

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K09984

研究課題名(和文) 乾癬性関節炎におけるリンパ球機能とサイトカインプロファイルの解析

研究課題名(英文) Analysis of lymphocyte subsets in psoriatic arthritis

研究代表者

村上 美帆 (Murakami, Miho)

東京医科大学・医学部・兼任講師

研究者番号：30595591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：乾癬性関節炎(PsA)は皮膚疾患である乾癬に関節炎を合併した症候群で、根本的な病因や病態は解明されていない。我々は、PsA患者の末梢血中のリンパ球サブセットを解析し、PsAと同様に破壊性・進行性の関節炎を有する関節リウマチ(RA)患者の結果と比較した。PsAとRAでは、CD3+ T細胞やCD4+ T細胞の割合や活性化マーカーであるCD25の発現に違いがあることを見出した。また、PsA患者のTNF阻害薬治療前後のサイトカインとリンパ球サブセットを経時的にモニターリングしたところ、PsAの病態に関わっているIL-17やIL-12/23の血中濃度の変化は見られず、治療効果との関連が見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PsAは本邦で年々増加しており、その病因はおろか、病態も不明な点が多い。本研究により、PsAはRAとは違うリンパ球サブセットのプロファイリングを示したことやTNF阻害治療によるサイトカインプロファイリングを示したことにより、今後の診断の補助や治療効果の判定に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Psoriatic arthritis (PsA) is a chronic, immune-mediated, inflammatory arthritis associated with psoriasis, and its etiology is still largely unknown. We analyzed lymphocyte subsets and cytokines profiles in peripheral blood samples from PsA patients. In comparison with rheumatoid arthritis (RA) patients, the proportions of CD3+ cells and CD4+ cells in PsA patients were significantly higher than those of RA patients. On the other hand, the CD25+ cell proportions in CD4+ and CD8+ T cells in PsA patients were significantly lower than those of RA patients. During tumor necrosis factor (TNF) inhibitor treatment, plasma IL-17 and IL-12/23 levels were not changed. The plasma levels of both cytokines were not correlated to the therapeutic effects, yet it has been reported that they contribute to the pathogenesis of PsA.

研究分野：免疫学

キーワード：乾癬性関節炎 リンパ球サブセット サイトカイン 関節リウマチ

1. 研究開始当初の背景

乾癬性関節炎 (PsA) は皮膚疾患である乾癬に関節炎を合併した症候群であり、体軸性の脊椎関節炎、ぶどう膜炎、付着部炎などの症状を呈する。PsA の病態は未だ不明な点が多いが、HLA-B27 などの遺伝的な背景に、環境因子として腸内細菌の関与が示唆されている。また、乾癬患者の多くが、脂質異常症や糖尿病、高尿酸血症などの生活習慣病を有しており、これらが増悪因子となっていると考えられる。乾癬の欧米諸国での有病率が 2% であるのに対し、本邦では 0.1% とされていたが、食生活の欧米化に伴い本邦での乾癬患者数は年々増加し、それに伴い PsA の患者数も増加している。本研究の研究分担者である辻らの報告では、本邦での乾癬患者における PsA の発症率は 14.3% である (Ohara, Tsuji, et al., J Rheumatol, , 2015)。

関節リウマチ (RA) に対する抗サイトカイン療法の成功を背景に、PsA においても炎症性サイトカインを標的とした抗体医薬が臨床開発され、本邦においても interleukin (IL)-12/23 阻害剤、IL-17 阻害剤、そして tumor necrosis factor (TNF) 阻害剤がすでに承認されている。しかし、RA の場合と同様に、その根本的な病因や病態の解明は残されたまま治療法の開発が先行したため、治癒は望めず、高額な薬剤費は患者のみならず、我が国の保険財政に大きくのしかかる。従って、根本的な病因や病態の解明は急務である。

PsA は RA と同様に、破壊性・進行性の関節炎を呈するが、2 つの疾患には明らかな違いがある。PsA には自己抗体の存在は証明されていないが、RA は典型的な自己免疫疾患であり、リウマトイド因子 (RF) や抗シトルリン化ペプチド抗体 (ACPA) などの自己抗体を有する。PsA では、Class I 分子である HLA-B27 を有する患者が多いが (Queiro, et al., Rheumatology, 2016) RA では HLA-DR4 をはじめとする Class II 分子がリスク因子である。これらの事実は、PsA では、CD8+ の細胞障害性 T 細胞がより重要であり、自己抗原に反応する CD4+ T 細胞や自己抗体産生 B 細胞の活性化は少ないと考えられるが、未だ証明されていない。一方で、自己抗体を有する RA 患者においては、CD4+ T 細胞の活性化や、自己抗体産生 B 細胞の活性化があり、これらのリンパ球サブセットに偏りがあることを我々は報告した (Matsutani, Murakami. et. al., Ann Rheum Dis 72:Suppl 3 A614, 2013)。近年、PsA 患者の関節内で IL-17 を産生する CD8+ T 細胞の存在が示されたが (Menon, et al., Arthritis Rheumatol, 2014) PsA の病態における CD8+ T 細胞の機能については全く不明である。

治療薬においても、PsA で有効性が示されている IL-17 阻害剤の有効性は RA では証明されていない (Genovese, et al., Ann Rheum Dis, 2013)。また、RA に有効性が証明されている IL-6 阻害剤の効果は PsA では証明されていない (Ogata, et al. Joint Bone Spine, 2012)。すなわち、両疾患の関節破壊に関わる責任サイトカインに相違があると考えられる。

IL-6 は、抗原刺激により活性化された B 細胞を抗体産生細胞に分化させる因子である。また、IL-6 は TGF- β の存在下では、ナイーブな T 細胞を T helper (Th) 17 細胞に分化させるが、IL-6 非存在下では TGF- β 刺激により逆に自己免疫を抑制する制御性 T 細胞 (Treg) に分化させる (Bettelli, et al., Nature, 2006. Mangan, et al, Nature, 2006)。したがって、IL-6 の過剰産生は、B 細胞と T 細胞の分化を介して RA の自己免疫反応 (自己抗原に対する獲得免疫の異常) に関わっていると考えられる。一方で、IL-6 阻害剤の効果は証明されておらず自己抗体の産生がない PsA の患者でも IL-6 高値例がある。実際、生物学的製剤未使用の PsA 7 例の血中 IL-6 値を測定したところ、4 例の患者が血中 IL-6 値の増加を示していた。PsA では、IL-23 が Th17 細胞の誘導に関与していると言われている。しかしながら、このように IL-6 高値例もみられることから、IL-6 も関与している可能性は否定できない。ましてや、この増加した IL-6 が前述の IL-17 産生 CD8+ T 細胞の分化に関与するか否かも不明である。

2. 研究の目的

PsA は、RA と同様に、破壊性の関節炎を呈するが、RA とは異なり PsA では自己抗体は見られず、HLA Class I 分子の HLA-B27 との関連から、自己反応性 CD4+ T 細胞よりも CD8+ の細胞障害性 T 細胞の役割が重要と考えられる。また、同じサイトカイン分子を標的とした治療の有効性は両疾患で差異があり、関節破壊に関わる責任サイトカインに相違があると考えられる。本研究では、PsA 患者の末梢血中の T 細胞、特に CD8+ T 細胞のサブセットと、サイトカインならびに T 細胞のサイトカイン産生能を解析し、RA ならびに健常人と比較すること、関節炎が未発症の乾癬患者のリンパ球サブセットと血中サイトカインを経時的にモニターリングすることで、PsA の病態を明らかにする。

3. 研究の方法

PsA と RA 患者のリンパ球サブセットとサイトカインプロファイルの違いを明らかにするため、疾患活動性を有する患者の末梢血を入手し、Ficoll 密度勾配遠心分離により末梢血単核球 (PBMC) を単離した。同時に、血漿または血清も分離し凍結保存し、サイトカイン測定に使用した。また、生物学的製剤を使用する PsA 患者は治療前に加え、治療開始 6 ヶ月、12 ヶ月後に末梢血を採取し、治療前との比較を行った。また、PsA 患者、RA 患者、健常人の 3 群のデータ比較を行った。

1) リンパ球サブセットの解析：末梢血単核球では、FITC、PE および PECy5 標識抗ヒト CD 抗体

を用いて表面染色し、Flow cytometry により、下記のマーカーを調べた。Th1、Th2、Th17、制御性 T 細胞は、PMA/イオノマイシンにより 4 時間刺激した後、細胞内サイトカイン染色を行って調べた。

(ア) T 細胞： CD4 および CD8 陽性の T 細胞数、 CD28 陽性細胞数、 T 細胞活性化マーカー (CD25, CD62L^{low}, CD69) の発現、 制御性 T 細胞 (CD4+CD25+Foxp3+細胞) Th1 (CD4+IFN-⁺) CD8+IFN-⁺, Th2 (CD4+IL-4+) CD8+IL-4+, Th17 (CD4+IL-17+) CD8+IL-17+の頻度と細胞数、 CD3+CD4-CD8-細胞の割合

(イ) B 細胞 (主に RA との比較のため)： CD19 および CD20 陽性細胞数、 CD80、 sIgM、 sIgD、 sIgG、 B 細胞の生存・分化・抗体産生に重要な役割を果たす B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family 受容体 (BAFF-R)、 B-cell maturation antigen (BCMA)、 transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI)の発現 プラズマ細胞マーカー (CD138 等)の発現

2) 血清中のサイトカインプロファイル：血清中のサイトカインを ELISA で測定した。

4. 研究成果

バイオリジクスな PsA 症例をリクルートし、同意が得られた患者 21 名の末梢血のリンパ球と血漿を分離し、リンパ球サブセットとサイトカインの解析を実施した。その中で、生物学的製剤を開始した患者 15 名から、治療開始より 24 週後および 48 週後にも、末梢血を随時採取し、治療前後のサイトカインの推移、リンパ球の割合の推移を解析した。

PsA 患者 (21 名) RA 患者 (49 名) 健常人 (34 名) の 3 群のデータ比較では、PsA 群と健常人群を比較すると、CD3+T 細胞、CD19+B 細胞の割合に有意差は認められなかった。PsA 群と RA 群との比較では、CD19+B 細胞の割合は有意差がなかったが、CD3+T 細胞の割合は、RA 群は約 40%、PsA 群が約 50%と有意に高かった ($p = 0.024$)。また、ヘルパー T 細胞 (CD4+細胞) と細胞障害性 T 細胞 (CD8+細胞) の割合については、CD4+細胞の割合は、健常人群と PsA 群に有意差は認められなかったが、RA 群では約 30%に対し、PsA 群約 36%と有意に高かった ($p = 0.015$)。しかし、CD8+細胞の割合は、3 群間で有意差は認められなかった。

活性化マーカーについては、CD25+細胞の割合は、CD4+細胞、CD8+細胞ともに、PsA 群 (CD4+細胞中の CD25+細胞の割合は約 5%、CD8+細胞中の CD25+細胞の割合は約 3%) に比べ、RA 群 (CD4+細胞中の CD25+細胞の割合は約 10%、 $p < 0.0001$ 、CD8+細胞中の CD25+細胞の割合は約 5%、 $p = 0.015$) で有意に高かったが、PsA 群と健常人群には有意に差はなかった。また、CD62L^{low} 細胞の割合は、CD4+細胞、CD8+細胞ともに、3 群間で PsA 群が最も高かったが、有意差はなかった。さらに、CD69+細胞の割合は、CD8+細胞は 3 群間で有意差はなく、一方で、CD4+細胞では、健常人群が最も高く、次に RA 群が高く、PsA 群が最も低く、これらの値には有意差があった。このように、3 群比較において、PsA 群で、特に細胞障害性 T 細胞 (CD8+細胞) が活性化している結果は得られなかった。現在、B 細胞と Th1、Th2、Th17、制御性 T 細胞の解析中である。

次に、TNF 阻害治療を開始した PsA 患者 15 例の血清を、治療開始より 24 週後および 48 週後に随時採取し、治療前後のサイトカインの推移、リンパ球サブセットの割合の推移を解析した。Clinical disease activity index (CDAI) は治療前と比べ有意に低下した (図 1)。サイトカインの推移 (n=14) では、PsA の病態に関与している IL-17 と IL-12/23 は、治療前後で有意差はなかった (図 2)。一方、コントロールとして測定した血中 IL-6 (正常値 4 pg/mL 以下) の変化は、TNF 阻害治療により 24 週と 48 週で有意に低下した (図 2)。これらの結果から、SpA 患者における IL-17 と IL-12/23 と産生には、TNF は関与せず、一方で、TNF は IL-6 の産生を制御することが示唆された。

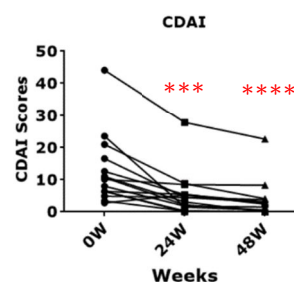


図 1: TNF 阻害治療による PsA 患者の CDAI の変化

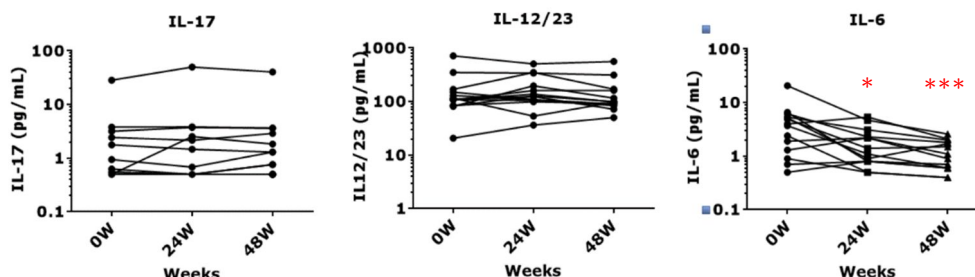


図 2: TNF 阻害治療による PsA 患者の血中サイトカインの変化

リンパ球サブセットの解析では、TNF 阻害療法前後では、CD3+T 細胞の割合は減少せず、CD19+B 細胞の割合は、治療前 (約 14%) に比べ、24 週 (約 17%、 $p=0.013$)、48 週 (約 19%、 $p=0.002$) と、有意に上昇した。治療前後で、CD4+細胞の割合に変化はなく、一方で、CD8+細胞の割合が治療 48 週で有意に増加した (治療前 約 20%、24 週 約 21%、 $p=0.46$ 、48 週 約 22%、 $p=0.023$)。

CD25+活性化 T 細胞の割合は、前述したように CD4+、CD8+細胞ともに、健常人群と比較して有

有意差はなかったが、治療前後の比較では、CD4+、CD8+細胞ともに、CD25+活性化T細胞の割合は増加傾向にあった（有意差なし）。CD62L^{low}の発現の割合は、CD4+、CD8+細胞ともに健常人群より高い傾向にあり（有意差なし）。CD4+細胞では治療による変化はなかったが、CD8+細胞では、治療48週で有意に低下した。

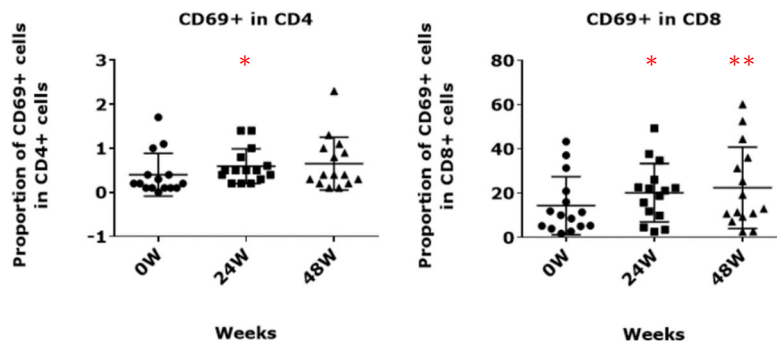


図3: TNF 阻害治療による CD69+細胞の割合の変化

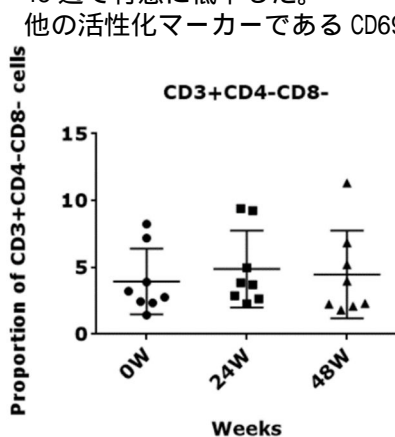


図4: TNF 阻害治療による CD3+CD4-CD8-細胞の割合の変化

他の活性化マーカーである CD69+細胞の割合は、CD4+細胞では、健常人群に比べ、PsA 群が低く、

TNF 阻害治療により CD4+、CD8+ 両方の細胞で増加傾向にあった（図3）。これらの活性化マーカーに関しては、PsA と健常人群では差がなく RA で高い割合の CD25 が、TNF 阻害治療により増加傾向にあれば、一方で、3 群間で有意差はないが PsA 群で最も高かった CD62L^{low}CD8+細胞の割合は有意に低下した。また、健常人と比較して有意に低かった CD69+CD4+細胞の割合や、もともと有意差がなかった CD69+CD8+細胞の割合も上昇した。このように活性化マーカーにより結果に違いがあるので、更に解析を進める必要がある。

また、PsA の病態に関わっていると報告されている CD3+CD4-CD8-細胞の割合 (n=8) は、治療前後で有意差は認められなかった（図4）。

またヘルパーT細胞である Th1 (CD4+IFN-⁺)、Th2 (CD4+IL-4⁺)、Th17 (CD4+IL-17⁺)細胞の割合は、治療前

に比べて、治療開始後には増加傾向にあり、治療48週のTh2の割合は治療前と比べ、有意に上昇していた。CD8+細胞に関しては、CD8+IFN-⁺、CD8+IL-4⁺、CD8+IL-17⁺細胞の割合も、治療前に比べて、上昇傾向にあり、治療48週のCD8+IFN-⁺とCD8+IL-17⁺の割合は、有意に増加していた。TNF 阻害治療により、血中 IL-6 が有意に低下しているにもかかわらず、Th17細胞の割合が有意差はないが増加しており、TNF 阻害治療により、血中 IL-12/23 は減少していないことから、PsA においては、IL-6 より IL-12/23 が Th17 細胞の誘導に関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村上美帆、西本憲弘
2. 発表標題 脊椎関節炎患者の血中IL-17値に対するTNF阻害治療による影響
3. 学会等名 日本脊椎関節炎学会 第29回学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西本 憲弘 (Nishimoto Norihiro) (80273663)	東京医科大学・医学部・兼任教授 (32645)	
研究分担者	辻 成佳 (Tsuji Shigeyoshi) (30795761)	独立行政法人国立病院機構（大阪南医療センター臨床研究部）・その他部局等・室長 (84416)	
研究分担者	橋本 淳 (Hashimoto Jun) (40237938)	独立行政法人国立病院機構（大阪南医療センター臨床研究部）・その他部局等・部長 (84416)	
研究分担者	乾 重樹 (Inui Shigeki) (30324750)	大阪大学・医学系研究科・特任教授 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------