

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2018～2020  
課題番号：18K08405  
研究課題名（和文）包括的トランスクリプトーム・エピゲノム解析による滑膜炎・付着部炎の分子病態の解明  
  
研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanisms of synovitis and enthesitis using comprehensive transcriptome/epigenome analyses  
  
研究代表者  
池田 啓（Ikeda, Kei）  
  
千葉大学・医学部附属病院・講師  
  
研究者番号：10456014  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：関節リウマチ（RA）および末梢型脊椎関節炎（SpA）患者計100名に詳細な関節エコーを実施し、血液中の自然リンパ球（ILC）とその分画をフローサイトメトリーで同定し、また末梢血サイトカイン濃度を測定した。その結果、関節エコーにより患者が滑膜炎優位群と非優位群の2パターンに分かれることが分かった。末梢血ILC数は、滑膜炎非優位群で有意に高かったが、血清サイトカインと関節エコー所見との関連は低かった。滑膜炎優位群であることはメトトレキサートに対する治療反応性の強い予測因子であった。以上より、ILCが滑膜炎以外の病変と関連し、メトトレキサートは滑膜炎に対して特に有効であることが確認された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、RA・SpA両疾患においてILCが滑膜炎以外の病態とより関連していることが明らかとなった。また同じく両疾患において、メトトレキサートが滑膜炎に対して特に有効であることが確認された。これにより、診断名よりも局所病態の把握が、病態の把握と治療反応性の予測に役立つことが示唆され、今後のプレジジョンメディスンに繋がることを期待される。

研究成果の概要（英文）：We recruited patients with rheumatoid arthritis (RA) and peripheral spondyloarthritis (SpA) and performed detailed musculoskeletal ultrasound, identified innate lymphoid cells in the peripheral blood, and measured serum cytokine levels. We found that patients were divided into 2 groups, synovitis-dominant group and synovitis-nondominant group. Peripheral ILC counts were significantly higher in the synovitis non-dominant group, while the correlations between serum cytokines and ILC counts were weak. Synovitis-dominant group is the strongest predictor of treatment response to methotrexate. Our data demonstrate that ILCs are associated with non-synovitis lesions in RA and SpA and confirms that methotrexate is preferentially effective for synovitis.

研究分野：膠原病・リウマチ学

キーワード：関節リウマチ 脊椎関節炎 滑膜炎 付着部炎 自然リンパ球 サイトカイン・ケモカイン 関節エコー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) は滑膜炎とびらん性関節破壊を特徴とする自己免疫性疾患であり、ヘルパーT細胞の活性化と自己抗体産生に代表される獲得免疫異常、ならびにサイトカインの過剰産生が病態の中心と考えられている。主に TNF $\alpha$ 、IL-6 シグナル、T/B 細胞を標的とする分子標的薬の臨床応用により RA の予後は改善したが、依然難治例も存在する。

一方、脊椎関節炎 (spondyloarthritis, SpA) は体軸あるいは末梢関節の靭帯付着部の炎症と骨形成を特徴とする自己免疫性疾患である。近年 SpA において TNF $\alpha$ に加えて IL-23/IL-17 経路の阻害薬の有用性が示され、さらに付着部組織において IL-23 に反応し IL-17 を産生する細胞集団として、マウスでは ROR $\gamma$ <sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>細胞 (Sherlock JP et al. Nat Med 2012;18:1069) あるいは  $\gamma\delta$ T 細胞 (Reinhardt A, et al. Arthritis Rheumatol 2016;68:2476)、ヒトでは innate lymphoid cell 3 (ILC3) (Cuthbert RJ, et al. Arthritis Rheumatol 2017;69:1816) が同定された。RA では IL-23/IL-17 経路の阻害薬の有効性は低く、これらは SpA の付着部炎の病態を特徴づける細胞集団であることが示唆された。

他方、高感度画像診断である関節エコーや核磁気共鳴画像 (magnetic resonance imaging, MRI) を用いた検討では、RA においても一定の頻度で付着部炎の所見が認められ (Mera-Varela A, et al. PLoS One 2013;8:e58616) また SpA においても高頻度で滑膜炎の所見が認められる (Bakewell CJ, et al. J Rheumatol 2013;40:1951)。つまり同一の疾患カテゴリーでも患者により異なる炎症性病態が混在しており、最適な治療標的分子経路が異なる可能性が示唆される。しかし同一個体における滑膜炎と付着部炎の分子病態を解析した検討はこれまでなかった。

Innate lymphoid cell (ILC)は、リンパ球様の形態を示すも既存の系列マーカーが陰性であり、特定のサイトカインを大量に産生する自然免疫細胞の総称である。ILC には、ウイルスの排除に重要な役割を果たすと考えられている ILC1、気管支喘息やアトピー性皮膚炎などにおけるアレルギー性炎症の誘導や寄生虫排除に関与すると考えられている ILC2、二次リンパ組織の形成誘導、及び消化管粘膜における生体防御に関与すると考えられている ILC3 が存在する。前述のヒト付着部組織における存在に加え、ILC3 は SpA 患者の血液中 (Ciccio F, et al. Ann Rheum Dis 2015;74:1739) や滑液中 (Leijten EF, et al. Arthritis Rheumatol 2015;67:2673) で増加していることが報告されている。また、興味深いことに RA 患者では、末梢血の ILC が増加しており (Bekiaris V, et al. J Immunol 2013;191:4611) その一方で ILC2 の産生する IL-9 が制御性 T 細胞を介して炎症を抑制することが示されている (Rauber S, et al. Nat Med 2017;23:938)。以上より、ILC は炎症性関節炎の増悪および制御に関わっていることが示唆されるが、そのサブタイプと炎症の局在 (滑膜炎または付着部炎) の関連、詳細な分子細胞機構は不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、滑膜炎と付着部炎の両者を発症することが明らかとなっているモデルマウスである抗コラーゲン抗体誘導性関節炎において、ILC を含む各細胞群を単離し経時的・包括的なトランスクリプトーム・エピゲノム解析を行うことにより、滑膜炎と付着部炎の分子細胞病態ならびに両者の関連を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 滑膜ならびに付着部における細胞分画の同定

B10.RIII マウスに抗コラーゲン抗体誘導性関節炎 (collagen antibody-induced arthritis, CAIA) を

誘導し、ベースライン/day3/day8 の足部の軟部組織ならびにアキレス腱付着部における血球細胞を単離、フローサイトメトリーで免疫細胞の比率を同定する。特に ILC ならびに $\gamma\delta$ T 細胞に注目し、ILC1/2/3 分画および $\gamma\delta$ T 細胞の比率を同定する。

#### (2) 滑膜ならびに付着部細胞のトランスクリプトーム・エピゲノム解析

CAIA を誘導し、ベースライン/day3/day8 の足部の軟部組織ならびにアキレス腱付着部における滑膜線維芽細胞、マクロファージ、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、B 細胞、腱細胞、軟骨細胞、ILCs、 $\gamma\delta$ T 細胞を単離する。1) RNA シークエンスによりトランスクリプトーム、2) ChIP シークエンスによりヘテロクロマチン領域 (H3K4me3) と活性化プロモーター/エンハンサー領域 (H3K27ac) 3) ATAC シークエンスによりオープンクロマチン領域を解析する。それぞれのデータを統合し、それぞれの細胞において発現誘導される分子の経時的変化と発現制御機構を解析する。この解析により、滑膜炎形成における新規分子細胞経路、付着部炎形成における新規分子経路、さらに滑膜炎と付着部炎のそれぞれへの移行を示す分子経路を同定する。

#### (3) 滑膜ならびに付着部細胞のシグナル伝達分子活性化と転写因子発現の包括的解析

研究計画 1-2 で同定された滑膜炎/付着部炎における主要な機能細胞において、CAIA 誘導時の単細胞レベルでの 35 種類以上の蛋白の発現を、mass cytometry (CyTOF)を用いて解析する。本研究により細胞のサブタイプごとの細胞内シグナル伝達分子と転写因子の発現・活性化レベルが包括的に明らかとなる。

#### (4) 滑膜ならびに付着部細胞のトランスクリプトーム・エピゲノム解析

研究計画 2-3 で同定された候補分子経路につき、遺伝子改変マウスを用いることにより、CAIA の滑膜炎と付着部炎それぞれに対する影響を解析する。先行研究より、滑膜線維芽細胞あるいはマクロファージの産生する IL-33 が ST2 シグナルを介して ILC2 を活性化することが滑膜炎の悪化に関与し、また IL-23 刺激による ILC3 または $\gamma\delta$ T 細胞の IL-17/IL-22 産生が付着部炎の発症に関与していることが示唆されている。これらの分子経路が研究計画 2. で同定される場合には、例えば IL-33 レポーターマウス/IL-33 欠損マウス (Dr Zeigler 研究室より導入手続き済み) に CAIA を誘導し、局所における IL-33 発現や炎症の重症度を評価する。必要に応じて候補分子の欠損マウス、floxed マウス、あるいはレポーターマウスを作成、解析することにより、滑膜炎/付着部炎発症の新規分子細胞メカニズムを明らかとする。

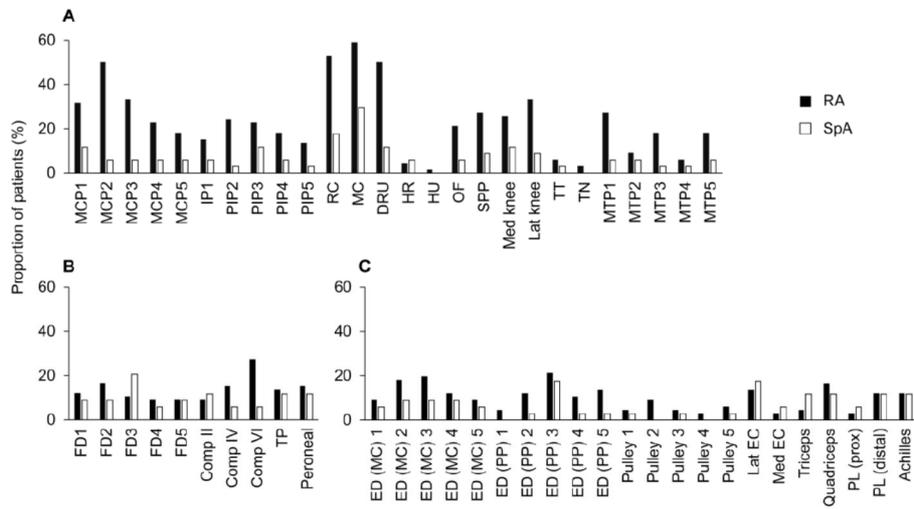
#### (5) RA および SpA 患者における ILC および機能分子の発現

未治療の RA および SpA 患者に関節エコーを実施し、40 関節の滑膜炎ならびに 32 部位の付着部炎の半定量評価を実施する。また、末梢血および滑液での ILC、 $\gamma\delta$ T 細胞、ならびに研究計画 1-3 で同定された機能細胞の分画をフローサイトメトリーで測定する。さらに、血清および滑液中の分泌蛋白を測定し、画像所見、細胞分画、ならびに分泌蛋白の関連を解析する。

## 4. 研究成果

研究計画 (1)-(4)の前提となる、マウスにおける抗コラーゲン抗体誘導性関節炎 (CAIA) では、条件を繰り返し調整するものの、足部の軟部組織並びにアキレス腱付着部の炎症は時折惹起されるものの、再現性は低く、既報より程度も弱かった。炎症が惹起された個体においてフローサイトメトリーを実施したが、主要な目的である ILC やガンマデルタ T 細胞がほぼ同定されず、CAIA による解析は断念した。

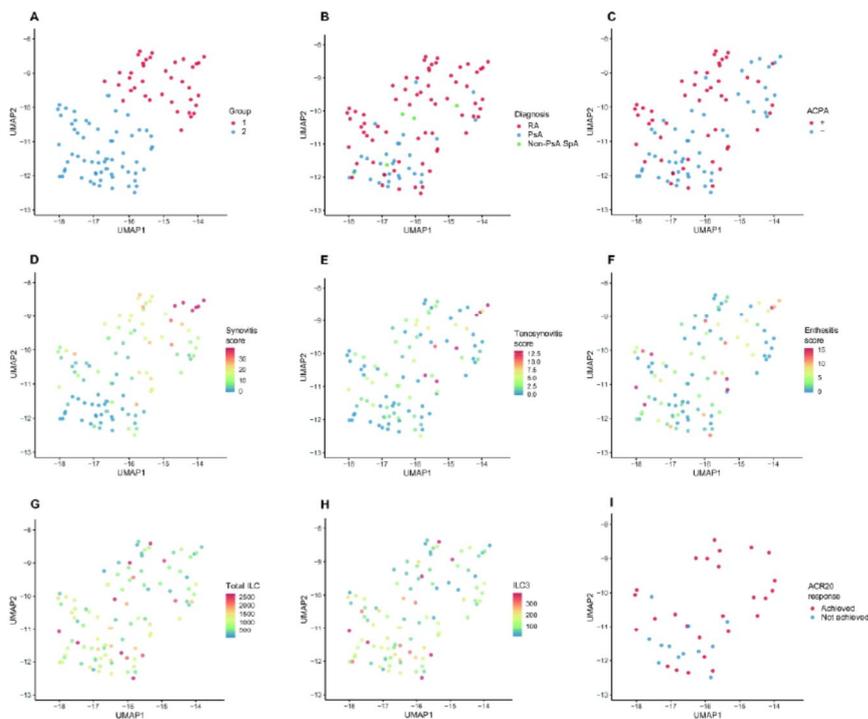
研究計画 (5)に従い、関節リウマチ (RA) および末梢型脊椎関節炎 (SpA) 患者計 100 名に関節エコーを実施し、40 関節の滑膜炎、並びに 32 部位の付着部炎の半定量評価を実施した。その結果、RA・SpA 共に広く滑膜炎、腱鞘滑膜炎、付着部炎所見を認めた (Figure 1)。



**Figure 1. Proportions of patients with positive power Doppler score for each site scanned**  
**A.** Joints evaluated for synovitis. **B.** Tendons evaluated for tenosynovitis. **C.** Entheses evaluated for enthesitis.

RA: rheumatoid arthritis; SpA: spondyloarthritis; MCP: metacarpophalangeal; IP: interphalangeal; PIP: proximal interphalangeal; RC: radiocarpal; MC: midcarpal; DRU: distal radioulnar; HR: humeroradial; HU: humeroulnar; OF: olecranon fossa; SPP: suprapatellar pouch; Med knee: medial aspect of knee; Lat knee: lateral aspect of knee; TT: tibiotalar; TN: talonavicular; MTP: metatarsophalangeal; FD: flexor digitorum; Comp: compartment of wrist extensor tendon; TP: tibialis posterior; ED (MC): extensor digitorum at metacarpal head; ED (PP): extensor digitorum insertion into proximal phalanx; Lat EC: lateral epicondyle; Med EC: medial epicondyle; PL (prox): proximal attachment of patellar ligament; PL (distal): distal attachment of patellar ligament

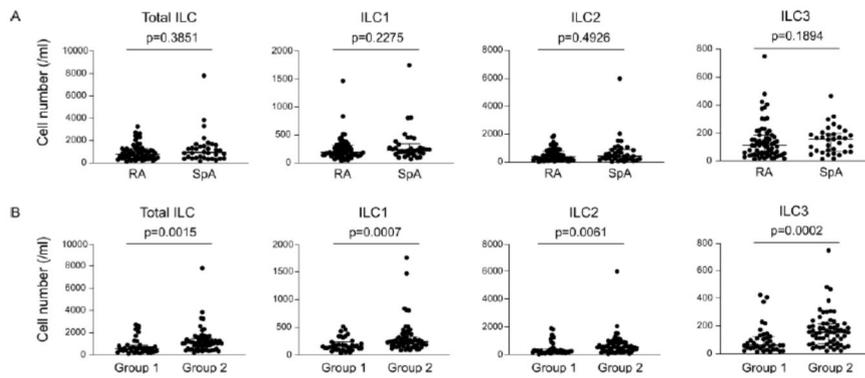
関節エコー所見は、滑膜炎優位群と非優位群の2パターンに分かれた ( Figure 2A-2F )。



**Figure 2. Clustering of patients based on ultrasound assessment**

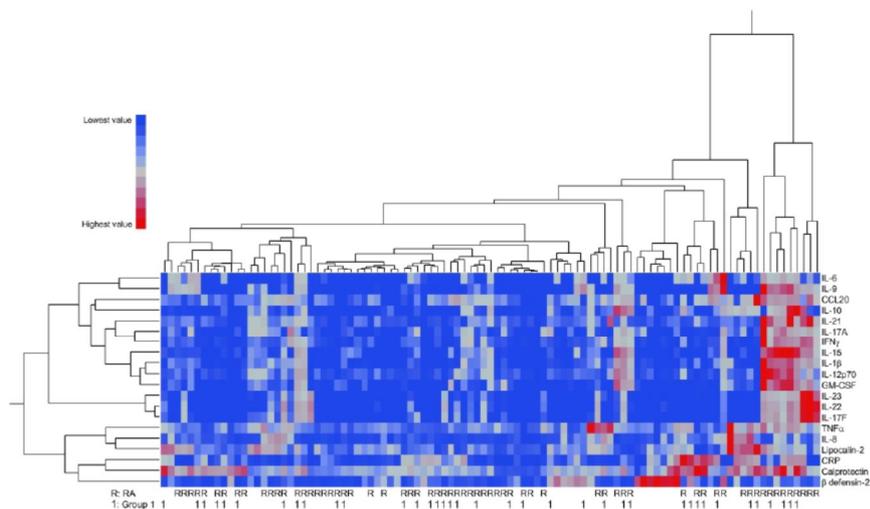
Positional relationship among patients (n=100) based on power Doppler scores (116 sites) is plotted by Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP). **A.** Partitioning Around Medoids (PAM) clustering of patients based on the two scaling coordinates of UMAP. **B-I.** Parameters are mapped on the UMAP plot: **B.** clinical diagnoses (rheumatoid arthritis [RA], psoriatic arthritis [PsA], non-PsA spondyloarthritis [SpA]), **C.** anti-citrullinated protein antibody (ACPA) positivity, **D.** total synovitis score, **E.** total tenosynovitis score, **F.** total enthesitis score, **G.** peripheral count of total innate lymphoid cell (ILC), **H.** peripheral ILC3 count, **I.** ACR20 response to methotrexate (MTX).

末梢血 ILC 数、特に ILC3 数は、滑膜炎非優位群で有意に高かった ( Figure 2G, 2H, Figure 3B )。



**Figure 3. Differences in innate lymphoid cell numbers between groups**  
 Numbers of total innate lymphoid cell (ILC) and Group 1-3 ILCs (ILC1, ILC2, and ILC3) in the peripheral blood are compared **A.** between patients with RA and those with SpA and **B.** between Group 1 (synovitis-dominant pattern) and Group 2 (synovitis-nondominant pattern).

一方、血清サイトカインと関節エコー所見との関連は低かった (Figure 4)。しかし beta-defensin は SpA および乾癬の皮疹と強く関連した (data not shown)。



**Figure 4. Clustering of patients based on serum cytokine/chemokines**  
 Shown are a heatmap representing the serum levels of 20 biomarkers and dendrograms illustrating hierarchical clustering of these cytokine/chemokines and patients ( $n=99$ ). The clinical diagnosis (rheumatoid arthritis vs. spondyloarthritis) and the ultrasound-based inflammation pattern (Group 1 vs. Group 2) are provided below the heatmap.

滑膜炎優位群であることはメトトレキサートに対する治療反応性の最も強い予測因子であった (Figure 2I)。

以上より、RA/SpA 両者において、ILC が滑膜炎以外の病変と関連し、メトトレキサートは滑膜炎に対して有効であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Manami Kato, Kei Ikeda, Takahiro Sugiyama, Shigeru Tanaka, Kazuma Iida, Kensuke Suga, Nozomi Nishimura, Norihiro Mimura, Tadamichi Kasuya, Takashi Kumagai, Hiroki Furuya, Taro Iwamoto, Arifumi Iwata, Shunsuke Furuta, Akira Suto, Kotaro Suzuki, Eiryu Kawakami, Hiroshi Nakajima	4. 巻 -
2. 論文標題 Associations of ultrasound-based inflammation patterns with peripheral innate lymphoid cell populations, serum cytokines/chemokines, and treatment response to methotrexate in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	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） 10.1371/journal.pone.0252116	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 加藤愛美、池田啓、杉山隆広、田中繁、古田俊介、鈴木浩太郎、中島裕史
2. 発表標題 炎症性関節炎における炎症の局在と末梢血自然リンパ球分画の関連
3. 学会等名 第48回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤愛美、池田啓、杉山隆広、飯田和馬、須賀謙介、三村典裕、西村望、粕谷忠道、熊谷崇、古田俊介、鈴木浩太郎、中島裕史
2. 発表標題 炎症性関節炎における関節エコー所見炎症の局在とおよび身体診察所見との関連一致度
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kei Ikeda
2. 発表標題 Pathophysiology of spondyloarthritis illustrated by imaging
3. 学会等名 22nd Asia-Pacific League of Associations for Rheumatology Virtual Congress（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020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
研究 分担者	中島 裕史  (Nakajima Hiroshi)  (00322024)	千葉大学・大学院医学研究院・教授   (12501)	
研究 分担者	岩田 有史  (Iwata Arifumi)  (90436353)	千葉大学・大学院医学研究院・助教   (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------