

表 1 本邦ブラウ症候群/若年発症サルコイドーシス症例の NOD2 遺伝子型

変異	症例数	%
p.Arg334Trp	12	37.5
p.Arg587Cys	6	18.8
p.Arg334Gln	4	12.5
p.Glu383Gly	2	6.3
p.Asp382Glu	1	3.1
p.Gly481Asp	1	3.1
p.Cys495Tyr	1	3.1
p.His496Leu	1	3.1
p.Met513Thr	1	3.1
p.Thr605Pro	1	3.1
p.Asn670Lys	1	3.1
p.Glu498Val, 499-500del	1	3.1
計	32	100

### C. 研究結果

21 症例中、2 例に遺伝子変異を認め、p.Arg587Cys、p.Arg334Trpそれぞれ 1 例ずつ同定した。いずれも *in vitro* の 293T 細胞での強制発現系において、NF- $\kappa$ B の活性化が確認されており、これまで同定されたいずれの変異も *in vitro* の 293T 細胞での強制発現系において、NF- $\kappa$ B の活性化を確認できた。

今回 2 症例を加え、本研究で得られた変異のまとめをしめすと、p.Arg334Trp 12 例、p.Arg587Cys 6 例、p.Arg334Gln 4 例、p.Glu383Gly 2 例、p.Asp382Glu、p.Gly481Asp、p.Cys495Tyr、p.His496Leu、p.Met513Thr、p.Thr605Pro、p.Asn670Lys、6 塩基欠失変異 (p.Glu498Val, 499-500del) はいずれも 1 症例ずつであった。(表 1)。

### D. 考察

本邦における遺伝子変異の検討では、p.Arg334Trp が最多で 37.5%、p.Arg587Cys が 18.8% で 2 つの変異でほぼ 50% をしめた。その後、p.Arg334Gln が 12.5%、p.Glu383Gly 6.3% と続き、他はそれぞれ 1 例のみであった。

International registry においては p.Arg334Trp、p.Arg334Gln がいずれも 40% を占めており、本邦においては p.Arg334Gln 変異が少なく、1 例報告である変異が多数存在する傾向は昨年同様みられた。

疾患特異的 NOD2 変異の性質として、リガンド非依存性 NF- $\kappa$ B 活性化能増加が重要であることは今年度終了時点でも例外なく、再確認されている。本指標は新規変異を持つ患者診断に重要である。さらに症例によって例外なく認められる事実であることは、病態・発症機序を考える上で大変重要な知見であると考えられた。

### E. 結論

NOD2 変異を同定できたブラウ症候群/若年発症サルコイドーシス本邦 32 症例における NOD2 遺伝子型を集計した。疾患特異的 NOD2 変異の性質として、リガンド非依存性 NF- $\kappa$ B 活性化能増加が重要であることが再確認された。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Yokota S, Nishikomori R, Takada H, Kikuchi M, Nozawa T, Kanetaka T, Kizawa T, Miyamae T, Mori M, Heike T, Hara T, Imagawa T. Guidance on the use of canakinumab in patients with cryopyrin-associated periodic syndrome in Japan. *Mod Rheumatol.* (in press)
2. Tanaka T, Takahashi K, Yamane M, Tomida S, Nakamura S, Oshima K, Niwa A, Nishikomori R, Kambe N, Hara H, Mitsuyama M, Morone N, Heuser JE, Yamamoto T, Watanabe A, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Asaka I, Heike T, Yamanaka S, Nakahata T, Saito MK. Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. *Blood*, 2012; 120: 1299-308.

3. Shinar Y, Obici L, Aksentijevich I, Bennetts B, Austrup F, Ceccherini I, Costa JM, De Leener A, Gattorno M, Kania U, Kone-Paut I, Lezer S, Livneh A, Moix I, Nishikomori R, Ozen S, Phylactou L, Risom L, Rowczenio D, Sarkisian T, van Gijn ME, Witsch-Baumgartner M, Morris M, Hoffman HM, Touitou I, N. European Molecular Genetics Quality. Guidelines for the genetic diagnosis of hereditary recurrent fevers. *Ann Rheum Dis*. 2012; 71: 1599-605.
  4. Izawa K, Hijikata A, Tanaka N, Kawai T, Saito MK, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, Yasumi T, Nakahata T, Heike T, Nishikomori R, Ohara O. Detection of base substitution-type somatic mosaicism of the NLRP3 gene with >99.9% statistical confidence by massively parallel sequencing. *DNA Res*. 2012; 19: 143-52.
  5. Aoyama K, Amano H, Takaoka Y, Nishikomori R, Ishikawa O. Cryopyrin-associated periodic syndrome: a case report and review of the Japanese literature. *Acta Derm Venereol*, 2012; 92: 395-8.
  6. Ohnishi H, Teramoto T, Iwata H, Kato Z, Kimura T, Kubota K, Nishikomori R, Kaneko H, Seishima M, Kondo N. Characterization of NLRP3 variants in Japanese cryopyrin-associated periodic syndrome patients. *J Clin Immunol*. 2012; 32: 221-9.
  7. Mizuno T, Sakai H, Nishikomori R, Oshima K, Ohara O, Hata I, Shigematsu Y, Ishige T, Tamura K, Arakawa H. Novel mutations of MVK gene in Japanese family members affected with hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Rheumatol Int*. 2012; 32: 3761-4.
2. 井澤 和司, 土方 敦司, 西小森 隆太, 小原 収, 齋藤 潤, 吉岡 耕平, 堀 雅之, 日衛嶋 栄太郎, 中川 権史, 小田 紘嗣, 阿部 純也, 河合 朋樹, 八角 高裕, 中畑 龍俊, 平家 俊男, 武井 修治, 河合 利尚. NLRP3体細胞モザイクを認めたMuckle-Wells症候群の2例 (第115回日本小児科学会, 4月20-22日, 2012, 福岡)
  3. 西小森 隆太. わかりにくい免疫疾患をわかりやすく 自己炎症疾患を疑ったときに考えること 鑑別診断のポイントを中心にして (第49回日本小児アレルギー学会, 9月15-16日, 2012, 大阪)
  4. 吉岡 耕平, 西小森 隆太, 日衛嶋 栄太郎, 阿部 純也, 酒井 秀政, 高岡 優貴, 井澤 和司, 河合 朋樹, 八角 高裕, 平家 俊男. 高IgD症候群に対してアナキンを使用した一例 (第40回日本臨床免疫学会, 9月27-28日, 2012, 東京)
  5. 西小森 隆太, 井澤 和司, 河合 朋樹, 八角 高裕, 平家 俊男. 感染症, 免疫不全・免疫異常症 Cryopyrin-associated periodic syndrome の治療 本邦における canakinumab 臨床試験及びアナキン疫学調査について (第40回日本臨床免疫学会, 9月27-28日, 2012, 東京)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 2. 学会発表

### 国内学会

1. 中澤 裕美子, 澤 新一郎, 河合 利尚, 西小森 隆太, 小野寺 雅史. 周期性発熱を認めなかったクリオリピン関連周期性発熱症候群 (第115回日本小児科学会, 4月20-22日, 2012, 福岡)

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

NOD2 変異に関連した全身性炎症性肉芽腫性疾患（ブラウ症候群/  
若年発症サルコイドーシス）の診療基盤推進に関する研究

### 分担研究報告書 3

ブラウ症候群/若年発症サルコイドーシスに対する治療評価  
—生物学的製剤による治療—

研究分担者 武井 修治 鹿児島大学医学部保健学科 教授

#### 研究要旨

当科で生物学的製剤(Bio 製剤)による治療を継続して行った Blau/EOS の 6 例 (男 3 例, 女 3 例) を対象に, その有効性を検討した。発症年齢は平均 2.4 歳で, Bio 製剤導入時の罹病期間は平均 9.4 年, Bio 製剤による治療期間は平均 5.4 年であった。また, 初回導入時に選択された Bio 製剤 (1st Bio) は, インフリキシマブ (IFX) が 2 例, アダリムマブ (ADA) が 1 例, エタネルセプト (ETA) が 2 例, トシリズマブ (TCZ) が 1 例であった。

その結果, 抗 TNF モノクローナル抗体製剤である IFX や ADA は Blau/EOS の関節炎, 全身性炎症病態 (倦怠感, 結節性紅斑), ブドウ膜炎に対し有効であり, 他剤への変更を要しなかった。一方, もう一つの抗 TNF 製剤である ETA は有効例と無効例に分かれ, 無効例は抗 IL-6 製剤 (TCZ) へ変更されても効果が得られず, 最終的に IFX へ変更されて病態は寛解した。1st Bio 製剤が TCZ の例でも有効性が認められず, IFX に変更して炎症は改善した。また, IFX で治療したブドウ膜炎未発症の 2 例では, 13 歳に達してもブドウ膜炎を発症しなかった。

以上から Blau/EOS に対する抗 TNF 製剤の有効性が示唆され, 多施設での検討が必要と思われた。

#### 研究協力者

山遠 剛・鹿児島大学医学部歯学部附属病院 医師

久保田知洋・鹿児島大学医歯学総合研究科 大学院生

山崎 雄一・鹿児島大学医歯学総合研究科 医師

た診断の基本提案を行い, 昨年度は Blau/EOS に特徴的な関節炎病態について報告してきた。

一方, 当科で診断した Blau/EOS の全例は, それまでの医療機関で若年性特発性関節炎 (JIA) と診断されており, 難治性であることから当科を紹介された症例であった。また, 本邦では, 炎症性サイトカインの抑制を目的とした生物学的製剤 (Bio 製剤) が 2003 年から関節リウマチで導入され, ほぼ同じ時期に JIA に対する臨床治験も開始されていた。

#### A. 研究目的

本研究班の目的は, ブラウ症候群・若年発症サルコイドーシス (Blau/EOS) の診療基盤の開発である。そこで, 平成 22 年度には, 当科で集積した NOD2 遺伝子変異を認める Blau/EOS 7 例の長期観察期間中 (平均観察期間 10.9 年) の臨床像から, 時間軸を踏まえ

このような状況を背景に, 当科では後に Blau/EOS と診断された症例の全例に Bio 製剤が導入され, NOD2 遺伝子変異を確認後も治療が継続され, 臨床データが集積されていた。そこで本年度は抗サイトカイン療法がおこなわれた Blau/EOS の臨床データを解析し, その有用性や限界について検討した。

表 1:対象のプロフィール

Case	Sex	遺伝子	発症年齢		抗サイトカイン製剤		
			Uveitis		製剤	導入時罹病	観察期間
MK	M	R334Q	0.5y	2y	INF	14.9y	6.8y
NK	M	R334Q	0.6y	4y	ADA	17.3y	0.7y
NT	M	R334Q	2.7y	5y	INF	18.1y	4.6y
YA	F	R334Q	4.5y	-	ETA	0.8y	0.4y
					→TCZ	1.8y	1.7y
					→IFX	5.1y	4.0y
SA	F	R587C/R471C	0.6y	2y	TCZ	11.9y	0.2y
					→IFX	12.1y	6.8y
AA	F	R587C	3.4y	-	ETA	2.6y	7.1y
平均			2.4y	3.3y		9.4y	5.4y

IFX: infliximab, ADA: adalimumab, ETA: etanercept, TCZ: tocilizumab

## B. 研究方法

対象患児の診療録から、Bio 製剤の導入時、導入 3 か月後、6 か月後、1 年後、3 年後、および最終受診日の臨床所見や検査データを後方視的に収集し、Bio 製剤導入後の変化を検討した。

Blau/EOS の臨床症状に対して、その疾患活動性を客観的に評価する指標はない。そこで、関節炎病態の変化については、関節痛、関節腫脹、手背足背の囊腫状腫脹、指趾の屈曲拘縮の項目に、また全身の炎症病態については倦怠感と結節性紅斑の項目に分けて検討し、理学所見や自覚症状から - ~ ++ で評価した。また、ブドウ膜炎の活動性については、眼科的検査で得られた前眼部（前房内炎症、虹彩癒着）、硝子体混濁、後眼部（乳頭浮腫、網膜血管炎）等の所見や、1 日のステロイド点眼回数（両眼の合計）を総合して評価した。更に、Bio 製剤の有効性については、その累積継続率でも評価した。

当科 Blau/EOS 患者に投与されていた Bio 製剤は、抗 TNF 製剤であるインフリキシマブ (IFX)、アダリムマブ (ADA)、エタネルセプト (ETA) の 4 種類と、抗 IL-6 製剤であるトシリズマブ (TCZ) であった。これらの Bio 製剤はそれぞれの製剤の通常の方法に従って投与された。具体的には、IFX は 5mg/kg を 6 週ごと（症例 MK）、または 10 mg/kg を 8 週ごと（NT）に点滴静注で投与された。また皮下注製剤である ADA と ETA

は、それぞれ 30mg を 2 週ごと（ADA）、あるいは 0.4mg/kg を週 2 回の間隔（ETA）で投与された。TCZ は点滴静注で 8mg/kg が投与され、その投与間隔は 2 週間隔（症例 SA）または 4 週間間隔（症例 YA）であった。TCZ で治療中の症例 SA を除き、すべての症例で週 1 回のメトトレキサート MTX 10mg/m<sup>2</sup>/w 内服が併用された。

## C. 研究結果

### 1. 対象のプロフィール

当科で集積した Blau/EOS 8 症例のうち、当科で抗サイトカイン療法を継続して行った 6 例（男 3 例、女 3 例）を対象とした（表 1）。発症年齢は平均 2.4 歳で、Bio 製剤導入時の罹病期間は平均 9.4 年（0.8~18.1 年）、Bio 製剤治療の観察期間は平均 5.4 年であった（0.7~7.1 年）。

### 2. Bio 製剤の選択

抗サイトカイン療法として選択された Bio 製剤は、抗 TNF 製剤としては、インフリキシマブ (IFX)、アダリムマブ (ADA)、エタネルセプト (ETA) と、抗 IL-6 製剤であるトシリズマブ (TCZ) であった。これらの Bio 製剤のうち、初回導入時に選択された製剤 (1st Bio 製剤) は、IFX と ETA がそれぞれ 2 例ずつ、ADA と TCZ がそれぞれ 1 例ずつであった。

表 2: 臨床像の変化

臨床像	評価時期	抗 TNF 製剤						抗 IL-6 製剤		
		IFX				ADA	ETA		TCZ	
		MK	NT	YA	SA	NK	YA	AA	YA	SA
関節痛	0	+	+	+	++	+	+	++	+	++
	3m	+-	-	-	+	+-	++	+	+	++
	6m	-	-	-	+-	-	++	-	-	→IFX
	1y	-	-	-	-	-	→TCZ	-	-	-
	3y	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	Last	-	-	-	-	-	-	-	→IFX	-
	関節腫脹	0	+	+	+	++	+	+	++	++
3m		-	+-	+	+	+-	++	+	++	+
6m		-	+-	+	+	-	++	+	++	→IFX
1y		-	+-	+	-	-	→TCZ	+	++	-
3y		-	+-	+	-	-	-	+	++	-
Last		-	+-	+	-	-	-	+-	→IFX	-
囊腫状腫脹		0	-	+	+	+	+	+	+	+
	3m	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	6m	-	+	+	+	+	+	+	+	→IFX
	1y	-	+/-	+	+	+	→TCZ	+	+	-
	3y	-	+/-	+	-	-	-	+	+	-
	Last	-	+/-	+	-	-	-	+	→IFX	-
	指趾屈曲	0	++	++	+	++	++	+	+	+
3m		++	++	+	++	++	+	+	+	++
6m		++	++	+	++	++	+	+	+	→IFX
1y		++	++	+	++	++	→TCZ	+	+	-
3y		++	++	+	++	++	-	+	+	-
Last		++	++	+	++	++	-	+	→IFX	-
倦怠感		0	+	+	-	++	-	-	+	-
	3m	+-	+	-	+	-	-	+	-	++
	6m	-	+	-	+	-	-	-	-	→IFX
	1y	-	+	-	+	-	→TCZ	-	-	-
	3y	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	Last	-	+	-	-	-	-	-	→IFX	-
	結節性紅斑	0	+	++	-	+	-	-	-	-
3m		+	-	-	+	-	-	-	-	+
6m		-	-	-	+	-	-	-	-	→IFX
1y		-	+/-	-	+	-	→TCZ	-	-	-
3y		-	+/-	-	-	-	-	-	-	-
Last		-	-	-	-	-	-	-	→IFX	-
ブドウ膜炎		0	++	+	-	+	-	-	-	-
	3m	+	+	-	+-	-	-	-	-	+
	6m	+	+	未発症	+-	-	未発症	未発症	未発症	+
	1y	-	+-	未発症	+-	-	未発症	未発症	未発症	→IFX
	3y	-	+-	未発症	-	-	未発症	未発症	未発症	-
	Last	-	+-	未発症	-	-	未発症	未発症	→IFX	-

改善
  悪化
  →変更



図 1a 右足関節前側（長軸断）

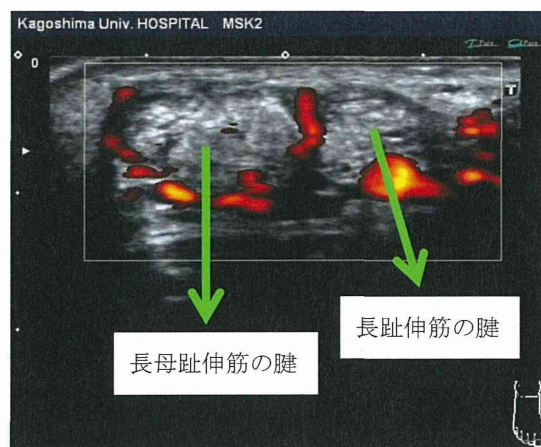


図 1b 右足関節前側（短軸断）

図 1a 及び図 1b：症例 MK にみられた腱鞘滑膜炎（PD シグナル）

本例では IFX 導入後、関節痛、関節腫脹、ブドウ膜炎は改善し、結節性紅斑も消失するなど臨床像が改善し、6.7 年にわたって IFX を継続した。しかし中節関節を主体とする指趾の屈曲は次第に顕在化した。関節エコーでは Gray Scale で腱の腫大と腱鞘の増殖を、PD シグナルで腱鞘滑膜炎に血流の増加（Grade 3）を認め活動性の腱鞘滑膜炎が観察された。関節滑膜炎は一部の関節で滑膜増殖を認めたが活動性の炎症所見は観察されなかった。

### 3. 臨床症状の変化

Bio 製剤導入後の臨床症状の変化を、3 か月、6 か月、1 年、3 年、最終受診時の臨床症状から検討した（表 2）。

#### 1) 関節所見

抗 TNF 製剤である IFX や ADA を導入した 5 例では、全例で関節痛が、4 例で関節腫脹が改善し、うち 2 例で囊腫状腫脹の軽減がみられた。しかし ETA を導入した 2 例では関節痛や関節腫脹に対して有効例（症例 AA）と無効例（症例 YA）がそれぞれ 1 例ずつみられ、無効例は TCZ へ変更された。一方、抗 IL-6 製剤である TCZ を導入した 2 例（症例 YA, SA）では、いずれも関節炎病態に対する改善は得られず、IFX へ変更された。また、手背足背の囊腫状腫脹については、Bio 製剤導入後の改善は一部（IFX で治療した 2 例）にとどまった。

一方、指趾の屈曲拘縮については、抗 TNF 製剤、抗 IL-6 製剤のいずれにおいても、改善は認められなかった。例えば症例 MK では、関節痛や関節腫脹は IFX 導入後すみやかに消失したものの、指趾の屈曲拘縮はその後次第に顕在化しており、最終受診時に評価した関節エコー検査では、活動性の腱鞘滑膜炎が確認された（図 1a,1b）。

#### 2) 全身症状

倦怠感 は Bio 製剤導入時に 5 例に認められ、そのうち抗 TNF 製剤で治療された 4 例中 3 例で倦怠感が改善した。一方、抗 IL-6 製剤で治療された 1 例は改善がみられなかった。

結節性紅斑は、Bio 製剤導入時に 4 例で認められ、IFX が導入された 3 例の全例で消失した。また Bio 製剤導入時に結節性紅斑を認めなかった 5 例では、Bio 製剤で治療中に出現することはなかった。

#### 3) ブドウ膜炎

Bio 製剤導入時までには活動性のブドウ膜炎を認めた例は 4 例あり、うち 3 例に IFX が、1 例に TCZ が導入された。その結果、IFX が導入された 3 例では全例でブドウ膜炎の改善がみられたが、TCZ が導入された 1 例では眼科所見に改善がみられなかった。

一方、Bio 製剤導入時に、ステロイド点眼によりブドウ膜炎が寛解していた症例 NK は、Bio 製剤投与中にブドウ膜炎が悪化することはなかった。

また、ブドウ膜炎を発症していない状況で Bio 製剤が導入された 2 例（症例 YA, AA, 導入時の年齢はそれぞれ 5 歳 4 か月、6 歳）では、最終的にはそれぞれ IFX と ETA で治療が継続されたが、最終受診時の年齢がそれぞれ 13 歳 9 か月、13 歳 3 か月に達しても、ブドウ膜炎の発症を認めなかった。

表 3: 検査値と治療の変化

所見	評価 時期	抗 TNF 製剤							抗 IL-6 製剤	
		IFX				ADA	ETA		TCZ	
		MK	NT	YA	SA	NK	YA	AA	YA	SA
ESR mm/h	0	4	11	69	41	4	45	54	43	37
	3m	2	6	19	28	2	60	37	10	54
	6m	2	10	23	41	2	81	32	4	41
	1y	4	5	30	42	2	→ TCZ	20	4	→IFX
	3y	2	14	25	47			21	56	
	Last	1	6	19	9			16	→IFX	
	CRP mg/dl	0	0.99	0.39	7.02	2.82	0.52	1.64	2.56	1.72
3m	0.02	0.27	0.26	0.27	0.02	0.02	4.21	1.11	0.07	0.69
6m	0	0.28	0.13	0.27	0.02	0.02	5.05	0.26	0	
1y			0.22	0.25	0.69	0.09	→ TCZ	0.09	0	
3y	0	0.14	0.19	1.89				0.06	2.93	
Last	0.02	0.08	0.1	0.03				0.07	→IFX	
MMP-3 ng/ml	0	122.7	277.8	2422.0	528.0	128.8	322.0	654.0	653.0	297.0
	3m	51.9	372.9	421.0	90.5	60.8	1260.0	381.0	1580.0	528.0
	6m	61.4	239.6	408.0	55.5	48.1	→ TCZ	167.0	720.0	→IFX
	1y	63.8	242.0	549.2	15.2			17.4	602.0	
	3y	82.4	200.4	446.5	174.5			75.3	1333.0	
	Last	106.6	216.8	267.4	153.7			83.5	→IFX	
	PSL 量 mg/day	0	8.75	15		5	1			
3m	8.75	15			5	0				5
6m	8.75	12.5	未使用		5	0	未使 用	未使 用	未使 用	→IFX
1y	8.75	11.25			5	0	用	用		
3y	7.5	11.25			9					
Last	6	10			7.5					
点眼回 数/day	0	8	6		8	6				8
	3m	8	6		6	6	ブドウ 膜炎	ブドウ 膜炎	ブドウ 膜炎	8
	6m	8	6	ブドウ 膜炎未 発症	6	6	未発 症	未発 症	未発 症	→IFX
	1y	8	4		6	6				
	3y	6	4		6	6				
	Last	6	4		0					

改善      悪化      →変更

#### 4. 検査所見および治療

臨床所見を反映した検査所見の変動や治療の変化が見られた (表 3)。

##### 1) ESR, CRP 値

Bio 製剤導入時に赤沈値の亢進を認めた例のうち、IFX 導入例の 2 例中 2 例で、ETA 導入 2 例中 1 例で ESR が正常化した。TCZ を導入した 2 例ではいずれも ESR 値の改善は見られなかった。CRP 値も ESR を反映した変化を示し、抗 TNF 製剤導入例では陰性化した。一方、TCZ でも CRP は陰性化した。一方、TCZ が CRP 産生を直接誘導する IL-6 の抗受容体抗体であることから、その評価はできなかった。

##### 2) MMP-3 値

MMP-3 値は、関節リウマチ RA や JIA の関節炎において軟骨や骨破壊の指標とされているが、Blau/EOS においても Bio 製剤導入時には全例で増加していた。この MMP-3 の Bio 製剤導入後の変化を検討すると、抗 TNF 製剤導入例では 7 例中 5 例で改善した。一方、抗 IL-6 製剤を導入した 2 例 (症例 YA, SA) では、TCZ 導入後に MMP-3 はむしろ増加し、いずれも IFX へ変更された後に改善した。

##### 3) 治療の変化

6 例中 4 例にブドウ膜炎があり、ステロイド点眼液で治療されていた。そこで Bio 製剤導入後のブドウ膜炎の変化を、両眼における 1 日の点眼回数で評価したところ、IFX を導入した 3 例の全員で導入後に点眼回数が減少し、うち 1 例 (症例 SA) は点眼が中止された。一方、TCZ はブドウ膜炎のある 1 例 (症例 SA) で導入されたが、ステロイド点眼回数は不変であった。

#### 5. Bio 製剤の継続率

Blau/EOS の 6 例に対し 4 種類の Bio 製剤が導入され、そのうち 1st Bio 製剤として選択されたのは、抗 TNF 製剤が 5 例、抗 IL-6 製剤が 1 例であった。

1st Bio 製剤導入後、平均 5.4 年にわたって治療経過が観察されたが、1st Bio 製剤として IFX (症例 MK, NT) や ADA (症例 NK) で治療が開始された 3 例では、いずれも最終評価時まで同じ Bio 製剤が継続された。

一方、ETA が導入された 2 例では、1 例 (症例 AA) は最終評価時まで ETA による治療を継続したものの、もう一例 (症例 YA) では効果が不十分なために TCZ へ変更された。しかし、この症例では TCZ でも十分な効果が得られず、最終的には IFX へ変更して病

態は寛解したため、最終評価時まで IFX が継続された。

また、1st Bio 製剤として抗 IL-6 製剤である TCZ が選択された症例 SA では、導入後に症状や検査値の悪化がみられた。この症例では約 2 か月後に IFX へ変更されて寛解が得られ、最終評価時まで IFX が継続された。

以上、1st Bio 製剤から 3rd Bio 製剤までの治療経過を、抗 TNF 製剤と抗 IL-6 製剤に分けて検討すると、Blau/EOS に対する抗 TNF 製剤の継続率は、抗 IL-6 製剤より有意に優れていた (Log-rank test  $P=0.022$ ) (図 2)。

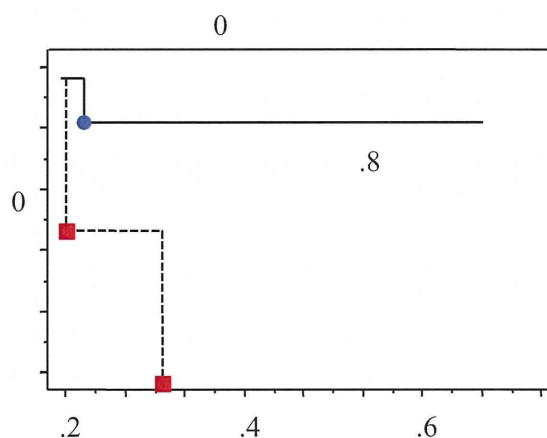


図 2: Blau/EOS における生物学的製剤の継続率  
抗 TNF 製剤のうち、1st Bio 製剤が IFX (3 例) と ADA (1 例) であった全員と、ETA であった 2 例中 1 例では改善がみられ、最終評価時まで 1st Bio 製剤を継続した。一方、ETA が無効であった 1 例では、TCZ (抗 IL-6 製剤) へ変更後も効果が得られず、IFX へ変更後に改善したため、IFX を継続した。また、TCZ で治療を開始した 1 例では効果が得られず、IFX へ変更して改善を認め、IFX を継続した。  
副作用で中止したり変更した例はなかった。

#### D. 考察

Blau/EOS の治療として Bio 製剤の有用性を検討したところ、Blau/EOS の関節炎、皮疹や倦怠感などの全身症状、ブドウ膜炎に対して、抗 IL-6 製剤よりも抗 TNF 製剤が有用である可能性が示唆された。

抗 TNF 製剤には、TNF 受容体 Fab 部と結合することで TNF 結合を遮断する ETA と、TNF に対するモノクローナル抗体である



INF や ADA があるが、抗 TNF モノクローナル抗体である IFX や ADA の有効性が ETA と比べて高かったことは、Blau/EOS の炎症病態における TNF の関与やその機序について、示唆を与えている可能性がある。

一方、IL-6 阻害薬である TCZ が Blau/EOS の 2 例（症例 YA, SA）において無効であったことは興味深い。これらの 2 例では、TCZ 導入後に臨床的な有効性が得られないばかりか、かえって MMP-3 が増加するなど、同じ関節炎疾患である JIA とは異なった反応を示した。Blau/EOS における抗 TNF 製剤と抗 IL-6 製剤の有効性の違いは、病態を形成し持続させる leading cytokine の違いを反映したものかもしれない。

抗 TNF 製剤は Blau/EOS の関節痛や関節腫脹に有効であったが、PIP 関節を中心とした指趾屈曲に対しては無効であった。そればかりか、Bio 製剤による治療を継続しても屈曲の程度が徐々に進行する傾向がみられた。そこで、その典型例である症例 MK で関節エコーを行ったところ、ドップラーによる血流評価では関節滑膜には血流の増加は見られないものの（Grade 0~1）、腱鞘滑膜に著明な血流増加を認めた（Grade 3）。これらの所見は、昨年度の本研究班で池田らが報告した所見と一致しており、抗 TNF 製剤による治療の限界を示唆している。なぜ抗 TNF 製剤が Blau/EOS の腱鞘滑膜炎に対しては無効であるかについては不明であり、今後の検討が必要である。

ブドウ膜炎は、Blau/EOS において生活予後を左右する重要な病態である。本邦の Blau/EOS 症例をまとめた Okafuji らの報告では（*Arthritis Rheum* 2009,60:242-50）、ブドウ膜炎は 20 例中 18 例（90%）にみられ、そのうち 14 例（78%）は 6 歳までに発症していた。

今回の検討で、Bio 製剤導入前にブドウ膜炎を認めていた 4 例の発症年齢は、それぞれ 2 歳、2 歳、4 歳、5 歳であり、Blau/EOS 発症から平均 2.2 年後であった。一方、Bio 製剤導入時までにブドウ膜炎を未発症であった 2 例（症例 YA, AA）の導入時の年齢は、それぞれ 5 歳と 6 歳であり、ブドウ膜炎発症のリスクがある年齢域であった。しかしながら、これらの 2 例では、抗 TNF 製剤導入後、それぞれ 8.4 年、4.1 年が経過した最終観察の時点においてもブドウ膜炎の発症はみられなかった。活動性ブドウ膜炎に対して抗 TNF 製剤が有効であった 4 例の治療成績を考慮すると、抗 TNF 製剤がブドウ膜炎の発症を予防している可能性は否定できない。

以上、Blau/EOS に対する Bio 製剤の有効性について検討したが、対象症例が 6 例と少なくしかも retrospective な検討であることから、得られた成果の妥当性については限界がある。今後、Blau/EOS 症例の登録制度が本邦でも確立し、多施設での prospective な検討が行われることが期待される。

## E. 結論

- Blau/EOS において、サイトカイン制御を目的とした Bio 製剤の有効性を検討した。
- 抗 TNF 製剤による治療は有効で、関節炎、全身性炎症病態（倦怠感、結節性紅斑）、ブドウ膜炎は改善したが、指趾屈曲の進行を阻止できなかった。
- 抗 TNF 製剤では、モノクローナル抗体製剤である IFX, ADA が有効性に優れていた。
- IFX を長期投与したブドウ膜炎未発症の 2 例では、13 歳に達してもブドウ膜炎を発症しなかった。
- 抗 IL-6 製剤の有効性は認められなかった。

以上の結果より、Blau/EOS に対し、抗 TNF モノクローナル抗体製剤による治療は有効と思われ、症例の蓄積を図る必要がある。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

国際学会

なし

国内学会

1. 武井修治, 山遠剛, 久保田知洋, 山崎雄一, 池田啓, 神戸直智. EOS/Blau 症候群における関節病態の臨床解析（第 5 回自己炎症疾患研究会. 2012 年 7 月 6 日, 福岡市）

- |                                                                                                             |                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| 2. 赤池治美, 久保田知洋, 山崎雄一, 山遠剛, 野中由希子, 根路銘安仁, 嶽崎智子, 今中啓之, 池田啓, 神戸直智. (第 22 回日本小児リウマチ学会. 2012 年 10 月 5-7 日, 名古屋市) | 2. 実用新案登録<br>なし<br>3. その他<br>なし |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

NOD2 変異に関連した全身性炎症性肉芽腫性疾患（ブラウ症候群/  
若年発症サルコイドーシス）の診療基盤推進に関する研究

## 分担研究報告書 4

関節エコーによるブラウ症候群・若年発症サルコイドーシス  
における関節病変の病態解析

研究分担者 池田 啓 千葉大学医学部附属病院アレルギー膠原病内科 助教

### 研究要旨

ブラウ症候群/若年発症サルコイドーシスの関節病変の病態を明らかとし、関節変形を予防する治療介入戦略の基盤を構築するため、遺伝子診断の確定している8症例を関節エコーで網羅的に評価した。その結果、本疾患の関節病変が関節滑膜炎よりも腱鞘滑膜炎優位であることが確認され、特に手関節および足関節では非常に高頻度に腱鞘滑膜炎を認めることが示された。一方、炎症が回避される腱鞘滑膜炎部位があること、また明らかな関節滑膜炎も散見されることが分かった。さらに、患者全体の滑膜炎の疾患活動性はDAS28-ESRに代表される composite score に反映されること、その一方で個々の関節部位の病変を診察で正確に評価することは困難であることが示唆された。

関節変形を防ぐためのより細やかな治療戦略の構築し、また本疾患の特徴的な関節病態を解明するためには、関節エコーによる詳細な病態評価が有用と考えられた。今後より多くの症例の蓄積、経時的変化の解析が必要である。

### A. 研究目的

ブラウ症候群/若年発症サルコイドーシスは皮疹、関節炎、ブドウ膜炎を三主徴とする主として4歳以下で発症する自己炎症症候群の1つである。本疾患における関節炎は腱鞘滑膜炎によるものとされているが、その詳細な病態、関節予後、ならびに治療介入の有用性は未だ不明である。

近年関節リウマチに代表される炎症性関節疾患における超音波検査（関節エコー）が進歩し、特に安静や放射線被爆が問題となる小児の関節疾患においてその有用性が注目されている。そこで本研究では、関節エコーを用いてブラウ症候群/若年発症サルコイドーシスの関節病変の病態を明らかとし、関節変形を予防する治療介入戦略の基盤を構築することを目的とした。

### B. 研究方法

鹿児島大学病院小児診療センター小児リウマチ膠原病外来、千葉大学医学部附属病院皮膚科/小児科、あるいは千葉県こども病院ア

レルギー・膠原病科で外来加療されている遺伝子診断の確定している8症例を関節エコーで網羅的に評価した。部位は40関節（DAS28 関節+足関節+MTP 関節）における100滑膜炎部位（関節滑膜/腱鞘滑膜/滑液包）を評価し、それぞれのグレースケール（GS）滑膜炎と滑膜パワードプラ（PD）シグナルを半定量的（グレード0-3）に評価した。超音波機器は日立メディコ社 HI VISION Ascendus, 探触子はリニア型マルチ周波数プローブを使用した。

### C. 研究結果

8症例（男性6症例）の関節エコー施行時の年齢は、5歳6ヶ月から37歳8ヶ月（中央値12歳6ヶ月）であった。プレドニゾロンが3症例、メトトレキサートが6症例、TNF阻害薬が3症例で投与されていた。関節エコー施行時の圧痛関節数（/40関節）は0-4（中央値0）、腫脹関節数（/40関節）は1-25

図 1. 8 症例の各関節部位における腱鞘滑膜炎のグレースケールスコアのヒートマップ

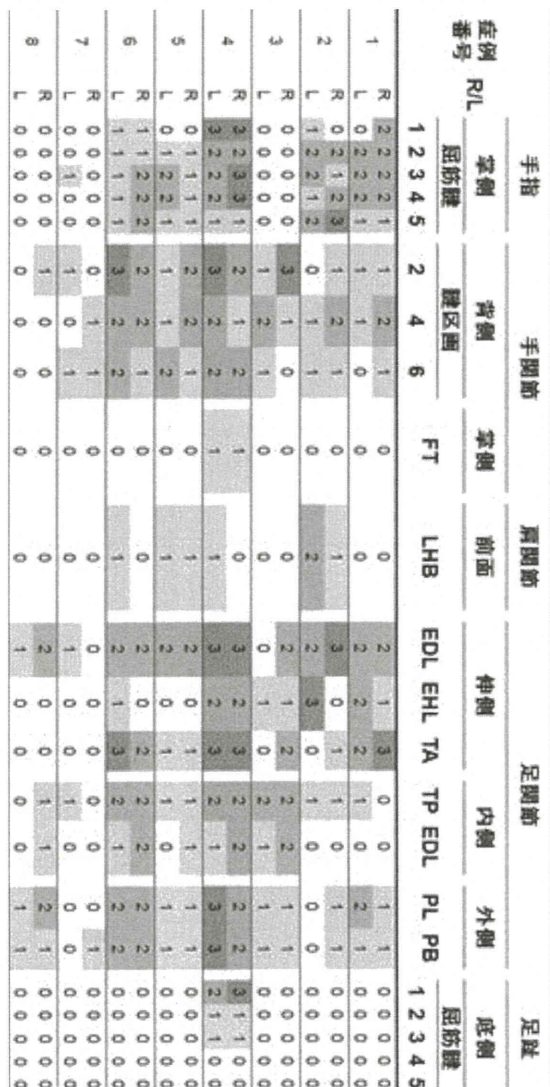
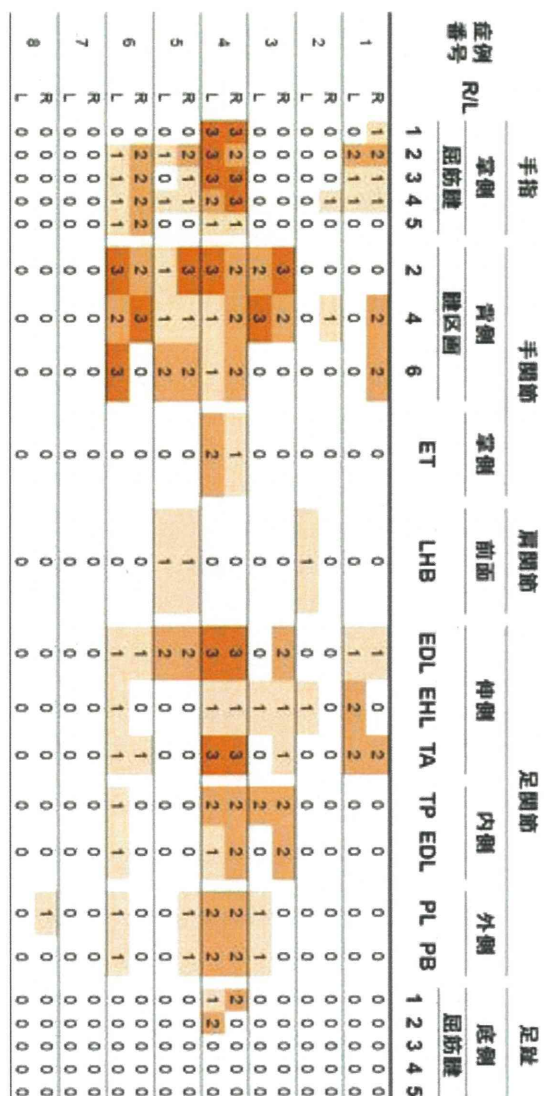


図 2. 8 症例の各関節部位における腱鞘滑膜炎のパワードブラシングナルスコアのヒートマップ



0, 正常; 1, 軽度; 2, 中等度; 3, 高度  
 FT, 屈筋腱; LHB, 上腕二頭筋長頭; EDL, 長趾伸筋; EPL, 長拇指伸筋; TA, 前脛骨筋; TP, 後脛骨筋; FDL, 長趾屈筋; PL, 長腓骨筋; PB, 短腓骨筋.

0, 正常; 1, 軽度; 2, 中等度; 3, 高度  
 FT, 屈筋腱; LHB, 上腕二頭筋長頭; EDL, 長趾伸筋; EPL, 長拇指伸筋; TA, 前脛骨筋; TP, 後脛骨筋; FDL, 長趾屈筋; PL, 長腓骨筋; PB, 短腓骨筋.

(中央値 4), 患者全般評価 VAS (/100 mm) は 0-65 mm (中央値 9 mm), CRP は 0.0-0.6 mg/dL (中央値 0.1 mg/dL), DAS28-ESR は 1.2-4.5 (中央値 2.55) であった。各関節部

位における腱鞘滑膜炎のグレースケールスコアおよびパワードブラシングナルスコアを、それぞれ図 1 および図 2 に示す。

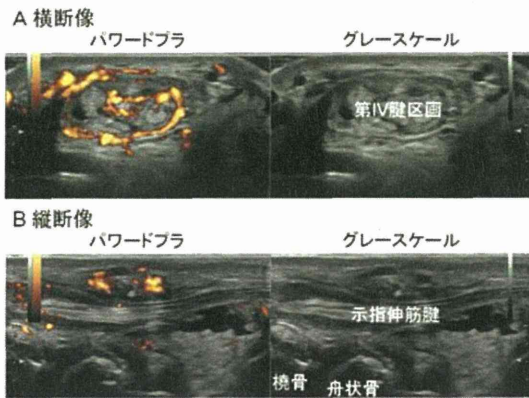


図3. 症例6の手関節で認められた典型的な腱鞘滑膜炎

図1および図2に示されるように、全症例で手関節および足関節に腱鞘滑膜病変を認めた。また手指屈筋腱にも高頻度に腱鞘滑膜炎を認めた。一方、手関節屈筋腱群に腱鞘滑膜炎の所見を認める症例はいなかった。図3に症例3で認められた典型的な手関節の腱鞘滑膜炎像を示す。グレースケールにて等エコー輝度の滑膜肥厚および無エコーの滑液貯留を認め、パワードプラモードにて滑膜肥厚に一致する強い滑膜血流シグナルを認めた。

次に各関節部位における関節滑膜炎のグレースケールスコアおよびパワードプラシグナルスコアを、それぞれ図4および図5に示す。

腱鞘滑膜病変と比較すると頻度はやや低く、症例によって罹患部位に大きな差があるが、関節滑膜病変も全例で認められた。腱鞘滑膜炎、関節滑膜炎ともに左右対称性である傾向があった。

次に、関節エコー所見と従来の関節炎評価方法であるDAS28-ESRとの相関を図6に示す。

図4. 8症例の各関節部位における関節滑膜炎のグレースケールスコアのヒートマップ

症例番号	手指		手関節		肘関節		肩関節		膝関節		足関節		足趾	
	背側	MCP	掌側	RC/IC/DRU	屈側	伸側	外側	背面	伸側	内側	外側	伸側	IT	MTP
1	R	12345	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000
	L	11211	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000
2	R	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000
	L	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000
3	R	00011	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000
	L	01001	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000
4	R	23332	12332	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000
	L	22232	12332	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000
5	R	01121	01000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000
	L	12321	10000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000
6	R	13322	12222	11111	11111	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000
	L	12332	23332	11111	11111	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000
7	R	01101	00000	10000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000
	L	01100	00100	10000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000
8	R	12221	01100	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000
	L	02221	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000

0, 正常; 1, 軽度; 2, 中等度; 3, 高度  
PIP, 近位指節間関節; IP, 指節間関節; MCP, 中手指節関節; RC, 橈骨手根関節; IC, 手根関節; DRU, 遠位橈尺関節; HR, 腕橈関節; HU, 腕尺関節; SDB, 三角筋下滑液包; SAB, 肩峰下滑液包; GH, 関節窩上腕関節; SPP, 膝蓋上囊; FT, 大腿脛骨関節; TT, 距腿関節; IT, 足根関節; MTP, 中足指節関節。

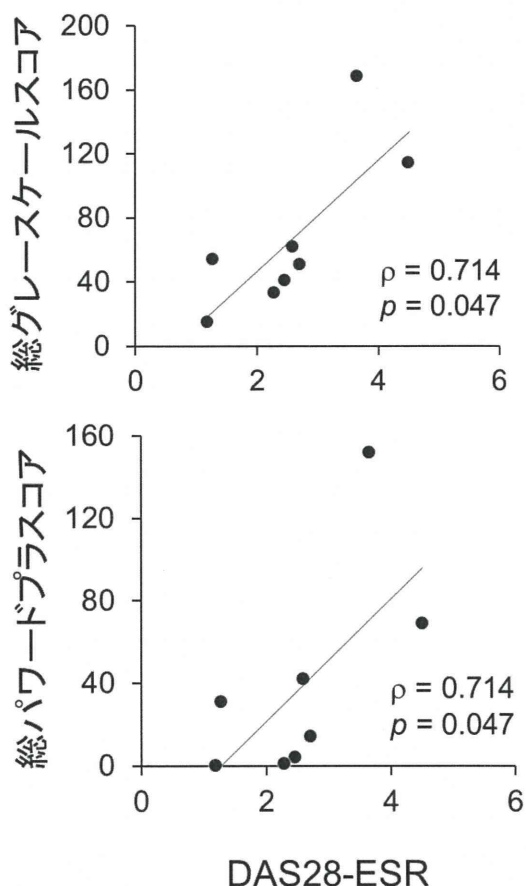
図 5. 8 症例の各関節部位における関節滑膜炎のパワードプラスコアのヒートマップ

症例 番号	R/L	手指			手関節			肘関節			肩関節			膝関節			足関節		足趾
		PIP (IP)	MCP	RC/IC	DRU	HR/HU	HU	SDB/SAB	GH	SPP	FT	FT	TT	IT	MTP				
1	R	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	R	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	2	0	0	0	0	0	0
	L	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2	0	0	0	0	0	0
4	R	0	0	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
	L	0	0	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
5	R	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	L	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	R	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
	L	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
7	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0, 正常; 1, 軽度; 2, 中等度; 3, 高度  
 PIP, 近位指節間関節; IP, 指節間関節; MCP, 中手指節関節; RC, 橈骨手根関節; IC, 手根関節; DRU, 遠位橈尺関節; HR, 腕橈関節; HU, 腕尺関節; SDB, 三角筋下滑液包; SAB, 肩峰下滑液包; GH, 関節窩上腕関節; SPP, 膝蓋上囊; FT, 大腿脛骨関節; TT, 距腿関節; IT, 足根関節; MTP, 中足指節関節。

少数の解析ではあるものの、DAS28-ESR と総 GS スコア/総 PD スコアは有意に相関することが示された (総 GS スコア  $\rho=0.714$ ,  $P=0.047$ ; 総 PD スコア  $\rho=0.714$ ,  $P=0.047$ , スピアマン順位相関係数)。これによりブラウ症候群/若年発症サルコイドーシスの患児全体としての滑膜病変は、DAS-ESR により評価可能であることが示された。

図 6. 関節エコー総スコアと DAS28-ESR の相関



次に、関節レベルにおいて診察所見と関節エコーを比較した。表 1 に示されるように、関節エコーでは約半数の関節で滑膜病変が検出されたが、診察上所見(圧痛または腫脹)を認めた関節は、320 関節中 70 関節 (22%) にとどまった。つまりブラウ症候群/若年発症サルコイドーシスの滑膜病変を関節レベルで正確に評価するためには診察所見のみでは不十分である可能性が示唆された。

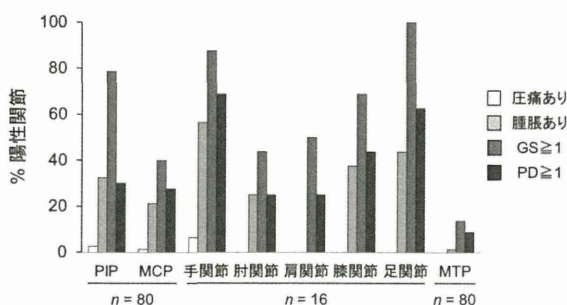
表 1. 全ての関節における診察所見とグレースケール滑膜炎スコアの比較

		診察上の関節所見 (腫脹または圧痛)		合計
		なし	あり	
関節エコー所見 (GS $\geq$ 1 または PD $\geq$ 1)	なし	146 (46%)	12 (4%)	158 (50%)
	あり	104 (32%)	58 (18%)	162 (50%)
合計		250 (78%)	70 (22%)	320 (100%)

関節部位毎の比較を図 7 に示す。

全体に診察による滑膜炎の検出精度に限界があることが示唆されるが、特に潜在性滑膜炎の頻度の高い PIP 関節、手関節、および足関節では関節エコー評価の意義が大きいと考えられた。

図 7. 関節部位毎の診察所見と関節エコー所見の比較



PIP, 近位指節間関節; MCP, 中手指節関節; MTP, 中足指節関節; GS, グレースケールスコア; PD, パワードプラスコア。

## E. 結論

ブラウ症候群/若年発症サルコイドーシスの関節病変を、高感度画像診断を用いて網羅的に解析した報告はこれまでない。今回の検討により、本疾患の関節病変の主体が腱鞘滑膜炎であることが確認され、特に手関節および足関節では非常に高頻度に腱鞘滑膜炎を認めることが示された。一方、炎症が回避される腱鞘滑膜炎部位があること、また腱鞘滑膜炎

よりも頻度は落ちるが、明らかな関節滑膜炎も認められることが分かった。さらに、患者全体の滑膜炎の疾患活動性は DAS28-ESR のような composite score に反映されること、その一方で個々の関節部位の病変を診察で正確に評価することには限界があることが示唆された。

ブラウ症候群/若年発症サルコイドーシスの関節病変が無痛性であることは患児の QOL 上良い点ではあるが、不可逆性の関節変形を予防するための治療介入が遅れる要因ともなり得る。今回の検討により現時点では composite score による病勢評価が妥当であることが示されたが、個々の関節変形を防ぐためのより細やかな治療戦略のためには関節エコーによる病態評価が有用となり得る。より多くの症例の蓄積、また治療介入に対する反応を含めた経時的変化の解析により、適正な治療戦略の基盤が構築されることが期待される。

またブラウ症候群/若年発症サルコイドーシスの炎症が、特定の腱鞘滑膜炎で回避され、特定の関節滑膜炎で惹起されること、画像上関節リウマチと同様の所見を呈しながら無痛性であることも興味深い知見である。今後他の解析手法と画像診断を組み合わせることにより、より詳細な病態が解明されることが期待される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Nakagomi D, Ikeda K, Okubo A, Iwamoto T, Sanayama Y, Takahashi K, Yamagata M, Takatori H, Suzuki K, Takabayashi K, Nakajima H. Ultrasound can improve the accuracy of the 2010 ACR/EULAR classification criteria for rheumatoid arthritis to predict methotrexate requirement. *Arthritis Rheum* ( in press)
- Tanaka S, Ikeda K, Uchiyama K, Iwamoto T, Sanayama Y, Okubo A, Nakagomi D, Takahashi K, Yokota M, Suto A, Suzuki K, Nakajima H. [18F] FDG uptake in proximal muscles assessed by PET/CT reflects both global and local muscular inflammation and provides useful information in the management of patients with polymyositis/

dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)* (in press)

3. Nakagomi D, Ikeda K, Kawashima H, Kobayashi Y, Suto A, Nakajima H. Bucillamine-induced yellow nail in Japanese patients with rheumatoid arthritis: two case reports and a review of 36 reported cases. *Rheumatol Int.* 2013; 33: 793-7.
  4. Wakefield RJ, D'Agostino MA, Naredo E, Buch MH, Iagnocco A, Terslev L, Ostergaard M, Backhaus M, Grassi W, Dougados M, Burmester GR, Saleem B, de Miguel E, Estrach C, Ikeda K, Gutierrez M, Thompson R, Balint P, Emery P. After treat-to-target: can a targeted ultrasound initiative improve RA outcomes? *Ann Rheum Dis.* 2012; 71: 799-803
  5. 池田 啓, 中込大樹, 中島裕史. 関節リウマチ診療における関節エコーの有用性. 治療 2012; 94; 214-20
  6. 池田 啓. 生物学的製剤使用下での画像診断の有用性. 最新医学 2012; 67; 58-63.
  7. 池田 啓. リウマチ診療における超音波検査の有用性. 新医療 2012; 39; 102-7.
  8. 池田 啓, 山形美絵子. 関節リウマチの超音波画像診断 映像情報メディカル 2012; 44; 934-7.
  9. 池田 啓. 関節リウマチ診療において構造的寛解の達成に画像的寛解は必要か? 臨床リウマチ 2012; 24; 314-9.
  10. 池田 啓. 関節エコーによる関節リウマチの疾患活動性モニタリング. リウマチ科 2012; 48; 509-13.
  11. EULAR リウマチ性疾患超音波検査テキスト (大野滋監訳) (2012), 第 1-5, 22, 26 章 メディカルサイエンスインターナショナル
2. 学会発表

#### 国際学会

1. Ikeda K, Nakagomi D, Sanayama Y, Yamagata M, Okubo A, Iwamoto T, Kawashima H, Takahashi K, Nakajima H. Time-integrated synovitis activity assessed by power Doppler ultrasound significantly correlates with radiographic progression in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate alone but not in those treated with TNF antagonists. 2012 American

College of Rheumatology Annual Meeting (November 11th, 2012, Washington D.C., USA)

2. Nakagomi D, Ikeda K, Okubo A, Iwamoto T, Sanayama Y, Takatori H, Suzuki K, Takabayashi K, Nakajima H. Ultrasonographic assessment of synovitis improves the accuracy of 2010 American College of Rheumatology/ European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis to predict development of a methotrexate-requiring disease. 2012 European League Against Rheumatism Congress. (June 8th, 2012, Berlin, Germany)

#### 国内学会

1. 池田啓. 関節エコーを用いた関節リウマチ診療の最適化. 第 45 回九州リウマチ学会モーニングレクチャー (2013 年 3 月 10 日, 沖縄)
2. 池田啓. リウマチ診療における超音波検査の有用性. 第 48 回日本超音波医学会中国地方会学術集会ランチョンセミナー (2012 年 9 月 8 日, 広島)
3. 池田啓. 関節リウマチ診療における超音波検査の展望. 第 23 回日本リウマチ学会関東支部学術集会シンポジウム 1「RA の画像診断と治療」(2012 年 12 月 1 日, 東京)
4. 池田啓. リウマチ診療における超音波検査. 第 85 回日本超音波医学会学術集会ハンズオンセッション (2012 年 5 月 27 日, 東京)
5. 牧田 莊平, 鈴木快枝, 池田啓, 細川淳一, 山形美絵子, 岩本太郎, 大久保綾子, 小林芳久, 中込大樹, 渡邊紀彦, 中島裕史. 全身性エリテマトーデスを合併した関節リウマチ 3 症例に対するアバセプトの有効性の検討. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (2012 年 4 月 28 日, 東京)
6. 中込大樹, 池田啓, 細川淳一, 山形美絵子, 大久保綾子, 岩本太郎, 鈴木快枝, 川島広稔, 星野東明, 高橋健太郎, 若新英史, 高取宏昌, 鈴木浩太郎, 高林克日己, 中島裕史. 超音波滑膜評価による 2010 年 ACR/EULAR 関節リウマチ分類基準の精度の向上. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (2012 年 4 月 27 日, 東京)



7. 池田啓. 関節エコーによる滑膜炎評価方法と関節リウマチ診療応用の国際的な流れ. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会, イブニングセミナー「日本における関節エコーの可能性 -RA の早期診断・治療に向けて-」(2012 年 4 月 27 日, 東京) 本リウマチ学会総会・学術集会, Meet the Expert (2012 年 4 月 26 日, 東京)
8. 池田啓. 関節エコーによる関節リウマチの滑膜炎評価 -日本リウマチ学会関節エコー撮像ガイドラインの活用-. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (ハンズオンセミナー. 2012 年 4 月 27 日, 東京)
9. 池田啓. リウマチ性疾患における関節エコーによる滑膜炎評価の実践. 第 56 回日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

NOD2 変異に関連した全身性炎症性肉芽腫性疾患（ブラウ症候群/  
若年発症サルコイドーシス）の診療基盤推進に関する研究

## 分担研究報告書 5

ブラウ症候群/若年発症サルコイドーシス末梢血  
CD14 陽性単球を用いた刺激時の発現遺伝子網羅解析

研究分担者 松江弘之 千葉大学大学院医学研究院皮膚科学 教授

### 研究要旨

NOD2 の変異を背景として肉芽腫を来すブラウ症候群/若年発症サルコイドーシスの分子メカニズムの解明を目指して、末梢血 CD14 陽性細胞を単離し、発現する遺伝子の網羅解析を行った。昨年度までの検討から、定常状態では末梢血 CD14 陽性単球における NOD2 の発現は、患者検体においてはむしろ抑制されていることを確認しており、本年度は分離した細胞を NOD2 の発現誘導作用が報告されているビタミン D3 共存下に 24 時間培養し、その細胞に発現する遺伝子を網羅解析した。

ビタミン D3 共存下に培養した細胞では、これまでの報告通り、抗菌ペプチドとともに NOD2 の発現が誘導されており、実験系自体は期待通りに機能していることが確認された。しかしながら、この NOD2 の発現が誘導された細胞を用いても、HEK293 細胞に疾患関連 NOD2 変異体を導入した際に確認される NF- $\kappa$ B の活性化は、残念ながら確認されなかった。

このため、末梢血 CD14 陽性単球をマクロファージに分化誘導する系を確立し、引き続き NOD2 変異が患者において肉芽腫を誘導する分子学的機序の解明を目指して検討を継続している。

### 研究協力者

小原 収・かずさ DNA 研究所ヒトゲノム研究部 部長

中野 倫代・千葉大学大学院医学研究院皮膚科学 助教

佐藤 貴史・千葉大学大学院医学研究院皮膚科学 助教

森 祐美子・千葉大学大学院医学研究院皮膚科学 技術補佐員

金澤 伸雄・和歌山県立医科大学皮膚科講師

の存在なしに肉芽腫を来す疾患である。アミノ酸置換を伴う遺伝子変異の結果として、NOD2 がリガンドによって活性化された時と同じ機序で活性化されて肉芽腫を形成すると考えられるものの、NOD2 の活性化によって肉芽腫を形成する詳細なメカニズムは解明されていない。

本研究では、ブラウ症候群/EOS 患者より、インフォームドコンセントの後、NOD2 を発現する末梢血単球を採取し、これに発現する遺伝子を網羅解析して健常者のそれと比較することで、NOD2 変異によって何が起きているのかを明らかにすることで、ブラウ症候群/EOS 患者において肉芽腫を発症する分子機序を明らかとすることを目的とする。また、本解析を通じて、肉芽腫形成の分子機序を明らかにすることで、現時点では特異的な治療法が確立していない本症に対する分子メカニズムに基づいた治療法の確立を目指す。

### A. 研究目的

ブラウ症候群/若年発症サルコイドーシス (early-onset sarcoidosis, EOS) は、細胞内のパターン認識受容体の 1 つである NOD2 遺伝子の変異を基盤とし、明らかな外因性因子

さらには、細胞生物学的あるいは分子生物学的な手法から肉芽腫形成のメカニズムの解明を目指す本研究は、NOD2 変異を背景とした稀な遺伝性疾患であるブラウ症候群/EOS の解析に留まらず、感染症や他の疾患で見られる肉芽腫形成の病態解明へと発展させることが可能となると期待される。

## B. 研究方法

NOD2 のファミリー分子である NLRP3 の恒常活性化型の遺伝子変異を背景として蕁麻疹様の皮疹を来す自己炎症性疾患であるクリオピリン関連周期性症候群 (cryopyrin-associated periodic syndrome, CAPS) においては、NLRP3 の中央部に位置する NOD 領域にアミノ酸置換を伴う遺伝子変異が入ることにより、NLRP3 がリガンド非依存性に活性化してインフラソームと呼ばれる蛋白複合体が形成され、その結果として IL-1 $\beta$  が産生・放出されることが特徴的な臨床症状の発現に関与することが知られている。また、これを反映するように、IL-1 $\beta$  の阻害剤が CAPS に対しては臨床応用され、劇的な症状の改善をもたらす。

これに対して、NOD2 の変異を背景として肉芽腫を来すブラウ症候群/EOS では、*in vitro* において変異 NOD2 遺伝子を HEK293 細胞に導入した際に NF- $\kappa$ B の転写亢進が確認されるが、この現象が実際に患者の中で起こっているのか、あるいはどのようなメカニズムによって NOD2 の変異が肉芽腫を誘導しているのか手がかりがない。そこで、NOD2 の下流で働いており、NOD2 の活性化によって差異のある遺伝子を網羅解析し、病態解析の手がかりを得るため、NOD2 を発現する細胞は末梢血では単球であることから、患者および健常者から、インフォームドコンセントを得た後に末梢血を採取し、Ficol 比重遠沈にて単核球を分離後、FITC 標識 CD14 陽性細胞で染色、抗 FITC 磁気ビーズを用いて染色された細胞を単離する。

続いて、単離した細胞に目的とする NOD2 遺伝子を発現誘導するために、ビタミン D3 を添加して 24 時間培養し、その後細胞より発現する mRNA を単離し、Agilent 社の 40K x 4 の Gene Chip を用いて、発現する遺伝子の網羅解析を行い、健常者と比較することで、NOD2 変異によって生体内においても NF- $\kappa$ B の活性化が認められるのか、あるいは遺伝子異常がどのようなカスケードに関与しているのかを検証する。

(倫理面への配慮)

対象となる患者の遺伝子解析は、関連する法規・細則に沿って、倫理審査委員会の承認を受けて実施しており、全ての試料は書面にてインフォームドコンセントを得て収集されたものである。

また、患者検体の取り扱いに関しても、千葉大学の倫理審査委員会の審査の承認を受けており、実施に当たっては、診療上の不利益を被ることのない範囲内で関係者の人権および利益の保護について十分配慮して、書面にてインフォームドコンセントを得て収集され、試料を実験に供している。

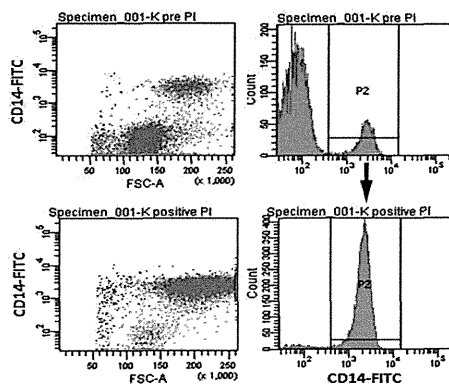


図 1 : 末梢血単核球における CD14 陽性細胞の割合 (上段) と磁気ビーズによる純化後の CD14 陽性細胞 (下段)

表 1 ビタミン D3 処理した末梢血 CD14 陽性細胞における遺伝子発現

Probe Name	Gene Symbol	ttest (paired) p-value	解析結果				アレイ解析数値データ (75%tile log2)					
			FC Absolute	FC regulation	SAM ranking	WAD ranking	Vitamin D3の添加なし			Vitamin D3の添加あり		
							C1	C2	C3	C1	C2	C3
A_23_P253791	<b>CAMP</b>	0.001200	888.24	up	5	8	-7.00541	-4.9251	-6.41687	2.156995	5.400211	3.479859
A_23_P420863	<b>NOD2</b>	0.016202	4.82	up	427	158	0.616155	1.299781	0.369632	3.411672	3.084832	2.597489
A_24_P129277	NOD1	0.018438	2.09	down	1061	1707	-0.12863	-0.32798	0.419016	-1.41922	-1.1177	-0.68852

### C. 研究結果

抗凝固剤としてヘパリン添加して採取した末梢血から比重遠沈にて単核球を採取した後、FITC 標識した抗 CD14 抗体でラベルすると、図 1 上段に示すような純度で細胞が採取できる。さらに抗 FITC 標識磁気ビーズを用いることで、純度 95%以上で、単球が得られる。

ビタミン D3 を添加した CD14 陽性細胞より mRNA を抽出し、共同研究先であるかずさ DNA 研究所(木更津市)へと検体を送付し、mRNA の純度を評価した後、発現する遺伝子の網羅解析を行った。

その結果、ビタミン D3 を添加することで、これまで発現誘導すると報告されている抗菌ペプチド (CAMP/LL37) とともに、NOD2 の発現が優位に発現増強していることが確認され、実験系としては予定通り、機能していることが確認された (表 1)。

しかしながら、健常者との比較検討で、NOD2 変異を有する患者から採取した末梢血 CD14 陽性細胞において、ビタミン D3 添加によって NOD2 の発現が増強したにもかかわらず、*in vitro* の系で遺伝子を細胞株へと強制発現させた時に観察されるような NF- $\kappa$ B が活性化していると示唆する遺伝子発現の推移は確認できなかった。

### D. 考察

恒常活性型変異体である NOD2 を背景とするブラウ症候群/EOS で肉芽腫がみられる、その分子機序を明らかに発現する遺伝子の網羅解析を行ったが、少なくとも今回の検討においては、NOD2 変異を来す患者において NF- $\kappa$ B の活性化を示唆する遺伝子発現を確認することはできなかった。

これまでの検討結果として、採取した患者由来末梢血 CD14 陽性細胞に NOD2 の発現を誘導することで、健常者との差異を検証する系を確立する必要があると思われる、実際にビタミン D3 の添加により、報告されている (Wang TT, et al. *J Biol Chem*. 2010) 抗菌ペプチドの発現増強を確認することができた。しかしながら、今回の検討では、病態解析に結びつけることができるとされる様な、少なくとも NF- $\kappa$ B の活性化を示唆する発現遺伝子の変動は依然として確認できなかった。

これは、ビタミン D3 添加によって、分離した細胞に NOD2 の発現を誘導することが

できたものの、発現した NOD2 からのシグナルを有効に伝えるための機構が、必ずしもこの細胞には備わっていない可能性を考えた。このため、今後の実験においては、分離した CD14 陽性細胞をマクロファージへと分化誘導することで、肉芽腫形成に関わると考えられる因子の検討を予定している。

### E. 結論

ブラウ症候群/EOS では恒常活性型変異体である NOD2 を背景として肉芽腫を来す疾患であり、患者で同定される変異 NOD2 は、HEK293 細胞へと強制発現させた際には NF- $\kappa$ B の活性化を来すものの、患者から分離培養した末梢血を用いた検討では、未だ、病態解析に結びつけられる様な治験を得るには至っていない。今後とも、病態解析を目指して、検討を加えていく予定である。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

国内学会

1. 神戸直智 (2013) 若年発症サルコイドーシスの患者末梢血 CD14 陽性細胞を用いた病態解析の試み (厚生労働省難治性疾患克服研究事業「自己炎症疾患とその類縁疾患に対する新規診療基盤の確立」班平成 24 年度班会議, 2 月 1 日, 東京)

### H. 知的財産権の出願・登録状況

#### 1. 特許取得

なし

#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

なし