



Title	強皮症並びに関節リウマチの病態評価および病態解明に関する研究
Author(s)	蛭川, 慶太
Description	配架番号 : 2708
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14970号
Issue Date	2022-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14970
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85936
Type	doctoral thesis
File Information	NINAGAWA_Keita.pdf



学位論文

強皮症並びに関節リウマチの病態評価

および病態解明に関する研究

**(Research on evaluation and elucidation of the
pathogenesis of scleroderma and rheumatoid
arthritis)**

2022年3月

北海道大学

蜷川 慶太

Keita Ninagawa

学位論文

強皮症並びに関節リウマチの病態評価

および病態解明に関する研究

**(Research on evaluation and elucidation of the
pathogenesis of scleroderma and rheumatoid
arthritis)**

2022年3月

北海道大学

蜷川 慶太

Keita Ninagawa

目次

発表論文目録および学会発表目録	1
1. 要旨	4
1.1. 第一章 境界型強皮症性肺高血圧症の評価方法に関する研究	4
1.2. 第二章 強皮症性肺動脈性肺高血圧症患者における左心疾患の評価	4
1.3. 第三章 関節リウマチの滑膜線維芽細胞における JAK-STAT 経路によるオートファジー制御機序の解明	5
2. 略語表	7
3. 緒言	9
4. 第一章 境界型強皮症性肺高血圧症の評価方法に関する研究	11
4.1 緒言	11
4.2 目的	13
4.3 方法	14
4.3.1 対象患者	14
4.3.2 評価方法	15
4.3.3 統計処理	15
4.4 結果	16
4.4.1 患者背景	16
4.4.2 $mPAP \geq 25mmHg$ または $>20mmHg$ に対する各因子の予測値	18
4.4.3 強皮症患者の早期肺高血圧症 ($mPAP > 20mmHg$) を検出するための試験的アルゴリズム	21
4.5 考察	24
4.6 結語	26
5. 第二章 強皮症性肺動脈性肺高血圧症患者における左心疾患の評価	27
5.1 緒言	28
5.2 目的	29
5.3 方法	30
5.3.1 対象患者およびデータ抽出	30
5.3.2 右心臓カテーテル検査(RHC)および臨床評価	30
5.3.3 経胸壁心エコー図 (TTE)	30

5.3.4	心臓磁気共鳴画像 (MRI) の取得と解析.....	31
5.3.5	左心疾患合併の定義.....	31
5.3.6	統計解析.....	32
5.4	結果.....	33
5.4.1	患者背景.....	33
5.4.2	強皮症(SSc)および肺高血圧(PH)患者における HFrEF, HEmrEF, HFpEF の評価.....	40
5.4.3	SSc+PH+HFpEF 患者と SSc+PH で HFpEF でない患者の臨床パラメ ータの比較.....	42
5.4.4	PAWP, LAD, LVEDVI による HFpEF の合併症検出の予測値.....	48
5.5	考察.....	51
5.6	結語.....	54
6.	第三章 関節リウマチの滑膜線維芽細胞における JAK-STAT 経路によるオー トファジー制御機序の解明.....	55
6.1	緒言.....	56
6.2	目的.....	64
6.3	材料と方法.....	65
6.3.1	対象患者.....	65
6.3.2	患者のサンプルと細胞の準備.....	65
6.3.3	Upadacitinib 濃度の条件検討.....	65
6.3.4	ウェスタンブロットティング法によるオートファジーの評価.....	66
6.3.5	リアルタイム PCR 法によるオートファジーの評価.....	67
6.3.6	免疫細胞染色法でのシトルリン化ビメンチン(cVIM)および HLA-DR の観察.....	68
6.3.7	共免疫沈降法を用いた HLA-DR と cVIM の結合の検討.....	68
6.3.8	Proximity Ligation Assay を用いた HLA-DR と cVIM の結合の検討....	69
6.3.9	ELISA 法による IL-6 の定量的評価.....	70
6.3.10	統計学的解析.....	71
6.4	実験結果.....	72
6.4.1	Upadacitinib 濃度の条件検討.....	72
6.4.2	ウェスタンブロットティング法によるオートファジーの評価.....	78
6.4.3	リアルタイム PCR 法によるオートファジーの評価.....	83
6.4.4	免疫細胞染色法での cVIM および HLA-DR の観察.....	89
6.4.5	共免疫沈降法を用いた HLA-DR と cVIM の結合の検討.....	92
6.4.6	Proximity Ligation Assay を用いた HLA-DR と cVIM の結合の検討....	95

6.4.7 ELISA 法による IL-6 の定量的評価.....	99
6.5 考察.....	102
6.6 結語.....	105
7. 総括.....	107
8. 謝辞.....	109
9. 利益相反.....	111
10. 引用文献.....	113

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は下記の論文として投稿した。

1. Keita Ninagawa, Masaru Kato, Hiroyuki Nakamura, Nobuya Abe, Michihito Kono, Yuichiro Fujieda, Kenji Oku, Shinsuke Yasuda, Hiroshi Ohira, Ichizo Tsujino, Tatsuya Atsumi.
Reduced diffusing capacity for carbon monoxide predicts borderline pulmonary arterial pressure in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology International*. 2019 Nov;39(11):1883-1887.
2. Keita Ninagawa, Masaru Kato, Hiroshi Ohira, Satonori Tsuneta, Hiroyuki Iwano, Michihito Kono, Yuichiro Fujieda, Kenji Oku, Ichizo Tsujino, Tatsuya Atsumi.
The assessment of left heart disease in patients with systemic sclerosis and pulmonary hypertension. *Clinical and Experimental Rheumatology*. Jul-Aug 2021;39 Suppl 131(4):103-110.

本研究の一部は下記の学会で発表した。

1. 蜷川 慶太、加藤 将、中村 浩之、麻生 邦之、佐藤 太貴、河野 通仁、藤枝 雄一郎、奥 健志、坊垣 暁之、オルガ アメンダアル、保田 晋助、渥美 達也
強皮症患者における平均肺動脈圧>20mmHg 予測アルゴリズムの作成第 63 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2019 年 4 月 15 日, 京都
2. Keita Ninagawa, Masaru Kato, Michihito Kono, Yuichiro Fujieda, Kenji Oku, Olga Amengual, Shinsuke Yasuda, Tatsuya Atsumi. The assessment of left heart disease phenotype in patients with systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension. 第 64 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2020 年 8 月 17 日-9

月 15 日, WEB 開催

3. 蜷川 慶太、加藤 将、河野 通仁、藤枝 雄一郎、奥 健志、渥美 達也
強皮症性肺動脈性肺高血圧症患者における左心疾患の評価
第 5 回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会. 2020 年 9 月 26 日-27 日, WEB 開催

4. Keita Ninagawa, Masaru Kato, Michihito Kono, Yuichiro Fujieda, Kenji Oku, Olga Amengual, Shinsuke Yasuda, Tatsuya Atsumi.
The assessment of left heart disease phenotype in patients with systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension
12th International Congress of Autoimmunity. 28 May, 2021, Online

5. Keita Ninagawa, Masaru Kato, Masaru Yoshimura, Yuki Kudo, Michihito Kono, Yuichiro Fujieda, Kenji Oku, Tatsuya Atsumi. JAK1 regulates autophagy and reinforces the inflammatory and autoimmune potentials in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts
The American College of Rheumatology/The Association of Rheumatology Health Professionals 2021 Annual Meeting, 5 Nov. 2021.

1. 要旨

全身性強皮症 (SSc) は各臓器の慢性的な線維化を特徴とする自己免疫疾患で、臓器病変の一つとして肺動脈性肺高血圧症 (SSc-PAH) を呈し、予後は特に不良かつ難治である。診断の遅れや、左心疾患の合併で病態の評価が難しいことが原因に挙げられる。

また、関節リウマチ (RA) は、慢性進行性の関節破壊を特徴とする自己免疫疾患である。滑膜線維芽細胞 (SFs) は、高いオートファジー活性を有し、病態の中心的な役割を果たすが、オートファジーがどのような調整を受けているかは不明である。

今回、我々はこれらを解明するべく研究を行った。

1.1 第一章 境界型強皮症性肺高血圧症の評価方法に関する研究

【背景と目的】近年、SSc-PAH 患者に対する早期の治療介入で予後が改善する可能性が示され、診断基準となる平均肺動脈圧 (mPAP) の引き下げが提唱されている。本研究では、mPAP>20mmHg となる強皮症患者の非侵襲的なスクリーニング法の作成を目的とした。

【対象と方法】2010~2018 年に当院で右心カテーテル検査 (RHC) を施行した SSc 患者 58 名で、自己抗体、血漿 BNP 値、血清尿酸値、右軸偏位、努力性肺活量 (FVC) 一酸化炭素拡散能 l (DLco)、三尖弁逆流速度を評価した。各マーカーで ROC 曲線を用いて、mPAP>20mmHg または mPAP \geq 25mmHg を予測する場合の正診能を比較した。また心臓核磁気共鳴画像法 (MRI) を追加した場合の正診能を検討した。

【結果】mPAP \geq 25mmHg のときに匹敵して、FVC/DLco と右軸偏位の mPAP>20mmHg を予測する特異度はそれぞれ 72%、96%と高かった。それらのオッズ比に基づき重み付けをして mPAP>20 予測のアルゴリズムを作成すると、AUC が 0.87、感度 90%、特異度 70%となった。心臓 MRI を加えると、AUC が 0.89、感度 93%、特異度 67%となった。

【結論】強皮症患者の mPAP>20mmHg を予測する新たなアルゴリズムを作成した。FVC/DLco や右軸偏位の重み付け、心臓 MRI の追加で予測精度が向上する可能性が示唆された。

1.2 第二章 強皮症性肺動脈性肺高血圧症患者における左心疾患の評価

【背景と目的】SSc-PAH はしばしば左心疾患を合併し、治療抵抗性である。SSc の心筋障害では拡張機能障害により、駆出率の保たれた心不全 (HFpEF) として

認められる。左心疾患による肺高血圧症 (Group 2 PH) は肺動脈楔入圧 (PAWP) $\geq 15\text{mmHg}$ で定義されるが、早期発見のための新たなアルゴリズムが最近提唱された。本研究では、このアルゴリズムを用いて SSc-PAH 患者における左心疾患の合併を評価した。

【対象と方法】2010~2019年に当院で RHC を受けた 76 人の SSc 患者で、年齢、代謝・心血管疾患の有無、心電図、心臓超音波検査 (TTE) を評価し Group 2 PH らしさで、3 群に分類した。臨床で実際に左心疾患を合併した患者数と比較し、アルゴリズムの SSc-PAH における妥当性を評価した。また、RHC や TTE、心臓 MRI などの画像モダリティにおける各パラメーターを HFpEF を合併した患者としていない患者の間で、ROC 曲線や多変量解析を用いて比較を行った。

【結果】76 名中 42 名の患者は PH ($\text{mPAP} > 20\text{mmHg}$) で、左心室駆出率が正常 ($\geq 50\%$) であった。うち 10 名がフラミンガム基準でも HFpEF と診断された。ROC 曲線で HFpEF の合併を予想するカットオフを決定し、ロジスティック回帰分析でも評価すると、TTE と心臓 MRI でそれぞれ評価した左心房径 (LAD; cut off; 42mm , $\text{OR}[95\%\text{CI}] = 14.5[2.55-82.2]$, $p = 0.003$.) と左心室拡張末期容積指数 (LVRMI; cut off; 57.1ml/m^2 , $\text{OR}[95\%\text{CI}] = 20.0[1.83-218.0]$) は、PAWP (cut off; 19 , $\text{OR}[95\%\text{CI}] = 13.4[1.01-177.0]$) よりも HFpEF の合併症を検出するための予測値が有意に高かった。

【結論】TTE と心臓 MRI による形態学的評価は、PAWP による血行動態学的な評価よりも、SSc および PH 患者における左心疾患の存在をより反映すると考えられる。

1.3 第三章 関節リウマチの滑膜線維芽細胞における JAK-STAT 経路によるオートファジー制御機序の解明

【背景と目的】我々の過去の研究で、オートファジーが亢進した RASFs ではシトルリン化ビメンチン (cVIM)が増加し、MHC クラス II (HLA-DR) と相互作用し、オートファジーは RASFs における免疫学的特徴に密接に関係していると考えられた。しかし、詳細な機能などは不明な部分も多い。一方、JAK-STAT 経路は多様なサイトカインの伝達に関わるため、オートファジーへの関与も考えられた。本研究では、SFs におけるオートファジーの制御における JAK1 の役割を調べた。

【対象と方法】当院で人工膝関節置換術を受けた RA 患者の滑膜から SFs を分離・培養し、 $\text{IFN-}\gamma$ や、飢餓刺激、プロテアソーム阻害薬である MG-132 でオートファジーを誘導した。JAK1 の選択的阻害薬である Upadacitinib の投与の有無で、LC3B や、Beclin-1、ATG5、ATG7 などのオートファジー関連遺伝子や蛋白質を、ウェスタンブロットティング (WB) 法やリアルタイム PCR 法で評価した。cVIM や HLA-DR の発現を免疫細胞染色法で評価し、これらの共発現を共免疫

沈降法と近接ライゲーションアッセイで評価した。また、RA SFs における IL-6 の産生を、培養上清の ELASA 法で評価した。

【結果】WB 法では、飢餓刺激を加えた SFs に Upadacitinib を添加すると、LC-3II/β アクチン比は有意に低下し ($p = 0.016$, $n = 7$ 、リアルタイム PCR 法でも、BECN1 ($p = 0.01$, $n = 6$)、ATG5 ($p = 0.03$, $n = 6$)、ATG7 ($p = 0.02$, $n = 6$) と各遺伝子で有意に低下した。他の刺激条件でも同様であった。免疫細胞染色 ($n = 1$) では、IFN- γ と飢餓刺激で刺激を行った SFs では cVIM と HLA-DR の発現は亢進し、Upadacitinib の添加で低下した。cVIM と HLA-DR の共局在は共免疫沈降法において、飢餓刺激と IFN- γ による刺激で亢進し、Upadacitinib の添加で低下した ($p = 0.03$, $n = 6$)。近接ライゲーションアッセイでも同様であった。また、IFN- γ による刺激で培養上清中の IL-6 は増加し ($p = 0.017$, $n = 3$)、Upadacitinib の添加で抑制された ($p = 0.02$, $n = 5$)。

【結論】オートファジーは JAK-STAT 経路により調節され、その阻害で cVIM の生成や cVIM と HLA-DR との共局在、IL-6 の産生も制御された。

SSc-PAH の早期例の検出には FVC/DLco や右軸偏位が有用で、左心疾患の早期例の検出には複数のモダリティーによる形態学的評価が重要であった。

RA に関する研究の結果では、オートファジーが JAK-STAT 経路による調節を受けていることが明らかとなり、病態の解明に大きく寄与するものと考えられる。

2. 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

3-MA	3-methyladenine
ACPA	anti-citrullinated peptide antibodies
AF	arterial fibrillation
AVB	atrioventricular block
BECN1	beclin1
BNP	brain natriuretic peptide
CI	cardiac index
CO	cardiac output
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DLco	diffusing capacity for carbon monoxide
DLco/VA	diffusing capacity for carbon monoxide/ alveolar volume,
DcT	deceleration time
ECG	electrocardiogram
FBS	fetal bovine serum
FEV	forced expiratory volume
FVC	forced vital capacity
FVC/DLCO	forced vital capacity/diffusing capacity for carbon monoxide
GERD	gastroesophageal reflux disease
GFR	glomerular filtration rate
HLA	human leukocyte antigen
IFNG/IFN- γ	interferon gamma
IL6	interleukin 6
IP	immunoprecipitation
LAD	left atrial dimension
LAVI	left atrial volume index
LBBB	left bundle branch block
LVAWT	left ventricle anterior wall thickness
LVEDVI	left ventricular end-diastolic volume index
LVEF	left ventricle ejection fraction
LVH	left ventricular hypertrophy

MAP1LC3/LC3 microtubule associated protein 1 light chain 3
MRI magnetic resonance imaging
NYHA New York Heart Association functional classification
OA osteoarthritis
PBS phosphate-buffered saline
PVOD pulmonary veno-occlusive disease
PVR pulmonary vascular resistance
RA rheumatoid arthritis
RAP right atrial pressure
RBBB right bundle branch block
RHC right heart catheterization
RVEDVI right ventricular end-diastolic volume index
RVEF right ventricle ejection fraction
RVH right ventricular hypertrophy
SAB sinoatrial block
SFs synovial fibroblasts
SSc systemic sclerosis
SvO₂ mixed venous oxygen saturation
TRV tricuspid regurgitant velocity
TRV tricuspid regurgitation velocity
TTE transthoracic echocardiography
TV tidal volume
UA uric acid
VC vital capacity
VIM vimentin
WHO-FC The World Health Organization functional class
anti-CCP anti-cyclic citrullinated peptide antibody
cVIM citrullinated VIM
dPAP diastolic pulmonary arterial pressure
dcSSc diffusecutaneous systemic sclerosis
ePASP estimated pulmonary artery systolic pressure
lcSSc limitedcutaneous systemic sclerosis
mPAP mean pulmonary arterial pressure
mPAP mean pulmonary artery pressure
sPAP systolic pulmonary arterial pressure

3. 緒言

数ある自己免疫疾患の中で、我々は、強皮症性肺高血圧症と関節リウマチという2つの難治性の疾患に直面した。

この10年で肺動脈性肺高血圧症 (PAH) の治療と予後は大きな進歩を遂げているが、それにも関わらず強皮症性肺高血圧症 (SSc-PAH) の予後は依然として不良であり、生存期間中央値はわずかに4年と非常に短い(Tyndall et al., 2010)。SSc-PAH の予後が不良である原因としては、疾患に関連した他の合併症によるものも考えられるが、診断の遅れによるものも大きいと考えられている(Morrisroe et al., 2017)。したがって、PAHの早期発見は、これらの患者の転帰の改善に非常に重要な課題である(Kato and Atsumi, 2018)。

また、心筋が線維化して障害されることで左心疾患 (LHD) を伴う場合があり(2群 PH) (Hsu et al., 2018; Utsunomiya et al., 2020)と、こうした様々な要因が複雑に絡み合うことで、難治性の病態が形成され、治療抵抗性を呈していると考えられている。

一方、関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) は自己免疫性疾患の一つであり、骨・軟骨を破壊する慢性多発性関節炎を特徴とする自己免疫疾患である(McInnes and Schett, 2011)。

RAの病態の詳細については不明な部分も多く、我々はこれまでRAの病態へのオートファジーの役割に着目して研究を行ってきた。オートファジーは細胞内の分解システムの一つであり、細胞内の蛋白質やオルガネラを分解することによる細胞内浄化や、飢餓条件下での自己消化によるエネルギー供給を主な役割とし、関節リウマチ患者のSFsにおいて亢進していることが示されている。(Kato et al., 2014) 我々はオートファジーが亢進しているとHLA-DRを介したシトルリン化ペプチドの抗原提示が促進されることを示し(Sugawara et al., 2020)、RAの発症に大きく影響することを示したが、SFsにおいてどのような調整を受けているかは明らかとなっていない。

一方で、JAK-STAT経路は近年RAの治療標的として注目され、JAK阻害剤は広範囲にサイトカインのシグナルをブロックすることが可能であり、様々な炎症性疾患や自己免疫疾患の治療薬としその開発や疾患への適応が進んできている。(Jamilloux et al., 2019) 関節リウマチにおいても各種JAK阻害薬が本邦では使用可能であり、難治例に対しても良好な結果を得ている。

さらに近年、このJAK-STAT経路が慢性骨髄性白血病(Zhu et al., 2013)や全身性エリテマトーデス(Dong et al., 2015)、高安動脈炎(Chen et al., 2019)においてオートファジーの調節を行っている可能性が示唆された。しかし、関節リウマチに

においては、オートファジーと JAK-STAT 経路の関係は明らかになっておらず、この部分を明らかにすることで RA の病態の深い理解につながり、将来的な寛解率の向上や関節破壊の抑制に寄与すると考えられた。

そこで、今回我々は SSc-PAH においては早期例の検出と、左心疾患合併例の評価を目的として臨床的パラメーターを用いて検討を行い、RA においては、オートファジーと JAK-STAT 経路がどのように関係しており、病態にどのように影響しているのかということについて研究を行うこととした。

4. 第一章 境界型強皮症性肺高血圧症
の評価方法に関する研究

4.1 緒言

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は肺動脈の血圧が上昇し、心臓の右側に負荷を及ぼす疾患であり、平均肺動脈圧 (mPAP) $\geq 25\text{mmHg}$ 、肺動脈楔入圧 (PAWP) $< 15\text{mmHg}$ と定義される。PAH は、特発性あるいは様々な疾患の合併症として発症し、特に全身性強皮症 (SSc) の患者では高い有病率を示す。この 10 年で PAH の治療と予後は大きな進歩を遂げているが、それにも関わらず強皮症性肺高血圧症 (SSc-PAH) の予後は依然として不良であり、生存期間中央値はわずかに 4 年と非常に短い(Tyndall et al., 2010)。SSc-PAH の予後が不良である原因としては、疾患に関連した他の合併症によるものも考えられるが、診断の遅れによるものも大きいと考えられている(Morrisroe et al., 2017)。したがって、PAH の早期発見は、これらの患者の転帰の改善に非常に重要な課題である(Kato and Atsumi, 2018)。ヨーロッパのグループの研究により、SSc-PAH をスクリーニングするためのアルゴリズムが発表された (DETECT 試験)(Coghlan et al., 2014)。この DETECT 試験では、まず心臓超音波検査 (TTE) 以外の項目を評価し、次に心臓超音波検査 (TTE) の項目を評価するという段階的なプロセスが採用されている。そして、高リスクの患者には右心カテーテル検査 (RHC) が推奨される。他のコホートでも、DETECT アルゴリズムの高い感度と陰性予測値が検証されており、それぞれの研究において良好な成績を収めている (Guillen-Del Castillo et al., 2017; Vandecasteele et al., 2017)。

最近のデータでは、SSc 患者の mPAP が 21-24mmHg の場合、境界型 PAH として、SSc-PAH の初期段階として治療の可能性があると考えられている(Valerio et al., 2013)。第 6 回 World Symposium on Pulmonary Hypertension (WSPH) では、SSc-PAH における転帰を改善するために、mPAP の診断カットオフレベルの 25mmHg 以上から 20mmHg 以上への変更が提唱された(Simonneau et al., 2019)。したがって、それに伴い、mPAP が 20mmHg 以上の SSc をスクリーニングする新しい戦略が必要であると考えられた。

4.2 目的

本研究は $mPAP > 20\text{mmHg}$ の SSc 患者を効率的に抽出するアルゴリズムを作成することを目的とした。

4.3 患者と方法

4.3.1 対象患者

本研究では、当院で 2010 年 7 月から 2018 年 7 月までに PAH を疑い RHC を施行した SSc 患者を対象とした。SSc は、現行の米国リウマチ学会の基準に基づいて診断した。%努力性肺活量 (FVC) <60% の間質性肺疾患、腎不全、肺塞栓症、臨床的に関連する左心疾患、PAWP \geq 15mmHg の患者は除外した。本研究は、ヘルシンキ宣言および Good Clinical Practice の原則に則って実施され、北海道大学病院の倫理委員会から承認を得た (承認番号：17-0327)。患者のプライバシーデータは厳重に保護され、研究に参加したすべての個人からインフォームド・コンセントを得た。

4.3.2 評価方法

本研究で使用されるすべてのデータは電子カルテから抽出を行った。SSc患者のPAHの危険因子として、DETECT研究(4)を参考に、抗セントロメア抗体またはU1-RNP抗体、血漿BNP値、血清尿酸値、右軸偏位、FVC/一酸化炭素拡散能(DLCO)比、三尖弁逆流速度(TRV)を評価した。

これらの因子のカットオフ値は、ROC曲線を用いて70%以上の感度でYouden Indexを最大化するように定義した。各因子のスクリーニング性能は、ROC曲線下面積(AUC)、感度、特異度、オッズ比で表した。

4.3.3 統計処理

連続変数は中央値[四分位]で表し、Wilcoxonの検定を用いて比較した。カテゴリ変数は、数(%)で表し、カイ二乗検定を用いて比較を行った。統計的な有意性は、確率が0.05未満であることにより定義した。すべての統計解析は、JMP Proソフトウェア(ver.14.0; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いて行った。

4.4 結果

4.4.1 患者背景

本研究では、女性 51 名、男性 7 名の計 58 名の患者が登録され、24 名 (41%) が $mPAP \geq 25\text{mmHg}$ 、9 名 (16%) が $25 > mPAP > 20\text{mmHg}$ 、25 名 (43%) が $20\text{mmHg} \geq mPAP$ であった。患者背景は、表 1 にまとめた。年齢、性別、自己抗体プロフィールは各群間で類似していた。血漿 BNP 値は、 $mPAP \geq 25\text{mmHg}$ の患者 (中央値 120pg/mL, $p=0.03$) では、 $20\text{mmHg} \geq mPAP$ の患者 (中央値 61 pg/mL) に比べて有意に高かったが、 $25 > mPAP > 20\text{mmHg}$ の患者 (中央値 35pg/mL) では上昇しなかった。血清尿酸値は各群間で差がなかった。右軸偏位は、 $mPAP \geq 25\text{mmHg}$ の患者の 63% に認められたが、 $25 > mPAP > 20\text{mmHg}$ の患者 (11%) や $20\text{mmHg} \geq mPAP$ の患者 (4%) では頻度が低かった。興味深いことに、FVC/DLCO は、 $mPAP \geq 25\text{mmHg}$ の患者 (中央値 2.5) と $25 > mPAP > 20\text{mmHg}$ の患者 (中央値 2.5) では、 $20\text{mmHg} \geq mPAP$ の患者 (中央値 1.5) に比べて同様に上昇した。

表 1. 患者背景

	Total (n = 58)	mPAP \geq 25 mmHg (n = 24)	25 mmHg > mPAP > 20 mmHg (n = 9)	20mmHg \geq mPAP (n = 25)	p value*
Age	62 [49-70]	58 [49-70]	60 [57-67]	65 [47-73]	0.76
Female	51 (88%)	21 (88%)	9 (100%)	21 (84%)	0.27
Anti-centromere antibody	17 (29%)	6 (25%)	4 (44%)	7 (28%)	0.56
Anti-U1-RNP antibody	23 (40%)	10 (42%)	4 (44%)	9 (36%)	0.88
Plasma BNP (pg/mL)	73 [25-169]	120 [54-222]	35 [22-79]	61 [14-176]	0.03
Serum urate (mg/dL)	5.2 [4.4-6.5]	5.3 [4.9-7.1]	4.5 [4.2-5.6]	4.5 [4.0-6.0]	0.10
Right axis deviation	17 (29%)	15 (63%)	1 (11%)	1 (4%)	< 0.01
FVC/DLCO	1.9 [1.5-2.7]	2.5 [1.7-3.6]	2.5 [2.4-2.9]	1.5 [1.3-2.0]	< 0.01
TRV (m/s)	3.1 [2.7-3.7]	3.7 [3.3-4.3]	3.1 [2.4-3.3]	2.7 [2.4-3.0]	< 0.01

*連続変数は Wilcoxon の検定を、カテゴリー変数はカイ二乗検定を用いて比較した

4.4.2 mPAP \geq 25mmHg または>20mmHg に対する各因子の予測値

mPAP \geq 25mmHg または>20mmHg を予測するための各危険因子の AUC, カットオフ値, 感度, 特異度, オッズ比を表 2A, 2B にまとめた。AUC は、血漿 BNP 値、血清尿酸値、FVC/DLCO などの定量的なパラメーターに関して算出した。血漿 BNP 値の AUC (0.70~0.61) と血清尿酸値の AUC (0.67~0.63) は、mPAP のカットオフ値を 25mmHg 以上から 20mmHg 以上に変更すると共に減少し、対照的に FVC/DLCO の AUC は減少しなかった (0.71~0.80)。自己抗体と右軸偏位を含む定性値のうち、後者は mPAP \geq 25mmHg と>20mmHg のいずれに対しても高い特異性 (それぞれ 0.94 と 0.96) と高いオッズ比 (それぞれ 26.7 と 22.2) を示した。これらの結果から、FVC/DLCO と右軸偏位は、mPAP>20mmHg を予測する上で特に重要な因子であることが示された。

表 2. mPAP \geq 25 mmHg または $>$ 20 mmHg を予測する為の各項目の予測値

(A) mPAP \geq 25 mmHg を予測する為の各項目の予測値

	mPAP \geq 25 mmHg				
	AUC	Cut-off	Sensitivity	Specificity	Odds ratio
Autoantibodies*	-	positive	0.67	0.29	0.8
Plasma BNP (pg/mL)	0.70	79.3	0.71	0.66	4.8
Serum urate (mg/dL)	0.67	4.9	0.83	0.53	5.5
Right axis deviation	-	positive	0.63	0.94	26.7
FVC/DLCO	0.71	1.47	1.00	0.32	-

(B) mPAP > 20 mmHg を予測する為の各項目の予測値

	mPAP > 20 mmHg					
	AUC	Cut-off	Sensitivity	Specificity	Odds ratio	Weighted score
Autoantibodies*	-	positive	0.72	0.36	1.4	1
Plasma BNP (pg/mL)	0.61	24.8	0.85	0.35	3.1	2
Serum urate (mg/dL)	0.63	4.5	0.82	0.44	3.6	2
Right axis deviation	-	positive	0.48	0.96	22.2	11
FVC/DLCO	0.80	1.78	0.78	0.72	9.1	5

*抗セントロメア抗体または抗 U1-RNP 抗体。 重みづけスコアは、オッズ比の約半分の値とした。

4.4.3 SSc 患者の早期肺高血圧症 (mPAP>20mmHg) を検出するためのパイロットアルゴリズム

最後に、SSc 患者の mPAP>20 mmHg を検出するためのパイロットアルゴリズムを作成した。アルゴリズムの作成に先立ち、心エコー図以外の各因子をそのオッズ比に基づいて重み付けを行った (表 2)。重み付けスコアはオッズ比の約半分値として算出した。重みづけスコアの合計は、正の危険因子の数と比較して、mPAP>20mmHg に対する高い予測能を示した (AUC 0.84 vs 0.88) (図 1A および B)。カットオフ値を 5 とした場合、重みづけスコアの感度と特異度は、それぞれ 97%と 52%であった。TRV (カットオフ値 2.8m/s, 加重スコア 4) を心エコー以外の因子に加えると、重みづけスコアの AUC はさらに 0.92 に上昇した (図 1C)。アルゴリズムの最終版を図 2 に示す。

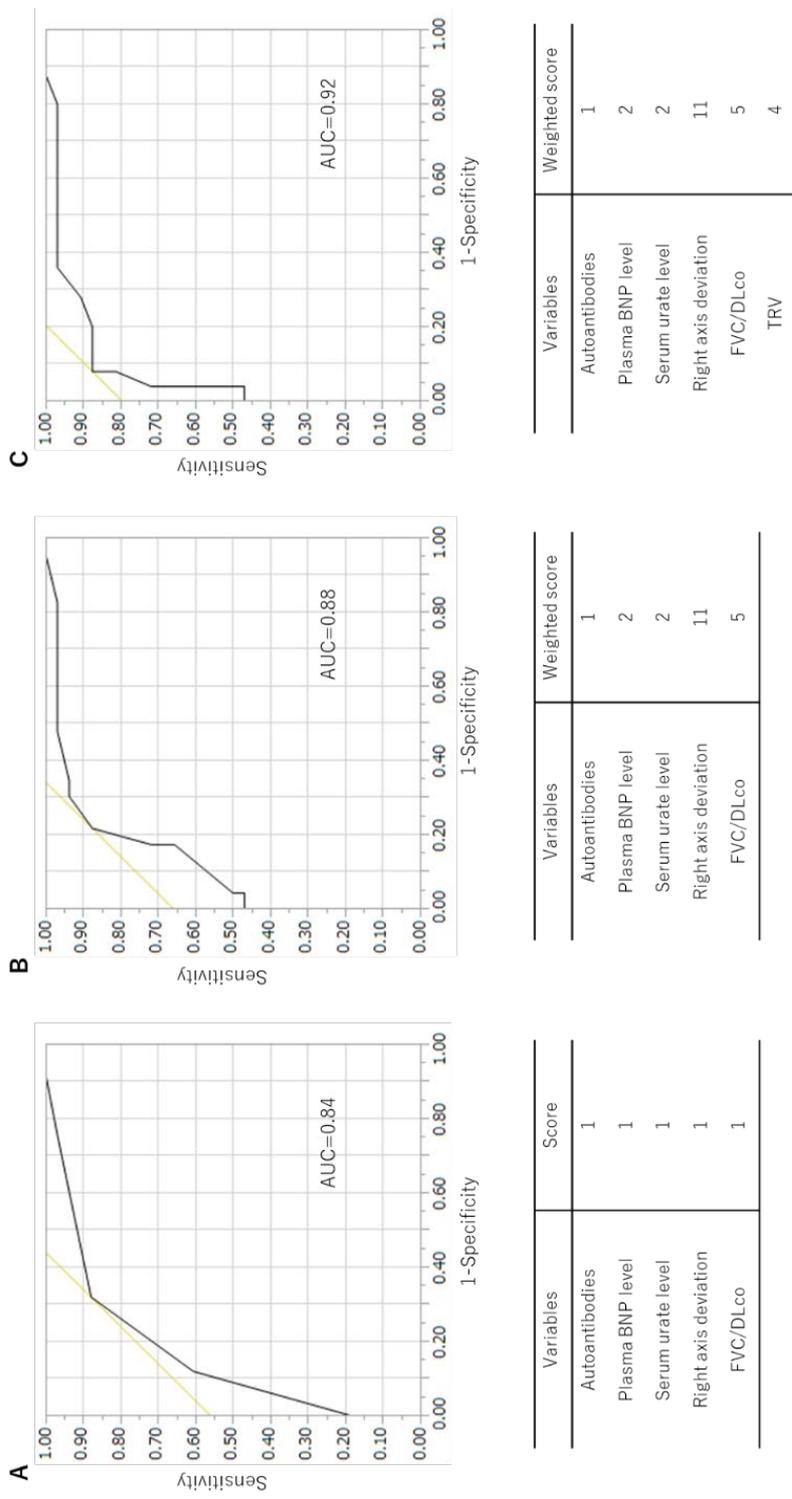


図 1. SSC-PAH 患者の早期例検出のためのスクリーニングアルゴリズム最終版

重み付けスコアはオッズ比の約半分値として算出した。

重み付けスコアの合計は、正の危険因子の数と比較して、**mPAP>20mmHg** に対する高い予測能を示した (AUC 0.84 vs 0.88) (図 1A および B)。

カットオフ値を 5 とした場合、重み付けスコアの感度と特異度は、それぞれ 97% と 52% であった。TRV (カットオフ値 2.8m/s、加重スコア 4) を心エコー以外の因子に加えると、重み付けスコアの AUC はさらに 0.92 に上昇した (図 1C)。

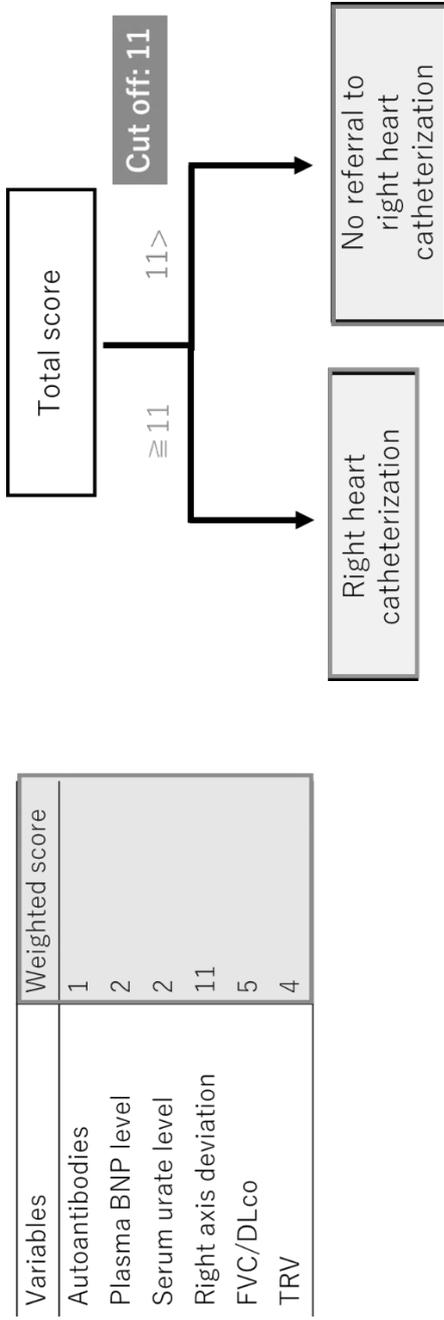


図 2. SSc 患者の早期肺高血圧症 (mPAP>20mmHg) を検出するためのパイロットアルゴリズム

自己抗体 (抗セントロメア抗体または抗 RNP 抗体)、血漿 BNP 値、血尿酸値、心電図検査での右軸偏移、呼吸機能検査での FVC/DLco と TTE での TRV の各項目の重みづけスコアを合計して、スコアの合計が 11 以上であれば RHC を施行し、RHC が 11 未満であれば経過観察が推奨される。

4.5 考察

本研究では、FVC/DLCO と右軸偏位の増加が SSc 患者の mPAP>20 mmHg を予測する重要な因子であることが示された。右軸偏位の感度が比較的低い (48%) ことを考慮すると、FVC/DLCO の方が mPAP>20 mmHg を予測するという点においてはより適切であると考えられた。25>mPAP>20mmHg の患者は、PAH の前駆段階と考えられ、自然経過で将来的に SSc-PAH に進行する可能性があると考えられている(Valerio et al., 2013)。PHAROS コホート研究では、2年間の追跡調査の結果、25>mPAP>20mmHg の患者の 55%が後に PAH を発症していた(Bae et al., 2012)。また、別のコホート研究では、25>mPAP>20mmHg である SSc 患者は、mPAP が正常値である患者と比較し、追跡期間中に PAH を発症する可能性が高いことが示されている(Valerio et al., 2013)。SSc の PAH は緩徐に進行するが、進行とともに酸素化の悪化や運動耐用能の著しい低下が出現するようになる。過去の研究では、PAH の発症早期の段階での介入により、その予後や症状の進行を改善する可能性が示唆されており、積極的なスクリーニングにより早期に診断された SSc-PAH 患者は、従来 of 基準に基づいて診断された患者よりも予後が良好であった(Humbert et al., 2011)。したがって、一般的に PAH の早期発見は SSc 患者の予後の改善という点において非常に重要であり、早期発見のためのスクリーニングツールの開発はこれまでの研究でも盛んに行われてきた。非侵襲的なマーカーを用いた RHC のスクリーニングアルゴリズムは本研究で採用された DETECT 研究でのアルゴリズムの他にも、様々なものが提唱されており、European Society of Cardiology/European Respiratory Society (ESC/ERS)ガイドライン(Galie et al., 2009)、Australian Scleroderma Interest Group (ASIG)アルゴリズム(Thakkar et al., 2012)、American College of Rheumatology の recommendation (Khanna et al., 2013)、などがあるが、これらのアルゴリズムの中でも DETECT 研究でのアルゴリズムは特に感度が高く、診断の漏れを減少させることが期待できることから、広く認知され普及している(Hao et al., 2015)。そうした背景から今回我々は DETECT アルゴリズムを用いて危険因子を評価し、SSc における境界型 PAH 患者を予測するアルゴリズムを新たに確立を目指した。

本研究は日本人の強皮症患者を対象とした研究であることから、評価項目に以下のように一部改変を行っている。まず、抗 U1-RNP 抗体は、アジア人集団における SSc-PAH のもう一つのリスクであることから(Sobanski et al., 2016)、抗セントロメア抗体に加えて抗 U1-RNP 抗体も評価した。また、DETECT 試験では除外されていたが、本研究では SSc-PAH の初期段階における DLCO の変化を評

価するために、DLCOが60%以下の患者も対象に含めている。

本研究での新たな発見は、SSc-PAHの前段階および早期段階においてはFVC/DLCOが特異的に上昇するということである。PAHの進行にあたり、最も早期に変化するパラメーターの発見は、境界型PAHなどの発症早期例の検出に重要であると考えられる。血漿BNPやNT-proBNPなどの血清学的なマーカーは、PAHの進行後に起こる肺血管の閉塞に対する心臓の代償を反映していると考えられることから、早期例の検出に際してはFVC/DLcoよりもやや重要性が劣ると考えられる。本研究における重みづけスコアはこうしたパラメーターごとの臨床的な意義を付加することを目的として採用し、結果として重みづけスコアを用いた場合とそうでない場合に比べてROC曲線におけるAUCは0.84から0.88へと上昇しており、スクリーニング精度の向上に大きく寄与したと考えられる。最後にDETECTアルゴリズム同様にTTEの項目を2段階目で追加しているが、本研究ではこれを1段階目に加えることによりAUCは0.88から0.92に上昇し、さらにスクリーニングツールとしての有用性が向上した。

本研究のlimitationとしては、まず、本研究は単一施設での研究であり、小さなサンプルサイズで実施されているということが挙げられる。後方視的なクロスセクションデータが使用されており、因子の交絡に対して特別な補正は行っていない。また、本研究は内部および外部の検証コホートを欠いている。したがって、さらなる研究によって、我々のパイロットアルゴリズムが評価され、改良される必要があると考えられる。

4.6 結語

SSc-PAH の早期例の検出において FVC/DLCO の上昇が重要であることが明らかとなった。

それをもとに作成された SSc 患者の $mPAP > 20\text{mmHg}$ を予測するアルゴリズムでは、FVC/DLCO や右軸偏位に重みづけすることで SSc-PAH の予測能が向上する可能性を示した。

5. 第二章

強皮症性肺動脈性肺高血圧症患者における

左心疾患の評価

5.1 緒言

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) はその病態において、肺動脈や細動脈のリモデリングや収縮の結果として平均肺動脈圧 (mPAP) の上昇を来し、進行すると右心不全に至る。PAH は、特発性 PAH (iPAH) として発症するものと、結合組織病などの他の疾患に伴って発症するものがある。結合組織病のうち、全身性強皮症 (SSc) は PAH の基礎疾患として臨床的に特に重要であり、強皮症性肺動脈性肺高血圧症(SSc-PAH)の予後は他の PAH に比べて明らかに不良である(Chung et al., 2010; Weatherald et al., 2018)。SSc-PAH の予後が不良である要因は、いくつかの要因が挙げられており(Kato et al., 2020; Krikeerati et al., 2021; Lei et al., 2021)、第一に、SSc-PAH の肺血管障害が他の PAH と組織学的に異なっていることが挙げられる。IPAH や SSc 以外の結合組織病に伴う PAH で認められる内皮細胞や平滑筋細胞の増殖を含む叢生性肺動脈症と比較して、SSc-PAH ではリモデリングによる線維化傾向が強く、それにより微小血管障害を来すことが挙げられる(Sasaki et al., 2011)。SSc-PAH では肺動脈だけでなく、肺静脈でもリモデリングが見られことがある(Overbeek et al., 2009)。第二に、心筋が線維化して障害されることで左心疾患 (LHD) を伴う場合があり (2 群 PH) (Hsu et al., 2018; Utsunomiya et al., 2020)と、それに独発した肺血管のリモデリングが追加で生じる場合がある(Fayyaz et al., 2018)。第三に、SSc においては、間質性肺疾患がほとんどの症例で認められる (3 群 PH) (Morrisroe et al., 2017)。SSc-PAH ではこれらの要因が複雑に絡み合うことで、難治性の病態が形成され、治療抵抗性を呈していると考えられている。

近年開催された、PH の国際会議である第 6 回 World Symposium on Pulmonary Hypertension (WSPH) では、肺動脈楔入圧 (PAWP) が 15mmHg 以下の患者を前毛細血管性 PH に分類され、左心疾患を伴う PH 患者を層別化するためのアルゴリズムも提案された(Vachier et al., 2019)。しかし、このアルゴリズムは加齢や動脈硬化に関連した左心疾患を合併する PH を対象としており、SSc 患者においては新たに独立して検証を行う必要があると考えられた。本研究で我々は、SSc 患者で 2 群 PH を有する患者において、どのような臨床パラメーターが駆出率の保たれた心不全 (HFpEF) の合併を最もよく反映するのかという疑問を解明するべく研究を行った。

5.2 目的

本研究では、PHを有するSSc患者における2群PHの要素の評価とその同定を目的とした。

5.3 方法

5.3.1 患者およびデータ抽出

本研究は、2010年7月から2019年7月までに北海道大学病院でPAHの診断のために右心カテーテル検査(RHC)を受け、2013年の米国リウマチ学会／欧州リウマチ連盟のSSc分類基準(van den Hoogen et al., 2013)を満たした患者を対象に後方視的に研究を行った。本研究は、ヘルシンキ宣言および Good Clinical Practice の原則に則って実施され、北海道大学病院の倫理審査委員会の承認を得た(承認番号: 17-0327)。患者のデータはプライバシーに配慮し、厳重に保護された。患者に関する臨床データは全て電子カルテから抽出を行った。SScは、LeRoy らの分類(LeRoy et al., 1988)と Tanaka's criteria of mixed connective tissue disease(Tanaka et al., 2020)に従って、diffuse cutaneous, limited cutaneous, mixed type の3つのサブセットに分けられた。本研究では、第6回 WSPH にて提唱された基準(Simonneau et al., 2019)に則り、mPAPが20mmHg以上である患者をPHと定義した。

5.3.2 RHC および臨床評価

RHCは、バルーン付きの7.0F熱希釈カテーテル(Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)を用いて、内頸静脈または大腿静脈から行った。肺血管抵抗(PVR)は以下のようにして測定した。 $PVR = (mPAP - PAWP) / CO$ (心拍出量)。COは熱希釈法で測定した。

5.3.3 経胸壁心エコー図 (TTE)

市販の超音波診断装置 (Aplio XG / Artida, Canon Medical Systems, Otawara, Japan; Vivid E9, GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA; iE33, Philips Medical Systems, Andover, Massachusetts, USA; Prosound F-75, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) を用いて、左腹臥位で行った(Lang et al., 2015; Nagueh et al., 2016)。

5.3.4 心臓磁気共鳴画像 (MRI) の撮像と解析

心臓 MRI は、心臓用 5 チャンネルフェーズドアレイコイルを搭載した 1.5T スキャナ (Achieva ; Philips Medical Systems, Best, The Netherlands) を用いて、吸気時に最大 10 秒間の息止めをして撮像を行った。心電図を用いたシネ画像は、定常自由歳差運動パルスシーケンスを用いて、息止めを繰り返しながら撮像を行った。シネ画像の撮像パラメーターは、視野 (FOV): 380mm、繰り返し時間 / エコー時間 : 2.8 / 1.38ms、撮像マトリックス : 192×256 ピクセル、スライス厚 : 10mm、フリップアングル : 60deg、1 心周期あたりのフェーズ数 : 20 であった。ガドリニウム造影心臓 MRI は、0.1 mmol/kg のガドリニウムジエチレントリアミン五酢酸 (マグネビスト, バイエル薬品, 大阪, 日本) またはガドブトロール (ガドビスト, バイエル薬品, 大阪, 日本) を静脈内投与して行った。注入から 10 分後に、脂肪飽和を伴う反転-回復準備された 3 次元高速フィールドエコーパルスシーケンスを用いて遅延強調画像を得た。最適な反転時間を選択し、Look-Locker シーケンスを用いて正常心筋からの信号を無効にした。総スキャン時間は約 40 分であった。

MRI 画像は市販のソフトウェア (Extended MR Workspace, Philips Medical Systems, Best, The Netherland) で解析した。遅延増強の有無は目視で確認した。

5.3.5 左心疾患合併の定義

駆出率の低下した心不全 (HF_rEF) と中途半端な駆出率の心不全 (HF_{mr}EF) は、TTE で測定した左心室駆出率 (LVEF) がそれぞれ 40%未満と 40~50%と定義した (Writing Committee et al., 2013)。HF_pEF は、第 6 回 WSPH の recommendation (Vachriery et al., 2019) およびフラミンガム基準 (McKee et al., 1971) に従って評価した。第 6 回 WSPH の recommendation では、年齢、代謝性/心血管合併症、心臓手術の既往、心電図、TTE、心臓 MRI の異常などの評価項目に基づいて、HF_pEF の確からしさを low、intermediate、high にグループ分けした。第 6 回 WSPH の recommendation で評価項目に含まれていた心肺運動負荷試験は本研究では実施していない。HE_pEF の確からしさと RHC で測定された PAWP を組み合わせ、PAWP が 13mmHg 以上の患者を以下の 4 つのグループに分類した。

「precapillary PH」(PAWP が 13~15mmHg で、HF_pEF の確からしさが low)「HF_pEF not excluded」(PAWP が 13~15mmHg で、HF_pEF の確からしさが intermediate または high)、「HF_pEF likely」(PAWP が 15mmHg 以上で、HF_pEF の確からしさが low)、「HF_pEF confirmed」(PAWP が 15mmHg 以上で、HF_pEF の確からしさが intermediate または high) の 4 つのグループに分けた。なお、HF_pEF は、心不全

の兆候や症状があり、フラミンガム基準で LVEF が 50%以上であることから臨床的に定義された。

5.3.6 統計解析

連続変数は中央値[四分位]で表し、Man-Whitney U 検定を用いて比較した。カテゴリ変数は数 (%) で表し、カイ二乗検定を用いて比較した。多変量解析では、単変量解析で 2 つ以上の利尿薬の必要性に有意な危険因子について、前方ステップワイズ法を採用した。HFpEF の合併症を検出するための各臨床パラメーターの予測値は、ROC (receiver operator characteristic) 曲線を用いて評価した。カットオフ値は、ROC 曲線を用いて 70%以上の感度で Youden Index を最大化するように定義した。これらのパラメーターのスクリーニング性能は、ROC 曲線下面積 (AUC), 感度, 特異度で表した。すべての解析は、JMP Pro ソフトウェア (ver.14.0 ; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて行った。

5.4 結果

5.4.1 患者背景

本研究は 76 名の SSc 患者を対象として行われ、そのうち 42 名は左心室駆出率が正常 ($\geq 50\%$) で PH (mPAP >20 mmHg) を有していた。登録された患者の特徴を表 3、表 4、表 5、表 6、表 7、表 8 にまとめた。特に、間質性肺疾患、胃食道逆流症、Raynaud 現象の合併が多く認められた。

表 3. 患者背景(年齢・性別・自己抗体・病型等)

	All patients (N = 76)	Patients with PH (N = 43)	Patients without PH (N = 33)	P value
Age at initial RHC, years	63.5 [50.3-70.0]	60.0 [48.5-70.0]	65.0 [32.0-80.0]	0.44
Sex female	64 (84.2%)	37 (86.0%)	26 (78.7%)	0.34
Height, m	1.55 [1.48-1.61]	1.56 [1.50-1.60]	154.6 [139-179.3]	0.72
Weight, kg	49.7 [43.1-58.6]	50.9 [45.5-61.2]	47.1 [35.7-71.9]	0.05
BMI, kg/m²	20.8 [18.5-23.5]	21.6 [19.5-24.6]	20.0 [15.8-28.9]	0.03
Antibodies				
Anti-Scl-70	20 (26.3%)	6 (14.0%)	14 (42.4%)	0.0081
Anti-U1-RNP	24 (31.6%)	17 (39.5%)	7 (21.2%)	0.13
Anti-Centromere	24 (31.6%)	14 (32.6%)	10 (30.3%)	0.99
Anti-RNA polymerase III	1 (0.02%)	1 (0.03%)	0 (0.0%)	0.99
Disease subtype				
dcSSc	29 (38.2%)	12 (27.9%)	17 (51.5%)	0.05
lcSSc	22 (28.9%)	11 (25.6%)	11 (33.3%)	0.61
Mixed	25 (32.9%)	20 (46.5%)	5 (15.1%)	0.006

値は n (%) または中央値 (四分位範囲) で示した。P 値は Mann-Whitney U-test に
より算出した。

表 4. 患者背景(臓器合併症・併存症・血液検査)

Organ involvement				
Interstitial lung disease	60 (78.9%)	33 (76.7%)	27 (81.8%)	0.77
Renal crisis	6 (7.90%)	2 (4.70%)	4 (12.1%)	0.39
GERD	63 (82.9%)	37 (86.0%)	26 (78.7%)	0.54
Raynaud`s phenomenon	70 (92.1%)	39 (90.7%)	31 (93.9%)	0.69
Digital ulcer	31 (40.7%)	15 (34.8%)	16 (48.4%)	0.24
PVOD	4 (5.30%)	4 (9.30%)	0 (0.0%)	0.12
Complications				
Hypertension	25 (32.9%)	12 (27.9%)	12 (36.3%)	0.61
Dyslipidemia	25(32.9%)	13 (30.2%)	11 (33.3%)	0.99
Obesity	13 (17.1%)	11 (25.6%)	2 (6.06%)	0.03
Diabetes mellitus	18 (23.7%)	10 (23.3%)	8 (24.2%)	0.99
Atrial fibrillation	18 (23.7%)	9 (20.9%)	9 (27.2%)	0.59
Laboratory Data				
BNP (pg/dl)	52.2 [8.6-13.7x10 ³]	58.9 [8.6-1.25x10 ³]	49.0 [10.9-13.7x10 ³]	0.47
UA (mg/dl)	5.20 [2.20-13.1]	5.30 [2.20-13.1]	4.6 [2.3-7.8]	0.10
Serum creatinine (mg/dl)	0.64 [0.4-7.08]	0.61 [0.4-1.9]	0.66 [0.4-7.08]	0.29
Estimated GFR (ml/min)	75.2 [6.8-138.9]	74.8 [22.9-123.5]	75.4 [6.8-138.9]	0.79

値は n(%) または中央値 (四分位範囲) で示した。P 値は Mann-Whitney U-test により算出した。

表 5. 患者背景(心電図・呼吸機能検査)

ECG				
Right axis deviation	10 (13.2%)	9 (20.9%)	1 (3.03%)	0.03
Atrial fibrillation	18 (23.7%)	9 (20.9%)	9 (27.2%)	0.59
LBBB	11 (14.5%)	5 (11.6%)	6 (18.1%)	0.51
RBBB	5 (6.6%)	3 (7.0%)	2 (6.06%)	0.99
LVH	9 (11.8%)	3 (7.0%)	6 (18.1%)	0.16
RVH	10 (13.2%)	9 (20.9%)	1 (3.03%)	0.03
AVB, SAB	4 (5.3%)	1 (2.3%)	3 (9.09%)	0.31
Spirometry				
VC (L)	2.17 [1-5.32]	2.23 [1.03-4.35]	2.16 [1.00-5.32]	0.65
%VC	83.1 [30.1-147.6]	81.4 [30.1-147.6]	86 [43.2-120.3]	0.41
FVC (L)	2.16 [0.9-5.53]	2.23 [1.02-4.36]	2.15 [0.9-5.53]	0.55
%FVC	85.2 [24.2-150]	81.4 [24.2-150]	91.4 [42.2-123.5]	0.25
TV	0.6 [0.23-1.11]	0.63 [0.23-1.07]	0.55 [0.25-1.11]	0.17
FEV1.0	1.71 [0.8-4.26]	1.6 [0.83-3.53]	1.80 [0.8-4.26]	0.15
FEV1.0/FVC	80.9 [51.6-98.7]	79.3 [51.6-98.7]	82.6 [59.3-97.8]	0.18
DLco (%)	44.9 [10.0-105.8]	31.8 [10.1-78.1]	57.7 [22.9-105.8]	<0.0001
DLco/VA (%)	55.5 [12.6-165]	48.2 [12.6-99.0]	64.2 [28.4-165.0]	0.0001
FVC/DLco	1.73 [0.63-7.71]	2.98 [1.30-7.71]	1.52 [0.63-4.17]	<0.0001

値は n (%) または中央値 (四分位範囲) で示した。P 値は Mann-Whitney U-test により算出した。

表 6. 患者背景(RHC)

RHC					
mPAP (mmHg)	24 [9-65]		36 [21-65]	16 [9-20]	<0.0001
PAWP (mmHg)	8 [2-26]		8 [2-26]	7 [2-12]	0.03
PVR (Wood Unit)	3.60 [0.98-19.3]		5.81 [2.43-19.3]	2.01 [0.98-3.78]	<0.0001
sPAP (mmHg)	37 [16-105]		55 [33-105]	27 [16-37]	<0.0001
dPAP (mmHg)	14 [4-50]		22 [7-50]	8 [4-15]	<0.0001
CO (L/min)	4.02 [2.27-6.59]		4.00 [2.27-6.59]	4.11 [2.82-6.44]	0.27
CI (L/min/m²)	2.70 [1.59-4.37]		2.57 [1.59-4.37]	2.97 [1.99-4.03]	0.01
RAP (mmHg)	4 [-1-19]		5 [0-13]	3 [-1-19]	0.02
SvO₂ (%)	73.0 [41.0-81.0]		71.5 [41.0-81.0]	74.1 [53.3-79.4]	0.02

値は n(%) または中央値 (四分位範囲) で示した。P 値は Mann-Whitney U-test により算出した。

表 7. 患者背景(TTE)

TTE				
ePASP (mmHg)	44.0 [20.0-117]	55.0 [20.0-117]	36.5 [21.0-60.0]	<0.0001
TRV (m/s)	3.12 [1.94-5.29]	3.54 [1.94-5.29]	2.80 [2.00-3.70]	<0.0001
LAD (mm)	34.0 [20.0-72.5]	35.0 [20.0-54.0]	33.0 [27.0-72.5]	0.76
LVEF (%)	66.0 [33.0-84.0]	62.5 [35.3-84.0]	66.0 [33.0-75.0]	0.82
LAVI (ml/m²)	33.5 [17.2-80.8]	30 [17.2-80.8]	36.1 [21.4-73.2]	0.15
E (cm/s)	67 [34.0-118.6]	73 [34.0-105.6]	77.6 [44.9-118.6]	0.0003
E/A	0.87 [0.47-4.48]	0.82 [0.50-1.53]	0.97 [0.47-4.48]	0.028
DcT (s)	199 [108-356]	190 [108-356]	200 [113-317]	0.43
e`sep (cm/s)	7.3 [2.5-14.2]	6.7 [2.5-12.7]	8.95 [2.70-14.2]	0.061
e`lat (cm/s)	9.6 [4.4-17.5]	9.25 [4.5-14.5]	10.25 [4.4-17.5]	0.26
E/e'	7.80 [4.00-30.0]	7.80 [4.00-18.9]	7.75 [4.90-30.0]	0.62

値は n(%) または中央値 (四分位範囲) で示した。P 値は Mann-Whitney U-test により算出した。

表 8. 患者背景(心臓 MRI・WHO 機能分類)

Cardiac MRI				
LVEDVI (ml/m²)	58.1 [32.6-97.1]	56.0 [32.6-93.5]	61.4 [37.5-97.1]	0.03
LV mass Index (g/m²)	45.5 [13.4-84.7]	48.8 [24.2-84.7]	44.2 [13.4-81.1]	0.27
LVEF (%)	62.6 [25.8-84.3]	61.9 [44.6-84.3]	64.3 [25.8-80.8]	0.45
LVAWT (mm)	8.65 [4.70-27.9]	8.65 [4.70-27.9]	8.5 [4.7-14.8]	0.63
RVEF (%)	46.0 [18.9-67.5]	42.4 [19.0-63.2]	55.4 [18.9-67.5]	<0.0001
RVEDVI (ml/m²)	76.4 [35.3-172]	92.8 [39.0-172]	58.1 [35.3-112.0]	<0.0001
Delayed enhancement	12 (15.8%)	5 (11.6%)	7 (21.2%)	0.34
WHO-FC				
I		1 (2.30%)		
II		3 (6.98%)		
III		24 (55.8%)		
IV		15 (34.9%)		

値は n(%) または中央値 (四分位範囲) で示した。P 値は Mann-Whitney U-test により算出した。

5.4.2 SSc および PH 患者における HFrEF, HEmrEF, HFpEF の評価

まず、SSc と PH の患者を対象に、HFrEF, HEmrEF, HFpEF を含む LHD を評価した (図 3)。SSc で mPAP が 20mmHg 以上の患者 43 人のうち、LVEF が低下した HFrEF は 1 人 (36%) だったが、他の 42 人は LVEF が正常 (50%以上) だった。SSc+PH+LVEF 正常の 42 人のうち、第 6 回 WSPH の recommendation を適用すると、HFpEF の確からしきは 10 名が high、32 名が intermediate と判定され、low と判定された患者はいなかった(Vachieri et al., 2019)。特筆すべきは、次の段階に進んで PAWP を評価しさらにグループ分けを行ったところ、「HFpEF not excluded」群、「HFpEF likely」群、「HFpEF confirmed」群に分類された患者は、それぞれ 4 人、0 人、3 人のみに留まったことである。これらの違いは、HFpEF の確からしさが intermediate または high であるにもかかわらず、PAWP が比較的低かった (13mmHg 未満) ことに起因していると考えられ、SSc や PH の患者では PAWP がそれ単独では PH 患者における左心疾患の要素の検出に適さない可能性が示唆された。反対に、フラミンガム基準(McKee et al., 1971)に基づいて HFpEF と臨床的に診断された患者は 10 人であった。

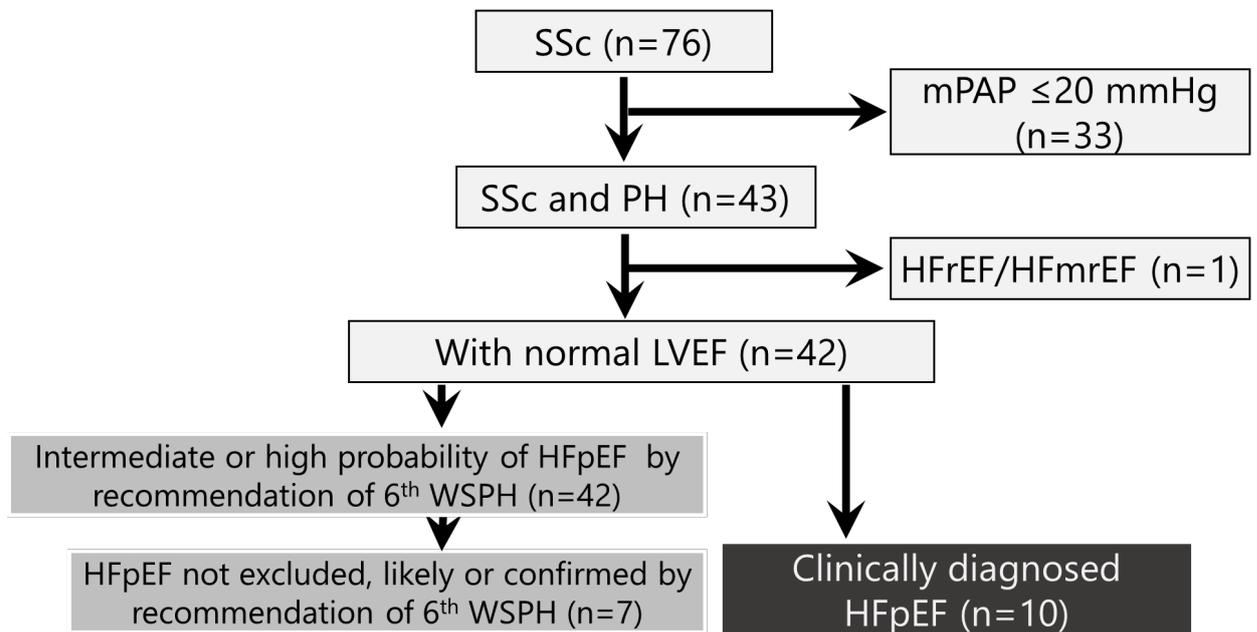


図 3. 本研究に登録された患者の左心疾患の評価

強皮症患者 76 人のうち、43 人が $mPAP > 20 \text{ mmHg}$ であり、PH を有していた。うち 1 名は EF が低下していたため、除外され、残りの 42 名で検討を行った。

この 42 人中第 6 回 WSOH での基準を用いた場合は合計 7 人が「HFpEF not excluded」、「HFpEF likely」、「HFpEF confirmed」のいずれかに該当したが、フラミンガム基準を用いて臨床的に HFpEF と診断された患者は 10 人であった。

5.4.3 SSc+PH+HFpEF 患者と SSc+PH で HFpEF を合併しない患者における臨床的評価項目の比較

次に、RHC, TTE, 心臓MRIの所見を含む臨床パラメーターを、フラミンガム基準(McKee et al., 1971)による SSc+PH+HFpEF 患者 (HFpEF 群、n=10) と、HFpEF を有しない SSc+PH 患者 (非 HFpEF 群、n=32) で比較した (表 9、表 10、表 11、表 12、表 13)。表 9 に示したように、SSc と PH の患者では、SSc のサブセットと強皮症関連自己抗体のいずれも HFpEF の合併には関係しなかった。また、女性よりも男性の方が、HFpEF を合併する頻度が高い傾向にあった。なお、RHC のいずれの所見も両群間で統計的に有意差を認めたパラメーターはなかった。PAWP の中央値 (範囲) は、HFpEF 群が 10 [5-24]、非 HFpEF 群が 8 [2-26]mmHg であった ($p=0.24$)。TTE 所見では、HFpEF 群は非 HFpEF 群に比べて左心房径が大きく、LVEF が低かったが、統計的に有意であった ($p=0.007$)。心臓MRIのパラメータのうち、LVEDVI と LVMI は、HFpEF 群において非 HFpEF 群に比べて統計的に有意に高かった($p=0.004, 0.013$)。また、遅延ガドリニウム造影検査での心筋の遅延造影効果は、HFpEF 群が非 HFpEF 群よりも多く見られた。動脈性高血圧と糖尿病は、LHD や HFpEF を含む血管系疾患とよく相関するため、その有病率を比較した。しかし、今回の研究では、これらの合併症は LHD や HFpEF とは明らかな関連を認めなかった。

表 9. HFpEF 患者と非患者における臨床パラメーターの比較(年齢・自己抗体等)

	PH with HFpEF (N = 10)	PH without HFpEF (N = 32)	P value
Age at initial RHC, years	66 [34-82]	59 [29-78]	0.22
Sex female	7 (70.0%)	30 (93.8%)	0.043
Height, m	155.6 [145.2-171.2]	154.7 [139.7-168.6]	0.80
Weight, kg	53.0 [37.3-77.5]	50.7 [28.0-95.1]	0.87
BMI, kg/m²	20.6 [14.8-35.2]	22.1 [13.4-35.3]	0.46
Antibodies			
Anti-Scl-70	1 (10.0%)	5 (15.6%)	0.66
Anti-U1-RNP	3 (30.0%)	14 (43.8%)	0.44
Anti- Centromere	4 (40.0%)	9 (28.1%)	0.48
Anti-RNA polymerase III	0 (0.0%)	1 (0.31%)	0.57
Disease subtype			
dcSSc	4 (40.0%)	8(25.0%)	0.36
lcSSc	2 (20.0%)	9 (28.1%)	0.61
Mixed	4 (40.0%)	16 (50.0%)	0.58

値は n(%) または中央値 (四分位範囲) で示した。P 値は Mann-Whitney U-test に
より算出した。

表 10. HFpEF 患者と非患者における臨床パラメーターの比較 (臓器合併症等)

Organ involvement			
Interstitial lung disease	9 (90.0%)	24 (75.0%)	0.31
Renal crisis	1 (10.0%)	1 (0.31%)	0.37
GERD	8 (80.0%)	28 (87.5%)	0.55
Raynaud's phenomenon	10 (100.0%)	28 (87.5%)	0.24
Digital ulcer	5 (50.0%)	10 (30.3%)	0.28
PVOD	1 (10.0%)	3 (9.38%)	0.95
Complications			
Hypertension	5 (50.0%)	7 (21.9%)	0.049
Dyslipidemia	2 (20.0%)	10 (31.3%)	0.59
Obesity	2 (20.0%)	9 (28.1%)	0.72
Diabetes mellitus	2 (20.0%)	8 (25.0%)	0.86
Atrial fibrillation	6 (60.0%)	3 (9.38%)	0.0007
Laboratory Data			
BNP (pg/dl)	133.5 [9.6-448.7]	44.1 [8.6-1254.1]	0.29
UA (mg/dl)	538 [3.8-10.9]	5.3 [2.2-8.2]	0.31

値は n (%) または中央値 (四分位範囲) で示した。P 値は Mann-Whitney U-test により算出した。

表 11. HFpEF 患者と非患者における臨床パラメーターの比較 (ECG・PFT 等)

ECG			
Right axis deviation	4 (40.0%)	5 (15.6%)	0.10
LBBB	2 (20.0%)	3 (9.38%)	0.36
RBBB	1 (10.0%)	2 (6.25%)	0.68
LVH	1 (10.0%)	1 (0.31%)	0.37
RVH	2 (20.0%)	6 (18.8%)	0.93
AVB, SAB	1 (10.0%)	0 (0.0%)	0.07
Spirometry			
VC (L)	2.13 [1.33-4.35]	2.31 [1.03-4.29]	0.74
%VC	80.65 [55.2-102.2]	81.4 [30.1-147.6]	0.65
FVC (L)	1.99 [1.29-4.36]	2.26 [1.02-4.27]	0.74
%FVC	79.2 [48.0-106.8]	81.4 [24.2-149.5]	0.79
TV	0.62 [0.23-0.82]	0.66 [0.24-1.07]	0.45
FEV1.0	1.49 [1.01-3.53]	1.66 [0.83-3.06]	0.70
FEV1.0/FVC	79.1 [68.6-87.9]	79.9 [51.6-98.7]	0.76
DLco (%)	29.8 [15.5-78.1]	39.1 [10.1-70.8]	0.69
DLco/VA (%)	46.5 [25.7-74.4]	51.2 [12.6-99.0]	0.61
FVC/DLco	2.52 [1.32-4.16]	2.39 [1.3-7.71]	0.55

値は n(%) または中央値 (四分位範囲) で示した。P 値は Mann-Whitney U-test により算出した。

表 12. HFpEF 患者と非患者における臨床パラメーターの比較 (RHC)

RHC			
mPAP (mmHg)	33.0 [24.0–46.0]	37.5 [21.0–65.0]	0.50
PAWP (mmHg)	10.0 [5.00-24.0]	8.00 [2.00-26]	0.24
PVR (Wood Unit)	5.13 [2.73-12.9]	6.13 [2.43-19.3]	0.21
sPAP (mmHg)	50.0 [35.0-85.0]	56.0 [33.0-105]	0.63
dPAP (mmHg)	21.0 [10.0-32.0]	22.0 [7.00-50.0]	0.91
CO (L/min)	4.26 [2.81-6.59]	3.97 [2.27-6.00]	0.73
CI (L/min/m²)	2.68 [1.90-4.37]	2.56 [1.59-3.87]	0.71
RAP (mmHg)	5.50 [1.00-10.0]	4.00 [0.00-13.0]	0.36
SvO₂ (%)	69.0 [46.0-79.0]	72.0 [41.0-81.0]	0.42

値は n (%) または中央値 (四分位範囲) で示した。P 値は Mann-Whitney U-test により算出した。

表 13. HFpEF 患者と非患者における臨床パラメーターの比較 (TTE・心臓 MRI)

TTE			
ePASP (mmHg)	51.0 [30.0-85.0]	58.0 [20.0-117]	0.32
TRV (m/s)	3.39 [2.50- 4.47]	3.64 [1.94- 5.29]	0.32
LAD (mm)	42.5 [29.0-54.0]	34.0 [20.0-43.4]	0.007
LVEF (%)	57.0 [56.0-60.0]	68.0 [55.0-84.0]	0.003
LAVI (ml/m²)	43.2 [17.2-80.8]	29.5 [18.0-47.4]	0.36
E (cm/s)	58.9 [40.5-86.9]	58.7 [34.0-105.6]	0.95
E/A	0.66 [0.51-1.28]	0.82[0.50-1.53]	0.37
DcT (s)	220 [156-260]	187 [108-356]	0.13
e`sep (cm/s)	7.1 [2.5-10.9]	6.6 [3.9-12.7]	0.64
e`lat (cm/s)	9.25 [4.5-14.5]	9.6 [5.2-12.5]	0.99
E/e'	7.45 [6.20-12.7]	8.00 [4.00-18.9]	0.84
Cardiac MRI			
LVEDVI (ml/m²)	72.4 [40.0-93.5]	52.3 [32.6-79.2]	0.004
LV mass Index (g/m²)	60.1 [40.1-84.7]	43.6 [24.2-83.1]	0.013
LVEF (%)	59.8 [47.5-84.3]	62.9 [44.6-82.3]	0.27
LVAWT (mm)	9.00 [6.00-27.9]	8.60 [4.70-13.4]	0.52
RVEF (%)	46.2 [29.4-50.8]	42.4 [19-63.2]	0.39
RVEDVI (ml/m²)	94.0 [61.5-172]	91.8 [39.0-172]	0.78
Delayed enhancement	3 (42.9%)	2 (7.69%)	0.021

値は n (%) または中央値 (四分位範囲) で示した。P 値は Mann-Whitney U-test により算出した。

4.4.4 PAWP, LAD, LVEDVI による HFpEF の合併検出のための予測値

最後に ROC 曲線を用いて、PAWP、左房径 (LAD)、LVEDVI (左室拡張末期容積係数) による HFpEF の合併を検出するための予測値を評価した。その結果、PAWP ($p=0.09$, $AUC=0.63$) よりも、LAD ($p=0.002$, $AUC=0.78$) と LVEDVI ($p=0.001$, $AUC=0.81$) において予測における有用性が示唆され (図 4)、SSc+PH+HFpEF 患者では PAWP の上昇が限定的であり、左心疾患の存在を評価するには不十分である可能性が示された。また、ロジスティック回帰分析により、LAD と LVEDVI において、HFpEF 合併を検出するための予測値を表 14 に示した。LAD 42 mm 以上 (OR [95%CI] = 14.5 [2.55-82.2], $p = 0.003$) と LVEDVI 57.1 ml/m² 以上 (OR [95%CI] = 18.6 [2.02-171.0], $p = 0.01$) は高い予測値を示した。これらのカットオフレベルは ROC 曲線で決定された (図 4)。年齢と性別を調整しても、LAD ≥ 42 mm (OR [95%CI] = 12.7 [1.93-83.4], $p = 0.008$) と LVEDVI ≥ 57.1 ml/m² (OR [95%CI] = 20.0 [1.83-218.0], $p = 0.014$) の HFpEF 合併を検出するための予測値は、統計的な有意性を保っていた。

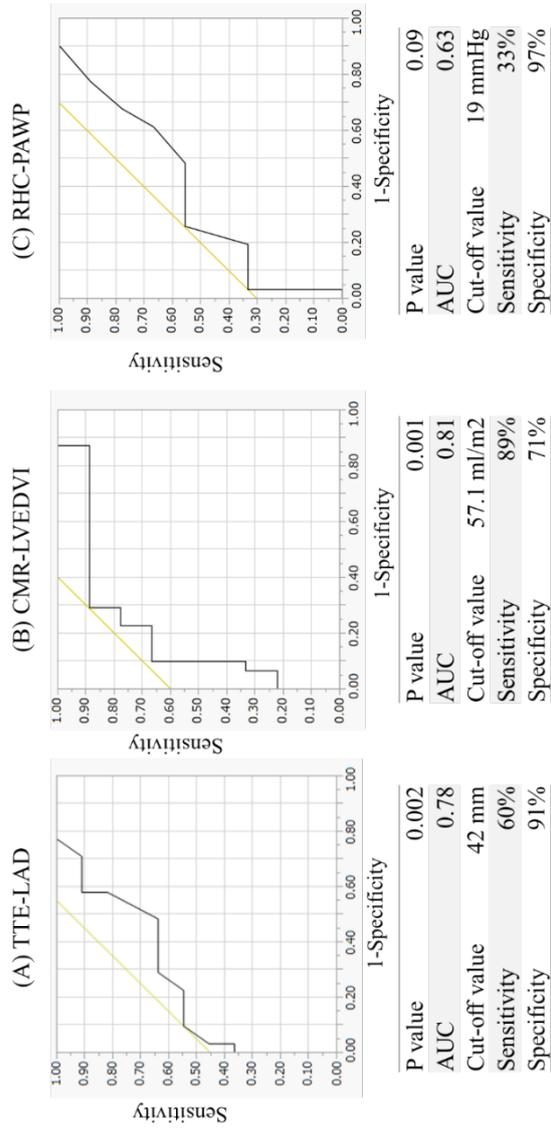


図 4. HFpEF 合併を検出するための LAD、LVEDVI および PAWP の予測値

ROC 曲線を用いて、PAWP、LAD、LVEDVI による HFpEF の合併を検出するための予測値を評価した。その結果、PAWP ($p = 0.09$, AUC = 0.63) よりも、LAD ($p = 0.002$, AUC = 0.78) と LVEDVI ($p = 0.001$, AUC = 0.81) において予測における有用性が示唆された。

表 14. HFpEF 合併を検出するための LAD、LVEDVI、PAWP の各予測値

Univariate analysis			
	Odds ratio	P-value	95%CI
LAD\geq42.2	14.5	0.003	2.55-82.2
LVEDVI\geq57.1	18.6	0.01	2.02-171.0
PAWP\geq19	15.5	0.026	1.36-175.0
Multivariate analysis			
	Odds ratio	P-value	95%CI
LAD\geq42.2	12.7	0.008	1.93-83.4
LVEDVI\geq57.1	20.0	0.014	1.83-218.0
PAWP\geq19	13.4	0.048	1.01-177.0

ロジスティック回帰分析により P 値を算出した。各パラメーターのカットオフレベルは ROC 曲線を用いて定義した (図 4 参照)。

LAD 42 mm 以上 (OR [95%CI] = 14.5 [2.55-82.2], p = 0.003) と LVEDVI 57.1 ml/m² 以上 (OR [95%CI] = 18.6 [2.02-171.0], p = 0.01) は HFpEF 合併例の検出に高い予測値を示した。

5.5 考察

SSc-PAH の大部分の患者では、肺動脈のリモデリングと収縮を特徴とする PAH のみならず、肺静脈症、LHD、間質性肺疾患がそれぞれ独立して、あるいは共働的に作用して右心不全の形成に関与していると考えられている(Kato et al., 2020)。第 6 回 WSPH では、"PAH with overt features of venous/capillaries involvement"(Simonneau et al., 2019)、"probability of LHD phenotype"(Vachier et al., 2019)、"chronic lung disease with severe PH"(Nathan et al., 2019)などの PH に関連する重要な概念がいくつか提示された。これらの概念は、多様な要因が複雑に絡み合っている PH の病態を病態別にアプローチしようと試みるものである。

我々は、PAWP による血行力学的なアプローチとは別に、TTE や心臓 MRI を用いた形態学的なアプローチが、SSc と PH を持つ患者の左心疾患スペクトラムの合併の予測に重要であることを示した。SSc+PH+HFpEF 患者の PAWP が、SSc ではない通常の 2 群 PH 患者よりも上昇しない理由としては、SSc 患者では非 SSc の 2 群 PH と比較して、肺動脈症や間質性肺疾患によって PVR が上昇していることからうっ血傾向になりづらく PAWP の上昇を来しにくいためと考えられる (図 5)。

このように SSc-PAH において心疾患の合併は通常的心疾患とは異なる機序により病態が形成されることから、臨床的な判断が難しい合併症であるが、SSc では潜在的な心筋障害が併存している患者が非常に多いことが知られている。SSc 患者を対象とした最近の研究では、心臓 MRI において 73%もの患者において心筋の炎症が検出されたと報告されている(Butt et al., 2019; Orlandi et al., 2020)。Fernandes らによる心内膜生検の研究(Fernandes et al., 2003)では、16 人の SSc 患者のうち 15 人 (94%) で心筋コラーゲンの異常沈着が認められたが、臨床症状として左右いずれかの心不全兆候は呈していなかった。また、ある剖検例を対象とした研究では、剖検された SSc 患者の 50%に肺の線維化が認められただけでなく、66%に心筋の線維化が認められた(Sandmeier et al., 2015)。また、心内膜生検から分離した右心室筋の筋線維を検体として用いた別の研究では、SSc-PAH 患者の心筋の筋線維では収縮力の低下とカルシウム感受性の異常が認められたが、特発性 PAH では収縮力が反対に亢進していることが明らかになった(Hsu et al., 2018)。SSc の心筋線維化は、構造的な血管疾患を伴っているか否かにかかわらず、血管の攣縮や微小循環の異常による局所的な虚血が繰り返された後に緩徐に進行していくと考えられている(Meune et al., 2010)。同様に、単光子放出型コンピュータ断層撮影法 (SPECT) を用いた研究では、SSc 患者においては冠動脈

の分布とは無関係な心筋灌流障害が認められ、血管拡張剤の投与後に一部の灌流障害が回復すると報告されている(Kahan and Allanore, 2006)。また、TTE や心臓 MRI で検出される無症候性の左室拡張機能障害は、HFpEF の前駆段階と考えられ、SSc 患者の死亡リスクの増加に関連する(Faludi et al., 2014; Hachulla et al., 2009; Tennoe et al., 2018)。そのため、利尿剤などの心不全治療を併用することで効果が得られる可能性のある 2 群 PH や、そこまでには至らなくとも左心疾患の要素を持つ患者を層別化する必要性が高いと考えられる。

Bourji ら(Bourji et al., 2017)の研究では、TTE で評価した左心房拡大が、SSc-PAH 患者における PAWP \leq 15mmHg と PAWP $>$ 15mmHg (HFpEF) の患者の鑑別に有用な評価項目であることが示されている。今回の我々の研究における結果はこれらの報告とも矛盾せず、さらに PAWP が 15mmHg 以下の SSc 患者においても左心房径が潜在的な左心疾患の要素を反映していることを示唆している。また、Lammi ら(Lammi et al., 2018)による最近の研究では、15mmHg をカットオフ値とする 1 回の PAWP 測定に依存した 2 群 PH の定義に対して問題提起がされており、彼らは、SSc に合併した PH 患者の約 30%において、時間の経過とともに PAWP の値が変化し、PH の分類が変化すること(例えば、1 または 3 群 PH から 2 群 PH へ、またはその逆への変化)を示した。特に、初回の RHC 後に肺血管拡張薬を開始した患者では、PAWP が有意に上昇し(11 \pm 5mmHg から 13 \pm 6mmHg)、PVR が PAWP に影響を与えているであろうという我々の仮説を支持する結果が示された(図 5)。

心臓 MRI は、潜在的な病変を検出すつ能力の高さから、近年、PAH 患者の評価のためのモダリティとして大きな注目を集めている(Abe et al., 2020; Alabed et al., 2020)。さらに、ガドリニウム造影剤を用いた遅延造影心臓 MRI は、SSc 患者における早期の心筋の病理組織学的変化の検出に有用であることが報告されている(Di Cesare et al., 2013; Tzelepis et al., 2007)。これらの既報での研究と同様に、本研究でも SSc に合併した PH 患者における HFpEF の合併の有無を検出するために心臓 MRI のパラメーターである LVEDVI および LV mass index が有用であることが示されており、その有用性を改めて実感するものとなった。

この研究にはいくつか **limitation** が存在し、以下に列挙する。まず、本研究は単一施設で実施された研究であることから、サンプルサイズが小さく、後方視的に観察を行っている。また、今回の研究では、潜在的な左心疾患の評価のために実施されることがある容量負荷試験と運動負荷試験は行っていない。

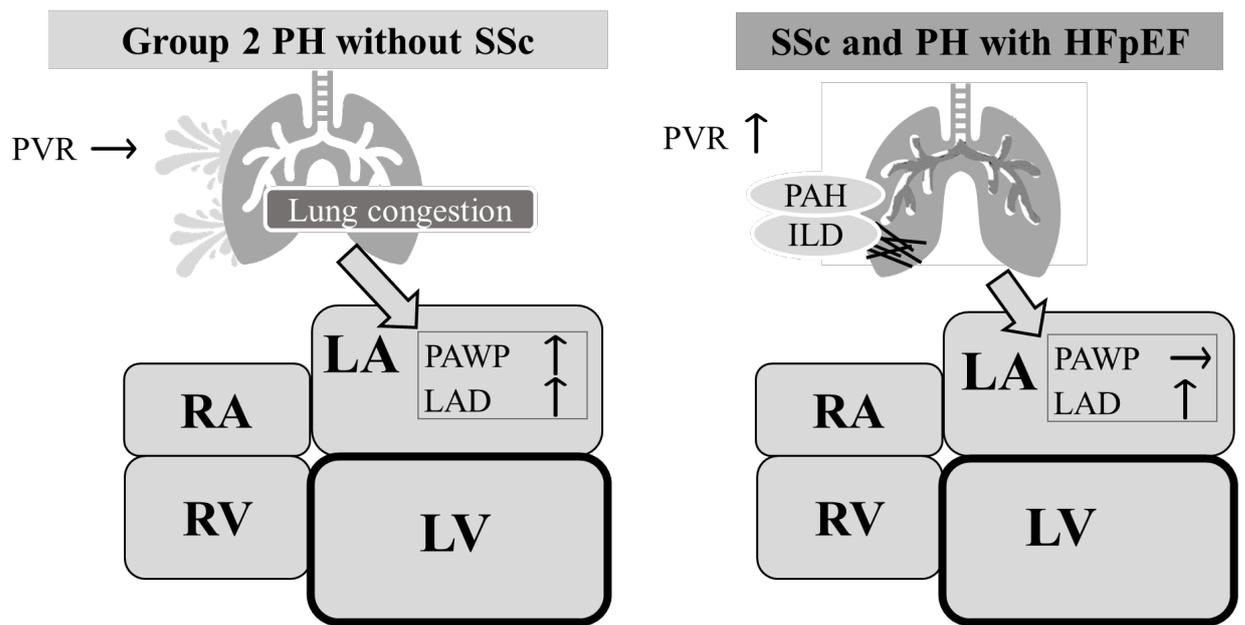


図 5. 一般的な 2 群 PH と SSc+PH+HFpEF における、肺血管抵抗 (PVR) と PAWP の関係の比較

一般的な 2 群 PH と SSc+PH+HFpEF の患者の病態の比較した場合、SSc+PH+HFpEF 患者の PAWP が、SSc ではない通常の 2 群 PH 患者よりも上昇しない理由としては、SSc 患者では非 SSc の 2 群 PH と比較して、肺動脈症や間質性肺疾患によって PVR が上昇していることからうっ血傾向になりづらく PAWP の上昇を来しにくいためと考えられる。

5.6 結語

結論として、SSc+PH+HFpEF の患者においては、一般的な 2 群 PH で認められるような PAWP の上昇は限定的であることが示唆された。PAWP に依存した評価は、SSc に合併した PH 患者においては、見落としにつながる可能性があり、PAWP による血行動態の評価に加えて、TTE と心臓 MRI による形態学的評価を行うことが重要であると考えられる。血行動態的なアプローチだけではなく、あらゆるモダリティを駆使した統合的なアプローチをとることで、この複雑な病態の核心に迫ることができる可能性が示唆される。

6. 第三章

関節リウマチの滑膜線維芽細胞における

JAK-STAT 経路による

オートファジー制御機序の解明

6.1 緒言

関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) は自己免疫性疾患の一つであり、関節滑膜の炎症に始まり、滑膜の肥厚・絨毛組織の増殖によって骨・軟骨を破壊する慢性多発性関節炎を特徴とする自己免疫疾患である(McInnes and Schett, 2011)。朝方に強い関節のこわばり、関節の疼痛や腫脹にはじまり、進行すると関節の変形、腱の損傷、関節脱臼、関節強直癒合などをきたす。骨破壊や関節破壊の進行により、関節の構造が不可逆的に変化すると、しばしば患者の activities of daily living (ADL)を著しく障害する(Klareskog et al., 2009; Maxwell and Singh, 2010)。RA の罹患頻度は 0.5~2.0%であり、男女比はおよそ 1:3 と女性に多く、好発年齢は 30-50 代であり、労働生産性にも大きく影響することから社会的にも重要な疾患の一つである。RA の発症率に人種差があることや家族内での発症が報告されており(Silman and Pearson, 2002)、遺伝学的素因が関係していると考えられてきた。

ゲノムワイド関連解析(genome-wide association study: GWAS)の結果では 100 以上の RA 疾患感受性遺伝子座位が特定されており(Okada et al., 2014)、この中でも Human leukocyte antigen (HLA)-DRB1 が特に強い関連を示しており、抗原提示が RA の病態形成に大きく関与することが示唆された。その他 CD28 などの T 細胞の活性化に必要な共刺激分子や PTPN22 など T 細胞内でシグナル伝達を行う分子、IFN- γ 、interleukin-6 (IL-6)などの炎症性サイトカイン、また、STAT4 や TYK2 など JAK-STAT 経路を構成する分子が疾患感受性遺伝子座位として同定されており(Okada et al., 2014)、これらが RA の病態を形作っていると考えられた。これらの遺伝的素因に加え、環境要因や遺伝子のエピジェネティックな修飾が RA の病態に関与していると考えられる(Klein and Gay, 2015)。環境要因としては喫煙(Smolen et al., 1996)、歯周病や腸内細菌叢の異常(Scher et al., 2016)が RA の発症に関連している。こうした環境要因を背景として、ヒストンのアセチル化、DNA のメチル化などの遺伝子のエピジェネティック修飾が加わることで滑膜線維芽細胞(synovial fibroblasts; SFs)や好中球を活性化され、RA の病態に関与していることが報告されている(Klein and Gay, 2015)。

RA の関節腫脹は滑膜の炎症性増殖を反映したもので、病理学的には SFs の腫瘍様の増殖と滑膜への炎症細胞浸潤がみられる(Smolen and Steiner, 2003)。最近、その SFs にもいくつかのサブタイプが存在することが示唆されており、RASFs のシングルセルトランスクリプトーム解析を行った研究では podoplanin, THY1 membrane glycoprotein and cadherin-11 を高発現し、CD34 陰性の SFs が炎症を起

こした滑膜の血管周囲に存在し、サイトカインの分泌などを行っていることが報告され、SFs の中でもいくつかのサブセットが存在することが報告されている (Mizoguchi et al., 2018)。

発症の機序としては RA に関連した抗原が樹状細胞、マクロファージや B 細胞などの抗原提示細胞 (antigen-presenting cells: APC) により Major histocompatibility complex class II (MHC class II) を介し T 細胞に抗原提示され免疫反応が起こると考えられている。また、B 細胞は形質細胞に分化しリウマチ因子 (rheumatoid factor: RF) や抗シトルリン化ペプチド抗体 (anti-citrullinated peptide antibodies: ACPA) などの自己抗体を含む抗体産生に関与し、自己抗体は免疫複合体を形成し補体や Fc レセプターの活性化を介して TNF- α 、IL-6、IL-1 などの炎症性サイトカインの産生を促進する (Volkov et al., 2020)。炎症性サイトカインにより活性化された SFs は腫瘍様に増殖し、炎症性サイトカイン、ケモカイン、matrix metalloproteinase (MMP)、receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) を産生し軟骨破壊や (Sabeh et al., 2010)、破骨細胞の分化および骨破壊を促進し (Bottini and Firestein, 2013)、RA の病態において中心的役割を担っている。

近年の RA の治療においては、こうした炎症性サイトカインやその受容体をターゲットとすることで、病態の制御において飛躍的な成果を上げることができているが、その詳細なメカニズムについては不明な部分も残されており、さらなる RA の病因・病態の解明が求められている。特に臨床においては、急速に関節破壊が進行する症例や、多剤抵抗性の治療難渋例、免疫抑制薬による副作用が強くでてしまい治療継続が困難な症例が依然として存在し、そうした症例の病態の解明はアンメッドニーズと考えられる。

RA の病態を究明するという目的で、我々はこれまで RA の病態へのオートファジーの役割に着目して研究を行ってきた。オートファジーは細胞内の分解システムの一つであり、細胞内の蛋白質やオルガネラを分解することによる細胞内浄化や、飢餓条件下での自己消化によるエネルギー供給を主な役割としている (図 6、7)。このオートファジーは関節リウマチ患者の SFs において亢進していることが示されている。 (Kato et al., 2014)

RA ではこの抗原提示によって ACPA が生成され、関節炎の発症に関与すると考えられており、中でも抗シトルリン化ビメンチン抗体はその陽性率が関節予後と相関する。 (Syversen et al., 2010) この ACPA の産生にはシトルリン化ペプチド自体は抗原として CD4 陽性 T 細胞に抗原提示される必要があるが、この抗原提示を行う細胞が RA 患者の SFs である可能性が示唆されている (Ireland and Unanue, 2011)。

過去の研究で我々はオートファジーが亢進していると HLA-DR を介したシト

ルリン化ペプチドの抗原提示が促進されることを示した(Sugawara et al., 2020)。このように、オートファジーは RA の発症に大きく影響するが、実際に RA の SFs においてどのような調整を受けて活性化または不活性化されているかは明らかとなっていない。

一方で、JAK-STAT 経路 (図 8) は近年 RA の治療標的として注目されてきた。サイトカインが受容体と相互作用すると JAK-STAT 経路を介して細胞内へシグナルの伝達を行うが (図 9)、それぞれのサイトカインの受容体はそれぞれ、特異的な JAK や STAT を活性化する (図 10)。(O'Shea et al., 2015)例えば、IFN α/β には JAK1 と Tyk2 が必要であり、IFN- γ のシグナル伝達には JAK1 と JAK2 が必要である。common γ c ファミリー (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15) は JAK3 とのみ関連している。(Hofmann and Kirsch, 2012) このように JAK は複数のサイトカインの受容体の構成要素となっていることから、JAK 阻害剤は広範囲にサイトカインのシグナルをブロックすることが可能であり、近年様々な炎症性疾患や自己免疫疾患の治療薬としその開発や疾患への適応が進んできている。(Jamilloux et al., 2019)

関節リウマチにおいては、Tofacitinib(Bergrath et al., 2017; Vieira et al., 2016)や Baricitinib(Ummarino, 2016), Peficitinib(Takeuchi et al., 2019; Tanaka et al., 2021), Upadacitinib(Kameda et al., 2021; Strand et al., 2019), Filgotinib などの各種 JAK 阻害薬が本邦では使用可能であり、バイオナীব症例だけでなく、TNF 不耐例などの難治例に対する臨床試験においても良好な結果を得ている。RA の SFs においてもマトリゲルで培養し増殖能を評価した研究や、migration assay で炎症局所への浸潤を模して評価した研究でもその増殖や炎症部位への遊走を抑制する効果が示されており、生態内での SFs の病的な挙動を抑制することがわかっている(Diller et al., 2019; Emori et al., 2020)。

さらに近年、この JAK-STAT 経路が慢性骨髄性白血病(Zhu et al., 2013)や全身性エリテマトーデス(Dong et al., 2015)、高安動脈炎(Chen et al., 2019)においてオートファジーの調節を行っている可能性が示唆された。しかし、関節リウマチにおいては、オートファジーと JAK-STAT 経路の関係は明らかになっておらず、この部分を明らかにすることで RA の病態の核心に近づけると考えられた。そこで、今回我々はオートファジーと JAK-STAT 経路がどのように関係しており、病態にどのように影響しているのかということについて研究を行うこととした。

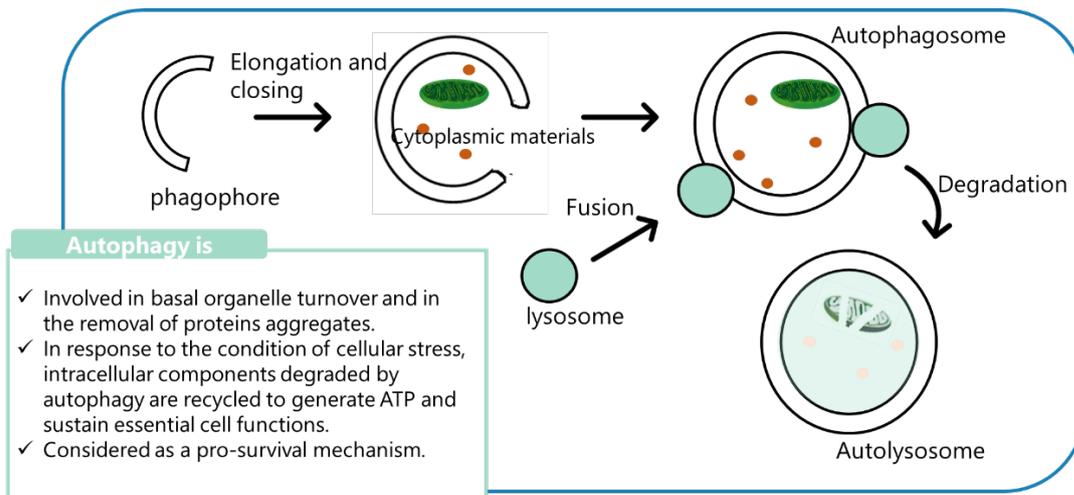


図 6.オートファジー概略図

オートファジーは細胞のストレス状態に応じて、細胞内のオルガネラのターンオーバーやタンパク質の凝集体の除去に関与している。隔離膜が伸長しながら、古くなったオルガネラやタンパク質をトラップし、オートファゴソームを形成する。オートファゴソームがさらにリソソームと融合することで、オートリソソームとなり、内容物を分解して ATP を生成することで細胞の必須機能を維持する。これらは主に生存のためのメカニズムと考えられている

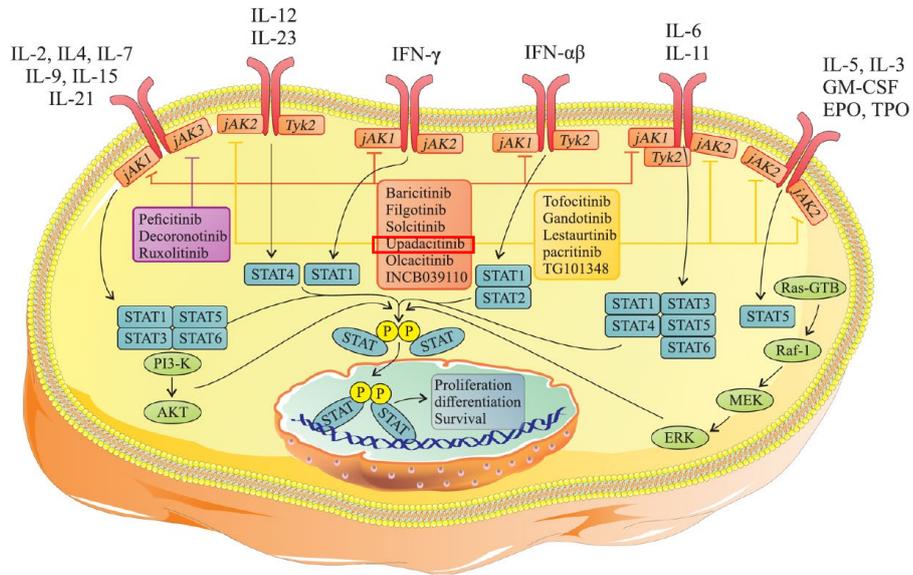


図 8. (Hosseini et al., 2020 より改変)

JAK 分子と STAT 分子の構造 JAK 分子は 4 つの機能ドメインを持つ。N 末端の FERM ドメイン、SH2 様ドメイン、SH2 様ドメイン、キナーゼ様シュードキナーゼドメイン (JH2)、C 末端のチロシンキナーゼドメイン (JH1) の 4 つの機能ドメインがある。FERM ドメインは触媒活性があり、JH2 ドメインは

JAK の触媒機能に関わっている。FERM ドメインは JAK キナーゼとサイトカイン受容体の特異的な結合に重要で、SH2 ドメインはサイトカイン受容体の結合と受容体の細胞表面への発現に必要な構造的特徴を有している。

STAT 分子の構造には、二量体-二量体の相互作用に必要な N-ドメイン、タンパク質の相互作用に必要な coiled-coil domain、DNA 結合ドメイン、リンカードメイン、受容体の結合と二量体化に必要な SH2 ドメインがある。

EPO: erythropoietin, FERM: Four-point-one protein, Ezrin, Radixin and Moesin, GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, IFN: interferon, IL: interleukin, JAK: Janus kinase, JH2: JAK homology 2, SH2: src homology 2, STAT: signal transduction and activation of transcription, TPO: thrombopoietin.

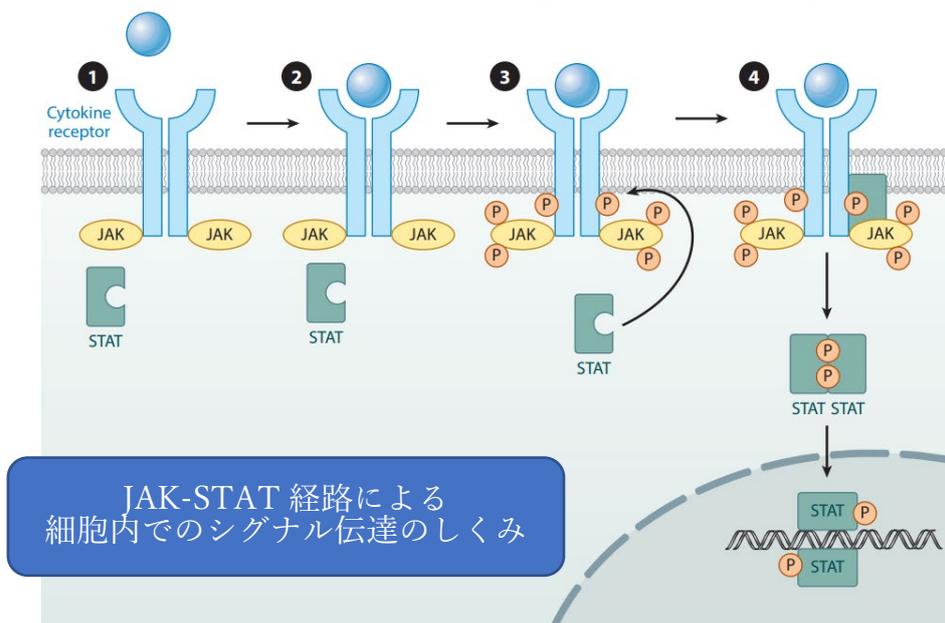


図 9. (O'Shea et al., 2015 より改変)

- (1) サイトカインが受容体に結合すると、JAK は活性化され、互いにリン酸化するとともに受容体の細胞内尾部をリン酸化する。
- (2) これにより、STAT のドッキング部位が形成され、STAT は受容体の細胞質ドメインに受容体の細胞質ドメインに結合できるようになる。
- (3) 次に、STAT がリン酸化されて活性化され、二量体化する。
- (4) STAT-STAT 二量体は、核に移動し、核内の DNA 直接結合して、遺伝子発現を制御する。

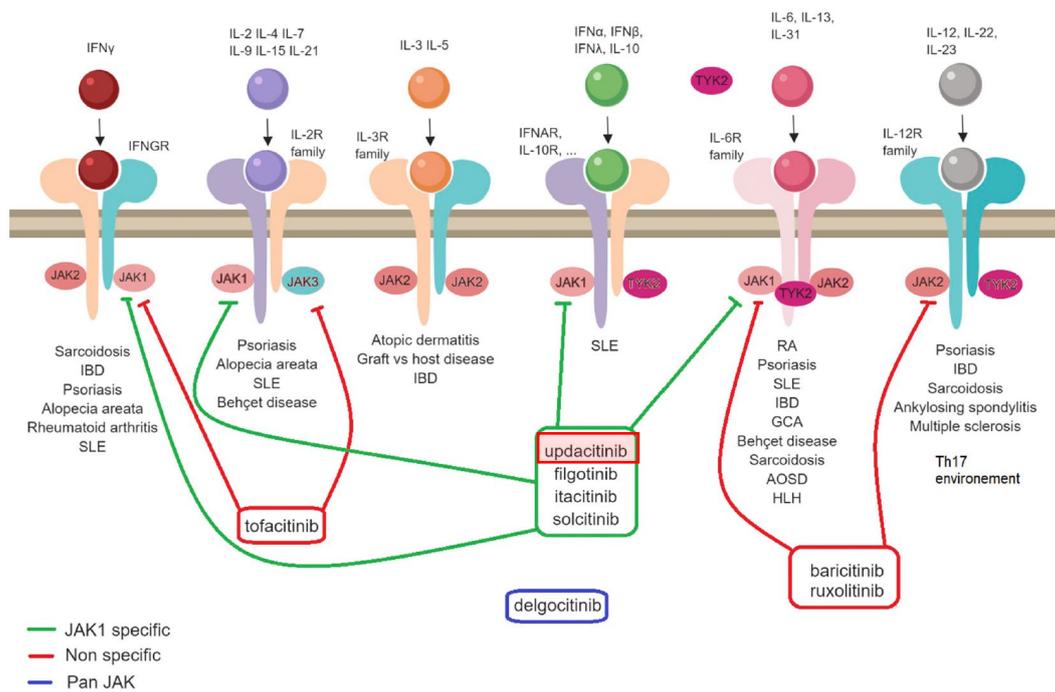


図 10. (Jamilloux et al., 2019 より改変)

JAK-STAT を介したサイトカインのシグナル伝達ネットワーク。各サイトカイン受容体は、細胞内の異なるプログラムを活性化するために、JAK/STAT の特定の組み合わせをリクルートする。

6.2 目的

今回我々は JAK 阻害薬を用いて SFs における JAK-STAT 経路によるオートファジー制御のメカニズムを解明することを目的に研究を行った。

6.3 材料と方法

6.3.1 対象患者

2015年4月から2021年4月までに北海道大学病院整形外科で人工関節置換術を施行された患者のうち、ヘルシンキ宣言に基づいた文書による同意と説明を得られた12名のRAおよびOAの患者を対象とした。すべてのRA患者は、American College of Rheumatology/Eurological Society (Aletaha et al., 2010) の基準に基づいて診断された。

本研究は北海道大学の倫理審査委員会 (Institutional Review Board : IRB) の承認の下で行った (承認番号 008-0103, 「関節リウマチの滑膜におけるシグナル分子発現およびバイオロジー解明に関する研究」)。

6.3.2 患者のサンプルと細胞の準備

RAおよびOA患者の関節置換手術で得られた滑膜組織から結合組織や脂肪を除去し、細かく切り刻み、分離し、5mg/mlのtypeIコラゲナーゼ (Sigma-Aldrich) を含んだHank's balanced salt solution (HBSS) に入れ、37°Cで2時間インキュベートを行った。その後、セルストレイナーに通して500G5分間で遠心分離を行ったのち、10%ウシ胎児血清 (FBS) ウシ胎児血清 (FBS、コスモバイオ社)、100IU/mLペニシリンおよび100μg/mLストレプトマイシン (Sigma-Aldrich) 含有Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM, Sigma-Aldrich) で培養した。すべてのSFsは4-8継代で実験に使用した。

6.3.3 Upadacitinib 濃度の条件検討

実験で使用するUpadacitinibの濃度を設定するため、濃度の条件検討を行った。4人のRA患者のSFsを使用し、T-75フラスコで培養したSFsを2mlのトリプシンで処理して剥がしたのち、10%非働化FBS含有IMDMを8ml加え、500G5分間で遠心を行った。上清を除去したのち、ペレットを1mlの10%非働化FBS含有IMDMに溶解させ、6well plate または96well plateに散布し、10%非働化FBS含有IMDMで培養を行った。6well plateで培養したSFsは、異なる濃度(1, 10, 50μM)のUpadacitinibで24時間培養し、無染色での観察とカルセイン染色を用

いた蛍光細胞染色法による観察を行った。また、96well plate で培養した SFs は、BrdU assay kit (Roche) を用いて、異なる濃度 (0, 1, 5, 10, 25, 50, 100 μ M) での Upadacitinib による細胞増殖の阻害効果を評価し、細胞増殖を抑制することのできる最低の濃度を今回の実験で使用していく最低の濃度とすることとした。

6.3.4 ウェスタンブロッティング法によるオートファジーの評価

T-75 フラスコで培養した 7 名の RA 患者の SFs を 2ml のトリプシンで処理して剥がしたのち、10%非働化 FBS 含有 IMDM を 8ml 加え、500G5 分間で遠心を行った。上清を除去したのち、ペレットを 1ml の 10%非働化 FBS 含有 IMDM に溶解させ、6well plate に散布し、10%非働化 FBS 含有 IMDM で培養を行った。

オートファジーを誘導するため SF は無血清培地を用いて回収の 2 時間前に飢餓状態にすることで飢餓刺激を与えた。また、SFs を活性化するサイトカイン (Zhang et al., 2019; Zhao et al., 2021) である IFN- γ (Biolegend) を 100 ng/mL で 24 時間刺激した。さらに、別経路でのオートファジー誘導による効果を確認するためプロテアソーム阻害剤 MG132 (Sigma-Aldrich) を 0~10 μ M 添加して 24 時間処理した。Upadacitinib で刺激する well には 10 μ M で添加し、刺激開始の 24 時間前から同濃度の Upadacitinib を加えた培地でプレトリートメントを行った。これらの刺激は各 well で各々組み合わせて行った。対照試料は、同量のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; Sigma-Aldrich) またはジメチルスルホキシド (DMSO; 同仁堂) で処理した。各々の well で刺激を行った後、PBS (Wako) で洗浄し、セルスクレイパーを用いて well plate を擦過した。SFs を含んだ PBS 500 μ l を 1.5ml のエッペンチューブに回収し、50G5 分間で遠心し、上澄みを除去した。ペレットに CellLytic M Cell lysis reagent (Sigma-Aldrich) を 20 μ l 添加し、15 分室温でインキュベートした。インキュベート後、15000G 10 分間で強遠心を行い、上澄みをライセートとして回収した。回収したライセートに Laemmli Buffer x4 (BioRad) を添加し、95 $^{\circ}$ C のヒートブロックで 5 分間加熱しサンプルを作成した。目的の蛋白に応じたアクリルアミドゲルを作成 (7.5%~15%) し、各レーンにアプライした。120V で 5-10 分間、150V で 40-50 分間電気泳動を行った。電気泳動終了後に、ponyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンに Transfer Buffer 中で 30 分間、60V~100V で転写を行った。

転写後のメンブレンは 0.5%BSA in TBST で 37 $^{\circ}$ C 30 分間のブロッキングを行った。オートファジー活性の評価は、オートファジー活性のマーカーである MAP1LC3/LC3-II (microtubule associated protein 1 light chain 3; CST) を用いて行い、抗体を 0.5%BSA in TBST を用いて 500 対 1 で希釈し、4 $^{\circ}$ C over night でインキュ

ベートした。その後、2次抗体として anti-rabbit antibody を 0.5%BSA in TBST を用いて 40000 対 1 で希釈し、4°C over night でインキュベートした。その後、洗浄し、検出試薬として enhanced chemiluminescence Western blot detection reagents (GE healthcare) を使用して、LAS-4000 imaging system (Fujifilm) を用いてバンドの観察を行った。バンドの計測は ImageJ で行い、LC3-II/B-Actin 比を算出することで定量的評価を行った。また、各メンブレン間の比較のために、各サンプルの LC3-II/B-Actin 比を対照試料 (Control) の LC3-II/B-Actin 比で割って補正したものをデータとして使用した。

6.3.5 リアルタイム PCR 法によるオートファジーの評価

T-75 フラスコで培養した 6 名の RA 患者の SFs を 2ml のトリプシンで処理して剥がしたのち、10%非働化 FBS 含有 IMDM を 8ml 加え、500G5 分間で遠心を行った。上清を除去したのち、ペレットを 1ml の 10%非働化 FBS 含有 IMDM に溶解させ、6well plate に散布し、10%非働化 FBS 含有 IMDM で培養を行った。

オートファジーを誘導するため SF は無血清培地を用いて回収の 2 時間前に飢餓状態にすることで飢餓刺激を与えた。また、SFs を活性化するサイトカイン (Zhang et al., 2019; Zhao et al., 2021) である IFN- γ (Biolegend) を 100 ng/mL で 6 時間刺激した。さらに、別経路でのオートファジー誘導による効果を確認するためプロテアソーム阻害剤 MG132 (Sigma-Aldrich) を 0~10 μ M 添加して 6 時間処理した。Upadacitinib で刺激する well には 10 μ M で添加し、刺激開始の 24 時間前から同濃度の Upadacitinib を加えた培地でプレトリートメントを行った。これらの刺激は各 well で各々組み合わせて行った。対照試料は、同量のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS ; Sigma-Aldrich) またはジメチルスルホキシド(DMSO; 同仁堂) で処理した。各々の well で刺激を行った後、PBS (Wako) で洗浄し、Fast Gene RNA 精製キット(日本ジェネティックス)を用いて、RNA 抽出を行った NA サンプルの逆転写には SuperScript VILO (Invitrogen) を用いて逆転写を行い、cDNA を作成した。DNA は SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) を用いて増幅し、BECN1, ATG5, ATG7, GAPDH のカスタムプライマー (北海道システムサイエンス) を使用し、Real-Time PCR System (Applied Biosystems) で Ct 値を測定した。相対的な定量は $\Delta \Delta$ Ct 法を用いて行い、BECN1, ATG5, ATG7 の Ct 値を GAPDH 転写物の Ct 値で補正して最終的な定量値を算出した。

6.3.6 免疫細胞染色法での cVIM および HLA-DR の観察

T-75 フラスコで培養した 1 名の RA 患者の SFs を 2ml のトリプシンで処理して剥がしたのち、10%非働化 FBS 含有 IMDM を 8ml 加え、500G5 分間で遠心を行った。上清を除去したのち、ペレットを 1ml の 10%非働化 FBS 含有 IMDM に溶解させ、96 well plate に散布し、10%非働化 FBS 含有 IMDM で培養を行った。

オートファジーを誘導するため SF は無血清培地を用いて回収の 2 時間前に飢餓状態にすることで飢餓刺激を与えた。また、HLA-DR の発現促進のため 100 ng/mL の IFN- γ (Biolegend) で 72 時間刺激した。Upadacitinib で刺激する well には 10 μ M で添加し、刺激開始の 24 時間前から同濃度の Upadacitinib を加えた培地でプレトリートメントを行った。これらの刺激は各 well で各々組み合わせて行った。対照試料は、同量のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS ; Sigma-Aldrich) またはジメチルスルホキシド (DMSO; 同仁堂) で処理した。各々の well で刺激を行った後、4%paraformaldehyde で常温で 15 分間インキュベートした。その後、PBS で洗浄し、70%メタノールに置換して-20 $^{\circ}$ C で 1 分間インキュベートし、透過処理を行った。再度 PBS で洗浄し、3%BSA in TBST で 37 $^{\circ}$ C 30 分間インキュベートし、ブロッキングを行った。ブロッキング溶液を除去して PBS で洗浄した後、0.1%BSA in TBST に 1:200 で希釈した anti-HLA-DR rabbit polyclonal antibody (Abcam)、anti-citrullinated vimentin mouse polyclonal antibody (Cayman Chemical) を 4 $^{\circ}$ C で over night した。次に PBS で洗浄した後、Alexa Flour[®] 594 anti-rabbit antibody、Alexa Flour[®] 488 anti-mouse antibody を 0.1%BSA in TBST に 1:200 で希釈して常温で 3 時間インキュベートした。PBS で洗浄し、1%BSA in TBST で 300nM に希釈した 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Biolegend) でカバーし、核の染色を行った。各種染色後には蛍光顕微鏡 (Diagnostic Biosystems) で観察を行った。

6.3.7 免疫沈降法を用いた HLA-DR と cVIM の結合の検討

6 名の RA 患者から分離した SFs を T-75 フラスコで培養し、PBS で洗浄後に各種刺激を行った。オートファジーを誘導するため SF は無血清培地を用いて回収の 2 時間前に飢餓状態にすることで飢餓刺激を与えた。また、HLA-DR の発現促進のため 100 ng/mL の IFN- γ (Biolegend) で 72 時間刺激した。Upadacitinib で刺激する well には 10 μ M で添加し、刺激開始の 24 時間前から同濃度の Upadacitinib を加えた培地でプレトリートメントを行った。これらの刺激は各 well で各々組み合わせて行った。対照試料は、同量のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS ; Sigma-Aldrich) またはジメチルスルホキシド (DMSO; 同仁堂) で処理した。

各種刺激後に PBS で洗浄し、SFs を 2ml のトリプシンで処理して剥がしたのち、10%非働化 FBS 含有 IMDM を 8ml 加え、500G5 分間で遠心を行った。上清を除去したのち、ペレットに CelLytic M Cell lysis reagent (Sigma-Aldrich) を 100 μ l 添加し、15 分室温でインキュベートした。インキュベート後、15000G 10 分間で強遠心を行い、上澄みをライセートとして回収した。anti-citrullinated vimentin mouse polyclonal antibody (Cayman Chemical) を 1:100 となるように加え、4 $^{\circ}$ C でローテーターで over night で反応させた。Protein G-Sepharose (GE healthcare) を加えて再度 4 $^{\circ}$ C でローテーターで 3 時間反応させたのち、Lysis buffer (50mM Tris-HCL, pH 8.0、150mM NaCl, 1% Nonidet P-40、1mM phenylmethylsulphonyl fluoride) で洗浄し、Laemmli Buffer x4 (BioRad) を加えて 95 $^{\circ}$ C のヒートブロックで 5 分間加熱しサンプルを作成した。15%のアクリルアミドゲルを作成し、各レーンにアプライした。120V で 5-10 分間、150V で 40-50 分間電気泳動を行った。電気泳動終了後に、ponyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンに Transfer Buffer 中で 30 分間、60V~100V で転写を行った。転写後のメンブレンは 0.5%BSA in TBST で 37 $^{\circ}$ C 30 分間のブロッキングを行った。anti-HLA-DR rabbit polyclonal antibody (Abcam) を 0.5%BSA in TBST を用いて 500 対 1 で希釈し、4 $^{\circ}$ C over night でインキュベートした。その後、2 次抗体として anti-rabbit antibody を 0.5%BSA in TBST を用いて 40000 対 1 で希釈し、4 $^{\circ}$ C over night でインキュベートした。その後、洗浄し、検出試薬として enhanced chemiluminescence Western blot detection reagents (GE healthcare) を使用して、LAS-4000 imaging system (Fujifilm) を用いてバンドの観察を行った。

6.3.8 Proximity Ligation Assay を用いた HLA-DR と cVIM の結合の検討

T-75 フラスコで培養した 6 名の RA 患者の SFs を 2ml のトリプシンで処理して剥がしたのち、10%非働化 FBS 含有 IMDM を 8ml 加え、500G5 分間で遠心を行った。上清を除去したのち、ペレットを 1ml の 10%非働化 FBS 含有 IMDM に溶解させ、8well slide chamber に散布し、10%非働化 FBS 含有 IMDM で培養を行った。

オートファジーを誘導するため SF は無血清培地を用いて回収の 2 時間前に飢餓状態にすることで飢餓刺激を与えた。また、HLA-DR の発現促進のため 100 ng/mL の IFN- γ (Biolegend) で 72 時間刺激した。さらに、プロテアソーム阻害剤 MG132 (Sigma-Aldrich) を 10 μ M 添加して 72 時間処理した。Upadacitinib で刺激する well には 10 μ M で添加し、刺激開始の 24 時間前から同濃度の Upadacitinib を加えた培地でプレトリートメントを行った。これらの刺激は各 well で各々組

み合わせて行った。対照試料は、同量のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS ; Sigma-Aldrich) またはジメチルスルホキシド (DMSO; 同仁堂) で処理した。各々の well で刺激を行った後、4%paraformaldehyde で常温で15分間インキュベートし、細胞を固定した。PBS で洗浄し、70%メタノールに置換して-20°Cで1分間インキュベートし、透過処理を行った。再度 PBS で洗浄後、Duolink®Blocking Solution を用いて 37°C 30 分間でインキュベートしブロッキングを行った。Duolink®Antibody Diluent で 500 倍希釈した anti-HLA-DR rabbit polyclonal antibody (Abcam)、anti-citrullinated vimentin mouse polyclonal antibody (Cayman Chemical) を 4°Cで over night で反応させた。洗浄の後、Duolink®Ligation Buffer で 40 倍希釈した Ligase と 37°C30 分間でインキュベートしライゲーションを行った。洗浄の後、Duolink®Amplification buffer で 80 倍希釈した polymerase と 37°C で遮光し 100 分間反応させ増幅反応を行った。洗浄の後、1%BSA 含有 PBS で 300nM に希釈した DAPI で常温 5 分間インキュベートし、核を染色した。スライドを fluorescent mounting medium でカバーし、蛍光顕微鏡 BZ-X800 で観察した。

6.3.9 ELISA 法による IL-6 の定量的評価

T-75 フラスコで培養した 5 名の RA 患者の SFs を 2ml のトリプシンで処理して剥がしたのち、10%非働化 FBS 含有 IMDM を 8ml 加え、500G5 分間で遠心を行った。上清を除去したのち、ペレットを 1ml の 10%非働化 FBS 含有 IMDM に溶解させ、6well plate に散布し、10%非働化 FBS 含有 IMDM で培養を行った。オートファジーを誘導するため SF は無血清培地を用いて回収の 2 時間前に飢餓状態にすることで飢餓刺激を与えた。また、HLA-DR の発現促進のため、100 ng/mL の IFN- γ (Biolegend) で 24 時間刺激した。さらに、別経路でのオートファジー誘導による効果を確認するためプロテアソーム阻害剤 MG132 (Sigma-Aldrich) を 10 μ M 添加して 24 時間処理した。Upadacitinib で刺激する well には 10 μ M で添加し、刺激開始の 24 時間前から同濃度の Upadacitinib を加えた培地でプレトリートメントを行った。これらの刺激は各 well で各々組み合わせて行った。対照試料は、同量のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS ; Sigma-Aldrich) またはジメチルスルホキシド (DMSO; 同仁堂) で処理した。培養した上清を回収し、サンプルとして回収した。また、IL-6 Human ELISA kit (Invitrogen) の Capture Antibody を TBST に 200 対 1 で希釈し、96 well plate にアプライし、4°Cで over night で反応させた後、回収したサンプルを各 well 200 μ l ずつ duplicate でアプライし、常温で 2 時間インキュベートした。その後洗浄し、Detection Antibody を TBST に

200 対 1 で希釈し加え、1 時間インキュベートした。再度洗浄し、Streptabivin 含有の HRP を加え、適切な発色が得られるまで常温で遮光しながらインキュベートした。発色が適切になった時点で吸光度の測定を行い、定量値はスタンダードカーブから近似曲線を作成し算出を行った。

6.3.10 統計学的解析

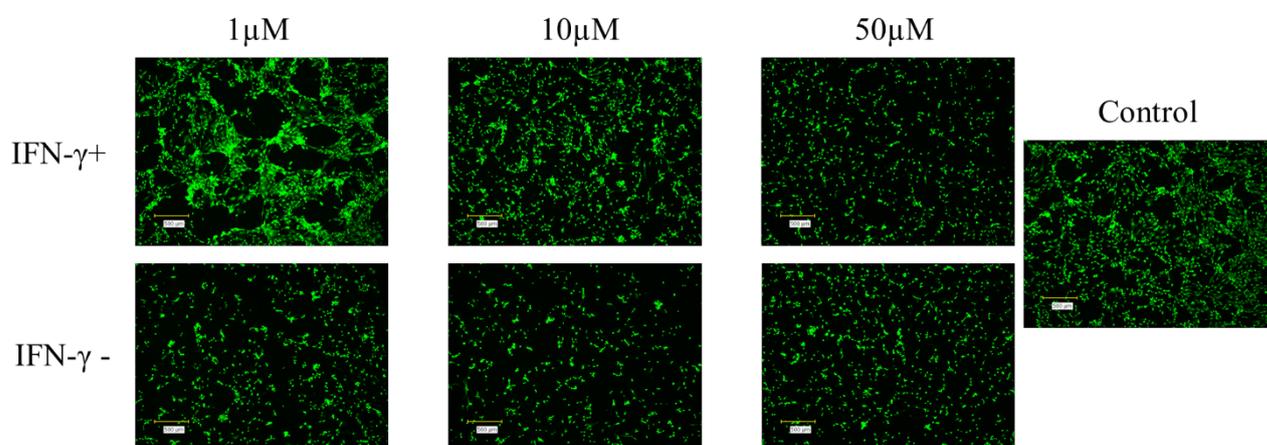
実験 6.3.4 における統計学的評価は ANOVA test を用い、実験 6.3.5 における統計学的評価は Student's t-test で行った。実験 6.3.6、6.3.8、6.3.9、6.3.10 における統計学的評価は ratio paired t-test で行った。P 値は 0.05 未満を有意とした。すべての統計解析は GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, U.S.A.) を用いて行った。

6.4 実験結果

6.4.1 Upadacitinib 濃度の条件検討

異なる濃度 (1, 10, 50 μ M) の Upadacitinib で 24 時間培養した培養した RASFs のカルセイン染色を用いた蛍光細胞染色法による観察を行った画像を図 11 に示す。カルセイン染色では濃度を上昇させることで細胞数が少なく、増殖が抑制されていることが予想された。

Calcein stain: low power-field (x4)



Calcein stain: high power-field (x10)

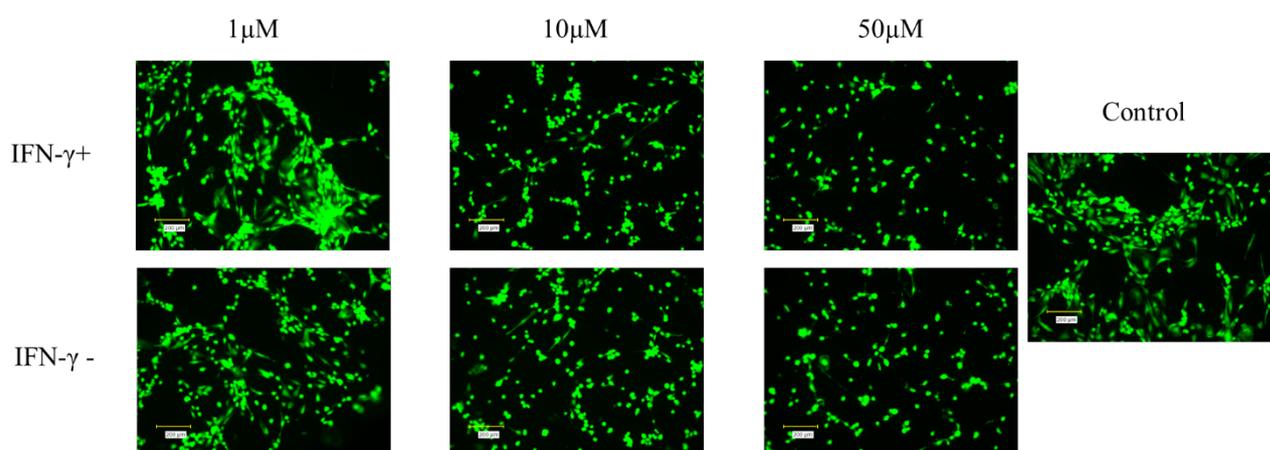


図 11. 異なる濃度 (1, 10, 50μM) の Upadacitinib で 24 時間培養した培養した RASFs のカルセイン染色を用いた蛍光細胞染色法による観察

RASFs に対し Upadacitinib を各濃度 (1, 10, 50μM) で添加し、24 時間培養した後カルセイン染色で生細胞の染色を行い観察したところ、濃度依存性に細胞数の減少を認め、細胞増殖が抑制されていた。

異なる濃度の Upadacitinib (0, 1, 5, 10, 25, 50, 100 μM) で 24 時間培養した RASFs の BrdU アッセイの結果を図 12 に示す。濃度が高くなるにつれて吸光度が低下していることがわかり、10 μM 以上の Upadacitinib で RASFs を処理したところ、統計学的に有意に吸光度が低下していた (表 15, $P = 0.008$)。これ以上の濃度ではプラトーに達していることから、今後の実験では 10 μM を刺激の際に使用する濃度とした。

また、今回の実験で使用した RA 患者 4 人のデータを表 16 に示す。

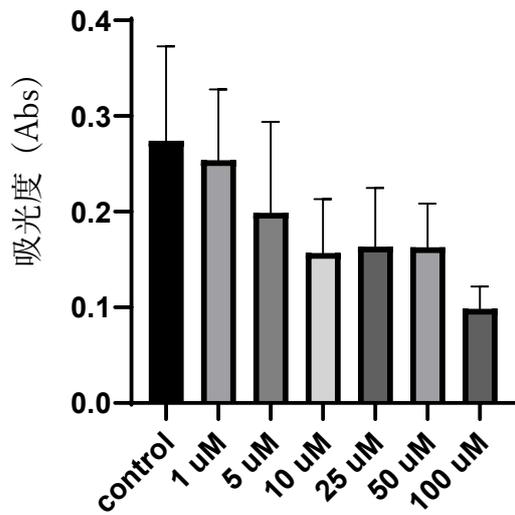


図 12. 異なる濃度の Upadacitinib (0, 1, 5, 10, 25, 50, 100 μM) で 24 時間培養した RASFs の BrdU アッセイの結果

RASFs を異なる濃度の Upadacitinib (0, 1, 5, 10, 25, 50, 100 μM) を加え培養し BrdU アッセイで増殖能を評価したところ、濃度依存性に吸光度は低下し、10μM 以降で control と比較し有意に低下した。したがって 10μM 以上の Upadacitinib を投与することで、RASFs の増殖能を抑制することができると考えられる。

表 15. 各濃度の Upadacitinib と Control の比較

	P value
control vs. 1 μ M	0.9685
control vs. 5 μ M	0.1189
control vs. 10 μ M	0.0080
control vs. 25 μ M	0.0126
control vs. 50 μ M	0.0120
control vs. 100 μ M	0.0002

表 16. RA 患者 4 名の患者背景

	Age (y)	sex	Deisease duration(y)	CRP (mg/dl)	ESR (mm/hr)	RF (IU/ml)	ACPA (U/ml)	DAS28 (ESR)	treatment
RA1	76	F	28	3.06	57	68.7	292.8	3.58	MTX 6mg BUC 100mg PSL 1mg
RA2	78	F	10	4.35	83	51.7	> 300.0	4.35	SASP 1000mg PSL 5mg IGU 50mg
RA3	66	F	12	1.36	4	185	134.2	2.65	MTX 6mg, PSL 3mg
RA4	61	F	15	0.36	7	185	134.2	3.02	TCZ 162mg MTX 6mg

M: male, F: female, CRP: C-reactive protein, ESR: erythrocyte sedimentation rate, RF: rheumatoid factor, ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies, DAS-28: disease activity score, MTX: methotrexate, BUC: bucillamine, PSL: predonisolone, SASP: salazosulfapyridine, IGU: iguratimod, TCZ: tocilizumab.

6.4.2 ウェスタンブロッティング法によるオートファジーの評価

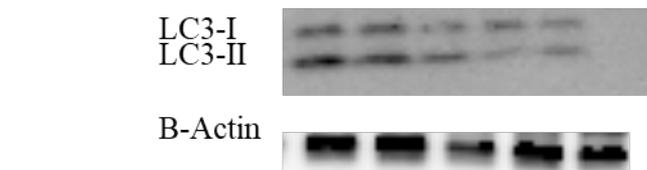
Upadacitinib を投与したことによるオートファジー活性の変化をウェスタンブロッティング法で評価した。SFs を分離した 7 人の RA 患者は表 17 に示す。オートファジーを誘導するため無血清培地での培養による飢餓刺激と、SFs を活性化するため IFN- γ (100ng/ml) または別経路でのオートファジー誘導による効果を確認するため MG132 (10 μ M) による刺激をそれぞれ組み合わせながら 24 時間培養を行った。

さらに、これらの条件に加え、Upadacitinib (10 μ M) も追加し、同様に 24 時間培養を行った。培養後 SFs を採取し、採取した SFs から作成したライセートをサンプルとして用いて、ウェスタンブロットを一次抗体として抗 MAP1LC3/LC3-II (microtubule associated protein 1 light chain 3; CST)抗体 を用いて行った。メンブレンを図 13 に示す。

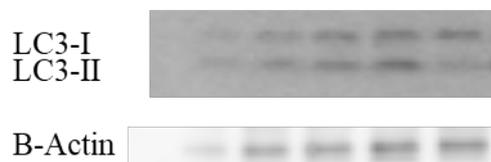
表 17 RA 患者 7 名の患者背景

	Age (y)	sex	Deisease duration(y)	CRP (mg/dl)	ESR (mm/hr)	RF (IU/ml)	ACPA (U/ml)	DAS28 (ESR)	treatment
RA1	76	F	28	3.06	57	68.7	292.8	3.58	MTX 6mg BUC 100mg PSL 1mg
RA2	78	F	10	4.35	83	51.7	> 300.0	4.35	SASP 1000mg PSL 5mg IGU 50mg
RA3	66	F	12	1.36	4	185	134.2	2.65	MTX 6mg, PSL 3mg
RA4	61	F	15	0.36	7	185	134.2	3.02	TCZ 162mg MTX 6mg
RA5	70	F	7	0.17	44	15.8	18.6	5.3	PSL 5mg SASP 1000mg IGU 25mg
RA6	69	M	7	1.19	55	96.8	>300.0	4.9	MTX 8mg Bari 4mg
RA7	60	F	9	0.11	16	1802.7	>300.0	3.12	PSL 7.5mg GLM 100mg

M: male, F: female, CRP: C-reactive protein, ESR: erythrocyte sedimentation rate, RF: rheumatoid factor, ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies, DAS-28: disease activity score, MTX: methotrexate, BUC: bucillamine, PSL: prednisolone, SASP: salazosulfapyridine, IGU: iguratimod, TCZ: tocilizumab, Bari: baricitinib, GLM: golimumab



IFN- γ	-	+	+	+	-
Starvation	+	+	-	-	-
MG-132	-	-	-	+	-



IFN- γ	-	+	+	+	-
Starvation	+	+	-	-	-
MG-132	-	-	-	+	-
Upadacitinib	+	+	+	+	+

図 13. オートファジーに対する Upadacitinib (10 μ M) 添加の影響の評価

上段のメンブレンは Upadacitinib (10 μ M) なしでオートファジーを誘導するため無血清培地での培養と、SFs を活性化するため IFN- γ (100ng/ml) による刺激、または別経路でのオートファジー誘導による効果を確認するための MG-132 (10 μ M) の添加 の各条件を組み合わせ培養した SFs のライセートを用いた結果であり、下段は Upadacitinib ありのライセートである。

また、このメンブレンの各バンドを Image J で定量し、LC3-II/B-Actin 比を算出することで各条件間の比較を行った。結果を図 14 に示す。その結果、オートファジーが亢進し、LC3-II/B-Actin 比が上昇していたすべての条件において、Upadacitinib (10 μ M) を加えて JAK-STAT 経路を阻害することで、オートファジーが抑制された。統計学的解析には Student's t-test で行った。*: p<0.05

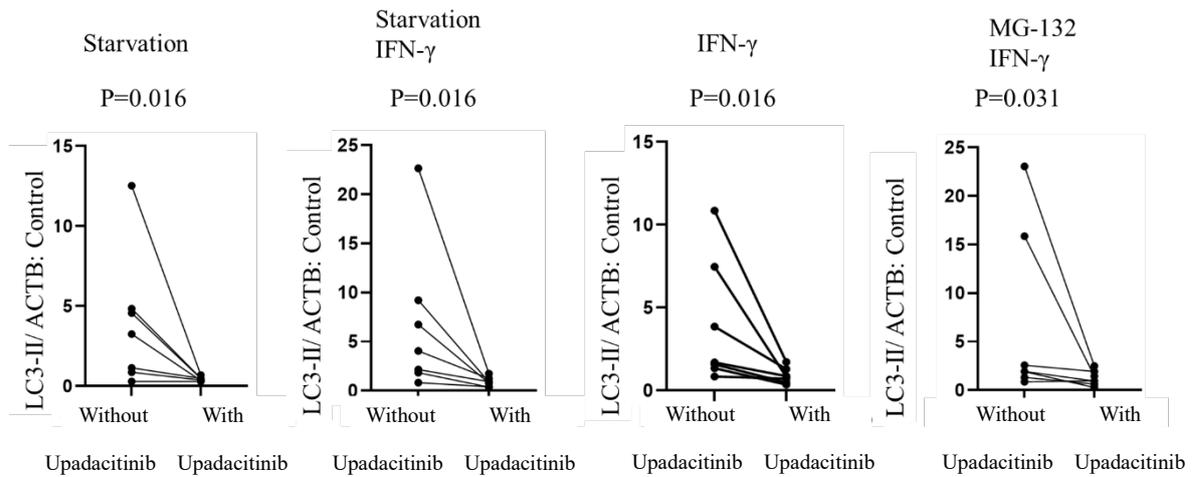


図 14. オートファジーの亢進がみられた各条件下での定量した LC3- II/B-Actin 比と、Upadacitinib 投与による LC3- II/B-Actin 比の変化

細胞の刺激を飢餓刺激単独、飢餓刺激と IFN- γ (100ng/ml)、IFN- γ (100ng/ml) 単独、MG-132 (10 μ M) と IFN- γ で行い、さらに、それぞれ Upadacitinib(10 μ M)を加えたライセートを作成した。飢餓刺激はオートファジー誘導、IFN- γ による刺激は HLA-DR を強制発現、MG-132 の添加は別経路でのオートファジー誘導による影響を評価することを目的に行った。ウェスタンブロッティング法で作成したメンブレン上の各バンドを Image J で定量し、LC3- II/B-Actin 比を算出してオートファジー活性を評価した。また、各メンブレン間の比較のために、各サンプルの LC3- II/B-Actin 比を対照試料 (Control) の LC3- II/B-Actin 比で割って補正したものをデータとして使用した。

各条件において、LC3- II/B-Actin 比は Upadacitinib の投与による JAK-STAT 経路の阻害によって統計学的に有意に低下していた。

6.4.3 リアルタイム PCR 法によるオートファジーの評価

Upadacitinib (10 μ M) を投与したことによるオートファジー活性の変化をリアルタイム PCR 法で評価した。SFs を分離した 6 人の患者を表 18 に示す。

SFs はオートファジーを誘導するため無血清培地での培養と、SFs を活性化するため IFN- γ (100ng/ml)による刺激、または別経路でのオートファジー誘導による効果を確認するための MG-132 (10 μ M)の添加 による刺激をそれぞれ組み合わせながら 6 時間培養を行った。さらに、これらの条件に加え、Upadacitinib (10 μ M) も追加し、同様に 6 時間培養を行った。その後ライセートを回収し、cDNA 合成を行いプライマー (GAPDH, Beclin-1, ATG5, ATG7) を用いてリアルタイム PCR 法を行い、オートファジー活性の評価を行った。オートファジー活性の評価のため使用したプライマーの配列を表 19 に示す。相対的な定量は $\Delta \Delta$ Ct 法を用いて行い、BECN1, ATG5, ATG7 の Ct 値を GAPDH 転写物の Ct 値で補正して最終的な定量値を算出した。統計学的評価は ratio paired t-test で行った。*: p<0.05

結果を図 15 に示す。

表 18. RA 患者 6 名の患者背景

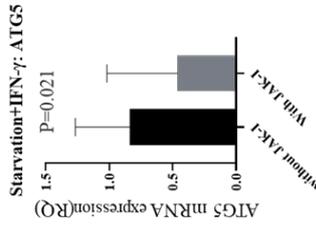
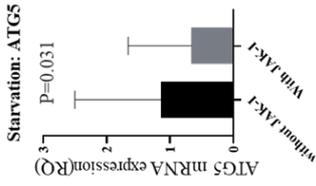
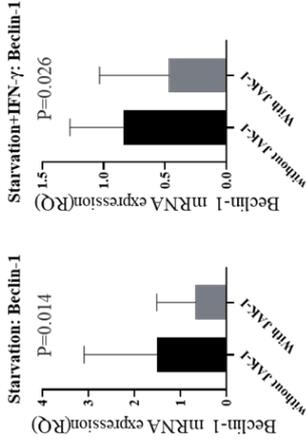
	Age (y)	sex	Deisease duration(y)	CRP (mg/dl)	ESR (mm/hr)	RF (IU/ml)	ACPA (U/ml)	DAS28 (ESR)	treatment
RA1	76	F	28	3.06	57	68.7	292.8	3.58	MTX 6mg BUC 100mg PSL 1mg
RA2	78	F	10	4.35	83	51.7	> 300.0	4.35	SASP 1000mg PSL 5mg IGU 50mg
RA3	66	F	12	1.36	4	185	134.2	2.65	MTX 6mg, PSL 3mg
RA4	61	F	15	0.36	7	185	134.2	3.02	TCZ 162mg MTX 6mg
RA5	69	M	7	1.19	55	96.8	>300.0	4.9	MTX 8mg Bari 4mg
RA6	60	F	9	0.11	16	1802.7	>300.0	3.12	PSL 7.5mg GLM 100mg

M: male, F: female, CRP: C-reactive protein, ESR: erythrocyte sedimentation rate, RF: rheumatoid factor, ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies, DAS-28: disease activity score, MTX: methotrexate, PSL: prednisolone

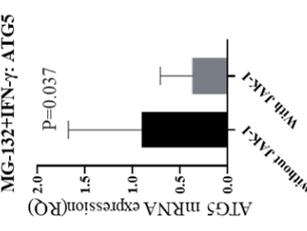
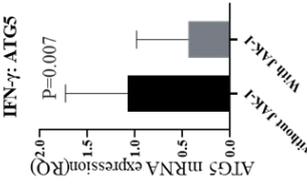
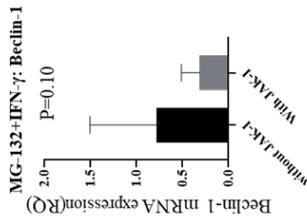
表 19. オートファジー活性の評価に使用したプライマーの塩基配列

Gene name	Primer
GADPH Forward	5'-GGGAAGCTTGTCATCAATGGA-3'
GADPH Reverse	5'-TCTGGCTCCTGGAAGATGGT-3'
BECN Forward	5'-GCTACCGGGAAGTCGCTGAAGACAG-3'
BECN Reverse	5'-CGTCTTGACCCTTCCATCCCTCGG-3'
ATG5 Forward	5'-GATGTGTGGTTTGGACGAATTCC-3'
ATG5 Reverse	5'-GTATGGTTCTGCTTCCCTTTCAG-3'
ATG7 Forward	5'-AACCTCTCTTGGGCTTGTGCCTCAC-3'
ATG7 Reverse	5'-CATCGCTCATGTCCCAGATCTCAGC-3'

Beclin-1



ATG5



ATG7

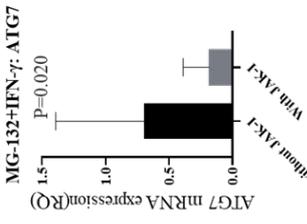
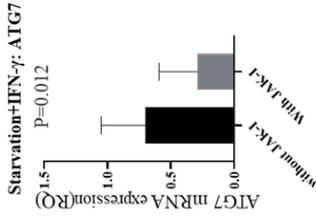


図 15.ASFs での各条件下でのオートファジー関連遺伝子 (Beclin-1, ATG5,ATG7)のリアルタイム PCR の結果

SF の刺激は飢餓刺激単独、飢餓刺激と IFN- γ (100ng/ml)、IFN- γ (100ng/ml) 単独、MG-132 (10 μ M) と IFN- γ で行いライセートを作成した。飢餓刺激はオートファジー誘導、IFN- γ は SFs を活性化するため、MG-132 は別経路でのオートファジー誘導による影響を評価することを目的に行った。さらに、それぞれ Upadacitinib を加えたライセートも作成した。作成したライセートで cDNA 合成を行いリアルタイム PCR 法でオートファジー関連遺伝子 (Beclin-1, ATG5,ATG7) の発現を評価した。相対的な定量は $\Delta \Delta$ Ct 法を用いて行い、BECN1,ATG5,ATG7 の Ct 値を GAPDH 転写物の Ct 値で補正して最終的な定量値を算出した。

各条件下において、いずれの RASF でも発現が亢進した Beclin-1, ATG5,ATG7 は Upadacitinib (10 μ M) を投与することとで、そのほとんどで発現が低下していた

また、OA 患者の SFs でも同様に検討を行った。3 名の OA 患者から SFs を分離した (69 歳女性, 81 歳男性, 83 歳女性)。リアルタイム PCR 法の結果を図 16 に示す。

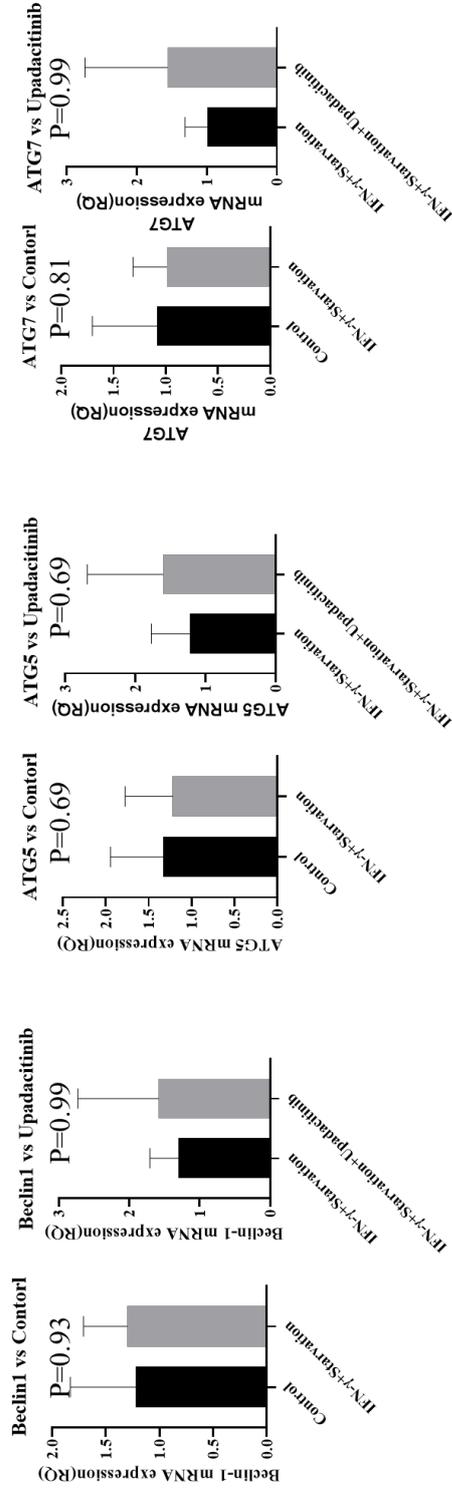


図 16. OASFs での各条件下でのオートファジー関連遺伝子 (Beclin-1, ATG5, ATG7) のリアルタイム PCR の結果

SFs の刺激はオートファジーを誘導するための飢餓刺激と SFs を活性化するための IFN- γ (100ng/ml) で行いライセートを作成した。さらに、Upadacitinib (10 μ M) を加えたライセートも作成した。作成したライセートで cDNA 合成を行いいリアルタイム PCR 法でオートファジー関連遺伝子 (Beclin-1, ATG5, ATG7) の発現を評価した。相対的な定量は $\Delta \Delta$ Ct 法を用いて行い、BECN1, ATG5, ATG7 の Ct 値を GAPDH 転写物の Ct 値で補正して最終的な定量値を算出した。

OASFs では飢餓刺激と IFN- γ (100ng/ml) で刺激を行ったサンプルはコントロールとの比較で、オートファジー関連遺伝子の発現に統計学的な有意差は認めず、また、Upadacitinib (10 μ M) の投与を行っても同様に有意差を認めなかった

6.4.4 免疫細胞染色法での cVIM および HLA-DR の観察

SFs 内の cVIM と HLA-DR の発現を免疫細胞染色法で評価した。SFs を分離した患者を表 20 に示す。

SFs はオートファジーを誘導するため無血清培地での培養と HLA-DR の発現促進のため IFN- γ (100ng/ml) で刺激を加えたものと、Upadacitinib (10 μ M) をさらに追加したものを 72 時間培養した。

蛍光顕微鏡での結果を図 17 に示す。

表 20. RA 患者 1 名の患者背景

	Age (y)	sex	Deisease duration(y)	CRP (mg/dl)	ESR (mm/hr)	RF (IU/ml)	ACPA (U/ml)	DAS28 (ESR)	treatment
RA2	78	F	10	4.35	83	51.7	> 300.0	4.35	SASP 1000mg PSL 5mg IGU 50mg

M: male, F: female, CRP: C-reactive protein, ESR: erythrocyte sedimentation rate, RF: rheumatoid factor, ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies, DAS-28: disease activity score, PSL: prednisolone, SASP: salazosulfapyridine, IGU: iguratimod.

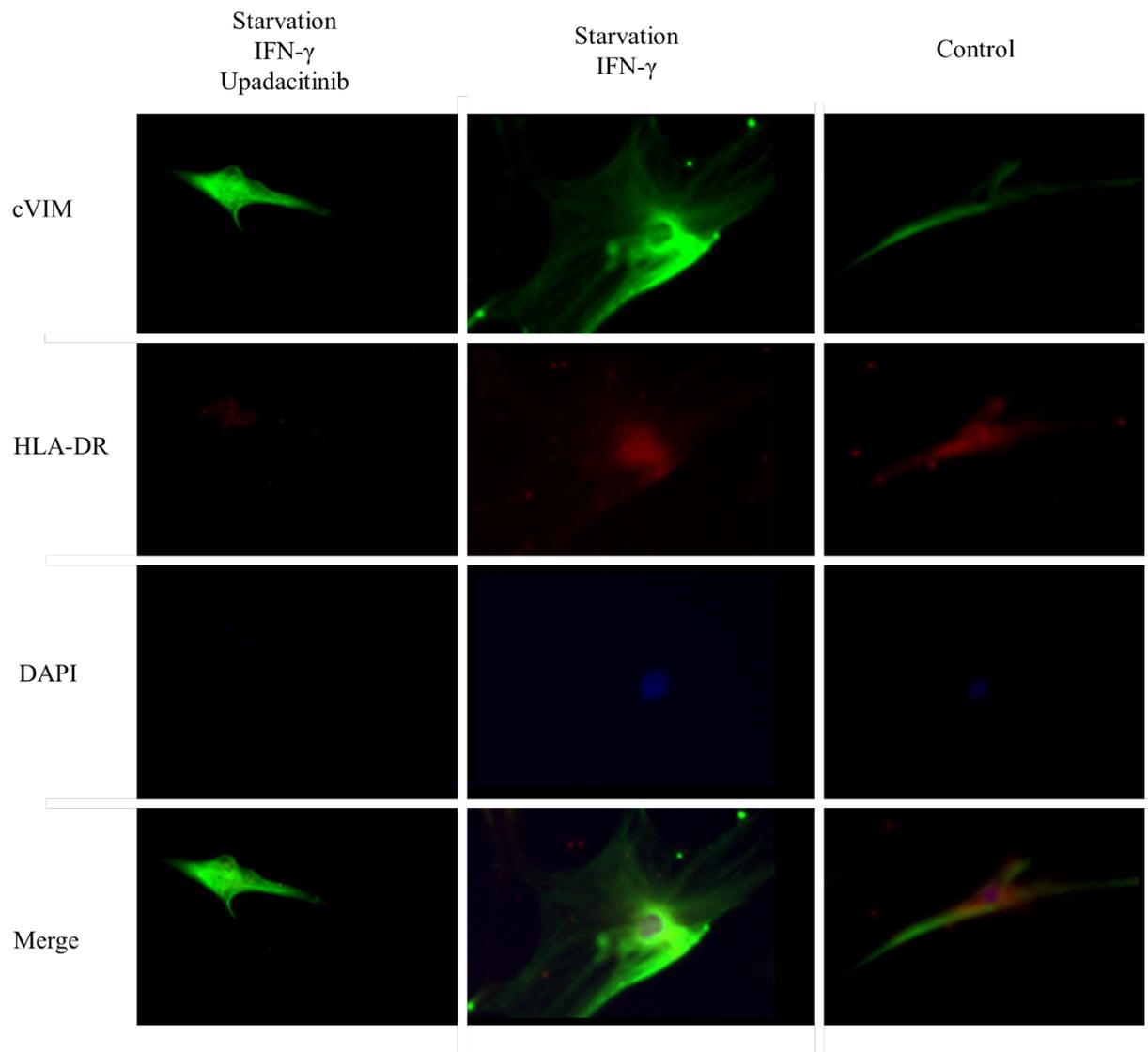


図 17. 免疫細胞染色法による SFs 内の cVIM と HLA-DR の発現の評価

SFs に対しオートファジーを誘導するため飢餓刺激と HLA-DR の発現促進のための IFN- γ (100ng/ml) で刺激を行い、さらに、Upadacitinib (10 μ M) を加えて 4well スライドチャンバー上で 72 時間培養した。

cVIM、HLA-DR とともに、飢餓刺激と IFN- γ (100ng/ml) による刺激条件下では、その発現が亢進していることがわかり、さらに Upadacitinib の投与により、JAK-STAT 経路が阻害されることで減弱していた。

6.4.5 共免疫沈降法を用いた HLA-DR と cVIM の結合の検討

cVIM と HLA-DR の共発現を共免疫沈降法で評価した。SFs を分離した患者を表 21 に示す。

SFs はオートファジーを誘導するための無血清培地での培養と HLA-DR の発現促進のための IFN- γ (100ng/ml) で刺激を加えたものと、Upadacitinib (10 μ M) をさらに追加したものを 72 時間培養して、ライセートを作成した。cVIM で SFs ライセートの免疫沈降を行い、抗 HLA-DR 抗体を用いたウェスタンブロッティング法で解析した。*: p<0.05

結果を図 18 に示す。

表 21. RA 患者 6 名の患者背景

	Age (y)	sex	Deisease duration(y)	CRP (mg/dl)	ESR (mm/hr)	RF (IU/ml)	ACPA (U/ml)	DAS28 (ESR)	treatment
RA1	76	F	28	3.06	57	68.7	292.8	3.58	MTX 6mg BUC 100mg PSL 1mg
RA2	78	F	10	4.35	83	51.7	> 300.0	4.35	SASP 1000mg PSL 5mg IGU 50mg
RA3	66	F	12	1.36	4	185	134.2	2.65	MTX 6mg, PSL 3mg
RA4	61	F	15	0.36	7	185	134.2	3.02	TCZ 162mg MTX 6mg
RA5	70	F	7	0.17	44	15.8	18.6	5.3	PSL 5mg SASP 1000mg IGU 25mg
RA6	69	M	7	1.19	55	96.8	>300.0	4.9	MTX 8mg Bari 4mg

M: male, F: female, CRP: C-reactive protein, ESR: erythrocyte sedimentation rate, RF: rheumatoid factor, ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies, DAS-28: disease activity score, MTX: methotrexate, BUC: bucillamine, PSL: predonisolone, SASP: salazosulfapyridine, IGU: iguratimod, TCZ: tocilizumab, Bari: baricitinib.

(A)

HLA-DR (sample)



HLA-DR (input)



IFN- γ	-	+	+
Starvation	-	+	+
Upadacitinib	-	-	+

(B)

Starvation+IFN- γ vs Starvation+IFN- γ +Upadacitinib

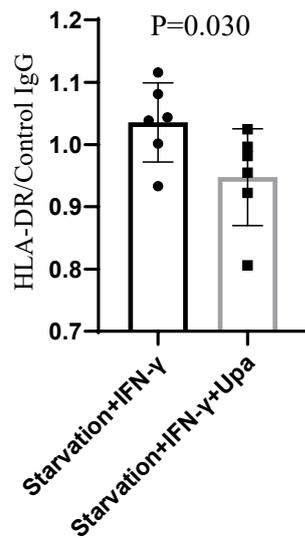


図 18. 共免疫沈降法による SFs 内の cVIM と HLA-DR の結合の評価

(A) 無血清培地での培養による飢餓刺激と IFN- γ (100ng/ml) で刺激を加えたライセートでは cVIM の免疫沈降産物は HLA-DR と結合しており、HLA-DR と cVIM は結合していると考えられた。

(B) SFs は無血清培地での培養と IFN- γ (100ng/ml) での刺激にさらに Upadacitinib (10 μ M) の添加を行ったライセートでは結合の減弱を認めた (p = 0.030)。

6.4.6 Proximity Ligation Assay を用いた HLA-DR と cVIM の結合の検討

cVIM と HLA-DR の共発現を Proximity Ligation Assay で評価した。SFs を分離した患者を表 22 に示す。

SFs はオートファジーを誘導するための無血清培地での培養と HLA-DR の発現促進のための IFN- γ (100ng/ml) 、またはオートファジー阻害薬である 3-methyladenine(3-MA; 5mM)による刺激をそれぞれ組み合わせながら 72 時間 8well スライドチャンバーで培養を行った。さらに、これらの条件に加え、Upadacitinib (10 μ M) も追加し、同様に 72 時間培養を行った。ライゲーシオンには抗 cVIM 抗体と抗 HLA-DR 抗体を使用しており、cVIM と HLA-DR が共局在し、互いに近接していると赤い particle となって発光する。Image J を用いて dot pixel 毎の蛍光の定量を行った。統計学的評価は ratio paired t-test で行った。*: p<0.05

ライゲーシオン後に撮像した蛍光顕微鏡の結果を図 19 に示す。また、解析の結果を図 20 に示す。

表 22. RA 患者 6 名の患者背景

	Age (y)	sex	Deisease duration(y)	CRP (mg/dl)	ESR (mm/hr)	RF (IU/ml)	ACPA (U/ml)	DAS28 (ESR)	treatment
RA1	76	F	28	3.06	57	68.7	292.8	3.58	MTX 6mg BUC 100mg PSL 1mg
RA2	78	F	10	4.35	83	51.7	> 300.0	4.35	SASP 1000mg PSL 5mg IGU 50mg
RA3	66	F	12	1.36	4	185	134.2	2.65	MTX 6mg, PSL 3mg
RA4	70	F	7	0.17	44	15.8	18.6	5.3	PSL 5mg SASP 1000mg IGU 25mg
RA5	69	M	7	1.19	55	96.8	>300.0	4.9	MTX 8mg Bari 4mg
RA6	60	F	9	0.11	16	1802.7	>300.0	3.12	PSL 7.5mg GLM 100mg

M: male, F: female, CRP: C-reactive protein, ESR: erythrocyte sedimentation rate, RF: rheumatoid factor, ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies, DAS-28: disease activity score, MTX: methotrexate, BUC: bucillamine, PSL: prednisolone, SASP: salazosulfapyridine, IGU: iguratimod, Bari: baricitinib, GLM: golimumab

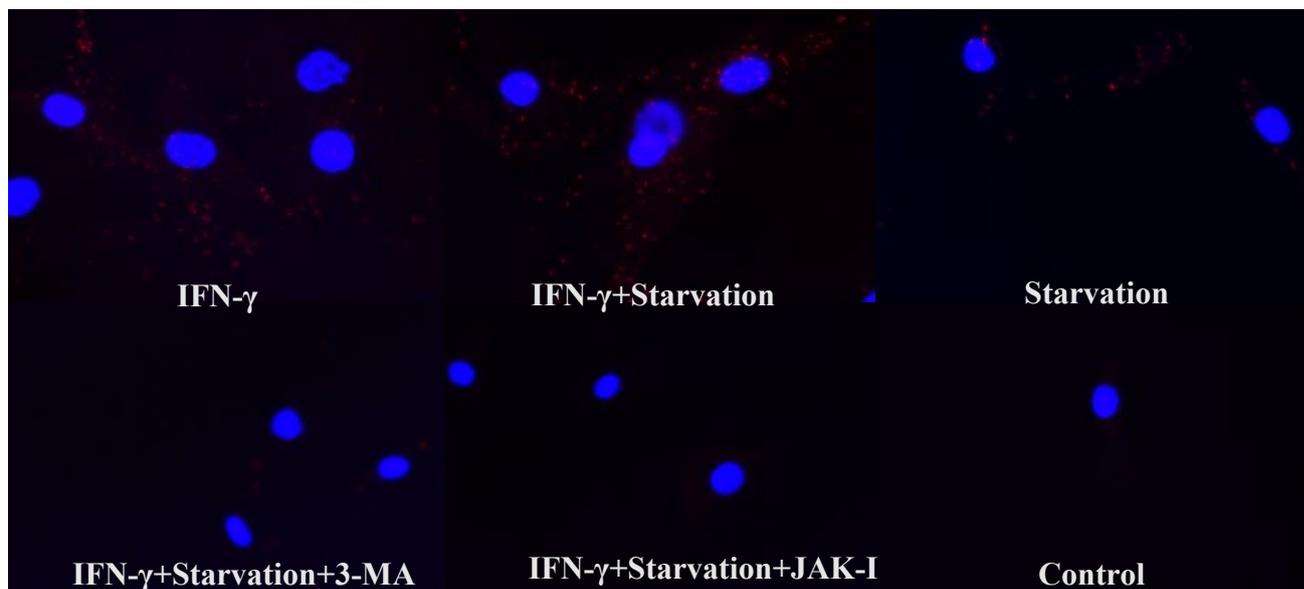


図 19. Proximity Ligation Assay による SFs 内の cVIM と HLA-DR の結合の評価
 SFs を 8well スライドチャンバーで培養し、飢餓刺激単独、飢餓刺激と IFN- γ (100ng/ml)、IFN- γ (100ng/ml) 単独で各々刺激を行った。さらに、一部の well では 3-MA (5mM) と Upadacitinib (10 μ M) を加えた。
 オートファジーが亢進した well では赤い particle が増加しており、HLA-DR と cVIM は結合していると考えられた。3-MA (5mM) や Upadacitinib(10 μ M)を加えた well では減弱していた。さらに、Upadacitinib (10 μ M) や 3-MA (5mM) を加えたものでは、結合が減弱していた。

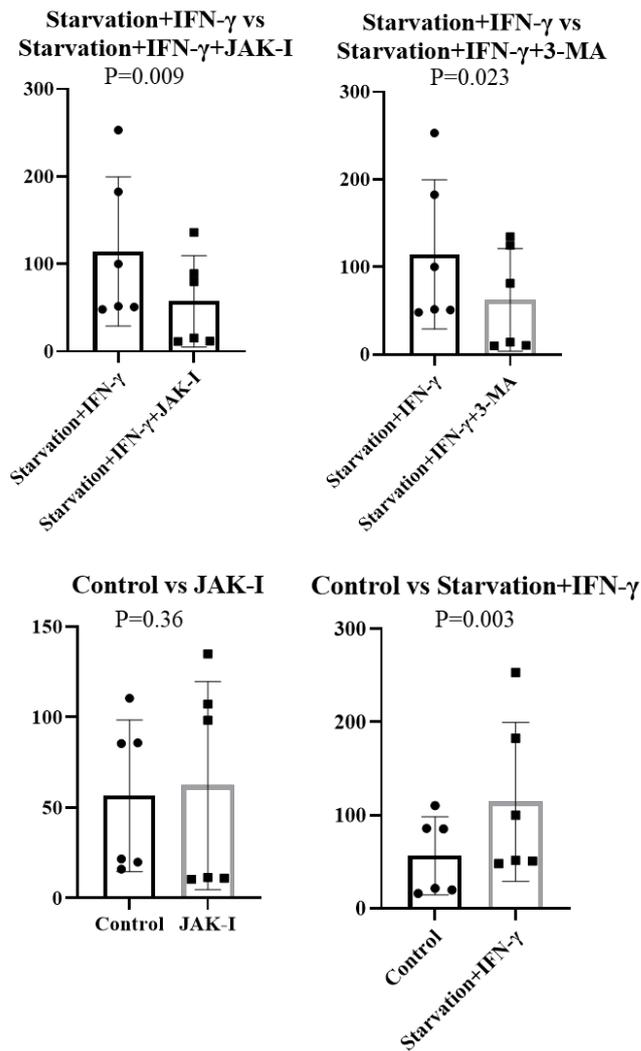


図 20. Image J を用いた Proximity Ligation Assay における cVIM と HLA-DR の結合の比較

Image J を用いて pixel 毎の蛍光の発現を定量化したところ、コントロールと比較し、飢餓刺激と IFN- γ (100ng/ml) で刺激した well では統計学的に有意にシグナルが増強したが、Upadacitinib (10 μ M) や 3-MA (5mM) を加えると、統計学的に有意に低下した。

6.4.7 ELISA 法による IL-6 の定量的評価

SFs を分離した RA 患者 5 名の患者背景を表 23 に示す。

オートファジーを誘導するための無血清培地での培養と、HLA-DR の発現促進のための IFN- γ (100ng/ml) または別経路でのオートファジー誘導による影響を評価するための MG-132 (10 μ M) による刺激をそれぞれ組み合わせながら 24 時間培養を行った。さらに、これらの条件に加え、Upadacitinib(10 μ M)も追加し、同様に 24 時間培養を行った。回収の 2 時間前に培養液を交換し、2 時間後に上清を回収し ELISA 法で IL-6 の測定を行った。統計学的評価は ratio paired t-test で行った。*: p<0.05

結果を図 21 に示す。

表 23. RA 患者 5 名の患者背景

	Age (y)	sex	Deisease duration(y)	CRP (mg/dl)	ESR (mm/hr)	RF (IU/ml)	ACPA (U/ml)	DAS28 (ESR)	treatment
RA1	78	F	10	4.35	83	51.7	> 300.0	4.35	SASP 1000mg PSL 5mg IGU 50mg
RA2	66	F	12	1.36	4	185	134.2	2.65	MTX 6mg, PSL 3mg
RA3	61	F	15	0.36	7	185	134.2	3.02	TCZ 162mg MTX 6mg
RA4	69	M	7	1.19	55	96.8	>300.0	4.9	MTX 8mg Bari 4mg
RA5	60	F	9	0.11	16	1802.7	>300.0	3.12	PSL 7.5mg GLM 100mg

M: male, F: female, CRP: C-reactive protein, ESR: erythrocyte sedimentation rate, RF: rheumatoid factor, ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies, DAS-28: disease activity score, MTX: methotrexate, PSL: prednisolone, SASP: salazosulfapyridine, IGU: iguratimod, TCZ: tocilizumab, Bari: baricitinib, GLM: golimumab

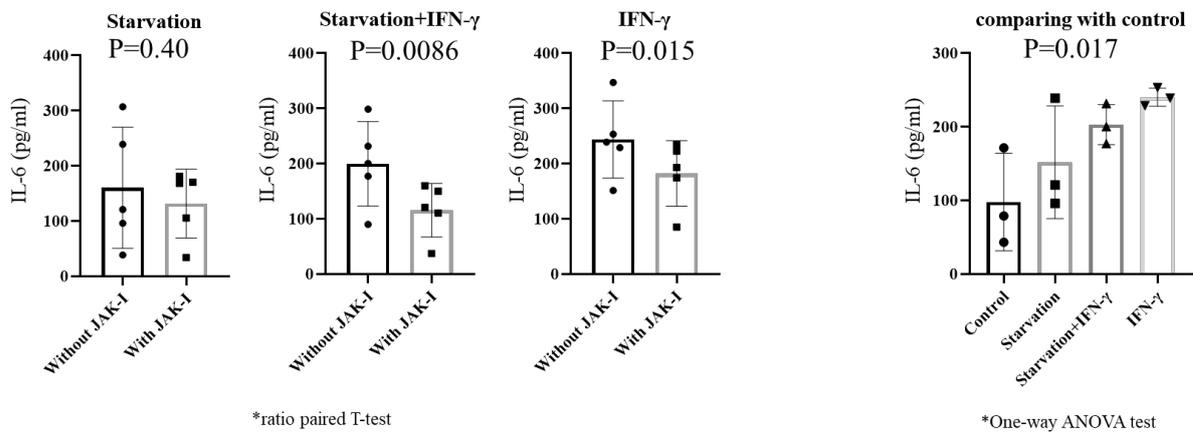


図 21. ELISA による各刺激条件の培養上清の IL-6 分泌量の比較

培養上清の ELISA では、無血清培地で Starvation を行ったサンプルでは有意差を認めなかったが、Starvation+IFN- γ および、IFN- γ (100ng/ml) で刺激したサンプルでは Upadacitinib (10 μ M) の添加で統計学的に有意に IL-6 の分泌が抑制された。

また、コントロールとの比較ではどの刺激条件でも統計学的に有意に IL-6 の分泌の増加を認めた。

6.5 考察

本研究では、RA の病態においてオートファジーが JAK-STAT 経路による調節を受けており、オートファジーが亢進することによって生じる cVIM と HLA-DR の共局在や、IL-6 の SFs による産生など、RA の病態を特徴づけるような現象においても大きな影響を及ぼしていることが示唆された。まず、各刺激によって亢進したオートファジー活性が mRNA および蛋白質双方のレベルにおいて JAK-STAT 経路を阻害することで活性が低下することを示した。また、JAK-STAT 経路を阻害することで、オートファジーが亢進している状態で促進される cVIM と HLA-DR の結合が行われなくなることを示した。

オートファジー活性が RA 患者の SFs で亢進しており (Kato et al., 2014)、cVIM の生成や HLA-DR との結合に大きく関わっていることは過去の我々の研究でも示されていた (Sugawara et al., 2020)。しかし、ではオートファジーが RA 患者の生体内でどのような制御を受けて亢進されているかという点に関しては未だ説明されていない部分が多い。

オートファジーを制御する機構として、今回我々は JAK-STAT 経路に着目した。オートファジーが JAK-STAT 経路による影響を受けている可能性はいくつかの文献で報告があり、Chang らは IL-17 によってオートファジーを誘導した RAFLs に対して STAT3 の阻害薬を用いることでオートファジー活性や細胞の増殖能が抑制されることを示した (Chang et al., 2019)。また、Chen らは RASFs に対して miR-218-5p を silencing することで JAK2/STAT3 が亢進し、オートファジー活性も併せて亢進することを示している (Chen et al., 2021)。しかし、RASFs に対して JAK 阻害薬を使用してオートファジー活性を評価した報告はない。今回の研究では RA 患者の SFs において JAK 阻害薬を投与することで、SFs のオートファジー活性がどのように変化するかを検討した。結果として、JAK-STAT 経路への関与が大きい IFN- γ による刺激を行った場合ではもちろんのこと、IFN- γ を用いない飢餓刺激単独で行った場合においても、亢進したオートファジーを JAK 阻害薬によって抑制することが mRNA および蛋白質双方のレベルにおいて確認できた。このことから、オートファジーが JAK-STAT 経路による調整を受けている可能性が示唆された。

cVIM は RA 患者において検出される抗 CCP 抗体の対応抗原の 1 つであり、細胞骨格蛋白質であるビメンチンがシトルリン化酵素である PAD により媒介されて翻訳後修飾を受けることで生成される (Fuhrmann et al., 2015; Vossenaar et al., 2004)。PAD のアイソタイプである PAD4 をコードする遺伝子の PADI4 は RA の

疾患感受性遺伝子として同定されており (Suzuki et al., 2003)、過剰なシトルリン化が RA の病態形成に深く関わっているとされる。我々は過去の研究で、cVIM の生成がオートファジーによって促進され、オートファジーの阻害によって生成が低下することを示した (Sugawara et al., 2020)。さらに、今回の研究では免疫細胞染色において、オートファジー亢進にともない、産生が促進された cVIM が Upadacitinib を投与することで、その産生が抑制される可能性を示唆した。

また、オートファジーが亢進している SFs では MHC class II を介した細胞内抗原提示を行うことが報告されており (Dengjel et al., 2005)、Ireland らは RASFs ではオートファジーが亢進することで CD4 陽性 T 細胞にシトルリン化抗原を提示する可能性を示した (Ireland and Unanue, 2011)。近年オートファジー依存性の MHC class II を介した細胞内抗原提示を定義した "Type 2 cross-presentation" という概念が提示されている (Valecka et al., 2018)。我々の過去の研究ではさらにその抗原がシトルリン化ペプチドであることを示している (Sugawara et al., 2020)。一方で、Zhao らは、JAK 阻害薬の添加によって RASFs の HLA-DR による抗原提示が阻害され、CD4 陽性 T 細胞が抗原提示されることで細胞表面に表出するはずの CD69 の発現も低下することを示した (Zhao et al., 2021)。さらに、今回の研究で我々は JAK-STAT 経路を阻害することで、cVIM と HLA-DR の結合も抑制されることを示し、先に示された抗原提示の抑制効果が、cVIM の抗原提示にも影響する可能性が示唆された。

RA においてサイトカイン刺激によって IL-6 の分泌が促進されることは報告されており、Nguyen らは RASFs を TNF- α と IL-17 で刺激することで培養液中の IL-6 濃度の上昇が ELISA で確認されることを報告している (Nguyen et al., 2017)。また、An らは、RA の好中球において siRNA を用いて ATG5 をノックダウンすることで、培養上清中の IL-6, IL-8, IL-10 や MCP-1 の濃度が低下することを示している (An et al., 2018)。今回の結果では、オートファジーの誘導によって IL-6 の産生が亢進し、抑制することで低下し、さらに JAK-STAT 経路を阻害することによっても低下することを示した。

総じて、これらの結果から、JAK-STAT 経路の阻害によるオートファジーの抑制がその活性だけでなく、機能的な部分にも影響していることがわかった。

RA においては、JAK1 に対する阻害効果とその病態に最も影響すると考えられる (Haan et al., 2011)。JAK1 は IL-6 や IFN- γ といった RA の病態でも中心となるサイトカインのシグナルの伝達に関与しており、それぞれ、STAT3 と STAT1 を介して細胞内へシグナル伝達される。受容体には JAK1/JAK2/TYK2 と、JAK1/JAK2 がそれぞれ結合していることから、多くの JAK 阻害薬は JAK 1 に対する阻害効果を有している。Upadacitinib は JAK 2 に対する阻害活性も高く (McInnes et al., 2019)、特筆すべきはその強力な JAK1 の阻害活性である。

(Genovese et al., 2016)

したがって、今回の実験では様々な炎症性サイトカインに対する高い阻害効果が期待できるという観点から Upadacitinib を使用し、サイトカインのシグナルを単純にブロックするだけでなく、JAK-STAT 経路がオートファジーにも関与しているという結果を得ることができた。

本研究では、cVIM が HLA-DR と結合した後に細胞表面に提示されて、CD4 陽性 T 細胞などへ抗原提示していることは確認していない。RA の生体内での免疫学的な病態を模倣できているかを評価する上でも、抗原提示された後の免疫細胞への影響を確認することは重要と考えられ、今後の研究課題である。さらに、今回は cVIM の生成の評価を免疫細胞染色でしか行っておらず、蛋白質レベルでの評価も必要と考えられる。また、今回は JAK 阻害薬として Upadacitinib のみを用いて評価しているが、各 JAK に対して異なる阻害活性をもつ他の JAK 阻害薬を用いた評価も行うべきと考えられ、これも今後の研究課題である。

6.6 結語

RA 患者においてオートファジーは JAK-STAT 経路による調整を受けている可能性があり、JAK1 を阻害することでオートファジーによって引き起こされる cVIM の生成や HLA-DR との共局在、IL-6 の産生が抑制されることで RA の病態の改善に寄与していると考えられる。

7.総括および結論

SSc-PAH の早期例の検出には FVC/DLco や右軸偏位が有用で、左心疾患の早期例の検出には複数のモダリティーによる形態学的評価が重要であった。

RA に関する研究の結果では、オートファジーが JAK-STAT 経路による調節を受けていることが明らかとなり、病態の解明に大きく寄与するものと考えられる。

7.1 第一章 Borderline 強皮症性肺高血圧症の評価方法に関する研究

・本研究では、SSc における早期例の検出に有用なパラメーターを同定することができた。SSc-PAH のスクリーニングアルゴリズムである DETECT アルゴリズムを $mPAP > 20 \text{ mmHg}$ を予測するように改変し、さらにパラメーターのスコアリングに重みづけスコアを採用することで、スクリーニング性能を向上させることができた。

・PAH に対する治療方法がこの 10 年で進歩を遂げ、一般的な PAH の予後も改善していく中で、依然として予後不良疾患として臨床上の大きな問題となっていた SSc-PAH の早期例の検出に関する知見を新たに発見できたことは今後の強皮症患者の診療において価値のあるものになると考えられる。

7.2 第二章 強皮症性肺動脈性肺高血圧症患者における左心疾患の評価

・本研究では、様々な臓器合併症が相互に関連しあい、複雑な病態を形成している SSc-PAH における、左心疾患を合併した患者群の特徴を明らかにし、一般的な 2 群肺高血圧症とは診断に際して異なるアプローチをとることが重要であることがわかった。

・強皮症においては左心疾患による関与が明らかな症例においても PAWP の変化が乏しい患者群がいることは以前より報告されてはいたが、血行動態学的なパラメーター以外で何を指標とし、左心疾患の合併とそれによる影響をどのように評価したらよいかを明らかにした報告はなく、今回の研究での結果は今後の SSc-PAH の病態の評価に関して一石を投じることができたと思われる。

7.3 第三章 関節リウマチの滑膜線維芽細胞における JAK-STAT 経路によるオートファジー制御機序の解明

・今回の研究で我々は、RASFs における cVIM の生成や HLA-DR による抗原提示など、RA の病態の様々な重要な局面に関与しているオートファジーという機構が JAK-STAT 経路による調節を受け、オートファジーが亢進することで引き起こされる現象に対しても影響を与えていることを示した。

・JAK 阻害薬は臨床でも現在大きな発展を遂げているカテゴリーであるが、詳細な機

序に関してはまだ明らかになっていない部分も多い。我々はその中でオートファジーに着目し、今回の結果を得ることによって、明らかになっていない病態の一部分を示すことができた。

今後の課題として、SSc-PAH に関しては、疾患のスクリーニングや左心疾患の合併のみならず早期からの治療に関するデータ等も積み上げていくことがさらなる強皮症診療の充実につながると考えられる。RA に関しては、オートファジーが亢進することで促進される現象は他にも数多くあり、JAK-STAT 経路の関わりもまだまだ評価する余地があり、研究課題と考えられる。

8.謝辞

本論文は筆者が北海道大学大学院医学研究院免疫・代謝内科学教室博士課程に在籍中の研究結果をまとめたものです。同分野教授 渥美達也先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えて頂き、その遂行にあたって終始、ご指導を頂きました。ここに深く感謝の意を表します。

本分野膠原病グループ講師 加藤将先生には本研究の遂行にあたり、終始熱心な指導、適切なお助言を頂きました。ここに深く感謝の意を表します。本分野膠原病グループ講師 Olga Amengual 先生、助教 藤枝 雄一郎先生、助教 河野 通仁先生には研究の遂行にあたり、日頃より有益なご討論、ご助言を頂きました。同期の大学院生の麻生邦之先生、佐藤太貴先生は臨床・研究のどちらにおいても深い知識と高い意欲を持っておられ、常に切磋琢磨しあえる大事な仲間でした。菅原恵理先生は実験グループの先輩として、多方面にわたりご指導頂き、大変感謝しております。工藤友喜大学院生は私が実験を始めた当初から実験の先輩としてサポートして頂き、大変感謝しております。また、ご卒業された嶋村早苗先生、中村浩之先生、河野通大先生、谷村瞬先生、柴田悠平先生、Lee Wenshi 先生、大西直樹先生、尾形裕介先生、阿部靖矢先生、狩野皓平先生、下山修平先生、大学院生の菅原正成先生、吉村大先生、竹山脩平先生、垂水政人先生、小住由衣先生、Jiang Wei 先生、多田真里亜先生、崎山広大先生、土田真央先生、安田充孝先生、守谷悠先生、西野慶先生はともに学び励ましあい大学院生活の支えとなってくさいました。心より感謝申し上げます。特に吉村大先生、工藤友喜大学院生は同じ研究グループとして長く苦楽を共にした大切な同僚であり、大学院生活を続ける中でとても大きな助けになってくれて、大変感謝しております。阿部靖矢先生も日頃の実験の悩みを聞いて頂き、アドバイスを頂いて大変感謝しております。

当科実験助手の金子由美子さん、石倉唯さん、藤田雄介さんのご協力なしには実験を遂行することは不可能でした。心より感謝申し上げます。この他にも、この論文作成にあたりご協力・ご指導・ご助言を頂きました多くの諸先輩方、同僚、後輩の皆様に対しまして心より感謝申し上げます。

また、陰ながら心配しつつも応援してくれた両親、弟には見守り、励ましなど大きなサポートを頂いたこと、大変感謝しております。

最後に、妻の晴奈と長男の椋太・長女のくるみにはいつも応援してもらい、とても励みになりました。この場を借りて日頃の感謝を記させていただきます。

9.利益相反

第3章の研究はアッヴィ合同会社からの研究助成を受けたものであるため、ここに開示致します。

10. 引用文献

Abe, N., Kato, M., Kono, M., Fujieda, Y., Ohira, H., Tsujino, I., Oyama-Manabe, N., Oku, K., Bohgaki, T., Yasuda, S., *et al.* (2020). Right ventricular dimension index by cardiac magnetic resonance for prognostication in connective tissue diseases and pulmonary hypertension. *Rheumatology (Oxford)* 59, 622-633.

Alabed, S., Shahin, Y., Garg, P., Alandejani, F., Johns, C.S., Lewis, R.A., Condliffe, R., Wild, J.M., Kiely, D.G., and Swift, A.J. (2020). Cardiac-MRI Predicts Clinical Worsening and Mortality in Pulmonary Arterial Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2021 May;14(5):931-942.

An, Q., Yan, W., Zhao, Y., and Yu, K. (2018). Enhanced neutrophil autophagy and increased concentrations of IL-6, IL-8, IL-10 and MCP-1 in rheumatoid arthritis. *Int Immunopharmacol* 65, 119-128.

Bae, S., Saggar, R., Bolster, M.B., Chung, L., Csuka, M.E., Derk, C., Domsic, R., Fischer, A., Frech, T., Goldberg, A., *et al.* (2012). Baseline characteristics and follow-up in patients with normal haemodynamics versus borderline mean pulmonary arterial pressure in systemic sclerosis: results from the PHAROS registry. *Ann Rheum Dis* 71, 1335-1342.

Bergrath, E., Gerber, R.A., Gruben, D., Lukic, T., Makin, C., and Wallenstein, G. (2017). Tofacitinib versus Biologic Treatments in Moderate-to-Severe Rheumatoid Arthritis Patients Who Have Had an Inadequate Response to Nonbiologic DMARDs: Systematic Literature Review and Network Meta-Analysis. *Int J Rheumatol* 2017, 8417249. Epub 2017 Mar 9.

Bottini, N., and Firestein, G.S. (2013). Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol* 9, 24-33.

Bourji, K.I., Kelemen, B.W., Mathai, S.C., Damico, R.L., Kolb, T.M., Mercurio, V., Cozzi, F., Tedford, R.J., and Hassoun, P.M. (2017). Poor survival in patients with scleroderma and pulmonary hypertension due to heart failure with preserved ejection fraction. *Pulm Circ* 7, 409-420.

Butt, S.A., Jeppesen, J.L., Torp-Pedersen, C., Sam, F., Gislason, G.H., Jacobsen, S., and Andersson, C. (2019). Cardiovascular Manifestations of Systemic Sclerosis: A Danish Nationwide Cohort Study. *J Am Heart Assoc.* 2019 Sep 3;8(17):e013405.

Chang, L., Feng, X., and Gao, W. (2019). Proliferation of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes is enhanced by IL-17-mediated autophagy through STAT3 activation. *Connect Tissue Res* 60, 358-366.

Chen, M., Li, M., Zhang, N., Sun, W., Wang, H., and Wei, W. (2021). Mechanism of miR-218-5p in autophagy, apoptosis and oxidative stress in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts is mediated by KLF9 and JAK/STAT3 pathways. *J Investig Med.* 2021 Feb 8;69(4):824-832.

Chen, R., Sun, Y., Cui, X., Ji, Z., Kong, X., Wu, S., Huang, Q., Dai, X., Zhang, S., Ma, L., *et al.* (2019). Autophagy promotes aortic adventitial fibrosis via the IL-6/Jak1 signaling pathway in Takayasu's arteritis. *J Autoimmun* 99, 39-47.

Chung, L., Liu, J., Parsons, L., Hassoun, P.M., McGoon, M., Badesch, D.B., Miller, D.P., Nicolls, M.R., and Zamanian, R.T. (2010). Characterization of connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension from REVEAL: identifying systemic sclerosis as a unique phenotype. *Chest* 138, 1383-1394.

Coghlan, J.G., Denton, C.P., Grunig, E., Bonderman, D., Distler, O., Khanna, D., Muller-Ladner, U., Pope, J.E., Vonk, M.C., Doelberg, M., *et al.* (2014). Evidence-based detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: the DETECT study. *Ann Rheum Dis* 73, 1340-1349.

Dengjel, J., Schoor, O., Fischer, R., Reich, M., Kraus, M., Muller, M., Kreyborg, K., Altenberend, F., Brandenburg, J., Kalbacher, H., *et al.* (2005). Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7922-7927.

Di Cesare, E., Battisti, S., Di Sibio, A., Cipriani, P., Giacomelli, R., Liakouli, V., Ruscitti, P., and Masciocchi, C. (2013). Early assessment of sub-clinical cardiac involvement in systemic sclerosis (SSc) using delayed enhancement cardiac magnetic resonance (CE-

MRI). *Eur J Radiol* 82, e268-273.

Diller, M., Hasseli, R., Hulser, M.L., Aykara, I., Frommer, K., Rehart, S., Muller-Ladner, U., and Neumann, E. (2019). Targeting Activated Synovial Fibroblasts in Rheumatoid Arthritis by Peficitinib. *Front Immunol* 10, 541.

Dong, G., You, M., Fan, H., Ding, L., Sun, L., and Hou, Y. (2015). STS-1 promotes IFN-alpha induced autophagy by activating the JAK1-STAT1 signaling pathway in B cells. *Eur J Immunol* 45, 2377-2388.

Emori, T., Kasahara, M., Sugahara, S., Hashimoto, M., Ito, H., Narumiya, S., Higashi, Y., and Fujii, Y. (2020). Role of JAK-STAT signaling in the pathogenic behavior of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis: Effect of the novel JAK inhibitor peficitinib. *Eur J Pharmacol.* 2020 Sep 5;882:173238.

Faludi, R., Kolto, G., Bartos, B., Csimas, G., Czirjak, L., and Komocsi, A. (2014). Five-year follow-up of left ventricular diastolic function in systemic sclerosis patients: determinants of mortality and disease progression. *Semin Arthritis Rheum* 44, 220-227.

Fayyaz, A.U., Edwards, W.D., Maleszewski, J.J., Konik, E.A., DuBrock, H.M., Borlaug, B.A., Frantz, R.P., Jenkins, S.M., and Redfield, M.M. (2018). Global Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Hypertension Associated With Heart Failure and Preserved or Reduced Ejection Fraction. *Circulation* 137, 1796-1810.

Fernandes, F., Ramires, F.J., Arteaga, E., Ianni, B.M., Bonfa, E.S., and Mady, C. (2003). Cardiac remodeling in patients with systemic sclerosis with no signs or symptoms of heart failure: an endomyocardial biopsy study. *J Card Fail* 9, 311-317.

Fuhrmann, J., Clancy, K.W., and Thompson, P.R. (2015). Chemical biology of protein arginine modifications in epigenetic regulation. *Chem Rev* 115, 5413-5461.

Galie, N., Hoeper, M.M., Humbert, M., Torbicki, A., Vachiery, J.L., Barbera, J.A., Beghetti, M., Corris, P., Gaine, S., Gibbs, J.S., *et al.* (2009). Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart

and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J* 30, 2493-2537.

Genovese, M.C., Smolen, J.S., Weinblatt, M.E., Burmester, G.R., Meerwein, S., Camp, H.S., Wang, L., Othman, A.A., Khan, N., Pangan, A.L., *et al.* (2016). Efficacy and Safety of ABT-494, a Selective JAK-1 Inhibitor, in a Phase IIb Study in Patients With Rheumatoid Arthritis and an Inadequate Response to Methotrexate. *Arthritis Rheumatol* 68, 2857-2866.

Guillen-Del Castillo, A., Callejas-Moraga, E.L., Garcia, G., Rodriguez-Palomares, J.F., Roman, A., Berastegui, C., Lopez-Meseguer, M., Domingo, E., Fonollosa-Pla, V., and Simeon-Aznar, C.P. (2017). High sensitivity and negative predictive value of the DETECT algorithm for an early diagnosis of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: application in a single center. *Arthritis Res Ther.* 2017 Jun 14;19(1):135.

Haan, C., Rolvering, C., Raulf, F., Kapp, M., Druckes, P., Thoma, G., Behrmann, I., and Zerwes, H.G. (2011). Jak1 has a dominant role over Jak3 in signal transduction through gammac-containing cytokine receptors. *Chem Biol* 18, 314-323.

Hachulla, A.L., Launay, D., Gaxotte, V., de Groote, P., Lamblin, N., Devos, P., Hatron, P.Y., Beregi, J.P., and Hachulla, E. (2009). Cardiac magnetic resonance imaging in systemic sclerosis: a cross-sectional observational study of 52 patients. *Ann Rheum Dis* 68, 1878-1884.

Hao, Y., Thakkar, V., Stevens, W., Morrisroe, K., Prior, D., Rabusa, C., Youssef, P., Gabbay, E., Roddy, J., Walker, J., *et al.* (2015). A comparison of the predictive accuracy of three screening models for pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther.* 2015 Jan 18;17(1):7.

Hofmann, H.D., and Kirsch, M. (2012). JAK2-STAT3 signaling: A novel function and a novel mechanism. *JAKSTAT* 1, 191-193.

Hosseini, A., Gharibi, T., Marofi, F., Javadian, M., Babaloo, Z., and Baradaran, B. (2020). Janus kinase inhibitors: A therapeutic strategy for cancer and autoimmune diseases. *J Cell Physiol* 235, 5903-5924.

Hsu, S., Kokkonen-Simon, K.M., Kirk, J.A., Kolb, T.M., Damico, R.L., Mathai, S.C.,

Mukherjee, M., Shah, A.A., Wigley, F.M., Margulies, K.B., *et al.* (2018). Right Ventricular Myofilament Functional Differences in Humans With Systemic Sclerosis-Associated Versus Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 137, 2360-2370.

Humbert, M., Yaici, A., de Groote, P., Montani, D., Sitbon, O., Launay, D., Gressin, V., Guillevin, L., Clerson, P., Simonneau, G., *et al.* (2011). Screening for pulmonary arterial hypertension in patients with systemic sclerosis: clinical characteristics at diagnosis and long-term survival. *Arthritis Rheum* 63, 3522-3530.

Ireland, J.M., and Unanue, E.R. (2011). Autophagy in antigen-presenting cells results in presentation of citrullinated peptides to CD4 T cells. *J Exp Med* 208, 2625-2632.

Jamilloux, Y., El Jammal, T., Vuitton, L., Gerfaud-Valentin, M., Kerever, S., and Seve, P. (2019). JAK inhibitors for the treatment of autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev.* 2019 Nov;18(11):102390.

Kahan, A., and Allanore, Y. (2006). Primary myocardial involvement in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 45 Suppl 4, iv14-17.

Kameda, H., Takeuchi, T., Yamaoka, K., Oribe, M., Kawano, M., Yokoyama, M., Pangan, A.L., Konishi, Y., Meerwein, S., and Tanaka, Y. (2021). Efficacy and safety of upadacitinib over 84 weeks in Japanese patients with rheumatoid arthritis (SELECT-SUNRISE). *Arthritis Res Ther.* 2021 Jan 6;23(1):9.

Kang, R., Zeh, H.J., Lotze, M.T., and Tang, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* 18, 571-580.

Kato, M., and Atsumi, T. (2018). Pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue diseases: A review focusing on distinctive clinical aspects. *Eur J Clin Invest.* 2018 Feb;48(2).

Kato, M., Ospelt, C., Gay, R.E., Gay, S., and Klein, K. (2014). Dual role of autophagy in stress-induced cell death in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheumatol* 66, 40-48.

Kato, M., Sugimoto, A., and Atsumi, T. (2020). Diagnostic and prognostic markers and treatment of connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension: current recommendations and recent advances. *Expert Rev Clin Immunol* 16, 993-1004.

Khanna, D., Gladue, H., Channick, R., Chung, L., Distler, O., Furst, D.E., Hachulla, E., Humbert, M., Langleben, D., Mathai, S.C., *et al.* (2013). Recommendations for screening and detection of connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension. *Arthritis Rheum* 65, 3194-3201.

Kim, E.K., Kwon, J.E., Lee, S.Y., Lee, E.J., Kim, D.S., Moon, S.J., Lee, J., Kwok, S.K., Park, S.H., and Cho, M.L. (2017). IL-17-mediated mitochondrial dysfunction impairs apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through activation of autophagy. *Cell Death Dis.* 2017 Jan 19;8(1):e2565.

Klareskog, L., Catrina, A.I., and Paget, S. (2009). Rheumatoid arthritis. *Lancet* 373, 659-672.

Klein, K., and Gay, S. (2015). Epigenetics in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 27, 76-82.

Krikeerati, T., Pussadhamma, B., Mahakkanukrauh, A., Suwannaroj, S., Nanagara, R., and Foocharoen, C. (2021). Associated factors of early-onset pulmonary hypertension and clinical difference between early- and late-onset pulmonary hypertension in Thai systemic sclerosis. *Mod Rheumatol* 31, 649-656.

Lammi, M.R., Saketkoo, L.A., Gordon, J.K., and Steen, V.D. (2018). Changes in hemodynamic classification over time are common in systemic sclerosis-associated pulmonary hypertension: insights from the PHAROS cohort. *Pulm Circ* 2018; 8(2) 1–7.

Lang, R.M., Badano, L.P., Mor-Avi, V., Afilalo, J., Armstrong, A., Ernande, L., Flachskampf, F.A., Foster, E., Goldstein, S.A., Kuznetsova, T., *et al.* (2015). Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr* 28, 1-39 e14.

Lee, W.S., Kato, M., Sugawara, E., Kono, M., Kudo, Y., Kono, M., Fujieda, Y., Bohgaki, T., Amengual, O., Oku, K., *et al.* (2020). Protective Role of Optineurin Against Joint

Destruction in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. *Arthritis Rheumatol* 72, 1493-1504.

Lei, Y., Zhang, X., Lin, H., Feng, Y., Wang, J., and Luo, R. (2021). The effects of oral treatment for systemic sclerosis related pulmonary arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis. *Mod Rheumatol* 31, 151-161.

LeRoy, E.C., Black, C., Fleischmajer, R., Jablonska, S., Krieg, T., Medsger, T.A., Jr., Rowell, N., and Wollheim, F. (1988). Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 15, 202-205.

Maxwell, L.J., and Singh, J.A. (2010). Abatacept for rheumatoid arthritis: a Cochrane systematic review. *J Rheumatol* 37, 234-245.

McInnes, I.B., Byers, N.L., Higgs, R.E., Lee, J., Macias, W.L., Na, S., Ortmann, R.A., Rocha, G., Rooney, T.P., Wehrman, T., *et al.* (2019). Comparison of baricitinib, upadacitinib, and tofacitinib mediated regulation of cytokine signaling in human leukocyte subpopulations. *Arthritis Res Ther* 21, 183.

McInnes, I.B., and Schett, G. (2011). The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 365, 2205-2219.

McKee, P.A., Castelli, W.P., McNamara, P.M., and Kannel, W.B. (1971). The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. *N Engl J Med* 285, 1441-1446.
Meune, C., Vignaux, O., Kahan, A., and Allanore, Y. (2010). Heart involvement in systemic sclerosis: evolving concept and diagnostic methodologies. *Arch Cardiovasc Dis* 103, 46-52.

Mizoguchi, F., Slowikowski, K., Wei, K., Marshall, J.L., Rao, D.A., Chang, S.K., Nguyen, H.N., Noss, E.H., Turner, J.D., Earp, B.E., *et al.* (2018). Functionally distinct disease-associated fibroblast subsets in rheumatoid arthritis. *Nat Commun.* 2018 Feb 23;9(1):789.

Morrisroe, K., Stevens, W., Huq, M., Prior, D., Sahhar, J., Ngian, G.S., Celermajer, D., Zochling, J., Proudman, S., Nikpour, M., *et al.* (2017). Survival and quality of life in incident systemic sclerosis-related pulmonary arterial hypertension. *Arthritis Res Ther.* 2017 Jun 2;19(1):122.

Nagueh, S.F., Smiseth, O.A., Appleton, C.P., Byrd, B.F., 3rd, Dokainish, H., Edvardsen, T., Flachskampf, F.A., Gillebert, T.C., Klein, A.L., Lancellotti, P., *et al.* (2016).

Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr* 29, 277-314.

Nathan, S.D., Barbera, J.A., Gaine, S.P., Harari, S., Martinez, F.J., Olschewski, H., Olsson, K.M., Peacock, A.J., Pepke-Zaba, J., Provencher, S., *et al.* (2019). Pulmonary hypertension in chronic lung disease and hypoxia. *Eur Respir J* 2019; 53: 1801914

Nguyen, H.N., Noss, E.H., Mizoguchi, F., Huppertz, C., Wei, K.S., Watts, G.F.M., and Brenner, M.B. (2017). Autocrine Loop Involving IL-6 Family Member LIF, LIF Receptor, and STAT4 Drives Sustained Fibroblast Production of Inflammatory Mediators. *Immunity* 46, 220-232.

O'Shea, J.J., Schwartz, D.M., Villarino, A.V., Gadina, M., McInnes, I.B., and Laurence, A. (2015). The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annu Rev Med* 66, 311-328.

Okada, Y., Wu, D., Trynka, G., Raj, T., Terao, C., Ikari, K., Kochi, Y., Ohmura, K., Suzuki, A., Yoshida, S., *et al.* (2014). Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* 506, 376-381.

Orlandi, M., Lepri, G., Damiani, A., Barsotti, S., Di Battista, M., Codullo, V., Della Rossa, A., Guiducci, S., and Allanore, Y. (2020). One year in review 2020: systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 38 *Suppl* 125, 3-17.

Overbeek, M.J., Vonk, M.C., Boonstra, A., Voskuyl, A.E., Vonk-Noordegraaf, A., Smit, E.F., Dijkmans, B.A., Postmus, P.E., Mooi, W.J., Heijdra, Y., *et al.* (2009). Pulmonary arterial hypertension in limited cutaneous systemic sclerosis: a distinctive vasculopathy. *Eur Respir J* 34, 371-379.

Sabeh, F., Fox, D., and Weiss, S.J. (2010). Membrane-type I matrix metalloproteinase-dependent regulation of rheumatoid arthritis synoviocyte function. *J Immunol* 184, 6396-6406.

Sandmeier, B., Jager, V.K., Nagy, G., Carreira, P.E., Tzankov, A., Widuchowska, M., Antic, M., Distler, O., Reichert, H., Distler, J.H., *et al.* (2015). Autopsy versus clinical findings in patients with systemic sclerosis in a case series from patients of the EUSTAR database. *Clin Exp Rheumatol* 33, S75-79.

Sasaki, N., Kamataki, A., and Sawai, T. (2011). A histopathological study of pulmonary hypertension in connective tissue disease. *Allergol Int* 60, 411-417.

Scher, J.U., Littman, D.R., and Abramson, S.B. (2016). Microbiome in Inflammatory Arthritis and Human Rheumatic Diseases. *Arthritis Rheumatol* 68, 35-45.

Silman, A.J., and Pearson, J.E. (2002). Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res 4 Suppl 3*, S265-272.

Simonneau, G., Montani, D., Celermajer, D.S., Denton, C.P., Gatzoulis, M.A., Krowka, M., Williams, P.G., and Souza, R. (2019). Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2019; 53: 1801913

Smolen, J.S., and Steiner, G. (2003). Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov* 2, 473-488.

Smolen, J.S., Tohidast-Akrad, M., Gal, A., Kunaver, M., Eberl, G., Zenz, P., Falus, A., and Steiner, G. (1996). The role of T-lymphocytes and cytokines in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 25, 1-4.

Sobanski, V., Giovannelli, J., Lynch, B.M., Schreiber, B.E., Nihtyanova, S.I., Harvey, J., Handler, C.E., Denton, C.P., and Coghlan, J.G. (2016). Characteristics and Survival of Anti-U1 RNP Antibody-Positive Patients With Connective Tissue Disease-Associated Pulmonary Arterial Hypertension. *Arthritis Rheumatol* 68, 484-493.

Strand, V., Schiff, M., Tundia, N., Friedman, A., Meerwein, S., Pangan, A., Ganguli, A., Fuldeore, M., Song, Y., and Pope, J. (2019). Effects of upadacitinib on patient-reported outcomes: results from SELECT-BEYOND, a phase 3 randomized trial in patients with rheumatoid arthritis and inadequate responses to biologic disease-modifying antirheumatic drugs. *Arthritis Res Ther.* 2019 Dec 2;21(1):263.

Sugawara, E., Kato, M., Kudo, Y., Lee, W., Hisada, R., Fujieda, Y., Oku, K., Bohgaki, T., Amengual, O., Yasuda, S., *et al.* (2020). Autophagy promotes citrullination of VIM (vimentin) and its interaction with major histocompatibility complex class II in synovial fibroblasts. *Autophagy* 16, 946-955.

Suzuki, A., Yamada, R., Chang, X., Tokuhira, S., Sawada, T., Suzuki, M., Nagasaki, M., Nakayama-Hamada, M., Kawaida, R., Ono, M., *et al.* (2003). Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 34, 395-402.

Syversen, S.W., Goll, G.L., van der Heijde, D., Landewe, R., Lie, B.A., Odegard, S., Uhlig, T., Gaarder, P.I., and Kvien, T.K. (2010). Prediction of radiographic progression in rheumatoid arthritis and the role of antibodies against mutated citrullinated vimentin: results from a 10-year prospective study. *Ann Rheum Dis* 69, 345-351.

Takeuchi, T., Tanaka, Y., Tanaka, S., Kawakami, A., Iwasaki, M., Katayama, K., Rokuda, M., Izutsu, H., Ushijima, S., Kaneko, Y., *et al.* (2019). Efficacy and safety of peficitinib (ASP015K) in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate: results of a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial (RAJ4) in Japan. *Ann Rheum Dis* 78, 1305-1319.

Tanaka, Y., Kuwana, M., Fujii, T., Kameda, H., Muro, Y., Fujio, K., Itoh, Y., Yasuoka, H., Fukaya, S., Ashihara, K., *et al.* (2020). 2019 Diagnostic criteria for mixed connective tissue disease (MCTD): From the Japan research committee of the ministry of health, labor, and welfare for systemic autoimmune diseases. *Mod Rheumatol*, 1-5.

Tanaka, Y., Okumura, H., Kim, S., Dorey, J., Wojciechowski, P., Chorazy, J., Kato, D., and Schultz, N.M. (2021). Comparative Efficacy and Safety of Peficitinib Versus Tofacitinib and Baricitinib for Treatment of Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Rheumatol Ther* 8, 729-750.

Tennoe, A.H., Murbraech, K., Andreassen, J.C., Fretheim, H., Garen, T., Gude, E., Andreassen, A., Aakhus, S., Molberg, O., and Hoffmann-Vold, A.M. (2018). Left Ventricular Diastolic Dysfunction Predicts Mortality in Patients With Systemic Sclerosis. *J Am Coll Cardiol* 72, 1804-1813.

Thakkar, V., Stevens, W.M., Prior, D., Moore, O.A., Byron, J., Liew, D., Patterson, K., Hissaria, P., Roddy, J., Zochling, J., *et al.* (2012). N-terminal pro-brain natriuretic peptide in a novel screening algorithm for pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: a case-control study. *Arthritis Res Ther.* 2012 Jun 12;14(3):R143.

Tyndall, A.J., Bannert, B., Vonk, M., Airo, P., Cozzi, F., Carreira, P.E., Bancel, D.F., Allanore, Y., Muller-Ladner, U., Distler, O., *et al.* (2010). Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis* 69, 1809-1815.

Tzelepis, G.E., Kelekis, N.L., Plastiras, S.C., Mitseas, P., Economopoulos, N., Kampolis, C., Gialafos, E.J., Moysakis, I., and Moutsopoulos, H.M. (2007). Pattern and distribution of myocardial fibrosis in systemic sclerosis: a delayed enhanced magnetic resonance imaging study. *Arthritis Rheum* 56, 3827-3836.

Ummarino, D. (2016). Rheumatoid arthritis: RA-BEACON illuminates baricitinib. *Nat Rev Rheumatol.* 2016 Jun;12(6):313.

Utsunomiya, A., Hasegawa, M., Oyama, N., Asano, Y., Endo, H., Fujimoto, M., Goto, D., Ishikawa, O., Kawaguchi, Y., Kuwana, M., *et al.* (2020). Clinical course of Japanese patients with early systemic sclerosis: A multicenter, prospective, observational study. *Mod Rheumatol*, 1-9.

Vachieri, J.L., Tedford, R.J., Rosenkranz, S., Palazzini, M., Lang, I., Guazzi, M., Coghlan, G., Chazova, I., and De Marco, T. (2019). Pulmonary hypertension due to left heart disease. *Eur Respir J.* 2019 Jan 24;53(1):1801897.

Valecka, J., Almeida, C.R., Su, B., Pierre, P., and Gatti, E. (2018). Autophagy and MHC-restricted antigen presentation. *Mol Immunol* 99, 163-170.

Valerio, C.J., Schreiber, B.E., Handler, C.E., Denton, C.P., and Coghlan, J.G. (2013). Borderline mean pulmonary artery pressure in patients with systemic sclerosis: transpulmonary gradient predicts risk of developing pulmonary hypertension. *Arthritis Rheum* 65, 1074-1084.

van den Hoogen, F., Khanna, D., Fransen, J., Johnson, S.R., Baron, M., Tyndall, A., Matucci-Cerinic, M., Naden, R.P., Medsger, T.A., Jr., Carreira, P.E., *et al.* (2013). 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 65, 2737-2747.

Vandecasteele, E., Drieghe, B., Melsens, K., Thevissen, K., De Pauw, M., Deschepper, E., Decuman, S., Bonroy, C., Piette, Y., De Keyser, F., *et al.* (2017). Screening for pulmonary arterial hypertension in an unselected prospective systemic sclerosis cohort. *Eur Respir J.* 2017 May 11;49(5):1602275.

Vieira, M.C., Zwillich, S.H., Jansen, J.P., Smiechowski, B., Spurden, D., and Wallenstein, G.V. (2016). Tofacitinib Versus Biologic Treatments in Patients With Active Rheumatoid Arthritis Who Have Had an Inadequate Response to Tumor Necrosis Factor Inhibitors: Results From a Network Meta-analysis. *Clin Ther* 38, 2628-2641 e2625.

Volkov, M., van Schie, K.A., and van der Woude, D. (2020). Autoantibodies and B Cells: The ABC of rheumatoid arthritis pathophysiology. *Immunol Rev* 294, 148-163.

Vossenaar, E.R., Radstake, T.R., van der Heijden, A., van Mansum, M.A., Dieteren, C., de Rooij, D.J., Barrera, P., Zendman, A.J., and van Venrooij, W.J. (2004). Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Ann Rheum Dis* 63, 373-381.

Weatherald, J., Boucly, A., Launay, D., Cottin, V., Prevot, G., Bourlier, D., Dauphin, C., Chaouat, A., Savale, L., Jais, X., *et al.* (2018). Haemodynamics and serial risk assessment in systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2018 Oct 18;52(4):1800678.

Writing Committee, M., Yancy, C.W., Jessup, M., Bozkurt, B., Butler, J., Casey, D.E., Jr., Drazner, M.H., Fonarow, G.C., Geraci, S.A., Horwich, T., *et al.* (2013). 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation* 128, e240-327.

Zhang, F., Wei, K., Slowikowski, K., Fonseka, C.Y., Rao, D.A., Kelly, S., Goodman,

S.M., Tabechian, D., Hughes, L.B., Salomon-Escoto, K., *et al.* (2019). Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry. *Nat Immunol* 20, 928-942.

Zhao, S., Grieshaber-Bouyer, R., Rao, D.A., Kolb, P., Chen, H., Andreeva, I., Tretter, T., Lorenz, H.M., Watzl, C., Wabnitz, G., *et al.* (2021). JAK inhibition prevents the induction of pro-inflammatory HLA-DR(+) CD90(+) RA synovial fibroblasts by IFN. *Arthritis Rheumatol.* 2021 Aug 25. doi: 10.1002/art.41958. Online ahead of print.

Zhu, S., Cao, L., Yu, Y., Yang, L., Yang, M., Liu, K., Huang, J., Kang, R., Livesey, K.M., and Tang, D. (2013). Inhibiting autophagy potentiates the anticancer activity of IFN1@IFNalpha in chronic myeloid leukemia cells. *Autophagy* 9, 317-327.