

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07786

研究課題名(和文) マクロファージ活性化症候群の病態解明とIL-18を標的とした新規治療法の確立

研究課題名(英文) Molecular and immunological analysis to clarify the pathogenesis of macrophage activation syndrome toward a developing interleukin18-targeted treatment strategy

研究代表者

清水 正樹 (Shimizu, Masaki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座講師

研究者番号：10401902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：IL-18/IL-1 持続皮下投与によるMASモデルマウスを確立し、MAS病態においてIL-1とIL-18は異なる役割を果たしていること、さらにMAS病態の発現には高濃度のIL-18刺激が必要であることが判明した。全身型JIA以外のリウマチ性疾患によるMAS症例との血清サイトカインプロファイルの比較検討から、全身型JIAではその他のリウマチ性疾患とは異なる機序でMASの発症を認めることが示唆された。さらにs-JIAにおいて血清IL-18値は他疾患との鑑別、病勢評価、寛解判定指標として有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、まだ未解明であったMAS病態におけるIL-1 とIL-18の役割に関する理解が進み、現在までの有効な治療が確立していないMASに対して、IL-1 およびIL-18両方の制御が必要であることが判明し、今後の治療開発に向け意義のある成果となった。また、臨床症状の組み合わせによって診断されるため他の炎症性疾患との鑑別が困難な全身型JIAおよびMASの診断、病勢評価、寛解判定に対する客観的指標として血清IL-18値が非常に有用であることが判明し、今後の保険収載に向けた基礎資料として意義のある成果となった。

研究成果の概要(英文)：We developed a new mouse model of MAS using continuous infusion with IL-1 and/or IL-18. IL-1 and IL-18 play distinct roles in MAS. Furthermore, sustained elevation of IL-18 was necessary to develop MAS. From the comparison of serum cytokine profiles in patients with MAS in different background rheumatic diseases, the pathogenesis of MAS associated with s-JIA might be different from other diseases. Serum IL-18 levels might be useful for the differentiation s-JIA from other diseases, the assessment of disease activity and also for diagnosis of remission in s-JIA.

研究分野：小児リウマチ、小児膠原病

キーワード：マクロファージ活性化症候群 全身型若年性特発性関節炎 インターロイキン18 インターロイキン1
モデルマウス バイオマーカー

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

全身型若年性特発性関節炎 (s-JIA) は、弛張熱、皮疹、全身のリンパ節腫脹、脾腫大、漿膜炎を伴う関節炎である。s-JIA の病態には T 細胞やマクロファージの異常活性化とこれらの細胞から産生される炎症性サイトカインが深く関与している。中でも IL-1、IL-6 はその中心となり、これらの作用を遮断する生物学的製剤は劇的な効果を認めている。しかしながらこれらの薬剤でも本症の致死的な合併症であるマクロファージ活性化症候群 (MAS) を抑制できないことが明らかになり、臨床的に大きな問題となっている。我々は本症におけるサイトカインプロファイル解析を行い、s-JIA と同様の臨床像を呈する疾患 (川崎病 (KD) など) において、サイトカイン動態は基礎疾患により異なり、s-JIA の基礎病態には IL-18 の過剰産生が関与していることを明らかにした (Rheumatology. 2010;49:1645-53)。さらに我々は s-JIA にはサイトカインプロファイルのパターンの異なる 2 つの亜群が存在し、IL-6 優位群では関節炎症状が強い一方、IL-18 優位群では MAS の合併が多く全身症状が優位であること、さらに血清 IL-18 濃度が MAS の発症予測に有用である (IL-18>47750pg/ml で有意に MAS 発症が多い) ことがわかり、臨床像の異なる亜群では、サイトカインプロファイルのパターンが異なり、臨床経過を予測する上で有用であることを明らかにした (Clin Immunol. 2015;160:277-81)。IL-18 は NK 細胞を活性化し IFN γ の産生を誘導するが、s-JIA 症例では活動期に NK 細胞活性の低下を認めている。これは s-JIA 症例において IL-18 受容体のリン酸化が持続し、IL-18 に対する反応性が低下していることに由来している。我々は MAS を合併した s-JIA 症例において、血清 IL-18 濃度と NK 細胞の IL-18 に対する反応性を経時的に評価し、急性期には高 IL-18 血症の持続が NK 活性の低下を引き起こすとともに、治療により高 IL-18 血症が改善すると、IL-18 に対する反応性が回復することを明らかにし、IL-18 の過剰産生による二次的な NK 活性の低下が MAS 病態への進展に深く関与することが判明した (Pediatr Int. 2018 ;60:984-985)。さらに MAS の発症には IFN γ の過剰産生が深く関与しているが、我々は MAS を合併した s-JIA 症例の急性期および MAS 合併時の血清中の 174 種のサイトカインについて抗体アレイを用いた発現プロファイル解析を行い、MAS 合併時には IL-18/IFN γ /IFN γ 誘導ケモカイン (CXCL9/MIG) 系が MAS 発症に重要な役割を果たしていることを明らかにした (Cytokine. 2019;119:182-187)。さらに 2017 年に IL-18 の過剰産生を背景とし、s-JIA と炎症性腸疾患の臨床症状を呈し、MAS を繰り返すことを特徴とする NLRC4 gain of function の症例が報告され、IL-18 が MAS の発症に深く関与していることが明らかになった。一方で MAS 病態には IL-18 のみならず、IL-1 β も深く関与していることが知られており、実際に欧米では IL-1 阻害薬である anakinra の高用量投与が MAS の抑制に用いられている。

2. 研究の目的

このように MAS の発症病態に IL-18 および IL-1 β が深く関与していることは間違いないが、MAS 病態における正確な役割は不明なままである。今までにいくつかの MAS の動物モデルは報告されているが、本症の特徴である IL-18 と IL-1 β の両方の過剰産生を呈するモデルマウスによる検討はなかった。そこで本研究では新たなモデルマウスを樹立し、MAS 病態における IL-1 β 、IL-18、個々の役割を明らかにし MAS の病態解明を目指すとともに MAS を抑制する治療法を確立することを目的とする。さらにヒトにおいては、MAS を呈する様々なリウマチ性疾患の血清サイトカインプロファイルを比較検討し、s-JIA に合併する MAS の病態を明らかにするとともに、s-JIA および MAS 病態における血清 IL-18 値のバイオマーカーとしての有用性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 新規の MAS モデルマウスの樹立および病態解析

IL-18、IL-1 β 、IL-18+IL-1 β 、生理食塩水を充填した浸透圧ポンプをマウスの皮下に埋め込み、7 日間持続的に皮下投与を行った後、Toll-like receptor 9 (TLR-9) agonist である CpG で刺激を行い MAS を誘発するモデルマウスを樹立した。このマウスを用いて、体重変化、肝腫大や脾腫大の程度、MAS のパラメーターである末梢白血球数、末梢血細胞亜群解析、血清フェリチン値、さらには脾臓におけるサイトカイン mRNA 発現を検討した。

(2) MAS の基礎疾患別の血清サイトカインプロファイルの比較解析

全身性エリテマトーデス (SLE) 12 例 (うち MAS5 例)、若年性皮膚筋炎 (JDM) 12 例 (うち MAS5 例)、KD75 例 (うち MAS4 例)、s-JIA179 例 (うち MAS43 例) について急性期および MAS 診断時の血清中の neopterin、IL-6、IL-18、sTNFR-I、sTNFR-II 値を測定し、それぞれ比較検討した。

(3) s-JIA および MAS 病態における血清 IL-18 値のバイオマーカーとしての臨床的有用性に関する検討

s-JIA116 例について、その他の臨床像の類似した鑑別疾患 151 例 (KD78 例、家族性地中海熱

7 例、TNF 受容体緩れ周期熱症候群 (TRAPS) 3 例、全身型以外の若年性特発性関節炎 23 例、SLE10 例、JDM12 例、白血病 6 例) および正常小児 20 例について血清 IL-18 値を測定し、鑑別診断に対する有用性を検討した。また 41 例について経時的に IL-18 値を測定し、病型との関連、再発予測の有用性について検討した。

4. 研究成果

(1) MAS モデルマウスを用いた MAS 病態における IL-18 および IL-1 β の役割に関する検討
IL-18 および IL-1 β の投与量はヒトにおける MAS 合併時の血中濃度を参考に設定した。CpG 投与後以下のような結果が得られた。IL-1 β 群、IL-18+IL-1 β 群で有意な体重減少を認めた。

すべての群で有意な脾腫大が認められた。IL-18 群でのみ有意な肝腫大が認められた。IL-18 群で白血球数の低下を認めた。IL-1 β 群では CpG 刺激後の好中球および単球数の低下が軽度にとどまった。IL-18+IL-1 β 群では有意に CD4⁺T 細胞および CD8⁺T 細胞数の低下を認めた。

IL-18+IL-1 β 群で赤血球数、血小板数の有意な低下を認めた。脾臓では IL-18 群で、IFN γ 、CLCL9、IL-12AmRNA 発現の上昇を IL-10mRNA 発現の低下を認めた。肝腫大、脾腫大は IL-18 の濃度依存的に増悪し、脾臓での CLCL9、IL-12A および TNF α mRNA 発現は、高濃度刺激群においてのみ認められた。

これらの結果から MAS 病態において IL-1 β と IL-18 異なる役割を司り、IL-1 β は体重減少 (全身炎症) に、IL-18 は肝腫大、IFN γ および IL-12 発現の増強、IL-10 発現の抑制に働き、さらに IL-1 β と IL-18 の共刺激により、T 細胞数減少、貧血、血小板減少が引き起こされることが判明した。さらに、MAS 病態の発現 (肝腫大、非腫大、CXCL9、IL-12、TNF α の発現増強) には高濃度の IL-18 刺激が必要であることが判明した。IL-1 β あるいは IL-18 どちらかの抑制のみでは MAS の制御は困難であり、今後 IL-1/IL-18 dual blocker の応用が望まれた。

(2) MAS の基礎疾患別の血清サイトカインプロファイルの比較検討

血清 IL-18 値は SLE, JDM, KD, s-JIA いずれにおいても MAS 合併時に有意に上昇しており、IL-18 はすべての疾患に合併した MAS の病態に関与しているが、一方で s-JIA ではその他の疾患と比べ MAS 発症前の急性期より著増しており、s-JIA とそれ以外の疾患では MAS の発症病態が異なることが示唆された。一方で、neopterin, sTNFR-II はすべての疾患で有意に増加しており、IFN γ と TNF α の過剰産生が MAS 病態に共通して関連していることが明らかになった。

(3) s-JIA および MAS 病態における血清 IL-18 値のバイオマーカーとしての臨床的有用性に関する検討

全身型 JIA ではその他の鑑別疾患すべてと比較し有意に血清 IL-18 値の上昇が認められ、鑑別に有用なカットオフ値はそれぞれ、KD 4560, FMF 4800, TRAPS 1685, JIA 1728, SLE 2400 JDM 2125, 白血病 2240pg/mL だった。血清 IL-18 濃度は病型に一致して推移し、病勢を正確に反映していた。経過良好群では寛解後 IL-18 値は 1000pg/mL となりそのまま低値で推移する一方、慢性関節炎型では 1000pg/mL 以上で下げ止まり、寛解後も高値が持続し、再燃時には更なる上昇を認めた。寛解の判定基準として IL-18<595pg/mL が有用と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shimizu M, Kizawa T, Kato R, Suzuki T, Yachie A.	4. 巻 207
2. 論文標題 Macrophage activation syndrome in neonates born to mothers with adult-onset Still's disease: Perinatal effect of maternal IL-18.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Immunol	6. 最初と最後の頁 36-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clim.2019.07.005.	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 Mizuta M, Shimizu M, Inoue N, Nakagishi Y, Yachie A.	4. 巻 119
2. 論文標題 Clinical significance of serum CXCL9 levels as a biomarker for systemic juvenile idiopathic arthritis associated macrophage activation syndrome.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cytokine	6. 最初と最後の頁 182-187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cyto.2019.03.018.	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 Jinkawa A, Shimizu M, Nishida K, Kaneko S, Usami M, Sakumura N, Irabu H, Takakuwa M, Inoue N, Mizuta M, Ikawa Y, Fujita S, Yachie A.	4. 巻 119
2. 論文標題 Cytokine profile of macrophage activation syndrome associated with Kawasaki disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cytokine	6. 最初と最後の頁 52-56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cyto.2019.03.001.	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 Ono R, Shimizu M, Yamamoto K, Umehara N, Manabe A.	4. 巻 61
2. 論文標題 Kawasaki disease shock syndrome: Case report and cytokine profiling.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatr Int	6. 最初と最後の頁 620-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.13864	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 Takakura M, Shimizu M, Irabu H, Sakumura N, Inoue N, Mizuta M, Nakagishi Y, Yachie A.	4. 巻 208
2. 論文標題 Comparison of serum biomarkers for the diagnosis of macrophage activation syndrome complicating systemic juvenile idiopathic arthritis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Immunol	6. 最初と最後の頁 108252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clim.2019.108252.	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 Usami M, Shimizu M, Mizuta M, Inoue N, Irabu H, Sakumura N, Nakagishi Y, Yachie A.	4. 巻 208
2. 論文標題 Extensive serum biomarker analysis in patients with macrophage activation syndrome associated with systemic lupus erythematosus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Immunol	6. 最初と最後の頁 108255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clim.2019.108255.	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 Irabu H, Shimizu M, Kaneko S, Inoue N, Mizuta M, Nakagishi Y, Yachie A.	4. 巻 88
2. 論文標題 Comparison of serum biomarkers for the diagnosis of macrophage activation syndrome complicating systemic juvenile idiopathic arthritis during tocilizumab therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatr Res	6. 最初と最後の頁 934-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41390-020-0843-4.	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 Mizuta M, Shimizu M, Irabu H, Usami M, Inoue N, Nakagishi Y, Wada T, Yachie A.	4. 巻 60
2. 論文標題 Comparison of serum cytokine profiles in macrophage activation syndrome complicating different background rheumatic diseases in children	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 231-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/keaa299.	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 Yasumura J, Shimizu M, Toma T, Yashiro M, Yachie A, Okada S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Clinical Significance of Serum Soluble TNF Receptor I/II Ratio for the Differential Diagnosis of Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Periodic Syndrome From Other Autoinflammatory Diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 576152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.576152.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mizuta M, Shimizu M, Inoue N, Ikawa Y, Nakagishi Y, Yasuoka R, Iwata N, Yachie A.	4. 巻 60
2. 論文標題 Clinical significance of interleukin-18 for the diagnosis and prediction of disease course in systemic juvenile idiopathic arthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 2421-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/keaa634.	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 Masaki Shimizu	4. 巻 13
2. 論文標題 Macrophage activation syndrome in systemic juvenile idiopathic arthritis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunol Med	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/25785826.2021.1912893.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Mao Mizuta, Masaki Shimizu, Masaaki Usami, Naoto Sakumura, Hitoshi Iwabuchi, Maiko Takakuwa, Natsumi Inoue, Yasuo Nakagishi, Akihiro Yachie
2. 発表標題 Comparison of serum cytokine profile in macrophage activation syndrome among different background rheumatic diseases in children
3. 学会等名 European congress of Rheumatology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Irabu H, Shimizu M, Takakura M, Sakumura N, Inoue N, Mizuta M, Nakagishi Y, Yachie A.
2. 発表標題 Comparison of serum biomarkers for the diagnosis of macrophage activation syndrome complicating systemic juvenile idiopathic arthritis.
3. 学会等名 European congress of Rheumatology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊良部仁、清水正樹、水田麻雄、井上なつみ、宇佐美雅章、高桑麻衣子、作村直人、中岸保夫、谷内江昭宏
2. 発表標題 マクロファージ活性化症候群における基礎疾患による血清サイトカインプロファイルの比較検討
3. 学会等名 第28回日本小児リウマチ学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高桑麻衣子、清水正樹、水田麻雄、井上なつみ、中岸保夫、谷内江昭宏
2. 発表標題 全身型若年性特発性関節炎に合併したマクロファージ活性化症候群における診断バイオマーカーの比較検討 血清neopterin値の有用性
3. 学会等名 第28回日本小児リウマチ学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水正樹
2. 発表標題 多面的サイトカイン解析からみたマクロファージ活性化症候群 (MAS) の臨床的特徴
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水正樹
2. 発表標題 サイトカインプロファイリング - どんな時にオーダーするのか？何が分かるのか？ -
3. 学会等名 第123回 日本小児科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水正樹
2. 発表標題 多面的サイトカイン解析からみた マクロファージ活性化症候群(MAS)の臨床的特徴
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masaki Shimizu
2. 発表標題 Macrophage Activation Syndrome: Analysis of various Cytokines.
3. 学会等名 22nd Asia-Pacific League of Associations for Rheumatology Congress（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水正樹
2. 発表標題 全身型若年性特発性関節炎
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 清水正樹	4. 発行年 2021年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 108
3. 書名 若年性特発性関節炎 カナキヌマブ治療の理論と実際	

〔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
研究協力者	井上 なつみ (Natsumi Inoue) (90808924)	金沢大学・小児科・助教 (13301)	

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
---------	---------