

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）

総合研究報告書

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

研究代表者 池田 啓

千葉大学医学部附属病院アレルギー・膠原病内科 助教

研究要旨

本研究では、末梢血単核球（PBMC）および CD4 陽性 T 細胞の網羅的遺伝子発現解析のデータをもとに、トシリズマブ（TCZ）の薬効予測モデルを構築し実用化すること、TCZ の新規薬効評価マーカーを同定すること、TCZ 効果発現の分子機構を解明することを目的とした。

TCZ を新規に投与した RA 患者を 6 ヶ月間経過観察し、治療効果判定を行った。TCZ 治療前後の PBMC および CD4 陽性 T 細胞における遺伝子発現の網羅的解析を DNA アレイを用いて行い、治療効果予測マーカーおよび治療効果判定マーカーの抽出を行った。候補マーカーについては半定量的 PCR による遺伝子発現の確認を行った。さらに TCZ 有効例特異的に治療前後で CD4 陽性 T 細胞において発現の変化する遺伝子を抽出し、その CD4 陽性 T 細胞分化における役割を解析した。

トレーニングコホートにおいて無効例と有効例で 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、無効例と有効例の間で 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、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（*Arthritis Rheumatol* 2014;66:1421）。臨床情報ならびに関節超音波所見は、TCZ の薬効予測には寄与しなかった。

ヒト末梢血およびマウス脾臓由来のナイーブ CD4 陽性 T 細胞から各種条件で分化誘導した細胞では、Th17 細胞において ARID5A の mRNA 発現が亢進していた。興味深いことに、マウス脾臓由来の CD4 陽性 T 細胞にレトロウイルスベクターを用いて ARID5A を強制発現させると、Th17 細胞分化が低下した。Treg 細胞分化に対する影響はなかった。T 細胞特異的 STAT3 欠損マウス由来の Th17 細胞では ARID5A の mRNA 発現が著明に低下していた。レポーター解析では ARID5A の強制発現は ROR γ t による IL-17 発現を抑制し、またウェスタンブロットにより ARID5A と ROR γ t の直接結合が示された（*Arthritis Rheum* 2014;66:1185）。

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。また RA 患者の末梢血 CD4 陽性 T 細胞において、TCZ 投与により発現低下する遺伝子として ARID5A が同定され、Th17 細胞分化の新規抑制分子であることが示された。TCZ 特異的薬効評価マーカーならびに新規治療ターゲット経路の候補と考えられた。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

中島裕史・千葉大学大学院医学研究院アレルギー・臨床免疫学教授
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
高取宏昌・千葉大学医学部附属病院アレルギー・膠原病内科助教

A. 研究目的

本研究では、末梢血単核球 (PBMC) および CD4 陽性 T 細胞の網羅的遺伝子発現解析のデータをもとに、トシリズマブ (TCZ) の薬効予測モデルを構築し実用化すること、TCZ の新規薬効評価マーカーを同定すること、TCZ 効果発現の分子機構を解明することを目的とした。

B. 方法

1) 症例の組み入れ、評価項目、ならびに効果判定 (池田、中島)

TCZを新規に投与したRA患者60症例 (トレーニングコホート40症例、バリデーショコホート20症例)、またコントロールとしてメトトレキサート (MTX)、インフリキシマブ (IFX)、エタネルセプト (ETN)、アダリムマブ (ADA) ならびにアバタセプト (ABT) を新規に投与するRA患者それぞれ5症例ずつを24週間経過観察した。治療前、治療開始12週後、および治療開始24週後のDAS (Disease Activity Score) 28、SDAI (Simplified Disease Activity Index)、CDAI (Clinical Disease Activity Index)、さらに関節超音波による38関節 (DAS28 関節+足関節+第2-5指MTP関節) のグレースケール (GS) およびパワー Doppler (PD) の半定量スコア (OMERACTシステム) を記録した。治療24週での治療効果判定をCDAI変化量および医師総合評価により判定した。

2) 末梢血単核球 (PBMC) およびCD4陽性T細胞における遺伝子発現の網羅的解析 (池田、中島、高取)

TCZ (n = 20)、TNF阻害薬 (n = 15)、およびMTX (n = 5) を投与するRA患者の、治療前および治療開始12週後に全血20 mLをヘパリン採血した。速やかにPBMCを分離、さらにその3/4をCD4陽性T細胞へ純化し、それぞれの細胞における遺伝子発現をDNAアレイを用いて包括的に解析した。DNAアレイはかずさDNA研究所においてAgilent社製遺伝子発現用マイクロアレイHuman Whole Genomeを用いて行った。ラベлизация方法はAgilent社製Quick Amp Labeling Kitを使用した。

3) TCZの治療効果を予測する臨床情報ならびに予測候補遺伝子の抽出 (池田、中島)

トレーニングコホート (n = 20) の医師総合評価とCDAI変化による無効例と有効例において、有意差のある患者背景、およびTCZ治療開始前の臨床所見、血液検査所見、ならびに関節超音波所見を、単変量解析を用いて抽出した。同様にTCZ投与前のPBMCで発現に違いのある遺伝子を単変量解析で抽出した (t検定 $p < 0.05$ かつ fold change > 1.5)。

4) 定量的PCRを用いたTCZの薬効予測モデルの確立 (池田、廣瀬、中島)

3) により抽出された遺伝子の発現レベルを定量的リアルタイムPCRを用いて解析し、DNAマイクロアレイのシグナル値との相関を検証した。相関の高い遺伝子による薬効予測モデルを構築し、バリデーショコホート (n = 20) において薬効予測の精度を測定した。

5) 血清マーカーを用いたTCZの薬効予測モデルの確立 (池田)

4) により抽出された遺伝子より分泌蛋白、膜蛋白、ならびに関連血清蛋白を同定し、トレーニングコホートの有効群と無効群の血清における蛋白発現の差をELISAを用いて確認した。

6) TCZの効果発現機序の解明(池田、中島、高取)

TCZ著効症例の末梢血CD4陽性T細胞において、TCZ投与後に発現の低下している AT-rich interactive domain-containing protein 5a (ARID5A)に注目した。ヒト末梢血およびマウス脾臓由来のナイーブCD4陽性T細胞から分化誘導したTh1細胞、Th2細胞、Th17細胞、Tfh細胞、Treg細胞におけるARID5Aの発現をリアルタイムPCR法で解析した。マウス脾臓由来のCD4陽性T細胞にレトロウイルスベクターを用いてARID5AをGFPと共に強制発現させ、各ヘルパーT細胞の分化誘導条件で培養した際のヘルパーT細胞分化への影響を細胞内サイトカイン染色法により解析した。またT細胞特異的STAT3/ROR γ t欠損マウスの脾臓由来のナイーブCD4陽性T細胞を各種条件で分化誘導した際のARID5Aの発現を解析した。

7) 新規薬効評価マーカーの同定(高取、池田)

全症例において、CDAI/超音波総PDスコアと同時に採取したPBMC/CD4陽性T細胞での発現が相関する遺伝子を抽出した。また有効群と無効群の間で、投与12週での発現の変化の差が大きい遺伝子を抽出した。これらを発現量、あるいは分泌蛋白、膜蛋白で絞り込み、定量的PCRあるいはELISAで発現を確認した。治療12週でのSRM (standardized response mean)、あるいは52週での総シャープスコアとの相関を解析することにより、新規薬効評価マーカーとしての有用性を検討した。

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 (図 1) 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 (Arthritis Rheumatol 2014;66:1421)。臨床情報ならびに関節超音波所見は、TCZ の薬効予測には寄与しなかった。

ヒト末梢血およびマウス脾臓由来のナイーブ CD4 陽性 T 細胞から各種条件で分化誘導した細胞では、Th17 細胞において ARID5A の mRNA 発現が亢進していた。興味深いことに、マウス脾臓由来の CD4 陽性 T 細胞にレトロウイルスベクターを用いて ARID5A を強制発現させると、Th17 細胞分化が低下した (図 2)。Treg 細胞分化に対する影響はなかった。T 細胞特異的 STAT3 欠損マウス由来の Th17 細胞では ARID5A の mRNA 発現が著明に低下していた。レポーター解析では ARID5A の強制発現は ROR γ t による IL-17 発現を抑制し (図 3) またウェスタンブロットにより ARID5A と ROR γ t の直接結合が示された (Arthritis Rheum 2014;66:1185)。

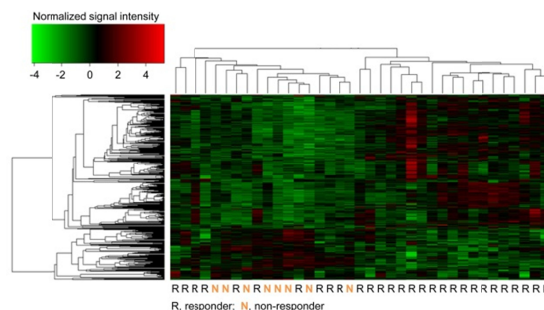


図 1. 無効例と有効例の間でシグナル値が有意に異なったプローブのクラスター解析

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

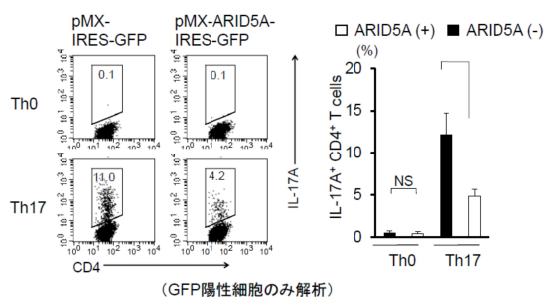


図2. マウス CD4 陽性 T 細胞における ARID5A の強制発現による Th17 細胞分化の低下

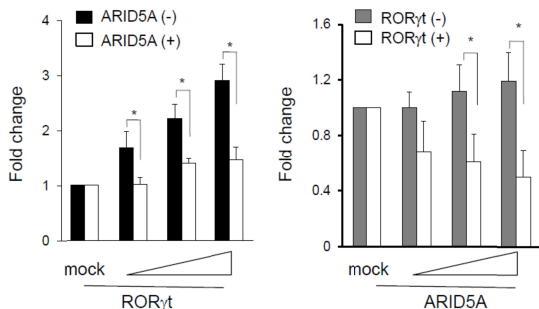


図3. ARID5A および ROR γ t の強制発現による IL-17 プロモーター活性の変化

D. 考察

TCZ 薬効予測遺伝子として抽出された 4 遺伝子中、*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一つであるが、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。現在 4 遺伝子によるカスタムアレイを作成中であり、関連血清マーカーとともに大規模での TCZ の薬効予測精度を検証予定である。

ARID5A は Th17 分化に伴って STAT3 依存性に発現し、Th17 細胞分化を抑制する負のフィードバック機構として働いていること、その分子機構として ROR γ t との直接結合による阻害が示唆された。近年 ARID5A の IL-6 mRNA の安定性を介した自己免疫への関与が報告されているが、その関節炎モデルにおける役割を現在検討中である。

複数の IRGs、メタロチオネイン I/II ファミリー遺伝子、さらに ARID5A は、TCZ 有効群において疾患活動性の低下に伴いその発現が低下した。TCZ 投与下における特異的な疾患活動性/薬効評価マーカーとしての有用性が示唆され、他の抗リウマチ薬投与患者を含め検証中である。

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。また RA 患者の末梢血 CD4 陽性 T 細胞において、TCZ 投与により発現低下する遺伝子として ARID5A が同定され、Th17 細胞分化の新規抑制分子であることが示された。TCZ 特異的薬効評価マーカーならびに新規治療ターゲット経路の候補と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

英文

1. Sanayama Y, Ikeda K, Saito Y, Kagami S, Yamagata M, Furuta S, Kashiwakuma D, Iwamoto I, Umibe T, Nawata Y, Matsumura R, Sugiyama T, Sueishi M, Hiraguri M, Nonaka K, Ohara O, Nakajima H. Prediction of therapeutic responses to tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis: biomarkers identified by analysis of gene expression in peripheral blood mononuclear cells using genome-wide DNA microarray. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:1421-31.
2. Saito Y, Kagami S, Sanayama Y, Ikeda K, Suto A, Kashiwakuma D, Furuta S, Iwamoto I, Nonaka K, Ohara O, Nakajima H. AT-rich-interactive domain-containing protein 5A functions as a negative regulator of retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor gamma-induced Th17 cell differentiation. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:1185-94.

国際学会

1. Sanayama Y, Ikeda K, Saito Y, Kagami S, Yamagata M, Furuta S, Kashiwakuma D, Iwamoto I, Umibe T, Nawata Y, Matsumura R, Sugiyama T, Sueishi M, Hiraguri M, Nonaka K, Ohara O, Nakajima H. Prediction of therapeutic responses to tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis using biomarkers identified by genome-wide dna microarray analysis in peripheral blood mononuclear cells. *2014*

European Colleague Against Rheumatism Congress, Jun 2014, Paris.

2. Sanayama Y, Ikeda K, Kagami S, Furuta S, Kashiwakuma D, Iwamoto I, Umibe T, Matsumura R, Sugiyama T, Sueishi M, Nawata Y, Hiraguri M, Nonaka K, Ohara O, Nakajima H. Prediction of clinical response to tocilizumab therapy with comprehensive gene expression analysis of peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis. *2012 European Colleague Against Rheumatism Congress*, Jun 2012, Berlin.

国内学会

1. 齊藤ゆかり、加々美新一郎、眞山快枝、池田啓、岩本逸夫、小原収、中島裕史 . AT-rich interactive domain-containing protein 5a functions as a negative regulator of ROR γ t-induced Th17 cell differentiation. 第 42 回日本免疫学会 総会・学術集会 . 2013 年 12 月, 千葉 .
2. 古田俊介, 山形美絵子, 松浦功, 柏熊大輔, 岩本逸夫, 吉田象二, 鈴木快枝, 池田啓, 加々美新一郎, 中島裕史. トシリズマブ DNA アレイ解析によるトシリズマブの関節リウマチに対する薬効予測. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会 . 2011 年 7 月. 神戸 .

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