

20020818

厚生労働科学研究費補助金
免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

**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 14 年度 総括・分担研究報告書

平成 15 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
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	17
1. 遺伝子発現プロファイルによる疾患診断システムに関する研究	
油谷浩幸	19
2. 抗リウマチ薬代謝酵素の遺伝子多型を用いたテーラーメイド医療への展開	
山中 寿	25
3. 関節リウマチ患者骨髄幹細胞における遺伝子発現の異常に関する研究	
小林 茂人	27
4. 新規 IkappaB キナーゼ阻害薬の滑膜細胞機能におよぼす影響およびコラーゲン関節炎に対する治療効果に関する研究	
沢田 哲治	30
5. 抗 fractalkine 抗体による関節炎抑制効果の検討	
南木 敏宏	33
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	37
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	41
V. 合同班会議プログラム	49

平成14年度
厚生労働科学研究費補助金
免疫アレルギー疾患予防・治療等研究事業
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

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	東京大学国際・産学共同研究センター	教 授
	山中 寿	東京女子医科大学附属 膠原病リウマチ痛風センター	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	東京大学医学部附属病院 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	長崎大学医学部内科学 第一講座	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

(免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)

主任研究者 竹内 勤

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

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）

研究要旨

関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis:RA)の薬物療法の進歩はめざましく、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、数種類にのぼる製剤の選択、高価な薬剤費、約50%の有効率、結核の再活性化などの問題点が指摘されており、個々の症例に則したオーダーメイド医療の構築が求められている。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の同定を試みた。キメラ型抗 TNF α 抗体が投与された RA 症例での検討などから有効性と関連して変動する遺伝子群を同定した。これらの遺伝子を含む720のcDNAをスポットしたカスタムチップを作成し、その性能、再現性を確認した。

分担研究者

油谷浩幸

東京大学国際・産学共同研究センター教授

山中 寿

東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター
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・リウマチ内科助手

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

ため多関節に及ぶ人工関節置換術を余儀無くされる患者が後を絶たない。RAの治療目標は、薬物療法によってかかる状況を回避することにある。そのような薬剤として、疾患修飾性抗リウマチ薬(DMARD)が使用され、寛解率の向上など一定の効果が得られている。しかし、9剤あるDMARDの有効性、副作用発現の予測は困難で、薬剤選択にあつての指針は示されていない。一方、既存のDMARDによっても活動性のコントロールが困難な症例に対して、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に期待が寄せられている。その優れた臨床的効果、骨破壊抑制効果が明らかにされている。しかし、数種類にのぼる製剤の選択、高価な薬剤費、約50%の有効率、結核の再活性化などの問題点が指摘されており、個々の症例に則したオーダーメイド医療の構築、薬剤費軽減からなる総合的な戦略が必要である。

A.研究目的

関節リウマチ(RA)は、全身に及ぶ多関節炎のため罹患関節の破壊・変形を来し、Quality of Life(QOL)は著しく低下する。この

本研究班では、DMARD および生物学的薬剤の適応、薬剤選択、投与方法に関する研究を通して、科学的根拠に基づいた RA の薬物療法確立を目的とする。

B.研究方法

網羅的遺伝子発現解析

- 1) 識別遺伝子抽出アルゴリズム：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 検定により実施。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。
- 2) マイクロアレイ：Affimetrix などの市販アレイに加え、本研究班独自のカスタムアレイ (720 遺伝子の cDNA をスポットしたガラスアレイ) を用いる。
- 3) データベースの構築：発現プロファイル解析データを遺伝子アノテーション情報などと共にリレーションデータベースに格納。研究班で得られた解析データは、パスワードによるアクセス制限を設けて Genet サーバーに格納。
- 4) パイロット解析：同意がえられた 4 例の RA に対して、キメラ型抗 TNF α モノクローナル抗体 infliximab 投与前および、投与 2 週間後の末梢血単核球を採取。Affimetrix Hu6800 チップを用いて遺伝子発現プロファイルを解析。

候補遺伝子発現解析

- 1) アポトーシス関連：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。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、 ^{51}Cr release assay と Hoechst 33258 dye staining を用いて評価。TRAIL 誘導性アポトーシスにおける PDGF およびキナーゼカスケードに関与する分子の役割は、各種インヒビターを用いて解析。

- 2) 炎症シグナル関連：患者滑膜細胞、関節炎モデル動物を用い、NF-kB シグナル伝達に関与する分子を、コンピューター支援薬剤デザインによって作製されたインヒビターを用いて解析。
- 3) ケモカイン関連：患者末梢血 CD4, CD8 T 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。関節炎モデル動物を用い CXC3CL1/CX3CR1 の役割を抗体による抑制実験によって解析。
- 4) DMARD 代謝酵素関連：MTX の主要代謝酵素 MTHFR および、スルファサラジン代謝酵素 NAT2 を指標として、治療反応性、副作用と関連する遺伝子型を 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

網羅的遺伝子発現解析

- 1) 患者サンプルを用いた解析：OA および RA 患者滑膜組織サンプルを RA に特徴的に発現される遺伝子群を抽出することができた。CD34+ 骨髄幹細胞は RA の病態に深く関与することが想定されている。そこで、マグネティックビーズを用いて、CD34+細胞を分離、RA患者20例、OA患者35例のRNAをプールし、クオンテックcDNAアレイを用いて、約3600個の遺伝子発現プロファイルを検索した。結果、kinesin related protein、calgranulin C がそれぞれ約15倍、10倍と遺伝子発現の増強を認めた。一方、4例のキメラ型抗TNF α モノクローナル抗体 infliximab 投与患者から得られた末梢血単核球サンプルを対象とし、affimetrix Hu6800 チップで解析した。4症例は、3例が実薬、1例がプラセボ投与群 (MTX 単独) で、実薬投与3例のうち、2例がACR50%基準を満足する有効群、1例がACR20%を満足しない効果不十分例であった。これら症例での遺伝子発現を解析したところ、実薬群では、TNFを含むクラスターが、実薬投与有効群では、IL-1 β を含むクラスターが明らかとなった。有効群ではTNF阻害によってこれらの遺伝子発現が抑制され、サイトカインカスケード下流の分子における役割が注目された。以上より、TNF阻害の有無、臨床的有効性と関連して変動する遺伝子のクラスターが抽出された。

- 2) データベースの構築：研究班で得られた解析結果は、システム生物医学データベース (SBM-DB) の公開データ (www.genomi.rcast.u-tokyo.ac.jp) と共に、アクセス制限を設けて班員に公開。
- 3) カスタムアレイ：前年度の解析結果から得られたデータ、既存の情報を基に、生物製剤投与前後で変動が予測される720遺伝子を選択。このcDNAすべてをクローニングし、それをスポットしたカスタムアレイを作製した。DMARD投与前後の患者末梢血単核球サンプルを用い、その性能チェックを実施し実用段階にあることを確認。
- 4) カスタムアレイを用いた多数例発現解析：キメラ型抗TNF α モノクローナル抗体 infliximab の導入に際し、カスタムチップを用いて治療反応性、副作用と関連する因子を解析するための研究を目標症例数100として施行する。そのための研究デザインを確立した。

候補遺伝子解析

- 1) アポトーシス関連：RA患者滑膜細胞はDR5を含むTRAILを発現し、rTRAILはカスパーゼ-3/-8/-9の活性化を介してアポトーシスを誘導した。このTRAIL誘導性アポトーシスはPI3K阻害薬によって著しく増強された。滑膜細胞の増殖因子であるPDGFはこのTRAIL誘導性アポトーシスを抑制し、それがPDGFによる滑膜細胞増殖効果の一要因と考えられた。この経路に注目した薬剤有効性予測の検討が待たれる。
- 2) 炎症シグナル関連：TNF α による炎症シグナルの細胞内伝達に重要なNF- κ B経路においては、TNF α 刺激によって活性化されたI κ B

kinase (IKK)-beta は、Ik-B をリン酸化してこれを分解し、その結果 NF-kB が核内に移行し標的遺伝子の転写を促進する。コンピュータ支援薬剤デザインによって作製された IKK-beta 阻害薬を同定し、その関節炎モデルに対する効果を検証した。その結果、同薬剤は、*in vitro* において RA 滑膜細胞のサイトカイン産生、IKK-beta 活性、NF-kB 活性を阻害し、*in vivo* においてもマウスコラーゲン関節炎の発症を抑制した。以上から、この経路の分子群は、TNF α 阻害療法の反応性を規定する因子として重要であることが確認された。

- 3) ケモカイン関連：末梢血T細胞に発現されるケモカイン CX3CR1 と、血管内皮細胞に発現されるリガンド CX3CL1 を介した経路の役割を、抗マウス CX3CL1 抗体を用い、マウスコラーゲン関節炎において検討した。その結果、同抗体は炎症細胞の滑膜浸潤を抑制することによって関節炎が抑制され、この経路の細胞浸潤における役割が *in vivo* モデルにおいて明かとなった。

DMARD 薬物代謝酵素関連

- 1) MTX 代謝に関与する MTHFR の遺伝子型：MTHFR の 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。スルファサラジン代謝に関する NAT2 のハプロタイプ・ディプロタイプ型：スルファサラジンの重篤副作用は野生型の rapid acetylator では 8.1%であるのに対して、slow acetylator では 62.5%と有意に高頻度であった。これを用いた薬剤有効性予測、副作用予測を前向き研究によって検証する必要がある。

D.考察と結論

候補遺伝子アプローチによってRAの病態に密接に関連し、薬剤によってその発現・機能が修飾される分子群としてアポトーシス関連、炎症シグナル関連、ケモカイン・サイトカイン/レセプター関連および薬物代謝酵素の重要性が明らかにされた。一方、網羅的発現解析アプローチの方法論の検討から、統計解析手法、データベース構築法、市販の遺伝子チップの性能検討を行い、これらシステムが効率良く稼動することを確認した。実際に、キメラ型抗TNF α モノクローナル抗体 infliximabの投与前後で末梢血単核球を採取できた4例のRAについて検討した結果、治療有効性と関連して変動した遺伝子群を同定した。その結果を踏まえTNF阻害療法によって発現が変動すると予測される遺伝子群を含む720遺伝子のcDNA断片をスポットしたカスタムアレイを作製し、それが実用段階にあることを確認した。キメラ型抗TNF α モノクローナル抗体 infliximabの導入に向けて、薬剤有効性と関連して変動する遺伝子を同定することを目的とした多施設共同の前向き研究のデザインを完了し、最終段階へと検討を進める予定である。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、より臨床的効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。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されている。RAにおけるTNF阻害療法の反応性についても、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500~900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した。

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、しかも繰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。

従来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infiximab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となる。

E.健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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* 12: 167-173 2002.
2. 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* 129: 160-169-8, 2002.
3. Tsubota K, Fujita H, Tadano K, Onoda N, Tsuzaka K, and Takeuchi T. Abnormal expression of Fas ligand of lacrimal glands and peripheral blood in Sjogren's syndrome patients with enlarged exocrine glands. *Clin Exp Immunol* 129: 177-182, 2002.
4. Takeuchi T, and Abe T. Role of adhesion molecules in vasculitis syndrome. *Int Med* 41: 41-44 2002.
5. Takeuchi T, Tsuzaka K, and Abe T. Altered expression of the T cell receptor-CD3 complex in systemic lupus erythematosus. *Int Rev Immunol* in press.
6. Tsuzaka K, Fukuhara I, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, and Takeuchi T. Forced expression of TCR ζ mRNA with alternatively spliced 3' untranslated region found in SLE patients lead to decreased production and cell surface expression of TCR ζ and TCR-CD3 complex. *J Immunol* in press.

2. 学会発表

1. シンポジウム SLE の病因・病態と治療戦略 第46回日本リウマチ学会 2002.4.23 神戸
2. シンポジウム RA の早期診断と早期治療 第46回日本リウマチ学会 2002.4.22 神戸
3. ワークショップ 新しいDMARDs 2002.4.22 第46回日本リウマチ学会 神戸
4. 国際シンポジウム リウマチ薬剤療法のエビデンスを考える RA患者に対するインフリキシマブ療法の遠隔効果 第46回日本リウマチ学会 2002.4.24 神戸
5. New strategy for the treatment of RA 第26回国際内科学会議 2002.5.28 京都
6. 教育講演：抗TNF療法 第52回日本アレルギー学会 2002.11.28-30(パシフィコ横浜)
7. シンポジウム 自己免疫疾患研究の進歩基礎と臨床：TNF阻害療法前後におけるRA患者末梢血単核球の遺伝子発現網羅的プロファイル解析 第52回日本アレルギー学会 2002.11.28-30(パシフィコ横浜)

G.知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

- ① T 細胞リセプターと鎖タンパク、これをコードする遺伝子若しくはその一部を含む精製された核酸又は該タンパク若しくは該核酸に基づく自己免疫疾患検出方法（特願平 9-309302）
- ② 分泌腺細胞とリンパ球との接着阻害剤（08/946838）

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

図 1

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（H14~15）

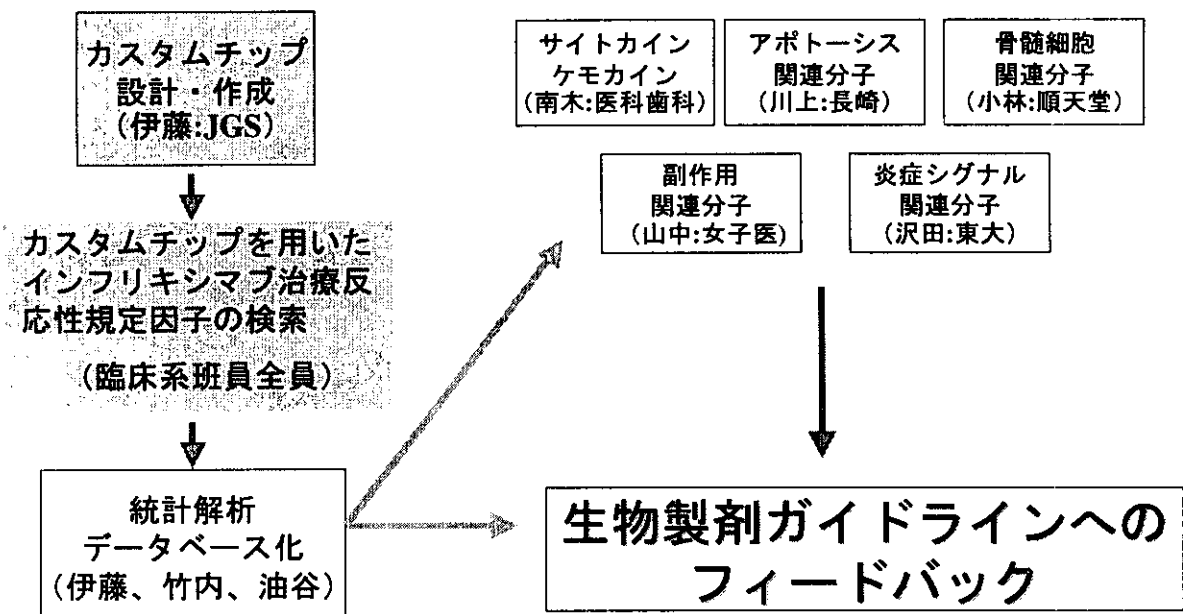


表 1

生物学的製剤の反応性予測に求められるもの

- 有効性を予測する因子は同定されていない
- 臨床的パラメーター、血中、関節サイトカインレベルは有効性と関連しない

有効性予測因子を同定する必要がある



- 多くの情報を一括して解析できる→マイクロアレイ、チップ
- 再現性に優れる→最低でも数百以上のスポット遺伝子数
- 滑膜（油谷班員）骨髄（小林班員）末梢血（竹内）で検討
- 検体の採取が簡便である→滑膜・骨髄よりも末梢血
- 治療前/早期の結果必要→治療背景が異なるため変動で判定



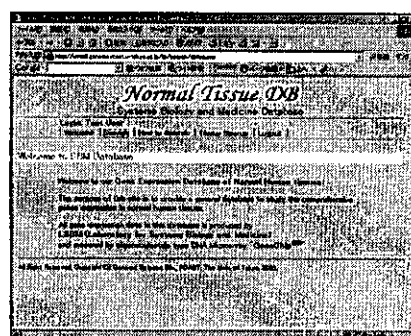
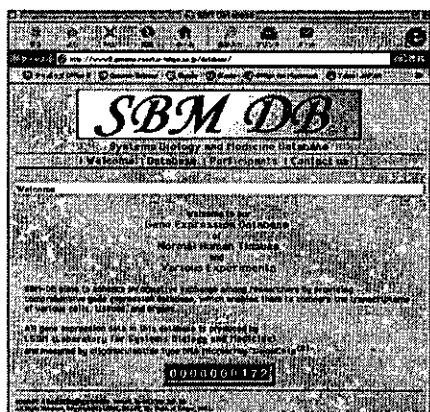
末梢血単核球を治療前後に採取し、そのmRNA発現量を網羅的に解析

図 2

SBM-DB (システム生物医学データベース)

- ヒト臓器別発現データベース
 - 40臓器
 - 23,000遺伝子
- 実験別発現プロファイルデータ
 - URL : <http://www2.genome.reast.u-tokyo.ac.jp/database/>
 - <http://www.lsbm.org>

Systems Biology and Medicine Database
(SBM-DB)



東京大学先端科学技術研究センター：油谷班員

表 2

カスタムチップ遺伝子群リスト

- TNF関連遺伝子群 (含NF- κ B関連遺伝子)
- Apoptosis関連遺伝子群
- Chemokine/Cytokine関連遺伝子群
- Growth Factor関連遺伝子群
- Kinase関連遺伝子群
- Osteoclast/blast関連遺伝子群
- Matrix関連遺伝子群
- 細胞表面蛋白質関連遺伝子群
- 細胞周期関連遺伝子群
- 転写調節関連遺伝子群
- Protease関連遺伝子群
- Oncogene/Suppressor gene関連遺伝子群
- その他

図 3

RAカスタムチップパターン

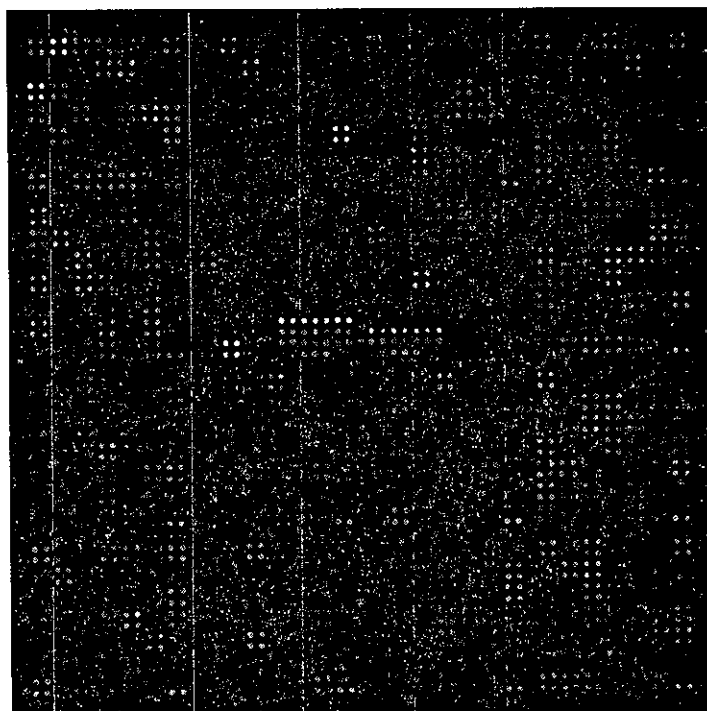
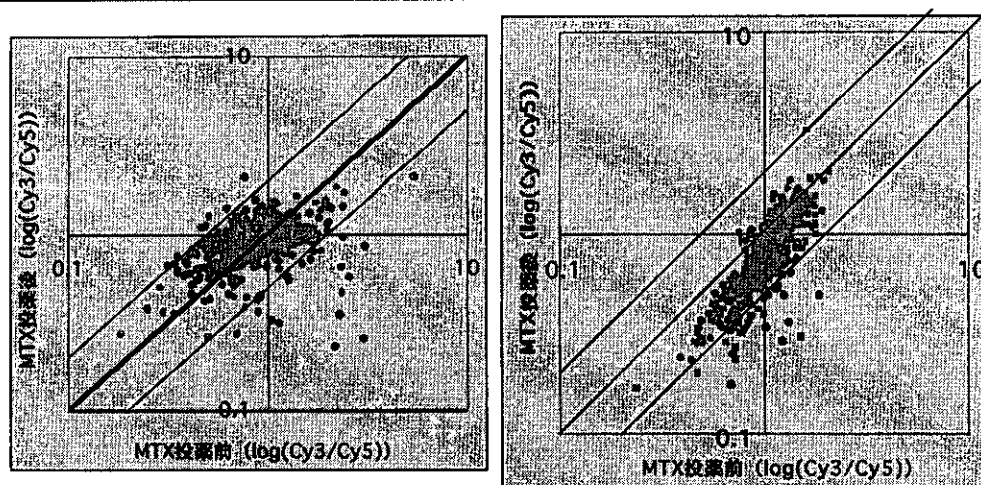


図 4

MTX投薬前後での末梢血単核球トランスクリプト発現パターン (RAカスタムチップの性能検証)



● : 2症例でMTX投薬により発現量が低下した遺伝子

IL-1 β , proIL-1 β , GRO2, IL-8, MIP-1 β activation (Act-2), Fos, Mac 2, etc.

図 5

カスタム遺伝子チップによる抗TNF療法前後の遺伝子発現プロファイル解析

- 対象 : 抗TNF療法適応RA 100例
- サンプル : 抗TNF療法前後の末梢血単核球
- 採取時期 : 投与直前, 投与後2週間
- 遺伝子チップ : カスタムチップ (JGS)
- 解析 : クラスタ解析ソフト (JGS)
- 目標 : 有効性予測因子の同定
無効例で変動しない分子の同定
新たな標的の検索



カスタム遺伝子チップ (Japan Genome Solutions, Inc.)
予備実験で変動したものを含む720遺伝子
cDNA断片をガラスプレートにスポット

Ⅲ. 分 担 研 究 報 告 書

(免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

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（東京大学国際・産学共同研究センター教授）

研究要旨

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ことを目的とし、治療反応性規定因子の同定と新たな治療方針の確立を目指している。本年度は大量の発現プロファイルデータを共同研究者間で共有し解析を進めるためのデータサーバシステムの構築を行った。ヒト正常臓器での発現パターンとのリンク、遺伝子機能情報の更新を行うことが出来、ネット上で研究班に所属する複数の研究機関の間で解析データの共有を行うことが可能となった。TNF α 添加時の遺伝子発現変動を検討し、応答に関与する転写因子結合領域の同定に着手した。

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ル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

遺伝子発現プロファイルデータサーバーの構築

発現プロファイルデータは大量に及び、データの保管及び解析には専用のデータベースサーバーが必要となる、複数の研究機関の研究者の間で解析結果を共有するためには web ベースの閲覧システムの開発が求められる。データベースの構造は様々なマイクロアレイの測定方式に対応可能であり、遺伝子情報の更新、ヒト正常組織における発現情報とのリンクを行えるように構築した。

TNF α シグナルによる転写調節

ヒトゲノム計画の進展によりゲノム配列中の転写調節領域の配列についても情報が得られつつある。ヒト FL アレイ(Affymetrix 社)を用いて血管内皮細胞 HUVEC において TNF α による転写調節を受ける遺伝子を抽出し、転写調節機構についてプロモーター配列の解析を試みた。

（倫理面への配慮）

本年度の研究には DNA 多型解析研究は含まれず、倫理上の問題はない。

C. 研究結果

遺伝子発現プロファイルデータサーバーの構築

当研究室は所属するシステム生物医学ラボラトリー (LSBM) の遺伝子発現データベースを管理しており、発現プロファイルデータ閲覧システムについては、SiliconGenetics社の開発したGenetをベースに作成した。現在はホームページ (URL: www.genome.rcast.u-tokyo.ac.jp) からアクセスすることが出来る。Username と Password を入力して、Log In ボタンをクリックすることにより、予め登録したユーザーのみがアクセス可能とした。既に公開した情報についてはguestとしてのログインにより自由に閲覧が可能である (図1)。また、解析に用いたアレイの種類や実験の種類毎にデータの選択が可能である (図2)。実際の閲覧画面を図3に示す。実験情報、遺伝子情報、発現データなど様々なデータが提供され、ユーザー注釈についても登録できるため、共同研究者間での情報交換にも有用である。

TNF α シグナルによる転写調節

HUVEC 細胞に TNF α 添加を行った際の遺伝子の発現変動を0, 1, 2, 4, 8時間後にモニタリングした。階層的クラスタリングにより添加1時間後において発現がピークとなる遺伝子群を抽出した (図4)。転写開始点 (TSS, Transcription start site) より上流500塩基、下流100塩基の合計600塩基配列情報をゲノム配列から取り出して、転写因子結合配列の共通性について検討したところ、ETSF と NF κ B 結合部位が含まれる遺伝子が多く認められた (図5)。

D. 考察

現在、正常臓器、各種実験結果は2つのデータベースに分離されているので1つのプラットフォームへ統合できるような環境の整備

が今後必要であろうと思われる。また、今後のマイクロアレイ解析結果の公表に際しては MIAME (Minimum information about a microarray experiment) に準拠したデータ様式が必須とされるので、次年度において開発を進める予定である。

HUVEC における TNF 添加に対する転写応答についてのマイクロアレイ解析結果では、同様な調節が認められる遺伝子が抽出され、高頻度かつ共通に調節に関与すると思われる転写因子結合配列が存在することが認められた。とりわけ複数の転写因子結合配列の拾い出しを行う際には有用と思われ、今後のゲノム情報の整備により調節領域の同定が進むと期待される。TNF α 阻害療法に対する治療反応性に個人差が認められた場合には、それらの遺伝子について調節領域の SNP (一塩基多型) の解析を進めることも重要と思われた。

E. 結論

大量の発現プロファイルデータを共同研究者間で共有し解析を進めるためのデータサーバシステムの構築を行った。複数の転写因子結合配列の拾い出しを効率よく行うことが出来た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kano M, Nishimura K, Ishikawa S, Tsutsumi S, Hirota K, Hirose M, Aburatani H. Expression Imbalance Map: A New Visualization Method for Detection of mRNA Expression Imbalance Regions. *Physiol Genomics*. 2003 Jan 7 [epub ahead of print]
- 2) Higuchi A, Shimmura S, Ishii M, Aburatani

- H, Tsubota K. Serum- and serum deprivation-induced transcriptional profiles of cultured conjunctival epithelial cells. **Adv Exp Med Biol.** 2002; 506(Pt A):673-6
- 3) Nakajima A, Wada K, Katayama K, Saubermann L, Osawa E, Nagase H, Ueno N, Matsubashi N, Aburatani H. Gene expression profile after peroxisome proliferator activator receptor-gamma ligand administration in dextran sodium sulfate mice. **J Gastroenterol.** 37 Suppl 14:62-6. 2002
 - 4) Saubermann LJ, Nakajima A, Wada K, Zhao S, Terauchi Y, Kadowaki T, Aburatani H, Matsubashi N, Nagai R, Blumberg RS. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist ligands stimulate a Th2 cytokine response and prevent acute colitis. **INFLAMMATORY BOWEL DISEASES** 8: (5) 330-339. 2002
 - 5) Ota T, Fujii M, Sugizaki T, Ishii M, Miyazawa K, Aburatani H, Miyazono K. Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells. **J Cell Physiol.** 193(3): 299-318. 2002
 - 6) Saiura A, Kohro T, Yamamoto T, Izumi A, Wada Y, Aburatani H, Sugawara Y, Hamakubo T, Taniguchi T, Naito M, Kodama T, Makuuchi M. Detection of an up-regulation of a group of chemokine genes in murine cardiac allograft in the absence of interferon-gamma by means of DNA microarray1. **Transplantation.** 73(9): 1480-1486. 2002
 - 7) Hippo Y, Taniguchi H, Tsutsumi S, Machida N, Chong JM, Fukayama M, Kodama T, Aburatani H. Global gene expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays. **Cancer Research** 62(1): 233-240, 2002
- 総説**
- 1) 油谷浩幸 DNA チップの医療への応用 **Medicina** 39(3): 444-448 2002
 - 2) 油谷浩幸 遺伝子発現プロファイリング解析による癌の個性診断 **医学のあゆみ** 201(9) 687-692, 2002
 - 3) 油谷浩幸 がんの機能ゲノミクス解析 **埼玉医科大学雑誌** 29(1):85-91, 2002
 - 4) 油谷浩幸 ヒトゲノムプロジェクトの現状と将来について **MEDICAL CORNER** 111(3): 4-7, 2002
 - 5) 油谷浩幸 ヒトゲノムプロジェクトの現状と将来 **総合臨床** 51(10):2901-2, 2002
 - 6) Aburatani H. Understanding cancer through gene expression profiling. (review) **International Congress Series** 1246: 261-270, 2002
- 2. 学会発表**
- 1) The 3rd Cherry blossom symposium. "Cancer Classification by Gene Expression Profiling."
 - 2) 第3回 Sun Bioinformatics セミナー「トランスクリプトーム解析のための生命情報の統合ーシステム生物学へー」
 - 3) 第34回日本臨床検査自動化学会特別企画講演「システム生物学へのパラダイムシフトートランスクリプトームからの疾病解析ー」
 - 4) 第61回日本癌学会総会シンポジウム「ゲノム科学とがん研究」トランスクリプトーム解析からがんのシステム生物学へ
 - 5) Toxicogenomics International Forum 2002, "Understanding cancer through gene expression profiling"
 - 6) Rad-genomics 「発現プロファイル解析と疾病研究」

7) 学術創成研究第4回シンポジウム「高感度 DNA マイクロアレイによる遺伝子機能解析」

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

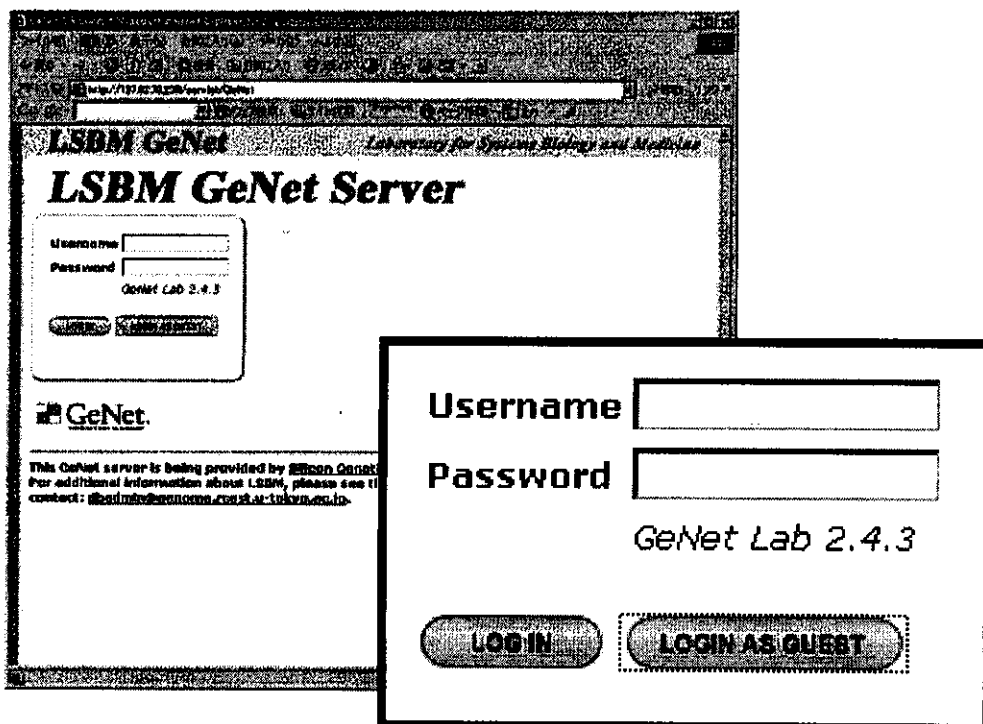
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

図1 LSBM の Genet サーバー



ゲストあるいは登録ユーザーとしてのログインが可能である。

図2 データの閲覧

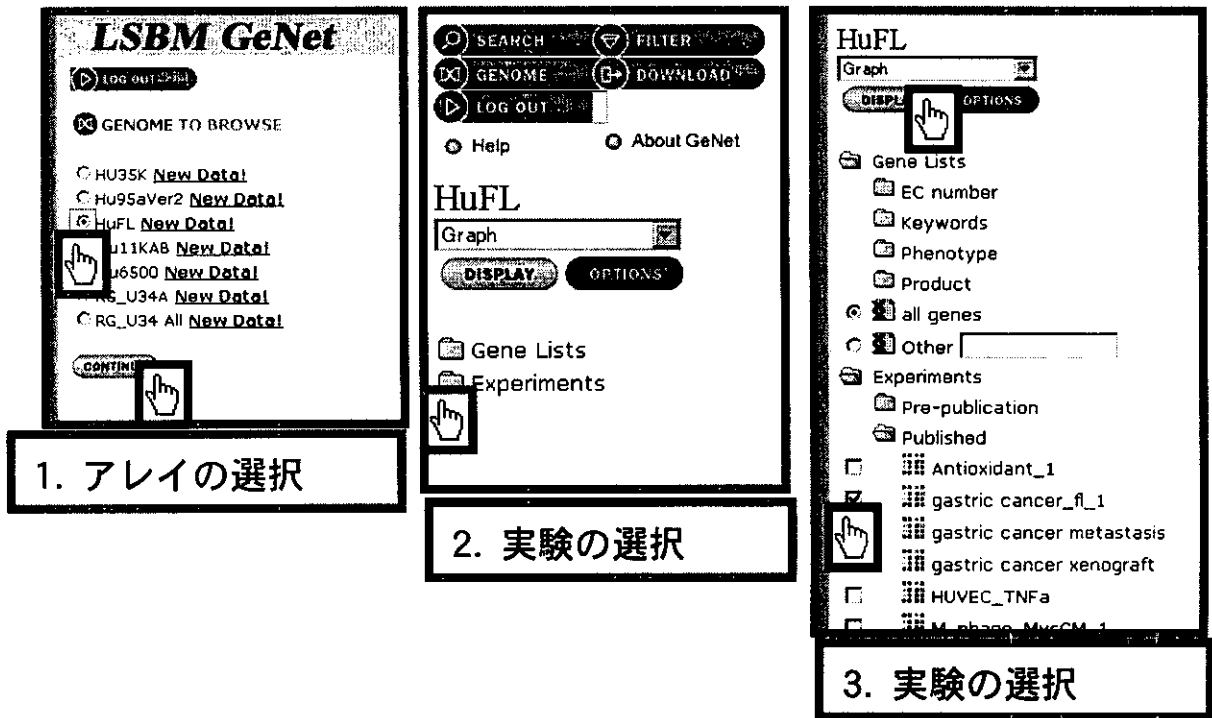


図3 Genet によるデータ閲覧例

