

令和 4 年 6 月 30 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17908

研究課題名（和文）小児リウマチ性疾患における免疫担当細胞の動態解析と難治性予測バイオマーカーの確立

研究課題名（英文）Analysis of immunocyte dynamics for identifying refractory predictive biomarkers in pediatric rheumatic diseases

研究代表者

脇口 宏之（Wakiguchi, Hiroyuki）

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00716590

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：小児リウマチ性疾患の検体収集システムおよび免疫担当細胞数の測定系を確立した。しかし、新型コロナウイルス感染症の感染拡大が研究の進捗に影響を及ぼし、特に検体収集システムが不安定となったため、解析できるほどの結果が揃っていない状況である。予定研究期間は終了してしまったが、今後も地道に検体収集を行い、免疫担当細胞数の測定および解析を行っていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児リウマチ性疾患における免疫担当細胞の網羅的解析により、難治性予測バイオマーカーが発見できる可能性があること。

研究成果の概要（英文）：I have established a sample collection system from the pediatric rheumatic diseases and a system for measuring the number of immunocytes. However, the number of samples is not enough to analyze the results. Although the planned research period has ended, I will continue to collect samples steadily and measure and analyze the number of immunocytes.

研究分野：小児リウマチ

キーワード：小児リウマチ

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

若年性特発性関節炎、全身性エリテマトーデス、若年性皮膚筋炎、シェーグレン症候群および川崎病に代表される小児リウマチ性疾患は、原因不明の難治性免疫疾患である。その病態解明には免疫担当細胞の解析が望まれるが、報告は未だ不十分である。病態を解明し、難治性を予測するバイオマーカーを見出せば、適切な治療が患者に提供される。

2. 研究の目的

小児リウマチ性疾患における病態の解明および難治性予測バイオマーカーの確立を目的に、治療前後および寛解増悪時の患者末梢血および関節液免疫担当細胞数を網羅的にフローサイトメトリーで測定し、その動態を解析する。さらに、成人リウマチ性疾患との病態の違いについても評価する。

3. 研究の方法

<概要>

小児リウマチ性疾患の病態を解明すること：小児リウマチ性疾患患者の治療前後および寛解増悪時における末梢血および関節液の T 細胞、B 細胞、単球、NK 細胞、樹状細胞数/比率を網羅的に測定し、その動態を解析する。

小児リウマチ性疾患の難治性を予測するバイオマーカーを確立すること：小児リウマチ性疾患患者において、治療後に治療反応性から治療反応群と治療不応群とに分け、治療前に測定した各種免疫担当細胞数/比率を 2 群間で統計学的に比較検討する。

成人リウマチ性疾患との病態の違いについて評価すること：の結果と既報の成人リウマチ性疾患の末梢血および関節液の T 細胞、B 細胞、単球、NK 細胞、樹状細胞数/比率とを比較検討する。

<詳細>

患者検体を収集しフローサイトメトリーにより免疫担当細胞数/比率を測定する：対象は未治療の若年性特発性関節炎、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、シェーグレン症候群および川崎病患児とする。患者の検体を安定して収集するために、山口大学医学部附属病院だけではなく国内の小児リウマチ専門医が在籍する小児科に協力を依頼し、継続的な検体収集システムを確立させる。検体は末梢血および関節液（貯留時のみ）をグルココルチコイド、免疫抑制薬、生物学的製剤、免疫グロブリンによる(1)治療前、(2)治療後、(3)寛解時の 3 ポイント、再燃時にも同様の 3 ポイントで採取する。免疫担当細胞数の測定は 8 カラーフローサイトメトリーを用いる。免疫担当細胞のマーカーは CD3, CD4, CD8, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD20, CD25, CD27, CD38, CD45RA, CD45RO, CD56, CD69, CD123, CD127, CCR4, CCR6, CCR7, CXCR3, CXCR5, ICOS, IgD, HLA-DR を用いる。蛍光標識は FITC, PE, PerCP, APC, BV421, BV510, BV570, BV650 を用いる。マーカーと蛍光標識との組み合わせを図 1 に示す。フローサイトメーターは NovoCyte を用いる。

Naïve CD4+ T cell: CD3+CD4+CCR7+CD45RA+

Central memory CD4+ T cell: CD3+CD4+CCR7+CD45RA-

TEMRA CD4+ T cell: CD3+CD4+CCR7-CD45RA+

Effector memory CD4+ T cell: CD3+CD4+CCR7-CD45RA-

Th1 cell: CD3+CD4+CXCR3+CCR6-

Th17 cell: CD3+CD4+CXCR3-CCR6+

Activated CD4+ cell: CD3+CD4+CD38+HLA-DR+

Tfh cell: CD3+CD4+CXCR5+ICOS+

Activated Tfh cell: CD3+CD4+CXCR5+ICOS+CD69+

Memory Treg cell: CD3+CD4+CCR4+CD25+CD127lowCD45RO+

Naïve Treg cell: CD3+CD4+CCR4+CD25+CD127lowCD45RO-

Activated Treg cell: CD3+CD4+CCR4+CD25+CD127lowHLA-DR+

Naïve CD8+ T cell: CD3+CD8+CCR7+CD45RA+

Central memory CD8+ T cell: CD3+CD8+CCR7+CD45RA-

TEMRA CD8+ T cell: CD3+CD8+CCR7-CD45RA+

Effector memory CD8+ T cell: CD3+CD8+CCR7-CD45RA-

Activated CD8+ cell: CD3+CD8+CD38+HLA-DR+

IgM memory B cell: CD3-CD19+CD27+IgD+
 Class-switched memory B cell: CD3-CD19+CD27+IgD-
 Plasmablast: CD3-CD19+CD27+CD20-CD38+
 Naïve B cell: CD3-CD19+CD27-IgD+
 Double negative B cell: CD3-CD19+CD27-IgD-
 Non classical monocyte: CD3-CD19-CD14+CD16+
 Classical monocyte: CD3-CD19-CD14+CD16-
 CD16+ NK cell: CD3-CD19-CD14-CD20-CD56+CD16+
 CD16- NK cell: CD3-CD19-CD14-CD20-CD56+CD16-
 Myeloid dendritic cell: CD3-CD19-CD14-CD20-HLA-DR+CD11c+
 Plasmacytoid dendritic cell: CD3-CD19-CD14-CD20-HLA-DR+CD123+

	FITC	PE	PerCP	APC	BV421	BV510	BV570	BV650
①	CD4	CD8	7AAD	CD45 RA	CCR7	HLA- DR	CD3	CD38
②	CD4	CCR6	7AAD	CXCR3	-	HLA- DR	CD3	CD38
③	CD4	CD69	7AAD	CXCR5	ICOS	-	CD3	-
④	CD4	CD45 RO	7AAD	CCR4	CD25	HLA- DR	CD3	CD127
⑤	CD27	IgD	7AAD	CD20	CD19	-	CD3	CD38
⑥	CD56	CD16	7AAD	CD20	CD19	-	CD3	CD14
⑦	CD11c	CD123	7AAD	CD20	CD19	HLA- DR	CD3	CD14

図 1. 免疫担当細胞マーカーと蛍光標識との組み合わせ

4. 研究成果

小児リウマチ性疾患における検体収集システムおよび免疫担当細胞数の測定系を確立した。しかし、現段階では、結果を解析できるほどの検体数が揃っていない状況である。予定研究期間は満了してしまったが、今後も地道に検体収集を行い、引き続き免疫担当細胞数の測定および解析を行っていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Furusawa Akinori, Wakiguchi Hiroyuki, Okazaki Fumiko, Korenaga Yuno, Azuma Yoshihiro, Yasudo Hiroki, Hasegawa Shunji	4. 巻 25
2. 論文標題 Successful treatment of children with juvenile systemic sclerosis using mycophenolate mofetil after methylprednisolone pulse therapy: A 3 year follow up	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 95 ~ 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1756-185X.14260	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 Okazaki Fumiko, Wakiguchi Hiroyuki, Korenaga Yuno, Nakamura Tamaki, Yasudo Hiroki, Uchi Shohei, Yanai Ryoji, Asano Nobuyuki, Hoshii Yoshinobu, Tanabe Tsuyoshi, Izawa Kazushi, Honda Yoshitaka, Nishikomori Ryuta, Uchida Keisuke, Eishi Yoshinobu, Ohga Shouichi, Hasegawa Shunji	4. 巻 19
2. 論文標題 A novel mutation in early onset sarcoidosis/Blau syndrome: an association with Propionibacterium acnes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatric Rheumatology	6. 最初と最後の頁 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12969-021-00505-5	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 Korenaga Yuno, Wakiguchi Hiroyuki, Matsushige Takeshi, Inoue Hirofumi, Mizutani Makoto, Furuta Takashi, Kawamura Mai, Nakamura Tamaki, Okazaki Fumiko, Yasudo Hiroki, Maki Takashi, Hasegawa Shunji	4. 巻 -
2. 論文標題 Juvenile Neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus With Magnetic Resonance Imaging Findings Similar to Acute Necrotizing Encephalopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCR: Journal of Clinical Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/RHU.0000000000001698	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 Wakiguchi Hiroyuki	4. 巻 Volume 12
2. 論文標題 Multispecialty approach for improving outcomes in juvenile dermatomyositis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Multidisciplinary Healthcare	6. 最初と最後の頁 387 ~ 394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/JMDH.S171095	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2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 脇口 宏之
2. 発表標題 小児リウマチ性疾患における免疫担当細胞の網羅的解析に向けて
3. 学会等名 第6回JCRベーシックリサーチカンファレンス（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 脇口 宏之
2. 発表標題 小児リウマチ性疾患における免疫担当細胞の網羅的解析に向けて
3. 学会等名 第24回リウマチフォーラム（招待講演）
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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