

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

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 竹内 勤

平成 19 (2007) 年 3 月

目 次

I. 構成員名簿	3
II. 総括研究報告書	
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	5
III. 分担研究報告書	
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	15
2. 関節リウマチ疾患関連遺伝子の民族差 山本 一彦	19
3. Methotrexate の薬理ゲノム学的研究－ <i>MTHFR</i> 以外の遺伝子を中心に 谷口 敦夫	21
4. ホスファチジルイノシトール3キナーゼ阻害による 関節炎制御に関する研究 田村 直人	24
5. インフリキシマブ使用関節リウマチ患者における 手足X線所見の変化に関する研究 伊藤 聡	27
6. 蛋白シトルリン化機序の解析に関する研究 川上 純	31
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	35
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	39
V. 合同研究発表会プログラム	49

I. 構 成 員 名 簿

平成 18 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・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 リウマチ・膠原病内科	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
	田村 直人	順天堂大学医学部 膠原病内科	講 師
	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
	南木 敏宏	東京医科歯科大学 膠原病・リウマチ内科学	助 手
	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
研究協力者	渥美 達也	北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座・第二内科	講 師
	藤井 隆夫	京都大学大学院医学研究科臨床免疫学	講 師
	斉藤 和義	産業医科大学医学部第一内科学講座	助教授

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

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リウマチ・膠原病内科 教授

研究要旨

関節リウマチ（RA）に用いられる抗リウマチ薬や生物学的製剤の有効性・副作用を予測する因子を明らかにする事を目的とした。腫瘍壊死因子 Tumor Necrosis Factor（TNF）を標的とした生物学的製剤は、関節破壊進行の早い予後不良例に積極的に、効果のある薬剤を導入し、その副作用を最小限にとどめる治療戦略が求められている。本年度は、2005 年承認された生物学的製剤エタネルセプトの使用ガイドラインを作成した。また、予後不良因子の一つ抗 CCP 抗体と関連する PADI4 および FCRL3 遺伝子型についてその民族差を検証すると共に、MTX の有効性、副作用と関連する遺伝子多型、SASP の副作用と関連する遺伝子多型を明らかにした。一方、TNF 阻害剤の有効性を予測するための網羅的遺伝子発現解析が進められ、班で開発した低密度カスタムマイクロアレイを用い、インフリキシマブ投与前に有効例を 80% の正確性で診断するアルゴリズムを構築した。

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
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

田村直人

順天堂大学医学部膠原病内科 講師

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

研究協力者

渥美 達也

北海道大学大学院医学研究科病態内科学
講座・

第二内科

藤井隆夫

京都大学大学院医学研究科臨床免疫学

斉藤 和義

産業医科大学医学部第一内科学講座

A. 研究目的：関節リウマチ（Rheumatoid Arthritis: RA）の治療は、抗リウマチ薬による積極的な治療によって大きな進歩を遂げた。アンカードラッグであるメトトレキサート（MTX）ならびに炎症性サイトカインを標的とした生物学的製剤の導入によって、臨床的寛解、関節破壊の阻止等、従来考えられなかった画期的効果が得られている。わが国におい

ても 99 年の MTX に続いて、03 年キメラ型モノクローナル抗体インフリキシマブ、05 年には TNFR2-Ig 融合蛋白エタネルセプトと、2 剤の生物学的製剤が承認され、治療抵抗性の RA 治療に使用可能となった。しかし、生物学的製剤の効果は、患者満足度を反映する ACR50% を指標とした場合、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、抗リウマチ薬や生物学的製剤を効率よく、必要な症例に投与するテーラーメイド医療を構築することを目的として以下の検討を行う。

B. 結果：

臨床的有効性に関する検討

1) 3 大学共同臨床研究 (RECONFIRM 研究) : 03 年に我が国で承認された初めての生物学的製剤インフリキシマブの有効性と関連する因子を明らかにするため、最も投与例数が多かった、産業医科大学、東京女子医科大学、埼玉医大総合医療センターの 3 施設で、投与 22 週までの情報が集積された 258 例について多変量解析を施行した。インフリキシマブ投与前、90.3% が高活動性であったが、投与 22 週後には、84.5% が中等度反応以上の有効性を示した。一方、good response は 38% に、寛解は 27.9% に達成された。Good responder と関連する臨床パラメーターとして、CRP 低値、腫脹関節少数、PSL 少量、男性、リウマトイド因子陰性との関連が明らかにされた。前 3 者の odds ratio は 0.87-0.96 であったが、男性、リウマトイド因子陰性は、それぞれ 0.41, 0.46 であった。この成績は、以前から報告されてきた予後良好因子としての男性、リウマトイド因子陰性と一致する成績で、これらの因子は他の抗リウマチ薬においても確認されている。インフリキシマブの効果が高い精度で予測する臨床パラメーターは、残念ながら見いだ

されない事を示唆する。(竹内班長)

2) インフリキシマブの関節破壊予防効果と、臨床的効果の関連：インフリキシマブを使用し、54 週を経過した 21 例 (男性 9 例、女性 12 例) の関節リウマチ患者の、手、足の X 線を評価し、骨破壊の進行について放射線科医の診断を基に検討した。手足関節に関しては、インフリキシマブの骨破壊の振興阻止が確認された。ACR 改善率と骨破壊の進行には明確な関係が認められない可能性が示唆された。大関節 (荷重関節) の破壊抑制に関しては、今後の検討が必要である。(伊藤班員)

臨床検査システムの開発

1) in vitro TNF 産生：リポポリサッカライド (LPS) 添加チューブを用いた in vitro TNF 産生システムのインフリキシマブ予測有効性に関する検討をおこなった。この検査システムは、積水化学工業が開発した検査キット SEK-5001 で、2ml の末梢血をそのまま LPS 添加真空チューブに採血し、そのまま採血チューブを 4 時間培養し、その上清中の TNF を ELISA で測定するシステムである。埼玉医大総合医療センターにおいて、インフリキシマブが投与され、30 週の観察が行なわれた 53 例において、このキットを用いて検討を行った。In vitro TNF 産生能と投与前 CRP 値を組み合わせる事によって、EULAR 反応の good responder を、感度 65%、特異度 86%、診断正確度 79% で予測できる事が明らかとなった。今後、症例数を増やし、疾患コントロールにおいて、多施設で検証して行く必要がある。(竹内班長)

候補分子解析

2) ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) : ホスファチジルイノシトール 3 (PI3) キナーゼは細胞の増殖やアポトーシスに関与する酵素であり、関節リウマチ滑膜組織でも活性化していることが報

告されている。そこで、抗リウマチ薬の標的としての PI3K の役割について検討した。PI3 キナーゼ阻害薬 (ZSTK474) はマウス膠原病誘発性関節炎を用量依存的に抑制した。病理学的解析によって炎症細胞浸潤、滑膜増殖および軟骨・骨破壊の抑制も確認され、その作用は、T 細胞、B 細胞、破骨細胞を介している事が *in vitro* 実験系で確認された。抗リウマチ薬有効性が、PI3K によって規定される可能性について追求する必要がある。

(田村班員)

- 3) CD16: ヒト末梢血単球は CD16 の発現の有無により 2 つのサブセットに分けられ、サイトカイン産生能やケモカインによる遊走能に差異があることが報告されている。昨年度までの本研究で、CD16 陰性単球には、破骨細胞への分化能があることを明らかにした。本年度、CD16 陽性、陰性単球の破骨細胞への分化能の差異についてより詳細な検討を進めた。その結果、単球各サブセットの M-CSF および RANKL に対する反応性の相違は、破骨細胞分化に重要な役割を担う ERK、p38 の活性化の差異による可能性が示唆された。また、インテグリン β 3 のノックダウンにより、CD16-単球からの破骨細胞分化が阻害された。インテグリン β 3 は単球・破骨細胞においては α v とのみ結合し、 α v β 3 ヘテロダイマーとして発現する。したがって、 α v β 3 は CD16 陰性単球が破骨細胞へ分化するために必要な分子であると考えられる。抗リウマチ薬の作用が、上記分子を介して発現され、それが有効性と関連しているか否か検討を進める必要がある。

(川上班員)

候補遺伝子解析

- 1) 抗リウマチ薬の有効性・副作用予測に関する多型解析: MTX の効果・副作用予測に関し、昨年度までその代謝主要酵素である MTHFR 多型との関連を明らかにした。本年度はさらに、MTHFR 以外の代謝酵素

の遺伝子多型と MTX の効果・副作用との関連について検討した。その結果、serine hydroxymethyltransferase (SHMT) 遺伝子多型と有効性との関連が明らかになった。一方、副作用に関しては、10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase (FTD) 遺伝子、thymidylate synthase (TYMS) 遺伝子多型と副作用発現頻度に有意の関連を認められた。副作用を肝機能異常のみに限ると reduced folate carrier (RFC) 遺伝子にも弱い関連が存在する事が明らかとなった。(谷口班員)

- 2) 疾患感受性遺伝子関連: *PADI4* の機能的ハプロタイプに関しては、抗シトルリン化フィラグリン抗体の陽性率は、RA 感受性ハプロタイプ (haplotype2) をホモに持つ患者群では 87%の陽性率であったが、それ以外の群では 50%で、有意な関連がみられた。一方、Fc 受容体類似分子 FCRL3 のプロモーターに存在する機能的遺伝子多型 (-169C/T) とリウマトイド因子抗体価が相関することが明らかとなった。DMARD 薬物代謝酵素関連: 1) MTX 週 6mg 以下で開始され、12 ヶ月後の MTX 投与量が週 6mg を超えていた high dose group、6mg 以下であった症例 low dose group の *MTHFR* 遺伝子 A1298C 多型を比較したところ、AA あるいは AC を持つ症例は有意に high dose group に多く ($P=0.008$, $RR=1.84$, $95\%CI 1.12-3.01$)、gene dose effect が認められた。MTX の副作用が生じた症例で C677T 多型の CT あるいは TT を有する症例群は CC を有する症例群に比し副作用が生じた症例が有意に多かった。3) SSZ の副作用は Slow acetylator と関連する MM ディプロタイプ形を有する症例群が、rapid acetylator と関連する WW あるいは WM ディプロタイプ形を有する症例群に比べ有意に多かった。

網羅的遺伝子発現解析

- 1) SNPs による遺伝子多型解析: 白人で報告

されている RA 関連遺伝子多型頻度について多数の日本人の患者・健常人検体を用いて検討した。PTPN22 および PDCD-1 については、当該疾患関連 SNP が日本人には存在しなかった。また、CTLA4, MHC2TA, TNF, TNFR2 については関連が認められなかった。それぞれの疾患関連遺伝子多型が民族により異なる場合、その遺伝子が民族特有の要因である可能性と当該遺伝子は疾患の成立に関与しているが、遺伝子多型に有意差が検出されない場合があり得る。例えば、アフリカ系米国人では HLA-DR の shared epitope 仮説が追認されないが、これはこの民族の RA には HLA-DR 遺伝子が関与していないことを示すものではない。遺伝学的解析と病態生理学的解析を融合して判断する必要がある。RA のように浸透率が低く複数の遺伝子座が発症に関与する可能性が考えられている疾患においては、さらなる疾患関連遺伝子同定のために日本人検体の確保、SNP データベースの充実などが急務と考える。(山本班員)

- 2) 低密度カスタム DNA マイクロアレイを用いた解析：インフリキシマブ投与18例を用いた発現変動のパイロット解析：埼玉医科大学総合医療センターリウマチ・膠原病内科の18症例を対象に、末梢血から直接 PAXgene チューブで RNA を採取し、増幅した。このサンプルを用いて、カスタム DNA マイクロアレイで解析し、投与0週～22週の発現変動を解析した。CRP は全ての症例で投与2週目に有意の低下を示し、これと平行して炎症関連遺伝子群が投与2週目に低下した。しかし、14週目には、CRP は有効例では低値を持続、一方無効例では上昇する傾向を示した。14週目の有効性と関連した遺伝子群は、インターフェロン関連遺伝子群、clarthrin adaptor complex などの膜リセプターリサイクリングに関わる分子で、有望な遺伝子9遺伝子からなるアルゴリ

ズムを構築したところ、投与前と投与後の2サンプル比較で、90%以上の正確性で有効例を予測する事が可能となった。これを用いて投与前1ポイントでの有効性の予測を試みたところ、正確性80%で予測可能であった。多施設からの追加サンプルを用いてこれを検証する必要がある。(竹内班長)

- 3) 高密度 DNA マイクロアレイ (Code Link) を用いた解析：Infliximab 投与が行われた RA 登録症例 135 例より、投与前および投与2週間後に採血を行い、末梢血球より total RNA を抽出した。このサンプルを対象として CodeLink Human Whole Genome 55K アレイを用いて発現解析を行った。早期の治療効果関連遺伝子の抽出のために 14 週時の ACR0 (16 例) と ACR70 (18 例) の2群間での比較を行った。さらに治療効果の持続性を検討する目的で、14 週時に ACR50-70 であった反応性良好群 (47 例) について 30 週時に ACR0 となった増悪例 10 例と ACR70 となった改善持続例 12 例の2群について比較した。その結果、ACR70 群で高発現する遺伝子 87 プローブ、低発現遺伝子 177 プローブが得られた。また、30 週時での改善持続例に高発現する遺伝子には 14 プローブ、低発現遺伝子は 9 プローブであった。(油谷班員)

C. 考察および結論：関節リウマチの治療法の進歩は目覚ましいものがあるが、その有効性、安全性のプロファイルから、個々の症例に適した治療法を構築する必要性が叫ばれている。これを実現させるためには、薬剤の有効性、安全性を予測することが必須である。抗リウマチ薬に関しては、MTX の有効性、副作用と関連する遺伝子多型、SASP の副作用と関連する遺伝子多型が明らかとなった。一方、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

抗体アダリムマブ、TNFR2-IgGfc 融合蛋白エタネルセプトの3剤であるが、関節破壊進行の早い予後不良例に積極的に、効果のある薬剤を導入し、その副作用を最小限にとどめる治療戦略が求められている。本研究班も加わって作成したガイドラインに基づいてインフリキシマブが投与された症例の治療反応性を、臨床パラメーターから予測可能か検証したところ、予後因子と関連する性、リウマトイド因子のみが有望で、インフリキシマブに特異性の高い有効性予測因子を、臨床パラメーターから見いだす事は困難であった。一方、in vitro TNF 産生システムの検討、網羅的遺伝子発現解析が進められ、班で開発した低密度カスタムマイクロアレイならびに高密度マイクロアレイの2つの方法で、有望な結果が報告された。これらの情報を集約して、実際の臨床現場に効率よく適用する方法を検討していく必要がある。それによって個々の症例に最適な治療方針を提示する事が可能となる。

D. 健康危険情報

特に無し

E. 研究発表

1. 論文発表

1. 竹内 勤、伊藤 哲：マイクロアレイ解析の現状とその将来に期待される展開
炎症と免疫 14(2):40-42,2006
2. 竹内 勤：関節リウマチ治療の実際と新たな展開
Medical Practice 23(4): 559-566,2006
1. Tsuzaka K, Nozaki K, Kumazawa C, Shiraishi K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, and Takeuchi T. DNA microarray gene expression profile of T cells with splice variants of TCRz mRNA observed in SLE. *J Immunol* 176:949-56, 2006.
2. Abe T, Takeuchi T, Miyasaka N, et al. A multi-center, double-blind, placebo-controlled trial of infliximab combined with low dose methotrexate in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *J Rheum* 33:37-44, 2006.
3. Miyasaka M, Takeuchi T, and Eguchi K. Guidelines for the proper use of etanercept in Japan. *Mod Rheum* 16:63-7, 2006.
4. Kameda H, Ishigami H, Suzuki M, Abe T, and Takeuchi T. Imatinib mesylate inhibits proliferation of rheumatoid synovial fibroblast-like cells and phosphorylation of Gab adaptor proteins activated by platelet-derived growth factor. *Clin Exp Immunol* 144: 335-41, 2006.
5. Sekiguchi N, Kameda H, Amano K, and Takeuchi T. Efficacy and safety of busillamine, a D-Penicillamine analogue, in patients with active Rheumatoid Arthritis. *Mod Rheum* 16:85-91, 2006.
6. Yoshimoto K, Takahashi Y, Ogasawara M, Setoyama Y, Suzuki K, Tsuzaka K, Abe T, and Takeuchi T. Aberrant expression of BAFF in T cells of systemic lupus erythematosus, which is recapitulated by a human T cell line, Loucy. *Int Immunol* 18: 1189-96, 2006.
7. Takeuchi T, Amano K, and Kameda H. Impact of TNF inhibitors on Rheumatoid Arthritis. *Inflammation & Regeneration* 26: 148-159, 2006.
8. Kameda H, and Takeuchi T. Recent advances in the treatment of interstitial lung disease in patients with polymyositis/dermatomyositis. *Endocrine, metabolic & Immune disorders-Drug Targets*. In press, 2006.
9. Kameda H, Sekiguchi N, Nagasawa H, Amano K, Takei H, Suzuki K, Nishi E,

- Ogawa H, and Takeuchi T. Development and validation of handy rheumatoid activity score with 38 joints (HRAS38) in rheumatoid arthritis patients receiving infliximab. *Mod Rheum* 16:381-388, 2006.
10. Tsuzaka K, Nozaki K, Kumazawa C, Shiraishi K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Abe T, and Takeuchi T. TCRz mRNA splice variant forms observed in peripheral blood T cells from systemic lupus erythematosus patients. *Springer Seminars in Immunopathology* 28:185-93, 2006.
 11. Kameda H, Okuyama A, Tamaru J, Itoyama S, Iizuka A, and Takeuchi T. Lymphomatoid granulomatosis and diffuse alveolar damage associated with methotrexate in a patient with rheumatoid arthritis. *Clin Rheum* in press.
 12. Yamanaka H, Tanaka Y, Sekiguchi N, Inoue E, Saitao K, Kameda H, Iikuni N, Nawata M, Amano K, Shinozaki M, and Takeuchi T. Retrospective clinical study on the notable efficacy and related factors of infliximab therapy in rheumatoid arthritis management group in Japan (RECONFIRM) *Mod Rheum* 17:28-32, 2007.
 13. Ogawa H, Kameda H, Nagasawa H, Sekiguchi N, Takei H, Tsuzaka K, Amano K, and Takeuchi T. Prospective study of low dose cyclosporine A in patients with refractory lupus nephritis. *Mod Rheum* in press.
2. 学会発表.
1. Post-marketing Surveillance of Infliximab in Japanese Patients with Rheumatoid Arthritis -Five Thousand Patients- 第15回国際シンポジウム 長崎 2006.4.24
 2. 4.Lessons we learn from Japanese anticytokine treatment. DUTCH/JAPANESE RHEMATOLOGY WORKSHOP TOKYO, JAPAN 2006.6.9
 3. 関節リウマチに対する TNF 阻害療法 第103 回日本内科学会 シンポジウム 横浜 2006.4.16
 4. 生物学的製剤の最近の知見 第50 回日本リウマチ学会総会 アニュアルコースレクチャー 長崎 2006.4.23
 5. Post-marketing Surveillance of Infliximab in Japanese Patients with Rheumatoid Arthritis -Five Thousand Patients- 第15 回国際シンポジウム 長崎 2006.4.24
 6. 膠原病治療における生物学的製剤－光と影－ 第18 回日本アレルギー学会春季臨床大会 招請講演 東京 2006.5.30
 7. TNF 阻害薬による関節リウマチの関節破壊抑止 第24 回日本骨代謝学会 シンポジウム3「免疫と骨代謝の接点：基礎から臨床へ」 東京 2006.7.8
 8. 関節リウマチ ワークショップ「生物学的製剤による炎症制御の現状と展望」 第27 回日本炎症・再生医学会 東京 2006.7.11
 9. ヒト型 TNF 抗体のリウマチに対する現状 ワークショップ「難治性膠原病疾患の治療の進歩」 第27 回日本炎症・再生医学会 東京 2006.7.12
 10. RA における生物学的製剤の新展開 第34 回日本臨床免疫学会 イブニングセミナー 東京 2006.10.2
 11. 早期リウマチの治療指針 第21 回日本臨床リウマチ学会 シンポジウム「早期多発関節炎をどう診療するか」 東京

2006.11.21

F. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

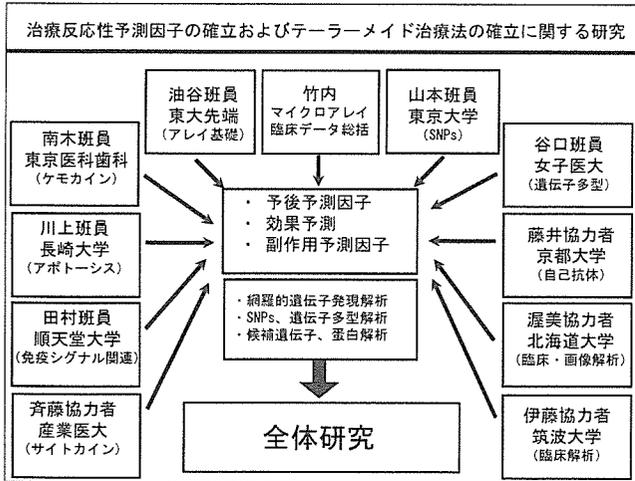
1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他



従来型DMARDの効果予測

1) 臨床パラメーター：効果予測

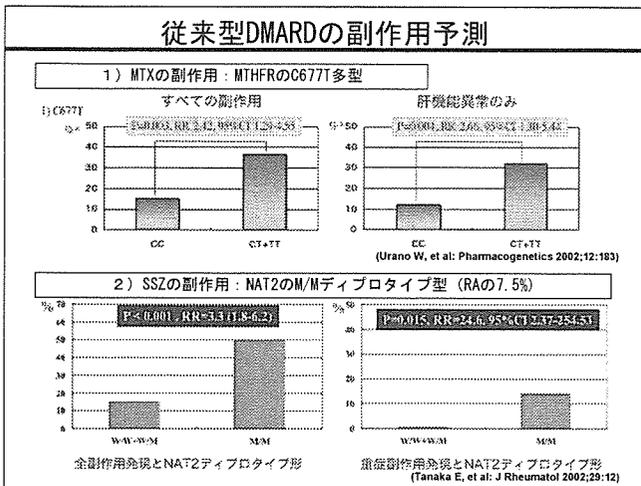
- MTX反応性: 男性 > 女性 (Kameda *Mod Rheum* 14:442, 04')
- BUC反応性: 高齢発症 (Sekuguchi *Mod Rheum* 16:85, 06')

2) ゲノム解析：効果予測

- MTX反応性: MTHFRのA1289C 多型のCアレルが有効性と関連 (Urano W. et al: *Pharmacogenetics* 2002;12:183)

384例のRA患者を無作為に選択し、retrospective pharmacogenetic studyを施行
有効性: MTX6mg/週以下で開始し、投与開始1年後の増量の有無を各遺伝子型別に検討

(谷口班員)



- ### 生物学的製剤の有効性予測 & 治療戦略研究
- #### インフリキシマブの有効性予測
- 臨床的解析：3大学共同研究 (RECONFIRM研究)
 - 網羅的遺伝子発現解析
 - 低密度カスタムマイクロアレイ (genomessage)
 - 高密度マイクロアレイ (CodeLink)
 - 免疫機能解析 (in vitro TNF産生能)
- #### エタネルセプトの治療法選択
- 治療戦略研究 (JESMR)

RECONFIRM研究

Retrospective Clinical study On the Notable efficacy and related Factors of Infliximab therapy in a Rheumatoid arthritis Management group in Japan

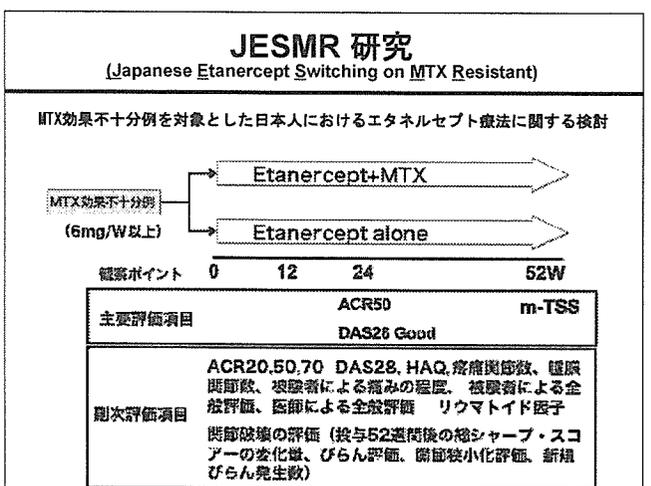
★産業医科大学、東京女子医科大学、埼玉医科大学総合医療センターの3施設で、インフリキシマブを投与された351例のRAを後向きに解析。22週目まで観察された251例の治療反応性に関する因子を検討した。

★DAS28-CRPによる活動性評価の結果、投与前には90.3%が高活動性であったが、投与22週後には、高活動性27.9%、中等度活動性33.3%、低活動性10.9%、寛解27.9%、と高い有効性を示した。

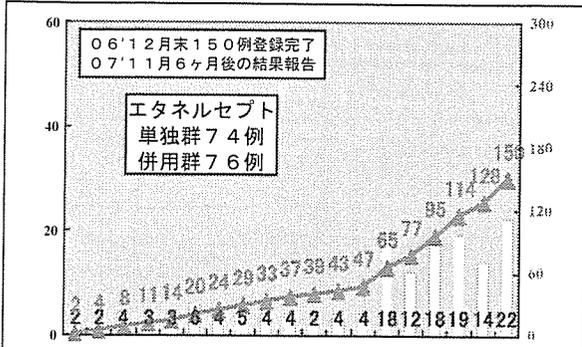
◎男性、RF、CRP低値、少腫脹関節数、PSL少量投与が、良好な治療反応性と関連していた。

予後不良因子関連のものが抽出！
臨床パラメーターのみでは、有効性予測は困難！

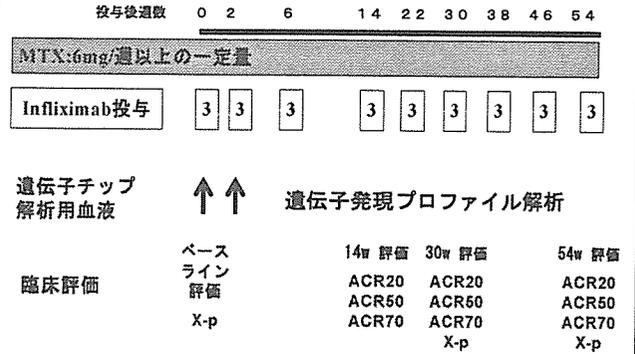
Mod Rheumatol 17:28-32, 2007



登録症例数の推移



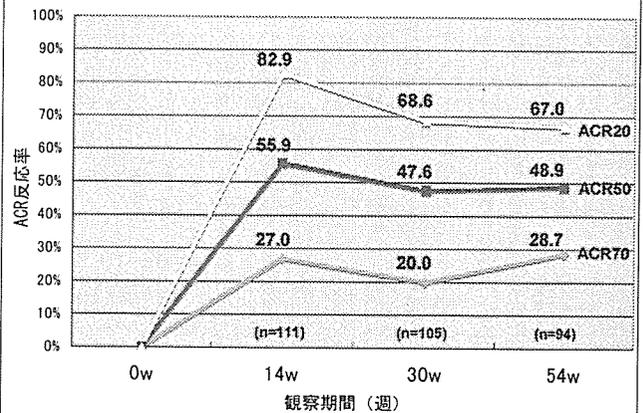
インフリキシマブ有効性予測因子同定の試験計画



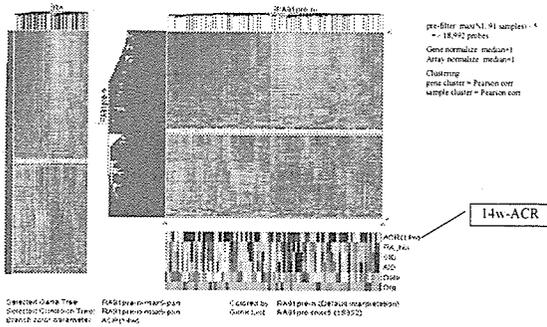
登録症例の患者背景

臨床パラメーター	登録症例
症例数	135 例
年齢 (平均+/-SD)	52.6 +/- 12.5 歳
年齢 (中央値: max-min)	53 (75-19) 歳
male:female	21:102 例
罹病期間 (平均+/-SD)	100 +/- 100 ヶ月
罹病期間 (中央値: max-min)	73 (624-4) ヶ月
DAS28 (CRP)	6.42 +/- 7.67
TJC	15.4 +/- 10.1
SJC	14.7 +/- 8.9
GH	58.1 +/- 27.9
CRP	3.49 +/- 2.65
MMP-3	266.6 +/- 214.1

登録症例の有効性



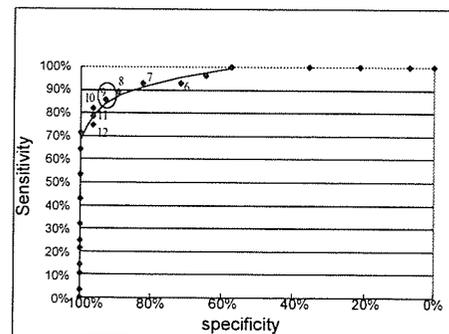
階層的クラスタリング 投薬前(0w) 91症例



全サンプルのときと同様に、2つのサンプルクラスタが見られるが、投薬、ACR、その他の臨床情報や解析日での有意な偏りは見られない

投与前1ポイントでのアルゴリズムの確立

- ★各遺伝子の中心からの空間的ズレを数値化し (0-27)、その数値別の感度・特異度を検討
- ★スコア-9とすると、感度89%、特異度94%



投与前1ポイントでの有効性予測アルゴリズムの確立

A. Standard & Training
P < 0.0001

	Clinical outcome			Accuracy
	ACR0-20	ACR50-70		
Prediction	17	1		94%
Hit ratio	89%	94%		

B. Validation
P < 0.005

	Clinical outcome			Accuracy
	ACR0-20	ACR50-70		
Prediction	7	1		88%
Hit ratio	78%	89%		

C. Blind Cross-validation
P < 0.01

	Clinical outcome			Accuracy
	ACR0-20	ACR50-70		
Prediction	6	3		67%
Hit ratio	75%	82%		

gene	有効	無効
vacuolar protein sorting 28	↑	
AP-1 associated adaptor	↑	
CXCR3-1	↑	
folate receptor β		↓
TNFSF6		↓
TNFSF11		↓
FLICE2		↓
LFNG		↓
PCK1		↓
DR-nm23		↓

研究のまとめ -1-

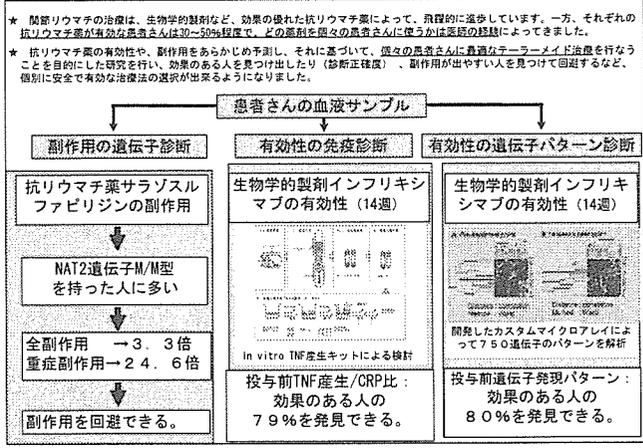
有効性 (背景因子、予測因子)				
薬剤	臨床的解析	免疫学的解析	遺伝子発現解析	ゲノム解析
ブシラミン	関口研究 高齢発症			
メトトレキサート	亀田研究 男性一反応良好			MTHFR遺伝子: A1298C多型 (谷口)
インフリキシマブ	1) 後期第2相試験 2) RECONFIRM試験: 男性、低CRP、低RF、低ESR、短PDL一反応良好 3) 伊藤研究	in vitro TNF産生能	カスタムマイクロアレイ 高密度マイクロアレイ (油谷)	
エタネルセプト	JESMR試験			

副作用 (背景因子、予測因子)				
薬剤	臨床的解析	免疫学的解析	遺伝子発現解析	ゲノム解析
SASP				NAT2遺伝子 チイロタイプ型 (谷口)
メトトレキサート				MTHFR遺伝子: C677T多型 (谷口)
インフリキシマブ	1) 後期第2相試験 2) 市販後全例調査			

研究のまとめ -2-

予後 (背景因子、予測因子)				
病態・疾患	臨床的解析	免疫学的解析	遺伝子発現解析	ゲノム解析
関節破壊	亀田研究 (HARAS)	CD16 (南木)	TNFmRNA安定性 (伊藤)	
関節炎	亀田研究 (HARAS)	1) P13K (田村) 2) CCR11 (川上) 3) CXCL1 (南木)	TNFmRNA安定性 (伊藤)	
自己抗体産生				1) PAD14多型のハプロタイプ (山本) 2) FCRL3遺伝子: C169T多型 (山本)
解析技術			アレイ解析 (油谷)	

関節リウマチのテーラーメイド治療法確立に向けた研究



Ⅲ. 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 教授

研究要旨

Infliximab 投与が行われた RA 登録症例 135 例より、投与前および投与 2 週間後に採血を行い、末梢血球より total RNA を抽出し、91 症例についてマイクロアレイ解析を施行した。治療応答性の指標には 14 週（87 例）、30 週（76 例）および 54 週（76 例）後の ACR を用いた。14 週という早期の症状改善に相関する遺伝子群はインターフェロン応答性遺伝子との関連が示唆された。

A. 研究目的

本研究は関節リウマチ（RA）患者末梢血の遺伝子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

臨床検体

研究協力機関において登録された Infliximab 投与が行われた RA 登録症例 135 例より、投与前および投与 2 週間後に採血を行い、末梢血球より total RNA を抽出した。なお、症例登録に参加された医療機関は東京医科歯科大学、順天堂大学、筑波大学、長崎大学、産業医科大学、東京大学、東京女子医科大学、北海道大学および埼玉医科大学である。

網羅的遺伝子発現解析

PAXgene (QIAGEN) を用いて RNA を抽出後、Nanodrop による RNA 濃度測定、Bioanalyzer2100 (Agilent) による品質確認を行った。最終的に 135 症例中 91 症例についてマイクロアレイ解析を施行した。全 RNA 1ug より IVT 法により cRNA を増幅・合成、Biotin

標識して CodeLink Human Whole Genome 55K アレイ (GE ヘルスケア) を用いて発現プロファイル解析を行い、中間値を 1 とした。解析は複数回に分けて行ったので、実験間、アレイ間の内部標準データとしてその都度同一検体として日本人不死化リンパ球株 34 検体の混合検体 (LN-mix) を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究計画について当研究所の生物医学研究倫理委員会において承認されており、全ての臨床検体はそれぞれの医療機関の研究倫理委員会の承認の下に採取後匿名化された上で当研究所に送られた。尚、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

検体採取と網羅的遺伝子発現解析

検体採取施設、解析日、投薬の前後などによるプロファイルの偏りは認められなかった。検体量および RNA の品質からアレイ解析に不適当とされた症例が 40 例以上に及んだ。その頻度には施設間で若干のバラツキが認められたことから、検体採取の際の操作を標準化すること、患者の白血球数などにより採血量の

変更を検討することも必要と思われた。

各回に測定した LN-mix のプロファイルには大きな相違は認められなかった。

発現プロファイルデータの解析

階層的クラスタリングでは投薬の前後、ACR 値などの臨床情報やアレイ解析施行日による大きな偏りは認められなかったものの、大きく2つのクラスタが認められた (図1)。

臨床情報として治療応答性の指標には 14 週 (87 例)、30 週 (76 例) および 54 週 (76 例) 後の ACR を用いた (臨床情報は 2006 年 9 月 20 日時点) (図2)。

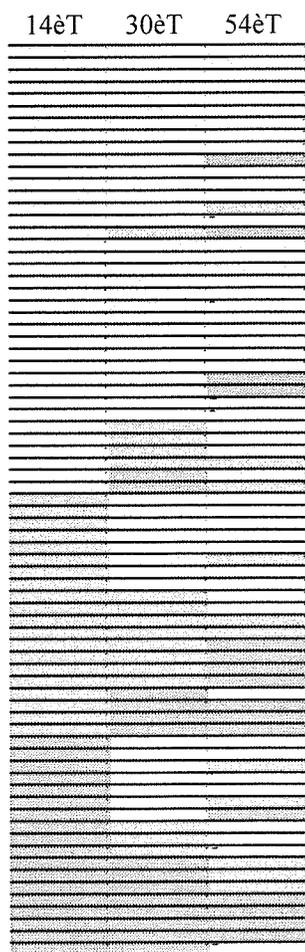


図2 ACR 値の推移

投与開始後 14 週、30 週および 54 週時における 76 症例の ACR 値を示す。青色は ACR_0、黄色は ACR_20、橙色は ACR_50、ピンク色は ACR_70。

早期の治療効果関連遺伝子の抽出のために 14 週時の ACRO (16 例) と ACR70 (18 例) の 2 群間での比較を行った。発現値が 1.5 倍以上変動し、かつ Wilcoxon rank sum test にて有意である遺伝子として ($p < 0.01$)、ACR70 群で高発現する遺伝子 87 プローブ、低発現遺伝子 177 プローブが得られた。さらに治療効果の持続性を検討する目的で、14 週時に ACR50-70 であった反応性良好群 (47 例) について 30 週時に ACRO となった増悪例 10 例と ACR70 となった改善持続例 12 例の 2 群について比較した。30 週時での改善持続例に高発現する遺伝子には 14 プローブ、低発現遺伝子は 9 プローブであった。

抽出された遺伝子群がどのような機能分類に含まれるかについて、米国の NIH が提供する情報解析ツールである DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) や GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) により、遺伝子の機能分類や既存の遺伝子発現 signature との関連を検討した。上述の 14 週時の ACRO と ACR70 の 2 群間で投与開始前の発現が異なる遺伝子群は GSEA により β インターフェロンにより誘導される遺伝子リストの濃縮が強く認められた (図3)。

D. 考察

教師無しの解析法である階層的クラスタリングによっては治療有効群と無効群を識別することは出来なかった。階層的クラスタリングにより認められた 2 つのグループの成因については末梢白血球分画などを含めた臨床パラメータとの相関を検討予定である。

選ばれた遺伝子セットの機能的な意義を理解する上でまた抽出された遺伝子群のプロモーター領域の配列について TRANSFAC 解析を用いて制御に関与する転写因子の予測を今後進める予定である。今回の解析では 14 週時の改善に相関する発現遺伝子群としてインターフェロン応答遺伝子群との濃縮が認められた。平成 16 年度に少数例の検体で予備的に行った

プロモーター解析結果でも結合配列の出現頻度が高い因子としてインターフェロン下流の転写因子である IRF1 や IRF2 が選ばれており、興味深い結果と思われる。今後、治療反応性予測に関わる識別遺伝子の抽出には、最終的な臨床情報が揃った時点で再解析を行う予定である。

E. 結論

Infliximab の有効性を予測するために RA 患者末梢血由来 RNA についてマイクロアレイによる発現プロファイル解析を行った。早期（投与開始 14 週後）の症状改善に相関する遺伝子群はインターフェロン応答性遺伝子との関連が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- ・第95回日本病理学会総会（新宿、5/2）ワークショップー 分子病因からみたトキシコロジーー 「化合物の作用予測と個人差」
- ・日本人類遺伝学会第51回大会シンポジウム「ゲノム科学の成果を臨床現場へ」（米子、10/20）「ヒトゲノムコピー数多型マップ」

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

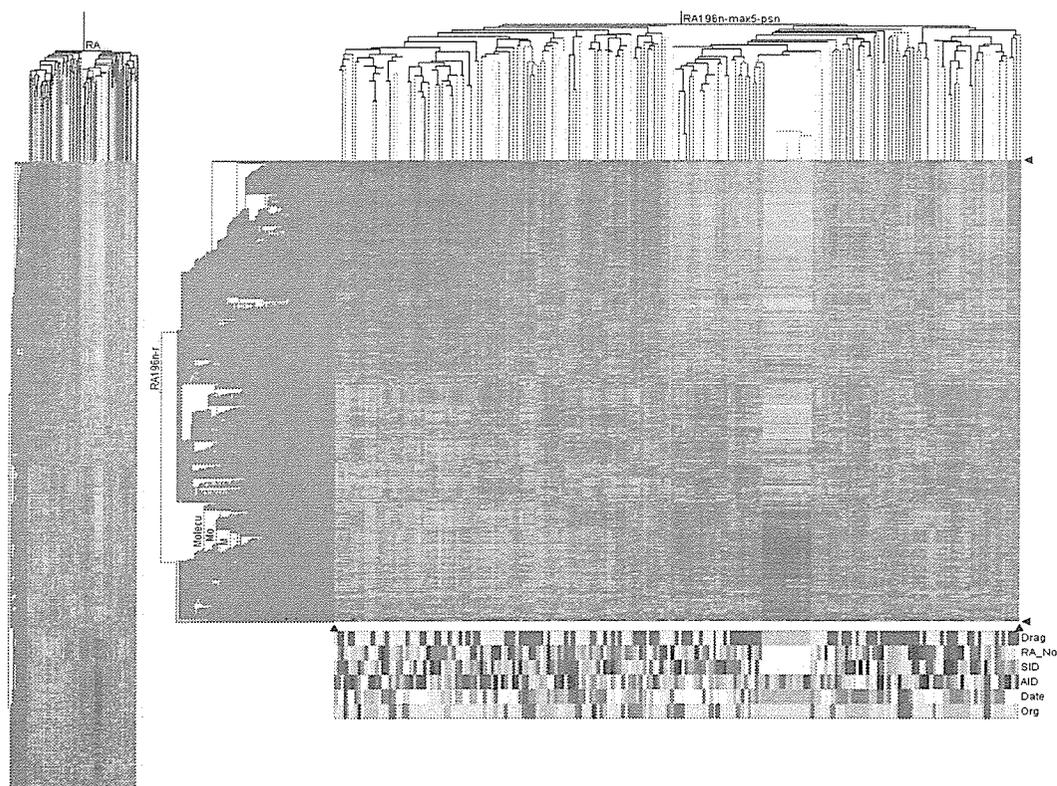
なし

3. その他

なし

図1 全症例の階層的クラスタリング

91 症例の投薬前後それぞれの合計 192 検体とコントロール（LN-mix）検体について 2 方向階層的クラスタリング（ピアソン相関）を行った。用いた遺伝子はいずれかの検体で発現値が 5 を超えた 17,549 プローブ。

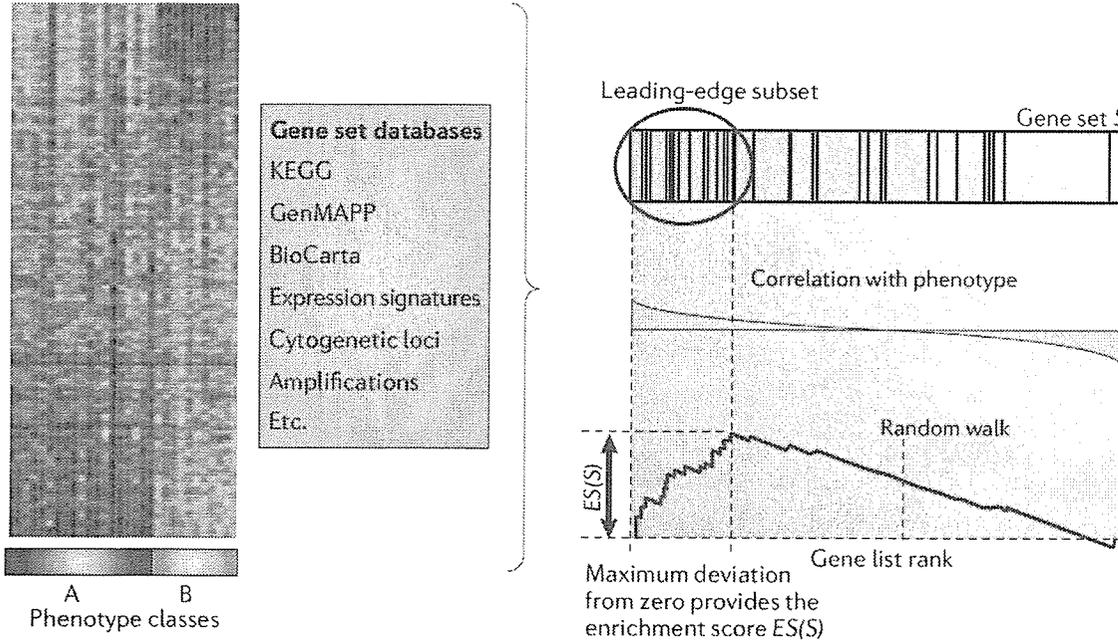


Selected Gene Tree RA196n-rmax5-psn
 Selected Condition Tree RA196n-max5-psn
 Branch color parameter Drag

Colored by RA196n (Default Interpretation)
 Gene List: RA196n-max5 (17549)

図3 GSEA

a. GSEA について



b. 14 週における治療応答に相関する遺伝子群と相関する signature

14 週時の ACR0 (16 例、右図黄色) と ACR70 (18 例、同灰色) の 2 群間比較で、ACR70 群で発現が高い順に左側からランキングして、sigDB データベースのそれぞれの signature との重複を算出した。左図の縦線はインターフェロン誘導遺伝子 signature にヒットした遺伝子を縦線で示しており、 β インターフェロンで誘導される遺伝子群が上位に濃縮されていることを示す。右図は今回の解析での発現をヒートマップ表示した。

