膜心筋生検における陽性率はわずか6割程度にとどまり、残り約4割の症例は免疫抑制治療に踏み切れず、死亡後に心臓サ症と診断される症例も存在する。近年、心臓外サ症において類上皮細胞肉芽腫形成の上流で炎症惹起性の役割を果たすと報告された樹状細胞に着目した新しい診断法を開発し、かつ樹状細胞浸潤の程度により、予後リスクを層別化し、心臓サ症の新しい診断治療指針を示すことがこの研究の目的である。

## 3. 研究の方法

(1) 後ろ向きコホートを用いた多数例における心筋組織への樹状細胞浸潤の検証と新しい病理診断基準の作成: 確定診断時に心筋生検が施行された心サ症94例を抽出し、まずは、生検心筋検体にHE染色およびMasson-Trichrome染色を施行し、心筋組織における類上皮細胞肉芽腫形成、樹状細胞を主とした免疫担当細胞浸潤と間質線維化の程度を評価し、組織に浸潤している様々な免疫担当細胞の種類、炎症性M1マクロファ

ージ (CD68)、抗炎症性 M2 マクロファージ (CD163)、T リンパ球 (CD3)、全樹状細胞 (CD209)、成熟樹状細胞 (CD83) (樹状細胞は、その成熟により抗原提示能が異なることが知られており、成熟化につれ強い抗原提示能を獲得してゆく。従って、心サ症における免疫応答の活性化は、浸潤する樹状細胞の数のみならず成熟化によって影響を受けると推察されるため、樹状細胞の成熟化の評価を同時に行うことによって臨床的意義はさらに高まるものと考えられる)、炎症マーカーであるテネイシン C、樹状細胞の浸潤経路と考えられているリンパ管 (D2-40) に関して免疫組織化学染色を行い、樹状細胞浸潤数と各種免疫担当細胞浸潤数、間質線維化、テネイシン C の発現、およびリンパ管増生との相関を評価する。次に、拡張型心筋症の後ろ向きコホートから抽出した年齢と性別など患者背景をマッチさせた拡張型心筋症症例 100 例についても同様の解析を行ったうえで、心臓サルコイドーシスと拡張型心筋症における樹状細胞浸潤を主とした免疫応答レベルの比較、心筋組織に浸潤した樹状細胞数に関しては、ROC 解析による適切なカットオフ値から確定診断における感度および特異度を算出し、樹状細胞に着目した新しい病理診断基準を作成する。

(2) 前向き検証コホートによる、新しい病理診断基準の妥当性の検討：心臓サルコイドーシスの鑑別が必要な心筋症が強く疑われる症例に対し、(1) で作成した新しい病理診断基準を用いて、その妥当性を検証する。まずは、以下の基準で症例を登録する。

<登録基準>

心臓サルコイドーシスなど原因疾患の鑑別が必要な、新規の心筋症症例

心臓超音波検査における左室駆出率が 50% 未満に低下している症例

<除外基準>

心内膜心筋生検の同意が得られない症例  
冠動脈疾患の既往もしくは精査中に冠動脈疾患の存在が明らかとなった症例

慢性心筋炎と診断されている、もしくは新規に診断された症例

肥大型心筋症と診断されている、もしくは新規に診断された症例

ファブリー病と診断されている、もしくは新規に診断された症例

弁膜症が左室機能低下の主な原因と考えられる症例

次に、登録症例に対し、心内膜心筋生検を施行し、得られた心筋組織に前述の後ろ向きコホートでの検討の際に施行した、免疫染色含む各種病理解析を行う。その結果を作成した新しい病理診断基準に当てはめ、病理診断を行う。最後に、心臓外臓器 (眼、肺、皮膚、リンパ節、肝臓、腎臓) において、全身疾患であるサルコイドーシスのスクリーニングを行う。スクリーニングに関しては、日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会 2006 年診断基準を用いて、サルコイドーシスの診断を行い、新しい病理診断基準の感度、特異度を算出する。

(3) その他検査と経過観察

経過中に行った血液検査、胸部レントゲン検査、呼吸機能検査、心臓超音波検査、核医学検査、眼底検査、臓器生検検査などの結果も登録する。患者の臨床的な特徴、さらにバイオマーカー (サルコイドーシスの全身性活動性を示すといわれている、血清 Angiotensin converting enzyme、血清リゾチーム、可溶性 IL-2 receptor、そして心筋障害マーカーである脳性ナトリウム利尿ペプチドや高感度トロポニン T など) 含めた血液検査や各種検査結果を記録し、継続的にフォローアップを行う。その後、同意が得られた症例に関しては一年毎に追跡調査と血液検査を通常の診療範囲内で行う。得られた情報は個人情報管理者に

よる連結可能匿名化を行い、集積する。

#### (4) 予後評価

基本的には樹状細胞の浸潤数で多数群、少数群の2群で各種統計学的手法を用いて背景などを検証するが、今回の研究では、免疫抑制療法の介入なども重要項目であり、それらを盛り込んだ解析も追加する。予後検討に関しては、1次エンドポイントを心臓死、2次エンドポイントを全死亡、心不全、症候性不整脈とし、Kaplan-Meier法を用いて検証し、免疫抑制療法が開始された症例に関しては、その効果を評価する。研究期間内の短期予後に加え、サルコイドーシスの臨床経過が長いことを鑑み、研究期間内に登録された症例を以後3年間追跡する。さらに、画像診断や長期予後を含む臨床データと合わせて、ロジスティック回帰分析およびCox比例ハザードモデルによる解析を追加し、疾患活動性、免疫抑制薬による治療効果の予測や長期予後予測における疾患リスク層別法を確立し、新たな治療指針作成のための基礎データとして国内外に発信する。

#### 4. 研究成果

北海道大学との共同研究に発展させた結果、最終的な症例数として心サ症連続95例と心サ症以外の非虚血性心筋症連続50例(対照群)を比較検討した。心サ症の肉芽腫組織(N=30)に浸潤する免疫担当細胞の特徴を検討後、心サ症例を肉芽腫陽性(N=26)、肉芽腫陰性かつ厚労省診断基準2007年度改訂版による確定診断(N=65)、肉芽腫陰性かつHeart Rhythm Society 2014年度診断基準による確定診断(N=26)の3群に分類し、各群の非肉芽腫組織切片における免疫担当細胞の浸潤を対照群と比較検討し、これら病理組織学的特徴による心サ症の診断精度を検討した。結果、心サ症の非肉芽腫心筋組織切片に浸潤するCD209陽性樹状細胞数(P<0.05)お

よびCD68陽性マクロファージ数(P<0.01)は対照群と比較して有意に高値である一方、CD163陽性M2マクロファージ数は低値であった(P<0.01)。ROC解析で得られたCut-off値における、非肉芽腫切片のCD209陽性樹状細胞数高値かつCD163陽性M2マクロファージ/CD68陽性マクロファージ比低値の各診断基準による診断感度は46.2~65.4%、特異度は100%:95%CI 92.9-100%であった。結論としては非肉芽腫心筋組織切片への樹状細胞浸潤増加かつM2マクロファージ比の減少は、心サ症の診断において従来の報告より高い感度と極めて高い特異度を示し、樹状細胞とマクロファージフェノタイプは心サ症の診断における新たな病理組織学的マーカーになりうると考えられた。この新規診断補助法に関する論文は米国心臓協会の専門誌に掲載された(J Am Heart Assoc 2016;5:e004019)。さらに本研究成果は第20回日本心不全学会学術集会において、Young Investigator's Awardを受賞した。当初最終年度に予定した、新規病理診断基準の診断妥当性検証については十分な統計学的検証に足りうる症例数に届かず、現在継続して症例を登録中である。今後も症例登録を継続し、当初の計画通り将来のイベントリスク層別解析に応用できるよう予後追跡を行う予定である。

#### 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2件)

Nagai T, Nagano N, Sugano Y, Asaumi Y, Aiba T, Kanzaki H, Kusano K, Noguchi T, Yasuda S, Ogawa H, Anzai T. Effect of Discontinuation of Prednisolone Therapy on Risk of Cardiac Mortality Associated with Worsening Left Ventricular Dysfunction in Cardiac Sarcoidosis. **Am J Cardiol**

2016; 117: 966-71. (査読有)

Honda Y, Nagai T (Corresponding author, and equal contribution to first author), Ikeda Y, Sakakibara M, Asakawa N, Nagano N, Nakai M, Nishimura K, Sugano Y, Ogo KO, Asaumi Y, Aiba T, Kanzaki H, Kusano K, Noguchi T, Yasuda S, Tsutsui H, Ueda HI, Anzai T. Myocardial Immunocompetent Cells and Macrophage Phenotypes as Histopathological Surrogates for Diagnosis of Cardiac Sarcoidosis in Japanese. *J Am Heart Assoc* 2016; 5: e004019. (査読有)

〔学会発表〕(計6件)

Nagai T, Honda Y, Ikeda Y, Sakakibara M, Asakawa N, Nagano N, Yasuda S, Tsutsui H, Ueda HI, Anzai T. Usefulness of Dendritic Cells and Macrophage Phenotypes Infiltrated Into Myocardium for Diagnosis of Cardiac Sarcoidosis. 第20回日本心不全学会学術集会 2016年10月06日～2016年10月08日 ロイトン札幌 (北海道札幌市)

永井利幸, 永野伸卓, 菅野康夫, 浅海泰栄, 草野研吾, 野口暉夫, 安田聡, 安斉俊久 心臓サルコイドーシスにおけるステロイド療法の現状と今後の課題. 第64回日本心臓病学会学術集会 (招待講演) 2016年09月23日～2016年09月25日東京国際フォーラム (東京都千代田区)

Nagai T, Nagano N, Kusano K, Yasuda S, Anzai T. Corticosteroid Therapy for Cardiac Sarcoidosis. 第63回日本不整脈心電学会学術集会 (招待講演) 2016年07月14日～2016年07月17日札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

永井利幸, 永野伸卓, 菅野康夫, 浅海泰

栄, 草野研吾, 野口暉夫, 安田聡, 安斉俊久. 心臓サルコイドーシスにおけるステロイド治療～開始と中止の至適タイミングをどのように考えるべきか～ 第2回日本心筋症研究会 (招待講演) 2016年05月14日～2016年05月14日 まつもと市民芸術館 (長野県松本市)

永井利幸, 永野伸卓, 菅野康夫, 相庭武司, 神崎秀明, 草野研吾, 野口暉夫, 安田聡, 小川久雄, 安斉俊久. 心臓サルコイドーシスにおけるステロイド治療の途中中止は左室機能障害の進行と関連して心臓死を増加させる. 第35回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会 2015年11月07日～2015年11月08日 ホテルエルセラール大阪 (大阪府大阪市)

Nagai T, Nagano N, Sugano Y, Asaumi Y, Aiba T, Kanzaki H, Kusano K, Noguchi T, Yasuda S, Ogawa H, Anzai T. Discontinuation of Corticosteroid Therapy Increases the Risk of Cardiac Mortality Associated with Progression of Left Ventricular Dysfunction in Cardiac Sarcoidosis. 第19回日本心不全学会学術集会 2015年10月22日～2015年10月24日 グランフロント大阪 (大阪府大阪市)

〔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  
永井 利幸 (NAGAI Toshiyuki)  
北海道大学・大学病院・助教  
研究者番号: 00528218

(2) 研究分担者  
なし

( 3 ) 連携研究者  
なし