

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

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

平成 16 年 3 月

主任研究者 竹 内 勤

目 次

I 構成員名簿	1
II 総括研究報告書	5
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	11
1 カスタム DNA マイクロアレイを用いたインフリキシマブの有効性予側 因子同定に関する研究	
竹内 勤	
2 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	18
3 抗リウマチ薬投与に関するテーラーメイド医療	
山中 寿	23
4 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	26
5 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	29
6 In vitro でのヒト末梢血 B 細胞の抗シトルリン化ペプチド抗体産生に 関する検討	
沢田 哲治	32
7 抗 fractalkine 抗体による関節炎抑制機序の検討	
南木 敏宏	35
IV 研究成果の刊行に関する一覧表	39
V 合同班会議プログラム	51

I. 構 成 員 名 簿

平成15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	教 授
	小林茂人	順天堂大学医学部 膠原病内科	助教授
	川上 純	長崎大学医学部内科学 第一講座	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
研究協力者	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

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）
総括研究報告書

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二内科（教授）

研究要旨

最終年度には、2003年我国でRAに対してはじめて承認されたキメラ型抗TNF α 抗体インフリキシマブの使用ガイドラインを作成した。一方、インフリキシマブの有効性の予測のため、班全体で取り組んできた。750遺伝子をスポットしたカスタムDNAマイクロアレイが完成し、その実用性および再現性が確認された。これを用いてインフリキシマブの有効性予測因子を同定する臨床研究がスタートし、目標症例100例に対し、42例の登録が完了した。

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

東京女子医科大学附属

膠原病リウマチ痛風センター 教授

小林 茂人

順天堂大学医学部 膠原病内科 助教授

川上 純

長崎大学医学部 第一内科 講師

尺田 哲治

東京女子医学部 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

リウマチ薬（DMARD）が使用され、寛解率の向上など一定の効果を得られている。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。

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

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

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。

- 2) マイクロアレイ Affimetrix, CodeLink, Agilent, Clontech などの市販アレイに加え、本研究班独自に開発したのカスタム DNA マイクロアレイ (750 遺伝子の cDNA をスポットしたガラスアレイ) を用いる。
- 3) 検体の収集 末梢血から直接 PAXgene を用いて RNA を採取し、増幅後カスタムアレイで検討。
- 4) カスタム DNA マイクロアレイの性能、再現性の検討 メトトレキサート投与前後の末梢血サンプルにおける遺伝子プロファイルのカスタムマイクロアレイによって解析し、その結果を市販チップの成績あるいは real time-PCR の結果と比較。カスタムチップの性能、再現性を検証する。

候補遺伝子発現解析

- 1) アポトーシス関連 患者滑膜細胞を用い、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参与する分子の役割を、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- κ B シグナル伝達に参与する分子を、コンピュータ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 関節炎モデル動物を用い CXCL3/CXCR1 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 SNP を解析。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮 個人情報、その外部への持ち出しを厳重に禁止し、遺伝子解析に使用

する検体、試料はコート化し匿名とする。また、生命倫理に関してはこの研究の趣旨を充分説明し提供者の自由意思によるインフォームド・コンセントを取得するものとする。試料の遺伝子解析にヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) を遵守し、平成 15 年 2 月 28 日 埼玉医科大学倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

網羅的遺伝子発現解析

- 1) 患者骨髄サンプルを用いた解析 CD 34 + 骨髄幹細胞に注目し、その機能解析として、Clontech の cDNA アレイを用い、遺伝子発現の差異を RA と OA の患者から得られた RNA を比較することで検討した。さらに得られた結果を元に、定量的 real-time PCR 法を用いて差異のあった遺伝子について mRNA 発現を、RA、OA、大腿骨頭壊死症患者で比較した。RA 患者は OA 患者、大腿骨頭壊死症患者に比べて有意に S100A8、S100A9 の発現が高かった。
- 2) 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。加えて、候補遺伝子アプローチの結果から有望と考えられた 30 遺伝子を加え、750 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 DNA マイクロアレイを作製した。再現性に優れ、また MTX 投与前後の患者末梢血サンプルを用い、その性能チェックを実施し実用段階にあることを確認。
- 3) 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 昨年度までの検討で滑膜細胞には tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)誘導性アポトーシスが惹起され、Akt は翻訳後修飾の機序で滑膜細胞 TRAIL 誘導性アポトーシスを抑制することかわかった。本年度は翻訳調節機序での制御機構を検討した。Interferon gamma (IFN- γ)で滑膜細胞を刺激すると STAT カリン酸化され、滑膜細胞の TRAIL 感受性は顕著に抑制された。この過程では滑膜細胞の TRAIL 受容体発現には変化はなく、しかしながら、STAT 阻害剤および蛋白合成阻害剤の添加で IFN- γ の抑制作用は解除された。Western blotting での評価では、滑膜細胞の pro-caspase-3/-8/-9、Bcl-2、Bcl-xL、Bax、FLIP、SOCS-1/-3 の発現は IFN- γ 刺激の有無で差異はなかった。今回の検討では STAT が制御する蛋白の同定はできなかつたか、STAT は、翻訳調節機序で滑膜細胞の TRAIL 誘導性アポトーシスを制御する重要な転写因子であることか示唆された。
- 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 による I kappa-B kinase (IKK)-beta の活性化が重要で、それか Ik-B をリン酸化して分解、NF- κ B の核内移行を促進する。そこでこの経路をブロックする化合物をコンピューター支援薬剤デザインによってスクリーニングした。作製された IKK-beta 阻害薬は、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- κ B 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。
- 3) ケモカイン関連 コラーゲン関節炎マウスに抗 fractalkine (FKN)抗体を投与することにより、その関節炎が抑制された。抗 FKN 抗体投与は抗コラーゲン抗体産生

には影響せず、また脾臓 T 細胞のコラーゲン刺激による IFN- γ 産生にも影響しなかったが、脾臓 Mac-1 陽性細胞の関節滑膜組織への遊走は抗 FKN 抗体投与で抑制された。このことより、抗 FKN 抗体により炎症細胞浸潤が抑制され、関節炎が抑制されたと考えられた。FKN/CX3CR1 相互作用阻害が RA の新たな治療薬となる可能性が示唆された。

DMARD 薬物代謝酵素関連 thymidylate synthetase (TS)と reduced folate carrier (RFC)遺伝子のハプロタイプが methotrexate 投与時の効果と副作用に及ぼす影響を検討した結果、TS および RFC 遺伝子型による副作用発症の統計学的な有意差は認められなかつたか、有効性との関連では、TS 遺伝子における 3R3R 遺伝子型を有する群で CRP 値の有意な改善を認めた (p<0.005)。TS 遺伝子型の検討は RA 症例における pharmacogenomics に基づくテーラーメード医療の有益な指標となる可能性が示された。

D. 考察および結論

候補遺伝子アプローチによっ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とその詳細な分子機序が明らかにされた。一方、網羅的発現解析アプローチのマイクロアレイの検討からそれぞれの長所・短所が明らかにされた。その中で、本研究班で開発に成功したカスタ DNA マイクロアレイの実用性・再現性が確認された。キメラ型抗 TNF α モノクローナル抗体インフリキシマフの承認を受け、その使用ガイドラインを作成し、その適応症例の有効性を予測する因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がスタートし42例の登録が完了した。目標100例の登録が完了し、54週の観察期間が終了した時点で、臨床的効果、関節破壊抑制効果と関連する遺伝子クラスターが明らかになると思われる。インフリキシ

マブを初めとする TNF 阻害生物学的製剤の
効果予測因子は、TNF-308 の多型について検
討が行われているか、一定の成績が得られて
いない。効果予測には、より多くの分子の中
から同定する必要がある。その点、網羅的遺
伝子発現解析は有効な手段と考えられるか、
その報告は世界的にも類がない。この結果が
明らかとなれば、世界的にも極めて貴重な情
報となり、この結果を基盤としてインフリキ
シマブの効果予測が可能となる。

F.健康危険情報

特になし

Ⅲ. 分 担 研 究 報 告 書

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

カスタム DNA マイクロアレイを用いたインフリキシマブの
有効性予測因子同定に関する研究

分担研究者 竹内 勤 埼玉医科大学総合医療センター第二内科（教授）

研究要旨

750 遺伝子をスポットしたカスタム DNA マイクロアレイを用いて、キメラ型抗 TNF α モノクローナル抗体の有効性予測因子の同定を試みた。MTX 抵抗性 RA 症例を対象とし、インフリキシマブ投与前後の mRNA 発現の変動をアレイで解析した。臨床的指標による有効群、無効群での変動遺伝子をクラスター解析によりあきらかにすることを目的とした。現在、目標 100 例に対し 42 例の登録が完了した。

A. 研究目的

関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis RA) は、破壊性関節炎を特徴とする原因不明の炎症性疾患である。高度の関節変形のため、日常生活動作は低下し、無治療では 50% が 10 年後には寝たきりになるとされる。機能的予後が著しく不良であると同時に、生命予後も 10 年短い。この関節破壊を抑制し、予後を改善することか、RA の治療目標である。これまでに、10 種類にのぼる抗リウマチ薬 (Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug DMARD) が RA の炎症を抑え、関節破壊を抑制する目的で使用されてきた。しかしながら、最も強力な抗リウマチ作用を有するメトトレキサートを持ってしても、50% の症例では満足いくコントロールが得られなかった。しかし、RA の病態解析が進み、炎症性サイトカインが中心的役割を担っていることが判明し、これを標的とした生物学的製剤が開発され、画期的臨床効果が観察されている。わが国においても 2003 年キメラ型モノクローナル抗体インフリキシマブが承認され、重症の RA 治療に使用可能となった。しかし、その効果は 50~60% であること、年間薬剤費が約 160 万円と高価なこと、また、結

核を初めとする感染症などの副作用が問題とされる。そこで、インフリキシマブの使用にあたってのガイドラインを、厚生労働省内科的治療研究班 3 班（宮坂、竹内、江口班）の合同で作成することを目標の 1 つとした。一方、本研究班では、インフリキシマブの作用点を考慮し、それによって変動が予測される分子群、ならびに DNA チップによってインフリキシマブ投与後に変動した遺伝子群の成績を基に、効果予測に有望な 750 遺伝子を同定し、それをスポットしたカスタム DNA マイクロアレイの開発に成功した。本研究では、研究班が開発したこのカスタム DNA マイクロアレイを用いて、インフリキシマブ投与を行う 100 例の症例を対象に、インフリキシマブの効果を予測する分子を同定することを目的とした。

B. 研究方法

A 方法

カスタム遺伝子チップ

候補遺伝子アプローチ、網羅的遺伝子発現アプローチを通してインフリキシマブ投与前後に変動する 750 遺伝子を絞り込み、TNF 関連遺伝子群、Apoptosis 関連遺伝子群、

Chemokine/Cytokine遺伝子、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、薬物代謝関連遺伝子群の各cDNAを精製、それをガラスプレートにスポットしたカスタムDNAマイクロアレイを作製した。

臨床解析

- 1) 対象症例 アメリカリウマチ学会分類基準を満足する RA で、本研究班を含む厚生労働省研究班3班で作成したインフリキシマブ使用ガイドラインに合致するメトトレキサート効果不十分例100例を対象とした
- 2) 検体 インフリキシマブ投与前ならひに、投与2週間目の第2回インフリキシマブ投与直前の2点で、末梢血をPAXgeneを用いて採取。検体は、収集して、DNAマイクロアレイを用いて一括解析。
- 3) 研究デザイン インフリキシマブ投与前、投与14週目(0、2、6週の3回投与後8週目)、投与30週目(5回投与後8週目)、および投与54週目(8回投与後8週目)に、ACR20%、ACR50%、ACR70%反応を指標として、有効群、無効群を判定。同時に、投与前、投与30週、投与54週目に手・足の単純X線を撮影し、シャープ・スコアを記録。シャープ・スコア増加群、無変動群を判定。
- 4) 効果予測因子の同定 臨床的効果、ならひに関節破壊抑制効果を指標として、効果あり群、効果なし群の2群に分け、それぞれを識別するクラスターを、独自に開発したコンピューターソフトにより同定する。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮 個人情報、その外部への持ち出しを厳重に禁止し、遺伝子解析に使用する検体、試料はコード化し匿名とす

る。また、生命倫理に関してはこの研究の趣旨を充分説明し提供者の自由意思によるインフォームド・コンセントを取得するものとする。

試料の遺伝子解析にヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)を遵守し、平成15年2月28日 埼玉医科大学倫理委員会の承認を得た。

C.研究結果

インフリキシマブ使用ガイドライン

- 1) ガイドライン作成の経緯 生物学的製剤は、生物から産生された物質を治療薬剤として利用するもので、リウマチ領域では、炎症性サイトカインや細胞表面分子を標的とし、最新のハイオテクノロジー技術を駆使して作られている。欧米では既に市販されているか、2003年日本においても関節リウマチ治療薬としてインフリキシマブ(レミケート®)が承認された。この製剤は、これまでになくの特徴を有しているため、その使用にあたっては適応、禁忌などに関する詳細な知識が求められている。それらの情報を盛り込んだガイドラインは、生物学的製剤の導入を目前に、厚生労働省リウマチ研究班の『新規治療に関する研究班 宮坂信之班長』、『治療反応性規定因子の同定と、それを用いた新治療体系確立に関する研究班 竹内 勤班長』、『早期診断に関する研究班 江口 勝美班長』の3班合同によって作成された。その後、これをインフリキシマブ承認後の臨床現場での混乱を少なくし広くリウマチ医に周知する目的で、日本リウマチ学会か、レミケート使用マニュアルとして公表した。
- 2) ガイドラインの概要 ガイドラインは、適応、禁忌、施設基準、注射時反応に対する対処法について具体的に述べられており、インフリキシマブ(レミケート®)を使いたい症例に対し、適応に合致し、

かつ禁忌事項かないことを確認した上で、患者に同意を求める。

3) 適応 関節リウマチと診断され、メトトレキサート(MTX)を3ヵ月間、6mg/週以上投与してもなお、疼痛関節6個以上、腫脹関節6個以上、CRP2mg/dl あるいは ESR28mm/hr 以上の3項目すべてを満足する活動性症例か適応である。日本において行われた後期第2相試験での適応基準を考慮して設定された。MTX 不応の用量も治験での用量とおりて、最高用量の8mg/週か望ましいとの意見もあったか、重篤な肝機能障害などの副作用で8mg/週に増量不可能な症例を考慮した。また、6mg/週での抗キメラ抗体出現率も、日本の2倍近い MTX 投与量である欧米でのそれとほぼ同等であることから、日本でのエヒテンスかある6mg/週は適切な用量とされた。一方、それ以下の用量に関しては、併用によるキメラ抗体抑制のエヒテンスか世界的にも日本にもなく、危険であると考えられ最終的に『6mg/週以上投与しても』という表現となった。MTX の効果は、ほぼ3ヵ月でプラトーに達することから、3ヵ月継続投与後に活動性を判定する。活動性は、多くの生物学的製剤の治験に使われている活動性判定基準で、疼痛関節、腫脹関節と CRP あるいは ESR のどちらか一方の炎症マーカーで判定する。インフリキシマブでは、欧米での市販後調査の結果から、結核などの細胞内寄生感染の危険性が指摘されていた。そこで、感染防御能を反映する白血球数、リンパ球数か、それぞれ4000/mm³、1000/mm³以上で、真菌感染、カリニ肺炎で上昇するとされるβ-D-グルカン値か正常という項目か設定されている。カリニ肺炎のリスクは、CD4+ T 細胞数とより密接に関連するという報告や、T 細胞機能がより適切なリスク指標であるとする意見もあるか、臨床現場での対応か困難であることから、

これらの項目は除外された。今後、今回設定された項目か、リスク評価に適切であったかを解析する必要かある。

4) 禁忌 インフリキシマブの標的である腫瘍壊死因子アルファ(Tumor Necrosis Factor alpha TNFα)は、関節リウマチの炎症病巣形成に重要な役割を果たしているか、同時に生理的役割として感染防御に関与する。従って、MTX 併用下でインフリキシマブを投与すると感染防御能の低下か懸念される。そのため、禁忌の第一として、投与時に活動性の感染かある例かあけられている。同様の理由で、過去6ヵ月以内に、重篤な感染症の既往を有するも禁忌である。さらに、感染に関して、肺外結核、カリニ肺炎の既往も禁忌とされている。これらは、インフリキシマブ投与によって感染症の再活性化か懸念されるからである。事実、結核は、米国のインフリキシマブ投与症例で一般人口の7倍ほどのリスクかあるとされ、投与3回以内に75%か結核を発症していることから、既感染の再活性化と判断されている。米国では、BCG を実施していないこともあり、ツヘルクリンテストで5mm以上の硬結を陽性とし、それらに対してイソニコチンヒトラシト (INH)の予防投与をし、効果をあけている。マニュアルでは、結核胸部 X 線写真で胸膜肥厚、索状影、5mm以上の石灰化影を陳旧性肺結核症の疑いとした。その上で、リスク/ヘネフィットを考慮し、インフリキシマブの適応ありと判断された場合、イソニアジド (INH) の予防投与を行う。米国で行われている予防投与の方法は、最低一ヵ月予防投与を先行させ、その後9ヵ月は服用を続けるといものである。

悪性腫瘍は、悪性リンパ腫を除いて、これまで特に一般対象と比べて有意に高いと報告されたものはないか、標的か腫瘍壊死因子であり、10年以上の長期観察も不十分であることから、禁忌として

いる。

インフリキシマブの治験が行われ疾患が悪化することが確認された多発性硬化症などの脱髄疾患や、うっ血性心不全は禁忌である。

カスタム DNA マイクロアレイの実用性

- 1) 再現性 単離末梢血単核球を使用するのではなく、末梢血から直接 PAXgene チューブで RNA を採取し、増幅した。これによって調整段階での検体間のはらつきを最小限に抑える事が可能となった。このサンプルを用いて、カスタム DNA マイクロアレイで 2 回解析した結果、高い再現性が得られた。異なる検体間での標準化を図るため、referenceRNA をサンプルに加え、これをコントロールとして用い、異なる検体間での比較を可能とした。
- 2) RA における mRNA 発現様式 RA と、他の全身性リウマチ性疾患を比較したところ、他の疾患にない独特の発現様式が見られた。その中には、Interferon inducible gene, Cytokine (IL-1b, etc), Chemokine (CCR3, etc) などが含まれていた。
- 3) MTX 投与例での mRNA 発現変動 MTX 投与によって臨床的効果が得られたサンプルを用いて、このカスタム DNA マイクロアレイの性能を検証したところ、これまで報告されている遺伝子変動と合致する IL-1B, pro-IL-1B, MIP-1a などの遺伝子変動が検出され、実際の臨床サンプルにおける有用性が示された。

臨床症例

1) キメラ型抗 TNF α モノクローナル抗体インフリキシマブが平成 15 年 7 月 16 日に RA に適応承認されたのを受け、本研究班を中心としてその効果予測因子を同定するための臨床試験を開始した。投与前、投与 2 週間後の末梢血サンプルは、カスタム DNA マイクロアレイを用いて解析、一方、臨床データは、投与 54 週目まで収集することとした。各大学の倫理委員会の承認を受け、登録が開

始され、平成 16 年 2 月 16 日現在、42 例の症例が登録された。女性 33 例、男性 9 例で、平均年齢 55.3 \pm 9.3 才、31~71 才に分布していた。

投与 14 週後の臨床データが収集された症例での患者背景 投与 14 週後までの臨床データが収集された 16 例では、インフリキシマブ投与までの罹病期間 99.0 \pm 69.7 (4-311)、MTX 以外に使用した DMARD 数 1.8 \pm 1.7 (0-5)、MTX 使用平均用量 8.7 \pm 1.6mg/week (6-13)であった。インフリキシマブ投与までの MTX 使用期間は 48.2 \pm 39.1 (3-132)カ月、疼痛関節 19.7 \pm 7.6 (6-32)、腫脹関節 15.7 \pm 7.2 (6-30)、CRP 4.6 \pm 2.3 (2.0-9.3)と活動性の高い advanced RA の臨床像を呈していた。

D. 考察および結論

腫瘍壊死因子 Tumor Necrosis Factor (TNF) を標的とした生物学的製剤は、キメラ型モノクローナル抗体インフリキシマブ、完全ヒト抗体アタリムマブ、TNFR2-IgGFc 融合蛋白エタネルセプトの 3 剤であるが、その臨床的効果は、ACR20%反応率で約 60%とされる。その有効性を予測する因子の解析が行われてきたが、臨床パラメーターではその予測は困難とされた。TNF-308 の多様性が明らかにされ、その多型とインフリキシマブの有効性が関連するとする報告が 2003 年なされた。しかし、同年その TNF-308 が有効性と関連しないと報告され、その意義については依然として議論が多い。一方、網羅的遺伝子発現解析によってこれを同定しようとする試みが報告されているが、その成績は明らかにされていない。今回、本研究班で行っている研究が目標症例数に達し、臨床データが 54 週まで集積されれば、世界的にも極めて貴重な情報が得られるものと期待される。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1 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
- 2 Tsuzaka K, Fukuhara I, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, and Takeuchi T TCR ζ mRNA with an alternatively spliced 3' untranslated region detected in Systemic Lupus Erythematosus patients lead to the down-regulation of TCR ζ and complex. *J Immunol* 171 2496-2503, 2003

2. 学会発表

- 1 Kameda H, Ishigami H, Abe T, Takeuchi T Expression of adapter proteins in rheumatoid synovial fibroblast-like cells and their involvements in the signaling from growth factor receptors 67th Annual Meeting, Orlando, U S A , October, 2003
- 2 Kameda H, Amano K, Ogawa H, Nagasawa H, Iizuka A, Sekiguchi N, Takei H, Tsuzaka K, Tokuhira M, Takeuchi T The combination therapy with corticosteroids, cyclosporin A and intravenous pulse cyclophosphamide for acute/subacute interstitial pneumonitis in patients with dermatomyositis 第47回日本リウマチ学会総会（国際ワークショップ），2003年4月，東京
- 3 竹内 勤 シンポジウム リウマチ 膠原病の最新の進歩 「関節リウマチの最新の治療 抗サイトカイン療法を中心として」日本医学会総会 2003 4 5 福岡
- 4 竹内 勤 シンポジウム リウマチ薬物治療の最新の進歩「抗 TNF α 抗体インフリキシマフの臨床的効果と今後の課題」第47回日本リウマチ学会 2003 4 24～26 東京
- 5 竹内 勤 シンポジウム RAの抗 TNF α 抗体療法 日本での成果 2003 5 13 第15回日本アレルギー学会春季臨床大会 横浜
- 6 リウマチ／膠原病の病態と薬物療法の進歩 日本内科学会生涯教育講演会 2003 6 8/9 7 東京、名古屋
- 7 竹内 勤 スポンサーシンポジウム 関節リウマチの抗サイトカイン療法 展望と問題点「抗サイトカイン療法の症状改善効果～投与中断の見極め～」 第18回日本臨床リウマチ学会 2003 10 2
- 8 竹内 勤 シンポジウム 自己免疫疾患の薬物治療における最近の進歩「抗 TN 療法の現状」 第53回日本アレルギー学会 2002 10 23 岐阜
- 9 竹内 勤 シンポジウム 生物製剤による炎症の制御「TNF α 抗体（インフリキシマフ）を用いた関節リウマチの治療」第24回に本炎症・再生医学会 2003 11 26 京都
- 10 竹内 勤 臨床薬理シンポジウム 生物学的製剤の新薬開発の現状と問題点「リウマチ性疾患」第24回日本学術会議薬理学研連 2003 12 10 横浜
- 11 厚生労働科学研究公開シンポジウム 総括・生物学的製剤による関節リウマチの治療 現状と課題 2004 2 23、24 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

- ① T細胞リセプターと鎖タンパク、これをコート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

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。本年度は患者末梢血から得られる発現プロファイル解析について、単核球画分と全血をそれぞれ用いて行い比較した。後者については赤芽球に含まれる RNA、とりわけグロビン遺伝子の RNA が大量に含まれることから、選択的に分解した後に標識するプロトコールも試みたが、RNA 自体の分解が生じ、かえってデータのはらつきの原因となるため、全血のまま用いることとした。レミケート投与 13 例について投与前後について発現プロファイルを解析した。

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か期待される。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。

また、全血を解析対象とする場合において、主に赤芽球で大量に発現しているクロビン RNA が、トータル RNA から cRNA を合成する際に過剰に増幅されてしまい、他の遺伝子由来の cRNA 合成を妨げるという報告が Affymetrix 社からなされており、グロビン分解プロトコールについて検討を行った。

B.研究方法

クロビン遺伝子分解プロトコール

クロビン分解プロトコール（GRP）は、 $\alpha 1$ -、 $\alpha 2$ -、 β -globin mRNA の相補鎖オリゴ DNA と RNase H を用いて globin mRNA を分解させ、cRNA を合成する前に total RNA 中の含有量を下げる方法である（http://www.affymetrix.com/support/technical/technotes/blood2_technote.pdf）。 $\alpha 1$ -、 $\alpha 2$ -、 β -globin mRNA の相補鎖オリゴ DNA と Total RNA をハイブリタイズさせ、DNA と 2 重鎖を形成した RNA のみを分解する酵素である RNase H を用いて消化を行った。その後、GeneChip Sample Cleanup Module を用いて Total RNA の精製を行った。RNA の品質の確認には、Bioanalyzer 2100（Agilent technologies Inc）を用いた。RNA 試料としては TRIZol で抽出した健常者の全血検体の全 RNA、胃癌細胞株 2MD3 の全 RNA 各 7 μ g を使用した。

1) 健常者の全血検体を用いた実験

GRP 処理した RNA と未処理の RNA の品質及び、それぞれの全 RNA から合成した cRNA を比較した。cRNA の合成は、CodeLink Expression Bioarray System のプロトコールにしたか行った

(http://www.jp.amershambiosciences.com/tech_support/tech_material/pdf/codelink_manual.pdf)。

2) 2MD3 を用いた実験

RNA 分解が生じる原因を考察する目的で、血液以外の試料として胃癌細胞株 2MD3 の全 RNA を GRP 処理した。その際、対照として、(1)GRP 処理をしないサンプル、(2)Globin Reduction Oligos のみを添加したサンプル、(3)RNase H のみを添加したサンプルを用いた。

レミケート投与症例の発現プロファイル解析

レミケートを投与した 13 症例について投与前後の末梢血より PAXgene (Qiagen) を用いて全 RNA を抽出した。5 μ g の RNA より合成、増幅した cRNA を Biotin-11-UTP を用いて標識後、CodeLink ヒト 20K アレイ (Amersham) を用いて 2 万遺伝子の発現プロファイル解析を行った。スキャナーは Agilent 社の共焦点スキャナーを使用した。

(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

グロビン遺伝子分解プロトコール

1) 健常者の全血検体を用いた実験 (図 1)
健常者の全血検体から抽出した total RNA に GRP を施行し、Bioanalyzer で電気泳動を行った結果、RNA の quality を示す指標である 28S/18S 比が 0.91 から 0.31 に低下しており、RNA の分解が認められた。次に、この RNA を用いて cRNA の合成を試みたが、約 700bp のピークが現れ、globin mRNA が除去できていないことがわかった。また、300-700bp 付近の長さの cRNA 合成量が、GRP を施行していないサンプルに比べて多かった。

2) 2MD3 を用いた実験 (図 2)

胃癌細胞株 2MD3 由来の RNA を用いて GRP による RNA の分解について検討を行った実験では、GRP 処理を行った検体のみ

28S/18S 比が 1.80 → 0.54 と減少しており、RNA 分解が認められた。

レミケート投与症例の発現プロファイル解析

2 万遺伝子の発現プロファイルデータが得られ、今後臨床情報と照合の上、解析を進める予定である。図 3 にレミケート投与前における末梢血の遺伝子発現プロファイルのクラスタ解析結果を示す。

D. 考察

GRP 処理によって RNA が分解されてしまうという現象が認められた。そこで、2MD3 を用いて Globin Reduction Oligos、RNase H をそれぞれ単独で添加したコントロール実験を行ったが、RNA の分解は認められなかった。したがって、RNase H の混入やケノム DNA 混入による非特異的切断ではなく、Globin Reduction Oligos が RNA と非特異的結合を起こし、RNase H による分解が起きている可能性が高いと考えられた。実際に BLAST 検索を行ったところ、Oligo DNA の一部 (26mer 中 10mer 前後) と相同性を有する配列が数多く存在していた。

健常者の全血検体を用いた実験では、GRP 処理後に cRNA の合成を行った。Affymetrix 社の報告によると、globin が除去された RNA から合成した cRNA のピークは 800-900bp ほどになっており、比較的高分子の cRNA が増幅されていた。しかし、本検討の結果では、300-700bp 付近の低分子量の cRNA 量が GRP 未処理に比べて増幅していた。さらに、GRP 処理後も globin mRNA と思われるピークが存在し、ほとんど除去されていないという結果になった。

本検討の結果、GRP 処理により RNA の品質が低下し、globin も除去されていなかった。さらに、GRP 処理後のカラム精製の回収率は 50-60% と低く、サンプルのロスも大きかった。このため、本検討では、マイクロアレイ実験の前処理として有用であることが確認できなかった。今後は、再度検討を行い、GRP 処理、未処理の検体について GeneChip を用いた解

析を行い、発現量にどのような相違があるかなどについて検討を進めていく予定である。

E. 結論

安定した測定結果を得るためには、採取後全血のまま直ちに RNA を固定化する方法が再現性が高いと思われる。全血使用時においてはさらなる検討が必要であると考えられた。本年度終了間際によくレミケート投与症例についての解析に着手することかてきた。

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** 13 31-46, 2003
- 2) Kawahara N, Wang Y, Mukasa A, Furuya K, Shimizu T, Hamakubo T, Aburatani H, Kodama T, Kirino T Genome-wide Gene Expression Analysis for Induced Ischemic Tolerance and Delayed Neuronal Death Following Transient Global Ischemia in Rats **J Cereb Blood Flow Metab.** 24(2) 212-223 2004
- 3) Matsuyama S, Iwadata M, Kondo M, Saitoh

M, Hanyu A, Shimizu K, Aburatani H, Mishima HK, Imamura T, Miyazono K, Miyazawa K SB-431542 and Gleevec Inhibit Transforming Growth Factor-beta-Induced Proliferation of Human Osteosarcoma Cells **Cancer Res** 63(22) 7791-7798 2003

2. 学会発表

- 1 第 5 回国際ゲノム会議（横浜）「Transcriptome to Integrated Biology」2003 6 27
- 2 箱根山シンポジウム（東京）「トランスクリプトーム解析から Integrated Biology へ」2003 7 7
- 3 第 13 回遺伝医学セミナー（東京）「マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析」2003 9 5
- 4 厚生労働省研究公開シンポジウム「関節リウマチの最新薬物治療～テーラーメイド医療に向けて～」 「遺伝子発現プロファイルによる治療反応性診断システムの開発」2004 2 24

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
なし

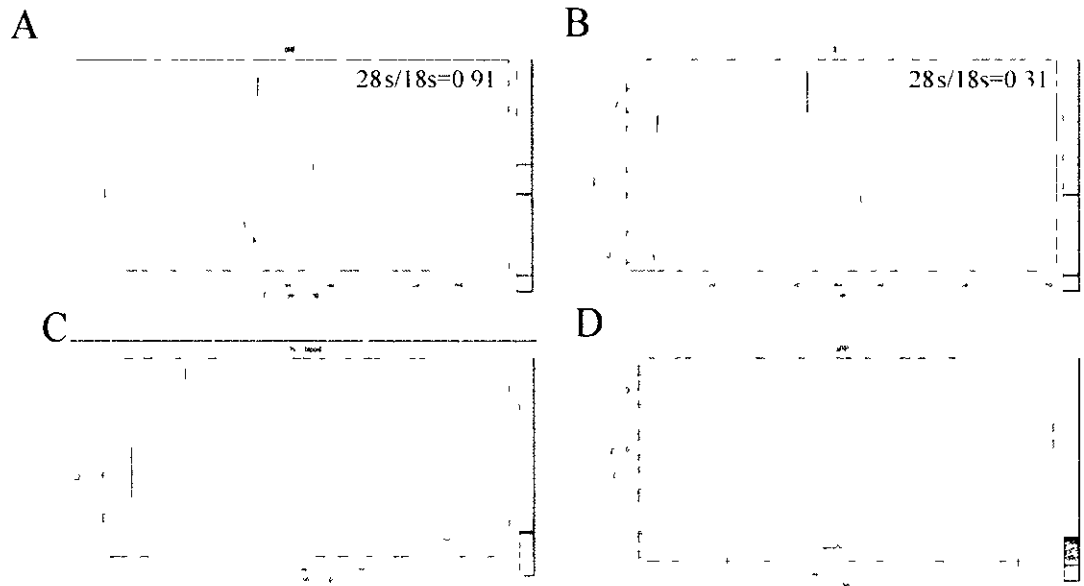


図1 健常者全血検体を用いた GRP 処理結果
 A,B 全 RNA, C,D cRNA, A,C GRP 処理, B,D 未処理

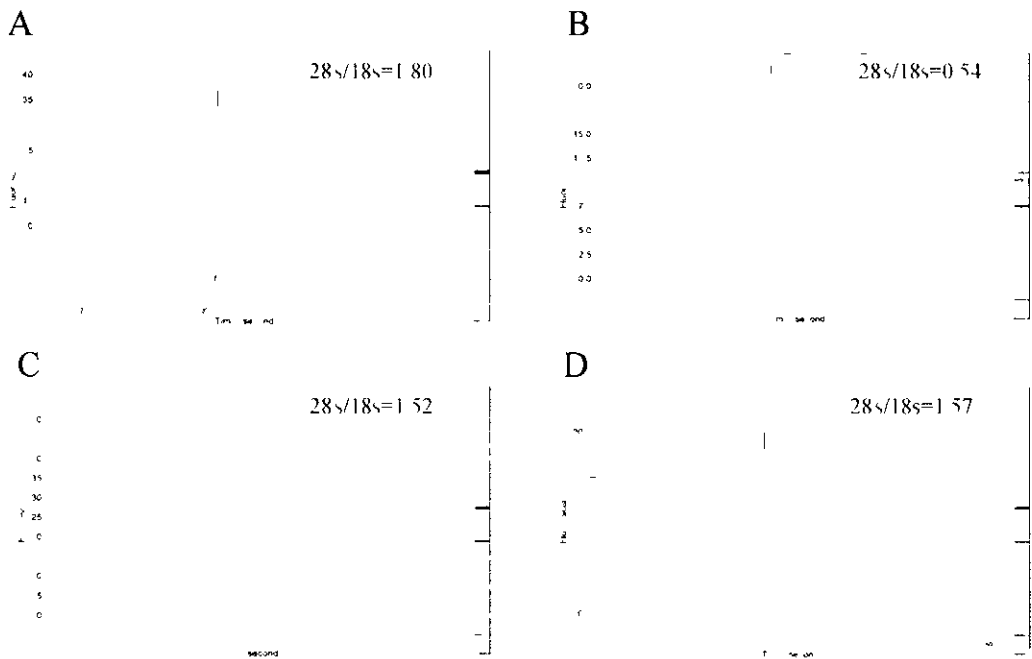


図2 胃癌細胞株 2MD3 を用いた GRP 処理結果
 A control, B GRP 処理, C Globin Reduction Oligos のみ, D RNase H のみ

図3 レミケート投与前の遺伝子発現プロファイル
 ○は ACR50 により症状改善と判定された症例、×は無効例である

