

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月14日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592263

研究課題名（和文） マイクロアレイを用いたベーチェット病に対する抗 TNF- $\alpha$  抗体治療の作用機序の解析

研究課題名（英文） Effect of infliximab on gene expression profiling in Behcet's disease using microarray analysis

## 研究代表者

岡田 アナベル・あやめ (OKADA ANNABELLE AYAME)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：50303962

## 研究成果の概要（和文）：

本課題ではベーチェット病ぶどう膜炎における抗 TNF- $\alpha$  抗体療法の作用機序を明らかにするため、マイクロアレイの手法を用いてインフリキシマブ (IFX) 治療前後 (4 例) の末梢血単核球における遺伝子発現解析を行った。その結果、4 例全例で発現が低下したものが 8 遺伝子、4 例全例で発現が上昇したものが 1 遺伝子であった。発現が低下した遺伝子の中でも CLEC4E、TLR2 は全例で発現量が治療前の半分以下に低下、ets2 については 4 例中 3 例で発現が低下していることが定量 PCR で確認された。CLEC4E は結核菌の糖脂質 (code factor) の受容体であること、TLR2 は細菌の細胞壁成分を認識し、自然免疫応答に重要な作用をもつことから感染防御に関与する分子群の発現低下が IFX によるベーチェット病眼炎症発作の抑制に関与する可能性がある。

## 研究成果の概要（英文）：

In this study, we investigated the effect of infliximab on gene expression patterns in peripheral blood mononuclear cells of Behcet's disease patients (4 cases) before and after initiation of infliximab treatment. Microarray analysis showed that 8 genes were down-regulated and 1 gene was up-regulated in all patients. Quantitative PCR analysis demonstrated that gene expression of CLEC4E, ets2, and TLR2 was down-regulated in all patients. Thus, several up-regulated or down-regulated genes identified in this study may be candidates for further studies in delineating the molecular mechanism of infliximab for the treatment of Behcet's disease with refractory uveoretinitis.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 眼科学

キーワード：生物学的製剤、ぶどう膜炎、ベーチェット病

## 1. 研究開始当初の背景

近年、既存の免疫抑制療法を行っても眼炎症

発作を繰り返す難治性のベーチェット病患者に対して、生物学的製剤である抗 TNF- $\alpha$  抗体

(インフリキシマブ)の有効性が報告されている。本邦においてもインフリキシマブを用いた抗 TNF- $\alpha$ 療法が 2007 年 1 月に世界に先がけて承認され、眼炎症発作に対する著明な抑制効果があることが明らかとなってきた。これまでのところ、抗 TNF- $\alpha$ 抗体がどのような機序でベーチェット病ぶどう膜網膜炎を制御しているのか、その分子メカニズムに関する解析はほとんどなされていなかった。また一部の症例で抗 TNF- $\alpha$ 抗体治療に抵抗性を示すことも分かってきたが、その要因についても不明な点が多い。ベーチェット病に対する抗 TNF- $\alpha$ 抗体による作用機序を解明することはベーチェット病ぶどう膜網膜炎の発症機序を明らかにしていくうえでも重要な研究課題であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究課題ではマイクロアレイの手法を用いて、インフリキシマブ治療前後の末梢血単核球における網羅的な遺伝子発現解析を施行し、抗 TNF- $\alpha$ 抗体(インフリキシマブ)療法の作用機序を分子レベルで解明すること、治療反応性規定分子の同定を行うことを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

従来の免疫抑制療法に抵抗性を示す 4 例のベーチェット病患者(4 例:男性 1 例、女性 3 例、21 歳-64 歳)に対してインフリキシマブを導入、インフリキシマブ投与開始前と開始 22 週間後に末梢血 20ml を採取、単核球を分離後、Isogen を用いて total RNA を抽出、CodeLink human genome bioarray にて治療開始前と開始後で単核球における網羅的な遺伝子発現解析を行った。マイクロアレイにて発現の変動がみられた遺伝子については定量 PCR の手法を用いて発現の確認を行った。

## 4. 研究成果

(1) インフリキシマブによる眼炎症抑制効果

4 例に対するインフリキシマブの眼炎症抑制効果について検討したところ、4 例中 3 例で開始後 6 ヶ月の時点で眼発作回数が減少、蛍光眼底造影検査による漏出スコアも全例で改善がみられた。

(2) インフリキシマブ治療前後の網羅的遺伝子発現解析

マイクロアレイの手法を用いて 54,359 個の遺伝子発現について検討したところ、発現量が 2 倍以上に上昇した遺伝子数が症

例 1 で 138、症例 2 で 188、症例 3 で 271、症例 4 で 1717 であった。

一方、発現量が 0.5 倍以下に低下した遺伝子数が症例 1 で 267、症例 2 で 456、症例 3 で 356、症例 4 で 456 であった。

4 例のマイクロアレイの結果について NCBI のデータベースを用いた pathway 解析を行ったところ、治療開始後にケモカイン、ケモカイン受容体に関連する gene pathway の有意な発現低下がみられた。一方で T 細胞受容体の細胞内シグナルに関連する gene pathway の上昇がみられた。炎症性サイトカインの発現について検討したところ、IL-1、IL-6、IFN-gamma 関連遺伝子群の発現の低下がみられた。

さらに 4 例全例で発現が低下したものが 8 遺伝子: CLEC4E (C-type lectin domain family 4, member E: NM\_014358), CPLX2 (complexin 2:NM\_001008220), UI-H-DFI-auj-n-04-0-UI.

s1 NCI\_CGAP\_DF1: BM991706), ETS2(v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2: NM\_005239), TLR2 (BC032464), PLXNC1 (plexin C1: AI290473), LHFPL2 (lipoma HMGIC fusion partner-like 2: NM\_005779), TPCN2 (two pore segment channel2:NM\_139075) and

UI-H-DFI-auj-n-04-0-UI. s1 NCI\_CGAP\_DF1 (BM991706)、4 例全例で発現が上昇したものが 1 遺伝子 KIAA0101 (NM\_014736)であった。

### (3) 定量 PCR による遺伝子発現解析

発現低下がみられた遺伝子から CLEC4E、ets2, TLR2 の発現について定量 PCR を行ったところ、マイクロアレイの結果と同様、CLEC4E、TLR2 は全例で発現量が治療前の半分以上に低下、ets2 については 4 例中 3 例で発現の低下が確認された。また発現上昇がみられた遺伝子 KIAA0101 については 4 例全例で 1.5 倍以上の発現上昇がみられた。

最近の報告では CLEC4E は結核菌の糖脂質 (code factor) の受容体として同定され、結核菌に対する感染防御に重要な作用を有することが知られている。また TLR2 は細菌や真菌の細胞壁成分を認識し、自然免疫応答に重要な作用をもつことが明らかであることから感染防御に関与する分子群の発現低下がインフリキシマブによるベーチェット病の眼炎症発作の抑制に関与している可能性が考えられた。

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 20 件)

1. Keino H, Watanabe T, Taki W, Okada A. Effect of infliximab on gene expression profiling in Behcet's disease. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011;52: 7681-7686.
2. Keino H, Okada AA, Watanabe T, Taki W. Decreased ocular inflammatory attacks and background retinal and disc vascular leakage in patients with Behcet's disease on infliximab therapy. Br J Ophthalmol 2011;95: 1245-1250.
3. Yonekawa Y, Hirakata A, Inoue M, Okada AA. Spontaneous closure of a recurrent myopic macular hole previously repaired by pars plana vitrectomy. Acta Ophthalmologica 2011;89:e536-537.
4. Hiratsuka Y, Yamada M, Murakami A, Okada AA, Yamashita H, Ohashi Y, Yamagishi N, Tamura H, Fukuhara S, Takura T. Cost-effectiveness of cataract surgery in Japan. Jpn J Ophthalmol 2011;55: 333-342.
5. Taki W, Keino H, Watanabe T, Nakashima C, Okada AA. Interferon-gamma release assay in tuberculous scleritis. Arch Ophthalmol 2011;129: 368-371.
6. 渡邊交世, 三木大二郎, 岡田アナベルあやめ, 平形明人. 急性網膜壊死の治療成績の検討. 日本眼科学会雑誌 2011;115:7-12.
7. Keino H, Watanabe T, Sato Y, Okada AA. Oral Administration of Retinoic Acid Receptor- $\alpha/\beta$ -Specific Ligand Am80 Suppresses Experimental Autoimmune Uveoretinitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011;52:1548-1556.
8. Nakashima C, Keino H, Watanabe T, Taki W, Okada AA. Intravitreal bevacizumab for iris metastasis of small cell lung carcinoma and neovascular glaucoma. Jpn J Ophthalmol 2011; 55:80-81.
9. Levinson RD, Okada AA, Ashouri E, Keino H, Rajalingam R: Killer cell immunoglobulin-like receptor gene-cluster 3DS1-2DL5-2DS1-2DS5 predisposes susceptibility to Vogt-Koyanagi-Harada disease in Japanese individuals. Hum Immunol 71:192-194, 2010.
10. Okada AA. The dream of biologics in uveitis. Arch Ophthalmol 2010;128: 632-635.
11. de Smet MD, Okada AA. Cystoid macular edema in uveitis. Dev Ophthalmol 2010;47:136-147.
12. Keino H, Watanabe T, Sato Y, Okada AA. Anti-inflammatory effect of retinoic acid on experimental autoimmune uveoretinitis. Br J Ophthalmol 2010;94:802-807.
13. Tano Y, Ohji M on behalf of the EXTEND-I Study Group (including Okada AA) EXTEND-I: safety and efficacy of ranibizumab in Japanese patients with subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. Acta Ophthalmologica 2010;88:309-316.
14. Hirakata A, Inoue M, Oshitari K, Okada AA, Nagamoto T, Hida T. Histopathological examination of internal limiting membrane surface after scraping with diamond-dusted membrane scraper. Acta Ophthalmologica 2010;88:e293-294.
15. Keino H, Watanabe T, Taki W, Nakashima C, Okada AA. Clinical features and visual outcomes of Japanese patients with scleritis. Br J Ophthalmol 2010;94:1459-1463.
16. Rao NA, Gupta A, Dustin L, Chee SP, Okada AA, Khairallah M, Bodaghi B, Lehoang P, Accorinti M, Mochizuki M, Prabripataloong T, Read RW: Frequency of distinguishing clinical features in Vogt-Koyanagi-Harada disease. Ophthalmology 2010; 117:591-599.
17. Okada AA, Keino H, Watanabe T, Taki W, Hayakawa R. Recurrence of acute anterior inflammation after intravitreal injection of bevacizumab in uveitis. Jpn J Ophthalmol 2009;53:182-184.

18. Watanabe T, Keino H, Sato K, Kudo A, Kawakami H, Okada AA. High mobility group box 1 (HMGB-1) in experimental autoimmune uveoretinitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 2009;50:2283-2290.
19. Herbort CP, Rao NA, Mochizuki M and members of Scientific Committee of First International Workshop on Ocular Sarcoidosis (IWOS) (including Okada AA): International criteria for the diagnosis of ocular sarcoidosis: results of the first international workshop on ocular sarcoidosis (IWOS). Ocul Immunol Inflamm 2009;17:160-169.
20. Keino H, Nakashima C, Watanabe T, Taki W, Hayakawa R, Sugitani A, Okada AA. Frequency and clinical features of intraocular inflammation in Tokyo. Clin Exp Ophthalmol 2009;37:595-601.

[学会発表] (計 33 件)

1. Yamamoto A, Okada AA, Sugitani A, Yokota R, Shibata T, Kunita D, Rii T. Subfoveal choroidal thickness in typical age-related macular degeneration versus polypoidal choroidal vasculopathy. WOC 2012 2012年2月16-20日 Abu Dhabi, Abu Dhabi
2. 山本亜希子、岡田アナベルあやめ、杉谷篤彦、利井東昇、國田大輔、柴田朋宏、横田怜二. 滲出型加齢黄斑変性に対する ranibizumab 硝子体内投与2年間の治療成績 第50回日本網膜硝子体学会総会 2011年12月2-4日 東京
3. 慶野博、渡辺交世、中山真紀子、瀧和歌子、岡田アナベルあやめ. EDI-OCT を用いた原田病回復期の脈絡膜厚の評価. 第65回日本臨床眼科学会 2011年10月7-10日 東京
4. 渡辺交世、慶野博、瀧和歌子、越前成旭、岡田アナベルあやめ. 滲出型加齢黄斑変性に対し初回治療に pegaptanib 硝子体内投与を選択した症例の治療成績. 第65回日本臨床眼科学会 2011年10月7-10日 東京
5. 中山真紀子、平形明人、慶野博、柴田朋宏、寺戸雄一、藤野節、岡田アナベルあやめ. 結節性硬化症に合併した網膜腫瘍に網膜生検を施行した一例. 第65回日本臨床

眼科学会 2011年10月7-10日 東京

6. 岡田アナベルあやめ、中山真紀子、慶野博、渡辺交世、渡邊望、井上真、平形明人. 眼炎症疾患における EDI-OCT. 第13回 Japan Macula Club 2011年8月20-21日 蒲郡
7. Okada AA, Trusko BE, Mochizuki M, Ohno S, Jabs DA. Development of Structured Clinical Terminology for Uveitis. 第45回日本眼炎症学会 2011年7月8-10日 京都
8. 瀧和歌子、慶野博、渡辺交世、伊東真知子、岡田アナベルあやめ. EDI-OCT を用いた片眼性後部強膜炎の脈絡膜厚の評価. 第45回日本眼炎症学会 2011年7月8-10日 京都
9. 中山真紀子、慶野博、渡辺交世、瀧和歌子、岡田アナベルあやめ. 原田病における脈絡膜厚の長期経過. 第45回日本眼炎症学会 2011年7月8-10日 京都
10. 中島史絵、慶野博、渡辺交世、瀧和歌子、岡田アナベルあやめ. Bevacizumab 硝子体注射により新生血管の退縮がみられた転移性虹彩腫瘍の1例. 第115回日本眼科学会総会 2011年5月12-15日 東京.
11. Nakayama M, Keino H, Watanabe T, Inoue M, Hirakata A, Okada AA. Enhanced depth imaging optical coherence tomography of the choroid in new-onset acute Vogt-Koyanagi-Harada disease. 2011年5月1-4日 Ft.Lauderdale, Florida, USA
12. Davis EJ, Hills WL, Winthrop KL, Smith JR, Tuberculous Optic Neuropathy Study Group (includes Okada AA). Tuberculosis optic neuropathy: clinical presentations and visual outcomes. ARVO 2011年5月1-4日 Ft.Lauderdale, Florida, USA
13. 岡田アナベルあやめ. 眼炎症疾患: 最近のトピックより. 第83回鳥取大学眼科研究会 2011年2月26日 米子
14. Okada AA. New methods for assessing inflammation in uveitis. Immunology /Inflammation /Microbiology Symposium Asia ARVO 2011年1月21日 Singapore
15. 横川直人、杉井章二、小田井剛、加藤雪彦、田中裕一郎、鶴岡一英、田中伸茂、

- 岡田アナベルあやめ、稲田進一 当院における未承認薬ヒドロキシクロキンの服薬指導の経験. 第 25 回日本臨床リウマチ学会 2010 年 11 月 27-28 日 東京
16. 中山真紀子, 慶野博, 渡邊交世, 井上真, 平形 明人, 岡田アナベルあやめ. Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) 病における脈絡網厚の経時的評価. 第 64 回日本臨床眼科学会 2010 年 11 月 11-14 日 神戸
  17. 慶野博, 渡邊交世, 瀧和歌子, 伊東真知子, 岡田アナベルあやめ. ベーチェット病網膜ぶどう膜炎に対するインフリキシマブ長期投与の有効性. 第 64 回日本臨床眼科学会 2010 年 11 月 11-14 日 神戸
  18. 城下哲夫, 山本亜希子, 杉谷篤彦, 國田大輔, 伊東裕二, 岡田アナベルあやめ. 難治性滲出型加齢黄斑変性に対する ranibizumab 併用 PDT 療法の治療成績. 第 64 回日本臨床眼科学会 2010 年 11 月 11-14 日 神戸
  19. 山本亜希子, 岡田アナベルあやめ, 杉谷篤彦, 國田大輔, 伊東裕二. 滲出型加齢黄斑変性に対する ranibizumab 硝子体内投与の治療成績. 第 64 回日本臨床眼科学会 2010 年 11 月 11-14 日 神戸
  20. Okada AA Behcet' s Disease Research Group of Japan Late Breaking News: Results of a multicenter study of infliximab therapy for Behcet' s disease. Uveitis Subspecialty Day. 2010 年 10 月 16 日 Chicago
  21. 大田妙子, 藤木俊寛, 山田恵子, 小西道雄, 井尻茂之, 林篤志, 岡田アナベルあやめ, 大黒伸行. インフリキシマブが奏功した 14 歳発症の難治性多巣網脈絡網炎の 1 例. 第 44 回日本眼炎症学会 2010 年 7 月 9-11 日 東京
  22. 島千春, 安積淳, 大黒伸行, 岡田アナベルあやめ, 蕪城俊克, 後藤浩, 園田康平, 南場研一 急性網膜壊死の視力予後に関する因子. 第 44 回日本眼炎症学会 2010 年 7 月 9-11 日 東京
  23. 慶野博, 佐藤康彦, 首藤紘一, 岡田アナベルあやめ 合成レチノイド Am80 による実験自己免疫性ぶどう網膜網炎の軽症化. 第 44 回日本眼炎症学会 2010 年 7 月 9-11 日 東京
  24. 渡邊交世, 慶野博, 井上真, 吉野啓, 岡田アナベルあやめ 結核性ぶどう膜炎の合併が疑われた眼内悪性リンパ種の 1 例. 第 44 回日本眼炎症学会 2010 年 7 月 9-11 日 東京
  25. Ohno S, Okada AA, Goto H, Namba K, Kitaichi N. Infliximab therapy may greatly change ocular inflammation and visual prognosis in Behcet' s disease. 14th International Conference on Behcet' s Disease 2010 年 7 月 8-10 日 London
  26. 岡田アナベルあやめ. ベーチェット病の予後が変わるレミケード療法. 第 4 回九州ベーチェット病フォーラム 2010 年 6 月 26 日 福岡
  27. Okada AA. Uveitis Education in Japan. Symposium: Uveitis Education Around the World WOC 2010 年 6 月 9 日 Berlin
  28. Okada AA. Sarcoidosis. Asia-Pacific Intraocular Inflammation Study Group Symposium WOC 2010 年 6 月 8 日 Berlin, Germany.
  29. 佐藤康彦, 慶野博, 梅沢一夫, 岡田アナベルあやめ. 培養ヒト網膜色素上皮細胞に対する DHMEQ の抗炎症効果. 第 114 回日本眼科学会総会 2010 年 4 月 15-18 日 名古屋
  30. 慶野博, Levinson R, Rajalingam R, 岡田アナベルあやめ. Vogt-小柳-原田病と KIR 遺伝子多型. 第 114 回日本眼科学会総会 2010 年 4 月 15-18 日 名古屋
  31. 山本亜希子, 岡田アナベルあやめ, 杉谷篤彦, 國田大輔, 谷内修太郎. 滲出型加齢黄斑変性に対する ranibizumab 硝子体内投与の短期経過. 第 114 回日本眼科学会総会 2010 年 4 月 15-18 日 名古屋
  32. 岡田アナベルあやめ. ぶどう膜炎診療の進歩 免疫抑制薬の使い方. 第 114 回日本眼科学会総会 2010 年 4 月 15-18 日 名古屋
  33. 岡田アナベルあやめ. 眼炎症疾患: 最近のトピックより. 静岡県眼科医会総会 2010 年 4 月 10 日 静岡
- [図書] (計 件)
1. 岡田アナベルあやめ 感染症と眼 日本医師会雑誌 2010 p1647-1651.

2. 慶野博, 岡田アナベルあやめ 【リウマチ・膠原病診療における評価】 ベーチェット病におけるぶどう網膜網炎の活動性の評価法. リウマチ科 2010 p620-628
3. 岡田アナベルあやめ 生物学的製剤とは?. 日本の眼科 2010 p150-154.
4. 岡田アナベルあやめ 眼が眩しい. あたらしい眼科 2010 p573

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡田 アナベル・あやめ  
(OKADA ANNABELLE AYAME)  
杏林大学・医学部・教授  
研究者番号：50303962

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

慶野 浩 (KEINO HIROSHI)  
杏林大学・医学部・准教授  
研究者番号：90328211