

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 25 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293123

研究課題名(和文) 抗リウマチ薬による有害事象に関わる遺伝要因と発症機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the genetic factors and the mechanisms of adverse effects by anti-rheumatic drugs.

研究代表者

古川 宏 (FURUKAWA, Hiroshi)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：00372293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：抗リウマチ薬に伴う有害事象感受性遺伝子をヒト白血球抗原(HLA)関連解析およびゲノムワイド関連解析(GWAS)によって明らかにし、HLA分子・サイトカイン・micro RNA等の分子病態の側面から薬剤有害事象の病態を解明することを目的とした。薬剤誘発性間質性肺病変のGWASの結果は再現されなかった。また、薬剤誘発性間質性肺病変を起こした関節リウマチ患者血漿中のmicro RNAを測定したが、関連のあるmicro RNAは得られなかった。薬剤誘発性間質性肺病変の疾患感受性アレルHLA-A*31:01のトランスジェニックマウスでの薬剤誘発性間質性肺病変モデルでは疾患感受性の増強は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：It was tried to detect the genetic factors and the mechanisms of adverse effects by anti-rheumatic drugs. The genome wide association study was performed, but the results were not confirmed by the replication analysis. No specific micro RNA was detected in the plasma from the rheumatoid arthritis patients with methotrexate-induced interstitial lung diseases. The transgenic mouse of HLA-A*31:01, a susceptibility allele for methotrexate-induced interstitial lung diseases, was not more susceptible for the model of methotrexate-induced induced interstitial lung disease.

研究分野：医歯薬学

キーワード：遺伝子診断・治療

1. 研究開始当初の背景

多因子疾患は環境要因と遺伝要因の作用によって発症する疾患であり、環境要因と遺伝要因はそれぞれ独立に疫学研究と遺伝疫学研究によって調べられてきたが、その相互作用が注目されている。また、加齢に伴い服用する薬剤の種類と量は増える傾向にあり、多因子疾患としての薬剤有害事象の発症頻度も高齢者に高いことから、日本人の身体を取り巻く環境要因としての薬剤は無視できない存在となりつつある。そのなかで、薬剤応答性は薬剤という環境要因に対する反応であり、この応答性を決める遺伝要因に関するファーマコゲノミクス研究は次第に重要性を増している。

関節リウマチ(RA)治療はメトトレキサート(MTX)をはじめとする種々の抗リウマチ薬や生物学的製剤により格段の進歩をみせており、特に関節破壊抑制効果に極めて有効な結果が報告されている。これらの新規治療薬による有害事象には皮疹・痒疹・肝障害・腎障害・血球減少・間質性肺病変(ILD)・悪性リンパ腫・口内炎・結核・帯状疱疹などがあり、これらは生命予後に重大な影響を及ぼしうるにもかかわらず、その発症機序の解明や治療法の確立は不十分である。これらには、発症が投与量に依存せず、ヒト白血球抗原(HLA)と強く関連するものがあることから、IV型アレルギー反応の関与も考えられている。近年、薬剤応答性に関わる遺伝要因の研究報告が相次いでいるが、抗リウマチ薬に伴う有害事象の遺伝要因に関する報告はほとんどない。

2. 研究の目的

日本で薬剤誘発性ILDと皮膚薬剤過敏症(Stevens-Johnson症候群、中毒性表皮壊死症)の発症頻度が他国と比べて著しく高いことは、日本人特有の遺伝要因の関与を示唆している。また、他の膠原病と比べてRA患者では抗リウマチ薬に伴う有害事象の頻度が高い。HLAと一部の薬剤有害事象との関連は極めて強く、原因薬剤ごとに異なるアレルとの関連が報告されている。我々はMTX誘発性ILDとHLA-A*31:01との関連(*Ann Rheum Dis.* 72:153)および、プシラミン誘発性腎障害とDRB1*08:02との関連(*Biomark Insights.* 9:23)を世界に先駆けて明らかにした。A*31:01のアレル頻度は日本人で高く、A*31:01が日本人RAに最も多いDRB1*04:05と連鎖不平衡にあることは、日本人RAにMTX誘発性ILDが多い理由の説明になっている。しかしながら、A31分子のILD発症機序への関わりと、DR8分子の腎障害発症機序への関わりはどちらも不明である。本研究では遺伝因子の側面から抗リウマチ薬に伴う有害事象の要因を解明することを目的とする。HLAと関連する薬剤過敏性反応の病態はまだ明らかではない。HLA分子が薬剤で修飾されてT細胞を活性化する可能性もあるが、薬剤

やその代謝物がハプテンとして働いてHLAに提示されたペプチドを修飾する可能性もある。薬剤がHLAクラスI分子の溝にはまることによって、提示されるペプチドのrepertoireが変化し、アロ認識をするCD8⁺T細胞が活性化されるとする説もある。細胞内でポリグルタミン酸化されたMTXがHLAによって直接提示される可能性もある。以上のような報告・知見は示されているが、抗リウマチ薬に伴う有害事象の発症機序に関する研究報告はほとんどない。抗リウマチ薬に伴う有害事象の病因・病態の解明は極めて重要であると同時に、まさに今求められている研究である。

薬剤誘発性ILD発症時と安定時とで発現の変化したサイトカイン・miRNAを網羅的に調べることにより、病態形成に重要な役割を果たしているサイトカイン・microRNA(miRNA)の候補を挙げることが可能と考えられる。そこで、薬剤誘発性ILDを発症したRA例の、発症時と安定時とのペア血清中のサイトカイン類を網羅的に測定した(*BMC Immunol.* 14:9)。TIMP-1, IL-2R, MMP-1, MMP-8が増加し、eotaxin 2, TIMP-2, MMP-3が減少した。同様にペア血清から抽出されたmiRNAも網羅的に測定する。薬剤誘発性ILD発症時に変化の見られたサイトカイン・miRNAは予後予測マーカーだけでなく、治療標的となりうる。HLA分子・サイトカイン・miRNA等の分子病態の側面から薬剤有害事象の病態を解明することも目的とする。

3. 研究の方法

これまでにRA762例のゲノムDNAが採集された。採集されたゲノムDNA検体530について東京大学と相模原病院で全ゲノム上70万SNPとHLAのタイピングを行い、ゲノムワイド関連解析(GWAS)を行った。「薬剤誘発性ILD発症RA例」対「非発症RA例」の比較でGWASを行った結果、薬剤誘発性ILD発症に関する関連解析で最小のP=1.76×10⁻⁷であった。この結果から候補SNPを選定し、その後収集された検体でこれらの候補SNPについてReplication studyを行った。

MTX誘発性ILDの疾患感受性アレルA*31:01のトランスジェニック(Tg)マウスを作製した。細胞表面への発現効率を上げ、マウスCD8分子による認識を確実にするため、A*31:01のcDNAの3ドメインをマウスMHCクラスIのH2-D^bの3ドメインと交換したキメラ遺伝子をマウスRosaプロモーターの下流にサブクローニングしてconstructを作成した。ヒト2ミクログロブリンcDNAをサブクローニングしたconstructと1:1で混ぜて、C57BL/6Jマウス由来の受精卵の前核中に注入することにより、HLA-A31とH2-D^bのキメラ分子をヒト2ミクログロブリンと共にユビキタスに細胞表面に発現するTgマウスを作製した。経口投与によるMTX誘発性ILDモデルも近年開発されており(*J Toxicol Sci.*

35:653)、A*31:01Tg マウスにおける MTX 誘発性 ILD モデルでは、野生型と比べて感受性が高くなると予想された。

MTX 誘発性 ILD 発症時と安定時とで発現の変化した miRNA を網羅的に調べることにより、病態形成に重要な役割を果たしている miRNA の候補を挙げることが可能と考えられる。MTX 誘発性 ILD 発症例の発症時と安定時とのプール血漿について、miRNA PCR アレイを用いて miRNA を網羅的に測定する。MTX 誘発性 ILD 発症時に大きく変化した miRNA について、リアルタイム PCR 法によって各検体中の miRNA を定量した。

4. 研究成果

「薬剤誘発性 ILD 発症 RA 例」対「非発症 RA 例」の比較で GWAS を行った結果、薬剤誘発性 ILD 発症に関する関連解析で最小の $P=1.76 \times 10^{-7}$ であった。この結果から候補 SNP を選定し、その後収集された検体でこれらの候補 SNP について Replication study を行ったが、GWAS の結果は再現されなかった。また、MTX 関連リンパ増殖性疾患と *DQB1*06:01* が関連していることが示唆された (*J Hum Genet.* 60:691)。

MTX 誘発性 ILD の疾患感受性アレル *A*31:01* の Tg マウスを作製し、このマウスで MTX 誘発性 ILD の疾患モデル動物を作ったが、疾患感受性の増強は認められなかった。さらに、X 線照射を行ってから、MTX 誘発性 ILD の疾患モデル動物を作ってみたところ、*A*31:01* の Tg マウスで疾患感受性の増強は認められなかった。

MTX 誘発性 ILD を起こした患者血漿中の miRNA を測定し、病態に関連する可能性のある miRNA を調べたが、関連のある miRNA を見つけることはできなかった。しかしながら、RA に伴う ILD に関連のある miRNA を発見した (*BMC Musculoskelet Disord.* 18:21)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

1. Terao C, Kawaguchi T, Dieude P, Varga J, Kuwana M, Hudson M, Kawaguchi Y, Matucci-Cerinic M, Ohmura K, Riemekasten G, Kawasaki A, Airo P, Horita T, Oka A, Hachulla E, Yoshifuji H, Caramaschi P, Hunzelmann N, Baron M, Atsumi T, Hassouns P, Torii T, Takahashi M, Tabara Y, Shimizu M, Tochimoto A, Ayuzawa N, Yanagida H, Furukawa H, Tohma S, Hasegawa M, Fujimoto M, Ishikawa O, Yamamoto T, Goto D, Asano Y, Jinnin M, Endo H, Takahashi H, Takehara K, Sato S, Ihn H, Raychaudhuri S, Liao K, Gregersen P, Tsuchiya N, Ricciardi V, Melchers I, Valentini G, Cauvet A, Martinez M, Mimori T, Matsuda F, Allanore Y. Trans-ethnic meta-analysis

identifies GSDMA and PRDM1 as susceptibility genes to systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2017 in press (査読有)

2. Furukawa H, Oka S, Tsuchiya N, Shimada K, Hashimoto A, Tohma S, Kawasaki A. The Role of Common Protective Alleles HLA-DRB1*13 Among Systemic Autoimmune Diseases. *Genes Immun.* 2017 Jan;18(1):1-7. (有)
3. Oka S, Furukawa H, Shimada K, Hashimoto A, Komiya A, Fukui N, Tsuchiya N, Tohma S. Plasma miRNA Expression Profiles in Rheumatoid Arthritis Associated Interstitial Lung Disease. *BMC Musculoskelet Disord.* 2017 Jan 19;18(1):21. (有)
4. Higuchi T, Oka S, Furukawa H, Nakamura M, Komori A, Abiru S, Nagaoka S, Hashimoto S, Naganuma A, Naeshiro N, Yoshizawa K, Shimada M, Nishimura H, Tomizawa M, Kikuchi M, Makita F, Yamashita H, Ario K, Yatsuhashi H, Tohma S, Kawasaki A, Ohira H, Tsuchiya N, Migita K. Association of a single nucleotide polymorphism upstream of ICOS with Japanese autoimmune hepatitis type 1. *J Hum Genet.* 2017 Apr;62(4):481-484. (有)
5. Furukawa H, Oka S, Kawasaki A, Shimada K, Sugii S, Matsushita T, Hashimoto A, Komiya A, Fukui N, Kobayashi K, Osada A, Ihata A, Kondo Y, Nagai T, Setoguchi K, Okamoto A, Okamoto A, Chiba N, Suematsu E, Kono H, Katayama M, Hirohata S, Sumida T, Migita K, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S, Nagaoka S, Takehara K, Tohma S, Tsuchiya N. Human Leukocyte Antigen and Systemic Sclerosis in Japanese: The Sign of the Four Independent Protective Alleles, DRB1*13:02, DRB1*14:06, DQB1*03:01, and DPB1*02:01. *PLoS ONE.* 2016 Apr 26;11(4):e0154255. (有)
6. Furukawa H, Oka S, Shimada K, Masuo K, Nakajima F, Funano S, Tanaka Y, Komiya A, Fukui N, Sawasaki T, Tadokoro K, Nose M, Tsuchiya N, Tohma S. Autoantibody Profiles in Collagen Disease Patients with Interstitial Lung Disease (ILD): Antibodies to Major Histocompatibility Complex Class I-Related Chain A (MICA) as Markers of ILD. *Biomark Insights.* 2015 Aug 16;10:63-73. (有)
7. Oka S, Furukawa H, Shimada K, Sugii S, Hashimoto A, Komiya A, Fukui N, Suda A, Tsunoda S, Ito S, Katayama M, Nakamura T, Saisho K, Sano H, Migita

- K, Nagaoka S, Tsuchiya N, Tohma S. Association of Human Leukocyte Antigen Alleles with Chronic Lung Diseases in Rheumatoid Arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2016 Jul;55(7):1301-7. (有)
8. Hashimoto A, Chiba N, Tsuno H, Komiya A, Furukawa H, Matsui T, Nishino J, Tohma S. Incidence of malignancy and the risk of lymphoma in Japanese rheumatoid arthritis patients compared to the general population. *J Rheumatol*. 2015 Apr;42(4):564-71. (有)
 9. Furukawa H, Oka S, Shimada K, Hashimoto A, Tohma S. Human Leukocyte Antigen Polymorphisms and Personalized Medicine for Rheumatoid Arthritis. *J Hum Genet*. 2015 Nov;60(11):691-6. (有)
 10. Furukawa H, Oka S, Shimada K, Tsuchiya N, Tohma S. Genetics of interstitial lung disease: Vol de nuit (night flight). *Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med*. 2015 Apr 29;9(Suppl 1):1-7. (有)
 11. Kawasaki A, Furukawa H, Nishida N, Warabi E, Kondo Y, Ito S, Matsumoto I, Kusaoi M, Amano H, Suda A, Nagaoka S, Setoguchi K, Nagai T, Hirohata S, Shimada K, Sugii S, Okamoto A, Chiba N, Suematsu E, Ohno S, Katayama M, Okamoto A, Kono H, Tokunaga K, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Tohma S, Tsuchiya N. Association of functional polymorphisms in interferon regulatory factor 2 (IRF2) with susceptibility to systemic lupus erythematosus: a case-control association study. *PLoS ONE*. 2014 Oct 7;9(10): e109764. (有)
 12. Oka S, Furukawa H, Kawasaki A, Shimada K, Sugii S, Hashimoto A, Komiya A, Fukui N, Ito S, Nakamura T, Saisho K, Katayama M, Tsunoda S, Sano H, Migita K, Suda A, Nagaoka S, Tsuchiya N, Tohma S. Protective effect of the HLA-DRB1*13:02 allele in Japanese rheumatoid arthritis patients. *PLoS ONE*. 2014 Jun 9;9(6):e99453. (有)
 13. Furukawa H, Oka S, Shimada K, Sugii S, Hashimoto A, Komiya A, Fukui N, Miyashita T, Migita K, Suda A, Nagaoka S, Tsuchiya N, Tohma S. HLA-DRB1*08:02 is associated with bucillamine-induced proteinuria in Japanese rheumatoid arthritis patients. *Biomark Insights*. 2014 May 19;9:23-8. (有)
- [学会発表](計 17 件)
1. 古川宏, 岡笑美, 川崎綾, 島田浩太, 杉井章二, 松下貴史, 橋本篤, 小宮明子, 福井尚志, 小林幸司, 長田侑, 井畑淳, 近藤裕也, 永井立夫, 瀬戸口京吾, 岡本明子, 岡本享, 千葉実行, 末松栄一, 河野肇, 片山雅夫, 廣畑俊成, 住田孝之, 右田清志, 長谷川稔, 藤本学, 佐藤伸一, 長岡章平, 竹原和彦, 當間重人, 土屋尚之: HLA クラス II と強皮症(第 20 回強皮症研究会議 2017 年 1 月 14 日アステラス本社東京都中央区)
 2. 岡笑美, 古川宏, 島田浩太, 橋本篤, 小宮明子, 土屋尚之, 當間重人: 関節リウマチ関連間質性肺病変における血漿中 miRNA(第 70 回国立病院総合医学会 2016 年 11 月 11-12 日沖縄コンベンションセンター沖縄県宜野湾市)
 3. 吉村美郁, 樋口貴士, 岡笑美, 川崎綾, 蕨栄治, 水野聖哉, 小野栄夫, 高橋智, 當間重人, 土屋尚之, 古川宏: マウスにおける高脂肪食によるメトトレキサート毒性の増強(第 3 回 日本リウマチ学会ベシクリサーチカンファレンス 2016 年 10 月 14-15 日アキバプラザ東京都千代田区)
 4. 樋口貴士, 岡笑美, 古川宏, 小森敦正, 八橋弘, 中村稔, 川崎綾, 土屋尚之, 右田清志: 日本人における自己免疫性肝炎発症に関わる遺伝要因(第 44 回日本臨床免疫学会総会 2016 年 9 月 8-10 日京王プラザホテル東京都新宿区)
 5. 吉村美郁, 樋口貴士, 岡笑美, 川崎綾, 蕨栄治, 水野聖哉, 小野栄夫, 高橋智, 當間重人, 土屋尚之, 古川宏: HLA-A*31:01 遺伝子導入マウスを用いたメトトレキサート誘導性間質性肺炎モデルの作成と評価(第 44 回日本臨床免疫学会総会 2016 年 9 月 8-10 日京王プラザホテル東京都新宿区)
 6. 岡笑美, 古川宏, 島田浩太, 橋本篤, 小宮明子, 土屋尚之, 當間重人: 関節リウマチに合併する間質性肺病変と血漿中 miRNA 発現(第 60 回日本リウマチ学会 2016 年 4 月 21-23 日パシフィコ横浜神奈川県横浜市)
 7. 古川宏, 岡笑美, 川崎綾, 島田浩太, 杉井章二, 松下貴史, 橋本篤, 小宮明子, 小林幸司, 長田侑, 井畑淳, 永井立夫, 瀬戸口京吾, 岡本明子, 岡本享, 千葉実行, 末松栄一, 河野肇, 片山雅夫, 廣畑俊成, 右田清志, 長谷川稔, 藤本学, 佐藤伸一, 竹原和彦, 長岡章平, 當間重人, 土屋尚之: 抗セントロメア抗体陽性強皮症と HLA-DQB1 との関連(第 60 回日本リウマチ学会 2016 年 4 月 21-23 日パシフィコ横浜神奈川県横浜市)
 8. 古川宏, 岡笑美, 島田浩太, 杉井章二, 橋本篤, 小宮明子, 福井尚志, 小林幸司, 長田侑, 井畑淳, 永井立夫, 瀬戸口京吾, 岡本明子, 岡本享, 千葉実行, 末松栄一, 河

- 野肇,片山雅夫,廣畑俊成,右田清志,長岡章平,當間重人:HLA-DQB1 アレルと抗セントロメア抗体陽性強皮症(第60回日本人類遺伝学会大会 2015年10月15-17日京王プラザホテル東京都新宿区)
9. 岡笑美,古川宏,島田浩太,杉井章二,橋本篤,小宮明子,福井尚志,須田昭子,角田慎一郎,伊藤聡,片山雅夫,中村正,税所幸一郎,佐野統,右田清志,長岡章平,土屋尚之,當間重人:関節リウマチに伴う肺病変とHLAとの関連(第69回国立病院総合医学学会 2015年10月2-3日ロイトン札幌北海道札幌市)
10. Tsuchiya N, Hasebe N, Hidaka M, Sada K, Kobayashi S, Yamada H, Furukawa H, Yamagata K, Sumida T, Miyasaka N, Tohma S, Ozaki S, Matsuo S, Hashimoto H, Makino H, Arimura Y, Harigai M, Kawasaki A: Genetic Background of ANCA-Associated Vasculitis in the Japanese population. (第59回日本リウマチ学会 2015年4月23-25日名古屋国際会議愛知県名古屋市)
11. 古川宏,當間重人:リウマチ性疾患の疾患感受性・薬剤応答性とHLA-新たな知見(第59回日本リウマチ学会 2015年4月23-25日名古屋国際会議愛知県名古屋市)
12. 岡笑美,古川宏,島田浩太,杉井章二,橋本篤,小宮明子,須田昭子,角田慎一郎,伊藤聡,中村正,税所幸一郎,佐野統,右田清志,長岡章平,土屋尚之,當間重人:HLAと関節リウマチに伴う気道病変の関連(第59回日本リウマチ学会 2015年4月23-25日名古屋国際会議愛知県名古屋市)
13. 古川宏,岡笑美,島田浩太,小宮明子,土屋尚之,當間重人:関節リウマチに合併する間質性肺病変と抗MICA抗体(第59回日本リウマチ学会 2015年4月23-25日名古屋国際会議愛知県名古屋市)
14. 古川宏,岡笑美,島田浩太,杉井章二,橋本篤,小宮明子,宮下賜一郎,右田清志,須田昭子,長岡章平,土屋尚之,當間重人:プシラミン誘発性蛋白尿とHLA-DRB1*08:02との関連(第35回日本臨床薬理学会学術総会 2014年12月4-6日愛媛県民文化会館愛媛県松山市)
15. 古川宏,岡笑美,島田浩太,杉井章二,橋本篤,小宮明子,福井尚志,宮下賜一郎,右田清志,須田昭子,長岡章平,土屋尚之,當間重人:プシラミン誘発性蛋白尿とHLA-DRB1*08:02(第59回日本人類遺伝学会大会 2014年11月19-22日タワーホール船堀東京都江戸川区)
16. 豊岡理人,島田浩太,古川宏,西田奈央,川島実苗,岡笑美,杉井章二,橋本篤,高岡宏和,小宮明子,中村正,右田清志,須田昭子,土屋尚之,徳永勝士,當間重人:関節リウマチに合併する間質性肺病変

とヒト白血球抗原(HLA)以外の遺伝要因の探索(第59回日本人類遺伝学会大会 2014年11月19-22日タワーホール船堀東京都江戸川区)

17. 古川宏,島田浩太,杉井章二,橋本篤,小宮明子,宮下賜一郎,右田清志,須田昭子,長岡章平,土屋尚之,當間重人:プシラミン誘発性蛋白尿とHLA-DRB1*08:02との関連(第58回日本リウマチ学会 2014年4月24-26日グランドプリンスホテル新高輪東京都港区)

〔図書〕(計1件)

1. 八谷有紀,古川宏,土屋尚之:遺伝因子「強皮症の基礎と臨床:病態の解明から最新の診療まで」(佐藤伸一編)医薬ジャーナル社、大阪、2016 Aug 20;60-69.

〔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(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

古川 宏 (FURUKAWA Hiroshi)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号:00372293

(2)研究分担者

當間重人 (TOHMA Shigeto)

独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター・リウマチ性疾患研究部・部長

研究者番号:50207528

(3)連携研究者

土屋尚之 (TSUCHIYA Naoyuki)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号:60231437