

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16～18年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告書	
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	17
2. 関節リウマチ疾患関連遺伝子の解析とその民族差 山本 一彦	23
3. 抗リウマチ薬の薬理ゲノム学的研究 谷口 敦夫	26
4. 関節リウマチの病態に関与する免疫・シグナル伝達経路に 関する研究 田村 直人	31
5. 関節リウマチ患者におけるインフリキシマブの治療反応性の 予測に関する研究 伊藤 聡	36
6. 関節リウマチの病態形成に関わるシグナルカスケードに関する研究 川上 純	43
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	50
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	59
V. 研究成果の刊行物・別冊（主なもの）	77

I. 構 成 員 名 簿

平成 16～18 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
	(H16) 小林 茂人	順天堂大学医学部 膠原病内科	助教授
	(H17) 深沢 徹	順天堂大学医学部 膠原病内科	講 師
	(H18) 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

関節リウマチ治療の進歩は目覚ましいものがあるが、治療薬剤の有効性、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。本研究によって、エビデンス A の抗リウマチ薬 MTX, SASP, BUC の 3 剤について、臨床的、遺伝子的解析を行い、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、BUC の有効性と関連する臨床的特徴を明らかにした。腫瘍壊死因子 Tumor Necrosis Factor (TNF) を標的とした生物学的製剤は、上記抗リウマチ薬に抵抗性の症例にも優れた効果があるが、その効果は 50-60% 前後で、結核を初めとする感染症等の副作用も課題とされてきた。そこで、我が国で承認されたインフリキシマブ、エタネルセプトの 2 剤の生物学的製剤を有効かつ安全に使用するためのガイドラインを作成した。インフリキシマブの治療反応性の予測因子を検索したところ、臨床パラメーターからインフリキシマブに特異性の高い有効性予測因子を見いだす事は困難であった。一方、in vitro TNF 産生検査、網羅的遺伝子発現解析によって、インフリキシマブ投与前に正確性 80% 以上で有効例を予測可能という結果を得た。今後、これらの情報を集約して、薬剤選択アルゴリズムを構築し、実際の臨床現場に効率よく適用する方法を検討する必要がある。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。

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(H16)

順天堂大学医学部膠原病内科 助教授

深沢 徹(H17)

順天堂大学医学部膠原病内科 講師

田村直人(H18)

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. 研究方法

高齢者に多い関節リウマチ (RA) は、激しい多関節炎を特徴とし、罹患関節の破壊・変形により著しい

日常生活動作 (ADL) の低下を来す。無治療では、10 年後に 50% の症例が寝たきりになるとされ、AD

L 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。これまで、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が、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、5

0% 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、炎症性サイトカインを標的とした生物学的製剤が開発され、画期的臨床効果が確認されている。課題として、

その効果は患者満足度を反映する ACR50% 反応率では 50-60% であること、年間薬剤費が約 100-200 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。

このような課題を解決する一つの方策は、薬剤の有効性、副作用を予測し、個々の症例に適した投与法を提唱することである。そこで、MTX を初めとする抗リウマチ薬や生物学的製剤をより効率よく必要な症例に投与するためのテーラーメイド医療の構築することを目的として検討を行った。

C. 研究結果

1) エタネルセプト使用ガイドライン

2005 年 3 月、我が国において関節リウマチを適応とした 2 番目の生物学的製剤であるエタネルセプトが承認された。インフリキシマブ同様、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おり、厚生労働省リウマチ研究班の『関節リウマチ治療における新規生物製剤の治療方針の作成及びその検証に関する研究班: 宮坂信之班長』、『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 勤班長』、『関節リウマチの早期診断法の確立及び臨床経過の予測に関する研究: 江口勝美班長』の 3 班合同によってエタネルセプト使用ガイドラインを作成した。その後、日本リウマチ学会が、これを承認した。

2) 臨床的有効性に関する検討

a) 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を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)。

b) 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)

3) 免疫学的有効性予測システムの開発

a) 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 (竹内)。

b) 有効性予測の候補分子

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参与する酵素であり、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) はマウスコラーゲン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)。

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 $\beta 3$ 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 $\beta 3$ は単球・破骨細胞においては αv とのみ結合し、 $\alpha v \beta 3$ ヘテロダイマーとして発現する。したがって、 $\alpha v \beta 3$ 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可能性が示された。(南木)。

CAMKII: CIA マウス、アジュバント関節炎ラット、培養滑膜線維芽細胞を用いたデータより、Calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) は、Akt 活性化を誘導し、滑膜線

維芽細胞の増殖・アポトーシス抑制に關与することを明らかにした。また、その作用点は DISC での caspase-8 活性化に關わると考えられた。

これら滑膜纖維芽細胞の増殖調節機構が、抗リウマチ薬のターゲットになっている可能性があり、これを指標とした薬剤効果判定、副作用判定の有用性について検証する必要がある(川上)。

4) 候補遺伝子解析 (SNPs) を用いた DMARD の効果、副作用予測、および予後予測研究

a) 薬物代謝酵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。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關連することが示唆された(谷口)。

b) 疾患關連遺伝子多型と予後の關連

PADI4 の機能的ハプロタイプに關しては、RA 感受性ハプロタイプ (haplotype2) と RA 非

感受性ハプロタイプ (haplotype1) について、抗 CCP 抗体および抗シトルリン化フィラグリン抗体の陽性率を測定した。感度の高い抗 CCP 抗体とは明らかな相関は見出されなかったが、抗シトルリン化フィラグリン抗体の陽性率は、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% であり、有意な關連がみられた。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) については、リウマトイド因子および抗 CCP 抗体の關連を検討した。148 名の RA 患者の調べる経過中で最も高いリウマトイド因子抗体価は、感受性多型-169C のホモ、ヘテロ、非感受性多型-160T ホモそれぞれについて相関することが回帰分析で明らかになった。また、感受性多型-169C のホモの RA 患者は抗 CCP 抗体の陽性率が 100% であるのに対して、ヘテロの患者は 94.3%、非感受性多型-160T ホモの患者は 73.7% の陽性に留まり、遺伝子多型と自己抗体產生に關連があることが明らかとなった(山本)。

5) 網羅的遺伝子発現解析によるインフリキシマブ効果予測研究

a) キメラ型抗 TNF・抗体インフリキシマブ投与後の遺伝子発現變動の推移

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、埼玉医大総合医療センター 1 8 例の RA 患者から末梢血サンプルを PAXgene で収集、RNA を採取、増幅した。このサンプルを対象として、本研究班で開発したカスタムマイクロアレイを用い、投与 0 週 - 2 2 週の発現變動を解析した。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關連遺伝子群が投与 2 週目に低低下した。しかし、1 4 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。1 4 週目の有効性と關連した遺伝子群の一つは、インターフェロン關連遺伝子群で有効例の 4 0 - 5 0 % に認められた。これに加えて、1 4 週目の有効性と關連して變動する遺伝子群に、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が明らかになった。これら複数の有望な遺伝子群を加えて9遺伝子からなるアルゴリズムを構築した。

b) カスタムマイクロアレイによるキメラ型抗TNF・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135例の登録が完了し、発現解析用のサンプルが収集された。14週目の臨床的効果が判定可能であった82症例について解析したところ、ACR50%を有効性の指標とすると、投与前及び、投与後の2週の2ポイントの変動パターンに、有効性と無効性で明確なクラスターが存在した。先のアルゴリズムを用いて有効性を予測した結果、正確性92~94%で有効例を予測できることが明らかとなった。一方、投与前の1ポイントで14週後の有効性をACR50%反応を指標として判定する方法を検討し、vacuolar protein sorting 28, AP-clathrin adaptor complex, CXCR3-1を含む9遺伝子を用いるアルゴリズムを構築した。その結果、投与前1ポイントのサンプルで正確度80%で有効例を予測できることが明らかとなった(竹内)。

c) 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

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。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RNA1ug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った。解析は複数回に分けて行ったため、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

(LN-mix)を測定した。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相当とされた症例が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。

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)。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。

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NIHが提供する情報解析ツールであるDAVID(Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)を用いて行った。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)。

(倫理面の配慮)

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。

D. 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、診断正確度80%で投与前にインフリキシマブの有効性を予測することが明らかとなった。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。

計画していた目標の80%は達成できた。特に網羅的発現解析により診断正確度80%のアルゴリズムを構築できた事、新たな有効性予測のための in vitro TNF 産生アッセイを

見出した事、ガイドラインを作成できた点は当初の計画あるいはそれ以上と考える。一方これら予測法を臨床応用するに至らなかった事、これを組み入れた指針の作成が出来なかった点がマイナス20%の部分である。

1) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について：

薬物治療のあり方をテーラーメイドの観点から構築する事の重要性を示した事は、学術的にも社会的にも大きな成果があったと考える。今後、研究成果をより多くの国際的学術誌で報告する必要がある。

2) 今後の展望について：

本研究で報告された有効性および副作用予測法を臨床現場に導入するための具体的方策が必要である。本研究で明らかにされた細胞内発現解析アルゴリズムをコンテンツとするカートリッジ型マイクロアレイシステムの開発研究が平成18年度から開始された。

E. 健康危険情報

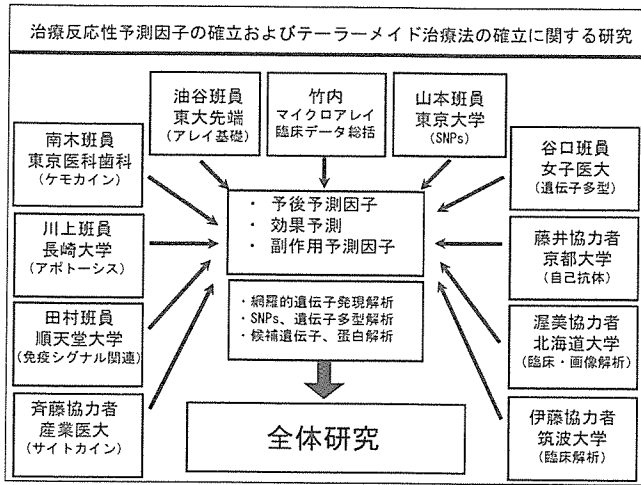
特になし

F. 研究発表

1. 論文発表
1. Takeuchi T, Amano K, and Kameda H. Anti-TNF biological agents in rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases. *Allergology Int* 54:191-202,2005.
2. Miyasaka N, Takeuchi T, and Eguchi K. Official Japanese guidelines for the use of infliximab for Rheumatoid Arthritis. *Mod Rheum* 15:4-8, 2005.
3. Shiraishi K, Tsuzaka K, Abe T, and Takeuchi T. Critical role of the 5th domain of E-cadherin for heterophilic adhesion with α E β 7, but not for homophilic adhesion. *J Immunol* 175:1014-1021, 2005.
4. 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.
5. Miyasaka M, Takeuchi T, and Eguchi K. Official guidelines for the proper use of etanercept in Japan. *Mod Rheum* 16: 63-67, 2006.
 6. Hideto Kameda, Hironobu Ishigami, Miyuki Suzuki, Tohru Abe, Tsutomu Takeuchi. Imatinib mesylate inhibits proliferation of rheumatoid synovial fibroblast-like cells and phosphorylation of Gab adapter proteins activated by platelet-derived growth factor. *Clin Exp Immunol* (in press)
 7. Naoya Sekiguchi, Hideto Kameda, Koichi Amano, Tsutomu Takeuchi. The efficacy and safety of bucillamine, a d-penicillamine analogue, in patients with active rheumatoid arthritis. *Mod. Rheum.* (in press)
 8. 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
 9. 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
 10. 竹内 勤：関節リウマチに対する分子標的療法の個別化 *Molecular Medicine* 42: 879-886, 2005
 11. 竹内 勤：生物学的製剤による炎症性疾患治療の新ステージ *日本炎症・再生医学会雑誌 editorial* 25:88, 2005
 12. 竹内 勤：わが国の生物学的製剤使用のためのガイドライン *Geriatric Medicine* 43: 921-926, 2005
 13. 関口直哉、竹内 勤：関節リウマチ早期例と生物学的製剤 リウマチ科 34 : 283-287,2005
 14. 竹内 勤：関節リウマチに対する TNF 阻害療法 *日本内科学会雑誌* 95(Supl): 90, 2005
 15. 竹内 勤：生物学的製剤使用のためのガイドライン 関節リウマチー成因研究から治療の新時代へー日本臨床増刊号 63(Supl): 444-447, 2005
 16. 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: 196-198, 2005
 17. 竹内 勤：生物学的製剤の適応と課題 *Bio Clinica* 20 : 794-799, 2005
 18. 竹内 勤 生物学的製剤の新薬開発の現状と問題点 *CLINICIAN* 2004 : 51 : 118-124
 19. 竹内 勤、伊藤 哲 関節リウマチの病態・治療に対する生物学的・分子生物学的アプローチ *Arthritis-運動器疾患と炎症* 2004 : 2(3) : 156-161.
 20. 竹内 勤 生物学的製剤使用のためのガイドライン 関節リウマチー成因研究から治療の新時代へー 2005.1 : 63 : 414-417.
 21. 伊藤哲、竹内 勤 関節リウマチの網羅的発現解析 *ゲノム医学* 2005.1 : 5 (1) : 51-57.
- 学会発表 (竹内 勤)**
1. 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
 2. 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
 3. 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
 4. 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
 5. 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
6. 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
 7. 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
 8. 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
 9. 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
 10. インフリキシマブの有効性予知は可能か？ 第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会 シンポジウム パシフィコ横浜（横浜）2005.4.18
 11. Infliximab treatment in Japan Designing TNF α in RA frontline Part-1 "TNF α targeting therapy: History, present and future strategies" 第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会 イブニングシンポジウム パシフィコ横浜（横浜）2005.4.18
 12. 生物学的製剤の最先端—TNF 阻害剤を中心に— 第 78 回日本整形外科学会学術集会 ランチョンレクチャー パシフィコ横浜（横浜）2005.5.12
 13. マイクロアレイを用いた関節リウマチ抗 TNF 療法の効果予測 第 26 回日本炎症・再生医学会 ワークショップ 京王プラザホテル（東京） 2005.7.13
 14. 関節リウマチに対する抗 TNF 療法の有効性予測に関する網羅的遺伝子発現解析 特別講演 創薬薬理フォーラム第 13 回シンポジウム 日本薬学会 長井記念館（渋谷）2005.9.8
 15. 関節リウマチに対する抗サイトカイン療法の現状と課題 第 33 回日本内科学会信越支部生涯教育研究会 新潟ユニゾンプラザ 2005.10.16
 16. 関節リウマチの生物学的製剤の反応性と DNA チップ解析 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会 シンポジウム ホテルメトロポリタン盛岡（岩手）2005.10.22
 17. 生物学的製剤に関する最新の話 第 20 回日本臨床リウマチ学会 ノーンタイムレクチャー 神戸国際会議場（神戸）2005.11.4
- G.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



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

AA AC+CC (谷口班員)

従来型DMARDの副作用予測

1) MTXの副作用：MTHFRのC677T多型

すべての副作用 (P=0.0001, RR=2.43, 95%CI 1.23-4.55)

肝機能異常のみ (P=0.0001, RR=2.69, 95%CI 1.30-5.15)

2) SS2の副作用：NAT2のM/M,MMディプロタイプ (RAの7.5%)

全副作用発現とNAT2ディプロタイプ形 (P<0.001, RR=3.61, 95%CI 1.77-7.34)

重症副作用発現とNAT2ディプロタイプ形 (P=0.015, RR=2.66, 95%CI 1.17-5.65)

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、少関節関節数、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

JESMR 研究

(Japanese Etanercept Switching on MTX Resistant)

MTX効果不十分例を対象とした日本人におけるエタネルセプト療法に関する検討

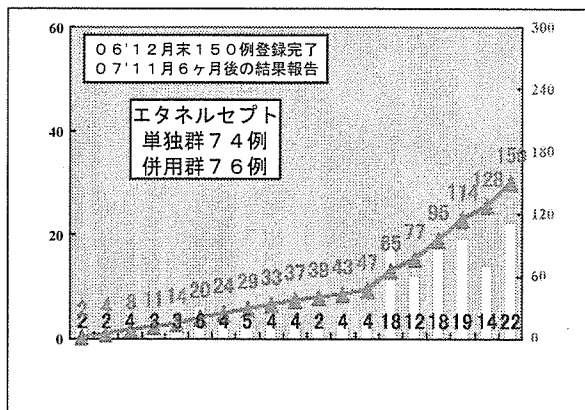
MTX効果不十分例 (6mg/W以上)

- Etanercept+MTX
- Etanercept alone

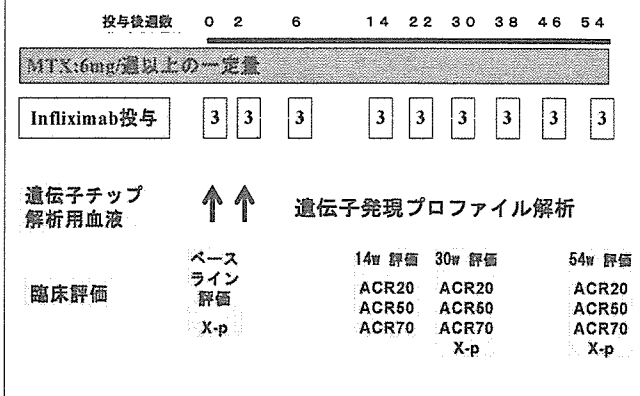
観察ポイント: 0, 12, 24, 52W

主要評価項目	ACR50	m-TSS
	DAS28 Good	
副次評価項目	ACR20,50,70 DAS28, HAQ, 疼痛関節数、腫脹関節数、跛行による歩みの程度、跛行による全健評価、跛行による全健評価、関節による全健評価、リウマトイド因子、関節破壊の評価 (投与52週後の総シャープ・スコアの変化量、びらん評価、関節狭小化評価、新規びらん発症数)	

登録症例数の推移



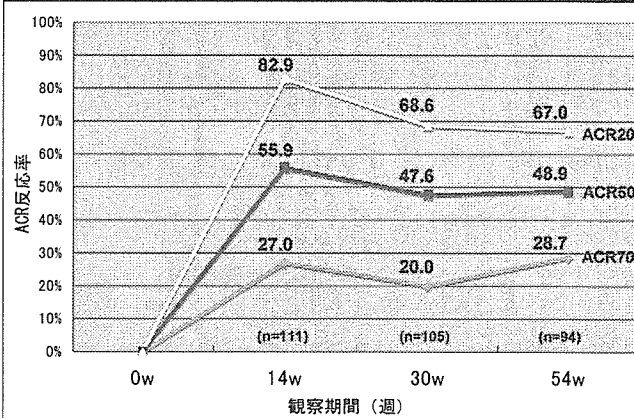
インフリキシマブ有効性予測因子同定の試験計画



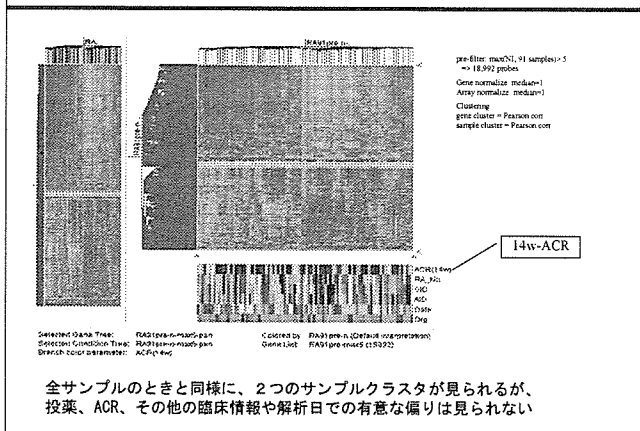
登録症例の患者背景

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

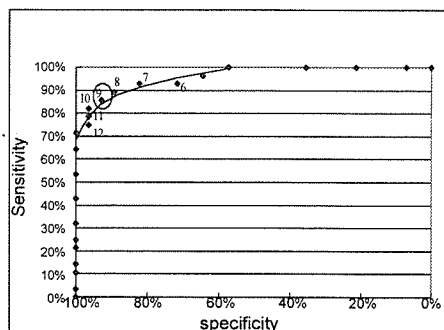


階層的クラスタリング 投薬前(0w) 91症例



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

Prediction	Clinical outcome			Accuracy
	ACR0-20	ACR0-70	ACR50-70	
Hit ratio	89%	94%	92%	

gene	有効	無効
vacuolar protein sorting 28	↑	
AP-1 associated adaptor	↑	
CXC3R-1	↑	
folate receptor β		↓
TNFSF6		↓
TNFSF11		↓
FLICE2		↓
LFNG		↓
PCK1		↓
DR-nm23		↓

B. Validation
P < 0.005

Prediction	Clinical outcome			Accuracy
	ACR0-20	ACR0-70	ACR50-70	
Hit ratio	78%	89%	83%	

C. Blind Cross-validation
P < 0.01

Prediction	Clinical outcome			Accuracy
	ACR0-20	ACR0-70	ACR50-70	
Hit ratio	75%	82%	80%	

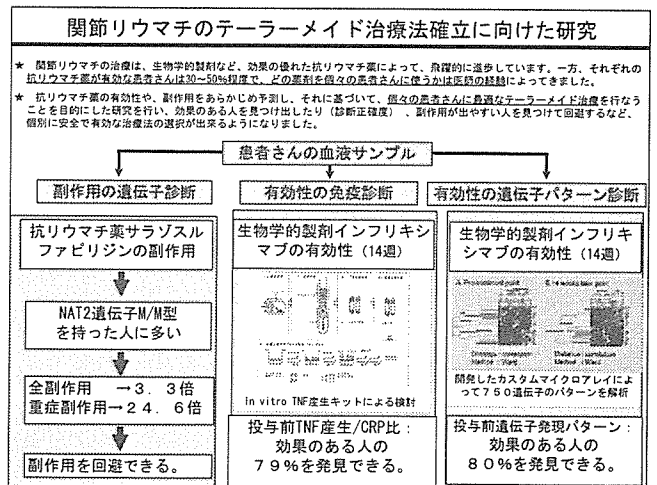
研究のまとめ -1-

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
プシラミン	開口研究 高齢発症			
メトトレキサート	亀田研究 男性→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、低PDL-1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、ディプロタイプ型 (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)	TNF mRNA安定性 (伊藤)	
関節炎	亀田研究 (HARAS)	1) PI3K (田村) 2) GSK11 (川上) 3) CX3CL1 (南木)	TNF mRNA安定性 (伊藤)	
自己抗体産生				1) PAD14遺伝的ハプロタイプ (山本) 2) FCRL3遺伝子、G169T多型 (山本)
解析技術			アレイ解析 (油谷)	



Ⅲ. 総合研究報告書

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

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。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、末梢血球より全 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として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、末梢単核球より 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。

統計解析

クラスタリング解析は GeneSpring ソフトウェア (Agilent) を用いて行った。パスウェイおよび signature 解析は、Gene Ontology 分類のほか、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) のウェブサイトを利用して行った。

(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。

網羅的発現解析のプラットフォームには搭載遺伝子数が多く、低発現遺伝子の定量性が比較的良好とされる CodeLink アレイ (GE ヘルスケア) を用いて行った。16 年度は 2 万遺伝子を duplicate でスポットしたカスタムアレイを作成したが、遺伝子数が少ないにもかかわらず、むしろ作成コストが嵩むため、最終的にカタログアレイである 55K アレイを用いて発現解析を実施することとした。

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 つのクラスターが認められた (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)。

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、DAVID や GSEA 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)。

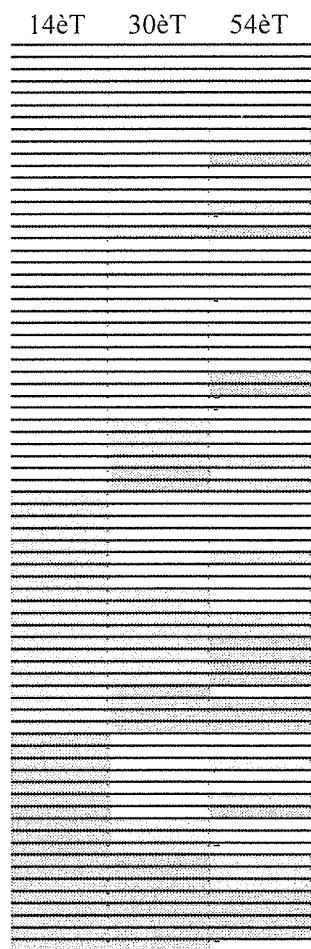


図 2 ACR 値の推移

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。

TRANSFAC による転写因子結合配列の解析

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。

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確定し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

平成16年度

- 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

平成17年度

- 3) Inamura K, Fujiwara T, Hoshida Y, Isagawa T, Jones MH, Virtanen C, Shimane M, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Tsuchiya E, Ishikawa S, Aburatani H, Nomura H, Ishikawa Y. Two subclasses of lung squamous cell carcinoma with different gene expression profiles and prognosis identified by hierarchical clustering and non-negative matrix factorization. *Oncogene*. 24(47):7105-13. 2005
- 4) Yamashita S, Tanaka Y, Tsutsumi S, Aburatani H, Minato N, Ihara S. Analysis of mechanism for human gammadelta T cell recognition of nonpeptide antigens. *Biochem Biophys Res Commun*. 334(2):349-360. 2005
- 5) Ge X, Yamamoto S, Tsutsumi S, Midorikawa Y, Ihara S, Wang SM, Aburatani H. Interpreting expression profiles of cancers by genome-wide survey of breadth-of-expression in normal tissues. *Genomics* 86(2):127-141, 2005
- 6) Aggarwal A, Li Guo D, Hoshida Y, Tsan Yuen S, Chu KM, So S, Boussioutas A, Chen