

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07797

研究課題名(和文)CRP陰性若年性特発性関節炎のバイオマーカー探索

研究課題名(英文)Biomarker discovery trial for CRP-negative Juvenile idiopathic arthritis

研究代表者

秋岡 親司(Akioka, Shinji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60598093

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)：若年性特発性関節炎の乾癬性関節炎型および付着部炎関連関節炎型の半数は、血清C反応性タンパク値(CRP)が上昇しないため診断に至らない例が多い。抗体療法の有効性より炎症病態にはTNFαおよびIL-17が関与すると考えられる。TNFαおよびIL-17誘導性を根拠に血清バイオマーカー探索を行った。TNFαおよびIL-17遺伝子の発現制御をレポーターアッセイ系で行った。遺伝子編集したヒト単球細胞株に患者血清を添加したところ、TNFα遺伝子の内因性発現が抑制された。血清エクソソームは遺伝子発現に影響しなかった。CRPとは関連のない、血清による炎症性サイトカイン遺伝子の発現抑制機構の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で若年性特発性関節炎の乾癬性関節炎型および付着部炎関連関節炎型の新しいバイオマーカーを血清および血清エクソソーム中に見出すことはできなかった。しかし一部の血清蛋白が単球系細胞のTNFα発現を負に制御していることが明らかとなった。CRPは元々炎症を制御する蛋白であることを鑑みると、この分子が炎症病態のバイオマーカーである可能性が考えられる。将来的な臨床応用が期待できる結果であった。

研究成果の概要(英文)：Psoriatic arthritis type and enthesitis-related arthritis type of juvenile idiopathic arthritis, JIA, has not be fully diagnosed because of lack of biomarker, such as serum C-reactive protein, CRP, in other types of JIA. From the effectiveness of antibody therapy, TNFα and IL-17 are considered to be involved in the pathophysiology of the inflammation. Biomarker discovery trial has been conducted using patient sera which might have a potential for inducing TNFα and IL-17.

A reporter assay system was applied regarding with the expression of TNFα and IL-17 gene products. Addition of patient serum to a genetically edited human monocyte cell line suppressed the endogenous expression of the TNFα gene in this system. Serum exosomes did not affect the gene expression. These results suggests that certain serum protein has a potential for suppressing the expression of inflammatory cytokine genes.

研究分野：小児科学 臨床免疫学

キーワード：若年性特発性関節炎 血清バイオマーカー サイトカイン制御

## 1. 研究開始当初の背景

C反応性タンパク(CRP)は、疾患の炎症状態の評価に不可欠のバイオマーカーである。血清CRP値の異常・正常で炎症の存在を判断することも多い。しかし、SLE、皮膚筋炎、強皮症、炎症性腸疾患など、血清CRP値の異常を認めない全身性の炎症性疾患は多い。これは、CRPの関与の乏しい炎症病態の存在を示している。

若年性特発性関節炎(JIA)も、血清CRP値に異常を認めない可能性のある炎症性疾患である。7つの病型(全身型、少関節型、多関節型リウマチ因子陰性、多関節型リウマチ因子陽性、乾癬性関節炎型、付着部炎関連関節炎型、その他)で構成されるJIAのうち、①～④は血清CRPの異常高値を認める。しかし、乾癬性関節炎型(JPsA)および付着部炎関連関節炎型(ERA)の半数以上の症例では、血清CRP値や赤沈値の異常を認めない。JPsA/ERAはHLA-B27関連の脊椎関節炎類縁疾患として、本邦では極めて少ないと報告されてきた(JIAの約1%)が、その要因の一つとして、血清CRP値の正常を理由に、炎症性疾患に至らない例は多い点が挙げられる。では、CRP陰性のPsA/ERA例ではどのような「炎症分子」が関与しているのであろうか？これが、本研究の「問い」である。この問いに答えることで、JPsA/ERAの正診率が改善すると共に、臨床からの新しい炎症システムの提言が可能になると考えられる。

これまでの基礎研究から、Toll-like受容体を介したシグナル、inflammasome、interferonopathyなど、分子を基準に多彩な炎症の概念が提唱されている。臨床病態はそれらの複合体であり、臨床表現をいかに分子の言葉に読み替えるかが臨床医の課題である。今回、対象となるJIAのJPsA/ERAではTNF阻害薬、IL-17阻害薬、IL-12/IL-23阻害薬の抗サイトカイン製剤が有効である一方、IL-6阻害薬の効果が乏しいことが知られている。これはCRP陰性のJPsA/ERAにおいて、TNF-a、IL-17を介し、IL-6を介さない炎症が生じていると解釈できる。

バイオマーカー探索では、炎症の局所から候補を探すのが最も効率的である。関節リウマチにおける増殖滑膜のように、JPsA/ERAでも炎症局所の腱や腱鞘および靭帯での検討が想定されるが、同部位の生検は不可逆な組織断裂を来すため、用いることはできない。一方、JPsA/ERAは乾癬、内眼炎、炎症性腸疾患を高率に合併する全身性疾患であるため、循環血液中には病態の軸となる「炎症分子」の存在が予想される。

血中バイオマーカー探索で、今までの血清プロテオミクスや発現アレイでは、膨大なデータから真に意味のある分子を見いだすことは難しかった。一方、近年、細胞外小胞であるエクソソームが種々の細胞から分泌され循環血中に認められること、小胞内に含む蛋白、mRNA、miRNAが種々の活性をもち組織環境を変化させる可能性があること、主に癌の領域ではあるがバイオマーカーとして有用であることが明らかとなった。循環血中のエクソソームを用いることで炎症局所由来のエクソソームも解析対象に含まれると考えられ、「炎症分子」の探索において組織生検の代替になると考えられる。

## 2. 研究の目的

JIA乾癬性関節炎型および付着部炎関連関節炎型のCRP陰性例において、サイトカインを介した炎症が生じているとの仮説のもと、それに関わる炎症分子をTNF-aおよびIL-17発現誘導性、IL-6非誘導性の点から、診断や疾患活動性に関わるバイオマーカーを明らかにすること、さらにその炎症分子を血中エクソソームに検出することが目的である。

## 3. 研究の方法

JIA乾癬性関節炎型および付着部炎関連関節炎型の患者血清のうち、IL-6非誘導性を意味するCRP陰性患者血清を選択し、以下の実験に用いる。下記およびでレポーターの発現上昇を認めた血清については、蛋白・ペプチドレベルおよびエクソソームにおいてはmiRNAに関し、プロテインチップや次世代プロテオミクスの手法、miRNAアレイなどを用いてプロファイリングし、有意な分子を選定する。

### TNF-aおよびIL-17発現誘導性を検定する細胞培養系の確立

患者血清のサイトカイン誘導能に関する標準検定システムを細胞培養系に確立する。細胞は単球・マクロファージ系細胞株を用いる。細胞培養に伴う発現分子の安定性のため、サイトカイン誘導能はレポーターアッセイで評価する。レポーターアッセイは強制発現系では無く、サイトカイン遺伝子をCRISPR/Cas9を用いて遺伝子改変してレポーター遺伝子を導入、検定細胞の有する本来のプロモーター活性を活かす実験系とする。そのため高感度でレポーター活性の高い発光系を採用する。

### 細胞培養系におけるレポーターアッセイ

従来の細胞培養用96穴培養器を用い、ハイスループットスクリーニング可能なルシフェラーゼ活性測定系を確立する。細胞数、培養期間、培養条件、陽性刺激を適正化し、Promega社のNano-Glo HiBit Detection Systemで発光量を測定する。

### エクソソームの抽出とレポーターアッセイ

血清中のエクソソームを抽出し、細胞培養系に添加、レポーターアッセイを行う。抽出は超遠心法、表面抗原等を認識する抗体を用いたポジティブセクション法、ホスファチジルセリン親和

性を利用したPSアフィニティー法を試す。バイオアッセイに用いる点から NanoSight で観察し、よりインタクトな抽出を基準に抽出法を選択する。抽出したエクソソームを用いたレポーターアッセイは と同様に行う。

#### 4. 研究成果

##### サイトカイン発現を検定するための細胞株の樹立

TNF- $\alpha$  の遺伝子発現の検定系を、ヒト単球白血病細胞株 HL-60 を用いて作成した。内因性の転写・翻訳を反映させるため、CRISPER/Cas9 を用いた遺伝子編集の技術を使い、TNF $\alpha$  遺伝子の転写領域にレポーター(ルシフェラーゼ)遺伝子をノックインした(図1)。PAM 配列検索でノックインの部位を選定しガイド RNA を作成した(ノックイン部位は5'側と3'側の2種類のクローン株を作成したが最終的には発現誘導の点から転写開始点ATG直後にノックインしたクローン5'側を用いた)。また、ノックイン配列後の繰り返し protospacer 配列が認識されて切断が繰り返されないように、protospacer 配列およびPAM 配列にはサイレント変異を設定した。レポーター遺伝子は、転写調節への影響を少なく、高感度に翻訳産物を定量的に評価するため、Promega 社の NanoBiT システムを採用、HiBiT 遺伝子をノックインした。限界希釈法によるシングルセルクローニングを経て2株樹立した。さらに安定した解析系のために AIM-V メディウムでの無血清化を進め、無血清細胞株を得た。レポーター検出感度は非常に高く、PMA 刺激時は非誘導時の約1000倍の発光を示し、高い感度を確認した。また、IL-17 遺伝子発現に関して同様の方法を用いてノックイン細胞株を作成、無血清細胞株を得た。

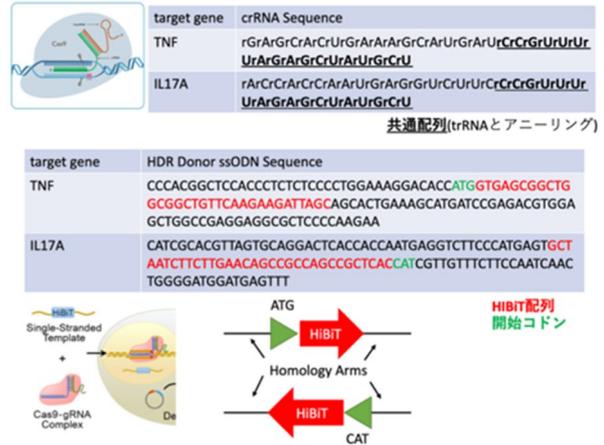


図1 各サイトカイン遺伝子の遺伝子編集部位と組換え後の遺伝子配列

##### 血清添加によるサイトカイン発現の解析

内因性の TNF- $\alpha$  遺伝子発現を検出する HiBiT 遺伝子ノックインヒト単球細胞株 HL-60 を用い、血清 CRP 陰性の患者由来血清のレポーターアッセイを、in vitro cell culture システムで行った。血清によるレポーター発現は、予想に反して HL-60 の内因性発現を有意に抑制した(陽性対照に選んだ PMA 刺激では有意にレポーター発現を上昇させた)。また、この抑制は CRP 陰性血清に特異的では無く、全ての血清サンプルで認められた。患者血清を用いることは、バイオマーカー探索のスクリーニングには適さない結果であった。そこで予定していた全血清を用いる方法を変更し、血清分画におけるレポーター発現を評価することとし、機能性分子の存在の可能性の高いエクソソームをスクリーニング対象に変更した。

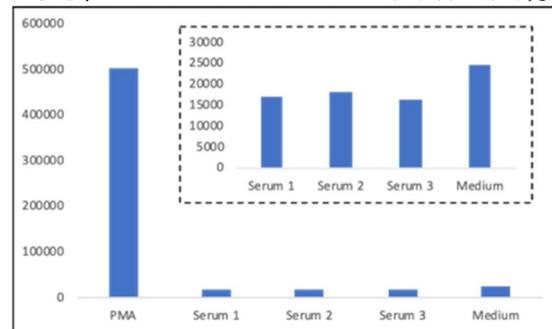


図2 患者血清添加によるHiBiTカウント

##### 血清より単離したエクソソームのサイトカイン誘導性の検定

エクソソームは超遠心法と表面抗原等を用いる方法、PS アフィニティー法により単離し、NanoSight を用いてその収量および形態を比較した。共に優れていると考えられる PS アフィニティー法を利用したエクソソームを以下のアッセイに使用した。

当初、エクソソーム添加群でレポーター発現の上昇を認めしたが、使用バッファーによる上昇であることが判明、バッファー交換することで血清単離エクソソームは、内因性の TNF- $\alpha$  遺伝子発現を全く変化させないことが明らかとなった。一方、エクソソーム除去後の血清は、全血清と同様に、レポーター発現を抑制した。このことは、患者血清由来エクソソームには TNF- $\alpha$  遺伝子発現の調節能が乏しい一方、エクソソーム以外の血清分画に TNF- $\alpha$  遺伝子発現を抑制する分子が存在することがわかった。

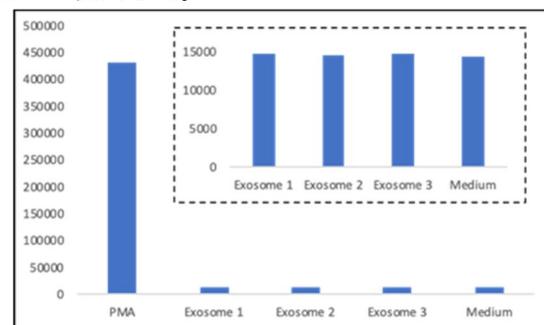


図3 Exosome添加によるHiBiTカウント

##### 血清蛋白による新たな炎症制御因子の提唱

当初の予想に反し、JIA 患者血清は CRP の陽陰にかかわらず、単球系細胞の TNF $\alpha$  発現を抑制し

た。この分子はエクソソームには含まれず、その抑制はある程度恒常的であった。現在、次のプロジェクトとして、硫酸沈殿やアフィニティークロマトグラフィー等を用いて血清タンパクを分画化し、フラクション毎に TNF $\alpha$  発現抑制能を評価している。予備実験の段階であるが、ある蛋白 A について TNF $\alpha$  発現抑制を、今回確立したレポーターアッセイで認めた。CRP 含むペントラキシンファミリー蛋白が抗炎症作用を有する点を鑑みると、このような血清蛋白の存在は不思議ではない。単球系細胞の TNF $\alpha$  発現を抑制する抗炎症性蛋白を今後明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|