

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07940

研究課題名(和文) Cureを可能とする関節リウマチの早期予測バイオマーカーの創出

研究課題名(英文) Development of predictive biomarkers that enable to "cure" rheumatoid arthritis

研究代表者

平田 信太郎 (Shintaro, Hirata)

広島大学・病院(医)・教授

研究者番号：90525461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではRAのCureを目指すバイオマーカー探索を目的とし、早期RAレジストリでのバイオマーカー探索、破骨細胞分化調節機序の解析、の2段階で研究を進めた。レジストリは全204例を観察完了し、うち初期32例においてIL-4とIP10が治療反応性の指標、RANTESが予後予測因子と示された。基礎研究ではCXCL10によるCTLA-4-Igの作用への影響、TGF- β 1の破骨細胞分化制御、activin AおよびCXCL10制御への関与を示し、TGF- β 1が治療標的と、CXCL10が新規マーカーと期待された。しかし検証段階でLPS混入の影響が判明し、Re-LPSを用いた新たな除去手法の開発に繋がった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではCureを目指したバイオマーカーの探索に、臨床的・トランスレーショナル研究と基礎研究の両面からアプローチした。CXCL10のバイオマーカーとしての有用性および測定系におけるLPS除去の重要性が示されるとともに、新たな治療ターゲットとしてのTGF- β 1の可能性が示唆された。また副次的成果としてRe-LPSによるLPSコンタミネーションの新たな解決法開発に繋がった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate novel biomarker for "Cure" in rheumatoid arthritis (RA). The study was conducted in two phases: biomarker discovery in an early RA registry and analysis of the regulatory mechanisms of osteoclast differentiation. A total of 204 patients were included in the registry, of which IL-4 and IP10 were shown to be indicators of response to treatment in the first 32 patients, and RANTES was shown to be a predictor of prognosis in the early 32 patients. Basic studies showed an effect of CXCL10 on CTLA-4-Ig action, TGF- β 1 regulation of osteoclast differentiation, and involvement of activin A and CXCL10 in regulation, leading to the expectation that TGF- β 1 would be a therapeutic target and CXCL10 a novel marker. However, the effect of LPS contamination was found during the validation phase, leading to the development of a new removal method using Re-LPS.

研究分野：膠原病・リウマチ内科学

キーワード：関節リウマチ バイオマーカー 治癒 寛解

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)の治療は生物学的製剤や JAK 阻害薬といった分子標的療法による進歩を遂げ、臨床的寛解や構造的寛解および機能障害阻止が現実的な治療目標となった。加えて、寛解導入後の抗リウマチ薬(DMARDs)休薬も一部の症例において達成されつつある。しかし永続的に治療を要さない治癒(Cure)の状態を達成できる症例は極めて少数である。RA の Cure に必要な免疫学的異常の " point of no return " の指標となりうるバイオマーカーは未だ見出されていない。申請者は一貫して RA の病態ならびに予後を予測するバイオマーカーに関する研究を継続的に行っており、RA における Cure を目指すバイオマーカーを探索ことで RA の疾患の理解にインパクトを与える研究成果が得られることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、発症早期かつ RA 診断確定直後の未治療 RA 患者において、治療開始後の臨床的・構造的・機能的寛解ならびに抗リウマチ薬の休薬後再燃リスクに関係する血清バイオマーカーを明らかにし、RA の Cure を目指す指標としての可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 発症早期未治療 RA レジストリ (Three Arrow Registry) の構築と診断時の血清における新規バイオマーカーの探索および臨床的意義の検討

当教室では発症早期未治療 RA を連続的にレジストリ登録し、登録時(治療導入時)および半年後・1年後において、臨床的・画像的データ収集および血清保存を行った。

この Three Arrow Registry レジストリでは、登録症例の年齢・性別・罹病期間・喫煙歴・使用薬剤(生物学的製剤・抗リウマチ薬)・合併症・疼痛関節数・腫脹関節数・患者全般評価・DAS28・CDAI・SDAI・HAQ・ESR・CRP・リウマトイド因子・抗 CCP 抗体などをデータベース化した。さらに、将来の Sharp-van der Heijde score による関節破壊進行の定量的評価を行うため、治療開始時・半年後・1年後の手・足レントゲンを施行。並行して、登録時(治療導入時)および半年後保存血清を採取分離し、凍結保存した。

凍結保存した血清を用いて、multiplex assay 法を用いて炎症性サイトカイン、ケモカインの網羅的スクリーニングを行い、これらの結果を臨床情報と照合比較することにより、臨床的意義の探索を行った。

(2) ヒト単球系細胞および RA 滑膜細胞における破骨細胞分化の調節機序の解明

健常ヒト末梢血単球系細胞、および、RA 患者における関節手術時に得られた RA 滑膜組織を用いて、破骨細胞分化メカニズムについて解析を行った。

ヒト末梢血より単球系細胞を磁気ビーズ法で分離した後、M-CSF および RANKL 刺

激による破骨細胞分化誘導を行い、各種メカニズム解析を行った。

RA 滑膜組織より単球系細胞を分離し同様の実験を行うと共に、免疫組織化学的検討を行った。

4. 研究成果

(1) レジストリ研究から下記の結果を得た。

未治療早期 RA レジストリ (Three Arrow Registry) は 2021 年 3 月に 204 例の登録をもって新規登録を完了し、2022 年 3 月に全症例の観察期間が完了し、データベース化とデータ固定化を進めた。

このうち、初期 32 例の治療前および 24 週での臨床的アウトカムと血清バイオマーカーの関係についてマルチプルアッセイを用いた新規バイオマーカーのスクリーニングを行い、IL-4、IL-6、IL-10、IP-10 など複数のサイトカインの有意な低下、および、特に IL-4 と IP10 が RA の治療反応性と相関し、また診断時の RANTES 値が早期 RA における予後予測因子となりうる可能性を見出した。

(2) また破骨細胞分化に関する基礎的研究から以下の結果を得た。

- ・ RA の病態に重要なサイトカインである TNF- α は単球上の CD80 発現を誘導され、それにより CTLA-4-Ig が破骨細胞の形成をより強力に抑制することで関節リウマチの骨破壊を保護することを示した。一方、CTLA-4-Ig は *in vitro* において有意に IFN- γ と CXCL10 のレベルに影響し、また RA 患者の血清 CXCL10 レベルは CTLA-4-Ig 治療において治療効果を反映することを示した。また、研究者がバイオマーカーとしての可能性を報告してきた 14-3-3 η について分泌機構を解析し、14-3-3 η を高発現したマクロファージは TNF- α 誘導性に細胞構造の損傷を伴うネクロトーシスを受け、その結果、細胞外へ分泌されることを明らかにした。
- ・ 一方、TGF β 1 が NF- κ B の核内移行阻害による NFATc1 の抑制を介して、ヒト RANKL 誘導性破骨細胞分化を制御し、TGF β 1 が RA に対する潜在的治療標的となりうることを示した。TGF- β 1 はまた、炎症関節においてアクチビン A の発現に関与し、さらにアクチビン A は主として抗炎症作用を発揮し、CXCL10 の制御と破骨細胞形成を介する関節破壊を抑制することを示した。
- ・ これらの知見から、CXCL10 が RA の病態に深く関与し、RA に対する活動性制御の新たなバイオマーカーとして期待された。しかし、疾患活動性と関節破壊を反映する新規バイオマーカーとして CXCL10 の詳細な解析を進めたところ、血清 CXCL10 測定に用いる試薬の LPS 混入が判明した。ポリミキシン吸着などの従来法では十分な LPS 除去が困難であったが、新たに Re-LPS を用いた LPS 混入の影響回避法を開発し報告を行った。
- ・ なお、本法を適応した際の CXCL10 の RA バイオマーカーとしての有用性は再現性を得られず引き続き検討を要すると判断した。結果的に本研究を通じてバイオマーカー開発における LPS 混入によるデータ攪乱の影響が明らかとなり、LPS 混入による影響を除去するための新しい手法の開発につながった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Kohno Hiroki, Ouhara Kazuhisa, Mokuda Sho, Tokunaga Tadahiro, Sugimoto Tomohiro, Watanabe Hirofumi, Ishitoku Michinori, Yoshida Yusuke, Mizuno Noriyoshi, Ozawa Tatsuhiko, Kawataka Masatoshi, Hirata Shintaro, Kishi Hiroyuki, Sugiyama Eiji	4. 巻 89
2. 論文標題 The Lipopolysaccharide Mutant Re-LPS Is a Useful Tool for Detecting LPS Contamination in Rheumatoid Synovial Cell Cultures	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathobiology	6. 最初と最後の頁 92~100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000520022	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 Hirata Shintaro, Kohno Hiroki, Watanabe Hirofumi, Tokunaga Tadahiro, Yoshida Yusuke, Sugimoto Tomohiro, Mokuda Sho, Oda Keisuke, Nojima Takaki, Sugiyama Eiji	4. 巻 31
2. 論文標題 Tapering and discontinuation of oral glucocorticoids without deterioration of disease status in patients with rheumatoid arthritis under a stable treatment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 803~808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2020.1864914	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 Hamamoto Yuta, Ouhara Kazuhisa, Munenaga Syuichi, Shoji Mikio, Ozawa Tatsuhiko, Hisatsune Jyunzo, Kado Isamu, Kajiya Mikihiro, Matsuda Shinji, Kawai Toshihisa, Mizuno Noriyoshi, Fujita Tsuyoshi, Hirata Shintaro, Tanimoto Kotaro, Nakayama Koji, Kishi Hiroyuki, Sugiyama Eiji, Kurihara Hidemi	4. 巻 22
2. 論文標題 Effect of Porphyromonas gingivalis infection on gut dysbiosis and resultant arthritis exacerbation in mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-020-02348-z	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 -

1. 著者名 Oi K, Tokunaga T, Kuranobu T, Yukawa K, Kohno H, Yoshida Y, Mokuda S, Hirata S, Sugiyama E	4. 巻 196
2. 論文標題 Tumour necrosis factor augments the inhibitory effects of CTLA 4 Ig on osteoclast generation from human monocytes via induction of CD80 expression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Exp Immunol	6. 最初と最後の頁 392-402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cei.13271	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 Kuranobu T, Mokuda S, Oi K, Tokunaga T, Yukawa K, Kohno H, Yoshida Y, Hirata S, Sugiyama E	4. 巻 -
2. 論文標題 Activin A Expressed in Rheumatoid Synovial Cells Downregulates TNF -Induced CXCL10 Expression and Osteoclastogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathobiology	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) 10.1159/000506260	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 Tokunaga T, Mokuda S, Kohno H, Yukawa K, Kuranobu T, Oi K, Yoshida Y, Hirata S, Sugiyama E	4. 巻 21
2. 論文標題 TGF 1 Regulates Human RANKL-Induced Osteoclastogenesis via Suppression of NFATc1 Expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 800-800
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21030800	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 Trimova G, Yamagata K, Iwata S, Hirata S, Zhang T, Uemura F, Satoh M, Biln N, Nakayamada S, Maksymowych WP, Tanaka Y	4. 巻 22
2. 論文標題 Tumour necrosis factor alpha promotes secretion of 14-3-3 by inducing necroptosis in macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arthritis Res Ther	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) 10.1186/s13075-020-2110-9	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 該当する

1. 著者名 Yukawa K, Mokuda S, Kohno H, Oi K, Kuranobu T, Tokunaga T, Yoshida Y, Yamana J, Iwahashi M, Hirata S, Yamana S, Sugiyama E.	4. 巻 -
2. 論文標題 Serum CXCL10 levels are associated with better responses to abatacept treatment of rheumatoid arthritis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Exp Rheumatol	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) なし	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 河野紘輝, 荒木慧, 石徳理訓, 渡辺裕文, 茂久田翔, 平田信太郎, 杉山英二
2. 発表標題 無治療の関節リウマチの血清反応陽性例、陰性例における血清バイオマーカー値の比較検討
3. 学会等名 第36回日本臨床リウマチ学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 24.河野紘輝, 應原一久, 徳永忠浩, 茂久田翔, 水野智仁, 小澤龍彦, 川高正聖, 平田信太郎, 岸 裕幸, 杉山英二
2. 発表標題 リウマチ滑膜細胞のTLR4活性化研究におけるLPSのコンタミネーションの検出に、変異型LPS・Re-LPSは有用である
3. 学会等名 第36回日本臨床リウマチ学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野 紘輝, 應原 一久, 大本 卓司, 渡辺 裕文, 湯川 和俊, 徳永 忠浩, 倉信 達臣, 大井 勝博, 杉本 智裕, 吉田 雄介, 茂久田 翔, 小田 啓介, 野島 崇樹, 平田 信太郎, 杉山 英二
2. 発表標題 関節リウマチ滑膜細胞におけるシトルリン化フィブリノーゲンのCXCL10誘導作用とその機序の検討
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirata S, Omoto T, Kohno H, Watanabe H, Yukawa K, Tokunaga T, Kuranobu T, Oi K, Yoshida Y, Sugimoto T, Mokuda S, Oda K, Nojima T, Sugiyama E
2. 発表標題 Tapering and Discontinuing Prednisolone Without Deteriorated Disease Control by Optimizing Methotrexate in Patients with Rheumatoid Arthritis Under Stable Treatment - 2-year Results in the Real-world Clinical Practice -
3. 学会等名 2019 ACR/ARP Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

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