

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：84416

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07384

研究課題名(和文)ゲノム医療に向けたメトトレキサート関連リンパ増殖性疾患の新規責任遺伝子の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of novel responsible genes for methotrexate-related lymphoproliferative disease toward genomic medicine

研究代表者

星田 義彦 (Hoshida, Yoshihiko)

独立行政法人国立病院機構(大阪南医療センター臨床研究部)・その他部局等・医長

研究者番号：40324777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本課題ではメトトレキサート関連リンパ増殖性疾患(MTX-LPD)の病態と関連する網羅的遺伝子探索を目的として先行研究で実施したゲノムワイド関連(GWAS)解析と統合的解析するためにRNAトランスクリプトーム解析の統合的解析を実施した。これによりMTX-LPDの病態に関連する幾らかの遺伝子を見出した。特に治療効果と遺伝子A、MTX投与中止にて退縮する病態と関連する2つの遺伝子を見出した。これらの遺伝子を用いたprecision medicineが可能となり、本課題の研究成果がゲノム医療に繋がることが期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MTX-LPDは、リウマチ(RA)治療薬であるMTXの低容量投与中に発生するLPDで、時にMTX投与の中止にて腫瘍が退縮する“リバーシブルなリンパ腫”という興味深い病態を示す。本課題では先行のGWAS解析にてゲノムワイド水準を上回ったSNP情報からえられた候補遺伝子とRNAトランスクリプトーム解析の統合的解析を行う。これにより、MTX-LPDの病態のメカニズムの解明、それに伴うゲノム医療の実践、治療薬の開発等の社会貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Lymphoproliferative disorders (LPD) that develop in patients with rheumatoid arthritis (RA) treated with low-dose methotrexate (MTX) are known as MTX-associated LPD (MTX-LPD). More than half of the cases of MTX-LPD undergo spontaneous regression after the discontinuation of MTX, while approximately 33% of these cases relapse after a certain period. MTX-LPD is currently the most serious obstacle to RA treatment. Integrated analysis with genome-wide association analysis (conducted in previous research) and RNA transcriptome analysis was performed to comprehensively search for genes related to MTX-LPD pathophysiology. Our findings suggest that Gene A, which is associated with therapeutic effects, and Gene B, which is associated with MTX-LPD regression pathology, can be used to develop precision medicine. It is expected that the results of this project will lead to the development of genomic medicine.

研究分野：血液病理

キーワード：Rheumatoid arthritis LPD Methotrexate RNA transcriptome GWAS MTX-LPD RA-LPD

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

MTX-LPD は MTX を長期間低容量投与された患者に発生する LPD で、多くは RA 患者に発生する。本疾患はいくつかの要因からできたヘテロな疾患群であり、RA の免疫異常状態、MTX が宿主にもたらす免疫抑制状態、エプスタインバーウイルス(EBV)感染等の要因が複雑多岐に絡まって興味深い病態を形成している。特にこれらの中に『リバーシブルなリンパ腫』な病態を示す症例が含まれていることは、日常リウマチ臨床の場での対応を難しくしている。

本疾患は RA 治療薬である MTX が関係する薬剤関連疾患であることより、その発症や病態に宿主側の遺伝子多型(SNP)が関与することが予想された。そこで我々は平成 29 年度-31 年度科研費、基盤研究 (C)にて LPD を発症したリウマチ患者 238 例とその対照として LPD を発症していないリウマチ患者の血液検体 594 例を用いてジャポニカアレイによる日本人に適した GWAS 法による SNP 解析を行った。用いたプローブは 659,636 個の SNP で、更に約 400 万個の SNP についてのインピュテーション解析を行い、ゲノムワイド水準を上回った 29 個の SNP を同定した。

## 2. 研究の目的

本研究では、先行研究で得たゲノムワイド関連解析(GWAS)による SNP 解析結果に加えて RNA トランスクリプトーム解析を実施し、これらにつき統合的解析を行う。本解析により、MTX-LPD の病態のメカニズムの解明でき、ゲノム医療の実践、治療薬の開発に繋がることが期待できる。

## 3. 研究の方法

### (1) RNA トランスクリプトーム解析

MTX-LPD 発症の RA 患者 191 例と LPD 非発症の RA 患者 20 例の血液検体から RNA トランスクリプトーム解析を実施し、mRNA レベルでの遺伝子発現状況を網羅的に解析した。その結果と GWAS でゲノムワイド水準を超えた SNP に位置する遺伝子の SNP のゲノタイプと RNA トランスクリプトームとの統合解析を行った。

RA-LPD86 例と非 RA 患者に発生した LPD(対照)39 例の腫瘍部の検体を用いた RNA トランスクリプトーム解析を実施し、上記と同様の解析を行った。

### (2) RA 患者に発生する LPD の多施設共同研究による臨床病理学的解析

RA 患者に発生する LPD (RA-LPD) につき全国の 48 施設との多施設共同研究により 752 例の多数例の臨床病理学的解析を実施した。

## 4. 研究成果

### (1) GWAS 解析と RNA トランスクリプトーム解析の統合的解析

MTX-LPD の中で最大亜型である瀰漫性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL) の症例のなかで治療効果の良い群 (CR+SR) の血液検体において GWAS でゲノムワイド水準を超えた SNP に位置する遺伝子である遺伝子 A は対照群(非 LPD 発症 RA 患者)に比べ低発現を示した。

MTX-LPD の MTX 投与中止により自然退縮した群において GWAS でゲノムワイド水準を超えた SNP に位置する遺伝子である遺伝子 B は、DLBCL 群の自然退縮した症例の腫瘍部で非 RA 患者に発生した DLBCL に比べ RNA の高発現を示した。

MTX-LPD の節性の DLBCL において

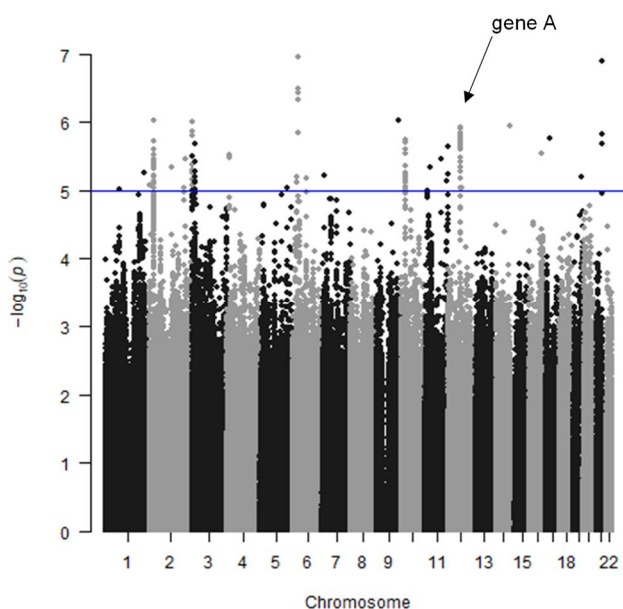


図1. マンハッタンプロット

GWAS でゲノムワイド水準を超えた SNP に位置する癌抑制遺伝子である遺伝子 C は腫瘍部において発現は有意差が見られなかったが低下する傾向がみられた(P=0.086)。MTX-LPD の退縮後再発なしの DLBCL において GWAS でゲノムワイド水準を超えた SNP に位置する癌遺伝子である遺伝子 D は腫瘍部においては有意差が見られなかったが高発現する傾向がみられた(P=0.060)。

(2) 網羅的 RNA トランスクリプトーム解析

LPD 症例の腫瘍部からの網羅的 RNA トランスクリプトーム解析により、DLBCL 症例の発現変動遺伝子 (DEG) (FC>2、p 値<0.1) として 113 の遺伝子が認められた。pathway 解析を行ったところ、DLBCL 群で TNF 経路に関連する遺伝子が亢進し、自然消退した群では自然消退しない群と比較して interferon-、interferon- の経路などが亢進していた。同じく、自然消退した群内で EB ウイルス陽性群では E2F\_target に関する経路が、陰性群では NOTCH signaling、TGF-、WNT- signaling、IL2-STAT5 に関する経路が亢進し、陽性群と陰性群間で異なる pathway が亢進していた。

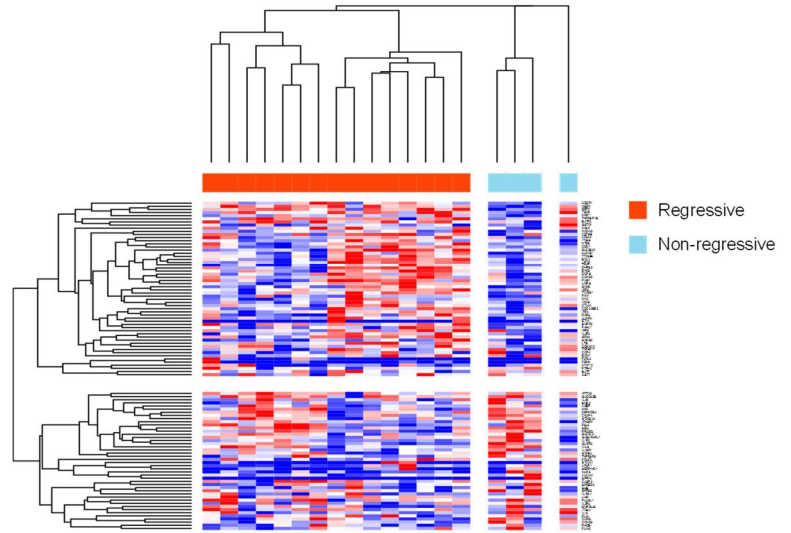


図 2. ヒートマップ

(3) 多施設共同研究による臨床病理学的解析

RA-LPD は発症前のリウマチ治療薬を重複なしに検討して、これらにより RA-LPD の臨床病理学的特徴が異なることを報告した。

LPD 発症後の諸因子につき検討した。その結果、RA-LPD の予後は全体的には一般のリンパ腫に比べ予後が良いが、個々にみるとホジキン病、マルトリンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、肺、胃原発では差はみられず、組織型別や発生部位別に予後予測をする必要があることを示した。

抗リウマチ投与中止後退縮した症例や初期治療後寛解した症例の 4.1%では異なる組織型を示し、そのような症例は腫瘍死が多かったことより、再増殖、再発時にはできるだけ再生検を必要があることを示した。

LPD 発症後トシリズマブ (TCZ) 単独投与した症例では予後が良いことを示し、LPD 発症後のリウマチ治療薬の選択のために有用なエビデンスを示した。

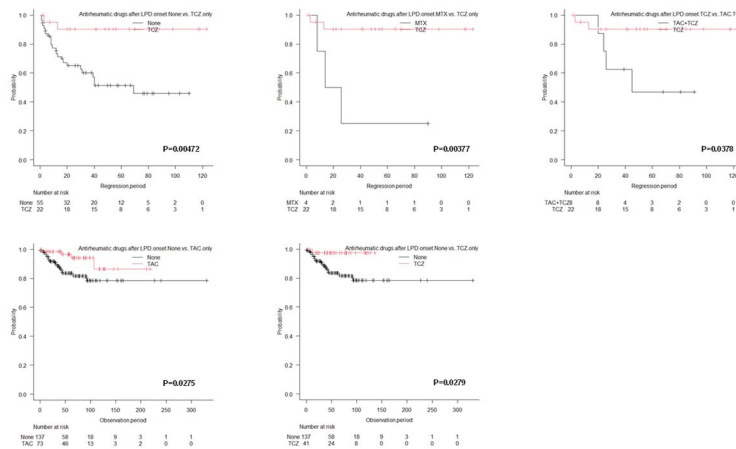


図 3. カプランマイヤー曲線

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saeki Yukihiro, Okita Yasutaka, Igashira-Oguro Eri, Udagawa Chikako, Murata Atsuko, Tanaka Takashi, Mukai Junji, Miyazawa Keiji, Hoshida Yoshihiko, Ohshima Shiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Modulation of TNFR 1-triggered two opposing signals for inflammation and apoptosis via RIPK 1 disruption by geldanamycin in rheumatoid arthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Rheumatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10067-021-05579-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamada Chika, Oguro Eri, Tsuji Soichiro, Kudo-Tanaka Eriko, Teshigawara Satoru, Ohshima Shiro, Hashimoto Jun, Saeki Yukihiro, Horiuchi Tetsuya, Iizuka Norishige, Tomita Yasuhiko, Hoshida Yoshihiko	4. 巻 30
2. 論文標題 Pathological assessment of the lymph node biopsies for lymphadenopathy in rheumatoid arthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 835 ~ 842
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2019.1675260	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Noguchi Takaaki, Hirao Makoto, Okamura Gensuke, Tsuiji Shigeyoshi, Etani Yuki, Ebina Kosuke, Tsuboi Hideki, Hoshida Yoshihiko, Okada Seiji, Hashimoto Jun	4. 巻 -
2. 論文標題 Early Resection of the Tibialis Anterior Tendon for Tendon Exposure After Total Ankle Arthroplasty to Prevent Deep Infection: A Report of Three Cases in Patients With Rheumatoid Arthritis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cureus	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7759/cureus.40441	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 星田義彦
2. 発表標題 Rheumatoid Arthritis Associated Lymphoproliferative Disorders: Current Features and It's Changing Pattern Due to the Influence of Anti-rheumatic Drugs
3. 学会等名 ACR 2022 annual Meeting American College of Rheumatology (ACR) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 星田義彦
2. 発表標題 リウマチ患者に発生したリンパ増殖性疾患の臨床病理学的特徴
3. 学会等名 第111回日本病理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 星田義彦
2. 発表標題 乾癬性関節炎に合併したMTX関連リンパ増殖性疾患(PsA-LPD)の3例報告
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 星田義彦
2. 発表標題 MTX関連リンパ増殖性疾患発生後のRA患者に対するイグラチモドの有効性・安全性
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 星田義彦
2. 発表標題 関節リウマチ患者に発生したEBV陽性CD20陰性びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫の一例
3. 学会等名 第110回日本病理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 星田義彦
2. 発表標題 リウマチ性疾患の合併症：リンパ増殖性疾患 リウマチ関連リンパ増殖性疾患の多施設共同研究による病理学的解析
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 星田義彦
2. 発表標題 MTX-LPDを疑う関節リウマチ患者のリンパ節生検に対する客観的指標の検討
3. 学会等名 第109回日本病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 星田義彦
2. 発表標題 リウマチ関連リンパ増殖性疾患における検査値の動向
3. 学会等名 第67回日本臨床検査医学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 3 学会合同RA関連LPDワーキンググループ（日本リウマチ学会、日本血液学会、日本病理学会）（分担執筆）星田義彦	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 135
3. 書名 関節リウマチ関連リンパ増殖性疾患の診断と管理の手引き	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大島 至郎  (OHSHIMA SHIRO)  (50362728)	独立行政法人国立病院機構（大阪南医療センター臨床研究部）・その他部局等・部長    (84416)	
研究分担者	大前 陽輔  (OMAE YOSUKE)  (70722552)	国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・上級研究員    (82610)	
研究分担者	西尾 和人  (NISHIO KAZUTO)  (10208134)	近畿大学・医学部・教授    (34419)	
研究分担者	坂井 和子  (SAKAI KAZUKO)  (20580559)	近畿大学・医学部・講師    (34419)	
研究分担者	富田 裕彦  (TOMITA YASUHIKO)  (60263266)	国際医療福祉大学・医学部・教授    (32206)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	辻井 敦子  (TSUJII ATSUKO)  (30972210)	独立行政法人国立病院機構（大阪南医療センター臨床研究部）・その他部局等・医師     (84416)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関