HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	難治性自己免疫疾患における新規疾患活動性マーカーと治療薬に関する研究
Author(s)	谷村, 瞬
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13455号
Issue Date	2019-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k13455
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/74992
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号：2469
File Information	Shun_Tanimura.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

難治性自己免疫疾患における
新規疾患活動性マーカーと治療薬に関する研究
(Novel disease activity markers and therapeutic targets for refractory autoimmune diseases: systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis)

2019 年 3 月

北海道大学

谷村　瞬

Shun Tanimura

学位論文

難治性自己免疫疾患における
新規疾患活動性マーカーと治療薬に関する研究
(Novel disease activity markers and therapeutic targets for refractory autoimmune diseases: systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis)

2019 年 3 月

北海道大学

谷村　瞬

Shun Tanimura

目次

1. 発表論文目録及び学会発表目録……...……1
2. 要旨……...3
3. 略語表……...6
4. 諸言……...8

5. 第一章 全身性エリテマトーデス患者における血漿プレセプシン測定の意義…..10
5.1 背景……11
5.2 対象と方法……12
5.2.1 研究デザイン……...12
5.2.2 対象……...……12
5.2.3 感染症の定義……...13
5.2.4 評価項目……..13
5.2.5 血漿採取と保存……..……..……14
5.2.6 血漿プレセプシン値の測定……...14
5.2.7 統計解析……..14
5.3 結果……15
5.3.1 対象患者の背景疾患……15
5.3.2 自己免疫疾患患者の血漿プレセプシン値の測定……17
5.3.3 SLE と非 SLE 患者の血漿プレセプシン値の解析……...20
5.3.4 SLE と非 SLE 患者の背景……..22
5.3.5 SLE 患者の血漿プレセプシン値と疾患活動性の相関……27
5.3.6 フォローアップスタディー……...32
5.4 考察……34
5.5 結語……38

6. 第二章 スタチンの関節炎抑制効果と機序の検討……..……...39
6.1 背景……40
6.2 目的……41
6.3 関節炎自然発症型モデルラットに対するスタチンの関節炎抑制効果……42
6.3.1 はじめに……..43
6.3.1.1 関節炎モデル動物に対するスタチン製剤の有効性……43
6.3.1.2 env-pX ラット……..43
6.3.2 方法…..……44

6.3.2.1　試薬の作成....……....…44
6.3.2.2　研究デザイン….....……44
6.3.2.3　血液採取とリウマチ因子の測定……44
6.3.2.4　env-pX ラットにおける関節超音波検査……45
6.3.2.5　足関節の組織採取と組織学的検討……45
6.3.2.6　統計解析……...……46
6.3.3　結果……..……47
6.3.3.1　関節腫脹の経時的肉眼的評価……47
6.3.3.2　リウマトイド因子の抗体価……49
6.3.3.3　関節超音波検査による滑膜炎の経時的評価……51
6.3.3.4　組織学的評価……57
6.3.4　考察……..61
6.4　結語……66

7. 結論……..……67
8. 謝辞……...……...68
9. 利益相反……..……70
10. 引用文献……71

1. 発表論文目録及び学会発表目録

本研究の一部は以下の論文として発表または投稿中である。

1. Shun Tanimura, Yuichiro Fujieda, Michihiro Kono, Yuhei Shibata, Ryo Hisada, Eri Sugawara, Hiroyuki Nakamura, Kazumasa Ohmura, Sanae Shimamura, Asako Mitani, Haruki Shida, Toshiyuki Watanabe, Masaru Kato, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Olga Amengual, Shinsuke Yasuda, Chikara Shimizu and Tatsuya Atsumi. Clinical significance of plasma Presepsin levels in patients with systemic lupus erythematosus. Modern Rheumatology. 2018; 28(5): 865-871.

2. Shun Tanimura, Mutsumi Nishida, Tatsunori Horie, Tamotsu Kamishima, Yuka Nishibata, Sakiko Masuda, Daigo Nakazawa, Utano Tomaru, Tatsuya Atsumi and Akihiro Ishizu. Fluvastatin, an inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase, prevents the development of arthritis in env-pX rats. Submitted.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Shun Tanimura, Yuichiro Fujieda, Michihiro Kono, Ryo Hisada, Eri Sugawara, Hiroyuki Nakamura, Kazumasa Ohmura, Sanae Shimamura, Yuka Shimizu, Toshiyuki Watanabe, Haruki Shida, Masaru Kato, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Olga Amengual, Tetsuya Horita, Shinsuke Yasuda, and Tatsuya Atsumi. 「Clinical Significance of plasma Presepsin levels in Patients with Connective Tissue Diseases」第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 福岡, 2017 年 4 月.

2. 谷村瞬、西田陸、堀江達則、神島保、齋藤克己、西端友香、益田紗季子、外丸詩野、渥美達也、石津明洋. 「スタチンの関節炎抑制効果とその機序の検討」第 3 回日本骨免疫学会, 沖縄, 2017 年 6 月.

3. Shun Tanimura, Yuichiro Fujieda, Michihiro Kono, Ryo Hisada, Eri Sugawara, Hiroyuki Nakamura, Kazumasa Ohmura, Sanae Shimamura, Yuka Shimizu, Toshiyuki Watanabe, Haruki Shida, Masaru Kato, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Olga Amengual, Tetsuya Horita, Shinsuke Yasuda, and Tatsuya Atsumi. 「Clinical significance of plasma Presepsin levels in patients with systemic lupus erythematosus」The 19th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress, Dubai, UAE. October 2017.

4. 谷村瞬、西田陸、堀江達則、神島保、齋藤克己、西端友香、益田紗季子、外丸詩野、渥美達也、石津明洋 「スタチンの関節炎抑制効果とその機序の解明」第 62 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京, 2018 年 4 月.

2. 要旨

【背景と目的】

自己免疫疾患は自己免疫寛容が破綻することで、自己の細胞や組織を抗原と認識・反応を起こし臓器・機能障害を来す。ひと昔前においては、そのほとんどが原因不明であったが、現在はリウマチ性疾患・膠原病として病態の解明が進み、新たな治療の進歩は著しいものがある。しかしその中でも、ときに進行性かつ非可逆的な臓器障害を来し、生命予後が不良となりえる病態が存在することもまた事実である。これより病態の解明はもとより、確立した診断・治療ストラテジーを作成するためにも、これら難治性自己免疫疾患のさらなる疾患活動性マーカーや治療薬の発見・開発が必要と考えられる。我々はこうした難治性自己免疫疾患のうち、代表的な疾患である全身性エリテマトーデス（SLE）と関節リウマチ（RA）に焦点を当てた。

SLE は抗 ds-DNA 抗体などの自己抗体が組織に沈着することで全身の臓器に多様な病変が生じる。ステロイドや免疫抑制薬を中心とした治療の開発により、生命予後は改善の一歩を辿っている。しかし依然として SLE の病態は不均一であり患者一人ひとりによって重症度は細かく分けられ、必要な治療メニューに一定のものはない。そのためより早期に診断し、それぞれの患者の重症度を見極めていくことが重要である。今回我々は患者の血漿で測定できるプレセプシン（P-SEP）に注目した。P-SEP とは可溶性 CD14 subtype であり、感染症に伴う敗血症で高値を示すことが証明され、現在は一般診療でプロカルシトニンと同様に、感染症マーカーとして利用されている。我々は SLE の病態から、P-SEP が疾患活動性を反映する可能性に着目し解析を行った。

RA は関節滑膜を炎症の主座とする慢性炎症性の自己免疫疾患である。その頻度は膠原病に分類される疾患の中で最も多い。そしてまた膠原病診療の中で、近年最も大きく進歩したのも RA 治療である。2000 年代に入り炎症性サイトカイン遮断治療薬として TNF-α、IL-6、CTLA-4 を標的とする治療薬の登場で、RA 治療はパラダイムシフトを迎え、RA の活動性を寛解に導くことが可能となった。しかし高額な治療費、生物学的製剤・免疫抑制薬による感染症等の副作用、そしてそれらを持ってしても依然存在する難治例などの問題が全て解決していないのも現状である。今回我々はスタチンに注目した。スタチンは HMG-CoA 還元酵素阻害薬であり、メバロン酸代謝経路を阻害してコレステロール合成を低下させ、一般的に脂質異常症の治療薬として使用される。しかし近年、スタチンは脂質プロファイル以外に抗炎症効果などの多面的効果（pleiotropic effects)を有していることが多く報告されている。スタチ

ンの RA における影響に関しても、コホート研究が行われているが、その見解に未だ一定のものはない。これより我々は、スタチンの関節炎抑制効果と機序の解明を目的に研究を行った。

第一章：全身性エリテマトーデス患者における血漿プレセプシン測定の意義

【対象と方法】2012 年 8 月から 2015 年 9 月の間に北海道大学病院の膠原病診療部門を受診した自己免疫疾患患者のうち、疾患活動性が高く免疫抑制治療が必要と判断される、もしくは感染症と診断され抗菌薬治療が必要と判断され、入院加療が必要となった患者 107 人を対象とした。そのうち非感染症 SLE 群（n=22)、感染症 SLE 群（n=13)、非感染症非 SLE 群（n=32)、感染症非 SLE 群（n=40)の 4 群に分けて、血漿 P-SEP 値との関連について解析した。

【結果】非感染症群の比較では、SLE 患者は非 SLE 患者に比べ有意に血漿 P-SEP 値が高値であった また非 SLE 患者の比較では、感染群は非感染群に比べ有意に血漿 P-SEP 値が高値であったが、SLE 患者の比較では、感染群と非感染症群で有意な差はなかった 。さらに非感染症の SLE 患者の血漿 P-SEP 値は、SLE の疾患活動性指標で用いられている SLEDAI-2K や血清補体価（C3、CH50）と有意な相関関係があり、免疫抑制治療により、その値が改善した。

【考察】SLE 患者の疾患活動性の評価、治療効果において、血漿 P-SEP は新規のバイオマーカーに成りえる可能性がある。

第二章：スタチンの関節炎抑制効果と機序の検討

【対象と方法】6-8 週齢の肉眼的関節腫脹を伴わない、オスの env-pX ラットを用いた。11 匹の env-pX ラットのうち、ランダムに選んだ 6 匹にフルバスタチン 4 μg/ml (500 μg/kg) 溶液を 50ml、30 日間連続経口摂取させた。コントロール群として残りの 5 匹には、5%ブドウ糖液 50ml を同様に 30 日間連続経口摂取させた。Day 0 (薬剤投与前)から Day 30 まで継続的に env-pX ラットの足関節の腫脹の有無を肉眼的に観察した。また Day 0、Day 10、Day 20、Day 30 にリウマチ因子（RAPA）の測定と関節超音波検査を行った。Day 30 の観察終了後に、麻酔下の全採血により安楽死させた後に、足関節を採取し組織学的検討を行った。

【結果】フルバスタチン投与群はコントロール群と比較して、RAPA の陽性率が低い傾向を示し、関節腫脹の肉眼的評価、組織学的評価において、有意に関節炎の発症を予防した。さらに関節超音波検査では、滑膜内血流シグナルの増加率が、フルバスタチン群で有意に低くかった。

【考察】スタチンにおける免疫調整作用と抗炎症効果から関節炎を抑制する可能性がある。

【結論】第一章では自己免疫疾患患者における血漿 P-SEP 値測定を行い、SLE 患者の血漿 P-SEP 値が有意に上昇しており、SLE の疾患活動性と血漿 P-SEP 値は相関していたことから、血漿 P-SEP 値は SLE の新たな診断、治療マーカーの候補となる可能性が考えられた。第二章では関節炎モデルラットを用いた in vivo の実験により、フルバスタチン投与により関節炎を抑制することを示した。しかしスタチンの関節炎抑制機序の解明は未だ不十分であり、エビデンスが不十分なことからも、関節炎の治療薬として用いられていないが、今後さらなる原因究明やエビデンスの構築がなされれば、RA の新規治療薬候補となる可能性が考えられる。

3. 略語表

本文中のおよび図中で使用した略語は以下の通りである.

ACPA	Anti-citrullinated proteins antibodies
ACR	American College of Rheumatology
AIA	Adjuvant induced arthritis
ANCA	Antineutrophil cytoplasmic antibody
AOSD	Adult onset still’s disease
BD	Beçhet's disease
CD	Cluster of differentiation
CIA	Collagen induced arthritis
CLIA	Chemiluminescent enzyme immunoassay
Cre	Creatinine
CRP	C-reactive protein
CTLA	Cytotoxic T-lymphocyte antigen
ds-DNA	anti-double stranded- deoxyribonucleic acid
eGFR	estimated Glomerular filtration rate
ESR	Erythrocyte sedimentation rate
EULAR	European League Against Rheumatism
FMF	Familial mediterranean fever
GGPP	Geranylgeranyl pyrophosphate
GS	Gray Scale
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl- coenzyme A
HTLV-1	Human T-cell leukemia virus type I
ICAM	Intracellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRF	Interferon regulatory factor
IVCY	Intravenous cyclophosphamide
LDL	Low-density lipoprotein
LFA	Leukocyte function antigen
LPS	Lipopolysaccharide

MCTD	Mixed connective tissue disease
MHC	Major histocompatibility complex
mPSL	methylprednisolone
NETs	Neutrophil extracellular traps
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
PCT	Procalcitonin
PD	Power Doppler
PM/DM	Polymyositis/Dermatomyositis
PMR	Polymyalgia rheumatic
PRF	Pulse repetition frequency
P-SEP	Presepsin
RA	Rheumatoid arthritis
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RAPA	Rheumatoid arthritis particle aggregation
RF	Rheumatoid factor
ROI	Region of Interest
SLE	Systemic lupus erythematosus
SLEDAI	Systemic lupus erythematosus disease activity index
SS	Sjögren syndrome
SSc	Scleroderma
TNF-α	Tumor necrosis factor-α
WBC	White blood cell

4. 緒言

自己免疫疾患は自己免疫寛容が破綻することで T 細胞や抗体が自己の細胞や組織を抗原と認識・反応を起こし臓器・機能障害を来す。ひと昔前においては、そのほとんどが原因不明であったが、現在はリウマチ性疾患・膠原病として病態の解明が進み、新たな治療の進歩は著しいものがある。しかしその中でも、ときに進行性かつ非可逆的な臓器障害を来し、生命予後が不良となりえる病態が存在することもまた事実である。これより病態の解明はもとより、確立した診断・治療ストラテジーを作成するためにも、これら難治性自己免疫疾患のさらなる疾患活動性マーカーや治療薬の発見・開発が必要と考えられる。我々はこうした難治性自己免疫疾患のうち、代表的な疾患である全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) と関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) に焦点を当てた。

SLE は難治性の自己免疫疾患であり，抗 ds-DNA (anti-double stranded-deoxyribonucleic acid) 抗体などの自己抗体が組織に沈着することで全身の臓器に多様な病変が生じる。ステロイドや免疫抑制薬を中心とした治療の開発により、生命予後は改善の一歩を辿っている。しかし依然として SLE の病態は不均一であり患者一人ひとりによって重症度は細かく分けられ、必要な治療メニューに一定のものはない。そのためより早期に診断し、それぞれの患者の重症度を見極めていくことが重要である。今回我々は患者の血漿で測定できるプレセプシン (presepsin: P-SEP) に注目した。P-SEP とは可溶性 CD (cluster of differentiation) 14 subtype であり、感染症に伴う敗血症で高値を示すことが証明され、現在は一般診療でプロカルシトニンと同様に、感染症マーカーとして利用されている。我々は SLE の病態から、P-SEP が活動期にある SLE 患者で高値である可能性に着目し解析を行った。

RA は関節滑膜を炎症の首座とする慢性炎症性の自己免疫疾患である。その頻度は膠原病に分類される疾患の中で最も多く、全世界の有病率は 0.5-1.0%であり、我が国では 70～80 万人の患者がいるとされている。そしてまた膠原病診療の中で、近年最も大きく進歩したのも RA 治療である。2000 年代に入り炎症性サイトカイン遮断治療薬として抗 Tumor necrosis factor (TNF) - α モノクローナル抗体が開発された。その後、Interleukin (IL) -6 や Cytotoxic T-lymphocyte antigen (CTLA) -4 を標的とする治療薬の登場で、RA 治療はパラダイムシフトを迎え、RA の活動性を寛解に導くことが可能となった。しかし高額な治療費、生物学的製剤・免疫抑制薬による感染症等の副作用、そしてそれらを持ってしても依然存

在する難治例などの問題が全て解決していないのも現状である。今回我々はスタチンに注目した。スタチンは hydroxymethylglutaryl- coenzyme A (HMG-CoA) 還元酵素阻害薬であり、メバロン酸代謝経路を阻害してコレステロール合成を低下させ、一般的に脂質異常症の治療薬として使用される。しかし近年、スタチンは脂質プロファイル以外に抗炎症効果などの多面的効果 (pleiotropic effects)を有していることが多く報告されている。スタチンの RA における影響に関しても、コホート研究が行われているが、その見解に未だ一定のものはない。これより我々は、スタチンの関節炎抑制効果と機序の解明を目的に研究を行った。

5. 第一章

全身性エリテマトーデス患者における
血漿プレセプシン測定の意義

5.1　背景

全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematosus: SLE）は、抗核抗体や抗 ds-DNA 抗体を初めとする多彩な自己抗体を産生と、免疫複合体の組織沈着により全身の諸臓器を障害する原因不明の自己免疫疾患であり、若年から中年の女性に好発するとされている(Lisnevskaia et al., 2014)。SLE の発症と病態形成には B リンパ球の高反応性、CD4 陽性 T リンパ球の活性化をはじめとする免疫システムの破綻、及び環境因子や遺伝的背景が関わることが知られているが、近年、単球や樹状細胞などのアポトーシスを来す細胞のクリアランス異常や、それらに起因する I 型インターフェロンや炎症性サイトカインも SLE の臨床・血清学的異常に関与していることが報告されている(Grossmayer et al., 2005; Herrmann et al., 1998)。特に単球の活性・機能異常、及びその病理学的意義の重要性は、SLE においてますます認識されて始めている(Taylor et al., 2000)。しかしながら、単球の活性化を指す SLE の疾患活性としてのバイオマーカーは未だ確立されていない。これより単球の活動性に有用な新規バイオマーカーの探索は、SLE の診断、疾患活動性や治療評価のみならず病態解明においても非常に重要である。

プレセプシン (presepsin: P-SEP) は、敗血症患者の血中で高値を示すマーカーとして 2002 年に我が国で発見された CD14 アミノ酸配列 1-64 前後を含む 13kDa の糖蛋白で、炎症性ストレス下のもとでエラスターゼを有する単球や好中球が細菌や抗原を貪食した際に放出される CD14 断片産物である(Mussap et al., 2011; Tsujimoto et al., 2016; Zou et al., 2014)。P-SEP の名称は、当初可溶性 CD14 サブタイプ (sCD14 sub-type)と呼ばれていたが、敗血症に移行する前から血中濃度が上昇する蛋白であることが由来となり 2011 年に改名された(Shirakawa et al., 2011)。P-SEP は侵襲度の高い外傷や熱傷などの感染を伴わない高サイトカイン血症の病態において従来の炎症マーカーに対し影響を受けにくく、感染症早期に上昇することが報告されており、現在一般臨床レベルにおいて、敗血症の診断、治療マーカーとして測定されている(Endo et al., 2014)。併せて単球の異常活性化を病態の主座とする血球貪食症候群でも P-SEP が上昇することも報告されている(Nanno et al., 2016)。

我々は、P-SEP が SLE における単球の活性化を反映すると仮定し、SLE 患者の血漿 P-SEP 値と、SLE の疾患活動性が相関するかを評価した。

5.2　対象と方法

5.2.1　研究デザイン

本研究は横断研究である。SLE 患者に対する血漿 P-SEP 値の疾患活動性マーカーとしての有用性を明らかにすることを目的とした。入院時の採血または保存血漿を用いて P-SEP 測定を行い、血漿採取時の臨床情報は医療記録から収集した。この研究はヘルシンキ宣言と臨床試験の基本理念に従って施行し、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会の承認 (承認番号: 014-0027、016-0470) を得て行った。

5.2.2　対象

2012 年 8 月から 2015 年 9 月の間に北海道大学病院の膠原病診療部門を受診した自己免疫疾患患者のうち、疾患活動性が高く免疫抑制治療が必要と判断される、もしくは感染症と診断され抗菌薬治療が必要と判断され、入院加療が必要となった患者 107 人を対象とした。各自己免疫疾患の診断は下記に示した基準に基づき少なくとも 2 名以上の専門医が行った。

- SLE: 米国リウマチ学会 (American College of Rheumatology: ACR) 1997 年改訂分類基準(Hochberg, 1997)
- RA: ACR-欧州リウマチ学会 (European League Against Rheumatism: EULAR) 2010 年共同作成分類基準(Neogi et al., 2010)
- 血管炎症候群 (ANCA (antineutrophil cytoplasmic antibody) 関連血管炎、結節性多発動脈炎): Watts 分類(Watts et al., 2007)、ACR1990 年改訂分類基準(Arend et al., 1990; Hunder et al., 1990)
- シェーグレン症候群 (Sjögren syndrome: SS): 1990 年厚生労働省分類基準(Fujibayashi et al., 2004)
- リウマチ性多発筋痛症 (Polymyalgia rheumatic: PMR): ACR-EULAR2012 年改訂分類基準(Dasgupta et al., 2012)
- 混合性結合組織病 (Mixed connective tissue disease: MCTD): 2012 年改訂シャープ分類基準(Ortega-Hernandez and Shoenfeld, 2012)

- 成人 Still 病 (Adult onset still’s disease: AOSD): 山口の分類基準(Yamaguchi et al., 1992)
- ベーチェット病 (Beçhet's disease: BD): ベーチェット病国際分類基準 (Davatchi, 2012)
- 家族性地中海熱 (Familial mediterranean fever: FMF): Tel-Hashomer 分類基準 (Pras, 1998)
- 強皮症 (Scleroderma: SSc): ACR-EULAR2013 年改訂分類基準(van den Hoogen et al., 2013)
- 多発性筋炎/皮膚筋炎 (Polymyositis/Dermatomyositis: PM/DM): Bohan/Peter の分類基準(Bohan and Peter, 1975)

5.2.3 感染症の定義

我々は感染症を、International Sepsis Forum Consensus Conference(Calandra and Cohen, 2005)の基準に従って定義した。17 の感染を来し得る部位において、臨床的症状、検査データ、画像データ、各種培養における微生物学的証拠に基づき、菌体の証明が確定的または可能性がある場合を細菌感染症と定義とした。また真菌感染症、ウイルス感染症であった場合、細菌感染症とそれらが重複している患者は除外とした。さらに初期治療の過程で抗生剤と免疫抑制治療の新規または追加療法を同時に行った患者も除外した。

5.2.4 評価項目

全てのデータを医療記録から収集した。患者背景として血漿 P-SEP 値測定時の疾患名、発症時年齢、性別、有病期間、過去に使用した薬剤を含めた治療歴、疾患活動性 (Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000 (SLEDAI-2K)(Gladman et al., 2002))を収集した。臨床検査は、白血球数 (White blood cell: WBC) 、C 反応性蛋白質 (C-reactive protein: CRP)、赤血球沈降速度 (Erythrocyte sedimentation rate: ESR)、プロカルシトニン (Procalcitonin: PCT)、クレアチニン（Creatinine: Cre）、糸球体濾過率（estimated Glomerular filtration rate: eGFR）、血清補体価 (C3、C4、CH50)、抗 ds-DNA 抗体 (radioimmunoassay、基準値 <12)を収集した。

5.2.5　血漿採取と保存

全ての血漿は、入院時または通常の外来受診時に患者の同意を得て採取・保存した。0.109 M クエン酸ナトリウム入りの採血管に静脈血を採取し、直ちに 4 °C で遠心分離した。得られた血漿は−80 °C で保存した。

5.2.6　血漿プレセプシン値の測定

血漿 P-SEP 値は、CLIA 法 (Chemiluminescent enzyme immunoassay)による自動免疫分析装置 PATHFAST® (Mitsubishi Chemical Analytec Co. Ltd.、Tokyo、Japan) を用いて測定した(Behnes et al., 2014)。PATHFAST®の血漿 P-SEP 検出範囲は下限 20 pg / ml から上限 20,000 pg / ml であり、健常人の血漿 P-SEP 値は 73-209 pg / ml (平均±SD 132.5±50.6 pg / ml) と定めた(Okamura and Yokoi, 2011)。

5.2.7　統計分析

正規分布が仮定できない連続変数は中央値　[範囲] で示し、カテゴリー変数は実数値もしくはパーセンテージで示した。連続変数の群間比較は Wilcoxon test または Kruskal-Wallis test を用いた。2 群間の一致度は Cohen’s kappa statistic を 2 群間の相関は Spearman’s rank-order correlation coefficient を用いて評価した。すべての p 値は 0.05 未満を統計学的有意とした。統計解析は JMP Pro software (ver. 12.0; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) と GraphPad Prism software (ver. 7.02; GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA) を用いて行った。

5.3　結果

5.3.1　対象患者の背景疾患

107 例 (非感染 61 例、感染 46 例)の自己免疫疾患患者が本症例の対象となった。そのうち 35 例が SLE 患者であり、13 例 (37%)が感染群であった。その 13 例の感染症の内訳は、尿路感染症 (n = 3)、蜂窩織炎 (n = 3)、細菌性肺炎 (n = 2)、膿瘍 (n = 2)、感染性胃腸炎 (n = 1)、急性胆管炎 (n = 1)、感染性心内膜炎 (n = 1)であった。対象患者の背景疾患は Table 1 に示した。

Table 1. 対象患者の背景疾患

疾患名	n=107 (感染: n=46)
SLE	35 (13)
RA	22 (11)
Vasculitis (AAV/PN)	22 (11)
SS	8 (5)
PMR	4 (1)
MCTD	3 (1)
AOSD	3 (0)
BD	3 (0)
FMF	3 (0)
SSc	2 (2)
PM/DM	2 (2)

SLE: Systemic lupus erythematosus; RA: Rheumatoid arthritis; Vasculitis: ANCA associated vasculitis＋Polyarteritis nodosa; SS: Sjögren syndrome; PMR: Polymyalgia rheumatic; MCTD: Mixed connective tissue disease; AOSD: Adult onset still’s disease; BD: Beçhet's disease; FMF: Familial mediterranean fever; SSc: Scleroderma; PM/DM: Polymyositis/Dermatomyositis.

5.3.2　自己免疫疾患患者の血漿プレセプシン値の測定

全ての疾患群において、感染症の有無を問わずに測定した血漿 P-SEP 値を Figure 1A に示した。SLE、RA および血管炎の患者で血漿 P-SEP 値が他の自己免疫疾患患者と比較して高い傾向が見られたが、それぞれの疾患群別には統計学的な有意差は認められなかった。

SLE 以外の疾患患者をまとめて、非 SLE 患者として、SLE 患者と血漿 P-SEP 値を比較検討したものを Figure 1B に示した。SLE 患者は非 SLE 患者と比較して、有意に血漿 P-SEP 値が高値であった（中央値 [四分位範囲] SLE：540 pg / ml [325.8 - 1725.0] 対 非 SLE：295.5 pg / ml [166.3 - 567], p = 0.0015）。

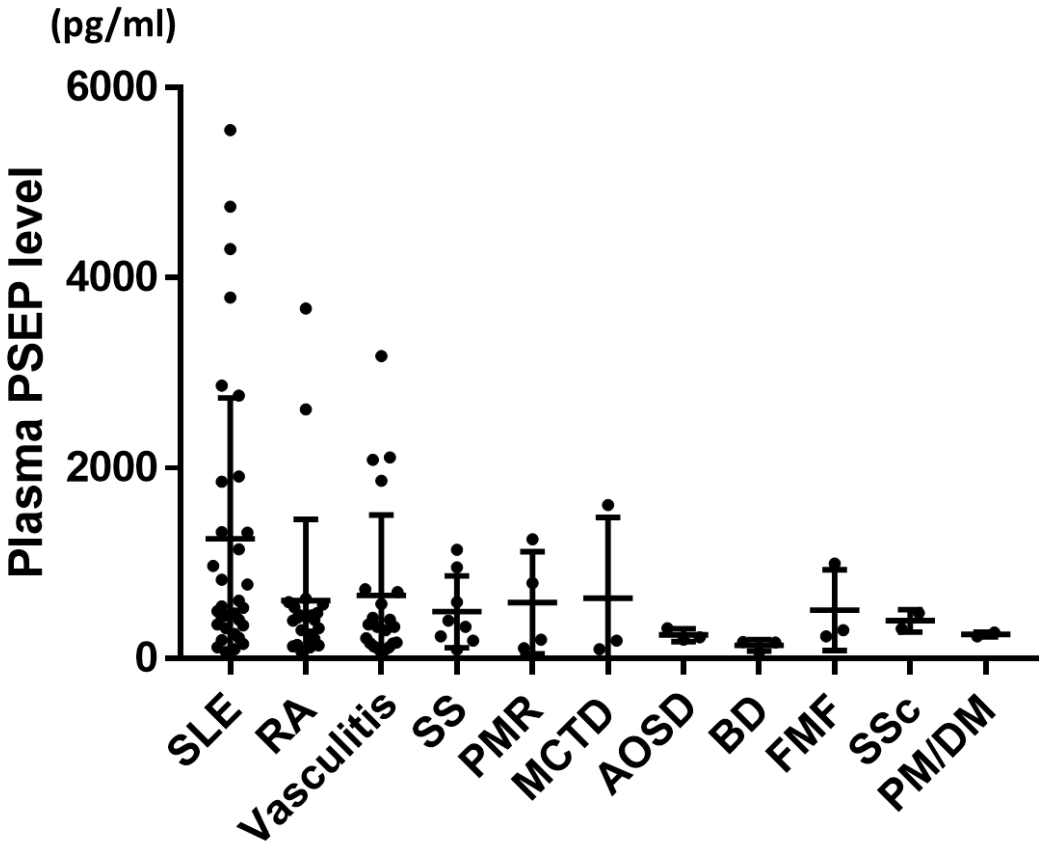

Figure 1A. 自己免疫疾患患者における血漿 P-SEP 値測定

血漿 P-SEP 値は、CLIA 法による自動免疫分析装置 PATHFAST®を用いて測定した。PSEP: Presepsin; SLE: Systemic lupus erythematosus; RA: Rheumatoid arthritis; Vasculitis: ANCA associated vasculitis＋Polyarteritis nodosa; SS: Sjögren syndrome; PMR: Polymyalgia rheumatic; MCTD: Mixed connective tissue disease; AOSD: Adult onset still’s disease; BD: Beçhet's disease; FMF: Familial mediterranean fever; SSc: Scleroderma; PM/DM: Polymyositis/Dermatomyositis.

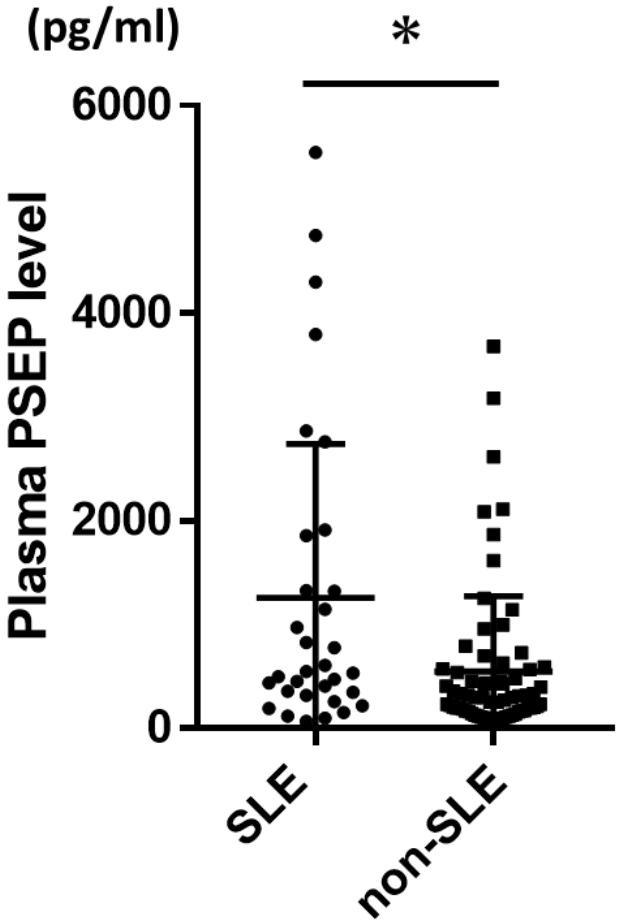

Figure 1B. SLE 患者と非 SLE 患者における血漿 P-SEP 値測定

血漿 P-SEP 値は、CLIA 法による自動免疫分析装置 PATHFAST®を用いて測定した。データは中央値で示した。*p＜0.05.

PSEP: Presepsin; SLE: Systemic lupus erythematosus.

5.3.3　SLE と非 SLE 患者の血漿プレセプシン値の解析

対象患者 107 人を非感染症 SLE 群 (n=22)、感染症 SLE 群 (n=13)、非感染症非 SLE 群 (n=32)、感染症非 SLE 群 (n=40)に分けて、各群における血漿 P-SEP 値を Figure 2 に示した。

非感染症群の比較では、SLE 患者は非 SLE 患者に比べ有意に血漿 P-SEP 値が高値であった (SLE : 511 pg / ml [325.8 - 1871.0] 対 非 SLE : 195 pg / ml [138 - 295]、p = 0.0008)。また非 SLE 患者の比較では、感染群は非感染群に比べ有意に血漿 P-SEP 値が高値であった (感染群：436 pg / ml〔251 - 975〕対 非感染群：202 pg / ml 〔147.5 - 308.0〕、 p = 0.0146)。しかし SLE 患者の比較では、感染群と非感染症群で有意な差はなかった (感染群 : 511 pg / ml〔353.5 - 1871〕対 非感染群 : 534 pg / ml 〔237.5 - 1234〕、 p = 0.5443)。

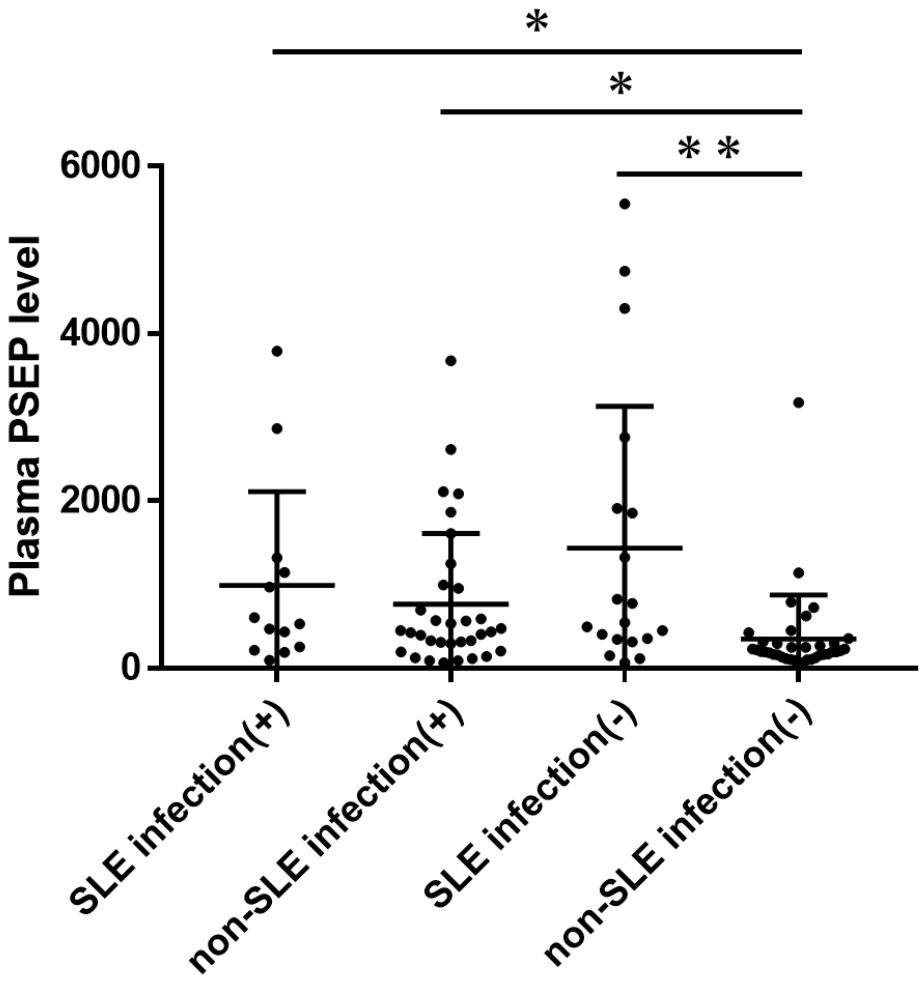

Figure 2. SLE 患者と非 SLE 患者における血漿 P-SEP 値測定

血漿 P-SEP 値は、CLIA 法による自動免疫分析装置 PATHFAST®を用いて測定した。データは中央値で示した。*p＜0.05, **p＜0.001.

PSEP: Presepsin; SLE: Systemic lupus erythematosus.

5.3.4　SLE と非 SLE 患者の背景

SLE 患者の感染症群 (n=13) と非感染症群 (n=22)、非 SLE 患者の感染症群 (n=33) と非感染症群 (n=39) の計 4 群に分け、SLE 患者の背景を Table 2、非 SLE 患者の背景を Table 3 に示した。

SLE 患者における感染群と非感染群を比較したところ、感染群の方が非感染症群に比べ、高齢で罹患期間が長かった。また感染・炎症マーカーである WBC、CRP、ESR、PCT が感染群で高値であった。逆に SLE の活動性マーカーである C3、C4、CH50、抗 ds-DNA 抗体、SLEDAI-2K は非感染症群がより SLE の高活動性を反映していた。

非 SLE 患者における感染群と非感染群を比較したところ、感染症群で CRP、PCT が高値であり、eGFR はより低値であった。また内服薬は感染症群でステロイド及びメトトレキサートがより多かった。

Table 2. SLE 群の患者背景

	SLE without infection	SLE with infection	p-value
Patient number, n	22	13	
Female. n (%)	19 (86.4)	11 (84.6)	0.910
Age at onset	42〔28.5-51〕	58〔42-69.5〕	0.009**
Disease duration (day)	1275〔77-3961〕	4804〔3144-9818〕	0.018*
Laboratory data			
WBC	5850〔3600-8750〕	9700〔6750-13600〕	0.025*
CRP	1.36〔0.39-4.38〕	7.04〔2.81-14.82〕	0.001**
ESR	41〔28-54〕	68.5〔46-102〕	0.046*
PCT	0.141〔0.06-0.67〕	0.56〔0.16-15.05〕	0.037*
Cre	0.76〔0.48-0.92〕	1.0〔0.68-1.64〕	0.956
eGFR	74.5〔53.5-117.9〕	50〔31.35-68.95〕	0.485
Disease Activity			
C3	43〔32.5-65.5〕	105〔93-125〕	<0.0001**
C4	12〔4-18〕	27〔18-29〕	0.0016**
CH50	25〔12.5-41.0〕	53〔40-56〕	0.0017**
Anti ds-DNA antibody	14.95〔12-166.5〕	0	0.026*

SLEDAI-2K	21〔9-24.25〕	2〔0-2〕	<0.0001**
Past history treatment			
CS, n (%)	16 (72.7)	13 (100)	0.058
Average dose of CS	10〔3.75-31.25〕	7.5〔5- 10〕	0.240
Tacrolimus, n (%)	6 (27.3)	6 (46.2)	0.217
Methotrexate, n (%)	-	1 (7.7)	0.406
CY, n (%)	3 (13.6)	2 (15.4)	0.406
MMF, n (%)	2 (9.1)	1 (7.7)	0.542

全てのデータは中央値 [範囲] もしくは人数 (%) で示した。
SLE: Systemic lupus erythematosus; WBC: White blood cell; CRP: C-reactive protein; ESR: Erythrocyte sedimentation rate; PCT: Procalcitonin; Cre: Creatinine; eGFR: epidermal growth factor receptor; SLEDAI-2K: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity index 2000; CS: Corticosteroids; CY: Cyclophosphamide; MMF: Mycophenolate mofetil. ＊p-values <0.05. ＊＊p-values <0.01.

Table 3. 非 SLE 群の患者背景

	non-SLE without infection	non-SLE with infection	p-value
Patient number, n	39	33	
Female. n (%)	28 (87.5)	25 (75.8)	0.914
Age at onset	62 〔38- 68.5〕	70 〔47-77.5〕	0.089
Disease duration (day)	66 〔2- 1334〕	2336 〔445- 4089〕	<0.0001**
Laboratory data			
WBC	9400 〔6250- 15050〕	9500 〔6300- 14000〕	0.763
CRP	6.95 〔4.08- 10.90〕	10.99 〔6.13- 18.87〕	0.007**
ESR	74 〔61.5- 85.75〕	59.5 〔36.5- 82.75〕	0.170
PCT	0.034 〔0.034- 0.17〕	0.312 〔0.091- 3.68〕	0.029*
Cre	0.63 〔0.50- 0.72〕	0.72 〔0.49- 1.04〕	0.187
eGFR	86.4 〔68.05- 107.3〕	77.3 〔48.35- 95.5〕	0.019*
Disease Activity			
C3			
C4			
CH50			

Anti ds-DNA antibody			
SLEDAI-2K			
Past history treatment			
CS, n (%)	18 (50)	29(87.9)	0.0002**
Average dose of CS	0〔0- 15〕	5〔2.25-8.5〕	0.4254
Tacrolimus, n (%)	3(7.7)	5(15.2)	0.324
Methotrexate, n (%)	4(10.3)	13(39.4)	0.0041**
CY, n (%)	1(2.6)	3(9.1)	0.237
MMF, n (%)	-	-	

全てのデータは中央値 [範囲] もしくは人数 (%) で示した。
SLE: Systemic lupus erythematosus; WBC: White blood cell; CRP: C-reactive protein; ESR: Erythrocyte sedimentation rate; PCT: Procalcitonin; Cre: Creatinine; eGFR: epidermal growth factor receptor; SLEDAI-2K: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity index 2000; CS: Corticosteroids; CY: Cyclophosphamide; MMF: Mycophenolate mofetil. ＊p-values <0.05. ＊＊p-values <0.01.

5.3.5　SLE 患者の血漿プレセプシン値と疾患活動性の相関

SLE 患者における血漿 P-SEP 値と、その疾患活動性の相関関係について解析した。感染症群の血漿 P-SEP 値は SLE の疾患活動性マーカーである SLEDAI-2K と相関を示さなかった (r = -0.0458、p = 0.8818) (Figure 3A)。しかし非感染症群では、血漿 P-SEP 値は SLEDAI-2K と有意な正の相関を示した (r = 0.4801、p = 0.0237) (Figure 3B)。

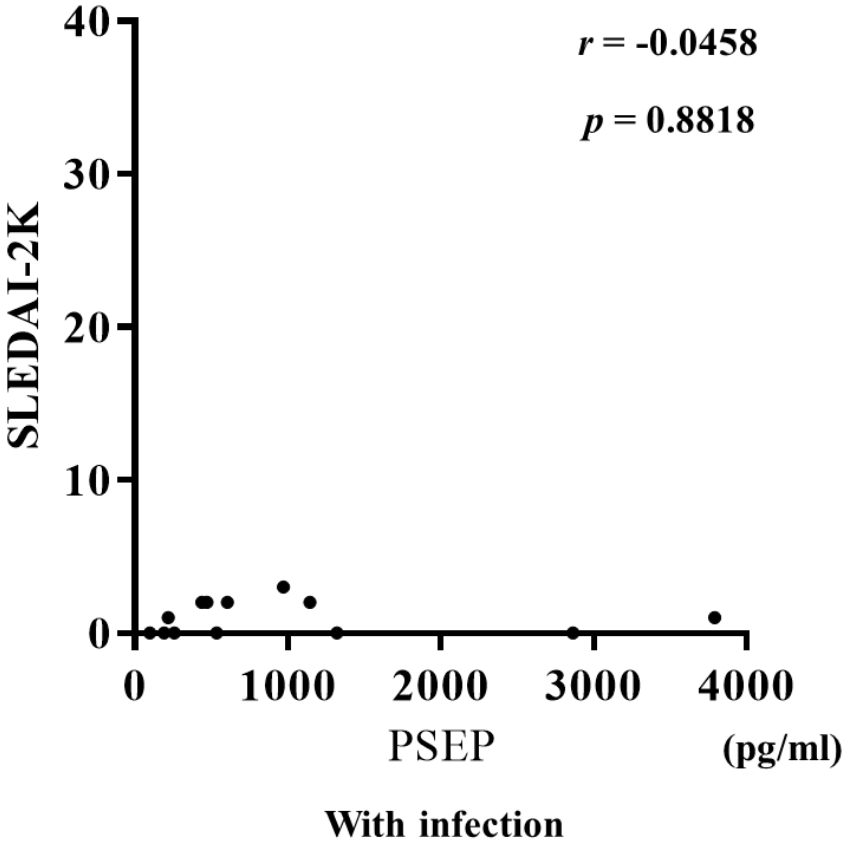

Figure 3A. SLE 患者における感染症群の血漿 P-SEP 値と SLEDAI-2K の相関
血漿 P-SEP 値は、CLIA 法による自動免疫分析装置 PATHFAST®を用いて測定した。血漿 P-SEP 測定時の SLEDAI-2K の相関を調べた。SLEDAI-2K: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity index 2000; PSEP: Presepsin. Spearman's rank-order correlation coefficient.

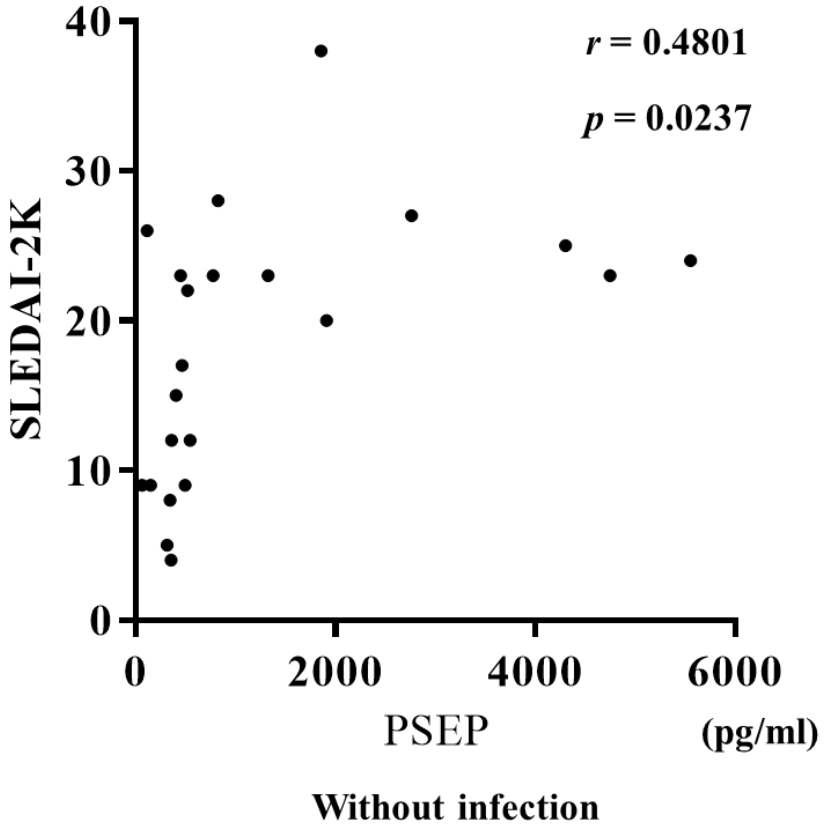

Figure 3B. SLE 患者における非感染症群の血漿 P-SEP 値と SLEDAI-2K の相関
血漿 P-SEP 値は、CLIA 法による自動免疫分析装置 PATHFAST®を用いて測定した。血漿 P-SEP 測定時の SLEDAI-2K の相関を調べた。SLEDAI-2K: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity index 2000; PSEP: Presepsin. *Spearman's rank-order correlation coefficient.

また SLE 患者における非感染症群の血漿 P-SEP 値と採血データの相関については Table 4 に示した。非感染症群 SLE 患者の血漿 P-SEP 値は、血清 C3 値 (r = -0.4454、p = 0.0430) と血清 CH50 値 (r = -0.4502、p = 0.0406)で有意な負の相関を示した。採血データでは、WBC (r = 0.5588、p = 0.0069)、CRP (r = 0.5259、p = 0.0119)、PCT (r = 0.6607、p = 0.0011) で有意な正の相関を認め、eGFR (r = -0.4801、p = 0.0237) で有意な負の相関を認めた。

Table 4. SLE 患者における非感染症群の血漿 P-SEP 値と採血データの相関

Clinical manifestations	PSEP in SLE without infection	
	r	*p*-value
Laboratory data		
WBC	0.5588	0.0069**
CRP	0.5259	0.0119*
ESR	0.0638	0.8211
PCT	0.6607	0.0011**
Cre	0.2983	0.1775
eGFR	-0.4984	0.0182*
Disease activity		
C3	-0.4454	0.0430*
C4	-0.4278	0.0530
CH50	-0.4502	0.0406*
Anti ds-DNA antibody	-0.2178	0.4178
SLEDAI-2K	0.4801	0.0237*

WBC: White blood cell; CRP: C-reactive protein; ESR: Erythrocyte sedimentation rate; PCT: Procalcitonin; Cre: Creatinine; eGFR: epidermal growth factor receptor; SLEDAI-2K: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity index 2000.

*p-values <0.05. **p-values <0.01. Spearman's rank-order correlation coefficient.

5.3.6　フォローアップスタディー

非感染症群の SLE 患者で、免疫抑制治療の開始前に血清 P-SEP 値が測定した 9 症例において、治療開始後の血清 P-SEP 値の推移をフォローしたものを Figure 4A に示した。その 9 症例において、治療効果による SLEDAI-2K の低下 (Figure 4B)に従い、血漿 P-SEP 値が低下することを確認した。

そのうちの 1 例の臨床経過を Figure 4C に示した。症例は 29 歳の女性で、肺胞出血、汎血球減少で当科紹介となった。上記症状と加え、蝶形紅斑、抗核抗体陽性、抗 ds-DNA 抗体陽性であることから SLE と診断した。この時の血漿 P-SEP 値は 1327 pg/ml と高値であった。ステロイドパルス療法、シクロホスファミド大量静注療法 (intravenous cyclophosphamide: IVCY) に加え、血漿交換療法を施行し、肺胞出血、汎血球減少は改善し、疾患活動性マーカーである補体 C3 値の上昇と抗 ds-DNA 抗体の低下を認めた。その後測定した血漿 P-SEP 値は、109 pg/ml と低値となった。

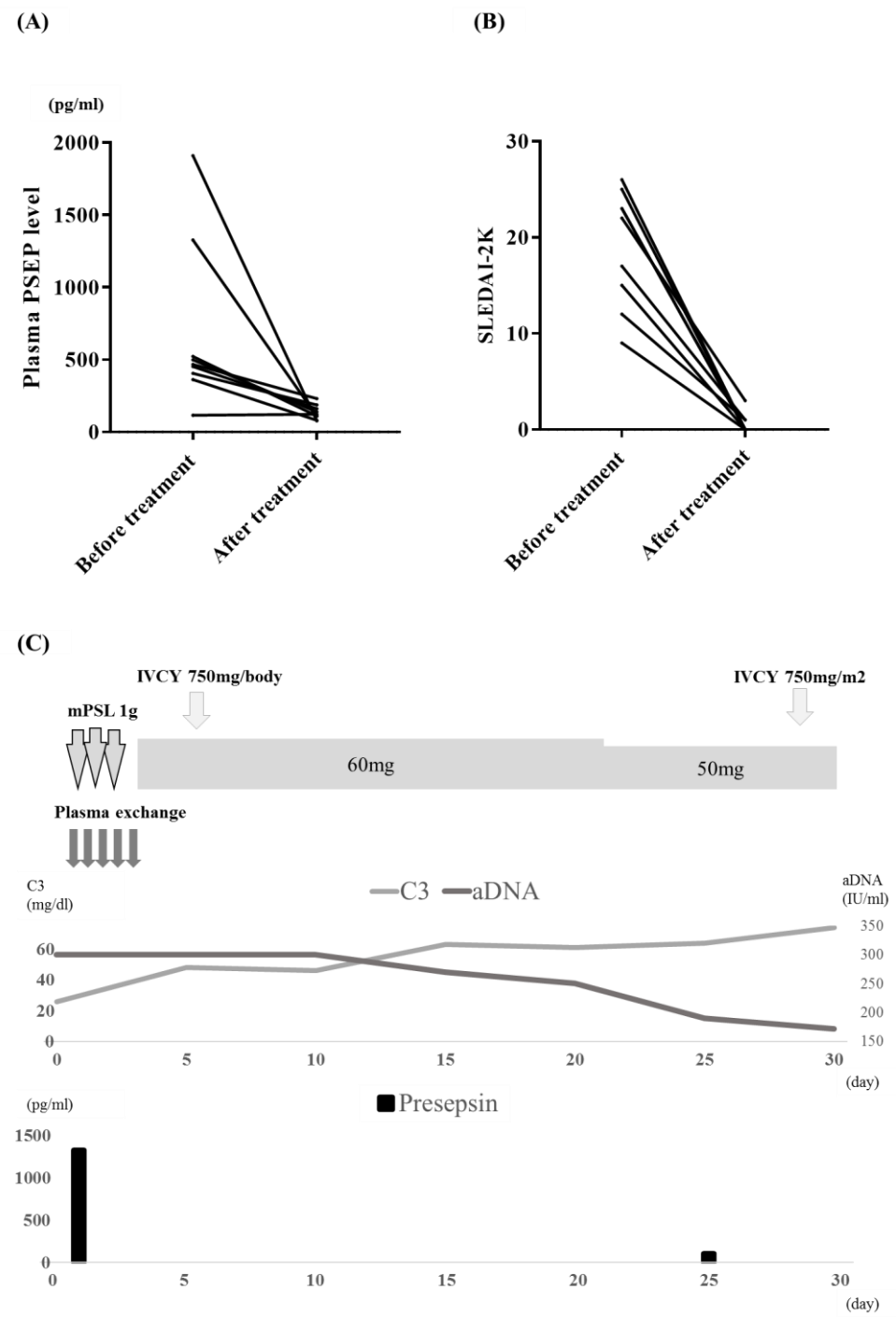

Figure 4. 治療介入による疾患活動性と血漿 P-SEP 値の変化

29 歳 SLE の女性。肺胞出血、汎血球減少に対してステロイドパルス療法、IVCY、血漿交換を施行した。疾患活動性の改善に伴い、血漿 P-SEP 値は 1327 pg/ml から 109 pg/ml まで低下した。PSEP: Presepsin; SLEDAI-2K: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity index 2000; mPSL: methylprednisolone; IVCY: intravenous cyclophosphamide.

5.4　考察

今回の横断研究は、自己免疫性疾患、特に SLE 患者における血漿 P-SEP の測定の意義を示した世界で初めての研究である。通常血漿 P-SEP 値は、背景でも述べたように、敗血症などの感染症患者の血中で高値を示すマーカーとして知られており、本研究でも非 SLE の自己免疫疾患患者は、細菌感染症を同定するために血漿 P-SEP 値は有用であった。しかし SLE 患者の血漿 P-SEP 値は、細菌感染症の有無に関わらず高値であった。さらにその血漿 P-SEP 値は、SLE の疾患活動性指標で用いられている SLEDAI-2K や血清補体価 (C3、CH50) と有意な相関関係があり、免疫抑制治療により、その値が改善することを示した。これら研究内容から SLE 患者の疾患活動性の評価、治療効果において、血漿 P-SEP は新規のバイオマーカーに成りえる可能性を示唆するものであった。

分子量 53-55kDa のグリコシル-ホスファチジルイノシトール結合型単鎖膜糖蛋白である CD14 は単球、マクロファージ、好中球の膜表面で発現しており、LPS (Lipopolysaccharide) に対する特異的高親和性受容体として働く(Ferrero and Goyert, 1988; Wright et al., 1990)。その CD14 は、膜結合型 CD14 (mCD14: membrane CD14)と可溶性 CD14 (sCD14: soluble CD14)の形態を持つ。sCD14 は mCD14 から切断された 2 つの異なる分子量 (49kDa 及び 55kDa)で検出される(Bazil and Strominger, 1991)。そしてそれら sCD14 は、細菌感染に応答して、内皮細胞、上皮細胞などの CD14 陰性細胞の免疫活性化を媒介する上で重要な役割を果たすことが知られている。

一方で P-SEP は 13kDa 形態を有するもので、炎症性ストレス下において、mCD14 ならびに他の sCD14 から切り離されて出てくる sCD14 のサブタイプ (sCD14-ST: sCD14- subtype) である。P-SEP の主な産生機序（Figure 5）として単球による細菌の貪食から、ライソゾーム酵素であるカテプシン D により mCD14 がリソソーム内で消化されることが大腸菌を用いた実験で証明されたが、LPS や TNF-α などの炎症性サイトカインのみの刺激では P-SEP の分泌が誘導できなかった。これより単球による貪食作用が炎症性サイトカイン刺激よりもより重要であることが分かった(Arai et al., 2015)。また現在、P-SEP の半減期は約 0.5-1 時間と短いが、腎代謝であることから、腎不全患者では P-SEP はより長い半減期を有することが分かっている(Nagata et al., 2015)。

SLE 患者では血漿 P-SEP 値がなぜ高値であるかに関して現時点で分かっていないが、いくつかの仮説が挙げられる。1 つは SLE 患者ではアポトーシスにおけるクリアランスレベルの低下が報告されており、これにより単球及び好中球の貪食能の促進により CD14 の取り込みが亢進する(Arai et al., 2015)。これをサ

ポートするように、SLE 患者では CD14 陽性細胞数及び各細胞の CD14 発現量が高い報告がある(Ziegler-Heitbrock et al., 2010; Ziegler-Heitbrock and Hofer, 2013)。2 つ目は SLE 患者では血清中のカテプシン D 活性が高く、これにより mCD14 のリソソーム内での消化、分解が亢進している可能性がある(Nockher et al., 1994; Phi et al., 1989)。最後に近年、SLE において好中球からの好中球細胞外トラップ(NETs: neutrophil extracellular traps)の分解能異常が報告されており、NETosis の悪循環により好中球による mCD14 の取り込みが亢進し P-SEP が産生されることも考えられる(Tsokos et al., 2016; Villanueva et al., 2011)。そして SLE における好中球による貪食作用の障害が、カテプシン D 活性と関連する報告もある(Wu et al., 2013)。

これまで感染症のマーカーとして、P-SEP 以前にプロカルシトニン（PCT）が測定されており、本研究でも PCT と P-SEP の違いについて検討した。PCT は甲状腺の C 細胞で産生されるカルシトニンの前駆タンパクであり、細菌感染や敗血症、エンドトキシンや炎症性サイトカインの刺激で、甲状腺以外の肝臓、肺、腎臓、筋肉など様々な臓器から産生される。今回の我々の研究で PCT は SLE 疾患活性および P-SEP と相関を示した。PCT は自己免疫性疾患の疾患活動性と相関する報告は過去に存在する(Buhaescu et al., 2010)。しかし SLE において血清 PCT 値は低く正常範囲内であることや疾患活動性との相関はないなどの否定的な報告も多く存在し(Bador et al., 2012; Eberhard et al., 1997; Lanoix et al., 2011; Quintana et al., 2008)、未だ controvertial な要素が強い。今回の我々のデータでも、P-SEP との相関は示しているものの、値自体は非常に低く、正常範囲内であった。一方で P-SEP は PCT と比較しても大きな変動範囲であり、免疫抑制治療により低下することからも、より SLE の疾患活動性指標として有用なマーカーであると考える。

本研究の limitation として、以下の項目が挙げられる。 1 つは対象患者数が少なかったことにより、血漿 P-SEP 値と SLE 患者における障害臓器別での解析が行うことが出来なかった。データでは示していないが、中枢性ループス、ループス腎炎、肺胞出血など重症臓器障害とされる症例においては、より血漿 P-SEP 値が高かったことからも、今後より多くのデータの集積が待たれる。2 つ目は、腎機能障害をもつ症例においては、血漿 P-SEP 値が上昇することが報告されているが(Kotera et al., 2014; Nagata et al., 2015)、現時点で確立された補正式などはなく、今回の研究において腎機能障害のある症例において血漿 P-SEP 値の調整は行うことが出来なかった。最後に今回の研究で、血漿 P-SEP が、現在日常診療で SLE の疾患活動性マーカーとして用いられている抗 ds-DNA 抗体や血清補体価 (C3、C4、CH50)に比べて、より有能なマーカーであるとは示していない。しかし中枢性ループスを発症した SLE 患者において、抗 ds-DNA 抗体が陰性 (< 12

IU / ml)であったが、血漿 P-SEP 値が 829 pg/ml と高値を示した患者が存在した。これからも血漿 P-SEP は、他の疾患活動性マーカーの変動が少ない、または疾患活動性マーカーの変動がない患者において、診断や疾患活動性評価の補助的な役割として有能な可能性がある。

本研究は血漿 P-SEP が SLE 患者に対して診断や疾患活動性を評価するにあたって、新たなバイオマーカーとして有用である可能性を証明した最初の報告であり、非常に意義のある結果であったと考える。しかし現在、SLE 患者の血漿 P-SEP 値がなぜ高値であるかに関しては、何も分かっておらず、これらの研究をさらに進めることが SLE の病態を明らかにすることも可能であると考える。

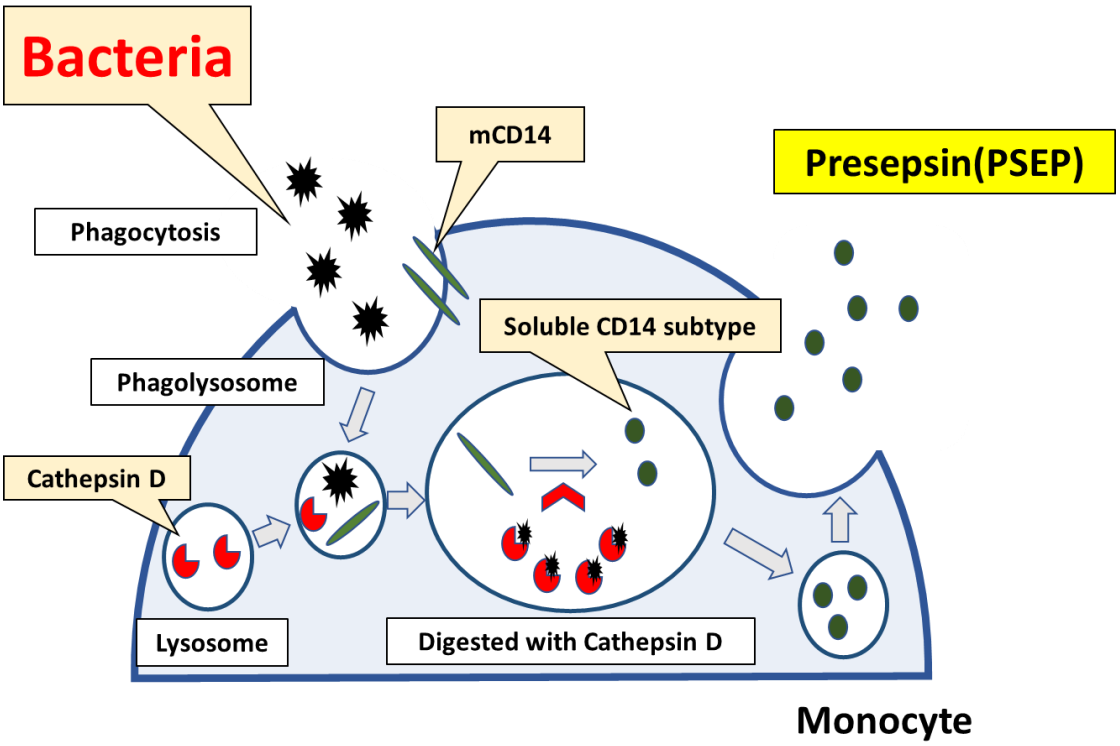

Figure 5. P-SEP 産生の機序.

感染に伴い単球が細菌等を貪食する際に mCD14 を同時に細胞内に取り込み、ライソゾーム内でカテプシン D を代表とするアスパラギン酸プロテアーゼによって取り込まれた CD14 が消化分解され、そのうち分子量 13kDa の可溶性分画が soluble CD14 subtype 即ち P-SEP となり血中に放出される。

5.5　結語

自己免疫性疾患患者における血漿 P-SEP 値は、SLE 患者で上昇しており、さらに SLE 患者の血漿 P-SEP 値は SLE の疾患活動性に相関していた。

6. 第二章

スタチンの関節炎抑制効果と機序の検討

6.1　背景

第一章では難治性自己免疫疾患の 1 つである全身性エリテマトーデスにおける新規の疾患活動性マーカーとして血漿プレセプシンの有用性を示した。第二章では難治性自己免疫疾患の代表疾患である関節リウマチ(rheumatoid arthritis: RA)の新規治療薬に関して検討する。

RA は、全人口の約 0.5-1%が罹患している慢性多発性関節炎を来す自己免疫疾患であり(McInnes and Schett, 2011)、滑膜の肥厚・増殖に伴う骨・軟骨破壊を特徴とする。現在、その病態の完全なる解明には至っていないが、関節滑膜局所で活性化されたマクロファージと T 細胞から産生される TNF-α、IL-6、IL-17 などの炎症性サイトカインが非常に重要な役割を担っており(Miossec and Kolls, 2012)、それらが receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)などを誘導し、破骨細胞を活性化することで骨破壊が進行すると言われている。また RA は rheumatoid factor (RF) や anti-citrullinated proteins antibodies (ACPA)などの特異的自己抗体を産生することも大きな特徴である(Burmester et al., 2014)。治療戦略においては、TNF - α、IL - 6、CTLA - 4 を標的とする生物学的製剤の登場で、RA の寛解が可能となった(Wang et al., 2014)。しかし現在においても、より高額になった治療費、生物学的製剤・免疫抑制薬による副作用、それら治療抵抗性を含めた難治例などの問題は山積しており、より安価かつ安全でより効果のある新規治療薬の開発が求められている。

今回我々はスタチンに着目した。スタチンとは HMG-CoA 還元酵素阻害薬であり、メバロン酸代謝経路を阻害して内因性コレステロールの合成を低下させ、肝臓での LDL (low-density lipoprotein) 受容体の発現を高めて、血中コレステロールを低下させる作用を持つ。これより現在の一般臨床で、脂質異常症の治療薬として使用され、動脈硬化性疾患の一次及び二次予防において、最も重要な薬剤となっている。またスタチンは近年の研究によって、脂質プロファイルの改善以外に抗炎症効果、血管内皮障害の修復、抗血栓効果などの多面的効果 (pleiotropic effect) を有していることが報告され注目を集めている(DuBroff and de Lorgeril, 2015)。

RA におけるスタチンの効果に関しても、いくつかの後ろ向きコホート研究が行われ、有用である可能性が示唆されている(Chodick et al., 2010; Das et al., 2015; McCarey et al., 2004)。その免疫学的機序としては、スタチンが interferon (IFN) - αによる抗原提示細胞上の major histocompatibility complex (MHC) classⅡ発現を直接阻害する(Kwak et al., 2000)、また接着分子である leukocyte function antigen (LFA)-1 とそのリガンドである intracellular adhesion molecule (ICAM)- 1 の結合を

阻害し炎症細胞の細胞間接着や遊走能を抑制する(Dinarello, 2010)など様々な報告がされているが、一定の見解には至っていない。

6.2　目的

スタチンの関節炎抑制効果を動物モデルで明らかにし、その機序を解明することを目的にした。

6.3　関節炎自然発症型モデルラットに対する
スタチンの関節炎抑制効果

6.3.1　はじめに

6.3.1.1　関節炎モデル動物に対するスタチン製剤の有効性

スタチンが抗炎症効果を示した既報に基づき、関節炎モデル動物を用いた *in vivo* でのスタチンの関節炎抑制効果について検討した。

Carmen らは adjuvant-induced arthritis (AIA)ラットを非内服群、シンバスタチン内服群、エゼチミブ内服群、シンバスタチンとエゼチニブ併用内服群に分けて、滑膜における炎症細胞浸潤や IL - 1 β や IL – 17 などの炎症性サイトカインを比較したところ、シンバスタチンや併用群で有意に炎症細胞浸潤や炎症性サイトカインが低かったことを報告した(Barbosa et al., 2017)。また Limi らも collagen-induced arthritis (CIA)ラットを用いて、同様にスタチンが炎症性サイトカインを低下させたと報告した(Mathew et al., 2017)。しかし、スタチンの関節炎抑制機序や免疫学的影響に関しては不明であり、自然発症型の関節炎モデル動物での検証も報告されていない。

6.3.1.2　env-pX ラット

env-pX ラットは、ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (human T-cell leukemia virus type I: HTLV-I) の主な病原因子である p40Tax をコードする遺伝子 (env-pX 遺伝子) を導入したトランスジェニックラットである。HTLV-1 の構造タンパクは発現せず、HTLV-1 感染モデルというよりは、p40Tax 過剰発現による細胞レベルでの転写異常モデルであり、表現型として関節炎や非血管炎性血栓症、皮膚炎、唾液腺炎など多彩な症状を呈し、また血液中に抗核抗体や RF、抗 DNA 抗体など種々の自己抗体が検出され、自然発症型膠原病モデルラットとして知られている(Sugaya et al., 2002; Yamazaki et al., 1997; Yamazaki et al., 1998)。

そこで、env-pX ラットにフルバスタチンを投与し、関節炎抑制効果と免疫学的変化について検討した。

6.3.2　方法

以下に記載する動物実験は、北海道大学の遺伝子組換え実験等安全委員会の承認 (承認番号: 2014-066) ならびに動物実験委員会の承認 (承認番号: 15-0034) のもと、「北海道大学動物実験に関する規程」に従って実施した。

6.3.2.1　試薬の作成

D-(+)-グルコース (ナカライテスク、京都、日本) を滅菌蒸留水 (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) で溶解し、5%ブドウ糖液を作成した。またその 5%ブドウ糖液でフルバスタチン (富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本) を溶解し、4 μg/ml の濃度に調整した。

6.3.2.2　研究デザイン

本研究では 6-8 週齢の肉眼的関節腫脹を伴わない、オスの env-pX ラットを用いた。11 匹の env-pX ラットのうち、ランダムに選んだ 6 匹にフルバスタチン 4 μg/ml (500 μg/kg) 溶液を 50ml、30 日間連続経口摂取させた。コントロール群として残りの 5 匹には、5%ブドウ糖液 50ml を同様に 30 日間連続経口摂取させた。

Day 0 (薬剤投与前)から Day 30 まで継続的に env-pX ラットの足関節の腫脹の有無を肉眼的に観察した。また Day 0、Day 10、Day 20、Day 30 に RF の測定と関節超音波検査を行った。Day 30 の観察終了後に、麻酔下の全採血により安楽死させた後に、足関節を採取し組織学的検討を行った。

6.3.2.3　血液採取とリウマトイド因子の測定

Day 0 (薬剤投与前)、Day 10、Day 20、Day 30 に尾部より採血を行い、4℃で直ちに遠心分離し、使用まで-80℃で保存した。採取した血漿を用いて、rheumatoid arthritis particle aggregation (RAPA; 富士レビオ、東京、日本)の測定を行った。

6.3.2.4　env-pX ラットにおける関節超音波検査

Day 0 (薬剤投与前)、Day 10、Day 20、Day 30 に env-pX ラットを吸入麻酔下で鎮静、臥位の状態にし、剃毛した両側の足関節を超音波で観察した。超音波検査は、臨床経験年数 8 年及び 32 年の関節超音波技師 2 人が実施した。観察に用いた超音波装置は Logiq e Premium（GE ヘルスケアジャパン、東京、日本）で、L10-22 RS プローブ（最大 22MHz)、パワードプラ（power Doppler: PD）のフレームレートは 7 frame/s、パルス繰返し周波数（pulse repetition frequency: PRF）は 3.7 cm/s であった。

最初にグレースケール (Gray Scale: GS)で、ラットの足関節 (脛骨と中足骨間部)を描出し、次に PD を用いて同部滑膜内の血流シグナルを検出した。最も強い血流シグナルが検出された画像を静止画像として保存した。

保存した画像について、各ラットの血流シグナルと滑膜肥厚を Image J 1.50i を用いて定量評価した。具体的には、関節部の滑膜を手作業で範囲化し、関心領域 (region of Interest: ROI)とした。滑膜肥厚は ROI 内の総ピクセルをカウントした。血流シグナルは、ROI 内のノイズを除いた PD シグナルの合計をピクセル数でカウントした。また、血流シグナル、滑膜肥厚いずれも Day 0 の値を基準とした変化率で示した。

6.3.2.5　足関節の組織採取と組織学的検討

足関節組織は 10%ホルマリンで 24 時間以上固定した。脱灰した後、長軸方向に半割し、パラフィン包埋を行った。5 μm の切片を作成し、Hematoxylin- Eosin 染色を行った。

組織学的検討は既報(Williams et al., 1992)に従い、滑膜炎の 3 つの組織学的特徴 (①炎症細胞浸潤、②滑膜肥厚、③骨びらん)について、4 段階 (0 =正常、 1 =軽度、 2 =中等度、 3 =重度) のスコア化 (最大 9 点) を行い評価した。このスコアリングは 11 匹の env-pX ラットにおける、22 の足関節で行った。

6.3.2.6　統計分析

正規分布が仮定できない連続変数は中央値　[範囲] で示し、カテゴリー変数は実数値もしくはパーセンテージで示した。連続変数の群間比較は Wilcoxon test または Kruskal-Wallis test を用いて、カテゴリー変数の群間比較は chi-square test を用いた。すべての p 値は 0.05 未満を統計学的有意とした。統計解析は JMP Pro software (ver. 12.0; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) と GraphPad Prism software (ver. 7.02; GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA) を用いて行った。

6.3.3　結果

6.3.3.1　関節腫脹の経時的肉眼的評価

Day 0 から Day 30 までのフルバスタチン投与群 (n = 6; 総関節数= 12) とコントロール群 (n = 5; 総関節数= 10) で経時的に足関節腫脹の有無を観察したものを Figure 6 に示した。

フルバスタチン投与群では、コントロール群と比較して足関節の腫脹が抑制された。その差は Day 18 以降において有意であった。

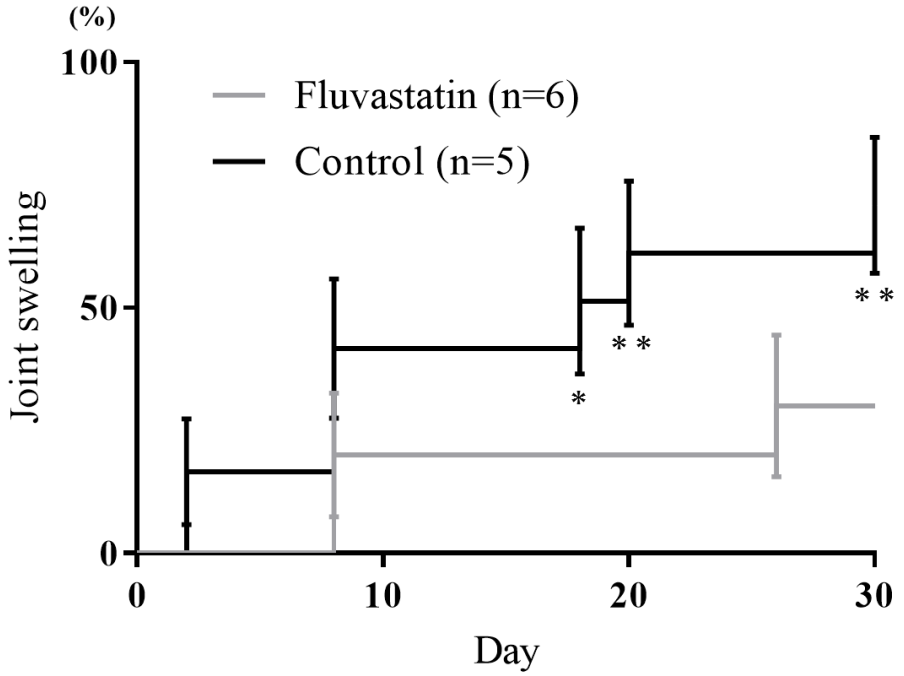

Figure 6. 関節腫脹の経時的肉眼的評価

*p <0.05. **p <0.01.

6.3.3.2　リウマトイド因子の抗体価

経時的な採血が可能であったフルバスタチン投与群 (n=5) とコントロール群(n=4)の血漿を用いて RAPA を測定した結果を Table 5 に示した。RAPA の陽性率(80 倍以上)は、フルバスタチン投与群とコントロール群で統計学的に有意な差は認めなかったが($p = 0.206$)、フルバスタチン投与群はコントロール群に比べて、抗体力価が低い傾向にあった。

Table 5. RAPA の抗体力価

		Day 0	Day 10	Day 20	Day 30
Fluvastatin	No.1	0	0	0	0
	No.2	0	0	0	0
	No.3	0	0	×80	×160
	No.4	0	0	0	0
	No.5	0	0	0	0
Control	No.1	0	0	0	0
	No.2	0	0	×80	×1280
	No.3	0	0	×80	×640
	No.4	0	0	×640	×640

フルバスタチン投与群 (n=5) とコントロール群 (n=4)の血漿において、RAPA 法を用いてリウマトイド因子を測定した。

6.3.3.3　関節超音波検査による滑膜炎の経時的評価

Day 0 と Day 30 の代表的な env-pX ラットの足関節の写真とその関節超音波検査における滑膜 (ROI)と血流シグナルを Figure 7 に示した。

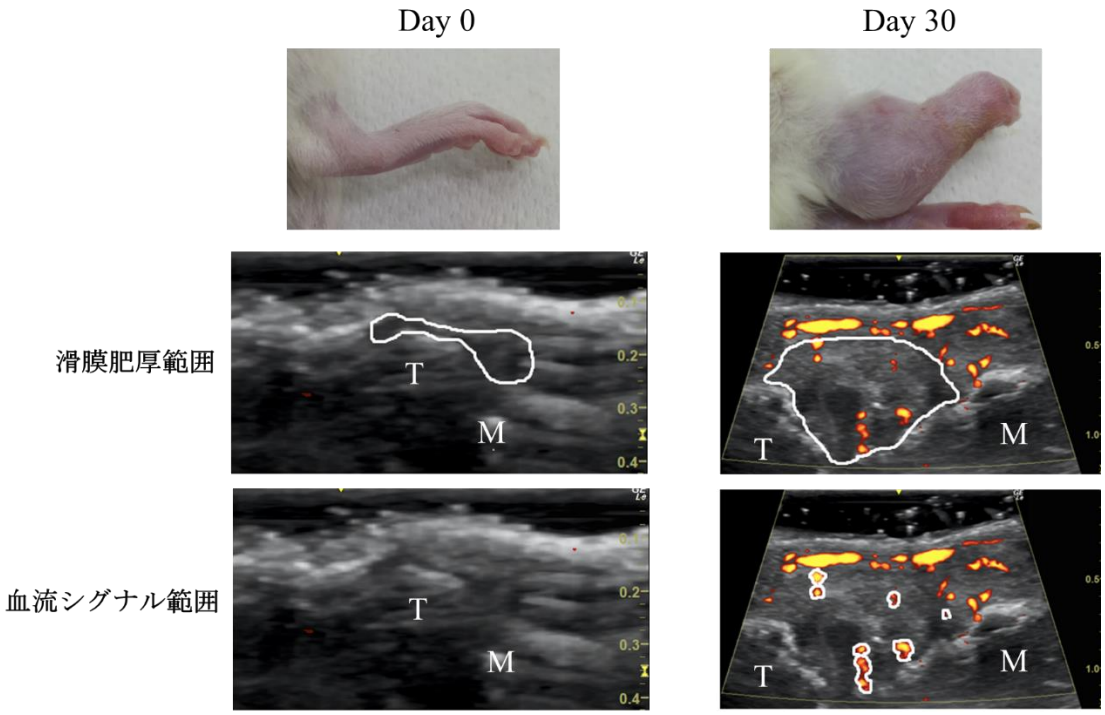

Figure 7. 足関節の肉眼写真と関節超音波における滑膜 (ROI)と血流シグナル
関節超音波装置 Logiq e Premium を用いて env-pX ラット (観察期間 Day 0 と Day 30)の足関節を観察した。白色で範囲化したものは滑膜肥厚部と異常血流シグナル部を示す。T: Tibia. M: Metatarsal bone.

フルバスタチン投与群とコントロール群における代表的な関節超音波画像を Figure 8 に示した。

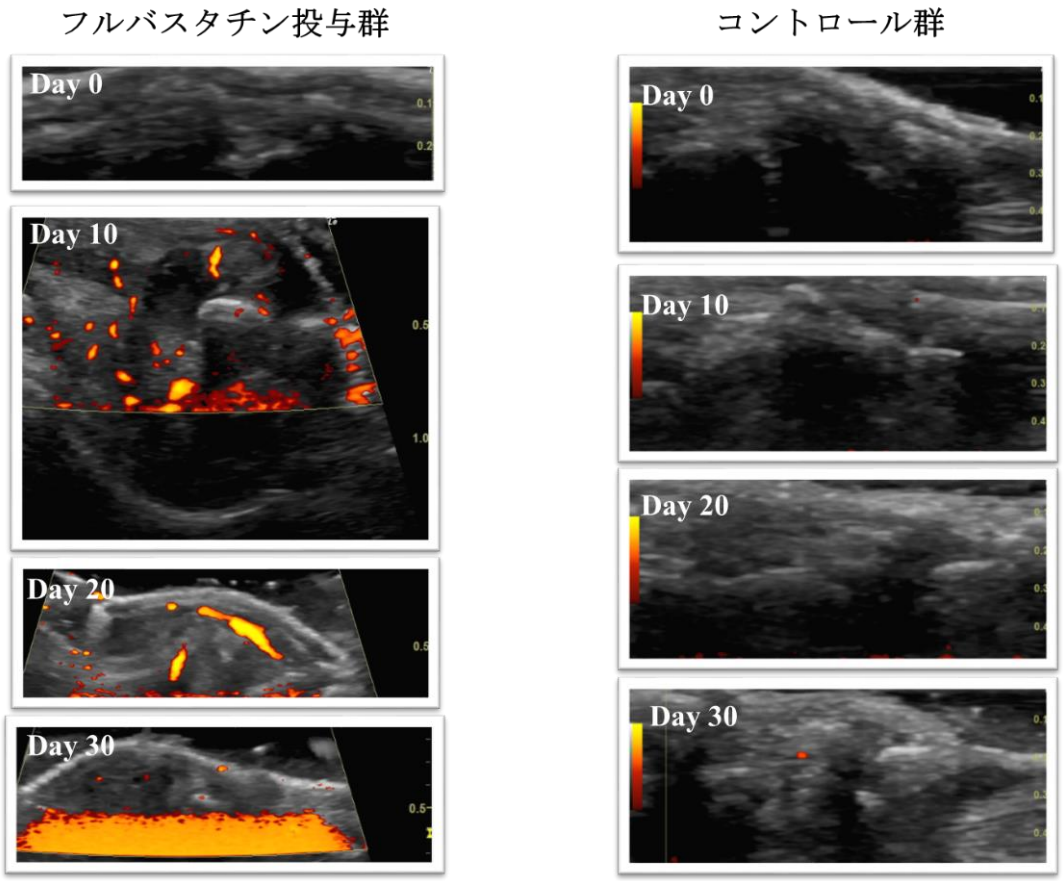

Figure 8. 関節超音波検査における滑膜炎の経時的評価

関節超音波装置 Logiq e Premium を用いてフルバスタチン投与群とコントロール群の足関節を Day 0、Day 10、Day 20、Day 30 に観察した。

血流シグナルについて、フルバスタチン投与群がコントロール群に比べて有意に改善を認めた (Figure 9A, p=0.0276)。滑膜肥厚に関しては両群に有意差はなかったが (p=0.1169)、フルバスタチン投与群の方が改善している傾向であった (Figure 9B)。

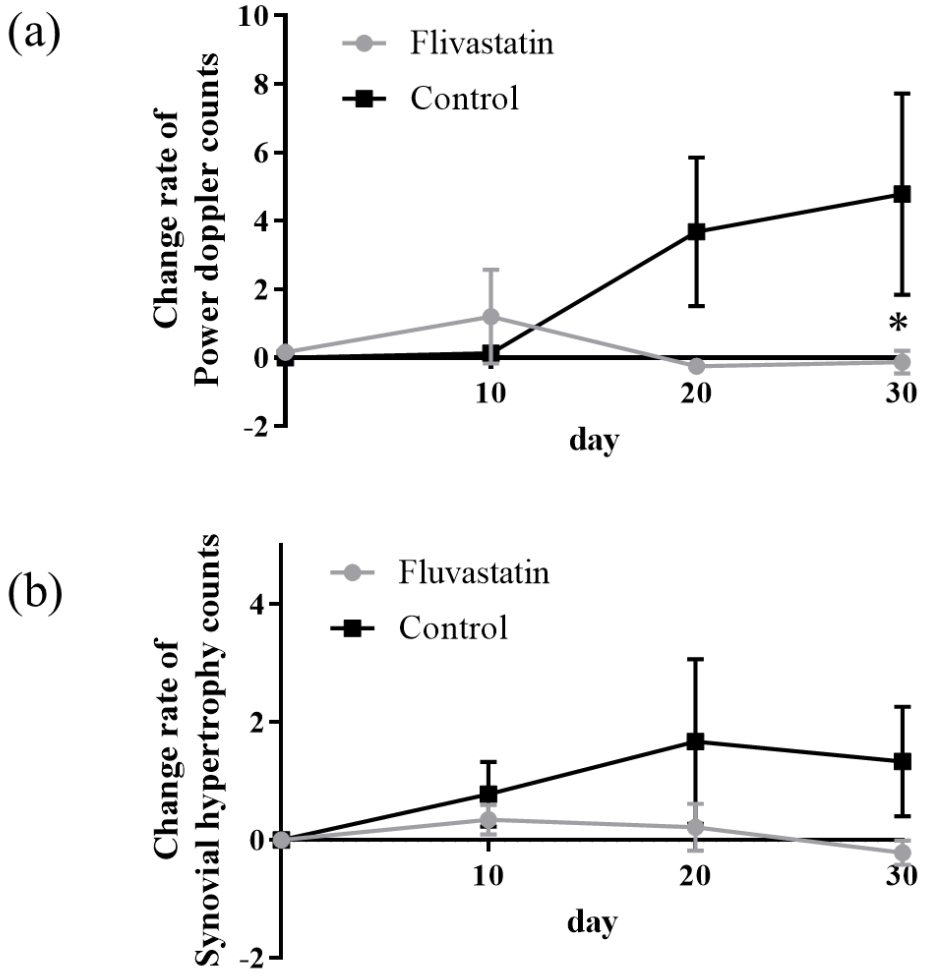

Figure 9. 関節超音波検査における血流シグナルと滑膜肥厚の変化率
関節超音波検査で観察された血流シグナルと滑膜肥厚の範囲化したものを ROI 内の総ピクセル数としてカウントし、Day 0 のピクセル値を基準として血流シグナルと滑膜肥厚の改善率をそのピクセル値の変化率として示した。*p <0.05.

6.3.3.4　組織学的評価

炎症細胞浸潤、滑膜肥厚、骨びらんについて、4 段階 (0 =正常、 1 =軽度、 2 =中等度、 3 =重度) の各スコアに相当する画像を Figure 10 に示した。

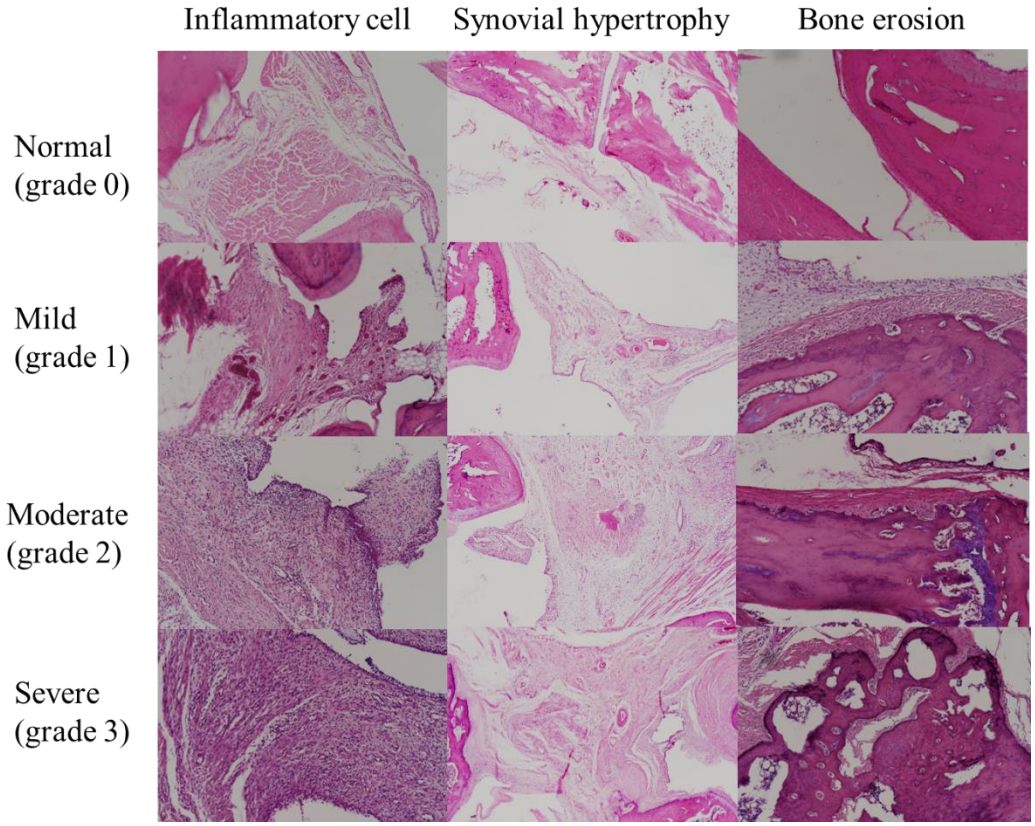

Figure 10. 炎症細胞浸潤、滑膜肥厚、骨びらんの組織学的スコア
env-pX ラットの足関節組織を 10%ホルマリンで 24 時間以上固定した。脱灰した後、長軸方向に半割し、パラフィン包埋を行った。5 μm の切片を作成し、Hematoxylin- Eosin 染色を行った。

フルバスタチン投与群とコントロール群における組織学的スコアリングを Figure 11 に示した。炎症細胞浸潤、滑膜肥厚、骨びらん、その合計スコアのいずれにおいても、フルバスタチン投与群はコントロール群に比べてスコアが有意に低値であった (炎症細胞浸潤: フルバスタチン投与群 1.0 [0.25-1.0] vs コントロール群 2.0 [1.0-2.0]、p = 0.004、滑膜肥厚: フルバスタチン投与群 1.0 [0-1.0] vs コントロール群 2.5 [1.0-3.0]、p = 0.0009、骨びらん: フルバスタチン投与群 0.25 [0-1.0] vs コントロール群 2.5 [1.0-3.0]、p = 0.0123、合計スコア: フルバスタチン投与群 3.0 [0.5-4.0] vs コントロール群 7.0 [3.0-8.0]、p = 0.0013)。

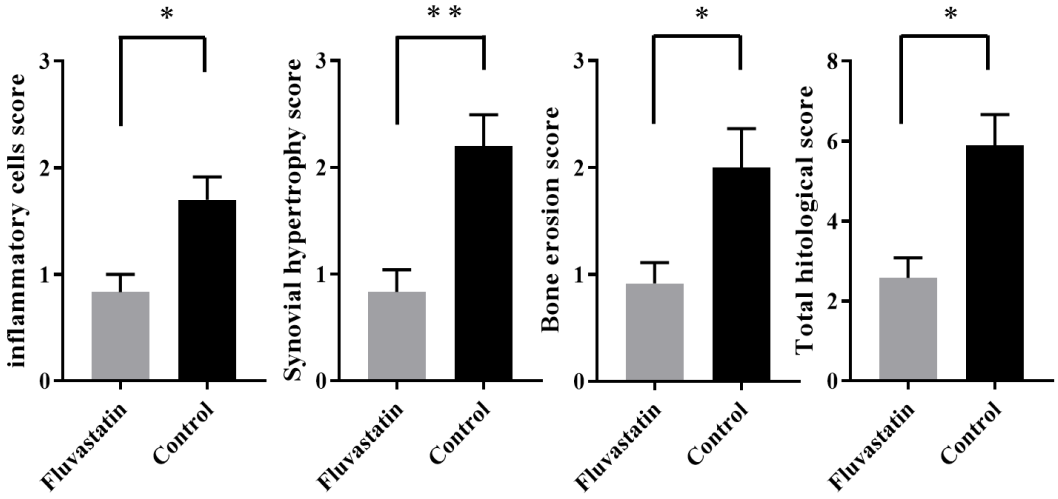

Figure 11. 炎症細胞浸潤、滑膜肥厚、骨びらん、合計の組織学的スコア
フルバスタチン投与群とコントロール群の組織学的スコアを比較した。*p＜0.05, **p＜0.001.

6.3.4　考察

今回の研究は、自然発症型の関節炎モデルラットを用いてフルバスタチンの関節炎抑制効果を確認することを目的とした。結果は、フルバスタチン投与群はコントロール群と比較して、RAPA の陽性率が低い傾向を示し、関節腫脹の肉眼的評価、組織学的評価において、有意に関節炎の発症を予防した。さらに、滑膜炎を経時的に評価するために本研究では関節超音波を用いた。滑膜内血流シグナルの増加率は、フルバスタチン群で有意に低いことを示した。以上の結果からフルバスタチンの関節炎に対する抗炎症効果と免疫学的効果を *in vivo* で確認することが出来た。

本研究では env-pX ラットを用いた。既報では、AIA ラットや CIA ラットにスタチンを投与し、炎症性サイトカインや関節炎スコアなどの改善が認められている(Barbosa et al., 2017; Dinarello, 2010)。しかし、自然発症型関節炎モデル動物を用い、かつ経時的に滑膜炎を評価した報告はない。env-pX ラットは、抗核抗体、RF などの様々な自己抗体を産生する。また、滑膜炎が自然発症する以外にも、血管炎、筋炎、心筋炎、皮膚炎など様々な病変を呈し、AIA ラットや CIA ラットなどの誘導モデルに比べて、よりヒトの RA に近い病態を示すと考えられる。

加えて、本研究では滑膜炎の程度を経時的、低コストでより安全に評価するために、関節超音波検査を行った。動物実験レベルでは、心臓や肝臓などの容積の大きい臓器において超音波検査の施行は可能であるが、小動物の足関節を超音波で評価した報告はほとんどなく、今までの装置技術では解像度も低かった(Clavel et al., 2008; Liao et al., 2016)。近年の関節超音波技術の進歩は著しく、高い周波数のまま、motion artifact を低く抑え、より明瞭に imaging することが可能となった。

スタチンはメバロン酸代謝経路における HMG-CoA 還元酵素を阻害し、内因性コレステロールの生合成を低下させることで、肝臓での LDL 受容体の発現が高まり、細胞内への LDL の取り込みは亢進し、血中コレステロールを低下させる作用を持つ。実臨床において、現時点でスタチンは脂質異常症に対してのみ使用されている。しかし、近年の研究において、スタチンは脂質プロファイルの改善に関連するものとは独立した多面的効果 (pleiotropic effect)を有していることが多く報告され、注目を集めている(Bedi et al., 2016; DuBroff and de Lorgeril, 2015)。具体的には、抗炎症作用、血管内皮機能改善作用、抗酸化作用、血小板凝集抑制作用など様々な作用が想定されており、脳・心筋梗塞、慢性腎臓病、骨粗鬆症、認知症、気管支喘息や悪性腫瘍など多岐にわたる疾患で、その有用性が検討され

ている(Deakin et al., 2003; Li et al., 2005; Mahajan and Dhawan, 2010; Reiss and Wirkowski, 2007; Vaughan, 2003; Yagi et al., 2008)。それらの pleotropic effect の機序として、スタチンがメバロン酸経路の下流に存在するゲラニルゲラニルピロリン酸 (geranylgeranyl pyrophosphate: GGPP)の産生を抑制することで、低分子量 G 蛋白のイソプレニル化を阻害することが考えられている(Brown et al., 2006)。そして RhoA、Rac1、Cdc42 などに代表される低分子量 G 蛋白は、細胞の形態形成や運動性を制御するシグナル伝達の中心的な役割を担うとともに、細胞の生存・増殖にも強く影響を及ぼし、上記のような pleotropic effect を媒介すると考えられている(Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997) (Figure 12)。

これらの知見から、スタチンが RA の新規治療薬になる可能性が考えられ、過去に海外でランダム化比較試験が行われた。この試験では、RA 患者において、アトルバスタチン内服群ではプラセボ群と比較して、腫脹関節 ($p = 0.0058$)、CRP ($p < 0.0001$)、RA の疾患活動性 ($p = 0.004$)が有意に改善したと報告している(McCarey et al., 2004)。その後、同様にスタチンの RA における効果の報告はいくつか存在する(Chodick et al., 2010; Das et al., 2015)。その一方で、スタチンが RA の疾患活動性に影響を及ぼさないという報告があるのも事実である(Akiyama et al., 2015)。このように臨床研究において、RA に対するスタチンの効果は未確定である。

スタチンが持つ関節炎抑制効果の機序に関して、未だ一定の見解は得られていないが、in vitro において、いくつかの仮説が報告されている。ひとつはスタチンが GGPP 及び Rho キナーゼ経路をブロックすることで、ミトコンドリアにおけるカスパーゼ３活性が亢進し、増殖した滑膜細胞にアポトーシスが誘導されるとするものである(Nagashima et al., 2006; Nanke et al., 2009)。ふたつ目は培養滑膜細胞に Rho キナーゼ阻害薬を添加すると NF (nuclear factor) - κ B 経路及び TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 などの炎症性サイトカインの産生が低下するとの報告があることから(He et al., 2008; Xu et al., 2006)、Rho キナーゼ活性を低下させるスタチンが滑膜細胞からの炎症性サイトカインを低下させるとするものである。最後に Rho キナーゼが転写因子である IRF (interferon regulatory factor) 4 のリン酸化に関与し、免疫グロブリンのクラススイッチや形質細胞への分化の調節を担っていることから(Pernis et al., 2016)、Rho キナーゼ活性を低下させるスタチンが自己抗体の産生に対して抑制的に働くとするものである。これらのことから、スタチンの関節炎抑制機序に低分子量 G 蛋白のひとつである Rho が重要であることが推測される (Figure 13)。

本研究の limitation として、以下が挙げられる。ひとつは、使用できる env-pX ラット数に制限があり、実験対象数が少なかったことである。これによりフルバスタチンの容量別での検討が出来なかった。今回使用した容量は 500μg/kg/day で

あり、これは患者に対してわが国で使用できる保険適用の最大量を、ラットの体表面積に換算して算出した容量である。もうひとつは、本研究で使用したスタチンがフルバスタチンのみであることである。現在実臨床で使用されているスタチンは 6 種類あり、フルバスタチン以外のスタチンにも同様の効果があるかどうかに関しては不明であり、今後の検討課題となる。本研究でフルバスタチンを選択した理由は、細胞内への取り込みが可能な脂溶性物質であること、仮に実臨床で使用することになった場合、脂質異常のない患者でも使用しやすいスタンダードスタチンであること、そして他疾患を含め pleotropic effect の報告が他のスタチンに比べて多かったことである。

本研究の結果は、スタチンにおける免疫調整作用と抗炎症効果から関節炎を抑制することを明らかにしたことで、他の既報を肯定する新たなエビデンスとして非常に意義のあるものであると考える。またラットの関節超音波検査を施行したことも、小動物の関節炎モデルを用いた研究の新たなツールとなり、RA の新しい治療薬の効能評価及び更なる生理学検査の開発に繋がる可能性があると考える。

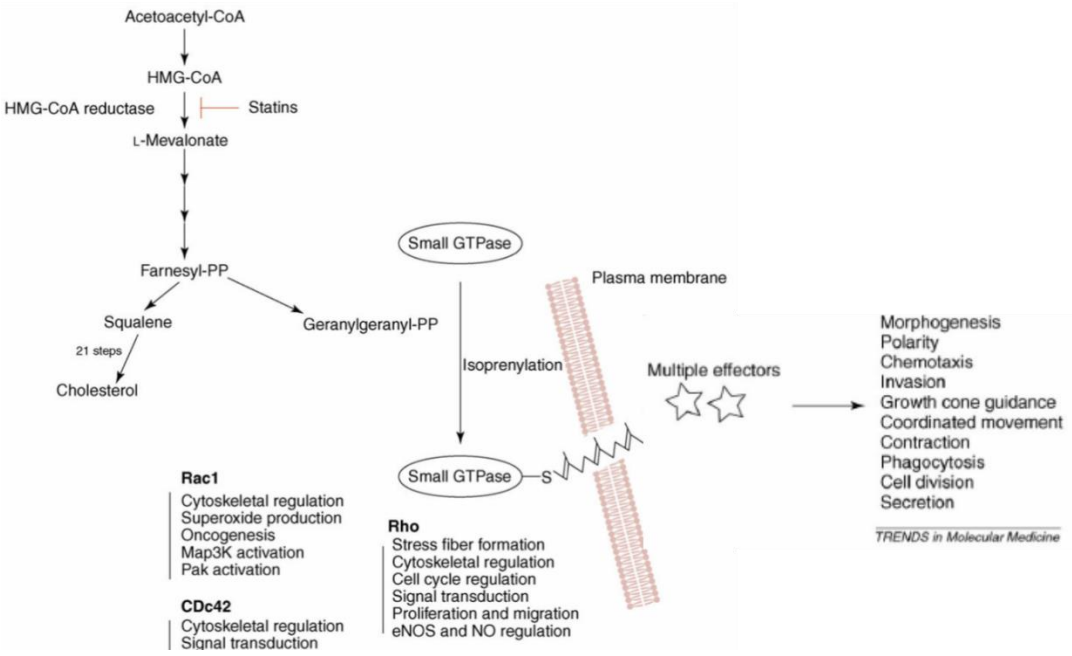

Figure 12. スタチンによる pleotropic effect の機序

スタチンが HMG-CoA 還元酵素を阻害することで、その下流に存在する GGPP の産生を抑制し、細胞の形態形成や運動性を制御するシグナル伝達の中心的な役割を担う低分子量 G 蛋白のイソプレニル化を阻害する。これにより低分子量 G 蛋白の活性を抑制し、多面的効果 (pleotropic effect) を呈すると考えられている。

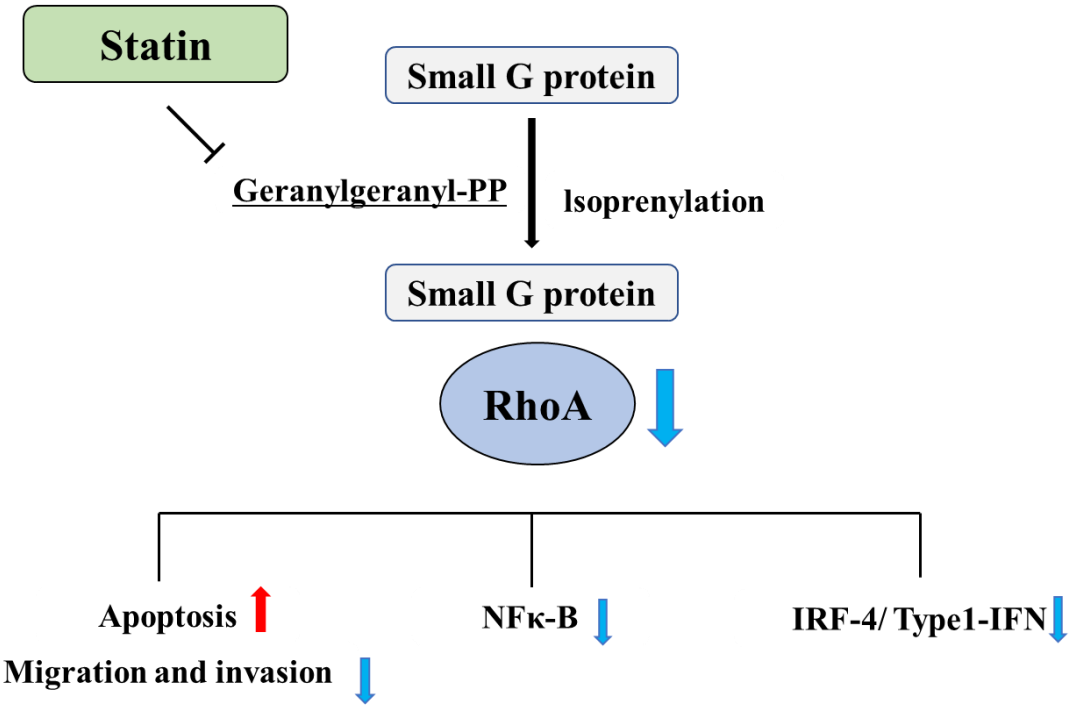

Figure 13. スタチンにおける関節炎抑制効果の仮説

スタチンが低分子量 G 蛋白 Rho 活性を抑制することで、増殖した滑膜細胞に対するアポトーシスの誘導や、NF-κB 経路及び TNF-α、IL-1β、IL-6 などの炎症性サイトカインの産生低下、さらに転写因子である IRF 4 のリン酸化の制御から、免疫グロブリンのクラススイッチや形質細胞への分化を抑制させて、自己抗体産生を低下させる。

6.4　結語

env-pX ラットを用いた *in vivo* の検討において、フルバスタチンの関節炎抑制効果を認めた。

7. 結論

第一章では自己免疫疾患患者における血漿 P-SEP 値測定を行い、SLE 患者の血漿 P-SEP 値が有意に上昇しており、SLE の疾患活動性と血漿 P-SEP 値は相関していたことから、血漿 P-SEP 値は SLE の新たな診断、治療マーカーの候補となる可能性が考えられた。第二章では関節炎モデルラットを用いた *in vivo* の実験により、フルバスタチン投与により関節炎を抑制することを示した。しかしスタチンの関節炎抑制機序の解明は未だ不十分であり、エビデンスが不十分なことからも、関節炎の治療薬として用いられていないが、今後さらなる原因究明やエビデンスの構築がなされれば、RA の新規治療薬候補となる可能性が考えられる。

本研究で得られたこれらの結果は、今後さらに継続的、長期的に検討していく必要があるが、現在、自己免疫疾患の難治性病態に苦しむ患者の一助となっていくことを願う。

8. 謝辞

本論文は筆者が北海道大学大学院医学院 内科学分野 免疫・代謝内科学教室博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。同教室、渥美達也教授には指導教官として本研究の実施の機会を与えていただき、その遂行にあたって終始、御指導をいただきました。ここに深謝の意を表します。また北海道大学大学院保健科学研究院 保健科学部門 病態解析学分野、石津明洋教授には第二章の基礎研究の遂行にあたり、終始、丁寧かつ熱心に御指導、適切な御助言をいただきました。ここに心より深く感謝の意を表します。

第一章のプレセプシンの研究につきましては、藤枝雄一郎助教に本研究指導の他にも学会発表におけるプレゼンテーション、論文作成など多大な御指導をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。また保田晋助准教授、Olga Amengual 助教、坊垣暁之助教、奥健志助教、加藤将助教には有益な御討論、御助言を頂きました。ここに深く感謝の意を表します。そして何よりこの臨床研究は、患者様たちの協力なしには成り立たないものでした。研究の趣旨に御理解と御協力をいただき、研究の遂行を可能にしてくれた多くの患者様たちに心より感謝申し上げます。

第二章のスタチンの関節炎抑制効果の研究では、北海道大学大学院保健科学研究院 保健科学部門 医用生体理工学分野の神島保教授、北海道大学病院 超音波センターの西田睦先生、検査・輸血部の堀江達則さんにはラットにおける関節超音波検査を施行するにあたり、多大な御協力, 御指導をいただきました。また北海道大学大学院医学院 病理学教室 分子病理学分野の外丸詩野准教授、北海道大学大学院医学院 内科学分野 免疫・代謝内科学教室の中沢大悟助教、北海道大学大学院保健科学研究院 保健科学部門 病態解析学分野の益田紗季子助教には NETs-plus ミーティングなどのカンファレンスで有益な御討論、御助言を頂きました。ここに深く感謝の意を表します。

そして大学院を同期入学し、どんな時でも温かく励ましてくれた中村浩之先生、河野通大先生、柴田悠平先生には、心より深く感謝を申し上げます。グループの垣根をこえて、いつも適切な助言をくれた楠由宏先生、八反田文彦先生、北海道大学病院 輸血・検査部の魚住諒さんにも深い感謝の意を示します。工藤友喜大学院生は Immunoblotting など実験手技に関して多くのアドバイスを授けてくれました。嶋村早苗先生、菅原恵理先生、大西直樹先生、阿部靖矢先生、狩野晧平先生、Lee Wenshi 大学院生には同じ大学院の仲間として、研究遂行にあたり日頃より有益な御討論、御助言をいただき、心より深く感謝を申し上げます。当科実験助手の金子由美子さん、石倉唯さんの御協力なしに実験を遂行すること

は不可能でした。心より感謝を申し上げます。この他にもこの論文作成にあたり、ここに書ききれないくらい多くの御協力、御助言、御支援をいただきました。重ねまして心より感謝を申し上げます。最後に両親、兄弟、そしていつも優しく支え続けてくれた妻と子供たち家族に心から感謝致します。

9. 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。
The author declares no conflict of interest.

10. 引用文献

Akiyama, M., Mawatari, T., Nakashima, Y., Miyahara, H., Yamada, H., Okazaki, K., Fukushi, J., Kondo, M., Kishimoto, J., Hashimura, C., et al. (2015). Prevalence of dyslipidemia in Japanese patients with rheumatoid arthritis and effects of atorvastatin treatment. Clin Rheumatol 34, 1867-1875.

Arai, Y., Mizugishi, K., Nonomura, K., Naitoh, K., Takaori-Kondo, A., and Yamashita, K. (2015). Phagocytosis by human monocytes is required for the secretion of presepsin. J Infect Chemother 21, 564-569.

Arend, W.P., Michel, B.A., Bloch, D.A., Hunder, G.G., Calabrese, L.H., Edworthy, S.M., Fauci, A.S., Leavitt, R.Y., Lie, J.T., Lightfoot, R.W., Jr., et al. (1990). The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Takayasu arteritis. Arthritis Rheum 33, 1129-1134.

Bador, K.M., Intan, S., Hussin, S., and Gafor, A.H. (2012). Serum procalcitonin has negative predictive value for bacterial infection in active systemic lupus erythematosus. Lupus 21, 1172-1177.

Barbosa, C.P., Bracht, L., Ames, F.Q., de Souza Silva-Comar, F.M., Tronco, R.P., and Bersani-Amado, C.A. (2017). Effects of Ezetimibe, Simvastatin, and their Combination on Inflammatory Parameters in a Rat Model of Adjuvant-Induced Arthritis. Inflammation 40, 717-724.

Bazil, V., and Strominger, J.L. (1991). Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. J Immunol 147, 1567-1574.

Bedi, O., Dhawan, V., Sharma, P.L., and Kumar, P. (2016). Pleiotropic effects of statins: new therapeutic targets in drug design. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 389, 695-712.

Behnes, M., Bertsch, T., Lepiorz, D., Lang, S., Trinkmann, F., Brueckmann, M., Borggrefe, M., and Hoffmann, U. (2014). Diagnostic and prognostic utility of soluble CD 14 subtype (presepsin) for severe sepsis and septic shock during the first week of intensive

care treatment. Crit Care 18, 507.

Bohan, A., and Peter, J.B. (1975). Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). N Engl J Med 292, 344-347.

Brown, J.H., Del Re, D.P., and Sussman, M.A. (2006). The Rac and Rho hall of fame: a decade of hypertrophic signaling hits. Circ Res 98, 730-742.

Buhaescu, I., Yood, R.A., and Izzedine, H. (2010). Serum procalcitonin in systemic autoimmune diseases--where are we now? Semin Arthritis Rheum 40, 176-183.

Burmester, G.R., Feist, E., and Dorner, T. (2014). Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis. Nat Rev Rheumatol 10, 77-88.

Calandra, T., and Cohen, J. (2005). The international sepsis forum consensus conference on definitions of infection in the intensive care unit. Crit Care Med 33, 1538-1548.

Chodick, G., Amital, H., Shalem, Y., Kokia, E., Heymann, A.D., Porath, A., and Shalev, V. (2010). Persistence with statins and onset of rheumatoid arthritis: a population-based cohort study. PLoS Med 7, e1000336.

Clavel, G., Marchiol-Fournigault, C., Renault, G., Boissier, M.C., Fradelizi, D., and Bessis, N. (2008). Ultrasound and Doppler micro-imaging in a model of rheumatoid arthritis in mice. Ann Rheum Dis 67, 1765-1772.

Das, S., Mohanty, M., and Padhan, P. (2015). Outcome of rheumatoid arthritis following adjunct statin therapy. Indian J Pharmacol 47, 605-609.

Dasgupta, B., Cimmino, M.A., Kremers, H.M., Schmidt, W.A., Schirmer, M., Salvarani, C., Bachta, A., Dejaco, C., Duftner, C., Jensen, H.S., et al. (2012). 2012 Provisional classification criteria for polymyalgia rheumatica: a European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology collaborative initiative. Arthritis Rheum 64, 943-954.

Davatchi, F. (2012). Diagnosis/Classification Criteria for Behcet's Disease. Patholog Res Int 2012, 607921.

Deakin, S., Leviev, I., Guernier, S., and James, R.W. (2003). Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2. Arterioscler Thromb Vasc Biol 23, 2083-2089.

Dinarello, C.A. (2010). Anti-inflammatory Agents: Present and Future. Cell 140, 935-950.

DuBroff, R., and de Lorgeril, M. (2015). Cholesterol confusion and statin controversy. World J Cardiol 7, 404-409.

Eberhard, O.K., Haubitz, M., Brunkhorst, F.M., Kliem, V., Koch, K.M., and Brunkhorst, R. (1997). Usefulness of procalcitonin for differentiation between activity of systemic autoimmune disease (systemic lupus erythematosus/systemic antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis) and invasive bacterial infection. Arthritis Rheum 40, 1250-1256.

Endo, S., Suzuki, Y., Takahashi, G., Shozushima, T., Ishikura, H., Murai, A., Nishida, T., Irie, Y., Miura, M., Iguchi, H., et al. (2014). Presepsin as a powerful monitoring tool for the prognosis and treatment of sepsis: a multicenter prospective study. J Infect Chemother 20, 30-34.

Ferrero, E., and Goyert, S.M. (1988). Nucleotide sequence of the gene encoding the monocyte differentiation antigen, CD14. Nucleic Acids Res 16, 4173.

Fujibayashi, T., Sugai, S., Miyasaka, N., Hayashi, Y., and Tsubota, K. (2004). Revised Japanese criteria for Sjogren's syndrome (1999): availability and validity. Mod Rheumatol 14, 425-434.

Gladman, D.D., Ibanez, D., and Urowitz, M.B. (2002). Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. J Rheumatol 29, 288-291.

Grossmayer, G.E., Munoz, L.E., Gaipl, U.S., Franz, S., Sheriff, A., Voll, R.E., Kalden, J.R., and Herrmann, M. (2005). Removal of dying cells and systemic lupus erythematosus. Mod Rheumatol 15, 383-390.

He, Y., Xu, H., Liang, L., Zhan, Z., Yang, X., Yu, X., Ye, Y., and Sun, L. (2008).

Antiinflammatory effect of Rho kinase blockade via inhibition of NF-kappaB activation in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 58, 3366-3376.

Herrmann, M., Voll, R.E., Zoller, O.M., Hagenhofer, M., Ponner, B.B., and Kalden, J.R. (1998). Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 41, 1241-1250.

Hochberg, M.C. (1997). Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 40, 1725.

Hunder, G.G., Bloch, D.A., Michel, B.A., Stevens, M.B., Arend, W.P., Calabrese, L.H., Edworthy, S.M., Fauci, A.S., Leavitt, R.Y., Lie, J.T., et al. (1990). The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of giant cell arteritis. Arthritis Rheum 33, 1122-1128.

Kotera, A., Sagishima, K., Tashiro, T., Niimori, D., Kamohara, H., and Kinoshita, Y. (2014). A validation of presepsin levels in kidney dysfunction patients: four case reports. J Intensive Care 2, 63.

Kwak, B., Mulhaupt, F., Myit, S., and Mach, F. (2000). Statins as a newly recognized type of immunomodulator. Nat Med 6, 1399-1402.

Lanoix, J.P., Bourgeois, A.M., Schmidt, J., Desblache, J., Salle, V., Smail, A., Maziere, J.C., Betsou, F., Choukroun, G., Duhaut, P., et al. (2011). Serum procalcitonin does not differentiate between infection and disease flare in patients with systemic lupus erythematosus. Lupus 20, 125-130.

Li, F., Drel, V.R., Szabo, C., Stevens, M.J., and Obrosova, I.G. (2005). Low-dose poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor-containing combination therapies reverse early peripheral diabetic neuropathy. Diabetes 54, 1514-1522.

Liao, A.H., Chung, H.Y., Chen, W.S., and Yeh, M.K. (2016). Efficacy of Combined Ultrasound-and-Microbubbles-Mediated Diclofenac Gel Delivery to Enhance Transdermal Permeation in Adjuvant-Induced Rheumatoid Arthritis in the Rat. Ultrasound Med Biol 42, 1976-1985.

Lisnevskaia, L., Murphy, G., and Isenberg, D. (2014). Systemic lupus erythematosus. Lancet 384, 1878-1888.

Mahajan, N., and Dhawan, V. (2010). In vitro modulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and its genes by C-reactive protein. Role of atorvastatin. Arch Med Res 41, 154-161.

Mathew, L.E., Rajagopal, V., and A, H. (2017). Betulinic acid and fluvastatin exhibits synergistic effect on toll-like receptor-4 mediated anti-atherogenic mechanism in type II collagen induced arthritis. Biomed Pharmacother 93, 681-694.

McCarey, D.W., McInnes, I.B., Madhok, R., Hampson, R., Scherbakov, O., Ford, I., Capell, H.A., and Sattar, N. (2004). Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis (TARA): double-blind, randomised placebo-controlled trial. Lancet 363, 2015-2021.

McInnes, I.B., and Schett, G. (2011). The pathogenesis of rheumatoid arthritis. N Engl J Med 365, 2205-2219.

Miossec, P., and Kolls, J.K. (2012). Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. Nat Rev Drug Discov 11, 763-776.

Mussap, M., Noto, A., Fravega, M., and Fanos, V. (2011). Soluble CD14 subtype presepsin (sCD14-ST) and lipopolysaccharide binding protein (LBP) in neonatal sepsis: new clinical and analytical perspectives for two old biomarkers. J Matern Fetal Neonatal Med 24 Suppl 2, 12-14.

Nagashima, T., Okazaki, H., Yudoh, K., Matsuno, H., and Minota, S. (2006). Apoptosis of rheumatoid synovial cells by statins through the blocking of protein geranylgeranylation: a potential therapeutic approach to rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 54, 579-586.

Nagata, T., Yasuda, Y., Ando, M., Abe, T., Katsuno, T., Kato, S., Tsuboi, N., Matsuo, S., and Maruyama, S. (2015). Clinical impact of kidney function on presepsin levels. PLoS One 10, e0129159.

Nanke, Y., Kawamoto, M., Yago, T., Chiba, J., Yamanaka, H., and Kotake, S. (2009). Geranylgeranylacetone, a non-toxic inducer of heat shock protein, induces cell death in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. Mod Rheumatol 19, 379-383.

Nanno, S., Koh, H., Katayama, T., Hashiba, M., Sato, A., Makuuchi, Y., Nagasaki, J., Kuno, M., Yoshimura, T., Okamura, H., et al. (2016). Plasma Levels of Presepsin (Soluble CD14-subtype) as a Novel Prognostic Marker for Hemophagocytic Syndrome in Hematological Malignancies. Intern Med 55, 2173-2184.

Neogi, T., Aletaha, D., Silman, A.J., Naden, R.L., Felson, D.T., Aggarwal, R., Bingham, C.O., 3rd, Birnbaum, N.S., Burmester, G.R., Bykerk, V.P., et al. (2010). The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: Phase 2 methodological report. Arthritis Rheum 62, 2582-2591.

Nockher, W.A., Wigand, R., Schoeppe, W., and Scherberich, J.E. (1994). Elevated levels of soluble CD14 in serum of patients with systemic lupus erythematosus. Clin Exp Immunol 96, 15-19.

Okamura, Y., and Yokoi, H. (2011). Development of a point-of-care assay system for measurement of presepsin (sCD14-ST). Clin Chim Acta 412, 2157-2161.

Ortega-Hernandez, O.D., and Shoenfeld, Y. (2012). Mixed connective tissue disease: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. Best Pract Res Clin Rheumatol 26, 61-72.

Pernis, A.B., Ricker, E., Weng, C.H., Rozo, C., and Yi, W. (2016). Rho Kinases in Autoimmune Diseases. Annu Rev Med 67, 355-374.

Phi, N.C., Chien, D.K., Binh, V.V., and Gergely, P. (1989). Cathepsin D-like activity in serum of patients with systemic lupus erythematosus. J Clin Lab Immunol 29, 185-188.
Pras, M. (1998). Familial Mediterranean fever: from the clinical syndrome to the cloning of the pyrin gene. Scand J Rheumatol 27, 92-97.

Quintana, G., Medina, Y.F., Rojas, C., Fernandez, A., Restrepo, J.F., Rondon, F., and

Iglesias, A. (2008). The use of procalcitonin determinations in evaluation of systemic lupus erythematosus. J Clin Rheumatol 14, 138-142.

Reiss, A.B., and Wirkowski, E. (2007). Role of HMG-CoA reductase inhibitors in neurological disorders : progress to date. Drugs 67, 2111-2120.

Shirakawa, K., Naitou, K., Hirose, J., Takahashi, T., and Furusako, S. (2011). Presepsin (sCD14-ST): development and evaluation of one-step ELISA with a new standard that is similar to the form of presepsin in septic patients. Clin Chem Lab Med 49, 937-939.

Sugaya, T., Ishizu, A., Ikeda, H., Nakamaru, Y., Fugo, K., Higuchi, M., Yamazaki, H., Imai, K., and Yoshiki, T. (2002). Clonotypic analysis of T cells accumulating at arthritic lesions in HTLV-I env-pX transgenic rats. Exp Mol Pathol 72, 56-61.

Taylor, P.R., Carugati, A., Fadok, V.A., Cook, H.T., Andrews, M., Carroll, M.C., Savill, J.S., Henson, P.M., Botto, M., and Walport, M.J. (2000). A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo. J Exp Med 192, 359-366.

Tsokos, G.C., Lo, M.S., Costa Reis, P., and Sullivan, K.E. (2016). New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. Nat Rev Rheumatol 12, 716-730.

Tsujimoto, K., Hata, A., Fujita, M., Hatachi, S., and Yagita, M. (2016). Presepsin and procalcitonin as biomarkers of systemic bacterial infection in patients with rheumatoid arthritis. Int J Rheum Dis.

Van Aelst, L., and D'Souza-Schorey, C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. Genes Dev 11, 2295-2322.

van den Hoogen, F., Khanna, D., Fransen, J., Johnson, S.R., Baron, M., Tyndall, A., Matucci-Cerinic, M., Naden, R.P., Medsger, T.A., Jr., Carreira, P.E., et al. (2013). 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. Arthritis Rheum 65, 2737-2747.

Vaughan, C.J. (2003). Prevention of stroke and dementia with statins: Effects beyond lipid

lowering. Am J Cardiol 91, 23b-29b.

Villanueva, E., Yalavarthi, S., Berthier, C.C., Hodgin, J.B., Khandpur, R., Lin, A.M., Rubin, C.J., Zhao, W., Olsen, S.H., Klinker, M., et al. (2011). Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. J Immunol 187, 538-552.

Wang, D., Li, Y., Liu, Y., and Shi, G. (2014). The use of biologic therapies in the treatment of rheumatoid arthritis. Curr Pharm Biotechnol 15, 542-548.

Watts, R., Lane, S., Hanslik, T., Hauser, T., Hellmich, B., Koldingsnes, W., Mahr, A., Segelmark, M., Cohen-Tervaert, J.W., and Scott, D. (2007). Development and validation of a consensus methodology for the classification of the ANCA-associated vasculitides and polyarteritis nodosa for epidemiological studies. Ann Rheum Dis 66, 222-227.

Williams, R.O., Feldmann, M., and Maini, R.N. (1992). Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. Proc Natl Acad Sci U S A 89, 9784-9788.

Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., and Mathison, J.C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. Science 249, 1431-1433.

Wu, S.A., Yeh, K.W., Lee, W.I., Yao, T.C., Kuo, M.L., Huang, B., and Huang, J.L. (2013). Impaired phagocytosis and susceptibility to infection in pediatric-onset systemic lupus erythematosus. Lupus 22, 279-288.

Xu, H., Liu, P., Liang, L., Danesh, F.R., Yang, X., Ye, Y., Zhan, Z., Yu, X., Peng, H., and Sun, L. (2006). RhoA-mediated, tumor necrosis factor alpha-induced activation of NF-kappaB in rheumatoid synoviocytes: inhibitory effect of simvastatin. Arthritis Rheum 54, 3441-3451.

Yagi, S., Aihara, K., Ikeda, Y., Sumitomo, Y., Yoshida, S., Ise, T., Iwase, T., Ishikawa, K., Azuma, H., Akaike, M., et al. (2008). Pitavastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, exerts eNOS-independent protective actions against angiotensin II induced cardiovascular remodeling and renal insufficiency. Circ Res 102, 68-76.

Yamaguchi, M., Ohta, A., Tsunematsu, T., Kasukawa, R., Mizushima, Y., Kashiwagi, H., Kashiwazaki, S., Tanimoto, K., Matsumoto, Y., Ota, T., et al. (1992). Preliminary criteria for classification of adult Still's disease. J Rheumatol 19, 424-430.

Yamazaki, H., Ikeda, H., Ishuzu, A., Shikishima, H., Kikuchi, K., Wakisaka, A., Hatanaka, M., and Yoshiki, T. (1997). HTLV-I env-pX transgenic rats: prototype animal model for collagen vascular diseases. Leukemia 11 Suppl 3, 258-259.

Yamazaki, H., Kunisada, T., Ishizu, A., Ikeda, H., Miyoshi, I., Sudo, T., Hayashi, S.I., and Yoshiki, T. (1998). Promotion of early osteoclastogenesis and B lymphopoiesis in the bone marrow of transgenic rats with the env-pX gene of human T-cell lymphotropic virus type I. Oncogene 17, 2955-2960.

Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J., Liu, Y.J., MacPherson, G., Randolph, G.J., et al. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. Blood 116, e74-80.

Ziegler-Heitbrock, L., and Hofer, T.P. (2013). Toward a refined definition of monocyte subsets. Front Immunol 4, 23.

Zou, Q., Wen, W., and Zhang, X.C. (2014). Presepsin as a novel sepsis biomarker. World J Emerg Med 5, 16-19.