

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等実用化研究事業
免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究分野
研究分担報告書

関節リウマチにおける潜在性 B 型肝炎ウイルス感染の末梢血遺伝子発現に関する研究

研究分担者 小山 芳伸 岡山赤十字病院 膠原病リウマチ内科 部長
研究協力者 樋口 俊恵 岡山赤十字病院 膠原病リウマチ内科 医師

研究要旨

HBV 既感染患者は HBV 遺伝子が cccDNA の形で肝細胞内に残存していると考えられている。ここに免疫抑制などによって免疫監視機構がはずれると、ウイルスの再活性化が起こる。しかし、その割合や詳細なメカニズムなどは不明であり、再活性化リスクをあらかじめ見積もることはできない。我々は治療未介入初発 RA 患者 19 例を対象に、B 型肝炎ウイルス (HBV) 既感染の有無で発現の変化する末梢血遺伝子について、DNA マイクロアレイを用いて調べた。その結果、有意な差のある 311 遺伝子が抽出された。そのうち、NCBI データベースでウイルス感染や HBV 感染に関連するのは 8 遺伝子あり、インターフェロンのシグナル伝達に關与する 2 遺伝子が含まれていた。この事は、ウイルス感染による生体内変化を反映しているだけでなく、HBV ウイルスの免疫監視機構を反映している可能性がある。また、今後 HBV 再活性化症例について同様の検討を行うことで、HBV 再活性化の予防にも有用な情報を提供する可能性がある。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス (HBV) 既感染の患者では、HBV 遺伝子が cccDNA の形で肝細胞内に残存していると考えられている。ここに免疫抑制などが原因で免疫監視機構がはずれると、ウイルスの再活性化が起こり得る。具体的には免疫抑制剤や悪性腫瘍治療薬の使用などによって引き起こされる de novo B 型肝炎が問題となっている。現時点では、免疫監視機構の詳細なメカニズムや、免疫抑制による再活性化割合などは不明であり、そのリスクをあらかじめ見積もることはできない。

一方 HBV 感染により、特に肝炎症状を認めない状況でも、生体は何らかの変化を起こして免疫監視機構を働かせていると予想される。つまり、末梢血遺伝子発現は、HBV の感染状況に応じて変化している可能性がある。近年 DNA マイクロアレイなどの手法により、全ゲノムの遺伝子発現を一度に調べることが可能になった。従って、その発現特性を調べることで、免疫監視の機能状況や再活性化のリスクが予測できる可能性があり、その調査を目的とする。

B. 研究方法

岡山赤十字病院の関節リウマチ (RA) 患者の

うち、初発で治療修飾を受けておらず、研究に同意が得られた患者 19 症例について解析を行った。

治療開始前に QIAGEN PAX-Gene 試験管で全血を採取し mRNA を安定化後 -70℃ に保管。mRNA を精製後 Agilent 社 Whole human genome 60K チップを用いて、全ゲノム (42406 遺伝子) を対象に遺伝子発現レベルを測定した。

HBc 抗体陽性患者と陰性患者について比較し、遺伝子発現に差異があるかどうかを調べた (倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針 (平成 25 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) を遵守した上で、説明文書を作成し、研究参加の同意を文書で取得した。また、岡山赤十字病院・倫理委員会の承認を受けた。

C. 研究結果

HBc 抗体陰性例 14 例、陽性例 5 例であった。RA 活動性について、両グループ間で統計学的有意差は認めなかったが、HBc 陽性例では RF 陰性、ACPA 陰性例が多かった。(Table1)

【Table1】

	HbC 陰性	HbC 陽性
患者数	14	5
RF 陽性率 (%)	78.6	40.0
ACPA 陽性率 (%)	84.6	40.0
CRP (mg/dL)	1.81 ± 1.29	1.99 ± 2.66
MMP-3 (ng/mL)	306.8 ± 379.8	381.1 ± 437.8
DAS28	3.82 ± 1.92	5.01 ± 2.51
SDAI	18.1 ± 9.3	27.9 ± 15.0

全ゲノム遺伝子を対象に、各遺伝子の mRNA の発現量を調べ、2 グループ間で t 検定により有意差を認められたのは 311 遺伝子であった。そのうち NCBI データベースでウイルス感染や HBV 感染に関連するとされた遺伝子が 8 つあった。(Table2) 各遺伝子について、NCBI において「viral infection」「Hepatitis B」に関連するものに 印を付けた。

【Table2】

Probe Name	T-test p-val	up/down	virus infection	HBV	Chrom No	Description
A_23_P86599	0.001	down			chr10	Deleted in malignant brain tumors 1 (DMBT1)
A_23_P500271	0.001	up			chr7	Interferon regulatory factor 5 (IRF5)
A_23_P12113	0.002	down			chr1	Feline leukemia virus subgroup C cellular receptor 1 (FLVCR1)
A_33_P3361457	0.002	up			chr21	Interferon (alpha, beta and omega) receptor 2 (IFNAR2)
A_23_P150053	0.003	up			chr10	Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta (ACTA2)
A_23_P95213	0.004	up			chr8	Surfactant protein C

					(SFTPC)
A_33_P3250680	0.006	down		chrX	CD40 ligand (CD40LG)
A_23_P404494	0.007	down		chr5	Interleukin 7 receptor (IL7R)

D. 考察

HbC 抗体陽性は、HBV 既感染者と考えられ、HBV は cccDNA の形で肝細胞内に組み込まれているとされる。このような状態では、適正な免疫監視機構が働いていれば、HBV が再活性化される事はないと考えられている。今回、RA 未治療患者の、HbC 抗体陽性者と陰性者の末梢血遺伝子発現で、統計学的に有意な差を認められたのは 311 遺伝子であった。このうち、NCBI のデータベースでウイルス感染や HBV 感染に関連する遺伝子が 8 つ存在した。この事は、まず、HBV 感染によって何らかの生体の反応が起こり、末梢血遺伝子発現が変化していると考えられる。また、HBV 既感染者の多くで HBV が何らかの活動を行い、これが末梢血遺伝子発現に影響を与えている可能性も示唆される。

この 8 遺伝子の中にはインターフェロンのシグナル伝達に関わる IRF5 や IFNAR2 遺伝子も含まれていた。現時点では、HBV 再活性化を抑制する免疫監視機構の詳細なメカニズムは明らかで無いが、これらの遺伝子に関わっている可能性も考えられる。

HBV 再活性化は免疫機能が落ちて再活性化が起こるとされている。しかし、具体的に免疫機能のどの部分がクリティカルなのかは未だ不明である。末梢血遺伝子発現レベルにおいて、どのような遺伝子発現の低下が HBV 再活性化につながるのかは、極めて興味深いテーマである。これが解明できれば、再活性化が起こる前に予防することが可能となる。

ただ、現時点では HBV 再活性化患者は解析に含まれていない。従って、これらの遺伝子が免疫監視機構にどの程度関わっているのか、また、HBV 再活性化リスクの評価に有用か否かは、HBV 再活性化症例についても、同様の解析を行う必要がある。

しかし、今回の研究によって、末梢血遺伝子発現が HBV 既感染の有無によって異なる事が示された意義は大きい。

E. 結論

治療未介入 RA 患者において、HBV 既感染の

有無により、末梢血で発現が有意に異なる遺伝子が存在した。

遺伝子発現の変化は、ウイルス感染による生体内変化を反映しているだけでなく、HBV ウイルス活動性を反映している可能性もある。遺伝子発現の変化が有意に認められた遺伝子のうち、NCBI データベースにおいて、ウイルス感染や HBV 感染に関連するものとして 8 遺伝子が同定された。中でも IRF5 や IFNAR2 は IFN シグナルに関連する遺伝子であり、HBV 再活性化予防の免疫監視機構に関わっている可能性も考えられた。

HBV 既感染者における末梢血発現遺伝子の検討は、HBV 再活性化の予防やモニターに有用な情報を提供する可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 第58回日本リウマチ学会（2014年4月東京）
・肥満と関節リウマチ（RA）～内臓脂肪/皮下脂肪比はRA活動性に影響する
樋口俊恵、中村明彦、小山芳伸
- 第66回欧州リウマチ学会（2014年6月 フランス・パリ）
・IL-6 inhibitor or TNF inhibitor?
Validation of a newly proposed scoring method to predict preferable treatment for rheumatoid arthritis.
J.Nakagawa, A Kawakami, Y Ueki, T.Horiuchi, A.Uchino, T.Ota, S.Nagano, Y.Koyama,

・Association of obesity with rheumatoid arthritis: The visceral/subcutaneous fat ratio affects disease activity, resistance to methotrexate treatment and the expression of FAS gene in peripheral blood.
T.Higuchi, A.Nakamura, M.Tanino, Y.Koyama
- 第78回米国リウマチ学会（2014年11月 米国・ボストン）
・Targeting IL-6 Versus Targeting JAK or SYK? : An Analysis of Transcriptome Alteration in Peripheral Blood By RA Treatment

Y.Koyama, M.Tanino, S.Nagano, T.Ota, T.Higuchi

- 第29回臨床リウマチ学会（2014年11月福岡）
・RA活動性指標と精神的因子～患者/医師全般評価の乖離に気分の因子が影響する
亀山由佳、柳島真樹、深見沙弥佳、樋口俊恵、小山芳伸

・肥満のタイプは関節リウマチの病態を修飾する因子である

樋口俊恵、中村明彦、小山芳伸

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