

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860811

研究課題名(和文)成人スチル病の病態発現におけるToll様受容体の研究

研究課題名(英文)Expression of Toll-like receptors in adult onset Still's disease

研究代表者

末松 梨絵 (Suematsu, Rie)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：80632322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：Toll様受容体(TLR)は病原微生物由来の成分が合するとシグナル伝達系を活性化し炎症反応を惹起するレセプターであり様々な自己免疫疾患との関連が研究されている。今回我々は成人スチル病(AOSD)におけるTLRの活性化について検討した。活動期AOSD患者末梢血中の可溶性TLRを測定するとsTLR2、5、9の有意な上昇を認め、それらは疾患活動性と相関を示した。次にリアルタイムPCR法にて末梢血細胞におけるTLRの発現を測定すると患者群では有意にTLR5の発現亢進を認めた。両測定系で上昇を認めたのはTLR5のみであり、AOSDの病態形成に最も重要なTLRと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Adult-onset Still's disease (AOSD) is a systemic inflammatory disease of uncertain etiology. It is suggested that some kind of infection participate in the onset of AOSD. Toll-like receptors (TLRs) are a family of receptors that recognizes microbial-associated molecular patterns from diverse organisms. We analyzed the activation of TLRs in AOSD patients. First, we measured soluble TLRs (sTLRs) levels in the sera from 10 patients with active AOSD and 10 controls, and found that sTLR2, 5, and 9 levels were increased in AOSD group. sTLR2 values correlated with ferritin and LDH; sTLR5 values correlated with ferritin, LDH and soluble IL-2 receptor levels in AOSD. Second, we examined the expressions of TLR mRNA in the peripheral blood cells by real-time PCR in 7 AOSD patients and 4 controls. Only TLR5 mRNA levels were significantly higher in AOSD. From these experiments, TLR5 is upregulated in AOSD and it is suggested that TLR5 may be the most important TLR in the development of AOSD.

研究分野：内科系臨床医学

キーワード：成人スチル病 Toll様受容体

#### 1. 研究開始当初の背景

成人スチル病は高熱、多関節痛、皮疹、リンパ節腫脹や肝障害などを来す全身性炎症性疾患であり、不明熱の重要な鑑別疾患の一つである(Ohta A et al. J Rheumatol 1990)。以前より当教室では成人スチル病の研究を行っており、現在世界的に使用されている診断基準を作成も行った(Yamaguchi M et al. J Rheumatol 1992)。治療はステロイドホルモンが中心になるが、確立された治療ガイドラインは存在していない。しばしばステロイド抵抗性、難治性のものが存在し免疫抑制剤などが使用されるが、我々はこれまでシクロスポリンの有効性や (Mitamura M et al. Mod Rheumatol 2009)、生物学的製剤、特に抗 IL-6 抗体であるトシリズマブの有効性を報告してきた (Suematsu R et al. Mod Rheumatol 2012)。

病因に関する研究はこれまでもなされているが未だ不明な点が多く、何らかの感染性因子 (ウイルス感染、細菌感染) や環境因子 (予防接種や妊娠出産) が発症の引き金となると考えられている。それらの刺激により宿主の T リンパ球とマクロファージが活性化され TNF、IL-1、IL-6、IL-18 などの炎症性サイトカインが産生され発熱、白血球増多、CRP などの急性期炎症性蛋白産生を促進すると考えられている。本疾患の活動期の患者の血清 IL-6 や IL-18 のレベルは上昇しており疾患活動性と相関する。また本疾患の重篤な合併症の一つとしてマクロファージ活性化症候群 (MAS) がある。マクロファージの活性化や高サイトカイン血症が持続、進行しサイトカインストームと呼ばれる状態に至ったもので汎血球減少 (骨髄抑制) DIC、血球貪食、フェリチンの著増、重篤な肝障害などの臨床像を呈し時に致命的となる (大田明英. 臨床と研究 2010)。Toll 様受容体 (Toll-like receptor TLR) は 1 型の膜蛋白質でヒト

では 10 種類、マウスでは 13 種類のファミリー分子からなり、病原微生物由来の成分が結合し樹状細胞やマクロファージなどに活性化シグナルを伝える作用を有する (Akira S. Cell 2006)。最近、マウスにおいて TLR9 のリガンドを繰り返し投与することでマクロファージ活性化症候群と同様の病態が出現したとの報告がなされた (Edward M. J Clin Invest 2011)。前述のようにこれまでも感染症が成人スチル病の発症要因として考えられてきたが、この報告からも病原性微生物のレセプターである TLR を介した活性化が成人スチル病やサイトカインストーム、すなわち MAS の発症に関与していることが想定される。これまで SLE などにおける TLR の研究報告はいくつかなされており、我々も感染症における TLR4 の発現亢進を報告している (Haruta et al. Scand J Infect Dis 2007)。成人スチル病に関しては未だ報告はない。そこで今回我々は成人スチル病患者における TLR および TLR を介したシグナル系の活性化について研究を行い、MAS と類似の病態である成人スチル病の発症要因の一端を明らかにすることを目指す。これにより成人スチル病や MAS に対する有効な治療法の開発となる可能性があると考えた。

## 2. 研究の目的

成人スチル病患者の血清 TLR の発現を測定しその活性化と病態との関わりについて明らかにすること。

## 3. 研究の方法

活動期 AOSD 患者 10 例と健常コントロール 10 例において血清中の可溶性 TLR (sTLR)(sTLR-2、3、4、5、7、9) を ELISA で測定し比較した。また AOSD 患者の疾患活動性と sTLR との相関関係を検討した。次に活動期 AOSD 患者 7 名と健常コントロール 4 名で患者群では治療介入前に RNA 保存用真空採血管にて採血を施行。RNA を抽出しリアルタイム PCR 法により TLR の発現レベルを測定した。内因性コントロールとして アクチンを用いた。患者群ではさらに生化学、免疫学的検査データを収集し、sTLR や TLR 発現量との比較を行った。

## 4. 研究成果

まず sTLR の検討においては AOSD 患者では健常コントロールと比べて sTLR 2、5、9 の有意な上昇を認めた。一方 RNA レセプターである TLR 3 や 7 の上昇は認められなかった。TLR 2 とフェリチン及び LDH、また TLR 5 とフェリチン、LDH、可溶性 IL-2R との間には相関関係を認めた。また統計上の有意差は認めなかったが MAS を起こした症例では、TLR 2、5、9 が高い傾向が認められた。免疫抑制剤の併用を要した重症群では TLR 2 の上昇が認められた。次に RNA の発現に関しては患者群ではコントロール群と比べ TLR 5 の発現が有意に上昇していた。(患者群 ; 0.2355, コントロール群; 0.082,  $p=0.05$ ). また疾患活動性を表す各種臨床パラメーターと TLR 5 との相関を調べると、プロカルシトニン値、可溶性 IL2 レセプターとの間に中等度の相関を認めた (プロカルシトニン ;  $r=0.618$ , 可溶性 IL2 レセプター ;  $r=0.607$ ). また臨床所見に於いては表在リンパ節腫脹

を認めない群においてリンパ節腫脹を認める群より有意に TLR 5 の上昇を認めた (リンパ節腫脹なし ; 0.4242、リンパ節腫脹あり ; 0.156  $p=0.0059$ )

今回の 2 つの測定系において共通して上昇が認められたのは TLR 5 のみであり、本疾患において最も注目すべき TLR は TLR 5 であろうと考えられた。TLR 5 は微生物由来成分のフラジェリンと結合することが示されている。今回の結果より成人スチル病の病態形成において鞭毛を有する微生物の関与が示唆された。

## 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 1 件)

末松梨絵、多田芳史. 成人スチル病における生物学的製剤治療 九州リウマチ 2015; 35: 7-10.(査読なし)

〔学会発表〕(計 1 件)

末松梨絵、永尾奈津美、田代知子、他. 成人スチル病における可溶性 Toll 様受容体についての検討. 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2013.4.18-21. (京都府)

〔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 :  
出願年月日 :  
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

末松梨絵 (SUEMATSU Rie)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：80632322

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：