

201207014A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

課題番号 (H24-バイオ一般-002)

次世代型 IL-6 受容体抗体使用時の炎症マーカーとしての
LRG 定量キットの開発と臨床応用

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 仲 哲治

独立行政法人医薬基盤研究所

平成 25(2013)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

課題番号 (H24-バイオ一般-002)

**次世代型 IL-6 受容体抗体使用時の炎症マーカーとしての
LRG 定量キットの開発と臨床応用**

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 仲 哲治

独立行政法人医薬基盤研究所

平成 25(2013)年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

次世代型 IL-6 受容体抗体使用時の炎症マーカーとしての LRG 定量キットの開発と臨床応用 仲 哲 治	1
---	---

II. 分担研究報告

1. 次世代型 IL-6 受容体抗体使用時の炎症マーカーとしての LRG 定量キットの開発と臨床応用 竹 内 勤	10
2. 次世代型 IL-6 受容体抗体使用時の炎症マーカーとしての LRG 定量キットの開発と臨床応用 南 木 敏 宏	14
3. 次世代型 IL-6 受容体抗体使用時の炎症マーカーとしての LRG 定量キットの開発と臨床応用 緒 方 篤	20
4. 次世代型 IL-6 受容体抗体使用時の炎症マーカーとしての LRG 定量キットの開発 —抗体作製法に関する検討— 角 田 慎 一	24
5. サルコラーゲン関節炎モデルの作成と 次世代型 IL-6 受容体抗体投与時の血漿サンプルの収集 服 部 有 宏	34

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	37
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	50
-----------------------	----

次世代型 IL-6 受容体抗体使用時の炎症マーカーとしての LRG 定量キットの開発と臨床応用

研究代表者 仲哲 治 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬基盤研究部 創薬基盤研究部長

研究要旨

関節リウマチ(RA)の治療には TNF を阻害する生物製剤以外に本邦で開発された IL-6 受容体抗体 (tocilizumab) が劇的な治療効果を上げている。しかし、tocilizumab に無効な症例も存在するため、無効例を早期に判別し薬剤変更することが疾患の進行を阻止するために重要である。現在、疾患活動性マーカーとして CRP が使用されているが、IL-6 受容体抗体投与時には IL-6 依存性の CRP が治療効果に無関係に常に陰性化し、感染症を合併しても上昇することがないため、無効例への継続投与やその発見の遅れから感染症重症化の懸念がある。現在、スーパー特区(岸本班)において共同研究者の中外製薬は次世代型 IL-6 受容体抗体を開発中である。次世代型 IL-6 受容体抗体は、最新のタンパク工学技術(Igawa T et al, Nat Biotechnol 2010)を用いて現行の IL-6 受容体抗体(tocilizumab)に比べて半減期を 2 倍以上に延長したものであり、投与回数の減少により医療費の削減に貢献するものと期待されるが、IL-6 を阻害する以上は上記問題点を現行型の tocilizumab と共有する。以上より、IL-6 に依存せず疾患活動性を正確に反映する新たなマーカーの開発が急務である。これまで申請者らは最新のプロテオミクス手法を駆使して leucine-rich alpha-2 glycoprotein (LRG) が CRP に代わる RA の新たな活動性マーカーとなり得る可能性を報告した。また、LRG は TNF、IL-6、IL-22 など複数のサイトカインで誘導され、LRG が IL-6 阻害時にも上昇することや、結核や重症感染症においても上昇することを明らかにした。

本年度においては、LRG モノクローナル抗体を作成し、血液中の LRG を定量出来る ELISA システムを構築した。本 ELISA システムを用いて、カニクイザルコラーゲン誘発関節炎モデルに対して、次世代型 IL-6 受容体抗体投与時の血中 LRG 濃度が CRP よりも関節炎スコアとより強く相関することを明らかにした。このことは次世代型 IL-6 受容体抗体による治療を受ける関節リウマチ患者において、CRP よりも血中 LRG 濃度を定量する事の方が疾患活動性を正確に把握する上で有用性が高いことを示唆している。

研究分担者

竹内勤	慶應義塾大学 医学部 内科学 リウマチ研究室	教授
南木敏宏	東京医科歯科大学 薬害監視学講座	寄附講座准教授
緒方篤	大阪大学大学院医学系研究科 呼吸器免疫アレルギー内科学	講師
角田慎一	医薬基盤研究所 創薬基盤研究部 バイオ創薬プロジェクト	プロジェクトリーダー
服部有宏	中外製薬株式会社 富士御殿場研究所 研究本部 探索研究部	探索研究部長

A. 研究目的

本研究の目的は、治験が予定されている次世代型 IL-6 受容体抗体(スーパー特区で開発中)投与前後の関節リウマチ(RA)患者血清の leucine-rich alpha-2 glycoprotein (LRG)を測

定し、LRG が IL-6 受容体抗体投与時にも信頼性の高い新たな炎症マーカーであることと、生物学的製剤使用時に併発する感染症を早期に検出できるマーカーとなる事を証明し、最終的には臨床検査として血清 LRG 測定を実用化すること

である。

RA の治療には TNF を阻害する生物製剤 (infliximab, adalimumab, etanercept) 以外に本邦で開発された IL-6 受容体抗体 (tocilizumab) が劇的な治療効果を上げている。しかし、tocilizumab に無効な症例も存在するため、無効例を早期に判別し薬剤変更することが疾患の進行を阻止するために重要である。現在、疾患活動性マーカーとして CRP が使用されている。しかし、IL-6 受容体抗体投与時には、IL-6 依存性の CRP は治療効果に無関係に常に陰性化し、感染症を合併しても上昇することがないため、感染症重症化の懸念がある。現在、スーパー特区において共同研究者の中外製薬は次世代型 IL-6 受容体抗体を開発中である。次世代型 IL-6 受容体抗体とは、最新のタンパク工学技術 (Igawa T *et al*, Nat Biotechnol. 2010) を用いて現行の IL-6 受容体抗体に比べて半減期を 2 倍以上に延長したものであり、投与回数を減らすことにより医療費の削減に貢献するものと期待されるが、IL-6 を阻害する以上は上記問題点を現行型と共有する。以上より、IL-6 に依存せず疾患活動性を正確に反映する新たなマーカーの開発が急務である。これまで申請者らは最新のプロテオミクス手法を駆使して LRG が CRP に代わる RA の新たな活動性マーカーとなり得る可能性を報告した (Serada S, Naka T *et al*, Ann Rheum Dis 2010)。また、LRG は TNF、IL-6、IL-22 など複数のサイトカインで誘導され、IL-6 阻害時にも上昇することを明らかにした (Serada S, Naka T. *et al*, Inflamm Bowel Dis. 2012)。さらに、結核や重症感染症においても血中 LRG 濃度が上昇するというデータも持ち合わせている。したがって、LRG は次世代型 IL-6 受容体抗体投与時にも薬剤に影響されずに正確に疾患活動性を反映するマーカーであることが大いに期待される。なお、感染症併発時にも LRG は上昇すると期待されるが、原疾患の悪化か感染症併発かは臨床症状から十分鑑別可能と考えられる。

本研究では、治験が予定されている次世代型

IL-6 受容体抗体投与前後の RA 患者血清の LRG が IL-6 受容体抗体投与時にも信頼性の高い新たな炎症マーカーであることを証明すし、臨床検査として血清 LRG 測定を実用化するため、血中 LRG を定量出来る LRG の ELISA システムの構築を行った。そして分担研究者の服部有宏のグループで調製された次世代型 IL-6 受容体抗体投与時のカニクイザルコラーゲン誘発関節炎モデルにおける血中 LRG 濃度の測定と疾患活動性との相関関係について解析した。

B. 研究方法

(1) 血液中の LRG を定量する ELISA システムの開発

血清中の LRG を定量できる ELISA システムを構築するため、ヒト LRG 遺伝子をクローニングし、LRG タンパク質を安定発現する Chinese Hamster Ovary (CHO)-K1 細胞を樹立した。続いて、ヒト LRG タンパク質を精製し、マウスに免疫することで LRG に対するマウスモノクローナル抗体の作成を試みた。LRG モノクローナル抗体を産生する複数のハイブリドーマより LRG モノクローナル抗体を精製し、2 種類ずつ組み合わせることでサンドイッチ ELISA システムの構築を試みた。

(2) 次世代型 IL-6 受容体抗体投与時のカニクイザルコラーゲン誘発関節炎モデルにおける血中 LRG 濃度の測定と疾患活動性との相関関係の解析

研究分担者の服部有宏のグループにて次世代型 IL-6 受容体抗体投与時のカニクイザルコラーゲン誘発関節炎血漿検体を輸送していただき、独自に開発した LRG キットを用いて、血漿中 LRG 濃度を定量した。

(3) 次世代型 IL-6 受容体抗体による治療を受ける RA 血清と臨床情報の収集

本研究を進めるにあたり臨床検体 (患者血清) が必要となるが、すでに慶應義塾大学、東京医

科歯科大学、大阪大学医学部、医薬基盤研究所にて倫理委員会の承認済みである。将来、次世代型 IL-6 受容体抗体の治験により治療を受ける RA 患者より臨床検体を提供していただく必要があるが、次世代型 IL-6 受容体抗体を使用する RA 検体の収集には時間がかかることが考えられる。そこで、まず従来型の IL-6 受容体抗体 (tocilizumab) により治療を受ける RA 患者より血清サンプルを平成 24 年 11 月時点で 43 例を収集し、それに対応する詳細な臨床情報についても収集を継続している段階である。IL-6 受容体抗体投与時に感染症を併発する RA 患者血清についても収集を進めている。

(倫理面への配慮)

インフォームドコンセント

本研究は大阪大学医学部医学倫理委員会、東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会、慶應義塾大学医学部倫理委員会、及び、医薬基盤研究所研究倫理審査委員会にて承認された研究計画書、「個人情報保護法」、「臨床研究に関する倫理指針 (平成 20 年厚生労働省告示第 415 号)」に準じて実施した。対象患者に対し、大阪大学医学部附属病院、東京医科歯科大学医学部附属病院、慶應義塾大学附属病院の共同研究者である医師が説明資料に従い研究について説明し、十分の理解を得た上で、文書に同意を得た。

個人情報保護

大阪大学医学部附属病院においては呼吸器・免疫アレルギー内科、立花功助教、東京医科歯科大学医学部附属病院においては薬害監視学講座、南木敏宏寄附講座准教授、慶應義塾大学附属病院においては西川あゆみ助教を個人情報管理者とし連結可能匿名化することで個人情報の管理を行った。医薬基盤研究所には大阪大学医学部附属病院、東京医科歯科大学医学部附属病院、慶應義塾大学附属病院において連結可能匿名化された情報が試料とともに提供し、提供される情報は年齢、性別、病名、生化学データと

した。試料(血清)は、医薬基盤研究所、免疫シグナルプロジェクトの鍵のかかる冷凍庫内に保管した。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載した。

D. 結果・考察

(1) 血液中の LRG を定量する ELISA システムの開発

ヒト LRG タンパク質を精製し、マウスに免疫し、LRG に対するマウスモノクローナル抗体を産生する複数のハイブリドーマの樹立に成功した。得られたハイブリドーマ 10 クローンより LRG モノクローナル抗体を精製し、2 種類ずつ組み合わせることでサンドイッチ ELISA システムの構築を試みた。その結果、血清 LRG を定量できる LRG 抗体の組み合わせを発見し、ELISA システムの構築に成功した(図 1)。本 ELISA システムによりヒト以外にカンクイザル血液中の LRG を定量できることも明らかにした。

(2) 次世代型 IL-6 受容体抗体投与時のカンクイザルコラーゲン誘発関節炎モデルにおける血中 LRG 濃度の測定と疾患活動性との相関関係の解析

研究分担者の服部有宏のグループにて次世代型 IL-6 受容体抗体投与時のカンクイザルコラーゲン誘発関節炎血漿サンプルを調製し、研究代表者の研究室に輸送した。これらの検体に対して独自に開発した LRG キットを用いて、血漿中 LRG 濃度を定量した。その結果、LRG 次世代型 IL-6 受容体抗体投与時のカンクイザルコラーゲン誘発関節炎モデルにおいて血中 LRG 濃度が CRP よりも疾患活動性スコアと強く相関することが認められた(図 2)。次世代型 IL-6 受容体抗体を投与することにより、CRP 値と関節炎スコアが共に低下している検体もあるが、IL-6 のシグナルを完全に抑えられないため、CRP 値と関節炎スコアの両方が高い検体も見られた。興

味深いことに、次世代型 IL-6 受容体抗体投与により、CRP 値が陰性で、関節炎スコアが高い検体が 2 例見られた。これらの検体に対して、血漿中 LRG 濃度は高い値を示していた (#1、#2)。CRP は IL-6 により肝臓から産生されるが、LRG は IL-6 以外にも I1-22 や TNF- α により炎暑局所から産生されるため、より疾患活動性を正確に反映していると考えられる。即ち、カニクイザルコラーゲン誘発関節炎モデルにおいて血漿 LRG 濃度は CRP 値では検出出来ない疾患活動性を検出出来るマーカーとなりえると考えられる。

E. 結論

本研究にて、ヒトおよびサル血液中の LRG を定量するキットの開発に成功した。カニクイザルコラーゲン誘発関節炎モデルに対して、次世代型 IL-6 受容体抗体投与時の血中 LRG 濃度が CRP よりも関節炎スコアとより強く相関したことから、次世代型 IL-6 受容体抗体による治療を受ける関節リウマチ患者において、CRP よりも血中 LRG 濃度を定量する事の方が疾患活動性を正確に把握する上で有用性が高いことが示唆された。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Shinzaki S, Kuroki E, Iijima H, Tatsunaka N, Ishii M, Fujii H, Kamada Y, Kobayashi T, Shibukawa N, Inoue T, Tsujii M, Takeishi S, Mizushima T, Ogata A, **Naka T**, Plevy SE, Takehara T, Miyoshi E. Lectin-based Immunoassay for Aberrant IgG Glycosylation as the Biomarker for Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 In Press

2. Nishioka C, Ikezoe T, Furihata M, Yang J,

Serada S, **Naka T**, Nobumoto A, Kataoka S, Tsuda M, Udaka K, Yokoyama A. CD34(+)/CD38(-) acute myelogenous leukemia cells aberrantly express CD82 which regulates adhesion and survival of leukemia stem cells. *Int J Cancer*. 2012 In Press

3. Yokoyama T, Enomoto T, Serada S, Morimoto A, Matsuzaki S, Ueda Y, Yoshino K, Fujita M, Kyo S, Iwahori K, Fujimoto M, Kimura T, **Naka T**. Plasma membrane proteomics identifies bone marrow stromal antigen 2 as a potential therapeutic target in endometrial cancer. *Int J Cancer*. 2013;132(2):472-84.

4. Iwahori K, Serada S, Fujimoto M, Ripley B, Nomura S, Mizuguchi H, Shimada K, Takahashi T, Kawase I, Kishimoto T, **Naka T**. SOCS-1 gene delivery cooperates with cisplatin plus pemetrexed to exhibit preclinical antitumor activity against malignant pleural mesothelioma. *Int J Cancer*. 2013;132(2):459-71.

5. Ishii H, Jin X, Ueno M, Tanabe S, Kubo T, Serada S, **Naka T**, Yamashita T. Adoptive transfer of Th1-conditioned lymphocytes promotes axonal remodeling and functional recovery after spinal cord injury. *Cell Death Dis*. 2012; 3(e363).

6. Iwahori K, Suzuki H, Kishi Y, Fujii Y, Uehara R, Okamoto N, Kobayashi M, Hirashima T, Kawase I, **Naka T**. Serum HE4 as a diagnostic and prognostic marker for lung cancer. *Tumour Biol*. 2012; 33(4): 1141-9.

7. Kitaba S, Murota H, Terao M, Azukizawa

H, Terabe F, Shima Y, Fujimoto M, Tanaka T, **Naka T**, Kishimoto T, Katayama I. Blockade of interleukin-6 receptor alleviates disease in mouse model of scleroderma. *Am J Pathol*. 2012; 180(1): 165-76.

8. Kotobuki Y, Tanemura A, Yang L, Itoi S, Wataya-Kaneda M, Murota H, Fujimoto M, Serada S, **Naka T**, Katayama I. Dysregulation of melanocyte function by Th17-related cytokines: significance of Th17 cell infiltration in autoimmune vitiligo vulgaris. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2012; 25(2): 219-30.

9. Otsuka K, Kotobuki Y, Shiraishi H, Serada S, Ohta S, Tanemura A, Yang L, Fujimoto M, Arima K, Suzuki S, Murota H, Toda S, Kudo A, Conway S J, Narisawa Y, Katayama I, Izuhara K, **Naka T**. Periostin, a matricellular protein, accelerates cutaneous wound repair by activating dermal fibroblasts. *Exp Dermatol*. 2012; 21(5): 331-6.

10. Serada S, Fujimoto M, Terabe F, Iijima H, Shinzaki S, Matsuzaki S, Ohkawara T, Nezu R, Nakajima S, Kobayashi T, Plevy S E, Takehara T, **Naka T**. Serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a disease activity biomarker in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 ;18(11):2169-79.

11. Souma Y, Nishida T, Serada S, Iwahori K, Takahashi T, Fujimoto M, Ripley B, Nakajima K, Miyazaki Y, Mori M, Doki Y, Sawa Y, **Naka T**. Antiproliferative effect of SOCS-1 through the suppression of STAT3 and p38 MAPK activation in gastric cancer cells. *Int J Cancer*. 2012; 131(6): 1287-96.

12. Tajiri K, Imanaka-Yoshida K, Matsubara A, Tsujimura Y, Hiroe M, **Naka T**, Shimojo N, Sakai S, Aonuma K, Yasutomi Y. Suppressor of cytokine signaling 1 DNA administration inhibits inflammatory and pathogenic responses in autoimmune myocarditis. *J Immunol*. 2012; 189(4): 2043-53.

13. Uebi T, Itoh Y, Hatano O, Kumagai A, Sanosaka M, Sasaki T, Sasagawa S, Doi J, Tatsumi K, Mitamura K, Morii E, Aozasa K, Kawamura T, Okumura M, Nakae J, Takikawa H, Fukusato T, Koura M, Nish M, Hamsten A, Silveira A, Bertorello A M, Kitagawa K, Nagaoka Y, Kawahara H, Tomonaga T, **Naka T**, Ikegawa S, Tsumaki N, Matsuda J, Takemori H. Involvement of SIK3 in glucose and lipid homeostasis in mice. *PLoS One*. 2012; 7(5): e37803.

14. Yang L, Serada S, Fujimoto M, Terao M, Kotobuki Y, Kitaba S, Matsui S, Kudo A, **Naka T**, Murota H, Katayama I. Periostin Facilitates Skin Sclerosis via PI3K/Akt Dependent Mechanism in a Mouse Model of Scleroderma. *PLoS One*. 2012; 7(7): e41994.

15. 世良田聡、藤本穰、仲哲治 Serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a disease activity biomarker in ulcerative colitis. *INTESTINE* 17(1) : 107-109, 2013 (和文総説)

G-2. 学会発表

1. ACR/ARHP Annual Meeting, in Washington, DC, November 09 - 14, 2012. November 12 (ACR 2012 第78回米国リウマチ学会議)

Heterogeneous Nuclear RNP-K Is a Novel Cold-Related Autoantigen in Patients with Raynaud's Phenomenon. Satoshi Serada,

Minoru Fujimoto, Tetsuji Naka.

出願番号 : 特願 2012-84996 号

2. International Cytokine Society 2012
INTERLEUKIN (IL)-6 DEFICIENCY
DOES NOT AFFECT MOTOR NEURON
DISEASE CAUSED BY SUPEROXIDE
DISMUTASE 1 MUTATIONS
YONG MEI, M. Fujimoto, T. Ohkawara, L.
Yang, S. Serada, S.-I. Tsunoda, T. Naka

名称 : 膠原病に伴うレイノー症状を
診断する方法及び
診断用キット
発明者 : 仲哲治、藤本穰、世良田聡
出願人 : 独立行政法人医薬基盤研究所
出願日 : 2012年6月22日
出願番号 : 特願 2012-141434 号

3. International Cytokine Society 2012
UP-REGULATION OF INTERLEUKIN 8
AND CXC CHEMOKINE LIGAND 1 BY
COLD STIMULATION IN HUMAN
DERMAL MICROVASCULAR
ENDOTHELIAL CELLS: A ROLE IN
WINTER ULCERATION AND COLD
URTICARIA
L. Yang, H. Murota, M. Fujimoto, S.
Serada, M. Yong, T. Ohkawara, T. Naka, I.
Katayama

I. 研究協力者

藤本穰 医薬基盤研究所
免疫シグナルプロジェクト
世良田聡 医薬基盤研究所
免疫シグナルプロジェクト

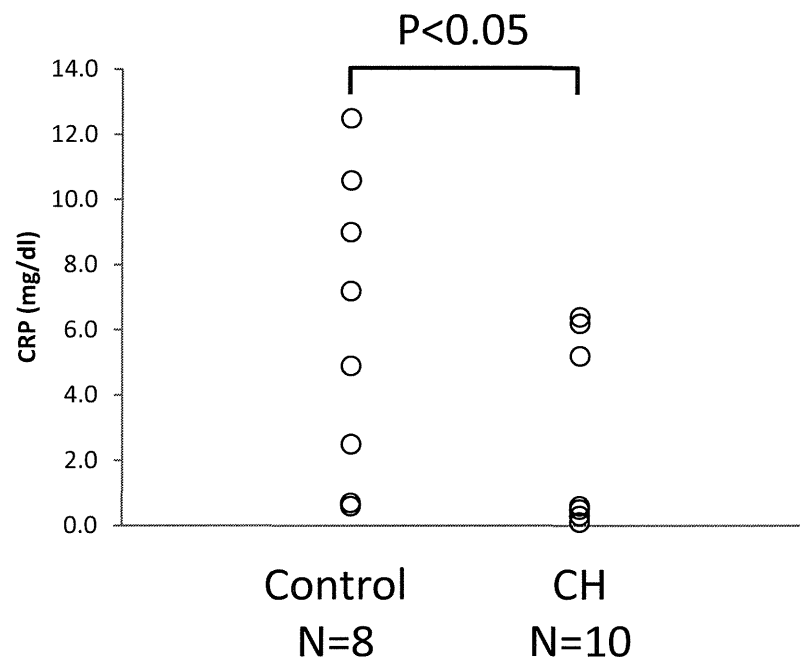
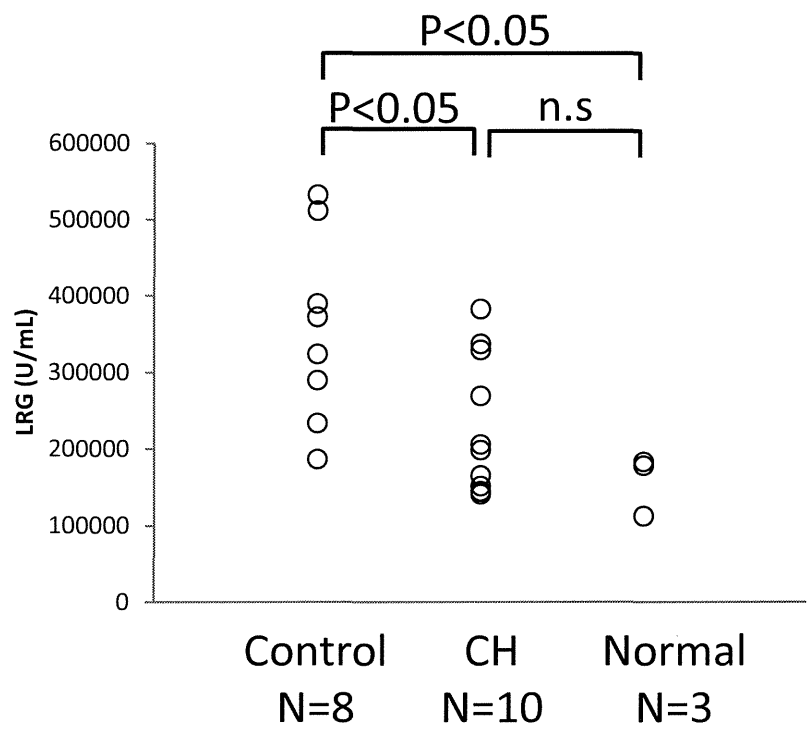
4. 31th EULAR 2012 Berlin, Germany 6 -
9 June 2012
PERIOSTIN, A NOVEL
MTRICELLULAR PROTEIN, IS
REQUIRED FOR CUTANEOUS
SCLEROSIS IN A MOUSE MODEL OF
SCLERODERMA
L. Yang, S. Serada, M. Fujimoto, H.
Murota, Y. Kotobuki, S. Kitaba, T. Naka, I.
Katayama

H. 知的財産権の出願・登録状況

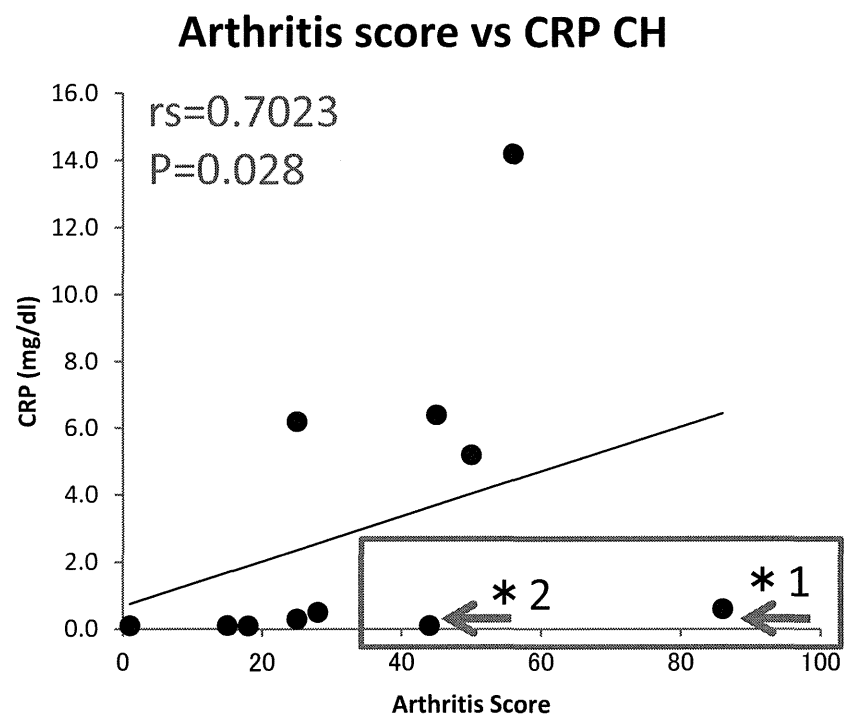
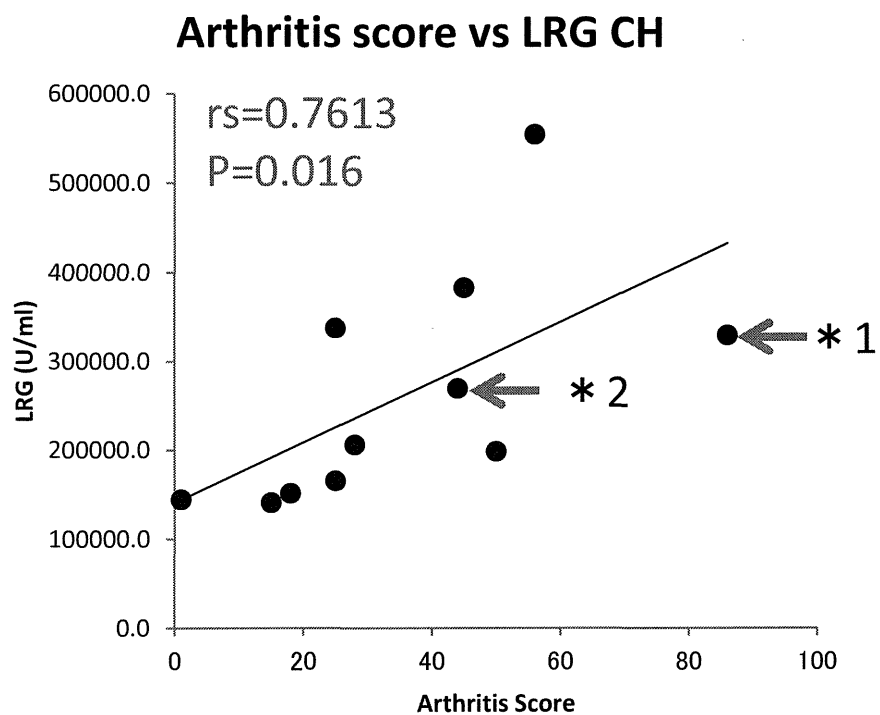
名称 : 結核検査用バイオマーカー
発明者 : 仲哲治、藤本穰、世良田聡、
松本智成
出願人 : 独立行政法人医薬基盤研究所
出願日 : 2012年4月3日

カニクイザルCIA血漿中LRGは次世代型IL-6受容体抗体投与後に低下する

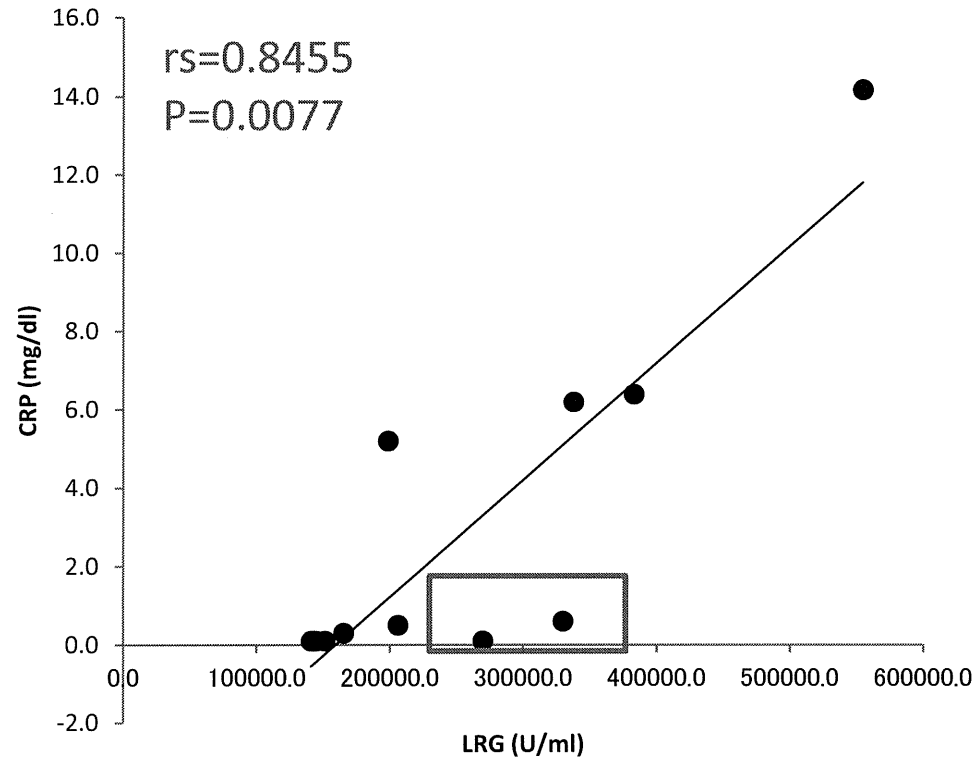
- 7 -



次世代型IL-6受容体抗体投与後のカニクイザルCIA血漿中LRGはCRPよりも関節炎スコアと高く相関する



LRG vs CRP CH



次世代型 IL-6 受容体抗体使用時の炎症マーカーとしての LRG 定量キットの開発と臨床応用

研究分担者 竹内 勤 慶應義塾大学 医学部 リウマチ内科 教授

研究要旨

本分担研究では、次世代型 IL-6 受容体抗体による治療を受ける RA 患者血清とその臨床情報の収集、次世代型 IL-6 受容体抗体投与前後の RA 患者の血清を 50 例を目標に収集するシステムの構築と、血清の収集を行うことを目標とする。本年度は、1) 研究計画の倫理委員会承認手続き、2) 臨床検体情報データベースの構築、3) 臨床検体の収集にむけた準備を行った。研究班として早期の治験開始を目指すとともに、本分担研究でも引き続き予備検討をすすめ、研究班の創薬基盤の構築の推進に役立てていきたい。

A. 研究目的

本研究班の目的は、今後治験が予定されている次世代型IL-6受容体抗体(スーパー特区、免疫先端医薬品開発プロジェクト-先端的抗体医薬品・アジュバントの革新的技術の開発、代表 岸本忠三)による治療を受ける関節リウマチ(RA)患者において、血清leucine-rich alpha-2 glycoprotein (LRG) レベルがRAの治療効果を正確に反映するバイオマーカーであることを本研究期間内に証明し、臨床検査として血清LRG測定を実用化することである。

本研究班ではH24年度に血中LRGを定量できるシステムを構築し、H25年度に次世代型IL-6受容体抗体投与時のサルコラーゲン関節炎血清LRGの定量と疾患活動性マーカーとしての有用性の評価、H26年度には多数例(総数50例)のRA血清を用いてIL-6阻害治療時の炎症マーカーとしてLRGの有用性を証明し、臨床検査としての実用化を最終目標とする。現在、国内外を含めて血清LRG測定を臨床応用している例はなく、これが臨床検査として使用可能に

なれば、IL-6受容体抗体投与例において正確な効果判定と感染症合併の早期診断における

有用性が高く、効率的な医療に貢献すると考えられる。

本分担研究では、次世代型IL-6受容体抗体による治療を受けるRA患者血清とその臨床情報の収集、次世代型IL-6受容体抗体投与前後のRA患者の血清を50例を目標に収集するシステムの構築と、血清の収集を行うことを目標とする。

B. 研究方法

本年度は、1) 研究計画の倫理委員会承認手続き、2) 臨床検体情報データベースの構築、3) 臨床検体の収集にむけた準備を行った。

(倫理面への配慮)

倫理委員会承認の同意書の取得が得られた検体を用い、連結可能匿名化状態で解析施行する。検体提供者のプライバシーについて最大限配慮を行う。

C. 研究結果

1) 研究計画の倫理委員会承認手続き

本研究計画に関して、当施設の倫理委員会に書類を提出し、承認を得た。

2) 臨床検体情報データベースの構築

臨床検体および臨床情報(疾患活動性スコア、CRP、WBC、MMP-3 など)を管理するための情報データベースの作成を行った。

3) 臨床試験検体の収集にむけた準備

臨床検体は薬剤開始前と投与ごとに採取を予定している。血清等の処理を含めた各種の関連する予備実験を行った。また、臨床試験開始に向けて、当施設における体制の整備に向けた準備を行った。

D. 考察

臨床試験の実施、検体および情報の収集に向けて、さまざまな予備的検討がさらに必要と考えられた。来年度以降のシステム・人的整備を含め、引き続き検討すべき課題も多く見いだされた。

E. 結論

研究班として早期の治験開始を目指すとともに、本分担研究でも引き続き予備検討をすすめ、研究班の創薬基盤の構築の推進に役立てていきたい。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. **Takeuchi T** and Suzuki K. *CD247* variants and single nucleotide polymorphisms observed in systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology (Oxford)* In Press

2. **Takeuchi T**, Miyasaka N, Zang C, Alvarez D, Fletcher T, Wajdula J, Yuasa H, Vlahos B. A phase 3 randomized, double-blind, multicenter comparative study evaluating the effect of etanercept versus methotrexate on radiographic outcomes, disease activity and safety in Japanese subjects with rheumatoid arthritis. *Mod Rheum* 2012 In press

3. **Takeuchi T**, Yamanaka H, Ishiguro N, Miyasaka N, Mukai M, Matsubara T, Uchida S,

Akama H, Hartmut K, Vipin A, and Tanaka Y. Adalimumab, a Human anti-TNF monoclonal antibody, outcome study for the prevention of joint damage in Japanese patients with early RA: the HOPEFUL 1 study. *Ann Rheum Dis* 2012 In press

4. Nishi E, Kameda H, Ogawa H, Nagasawa H, Takei H, Okuyama A, Kurasawa T, Kondo T, Nishimura K, Shirai Y, Sakai R, Ito T, **Takeuchi T**, Amano K. Efficacy of weekly mizoribine pulse therapy in refractory lupus nephritis. *Mod Rheum* 2013;23:97-103.

5. Nakajima A, Saitoh K, Kojima T, Amano K, Yoshio T, Fukuda W, Inoue E, Taniguchi A, Momohara S, Minota S, **Takeuchi T**, Ishiguro N, Tanaka Y, Yamanaka H. No increased mortality in patients with rheumatoid arthritis treated with biologics: results from the biologics register of six rheumatology institutes in Japan. *Mod Rheum* 2012 In press

6. Kameda H, Kanbe K, Sato E, Ueki Y, Saito K, Nagaoka S, Hidaka T, Atsumi T, Tsukano M, Kasama T, Shiozawa S, Tanaka Y, Yamanaka H, **Takeuchi T**, and JBASIC. A merged presentation of clinical and radiographic data using probability plots in a clinical trial, JESMR study. *Ann Rheum Dis* 2013;72:310-312.

7. Sugano K, Kinoshita Y, Miwa H, **Takeuchi T**, on behalf of theesomeprazole NSAID preventive study group. Randomised clinical trial: esomeprazole for the prevention of nonsteroidal anti-inflammatory drug-related peptic ulcers in Japanese patients. *Aliment Pharmacol and Ther.* In press

8. Tanaka Y, Yamanaka H, Saito K, Iwata S, Miyagawa I, Seto Y, Momohara S, Nagasawa H,

- Kameda H, Kaneko Y, Izumi K, Amano K, **Takeuchi T**. Structural damages disturb functional improvement in patients with rheumatoid arthritis treated with etanercept. *Mod Rheum*. 2012;22:186-94.
9. **Takeuchi T**, Tanaka Y, Kaneko Y, Tanaka E, Hirata S, Kurasawa T, Kubo S, Shidara K, Kimura N, Nagasawa H, Kameda H, Amano K, Yamanaka H. Effectiveness and safety of adalimumab in Japanese patients with rheumatoid arthritis: Retrospective analyses of data collected during the first year of adalimumab treatment in routine clinical practice (HARMONY study). *Mod Rheum*. 2012;22:327-338.
10. Tanaka Y, Harigaya M, **Takeuchi T**, Yamanaka H, Ishiguro N, Yamamoto K, Miyasaka N, Koike T, Kanazawa M, Ohba T, Yoshinari T, Baker D, and the GO-FORTH study group. Golimumab in combination with methotrexate in Japanese patients with active rheumatoid arthritis: results of the GO-FORTH study. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(6):817-24
11. Koike T, Harigaya M, Ishiguro N, Inokuma S, Takei S, **Takeuchi T**, Yamanaka H, Tanaka Y. Safety and effectiveness of adalimumab in Japanese rheumatoid arthritis patients: post marketing surveillance report of the first 3,000 patients. *Mod Rheum*. 2012;22:498-508.
12. **Takeuchi T**, Miyasaka N, Tatsuki Y, Yano T, Yoshinari T, Abe T, Koike T. Inhibition of plasma IL-6 in addition to maintain efficacious trough level of infliximab was associated with clinical remission in patients with rheumatoid arthritis: analysis of the RISING Study. *Ann Rheum Dis*. 2012;71:1583-85.
13. **Takeuchi T**, Kameda H. What is the future of CCR5 antagonists? *Arthritis Research and Therapy*. 2012;14(2):114.
14. **Takeuchi T**, Suzuki K, Kondo T, Yoshimoto K, and Tsuzaka K. CD3 ζ defects in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2012;71:i78-i81.
15. Harigai M, Takeuchi T, Tanaka Y, Matsubara T, Yamanaka H, Miyasaka N. Discontinuation of adalimumab treatment in rheumatoid arthritis patients after achieving low disease activity. *Mod Rheum*. 2012;22: 814-22.
16. Niki Y, **Takeuchi T**, Masanori Nakayama, Hayato Nagasawa, Takahiko Kurasawa, Harumoto Yamada, Toyama Y, Takeshi Miyamoto. Clinical Significance of Cartilage Biomarkers for Monitoring Structural Joint Damage in Rheumatoid Arthritis Patients Treated with Anti-TNF Therapy. *PLoS ONE*. 2012;7:e37447.
17. **Takeuchi T**, Matsubara T, Nitobe T, Suematsu E, Ohta S, Honjyo S, Abe T, Yamamoto A, Miyasaka N, and The Japan Abatacept Study Group. Phase II dose-response study of abatacept in Japanese patients with active rheumatoid arthritis with inadequate response to methotrexate. *Mod Rheum on line*. 2012;June 9.
18. Sakai R, Nagasawa H, Nishi E, Okuyama A, Takei H, Kurasawa T, Kondo T, Nishimura K, Shirai Y, Ito T, Kameda H, **Takeuchi T**, Amano K. Successful treatment of adult-onset Still's disease with tocilizumab monotherapy: two case reports with literature review. *Clin Rheum*. 2012;31:569-74.
19. **Takeuchi T**, Harigaya M, Tanaka Y, Yama

naka H, Ishiguro N, Yamamoto K, Miyasaka N, Koike T, Kanazawa M, Ohba T, Yoshinari T, Baker D, and the GO-MONO study group. Golimumab monotherapy in Japanese patients with active rheumatoid arthritis despite prior treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs: results of the Phase 2/3, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled GO-MONO study through 24 weeks. Ann Rheum Dis online 2012;September 18.

20. 倉沢隆彦、鈴木勝也、竹内勤: 特集 自己免疫疾患の最近の話題と展望 マイクロアレイを用いた自己免疫疾患の解析 Pharma Medica vol.31 No.1 メディカルレビュー 2013

G-2. 学会発表

1. 鈴木勝也、瀬戸山由美子、近藤恒夫、吉本桂子、亀田秀人、天野宏一、竹内勤: 未治療活動性 SLE 末梢血亜分画における遺伝子発現の統合解析、2012 年 4 月 27 日、第 56 回日本リウマチ学会学術集会、東京

2. 近藤恒夫、鈴木勝也、近藤恒夫、吉本桂子、亀田秀人、竹内勤、天野宏一: カルシニューリン阻害薬による全身性エリテマトーデス患者 TCR ζ 鎖発現の回復効果、第 56 回日本リウマチ学会学術集会、2012 年 4 月 27 日、東京

3. 鈴木勝也、瀬戸山由美子、近藤恒夫、吉本桂子、亀田秀人、天野宏一、竹内勤: 未治療活動性 SLE 末梢血亜分画における遺伝子発現の統合解析、2012 年 9 月 27 日、第 40 回日本臨床免疫学会総会、東京

4. 鈴木勝也、竹下勝、竹内勤: 関節リウマチの新たなバイオマーカー、第 2 回 TNF 療法研究会、2012 年 10 月 18 日、東京

5. Suzuki K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Kameda

H, Takeuchi T. Integrative gene expression analysis in subpopulation of peripheral blood mononuclear cells from untreated active systemic lupus erythematosus patients 2012 年 12 月 7 日、第 41 回日本免疫学会学術集会、神戸

6. Suzuki K and Takeuchi T. Application of transcriptomics for systemic lupus erythematosus pathogenesis analysis 2012 年 12 月 12 日、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

I. 研究協力者

鈴木 勝也 慶應義塾大学 医学部
リウマチ内科 特任助教
西川 あゆみ 慶應義塾大学 医学部
リウマチ内科 大学院生

次世代型 IL-6 受容体抗体使用時の炎症マーカーとしての LRG 定量キットの開発と臨床応用

研究分担者 南木敏宏 東京医科歯科大学 薬害監視学講座 寄附講座准教授

研究要旨

近年、関節リウマチ(RA)の治療に TNF 阻害薬とともに IL-6 受容体抗体(tocilizumab)も用いられるようになり、劇的な治療効果を上げている。RA の活動性評価に血清 C-reactive protein (CRP)が広く用いられているが、tocilizumab は IL-6 からのシグナルを阻害するため、tocilizumab 投与中の患者では RA の疾患活動性にかかわらず血清 CRP は陰性化する。また、tocilizumab 投与患者では重篤な感染症時にも CRP の上昇がみられないことがある。そのため、tocilizumab 投与患者では、治療無効の判断の遅延や、重症感染症の発見の遅れが生じることがある。そこで、CRP に代わる新たな疾患活動性マーカーが必要となっている。現在、研究分担者の中外製薬は次世代型 IL-6 受容体抗体を開発中である。次世代型 IL-6 受容体抗体は、現行の IL-6 受容体抗体(tocilizumab)に比べて半減期を 2 倍以上に延長したものであり、投与回数や投与量の減少により医療費の削減に貢献するものと期待されるが、上記問題点は現行型の tocilizumab と同様である。これまで研究代表者らは血中 leucine-rich alpha-2 glycoprotein (LRG)が CRP に代わる RA の新たな活動性マーカーとなり得る可能性を報告し、また、LRG が結核や重症感染症にも上昇することを明らかにしている。本年度は RA 患者血清を収集し、その疾患活動性や治療内容を検討した。今後これらの血清中の LRG レベルを測定し、疾患活動性との関連を詳細に検討する。特に tocilizumab 投与中の患者における LRG の疾患活動性評価における有用性を検討していく。さらに、tocilizumab 投与中の感染症発症時の LRG レベルも解析する。

A. 研究目的

関節リウマチ（以降 RA）に対して、約 10 年前より TNF を阻害する生物学的製剤が用いられるようになり、著明な炎症抑制効果、骨破壊抑制効果がみられ、RA に対する治療法は劇的に変化し、RA の予後も改善されてきている。現在本邦では、4 種類の TNF を阻害する生物学的製剤（infliximab, etanercept, adalimumab, golimumab）が用いられている。一方、TNF 阻害以外に、本邦で開発された IL-6 受容体抗体（tocilizumab）も RA に対して著明な効果を認め、本邦含めて世界的にも広く使用されている。Tocilizumab は IL-6 受容体 α を阻害することにより IL-6 からのシグナルをブロックする。IL-6 は肝細胞からの C-reactive protein (CRP) 産生を制御しているため、tocilizumab を使用している患者では血中の CRP は一般に陰性化する。CRP

は RA 活動性のマーカーとして広く用いられているが、tocilizumab 投与患者では RA の活動性が低下していない患者でも CRP が陰性となりうる。また、tocilizumab の重篤な副作用に感染症があげられる。一般に重症感染症時には CRP が上昇するが、tocilizumab 投与患者では CRP 上昇を認めないことがある。そのため感染症の合併を見落とす危険もある。

現在、研究分担者の中外製薬は、現行の IL-6 受容体抗体に比べて半減期を 2 倍以上に延長した次世代型 IL-6 受容体抗体を開発中である。半減期の延長により、投与回数や投与量を減らすことができ、患者の利便性、医療費の削減に貢献するものと期待される。しかし、IL-6 シグナルを阻害することによる上記問題点は現行型と同様である。そのため、IL-6 に依存せず疾患活動性や感染症の併

発を反映する新たなマーカーの開発が必要とされている。

これまで本研究代表者らは、血中 leucine-rich alpha-2 glycoprotein (LRG) が CRP に代わる RA の新たな活動性マーカーとなることを報告した (Serada S, Naka T *et al*, Ann Rheum Dis 2010)。LRG は複数のサイトカイン刺激で誘導され、IL-6 阻害時にも上昇した (Serada S, Naka T. *et al*, Inflamm Bowel Dis. 2012)。また、血中 LRG 濃度が感染症時にも上昇することが示唆されている。これらのことより、血中 LRG 濃度は IL-6 シグナル阻害に影響されず、RA の疾患活動性や、感染症併発時のマーカーとして有用であることが期待される。

そこで、本研究は次世代型 IL-6 受容体抗体を投与する RA 患者血清の LRG 濃度を測定し、LRG レベルが IL-6 受容体抗体投与時にも関節炎のマーカーとなること、また感染症の併発を早期に検出できるマーカーとなることを証明し、臨床検査として血清 LRG 測定を実用化することを目的とする。本年度は、RA 患者の血清を収集し、疾患活動性、治療内容を検討した。まず、tocilizumab 投与中の患者での LRG レベルと RA 疾患活動性の関連などを評価する。

B. 研究方法

患者血清の収集

東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会にて本研究計画の承認を受けた後に研究を開始した。外来通院中の 1987 年 ACR 分類基準を満たす RA 患者 40 人より、同意を取得後、血清約 5ml を採取した。また、患者情報として以下の項目を調査した (性別、年齢、治療内容、腫脹関節痛、圧痛関節数、赤沈、CRP、MMP-3、患者による全般評価 visual analogue scale (VAS)、医師による VAS)。

(倫理面への配慮)

インフォームドコンセント

本研究は東京医科歯科大学医学部医学倫理委員会にて承認された研究計画書に準じて実施した。本

研究はヘルシンキ宣言 (2008 年改訂) および、「疫学研究 (平成 19 年改正・平成 20 年一部改正) に関する倫理指針」を遵守して実施した。全ての研究参加患者に倫理審査委員会で承認の得られた同意説明文書による十分な説明を行い、自由意思による文書同意を得た。

個人情報保護

東京医科歯科大学医学部附属病院において、膠原病・リウマチ内科、南木敏宏を個人情報管理者とし個人情報の管理を行った。基盤研には東京医科歯科大学医学部附属病院において連結可能匿名化された情報が試料とともに提供し、提供される情報は、性別、年齢、治療内容、腫脹関節痛、圧痛関節数、赤沈、CRP、MMP-3、患者 VAS、医師 VAS とした。

C. 研究結果

RA 患者 40 人の血清を採取した。男女比 9 : 31、年齢 63.3 ± 13.0 歳 (平均 ± SD)。RA の活動性評価に関しては、圧痛関節数 (28 関節中) 0.85 ± 1.37、腫脹関節数 (28 関節中) 2.78 ± 3.68、赤沈 14.9 ± 13.3 mm/hr、CRP 0.11 ± 0.14 mg/dl、MMP-3 124.7 ± 89.4 ng/ml、患者 VAS 25.9 ± 21.8 mm/100 mm、医師 VAS 21.3 ± 15.8 mm/100 mm であった。また、Disease activity score (DAS)28-ESR 2.68 ± 1.04、DAS28-CRP 2.23 ± 0.76、simple disease activity index (SDAI) 8.45 ± 6.64、clinical disease activity index (CDAI) 8.34 ± 6.63。

治療内容は、23 人に生物学的製剤が投与され、その内訳は infliximab 6 人、etanercept 6 人、tocilizumab 11 人であった。また、methotrexate は 27 人に、副腎皮質ステロイド薬は 26 人に投与されていた。

D. 結果・考察

血清を収集した RA 患者には tocilizumab 含めた生物学的製剤を投与中で、CRP は陰性にも関わらず関節炎が残存し疾患活動性がある患者も含まれている。今後、患者血清を用いて、血中 LRG 濃度の測定をしていく。血清 LRG レベルと、全般的な疾

患活動性との関連のみならず、活動性評価に用いる各々のコンポーネントや、MMP-3 などとの関連も評価できる。これまで、RA の疾患活動性マーカーとして、赤沈、CRP、MMP-3 が用いられてきた。本研究結果により、LRG と既存のマーカーとの関連性、各マーカーの特徴などが評価できるものと考えられる。Tocilizumab が用いられている患者で、疾患活動性はあるものの CRP 陰性の場合、LRG 含めた各マーカーの有用性の解明が期待される。

また、今後経過中に感染症を発症した際に、LRG レベルの変化も解析する。特に tocilizumab 投与中の患者で、CRP 上昇はみられない感染症時に LRG レベルの変化に興味を持たれる。LRG は tocilizumab 投与時の感染症のマーカーとしても大きく期待される。

E. 結論

Tocilizumab 投与中の患者において、血中 LRG レベルが疾患活動性の評価や感染症発症時の発見に有用であることが期待される。今後、患者血清中の LRG レベルと疾患活動性の関連などの解析を進める。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Takayasu A, Miyabe Y, Yokoyama W, Kaneko K, Miyabe C, Fukuda S, Kubota T, Miyasaka N, **Nanki T**. CCL18 activates fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. In Press

2. Uto-Konomi A, Wirtz J, Sato Y, Takano A, **Nanki T**, Suzuki S. CXCR7 agonists inhibit the function of CXCL12 by down-regulation of CXCR4. *Biochem Biophys Res Commun*. In Press

3. **Nanki T**, Onoue I, Nagasaka K, Takayasu A, Ebisawa M, Hosoya T, Shirai T, Sugihara T, Hirata S, Kubota T, Harigai M, Miyasaka N. Suppression of elevations in serum C reactive protein levels by anti-IL-6 autoantibodies in two patients with severe bacterial infections. *Ann Rheum Dis*. In Press

4. Watanabe K, Sakai R, Koike R, Sakai F, Sugiyama H, Tanaka M, Komano Y, Akiyama Y, Mimura T, Kaneko M, Tokuda H, Iso T, Motegi M, Ikeda K, Nakajima H, Taki H, Kubota T, Kodama H, Sugii S, Kuroiwa T, Nawata Y, Shiozawa K, Ogata A, Sawada S, Matsukawa Y, Okazaki T, Mukai M, Iwahashi M, Saito K, Tanaka Y, **Nanki T**, Miyasaka N, Harigai M. Clinical characteristics and risk factors for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with rheumatoid arthritis receiving adalimumab: A retrospective review and case-control study of 17 patients. *Mod Rheumatol*. In Press

5. Miyabe C, Miyabe Y, Miura NN, Takahashi K, Terashima Y, Toda E, Honda F, Morio T, Yamagata N, Ohno N, Shudo K, Suzuki J, Isobe M, Matsushima K, Tsuboi R, Miyasaka N, **Nanki T**. Am80, a retinoic acid receptor agonist, ameliorates murine vasculitis through the suppression of neutrophil migration and activation. *Arthritis Rheum*. 2013; 65(2): 503-512.

6. Tanaka M, Sakai R, Koike R, Komano Y, **Nanki T**, Sakai F, Sugiyama H, Matsushima H, Kojima T, Ohta S, Ishibe Y, Sawabe T, Ota Y, Ohishi K, Miyazato H, Nonomura Y, Saito K,

Tanaka Y, Nagasawa H, Takeuchi T, Nakajima A, Ohtsubo H, Onishi M, Goto Y, Dobashi H, Miyasaka N, Harigai M. Pneumocystis jirovecii pneumonia associated with etanercept treatment in patients with rheumatoid arthritis: a retrospective review of 15 cases and analysis of risk factors. *Mod Rheumatol*. 2012; 22(6): 849-858.

7. Sakai R, Tanaka M, **Nanki T**, Watanabe K, Yamazaki H, Koike R, Nagasawa H, Amano K, Saito K, Tanaka Y, Ito S, Sumida T, Ihata A, Ishigatsubo Y, Atsumi T, Koike T, Nakajima A, Tamura N, Fujii T, Dobashi H, Tohma S, Sugihara T, Ueki Y, Hashiramoto A, Kawakami A, Hagino N, Miyasaka N, Harigai M; REAL Study Group. Drug retention rates and relevant risk factors for drug discontinuation due to adverse events in rheumatoid arthritis patients receiving anticytokine therapy with different target molecules. *Ann Rheum Dis*. 2012; 71(11): 1820-1826.

8. Sakai R, Komano Y, Tanaka M, **Nanki T**, Koike R, Nagasawa H, Amano K, Nakajima A, Atsumi T, Koike T, Ihata A, Ishigatsubo Y, Saito K, Tanaka Y, Ito S, Sumida T, Tohma S, Tamura N, Fujii T, Sugihara T, Kawakami A, Hagino N, Ueki Y, Hashiramoto A, Nagasaka K, Miyasaka N, Harigai M; Real Study Group. Time-dependent increased risk for serious infection from continuous use of tumor necrosis factor antagonists over three years in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res*. 2012; 64(8): 1125-1134.

9. Umezawa N, Kohsaka H, **Nanki T**, Watanabe K, Tanaka M, Shane PY, Miyasaka N. Successful treatment of eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (EGPA; formerly Churg-Strauss syndrome) with rituximab in a case refractory to glucocorticoids, cyclophosphamide, and IVIG. *Mod Rheumatol*. In Press

10. Fukuda S, **Nanki T**, Morio T, Hasegawa H, Koike R, Miyasaka N. Recurrent mitral valve regurgitation with neutrophil infiltration in a patient with multiple aseptic abscesses. *Mod Rheumatol*. In Press

11. Yamazaki H, **Nanki T**, Harigai M, Miyasaka N. Successful treatment of refractory Takayasu arteritis with tacrolimus. *J Rheumatol*. 2012; 39(7):1487-1488.

12. **南木敏宏** 特集 自己免疫疾患・リウマチ・関節炎の最新治療-。T細胞標的治療。アレルギーの臨床 437(12): 36-40 (1215-1219), 2012 (和文総説)

G-2. 学会発表

1. 第23回日本リウマチ学会関東支部集会。さいたま、2012/12。シンポジウム2「生物学的製剤の使い方 6 製剤時代をを迎えて」、肺合併症を有する患者への生物学的製剤投与はどうか?。 **南木敏宏**。

2. 第76回アメリカリウマチ学会。Washington DC, USA, 2012/11. How to assess risks for pulmonary infection in patients receiving immunosuppressive treatment for rheumatic diseases? A report from a large-scale prospective