

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592678

研究課題名(和文) マイクロRNAを標的としたベーチェット病における抗TNF抗体治療の分子機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of miRNA signatures in Behcets disease patients treated with infliximab

研究代表者

岡田 アナベル・あやめ (Okada, Annabelle A)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：50303962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では4名のベーチェット病ぶどう膜炎患者のインフリキシマブ治療前後の末梢血単核球のmicroRNA (miRNA)に関する網羅的な遺伝子発現解析を施行しmiRNAとぶどう膜炎活動性との関連について検討した。MiRNAの網羅的遺伝子発現の検討では、4例中3例(眼発作抑制例)でmiRNA144の発現の低下がみられた。一方、4例中1例(眼発作のみられた症例)でmiRNA144の発現が導入前に比べて約2倍の上昇を示した。少数例での検討であるが、末梢血単核球中のmiRNA144がベーチェット病ぶどう膜網膜炎におけるインフリキシマブの有効性を評価するバイオマーカーとして有用である可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：To determine the effect of infliximab on microRNA (miRNA) expression in peripheral blood mononuclear cells of Behcet's disease patients before and after initiation of infliximab treatment, we analyzed miRNA expression profiles in 4 patients at baseline and at 22 weeks after initiation of infliximab. Anti-TNF- α antibody therapy reduced the frequency of ocular attacks in 3 of 4 patients during 2 years of follow-up, while one patient continued to have inflammatory relapses during that time. Several miRNAs were increased or decreased in each patient. Although the expression of miRNA-144 was decreased in all 3 patients with no relapses, its expression was increased in the one patient who continued to have relapses. MiRNA-144 may represent a new biomarker for monitoring response to infliximab in the treatment of Behcet's disease with refractory uveoretinitis.

研究分野：ぶどう膜炎

キーワード：免疫

1. 研究開始当初の背景

失明率の高い難治性のぶどう膜網膜炎であるベーチェット病に対して、2007年1月より生物学的製剤である抗TNF- α 抗体(インフリキシマブ)が保険適応され、その有効性が報告されている。これまで抗TNF- α 抗体治療の作用機序についての報告は散見されるものの、その分子機序に関する詳細は不明な点が多い。

microRNA (miRNA)は機能性 non-coding RNAの中のひとつの分子群で、20-24塩基長程の低分子RNAであり、相補的な配列をもつ標的 mRNA の分解、翻訳を制御することで機能している。現在、miRNA は個体の発生、細胞の増殖、癌化など様々な生命現象に関与していることが明らかとなっており、最近では炎症を司る自然免疫機能の調整に多数の miRNA が連携して作用していることも示されている。

2. 研究の目的

本研究課題では抗TNF- α 抗体製剤：インフリキシマブ治療前後の末梢血単核球の microRNA に関する網羅的な遺伝子発現解析を施行し、miRNA の変動、miRNA とぶどう膜炎活動性との関連、インフリキシマブの作用機序について検討を行う。

3. 研究の方法

インフリキシマブ治療の開始前後でベーチェット病の末梢血単核球を採取し、miRNA の遺伝子発現の変動について以下の方法で網羅的な解析を行った。

(1) インフリキシマブ投与開始前と投与開始22週間後に末梢血を採取、単核球を分離した後、miRNA の発現を治療開始前と開始後でマイクロアレイの手法を用いて網羅的に検討する。

(2) マイクロアレイで得られた結果から、治

療の前後で特に発現の上昇、低下が著明な miRNA の標的遺伝子について miRBase などのデータベースを用いて調査する。

(3) miRNA の発現解析で用いた同様のサンプルを用いて messenger RNA (mRNA) の発現をマイクロアレイにて解析し、上記 2) で発現の上昇、または低下のみられた miRNA の標的遺伝子との関連について検討する。

(4) 眼所見の改善度と(2)で発現の上昇、低下のみられた miRNA の発現との関連について検討を行う。

4. 研究成果

ベーチェット病ぶどう膜網膜炎患者(4例)を対象にインフリキシマブ導入前後で mRNA および miRNA の発現について末梢血単核球を用いてマイクロアレイによる網羅的な解析を行った。4例において発現の上昇、低下のみられた miRNA を抽出し、それらの miRNA の標的となる遺伝子発現(mRNA)をマイクロアレイの手法を用いて解析した。インフリキシマブ導入後の眼発作抑制効果について検討したところ、4例中3例ではインフリキシマブ治療開始後2年間で眼発作を認めなかったが、残りの1例はインフリキシマブ治療開始2年目以降に眼炎症発作がみられた。

MiRNA の網羅的な遺伝子発現の検討では、4例に共通して発現の上昇、または低下した miRNA は認めなかったものの、4例中3例で miRNA-144 の発現の低下がみられた。一方、4例中1例(眼発作のみられた症例)で miRNA-144 の発現がインフリキシマブ導入前に比べて約2倍の上昇を示した。また眼発作のみられた症例において miRNA-144 の標的遺伝子の一つである phosphatase and tensin homolog (PTEN)の発現低下がみられた。最近、制御性 T 細胞(CD4+Foxp3+ regulatory T

cells) の機能保持に PTEN の発現が必須であることが報告されている (Nature Immunology, 2015, 16:178-87)。少数例での検討であるが、通常の眼所見や蛍光眼底造影所見に加えて末梢血単核球中の miRNA144 とその標的遺伝子である PTEN がベーチェット病ぶどう膜網膜炎におけるインフリキシマブの有効性を評価するバイオマーカーとして有用であ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 10 件)

1. Takase H, Okada AA, Goto H, Mizuki N, Namba K, Ohguro N, Sonoda KH, Tomita M, Keino H, Kezuka T, Kubono R, Mizuuchi K, Shibuya E, Takahashi H, Yanai R, Mochizuki M. Development and validation of new diagnostic criteria for acute retinal necrosis. Jpn J Ophthalmol. 2015;59:14-20.
2. Takeuchi M, Kezuka T, Sugita S, Keino H, Namba K, Kaburaki T, Maruyama K, Nakai K, Hijioka K, Shibuya E, Komae K, Hori J, Ohguro N, Sonoda KH, Mizuki N, Okada AA, Ishibashi T, Goto H, Mochizuki M. Evaluation of the long-term efficacy and safety of infliximab treatment for uveitis in Behcet's disease: a multicenter study. Ophthalmology. 2014;121:1877-1884.
3. Keino H, Okada AA, Watanabe T, Taki W. Long-term efficacy of infliximab on background vascular leakage in patients with Behcet's disease. Eye (Lond). 2014;28:1100-1106.
4. Iwahasi-Shima C, Azumi A, Ohguro N, Okada AA, Kaburaki T, Goto H, Sonoda KH, Namba K, Mizuki N, Mochizuki M. Acute retinal necrosis: factors associated with anatomic and visual outcomes. Jpn J Ophthalmol. 2013;57:98-103.
5. Trusko BE, Jabs DA, Thorne JE, Belfort R, Dick AD, Gangaputra S, Nussenblatt RB, Okada AA, Rosenbaum JT and the Standardization of Uveitis Nomenclature (SUN) Working Group. Development of a clinical evidence base utilizing informatics tools and techniques for the standardization of uveitis nomenclature (SUN) project. Methods Inf Med. 2013; 52:259-260.
6. Okada AA, Jabs DA. The SUN Project: the future is here. JAMA Ophthalmol Editorial] 2013;131:787-789.
7. Hirukawa K, Keino H, Watanabe T, Okada AA. Enhanced depth imaging optical coherence tomography of the choroid in new-onset acute posterior scleritis. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2013; 251:2273-2275.
8. Okada AA, Goto H, Ohno S, Mochizuki M; Ocular Behcet's Disease Research Group of Japan. Multicenter study of infliximab for refractory uveoretinitis in Behcet's disease. Arch Ophthalmol. 2012;130:592-598.
9. Taki W, Keino H, Watanabe T, Okada AA. Enhanced depth imaging optical coherence tomography of the choroid in recurrent unilateral posterior scleritis. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2013;251:1003-1004.
10. Nakayama M, Keino H, Okada AA, Watanabe T, Taki W, Inoue M, Hirakata A. Enhanced depth imaging optical coherence tomography of the choroid

in Vogt-Koyanagi-Harada disease.
Retina. 2012;32:2061-2069.

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 松本杏奈、慶野博、厚東隆志、渡辺交世、岡田アナベルあやめ. OCTで眼底後極部の経時的な変化を観察した急性網膜壊死の1例. 第68回日本臨床眼科学会神戸 2014年11月13日-16日.
2. 中山真紀子、慶野博、渡辺交世、平形明人、岡田アナベルあやめ. 多発消失性白点症候群の網膜外層所見と眼底自発蛍光. 第68回日本臨床眼科学会 神戸 2014年11月13日-16日
3. 高瀬博、大黒伸行、岡田アナベルあやめ、後藤浩、園田康平、富田誠、南場研一、水木信久、望月學 我が国における急性網膜壊死の実態調査 第68回日本臨床眼科学会 神戸 2014年11月13日-16日
4. 慶野博、渡邊交世、慶野博、越前成旭、瀧和歌子、井上真、岡田アナベルあやめ. 眼内悪性リンパ腫における黄斑部SD-OCT所見の検討 第48回日本眼炎症学会 東京 2014年7月4日-5日
5. 渡邊交世、肥留川京子、慶野博、瀧和歌子、越前成旭、岡田アナベルあやめ. 糖尿病性虹彩炎を発症した患者の臨床的特徴についての検討 第48回日本眼炎症学会 東京 2014年7月4日-5日
6. Hiroshi Keino, Yasuhiko Sato, Annabelle A Okada. IL-2/IL-2 Ab complex plus rapamycin ameliorate experimental autoimmune uveoretinitis associated with expansion of CD4+Foxp3+ regulatory T cells. Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS 2014) シカゴ、米国, 2014年6月25日-28日.
7. Hiroshi Keino, Takayo Watanabe, Yasuhiko Sato, Koichi Shudo, Yasushi Kitaoka, Takayuki Harada, Annabelle A Okada. Retinoic Acid Receptor Stimulation Ameliorates Experimental Autoimmune Optic Neuritis (EAON), 東京, 2014年4月2日-6日.
8. Annabelle A. Okada, Hiroshi Keino, Takayo Watanabe, Wakako Taki, Kyoko Hirukawa, Nariaki Echizen Symposium: An update on Behcet's disease uveitis Title: Long-term results of anti-TNF therapy. IOIS meeting Spain Valencia 2014年2月27-3月1日.
9. 慶野博、中島史絵、渡辺交世、瀧和歌子、岡田アナベルあやめ. 杏林アイセンターにおける小児および若年者のぶどう膜炎の統計. 第67回日本臨床眼科学会. 横浜. 2013年10月31日-11月3日.
10. 高瀬博、大黒伸行、岡田アナベルあやめ、後藤浩、園田康平、富田誠、南場研一、水木信久、望月學. 急性網膜壊死の診断基準の作成. 第47回日本眼炎症学会, 大阪, 2013年7月12日-14日.
11. 慶野博、渡辺交世、宮東昭彦、川上速人、岡田アナベルあやめ. 実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎(EAU)における眼局所のmicroRNAの発現. 第47回日本眼炎症学会, 大阪, 2013年7月12日-14日.
12. 井之川宗右、慶野博、福田憲、福島敦樹、岡田アナベルあやめ、平形明人、梅澤一夫. ヒト培養角膜線維芽細胞に対する dehydrowymethylepoxyquinomicin (DHMEQ)の抗炎症効果. 第47回日本眼炎症学会, 大阪, 2013年7月12-14日.
13. Keino H, Sato Y, Okada AA. IL-2/IL-2 Ab complex plus rapamycin ameliorate experimental autoimmune uveoretinitis associated with

expansion of CD4+Foxp3+ regulatory T cells. ARVO, Seattle USA 2013年5月4-8日

14. 岡田アナベルあやめ . 英文論文のレビュー (査読) : Top 10 Dos and Don'ts . 教育セミナー「学術論文の作り方」, 第117回日本眼科学会総会, 東京, 2013年4月5日 .
15. 肥留川京子、慶野博、渡辺交世、瀧和歌子、平形明人、岡田アナベルあやめ 網膜動脈閉塞症に対してステロイドパルス療法が奏功した SLE 網膜症の 1 例 第 46 回日本眼炎症学会、横浜、2012 年 7 月 14-16 日
16. 慶野博、渡辺交世、瀧和歌子、岡田アナベルあやめ インフリキシマブ長期投与ベージェット病患者の蛍光眼底造影像の推移 第 46 回日本眼炎症学会、横浜、2012 年 7 月 14-16 日
17. 渡辺交世、慶野博、瀧和歌子、越前成旭、岡田アナベルあやめ インフリキシマブ治療を導入した若年性ベージェット病ぶどう膜網膜炎の 2 症例 第 116 回日本眼科学会総会、東京、2012 年 4 月 5-8 日

〔図書〕(計 1 件)

1. 慶野博、岡田アナベルあやめ
ぶどう膜炎の評価
眼炎症の標準的評価法
-SUN ワーキンググループによる分類-
眼科 金原出版
2014;56:1135-1138.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔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 ANABERU AYAME)
杏林大学眼科学教室 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
慶野博 (KEINO HIROSHI)
杏林大学眼科学教室 准教授
研究者番号 : 90328211