

## マルチオミクスとAI解析で迫るANCA関連血管炎の 病態解明と新規治療法探索

University of Pittsburgh, Visiting Scholar

川崎 貴裕



原因不明の予後不良の難病・ANCA関連血管炎（AAV）の一つである好酸球性多発血管炎性肉芽腫症（EGPA）は、その他のAAVのMPA・GPAと異なる病態が想定され、有用な診断マーカー、病勢マーカーが欠如している。また、根治療法がなく、疾患鍵分子を手掛かりにした病態解明・新規治療法開発は急務である。血清の細胞外小胞（EV）は理想的なLiquid biopsyと考えられており、EVはANCA関連血管炎（AAV）の病態に関わっていることが報告されている。EGPAのみならずAAV全体でも血清蛋白の良質な網羅的解析の先行研究は乏しく、特に血清EVの次世代プロテオミクスと呼ばれるDIA法の質量分析による解析は過去に報告されていない。そこで、本研究では、次世代プロテオミクスを中心とした血液検体のオミクス解析により、EGPAの診断・疾患活動性バイオマーカー（BM）および疾患鍵分子の探索、およびそれを手掛かりにした病態解明を目指すこととした。

治療前・後のAAV（それぞれMPA、GPA、EGPA n=5ずつ）、健常人（HC）n=5の血清からEVを抽出し、LC/MS（DIA法）によるプロテオミクスを施行した結果、総数1855個の蛋白を同定した。さらに、検証プロテオミクスとして治療前AAV（EGPA n=16, MPA n=5, GPA n=5）、治療後AAV（EGPA n=18, MPA n=6, GPA n=3）、気管支喘息（BA）n=15、HC n=14の血清からEVを抽出し、同様にプロテオミクスを施行した。結果、総数2444個の蛋白を同定した。治療前EGPAでは両プロテオミクスで共通して、炎症応答、補体系、凝固系に関するパスウェイに関わる分子が多く含まれていた。最終的に、EGPA特異性が高い新規蛋白としてA、B、C、Dの4つを同定した（図参照）。これらの治療前EGPAの診断能は、ROC解析においていずれもAUC=0.8以上と極めて高く、また、疾患活動性（BVAS）との相関もrho=0.7～0.8程度と非常に強かった。また予後予測能として、採血時点以降の観察期間内での再燃の有無を後ろ向きに調べROC解析をおこなったところ、蛋白A・B・DはいずれもAUCが0.5を超え、末梢血好酸球数やCRPを上回った。

また、このうち蛋白Bについては、血清EVのウエスタンプロットでEGPA特異的な発現上昇を確認した。また、皮膚生検の免疫組織染色でも、病変部位での発現上昇を確認できた。蛋白Bは先行研究では好中球での発現が知られている分子であり、好中球を用いたin vitroでの検証を試みた。健常人の末梢血から採取した好中球をTNF $\alpha$ でプライミングしたうえでAAVを模した刺激として抗MPO抗体を加えたところ、ウエスタンプロットで培養上清中の蛋白Bの増加を確認した。

以上より、血清EVのEGPAのBMとしてA、B、C、Dを同定し、これらはEGPA特異的診断マーカーであるのみならず、病勢マーカーでもあり、かつ予後予測能を有する。特に、蛋白Bについては病変局所での増加やin vitroでの好中球への刺激で分泌増加が見られる分子であり、難治性病態の鍵分子・創薬標的である可能性があると考える。

## EGPA特異的な血清EVのBMを同定（1<sup>st</sup>・2<sup>nd</sup>の共通項）

