



TRANSLATIONAL SCIENCE

Peripheral blood gene expression profiling shows predictive significance for response to mycophenolate in systemic sclerosis-related interstitial lung disease

Shervin Assassi ¹, Elizabeth R Volkman ², W Jim Zheng,³ Xuan Wang,⁴ Holly Wilhalme,² Marka A Lyons,¹ Michael D Roth,² Donald P Tashkin²

膠原病・リウマチ内科 ジャーナルクラブ

2022年6月21日

宮崎 一鳳

Ann Rheum Dis. 2022 Jun;81(6):854-860.

背景

- ILDはSScの主な死因の一つである.
- SLS (Scleroderma Lung Studies) I ¹⁾とSLS II ²⁾では, 内服CYC, MMFともに%FVCの低下抑制と皮膚硬化に有効であった.
- しかし, 治療反応性は幅広く, 3分の1の症例では治療にもかかわらず%FVCが低下していた.
- また, Nintedanib³⁾やTocilizumab⁴⁾など治療の選択肢が増えている.
- 最適な薬剤を選択し, 不可逆的な損傷 (%FVC低下) を回避するための, 適切な予測バイオマーカーが望まれている.

1) N Engl J Med. 2006;354:2655-2666.

2) Lancet Respir Med. 2016;4(9):708-719.

3) N Engl J Med 2019;380:2518-28. (SENSCIS)

4) Lancet Respir Med. 2020;8:963-974. (focuSSced)

背景

- SSc-ILDで、IVCY治療前後の末梢血 (Peripheral Blood Cell: PBC) の遺伝子発現の変化は、SCOT trial⁵⁾ のサンプルで報告された⁶⁾。
- 経口CYCやMMFのSSc-ILD治療前後のPBC遺伝子発現解析は未報告。
- 本研究では、SLS IIにおける経口CYC or MMFによるPBCの遺伝子発現変化をmodule解析した。
- 各moduleとSSc-ILDに対する治療反応性との関連を調べ、baselineのPBC transcript scoresによって治療効果の予測ができるかを検討した。

5) N Engl J Med 2018;378(1):35-47.

6) Ann Rheum Dis 2019;78:1371–8.

[同じグループによる、本報告と同様のPBC遺伝子発現解析]

SLS II の概要

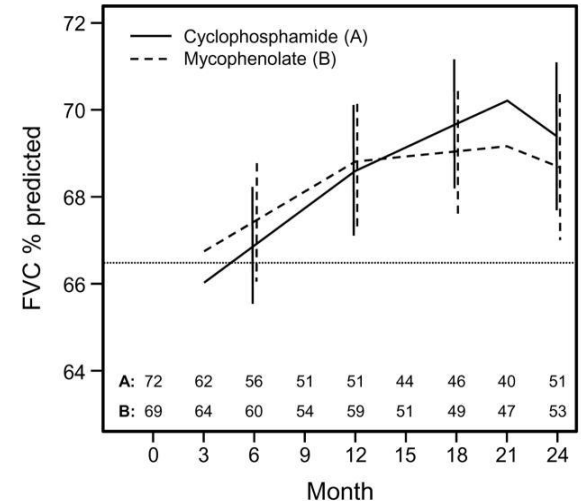
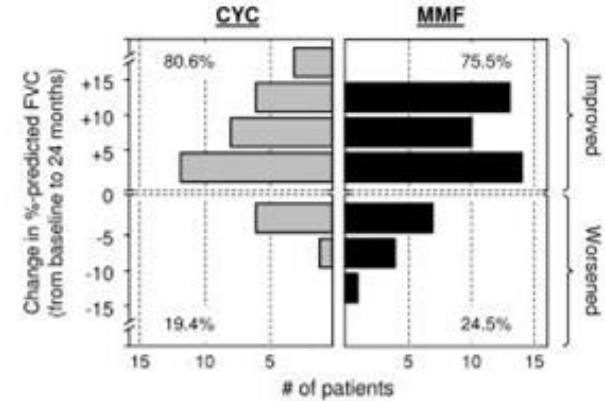
[Lancet Respir Med. 2016;4(9):708-719.]

PICO

Patient	SSc-ILD (dc/lc), %FVC 80%~45%, Mahler Baseline Dyspnea Index ≥ 2 , HRCTでGGOあり, Raynaud以外のSSc症状発症して7年以内
Intervention	MMF 1.5g 2年内服
Compare	CYC 2mg/kg 1年内服 (その後1年 placebo内服)
Outcome	MMFがCYCより24か月後の%FVCを改善するか

- Baselineと24か月後の比較では、CYC群で 2.88% (95% CI 1.19 - 4.58), MMF群で 2.19% (95% CI 0.58 - 3.84) FVCが改善した。
- 一方、両群間の比較では、24か月後の%FVC変化に有意差はなかった (p=0.24)。

Completers



方法

- SLS IIに参加した患者の, CYC群とMFM群の投与前と投与1年後のPBCを解析した.
- %FVC変化はSLS IIのprimary endpoint (2年後の%FVC変化) に従った.
- 全血PBC sampleはPAXgene tubeで保存され, RNAを抽出した.
- RNA-seqはIllumina NovaSeq 6000で行った.
- 2 sample以上でCPM 1以上の遺伝子を解析に用い, その後DESeq2で正規化した.

方法 : Module解析

- 全血用に選択した62個のmodule (遺伝子群)を用いてmodule解析する (repertoire analysisと筆者らが呼ぶ方法; 既報⁷⁾ に準じて解析).
- module内で発現亢進した遺伝子と低下した遺伝子の割合で, 各moduleを要約した (亢進が多いと赤, 低下が多いと青).
- QuSAGEアルゴリズム⁸⁾を用いて, module内遺伝子の平均fold changeを検定し, DEG (differentially expressed gene)を同定した. gene set内の遺伝子間の相関が調整され, 理解しやすい指標が得られる.
- Differentially expressed moduleの閾値は, FDR <0.05 かつ log2 fold change >0.2 とした.
- 各moduleで複合スコアを計算した.

7) Nat Rev Immunol 2014;14:271–80.

8) Nucleic Acids Res 2013;41:e170.

方法：Moduleの予測有意性の検定

- ベースラインのmodule scoreと、罹患年数, FVC%, mRSS, 抗体の種類などの関連を解析した.
- ベースラインのmodule score, 時間, ベースラインの%FVCをfixed effectとし, 連続変数としての%FVC (3~12カ月)をlinear mixed effects submodelとしたjoint modelを各治療群で作成.
- ベースラインのtranscript scoreのP値は, $P_{\text{FDR}} < 0.05$ を有意とした.
- 探索的分析：治療反応性をoutcomeとしたLogistic回帰分析.
 $\Delta\%FVC > +3\%$ をimprover, $\Delta\%FVC < -3\%$ をworseningとし, ベースラインのmodule scoreでimprover/non-improver, worsening/non-worseningを予測できるか検定した.

結果：患者の特徴

- ベースラインは134人 (CYC群 69人, MMF群 65人)で評価。
- 12カ月後は98人 (CYC群 47人, MMF群 51人)で評価。
- diffuse type SSc : 59.0%
- 平均罹患年数 : 2.6年
- %FVC平均 : 66.3%
- 抗Topo I 抗体 44.6%
抗RNA-polymerase III 抗体 13.1%

Table 1 Baseline patient characteristics

Characteristic	CYC, n=69	MMF, n=65	Overall, n=134
Age in years*	52.0±9.5	52.8±9.9	52.4±9.7
Female, n (%)	53 (76.8)	45 (69.2)	98 (73.1)
Race, n (%)			
White	45 (65.2)	48 (73.8)	93 (69.4)
African American	18 (26.1)	11 (16.9)	29 (21.6)
Asian	3 (4.3)	6 (9.2)	9 (6.7)
Native American	3 (4.3)	0 (0.0)	3 (2.2)
Hispanic ethnicity, n (%)	9 (13.0)	8 (12.3)	17 (12.7)
Diffuse disease type, n (%)	39 (56.5)	40 (61.5)	79 (59.0)
Disease duration in years*	2.5±1.8	2.8±1.8	2.6±1.8
FVC%*	66.0±9.9	66.5±8.2	66.3±9.1
DLCO %*	54.3±14.1	54.3±11.3	54.3±12.8
mRSS*	14.3±10.8	15.1±10.2	14.7±10.5
Antitopoisomerase I, n (%)†	30 (44.1)	28 (45.2)	58 (44.6)
Anti-RNA polymerase III, n (%)†	8 (11.8)	9 (14.5)	17 (13.1)

*Mean±SD.

†Antibody data are missing in four participants.

CYC, cyclophosphamide; DLCO%, per cent predicted diffusing capacity for carbon monoxide; FVC%, per cent predicted forced vital capacity; MMF, mycophenolate mofetil; mRSS, modified Rodnan Skin Score.

結果：治療前後の遺伝子発現レベルの変化

- CYC治療前後では6873, MMF治療前後では113の遺伝子がDEGとして抽出された. MMFの方がPBC遺伝子変化が軽度.
- Ingenuity Pathway Analysis (IPA) による, top canonical pathwayは以下の通り ;
 - CYC群 : phagosome formation, ferroptosis signalling, hepatic fibrosis signalling
 - MMF群 : primary immunodeficiency signalling, kinetochore metaphase signalling, B cell receptor signalling

結果：治療前後のModule発現の変化

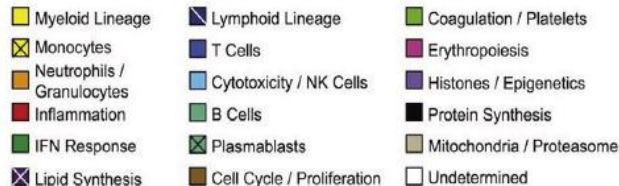
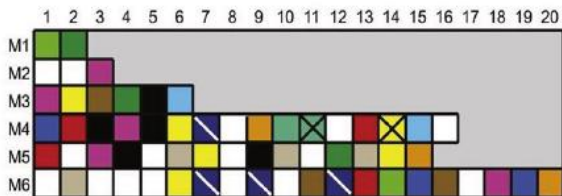
- 全血の解析で検討されてきた62 moduleを観察.
- ベースラインのCYC群, MMF群間でmodule発現の差はなかった.
- CYC治療前後の比較 (次スライド)では, 多くのmodule変化を認めた. QuSAGE解析では, Erythropoiesis, 炎症, Myeloid lineage moduleが亢進し, Lymphoid lineage moduleが低下していた.
- MMF治療前後の比較 (次々スライド)では, module変化はより少なく, QuSAGE解析では, Plasmablast, Cell cycle moduleが低下していた.

CYC治療前後のmodule変化

Traditional repertoire analysisによるdifferentially expressed moduleの発現亢進(赤)/低下(青)



Blood Module Functional Map



Upregulation
Erythropoiesis
Inflammation
Myeloid lineage

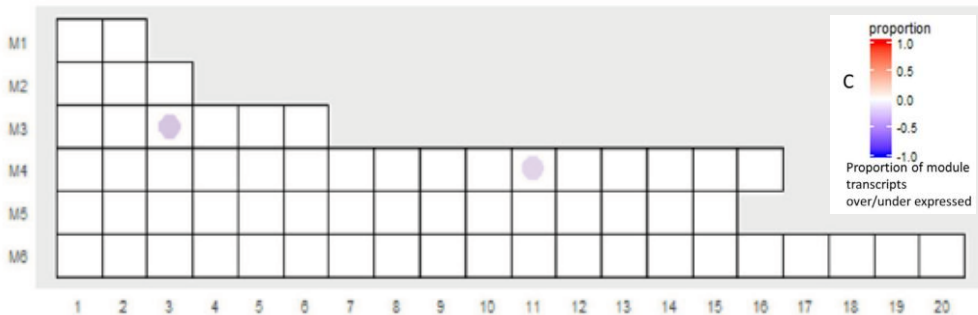
Downregulation
Lymphoid lineage

QuSAGE解析によるdifferentially expressed module

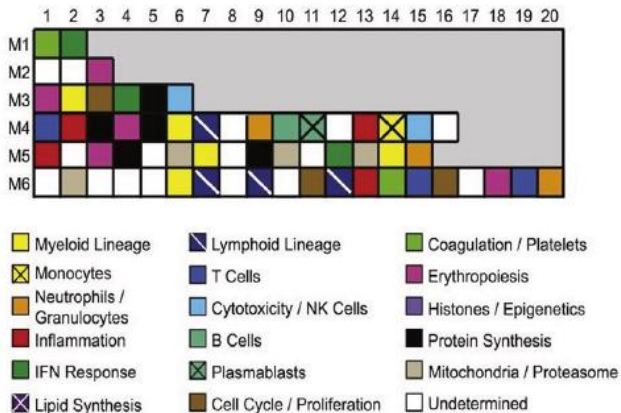
Module	Annotation	Log2 fold change	P _{FDR} value
M2.3	Erythropoiesis	1.21	<0.0001
M6.18	Erythropoiesis	0.93	<0.0001
M3.1	Erythropoiesis	0.91	<0.0001
M4.4	Erythropoiesis	0.57	<0.0001
M5.15	Neutrophils/granulocytes	0.53	<0.0001
M4.2	Inflammation	0.47	<0.0001
M5.3	Erythropoiesis	0.39	<0.0001
M1.1	Coagulation/platelets	0.35	0.002
M3.3	Cell cycle/proliferation	0.34	<0.0001
M3.2	Myeloid lineage	0.31	<0.0001
M6.11	Cell cycle/proliferation	0.28	0.0042
M4.14	Monocytes	0.27	<0.0001
M6.14	Coagulation/platelets	0.26	0.0001
M6.6	Myeloid lineage	0.26	<0.0001
M3.4	IFN response	0.24	0.0103
M4.6	Myeloid lineage	0.23	0.0001
M4.13	Inflammation	0.21	0.0055
M6.13	Inflammation	0.2	<0.0001
M3.6	Cytotoxic/NK cell	-0.23	0.0095
M4.3	Protein synthesis	-0.25	0.0021
M6.12	Lymphoid lineage	-0.26	<0.0001
M4.7	Lymphoid lineage	-0.3	<0.0001
M6.9	Lymphoid lineage	-0.36	<0.0001
M4.15	Cytotoxic/NK cell	-0.46	<0.0001
M6.15	T cells	-0.51	<0.0001
M6.19	T cells	-0.62	<0.0001
M4.1	T cells	-0.82	<0.0001
M4.11	Plasmablasts	-0.98	<0.0001
M4.10	B cells	-1.29	<0.0001

MMF治療前後のmodule変化

Traditional repertoire analysisによるdifferentially expressed moduleの発現亢進(赤)/低下(青)



Blood Module Functional Map



Downregulation
Plasmablast
Cell cycle

QuSAGE解析によるdifferentially expressed module

Table 3 Results of QuSAGE analysis for differentially expressed annotated modules in pairwise comparison of 12-month with baseline samples in the MMF arm

Module	Annotation	Log2 fold change	P _{FDR} value
M3.3	Cell cycle	-0.43	<0.0001
M6.11	Cell cycle/DNA repair	-0.39	0.0003
M4.11	Plasmablast	-0.77	<0.0001

FDR, false discovery rate; MMF, mycophenolate mofetil.

結果：ベースラインmodule発現と臨床項目の関連

- ベースラインのmodule scoreと、罹患年数、ベースラインのFVC%, mRSS, 病型, 抗RNApol3抗体との関連は認めなかった.
- ベースラインのmodule scoreで, CYC群・MMF群とも, 3~12カ月のmRSSの変化を予測するものはなかった (supplementary table 4).

結果：ベースラインmodule scoreと $\Delta\%$ FVCの関連

(Primary analysis)

- CYC群の $\Delta\%$ FVC (3-12月)を有意に予測するベースラインmoduleはない。
- **MMF群の $\Delta\%$ FVC (3-12月)を有意に予測するベースラインmoduleは16個ある。**
 - Lymphoid関連やミトコンドリア・蛋白産生のbaseline module scoreが高いほど、 $\%$ FVCが増加する。

Ex) BaselineのLymphoid lineage module (M6.12) のZ scoreが1 unit高いと、3-12ヶ月の $\%$ FVCが+2.85%増加する。
 - Myeloid関連や炎症のmodule scoreが高いほど、 $\%$ FVCが低下する。

Module	Annotation	CYC群		MMF群	
		Estimate (95% CI)	P _{FDR}	Estimate (95% CI)	P _{FDR}
M3.2	Myeloid Lineage	-1.03 (-2.25, 0.2)	0.290	-1.46 (-2.53, -0.39)	0.044
M3.5	Protein Synthesis	0.67 (-0.68, 2.02)	0.548	2.51 (1.26, 3.75)	0.004
M4.2	Inflammation	-0.88 (-2.02, 0.26)	0.334	-1.37 (-2.35, -0.38)	0.040
M4.3	Protein Synthesis	0.08 (-1.05, 1.21)	0.924	2.41 (1.2, 3.62)	0.004
M4.9	Neutrophils / Granulocytes	-0.73 (-2.3, 0.84)	0.573	-2.18 (-3.65, -0.72)	0.025
M4.13	Inflammation	-1 (-2.19, 0.19)	0.290	-1.56 (-2.6, -0.51)	0.025
M4.15	Cytotoxic/NK Cell	1.15 (0.11, 2.19)	0.120	1.3 (0.4, 2.2)	0.031
M5.1	Inflammation	-1.15 (-2.6, 0.3)	0.313	-1.93 (-3.3, -0.56)	0.037
M5.6	Mitochondria / Proteasome	0.29 (-1.22, 1.81)	0.798	2.32 (0.8, 3.83)	0.024
M5.7	Myeloid Lineage	-0.79 (-2.05, 0.47)	0.435	-2.09 (-3.26, -0.91)	0.006
M5.9	Protein Synthesis	-0.26 (-1.55, 1.03)	0.798	2.46 (1.08, 3.84)	0.006
M5.10	Mitochondria / Proteasome	0.47 (-1.31, 2.25)	0.755	3.24 (1.55, 4.94)	0.004
M5.14	Myeloid Lineage	-1.21 (-2.48, 0.06)	0.204	-1.79 (-2.98, -0.59)	0.025
M6.9	Lymphoid Lineage	1.32 (-0.05, 2.69)	0.204	2.33 (1.12, 3.53)	0.004
M6.12	Lymphoid Lineage	0.97 (-0.56, 2.5)	0.435	2.85 (1.33, 4.38)	0.004
M6.20	Neutrophils / Granulocytes	-0.91 (-2.14, 0.31)	0.356	-2.07 (-3.21, -0.92)	0.006

(supplementary table 5)

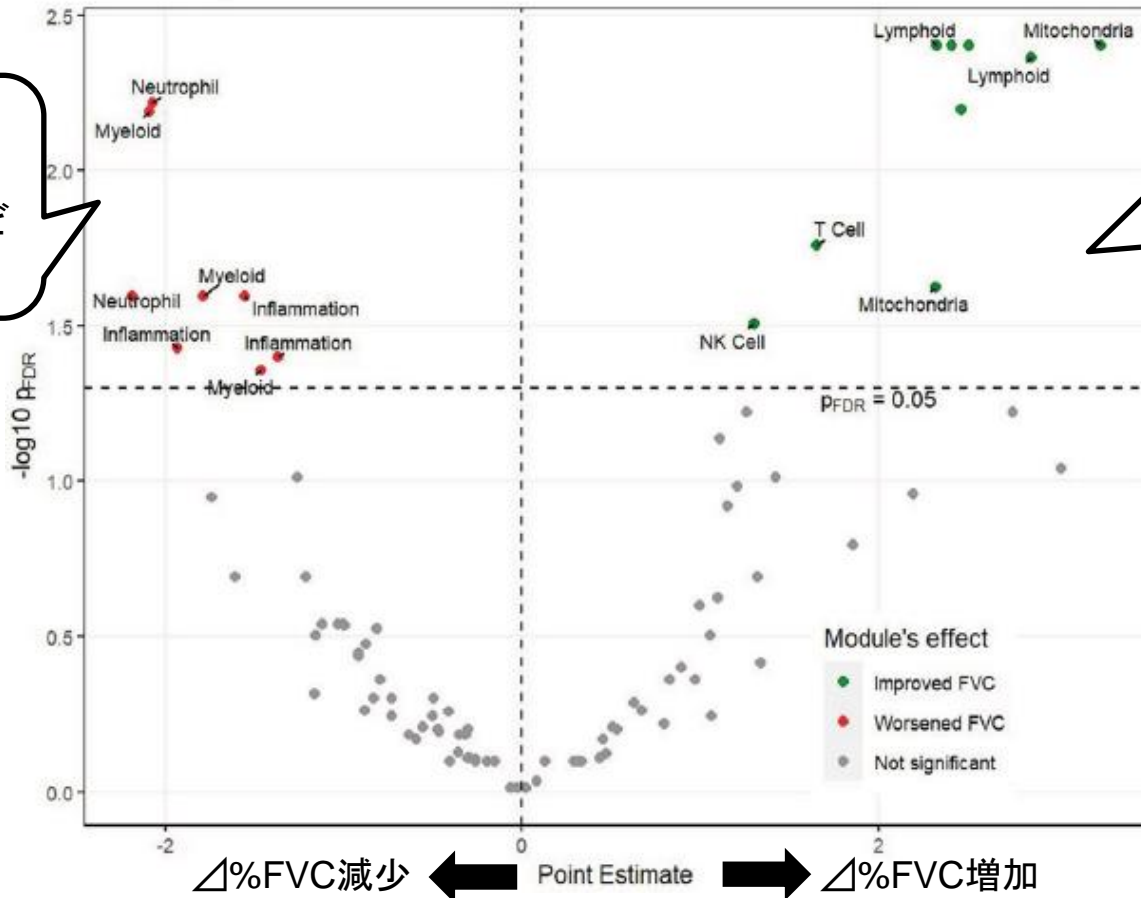
MMF群のベースラインmodule scoreと $\Delta\%FVC$ の関連

(Primary analysis)

好中球/Myeloid,
炎症のmodule
scoreが高いほど
 $\Delta\%FVC$ が減少

リンパ球系 (T/CTL/NK),
ミトコンドリア, 蛋白合成の
module scoreが高いほど
 $\Delta\%FVC$ が増加

予測関連解析の $-\log_{10} P_{FDR}$



- MMF群の全62 moduleについて, baseline module scoreと $\Delta\%FVC$ の予測解析のvolcano plot.
- 横軸: Estimate (module score 1Uあたりの $\Delta\%FVC$)
- 縦軸: 予測解析の $-\log_{10} P_{FDR}$

MMF群のベースラインmodule scoreと治療反応性

(Exploratory analysis : MMFによる%FVC 改善 or 悪化のLogistic回帰分析)

- MMF群における $\Delta\%$ FVC $>3\%$ をimprover (n=52), $\Delta\%$ FVC $<-3\%$ をworsening (n=26)と定義.

Improverを予測するmoduleのOR

Module	Annotation	OR	95% CI	P value
M5.10	Mitochondria/proteasome	3.68	1.09 to 12.44	0.0358
M6.12	Lymphoid lineage	3.63	1.21 to 10.89	0.0215
M6.9	Lymphoid lineage	2.9	1.16 to 7.26	0.0233
M4.3	Protein synthesis	2.23	1.05 to 4.71	0.0359
M3.2	Myeloid lineage	0.48	0.24 to 0.98	0.0444
M4.13	Inflammation	0.46	0.23 to 0.92	0.0277
M5.7	Myeloid lineage	0.4	0.17 to 0.92	0.0313
M6.20	Neutrophils/granulocytes	0.36	0.16 to 0.8	0.0124
M5.14	Myeloid lineage	0.35	0.16 to 0.78	0.0105

Worseningを予測するmoduleのOR

Module	Annotation	OR	95% CI	P value
M5.7	Myeloid lineage	5.18	1.6 to 16.78	0.006
M5.14	Myeloid lineage	4.86	1.54 to 15.29	0.0069
M5.1	Inflammation	4.65	1.43 to 15.13	0.0107
M6.20	Neutrophils/granulocytes	4.62	1.63 to 13.05	0.0039
M4.9	Neutrophils/granulocytes	3.95	1.2 to 12.99	0.0239
M4.13	Inflammation	3.36	1.36 to 8.27	0.0084
M6.13	Inflammation	3.22	1.07 to 9.74	0.0381
M3.2	Myeloid lineage	2.76	1.19 to 6.37	0.0177
M4.2	Inflammation	2.26	1.09 to 4.66	0.0275
M4.6	Myeloid lineage	2.25	1.05 to 4.79	0.0363
M4.11	Plasmablasts	0.43	0.2 to 0.97	0.0414
M6.19	T cells	0.43	0.19 to 0.96	0.04
M4.10	B cells	0.42	0.2 to 0.91	0.0267
M4.15	Cytotoxic/NK cell	0.42	0.2 to 0.84	0.0153
M6.15	T cells	0.40	0.17 to 0.96	0.041
M4.3	Protein synthesis	0.38	0.16 to 0.9	0.0281
M3.6	Cytotoxic/NK cell	0.36	0.13 to 0.98	0.0457
M5.6	Mitochondria/proteasome	0.31	0.11 to 0.91	0.0325
M3.5	Protein synthesis	0.26	0.09 to 0.69	0.0074
M6.9	Lymphoid lineage	0.25	0.09 to 0.7	0.0081
M5.10	Mitochondria/proteasome	0.20	0.05 to 0.78	0.0205
M6.12	Lymphoid lineage	0.19	0.05 to 0.64	0.0073
M6.16	Cell cycle/DNA repair	0.11	0.02 to 0.64	0.0132

- ベースラインのmodule scoreで両者を予測可能か, Logistic回帰分析を行った.
- Lymphoid・ミトコンドリア moduleのベースラインscoreが高いほど, MMFで%FVCが改善しやすい.
- Myeloid・炎症 moduleのベースラインscoreが高いほど, MMFで%FVCが悪化しやすい.

考察 - 1

- 経口CYCは免疫・凝固・EPO関連遺伝子の発現に強い影響があった。
- SCOT (IVCY) ではB cell module (M4.10) 低下, Neu module (M5.15) 亢進したが, 今回のpoCYではより多くのmoduleに変化があった。
SLS II は人数が多く, doseが多く, 投与経路が違うためだろう。
- CYCの遺伝子発現への影響はMMFより大きい。これは, SLS II 試験でCYCがMMFより忍容性が低く, 有害事象が多かったことと一致する。

	SCOT trial (n=35)	SLS II (n=69)
CY投与方法	点滴 750 mg/m ² /月	経口 2 mg/kg/日
CYで亢進module	Neutrophil	Neutrophil, Myeloid lineage, エリスロ°エチン, 凝固
CYで低下module	B cell	B cell, Lymphoid lineage

考察 - 2

- MMFはグアノシン合成酵素IMPDHを阻害するが、活性化T・B細胞に発現するⅡ型をより強く阻害する (housekeeping isoform I型の5倍).
- 今回の解析で、MMFでPlasmablastのmoduleが抑制されたことと、lymphoid lineage moduleが高い患者で、MMFの $\Delta\%$ FVC改善効果が高かったことは、MMFの薬理機序と合致している.

考察 - 3

- SScのPBCで, IFN module (M1.2) が健常人より著明に亢進している⁶⁾.
- 今回, CYCもMMFも本moduleを抑制していなかった. SCOTでも, IVCYは本moduleを抑制していなかった⁶⁾.
- 一方, SLS II で, IFNから誘導される6つの血清蛋白質の複合スコアは, CYC・MMFによって抑制されていた⁹⁾.
- PBCのRNAと, 血清蛋白質の乖離については, IFN由来蛋白質がPBC以外の臓器から産生されている可能性が考えられる (spillover effect).

6) Ann Rheum Dis 2019;78:1371–8.

9) Arthritis Rheumatol 2021;73:1005–13.

考察 - 4

- 本研究のstrength:
 - SScに対するMMF治療の, PBC遺伝子発現変化についての初報告.
 - PBC遺伝子発現のSSc-ILD治療効果予測解析の初報告. Lymphoid moduleが高いとMMFの効果が期待され, 層別化投与に寄与しうる.
- 本研究のlimitation:
 - プラセボ群がないため, 自然経過でのmoduleのSSc-ILDの予測データが不明である.
 - ベースラインのmoduleでmRSSの進行予測できるものがなかった. 進行性の皮膚病変のある患者が少なかったからかもしれない.

結論

- 経口CYCは, SSc-ILD患者のPBC遺伝子発現に大きな影響があり, 既知の毒性の高さを説明している可能性がある.
- MMFは, Plasmablast moduleの抑制など, より穏やかな影響を及ぼす.
- ベースラインのPBC module scoreは, MMF群のSSc-ILDの経過について予測的有意性を示した. ベースラインのリンパ球関連moduleの発現が高いと, MMFへの%FVCの治療反応性がよく, 骨髄細胞関連moduleの発現が高いとMMFへの%FVCの治療反応性が不良だった.
- SSc-ILDの治療に際して, 遺伝子発現プロファイリングが, 患者の治療をパーソナライズに寄与する可能性がある.