

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591564

研究課題名(和文) PFAPA症候群の発熱発作予防におけるシメチジンの作用機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms by which cimetidine prevents febrile attacks of PFAPA syndrome

研究代表者

楠原 浩一 (KUSUHARA, Koichi)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：20243941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：末梢血単核球のcDNAマイクロアレイおよび定量RT-PCRを用いた解析により、シメチジン非内服PFAPA患者で正常対照群より発現が亢進し、シメチジン内服群で非内服群より発現が低下している遺伝子としてRegulator of G-protein signaling 1 (RGS1)を同定した。末梢血単核球におけるRGS1の発現低下が、シメチジンの炎症反応抑制機序に関連していることが示唆された。また、単球性白血病由来細胞株THP-1をLPSで刺激した場合とそれにシメチジンを加えた場合の同様の比較から、単球におけるIL-10の発現低下も、シメチジンによる炎症反応抑制に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In analyses using cDNA microarray and quantitative RT-PCR of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), regulator of G-protein signaling 1 (RGS1) showed higher expression in PFAPA patients without cimetidine medication than in normal controls and lower expression in PFAPA patients with cimetidine medication than those without. It was suggested that reduced expression of RGS1 in PBMCs played an important role in cimetidine-induced inhibition of inflammatory response. Furthermore, comparison of LPS-added monocytoid leukemia cell line, THP-1 culture and LPS plus cimetidine-added THP-1 culture using the same analytical strategy, we demonstrated reduced expression of IL-10 in LPS plus cimetidine-added THP-1 culture, suggesting that reduced expression of IL-10 in monocytes was also associated with cimetidine-induced inhibition of inflammatory response.

研究分野：小児感染症学、自己炎症疾患

キーワード：周期性発熱 PFAPA症候群 自己炎症疾患 シメチジン 治療 作用機序

## 1. 研究開始当初の背景

PFAPA 症候群は、アフタ性口内炎、頸部リンパ節炎、咽頭炎を伴う周期性発熱疾患である。1989年に Marshallらにより PFAPA (periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and adenitis) 症候群として新しい疾患概念として提唱され、その後国内外で相次いで報告されている。現時点では、病因、病態は不明であり、診断に有用なバイオマーカーも判明していない。依然、他の発熱性疾患と鑑別することが容易ではなく、発熱発作を繰り返すことで本疾患を疑われ、Thomas らの報告した診断基準を以て診断されるが、不要な抗菌薬使用や入院が繰り返されているのが現状である。治療法としては、シメチジン、ステロイド、扁桃摘出術/アデノイド摘出術が行われている。

H2 ブロッカーであるシメチジンによる本症の発作予防は 1989 年に Feder らによって最初に報告された(Pediatr. Infect. Dis. J, 1989)。15 ~ 20mg/kg 分 2 ~ 分 3 投与が用いられる。約 60% の患者で発作抑制に有効であるが、発作が完全に消失するのはその 1/3 程度であり、残りは、発作の間隔が開いたり、熱の高さや発熱期間が改善したりするなどの部分的な有効例である。Feder らの最近の報告では、150mg 日 2 回を 6 ~ 12 か月間使用した 26 例のうち、7 例 (27%) で発熱発作がみられなくなっていた (Acta Paediatr, 2010)。本剤の作用機序は不明であり、本剤の持つ、細胞障害性 T リンパ球 (CD8) の抑制などの免疫調節作用が関与している可能性などが推定されているが、確認されていない。本症の発作を頓挫させるにはステロイドが有効であるが、非特異的な炎症抑制作用をもつステロイドよりも、シメチジンのほうが特異的な作用機序を有していると推測される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、PFAPA 症候群の発熱発作の予防に有効な H2 ブロッカーであるシメチジンの作用機序を、cDNA マイクロアレイや定量 PCR、サイトカイン、ケモカイン測定などの網羅的、多角的な解析により解明することであり、その結果を本症の病態解明に役立てるとともに、新たな治療法の開発につなげることを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象

PFAPA 症候群シメチジン内服患者 6 名  
(年齢範囲 3 ~ 8 歳、年齢中央値 5.5 歳)

PFAPA 症候群シメチジン非内服患者 10 名  
(年齢範囲 1 ~ 16 歳、年齢中央値 5.5 歳)  
正常対照 14 名

(年齢範囲 0 ~ 7 歳、年齢中央値 2.5 歳)

### (2) 方法

末梢血単核球のマイクロアレイによる

## 解析

1) 同一症例で、シメチジン開始前と開始後の非発熱時の末梢血単核球検体が両方とも収集できた 3 名の PFAPA 症候群患者について、末梢血単核球から mRNA を抽出し、cDNA に変換した後、開始前と開始後における cDNA microarray による発現の比較を行った。その結果から、シメチジン開始後において発現が有意に低下している遺伝子群を抽出した。

2) シメチジン非投与症例の非発熱時の検体が得られた PFAPA 症候群患者と正常対照群との間で、同様に cDNA microarray による比較を行い、非発熱時に発現が有意に亢進している遺伝子を抽出した。

3) これら 2 つの cDNA microarray の結果を比較し、非発熱時に発現が亢進し、シメチジン開始後に発現が低下している遺伝子群をシメチジンの作用機序に関連している可能性がある遺伝子群として抽出した。

末梢血単核球の定量 PCR による解析

上記の遺伝子について、同一症例に限らず、シメチジン開始前および開始後の検体を対象に、mRNA を抽出し cDNA に変換した後、定量 PCR を行い、実際にシメチジン開始後に発現が低下または上昇しているかどうかを確認した。

単球性白血病由来細胞株 THP-1 を用いた検討

PFAPA 症候群の急性期の血清および末梢白血球の解析から、血清ケモカインの中で CXCL9 (monokine induced by gamma-interferon, MIG) が高値をとること、また単球において活性化マーカーである CD64 の発現が亢進していることが明らかになり、本症候群の病態に単球が主要な役割を担っていることが示唆された。そこで、THP-1 を用いて *in vitro* での検討を行った

1) THP-1 細胞を lipopolysaccharide (LPS) で刺激した場合と LPS+シメチジンで刺激した場合の培養上清中の IL- 濃度の比較検討を行った。

2) 1) の系において、THP-1 細胞から mRNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法により各種遺伝子 (IL1B、シメチジンの内服後に末梢血単核球での mRNA 発現が低下していた遺伝子) の発現を解析した。

3) 1) の系において、cDNA microarray を用いた網羅的な解析を行い、LPS+シメチジンで発現が抑制されている遺伝子を検索した。

4) 3) によって抽出された遺伝子について、上記と同様の解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 末梢血単核球のマイクロアレイによる解析

同一症例で、シメチジン開始前と開始後の非発熱時検体が両方とも収集できた 3 名の PFAPA 症候群患者について、シメチジン

発現が有意に低下している遺伝子群を A 群とした。一方、シメチジン非投与症例の非発熱時検体が得られた PFAPA 症候群患者と正常対照群との間で、同様に cDNA microarray による比較を行い、非発熱時に発現が有意に亢進している遺伝子群を B 群とした。A 群と B 群に共通している遺伝子を抽出した。これらには、JUN, CD83, C15orf48, RGS1, AREG, IL-1 $\beta$ , NR4A2, PER1 が含まれていた(図1)。

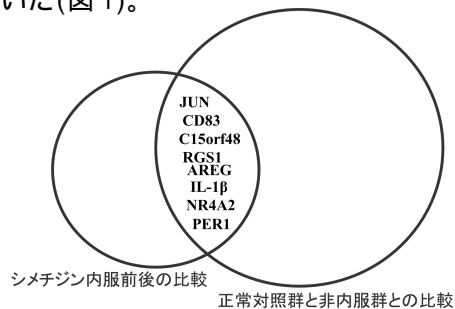


図1 PFAPA 症候群においてシメチジン内服後に発現が低下しており、かつ正常対照群と比較して PFAPA 症候群シメチジン非内服群で発現亢進している遺伝子

(2) 末梢血単核球の定量 PCR による解析

(1)で抽出された遺伝子について、リアルタイム定量 PCR 法を用いて、mRNA の発現を内服群、非内服群、正常対照群で比較した。

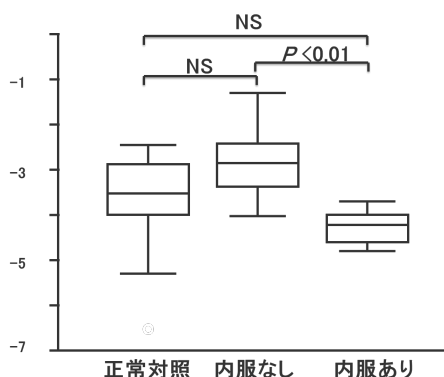


図2 リアルタイム定量 PCR による JUN 遺伝子の発現

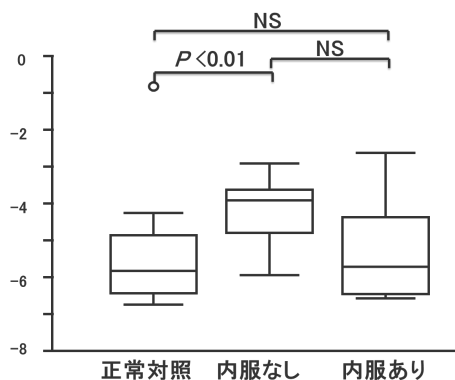


図3 リアルタイム定量 PCR による CD83 遺伝子の発現

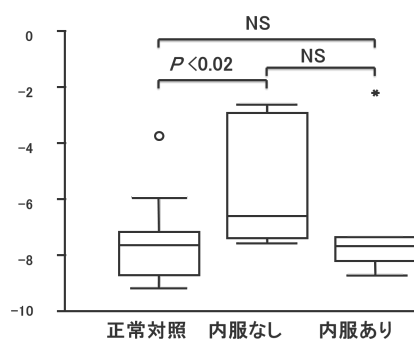


図4 リアルタイム定量 PCR による C15orf48 遺伝子の発現

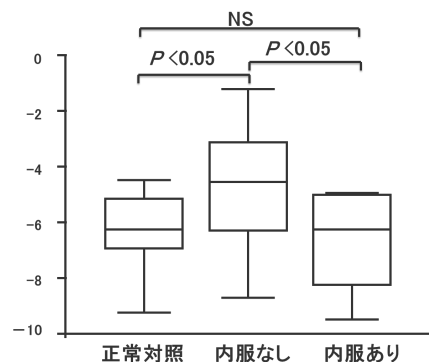


図5 リアルタイム定量 PCR による RGS1 遺伝子の発現

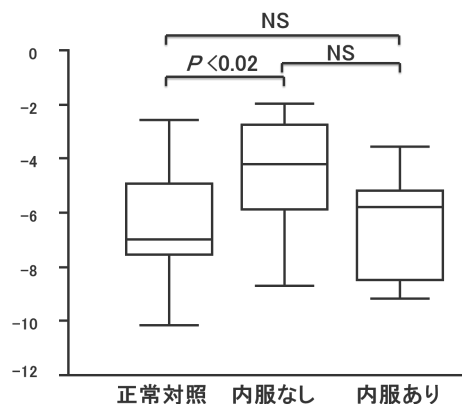


図6 リアルタイム定量 PCR による AREG 遺伝子の発現

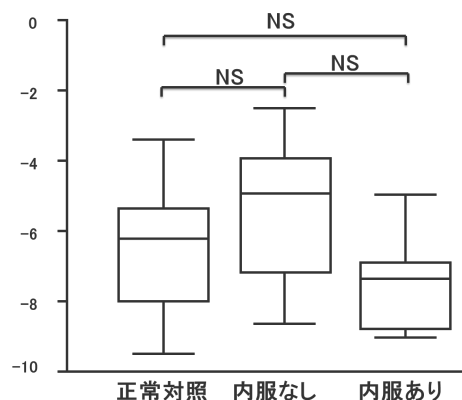


図7 リアルタイム定量 PCR による IL-1 遺伝子の発現

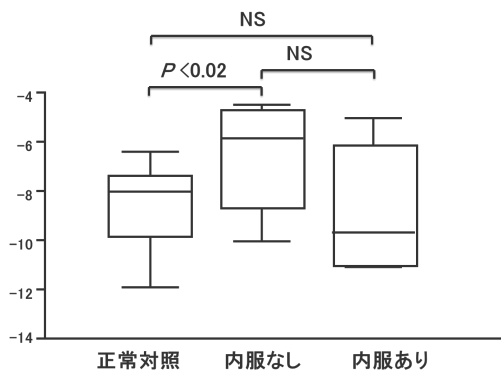


図 8 リアルタイム定量 PCR による NR4A2 遺伝子の発現

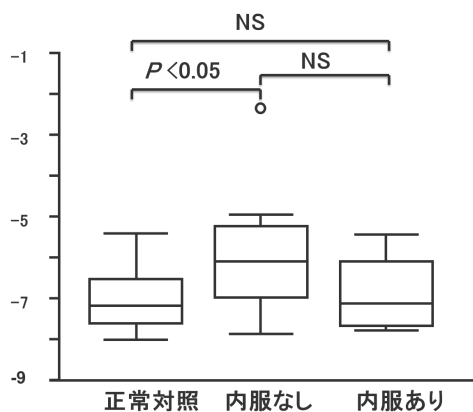


図 9 リアルタイム定量 PCR による PER1 遺伝子の発現

その結果、非内服群は正常対照群と比較して NR4A2、RGS1、C15orf48、CD83、AREG の発現が有意に亢進していた。非内服群と内服群との比較では RGS1 と JUN の発現が内服群で有意に低下していた(図 2~9)。したがって、RGS1 が、シメチジンの作用機序に関連している可能性が示唆された。

### (3) 単球性白血病由来細胞株 THP-1 を用いた検討

THP-1 細胞に LPS を単独で添加した場合に比べて、LPS + シメチジンの添加では、有意に IL-1 濃度が低下しており(図 10)、シメチジンは単球における自然炎症経路を抑制する作用があることが明らかになった。

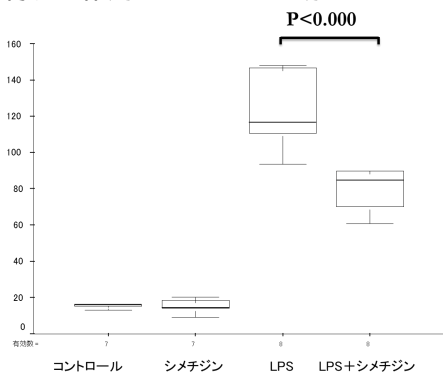


図 10 各培養系における IL-1 濃度 (単位 pg/ml)

次にこの系において、リアルタイム定量 PCR を用いて、シメチジン内服後の末梢血単核球における発現亢進がみられた遺伝子 (RGS1, IL1B, C15orf48, PER1, CD83, JUN, NR4A2, AREG) の mRNA の発現を、対照、LPS 単独、シメチジン単独、シメチジン+LPS 比較した。IL1B については、シメチジンの有無で発現に変化がなかったことから(図 11)、シメチジンによる IL-1 産生の抑制は、遺伝子発現の抑制ではなく、proIL-1 から IL-1 への変換に関与する過程で生じていることが明らかになった。他の遺伝子については、シメチジンの有無で発現に有意の変化はみられず、これら以外の遺伝子の発現制御を介して自然免疫経路を抑制していることが示唆された。

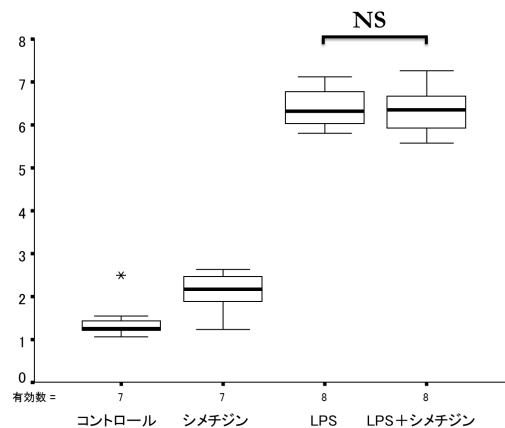


図 11 リアルタイム定量 PCR による各培養系における IL-1 遺伝子 (IL1B) の発現

LPS 刺激した THP-1 細胞と LPS 刺激にシメチジンを加えた THP-1 細胞から、mRNA を抽出し、cDNA マイクロアレイによる発現比較を行った。その結果、LPS+シメチジンで、LPS に対して発現が亢進している遺伝子として、IL-17F と CXCL12 が挙げられた。逆に、LPS+シメチジンで、LPS に対して発現が低下している遺伝子として、IL-10、epidermal growth factor receptor (EGFR)、regulator of G-protein signaling 1 (RGS1) が挙げられた。

で挙げられた遺伝子について、mRNA を鋳型としてリアルタイム RT-PCR 法により発現状況を確認した。IL-17F については、全体の発現が極めて低く、比較検討が困難であった。CXCL12 については、LPS+シメチジンと LPS の差を確認できなかった。IL-10 については、LPS+シメチジンでの発現低下を確認できた(図 12)。EGFR と RGS1 では、LPS+シメチジンと LPS の差を確認できなかった。以上の結果より、単球における IL-10 の発現低下が、シメチジンによる PFAPA 症候群の炎症反応抑制に一定の役割を果たしていることが示唆された。

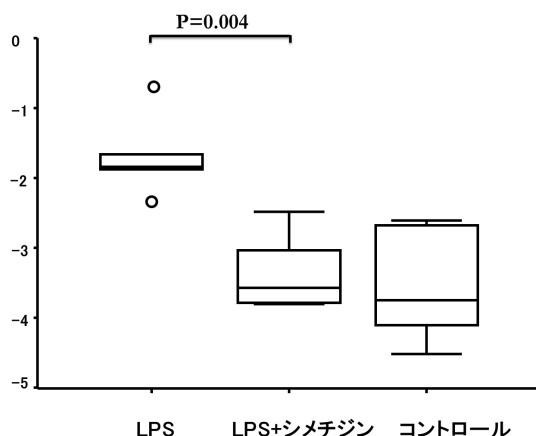


図 12 リアルタイム定量 PCR による各培養系における IL-10 遺伝子の発現

## 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 7 件)

Yamamoto N, Sato K, Hoshina T, Kojiro M, Kusuhara K: Utility of ferritin as a predictor of the patients with Kawasaki disease refractory to intravenous immunoglobulin therapy. *Mod Rheumatol* (Epub ahead of print)

Sato T, Kunishima S, Shirayama R, Ichikawa S, Sakai M, Kusuhara K: Bernard-Soulier syndrome due to compound heterozygosity for a novel glycoprotein Ib mutation. *Acta Haematol* **131**: 46-9, 2014.

Hoshina T, Nanishi E, Kanno S, Nishio H, Kusuhara K, Hara T: The utility of biomarkers in differentiating bacterial from non-bacterial lower respiratory tract infection in hospitalized children: difference of the diagnostic performance between acute pneumonia and bronchitis. *J Infect Chemother* **20**:616-20, 2014.

Kusuhara K, Hoshina T, Saito M, Ishimura M, Inoue H, Horiuchi T, Sato T, Hara T: Successful treatment of a patient with tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome using a half-dose of etanercept. *Pediatr Int* **54**:552-5, 2012.

Hoshina T, Kusuhara K, Saito M, Mizuno Y, Hara T: NKRP1A+ and T cells are preferentially induced in patients with Salmonella infection. *Human Immunol* **73**:623-8, 2012.

Abe Y, Hashimoto K, Inuma K, Ohtsuka Y, Ichiyama T, Kusuhara K, Nomura K, Mizuguchi M, Aiba H, Suzuki Y, Mizusawa H, Hosoya M: Survey of subacute sclerosing panencephalitis in Japan. *J Child Neurol* **27**:1529-33, 2012.

Kitajima J, Inoue H, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Yoshida T, Kusuhara K, Hara T: Differential transmission and postnatal outcomes in triplets with intrauterine cytomegalovirus infection. *Pediatr Dev Pathol* **15**:151-5, 2012.

[学会発表](計 3 件)

楠原浩一: PFAPA 症候群. 第 116 回日本小児科学会学術集会(シンポジウム), 2013 年 4 月 20 日、広島国際会議場(広島県・広島市)

楠原浩一: 周期性発熱症候群の病態と診断・治療. 第 23 回日本外来小児科学会学術集会(教育講演), 2013 年 9 月 1 日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

石井雅宏、佐藤 薫、市川 俊、小川将人、山本 昇、保科隆之、佐藤哲司、楠原浩一. PFAPA 症候群におけるシメチジン内服による末梢血単核球の遺伝子発現の変化. 第 45 回日本小児感染症学会、2013 年 10 月 26 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

[図書](計 1 件)

楠原浩一(共著). 自己炎症性疾患・自然免疫不全症とその近縁疾患、診断と治療社、東京、2012, 279 頁(p78-p83, p204-206)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

楠原 浩一(KUSUHARA Koichi)  
産業医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 20243941

(2)研究分担者

佐藤 哲司(SATO Tetsuji)  
産業医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 10389447

佐藤 薫(SATO Kaoru)

産業医科大学・医学部・助教 非常勤医師  
研究者番号：70596733

(3)連携研究者

神園 淳司 (KAMIZONO Junji)  
産業医科大学・医学部・非常勤医師  
研究者番号：50299616

宮川 隆之 (MIYAKAWA Takayuki)  
産業医科大学・医学部・非常勤医師  
研究者番号：90219733