

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16218

研究課題名(和文) 強皮症に対する革新的な形態的・機能的評価法の確立と個別化医療への応用

研究課題名(英文) Establishment of an innovative morphological and functional evaluation method in patients with systemic sclerosis

研究代表者

久保 智史 (Kubo, Satoshi)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：70461548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：強皮症の免疫フェノタイプに基づき階層型クラスター解析を行ったところ、免疫フェノタイプ異常に乏しい群、制御性T細胞が増加している群、濾胞性T細胞と形質芽細胞の増加を伴う群(Tfh dominant群)に分けられた。中でもTfh dominant群で皮膚硬化の進行、下部消化管障害、そして指尖潰瘍が有意に他の群に比して多かった。さらにTfh dominant群では血管障害の進行例が多く、他の群よりも血管障害の進展が早いことが示された。そしてこの血管障害の進行は強皮症で起こりうるほぼすべての臓器障害に関連していた。以上、免疫フェノタイプによる細分化が強皮症の多様性の評価に有用である可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により強皮症の免疫フェノタイプ異常と強皮症患者の細分化が示された。免疫学的異常は強皮症患者で均一ではなく、免疫フェノタイプの相違により細分化することにより、爪郭部毛細血管顕微鏡で検出した血管障害の進行や臓器障害の併発に関連するサブグループが存在することが明らかになり、そのサブグループが濾胞性T細胞が優位な免疫フェノタイプを有することが示された。このような試みによるエビデンスの蓄積は、強皮症の病態解明のみならず治療への応用、precision medicineの実現が期待される。

研究成果の概要(英文)：Peripheral blood mononuclear cells obtained from 150 SSc patients were used for comprehensive flow cytometric analysis. Hierarchical cluster analysis stratified SSc patients into three groups: patients with few immune abnormalities, high proportions of activated T and Treg cells, and patients with high proportions of Tfh and plasmablasts (Tfh-dominant group). Microvascular abnormalities, especially the “late” nailfold videocapillaroscopy (NVC) pattern, correlated with internal organ involvement. Among the groups stratified according to immune cell phenotype, the progression to the “late” NVC pattern was more frequent in the Tfh-dominant group. In conclusion, our study confirmed the presence of immunophenotypic abnormalities in SSc. Immunological abnormalities were not uniform but rather limited to subpopulations, particularly the Tfh-dominant group, where they were highly associated with microvascular abnormalities and organ involvement.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：強皮症 爪郭部毛細血管顕微鏡 免疫フェノタイプ 肺動脈性肺高血圧症 間質性肺疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

強皮症は全身の臓器に線維化をきたす自己免疫疾患である。その病態は血管障害、免疫異常、そして線維化から成り立つと考えられているが、その原因は解明されておらず、未だに疾患特異的な治療は存在しない。強皮症の臓器障害の中心をなす線維化については、細胞外マトリクスであるコラーゲンの過剰産生が報告されている。しかしながら、このような組織再編成を伴う線維化に対しての治療は極めて限定的であり、線維化に至る前の治療が望まれる。

強皮症では疾患特異的な自己抗体が産生され、自己免疫の関与が示唆されている。実際、リンパ球の強皮症への関与がいくつか報告されてきた。T 細胞については、Th17 細胞や Treg 細胞の関与が報告されている。B 細胞についても、その機能異常と活性化が強皮症では指摘されている。しかしながら他の自己免疫疾患に比して、実際の強皮症患者における免疫異常の報告は多くなく、それらの報告も上述のように特定のヘルパーT 細胞や B 細胞に着目しており、網羅的な免疫調節不全については知られていない。また、強皮症治療におけるこれら免疫細胞に対する分子標的薬の効果は限定的である。B 細胞除去療法や抗 IL-6 受容体抗体などが期待されているが、強皮症の主病態である皮膚硬化に対して、二重盲検比較試験で明らかな改善効果を証明した治療は存在しない。

その最も大きな原因として、強皮症の多様性が挙げられる。すなわち、強皮症全体を単一の分子標的薬で治療しても、その多様性によって有効性の幅が大きくなるためデータの解釈が難しくなる。さらには、臓器障害に直結する血管障害が、免疫異常とどのように関係しているかについても明らかにはなっていない。この状況は、強皮症に対する EULAR treatment recommendation においても明確で、同 recommendation では臓器障害別の治療法が明記され、特に治療薬として免疫抑制剤と血管作動薬が混在している。つまり、強皮症の多様性と血管障害との関連を解明することは臨床的にも病態説明の上でも重要であり、これらが明らかとなれば、個々の病態に則した特異的な治療法へ適応、開発が見込まれる。

2. 研究の目的

本研究では、NiH/FOCIS が提唱した Human Immunology Project Consortium (HIPC) に基づいた抗体セットを基本にマルチカラーフローサイトメトリーを用いて末梢血の免疫担当細胞の免疫フェノタイプを網羅的に解析し、強皮症患者がどのような免疫フェノタイプを有するかを検討した。さらに階層型クラスター解析法を用いて強皮症患者を免疫学的に亜群へ分類するとともに、血管障害との関連について検討を行った。

3. 研究の方法

強皮症と診断した 150 名の患者を対象とし、マルチカラーフローサイトメトリーを用いて末梢血免疫担当細胞の免疫フェノタイプングを行い、その結果を階層型クラスター解析により細分化した。爪郭部毛細血管ビデオ顕微鏡 Nailfold videocapillaroscopy (NVC) による爪郭部毛細血管異常との関連を検討した。

4. 研究成果

(1) 強皮症全体における末梢血免疫フェノタイプ

T ヘルパー細胞分化においては、強皮症では健常人に比して、活性化ヘルパーT 細胞 (8.1% vs 6.4%) の割合が高かった。また、細胞障害性 T 細胞分化に関しては、セントラルメモリー細胞障害性 T 細胞 (21.3% vs 14.7%) が健常人に比して増加していた。ヘルパーT 細胞のサブセットである Th1、Th17、Treg および Tfh を検討したところ、Th1、Th17、Treg および Tfh cells の割合はすべて健常人と同等であった、しかし、活性化した Th1 (2.0% vs 1.4%) および活性化した Th 17 cell (1.3% vs 0.9%) が健常人に比して上昇していた。B 細胞の分化に関しては、IgM memory B 細胞 (13.0% vs 21.2%) や Central memory B 細胞 (8.6% vs 12.2%) が低下する一方で、Effector (double negative) B 細胞 (6.9% vs 5.4%) の割合が上昇していた。形質芽細胞については健常人と差が見られなかった。その他、単球、樹状細胞では健常人と統計学的に有意な差は認めなかった。また、免疫抑制剤を使用せずに 1 年経過した 18 例においてその免疫フェノタイプの変化を検出したところ、すべての項目において 1 年で免疫フェノタイプに変化が見られなかった。

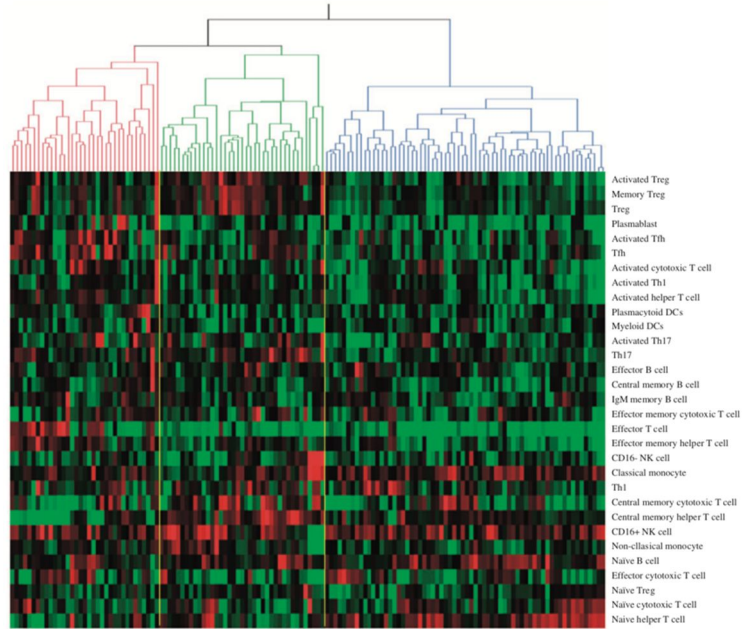
(2) 階層型クラスター解析

末梢血免疫フェノタイプに基づき階層型クラスター解析を行ったところ、強皮症患者は 3 つのグループに分けられることが明らかとなった。各群を赤色、緑色および青色に色付けして示す (下図)。強皮症患者の約半数を占める青色の群では、他の 2 群に比して Naive T ヘルパー細胞の上昇や Naive B 細胞の上昇を認める一方で、全体で見られた活性化ヘルパーT 細胞などの増加は見られなかった。すなわち強皮症患者の約半数では末梢血における免疫学的異常に乏しいことが示された。次に、緑色群および赤色群においては、いずれの群においても Naive T ヘルパー細胞が減少し活性化 T ヘルパー細胞が増加しており、免疫異常が見られた。しかしながら緑色群においては活性化 T ヘルパー細胞の増加に加えて、他の 2 群に比して制御性 T 細胞が著明に増加していた。最後に赤色群では、TEMRA や活性化ヘルパーT 細胞の著明な増加を伴い、最も免疫異常が強く見られた。さらにこの群の特徴として、他の群では見られない濾胞性 T 細胞 (Tfh) と形質芽細胞の増加が見られた (Tfh

dominant group)。この免疫フェノタイプによって分けられた3群における年齢や罹病期間に違いは見られなかった。臓器障害に関しては Tfh dominant 群において、皮膚硬化の進行、下部消化管障害、そして指尖潰瘍が有意に他の群に比して多かった。

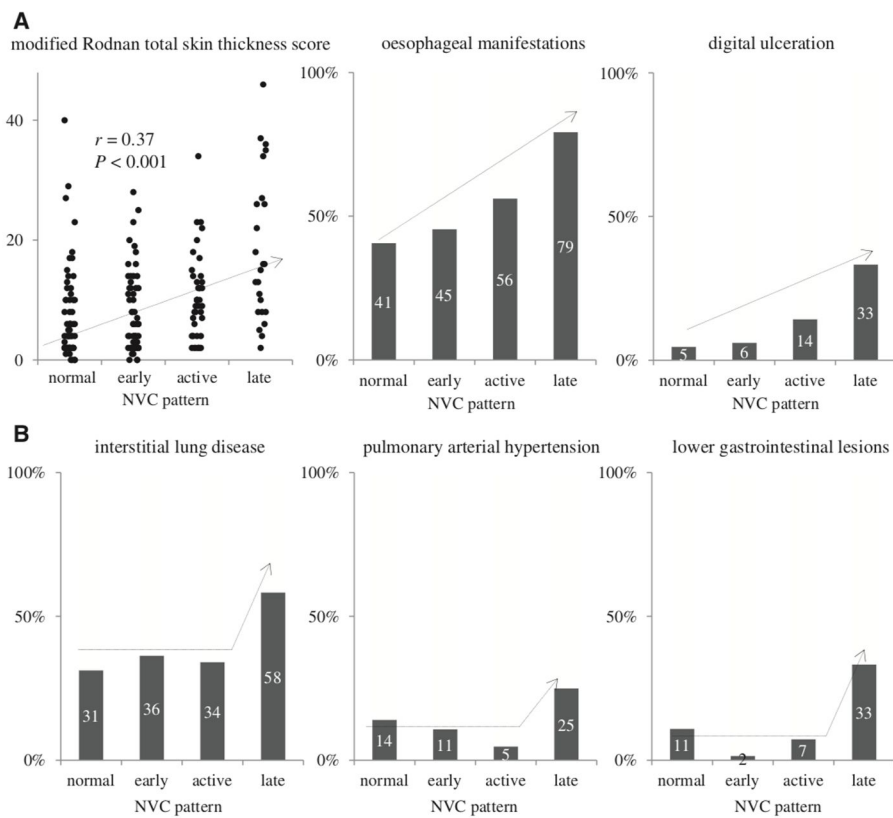
(3) 微小血管障害

免疫フェノタイプと血管障害の関連について検討を行った。NVC によって爪郭部毛細血管異常を検出したところ、7割に異常が認められ、その所見は early、active、late pattern に分けることが可能であった。免疫フェノタイプによって分けられた3群における血管異常の程度を比較したところ、Tfh dominant 群において Late pattern への進行例が多く (p=0.055)、Active pattern への進行例も多い傾向を認めた。さらに、Tfh dominant 群では Late pattern へ進行した症例の平均罹病期間が他群に比して短く、またその進行も直線的であることが示唆される一方で、他の群では Active pattern への進行から Late pattern への進展が遅いことが示された。以上、Tfh dominant group では爪郭部毛細血管異常の Late pattern への進行が早いことが示唆された。



(4) 微小血管障害と臓器障害

NVC による爪郭部毛細血管異常のパターンが臓器障害に関連するかを検討するため、免疫フェノタイプを評価した強皮症患者を含めた強皮症 200 例において臓器障害と爪郭部毛細血管異常の程度を評価した。結果として、爪郭部毛細血管異常の有無 (normal vs early, active, late) では、スキンスコア、食道障害の有無 (p=0.07) そして皮膚潰瘍 (p=0.06) の有無が関連していた。一方で、爪郭部毛細血管異常が進行した例とそれ以外では (normal,



early, active vs late) すべての臓器障害が関連していた。皮膚硬化、食道障害、皮膚潰瘍は毛細血管異常の出現とともにその発生頻度が増加してくるのに比して、間質性肺炎や肺動脈性肺高血圧症などの重要臓器障害は、爪郭部毛細血管異常がある程度進行すると急激に臓器障害が出現することが示され (左図)、毛細血管異常の Late pattern への進展が臓器障害に関連し、重要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kubo Satoshi, Smith Vanessa, Cutolo Maurizio, Tanaka Yoshiya	4. 巻 41
2. 論文標題 The role of nailfold videocapillaroscopy in patients with systemic sclerosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Immunological Medicine	6. 最初と最後の頁 113 ~ 119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/25785826.2018.1531189	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kubo Satoshi, Tanaka Yoshiya	4. 巻 58
2. 論文標題 Scleroderma in an ice-cream shop worker	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1120 ~ 1121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rheumatology/key400	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kubo Satoshi, Todoroki Yasuyuki, Nakayamada Shingo, Nakano Kazuhisa, Satoh Minoru, Nawata Aya, Satoh Yurie, Miyagawa Ippei, Saito Kazuyoshi, Smith Vanessa, Cutolo Maurizio, Tanaka Yoshiya	4. 巻 58
2. 論文標題 Significance of nailfold videocapillaroscopy in patients with idiopathic inflammatory myopathies	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 120 ~ 130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rheumatology/key257	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kubo Satoshi, Siebuhr Anne Sofie, Bay Jensen Anne C., Juhl Pernille, Karsdal Morten A., Satoh Yurie, Todoroki Yasuyuki, Nakano Kazuhisa, Nakayamada Shingo, Tanaka Yoshiya	4. 巻 [Epub]
2. 論文標題 Correlation between serological biomarkers of extracellular matrix turnover and lung fibrosis and pulmonary artery hypertension in patients with systemic sclerosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 [Epub]
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1756-185X.13804	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kubo Satoshi, Nakayamada Shingo, Miyazaki Yusuke, Yoshikawa Maiko, Yoshinari Hiroko, Satoh Yurie, Todoroki Yasuyuki, Nakano Kazuhisa, Satoh Minoru, Smith Vanessa, Cutolo Maurizio, Tanaka Yoshiya	4. 巻 58
2. 論文標題 Distinctive association of peripheral immune cell phenotypes with capillaroscopic microvascular patterns in systemic sclerosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 2273 ~ 2283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/kez244	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Smith Vanessa, Vanhaecke Amber, Herrick Ariane L., Distler Oliver, Guerra Miguel G., Denton Christopher P., Deschepper Ellen, Foeldvari Ivan, Gutierrez Marwin, Hachulla Eric, Ingegnoli Francesca, Kubo Satoshi, Muller-Ladner Ulf, Riccieri Valeria, Sulli Alberto, van Laar Jaap M., Vonk Madelon C., Walker Ulrich A., et al	4. 巻 18
2. 論文標題 Fast track algorithm: How to differentiate a "scleroderma pattern" from a "non-scleroderma pattern"	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Autoimmunity Reviews	6. 最初と最後の頁 102394 ~ 102394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.autrev.2019.102394	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 久保智史、中山田真吾、中野和久、岩田慈、花見健太郎、福與俊介、宮川一平、宮崎祐介、河邊明男、吉成紘子、佐藤友梨恵、轟泰幸、佐藤実、田中良哉
2. 発表標題 強皮症患者は末梢血免疫フェノタイプにより3つの亜群に分かれ、微小血管障害の進行と関連する
3. 学会等名 第46回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Kubo, Shingo Nakayamada, Kazuhisa Nakano, Maiko Yoshikawa, Yusuke Miyazaki, Hiroko Yoshinari, Yasutaro Tamaki, Shigeru Iwata, Kentaro Hanami, Shunsuke Fukuyo, Ippei Miyagawa, Yoshiya Tanaka.
2. 発表標題 The association between immunophenotype of peripheral blood and nailfold microvascular changes in patients with systemic sclerosis (SSc).
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Kubo, Shingo Nakayamada, Maiko Yoshikawa, Yusuke Miyazaki, Hiroko Yoshinari, Yurie Satoh, Yasuyuki Todoroki, Kazuhisa Nakano, Shigeru Iwata, Kentaro Hanami, Shunsuke Fukuyo, Ippei Miyagawa, Minoru Satoh and Yoshiya Tanaka
2. 発表標題 The immunophenotyping of peripheral blood associates with nailfold microvascular changes in patients with systemic sclerosis
3. 学会等名 2017アメリカリウマチ学会 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Satoshi Kubo, Shingo Nakayamada, Kazuhisa Nakano, Maiko Yoshikawa, Yusuke Miyazaki, Hiroko Yoshinari, Yasutaro Tamaki, Shigeru Iwata, Kentaro Hanami, Shunsuke Fukuyo, Ippei Miyagawa, Yoshiya Tanaka
2. 発表標題 The association between immunophenotype of peripheral blood and nailfold microvascular changes in patients with systemic sclerosis (SSc)
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会
4. 発表年 2018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