HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	難治性自己免疫疾患ならびにもやもや病の病態解明と新規バイオマーカーの探索［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	工藤, 友喜
Description	配架番号：2881
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16200号
Issue Date	2024-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94089
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	KUDO_Yuki_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏名　工　藤　友　喜

学位論文題名

難治性自己免疫疾患ならびにもやもや病の病態解明と新規バイオマーカーの探索
(Exploration of pathophysiology and novel biomarkers in systemic autoimmune diseases and Moyamoya disease)

＜第一部＞

【背景と目的】 全身性エリテマトーデス (Systemic Lupus Erythematosus: SLE) は多彩な自己抗体産生と免疫複合体沈着を特徴とする自己免疫疾患である。重症例では心病変、血管炎、漿膜炎など多彩な臓器病変に加え腎病変を呈するループス腎炎、中枢神経病変を呈する精神神経ループスなどを発症する場合もあり、予後不良な病態である。SLE は多因子疾患であり、発症過程では遺伝的素因に加え環境要因など複数の要素が関与するが、特に自己反応性 T cell の出現や B 細胞の活性化など、末梢免疫細胞が病態に大きな影響を及ぼすことが報告されている。SLE の治療においては疾患活動性のモニタリングが必要不可欠だが、現状高感度なバイオマーカーが少ないことが非常に大きな問題である。そこで、SLE における疾患活動性の指標となり得る新規バイオマーカーを見出すことを目的として、本研究を実施した。

【対象と方法】 SLE 患者 34 名及び健常者 (Healthy control: HC) 10 名の血清を用いて、炎症関連タンパク質の高感度プロテオーム解析を施行した。得られた結果と、SLE Disease Activity Index (SLEDAI) をはじめとする各種臨床データとの相関解析から、SLE のバイオマーカータンパク質を探索した。さらに同患者及び HC の末梢血単核球を用いて、45 種の免疫細胞サブセットの割合をフローサイトメトリーで測定し、バイオマーカータンパク質との関連性を評価した。

【結果】 プロテオーム解析では計 368 種の炎症関連タンパク質が検出され、SLE-HC 間で 82 種に有意差を認めた。うち SLEDAI と 14 種で正の相関 ($r > 0.4$)、4 種で負の相関 ($r < -0.4$) を認めた。我々はその中から、SLEDAI と強い正の相関があり、NF-κB 経路を介して炎症性サイトカイン産生を誘導する cytoskeleton-associated protein 4 (CKAP4) ならびに C-type lectin domain family 7 member A (CLEC7A) に着目した。血清 CKAP4 及び CLEC7A 値は、活動性の低い SLE 患者 ($SLEDAI \leq 4$) でも HC と比べ有意に上昇していた。また補体ならびに抗 ds-DNA 抗体が正常値の SLE 患者においても、81.8%で CKAP4 が、90.9%で CLEC7A が陽性となった。免疫細胞サブセット解析では測定した 45 サブセット中、SLE 患者において 19 サブセットで HC との有意な差を認めた。さらに、血清 CKAP4 ならびに CLEC7A 値は、follicular helper T 細胞や peripheral helper T 細胞関連をはじめとする複数サブセットと相関を認めた。

【考察】 本研究で CKAP4 及び CLEC7A は、低疾患活動性群、また血清学的に正常な SLE 群でも上昇を認めたことから、従来のものとは異なる疾患活動性のマーカーとなりうると考えられる。また CKAP4 ならびに CLEC7A は、NF-kb 経路の活性化を介して TNF-α、IL-6、type 1 IFN などの炎症性サイトカインの産生を誘導することが知られている。これらのサイトカインは Tfh ならびに Tph の分化を制御しており、また本研究では血清 CKAP4 及び CLEC7A 値が Tfh、Tph 関連サブセットと正に相関していたことから、両タンパク質が炎症性サイトカイン放出を介して Tfh や Tph の分化に関与する可能性があると考えられる。

【結論】 血清 CKAP4 ならびに CLEC7A 値は、SLE の疾患活動性を評価するための高感度なバイオマーカーとなり得ることが示された。

＜第二部＞

【背景と目的】 全身性強皮症 (systemic sclerosis: SSc) は全身に線維化病変をきたす疾患で、肺動脈性肺高血圧症を合併した強皮症性肺動脈性肺高血圧症 (systemic sclerosis associated pulmonary arterial

hypertension: SSc-PAH) は特に予後不良である。その原因として静脈病変の関与が示唆されているが、患者生体組織を用いた評価は難しく、疾患に関与する遺伝子などの報告はほぼ無い。そこで我々は、患者由来疾患特異的 iPSc を樹立し血管内皮細胞 (endothelial cell: EC) に分化誘導させ、EC の機能異常を解明することを目指して研究を行った。

【対象と方法】 肺動脈性肺高血圧症と肺静脈閉塞症を合併した SSc 患者及び HC の末梢血単核球から iPSc を樹立し、EC に分化誘導させた。得られた EC を用いて細胞増殖能、脈管形成能の評価と RNA-sequence を行った。RNA-sequence の結果から SSc-PAH の病態に関与する可能性のある遺伝子を選定し、HUVEC を用いた発現調節実験を行った。また PAH の発症に関与すると言われている内皮間葉転換 (endothelial-mesenchymal transition: Endo-MT) をサイトカイン刺激により誘発した HUVEC において、RNA-sequence で着目した因子の発現を評価した。

【結果】 患者、HC 双方からの iPSc 樹立ならびに EC 分化誘導に成功し、患者由来 EC で細胞増殖能の亢進、脈管形成能の低下を認めた。RNA-sequence の結果から、発現低下遺伝子群の pathway 解析において上位 10 pathway 中 9 種に含まれた Caveolin 1 (CAV1) に着目した。CAV1 knockdown HUVEC では患者由来 EC 同様に細胞増殖能の亢進を認め、Endo-MT マーカーの発現も認められた。また in vitro Endo-MT モデル HUVEC でも、CAV1 タンパク質の発現低下が認められた。

【考察】 SSc 患者では、腎臓や肺などで血管内腔の狭窄、閉塞を認めることから、誘導した患者由来 EC は SSc の血管異常を反映していると考えられた。また Endo-MT は、TGF-β、TNF-α、IL-1β などの炎症性サイトカイン刺激によって EC が間葉系細胞の表現型を獲得し、異常増殖する現象である。TGF-β は SSc において線維化の進行にも影響を及ぼすことから、CAV1 は Endo-MT を介した PAH の発症と SSc の進行の双方に関与する可能性がある。

【結論】 SSc-PAH 患者由来 EC は、SSc の血管異常を反映していた。EC における CAV1 発現の低下が、Endo-MT を介して SSc ならびに PAH の病態形成に関与する可能性が示唆された。

＜第三部＞

【背景と目的】 もやもや病とは、内頸動脈末端部の狭窄閉塞性変化と脳底部の血管網形成を特徴とする脳血管障害である。我々は血清補体価 CH50 低値であるもやもや病の一例を経験し、当該患者の補体活性化経路異常を見出すことを目指して本研究を行った。

【対象と方法】 CH50 低値を認めたもやもや病患者に対し、もやもや病の感受性遺伝子ならびに補体関連遺伝子の遺伝子解析を施行した。患者血漿の Mixing test によって C6 に対する自己抗体の存在を、患者血清の Western blot によって C6 タンパク質発現を評価した。患者家族の遺伝子解析ならびに CH50 値の測定も行った。

【結果】 患者は MASP2 遺伝子のヘテロ接合型ミスセンスバリアント及び C6 遺伝子のホモ接合型ミスセンスバリアントを有しており、RNF213 遺伝子のバリアントは有さなかった。Mixing test では、1%健常者血漿、または生体内の濃度の 1/50–100 に値する 1 μg/mL の精製ヒト C6 タンパク質の混合により、患者血漿中の CH50 濃度は顕著に上昇した。また Western blot では、患者血清中の C6 タンパク質の量的な欠失が確認された。患者の父、弟、息子 2 名の CH50 値は正常範囲内であり、父と弟は C6 遺伝子のヘテロ接合型ミスセンスバリアントを有していた。

【考察】 本症例は、もやもや病と C6 欠損症の偶発的な併発である可能性もあるが、当該患者は他の疾患や遺伝的感受性の背景が無く、患者家族に補体欠損症や脳血管障害を呈する人がいなかったことから、両疾患の関連性が示唆された。

【結論】 CH50 低値のもやもや病患者における、ホモ接合性 C6 遺伝子バリアント及び量的 C6 タンパク質欠損が証明された。

＜まとめ＞

膠原病の中でも特に難治性の疾患を対象にした 2 つの研究、また極めて希少な疾患に関する研究を通して、新規バイオマーカーや治療ターゲットを見出す糸口を掴むことができた。これらの疾患の病態研究を一層進めることが、難治性疾患患者の未来に繋がると考える。