

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591462

研究課題名(和文) サイトカイン網羅解析による膠原病性肺高血圧・レイノー症状の病態解析

研究課題名(英文) Analysis of pathology of the pulmonary hypertension with connective tissue disease using cytokine array

研究代表者

萩原 圭祐 (Hagihara, Keisuke)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座准教授

研究者番号：60423183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：膠原病性PAH患者に合併するレイノー症状に対するボセンタンとPDE-5阻害薬との前向き無作為比較試験では、冷水負荷テストでは両群ともに、有意に手指温度の上昇を認め、QOLの検討では、ボセンタン投与群において、身体機能、活力、心の健康が有意に改善を示した。原発性と膠原病性PAHでのサイトカイン網羅解析では、IL-7、Eotaxin、IL-12p40、IL-16、TRAIL、HGF、IFN- γ 2の発現に有意差を認めた。年齢、HGF、SCGFを用いて、ロジスティック回帰分析により膠原病性、IPAH、CETPH 3群の鑑別が、サイトカイン測定により可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We performed randomized controlled trials with PDE-5 inhibitors and bosentan for Raynaud's symptoms in the collagen disease patients with PAH. We found that fingers' temperature significantly increased in the cold water test after treatment of PDE-5 inhibitors and bosentan. We confirmed that physical function, vitality, mental in the bosentan group significantly improved using SF-36 QOL questionnaire. Next, we examined the cytokine profiling between primary PAH and secondary PAH with collagen disease using Bio-plex cytokine array. We found that the expression of IL-7, Eotaxin, IL-12p40, IL-16, TRAIL, HGF, and IFN- γ 2 were significantly differed. The logistic regression analysis using age, HGF, and SCGF clearly showed that collagen diseases, CETPH and IPAH were distinguished if we measured above cytokines.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 膠原病・アレルギー 内科学

キーワード：肺高血圧症 レイノー症状 サイトカイン エンドセリン受容体拮抗薬 PDE5阻害薬

1. 研究開始当初の背景

1. 学術的背景

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は難治性疾患であり、全身性強皮症 (SSc) や SLE の患者に続発し、しばしば不幸な転記を示すことが知られているが、近年その治療戦略は劇的に変化しつつある。その発症には、エンドセリン経路、一酸化窒素 (NO) 経路、プロスタサイクリン経路の3つが関与することが明らかとなっている。NO 経路では、NO が細胞内 cGMP を直接増加させ血管拡張を起こすが、タダラフィル・シルデナフィルは、cGMP を分解する酵素である PDE-5 を阻害することにより cGMP を増加させ、血管拡張作用を示す。エンドセリン拮抗薬であるボセンタンは、ETA と ETB 受容体の両方に結合し、エンドセリンと受容体の結合を競合的に拮抗阻害することにより血管収縮、細胞増殖を抑制すると言われている。

ボセンタンの臨床効果はすでにいくつもの報告があり、膠原病性肺高血圧症の患者の予後を改善することが明らかになっている。しかし、興味深いことに、ボセンタンの使用により、明らかに生命予後は改善するものの、肺動脈圧は、従来治療群と比較し、有意な低下は示さなかった。欧州心臓学会議 (ESC) と欧州呼吸器会議 (ERS) による 2009 年の肺高血圧の診断治療ガイドラインにおいても、肺動脈圧や心係数は、診断には必要であるが、予後を予測できるかは不明であるとなっている (European Heart J 2009)。つまり、PAH の治療において、エンドセリン経路を阻害することは、結果的に未知の経路に作用し、生命予後を改善している可能性が示唆されている。

また、ボセンタンの多様な臨床効果として、膠原病患者に合併する肢端潰瘍やレイノー症状の改善が挙げられる。SSc 患者におけるボセンタンとプラセボ対象の比較試験では、潰瘍治癒時間に差はなかったが、4 個以上の潰瘍を有する患者では、新規潰瘍の発生が有意に抑えられたと報告されている (Matucci-Cernic et al. Ann Rheum Dis 2010)。レイノー症状に関しては、発作回数や痛みなどは改善しないが、質問紙による評価では手の機能は改善することが明らかになっている (Nguyen VA et al. ; Rheumatology 2009)。しかし、これらの報告は、あくまで臨床結果であり、ボセンタンがどのように肢端潰瘍・レイノー症状を改善しているのかは、まったく不明である。

2. 研究の目的

本研究代表者は、サイトカイン-エンドセリンネットワークの存在を想定した。ボセンタンはその悪循環を阻害する結果、臨床効果を発揮していると仮説を立て、2007 年アクテリオンアカデミアプライズより研究資金の提供を受け、ボセンタン治療前後での約 50 種類のサイトカイン動態を Bio-Plex

cytokine array により、網羅的に解析を行った。特に、ボセンタンの薬効にまだ議論の残るレイノー症状に注目し、サーモグラフィーにより手指温度を定量的に測定する方法で解析をおこなった。ボセンタンを導入した患者連続 12 例のうち、レイノー症状を呈する 5 例の患者に冷水負荷試験後の手指温度をサーモグラフィーで測定した。ボセンタンは劇的な臨床効果を示し、治療 6 ヶ月後において 22.6 ± 1.9 28.8 ± 4.4 ($p=0.02$) と有意な上昇を示すことを明らかにした。これらの患者の治療前後では、G-CSF, MCP-1, VEGF, IL-16, IL-18, HGF などのサイトカインが有意な変化を示した。つまり、ボセンタンの多様な臨床効果は、サイトカインの発現に影響した結果である可能性が示唆された。しかし、この結果にはいくつかの考慮すべき点がある。

(1) サンプルサイズが小さいこと。(2) PAH の病態が改善した結果であり、PDE-5 阻害薬などでも同様の変化が起こる可能性があるということ。(3) 背景疾患である膠原病の活動性により、治療経過上、今回のような結果になった可能性、などが挙げられる。そこで、これらの問題を解決するために以下の解析を行うことを目的とする。

(a) ボセンタンと PDE-5 阻害薬タダラフィルとの比較試験を行い、レイノー症状の改善効果およびサイトカインの変化を比較検討する。

(b) 原発性 PAH 患者と膠原病性 PAH 患者のサイトカインプロファイルを比較し、肺高血圧の病態形成におけるサイトカイン-エンドセリンネットワークの関与を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 膠原病性 PAH 患者に合併するレイノー症状に対するボセンタンと PDE-5 阻害薬との前向き無作為比較試験。

大阪大学倫理委員会の承認を得た後に、ボセンタンとタダラフィルとの前向き無作為化オープンラベル比較臨床試験を行った。スクリーニング期間を経て、ブロック置換法で無作為に割り付け、レイノー症状の臨床評価、肺高血圧の臨床評価を行った。この際、血清、mRNA の採取も行った。ボセンタンは 62.5mg より内服を開始し、4 週後 125mg に増量する。タダラフィルは 20mg より開始し、問題なければ 40mg に増量する。12 週投与したところで、改めて臨床評価を行った

(1) 主要評価項目

(a) レイノー症状の臨床評価

(i) SF-36 を用いた QOL アンケート調査、

(ii) サーモグラフィーによる冷水負荷試験前後での手指温度

24 の室温中に、両手は被覆せず全身を 20 分間静置して、負荷前の手指温度としてサーモグラフィーで測定する。その後、4 の氷

水に両手を手関節まで 10 秒間浸し、冷水負荷。負荷直後から 5 分ごとと負荷後 20 分までの手指温度変化をサーモグラフィーで測定する。

(2)副次的評価項目 (a)肺高血圧の臨床評価 ()6 分間歩行テスト、()Borg scale、() WHO 機能分類、()心エコー、()BNP

(2) 原発性 PAH 患者と膠原病性 PAH 患者におけるサイトカインプロファイルの比較検討

国立病院機構岡山医療センター循環器内科松原広己氏に研究協力により、原発性 PAH 患者と膠原病性 PAH 患者のサイトカインプロファイルを比較し、臨床指標を加えた多変量解析を行った。国立病院機構岡山医療センターにおいても倫理委員会の承認を受けている。

評価方法としては、スクリーニング時期におこなった肺高血圧の臨床評価である ()6 分間歩行テスト、()Borg scale、()WHO 機能分類、()心エコー、()BNP に加えて、画像検査、血液性化学データなどの臨床データの蓄積に加えて、Bio-Plex を用いたサイトカイン網羅解析を行う。これらの項目とサイトカインのデータをあわせて、多変量解析を行い、PAH 病態形成に相関性の高いサイトカインを探索した。

OBio-Plex は、FACS の原理を応用した新しい測定機器であり、サイトカインを網羅的に、ELISA と同等以上の感度で、容易に測定することが可能である。以下のパネルを用いて測定を行った。

26-plex : 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, Eotaxin, basic-FGF, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, MCP-1, MIP-1, MIP-1 β , RANTES, PDGF, VEGF, TNF-

22-Plex : IL-1a, IL-2Ra, IL-3, IL-12(p40), IL-16, IL-18, CTACK, GRO-a, HGF, ICAM-1, IFN-a2, LIF, MCP-3, M-CSF, MIF, MIG, b-NGF, SCF, SCGF-1, SDF-1a, TNF- α , TRAIL

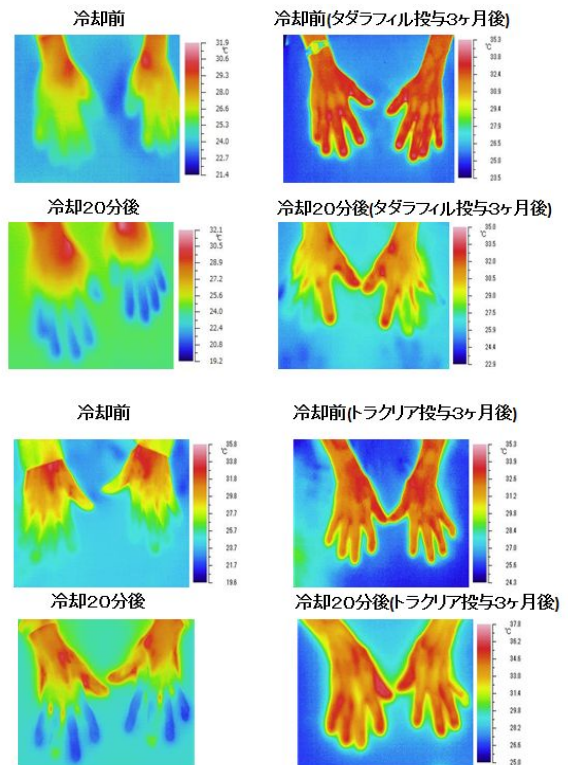
4. 研究成果

(1) 膠原病性 PAH 患者に合併するレイノー症状に対するボセンタンと PDE-5 阻害薬との前向き無作為比較試験。

合計 17 例がエントリーした。疾患背景は全身性強皮症 (SSc) 8 例、全身性エリテマトーデス (SLE) 5 例、混合性結合組織病 1 例、関節リウマチ 1 例、シェーグレン症候群 1 例、皮膚筋炎 1 例、男 3 例、女性 14 例。平均年齢 59.0 ± 15.0 歳。身長 158.5 ± 9.3 cm、体重 52.4 ± 9.1kg、BMI 19.5 ± 5.6。治療背景は、ステロイド内服例は 11/17 例、PSL 投与量 3.8 ± 4.2mg、生物製剤投与患者 2 例、免疫抑制剤 1 例であった。WHO 分類 II 17 例、Borg score 3.13 ± 1.67、BNP 34.4 ± 33.0pg/ml、6 分間歩行テスト 419.0 ± 51.5m、TRPG 23.3 ± 5.5mmHg であった。プロ

ック法による無作為割り付けにて、トラクリア投与群 9 例、アドシルカ投与群 8 例となった。そのうち、トラクリア投与群 2 例が脱落した。1 例は、トラクリア 125mg 増量後に肝機能障害が出現し中止となった。もう 1 例は、筋炎の増悪に伴い試験を中止した。アドシルカ投与群では、投与開始後、皮膚のかゆみが発生し、1 例中止となった。

冷水負荷テストの結果を示す。各群の著効例を図に示すように、両群ともに、有意に手指温度の上昇を認めた。冷却前右手平均温度 30.6 ± 2.83 32.1 ± 2.17 (paired-t 0.0028)、冷却前左手平均温度 30.1 ± 1.86 32.9 ± 0.95 (paired-t 0.0007)。詳細は表に示している。今回の結果では、トラクリア群、タダラフィル投与群間での手指温度上昇作用に有意差は認めなかった。



各投与群における手指温度の推移

		トラクリア投与群		p-value	タダラフィル投与群		p-value
		投与前	3か月後		投与前	3か月後	
右手 平均温度	冷水 負荷前	30.6 ± 2.83	32.1 ± 2.17	0.0054	30.1 ± 1.86	32.9 ± 0.95	0.0028
	5分後	27.5 ± 4.0	28.5 ± 2.55	0.001	26.6 ± 2.34	30.1 ± 1.61	0.0150
	20分後	28.9 ± 3.43	31.3 ± 4.10	0.0066	28.9 ± 3.42	32.9 ± 1.71	0.0369
左手 平均温度	冷水 負荷前	30.8 ± 2.67	32.6 ± 2.13	0.0026	29.8 ± 1.74	33.2 ± 0.74	0.0007
	5分後	27.6 ± 3.81	29.1 ± 2.88	0.0019	26.4 ± 2.11	30.3 ± 1.41	0.0124
	20分後	29.4 ± 4.34	31.5 ± 4.10	0.0098	28.4 ± 3.48	33.2 ± 1.79	0.0337

その他の評価項目では、QOL の尺度である SF-36 v 2 質問紙による検討の結果では、国民標準値に基づいた下位尺度得点で評価したところ、トラクリア投与群において、身体機能 (PF_N) 36.2 ± 16.8 42.3 ± 18.1 (p

=0.049, paired-t)、活力(V T_N)43.7 ± 12.4 53.9 ± 8.0 (p=0.033, paired-t)、心の健康 (M H_N) 45.5 ± 11.6 52.9 ± 11.1 (p =0.025, paired-t)が有意に改善を示した。また、アドシルカ投与群においても、心の健康 (M H_N) が、42.6 ± 10.7 47.8 ± 8.1 (p =0.025, paired-t)と有意に改善を示した。これらの薬剤が、身体機能のQOL改善を示すことは、当初から予想されたことであるが、活力や心の健康を改善することが示されたのは、初めての報告である。今後、循環動態と心の問題とのかかわりを検討していく必要があると思われる。

循環器系のパラメーターにおいては、アドシルカ投与群において Borg score 2.87 ± 1.88 2.0 ± 1.67 (p =0.0378, paired-t)、TRPG 23.0 ± 4.1 15.8 ± 3.48 (p =0.0472, paired-t)と有意な改善を示した。トラクリア投与群では、有意な改善は示されなかった。以下に各パラメーターを示す。

各投与群における循環器パラメーターの推移

	トラクリア投与群		p-value	タダラフィル投与群		p-value
	投与前	3か月後		投与前	3か月後	
BNP(pg/mL)	39.1 ± 41.7	48.1 ± 51.8	0.447	28.9 ± 20.9	28.1 ± 18.8	0.169
Borg	3.37 ± 1.51	3.14 ± 1.57	0.178	2.87 ± 1.88	2.0 ± 1.67	0.0378
6分間歩行(m)	421.6 ± 48.6	449.4 ± 52.6	0.057	416.0 ± 58.3	428.3 ± 61.8	0.270
TRPG(mmHg)	23.4 ± 6.7	20.0 ± 10.1	0.10	23.0 ± 4.1	15.8 ± 3.48	0.0472

(2) 原発性 PAH 患者と膠原病性 PAH とのサイトカインプロファイルを比較検討

対象は、大阪大学免疫アレルギー内科で診断された膠原病性肺高血圧症の患者 11 例 (S S c 6 例, 多発性筋炎 2 例, 関節リウマチ 2 例, SLE1 例、平均年齢 61.7 ± 8.4 才, 男/女: 1/9、) 国立病院機構岡山医療センター循環器内科の患者 14 例 (特発性肺高血圧症 (IPAH) 5 例, 慢性血栓性肺高血圧症 (CTEPH) 9 例, 平均年齢 53.2 ± 19.8 才, 男/女: 4/10)。患者背景を以下に示す。両群間の比較では、自覚的運動強度である Borg scale (2.0 ± 1.6 vs. 9.4 ± 5.8 p=0.0004 welch の検定) に有意差を認めしたが、6 分間歩行や各種呼吸機能では有意差を認めなかった。つまり、診察において、自覚症状を問診することは、重要であることが示された。

一方、循環パラメーターでは、BNP は有意差を認めず、心エコーにおいても、EF などの左心系のパラメーターは有意差を認めなかったが、P は明らかな有意差を認めた (29.6 ± 17.4 mmHg vs. 52.8 ± 20.2 mmHg p=0.0054 welch の検定)。右心カテテルの結果は、従来の報告通り、肺血管抵抗 (PVR) の値に著名な有意差を認めた (142.0 ± 72.8 vs. 981.5 ± 495.6 p < 0.0001)。

welch の検定)。つまり、患者の各種パラメーターの比較から、問診において、運動負荷における自覚症状を聞きだし、非侵襲的な方法として、心エコーを行い、ドップラーなどで、P の値を算出し、高い場合は積極的に、右心カテテルを行い、肺血管抵抗を算出するのが、臨床的に正確な診断を行う上で必要であることが示唆された。

サイトカインの網羅解析では、IL-7, Eotaxin, IL-12p40, IL-16, TRAIL, HGF, IFN- γ の発現に有意差を認めた。各臨床指標との相関性は、Borg scale は IFN- γ (R0.53, p=0.009), PCWP は MCP-1 (R0.60, p < 0.0001) と正相関、PVR は Eotaxin (R0.59, p=0.0213) と逆相関を示し、年齢、BMI で調整後も有意であった。6 分間歩行は %DLCO, mPA は P と相関を示した。年齢、HGF、SCGF を用いて、ロジスティック回帰分析したところ、膠原病性、IPAH、CTEPH の誤判別率が 4%(1/25) を示し (R0.797, p <

各患者群の循環パラメーター

	膠原病性	循環器系	p-value
LVDd(mm)	45.1 ± 3.42	43.5 ± 6.78	0.3926
LVDs(mm)	27.6 ± 2.97	28.0 ± 4.73	0.8196
EF (%)	68.8 ± 12.5	68.5 ± 7.88	0.9363
E/A	0.89 ± 0.45	1.06 ± 0.39	0.3608
Δ P (mmHg)	29.6 ± 17.4	52.8 ± 20.2	0.0054
BNP	107.2 ± 104.4	145.5 ± 281.8	0.657
RA mmHg	7.92 ± 4.66	6.66 ± 2.60	0.4153
RV mmHg	9.33 ± 1.41	86.5 ± 24.4	< 0.0001*
mPA mmHg	25.5 ± 6.6	52.6 ± 30.3	0.0002*
PCWP mmHg	15.0 ± 9.64	9.07 ± 2.46	0.1055*
CI	4.06 ± 1.31	2.70 ± 0.85	0.0168
PVR dyne*sec/cm ⁵	142.0 ± 72.8	981.5 ± 495.6	< 0.0001*

患者背景

	膠原病性	循環器系	p-value
身長 cm	155.9 ± 4.9	158.2 ± 6.9	0.3487
体重 kg	51.2 ± 10.1	49.4 ± 7.4	0.6210
BSA(m ²)	1.51 ± 0.14	1.47 ± 0.13	0.5101
6MW m	350.1 ± 137.1	357.5 ± 69.5	0.8829
SaO ₂ 安静時	96.1 ± 2.8%	97.4 ± 0.9%	0.210
SaO ₂ 6MW後	93.3 ± 4.8%	90.9 ± 3.7%	0.226
Borg scale	2.0 ± 1.6	9.4 ± 5.8	0.0004*
VC	2.34 ± 0.66	2.32 ± 0.64	0.9576
FEV1.0%	85.8 ± 7.8	79.5 ± 10.3	0.121
%VC	86.7 ± 24.8	87.6 ± 10.3	0.92
%DLCO	45.8 ± 20.6	50.9 ± 14.1	0.535

0.0001)、3 群の鑑別が、サイトカイン測定により可能であることが示唆された。

各患者群の血清中のサイトカイン濃度

pg/ml	膠原病性	循環器系	p-value
IL-7	5.69 ± 2.74	2.90 ± 1.39	0.0120
Eotaxin	163.4 ± 139.2	64.3 ± 55.1	0.0292
IL-12p40	13.2 ± 28.2	419.9 ± 682.3	0.0423
IL-16	153.8 ± 56.2	568.6 ± 646.7	0.0331
SCGF-b	36752.9 ± 19436.5	52107.8 ± 25993.1	0.0685
TRAIL	42.7 ± 44.6	142.2 ± 155.3	0.0315
HGF	533.7 ± 485.4	8392.9 ± 11187.8	0.0191
IFN- γ	23.6 ± 10.3	60.2 ± 52.7	0.0192

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

ロジスティック回帰分析による肺高血圧の診断予測

診断	分類	膠原病性の確率	GTEPHの確率	IPAHの確率	予測
SSc	1	0.9992	0.0008	0.0000	1
PM	1	0.9998	0.0001	0.0000	1
RA	1	0.6942	0.3058	0.0000	1
RA	1	0.7073	0.2927	0.0000	1
SLE	1	0.7746	0.2255	0.0000	1
SSc	1	0.9900	0.0100	0.0000	1
PM	1	0.9866	0.0134	0.0000	1
SSc	1	0.9877	0.0123	0.0000	1
SSc	1	0.8388	0.0000	0.1612	1
SSc	1	0.8275	0.1725	0.0000	1
SSc	1	0.9822	0.0002	0.0177	1
GTEPH	0	0.0000	1.0000	0.0000	0
GTEPH	0	0.0758	0.9242	0.0000	0
GTEPH	0	0.0000	0.9948	0.0052	0
GTEPH	0	0.0000	1.0000	0.0000	0
GTEPH	0	0.0000	1.0000	0.0000	0
GTEPH	0	0.0000	1.0000	0.0000	0
GTEPH	0	0.1090	0.6314	0.2596	0
GTEPH	0	0.9419	0.0581	0.0000	1
GTEPH	0	0.0000	1.0000	0.0000	0
IPAH	2	0.0815	0.0000	0.9185	2
IPAH	2	0.0000	0.0000	1.0000	2
IPAH	2	0.0040	0.3582	0.6378	2
IPAH	2	0.0000	0.0000	1.0000	2
IPAH	2	0.0000	0.0000	1.0000	2

	パラメーター数	自由度	カイニ乗	p値
年齢	2	2	23.4910323	<.0001
SCGF-b	2	2	9.006886409	0.0111
HGF	2	2	16.19870194	0.0003

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会
2012 年 4 月 28 日。グランドプリンスホテル
新高輪。Bio-plex cytokine array による肺
高血圧患者におけるサイトカインの病態意
義の解析

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 萩原圭祐 医学系研究科
(研究院)

研究者番号：60423183

(2)研究分担者 室田 浩之 医学系研究科
(研究院)

研究者番号：90363499

研究分担者 田中 敏郎 医学系研究科
(研究院)

研究者番号：40273651

(3)連携研究者 松原広己氏
()

研究者番号：なし