

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591445

研究課題名(和文)メタボロームに着目した膠原病の新規治療法および診断法の開発

研究課題名(英文)Metabolomics for biomarker discovery in systemic lupus erythematosus

研究代表者

三枝 淳(Saegusa, Jun)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20514970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：全身性エリテマトーデス(SLE)の診断および疾患活動性モニタリングに有用な新規バイオマーカーを同定することを目的にガスクロマトグラフィー質量分析計を用いた血清メタボロミクスを行い、以下の知見を得た。

1. 血中代謝物プロファイルの主成分分析によりSLE群と健常人群は区別してグループ分けされ、グリセロールなど5つの代謝物とその区別に大きく寄与していた。2. 血液中のグルタミン酸濃度は、SLEの疾患活動性と相関していた。

研究成果の概要(英文)：Metabolomics is the identification and quantification of the metabolome, all the low-molecular-weight metabolites in a biological sample. We examined the differences in the serum metabolome between patients with SLE and healthy subjects, using GC/MS. The levels of 25 metabolites were significantly different in SLE patients compared to healthy controls. The two-dimensional plot of the principal component analysis scores showed distinct clustering for the two subject groups. Multivariate statistical analysis revealed that variations in the levels of glutamic acid, urea, tyrosine, phosphate and glycerol greatly contributed to the observed separation of the metabolomics profiles of the SLE patients and healthy controls. The serum levels of glutamic acid were significantly correlated with the SLE disease activity index score in the patient group. These findings suggest that GC/MS-based serum metabolomics can serve as a novel diagnostic and monitoring tool for autoimmune diseases.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：メタボローム解析 全身性エリテマトーデス バイオマーカー ガスクロマトグラフィー質量分析計
グルタミン酸

1. 研究開始当初の背景

細胞の活動は種々の酵素反応の連鎖、すなわち代謝によって営まれており、代謝によって産生された産物の総体をメタボロームと呼ぶ。メタボローム解析あるいはメタボロミクスとは、対象とするサンプル中に存在する低分子代謝産物(メタボライト)を網羅的に解析することによって細胞の動的な振る舞いを理解しようとする方法論であり、ポストゲノム研究の新しい手法として近年注目を浴びている。メタボライトは生命活動における最終産物であるため、その変動は生物の環境応答や適応変化などを鋭敏に反映していると考えられる。そして、疾病などによって細胞内や組織内において代謝の変動が起こった場合、血液、尿などの体液中の代謝物質の組成や濃度にも変化が起こることは容易に想像できる。したがって、血液や尿のメタボローム解析はバイオマーカー候補の探索に有用であると思われる。

がん細胞がグルコースを活発に取り込み解糖系を亢進する、いわゆる "Warburg 効果" はがん細胞の根源的性質の一つとして古くから知られている。がん細胞がなぜこの一見非効率的な代謝的特徴を有しているのかは未だに解明されていないが、メタボローム解析技術の進化などにより、近年がん細胞の代謝的特徴に関する興味深い報告が相次いでいる。さらに最近、T 細胞やマクロファージといった免疫担当細胞の機能も、細胞内の代謝と密接な関連があることが明らかとなっている。例えば、Th17 細胞、M1 マクロファージといった炎症促進性の細胞は解糖系やペントースリン酸経路の亢進といったがん細胞の代謝に類似した代謝的特徴を示し、対照的に、制御性 T (Treg) 細胞や M2 マクロファージといった炎症抑制性の細胞は、酸化リン酸化経路の相対的な亢進を認めることが知られている。

全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus; SLE) は全身の臓器に炎症をきたす自己免疫疾患であり、主に若い女性に発症する。その病因は未だ不明であるが、遺伝因子と環境因子が複雑に絡み合うことによって自然免疫応答および獲得免疫応答の異常が生じ、免疫バランスの破綻をきたして発症すると考えられている。そしてその病態には自己抗体、自己反応性リンパ球、樹状細胞、免疫複合体といった免疫系の様々な細胞が関与している。臨床症状と検査所見を組み合わせた 11 の判定基準のうち少なくとも 4 つの基準を満たす場合に SLE と分類されるが、SLE 患者の臨床症状および検査所見は多彩であるため、診断に難渋することも少なくない。また、その予後は免疫抑制薬による治療の進歩により劇的に改善したが、急性期の治療によって症状が軽快した後も寛解と増悪を繰り返しながら慢性の経過をたどることが多く、長年に渡る嚴重な疾患活動性のモ

ニタリングが非常に重要である。

2. 研究の目的

血清メタボローム解析により、SLE の診断あるいは疾患活動性モニタリングに有用な新規バイオマーカーとなり得る低分子代謝産物を同定する。

3. 研究の方法

1) 試料

神戸大学医学倫理委員会の承認後、インフォームドコンセントを得た上で、26 名の SLE 患者および 26 名の健常人の血清を採取した。食事は血中の代謝産物に影響を与えうるため、血清はすべて早朝空腹時とした。疾患コントロールとして 32 名の関節リウマチ (RA) 患者の空腹時血清も採取した。SLE 患者はほとんどが女性であるため、対象はすべて女性とした。

2) サンプルの前処理

血清サンプルから水溶性代謝物の抽出と誘導体化を行った。タンパクを除去するため、サンプルにメタノール/水/クロロホルム溶液 (2.5 : 1 : 1) を加えて処理を行い、上清を回収した (Bligh-Dyer の方法)。脱水処理した後、メトキシアミンに溶かして糖をオキシム化し、代謝物が気化しやすくなるように N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) を用いて誘導体化を行った。

3) ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC/MS) によるメタボローム解析

GC/MS は、GCMS-QP2010 (島津製作所) を使用した。GC は 100 から 320 までを毎分 4 の速度で上昇させ、各サンプルについて代謝物の全イオン電流クロマトグラムを得る。主要なピークについて、データ解析ソフト GCMS Solution を用いて島津製作所の GC/MS 代謝成分データベースに対して検索を行った。EI スペクトルピークの m/z の類似度が 80 以上の代謝物を同定し、これらについて SLE 患者群と健常人群のメタボロームデータを取得した。

4) 統計学的解析

得られたメタボロームデータを用いて、個々の疾患について患者群と健常人群に分けて統計解析を行い、二群間で有意差のあるメタボロームを明らかにした。そして、同じくメタボロームデータを用いて主成分分析 (principal component analysis; PCA) を行い、比較パターン解析を行うことで SLE に

特異的な代謝産物の変動パターンの有無を調べた。さらに、PLS 回帰法 (部分最小二乗による判別分析; PLS-DA) も行い、各疾患群と健常人群のグループ分けに寄与している代謝産物を複数同定した。

また、各代謝産物の血中濃度と SLE 疾患活動性指数との相関は、スピアマンの順位相関係数を求めることにより解析した。

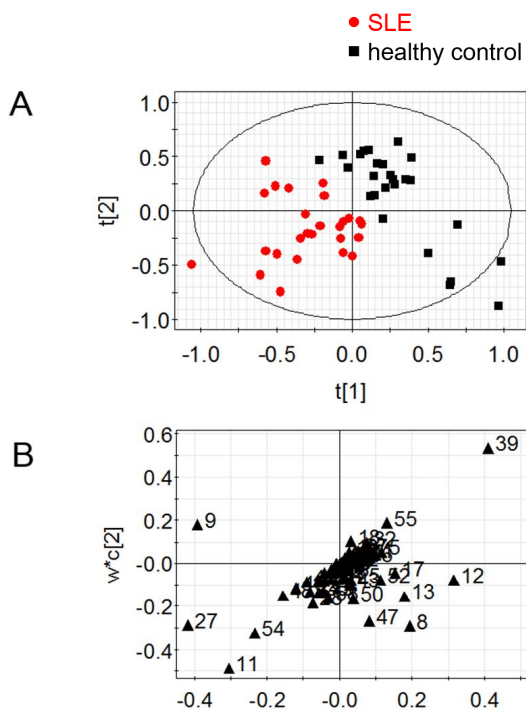
4. 研究成果

GC/MS を利用したメタボローム解析により、SLE 患者 (n=26) および健常人 (n=26) の空腹時血清から、62 種類の代謝産物を同定した。そして SLE 患者群におけるそれぞれの代謝産物の血清中の濃度を健常人群と比較したところ、25 種類の代謝産物の濃度が有意に上昇、あるいは低下していた。

続いて、得られたメタボロームデータを多変量解析にて分析した。

まず、主成分分析 (PCA) を行ったところ、SLE 患者群と健常人群を区別してグループ分けすることができた (図 1A)。

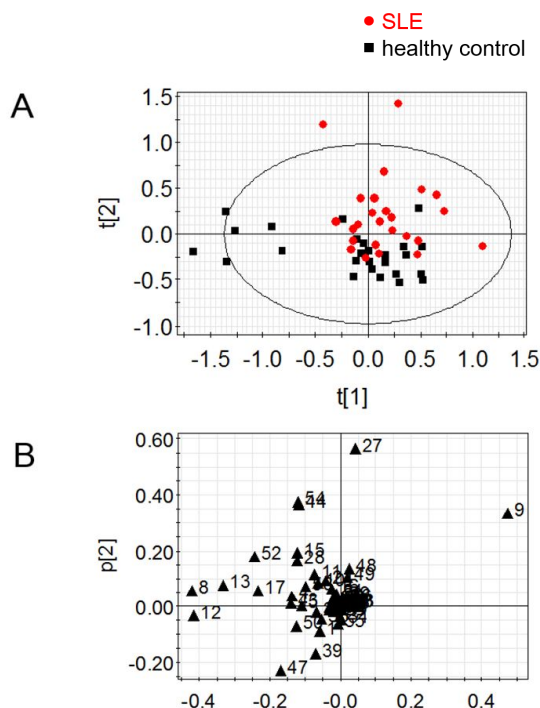
図 1



続いて、PLS 判別分析 (PLS-DA) を行うと、さらにはっきりと両群を区別することができた (図 2A)。

そして、PCA および PLS-DA により、SLE 患者群と健常人群の区別に寄与している代謝産物を同定した (図 1B, 図 2B)。

図 2

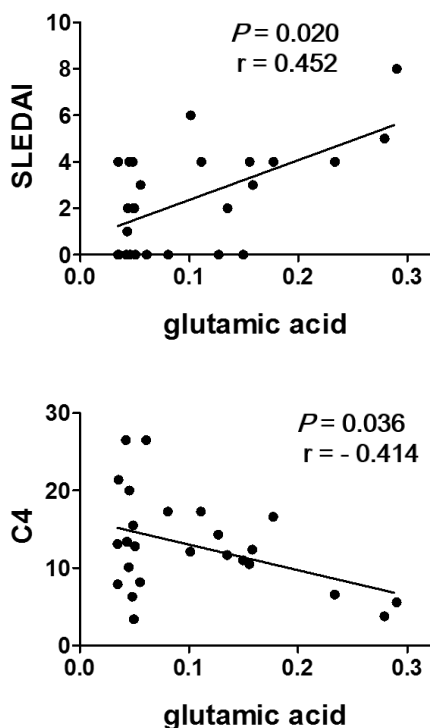


続いて、SLE 患者血清で認められる代謝変動が SLE に特有の変化であるのか、あるいは他の全身性自己免疫疾患と共通のものであるのかを明らかにする目的で、もう一つの代表的な全身性自己免疫疾患 / 慢性炎症性疾患である関節リウマチ (RA) 患者の血清メタボローム解析も行った。SLE 患者のメタボロームデータを、32 例の RA 患者のメタボロームデータと比較検討したところ、SLE と同様の変動を示す代謝物が多くある一方で、SLE では低下しているものが RA では上昇するなど、逆の変動を示す代謝物も数多く存在した。

この RA との比較解析と、上記の多変量解析の結果、さらに個々の代謝産物の血中濃度のデータをもとに総合的な検討を行ったところ、SLE 患者の血清中で特有の変動をきたしている代謝物は、グルタミン酸、尿素、チロシン、リン酸、グリセロールの 5 つであることが判明した。

血液中や尿中の代謝産物の変動は非常にダイナミックであるため、その濃度が疾患活動性に関連して変動することは十分に予想される。したがって、我々は次に血清中の代謝産物の濃度と SLE の疾患活動性との関連について検討した。そして SLE 患者の血液中で増加あるいは減少していた 25 種類の代謝産物のうち、SLE 患者の血清中で有意に上昇していたグルタミン酸の濃度が、SLE 疾患活動性指数 (SLEDAI) と有意な正の相関を示すことを発見した。さらに、SLE の各種血清バイオマーカーと各代謝産物の濃度との相関を検討したところ、グルタミン酸の濃度が、SLE の活動期に低下することが知られている C4 の血中濃度と有意な負の相関を示すことを見出した (図 3)。

図 3



この結果から、血中グルタミン酸濃度は、SLE の疾患活動性モニタリングに有用なバイオマーカーの候補の一つであると考えられた。さらに、SLE の患者群を、腎病変の有無、中枢神経障害の有無など障害臓器や臨床症状によって細かくグループ分けしてそれぞれに特徴的な代謝産物の変動の有無を検討したが、有意なものは同定できなかった。

今回の検討により、GC/MS を用いた血清メタボローム解析は、自己免疫疾患の新規診断法や疾患活動性モニタリング法の開発に有用であると考えられた。今後の臨床現場への応用のためには、多施設による大規模な検証研究が必要である。さらには、SLE と RA 以外の全身性自己免疫疾患、例えば強皮症、多発性筋炎 / 皮膚筋炎、シェーグレン症候群といった疾患の血清メタボローム解析も行い、代謝産物の変動を比較検討することも大切である。

現在我々は、抗 TNF- α 製剤といった生物学的製剤の投与前後の RA 患者の血清メタボロミクスを行い、生物学的製剤によって変動する代謝産物や、生物学的製剤の治療反応性の予測に利用できる代謝産物の同定を試みている。

さらに、血清メタボローム解析のみならず、涙腺や唾液腺を主な標的とする全身性自己免疫疾患であるシェーグレン症候群の唾液のメタボローム解析も進めている。また、体液のみならず、RA 患者由来の関節滑膜細胞から代謝産物を抽出してメタボローム解析を行い、対照滑膜細胞との比較検討も行なっている。これらの様々な解析を総合的に検討す

ることにより、自己免疫疾患の病因病態解明の手掛かりを得て、代謝制御という新しい観点からの新規治療薬の開発につなげたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 15 件)

英文 原著論文

1. Onishi A, Sugiyama D, Kogata Y, Saegusa J, Sugimoto T, Kawano S, Morinobu A, Nishimura K, Kumagai S. Diagnostic Accuracy of Serum 1,3- β -D-Glucan for Pneumocystis Jiroveci Pneumonia, Invasive Candidiasis and Invasive Aspergillosis: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Microbiol.* 2012, 50(1):7-15
2. Jauharoh SNA, Saegusa J, Sugimoto T, Ardianto B, Kasagi S, Sugiyama D, Kurimoto C, Tokuno O, Nakamachi Y, Kumagai S, Kawano S. SS-A/Ro52 promotes apoptosis by regulating Bcl-2 production. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012, 417(1):582-7
3. Nishimura K, Saegusa J, Kawano S, Morinobu A. Anti TNF- α agent-induced anti-GBM antibody disease in a patient with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2012, 39(9):1904-5
4. Onishi A, Sugiyama D, Tsuji G, Nakazawa T, Kogata Y, Tsuda K, Naka I, Nishimura K, Misaki K, Kurimoto C, Hayashi H, Kageyama G, Saegusa J, Sugimoto T, Kawano S, Kumagai S, Morinobu A. Mycophenolate mofetil versus intravenous cyclophosphamide for induction treatment of proliferative lupus nephritis in a Japanese population: a retrospective study. *Mod Rheumatol.* 2013, 23(1):89-96
5. Miyamoto Y, Uga H, Tanaka S, Kadowaki M, Ikeda M, Saegusa J, Morinobu A, Kumagai S, Kurata H. Podoplanin is an inflammatory protein upregulated in Th17 cells in SKG arthritic joints. *Mol Immunol.* 2013, 54(2):199-207
6. Matsuki F, Saegusa J, Miyamoto Y, Misaki K, Kumagai S, Morinobu A. CD45RA-Foxp3^{high} activated/effector regulatory T cells in the CCR7+CD45RA-CD27+CD28+ central memory subset are decreased in peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys*

- Res Commun. 2013, 438(4):778-83
7. Mori S, Tran V, Nishikawa K, Kaneda T, Hamada Y, Kawaguchi N, Fujita M, Saegusa J, Takada YK, Matsuura N, Zhao M, Takada Y. A dominant-negative FGF1 mutant (the R50E mutant) suppresses tumorigenesis and angiogenesis. *PLoS One*. 2013, 8(2):e57927
 8. Saegusa J, Irino Y, Yoshida M, Tanaka S, Kogata Y, Kageyama G, Tsuji G, Takenawa T, Kawano S, Kumagai S, Morinobu A. GC/MS-based metabolomics detects metabolic alterations in serum from SLE patients. *Clin Exp Rheumatol*. 2014, 32(1):148
 9. Matsuki F, Saegusa J, Nishimura K, Miura Y, Kurosaka M, Kumagai S, Morinobu A. CD45RA-Foxp3^{low} non-regulatory T cells in the CCR7-CD45RA-CD27+CD28⁺ effector memory subset are increased in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol*. 2014, 290(1):96-101
 10. Nishimura K, Saegusa J, Matsuki F, Akashi K, Kageyama G, Morinobu A. Tofacitinib facilitates the expansion of myeloid-derived suppressor cells and ameliorates arthritis in SKG mice. *Arthritis Rheumatol*. 2015, 67(4):893-902
 11. Nakamachi Y, Ohnuma K, Uto K, Noguchi Y, Saegusa J, Kawano S. MicroRNA-124 inhibits the progression of adjuvant-induced arthritis in rats. *Ann Rheum Dis*. 2015, in press

英文 総説論文

12. Saegusa J, Matsuki F, Morinobu A. Foxp3⁺ regulatory T cells in the peripheral blood and synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. *Inflamm. Regen*. 2015, 35(2):51-6
13. Hsu DK, Yang RY, Saegusa J, Liu FT. Analysis of the intracellular role of galectins in cell growth and apoptosis. *Methods Mol Biol*. 2015, 1207:451-63.

和文 原著論文

14. 9種類の新世代および第3世代抗環状シトルリン化ペプチド抗体(抗CCP抗体)試薬の比較検討 林 伸英, 熊谷 俊一, 大沼 健一郎, 生戸 健一, 杉山 大典, 三枝 淳, 河野 誠司 日本臨床免疫学会雑誌 36(2):104-14, 2013

和文 総説

15. Myeloid-derived suppressor cell の誘導による自己免疫疾患の治療 西村 啓

佑, 三枝 淳, 森信 暁雄 臨床免疫・アレルギー科 62:5, 481-4, 2014

〔学会発表〕(計19件)

1. Regulatory and pro-inflammatory properties of CD4⁺ T-cell subsets defined by CD45RA, CCR7, CD27, and CD28 in patients with rheumatoid arthritis. Matsuki F, Saegusa J, Miyamoto Y, Misaki K, Kumagai S, Morinobu S. The 12th meeting of the Asian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine, 2012
2. Serum Metabolomics As a Novel Diagnostic Approach for Systemic Lupus Erythematosus. Saegusa J, Irino Y, Yoshida M, Tanaka S, Kogata Y, Kageyama G, Kawano S, Tsuji G, Kumagai S, Morinobu A. American College of Rheumatology 76th Annual Scientific Meeting, 2012
3. Early Growth Response-1 (EGR-1) Controls Synoviocyte Apoptosis, and Its Expression Is Regulated by the Direct Binding of Fibroblast Growth Factor-1 (FGF1) or Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF1) to Integrin $\alpha\beta 3$. Tanaka S, Saegusa J, Kawano S, Takada Y, Kumagai S, Morinobu A. American College of Rheumatology 76th Annual Scientific Meeting, 2012
4. Immediate Early Response Gene X-1 Is Over-Expressed and Regulates Apoptosis and Cytokine Production in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. Morinobu A, Fujita M, Tanaka S, Saegusa J, Kumagai S. American College of Rheumatology 76th Annual Scientific Meeting, 2012
5. Clinical Features of 127 patients with Behcet's disease in Japan. Nishimura K, Saegusa J, Sendo S, Kogata Y, Kageyama G, Kawano S, Kumagai S, Morinobu A. American College of Rheumatology 77th Annual Scientific Meeting, 2013
6. Serum cytokine/chemokine profiles are useful for evaluating pathological conditions of rheumatoid arthritis and diagnosing anti-CCP antibody-negative patients. Uga H, Okazawa T, Miyamoto Y, Hasegawa T, Saegusa J, Tsuji G, Sendo S, Morinobu A, Kumagai S, Kurata H. American College of Rheumatology 77th Annual Scientific Meeting, 2013
7. Glutamate As A Metabolic Biomarker For Monitoring Disease Activity Of Systemic Lupus Erythematosus. Saegusa J, Irino Y, Yoshida M, Tanaka S, Kogata

- Y, Kageyama G, Tsuji G, Kawano S, Kumagai S, Morinobu A. Annual European Congress of Rheumatology, The European League Against Rheumatism, 2014
8. CD45RA-Foxp3^{low} Non-Regulatory T Cells Are Increased In Synovial Fluid From Patients With Rheumatoid Arthritis. Saegusa J, Matsuki F, Nishimura K, Miura Y, Kageyama G, Kumagai S, Morinobu A. Annual European Congress of Rheumatology, The European League Against Rheumatism, 2014
 9. Ineffective Fracture Prevention by Bisphosphonate in Patients Undergoing High Dose Glucocorticoid Therapy with a FRAX Ten Year Probability Greater Than 5.8%. Kageyama G, Okano T, Yamamoto Y, Sugiyama D, Tsuji G, Tsuda K, Takahashi S, Nishida M, Akashi K, Nishimura D, Sendo S, Kogata Y, Saegusa J, Kawano S, Kumagai S, Morinobu A. Annual European Congress of Rheumatology, The European League Against Rheumatism, 2014
 10. Analytical performance of the ST AIA-PACK C-Peptide on AIA-2000. Watanabe Y, Sato I, Hayashi N, Saegusa J, Kawano S. American Association for Clinical Chemistry Annual Meeting 2014
 11. Salivary Metabolomics of Primary Sjögren's Syndrome. Kageyama G, Saegusa J, Tanaka S, Takahashi S, Nishida M, Tsuda K, Yamamoto Y, Okano T, Akashi K, Nishimura K, Sendo S, Kogata Y, Kawano S, Morinobu A. Annual European Congress of Rheumatology, The European League Against Rheumatism, 2014
 12. Comparison of nine second- and third-generation anti-CCP antibody assays for the diagnosis of rheumatoid arthritis. Hayashi N, Kumagai S, Onuma K, Uto K, Sugiyama D, Saegusa J, Kawano S. The 31st World Congress of Biomedical Laboratory Science, 2014
 13. Foxp3+ regulatory T cells in peripheral blood and synovial fluid of patients with RA: A comparative phenotypic analysis. Saegusa J, Matsuki F, Miura Y, Kageyama G, Kawano S, Kumagai S, Morinobu A. American College of Rheumatology 78th Annual Scientific Meeting, 2014
 14. Tofacitinib facilitates the expansion of myeloid-derived suppressor cells and ameliorates arthritis in SKG mice. Nishimura K, Saegusa J, Matsuki F, Akashi K, Kageyama G, and Morinobu A. American College of Rheumatology 78th Annual Scientific Meeting, 2014
 15. 自己免疫疾患のメタボローム解析の未来～新規バイオマーカーの同定と病態解明を目指して～ 三枝 淳 日本臨床検査医学会 第57回近畿支部総会 シンポジウム 自己免疫疾患への多角的検査アプローチ, 2014
 16. シェーグレン症候群患者の唾液メタボロミクス 蔭山 豪一, 三枝 淳, 高橋宗史, 西田 美和, 山本 謙, 津田 耕作, 岡野 隆一, 明石 健吾, 西村 啓佑, 千藤 荘, 古形 芳則, 森信 暁雄. 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2014
 17. シェーグレン症候群患者の唾液メタボロミクス 蔭山 豪一, 三枝 淳, 田中 姿乃, 大西 輝, 古形 芳則, 森信 暁雄 第23回日本シェーグレン症候群学会学術集会, 2014
 18. シェーグレン症候群患者の唾液メタボロミクス 蔭山 豪一, 三枝 淳, 田中 姿乃, 大西 輝, 古形 芳則, 河野 誠司, 森信 暁雄. 日本臨床検査医学会 第57回近畿支部総会, 2014
 19. 血清メタボロミクスによる全身性エリテマトーデスの新規バイオマーカーの探索 三枝 淳, 河野 誠司, 辻 剛, 熊谷 俊一, 森信 暁雄. 第61回日本臨床検査医学会学術集会, 2014
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
三枝 淳 (SAEGUSA JUN)
神戸大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 20514970
 - (2) 研究分担者
森信 暁雄 (MORINOBU AKIO)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 10294216
- 河野 誠司 (KAWANO SEIJI)
神戸大学・医学部附属病院・特命准教授
研究者番号: 20351512