

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860868

研究課題名(和文)壊死性リンパ節炎の非侵襲的早期診断法の開発

研究課題名(英文)An early and non-invasive diagnosis of histiocytic necrotizing lymphadenitis

研究代表者

石村 匡崇 (Masataka, Ishimura)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10448417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：亜急性壊死性リンパ節炎(菊池病)は、原因不明の自己炎症性疾患であるが、しばしば悪性リンパ腫などの鑑別が必要となる。これまでのところ臨床症状に加え、格的診断のためにはリンパ節生検を行い、病理学的検討を行うことが唯一診断方法であった。私達は一般採血から得られる末梢血単核球の遺伝子発現プロファイルを解析し、統計解析手法を組みわせることにより診断する方法を確立した。本方法により手術を行うことなく非侵襲的に診断を行うことが可能となった。

研究成果の概要(英文)：Histiocytic necrotizing lymphadenitis (HNL), also called Kikuchi-Fujimoto disease, is a benign, self-limiting inflammatory disease with fever and painful cervical lymphadenopathy of unknown etiology. A lymph node biopsy is required for the definitive diagnosis because of no specific symptoms or laboratory findings for HNL. We investigated genes specifically expressed in the patients by analyzing whole transcriptome using microarray analysis of peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The expression levels of the up-regulated genes by microarray were verified by quantitative PCR. The discriminant analysis using the expression levels of these five genes distinguished HNL with 84% accuracy. An analysis of the gene expression profile of PBMC may provide a rapid non-invasive diagnosis.

研究分野：血液・免疫

キーワード：組織球性壊死性リンパ節炎 菊池病 早期診断 インターフェロン インターフェロン誘導遺伝子

1. 研究開始当初の背景

壊死性リンパ節炎 (HNL、菊池病とも呼ばれる) は発熱、有痛性頸部リンパ節腫脹を主徴とし、自然経過で軽快する良性炎症性疾患であるが、その病因は不明である。一部の重篤な HNL では時として血球貪食症候群を発症し、また遷延する発熱に対して免疫抑制療法を必要とすることがある。HNL に特徴的な症状や特異的検査がなく、悪性疾患との鑑別のためにはリンパ節生検が必要である。組織学的評価では、リンパ節では傍皮質領域で多くの核崩壊像を伴う凝固壊死像を認め、組織球と形質細胞様樹状細胞(pDC)、リンパ球で占められ好中球や形質細胞はほとんど見られない。組織学的評価では、組織球は MPO や CD68 が陽性で、リンパ球は主として CD8 陽性 CTL である。発症早期には組織球や pDC が主として見られ、HNL の病態に関与していると考えられており、アポトーシスやネクローシスにはパーフォリンや Fas 経路が重要であると考えられている。HNL の一部ではウイルス感染や SLE などの自己免疫疾患との関連が報告されており、血清の IFN γ や IL6、2' 5' AS の上昇がみられることも、HNL の病態として、ウイルスや自己抗原に反応して全身性の免疫反応が惹起されていることを示唆する所見である。

2. 研究の目的

HNL の非侵襲的な早期診断法を確立するため、末梢血単核球の遺伝子発現 profile を解析し、判別分析を行う

3. 研究の方法

[対象] 24 例の HNL 例を解析対象とした。検体はステロイドや免疫抑制剤が投与されていない状況で採取した。93 例の疾患対照、34 例の正常対照が本研究に加わった。HNL 9 例、反応性リンパ節腫脹 4 例のリンパ節検体を福岡大学病理学教室より提供して頂いた。血清は HNL12 例、川崎病 5 例、伝染性単核症 4 例、化膿性リンパ節炎 5 例を解析した。また、九州大学倫理委員会に承認された方法に基づき、全ての研究参加者に同意を得た。

[方法] 末梢血単核球は比重遠心法により分離し、RNA を抽出し cDNA を合成した。リンパ節も同様に RNA を抽出した。マイクロアレイによる遺伝子発現解析では、HNL2 例と、全身型 JIA5 例、川崎病 3 例、1 例の正常対照で比較検討し、HNL で 2 倍以上の発現上昇が見られた遺伝子を選択した。定量 PCR により遺伝子発現解析を行い、ACTB を対照として比較 Ct 法を用いた。血清 CXCL10 は Beads array kit を用いて解析した。

[統計解析] 統計解析ソフトウェア JMP を用いて統計解析を行った。定量 PCR で得られたデータは対数正規性を認めたため、対数変換を行って解析した。相関係数は Pearson 法を

用いた。遺伝子発現、血清 CXCL10 の群間比較には Dunnett 検定を用い、CXCL10 の経時的比較にはペア t 検定を用いた。判別分析には対数変換した遺伝子発現量を用い、stepwise 法によりモデルを決定した。

4. 研究成果

末梢血単核球のマイクロアレイでは、HNL 患者において 137 遺伝子で 2 倍以上の発現上昇が見られた。上位 10 遺伝子のうち、9 遺伝子が IFN 誘導遺伝子 (ISGs) であった (表 1)。

遺伝子名	Synonyms	Fold difference between Healthy control		
		HNL (n=2)	SoJIA (n=5)	KD (n=3)
interferon-induced protein 44-like	IFI44L	12.99	3.32	0.39
chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	12.04	2.21	0.56
guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	GBP1	8.30	2.51	1.12
epithelial stromal interaction 1 (breast)	EPSTI1	7.10	3.01	1.05
interferon, alpha-inducible protein 27	IFI27	6.90	2.14	1.05
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	TNFSF10	6.36	2.84	1.87
immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides	IGJ	6.26	2.08	2.29
interferon-induced protein 44	IFI44	5.59	1.97	0.96
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	IFIT3	5.29	2.31	0.40
proteasome (prosome, macropain) activator subunit 2 (PA28 beta)	PSME2	4.87	2.32	0.85

表 1. マイクロアレイにおいて HNL 患者末梢血単核球で発現が上昇していた上位 10 遺伝子

更に上位 5 遺伝子 (IFI44L, CXCL10, GBP1, EPSTI1, IFI27) について定量 PCR により解析した。5 遺伝子は正常対照と比べ著明な発現上昇がみられたが、HNL に特異的ではなくウイルス感染や SLE でも発現上昇が見られていた (図 1)。これらの 5 遺伝子の発現レベルは各遺伝子間で正の相関を認めており ($r^2=0.28-0.60$)、I 型 IFN 刺激での共通の発現誘導が示唆された。

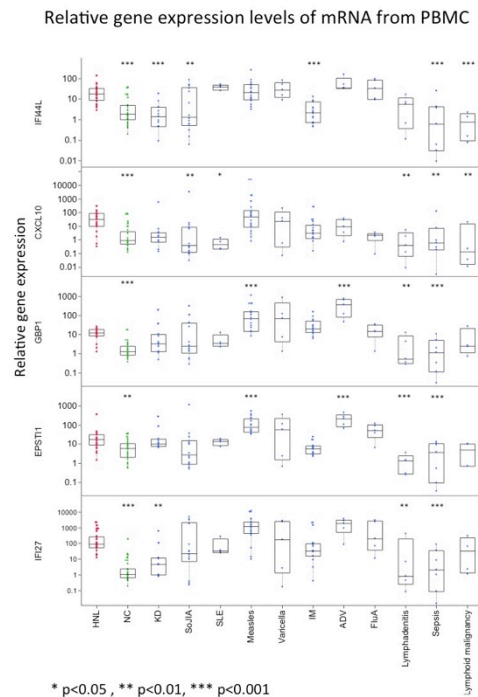


図 1. 定量 PCR による遺伝子発現比較

HNL 患者リンパ節での解析でも同様に発現が上昇していた(図 2)。

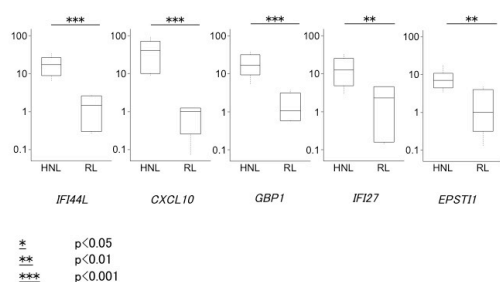


図 2. 頸部リンパ節での遺伝子発現 (反応性リンパ節腫脹との比較)

血清の CXCL10 の解析では、HNL 例では回復期に比べ急性期に上昇が見られているが、他疾患でも上昇が見られ、有意差は認めなかった。

遺伝子発現 profile を用いて HNL の診断法を確立することを目的とし、対数変換した 5 遺伝子の発現量を用いて正準判別分析を行った。対照を 3 群に分けて判別したところ、84.2%の正確性をもって判別しえた。HNL の AUC は 0.975 であった。正準判別分析に用いたスコアは以下の通りである(図 3)。

$$\text{Canonical 1} = -0.1947 \times \text{IFI44L} - 0.2058 \text{CXCL10} + 0.4870 \text{GBP1} - 0.1620 \text{EPST11} + 0.2197 \text{IFI27},$$

$$\text{Canonical 2} = 0.2485 \text{IFI44L} + 0.2488 \text{CXCL10} - 0.2387 \text{GBP1} - 0.2802 \text{EPST11} + 0.1598 \text{IFI27}$$

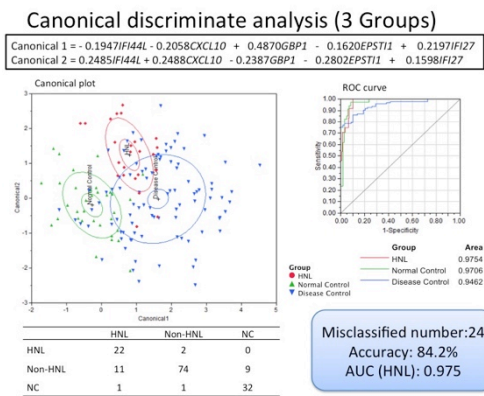


図 3. 3 群での正準判別分析

HNL 群と疾患群の 2 群での判別分析モデルでは、上位 3 遺伝子 (IFI44L, CXCL10, GBP1) がパラメータとして選択され、3 群間比較モデルと同等の検出力で、正確性は 82.2%で、AUC は 0.942 であった。判別分析に用いたスコアは以下の通りである(図 4)。

$$\text{Canonical 1} = -0.2632 \text{IFI44L} - 0.3061 \text{CXCL10} + 0.5101 \text{GBP1}$$

Canonical discriminant analysis (2 Groups)

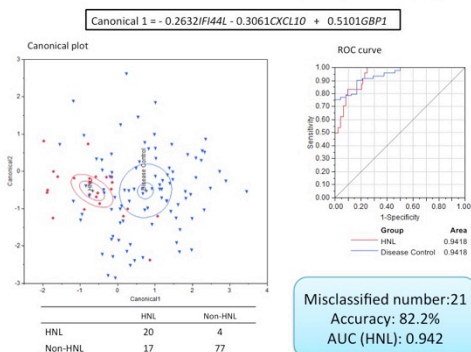


図 4. 2 群での正準判別分析

考察

本研究では、HNL 患者においてリンパ節同様末梢血単核球でも IFN 誘導遺伝子発現の上昇が観察された。これらの遺伝子発現 profile が判別分析法により HNL に特異的であると考えられた。I 型 IFN は、ウイルスの侵入に対して宿主防御ために反応する。この防御における細胞要素が IFN 誘導遺伝子産物である。HNL のリンパ節は主として pDC や組織球、T リンパ球で成り立っており、pDC は主要な I 型 IFN 産生細胞のひとつとして知られる。HNL リンパ節では CXCL10 や IL18 が組織球に発現し、CXCR3 や IFN- γ が T リンパ球に発現しており、このサイトカイン、ケモカイン経路が HNL の病態生理において重要であると考えられている。本研究で CXCL10 が血清で上昇していたが、血清 IFN- γ や IL6 の上昇が報告されており、HNL が全身性炎症性疾患であることを示唆し、末梢血単核球の遺伝子発現 profile にも影響していると考えられる。HNL では pDC が IFN 誘導遺伝子発現に影響する主要な I 型 IFN 産生細胞であると考えられる。一方で、本解析では IFN 遺伝子自体の遺伝子発現上昇は認めず、これは末梢血単核球において pDC の数自体は少数であることが影響していると推察される。

臨床では悪性リンパ腫と白血病が最も重要な鑑別疾患であるが、本解析では判別が可能であった。一方で、SLE ではこれらの IFN 誘導遺伝子発現が上昇しているとの報告があり、本解析でも同様の結果であった。HNL と SLE は I 型 IFN により惹起される類縁疾患であるかもしれない。

IFN 誘導遺伝子は抗ウイルス活性を持ち、ウイルスにより発現する遺伝子が異なってくると報告されている。HNL 患者で同等に 5 遺伝子の高発現がみられることは、HNL では何らかのウイルス感染や自己抗原に反応していることを示唆する所見であると考えられる。これを解析することにより、HNL の非侵襲的な早期診断法へつながることが期待される。

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)

1. Ishimura M, Yamamoto H, Mizuno Y, Takada H, Goto M, Doi T, Hoshina T, Ohga S, Ohshima K, Hara T.

A non-invasive diagnosis of histiocytic necrotizing lymphadenitis by means of gene expression profile analysis of peripheral blood mononuclear cells.

J Clin Immunol. 33:1018-26, 2013 査読あり

2. Doi T, Ohga S, Ishimura M, Takada H, Ishii K, Ihara K, Nagai H, Hara T.

Long-term liposteroid therapy for idiopathic pulmonary hemosiderosis.

Eur J Pediatr. 172:1475-81, 2013 査読あり

3. Ohga S, Kang D, Kinjo T, Ochiai M, Doi T, Ishimura M, Kayamori Y, Urata M, Yamamoto J, Suenobu SI, Kanegane H, Ikenoue T, Shirahata A, Hara T.

Paediatric presentation and outcome of congenital protein C deficiency in Japan.

Haemophilia. 19:378-84, 2013 査読あり

4. Higuchi Y, Shimizu J, Hatanaka M, Kitano E, Kitamura H, Takada H, Ishimura M, Hara T, Ohara O, Asagoe K, Kubo T.

The identification of a novel splicing mutation in C1qB in a Japanese family with C1q deficiency: a case report.

Pediatr Rheumatol Online J.; 11:41, 2013 査読あり

5. Yamamura K, Takada H, Uike K, Nakashima Y, Hirata Y, Nagata H, Takimoto T, Ishimura M, Morihana E, Ohga S, Hara T.

Early progression of atherosclerosis in children with chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome.

Rheumatology(Oxford).

2014 Oct;53(10):1783-7. 査読あり

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1. Hara T., Ishimura M, Yamamoto H, Mizuno Y., Takada H., Ohshima K.

A Non-invasive Diagnosis of Histiocytic Necrotizing Lymphadenitis

Frontiers in Immunology Research 2013 International Conference, Monte Carlo, Monaco, July 1-4, 2013

2. Ishimura M, Mizuno Y., Takada H., Ohga S., Hara T. :

An Early and Non-invasive Diagnostic

Method for Histiocytic Necrotizing Lymphadenitis

FISP/M, Aug 30, 2014, Fukuoka, Japan

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石村 匡崇 (ISHIMURA, Masataka)

九州大学・大学院医学研究院成長発達医学分

野・助教

研究者番号 : 10448417