

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860809

研究課題名(和文) 網羅的オミックス解析を用いた高安動脈炎の病態解明

研究課題名(英文) Clarification of pathophysiology of Takayasu Arteritis

研究代表者

寺尾 知可史(Terao, Chikashi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60610459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：400例超の高安動脈炎患者DNA検体及びデータを集積し、新規感受性HLA-Bアレルを同定し、全ゲノム関連解析にてIL12p40をコードするIL12Bを含む新規感受性領域を2つ同定した。IL12Bは高いオッズ比を示し、合併症およびその重症度と関連、既報のHLA-B*52:01と相互作用を示し、病態の中心的役割を果たしているものと思われた。また、炎症性腸疾患の一つである潰瘍性大腸炎の合併が6.4%に及ぶこと、遺伝学的手法により両疾患に共通の分子基盤が関わっていることを示した。さらに、炎症性腸疾患に用いられているIL12p40を標的としたウステキヌマブが有効であることを臨床試験によって示した。

研究成果の概要(英文)：We collected DNA samples and clinical information from more than 400 patients with Takayasu arteritis (TAK). We identified a novel susceptibility HLA-B allele and two novel non-HLA susceptibility loci. The top SNP in the IL12B region showed high odds ratio and was associated with complication and severity of aortic regurgitation, a severe complication of TAK. Furthermore, the SNP demonstrated a synergistic effect with HLA-B*52:01, the strongest HLA susceptibility allele to TAK. These results indicate that IL12p40, encoded by IL12B, is a key molecule to TAK. Furthermore, we showed that 6.4% of patients with TAK suffered from ulcerative colitis (UC), one of inflammatory bowel diseases (IBD). We also showed a significant genetic overlap between TAK and UC, suggesting that the two diseases share common molecular pathways. Furthermore, we showed that ustekinumab, a monoclonal antibody to IL12p40 used for patients with IBD, was effective to patients with TAK in a pilot clinical study.

研究分野：免疫ゲノム医学

キーワード：自己免疫性疾患 高安動脈炎 全ゲノム関連解析

1. 研究開始当初の背景

高安動脈炎は1908年に本邦から世界で初めて報告された疾患であり、大動脈及びその主要な分枝を侵す血管炎である。若年女性に好発し、全身炎症に伴う症状の他、虚血による臓器障害、大動脈弁閉鎖不全症や心筋梗塞・脳梗塞などの重篤な合併症を呈する。治療はステロイドが使用できるようになってから改善したが未だ十分でなく、免疫抑制剤の併用も行われるが疾患活動性のコントロールに難渋する例も多い。

高安動脈炎患者数は本邦で5000-10000例ほどと推計されており、高安動脈炎の研究は検体蓄積の困難さからあまり進んでいない。遺伝因子の関与はHLA-B領域、特にHLA-B*52:01が人種を越えたりスクであることは知られていたが、他のHLAアレルに関しては確立したものはなかった。また、非HLA領域についての研究はほとんど行われていなかった。遺伝因子を基にした病態解明は高安動脈炎の本質を明らかにし、新規治療ターゲットを同定することにつながる可能性があると考えられた。

また、高安動脈炎の解析が進捗すれば、本解析で用いたフレームワークは希少性複合性疾患の克服に向けたアプローチのモデルとなる可能性があると思われる。

2. 研究の目的

1) 研究者のこれまで培ってきた共同研究施設ネットワークをさらに拡充して高安動脈炎患者検体を集積するとともに、患者団体と協力して患者検体の収集を積極的に進め、HLAタイピングによる疾患感受性HLAアレルの同定、一塩基多型(SNP)に着目した全ゲノム関連解析(GWAS)による疾患感受性領域の同定を目的とする。また、疾患感受性HLAアレル及び非HLA領域の機能的役割を明らかにする。

2) 集積した検体の臨床情報を収集し、疫学的手法と遺伝学的手法を用いてその疾患病態に関するエビデンスを提示する。

3) 上記の解析結果を基に、新規治療ターゲットとなり得る物質を同定し、治療戦略として臨床応用可能かどうかを検証する。

3. 研究の方法

1) 高安動脈炎患者のHLA-Bアレルのタイピングを行い、健常人データとの比較を行う。
2) セットの独立した症例対照群、高安動脈炎患者合計173例と健常人2000例とを比較した。また、HLA-Bアレルのデータを基に、アミノ酸の配列を取得し、アミノ酸変異ごとの関連解析を施行した。

2) 高安動脈炎患者167例と健常人663例を

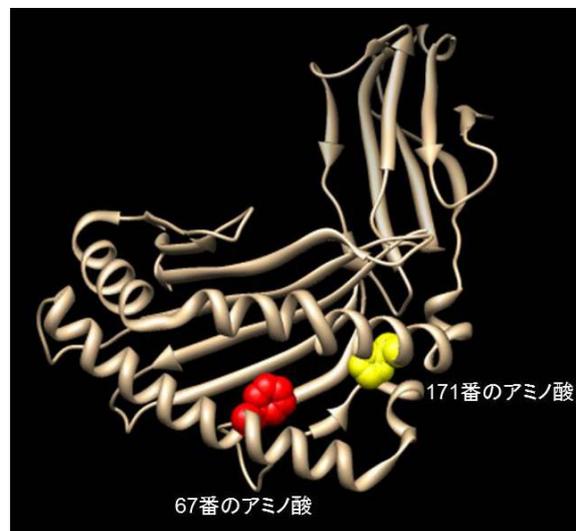
用いてGWASを施行した。結果を基に212人の患者検体と1,322人の健常人検体を用いて追認解析を行った。また、関連SNPにつき、高安動脈炎の臨床症状との関連解析を行った。

3) 遺伝子解析結果に用いた検体を中心に日本全国14施設から合計470例のデータを収集し、炎症性腸疾患の一つである潰瘍性大腸炎の合併について解析を行った。合併例の特徴につき、高安動脈炎の臨床症状を中心に関連解析を施行した。また、両疾患の遺伝的な類似性を検討し、共通の分子基盤がないかどうかを解析した。

4) 遺伝子解析結果及び炎症性腸疾患との共通分子基盤から極めて有望な治療標的と思われるIL12p40に対する抗体製剤であるウスチキヌマブを用い、高安動脈炎患者に対する臨床試験を行った。

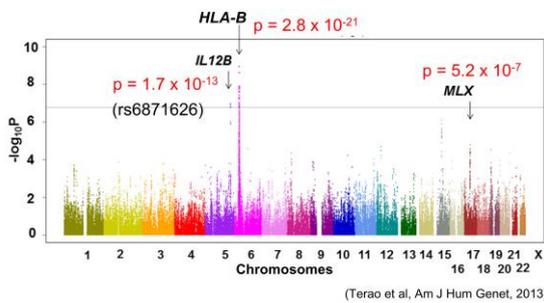
4. 研究成果

1) 既報のHLA-B*52:01の関連を確認した($p=1.6 \times 10^{-16}$, オッズ比2.82 (95%信頼区間2.19-3.64))ほか、新規の感受性アレルHLA-B*67:01を同定した($p=9.5 \times 10^{-6}$, オッズ比3.62 (95%信頼区間1.97-6.66))。以前に一部で報告のあったHLA-B*39:01の関連は明らかでなかった。アミノ酸の解析では、171番目のヒスチジン(感受的)と67番目のフェニルアラニン(防御的)が関連を示した。これら2つのアミノ酸の影響を除くと、158番目のアラニンが関連を示したが、他のアミノ酸のモデルと比し有意差がなく、疾患感受性に重要であるアミノ酸は158番目のアラニンであるとは結論付けられなかった。171番と67番のアミノ酸はHLA-Bタンパクのペプチド結合領域に存在しており、これらのアミノ酸によってもたらされる抗原結合の変化が高安動脈炎の疾患感受性に重要であることが示唆された(図)。



HLA-B*51:01 は B*52:01 と二つのアミノ酸しか異ならないにもかかわらず、高安動脈炎には関連せず、別の膠原病であるベーチェット病と関連する。67 番目のアミノ酸はこれら二つのアレルで異なる二つのアミノ酸のうちの一つであり、HLA-B*51:01 は 67 番目のフェニルアラニンを持つ。我々の解析の結果によって、なぜ HLA-B*51:01 が高安動脈炎に関連しないかの説明がつくと思われた。

2) ゲノムスキャンの結果、HLA 領域に加え、染色体 5 番の IL12B 領域に強い関連を認めた ($p \leq 1.8 \times 10^{-7}$)。遺伝的背景の構造化は認められなかった。また、p 値が 5.0×10^{-5} より小さい関連を示す多型を 4 つ同定し、追認解析を行った結果、HLA 領域、IL12B 領域に加え、染色体 17 番の MLX 領域の関連が確認された(下図)。HLA 領域で最も強い関連を示した SNP は HLA-B*52:01 と連鎖する SNP であった。



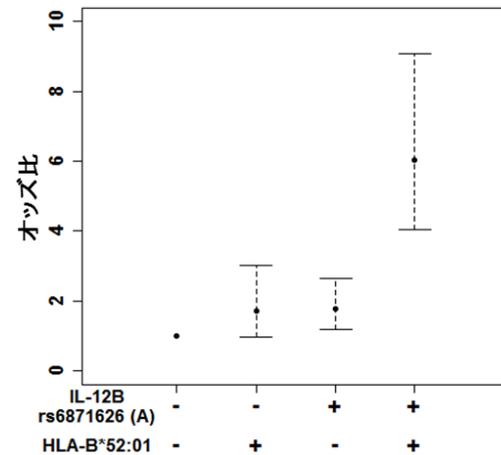
IL12B 領域の SNP の周囲には IL12B 遺伝子しかないが、MLX 領域の SNP 周囲は遺伝子が密にあり、多くが免疫に関連する遺伝子であったため、染色体 17 番の関連が MLX に起因するかどうかはさらなる研究が必要であると思われた。

強い関連を示した IL12B 領域の rs6871626 に着目してさらなる解析を行った結果、rs6871626 のリスクアレルは、高安動脈炎の重篤な合併症である大動脈弁閉鎖不全の合併頻度の上昇と関連していた ($p=0.0046$)。さらに、大動脈弁閉鎖不全症を合併した患者のみに着目した解析によって、rs6871626 のリスクアレルは、大動脈弁閉鎖不全症がより重篤であった ($p=0.0018$)。さらに、rs6871626 のリスクアレルは、炎症性マーカーである CRP の患者ごとの時間平均値の上昇と関連を示した ($p=0.021$)。

さらに、HLA-B*52:01 と rs6871626 は相互作用を示し、両方のリスクアレルを持つと、どちらか一方のみを持った場合のリスクから想定されるよりも高いリスクとなることを見出した(右上図)。

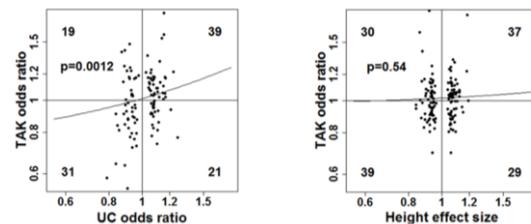
IL12B 遺伝子は、IL12 と IL23 の共通サブユニットである IL12/23 p40 タンパクをコードする。IL12 はタイプ 1 ヘルパー T 細胞 (Th1) の分化・増殖に必須のサイトカインであり、IL23 は、IL17 を産生するヘルパー T 細胞分画である Th17 の増殖・活性化に重要なサイト

カインである。発症だけでなく、合併症および重症度との関連は、IL12B 遺伝子ひいては IL12/23p40 が、高安動脈炎の病態に本質的な役割を果たしていることを強く示唆するものであると思われた。



3) 470 例の高安動脈炎患者データを解析した結果、潰瘍性大腸炎は 30 例に合併しており、合併率は 6.4%であった (95%信頼区間:4.3-9.0)。この割合は潰瘍性大腸炎の有病率(0.1%程度)を考えるとはるかに高い数値であった。合併例の特徴を調べると、合併例は高安動脈炎を有意に若い年齢で発症しており、合併例は非合併例に比して男性の割合が増加している傾向にあった。大動脈弁閉鎖不全症の合併及びその重篤度には差を認めなかった。

合併例の遺伝的特徴を解析すると、HLA-B*52:01 が強く関連していることが分かった ($p=1.0 \times 10^{-5}$, オッズ比:12.14 (95%信頼区間:2.96-107.23))。IL12B の多型も合併例に多い傾向にあった ($p=0.16$, OR:2.47 (95%信頼区間:0.72-13.11))。非合併例に注目して既報の潰瘍性大腸炎の疾患感受性領域との関連を解析すると、潰瘍性大腸炎感受性アレルは有意に高安動脈炎においても感受的に働いており、そのエフェクトサイズも有意に相関することが分かった(下図)。



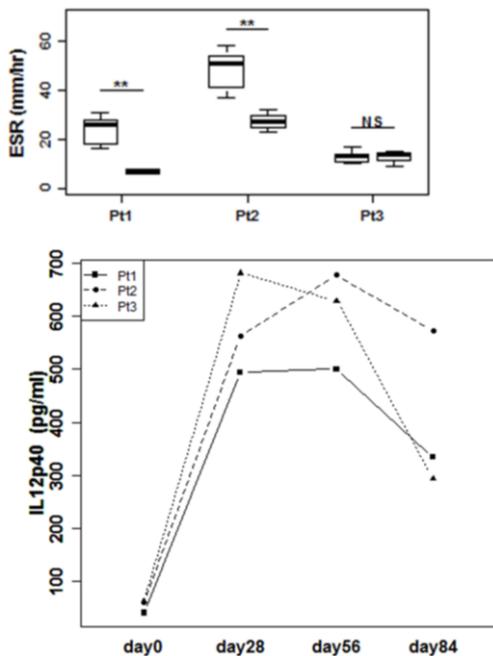
もう一つの炎症性腸疾患であるクローン病は潰瘍性大腸炎と遺伝的リスクを大部分で共有しているため、本結果は高安動脈炎と潰瘍性大腸炎、ひいては炎症性腸疾患との間に共通の分子基盤があることを強く示唆す

るものである。

4) 高安動脈炎において中心的役割を果たしている可能性の高い IL12p40 に対する抗体製剤であるウステキヌマブは、すでに臨床において乾癬および炎症性腸疾患に用いられており、効果を挙げている。さらに、乾癬・炎症性腸疾患ともに IL12B 領域が関連する。炎症性腸疾患と高安動脈炎は共通の分子ネットワークをその病態に持っている可能性が強いことから、ウステキヌマブは高安動脈炎患者に対して非常に有望な治療となる可能性がある。

そこで、倫理委員会承認のもと、ステロイド及び既存の免疫抑制薬に不応性の高安動脈炎患者 3 例を対象にパイロット臨床試験を行った。Day0, 28 の二回ウステキヌマブ投与を行い、投与前および Day84 に画像評価を行って 4 週毎に採血及び診察を行った。

3 例ともに投与前は高疾患活動性であったが、Day84 においては疾患活動性は低下した。特に血中の炎症性マーカーは速やかに低下した。血中の IL12p40 濃度は投与後から速やかに上昇し、これは IL12p40 とウステキヌマブが複合体を形成したためと思われる(下図)。



Terao et al. Scand J Rheumatol (in press)

一例が期間中に感冒用症状を呈したが速やかに改善し、他に副作用を疑わせる所見は認められなかった。一方で、画像評価においては投与前に認められた血管壁の増強効果は Day84 においても認められ、長期的な効果の評価は今後の課題であると思われる。今後、更なる規模の大きな臨床試験や治験を行い、最終的には保険適応を目指す予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- 1) Terao C et al. Ustekinumab as a therapeutic option for Takayasu arteritis -from genetic findings to clinical application- Scand J Rheumatol 査読有 (in press)
- 2) Terao C et al. Takayasu arteritis and ulcerative colitis -high concurrence ratio and genetic overlap. Arthritis Rheumatol. 査読有 (in press)
- 3) Terao C. History of Takayasu arteritis and Dr. Mikito Takayasu. Int J Rheum Dis. 査読有 2014 Nov;17(8):931-5.
- 4) Terao C et al. Recent advances in Takayasu arteritis. Int J Rheum Dis. 査読有 2014, 17(3):238-47
- 5) Terao C et al. Susceptibility HLA alleles and amino acids to Takayasu arteritis. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi. 査読無 2014;37(3):166-70.
- 6) Terao C et al. Two Susceptibility Loci to Takayasu Arteritis Reveal a Synergistic Role of the IL12B and HLA-B Regions in a Japanese Population. Am J Hum Genet. 査読有 2013;93(2):289-97.
- 7) Terao C et al. Association of Takayasu arteritis with HLA-B*67:01 and two amino acids in HLA-B protein. Rheumatology (Oxford). 査読有 2013;52(10):1769-74.

[学会発表] (計 6 件)

- 1) 寺尾 知可史, 松村 貴由, 吉藤元, 桐野 洋平, 前嶋 康浩, 中岡 良和, 高橋 めい子, 網谷 英介, 田村 夏子, 中島 俊樹, 折口 智樹, 大村 浩一郎, 桑名 正隆, 小室 一成, 上田 敦久, 磯部 光章, 三森 経世, 松田 文彦
潰瘍性大腸炎は高安動脈炎の主要な合併症であり、合併には HLA-B*52:01 が特に重要であって両疾患は遺伝因子を共有している
日本人類遺伝学会第 59 回大会 2014/11/22
- 2) Terao C, Matsumura T, Yoshifuji H, Kirino Y, Maejima Y, Nakaoka Y, Takahashi M, Amiya E, Tamura N, Nakajima T, Origuchi T, Horita T, Matsukura M, Kochi Y, Ogimoto A, Yamamoto M, Takahashi H,

Nakayamada S, Saito K, Wada Y, Narita I, Kawaguchi Y, Yamanaka H, Ohmura K, Atsumi T, Tanemoto K, Miyata T, Kuwana M, Komuro I, Tabara Y, Ueda A, Isobe M, Mimori T, Matsuda F.

Takayasu Arteritis and Ulcerative Colitis -High Concurrence Ratio and Genetic Overlap

Annual Congress of American College of Rheumatology (Boston, USA) 2014/11/16

- 3) 中島 俊樹, 吉藤 元, 寺尾 知可史, 井村 嘉孝, 中嶋 蘭, 湯川 尚一郎, 大村 浩一郎, 藤井 隆夫, 三森 経世 高安動脈炎の新規疾患関連遺伝子 IL12B と臨床病態との関連 第111回日本内科学会講演会 東京国際フォーラム 2014/04/12
- 4) 寺尾知可史, 吉藤元, 木村彰方, 松村 貴由, 大村 浩一郎, 成瀬 妙子, 佐藤 愛子, 前島 康浩, 和田 庸子, 成田 一衛, 川口 鎮司, 山中 寿, 前川 平, 小川 誠司, 小室 一成, 永井良三, 田原 康玄, 磯部 光章, 三森 経世, 松田 文彦 IL12B は高安動脈炎の新規疾患感受性遺伝子であり HLA-B*52:01 と相互作用を示す 第41回日本臨床免疫学会 下関 2013/11/28
- 5) Yoshifuji H, Terao C, Murakami K, Kawabata D, Ohmura K, Fujii T, Kawaguchi Y, Yamanaka H, Mimori T Association between HLA-B' s amino acid variation and disease-susceptibility to Takayasu arteritis. Annual Congress of American College of Rheumatology (SanDiego, USA) 2013/10/27
- 6) 寺尾 知可史, 吉藤 元, 村上 孝作, 川端 大介, 大村 浩一郎, 秋月 正史, 川口 鎮司, 山中 寿, 三森 経世 高安動脈炎感受性と相関する3つの新規HLA-Bアミノ酸多型 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会 京都 国際会館 2013/4/19

[図書] (計 1 件)

- 1) 寺尾 知可史 感染・炎症・免疫 vol144.1 2014 高安動脈炎の全ゲノム関連解析による関連遺伝子の発見 鳥井薬品株式会社

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
寺尾 知可史 (TERAO, Chikashi)

研究者番号：60610459

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：