

強直性脊椎炎患者の末梢血単核球に関する研究

分担研究者 田村直人 順天堂大学医学部膠原病内科 准教授
研究協力者 多田久里守 順天堂大学医学部膠原病内科
林 絵利 順天堂大学医学部膠原病内科

研究要旨 強直性脊椎炎患者末梢血単核球における各免疫細胞の頻度について、健常人と比較検討を行った。細胞表面マーカーを用いた多重染色により解析したところ、Th17細胞や単球の増加を認め、NK細胞は減少していた。サイトカイン産生細胞ではCD8T細胞におけるIL-17産生細胞の増加が認められた。強直性脊椎炎ではIL-23/IL-17経路の病態への関与が考えられているが、Th17細胞の頻度については様々な報告があり一定していない。また、国内では強直性脊椎炎はまれで末梢血単核球のサブセットに関する検討はほとんどされていないため、今後、さらなる検討が必要である。

A. 研究目的

強直性脊椎炎（ankylosing spondylitis: AS）は、体軸関節炎および末梢関節炎を主病態とする原因不明の慢性炎症性疾患である。これまでにAS患者末梢血においていくつかのリンパ球サブセット異常が示されているが、欧米に比べて有病率が極端に低い日本人における報告はほとんどない。今回、日本人AS患者の末梢血の免疫細胞の頻度について検討を行った。

B. 研究方法

健常人10名および改定ニューヨーク分類基準を満たしたAS患者10名の末梢血より単核球（PBMC）を分離し、本研究班の標準化プロトコルに準じて、細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体で多重染色後、フローサイトメトリーにて免疫細胞の頻度を解析して、比較検討を行った。また、PBMCをPMA 50 ng/ml および ionomycin 500 ng/ml で3時間培養し、サイトカイン産生細胞の頻度を細胞内染色にて解析した。

（倫理面への配慮）

患者検体を用いるにあたっては当施設の倫理委員会の承認を受け、十分なインフォームドコンセントを行った。患者検体は本研究以外の目的では用いていない。また、個人情報の管理に注意を払い、個人の特定が行われないように配慮した。

C. 研究結果

AS患者10名中9名が男性で、年齢30.5（中央値） \pm 8.7歳（19-44歳）、平均罹病期間11.3 \pm 6.5年であり、疾患活動性の指標であるBASDAI（Bath Ankylosing spondylitis disease activity score）は3.54 \pm 2.54、CRP2.51 \pm 4.64mg/dlであった。9名でNSAIDが投与され、3名でサラゾスルファピリジン、2名でTNF阻害薬が投与されていた。HLA-B27は検査された7名全例で陽性、残り3名は未検であった。

AS患者では、健常人に比してTh17細胞の頻度が高い傾向にあった（図1）が、疾患活動性との明らかな相関はみられなかった。Th1、Th2細胞、Treg細胞の頻度にASと健常人で差は認めなかった。自然免疫系では、NK細胞の頻度がASでは有意に低かった。B細胞およびそのサブセットに有意な差はみられなかったが、ASでは単球の頻度が増加しており、classical monocyteの頻度が増加し、non-classical monocyteは減少していた。

CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞中のPMA+ionomycin刺激後のIL-17、IFN γ およびTNF α 産生細胞の頻度について検討したところ、CD8陽性T細胞でのIL-17産生細胞の頻度がASで高い傾向にあった（図2）。

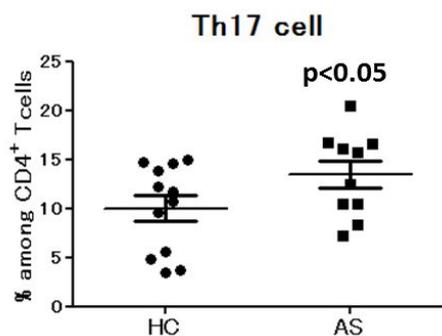


図1. AS患者PBMCにおけるTh17細胞の頻度

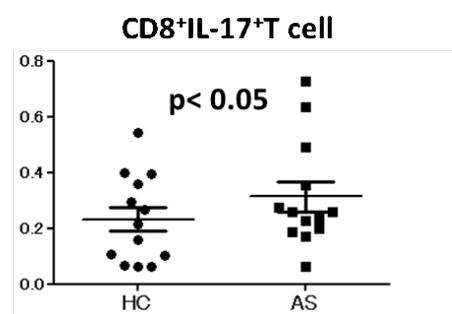


図2. AS患者CD8陽性T細胞におけるIL-17産生細胞の頻度

D. 考察

ASの病態にはTNFのほか、IL-17/IL-23が関与すると考えられており、TNF阻害薬は約60%のASに有効であり、またIL-23やIL-17阻害薬も試験が行われ有効性が報告されている。これまでにAS患者末梢血リンパ球におけるTh17細胞、あるいはIL-17産生細胞の増加が示されているが、差がないとの報告や逆に低下しているとの報告もある。今回、日本人AS患者では健常人よりTh17細胞が増加していたが、活動性との関連性はみられなかった。

他のThサブセットやTreg細胞、B細胞サブセットの頻度はASと健常人で有意な差は認めなかった。特異的自己抗体が陽性で関節外症状が多彩な関節リウマチと比べて、ASの炎症はより局所的であり、免疫細胞の変化はより少ない可能性がある。また、ASの発症早期は炎症が強く、症状の増悪と消失の繰り返しが顕著であり、その後は徐々に骨新生による変化が主体となる。従って、検体採取時期や骨病変の進行度によっても、免疫細胞の頻度やサイトカイン産生量は異なると考えられる。今後はより早期の症例で解析を進めるとともに、病期による違いについて検討を行っていく必

要がある。日本人はASと強く関連するHLA-B27保有率が低く、ASの有病率も欧米に比べ極端に低いため、これまでの解析はほとんどなく、今後のさらなる検討が必要である。

E. 結論

AS患者末梢血単核球ではTh17細胞の頻度が高く、IL-17産生CD8陽性T細胞の増加が認められたが、症例数が少ないため病態との関連を含めて今後のさらなる検討が必要である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Gorai M, Ogasawara M, Matsuki Y, Yamada Y, Murayama G, Sugisaki N, Nemoto T, Ando S, Minowa K, Kon T, Tada K, Matsushita M, Yamaji K, Tamura N, Takasaki Y. Weighting with the Lansbury articular index improves the correlation of ultrasound score with serum matrix metalloproteinase-3 level in rheumatoid arthritis patients. *Mod Rheumatol* 2014; 24:915-9.

2) Doe K, Nozawa K, Okada T, Tada K, Yamaji K, Tamura N, Takasaki Y. Usefulness of minor salivary gland biopsy in the diagnosis of IgG4-related disease. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 15:2673-7.

3) Nemoto T, Ogasawara M, Matsuki Y, Murayama G, Yamada Y, Sugisaki N, Ando S, Minowa K, Kon T, Tada K, Matsushita M, Yamaji K, Tamura N, Takasaki Y. Can routine clinical measures predict ultrasound-determined synovitis and remission in rheumatoid arthritis patients?. *Clin Exp Rheumatol*. 2014; 32:54-60.

4) Tokai N, Ogasawara M, Gorai M, Matsuki Y, Yamada Y, Murayama G, Sugisaki N, Nemoto T, Ando S, Minowa K, Kon T, Tada K, Matsushita M, Yamaji K, Tamura N, Makino S, Takasaki Y. Predictive value of bone destruction and duration of clinical remission for subclinical synovitis in rheumatoid arthritis patients. *Mod Rheumatol*. 2014;

15:1-6.

5) 田村直人,多田久里守,小林茂人,井上 久,
高崎芳成. 強直性脊椎炎の病態: 炎症と骨新生
について.日本脊椎関節炎学会誌 4:19-24 2014.

2. 学会発表

1) 林 絵利,千葉麻子,多田久里守,山路 健,
田村直人,高崎芳成,三宅幸子. 強直性脊椎炎
患者における免疫細胞の解析.第58回日本リウ
マチ学会総会・学術集会,グランドプリンスホ
テル新高輪,東京,2014年4月24-26日.

2) 多田久里守,田村直人,小林茂人,井上 久,
高崎芳成. 本邦における Adalimumab あるいは
Infliximab 投与した強直性脊椎炎患者の疾患
活動性予測因子の解析.第58回日本リウマチ学
会総会・学術集会,グランドプリンスホテル新
高輪,東京,2014年4月24-26日.

3) Eri Hayashi, Asako Chiba, Mie Kitagaichi,
Kurisu Tada, Ken Yamaji, Naoto Tamura,
Yoshinari Takasaki and Sachiko Miyake.
Involvement of IL-17-Producing MAIT Cells in
the pathogenesis of rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheumatol 2014;66 (Suppl): s766.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし