



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                   |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | 自己免疫疾患の治療反応性予測因子と新規バイオマーカーの探索 [全文の要約]                                             |
| Author(s)           | 菅原, 正成                                                                            |
| Description         | この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。<br>配架番号：2765 他                                 |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                             |
| Degree Name         | 博士(医学)                                                                            |
| Dissertation Number | 甲第15447号                                                                          |
| Issue Date          | 2023-03-23                                                                        |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/89992">https://hdl.handle.net/2115/89992</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                   |
| File Information    | SUGAWARA_Masanari_summary.pdf                                                     |



# 学位論文（要約）

自己免疫疾患の治療反応性予測因子と  
新規バイオマーカーの探索  
(Explorations of predictors and new biomarkers in  
the treatment for autoimmune diseases)

2023 年 3 月  
北 海 道 大 学  
菅 原 正 成



# 学位論文（要約）

自己免疫疾患の治療反応性予測因子と  
新規バイオマーカーの探索  
(Explorations of predictors and new biomarkers in  
the treatment for autoimmune diseases)

2023 年 3 月  
北 海 道 大 学  
菅 原 正 成

## 学位論文の要約

関節リウマチ (RA) は慢性かつ進行性の関節破壊を特徴とする自己免疫疾患であり、これまで RA の治療として副腎皮質ステロイドの他、様々な種類の疾患修飾性抗リウマチ薬 (DMARDs) が開発されてきた。このうち分子標的型合成 DMARDs に属するヤヌスキナーゼ (JAK) 阻害薬 (JAKis) は既存の治療に抵抗性の RA 患者に対し高い有効性が示された。しかしながら依然として JAKis 無効 (JAKis-IR) となる患者は一定数存在し、その治療反応性を予測することが、有効な薬剤の選択に重要である。これまでに JAKis-IR の予測因子について確立した見解は無く、前半では臨床パラメーターを用いた患者の層別化による RA 患者の JAKis-IR に対する治療反応性の予測を行った。

RA ではこれまでさまざまな治療反応性予測を行うための試みがなされている。中には臨床パラメーターを用いたものだけではなく、新規バイオマーカーも多く探索されているが、治療反応性を予測する指標が確立されたとはいえない。近年、マイクロプロテインと呼ばれる 100 アミノ酸未満の小さなタンパク質が発見された。これらマイクロプロテインの中には生体内で重要な働きを担っているものも多数認められ、関節リウマチや他の自己免疫疾患の治療反応性予測に関与するマイクロプロテインが存在すると仮説を立てた。先行研究により我々が独自に発見したマイクロプロテイン MKMP78 は当初は腎尿細管細胞で発見されたが、シングルセル解析の結果などを加味すると、単球・マクロファージでも発現があることが予想された。単球・マクロファージは関節リウマチや他の自己免疫疾患の病態において重要な役割を担っているので、MKMP78 により関節リウマチや自己免疫疾患の治療反応性予測ができる可能性を考え、後半ではその仮説の立証にいたる前段階である、MKMP78 の単球・マクロファージにおける発現解析を行った。

### 第一章 RA 患者における JAKis-IR の予測因子に関する研究

【背景と目的】JAKis は現在、従来型 DMARDs で効果不十分な RA 症例において、生物学的製剤と並ぶ追加の治療選択肢として推奨されているが、しばしば JAKis-IR となる患者を経験する。しかし JAKis-IR に関連する因子についてこれまで確立した見解は無く、本研究では RA における JAKis-IR の予測因子を有するサブグループを解明する事を目的とした。

【対象と方法】2013 年 7 月から 2019 年 9 月に 6 施設で JAKis (トファシチニブまたはバリシチニブ) を開始された RA 患者を後ろ向きに解析した。JAKis 開始時の臨床的及び血清学的パラメーターを用いて階層クラスター分析を行い、主要評価項目をクラスター毎の JAKis-IR の割合とした。JAKis-IR の定義として、①JAKis 無反応：JAKis 開始 12 週時点で治療開始時と比較し、C 反応性タンパクを用いた疾患活動性スコア 28 の変化量が 1.2 未満かつアメリカリウマチ学会 20%改善基準の非達成、②JAKis 不耐容：JAKis 開始 12 週未満で有害事象、臓器障害、関節炎の悪化等の臨床経過を理由に中止、のいずれかとした。副次的評価項目としてクラスター毎にパラメーターの傾向を調査した。

【結果】132 名の RA 患者がエントリーし、階層クラスター分析によって A, B, C, D の 4 群に分類された。4 群は RA に関する 3 つの臨床的特徴 (自己抗体、関節破壊、間質性肺疾患 (ILD)) によって区別され、A 群 (n=32)：自己抗体陰性・関節破壊あり・ILD なし、B 群 (n=35)：自己抗体陽性・関節破壊なし・ILD なし、C 群 (n=20)：自己抗体陽性・関節破壊なし・ILD あり、D 群 (n=45)：自己抗体陽性・関節破壊あり・ILD あり、であった。JAKis-IR の割合は A 群：34.3%、B 群：17.1%、C 群：20.0%、D 群：8.9% であり、A 群と D 群間は統計学的に有意だった ( $p=0.04$ )。

【考察】グループ D の RA 患者では自己抗体陽性を背景に JAK-STAT シグナル経路が強く活性化され、関節破壊病変や ILD の形成への影響や JAKis に対して良好な反応性を生じた事が考えられた。一方でグループ A は自己抗体陰性の RA 患者が多く、JAK-STAT シグナル経路の活性化が相対的に弱い事で、グループ D と比較し高率の JAKis-IR を生じたと考えられた。

【結論】階層クラスター分析により、自己抗体陰性・関節破壊病変・ILD の特徴を有する RA のサブグループにおいて JAKis-IR を生じやすいと考えられた。

## 第二章 単球・マクロファージ（骨髄系細胞）における新規マイクロプロテイン MKMP78 の発現評価

【背景と目的】既知の分子には無い自己免疫疾患の治療反応性予測に有用なバイオマーカーとして、我々はマイクロプロテインに着目した。先行研究で、同定された新規マイクロプロテイン MKMP78 は当初は腎尿細管細胞で同定されたが骨髄系細胞でも発現が上昇している事が予想されたため、本研究では骨髄系細胞における MKMP78 の発現を評価する事を目的とした。

【対象と方法】ヒト単球系白血病細胞株 THP-1 に PMA を添加し THP-1 由来未分化 (M0) マクロファージを誘導し、THP-1 及び M0 マクロファージにおける MKMP78 の mRNA 発現レベルを定量的逆転写 PCR 法 (RT-qPCR) で、タンパク発現レベルをウェスタンブロッティング、免疫蛍光染色、フローサイトメトリーで評価した。また活性化単球における MKMP78 の発現を評価するため、THP-1 に炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  と IFN- $\gamma$ 、または Toll 様受容体 (TLR) リガンドである LPS、Zymosan、CpG、Poly (I:C) を添加し、添加から 0、1、6、12、24 時間後の MKMP78 の発現レベルを RT-qPCR 及びフローサイトメトリーで評価した。

【結果】M0 マクロファージでは THP-1 と比較して有意な MKMP78 mRNA 発現レベルの上昇を認め、フローサイトメトリーのみ有意な MKMP78 のタンパクレベルの上昇を認めた。THP-1 に対しサイトカインまたは TLR リガンドによる活性化刺激後、いずれの刺激においても 12 時間以内の MKMP78 mRNA 発現レベルの有意な上昇を認め、IFN- $\gamma$  以外で有意差は認めなかったが MKMP78 のタンパク発現レベルも刺激後に上昇する傾向だった。

【考察】本研究で用いた PMA やサイトカイン及び TLR リガンドはマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) の一種である細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) を活性化させるが、既報では転写因子 c-Myc を介した MKMP78 の発現亢進が報告されており、MAPK/ERK シグナル経路の活性化による c-Myc の産生亢進を介して、MKMP78 mRNA の発現上昇を生じたと考えられた。タンパク発現の結果は WB 及び IF とフローサイトメトリーの間で相違があり、各実験系において今後更なる条件検討や最適化が必要と考えられた。

【結論】THP-1 に対し PMA を用いた M0 マクロファージへの誘導、及びサイトカインや TLR リガンドを用いた活性化刺激により、MKMP78 の mRNA 発現レベルの上昇を認め、c-Myc を介した制御機構の存在が考えられた。

第一章における階層クラスター分析を用いた検討では自己抗体陰性・関節破壊あり・RA-ILD なしの RA 患者で JAKi-IR が高率であり、臨床的にはこれらの特徴を有する RA 患者に対する JAKis の治療反応性の評価を慎重に行う必要があると考えられた。また第二章においては、自己免疫疾患の新規バイオマーカーを探索するために新しく発見された MKMP78 に注目し、THP-1 セルラインを用いた骨髄系細胞における MKMP78 の発現を評価した。THP-1 に対し PMA で誘導した未分化マクロファージや、サイトカインや TLR リガンドで活性化刺激を行った THP-1 において MKMP78 の mRNA レベルの発現上昇を認めた。これらの刺激に関与する細胞内シグナル経路との関係から、骨髄系細胞において一定の制御機構の存在が示唆された。また既報では MKMP78 遺伝子について細胞増殖や生存などの細胞機能との関連が示唆され、今後のタンパク発現の更なる解析を経て、将来的に新規バイオマーカーとしての樹立が期待される分子と考えられた。