



Galectin-9はSLEの疾患活動性を反映し臓器障害を予測するバイオマーカーとして有用である

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-10-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 松岡, 直紀 メールアドレス: 所属:
URL	https://fmu.repo.nii.ac.jp/records/2000407

学 位 論 文

学位論文名

Galectin-9 は SLE の疾患活動性を反映し
臓器障害を予測するバイオマーカーとして
有用である

福島県立医科大学大学院医学研究科

リウマチ膠原病学分野リウマチ膠原病内科学講座

松岡 直紀

【緒言】

全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus; 以下 SLE) は T 細胞・B 細胞に起因する免疫異常により自己抗原への免疫寛容が破綻することで、自己抗体が産生され、全身の諸臓器に急性あるいは慢性の障害を来す自己免疫疾患である¹⁾。SLE の発症には遺伝的要因、環境因子、エピゲノム制御機構などが関与しているが、まだ不明な点が多く、SLE の病態には自己抗体産生の他、免疫複合体の沈着、炎症性サイトカイン、ケモカインの異常産生が関与している²⁾。トランスクリプトーム解析による研究では SLE 患者においてインターフェロン (IFN) シグニチャーとして知られる I 型 IFN 誘導遺伝子の発現が有意に増加しており、I 型 IFN の活性化が SLE の病態形成に関与していることが知られている。また、I 型 IFN は病態形成だけではなく、SLE における疾患活動性や重症度に関与している可能性も報告されている³⁾。C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10) など IFN シグニチャーを反映するケモカインの測定が SLE 患者において検証されてはいるが⁴⁾、簡便かつ正確に IFN シグニチャーを測定する方法は一般的には確立されていないのが現状である⁵⁾。しかし、近年 Hoogen らは SLE 患者において Galactin-9 (Gal-9) が IFN シグニチャーを反映する有用なバイオマーカーとなることを報告している⁶⁾。Gal-9 は β ガラクトシドに結合する動物レクチンの一つであり、自己炎症性疾患において制御的な役割を果たすことが知られている⁷⁾。Gal-9 は Th1 細胞, Th17 細胞, 細胞傷害性 T 細胞などの細胞表面に発現している免疫チェックポイント分子である T cell immunoglobulin and mucin domain containing molecule-3 (Tim-3) のリガンドであることが同定されている。Gal-9 の機能として Tim-3 を介して Th1 細胞, Th17 細胞, 細胞傷害性 T 細胞のアポトーシスを誘導し、免疫反応を抑制する Tim-3 / Gal-9 pathway が知られている⁸⁾。最近の研究ではこの Tim-3 を介した作用の他に Gal-9 が Th17 細胞の

分化を直接抑制する作用を有する可能性が示唆されている⁹⁾. SLE では Th1 細胞と Th2 細胞の機能が不均衡となることや Th17 細胞が制御不全となった結果 T リンパ球におけるシグナル分子の異常な発現を来たすことが疾患の発症, 進展に寄与すると考えられており¹⁰⁾, T リンパ球の抑制に関わる Tim-3 / Gal-9 pathway の異常が SLE の病態に関与する可能性がこれまで報告されており, 治療ターゲットとしても注目されている¹¹⁾. また, Wisteria floribunda lectin (WFA) を用いて Mac-2 binding protein (M2BP) の糖鎖構造変化を測定した M2BP glycosylation isomer (M2BPGi) は自己免疫性肝炎において肝線維化を評価するための有用なバイオマーカーとして報告されているが¹²⁾, M2BPGi は SLE においても炎症のプロセスに寄与し, 疾患活動性を評価するバイオマーカーとなる可能性が報告されている¹³⁾. SLE の病態の多様性のため, 疾患活動性や臓器障害を反映するバイオマーカーが臨床においては特に重要となるが, 一般的に SLE の疾患活動性評価に用いられる補体価, 抗 ds-DNA 抗体などの自己抗体価は SLE における個々の病態までは反映しておらず, また発症後の不可逆的な臓器障害を評価するのには十分と言えないのが現状である¹⁴⁾¹⁵⁾. そこで, 今回我々は, Gal-9 を含む IFN シグニチャーを反映する分子が SLE における疾患活動性や病型の差を反映するか, また, Gal-9 が疾患活動性との関連だけではなく SLE に伴う臓器障害を予測する有用なバイオマーカーとなり得るのか検証を行った.

【方法】

対象症例と臨床評価

福島県立医科大学リウマチ膠原病内科に 2009 年 6 月から 2019 年 3 月まで通院していた患者の内、保存血清が採取されていた 58 例の SLE 患者、保存髄液が採取されていた 18 例の神経精神 SLE (NPSLE) 患者を本研究の対象とした。SLE の診断に際しては 1997 年アメリカリウマチ学会 (American College of Rheumatology ; ACR) SLE 分類改訂基準を満たす者とした¹⁶⁾。本研究の SLE 患者は診断から 32 カ月以内 (中央値 18 カ月) の比較的発症から時間経過の短い症例が中心であった。全ての患者は当科で問診、身体診察、検査を施行されており、過去の診療記録も参照し情報収集を行った。SLE の疾患活動性評価としては、2002 年改訂の Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI-2K) スコアを用いた。SLEDAI-2K スコアは 10 日以内の症状・検査異常に関して、各々 1 項目毎に点数がつけられており、総スコアは 0-105 点となり、点数が高くなるほど疾患活動性が高いことを示すものである¹⁷⁾。SLE 発症後の臓器障害の評価としては、Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) damage index : SDI を用いた。SDI における臓器障害は SLE における病態とその後遺症、治療に起因する臓器障害が含まれており疾患活動性とは区別され、評価項目は 12 の臓器よりなり、少なくとも 6 ヶ月間存在する臓器障害が対象となる。スコアは全て 1 であるが、反復して認められた場合には 2 としスコアを合計したものが障害度の指標となる¹⁸⁾。SLE の疾患活動性評価としては British Isles lupus assessment Group (BILAG) -2004 での評価も行った。BILAG は 28 日前からの症状・検査の異常を 9 領域 (General, Mucocutaneous, Neurological, Musculoskeletal, Cardiorespiratory, Gastrointestinal, Renal, Hematological, Ophthalmic) に分け、それぞれにつき治療の必要性を A (強い治療が必要) から E (障害がないため無治療)

の 5 つの grade に分け、スコア化するものである。カテゴリー A が 9 点, B が 3 点, C が 1 点, D 及び E が 0 点であり総スコアは 0-81 点となる¹⁹⁾。SLEDAI-2K では SLE の全般的な疾患活動性を評価できるのに対して, BILAG-2004 では臓器ごとの活動性を評価することができる。本研究はヘルシンキ宣言の原則に基づき, 福島県立医科大学倫理委員会の承認 (No. 30285) を得て行った。

血清学的評価

末梢血, 生化学検査における各種項目や血清補体価, 抗 ds-DNA 抗体, 抗核抗体は過去に診療の際に当院で測定されたデータを診療録から収集した。58 名の SLE 患者 (女性 50 名、男性 8 名) で血清が保存されており, その内 5 名の患者で疾患活動性の異なる別時点での血清が保存されていた。保存血清における測定結果のコントロール群としては年齢性別を適合させた 31 人の健常者 (男性 5 人, 女性 26 人, 年齢中央値 39 歳) を用いた。血清は-70℃で保存をしていた。

髄液評価

髄液検体は NPSLE 患者 18 名 (女性 15 名、男性 3 名) で保存されており, その内 7 名は前述の 58 名の SLE 患者には含まれていなかった。NPSLE の定義としては, 少なくとも一つ以上の神経精神症状を持ち, 少なくとも一つ以上 ①MRI で異常所見を認める, ②single-photon-emission computerized tomography (SPECT) 検査でびまん性の異常信号を認める, ③神経精神学的評価において重度の異常な結果を示す, ④IgG インデックスの上昇もしくは髄液 IL-6 の上昇を認める, のいずれかを満たすものとした²⁰⁾。

保存髄液での評価のため, また倫理的事由により神経症状のない SLE 患者や健常者からの髄液検体をコントロールとして用いることは困難であった。そのた

め、コントロール群としては頭痛症状を呈し髄液検査が施行された他自己免疫疾患患者 6 名 (Behçet 病 5 名, ANCA 関連血管炎 1 名) の保存髄液を用い非 SLE 患者群と定義した。髄液は-70℃で保存をしていた。

CXCL10, Gal-9, IFN- α の Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 測定

血清・髄液 Gal-9, 血清 CXCL10 の測定は human enzyme-linked immunosorbent assay kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて, 血清 IFN- α の測定は VeriKine™ Human IFN- α ELISA Kit (Product #41100) を用いて酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA 法) を行った。方法としては, Standard 希釈系列を作成し, 血清検体の希釈を行い (血清 Gal-9: 7 倍希釈, 髄液 Gal-9: 2 倍希釈, 血清 CXCL10: 8 倍希釈, 血清 IFN- α : 等倍), 希釈検体を HRP (horseradish peroxidase) 標識抗 Gal-9, CXCL10 抗体とそれぞれ反応させた後, マイクロプレートリーダーを用いて 450 nm で吸光度を測定した。得られた吸光度から standard の結果を基に血清検体の測定値を算出した。

血清 M2BPGi の Chemiluminescent enzyme immunoassay (CLEIA) 測定

血清 M2BPGi は HISCL™ M2BPGi™ reagent kit (Sysmex, Kobe, Japan) を用いて化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA 法) で測定した。CLEIA 法は ELISA 法と同様に酵素標識した抗原・抗体を反応型に組み込み酵素活性を検出する方法であるが, 吸光度測定により酵素活性を算出する ELISA 法に対し, CLEIA 法は発光量を検出することにより酵素活性を算出する点が異なる。実際には血清 M2BPGi は全自動免疫測定装置 HISCL-5000 (Sysmex, Hyogo, Japan) で測定した。検体より得られた発光強度から M2BPGi level は以下の計算式を用いて Cut-off Index を求めた²¹⁾: Cut-off Index (C.O.I.) = ([M2BPGi] sample - [M2BPGi] NC) / ([M2BPGi]

PC - [M2BPGi] NC)

([M2BPGi]: M2BPGi 発光強度, sample: 検体, PC: ポジティブコントロール, NC: ネガティブコントロール).

統計解析

血清・髄液検体より得られた検査結果は非正規分布に則り中央値と四分位範囲 (inter-quartile range: IQR) で表記した [median, IQR]. またSLE患者とcontrol群との2群比較にはノンパラメトリック検定であるMann-Whitney U検定を用いて解析した. 検査結果と連続変数で示される各種項目間の相関を調べる解析にはノンパラメトリック検定であるSpearman順位相関係数を用い, 95%信頼区間を示した [95%CI]. 相関係数を r で表記し, 相関の程度を, $0 \leq |r| < 0.2$ をほとんど相関関係なし, $0.2 \leq |r| < 0.4$ を低い相関関係あり, $0.4 \leq |r| < 0.7$ を中等度の相関関係あり, $0.7 \leq |r| \leq 1$ を高い相関関係ありと定義した. 同一患者における経時的検査データの推移 (差) を比較するpaired sample検定にはノンパラメトリック検定であるWilcoxon符号順位検定を用いて解析を行った.

【結果】

SLE 患者の臨床的特徴

我々は 58 名の SLE 患者群と 31 名の健常者コントロール群で保存血清を用いた研究を行った. SLE 患者の臨床的特徴は Table 1 に示す. SLE 患者は全て日本人で女性が 86%であった. 90%の SLE 患者は未治療（治療開始前）であった. 約 95%の SLE 患者は SLEDAI 5 点以上で示される疾患活動性を有しており, 約 57%の SLE 患者は SDI 1 点以上で示される慢性的な臓器障害を有していた. SLE 患者群と健常者コントロール群で性別・年齢などの明らかな差異は認められなかった.

Table 1. SLE 患者 58 名の臨床的特徴

Characteristics	n=58
Sex	
Female, n (%)	50 (86)
Male, n (%)	8 (14)
Age, median (range), years	36 (16-79)
Duration of SLE, median (range), month	18 (0-32)
Untreated patient, n (%)	52(90)
Components of SLE diagnostic criteria, n (%)	
Skin rash	30 (52)
Oral ulcers	4 (7)
Alopecia	1 (2)
Arthritis	20 (34)
Serositis	15 (26)
Renal disease	29(50)
CNS disease	11(19)
Hemolytic anemia	9 (15)
Laboratory findings	
Leukocytopenia	21 (36)
Thrombocytopenia	15 (26)
Anti-ds-DNA Ab positive	46 (79)
Anti-smith Ab positive	28 (48)
Anti-phospholipid Ab positive	27 (47)
SLEDAI, median(range)	13 (0-50)
SDI, median(range)	1(0-4)

血清 Gal-9 と SLE 疾患活動性の検証

Fig. 1. に示すように血清 Gal-9 は健常者コントロール群と比較して SLE 患者群で有意に高値であった (4.74 ng/ml [IQR; 3.0-9.5] versus 16.6 ng/ml [IQR; 3.6-59.7], $p<0.0001$).

Fig. 1. SLE患者 (n=58) と健常者 (n=31) における血清Gal-9

血清Gal-9は健常者と比べSLE患者で有意に高値であった. Mann-Whitney U検定で統計解析を行った. 中央値をグラフ横線で示した.

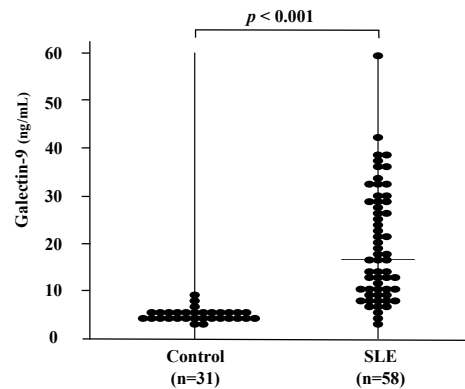
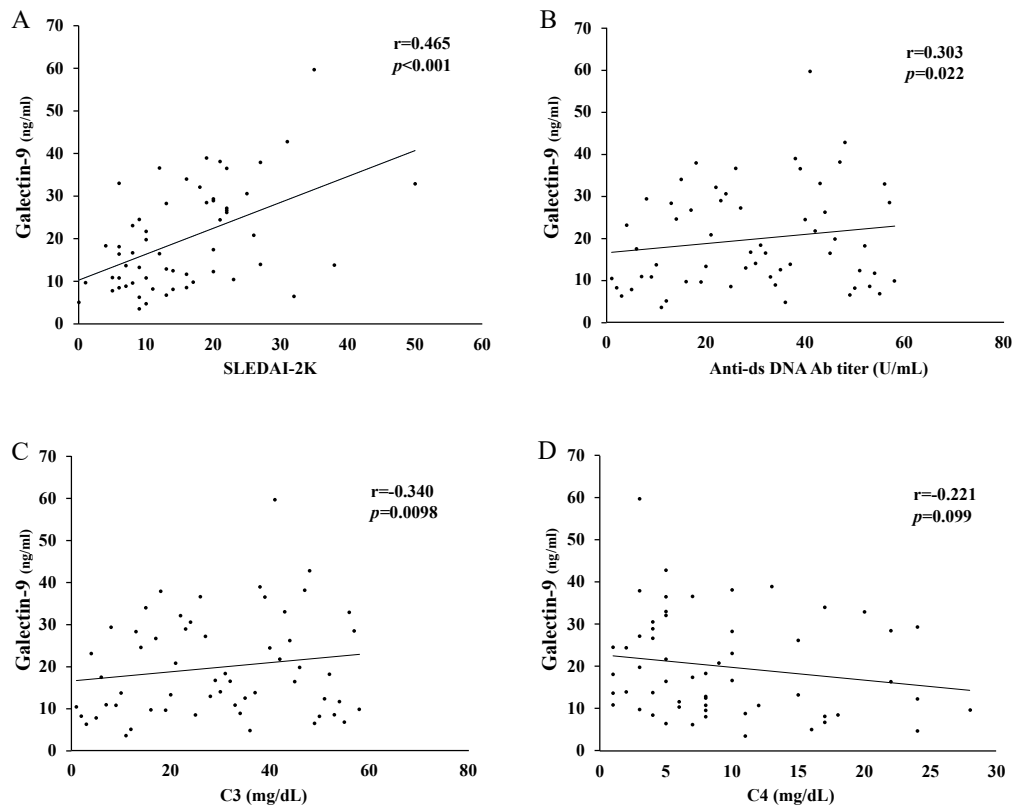


Fig. 2A-D に血清 Gal-9 と SLE 疾患活動性スコアである SLEDAI-2K スコアとの相関関係, 血清 Gal-9 と SLE の疾患活動性を示す各種検査項目との相関関係を調べた結果を示す. 血清 Gal-9 は SLEDAI-2K スコアと有意な正の相関を認め, 中等度の相関関係を示した (Fig. 2A, $p < 0.001$, $r = 0.47$ [95%CI; 0.27-0.67]).

さらに血清 Gal-9 は抗 ds-DNA 抗体価と有意な正の相関を認め, 低い相関関係を示した (Fig. 2B, $p = 0.02$, $r = 0.30$ [95%CI; 0.15-0.42]). 血清 Gal-9 は血清 C3 と有意な負の相関を認め, 低い相関関係を示した (Fig. 2C, $p = 0.01$, $r = -0.34$ [95%CI; -0.54- -0.11]) が血清 C4 との有意な相関は認められなかった (Fig. 2D, $p = 0.19$, $r = -0.18$ [95%CI; -0.32- -0.02]).

Fig. 2. SLE患者における血清Gal-9とSLE疾患活動性を示す各種検査項目との相関関係 (A: SLEDAI-2K, B: anti-ds-DNA Ab, C: C3, D: C4)

血清Gal-9は SLEDAI-2K (A) とanti-ds-DNA Ab (B) と有意に正の相関を示し, 血清C3 (C) と有意に負の相関を示した. 血清C4 (D) とは有意な相関を認めなかった. 統計解析にはSpearman順位相関係数を用いて相関係数, 回帰直線を求めた.

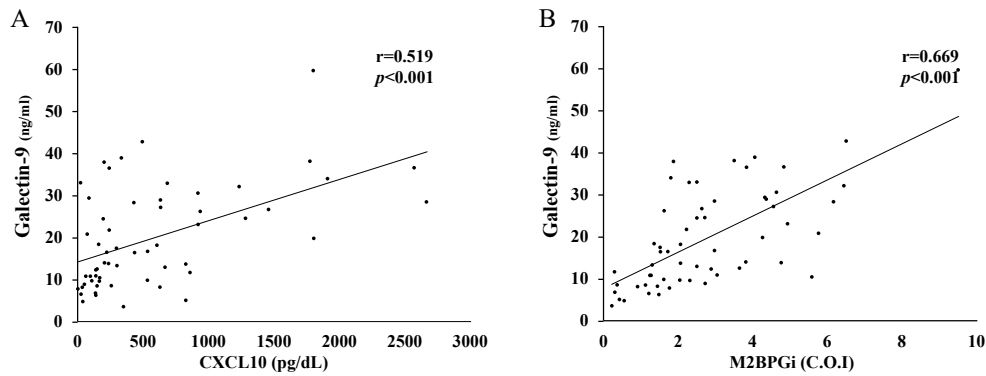


血清バイオマーカーと臓器障害の関連性

IFN シグニチャーを高発現している SLE 患者において上昇することが示されている CXCL10 について⁴⁾, また前述の通り SLE の疾患活動性を反映するバイオマーカーとしての可能性が示唆されている M2BPGi¹³⁾について SLE 患者の血清を用いて測定し, Gal-9 との関連性を調べた. 結果として血清 Gal-9 は血清 CXCL10, M2BPGi 共に有意な相関を示した (Fig. 3).

Fig. 3. SLE 患者における Gal-9 と CXCL10 (A), M2BPGi (B) との相関関係.

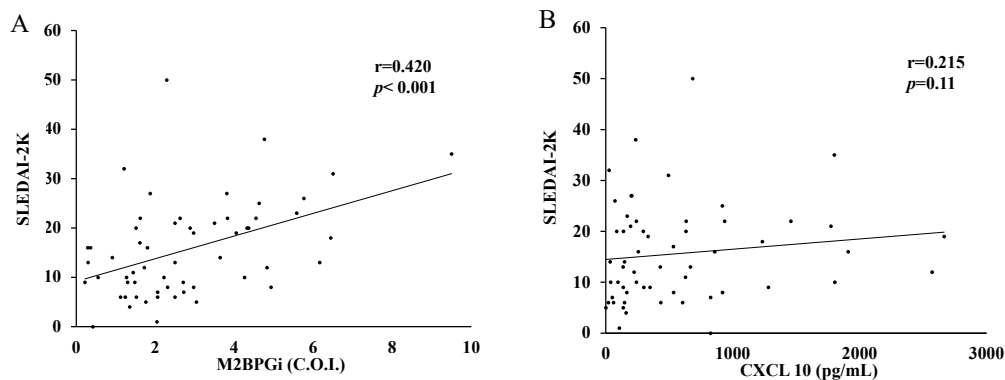
SLE患者において血清Gal-9は血清CXCL10 (A), M2BPGi (B) と有意な相関を示した. 統計解析にはSpearman順位相関係数を用いて相関係数, 回帰直線を求めた.



さらに CXCL10, M2BPGi と SLE 疾患活動性スコアである SLEDAI-2K スコアとの関連を調べた (Fig. 4A and Fig. 4B). SLEDAI-2K スコアと血清 M2BPGi には有意な相関を認めたが (Fig. 4A), SLEDAI-2K スコアと血清 CXCL10 には有意な相関を認めなかった (Fig. 4B).

Fig. 4. SLE 患者における SLEDAI-2K と M2BPGi (A), CXCL10 (B) との相関関係.

SLE患者においてSLEDAI-2Kは血清M2BPGi (A) と有意な相関を示したが、血清CXCL10 (B)とは有意な相関を認めなかった。統計解析にはSpearman順位相関係数を用いて相関係数、回帰直線を求めた。

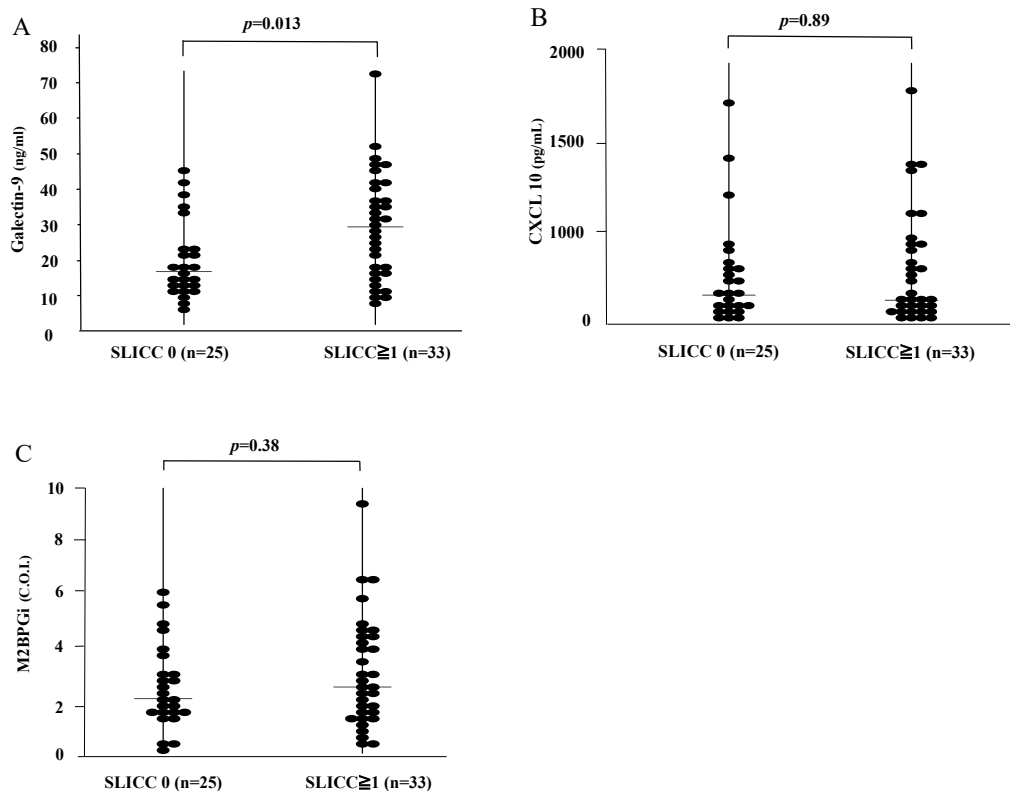


次に, SLE 患者を SLICC/ACR Damage Index (SDI) で示される SLE に伴う臓器障害を認めない群 ($SDI=0$) と臓器障害を認める群 ($SDI \geq 1$) に分け, 2 群間で血清

Gal-9 (Fig. 5A), CXCL10 (Fig. 5B), M2BPGi (Fig. 5C) に差を認めるかを調べた。Fig. 5A に示すように血清 Gal-9 は臓器障害を認めない群 (SDI=0) と比べて臓器障害を認める群 (SDI ≥ 1) で有意に高値であった (12.5 ng/ml [IQR: 3.6-36.6] versus 23.1 ng/ml [IQR: 4.8-59.7], $p=0.013$)。対照的に, Fig. 5B, Fig. 5C で示すように血清 CXCL10, M2BPGi では2群間に有意差は認められなかった (CXCL10: 299.6 ng/ml [IQR: 0.4-2570.4] versus 240.2 ng/ml [IQR: 20.9-2664.8], $p=0.89$), (M2BPGi: 2.1 ng/ml [IQR: 0.2-6.2] versus 2.5 ng/ml [IQR: 0.6-9.5], $p=0.38$)。

Fig. 5. SLEによる臓器障害の有無による血清バイオマーカー値の比較

SLE患者において臓器障害を認めない群 (SDI=0), 臓器障害を認める群 (SDI ≥ 1) の2群間で血清バイオマーカー (A: Gal-9, B: CXCL10, C: M2BPGi) の比較を行った。Gal-9 (A) は臓器障害を認めない群と比べ臓器障害を認める群で有意に高値であった。CXCL10 (B), M2BPGi (C) では臓器障害の有無で有意差を認めなかった。Mann-Whitney U検定で統計解析を行った。中央値をグラフ横線で示した。



また、臓器毎の疾患活動性評価の指標である The British Isles lupus assessment Group (BILAG) で評価を行うため SLE 患者の 28 日前からの症状・検査の異常を 9 領域 (General, Mucocutaneous, Neurological, Musculoskeletal, Cardiorespiratory, Gastrointestinal, Renal, Hematological, Ophthalmic) に区別し、それぞれにつき治療の必要性を A (強い治療が必要) から E (障害がないため無治療) の 5 つの grade に分類した. Table 2 に分類した結果を示す. 9 領域の内、活動性病変は主に General, Neurological, Renal, Hematological の領域で認められた. Fig. 6 で示すように Renal の領域において活動性を示す BILAG A, B 群は活動性の低い BILAG C-E 群と比べ有意に血清 Gal-9 は高値であった. 一方で, General, Neurological, Hematological の領域においては活動性を示す群と活動性の低い群の間で血清 Gal-9 の値に有意差は認められなかった.

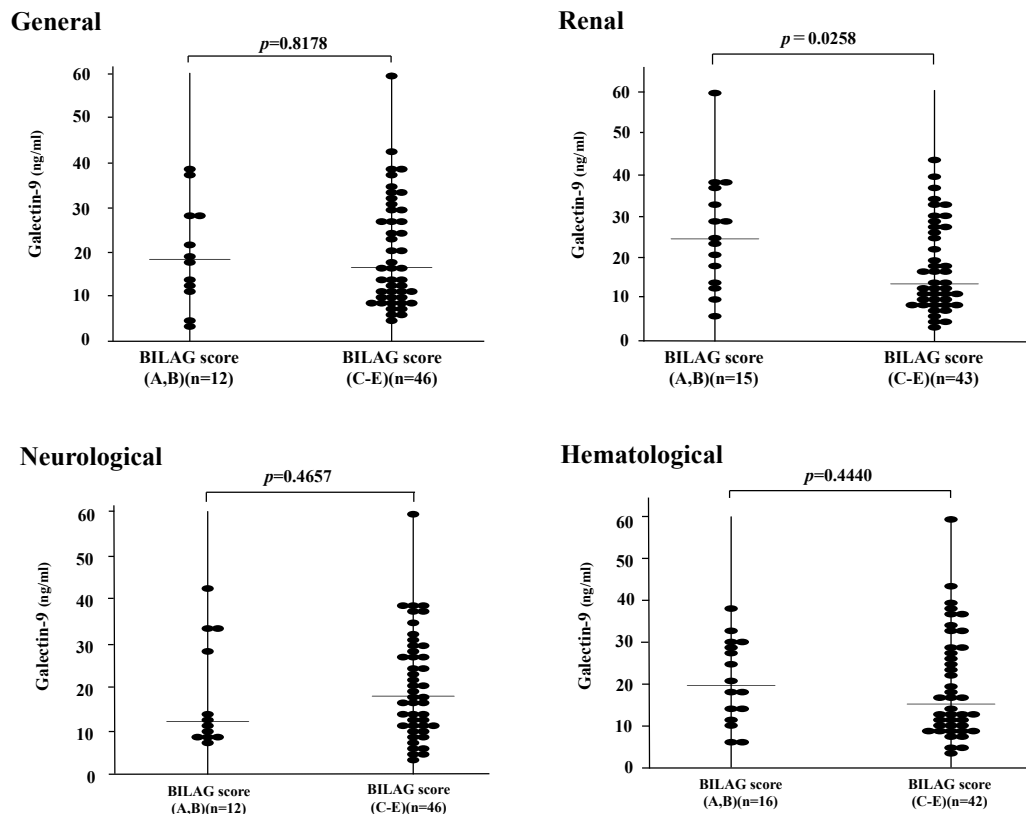
Table 2. British Isles Lupus Assessment Group (BILAG) grading による疾患活動性の分布

BILAG Manifestations	BILAG grade				
	A	B	C	D	E
General	0	12	14	4	28
Mucocutaneous	1	4	19	2	32
Neurological	2	10	1	0	45
Musculoskeletal	1	4	14	2	37
Cardiorespiratory	0	6	9	3	40
Gastrointestinal	0	7	0	0	51
Renal	10	5	6	3	34
Hematological	1	15	32	1	9
Ophthalmic	1	4	6	1	46

BILAG grades: A: severe, B: intermediate, C: mild, D: inactive, E: no activity.

Fig. 6. BILAG score における活動性臓器病変の有無による血清 Gal-9 の比較

General, Renal, Neurological, Hematological領域においてBILAG score A, Bの活動性を示す群, BILAG score C, D, Eの活動性が低い群での2群間で血清Gal-9の比較を行った. Mann-Whitney U検定で統計解析を行った. 中央値をグラフ横線で示した.

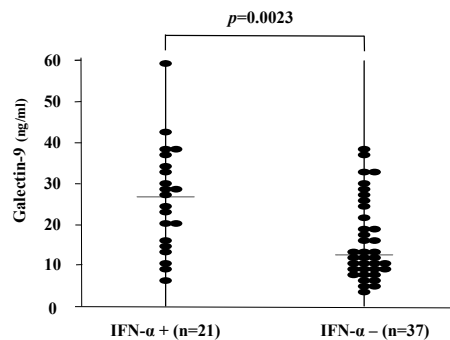


血清 Gal-9 と血清 IFN- α の関連性

血清 IFN- α と血清 Gal-9 の関連を調べるために SLE 患者の血清より IFN- α の測定を行った. IFN- α は58名の SLE 患者の内 21 名 (36.2%) で検出された (70.0 pg/ml [IQR: 1.4-601.0]). IFN- α 検出群 (n=21, cut-off value=1.0 pg/ml) と IFN- α 非検出群 (n=37) で血清 Gal-9 の比較を行った. Fig. 7で示すように血清 Gal-9 は IFN- α 検出群において IFN- α 非検出群と比べ有意に高値であった (26.7 ng/ml [IQR: 6.5-59.7] versus 12.5 ng/ml [IQR: 3.6-39.0], $p<0.002$).

Fig. 7. IFN- α 検出群とIFN- α 非検出群における血清Gal-9の比較

SLE患者において血清Gal-9はIFN- α 検出群でIFN- α 非検出群と比べ有意に高値であった。Mann-Whitney U検定で統計解析を行った。中央値をグラフ横線で示した。

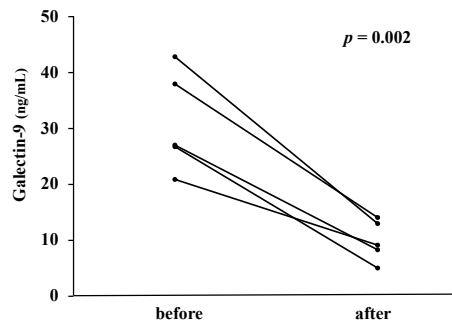


血清 Gal-9 の経時的変化

治療導入前後（血清採取間隔は少なくとも 1 ヶ月以上離れている）で保存血清を採取できた疾患活動性の高い SLE 患者 5 例で疾患活動性の変化に伴う血清 Gal-9 の経時的変化を調べた。SLE 患者 5 例はいずれも疾患活動性の低下した状態で治療後の血清が採取されており（SLEDAI-2K 治療前 23.4 ± 7.6 , 治療後 6.0 ± 5.1 ），血清採取間隔の中央値は 2 ヶ月（1–12 months）であった。Fig. 8 で示すように免疫抑制療法による治療後の血清 Gal-9 は治療前と比べ有意な減少を認めた。

Fig. 8. 活動性 SLE 患者 5 例の免疫抑制療法前後での血清 Gal-9 の経時的推移

同一患者における経時的検査データの推移を比較する paired sample 検定には Wilcoxon 符号順位検定を用いて解析した。

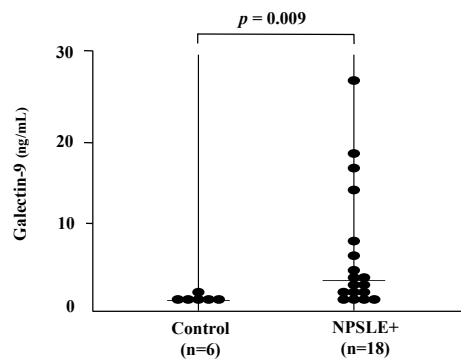


NPSLE 患者における髄液 Gal-9

Neurological 領域で BILAG 活動性を示す群 (BILAG A, B) と活動性の低い群 (BILAG C-E) で血清 Gal-9 には有意差が認められなかったため, NPSLE 患者における髄液 Gal-9 の特異性の有無について検証した. 18 名の NPSLE 患者群と 6 名の非 SLE 患者群で保存髄液を用いた検証を行った. NPSLE 発症年齢の中央値は 33.5 歳であり, NPSLE の神経症状の内訳としては, ACR での分類では²²⁾, 無菌性髄膜炎 8 名, 痙攣発作 3 名, 認知機能障害 3 名, 頭痛 1 名, 脳血管障害 1 名, 脊髄炎 1 名, 中枢神経性ニューロパチー 1 名であった. Fig. 9 で示すように髄液 Gal-9 は非 SLE 患者群と比べ NPSLE 患者群において有意に高値であった (1.3 ± 0.4 ng/ml [IQR: 0.9-2.1] vs 6.7 ± 7.4 ng/ml [IQR: 1.0-27.2], $p=0.0093$).

Fig. 9. NPSLE 患者群と非 SLE 患者群における髄液 Gal-9 の比較

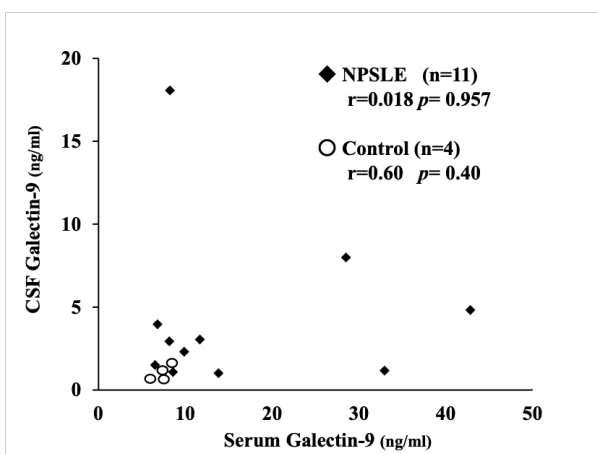
髄液 Gal-9 は非 SLE 患者 (n=6) と比べ NPSLE 患者 (n=18) で有意に高値であった. Mann-Whitney U 検定で統計解析を行った. 中央値をグラフ横線で示した.



同一患者における髄液と血清のペア検体を得ることのできた症例は少数であったが、11名のNPSLE患者と4名の非SLE患者で髄液Gal-9と血清Gal-9の相関関係を調べた。Fig. 10に示すように、両群とも髄液Gal-9と血清Gal-9に明らかな相関は認められなかった。

Fig. 10. NPSLE患者群と非SLE患者群における血清Gal-9と髄液Gal-9の相関関係

両群とも髄液Gal-9と血清Gal-9には有意な相関を認めなかった。統計解析にはSpearman順位相関係数を用いて相関係数を求めた。



【考察】

I 型 IFN は自然免疫, 獲得免疫の双方に作用し, 免疫寛容を破綻させることにより自己免疫疾患の病態形成に関与することが知られている. さらに SLE においては I 型 IFN の過剰な活性化が形質細胞様樹状細胞における核酸に対する自己抗体の産生を誘導する結果, 免疫複合体が形成され全身に臓器障害を来たと考えられている²³⁾. SLE の疾患活動性や治療評価の指標となる非侵襲的で測定の簡便なバイオマーカーの探索が多くの研究により行われており²⁴⁾, I 型 IFN に関わるサイトカインの検証も行われているが, 現時点においては IFN- α は直接数値化することが難しく, IFN シグニチャーの測定は十分には普及していない状況である. 我々は SLE 患者における IFN シグニチャーを反映する潜在的なバイオマーカーとしての可能性が示唆されている Gal-9 に着目し⁶⁾, バイオマーカーとしての有用性について検証を行った. Gal-9 は β ガラクトシドに結合する動物レクチンの一つであり, リガンドである Tim-3 依存性もしくは非依存性に Th1 細胞, Th17 細胞を抑制する⁸⁾. また, Tim-3 は自己免疫疾患における病態への関与が知られており²⁵⁾, SLE 患者では Tim-3 陽性 CD3⁺CD4⁺ T 細胞の割合が健康人と比較して高いことが示されている. また T 細胞上に発現する Tim-3 が SLE の疾患活動性に相関して亢進することが示されている²⁶⁾. Gal-9 は様々な臓器に遍在しているが, 主に免疫に機能する特性を持ち²⁷⁾, IFN- γ によるフィードバック機序により発現が誘導され²⁸⁾, Th1 / Th17 細胞の機能を Tim-3 依存性に抑制することが知られている²⁹⁾. これら Tim-3 と SLE の疾患活動性との関連性は血清 Gal-9 の上昇が SLE の疾患活動性に影響する根拠となる可能性があり, Gal-9 のバイオマーカーとしての有用性を支持するものである.

今回の研究では, SLEDAI-2K スコアを用いた検証にて血清 Gal-9 は SLE の疾患活動性を反映し有意な相関を認めた. この結果からは血清 Gal-9 が IFN シグ

ニチャーを反映するだけでなく, SLE の疾患活動性の評価に有用であることが示された. さらに BILAG-2004 を用いた検証により血清 Gal-9 は活動性の腎病変を認める SLE 患者群で有意に高値であった. 腎炎の評価においては尿検体におけるバイオマーカーの探索が有用とも考えられるが, SLE 患者において尿中 Gal-9 は腎の活動性を反映しなかったという結果が報告されている³⁰⁾. 今回の結果は血清 Gal-9 が疾患活動性における障害臓器, 特に腎障害を反映するバイオマーカーとしての可能性を示唆していた. しかし, BILAG-2004 スコアにおける他の領域との比較という点では, Table 2 で示す疾患活動性の分布には領域間で偏りがあり, Renal 領域においては活動性の最も高い grade A が他の領域と比べ多く認められた. この領域間での疾患活動性分布の偏りが検証結果に影響を与えた可能性が否定出来ないため, 今後症例を更に集積することにより領域間での偏りを少なくすることが検証の上で重要となると思われる. また, 血清 Gal-9 は血清 CXCL10, M2BPGi と有意に相関しており, さらに M2BPGi は SLEDAI-2K スコアによる SLE の疾患活動性と有意に相関が認められた. 既報でも示されているが¹³⁾, 今回の検証でも血清 M2BPGi は SLE の疾患活動性を反映する低侵襲で簡便なバイオマーカーとなる可能性が示唆された. また, SLICC damage index を用いた検証にて血清 Gal-9 は SLE に伴う臓器障害を認める群で臓器障害を認めない群と比べ有意に高値であったのに対し, 血清 CXCL10, M2BPGi ではこのような有意差は認められなかった. この結果からは血清 Gal-9 は SLE に伴う臓器障害を予測する点で他のバイオマーカーより有用となる可能性が示唆された. さらに, 活動性 SLE 患者における治療前後で血清 Gal-9 が有意に低下した結果からは血清 Gal-9 が SLE の治療評価に有用である可能性も示唆された. 高疾患活動性の SLE 患者ではその後の臓器障害のリスクを増大させることが知られており³¹⁾, BILAG スコアによる高疾患活動性は新規臓器障害の発症や生命予後に

寄与するとの報告もある³²⁾。血清 Gal-9 は IFN シグニチャーを反映する有用なバイオマーカーであることが示されているが、今回の我々の研究結果は血清 Gal-9 が SLE の疾患活動性だけでなく SLE に関連する臓器障害を予測するバイオマーカーである可能性を示している。

また、今回の研究では、NPSLE 患者より採取された髄液で Gal-9 が高値であることを示した。中枢神経に障害を及ぼす NPSLE は SLE において生命予後に関与する重症病態であり³³⁾、その病因は完全には解明されていないが³⁴⁾、特定の自己抗体やサイトカインに着目した研究が行われ、その関連性が報告されている³⁵⁾。髄液を用いた研究は NPSLE の病因に関与するバイオマーカーの探索に非常に有用であり³⁶⁾、髄液中の IL-6 や IFN- α などのサイトカインや³⁷⁾、血液脳関門を通過した自己抗体が NPSLE の病態に関与することが示唆されている³⁸⁾。NPSLE における髄液 Gal-9 に着目し、考察した研究はこれまで報告がなく、NPSLE 患者において髄液 Gal-9 が非 SLE 患者と比べ高値であったという今回の結果は初の報告であると思われた。これらの結果は NPSLE においても Gal-9 が病態に関与している可能性を示唆するものであった。また、今回非 SLE 患者群として Behçet 病、ANCA 関連血管炎患者の髄液検体を用いたが、Behçet 病においては Gal-9 に関する報告はこれまで認められず、ANCA 関連血管炎においては血清 Gal-9 が疾患活動性を反映したという報告を認めるが³⁹⁾、髄液 Gal-9 を検証した報告は認められなかった。

今回の研究の限界点としては、まずサンプルサイズが比較的少数であったことである。理由としては、①未治療の SLE 患者で保存血清が採取されていることが多かったが全体としては未治療の SLE 患者数自体がそこまで多くなかったこと、②各種検査項目の測定に足るだけの十分な保存血清が残っていなかった症例が比較的多かったこと、③治療が複雑化し、その治療経過で保存血清が

採取された患者から得られた検体は結果の解釈も複雑になるため除外したこと、
などが考えられた。その他、研究デザインが検体採取時点における横断研究で
あったこと、髄液サンプルとして NPSLE 患者以外の SLE 患者から髄液を得るこ
とができず両者の比較ができなかったことが挙げられた。また、SLE 患者群に対
し IFN シグニチャーを同定するための遺伝子解析などが行われていないこと、
保存血清という制限のため大部分の SLE 患者が新規発症の疾患活動性の高い母
集団であったこと、臓器障害の評価を比較的短期間に限定して行なったことも
挙げられた。今後この様な点に留意したさらなる検証が望まれると考えられた。

【結語】

今回の研究で血清 Gal-9 が SLE の疾患活動性を反映するだけでなく SLE による臓器障害を予測するバイオマーカーとなる可能性が示された。さらに髄液 Gal-9 が NPSLE において有用なバイオマーカーとなる可能性が示された。バイオマーカーとしての側面の他に, SLE の病態における Gal-9 の意義や NPSLE, ループス腎炎を含め Gal-9 が SLE の病型にどのように関わるのかに関しては今後さらなる研究が必要であると考えられた。

【謝辞】

博士課程への進学及び、本研究を遂行するにあたり実験計画から実験方法に至るまで研究全般にわたり多大なる御支援と御指導を賜りました福島県立医科大学リウマチ膠原病内科学講座教授 右田清志先生に深く感謝申し上げます。また、実験補助やデータ整理など多岐にわたる御支援を頂きました同講座実験助手 菅野祥代様に心より御礼申し上げ、謝辞とさせていただきます。

【参考文献】

1. Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 56 ; 481-490 : 2003
2. Ronnblom L, Elkon KB. Cytokines as therapeutic targets in SLE. *Nat Rev Rheumatol* 6 ; 339-347 : 2010
3. Kirou KA, Lee C, Geroje S, et al. Activation of interferon-alpha pathway identifies a subgroup of systemic lupus erythematosus patients with distinct serologic features and active disease. *Arthritis Rheum* 52 ; 1491-1503 : 2005
4. Bauer JW, Petri M, Batliwalla FM, et al. Interferon-regulated chemokines as biomarkers of systemic lupus erythematosus disease activity: a validation study. *Arthritis Rheum* 60 ; 3098-3107 : 2009
5. Hagberg N, Rönblom L. Systemic Lupus Erythematosus--A Disease with A Dysregulated Type I Interferon System. *Scand J Immunol* 82 ; 199-207 : 2015
6. van den Hoogen LL, van Roon JAG, Mertens JS, et al. Galectin-9 is an easy to measure biomarker for the interferon signature in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 77 ; 1810-1814 : 2018
7. Bianco GA, Toscano MA, Ilarregui JM, et al. Impact of protein-glycan interactions in the regulation of autoimmunity and chronic inflammation. *Autoimmun Rev* 5 ; 349-356 : 2006
8. Zhu C, Anderson AC, Kuchroo VK. TIM-3 and its regulatory role in immune responses. *Curr Top Microbiol Immunol* 350 ; 1-15 : 2011
9. Rodriguez-Manzanet R, DeKruyff R, Kuchroo VK, et al. The costimulatory role of TIM molecules. *Immunol Rev* 229 ; 259-270 :2009
10. Guo L, Yang X, Xia Q, et al. Expression of human T cell immunoglobulin domain

- and mucin-3 (TIM-3) on kidney tissue from systemic lupus erythematosus (SLE) patients. Clin Exp Med 14 ; 381-388 : 2014
11. Pan HF, Zhang N, Li WX, et al. Tim-3 as a new therapeutic target in systemic lupus erythematosus. Mol Biol Rep 37 ; 395-398 : 2010.
 12. Nishikawa H, Enomoto H, Iwata Y, et al. Clinical significance of serum Wisteria floribunda agglutinin positive Mac-2-binding protein level and high-sensitivity C-reactive protein concentration in autoimmune hepatitis. Hepatol Res 46 ; 613-621 : 2016
 13. Ahn SS, Park Y, Lee DD, et al. Serum Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2-binding protein can reflect systemic lupus erythematosus activity. Lupus 27 ; 771-779 : 2018
 14. Bengtsson A, Nezlin R, Shoenfeld Y, et al. DNA levels in circulating immune complexes decrease at severe SLE flares-correlation with complement component C1q. J Autoimmun 13 ; 111-119 : 1999
 15. Wu H, Zeng J, Yin J, et al. Organ-specific biomarkers in lupus. Autoimmun Rev 16 ; 391-397 : 2017
 16. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 40 ; 1725-1734 : 1997
 17. Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. J Rheumatol 29 ; 288-291 : 2002
 18. Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, et al. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of

- Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 39 ; 363-369 : 1996
19. Isenberg DA, Rahman A, Allen E, et al. BILAG 2004. Development and initial validation of an updated version of the British Isles Lupus Assessment Group's disease activity index for patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 44 ; 902-906 : 2005
20. Hanly JG. Diagnosis and management of neuropsychiatric SLE. *Nat Rev Rheumatol* 10 ; 338-347 : 2014
21. Yamasaki K, Tateyama M, Abiru S, et al. Elevated serum levels of Wisteria floribunda agglutinin-positive human Mac-2 binding protein predict the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis C patients. *Hepatology* 60 ; 1563-1570 : 2014
22. ACR Ad Hoc Committee on Neuropsychiatric Lupus Nomenclature. The American College of Rheumatology nomenclature and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes. *Arthritis Rheum* 42 ; 599-608 : 1999
23. Bengtsson AA, Ronnblom L. Role of interferons in SLE. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 31 ; 415-428 : 2017
24. Elkon KB, Wiedeman A. Type I IFN system in the development and manifestations of SLE. *Curr Opin Rheumatol* 24 ; 499-505 : 2012
25. Anderson AC, Anderson DE. TIM-3 in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 18 ; 665-669 : 2006
26. Jiao Q, Qian Q, Zhao Z, et al. Expression of human T cell immunoglobulin domain and mucin-3 (TIM-3) and TIM-3 ligands in peripheral blood from patients with systemic lupus erythematosus. *Arch Dermatol Res* 308 ; 53-561 : 2016

27. Wada J, Kanwar YS. Identification and characterization of galectin-9, a novel beta-galactoside-binding mammalian lectin. *J Biol Chem* 272 ; 6078-6086 : 1997
28. Imaizumi T, Kumagai M, Sasaki N, et al. Interferon-gamma stimulates the expression of galectin-9 in cultured human endothelial cells. *J Leukoc Biol* 72 ; 486-491 : 2002
29. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* 6 ; 1245-1252 : 2005
30. Mehta P, Singh P, Aggarwal A. Serum and urinary galectin-9 and C-X-C motif chemokine ligand 10. *Lupus* 31 ; 482-487 : 2022
31. Stoll T, Sutcliffe N, Mach J, et al. Analysis of the relationship between disease activity and damage in patients with systemic lupus erythematosus--a 5-yr prospective study. *Rheumatology* 43 ; 1039-1044 : 2004
32. Lopez R, Davidson JE, Beeby MD, et al. Lupus disease activity and the risk of subsequent organ damage and mortality in a large lupus cohort. *Rheumatology* 51; 491-498 : 2012
33. Hanly JG, Kozora E, Beyea SD, et al. Review: Nervous System Disease in Systemic Lupus Erythematosus: Current Status and Future Directions. *Arthritis Rheumatol* 71 ; 33-42 : 2019
34. Schwartz N, Stock AD, Putterman C. Neuropsychiatric lupus: new mechanistic insights and future treatment directions. *Nat Rev Rheumatol* 15 ; 137-152 : 2019
35. Jeltsch-David H, Muller S. Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: pathogenesis and biomarkers. *Nat Rev Neurol* 10 ; 579-596 : 2014

36. Fragoso-Loyo H, Atisha-Fregoso Y, Llorente L, et al. Inflammatory profile in cerebrospinal fluid of patients with headache as a manifestation of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* ; 52 ; 2218-2222 : 2013
37. Fragoso-Loyo H, Richaud-Patin Y, Orozco-Narváez A, et al. Interleukin-6 and chemokines in the neuropsychiatric manifestations of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 56 ; 1242-1250 : 2007
38. Duarte-Delgado NP, Vásquez G, Ortiz-Reyes BL. Blood-brain barrier disruption and neuroinflammation as pathophysiological mechanisms of the diffuse manifestations of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 18 ; 426-432 : 2019
39. Yoon T, Ahn SS, Pyo JY, et al. Serum galectin-9 could be a potential biomarker in assessing the disease activity of antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Clin Exp Rheumatol* 40 ; 779-786 : 2021