

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08396

研究課題名（和文）関節リウマチ病態に関する新規分子MS4A4Aの機能解明と臨床応用の検討

研究課題名（英文）Function and clinical application of MS4A4A involved in pathology of rheumatoid arthritis

研究代表者

山岡 邦宏 (Yamaoka, Kunihiro)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：20425317

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：関節リウマチの治療は飛躍的に発展し、関節の破壊が全く進行しない寛解状態に導入することが可能となったが、未だ十分な治療効果が得られない症例も多い。本研究では、単球に発現し関節リウマチの疾患活動性と相関する細胞表面分子MS4A4Aに着目した。MS4A4Aの機能は未知であり、単球系細胞株でのMS4A4A発現誘導につき検討を行い、抗炎症作用を有するM2マクロファージでの発現亢進が明らかとなった。また、今後の生体内における機能を明らかにするためにMS4A4A<sup>flox/flox</sup>マウスを作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で着目したMS4A4Aは単球に発現しており、関節リウマチの活動性と相関することからその機能を明らかにすることで、新たな治療戦略の開発を可能とする研究である。本研究結果は、抗炎症作用にMS4A4Aが関与することを示唆している。コンディショナルノックアウトマウス作成に向けた<sup>flox</sup>マウスを作成できたことから、生体内でのMS4A4Aの機能解析が可能となった。

研究成果の概要（英文）：The treatment of rheumatoid arthritis (RA) has made great progression, and it is now possible to achieve a state of remission in which the destruction of joints does not progress, but there are still many cases in which the treatment is not sufficiently effective. In this study, we focused on the cell surface molecule MS4A4A, which is expressed on monocytes and correlates with RA disease activity. We investigated the induction of MS4A4A expression in monocytic cell lines and found that MS4A4A is upregulated in M2 macrophages, which have an anti-inflammatory effect. In order to clarify the function of MS4A4A in vivo, we generated MS4A4A<sup>flox/flox</sup> mice.

研究分野：リウマチ学、膠原病学、免疫学

キーワード：関節リウマチ MS4A4A 単球

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis: RA) は、自己免疫学的機序により関節破壊を来す難治性疾患である。炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  や IL-6 をターゲットとした生物学的製剤により治療は飛躍的に進歩し、病気の進行のない状態である寛解に 30~50% で導入可能となっている。しかし、生物学的製剤が導入されている RA 患者は全体の 30~50% であり、生物学的製剤を必要とする病態を有し、十分に疾患活動性を制御可能となっているのは未だ一部にとどまると言える。また、寛解状態を維持した後に薬剤投与を中止することで 50~80% で病態が再燃することから、未だ RA の治癒は望むべくもなくアンメットニーズが存在する。その原因の 1 つとして分子レベルでの病態理解が不十分であるため適切な治療を適切な患者に届けられていないことが挙げられる。

既存の生物学的製剤の多くがサイトカインや獲得免疫を担う細胞に発現する分子を標的とし、先述のように投与中止が RA の再燃を招くことから申請者らは、自然免疫へのアプローチを行う手段が必要と考えてきた。事実、RA の活動性と相関する末梢血単球サブセットも多く報告されている。そこで、以前に行った約 600 名の生物学的製剤導入 RA 患者末梢血の網羅的遺伝子発現解析により RA の活動性指標として一般的にもちいられている DAS28 と相関する遺伝子群に着目した。その中から、新規病態責任分子候補として疾患活動性に伴って単球サブセットで高発現する機能未知の分子 MS4A4A (membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4) を同定した。事前に行った検討では、健常者だけでなく RA 同様に高度の炎症病態をきたす血管炎や成人発症スチル病患者末梢血での発現と比較して RA では高いことが明らかとなり疾患特異性も示唆された。末梢血単球分画の検討では、RA の活動性との関連が報告されている CD14+CD16+intermediate 単球での発現が亢進していた。また、RA モデル動物として一般的に用いられているコラーゲン誘導関節炎マウスの滑膜と末梢血においても野生型と比較して高発現していることが確認できた。Intermediate 単球は炎症環境下での破骨細胞分化に関与することが報告されており、マウス骨髄細胞を用いた破骨細胞分化過程では MS4A4A 遺伝子の発現誘導がみられたことから、MS4A4A が RA 患者の骨破壊と連動した病態分子である可能性を示唆していると考えた。そこで、本研究課題では免疫反応の根幹に関わる単球で発現する MS4A4A の RA 病態形成への寄与に着目し、その発現メカニズムの基礎的検討から病態への関与について、臨床検体と動物モデルを用いて細胞レベルから生体レベルまでの検討を行ない、RA 治療における治療標的またはバイオマーカーとしての有用性を明らかにすることを目的とする。

### 2. 研究の目的

MS4A4A の RA 病態下での単球における機能を明らかにする

### 3. 研究の方法

#### MS4A4A発現とRA疾患活動性の関与解明

疾患活動性と MS4A4A 遺伝子発現量の相関をタンパクレベルで確認する。MS4A4A 同定過程で単球での発現分子に絞り込み、RA 患者検体でも単球サブセットでの MS4A4A 発現を確認できたため、疾患活動性等との関連を解析することで臨床情報に基づいた病態への関与を明らかにする。また、MS4A4A 同定に用いた検体由来の患者データとの相関解析を行い、DAS28 以外の

疾患活動性や炎症との関連解析を行った。

#### ヒト破骨細胞分化におけるMS4A4A発現解析

ヒトにおける挙動を明らかにする。健常者末梢単球より MCSF と RANKL により破骨細胞を分化誘導し、MS4A4A の遺伝子およびタンパクレベルでの発現を確認する。

#### 関節炎モデルマウスにおけるMS4A4A発現解析、ノックダウン実験

コラーゲン誘導関節炎モデルマウスの免疫関連組織（血液、関節、脾臓、リンパ節）における MS4A4A の発現を確認する。血液、脾臓に関しては単球サブセット詳細について確認する。

#### ヒト関節滑膜における MS4A4A 発現解析

RA の炎症局所である滑膜における MS4A4A の発現と発現細胞を特定する。

#### 細胞株を用いた MS4A4A ノックダウン実験 (In Vitro)

THP-1、U937、RAW264.7 などの単球系細胞株または健常者より分離した単球で siRNA を用いて MS4A4A 発現抑制し、サイトカイン発現・応答、破骨細胞分化への影響を検討する。また、ノックダウンの有無による遺伝子発現の変化を網羅的に検索することで MS4A4A が制御する因子を同定し、炎症病態に關与するメカニズムを明らかにする。

### 4. 研究成果

RA の炎症局所である滑膜における MS4A4A の発現と発現細胞を特定する。

#### MS4A4A 発現と RA 疾患活動性の関与説明

研究期間中に十分な検体収集が困難な状況となり（研究責任者所属変更、緊急事態宣言等）、対照疾患を含めてフローサイトメトリーでのデータは予備実験に追加しての新規情報は得られていない。RA 患者の各種臨床データと MS4A4A 遺伝子発現解析を行い、疾患活動性との相関は確認できているが、CRP や赤血球沈降速度などの生化学データとの明らかな相関はみられなかった。

#### ヒト破骨細胞分化におけるMS4A4A発現解析

MCSFとRANKLによる破骨細胞分化過程でのMS4A4A遺伝子発現解析を行ったが、発現誘導はみられず、マウスとの結果には乖離がみられた。

#### 関節炎モデルマウスにおけるMS4A4A発現解析、ノックダウン実験

In vivo でのノックダウン実験が困難と判断し、コンディショナルノックアウトマウスの作成に変更した。マウス Ms4a4a 領域に flox 領域を遺伝子挿入したマウス (Ms4a4a flox マウス) の遺伝子操作デザインの再検討を繰り返し、Ms4a4a flox マウスの作成に成功した。現在、交配を繰り返して純化を進めている。

関節炎モデルマウスでの発現解析に向けてマウス MS4A4A に対するポリクローナル抗体を作成し、ウエスタンブロット法で抗体の特異性を検討中である。マウス脾臓細胞、マウス骨髄細胞、マウス単球系細胞株 RAW264.7 について、Ms4a4a mRNA の発現を qPCR で発現を確認した。さらに脾臓細胞、骨髄細胞を用いてウエスタンブロットを行い、マウス MS4A4A 分子量である 25kD でのバンドを確認した。

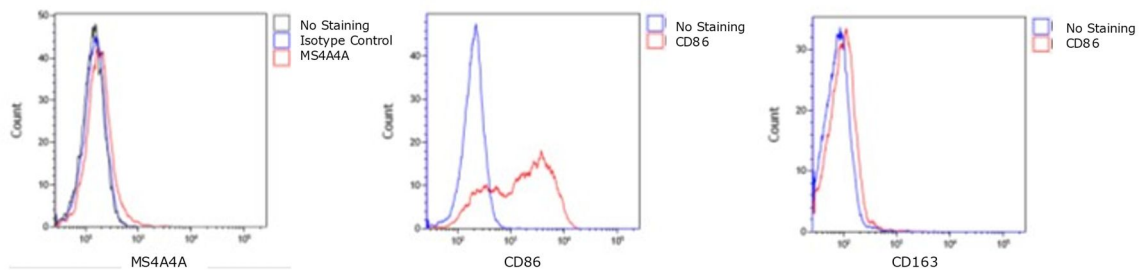
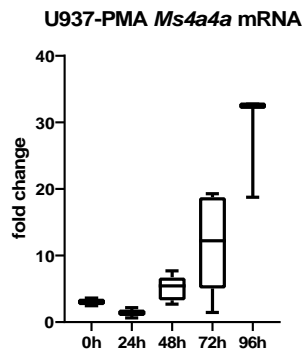
#### ヒト関節滑膜における MS4A4A 発現解析

すでに手術検体確保に向けた体制整備は行ったが、研究期間中に十分な検体収集が困難な状況となり（研究責任者所属変更、緊急事態宣言等）、十分な情報は得られなかった。

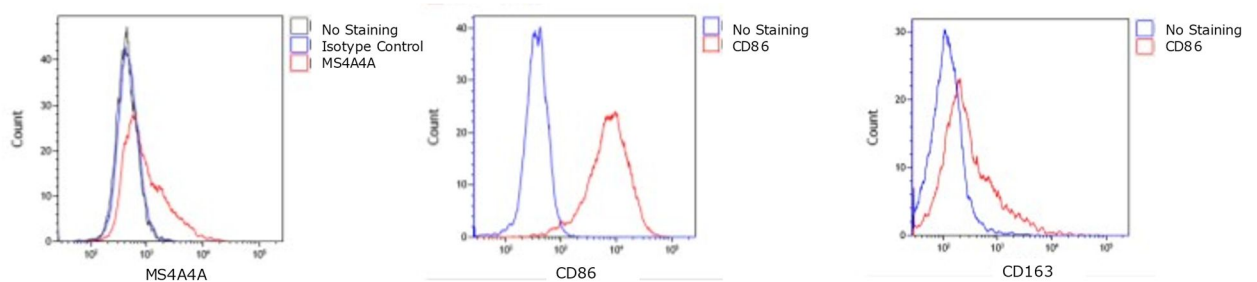
#### 細胞株を用いた MS4A4A ノックダウン実験 (In Vitro)

各種細胞株での MS4A4A 発現を確認し U937 での分化・分極過程における MS4A4A の発現を調査した。U937 を PMA で処理してマクロファージへ分化させた過程で、Ms4a4a mRNA 発現

は時間経過に応じて増加した。しかし、PMA 処理 72 時間時点での細胞表面の MS4A4A 蛋白発現をフローサイトメトリー (FCM) で確認したところ、その発現は認められなかった。この条件での U937 由来マクロファージの細胞特性を調べるため、M1 マクロファージマーカー CD86、M2 マクロファージマーカー CD163 の発現を FCM で確認したところ、CD86 の発現を認める一方で CD163 の発現は認めなかった。



U937 を PMA で処理した後にリコンビナントヒト (rh) IL-4 で処理を行い、M2 マクロファージへ分極させた。この条件では、FCM を用いて M2 マクロファージマーカー CD163 の発現を認めた。同時に、細胞表面 MS4A4A 蛋白発現を FCM で確認したところ、その発現も認めた。



MS4A4A は U937 の M2 マクロファージへの分化条件下にて発現が誘導されることが明らかとなった。

本研究期間において様々な要因により当初計画していた内容が十分に履行できなかったが、ヒト単球での発現と M2 マクロファージでの発現誘導が確認されたことから、抗炎症における MS4A4A の機能が示唆される。本研究での最大の収穫はコンディショナルノックアウトマウス作出であり、今後 *in vivo*/*in vitro* で MS4A4A 機能を明確にすることが可能となった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Hideto Kameda, Tsutomu Takeuchi, Kunihiro Yamaoka, Motohiro Oribe, Mitsuhiro Kawano, Yijie Zhou, Ahmed A Othman, A L Pangan, Susumu Kitamura, Sebastian Meerwein, Yoshiya Tanaka	4. 巻 59(11)
2. 論文標題 Efficacy and safety of upadacitinib in Japanese patients with rheumatoid arthritis (SELECT-SUNRISE): a placebo-controlled phase IIb/III study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 3303-3313
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rheumatology/keaa084.	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 Hasegawa T., Kikuta J., Sudo T., Matsuura Y., Matsui T., Simmons S., Ebina K., Hirao M., Okuzaki D., Yoshida Y., Hirao A., Kalinichenko V., Yamaoka K., Takeuchi T.,	4. 巻 20(12)
2. 論文標題 Identification of a novel arthritis-associated osteoclast precursor macrophage regulated by FoxM1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Immunol.	6. 最初と最後の頁 1631-1643
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41590-019-0526-7	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 Kunihiro Yamaoka	4. 巻 15(6)
2. 論文標題 Tofacitinib for the treatment of rheumatoid arthritis: an update	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Expert Rev Clin Immunol	6. 最初と最後の頁 577-588
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/1744666X.2019.1607298	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 Tasaki S, Suzuki K, Kassai Y, Takeshita M, Murota A, Kondo Y, Ando T, Nakayama Y, Okuzono Y, Takiguchi M, Kurisu R, Miyazaki T, Yoshimoto K, Yasuoka H, Yamaoka K, Morita R, Yoshimura A, Toyoshiba H, Takeuchi T.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Multi-omics monitoring of drug response in rheumatoid arthritis in pursuit of molecular remission	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 2755
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-05044-4	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 Kondo Y, Suzuki K, Inoue Y, Sakata K, Takahashi C, Takeshita M, Kassai Y, Miyazaki T, Morita R, Niki Y, Kaneko Y, Yasuoka H, Yamaoka K, Yoshimura A, Takeuchi T.	4. 巻 21(1)
2. 論文標題 Significant association between joint ultrasonographic parameters and synovial inflammatory factors in rheumatoid arthritis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arthritis Res Ther	6. 最初と最後の頁 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-018-1802-x.	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 Yutaro Kurihara, Takaaki Maruhashi, Tatsuhiko Wada, Mayuko Osada, Marina Oi, Kunihiro Yamaoka, Yasushi Asari	4. 巻 25(2)
2. 論文標題 Skeletal unloading reduces cluster of differentiation (CD) 38 expression in the bone marrow and osteoblasts of mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Orthop Sci	6. 最初と最後の頁 331-337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2019.03.023.	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 Manabu Narisawa 1, Satoshi Kubo 2, Yosuke Okada 3, Kaoru Yamagata 4, Shingo Nakayamada, Kei Sakata, Kunihiro Yamaoka, Yoshiya Tanaka	4. 巻 142
2. 論文標題 Human dendritic cell-derived osteoclasts with high bone resorption capacity and T cell stimulation ability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone .	6. 最初と最後の頁 115616
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2020.115616.	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 -

〔学会発表〕 計15件(うち招待講演 0件/うち国際学会 15件)

1. 発表者名 Yamaoka K.
2. 発表標題 Perspectives around the accumulated evidence for IL-6 in autoimmune diseases; From Bench side.
3. 学会等名 2nd Asia-Pacific League of Associations for Rheumatology Virtual Congress, (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamaoka K.
2. 発表標題 Evolution of molecular targeting.
3. 学会等名 The European League Against Rheumatism, E-Congress, (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamaoka K.
2. 発表標題 Basics of JAKs and challenges of JAK inhibitors in autoimmune diseases; focus on off-label efficacy.
3. 学会等名 International Conference of Chinese Rheumatologists 2019, (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamaoka K.
2. 発表標題 Advances of treatment with kinase inhibitors for RA.
3. 学会等名 18th World congress of basic and clinical pharmacology, (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamaoka K.
2. 発表標題 Incidence and Risk Factors for Herpes Zoster in Rheumatoid Arthritis Patients Receiving Upadacitinib
3. 学会等名 American College of Rheumatology2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamaoka K.
2. 発表標題 Characterization of Serious Infections with Upadacitinib in Patients with Rheumatoid Arthritis.
3. 学会等名 American College of Rheumatology2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Charles Schoeman C., Bae SC., Chopra A., Cohen S., Curtis JR., Gottenberg JE., Keystone EC., Yamaoka K., Nash P., Simon JA, Stohl W., Weinblatt M., Westhovens R., Siegel J., Tiamiyu I., Ye L., Jiang D., Matzkies F., Jahreis A., Sundry JS., Giles J.
2. 発表標題 Adjudicated MACE and VTE in the filgotinib RA program: Integrated analysis from phase 2 and 3 clinical trials
3. 学会等名 American College of Rheumatology2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Harigai M., Imafuku S., Sasaki N., Zhang Y., Khan N., Yamaoka K
2. 発表標題 Incidence and Risk Factors for Herpes Zoster (HZ) in Japanese and Global Rheumatoid Arthritis (RA) Populations Receiving Upadacitinib (UPA).
3. 学会等名 22nd Asia-Pacific League of Associations for Rheumatology Virtual Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kameda H., Takeuchi T., Yamaoka K., Oribe M., Kawano M., Asabe S., Yokoyama M., Meerwein S., Tanaka Y.
2. 発表標題 The long-term safety and efficacy of upadacitinib (UPA) in Japanese patients (pts) with rheumatoid arthritis (RA) and an inadequate response to conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs (csDMARDs): 84-week results from SELECT-SUNRISE.
3. 学会等名 22nd Asia-Pacific League of Associations for Rheumatology Virtual Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 Yamaoka K., Tanaka Y., Kameda H., Khan N., Zhang Y., Takeuchi T.
2. 発表標題 Safety Profile of Upadacitinib (UPA) In Japanese Patients (Pts) With Rheumatoid Arthritis (RA).
3. 学会等名 22nd Asia-Pacific League of Associations for Rheumatology Virtual Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Winthrop W., Nash P., Yamaoka K., Mysler E., Calabrese LH., Khan N., Enejosa JV., Song Y., Suboticki JL., Curtis JR.
2. 発表標題 Incidence and Risk Factors for Herpes Zoster in Rheumatoid Arthritis Patients Receiving Upadacitinib
3. 学会等名 The European League Against Rheumatism 2020. E-Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Winthrop K., Calabrese LH., Van den Bosch F., Yamaoka K., Selmi C., Song Y., Hendrickson B., Galindo IL., McInnes IB.
2. 発表標題 Characterization of serious infections with upadacitinib in patients with rheumatoid arthritis.
3. 学会等名 The European League Against Rheumatism 2020. E-Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamaoka K., Tanaka Y., Kameda H., Hendrickson B., Meerwein S., Zhang Y., Takeuchi T.
2. 発表標題 The Safety Profile of Upadacitinib in Japanese Patients with Rheumatoid Arthritis.
3. 学会等名 American College of Rheumatology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeuchi T., Matsubara T., Atsumi T., Amano K., Ishiguro N., Sugiyama E., Yamaoka K., Genovese MC., Kalunian K., Walker D., Gottenberg J-E., de Vlam K., Mozaffarian N., Bartok B., Matzkies F., Gao J., Guo Y., Tasset C., Sundy J., Tanaka Y.
2. 発表標題 Safety and efficacy of filgotinib in Japanese patients enrolled in a global phase 3 trial of patients with active rheumatoid arthritis and inadequate response or tolerance to biologic DMARDs.
3. 学会等名 The European League Against Rheumatism 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tanaka Y., Takeuchi T., Yamaoka K., Oribe M., Kawano M., Zhou Y., Othman A.A., Pangan A.L., Kitamura S., Matsuda N., Meerwein S., Kameda H..
2. 発表標題 A phase 2b/3 randomised, placebo-controlled, double-blind study of upadacitinib, a selective jak1 inhibitor, in japanese patients with active rheumatoid arthritis and inadequate response to conventional synthetic dmards.
3. 学会等名 The European League Against Rheumatism 2018. (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山岡 邦宏	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 171-176
3. 書名 検査値ドリル	

〔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
研究分担者	竹内 勤  (Takeuchi Tsutomu)  (50179610)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授   (32612)	

6. 研究組織（つづき）

	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 分 担 者	吉本 桂子  (Yoshimoto Keiko)  (20383292)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・研究員     (32612)	

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