

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16209

研究課題名(和文) 定量プロテオミクスによるANCA関連血管炎の活動性/臓器障害マーカーの同定と解析

研究課題名(英文) Identification and analysis of biomarkers of disease activity and organ involvement in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis by quantitative proteomics

研究代表者

石崎 淳 (Ishizaki, Jun)

愛媛大学・医学部附属病院・講師(病院教員)

研究者番号：00620527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は質量分析による選択的反応モニタリング法を用いてANCA関連血管炎(AAV)の血清プロテオーム解析を行い、疾患活動性マーカーとしてTissue Inhibitor Of Metalloproteinase 1 (TIMP-1)、腎障害(腎予後予測)マーカーとしてCD93、Transketolaseを見出した。AAV患者における皮膚、胃粘膜および腎の血管炎部位の免疫組織染色では、TIMP-1はS100陽性間葉系細胞に発現されており、CD93はCD31陽性の血管内皮細胞に高発現されていた。可溶性CD93は、濃度依存的にマクロファージからのTNF- α 、IL-6、IL-8産生を亢進させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ANCA関連血管炎(AAV)の活動性マーカーであるANCA値やCRPは必ずしも疾患活動性や臓器障害を反映せず、新規バイオマーカーが望まれている。我々は質量分析を用いた選択的反応モニタリング法により微量タンパク質の高感度な一斉定量解析を行い、AAVの血清プロテオームを大規模解析し、既存マーカーより優れた活動性マーカー(TIMP-1)や新規の腎病変マーカー(CD93、TKT)を同定した。新規マーカーによる客観的な活動性および重症度評価を確立することで、適切な治療決定、治療効果判定や再燃予測が可能となる。マーカータンパク質の発現細胞や機能解析により疾患発症機序の解明や新規治療標的の探索につながる。

研究成果の概要(英文)：We identified promising biomarkers of disease activity and organ involvement in AAV with a targeted proteomics approach. Our analysis demonstrated the effectiveness of TIMP-1 as a marker of AAV disease activity. We identified CD93 and Transketolase as novel markers for evaluation of renal involvement and renal outcome in AAV. In skin, stomach and renal involvement in AAV patients, TIMP-1 was expressed in S100-positive mesenchymal cells and CD93 was expressed in CD31-positive vascular endothelial cells. Soluble form of CD93 induced the productions of TNF- α , IL-6 and IL-8 from local macrophages in a concentration dependent manner.

研究分野：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：ANCA関連血管炎 バイオマーカー ターゲットプロテオミクス 顕微鏡的多発血管炎 多発血管炎性肉芽腫症 好酸球性多発血管炎性肉芽腫症

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

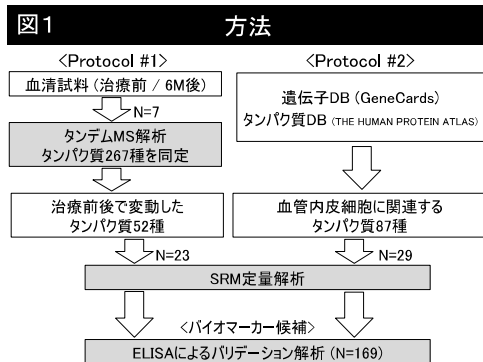
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ANCA 関連血管炎(AAV)は、抗好中球細胞質抗体(ANCA)と関連した小血管に主病変がある壊死性血管炎である。AAV には顕微鏡的多発血管炎(MPA)、多発血管炎性肉芽腫症(GPA)、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症(EGPA)がある。日常診療で使用される疾患活動性マーカーとして CRP や ANCA 値が挙がるが、CRP は AAV に非特異的な炎症マーカーであり、ANCA 値は活動性と無関係に変動する症例が 20~30%にみられ、ANCA 陰性例も存在する。現在、疾患活動性指標として Birmingham Vasculitis Activity Score(BVAS)があるが、各臓器障害の精査実施の有無や、評価者により点数にばらつきがあるため客観性に欠ける。以上より、現在の活動性指標には非常に多くの問題があり、客観的評価が可能な新規バイオマーカーが切望されている。

AAV の活動性のバイオマーカーの既報の大部分が、マーカー候補蛋白質を任意に選出した上で数十例の患者血清で解析しており、全てが実用化に至っていないのが現状である。AAV の大規模コホート研究レベルで既報のない未知のマーカー候補を含んだ網羅的なバイオマーカーの探索が必要である。我々は安定同位体標識した内部標準ペプチドと 3 連四重極型質量分析を用いた選択反応モニタリング法(Selected reaction monitoring, SRM)による血中の微量タンパク質 (ng/mL レベル)を標的とする高感度な定量解析システム(ターゲットプロテオミクス)を確立している(Takemori N et al. Molecular Biosystems 2016)。本研究では、厚生労働省難治性血管炎に関する調査研究班が主導で行っている前向きコホート研究(RemIT-JAV-RPGN)登録患者 152 名と当院の患者 17 名と合わせた 169 名(MPA 105 例、GPA 36 例、EGPA 25 例、分類不能 3 例)の多検体血清試料を用いて、大規模な血清プロテオーム定量解析を行うことができるため、新規の活動性および臓器障害のバイオマーカーの同定が可能になり、その信頼性が増すことが考えられる。

我々は、タンデム質量分析を用いて AAV 患者 7 名の治療前/治療 6 ヶ月後の血清試料中に発現する 267 種のタンパク質を同定した(図 1)。そのうち、血管炎との関連しうる 52 種を選出し(プロトコール#1)さらに、遺伝子・タンパク質データベース(GeneCards、THE HUMAN PROTEIN ATLAS)から血管内皮細胞に関連するタンパク質 87 種を選出している(プロトコール#2)。さらに、プロトコール#1 では 23 名、プロトコール#3 では 29 名の AAV 患者の治療前後の血清を用いた SRM 定量解析を開始している。今後、治療前と寛解期(治療 6 か月後)を比較し、統計学的に有意な変動を示す有望なマーカーを選出し、多検体血清試料を用いて、ELISA によるバリデーション解析を進める。今後、信頼性の高い新規活動性および臓器障害のマーカーを同定することができ、AAV の血清タンパク質での客観的な活動性、重症度および臓器障害指標が作成できる。さらにタンパク質の機能解析によって AAV 発症機序の解明や新規治療標的の探索につながる。



2. 研究の目的

ANCA 関連血管炎(AAV)の診断マーカーとなる血清 ANCA 値は必ずしも病勢とは一致しない。我々は内部標準ペプチドと 3 連四重極型質量分析計を用いた選択反応モニタリング法による血中微量タンパク質(サブ ng/mL レベル)を標的とする高感度な定量解析システムを確立している。この手技を用い、AAV 患者 169 名を対象に治療前と治療 6 か月後の血清プロテオームの大規模定量解析を行う。本研究では SRM 定量解析で疾患活動性、重症度、臓器障害を反映する新規マーカー候補を選出し、有望なマーカー候補については多検体試料で ELISA によるバリデーション解析を行い、疾患活動性・重症度・臓器障害を反映するバイオマーカーの同定、これらのマーカータンパクの AAV の病態への関与について解析し、新たな治療標的タンパク質の探索を行う。

3. 研究の方法

(1) AAV 血清試料から、SRM 定量解析および多検体試料での ELISA によるバリデーション解析を行い、活動性、臓器障害マーカー(腎病変)を反映するマーカーを同定する。

マーカー候補タンパク質の SRM 解析

マーカー候補タンパク質に関して、イオン化しやすく SRM 解析に適した標的のアミノ酸配列を選択し、その配列を有する安定同位体標識ペプチドを内部標準として合成する。次に合成ペプチドとトリプル四重極型質量分析システムを用いて、候補タンパク質の定量解析用 SRM アッセイを構築する。分析に用いる血清試料は、主要 14 タンパク質をカラム除去した後、トリプシンで消化処理を行い、マイクロ逆相カートリッジで脱塩精製後に、SRM 解析に供する。

SRM 定量解析で同定したマーカー候補の ELISA によるバリデーション解析

SRM 定量解析結果から、治療前/6 か月後(寛解期)、および治療前/健康人の比較で AUC と陽性尤度比を算出後、有望なマーカーを選出し、多検体血清試料(n=169)を用いて ELISA 解析を行う。

(2) マーカータンパク質によるマクロファージのサイトカイン・ケモカイン産生作用の解析

健康人 8 名の末梢血単核細胞(PBMC)から磁気細胞分離法で CD14+単球を単離後、M-CSF を含む M-SFM で 7 日間培養しマクロファージに分化させた。小麦胚芽無細胞タンパク質合成法で作成した可溶性 CD93(200ng/mL、1 µg/mL、3 µg/mL)を加え、2 日培養後の上清を回収し ELISA 法で

TNF- α 、IL-6、IL-8 を測定した。TIMP1(2 μ g/mL)、LRG1(10 μ g/mL)、S100A8/A9(20 μ g/mL)、H4(50 μ g/mL)でも同様に検証した。

(3) 免疫組織染色によるマーカータンパク質の発現臓器や発現細胞の同定

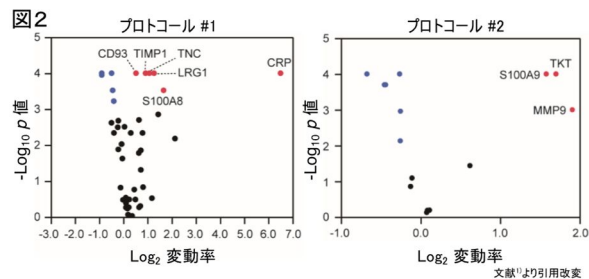
AAV 患者の血管炎部位(皮膚、胃、腎)の生検組織を用いて免疫染色を行い、Tissue Inhibitor Of Metalloproteinase 1 (TIMP-1) と CD93 の産生細胞を解析した。

4. 研究成果

(1)SRM 定量解析および ELISA による AAV の活動性バイオマーカーの同定

マーカー候補タンパク質の SRM 解析

AAV 患者の治療前後の血清を用いた SRM アッセイで解析した結果、治療前有意に血中濃度が上昇するタンパク質で ROC 曲線下面積 (AUC) >0.7 であったものとして、protocol 1 から Tenascin (TNC)、CRP、TIMP-1、Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1 (LRG1)、S100A8 および CD93 の 6 種、protocol 2 から、S100A9、MMP9 および Transketolase (TKT) の 3 種が見出され、これら活動をマーカー候補とした(図 2)。これらのマーカー候補に MPO-ANCA を加え、ELISA によるバリデーション解析を行った。



これらのマーカー候補に MPO-ANCA を加え、ELISA によるバリデーション解析を行った。

SRM 定量解析で同定したマーカー候補の ELISA によるバリデーション解析

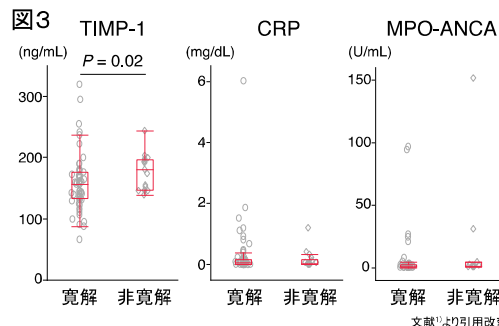
62 名の寛解達成患者 (MPA33 名、GPA15 名、EGPA11 名、分類不能 3 名) において治療前と治療 6 か月後の血清を用いて ELISA 定量解析をした結果、MMP9 以外の 8 種、TNC、CRP、TIMP-1、LRG1、S100A8/A9、CD93、TKT、MPO-ANCA は、AUC>0.7 をもって、AAV の高活動期と寛解期を判別できる有用なバイオマーカーとして同定された(表 1)。169 名の治療前 AAV 患者と 30 名の健康人ドナーとの比較においても、MMP9 以外の 8 種は、AUC>0.8 をもって、AAV と健康人を判別できる有用なマーカーであった。

表 1

バイオマーカー	高活動期 (n=62)	寛解期 (n=62)	p値	AUC	COP	感度	特異度
TIMP-1 (ng/mL)	329 (250-405)	156 (134-175)	<0.0001	0.93	205	92	89
CRP (mg/dL)	6.34 (2.14-11.5)	0.06 (0.01-0.16)	<0.0001	0.93	1.22	82	95
TNC (ng/mL)	144 (97.7-272)	47.0 (37.0-68.3)	<0.0001	0.88	72.7	90	79
LRG1 (μ g/mL)	151 (110-231)	40.1 (29.8-62.0)	<0.0001	0.9	71.9	89	85
S100A8/A9 (μ g/mL)	6.4 (4.4-10.3)	2.2 (1.2-3.8)	<0.0001	0.86	4.1	77	82
CD93 (ng/mL)	192 (151-252)	124 (103-164)	<0.0001	0.78	146	79	69
TKT (ng/mL)	104 (61.8-162)	52.0 (28.9-91.5)	<0.0001	0.72	115	47	90
MMP9 (ng/mL)	909 (447-1623)	566 (330-839)	0.0007	0.67	897	53	77
MPO-ANCA (U/mL)	63.5 (27.4-223)	0.8 (0.5-2.2)	<0.0001	0.96	5.1	98	88

中央値(四分位範囲)を表示。COP, カットオフ値。MPO-ANCA 陽性患者のみ (n = 48) (文献¹)より引用改変)

さらに、治療 6 か月後の寛解患者 62 名と非寛解患者 (BVAS 中央値 5) 17 名について、9 種類の活動性マーカーを比較した結果、TIMP-1 は、非寛解群では寛解群と比較して有意に高値であった。一方、CRP や MPO-ANCA など他のマーカーでは有意差はなかった(図 3)。したがって、AAV の活動性の状態を判断するには TIMP-1 が CRP や MPO-ANCA より有用なマーカーと考えられた。



AAV の腎病変マーカーの検討

BVAS 主要項目の評価において腎病変あり群は腎病変なし群と比較して、CD93 と TKT が有意に高値であった (CD93, 中央値 255ng/mL vs 163ng/mL; TKT, 147ng/mL vs 88ng/mL)。さらに、腎病変を合併した AAV 患者において、治療前 CD93 が >356ng/mL で (AUC 0.82; 感度 73%; 特異度 86%)、治療前 TKT は >229ng/mL (AUC 0.91; 感度 87%; 特異度 93%) で 6 か月以内に高率に腎死 (維持透析もしくは血清クレアチニン 5.6mg/dL 以上) に陥っており、新たな腎予後予測マーカーが見出された。

(2) マーカータンパク質によるマクロファージのサイトカイン・ケモカイン産生作用の解析

健常人の PBMC から分化させたマクロファージの培養上清において、200ng/mL、1 μg/mL、3 μg/mL の可溶性 CD93 (sCD93) 刺激下で、濃度依存的に TNF- (4.0, 85.1, 729.1pg/mL)、IL-6(3.6, 186.6, 941.5pg/mL)、IL-8(2.4, 6.6, 7.3ng/mL)は上昇した(n=1)。TIMP1、LRG1、S100A8/A9、H4 で刺激後、TNF- は 5.4, 14.6, 33.0, 43.1pg/mL、IL-6 は 2.2, 8.6, 37.7, 19.4pg/mL、IL-8 は 1.2, 2.9, 3.6, 3.7ng/mL であり sCD93 と比較し低値であった。多検体(n=8)においてコントロールと比較し sCD93(3 μg/mL)刺激下で、TNF- (1.6 vs 245pg/mL, p<0.001)、IL-6(1.3 vs 749pg/mL, p<0.001)、IL-8(0.05 vs 9.9ng/mL, p<0.001)は有意に上昇した。以上より、sCD93 はマクロファージの TNF- 、IL-6、IL-8 産生を亢進させることが見出された。

(3) 免疫組織染色によるマーカータンパク質の発現臓器や発現細胞の同定

AAV 患者の皮膚、胃粘膜および腎の血管炎部位では、TIMP-1 は S100 陽性間葉系細胞から強く発現されており、CD3、CD19、CD68 または CD31 陽性細胞からの発現はほとんど認められなかった。一方で、CD93 は CD31 陽性の血管内皮細胞から高発現されており、CD3、CD19 または CD68 陽性細胞からの発現はほとんど認められなかった。腎病変においても CD93 は係蹄壁に沿って CD31 陽性の内皮細胞から強く発現されていた。

<引用文献>

Ishizaki J, Takemori A, Suemori K, et al. Targeted proteomics reveals promising biomarkers of disease activity and organ involvement in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Res Ther* 2017;19:218.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 石崎淳、長谷川均	4. 巻 63
2. 論文標題 血管炎症候群	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 リウマチ科	6. 最初と最後の頁 28-36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 武森信暁、石崎淳、長谷川均	4. 巻 28
2. 論文標題 ANCA関連血管炎のプロテオミクス	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 3-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 石崎淳、長谷川均	4. 巻 60
2. 論文標題 ANCA関連血管炎のバイオマーカー	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 リウマチ科	6. 最初と最後の頁 60-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 長谷川均、石崎淳	4. 巻 76
2. 論文標題 ANCA関連血管炎の活動性バイオマーカー	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本臨牀 増刊号 血管炎（第2版）	6. 最初と最後の頁 492-498
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Ishizaki Jun, Takemori Ayako, Suemori Koichiro, Matsumoto Takuya, Akita Yoko, Sada Ken-ei, Yuzawa Yukio, Amano Koichi, Takasaki Yoshinari, Harigai Masayoshi, Arimura Yoshihiro, Makino Hirofumi, Yasukawa Masaki, Takemori Nobuaki, Hasegawa Hitoshi	4. 巻 19
2. 論文標題 Targeted proteomics reveals promising biomarkers of disease activity and organ involvement in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-017-1429-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 石崎 淳, 松本卓也, 末盛浩一郎, 佐田榮司, 竹中克斗, 長谷川均
2. 発表標題 ANCA関連血管炎の寛解導入および寛解維持期における疾患活動性マーカーとしての血清TIMP1値の有用性の検討
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石崎淳, 松本卓也, 末盛浩一郎, 長谷川均
2. 発表標題 ANCA関連血管炎における新規マーカーCD93の病態への関与
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会総会・学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石崎淳, 松本卓也, 末盛浩一郎, 安川正貴, 長谷川均
2. 発表標題 質量分析を用いた大規模プロテオーム解析によるANCA関連血管炎の新規活動性および臓器障害マーカーの探索
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 Jun Ishizaki, Ayako Takemori, Koichiro Suemori, Takuya Matsumoto, Yoko Akita, Masaki Yasukawa, Nobuaki Takemori and Hitoshi Hasegawa
2. 発表標題 Identification of Circulating Biomarkers of Disease Activity and Organ Involvement in ANCA-Associated Vasculitis By Targeted Proteomics
3. 学会等名 2017 ACR/ARHP Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----