

平成 30 年 5 月 12 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19579

研究課題名(和文) SLEの免疫学的分類による治療最適化に関する研究

研究課題名(英文) Optimization of the treatment of systemic lupus erythematosus by immunological classifications

研究代表者

菊池 潤 (Kikuchi, Jun)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：20570881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒトSLEの病態解析と個別化医療のためのアルゴリズム確立を追求した。細胞表面分子の網羅的解析からMilk Fat Globule Epidermal growth factor 8 (MFG-E8)に着目した。末梢血中のMFG-E8陽性単球数は疾患活動性と相関した。皮膚、筋骨格病変、白血球減少を有する患者で高値であり、障害臓器での特徴を有する可能性を報告した。また、CD8T細胞亜分画は疾患活動性と相関し、各障害臓器との関連を示した。以上より、末梢血免疫細胞および血清蛋白を指標として、障害臓器および免疫学的アプローチから層別化することの実現可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to analyze the pathogenesis of SLE leading to optimization of the management. We selected the molecule, Milk Fat Globule Epidermal growth factor 8 (MFG-E8), with comprehensive protein analysis. We reported that MFG-E8 positive peripheral monocytes correlated with the disease activity, and were higher in patients with skin, musculoskeletal and lymphocytopenia. In addition, the subpopulations of peripheral CD8 positive T cells correlated with disease activity and were associated with some clinical organ characteristics. Our study indicated the possibility that immunological approach with serum proteins and peripheral immune cells may enable us to classify and implement personalized management.

研究分野：リウマチ・膠原病

キーワード：全身性エリテマトーデス

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス (SLE) は、ステロイドおよび免疫抑制剤の使用により生存率が改善したが、長期に渡る治療や再燃に伴う臓器障害の蓄積が課題である。現在、ステロイドに代わる適切な治療薬の選択、再燃の早期介入、その先の予後の改善を実現するために、適切なバイオマーカーおよび個別化医療の方向が模索されている。本疾患の診断は臨床症状および検査所見の組み合わせによるため、多彩な表現系を呈する患者群を内包する症候群となっていることから個別化治療の必要性が重要な課題となっている。すなわち、個々の臓器障害に対応した新規バイオマーカーや個々の患者の特徴を考慮して治療の最適化を行うことが求められている。多くの報告から、SLE の発症機序や免疫学的病態に関して、様々な異常の存在が明らかとなっているが、個々の症例や臓器障害に応じた免疫学的病態の分類は明確なものはないことに着目した。

2. 研究の目的

本研究によりヒト SLE の病態解析に加え、収集したデータを基にした個別化医療のためのアルゴリズムを新たに確立することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 患者および健常人の選択：慶應義塾大学病院および東京医療センターに通院中で、寛解導入もしくは再寛解導入療法を必要とする BILAG (British Isles Lupus Assessment Group) 1A もしくは 1B 以上の活動性 SLE 患者、維持期の非活動性 SLE 患者、健常人を対象とした。
- (2) 末梢血の免疫学的指標に関する解析：上記対象者の末梢血を採取した。活動性 SLE 患者では治療開始前および開始後に経時的に採取した。全血でフローサイトメトリーを施行し、細胞表面分子による末梢血サブセット数および割合を網羅的に解析した。病態関連分子スクリーニングを行い、候補となる細胞表面マーカーを同定した。関連する血清蛋白を ELISA 法で測定した。
- (3) 候補細胞表面分子と各種臨床指標 (SLEDAI を含む臨床的活動性指標および患者背景因子) との関連、障害臓器での特徴との関連を解析した。

4. 研究成果

- (1) SLE における特徴的新規細胞表面候補分子の選定
活動性 SLE 3 例、非活動性 SLE 3 例、健常人 3 例について、Legend Screen Human Cell Screening Kit (BioLegend 社) を用いて網羅的に細胞表面マーカーを測定し比較を行った。複数の分子において活動性 SLE で発現亢進が認められた。これら

の候補分子の性質を文献的に検討し、SLE 病態に関連する分子として特に Milk Fat Globule Epidermal growth factor 8 (MFG-E8) に焦点を絞った。また、合わせて T 細胞、B 細胞、形質細胞、単球、樹状細胞についてそのサブセットを Flow Jo 解析ソフトを用いて解析した。これらは活動性 SLE 31 例、非活動性 SLE 33 例、健常人 21 例が解析対象となった。

(2) MFG-E8 と疾患活動性、障害臓器における特徴

MFG-E8 はアポトーシス関連の分泌蛋白である。SLE の病態にアポトーシス細胞の除去不全が関与していること、既報により血清 MFG-E8 が一部の SLE 患者で高値であることが言われている。その背景から単球上の MFG-E8 に着目した。36 例の活動性 SLE、38 例の非活動性 SLE、24 例の健常コントロールで検討した。末梢血中の MFG-E8 陽性単球数は活動性 SLE で有意に高値であり、活動性と非活動性 SLE の鑑別において高い AUC を示した (Figure 1)。また MFG-E8 陽性単球割合は SLEDAI、抗 dsDNA 抗体価、血清補体価、免疫複合体と相関を示した (Table 1)。さらに、皮膚病変または筋骨格病変または白血球減少を有する患者では MFG-E8 陽性単球割合が高値であった。治療 6 ヶ月の経過では MFG-E8 陽性単球割合は有意に低下し、再燃例では上昇傾向が認められた。これらの相関関係および変化は血清 MFG-E8 では認めなかった。以上より、MFG-E8 陽性単球は活動性 SLE のバイオマーカーの一つとなること、および障害臓器での特徴を有する可能性が強く示唆された。

Figure 1. 活動性 SLE 指標に対する a) MFG-E8 陽性単球、b) 血清 MFG-E8 の ROC 曲線

Figure 1. Receiver operating characteristic curve analysis for discriminating active from inactive SLE

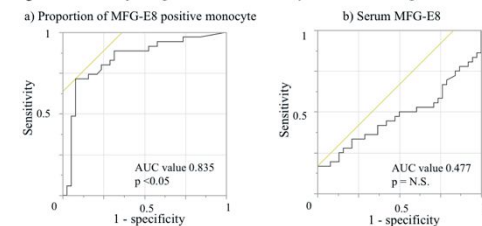


Table 1. MFG-E8 陽性単球と血清 MFG-E8 と活動性指標および障害臓器の関連

Table 1. Associations between MFG-E8 positive monocyte and serum MFG-E8, and activity markers and organ involvements.

	Number of MFG-E8 positive monocyte	Proportion of MFG-E8 positive monocyte	Serum MFG-E8
Correlation with serological markers (Spearman's rho)			
Activity	SLEDAI	0.570*	0.634*
Serological markers	CH50	-0.503*	-0.591*
	Anti ds-DNA ab.	0.425*	0.449*
	C1q	0.526*	0.568*
Difference of positivity of organ involvement in active SLE group (p-value)			
Organ involvement	Renal	0.397(23)	0.804 (24)
	Cutaneous	0.069	<-0.01 [†]
	Leukocytopenia	0.109	<-0.01 [†]
	Musculoskeletal	0.059	0.031 [†]

* p<0.01 by Spearman's correlation coefficient.
[†] Wilcoxon's test was performed to analyze.

(3) 末梢血 CD8T 細胞亜分画と臨床特徴との関連

寛解導入前の活動性 SLE では CD3 に対する CD8T 細胞割合、CD8 における活性化 CD8T 細胞が非活動性 SLE および健康人よりも高値であり、central memory CD8T 細胞および effector memory CD8T 細胞が低値であった。そのうち活性化 CD8T 細胞は有意に疾患活動性指標である SLEDAI と正の相関を示し (rho=0.29, p=0.021)、central memory CD8T 細胞は負の相関を示した (rho=-0.56, p<0.001)。さらに、naïve CD8T 細胞は血清抗 dsDNA 抗体価および免疫複合体と相関し、補体価と負の相関を示し、central memory CD8T 細胞は逆の相関関係を示した (Table 2)。障害臓器別の検討では、ループス腎炎、皮疹の有無、白血球減少の程度と活性化 CD8T 細胞割合が有意に正の相関関係を示し、これらの臨床症状に加えて発熱の有無が central memory CD8T 細胞割合と有意に負の相関を示した。

寛解導入療法後の末梢血 CD8T 細胞サブセットの変化についても検討した。特に naïve CD8T 細胞割合は全体として減少し、活性化および effector memory CD8T 細胞割合が増加した。さらに治療 3 ヶ月後の naïve CD8T 細胞割合は SLEDAI の変化量および 3 ヶ月時点の SLEDAI と相関し、effector memory CD8T 細胞はこれらと負の相関を示した。Naïve CD8T 細胞割合は 3 ヶ月での腎反応性を得られた患者およびループス腎炎以外の障害臓器を持つ患者では低値あったのに対して、ループス腎炎治療の腎反応を示さなかった患者では有意に 3 ヶ月時点で高値であった (p=0.018) (Figure 2)。

以上の結果から、障害臓器によって関与する CD8T 細胞サブセットが異なる可能性が示された。

Table 2. CD8T 細胞亜分画と活動性指標の関連

	Anti-dsDNA Antibody	Immune complex	complement	SLEDAI
CD8/CD3	-0.07	0.00	0.05	0.07
Naïve/CD8	0.29*	0.26*	-0.47*	0.13
Act/CD8	0.18	0.10	0.09	0.29
Teff/CD8	-0.07	-0.04	0.18	-0.05
Tcm/CD8	-0.57*	-0.43*	0.49*	-0.56*
Tem/CD8	-0.21	-0.18	0.26	0.01

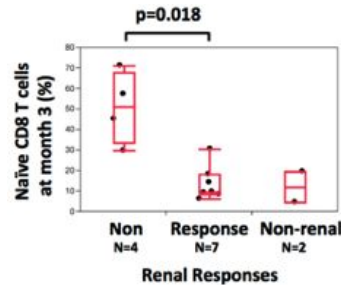
*P<0.05 by Spearman's correlation coefficient

Table 3. CD8T 細胞亜分画と障害臓器の関連

	Nephritis (N=21)	Rash (N=18)	Fever (N=7)	Leukopenia (N=16)
CD8/CD3	0.582	0.189	0.974	0.377
Naïve/CD8	0.847	0.210	0.644	0.963
Act/CD8	0.034*	0.023*	0.201	0.006*
Teff/CD8	0.892	0.464	0.408	0.757
Tcm/CD8	0.019*	0.001*	0.004*	0.005*
Tem/CD8	-0.21	0.709	0.855	0.158

*P<0.05 by Wilcoxon's test

Figure 2. 3 ヶ月時点での Naïve CD8T 細胞と腎反応性の関連



本期間での成果から、末梢血免疫細胞および血清蛋白を指標として、障害臓器および免疫学的アプローチから層別化することの実現可能性が示唆された。

今後は MFG-E8 発現単球の貪食能を含めた機能的解析、CD8T 細胞亜分画の各障害臓器での位置づけを探索していくことと、免疫学的分類によるアルゴリズム確立のための候補分子についてさらなる検討を考えている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1) M. Ushikubo, S. Saito, J. Kikuchi, M. Takeshita, K Yoshimoto, H. Yasuoka, K. Yamaoka, N. Seki, K. Suzuki, H. Oshima, T. Takeuchi: Milk Fat Globule Epidermal Growth Factor 8 on Monocytes is novel biomarker of disease activity in systemic lupus erythematosus. The European League Against Rheumatism Annual Congress 2018 (Amsterdam), presentation accepted.
- (2) J. Kikuchi, M. Ushikubo, S. Saito, K. Yamaoka, K. Sugahara, K. Chiba, T. Takeuchi: Involvement of peripheral cell subsets of CD8 T cells in patients with systemic lupus erythematosus. The 7th East Asian Group of Rheumatology (Tokyo, Japan) 2017.
- (3) Jun Kikuchi, Mari Ushikubo, Shuntaro Saito, Kunihiro Yamaoka, Kunio Sugahara, Tsutomu Takeuchi: Involvement of peripheral subsets of CD8 T cells in systemic lupus erythematosus. The 61th Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology (Fukuoka) 2017.
- (4) Jun Kikuchi, Masaru Takeshita, Katsuya Suzuki, Yoshiaki Kassai, Takahiro Miyazaki, Tsutomu Takeuchi. Proportions of Circulating Follicular Helper T Cells and Complement Levels, White Blood Cell Counts, and Skin Manifestations In Patients With Active

Systemic Lupus Erythematosus. 2016
American College of Rheumatology
Annual Meeting (Washington, DC, USA)
2016.

- (5) 菊池潤、牛窪真理、齋藤俊太郎、山岡邦
宏、竹内勤：SLE における末梢血 CD8 サ
ブセットと臨床所見の関連．第 1 回
United Front against Rheumatism (東京)
2016.

〔図書〕(計 1 件)

菊池潤、竹内勤：SLE の管理と治療、治療選
択基準について．田中良哉編集「最新醫學別
冊 診断と治療の ABC 118 全身性エリテマト
ーデス」 最新医学社、大阪、pp.132-141,
2016.

〔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

菊池 潤 (KIKUCHI, Jun)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：20570881