

MPO-ANCA関連血管炎の予後予測因子の探索

石津 明洋¹ 外丸 詩野² 村井 太一³ 吉木 敬³ 尾崎 承一⁴

要 旨：治療前および治療開始後 1 週間の時点で採取したMPO-ANCA関連血管炎患者の末梢血をサンプルとして、トランスクリプトーム解析を行った。治療後に寛解または改善した症例において、74個の遺伝子が治療前後で統計学的に有意な発現変動を示した。このうち、治療後に発現が有意に減少した遺伝子は59個で、また、治療後に発現が有意に増加した遺伝子は15個であった。これらの中から、治療開始後の早期にMPO-ANCA関連血管炎の治療反応性や予後を予測する16個の遺伝子を抽出した。(J Jpn Coll Angiol, 2009, 49: 45-51)

Key words: MPO-ANCA, vasculitis, peripheral blood, transcriptomics, prognosis

はじめに

MPO-ANCA関連血管炎は欧米に比べて本邦に多い血管炎である。ミエロペルオキシダーゼ(myeloperoxidase: MPO)を対応抗原とした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行われるにとどまり、また、薬剤の使用法についてこれまで施設間で統一されたものはなかった。われわれはわが国における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、多施設共同研究組織JMAAV(Japanese study group for MPO-ANCA Associated Vasculitis)を立ち上げ、同時に、本血管炎の病因・病態を明らかにするために患者末梢血の網羅的な遺伝子発現解析を行った。

JMAAVにおけるトランスクリプトーム解析

(1) Gene chip解析

研究期間中に50以上の症例がJMAAVに登録された。登録された症例に対しては病変の部位および分布をもとに重症度を評価し、重症度別にプロトコルに準拠した治療が行われた。どの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、観察期間が終了した時点において、先行する欧米の報告に匹敵する寛解率が得られている(詳細は本特集の他稿にゆずる)。

本解析では、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行った(Fig. 1)。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20症例のMPO-ANCA関連血管炎患者についてその後の臨床経過を調査したところ、寛解または改善を示した症例が13例、感染症を併発したものが1例、末期腎不全に至ったものが1例、死亡3例、不明1例、その他1例であった。治療後に寛解または改善した13症例について末梢血における遺伝子発現を検討した結果、74個の遺伝子が治療前後で統計学的に有意な1.5倍以上の発現変動を示

¹北海道大学大学院保健科学研究院²北海道大学大学院医学研究科分子病理学分野³株式会社ジェネティックラボ⁴聖マリアンナ医科大学リウマチ・膠原病・アレルギー内科

2008年9月3日受理

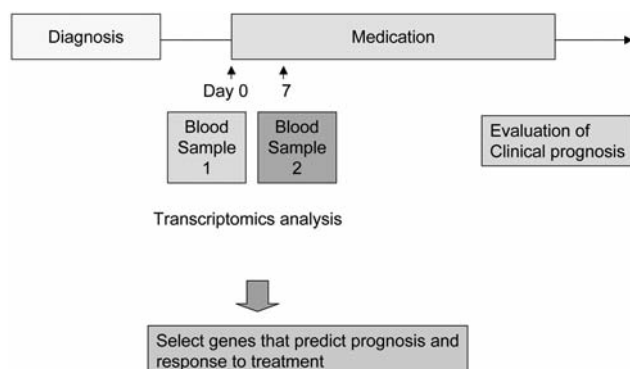


Figure 1 Scheme of transcriptomics analysis in JMAAV.

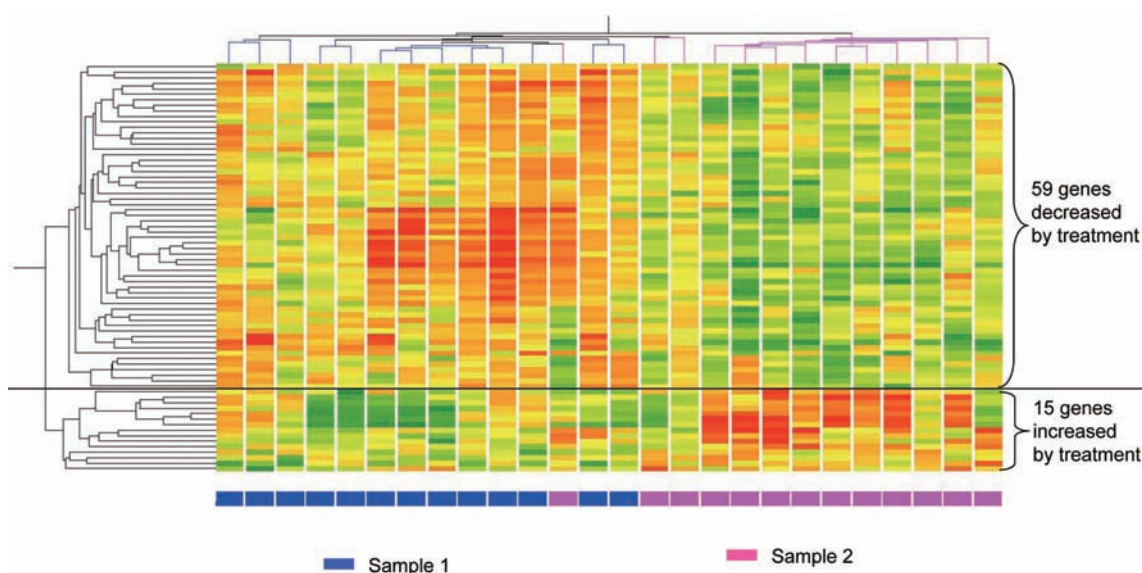


Figure 2 The gene chip analysis in JMAAV. Clustering of 74 genes significantly decreased or increased (>1.5 fold) at day 7 in patients with remission after treatment.

した(Fig. 2, Table 1)。このうち、治療後に発現が有意に減少した遺伝子は59個で、その中には“cell-cell signaling”や“host-pathogen interaction”に機能分類される遺伝子が多く含まれていた。また、治療後に発現が有意に増加した遺伝子は15個で、その中には“defense immunity protein activity”や“host-pathogen interaction”に機能分類される遺伝子が多く含まれていた。なお、寛解または改善を示さなかった7例については、治療前後で統計学的に有意な発現変動を示した遺伝子は抽出されなかった。

寛解または改善した症例において治療後に発現が減

少した遺伝子には、MPO-ANCA関連血管炎の病態増悪に関わる遺伝子が含まれている可能性がある。これらの遺伝子のうち、最も高い有意性を示したものはCharcot-Leyden crystal protein (CLC)であった。CLCは主として好酸球に含まれる分泌顆粒であり、抗菌作用や免疫作用、細胞傷害作用を媒介することや血管透過性を亢進させることが知られている¹⁾。その他、上位にリストアップされた遺伝子には、interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats (IFIT) familyに属する遺伝子²⁾や、CC chemokine receptors (CCRs)³⁾、tumor necrosis factor-

Table 1 List of 74 genes significantly decreased or increased (>1.5 fold) in MPO-ANCA-associated vasculitis patients with remission after treatment

No.	Official full name	Official symbol	Expression	Fold	p-value	Genes for LDA
1	Charcot-Leyden crystal protein	CLC	Decrease	0.174	0.00182	○
2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	IFIT1	Decrease	0.115	0.00671	○
3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	IFIT3	Decrease	0.302	0.00757	○
4	chemokine (C-C motif) receptor 3	CCR3	Decrease	0.339	0.00757	○
5	hect domain and RLD 5	HERC5	Decrease	0.375	0.00757	○
6	nerve growth factor receptor (TNFRSF16) associated protein 1	NGFRAP1	Decrease	0.520	0.00757	○
7	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	TNFSF10	Decrease	0.555	0.00757	○
8	fibrinogen-like 2	FGL2	Decrease	0.631	0.00757	○
10	myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	MX1	Decrease	0.337	0.00765	○
11	chemokine (C-C motif) receptor 1	CCR1	Decrease	0.372	0.00765	○
12	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1	EMR1	Decrease	0.380	0.00867	○
13	XIAP associated factor-1		Decrease	0.473	0.00867	○
14	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	OASL	Decrease	0.558	0.01080	○
15	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	OAS1	Decrease	0.365	0.01300	○
16	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	IFIT5	Decrease	0.449	0.01300	○
17	WD repeat and SOCS box-containing 2	WSB2	Decrease	0.655	0.01300	○
18	free fatty acid receptor 2	FFAR2	Decrease	0.486	0.01420	○
20	ISG15 ubiquitin-like modifier	ISG15	Decrease	0.374	0.01470	○
21	histone cluster 1, H3h	HIST1H3H	Decrease	0.489	0.01470	○
24	interferon, alpha-inducible protein 6	IFI6	Decrease	0.352	0.01500	○
25	cathepsin L1	CTSL1	Decrease	0.624	0.01500	○
27	guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	GBP1	Decrease	0.528	0.01910	○
28	interferon regulatory factor 7	IRF7	Decrease	0.588	0.01910	○
30	histone cluster 2, H2be	HIST2H2BE	Decrease	0.645	0.02050	○
31	interferon induced with helicase C domain 1	IFIH1	Decrease	0.485	0.02080	○
33	monocyte to macrophage differentiation-associated	MMD	Decrease	0.594	0.02270	○
34	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	CD36	Decrease	0.448	0.02590	○
35	metallothionein 2A	MT2A	Decrease	0.496	0.02590	○
36	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional peptidase 2)	PSMB9	Decrease	0.605	0.02590	○
38	phospholipid scramblase 1	PLSCR1	Decrease	0.497	0.02830	○
39	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	OAS2	Decrease	0.530	0.02910	○
40	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	EIF2AK2	Decrease	0.585	0.02910	○
41	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	LTB	Decrease	0.623	0.02910	○
42	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4	MS4A4A	Decrease	0.315	0.03100	○
43	adrenomedullin	ADM	Decrease	0.468	0.03100	○
44	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	OAS3	Decrease	0.478	0.03100	○
45	SLAM family member 7	SLAMF7	Decrease	0.517	0.03100	○
46	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	DDX58	Decrease	0.555	0.03100	○
47	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11	GNG11	Decrease	0.558	0.03100	○

48	TSC22 domain family, member 1	TSC22D1	Decrease	0.587	0.03100	
49	histone cluster 1, H2bd	HIST1H2BD	Decrease	0.620	0.03100	
50	interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	IFITM3	Decrease	0.624	0.03100	
51	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	UBE2L6	Decrease	0.634	0.03100	
52	H2B histone family, member S	H2BFS	Decrease	0.636	0.03100	
53	catalase	CAT	Decrease	0.640	0.03100	
54	SCO cytochrome oxidase deficient homolog 2 (yeast)	SCO2	Decrease	0.644	0.03100	
56	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 2 (PA28 beta)	PSME2	Decrease	0.666	0.03670	
58	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	STAT1	Decrease	0.648	0.03730	
59	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	MTHFD2	Decrease	0.653	0.03730	
61	metallothionein 1X	MT1X	Decrease	0.576	0.03790	
62	transforming growth factor, alpha	TGFA	Decrease	0.662	0.03800	
63	G protein-coupled receptor 109B	GPR109B	Decrease	0.530	0.03910	
64	histone cluster 1, H3d	HIST1H3D	Decrease	0.622	0.03910	
65	interferon-induced protein 44-like	IFI44L	Decrease	0.234	0.04080	
67	coagulation factor XIII, A1 polypeptide	F13A1	Decrease	0.544	0.04300	
71	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	CX3CR1	Decrease	0.597	0.04470	
72	Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor (CD64)	FCGR1A	Decrease	0.470	0.04480	
73	interleukin 1, beta	IL1B	Decrease	0.624	0.04740	
74	arrestin, beta 1	ARRB1	Decrease	0.666	0.04740	
9	ADAM metalloproteinase domain 28	ADAM28	Increase	2.825	0.00757	○
19	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8	CEACAM8	Increase	4.854	0.01420	○
22	collagen, type IX, alpha 2	COL9A2	Increase	1.883	0.01470	○
23	defensin, alpha 4, corticostatin	DEFA4	Increase	4.098	0.01470	○
26	lactotransferrin	LTF	Increase	3.401	0.01500	○
29	Sec23 homolog B (S. cerevisiae)	SEC23B	Increase	1.621	0.01910	○
32	V-set and immunoglobulin domain containing 4	VSIG4	Increase	2.463	0.02130	○
37	defensin, alpha 1	DEFA1	Increase	2.849	0.02590	○
55	CD163 molecule	CD163	Increase	1.795	0.03330	
57	RUN domain containing 3A (also known as RPIP8)	RUNDC3A	Increase	2.016	0.03710	
60	cathelicidin antimicrobial peptide	CAMP	Increase	1.961	0.03730	
66	lipocalin 2 (oncogene 24p3)	LCN2	Increase	2.326	0.04080	
68	histone deacetylase 9	HDAC9	Increase	1.621	0.04300	
69	CD24 molecule	CD24	Increase	2.237	0.04300	
70	interleukin 1 receptor, type II	IL1R2	Increase	2.320	0.04300	

related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)^{4,5)}などが含まれていた。一方、寛解または改善した症例において治療後に発現が増加した遺伝子には、MPO-ANCA関連血管炎の病態抑制に関わる遺伝子が含まれている可能性がある。これらの遺伝子のうち、最も高い有意性を示したものは disintegrin and metalloproteinase (ADAM) 28で

あった。ADAM28はリンパ球に発現するmetalloprotease活性を持つ分子であり、 $\alpha 4\beta 1$ や $\alpha 4\beta 7$ などのインテグリン分子に結合し、CD23やinsulin-like growth factor binding protein-3を切断する分子として知られている⁶⁻⁸⁾。また、P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)と結合し、白血球と血管内皮細胞の接着を増強することも報告されてい

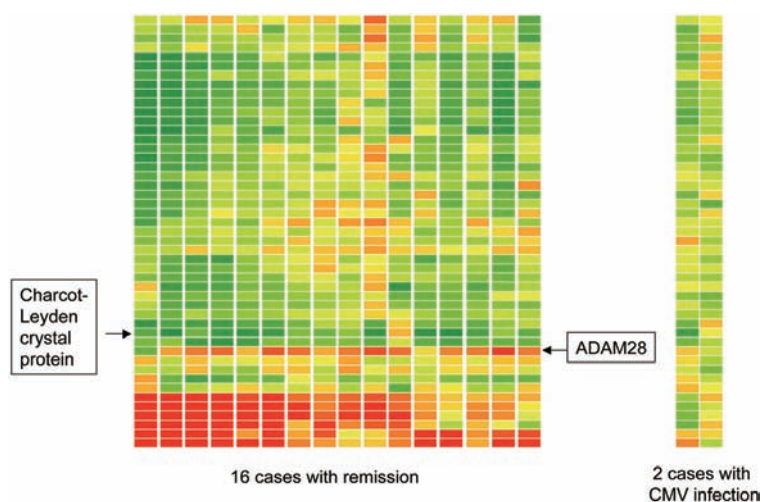


Figure 3 The LDA analysis in JMAAV. Altered expression of 44 genes in patients with remission (16 cases) and with CMV infection (2 cases) after treatment.

る⁹⁾。これらの分子がMPO-ANCA関連血管炎の病因・病態に実際にどのように関与しているかについては現時点では明らかではなく、今後の詳細な解析が必要である。

(2) Low Density Array (LDA)解析

次に、上記検討において抽出された74遺伝子の中から、有意性の高かった順に44遺伝子を選定し、TaqMan LDAを作製した。LDAはリアルタイム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優れている。この方法で治療前後の末梢血の遺伝子発現を解析したMPO-ANCA関連血管炎症例は25症例であり、治療後に問題なく寛解した症例が16例、サイトメガロウイルス(cytomegalovirus; CMV)感染やアスペルギルス感染等の日和見感染症を合併した症例が4例、C型肝炎ウイルスによる肝炎増悪を来した症例が1例、腎不全から血液透析に至った症例が2例、死亡3例であった。問題なく寛解した16症例について解析を行ったところ、どの症例でもCLCは発現低下を示し、ADAM28は発現増強を示すなど、LDAはgene chipの結果を良く再現した(Fig. 3)。一方、治療後に何らかの臨床的な問題が発生した9例の遺伝子発現プロファイルについては、寛解した16症例と明確な違いを見出すことは難しかったものの、CMV感染症を合併した2例では寛解症例で認められる特徴的な遺伝子発現プロファイルが見られず、

LDAを用いて治療前および治療開始後1週間の末梢血遺伝子発現をプロファイリングすることにより、治療後にCMV感染等の合併症を呈する症例を予測できる可能性が示唆された。

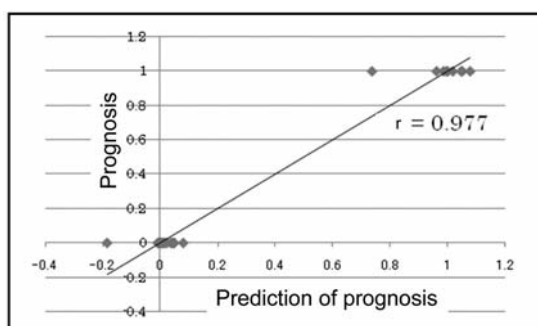
LDA解析を行った25症例について、44個の遺伝子すべてを用いてleave-one-out cross validationによる治療予後の予測を行ったところ、寛解または非寛解の正解率は60%となり、決して満足のいくものではなかった。これは、選択した44個の遺伝子の中に治療予後予測の結果への影響度の低い遺伝子も含まれているためと考えられた。そこで、重回帰分析を行い、結果への影響度の低い遺伝子を除くことにより、治療予後予測のための最適な遺伝子セットを求めた。最終的に抽出された遺伝子は16個(Table 2)で、この16個を用いてトレーニングサンプルの25症例について治療予後予測を行った結果は、寛解または非寛解の区別に対して、 $r = 0.977$ と極めて高い相関を示した(Fig. 4)。今後、新規のテストサンプルを用いて、16個の遺伝子を用いたLDA解析の治療予後予測の精度を確認していく必要がある。

おわりに

JMAAV研究において策定された標準的治療プロトコルにより、MPO-ANCA関連血管炎においても高い寛解導入率が得られることが明らかとなった。しかしなが

Table 2 List of most valuable genes for prognostic prediction of patients with MPO-ANCA-associated vasculitis after treatment

No.	Official full name	Official symbol
1	Charcot-Leyden crystal protein	CLC
2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	IFIT1
4	chemokine (C-C motif) receptor 3	CCR3
9	ADAM metallopeptidase domain 28	ADAM28
12	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1	EMR1
14	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	OASL
16	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	IFIT5
18	free fatty acid receptor 2	FFAR2
19	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8	CEACAM8
21	histone cluster 1, H3h	HIST1H3H
22	collagen, type IX, alpha 2	COL9A2
25	cathepsin L1	CTSL1
30	histone cluster 2, H2be	HIST2H2BE
39	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	OAS2
41	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	LTB
43	adrenomedullin	ADM

**Figure 4** Prediction of prognosis according to the 16 genes selected by the multiple regression analysis.

ら、治療後に死亡に至る症例も依然としてあり、そのようなケースではCMVやアスペルギルス等による日和見感染症が致命的となる場合が多い。経過中の感染症等の合併症発生を治療開始後の早期に予測できれば、薬剤の種類や投与量の変更、合併症に対する予防的措置を講じることなどが可能となり、患者の予後の改善に役立つと考えられる。

文 献

- 1) Pantanowitz L, Balogh K: Charcot-Leyden crystals: pathology and diagnostic utility. *Ear Nose Throat J*, 2004, **83**: 489–490.
- 2) Ye S, Pang H, Gu YY et al: Protein interaction for an interferon-inducible systemic lupus associated gene, IFIT1. *Rheumatology (Oxford)*, 2003, **42**: 1155–1163.
- 3) Haley KJ, Lilly CM, Yang JH et al: Overexpression of eotaxin and the CCR3 receptor in human atherosclerosis: using genomic technology to identify a potential novel pathway of vascular inflammation. *Circulation*, 2000, **102**: 2185–2189.
- 4) Kavurma MM, Schoppet M, Bobryshev YV et al: TRAIL stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells via activation of NF-kappaB and induction of insulin-like growth factor-1 receptor. *J Biol Chem*, 2008, **283**: 7754–7762.
- 5) Chen PL, Easton A: Apoptotic phenotype alters the capac-

- ity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand to induce human vascular endothelial activation. *J Vasc Res*, 2008, **45**: 111–122.
- 6) Bridges LC, Sheppard D, Bowditch RD: ADAM disintegrin-like domain recognition by the lymphocyte integrins $\alpha 4\beta$ and $\alpha 4\beta 7$. *Biochem J*, 2005, **387**: 101–108.
- 7) Fourie AM, Coles F, Moreno V et al: Catalytic activity of ADAM8, ADAM15, and MDC-L (ADAM28) on synthetic peptide substrates and in ectodomain cleavage of CD23. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 30469–30477.
- 8) Mochizuki S, Shimoda M, Shiomi T et al: ADAM28 is activated by MMP-7 (matrilysin-1) and cleaves insulin-like growth factor binding protein-3. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **315**: 79–84.
- 9) Shimoda M, Hashimoto G, Mochizuki S et al: Binding of ADAM28 to P-selectin glycoprotein ligand-1 enhances P-selectin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells. *J Biol Chem*, 2007, **282**: 25864–25874.

Prognostic Prediction of MPO-ANCA-associated Vasculitis: Transcriptomic Analysis of Blood Samples Obtained from Patients before and after Treatment

Akihiro Ishizu,¹ Utano Tomaru,² Taichi Murai,³ Takashi Yoshiki,³ and Shoichi Ozaki⁴

¹Faculty of Health Sciences, Hokkaido University, Hokkaido, Japan

²Department of Pathology, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Hokkaido, Japan

³GeneticLab Co. Ltd., Hokkaido, Japan

⁴Division of Rheumatology and Allergy, Department of Internal Medicine, St. Marianna University School of Medicine, Kanagawa, Japan

Key words: MPO-ANCA, vasculitis, peripheral blood, transcriptomics, prognosis

To detect genes closely related to the pathophysiology of MPO-ANCA-associated vasculitis, comprehensive gene expression profiles were analyzed using peripheral blood samples obtained from 45 patients before and 7 days after the start of treatment. Initially, 40 samples from 20 patients were analyzed using Affimetrix Human Genome Focus Array equipped with 8,797 genes. In 13 patients with remission, expressions of 74 genes were significantly decreased or increased after the treatment. Genes decreased by the treatment included 59 genes that may relate to progression of the disease. They included genes categorized as “cell-cell interaction” and “host-pathogen interaction”. Among them, the gene with the lowest P value was CLC gene, which encodes Charcot-Leyden crystal protein. Genes increased by the treatment included 15 genes that may relate to improvement of the disease. They included genes categorized as “defense immunity protein activity” and “host-pathogen interaction”. Among them, the gene with the lowest P value was a disintegrin and metalloprotease (ADAM) 28. Next, 50 samples from 25 patients were analyzed using TaqMan low density array (LDA) equipped with 44 genes selected from the gene chip analysis. In 16 patients with remission, LDA analysis reproduced the data obtained in the gene chip analysis. Although similar profiles were also observed in the remaining 9 cases with complications, some differences could be indicated in the samples from patients with cytomegalovirus infection. Further investigations are needed to clarify the relation between the gene profiles and the complications. To select the most valuable genes for the prediction of prognosis, a multiple regression analysis was conducted. Finally, 16 genes were listed as candidates that efficiently predict the responsiveness to therapeutic drugs and the prognosis of patients with MPO-ANCA-associated vasculitis.

(*J Jpn Coll Angiol*, 2009, **49**: 45–51)