

学 校 名	東 京 女 子 医 科 大 学	研究所名等		
研 究 課 題	関節リウマチ発症高リスク個体の免疫異常の探索 ー関節炎発症に対する遺伝的要因とDysbiosisの 関与ー		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①関節リウマチ ②Pre-clinical ③Shared epitope ④Dysbiosis			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
岡 本 祐 子	東京女子医科大学 医学部	講 師	研究の統括、臨床検体の収集、測定、解析の実施

○研究分担者

[illegible]

関節リウマチ発症高リスク個体の免疫異常の探索

ー関節炎発症に対する遺伝的要因と Dysbiosis の関与ー

1. 研究の目的

抗 CCP (cyclic citrullinated peptide) 抗体は、シトルリン化抗原を認識する自己抗体である。全人口の約 1%が罹患する関節リウマチ (RA) 患者においては、関節炎を発症する 5 年以上前から血中に抗 CCP 抗体が検出される前関節炎期を経て、関節炎が発症する。欧米では、抗 CCP 抗体陽性だが関節炎のない将来的な RA 発症高リスク者 (At-risk 者) を対象に、抗リウマチ薬を用いて、RA 発症予防を目的とする介入試験が行われているが、抗 CCP 抗体が産生される過程と、関節痛、関節炎発症に至る過程では、免疫学的メカニズムが異なる可能性が考えられる。安全性が高く、前関節炎期の免疫異常を特異的に制御する、新規の発症予防方法の開発が望まれている。

本研究では介入研究の前段階として、抗 CCP 抗体陽性だが関節炎のない At-risk 者の免疫異常の探索を目的とする。抗 CCP 抗体陽性 At-risk 者の観察開始時における、唾液と糞便の細菌叢と赤血球膜と血漿の ω -3/ ω -6 脂肪酸バランスが、At-risk 者の免疫機能と、その後の関節炎発症に関連し、さらにその関連は遺伝背景により異なると仮説を立て、以下の 2 つの目的を設定した。

- (1) 抗 CCP 抗体陽性 At-risk 者に特徴的な免疫異常を探索する。特に RA 発症との関連が推察される、遺伝的要因、口腔と腸管の細菌叢、末梢血リンパ球のフェノタイプと T 細胞受容体レパトア、血清サイトカインと可溶性免疫チェックポイント分子プロファイルに着目した解析を実施する。
- (2) 抗 CCP 抗体陽性 At-risk 者における、RA 発症予測モデルを構築する。

2. 研究の計画

(1) 患者の登録と検体収集

- ①当施設で実施中の RA 発症高リスク者の前向き観察研究に同意した抗 CCP 抗体陽性 At-risk 者、対照群として、抗 CCP 抗体陽性早期 RA 患者、健常人 (各群 50 人) から、臨床情報と検体の収集を実施する。
- ②末梢血リンパ球、血清、血漿、DNA、糞便と唾液を、研究用検体とする。
- ③At-risk 者は、登録時、RA 発症時、RA を発症しない場合は年に 1 回の検体採取を実施する。

(2) 収集した検体を用いて以下の測定を実施する。

- ①遺伝解析 (HLA の同定、Polygenic risk score の算出)
- ②唾液と糞便の 16S rRNA 遺伝子解析、糞便のメタゲノム解析
- ③赤血球膜と血漿の ω -3/ ω -6 脂肪酸測定
- ④末梢血リンパ球のフェノタイピングと T 細胞受容体レパトア解析
- ⑤血清サイトカインと可溶性免疫チェックポイント分子の測定

(3) 臨床情報、上記の測定結果と、At-risk 者の予後 (RA 発症有無) との統合解析を実施する。

3. 研究の成果

(1) At-risk 者の登録と検体採取

当施設を初診した関節痛患者のうち、抗 CCP 抗体陽性で臨床的な関節炎を認めなかった患者を At-risk 者として登録した。また、健診受診時に本研究に参加し抗 CCP 抗体を測定し、陽性であった無症状者も At-risk 者として登録した。At-risk 者は登録時に研究用検体を採取し、関節炎発症の有無につき経過観察した。臨床的な関節炎を発症し、米国リウマチ学会/欧州リウマチ学会が作成した 2010 年 RA 分類基準を満たした患者を RA と診断した。2025 年度末までに 65 例の At-risk 者を登録し、検体採取を完了した。また、対照群として早期 RA 患者 34 例、健常人 32 例を登録し、検体採取を完了した。

(2) 自己抗体プロファイルと RA 発症の関連

経過観察した At-risk 者からの RA 発症は 21 例 (32%) であった。RA 発症は全例関節痛受診

患者であり、健診抗 CCP 抗体陽性者からの RA 発症はなかった。関節痛患者中の RA 発症は 46% であった。登録時の抗 CCP 抗体とリウマトイド因子 (RF) の抗体価と、RA 発症との関連を解析し、**登録時の RF 高力価陽性 (カットオフ値の 3 倍以上) が、RA 発症リスクである**ことを見出し、学会発表した (口頭発表①)。また、現在日本の臨床で使用される第 2 世代抗 CCP 抗体と、米国で新規開発され日本未導入である第 3 世代抗 CCP 抗体の差異について検討、報告した (口頭発表⑦)。

(3) 末梢血リンパ球のマスサイトメトリー解析

At-risk 者の、その後の RA 発症と関連した末梢血リンパ球サブセットを探索するため、本コホートの末梢血単核細胞 (PBMC) を用いたマスサイトメトリー解析を実施した。T 細胞において、自己抗体産生に重要な役割を果たす循環濾胞ヘルパー T 細胞 (cTfh) と循環末梢ヘルパー T 細胞 (cTph 細胞)、制御性 T 細胞 (Treg) に着目し、機能分子の発現を測定した。cTph 細胞は、細胞膜上に、T 細胞の活性化を抑制的に調整する免疫チェック分子である、Programmed cell death 1 (PD-1) を高発現する。At-risk 者、早期 RA 患者、健常人の PBMC を用いた測定を行い、非バイアスのアルゴリズムを用いた網羅的解析を実施した。結果、At-risk 者と、早期 RA 患者の PBMC 中に、活性化分子である HLA-DR を高発現する cTph (HLA-DR⁺ cTph) 細胞、ICOS と HLA-DR を高発現する Treg の増加を認めた。特に、HLA-DR⁺ cTph 細胞は、検体採取から 1 年以内に RA を発症した At-risk 者の登録時において、有意な増加を認めた。臨床的な関節炎のない At-risk 者および早期 RA 患者に認められた cTph 細胞の増加および活性化は、抗 CCP 抗体産生から関節炎発症の過程に cTph 細胞が関与する可能性を示唆すると考えられた。本知見について、米国コロラド大学との共同研究を実施し、米国 At-risk 者コホートでも同様に、HLA-DR⁺ cTph 細胞の増加が確認された (発表論文①、口頭発表②)。

(4) 可溶性免疫チェックポイント分子の測定

cTph 細胞が RA 発症前から増加している点および、cTph 細胞の細胞膜上に高発現する PD-1 が可溶性分子 (sPD-1) として血清中に同定される点に着目し、本コホートの血清中の、sPD-1 を含む 10 の可溶性チェックポイント分子を Meso Scale Discovery assay を用いて測定した。At-risk 者において、血清中の sPD-1 の上昇を認め、sPD-1 の上昇は、その後の RA 発症のリスク因子であった。また、At-risk 者の登録時と RA 発症時、RA に進展しなかった At-risk 者は登録時と登録 1 年後の 2 点の経時評価を行った。RA に進展した At-risk 者では、持続的に sPD-1 が上昇していたのに対し、RA 非進展 At-risk 者では sPD-1 が経時的に低下しており、sPD-1 が RA 発症に関与している可能性が示唆された (口頭発表③⑤⑥、論文投稿準備中)。

(5) 糞便メタゲノム解析

本コホート登録者の糞便 DNA のショットガンメタゲノムシーケンスを実施した。現在、得られた配列データをもとに、細菌の分類学的構成および代謝経路についての解析を実施中である。

(6) 遺伝解析

本コホート登録者の DNA を用いてシーケンスを実施しており、今後、HLA 推定、多遺伝子性リスクスコア (Polygenic risk score; PRS) の算出を行う。

4. 研究の反省・考察

(1) 2024 年度は計画通りに対象者の登録と検体収集を実施した。2025 年度も引き続き対象者の登録と検体収集を進める。

(2) 計画した測定は、概ね予定通りに実施できている。2025 年度は解析を糞便メタゲノム解析、遺伝解析を進め、統合解析を完了する見込みである。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Takada H, Demoruelle MK, Deane KD, Nakamura S, Katsumata Y, Ikari K, Buckner JH, Robinson WH, Seifert JA, Feser ML, Moss L, Norris JM, Harigai M, Hsieh EWY, Holers VM, Okamoto Y. Expansion of HLA-DR Positive Peripheral Helper T and Naive B Cells in Anticitrullinated Protein Antibody-Positive Individuals At Risk for Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2024 Jul;76(7):1023-1035.

(2) 口頭発表

- ①「抗CCP抗体陽性関節リウマチ発症ハイリスク者における、自己抗体と関節リウマチ発症の関連の前向き検討」 本山亮、岡本祐子、中村昌平、勝又康弘、針谷正祥、第67回 日本リウマチ学会総会・学術集会、福岡、2023年4月26日
- ②「Expansion of circulating HLA-DR⁺ peripheral helper T cells and CXCR5⁺CD38⁺ mature naïve B cells in ACPA-positive individuals at-risk for and with classified RA」 H. Takada, M. Kristen Demoruelle, Kevin D. Deane, Shohei Nakamura, Yasuhiro Katsumata, Katsunori Ikari, Jane H. Buckner, William H. Robinson, Jennifer A. Seifert, Marie L. Feser, LauraKay Moss, Jill M. Norris, Masayoshi Harigai, Elena W.Y. Hsieh, V. Michael Holers, Yuko Okamoto, 2023年11月15日、米国リウマチ学会総会、San Diego, USA
- ③「抗CCP抗体陽性関節リウマチ発症ハイリスク者における、血清可溶性PD-1と関節リウマチ発症の関連に関する検討」 本山 亮、岡本 祐子、中村 昌平、勝又 康弘、針谷 正祥、第68回 日本リウマチ学会総会・学術集会、福岡、2024年4月18日
- ④「Jak阻害薬内服中関節リウマチ患者の末梢血免疫細胞における、サイトカインシグナル抑制の検討」 中村 昌平、岡本 祐子、針谷 正祥、第68回 日本リウマチ学会総会・学術集会、福岡、2024年4月18日
- ⑤「Association of Soluble Immune Checkpoint Proteins with the Risk of Developing RA in ACPA-positive At-risk Individuals」 Ryo Motoyama, Shohei Nakamura, Eisuke Inoue, Hideto Takada, Masayoshi Harigai, Yuko Okamoto, 2024年11月16日、米国リウマチ学会総会、Washington DC, USA
- ⑥「Sustained Elevation of Soluble Immune Checkpoint Proteins during Development of ACPA-positive rheumatoid arthritis」 Ryo Motoyama, Shohei Nakamura, Eisuke Inoue, Hideto Takada, Masayoshi Harigai, Yuko Okamoto, The 69th Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology, Fukuoka, 2025年4月26日
- ⑦「早期関節リウマチ患者と健診受診者における抗CCP2抗体と抗CCP3抗体の検討」 中村昌平、本山亮、高田秀人、針谷正祥、岡本祐子、第69回 日本リウマチ学会総会・学術集会、2025年4月24日

(3) 出版物

- ①「関節リウマチにおける末梢ヘルパーT細胞」 岡本祐子、高田秀人、リウマチ科、科学評論社、2025、Jan;73(1):67-73
- ②「関節リウマチ発症前個体における末梢ヘルパーT細胞」 高田秀人、岡本祐子、中村昌平、森山倫奈、本山亮、菊池華恵、伊能綾子、勝又康弘、針谷正祥、総合医科学研究所紀要44、東京女子医科大学総合医科学研究所、2025年3月