

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)

# 再発性多発軟骨炎の診断と治療体系の確立

平成 24 ~ 25 年度 総合研究報告書

研究代表者 鈴木 登

平成 26 (2014) 年 3 月

## 目 次

. 総合研究報告 . . . . .	1
	研究代表者 鈴木 登
. 分担研究報告	
1 . 再発性多発軟骨炎における患者レジストリ登録項目の検討	
	聖マリアナ医科大学 免疫学・病害動物学 鈴木 登
	平成 24 年度 . . . . . 5
	平成 25 年度 . . . . . 12
2 . 再発性多発軟骨炎の病因病態解明に向けた基礎的解析	
	聖マリアナ医科大学 難病治療研究センター 遊道 和雄
	平成 24 年度 . . . . . 19
	平成 25 年度 . . . . . 22
3 . 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	
	聖マリアナ医科大学 難病治療研究センター 山野 嘉久
	平成 24 年度 . . . . . 25
	平成 25 年度 . . . . . 33
4 . 再発性多発軟骨炎における Th1/Th17 細胞機能の検討	
	聖マリアナ医科大学 免疫学・病害動物学 清水 潤
	平成 25 年度 . . . . . 40
. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . .	44
. 研究成果の刊行物・別刷 . . . . .	48
. 平成 24-25 年度班員名簿 . . . . .	89

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))

総合研究報告書

再発性多発軟骨炎の診断と治療体系の確立 (H24-難治等(難)-指定-001)

研究代表者 鈴木 登 聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター, 免疫学・病害動物学

研究要旨:再発性多発軟骨炎(relapsing polychondritis、以下 RP)は、全身の軟骨に炎症を来たしうる原因不明の難治性疾患である。本邦における患者数は 500 人程度と推定され、疫学・病態研究が端緒についたばかりであり、診断・治療指針は未確立である。

本研究では平成 21～23 年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]における疫学調査による、RP における免疫抑制剤の有効性という新知見をうけ、臨床データと研究データの追跡を含めた前向き研究の確立に主眼を置いた。

その結果、臨床データの収集に関しては、厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「患者支援団体等が主体的に難病研究支援を実施するための体制構築に向けた研究(JPA 研究班)」の分担研究を担当することによって、「患者主体」レジストリ、すなわち患者自身によるきめの細かな症状等の追跡調査体制を整えた。

細胞性免疫機能の検討では Th1 細胞機能亢進が明確になり、そこに Th17 細胞が関与している可能性が示唆された。今後 Th1 細胞機能の是正が治療につながる可能性がある。

新患者レジストリ方法と新たな免疫機能検査法を有機的に結合させることで、迅速な治療指針の確立を図る。

研究分担者:

岡 寛 東京医科大学  
八王子医療センター

遊道和雄 聖マリアンナ医科大学  
難病治療研究センター

山野嘉久 聖マリアンナ医科大学  
難病治療研究センター

清水 潤 聖マリアンナ医科大学  
免疫学・病害動物学

A. 研究目的

i)研究の背景

再発性多発軟骨炎の疫学

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 21～23 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、本邦の患者実態として、本邦全体の患者数がおおよそ 500 人程度と推定されること、発症年齢は 3 歳より 97 歳まで多年齢層にわたり、平均は 52.7 歳であること、男性と女性の割合がほぼ同じであること、重症例となりやすい気道病変を持つ患者の割合が 50%程度になることを明らかにした。治療においては、気道病変はステロイド単独治療ではその病勢を抑えられないため、免疫抑制剤(メトトレキサート)が必要となることを発見した(文献 1)。

そこで現在免疫抑制剤を用いた臨床試験を計画しており、そのため新たな患者登録・追跡システムが必要となった。

日本難病・疾病団体協議会(JPA)

難病に対する患者支援の会も難病対策の歴史とともに発展してきた。難病対策の制定当時、「全国難病団体連絡協議会」「全国患者団体連絡協議会」がすでに活動中であったが、1986年前者とそれぞれの地域難病連絡協議会が合併し、「日本患者・家族団体協議会(JPC)」が設立。さらに2005年後者とJPCが合併する形で日本難病・疾病団体協議会(JPA)が結成された。行政、医療・医育機関への働きかけ、難病対策における国際協力、研究事業等を手掛ける。

研究事業の一環として、同組織が研究代表を務める厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「患者支援団体等が主体的に難病研究支援を実施するための体制構築に向けた研究(JPA研究班)」がある。現在の主な研究内容は、国内外の患者会の調査・報告と患者レジストリの構築である。RP研究班もJPA研究班の研究分担者として、モデル疾患におけるレジストリ収集項目に関する予備的調査を委託された。

## ii) 本研究の目的

本研究の目的は、大きく二つ存在する。

RPにおける治療臨床試験に向けた、高効率で正確である患者レジストリ方法の構築。JPA研究班の持つIT技術と、国際的な視点を積極活用する。

新規疾患パラメータの発見。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・線維化が進む症例も多く、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がある。そこで、昨年度

までにRP患者で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、CCL4/MIP-1、VEGFおよびMMP-3を同定した。(文献3)今年度は、疾患活動性をより正確に反映するマーカーを検討した。

## iii) 期待される研究成果

患者登録・追跡におけるIT技術の積極利用による、高効率化。

情報収集の多元化による、患者愁訴の綿密な収集。

JPA研究班を通じて、国レジストリ作成への意見反映の試み。

RPの病態・病勢を的確に反映する、簡便な検査法の確立。

RPに有効性が高いと考えられるメトトレキサート治療の前向き研究における評価方法の確立。

## (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2406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。

## B. 研究結果の概要

### i) 臨床研究における患者チェックリストの作製

メトトレキサートを用いた臨床研究に向けた、患者チェックリストを作成した(鈴木 分担研究報告書参照)。現在に至ってもRPに特異的な検査所見は存在しないため、国際的に用いられているRPの診断基準(マクアダムス、ダミアニの診断基準)は臨床症状に基づいている。そのため初発時

および経過にあわせた症状を記載できるように工夫した。

また、主治医への負担の軽減をはかり、できるだけ項目の簡略化を行った。そのため患者健康スケール評価もできるだけ少くしたが、報告には不十分となるため課題が残存する。

## ii) JPA 研究班における予備的調査報告

25年度の JPA 研究班研究は、国の難病対策の改編を受けて、「患者および患者支援団体等による研究支援体制の構築に関わる研究班」(通称橋本班)との共同研究体制をとった。それぞれのレジストリ内容は、JPA 班ではデータを含めある程度のセキュリティをかけるもの、一方の橋本班ではソーシャルネットワークも使用した患者間の連携を重要視したものと差がある。レジストリ方法は今後とも改良を要するが、安全を考える上で登録情報を制限する方向性が出てくるものと思われる。一方で、症状等の患者の直接的な情報は、回収しやすくなるとも考えられる。RP は再発性の疾患であり、このレジストリからは貴重な情報を得られる可能性がある。また、今後の研究においては、本班研究独自の情報集経路を確立する必要性が生じたこととなる。

### 疾患活動性をより正確に反映するマーカーの検討

(1) 近年、様々なヒト免疫疾患においてTh1細胞およびTh17細胞という獲得免疫の主要な細胞に異常がみられることが報告されている。そのTh1/Th17細胞の生成に重要であるサイトカインの血中濃度を測定した。RPにおいてTh1細胞が産生するIFN $\gamma$ の上昇、Th1細胞の維持に重要なIL-12の低下がみられ、Th1細胞の過剰な活性化とそのネガティブフィードバックが考察された(図1)。

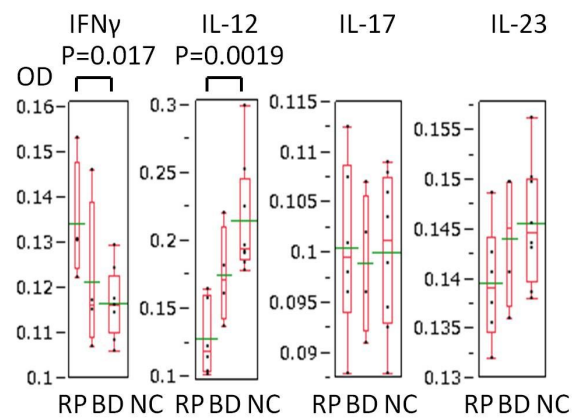


図1 RP、ベーチェット病(BD;疾患コントロール)、健常者(NC)の血中Th1/Th17細胞関連サイトカイン濃度

さらにそのIFN $\gamma$ 濃度はIL-23濃度と正相関(P=0.028)を示した(図2)。IL-23がその活性に重要に関与するTh17細胞もTh1細胞機能を介して、二次的にRPの病態形成に関わることが示唆される。

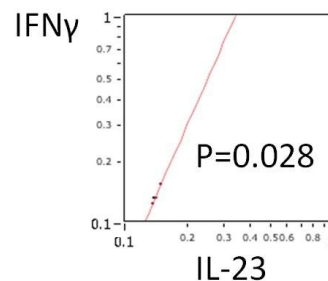


図2 RPにおける血中サイトカイン濃度の相関検討

我々はTh1/Th17細胞機能とその相互関係を鋭敏に反映するリンパ球機能検査も確立しており、今後RPでの詳細な解析を行う。

(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した。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)。患者の臨床症状・検査所見をsTREM-1が反映するのかを検討した。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。

これらの成績からは、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り、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。

### C. 結論

JPA班の研究により「患者主体」レジストリが形成されつつあり、研究に賛同する患者による登録が開始されている。RPにおいてもすでに10人以上がレジストリに参加している(2014年1月19日現在)。本研究にて、そのレジストリを研究に反映させる体制は整えたものと考えている。

血中サイトカイン濃度の相関検討より、Th1/Th17細胞両者のRP病態形成への関与が推察された。レジストリを利用した前向き追跡研究は適切な治療を考慮するうえで重要であると考え。

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Hiroshi Oka, Yoshihisa Yamano, Jun Shimizu, Kazuo Yudoh, Noboru, Suzuki. A large-scale survey of patients with relapsing polychondritis in Japan. *Inflammation and Regeneration*. In press.

- 2) 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 graft-versus-Tax effects in adult T-cell leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Immunology* 2013; 190: 4382-92.
- 3) 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*, 2014; 24: 129-36.

#### 2. 図書

なし

#### 3. 学会発表

なし

### F. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 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)
2. 特願2010-126487 平成22年6月2日  
再発性多発軟骨炎の検査方法およびそれに用いられる検査キット

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  
- 再発性多発軟骨炎における患者レジストリ登録項目の検討 -

研究代表者 鈴木 登 聖マリアンナ医科大学免疫学・病害動物学

研究要旨：再発性多発軟骨炎（relapsing polychondritis、以下 RP）は、全身の軟骨に炎症を来たしうる原因不明の難治性疾患である。本邦における患者数は500人程度と推察され、疫学・病態研究が端緒についたばかりであり、診断・治療指針は未確立である。

研究代表者らは平成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]における疫学調査をもとに、簡易で詳細な患者登録・追跡システムの作製を目的に、患者登録リストを作成した。さらに、平成24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「患者支援団体等が主体的に難病研究支援を実施するための体制構築に向けた研究（JPA研究班）」の分担研究を担当しそのモデル疾患として、患者レジストリの構築に向けた収集項目に関する予備的調査を行ったのであわせて報告する。

## A. 研究目的

### i) 研究の背景

#### 国の難病対策について

昭和47年に「難病対策要綱」が策定され、本邦に難病対策が設けられてから40年が経過した。その間の疫学研究や治療に果たした役割は決して小さくはないが、時間経過とともに現行制度のひずみも露呈されてきた。たとえば医療の進歩に伴い、医療関係者の間では典型的な「難病」と認識されている疾患でも研究事業や医療費助成の対象に選定されていないものがあること、医療費助成について都道府県の超過負担が続いていること、難病に関する普及啓発が不十分なこと等により国民の理解が必ずしも十分でないこと、難病患者の長期にわたる療養と社会生活を支える総合的な対策が不十分であることなどの課題が指摘されている。

これに対して厚労省厚生科学審議会疾病対策部会難病対策委員会は、今後の難病対策の在り方について一昨年9月より審議を行ってきた。その結果が同委員会より、平成25年1月25日に「難病対策の改革について（提言）」としてまとめられた。

この改革提言には3つの柱が存在し、第1：効果的な治療法の開発と医療の質の向上、第2：公平・安定的な医療費助成の仕組みの構築、第3：国民の理解の促進と

社会参加のための施策の充実である。第1の柱はさらに、治療法の開発に向けた難病研究の推進、難病患者データの精度の向上と有効活用、国際協力の推進、医療の質の向上、医療体制の整備、の4項目に細分化される。項のデータ管理に関しては、国主体の登録システムを平成26年度より立ち上げることが考えられている。現行の難病患者データ登録システムにおいては、データ登録率に都道府県によるばらつきが存在していることや、必ずしも個人票に臨床経過が反映されていないこと等の不備が指摘されている。新登録システムによってこれらの不備を解消することに加えてその精度を向上させることによって、研究および臨床における患者データの有効活用や、さらには国際協力の推進が図られる。このシステムのスムーズな立ち上げと、合理的な運営にはそれぞれの疾患における登録システムの検討は欠かせないものとする。

#### 再発性多発軟骨炎の疫学調査

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、本邦の患者実態として、本邦全体の患者数がおおよそ 500 人程度と推察されること、発症年齢は 3 歳より 97 歳まで多年齢層にわたり、平均は 52.7 歳であること、男性と女性の割合がほぼ同じであること、重症例となりやすい気道病変を持つ患者の割合が 50%程度になることを明らかにした。治療においては、気道病変はステロイド単独治療ではその病勢を抑えられないため、免疫抑制剤(メソトレキセート)が必要となることを発見した(文献 1)。

そこで現在免疫抑制剤を用いた臨床試験を計画しており、そのため新たな患者登録・追跡システムが必要となった。

#### **日本難病・疾病団体協議会(JPA)**

難病に対する患者支援の会も難病対策の歴史とともに発展してきた。難病対策の制定当時、「全国難病団体連絡協議会」「全国患者団体連絡協議会」がすでに活動中であったが、1986 年前者とそれぞれの地域難病連絡協議会が合併し、「日本患者・家族団体協議会(JPC)」が設立。さらに 2005 年後者と JPC が合併する形で日本難病・疾病団体協議会(JPA)が結成された。行政、医療・医育機関への働きかけ、難病対策における国際協力、研究事業等を手掛ける。

研究事業の一環として、同組織が研究代表を務める厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「患者支援団体等が主体的に難病研究支援を実施するための体制構築に向けた研究(JPA 研究班)」がある。現在の主な研究内容は、国内外の患者会の調査・報告と患者レジストリの構築である。RP 研究班も JPA 研究の研究分担者として、モデル疾患におけるレジストリ収集項目に関する予備的調査を委託された。

#### **ii) 本年度研究の目的**

本年度研究の目的は、RP における治療臨床試験に向けた、高効率で正確である患者レジストリ方法の構築にある。JPA 研究班の持つ IT 技術と、国際的な視点を

積極活用する。

#### **iii) 期待される研究成果**

RP に有効性が高いと考えられるメソトレキセート治療の前向き研究における評価。

患者登録・追跡における IT 技術の積極利用による、高効率化。

情報収集の多元化による、患者訴えの綿密な収集。

JPA 研究班を通じて、国レジストリ作成への意見反映の試み。

### **B. 研究の概要**

#### **i) 臨床研究における患者チェックリストの作製**

メソトレキセートを用いた臨床研究に向けた、患者チェックリストを作成した(別紙 1)。現在に至っても RP に特異的な検査所見は存在しないため、国際的に用いられている RP の診断基準(マクアダムス、ダミアニの診断基準)は別紙 2 に示すように臨床症状に基づいている。そのため初発時および経過にあわせた症状を記載できるように工夫した。また、主治医への負担を軽減できるようにできるだけ項目の簡略化を図った。そのため患者健康スケール評価もできるだけ少なくしたが、報告には不十分となるため課題が残存した。

#### **ii) JPA 研究班における予備的調査報告**

現在 JPA 研究班で検討中の患者レジストリは、セキュリティを考慮したうえで、さらにある程度の検査データも含めている。したがって、RP 研究では研究に有用な患者情報の大部分を網羅できるものと期待される。そこで上記 i)のチェックリスト作成の経験を踏まえ、研究報告を見据えた報告を実施した。具体的には本研究も参加し国際グループにて作成した疾患活動性評価(別紙 3、文献 2)の取り込みと、国際的な患者健康スケールとして SF36 につき報告した。

### **C. 結論**

国の難病対策の改革は今まさに実行中であり、その患者レジストリに関してもこれから概略の設定に入る段階と思われる。来年度は本研究の結果をもと



に、国の改革にあわせ患者および主治医サイドのい  
ずれにもメリットとなるように臨機応変に患者登  
録・追跡システムを発展させたい。

## 文献

1. 清水 潤, 山野 嘉久, 遊道 和雄, 岡 寛, 須賀 万  
智, 鈴木 登. 稀な肺疾患 再発性多発軟骨炎. 呼吸  
2012; 31: 641-645.
2. Arnaud L, Suzuki N et al. RPDAL study group. The  
Relapsing Polychondritis Disease Activity Index:  
development of a disease activity score for  
relapsing polychondritis. Autoimmun Rev. 2012; 12:  
204-9.

患者チェックリスト

基本属性

性別		現在の年齢	才	居住地(都道府県) 都道府県	
男	女	生年月日	年		
		月 日			

初診時の状況

初診年月日		年	初診時年齢		才
月 日			発症時(初発)年齢		才
✓	初診診療科	✓	初診時症状		
	一般内科・総合診療科		軟骨炎(耳)		
	膠原病内科		軟骨炎(鼻)		
	呼吸器内科		軟骨炎(気道)		
	神経内科		蝸牛・前庭神経障害		
	腎臓内科		関節炎		
	外科		眼病変		
	整形外科		皮膚病変		
	耳鼻咽喉科		心血管病変		
	眼科		中枢神経障害		
	皮膚科		腎障害		
	その他		その他		

確定診断

診断年月日		年	検査所見(確定診断時)	
月 日			CRP	mg/dl
生検(病理組織検査)			MMP-3	ng/ml
有	無		抗コラーゲンタイプ 抗体	
			U/ml	
✓	確定診断に至る根拠	生検(病理組織検査)所見		
	軟骨炎(耳)	炎症細胞浸潤主体		
	軟骨炎(鼻)	線維化主体		
	軟骨炎(気道)	その他		
	蝸牛・前庭神経障害	ステロイド・ダブソン治療への反応性		
	関節炎	その他		
	眼病変			
	皮膚病変			
	心血管病変			
	中枢神経障害			
	腎障害			

現在の状況

✓	おもな診療科	✓	現在ある症状	✓	現在おこなっている治療	
	一般内科・総合診療科		軟骨炎(耳)		非ステロイド系抗炎症剤	
	膠原病内科		軟骨炎(鼻)		ステロイド(経口)	mg/日
	呼吸器内科		軟骨炎(気道)		MTX	mg/日
	神経内科		蝸牛・前庭神経障害		エンドキサン	mg/日
	腎臓内科		関節炎		シクロスポリン	mg/日
	外科		眼病変		プロGRAF	mg/日
	整形外科		皮膚病変		イムラン	mg/日
	耳鼻咽喉科		心血管病変		プレドニン	mg/日
	眼科		中枢神経障害		インフリキシマブ	mg/Kg
	皮膚科		腎障害		エタネルセプト	mg/週
	その他		その他		アダリムマブ	mg/Kg
					トシリズマブ	mg/Kg
					その他	

現在の状況(続き)

検査所見(最近1ヶ月以内)	
CRP	mg/dl
MMP-3	ng/ml
抗コラーゲンタイプ	抗体
	U/ml

現在行っている治療(続き)

気管切開(現在)	
有	無

BIPAP(現在)	
有	無

気管内ステント(現在)	
有	無

現在のADLの状況

食事	整容	更衣	トイレ	入浴	平地歩行	階段昇降
自立	自立	自立	自立	自立	自立	自立
部分介助	部分介助	部分介助	部分介助	部分介助	部分介助	部分介助
完全介助	完全介助	完全介助	完全介助	完全介助	完全介助	完全介助

これまでの経過

✓	これまで認めたことがある症状
	軟骨炎(耳)
	軟骨炎(鼻)
	軟骨炎(気道)
	蝸牛・前庭神経障害
	関節炎
	眼病変
	皮膚病変
	心血管病変
	中枢神経障害
	腎障害
	その他

✓	これまで行ったことがある治療
	非ステロイド系抗炎症剤
	ステロイド(経口)
	ステロイド(静注)
	ステロイド(パルス)
	MTX
	エンドキサン
	シクロスポリン
	プロGRAF
	イムラン
	プレディニン
	インフリキシマブ
	エタネルセプト
	アダリムマブ
	トシリズマブ
	その他

気管切開の経験	
有	無

BIPAPの経験	
有	無

気管内ステントの経験	
有	無

✓	症状の経過
	寛解・治癒
	一貫して改善傾向
	改善と増悪の繰り返し
	一貫して増悪傾向

合併症など

✓	合併症
	特になし
	高血圧
	糖尿病
	脂質異常
	その他 病名を下欄に

その他の病名

連絡事項(お困りのこと等ございましたらご記入ください)

## 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。

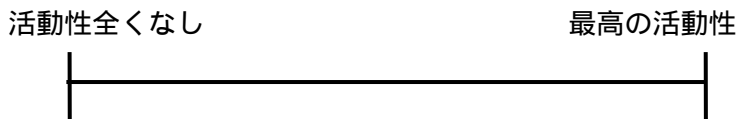
点数	全身症状	点数	皮膚・腎症状
2	発熱(38度以上) リウマチ様症状	3	紫斑
1	関節炎 軟骨炎	4	血尿
3	胸骨柄軟骨炎	6	蛋白尿
4	胸鎖軟骨炎	17	腎不全 心血管症状
4	肋軟骨炎	9	心膜炎
9	耳介軟骨炎(片側または両側)	16	大型そして/または中型血管障害
9	鼻軟骨炎 眼症状神経症状	17	心筋炎
5	上強膜炎	18	急性大動脈弁または僧帽弁不全
9	強膜炎	12	運動または感覚運動神経障害
9	ぶどう膜炎	22	脳炎 呼吸器症状
11	角膜潰瘍		呼吸器軟骨炎(喉頭、気管、気管支)
14	網膜血管炎 生化学	14	急性呼吸不全を伴わない
3	CRP(2.0mg/dl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



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））

### 再発性多発軟骨炎の診断と治療体系の確立

- 再発性多発軟骨炎における患者レジストリ登録項目の検討 -

研究代表者 鈴木 登 聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター，免疫学・病害動物学

研究要旨：再発性多発軟骨炎（relapsing polychondritis、以下 RP）は、全身の軟骨に炎症を来たしう原因不明の難治性疾患である。本邦における患者数は 500 人程度と推察され、疫学・病態研究が端緒についたばかりであり、診断・治療指針は未確立である。

研究代表者らは平成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]における疫学調査をもとに、簡易で詳細な患者登録・追跡システムの作製を目的に、患者登録リストを作成した。さらに、平成24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「患者支援団体等が主体的に難病研究支援を実施するための体制構築に向けた研究（JPA研究班）」の分担研究を担当しそのモデル疾患として、患者レジストリの構築に向けた収集項目に関する予備的調査を行ったのであわせて報告する。

## A. 研究目的

### i) 研究の背景

#### 国の難病対策について

昭和47年に「難病対策要綱」が策定され、本邦に難病対策が設けられてから40年が経過した。その間の疫学研究や治療に果たした役割は決して小さくはないが、時間経過とともに現行制度のひずみも露呈されてきた。たとえば医療の進歩に伴い、医療関係者の間では典型的な「難病」と認識されている疾患でも研究事業や医療費助成の対象に選定されていないものがあること、医療費助成について都道府県の超過負担が続いていること、難病に関する普及啓発が不十分なこと等により国民の理解が必ずしも十分でないこと、難病患者の長期にわたる療養と社会生活を支える総合的な対策が不十分であることなどの課題が指摘されている。

これに対して厚労省厚生科学審議会疾病対策部会難病対策委員会は、今後の難病対策の在り方について一昨年9月より審議を行ってきた。その結果が同委員会より、平成25年1月25日に「難病対策の改革について（提言）」としてまとめられた。

この改革提言には3つの柱が存在し、第1：効果的な治療法の開発と医療の質の向上、第2：公平・安定的な医療費助成の仕組みの構築、第3：国民の理解の促進と社会参加のための施策の充実である。第1の柱はさらに、治療法の開発に向けた難病研究の推進、難病患者データの精度の向上と有効活用、国際協力の推進、医療の質の向上、医療体制の整備、の4項目に細分化される。項のデータ管理に関しては、国主体の登録システム構築事業が平成26年度予算案に提示されることとなっている。現行の難病患者データ登録システムにおいては、データ登録率に都道府県によるばらつきが存在していることや、必ずしも個人票に臨床経過が反映されていないこと等の不備が指摘されている。新登録システムによってこれらの不備を解消することに加えてその精度を向上させることによって、研究および臨床における患者データの有効活用や、さらには国際協力の推進が図られる。このシステムのスムーズな立ち上げと、合理的な運営にはそれぞれの疾患における登録システムの検討は欠かせないものと考えられる。

## 再発性多発軟骨炎の疫学調査

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、本邦の患者実態として、本邦全体の患者数がおおよそ 500 人程度と推察されること、発症年齢は 3 歳より 97 歳まで多年齢層にわたり、平均は 52.7 歳であること、男性と女性の割合がほぼ同じであること、重症例となりやすい気道病変を持つ患者の割合が 50%程度になることを明らかにした。治療においては、気道病変はステロイド単独治療ではその病勢を抑えられないため、免疫抑制剤(メソトレキセート)が必要となることを発見した(文献 1)。

そこで現在免疫抑制剤を用いた臨床試験を計画しており、そのため新たな患者登録・追跡システムが必要となった。

### 日本難病・疾病団体協議会 (JPA)

前述の国の患者登録とは別に、希少疾患ゆえに疾患を越えた患者の組織化が当然必要となる。これは欧米(米 NORD、欧州 EURORDIS)での難病患者会の大きな組織力と、その効率性を考えると明白である。

難病に対する患者支援の会も難病対策の歴史とともに発展してきた。難病対策の制定当時、「全国難病団体連絡協議会」「全国患者団体連絡協議会」がすでに活動中であったが、1986 年前者とそれぞれの地域難病連絡協議会が合併し、「日本患者・家族団体協議会 (JPC)」が

設立。さらに 2005 年後者と JPC が合併する形で日本難病・疾病団体協議会 (JPA) が結成された。行政、医療・医育機関への働きかけ、難病対策における国際協力、研究事業等を手掛ける。

研究事業の一環として、同組織が研究代表を務める厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「患者支援団体等が主体的に難病研究支援を実施するための体制構築に向けた研究 (JPA 研究班)」がある。現在の主な研究内容は、国内外の患者会の調査・報告と患者レジストリの構築である。RP 研究班も JPA 研究の研究分担者として、モデル疾患におけるレジストリ収集項目に関する予備的調査を委託された。そこで我々はまず患者チェックリストを作成した(別紙 1)。現在に至っても RP に特異的な検査所見は存在しないため、国際的に用いられている RP の診断基準(マクアダムス、ダミアニの診断基準)は別紙 2 に示すように臨床症状に基づいている。そのため初発時および経過にあわせた症状を記載できるように工夫した。さらに国際グループと共同にて作成した疾患活動性評価票(別紙 3、文献 2)も作成した。

### ii) 本年度研究の目的

本研究 RP における治療臨床試験に向けた、高効率で正確である患者レジストリ方法の構築。

25年度の JPA 班研究は、国の難病対策の改編を受けて、「国の難病対策の改編を受けて、患者および患者支援団体等による研究支援体制の構築に関わる研究班」(通称橋本班)との共同研究を指示された。それによって、使用媒体やセキュリティを柔軟に検討する必要性が生じた。その上で、研究最終年度として試験的にインターネットを利用した患者登録システムを立ち上げることを本年度の目的となる。

### iii) 期待される研究成果

患者登録・追跡における IT 技術の積極利用による、高効率化。

情報収集の多元化による、患者訴えの綿密な収集。

JPA 研究班を通じて、国レジストリ作成への意見反映の試み。

RP の病態・病勢を的確に反映する、簡便な検査法の確立。

RP に有効性が高いと考えられるメソトレキセート治療の前向き研究における評価方法の確立。

## B. 研究の概要

### JPA 研究班における「患者主体」レジストリの構築

25年度のJPA研究班研究は、国の難病対策の改編を受けて、「患者および患者支援団体等による研究支援体制の構築に関わる研究班」（通称橋本班）との共同研究体制をとった。合同で「患者主体」レジストリを立ち上げることとなり、JPA研究班でも研究上の運営を平成25年9月26日より開始した(URL; <https://j-rare.net/>)。その後平成26年に入り双方のレジストリの相互移行が可能になった。それぞれのレジストリ内容は、JPA班ではデータを含めある程度のセキュリティをかけるもの、一方の橋本班ではソーシャルネットワークも使用した患者間の連携を重要視したものと差がある。レジストリ方法は今後とも改良を要するが、安全を考える上で登録情報を制限する方向性が出てくるものと思われる。

一方で、症状等の患者の直接的な情報は、回収しやすくなるとも考えられる。RPは再発性の疾患であり、このレジストリからは貴重な情報を得られる可能性がある。また、今後の研究においては、本班研究独自の情報集経路を確立する必要性が生じたこととなる。

## C. 結語

JPA班の研究により「患者主体」レジストリが形成

されつつあり、研究に賛同する患者による登録が開始されている。RPにおいてもすでに10人以上がレジストリに参加している(2014年1月19日現在)。本研究にて、そのレジストリを研究に反映させる体制は整えたものと考えている。我々の持つ臨床・研究データと「患者主体」レジストリデータの前向き研究は、とても興味深いものとする。

## 文献

- 1) Hiroshi Oka, Yoshihisa Yamano, Jun Shimizu, Kazuo Yudoh, Noboru, Suzuki. A large-scale survey of patients with relapsing polychondritis in Japan. *Inflammation and Regeneration*. In press.
- 2) Arnaud L, Suzuki N et al. RPDAl study group. The Relapsing Polychondritis Disease Activity Index: development of a disease activity score for relapsing polychondritis. *Autoimmun Rev*. 2012; 12: 204-9.



患者チェックリスト

基本属性

性別		現在の年齢	才	居住地(都道府県) 都道府県
男	女	生年月日	年	
			月 日	

初診時の状況

初診年月日		年	初診時年齢	才	
		月 日	発症時(初発)年齢	才	
✓	初診診療科	✓	初診時症状	✓	発症時(初発)症状
	一般内科・総合診療科		軟骨炎(耳)		軟骨炎(耳)
	膠原病内科		軟骨炎(鼻)		軟骨炎(鼻)
	呼吸器内科		軟骨炎(気道)		軟骨炎(気道)
	神経内科		蝸牛・前庭神経障害		蝸牛・前庭神経障害
	腎臓内科		関節炎		関節炎
	外科		眼病変		眼病変
	整形外科		皮膚病変		皮膚病変
	耳鼻咽喉科		心血管病変		心血管病変
	眼科		中枢神経障害		中枢神経障害
	皮膚科		腎障害		腎障害
	その他		その他		その他

確定診断 年

診断年月日	月 日	✓	確定診断に至る根拠	検査所見(確定診断時)	
			軟骨炎(耳)	CRP	mg/dl
			軟骨炎(鼻)	MMP-3	ng/ml
生検(病理組織検査)			軟骨炎(気道)	抗コラーゲンタイプ 抗体	
有	無		蝸牛・前庭神経障害		U/ml
			関節炎		
			眼病変		
✓	生検(病理組織検査)所見		皮膚病変		
	炎症細胞浸潤主体		心血管病変		
	線維化主体		中枢神経障害		
	その他		腎障害		
			ステロイド・ダブソン治療への反応性		
			その他		

現在の状況

✓	おもな診療科	✓	現在ある症状	✓	現在おこなっている治療	
	一般内科・総合診療科		軟骨炎(耳)		非ステロイド系抗炎症剤	
	膠原病内科		軟骨炎(鼻)		ステロイド(経口)	mg/日
	呼吸器内科		軟骨炎(気道)		MTX	mg/日
	神経内科		蝸牛・前庭神経障害		エンドキサン	mg/日
	腎臓内科		関節炎		シクロスポリン	mg/日
	外科		眼病変		プロGRAF	mg/日
	整形外科		皮膚病変		イムラン	mg/日
	耳鼻咽喉科		心血管病変		プレドニン	mg/日
	眼科		中枢神経障害		インフリキシマブ	mg/Kg
	皮膚科		腎障害		エタネルセプト	mg/週
	その他		その他		アダリムマブ	mg/Kg
					トシリズマブ	mg/Kg
					その他	

現在の状況(続き)

検査所見(最近1ヶ月以内)	
CRP	mg/dl
MMP-3	ng/ml
抗コラーゲンタイプ	抗体
	U/ml

現在行っている治療(続き)

気管切開(現在)	
有	無

BIPAP(現在)	
有	無

気管内ステント(現在)	
有	無

現在のADLの状況

食事	整容	更衣	トイレ	入浴	平地歩行	階段昇降
自立	自立	自立	自立	自立	自立	自立
部分介助	部分介助	部分介助	部分介助	部分介助	部分介助	部分介助
完全介助	完全介助	完全介助	完全介助	完全介助	完全介助	完全介助

これまでの経過

✓	これまで認めたことがある症状
	軟骨炎(耳)
	軟骨炎(鼻)
	軟骨炎(気道)
	蝸牛・前庭神経障害
	関節炎
	眼病変
	皮膚病変
	心血管病変
	中枢神経障害
	腎障害
	その他

✓	これまで行ったことがある治療
	非ステロイド系抗炎症剤
	ステロイド(経口)
	ステロイド(静注)
	ステロイド(パルス)
	MTX
	エンドキサン
	シクロスポリン
	プロGRAF
	イムラン
	プレディニン
	インフリキシマブ
	エタネルセプト
	アダリムマブ
	トシリズマブ
	その他

気管切開の経験	
有	無

BIPAPの経験	
有	無

気管内ステントの経験	
有	無

✓	症状の経過
	寛解・治癒
	一貫して改善傾向
	改善と増悪の繰り返し
	一貫して増悪傾向

合併症など

✓	合併症
	特になし
	高血圧
	糖尿病
	脂質異常
	その他 病名を下欄に

その他の病名

連絡事項(お困りのこと等ございましたらご記入ください)

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

 総点数(RPDAIスコア)

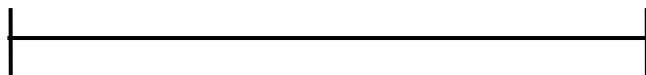
この患者の疾患活動性を医師としてあなたが判断してください

- 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、医療の場で役立てる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する。

## B. 研究の概要

### i) これまでの人工軟骨の問題点

#### 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)を發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。

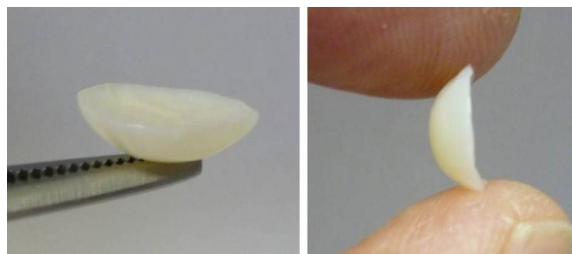
#### 化学合成による人工軟骨

ヒアルロン酸を架橋した例や、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

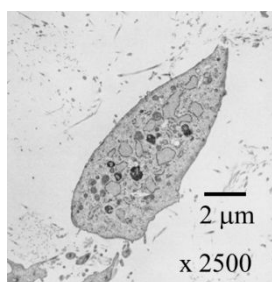
我々は、軟骨マトリックスの構成成分(II型コラーゲン、プロテオグリカン、ヒアルロン酸)のみを用い、各種反応条件下で軟骨様組織が形成されるかを

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、 $0.1 \sim 500 \text{ micrometer}$  長( $10 \sim 50 \text{ nanometer}$  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  $100 \sim 200$  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 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解し、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）。

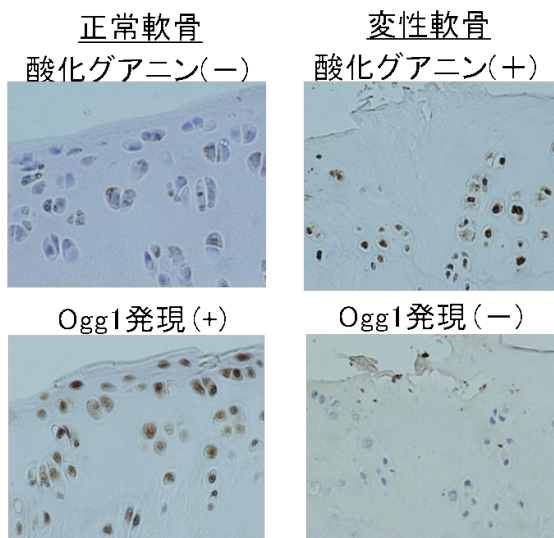


図 1. 変性軟骨組織に発現する DNA 修復酵素 (Ogg1)  
(自著投稿論文図表より改変)

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とチミン、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、これが発症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 type II 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 type II 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、嚔声、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、CCL4/MIP-1、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 CRP II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、嚔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、CCL4/MIP-1、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値の変動が治療に应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、治療应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の治療应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)。

\*ウェルヒの 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

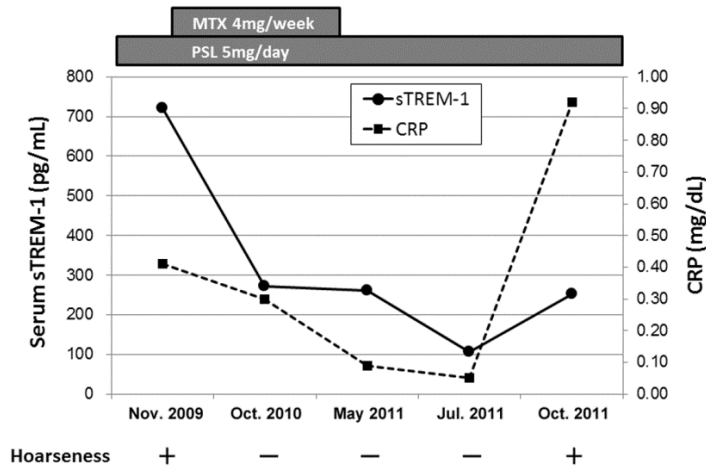


図2 末梢血単核球中の TREM-1 の発現

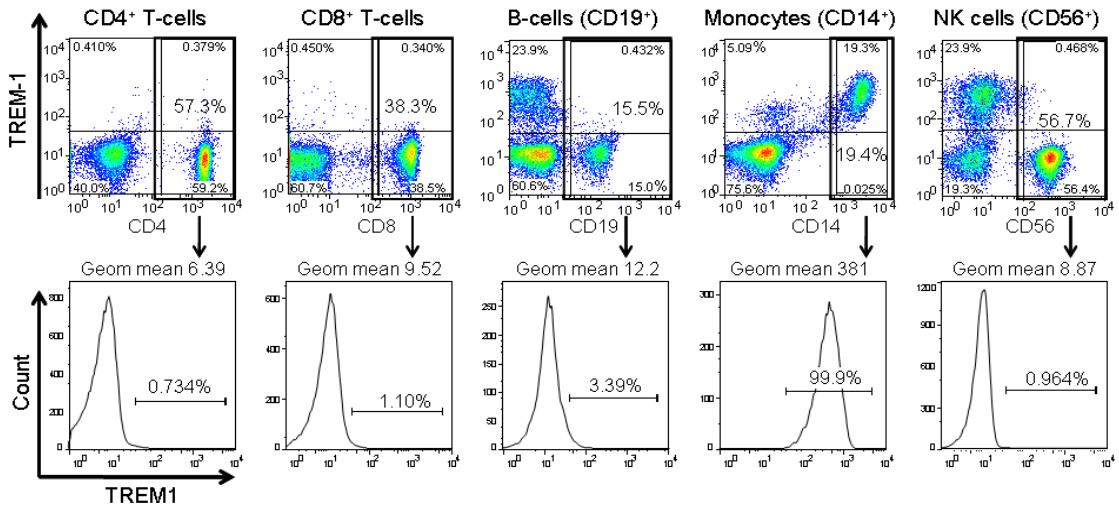


図3 健常者および RP 患者における単球上の TREM-1 発現比較

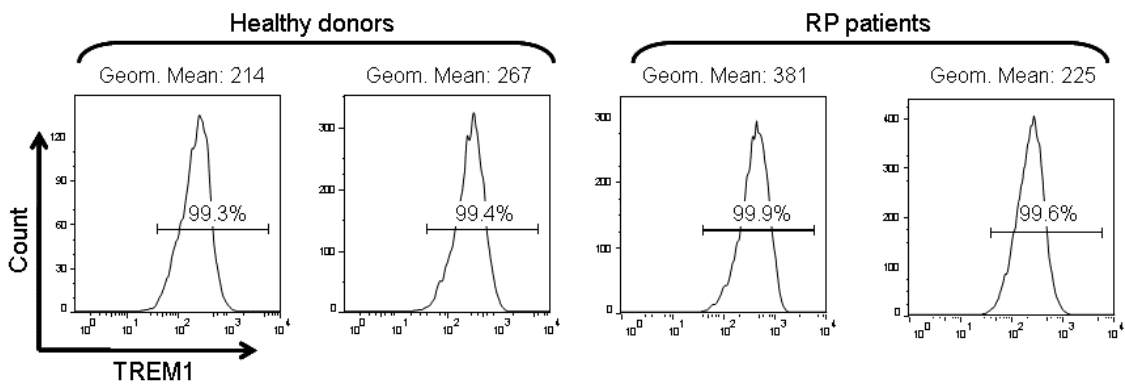
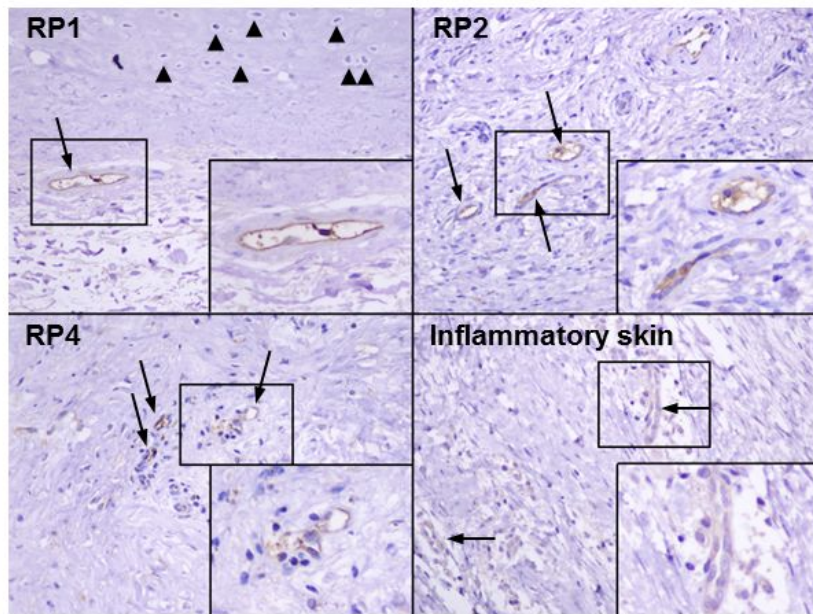


図4 RP患者の軟骨炎病変部における TREM-1 の局在



## 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、あるいは咳嗽や嚔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、嚔声、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 CRP II 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 専門外来を受診した 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ตอบสนอง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

表 1 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)。

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

図1 RP患者 (n=41) の男女比

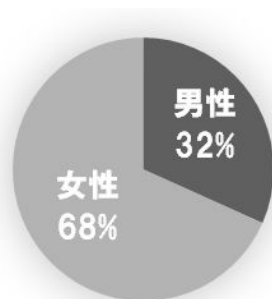


図2 RP患者の発症年齢構成

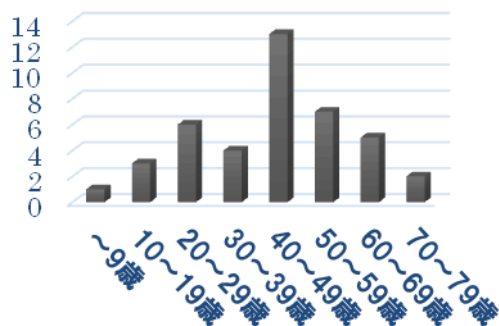
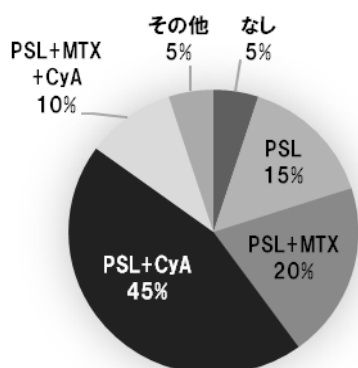
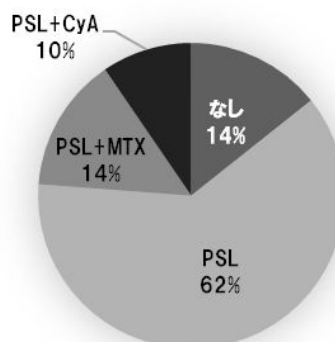


図3 気道病変の有無と現在の治療内容との関連

気道病変のある症例 (N=20)



気道病変のない症例 (N=21)

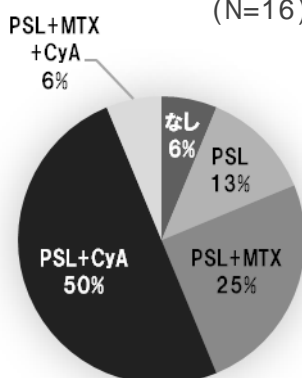


PSL=プレドニゾン、MTX=メトトレキサート、CyA=シクロスポリン

図4 初発症状としての気道症状の有無と現在の治療内容との関連

気道症状を初発とした症例

(N=16)



気道症状以外を初発とした症例

(N=25)

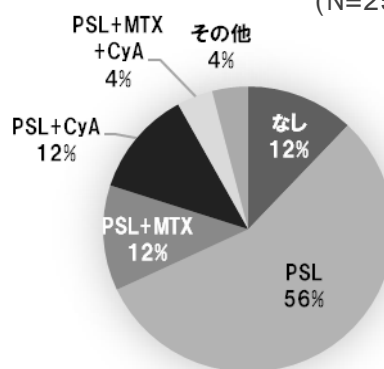
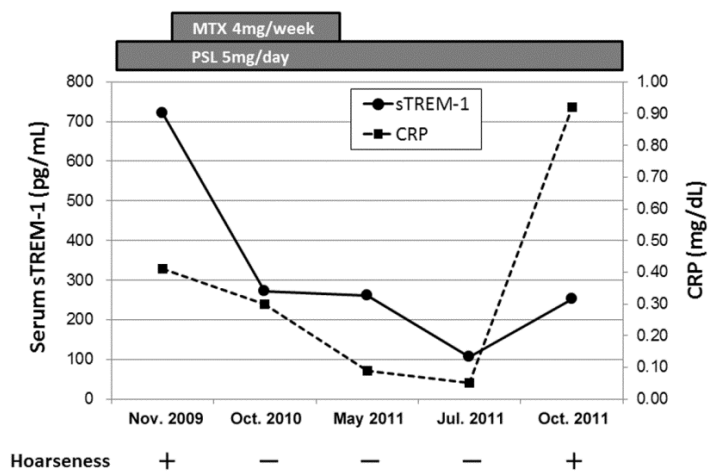


図5 活動性 RP 患者における臨床経過とマーカーの経時的変化の一例



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  
- 再発性多発軟骨炎における Th1/Th17 細胞機能の検討 -

研究分担者 清水 潤 聖マリアンナ医科大学, 免疫学・病害動物学  
研究代表者 鈴木 登 聖マリアンナ医科大学免疫学・病害動物学

研究要旨：再発性多発軟骨炎（relapsing polychondritis、以下 RP）は、全身の軟骨に炎症を来たしうる原因不明の難治性疾患である。本邦における患者数は 500 人程度と推察され、疫学・病態研究が端緒についたばかりであり、診断・治療指針は未確立である。

研究代表者らは厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「患者支援団体等が主体的に難病研究支援を実施するための体制構築に向けた研究（JPA 研究班）」の分担研究を担当し、同班研究がいわゆる「患者主体」レジストリを立ち上げ、それが症状主体の前向き研究を可能にすることを確認した。

そのデータを用いた新規治療方法の開発に向けた、新規パラメーターの検討の一環として昨年度は、血清 sTREM-1 レベルは活動性 RP および非活動性 RP を区別することが可能であり、RP の疾患活動性マーカーとして優れていることを発見した。本年度はこの自然免疫機能と対をなす、獲得免疫機能を検討した。

方法は、獲得免疫の中心的役割を果たしている T 細胞の機能発揮に重要とされるサイトカインの血清濃度を測定した。T 細胞機能は Th1、Th17 等に細分化され、それぞれに機能発揮に必要なサイトカインが異なり、ヒトの疾患に大きくかかわるとされるためである。その結果は Th1 細胞機能亢進が明確になり、そこに Th17 細胞が関与している可能性が示唆された。

この獲得免疫の異常は、我々が平成 21～23 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]の中で明らかにした、本疾患におけるメトトレキサートの有効性と密接な関連があるものと考えられる。

今後はこの新規疾患パラメーター検討を、「患者主体」レジストリの綿密な情報とあわせて前向き研究をすることで、本疾患の病態解明および適切な治療方法の確立を目指す。

## A. 研究目的

### i) 研究の背景

#### 再発性多発軟骨炎の疫学調査

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、本邦の患者実態として、本邦全体の患者数がおおよそ 500 人程度と推察されること、発症年齢は 3 歳より 97 歳まで多年齢層にわたり、平均は 52.7 歳であること、男性と女性の割合がほぼ同じであること、重症例となりやすい気道病変を持つ患者の割合が 50%程度になることを明らかにした。治療においては、気道病変はステロイド単独治療ではその病勢を抑えられないため、免疫抑制剤(メソトレキ

セート)が必要となることを発見した(文献1)。

そこで現在免疫抑制剤を用いた臨床試験を計画しており、そのため新たな患者登録・追跡システムが必要となった。その際、適切でかつ正確な臨床検査データの収集と、疾患機序解明のための新規疾患パラメーターの開発が不可欠である。

## ii) 本年度研究の目的 = 新規疾患パラメーターの開発

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、CCL4/MIP-1、VEGF および MMP-3 を同定した。その中でも血清 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り、RP の疾患活動性マーカーとして優れていることを発見した。

ヒトの免疫機能は、自然免疫と獲得免疫にてなりたっており、(1)(2)の自然免疫に加えて獲得免疫の異常を研究することは治療効果を上昇させるために重要なことと考える。近年、様々なヒト免疫疾患において Th1 細胞および Th17 細胞という獲得免疫の主要な細胞に異常がみられることが報告されている(後述)。本年度はこの細胞群の維持に必須であるサイトカインの血中濃度を測定する。

## iii) 期待される研究成果

患者登録・追跡における IT 技術の積極利用による、高効率化。

情報収集の多元化による、患者訴えの綿密な収集。

JPA 研究班を通じて、国レジストリ作成への意見反映の試み。

RP の病態・病勢を的確に反映する、簡便な検査法の確立。

RP に有効性が高いと考えられるメソトレキセート治療の前向き研究における評価方法の確立。

## B. 平成 25 年度研究結果

### i) Th1 細胞、Th17 細胞

獲得免疫の要である T 細胞は、生体の局所にあわせた機能の発揮のため、網内系においていくつかのサブセットに分化する。Th1 細胞と Th17 細胞は、代表的な炎症惹起性のサブセットのひとつであり、前者は細胞内寄生菌、後者は細胞外寄生菌および真菌の排除にあたりとされている。また、その分化には Th1 細胞は IL-12、Th17 細胞は TGF および IL-6 というサイトカインが必要であり、さらに Th17 細胞はその増殖・維持に IL-23 を要する。

### ii) ヒト免疫疾患と Th1 細胞、Th17 細胞

双方のサブセットともに関節リウマチに代表されるヒト免疫疾患の原因の一つであることが証明されており、抗体療法が臨床的に使用され始めている。

我々は厚生労働科学研究難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)ベーチェット病に関する調査研究の分担研究において、ベーチェット病にて末梢血における Th17 細胞の増加および Th1 細胞の減少、末梢血ナイーブ CD4+T 細胞が、IL-12 の存在下にて Th1 細胞様、IL-23 の存在下にて Th17 細胞様の過反応を示すこと等を発見し、双方の

細胞ともに病態に密接に関連している可能性を提示した。(文献2~5)

### iii) RP 血清中 Th1/Th17 細胞関連サイトカイン濃度の検討

本年度は疾患および健常者血清中の IFN $\gamma$ 、IL-12、IL-17 および IL-23 濃度を観察し、生体内での T 細胞分化誘導環境を検討した。

対象は RP6 例、健常者 8 例、疾患コントロールとしてベーチェット病 4 例。それぞれのキットを用い測定した。

RP において Th1 細胞が産生する IFN $\gamma$  の上昇、Th1 細胞の維持に重要な IL-12 の低下がみられ、Th1 細胞の過剰な活性化とそのネガティブフィードバックが考察された(図 1)。

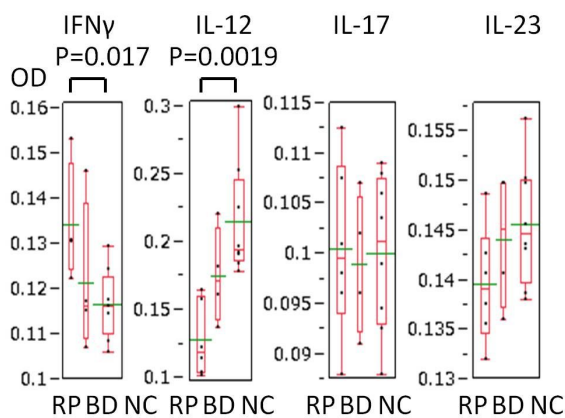


図1 RP、ベーチェット病(BD;疾患コントロール)、健常者(NC)の血中Th1/Th17細胞関連サイトカイン濃度

さらにそのIFN $\gamma$  濃度はIL-23濃度と正相関(P=0.028)を示した(図2)。IL-23がその活性に重要に関与するTh17細胞もTh1細胞機能を介して、二次的にRPの病態形成に関わることが示唆される。

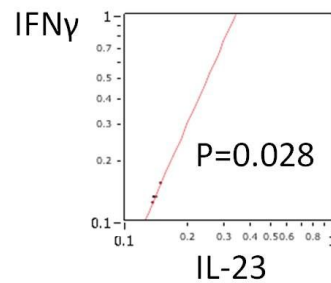


図2 RPにおける血中サイトカイン濃度の相関検討

## C. 結語

結果のii)項で記載したように、我々はTh1/Th17細胞機能とその相互関係を鋭敏に反映するリンパ球機能検査を確立しており、今後RPでの詳細な解析を行う。前述のJPA研究班による新患者レジストリ方法と本検査法を有機的に結合させることで、迅速な治療指針の確立を図ることを今後の目的とする。

## 文献

- 1) Hiroshi Oka, Yoshihisa Yamano, Jun Shimizu, Kazuo Yudoh, Noboru, Suzuki. A large-scale survey of patients with relapsing polychondritis in Japan. Inflammation and Regeneration. In press.
- 2) Shimizu J, Izumi T, Arimitsu N et al (2012) Skewed TGF $\beta$ /Smad signalling pathway in T cells in patients with Behçet's disease. Clin Exp Rheumatol 30:S35-39
- 3) Shimizu J, Takai K, Fujiwara N et al (2012) Excessive CD4+ T cells co-expressing interleukin-17 and interferon- $\gamma$  in patients with Behçet's disease. Clin Exp Immunol 168:68-74
- 4) Shimizu J, Izumi T, Suzuki N (2012)



Aberrant Activation of Heat Shock Protein 60/65 Reactive T Cells in Patients with Behcet's Disease. *Autoimmune Dis.* doi:10.1155/2012/105205

- 5) Shimizu J, Kaneko F, Suzuki N (2013) Skewed helper T cell responses to IL12 family cytokines produced by antigen presenting cells and the genetic background in Behcet 's Disease. *Genet Res Int.* doi:10.1155/2013/363859



研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
清水潤, 山野嘉久, 遊道和雄, 岡寛, 須賀万智, 鈴木 登.	稀な肺疾患 再発性多発軟骨炎.	呼吸	31	641-645	2012
Arnaud L, Suzuki N et al.	RPDAI study group. The Relapsing Polychondritis Disease Activity Index: development of a disease activity score for relapsing polychondritis.	Autoimmun Rev.	12	204-209	2012
Kawakami Y, Matsuo K, Murata M, Yudoh K, Nakamura H, Shimizu H, Beppu M, Inaba Y, Saito T, Kato T, Masuko K.	Expression of Angiotensin II Receptor-1 in Human Articular Chondrocytes.	Arthritis.	2012	648537	2012
Masuko K, Murata M, Beppu M, Nakamura H, Kato T, Yudoh K.	Sphingosine-1-phosphate modulates expression of vascular endothelial growth factor in human articular chondrocytes: a possible new role in arthritis.	Int J Rheum Dis.	15(4)	366-73	2012

Murata M, Yudoh K, Shimizu H, Beppu M, Nakamura H, Kato T, Masuko K.	Layilin, a talin-binding hyaluronan receptor, is expressed in human articular chondrocytes and synoviocytes and is down-regulated by interleukin-1 .	Mod Rheumatol.	6	online	2012
Kamada T, Kurokawa MS, Kato T, Takenouchi K, takahashi k, Yoshioka T, Uchida T, Mitsui H, Suematsu N, Okamoto K, Yudoh K, Katayama Y, Nakamura H.	Proteomic analysis of bone marrow-adherent cells in rheumatoid arthritis and osteoarthritis.. International	Journal of Rheumatic Diseases.	15	169-178	2012
Yudoh K, Karasawa R.	A Novel Biomaterial for Cartilage Repair Generated by Self-Assembly: Creation of a self-organized articular cartilage-like tissue.	J Biomaterials and Nanobiotech.	3	125-129	2012
Yagishita N., Aratani S., Leach C., Amano T., Yamano Y., Nakatani K., Nishioka K., 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
Shimizu J, Takai K, Fujiwara N, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Yoshikawa H, Kaneko F, Suzuki T, Suzuki N.	Excessive CD4+ T cells co-expressing interleukin-17 and interferon- in patients with Behçet's disease.	Clinical and Experimental Immunology.	168(1)	68-74	2012
Shimizu J, Izumi T, Arimitsu N, Fujiwara N, Ueda Y, Wakisaka S, Yoshikawa H, Kaneko F, Suzuki T, Takai K, Suzuki N.	Skewed TGF /Smad signaling pathway of T cells in patients with Behçet's disease.	Clinical and Experimental Rheumatology.	30(35)	S35-S39	2012

Shimizu J, Izumi T, Suzuki N.	Aberrant activation of Heat Shock Protein 60/65 reactive T cells in patients with Behcet's Disease.	Autoimmune Diseases.	2012	105205	2012
Arnaud L, Devilliers H, et al.	The Relapsing Polychondritis Disease Activity Index: development of a disease activity score for relapsing polychondritis.	Autoimmunity Reviews 2012	12(2)	204-209	2012
清水潤, 鈴木登 .	<特集> 次世代健康・医療・福祉の化学 神経細胞シートを用いた脳血管疾患への移植応用	月刊「化学工業」	64(1)	35-38	2013
Kono T, Arimitsu N, Shimizu J, Takai K, Fujiwara N, Umehara T, Saito A, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Hashimoto T, Tanaka Y, Suzuki N.	Human iPS Cell Derived Neurons with Cortical Motor Neuron Phenotype are Relevant for Functional Recovery of Hemiplegic Mice with Injured Motor Cortex.	St. Marianna Medical Journal	4(2)	31-40	2013.12
Umehara T, Arimitsu N, Iinuma M, Shimizu J, Takai K, Fujiwara N, Saito A, Kono T, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Moroe Beppu, Suzuki N.	Transplantation of Motor Neurons Derived from Human iPS Cells into Total Transection Model of Spinal Cord Injury in Mice.	St. Marianna Medical Journal	4(2)	21-30	2013.12
Saito A, Shimizu J, Fujiwara N, Takai K, Arimitsu N, Umehara T, Kono T, Misawa H, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Moroe Beppu, Suzuki N.	IGFII/Akt Signaling Regulates Myocyte Homeostasis in Human Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells.	St. Marianna Medical Journal	4(2)	41-48	2013.12
Fujiwara N, Shimizu J, Takai K, Arimitsu N, Saito A, Kono T, Umehara T, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N.	Restoration of spatial memory dysfunction of human APP transgenic mice by transplantation of neurons derived from human iPS cells.	Neuroscience Letters	557	129-134	2013

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
Jun Shimizu, Fumio Kaneko and Noboru Suzuki.	Skewed helper T cell responses to IL-12 family cytokines produced by antigen presenting cells and the genetic background in Behcet's Disease.	Genetics Research International		in press	2014
Hiroki Ueno, Takaaki Hattori, Yuta Kumagai, Noboru Suzuki, Satoki Ueno, and Hitoshi Takagi.	Alterations in the Corneal Nerve and Stem/Progenitor Cells in Diabetes: Preventive Effects of Insulin-Like Growth Factor-1 Treatment	International Journal of Endocrinology		in press	2014
Hiroshi Oka, Yoshihisa Yamano, Jun Shimizu, Kazuo Yudoh, Noboru Suzuki.	A large-scale survey of patients with relapsing polychondritis in Japan	Inflammation and Regeneration		in press	2014

# RING-finger type E3 ubiquitin ligase inhibitors as novel candidates for the treatment of rheumatoid arthritis

NAOKO YAGISHITA<sup>1</sup>, SATOKO ARATANI<sup>2</sup>, CRAIG LEACH<sup>3</sup>, TETSUYA AMANO<sup>1</sup>,  
YOSHIIISA YAMANO<sup>1</sup>, KO NAKATANI<sup>4</sup>, KUSUKI NISHIOKA<sup>2</sup> and TOSHIHIRO NAKAJIMA<sup>1,2,4,5</sup>

<sup>1</sup>Institute of Medical Science, St. Marianna University School of Medicine, Kawasaki, Kanagawa;

<sup>2</sup>Institute of Medical Science, Tokyo Medical University, Shinjuku, Tokyo, Japan;

<sup>3</sup>Progenra, Inc., Malvern, PA, USA; <sup>4</sup>Bayside Misato Medical Center, Kochi;

<sup>5</sup>Choju Medical Institute Fukushima Hospital, Toyohashi, Japan

Received April 5, 2012; Accepted May 30, 2012

DOI: 10.3892/ijmm.2012.1129

**Abstract.** Rheumatoid arthritis (RA) significantly affects quality of life. We recently cloned synoviolin, a RING-type E3 ubiquitin ligase implicated in the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway. Synoviolin is highly expressed in rheumatoid synovial cells and may be involved in the pathogenesis of RA. Inhibition of synoviolin activity is a potentially useful therapeutic approach for the treatment of RA. We conducted a high-throughput screen of small molecules to find inhibitors of synoviolin autoubiquitination activity. We identified two classes of small molecules, named LS-101 and LS-102, which inhibited synoviolin activity. LS-102 selectively inhibited synoviolin enzymatic activity, while LS-101 inhibited a broad array of RING-type E3 ligases. Moreover, these inhibitors suppressed the proliferation of rheumatoid synovial cells, and significantly reduced the severity of disease in a mouse model of RA. Our results suggest that inhibition of synoviolin is a potentially useful approach in the treatment of RA.

## Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is the most common chronic inflammatory joint disease, affecting ~0.5-1% of people in the industrialized world (1). Clinically, the disorder is characterized by joint pain, stiffness, and swelling due to synovial inflammation and effusion. The clinical features of RA are based on several pathological processes including chronic inflammation, overgrowth of synovial cells, bone and joint destruction, and fibrosis. Currently, the goal of RA treatment is the control of underlying inflammatory process to prevent joint damage using

non-steroidal anti-inflammatory drugs, glucocorticoids, and disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARD). The most widely used small molecule DMARD is methotrexate, which shows the highest retention rate compared with other agents (2). In recent years, biological agents such as inhibitors of tumor necrosis factor (TNF) signaling have become available for clinical use; however, this therapy is prohibitively expensive, and although TNF inhibitors are clinically as effective as methotrexate, the frequency and extent of response are more restricted. In fact, many patients can lose the clinical response to TNF inhibition, highlighting the need for other treatment modalities to further improve the outcome of RA (3,4).

To address this need, we have been investigating the mechanism of outgrowth in rheumatoid synovial cells (RSCs). First, we demonstrated the crucial role of Fas antigen-induced apoptosis in synovial cell hyperplasia (5). Then, while studying cellular functions of RSCs, we cloned synoviolin from these cells (6). Synoviolin, a mammalian homolog of Hrd1p/Der3p (7-9), is an endoplasmic reticulum (ER)-resident E3 ubiquitin ligase with a RING motif that is involved in ER-associated degradation (ERAD) pathway. Synoviolin is also highly expressed in synoviocytes of patients with RA (6,10-12). Overexpression of synoviolin in transgenic mice leads to advanced arthropathy caused by reduced apoptosis of synoviocytes (6). We postulated that hyperactivation of the ERAD pathway by overexpression of synoviolin prevents ER-stress-induced apoptosis, leading to synovial hyperplasia (13). Synoviolin<sup>+/−</sup> knockout mice showed resistance to the development of collagen-induced arthritis (CIA) due to enhanced apoptosis of synovial cells (6). Consistent with our hypothesis, cells from these mice show impaired ERAD due to the lack of synoviolin. In addition, synoviolin ubiquitinates and sequesters the tumor suppressor p53 in the cytoplasm, thereby negatively regulating its biological functions in transcription, cell cycle regulation, and apoptosis by targeting it instead for proteasomal degradation (14). Therefore, synoviolin regulates apoptosis in response to ER stress (through ERAD) as well as p53-dependent apoptosis.

Together, these studies implicated synoviolin as a candidate pathogenic factor in arthropathy, and suggested that the gene dosage of this protein correlates with the onset of arthropathy. Furthermore, elevated synoviolin levels were identified in

---

*Correspondence to:* Professor Toshihiro Nakajima, Institute of Medical Science, Tokyo Medical University, 6-1-1 Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo, 160-8402, Japan  
E-mail: marlin@tokyo-med.ac.jp

**Key words:** rheumatoid arthritis, synoviolin, E3 ubiquitin ligase, endoplasmic reticulum associated degradation, inhibitor

circulating monocytes in association with resistance to treatment with infliximab (a monoclonal antibody against TNF) (10). Therefore, blocking the function of synoviolin could be clinically beneficial in RA patients. This study attempted to identify an inhibitor of synoviolin that acts by blocking its enzymatic activity.

## Materials and methods

**Screening of synoviolin inhibitor.** Purified glutathione S-transferase (GST)-synoviolin  $\Delta$  transmembrane domain (TM) was mixed with glutathione-SPA beads (Amersham Pharmacia Biotech) in buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, Protease inhibitor cocktail, 14 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.5  $\mu$ l cell lysate/well, 0.2 mg SPA bead/well) and incubated for 30 min at room temperature. Glutathione-SPA beads were washed twice, and then mixed with the candidate synoviolin inhibitor compounds in buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM NaF, and 10 nM okadaic acid) in the presence of ATP (2 mM), <sup>33</sup>P-labeled ubiquitin (0.38  $\mu$ g/well), E1 (25 ng/well) (Affiniti Research), and E2 (0.3  $\mu$ g/well) (UbcH5c). After incubation for 90 min at room temperature, buffer comprising 0.2 M boric acid, pH 8.5, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and 2% Triton-X100 was added to stop the reaction. The beads were allowed to settle and the amount of <sup>33</sup>P-ubiquitin incorporated into the GST-synoviolin beads was determined using a Microbeta Scintillation counter.

The primary screen was conducted with multiple compounds per well (10-20 compounds per well) at an estimated screening concentration of 2-10  $\mu$ M. Compound mixtures showing potential activity in the primary screen were then rescreened at one compound per well to determine the active compound within the mixture. Three equivalents of a single compound per well follow-up screening were evaluated. Reconfirmed active compounds were resynthesized and tested in a dose-response experiment to determine potency.

**In vitro ubiquitination assay.** The *in vitro* ubiquitination assay used in this study was described previously (15). Briefly, 40 ng of E1 (Affiniti Research), 0.3  $\mu$ g of E2 (UbcH5c), 0.75  $\mu$ g of <sup>32</sup>P-labeled ubiquitin (a gift from T. Ohta), and 1  $\mu$ g of recombinant E3 ubiquitin ligases were incubated for 30 min at 37°C. Samples were analyzed as described above.

**Cells.** heLa cells were obtained from ATCC. Synovial cells were isolated from synovial tissue obtained patients with rheumatoid arthritis (RA) who met the American College of Rheumatology criteria for RA at the time of orthopedic surgery. These cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma).

**Proliferation assay.** The proliferation of rheumatoid synovial cells (RSCs) was evaluated using Alamar blue (BioSource International) according to the manufacturer's instructions.

**Induction of CIA.** CIA was induced as described previously (6). Briefly, bovine type II collagen (Collagen Research Center) was dissolved overnight in 0.05 M acetic acid at 4°C, and then emulsified in complete Freund's adjuvant (Difco) to a final concentration 1 mg/ml. DBA/1 male mice (7-week-old) were

immunized by subcutaneous injections containing 100  $\mu$ g of collagen emulsion. After 3 weeks, mice were boosted with 200  $\mu$ g collagen emulsion in Freund's complete adjuvant. Then, the mice were treated daily for 4 weeks with the inhibitor compounds at 1.3, 4.0, and 12.0 mg/kg/day in olive oil, vehicle control intraperitoneally, or oral administration of 0.25 mg/kg/day dexamethasone in methylcellulose as a positive control.

The mice were monitored daily for signs of arthritis using an established scoring system (16): 0, no swelling or redness; 1, swelling, redness of paw or 1 joint; 2, two joints involved; 3, more than two joints involved; 4, severe arthritis of entire paws and joints. All paws were evaluated in each animal and the maximum score per animal was 16.

**Histological studies.** The knee and elbow joints were fixed in 4% paraformaldehyde. After decalcification with EDTA, the joints were embedded in paraffin, and 4- $\mu$ m sections were prepared for staining with hematoxylin and eosin. The extent of arthritis in the joints was assessed according to the method reported by Tomita *et al.* (17): 0, normal synovium; 1, synovial membrane hypertrophy and cell infiltration; 2, pannus and cartilage erosion; 3, major erosion of cartilage and subchondral bone; 4, loss of joint integrity and ankylosis.

**Statistical analysis.** All data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Differences between groups were examined for statistical significance using Student's t-test. A P-value <0.05 denoted the presence of a statistically significant difference.

**Ethical considerations.** The ethics committee for Animal Experiments of St. Marianna University School of Medicine approved the mice experiments described in this study. Furthermore, all the experimental protocols described in this study were approved by the Ethics Review Committee of St. Marianna University School of Medicine (Approval number 01008), and the written informed consent was obtained from all patients.

## Results

**High-throughput compound screening for inhibitors of synoviolin.** To identify small molecule inhibitors of synoviolin autoubiquitination, we screened the Lead Discovery Service program of Pharmacopeia, which includes more than four million compounds from Pharmacopeia's Compound Collection (18). Herein we monitored <sup>33</sup>P-autoubiquitinated synoviolin in cell lysates containing GST-synoviolin $\Delta$ TM in the presence of ATP, E1, E2, and <sup>33</sup>P-labeled ubiquitin (Fig. 1A). The primary screen was conducted with multiple compounds per well (10-20 compounds per well) at an estimated screening concentration of 2-10  $\mu$ M. Mixtures of compounds showing potential activity in the primary screen were then rescreened individually. Compounds demonstrating activity in this reconfirmation assay were resynthesized and retested. Two unique compounds, termed LS-101 and LS-102, inhibited the autoubiquitination of synoviolin with a 50% inhibitory concentration value (IC<sub>50</sub>) of ~15  $\mu$ M (Fig. 1B) and 20  $\mu$ M (Fig. 1C), respectively.

**LS-101 and LS-102 inhibit the autoubiquitination of synoviolin.** Further evaluation of LS-101 and LS-102 in an *in vitro* ubiqui-



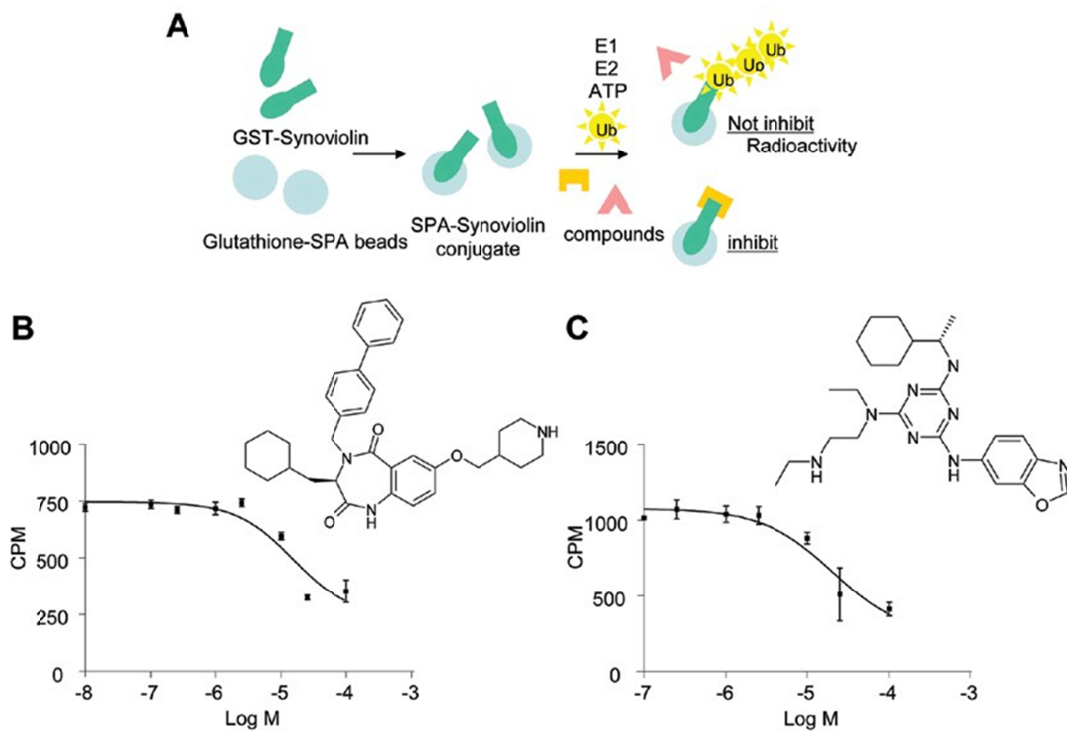


Figure 1. Screening for synoviolin inhibitors. (A) Scheme of high-throughput screening of synoviolin-induced ubiquitination assay. (B) Inhibition of synoviolin  $^{33}\text{P}$ -polyubiquitination by LS-101 and chemical structure of LS-101. (C) Inhibition of synoviolin  $^{33}\text{P}$ -polyubiquitination by LS-102 and chemical structure of LS-102.

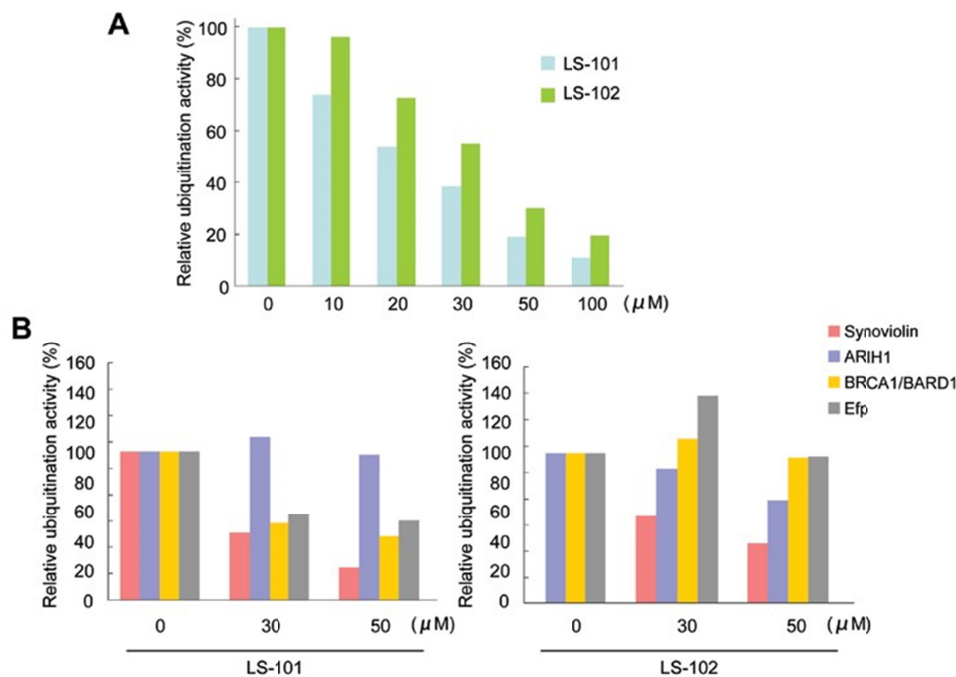


Figure 2. Effects of LS-101 and LS-102 on *in vitro* ubiquitination. (A) Both LS-101 and LS-102 inhibited the autoubiquitination of synoviolin in a dose-dependent manner. The  $\text{IC}_{50}$  of LS-101 was 20  $\mu\text{M}$  and that of LS-102 was 35  $\mu\text{M}$ . (B) Selectivity of LS-101 (left) and LS-102 (right) against other E3 ubiquitin ligases. LS-102 inhibited synoviolin selectively compared with LS-101. Data are mean  $\pm$  SEM of 3 experiments.

ubiquitination assay showed that the inhibition of synoviolin activity by both LS-101 and LS-102 was dose-dependent (LS-101;  $\text{IC}_{50}$ =20  $\mu\text{M}$ , LS-102;  $\text{IC}_{50}$ =35  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 2A). To assess the selectivity of the compounds for other E3 ubiquitin ligases, we determined the effects of LS-101 and LS-102 on the enzymatic

activity of the following RING-finger type E3 ubiquitin ligases: ariadne, *Drosophila*, homolog of, 1 (ARIH1) (19), breast cancer 1 gene (BRCA1)/BRCA1-associated RING domain 1 (BARD1) (20), and estrogen-responsive RING-finger protein (Efp) (21). LS-101 inhibited the activity of BRCA1/BARD1 and Efp

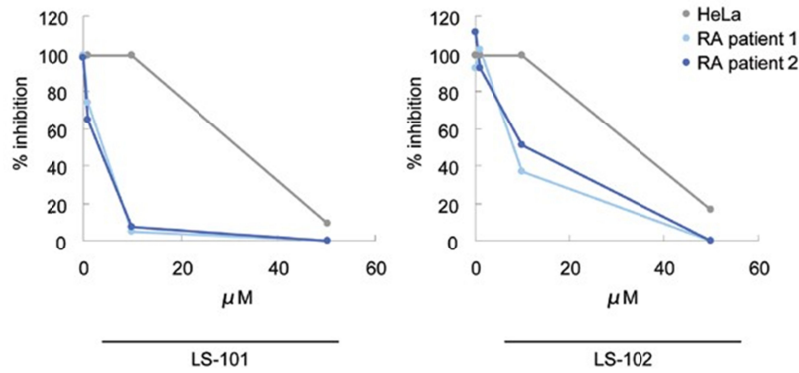


Figure 3. Effects of LS-101 and LS-102 on cell growth of RSCs. HeLa cells and RSCs derived from two RA patients were treated with synoviolin inhibitors for 12 h at the indicated concentrations. LS-101 and LS-102 repressed the proliferation of each RSC population tested. Data are expressed as the mean percentage of inhibition of the vehicle-treated control group  $\pm$  SEM; (n=3).

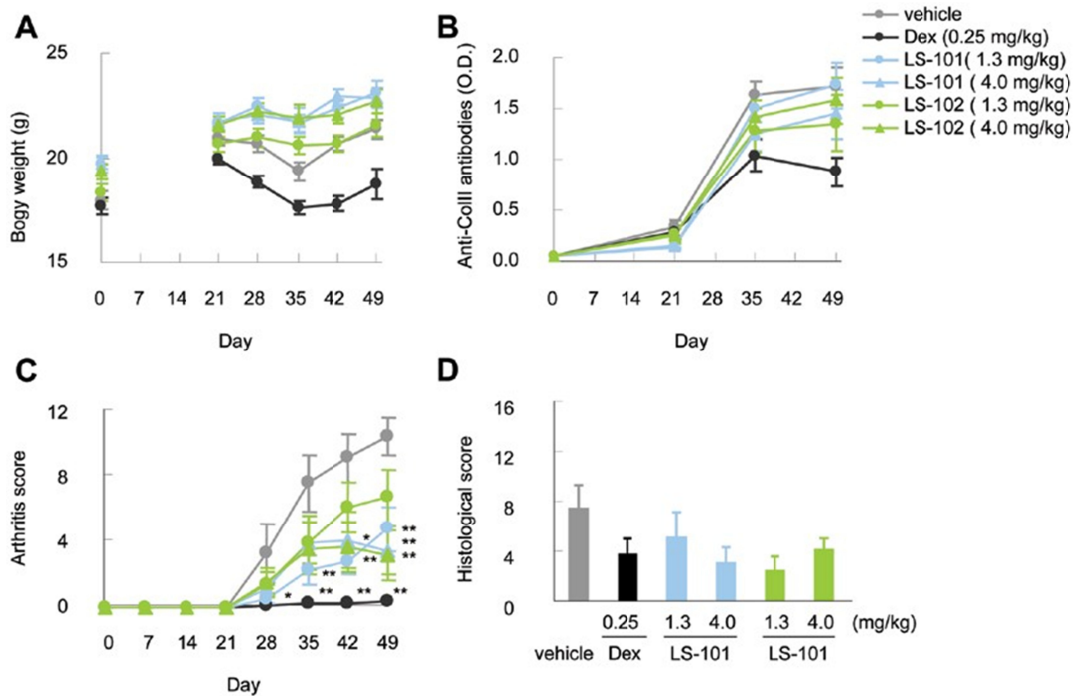


Figure 4. Effects of LS-101 and LS-102 in mouse CIA. DBA/1 mice immunized on day 0 and boosted on day 21 with type II collagen were treated with the vehicle alone, 0.25 mg/kg dexamethasone (Dex), or with 1.3, 4.0 mg/kg LS-101 or LS-102 from day 21 to 49. (A) Change in body weight. (B) The level of anti-type II collagen antibodies. (C) Total arthritis score. (D) Histological arthritis score. Data are mean  $\pm$  SEM (initial n=12; final n=7). \*P<0.05, \*\*P<0.01.

(Fig. 2B), although this effect was weaker than that observed with synoviolin (Fig. 2B). Moreover, LS-101 had no effect against the enzymatic activity of ARIH1 (Fig. 2B). On the other hand, LS-102 did not inhibit the activity of other E3 ubiquitin ligases, only affecting synoviolin (Fig. 2B). These results suggested that LS-102 is a more selective synoviolin inhibitor than LS-101.

**LS-101 and LS-102 inhibit proliferation of RSCs.** We next tested LS-101 and LS-102 for their effects on the proliferation of RSCs, using HeLa cells as a control. LS-101 and LS-102 inhibited HeLa cell growth only at very high concentrations (LS-101;  $IC_{50}$ =31.3  $\mu$ M, LS-102;  $IC_{50}$ =32.7  $\mu$ M). However, treatment of RSCs with these compounds suppressed synovial cell growth dose-dependently and with much greater potency than that observed in HeLa cells (Fig. 3). A similar effect was also observed in another line of RSCs (Fig. 3). In addition, LS-101

inhibited synovial cell proliferation more potently than LS-102 (LS-101;  $IC_{50}$ =4.2  $\mu$ M, LS-102;  $IC_{50}$ =5.4  $\mu$ M). These results demonstrated that blockade of synoviolin function reduced the proliferation of RSCs, and that RSCs are more susceptible to this effect than HeLa cells. Consistent with these findings, higher expression levels of synoviolin were observed in RSCs than in HeLa cells (6).

**LS-101 and LS-102 reduce clinical severity scores in a CIA model.** To evaluate the *in vivo* efficacy of synoviolin inhibitors, we tested LS-101 and LS-102 in a mouse model of arthritis over a period of 28 days. No reduction of body weight was observed during the administration of these compounds (Fig. 4A). Moreover, the production of anti-type II collagen antibodies resulting from type II collagen immunization in both the LS-101 and LS-102 group was comparable to that

observed in the vehicle control group (Fig. 4B). Intraperitoneal treatment with LS-101 or LS-102 starting on day 21 reduced the clinical severity scores compared to vehicle controls (Fig. 4C). The efficacy was observed at both 1.3 mg/kg and 4.1 mg/kg doses in this experiment, although the protective effect of LS-101 at 1.3 mg/kg against CIA was stronger than the same dose of LS-102. At 4.0 mg/kg, there was no difference in the effects between LS-101 and LS-102. Finally, histological analysis showed lower histological arthritis scores in mice treated with the synoviolin inhibitors compared with wild-type mice (Fig. 4D).

## Discussion

The selective degradation of proteins in eukaryotic cells is carried out by the ubiquitin proteasome system (UPS), whereby proteins are targeted for degradation by covalent ligation to small polypeptide ubiquitin (22,23). This reaction requires the sequential actions of three enzymes: E1, E2, and E3 ligases (22,23). E3 ligases are responsible for conferring selectivity to ubiquitination by recognizing specific substrates. Bioinformatic analysis has identified over 600 E3 ligases, with RING-type E3 ligases constituting the largest subfamily within this group (24). Accordingly, RING E3 ligases have been linked to the control of multiple cellular processes and to many human diseases such as diabetes mellitus, polyglutamine disease, and Parkinson's diseases (24-26). In the UPS, the proteasome inhibitory agent bortezomib (velcade) was recently approved for the treatment of multiple myeloma and mantle cell lymphoma (27). Bortezomib induces apoptosis of a wide variety of cancer cells, and is the first proteasome inhibitor to gain FDA approval (28-30). However, widespread clinical use of bortezomib continues to be hampered by the appearance of dose-limiting toxicities, drug-resistance, and interference by some natural compounds (31). Thus, despite the efficacy of bortezomib for treating lethal diseases such as cancer, the associated toxicities prevent its use for the treatment of chronic diseases such as RA. Thus, it is important to develop inhibitors of the ubiquitin-proteasome enzymatic cascade upstream from the proteasome to impact fewer cell processes and reduce toxicity. E3 ligases are attractive such targets given their large number and substrate specificity. We recently cloned the E3 ubiquitin ligase synoviolin, which localizes to the ER lumen and has enzymatic activity. We have also demonstrated that this protein plays crucial roles in the pathological processes of RA (6), and could therefore be a candidate novel therapeutic target of RA (32).

In this study, we identified two potent small compounds as inhibitors of synoviolin enzymatic activity using high-throughput screening (Fig. 1). Moreover, *in vivo* studies showed no serious toxicity associated with these compounds in terms of survival and weight loss during treatment (Fig. 4A). Biochemical characterization of the two compounds, LS-101 and LS-102, demonstrated that they both inhibit the autoubiquitination activity of synoviolin *in vitro* (Fig. 2), with LS-101 showing stronger efficacy ( $IC_{50}=20 \mu M$ ) than LS-102 ( $IC_{50}=35 \mu M$ ), but less selectivity (Fig. 2). It was unclear from this study why LS-101 showed a weak inhibitory effect on BRCA1/BARD1 and Efp activity, and further study is needed to understand the molecular basis for this observation. LS-101 and LS102 inhibited

the proliferation of RSCs and to a much lesser extent, heLa cells (Fig. 3). The difference in cell sensitivities to these compounds could be, at least in part, due to the expression level of synoviolin, namely, high levels of synoviolin in RSCs would contribute to the cell overgrowth and therefore, inhibition of synoviolin in these cells would in turn suppress proliferation. These cells may also have different requirements for synoviolin, such that repressing synoviolin activity in RSCs would lead to growth suppression. Prophylactic administration of either LS-101 or LS-102 also significantly reduced the severity of murine CIA (Fig. 4C). Since LS-101, a nonselective inhibitor, reduced clinical severity scores in CIA similarly to LS-102, blocking synoviolin enzymatic activity seems crucial in the pathological process of CIA. These findings suggest that the suppression level of synovial cell growth and incidence of arthritis reflect the efficacy of these compounds rather than their selectivity, and that in RA, synoviolin might have an indispensable role among E3 ligases.

RA comprises multiple processes such as chronic inflammation, overgrowth of synovial cells, joint destruction, and fibrosis. During the course of inflammation, synovial cells, macrophages, T cells, and B cells all contribute to the production of cytokines such as interleukin (IL)-1, IL-6, IL-10, TNF, and transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (33,34). These cytokines, in turn, stimulate the overgrowth of synovial cells to form a mass of synovial tissue, called pannus, which invades and destroys the bone and cartilage through osteoclast activation and protease production (33-37). This chronic inflammation state ultimately leads to fibrosis. Our study proved that synoviolin is, at least in part, involved in the overgrowth of synovial cells (6) and fibrosis (38) among these processes. The IL-17 induction of synoviolin may also contribute to RA chronicity (39), and synoviolin has been shown to target misfolded MhC class I heavy chains (40). In this study, antibody titers were elevated in synoviolin inhibitor-treated mice to levels comparable to those in vehicle controls (Fig. 4B). Thus, as with the study of synoviolin<sup>-/-</sup> knockout mice in CIA, it is difficult to clarify the function of synoviolin with respect to the chronicity of inflammation, because suppressing synoviolin blocks synovial cell outgrowth directly due to sequential events following immunization of type II collagen (6). Our results confirm that further studies of the association between chronic inflammation and synoviolin are clearly warranted.

Eight biological agents are currently approved for clinical use in treatment of RA, and these drugs have dramatically changed the outcome of RA during the past decade (3,4). However, some patients still fail to respond to the biological treatment or develop adverse effects such as an increased risk of infection. Moreover, these agents are associated with high costs and discomfort arising from the subcutaneous or intravenous administration. Thus, there is a clear need for the development of cheaper, orally administered therapies with fewer side effects. In this regard, spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor, an orally administered drug, has been developed for the treatment of RA (41,42). Dual blockade of TNF and IL-17 was also reported recently as a strategy for halting RA disease from progression to the extent seen when only one cytokine is blocked (43). The involvement of synoviolin in both the TNF and IL-17 pathways further implicates inhibitors of this enzyme as potential candidate drugs for treatment of RA.

In conclusion, we identified two strong synoviolin inhibitors, and confirmed that synoviolin is an ideal molecular target for RA for disease modification and treatment. We are now proceeding with the optimization of LS-101 and LS-102, and hope our research will lead to the development of a new therapy for RA.

### Acknowledgements

We thank A. Imai and F. Nagumo for the technical assistance. We also thank all members of Dr Nakajima's laboratory. This work was funded in part by grants from the Naito Foundation, Natural Science Scholarship Daiichi-Sankyo Foundation of Life Science, Bureau of Social Welfare and Public Health, Ministry of Health Labour and Welfare Japan Society for the Promotion of Science, Takeda Science Foundation.

### References

- Gabriel SE: The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 27: 269-281, 2001.
- Aletaha D and Smolen JS: Effectiveness profiles and dose dependent retention of traditional disease modifying anti-rheumatic drugs for rheumatoid arthritis. An observational study. *J Rheumatol* 29: 1631-1638, 2002.
- Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman Mh and Emery P: New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet* 370: 1861-1874, 2007.
- Nurmohamed MT: Newer biological agents in the treatment of rheumatoid arthritis: do the benefits outweigh the risks? *Drugs* 69: 2035-2043, 2009.
- Nakajima T, Aono H, Hasunuma T, Yamamoto K, Shirai T, Hirohata K and Nishioka K: Apoptosis and functional Fas antigen in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Rheum* 38: 485-491, 1995.
- Amano T, Yamasaki S, Yagishita N, *et al*: Synoviolin/Hrd1, an E3 ubiquitin ligase, as a novel pathogenic factor for arthropathy. *Genes Dev* 17: 2436-2449, 2003.
- Bordallo J, Plemper RK, Finger A and Wolf DH: Der3p/Hrd1p is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded luminal and integral membrane proteins. *Mol Biol Cell* 9: 209-222, 1998.
- Shearer AG and Hampton RY: Structural control of endoplasmic reticulum-associated degradation: effect of chemical chaperones on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *J Biol Chem* 279: 188-196, 2004.
- Shearer AG and Hampton RY: Lipid-mediated, reversible misfolding of a sterol-sensing domain protein. *EMBO J* 24: 149-159, 2005.
- Toh ML, Marotte H, Blond JL, Jhumka U, Eljaafari A, Mougin B and Miossec P: Overexpression of synoviolin in peripheral blood and synoviocytes from rheumatoid arthritis patients and continued elevation in nonresponders to infliximab treatment. *Arthritis Rheum* 54: 2109-2118, 2006.
- Gao B, Calhoun K and Fang D: The proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  induce the expression of Synoviolin, an E3 ubiquitin ligase, in mouse synovial fibroblasts via the Erk1/2-ETS1 pathway. *Arthritis Res Ther* 8: R172, 2006.
- Gao B, Lee SM, Chen A, *et al*: Synoviolin promotes IRE1 ubiquitination and degradation in synovial fibroblasts from mice with collagen-induced arthritis. *EMBO Rep* 9: 480-485, 2008.
- Yagishita N, Yamasaki S, Nishioka K and Nakajima T: Synoviolin, protein folding and the maintenance of joint homeostasis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4: 91-97, 2008.
- Yamasaki S, Yagishita N, Sasaki T, *et al*: Cytoplasmic destruction of p53 by the endoplasmic reticulum-resident ubiquitin ligase 'Synoviolin'. *EMBO J* 26: 113-122, 2007.
- Ohta T, Michel JJ, Schottelius AJ and Xiong Y: ROC1, a homolog of APC11, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity. *Mol Cell* 3: 535-541, 1999.
- Hughes C, Wolos JA, Giannini EH and Hirsch R: Induction of T helper cell hyporesponsiveness in an experimental model of autoimmunity by using nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibody. *J Immunol* 153: 3319-3325, 1994.
- Tomita T, Takeuchi E, Tomita N, *et al*: Suppressed severity of collagen-induced arthritis by in vivo transfection of nuclear factor kappaB decoy oligodeoxynucleotides as a gene therapy. *Arthritis Rheum* 42: 2532-2542, 1999.
- Dunn DA and Feygin I: Challenges and solutions to ultra-high-throughput screening assay miniaturization: submicroliter fluid handling. *Drug Discov Today* 5: 84-91, 2000.
- Moynihan TP, Ardley HC, Nuber U, *et al*: The ubiquitin-conjugating enzymes UbcH7 and UbcH8 interact with RING-finger/IBR motif-containing domains of HHARI and H7-AP1. *J Biol Chem* 274: 30963-30968, 1999.
- Hashizume R, Fukuda M, Maeda I, *et al*: The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J Biol Chem* 276: 14537-14540, 2001.
- Urano T, Saito T, Tsukui T, *et al*: Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature* 417: 871-875, 2002.
- Hershko A and Ciechanover A: The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67: 425-479, 1998.
- Pickart CM: Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70: 503-533, 2001.
- Deshai RJ and Joazeiro CA: RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 78: 399-434, 2009.
- Kaufman RJ: Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 110: 1389-1398, 2002.
- Araki E, Oyadomari S and Mori M: Endoplasmic reticulum stress and diabetes mellitus. *Intern Med* 42: 7-14, 2003.
- Cvek B and Dvorak Z: The ubiquitin-proteasome system (UPS) and the mechanism of action of bortezomib. *Curr Pharm Des* 17: 1483-1499, 2011.
- Adams J: Development of the proteasome inhibitor PS-341. *Oncologist* 7: 9-16, 2002.
- Mitchell BS: The proteasome - an emerging therapeutic target in cancer. *N Engl J Med* 348: 2597-2598, 2003.
- Burger AM and Seth AK: The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications. *Eur J Cancer* 40: 2217-2229, 2004.
- Chen D, Frezza M, Schmitt S, Kanwar J and Q PD: Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets* 11: 239-253, 2011.
- Hopkins AL and Groom CR: The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov* 1: 727-730, 2002.
- Arend WP: Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 45: 101-106, 2001.
- McInnes IB and Schett G: Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 7: 429-442, 2007.
- Stanczyk J, Ospelt C, Gay RE and Gay S: Synovial cell activation. *Curr Opin Rheumatol* 18: 262-267, 2006.
- huber LC, Distler O, Tarnier I, Gay RE, Gay S and Pap T: Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 45: 669-675, 2006.
- Knedla A, Neumann E and Muller-Ladner U: Developments in the synovial biology field 2006. *Arthritis Res Ther* 9: 209, 2007.
- Hasegawa D, Fujii R, Yagishita N, *et al*: E3 ubiquitin ligase synoviolin is involved in liver fibrogenesis. *PLoS One* 5: e13590, 2010.
- Toh ML, Gonzales G, Koenders MI, *et al*: Role of interleukin 17 in arthritis chronicity through survival of synoviocytes via regulation of synoviolin expression. *PLoS One* 5: e13416, 2010.
- Burr ML, Cano F, Svobodova S, Boyle LH, Boname JM and Lehner PJ: HRD1 and UBE2J1 target misfolded MHC class I heavy chains for endoplasmic reticulum-associated degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 2034-2039, 2011.
- Gomez-Puerta JA and Bosch X: Therapy: Spleen tyrosine kinase inhibitors - novel therapies for RA? *Nat Rev Rheumatol* 7: 134-136, 2011.
- Weinblatt ME, Kavanaugh A, Genovese MC, Musser TK, Grossbard EB and Magilavy DB: An oral spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 363: 1303-1312, 2010.
- Koenders MI, Marijnissen RJ, Devesa I, *et al*: Tumor necrosis factor-interleukin-17 interplay induces S100A8, interleukin-1 $\beta$ , and matrix metalloproteinases, and drives irreversible cartilage destruction in murine arthritis: rationale for combination treatment during arthritis. *Arthritis Rheum* 63: 2329-2339, 2011.

# Serum level of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as a biomarker of disease activity in relapsing polychondritis

Tomoo Sato · Yoshihisa Yamano · Utano Tomaru · Yukiko Shimizu · Hitoshi Ando · Takahiro Okazaki · Hiroko Nagafuchi · Jun Shimizu · Shoichi Ozaki · Teruomi Miyazawa · Kazuo Yudoh · Hiroshi Oka · Noboru Suzuki

Received: 7 September 2012 / Accepted: 4 January 2013  
© Japan College of Rheumatology 2013

## Abstract

**Objectives** We aimed to identify a serum biomarker for evaluating the disease activity of relapsing polychondritis (RP).

**Methods** We measured and compared serum levels of 28 biomarkers potentially associated with this disease, including soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1), high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), and cartilage oligomeric matrix protein (COMP),

in 15 RP patients and 16 healthy donors (HDs). We divided the 15 RP patients into active RP ( $n = 8$ ) and inactive RP ( $n = 7$ ) groups, depending on the extent of the disease, and compared candidate markers between groups. The localization of membrane-bound TREM-1 in the affected tissue was examined by immunohistochemistry.

**Results** Serum levels of sTREM-1, interferon- $\gamma$ , chemokine (C-C motif) ligand 4, vascular endothelial growth factor, and matrix metalloproteinases-3 were significantly higher in RP patients than HDs. Among these markers, sTREM-1 had the highest sensitivity and specificity (86.7 and 86.7 %, respectively). Furthermore, the serum level of sTREM-1 was significantly higher in active RP patients than inactive RP patients ( $p = 0.0403$ ), but this was not true for hs-CRP or COMP. TREM-1 was expressed on endothelial cells in RP lesions.

**Conclusions** The serum level of sTREM-1 may be a useful marker of disease activity in RP.

T. Sato · Y. Yamano · Y. Shimizu · H. Ando · K. Yudoh  
Institute of Medical Science, St. Marianna University  
School of Medicine, 2-16-1 Sugao, Miyamae-ku,  
Kawasaki 216-8512, Japan

U. Tomaru  
Department of Pathology, Hokkaido University Graduate  
School of Medicine, North 15, West 7, Kita-ku,  
Sapporo 060-8638, Japan

T. Okazaki · H. Nagafuchi · S. Ozaki  
Division of Rheumatology and Allergy, Department of Internal  
Medicine, St. Marianna University School of Medicine,  
2-16-1 Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki 216-8512, Japan

J. Shimizu · N. Suzuki (&)  
Departments of Immunology and Medicine, St. Marianna  
University School of Medicine, 2-16-1 Sugao, Miyamae-ku,  
Kawasaki 216-8512, Japan  
e-mail: n3suzuki@marianna-u.ac.jp

T. Miyazawa  
Division of Respiratory and Infectious Diseases,  
Department of Internal Medicine, St. Marianna University  
School of Medicine, 2-16-1 Sugao, Miyamae-ku,  
Kawasaki 216-8512, Japan

H. Oka  
Rheumatic Disease Center, Tokyo Medical University Hachioji  
Medical Center, 1163 Tate-machi, Hachioji 193-0998, Japan

**Keywords** Relapsing polychondritis · Serum marker · Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1

## Introduction

Relapsing polychondritis (RP) is a rare inflammatory disorder of unknown etiology; it is characterized by recurrent, widespread chondritis of systemic cartilages, specifically those in the ear, eye, nose, large airways, and joints [1–3]. RP is occasionally life-threatening, as its progression leads to fatal dyspnea due to cartilage destruction in large airways. To detect such disease progression, the accurate assessment of disease activity is important. Today, this assessment is performed by analyzing a combination of clinical manifestations, laboratory findings, and imaging results.

However, it is still difficult to conduct proper evaluations. This is partly because there are no established biomarkers for evaluating the disease activity of RP, although several potential biomarkers—such as CRP, antibody to type II collagen, and cartilage oligomeric matrix protein (COMP)—have been reported previously [3–7]. For example, CRP is the most commonly used marker of inflammation, and its serum level is frequently used to assess RP disease activity [3, 4]. However, RP patients with normal CRP levels are often observed to experience advanced fibrosis of the airways, suggesting insidious chronic inflammation in those tissues, which is difficult to detect by CRP [8]. It has also been reported that antibodies to type II collagen reflect RP disease activity [6]. However, these antibodies were only detected in 30–50 % of RP patients [6, 9]. Furthermore, it has been reported that this measure lacks sensitivity and specificity [10]. Therefore, in the current study, we aimed to identify more sensitive biomarkers that would be able to detect those small differences that cannot be detected by antibodies to type II collagen or CRP.

To do so, this study excluded highly active RP patients. We measured 28 candidate markers that had been previously shown to be involved in RP, inflammation, or cartilage destruction. The levels of these markers were compared not only between RP patients and healthy donors (HDs) but also between active RP and inactive RP patients. Our results showed that the serum level of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1) is most suitable as a disease-activity marker in RP.

TREM-1 is a type I transmembrane receptor of the immunoglobulin superfamily. The soluble form of TREM-1 (sTREM-1) is thought to be released from TREM-1-expressing cells by proteolytic cleavage of membrane-bound TREM-1 [11]. The serum level of sTREM-1 has been found to be elevated in patients with sepsis and has therefore been considered as a marker of microbial infection [12].

## Materials and methods

### Patients and samples

Fifteen patients (8 women and 7 men) diagnosed with RP according to Damiani's criteria [13, 14] and 16 healthy donors (HD) serving as age-matched and sex-matched controls (Table 1) were recruited from St. Marianna University Hospital, Kanagawa, Japan. They were enrolled between November and December 2009. In this study, we used the patient information (disease condition, disease duration, medication, etc.) obtained at the time of enrollment (Table 1). None of the patients had any other inflammatory disorders, such as overt infections or collagen diseases. To detect small differences that cannot be detected by CRP, this study enrolled RP patients in the chronic phase—not the acute phase—and further excluded patients who had highly active RP, such as those with acute respiratory failure. From among them, we divided the 15 RP patients into two groups (active RP and inactive RP) according to the definition by Lekpa et al. [7]. Briefly,

Table 1 Demographics, clinical characteristics, and medication of subjects

	HD	RP		
	( <i>n</i> = 16)	Total ( <i>n</i> = 15)	Active ( <i>n</i> = 8)	Inactive ( <i>n</i> = 7)
Demographics				
Age (years) <sup>a</sup>	40.5 [27–67]	47 [10–81]	50.5 [10–74]	44 [27–81]
Female sex	50.0 %	53.3 %	50.5 %	57.1 %
Clinical characteristics				
Disease duration (years) <sup>a</sup>		5 [1–19]	12 [4–19]	4 [1–8]
Auricular chondritis		46.7 %	62.5 %	28.6 %
Nasal chondritis		40.0 %	62.5 %	14.3 %
Laryngotracheal chondritis		66.7 %	87.5 %	42.9 %
Ear symptoms		53.3 %	87.5 %	14.3 %
Arthritis		46.7 %	75.0 %	14.3 %
Ocular inflammation		33.3 %	50.0 %	14.3 %
Medication				
Prednisolone		86.7 %	87.5 %	85.7 %
Methotrexate		33.3 %	50.0 %	28.6 %
Azathioprine		20.0 %	25.0 %	14.3 %

HD healthy donor, RP relapsing polychondritis

<sup>a</sup> Data are expressed as median [range]

patients were defined as having active RP if they were affected with chondritis involving at least two of three sites (auricular, nasal, or laryngotracheal cartilage) at the time of blood collection or if they were affected in one of these sites and also had two other manifestations, which could include ocular inflammation, audiovestibular symptoms, or seronegative inflammatory arthritis. Fourteen patients with HTLV-1-associated myelopathy (HAM), 10 with progressive systemic sclerosis (PSS), 19 with systemic lupus erythematosus (SLE), and 20 with rheumatoid arthritis (RA) also participated in this study.

All blood and cartilage samples were obtained with written informed consent and full ethical approval. The study protocol was approved by the Ethics Committee of St. Marianna University School of Medicine.

#### Measurement of serum levels of marker candidates

High-sensitivity CRP (hs-CRP) was determined by nephelometry using N-latex CRP II (Siemens Healthcare Diagnostics, Tokyo, Japan). Serum concentrations of sTREM-1; matrix metalloproteinases (MMP)-1, MMP-2, MMP-3, MMP-13; cartilage oligomeric matrix protein (COMP); interleukin (IL)-17A; and anti-type II collagen antibody (a-COLII Ab) were measured using commercially available ELISA kits (sTREM-1, MMP-1, and MMP-2: R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; MMP-3: Daiichi Fine Chemical, Toyama, Japan; MMP-13: GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK; COMP: Abnova, Taipei, Taiwan; IL-17A: Gen-Probe, San Diego, CA, USA; a-COLII Ab: Chondrex, Redmond, WA, USA). Serum concentrations of

Table 2 Serum concentrations of biomarker candidates in healthy donors and patients with RP

Biomarker candidates <sup>a</sup>	Units	Methods of measurement	HD ( <i>n</i> = 16) Mean ± SD	RP ( <i>n</i> = 15) Mean ± SD	<i>p</i> *
sTREM-1	pg/ml	ELISA	92.48 ± 56.45	281.87 ± 150.42	0.0002
IFN-c	pg/ml	CBA	N.D. <sup>c</sup>	5.65 ± 6.25	0.0035
CCL4	pg/ml	CBA	64.38 ± 66.03	133.76 ± 68.13	0.0075
VEGF	pg/ml	CBA	131.03 ± 104.66	267.46 ± 187.03	0.0212
MMP-3	ng/ml	ELISA	35.96 ± 29.23	243.12 ± 313.50	0.0229
CXCL10	pg/ml	CBA	154.72 ± 91.72	229.50 ± 114.03	0.0552
CCL5	ng/ml	CBA	2.70 ± 1.43	37.66 ± 15.66	0.0582
hs-CRP	ng/ml	Nephelometry	0.04 ± 0.05	0.30 ± 0.50	0.0643
IL-17A	pg/ml	ELISA	1.17 ± 1.52	0.33 ± 0.79	0.0673
TNF	pg/ml	CBA	N.D. <sup>c</sup>	0.76 ± 2.01	0.1646
IL-4	pg/ml	CBA	N.D. <sup>c</sup>	0.80 ± 2.13	0.1671
IL-6	pg/ml	CBA	N.D. <sup>c</sup>	1.27 ± 3.38	0.1686
COMP	ng/ml	ELISA	14.38 ± 4.28	24.33 ± 26.72	0.1750
MMP-13	ng/ml	ELISA	0.31 ± 0.04	0.28 ± 0.09	0.2367
MMP-2	ng/ml	ELISA	125.01 ± 10.45	133.01 ± 28.45	0.3191
IL-1a	pg/ml	CBA	N.D. <sup>c</sup>	0.54 ± 2.09	0.3343
IL-1b	pg/ml	CBA	N.D. <sup>c</sup>	0.58 ± 2.24	0.3343
IL-10	pg/ml	CBA	N.D. <sup>c</sup>	0.69 ± 2.69	0.3343
IL-12p70	pg/ml	CBA	N.D. <sup>c</sup>	0.35 ± 1.36	0.3343
CX3CL1	pg/ml	CBA	N.D. <sup>c</sup>	6.55 ± 25.38	0.3343
CXCL8	pg/ml	CBA	12.93 ± 11.52	16.24 ± 7.05	0.3413
MMP-1	ng/ml	ELISA	5.19 ± 3.15	4.30 ± 3.67	0.5129
CCL2	pg/ml	CBA	67.08 ± 43.78	72.29 ± 59.36	0.7842
aCOLII Ab <sup>b</sup>	U/ml	ELISA	51.75 ± 37.95	263.93 ± 577.87	0.2109

HD healthy donor, RP relapsing polychondritis, sTREM-1 soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1, ELISA enzyme-linked immunosorbent assay, IFN interferon, CBA cytometric bead array, ND not detected, CCL chemokine (C-C motif) ligand, VEGF vascular endothelial growth factor MMP matrix metalloproteinase, CXCL chemokine (C-X-C motif) ligand, hs-CRP high-sensitivity C-reactive protein, IL interleukin, TNF tumor necrosis factor, COMP cartilage oligomeric matrix protein, CX3CL chemokine (C-X3-C motif) ligand, aCOLII Ab anti-type II collagen antibody

\* By Welch's *t* test. *p* values of less than 0.05 are indicated in boldface

<sup>a</sup> The serum levels of IL-2, IL-5, GM-CSF, and CCL3 were below the detection limits in all cases

<sup>b</sup> The sample size of this item is different from that of the others due to the lack of some serum samples (HD: *n* = 13, RP: *n* = 13)

<sup>c</sup> For the statistical analyses, values of zero were substituted for the "N.D. (not detected)" entries

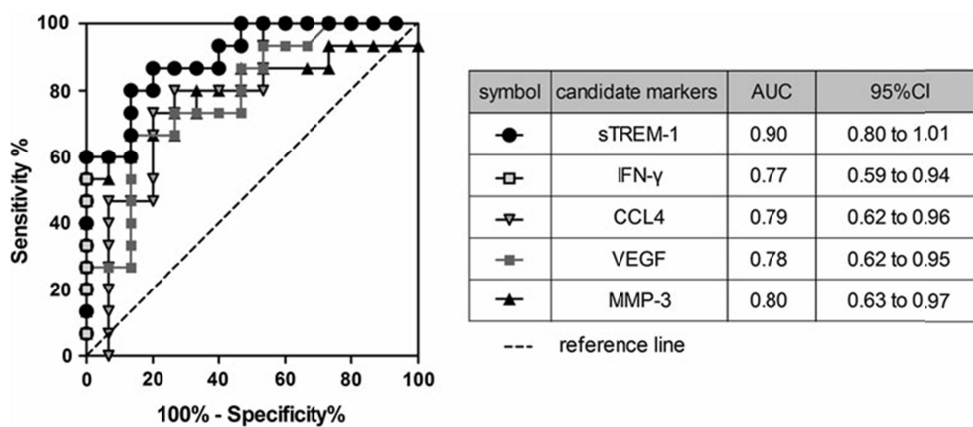


Fig. 1 Receiver operating characteristic (ROC) analysis of marker candidates of relapsing polychondritis (RP). We compared the sensitivity and specificity of soluble triggering receptors expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1), interferon (IFN)- $\gamma$ , chemokine (C-C motif) ligand 4 (CCL4), vascular endothelial growth factor (VEGF),

and matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) for discriminating RP patients from healthy donors (HDs) using ROC analysis. Closer proximity of the ROC curve to the upper left corner indicates higher sensitivity and specificity of the marker

IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70; interferon (IFN)- $\gamma$ ; tumor necrosis factor (TNF); chemokine (C-C motif) ligand (CCL) 2, CCL3, CCL4, CCL5; chemokine (C-X-C motif) ligand 8 (CXCL8), CXCL10; chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 (CX3CL1); granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF); and vascular endothelial growth factor (VEGF) were measured using a cytometric bead array (CBA; BD Biosciences, San Jose, CA, USA). All assays were conducted according to the respective manufacturers' instructions.

### Immunohistochemistry

Biopsy specimens from three patients with RP chondritis were subjected to immunohistochemical analysis. Formalin-fixed tissue sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in graded alcohols and distilled water. Slides were processed for antigen retrieval by a standard microwave-heating technique and incubated with anti-TREM-1 antibody (Sigma), followed by detection with streptavidin-biotin-horseradish peroxidase (Dako Cytomation Japan, Tokyo, Japan). All sections were visualized using 3,3'-diaminobenzidine (DAB).

### Statistical analysis

GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) was used to plot graphs and perform statistical analyses. Mean serum concentrations of biomarker candidates were compared between RP patients and HDs using Welch's *t* test (Table 2). Receiver operating characteristic (ROC) analysis was used to examine the sensitivity and specificity of the selected markers (Fig. 1). Serum

concentrations of biomarker candidates in patients with active RP and patients with inactive RP were analyzed by Welch's *t* test (Table 3). To compare serum sTREM-1 levels between healthy donors and patients with some inflammatory diseases (Fig. 3), we employed the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test. In all analyses, statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## Results

### Serum biomarker candidates in RP patients

First, we measured the serum levels of 12 cytokines, 7 chemokines, 4 MMPs, VEGF, hs-CRP, sTREM-1, COMP, and anti-type II collagen antibody in RP patients and age- and sex-matched HDs (Table 1), and compared the results from these two groups (Table 2). Serum samples from RP patients showed significantly higher concentrations of five molecules (sTREM-1, IFN- $\gamma$ , CCL4, VEGF, and MMP-3) than the samples from HDs (Table 2). The serum levels of several other molecules (including hs-CRP, COMP, and anti-type II collagen antibody) tended to be higher in RP patients than in HDs, though the differences were not statistically significant.

Then, using ROC analysis, we compared the performances of the above five molecules in distinguishing RP patients from HDs. As shown in Fig. 1, the ROC analysis demonstrated that sTREM-1 had the highest sensitivity and specificity of the five molecules (area under the ROC curve [AUC] = 0.90; 95 % confidence interval [CI] 0.80–1.01;  $p = 0.0002$ ). A sTREM-1 cut-off value of 158 pg/ml had a sensitivity of 86.7 % with a specificity of 86.7 %.



Table 3 Serum concentrations of biomarker candidates in patients with active RP and patients with inactive RP

Biomarker candidates <sup>a</sup>	Units	Active RP ( <i>n</i> = 8) Mean ± SD	Inactive RP ( <i>n</i> = 7) Mean ± SD	<i>p</i> <sup>*</sup>
sTREM-1	pg/ml	353.39 ± 158.03	200.14 ± 95.11	0.0403
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. <sup>c</sup>	0.1708
IL-6	pg/ml	2.38 ± 4.45	N.D. <sup>c</sup>	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-1a	pg/ml	1.01 ± 2.86	N.D. <sup>c</sup>	0.3506
IL-1b	pg/ml	1.09 ± 3.07	N.D. <sup>c</sup>	0.3506
IL-10	pg/ml	1.30 ± 3.68	N.D. <sup>c</sup>	0.3506
IL-12p70	pg/ml	0.66 ± 1.87	N.D. <sup>c</sup>	0.3506
CX3CL1	pg/ml	12.29 ± 34.75	N.D. <sup>c</sup>	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	124.71 ± 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
aCOLII 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, *aCOLII Ab* anti-type II collagen antibody

\* By Welch's *t* test. *p* values of less than 0.05 are indicated by boldface

<sup>a</sup> The serum levels of IL-2, IL-5, GM-CSF, and CCL3 were below the detection limits in all cases

<sup>b</sup> The sample size of this item is different from that of the others due to the lack of some serum samples (active RP: *n* = 6, inactive RP: *n* = 7)

<sup>c</sup> For the statistical analyses, values of zero were substituted for the "N.D. (not detected)" entries

#### Identification of serum markers of disease activity in RP

Next, to identify a serum marker that correlates with RP disease activity, we divided the 15 RP patients into two groups based on the extent of inflammation (see "Methods" for details) (Table 1): active RP (*n* = 8) and inactive RP (*n* = 7). We then compared serum levels of all tested molecules in the two RP groups. The results showed that only serum sTREM-1 level was significantly higher in active RP patients than in the inactive RP patients (*p* = 0.0403) (Table 3). Moreover, to investigate the association of serum sTREM-1 level with disease activity in RP, we examined the clinical course of one patient with active RP. As shown in Fig. 2, treatment with methotrexate

(MTX) provided symptomatic improvement in this case; simultaneously, the patient's abnormally high sTREM-1 level was reduced to almost the same level as healthy donor (720.5 pg/ml in Nov 2009 ? 106.6 pg/ml in June 2011). Importantly, before the MTX treatment, the patient's CRP level was almost normal, even when the sTREM-1 level was abnormally high (CRP 0.41 mg/dl, sTREM-1 720.5 pg/ml).

Serum levels of sTREM-1 in patients with other immunological disorders

To investigate the disease specificity of sTREM-1, we measured the serum levels of this molecule in patients with other immunological disorders, including HTLV-1-associated

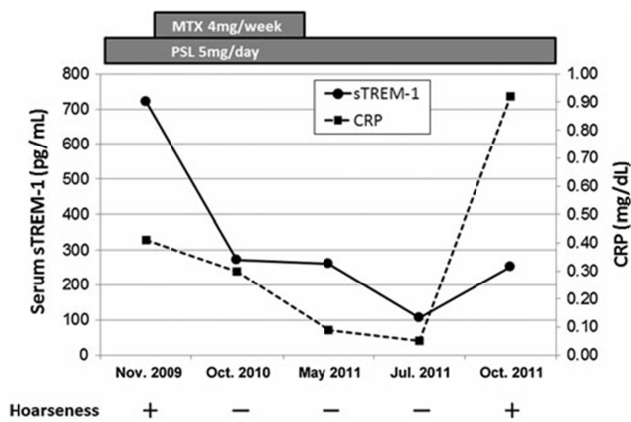


Fig. 2 Clinical course of a patient who was classified as having active RP at the time of enrollment, in 2009. The line chart shows the time courses of the serum sTREM-1 level (closed circles, solid line) and the CRP level (closed squares, dashed line) in an RP patient treated with prednisolone (PSL) and methotrexate (MTX). A plus sign (?) indicates the presence of hoarseness as a respiratory tract symptom, while a minus sign (-) indicates the absence of that symptom

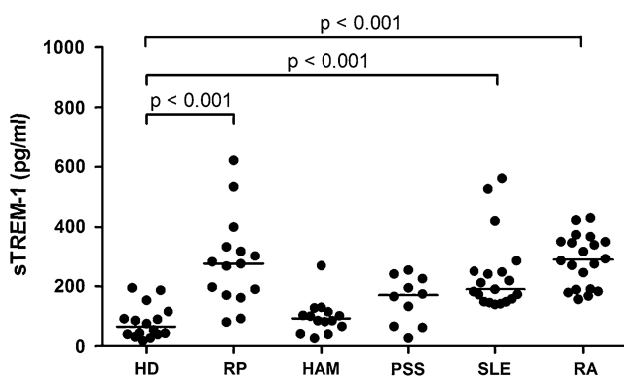


Fig. 3 Comparison of serum sTREM-1 levels between HDs and patients with other immunological disorders, including RP. Individual values are plotted, and the bars represent medians of the values. Statistical analysis was performed using the Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post hoc tests. HAM HTLV-1-associated myelopathy, PSS progressive systemic sclerosis, SLE systemic lupus erythematosus, and RA rheumatoid arthritis

myelopathy (HAM), progressive systemic sclerosis (PSS), systemic lupus erythematosus (SLE), and rheumatoid arthritis (RA). Serum sTREM-1 levels were higher by a statistically significant amount in patients with RP and in patients with SLE or RA when compared to the levels in HDs (Fig. 3). This result indicates that elevation of the serum sTREM-1 level is not specific to RP.

TREM-1 expression in chondritis-affected areas of RP patients

Finally, we examined the expression of membrane-bound TREM-1 in chondritis-affected areas of RP patients.

Immunohistochemistry demonstrated that TREM-1 was expressed on vascular endothelial cells in perichondral granulation foci but not on chondrocytes (Fig. 4). No positive cells were observed in a control sample (nonspecific inflammatory granulation tissue derived from a ruptured epidermal cyst) (Fig. 4).

## Discussion

In this study, we identified serum sTREM-1 level as a novel biomarker for RP. We produced several results indicating the strength of this candidate marker: first, our results indicated that serum sTREM-1 level could discriminate RP patients from HDs more successfully than could other candidate biomarkers (Table 2; Fig. 1). Second, serum sTREM-1 level gave better discrimination between active RP patients and inactive RP patients than 27 other tested molecules, including hs-CRP, COMP, and anti-type II collagen antibody (Table 3). Third, the time course of serum sTREM-1 level was associated with the clinical course in an RP patient who was treated with prednisolone and MTX (Fig. 2). However, sTREM-1 showed some limitations in disease specificity, as its serum level was also elevated in patients with SLE or RA (Fig. 3). These results suggest that serum sTREM-1 level is suitable for use as a disease-activity marker for RP, but not as a diagnostic marker for the disease.

TREM-1, as the name suggests, has been shown to express on myeloid cells such as neutrophils and monocytes/macrophages [15]. Recently, it has been reported that TREM-1 is also expressed on endothelial cells (a type of non-myeloid cell) in liver tissue from lipopolysaccharide-treated mice [16]. In this study, our immunohistochemical analyses demonstrated that TREM-1 is expressed on human endothelial cells in chondritis-affected areas of RP patients (Fig. 4). The increase in sTREM-1 in the blood of RP patients might be due to its presence on the surfaces of endothelial cells in those inflammatory lesion sites. This hypothesis is supported by the finding that there was no difference in the expression level of TREM-1 on peripheral blood mononuclear cells between healthy donors and RP patients (data not shown). However, further investigations are needed to clarify the source of the increased sTREM-1.

It was previously reported that the expression of TREM-1 is induced by bacterial infection and that levels of circulating sTREM-1 are important as a diagnostic and prognostic marker of sepsis [17–19]. More recently, however, it has been reported that the serum sTREM-1 level is elevated in non-infectious chronic inflammatory diseases such as RA and inflammatory bowel diseases [20, 21]. Therefore, our finding that serum samples from patients with chronic inflammatory diseases (including RP, RA, and

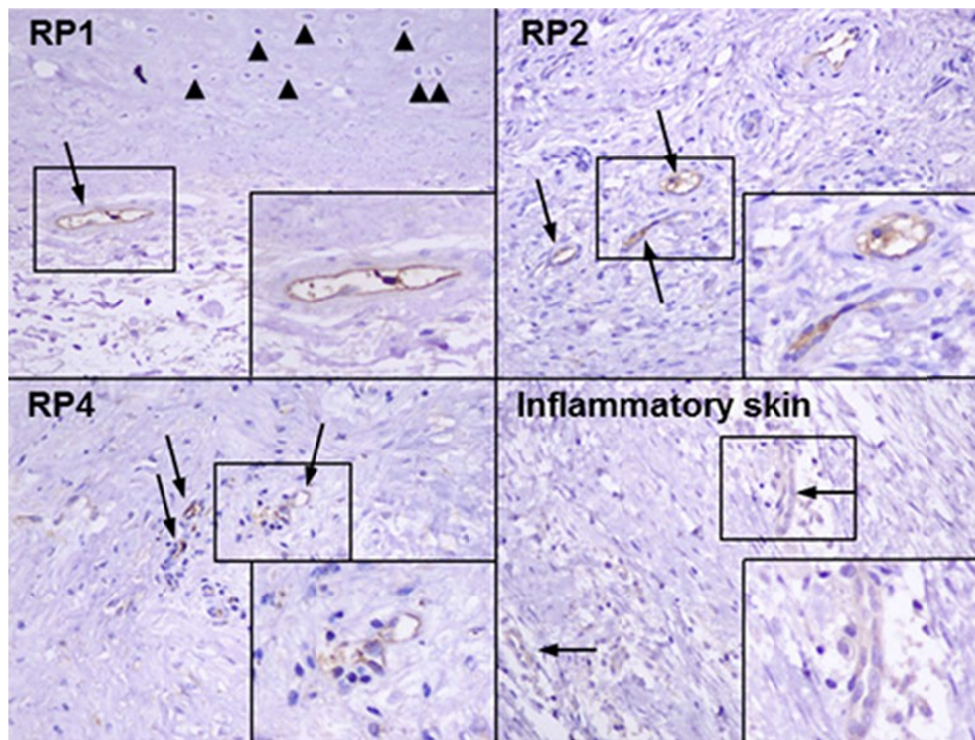


Fig. 4 Immunohistological staining showing the expression of TREM-1 in chondritis-affected areas. Inflammatory granulation tissue from a patient with a ruptured epidermal cyst was used as a negative control (*lower right panel*: inflammatory skin). TREM-1-positive

cells were stained brown using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and are displayed at a higher magnification in the *lower right inset*. Arrows and arrowheads indicate vascular endothelial cells and chondrocytes, respectively

SLE) had significantly higher concentrations of sTREM-1 is consistent with previous reports. On the other hand, serum level of sTREM-1 in patients with HAM—a chronic inflammatory neurologic disease caused by human T cell leukemia virus-1—was not significantly higher than the level in HDs. This indicates that the serum level of sTREM-1 differs among patients with different chronic inflammatory diseases. Anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis (AAV) is a chronic inflammatory disease. Patients with AAV show elevated levels of serum sTREM-1 [22]. Intriguingly, as in RP, sTREM-1 levels in active AAV have been shown to be significantly higher than those for inactive AAV [22]. Thus, elevated levels of serum sTREM-1 have been observed in several chronic inflammatory diseases.

Such disorders with elevated sTREM-1 levels often overlap in the same patient. For example, 14 % of patients with RP have clinically evident vasculitis [23] and 35.5 % of patients have other collagen diseases, such as RA or SLE [24]. These examples imply the existence of common mechanisms in the pathogenesis of these disorders. In this regard, because TREM-1 works as an amplifier of inflammatory responses through the production of multiple pro-inflammatory cytokines and chemokines, TREM-1 may

play an important role in the common pathomechanisms of these disorders [15, 21, 25, 26]. A previous study provided in vivo evidence that the blockade of TREM-1 can ameliorate collagen-induced arthritis in mice [27].

One of the molecules that has been reported as a disease-activity marker for RP is COMP [7]. This is a non-collagenous protein found in the matrix of cartilage. Lekpa et al. reported that serum COMP levels during the active phase were significantly higher than those seen during the inactive phase in the same patients. However, our results showed no significant differences in the serum levels of this molecule in active RP patients compared to inactive RP patients (Table 3). This discrepancy could be attributed to the different study designs employed, including differing disease conditions of the RP patients, sample sizes, and measurement methods.

To further characterize this molecule, we checked for correlations between serum levels of COMP and the other tested molecules. Interestingly, serum COMP levels in RP patients had a strong positive correlation only with serum MMP-3 levels ( $r_s = 0.7357$ ,  $p = 0.0018$ , by Spearman rank correlation test, data not shown). This suggests that serum levels of MMP-3 and COMP might reflect the degree of cartilage destruction in RP patients, since serum

MMP-3 level is considered a predictor of the degree of cartilage destruction in patients with early RA [28].

In conclusion, this study suggests that serum sTREM-1 level can serve as a more sensitive marker for disease activity in RP patients than other candidate molecules, such as CRP, COMP, and anti-type II collagen antibody.

**Acknowledgments** We would like to thank Katsunori Takahashi, Yasuo Kunitomo, Yuji Sato, Mikako Koike, and Yumiko Hasegawa for their excellent technical help. This study was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

**Conflict of interest** None.

## References

- Jaksch-Wartenhorst R. Polychondropathia. *Wien Arch Inn Med.* 1923;6:100.
- Pearson CM, Kline HM, Newcomer VD. Relapsing polychondritis. *N Engl J Med.* 1960;263:51–8.
- Lahmer T, Treiber M, von Werder A, Foerger F, Knopf A, Heemann U, et al. Relapsing polychondritis: an autoimmune disease with many faces. *Autoimmun Rev.* 2010;9:540–6.
- Kemta Lekpa F, Kraus VB, Chevalier X. Biologics in relapsing polychondritis: a literature review. *Semin Arthritis Rheum.* 2012;41:712–9.
- Rapini RP, Warner NB. Relapsing polychondritis. *Clin Dermatol.* 2006;24:482–5.
- Foidart JM, Abe S, Martin GR, Zizic TM, Barnett EV, Lawley TJ, et al. Antibodies to type II collagen in relapsing polychondritis. *N Engl J Med.* 1978;299:1203–7.
- Kemta Lekpa F, Piette JC, Bastuji-Garin S, Kraus VB, Stabler TV, Poole AR, et al. Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) level is a marker of disease activity in relapsing polychondritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2010;28:553–5.
- Michet CJ. Diagnostic evaluation of relapsing polychondritis. <http://www.uptodate.com/contents/diagnostic-evaluation-of-relapsing-polychondritis>.
- Terato K, Shimozuru Y, Katayama K, Takemitsu Y, Yamashita I, Miyatsu M, et al. Specificity of antibodies to type II collagen in rheumatoid arthritis. *Arthr Rheum.* 1990;33:1493–500.
- Kent PD, Michet CJ Jr, Luthra HS. Relapsing polychondritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2004;16:56–61.
- Gomez-Pina V, Soares-Schanoski A, Rodriguez-Rojas A, Del Fresno C, Garcia F, Vallejo-Cremades MT, et al. Metalloproteinases shed TREM-1 ectodomain from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *J Immunol.* 2007;179:4065–73.
- Gibot S, Cravoisy A. Soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as a marker of microbial infection. *Clin Med Res.* 2004;2:181–7.
- McAdam LP, O'Hanlan MA, Bluestone R, Pearson CM. Relapsing polychondritis: prospective study of 23 patients and a review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 1976;55:193–215.
- Damiani JM, Levine HL. Relapsing polychondritis—report of ten cases. *Laryngoscope.* 1979;89:929–46.
- Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol.* 2000;164:4991–5.
- Chen LC, Laskin JD, Gordon MK, Laskin DL. Regulation of TREM expression in hepatic macrophages and endothelial cells during acute endotoxemia. *Exp Mol Pathol.* 2008;84:145–55.
- Gibot S, Kolopp-Sarda MN, Bene MC, Cravoisy A, Levy B, Faure GC, et al. Plasma level of a triggering receptor expressed on myeloid cells-1: its diagnostic accuracy in patients with suspected sepsis. *Ann Intern Med.* 2004;141:9–15.
- Gibot S, Cravoisy A, Kolopp-Sarda MN, Bene MC, Faure G, Bollaert PE, et al. Time-course of sTREM (soluble triggering receptor expressed on myeloid cells)-1, procalcitonin, and C-reactive protein plasma concentrations during sepsis. *Crit Care Med.* 2005;33:792–6.
- Routsi C, Giamarellos-Bourboulis EJ, Antonopoulou A, Kollias S, Siasiakou S, Koronaos A, et al. Does soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 play any role in the pathogenesis of septic shock? *Clin Exp Immunol.* 2005;142:62–7.
- Tzivras M, Koussoulas V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Tzivras D, Tsaganos T, Koutoukas P, et al. Role of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2006;12:3416–9.
- Kuai J, Gregory B, Hill A, Pittman DD, Feldman JL, Brown T, et al. TREM-1 expression is increased in the synovium of rheumatoid arthritis patients and induces the expression of pro-inflammatory cytokines. *Rheumatology (Oxford).* 2009;48:1352–8.
- Daikeler T, Regenass S, Tyndall A, Gencay MM, Roth M, Christ-Crain M, et al. Increased serum levels of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis.* 2008;67:723–4.
- Michet CJ. Vasculitis and relapsing polychondritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 1990;16:441–4.
- Zeuner M, Straub RH, Rauh G, Albert ED, Scholmerich J, Lang B. Relapsing polychondritis: clinical and immunogenetic analysis of 62 patients. *J Rheumatol.* 1997;24:96–101.
- Bleharski JR, Kiessler V, Buonsanti C, Sieling PA, Stenger S, Colonna M, et al. A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. *J Immunol.* 2003;170:3812–8.
- Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature.* 2001;410:1103–7.
- Murakami Y, Akahoshi T, Aoki N, Toyomoto M, Miyasaka N, Kohsaka H. Intervention of an inflammation amplifier, triggering receptor expressed on myeloid cells 1, for treatment of autoimmune arthritis. *Arthr Rheum.* 2009;60:1615–23.
- Yamanaka H, Matsuda Y, Tanaka M, Sendo W, Nakajima H, Taniguchi A, et al. Serum matrix metalloproteinase 3 as a predictor of the degree of joint destruction during the six months after measurement, in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthr Rheum.* 2000;43:852–8.

Title page

Field: Inflammation

Types of manuscript: Full papers

Title: A large-scale survey of patients with relapsing polychondritis in Japan

by

Hiroshi Oka, Yoshihisa Yamano, Jun Shimizu, Kazuo Yudoh, Noboru Suzuki.

Institute of Medical Science and Departments of Immunology and Medicine

St. Marianna University School of Medicine

Kawasaki 216-8512, Japan

Address correspondence; Noboru Suzuki, MD, PhD, Institute of Medical Science, St.

Marianna University School of Medicine, 2-16-1, Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki

216-8512 Japan

Tel; 81-44-977-8111 (ext, 3547)

Fax; 81-44-975-3315

E-mail; n3suzuki@marianna-u.ac.jp

Short running title: Airway involvement in relapsing polychondritis (42)

## **Abstract (247 words)**

Relapsing polychondritis (RP) is a multisystem disorder characterized by recurrent inflammation and destruction of cartilage. The aim of this study is to assess the clinical characteristics of patients with RP in Japan, which remain unclear.

A survey was sent to 395 experienced clinicians who worked in Japanese major institutions. The questionnaire was designed to assess patients' profiles, clinical features, diagnosis, treatments and present complications. The response rate was 30.6% and 239 RP patient data were collected.

The average age of onset diagnosis was 52.7 years (range, 3-97) and the male-to-female ratio was 1.1:1. Clinical features of patients with RP in Japan were similar to previous studies. Airway and cardiac involvement, both of which were potentially serious complications of RP, were observed in 119 (49.8%) and 17 patients (7.1 %), respectively. Four patients (1.7%) had myelodysplasia. In addition to oral prednisolone (91.6%), patients received methotrexate (19.7%), cyclophosphamide (12.6%) and cyclosporine (8.4%) with clinical response rates of 64.0%, 66.7% and 73.7%, respectively.

42 patients (17.6%) required and underwent tracheotomy, including 12 patients (5.0%) who were treated with prednisolone only. 22 patients (9.2%) underwent stent placement and/or tracheotomy. The overall mortality rate was 9.0% (22 patients) and respiratory failure and pulmonary infection were the leading causes of death in patients with RP.

Airway involvement of RP was fundamentally progressive and required frequent clinical checks and appropriate intervention with administration of both prednisolone and immunosuppressant. Cardiac involvement of RP was less common in

Japan as compared with that in Western countries.

**Key words:** Airway involvement, Cartilage, Tracheal collapse, Steroid, Immunosuppressants.

## **Introduction**

Relapsing polychondritis (RP) is an uncommon inflammatory disorder of unknown etiology that affects the cartilage of ear, nose, peripheral joints, and respiratory tract<sup>1-4</sup>. Other proteoglycan-rich tissues such as eye, inner ear, heart, blood vessels, and kidneys are also involved<sup>1-4</sup>. When the visceral is affected by inflammation, RP is a potentially lethal disease.

The epidemiological studies of this disease have been conducted in Caucasian population<sup>4</sup>. The incidence of RP in Rochester, Minnesota is estimated to be 3.5 cases per million populations per year<sup>5</sup>. It seems to occur with equal frequency in all racial groups, but there are very few data available on non-Caucasian populations. Several case series with a decade of RP patient data have been reported from South/North India<sup>6, 7</sup> and Singapore<sup>8</sup>.

In 2012, RP Disease Activity Index (RPDAI), a preliminary score for assessing disease activity, was developed by worldwide specialists<sup>9</sup>. Nonetheless, even now, physicians treat patients with RP on the basis of largely empirical evidence because of the lack of large-scale survey and clinical guidelines for the management of patients.

Here, we conducted a survey of 239 patients with RP to outline the current epidemiology, clinical manifestations, management and long-term outcome of RP in Japan.

## **Subjects and Methods**

A Multi-institutional study survey of Japanese major medical facilities was conducted from July to December 2009. All subjects who were sent the questionnaire were informed of the purpose of the study and the responses would be kept confidential. All the authors reviewed the questionnaire.



We performed preliminary survey of clinical experience to treat patients with RP in 1894 Japanese medical facilities on July 1<sup>st</sup>, 2009, using a surveillance definition as follows: larger bed sizes (+200 or university hospitals) and adequate functions for RP treatments (providing services with eye-throat-nose, respiratory, chest surgery, dermatology, neurology and rheumatology divisions). We also reviewed recent Japanese clinical reports and research articles of RP using web accessible medical literature databases made by US National Library of Medicine, Japan Medical Abstracts Society and Japan University hospital Medical Information Network, and sent the initial survey questionnaire to the authors. Then, a main survey was sent to the 395 physicians who have returned a mail to us that the physicians have been treating or treated at least one patient with RP on August 14<sup>th</sup>, 2009. The patient data of the survey questionnaire were collected anonymously. This survey was approved by the ethics committee of St. Marianna University School of Medicine.

The questionnaire consisted of 5 sections to assess patients' (a) profiles, (b) clinical features, (c) diagnosis, (d) treatments and (e) present complications. It was summarized in Table 1. We asked the physicians to give us the most current laboratory findings with respiratory function except the titers of anti-type II collagen antibody and pathological findings.

## **Results**

The survey response rate was 30.6% (121 of 395 surveyed physicians) and 239 RP patient data were collected.

### **Patients' profiles**

Patient characteristics in McAdam series<sup>10)</sup> and current survey were summarized in Table 2. The male-to-female ratio was 1.13:1 (127 males and 112 females). Uni-modal

age distribution of disease onset is indicated in Fig. 1. The average age at onset was 52.7 years with a range from 3 to 97 and the average disease duration was 5.3 years with a range from 1 to 33. The ratios of patients whose disease duration was shorter than 2 and 5 years were 25 and 65 % of whole patients, respectively. We suggested that the time to diagnosis was not so long because a large part of patients had relatively short duration of disease. Older people (more than 51 years old) tend to develop RP rather than younger people (0-20 years old).

### **Clinical features**

Initial lesions and symptoms in patients with RP varied considerably. Auricular chondritis was shown in 137 patients (57.3%) and is the earliest and most frequent manifestation. 41 patients (17.2%) developed respiratory symptoms as an initial manifestation which included hoarseness, persistent cough, dyspnea, wheezing and inspiratory stridor caused by the inflammation of laryngeal, tracheal and bronchial cartilages.

Ocular symptoms (22 patients, 9.2%), arthritis (15 patients, 6.2%), inner ear disorder (9 patients, 3.8%), neurological symptoms (7 patients, 2.9%) and nasal chondritis (5 patients, 2.1%) were recognized in relatively small numbers of patients at the onset of disease.

The prevalence and severity of the disease symptoms increased during follow-up (Table 2).

Ninety-seven patients (40.6%), 47 patients (19.7%) and 119 patients (49.8%) showed tracheal lesion, laryngeal lesion and laryngotracheal involvement, respectively. Forty-nine patients (20.5%) suffered from upper airway collapse and 42 patients (17.6%) required tracheotomy. 22 patients (9.2%) underwent stent placement and 12

patients (5.0%) received nasal continuous positive airway pressure because of their tracheobronchomalacia.

Auricular and nasal chondritis were seen in 187 patients (78.2%) and 94 patients (39.3%), respectively. Saddle nose deformity after the nasal chondritis was observed in 76 patients (31.8%).

Otitis media complications with vestibular dysfunction were observed in 64 patients (26.8%). Prolonged inflammation in inner ear and vasculitis of internal auditory artery<sup>2)</sup> caused hearing loss (52 patients, 21.8%) and the vestibular dysfunction (39 patients, 16.3%) such as dizziness, ataxia, nausea and vomiting.

Joint, skin and eye involvement were observed in 92 (38.5%), 32 (13.4%), and 109 (45.6%) patients, respectively. The arthritis was mainly asymmetric, migratory and non-erosive.

Dermatologic manifestations included the purpura, papules, macules, vesicles, bullae, chronic dermatitis and nodules. Ocular symptoms included recurrent episcleritis, conjunctivitis, keratitis, uveitis, proptosis, periorbital edema, tarsitis and extra-ocular muscle palsy.

Neurologic and renal involvements were observed in 23 patients (9.6%) and 16 patients (6.7%), respectively. Cardiovascular involvement, including aortic insufficiency, myocarditis, pericarditis, paroxysmal atrial tachycardia, heart block and vasculitis, was observed in 17 patients (7.1%).

### **Laboratory findings**

Most of patients with RP showed the elevation of erythrocyte sedimentation rate (ESR, 68.2%) and C-reactive protein (CRP, 86.2%). Urinalysis was usually normal. Although the data were not routinely available, matrix metalloprotease (MMP)-3 and antibody to

type II collagen were found in 20.1% and 13.8% of patients, respectively.

Conventional radiograph showed changes in larynx, trachea, surrounding soft tissues and bronchi. In two cases, respiratory tract involvement was assessed by laryngoscopy. Endobronchial ultrasonography revealed fragmentation and edema of tracheobronchial cartilage in two patients<sup>11)</sup>. 3 dimensional-CT scan was performed in 61 patients (25.5%) and conventional CT was conducted in 30 patients (12.6%).

Biopsies were performed in 228 patients (95.4%) and 138 patients (60.5% of patients who underwent biopsy) were diagnosed with histological confirmation of RP.

### **Treatments**

Main treatment for RP patients even with airway involvement remains medical management. In the medication history profile, non-steroidal anti-inflammatory drugs were administered alone for 8 patients (3.3%) who had mild auricular or nasal chondritis. 219 patients (91.6%) had received at least one course of prednisolone through oral administration (204 patients, 85.4% of all patients), intravenous infusion (17 patients, 7.1%) and pulse therapy (40 patients, 16.7%). Low daily dose of prednisolone was administered in the majority of patients. Minocycline hydrochloride was used in 8 patients with RP but its effect remained unclear.

Immunosuppressants which were used against the chronic progression of RP included methotrexate (MTX, n=47), cyclophosphamide (CPA, n=30), cyclosporin A (CYA, n=20) and azathioprine (AZP, n=22). MTX, CPA, and CYA elicited considerable effects on clinical outcomes in 64.0%, 66.7%, and 73.7% of patients, respectively. MTX was added as an adjuvant treatment in refractory RP patients who required higher maintenance doses of prednisolone to reduce the overall steroid requirement. 3 patients were maintained with MTX alone. AZP was less effective than other agents and the rate

was estimated as fewer than 40%. Tacrolims was used in 3 patients and ameliorated manifestations in one patient.

Of those 47 patients with the combined therapy of steroid with MTX, 20 patients (42.6%) had some respiratory symptoms and did not require any surgical intervention (Fig. 2). In contrast, all 12 patients (5.0% of all patients) treated with prednisolone alone underwent tracheotomy. CPA, CYA and AZP treatment in conjunction with steroid administration also reduced the prevalence of airway involvement in patients with RP (54.5%, 50.0% and 57.0%, respectively, Fig. 2).

Discovery of the central role of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interleukin (IL)-6 in autoimmune/inflammatory diseases and subsequent development of anti-cytokine agents have quickly led to the clinical application of them in treatment of refractory RP.

In our survey, infliximab, an anti-TNF- $\alpha$  agent, treatment resulted in a response in 6 cases of 10 RP patients with airway involvement that had not responded to conventional immunosuppressants. Etanercept (anti-TNF- $\alpha$ ) and tocilizumab (anti-IL-6) treatment also showed a sustained response in 1 case of 3 patients with refractory RP.

### **Prognosis**

We summarized the prognostic outcome of patients of RP in our cohort in Fig. 3. Medication was discontinued without any manifestation in 11 patients (4.6%). All these patients exhibited auricular chondritis without respiratory involvement and 2 of the patients had scleritis.

One hundred and fifty-nine patients (66.5%) were well controlled and, in total, 71.1% of patients in our cohort responded to the treatments. 32 patients (13.4%) showed limited response and 9 patients (3.8%) suffered from progressive disease or relapse. 22

patients (9.0%) died and the causes of death were as follows; respiratory failure (8 patients), pulmonary infection (4), cardiovascular disease (2), cerebrovascular disease (2), suicide (1), myelodysplasia (1), leukemia (1) and unknown reason (2).

## **Discussion**

We conducted a large-scale survey of patients with RP in Japan. Surveyed physicians dispersed widely on geographic location and a large part of survey responses were limited in patient number even in the main surveys. Considering the survey response rate and the number of collected patient data, the RP prevalence in Japan was estimated to be similar to that in the United States<sup>5</sup>.

The disease severity and prognosis of RP largely depends on airway and cardiovascular involvement<sup>10</sup>. It has been reported that airway involvement were seen in approximately half of all RP patients during follow-up, while the manifestation were observed in only 20% of the patients at the onset of disease<sup>12, 13</sup>. 10-30% of patients with airway involvement were treated with tracheotomy and the leading cause of death was airway collapse and/or pulmonary infection<sup>12-14</sup>. These study results were similar to those in our study (Table 2, Fig. 3). Several studies reported a female predominance in RP patients with airway involvement (male-female ratio, 1:2.3-2.8)<sup>12, 13</sup> but the ratio in our study was approximately 1:1.

It was suggested that the detection of tracheal wall thickness in CT scan was remarkably effective to the diagnosis of airway involvement in patients with RP and dynamic expiratory CT scan was more useful to indicate the lesions than conventional CT scan<sup>12, 15-18</sup>. Despite of the advances in CT scanning techniques, bronchoscopy is essential for the diagnosis because it identify additional findings in approximately 25% of RP patients who received the CT scan<sup>12</sup>. Miyazawa et al. described the

endobronchial ultrasonography was useful to indicate fragmentation and edema of cartilage in patients with RP<sup>11</sup>).

It has been reported that cardiac involvement were seen in 15-46% RP patients and the second cause of RP death<sup>10, 19</sup>). The male-to-female ratio was high (1:0.4) in RP patients with cardiac complications<sup>20</sup>). A retrospective chart review of 33 RP patients with cardiac surgery recommended that ultrafast chest computed tomography, magnetic resonance imaging or trans-esophageal echocardiography should be repeated every 6 months because subclinical development of cardiovascular involvement was occasionally observed in RP patients<sup>20</sup>).

Certainly, several reports have described the latent phase of cardiovascular complications for a few years after the onset of RP in relatively young patients<sup>21-24</sup>). Several RP patients developed febrile vasculitis after RP onset with or without anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)<sup>25-30</sup>). The activity of the vasculitis correlated well with severity of scleritis in patients with RP<sup>2, 31, 32</sup>).

In our study, we found that cardiovascular involvement was less frequent in Japan (7.1 %) as compared with other reports<sup>10, 19</sup>). The reason for the low prevalence of cardiovascular disease remains unclear. Low prevalence of cardiac complications was reported in Japanese patients with rheumatoid arthritis as well<sup>33</sup>). We speculate that this is a public health issue of Japanese people regardless of the presence or absence of diseases.

No specific laboratory diagnostic test exists for RP and the diagnosis is made by clinical features and pathological findings of chondritis<sup>28</sup>). Typical pathological changes began with the loss of proteoglycans' basophilic staining of cartilage. Then lymphocytes, plasma cells and neutrophils infiltrated into perichondrial area,

degenerated and decreased the number of chondrocytes. Finally, the cartilage was replaced by fibrous tissue<sup>34)</sup>.

In this study, tissue biopsies were conducted in 95.4% of patients with RP and a definitive diagnosis was obtained in 60.5% of patients who underwent biopsy. To reach accurate diagnosis of RP, it was essential that physicians perform a deep biopsy to obtain the chondral tissue in the site with acute inflammation<sup>28)</sup>.

In laboratory experiments of biopsy specimen, immunoglobulin and C3 component of complement deposited to margin of cartilage and perichondrial vessel wall<sup>34)</sup>. Antibody to type II collagen was detected in patients with RP from the disease onset and the titers were correlated with disease activity<sup>35)</sup>. Hyper-activation of macrophage/monocytes in peripheral blood of RP patients was reported using cytokine profile analysis<sup>36)</sup>.

We found that serum level of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM1), an inflammatory receptor on macrophage/monocytes, was correlated with disease activity<sup>37)</sup>. These data suggest that over-activation of immune system in the whole organism of RP patients converge on the chondritis of RP in a polyphyletic manner.

Several studies reported the possibility that combination therapy with prednisolone and immunosuppressants was effective for patients with RP<sup>21, 38, 39)</sup>, especially that with methotrexate<sup>1, 2, 40, 41)</sup>. In agreement with the studies, our survey revealed high prevalence of airway involvement in patients with prednisolone monotherapy and relatively low prevalence of the involvement in patients with the combination therapy. We recommend use of the combination therapy using prednisolone and immunosuppressants in RP patients with airway involvement.



We found several case reports showed the effectiveness of anti-cytokine antibodies, such as infliximab<sup>42)</sup>, adalimumab<sup>43)</sup>, anakinra<sup>44, 45)</sup> and abatacept<sup>46)</sup>. We presume that the biological agents are applicable for patients with refractory RP based on the results of this survey. However, it is important to control infections of respiratory tracts before administrating such biological agents.

Endoscopic and surgical interventions are sometimes unavoidable for respiratory distress and such interventions with experienced clinicians were effective for the treatment of airway involvement in patients with RP<sup>12, 47)</sup>. The progression of airway involvement occurs even under intensive medication and intervention in some patients with RP and a new modality is awaited for treating such patients. We are currently planning to conduct a prospective study using a patient conducted patient registry system which allows us to collect detailed status data of patients.

## **Conclusions**

We described here patient profiles and major clinical features in patients with RP in Japan. Airway involvement of RP was fundamentally progressive and required frequent clinical checks and appropriate medications. Combination therapy with prednisolone and immunosuppressants may be beneficial for controlling airway involvement of RP than prednisolone monotherapy.

**Acknowledgments**

We thank Ms. Mihoko Kondo and Ms. Yoshimi Shinose for their administration assistance. This work was partially supported by a Grant-in The Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare.

**Disclosure**

All authors have no conflict of interest.

## References

- 1) Trentham DE, Le CH: Relapsing polychondritis. *Ann Intern Med.* 1998; 129: 114-122.
- 2) Letko E, Zafirakis P, Baltatzis S, Voudouri A, Livir-Rallatos C, Foster CS: Relapsing polychondritis: a clinical review. *Semin Arthritis Rheum.* 2002; 31: 384-395.
- 3) Kent PD, Michet CJ, Luthra HS: Relapsing polychondritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2004; 16: 56-61.
- 4) Gergely P Jr, Poór G: Relapsing polychondritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2004; 18: 723-738.
- 5) Luthra HS: Relapsing polychondritis; *Rheumatology.* (eds. Klippel JH, Dieppe PA), Mosby Inc, St. Louis; 1998. Vol. 27, pp1-4.
- 6) Ananthakrishna R, Goel R, Padhan P, Mathew J, Danda D: Relapsing polychondritis-case series from South India. *Clin Rheumatol.* 2009; 28 Suppl 1: S7-10.
- 7) Sharma A, Bambery P, Wanchu A, Sharma YP, Panda NK, Gupta A, Singh S: Relapsing polychondritis in North India: a report of 10 patients. *Scand J Rheumatol.* 2007; 36: 462-465.
- 8) Kong KO, Vasoo S, Tay NS, Chng HH: Relapsing polychondritis-an Oriental case series. *Singapore Med J.* 2003; 44: 197-200.
- 9) Arnaud L, Devilliers H, Peng SL, Mathian A, Costedoat-Chalumeau N, Buckner J, Dagna L, Michet C, Sharma A, Cervera R, Haroche J, Papo T, D'Cruz D, Arlet P, Zwerina J, Belot A, Suzuki N, Harle JR, Moots R, Jayne D, Hachulla E, Marie I, Tanaka T, Lebovics R, Scott D, Kucharz EJ, Birchall M, Kong KO, Gorochov G, Amoura Z; RPDAl study group: The Relapsing Polychondritis Disease Activity

Index: development of a disease activity score for relapsing polychondritis.

Autoimmun Rev. 2012; 12: 204-209.

- 10) McAdam LP, O'Hanlan MA, Bluestone R, Pearson CM: Relapsing polychondritis: prospective study of 23 patients and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 1976; 55: 193-215.
- 11) Miyazu Y, Miyazawa T, Kurimoto N, Iwamoto Y, Ishida A, Kanoh K, Kohno N: Endobronchial ultrasonography in the diagnosis and treatment of relapsing polychondritis with tracheobronchial malacia. *Chest*. 2003; 124: 2393-2395.
- 12) Ernst A, Rafeq S, Boiselle P, Sung A, Reddy C, Michaud G, Majid A, Herth FJ, Trentham D: Relapsing polychondritis and airway involvement. *Chest*. 2009; 135: 1024-1030.
- 13) Eng J, Sabanathan S: Airway complications in relapsing polychondritis. *Ann Thorac Surg*. 1991; 51: 686-692.
- 14) Michet CJ Jr, McKenna CH, Luthra HS, O'Fallon WM: Relapsing polychondritis. Survival and predictive role of early disease manifestations. *Ann Int Med*. 1986; 104: 74-78.
- 15) Behar JV, Choi YW, Hartman TA, Allen NB, McAdams HP: Relapsing polychondritis affecting the lower respiratory tract. *AJR Am J Roentgenol*. 2002; 178: 173-177.
- 16) Im JG, Chung JW, Han SK, Han MC, Kim CW: CT manifestations of tracheobronchial involvement in relapsing polychondritis. *J Compute Assist Tomogr*. 1988; 12: 792-793.
- 17) Faix LE, Branstetter BF: 4<sup>th</sup>: Uncommon CT findings in relapsing polychondritis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2005; 26: 2134-2136.

- 18) Tillie-Leblond I, Wallaert B, Leblond D, Salez F, Perez T, Remy-Jardin M, Vanhille P, Brouillard M, Marquette C, Tonnel AB: Respiratory involvement in relapsing polychondritis. Clinical, functional, endoscopic, and radiographic evaluations. *Medicine (Baltimore)*. 1998; 77: 168-176.
- 19) Dolan DL, Lemmon GB Jr, Teitelbaum SL: Relapsing polychondritis. Analytical literature review and studies on pathogenesis. *Am J Med*. 1966; 41: 285-299.
- 20) Dib C, Moustafa SE, Mookadam M, Zehr KJ, Michet CJ Jr, Mookadam F: Surgical treatment of the cardiac manifestations of relapsing polychondritis: overview of 33 patients identified through literature review and the Mayo Clinic records. *Mayo Clin Proc*. 2006; 81: 772-776.
- 21) Belot A, Duquesne A, Job-Deslandre C, Costedoat-Chalumeau N, Boudjemaa S, Wechsler B, Cochat P, Piette JC, Cimaz R: Pediatric-Onset Relapsing Polychondritis: Case Series and Systematic Review. *J Pediatr*. 2010; 156: 484-489.
- 22) Hidalgo-Tenorio C, Sabio-Sánchez JM, Linares PJ, Salmerón LM, Ros-Die E, Jiménez-Alonso J: Magic syndrome and true aortic aneurysm. *Clin Rheumatol*. 2008; 27: 115-117.
- 23) Ghosn S, Malek J, Shbaklo Z, Matta M, Uthman I: Takayasu disease presenting as malignant pyoderma gangrenosum in a child with relapsing polychondritis. *J Am Acad Dermatol*. 2008; 59: S84-87.
- 24) Stein JD, Lee P, Kuriya B, Tenenbaum J, Daniel LB, Butany J, Provost YL, David TE: Critical coronary artery stenosis and aortitis in a patient with relapsing polychondritis. *J Rheumatol*. 2008; 35: 1898-1901.
- 25) Kim MK, Park KS, Min JK, Cho CS, Kim HY: A case of polychondritis in a patient with Behçet's disease. *Kor J Int Med*. 2005; 20: 339-342.

- 26) Weber F, Kowald E, Schmuth M, Sepp N: Microscopic polyangiitis in a patient with relapsing polychondritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2001; 40: 233-235.
- 27) Coumbaras M, Boulin A, Piette AM, Graveleau P, Blétry O, Pierot L: Intracranial aneurysm associated with relapsing polychondritis. *Neuroradiology*. 2001; 43: 565-566.
- 28) Chauhan S, Agarwal V, D'Cruz S: Case 14-2007: a man with pain and swelling of both eyes and the right ear. *N Engl J Med*. 2007; 356: 1980-1988.
- 29) Yamazaki K, Suga T, Hirata K: Large vessel arteritis in relapsing polychondritis. *J Laryngo Oto*. 2001; 115: 836-838.
- 30) Walker UA, Weiner SM, Vaith P, Uhl M, Peter HH: Aortitis in relapsing polychondritis. *Br J Rheumatol*. 1998; 37: 1359-1361.
- 31) Hoang-Xaun T, Foster CS, Rice BA: Scleritis in relapsing polychondritis. Response to therapy. *Ophthalmology*. 1990; 97: 892-898.
- 32) Isaak BL, Liesegang TJ, Michet CJ Jr: Ocular and systemic findings in relapsing polychondritis. *Ophthalmology*. 1986; 93: 681-689.
- 33) Shinomiya F, Mima N, Nanba K, Tani K, Nakano S, Egawa H, Sakai T, Miyoshi H, Hamada D: Life expectancies of Japanese patients with rheumatoid arthritis: a review of deaths over a 20-year period. *Mod Rheumatol*. 2008; 18: 165-169.
- 34) Valenzuela R, Cooperrider PA, Gogate P, Deodhar SD, Bergfeld WF: Relapsing polychondritis. Immunomicroscopic findings in cartilage of ear biopsy specimens. *Hum Pathol*. 1980; 11: 19-22.
- 35) Foidart JM, Abe S, Martin GR, Zizic TM, Barnett EV, Lawley TJ, Katz SI: Antibodies to type II collagen in relapsing polychondritis. *N Engl J Med*. 1978; 299: 1203-1207.

- 36) Stabler T, Piette JC, Chevalier X, Marini-Portugal A, Kraus VB: Serum cytokine profiles in relapsing polychondritis suggest monocyte/macrophage activation. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 3663-3667.
- 37) 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. *Mod Rheumatol.* 2013 Feb 13. [Epub ahead of print]
- 38) Lipnick RN, Fink CW: Acute airway obstruction in relapsing polychondritis: treatment with pulse methylprednisolone. *J Rheumatol.* 1991; 18: 98-99.
- 39) Cohen PR, Rapini RP: Relapsing polychondritis. *Int J Dermatol.* 1986; 25: 280-285.
- 40) Mathew SD, Battafarano DF, Morris MJ: Relapsing polychondritis in the Department of Defense population and review of the literature. *Semin Arthritis Rheum.* 2012; 42: 70-83.
- 41) Yamaoka K, Saito K, Hanami K, Nakayamada S, Nawata M, Iwata S, Azuma T, Tanaka Y: A case of life-threatening refractory polychondritis successfully treated with combined intensive immunosuppressive therapy with methotrexate. *Mod Rheumatol.* 2007; 17: 144-147.
- 42) Ghosn S, Malek J, Shbaklo Z, Matta M, Uthman I: Takayasu disease presenting as malignant pyoderma gangrenosum in a child with relapsing polychondritis. *J Am Acad Dermatol.* 2008; 59: S84-87.
- 43) Seymour MW, Home DM, Williams RO, Allard SA: Prolonged response to anti-tumour necrosis factor treatment with adalimumab (Humira) in relapsing polychondritis complicated by aortitis. *Rheumatology (Oxford).* 2007; 46: 1739-1741.

- 44) Wendling D, Govindaraju S, Prati C, Toussirot E, Bertolini E: Efficacy of anakinra in a patient with refractory relapsing polychondritis. *Joint Bone Spine*. 2008; 75: 619-625.
- 45) Vounotrypidis P, Sakellariou GT, Zisopoulos D, Berberidis C: Refractory relapsing polychondritis: rapid and sustained response in the treatment with an IL-1 receptor antagonist (anakinra). *Rheumatology (Oxford)*. 2006; 45: 491-492.
- 46) Peng SL, Rodriguez D: Abatacept in relapsing polychondritis. *Ann Rheum Dis*. 2013; 72:1427-1429.
- 47) Sarodia BD, Dasgupta A, Mehta AC: Management of airway manifestations of relapsing polychondritis: case reports and review of literature. *Chest*. 1999; 116: 1669-1675.



## **Figure legends**

### **Fig. 1** Age distribution of disease onset in patients with RP

The mean age at onset of disease was 52.7 years old with a range from 3 to 97 years old. Older people (more than 51 years old) tend to develop RP rather than younger people (0-20 years old).

### **Fig. 2** Effects of immunosuppressants to the airway involvement of RP patients

Prevalence rates of airway involvement in patients with RP were 100, 42.6, 50.0 and 57.0% in treatment with steroid only, steroid with MTX, CPA, CYA and AZP, respectively, with and/or after each treatment.

### **Fig. 3** Summary of prognostic outcome in patients with RP in this survey

Medication was discontinued without any manifestation in 11 patients (4.6%). 159 patients (66.5%) were well controlled and, in total, 71.1% of patients in our cohort responded to the treatments. 32 patients (13.4%) showed limited response and 9 patients (3.8%) suffered from progressive disease or relapse. 22 patients (9.0%) died.

### **Table 1 Summary of Japan RP Questionnaire**

---

a. Patients' profile

Sex, onset age, follow-up years and diagnostic delay

b. Clinical features

Primary and follow-up

c. Laboratory findings

Laboratory tests, image analysis and histopathologic features

d. Treatment

Non-steroidal anti-inflammatory, prednisolone, immunosuppressants, antibiotics and surgical intervention

e. Prognosis and complications

Tracheal collapse, tracheotomy, vulvar surgery and death

---

**Table 2 Characteristics of patients with RP in McAdam series<sup>10)</sup> and current survey**

	McAdam (n=159)		Current survey (n=239)	
<b>Profile</b>				
Male-female ratio	83:76		127:112	
Mean age			57 (range 6-104)	
Mean age of disease onset	44		53 (range 3-97)	
Disease duration (yr)			5.3 (range 1-33)	
<b>Clinical features (%)</b>				
	Onset		Follow-up	
External ear	26	89	57	78
Internal ear	6.4	46	3.8	27
Nasal cartilage	13	72	2.1	39
Airway	14	56	17	50
laryngo				20
tracheobronchial				41
Eye	14	65	9.2	46
conjunctivitis				15
scleritis				26
uveitis				11
Arthritis	23	81	6.2	39
Skin		17		13
Cardiovascular		24		7.1

Neurological	2.9	9.6
Renal		6.7
Myelodysplasia		1.7

---

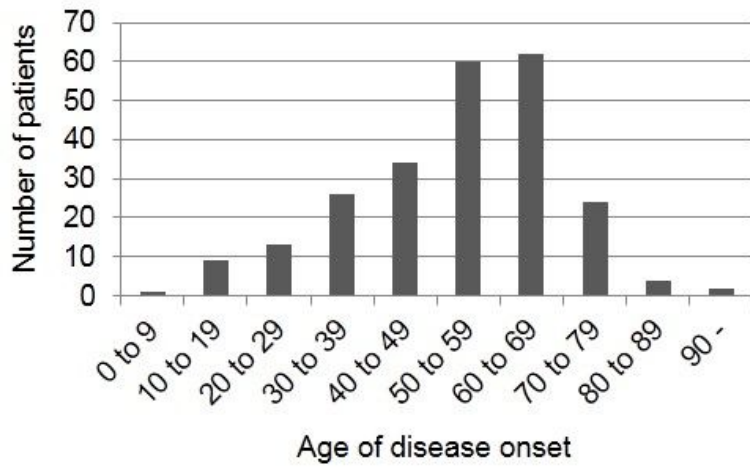


Fig. 1

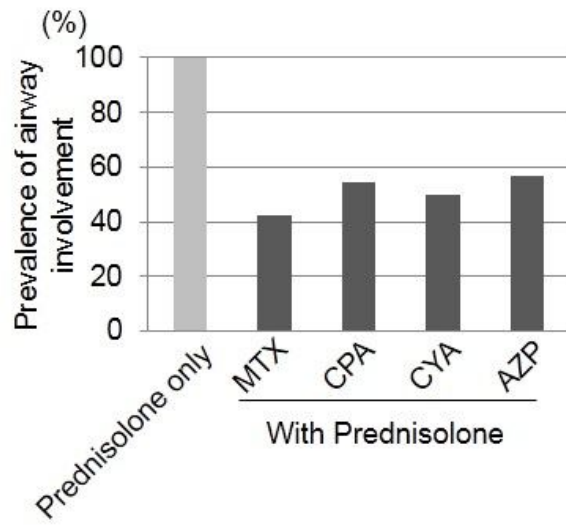


Fig. 2

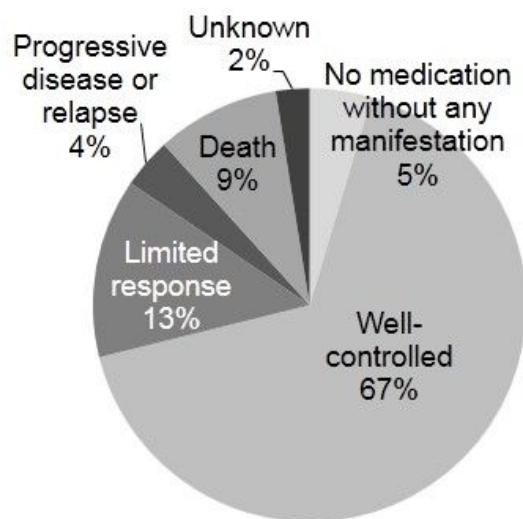


Fig. 3

平成 24-25 年度 難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)

研究分野	ライフサイエンス		
研究課題名	難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業) 再発性多発軟骨炎の診断と治療体系の確立		
課題番号	H24 - 難治等(難) - 指定 - 001		
区分	氏名	所属	職名
研究代表者 (24-25)	鈴木 登	聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター・医学部免疫学	教授
研究分担者 (24-25)	岡 寛	東京医科大学八王子医療センター リウマチ性疾患治療センター	教授
研究分担者 (24-25)	遊道 和雄	聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター	教授
研究分担者 (24-25)	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
研究分担者 (25)	清水 潤	聖マリアンナ医科大学 免疫学・病害動物学	准教授