

令和 6 年 5 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16354

研究課題名（和文）関節リウマチ患者の滑膜一細胞解析によるTNF- 阻害剤反応性予測マーカーの探索

研究課題名（英文）Exploratory research on predictive markers for TNF inhibitor response using single synovial cell analysis of patients with rheumatoid arthritis.

研究代表者

土屋 遥香（Tsuchiya, Haruka）

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50868560

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）：本課題は、RA患者の関節滑膜のシングルセル情報と前向きに収集する臨床情報の統合的解析を通じて、TNF- 阻害剤に対する治療抵抗性の獲得メカニズムを解明することを目的とした。申請者らは、特定の滑膜線維芽細胞（synovial fibroblasts; SFs）の亜集団が豊富な患者では、前向きに使用したTNF- 阻害剤に対する治療反応性が不良であることを明らかにした。また、これらは他のSFsの亜集団と比較し、特定のがん関連分子やケモカインを高発現した。今後、治療抵抗性に関連するSFsの炎症局所における誘導機序を探索することで、RAの難治性病態の一端が解明されることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチは、遺伝的素因や環境因子を背景に発症する代表的な自己免疫性関節炎である。約10%の患者は既存の抗リウマチ薬の効果が不十分であり、関節破壊が進行する。本課題では、滑膜シングルセル情報と臨床情報の統合的解析を通じて、特定の滑膜線維芽細胞の亜集団がTNF- 阻害剤に対する治療抵抗性に関連することを明らかにした。このことは、難治例に対する新規創薬ターゲット同様に繋がる可能性を内包している。

研究成果の概要（英文）：This project was designed to shed light on the mechanism of acquired resistance to TNF- inhibitors by integrating single cell information from the synovial membrane of rheumatoid arthritis (RA) patients and prospectively collected clinical information. The applicants revealed that patients with an abundance of a specific subpopulation of synovial fibroblasts (SFs) showed poor therapeutic response to TNF- inhibitors administered prospectively. In addition, these subpopulations expressed specific cancer-related molecules and chemokines at higher levels than other SFs subpopulations. The exploration of the induction mechanisms of SFs related to treatment resistance at the inflammatory site is expected to lead to an understanding of part of the intractable pathology of RA.

研究分野：自己免疫疾患

キーワード：関節リウマチ TNF- 阻害剤 治療抵抗性 滑膜線維芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

RA は、遺伝的素因や環境因子を背景に発症する代表的な自己免疫性関節炎である。発症早期から、RA の関節内では多様な免疫細胞 (例: T 細胞・B 細胞・単球) や間葉系細胞が細胞間接着や液性因子を介して相互に活性化し、局所の炎症環境を構成する (Smolen JS et al. *Nat Rev Dis Primers*. 2018)。近年登場した生物学的製剤や分子標的薬は、TNF- α や IL-6 等を介した炎症シグナルの入力や伝達経路を直接的に阻害することで、RA の治療を劇的に発展させた。一方、RA 患者は自己抗体の保有や重症度、罹患関節の分布に至るまで臨床的に多様であり、中でも、治療反応の不均一性は临床上の大きな課題である。現在の「くじ引き」にも例えられる探索的な治療戦略は、時に有効な薬剤に巡り合うまでの時間的損失と不可逆的な関節破壊をもたらし、就学や労働など日常生活活動能力の著しい低下に繋がらう。この事は、多大な個人的および社会的損失を生む。すなわち、RA の発症早期に、個々の患者の治療反応性を予測するバイオマーカー探索が喫緊の課題といえる。

2. 研究の目的

本研究は、本邦の従来型合成抗リウマチ薬の効果が不十分な RA 患者の関節滑膜のシングルセル情報と、TNF- α 阻害剤による治療強化にあたり前向きに収集する臨床情報の統合的解析を通じて、治療抵抗例 (TNF- α inhibitor-inadequate response; TNF-IR) と非抵抗例における免疫学的特徴の解明および、プレジジョン・メディシン (精密医療) にむけた基盤構築を目的とした。

3. 研究の方法

RA 分類基準 (ACR/EULAR 2010 年) を満し、発症早期 (1 年以内)、MTX-IR (MTX が 3 か月以上投与されても低疾患活動性以下に未到達) の患者から、研究内容に関して文書説明と同意を取得した。同意が得られた患者から、治療開始前の臨床情報 (年齢・性別・自己抗体・疾患活動性評価指標・身体機能障害評価指標等)、前向き臨床情報 (疾患活動性評価指標・身体機能障害評価指標等)、関節滑膜 (超音波ガイド下滑膜針生検などを用いて採取) を収集した。関節滑膜の細胞懸濁液から分離した単核球に、CITE-seq 抗体の添加と免疫蛍光染色を施し、フローサイトメーターを用いて生細胞を分取した (1 検体あたりの目安: 10,000 細胞)。10x Genomics Chromium システムを用いてシングルセルライブラリーを調整し、Novaseq 6000 による次世代シーケンスを行った。得られた関節滑膜のシングルセル情報と臨床情報を、統合的に解析した。

4. 研究成果

近年、欧米の研究により、RA 患者の滑膜の細胞構成の多様性と、一部の滑膜線維芽細胞 (synovial fibroblasts; SFs) が RA 患者の既存治療に対する抵抗性と密接に関連する可能性が示唆されている。例えば、関節滑膜の B 細胞浸潤に着目したランダム化比較試験 (R4RA [Rituximab versus tocilizumab in anti-TNF inadequate responder patients with rheumatoid arthritis] trial) では、TNF- α 阻害薬、IL-6 受容体阻害剤、抗 CD20 抗体の全てが効果不十分であった治療困難例では、いずれか 1 剤が有効であった患者と比較し、滑膜における間葉系細胞 (特に CD34+ SF や DKK3+ SF) の割合が有意に高いことが推定された (Rivellese F et al. *Nature Med*. 2022)。

本課題では、はじめに、関節滑膜のフローサイトメトリーデータと scRNA-seq データから、日本人 RA 患者の滑膜の細胞構成にも、過去の欧米からの報告同様に、患者ごとに多様性があることを確認した。

次に、単一細胞を対象とした線形混合効果モデルの一種である Mixed-effects association testing for single cells (MASC) を活用し、scRNA-seq データと TNF- α 阻害剤開始 3 か月後の疾患活動性情報 (CDAI) を統合的に解析した。その結果、特定の SFs の亜集団は、3 か月後の疾患活動性の高さに関連することが明らかになった。この SFs は、TNF- α や IL-6、IFN に代表される炎症性サイトカインの下流シグナリングの発現に乏しく、炎症経路とは独立した機序で形質誘導される可能性が示唆された。また、他の SFs の亜集団と比較し、腫瘍細胞の増殖、浸潤や転移に関連する特定の分子やケモカインを高発現しており、RA 滑膜の骨軟骨浸潤や免疫細胞の動員に寄与することが示唆された (論文投稿予定)。

今後、この病的な SF 亜集団の滑膜内における誘導機序を追求することで、RA の難治性病態の一端が解明され、治療困難例に対する新規創薬標的の同定に繋がる可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土屋遥香
2. 発表標題 滑膜解析から紐解く日本人関節リウマチ患者の層別化と精密化医療の可能性
3. 学会等名 第44回日本炎症・再生医学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土屋遥香
2. 発表標題 滑膜オミクス解析から、日本人関節リウマチ患者のよりよい明日を拓く
3. 学会等名 第41回日本骨代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土屋遥香
2. 発表標題 滑膜シングルセル解析から紐解く 日本人関節リウマチ患者の 治療抵抗性獲得メカニズム
3. 学会等名 第8回 日本骨免疫学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土屋遥香
2. 発表標題 滑膜線維芽細胞における 抗リウマチ薬の遺伝免疫学的な作用点
3. 学会等名 第67回 日本リウマチ学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023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
---------	---------