

## 厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）

### 末梢血単核球の網羅的遺伝子発現解析による関節リウマチに対するトシリズマブの薬効予測と効果発現機序の解明に関する研究

#### 分担研究年度終了報告書 2

### 末梢血単核球における定量的 PCR による 関節リウマチに対するトシリズマブの薬効予測モデルの構築に関する研究

研究分担者 廣瀬 晃一

千葉大学大学院医学研究院アレルギー・臨床免疫学 准教授

#### 研究要旨

末梢血単核球（PBMC）の網羅的遺伝子発現解析のデータにより抽出された 19 遺伝子の、定量的リアルタイム PCR（qPCR）による発現解析により、関節リウマチ（RA）に対するトシリズマブ（TCZ）の薬効予測モデルを構築することを目的とした。

19 遺伝子に対して特異的なプライマーを設定し、健常者ならびに RA 患者の PBMC の RNA 検体において qPCR と DNA マイクロアレイのシグナル値との相関を検討した。相関の高い遺伝子を用いて TCZ 薬効予測モデルを構築し、バリデーションコホート（n = 20）を用いてその精度を検証した。

19 遺伝子中、15 遺伝子で qPCR による発現と DNA マイクロアレイシグナル値との相関が確認できた。バリデーションコホートにおいて、無効例（n=5）と有効例（n=15）の間で TCZ 投与前の PBMC における qPCR による発現値に有意な差を認められたものは、15 遺伝子中 4 遺伝子（*IFI6*, *MX2*, *OASL*, *MT1G*）であった。これらの遺伝子を用いた TCZ の薬効予測モデルでは、Receiver operating characteristic（ROC）解析の曲線下面積が 0.947、感度 73.3%、特異度 100%と良好な結果が得られた。

DNA マイクロアレイならびに qPCR による PBMC の網羅的遺伝子発現解析により、RA における TCZ の薬効を高精度に予測する 4 遺伝子が同定された。RA の病態における I 型 IFN やメタロチオネインの関与が示唆された。

#### A. 研究目的

末梢血単核球（PBMC）の網羅的遺伝子発現解析のデータにより抽出された遺伝子の、定量的リアルタイム PCR（qPCR）による発現解析により、関節リウマチ（RA）に対するトシリズマブ（TCZ）の薬効予測モデルを構築することを目的とした。

#### B. 方法

TCZ を新規に投与した RA 患者 40 症例の PBMC の DNA マイクロアレイを用いて、有効例と無効例で発現の異なる予測遺伝子

を抽出した。それぞれの遺伝子に対して特異的なプライマーを設定し、健常者ならびに RA 患者の PBMC の RNA 検体において qPCR と DNA マイクロアレイのシグナル値との相関を検討した。相関の高い遺伝子を用いて TCZ 薬効予測モデルを構築し、バリデーションコホート（n = 20）を用いてその精度を検証した。

#### C. 結果

トレーニングコホートにおいて無効例（n=8）と有効例（n=29）で TCZ 投与前

の PBMC におけるシグナル値に有意差を認め、かつ一定のシグナル強度を示す 68 プローブを同定した。それらの中で、重複して同定されたもの、同一ファミリー遺伝子、および免疫あるいは炎症反応に直接関連する 19 遺伝子 23 プローブに注目した。さらにそれらの中で、qPCR による発現と DNA マイクロアレイシグナル値との相関が確認できた 15 遺伝子を予測候補遺伝子とした。バリデーションコホートにおいて、無効例 (n=5) と有効例 (n=15) の間で TCZ 投与前の PBMC における qPCR による発現値に有意な差を認められたものは、15 遺伝子中 4 遺伝子 (*IFI6*, *MX2*, *OASL*, *MT1G*) であった (表 1)。これらの遺伝子を用いた TCZ の薬効予測モデルでは、Receiver operating characteristic (ROC) 解析の曲線下面積が 0.947、感度 73.3%、特異度 100%と良好な結果が得られた。

Gene	Expression relative to GAPDH, mean $\pm$ SD		P
	Nonresponders	Responders	
<i>CCL3L3</i>	0.22908 $\pm$ 0.11719	0.71191 $\pm$ 1.14197	0.128
<i>CCL4</i>	0.47432 $\pm$ 0.52809	0.32468 $\pm$ 0.16105	0.565
<i>CD83</i>	0.09453 $\pm$ 0.06540	0.12588 $\pm$ 0.20742	0.623
<i>CXCR4</i>	2.02442 $\pm$ 0.52763	2.60166 $\pm$ 1.34114	0.186
<i>FOSL2</i>	0.12600 $\pm$ 0.05244	0.15703 $\pm$ 0.13811	0.477
<i>HP</i>	0.01959 $\pm$ 0.01192	0.03599 $\pm$ 0.03659	0.148
<i>IFI6</i>	0.01166 $\pm$ 0.00514	0.01517 $\pm$ 0.01106	0.038
<i>LY6E</i>	0.21193 $\pm$ 0.09510	0.41288 $\pm$ 0.45754	0.128
<i>MT1G</i>	0.00039 $\pm$ 0.00030	0.00164 $\pm$ 0.00128	0.003
<i>MT2A</i>	0.26977 $\pm$ 0.10763	0.35474 $\pm$ 0.24362	0.299
<i>MX2</i>	0.07054 $\pm$ 0.02718	0.13847 $\pm$ 0.08220	0.012
<i>OASL</i>	0.03208 $\pm$ 0.00883	0.07313 $\pm$ 0.06817	0.038
<i>RABGEF1</i>	0.03439 $\pm$ 0.01607	0.05279 $\pm$ 0.03053	0.107
<i>THBS1</i>	0.12593 $\pm$ 0.10264	0.24968 $\pm$ 0.26263	0.149
<i>WARS</i>	0.42023 $\pm$ 0.15457	0.51446 $\pm$ 0.28856	0.371

表 1. バリデーションコホートの TCZ 投与前の PBMC における 15 遺伝子の発現

#### D. 考察

*IFI6*, *MX2*, *OASL* はいずれも Type I interferon (IFN) response gene (IRG) であり、その他候補となった 19 遺伝子のうち *LY6E* も IRG であった。IRG の末梢血における高発現

は、TNF 阻害薬においても良好な薬効予測因子であることが報告されているが、B 細胞標的薬であるリツキシマブでは逆に治療不応性の予測因子であることが示されており、IRG 発現は薬剤選択に有用なバイオマーカーであることが示唆される。I 型 IFN は Th17 分化により自己免疫を促進することが示されており、そのような病態においては IL-6 シグナル阻害による Th17 分化抑制が RA の病態改善に有効である可能性が示唆された。また *MT1G* はメタロチオネインファミリー遺伝子の 1 つであるが、メタロチオネインは IL-6 により直接発現誘導される。メタロチオネイン遺伝子発現が IL-6 依存性炎症を反映している可能性が示唆された。

#### E. 結論

DNA マイクロアレイならびに qPCR による PBMC の網羅的遺伝子発現解析により、RA における TCZ の薬効を高精度に予測する 4 遺伝子が同定された。RA の病態における I 型 IFN やメタロチオネインの関与が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

「関節リウマチに対する抗 IL-6 受容体抗体療法の有効性の予測方法」特願 2011-156921

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし