

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390259

研究課題名(和文) DNAマイクロアレイによる早期関節リウマチ病態形成分子の探索とその機能解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of pathogenesis related molecules in early rheumatoid arthritis by DNA microarray

研究代表者

竹内 勤 (Takeuchi, Tsutomu)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：50179610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)の病態形成の上位分子を明らかにする事を目的として、DNAマイクロアレイ法により末梢血の遺伝子発現を網羅的に解析した。RA末梢血における特徴的な変化を確認した後、疾患活動性と最も強く関連した遺伝子としてFamily with sequence similarity 20, member A(FAM20A)を同定した。薬剤効果を反映する指標であることも確認し、最適化および病態形成への関与についてさらに検討の必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate superior key molecules on the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA), we comprehensively analyzed peripheral blood gene expression in RA patients by DNA microarray. We confirmed characteristic changes of gene expression in RA and identified Family with sequence similarity 20, member A (FAM20A) as a most related gene with disease activity. It was confirmed this could reflect drug effects. Further optimization and contribution to the pathogenesis should be investigated.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、膠原病・アレルギー内科学

キーワード：関節リウマチ DNAマイクロアレイ 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis: RA)は、自己免疫学的機序を基盤とする持続性滑膜炎により関節破壊を来す難治性疾患である。滑膜炎の分子病態の解析によって、TNF- alpha (Tumor Necrosis Factor-alpha)、IL-6 (Interleukin-6)が中心的役割を果たしている事が明らかとなった。それらを標的とした生物学的製剤は、RA 治療に大きな進歩をもたらした。治療目標は、滑膜炎がほぼ消失した寛解まで高められた。しかし、これら分子標的は炎症カスケードの下流に存在するため、これを阻害する治療は炎症エフェクター分子の阻害に留まる。事実、これら製剤を発症2年以内の早期に使用してその有効性を最大限に引き出したとしても、寛解導入後薬剤を中止して1年以上寛解が維持できる症例は20%にすぎない。加えて炎症性サイトカインを阻害に伴う感染症、長期使用に伴う注射時反応などの副作用も課題として残されている。

薬剤を中止しても寛解が維持できるような治療戦略を求める上で、発症早期の病態においてより上流にある病態形成分子の探索が必須である。関節局所に浸潤する免疫細胞が末梢血中由来である事を考えても、末梢血サンプルは多様な細胞集団を解析でき重要と考えられる。

また、炎症エフェクター相におけるサイトカインの役割が明確化されるなか、その中間に存在する病態に関しては依然としてブラックボックスの部分が多い。これに関わる分子群やパスウェイが明らかとなれば、疾患感受性遺伝子と炎症性サイトカイン発現を結びつける事が出来る。これが証明されれば、RAの病態理解がさらに進み、新たな創薬標的を見いだす事が可能になると考えられる。

申請者らは、これまでにトランスクリプトミクス手法を用いて生物学的製剤の有効性を予測する遺伝子の組み合わせを同定してきた。(Sekiguchi N, Rheumatology, 2008, Tanino M, BBRC,2009)

2. 研究の目的

関節リウマチ発症直後の病態に関して、DNA マイクロアレイによって網羅的遺伝子発現解析を行い、それによって病態形成に関わる分子を解明する。

3. 研究の方法

(1) 対象患者

2007年5月から2010年6月の間に、埼玉医科大学総合医療センターリウマチ・膠原病内科を受診した関節リウマチ患者のうち、研究参加について文書により説明し、同意を得た212名(計402検体)の末梢血サンプルを用いて検討した。

(2) 方法

末梢血からの RNA 抽出

末梢血全血より、PAXgene Blood RNA System (Qiagen)により total RNA を抽出した。Bioanalyzer 2100 (Agilent)により、RNAの品質を確認した。

DNA マイクロアレイによる遺伝子発現定量

Total RNA 250ng から Low RNA Input Linear Amp Kit Plus, One-color (Agilent)を用い、in vitro 転写反応を用い cRNA を増幅と同時に蛍光標識 (Cy3 標識) した。Whole Human Genome Micro Array 4X44k (Agilent) に対して、蛍光標識された cRNA を 65 にて 17 時間ハイブリダイゼーションを行った。Gene Expression Wash Buffer (Agilent)にて洗浄後、Agilent Scanner (Agilent) により蛍光画像を読み取り、画像数値化ソフト Feature Extraction (Agilent) を用いて蛍光画像における各スポットのシグナル強度の数値化を行った。

統計解析

数値化後のデータのノーマライゼーション処理は、GeneSpringGX11(Agilent)を用いた 75-percentile normalization を行った。各プローブのノーマライゼーション値と被験者の DAS28-CRP、DAS28-ESR との Pearson 積率相関係数、無相関検定 p 値を算出し、疾患活動性と相関する遺伝子抽出した。

4. 研究成果

(1) FAM20A の同定

DAS28-CRP、DAS28-ESR 双方の相関 p 値の平均でソートした際に、最も強く DAS28 と相関した遺伝子として Family with sequence similarity 20, member A(FAM20A)を同定した。(表1)

Probe ID	Correlation with DAS28-CRP		Correlation with DAS28-ESR		Pvalue Average
	Cor	Pvalue	Cor	Pvalue	
A_32_P108254_FAM20A_54757	0.608	5.08E-42	0.616	2.07E-43	2.64E-42
A_24_P352952_FAM20A_54757	0.539	1.25E-31	0.532	8.49E-31	4.87E-31

表1) DNA マイクロアレイによる FAM20A 遺伝子発現量と疾患活動性との関連

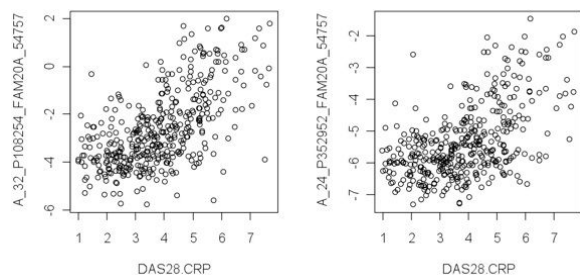


図1) FAM20A 遺伝子発現と関節リウマチの疾患活動性との関連

FAM20 の異なる 2 つプローブと RA 疾患活動性指標である DAS28-CRP の相関関係をプロットした。

FAM20A は複数プローブにおいて DAS28-CRP と高い相関性( $R=0.54-0.61$ )を示す(図 1)だけでなく、性質の異なる DAS28-CRP の 4 項目全てと有意な相関を示した。これは解析に用いた一部の症例の mRNA を利用した定量的 PCR でも確認された。FAM20A は別の検体を用いたコホートでも抽出され、免疫プロット法にて蛋白質レベルでも RA で高発現であることが明らかとなった。

#### (2) 薬剤による FAM20A の変動

薬剤投与による FAM20A の変動を調べるためにメトトレキサートあるいはインフリキシマブ投与と FAM20A との関連をみた。末梢血 FAM20A 遺伝子発現が RA の薬剤効果を反映しうるマーカーであることが示唆された。

#### (3) FAM20A の役割に関する報告

FAM20A は骨髄前駆細胞において ATRA+IL-3 添加で一過性に増加する mRNA として報告された。(BMC Genomics 2005, 6:11)進化においても保存されている細胞外分泌タンパク質で、ヒトでは、点変異がエナメル質形成不全や歯肉過形成の原因との報告されている。しかしながら RA における役割は不明である。

#### (4) FAM20A の機能

FAM20A は FAM20C に最も相同性の高い分子であるが、FAM20C の基質タンパク質をリン酸化しないと報告され、FAM20C とは異なる配列をリン酸化するキナーゼである可能性が検討されている。FAM20A の機能はまだ未知であるが、申請者らはこれまでの報告から新規の分泌タンパク質キナーゼの可能性が極めて高いと考えた。RA において本分子の発現が亢進しており活動性と高い相関を示すことから、RA の病態形成に関わる新たな鍵分子として着目した。

FAM20A を含む分泌タンパク質キナーゼは、RA における軟骨の破壊、骨破壊、動脈硬化の増悪などに関与していることが想定され、疾患マーカー候補であるとともに治療標的にもなりうる重要な分子であることを仮説として実証を行うことが今後必要であると考えた。

#### (5) 本研究課題の成果

DNA マイクロアレイによる網羅的スクリーニングにより、RA の新規活動性マーカーの候補として FAM20A を同定した。活動性マーカーとしての最適化および RA の病態との関連につき今後さらに検討の必要がある。

#### 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 1 件)

(1) 倉沢隆彦、鈴木勝也、竹内 勤 他: 特集 自己免疫疾患の最近の話題と展望マイクロアレイを用いた自己免疫疾患の解析(査読無)Pharma Medica vol.31 No.1 23-26 2013

#### 〔学会発表〕(計 6 件)

(1) 鈴木勝也、竹内 勤: トランスクリプトミクスのリウマチ性疾患への応用、第 8 回北海道ヤングアカデミー、2013 年 7 月 19 日、北広島

(2) 鈴木勝也、中村誠二、谷野元彦、竹下勝、吉本桂子、亀田秀人、天野宏一、竹内 勤: DNA マイクロアレイを用いた関節リウマチ新規活動性マーカーの探索、第 56 回日本リウマチ学会学術集会、2013 年 4 月 18 日、東京

(3) 鈴木勝也、竹内 勤: Application of transcriptomics for systemic lupus erythematosus pathogenesis analysis 第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 12 日、福岡

(4) 鈴木勝也、竹下 勝、竹内 勤: 関節リウマチの新たなバイオマーカー、第 2 回 TNF 療法研究会、2012 年 10 月 18 日、東京

(5) 鈴木勝也、竹内 勤: トランスクリプトミクスのリウマチ性疾患への応用、第 6 回京阪神バイオメディックス研究会、2012 年 3 月 2 日大阪

(6) 竹内 勤、鈴木勝也: 関節リウマチの治療と新たな分子標的の探索 基盤研究所セミナー、2012 年 1 月 12 日、大阪

#### 〔図書〕(計 0 件)

#### 〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 関節リウマチ 活動性指標を同定する方法及びそれに用いるバイオマーカー

発明者: 竹内 勤、天野 宏一、石澤 洋平、

中村 誠二、谷野 元彦、羽田 裕子

権利者: 学校法人慶應義塾、学校法人埼玉医科大学、株式会社 DNA チップ研究所

種類: 特許

番号: PCT/JP2011/76584

出願年月日: 平成 23 年 11 月 17 日

国内外の別: 国際出願(移行国指定なし)

#### 〔その他〕

慶應義塾大学医学部

<http://www.med.keio.ac.jp>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

竹内 勤 (Tutomu TAKEUCHI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号: 50179610

(2)研究分担者

天野 宏一 (Koichi AMANO)  
埼玉医科大学・医学部・教授  
研究者番号： 00175928

長澤 逸人 (Hayato NAGASAWA)  
埼玉医科大学・医学部・講師  
研究者番号： 20306343

津阪 憲政 (Kensei TSUZAKA)  
東京歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号： 00175928

(3)研究協力者

鈴木 勝也 (Katsuya SUZUKI)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号： 70306695