

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17892

研究課題名(和文) 全身性エリテマトーデスのマルチオミックス解析による新規バイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Investigation of novel biomarkers by multi-omics analysis of systemic lupus erythematosus

研究代表者

菊池 潤 (KIKUCHI, Jun)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：20570881

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)：初めに、活動性全身性エリテマトーデス(SLE)の寛解導入療法開始後12ヶ月以内の低疾患活動性状態(LLDAS)を達成することが、臨床的アウトカムと関連することを示した。次に活動性SLEにおける寛解導入療法開始後の末梢血免疫細胞の変動を特定した。特に寛解導入療法として主に用いられる薬剤で変動する末梢血免疫細胞の種類が異なることを示した。さらに、末梢血形質芽細胞の変動が治療予後と関連することを見出した。ループス腎炎に焦点を当て、尿中タンパク質の解析を行い、腎生検組織の活動性所見および間質病変所見と関連する病態として種々の経路が関連することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性エリテマトーデスは多彩な臓器障害をきたす自己免疫疾患で、難病に指定されている。その病態や治療後の経過における評価指標が不確定であるため本研究を行なった。まず適切な臨床的評価指標として、近年国際的に注目されている低疾患活動性状態を、治療開始後12ヶ月以内に達成することが予後と関連することを世界に先駆けて報告した。また、病態の根幹を成すと考えられている免疫担当細胞の亜分画の変動が、治療薬剤により異なること、治療予後と関連することを明らかにした。さらに、尿蛋白解析と腎生検組織所見との関連解析と合わせて、難治性病態の予測として使用される可能性につながる研究成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Initially, we reported that achieving a lupus low disease activity state within 12 months after starting induction therapy in active systemic lupus erythematosus (SLE) patients was associated with clinical outcomes. We then identified changes in peripheral blood immune cells following initiation of induction therapy in active SLE. In particular, we showed that the type of peripheral blood immune cells that fluctuate differed depending on the drug predominantly used as induction therapy. Furthermore, we found that fluctuations in peripheral blood plasmablasts were associated with treatment prognosis. Focusing on lupus nephritis, the analysis of urinary proteins showed that various pathways were associated with the pathogenesis associated with active and interstitial lesions in renal biopsy tissue findings.

研究分野：リウマチ・膠原病

キーワード：全身性エリテマトーデス ループス腎炎 末梢血免疫細胞

### 1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(SLE)は若年女性に好発する多彩な臓器病変を呈する自己免疫疾患で、国が定める指定難病の一つである。本邦における5年生存率は90%以上であるが、20年生存率は60%台との報告もあり、発症年齢のピークが20歳代から30歳代であることを考慮すると不十分である。寛解と再燃を繰り返すため、長期に免疫抑制療法を継続し、低疾患活動性維持、再燃抑制が必要である。(Ronald F van Vollenhoven et al. Ann Rheum Dis 2014; 73: 958-967.) 現在本邦では、シクロホスファミド、ミコフェノール酸モフェチル、カルシニューリン阻害剤を含めた免疫抑制療法やB細胞を標的とした生物学的製剤が用いられるが、それぞれの薬剤は作用機序が異なるものの臨床判断によって選択されており、治療選択の最適化が望まれる。さらに、それら薬剤とは異なる作用点での介入が望まれ、新たな治療標的分子の同定に繋がる病態解明が必要であり、適切なバイオマーカーの同定が予後の改善につながる。

以前から疾患特異抗体や患者背景因子による再燃・治療反応性・予後予測の検討がなされてきたが、治療強化の判断は臨床的な障害臓器や重症度によってなされているのが現状である(菊池潤、竹内勤:SLEの管理と治療、治療選択基準について. 田中良哉編集「最新医学別冊 診断と治療のABC 118 全身性エリテマトーデス」最新医学社、pp.132-141, 2016. 12.) SLEの診断は多彩な表現系を呈する患者群を内包する症候群となっているため、個々の患者の特徴を考慮して治療の最適化を行うことが真に求められている。(Ole Petter Rekvig & Johan Van der Vlag. Semin Immunopathol 2014; 36: 301-311.)

真に有用なバイオマーカーは、予後の改善に寄与するものと考えている。予後の改善とは、短期的には寛解導入率の向上であり、長期的には寛解状態または低疾患活動性状態の維持、蓄積する臓器障害の抑制(疾患によるものと治療によるものを両方含む)である。これらと関連し、かつ治療選択や調節の判断基準となるバイオマーカーの開発を目指す点が本研究の確固たる軸である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、障害臓器別および治療別の新規バイオマーカー、治療反応性およびアウトカムと関連した新規バイオマーカー、個々の症例における多面的な免疫学的指標の構築である。

### 3. 研究の方法

当院通院中で本研究に同意を得た活動性全身性エリテマトーデス患者を対象とし、寛解導入療法後の低疾患活動性状態(LLDAS; Lupus Low Disease Activity Score)(Franklyn K, et al. Ann Rheum Dis 2016;75:1615-21.)を記録し、経過中の再燃、障害蓄積との関連を検討した。また、寛解導入療法開始前および開始3ヶ月後に末梢血全血2mLを採取し、フローサイトメトリー(BD FACSAria™III)で解析した。末梢血免疫細胞は単球分画、リンパ球分画、活性化マーカーを用いて分類し、絶対数および割合の変動、予後との関連を解析した。生検で証明されたループス腎炎患者を対象に腎生検組織標本から組織学的特徴を分類し、同時に採取した尿検体を用いて尿中タンパク質をSomaScan®で測定し両者の関連を解析した。

### 4. 研究成果

#### 1) 臨床的アウトカムとしての低疾患活動性状態達成時期の設定

まず、全身性エリテマトーデスの予後を規定する指標の構築を目的として、LLDASの時期を検討した。活動性SLEにおいて、寛解導入療法開始後12ヶ月以内のLLDAS達成が重症再燃とステロイド使用積算量を低下させ、観察期間中のLLDAS ≥50%達成を有意に上昇させることを示した(図1)。それにより寛解導入療法開始後12ヶ月以内のLLDAS達成を臨床的アウトカムとして設定することの根拠を得た。本結果は国際的に注目されている臨床指標であるLLDASが、重症SLEにおいて有用な指標であることを世界に先駆けて報告した。

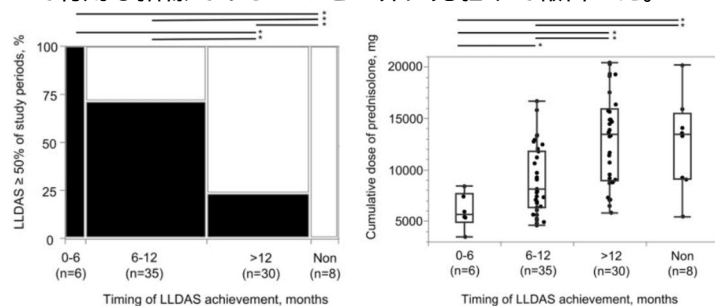


図1. LLDAS 達成時期別の LLDAS ≥50%達成率及びステロイド積算量

#### 2) SLE 寛解導入療法における末梢血免疫細胞の変動

活動性SLE患者81例を対象として、寛解導入療法開始前後の末梢血免疫細胞の変動を検討した。治療開始3ヶ月後には種々の末梢血免疫細胞が変動した。特に、CD4陽性T細胞、naïve CD4陽性T細胞、HLA-DR陽性Th17、naïve Tfh細胞、double negative T細胞、naïve B細胞、plasmablast、plasma細胞、樹状細胞の割合が有意に低下した。さらに、寛解導入療法として使用した免疫抑制剤別に群分けをして検討した。特にシクロホスファミド治療群ではCD4陽性T細胞全体、主にnaïve CD4陽性T細胞が有意に減少し、B細胞全体及びnaïve B細胞が有意に低下した一方、ミコフェノール酸モフェチル治療群ではnaïve CD4陽性T細胞とnaïve B細胞の変動は見出せず、活性化CD4陽性T細胞、活性化CD8陽性T細胞、plasmablast、plasma細胞、樹状細胞割合の低下が見出された。すなわち、寛解導入療法として主に用いられるシクロホスファミドとミコフェノール酸モフェチルの2剤で変動する末梢血免疫細胞の種類が異なることが示された。

### 3) SLE 寛解導入療法における末梢血免疫細胞とLLDAS達成の関連

LLDAS 12ヶ月以内達成者で有意に差のある、治療開始前の末梢血免疫細胞を検討した。CD8陽性Effector T細胞の割合が高値であること、Plasmablastの割合が高値であることが、12ヶ月以内のLLDAS達成と関連した(p=0.005, p=0.026)。一方、その他のCD4陽性T細胞、B細胞、NK細胞、樹状細胞、単球の割合は差がなかった。次に治療開始から3ヶ月で変動のある末梢血免疫細胞を検討した。LLDASを12ヶ月以内に達成した患者では未達成者と比較して、Th17細胞、

T細胞、Plasmablast、NK細胞の割合がそれぞれ減少し、naïve CD8陽性T細胞の割合が有意に上昇した。特に、治療開始前と3ヶ月後変動するPlasmablast割合に着目すると、治療開始前Plasmablast割合が低値かつ3ヶ月後に減少しない群は12ヶ月以内のLLDAS達成率が25.9%であったのに対して、治療開始前Plasmablast高値かつ3ヶ月後に減少した群は12ヶ月以内のLLDAS達成率が65.9%であり、有意差を認められた(図2)。さらに、シクロホスファミド治療群とミコフェノール酸モフェチル治療群で分けて検討を行なった(図3)。シクロホスファミド治療群ではHLA-DR陽性Th1-17細胞割合が治療前に高値で治療3ヶ月後に低下し、治療後にNK細胞と樹状細胞の割合が低下する群で、12ヶ月以内のLLDAS達成がしやすいことが見出された。また、ミコフェノール酸モフェチル治療群では、HLA-DR陽性Th2細胞が治療前に高値で、治療後低下する群、治療後にTh1-17細胞、Tfh1細胞、Tfh1-17細胞、活性化B細胞が低下し、naïve B細胞が上昇する群で、12ヶ月以内のLLDAS達成がしやすいことが見出された。

以上から、SLE寛解導入療法開始後12ヶ月以内にLLDASを達成した患者は、非達成者と比較して、治療開始前のplasmablastが高値で、治療3ヶ月後に有意にplasmablastが低下することが示され、plasmablastが抗dsDNA抗体産生を介してSLE病態に中心的に寄与していること(Jacobi AM, et al. Ann Rheum Dis 2010;69:305-8.)と、疾患活動性を相関するという既報(Banchereau R et al. Cell 2016;165:551-65.Kubo S. et al. Arthritis Rheumatol 2017;69:2029-37.)に合致して、治療予後のバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

さらに、末梢血細胞分画は免疫抑制薬そのものによる変化とLLDAS達成に関連する変化が必ずしも一致せず、シクロホスファミド治療群とミコフェノール酸モフェチル治療群でこれらの細胞集団が異なることが示された。

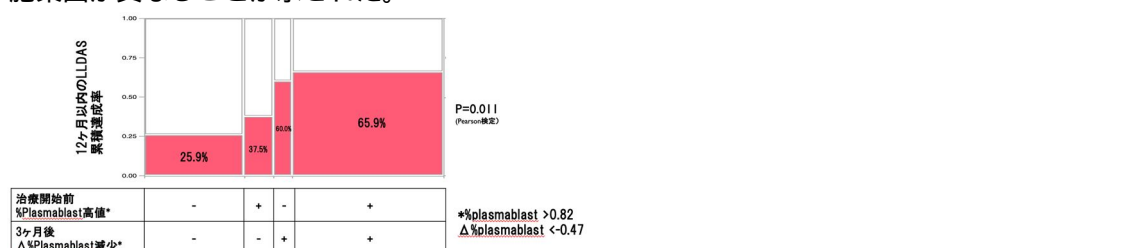


図2. 治療開始前及び治療後3ヶ月のplasmablast変動と12ヶ月以内LLDAS達成の関連

	IVCY		MMF	
	治療前	3ヶ月後	治療前	3ヶ月後
CD4+T cells	0.443	0.444	0.785	0.793
CD4+Treg	0.264	0.265	0.219	0.203
CD4+Teff	0.440	0.439	0.488	0.463
CD4+TeffCD45RO+	0.480	0.483	0.190	0.157
CD4+TeffCD45RO-	0.837	0.842	0.458	0.193
CD4+TeffCD45RO+	0.130	0.148	0.972	0.944
HLA-DR+CD4+T	0.445	0.334	0.533	0.534
Th1	0.157	0.087	0.351	0.385
Th17	0.261	0.239	0.249	0.043
Th17CD45RO+	0.177	0.190	0.046	0.066
Th17CD45RO-	0.148	0.117	0.441	0.312
Th17HLA-DR+Th17	0.887	0.993	0.703	0.212
Th17CD45RO+	0.462	0.739	0.113	0.096
Th17HLA-DR+Th17	0.208	0.058	0.484	0.379
CD4+TregCD45RO+	0.032	0.061	0.113	0.063
HLA-DR+TregCD45RO+	0.132	0.278	0.977	0.130
HLA-DR+Treg	0.163	0.162	0.988	0.921
TregCD45RO+	0.852	0.849	0.124	0.129
Treg	0.532	0.961	0.156	0.032
TregTh1	0.791	0.429	0.899	0.514
TregTh17	0.114	0.129	0.156	0.448
TregTh17CD45RO+	0.445	0.802	0.175	0.006
TregTh17CD45RO-	0.113	0.730	0.814	0.364
CD4+TregCD45RO+	0.342	0.665	0.448	0.740
CD4+Treg	0.292	0.795	0.443	0.111
CD4+TregHLA-DR+	0.480	0.895	0.895	0.351
CD4+TregHLA-DR+	0.242	0.358	0.515	0.145
CD4+TregCD45RO+CD45RO-	0.480	0.895	0.895	0.351
CD4+TregHLA-DR+CD45RO+	0.242	0.358	0.515	0.145
CD4+TregHLA-DR+CD45RO-	0.012	0.480	0.887	0.805
HLA-DR+CD4+Treg	0.491	0.641	0.544	0.302
HLA-DR+CD45RO+CD45RO-	0.349	0.214	0.614	0.462
CD4+Treg	0.127	0.246	0.866	0.611

図3. 治療前及び3ヶ月後の治療別末梢血免疫細胞の変動とLLDAS12ヶ月以内達成の関連

### 4) ループス腎炎における尿中タンパク質と腎生検組織との関連

ループス腎炎の組織学的所見を特徴づける尿中バイオマーカーの探索を行なった。24 例の腎生検で証明されたループス腎炎の尿中サンプルを取得し、尿中タンパク質を測定した。同時に腎生検組織を ISN/RPS 分類に従い、その特徴との関連を解析した。まず各病理組織所見との相関関係からいくつかの組織学的サブグループを抽出し、各組織学的サブグループと関連するタンパク質を解析した。腎糸球体の活動性組織所見（管内細胞増多、核崩壊、好中球浸潤、内皮下沈着）を含むサブグループと間質病変（間質の炎症、線維化、尿細管萎縮）を含むサブグループに着目した。前者の組織学的スコアは、CCL21、CXCL10、VCAM1 などのタンパク質と強い正の相関を示し、後者の組織学的スコアは、MCP-1、CCL11 などのタンパク質と相関を示した。さらにパスウェイ解析では前者の群では血小板増殖因子、顆粒球接着、血管拡張を含む経路、後者の群では IL-17、線維化に関するシグナル経路の発現が上昇していた。これらの結果から、尿中タンパク質は腎臓の主要な組織所見の有無や重症度を予測することができ、ループス腎炎患者の病態と関連することが示唆された。

本研究から、活動性 SLE の寛解導入療法別の末梢血免疫細胞分画が、治療および臨床的アウトカムに関連したバイオマーカーとなる可能性が見出された。さらにループス腎炎における尿中タンパク質解析が腎組織と関連したバイオマーカーとなりうることを示された。今後は本研究結果のバリデーションと個々の症例に対する免疫学的指標の構築を目指す方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Ushikubo Mari, Saito Shuntaro, Kikuchi Jun, Takeshita Masaru, Yoshimoto Keiko, Yasuoka Hidekata, Yamaoka Kunihiro, Seki Noriyasu, Suzuki Katsuya, Oshima Hisaji, Takeuchi Tsutomu	4. 巻 30
2. 論文標題 Milk fat globule epidermal growth factor 8 (MFG-E8) on monocytes is a novel biomarker of disease activity in systemic lupus erythematosus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lupus	6. 最初と最後の頁 61～69
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0961203320967761	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 Kikuchi Jun, Hanaoka Hironari, Saito Shuntaro, Oshige Tatsuhiro, Hiramoto Kazuoto, Kaneko Yuko, Takeuchi Tsutomu	4. 巻 -
2. 論文標題 Lupus low disease activity state within 12 months is associated with favourable outcomes in severely active systemic lupus erythematosus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 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） 10.1093/rheumatology/keac002	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 菊池 潤, 花岡 洋成, 齋藤 俊太郎, 大重 達寛, 平本 和音, 金子 祐子, 関 則靖, 竹内 勤
2. 発表標題 ループス腎炎の寛解導入期におけるDeep Remission達成の意義と それを特徴づける免疫学的特徴
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 Jun Kikuchi, Hironari Hanaoka, Shuntaro Saito, Kunio Sugahara, Tatsuhiro Oshige, Kazuoto Hiramoto, Naoshi Nishina, Kohei Otomo, Katsuya Suzuki, Yuko Kaneko, Tsutomu Takeuchi.
2. 発表標題 Deep Remission During Induction Therapy for Lupus Nephritis Prevents Damage Accrual and Associates with the Baseline Proportions of Peripheral Treg, CD8+ T Cells, and NKT-like Cells.
3. 学会等名 2019 American College of Rheumatology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊池 潤, 花岡 洋成, 齋藤 俊太郎, 牛窪真理, 大重 達寛, 平本 和音, 金子 祐子, 関 則靖, 竹内 勤
2. 発表標題 全身性エリテマトーデスの寛解導入療法における末梢血免疫細胞の変動と臨床的アウトカムの関連
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 菊池 潤, 花岡 洋成, 齋藤 俊太郎, 大重 達寛, 平本 和音, 金子 祐子, 竹内 勤
2. 発表標題 活動性全身性エリテマトーデスの寛解導入療法における早期LLDAS達成の臨床的意義
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

〔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