



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 [全文の要約]
Author(s)	工藤, 友喜
Description	配架番号 : 2881 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。 他
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/2115/94090
Type	doctoral thesis
File Information	KUDO_Yuki_summary.pdf



学 位 論 文 (要 約)

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)

2024 年 12 月

北 海 道 大 学

工 藤 友 喜

膠原病とは、全身の結合組織に炎症が起きる自己免疫疾患のひとつである。膠原病には、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE)、全身性強皮症 (systemic sclerosis: SSc)、多発性筋炎/皮膚筋炎、血管炎症候群、混合性結合組織病、シェーグレン症候群、抗リン脂質抗体症候群、ベーチェット病など様々な疾患が含まれる。近年、グルココルチコイドや免疫抑制薬の開発により、これら膠原病患者の生命予後は向上した。しかし既存薬では予後不良な病態やグルココルチコイドなどの薬剤による副作用による臓器障害も問題となっている。本研究ではとりわけ病態の詳細が未だ不明で治療に難渋する症例の多い疾患から、第一部では SLE、第二部では SSc に、第三部では背景に自己免疫疾患も関与する場合があるもやもや病に焦点を当てた。

<第一部>

全身性エリテマトーデスの新規血清バイオマーカー探索

【背景と目的】

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。SLE は全身倦怠感、発熱、皮疹、関節炎等のみを認める軽症例もある一方、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であるが、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】

2020 年から 2021 年にかけて北海道大学病院を受診した SLE 患者のうち、研究に同意をいただいた計 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 の疾患活動性評価の指標である 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】

SLE 患者 34 名（女性 31 名）の年齢（中央値）は 40 歳、SLEDAI（中央値）は 8.0 であった。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 と正の相関があり、NF- κ B 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 ≤ 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、Tfh や Tph をはじめとする複数の T 細胞関連サブセットとの正の相関を認めた。

【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- κ B 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 >

疾患特異的 iPSc を用いた強皮症性肺動脈性肺高血圧症の病態解明

【背景と目的】

SSc は、全身の皮膚硬化に加え全身の臓器に線維化、硬化をきたす自己免疫疾患である。この SSc に、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、肺動脈リモデリングをはじめ肺静脈病変、心病変など様々な要素の関与が考えられているが、未だ病態に関する分子生物学的な知見は殆ど報告がなく、根本的な治療法も確立されていない。そのため、SSc-PAH の病態解明や新規治療標的の発見が望まれているが、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も少ない。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を BrdU assay、脈管形成能を Tube formation assay で評価し、併せて RNA-sequence を施行した。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た。選定した遺伝子は HUVEC を用いて発現調節を行い、BrdU assay による細胞増殖能の評価を行った。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) に着目し、発現調節後の HUVEC における Endo-MT マーカータンパク質の発現を蛍光免疫染色により評価した。さらにサイトカイン刺激により Endo-MT を誘発した in vitro Endo-MT モデル HUVEC において、RNA-sequence で着目した遺伝子のコードするタンパク質の発現を、蛍光免疫染色で評価した。

【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 マーカーの発現が亢進していた。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-1 β 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 >

補体 CH50 低値を伴うもやもや病における遺伝子変異の同定

【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。もやもや病の発症には、感受性遺伝子として知られる *ring finger protein 213 (RNF213)* などの遺伝子変異に加え、自己免疫、感染症などの二次的要因が関与すると考えられている。またもやもや病患者では、第一部で取り上げた SLE をはじめとする膠原病と同様に、血清及び脳脊髄液中において様々な炎症関連分子が増加していることが知られている。我々は、補体の総合的な活性を示す指標である CH50 値の顕著な低下を認め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。併せて、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エーション及び *C6* 遺伝子のホモ接合型ミスセンスバリエーションを有しており、*RNF213* 遺伝子のバリエーションは有さなかった。**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 $\mu\text{g/mL}$ 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 遺伝子バリエーション及び量的 C6 タンパク質欠損が証明された。

<総括>

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。