

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08973

研究課題名(和文)抗CCP抗体産生B細胞レパトア解析による新規関節リウマチモニタリング方法の開発

研究課題名(英文)Development of a new rheumatoid arthritis monitoring method by analysis of anti-CCP antibody-producing B cell repertoire

研究代表者

石井 智徳 (ISHII, Tomonori)

東北大学・大学病院・特任教授

研究者番号：10282138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：既存治療を行ったにもかかわらず活動性が消失しなかった関節リウマチ患者15名に対してアバタセプトによる治療を行った。治療前に、患者より採血を行い、末梢血よりリンパ球分離を行った。得られたリンパ球よりB細胞レセプターおよびT細胞レセプターのレパトア解析を行った。これらの患者に対して、アバタセプトによる治療を3か月以上行った。治療後、2度目のB細胞、およびT細胞のレパトア解析を行い、治療前のレパトアと比較した。アバタセプトによる治療は70%の患者で有効性を認めた。これら治療により効果を認めた患者から得られたリンパ球において、治療前後で特定のT細胞レパトアの減少を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、関節リウマチ患者における活動性と関連したTCRのレパトアが存在する事が解明された。またこうしたレパトアがアバタセプトの治療により正常化することが確認できた。これにより、治療前に、こうした特定のレパトアの存在の有無をみることで、治療前からアバタセプトの有効性が期待できる患者群を特定できることが可能性が示された。また、治療後にこうしたレパトアが改善したことをマーカーに治療方針を決定することができる可能性が示唆された。これにより、薬剤の効率的な使用が可能になり、無駄な治療をする確率を減らすことで、患者の安全性のみでなく社会経済的観点からも有用性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Abatacept was administered to 15 patients with rheumatoid arthritis who did not lose their activity despite existing treatment. Before treatment, peripheral blood was collected from patients and lymphocytes were separated from peripheral blood. Repertoire analysis of B cell receptor and T cell receptor was performed on the obtained lymphocytes. Abatacept was treated for more than three months in these patients. After treatment, a second repertoire analysis of B cells and T cells was performed and compared with the repertoire before treatment. Abatacept treatment was effective in 70% of patients. Specific T cell repertoire decreased before and after treatment in lymphocytes obtained from patients who responded to these treatments

研究分野：リウマチ膠原病

キーワード：関節リウマチ レパトア解析 アバタセプト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 関節リウマチ (RA) は、関節を主座とした自己免疫疾患であり、その病態の本態は原因不明の増殖性滑膜炎であり、多量の炎症性サイトカインが病的滑膜から産生され、RA の発症、病状の進展に重要な役割を果たしている。RA 治療の進歩の中心は、TNF、IL6 を中心としたサイトカインの働きを、モノクローナル抗体を使って抑制し病態に介入する抗サイトカイン療法であるが、これに加え T 細胞抑制療法が臨床現場で応用されている。アバタセプト (CTLA4-Ig) は T 細胞の共刺激分子からのシグナルを抑制する事により T 細胞の活性化を抑制し RA の臨床病態を著明に改善させる。RA においても、その病態に重要な役割を持つ免疫担当細胞の調整は、その後の自己抗体産生の抑制につながる病態の改善に原因に近い部分で効果を及ぼす。近年、大きく進歩した RA 治療であるが問題点がいくつも存在する。第一は、薬剤の費用が非常に高額であることである。いかに効率的にこうした高額な薬剤を使用するかは重要な課題である。第二に、現在の治療は、結局効果があるかないか治療施行した結果で判断しながら変更して調整する戦略とならざるを得ない。第三に薬剤が著効し臨床的寛解にいたった症例においても、薬剤を中止する事により再燃し、再投与を必要とする症例が 50%以上で存在するとされ、現在はできるだけ効果のある薬剤は中止しないほうがよいという意見が増えている。

(2) RA の寛解とは、症状が完全に消失する臨床的寛解、骨破壊が完全に抑制される構造的寛解、日常生活動作が問題なくできる HAQ 寛解などが寛解の定義とされてきた。ここに、免疫学的活動性が完全に消失した、免疫学的寛解という概念が出現してきている。これは免疫学的な活動性を完全に消失させるという考え方で、達成できれば薬剤を中止できるのではないかという仮説がある。こうした免疫学的寛解を確認する信頼できるマーカーが存在すれば薬剤中止のためのメルクマールとなると考えられる。その一つとして T 細胞、B 細胞受容体の遺伝子構造を利用したレパトア解析が重要となる。

2. 研究の目的

(1) 大きく進歩した RA 治療であるが、使用される薬剤の費用が非常に高額であること、有効性が高い製剤でも臨床的寛解まで導ける患者は 20 - 30%程度であり治療有効性は治療施行前には予測できない事、また寛解患者の薬剤中止の可能性も中止前に判定できないという問題がある。これまでの RA の治療目標である寛解は病状を完全に落ち着かせることを意味していたが、免疫学的活動性が完全に消失した免疫学的寛解を達成できれば薬剤を中止できる可能性もあり、実際にそうした患者は存在する。現在は、こうした免疫学的寛解のメルクマールとなる信頼できるマーカーが存在しないためあくまで臨床的な寛解を目標にするしかないが、新たな有用なマーカーの開発により治療の個別化、効率のよい治療を施行できるようにするのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) B 細胞レパトア解析手法の確立

PCR 増幅時のバイアスを少なくするため、アダプターライゲーション法を基本とした、遺伝子特異的非バイアス増幅法を開発する。

この方法は、cDNA の 5' に特異的に一本鎖アダプターを結合させて、それをもとに PCR 法で増幅する。このため、PCR プライマーは最小でよく、不要な遺伝子増幅は起こらないため、バイアスをかけずに遺伝子を増幅できる。

(2) RA 患者にアバタセプト治療患者の TCR および BCR レパートリー解析

対象

平成 28 年年 4 月より平成 29 年年 3 月までの期間に、東北大学血液免疫科および共同研究施設において RA として通院し、アバタセプトにて加療される患者を対象とする。

診断方法 関節リウマチ：ACR criteria2010

対象目標数：40 人 (当院での目標数は 20 人) 対象施設：東北大学病院

患者選択基準

既存治療に治療抵抗性の患者で、アバタセプト治療を行った患者

T 細胞および B 細胞レパートリー解析

評価項目は T 細胞レパトアおよび B 細胞レパトアの アバタセプト治療前後での変動である。これらの解析と同時に疾患活動性も検討し、治療効果と、レパトアの変化に関する相関を確認する。

4. 研究成果

(1) B 細胞レパトア解析について。

これまで 1018 もの多様性のある T 細胞/B 細胞受容体の解析は、その多様性ゆえに困難であったが、次世代シーケンサーの登場により網羅的解析が現実のものとなった。次世代シーケンサーの利用には、RNA シーケンスを基盤としたシーケンズ技術を用いる。この際、mRNA から cDNA ライブラリー調製を行い、さらに、PCR 法によってライブラリーを、バイアスをかけずに増幅する必要がある。例えば、ヒト T 細胞受容体 鎖の V 領域は 117 種類存在するため、multiplex 法で代表される、多重プライマーを用いて増幅する方法がアメリカで開発され、実

用化されている。しかし、多重プライマーを用いる方法ではそれぞれのプライマーの結合強度が異なるため、どうしても PCR 増幅にバイアスがかかってしまうことが指摘されていた。レパトア解析の方法と結果。我々は、PCR 増幅時のバイアスを少なくするため、アダプターライゲーション法を基本とした、遺伝子特異的非バイアス増幅法を開発した。この方法は、cDNA の 5' に特異的に一本鎖アダプターを結合させて、それをもとに PCR 法で増幅する。このため、PCR プライマーは最小でよく、不要な遺伝子増幅は起こらないため、バイアスをかけずに遺伝子を増幅できる。29 年度は、この方法を用いて B 細胞受容体 H 鎖の検出を試み、B 細胞受容体 H 鎖 PCR プライマー設計を行って非バイアス遺伝子増幅技術を確立した。さらに、次世代シーケンサーでペアエンドシーケンスを行うことで、目的長の遺伝子配列を検出することができた。

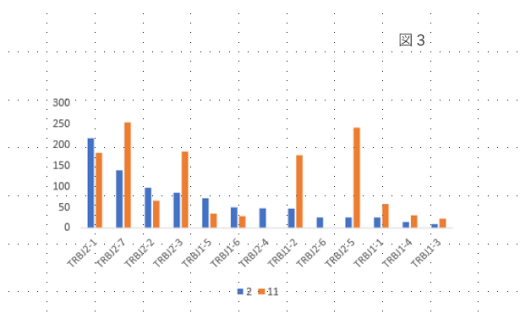
(2) 関節リウマチ患者にアバタセプト治療

既存治療を行ったにもかかわらず活動性が消失しなかった関節リウマチ患者 15 名に対してアバタセプトによる治療を行った。これらの患者に対して、アバタセプトによる治療を 3 か月以上行った。アバタセプトによる治療は 70% の患者で有効性を認めた。

(3) 関節リウマチ患者に対するアバタセプト治療前後でのレパトア

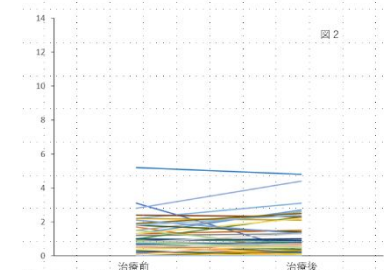
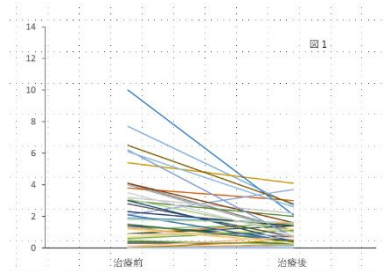
上記(2)でアバタセプト治療を行った関節リウマチ患者 15 名に対して、治療前に、患者より採血を行い、末梢血よりリンパ球分離を行った。得られたリンパ球より B 細胞レセプターおよび T 細胞レセプターのレパトア解析を行った。更にアバタセプトによる治療を 3 か月以上行った後、2 度目の B 細胞、および T 細胞のレパトア解析を行い、治療前のレパトアと比較した。

治療効果があった患者サンプルから得られた T 細胞レパトアのなかで、特定のレパトアは治療後に大きく減少しているものが存在する事が示された。治療が有効であった患者



から得られた TCR 鎖の V 領域における

レパトア解析の結果を図 1 に示す。一方、同様の解析をアバタセプト治療に反応が乏しかった患者で得られたリンパ球で行うと、治療効果があった患者にみられた大きなレパトア



の変化はみとめられなかった。(図 2)

ここで行われた解析を TCR 鎖のレパトアに対しても行った。治療前後での変化に関してまとめたデータを図 3 に示す。

<引用文献> 1) Human CD43+ B cells are closely related not only to memory B cells phenotypically but also to plasmablasts developmentally in healthy individuals.

Inui M, Hirota S, Hirano K, Fujii H, Sugahara-Tobinai A, Ishii T, Harigae H, Takai T. Int Immunol. 2015 Jul;27(7):345-55.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ogata A1,2, Tanaka Y, Ishii T, Kaneko M, Miwa H, Ohsawa S; SHINOBI study group.	4. 巻 28
2. 論文標題 A randomized, double-blind, parallel-group, phase III study of shortening the dosing interval of subcutaneous tocilizumab monotherapy in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to subcutaneous tocilizumab every other week: Results of the 12-week double-blind period	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol	6. 最初と最後の頁 76-84
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2017.1332507	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ogata A, Tanaka Y, Ishii T, Kaneko M, Miwa H, Ohsawa S, Yamakawa R	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 Long-term safety and efficacy of weekly subcutaneous tocilizumab monotherapy in patients with rheumatoid arthritis who had an inadequate response to subcutaneous tocilizumab every other week: Results from the open-label extension of the SHINOBI study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol	6. 最初と最後の頁 Epub ahead
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2018.1533514	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishii T, Tanaka Y, Kawakami A, Saito K, Ichinose K, Fujii H et al	4. 巻 28
2. 論文標題 Multicenter double-blind randomized controlled trial to evaluate the effectiveness and safety of borteomib as a treatment for refractory systemic lupus erythematosus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol	6. 最初と最後の頁 986-992
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2018.1432331	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shirai T, Hanaoka R, Goto Y, Kojima I, Ishii Y, Hoshi Y, Fujita Y, Shirota Y, Fujii H, Ishii T, Harigae H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Takayasu Arteritis Coexisting with Sclerosing Osteomyelitis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.0329-17.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishii T, Tanaka Y, Kawakami A, Saito K, Ichinose K, Fujii H, Shiota Y, Shirai T, Fujita Y, Watanabe R, Chiu SW, Yamaguchi T, Harigae H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Multicenter double-blind randomized controlled trial to evaluate the effectiveness and safety of bortezomib as a treatment for refractory systemic lupus erythematosus.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2018.1432331	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ojima Y, Sawada K, Fujii H, Shirai T, Saito A, Kagaya S, Aoki S, Takeuchi Y, Ishii T, Nagasawa T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody-associated Vasculitis (AAV) Restricted to the Limbs: A Case Report.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.9848-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda T, Fujii H, Nose M, Kamogawa Y, Shirai T, Shiota Y, Ishii T, Harigae H.	4. 巻 19(1)
2. 論文標題 Bortezomib treatment induces a higher mortality rate in lupus model mice with a higher disease activity.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-017-1397-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shirai T, Fujii H, Saito R, Nasu K, Kamogawa Y, Fukuhara N, Fujita Y, Shiota Y, Ishii T, Harigae H.	4. 巻 69(3)
2. 論文標題 Relapsing Polychondritis Complicated by Myelodysplastic Syndrome Is Resistant to Immunosuppression: Comment on the Article by Dion et al.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 682-683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.39969.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaneko Yuko, Kameda Hideto, Ikeda Kei, Ishii Tomonori, Murakami Kosaku, Takamatsu Hyota, Tanaka Yoshiya, Abe Takayuki, Takeuchi Tsutomu	4. 巻 78
2. 論文標題 Response to: 'Tocilizumab in patients with adult-onset Still's disease refractory to glucocorticoid treatment' by Lee	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 e134 ~ e134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/annrheumdis-2018-214653	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogata Atsushi, Tanaka Yoshiya, Ishii Tomonori, Kaneko Motohide, Miwa Hiroko, Ohsawa Shino, Yamakawa Reiji, the SHINOBI Study Group	4. 巻 29
2. 論文標題 Long-term safety and efficacy of weekly subcutaneous tocilizumab monotherapy in patients with rheumatoid arthritis who had an inadequate response to subcutaneous tocilizumab every other week: Results from the open-label extension of the SHINOBI study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 767 ~ 774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2018.1533514	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mutoh Tomoyuki, Shirai Tsuyoshi, Fujii Hiroshi, Ishii Tomonori, Harigae Hideo	4. 巻 47
2. 論文標題 Insufficient Use of Corticosteroids without Immunosuppressants Results in Higher Relapse Rates in Takayasu Arteritis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Rheumatology	6. 最初と最後の頁 255 ~ 263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3899/jrheum.181219	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shirai T, Shirota Y, Fujii H, Ishii T, Harigae H	4. 巻 48
2. 論文標題 Four distinct clinical phenotypes of vasculitis affecting medium-sized arteries	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scandinavian Journal of Rheumatology	6. 最初と最後の頁 308 ~ 314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/03009742.2018.1551965	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 石井 智徳(東北大学病院 臨床研究推進センター), 川口 鎮司, 石川 治, 竹森 弘光, 高澤 徳彦, 小林 仁, 安岡 秀剛, 高橋 裕一, 小寺 隆雄, 高井 修, 中屋 来哉, 泉山 朋政, 齋藤 真一郎, 鴨川 由起子, 藤田 洋子, 白井 剛志, 城田 祐子, 藤井 博司, 張替 秀郎
2. 発表標題 強皮症・MCTD・重複症候群1 全身性強皮症に伴う難治性皮膚潰瘍に対する低出力衝撃波療法の有効性・安全性検証試験
3. 学会等名 日本リウマチ学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古賀 智裕, 日高 利彦, 岡田 覚丈, 荒牧 俊幸, 福田 孝昭, 高橋 裕一, 石井 智徳
2. 発表標題 全国多施設前向きコホート研究(Apple study)を用いた関節リウマチ患者における機能的改善の予測因子に関する検討
3. 学会等名 九州リウマチ
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 城田 祐子, 星 陽介, 佐藤 紘子, 藤田 洋子, 白井 剛志, 藤井 博司, 石井 智徳, 張替 秀郎
2. 発表標題 リウマチ性疾患の合併症(感染症以外・アミロイドーシス・その他)3:その他2 膠原病性肺動脈性肺高血圧症(CTD-PAH)における予後予測因子と死因について
3. 学会等名 日本リウマチ学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井智徳
2. 発表標題 全身性エリマトーデスにおける新規治療薬の開発戦略
3. 学会等名 第61回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ishii T, Kawaguchi Y, Ishikawa O, Takasawa N, Koderu T, Yasuoka H, Takahashi Y, Takai O, Nakaya I, Fujii H, Kamogawa Y, Shirota Y, Shirai T, Fujita Y, Saito S, Shimokawa H and Harigae H.
2. 発表標題 Four-Distinct Phenotypes of Patients with Necrotizing Arteritis of Medium and Small Artery
3. 学会等名 2017 ACR/ARHP Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石井 智徳
2. 発表標題 全身性強皮症における皮膚潰瘍
3. 学会等名 第32回日本臨床リウマチ学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Christine Xu, Patrick Nolaín, Qiang Lu, Anne Paccaly, Melitza Iglesias-Rodriguez, Gregory St John, Chad Nivens, Rafael Maldonado, Tomonori Ishii
2. 発表標題 SARILUMAB AND TOCILIZUMAB RECEPTOR OCCUPANCY (RO), AND EFFECTS ON C-REACTIVE PROTEIN (CRP) LEVELS, IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS (RA)
3. 学会等名 EULAR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Christine Xu, Patrick Nolaín, Qiang Lu, Anne Paccaly, Melitza Iglesias-Rodriguez, Gregory St John, Chad Nivens, Rafael Maldonado, Tomonori Ishii
2. 発表標題 Sarilumab and Tocilizumab Receptor Occupancy (RO), and Effects on C-Reactive Protein (CRP) Levels, in Patients with Rheumatoid Arthritis (RA)
3. 学会等名 ACR (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学 血液・免疫病学分野
<http://www.rh.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小笠原 康悦 (Ogasawara kohetsu) (30323603)	東北大学・加齢医学研究所・教授 (11301)	
研究分担者	白井 剛志 (SHIRAI Tsuyoshi) (20646997)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	藤井 博司 (FUJII HIROSHI) (30531321)	東北大学・医学系研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	城田 祐子 (SHIROTA YUKO) (20455819)	東北医科薬科大学・医学部・准教授 (31305)	