

# 真性多血症と本態性血小板増加症患者における包括的な血漿サイトカインプロファイルの相違

高桑 輝人

<b>Citation</b>	大阪市医学会雑誌.
<b>Issue Date</b>	2018-12-25
<b>Type</b>	Journal Article
<b>Textversion</b>	Publisher
<b>Right</b>	© 大阪市医学会. © Osaka City Medical Association. Osaka City Medical Association. <a href="https://osakashi-igakukai.com/">https://osakashi-igakukai.com/</a> .

Placed on: Osaka City University Repository

# 真性多血症と本態性血小板増加症患者における 包括的な血漿サイトカインプロファイルの相違

高 桑 輝 人\*

大阪市立大学大学院医学研究科 血液腫瘍制御学

Different Plasma Cytokine Profiles in Patients with Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia

Teruhito Takakuwa

(Department of Hematology, Osaka City University Graduate School of Medicine)

## Abstract

**[Objective]** It is known that plasma cytokine levels increase in myeloproliferative neoplasms (MPN), but the differences of cytokine profiles in each type of MPN or Janus kinase 2 (JAK2) V617F mutation status are still unknown. Therefore, in this study, we compared the plasma cytokine levels and clinical manifestations in patients with polycythemia vera (PV) and essential thrombocytosis (ET) as a function of their JAK2V617F status.

**[Materials and Methods]** Sixty-eight patients diagnosed with MPN, who visited the Department of Hematology, Osaka City University Hospital from July to November 2013, were entered into the study. Thirty-eight patients had PV, and twenty-three patients had ET. We collected information on symptoms, age, sex, and history of thrombohemorrhagic complications at the time of blood sampling. Cytokine levels were measured using Bio-Plex Pro™ assays.

**[Results]** In comparison to PV, a significant increase in IL-12, IL-17, FGF basic, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PDGF-bb, and TNF- $\alpha$  was measured in the ET patients, whereas there was no significant difference except for IP-10 between JAK2 positive and negative patients. Next, in the group at high risk of thrombosis, aged 60 years or older and JAK2 positive, seventeen cytokine levels (IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, G-CSF, IFN- $\gamma$ , IP-10, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , and VEGF) showed a significant increase. In addition, patients with clinical symptoms such as pruritus and rash showed significantly high levels of IL-5.

**[Conclusions]** Various inflammatory cytokines were elevated in the group at high risk of thrombosis and management of cytokine levels may lead to a reduced risk of thrombotic complications and mortality.

## 要 約

**【目的】** 骨髄増殖性疾患 (MPN) では血漿サイトカインレベルが上昇することが知られているが、各病型におけるサイトカインの関与や JAK2V617F 変異の有無による相違は未だ不明である。本研究では真性多血症 (PV) および本態性血小板増加症 (ET) 患者において、サイトカイン、ケモカインが JAK2V617F 変異の有無、さらには臨床症状にどう関与するか検討するために、血漿中のサイトカイン、ケモカインを包括的に測定し、比較検討した。

**【対象と方法】** 対象は 2013 年 7 月 1 日から 2013 年 11 月 30 日までの間に大阪市立大学医学部附属病院血液内科外来を受診した PV 38 例、ET 23 例の合計 61 例の患者である。対象患者より同意取得後、血清、血漿を採取し、採血時の自覚症状、年齢、性別、病歴など情報を収集した。サイトカイン、ケモカインは Bio-Rad 社の Bio-PlexPro™ Assays を用いて測定を行った。

**【結果】** ET は PV に比べて、IL-12, IL-17, FGF basic, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PDGF-bb, TNF- $\alpha$  が有意に高値であったが、JAK2V617F 変異の有無による 2 群比較では、IP-10 を除いて有意な差は認められなかった。また、年齢 60 歳以上かつ JAK2 変異陽性である血栓症のハイリスク群ではローリスク群と比較して、IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5,

\* 大阪市立大学大学院医学研究科臨床医科学専攻 (血液腫瘍制御学) 課程修了  
受付 平成 29 年 8 月 30 日, 受理 平成 29 年 11 月 28 日

IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, G-CSF, IFN- $\gamma$ , IP-10, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , VEGF の 17 種類において有意に高値を示した。さらに、掻痒感や皮疹などの臨床症状を有する有症状群は無症状群と比較して、IL-5 が高値であった。

【結論】 血栓症のハイリスク群において炎症性サイトカインを含む種々のサイトカイン、ケモカインが高値を示しており、サイトカインレベルのコントロールが血栓症の発症や死亡リスクの軽減につながる可能性がある。

**Key Word:** Polycythemia vera, Essential thrombocytosis, Myeloproliferative neoplasms, JAK2, Cytokine

**略語:** MPN; myeloproliferative neoplasms, PV; polycythemia vera, ET; essential thrombocytosis, **JAK2**; Janus activating kinase 2

## 緒 言

骨髓増殖性疾患 (myeloid proliferative neoplasm; MPN) は造血幹細胞の異常によりクローナルな増殖がおこる疾患群で、遺伝子変異が病態の背景にあるとされる。MPN の代表的疾患としては真性多血症 (polycythemia vera; PV), 本態性血小板増加症 (essential thrombocythemia; ET) が挙げられる。これらの疾患は Janus activating kinase 2 (JAK2) V617F 変異の頻度が高く<sup>1)</sup>, MPN の疾患形成に重要な役割を果たしていることが知られている。JAK2V617F 変異は、JAK2 の恒常的な活性化を生じることにより、サイトカインの感受性の増加や、サイトカイン非依存性に増殖シグナルを伝達して細胞増殖を引き起こす<sup>2)</sup>。JAK2V617F 変異は疾患形成に非常に重要な変異であるが、JAK2V617F 変異がない MPN も存在し、同じ JAK2V617F 変異であっても PV と ET では病態が異なることから、この変異のみでは病態を完全に説明することはできない<sup>3)</sup>。

また、MPN では血漿サイトカインレベルの上昇が知られているが<sup>4)</sup>, MPN における血中のサイトカインレベルの上昇が、MPN における病型形成にどのように関わっているかは十分解明されておらず、PV と ET でサイトカインプロファイルが異なっている可能性も考えられる。血中のサイトカインレベルが上昇する機序としては、JAK2 依存性のサイトカインの活性化、サイトカインネットワークや autocrine loop などの機序の存在の可能性が議論されはじめているが<sup>5)</sup>, 増殖した細胞数と血漿サイトカインレベルが必ずしも相関しておらず<sup>6)</sup>, MPN における JAK2V617F 変異と血漿サイトカインレベル上昇との関係は、未だ不明である。

実際、JAK1/2 阻害剤による治療では治療前に上昇していたサイトカインは抑制されるが、JAK2 選択的阻害剤では炎症性サイトカインの変化は見られなかったという報告があり<sup>6-8)</sup>, MPN において JAK2 の活性化が直接、サイトカインの産生や分泌増加に関与していない可能性もある。

本研究では、MPN の表現型、JAK2V617F 変異の有無、臨床症状の有無によってサイトカイン、ケモカインプロ

ファイルの相違があるか否かを検討するために、PV, ET 患者を対象として、血漿中のサイトカイン、ケモカインを包括的に測定し、JAK2V617F 変異陽性例、陰性例両者におけるサイトカイン、ケモカインのプロファイルを比較検討した。

## 対象と方法

### 1. 対象

対象は 2013 年 7 月 1 日から 2013 年 11 月 30 日までの間に大阪市立大学医学部附属病院血液内科外来を受診した、PV 38 例、ET 23 例の合計 61 例の患者である。診断基準は診断年に応じて米国真性赤血球増加症研究グループの基準<sup>9,10)</sup>, 2001 年 WHO 分類<sup>11)</sup>, 2008 年 WHO 分類<sup>12)</sup> を用いた。対象者には本研究の主旨を十分に説明した上で、書面による同意を得ている。本研究は大阪市立大学医学部倫理委員会の承認を得ている (承認番号 2578)。

### 2. 方法

対象患者より同意取得後、血清、血漿を採取し、採血時の自覚症状 (掻痒感、皮疹、頭痛、その他の疼痛、腹部膨満感、全身倦怠感、脾腫)、年齢、性別、病歴 (発症年月日、既往歴、内服歴) の情報を収集した。症状の有無については患者アンケートを行い、情報を得た。一般血液生化学検査項目として血算、乳酸脱水素酵素 (LD)、総ビリルビン、間接ビリルビン、C 反応性蛋白 (CRP) を測定した。JAK2V617F の変異の有無は次項の通り遺伝子解析装置を用いて測定した。サイトカイン、ケモカイン濃度を測定するための患者検体は 1600 $\times$ g の遠心力、20 分、4 $^{\circ}$ C で分離し、血漿を -80 $^{\circ}$ C で凍結保存した。

1) i-densy<sup>TM</sup> IS-5320 による Quenching Probe を用いた、Tm 解析による JAK 遺伝子変異解析

JAK2V617F 変異は、患者全血を用い、変異の有無を遺伝子解析装置 i-densy<sup>TM</sup> IS-5320 (ARKRAY inc., Kyoto, Japan) を用いて測定した<sup>13)</sup>。i-densy は Quenching Probe (QProbe) を用いた Tm 解析法によって変異の有無を検出する (QProbe 法)<sup>13)</sup>。JAK2V617F 変異に相補的な QProbe を設計すると陰性の場合、DNA 結合が弱くな

**Table 1 Clinical characteristics and cytokine levels of Polycythemia vera and Essential thrombocythemia patients**

Characteristics	Polycythemia vera (n=38)		Essential thrombocythemia (n=23)		p value
	Median	range	Median	range	
Age	63	32-84	66	26-80	0.333
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	96	43-336	78	29-237	0.176
Basophil ( $\mu\text{L}$ )	128	0-4624	57	0-192	<b>0.024</b>
Eosinophil ( $\mu\text{L}$ )	249	0-1302	142	0-1040	0.133
Neutrophil ( $\mu\text{L}$ )	6093	272-28560	4911	1711-19197	0.291
Lymphocyte ( $\mu\text{L}$ )	1772	630-4400	1909	576-3619	0.712
Monocyte ( $\mu\text{L}$ )	428	150-4243	359	0-678	0.123
RBC ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	5.75	3.62-8.85	3.75	2.56-6.99	< <b>0.001</b>
Hemoglobin (g/dL)	14.3	10.7-21.2	13.3	9.3-15.3	<b>0.001</b>
Hematocrit (%)	46.1	32.6-67.2	39.3	28.7-51.0	< <b>0.001</b>
Reticulocyte ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	7.99	3.93-16.2	5.47	3.52-10.3	<b>0.002</b>
Platelets ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	31.4	6.3-100	56.6	34.7-109	< <b>0.001</b>
LD (IU/L)	259	141-1060	215	160-333	0.274
Total-Bilirubin (mg/dL)	0.7	0.4-1.6	0.65	0.4-1.4	0.804
Direct-Bilirubin (mg/dL)	0.2	0.2-0.5	0.2	0.1-0.4	0.573
CRP (mg/dL)	0.06	0.01-0.89	0.05	0.01-0.21	0.562

  

Cytokine	Median (pg/mL)	Range (pg/mL)	Median (pg/mL)	Range (pg/mL)	p value
IL-1 $\beta$	1.56	0.52-14.1	2.68	0.59-12.4	0.087
IL-1ra	135	26.0-3385	226	59.1-2173	<b>0.051</b>
IL-2	0	0-382	4.47	0-74.1	0.085
IL-4	1.54	0.25-15.4	2.21	0.44-12.7	0.125
IL-5	6.94	1.65-57.0	10.2	2.16-74.2	0.118
IL-6	4.82	1.13-59.2	8.23	2.42-54.9	0.116
IL-7	4.43	0.71-37.7	6.71	1.59-35.3	0.087
IL-8	11.1	2.47-79.5	17.4	3.32-85.4	0.178
IL-9	5.19	0-1185	7.36	0.6-98.3	0.102
IL-10	8.01	0.5-142	17.0	0.23-102	0.059
IL-12	16.5	1.45-1771	28.4	5.64-296	<b>0.032</b>
IL-13	6.25	0.70-39.6	6.61	2.74-25.1	0.503
IL-15	0	0-105	0	0-12.9	0.736
IL-17	22.3	0-3240	68.6	0-621	<b>0.014</b>
Eotaxin	0.75	0-717	14.8	0-154	0.147
FGF basic	39.8	0-1639	63.4	17.3-232	<b>0.004</b>
G-CSF	55.1	3.02-617	75.9	9.87-312	0.209
GM-CSF	22.1	0-1166	26.2	0-497	0.552
IFN- $\gamma$	71.5	10.2-713	84.2	34.5-681	0.051
IP-10	265	77.2-1469	215	89.2-1728	0.122
MCP-1	14.9	0-80.5	26.5	0-87.4	<b>0.025</b>
MIP-1 $\alpha$	3.21	0.97-200	5.55	1.07-19.5	<b>0.015</b>
PDGF-bb	406	80.2-2280	593	76.5-2719	<b>0.019</b>
MIP-1 $\beta$	38.8	14.7-196	36.0	12.4-77.0	0.988
TNF- $\alpha$	36.2	6.34-786	63.4	10-389	<b>0.045</b>
VEGF	14.3	0-808	27.3	3.9-91.9	0.061

WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; LD, lactate dehydrogenase; CRP, C-reactive protein; IL, interleukin; FGF, fibroblast growth factor; G-CSF, granulocyte-colony stimulating factor; GM-CSF, granulocyte macrophage colony-stimulating factor; IFN, interferon; IP-10, interferon gamma-induced protein 10; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MIP, macrophage inflammatory protein; PDGF, platelet derived growth factor; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor; and VEGF, vascular endothelial growth factor.

**Table 2 Clinical manifestations in patients with PV and ET**

	itching	skin rash	headache	other pain	abdominal distention	weakness	splenomegaly
PV (n=38)	7	2	4	2	4	5	4
ET (n=22)	5	2	2	4	1	5	1

PV, polycythemia vera; and ET, essential thrombocythemia.

**Table 3 Comparison of plasma cytokine levels in symptomatic and asymptomatic patients**

Cytokine	symptomatic patients (n=23)		asymptomatic patients (n=37)		p value
	Median (pg/mL)	Range (pg/mL)	Median (pg/mL)	Range (pg/mL)	
IL-5	10.3	2.85-74.2	6.64	1.65-57.0	<b>0.047</b>
IL-7	5.87	1.93-35.3	4.2	0.71-37.7	0.072
G-CSF	67.6	11.4-312	51.5	3.02-617	0.090
IP-10	274	129-1448	232	77.2-1728	0.069
MIP-1 $\beta$	43.6	15.0-77.0	31.6	12.4-196.3	0.072
TNF- $\alpha$	52.2	9.03-340	33.4	6.34-786	0.099

IL, interleukin; G-CSF, granulocyte-colony stimulating factor; IP-10, interferon gamma-induced protein 10; MIP, macrophage inflammatory protein; and TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor.

り Tm 値が低下するため、蛍光検出される温度の差を利用して変異の有無を確認した。

## 2) サイトカイン、ケモカイン濃度の測定

Bio-Rad 社の Bio-PlexPro™ Assays を用いて 27 種類のサイトカイン、ケモカイン [IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, TNF- $\alpha$ , G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IP-10, Eotaxin, RANTES, MCP-1, VEGF, FGF basic, PDGF-bb] を測定した<sup>14)</sup>。-80℃で凍結保存された患者血漿を 31200×g の遠心力、10 分、4℃で分離を行い、上清をサンプルとした。サンプルを Sample Diluent で 4 倍希釈し、50  $\mu$ L ずつ duplicate で 96 穴プレートへ入れ、そこへ一次抗体付ビーズを 50  $\mu$ L ずつ加え、室温で 60 分間振盪させた。各ウェルを洗浄後、検出用抗体 (ビオチンラベル抗体) を 25  $\mu$ L ずつ加え、さらに 30 分振盪させた。最後に各ウェルにストレプトアビジン-フィコエリスリン溶液を 50  $\mu$ L ずつ加え、遮光下で 10 分間振盪させ、3 回洗浄した後に Assay Buffer を 125  $\mu$ L 加え、Bio-Plex マネージャーソフトウェア ver.6.2 で分析を行った<sup>14)</sup>。変動係数は TNF- $\alpha$ , IL-2, FGF basic が 16.2%-17.4%, IL-6, IL-8, IL-9, IL-15, GM-CSF, MCP-1, VEGF が 11%-14.5%, その他は全て 10% 未満である<sup>15)</sup>。

## 3. 統計

数値はすべて中央値 (median) で示した。患者プロファイル、サイトカイン、ケモカインなどの 2 群比較では

Mann-Whitney test を用いた。統計学的検定には SPSS ver.22.0.0.0 を用い、両側検定で  $p < 0.05$  を有意水準とした。

## 結 果

### 1. PV と ET の比較

同意を取得できた 61 例の患者のうち、38 例が PV、23 例が ET であった (**Table 1**)。性別は PV で男性 23 例 (61%)、女性 15 例 (39%)、ET で男性 8 例 (35%)、女性 15 例 (65%) であった。年齢中央値は PV で 63 歳、ET で 66 歳と有意差はなかった。両群間で白血球数、LD、総ビリルビン、間接ビリルビン、CRP に有意差はなかったが、好塩基球、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、網状赤血球数は PV で有意に高く、血小板数は ET で有意に高かった。検体採取時点で血栓症の既往がある患者は PV で 1 例 (肺塞栓)、ET で 2 例 (ともに足趾血流障害) であった。出血の既往がある患者は PV で 2 例 (消化管出血、鼻出血)、ET で 2 例 (消化管出血、鼻出血) であったが、いずれも軽微であった。両群間で掻痒感、皮疹、頭痛、その他の疼痛、腹部膨満感、全身倦怠感、脾腫の有無に有意差は認めなかった (それぞれ  $p = 0.432, 0.582, 0.871, 0.114, 0.432, 0.348, 0.432$ ) (**Table 2**)。

PV と ET の 2 群において、Bio-Rad 社の Bio-PlexPro™ Assays を用いて 27 種類のサイトカイン、ケモカインを比較した。測定感度未満のものは 0 として処理し、RANTES は 61 例中 55 例 (90.2%) で測定感度以上となったため、

**Table 4 Clinical characteristics and cytokine levels according to JAK2 mutation status**

Characteristics	JAK2 mutation positive (n=38)		JAK2 mutation negative (n=23)		p value
	Median	range	Median	range	
Age	66	37-84	59	26-80	0.059
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	100	43-336	72	29-125	<b>0.002</b>
Neutrophil ( $\mu\text{L}$ )	7699	2150-28560	3739	272-9125	<b>&lt;0.001</b>
Lymphocyte ( $\mu\text{L}$ )	1859	576-3619	1788	744-4400	0.55
RBC ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	456	256-787	522	306-885	0.771
Hemoglobin (g/dL)	13.6	10.5-18.3	14.6	9.3-21.2	0.447
Platelets ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	48.1	12.6-109.6	35.7	6.3-108.5	0.057

  

Cytokine	JAK2 mutation positive (n=38)		JAK2 mutation negative (n=23)		p value
	Median (pg/mL)	Range (pg/mL)	Median (pg/mL)	Range (pg/mL)	
IP-10	274	77.2-1728	202	129-530	<b>0.017</b>
TNF- $\alpha$	41.2	6.34-786	30.4	9.03-340	0.084
VEGF	23.9	3.9-808	10.5	0-91.9	0.063

JAK2, Janus kinase 2; WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; IP-10, interferon gamma-induced protein 10; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor; and VEGF, vascular endothelial growth factor.

分析対象から除外した (Table 1). その結果, 7つのサイトカイン (IL-12, IL17, FGF basic, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PDGF-bb, TNF- $\alpha$ ) で有意差が検出され, いずれも ET で高値を示した. また, IL-1ra, IL-2, IL-7, IL-10, IFN- $\gamma$  および, VEGF の6つは有意ではないが, ET で高い傾向がみられた (それぞれ,  $p=0.051$ ,  $0.085$ ,  $0.087$ ,  $0.059$ ,  $0.051$ ,  $0.061$ ).

PV および ET の患者で搔痒感, 皮疹, 頭痛, その他の疼痛, 腹部膨満感, 全身倦怠感, 脾腫のいずれかを有する患者 (有症状群) といずれも有しない患者 (無症状群) におけるサイトカインレベルを比較した (Table 3). ET 患者 23 例のうち 1 例のみアンケート未回答であった. その結果, 有症状群で IL-5 のレベルが有意に高かった ( $10.3 \text{ pg/mL}$  vs  $6.64 \text{ pg/mL}$ ,  $p=0.047$ ). また, IL-7, G-CSF, IP-10, MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  は有症状群でやや高い傾向を示した.

## 2. JAK2 変異の有無による比較

JAK2V617F 変異の陽性率は PV で 63.2% (24 例), ET で 60.8% (14 例) であった (Table 4). 全体では JAK2V617F 変異陽性が 38 例, 陰性が 23 例であり, 年齢中央値はそれぞれ, 66 歳, 59 歳と JAK2V617F 変異陽性群でやや高い傾向がみられた ( $p=0.059$ ). また, JAK2V617F 変異陽性群では白血球数が有意に高く, 特に好中球数が高かった ( $p<0.001$ ). サイトカインの結果は JAK2V617F 変異陽性群で IP-10 が有意に高く ( $274 \text{ pg/mL}$  vs  $202 \text{ pg/mL}$ ,  $p=0.017$ ), TNF- $\alpha$  および VEGF でも高い傾向がみられた (それぞれ,  $41.2 \text{ pg/mL}$  vs  $30.46 \text{ pg/mL}$ ,  $p=0.084$ ,  $23.9 \text{ pg/mL}$  vs  $10.5 \text{ pg/mL}$ ,  $p=0.063$ ).

## 3. 血栓症リスクによる比較

血栓症のリスクによるサイトカインプロファイルの差異を検討した. 血栓症の既往に関しては研究対象とした 61 例中 3 例しかみられず, 比較は困難であったため, 年齢 60 歳以上かつ JAK2V617F 変異陽性である患者を血栓症の high risk, いずれも該当しない, またはいずれか一方のみに該当する患者を血栓症の low risk として 2 群比較を行った. high risk, low risk に該当する患者はそれぞれ 27 名, 34 名で, 年齢中央値はそれぞれ 69 歳, 54 歳であった (Table 5). 2 群間で白血球数, 赤血球数, 血小板数に有意な差はみられなかった. 全 26 種類のサイトカイン, ケモカインのうち, IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, G-CSF, IFN- $\gamma$ , IP-10, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , VEGF の 17 項目で有意差がみられ, いずれも high risk 群が高値を示した. また, FGF basic, MIP-1 $\beta$  は有意ではなかったが, やはり high risk で高い傾向を示した.

## 考 察

本研究で PV と ET のサイトカイン, ケモカインプロファイルを比較したところ, ET で PV に比べて, サイトカイン, ケモカインレベル (IL-12, IL17, FGF basic, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PDGF-bb, TNF- $\alpha$ ) が有意に高値を示していた. このことは, MPN おける病型にサイトカイン, ケモカインプロファイルの違いが関与していることを示唆する. また, 血栓症のリスクによるサイトカインプロファイルの差異を検討し, 血栓のリスクが高い群で IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-

Table 5 Clinical characteristics and cytokine levels according to risk of thrombosis

Characteristics	High risk (n=27)		Low risk (n=34)		p value
	Median	range	Median	range	
Age	69	60-84	54	26-80	<0.001
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	101	46-336	81.5	29-289	0.098
Neutrophil ( $\mu\text{L}$ )	8085	2654-28560	5594	1711-24276	0.087
Lymphocyte ( $\mu\text{L}$ )	1716	576-3619	1824	744-2730	0.673
RBC ( $\times 10^{12}/\mu\text{L}$ )	420	324-784	418	256-787	0.366
Hemoglobin (g/dL)	13.6	11.2-17.7	13.4	9.3-18.3	0.236
Platelets ( $\times 10^{12}/\mu\text{L}$ )	49.4	16.1-110	48.2	12.6-109	0.796

  

Cytokine	High risk (n=27)		Low risk (n=34)		p value
	Median (pg/mL)	Range (pg/mL)	Median (pg/mL)	Range (pg/mL)	
IL-1 $\beta$	2.26	0.71-14.19	1.33	0.52-12.4	0.007
IL-1ra	229	49-3385	123	26.0-2174	0.004
IL-2	6.02	0-382	0	0-74.1	0.004
IL-4	2.34	0.47-15.5	1.46	0.25-12.8	0.017
IL-5	11.1	3.09-57.1	6.77	1.65-74.3	0.014
IL-6	8.2	2.42-59.3	4.18	1.13-54.9	0.003
IL-7	6.39	1.23-37.7	3.82	0.71-33.4	0.002
IL-8	15.5	3.60-85.4	9.14	2.47-84.3	0.009
IL-9	9.31	0.36-209	5.38	0-1186	0.034
IL-10	13.8	2.40-143	6.61	0.23-102	0.017
IL-12	26.0	5.29-1771	16.5	1.45-212	0.021
FGF basic	67.1	12.4-1640	44.5	0-257	0.059
G-CSF	77.9	16.0-618	48.9	3.02-288	0.013
IFN- $\gamma$	101	28.2-713	72.2	10.2-681	0.041
IP-10	354	147-1729	201	77.3-530	<0.001
MIP-1 $\alpha$	5.12	1.59-201	3.05	0.97-19.5	0.004
MIP-1 $\beta$	39.3	15.1-196	32.6	12.4-57.6	0.076
TNF- $\alpha$	56.8	13.0-787	30.8	6.34-340	0.004
VEGF	27.0	3.90-809	10.6	6.34-340	0.003

WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; IL, interleukin; FGF, fibroblast growth factor; G-CSF, granulocyte-colony stimulating factor; IFN, interferon; IP-10, interferon gamma-induced protein 10; MIP, macrophage inflammatory protein; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor; and VEGF, vascular endothelial growth factor.

10, IL-12, G-CSF, IFN- $\gamma$ , IP-10, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , VEGF の 17 種類で有意に高いレベルを示した。血栓症のハイリスク症例で、広範なサイトカイン、ケモカインが高値を示したことは、血栓症形成に様々なサイトカイン、ケモカイン上昇が複合的に関与している可能性を示唆する。一方、JAK2V617F 変異の有無による 2 群比較では、JAK2 変異陽性の群で好中球数が有意に多かったが、IP-10 を除いて、JAK2V617F 変異の有無で血漿中の可溶性因子のレベルに有意な違いが見られなかった。さらに、掻痒感、皮疹、頭痛、その他の疼痛、腹部膨満感、全身倦怠感、脾腫のいずれかを有する患者はいずれも有しない患者と比べ、IL-5 のレベルが有意に高かった。

PV と ET における年齢中央値や男女比などのプロファイルは既に報告と矛盾するものではなかった<sup>9,16-19</sup>。PV と比

べ、ET で IFN- $\gamma$ , MCP-1, PDGF-bb などのサイトカインが有意に高値を示すことが報告されている<sup>20</sup>、本研究でも同様に ET のサイトカインレベルが有意に高値であった。

活性化した血小板は単独で、または血管内皮細胞との相互作用で種々のサイトカインレベルを引き上げることが知られており<sup>21-23</sup>、ET で複数のサイトカインレベルが上昇していることから、単純に病態を論じることはできないが、本研究で上昇を認めた複数のサイトカインが、PV と ET の病態の差異を反映している可能性はあると考える。PV と ET における血栓性合併症の発生率は報告によって様々であるが、とくに、ET で血栓症が多いという報告はなく、上昇が見られたサイトカインが、ET における血栓形成にどの程度関与しているかは不明である。

JAK2V617F 変異陽性患者は陰性患者と比べ、年齢が高く、白血球数が多いことが報告されており<sup>24,25)</sup>、本研究でも同様の結果が得られた。一方、今回の我々の結果では、JAK2V617F 変異陽性患者と陰性患者では、IP-10 を除いてほとんどのサイトカインで有意差はなく、JAK2V617F 変異そのものが MPN における血漿中のサイトカインレベル上昇に直接的には寄与していない可能性がある。PV と ET のいずれにも共通する危険因子としては血栓症の既往に加え、白血球数、年齢および JAK2V617F 変異が挙げられるが<sup>26-31)</sup>、今回の結果からは、JAK2V617F 変異に伴う可溶性因子の上昇よりむしろ、白血球数の増加および活性化や、血小板の活性化が血栓形成に大きく関与している可能性があると考えられる<sup>32)</sup>。JAK2 はシグナル伝達兼転写活性化因子 3 (STAT3) 経路を介して好中球の活性を上昇させ、STAT5 の経路を介して造血細胞の増殖と分化の調節に重要な役割を果たしていることが報告されており<sup>33)</sup>、好中球は組織因子経路インヒビターを分解することで、血管内での血栓形成を促進することが知られている<sup>34)</sup>。これは多くの報告で JAK2 変異陽性およびそれに起因する白血球数の増加が血栓症合併のリスク因子になっていることの説明の 1 つになると考える。

一般的に血栓症の危険性が高いとされているのは、年齢 60 歳以上、血栓症の既往、JAK2 変異陽性<sup>35)</sup> であるが、本研究において年齢 60 歳以上かつ JAK2 変異陽性である血栓症のハイリスク群で、広範なサイトカイン、ケモカインが高値を示した。IL-1 は単球やマクロファージなどによって産生させる炎症性サイトカインとして古くから知られている<sup>36)</sup>。IL-1 は下流で IL-17 や TNF- $\alpha$  などの発現を誘導することによって炎症を誘導する<sup>37)</sup>。IL-12 は NK 細胞を活性化し、IFN- $\gamma$  の産生を促進し、その IFN- $\gamma$  はナイーブ T 細胞から Th1 への分化誘導を促進する。そして、Th1 が IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  などのサイトカインを産生する。また、IL-7 は IL-12 と相乗的に作用し、IL-2 および IFN- $\gamma$  の産生を促進することが知られている<sup>38)</sup>。FGF basic は強力な血管新生因子であり、内皮細胞分裂促進因子であるが、慢性炎症疾患を有する患者で、その血中濃度が増加することが知られている<sup>39,40)</sup>。MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , RANTES といった CC ケモカインは T リンパ球の活性化に必要なシグナルを提供し、それによって抗原提示を促進し、IL-2 の産生を増加させることが知られている<sup>41,42)</sup>。これらのサイトカインは近年、眼科領域や脳外科領域、循環器疾患領域で幅広く研究されており、急性冠症候群で MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , RANTES が有意に上昇しているとする報告は興味深い<sup>43)</sup>。なかでも MCP-1 は酸化的損傷によって分泌が亢進され、局所にマクロファージを遊走させることによって、炎症反応を惹起することが知られており<sup>44)</sup>、活動性肺結核<sup>45)</sup> や急性膵炎<sup>46)</sup> など、高度の炎症を引き起こ

す疾患で上昇していることが報告されている。これらのサイトカイン、ケモカインが複合的に血栓症の発症に関与している可能性はある。

症状の有無で 2 群比較した際、有症状群で IL-5 が有意に高値であった。IL-5 は好酸球の分化、成熟、維持に不可欠であり<sup>47)</sup>、喘息を含めた多くのアレルギー疾患でその病態に関与している<sup>48)</sup>。掻痒感や皮疹などのアレルギー様の症状を引き起こした結果を示している可能性はある。今回の研究では MPN の病型や血栓症リスクによる群間比較と比べ、症状の有無による群間比較において有意な差異を示すサイトカイン、ケモカインの項目数は少なく、他の要因が MPN における症状形成に大きく関与している可能性が残る。また、症状出現の閾値には個人差があると考えられ、これが解析結果に影響した可能性もある。

本研究の限界は以下の点である。まず、多重解析によって一部の可溶性因子で偶然有意差が生じた可能性がある。また、横断研究であるため、白血化、血栓症発症やサイトカインの推移を経時的観察できていないため、病態との因果関係を結論づけることは出来ない。さらに、診断年が異なるために、異なる診断基準が用いられており、真に均一な集団ではない可能性がある。しかしながら、これらの限界はあるにしても本研究において、特に血栓症のハイリスク群において広範な可溶性因子で有意差が出ていることは血栓症発症の病態を解明する上で意味のあることと考えている。

血栓症のリスクが高いグループにおいて種々の炎症性サイトカインが上昇しているという事実は今後の治療戦略を立てる上で重要な発見であり、サイトカインレベルのコントロールが血栓症の発症や死亡リスクを軽減させることにつながる可能性がある。また、今後、サイトカインを継続的に観察する追加研究などが行われることによって、病勢や血栓リスクと強く相関する特定のサイトカインが治療のメルクマールになる可能性がある。

#### 謝 辞

本稿を終えるにあたり、懇切なる御指導、御高閣を賜りました大阪市立大学大学院医学研究科血液腫瘍制御学教室、日野雅之教授、中前博久准教授に深甚なる謝意を捧げます。また、御協力頂きました大阪市立大学大学院医学研究科血液腫瘍制御学教室の皆様にも厚く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352:1779-1790.
- 2) Reuther GW. JAK2 activation in myeloproliferative neoplasms: a potential role for heterodimeric receptors. *Cell Cycle* 2008;7:714-719.
- 3) Chen E, Beer PA, Godfrey AL, et al. Distinct clinical



- phenotypes associated with JAK2V617F reflect differential STAT1 signaling. *Cancer Cell* 2010;18:524-535.
- 4) Panteli KE, Hatzimichael EC, Bouranta PK, et al. Serum interleukin (IL)-1, IL-2, sIL-2Ra, IL-6 and thrombopoietin levels in patients with chronic myeloproliferative diseases. *Br J Haematol* 2005;130:709-715.
  - 5) Boissinot M, Cleyrat C, Vilaine M, et al. Anti-inflammatory cytokines hepatocyte growth factor and interleukin-11 are over-expressed in Polycythemia vera and contribute to the growth of clonal erythroblasts independently of JAK2V617F. *Oncogene* 2011;30:990-1001.
  - 6) Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA, et al. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *N Engl J Med* 2010;363:1117-1127.
  - 7) Quintás-Cardama A, Vaddi K, Liu P, et al. Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB 018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2010;115:3109-3117.
  - 8) Pardanani A, Gotlib JR, Jamieson C, et al. Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *J Clin Oncol* 2011;29:789-796.
  - 9) Berlin NI. Diagnosis and classification of the polycythemia. *Semin Hematol* 1975;12:339-351.
  - 10) Murphy S, Peterson P, Iland H, et al. Experience of the Polycythemia Vera Study Group with essential thrombocythemia: a final report on diagnostic criteria, survival, and leukemic transition by treatment. *Semin Hematol* 1997;34:29-39.
  - 11) Pierre R, Imbert M, Thiele J, et al. Polycythemia vera. WHO Classification of Tumors. In: Jaffe ES. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 3th ed. Lyon: IARC Press, 2001. pp. 32-34.
  - 12) J. Thiele, H.M. Kvasnicka, A. Orazi, et al. Essential thrombocythaemia. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon: IARC Press, 2008. pp. 48-50.
  - 13) Tanaka R, Kimura S, Ashihara E, et al. Rapid automated detection of ABL kinase domain mutations in imatinib-resistant patients. *Cancer Lett* 2011;312:228-234.
  - 14) Nakamae H, Koh H, Katayama T, et al. HLA haploidentical peripheral blood stem cell transplantation using reduced dose of posttransplantation cyclophosphamide for poor-prognosis or refractory leukemia and myelodysplastic syndrome. *Exp Hematol* 2015;43:921-929.e1.
  - 15) Kokkonen H, Soderstrom I, Rocklov J, et al. Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:383-391.
  - 16) Tefferi A, Rumi E, Finazzi G, et al. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia* 2013;27:1874-1881.
  - 17) Ania BJ, Suman VJ, Sobell JL, et al. Trends in the incidence of polycythemia vera among Olmsted County, Minnesota residents, 1935-1989. *Am J Hematol* 1994; 47:89-93.
  - 18) Gugliotta L, Marchioli R, Fiacchini M, et al. Epidemiological, diagnostic, therapeutic and prognostic aspects of essential thrombocythemia in a retrospective study of the GIMMC group in two thousand patients. *Blood* 1997;90:348a.
  - 19) Srour SA, Devesa SS, Morton LM, et al. Incidence and patient survival of myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms in the United States, 2001-12. *Br J Haematol* 2016;174:382-396.
  - 20) Pourcelot E, Trocme C, Mondet J, et al. Cytokine profiles in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients: clinical implications. *Exp Hematol* 2014;42: 360-368.
  - 21) Hawrylowicz CM, Howells GL, Feldmann M. Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production. *J Exp Med* 1991;174:785-790.
  - 22) Ripoche J. Blood platelets and inflammation: their relationship with liver and digestive diseases. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011;35:353-357.
  - 23) Bester J, Pretorius E. Effects of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 on erythrocytes, platelets and clot viscoelasticity. *Sci Rep* 2016;6:32188.
  - 24) Kittur J, Knudson RA, Lasho TL, et al. Clinical correlates of JAK2V617F allele burden in essential thrombocythemia. *Cancer* 2007;109:2279-2284.
  - 25) Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia* 2008;22:1299-1307.
  - 26) Passamonti F, Thiele J, Girodon F, et al. A prognostic model to predict survival in 867 World Health Organization-defined essential thrombocythemia at diagnosis: a study by the International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood* 2012;120:1197-1201.
  - 27) Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. Gruppo Italiano Studio Policitemia. *Ann Intern Med* 1995;123:656-664.
  - 28) Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, et al. Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J Clin Oncol* 2005;23:2224-2232.
  - 29) Gangat N, Strand J, Li CY, et al. Leucocytosis in polycythaemia vera predicts both inferior survival and leukaemic transformation. *Br J Haematol* 2007;138:354-358.
  - 30) Barbui T, Finazzi G, Carobbio A, et al. Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization-essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis). *Blood* 2012;120:

- 5128-5133; quiz 5252.
- 31) Barbui T, Vannucchi AM, Buxhofer-Ausch V, et al. Practice-relevant revision of IPSET-thrombosis based on 1019 patients with WHO-defined essential thrombocythemia. *Blood Cancer J* 2015;5:e369.
  - 32) Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larrán A, Reverter JC, et al. Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. *Haematologica* 2006;91:169-175.
  - 33) Oku S, Takenaka K, Kuriyama T, et al. JAK2 V617F uses distinct signalling pathways to induce cell proliferation and neutrophil activation. *Br J Haematol* 2010;150:334-344.
  - 34) Ruf W, Ruggeri ZM. Neutrophils release brakes of coagulation. *Nat Med* 2010;16:851-852.
  - 35) Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2017;92:94-108.
  - 36) Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87:2095-2147.
  - 37) Nakae S, Saijo S, Horai R, et al. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:5986-5990.
  - 38) Fry TJ, Mackall CL. Interleukin-7: from bench to clinic. *Blood* 2002;99:3892-3904.
  - 39) Kanazawa S, Tsunoda T, Onuma E, et al. VEGF, basic-FGF, and TGF-beta in Crohn's disease and ulcerative colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *Am J Gastroenterol* 2001;96:822-828.
  - 40) Gudbjörnsson B, Christofferson R, Larsson A. Synovial concentrations of the angiogenic peptides bFGF and VEGF do not discriminate rheumatoid arthritis from other forms of inflammatory arthritis. *Scand J Clin Lab Invest* 2004;64:9-15.
  - 41) Taub DD, Turcovski-Corrales SM, Key ML, et al. Chemokines and T lymphocyte activation: I. Beta chemokines costimulate human T lymphocyte activation in vitro. *J Immunol* 1996;156:2095-2103.
  - 42) Wong M, Fish EN. RANTES and MIP-1alpha activate stats in T cells. *J Biol Chem* 1998;273:309-314.
  - 43) Kobusiak-Prokopowicz M, Orzeszko J, Mazur G, et al. Kinetics of chemokines in acute myocardial infarction. *Kardiol Pol* 2005;62:301-14; discussion 315-316.
  - 44) Du Z, Wu X, Song M, et al. Oxidative damage induces MCP-1 secretion and macrophage aggregation in age-related macular degeneration (AMD). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2016;254:2469-2476.
  - 45) Liang Y, Wang Y, Li H, et al. Evaluation of a whole-blood chemiluminescent immunoassay of IFN- $\gamma$ , IP-10, and MCP-1 for diagnosis of active pulmonary tuberculosis and tuberculous pleurisy patients. *APMIS* 2016;124:856-864.
  - 46) Yang YZ, Xiang Y, Chen M, et al. Clinical significance of dynamic detection for serum levels of MCP-1, TNF- $\alpha$  and IL-8 in patients with acute pancreatitis. *Asian Pac J Trop Med* 2016;9:1111-1114.
  - 47) Sanderson CJ. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 1992;79:3101-3109.
  - 48) DeKruyff RH, Yu S, Kim HY, et al. Innate immunity in the lung regulates the development of asthma. *Immunol Rev* 2014;260:235-248.

(英文校正者: Nigel Douglas Hooper)