

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2014～2016

課題番号：26305007

研究課題名(和文) 米国におけるリウマチコホートの調査による診断・予後予測システムの開発

研究課題名(英文) Relation between 1-methyl adenosine and rheumatoid arthritis

## 研究代表者

阿部 高明 (ABE, Takaaki)

東北大学・医工学研究科・教授

研究者番号：80292209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：リウマチは多くの患者がいるにもかかわらず診断は経験に頼る部分が多く、リウマチの正確な病勢や治療効果を判定するマーカーが求められていた。我々はtRNAの変性が体内の酸化ストレスを示すこと、tRNAに対する抗体を作製して各種虚血障害モデルやヒトで検討したところtRNA抗体は臓器障害のマーカーになること、さらにそこで本研究は米国ハーバード大学リウマチ科Paul Anderson教授と共同で申請者が開発した高感度tRNA検出系を用いて同病院で行われている世界最大規模のリウマチ患者前向き観察研究であるBRASS研究の血液・組織サンプルを調べリウマチ患者の尿や組織で陽性になることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：It is critical to make accurate evaluation of disease activity of rheumatoid arthritis (RA) for a better treatment. We generated a novel method to monitor the stress condition in human by using a monoclonal antibody against mononucleoside 1-methyladenosine (m1A), which is a unique to the eukaryotic tRNA-specific modified nucleoside. By using this antibody, we have demonstrated that the nucleotide become detectable in damaged organs when they are under stresses. The presence of m1A is also confirmed in synovial tissue and urine from RA patients. Therefore, we hypothesize that ELISA system to measure m1A can be used for the evaluation of RA disease activity, especially of tissue damage in inflamed joints. We applied our m1A ELISA to serum samples of the Brigham and Women's Hospital Rheumatoid Arthritis Sequential Study (BRASS), which is a one of the largest prospective observational study designed to determine and validate biomarkers that predicted disease activity and prognosis in RA.

研究分野：腎臓内科

キーワード：酸化ストレス 1-メチルアデノシン リウマチ

## 1. 研究開始当初の背景

一般人口の0.5% (600万人) に達する非常に患者の多い疾患である関節リウマチ (RA) の診療においてはその診断を向上させより早期の治療介入することが必要とされている。現在 RA 診療における臨床的評価基準として最も頻用されているのは身体所見をポイント化して評価する複合的評価基準 Disease Activity Score (DAS) 28 である。しかしこの評価システムは患者と医師の主観が大きく関与しているため一般臨床医からは敬遠されがちである。また採血で最も RA の診断に用いられているマーカーは抗環状シトルリン化ペプチド抗体 (抗 CCP 抗体) である。しかし抗 CCP 抗体は RA の診断には有用ではあるが治療効果の予測マーカーとしての有用性は低い。従って客観性、定量性、診断性に優れたマーカーの要望が臨床では非常に高い。リウマチは多くの患者がいるにもかかわらず診断は経験に頼る部分が多く、また現在リウマチの診断に使用されている血清 CCP 抗体は診断はできても病気の病勢や治療効果・関節の状態を反映する事が出来ず、リウマチの正確な病勢や治療効果を判定するマーカーが求められていた。

申請者は慢性腎不全患者の血液から新規の細胞ストレス障害マーカーである遷移 RNA (tRNA) 構成成分である修飾核酸 “1-メチルアデノシン” (以下 m1A) を同定した (特願: 2011-184506、特願 2009-205033、PCT 出願 P20090059W0)。また我々は細胞障害時には tRNA の代謝が変化することを見だし、その生体内挙動の変化を検出するためにその抗体を作製した。

組織障害時において血中に存在する tRNA 由来物質の濃度の変化を検討した。腎虚血再灌流障害モデル、シスプラチン腎障害モデル、組織障害では血中 tRNA 由来物質の濃度が上昇することが明らかとなった。

虚血再灌流組織を用いた m1A 抗体による免疫染色の検討から虚血組織障害時に生じる細胞内 tRNA の立体構造の変化は tRNA の分解や DNA の断片化など既存の組織障害ステップよりも早期の段階に起きていることを明らかにした。

ヒトにおける組織障害と血中 tRNA 由来物質濃度の関係について検討した。心臓血管外科において、体外補助循環を用いて大動脈弓部置換術を施行した患者の術中検体をサンプルとした。その結果、ELISA で検知しうる血中 tRNA 由来物質濃度の増加は、再灌流後早期に濃度上昇を認め、またその増加は現在早期腎不全マーカーといわれている尿中 KIM-1 の増加よりも早期に認めた。

我々は上記から慢性的に血中 tRNA 由来物質濃度が高い人は酸化ストレスや組織障害が存在しており予後が悪いのではないかと仮説を考えた。この仮説を検証するため一般住民 1100 人を対象とした大迫地域 (現岩手県花巻市) のコホート研究調査で採取した血液の m1A 濃度を測定し予後との関係について検討した。その結果、m1A 血中濃度が高い一般住民 7 年後には血圧や腎機能、その他

の要因に関係なく**死亡率が約 7 倍**も高い事が確認され、m1A は**生命予後のマーカー**でもあることを明らかにした (特願 2009-205033、PCT 出願 P20090059W0)。

## 2. 研究の目的

そこで本研究は米国ハーバード大学リウマチ科 Paul Anderson 教授と共同で申請者が開発した高感度 tRNA 検出系を用いて同病院で行われている世界最大規模のリウマチ患者前向き観察研究である BRASS 研究の血液・組織サンプルを調べその臨床データとの関連を明らかにするため日米で新たな診断系を作る事を目的とした。

## 3. 研究の方法

まず tRNA の構成成分である 1-methyl Adenosine 抗体を作製するとともに用いた ELISA キットを抗体メーカーと作製した。作製した ELISA キットを米国に輸送して BRASS 研究の血液での 1-methyl Adenosine の濃度変化を検討した。またリウマチのマーカーの検討には大規模コホート研究が欠かせない。現在米国ハーバード大学リウマチ科では BRASS 研究という世界最大規模の 1,000 名 RA 患者の前向きコホート研究が開始されており全ての臨床データはデータベース化されているとともに患者の血液・尿と関節液が収集されている。また CCP や IL6 等の炎症性サイトカインなど 30 種類以上のマーカーが検査されている。さらに統計の専門家が整っている。

このデータベースは基本的にオープンであるが、研究参加には現地の専門家の参加が必要であること、BRASS のスタッフの賃金を支払う必要があること、測定要員をボストンに派遣する必要があること、データベースにアクセスするには研究協力費が必要なこと、統計解析要員を現地で雇用する必要等の制約がありそれを解決するために研究員を派遣した。

## 4. 研究成果

細胞障害時には

1. 酸化ストレスにより細胞内 tRNA の高次構造が変化すること。
2. 構造変化が起きると抗体がアクセスできるようになり染色性、認識性が出現する
3. 構造変化が起き傷んだ tRNA は RNase A ファミリーに属する angiogenin (ANG) と呼ばれる RNA 分解酵素が細胞内で tRNA をアンチコドンループの部分で半分に切断し、tRNA derived stress-induced fragments (tiRNA) と呼ばれる短いフラグメントを産生する。
4. このストレス応答性に産生された tiRNA は蛋白質の翻訳を全般的に抑制し細胞死を防ぐ。tiRNA はさらに分解酵素で 1 つの核酸にまで分解される。この分解された 1 つの核酸としての m1A が尿に検出されることが明らかとなった。このようにストレス応答や細胞障害制御における tRNA の重要性が報告されており、細胞障害時における tRNA

の役割や挙動を解明することは、新たなストレス応答や細胞障害のメカニズムの発見につながると考えられた。

一方、関節リウマチにおける tRNA の代謝変化に関して近年報告が相次いでいる。tRNA の代謝に関与しているリボヌクレアーゼ Angiogenin (ANG1) は関節リウマチの血清中、関節液中で上昇しその血中濃度は疾患活動性および骨破壊の予後と関連することが明らかとなった。また ANG1 の血中濃度は生物学的製剤による治療により減少することが明らかとなった。そこで関節リウマチにおける炎症の主座である滑膜組織において ANG1 の発現を検討したところ豊富な血管新生を伴ったパンヌス組織において、ANG1 の強い発現を認める細胞が確認された。さらに RA 患者の尿中では tRNA の成分である m1A の排泄が増えていることが明らかとなった。

さらに申請者の開発した m1A モノクローナル抗体による間接法 ELISA キット 1,000 人分をアメリカに運び、共同研究者がアメリカに赴き BRASS 研究で保存されているリウマチ関節組織を m1A 抗体により染色して組織病変の進展における m1A や tRNA 分解程度の検討を行った。また BRASS データと m1A 測定・組織染色結果を総合的に統計解析を行い tRNA 測定の有用性の確認を行い、申請者の開発した組織虚血のマーカーのリウマチでの有用性を確認した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① Mishima E., Inoue C., Saigusa D., Inoue R., Ito K., Ito S., Tomioka Y., Itoh K. and Abe T. Conformational Change in tRNA is an Early Indicator of Acute Cellular Damage with Prognostic Significance. *J. Am. Soc. Nephrol.* 25: 2316-2326, 2014 (査読あり)
- ② Mullen W., Saigusa D., Abe T., Adamski J. and Mischak H. Proteomics and Metabolomics as Tools to Unravel Novel Culprits and Mechanisms of Uremic Toxicity: Instrument or Hype? *Semin. Nephrol.* 34:180-190, 2014 (査読あり)
- ③ Masereeuw R., Mutsaers H.A., Toyohara T., Abe T., Jhawar S., Sweet D.H. and Lowenstein J. The Kidney and Uremic Toxin Removal: Glomerulus or Tubule? *Semin. Nephrol.* 34:191-208, 2014 (査読あり)
- ④ Sato T., Yamaguchi H., Kogawa T., Abe T. and Mano N. Organic anion transporting polypeptides 1B1 and 1B3 play an important role in uremic toxin handling and drug-uremic toxin interactions in the liver. *J. Pharm.*

*Pharm. Sci.* 17: 475-84, 2014 (査読あり)

- ⑤ Takeuchi Y. Mishima E., Shima H., Akiyama Y., Suzuki C., Suzuki T., Kobayashi T., Suzuki Y., Nakayama T., Takeshima Y., Vazquez N., Ito S., Gamba G. and Abe T. Exonic Mutations in the SLC12A3 Gene Cause Exon Skipping and Premature Termination in Gitelman's Syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26: 271-279, 2015 (査読あり)
- ⑥ Mishima E., Fukuda S., Shima H., Hirayama A., Akiyama Y., Takeuchi Y., Fukuda N.N., Suzuki T., Suzuki C., Yuri A., Kikuchi K., Tomioka Y., Ito S., Soga T. and Abe T. Alteration of the Intestinal Environment by Lubiprostone Is Associated with Amelioration of Adenine-Induced CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26: 1787-1794, 2015 (査読あり)
- ⑦ Ohmine K., Kawaguchi K., Ohtsuki S., Motoi F., Ohtsuka H., Kamiie J., Abe T., Unno M. and Terasaki T. Quantitative Targeted Proteomics of Pancreatic Cancer: Deoxycytidine Kinase Protein Level Correlates to Progression-Free Survival of Patients Receiving Gemcitabine Treatment. *Mol. Pharm.* 12: 3282-3191, 2015 (査読あり)
- ⑧ Uchida Y, Toyohara T, Ohtsuki S, Moriyama Y, Abe T., Terasaki T. Quantitative targeted absolute proteomics for 28 transporters in brush-border and basolateral membrane fractions of rat kidney. *J. Pharm. Sci.* 105: 1011-6, 2016. (査読あり)
- ⑨ Mishima E., Jinno D., Akiyama Y., Itoh K. Nankumo S., Shima H., Kikuchi K., Takeuchi Y., Suzuki T., Elkordy A., Niizuma K., Ito S., Tomioka Y. and Abe T. Immuno-Northern blotting: Detection of RNA modifications by using antibodies against modified nucleosides. *Plos One* 10 :e0143756, 2015 (査読あり)
- ⑩ Suzuki T., Yamaguchi H., Kikusato M., Matsuhashi T., Matsuo A., Sato T., Oba Y., Watanabe S., Minaki D., Saigusa D., Shimbo H., Mori N., Mishima E., Shima H., Akiyama Y., Takeuchi Y., Yuri A., Kikuchi K., Toyohara T., Suzuki C., Kohzuki M., Anzai J., Mano N., Kure S., Yanagisawa T., Tomioka Y., Toyomizu M., Ito S., Osaka H., Hayashi K. and Abe T. Mitochondrial Acid 5 (MA-5), a Derivative of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid, Improves Survival

- of Fibroblasts from Patients with Mitochondrial Diseases.  
*Tohoku J. Exp. Med.* 236: 225-232, 2015 (査読あり)
- ⑪ Suzuki T., Yamaguchi H., Kikusato M., Hashizume O., Nagatoishi S., Matsuo A., Sato T., Kudo T., Matsuhashi T., Murayama K., Ohba Y., Watanabe S., Kanno S.-I., Minaki D., Saigusa D., Shinbo H., Mori N., Yuri A., Yokoro M., Mishima E., Shima H., Akiyama Y., Takeuchi Y., Kikuchi K., Toyohara T., Suzuki C., Ichimura T., Anzai J., Kohzumi M., Mano N., Kure S., Yanagisawa T., Tomioka Y., Tohyomizu M., Tsumoto K., Kazuto Nakata K., Bonventre J.V., Ito S., Osaka H., Hayashi K. and **Abe T.** Mitochondrial acid MA-5 binds to mitochondria and ameliorates renal tubular and cardiac myocyte damages. *J. Am. Soc. Nephrol.* 27: 1925-1932, 2016 doi: 10.1681/ASN.2015060623 (査読あり)
- ⑫ Sato T., Ito H., Hirata A., **Abe T.**, Mano N. and Yamaguchi H. Interactions of crizotinib and gefitinib with organic anion-transporting polypeptides (OATP)1B1, OATP1B3, and OATP2B1: gefitinib shows contradictory interaction with OATP1B3. *Xenobiotica* 2017 Jan 12:1-6. doi: 10.1080/00498254.2016.1275880 (査読あり)
- ⑬ Sato E., Mori T., Mishima E., Suzuki A., Sugawara S., Kurasawa N., Saigusa D., Miura D., Morikawa-Ichinose T., Saito R., Oba-Yabana I., Oe Y., Kisu K., Naganuma E., Koizumi K., Mokudai T., Niwano Y., Kudo T., Suzuki C., Takahashi N., Sato H., **Abe T.**, Niwa T., Ito S. Metabolic alterations by indoxyl sulfate in skeletal muscle induce uremic sarcopenia in chronic kidney disease. *Sci Rep.* 2016 Nov 10;6:36618. doi: 10.1038/srep36618. (査読あり)
- ⑭ Mishima E., Fukuda, Mukawa C, Yuri A, Kanemitsu Y., Matsumoto Y., Akiyama Y., Fukuda N., Tsukamoto H., Asaji K., Shima H., Kikuchi K., Suzuki C., Suzuki T., Tomioka Y., Soga T., Ito S. and Takaaki **Abe T.** Evaluation of the impact of gut microbiota on uremic solute accumulation by a Capillary Electrophoresis-Time of Flight Mass Spectroscopy-based metabolomics approach. *Kidney International in press.* (査読あり) 2017年
- ⑮ Shima H., Sasaki K., Suzuki T., Mukawa C., Obara T., Oba Y., Matsuo A., Kobayashi T., Mishima E., Watanabe S., Akiyama Y., Kikuchi K., Matsuhashi T., Oikawa Y., Nannto F., Akiyama Y., Ho H.-J., Chitose Suzuki C., Saigusa D., Masamune A., Tomioka Y., Masaki T., Ito S., Hayashi K. and **Abe T.** A novel indole compound MA-35 attenuates renal fibrosis by inhibiting both TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta_1$  pathways. *Scientific Reports in press.* (査読あり)・2017年
- [学会発表] (計 19 件)
- ① AMED 難治疾患実用化研究事業「ミトコンドリア病の診療の質を高めるレジストリシステムの構築、診断基準・診療ガイドラインの策定および診断システムの整備を行う臨床研究」班 2017年2月11日(日本生産性本部 IPC 生産性国際交流センター、神奈川県三浦郡葉山町)「ミトコンドリア病;治療へ向けて」新規化合物 MA-5 の分子標的とミトコンドリア病への有効性 (ア) 阿部高明
- ② 第 20 回日本病態栄養学会年次学術集会 (2017年1月15日(京都) 京都国際会議場、京都市) シンポジウム 15 「腸管シグナルと生体調節機構」慢性腎臓病 (CKD) と腸内細菌叢 阿部高明
- ③ The 13th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine [ASMRM] and The 16th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (2016年10月31日 TKP ガーデンシティ品川、東京都) シンポジウム 5: Frontier of therapy: focusing the mechanism> 「Development of a novel mitochondrial drug, MA-5」 阿部高明
- ④ 第一回黒潮カンファレンス (2016年10月23日サンライズ九十九里、千葉) 「異分野融合による創薬研究の前衛を目指して」特別講演 1 ミトコンドリア病治療から代謝機能制御へ 阿部高明
- ⑤ 第46回腎臓学会西部学術大会 (2016年10月15日シーガイア コンベンションセンター、宮崎市) ワークショップ 2 「腸内細菌叢と腎疾患」 阿部高明
- ⑥ 第 46 回腎臓学会東部学術大会 よく分かるシリーズ 20 (2016年10月8日京王プラザ、東京都) 「ミトコンドリア機能障害と腎臓」 阿部高明
- ⑦ 第 59 回日本腎臓学会 (2016年6月17日横浜国際会議場、横浜市)

- シンポジウム5「マイクロバイオームと腎」「慢性腎臓病と腸内細菌叢」  
阿部高明
- ⑧ 第61回透析医学会（2016年6月11日大阪国際会議場、大阪市）シンポジウム11:「透析患者とエピジェネティクス」  
尿毒素によるエピジェネティック修飾と腎不全  
阿部高明
- ⑨ 第5回ゲノム創薬・医療フォーラム（2016年4月26日東京大学 医科学研究所、東京都）  
「ミトコンドリア創薬と臓器保護」  
阿部高明
- ⑩ 第14回東北・北海道先天代謝異常症研究会（2016年5月27日、良陵会館、仙台市）「ミトコンドリア病治療薬の開発」  
阿部高明
- ⑪ 第19回日本心血管内分泌代謝学会総会（2015年12月11日神戸国際会議場、神戸市）シンポジウム2「生体の代謝異常と心血管病」「腎不全時の腸内環境変化と治療応用」  
阿部高明
- ⑫ 第30回日本薬物動態学会（2015年11月12日、タワーホール船堀、東京都）シンポジウム2「腎領域研究の最前線と薬物動態研究との接点」  
ミトコンドリア病治療薬の開発と問題 D 阿部高明
- ⑬ 第49回日本栄養学会東北支部大会（2015年10月24日東北大学農学部、仙台市）公開シンポジウム「高血圧・腎臓病に関する最近の話題」  
腎不全時の腸内環境変化とその治療  
阿部高明
- ⑭ 第5回日本病院薬剤師会東北ブロック学術大会（2015年6月7日山形テルサ、山形市）医薬品相互作用研究会特別シンポジウム  
生活習慣病とトランスポーター  
阿部高明
- ⑮ 第58回日本腎臓学会（2015年6月5日名古屋国際会議場、名古屋市）シンポジウム1「腎臓領域の創薬の未来」  
ミトコンドリア病治療薬  
阿部高明
- ⑯ 第120回解剖生理学会（2015年3月21日神戸国際会議場、神戸市）シンポジウム27「細胞機能と膜輸送体・イオンチャネルの関連」  
腎不全物質の除去はトランスポーターの悪性サイクルを解除する  
阿部高明
- ⑰ 第88回日本薬理学会（2015年3月18日名古屋国際会議場、名古屋市）シンポジウム59:「新たな視点からの腎発生と病態修飾分子」

メタゲノムとメタボローム解析による腎不全時の腸内環境変化の検討  
阿部高明

- ⑱ 第44回日本腎臓学会東部学術大会（2014年10月24日ベルサール新宿グランド、東京都）シンポジウム1「動脈硬化と腎」  
虚血性腎症  
阿部高明
- ⑲ 第111回内科学会（2014年4月12日東京国際フォーラム、東京都）シンポジウム2「各種臓器の血管病変と治療の展望」  
慢性腎臓病の病態と新規治療  
阿部高明

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

名称：臓器線維化疾患の治療剤  
発明者：阿部高明、林謙一郎ほか  
権利者：東北大学、岡山理科大学  
種類：PCT 出願  
番号：PCT/JP2015/005455  
出願年月日：2015年10月27日  
国内外の別：国外

名称：血中尿毒症物質の低減剤  
発明者：阿部高明、富岡佳久  
権利者：東北大学  
種類：特許出願  
番号：2016年10月31日  
出願年月日：2016年10月31日  
国内外の別：国内

○取得状況（計 3 件）

名称：LST-1 及び／又はLST-2 によって輸送される化合物  
発明者：阿部高明  
権利者：東北大学  
種類：特許  
番号：特許第 6021148 号  
取得年月日：2016年10月14日  
国内外の別：国内

名称：エリスロポエチン産生促進剤  
発明者：エリスロポエチン産生促進剤  
権利者：東北大学ほか  
種類：特許  
番号：特許第 5818905 号  
取得年月日：2015年10月9日  
国内外の別：国内

名称：GATA阻害剤を有効成分とする有機イオントランスポーター発現増強剤及びGATA発現抑制剤  
発明者：阿部高明、曾我朋義

権利者：東北大学、慶応大学  
種類：特許  
番号：特許第 5812382 号  
取得年月日：2015 年 10 月 2 日  
国内外の別：国内

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

阿部高明 (ABE TAKAAKI)  
東北大学・大学院医工学研究科・教授  
研究者番号：80292209

### (2) 研究分担者

石井 智徳 (ISHII TOMONORI)  
東北大学・大学病院・教授  
研究者番号：10282138

### (3) 研究分担者

山崎聡士 (YAMAZAKI SATOSHI)  
広島大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：30367388

### (4) 研究分担者

伊藤 邦彦 (ITO KUNIHICO)  
静岡県立大学・薬学研究科・教授  
研究者番号：90221770

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )