

令和元年5月22日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04873

研究課題名(和文) オミクス情報を駆使した全身型特発性関節炎分子病態の解明と先制医療開発

研究課題名(英文) Omics-based analysis of molecular pathogenesis of systemic juvenile idiopathic arthritis and development of novel therapeutic intervention

研究代表者

谷内江 昭宏 (Yachie, Akihiro)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：40210281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：sJIAは発熱、関節痛などの症状を特徴とする、慢性炎症性疾患である。その原因はいまだに不明であるが、IL-18の異常高値がその病態の中核をなすと考えられている。一方、急性炎症病態が制御不十分な場合には、MASとして知られる、重篤な多臓器傷害が惹起され、しばしば致命的な経過をたどる。したがってsJIAの診療にあたっては、これを早期に診断すると同時に、MAS合併を予測し迅速な治療介入を行うことが必須である。本研究では、sJIAの炎症病態の指標となる種々のバイオマーカーを明らかにすると同時に、MAS合併のリスク因子についても明らかとし、sJIAの診断・治療に大きく貢献した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児における難治性炎症性疾患である、全身型若年性特発性関節炎の病態について、様々な有用な血清バイオマーカーを見出すことにより明らかにした。また、重篤な合併症であるマクロファージ活性化症候群発症のリスク因子を明らかにし、その予測や早期発見のためのバイオマーカーも提示した。これらの成果は、本疾患を病態から理解し、適切な診断・治療のための指標と提示することとなった。

研究成果の概要(英文)：sJIA is a chronic inflammatory illness characterized by fever and joint pain. Although its etiology remains unknown, extremely elevated serum level of IL-18 is a cardinal feature of the disease. When the inflammatory condition is not properly controlled, there often exists a risk of inducing macrophage activation syndrome, or MAS, which occasionally leads to fatal outcome. It is therefore very important to establish efficient system to diagnose sJIA early and predict the onset of MAS timely to start immediate therapeutic intervention. In this study, several biomarkers were found to be useful for this purpose and risk factors of MAS induction was also revealed. The whole study contributed a lot to the diagnosis and treatment of sJIA/MAS.

研究分野：小児科学

キーワード：sJIA MAS biomarker IL-18

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

sJIA は“診断基準”により規定される疾患単位であるが、病態の本質を説明する遺伝的背景や分子病態は明らかでないため、その診断はしばしば除外診断に基づくゴミ箱的診断に留まる。そのため重症感染症や悪性腫瘍、さらに難治性川崎病などの難治性炎症性疾患と sJIA との鑑別が困難な症例もあることが知られている。また sJIA は強い全身炎症病態をその特徴として、一部の症例ではマクロファージ活性化症候群 (macrophage activation syndrome; MAS) の合併により致命的な経過をたどることが知られている。このような特徴的な病態は、sJIA が炎症制御機構の異常と NK 細胞機能障害、さらに過剰な炎症病態を合併する特有な疾患であることを示唆している。申請者らはすでに、sJIA 急性期における血清サイトカインが IL-18 の異常高値を主体とした特徴的なプロファイルを示すことを明らかにしており、本疾患が NLRP3 インフラソームの機能異常を基盤とした「自己炎症性疾患」に分類されるべき疾患であることが示唆されている。

一方、臨床像や検査所見の差異から sJIA には複数の質的に異なる病態が含まれることが示唆されている。さらに申請者らのサイトカイン解析により、MAS を高率に合併し強い全身炎症病態を示す亜群と(全身炎症型)しばしば難治性の関節炎を合併し関節予後が不良となる亜群(関節炎型)では、発症初期の臨床像や炎症病態が類似するにも関わらず、その分子病態は全く異なる可能性が示されている。これらの異なる亜群に対しては、早期診断のための病態評価指標や分子標的治療薬の選択が異なることが予想される。したがって、致命的な合併症である MAS の発症リスクの高い亜群と、関節予後の不良な亜群とを発症早期より区別し、早期より最適の治療選択を行うことは重要な課題である。しかし、そのための信頼できる臨床指標はまだ提示されていなかった。

## 2. 研究の目的

sJIA において何故高率に MAS を合併するかについて、その分子病態を含めて詳細は明らかにされていない。しかし、前段で述べた通り、sJIA に分類される炎症性疾患の中で、MAS を合併しやすい亜群とそうではない亜群が存在すること、前者ではサイトカイン・プロファイルが異なる可能性があることなど、MAS 合併に至る特異的な分子機序が存在することが示唆される。sJIA に対する有効な治療法とされる抗 IL-6 受容体抗体製剤 (tocilizumab) の導入により急性炎症病態が制御されつつある症例でも、時に MAS の合併が見られる事実は、sJIA における MAS 合併が IL-6 高値により説明可能な炎症病態の単純な延長線上にはないこと、全く異なった分子機序によって発症していることを示している。申請者らは XIAP 欠損症における炎症病態の解析の過程で、偶然にこの疾患では sJIA と類似したサイトカイン・プロファイルを示すことを発見した。本疾患では高頻度で MAS/HLH を繰り返すことから、sJIA と共通した炎症病態を有する可能性が示唆される。

本研究では、申請者らがこれまでに明らかにしてきた成果を基盤として、新たな方法論を導入することによりさらにこれを発展させ、下記の事項を明らかにすることを目指す。

- 1) 多様な蛋白、遺伝子発現の網羅的解析 (オミクス情報) を駆使、sJIA 症例における炎症病態の包括的かつ経時的な変動を分析する。さらに分子病態に基づいた診断指標を提示する。
- 2) 上記により sJIA の異なる亜群の存在を明らかにし、早期診断、病態評価指標を提示する。
- 3) MAS 発症に関わる分子機構と NK 細胞機能との関わりを解明し、先制医療を提言する。

### 3. 研究の方法

#### 1) 複雑な炎症病態の経時的解剖と病態特異的バイオマーカーの探索；

現在用いられている「診断基準」に基づいて臨床的に sJIA と診断された症例を対象とする。既知の多様な臨床指標に加え、血清中サイトカインなどの炎症関連蛋白を定量、さらに網羅的解析により mRNA 発現プロファイルを明らかにする。症例毎に急性期、寛解期、安定期、MAS 合併時などを明確に定義し、炎症病態の時期毎に経時的にデータ解析を施行する。特に、MAS 前後においては短時間での変動をモニターし、バイオマーカーの時間軸に沿った変動について分析、MAS 発症の契機となる分子機序を探る。さらに、sJIA の異なる亜群についてこれらの指標を比較し、病態特異的バイオマーカーを探索し同定する。

#### 2) iPS 細胞の樹立と分化系の確立、病態の再現；

XIAP は X 連鎖性の原発性免疫不全症であり、hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) を繰り返し発症することが知られている。sJIA に合併する MAS と同様、高サイトカイン血症と血球貪食を繰り返すことから、しばしば sJIA との鑑別が問題となる。申請者らの分析でも XIAP 症例におけるサイトカイン動態は sJIA に極めて類似することが明らかとされている。XIAP 蛋白の機能と繰り返す HLH/MAS 様病態発症の関連は不明であるが、遺伝的背景が明らかである本疾患の炎症病態、HLH/MAS 発症機序を明らかにすることにより、sJIA 一般における MAS を惹起する分子病態を解明するきっかけが得られると予想される。本研究では、XIAP 症例より iPS 細胞を樹立、さらに細胞分化系を確立し、樹状細胞、マクロファージ、NK 細胞など、病態との関与が強く示唆される細胞の機能、特に NLRP3 インフラマソームの機能解析を行う。

#### 3) 早期診断のためのバイオマーカー選択と先制医療のための診断指針の提案；

網羅的解析を駆使した疾患特異的バイオマーカーの解明と、iPS 細胞を利用した分子病態の解明に基づいて、早期診断戦略と「先制医療」のための新しい診療指針の提案をめざす。このことが実現すれば、現在多様な病態の複合体である sJIA を的確なバイオマーカーにより早期に病態診断することが可能となる。さらに、病態進行あるいは増悪前に先制的に治療介入することにより、重症化、難治化、不可逆的な臓器傷害の合併を防ぐことが可能となる。結果として、診療費の大幅な削減と社会資源喪失の予防に貢献することが期待される。

### 4. 研究成果

sJIA の活動性ならびに MAS 発症の指標となるバイオマーカーの探索を継続した。中でも、sJIA/AOSD に共通の重要な炎症性サイトカインの異常高値が、*in vivo* での NK 細胞不応答性機能不全を惹起し、MAS 発症の直接の要因となることを以下の二つのモデルにより明らかとした。

第一に、sJIA あるいは AOSD 急性期、IL-18 異常高値の症例について、末梢血 NK 細胞の IL-18 による活性化を評価、正常対照に比べて、rIL-18 による活性化が著しく低下していることを明らかにした。このことから、従来から予想されていた、持続的 IL-18 異常高値による NK 細胞応答性の低下が客観的な指標により明らかにされた。第二に、このような異常 IL-18 高値に伴う NK 細胞機能低下が実際に MAS 発症の要因となるかどうかについて、AOSD 急性期に妊娠した母体における胎児ならびに新生児の炎症病態モニタリングを行った。母体血中の IL-18 は胎盤移行し、胎児ならびに新生児血中 IL-18 が異常高値を示すこと、経過を追って観察した複数症例の一部では臨床的に MAS と考えられる重篤な炎症病態が惹起された。これらの結果から、

胎盤移行した IL-18 による受動的な NK 細胞機能低下が、sJIA 患者さんと同様の MAS 発症リスクの高い炎症病態を惹起することが示された。

以上の結果は、IL-18 が異常高値を持続するという事実のみで、積極的な治療介入と、MAS 発症予防の戦略が重要であることを明らかに示した。今後は、この観点からの診断・治療介入戦略を提示する必要があると同時に、sJIA/AOSD 症例における炎症病態評価のより正確で有効なバイオマーカー選択を探索する必要がある。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 12 件 )

- 1) Mizuta M, Shimizu M, Inoue N, Nakagishi Y, Yachie A. Clinical significance of serum CXCL9 levels as a biomarker for systemic juvenile idiopathic arthritis associated macrophage activation syndrome. *Cytokine*. 2019; 119: 182-187.
- 2) Shimizu M, Inoue N, Mizuta M, Nakagishi Y, Yachie A. Serum Leucine-Rich  $\alpha$ 2-Glycoprotein as a Biomarker for Monitoring Disease Activity in Patients with Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis. *J Immunol Res*. 2019; 2019: 3140204.
- 3) Takakura M, Shimizu M, Yakoyama T, Mizuta M, Yachie A. Transient natural killer cell dysfunction associated with interleukin-18 overproduction in systemic juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Int*. 2018; 60: 984-985.
- 4) Sakumura N, Shimizu M, Mizuta M, Inoue N, Nakagishi Y, Yachie A. Soluble CD163, a unique biomarker to evaluate the disease activity, exhibits macrophage activation in systemic juvenile idiopathic arthritis. *Cytokine*. 2018; 110: 459-465.
- 5) Aizu M, Mizushima I, Nakazaki S, Nakashima A, Kato T, Murayama T, Kato S, Katsuki Y, Ogane K, Fujii H, Yamada K, Nomura H, Yachie A, Yamagishi M, Kawano M. Changes in serum interleukin-6 levels as possible predictor of efficacy of tocilizumab treatment in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. 2018; 28: 592-598.
- 6) 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.
- 7) Shimizu M, Ikawa Y, Mizuta M, Takakura M, Inoue N, Nishimura R, Yachie A. FDG-PET in macrophage activation syndrome associated with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Int*. 2017; 59: 509-511.
- 8) Shimizu M, Nakagishi Y, Inoue N, Mizuta M, Yachie A. Leucine-rich  $\alpha$ 2-glycoprotein as the acute-phase reactant to detect systemic juvenile idiopathic arthritis disease activity during anti-interleukin-6 blockade therapy: A case series. *Mod Rheumatol*. 2017; 27: 833-837.
- 9) Ishikawa S, Shimizu M, Inoue N, Mizuta M, Nakagishi Y, Yachie A. Interleukin-33 as a marker of disease activity in rheumatoid factor positive polyarticular juvenile idiopathic arthritis. *Mod Rheumatol*. 2017; 27: 609-613.
- 10) Mizuta M, Shimizu M, Inoue N, Kasai K, Nakagishi Y, Takahara T, Hamahira K, Yachie A. Serum ferritin levels as a useful diagnostic marker for the distinction of systemic juvenile idiopathic arthritis and Kawasaki disease. *Mod Rheumatol*. 2016; 26: 929-932.

- 11) 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.
- 12) 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.

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：和田 泰三

ローマ字氏名：WADA TAIZO

所属研究機関名：金沢大学

部局名：附属病院

職名：講師

研究者番号(8桁)：30313646

研究分担者氏名：東馬 智子

ローマ字氏名：TOMA TOMOKO

所属研究機関名：金沢大学

部局名：附属病院

職名：助教

研究者番号(8桁)：00377392

研究分担者氏名：清水 正樹

ローマ字氏名：SHIMIZU MASAKI

所属研究機関名：金沢大学

部局名：医学系

職名：助教

研究者番号（8桁）：10401902

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。