様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ６ 月 １０ 日現在

機関番号：１７３０１
研究種目：挑戦的研究（開拓）
研究期間：2020～2024
課題番号：２０Ｋ２０６１７

研究課題名（和文）健診コホートのプロテオミクスと人工知能を基盤とする関節リウマチ個別化予防の構築

研究課題名（英文）Construction of preemptive medicine for rheumatoid arthritis based on proteomics and artificial intelligence of a medical examination cohort

研究代表者
大山　要（Ohyama, Kaname）

長崎大学・病院（医学系）・教授

研究者番号：５０４３７８６０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　19,900,000円

研究成果の概要（和文）：関節リウマチ（RA）は自己抗原による慢性炎症で関節破壊がおき介助・介護が必要となる疾患である。RA治療に不応な患者や高額な治療薬で治療せざるを得ず経済的不安を抱える患者の存在が問題で、発病する前の段階から長期的に予防することが重要となる。今回の研究では、健康診断参加者からRAのリスク因子をもつ予備群を選別して、この予備群に特有の分子を特定した。そして、この分子はRAの進行に応じて増加することがわかり、将来的な治療標的となることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
長崎大学が実施する離島健康診断の参加者には「未病の関節リウマチ予備群」が含まれるというユニークな発想を起点に、未病期から進行に応じて増加する分子を特定した。関節リウマチの治療は抗体医薬で進歩したが、長期の治療では高額な医療費が必要となり、抗体医薬を使う患者のほぼ全員に経済的不安があるとされる。今回の研究で特定した分子は、未病期からの予防治療に適した薬のデザインに欠かせない情報であり、現在の治療に不応でQOLが低下する不安や経済的不安を抱える将来の患者に向けた新たな予防戦略を立てる研究に発展する。

研究成果の概要（英文）：Rheumatoid arthritis (RA) is a disease that requires assistance and nursing care due to chronic inflammation caused by autoantigens that lead to joint destruction. The problem is that there are patients who are refractory to RA treatment and patients who are forced to undergo treatment with expensive medication and suffer from financial anxiety, so it is important to prevent the disease in the long term from the onset stage. In this study, we selected a pre-stage group with RA risk factors from participants in a health checkup and identified a molecule specific to this pre-stage group. We then found that this molecule increases as RA progresses, indicating that it could be a future therapeutic target.

研究分野：臨床化学

キーワード：健診コホート　関節リウマチ　免疫複合体　先制医療

※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（共通）

１．研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は自己抗原による慢性炎症で関節破壊がおき介助・介護が必要となる疾患である。抗体医薬で RA 治療は進歩したが、患者の 25%は治療不十分である。RA は患者が多く、高額な抗体医薬で長期間治療するケースが多い。また、患者全体の 65%が日常生活動作の低下と介助・介護を受ける不安を抱え、抗体医薬を使う患者のほぼ全員に経済的不安があるとされる。治療不応による QOL 低下と治療進歩による新たな問題は、多くの国民が直面しうる社会問題といえる。この問題解決には、個別化予防を主体とする先制医療の導入が不可欠である。しかし、RA 関連遺伝子と発症との因果関係は弱く、RA 予備群の抽出が現状では難しい。

我々は体内の抗原-抗体複合体 (免疫複合体) に保存される抗原タンパク質を特殊な前処理と液体クロマトグラフィー-質量分析測定で網羅的に同定・定量する「イムノコンプレキソーム解析法」を開発し、これまでに様々な病態解析に応用してきた。特に、本解析法は自己抗原を契機として病態が形成される自己免疫疾患の解析で多くの成果をあげてきた。一方、長崎大学は離島地区の定期的な健康診断で収集される参加者の情報や検体を集積 (五島コホート) し、データベース化とバイオバンク化することで、様々な疫学・追跡調査研究を実施してきた。

２．研究の目的

RA の先制医療には、未病から早期に移行する過渡期を的確に捉える分子バイオマーカーが不可欠である。しかし、RA は何らかの症状が現れてから受診するため、この時期に該当する予備群を選別し検体を採取することはできない。そこで本研究では、上記五島コホートの参加者に RA 予備群が含まれることを念頭に、その予備群の分子情報を過去に遡ることで、未病から早期に移行する過程を捉えることができると考えた。そして、イムノコンプレキソーム解析法とデータの高次解析で、未病期から発症まで増加し続ける自己抗原を特定し、それをもとに RA 予備群を未病状態で抽出する検査系を確立することを目的とした。

３．研究の方法

<u>五島コホート検体</u>：

五島コホート参加者の血液検体･患者検体を利用するため、Nagasaki Island Study Collaboration を申請し、研究承認を得た。この研究承認を受け、コホート参加者のうち RA 発症が疑われた参加者 (ACPA 抗体陽性、無症状で未病の予備群と想定される) を抽出し、50 名以上の該当者がいることを確認した。また、当該参加者については、研究用の血清試料が残存していることを確認した。最終的に 56 名分の血清検体を用い、超早期から出現する免疫複合体抗原を探索した。

<u>サンプル前処理</u>：

免疫複合体は免疫複合体捕捉ビーズ (プロテイン G コーティング磁気ビーズ PureProteome®、ミリポア) で回収した。各ビーズタイプ (40 µL) を室温で 30 分間インキュベートし、10 µL の血清試料を 90 µL の PBS と混合した。ビーズを 500 µL PBS で 3 回洗浄し、50 µL の 0.01 mg/mL パパイン溶液 (0.04 M エチレンジアミン四酢酸、0.04 M L-システイン) に再懸濁し、37°C で 30 分間インキュベートした。上清を別のチューブに移し、PBS に溶解した 0.06 M ヨードアセトアミド 50 µL を加えて、パパイン消化を停止した。次に、100 µL の 10 mM ジチオスレイトールを添加し、56°C で 45 分間インキュベートした。そして、100 µL の 55 mM ヨードアセトアミドを混合物に添加し、暗所・室温で 30 分間インキュベートした。50 mM 炭酸水素アンモニウム (100 µL) と 100 µL の超純水を加え、続いて 0.05%酢酸中のトリプシンを加えて最終濃度 200 ng のトリプシン/µL とし、混合物を 37°C で一晩インキュベートした。最後に、12 µL の 10 % トリフルオロ酢酸を加え、2 分間混合して消化を停止した。このペプチド混合物溶液 (約 500 µL) を約 80 µL に減圧濃縮し、4°C で保存して測定に供した。

<u>質量分析</u>：

ペプチド混合物 (1 µL) をナノプレカラム (Acclaim PepMap^{TM}100、75 µmx2 cm、nano Viper、C18、3 µm、100 Å、Thermo Fisher Scientific) の注入ループに注入し、脱塩溶媒 (0.1%トリフルオロ酢酸/アセトニトリル=98/2, v/v) でループ洗浄した。その後、ナノ LC システム (EASY-nLCTM、Thermo Fisher Scientific) を備えた MS/MS 機器 (Thermo Fisher Scientific) を分析に使用した。ペプチドをナノ LC カラム (C18、内径 75 µm × 125 mm、粒子 3 µm、孔径 100 Å、日京テクノス、東京、日本) を用いて以下のグラジエント溶出条件でペプチドを分離した (流速 300 nL/min)。移動相 A (0.1%ギ酸/アセトニトリル=99/1, v/v) および移動相 B (0.1%ギ酸/アセトニトリル=10/90, v/v) を使用して、送液割合 (移動相 B が全送液に占める割合) を開始から 20 分後までに 5% から 35%に増加させ、その後 100%を 10 分間維持させた。分離後のペプチドは以下の条件でイオン化・検出した。m/z range (400–1500)、Full MS scan resolution (70,000)、AGC target value (1.00E+06)、Tandem mass spectra resolution (17,500)、AGC target value (5.00E+04)、collision energy (27%)、ion selection threshold (2.00E+04)、maximum allowed ion accumulation times (full MS, 100 ms; tandem mass, 50 ms)、dynamic exclusion time (15 s)、transfer capillary temperature (250°C)。

<u>タンパク質同定</u>：

質量分析で得られた MS ならびに MS/MS スペクトルをタンパク質データベース UniProt

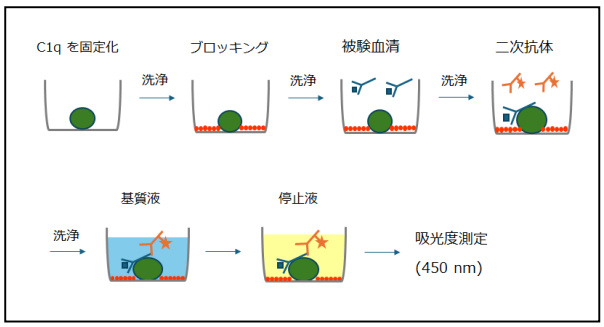
Knowledgebase と照合して、ペプチド・タンパク質を同定した。検索条件は以下の通りとした。Enzyme (trypsin)、Miss cleavage (2)、Peptide tolerance (10ppm)、Fragment ion tolerance (0.8Da)。 検索ソフトには Proteome Discoverer ver.1.4.0.288（Thermo Fisher Scientific）を用いた。

抗原タンパク質のラベルフリー定量：

同定されたタンパク質はラベルフリー定量解析(サンプル間に共通したペプチド由来のプリカーサーイオンの存在量により相対定量する手法)で定量化し、定量値が得られたタンパク質について検出頻度、定量値の比較を行った。

免疫複合体総量：

免疫複合体に結合する補体因子 C1q を固定化したプレートを作製し、右図に示す操作手順で定量した。



４．研究成果

(1) 未病→RA の過渡期 (超早期) に出現し、進行に応じて増加する免疫複合体抗原の特定

五島コホートでは 894 種類の免疫複合体抗原が同定された。このうち、RA 進行に応じて増加した免疫複合体抗原は 14 種類であった。さらに、RA 進行に応じて増加しかつ他の自己免疫疾患より五島コホートで有意に多く存在する抗原を絞り込んだ。その結果、7 種類の免疫複合体抗原が特定された。この免疫複合体抗原は早期 RA でも検出されなかったため、抗シトルリン化ペプチド抗体陽性ではあるが、症状が現れる (早期 RA) 前の超早期 RA に特徴的なものと考えられた。各タンパク質の局在は核内・細胞内であり、抗原性を伴うタンパク質機能異常が病態形成に関与するとともに、細胞破壊などで放出された各異常タンパク質が抗原認識される可能性が考えられた。3 種類の免疫複合体抗原が有する機能の異常や消失は、すでに RA との関連が文献で報告されている既知分子であったため、これらのタンパク質は RA の新たな早期診断指標、潜在的な治療標的となりうると考えられた。また、それ以外の 4 種類については、RA 病態との関連は不明であり、初期病態形成に関わる新たな因子となる可能性が考えられた (YJ Kutsuna, N Aibara, J Hashizume et al., Identification of immune complex antigens that are detected prior to early rheumatoid arthritis symptoms and increase with disease progression: Comprehensive serum immune complexome analysis to identify candidate disease biomarkers in health checkup cohort study, 英文誌投稿中)。

(2) 翻訳後修飾解析による超早期 RA 自己抗原の探索

本研究における超早期 RA 群は ACPA (抗シトルリン化ペプチド抗体) の有無で抽出し、解析して上記の結果を得た。よって、上記の免疫複合体抗原を含め、シトルリン化タンパク質が自己抗原化している可能性があるか否かは、これまでの RA 研究との整合性を考えるうえで重要な視点である。そこで、シトルリン化タンパク質に絞った免疫複合体抗原解析についても同様の比較を行い、超早期 RA に特徴的または特異的なシトルリン化配列 (ペプチド) を探索した。しかし、五島コホート内の超早期 RA に特徴的なシトルリン化抗原は見つからなかった。1)の結果も踏まえると、上記の超早期バイオマーカーはシトルリン化されたものではなく、シトルリン化以外のプロセスで異常化した可能性が示され、この点からも新規性が示唆された。また、RA の病態に関与する異常な翻訳後修飾として、シトルリン化以外にカルバミル化やアセチル化が含まれるという文献報告を考慮し、これら修飾を含めた網羅的解析を進めたが、シトルリン化修飾解析と同様に五島コホート特異性は認められなかった。以上のことから、RA の早期形成に翻訳後修飾によるタンパク質異常化があまり関与しないと考えられた。

(3) 未病→RA における免疫複合体総量の変化

未病・超早期→RA 進行に応じて免疫複合体総量が変化するかを調べた。免疫複合体量は、C1q をプレートに固定化したプレートを自ら作製して ELISA 法で測定した。その結果、疾患進行に応じた免疫複合体量の増加は認められず、免疫複合体の量ではなく質 (特徴的な免疫異常トリガーの存在) から超早期バイオマーカーを特定する妥当性が示された。一方、超早期 RA においては、他の自己免疫疾患群や健常群と比較して免疫複合体量が有意に高値であった点は興味深い。これは、超早期ですでに免疫複合体量が増加している可能性を示している。しかし、疾患進行に伴う免疫複合体量のさらなる増加は認められなかったため、検体数を増やし、疾患進行と免疫複合体量の関係をより詳細に検証する必要がある。

本研究は COVID-19 の影響で、五島健診が中断され、また研究室の稼働が著しく低下したため、当初の計画から大幅に遅れたが、研究成果として超早期の自己抗原を特定できた。この成果は、別研究で開発した免疫複合体から抗原決定基 (エピトープ) を直接解読する解析法を使用することで、計算化学と人工知能を駆使して患者間のエピトープ類似性を見つける研究に発展できる。エピトープの類似性に基づき、標的となる立体構造を構築し、これと親和性が高い低分子薬物を再開発または新規スクリーニングすることで、未病期から持続的に低価格で発症を抑制することが可能となり問題を抜本的に解決する先制医療を実現できる。研究期間後も引き続き、本研究の最終目標を目的に据えた研究を継続する。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計5件（うち査読付論文　5件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　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 （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	石川　岳志 (Ishikawa Takeshi) (80505909)	鹿児島大学・理工学域工学系・教授 (17701)	
研究分担者	玉井　慎美 (Tamai Mami) (60380862)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・准教授 (17301)	
研究分担者	川尻　真也 (Kawajiri Shinya) (20457576)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・准教授 (17301)	

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