

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17450

研究課題名（和文）滑膜細胞の多層オミックス解析による、治療抵抗性関節リウマチの病態解明

研究課題名（英文）Clarification of pathogenicity of Difficult to treat rheumatoid arthritis using by multi-omics analysis of synovial tissue

研究代表者

近藤 泰（Kondo, Yasushi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：50626380

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）：最終的に4年間で治療抵抗性RA 6例に加え、典型的なRA3例（予定では10例、定義：未治療、抗CCP抗体陽性例）をコントロール群とし、その他の関節炎合わせて、計18名程度をリクルートし、超音波ガイド下滑膜生検法により新鮮な滑膜を採取し、一般的な病理学的解析、免疫組織学的解析に加え、解析途中ではあるがCyTOFシステムを用いたマスサイトメトリーによる詳細な細胞サブセット解析、シングルセルのRNAシーケンシングによる遺伝子発現の網羅的解析を行った、現時点では解析の途中段階であるものの、治療抵抗性関節リウマチ患者や、高齢発症関節リウマチの症例に特徴的な滑膜浸潤細胞サブセットが見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では超音波ガイド下低滑膜生検法を用いることで、ヒト関節リウマチの病変滑膜を直接採取することが特徴の1つであった。採取した滑膜組織は、手術による生検組織に比べて、十分な組織量が採取できないことが問題点であったが、実際に今回得られた滑膜からフローサイトメトリー、CyTOFシステムを用いたマスサイトメトリーや、単一細胞（シングルセル）解析を行い、疾患特異的な新規細胞集団と考えられる分画が見いだせた点が本研究の学術的意義であったと考えられる。今後、治療抵抗性RAに対する薬剤反応性や副作用などの予後予測への応用が期待され、個別化医療の実現に繋がる端緒となりうることで社会的意義と考える。

研究成果の概要（英文）：We recruited a total of 18 patients with arthritis including, 6 patients with difficult to treat rheumatoid arthritis (D2T-RA), 3 patients with typical RA (defined as untreated, anti-CCP antibody-positive) and other arthritis as a control group. In addition to general histopathological and immunohistological analysis, detailed cell subset analysis by mass cytometry using the CyTOF system and comprehensive analysis of gene expression by single-cell RNA sequencing were performed, although the analysis is still in progress at this point. We identified that specific subsets of synovial infiltrating cells obtained from D2T-RA and elderly-onset rheumatoid arthritis.

Translated with DeepL.com (free version)

研究分野：リウマチ・膠原病

キーワード：滑膜 滑膜生検 マスサイトメトリー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis: RA)の治療は、TNF- および IL-6などのサイトカイン、T 細胞や B 細胞の表面蛋白を標的とした生物学的製剤の登場により、大きな変革がもたらされた。一方で、多剤を用いても疾患活動性が持続する治療抵抗性 RA(Difficult to treat RA; DTRA) が 10-15%ほど存在しており、臨床上重要な問題点となっている。この治療抵抗性 RA が、通常の RA と病態学的に何が異なっているかは十分に明らかになっていない。また、現在もそうした難治例を早期に予測することは困難であり、個々の RA 治療を最適化するための研究は未だ不十分であると言える。

これまで我々はヒト RA の末梢血、関節液を対象としたトランスクリプトーム解析、RA の病態および薬剤反応性に関わる分子群の同定、予後予測のアルゴリズムの検討等を行ってきた。(Rheumatology (Oxford) 2008, Arthritis Rheum.2008, Biochem Biophys Res Commun.2009 等) 特に、RA 末梢血の多層オミックス解析により得られた様々な分子の発現量のデータを、健康人と比較することで RA の分子的な寛解を定義し、これを報告した。(Nat Commun. 2018 Jul 16;9(1):2755.)

近年、RA の主病変である滑膜の詳細な解析により、RA に特徴的な滑膜固有マクロファージや線維芽細胞の存在、新規の T 細胞分画 (Tph 細胞) の存在が証明された。これまで我々が末梢血細胞に主に用いてきた解析手法を、治療抵抗性 RA の滑膜細胞を直接採取し応用することで、分子細胞生物学的に通常の RA との違いを明確にできることに加え、活性化しているサイトカインカスケードや蛋白相互作用を明確にすることで、より特異的な治療選択肢を示せる可能性がある。

### 2. 研究の目的

典型的な RA 患者および、治療抵抗性 RA から得られた滑膜組織検体の病理学的検討に加え、滑膜細胞を抽出し、CyTOF®システムを用いたマスマイトメトリーなどの解析手法に加え、滑膜浸潤細胞の単一細胞 RNA シーケンシングを行う。同様の解析は対応する末梢血細胞についても施行する。典型的な RA と比較し、末梢血・滑膜細胞に分布している細胞サブセットの特徴、遺伝子発現、分子シグネチャーを比較し、治療抵抗性 RA の詳細な病態解析を行う。臨床情報などの患者データと統合することで、最終的に治療アルゴリズムを新たに確立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

治療抵抗性 RA の病変関節から、超音波ガイド下滑膜生検法により採取した滑膜組織由来の細胞、もしくは末梢血細胞を CyTOF®システムを用いたマスマイトメトリーによる詳細な細胞サブセット解析、シングルセルの RNA シーケンシングによる遺伝子発現の網羅的解析を中心に、微量サイトカインなどの蛋白測定、病理組織学的検討など複合的な解析を行い、典型的な RA と比較する。これらのデータと末梢血解析、採取可能であれば関節液、採血データ、臨床画像などの臨床情報と組み合わせることにより、治療抵抗性 RA の病態解明を行い、その治療アルゴリズムを確立することを目的とする。

本研究は、慶應義塾大学病院(慶應義塾大学医学部リウマチ・膠原病内科)を中心に行う。対象は、本研究に同意の得られた治療抵抗性 RA 10 例(2 剤以上の生物学的製剤に不応で中等度以上の疾患活動性が残存している。)に加え、典型的な RA 10 例(未治療、抗 CCP 抗体陽性例)をコントロール群とし、計 20 名程度とする。十分実現可能な対象数であるが、難渋する場合でも当科の研究ミーティングでの周知徹底し円滑な患者リクルートを目指す。

超音波ガイド下滑膜生検は、予め安全を採血、事前超音波検査で確認したうえで行う。皮下、および関節内の局所麻酔を十分にいき、半自動生検針を用いて、直接超音波ガイド下に関節滑膜生検を行う。また、滑膜検体に対応する血液・関節液の採取を一般的な検査に追加する形か、残余検体で予定している。本生検法の安全性確認試験において、刺入部の出血、腫脹、疼痛などの合併症は認められなかったが、患者に重篤合併症が生じた際は、試料採取を中止する。

得られた滑膜組織の病理組織学的検討、および末梢血、滑膜細胞の解析は、慶應義塾大学医学部リウマチ・膠原病内科研究室で行う。滑膜組織切片は病理組織学的検討を目的として一部を別離した後、残った滑膜検体はホモジェナイズし、得られた細胞について、マスマイトメトリー、シングルセル解析を行う。遺伝子オントロジー解析、パスウェイ解析、ネットワーク解析、主成分分析などの最新のバイオインフォマティク解析法を駆使し多面的な検討を行い、これにより治療抵抗性 RA における細胞成分のトランスクリプトームプロファイリングを行う。

#### 4. 研究成果

関節エコーガイド下滑膜生検の安全性、認容性を確認したパイロット研究の論文を報告した。(Kondo Y, Suzuki K, Inoue Y, Sakata K, Takahashi C, Kaneko Y, Takeuchi T. Safety and tolerability of ultrasound-guided synovial needle biopsy in Japanese arthritis patients. *Mod Rheumatol*. 2020 Nov 20:1-9.)

最終的に4年間で治療抵抗性RA 6例(予定では10例、定義:2剤以上の生物学的製剤に不応で中等度以上の疾患活動性が残存している。)に加え、典型的なRA 3例(予定では10例、定義:未治療、抗CCP抗体陽性例)をコントロール群とし、その他の関節炎合わせて、計18名程度をリクルートし、超音波ガイド下滑膜生検法により新鮮な滑膜を採取した。2020年2月以降、COVID-19パンデミックに際しその臨床、およびCOVID-19のワクチンや免疫病態に関わる研究に従事したため、研究進捗の遅れが発生してしまったが、最終年度である2023年度は10件の関節エコーガイド下滑膜生検を実施した。一般的な病理学的解析、免疫組織学的解析に加え、解析途中ではあるがCyTOFシステムを用いたマスサイトメトリーによる詳細な細胞サブセット解析、シングルセルのRNAシーケンシングによる遺伝子発現の網羅的解析を行い、現時点では解析の途中段階であるものの、治療抵抗性関節リウマチ患者や、高齢発症関節リウマチの症例に特徴的な滑膜浸潤細胞サブセットが見出され、現在報告準備中である。

今後この知見をもとに、再現性を確認するため、症例数を増やすためことを目的とした多施設共同研究の計画、実行する予定である。今後も本研究を継続し、同時に採取した末梢血解析、採取可能であれば関節液、採血データ、臨床画像などの臨床情報と組み合わせることにより、治療抵抗性RAの病態を明らかにし、最終的に治療アルゴリズムを確立することを予定している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeshita Masaru, Nishina Naoshi, Moriyama Saya, Takahashi Yoshimasa, Ishii Makoto, Saya Hideyuki, Kondo Yasushi, Kaneko Yuko, Suzuki Katsuya, Fukunaga Koichi, Takeuchi Tsutomu	4. 巻 238
2. 論文標題 Immune evasion and chronological decrease in titer of neutralizing antibody against SARS-CoV-2 and its variants of concerns in COVID-19 patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 108999 ~ 108999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clim.2022.108999	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoguchi Tomohiro, Takenouchi Toshiki, Yamazaki Fumito, Kondo Yasushi, Mitamura Hiroto, Kosaki Kenjiro, Takahashi Takao	4. 巻 130
2. 論文標題 Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus in a girl with neurocutaneous melanosis caused by a somatic mutation in NRAS	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 15-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/keac130	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kondo Yasushi, Oyama Munenori, Nakamura Yoshio, Matsubara Shiro, Tanikawa Akiko, Kaneko Yuko	4. 巻 130
2. 論文標題 Dermatomyositis-like rash and inflammatory myopathy after mRNA-1273 vaccination	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 138-1140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/keac038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hanaoka Hironari, Ishigaki Sho, Takei Hiroshi, Hiramoto Kazuoto, Saito Shuntaro, Kondo Yasushi, Kikuchi Jun, Kaneko Yuko, Takeuchi Tsutomu	4. 巻 24
2. 論文標題 Early combination of pulmonary vasodilators prevents chronic kidney disease progression in connective tissue disease associated pulmonary hypertension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 1419 ~ 1426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1756-185X.14225	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imai Yuki, Kondo Yasushi, Ishigaki Sho, Nishina Naoshi, Ota Yuichiro, Hanaoka Hironari, Kaneko Yuko, Takeuchi Tsutomu	4. 巻 6
2. 論文標題 A case of eosinophilic granulomatosis with polyangiitis after prolonged intervals of an anti-interleukin-6 receptor antibody for rheumatoid arthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology Case Reports	6. 最初と最後の頁 83 ~ 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/mrcr/rxab010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toda Masataro, Fujii Kentaro, Yoshifuji Ayumi, Kondo Yasushi, Itoh Kazuto, Sekine Kazuhiko, Kikuchi Takahide, Ryuzaki Munekazu	4. 巻 26
2. 論文標題 Clinical efficacy and safety of combination therapy of tocilizumab and steroid pulse therapy for critical COVID-19 in HD patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 75 ~ 85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-021-02126-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inamo Jun, Suzuki Katsuya, Takeshita Masaru, Kondo Yasushi, Okuzono Yuumi, Koga Keiko, Kassai Yoshiaki, Takiguchi Maiko, Kurisu Rina, Yoshimura Akihiko, Takeuchi Tsutomu	4. 巻 11
2. 論文標題 Molecular remission at T cell level in patients with rheumatoid arthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-96300-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Rina, Yoshida Tadashi, Morimoto Kohkichi, Kondo Yasushi, Kikuchi Jun, Saito Shuntaro, Ishigaki Sho, Kaneko Yuko, Takeuchi Tsutomu, Itoh Hiroshi, Oya Mototsugu	4. 巻 14
2. 論文標題 Successful Treatment of Anti-MDA5 Antibody-Positive Dermatomyositis-Associated Rapidly Progressive-Interstitial Lung Disease by Plasma Exchange: Two Case Reports	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Medicine Insights: Case Reports	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/11795476211036322	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kondo Y, Kaneko Y, Takei H, Tamai H, Kabata H, Suhara T, Yamamoto R, Nagata H, Ishii M, Sasaki J, Hasegawa N, Fukunaga K, Takeuchi T; Keio Donner Project	4. 巻 39
2. 論文標題 COVID-19 shares clinical features with anti-melanoma differentiation-associated protein 5 positive dermatomyositis and adult Still's disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Experimental Rheumatology	6. 最初と最後の頁 631-638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 近藤 泰	4. 巻 20
2. 論文標題 Safety and tolerability of ultrasound-guided synovial needle biopsy in Japanese arthritis patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2020.1847754.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔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 (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
---------	---------