

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08912

研究課題名(和文) クローン病に対するレミケードの治療効果消失の解明と効果予測の遺伝子診断法の開発

研究課題名(英文) Establishment of DNA-based diagnosis and elucidation of molecular mechanisms for response and loss of response to infliximab at short or long period of treatment against Crohn's disease

研究代表者

塚元 和弘 (TSUKAMOTO, Kazuhiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授

研究者番号：30253305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：インフリキシマブ治療を受けたクローン病患者127名を10週後と1年後の治療効果で2群に分け、32個の候補遺伝子内の162個の一塩基多型の出現頻度を比較する相関解析を行った。10週後の薬剤応答性遺伝子遺伝子を6つ、1年後は9つ同定した。多変量解析で相関を認め一塩基多型を複数組み合わせさせた中で、10週後では「TRAF2 + TLR2」、1年後では「CD40 + P2RX7 + CASP1」が遺伝子診断のバイオマーカーとして最も有用で、高い確率で治療効果を予測することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クローン病患者に対するインフリキシマブ治療において、投与開始10週後も治療効果が持続する患者と治療効果が消失する患者では、どのような遺伝的背景であるかを解明できた。同様に、投与開始1年後の治療効果についても解明できた。さらに、10週後と1年後に関与する遺伝子は異なり、病態の分子機序が異なっていた。治療効果に関与していた遺伝子をバイオマーカーに用いた遺伝子診断法を開発した。インフリキシマブを投与する前にクローン病患者の10週後と1年後の治療効果あるいは治療効果消失が予測でき、個々の患者に最適の治療戦略を立案できる材料を提供できたことは、今後の個別化治療につながる成果であった。

研究成果の概要(英文)：Infliximab (IFX) is a monoclonal antibody exerting the therapeutic effect for Crohn's disease (CD). We examined an association study of 162 tag single nucleotide polymorphisms in 32 candidate genes with response to IFX at the 10-weeks or 1-year period of treatment for Japanese 127 CD patients, identifying 6 and 9 IFX-responsibility genes at the 10-weeks and 1-year period, respectively. Multivariate analyses and genetic tests revealed that the best combination of polymorphisms of TRAF2 and TLR2 is useful as a biomarker for identifying responders to IFX at the 10-weeks period of treatment. Likewise, a combination of polymorphisms of CD40, P2RX7, and CASP1 is most suitable for identifying responders at the 1-year period of treatment against CD patients.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：クローン病 遺伝子診断 インフリキシマブ ゲノム創薬 薬剤応答性遺伝子 治療感受性の機序解明 治療抵抗性の機序解明

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

クローン病(Crohn's disease: CD)は消化管の慢性肉芽腫性炎症を主体とする疾患である。原因は不明であるが、腸粘膜での免疫調節機構の破綻や腸管微生物に対する過剰な免疫応答に起因して消化管に炎症が生じる。治療法は薬物療法や栄養療法や外科療法を組み合わせで行われる。薬物療法では、軽症の場合には主に5-アミノサリチル酸製剤が、中等症から重症の場合には経口ステロイドが用いられる。さらに効果不十分な場合にインフリキシマブ(IFX)などの抗ヒト腫瘍壊死因子製剤の適応となる。

IFXは腫瘍壊死因子(TNF-alpha)の作用を阻害するキメラ型抗TNF-alphaモノクローナル抗体である。大規模試験でIFX投与10週後の有効率は89.1%で、その後8週ごとに維持投与を行った54週後の有効率は63.4%であった。つまり、IFXの短期使用で約10%、長期使用で約35%の患者ではIFXの治療効果が消失する。この消失機序を解明した研究は殆どない。我々の先行研究により、IL-17受容体のシグナル伝達分子の遺伝子多型がIFXの長期治療効果の消失に関連していた。IFXの標的分子であるTNF-alpha受容体の細胞内シグナル伝達分子(I-kB/NF-kB)を共有する別のシグナル伝達経路が活性化しているためにIFXの治療効果が消失すると作業仮説を立てた。

この仮説に基づき、TNF-alpha受容体下流の細胞内シグナル伝達分子(I-kB/NF-kB)を共有するシグナル伝達経路上に存在する候補遺伝子の中から、IFX投与開始10週間(短期)と1年後(長期)の治療効果に関連する治療感受性遺伝子や治療抵抗性遺伝子を同定する。同定した遺伝子の機能解析から治療効果消失の病態を分子レベルで解明する。同時に、同定した遺伝子多型をバイオマーカーに用いた遺伝子診断法の有用性を検証し、個別化治療に繋げる。

### 2. 研究の目的

本研究では、候補遺伝子の一塩基多型(SNPs)とIFXの短期および長期治療効果との相関解析を行い、治療効果の個人差を規定している治療感受性遺伝子や治療抵抗性遺伝子を同定する。また、IFXの短期および長期治療効果が消失する病態を解明し、治療効果消失を克服する新薬の標的分子を同定する。さらに、関連した遺伝子多型をバイオマーカーに用いた遺伝子診断法を開発する。

### 3. 研究の方法

(1) 長崎大学消化器内科と大分赤十字病院でCDと診断され、本研究に対する同意を取得後にIFXの治療を受けた患者127名を対象とした。IFX投与開始から10週後の治療効果により治療感受性群(116名)と治療抵抗性群(11名)に分けた。さらに、10週後で治療効果のあった116名の患者を1年後の治療効果で治療感受性群(97名)と治療抵抗性群(19名)に分けた。治療効果の判定には、クローン病の活動性指数であるCrohn's disease activity index (CDAI)とCRP値を用いた。CDAIが150未満かつCRP陰性を「治療効果あり」とし、それ以外を「治療効果なし」と判定した。

本研究は長崎大学および大分赤十字病院でヒト・ゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会より承認されている。文書によるインフォーム・ドコンセントを行い、本人より同意を得て採

血を行った。患者の試料(血液)および臨床情報は情報管理者を介して連結可能で匿名化されている。匿名化された血液から DNA を抽出した。

(2) 1000 Genome Project (GRCh37 p.13)のデータベースを参照し、候補遺伝子内とその上流 2 kb を加えた領域において、日本人で報告されている SNPs のうち、マイナー対立遺伝子の出現頻度が 0.20 以上の SNPs を抽出した。Haploview 4.3 ソフトウェアを用いて抽出した SNPsの中から解析対象の tag SNPs を選出した。また、文献で候補遺伝子の発現や機能に影響を与えることが報告されている SNPs も解析対象の tag SNPs に加えた。

本研究では 32 個の候補遺伝子内の 162 個の tag SNPs を解析した。候補遺伝子として、IL-1 シグナル経路に関連する 5 個の遺伝子(*IL1A*, *IL1R1*, *IL1RN*, *IL1R2*, *IL1RAP*)、CD40 シグナル経路に関連する 6 個の遺伝子(*CD40*, *CD40LG*, *TRAF2*, *TRAF3*, *CIAP1*, *CIAP2*)、P2RX7 シグナル経路に関与する 6 個の遺伝子(*P2RX7*, *CARD8*, *PYCARD*, *CASP1*, *IL18*, *IL1B*)、Toll-like 受容体と STAT3 シグナル経路に関連する 7 個の遺伝子(*TLR1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR6*, *TLR9*, *TLR10*, *STAT3*)、TNF 受容体シグナル経路に関連する 8 個の遺伝子(*ATG16L1*, *TICAM1*, *MYD88*, *IRAK1*, *IRAK4*, *IRAK6*, *IRF5*, *IKBKB*)を解析した。

(3) 解析対象の tag SNPs の遺伝子型の決定には、PCR-制限酵素断片長多型法、PCR-DNA シークエンス法および PCR-融解曲線分析法を用いた。

(4) 各候補遺伝子で、短期(10 週後)と長期(1 年後)ごとに、治療感受性群と治療抵抗性群間で tag SNPs の出現頻度を 3 つの遺伝モデルを用いて有意差検定(カイ二乗検定または Fisher の正確確率検定)し、IFX の治療感受性および治療抵抗性遺伝子を同定した。同定した複数の治療感受性や治療抵抗性遺伝子の tag SNPs がお互いに独立して治療感受性あるいは治療抵抗性に寄与しているかを多変量解析(多項ロジスティック回帰分析)で検証した。

(5) お互いに独立して治療感受性や治療抵抗性に寄与していた tag SNPs を複数組み合わせる遺伝子診断のバイオマーカーとして用いた。相対的危険度をオッズ比で表した。感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率および P 値を算出し、10 週後あるいは 1 年後の治療効果や治療効果消失を予測できるバイオマーカー(tag SNPs の組み合わせ)を同定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 治療感受性群と治療抵抗性群間の臨床因子の比較

IFX 投与開始 10 週後および 1 年後において治療感受性群と治療抵抗性群間の臨床因子を比較した。10 週後の両群間で、性別において治療抵抗性群に男性が有意に多かったため( $P=0.049$ )、その後の統計解析では多項ロジスティック回帰分析を用いて性別を補正した。その他の因子である平均年齢、プレドニゾン投与の有無、組織型において両群間に有意差はなかった。また、1 年後ではすべての臨床因子において両群間で統計学的有意差はなかった。

(2) IFX 投与開始 10 週後の治療効果と関連した遺伝子

(2-1) 単変量解析により 6 個の遺伝子, 8 個の tag SNPs が関連した。

*IL1R1* の rs3771200 ( $P = 0.049$ ), *TRAF2* の rs2784075 ( $P = 0.004$ ) と rs3750512 ( $P = 0.033$ ), *CARD8* の rs11670259 ( $P = 0.047$ ), *IL1B* の rs1143623 ( $P = 0.025$ ), *TLR1* の rs5743565 ( $P = 0.023$ ) と rs5743604 ( $P = 0.035$ ), *TLR2* の rs13105517 ( $P = 0.017$ ) が治療感受性および抵抗性を示した。

(2-2) 多変量解析により 2 つの遺伝子はお互いに独立して治療効果に関与していた。

*TRAF2* の rs2784075 で, G/G 遺伝子型を持つ患者は約 5.7 倍の治療感受性を示し, 一方, A/A あるいは A/G 遺伝子型を持つ患者は約 5.7 倍の治療抵抗性を示した ( $P = 0.026$ )。

*TLR2* の rs13105517 で, A/A あるいは A/G 遺伝子型を持つ患者は約 6.7 倍の治療感受性を示し, G/G 遺伝子型を持つ患者は約 6.7 倍の治療抵抗性を示した ( $P = 0.027$ )。

以上より, *TRAF2* と *TLR2* は, お互いに独立して IFX の短期治療効果に関与する薬剤応答性遺伝子であることが初めて示唆された。

(3) IFX 投与開始 10 週後の治療効果を予測する遺伝子診断の有用性の評価

多変量解析でお互いに独立して 10 週後の治療効果に寄与していた 2 つの遺伝子型を複数組み合わせてバイオマーカーとして用いた遺伝子診断を試みた。3 個の組み合わせで統計学的有意差を認めた。

(3-1) オッズ比が最も高かった組み合わせは「*TRAF2* + *TLR2* (オッズ比: 11.5)」

(3-2) P 値が最も低かった組み合わせは「*TRAF2* 単独 (P 値: 0.005)」

(3-3) 感度が最も高かった組み合わせは「*TRAF2* 単独 (感度: 79.3%)」

(3-4) 特異度が最も高かった組み合わせは「*TRAF2* + *TLR2* (特異度: 90.9%)」

(3-5) 陽性的中率が最も高かった組み合わせは「*TRAF2* + *TLR2* (陽性的中率: 98.4%)」

(3-6) 陰性的中率が最も高かった組み合わせは「*TRAF2* 単独 (陰性的中率: 22.6%)」

IFX 投与開始 10 週後において, 検査法として感度, 特異度, 陽性的中率, 陰性的中率, オッズ比および P 値のバランスが最も有用であった遺伝子型の組み合わせ (バイオマーカー) は「*TRAF2* + *TLR2*」で, 感度は 53.4% とやや低かったが, 特異度は 90.9%, 陽性的中率は 98.4% で, オッズ比が 11.5 と最も高く, そして P 値も 0.009 と強い相関を認めた。

(4) IFX 投与開始 1 年後の治療効果と関連した遺伝子

(4-1) 単変量解析により 9 個の遺伝子, 14 個の tag SNPs が関連した。

*CD40* の rs11569323 ( $P = 0.006$ ), *TRAF3* の rs4906267 ( $P = 0.011$ ) と rs72704712 ( $P = 0.006$ ) と rs8012367 ( $P = 0.005$ ) および rs3783385 ( $P = 0.014$ ), *P2RX7* の rs3751143 ( $P = 0.001$ ), *CARD8* の rs4389238 ( $P = 0.012$ ), *CASP1* の rs2282659 ( $P = 0.002$ ), *TLR2* の rs13105517 ( $P = 0.004$ ), *TICAM1* の rs2755265 ( $P = 0.038$ ), *IRAK4* の rs4251513 ( $P = 0.030$ ) と rs4251580 ( $P = 0.014$ ), *IKKB* の rs10105951 ( $P = 0.028$ ) と rs16891206 ( $P = 0.035$ ) が治療感受性および抵抗性を示した。

(4-2) 多変量解析により 4 つの遺伝子はお互いに独立して治療効果に関与していた。

*CD40* の rs11569323 で、T/T 遺伝子型を持つ患者は約 14.3 倍の治療感受性を示し、一方、C/C あるいは C/T 遺伝子型を持つ患者は約 14.3 倍の治療抵抗性を示した ( $P = 0.037$ )。

*P2RX7* の rs3751143 で、T/T あるいは T/G 遺伝子型を持つ患者は約 7 倍の治療感受性を示し、G/G 遺伝子型を持つ患者は約 7 倍の治療抵抗性を示した ( $P = 0.045$ )。

*CARD8* の rs4389238 で、C/C 遺伝子型を持つ患者は約 6.3 倍の治療感受性を示し、T/T あるいは T/C 遺伝子型を持つ患者は約 6.3 倍の治療抵抗性を示した ( $P = 0.024$ )。

*CASP1* の rs2282659 で、G/G あるいは G/A 遺伝子型を持つ患者は約 15.3 倍の治療感受性を示し、A/A 遺伝子型を持つ患者は約 15.3 倍の治療抵抗性を示した ( $P = 0.006$ )。

以上より、*CD40* と *P2RX7* と *CARD8* および *CASP1* は、お互いに独立して IFX の長期治療効果に関与する薬剤応答性遺伝子であることが初めて示唆された。

(5) IFX 投与開始 1 年後の治療効果を予測する遺伝子診断の有用性の評価

多変量解析でお互いに独立して 1 年後の治療効果に寄与していた 4 つの遺伝子型を複数組み合わせさせてバイオマーカーとして用いた遺伝子診断を試みた。11 個の組み合わせで統計学的有意差を認めた。

(5-1) オッズ比が最も高かった組み合わせは「*CD40* + *P2RX7* + *CASP1* (オッズ比：20.0)」

(5-2) P 値が最も低かった組み合わせは「*CD40* + *P2RX7* + *CASP1* (P 値：<0.0001)」

(5-3) 感度が最も高かった組み合わせは「*CD40* 単独(感度：97.9%)」

(5-4) 特異度が最も高かった組み合わせは「*CD40* + *P2RX7* + *CASP1* (特異度：94.7%)」

(5-5) 陽性的中率が最も高かった組み合わせは「*CD40* + *P2RX7* + *CASP1* (陽性的中率：98.1%)」

(5-6) 陰性的中率が最も高かった組み合わせは「*CD40* 単独(陰性的中率：66.7%)」

IFX 投与開始 1 年後において、検査法として感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率、オッズ比および P 値のバランスが最も有用であった遺伝子型の組み合わせ(バイオマーカー)は「*CD40* + *P2RX7* + *CASP1*」で、感度は 52.6%とやや低かったが、特異度は 94.7%、陽性的中率は 98.1%で、オッズ比が 20.0 と最も高く、P 値も <0.0001 と強い相関を認めた。

本研究により、*TRAF2* と *TLR2* は IFX の短期治療効果に、*CD40* と *P2RX7* と *CARD8* および *CASP1* は長期治療効果に関与する薬剤応答性遺伝子である。ある一方の遺伝子型を持つと治療感受性を示し、反対の遺伝子型を持つと治療抵抗性を持つことがわかった。さらに、これらの遺伝子多型をバイオマーカーに用いることで高い確率で 10 週間あるいは 1 年後の IFX の治療効果を予測することができた。

今後これらの遺伝子の機能解析を進め、IFX の治療感受性および治療抵抗性を示す病態を分子レベルで解明する。そして、IFX の治療効果を持続できる標的分子を同定することで、IFX の治療抵抗性を克服する新規治療補助薬の開発に繋げたい。

すべての結果を英語論文にまとめ、英語雑誌や当研究室のホームページで公表する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Araki C, Yoshimura M, Fukumitsu Y, Ma S, Ishida T, Urabe S, Matsushima K, Honda T, Uehara R, Fukuda Y, Takeshima F, Higuchi N, Isomoto H, Nakao K, Tsukamoto K	4. 巻 3
2. 論文標題 The evidence of genetic polymorphisms of genes involved in the P2RX7 signaling pathway as predictive biomarkers for response and loss of response to infliximab against Crohn's disease	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Integrative Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15761/IMM.1000262	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ma S, Fukumitsu Y, Noma Y, Inamine T, Kondo S, Urabe S, Matsushima K, Uehara R, Honda T, Machida H, Yamaguchi N, Ohnita K, Takeshima F, Isomoto H, Nakao K, Tsukamoto K
2. 発表標題 Associations between a polymorphism of the gene encoding the Toll like receptor and response to infliximab in Japanese patients with Crohn's disease
3. 学会等名 67th American Society of Human Genetics Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 野間友梨恵, 吉村 萌, 福満悠史, 馬 碩, 稲嶺達夫, 近藤新二, 磯本 一, 塚元和弘
2. 発表標題 IL-1R1受容体の下流シグナル経路はクローン病患者におけるインフリキシマブ長期治療効果に関与する
3. 学会等名 第34回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田添優奈, 谷口隼輔, 稲嶺達夫, 近藤新二, 磯本 一, 塚元和弘
2. 発表標題 TNFRSF1Aのrs2284344多型はインフリキシマブ治療抵抗性に関与する
3. 学会等名 日本薬学会第137年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・薬物治療学分野  
<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/treat/works-j.html>

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
研究協力者	石田 哲也  (ISHIDA Tetsuya)		
研究協力者	卜部 繁俊  (URABE Shigetoshi)		
研究協力者	稲嶺 達夫  (INAMINE Tatsuo)		
研究協力者	前田 和美  (MAEDA Kazumi)		
研究協力者	荒木 千鶴  (ARAKI Chizuru)		

## 6. 研究組織（つづき）

	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	吉村 萌  (YOSHIMURA Moe)		
研究協力者	野間 友梨恵  (NOMA Yurie)		
研究協力者	福満 悠史  (FUKUMITSU Yushi)		
研究協力者	馬 碩  (MA Shuo)		
研究協力者	磯本 一  (ISOMOTO Hajime)		