

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16931

研究課題名(和文)NK細胞機能に着目した全身型若年性特発性関節炎の病態解析

研究課題名(英文)Pathophysiological analysis of NK cell function in systemic juvenile idiopathic arthritis

研究代表者

大宅 喬(OHYA, Takashi)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：80846668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、全身型若年性特発性関節炎(sJIA)患者のNK細胞におけるInterleukin(IL)-18シグナル障害を証明し、このシグナル障害の機序や病態への影響解明を目指すことを目的として行った。研究結果から急性期や慢性関節炎を伴うsJIA症例のNK細胞には強いIL-18シグナル障害があり、このNK細胞のIL-18シグナル障害が高濃度IL-18によって起こる2次的なものであることを明らかにした。また、症例の経時的解析により、IL-18シグナル障害の程度はsJIAの症状の軽快、血清IL-18値の低下に伴い軽くなる傾向があり、病勢を見極める上でのバイオマーカーとして応用できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身型特発性関節炎(sJIA)において以前より知られていたバイオマーカーである血清IL-18値に比較して、NK細胞のIL-18シグナル障害の程度をみることは細胞の機能面での評価であるため、より病態を反映していると考えられる。そのため、治療の強化/継続/中止を評価できる指標になり得ることが示唆される。また、sJIAより移行することがあるマクロファージ活性化症候群においてもNK細胞機能障害がみられることがわかっており、sJIAと共通する病態が存在することが考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to demonstrate Interleukin (IL)-18 signaling defect in NK cells from patients with systemic juvenile idiopathic arthritis (sJIA) and to elucidate the mechanisms of this signaling defect and its impact on the pathogenesis. The results showed that NK cells in acute and chronic cases with arthritis showed strong IL-18 signaling defect, and this IL-18 signaling defect in NK cells was secondary to high levels of serum IL-18. Longitudinal analysis of the cases showed that the degree of IL-18 signaling defect tended to lighten as the symptoms of sJIA improved and serum IL-18 levels declined, suggesting that it may be applicable as a biomarker in identifying disease status.

研究分野：炎症・免疫

キーワード：全身型若年性特発性関節炎 NK細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身型若年性特発性関節炎(sJIA)は発熱、関節炎、発疹、肝脾腫などの症状を特徴とする疾患であり、急性期の約 10%に MAS を認め、適切な治療がなされなければ致死的な経過をとる。また、sJIA の 1/3 は一過性の経過をとる単周期型だが、2/3 は再発や関節炎の持続がみられ継続的な治療を要する。近年の治療や検査技術の発展により sJIA の病態の理解はすすんでいるものの、未だその原因は明らかになっていない。sJIA では血清 Interleukin-18(IL-18)が著明な高値をとり、診断や病勢を反映するバイオマーカーとして利用されている。IL-18 は、NK 細胞上の IL-18 receptor (IL-18R)に結合し細胞内シグナルを介して、その細胞障害作用と INF 産生を引き起こすことがわかっているが、血清 IL-18 が高値である急性期 sJIA の NK 細胞では、本来賦活されるべき細胞障害作用や INF 産生が低下していることがわかっており矛盾が存在する。

2. 研究の目的

本研究では、sJIA 患者の NK 細胞における IL-18 シグナル障害が、IL-18 高濃度環境下で引き起こされたものであるか、治療の継続 / 中止 / 変更を判断するためのバイオマーカーとして応用できるか、NK 細胞の機能(細胞障害作用や INF 産生など)にどのような影響を与えるか、どのような分子細胞学的機序で起こるかを解析する。このシグナル障害の機序と sJIA 病態への影響解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 対象

2016 年から 2020 年の間に、31 名の sJIA 患者と 6 名の健常者を本研究の対象者としてリクルートした。全ての対象者において、本人または保護者から書面の同意を得た。sJIA 患者は病期に応じて、1) 全身炎症群(初発:6 名、再発:2 名)、2) 慢性関節炎群(全身症状がなく 6 か月以上関節炎が持続するもの:7 名)、3) 治療あり寛解群(10 名)、4) 治療なし寛解群(6 名)、の 4 群に分けた。寛解は 3 か月以上症状がないものと定義した。

(2) 方法

・研究対象者の血清 IL-18 測定は、human IL-18 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit (MBL)を用いて行った。

・IL-18 は NK 細胞上の受容体に結合後、MAPK p38 や NF B p65 などのリン酸化を起こし細胞障害活性や INF 分泌を促す。研究対象者の NK 細胞の IL-18 シグナルを解析するため、末梢血単核球 (PBMC)を recombinant human IL-18 (rhIL-18)で 15 分間刺激した。BD Phosflow PE anti-p38 MAPK (pT180/pY182) antibody と PE anti NF B p65 (pS529) antibody (BD Biosciences)を用いて、フローサイトメーター (EC800, Sony Bio technology)で解析し、MAPK p38 および NF B p65 のリン酸化をみた。NK 細胞は、CD3-CD56+と定義した。同時に NK 細胞上の IL-18 receptor (IL-18R)の発現も解析した。リン酸化の程度や IL-18R の発現は MFI(平均蛍光強度)にて定量化した。

・高濃度 IL-18 が NK 細胞の IL-18 シグナルに与える影響を調べるため、健常者 PBMC を rhIL-18 の存在する環境下で 12 時間培養し、上記方法で IL-18 シグナル解析を行った。また、高濃度 rhIL-18 存在下で 24 時間培養した NK 細胞の、IL-18R 発現や INF 産生能をフローサイトメーターで確認した。

4. 研究成果

(1) 対象者の血清 IL-18 値 (図 1)

血清 IL-18 値は、全身炎症群、慢性関節炎群、治療あり寛解群、治療無し寛解群の順に高く、病勢と正の相関関係を認めた。

(2) 対象者各群の NK 細胞における IL-18 シグナルの比較 (図 2、図 3)

IL-18 によって引き起こされる NK 細胞内の MAPK p38 および NF B p65 のリン酸化の程度は、全身炎症群、慢性関節炎群、治療あり寛解群、治療無し寛解群の順に弱く、各群に有意差を認められた。また、症例の血清 IL-18 値と NK 細胞の IL-18 シグナルの程度には負の相関があることがわかった。

(3) 高濃度 IL-18 環境下における NK 細胞の IL-18 シグナル変化と IFN γ 産生能(図 4、図 5)
rhIL-18 が存在する環境下で NK 細胞を培養すると、IL-18 によって引き起こされる NK 細胞内の MAPK p38 および NF κ B p65 のリン酸化の程度は低下する傾向があった。また、その低下の程度は培養した rhIL-18 濃度が高いほど顕著であった。同様に、NK 細胞の IL-18R 発現や IFN γ 産生能を確認したところ、前者では培養する rhIL-18 濃度で変化はなく、後者では有意差は認めなかったが培養した rhIL-18 濃度が高いほど IFN γ 産生の低下傾向があった。

(4) NK 細胞における IL-18 シグナル障害の経時的な変化

無治療急性期にリクルートした症例の NK 細胞における IL-18 シグナル障害の経時的な変化についての評価を実施した。IL-18 シグナル障害の程度が、症状の軽快、血清 IL-18 値の低下に伴い軽くなりバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

(5) まとめ

sJIA 症例でみられる NK 細胞の IL-18 シグナル障害が、高濃度 IL-18 によって引き起こされる二次的なものであることを明らかにした。sJIA において、NK 細胞の IL-18 シグナル障害は臨床症状と相関し、病勢を見極める上でのバイオマーカーとして応用できる可能性がある。また、以前より知られたバイオマーカーである血清 IL-18 値と比較して、NK 細胞の IL-18 シグナル障害の程度をみることは細胞の機能面での評価であるため、より病態を反映していると考えられる。そのため、治療の強化/継続/中止を評価できる指標になり得ることが示唆された。今後、症例数を増やし、NK 細胞の IL-18 シグナル障害の程度がバイオマーカーとして応用可能かを評価するとともに、NK 細胞の IL-18 シグナル障害が引き起こす詳細なメカニズムについて解析していく。

文献) 1. Takashi Ohya, Kenichi Nishimura, Ayako Murase, Seira Hattori, Asami Ohara, Tomo Nozawa, Ryoki Hara, Shuichi Ito. Impaired Interleukin-18 Signaling in Natural Killer Cells From Patients With Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis. ACR Open Rheumatol. 2022;4(6):503-510

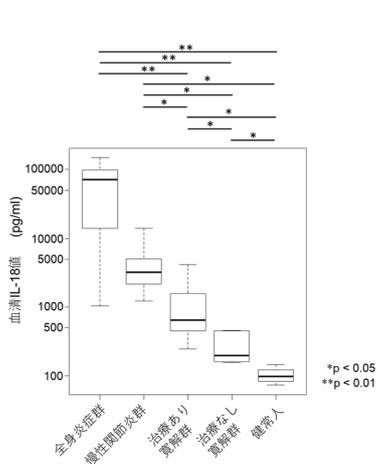


図 1. 対象者の血清 IL-18 値 文献1より引用し、図の一部を改変

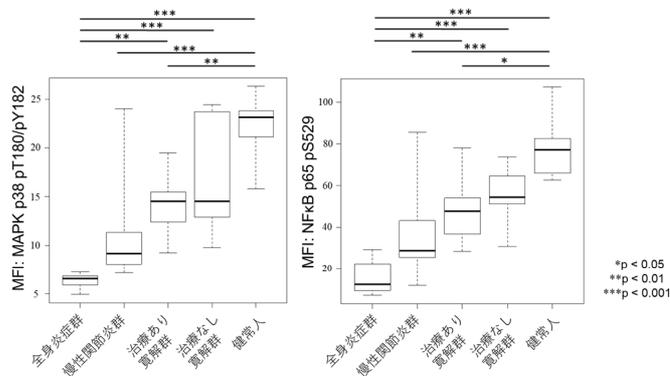


図 2. 対象者各群のNK細胞におけるIL-18シグナルの比較 文献1より引用し、図の一部を改変

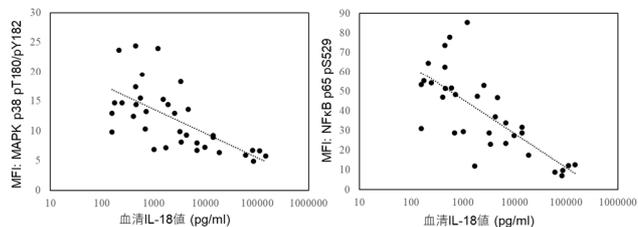


図 3. 対象者の血清 IL-18 値とNK細胞のIL-18シグナルの相関

文献1より引用し、図の一部を改変

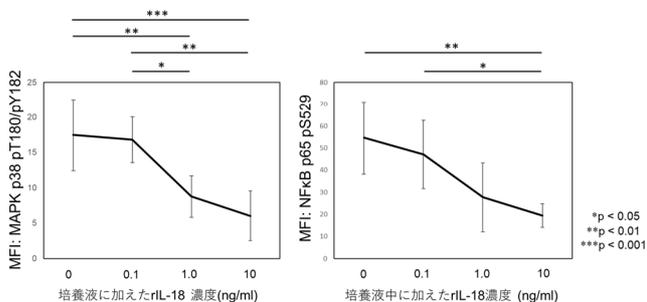


図 4. 高濃度 IL-18 環境下におけるNK細胞のIL-18シグナル変化

文献1より引用し、図の一部を改変

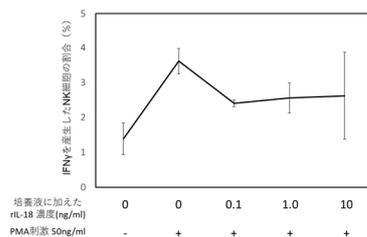


図 5. 高濃度 IL-18 環境下におけるNK細胞のIFN γ 産生能

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Ohya Takashi, Nishimura Kenichi, Murase Ayako, Hattori Seira, Ohara Asami, Nozawa Tomo, Hara Ryoki, Ito Shuichi | 4. 巻 4(6) |
| 2. 論文標題 Impaired Interleukin 18 Signaling in Natural Killer Cells From Patients With Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 ACR Open Rheumatology | 6. 最初と最後の頁 503-510 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/acr2.11426 | 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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|