

血管炎の予後は予測できるか —予測因子検索の道—

石津明洋* 外丸詩野** 村井太一*** 山本智宏*** 吉木 敬***

* 北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野

** 北海道大学大学院医学研究科分子病理学分野

*** 株式会社ジェネティックラボ

JMAAV 試験では、MPO-ANCA 関連血管炎の重症度別治療プロトコルの有用性が検討された。その結果、策定したプロトコルにもとづいて治療をおこなった場合、89.4%という高い確率で寛解が得られることが示された。一方、約20%の症例が再燃し、研究期間中の死亡率は約10%であった。われわれは、MPO-ANCA 関連血管炎のさらなる予後改善を目的として、JMAAV 試験に登録された症例の治療前および治療開始1週間後の末梢血について網羅的遺伝子発現解析（トランスクリプトーム解析）をおこなった。治療後に寛解し、その後も寛解が維持された症例において、88個の遺伝子が治療前後で統計学的に有意な発現変化を示した。このうち、治療後に発現が低下した遺伝子は66個、治療後に発現が上昇した遺伝子は22個であった。これらのなかから、MPO-ANCA 関連血管炎の治療反応性を治療開始後の早期に予測する16個の遺伝子を抽出した。

はじめに

MPO-ANCA 関連血管炎、なかでも顕微鏡的多発血管炎（microscopic polyangiitis）は欧米にくらべてわが国に多い血管炎である¹⁾。50~60代に好発し、糸球体をはじめとする小血管を主体に血管壁のフィブリノイド壊死をきたし、糸球体では半月体形成性壊死性糸球体腎炎の像を呈する。ミエロペルオキシダーゼ（myeloperoxidase：MPO）を対応抗原とする抗好中球細胞質抗体（anti-neutrophil cytoplasmic antibody：ANCA）が病態に密接に関係しており、好中球やリンパ球など末梢血の白血球が病因において重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、詳細な発症機序は不明であるため、治療としてはステロイド剤を中心とした非特異

的な免疫抑制療法がおこなわれるにとどまり、また、薬剤の使用方法についてもこれまで施設間で統一されたものはなかった。Ozakiらはわが国におけるMPO-ANCA 関連血管炎の標準的治療プロトコル策定を目的として、多施設共同前向き臨床試験JMAAVを実施した²⁾。JMAAV 試験では、研究期間中に新たにMPO-ANCA 関連血管炎と診断された48症例を対象として、病変の部位および分布をもとに重症度を評価し、策定した重症度別プロトコルに準拠した治療がおこなわれた。48症例の重症度の内訳は、軽症例23例、重症例23例、最重症例2例であった。どの重症度に対する治療プロトコルもステロイド剤とシクロホスファミドをはじめとする免疫抑制剤の組み合わせよりなっており、重症度別にその使用方法が規定されている。治療開始後の経過を追跡し得た47症例のうち42症例が寛解に至り、寛解導入率は89.4%と高いものであった。一方、寛解後に再燃をきたした症例が8例あり（再燃率19.0%）、研究期間中の死亡は5例（死亡率10.6%）であった。われわれは、治療前もしくは治療開始後の早期に個々の症例の治療反応性を予測できれば、反応性不良と予測された症例に対し

Key Words

MPO-ANCA 関連血管炎、顕微鏡的多発血管炎、トランスクリプトーム解析、治療反応性、最適遺伝子診断セット

て嚴重な経過観察により再燃を未然に把握し、付加的な治療をおこなうことにより、最終的な予後の改善に寄与できる可能性があると考えた。

1. 治療前末梢血の遺伝子発現プロフィールと重症度および治療反応性

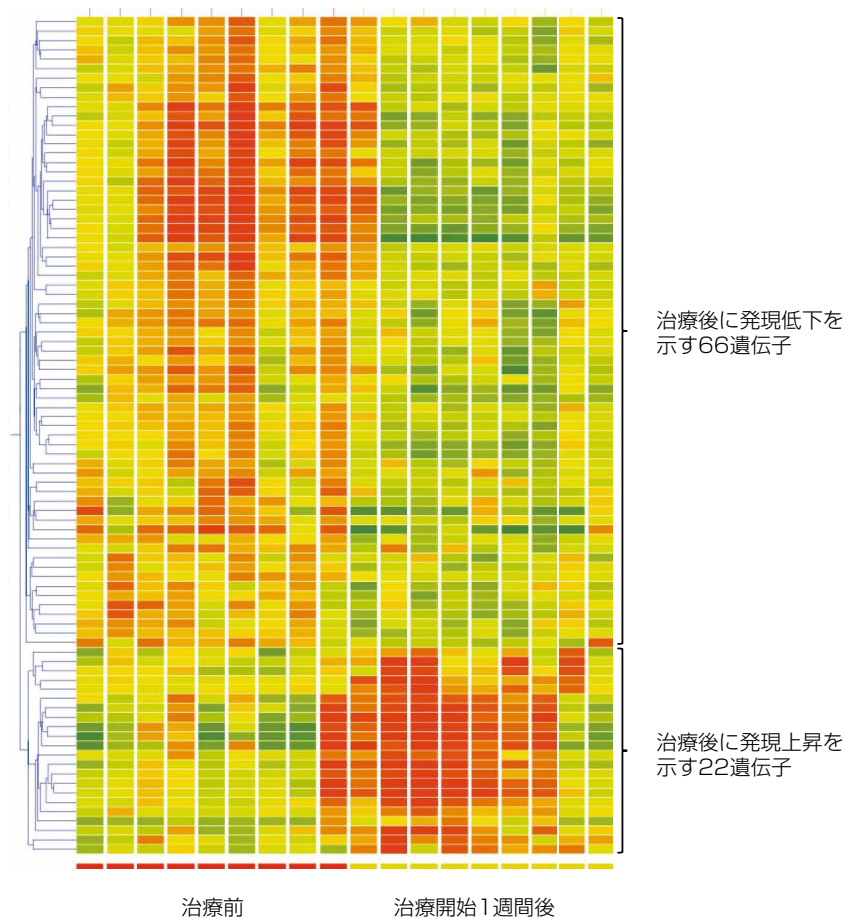
治療前および治療開始後1週間の時点で採取したMPO-ANCA関連血管炎患者12症例の末梢血をサンプルとして、Affymetrix社のHuman Genome Focus Arrayを用いたトランスクリプトーム解析をおこなった。このgene chipには、炎症反応や免疫反応などに関わる8,797個のヒト遺伝子が搭載されている。本解析に用いた12症例の内訳は、軽症例6例、重症例5例、最重症例1例であり、治療後の経過は、寛解維持例9例、寛解後再燃例2例、非寛解死亡例1例であった。はじめに、治療前末梢血遺伝子発現プロフィールが重症度と相関するか検討した。12症例を軽症例(6例)と重症または最重症例(計6例)の2群に分け、遺伝子発現の差を比較したが、両者のあいだで統計学的に有意な発現差を示す遺伝子は認められなかった。つぎに、治療前末梢血遺伝子発現プロフィールが治療反応性と相関するか検討した。12症例を寛解維持例(9例)と寛解後再燃または非寛解死亡例(計3例)の2群に分け、遺伝子発現の差を比較したところ、62個の遺伝子について、両者のあいだで統計学的に有意な発現差が認められた。そこで、62遺伝子のうち有意性の高かった上位45遺伝子を選択し、35症例(寛解維持例26例、寛解後再燃例7例、非寛解例2例)について、BioMarkシステム(Fluidigm社)による定量的発現解析をおこなった。BioMarkシステムはハイスループットのリアルタイムreverse transcriptase (RT)-PCR法であり、gene chip解析に比べ、遺伝子発現の定量性にすぐれている。その結果、寛解維持群(26例)とそれ以外の群(計9例)のあいだに、統計学的に有意な発現差を示す遺伝子は認められない、という結果になった。サンプル数が増えたこと、ならびに、より厳密な定量解析をおこなったことにより、当初の有意性が棄却されたものと考えられた。

2. 治療前後の末梢血における遺伝子発現の変化と治療反応性

そこで、gene chip解析に用いた12症例のうち、治療開始の6週後に寛解が導入され、その後も寛解が維持された9症例について、治療前と治療後1週間の末梢血における遺伝子発現の変化を検討したところ、88遺伝子が治療前後で統計学的に有意な発現変化を示した(図1)。このうち、治療後に発現が低下した遺伝子は66個、発現が上昇した遺伝子は22個であった。寛解後に再燃した2例および寛解に至らず死亡した1例の計3例では、治療前後で統計学的に有意な発現変化を示す遺伝子は認められなかった。

3. 治療開始後の早期に治療反応性を予測する最適遺伝子の抽出

上記検討において抽出された88遺伝子のなかから、再現性の確認された30遺伝子を選定してApplied Biosystems社製TaqMan Low Density Array (LDA)を作製し、解析した。LDAはBioMarkシステムと同様、リアルタイムRT-PCR法を応用した遺伝子発現解析法であり、gene chip解析に比べて定量性にすぐれている。この方法で治療前後の末梢血の遺伝子発現を解析した症例は22症例であり、その内訳は、寛解維持例17例、寛解後再燃例4例、非寛解死亡例1例であった。この22症例をトレーニングサンプルとし、30遺伝子のなかから無作為に16個の遺伝子を選択し、重回帰分析を実施した。その際、寛解維持症例を「治療反応性良好群:0」、寛解後再燃症例および非寛解死亡症例を「治療反応性不良群:1」というダミー変数(目的変数)に変換した。治療反応性、すなわち目的変数に与える影響度を求め、それが最小であった遺伝子を除き、解析に加えなかった別の遺伝子(30個の遺伝子のうち、最初に選択した16個の遺伝子以外の14個のなかから1つ)を代わりに加えて、重回帰分析をくり返し実施した。加える遺伝子がなくなった後は、影響度が最小となった遺伝子を除いて重回帰分析をおこない、最終的に遺伝子が1つになるまで重回帰分析を実施した。以上の解析をおこなった遺伝子の



図① 寛解維持症例における治療前後の遺伝子発現変化 (投稿中)

組み合わせのなかから、Akaikeの情報量基準 Akaike's Information Criterion (AIC)³⁾が最小となる予測精度の最も高い「最適な回帰モデル」を決定した。

4. 最適遺伝子診断セットを用いた治療反応性の予測

「最適な回帰モデル」を作製するために選択された遺伝子は16個で、この16個の遺伝子を「MPO-ANCA関連血管炎の治療反応性を治療開始後の早期に予測する最適遺伝子診断セット」と命名した(表①)。16個の遺伝子の治療前後における発現変化 $\Delta\Delta Ct$ を以下の計算式に代入することにより、治療反応性予測値 Outcome indexを求めることができる。なお、 $\Delta\Delta Ct$ はリアルタイム RT-PCRにより求められる指数である。Outcome indexが0に近ければ反応性良好と予測され、1に近ければ反応性

不良と予測される。

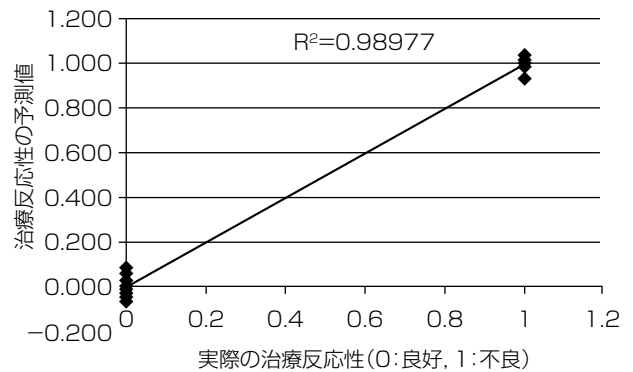
$$\begin{aligned} \text{Outcome index} = & 0.844044085142021 + \\ & (0.736608168793488) \times (2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ of IRF7}) + \\ & (-0.322838158450077) \times (2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ of IFIT1}) + \\ & (-1.43874462149203) \times (2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ of IFIT5}) + \\ & (-0.183642900058098) \times (2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ of OASL}) + \\ & (0.0484321399637678) \times (2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ of CLC}) + \\ & (-0.83509962882179) \times (2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ of GBP1}) + \\ & (0.380999598038957) \times (2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ of PSMB9}) + \\ & (0.366291679647718) \times (2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ of HERC5}) + \\ & (-0.911075828160401) \times (2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ of CCR1}) + \\ & (-0.842873405247722) \times (2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ of CD36}) + \\ & (0.429218020321458) \times (2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ of MS4A4A}) + \\ & (0.932404175504654) \times (2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ of BIRC4BP}) + \\ & (0.71507830637659) \times (2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ of PLSCR1}) + \end{aligned}$$

表① MPO-ANCA 関連血管炎の治療反応性を治療開始後の早期に予測する最適遺伝子診断セット

Gene Symbol	Description	Alteration after treatment
IRF7	Interferon regulatory factor 7	Increase
IFIT1	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	Increase
IFIT5	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	Increase
OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	Increase
CLC	Charcot-Leyden crystal protein	Increase
GBP1	Guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67 kDa	Increase
PSMB9	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional peptidase 2)	Increase
HERC5	Hect domain and RLD 5	Increase
CCR1	Chemokine (C-C motif) receptor 1	Increase
CD36	CD36 antigen (collagen type I receptor, thrombospondin receptor)	Increase
MS4A4A	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4	Increase
BIRC4BP	XIAP associated factor-1	Increase
PLSCR1	Phospholipid scramblase 1	Increase
DEFA1/DEFA3	Defensin, alpha 1/Defensin, alpha 3, neutrophil-specific	Decrease
DEFA4	Defensin, alpha 4, corticostatin	Decrease
COL9A2	Collagen, type IX, alpha 2	Decrease

$$(0.0109975921341484) \times (2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ of DEFA1/DEFA3}) + (-0.0178729363274759) \times (2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ of DEFA4}) + (-0.0607758234431297) \times (2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ of COL9A2})$$

最適遺伝子診断セットを搭載した TaqMan LDA を用いて、前述の 22 症例について治療反応性の予測をおこなった結果は、「反応性良好」または「反応性不良」の実際の臨床経過に対して、 $R^2=0.9898$ と高い一致率を示した (図②)。



図② 最適遺伝子診断セットを用いた治療反応性の予測結果と実際の臨床経過の相関
縦軸：予測値，横軸：実際の臨床経過 (0：治療反応性良好，1：治療反応性不良)

5. 抽出された遺伝子の発現変化が示す意味

「MPO-ANCA 関連血管炎の治療反応性を治療開始後の早期に予測する最適遺伝子診断セット」として抽出された 16 個の遺伝子のうち、13 個は治療後に発現低下を示す遺伝子であり、3 個が発現上昇を示す遺伝子であった (表①)。治療後に発現低下を示す遺伝子には、interferon regulatory factor (IRF) family の遺伝子や interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats (IFIT) family の遺伝子、2'-5'-oligoadenylate synthetase (OAS) family の遺伝子などインターフェロン関連遺伝子が多く含まれている。しかしながら、Lyons ら⁴⁾によると、末梢血の CD4 陽性 T 細胞におけるインターフェロン特性 interferon signature は、ANCA 関連血管

炎では全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus : SLE) に比べて顕著ではないと報告されている。この点についてはさらなる解析が必要であるが、本研究で認められたインターフェロン関連遺伝子の治療による発現低下は、MPO-ANCA 関連血管炎の病態そのものというよりは治療効果を反映した結果であるのかもしれない。一方、治療後に発現上昇を示す遺伝子には defensin が含まれていた。この分子は SLE では発現が増加しており、治療によってその発現が低下する分子として知られている⁵⁾⁶⁾。MPO-ANCA 関連血管炎で治療後に発現が上昇する意義については明らかではないが、

治療に対する defensin の発現変化の違いが MPO-ANCA 関連血管炎と SLE の病因・病態の違いを反映している可能性があり、今後の検討課題である。

おわりに

MPO-ANCA 関連血管炎患者の治療前末梢血遺伝子発現プロフィールと、疾患の重症度ならびに治療反応性とのあいだには、明らかな相関は認めなかった。しかしながら、治療前と治療開始1週間後の末梢血をサンプルとして、最適遺伝子診断セットの16個の遺伝子発現変化を調べることにより、治療開始後の早期に治療反応性を予測できる可能性が示された。MPO-ANCA 関連血管炎患者の治療反応性を治療開始後の早期に予測し、反応性不良が予測される場合には、嚴重な経過観察により再燃を未然に把握し、付加的な治療をおこなうことにより、最終的な予後の改善に寄与できる可能性がある。



文献

- 1) Ozaki S : ANCA-associated vasculitis : diagnostic and therapeutic strategy. *Allergol Int* **56** : 87-96, 2007
- 2) Ozaki S *et al* : Severity-based treatment for Japanese patients with MPO-ANCA-associated vasculitis : the JMAAV study. *Mod Rheumatol* **22** : 394-404, 2012
- 3) Harada T *et al* : Application of Akaike information criterion to evaluate warfarin dosing algorithm. *Thromb Res* **126** : 183-190, 2010
- 4) Lyons PA *et al* : Novel expression signatures identified by transcriptional analysis of separated leucocyte subsets in systemic lupus erythematosus and vasculitis. *Ann Rheum Dis* **69** : 1208-1213, 2010
- 5) Ishii T *et al* : Isolation and expression profiling of genes upregulated in the peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *DNA Res* **12** : 429-439, 2005
- 6) Froy O *et al* : Defensins in systemic lupus erythematosus. *Ann NY Acad Sci* **1173** : 365-369, 2009