

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月14日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659815

研究課題名（和文） ベーチェット病のインフリキシマブ治療不応答性因子の解明

研究課題名（英文） Analysis of risk factors associated with non-response to infliximab treatment for Behcet's disease

研究代表者

水木 信久 (MIZUKI NOBUHISA)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：90336579

研究成果の概要（和文）：本研究では、日本人ベーチェット病患者を対象に、インフリキシマブ不応答性に関わる因子の同定を試みた。網羅的な自己抗体解析の結果、インフリキシマブ不応答性に関与を示唆するタンパク質が複数検出された。また、ゲノムワイド関連解析により得られた遺伝情報をもとに遺伝因子の検索を行った結果、インフリキシマブ不応答性への関与を示唆する複数の遺伝子が検出された。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to investigate risk factors associated with non-response to infliximab treatment for Behcet's disease. We found some candidate proteins associated with non-response to infliximab treatment using wheat cell-free protein synthesis technology. In addition, we found some candidate genes for non-response to infliximab treatment by assessing the genotypic data from the genome-wide association study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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：眼生化学・分子生物学

1. 研究開始当初の背景

(1) ベーチェット病は全身の諸臓器に急性の炎症を繰り返す原因不明の難治性炎症性疾患であり、口腔内アフタ性潰瘍、眼症状、皮膚症状、外陰部潰瘍の4症状を主症状とする。青壮年期に多く発症し、長期間にわたって再発と寛解を繰り返すため、ベーチェット病により重度の視力障害を来す患者は少なくない。

(2) ベーチェット病の基本病態は好中球の機能過剰であり、TNF（tumor necrosis factor：腫瘍壊死因子）やインターロイキン（IL）-1、IL-6などの炎症性サイトカインが本病発症に大きく関与する。特にTNF α は

サイトカインネットワークの上流で各種炎症性サイトカインを制御する中心的なメディエーターである。したがって、その阻害薬である抗TNF α 抗体、インフリキシマブはベーチェット病の治療薬として大変有効である。

(3) インフリキシマブは、注射（点滴静注）で投与するもので、投与量は体重1kgあたり5mgである。初回の投与から、2週、6週、10週後に投与し、その後は8週毎に投与を行う。インフリキシマブは即効性であり、投与早期より有効性が認められる。投与期間中は眼発作がほぼ抑えられ、治療維持効果も認められる。他の治療薬で効果不十分の難治性

患者においても優れた治療効果を示す。しかしながら、すべての患者で有効というわけではなく、1割程度の患者においてインフリキシマブの効果認められない（一次無効）。さらに、二次無効症例（効果減弱）、効果不十分症例も認められる。本薬剤の不応答性に関わる要因は明確ではないが、遺伝学的または生化学的要因が関与することが示唆されている。

(4) 近年我々は、ベーチェット病のゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study: GWAS) を実行し、日本人ベーチェット病患者の遺伝子変異情報を網羅的に取得しており (Mizuki N, et al. Nat Genet 2010;42(8):703-6.)、その遺伝情報は本病のインフリキシマブ不応答性の検討において非常に有用なものになると考える。また、我々は自己抗体や自己抗原の探索を系統的に遂行するシステムを構築しており、インフリキシマブの不応答性を生化学的に解析可能である。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、日本人ベーチェット病患者を対象として、網羅的な自己抗体解析を実行することにより、ベーチェット病におけるインフリキシマブ不応答性に関与するタンパク質をすべて同定する (生化学的アプローチ)。

(2) さらに、GWASにより同定した遺伝情報をもとにインフリキシマブ不応答性に関わる候補遺伝子の検索を行う (遺伝学的アプローチ)。

3. 研究の方法

(1) 自己抗体検出システム (コムギ胚芽無細胞タンパク質合成ロボット) を用いて網羅的な自己抗体スクリーニングを行い、インフリキシマブ不応答患者特異的な自己抗体の同定を行う (生化学的アプローチ)。

ベーチェット病患者を対象に、インフリキシマブ応答群と不応答群 (一次無効、二次無効、および効果不十分) に層別化し、不応答群と有意な相関を示す自己抗体を網羅的に検索する。解析サンプルとして患者より採取した血清を用いる。

(2) 日本人ベーチェット病患者を対象とした GWAS により、ベーチェット病患者におけるゲノム全域にわたる遺伝情報 (50 万個以上の遺伝子変異情報) を取得している。したがって、これら遺伝情報をもとにインフリキシマブ不応答に関わる遺伝子型の検索を行う (遺伝学的アプローチ)。

ベーチェット病患者をインフリキシマブ

応答群と不応答群に層別化し、不応答群と有意な相関を示す遺伝子変異を網羅的に検索する。

4. 研究成果

(1) 日本人ベーチェット病患者を対象に網羅的自己抗体解析を行った結果、インフリキシマブ不応答性に関与する可能性を示唆するタンパク質が複数検出された。得られた結果を検証するため、今後より詳細な解析を実行する必要がある。

(2) また、日本人集団を対象とした GWAS データの情報を用いた遺伝学的アプローチにより、複数の遺伝子がインフリキシマブの不応答性への関与を示唆する結果を示した。本解析の結果を有効なものにするため、今後ベーチェット病患者の症例数を増やして再現性の確認を実行する必要がある。

(3) 本研究の成果は、ベーチェット病患者の個人個人に応じたより適切な治療法の確立につながり、その医学的意義は大変高いと考えられる。

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 29 件)

(1) Mizuki N, Meguro A (他 22 名、4 番目、21 番目): Genome-wide association analysis identifies new susceptibility loci for Behçet's disease and epistasis between HLA-B*51 and ERAP1. Nat Genet. (査読有) 2013;45(2):202-7.
DOI: 10.1038/ng.2520

(2) Meguro A, Mizuki N (他 19 名、12 番目、13 番目): Genome-wide association study identifies GIMAP as a novel susceptibility locus for Behçet's disease. Ann Rheum Dis. (査読有) 2013 Feb 25. [Epub ahead of print]
URL: <http://ard.bmj.com/content/early/2013/02/24/annrheumdis-2011-200288.long>

(3) Meguro A, Mizuki N (他 4 名、3 番目、6 番目): Staining internal limiting membrane with a mixture of BBG and sodium hyaluronate. Br J Ophthalmol. (査読有) 2013;97(6):690-3.
DOI: 10.1136/bjophthalmol-2012-302289.

(4) Mizuki N (他 5 名、6 番目): A case of corneal endotheliitis with mumps virus RNA

in aqueous humor detected by rt-PCR. *Ocul Immunol Inflamm.* (査読有) 2013;21(2):150-2.
DOI: 10.3109/09273948.2012.747619.

(5) Mizuki N(他 9 名、9 番目): Acute retinal necrosis: factors associated with anatomic and visual outcomes. *Jpn J Ophthalmol.* (査読有) 2013;57(1):98-103.
DOI: 10.1007/s10384-012-0211-y.

(6) Meguro A, Mizuki N (他 2 名、3 番目、4 番目): Modification of Swan-Jacobs lens for iridocorneal angle surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* (査読有) 2012 Dec 22. [Epub ahead of print]
URL :
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00417-012-2232-0>

(7) Mizuki N (他 2 名、3 番目): Treatment of pterygium by ligation and bevacizumab injection. *Cornea.* (査読有) 2012 ;31(11):1339-41.
DOI: 10.1097/ICO.0b013e3182408bc7.

(8) Mizuki N (他 6 名、5 番目): Modulation of human visual evoked potentials in 3-dimensional perception after stimuli produced with an integral imaging method. *Clin EEG Neurosci.* (査読有) 2012;43(4):303-11.
DOI: 10.1177/1550059412445608.

(9) Meguro A, Kawagoe T, Mizuki N (他 21 名、3 番目、5 番目、24 番目): Genetic characterization and susceptibility for sarcoidosis in Japanese patients: risk factors of BTNL2 gene polymorphisms and HLA class II alleles. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (査読有) 2012;53(11):7109-15.
DOI : 10.1167/iovs.12-10491

(10) Meguro A, Kawagoe T, Mizuki N (他 14 名、1 番目、11 番目、17 番目): Common variants in the COL4A4 gene confer susceptibility to lattice degeneration of the retina. *PLoS One.* (査読有) 2012;7(6):e39300.
DOI : 10.1371/journal.pone.0039300

(11) Meguro A, Mizuki N (他 28 名、5 番目、22 番目): Genetic variants on chromosome 1q41 influence ocular axial length and high myopia. *PLoS Genet.* (査読有) 2012;8(6):e1002753.
DOI : 10.1371/journal.pgen.1002753

(12) Kawagoe T, Mizuki N (他 3 名、3 番目、5 番目): Immediate removal of posteriorly dislocated lens fragments through sclerocorneal incision during cataract surgery. *Br J Ophthalmol.* (査読有) 2012;96(8):1058-62.
DOI: 10.1136/bjophthalmol-2011-300864.

(13) Meguro A, Mizuki N (他 15 名、2 番目、17 番目): Lack of association between IL10 polymorphisms and sarcoidosis in Japanese patients. *Mol Vis.* (査読有) 2012;18:512-8.
URL :
<http://www.molvis.org/molvis/v18/a56/>

(14) Kawagoe T, Mizuki N (他 4 名、3 番目、6 番目): Infliximab monotherapy versus infliximab and colchicine combination therapy in patients with Behçet's disease. *Ocul Immunol Inflamm.* (査読有) 2012 ;20(3):193-7.
DOI: 10.3109/09273948.2012.665124.

(15) Meguro A, Mizuki N (他 7 名、3 番目、4 番目): Confirmation of TBK1 duplication in normal tension glaucoma. *Exp Eye Res.* (査読有) 2012;96(1):178-80.
DOI : 10.1016/j.exer.2011.12.021

(16) Meguro A, Mizuki N (他 13 名、2 番目、12 番目): Replication of a microsatellite genome-wide association study of Behçet's disease in a Korean population. *Rheumatology (Oxford).* (査読有) 2012;51(6):983-6.
DOI : 10.1093/rheumatology/ker444

(17) Mizuki N(他 2 名、3 番目): Thermocautery for inferior conjunctivochalasis. *Cornea.* (査読有) 2012;31(5):514-9.
DOI: 10.1097/ICO.0b013e3181dc81d2.

(18) Mizuki N (他 5 名、6 番目): Cyclooxygenase inhibitor improved an exudative lesion of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Eur J Ophthalmol.* (査読有) 2012;22(3):495-8.
DOI: 10.5301/ejo.5000032.

(19) Meguro A, Mizuki N (他 3 名、3 番目、5 番目): Anatomical and functional changes of retina following subretinal injection of high-speed fluid. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* (査読有) 2012;250(3):447-50.
DOI: 10.1007/s00417-011-1800-z.

(20) Kawagoe T, Meguro A, Mizuki N (他 3 名、3 番目、4 番目、6 番目) : Factors associated with enlargement of chorioretinal atrophy after intravitreal bevacizumab for myopic choroidal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. (査読有) 2012;250(7):989-97. DOI: 10.1007/s00417-011-1921-4.

(21) Meguro A, Mizuki N (他 3 名、3 番目、5 番目) : Anatomical and functional changes of retina following subretinal injection of high-speed fluid. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. (査読有) 2012;250(3):447-50. DOI: 10.1007/s00417-011-1800-z

(22) Mizuki N (他 9 名、8 番目) : The carboxyl-terminal region of Crtac1B/LOTUS acts as a functional domain in endogenous antagonism to Nogo receptor-1. *Biochem Biophys Res Commun*. (査読有) 2012;418(2):390-5. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.01.033.

(23) Kawagoe T, Mizuki N: Sarcoidosis. *Curr Opin Ophthalmol*. (査読有) 2011;22(6):502-7. DOI: 10.1097/ICU.0b013e32834bbd7e.

(24) Mizuki N (他 8 名、9 番目) : Clinical Course before and after Cataract and Glaucoma Surgery under Systemic Infliximab Therapy in Patients with Behçet's Disease. *Case Rep Ophthalmol*. (査読有) 2011;2(2):189-92. DOI: 10.1159/000329190.

(25) Meguro A, Mizuki N (他 11 名、3 番目、13 番目) : Investigation of association between TLR9 gene polymorphisms and VKH in Japanese patients. *Ocul Immunol Inflamm*. (査読有) 2011;19(3):202-5. DOI: 10.3109/09273948.2011.553981

(26) Meguro A, Mizuki N (他 26 名、2 番目、28 番目) : Investigation of the association between SLC1A3 gene polymorphisms and normal tension glaucoma. *Mol Vis*. (査読有) 2011;17:792-6. URL: <http://www.molvis.org/molvis/v17/a89/>

(27) Kawagoe T, Meguro A, Mizuki N (他 12 名、2 番目、3 番目、15 番目) : Toll-like receptor 2 (TLR2) gene polymorphisms are not associated with sarcoidosis in the Japanese population. *Mol Vis*. (査読有)

2011;17:731-6.

URL:

<http://www.molvis.org/molvis/v17/a83/>

(28) Mizuki N (他 13 名、12 番目) : Association of HLA-A*02:06 and HLA-DRB1*04:05 with clinical subtypes of juvenile idiopathic arthritis. *J Hum Genet*. (査読有) 2011;56(3):196-9. DOI: 10.1038/jhg.2010.159.

(29) Meguro A, Mizuki N (他 9 名、4 番目、11 番目) : Association analysis of Toll-like receptor 7 gene polymorphisms and Behçet's disease in Japanese patients. *Hum Immunol*. (査読有) 2011;72(3):269-72. DOI: 10.1016/j.humimm.2010.12.007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水木 信久 (MIZUKI NOBUHISA)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：90336579

(2) 研究分担者

目黒 明 (MEGURO AKIRA)
横浜市立大学・医学研究科・特任講師
研究者番号：60508802
河越 龍方 (KAWAGOE TATSUKATA)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：20564800

(3) 連携研究者

澤崎 達也 (SAWASAKI TATSUYA)
愛媛大学・無細胞生命科学工学研究センター・教授
研究者番号：50314969