

20010804

厚生科学研究費補助金
感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業

慢性関節リウマチの治療反応性規定因子の同定と、
それを用いた新治療方針確立に関する総合的研究

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

平成 14 年 3 月

主任研究者 竹 内 勤

目 次

I. 構成員名簿	3
II. 総括研究報告書	7
慢性関節リウマチの治療反応性規定因子の同定と、それを用いた新治療方針確立に関する総合的研究 竹内 勤	
III. 分担研究報告書	23
1. 遺伝子発現プロファイルによる疾患診断システムの開発に関する研究 油谷 浩幸	25
2. 抗リウマチ薬代謝酵素の遺伝子多型を用いた薬剤効果と副作用発現の予測 山中 寿	33
3. 慢性関節リウマチ患者骨髄幹細胞における遺伝子発現の以上に関する研究 小林 茂人	37
4. 内在性レトロウイルス周辺ゲノム転写活性化領域マッピングの臨床応用に関する研究 沢田 哲治	43
5. COX3CL1/COX3CR1 相互作用による慢性関節リウマチ(RA)滑膜組織へのT細胞浸潤に関する研究 南木 敏宏	45
6. 滑膜細胞の TRAIL 誘導性アポトーシスの検討に関する研究 川上 純	49
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	53

I. 構 成 員 名 簿

平成13年度
 厚生科学研究費補助金 感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業
 慢性関節リウマチの治療反応性規定因子の同定と
 それを用いた新治療方針確立に関する総合的研究班

構成員名簿

区 分	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	竹内 勤	埼玉医科大学総合医療センター 第2内科	教 授
分担研究者	油谷浩幸	東京大学先端科学技術研究センター 研究戦略 社会システム大部門	教 授
	山中 寿	東京女子医科大学 リウマチ膠原病痛風センター	助教授
	小林茂人	順天堂大学医学部 膠原病内科	講 師
	沢田哲治	東京大学医学部 アレルギー・リウマチ科	助 手
	南木敏宏	東京医科歯科大学 生体応答調節学	助 手
	川上 純	長崎大学医学部 第一内科	助 手
研究協力者	島 伸行	埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター 病態生理部門	講 師
	伊藤 哲	(株)ジェー・ジー・エス研究開発部	部 長

Ⅱ. 総括研究報告書

(感覚器障害および、免疫・アレルギー等研究事業)

主任研究者 竹内 勤

慢性関節リウマチの治療反応性規定因子の同定と、 それを用いた新治療方針確立に関する総合的研究

竹内 勤（埼玉医科大学総合医療センター第2内科）

研究要旨

慢性関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis:RA)の薬物療法の進歩はめざましく、有望な薬剤が相次いで開発されている。中でも、TNF α を初めとする炎症性サイトカイン阻害療法の優れた臨床効果が明らかにされている。しかし、有効性は約50%の症例にのみ認められ、それを予測する因子は不明のままある。本研究では、遺伝子チップを用いた網羅的遺伝子発現プロファイル解析および、候補遺伝子発現解析によって、TNF α 阻害療法の治療反応性規定因子を同定し、その結果得られるエビデンスに基づき、新たな薬剤の導入を視野に入れた治療指針の確立を目的とする。

分担研究者

油谷浩幸

東京大学先端科学技術研究センター教授

山中 寿

東京女子医科大学

リウマチ膠原病痛風センター助教授

小林茂人

順天堂大学医学部講師

沢田哲治

東京大学医学部助手

南木敏宏

東京医科歯科大学助手

川上 純

長崎大学医学部助手

A. 研究目的

慢性関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis)の薬物療法の進歩はめざましく、有望な薬剤が相次いで開発されている。中でも、TNF α を初めとする炎症性サイトカイン阻害療法は優れた臨床効果が明らかにされ、加えて関節破壊の進行を阻止することが証明されている。しかし、臨床的効果が認められるのは約50%の症例のみであり、半数は効果が十分でない。キメラ型抗TNF α モノクローナル抗体 infliximab の効果発現は10～14週間でほぼピークに達するが、その効果予測は困難とされ、現状の臨床パラメーターは予測因子としないと報告されている。本研究では、これら薬剤の治療反応性規定因子を同定し、その結果得られるエビデンスに基づき、新たに導入されようとしているサイトカイン阻害薬を含めた治療指針の確立を目的とする。

協力研究者

島 伸行

埼玉医科大学ゲノム医学研究センター

病態生理部門講師

伊藤 哲

(株)ジェー・ジーエス研究開発部部长

B. 研究方法

(1) 日本で行われたキメラ型抗TNF α モノクローナル抗体infiximabの早期第2相試験に組み入れられた91例のRAに対し、投与開始後54週の疼痛関節数、腫脹関節数、CRP値などの臨床パラメーターをアンケート方式によって収集。

(2) 識別遺伝子抽出アルゴリズムの開発

識別遺伝子の抽出法に関する検討は、Neighborhood解析あるいはMann-Whitney検定。抽出アルゴリズムの検討に用いたデータセットは肝癌患者から採取した非癌部組織（慢性肝炎6例、肝硬変10例）。識別のために選択されたクローンの有意性の検定にはpermutationテスト。クラスター解析はGenespring（SiliconGenetics社）、主成分分析は既存の統計パッケージにより行った。

(3) 滑膜組織のプロファイリング

GeneChip（Affymetrix）を用いてヒト遺伝子あるいはEST（Expressed Sequence Tag）12,000個の発現プロファイル解析を行った。滑膜組織については切除後2～3週間培養後に得られた滑膜細胞からRNAを抽出し、トータルRNA 5 μ gを用いてBiotin標識cRNAを作成。

(4) 骨髄細胞の遺伝子発現解析

RA患者から関節手術時骨髄液を採取、マグネットビーズ法にてCD34陽性細胞を分離後、RNAを抽出しcDNAアレイ法にて解析。対照は外傷、変形性関節炎、大腿骨頭壊死症患者。定量的PCR法で確認。

(5) 患者末梢血単核球の遺伝子発現解析

プラセボ1例、キメラ型抗TNF α モノクローナル抗体infiximab投与3例の投与前および、投与2週間後の末梢血単核球を分離し、eneChip（Hu6800）を用い、6800遺伝子のプロファイル解析を行った。

(6) 内在性レトロウイルス周辺転写活性化領域の同定

ゲノムDNAをメチル化感受性制限酵素（HpaII）で切断、断片にアダプターを付与。アダプタープライマーとHERVのLTR領域に設定した普遍プライマー（蛍光標識）とを用いたSuppression PCRで、HERV配列を含むHpaIIフラグメントの増幅を施行。得られたHpaIIフラグメントを自動シーケンサーで展開、Gene Scanで解析し、HERV周辺遺伝子のメチル化パターンを検討。

(7) ケモカインリセプターの機能・発現解析

患者末梢血CD4⁺、CD8T細胞上のCX3CR1の発現頻度、末梢血CX3CR1陽性T細胞のサイトカイン産生能、細胞障害性分子（granzyme A, perforin）発現はフローサイトメーターで解析。RA滑膜組織のT細胞におけるCX3CR1の発現、RA滑膜組織でのCX3CL1の発現は免疫組織染色で解析。RA滑膜線維芽細胞様滑膜細胞のCX3CL1発現はELISAにて解析。細胞遊走能は、ECV304をコートしたtranswellを用いてmigration assayを施行。

(8) アポトーシス関連分子の解析

培養RA滑膜細胞（滑膜線維芽細胞）は手術時の滑膜組織から分離。RA関節液および滑膜細胞培養上清中のOPGおよびIL-1 β 蛋白濃度はELISA法で測定。培養滑膜細胞の膜型TRAILレセプター、DR4、DR5、decoy receptor 1（DcR1）およびDcR2は免疫プロットで評価。増殖能は³H-thymidineの取り込み、TRAIL誘導性アポトーシスはsoluble TRAIL（sTRAIL）添加により誘導、⁵¹Cr release assayとHoechst 33258 dye stainingを用いて評価。

(9) 副作用関連遺伝子の解析

メトトレキサート製剤（MTX）、およびスルファサラジン製剤（SASP）服用歴のあるRAを対象とし、ゲノムDNAを患者の同意を得て抽出。MTX服用例では葉酸

代謝の主要酵素 Methylene tetra hydrofolate reductase (MTHFR) の遺伝子型、SASP 服用例では代謝酵素の一である N-acetyltransferase-2 (NAT2) の遺伝子型を PCR-RFLP 法で決定。EM アルゴリズムに基づく maximum likelihood estimation を応用して独自に開発した解析プログラムでハプロタイプ、ディプロタイプ形を決定。

C. 研究結果

抗 TNF α モノクローナル抗治療の遠隔効果

キメラ型抗 TNF α モノクローナル抗体 infliximab の欧米での使用法は、3 回パルス投与 (0, 2, 6 週) の後、1~2 ヶ月毎に継続治療するというものである。この問題点として、継続投与に伴う副作用、高価な薬剤費が指摘されていた。日本で実施された早期第 2 相試験は 3 回のみパルス投与で継続投与が行われなかった。そこで 3 回パルス投与 5 4 週後のアンケート調査を実施した。投与 9 1 症例の約 80% にあたる症例からアンケートを回収し、臨床効果が投与前に比べ 50% 以上に改善した症例が 1mg/kg 群 (n=30) で 52.1%、3mg/kg 群 (n=31) が 54.5%、10mg/kg 群 (n=30) が 52.9% と良好な長期有効性を確認した。今後、前向き研究によってこの結果の妥当性を検証する必要がある。3 回パルス投与が継続投与と同等であることが明らかとなれば、一人あたりのコストは 1/3 に減少し、現状の 3 倍の RA 患者に生物学的製剤を使う機会を与えることになる。

抗 TNF α モノクローナル抗体投与前後での遺伝子発現プロファイル解析

自験の臨床試験で抗 TNF α モノクローナル抗体 infliximab の臨床的有效率が約 50% であることから、これを規定する因

子について遺伝子チップを用いて網羅的に解析することを試みた。

① 遺伝子チップによる発現プロファイル解析アルゴリズムの開発

発現プロファイル解析データから臨床的パラメータと相関が高い遺伝子群を抽出するアルゴリズム開発が必要となる。そこで、肝癌患者から採取した非癌部肝組織 (慢性肝炎 6 例、肝硬変 10 例) をサンプルとして、発現プロファイル解析を行った。アルゴリズム開発を目的とする。GeneChip (Affymetrix) を用いて EST (Expressed Sequence Tag) 12,000 個の発現プロファイル解析を行った。その結果、すういれう意な遺伝子群の存在が示された (図 2) ことがわかった肝細胞癌と非癌部組織については階層的なクラスタ解析により分別され、主成分分析においても各群を分類することは可能であった。非癌部肝組織データの検討において Neighborhood 解析を用いたところ、感染した肝炎ウイルス型により有意にプロファイルデータが異なり、識別遺伝子が抽出できることが明かとなった。HBV あるいは HCV 感染群の間での識別は、Neighborhood 解析により非癌部同士では permutation テストにより有意な遺伝子群の存在が示された。このような解析アルゴリズムを本研究の発現プロファイル解析に応用する。

② 患者サンプルを対象とした遺伝子チップによる発現プロファイル解析

慢性関節リウマチ患者の骨髓、滑膜、末梢血単核球における遺伝子発現プロファイルを、遺伝子チップあるいは、膜アレイを用いて解析した。骨髓サンプルを用いた発現プロファイル解析によって目的とする変動分子の同定が可能か否か検討した。コラーゲン関節炎モデルマウスの骨髓樹状細胞を用いて解析した結果、MIP2, SP2 が有意に変動する事を証明し、患者骨

髄サンプルへの応用に向けた基礎的検討が終了した。RA患者2名、変形性関節症患者1名について滑膜組織由来細胞の発現プロファイル解析を行ったところ、RA群とOAの間で発現が異なる遺伝子群が抽出された。滑膜サンプルの採取時期、既存治療薬の影響などが今後解決すべき問題とされた。抗TNF α モノクローナル抗体infiximab投与前後で、患者末梢血単核球において変動する遺伝子発現について遺伝子チップで解析し、プラセボ群、実薬投与無効群、実薬投与有効群と関連する遺伝子群が抽出された。

③ 解析アルゴリズムの開発

肝癌非癌部組織を対象とした遺伝子チップ解析アルゴリズムの開発では、各群毎の症例数が少なく、データの分布に正規性はないため、Neighborhood解析あるいは順位検定(Mann-Whitney検定)を用いて抽出を行った。肝細胞癌と非癌部組織については階層的なクラスタ解析や主成分分析で各群を分類することが出来た。非癌部肝組織データをNeighborhood解析したところ、感染した肝炎ウイルス型により発現プロファイルの差が明らかとなり、識別遺伝子の抽出に成功した。ウイルス種の識別は、Neighborhood解析、非癌部同士ではpermutationテストにより有意な遺伝子群の存在が示された。

炎症性サイトカイン阻害により変動する候補遺伝子の解析

TNF α によって遺伝子発現が調節され、これまでの研究結果からTNF阻害療法の有効性予測因子として可能性の高い遺伝子群について、TNF α 阻害剤投与前後での動態を調べ、臨床的効果、関節破壊抑制効果と関連するものを明らかにした。

① 候補領域の探索に関する基礎的検討

炎症性サイトカインがRAの病態に深く関わっていることが明らかにされている

が、その作用機序、阻害療法の作用点に関しては、不明な部分が多い。網羅的解析とは別個に、遺伝子発現亢進領域をゲノムワイドに探索し、そのなかから、サイトカイン阻害に関連して変動する新たな領域を見出すことは重要な課題である。そこで、CpG島におけるシトシン残基の脱メチル化が遺伝子の転写活性と関連することに着目した。特に自己免疫疾患の病因との関連で注目され、自身のプロモーター活性による周辺遺伝子の活性化を惹起する内在性レトロウイルスに焦点をあて、その周辺の脱メチル化領域の解析を行った。HERV周辺のゲノムDNAメチル化プロファイルをSuppression PCR法で解析し、ゲノムDNAのメチル化(Epigenetic factor)の相違を簡便にスクリーニングできるシステムを構築した。

② RAの病態とケモカイン/サイトカイン遺伝子群

TNF α 阻害療法の作用点の一つは、血管内T細胞の関節局所への浸潤にあるとされている。そこで、南木らは、ケモカインリセプターに着目し、RA患者の末梢血で増加しているCX3CR1陽性CD4、CD8 T細胞がRA滑膜組織に浸潤し、IFN- γ 、TNF- α 、細胞障害性分子(granzyme A, perforin)を産生していることを示した。そこで発現が高まるIFN- γ 、TNF- α はRA滑膜組織の血管内皮細胞を刺激し、血管内皮上にCX3CL1の産生を誘導し、それがCX3CR1陽性T細胞の関節への遊走に関与していると考えられた。CX3CL1-CX3CR1相互作用は、RA滑膜へのTh1型T細胞の遊走・集簇に深く関わっているものと思われる。今後、CX3CR1陽性T細胞の動態、およびリガンドの発現レベルと、TNF α 阻害療法の有効性との関連を追求する必要がある。

RAの病態とアポトーシス関連分子

RA 関節液中には全RA症例でOPGが検出され、この濃度はRA 関節液中のIL-1 β 濃度と正の相関を示した。OPGは滑膜細胞培養上清中にも検出され、その蛋白濃度はIL-1 β 添加により顕著に増強した。そこで、OPGの滑膜細胞TRAIL誘導性アポトーシスへの効果を検討した。sTRAIL添加によりそのリガンドDR5を発現する滑膜細胞にはアポトーシスが誘導され、このTRAIL誘導性アポトーシスはOPGの同時添加でほぼ抑制された。滑膜細胞の成長因子とされるIL-1 β が滑膜細胞のosteoprotegerin(OPG)産生を強力に誘導し、それがTRAILのデコイレセプターとして作用しTRAILを介した滑膜細胞のアポトーシスに抑制的に作用した可能性が示された。IL-1 β 産生は、TNFの下流に存在すると考えられることから、今後、TNF阻害に伴いアポトーシス関連分子がどのように変動し、また、有効性とどう関連するか明らかにする必要がある。

副作用予測因子の同定と解析

遺伝子に関する情報が急速に増大し、DNA多型情報を薬物治療の反応予測に用いることが可能になってきた。山中らは、薬物代謝に関連する遺伝子の多型を解析することによる抗リウマチ薬の治療反応性や副作用発現の予測を検討した。その結果、MTX服用例では葉酸代謝の主要な酵素である5,10-Methylenetetra-hydrofolate reductase (MTHFR)の遺伝子型ハプロタイプを解析し、677C-1298Cハプロタイプは他に比してMTX用量が有意に少量であり、677T-1298Aハプロタイプは副作用発現が有意に高率であった。一方、SASP服用例では代謝酵素の一つであるN-acetyltransferase-2 (NAT2)のハプロタイプと副作用の有無を検討し、副作用出現群ではM2ハプロタイプが有意に多かった。ディプロタイプ形との関連では、副作用

出現率は、野生型のrapid acetylatorでは8.1%であったのに対して、slow acetylatorでは62.5%と有意に高頻度であった。MTXおよびSASPの代謝(関連)酵素の遺伝的多型が臨床的に見た有効性や副作用の頻度と関連することが示され、不完全な情報であるsingle locusの検討よりも完全情報であるハプロタイプ型、ディプロタイプ型の検討が、より良く臨床像を反映した。今後の遺伝子多型の検討にはこのような遺伝統計学的な解析手法が不可欠になると考えられる。

D.E 考察と結論

RAの治療に画期的効果をもたらしたキメラ型抗TNF α モノクローナル抗体infliximabは、他の抗リウマチ薬に比べ、より臨床的效果がシャープで、標的が明確である。海外での成績および本邦での検討から、その有効性はほぼ50%であることが判明している。一方、現状の投与方法では、継続投与が必要とされ、それによる高コスト、長期安全性の点からも問題点が指摘されている。本研究によって、継続投与なしの3回パルス投与でも、54週後に継続投与とほぼ同等の50%前後の有効性が明らかにされた。一方、直接効果も遠隔効果も有効性は約半数であることから、投与後早い段階で治療反応例を予測することは極めて重要な課題である。しかしながら、世界的にもTNF阻害療法の有効性予測因子を報告した例はない。このことは、罹病期間、臨床症状、炎症マーカー、リウマトイド因子、関節破壊度などの一般的な臨床パラメーターでは、予測困難である可能性を強く示唆する。そこで、遺伝子チップを用いて網羅的に遺伝子発現を解析し、TNFと関連しRAの病態に深く関わる可能性のある分子を加えた遺伝子群の中から、本治療法の反応

性を規定している因子の同定に向けた基盤づくりを進めた。

GeneChip 解析データにより肝炎ウイルス感染に対する応答遺伝子の違いが発現プロファイルに反映され、識別遺伝子を抽出できることが確認できた。今後、臨床統計的な取り扱いが出来るように症例数を重ねていくことが重要である。今後、アレイ解析を臨床診断に活用するためには、現在のコストは余りにも高価であり、大量安価なチップが望まれる。一方で迅速、高感度であることも要求される。この問題点を克服するためには、カスタム遺伝子チップの作製が不可欠である。チップに配する遺伝子数は500～600が適切と考えられ、肝炎のインターフェロン療法の効果予測に有用なチップ開発を行った経験を生かし、カスタムチップの開発を行う。本研究で明かとなった抗体投与前後で有効性と関連して変動した遺伝子群を中心に、1) TNF, TNFRおよびそのシグナル伝達分子群、2) IL-1, IL-6などのサイトカイン、そのリセプター遺伝子群、CX3CRなどのケモカインリセプター遺伝子群、3) プロテアーゼ群、4) CD3抗原など免疫関連遺伝子群、5) TRAILなどのアポトーシス関連遺伝子群、6) 金属遺伝子群、7) 副作用関連遺伝子群などを配する必要がある。

採取したプロファイルデータについては、症例それぞれからの生物学的ばらつきと実験そのものからのばらつきを双方を含むことを考慮することが必要である。特に検体が炎症組織の場合には検体の均一性が問題となる。滑膜組織は、RAの病態を直接反映し、病態解析には最も適したサンプルであるが、検体採取の時期、容易さ、部位などさまざまな問題点がある。同様のことは、骨髄サンプルについても考えられ、病態・病因解析には適している

が、治療反応性予測という観点からは、技術的な困難さを伴う。この点、末梢血サンプルは、非侵襲的に収集でき、検体の扱いが容易である。反面、病態との関連が必ずしも明確でないという弱点がある。しかし、薬剤投与前後の比較によって発現プロファイル解析を行うためには、容易に、しかもくり返し採取できる必要があり、その点で末梢血が最も適切なサンプルと考えられる。

RAは臨床的に多様性に富む疾患であるので、患者群の層別化が統計処理に際しては重要で、種々の臨床的パラメータとの相関からグループ化していく必要がある。そのためにも詳細な臨床的観察とそのデータベース化が欠かせない。

一方、mRNA発現のみならず、ゲノムに着目した検討も必要である。SNPsの解析によって、薬剤投与前に有効性が予測できれば理想的である。しかし、SNPなど大規模ゲノム研究による網羅的スクリーニングのみでは、RAの薬剤感受性に関与する遺伝子を直接同定することには多くの困難を伴い効率の良い方法とはいえない。スクリーニングで得られる候補遺伝子がある程度絞り込む必要があるが、その点RAゲノム特異的脱メチル化領域に着目し、抗TNF抗体をはじめとする治療によって変化するフラグメントの塩基配列を決定すれば効率の良い検索システムとなるものと思われる。

従来の抗リウマチ薬無効例および副作用中止例は、良いキメラ型抗TNF α モノクローナル抗体infliximabの適応症例となる。それを予測する試みが行われ、MTXとその主要な酵素であるMTHFRの遺伝子型、SASPとNAT2遺伝子型との関連が明らかになった。他の薬剤での検討、より簡便なスクリーニング法を開発すれば、RA薬物療法の指針作りに重要なエビデンス

スとなる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Pang M, Setoyama Y, Tsuzaka K, Yoshimoto K, Amano K, Abe T, and Takeuchi T. Defective expression and tyrosine phosphorylation of the T cell receptor zeta chain in peripheral blood T cells from systemic lupus erythematosus patients. Clin Exp Immunol in press.
- 2) Tsuzaka T, Onoda N, Yoshimoto K, Zhang L, Pang M, Abe T, and Takeuchi T. Alternatively spliced 3' untranslated region of TCR ζ mRNA in the peripheral blood T cells of systemic lupus erythematosus patients. Modern Rheum in press.
- 3) Abe T and Takeuchi T. Rheumatoid Arthritis and tumor necrosis factor α . Autoimmunity 34:291-303,2002.
- 4) Kameda H, Rinsinger JI, Han B-B, Baek SJ, Barrett JC, Abe T, Takeuchi T, Glasgow WC, and Elling TE. Expression of Gab1 lacking the Pleckstrin Homology domain is associated with neoplastic progression. Mol Cell Biol 21:6895-6905, 2001.
- 5) Amano K, and Takeuchi T. Amebiasis in acquired immunodeficiency syndrome. Int Med 40: 563-4,2001.
- 6) Ahmed S, Ihara K, Kanemitsu S, Nakashima H, Otsuka T, Tsuzaka K, Takeuchi T, and Hara T. Association of CTLA-4 but no CD28 gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in the Japanese population. Rheumatology 40: 662-7,2001.
- 7) Kawashima M, Yamamura M, Tani M, Yamauchi, H, Tanimoto T, Kurimoto M,

Miyawaki S, Amano T, Takeuchi T, and Makino H. Extremely increased levels of IL-18 and IL-18 binding protein in blood circulation of patients with adult still's disease. Arthritis & Rheum44: 550-60,2001.

8) Ishihara O, Saitoh M, Hayashi N, Kinoshita K, and Takeuchi T. Failure of embryo implantation successfully treated with prednisolone in patients with Sjogren's syndrome. Fertility & Sterility75: 640-1,2001.

9) Tsubota K, Fujita H, Tsuzaka K, and Takeuchi T. Lacrimal gland function, lymphocyte infiltration and apoptosis of aciner cells in Mikulicz's disease and Sjogren's syndrome. Invest Ophthal Vis Sci42: 101-110,2001.

10) Abe T, and Takeuchi T. The other side of TNF-targeted therapy of patients with rheumatoid arthritis. Curr Rheum Report 3: 1-2,2001.

2. 学会発表

- 1) Tsuzaka K, Onoda N, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, Takeuchi T. Alternatively spliced 3' untranslated region of TCR ζ messenger RNA could lead to the downregulation of TCR ζ monomer and homodimer in the peripheral blood T cells of systemic lupus erythematosus patients. American College of Rheumatology, 65th Annual Meeting, San Francisco, U.S.A., November, 2001
- 2) Shiraishi K, Tsuzaka K, Tsubota K, Abe T, Takeuchi T. Increased expression of caspases, PARP, and DFF45 in the lacrimal gland of patients with Sjogren's syndrome. American College of Rheumatology, 65th Annual Meeting, San Francisco, U.S.A., November, 2001
- 3) Suzuki K, Tsuzaka K, Onoda N, Abe T, Takeuchi T. Molecular mechanism of BAFF expression in peripheral blood lymphocytes in systemic lupus erythematosus patients. American College of Rheumatology, 65th Annual

Meeting, San Francisco, U.S.A., November, 2001

6) Tsuzaka K, Onoda N, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, Takeuchi T. Molecular mechanism of the decreased expression of TCR ζ in systemic lupus erythematosus patients. 第45回日本リウマチ学会総会, 2001年5月 (国際シンポジウム)

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

表1. 新たな治療方針確立が必要となった背景

- メトトレキサートの承認
- 新たな抗リウマチ薬の導入
(leflunomide, FK506, etc)
- 生物製剤の導入
(infliximab, etanercept, anakinra, anti-IL-6R)
- 薬剤の選択順位
- evidenceに基づく予後改善を指向した治療法

表2. RA承認生物学的製剤の適応

infliximab	etanercept	anakinra
適応: - moderately to severely active	- moderately to severely active	- moderately to severely active
効果: - reducing signs and symptoms - inhibiting progression of structural damage	- reducing signs and symptoms - inhibiting progression of structural damage	- reducing signs and symptoms
用法: - IV (0, 2, 6w, and every 2m), 3mg/kg	- SQ (twice a week) 25mg	- SQ (everyday) 100mg
併用: with MTX	with or without MTX	not with TNF blocker
注意: risk of infections (Tbs, fungus, others)	risk of infections (sepsis, etc)	risk of infections

図1. 研究組織 (1. カスタムチップ作製)

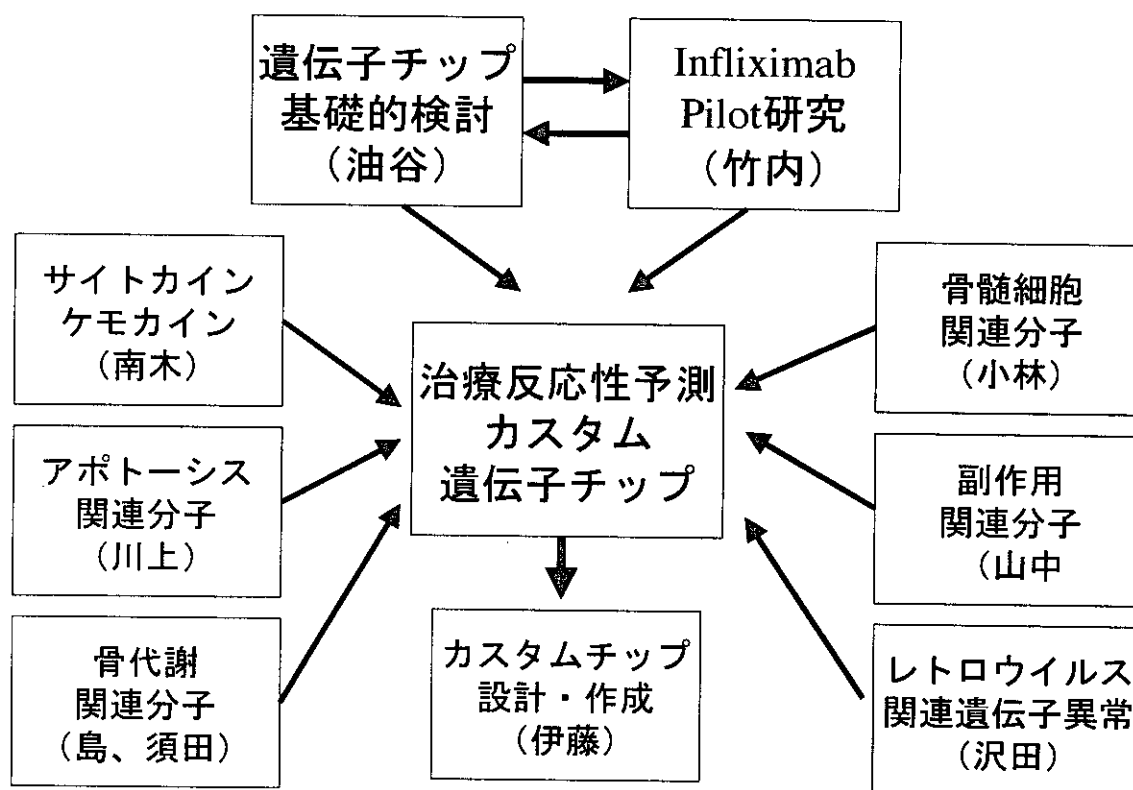


図2. 研究組織 (2. カスタムチップを用いた解析)

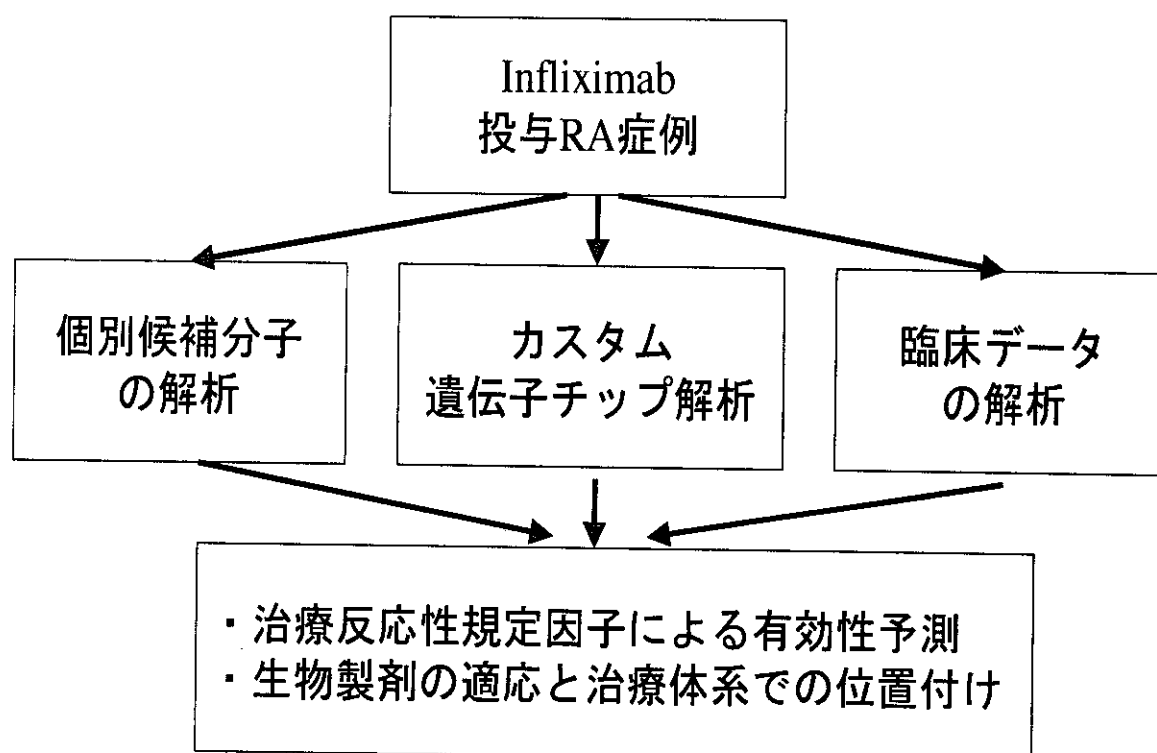
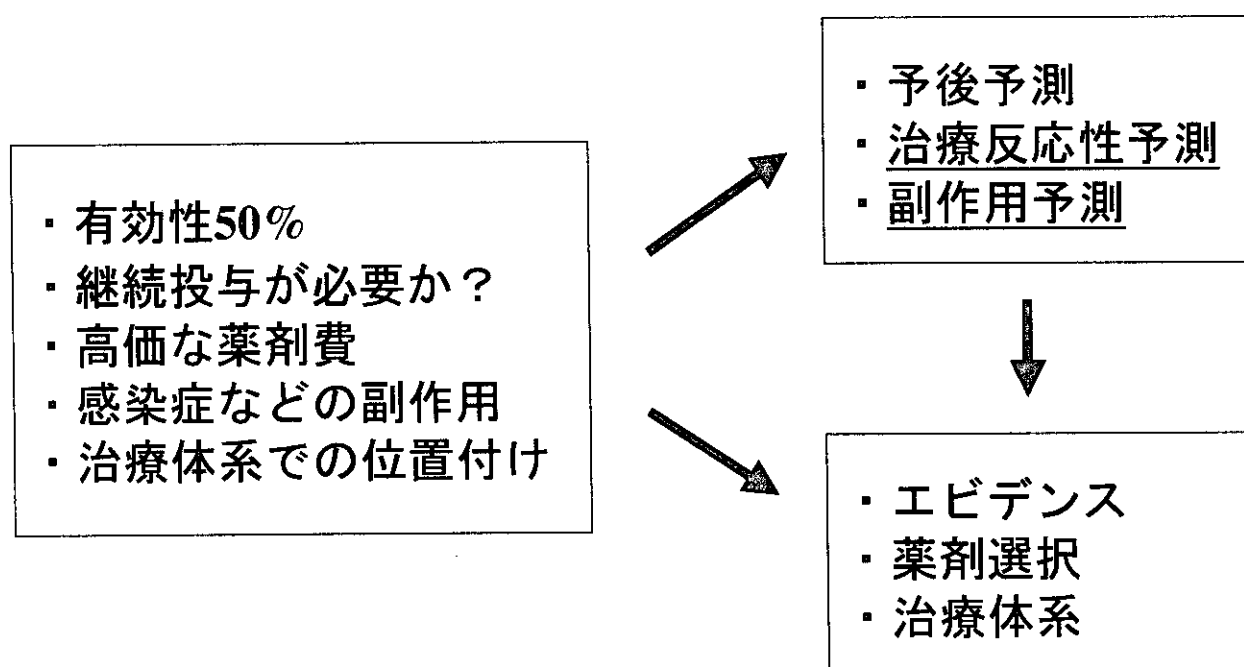


表3. 日本で行われたinfliximab早期第2相試験の結果：直接効果と遠隔効果
(アンケート調査による解析)

評価時期	1mg/kg群 (n=30)	3mg/kg群 (n=31)	5mg/kg群 (n=30)
		直接効果	
10週後	33.3%	40.7%	55.2%
		遠隔効果	
54週後 アンケート対象	52.1% (n=23)	54.5% (n=22)	52.9% (n=17)

図3. 生物製剤導入を巡っての問題点



Ⅲ. 分 担 研 究 報 告 書

(感覚器障害および、免疫・アレルギー等研究事業)

遺伝子発現プロファイルによる疾患診断システムの開発に関する研究

分担研究者 油谷浩幸 東京大学先端科学技術研究センター教授

研究要旨

慢性関節リウマチにおける罹患組織あるいは薬剤投与時における遺伝子発現プロファイルの変動を解析することにより病態の解明や薬剤の作用機序の解明へとつながることが期待される。本研究では、発現プロファイル解析データから臨床的パラメータと相関が高い遺伝子群を抽出するアルゴリズム開発を行った。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ（RA）は、全身に及ぶ関節炎のため、罹患関節の破壊、変形を来す。抗リウマチ薬として従来の薬物治療に加えて、近年TNFなどの炎症性サイトカインを標的とする生物学的製剤が効果的であることが注目されている。治療法の選択や投与方法について科学的な根拠に基づいて確立することが重要である。DNAチップはESTクローン数の飛躍的な増加と共に包括的な発現プロファイリング解析を可能とした。罹患組織における遺伝子発現プロファイルの変異あるいは薬剤投与による変動を解析することにより病態の解明や薬剤の作用機序の解明へとつながることが期待される。本研究では、発現プロファイル解析データから臨床的パラメータと相関が高い遺伝子群を抽出するアルゴリズム開発を目的とする。

B. 研究方法

滑膜組織のプロファイリング

GeneChip（Affymetrix）を用いてヒト遺伝子あるいはEST（Expressed Sequence Tag）12,000個の発現プロファイル解析を

行った。滑膜組織については切除後2～3週間培養後に得られた滑膜細胞からRNAを抽出し、トータルRNA 5 μ gを用いてBiotin標識cRNAを作成した。組織材料は九州大学吉村昭彦教授からの提供を受けて行った。

識別遺伝子抽出アルゴリズムの開発

識別遺伝子の抽出法に関する検討は、Neighborhood解析（Golub T, 1999）あるいはMann-Whitney検定により行った。抽出アルゴリズムの検討に用いたデータセットは肝癌患者から採取した非癌部肝組織（慢性肝炎6例、肝硬変10例）を用いて採取したプロファイルデータを用いた。C型肝炎ウイルス感染及びB型肝炎ウイルス感染例はそれぞれ8例ずつである。‘neighborhood’解析による予測のためのp値は次の式を用いて算出した。

$$P=(\mu_1 - \mu_2)/(\sigma_1 - \sigma_2)$$

（ μ ：平均値、 σ ：標準偏差）

識別のために選択されたクローンの有意性の検定には permutation テストを行った（図1）。クラスタ解析は Genespring（SiliconGenetics社）、主成分分析は既存の統計パッケージにより行った。

C. 研究結果

識別遺伝子抽出アルゴリズムの開発

発現量の低い遺伝子についてはデータの信頼度が低いいため、average difference 値がいずれの症例でも 100 以下の場合には、解析対象から除外した。なお、カットオフの閾値については解析により変動させた。

2 群間の識別が最大限至適化されるようアルゴリズムの作成に着手した。各群毎の症例数が少なく、データの分布に正規性はないため、Neighborhood解析あるいは順位検定 (Mann-Whitney 検定) を用いて群間の識別を行う遺伝子の抽出を行った。肝細胞癌と非癌部組織については階層的なクラスタ解析により分別され、主成分分析においても各群を分類することは可能であった。非癌部肝組織データの検討において Neighborhood 解析を用いたところ、感染した肝炎ウイルス型により有意にプロファイルデータが異なり、識別遺伝子が抽出できることがわかった。HBV あるいは HCV 感染群の間での識別は、Neighborhood解析により非癌部同士では permutation テストにより有意な遺伝子群の存在が示された (図 2)。両者での差が大きい遺伝子群、すなわち p 値が大きい遺伝子群にはインターフェロン応答に関与する遺伝子が多く含まれていた。(緑川、未発表データ)。

滑膜組織の発現プロファイリング

関節リウマチ (RA) 患者 2 名、変形性関節症 (OA) 患者 1 名について滑膜組織由来の細胞について発現プロファイルを解析した。RA 群と OA の間で発現が異なる遺伝子群を抽出した (表 1, 2)。

D. 考察

GeneChip 解析データにより肝炎ウイルス感染に対する応答遺伝子の違いが発現プロファイルな反映され、識別遺伝子を

抽出できることが確認できた。今後、臨床統計的な取り扱いが出来るように症例数を重ねていくことが重要であると考えられた。今後、アレイ解析を臨床診断に活用するためには、現在のコストは余りにも高価格であるため、大量安価なチップが望まれる。一方では迅速、高感度であることも要求される。

採取したプロファイルデータについては、症例それぞれからの生物学的ばらつきと実験そのものからのばらつきの双方を含むことを考慮することが必要である。特に検体が炎症組織の場合には検体の均一性が問題である。出来るだけプライマリーなデータを採取するためには初期の炎症組織が得られることが理想的であるが、現実的には不可能であろう。

関節リウマチはheterogeneityを有する疾患であるので、患者群の層別化が統計処理に際しては重要であり、種々の臨床的パラメータとの相関からグループ化していく必要があるだろう。GeneChip 解析で変動する遺伝子を絞り込んだ後に、多数検体を用いて詳細に解析することが必要となるだろう。

E.. 結論

二群間で発現プロファイルの違いを示す遺伝子群を抽出する手法を確立できた。リウマチをはじめとする疾患の病態解析にも応用されることが期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hippo Y, Taniguchi H, Tsutsumi S, Machida N, Chong JM, Fukayama M, Kodama T, Aburatani H. Gene expression profiling of gas-

tric cancer. *Cancer Research* 62(1): 233-240, 2002

Mukasa A, Ueki K, Matsumoto S, Tsutsumi S, Nishikawa R, Fujimaki T, Asai A, Kirino T, Aburatani H.: Distinction in gene expression profiles of oligodendrogliomas with and without allelic loss of 1p. *Oncogene*, in press 2002

Takahashi M, Tsuboyama-Kasaoka N, Nakatani T, Ishii M, Tsutsumi S, Aburatani H, Ezaki O. Fish oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPAR α activation and ROS production. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 282(2):G338-48. 2002

Takabe W, Kodama T, Hamakubo T, Tanaka K, Suzuki T, Aburatani H, Matsukawa N, Noguchi N. Anti-atherogenic antioxidants regulate the expression and function of proteasome γ -type subunits in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 276(44):40497-501, 2001

Saiura A, Mataka C, Murakami T, Umetani M, Wada Y, Kohro T, Aburatani H, Harihara Y, Hamakubo T, Yamaguchi T, Hasegawa G, Naito M, Makuuchi M, Kodama T. A comparison of gene expression in murine cardiac allografts and isografts by means dna microarray analysis I. *Transplantation*. 72(2):320-9. 2001

Akiyoshi S, Ishii M, Nemoto N, Kawabata M, Aburatani H, Miyazono K. Targets of Transcriptional Regulation by Transforming Growth Factor- β : Expression Profile Analysis Using Oligonucleotide Arrays. *Jpn J Cancer Res.* 92(3): 257-268. 2001

Hippo Y, Yashiro M, Ishii M, Taniguchi H, Tsutsumi S, Hirakawa K, Kodama T, Aburatani H. Differential gene expression profiles of scirrhous gastric cancer cells with highly metastatic potential to peritoneum or lymph nodes. *Cancer Research* 61: 889-895, 2001

2. 学会発表

情報計算法学生物学会 2001 年大会 (7/25-27, 駒場) 遺伝子発現量情報に基づくクラスタの比較とその可視化手法に関する研究

加納, 堤, 西村, 油谷, 広田, 廣瀬

Joint Cold Spring Harbor laboratory/ Welcome Trust Conference 'GENOME INFORMATICS' (8/8-12, Hinxton, UK) Selecting relevant genes from microarray data with multiple classes.

葛, 堤, 油谷, 岩田

第 6 回 VR 学会 (9/19-21)

没入型多面ディスプレイを利用した時系列遺伝子発現量解析と可視化に関する研究

西村, 加納, 堤, 油谷, 広田, 廣瀬
比較マップによる遺伝子クラスタ群の可視化

加納, 堤, 西村, 油谷, 広田, 廣瀬
2nd Cold Spring Harbor Meeting on Computational Biology (9/28-30, CSH)

Visualization for comparison between gene clustered generated from different sources

加納, 堤, 緑川, 廣瀬, 油谷

第 13 回日本脳循環代謝学会総会 (10/18-19, 新横浜)

Sequential gene expression analysis in delayed neuronal death and induced ischemic tolerance following global cerebral ischemia in rats

川原, 王, 武笠, 古屋, 前田, 豊田, 浜窪, 油谷, 児玉, 桐野

第 24 回日本分子生物学会 (12/7-11, 横浜)
ワークショップ「ポストシーケンス時代の染色体分子生物学におけるデータマイニング」

ゲノム情報とトランスクリプトーム情報の統合 油谷

3. 邦文

(雑誌)

油谷浩幸 ゲノム機能解析の技術的進歩
最新医学 56:2053-2063, 2001

油谷浩幸 オーダーメイド医療 Molecular
Medicine 38(10):, 2001

油谷浩幸 マイクロアレイの癌治療への
応用 実験医学 19(19):2518-2524, 2001

油谷浩幸 創薬におけるDNAチップの利用
現代化学 (11):24-29, 2001

油谷浩幸 ヒト疾病の機能ゲノム解析
Therapeutic Research 22(12): 2647-2656, 2001

(著書)

油谷浩幸 DNAチップの解析原理と医療
への応用 In ゲノム医科学がわかる (わ
かる実験医学シリーズ) 菅野純夫編 羊
土社 pp.56-65、2001

H. 特許

なし