

血液及び尿のメタボロミクス解析による
関節リウマチのバイオマーカーの探索

佐々木千代美

目次

要旨	1
略語表	2
第一章 序論	4
1-1. 概要	5
1-2. 疾患活動性評価指標	6
1-3. 疾患の発症要因・病態とバイオマーカー	7
1-4. 治療薬	11
1-5. バイオマーカー探索とメタボロミクス解析	12
第二章 材料と方法	13
2-1. 研究対象者	14
2-2. サンプル調製	14
2-3. メタボロミクス解析	14
2-4. 統計解析	16
第三章 結果	17
3-1. サンプル採取患者の特徴	18
3-2. RA患者とコントロールの血漿における代謝産物の比較	18
3-3. DAS28-ESRと関連する代謝産物	22
3-4. 重回帰分析	31
第四章 考察	33
参考文献	42
謝辞	52

要旨

関節リウマチ(Rheumatoid arthritis : RA)は滑膜の炎症、関節軟骨および骨破壊が生じる全身性自己免疫疾患の一種である。RA の病態は多種多様であり、疾患の発症を誘発させる要因も患者によって様々である。要因例としては環境、タンパク質の翻訳後修飾、エピジェネティックな遺伝子制御、更には RA 発症の確率を上げる遺伝子群などが考えられている。病気の複雑さは臨床的な様々な特徴からも推測され、疾患修飾性抗リウマチ薬や生物学的製剤を使用した際の患者の治療反応性の違いもそれを示唆している。この多様な活動性や病態の差異を総合的に表現・説明できるバイオマーカーを見いだすことができれば、RA の治療および病態のさらなる解明に役立つことが考えられた。

本研究では、関節リウマチ(RA)患者の疾患活動性を評価するバイオマーカーを探索する目的で、CE-Q-TOFMS(capillary electrophoresis quadrupole time-of-flight mass spectrometry)を用いたメタボロミクス解析により、RA 患者の疾患活動性を評価する DAS(disease activity score)28-ESR(erythrocyte sedimentation rate: 血液沈降速度)指標に関連して変動する代謝産物を調べた。32 名の高活動性 RA 患者(DAS28-ESR \geq 3.2)と 17 名の低活動性 RA 患者(DAS28-ESR $<$ 3.2)の血漿と尿を採取して解析し、DAS28-ESR と、弱いながら有意に正または負の相関がある代謝産物を、血漿からは 15 種、尿からは 20 種類見出した。また、高活動性患者と低活動性患者での比較では、血漿で 9 種、尿では 15 種類の代謝産物量に有意差のあることが判明した。これらの結果をふまえ、血漿と尿から DAS28-ESR と有意に正または負の相関があり、かつ高活動性と低活動性患者間で有意差のある合計 11 種類の代謝産物をバイオマーカー候補として選出した。続いて、RA の高疾患活動性と低疾患活動性を判別する多重ロジスティック回帰モデル作成を試みたところ、血漿中の histidine と guanidoacetic acid、尿中の hypotaurine の 3 つの代謝産物により、ROC 曲線下面積値の高い (AUC=0.8934) モデルを作成できた。本結果より、血漿と尿のメタボロミクス解析を組み合わせることでより正確で信頼性の高い RA の疾患状態の把握が可能になることが示唆された。

略語表

ACPA: antibodies to citrullinated protein antigens

ACR: american college of rheumatology

AGAT: arginine:glycine amidinotransferase

APC: antigen presenting cell

bDMARDs: biological disease modifying anti-rheumatic drugs

CDAI: clinical disease activity index

CE-Q-TOFMS: capillary electrophoresis quadrupole time-of-flight mass spectrometry

csDMARDs: conventional synthetic disease modifying anti-rheumatic drugs

DAS28: disease activity score 28

DC: dendritic cell

DCA: dichloroacetate

DMARDs: disease modified anti-rheumatic drug

EAE: experimental autoimmune encephalomyelitis

ESR: erythrocyte sedimentation rate

FLS: fibroblast-like synoviocyte

GCs: glucocorticoids

GAMT: guanidinoacetate N-methyltransferase

H₂S: hydrogen sulfide

HIF-1 α : hypoxia-inducible factor 1 α

HLA: human leukocyte antigen

IL: interleukin

JAK: janus kinase

KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes database

MLR model: multiple logistic regression model

MMP: metalloproteinase

MTX: methotrexate

NF- κ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NOS: nitric oxide synthase

NSAIDs: nonsteroidal anti-inflammatory drugs

PAD: peptidylarginine deiminase

PCA: principal component analysis

PDH: pyruvate dehydrogenase

PDHK: pyruvate dehydrogenase kinase

PLS-DA: partial least-squares discriminant analysis

RA: rheumatoid arthritis

RANKL: receptor activator of nuclear factor- κ B ligand

RF: rheumatoid factor

ROC: receiver operating characteristic curve

SAH: S-adenosylhomocysteine

SAM: S-adenosylmethionine

SDAI: simplified disease activity index

SNP: single-nucleotide polymorphism

TGF- β : transforming growth factor- β

Th17: T helper 17 cell

TLR: toll like receptor

TNF: tumor necrosis factor

Treg: regulatory T cell

tsDMARDs: targeted synthetic disease modifying anti-rheumatic drugs

VAS: visual analogue scale

第一章

序論

1-1. 概要

関節リウマチ(Rheumatoid arthritis : RA)は滑膜の炎症、関節軟骨及び骨破壊が生じる全身性自己免疫疾患の一種である[1,2]。発症年齢は30歳～60歳代とされ、国によって頻度は異なるが、約1%の人口がRAを発症しており、男女比は1対3と女性患者が多い疾患である[3]。

関節は2つの骨と骨の間のクッションの役割をする軟骨とそれを包む関節包や滑膜などから構成されている(図1)。関節リウマチでは滑膜に炎症が起こり増殖し、進行すると骨や軟骨などが破壊され関節が変形する症状が確認される(図2)。

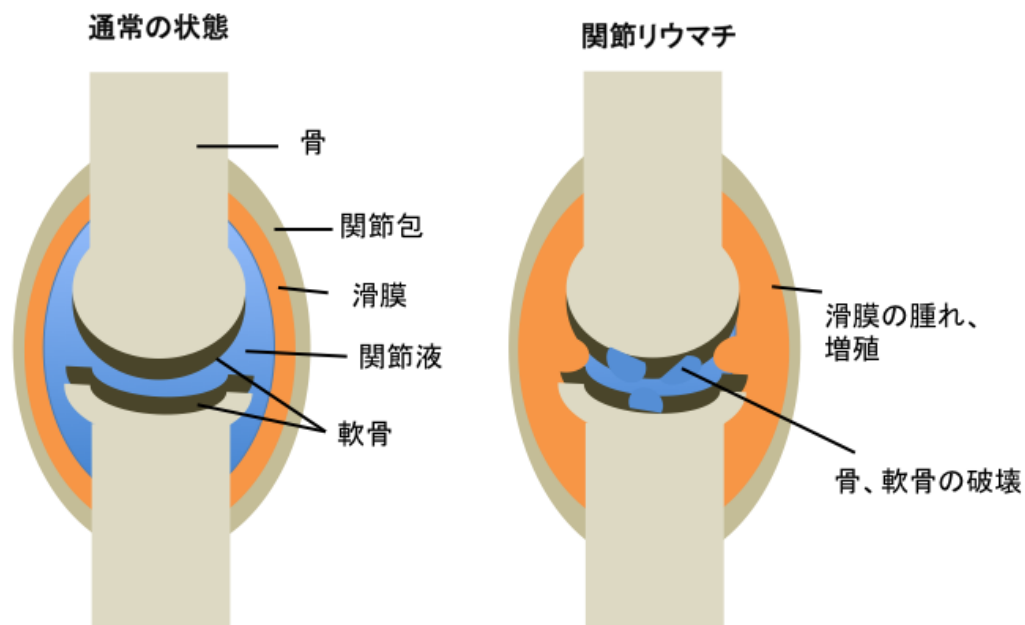


図1 関節リウマチの概要図 (参考文献 [4] より一部改変)

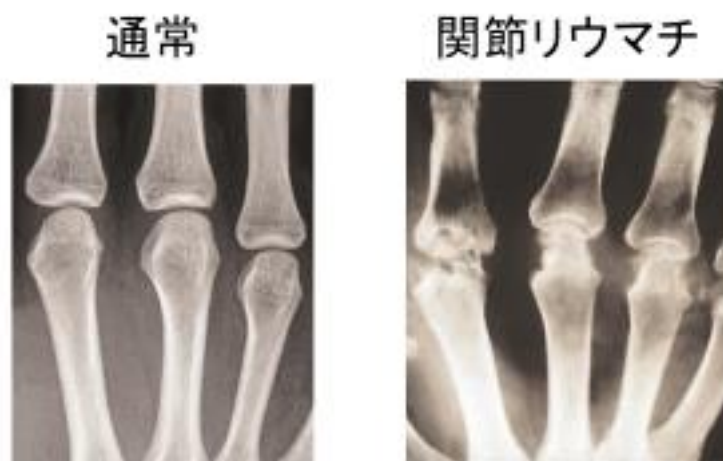


図2 関節リウマチを発症した患者の画像 (参考文献 [5] より引用)

1-2. 疾患活動性評価指標

関節リウマチの疾患の活動性を指標化して評価するため、医師や患者の評価や血液の検査値などを定められた計算式に入れ数値化し、一定の基準で活動性を測定する方法がある。代表的な評価方法としては、DAS(Disease Activity Score) 28、SDAI(simplified disease activity index), CDAI(clinical disease activity index)などが挙げられ[6]、これらの指標を用いて診療が進められる。

この中で本研究で使用した DAS-28(Disease Activity Score 28)-ESR(Erythrocyte sedimentation rate: 赤血球沈降速度)は最も使用されている疾患活動性の指標であり、肩、肘、手首、手指、膝など 28 関節[7] (図 3) における圧痛関節数、腫脹関節数、VAS(visual analogue scale)を用いた目測による症状の評価、そして ESR の測定値を定められた式に当てはめ算出される評価である[8] (表 1)。ESR とは採血管に採血して 1 時間で血液成分が沈んでできた上澄みの高さを mm 単位で測定した値である。赤血球が沈むメカニズムの一つとして報告されているのは、血液中で陰性に帯電する赤血球とアルブミンが、炎症によって増加する陽性に帯電した免疫グロブリンやフィブリノーゲンなどの蛋白質と吸着し、凝集塊が形成され沈殿が亢進するということである。この沈殿の亢進度が慢性炎症活動性を反映し簡便で有用な指標として関節リウマチの検査に使われている[9]。

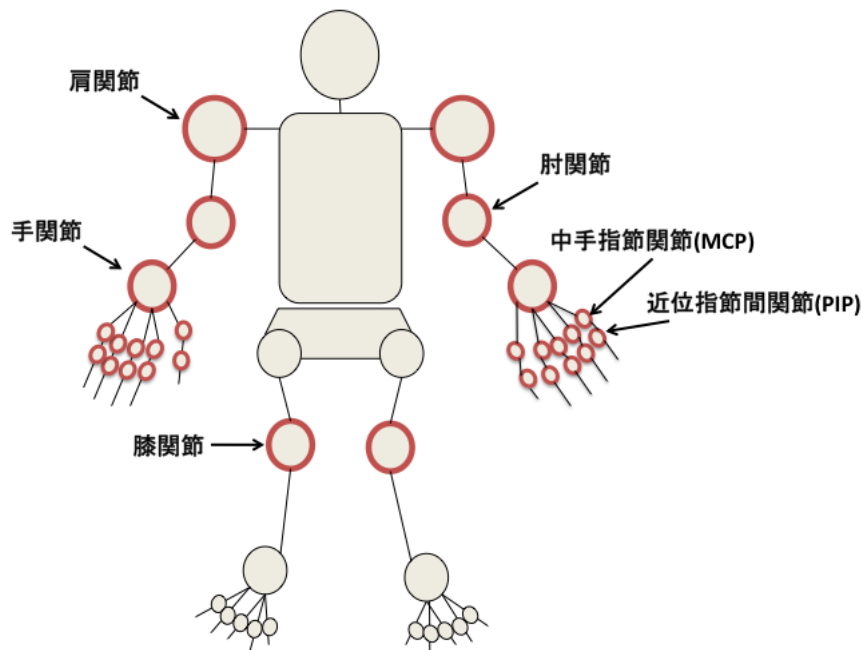


図3 DAS28-ESR における関節炎（腫脹または疼痛関節）の分布（参考文献 [7] より引用）

表1 関節リウマチ疾患活動性指数（参考文献 [8] より引用）

	寛解	低活動性	中等度活動性	高活動性
DAS28(ESR) disease activity score	< 2.6	< 3.2	3.2 ~ 5.1	> 5.1

計算式: $DAS28(ESR) = 0.56\sqrt{\text{(圧痛関節数)}} + 0.28\sqrt{\text{(腫脹関節数)}} + 0.70 \ln \text{ESR (mm/h)} + 0.014 \text{ 患者による全般評価(VAS/mm)}$

本研究においては後述するように DAS28-ESR<3.2 の患者群を低活動性群、DAS28-ESR \geq 3.2 の患者群を高活動性群と定義し、解析を行った。

1-3. 疾患の発症要因・病態とバイオマーカー

RA の病態は多種多様であり、疾患の発症を誘発させる要因も患者によって様々である。要因例としては、喫煙、感染症、または腸内細菌叢の変化などの環境要因[2,10]、タンパク質のアミノ酸配列中のアルギニンがシトルリンに変わるシトルリン化などをはじめとする翻訳後修飾[2]、DNA メチル化などエピジェ

ネティクスな遺伝子制御の要因[11]、更には RA を発症しやすい SNP(Single-nucleotide polymorphism)や HLA(Human Leukocyte Antigen)遺伝子などの遺伝要因[12-14]、などが挙げられている。

これら要因の組み合わせによって引き起こされた関節滑膜組織の炎症部位には、活性化した免疫細胞、例えば好中球や顆粒球、マクロファージなどの自然免疫系の細胞と、獲得免疫系である活性化した T、B 細胞や、形質細胞などが関節の滑液や滑膜に多く集結している。また、RA を発症するかなり初期の段階で抗シトルリン化ペプチド抗体 (Antibodies to Citrullinated Protein Antigens: ACPA) やリウマチ因子(Rheumatoid Factor: RF)が血清中で上昇し滑膜の炎症を誘導することが報告されている[15]。RF とは免疫グロブリンの Fc 領域に対する自己抗体で、RA 患者の約 3 分の 2 が RF や ACPA 陽性と報告されている[16]。特に、RA 患者に特異性のある ACPA が、免疫細胞とどのように関わり関節リウマチへと導くのか、少しずつ明らかになってきている。基本的に ACPA の抗原は、シトルリン化されたフィラグリン、フィブリノーゲン、ビメンチン、ヒストン、タイプ II コラーゲンなど、様々なものが挙げられており、これらをシトルリン化する酵素としてペプチジルアルギニン・デイミナーゼ(Peptidylarginine Deiminase: PAD)が知られている [16]。未だ解明されていないことは多々あるが、一つ分かっていることは、喫煙や粉塵、微生物など吸い込むことにより肺組織内で PAD の発現が上昇することである[17]。それに伴いシトルリン化された多くのタンパクは樹状細胞などの抗原提示細胞(antigen-presenting cell: APC)によって取り込まれ、抗原に反応して活性化した T 細胞は B 細胞を活性化し、ACPA が多量に産生されると考えられている[16](図 4)。その後 ACPA は免疫複合体を形成し関節内に移行し、滑膜組織やマクロファージなどに多く発現している TLRs (Toll Like Receptors)に結合するなどして腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor: TNF)やインターロイキン(interleukin: IL)-1、6 などのサイトカインを産生し炎症を誘導していることが報告されている[18]。また、ACPA とこれらのサイトカインは滑膜線維芽細胞 (fibroblast-like synoviocyte; FLS) や破骨細胞を刺激し、細胞外基質分解酵素(matrix metalloproteinase: MMP)を産生させることで軟骨破壊を促進する [16,19]。加えて抗原提示細胞(APC)から刺激を受け Th17 に分化した細胞から放出された TNF や IL-17 などのサイトカインが、破骨細胞や FLS を刺激することで骨・軟骨の破壊・吸収が促進されることが考えられている[19,20](図 5)。

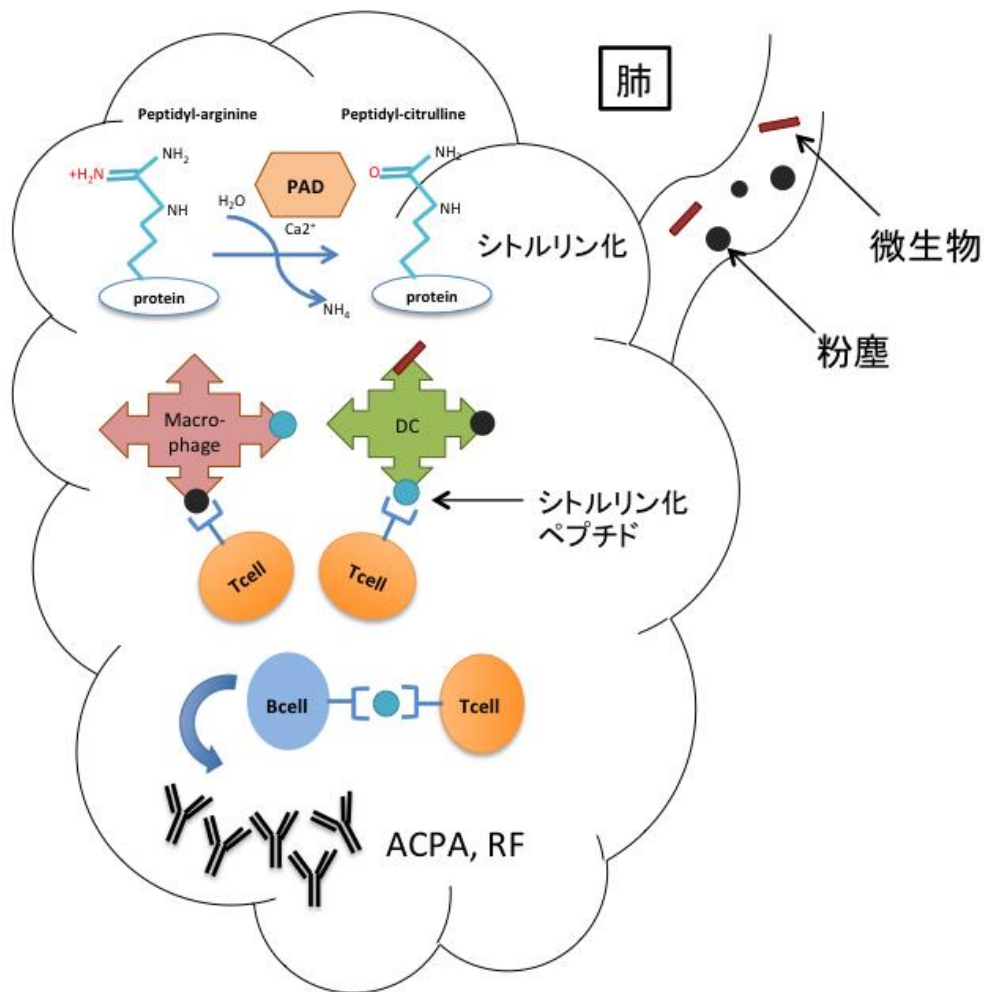


図4 RA 疾患において ACPA, RF が産生されるメカニズム

喫煙や粉塵、微生物など吸い込むことにより肺組織内で PAD がタンパクをシトルリン化し、樹状細胞やマクロファージなどの APC によって取り込まれ、APC が提示した抗原に反応して活性化された T 細胞が B 細胞を活性化し、ACPA や RF が多量に産生されると考えられている。(参考文献 [16] より引用)

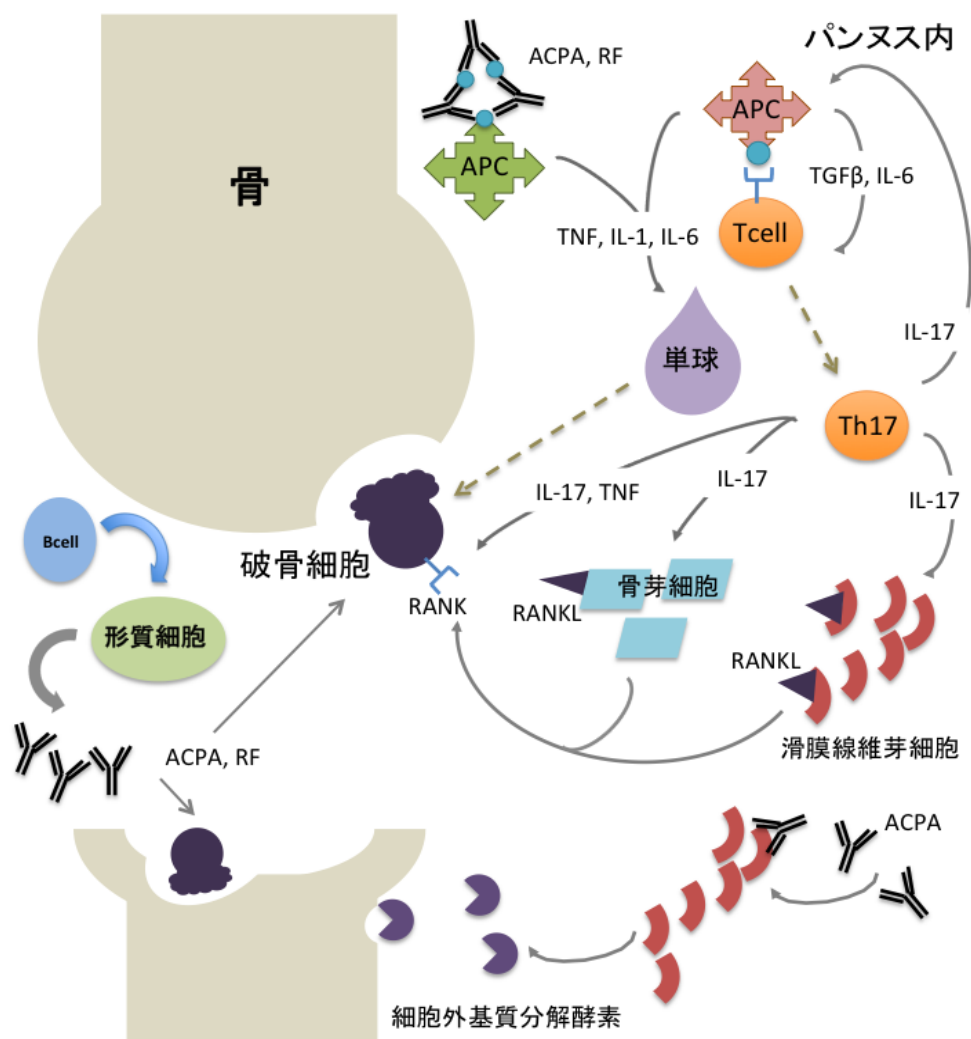


図5 RA 疾患において骨の破壊が促進されるメカニズム

APCA や免疫複合体が APC や滑膜組織に発現している TLR に結合し TNF、IL-1、IL-6 などを産生し炎症を誘導する。また APC から刺激を受け分化した Th17 細胞が TNF や IL-17 などのサイトカインを産生し、滑膜線維芽細胞、細胞外基質分解酵素や破骨細胞を刺激し、骨・軟骨の破壊・吸収が促進される。また、これらの炎症や骨破壊はパンヌスと呼ばれる絨毛のような組織が形成された中で起こることが報告されている。(参考文献 [16] より一部改変)

以上に述べたのは RA 病態に関連して明らかになっている経路の一部であるが、RA の複雑さは多岐にわたる臨床的特徴からも推測され、疾患修飾性抗リウマチ薬 (disease-modified anti-rheumatic drug : DMARD) や生物学的製剤を使用し

た際の患者の治療反応性の違いもそれを示唆している[2,16,21]。この多様な活動性や病態の差異を表現・説明できるバイオマーカーを見いだせれば、RA の治療および病態のさらなる理解に大変有益な情報をもたらすと考えられる。

1-4. 治療薬

関節リウマチを治療する薬は、疾患修飾性抗リウマチ薬 (disease-modifying anti-rheumatic drugs: DMARDs) と呼ばれ、RA の免疫異常を標的とすることにより関節痛、腫脹、関節破壊の進行を抑制する作用がある薬剤である[2]。DMARDs の中でも Methotrexate (MTX) などの従来型合成抗リウマチ薬 (conventional synthetic disease modifying anti-rheumatic drug: csDMARD) と呼ばれる免疫抑制剤、また、TNF や IL-6 などの炎症性サイトカインの働きを抑えたり、これらのサイトカインを産生する細胞の活性化を抑制する生物学的製剤 (biological DMARD: bDMARD) や JAK などのサイトカイン受容体下流のキナーゼを阻害する分子標的型合成抗リウマチ薬 (targeted synthetic DMARD: tsDMARD) など、作用機序が異なる様々なものが使用されている[2](表 2)。他にも非ステロイド系抗炎症薬 (non-steroidal anti-inflammatory drugs: NSAIDs) や副腎皮質ステロイド (グルココルチコイド: GC) なども補助薬として使用される。本研究では、効果の高い生物学的製剤の影響を排除するため、生物学的製剤を使用されていない患者を選択し、MTX 或いは GC 単独または両方を併用した患者の RA 疾患活動性との相関性を調べた。

表2 DMARDs に分類されている免疫調整薬、免疫抑制剤、生物学的製剤で治療に使用されている一部の例 (参考文献 [2] より引用)

生物学的製剤 (bDMARDs)	標的
Adalimumab	TNF阻害
Certolizumab pegol	TNF阻害
Etanercept	TNF阻害
Golimumab	TNF阻害
Infliximab	TNF阻害
Rituximab	抗B細胞(anti-CD20)
Abatacept	抗T細胞(anti-CD80/86)
Tocilizumab	抗IL-6R
分子標的型 (tsDMARDs)	標的
Tofacitinib	JAK阻害

免疫調整薬 (csDMARDs)	作用(ほぼ不確定)
Sodium Aurothiomalate	作用不確定・貪食能抑制作用
D-penicillamine	作用不確定・免疫複合体を解離
Salazosulfapyridine	T/マクロファージに作用しサイトカイン産生抑制
Bucillamine	サブレッサーT細胞の機能改善

免疫抑制剤 (csDMARDs)	作用
Methotrexate(MTX)	DNA, RNA合成阻害
Leflunomide	DNA, RNA合成阻害
Tacrolimus(FK506)	カルシニューリン酵素活性阻害(サイトカイン産生を抑制しリンパ球の増殖や分化を抑制)
Cyclophosphamide	T, B細胞のアポトーシス誘導
Cyclosporine	カルシニューリン酵素活性阻害(サイトカイン産生を抑制しリンパ球の増殖や分化を抑制)

1-5 バイオマーカー探索とメタボロミクス解析

これまで、RA の分子レベルでの病態生理や個々の患者における病態を解明するため様々なオミックス解析が実施されてきた。近年においては患者の血漿、血清、尿や滑液などの検体を使い RA のバイオマーカーとなりうる分子を特定するためメタボロミクス解析が有力な手法であることとして認められつつある [22-26]。メタボロミクスの利点はバイオマーカー探索だけではない。代謝物を調べることにより、疾患の活動性によって急速に変化する生理的反応を知ることができ、さらに予後の予測や治療に対する反応性を評価し、疾患の病態生理を理解することができる。また、代謝産物は生化学的活性によるものであるため病態の表現型と相関しやすいことが期待される。しかしながら、RA の病態活動性と代謝産物の変動の相関性についてはこれまでよく検討されていない。

本研究では、生物学的製剤未使用 RA 患者の尿と血漿を採取し、CE-Q-TOFMS を使い病態活動性と関連している代謝産物を探索した。このメタボロミクス解析手法ではほぼ全ての極性及び荷電した分子種の解析が可能で、高い分解分離能と優れた検出選択性・感度を併せ持ち、かつ高い再現性が実現できる [27,28] ため今回の研究で使用することにした。

第二章

材料と方法

2-1. 研究対象者

本研究は京都大学大学院医科学研究科・医学部の医の倫理委員会によって承認されたものである。京都大学医学部附属病院リウマチセンターにおいて、アメリカリウマチ学会(ACR: American College of Rheumatology)による診療ガイドラインに沿って RA と診断された患者 50 名の血液と尿が集められた。血液透析を受けていた一名の男性患者のデータは除外された。どの患者も生物学的製剤で治療はされておらず、各患者の RA 活動性は DAS28-ESR(disease activity score using 28 joint counts based on erythrocyte sedimentation rate)の指標によって分類された。DAS28-ESR \geq 3.2 を高活動性、DAS28-ESR $<$ 3.2 を低活動性の RA 患者と定義した。その他の患者の臨床情報は診療記録から取得した。コントロールには年齢と性別がほぼ同じ 10 名の非 RA ボランティアを集め血液を採取した。全ての RA 患者とコントロールは 2012 年 11 月から 2013 年 5 月の間に集められ、試料採取日に書面による同意をいただいた。

2-2. サンプル調製

全ての血液と尿は取得してすぐ 4°C で保管され、1 時間以内に処理された。血漿は EDTA 入り採血管を使用し、血漿と尿は複数のチューブに分注し解析まで -80°C で保管した。

2-3. メタボロミクス解析

血漿若しくは尿検体(50 μ L)に 450 μ L の内部標準(H3304-1002; Human Metabolome Technologies, Inc. [HMT], Tsuruoka, Japan)を含んだメタノール (134-14523, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation [Wako], Osaka, Japan)、200 μ L の MilliQ 水、そして 500 μ L のクロロホルムの混合液を添加した。サンプルはボルテックスで良く混和し、4°C、9,100 g で 20 分遠心した。遠心後、350 μ L の上澄みからタンパク質や高分子を除くために 4°C、9,100 g にて 5-kDa の遠心濾過を終夜行った。エバポレーターで濾液を乾燥させ、CE-Q-TOFMS 用のインターナルスタンダードを含む 50 μ L の MilliQ 水で溶解した。

Agilent 6510 Q-TOF 質量分析計(Agilent Technologies)付きのキャピラリー電気泳動システム(Agilent Technologies, Santa Clara, California)を用いて CE-Q-TOFMS を実施した。溶融シリカキャピラリーと解析試薬は HMT から購入した。陽イオン性代謝産物を解析するために、サンプル液は 10 秒間 50 mbar の圧力で注入され、電気泳動キャピラリーには 27 kV の電圧を印加した。陽イオンモードでの質量分析装置のキャピラリー電圧（溶出液から静電噴霧現象によって帯電した液滴を生成させるための ESI キャピラリーに印加する電圧）は 4000 V、フラグメンター電圧（イオンを質量分析部に導入するために印加する電圧）は 80 V に設定した。熱した乾燥窒素ガスの流量（加熱器温度：300 °C）は 5 psig で 7 L/min に維持された。スペクトロメーターは m/z 100 から 3000 をスキャンした。陰イオン代謝産物を解析するために、サンプル液は 25 秒間 50 mbar の圧力で注入され、30 kV の電圧を印加した。陰イオンモードでの質量分析装置のキャピラリー電圧とフラグメンター電圧は 3500 V と 125 V にセットした。熱した乾燥窒素ガスの流量（加熱器温度：300 °C）は 5 psig で 7 L/min に維持された。スペクトロメーターは m/z 100 から 3000 をスキャンした。その他の条件は若干の変更を加え、以前実施した時と同じ設定[29]で行った。

m/z 、分離時間(migration time, MT)、peak area などのピーク情報を得るため MasterHands automatic integration software (Keio University, Tsuruoka, Japan) を使いデータ解析を行った[30]。アイソトポマー、付加イオン、または既知の代謝物のイオン産物は除外し、残りのピークには分離時間や m/z 値をもとに MasterHands データベースから推定される代謝物をアノテートした。ピークアノテーションの許容範囲は、分離時間では ± 0.2 min (陰イオン)/ ± 1.0 min (陽イオン)、 m/z では ± 40 ppm に設定した。また、ピーク面積 (peak area) は内部標準のピーク面積でノーマライズされ、尿サンプルの相対的面積値 はクレアチニン ^{13}C のピークで更にノーマライズされた。代謝物 ID は Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database (KEGG, <https://www.genome.jp/kegg/>) から採択した。

2-4. 統計分析

Genedata Analyst (Genedata AG., Basel, Switzerland) を用いて 2 群間の統計的有意差を Student's t test または Welch's t test で評価した。Fisher's exact test は 2 グループにおける 2 カテゴリー変数の関連を検討するために JMP Pro 12.2.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)で行った。DAS28-ESR と代謝物の相関は JMP Pro で Spearman の順位相関検定により分析した。主成分解析(Principal component analysis; PCA)、部分最小二乗判別分析 (partial least-squares discriminant analysis; PLS-DA)、そして permutation test による PLS-DA モデルの確認は、MetaboAnalyst 4.0 (参考[31]<http://www.metaboanalyst.ca/>)により、ノーマライズされたメタボロミクスのデータを使用して実施された。高活動性と低活動性 RA 患者群を判別するための多重ロジスティック回帰分析 (multiple logistic regression (MLR) model) は、JMP Pro を用い、変数選択アルゴリズムとしてステップワイズ法(forward と backward 法、 $p < 0.1$ の閾値)を採用して実施した。

第三章

結果

3-1. サンプル採取患者の特徴

本研究では 32 名の高活動性(DAS28-ESR \geq 3.2)と 17 名の低活動性 RA 患者 (DAS28-ESR $<$ 3.2)、そして 10 名の非 RA ボランティアから尿や血液を採取した。サンプル提供者の特徴は表 3 に示す通りである。RA 患者は MTX か GC を単独、若しくは両方を併用して投与されており、生物学的製剤の治療は受けていない患者が集められた。

表 3 コントロールと RA 患者情報

	コントロール (非RAボランティア)	RA患者 (合計)	p-value ⁽²⁾	低活動性RA患者 ⁽¹⁾	高活動性RA患者 ⁽¹⁾	p-value ⁽³⁾
サンプル数	10	49		17	32	
年齢	63 \pm 14	63 \pm 13	0.540 ⁽⁴⁾	59 \pm 12	63 \pm 13	0.492 ⁽⁴⁾
(範囲)	(51-86)	(34-81)		(34-81)	(34-81)	
性別比(女性/男性)	10/0	43/6	0.577 ⁽⁵⁾	16/1	27/5	0.650 ⁽⁵⁾
DAS28-ESR	-	3.71 \pm 1.23		2.46 \pm 0.54	4.38 \pm 0.94	$<$ 0.001 ⁽⁴⁾
(範囲)		(1.12-7.62)		(1.12-3.11)	(3.23-7.62)	
治療	-	MTX: 39		MTX: 12	MTX: 27	0.285 ⁽⁵⁾
		GCs: 22		GCs: 5	GCs: 17	0.140 ⁽⁵⁾

⁽¹⁾高活動性 RA 患者は DAS28-ESR \geq 3.2、低活動性 RA 患者は DAS28-ESR $<$ 3.2 とした。

⁽²⁾コントロールと RA 群間の p 値。

⁽³⁾低活動性と高活動性 RA 患者間の p 値。

⁽⁴⁾ Student's t test の p 値。

⁽⁵⁾ Fisher's exact test の p 値。

全ての値は mean \pm standard deviation (SD) と範囲(最小値-最大値)で表示されている。

3-2. RA 患者とコントロールの血漿における代謝産物の比較

CE-Q-TOFMS 法を用いて 104 種の代謝物を血漿から、217 種を尿から検出した。ただし、尿中から確認されたケトプロフェンは生体内で自然発生する代謝産物ではなかったため、解析からは除外された。

まず始めに、収集された患者サンプルの妥当性を評価するために、RA 群とコントロール群の血漿由来の代謝産物を用いて主成分分析 (principal component analysis; PCA) を行った。PCA とは、多次元データにおいてデータ全体のばらつきが最大となる方向を見つけ、元の情報をできるだけ損なわずに縮約し、2次元データ散布図に変換し視覚化することでデータの解釈を容易にする分析方法

である[32]。その結果、両群の確かな分離は見受けられなかった(図 6)。今回の PCA プロットで明確な分離が得られなかった理由として、RA に比べコントロールの例数が少なかったことと、群間差を示す代謝産物が少数であり、他の多数の代謝物データがノイズとなっていることが推測された。また、PC1 と PC2 での寄与率 (図 6 の説明参照) が比較的低いという結果も、データに含まれる代謝物質のパターンが非常に多様であることを示唆している。

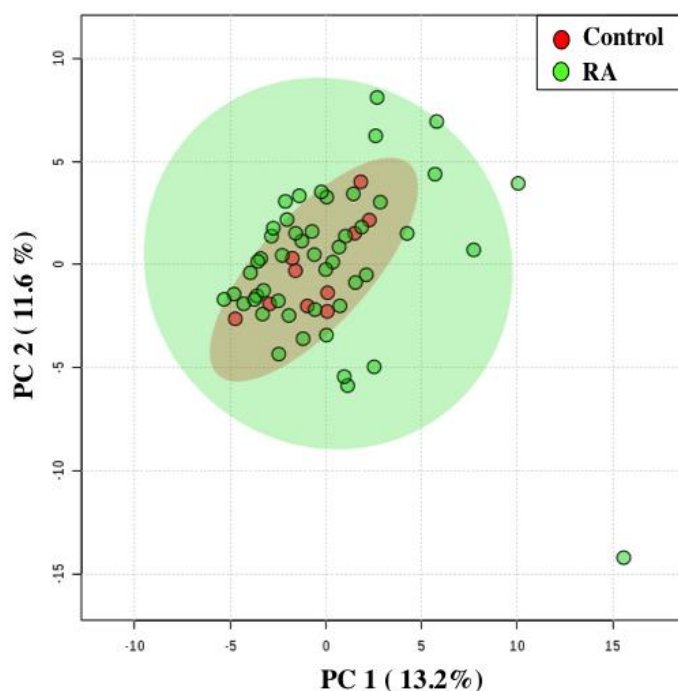


図6 PCA を用いた RA 患者(n = 49)とコントロール(n = 10)間における血漿代謝産物のプロット

各血漿サンプルから検出された 104 の代謝物に対する散布図に、データのばらつきが最大となる軸 (第 1 主成分軸) を算出し、次に第 1 主成分軸と直行する軸でデータの分散が最大となる軸 (第 2 主成分軸) を算出し、それらを 2 次元の図にプロットしたものが上記図である。1 名から検出された代謝物が 1 データ点に相当する。また、各主成分軸における個々のデータの変化が、データ全体に対しどの程度貢献しているかを、割合で示す指標である寄与率を算出した。その結果、第 1 主成分(PC1)の寄与率が 13.2%、第 2 主成分(PC2)の寄与率が 11.6%であった。緑が RA 患者、赤がコントロールサンプルを示す。

PCA では両群の確かな分離が見受けられなかったため、次にメタボロミクス解析で頻用される部分最小二乗判別分析(partial least-squares discriminant analysis: PLS-DA)を用いて解析を行った。PLS-DA は、PCA のように群情報を使用せず試料の分布を見るのではなく、群情報を用いて 2 群に分類されたサンプルが最も大きく別れるように変数を作り出す解析法である[32]。その結果、比較的良好なモデルパラメーターで ($R^2 = 0.75529$, $Q^2 = 0.4068$) 明確な2つの集団が確認された(図7)。このモデルの評価法として R^2 はモデルの精度、 Q^2 はモデルの安定性を示し、 R^2 及び Q^2 が 1 に近いほど良い予測モデルであり、具体的には R^2 が 0.65 以上、 Q^2 は 0.5 以上あれば良好な予測モデルとされ、かつ R^2 と Q^2 の数値が近い方が良いとされている[33]。

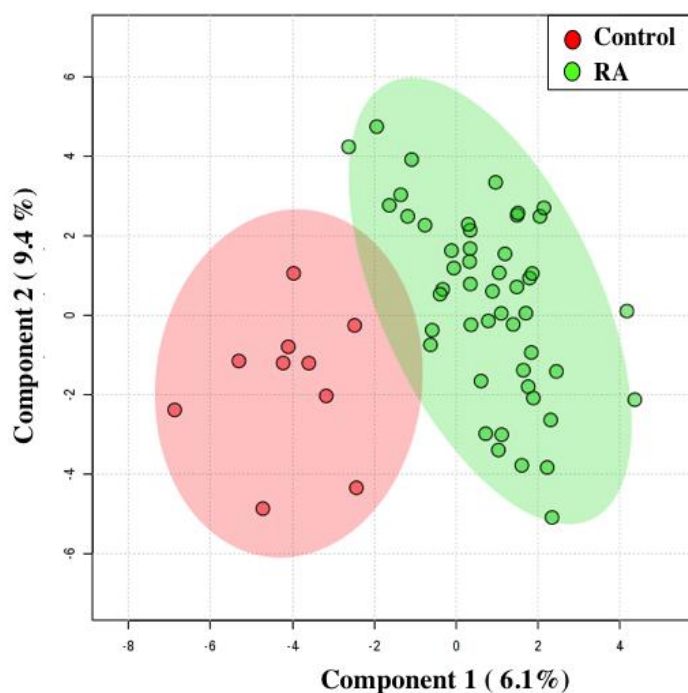


図7 PLS-DA を用いた RA 患者(n = 49) とコントロール(n = 10)間における血漿代謝産物のプロット 緑が RA 患者、赤がコントロールを示す。

さらに、PLS-DA モデルで得られた集団が偶然ではなく統計的に有意な分離であるかどうか検証するため Permutation テストを行った(図 8)。この手法は、元

の 2 群のそれぞれのデータ数を固定したまま値をランダムに入れ替え、その都度統計値を算出し、元のデータの統計値と比べ高い値が出た頻度を p-value としたものである[34]。今回は $n = 1000$ 回ランダムに値を入れ替えた結果、22 回のみ元の統計値より高い値が算出された($p = 0.022$)。従って、2 群は有意な分離であることが示された。

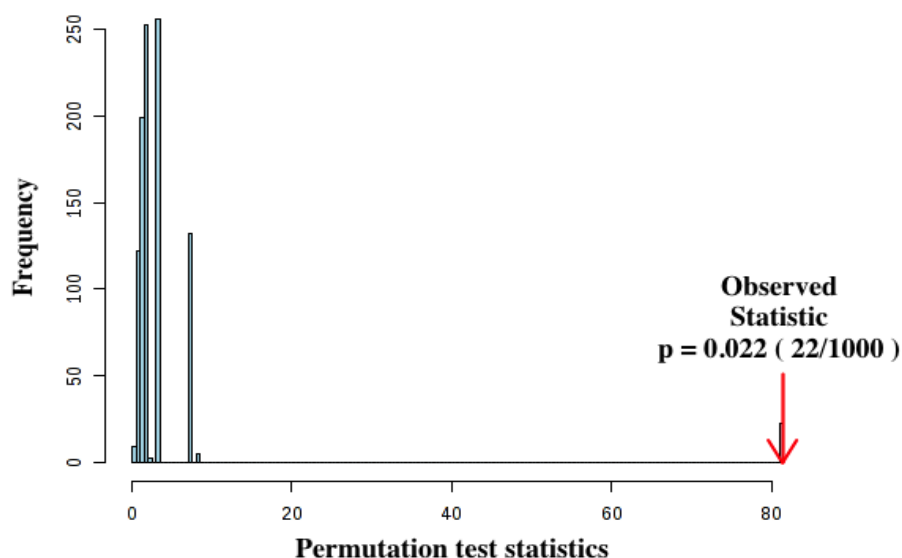


図 8 Permutation テストによる PLS-DA の検証

縦軸は頻度 (足すと 1000 になる)、横軸は class assignment 予測値の群間平方和/群内平方和の比を示す。矢印の位置がより分布の右側にあるほど 2 群の分離は有意であることを示す。

次に RA 患者の代謝産物の中でコントロールと比べ有意に変動しているものを Welch の t 検定を用いて調べてみたところ、24 種が有意差のある代謝産物 (Welch's t-test with $p < 0.05$) として見つかった(表 4)。

いくつかの代謝産物の変動、例えば RA 患者での histidine および serine の低下、glyceric acid、phenylalanine、tyrosine の上昇は以前より報告されている結果と一致した[24,26,35-37]。更に、今回確認された代謝産物は、解糖系、TCA 回路、アミノ酸代謝に関わる経路などの代謝経路の主代謝物であり、これもこれまでの報告と一致した[24, 26]。これらの結果より、本研究で集められたサンプルは例

外的な RA 患者からのものではないことが示唆された。

表 4 血漿にて RA 患者とコントロールの間に有意差があった代謝産物リスト

代謝産物	KEGG ID	Mode	<i>m/z</i>	MT	P-value ¹⁾	Fold change ²⁾ RA/Control
Azelaic acid	C08261	A	187.1	12.58	<0.001	-2.98
N-Acetylleucine	C02710	A	172.1	8.229	<0.001	-2.21
Pyruvic acid	C00022	A	87.009	13.46	<0.001	1.99
Phenylalanine	C00079	C	166.09	12.14	<0.001	1.36
Glycerol-3-phosphate	C00093	A	171.01	12.62	0.001	1.89
Cysteine-glutathione disulphide	N/A	C	427.1	12.76	0.002	-1.69
Glutamic acid; threo-beta-methylaspartic acid	C00025; N/A	C	148.06	11.95	0.002	1.44
Glyceric acid	C00258	A	105.02	10.81	0.002	1.26
Tyrosine	C00082	C	182.08	12.44	0.005	1.19
Cysteine-glutathione disulphide –Divalent	N/A	C	214.05	12.76	0.005	-1.56
Glucuronic acid; Galacturonic acid	C00191; C08348	A	193.04	8.302	0.006	1.99
3-Methylhistidine	C01152	C	170.09	8.046	0.007	1.7
Gluconic acid	C00257	A	195.05	8.344	0.017	1.25
Threonic acid	C01620	A	135.03	9.518	0.02	1.32
Pelargonic acid	C01601	A	157.12	8.331	0.023	1.14
gamma-Butyrobetaine	C01181	C	146.12	8.714	0.024	-1.34
Asymmetric dimethylarginine	C03626	C	203.15	8.251	0.026	1.11
Serine	C00065	C	106.05	10.84	0.028	-1.19
Histidine	C00135	C	156.08	7.824	0.029	-1.11
N,N-Dimethylglycine	C01026	C	104.07	11.95	0.032	1.25
1-Methylnicotinamide	C02918	C	137.07	7.882	0.037	-1.57
Mucic acid; Glucaric acid	C00879; C00818	A	209.03	14.66	0.039	1.77
Lactic acid	C00186	A	89.025	11.23	0.043	1.23
2-Hydroxybutyric acid; 2-Hydroxyisobutyric acid	C05984; N/A	A	103.04	10.08	0.049	1.22

A, anion mode³⁾; C, cation mode⁴⁾; MT, migration time⁵⁾ N/A, not applicable

¹⁾RA 群とコントロール間の Welch's t test の p 値。

²⁾Fold change は RA 群の平均値をコントロール群の平均値で割った値。値が 1 以下であった場合は負の逆数値で示した。

³⁾陽イオン性代謝物質を測定する時のモード。試料の注入側を陽極、検出側を陰極にして電圧を印加し、代謝物質が移動する。

⁴⁾陰イオン性代謝物質を測定する時のモード。試料の注入側を陰極、検出側を陽極にして電圧を印加し、代謝物質が移動する。

⁵⁾代謝産物をキャピラリーに注入し、電圧を印加することで物質をイオン化し、そのイオン電荷/水合イオン半径の比に基づきキャピラリー内を泳動する時間。

3-3. DAS28-ESR と関連する代謝産物

次に、RA の活動性と関連するバイオマーカーを探索した。まず高活動性 (DAS28-ESR \geq 3.2) 患者と低活動性 (DAS28-ESR $<$ 3.2)患者の血漿及び尿の代謝産物データを以て PCA を実施したが、明確な分離は見られなかった(図 9)。次に

PLS-DA を実施し、一見明確に分離したかと思えたが(図 10)、 Q^2 値が 0.12656 と低く、 R^2 と Q^2 の値も大きく離れていることから、過剰適合であることが強く示唆された($R^2 = 0.95405$ $Q^2 = 0.12656$)。過剰適合となる原因としては、症例数が少なく、かつ代謝産物データ数が多いことによる (より過剰に複雑なモデルが生成されてしまった) 可能性が考えられる。

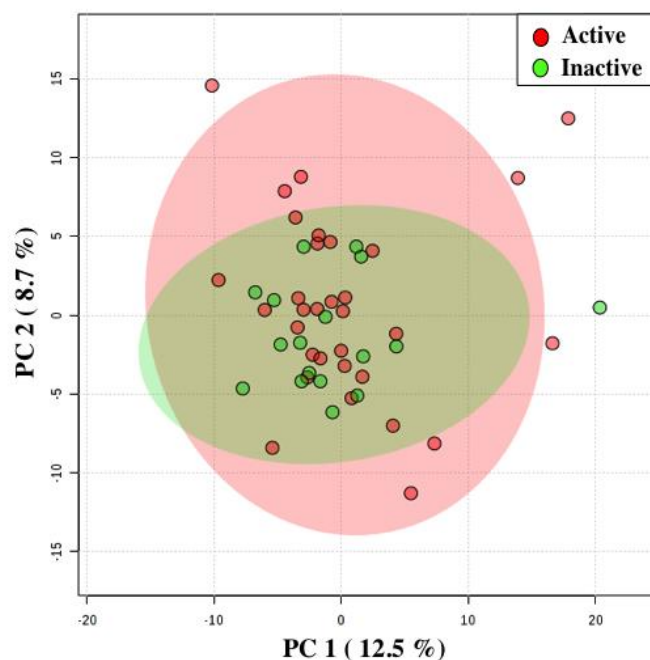


図 9 PCA を用いた高活動性 (DAS28-ESR \geq 3.2) 患者(n = 32)と低活動性 (DAS28-ESR $<$ 3.2)患者(n=17)間の血漿及び尿代謝産物プロット

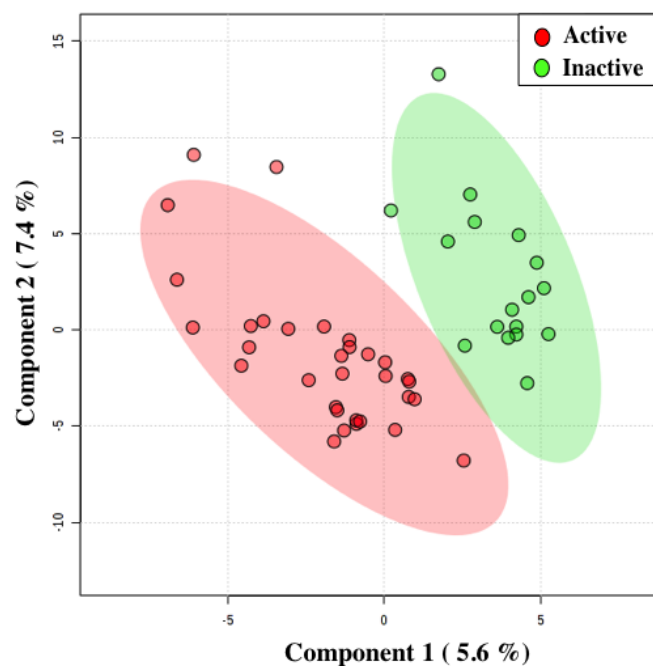


図 10 PLS-DA を用いた高活動性 (DAS28-ESR \geq 3.2) 患者(n = 32)と低活動性 (DAS28-ESR<3.2)患者(n = 17)間の血漿及び尿代謝産物プロット

これらの結果は、代謝産物データのバリエーションが大きく、2群を見分けるにはノイズとなるデータを多く含んでいることを示唆するため、意味のありそうな代謝産物を見出すべく、まず Spearman の順位相関係数を用いて検定を行い DAS28-ESR と有意に相関する代謝産物を探すことにした。その結果、血漿中では DAS28-ESR と 7 種が正の、8 種が負の相関にあることが判明し、尿中では 16 が正の、4 種が負の相関にあることが明らかになった (表 5)。また、それらの相関した代謝産物は血漿と尿中で重複するものはなかった。

表5 RA患者の血漿と尿にてDAS28-ESRと有意に相関した代謝産物リスト

Metabolite	KEGG ID	Mode	m/z	MT	Spearman ρ	P-value
<i>Plasma</i>						
Glucuronic acid; Galacturonic acid	C00191; C08348	A	193.04	8.302	0.378	0.007
Urea	C00086	C	61.041	24.25	0.376	0.008
N,N-Dimethylglycine	C01026	C	104.07	11.95	0.365	0.01
Gluconic acid	C00257	A	195.05	8.344	0.354	0.013
Cysteine	C00097	C	122.03	12.05	0.298	0.038
Sarcosine	C00213	C	90.055	10.27	0.292	0.042
3-Methylhistidine	C01152	C	170.09	8.046	0.287	0.046
4-Methyl-2-oxopentanoic acid; 3-Methyl-2-oxovaleric acid	C00233; C03465	A	129.06	9.865	-0.298	0.038
Cysteine-glutathione disulphide	N/A	C	427.1	12.76	-0.306	0.033
Homoarginine; N6,N6,N6-Trimethyllysine	C01924; C03793	C	189.14	7.718	-0.318	0.026
Cysteine-glutathione disulphide -Divalent	N/A	C	214.05	12.76	-0.323	0.023
Citric acid	C00158	A	191.02	27.94	-0.324	0.023
Methionine	C00073	C	150.06	11.71	-0.361	0.011
Guanidoacetic acid	C00581	C	118.06	8.874	-0.4	0.005
Histidine	C00135	C	156.08	7.824	-0.477	0.001
<i>Urine</i>						
2-Quinolinecarboxylic acid	C06325	A	172.04	9.215	0.378	0.008
4-Hydroxy-3-methoxymandelic acid; Syringic acid	C05584; C10833	A	197.05	8.349	0.36	0.011
N-Acetylneuraminic acid	C00270	A	308.1	7.282	0.35	0.014
p-Hydroxyphenylacetic acid; p-Anisic acid	C00642; C02519	A	151.04	8.898	0.34	0.017
Homoserine	C00263	C	120.06	10.95	0.325	0.023
Riboflavin	C00255	C	377.14	25.5	0.322	0.026
2'-Deoxycytidine	C00881	C	228.09	10.18	0.319	0.026
Gibberellic acid	C01699	A	345.15	7.101	0.318	0.026
1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine	C04599	C	174.12	9.769	0.311	0.03
gamma-Glu-2-aminobutanoic acid	N/A	C	233.11	13.64	0.307	0.032
Methylguanidine	C02294	C	74.071	6.578	0.306	0.033
3-Hydroxy-3-methylglutaric acid	C03761	A	161.05	16.03	0.302	0.035
Hypotaurine	C00519	C	110.03	20.74	0.298	0.038
N-Acetylglucosamine 1-phosphate	C04256	A	300.04	9.91	0.285	0.047
4-Oxovaleric acid	N/A	A	115.04	9.912	0.284	0.048
Threonic acid	C01620	A	135.03	9.479	0.284	0.048
N6,N6,N6-Trimethyllysine	C03793	C	189.16	7.636	-0.283	0.049
Hypoxanthine	C00262	C	137.05	12.04	-0.304	0.034
gamma-Butyrobetaine	C01181	C	146.12	8.695	-0.304	0.034
Alanine	C00041	C	90.056	9.758	-0.31	0.03

A, anion mode⁽¹⁾; C, cation mode⁽²⁾; MT, migration time⁽³⁾; N/A, not applicable

⁽¹⁾-⁽³⁾ 表4の(3)-(5)の補足と同様

更に、高活動性患者の代謝産物の中で低活動性患者と比較し有意に変動している代謝産物を調べるため、Welchのt検定を行った。表6で示されているように、血漿中で9種、尿中で15種の代謝産物に有意差(Welch's t-test with $p < 0.05$)があることが示された。ここにおいても、血漿と尿両方で確認される代謝産物はなかった。

表 6 高活動性と低活動性 RA 患者間において有意差があった血漿と尿の代謝産物リスト

Metabolite	KEGG ID	Mode	m/z	MT	P-value ¹⁾	Fold change ²⁾ Active/inactive
<i>Plasma</i>						
Histidine	C00135	C	156.08	7.824	0.003	-1.13
Urea	C00086	C	61.041	24.25	0.004	1.26
N,N-Dimethylglycine	C01026	C	104.07	11.95	0.007	1.33
Guanidoacetic acid	C00581	C	118.06	8.874	0.01	-1.3
Homoarginine; N6,N6,N6-Trimethyllysine	C01924; C03793	C	189.14	7.718	0.011	-1.24
3-Phenylpropionic acid	C05629	A	149.06	8.998	0.022	1.44
Phenylalanine	C00079	C	166.09	12.14	0.024	1.27
3-Indoxylsulfuric acid	N/A	A	212	9.883	0.031	1.77
beta-Alanine	C00099	C	90.055	7.868	0.049	1.27
<i>Urine</i>						
2-Quinolinecarboxylic acid	C06325	A	172.04	9.215	0.002	3.85
Gibberellic acid	C01699	A	345.15	7.101	0.002	3.52
Riboflavin	C00255	C	377.14	25.5	0.006	9.95
N-Acetylglucosamine 1-phosphate	C04256	A	300.04	9.91	0.009	3.1
3-Indoxylsulfuric acid	N/A	A	212	9.821	0.013	1.74
m-Hydroxybenzoic acid	C00587	A	137.02	9.555	0.013	2.5
5-Methoxyindoleacetic acid	C05660	C	206.08	25.63	0.017	2.76
Hypotaurine	C00519	C	110.03	20.74	0.017	1.59
Anserine; Homocarnosine	C01262; C00884	C	241.13	7.354	0.023	2.6
4-Guanidinobutyric acid	C01035	C	146.09	8.892	0.023	1.48
Ophthalmic acid	N/A	C	290.14	14.58	0.024	1.48
Azetidine 2-carboxylic acid	C08267	C	102.06	9.568	0.03	1.72
2,6-Diaminoheptanedioic acid	C00666	C	191.1	9.574	0.036	3.09
Betonicine	C08269	C	160.1	14.51	0.038	4.12
1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine	C04599	C	174.12	9.769	0.039	2.08

A, anion mode⁽³⁾; C, cation mode⁽⁴⁾; MT, migration time⁽⁵⁾; N/A, not applicable

⁽¹⁾高活動性 RA 群と低活動性 RA 群間の Welch's t test の p 値。

⁽²⁾Fold change は高活動性 RA 群の平均値を低活動性 RA 群の平均値で割った値。値が 1 以下であった場合は負の逆数値で示した。⁽³⁾-⁽⁵⁾ 表 4 の補足と同様

これらの結果を受け、DAS28-ESR と正または負の相関があり、且つ、高活動性と低活動性 RA 患者の間で有意差のあった代謝産物として 11 種類の代謝産物を選び出した。その 11 種の代謝産物は、血漿からは guanidoacetic acid、histidine、homoarginine または N6,N6,N6-trimethyllysine、N,N-dimethylglycine、urea の 5 種、そして尿からは 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine、2-quinolinecarboxylic acid、gibberellic acid、hypotaurine、N-acetylglucosamine-1-phosphate、riboflavin の 6 種であった(図 11-14)。

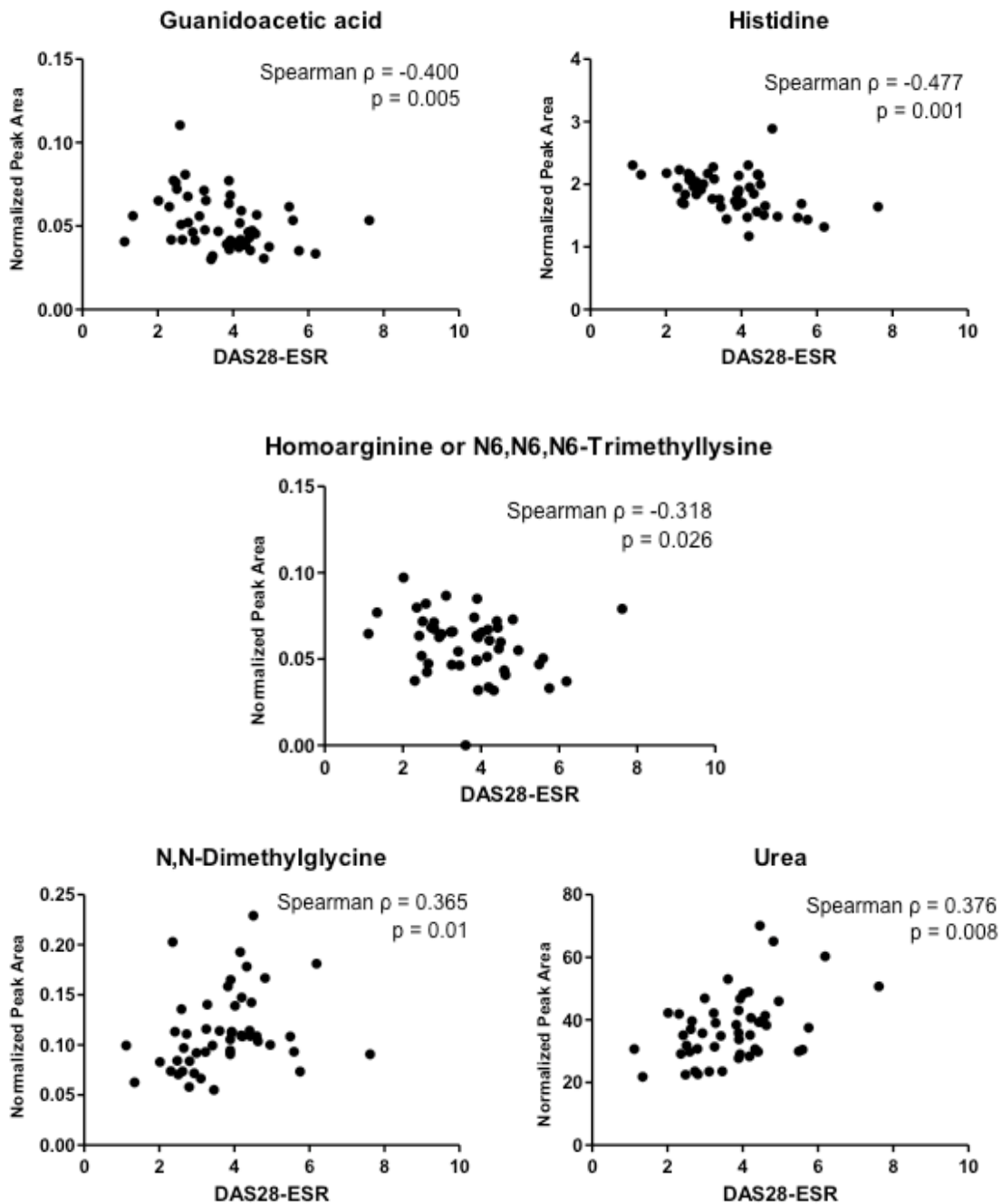


図 11 RA 患者の血漿から有意に選出された 5 種の代謝産物と DAS28-ESR の相関図
 Normalized Peak Area とは正規化されたピーク面積(各 RA 患者から検出された代謝産物レベル)を示す。DAS28-ESR は連続変数ではないため、ノンパラメトリック検定である Spearman の順位相関分析を採用した。 ρ : spearman ρ
 $0 < |\rho| \leq 0.2$ ほとんど相関なし、 $0.2 < |\rho| \leq 0.4$ 低い相関あり、 $0.4 < |\rho| \leq 0.7$ 相関あり、 $0.7 < |\rho| \leq 1.0$ 高い相関あり。

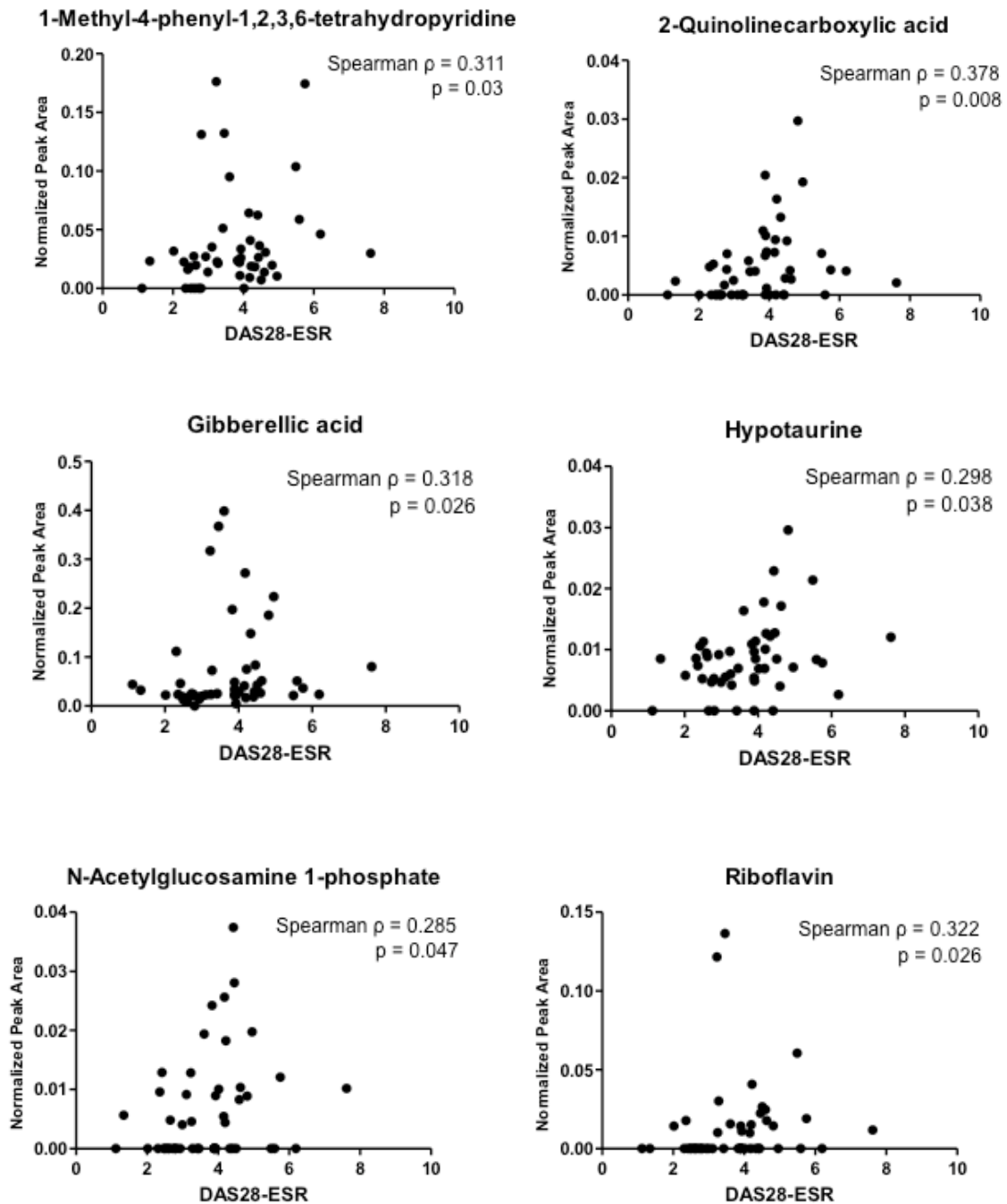


図 12 RA 患者の尿から有意に選出された 6 種の代謝産物と DAS28-ESR の相関図
 Normalized Peak Area とは正規化されたピーク面積(各 RA 患者から検出された代謝産物レベル)を示す。DAS28-ESR は連続変数ではないため、ノンパラメトリック検定である Spearman の順位相関分析を採用した。 ρ : spearman ρ
 $0 < \rho \leq 0.2$ ほとんど相関なし、 $0.2 < \rho \leq 0.4$ 低い相関あり、 $0.4 < \rho \leq 0.7$ 相関あり、 $0.7 < \rho \leq 1.0$ 高い相関あり。

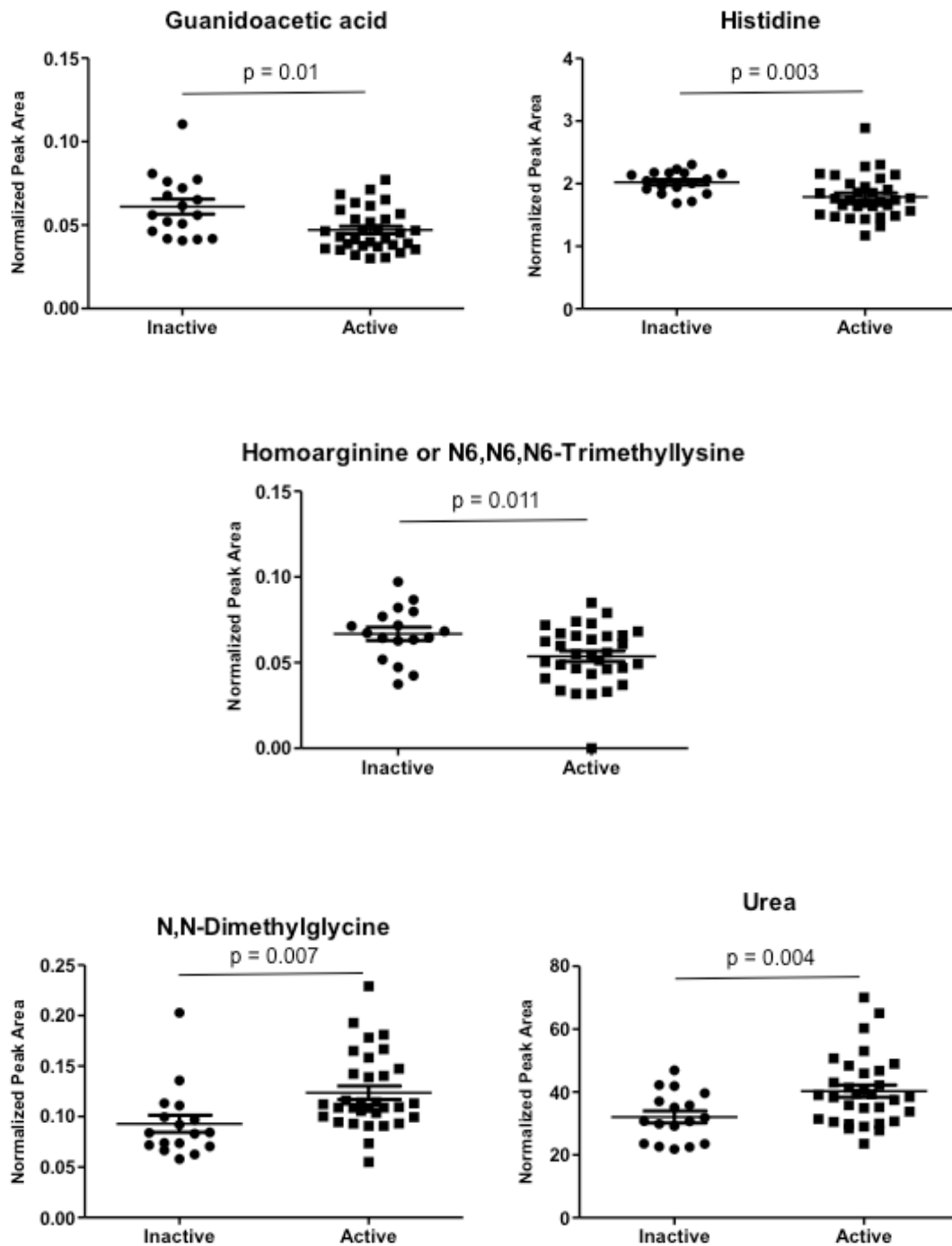


図 13 血漿より選出された 5 種の代謝産物の低活動性と高活動性 RA 患者における比較

Normalized Peak Area とは正規化されたピーク面積(各 RA 患者から検出された代謝産物レベル)を示す。p-values は Welch's t-test による。

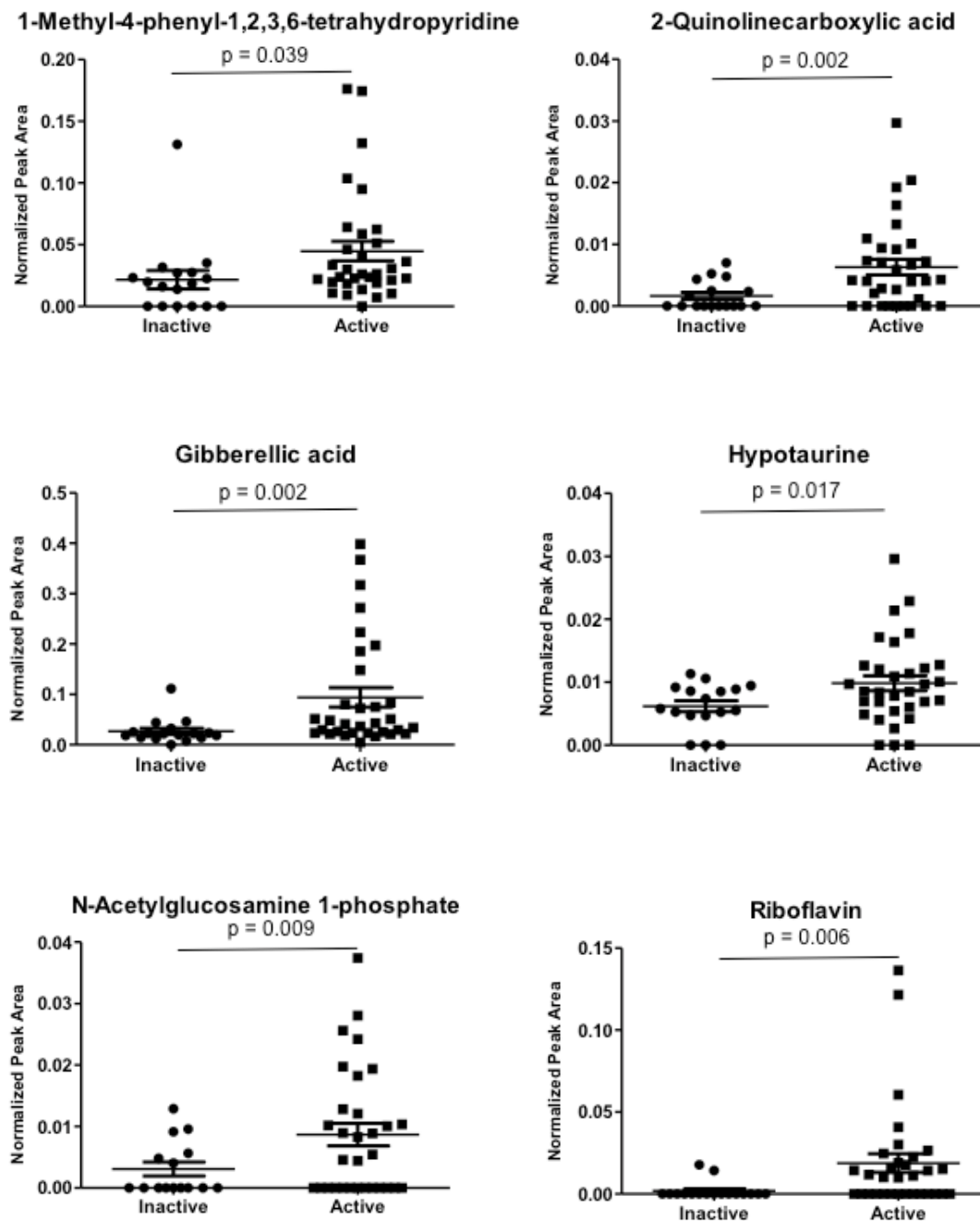


図 14 尿より選出された 6 種の代謝物の低活動性と高活動性 RA 患者における比較図
 Normalized Peak Area とは正規化されたピーク面積(各 RA 患者から検出された代謝産物レベル)
 を示す。p-values は Welch's t-test による。

3-4. 重回帰分析

RA 疾患活動性のバイオマーカーとなりうる代謝産物を探すために重回帰分析モデルを構築することにした。DAS28-ESR と相関し、高活動性と低活動性 RA 患者で有意差が認められた代謝産物 11 種類から、優れたバイオマーカー候補となる代謝物を選出するアルゴリズムとして、比較的頻用されているステップワイズ法を採用した。ステップワイズ法の中でもいくつか手段がある中で、変数増減法を用いて解析を実施した。変数増減法とは、全ての説明変数（今回は 11 種の代謝物）を含むモデルから、一つずつ説明変数を加えるか除外するかを評価し最適な組み合わせを探す方法である[38]。その結果、血漿中の histidine と guanidoacetic acid、尿中の hypotaurine の 3 種類の代謝産物を選出された。

次に、選ばれた 3 つの代謝物がどの程度疾患活動性を評価する上で優れているかを ROC 曲線 (Receiver Operating Characteristic Curve) を用いて解析した。ROC 曲線は、曲線が(0,1)の座標により近く、曲線下面積(AUC: Area Under the Curve)が 1.0 に近くなるほど予測確度が高いと解釈される [38]。解析の結果、血漿中の histidine, guanidoacetic acid, 及び尿中の hypotaurine を用いて得られた ROC 曲線の曲線下面積は AUC=0.8934 であった(図 15)。この結果より、選択した代謝物は RA の疾患活動性を評価するのに有用なマーカーとなりうる可能性を示した。

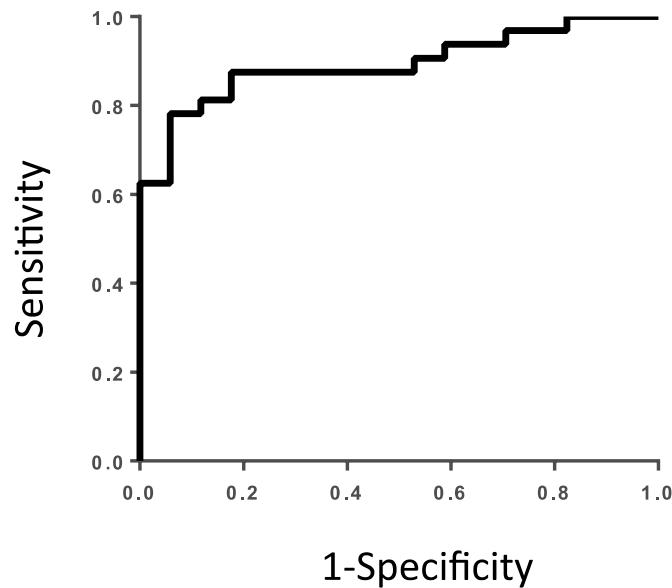


図 15 高活動性と低活動性 RA 患者間において DAS28-ESR と相関し、かつ優位差があった 3 種類の代謝産物(血漿中の histidine、guanidoacetic acid、尿中の hypotaurine)代謝産物の ROC curve 図

ROC 曲線は縦軸を感度(sensitivity)または真の陽性率、横軸を 1-特異度(specificity)または偽陽性率とし、プロットされるグラフである。選ばれた 3 つの代謝産物レベルが RA の高活動性を示す判断基準となる値、つまりカットオフポイントを決め、その値を境に活動性が高い患者と低い患者の割合を計算し感度と偽陽性率が算出された。同様に、いくつかのカットオフポイントで感度と偽陽性率を計算し、その値をグラフにプロットした。今回描かれた曲線は偽陽性率が 0 の時に陽性率が比較的高い、つまり 3 つの代謝産物レベルによって RA の高活動性を正しく診断できているということになる。逆に陽性率が高くなるにつれ偽陽性も高くなる。よって、ROC 曲線がより左上方向に位置するほど優れた診断基準と解釈される[38]。

第四章

考察

4. 考察

近年における関節リウマチ治療薬の中で、特に MTX は、単独で使用した場合でも死亡するリスクが 60%減少し[39,40]、また米国リウマチ学会(ACR)が定めた ACR70(70%以上改善)という評価基準に達した患者は約 30%にも及ぶ[21][41]ことから、日本では 2011 年に RA の標準薬、第一選択薬に位置づけられた[42]。したがって、本研究で治療中の RA 患者を研究する上で、MTX を使用する患者を除外するのは現実的な選択ではないと判断した。しかしながら逆に言えば、MTX 単剤で治療を受けている患者の約三分の二は十分な臨床効果を得られていない [41,43]。また、生物学的製剤は高い治療効果を示すものの、単独治療ではやはり不十分な効果のこともあり[41,43]、MTX と生物学的製剤を併用することで DAS28 寛解率は約 60%まで上昇するという報告がある[41-43]。これらを踏まえ、本研究では意図的に生物学的製剤を使用されていない患者を選択した。これにより、MTX 等の基礎治療薬を使用してもなお疾患活動性のある患者とない患者を比較でき、基礎治療薬使用下での重要な疾患活動性要因を抽出するとともに、より正確には、MTX やグルココルチコイドだけでは十分な治療効果が得られない要因の手がかりを得ることができると想定し解析を行った。結果、CE-Q-TOFMS 法で RA 疾患活動性バイオマーカー候補の代謝産物を血漿と尿から見つけることができた。興味深いことに、代謝産物で血漿と尿両方で見つかったものは極めて少なかった。つまりこれは、それぞれの体液から別々のバイオマーカーが存在するというを示唆している。本研究でも、血漿からは histidine と guanidoacetic acid、尿からは hypotaurine が、RA の疾患活動性と深く関係する可能性が示された。

RA 患者の血中の代謝産物の中で histidine 濃度が低いというのはすでに知られており[35-37]、RA 以外でも、例えば慢性腎臓病や慢性胆嚢炎でも健常者より低いということが報告されている[44,45]。Histidine は抗炎症作用があることや酸化防止作用があるとみなされていることから[46,47]、RA の炎症状態と関連性があることが推測される。今後、RA 患者で histidine 濃度が減少するメカニズムを知る手掛かりとして、まず histidine 代謝経路に関わる酵素の活性や発現量に変化

があるかを調べるなど、さらなる検討が必要と考える。

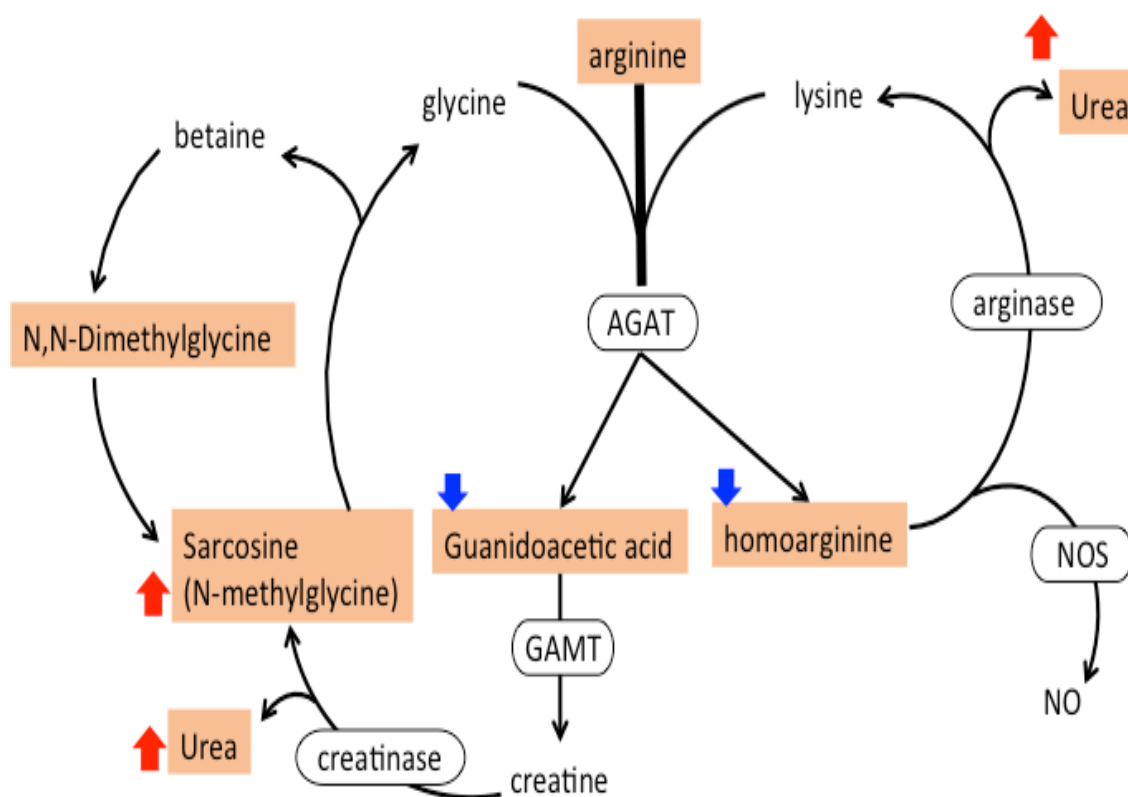


図 16 Arginine 代謝経路

本研究で見出した RA 疾患活動性と関連している代謝産物の一部が Arginine 代謝経路と関わっていた。赤い矢印は DAS28-ESR と正に相関、または高活動性患者において上昇していた代謝産物、青の矢印は DAS28-ESR と負に相関、または高活動性患者において減少していた代謝産物。(代謝経路は KEGG (<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>) と参考文献 [48] より一部改変。)

guanidoacetic acid は arginine 代謝経路に関与しており(図 16)、arginine、glycine、及び lysine から arginine:glycine amidinotransferase (AGAT)を介して合成される。homoarginine も AGAT によって生成され[48]、guanidoacetic acid と homoarginine はどちらも DAS28-ESR に逆相関し、その濃度は高活動性 RA 患者で減少していた(表 5,6)。この代謝経路では guanidoacetic acid は guanidoacetic N-methyltransferase (GAMT) によって creatine に代謝され、続いて creatinase によって urea と sarcosine へ合成される。今回の研究でも血漿中の urea と sarcosine は DAS28-ESR と有意に正の相関を示していた(表 5)。これらの結果から、arginine、glycine、lysine か

ら homoarginine、guanidoacetic acid への代謝、homoarginine からの urea の代謝、また guanidoacetic acid から urea、sarcosine への代謝経路が RA の病態活性が上がるにつれ調節不全になっていることが示唆された。guanidoacetic acid の低下が何らかの病態との関連性の報告は無いが、homoarginine 濃度の低下は心筋機能障害[49,50]、腎不全[50,51]で報告されており、また、血管を拡張させる一酸化窒素(NO)産生やミネラル代謝と関係があるとの報告もある[50]。RA は往々にして循環器疾患や腎臓病を併発することは良く知られているため、高活動性 RA 患者における arginine 代謝の調節異常を意味する homoarginine と guanidoacetic acid 濃度の低下は、これらの病気を併発する危険性と密接に関係しているのかもしれない。

RA 患者の尿中で上昇が同定された hypotaurine は、酸化ストレスを防ぐ役割があると言われている[52]。興味深いことに、taurine と hypotaurine 代謝経路の上流にある cysteine と methionine 代謝経路のいくつかの代謝産物が RA の病態活性と関わりがある事が本研究で判明した (図 17)。

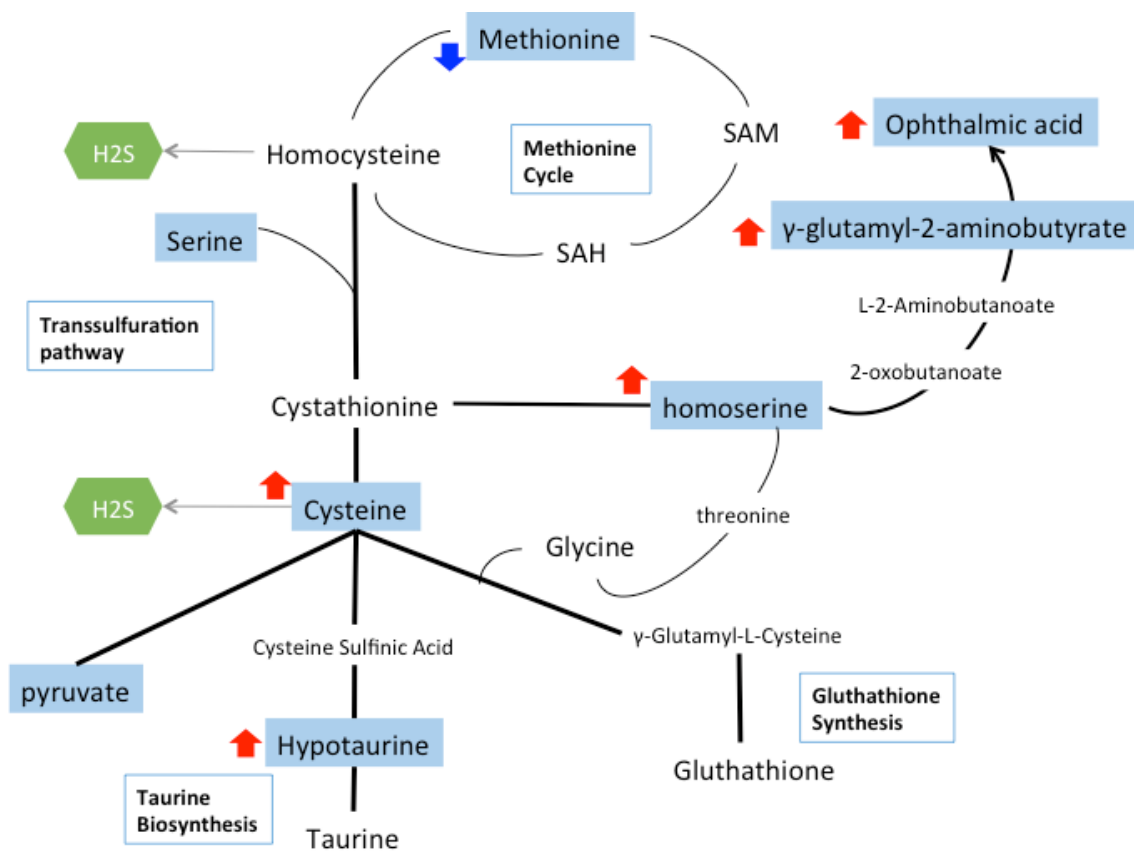


図17 Methionine サイクル、Transsulfuration 経路、Taurine 代謝経路と本研究で見つかった代謝産物との関連性

赤い矢印は DAS28-ESR と正に相関、または高活動性患者において上昇していた代謝産物、青の矢印は DAS28-ESR と負に相関した代謝産物。(代謝経路は KEGG (<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>) と参考文献 [53] より一部改変。)

例えば、血漿中の cysteine は DAS28-ESR と正の相関、methionine は負の相関を示すことが分かった(表 5)。また尿中では homoserine と γ -glutamyl-2-aminobutyrate は DAS28-ESR と正の相関にあり(表 5)、また ophthalmic acid 濃度は高活動性患者で上昇していた(表 6)。これら全ての代謝産物は cysteine と methionine 代謝経路と関わっている産物である。更に、cysteine は抗酸化物質である glutathione の一つの要素であり、中間体である cystathionine を介して cysteine と homocysteine を相互に変換する transsulfuration 経路に関与している[54]。この経路のいくつかの中間体が DAS28-ESR と相関していることから、今回の研究では RA の疾患活動性が上がるにつれ transsulfuration 経路の逆反応が強く誘導されていることが示唆された。cysteine から生成される硫化水素(H_2S)は炎症にお

いて生理的作用を制御するシグナリング分子であることが知られており[55,56]、RA 患者の滑液で上昇していることが報告されている[57]。従って、cysteine の下流にあるいくつかの経路が活性化している可能性があり、尿中の hypotaurine 濃度の上昇は高活動性 RA 患者においてこれらの代謝の変化を表しているのかもしれない。

加えて RA 患者とコントロールとの比較、高活動性と低活動性患者の比較、そして RA 患者と DAS28-ESR との相関、それぞれにおいて有意に差があった代謝物の一部は解糖系、ヘキソサミン経路、グルタミン代謝などに関わっていることが分かった(図 18)。

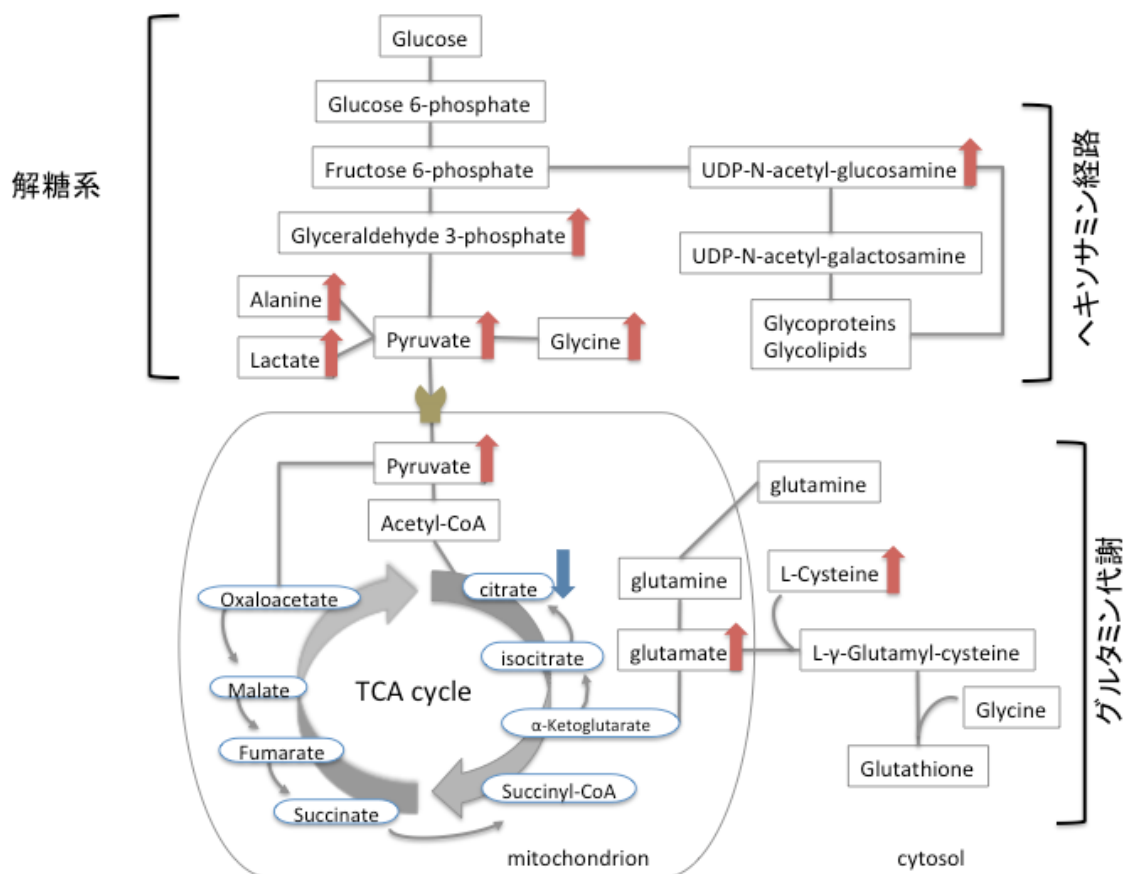


図 18 RA 疾患または RA の活動性と関連している代謝産物の一部が関わっていた主な代謝経路

赤い矢印は健常者と比べて RA 患者で上昇していたもの、または DAS28-ESR と正に相関、或いは高活動性患者において上昇していた代謝産物、青の矢印は DAS28-ESR と負に相関していた代謝産物。(参考文献 [58] より一部改変)

炎症局所においては低酸素に陥ることが知られており、そこに集積する細胞内で HIF-1 α (hypoxia-inducible factor: HIF)という転写因子が解糖系に関わる遺伝子の発現を増幅することにより解糖系が活性化し[59]、がん細胞で見られるワールブルグ効果のような有酸素下で解糖系が促進される現象が起こることが報告されている[60]。よって、乳酸が健常者よりも RA 患者で上昇していたのは(表 4)そのためだと考えられ、RA の炎症により解糖系が促進していることが推測される。そして解糖系が活性化した結果、途中で分岐するヘキソサミン経路、グルタミン代謝などの代謝経路も亢進されていたのではないかと考えられる[61]。

一方、今回の結果だけでどの代謝産物が疾患の治癒と悪化、どちらの方向性を示すのか判断するのは難しい。例えば乳酸を例にとると、細胞内で解糖系が促進されることで乳酸が蓄積・放出され、外的環境が酸性になることで炎症性シグナル経路が阻害され、TGF- β や IL-10 などの抗炎症性サイトカイン遺伝子の発現が上昇し、免疫反応が抑えられる[62-64]。さらに、酸性条件では CD8+ T 細胞の生存や細胞障害活性を抑制し[65]、Treg の増殖を促進するという報告もある[66]。

また当然ではあるが、本研究で見つかった代謝物そのものではなく、代謝経路に関わっている酵素に注目してみるのも興味深い。例えばピルビン酸を acetyl-CoA に変換する pyruvate dehydrogenase (PDH) 酵素の活性を不活化する PDH キナーゼ(PDHK)を阻害することでピルビン酸から乳酸への変換を抑制することができる[67](図 19)。

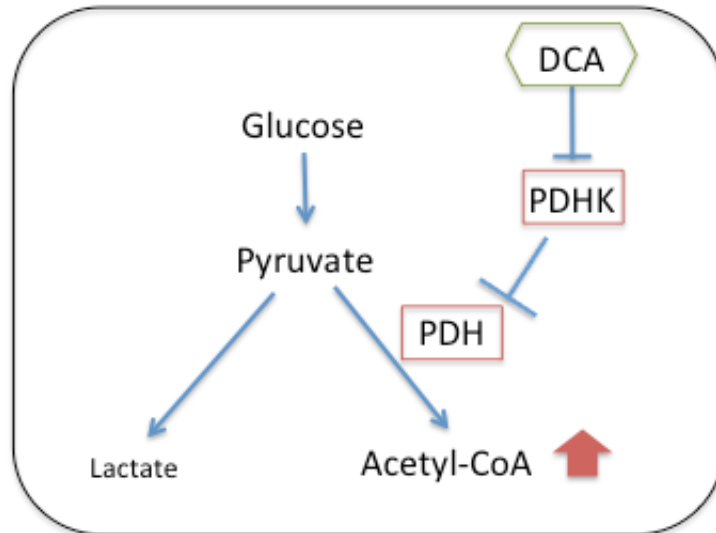


図 19 DCA が PDH を活性化するメカニズム

PDH 酵素を不活化する PDHK を DCA で阻害すると Acetyl-CoA 産生が亢進する。(参考文献 [67] より引用)

PDHK を阻害するジクロロ酢酸(dichloroacetate: DCA)を加えると、Th17 の分化と機能を阻害しながら Treg が増殖したことが報告されている[67]。これは Th17 の方が Treg よりも PDHK 発現が高いためであり、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE)モデルの例では DCA 投与により疾患スコアと進行が抑制されたと報告されている[67]。現在 DCA は実際の免疫疾患系の治療には使われていないが、例えば RA でも疾患の要因になっている細胞の中で発現が高い代謝酵素を阻害することで、RA 特異的に効果のある治療薬を探し出せるかもしれない。そのためには、RA の病態をより反映していると思われる滑膜や滑液など炎症局所のサンプルを採取してマーカー探索を行い、血液や尿などの全身指標と比較検討するような研究が今後の重要な方向の一つと考えられる。

本研究の結果として、今回の研究で RA の組み合わせバイオマーカーとなり得る代謝物質を血漿と尿から見出した。この成果は、メタボロミクス解析は疾患のバイオマーカー探索手法として期待でき、特に複数の体液や組織のサンプル

の解析で病態生理の深い理解を得られる可能性を示唆している。しかしながら、このメタボロミクス研究は代謝産物の総合的な結果でしかない。それぞれの細胞が各々の局面にすることで、正反対の代謝経路が動いている細胞も中には沢山存在する可能性があるため、将来的にはシングルセルレベルでのメタボロミクス解析を実施することも必要かもしれない。本研究で見出したバイオマーカー候補の妥当性や代謝経路がどのように RA 病態に影響しているのかを知るためには、別の患者やコントロールを用い、例数を更に増やすなどして検証する必要がある。更には治療前、治療後で奏功率が高い患者はどの代謝産物が低いか、高いかなどが分かれば、今後の治療方針が明確になり別の代謝物がバイオマーカーとして見えてくる可能性もある。

様々な課題点はあるつつも、本研究において新たに見つかった代謝産物や RA の病態活動性と代謝物の変動の相関性は、RA の病態生理を理解することができ、他の自己免疫疾患におけるメカニズムの解明にも繋がることが期待される。

参考文献

- 1 Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010;62(9):2569-2581.
- 2 Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2016;388(10055):2023-2038.
- 3 Kato E, Sawada T, Tahara K, Hayashi H, Tago M, Mori H, et al. The age at onset of rheumatoid arthritis is increasing in Japan: a nationwide database study. *Int J Rheum Dis.* 2017 Jul;20(7):839-845.
- 4 Mankia K, Emery P. Palindromic rheumatism as part of the rheumatoid arthritis continuum. *Nat Rev Rheumatol.* 2019 Nov;15(11):687-695. doi: 10.1038/s41584-019-0308-5.
- 5 Smolen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov.* 2003 Jun;2(6):473-88.
- 6 Shidara K, Nakajima A, Inoue E, Hoshi D, Sugimoto N, Seto Y, Tanaka E, Momohara S, Taniguchi A, Yamanaka H. Continual Maintenance of Remission Defined by the ACR/EULAR Criteria in Daily Practice Leads to Better Functional Outcomes in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol.* 2017 Feb;44(2):147-153.
- 7 Fuchs HA, Brooks RH, Callahan LF, Pincus T. A simplified twenty-eight-joint quantitative articular index in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1989 May;32(5):531-7.

8 Prevo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995 Jan;38(1):44-8.

9 巽典之、田渕倫美、横田正春、秋山利行、近藤弘「総合健診システムによる赤血球沈降速度検査(ESR)の有用性とその理論的背景」 *HEP Vol.30, No.6, 2003 (592-598).*

10 Kishikawa T, Maeda Y, Nii T, Motooka D, Matsumoto Y, Matsushita M, et al. Metagenome-wide association study of gut microbiome revealed novel aetiology of rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Ann Rheum Dis.* 2020;79(1):103-111.

11 Liu Y, Aryee MJ, Padyukov L, Fallin MD, Hesselberg E, Runarsson A, et al. Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis. *Nat Biotechnol.* 2013;31(2):142-147.

12 Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, Xie G, Eyre S, Thomson BP, et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet.* 2010;42(6):508-514.

13 Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature.* 2014;506(7488):376-381.

14 Okada Y, Kim K, Han B, Pillai NE, Ong RT, Saw WY, et al. Risk for ACPA-positive rheumatoid arthritis is driven by shared HLA amino acid

polymorphisms in Asian and European populations. *Hum Mol Genet.* 2014;23(25):6916-26.

15 Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, van Venrooij WJ. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* 2000 Jan;43(1):155-63.

16 Malmstrom V, Catrina AI, Klareskog L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(1):60-75.

17 Reynisdottir, G., et al.: Signs of immune activation and local inflammation are present in the bronchial tissue of patients with untreated early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 75: 1722–1727, 2016.

18 Sokolove J, Zhao X, Chandra PE, Robinson WH. Immune complexes containing citrullinated fibrinogen costimulate macrophages via Toll-like receptor 4 and Fcγ receptor. *Arthritis Rheum.* 2011;63(1):53–62.

19 Schett G, Gravallese E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol.* 2012;8(11):656–664.

20 Walsh MC, Takegahara N, Kim H, Choi Y. Updating osteoimmunology: regulation of bone cells by innate and adaptive immunity. *Nat Rev Rheumatol.* 2018;14(3):146–156.

21 Smolen JS, Aletaha D. Rheumatoid arthritis therapy reappraisal: strategies,

opportunities and challenges. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11(5):276-289.

22 Surowiec I, Arlestig L, Rantapaa-Dahlqvist S, Trygg J. Metabolite and Lipid Profiling of Biobank Plasma Samples Collected Prior to Onset of Rheumatoid Arthritis. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164196.

23 Zheng K, Shen N, Chen H, Ni S, Zhang T, Hu M, et al. Global and targeted metabolomics of synovial fluid discovers special osteoarthritis metabolites. *J Orthop Res*. 2017;35(9):1973-1981.

24 Li J, Che N, Xu L, Zhang Q, Wang Q, Tan W, et al. LC-MS-based serum metabolomics reveals a distinctive signature in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2018;37(6):1493-1502.

25 Cuppen BV, Fu J, van Wietmarschen HA, Harms AC, Koval S, Marijnissen AC, et al. Exploring the Inflammatory Metabolomic Profile to Predict Response to TNF-alpha Inhibitors in Rheumatoid Arthritis. *PLoS One*. 2016;11(9):e0163087.

26 Zhou J, Chen J, Hu C, Xie Z, Li H, Wei S, et al. Exploration of the serum metabolite signature in patients with rheumatoid arthritis using gas chromatography-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2016;127:60-67.

27 Ramautar R, Somsen GW, de Jong GJ. CE-MS for metabolomics: Developments and applications in the period 2014-2016. *Electrophoresis*. 2017;38(1):190-202.

28 Hirayama A, Tomita M, Soga T. Sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry with a high-sensitivity porous sprayer for cationic metabolome analysis.

Analyst. 2012;137(21):5026-5033.

29 Kami K, Fujimori T, Sato H, Sato M, Yamamoto H, Ohashi Y, et al. Metabolomic profiling of lung and prostate tumor tissues by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Metabolomics*. 2013;9(2):444-453.

30 Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, Soga T, Tomita M. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics*. 2010;6(1):78-95.

31 Chong J, Soufan O, Li C, Caraus I, Li S, Bourque G, et al. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(W1):W486-w494.

32 河原崎正貴 「食品分野におけるメタボリック・プロファイリングの活用 NMR・MS を用いた包括的な食品成分分析」*化学と生物* Vol. 55, No. 8, 2017.

33 大渡・杉山・牧野・松林・田畑 メタボローム解析を用いた食品成分の評価技術の確立（第2報）.

34 Bijlsma S, Bobeldijk I, Verheij ER, et al. Large-scale human metabolomics studies: a strategy for data (pre-) processing and validation. *Anal Chem*. 2006;78(2):567_574.

35 Madsen RK, Lundstedt T, Gabrielson J, Sennbro CJ, Alenius GM, Moritz T, et al. Diagnostic properties of metabolic perturbations in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(1):R19.

- 36 Smolenska Z, Smolenski RT, Zdrojewski Z. Plasma concentrations of amino acid and nicotinamide metabolites in rheumatoid arthritis--potential biomarkers of disease activity and drug treatment. *Biomarkers*. 2016;21(3):218-224.
- 37 Gerber DA. Low free serum histidine concentration in rheumatoid arthritis. A measure of disease activity. *J Clin Invest*. 1975;55(6):1164-1173.
- 38 「EZR による医学統計入門」第 2.0 版 下川敏雄 和歌山県立医科大学 付属病院 臨床研究センター
- 39 Choi HK, Hernán MA, Seeger JD, Robins JM, Wolfe F. Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study. *Lancet*. 2002;359(9313):1173 - 1177.
- 40 Wasko MC, Dasgupta A, Hubert H, Fries JF, Ward MM. Propensity-adjusted association of methotrexate with overall survival in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2013;65(2):334 - 342.
- 41 Atsumi T, Yamamoto K, Takeuchi T, et al. The first double-blind, randomised, parallel-group certolizumab pegol study in methotrexate-naive early rheumatoid arthritis patients with poor prognostic factors, C-OPERA, shows inhibition of radiographic progression. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(1):75 - 83.
- 42 日本リウマチ学会 MTX 診療ガイドライン策定小委員会編：関節リウマチ治療におけるメトトレキサート（MTX）診療ガイドライン 2016 年改訂版. 第 2 版, 羊土社, 東京, 2016.

- 43 Emery P, Burmester GR, Bykerk VP, et al. Evaluating drug-free remission with abatacept in early rheumatoid arthritis: results from the phase 3b, multicentre, randomised, active-controlled AVERT study of 24 months, with a 12-month, double-blind treatment period. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(1):19 - 26.
- 44 Watanabe M, Suliman ME, Qureshi AR, Garcia-Lopez E, Barany P, Heimbürger O, et al. Consequences of low plasma histidine in chronic kidney disease patients: associations with inflammation, oxidative stress, and mortality. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(6):1860-1866.
- 45 Sharma RK, Mishra K, Farooqui A, Behari A, Kapoor VK, Sinha N. (1)H nuclear magnetic resonance (NMR)-based serum metabolomics of human gallbladder inflammation. *Inflamm Res.* 2017;66(1):97-105.
- 46 Pisarenko OI. Mechanisms of myocardial protection by amino acids: facts and hypotheses. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1996;23(8):627-633.
- 47 Wade A.M., Tucker H.N. Antioxidant characteristics of L-histidine. *J Nutr Biochem* 1998;9(6):308-315.
- 48 Davids M, Ndika JD, Salomons GS, Blom HJ, Teerlink T. Promiscuous activity of arginine:glycine amidinotransferase is responsible for the synthesis of the novel cardiovascular risk factor homoarginine. *FEBS Lett.* 2012;586(20):3653-3657.
- 49 Pilz S, Meinitzer A, Tomaschitz A, Drechsler C, Ritz E, Krane V, et al. Low homoarginine concentration is a novel risk factor for heart disease. *Heart.* 2011;97(15):1222-1227.

- 50 Pilz S, Meinitzer A, Gaksch M, Grubler M, Verheyen N, Drechsler C, et al. Homoarginine in the renal and cardiovascular systems. *Amino Acids*. 2015;47(9):1703-1713.
- 51 Drechsler C, Kollerits B, Meinitzer A, Marz W, Ritz E, König P, et al. Homoarginine and progression of chronic kidney disease: results from the Mild to Moderate Kidney Disease Study. *PLoS One*. 2013;8(5):e63560.
- 52 Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem J*. 1988;256(1):251-255.
- 53 Sbodio JI, Snyder SH, Paul BD. Regulators of the transsulfuration pathway. *Br J Pharmacol*. 2019 Feb;176(4):583-593.
- 54 Stipanuk MH. Metabolism of sulfur-containing amino acids. *Annu Rev Nutr*. 1986;6:179-209.
- 55 Sbodio JI, Snyder SH, Paul BD. Golgi stress response reprograms cysteine metabolism to confer cytoprotection in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(4):780-785.
- 56 Kabil O, Yadav V, Banerjee R. Heme-dependent Metabolite Switching Regulates H₂S Synthesis in Response to Endoplasmic Reticulum (ER) Stress. *J Biol Chem*. 2016;291(32):16418-16423.
- 57 Muniraj N, Stamp LK, Badiei A, Hegde A, Cameron V, Bhatia M. Hydrogen sulfide acts as a pro-inflammatory mediator in rheumatic disease. *Int J Rheum Dis*. 2017;20(2):182-189.

- 58 Guma M, Tiziani S, Firestein GS. Metabolomics in rheumatic diseases: desperately seeking biomarkers. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(5):269–281.
- 59 Soto-Herero G, Gómez de Las Heras MM, Gabandé-Rodríguez E, Oller J, Mittelbrunn M. Glycolysis - a key player in the inflammatory response [published online ahead of print, 2020 Apr 7]. *FEBS J*. 2020;10.1111/febs.15327.
- 60 Johnson CH, Ivanisevic J, Siuzdak G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(7):451–459.
- 61 Pearce EL, Poffenberger MC, Chang CH, Jones RG. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science*. 2013;342(6155):1242454.
- 62 Ivashkiv LB. The hypoxia-lactate axis tempers inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(2):85 - 86.
- 63 Hoque R, Farooq A, Ghani A, Gorelick F, Mehal WZ. Lactate reduces liver and pancreatic injury in Toll-like receptor- and inflammasome-mediated inflammation via GPR81-mediated suppression of innate immunity. *Gastroenterology*. 2014;146(7):1763 - 1774.
- 64 Morioka S, Perry JSA, Raymond MH, et al. Efferocytosis induces a novel SLC program to promote glucose uptake and lactate release. *Nature*. 2018;563(7733):714 - 718.
- 65 Haas R, Smith J, Rocher-Ros V, et al. Lactate Regulates Metabolic and Pro-inflammatory Circuits in Control of T Cell Migration and Effector Functions. *PLoS*

Biol. 2015;13(7):e1002202.

66 Angelin A, Gil-de-Gómez L, Dahiya S, et al. Foxp3 Reprograms T Cell Metabolism to Function in Low-Glucose, High-Lactate Environments. *Cell Metab.* 2017;25(6):1282 - 1293.e7.

67 Gerriets VA, Kishton RJ, Nichols AG, et al. Metabolic programming and PDHK1 control CD4⁺ T cell subsets and inflammation. *J Clin Invest.* 2015;125(1):194 - 207.

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、京都大学医学研究科次世代免疫制御を目指す創薬医学融合拠点 AK プロジェクトに参加されていたアステラス製薬株式会社 薬理研究所 企業派遣創薬研究グループリーダー 平山良孝さんに終始暖かいご指導、ご鞭撻をいただきましたことを深く感謝いたします。また、患者サンプルや研究の貴重なご助言をいただきました京都大学医学部付属病院 整形外科 伊藤宣先生、京都大学医学部付属病院 免疫・膠原病内科 橋本求先生に心より感謝申し上げます。

実験の実施にあたり、AK プロジェクトに参加されていたアステラス製薬株式会社 薬理研究所 企業派遣創薬研究グループ研究員 奥琢磨さん、大熊賢司さんにご協力いただき厚く御礼申し上げます。質量分析に関して、アステラス製薬株式会社 薬物動態研究所バイオマーカー研究室 鈴木謙一さん、平石智子さんにご協力いただきました。心から感謝いたします。また研究推進の承諾及び助言をいただきました AK プロジェクト 研究推進委員（現：国立研究開発法人日本医療研究開発機構 創薬戦略部 西日本統括部） 荒森一朗さんに厚く御礼申し上げます。

本学生命科学研究科 高次生命科学専攻 高次生体統御学分野教授 垣塚彰先生に修士課程入学から長期にわたり懇切にご指導、アドバイスなどをいただきましたことを深く感謝申し上げます。そして研究生活を支えてくださった AK プロジェクトの先生方やスタッフの皆様、最後まで応援してくれた家族に感謝いたします。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Metabolomic approach to the exploration of biomarkers associated with disease activity in rheumatoid arthritis

Chiomi Sasaki, Tomoko Hiraishi, Takuma Oku, Kenji Okuma, Kenichi Suzumura, Motomu Hashimoto, Hiromu Ito, Ichiro Aramori, Yoshitaka Hirayama. PLoS ONE 14(7): e0219400.