

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08812

研究課題名(和文) 全身性強皮症に伴う心筋病変の形成における心筋指向性単球の解析

研究課題名(英文) Circulating monocytes in contributing to myocardial involvement of systemic sclerosis

研究代表者

桑名 正隆 (Kuwana, Masataka)

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授

研究者番号：50245479

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)：全身性強皮症(SSc)に伴う心病変は予後不良因子だが、その詳細な病態は明らかでない。そこでSScに伴う心病変を有し、心内膜生検が実施されたSSc患者4例を対象に心筋残余試料をRNAシーケンスし、その遺伝子発現プロファイルを解析した。(拡張型心筋症4例との比較で、SSc心筋では脂肪酸酸化、クエン酸回路等の心筋エネルギー代謝に関連したパスウェイに活性化がみられ、上流制御因子としてNUPR1、IL-1の活性化、微小管・細胞骨格の機能抑制が示唆された。各免疫細胞の割合の推計では、2群間で差はみられなかった。以上より、SSc心筋では拡張型心筋症とは異なる分子病態が存在する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はSSc患者心筋を用いた初めてのトランスクリプトーム解析である。症例数が少ない、対照が健常心筋ではなく拡張型心筋症患者の心筋であるなど制約があるものの、仮説なしの網羅的解析により病態と関連するパスウェイや上流制御因子が同定された学術的意義は大きい。本研究成果は難治性病態の解明に役立つとともに、新たに同定された治療標的に対する新規治療薬の開発につながる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：The heart involvement in systemic sclerosis (SSc) is a poor prognostic factor, although the detailed pathogenesis remains unclear. We conducted transcriptomic analysis of myocardial tissue samples obtained by endomyocardial biopsy from SSc patients with primary heart involvement. Compared to the control group (dilated cardiomyopathy), the SSc myocardium showed activation of pathways related to myocardial energy metabolism, such as fatty acid beta-oxidation and the citric acid cycle, and upstream regulators including NUPR1 and IL-1 were predicted to be activated, leading to dysregulation of microtubules and cytoskeleton of the heart. Estimation of immune cell population did not show any significant differences in the number of specific cell types or oligoclonality compared with the control. These findings suggest that SSc myocardium have a distinct molecular pathogenesis compared to dilated cardiomyopathy.

研究分野：膠原病

キーワード：全身性強皮症 バイオインフォマティクス 心筋

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症(Systemic Sclerosis; SSc)は、自己免疫、微小血管障害、過剰な線維化を特徴とする結合組織病であり、予後不良例では早期に治療しなければ不可逆的な臓器障害を引き起こす。特に、SScに関連した心病変(SSc primary heart involvement; SSc-pHI)は全死亡の強い予測因子であることが報告されている(ハザード比2.8; 95%信頼区間2.1-3.8)。イタリアで行われた大規模コホート研究によればSSc患者の35%が心病変または不整脈を有し、疾患連死亡の36%を占めていた。無症状の症例を含めるとかなりの割合のSSc患者が疾患の早期から心筋灌流異常を有し、局所的な壁運動異常は約30%の患者で、剖検では心筋の線維化所見が約80%の患者で認められ、SScに伴う心病変は考えられていたより高頻度なことが示されている。病態生理としてはSScによる微小血管障害を主体とした直接的な心筋傷害や虚血再灌流障害が心筋細胞の微小壊死や慢性炎症を惹起し、最終的に心筋線維化に至る可能性が想起されている。心筋生検が施行されたSSc-pHI患者の病理所見を評価したドイツからの報告では、心筋組織におけるマクロファージなどの炎症細胞の浸潤がその後の予後と相関することが示されている。病理学的には心内膜下領域のびまん性心筋線維化と心外膜冠動脈走行とは無関係の収縮帯壊死は特徴的で、これらを反映した所見が心臓MRIや心筋生検病理で見られる場合がある。SScにおける心病変の定義は研究によって異なっていたが、2019年にWorld Scleroderma FoundationとEuropean Heart Failure Associationが連携してSSc-pHIの定義として「強皮症の血管病変が主な原因となる一時的な心病変で、動脈硬化性冠動脈疾患、心臓弁膜症を含む非SSc心病変及び肺動脈性高血圧症等のSSc非心病変を除外する客観的診断方法を要する」を提案した。今回、我々はSScに伴う心病変の病態を追究するため、SSc-pHI基準を満たす患者の心筋生検組織を用いた網羅的遺伝子発現解析を実施した。

2. 研究の目的

心筋検体の心筋トランスクリプトーム解析を通じてSSc-pHIの分子病態を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 対象

当施設の疾患レジストリに登録されているSSc患者470例のうち、定期的に行われている経胸壁心エコーや心電図、心臓MRI等の検査によりSSc-pHIの基準を満たし、過去または現在において肺うっ血/体うっ血いずれかのうっ血症状がある、労作時息切れ等の運動耐容能低下(NYHA分類II度以上)の心不全がある、不整脈発作や心ブロック(II度以上)がある、のいずれかに該当する20歳以上の症例を対象とした。そのうち、診断目的に心筋生検が実施され、心筋残余研究が利用可能である例を心筋トランスクリプトーム解析の対象とした。心筋生検が実施された拡張型心筋症(DCM)連続4例を対照群として用いた。

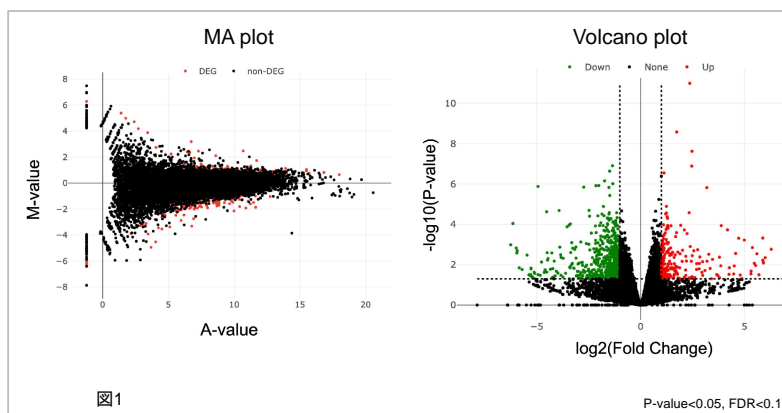
(2) 検体処理とトランスクリプトーム解析

経皮的カテーテル的に採取された微量の心筋検体は直ちに滅菌含生食ガーゼ上に静置、洗浄し、チューブに入れて冷却メタノール溶媒を介して液体窒素で瞬間凍結させ、-80℃で保存した。RNAシーケンス(RNA-seq)はタカラバイオ株式会社で実施し、核酸抽出はNucleoSpin RNA kit(Takara bio, Japan)、ライブラリー作成はSMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA(Takara bio, Japan)、核酸シーケンスはNovaSeq 6000 (Illumina, USA)を用いて指定のプロトコルに従って実施した。RNA-seqデータから得られたカウントデータをTMM正規化(Trimmed mean of M values)し、バイオインフォマティクス評価はR packageのTCC (doi: 10.1186/s12859-015-0794-7)を用い、ベイズ推定による事後検定(post-hoc test)およびBenjamini-Hochberg法によるfalse discovery rateの調整を実施した。Ingenuity Pathway Analysis (IPA, QIAGEN)ソフトウェアを用いてパスウェイ解析を実施した。Heatmap作成、階層化クラスタリングは統計ソフトRを用いて作成した。本研究は学内の倫理委員会で承認され、全ての研究対象者から事前に文書による同意を得て実施した。

4. 研究成果

(1) 研究対象者の臨床背景

当院のSScレジストリ登録例のうち22例が組み入れ基準を満たし、そのうち経カテーテル的心筋生検が実施された4例を心筋トランスクリプトーム解析の対象とした。対照群としてDCM4症例を用いた。対象となったSSc-pHI4例の臨床的背景として、いずれも70ヶ月以上の罹病期間を有し、NYHA度が2例、度



が2例、心エコ で中等度の壁運動低下や心嚢液貯留があり、心臓 MRI では全例で遅延造影効果やT1 マッピング値の異常が認められた。また、全例で皮膚硬化や間質性肺疾患に対する疾患修飾療法としてミコフェノール酸モフェチルまたはトシリズマブが投薬されていた。RNA-seq で取得した発現遺伝子情報のうち、pseudo-genes や超低発現の遺伝子を除外した蛋白コード遺伝子16,780を解析対象とした。

(2) 発現量解析・パスウェイ解析

SSc-pHI 群と DCM 群と比較すると、SSc 心筋で発現上昇または低下する 221 の発現変動遺伝子(DEG)を検出した(図 1)。これら DEG は心筋細胞に由来あるいは関連した遺伝子が多かった。

IPA®を用いたパスウェイ解析では、Fatty Acid -oxidation、アポトーシス誘導酵素である Granzyme A Signaling など細胞エネルギー代謝経路に有意な活性化が見られた(図 2)。Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)を用いたパスウェイ解析でも Carbon metabolism, Citrate cycle などの心筋エネルギー代謝関連経路に活性化が見られた。

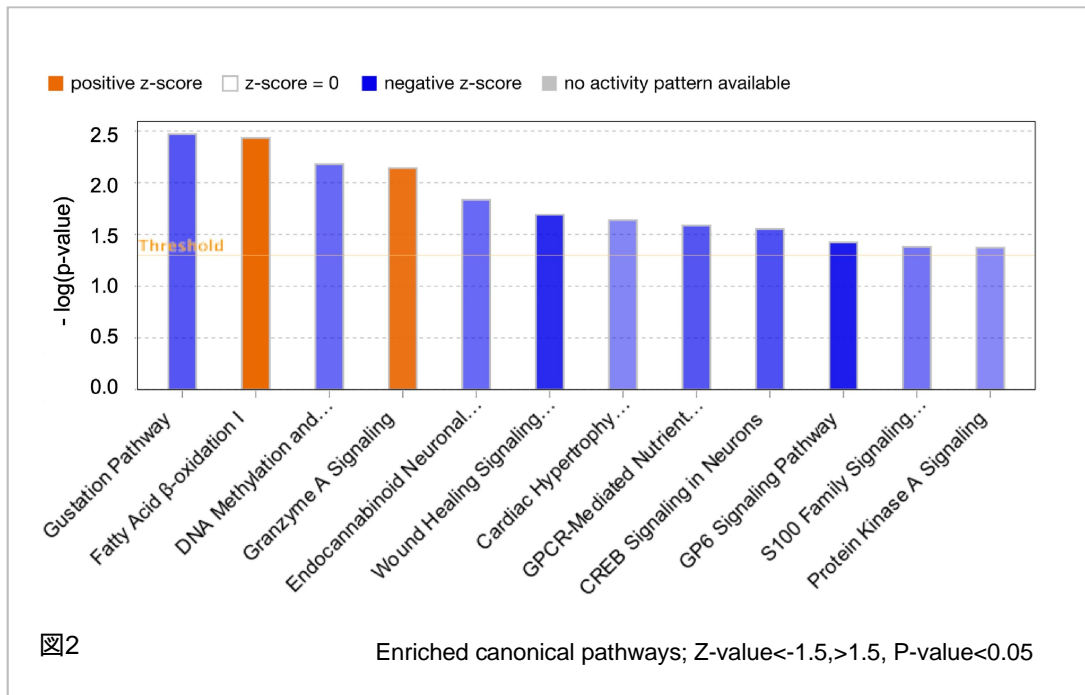
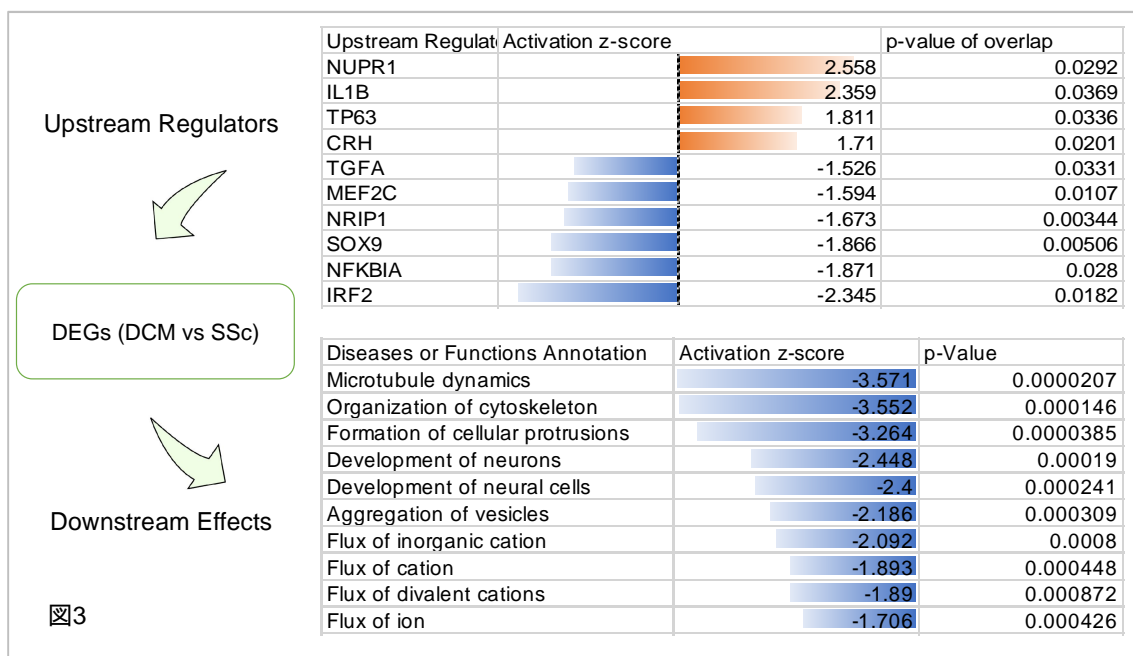


図2

DEG を上流で制御する分子(Upstream Regulators :UR)や DEG が与える下流の生物学的機能(Downstream Effects; DE)を評価したところ、UR として転写調節因子 NUPR1、サイトカイン IL-1 の上昇が見られた。DE としては Microtubule dynamics、Organization of cytoskeleton と微小管・細胞骨格機能に関連したアノテーションの抑制が認められた(図 3)。



心筋組織に含有・浸潤する免疫担当細胞の発現量をリードカウント値から MCP counter®及び Cybersort®を用いて疾患群、対照群それぞれで推計した。B細胞、T細胞、NK細胞、好中球、血管内皮細胞、線維芽細胞の数量はサンプル間で変動はあったものの、疾患群、対照群の二群間比較では明らかな相違はなかった。また、各サンプルを構成するそれらの比率も群間で一定の傾向は見られなかった(図4)。

Estimated expression level of immune cells infiltrating myocardial tissue (inter-samples comparison)

	T cells	CD8 T cells	Cytotoxic lymph	B lineage	NK cells	Monocytic line	Myeloid dendri	Neutrophils	Endothelial cel	Fibroblasts
DCM_1	29.07	23.00	28.14	1.25	9.13	344.14	24.00	208.20	504.72	2040.88
DCM_2	26.93	15.00	36.00	4.88	8.13	338.14	22.00	204.13	588.44	1622.88
DCM_3	43.29	10.00	38.57	1.00	7.00	474.14	81.60	297.47	848.91	6021.25
DCM_4	28.07	3.00	54.86	3.38	13.88	467.00	56.60	222.93	1047.16	7096.13
SSc_1	36.21	11.00	22.00	1.50	7.50	383.43	61.40	170.07	714.31	4238.13
SSc_2	24.29	32.00	14.86	0.88	8.50	340.57	54.80	232.07	844.50	4094.88
SSc_3	40.14	14.00	65.71	0.38	12.63	407.71	34.40	213.87	938.91	3284.75
SSc_4	15.21	2.00	8.29	2.75	4.63	387.29	40.20	188.40	841.94	3994.63
P-value	0.69	0.8	0.44	0.28	0.606	0.456	0.919	0.259	0.534	0.842

Estimated expression ratio of immune cells infiltrating myocardial tissue (intra-samples comparison)

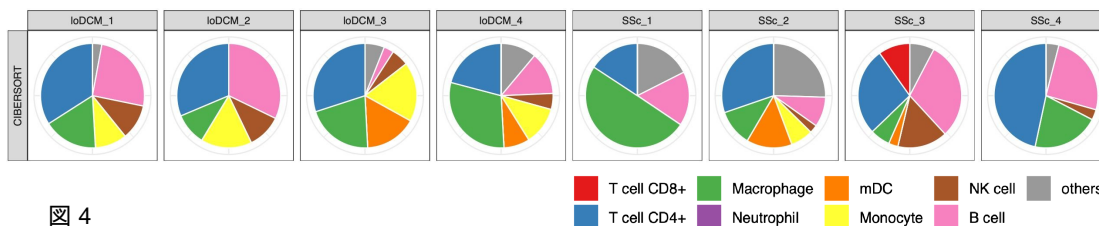


図 4

以上より、SSc 心筋では拡張型心筋症とは異なる分子病態が存在する可能性が示唆された。本研究で同定されたパスウェイや上流制御因子が病態解明に役立つとともに、新規治療標的となる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kuwana M, Hasegawa M, Fukue R, Shirai Y, Ishikawa O, Endo H, Ogawa F, Goto D, Kawaguchi Y, Sato S, Ihn H, and Takehara K	4. 巻 31
2. 論文標題 Initial predictors of skin thickness progression in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis: results from a multicentre prospective cohort in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mod. Rheumatol	6. 最初と最後の頁 386-393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2020.1784548	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 Ota Y, and Kuwana M	4. 巻 4
2. 論文標題 Updates on genetics in systemic sclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inflamm. Regen	6. 最初と最後の頁 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-021-00167-6	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 Spiera R, Khanna D, Kuwana M, Furst DE, Frech TM, Hummers L, Stevens W, Matucci-Cerinic M, Baron M, Distler O, Dgetluck N, Bloom BJ, Dinh Q, White B, and Denton CP	4. 巻 131
2. 論文標題 A randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 study of lenabasum in diffuse cutaneous systemic sclerosis: RESOLVE-1 design and rationale	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin. Exp. Rheumatol	6. 最初と最後の頁 124-133
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 該当する
1. 著者名 Shirai Y, Fukue R, Kaneko Y, and Kuwana M	4. 巻 11
2. 論文標題 Clinical relevance of the serial measurement of Krebs von den Lungen-6 levels in patients with systemic sclerosis-associated interstitial lung disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diagnostics (Basel)	6. 最初と最後の頁 2007
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics11112007	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 Bruni C, Kuwana M. (35人中27番目)	4. 巻 7
2. 論文標題 Primary systemic sclerosis heart involvement: a systematic literature review and preliminary consensus-based WSF/HFA definition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Scleroderma Relat. Disord	6. 最初と最後の頁 24-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/23971983211053246	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 Shirai Y, Kawami N, Iwakiri K, and Kuwana M	4. 巻 7
2. 論文標題 Use of vonoprazan, a novel potassium-competitive acid blocker, for the treatment of proton pump inhibitor-refractory reflux esophagitis in patients with systemic sclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Scleroderma Relat. Disord	6. 最初と最後の頁 57-61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/23971983211021747	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 Kuwana M, Allamore Y, Denton CP, Distler JHW, Steen VD, Khanna D, Matucci-Cerinic M, Mayes MD, Volkman ER, Miede C, Gahlemann M, Quaresma Lic M, Alves M, and Distler O	4. 巻 74
2. 論文標題 Nintedanib in patients with systemic sclerosis-associated interstitial lung disease: subgroup analyses by autoantibody status and skin score.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis Rheumatol	6. 最初と最後の頁 518-526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.41965. PMID: 34514739	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

1. 著者名 Lescoat A, Roofeh D, Kuwana M, Lafyatis R, Allamore Y, and Khanna D	4. 巻 -
2. 論文標題 Therapeutic approaches to systemic sclerosis: Recent approvals and future candidate therapies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin. Rev. Allergy Immunol	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) 10.1007/s12016-021-08891-0	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 Yomono K and Kuwana M	4. 巻 -
2. 論文標題 Outcomes in patients with systemic sclerosis undergoing early versus delayed intervention with potential disease-modifying therapies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Rheumatology (Oxford)	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/keab931	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 Isomura Y, Shirai Y, and Kuwana M	4. 巻 -
2. 論文標題 Clinical worsening following discontinuation of tocilizumab in diffuse cutaneous systemic sclerosis: a single-centre experience in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Rheumatology (Oxford)	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/keac136	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 Matucci-Cerinic M, Bruni C, Allanore Y, Clementi M, Dagna L, Damjanov N, De Paulis A, Denton CP, Distler O, Fox D, Furst DE, Khanna D, Krieg T, Kuwana M, Lee EB, Li, Pillai S, Wang Y, Zeng X, and Taliani G	4. 巻 79(6)
2. 論文標題 Systemic sclerosis and the COVID-19 pandemic: World Scleroderma Foundation preliminary advice for patient management	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann. Rheum. Dis	6. 最初と最後の頁 724-726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/annrheumdis-2020-217407	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 Nawata T, Shirai Y, Suzuki M, and Kuwana M	4. 巻 60(1)
2. 論文標題 Chest wall muscle atrophy as a contributory factor for forced vital capacity decline in systemic sclerosis-interstitial lung disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Rheumatology (Oxford)	6. 最初と最後の頁 250-255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/keaa322	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 Kuwana M, Hasegawa M, Fukue R, Shirai Y, Ishikawa O, Endo H, Ogawa F, Goto D, Kawaguchi Y, Sato S, Ihn H, and Takehara K	4. 巻 31(2)
2. 論文標題 Initial predictors of skin thickness progression in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis: results from a multicentre prospective cohort in Japan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mod. Rheumatol	6. 最初と最後の頁 386-393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2020.1784548	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5件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Kuwana M
2. 発表標題 Management of pulmonary arterial hypertension and interstitial lung disease associated with systemic sclerosis
3. 学会等名 23st Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress. APLAR2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Isomura Y, Yamasaki Y, Shirai Y, Kuwana M
2. 発表標題 Outcomes of Dose-Reduction or Discontinuation of Tocilizumab in Patients with Early Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis
3. 学会等名 Annual European Congress of Rheumatology EULAR2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Assassi S, Christopher P Denton, Cutolo M, Tracy R Luckhardt, Diefenbach C, Ittrich C, Alves M, Kuwana M on behalf of the SENSICIS trial investigators
2. 発表標題 Effect of Nintedanib on KL-6 in Patients with Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease in the SENSICIS Trial
3. 学会等名 ACR Convergence2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yomono K, and Kuwana M
2. 発表標題 Early Intervention with Immunomodulators Leads to Better Outcomes in Patients with Systemic Sclerosis.
3. 学会等名 ACR Convergence2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kuwana M, Inoue Y, Inase N, Makino S, Takizawa A, Takenouchi K, Rohr K, Schlenker-Herceg R, Takeuchi T
2. 発表標題 Effects of Nintedanib on Patient-Reported Outcomes in Japanese Patients with Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases: Sub-Analysis of INBUILD
3. 学会等名 APLAR2020 (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
研究協力者	磯村 洋平 (Isomura Yohei)	大学院医学研究科・大学院生 (32666)	

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