

200400691A

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

リウマチ・アレルギー疾患の治療反応性因子の確立
及びテラーメイド治療法の確立に関する研究

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 竹 内 勤

平成 17 (2005) 年 3 月

目 次

I. 構成員名簿	1
II. 総括研究報告書	5
1 リウマチ・アレルギー疾患の治療反応性予測因子の確立及び テーラーメイド治療法の確立に関する研究 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治療反応性診断システムの 開発に関する研究 油谷 浩幸	
2 関節リウマチ関連遺伝子の民族差と日本人での検証 山本 一彦	23
3 関節リウマチ診断に有用な遺伝子に関する研究 谷口 敦夫	26
4 関節リウマチ診断に有用な遺伝子に関する研究 小林 茂人	30
5 関節リウマチ患者における臨床像、末梢血単核血球中 TNF α および tristetraaprolin mRNA 量、血中抗 glucose-6-phosphate 抗体の有無による Infliximab 治療反応性の予測に関する研究 伊藤 聡	34
6 CaMK II による滑膜線維芽細胞アポトーシスの制御に関する研究 川上 純	37
7 ヒト末梢血単球サブセットによる破骨細胞への分化能の比較検討 南木 敏宏	40
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	45
V. 合同班会議プログラム	55

I. 構 成 員 名 簿

平成16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
リウマチ・アレルギー疾患の治療反応性予測因子の確立
及びテーラーメイド治療法の確立に関する研究

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	東京大学先端科学技術研究センター ゲノムサイエンス分野	教 授
	山本一彦	東京大学大学院医学系研究科内科学専攻 アレルギーリウマチ学	教 授
	谷口敦夫	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・ 順天堂越谷病院内科	助教授
	伊藤 聡	筑波大学大学院人間総合科学研究科 先端応用医学専攻 臨床免疫学	講 師
	川上 純	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科病態解析・ 制御学講座（第一内科）	講 師
	南木敏宏	東京医科歯科大学 膠原病・リウマチ内科学	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

(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

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

リウマチ・アレルギー疾患の治療反応性予測因子の確立及び
テーラーメイド治療法の確立に関する研究

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

SNPs 多型解析、網羅的遺伝子発現解析、候補遺伝子解析によって、生物学的製剤を含む抗リウマチ薬の効果、副作用予測に向けた基礎的、臨床的検討を行った。その中から、研究班独自に開発したカセタムマイクロアレイの性能、再現性が確認され、インフリキシマブ投与を受けた18名のRA症例での経時的な遺伝子発現パターンが明らかとなった。この成績を受けて、班員を中心とした8施設からなるインフリキシマブ有効性予測に関する共同研究を行い、133例の登録が完了し、一年間の臨床的観察を実施中である

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
ゲノムサイエンス分野 教授

山本一彦

東京大学大学院医学系研究科内科学専攻
アレルギーリウマチ学 教授

谷口敦夫

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・順天堂越
谷病院内科 助教授

伊藤 聡

筑波大学大学院 人間総合科学研究科
先端応用医学専攻 臨床免疫学 講師

川上 純

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
病態解析・制御学講座 講師

南木敏宏

東京医科歯科大学
膠原病・リウマチ内科学 助手

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。無治療では、10年後に50%の症例が寝たきりになるとされ、ADL 低下につながる関節破壊をいかに阻止するかが課題となってきた。従来、関節破壊は発症10年以降の晩期に起ると考えられていたが、定量的な関節破壊評価法の導入の結果、1)75%の症例は2年以内に関節破壊の主要なマーカーである骨びらんが認められること、2)多くの症例で関節破壊は発症2年以内に急速に進み、3)2年以後も一定の速度で生涯に渡って進行すること、が明らかとなった。従って、RAの身体機能の低下を阻止するためには、個々の症例の関節炎破壊の病勢に応じた治療方針が必要で、特に病勢の進行が早い予後不良例では発症早期から強力に関節破壊を抑制しなければならないことが判明した。

RAの関節炎、関節破壊の病態には、TNFなどの炎症性サイトカインが重要な役割を

果たしていることが明らかとなり、TNF を阻害する生物学的製剤が開発された。その優れた臨床的効果、関節破壊抑制効果から、全世界で50万人以上に投与されている。我が国においても2003年、キメラ型抗TNF α 抗体インフリキシマブが承認され、今後数種類の生物学的製剤の導入が期待されている。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テーラーメイド医療の構築が必須である。

本研究班では、生物学的薬剤を初めとしたRA治療薬剤の適応、薬剤選択、投与方法に関する研究を通して、RA薬物療法のテーラーメイド化を確立することを目的とする。

B.研究方法

SNPsを用いたDMARD効果、副作用予測の解析

- 1) MTX 副作用予測に関する研究：対象患者の末梢血からゲノムDNAを抽出した。*MTHFR* 遺伝子のC677T多型、*MTHFD1* 遺伝子のR134K多型、*GGH* 遺伝子のR6C多型について、TaqMan法 (Applied Biosystems, Foster City, CA) により遺伝子型を決定した。
- 2) 関節リウマチ関連遺伝子の民族差と日本人での検証：インフォームドコンセントを得て採取したRAあるいは健常人DNAを、インベーター法ないしスタックマン法を用いて1塩基多型 (SNPs) を検討。

カスタムマイクロアレイ

- 3) 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。
- 4) マイクロアレイ：Affimetrix, CodeLink, Agilent, Clonetechnなどの市販アレイに加

え、本研究班独自に開発したカスタムマイクロアレイ (750 遺伝子の cDNA をスポットしたガラスアレイ) を用いる。

- 5) 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。
- 6) 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。

高密度 DNA アレイ

オリゴ DNA マイクロアレイの解析には CodeLink Human 20K アレイ (GE 社) を用いておよそ2万遺伝子の発現プロファイル解析を行った。

Infliximab 投与前、投与後による2群間検定を行った。投与前、投与後の比

(post/pre ratio) をとり、ratio の値でソートして、投与後で発現量が上がっている遺伝子、発現量が下がっている遺伝子群を抽出した。さらに ACR50 以上の臨床的改善が認められた群 (6 例) と改善が認められなかった群 (4 例) について投与前の発現プロファイルに差がある遺伝子、投与後の発現量の変動に差がある遺伝子を Signal to noise 解析により抽出した。

これらの遺伝子群がどのような機能分類に含まれるかについて Gene Ontology (GO) 分類に基づいて解析を行った。GO 分類との関連については Wayne State 大学が開発した解析ツールである Onto-express を用いて行った。本ツールはマイクロアレイ解析によって選択された遺伝子群を GO 分類ごとに、マイクロアレイ上のすべての遺伝子中から出現する確率を超幾何分布により計算している。さらにどのような転写因子によって制御されているか、プロモーターを含

むと思われる転写開始点周辺の配列から TRANSFAC を用いて予測を行った。

インフリキシマブ効果予測因子同定を目的とした臨床研究

- 1) 対象：厚生労働省生物学的製剤ガイドラインに合致し、インフリキシマブ投与が適応となる関節リウマチ。
- 2) サンプル：インフリキシマブ投与前、投与2週間目の2回に PAX Gene を用いて末梢血サンプルを採取。
- 3) 臨床データ：インフリキシマブ投与前、投与30週、投与54週の ACR コアセット各項目および、手・足レントゲン写真のシャープ変法スコアによって評価。
- 4) データ解析：カスタムマイクロアレイの遺伝子発現変動データと臨床データは、クラスター解析によって検討。

候補遺伝子アプローチ

- 1) アポトーシス関連：滑膜線維芽細胞のアポトーシスは抗 Fas 抗体と rTRAIL で誘導し、ミトコンドリア膜電位の低下で評価した。
- 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 シグナル伝達に関与する分子を、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：ヒト末梢血より単離した単球サブセット (CD16 陽性、CD16 陰性分画) からの破骨細胞形成を、形態・TRAP 染色・骨吸収能にて評価。また、破骨細胞分化に関与する分子の mRNA 発現を半定量 PCR にて解析。単球サブセット間で各種ケモカインに対する走化性を chemotaxis chamber を用いて解析。

(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

1. SNPs を用いた DMARD の効果、副作用予測研究

a) 関節リウマチ関連遺伝子の民族差と日本人での検証

関節リウマチは多因子疾患であり、遺伝的要因が発症および病態の進展に大きく寄与している。今後、疾患の病型、治療反応性予測、テーラーメイド医療の実現などに疾患関連遺伝子多型の情報を多く集め、それらの関連を検討することが重要となる。本研究では海外から RA 関連遺伝子として報告された遺伝子多型の日本人での検証と我々が独自に発表した遺伝子多型についての海外からの報告との比較を行い、我が国での有用性を検討した。

欧米人で RA に関連すると報告された PDCD1、PTPN22 さらに SLC22A4 と SLC22A5 の完全連鎖ハプロタイプの変異は日本人では全く存在しないことが判明した。これらの遺伝子は欧米では RA のみでなく複数の自己免疫疾患について関連が認められているものであるが、例えば PDCD1 や PTPN22 では、同じ欧州からの報告でも変異の頻度に大きな差があることが明らかになっている。一方、我々が発表した PADI4 については欧州での SNP とハプロタイプ頻度はほぼ同じであったが、イギリス人では PADI4 の RA 感受性ハプロタイプは RA でやや多い傾向であったが有意ではないと

の報告が本年なされた。しかし、我が国では我々とは独立して PADI4 の関連を支持する報告があり、さらに韓国でも確認されている。

欧米のデータを参照しながらも我が国独自の多型データの蓄積が重要であることが明らかとなった。

b) 薬物代謝酵素遺伝子多型を用いた MTX の副作用予測

対象患者の臨床記録から MTX による副作用を抽出した。今回の研究では特に MTX による肝機能異常に注目し、ALT 45 IU/l を超える場合を肝機能異常ありとした。MTHFR 遺伝子 C677T 多型において、CC の場合は ALT 45 IU/l を超えた症例は 14.5% であるのに対し、CT あるいは TT では 34.0% と、T アレルを持つ症例の方が有意に肝機能異常の頻度が高かった ($P < 0.05$, RR 2.3, 95% CI 1.2-4.4)。アレル頻度を検討すると、C アレルを有する症例では 19.8% であったのに対し、T アレルを有する症例では 35.5% であり、有意に T アレルを有する症例の方が有意に肝機能異常の頻度が高かった ($P < 0.05$, RR 1.7, 95% CI 1.2-2.4)。

MTHFD1 遺伝子の R134K 多型については GG である症例の 57.8%、GA あるいは AA である症例の 63.7% に肝機能異常が認められたが、有意差はなかった。

GGH 遺伝子の R6C 多型では AA である症例で 59.9%、AG あるいは GG である症例で 61.2% に肝機能異常が認められたが、有意差はなかった。以上、

methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) の遺伝子多型 C677T が MTX の副作用発現と関連することを明らかにした。さらに、MTX 投与開始 1 年以内に生じた肝機能異常の頻度は 677T アレルを持つ症例で有意に高頻度であり、MTHFR C677T 多型が MTX による肝機能異常と関連することが示唆された。

2. マイクロアレイを用いたインフリキシマブ効果予測研究

a) TNF 阻害生物学的製剤用カスタムマイクロアレイの開発

キメラ型抗 TNF α モノクローナル抗体インフリキシマブは、関節リウマチの臨床症状を改善させるに留まらず、少なくとも 1~2 年にわたって、関節破壊の進行を抑制することが明らかにされている画期的治療薬である。2003 年、我が国においても関節リウマチへの適応が承認された。インフリキシマブの有効性は、ACR20% 反応率を指標とした場合、50~60% 前後で、約半数に効果が見られる。高価な薬剤費、感染症、注射時反応などの副作用の問題もあり、有効例の予測が期待されていた。しかしながら、臨床パラメーターによる有効性の予測は困難で、その他にも、有望な指標が見つかっていなかった。そこで、網羅的遺伝子発現解析によって、インフリキシマブの有効性を予測しようとするパイロット研究が行われた。Affimetrix 社の DNA チップを用い、RA 患者 4 例の末梢血サンプルの解析を行った所、インフリキシマブの有効例で変動する遺伝子 11 群、750 遺伝子が明らかとなった。この解析で明らかにされた TNF 関連遺伝子群、Apoptosis 関連遺伝子群、Chemokine/Cytokine 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、薬物代謝関連遺伝子群の 750 個の cDNA を精製し、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。

b) カスタムマイクロアレイの再現性・検出力の検討

新たに作製されたマイクロアレイの再現性

は、ヒト末梢血を LPS で刺激する系で検討され、TNF を初めとするサイトカインなどの発現亢進が確認され、その検出力は十分であると確認された。同一実験条件での再現性確認試験においても、その高い再現性が証明された。以上の in vitro データから、このマイクロアレイは高い実用性を有している物と判断された。そこで、MTX 投与によって活動性が良好にコントロールされた 2 症例について、MTX 投与前後の末梢血サンプルを対象にこのカスタムマイクロアレイで解析したところ、IL-1, IL-8, MIP-1 などの炎症性サイトカイン、ケモカインが MTX 投与後明らかに発現低下することが示され、マイクロアレイの in vivo での実用性が明らかとなった。

c) キメラ型抗 TNF α 抗体インフリキシマブ投与後の遺伝子発現変動の推移

インフリキシマブ投与前および投与 2 週間後、1 4 週後、2 2 週後の 4 ポイントで 1 8 例の RA 患者から末梢血サンプルを収集し、カスタムマイクロアレイで解析した。その結果、全例で投与 2 週間後に DAS28 スコアおよび CRP が低下したが、1 4 週、2 2 週には DAS28 および CRP が低値のまま推移する効果持続群と、それらが悪化する効果不十分例の 2 群に分類された。この 2 群は、3 0 週の ACR50% 反応満足群、非満足群に対応していた。この間、7 5 0 遺伝子の発現レベルをモニターし、1 5 % の遺伝子が発現変動する事が観察された。その中で、すべての症例に共通する発現変動遺伝子は存在しなかったが、ACR50% 満足群と非満足群の 2 群で、明らかに発現変動パターンが異なる遺伝子が存在した。一方、ACR20% 満足群と、非満足群の間には、明らかな発現パターンの差異がなかった。以上より、本研究のようなオープン試験においては、効果判定の指標として、ACR50% を用いる事が適切と考えられた。ACR50% 反応を指標として 3 0 週で

効果判定すると、効果不十分群に比し有効群で明らかに発現低下した遺伝子 1 8 個が明らかとなり、そのトップ 1 0 はいずれもインターフェロン関連遺伝子であった。この解析から、インフリキシマブ投与前、投与 2 週間後の 2 ポイントで末梢血サンプルを採取し、インターフェロン関連遺伝子などに着目して発現低下パターンを解析する事によって、3 0 週後の有効、無効を予測できる可能性が示唆された。

d) カスタムマイクロアレイによるキメラ型抗 TNF α 抗体インフリキシマブの有効性予測に関する多施設共同研究

キメラ型抗 TNF モノクローナル抗体インフリキシマブ投与前および投与 2 週間後の末梢血サンプルを用い、カスタムマイクロアレイで網羅的遺伝子発現解析を行う臨床研究が開始された。これまでに班員、研究協力者が所属する 8 施設から計 1 3 3 例の登録が完了し、発現解析用のサンプルが収集された。今後、投与 3 0 週、5 4 週後の臨床効果、および投与 5 4 週後の関節破壊抑制効果を判定し、それと関連する遺伝子を明らかにする。

e) 高密度 DNA アレイを用いたインフリキシマブ投与前後の遺伝子発現パターンの変動

インフリキシマブ投与によって末梢血の遺伝子発現プロファイルがどのように変化するかを検討したところ、TNF の下流の遺伝子である NF κ B や TNF α induced protein family ではほとんど低下が認められなかったが、炎症・細胞接着・細胞増殖に関連した遺伝子群で有意な発現低下が認められた ($p < 0.01$)。なお、TNF のレセプターである TNF-R は 13 例中 12 例で発現が低下しており、このことは、TNF α による刺激をインフリキシマブ投与によって抑えることによって、TNF への応答性を低下させる可能性が示唆された。さらに我々

は、ACR50 以上の臨床的改善が認められた群 (6 例) と改善が認められなかった群 (4 例) について投与前の発現プロファイルに差がある遺伝子、投与後の発現量の変動に差がある遺伝子を Signal to noise 解析により抽出した。また、これらの遺伝子がどのような転写因子によって制御されているか、プロモーターの上流の配列から TRANSFAC を用いて予測を行った。

f) 早期リウマチ症例における遺伝子発現パターンに関する検討：早期 RA では、急性期反応性蛋白や赤血球系遺伝子、シグナル抑制因子などの遺伝子の発現が 2 倍以上に上昇していた。2 倍以上に減少していた遺伝子は、シグナル伝達に関与する分子、細胞接着に関与する分子、細胞内の vesicle transport に関する遺伝子、細胞周期に関する遺伝子等が多かった。これらはいずれも、他の臓器特異的自己免疫疾患でみられたものとは、著しく異なる遺伝子プロファイルであった。今後変形性関節炎等の関節疾患との比較が重要であると思われ、検討すべき課題である。

3) 候補遺伝子アプローチによる解析

a) アポトーシス関連：種々の kinase cascade は、RA の病態形成に必須である。滑膜線維芽細胞のアポトーシス感受性が kinase 活性化・不活性化により制御されることが明らかとなった、特に Akt はこれら細胞のアポトーシスの制御に重要で、Calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) は Akt の上位 kinase の可能性があり、CaMKII と滑膜線維芽細胞のアポトーシスについて検討した。

CIA マウス関節局所では PCNA 陽性細胞数は多いが TUNEL 陽性細胞数は少なく、ヒト RA 類似の病態が検出された。CIA マウス関節局所では、多くの細胞がリン酸化 Akt と CaMKII が陽性で、共焦点で merge 像が認められた。

ヒト培養滑膜線維芽細胞で検討したところ、培養滑膜線維芽細胞には、Akt と CaMKII の発現がみとめられた。滑膜線維芽細胞には Fas 依存性アポトーシスおよび TRAIL 依存性アポトーシスが誘導されたが、これらアポトーシスは CaMKII chemical inhibitor の KN93 により顕著に増大した。

以上、CIA と培養滑膜線維芽細胞を用いた検討から、CaMKII は Akt 活性化を制御し、滑膜増殖をコントロールしていることが考えられた。CaMKII は RA 治療の新たなターゲット分子の可能性があり、今後は RNAi や dominant negative transformants などを用いて、より詳細な機序の検討が必要と考えられる。

b) ケモカイン関連：破骨細胞活性化による骨破壊には、ケモカインによってリクルートされ破骨細胞に分化した末梢血単球も関与することが推測されている。そこで、本研究では破骨細胞へ分化する単球サブセットを同定し、そのケモカインに対する遊走能を解析した。CD16 陽性、CD16 陰性の各単球サブセットを M-CSF+RANKL または TNF- α で刺激し、分化した破骨細胞数を比較したところ、いずれの条件下でも CD16 陰性のサブセットから破骨細胞が有意に多く形成された。リン酸カルシウム付着プレート上で培養し、骨吸収能を解析すると、同様に CD16 陰性サブセットのみ骨吸収が認められた。破骨細胞分化への関連が報告されている RANK, TRAF6, TREM2, c-fos, c-fms, NFATc, SIRP1- β , DAP12, FcR γ の mRNA 発現を半定量 PCR 法にて比較したが、両サブセット間で明らかな差は認めなかった。

各単球サブセットを RANKL+M-CSF で刺激し、TNF- α , IL-6 の産生を ELISA にて測定した。CD16 陽性単球は CD16 陰性単球と比較して TNF- α , IL-6 とともにその産生能が高く、RANKL 刺激によりそれらの産生が亢進した。

また、各種ケモカインに対する遊走能を解析したところ、CD16 陰性単球は MCP-1、MIP-1 α に対して高い遊走能を示し、SDF-1、RANTES、FKN に対しても遊走能がみられた。一方、CD16 陽性サブセットは FKN に対してのみ遊走能を認めた。

RA 滑膜組織を CD68 および CD16 で二重染色したところ、一部の CD68 陽性マクロファージにおいて CD16 の発現がみられた。

c) サイトカインおよびその他の分子関連：

TNF α および tristetraprolin mRNA 量、血中抗 glucose-6-phosphate isomerase 抗体の有無によるインフリキシマブ治療反応性の予測に関し、検討を行った。関節リウマチ患者 20 例にインフリキシマブを使用した。30 週での ACR コアセットは、無効:6 例、20:3 例、50:1 例、70:3 例であった。有効例 3 例、無効 3 例で 0、2 週の臨床所見、TNF α と tristetraprolin (TTP) の mRNA 量を比較した。また全例で抗ヒト glucose-6-phosphate isomerase (GPI) 抗体を測定した。有効群は、腫脹関節数、関節点数(腫脹関節にグレーディングをし、加算したもの)、医師評価が高く、赤沈、IgG が低かった。2 週後、有効群では IgG が無効群よりも低値であり、有効群で腫脹関節数、関節点数、CRP、無効群で赤沈が改善していた。TTP、TNF α の mRNA 量に差はなかった。無効群 2 例で抗 GPI 抗体が陽性であった。関節腫脹が激しく CRP が低下しやすい抗 GPI 抗体陰性例で、インフリキシマブの反応性がよいと思われた。

D. E. 考察および、結論

抗リウマチ薬 (DMARD)、生物学的製剤の有効性、副作用効果予測に関し、基礎的、臨床的検討を行った。1) SNPs を用いた遺伝子多型解析、2) マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析、3) 候補遺伝子解析の 3 つの方法を用いた。

疾患感受性遺伝子を SNPs を用いて解析した結果から、我が国の関節リウマチで明らかにされた PADI4 遺伝子多型は、必ずしも白人では観察されない事から、我が国独自の多型データの蓄積が重要であることが示唆された。サラゾスルファピリジンの代謝酵素 NAT-1 の重症副作用と関連する多型が明らかとなったが、一方で、メトトレキサートの副作用と関連する MTHFR の多型には人種差が存在する事が示された。これら多型を用いた我が国独自の副作用予測の確立に向けて、さらなる臨床的検討が必要であろう。

候補遺伝子アプローチによってアポトーシス関連、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解析によって、有効性予測に関し貴重なデータが集積された。その中で、本研究班で開発に成功したカスタム 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ブの承認を受け、その投与を受けた 18 例の症例での経時的遺伝子発現パターンを解析し、臨床的有効例と関連する遺伝子群は投与 2 週間から 22 週間にかけて安定した発現抑制が見られたが、効果不十分例では、投与 6 週間以降、発現パターンが正常化した。これを受けて投与前、投与後 2 週間の 2 ポイントの末梢血サンプルを用いたカスタムマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行う多施設共同研究を開始した。現在まで、133 例の登録が完了し、現在臨床データを収集している段階にある。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と推測される。

F. 健康危険情報

特になし

G.研究発表（主任研究者分）

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 23:273-291,2004
2. Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, Kazuhiko Y, Kawai S, Takeuchi T, Hashimoto J, Azuma J, and Kishimoto T. Treatment of Rheumatoid Arthritis with humanized anti-IL-6 receptor monoclonal antibody: A multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. Arthritis & Rheum 50:1761-1769,2004
3. Mori T, Kameda H, Ogawa H, Iizuka A, Sekiguchi N, Takei H, Nagasawa H, Tokuhira M, Tanaka T, Saito Y, Amano K, Abe T, and Takeuchi T. Incidence of cytomegalovirus reactivation in patients with inflammatory connective tissue disease who are in immunosuppressive therapy. J Rheum 31:1349-1351,2004
4. Takeuchi T, Amano K, and Kameda H. Anti-TNF biological agents in rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases. Allergology Int. in press.
5. Kameda H, Amano K, Sekiguchi N, Takei H, Ogawa H, Nagasawa H, and Takeuchi T. Factors predicting response to a low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis: A better response in male patients. Mod Rheum in press.
6. Miyasaka N, Takeuchi T, and Eguchi K . Official Japanese guidelines for

the use of infliximab for Rheumatoid Arthritis. Mod Rheum. in press.

7. 竹内 勤：TNF 阻害療法による関節破壊抑制と破壊修復分子リウマチ 1(2):113-118,2005
8. 竹内 勤、天野宏一：TNF 阻害による関節リウマチの治療 日本臨床免疫学会会誌 27 (1)：7-15,2004
9. 竹内 勤：リウマチ性疾患 臨床薬理 35 (3)：165-166,2004.

2.学会発表

1. H. Kameda, T.Takeuchi et al. EXPRESSION OF ADAPTER PROTEINS in rheumatoid synovial fibroblast-like cells and their involvements in signaling from growth factor receptors 第5回欧州リウマチ学会議 (EULAR) 2004.6.8～13 ドイツ
2. N. Sekiguchi, T. Takeuchi et al. The Efficacy and safety of bucillamine, a D-penicillamine analogue, in patients with ACTIVE rheumatoid arthritis 第5回欧州リウマチ学会議 (EULAR) 2004.6.8～13 ドイツ
3. H. Kameda, T. Takeuchi et al. High-dose glucocorticoid-induced osteoporosis in patients with collagen diseases 第5回欧州リウマチ学会議 (EULAR) 2004.6.8～13 ドイツ
4. T. Takeuchi:Expression profile analysis by microarray to predict responders to anti TNF biologics in RA. 国際シンポジウム 第25回 炎症・再生学会 2004.7.14 京王プラザホテル 東京
5. T. Takeuchi: Expression profile analysis by microarray to predict responders to anti TNF biologics in RA. APLAR 2004. 2004.9.12 国際

コンベンションセンター 濟州島 韓国

6. T. Takeuchi: 日本とアメリカにおける最新の関節リウマチ治療 US & Japan round table discussion on treatment strategies 2004.10.20 San Antonio, USA
7. Tsuzaka K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Shiraishi K, Suzuki K, Abe T, Takeuchi T. DNA microarray gene expression profile of T cells with the splice variants of TCR ζ mRNA observed in SLE. American College of Rheumatology, 68th Annual Meeting, San Antonio, U.S.A., October, 2004
8. Kameda H, Ishigami H, Abe T, Takeuchi T. Blockade of signaling from growth factor receptors by STI571 inhibits both anchorage-dependent and -independent growth of rheumatoid synovial fibroblast-like cells. The 68th Annual Meeting of American College of Rheumatology, San Antonio, TX, USA. Oct 16-21, 2004.
9. T. Takeuchi: Biologics in Japanese RA patients: Background, PMS, and gene expression profiling. Clinical Immunology Society, spring school. 2005.3.2-6, Santa-Fe, New Mexico USA
10. 生物学的製剤による治療 教育講演 日本リウマチ学会 2004.4.16 ホテルグランヴィア岡山 岡山
11. 抗 TNF 製剤を用いた分子標的治療 シンポジウム 日本リウマチ学会 2004.4.16 ホテルグランヴィア岡山 岡山
12. RA における TNF 阻害療法の現状と将来展望 第 28 回九州リウマチ学会 イブニングセミナー 2004.9.14 ルネ

ッサンスホテル創世 福岡

13. リウマチ治療における生物学的製剤の国内外の最新情報 第 103 回中部日本整形外科災害外科学会 ノーンタイムレクチャー 2004.11.5 神戸国際会議場 兵庫
14. RA における TNF 阻害療法の光と影 第 19 回日本臨床リウマチ学会 ランチオンセミナー 2004.11.27 京王プラザホテル 東京
15. RA の最新治療 第 15 回日本リウマチ学会関東支部学術集会 特別講演 2004.12.4 大手町サンケイプラザホール 東京
16. リウマチ・アレルギー疾患の治療反応予測因子の確立および、テーラーメイド治療法の確立に関する研究(総括) 厚生労働省班研究 平成 16 年度 3 班合同発表会 2004.12.16 東京ガーデンパレス 東京
17. 関節リウマチにおけるテーラーメイド治療の構築に向けて 平成 16 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・治療研究事業リウマチ研究班合同公開シンポジウム 2005.2.8 都市センターホール 東京
18. 生物学的製剤による新しいリウマチ治療 「市民公開シンポジウム」ーリウマチ治療はここまで進んでいるー 2004.4.11 津田ホール 東京

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

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

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 ゲノムサイエンス分野 教授

研究要旨

関節リウマチ（RA）患者末梢血の発現プロファイルをおこない、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的とする。Infliximab 投与を行った RA 患者末梢血のマイクロアレイによる発現プロファイル解析を行い、いくつかの炎症・細胞接着・細胞増殖に関連した遺伝子群の発現低下が認められた。また、薬剤有効例と無効例との比較により、様々な治療反応性規定因子候補および関与する転写因子が得られた。

A.研究目的

本研究は RA 患者末梢血の発現プロファイルから臨床的パラメータと相関が高い遺伝子群を抽出し、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的とする。

B.研究方法

TNF α に対する抗体製剤である Infliximab 投与による血球細胞 RNA における発現プロファイル変化の解析を行った。解析に用いた症例は MTX 投与が無効と考えられ Infliximab 投与が適切であると判断された慢性関節リウマチ患者 13 症例である。薬剤投与前および投与 2 週間後に採取した全血から PAXgene (QIAGEN 社) を用いて total RNA を抽出した。

オリゴ DNA マイクロアレイの解析には CodeLink Human 20K アレイ (GE 社) を用いておよそ 2 万遺伝子の発現プロファイル解析を行った。

Infliximab 投与前、投与後による 2 群間検定を行った。投与前、投与後の比 (post/pre ratio) をとり、ratio の値でソートして、投与後で発現量が上がっている遺伝子、発現量が下がっている遺伝子群を抽出した。さらに ACR50 以上の臨床的改善が認められた群 (6

例) と改善が認められなかった群 (4 例) について投与前の発現プロファイルに差がある遺伝子、投与後の発現量の変動に差がある遺伝子を Signal to noise 解析により抽出した。

これらの遺伝子群がどのような機能分類に含まれるかについて Gene Ontology (GO) 分類に基づいて解析を行った。GO 分類との関連については Wayne State 大学が開発した解析ツールである Onto-express を用いて行った。本ツールはマイクロアレイ解析によって選択された遺伝子群を GO 分類ごとに、マイクロアレイ上のすべての遺伝子中から出現する確率を超幾何分布により計算している。さらにどのような転写因子によって制御されているか、プロモーターを含むと思われる転写開始点周辺の配列から TRANSFAC を用いて予測を行った。

(倫理面への配慮)

血液試料の採取はそれぞれの医療機関の倫理委員会の承認の下に施行されている。なお、本研究は個人のゲノタイプを解析する研究は含まない。

C.研究結果および D.考察

Infliximab 投与前後による発現プロファイ

ルを比較したところ、TNFの下流の遺伝子であるNFkBやTNF α induced protein familyではほとんど低下が認められなかった。13例中12例以上に発現変動が認められた200遺伝子についてOnto-expressを用いた解析を行ったところ、chemotaxis (p値0.02)をはじめとして炎症・細胞接着・細胞増殖に関連した遺伝子群で有意な発現低下が認められた(p<0.05)。なお、TNFのレセプターであるTNF-Rは13例中12例で発現が低下しており、このことは、TNF α による刺激をInfliximab投与によって抑えることによりTNFへの応答性を低下させる可能性が示唆された。

教師無しの解析法である階層的クラスタリングでは、有効群と無効群を明瞭に識別することは出来なかった(図1)。治療著効例、無効例で有意な差がある遺伝子群を見出した。投与前の比較では、遺伝子多型がリウマチ感受性に関連があると報告されているFCGR2Bや、血中のIgG濃度と多型が報告されているPHF11などが、有効例で発現量が高かった。また、無効例では、リウマチの薬剤有効性に関連があると報告がある細胞接着因子のE-Selectinなどが高発現していた。

TRANSFACによる転写因子結合配列の解析では、薬剤投与前に発現量に差がある300遺伝子の上流に結合する可能性がある転写因子を検索したところ、著効例では、インターフェロン関連遺伝子の転写因子であるIRFファミリー、IFN-stimulated response element (ISRE)などが有意に選択された。

E.結論

マイクロアレイによるRA患者末梢血の発現プロファイル解析を行い、Infliximab投与により、いくつかの炎症・細胞接着・細胞増殖に関連した遺伝子群の発現低下が認められた。また、薬剤有効例と無効例との比較により、様々な治療反応性規定因子候補および関与する転写因子が得られた。さらに症例数を増やすことによるデータの検証が必要である。

F.健康危険情報
なし

G.研究発表

1.論文発表

- 1) Komura D, Nakamura H, Tsutsumi S, Aburatani H, Ihara S. Multidimensional support vector machines for visualization of gene expression data. *Bioinformatics*. 21(4):439-44. 2005
- 2) Kohro T, Tanaka T, Murakami T, Wada Y, Aburatani H, Hamakubo T, Kodama T. A Comparison of Differences in the Gene Expression Profiles of Phorbol 12-myristate 13-acetate Differentiated THP-1 Cells and Human Monocyte-derived Macrophage. *J Atheroscler Thromb*. 11(2): 88-97. 2004

2.学会発表

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

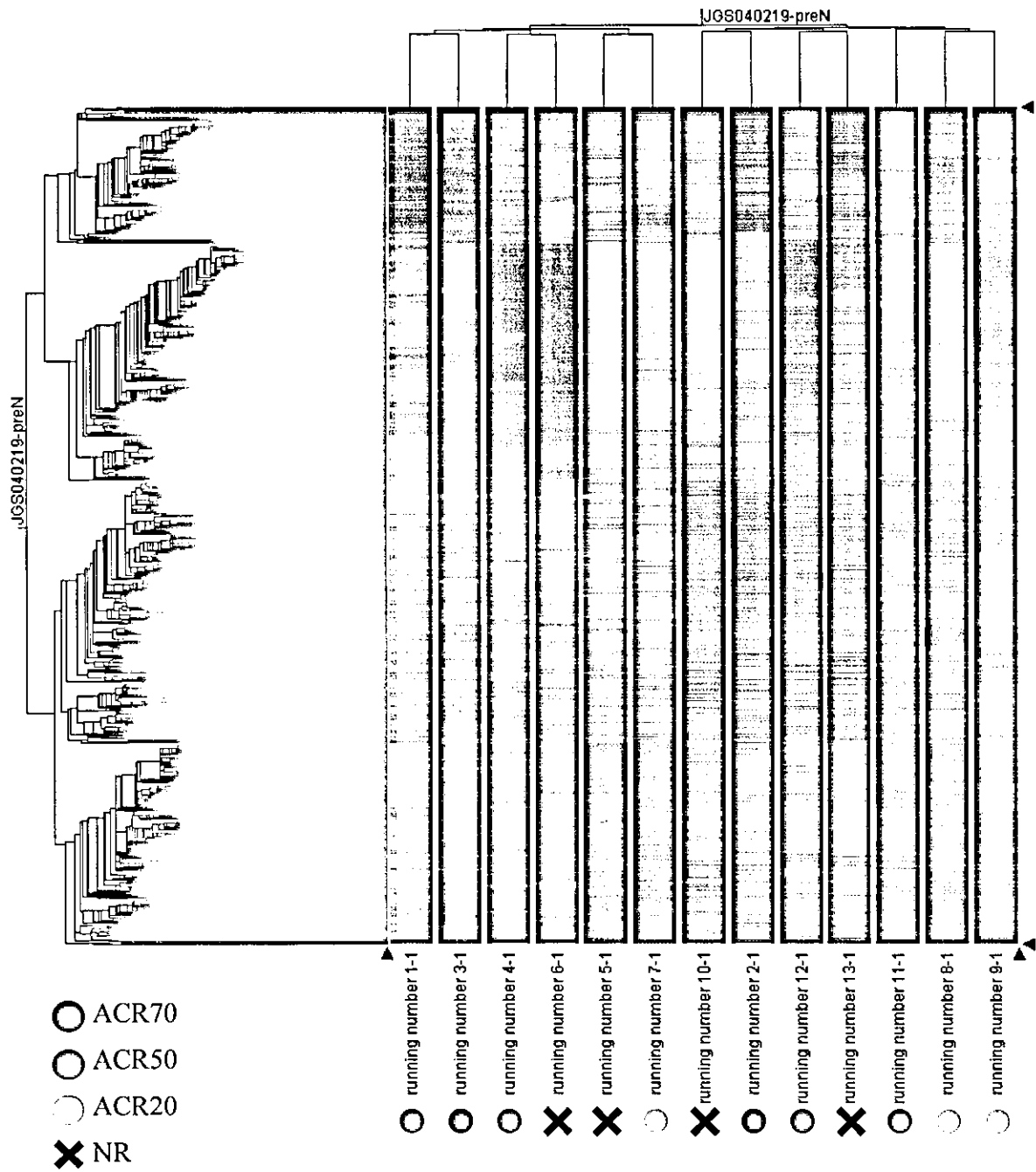
2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

図1. Infliximab 投与前の発現プロファイルのクラスタ解析



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

関節リウマチ関連遺伝子の民族差と日本人での検証

分担研究者 山本 一彦 東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 教授

研究要旨

関節リウマチ関連遺伝子として欧米から発表された遺伝子・ハプロタイプ、および我々が報告した遺伝子について、民族差があるか否かを検討した結果、欧米人での変異が日本人では全く存在しない場合や、わが国では複数の研究で関連が確認された遺伝子多型が欧米人には有意でないなどの例がかなりあることが判明した。今後、疾患の病型分類、治療反応予測、テーラーメイド医療などを推進するためには、わが国独自の遺伝子多型情報の蓄積が重要であることが示された。

A.研究目的

関節リウマチは多因子疾患であり、遺伝要因が発症および病態の進展に大きく寄与している。今後、疾患の病型、治療反応性予測、テーラーメイド医療の実現などに疾患関連遺伝子多型の情報を多く集め、それらの関連を検討することが重要となる。遺伝要因ではHLA領域の寄与度が大きく、shared epitope仮説が提唱されているが、本当のメカニズムはまだよく分かっていない。非HLA領域の遺伝要因の検索には種々の方法があるが、まだどのような方法論が最も効率的であるかの定見はない。しかしこのような現状でも少しずつ国内外からRA関連遺伝子の同定が報告されている。本研究では海外からRA関連遺伝子として報告された遺伝子多型の日本人での検証と我々が独自に発表した遺伝子多型についての海外からの報告との比較を行い、我が国での有用性を検討した。

B.研究方法

インフォームドコンセントを得て採取したRA患者および健常人DNAを用い、インベーター法ないしタックマン法を用いて1塩基多型(SNP)を検討した。

(倫理面への配慮)

ゲノムの解析には倫理委員会の承諾を得ており、問題はないと判断される。

C.研究結果

欧米人でRAに関連すると報告されたPDCD1、PTPN22さらにSLC22A4とSLC22A5の完全連鎖ハプロタイプの変異は日本人では全く存在しないことが判明した。これらの遺伝子は欧米ではRAのみでなく複数の自己免疫疾患について関連が認められているものであるが、例えばPDCD1やPTPN22では、同じ欧州からの報告でも変異の頻度に大きな差があることが明らかになっている。一方、我々が発表したPADI4については欧州でのSNPとハプロタイプ頻度はほぼ同じであったが、イギリス人ではPADI4のRA感受性ハプロタイプはRAでやや多い傾向であったが有意ではないとの報告が本年なされた。しかし、我が国では我々とは独立してPADI4の関連を支持する報告があり、さらに韓国でも確認されている。

D.考察

これらのデータの民族間および報告でのば

らつきに関して、幾つかの可能性が考えられる。まずはケースとコントロールの集団の階層化の違い、統計学的な不十分さ、疾患の不均一さ、パブリケーション・バイアスなどである。同一母集団での結果の相違は主としてこれらによると思われる。しかし、ほぼ確立されている RA と HLA-DR の shared epitope ですら、例えば African-American やヒスパニックの RA 患者ではこのような関連を検出出来ていないことから、民族や集団のおそらく背景因子の違いによる疾患感受性遺伝子の検出の差異は、考えていたより大きい可能性がある。一例を挙げると、T 細胞上に発現する分子である TIM-1 (T-cell immunoglobulin domain and mucin domain-1) はアトピーとの関連が見いだされている。TIM-1 は Th2 細胞への分化に伴って発現すること、A 型肝炎ウイルス (HAV) の細胞上のレセプターであることが既に判明している。最近 TIM-1 の遺伝子多型 (6 アミノ酸挿入変異) がアトピーに対して抑制的関連を示すのは、HAV の既感染集団でのみ (P=0.0005) であることが判明した。これは TIM-1 と HAV の関係を考えれば理解出来るものであるが、このように因果関係がはっきりしない場合には、得られたデータがある集団または民族に偏った場合の解釈は難しい。また、異民族間である遺伝子の寄与度や寄与パターンが同一だとしても、それをもたらす遺伝子多型が必ずしも一致している必要はないことも、単純な追試が民族を越えて成功しない理由となり得るとと思われる。

E. 結論

今後 RA の病型、治療反応性予測、テイラーメイド医療の実現を推定する上での遺伝子多型について、欧米のデータを参照しながらも我が国独自の多型データの蓄積が重要であることが判明した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Chang X, Yamada R, Suzuki A, Sawada T, Yoshino S, Tokuhito S, Yamamoto K. Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2004. in press.
2. Zhou G, Fujio K, Sadakata A, Okamoto A, Yu R, Yamamoto K. Identification of systemically expanded activated T cell clones in MRL/lpr and NZB/W F1 lupus model mice. *Clin Exp Immunol*. 136:448-455, 2004.
3. Chamoto K, Tsuji T, Funamoto H, Kosaka A, Matsuzaki J, Sato T, Abe H, Fujio K, Yamamoto K, Kitamura T, Takeshima T, Togashi Y, Nishimura T. Potentiation of tumor eradication by adoptive immunotherapy with t-cell receptor gene-transduced T-helper type 1 cells. *Cancer Res*. 64:386-390, 2004.
4. Sato K, Sato U, Tateishi S, Kubo K, Horikawa R, Mimura T, Yamamoto K, Kanda H. Aire downregulates multiple molecules that have contradicting immune-enhancing and immune-suppressive functions. *Biochem Biophys Res Commun*. 318:935-940, 2004.
4. Iikura M, Ebisawa M, Yamaguchi M, Tachimoto H, Ohta K, Yamamoto K, Hirai K. Transendothelial migration of human basophils. *J Immunol*. 173:5189-5195, 2004.
5. Fujio K, Okamoto A, Tahara H, Abe M, Jiang Y, Kitamura T, Hirose S, Yamamoto K. Nucleosome-specific regulatory T cells engineered by triple gene transfer suppress a systemic autoimmune disease. *J Immunol*. 173:2118-2125, 2004.
6. Yamada R, Tokuhito S, Chang X, Yamamoto K. SLC22A4 and RUNX1: identification of RA susceptible genes. *J Mol Med*. 82:558-564, 2004.
7. Zhang D, Fujio K, Jiang Y, Zhao J, Tada N, Sudo K, Tsurui H, Nakamura K, Yamamoto K, Nishimura H, Shirai T, Hirose S. Dissection of the role of MHC class II A and E genes in autoimmune susceptibility in murine lupus models with intragenic recombination. *PNAS*. 101:13838-13843, 2004.
8. Setoguchi K, Misaki Y, Kawahata K, Shimada