

令和元年6月11日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09888

研究課題名(和文) 関節リウマチの治療応答性遺伝子の網羅的解析に基づく疾患活動性指標確立と治療法開発

研究課題名(英文) To establish a new disease activity marker and a new treatment target by comprehensive gene expression analysis of patients with rheumatoid arthritis

研究代表者

古田 俊介 (FURUTA, Shunsuke)

千葉大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：10422221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：各生物製剤有効例のCD4陽性T細胞で治療に伴い共通して発現変動する遺伝子を網羅的に解析、関節リウマチの活動性指標、治療標的を探索した。有効例で治療に伴い発現変動した遺伝子群からZFP36L2が同定された。ZFP36L2は有効例で治療後発現が上昇した。マウスではnaive CD4陽性T細胞でZFP36L2は恒常的に発現、T細胞受容体刺激で発現は減弱した。Th1細胞、Th2細胞、Th9細胞、Th17細胞でもZFP36L2は等しく発現、T細胞受容体刺激で発現は減弱した。ZFP36L2は定常状態ではT細胞の活性化を抑制していると推測された。今後ZFP36L2を標的に新規治療を開発予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の特色は異なる生物学製剤で治療されたRA患者のCD4陽性T細胞における治療前後の遺伝子発現変化を、網羅的に解析し、RAの病態に関与する分子の同定を行うことである。解析はこの領域で多くの実績を有するかずさDNA研究所(千葉県)と共同で行われ、詳細な臨床情報とDNAアレイ情報からなるデータベースを構築した。有効例で共通して変動する遺伝子の中からRAの活動性を反映した活動性指標が確立し、客観的な病勢判定に基づくRA治療の最適化が可能と考える。また、新規治療標的であるZfp36L2が見出され、高い有効性が期待される薬物療法の基盤構築が可能と考える。本研究の臨床的意義は極めて大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Objective: This study aimed to clarify pathophysiological roles of CD4-positive T cells in RA and to find a novel therapeutic target. Methods: We examined gene expression profile of CD4-positive T cells in RA patients before and after the treatments with several biologics by DNA microarray analysis. We also examined the expression of ZFP36L2, whose expression was up-regulated in the responders to biologics. Next, we examined the expression of ZFP36L2 in murine naive CD4-positive T cells, Th1 cells, Th2 cells, Th9 cells, and Th17 cells. Finally, we examined the expression of ZFP36L2 in TCR-stimulated murine CD4-positive T cells. Results: ZFP36L2 gene expression was increased in CD4-positive T cells in the responders. ZFP36L2 was constitutively expressed in naive CD4-positive T cells, Th1 cells, Th2 cells, and Th17 cells. TCR-mediated stimulation rapidly reduced ZFP36L2 expression. Conclusion: ZFP36L2 may function as a negative regulator of CD4-positive T cells.

研究分野：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：関節リウマチ CD4陽性T細胞 zinc finger protein 生物学的製剤

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)は、本邦で約70万人の患者が存在すると推測される、滑膜炎と関節破壊を特徴とする自己免疫疾患であり、その身体機能予後は不良である。近年、RAの病態における炎症性サイトカインの重要性が示され、その機能を阻害する生物学的製剤の臨床応用により治療成績は劇的に改善した。しかし、治療反応性には個体差が大きく、また、無効例も存在する。更なる治療成績の向上のためには、より多くの症例で共通する病態の解明が必要である。

2. 研究の目的

そこで本研究では、それぞれの生物学的製剤(抗TNF製剤(TNFi)、抗IL-6受容体抗体(トシリズマブ、[TCZ])、T細胞共刺激抑制蛋白(アバタセプト、[ABT])の有効症例のCD4陽性T細胞において治療にともない共通して発現変動する遺伝子を網羅的に探索しRAの新規疾患活動性指標を見出すとともに、その機能を解析することで、新規治療標的を発見することを目的とする。本研究では、作用機序が異なる3系統の生物学的製剤で治療されたRA患者のCD4陽性T細胞における治療前後での遺伝子発現変化を、同じ手法で網羅的に直接比較することにより、網羅的解析の弱点であるノイズを最小限に抑え、すべての製剤の有効例で共通して変動する遺伝子の中から、標的が異なる製剤で治療される患者においてユニバーサルに利用可能なRAの新規活動性指標を確立する。これにより、客観的な病勢判定に基づくRA治療が可能となり、寛解に至るまでの時間を短縮し、関節破壊による機能障害を最小化するとともに、高価な製剤の無駄な投与、及び副作用のリスクを減らし、医療費の増大を抑制することが可能になると考える。さらに共通して変動する遺伝子の機能を解析し、RA患者の病態の個体差を越えた新規治療標的を見出し、より多くの症例に応用可能な治療法、特に根治療法に繋がる可能性のある治療法開発の基盤を構築する。

3. 研究の方法

(1)RAの新規疾患活動性指標の確立

症例(TNFi、TCZ、ABT各25例、計75例)の登録とCD4陽性T細胞のアレイ解析(75例の治療前後で計150サンプル)と健常者及び未治療RA患者(各25例)においても症例登録とCD4陽性T細胞のアレイ解析を行った。さらに本申請研究では、各生物学的製剤に共通の遺伝子発現変化に注目するという別の観点から、RAの新規疾患活動性指標の同定と臨床的有用性の評価、並びに新規治療標的候補分子の同定とRA患者、マウスCD4陽性T細胞における発現解析を行う。具体的には、各生物学的製剤の治療前後で発現変化した遺伝子上位5%を抽出し、全ての生物学的製剤で共通して変動した遺伝子154個を抽出した。

(2)治療反応性良好RA患者群と治療抵抗性RA患者群におけるZFP36L2の発現レベルの解析
RA治療に対して良好な反応を示したRA患者群67症例と治療抵抗性を示したRA患者群におけるZFP36L2の発現レベルを治療開始時および治療後12週での末梢血単核球分画よりmRNAを抽出し、qPCR法を用いて確認した。

(3)マウスCD4陽性T細胞におけるZFP36L2の発現レベルの解析

(a)ナイーブCD4陽性T細胞

野生型マウスのリンパ節よりナイーブCD4陽性T細胞をFACS sortingにより純化し、mRNAを抽出後、ZFP36L2の発現レベルをqPCR法を用いて確認した。

(b)Th1細胞、Th2細胞、Th9細胞、Th17細胞

野生型マウスのリンパ節よりナイーブCD4陽性T細胞をFACS sortingにより純化後、各CD4陽性T細胞サブセット分化条件にて培養して、Th1細胞、Th2細胞、Th17細胞作成後、mRNAを抽出後、ZFP36L2の発現レベルをqPCR法を用いて確認した。

(c)TCR刺激によるZFP36L2の発現レベルの検出

野生型マウスのリンパ節よりナイーブCD4陽性T細胞をFACS sortingにより純化し、T細胞受容体刺激後、mRNAを抽出後、ZFP36L2の発現レベルをqPCR法を用いて確認した。

4. 研究成果

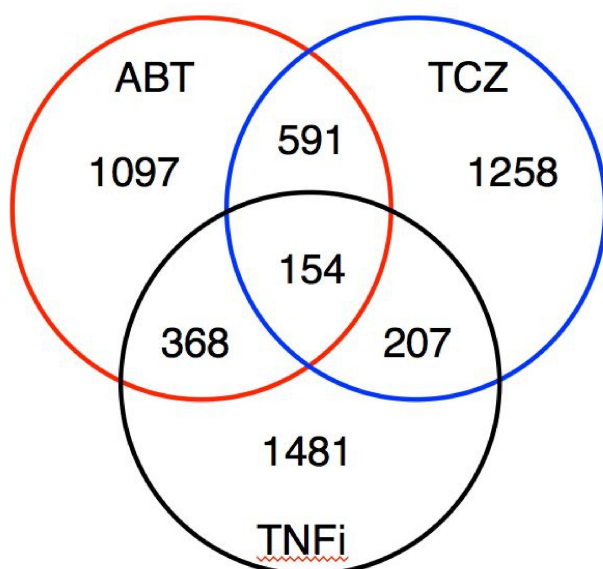
(1)RAの新規疾患活動性指標の確立

各生物学的製剤(抗TNF製剤、抗IL-6受容体抗体製剤、T細胞共刺激抑制蛋白)の有効例のCD4陽性T細胞で治療に伴い共通して発現が変化する遺伝子を網羅的に比較解析し、広く利用可能なRAの新規疾患活動性指標を同定した(図1)。マイクロアレイ解析の結果、3系統の生物学的製剤有効例(各25例)で共通して発現が変動する遺伝子が154個抽出され、その中には以下の表に示すRA病態への関連が推測される分子が見出された(表1)。

(図1)抗TNF製剤、抗IL-6受容体抗体製剤、T細胞共刺激抑制蛋白有効例における発現変動遺伝子

ACR 1987 revised criteria for the classification of RAにより診断されたRA患者。2008年11月から2014年2月までの間に千葉大学医学部附属病院およびその関連施設にて診療された症例よりリクルートされた。全て生物学的製剤 Tocilizumab(TCZ)、TNF inhibitors(TNFi)、Abatacept(ABT)を使用された患者で、治療前と治療開始後12週後に臨床学的アセスメントと検体の採取を行った。治療開始時baselineより治療開始後のDAS28-ESRが1.2以上の低下を認めたものを治療良好群と定義した。末梢血単核球(PBMC)はFicoll-Plaque density gradient

centrifugation (GE Healthcare, Piscataway, NJ)により分離され、さらに CD4+ T cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, Sunnyvale, CA)を用いて CD4 陽性 T 細胞を純化した。FACS 解析にて常に 98%以上の purity を確認した。純化された CD4 陽性 T 細胞より RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて Total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを行ったところ、154 の遺伝子が TCZ、TNFi、ABT 治療により共通して変動していた。



(表 1) RA 疾患活動性指標候補分子

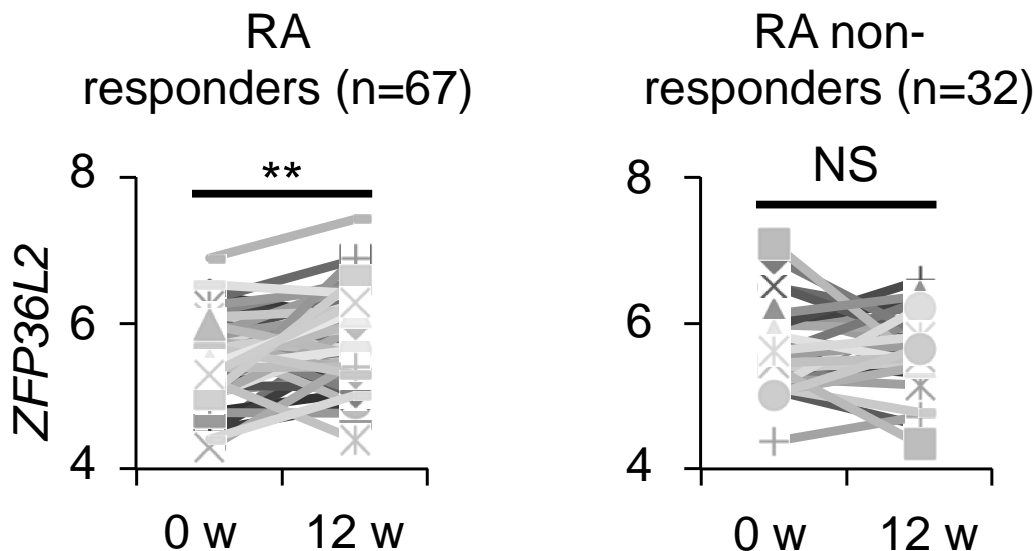
Probe Name	Gene Symbol	説明
A_23_P101960	ZFP36L2	RNA結合タンパク、Bcl2の発現制御
A_23_P74145	CD48	GPI結合型糖タンパク、白血球の接着、B細胞活性化
A_24_P216165	CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)alpha、T細胞活性化
A_24_P416131	COTL1	免疫シナプスの形成に関与
A_32_P7721	RORA	ROR-response elementsを認識、ILC2の分化に関与
A_23_P24870	CD44	細胞接着に関与
A_23_P404494	IL7R	IL-7レセプター
A_23_P420873	NR1D1	別名 rev-erb、転写抑制因子
A_23_P43157	MYBL1	germinal center markers、Bcl-6と関連
A_23_P51508	DUSP12	自己免疫疾患で変異の報告
A_23_P54573	ZFPM1	zinc finger protein、FOG family member 1、GATAを抑制
A_23_P54840	MT1A	メタロチオネイン、亜鉛代謝に関与
A_23_P74550	DRAM2	オートファジーに関与
A_24_P356338	GABARAPL2	RAの自己抗体の対応抗原の一つとして報告
A_24_P382319	CEACAM1	別名 CD66a、細胞接着に関与

(2)治療反応性良好 RA 患者群と治療抵抗性 RA 患者群における ZFP36L2 の発現レベルの解析
 前述の方法より抽出された遺伝子群の中から zinc finger protein 36 ring finger protein like 2 (ZFP36L2) が抽出された。ZFP36L2 は zinc finger domain をもつ RNA-binding protein と考えられているが、その機能については不明な点が多い。そこで次に我々は RA 治療に対して良好な反応を示した RA 患者群 67 症例と治療抵抗性を示した RA 患者群における ZFP36L2 の発現レベルを治療開始時および治療後 12 週での末梢血単核球分画より mRNA を抽出し、qPCR 法を用いて確認したところ、治療反応性良好群(RA responders)では、治療後、ZFP36L2 の発現が有意に増加していた (** p<0.01)。一方、治療反応性抵抗群(RA non-responders)では、治療後、ZFP36L2 の発現は変化しなかった (NS)(図 2)。

(図 2) 治療反応性良好 RA 患者群と治療抵抗性 RA 患者群における治療前後の ZFP36L2 の発現推移

前述(図 1)の患者より採取され純化された CD4 陽性 T 細胞より RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて Total RNA は抽出された。Total RNA より iScript cDNA synthesis kit (BioRad Hercules, CA)を用いて DNA 合成し、合成された DNA を鋳型として、Zfp36l2 遺伝子発現を以下の primer を用いて qPCR 法により b-actin レベルと比較し半定量した。Zfp36l2、

forward primer; 5' -GGCCGCACAAGCACAAC-3'、 reverse primer; 5' -GAGACTCGAACCAAGATGAATAACG-3'。

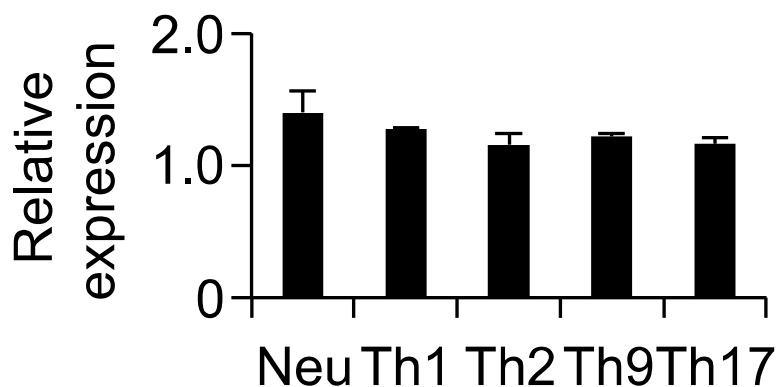


(3) マウス CD4 陽性 T 細胞における ZFP36L2 の発現レベルの解析

(a,b)次に我々は野生型マウスのリンパ節よりナイーブ CD4 陽性 T 細胞を FACS sorting により純化し、各 CD4 陽性 T 細胞サブセット分化条件にて培養して、Th1 細胞、Th2 細胞、Th9 細胞、Th17 細胞作成後、mRNA を抽出後、ZFP36L2 の発現レベルを qPCR 法を用いて確認したところ、各サブセット間で ZFP36L2 の発現レベルの相違は認められなかった (図 3)。

(図 3) Th 細胞サブセットにおける ZFP36L2 の発現

C57BL/6 マウス脾臓よりナイーブ CD4 陽性 T 細胞 (CD4+CD62L+CD25- T cells) を EasySep™ Mouse Naïve CD4+ T Cell Isolation Kit (STEMCELL)により採取する。FACS 解析により採取された細胞が 98%以上 CD4+CD62L+CD25- T cells であることを確認した。ナイーブ CD4 陽性 T 細胞は、plate-bound anti-CD3 mAb と anti-CD28 mAb により刺激し (neutral 条件; Neu)、一部の細胞は、IL-12 添加(Th1 条件)、IL-4 添加(Th2 条件)、IL-4+TGF- β 添加(Th9 条件)、IL-6+TGF- β 添加(Th17 条件)にて培養し、各 Th 細胞サブセットへと分化させた。分化後、細胞を回収し RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて Total RNA は抽出された。Total RNA より iScript cDNA synthesis kit (BioRad Hercules, CA)を用いて DNA 合成し、合成された DNA を鋳型として、Zfp36l2 遺伝子発現を以下の primer を用いて qPCR 法により b-actin レベルと比較し半定量した。



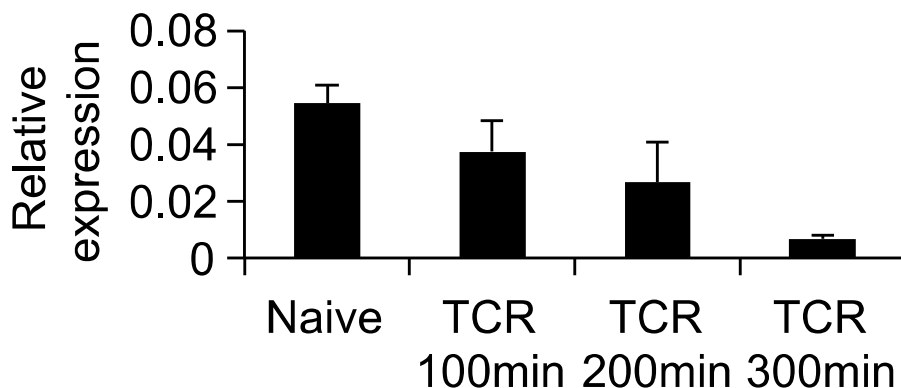
(c)TCR 刺激による ZFP36L2 の発現レベルの検討

最後に野生型マウスのリンパ節よりナイーブ CD4 陽性 T 細胞を FACS sorting により純化し、T 細胞受容体刺激後、mRNA を抽出後、ZFP36L2 の発現レベルを qPCR 法を用いて確認したところ、TCR 刺激後、ZFP36L2 の発現は減弱していた (図 4)。

(図 4) TCR 刺激による ZFP36L2 の発現変化

C57BL/6 マウス脾臓よりナイーブ CD4 陽性 T 細胞 (CD4+CD62L+CD25- T cells) を EasySep™ Mouse Naïve CD4+ T Cell Isolation Kit (STEMCELL)により採取する。FACS

解析により採取された細胞が 98%以上 CD4+CD62L+CD25- T cells であることを確認した。Naïve CD4 陽性 T 細胞は、plate-bound anti-CD3 mAb と anti-CD28 mAb により刺激し (neutral 条件; Neu)、図 4 に示された各時間ごとに細胞を回収した。回収された細胞より RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて Total RNA は抽出された。Total RNA より iScript cDNA synthesis kit (BioRad Hercules, CA) を用いて DNA 合成し、合成された DNA を鋳型として、Zfp36l2 遺伝子発現を以下の primer を用いて qPCR 法により b-actin レベルと比較し半定量した。



(結果のまとめ)
 今回の研究で、各生物学的製剤有効症例のCD4陽性T細胞において治療にともない発現が変動した遺伝子ランキングで各上位3%に入る遺伝子

子群をオーバーラップさせたところzinc finger protein 36 ring finger protein like 2 (ZFP36L2) が抽出された。

ZFP36L2 の発現については、各生物学的製剤有効症例の RA 患者において、治療後、その発現が有意に上昇していた。次にマウス CD4 陽性 T 細胞における ZFP36L2 の発現について解析したところ、CD4 陽性 T 細胞サブタイプにおける ZFP36L2 の発現については、ZFP36L2 は Th1 細胞、Th2 細胞、Th9 細胞、Th17 細胞に等しく発現しており、また、naïve CD4 陽性 T 細胞では ZFP36L2 は恒常的に発現しているが、T 細胞受容体刺激によりその発現は著明に減弱した。以上より、ZFP36L2 は T 細胞受容体刺激により発現が減弱する遺伝子であり、定常状態においては T 細胞の活性化を抑制していることが推測された。ZFP36L2 は zinc finger domain をもつ RNA-binding protein で有ることが示唆されており、T 細胞の活性化や分化、増殖に必須な遺伝子のメッセンジャーRNA の 3' 非翻訳領域に結合することにより、メッセンジャーRNA の安定性を制御している分子であると推測している。今後は ZFP36L2 を過剰発現させた CD4 陽性 T 細胞における遺伝子発現の変動を網羅的に解析し、ZFP36L2 の標的遺伝子を決定するとともに、ZFP36L2 をターゲットにした新規 RA 治療の方法を確立していく予定である。

5. 主な発表論文等

- 〔雑誌論文〕(計 0 件)
- 該当なし(投稿準備中)
- 〔学会発表〕(計 0 件)
- 該当なし
- 〔図書〕(計 0 件)
- 該当なし
- 〔産業財産権〕
- 出願状況(計 0 件)
- 該当なし
- 取得状況(計 0 件)
- 該当なし
- 〔その他〕
- ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.jp/class/gene/kenkyugyouseki.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：中島 裕史

ローマ字氏名：NAKAJIMA, Hiroshi

所属研究機関名：千葉大学

部局名：大学院医学研究院

職名：教授

研究者番号（8桁）：00322024

研究分担者氏名：須藤 明

ローマ字氏名：SUTO, Akira

所属研究機関名：千葉大学

部局名：大学院医学研究院

職名：准教授

研究者番号（8桁）：50447306

(2)研究協力者

該当なし