

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19623

研究課題名(和文) 全身型若年性特発性関節炎の早期診断法の確立

研究課題名(英文) Early diagnosis of systemic juvenile idiopathic arthritis

研究代表者

石村 匡崇 (Ishimura, Masataka)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：10448417

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)：全身型若年性特発性関節炎(JIA)の早期診断法の確立を目的とし、全身型JIA患者末梢血単核球での遺伝子発現を解析し、有核赤血球由来の遺伝子(AHSP/HBD/CA1)の発現上昇を認めた。これら3遺伝子はCD45陽性白血球に全く発現がみられず、CD71陽性有核赤血球のみで発現していることから、全身型JIA患者末梢血中に多くの有核赤血球が存在することが示唆された。フローサイトメトリーで有核赤血球を評価し、全身型JIA患者末梢血で有意に有核赤血球が増加していることを確認された。末梢血nRBC数を評価することは、全身型JIAの診断に有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To establish the diagnostic method for systemic idiopathic juvenile arthritis (JIA), we investigated genes specifically expressed in systemic JIA patients by analyzing whole transcriptome using microarray analysis of peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The most upregulated genes (ASHP, HBD, CA1) were derived from nucleated red blood cells (nRBC), which indicated the increased number of nRBC in PBMC. The peripheral blood erythroblastosis of systemic JIA patients was confirmed by flow cytometry. The analysis of nRBC ratio in PBMC by flow cytometry would be helpful for diagnosis of systemic JIA.

研究分野：小児血液・免疫

キーワード：全身型若年性特発性関節炎 早期診断 遺伝子発現 有核赤血球 末梢血単核球 フローサイトメトリー

1. 研究開始当初の背景

若年性特発性関節炎 (Juvenile idiopathic arthritis: JIA) は、小児期の6週間以上持続する原因不明の関節炎を有する疾患である。弛張熱、皮疹、関節炎、心膜炎を特徴とする全身型と関節炎型 (リウマトイド因子陽性型、2.抗核抗体陽性型、3.血清因子陰性型)、二次性慢性関節炎 (乾癬関連、炎症性腸疾患関連、附着部炎関連など) に分類される。

全身型 JIA では IL-6 や IL18 などの異常産生に伴うサイトカイン調節の破綻により、CRP 高値、血清アミロイド A 高値、好中球増多、貧血、高ガンマグロブリン血症を呈する。全身型 JIA では発熱と発疹、漿膜炎が主症状で自己抗体の上昇はみられず、感染症や川崎病、リウマチ熱や他の膠原病、悪性疾患などを除外する必要がある。しかし、診断において特徴的な症状や特異的な検査はなく、診断の遅れによりマクロファージ活性化症候群を発症すると血球貪食、播種性血管内凝固を呈し致死的となる疾患である。

2. 研究の目的

全身型 JIA において、採取が比較的容易な末梢血単核球で発現上昇または発現低下が見られる遺伝子の詳細な発現解析を行うことで、全身型 JIA の病態を明らかとし、血中で新たなバイオマーカーの探索を行う。また、特徴的発現プロファイルを用いて多検体での解析を行い、統計解析法を組み合わせることで非侵襲的な早期診断法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

[方法]

本研究に関しては、九州大学倫理委員会の承認を受けて行った。

1. 全身型 JIA 5 例、川崎病 3 例、壊死性リンパ節炎 2 例の末梢血から単核球を比重遠心法により分離し、mRNA を抽出しマイクロアレイによる比較解析を行った。他疾患と比較し全身型 JIA で2倍以上の発現上昇が見られた遺伝子を抽出した。

2. 24 例の全身型 JIA、川崎病を含む 31 例の疾患対照、36 例の正常対照の末梢血単核球から合成した cDNA を用いて、1 で同定された有核赤血球 (nRBC) 関連遺伝子の定量 PCR を行った。ACTB を対照として、比較 Ct 法で比較した。

3. 遺伝子の由来が nRBC であることを確認するため、健常臍帯血から CD45、CD71、GPA 抗体を用いて分離した赤芽球と単核球で遺伝子発現を比較した。

4. フローサイトメトリー (FCM) による末梢血単核球中の nRBC の割合について、新規に受診した患者で前向き検討を行った。5 例の全身型 JIA、6 例の川崎病、7 例の他の炎症性疾患、5 例の正常対照の間で比較した。また、治療前後における nRBC の割合の変化も

検討した。

[統計解析]

統計解析ソフトウェア JMP を用いて統計解析を行った。定量 PCR および FCM の結果比較には Dunnett 検定を用いた。相関解析は Pearson 法を用いた。FCM 結果の経時的比較にはペア t 検定を用いた。

4. 研究成果

(1) 末梢血単核球のマイクロアレイでは、全身型 JIA 患者において 59 遺伝子で2倍以上の発現上昇が見られた。上位 8 遺伝子のうち、3 遺伝子が nRBC 関連遺伝子であった (表 1)。

Gene name	Synonyms	Fold differences between healthy donor			Expression in CD71+ erythroid
		SoJIA	KD	HNL	
RAP1A, Member Of RAS Oncogene Family	RAP1A	11.770	3.361	1.060	
Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein	AHSP	11.098	2.330	0.721	+++
Hemoglobin, Delta	HBD	8.240	4.085	0.959	+++
Leucine-Rich Repeats And Calponin Homology (CH) Domain Containing 1	LRCH1	7.153	2.053	0.949	
Fibroblast Growth Factor 7	FGF7	7.010	1.530	1.066	
Carbonic anhydrase 1	CA1	6.483	2.560	0.550	+++
Avian Erythroblastosis Virus E26 (V-Ets) Oncogene Homolog-1	ETS1	6.197	2.104	1.057	
Calcium Channel, Voltage-Dependent, Beta Subunit Associated Regulatory	C19orf26	5.873	1.510	0.961	

表 1. マイクロアレイにおいて全身型 JIA 患者末梢血単核球で発現が上昇していた上位 8 遺伝子

(2) nRBC 関連の 3 遺伝子 (AHSP, HBD, CA1) について定量 PCR で解析した。3 遺伝子とも疾患対照、正常対照と比べ著明な発現上昇が見られた (図 1)。

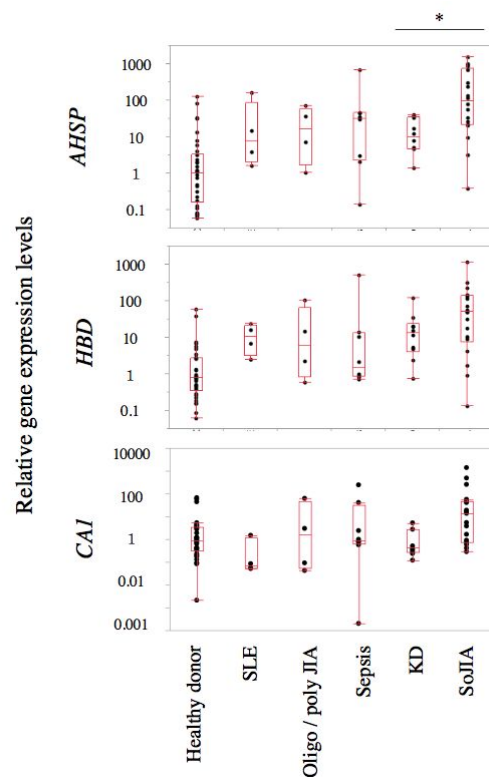


図 1. 定量 PCR による遺伝子発現比較
SLE: 全身性エリテマトーデス,

Oligo/poly JIA: 単関節型 or 多関節型 JIA
 Sepsis: 敗血症, KD: 川崎病,
 SoJIA: 全身型 JIA

(3) これら 3 遺伝子の遺伝子発現は健常臍帯血由来の nRBC には認められたが、単核球には認められなかった。

(4) 末梢血単核球中の nRBC を FCM により解析したところ、全身型 JIA で川崎病よりも有意に増加していた。また、全身型 JIA で増加が確認された nRBC は治療後有意に減少していることを確認した (図 2)。

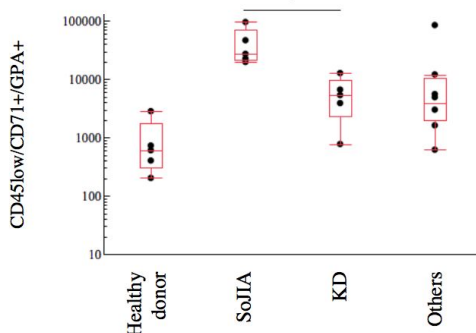


図 2. FCM における nRBC の単核球中に占める割合の比較

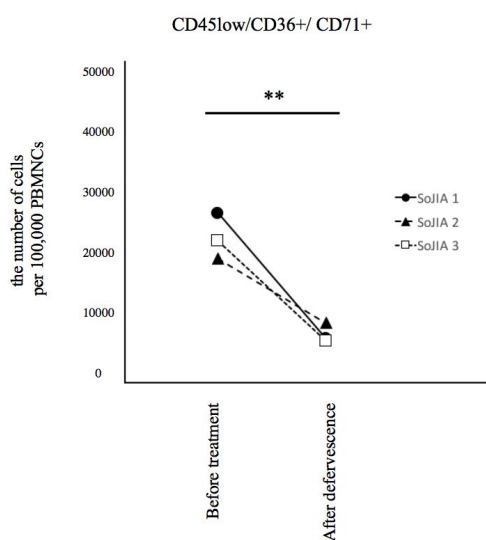


図 3. FCM における nRBC の単核球中に占める割合の治療前後における経時的変化

考察

本研究では、全身型 JIA 患者において末梢血単核球中で nRBC 関連の遺伝子発現が上昇していることが確認された。実際にはこれらの遺伝子は単核球自身には発現していないことを確認し、全身型 JIA 患者では末梢血中に nRBC が増加し分離した単核球中に混入していることが示唆された。このため FCM によ

り末梢血単核球に占める nRBC の割合を確認したところ、他疾患に比べ全身型 JIA で有意に増加していることが観察された。

本研究と同様に全身型 JIA の末梢血単核球のマイクロアレイ解析を行った報告のうち、本研究と同様に nRBC 関連のクラスター遺伝子の発現上昇を認めた報告は複数認める [1-3] が、FCM を用いて単核球中の nRBC そのものを調べた報告はない。mRNA 発現の解析に比べ、FCM の解析は格段に簡便であり迅速に施行可能である。また、本法ではしばしば鑑別に苦慮する川崎病とも有意な差を持って区別でき、全身型 JIA の早期診断、早期鑑別に有用と考える。

本来末梢血中には nRBC はほとんど存在しないことが知られているが、敗血症などの重症疾患罹患時には増加することが過去の報告で示されている [4]。原因については現時点では不明であるが、我々の検討でも、全身型 JIA のみならず、川崎病を含む他の炎症性疾患でも正常対照に比してわずかながら上昇を認めたことから、何らかの炎症関連物質の関与が示唆される。このような観点から、今後、患者血清中のサイトカインとの関連の解析が必要である。また、近年 nRBC には炎症抑制作用といった新たな機能が知られるようになってきている [5]。全身型 JIA で増加している nRBC には本来とは異なる機能を持っている可能性もあり、更なる検討が必要である。

〔引用論文〕

Gene expression profiling of peripheral blood from patients with untreated new-onset systemic juvenile idiopathic arthritis reveals molecular heterogeneity that may predict macrophage activation syndrome.

Fall N, et al. *Arthritis & Rheumatism*. 2007;56.11:3793-3804.

doi: 10.1002/art.22981

Blood leukocyte microarrays to diagnose systemic onset juvenile idiopathic arthritis and follow the response to IL-1 blockade.

Allantaz F, et al. *Journal of Experimental Medicine*, 2007;204.9:2131-2144.

doi: 10.1084/jem.200700709109c

Subtype-specific peripheral blood gene expression profiles in recent-onset juvenile idiopathic arthritis.

Barnes MG, et al. *Arthritis & Rheumatism*, 2009;60.7: 2102-2112.

doi: 10.1002/art.24601

Nucleated Red Blood Cells as Predictors of All-Cause Mortality in Cardiac Intensive Care Unit Patients: A Prospective Cohort Study.

JGMM Júnior, et al. *PLoS one*, 2015;10.12:

e0144259.
doi: 10.1371/journal.pone.0144259

Immunoregulatory function of neonatal nucleated red blood cells in humans.
Cui L, Takada H, Takimoto T, Fujiyoshi J, Ishimura M, Hara T. Immunobiology. 2016;22:853-61.

doi: 10.1016/j.imbio.2016.04.004

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome presenting with gut-associated T-cell lymphoproliferative disease. Teranishi H, Ishimura M, Koga Y, *et al*, Rinsho Ketsueki. 2017;58:20-25. (in Japanese)

doi: 10.11406/rinketsu.58.20. (査読有り)

Immunoregulatory function of neonatal nucleated red blood cells in humans.
Cui L, Takada H, Takimoto T, Fujiyoshi J, Ishimura M, Hara T. Immunobiology. 2016;22:853-61.

doi: 10.1016/j.imbio.2016.04.004. (査読有り)

A nationwide survey of common viral infections in childhood among patients with primary immunodeficiency diseases.
Nanishi E, Hoshina T, Takada H, Ishimura M, *et al*, J Infect. 2016;73:358-68.

doi: 10.1016/j.jinf.2016.07.018. (査読有り)

Insufficient immune reconstitution after allogeneic cord blood transplantation without chemotherapy conditioning in patients with SCID caused by CD3 δ deficiency.
Takada H, Ishimura M, Hara T.

Bone Marrow Transplant. 2016;51:1131-3.

doi: 10.1038/bmt.2016.64. (査読有り)

Invasive Bacterial Infection in Patients with Interleukin-1 Receptor-associated Kinase 4 Deficiency: Case Report.

Takada H, Ishimura M, Takimoto T, *et al*, Medicine (Baltimore). 2016;95:e2437.

doi: 10.1097/MD.0000000000002437. (査読有り)

BTK gene targeting by homologous recombination using a helper-dependent adenovirus/adeno-associated virus hybrid vector.
Yamamoto H*, Ishimura M*, Ochiai M, *et al*, Gene Ther. 2016;23:205-13. *eqally contributed
doi: 10.1038/gt.2015.91. (査読有り)

〔学会発表〕(計5件)

発熱、関節痛、歯肉腫脹、紫斑を主訴に診断に至った壊血病の男児例

園田素史、江口克秀、石村匡崇 他：
第492回日本小児科学会福岡地方会 平成28年12月10日 福岡

難治性川崎病と全身型若年性特発性関節炎の鑑別に難渋し、トシリズマブが著効した一例

園田素史、石村匡崇、他：
第8回 KOCS 小児リウマチ研究会 平成28年6月4日 福岡

難治性川崎病との鑑別に難渋し、トシリズマブが著効した全身型若年性特発性関節リウマチの一例

園田素史、豊村大亮、鶴池清、中島康貴、石村匡崇、他 第15回九州川崎病研究会 平成28年5月28日 福岡

一宮優子、上田圭希、石村匡崇、他 Crohn病に対するアダリムマブ治療中にループス様症候群と橋病変を認めた一例

第7回 KOCS 小児リウマチ研究会 平成27年5月30日 福岡

一宮優子、上田圭希、石村匡崇、他 Crohn病に対するアダリムマブ治療中にループス様症候群と橋病変を認めた一例

第484回日本小児科学会福岡地方会 平成27年4月11日 福岡

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石村 匡崇 (ISHIMURA, Masataka)
九州大学・大学院医学研究院成長発達医学分野・助教
研究者番号：10448417