

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17443

研究課題名（和文）血管炎症候群の新規活動性バイオマーカーの実用化に向けた検証と新規治療標的の探索

研究課題名（英文）Verification of novel biomarkers of disease activity in vasculitis syndrome for practical use and identification of novel therapeutic targets

研究代表者

石崎 淳（Ishizaki, Jun）

愛媛大学・医学部附属病院・講師（病院教員）

研究者番号：00620527

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々は血清プロテオーム解析によりANCA関連血管炎（AAV）の新規活動性マーカー Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1（TIMP-1）と腎病変マーカーCD93を同定している。2つのコホート研究により血清TIMP-1値が寛解維持期の寛解維持予測と再燃予測に有用であることを見出した。血管炎モデルマウスを用いたCD93の病態への関与を解析するため、CD93欠損マウスのフェノタイプ解析、MPO欠損マウスの作製と抗MPO抗体の単離を行った。また、大型血管炎患者の血清TIMP-1値が治療前に健常人より有意に上昇し、治療6、12ヶ月後に有意に低下することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ANCA関連血管炎（AAV）の再燃率の低下、グルコルチコイド関連有害事象の減少や予後改善には、既存マーカーより有用な活動性マーカーを用いた診療マネジメントの改善が必要不可欠である。我々が同定した新規活動性マーカーTIMP-1は、寛解導入・寛解維持期における寛解判定、再燃と寛解維持予測に有用であり、将来、グルコルチコイドを含む免疫抑制療法の減量・中止等の治療方針を決定する重要指標となる可能性がある。また、AAVと同様に新規活動性マーカーが望まれる大型血管炎に応用できる可能性がある。新規腎病変マーカーCD93のAAVにおける機能解析により発症機序の解明や新規治療標的の開発につながる。

研究成果の概要（英文）：We have identified novel activity marker TIMP-1 and renal involvement marker CD93 in ANCA-associated vasculitis (AAV) with a targeted proteomics approach. Serum TIMP-1 levels are useful as a predictive biomarker of relapse and sustained remission in AAV patients during maintenance therapy in two cohort studies. To analyze the involvement of CD93 in the pathogenesis using a vasculitis mouse model, we performed phenotype analysis of CD93-deficient mice, generated MPO-deficient mice, and isolated anti-MPO antibodies. Serum TIMP-1 levels are significantly increased in patients with large vessel vasculitis before initiation of treatment compared to healthy controls, and significantly decreased at 6 and 12 months after treatment.

研究分野：膠原病およびアレルギー内科学

キーワード：ANCA関連血管炎 バイオマーカー 顕微鏡的多発血管炎 多発血管炎性肉芽腫症 寛解維持予測 再燃予測 ターゲットプロテオミクス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

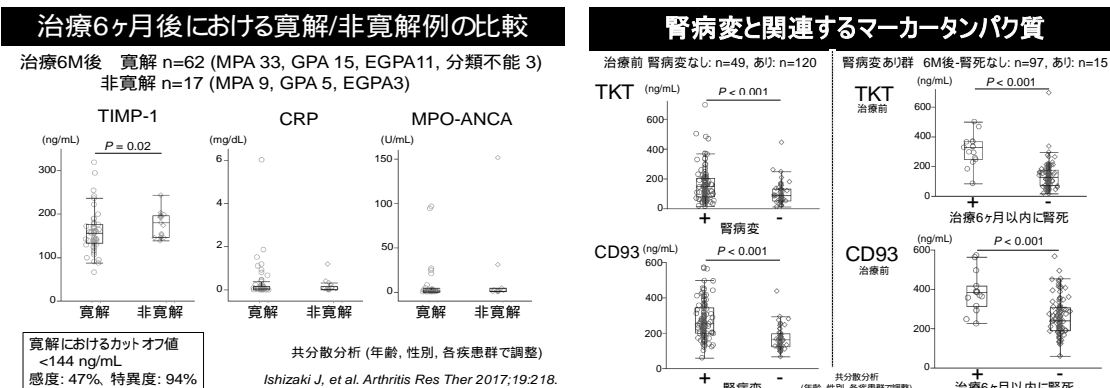
1. 研究開始当初の背景

ANCA 関連血管炎(AAV)は、抗好中球細胞質抗体(ANCA)と関連した小血管に主病変がある壊死性血管炎である。AAV には顕微鏡的多発血管炎(MPA)、多発血管炎性肉芽腫症(GPA)、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症(EGPA)がある。CRP や ANCA 値が疾患活動性マーカーとして使用されるが、CRP は AAV に非特異的な炎症マーカーであり、免疫抑制療法中に合併する感染症でも上昇する。ANCA 値は活動性と無関係に変動する症例が 20~30%にみられ、ANCA 陰性例も存在する。現在の活動性指標には非常に多くの問題があり、客観的評価が可能な新規バイオマーカーが切望されている。我々が開発した選択反応モニタリング法(Selected reaction monitoring, SRM)を用いた血清プロテオームの定量解析システムは、イムノアッセイでは困難な 50 種類を超える標的蛋白質のサブ ng/mL レベルまでの絶対量を同時かつ高精度に定量できる (Ref. 1)。我々は世界に先駆けてターゲットプロテオミクスを AAV のバイオマーカー研究に導入した(Ref. 2)。本邦の AAV の前向きコホート研究(RemIT-JAV-RPGN)の登録患者(152 名)および当院患者の計 169 例の AAV の血清試料(治療前、6 ヶ月後)を用い、タンデム MS 解析により血清に発現する 267 種の蛋白質を同定した。活動性マーカー候補となる 135 種の標的蛋白質について SRM 法によるマルチアッセイを行い、Tenascin(TNC)、CRP、TIMP-1、Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1(LRG1)、S100A8/A9、CD93、TKT が AUC>0.7 をもって高活動期(BVAS 中央値 15)と寛解期を区別できる有用なマーカーとして同定された。

CRP や MPO-ANCA は治療 6 か月後の寛解群と非寛解群(低活動期、BVAS 中央値 5)で有意差がない一方、TIMP-1 は非寛解群で有意に高値であり CRP や ANCA より優れた活動性マーカーである(図 1)。CD93 と TKT は新規の腎病変マーカーで、治療前に高値であれば 6 か月以内に高率に腎死に至るため、新規の腎予後予測マーカーとして有用である(図 2)。

(図 1)

(図 2)



しかし、これらの血清マーカーは治療前と 6 ヶ月後の 2 点でのみ解析しており、寛解導入および維持療法期のより細かな経時的変化を解析し、実用化に向けた更なる検証が必要である。AAV と同様に大型血管炎(高安動脈炎、巨細胞性動脈炎)の疾患活動性マーカーも炎症マーカー(CRP、ESR)であり、実臨床では炎症マーカーと血管壁炎症が一致しないケースが問題視されている。また、大型血管炎に保険適応となった抗 IL-6 受容体抗体トシリズマブ(TCZ)は、IL-6 を標的として CRP 産生を直接抑えるため、TCZ 投与下では CRP を活動性評価に用いることができない。以上より大型血管炎も新規活動性マーカーの確立が望まれる。

我々は小麦胚芽無細胞タンパク質合成法で可溶性 CD93 を作成し、CD93 刺激下で濃度依存的にマクロファージから TNF- α 、IL-6、IL-8 が産生されることを見出している。CD93 は血管内皮細胞に高発現する膜蛋白質で、炎症刺激で可溶型となりマクロファージを活性化させることで AAV の炎症ループを形成するため、治療標的になることが示唆されている。

2. 研究の目的

我々はターゲットプロテオミクスを世界で初めて AAV のバイオマーカー探索に導入し、有望な新規活動性マーカーの同定に成功した。AAV のバイオマーカー探索で我々のように網羅的に多検体試料で大規模解析した報告はない。欧米と比較し我が国では MPA が多く、MPA が大部分である本研究は国内外において希少で非常に注目されるバイオマーカー研究である。

実用化に向けた更なるエビデンス構築のため、既存マーカーより優れた新規活動性マーカー TIMP-1 の寛解導入および維持療法期の細かな経時的変化を解析し、血清マーカーでの客観的な活動性指標を確立することを目的とする。

我々はすでに C57BL/6 マウスで CRISPR/Cas9 法を用いて CD93 欠損マウスを作製しており、血管炎を誘導し CD93 と AAV の病態の関連を解析することを目的とする。これにより AAV の発症機序の解明や新規治療標的の探索につながる。

また、同定した AAV の新規活動性マーカーの大型血管炎における有用性は解析されておらず、より正確な治療効果判定や再燃予測を可能とするバイオマーカー探索のために、大型血管炎の患者血清を用いて経時的な ELISA 定量解析により既存の炎症マーカーより優れた活動性マーカーを同定する。

3. 研究の方法

(1) AAVの寛解導入および維持療法期における血清TIMP-1値のELISA定量解析

RemIT-JAV-RPGN登録患者および当院患者の計69名(MPA 46名, GPA 23名)における治療開始18ヶ月後までの臨床転帰と血清TIMP-1値(治療開始6ヶ月後)を比較解析した。臨床転帰については、寛解はパーミンガム血管炎活動性スコア(BVAS) 0, 寛解維持は治療6~18ヶ月の間にBVAS 0かつステロイド減量困難なし、再燃はBVAS症候が1つ以上出現もしくは増悪、グルココルチコイド減量困難は治療18ヶ月時にプレドニゾロン10mg/日以上を服用と定義した。

維持療法中で寛解状態である当院AAV患者30名(MPA 16名, GPA 14名)を対象に、経時的に血清TIMP-1値をELISA法で定量解析した(MAAV-EU study; Maintenance therapy for AAV in the Ehime University study)。観察期間(2017年12月~2020年3月)に寛解維持した患者を寛解維持群(少なくとも12ヶ月以上寛解維持, n=25)とし、寛解維持群のエントリーから6ヶ月後と再燃群(n=5)の再燃時をベースラインとして、ベースライン時(再燃時)3ヶ月前、6ヶ月前で2群間を比較した。

(2)血管炎モデルマウスを用いたCD93のAAVの病態への関連の解析

我々が既に作製したCD93欠損マウスと野生型B6マウスについて、骨髓、胸腺、脾、末梢血における免疫担当細胞の表現型をFACS解析で比較する。前述の臓器に加えて肺、心臓、肝臓、腎臓、腸管、生殖器の病理組織標本を比較する。AAVを惹起させるためにはMPO欠損マウスが必要であるため、CRISPR/Cas9法を用いてミエロペルオキシダーゼ(MPO)欠損マウスを作製する。MPO欠損マウスにMPOで免疫し、抗MPO抗体とMPO感作脾細胞を作成する。これらをCD93欠損マウスおよび野生型B6マウスに移入し、半月体形成性糸球体腎炎や出血性肺毛細血管炎の発症率を比較する。

(3)大型血管炎における新規活動性マーカーのELISA定量解析

当院の大型血管炎患者(高安動脈炎(TAK)6名, 巨細胞性動脈炎(GCA)9名)において、治療開始前、治療6ヶ月および12ヶ月後の血清TIMP-1とIL-6についてELISA定量解析を行い、疾患活動性および血管病変の進行との関連を解析する。

4. 研究成果

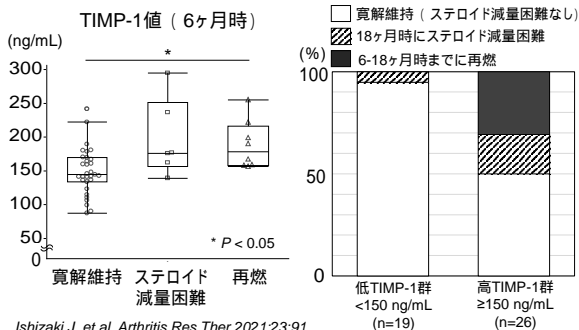
(1) AAVの寛解導入および維持療法期における血清TIMP-1値のELISA定量解析

RemIT-JAV-RPGN studyにおける寛解維持療法期の臨床転帰と血清TIMP-1値の関連

血清TIMP-1値は高活動期(治療前)で寛解期より有意に高く(中央値302(四分位範囲227-381) vs 160(139-179)ng/mL, $p < 0.001$)。治療6ヶ月時の非寛解群(n=17)は寛解群(n=52)と比較し有意に高値であった。治療6ヶ月時の非寛解群(n=17)は寛解群(n=52)と比較し有意に血清TIMP-1値が高値であった。7名の観察打ち切り例(AAV以外の原因で死亡2名、観察中断5名)を除く寛解患者45名の血清TIMP-1値(治療6ヶ月時)は、治療6-18ヶ月までに再燃もしくはグルココルチコイド減量困難となった群(n=14)で寛解維持群(n=31)よりも有意に高値であり(176(159-216) vs 144(135-168)ng/mL, $p = 0.004$)。臨床転帰3群の比較においても血清TIMP-1値に有意差を認めた(図3, Kruskal-Wallis検定, $p = 0.014$)。一方、治療6ヶ月時のグルココルチコイド投与量や免疫抑制剤の併用率、CRPやMPO-ANCA値では有意差を認めなかった。治療6ヶ月時の寛解患者を高TIMP-1群(≥ 150 ng/mL, n=26)と低TIMP-1群(< 150 ng/mL, n=19)の2群に分けて解析したところ、高TIMP-1群では治療18ヶ月までに31%が再燃、19%がグルココルチコイド減量困難、50%が寛解維持した一方で、低TIMP-1群ではグルココルチコイド減量困難であった1名を除く95%が寛解を維持した(図3)。Kaplan-Meier法を用いた無再燃生存期間の解析においても2群で有意差を認めた(Log-rank test: $p = 0.01$)。

図3 寛解維持期におけるTIMP-1値(6ヶ月時)と治療6~18ヶ月後までの臨床転帰との関連

RemIT-JAV-RPGN study 治療6ヶ月時の寛解患者 n=45



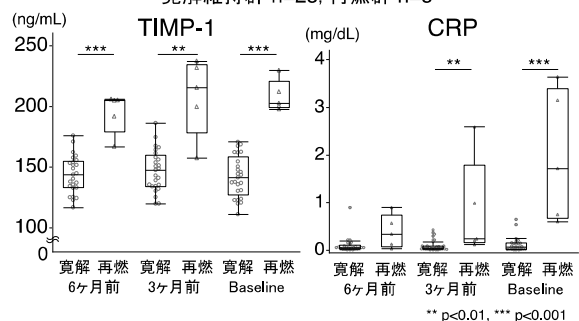
Ishizaki J, et al. Arthritis Res Ther 2021;23:91

MAAV-EU studyにおける血清TIMP-1値の経時的測定

再燃群(n=5)の血清TIMP-1値は寛解維持群(n=25)と比較し、再燃時、再燃3ヶ月前および6ヶ月前で有意に高値であり、CRPよりも早期に上昇を認めた(図4)。ベースラインから6ヶ月前での高TIMP-1群(≥ 150 ng/mL, n=15)では33%が6ヶ月後に再燃したが、低TIMP-1群(< 150 ng/mL, n=15)は全例で観察期間中に寛解を維持した。

図4 寛解維持期の寛解維持群と再燃群におけるTIMP-1・CRP値の経時的比較解析

MAAV-EU study 寛解維持療法中のAAV患者30名
寛解維持群 n=25, 再燃群 n=5



** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

、の両解析において、寛解維持療法中に血清 TIMP-1 値が 150ng/mL 以上であれば約 30%の患者が 6-12 ヶ月後に再燃したが、150ng/mL 未満であればほぼ全例で少なくとも 12 ヶ月の寛解を維持しており、血清 TIMP-1 値は寛解維持期における寛解維持予測および再燃予測に有用なマーカーとなることが示唆された。上記内容について論文作成し報告した (Ref.3)

(2)血管炎モデルマウスを用いた CD93 の AAV の病態への関連の解析

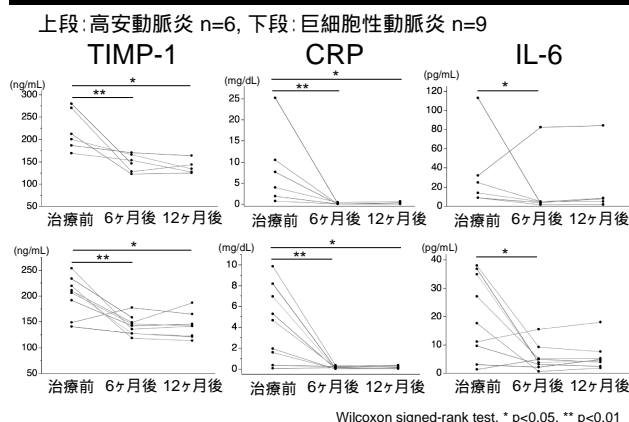
CD93 欠損マウスと野生型 B6 マウスについて、骨髄、胸腺、脾、末梢血における免疫担当細胞の表現型を FACS 解析で比較し、有意差がないことを確認した。前述の臓器に加えて肺、心臓、肝臓、腎臓、腸管、生殖器の病理組織標本を比較し、両者に明らかな違いはなかった。

AAV の惹起に必要となる MPO 欠損マウスを CRISPR/Cas9 法を用いて作製した。ジェノタイプングではホモ接合型マウスの MPO 標的配列(55 塩基)の欠損を確認し、ウェスタンブロッティングで骨髄中の MPO 欠損を確認した。MPO 欠損マウスに MPO 蛋白 20 μg を 3 回腹腔内投与、1 回静注し、血清中に抗 MPO 抗体が産生されていることを ELISA で確認した。AAV を誘発するために必要な抗 MPO 抗体の抗体量を得るため、MPO を免疫した複数の MPO 欠損マウスの血清から抗体精製用カラムを用いて IgG を単離し、同マウスから MPO 感作脾細胞を採取し凍結保存した。抗 MPO 抗体を CD93 欠損マウスおよび野生型 B6 マウスに移入し、半月体形成性糸球体腎炎や出血性肺毛細血管炎の発症率を比較解析する。

(3)大型血管炎における新規活動性マーカーの ELISA 定量解析

治療前の TIMP-1 値は、健常人よりも有意に高値であり、それぞれのカットオフ値 (TAK 169ng/mL、GCA 191ng/mL) において AUC 1.0(感度 100%、特異度 100%)、AUC0.93(感度 80%、特異度 100%)をもって健常人と判別できた。血清 TIMP-1 値は治療前と比較し、治療 6 および 12 ヶ月後に有意に低下し、IL-6 受容体抗体トシリズマブ投与下でも疾患活動性を反映した (図 5)。一方、IL-6 値も治療 6 ヶ月後に有意に低下を認めたと、トシリズマブ投与下では活動性と関連せず上昇する症例を認めた。

図 5 大型血管炎患者における血清マーカーの定量解析



< 引用文献 >

Takemori N, Takemori A, Tanaka Y, Ishizaki J, Hasegawa H, Shiraishi A, Ohashi Y. High-throughput production of a stable isotope-labeled peptide library for targeted proteomics using a wheat germ cell-free synthesis system. *Molecular Biosystems* 2016; 12: 2389-93.

Ishizaki J, Takemori A, Suemori K, Matsumoto T, Akita Y, Sada KE, Yuzawa Y, Amano K, Takasaki Y, Harigai M, Arimura Y, Makino H, Yasukawa M, Takemori N, Hasegawa H. Research Committee of Intractable Vasculitis Syndrome and the Research Committee of Intractable Renal Disease of the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. Targeted proteomics reveals promising biomarkers of disease activity and organ involvement in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Research & Therapy* 2017; 19: 218.

Ishizaki J, Takemori A, Horie K, Hiraoka D, Suemori K, Matsumoto T, Sada KE, Amano K, Harigai M, Arimura Y, Makino H, Takenaka K, Takemori N, Hasegawa H. Usefulness of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 as a predictor of sustained remission in patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Research & Therapy* 2021; 23: 91.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishizaki J, Takemori A, Horie K, Hiraoka D, Suemori K, Matsumoto T, Sada KE, Amano K, Harigai M, Arimura Y, Makino H, Takenaka K, Takemori N, Hasegawa H	4. 巻 23
2. 論文標題 Usefulness of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 as a predictor of sustained remission in patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13075-021-02471-5	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

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Jun Ishizaki
2. 発表標題 Useful biomarkers in the management of vasculitides (Symposium 5, Rapidly changing paradigm of vasculitis treatment)
3. 学会等名 The 66th Annual General Assembly and Scientific Meeting of the JCR (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石崎淳, 堀江健太, 平岡大輔, 田中徹也, 松本卓也, 末盛浩一郎, 佐田榮司, 竹中克斗, 長谷川均
2. 発表標題 ANCA関連血管炎における再燃および寛解維持予測マーカーとしての血清TIMP-1の有用性
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jun Ishizaki
2. 発表標題 Novel biomarkers of disease activity in ANCA-associated vasculitis
3. 学会等名 23rd Asia-Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石崎淳, 堀江健太, 平岡大輔, 松本卓也, 末盛浩一郎, 竹中克斗, 長谷川均
2. 発表標題 顕微鏡的多発血管炎に伴う間質性肺炎に関連するバイオマーカーの解析
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 石崎 淳	4. 発行年 2022年
2. 出版社 日本臨床社	5. 総ページ数 174
3. 書名 血管炎の診療update V.最近のトピックス ANCA関連血管炎のバイオマーカー	

1. 著者名 石崎 淳, 日本リウマチ財団教育研修委員会, 日本リウマチ学会生涯教育委員会	4. 発行年 2022年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 608
3. 書名 リウマチ病学テキスト(改訂第3版), 妊娠とリウマチ性疾患その他(高安動脈炎など)	

1. 著者名 長谷川均, 石崎淳	4. 発行年 2021年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 284
3. 書名 臨床放射線 血管炎症候群のすべて	

〔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
---------	---------