

令和 5 年 10 月 30 日現在

機関番号：74329

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10460

研究課題名(和文) 血中サイトカイン動態によるリウマチ・キャッスルマン関連疾患分類と治療効果の解析

研究課題名(英文) Determination of disease characteristics of Castleman's disease and Rheumatoid arthritis using serum cytokine and chemokine patterns.

研究代表者

宇野 賀津子 (Uno, Kazuko)

公益財団法人ルイ・パストゥール医学研究センター・IFN・生体防御研究室・研究員(移行)

研究者番号：50211082

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)：リウマチとキャッスルマン病、COVID-19はIL-6の作用を抑制する抗ヒトIL-6受容体の抗体薬(TCZ:トシリズマブ)による治療が有効である。リウマチは自己免疫疾患、キャッスルマン病はリンパ球増殖性疾患、COVID-19は感染症でその病態は大きく異なっている。従って、各疾患のTCZの治療により影響を受けるサイトカイン・ケモカイン系、治療効果とサイトカイン・ケモカイン動態の変化を明らかにすることにより、臨床症状にIL-6がどのように関与し、そのブロックにより治療に繋がるのか、血中のサイトカイン・ケモカインを網羅的に測定し、健康人の状態と比較しつつ検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リウマチとキャッスルマン病、COVID-19はIL-6の作用を抑制する抗ヒトIL-6受容体の抗体薬(TCZ:トシリズマブ)による治療が有効であるが、病因は全く異なる疾患である。各疾患のTCZ治療前後でのサイトカイン・ケモカインの動態を測定し、その変化を解析する事により、TCZの各疾患に対する作用を明らかにする。また、各疾患の特性にせまることが可能となる。

研究成果の概要(英文)：Rheumatoid arthritis, Castleman's disease, and COVID-19 can be effectively treated with Tocilizumab(TCZ), an antihuman IL-6 receptor antibody drug that inhibits the action of IL-6. The pathogenesis of all three disease are different: rheumatoid arthritis is an autoimmune disease, Castleman's disease is a lymphoproliferative disease, and COVID-19 is an infectious disease. We comprehensively measured cytokine/chemokines in the blood serum of patients before/after TCZ treatments and compared all three diseases with the serum of healthy subjects.

By clarifying the cytokine/chemokine system affected by TCZ in each disease, the effect of treatment and changes in cytokine/chemokine dynamics, will reveal how IL-6 is involved in the clinical symptoms, and whether blocking IL-6 can result in significant improvements or the elimination of these symptoms.

研究分野：免疫学

キーワード：IL-6 トシリズマブ サイトカイン ケモカイン PLS2解析

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)とキャッスルマン病(MCD)はIL-6の作用を抑制する抗ヒトIL-6受容体の抗体薬(TCZ:トシリズマブ)による治療が有効である<sup>1,2,3</sup>。しかしながらリウマチは自己免疫疾患、キャッスルマン病はリンパ球増殖性疾患で、その病因・病態は大きく異なっている。更に、TCZはCOVID-19治療薬として、2021年6月に米国で緊急使用許可を取得し、欧州でも承認(同年12月)、日本では2022年1月に承認された<sup>4</sup>。COVID-19は感染症であり、リウマチ、キャッスルマン病、COVID-19の病因は全く異なっている<sup>5,6</sup>。このように大きく病因も症状も異なる疾患にTCZは有効である。

## 2. 研究の目的

各疾患のTCZの治療により影響を受けるサイトカイン・ケモカイン、TCZ治療後の治療効果とサイトカイン・ケモカイン動態の変化を明らかにすることにより、臨床症状にIL-6がどのように関与し、そのブロックにより治癒に繋がるのか、血中のサイトカイン・ケモカインを網羅的に測定し、健常人の測定値と比較しつつ検討した。

## 3. 研究の方法

### 3-1 対象

キャッスルマン病患者19名(治療前と治療後)、リウマチ患者28名(治療前、治療4週、24週後)、COVID-19患者(中等症II及び重症)12名(治療前、3~20日後)のTCZ治療前、治療後の血清検体及び健常人検体を用いた。それぞれの疾患については徳州会病院、羽曳野医療センター、(公財)ルイ・パストゥール医学研究センターの倫理委員会の承認を得ている。

### 3-2 サイトカイン・ケモカインの測定

27plex panel(IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, basic FGF, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , PDGF-bb, RANTES, TNF- $\alpha$ , VEGF)及びInflammation panel(APRIL, BAFF, CD30, CD163, Chitinase, sgp130, IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\beta$ , sIL-6Ra, IL-11, IL-12(p40), IL-19, IL-20, IL-22, IL-26, IL-27, IL-28A, IL-29, IL-32, IL-34, IL-35, LIGHT, MMP-1, MMP-2, MMP-3, Osteocalcin, Osteopontin, Pentraxin-3, sTNF-R1, sTNF-R2, TSLP, TWEAK)(Bio-Rad Laboratories, CA, USA)を用いて、Bio-Plex 200にて測定した。なおInflammation panelのうち、IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-8, IL-10, IL-12(p70)など27plex panelと重なっていた項目は解析から除外し、27plexの結果を採用した。

### 3-3 解析

サイトカイン・ケモカインの測定値は、対数変換後 JMP13.0 を用いて解析した。また更に Partial Least Squares Regression 2 (PLS2 解析)により治療前後の変化を見た。

## 4. 研究成果

### 4-1 TCZ 投与臨床的効果

キャッスルマン病患者、リウマチ患者、COVID-19患者のCRPはTCZ治療後、ほとんどの患者で低下した(図1)。リウマチではTCZ治療4週後では一部数mg/dLと高い患者がいたが大半の患者は1mg/dL以下に低下、24週では全て低下していた。COVID-19患者でもTCZ投与数日後から低下した。キャッスルマン患者でも大きく低下していた。

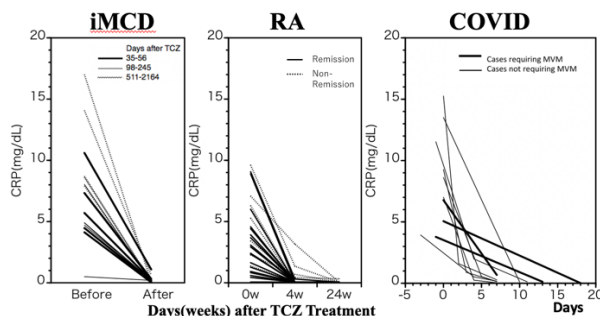


図1 各疾患患者のTCZ治療前後のCRP値

### 4-2 治療前の各疾患におけるサイトカイン・ケモカイン動態

27plex panelにおいては、キャッスルマン病患者12項目、リウマチ患者17項目、COVID-19患者21項目で健常人比べて上昇していた。7項目は3疾患で共通して上昇していた。Inflammation panelにおいては、27plexと二重に測定している項目を除くと、キャッスルマン病

患者 12 項目、リウマチ患者 15 項目、COVID-19 患者 17 項目が、健常人に比べて上昇していた。4 項目は 3 疾患で共通して上昇していた。  
興味深いことに、27plex panel の項目では、リウマチ、COVID-19 は TCZ 治療後、低下または一過的上昇後低下となるのに対して、キャッスルマン病では大半の項目で TCZ 治療後も上昇が継続していた。一方、inflammation panel の項目では、一部サイトカイン受容体などは上昇したが、キャッスルマン病でも、大半の項目は、低下傾向を示した。(表 1)

27plex panel						Inflammation panel						
	MCD	MCD-TCZ	RA	RA-TCZ	COVID		MCD	MCD-TCZ	RA	RA-TCZ	COVID	COVID-TCZ
IL-1β	○	↗	○	↗	●	↗	●	↘	●	↘	●	↘
IL-2	●	→	●	↘	○	↗	●	↘	○	↘	○	↘
IL-6	●	↗	●	↗	●	↗	●	↘	○	↘	○	↘
IL-8	●	→	○	→	○	↗	●	↘	○	↘	○	→
IL-15	●	→	●	↘	●	↗	●	↘	○	↘	○	→
IL-17	●	↗	○	→	○	↗	○	↘	○	↘	○	→
VEGF	●	→	●	↘	●	↗	●	↘	○	↘	○	→
FGF	○	↗	○	↗	○	↗	○	↘	○	↘	○	→
IL-9	○	↗	○	↘	○	↗	○	↘	○	↘	○	→
MIP-1α	●	→	○	→	○	↗	○	↘	○	↘	○	→
MIP-1β	○	↗	○	→	○	↗	○	↘	○	↘	○	→
G-CSF	○	↗	○	→	○	↗	○	↘	○	↘	○	→
IL-1ra	○	↗	○	→	○	↗	○	↘	○	↘	○	→
IL-5	○	↗	○	→	○	↗	○	↘	○	↘	○	→
IL-7	○	↗	○	→	○	↗	○	↘	○	↘	○	→
IL-12p70	○	↗	○	→	○	↗	○	↘	○	↘	○	→
IL-13	○	↗	○	→	○	↗	○	↘	○	↘	○	→
IP-10	○	↗	○	→	○	↗	○	↘	○	↘	○	→
GM-CSF	○	↗	○	→	○	↗	○	↘	○	↘	○	→
IFN-γ	○	↗	○	→	○	↗	○	↘	○	↘	○	→
TNF-α	○	↗	○	→	○	↗	○	↘	○	↘	○	→
IL-4	○	↗	○	→	○	↗	○	↘	○	↘	○	→
IL-10	○	↗	○	→	○	↗	○	↘	○	↘	○	→
MCP-1	○	↗	○	→	○	↗	○	↘	○	↘	○	→
PDGF-β	○	↗	○	→	○	↗	○	↘	○	↘	○	→
RANTES	○	↗	○	→	○	↗	○	↘	○	↘	○	→
Eotaxin	○	↗	○	→	○	↗	○	↘	○	↘	○	→
IFN-α2	●	↘	●	↘	●	↘	●	↘	○	↘	○	↘
IL-26	●	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
IL-32	●	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
IL-34	●	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
Chitinase-3	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
IFN-β	●	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
IL-22	●	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
IL-20	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
LIGHT	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
MMP-1	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
CD133	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
Osteopontin	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
IL-11	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
IL-27	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
IL-28A	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
IL-29	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
IL-35	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
BAFF	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
CD30	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
Pentraxin-3	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
IL-12p49	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
TNF-R2	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
gp130	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
sIL-6Rα	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
APRIL	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
IL-19	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
MMP-2	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
MMP-3	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
Osteocalcin	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
TNF-R1	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
TSLP	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘
TWEAK	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘	○	↘

表 1 サイトカイン・ケモカイン値、健常人との比較

- 健常人に比べ高値, ▼ 健常人に比べ有意に低値 p<0.0001
- 健常人に比べ高値, ▽ 健常人に比べ有意に低値 p<0.05
- 健常人範囲内
- ↗ TCZ 治療後上昇傾向, ↘ TCZ 治療後低下傾向, ↗↘ TCZ 治療後一旦上昇その後低下

#### 4-3 PLS2 による解析 (TCZ 治療前)

多変量解析の一つである PLS2 解析により、サイトカイン動態についてキャッスルマン病、リウマチ、COVID-19 患者について比較した。図 2 から明らかなように、27plex および Inflammation panel とともに、健常人および 3 つの疾患の距離は、大きく離れていて、このことは 3 種の疾患はそれぞれに大きく違っていることを意味している。

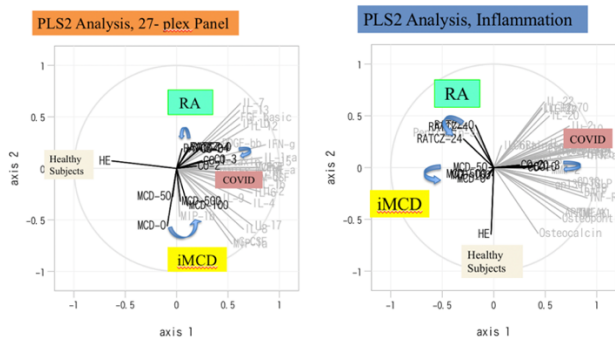


図 2 PLS2 解析

#### 4-4 PLS2 による解析 (TCZ 治療後)

更に図 2 の TCZ 治療後の 27plex panel の変化をみてみると、リウマチや COVID-19 では TCZ 治療により、やや健常人値に近づいている。一方キャッスルマン病患者では、MCD-0 に比較して、MCD-100 (日), 500 (日) ではむしろ健常人から離れる方向に移動している。これらの結果は表 1 の 27plex panel の結果ではむしろ上昇している項目が多いことと一致している。同様に、Inflammation panel についても PLS2 解析の結果について調べた。その結果 Inflammation panel では、27plex panel の結果とは異なりキャッスルマン病患者でも、リウマチや COVID-19 と同様、やや健常人に近づいた。

このように、TCZ 治療の前後において、27plex panel に含まれる基本的なサイトカイン・ケモカ

インと、炎症に関与するサイトカイン・ケモカインの動きで、キャッスルマン病で大きな違いが認められた。このことは、TCZ 治療により、リウマチ、COVID-19 のみならず、キャッスルマン病でも患者の炎症症状は改善することを反映している。

## 5. まとめ

IL-6 の作用をブロックする TCZ はキャッスルマン病、リウマチ、COVID-19 で使われ、患者の臨床症状改善に有効である。今回の研究結果は、患者の炎症関連のサイトカイン・ケモカインは3疾患で共通して TCZ 治療により低下するが、IL-1b, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 等ではキャッスルマン病とリウマチ、COVID-19 とは異なる動きをすることが明らかにされた。即ち、リウマチ、COVID-19 では TCZ 治療後一過的に IL-6 を含め、いくつかのサイトカイン・ケモカインの上昇が認められるが、その後速やかに低下する。一方キャッスルマン病では、炎症症状は改善するものの、TCZ では根本的治癒にはつながっていないことを、反映していると考えられる。最近、キャッスルマン病では Tph 細胞が増殖し CXCL13 が産生増加した免疫異常症であることが示唆されている<sup>7</sup>。このようなサイトカイン・ケモカイン動態の更なる解析により、それぞれの疾患の特性を明らかにすることができるかと期待される。

## 参考文献

1. Yoshizaki K, Nakagawa T, Fukunaga K, Kaieda T, Maruyama S, Kishimoto S, Yamamura Y, Kishimoto T. Characterization of human B cell growth factor (BCGF) from cloned T cells or mitogen-stimulated T cells. *J Immunol.* 1983 Mar;130(3):1241-6. PMID: 6600479
2. Yoshizaki K, Nakagawa T, Fukunaga K, Tseng LT, Yamamura Y, Kishimoto T. Isolation and characterization of B cell differentiation factor (BCDF) secreted from a human B lymphoblastoid cell line. *J Immunol.* 1984 Jun;132(6):2948-54. PMID: 6202767
3. Yoshizaki K, Matsuda T, Nishimoto N et al. Pathogenic Significance of Interleukin-6(IL-6/BSF-2) in Castleman's Disease *Blood*, Vol74, No.4, 1989,1360-1367
4. Hashimoto S, Yoshizaki K, Uno K, et al. Prompt Reduction in CRP, IL-6, IFN- $\gamma$ , IP-10, and MCP-1 and a Relatively Low Basal Ratio of Ferritin/CRP Is Possibly Associated With the Efficacy of Tocilizumab Monotherapy in Severely to Critically Ill Patients With COVID-19. *Frontiers in Medicine* 2021 *Front Med (Lausanne)*, Sep 23;8:734838. doi: 10.3389/fmed.2021.734838. eCollection 2021.
5. Castleman B, Towne VW Case records of the Massachusetts General Hospital: Case No. 40231. *N Engl J Med.* 1954 Jun 10;250(23):1001-5. doi: 10.1056/NEJM195406102502308. PMID: 13165944
6. Yoshizaki K, Nishimoto N et al. Therapy of rheumatoid arthritis by blocking IL-6 signal transduction with a humanized anti-IL-6 receptor antibody *Spronger Semin Immunopathol*,1998, 20:247-259
7. Pierson S, Katz L et al. CXCL13 is a predictive biomarker in idiopathic multicentric Castleman disease. *Nature Communications*, 2022,13:7236

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hashimoto Shoji, Yoshizaki Kazuyuki, Uno Kazuko, et al	4. 巻 8
2. 論文標題 Prompt Reduction in CRP, IL-6, IFN- $\gamma$ , IP-10, and MCP-1 and a Relatively Low Basal Ratio of Ferritin/CRP Is Possibly Associated With the Efficacy of Tocilizumab Monotherapy in Severely to Critically Ill Patients With COVID-19	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmed.2021.734838	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 95. Uno K, Muso E, Ito-Ihara T, Endo T, Yasuda Y, Yagi K, Suzuki K	4. 巻 Dec;136
2. 論文標題 Impaired HVJ-stimulated Interferon producing capacity in MPO-ANCA-Associated vasculitis with Rapidly Progressive Glomerulonephritis lead to susceptibility to infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytokine	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cyto.2020.155221	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 Nakayama EE, Kubota-Koketsu R, Sasaki T, Suzuki K, Uno K, et al.	4. 巻 16;12(1)
2. 論文標題 Anti-nucleocapsid antibodies enhance the production of IL-6 induced by SARS-CoV-2 N protein.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 T. Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 8108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-12252-y.PMID: 35577892	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 宇野賀津子、吉崎和幸、岩橋充啓、原田博雅、金香充範、富田雅史、藤宮仁	4. 巻 30
2. 論文標題 血清中サイトカイン・ケモカインのPLS2解析による、キャッスルマン病と関節リウマチの疾患特性の解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PASKEN J	6. 最初と最後の頁 29-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 1件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Kazuko Uno, Kazuyuki Yoshizaki, Mitsuhiro Iwahashi, Hitoshi Fujimiya
2. 発表標題 Disease Characterization of Castleman's Disease and Rheumatoid Arthritis based on Serum Cytokine and Chemokine Patterns Using Partial Least Squares Regression 2 Analysis
3. 学会等名 1st International Symposium on Castleman Disease (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 K. Uno, H. Fujimiya, M. Iwahashi, S. Hashimoto, T. Tanaka, K. Yoshizaki
2. 発表標題 Characterizing COVID-19, Castleman's Disease and Rheumatoid Arthritis Based on Patients' Serum Cytokine and Chemokine Patterns Before and After Tocilizumab Treatment Using Partial Least Squares Regression 2 Analysis
3. 学会等名 Cytokines 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuko Uno, Toshio Tanaka, Kazuyuki Yoshizaki
2. 発表標題 Characterizing COVID-19, Castleman's Disease and Rheumatoid Arthritis Based on Patients' Serum Cytokine/Chemokine Patterns Before and After Tocilizumab Treatment Using Partial Least Squares Regression 2 Analysis
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuko Uno, Kazuyuki Yoshizaki, Toshio Tanaka et al.
2. 発表標題 Characterizing COVID-19, Castleman's Disease and Rheumatoid Arthritis Based on Patients' Serum Cytokine and Chemokine Patterns Before and After Tocilizumab Treatment Using Partial Least Squares Regression 2 Analysis
3. 学会等名 Cytokines 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 吉崎和幸、川上純編、宇野賀津子 分担執筆	4. 発行年 2022年
2. 出版社 フジメディカル出版	5. 総ページ数 280
3. 書名 キャッスルマン病, TAFRO症候群	

〔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	吉崎 和幸  (Yoshizaki Kazuyuki)  (90144485)	大阪大学・産業科学研究所・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
---------	---------