



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Annals of the Rheumatic Diseases

journal homepage: <https://www.sciencedirect.com/journal/annals-of-the-rheumatic-diseases>



Systemic lupus erythematosus

Untargeted breathomics identifies metabolic signatures of immune activity, intestinal integrity, and fatigue in systemic lupus erythematosus

Ioannis Parodis^{1,2,*}, Martina Iacubino³, Lorenzo Rocco³, Dionysis Nikolopoulos¹, Leonardo Palazzo¹, Liam Grimmett⁴, Matt Kerr⁴, Chiara Bellocchi^{3,5}, Barbara Vigone³, Alessandro Santaniello³, Guillermo Barturen^{6,7}, Alexandre E. Voskuyl⁸, Marta E. Alarcón-Riquelme^{6,9}, Lorenzo Beretta^{3,**}

¹ Division of Rheumatology, Department of Medicine Solna, Karolinska Institutet, Karolinska University Hospital, and Center for Molecular Medicine (CMM), Stockholm, Sweden

² Department of Rheumatology, Faculty of Medicine and Health, Örebro University, Örebro, Sweden

³ Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, Referral Center for Systemic Autoimmune Diseases, Milan, Italy

⁴ Owlstone Medical Ltd, Cambridge, UK

⁵ Department of Clinical Sciences and Community Health, Department of Excellence 2023–2027, University of Milan, Milan, Italy

⁶ GENyO, Center for Genomics and Oncological Research Pfizer/University of Granada, Department of Medical Genomics, Granada, Spain

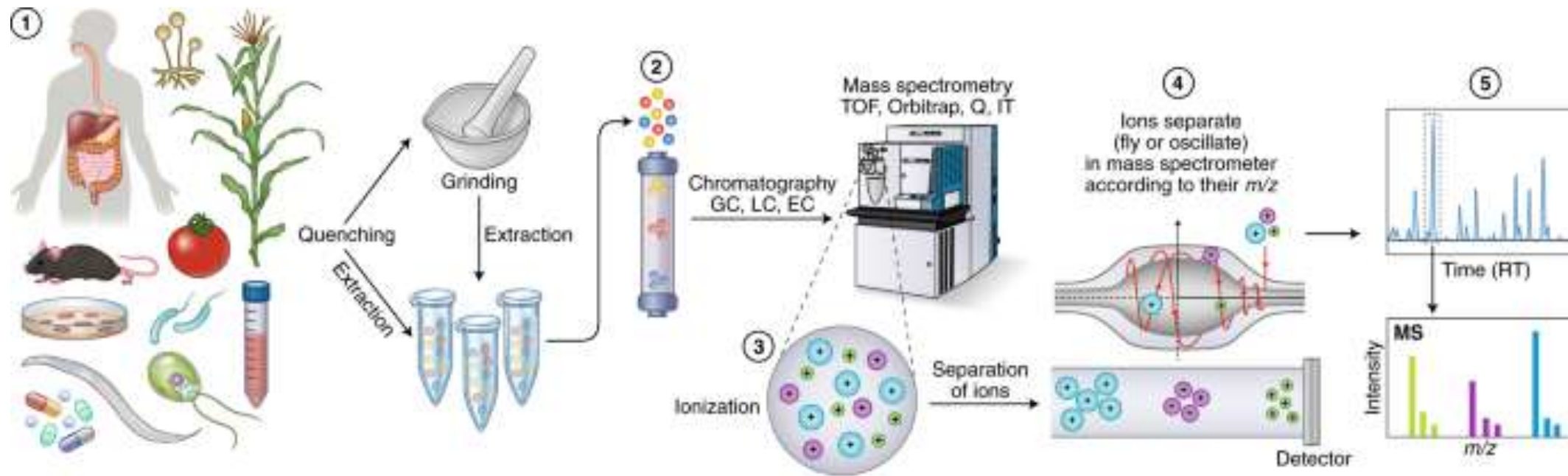
⁷ Department of Genetics, Faculty of Sciences, University of Granada, Granada, Spain

⁸ Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Amsterdam Rheumatology and Immunology Center, Amsterdam UMC, Amsterdam, the Netherlands

⁹ Department of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

Introduction メタボロミクスとは

- 唾液・糞便・尿・呼気など生物学的サンプル中の代謝物を質量分析法で測定して生理学的/病理学的プロセスの全体像をみる。



① サンプル準備と抽出

② クロマトグラフィー

GC; ガスクロマトグラフィー
LC; 液体クロマトグラフィー
EC; 電気泳動系

で抽出した代謝物混合物を時間的にばらして分離

③ イオン化

質量分析計(MS)で測定できるようにイオンに変換

④ イオンを分離(m/zで分離)

イオン化された分子をMS内で飛ばしたり振動させて質量電荷比の違いで分ける

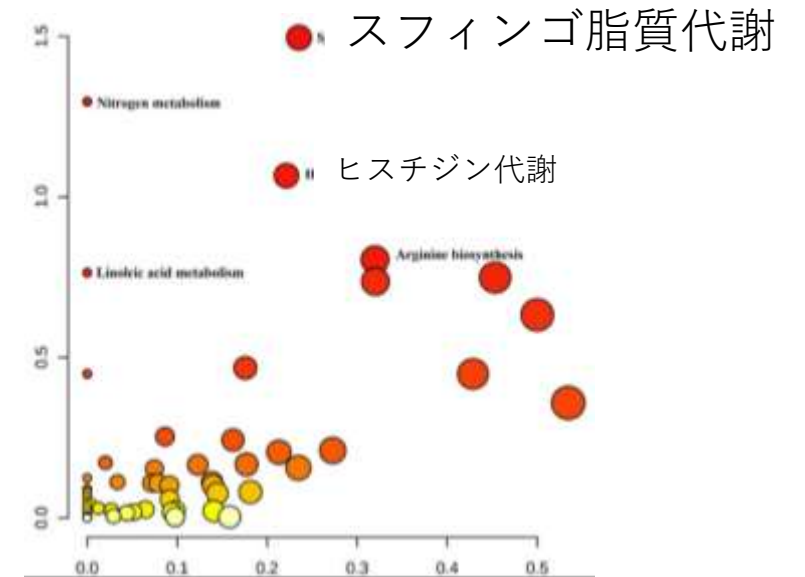
⑤ クロマトグラフィー質量分析 (MS)

分離・測定されたイオンを記録し解析用データにする

Introduction SLEの病態におけるメタボロミクスの応用

【脂質代謝】

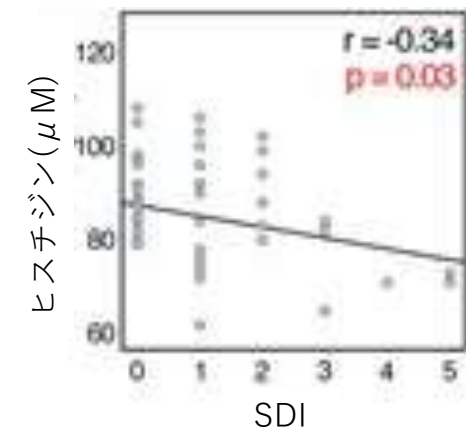
脂質プロファイルの時間空間的变化を特定する。
SLE(低～高活動性含む) vs 健常対照者の計40名での解析では、
SLE患者はスフィンゴ脂質、アポリポタンパク質が健常人と比べて高かった。いずれもアテローム性動脈硬化に関して重要で、スフィンゴ脂質代謝の破綻からアポリポタンパクレベル変化と共にSLE疾患活動性を促進する役割を果たす。
Front Immunol. (2022) 13:833699.



【アミノ酸代謝】

血漿サンプルのメタボロミクスプロファイル进行分析した結果、SLEの血漿ヒスチジン値とSLICC Damage Index(SDI)が負の相関を示した。
Rheumatol (Oxford England). (2023) 62:905–13.

リソソーム内のヒスチジン濃度はTLR7誘導性B細胞のtype1IFN産生を制御する
Immunity. (2014) 41:375–88.



Introduction Breathomics(ブレスミクス)とは

- 呼気中の揮発性有機化合物(VOC)を解析する方法
- VOC変動は悪性腫瘍, 感染症, 胃腸疾患, 肝臓疾患, 呼吸器疾患の既報がある

Metabolomics. 2024; 20(4):72

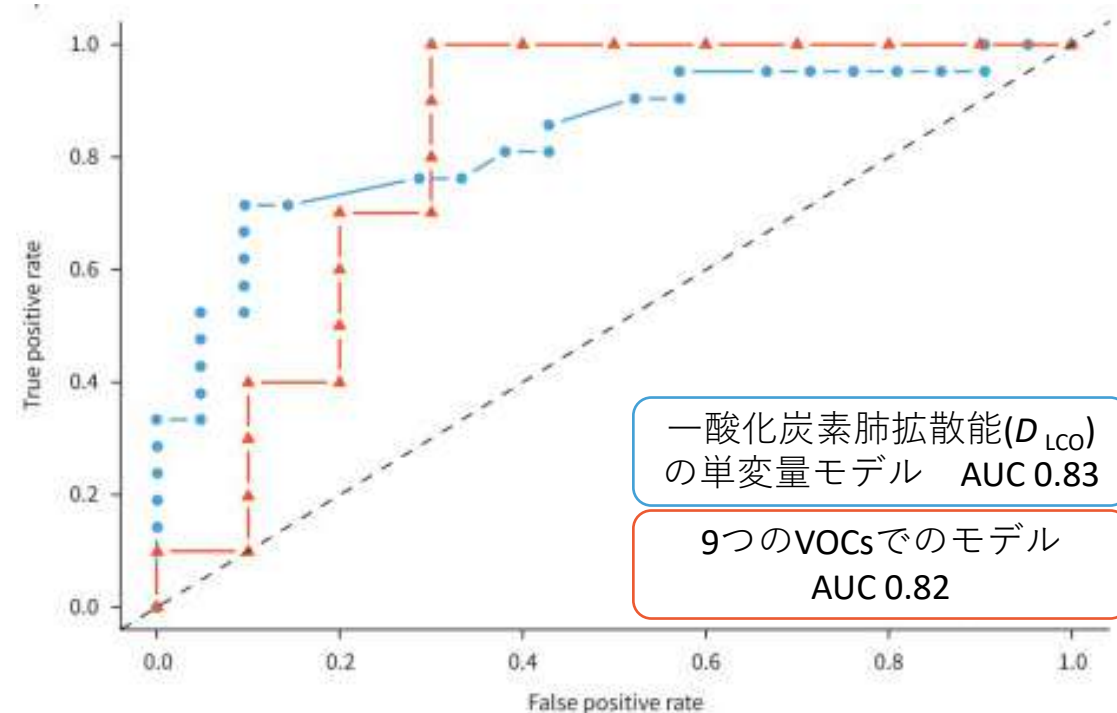
- 呼気分析でCOVID-19を検出するためのVOCバイオマーカーが4つ検出され, 非COVID-19と94.7%の精度で識別できた.

JAMA Netw Open. 2023;6(2):e230982.

- 全身性硬化症(SSc)の中で間質性肺疾患(ILD)表現型を予測するモデルをVOCを用いた呼気分析を行った結果, 9つの代謝物が検出されAUC0.82, 感度77%, 特異度100%を達成した.

ERJ Open Res. 2024; 10(4):00175-02024

SSc-ILD診断における一酸化炭素肺拡散能とVOCsでのROCモデル



ERJ Open Res. 2024; 10(4):00175-02024

Objectives

- 呼気を用いて,十分に特徴づけられたSLE患者コホートにおける,
ブレスミクス (Breathomics) シグネチャーを同定すること

Study Design 単施設 症例対照研究



2019 EULAR/ACR SLE分類基準を満たすSLE30名



年齢および生物学的性別を一致させた健常対照30名

- 現在喫煙者ではない
- 間質性肺疾患または吸入ステロイドを要する慢性呼吸器疾患の既往なし

【臨床データ】 SLEDAI-2K, BILAG-2004, 現在の治療薬, 医師全般評価(PhGA), 患者全般評価(PtGA), 抗ds-DNA抗体, C3, C4, 病勢評価にはLLDAS, DORISも追加, 疲労評価[FACIT-F質問票, 疲労VAS, LupusQoL疲労サブスケール]

Analytical procedures サンプル採取と分析

呼気は ReCIVA Breath Sampler(マウスピース付Owlstone Medical Ltd)で採取

呼気のうち呼出終末(下気道由来の肺胞気)のみ採取し最初の死腔気は除外

環境由来VOCと呼気由来シグナルを識別するため同じカートリッジと同じワークフローで**ブランク試料**も採取

呼気試料は加熱脱着ガスクロマトグラフィー/質量分析(thermal desorption GC/MS)で分析

Analytical procedures 呼気由来VOCの判定とSLEとの関連解析

1. 解析対象VOCの選定

環境由来の混入を減らし実際に呼気に由来するVOCに絞って解析。

以下のうち1つ以上を満たすVOCを”on-breath VOC”として採用：

- いずれかの群で50%以上の試料がブランク平均 + 3SD を上回る
- 試料 vs ブランクで有意差あり(片側検定, $P < 0.05$)+2倍以上の差
- ブランクとの識別性能が高い(ROC-AUC > 0.8)

2. 疾患との関連解析 (回帰モデル)

VOCとSLE病態との関連は、**線形回帰モデル**で評価。

以下の要因を共変量として調整：

年齢, 性別, 採取日, 最終食事/飲水からの時間, BMI, 歯磨きからの時間

β 係数の解釈：

予測因子が1単位変化したときのVOC濃度(log10スケール)の変化量

Analytical procedures 呼気由来VOCの判定

3. 主成分分析(PCA)

共変量調整後の残差を用いて主成分分析を実施

VOC群の共通パターン(多変量構造)を可視化

特に臨床関連が広がったVOCクラスターを重点的に解析

4. データ変換・外れ値処理

VOC濃度は \log_{10} 変換して解析. 外れ値は頑健な方法(double MAD法)で処理

5. 相関解析・効果量

共変量調整後の関連は頑健なPearson相関 (robust Pearson)で評価. 群間差の大きさはrobust Cohen's dで評価 (効果量)

患者背景と臨床的特徴

Table

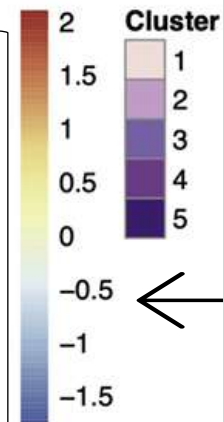
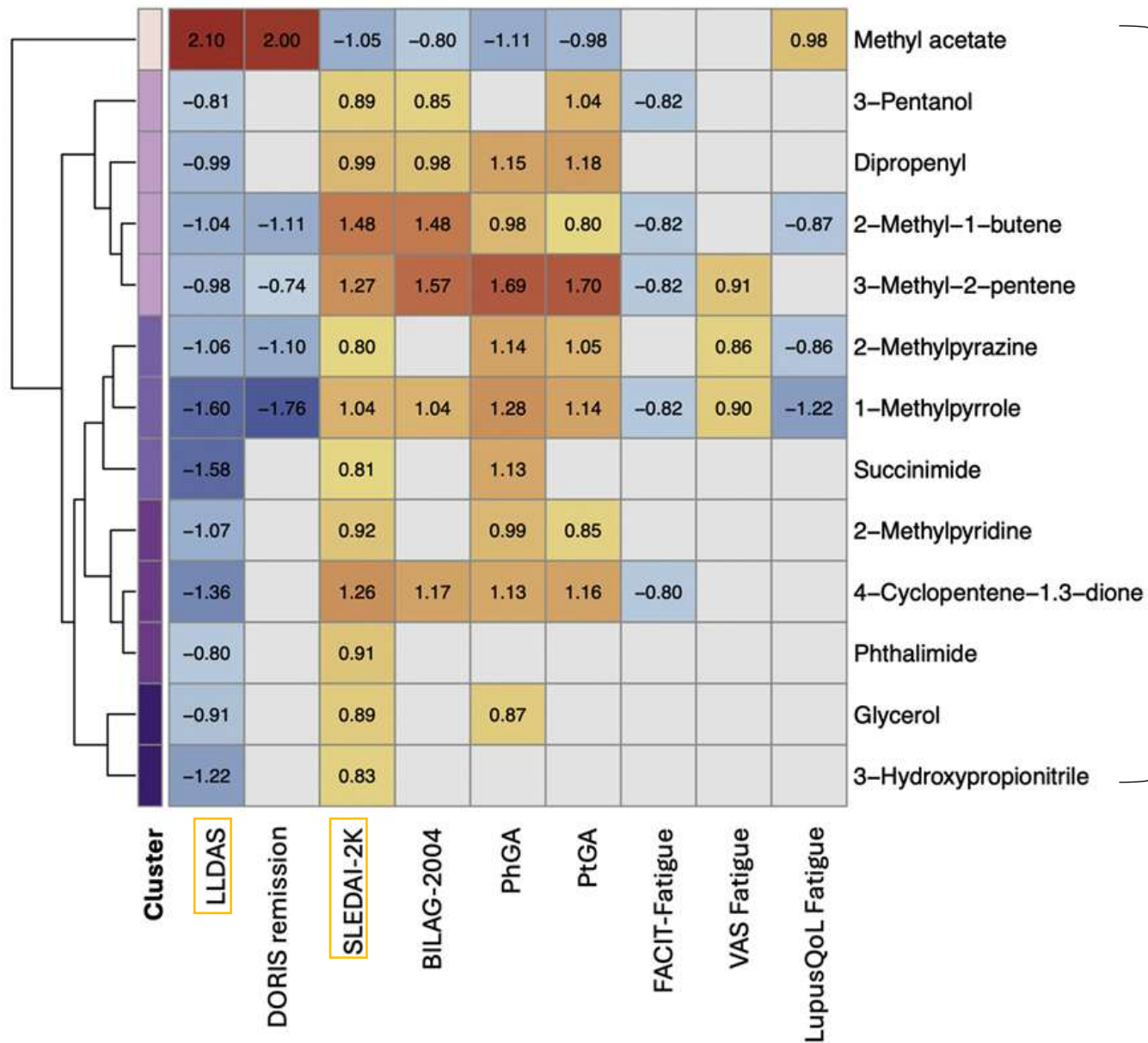
Demographic and clinical characteristics

Variable	SLE (n = 30)	Controls (n = 29)	P value
Age, mean ± SD	46.3 ± 13.8	46.7 ± 14.7	NS
Women, n (%)	25 (83.3%)	24 (82.8%)	NS
BMI, mean ± SD	23.5 ± 4.7	23.9 ± 3.6	NS
Time since last meal (h), mean ± SD	7.1 ± 5.6	7.7 ± 5.3	NS
Time since last drink (h), mean ± SD	4.3 ± 4.4	3.7 ± 4.2	NS
Time since brushing teeth (h), mean ± SD	3.8 ± 2.1	4.1 ± 2.5	NS
Disease duration (y), mean ± SD	14 ± 10.4	-	-
SLEDAI-2K, median (IQR)	2.5 (1.3-5.8)	-	-
BILAG-2004, median (IQR)	5 (1-10)	-	-
PhGA (0-3), median (IQR)	0.3 (0.2-0.8)	-	-
PtGA (0-100), median (IQR)	40 (2.5-70.0)	-	-
Low C3 and/or low C4, n (%)	18 (60.0%)	-	-
Increased anti-dsDNA binding, n (%)	14 (46.7%)	-	-
Steroid use, n (%)	18 (60.0%)	-	-
Steroid dose (mg/day), mean ± SD	2.6 ± 2.7	-	-
Hydroxychloroquine use, n (%)	21 (70.0%)	-	-
Immunosuppressant use, n (%)	13 (43.3%)	-	-
LLDAS, n (%)	20 (66.6%)	-	-
DORIS remission, n (%)	13 (43.3%)	-	-
FACIT-F, median (IQR)	41.5 (31.5-47.5)	48.0 (44.0-51.0)	<2.2 × 10 ⁻¹⁶
VAS fatigue (0-100), median (IQR)	50 (0-80)	0 (0-10)	3.2 × 10 ⁻⁴
LupusQoL fatigue (0-100), median (IQR)	81.3 (51.6-93.7)	-	-

SLE患者は疾患活動性が低い状態であった。
66.7%(n=20)がLLDASを達成
血清学的所見も陰性だったのは30%(n=6)にとどまった

SLEは健常人と比べFACT-Fスコアが有意に低く、
疲労負荷が高いことが示唆された。

VOCと臨床転帰の関連の強さを示したヒートマップ

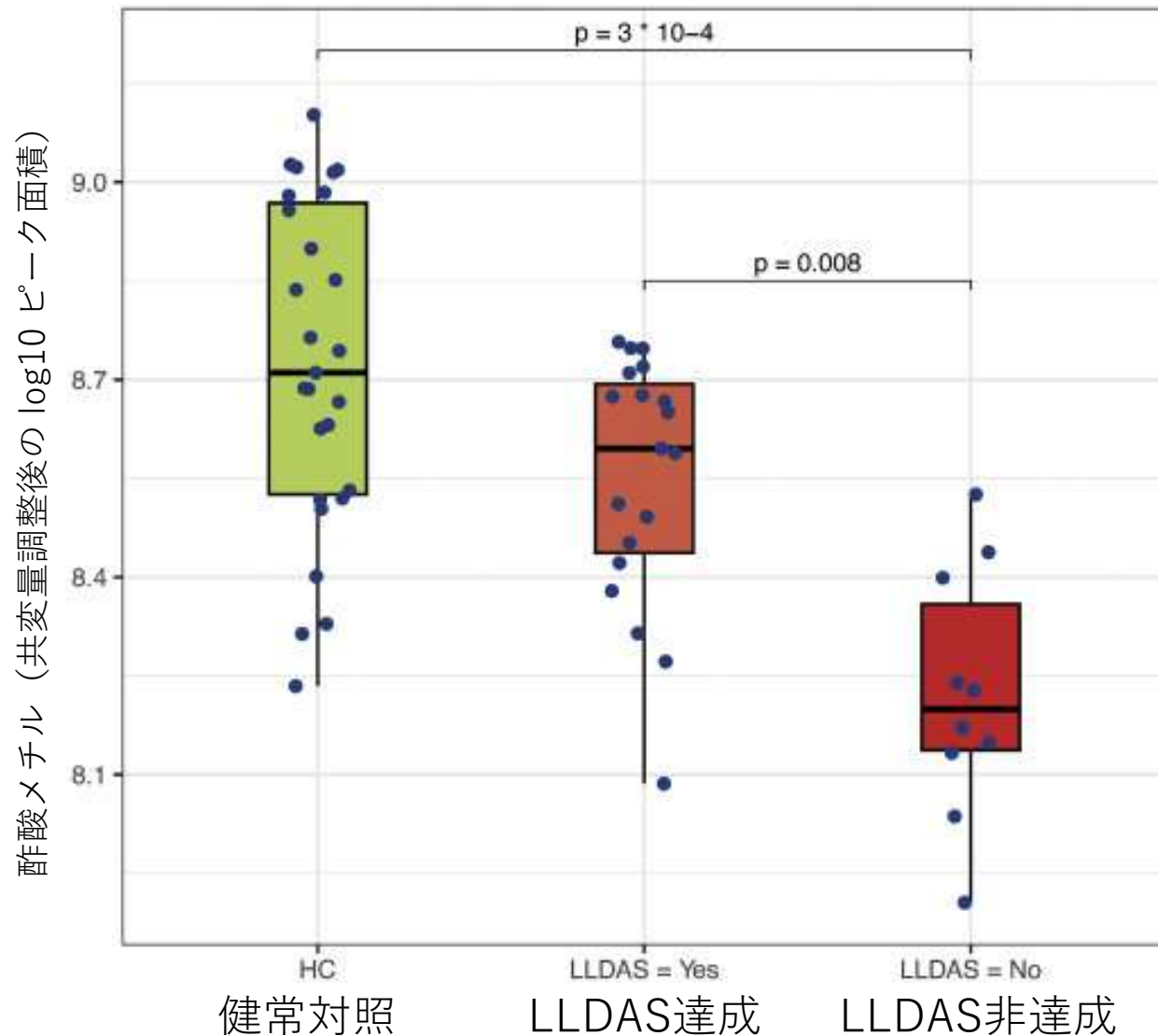


ロバストCohen's d(dr)を指標
 • $|dr| > 0.5$: 中等度の効果
 • $|dr| > 0.8$: 強い効果
 とした

抗dsDNA抗体, C3と関連したものはないが
 グリセロール($rw = -0.373, p = .042$)と3-ペンタ
 ノール($rw = -0.451, p = .014$)はC4と逆相関

LLDAS・SLEDAI-2Kと有意に関連した
 化合物をロバストなピアソンの相関で
 5つのクラスターに分類.

Cluster 1 酢酸メチル



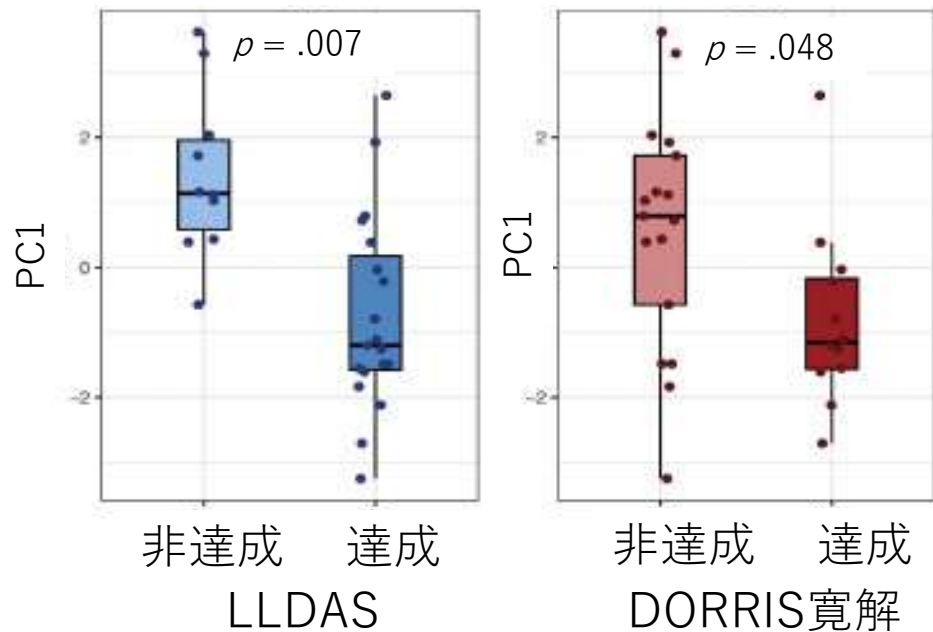
- LLDAS・DORIS寛解と正の相関を示した
→病勢が安定している程高い酢酸メチルの傾向
- SLE患者は健常対照より酢酸メチルは有意に低値
($dr = -1.21$, $\log_{10}FC = -0.3$, $p = 0.003$)
- SLEDAI-2K / BILAG-2004 / PhGA / PtGA と負の相関
→疾患活動性が高い程低い酢酸メチルの傾向
- 疲労 (LupusQoL fatigue) と負の相関
→疲労が強いほど酢酸メチルが低値だった

Cluster 2 分岐アルケン・アルコール群

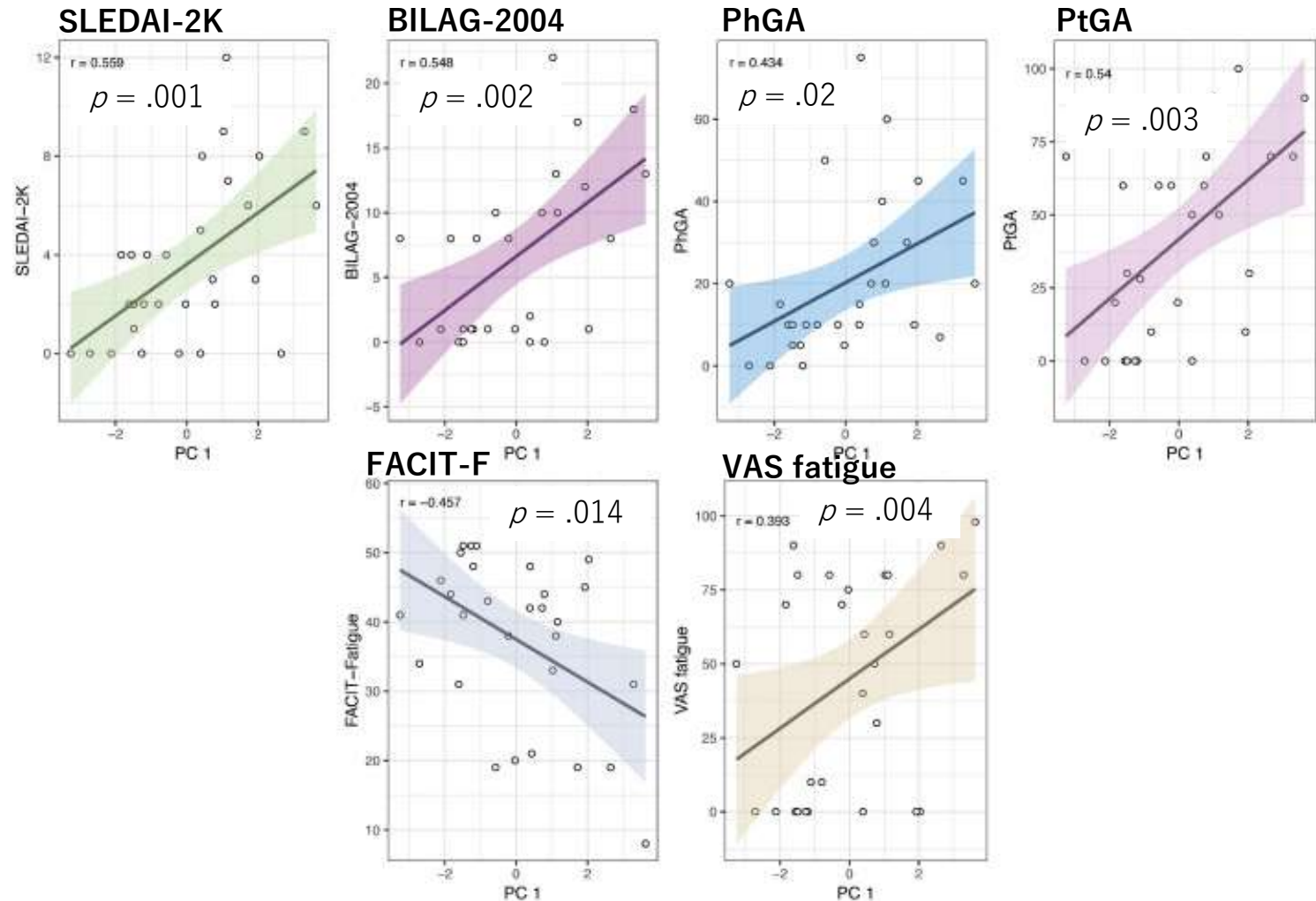
Cluster 2 は4種類のVOCで構成

- 3-methyl-2-pentene
- 2-methyl-1-butene
- dipropenyl
- 3-pentanol

4種類VOCの共変量調整後残差に対する
主成分分析で得られた第1主成分(PC1)のプロット



第1主成分(PC1)と臨床的スコア(疾患活動性, 疲労)との相関



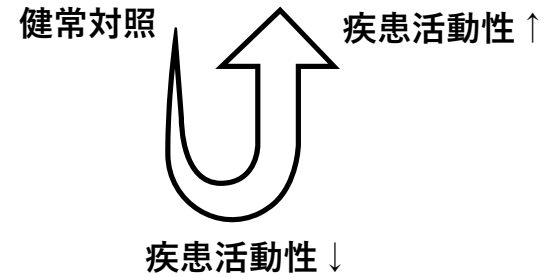
疾患活動性の上昇, LLDASまたはDORRIS寛解の非達成, 疲労の増加と関連していた

Cluster 3 含窒素ヘテロ環化合物

2-メチルピラジン, 1-メチルピロール, スクシンイミドから構成され主として外因性由来の化合物.

- 寛解患者で低値
- 活動性疾患患者および健常対照で高値

→腸管バリア機能, 吸収機構との関連を示唆する



Cluster 4 フタルイミドと酸化ストレス関連VOC

フタルイミド, 4-シクロペンテン-1,3-ジオン, 2-メチルピリジンを含む.
環境曝露または微生物もしくは宿主の代謝変化の関与していることが示唆され
疾患活動性と正の相関, LLDASと負の相関を示した.

Cluster 5 小さな極性分子

グリセロールと3-ヒドロキシプロピオニトリルで構成
SLEDAI-2Kと正の相関, LLDASと負の相関があるが複数の疾患活動性指標間で一貫した
相関が見られず

→病態生理学的メカニズムにおいて限定的または非特異的な役割に留まる

Discussion

Cluster 1 酢酸メチル

- SLE患者, 特に LLDAS/DORIS非達成で有意に低い
- 疾患活動性指標と逆相関・疲労とも一部逆相関

解釈

酢酸メチルがIL-6およびIL-10の産生を調節し**炎症反応を軽減**する既報^[1]と一致し慢性免疫活性化に伴い内因性調節活性不足を反映する腸内細菌叢異常により酢酸由来代謝産物の生成が低下^[2]

→酢酸メチルが**活動性SLEにおける内因性の炎症制御不全**を反映する

[1] *Int Immunopharmacol.* 2021; **101**(Pt B), 108291

[2] *Emerg Top Life Sci.* 2024 Feb 22;8(1):1-13.

Discussion

Cluster 2 分岐アルケン・分岐アルコール

- SLEの高い疾患活動性・非寛解・疲労増悪と関連

解釈

アルケンは脂質過酸化, 具体的には酸化分解を受ける分岐鎖プレノールー脂質過酸化(酸化ストレス)に由来^[1]→酸化ストレスのマーカーの可能性

SLEでは脂質代謝異常・脂質過酸化が病態に関与^[2,3,4]

分岐アルケンは炎症誘発性遺伝子の発現を促進するDNA低メチル化などのエピジェネティックな変化を誘導^[5]し病原性をもつ可能性

慢性炎症性疾患の疲労は脂質過酸化, 酸化ストレスと関連^[6-9]

→酸化ストレスが免疫異常と疲労の両方に
関与している可能性

[1] J Breath Res. 2020; 14(3), 034001

[2] Int Immunopharmacol. 2021; 101(Pt B), 108291

[3] Arthritis Res Ther. 2020; 22(1):172

[4] Sci Rep. 2024; 14(1), 18879

[5] Front Immunol. 2022; 13, 928379

[6] Curr Neuropharmacol. 2014; 12 (2):168-185

[7] Med Sci Monit. 2010; 16(12):CR628-CR632

[8] Lupus. 2007; 16(3):195-200

[9] Lupus. 2012; 21(9):984-992

Discussion

Cluster 3 窒素含有複素環化合物

外因性化合物； 2-メチルピラジン,
1-メチルピロール, スクシンイミド

- 寛解状態で低下し健常対照および活動性SLEで上昇

解釈

活動性SLEは腸管透過性亢進で外因性化合物が全身へ再流入する可能性あり
SLEでは腸管透過性亢進と疾患重症度との関連を支持する報告がある^[1-4]

→ VOCレベル変化はSLEの腸管バリア機能の間接マーカーとなる可能性

- [1] *J Transl Autoimmun.* 2021; **4**, 100106
- [2] *Ann Rheum Dis.* 2019; **78**(7):947-956.
- [3] *Front Immunol.* 2021; **12**, 799788
- [4] *Front Immunol.* 2022; **13**, 919792

Discussion

Cluster 4 フタルイミドと酸化ストレス関連VOC

フタルイミド, 4-シクロペンテン-1,3-ジオン, 2-メチルピリジン

- 疾患活動性と正の相関, LLDASと負の相関
4-シクロペンテン-1,3-ジオンは炎症/酸化ストレス時に生成される反応性脂質メディエーターであるプロスタグランジンJ2のシクロペンテノン骨格と構造類似性があった^[1,2]

Cluster 5 小型極性分子

グリセロール, 3-ヒドロキシプロピオニトリル

- SLE特異的というよりも, 一般的な代謝ストレスを反映する可能性

[1] Mini Rev Med Chem. 2014; 14(4):322-331

[2] PPAR Res. 2019; 2019, 7242030

Limitation

[疲労との関連]

疲労に関連するVOC変化が疾患活動性に完全には依存しない

SLEにおいて炎症コントロールと患者報告疲労との一致が部分的に留まり^[1-2]
酸化ストレスは臨床活動性とは独立して疲労に寄与する^[3-4]

[内因性/外因性VOCの区別]

環境，食事の影響で解釈が困難となる可能性

他生体検体(血液，尿，便など)を組み合わせ代謝経路を確認する必要あり

[一般化]

単施設研究であり，広範なSLE集団に落とし込むには多施設
コホートでの縦断的評価が必要

[1] Rheumatology (Oxford). 2025; 64(2):639-64

[2] Front Med (Lausanne). 2021; 8, 651249

[3] Sci Rep. 2018; 8(1), 12890

[4] Biol Psychol. 2016; 118:88-93