

## RP の診断基準

## マクアダムスの診断基準 (McAdam's Criteria)

以下の 3 つ以上が陽性

1. 両側性の耳介軟骨炎
2. 非びらん性、血清陰性、炎症性多発性軟骨炎
3. 鼻軟骨炎
4. 眼炎症: 結膜炎、角膜炎、強膜炎、上強膜炎、ぶどう膜炎
5. 気道軟骨炎: 咽頭あるいは気管軟骨炎
6. 蝸牛あるいは前庭機能障害: 神経性難聴、耳鳴、めまい

生検(耳・鼻・気管)の病理学的診断は、臨床的に診断が明らかであっても基本的には必要である。

## ダミアニの診断基準 (Damiani's Criteria)

1. マクアダムスの診断基準で 3 つ以上が陽性の場合、必ずしも組織学的な確認は必要ない
2. マクアダムスの診断基準で 1 つ以上が陽性で、確定的な組織所見が得られる場合
3. 軟骨炎が解剖学的離れた 2 箇所以上で認められ、それらがステロイド/タブソン治療に反応して改善する場合

## 再発性多発軟骨炎疾患活動性評価票

医師名 \_\_\_\_\_  
 評価日 \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日  
 患者ID番号 \_\_\_\_\_

この評価票では再発性多発軟骨炎に基づく症状のみを、過去28日以内に認められた症状について評価する。

- | 点数 | 全身症状                                     | 点数 | 皮膚・腎症状                                     |
|----|--|----|--|
| 2  | <input type="checkbox"/> 発熱(38度以上)       | 3  | <input type="checkbox"/> 紫斑                |
|    | <input type="checkbox"/> リウマチ様症状         | 4  | <input type="checkbox"/> 血尿                |
| 1  | <input type="checkbox"/> 関節炎             | 6  | <input type="checkbox"/> 蛋白尿               |
|    | <input type="checkbox"/> 軟骨炎             | 17 | <input type="checkbox"/> 腎不全               |
| 3  | <input type="checkbox"/> 胸骨柄軟骨炎          |    | <input type="checkbox"/> 心血管症状             |
| 4  | <input type="checkbox"/> 胸鎖軟骨炎           | 9  | <input type="checkbox"/> 心膜炎               |
| 4  | <input type="checkbox"/> 肋軟骨炎            | 16 | <input type="checkbox"/> 大型そして/または中型血管障害   |
| 9  | <input type="checkbox"/> 耳介軟骨炎(片側または両側)  | 17 | <input type="checkbox"/> 心筋炎               |
| 9  | <input type="checkbox"/> 鼻軟骨炎            | 18 | <input type="checkbox"/> 急性大動脈弁または僧帽弁不全    |
|    | <input type="checkbox"/> 眼症状神経症状         | 12 | <input type="checkbox"/> 運動または感覚運動神経障害     |
| 5  | <input type="checkbox"/> 上強膜炎            | 22 | <input type="checkbox"/> 脳炎                |
| 9  | <input type="checkbox"/> 強膜炎             |    | <input type="checkbox"/> 呼吸器症状             |
| 9  | <input type="checkbox"/> ぶどう膜炎           |    | <input type="checkbox"/> 呼吸器軟骨炎(喉頭、気管、気管支) |
| 11 | <input type="checkbox"/> 角膜潰瘍            | 14 | <input type="checkbox"/> 急性呼吸不全を伴わない       |
| 14 | <input type="checkbox"/> 網膜血管炎           | 24 | <input type="checkbox"/> 急性呼吸不全を伴う         |
|    | <input type="checkbox"/> 生化学             |    | <input type="checkbox"/> その他の症状            |
| 3  | <input type="checkbox"/> CRP(2.0mg/dl以上) |    | <input type="checkbox"/> 症状の詳細記            |
|    | <input type="checkbox"/> 内耳機能障害          |    |  |
| 8  | <input type="checkbox"/> 感音難聴            |    |  |
| 12 | <input type="checkbox"/> 前庭機能障害          |    |  |

総点数(RPDAIスコア)

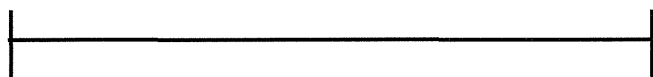
この患者の疾患活動性を医師としてあなたが判断してください

- 活動性なし  
くすぶりあるいは時々  
弱い活動性  
中等度の活動性  
高度の活動性

この患者の活動性を下の線にしるしてください。

活動性全くなし

最高の活動性



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業））  
分担研究報告書

再発性多発軟骨炎の診断と治療体系の確立

—軟骨炎により侵された軟骨再生医療に向けた自己組織化バイオマテリアルの創製—

研究分担者 遊道 和雄 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター

研究要旨：再発性多発軟骨炎（relapsing polychondritis、以下 RP）は、原因不明で稀な難治性疾患である。本邦における疫学情報や病態研究は不十分であり、診断・治療のための指針が作成されていない。  
本年度は、平成21年度厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業[課題名：疾患の診断及び治療方法の更なる推進に関する研究]の計画に基づいて、聖マリアンナ医科大学および全国基幹医療機関・施設（RP診療担当科）の研究者で構成されるRP研究チームを組織し、病因・病態の解明ならびに、診断および治療法の確立を目指した研究を進めている。平成24年度は、本疾患の進行、すなわち軟骨炎（軟骨組織の炎症細胞浸潤・破壊）に対する新規治療法として再生医療導入の可能性を探求するため、自己組織化軟骨様バイオマテリアルの創製に向けた研究開発を行なったので報告する。

A. 研究目的

i) 研究の背景

再発性多発軟骨炎（relapsing polychondritis、以下 RP）は、原因不明で稀な難治性疾患である。本邦における疫学情報や病態研究は不十分であり、かつ診断・治療のための指針が作成されていない。その為、認知度が低く診断が見過ごされているケースも多く、気道軟骨病変などの臓器病変を伴う患者の予後は極めて不良であり、診断、治療法の確立が急務である。

我々は平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業[課題名：再発性多発軟骨炎の診断と治療体系の確立]において、RP に対する患者実態・疫学調査(RP 239 症例)を行ない、本邦の患者実態(有病率、初発年齢、性差、臨床像、予後)に加えて、ステロイド剤や免疫抑制剤、生物学的製剤の治療薬の効果に関して新たな知見を得た。しかしながら、本症に対する薬物療法の有効性については未だ不明な点も多く、既に軟骨炎が進行し、変性破壊が進んでしまった軟骨組織病変については、薬物療法で進行を抑制することはできても、その組織そのものの機能を維持または再建することは困難と言わざるを得ない。

特に軟骨組織は、無血管・無神経分布の自己修復能のない組織であり、発生学的にも組織学的にも細胞外

マトリックスが組織体積比 90%（細胞成分 10%）を占め、かつ高度に分化した硬組織であることから、他の組織のように幹細胞等を培養して再生組織を作製しても、軟骨特有の組織・機能までを再生・再建できる技術レベルには至っていない。

ii) 本年度研究の目的

本年度研究の目的は、再発性多発軟骨炎における進行性の軟骨炎のため、重度に軟骨組織変性・破壊が進み、罹患軟骨部位の機能障害（気道軟骨の破壊、鼻軟骨破壊による鞍鼻、耳介軟骨破壊等）に対して軟骨再生医療を実現するための自己組織化軟骨様バイオマテリアルを創製することである。

iii) 期待される研究成果

本研究の達成によって、発症早期から進行期のうちに、炎症により変性破壊された軟骨部を修復させ、症状を治療し、RP 罹患軟骨の変性の広がりや破壊を防止する新しい治療戦略・再生医療の柱となるバイオマテリアルを早く世に出し、医療の場で役立つことを期待している。これにより、現在まだ予防または早期治療薬のない RP 患者の生命予後および QOL 低下を改善し、社会的損失と医療費の軽減の一助としたい。

さらに、現在研究が進んでいる iPS 細胞を用いた再生医療研究に対しても、軟骨組織固有の特性を生かし

た scaffold として本研究シーズを活用できることから、再生医療の実現に資するものと考えられる。

## B. 研究の概要

### i) これまでの人工軟骨の問題点

#### ① ヒト培養細胞を用いた人工軟骨

個々の患者由来の関節軟骨組織から分離した軟骨細胞を培養して増やす場合にも、間葉系幹細胞や iPS 細胞から軟骨細胞を誘導するにしても、軟骨組織を形成するためには細胞自体に軟骨マトリックスを産生させるプロセスが必須である。しかし、例えば  $1\text{ cm}^3$  の軟骨欠損を充填するには、 $2 \sim 5 \times 10^6$  個の軟骨細胞が必要とされており、大型の再生組織を作製するために必要十分な細胞数を獲得するには細胞培養を数代にわたり続ける必要がある。このため継代培養中に軟骨細胞としての特性を失い、脱分化する可能性があり、細胞資源確保の観点から解決すべき問題点も多い。

ヒト軟骨細胞を培養した培養軟骨を用いた再生医療には、自己細胞を採取するための事前の手術や数週間の細胞培養を必要とする。さらに移植時の培養軟骨(ゲル状)は軟骨機能として必須の弾性を持たず、仮に移植した人工軟骨様組織が欠損部に生着してとしても軟骨に求められる機能(弾性)を発揮できる組織として維持されるか否かについては今後の詳解を待たねばならない。

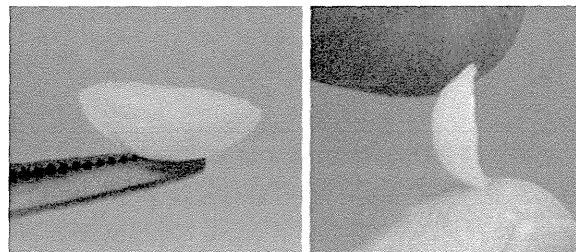
#### ② 化学合成による人工軟骨

ヒアルロン酸を架橋剤で架橋した例や、グリコサミノグリカンとポリカチオンを縮合剤で架橋したグリコサミノグリカン-ポリカチオン複合体の報告がある。しかし、架橋剤や縮合剤を用いた場合は、製造過程で架橋剤、縮合剤、副生成物を洗浄除去する手間がかかり、また、これらを体内に移植した場合は残留化学物質のリスクがある。

### ii) 我々が開発中の人工軟骨

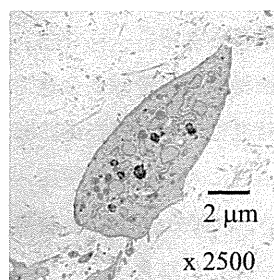
我々は、軟骨マトリックスの構成成分(II型コラーゲン、プロテオグリカン、ヒアルロン酸)のみを用い、各種反応条件下で軟骨様組織が形成されるかを

検討した結果、成分の濃度及び pH 等を特定範囲に制御することで、 $0.1 - 500\text{ micrometer}$  長( $10 - 50\text{ nanometer}$  径)の細繊維からなる II 型コラーゲン-アグリカン複合体を自己組織化させることに成功した(特許査定手続き中 2013 年 2 月)。



人工軟骨様複合体

作製した人工軟骨様組織を位相差顕微鏡で観察したところ、細繊維からなる密な網状構造が観察された。人工軟骨様組織を走査型および透過型電子顕微鏡で観察した結果、コラーゲン分子配列からなる細繊維の網状構造間に、一本鎖のヒアルロン酸高分子に平均約  $100-200$  個のプロテオグリカン分子が結合したアグリカン-ヒアルロン酸複合体が保持されている構造体が観察された。これは、生体軟骨組織の基本骨格であるコラーゲン線維網と、保水機能を担うプロテオグリカンがヒアルロン酸に結合した複合体に相当する構造に相当すると考えた。



電顕写真：バイオマテリアル内の軟骨細胞

(自著論文図より改変)

また、人工軟骨様組織の作製段階で、溶液中に浮遊培養軟骨細胞を加えることで、複合体中に細胞を播種し、 $37^\circ\text{C}$  の細胞培養器で 8 週間培養させたのち、光学顕微鏡視下に観察したところ、細胞の生着と増殖が観察された。この組織を走査型および透過型電子顕微鏡で解析すると、細胞突起を伸ばして複合体

に接着し、正常な細胞内小器官も観察された。

さらに研究を進めて、最終的には生体軟骨特性に近い弾力性 [1~2 MPa (メガパスカル)と表面低摩擦性(0.001~0.003)を有する製法を目指していく(文献)。

現在、実験動物を用いて、この自己組織化軟骨様バイオマテリアルの生体親和性および生体内における機能を試験中である。

## 結語

RP において軟骨組織は再発・多発性に変性破壊されていく。軟骨組織は無血管で、かつ自己治癒能に乏しいことから、ADL 障害に対して QOL を維持するためには、予防とともに早期の比較的小範囲・軽度変性の段階から病変を治療して増悪させないような、発症早期~中期に対応した新しい治療法の確立が求められている。しかし、軟骨変性を早期から抑制し、保護する有効な医薬品は未だない。

我々は、未だ有効な治療法のない RP の軟骨障害に対して、次世代の中心的治療法と位置づけられる再生医療への応用を目標として、既存の軟骨再生技術に比べて構造・機能ともに生体軟骨により近似した「細胞を培養せずに作製する自己組織化軟骨再生用バイオマテリアル」を短時間で創製する技術を研究した。

## 文献

Yudoh K. A Novel Biomaterial for Cartilage Repair Generated by Self-Assembly: Creation of a Self-Organized Articular Cartilage-Like Tissue. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 2012, 3, 125-129.

## 知的財産

出願番号 PCT/JP2006/318188

自己組織化軟骨様バイオマテリアル

(2013年2月現在 特許査定手続き中)

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)  
分担研究報告書

再発性多発軟骨炎の診断と治療体系の確立  
—再発性多発軟骨炎の病因病態解明に向けた基礎的解析—

研究分担者 遊道 和雄 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター

**研究要旨：** 再発性多発軟骨炎 (relapsing polychondritis, 以下 RP) は、原因不明で稀な難治性疾患である。本邦における疫学情報や病態研究は不十分であり、診断・治療法の確立のため RP の病因病態解明を進める必要がある。本年度は、本疾患の進行、すなわち軟骨炎 (軟骨組織の炎症細胞浸潤・破壊) の病因病態解明および新規治療法開発の糸口を探求するため、軟骨細胞のストレス応答や防御機構、軟骨変性の機序を行なったので報告する。

A. 研究目的

i) 研究の背景

再発性多発軟骨炎 (relapsing polychondritis, 以下 RP) は、原因不明で稀な難治性疾患である。本邦における疫学情報や病態研究は不十分であり、かつ診断・治療のための指針が作成されていない。その為、認知度が低く診断が見逃されているケースも多く、気道軟骨病変などの臓器病変を伴う患者の予後は極めて不良であり、診断、治療法の確立が急務である。

我々は平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業[課題名:再発性多発軟骨炎の診断と治療体系の確立]において、RP に対する患者実態・疫学調査(RP 239 症例)を行ない、本邦の患者実態(有病率、初発年齢、性差、臨床像、予後)に加えて、ステロイド剤や免疫抑制剤、生物学的製剤の治療薬の効果に関して新たな知見を得た。しかしながら、本症に対する薬物療法の有効性については未だ不明な点も多く、既に軟骨炎が進行し、変性破壊が進んでしまった軟骨組織病変については、薬物療法で進行を抑制することはできても、その組織そのものの機能を維持または再建することは困難と言わざるを得ない。

特に軟骨組織は、無血管・無神経分布の自己修復能のない組織であり、発生学的にも組織学的にも細胞外マトリックスが組織体積比 90% (細胞成分 10%) を占め、かつ高度に分化した硬組織であるが、軟骨組織の炎症発生の病因・病態、軟骨細胞応答能や防御機構、

軟骨変性のメカニズムについては未だ不明な点が多い。

ii) 本年度研究の目的

本年度研究の目的は、再発性多発軟骨炎における進行性の軟骨炎の病因病態解明に向けて、軟骨の炎症・変性発生機序の解明を目指し、様々な外因性ストレスに対する軟骨細胞応答能や防御機構および軟骨変性のメカニズムを *in vitro* で解析することである。

iii) 期待される研究成果

本研究は、RP 発症と密接に関わる外因性ストレスに対する軟骨細胞の応答機構、特に未だ解明されていない外因性ストレスに対する軟骨防護機構としての細胞内ストレス応答因子の生物学的的重要性 (軟骨変性との関連) について解明を試みる初めての基礎的研究である。本研究を通じて、関節軟骨変性の発生機序を軟骨細胞 DNA 損傷修復酵素の変化の観点から詳細し、新規の RP 病因・病態解析および治療法開発研究の糸口が得られた。

iv) 研究期間内の達成点と今後の課題

「防御機構としての軟骨細胞ストレス応答の調節機構」と「細胞ストレス応答調節機構の変化・破綻がもたらす軟骨変性における意義」を検討した。

具体的には、軟骨異化因子 (炎症) に応答する軟骨細胞 DNA 損傷修復酵素(Ogg1, Apex2)発現・活性の細

胞内情報伝達路を解析し、ストレス応答の調節機構・防御機構としての役割を検証した。

さらに現在、DNA 修復酵素群の調節機構の変化・破綻が軟骨変性の誘因となるか否かを解析中である。

## B. 研究の概要

**本研究の着想点・仮説：** 最近、細胞のストレス応答機構として DNA 損傷に対する修復酵素の重要性が指摘されている。我々は、炎症や酸化ストレス等に応答して軟骨細胞内の DNA 修復酵素の発現や活性は変化し、軟骨細胞内の防御機構として関節軟骨の恒常性維持に働くが、外因性ストレスに抗しきれなくなって機能が低下すると軟骨細胞活性の低下や細胞死、炎症等を惹起し、RP においても軟骨変性や軟骨炎の発症・増悪に関連するのではないかと考えている。

## 本年度の研究成果

### DNA 損傷修復酵素に関する知見：

我々は本研究において、DNA 損傷修復酵素 Ogg1 の発現度は軟骨組織の変性度と相関して低下していること、変性軟骨部の細胞にはグアニン酸化体 (8-oxoguanine) が高発現することを見出した (国際変形性関節症学会 OARSI2013 発表, OARSI2014 発表予定、論文投稿中)。

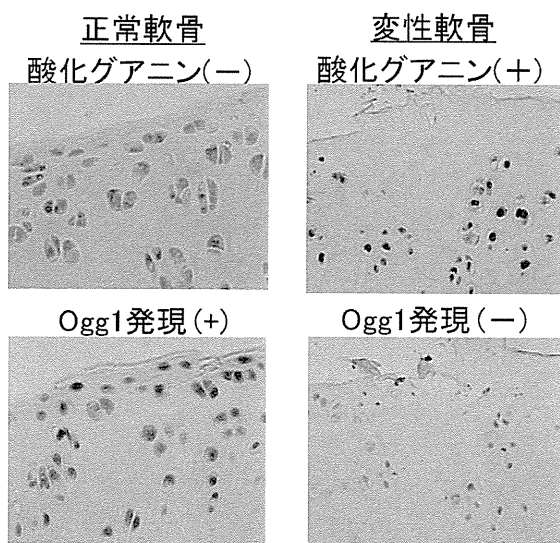


図 1. 変性軟骨組織に発現する DNA 修復酵素 (Ogg1)  
(自著投稿論文図表より改変)

図 1 にみるように、軟骨変性部においては DNA 酸化損傷の結果としてグアニン酸化体が高発現しており、これに相反して DNA 損傷修復酵素 Ogg1 活性は低下していた。この研究結果から、変性部の軟骨細胞では DNA 損傷が蓄積して細胞死や軟骨組織の恒常性低下がみられ、ひいては軟骨変性につながっていくことが示唆された。現在、Ogg1 発現動態の変化と RP の軟骨炎発症のメカニズムとの関連を検討している。

さらに本研究において、軟骨変性・異化の誘導因子に応答した DNA 修復酵素 AP エンドヌクレアーゼ (Apex2) の発現が、正常軟骨細胞ではみられず、変性軟骨組織における軟骨細胞のみにおいて上昇していることを新たに見出した (投稿準備中)。

## C. 考察

### 1) 疾患における軟骨変性・炎症発症機序について

国内外における多くの精力的研究から、軟骨の発症は加齢・老化に伴う軟骨基質マトリックスの組成変化に加えて、炎症等のケミカルストレス、肥満や荷重等のメカニカルストレスと、それに伴い誘導される酸化ストレス (活性酸素種) の蓄積が関与し、軟骨細胞 DNA 損傷および軟骨基質の変性を引き起こすとされ、酸化ストレスと関節軟骨変性の発症・進行は密接な関連を持つことが明らかとされてきた。

そこで我々は、軟骨病変の主要因と考えられる軟骨組織への炎症を含む様々なストレスによって生じる軟骨組織における過剰なフリーラジカル産生と、軟骨細胞 DNA 酸化損傷および軟骨変性との関連について一連の研究を進め、軟骨変性の発生機序を軟骨細胞の DNA 酸化損傷の観点から解明中である。

### 2) DNA 修復酵素(Ogg1, Apex2)について

遺伝情報を担う DNA を構成する塩基 (アデニン、グアニン、シトシン、チミン) は、シャルガフの法則からアデニンはチミン、グアニンはシトシンとしか水素結合せず、DNA 鎖は互いに逆向きに二重らせんとなる。しかし、活性酸素種により生じる DNA 損傷のなかで、グアニンの酸化体である 8-oxoguanine は DNA 複製の際にシトシンと同程度の効率でアデニンと結合する point mutation を引き起こし、これが発癌をはじめ様々な疾患の病因の一つと考えられている。この DNA 酸

化損傷に対する防御機構として、DNA 修復酵素 Ogg1 や Apex2 の重要性が指摘されている。

近年、DNA 塩基グアニン酸化体を修復する DNA 損傷修復酵素 Ogg1 や Apex2 については、筋萎縮性側索硬化症やアルツハイマー病の神経細胞で発現の低下が報告され、神経変性疾患の病因・病態との関連が示唆されている(Kikuchi H et al., Acta Neuropathol. 2002, 408-414)。さらに、神経以外の組織の変性疾患における当該因子の病態への関与も研究が進められている。

こうした神経変性疾患における知見ならびに、変性軟骨組織における細胞応答関連遺伝子・蛋白に関する我々の本研究成果は、RP の病因病態の解明の一助となり、診断と治療法の向上に役立つものと考えられる。

## 結語

RP において軟骨組織は再発・多発性に変性破壊されていく。軟骨組織は無血管で、かつ自己治癒能に乏しいことから、ADL 障害に対して QOL を維持するためには、予防とともに早期の比較的小範囲・軽度変性の段階から病変を治療して増悪させないような、発症早期～中期に対応した新しい治療法の確立が求められている。しかし、軟骨変性を早期から抑制し、保護する有効な医薬品は未だない。

我々は、未だ病因が明らかでない RP における軟骨炎、軟骨変性の発生機序の解明を目指し、変性軟骨組織由来の軟骨細胞を用いて *in vitro* 解析を行なった。その結果、我々は変性軟骨ではグアニン酸化体を始めとする核酸の酸化損傷の蓄積と、これに対する防御因子 DNA 修復酵素 Ogg1, APEX2 の発現変動を見だし、軟骨変性の病因・病態に軟骨細胞の核酸酸化損傷と、その防御機構の異常が関与する可能性を初めて明らかにした。

この核酸修復酵素に関する研究成果を基に、今後も以下の RP 病因病態の解明に向けた研究を行なう。

(1) 軟骨細胞における RP 関連因子(炎症性サイトカイン)に応答する核酸修復酵素の活性調節機構を解析する。

(2) RP 関連因子に応答する核酸修復酵素活性の変動と軟骨変性との関連を解明し、さらに治療ターゲットを探索する。

## 文献

1. Yudoh K., et al. Potential involvement of mitochondrial DNA repair enzyme, 8-oxoguanine DNA glycosylase (Ogg1), in the degeneration of articular cartilage in osteoarthritis (OA): Ogg1 protects against the catabolic stress-induced downregulation of chondrocyte activity and the apoptosis in OA (submitted).
2. Yui N., Karasawa R., Yudoh K. DNA repair enzyme, apurinic/aprimidinic endonuclease 2 (APEX2), has a potential to protect against the down-regulation of chondrocyte activity in osteoarthritis (preparing).



## 再発性多発軟骨炎における疾患活動性マーカーの探索研究

研究分担者 山野 嘉久 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 准教授

**研究要旨：** 再発性多発軟骨炎（relapsing polychondritis, 以下 RP）は全身の軟骨組織における再発性の炎症を特徴とする難治性疾患である。これまで RP の疾患活動性や治療効果判定を評価する検査に関しては、C 反応性タンパク質（以下 CRP）や抗 typeII コラーゲン抗体が用いられている。しかし、これらは正常範囲内にあっても軟骨破壊が進行することも多く、より感度に優れた疾患活動性マーカーの同定の必要性が高い。そこで本研究では、より優れた RP の疾患活動性マーカーを同定することを目的とし、28 種類のマーカー候補分子を活動性 RP 患者と非活動性 RP 患者間で比較した。その結果、既存マーカーである CRP、COMP、抗 typeII コラーゲン抗体は活動性 RP 患者群よりも活動性 RP 患者群で高値を示す傾向はあるものの有意差を認めないのに対し、sTREM-1 は活動性 RP 患者群において有意に高値を示した。実際、活動性 RP 患者において sTREM-1 値の変動が治療に応答した臨床症状の変化と一致した例を認めた。以上から、sTREM-1 は RP の疾患活動性マーカーとして既存のマーカーよりも優れている可能性が示唆された。

### A. 研究目的

再発性多発軟骨炎（以下 RP）は、原因不明の稀な難治性疾患である。その病態は全身の軟骨組織およびムコ多糖を多く含む組織における寛解と再発を繰り返す炎症によって特徴づけられる。耳介の発赤・腫脹・疼痛、鞍鼻、関節の腫脹・疼痛、嗄声、咳嗽、眼痛、難聴、眩暈など多彩な症状を示し、気道病変や血管炎により予後不良な例が存在する。RP のような慢性疾患では疾患の活動性を正しく評価し、それに応じた治療を行うことが長期予後を改善するためには重要である。これまで RP 患者の疾患活動性は CRP や抗 type II コラーゲン抗体によって評価されており、急性期には多くの RP 患者で高値を認める。しかしながら、CRP が正常範囲内にある症例でも軟骨の破壊・線維化が進む例も多く、CRP では疾患活

動性の評価が困難な面がある。また抗 type II コラーゲン抗体も疾患活動性との相関が報告されているが、陽性者は RP 患者の 30～50% にすぎず、感度・特異度もあまり高くないという報告もある。そこで、昨年度までに RP を検出する感度のよいマーカーを同定する目的で 28 種類のマーカー候補分子の中から、健常者と比較して RP 患者血清で有意に高値を示す分子を探索し、可溶性 TREM-1 (sTREM-1)、インターフェロン $\gamma$ 、CCL4/MIP-1 $\beta$ 、VEGF および MMP-3 を同定した。今年度は、疾患活動性をより正確に反映するマーカーを同定することを目的として、以下の実験を行った。

### B. 研究方法

(1) 本研究では Damiani による診断基準を用いて診断された RP 患者 15 名を以下の

criteria に従って、活動性と非活動性の 2 群に分け、マーカー候補分子をこの両群で比較した (表 1、表 2)。活動性 RP とする基準は耳介、鼻、気管の 3 か所のうち、2 か所以上の軟骨炎を認める例および 1 か所とその他 2 つの症状 (眼の炎症、関節炎、又は聴覚・前庭症状) を有する例とした。この基準において活動性 RP 患者 8 名、非活動性 RP 患者 7 名となり、この両群の比較を Welch の t 検定によって実施した。

測定した項目は以下の通りである。

IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF, IFN $\gamma$ , GM-CSF, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CXCL10/IP-10, vascular endothelial growth factor (VEGF), CX3CL1/Fractalkine の測定には Cytometric Bead Array Flex set system (BD Biosciences) を用いた。IL-17, matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-2, MMP-3, MMP-13, 可溶性 TREM-1 (sTREM-1), cartilage oligomeric matrix protein (COMP) および抗 typeII コラーゲン抗体は ELISA を用いて、測定を行った。CRP 濃度 (CRP および高感度 CRP) は三菱化学メディエンスにおいて N-Latex CRPII キットを用いた nephelometry によって測定された。

(2) 血清 sTREM-1 値が RP の疾患活動性を反映し、治療に対して応答するかどうかを調べるために、メトトレキサートによる治療を開始した活動性 RP 患者において、臨床症状、治療内容、sTREM-1 値および CRP 値が経時的に得られた例があり、その結果を解析した。

(3) RP 患者において血清 sTREM-1 値が高値を示す機序を推定するため、健常者 2 名および RP 患者 2 名の末梢血単核球を用いて、5 つの各細胞群における膜型 TREM-1 の発現を解析・比較した。具体的には、フローサイトメトリーを用いて、CD4+T 細胞 (CD3+CD4+細胞)、

CD8+T 細胞 (CD3+CD8+細胞)、B 細胞 (CD3-CD19+細胞)、単球 (CD3-CD14+細胞) および NK 細胞 (CD3-CD56+細胞) における TREM-1 発現を解析した。

(4) RP 患者の病変部における膜型 TREM-1 発現の有無と局在を調べるために、免疫組織染色を行った。コントロールとして非特異的な炎症による肉芽組織を使用した。

#### (倫理面への配慮)

臨床検体の収集に際しては、本学の生命倫理委員会で承認された (承認番号: 第 1625 号) 同意書を用いて、不利益や危険性の排除などに関するインフォームドコンセントを行った。また検体は、提供者を特定できないように個人情報管理者が連結不可能匿名化により番号化し、患者の人権擁護に努めた。

### C. 研究結果

(1) 28種類のマーカー候補分子を活動性 RP 患者群と非活動性 RP 患者群で比較すると、RP のマーカーとして報告のある CRP, COMP および抗 typeII コラーゲン抗体は確かに活動性 RP 患者において高値を示すが、非活動性 RP 患者群との比較において有意差を示すことができなかった。それに対して、sTREM-1 は活動性 RP 患者群において有意に高値を示した ( $p = 0.0403$ ) (表 2)。

(2) 図 1 に示すように、メトトレキサートによる治療を開始後、嗄声が改善すると同時に、720.5 pg/ml と異常高値を示していた sTREM-1 レベルが 106.6 pg/ml まで低下した。この値は我々が以前、決定した「健常者と RP 患者を判別するカットオフ」である 158 pg/ml を下回るレベルである。また、重要なことにメトトレキサート投与前、CRP 値は 0.41 mg/dl と正常値に近く、疾患活動性が捉えられていない状況においても、sTREM-1 値は異常高値を

示した。

(3) 図2に RP 患者1名の解析結果を示す。その結果から単球 (CD3-CD14+細胞) においてのみ、膜型 TREM-1 の発現レベルが高いことが判明した。そこで、RP 患者および健常者由来の単球上の膜型 TREM-1 発現レベルを比較したが、両者に発現の差を認めなかった(図3)。

(4) 膜型TREM-1はRP患者の病変部にある軟骨細胞上では検出されず、病変部にある炎症性肉芽組織の血管内皮細胞において発現していることが明らかになった (図4)。

#### D. 考案

昨年度までに健常者と比較して RP 患者血清で有意に高値を示す分子として、sTREM-1、インターフェロングamma、CCL4/MIP-1beta、VEGF および MMP-3 を同定していたが、その中で血清 sTREM-1 レベルは活動性 RP および非活動性 RP も区別することが可能であったため、RP の疾患活動性マーカーとして優れていることが明らかとなった。実際、活動性 RP 患者において sTREM-1 値の変動が治療に応答した臨床症状の変化と一致した例を認めた。これは血清 sTREM-1 が RP の疾患活動性マーカーだけでなく、治療応答マーカーである可能性も示唆するものである。

膜型 TREM-1 は免疫グロブリンスーパーファミリーの一員で、主に好中球、単球/マクロファージの細胞膜上に発現していることが知られるが、本研究では少なくとも単球を含む末梢血単核球において、健常者と RP 患者間で膜型 TREM-1 の発現量に差を認めなかった。しかし、RP 病変部の血管内皮細胞ではコントロールでは確認できない膜型 TREM-1 が発現していたことから、活動性の高い RP 患者における末梢血中の sTREM-1 の上昇は血管内皮細胞上の TREM-1 から切断・遊離されてくる可能性が考えられた。

#### E. 結論

本研究により CRP, COMP および抗 type II コラーゲン抗体よりも優れた RP の疾患活動性マーカーとして血清 sTREM-1 を同定することができた。この血清 sTREM-1 レベルは RP の治療応答性マーカーとしての可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tamai Y., Hasegawa A., Takamori A., Sasada A., Tanosaki R., Choi I., Utsunomiya A., Maeda Y., Yamano Y., Eto T., Koh K., Nakamae H., Suehiro Y., Kato K., Takemoto S., Okamura J., Uike N., Kannagi M. Potential contribution of a novel Tax epitope-specific CD4+ T cells to graftversus-Tax effects in adult T-cell leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Immunology*, in press, 2013.
- 2) Sato T., Yamano Y., Tomaru U., Shimizu Y., Ando H., Okazaki T., Nagafuchi H., Shimizu J., Ozaki S., Miyazawa T., Yudoh K., Oka H., Suzuki N. Serum level of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as a biomarker of disease activity in relapsing polychondritis. *Modern Rheumatology*, in press, 2013.
- 3) Yagishita N., Aratani S., Leach C., Amano T., Yamano Y., Nakatani K., Nishioka K. and Nakajima T.

RING-finger type E3 ubiquitin ligase inhibitors as novel candidates for the treatment of rheumatoid arthritis.  
*Int. J. Mol. Med*, 30:1281-1286, 2012.

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

## 2. 学会発表

表 1 被験 RP 患者の臨床情報

	RP 患者		
	全例(n = 15)	活動性(n = 8)	非活動性(n =7)
年齢(年)	47 [10-81]	50.5 [10-74]	44 [27-81]
女性の割合	53.3%	50.5%	57.1%
罹病期間(年)	5 [1-19]	12 [4-19]	4 [1-8]
耳介軟骨炎	46.7%	62.5%	28.6%
鼻軟骨炎	40.0%	62.5%	14.3%
気管軟骨炎	66.7%	87.5%	42.9%
耳症状	53.3%	87.5%	14.3%
関節炎	46.7%	75.0%	14.3%
眼の炎症	33.3%	50.0%	14.3%

表2 活動性RP患者と非活動性RP患者におけるマーカー候補分子の血清濃度の比較

Biomarker candidates <sup>a</sup>	Units	Active RP (n=8)		Inactive RP (n=7)		P*
		Mean	± SD	Mean	± SD	
sTREM-1	pg/ml	353.39	± 158.03	200.14	± 95.11	<b>0.0403</b>
VEGF	pg/ml	339.19	± 218.10	185.48	± 106.88	0.1066
hs-CRP	ng/ml	0.48	± 0.64	0.10	± 0.08	0.1342
TNF	pg/ml	1.43	± 2.65	N.D.		0.1708
IL-6	pg/ml	2.38	± 4.45	N.D.		0.1752
IL-17A	pg/ml	0.05	± 0.14	0.71	± 1.14	0.2129
MMP-3	ng/ml	334.71	± 400.33	138.44	± 135.59	0.2254
MMP-1	ng/ml	5.35	± 4.35	3.07	± 2.51	0.2658
MMP-13	ng/ml	0.30	± 0.11	0.26	± 0.05	0.3469
IL-1 $\alpha$	pg/ml	1.01	± 2.86	N.D.		0.3506
IL-1 $\beta$	pg/ml	1.09	± 3.07	N.D.		0.3506
IL-10	pg/ml	1.30	± 3.68	N.D.		0.3506
IL-12p70	pg/ml	0.66	± 1.87	N.D.		0.3506
CX3CL1	pg/ml	12.29	± 34.75	N.D.		0.3506
MMP-2	ng/ml	139.68	± 25.79	125.38	± 31.39	0.3589
COMP	ng/ml	30.26	± 35.31	17.56	± 10.53	0.3598
CXCL10	pg/ml	251.14	± 110.78	204.78	± 121.20	0.4563
IFN- $\gamma$	pg/ml	4.54	± 7.29	6.93	± 5.06	0.4703
CXCL8	pg/ml	17.31	± 6.34	15.01	± 8.11	0.5571
CCL2	pg/ml	80.59	± 78.04	62.80	± 30.33	0.5660
CCL4	pg/ml	141.68	± 90.46	124.7	± 33.26	0.6332
IL-4	pg/ml	0.83	± 2.36	0.76	± 2.02	0.9509
CCL5	ng/ml	37.87	± 17.21	37.42	± 15.05	0.9585
$\alpha$ COLII Ab <sup>b</sup>	U/ml	382.34	± 808.48	162.44	± 311.65	0.5525

RP, relapsing polychondritis; sTREM-1, soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1; VEGF, vascular endothelial growth factor; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; TNF, tumor necrosis factor; N.D., not detected; IL, interleukin; MMP, matrix metalloproteinase; CX3CL, chemokine (C-X3-C motif) ligand; COMP, cartilage oligomeric matrix protein; CXCL, chemokine (C-X-C motif) ligand; IFN, interferon; CCL, chemokine (C-C motif) ligand;  $\alpha$ COLII Ab, anti-type II collagen antibody

<sup>a</sup> IL-2, IL-5, GM-CSF, CCL3 の血清レベルはすべての症例において検出限界以下であった。

<sup>b</sup> 検体の不足により、本項目のサンプルサイズは以下の通り (active RP: n = 6, inactive RP: n = 7)。

\*ウエルヒの T 検定による. 0.05 以下の P 値のみ太字で表示した。

図1 活動性RP患者における臨床経過とマーカーの経時的変化の一例

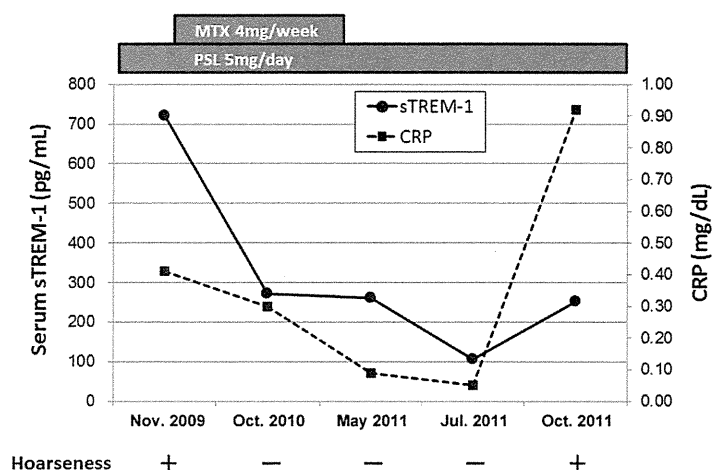


図2 末梢血単核球中の TREM-1 の発現

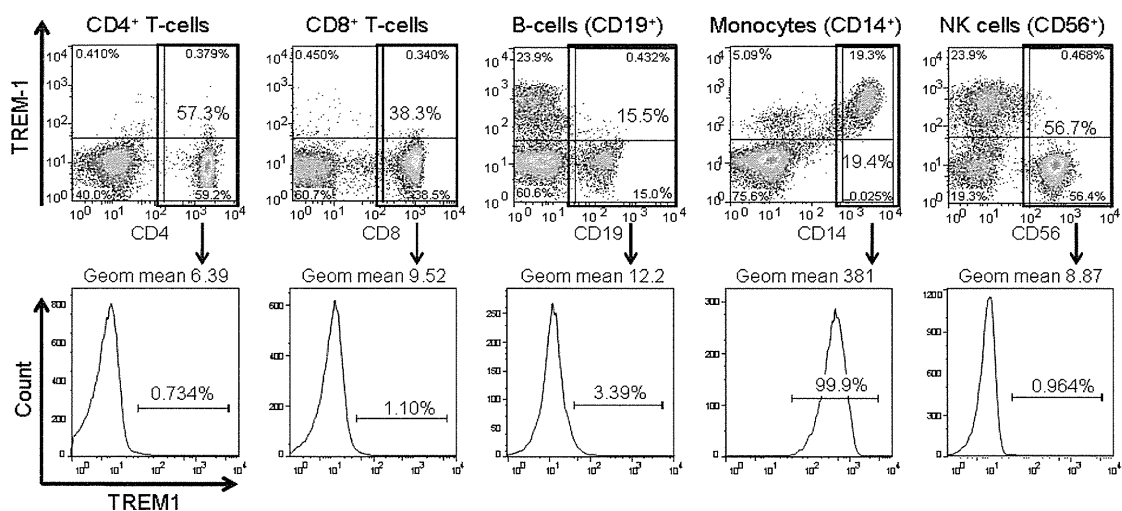


図3 健常者およびRP患者における単球上のTREM-1発現比較

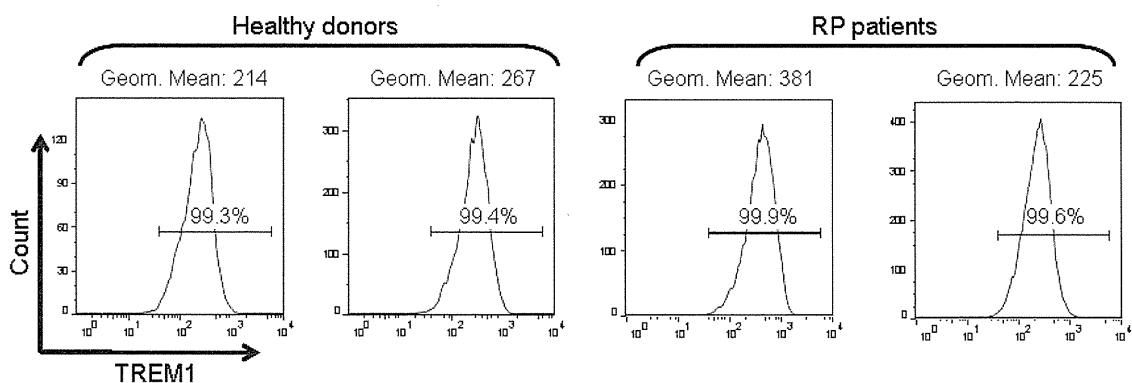
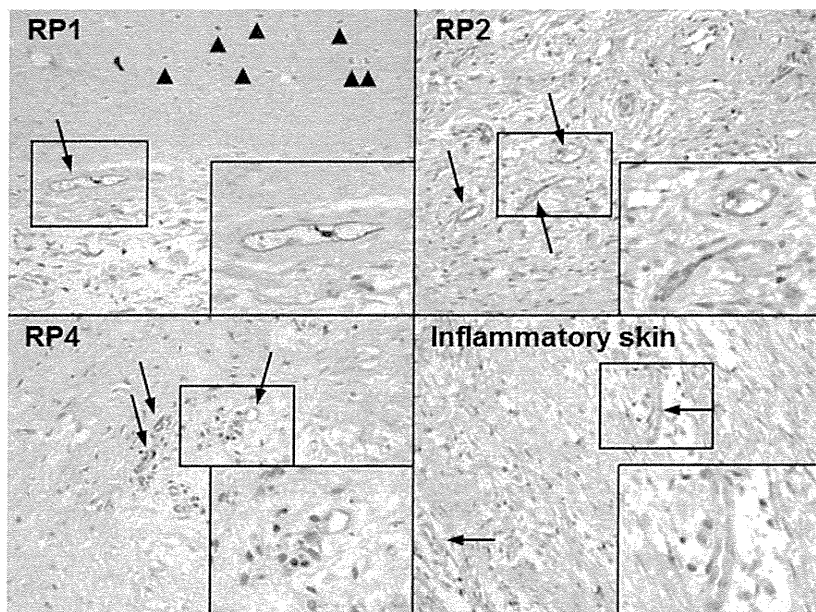


図4 RP 患者の軟骨炎病変部における TREM-1 の局在





## 再発性多発軟骨炎（RP）患者の診療情報および治療実態に関する調査研究

研究分担者 山野 嘉久 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 准教授

**研究要旨：** 再発性多発軟骨炎（relapsing polychondritis, 以下 RP）は全身の軟骨組織における再発性の炎症を特徴とする難治性疾患である。本疾患は稀な疾患であるため、疾患活動性を把握し、それに応じた適切な治療が実施されていない現状がある。そこで、本研究では RP の診療ガイドライン作成にむけて、RP 専門外来の診療情報および治療実態を調査すると共に、疾患活動性を把握する有用なバイオマーカーの同定を試みた。その結果、今回対象とした RP 患者 41 例では男女比が 1:2、発症年齢は 40 歳代がもっとも多く、気道病変を有する例が約半数を占めた。そして、気道病変を有する RP 患者、あるいは咳嗽や嘔声といった気道症状を初発とした RP 患者は治療に難渋する例が多く、PSL 以外にメトトレキサート（MTX）やシクロスポリン（CyA）を併用する例が多く認められた。次に、RP 患者 15 例を活動性 RP と非活動性 RP の 2 群に分け、28 種類の血清マーカー候補分子について両群間で比較した。その結果、既存のマーカーである CRP, COMP および抗 typeII コラーゲン抗体は活動性 RP 患者において高値を示す傾向を示したが有意差は認められなかった。それに対して、血清 sTREM-1 は活動性 RP 患者群において有意に高値を示した ( $p = 0.0403$ )。本研究により、RP 患者の診療においては、(1)気道病変を有する症例に対しては PSL に加えて、MTX や CyA を併用する集中的な治療が必要であること、(2)血清 sTREM-1 や CRP などを用いて、疾患活動性を正しく把握し、それに応じた治療をすること、の 2 点が重要と考えられた。

### A. 研究目的

再発性多発軟骨炎（以下 RP）は、原因不明の稀な難治性疾患である。その病態は全身の軟骨組織およびムコ多糖を多く含む組織における寛解と再発を繰り返す炎症によって特徴づけられる。耳介の発赤・腫脹・疼痛、鞍鼻、関節の腫脹・疼痛、嘔声、咳嗽、眼痛、難聴、眩暈など多彩な症状を示し、気道病変や血管炎により予後不良な例が存在する。そのため、RP では疾患の活動性を正しく評価し、それに応じた治療を行

うことが機能的な長期予後だけでなく、生命予後を改善するためにも重要である。しかし、RP は非常に稀な疾患であり、医療従事者における認知度も低い。そのため、患者は様々な医療機関に点在し、診断まで時間がかかるケースや診断後も疾患活動性に応じた適切な治療を受けていないケースがある。これらの問題を解決するには全国における RP 患者の実態、RP の治療とその有効性を調査し、そこから明らかとなってくる clinical question に応える診療ガイドラインを作成、啓蒙することで RP 患者へよ

りよい医療を提供することが望まれる。このため、本研究は、まず我々の RP 専門外来を受診した RP 患者の実態と、RP 患者に対する診療状況について調査し、RP の治療研究推進に資する情報を提供することを目的とした。また、そこで得られた貴重な臨床検体を用いて、RP の疾患活動性をより正確に反映するマーカーを同定することも目的とした。

## B. 研究方法

(1) 2010年4月から2014年2月現在までに聖マリアンナ医科大学リウマチ膠原病内科の RP 専門外来へ受診した RP 患者について、臨床情報(年齢、性別、発症年齢、初発症状、罹病期間、罹患部位)および実施した治療内容を収集した。その情報をもとに、男女比、発症年齢の構成、罹患部位や初発症状と治療内容との関連を調べた。

(2) 上記 RP 患者のうち、臨床検体が得られた 15 名について、活動性と非活動性の 2 群に分け、マーカー候補分子をこの両群で比較した。活動性 RP は耳介、鼻、気管の 3 か所のうち、2 か所以上の軟骨炎を認める例および 1 か所とその他 2 つの症状(眼の炎症、関節炎、又は聴覚・前庭症状)を有する例とした。この基準において活動性 RP 患者 8 名、非活動性 RP 患者 7 名となり、この両群の比較を Welch の t 検定によって実施した。

測定した項目は以下の通りである。

IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF, IFN $\gamma$ , GM-CSF, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CXCL10/IP-10, vascular endothelial growth factor (VEGF), CX3CL1/Fractalkine の測定には Cytometric Bead Array Flex set system

(BD Biosciences) を用いた。IL-17, matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-2, MMP-3, MMP-13, 可溶性 TREM-1 (sTREM-1), cartilage oligomeric matrix protein (COMP) および抗 typeII コラーゲン抗体は ELISA を用いて、測定を行った。CRP 濃度 (CRP および高感度 CRP) は三菱化学メディエンスにおいて N-Latex CRPII キットを用いた nephelometry によって測定された。

(3) 血清 sTREM-1 値が RP の疾患活動性を反映し、治療に対して応答するかどうかを調べるために、メトトレキサートによる治療を開始した活動性 RP 患者において、臨床症状、治療内容、sTREM-1 値および CRP 値が経時的に得られた例があり、その結果を解析した。

### (倫理面への配慮)

臨床検体の収集に際しては、本学の生命倫理委員会で承認された(承認番号:第 1625 号)同意書を用いて、不利益や危険性の排除などに関するインフォームドコンセントを行った。また検体は、提供者を特定できないように個人情報管理者が連結不可能匿名化により番号化し、患者の人権擁護に努めた。

## C. 研究結果

(1) 2010年4月から2014年2月現在までに当科 RP 専門外来に受診した RP 患者 41 例において、男女比は約 1:2 (男性 13 例、女性 28 例)であった(図 1)。発症年齢は 40 歳代にもっとも多かったが、小児から高齢者まで幅広いことが判明した(図 2: 中央値:45 歳、範囲: 9 歳~77 歳)。罹患部位を調べると、気道病変のある症例が 20 例、気道病変のない症例が 21 例とほぼ同数見られた。

次に、気道病変のある症例とない症例に

ついて、その治療内容について比較した。その結果、気道病変のある症例では、20例中15例（75%）はプレドニゾロン（PSL）と免疫抑制剤の組み合わせで2剤以上の治療を要しているのに対し、気道病変のない症例で2剤以上の治療を要した例は、21例中5例のみ（24%）であった（図3）。

興味深いことに、咳嗽・嘔声など気道症状を初発とした症例では、16例中13例（81%）はPSLと免疫抑制剤の組み合わせで2剤以上の治療を要しているのに対し、耳介の腫脹疼痛、関節痛や眼症状など気道症状以外を初発とした症例で2剤以上の治療を要した例は、25例中7例のみ（28%）であった（図4）。

（2）28種類のマーカー候補分子を活動性RP患者群と非活動性RP患者群で比較すると、RPのマーカーとして報告のあるCRP、COMPおよび抗typeIIコラーゲン抗体は確かに活動性RP患者において高値を示すが、非活動性RP患者群との比較において有意差を示すことができなかった。それに対して、sTREM-1は活動性RP患者群において有意に高値を示した（ $p=0.0403$ ）（表1）。

（3）図5に示すように、メトトレキサートによる治療を開始後、嘔声が改善すると同時に、720.5 pg/mlと異常高値を示していたsTREM-1レベルが106.6 pg/mlまで低下した。この値は我々が以前、決定した「健常者とRP患者を判別するカットオフ」である158 pg/mlを下回るレベルである。また、重要なことにメトトレキサート投与前、CRP値は0.41 mg/dlと正常値に近く、疾患活動性が捉えられていない状況においても、sTREM-1値は異常高値を示した。

#### D. 考案

これまでの研究から日本におけるRP患者数は400~500例程度と考えられている。

したがって、今回対象となった41例はその約1割を占める。しかしながら、これまで男女比はほぼ1:1と言われているのに対し、今回のコホートでは1:2と女性が多く認められた。この点は、対象が大学病院の専門外来に受診する患者に絞られるという選択バイアスが原因にあるかもしれない。2010年の全国調査では約2割（239例中50例）であった気道病変を有する患者の割合も、本コホートでは約5割（41例中20例）である点もこの可能性を支持している。

上記の理由で、気道病変を有する重度RP患者の診療経験が豊富となっている。その中でわかってきたことは、気道病変を有するRP患者、あるいは咳嗽や嘔声を初発症状としたRP患者は治療に難渋する例が多く、PSL以外にメトトレキサート（MTX）やシクロスポリン（CyA）を併用する例が多く認められた。また、そのような例で、アザチオプリン（AZA）やシクロフォスファミド（CPA）パルス療法の無効例が少なからず認められた。

RPは再発と寛解を繰り返す特徴があるため、疾患活動性の把握が重要であるが、今回、活動性RPと非活動性RPを比較することによって血清sTREM-1レベルがRPの疾患活動性マーカーとして優れていることも明らかとなった。実際、活動性RP患者においてsTREM-1値の変動が治療に回答した臨床症状の変化と一致した例を認めた。これは血清sTREM-1がRPの疾患活動性マーカーだけでなく、治療応答マーカーである可能性も示唆するものである。

#### E. 結論

本研究により、RP患者の診療においては、

- 1) 気道病変を有する症例に対してはPSLに加えて、MTXやCyA等の免疫抑制剤を併用する集中的な治療が有用であ

ること、

- 2) 血清 sTREM-1 や CRP などを用いて、疾患活動性を正しく把握し、それに応じた治療をすること、

の 2 点が重要と考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sato T., Yamano Y., Tomaru U., Shimizu Y., Ando H., Okazaki T., Nagafuchi H., Shimizu J., Ozaki S., Miyazawa T., Yudoh K., Oka H., Suzuki N. Serum level of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as a biomarker of disease activity in relapsing

polychondritis. *Modern Rheumatology*, 24(1):129-136, 2014.

- 2) Oka H., Yamano Y., Shimizu J., Yudoh K., Suzuki N. A large-scale survey of patients with relapsing polychondritis in Japan. *Inflammation and regeneration*, *in press*, 2014.

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし