

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15695

研究課題名(和文) PFAPA症候群患児の扁桃組織における自然免疫関連遺伝子の発現解析

研究課題名(英文) Transcriptome analysis of innate immunity-related genes in tonsils of children with PFAPA syndrome

研究代表者

原 真理子 (HARA, MARIKO)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・免疫アレルギー・感染研究部・リサーチアソシエイト

研究者番号：30744552

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)：PFAPA患児の扁桃における自然免疫関連遺伝子の発現に関してトランスクリプトーム解析を行った。クラスター解析から、本疾患は2つのサブタイプに分かれ、endotypeを持つことが示された。また、上流因子解析から、IFN- $\gamma$  刺激、1,25-(OH) $_2$ ビタミンD減少が、自然免疫関連遺伝子を誘導する免疫経路であることが推測された。endotype間では、臨床症状も有意に異なっており、本疾患はphenotypeを持つことも示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PFAPAは、多くの症例が扁桃炎を随伴し、扁桃摘出術によって症状が改善することから、扁桃組織が病態形成に深く関連していると考えられる。しかし、本疾患に関する既報は、血液を解析したものが多く、扁桃組織を解析した報告は少ない。また、自然免疫が発熱に関与していることが推測されているが、その詳細は分かっていない。本研究は、PFAPAの扁桃組織における自然免疫関連遺伝子の発現変化と、発熱を惹起する分子経路を解析した研究であり、これまでに報告されていない内容である。

研究成果の概要(英文)：We tried to identify the involved innate immune pathways using the mRNA expression profiles of innate immunity-related genes in the tonsils of children with PFAPA. Unbiased hierarchical clustering analysis revealed that the patients could be classified into 2 distinct subtypes. One distinct gene cluster was identified as being characteristic of each endotype. Upstream regulator analysis indicated that activation of TLRs, IFN- $\gamma$  production and decrease in 1, 25-dihydroxyvitamin D are the putative immune pathways for the induction of endotype-specific genes. Moreover, several clinical manifestations were significantly different between the endotypes, suggesting the presence of endotype-related phenotypes in PFAPA.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：PFAPA症候群 自然免疫

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and cervical adenitis syndrome (PFAPA 症候群)は周期性発熱疾患のひとつであり、小児の周期性熱の中では最も罹患率が高い疾患である。発熱周期や発熱期間、発症年齢、随伴症状、治療への反応性などは患者によって異なり、臨床的多様性をもつ症候群である。

本疾患は、発熱時に proinflammatory cytokine が増加することから、抗原非特異的な自然免疫による炎症反応が重要な役割を演じていると推測されている。本疾患を診断する際には、上気道感染症状を伴わないこと、扁桃の細菌培養検査が陰性であること、抗菌薬治療が無効であることが挙げられ、つまり、本疾患は感染症ではないと言える。しかし、自然免疫が誘導されていることや、咽頭の炎症症状があることから、なんらかの microbial trigger が原因となっている可能性が考えられる。

また、治療法の中で最も有効であるのは扁桃摘出術であり、発熱と同時に多くの症例が扁桃炎を随伴する。このような病態から、扁桃組織における炎症が本疾患の病態形成に深く関連している可能性が考えられる。

これまで、本疾患の扁桃組織の解析は適応免疫に関する検討が多く、自然免疫に関する検討はあまり行われていない。そこで、扁桃組織に残された自然免疫関連遺伝子の発現変化を解析することによって、発熱を惹起する分子経路を明らかにすることができるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は、PFAPA 症候群の扁桃組織における自然免疫関連遺伝子を網羅的に解析し、どのような自然免疫系の分子経路が活性化されているかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

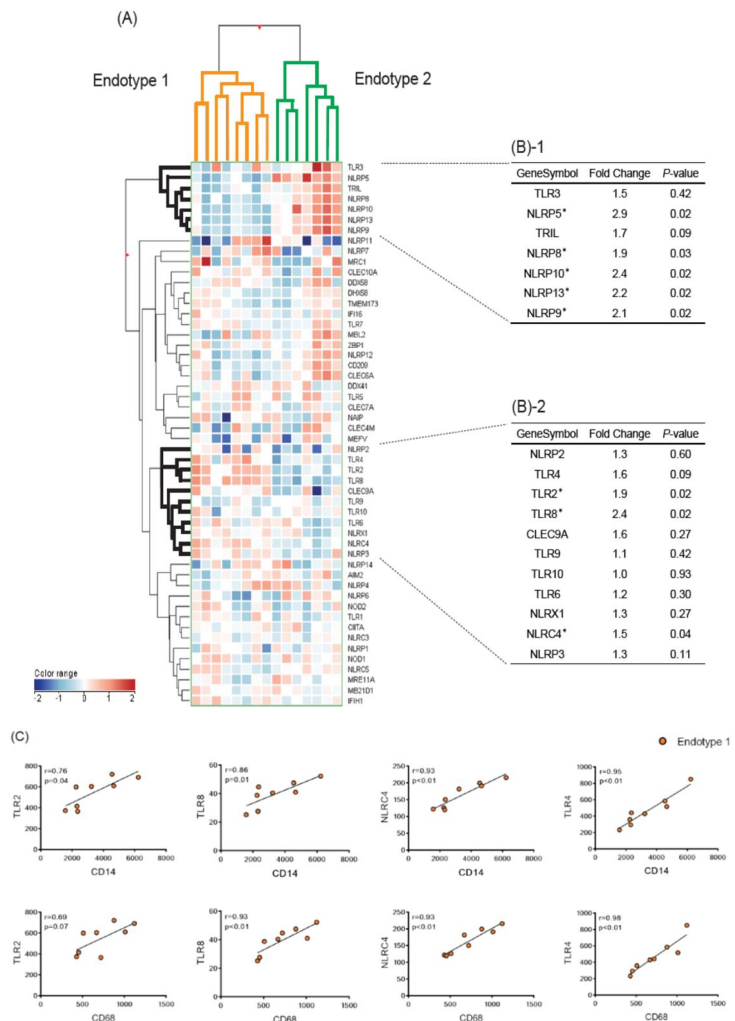
PFAPA 症候群の手術症例を対象とし、摘出した扁桃組織から RNA を抽出して microarray を行った。自然免疫関連遺伝子として、toll-like receptors (TLRs), nod-like receptors (NLRs), RIG-like receptors (RLRs), C-type lectin-like receptors (CLRs), DNA sensors の全 52 遺伝子に着目し、トランスクリプトーム解析を行った。cluster 分析により endotype を解析し、さらに、endotype 間の細胞組成の違い、活性化される分子経路や上流因子など背景因子について解析を行った。また、endotype と phenotype との関連についても解析した。

### 4. 研究成果

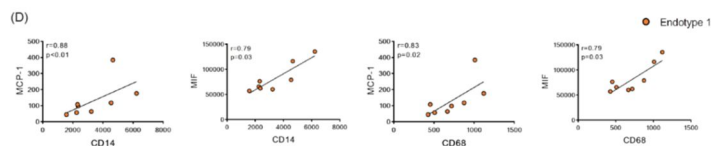
対象となったのは、PFAPA 症候群 15 症例であった。

自然免疫関連遺伝子 52 個の発現パターンに関して、cluster 分析を行った結果、2 つの分子経路に分かれることが示された。つまり endotype (Endotype1, Endotype2) を持つことが分かった (図 A)。

Endotype1 では、6 個の TLRs (TLR2, TLR4, TLR6, TLR8, TLR9, TLR10) と 3 個の inflammasome 関連遺伝子 (NLRP2, NLRP3, NLRC4) を含んだ 11 遺伝子の発現増加を認めた (図 B-2)。両群の扁桃構成細胞組成を比較したところ、Endotype1 では、単球/マクロファージの細胞マーカーである CD14, CD68 の発現が有意に増加していた。CD14, CD68 の発現は、TLR2, TLR4, TLR8, NLRC4 の発現と正の相関を認め (図 C)、さらには、単球/マクロファージの遊走因子である MCP-1, MIF の発現とも相関が認められた (図 D)。以上から、Endotype1 では、扁桃組織内に単球/マクロファージが遊走し、TLRs や inflammasome を介する自然免疫応答が惹起さ



れ炎症が誘導された可能性が示唆された。また、上流因子解析では、TLRs 活性化や IFN- 刺激、1,25-(OH)<sub>2</sub> ビタミン D 減少が、Endotype1 に特異的な遺伝子群の発現増加に關与する可能性が示唆された。



一方、Endotype2 では、TLR3 と 5 個の inflammasome 關連遺伝子 (NLRP5, NLRP8, NLRP9, NLRP10, NLRP13) を含む 7 遺伝子の発現増加を認めた (図 B-1)。Endotype2 では、増加している細胞成分や、細胞マーカー遺伝子との発現の相関は認められなかった。以上から、Endotype2 では、細胞構成の変化以外の因子が、自然免疫關連遺伝子群の発現増強に影響していることが示唆された。

最後に、endotype と各臨床症状との相関を検討した。多変量解析の結果、発熱期間、最高体温、腹痛と頭痛の随伴の有無が、随伴症状の数が両群で有意に異なることが示された。

以上より、PFAPA 症候群の扁桃組織では自然免疫応答に關して 2 つの endotype が存在し、さらに endotype は phenotype とも關連していることが明らかとなった。TLRs 活性、IFN- 刺激、1,25-(OH)<sub>2</sub> ビタミン D 減少が上流因子となり、自然免疫と獲得免疫の相互作用が病態形成に寄与する可能性が示唆された。

上記の成果は現在英文誌に投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----