

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591559

研究課題名(和文) 非遺伝性周期性発熱症候群におけるバイオマーカーの検討と病態の解明

研究課題名(英文) Study of biomarker and pathophysiology in non-hereditary periodic fever syndrome

研究代表者

佐藤 哲司(SATO, Tetsuji)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：10389447

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)：PFAPA症候群発熱時に、非発熱時や正常対照、疾患対照と比較してCXCL10、ANKRD22、SERPING1、SLAMF8、GBP1のmRNA発現が亢進していた。炎症関連物質の定量ではPFAPA症候群発熱時に単球CD64の発現亢進を認めた。アデノウイルス感染症との比較では、単球由来のケモカインであるCXCL9の血清濃度が上昇していた。以上よりPFAPA症候群の病態に単球活性化の関与が推定されたため、単球性白血病由来細胞株THP-1を用いて、LPS添加の有無による遺伝子発現を比較した。その結果、CXCL10およびGBP1が、単球における自然免疫応答の主役を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Febrile period of PFAPA syndrome showed increased mRNA expression of CXCL10, ANKRD22, SERPING1, SLAMF8, GBP1 by microarray and quantitative RT-PCR, compared to non-febrile period of PFAPA syndrome, normal controls and disease controls. In quantification of inflammatory markers, CD64 expression on monocytes was increased in febrile period of PFAPA syndrome. Serum level of CXCL9, a monocyte-derived chemokine, was higher in febrile period of PFAPA syndrome than in adenovirus infection. As these findings suggested that activation of monocytes plays important role in the pathophysiology of PFAPA syndrome, in vitro assay using THP-1 cells, a monocytic leukemia cell line, was performed. Quantitative RT-PCR of THP-1 cells showed increased expression of CXCL10 and GBP1 after stimulation by LPS, suggesting that these molecules play pivotal role in innate immune response of monocytes in PFAPA syndrome.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児免疫・アレルギー・膠原病学 周期性発熱症候群

1. 研究開始当初の背景

PFAPA(periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and cervical adenitis)症候群は、アフタ性口内炎、頸部リンパ節炎、咽頭炎を伴う非遺伝性の周期性発熱疾患である。1989年にMarshallらにより新しい疾患概念として提唱され、その後国内外で相次いで症例報告が行われている。本邦における発症頻度は不明であるが、2006年までに本邦で約20例が報告されているにすぎなかった。しかし、近年になり認知が高まるとともに、多くの症例が報告されている。現時点では、病因、病態は不明であり、診断に有用なバイオマーカーも判明していない。診断手順はThomasらの報告した基準を用いるが、実際、他の発熱性疾患と鑑別することが容易ではなく、本症と診断がつかず、多くの例で不要な抗菌薬使用や入院が繰り返されているのが現状である。治療法としては、ステロイド、シメチジン、扁桃摘出術が行われているが特異的な治療法は確立していない。病因、病態、また治療法を推測する上で、本疾患におけるサイトカインをはじめとするバイオマーカーの推移が重要と考えられるものの、サイトカインを測定した報告は海外からの2報のみである。しかし、これらの報告では診断・病態の解明に有用なバイオマーカーの特定には至っていない。

2. 研究の目的

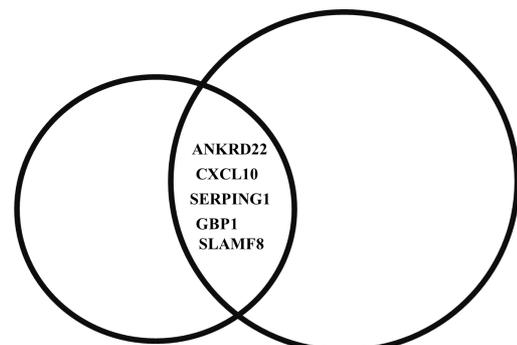
PFAPA症候群の発作時、非発作時、他の熱性疾患(敗血症、アデノウイルス感染症、全身型若年性特発性関節炎、川崎病、遺伝性周期性発熱症候群など)および正常対照におけるバイオマーカーの推移を比較検討し、本症に特異的なバイオマーカーを明らかにするとともに、本症の病態解明や診断精度の向上に役立たせる。

3. 研究の方法

- (1) PFAPA症候群の発熱時と非発熱時、他の熱性疾患、正常対照においてマイクロアレイ解析とそれに続くmRNAの定量を行ってPFAPA症候群で特異的に発現が亢進または低下している分子を網羅的に検索する。
- (2) PFAPA症候群の発熱時と非発熱時、他の熱性疾患、正常対照において血清中の各種サイトカイン・炎症関連物質をビーズアレイあるいはELISA法を用いて定量し、各群間で比較検討する。
- (3) (1)や(2)で同定した結果からPFAPA症候群の活性経路を推定する。その中心と考えられる系を細胞培養と薬剤添加にて類似環境を作成する。それについて(1)と同様の検討を行う。mRNAレベルで発現が亢進(もしくは低下)している物質があれば、蛋白レベルで濃度が上昇(もしくは低下)しているかを可能であれば確認する。
- (4) (1)-(3)のデータを解析し、PFAPA症候群の診断や病態解明に有用なバイオマーカーを同定する。

4. 研究成果

(1): 同一症例で、PFAPA症候群発熱発作時との非発熱発作時検体が両方とも収集できた3名のPFAPA患者と正常対照患者4名について、および疾患対照として全身性JIA2名の末梢血単核球からmRNAを抽出し、cDNAに変換した後、cDNA microarrayによる発現の比較を行った。その結果から、PFAPA症候群発熱発作時において健常群と比較して発現量が10倍より上昇している遺伝子群を抽出した。これらの遺伝子について、疾患対照群が健常群と比べて発現量が2倍以内であるものをピックアップした。(図1)



PFAPAで発現が亢進している 全身性JIAで亢進していない

図1 マイクロアレイでピックアップした遺伝子

PFAPA症候群発熱発作時において健常群と比較して発現量が10倍より上昇し、疾患対照群が健常群と比べて発現量が2倍以内であるもの。

ピックアップしたのは、CXCL10 (interferon gamma-induced Protein10, IP-10)、ANKRD22 (ankyrin repeat domain 22)、SERPING1 (serine peptidase inhibitor, clade G, member 1)、SLAMF8 (SLAM family member 8)、GBP1 (guanylate binding protein 1)の5つであった。

次に同一症例に限らず、PFAPA発熱発作時(11名)と、非発熱発作時(11名)、正常対照群(7名)、疾患対照群(敗血症1名、アデノウイルス感染症1名、川崎病1名、全身性JIA2名、家族性地中海熱発熱時1名、熱性けいれん重積1名)の検体を対象に、mRNAを抽出しcDNAに変換した後、定量PCR法を行い、比較した。その結果、発熱時、非発熱時、正常対照、全身性JIAでは前述のマイクロアレイと同様の結果になったが、敗血症の検体はいずれの項目でも上昇を認めており、全身感染症とPFAPA症候群とのバイオマーカーでの区別は困難であった。

(2): また、炎症関連物質の一つである好中球CD64および単球CD64発現(molecules/cell)をPFAPA症候群発熱期13名間欠期12名、正常対照9名、疾患対照11名(全身性JIA3名、敗血症2名、局所細菌感染症もしくはウイルス感染症5名)に対し

QuantiBRIGHT CD64PE/CD45PerCP および PE beads (Becton-Dickinson)を用いてフローサイトメーターにて定量した。(図2、図3)

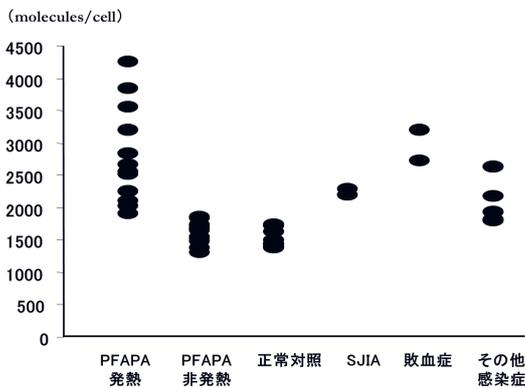


図2 単球でのCD64の発現
PFAPA発熱時は他の群に比べ発現の亢進が目立った。

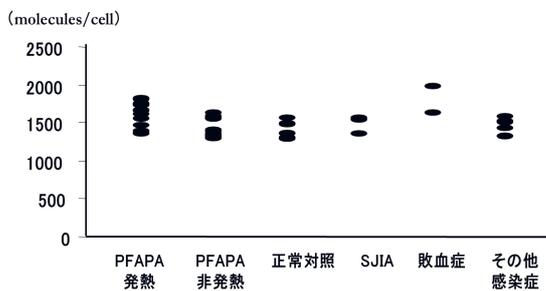


図3 好中球でのCD64の発現
PFAPA発熱時は他の群に比べ発現の亢進を認めたが、単球ほど著明ではなかった。

その結果、PFAPA発作時には単球の著しい活性の亢進を認めた。次に、疾患対象群からPFAPA症候群と、臨床徴候の類似点が多いと言われているアデノウイルス感染症との比較を行った。発熱期のPFAPA症候群患者19名とアデノウイルス感染症患者64名、正常対照14名における5種のケモカイン濃度(IL-8、CCL2、CCL5、CXCL9、CXCL10)をCytometric Bead Array Kit (Becton-Dickinson)を用いて測定し比較した。その結果CXCL9はPFAPA症候群発熱期のみアデノウイルス感染症および正常対照と比較して有意に高値であった。

(図4)

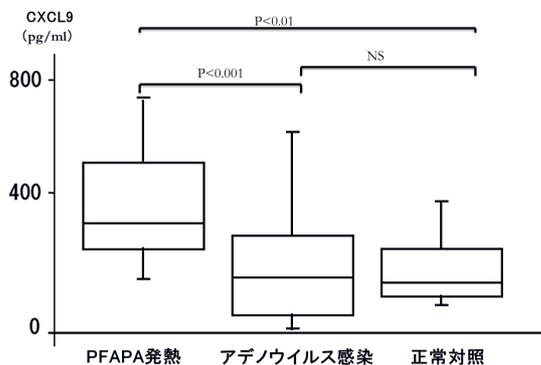


図4 CXCL9の血中濃度

PFAPA発熱群ではアデノウイルス感染群および正常対照群と比べて有意にCXCL9が上昇していた。

IL-8とCXCL10はPFAPA症候群発熱期、アデノウイルス感染症ともに正常対照と比較して有意に高値であった。CCL5はPFAPA症候群発熱期、アデノウイルス感染症ともに、正常対照と比較して有意に低値であった。CCL2は3群間で有意差はなかった。

PFAPA症候群発熱期とアデノウイルス感染症では類似したケモカインプロファイルを呈していたが、CXCL9のみ両者で異なっていた。CXCL9はIFN- γ の刺激により主に単球/マクロファージから産生されるケモカインであるので、IFN- γ をCytometric Bead Array Kit (Becton-Dickinson)を用い、単球CD64はQuantiBRIGHT CD64PE/CD45PerCPおよびPE beads (Becton-Dickinson)を用いて測定し、比較した。(図5、図6)

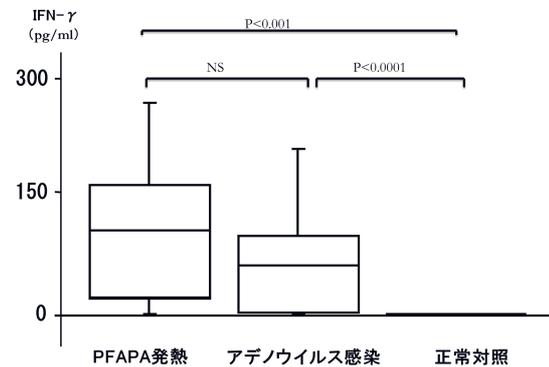


図5 IFN- γ の血中濃度
PFAPA発熱群は正常対照群よりはIFN- γ の濃度は高かったがアデノウイルス感染群とは有意な差は無かった。

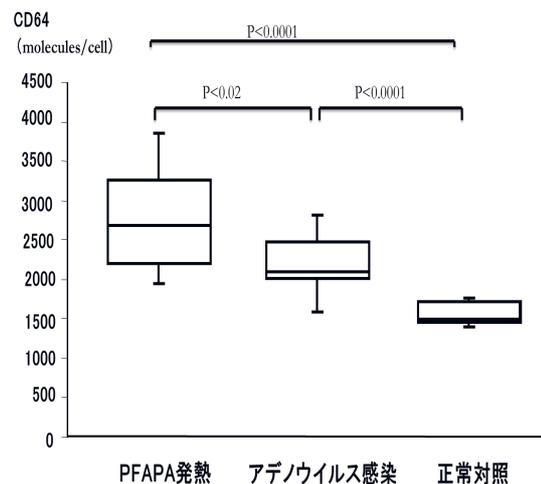


図6 単球でのCD64発現
PFAPA発熱群ではアデノウイルス感染群と正常対照群に比べて有意に単球CD64発現が亢進している。

CXCL9がPFAPA症候群でより高値である背景として、図5で示すようにIFN- γ 濃度には差がみられず、図6で示すように単球でのCD64

発現が有意に亢進していたことから、単球/マクロファージの活性化が本症候群の病態により深く関与していると考えられた。これら一連の実験の結果から PFAPA 症候群の発作時は単球系の活性化が強く示唆された。

(3) さらに PFAPA 発作時の単球の活性化を解析するため、単球性白血病由来細胞株 THP-1 を用いて in vitro で検討を行った。THP-1 細胞を lipopolysaccharide (LPS) で刺激することにより培養上清中の IL- γ 濃度の上昇がみられる系を、自然免疫応答を模した系としてとらえ、LPS 添加の有無による遺伝子発現の比較検討を行った。THP-1 細胞に LPS を添加し 24 時間後の細胞を回収した。その細胞から cDNA を抽出した。(1)の、マイクロアレイを出発点とした末梢血単核球の遺伝子発現の解析結果からは、CXCL10、ANKRD2、SERPING1、SLAMF8、GBP1 の発現が PFAPA 症候群の発熱期において上昇していたため、これらの遺伝子の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR にて定量した。その結果、CXCL10 および GBP1 では、LPS 添加により mRNA の発現が有意に亢進していた。

(図7、図8)

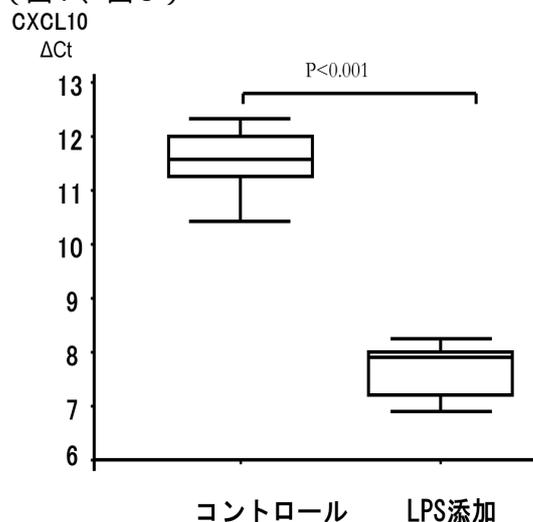


図7 CXCL10 の mRNA 発現量の比較
LPS 添加群ではコントロール群に比べ、有意に CXCL10 の mRNA 発現が亢進していた。

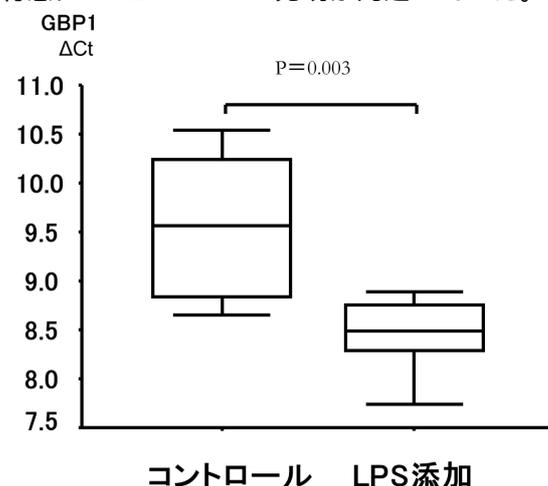


図8 GBP1 の mRNA 発現量の比較
LPS 添加群ではコントロール群に比べ、有意に GBP1 の mRNA 発現が亢進していた。

これに対して、SERPING1 では、LPS 添加によりコントロール群と比べて発現が有意に低下していた。(図9)

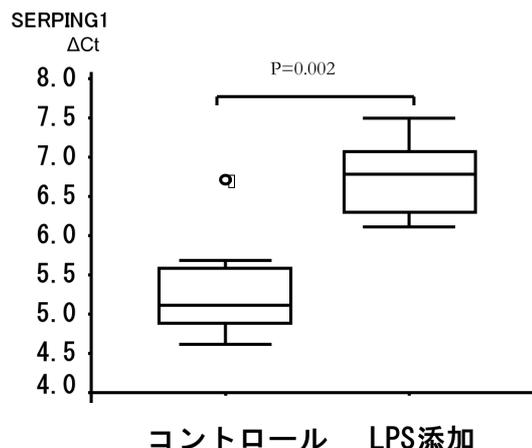


図9 SERPING1 の mRNA 発現量の比較
LPS 添加群ではコントロール群に比べ、有意に SERPING1 の mRNA 発現が低下していた。

ANKRD22 と SLAMF8 は LPS 添加群とコントロール群では発現に変化がみられなかった。これらの結果より、PFAPA 症候群患者の単球においては、インターフェロンで誘導される CXCL10 および GBP1 が自然免疫応答の主役を担っていることが示唆された。一方、SERPING1 は末梢血単核球の単球以外の主成分であるリンパ球において炎症発生に重要な役割を果たしていると考えられた。

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)

[雑誌論文](計 2 件)

Kusuhara K, Hoshina T, Saito M, Ishimura M, Inoue H, Horiuchi T, Sato T, Hara T. Successful treatment of a patient with tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome using a half-dose of etanercept. *Pediatric International* 2012 Aug;54:552-5.

Sato T, Kunishima S, Shirayama R, Ichikawa S, Sakai M, Kusuhara K. Bernard-Soulier syndrome due to compound heterozygosity for a novel

glycoprotein Ibβ mutation. Acta

Haematologica 2014;131:46-9.

〔学会発表〕(計 3 件)

石井雅宏、佐藤薫、市川俊、小川将人、
坂本亘司、楠原浩一 PFAPA症候群とアデ
ノウイルス感染症におけるケモカインプ
ロファイルの比較 第44回日本小児感染
症学会2012年11月24日～2012年11月25日
北九州国際会議場(北九州)

石井雅宏、佐藤薫、楠原浩一、他 2 名
PFAPA 症候群における単球および好中球
の CD64 分類 日本小児感染症学会
2011年10月30日 岡山コンベンション
センター(岡山)

楠原浩一 自己炎症性疾患の基礎と臨床
(PFAPA 症候群) 日本小児科学会 2013
年4月19日～21日 リーガロイヤル広
島(広島)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

佐藤哲司(SATO Tetsuji)
産業医科大学医学部助教
研究者番号：10389447

(2) 研究分担者

楠原浩一(KUSUHARA Koichi)
産業医科大学医学部教授
研究者番号：20243941

佐藤 薫(SATO Kaoru)
産業医科大学医学部助教
研究者番号：70596733

(3) 連携研究者

()

研究者番号：