

2010;12(2):R42. Epub 2010 Mar 12. PubMed PMID: 2022601.

10. Nakajima A, et al. Mortality and cause of death in Japanese patients with rheumatoid arthritis based on a large observational cohort, IORRA. *Scand J Rheumatol.* 2010;39(5):360-7.

## 2. 学会発表

1. Shidara K, et al. Successful maintenance of remission defined by the new ACR/EULAR criteria leads to better functional outcomes in rheumatoid arthritis in daily practice, especially in patients with early RA, based on the Institute of Rheumatology, Rheumatoid Arthritis (IORRA) Cohort. ACR2011 (Chicago, 4-9 November 2011)
2. Tanaka, E, et al. Discrepancy between Boolean remission and DAS28 remission is dependent on the differences in number of swollen joints and patients global assessment in Daily practice, based on the Institute of Rheumatology, Rheumatoid Arthritis (IORRA) Cohort. ACR2011 (Chicago, 4-9 November 2011)
3. Nakajima A, et al. No evidence of increased mortality in Rheumatoid Arthritis patients treated with biologics: results from a multicenter cohort in Japan. ACR2011 (Chicago, 4-9 November 2011)
4. Inoue Y, et al. Analysis of factors impact on patient global assessment in daily practice based on observational cohort IORRA. ACR2012 (Washington D.C., 9-14 November 2012)
5. Seto Y, E, et al. Suppression of disease activity with methotrexate AND/OR TNF inhibitors but not corticosteroid ameliorates the functional disability of

RA patients in a large prospective cohort study. EULAR 2010 (Rome, Italy, 16-19 June 2010)

6. Yamanaka H, et al. Improvement in disease activity of Japanese patients with rheumatoid arthritis from 2000 to 2010 based on the long-term observational cohort IORRA. (London, England, 25-28 May 2011)
7. Yamanaka H, et al. Evaluation of the new remission criteria from EULAR/ACR in daily practice based observational cohort IORRA. (London, England, 25-28 May 2011)
8. Shimizu Y, et al. Influence of dose titration of concomitant steroid and methotrexate during biologic therapy on remission rates in patients with rheumatoid arthritis according to the new ACR/EULAR remission criteria in daily practice based on the IORRA cohort. EULAR 2012 (Berlin, 6-9 June, 2012)
9. Nakajima A, et al. Impact of comorbidities on both disease activity and treatment strategy in patients with rheumatoid arthritis: analysis of the IORRA cohort database. EULAR 2012 (Berlin, 6-9 June, 2012)
10. 中島亜矢子 関節リウマチの自然歴－IORRA コホートからの解析－（第54回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010年4月）抄録集 565
11. 中島亜矢子 シンポジウム ACR/EULAR 提案の RA 診断基準について：IORRA データベースを用いた ACR/EULAR 新分類基準の検証（第54回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010年4月）抄録集 p.55
12. 星 大介 IORRA コホートにおける生物学的製剤使用/非使用 RA 患者の労働状況（第55回日本リウマチ学会総会・学

- 術集会 2011年7月)・抄録集 598
13. 山中 寿 招請講演・日本の関節リウマチコホート研究 IORRA (第 108 回日本内科学会年次講演会 2011年11月)
  14. 中島亜矢子 IORRA における生物学的製剤投与患者の臨床的寛解の現状 (第 26 回日本臨床リウマチ学会 2011年12月) 抄録集 p.81
  15. 中島亜矢子 生物学的製剤にて加療された関節リウマチ患者の生命予後は悪化しない (第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2012年4月) 抄録集 p.296
  16. 清水陽子 生物学的製剤投与 RA 患者に

おける寛解率とステロイド、メトトレキサートの服用率、服用量の実態～IORRA コホートを用いた検討 (第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2012年4月) 抄録集 p.346

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

特になし

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）  
平成 22 年度～平成 24 年度 総合研究報告書

関節リウマチにおけるバイオフィリー寛解導入療法体系化に関する研究

研究分担者 田中 良哉 産業医科大学医学部第 1 内科学講座 教授  
研究協力者 齋藤 和義 産業医科大学医学部第 1 内科学講座 准教授  
研究協力者 平田信太郎 産業医科大学病院病理・臨床検査・輸血部 講師

研究要旨

関節リウマチ（RA）の治療では、メトトレキサート（MTX）と TNF を標的とした生物学的製剤の併用により、治療目標は、臨床的寛解、構造的寛解、機能的寛解へとパラダイムシフトした。本研究では、次の目標として、RA に於ける TNF 阻害薬により寛解導入後の生物学的製剤（バイオ）フリー寛解導入療法の体系化を目的とした。平成 22 年度は、多施設臨床研究（RRR 研究）により、TNF 抗体インフリキシマブを用いて低疾患活動性を維持した症例では、インフリキシマブを休薬しても低疾患活動性を維持することを検証した。結果として 1 年後の解析対象 102 例中、50 例（49%）が低疾患活動性、27 例（26%）がインフリキシマブを休薬しても臨床的寛解を満たした。また、これらの患者では、機能的寛解や構造的寛解を満たした。その後、平成 24 年度まで同試験を延長し、2 年後に 50 例（44%）、3 年後に 42 例（37%）が、インフリキシマブ休薬のまま低疾患活動性を維持できた。一方、平成 23-24 年度は、TNF 抗体アダリムマブを用いて、同様に寛解導入後にバイオフィリー寛解可能か否かを目的として、観察研究（HONOR スタディ）を実施した。その結果、アダリムマブを休薬し得た 51 例のうち 47 例について、18 例（38%）が DAS28 寛解を 1 年間維持した。休薬後の寛解維持に関与する因子として、休薬時 DAS28 低値が抽出され、cut-off 値は 2.16 であった。以上より、TNF 阻害薬によりタイトコントロールを行い、一定期間寛解を維持すれば、構造的、機能的障害の進行なく TNF 阻害薬の休薬が可能であることが示された。以上より、TNF 阻害薬による RA の治療に於いて、バイオフィリー寛解の導入という新たな治療体系の構築の可能性が示された。

A. 研究目的

関節リウマチ（RA）の治療では、メトトレキサート（MTX）と TNF を標的とした生物学的製剤の併用により、治療目標は、臨床的寛解、構造的寛解、機能的寛解へとパラダイムシフトした。次の目標として、生物学的製剤（バイオ）フリー寛解を目指す試みが国内外でなされている。本研究では、RA に於ける TNF 阻害薬により寛解導入後のバイオフィリー寛解導入療法の体系化を目的とする。平成 22-24 年度は、TNF 抗体インフリキシマブを用いて低疾患活動性を維持した症例では、

インフリキシマブを休薬しても低疾患活動性を維持することを検証するために、多施設臨床研究（RRR 研究）を実施した。また、平成 23-24 年度に当科に於いて、TNF 抗体アダリムマブを用いて、同様に寛解導入後にバイオフィリー寛解可能か否かを検証することを目的として HONOR スタディを実施した。

B. 研究方法

アメリカリウマチ学会（ACR）の診断基準を満たし、MTX に治療抵抗性の症例に対してインフリキシマブで治療し、低疾患活動性

(DAS28<3.2)を24週以上持続した114例に対して、インフリキシマブを休薬した(RRR試験; UMIN00002110)。主要評価項目はインフリキシマブ休薬後1年後に低疾患活動性を維持し、構造的に進行を認めないこととし、休薬後3年間の低疾患活動性維持ならびに構造的寛解を副次的評価とした。同様に、MTX治療抵抗性のRA症例をアダリムマブで治療し、寛解(DAS28<2.6)を24週以上持続した51例に対して、アダリムマブを休薬した(HONOR試験; UMIN R000007876)。主要評価項目はアダリムマブ休薬開始後1年後の寛解(DAS28<2.6)維持の割合とし、低疾患活動性維持ならびに構造的寛解を副次的評価とした。RRRは参加26施設、HONORは本施設において倫理委員会またはIRBで承認された。

#### (倫理面への配慮)

臨床検体を使用する場合には、所属機関の倫理委員会、或は、IRBで承認を得た研究に限定し、患者からインフォームドコンセントを得た上で、倫理委員会の規約を遵守し、所属機関の現有設備を用いて行う。患者の個人情報が入所機関外に漏洩せぬよう、試料や解析データは万全の安全システムをもって厳重に管理し、人権擁護に努めると共に、患者は、経済的負担を始め如何なる不利益や危険性も被らない事を明確にする。

### C. 研究結果

(1) RRR試験：インフリキシマブを中止したRA患者114症例中、脱落例を除く102例を1年後に解析した結果、56例(55%)が低疾患活動性(DAS28<2.6; LDA)を満たし、44例(43%)が臨床的寛解(DAS28<2.6)を満たした。休薬後1年目にLDAを維持した患者は、そうでない群より年齢が若く、罹病期間が短く(4.8対7.8年、 $P<0.05$ )、TSS低値であったが、LDA維持群には罹病期間が10年以上の関節破壊が進行した10例も含まれた。また、低疾患活動性の維持を規定する

因子として、休薬時のDAS28値が同定され、cut-offポイントはDAS28=2.225であった。さらに、1年後にLDAを満たした56例中44例(79%)は、その後2年目においてもLDAを維持した。また、1年後にLDAを満たさなかった46例のうち17例はインフリキシマブの休薬を継続し、2年目において6例がLDAとなり、結果として1年後の解析対象102例中、50例(49%)がLDA、27例(26%)が臨床的寛解を満たした。さらに、3年後に42例(37%)が低疾患活動性を維持できた。3年間休薬維持できた因子に関して、休薬を1年間維持できなかった群を対象に単変量ロジスティック回帰を行った結果、年齢が若い、罹病期間が短い、インフリキシマブ休薬時のDAS28が低いことが抽出された。3年間関節X線評価が可能だった19例について関節破壊の進行をTSSにて評価した結果、3年間休薬維持群では3年間の年間TSS変化量( $\Delta$ TSS)は0.4であった。

(2) HONOR試験：アダリムマブを休薬し得た51例のうち47例について、休薬後もDAS28寛解、低疾患活動性を1年間維持した症例は、それぞれ18例(38%)、27例(57%)であった。再燃後にアダリムマブを再投与した10例中、9例で半年以内に低疾患活動性に導入できた。休薬後の寛解維持に関与する因子として、ロジスティック解析により休薬時DAS28低値が抽出され、cut-off値2.16で群分けすると1年間寛解維持率は55%対28%と深い寛解群で有意に高かった。また臨床的寛解を維持した全例が構造的寛解を、94%が機能的寛解を1年間維持できた。

### D. 考察

以上、RA患者に対して、TNF阻害薬を用いて寛解導入・寛解維持が達成すれば、その後、生物学的製剤を休薬しても寛解が維持できるバイオフィリー寛解の可能性が示された。海外におけるTNF阻害薬の寛解後中止の可能性を検討したBeSt試験やOPTION試験では、平均罹病期間は0.5年以下の早期症例を

対象としているが、本報告の RRR 試験、HONOR 試験共に罹病期間は6-7年と長く、通常の実臨床で経験するような RA 患者に於けるバイオフリー寛解の可能性が示された。また、ロジスティック解析により TNF 阻害薬休薬後の寛解維持に関与する因子として休薬時 DAS28 低値が抽出され、深い寛解群で有意に高く、バイオフリー寛解を得るためには、発症早期の症例に、十分量の MTX と併用してタイトコントロールにより深い寛解を維持する必要があることが示唆された。一方、バイオフリー寛解に入れば、構造的寛解、機能的寛解も維持できる可能性が示され、長期安全性や医療経済的な側面からも有意義な結果であると考えられた。

RA の治療の基本は、まず、臨床的寛解を導入し、寛解を長期間維持することにより構造的、及び、機能的寛解を維持することである。今回の報告からだけで、最初からバイオフリー寛解を目指して治療するまでの十分なエビデンスが確立されたとは言い難い。また、バイオフリー寛解を獲得するには、MTX と生物学的製剤によりバイオタイトコントロールが必要であること、また、バイオフリー後の十分なモニターの必要性も示された。しかし、患者にとってはバイオフリー寛解の可能性を検証することは、医療経済および安全性の双方の観点から極めて重要である。一方、薬剤フリー寛解症例の多くでは、リウマトイド因子が陰性化し、免疫学的寛解が齎された可能性が示された。かかる TNF 阻害薬の効果は、病態の形成過程を制御すれば免疫異常をリセットして、原因は残ったままで治癒できる可能性を示唆し、原因を突き止めて治癒を目指すという治療概念をも脱却しつつある。生物学的製剤の適正使用により寛解率が上昇すれば、医療経済上の問題を克服できるとされ、「リウマチ医療」のあり方を考え直す時期かもしれない。

## E. 結論

RA 患者において MTX とインフリキシマ

ブ (RRR 試験)、アダリムマブ (HONOR 試験) によりタイトコントロールを行い、一定期間寛解を維持すれば、構造的、機能的障害の進行なく TNF 阻害薬の休薬が可能であることが示された。以上より、TNF 阻害薬による RA の治療に於いて、バイオフリー寛解の導入という新たな治療体系の構築の可能性が示された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tanaka Y. Next stage of RA treatment: TNF-inhibitor-free remission will be a possible treatment goal? Ann Rheum Dis (in press)
2. 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. A merged presentation of clinical and radiographic data using probability plots in a clinical trial, the JESMR study. Ann Rheum Dis (in press)
3. Takeuchi T, Harigai M, Tanaka Y., Yamanaka H, Ishiguro N, Yamamoto K, Miyasaka N, Koike T, Kanazawa M, Oba 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 (in press)
4. van der Heijde D, Tanaka Y., Fleischmann R, Keystone E, Kremer J, Zerbini C, Cardiel MH, Cohen S, Nash

- P, Song YW, Tegzová D, Wyman BT, Gruben D, Benda B, Wallenstein G, Krishnaswami S, Zwillich SH, Bradley JD, Connell CA and the ORAL Scan investigators. Tofacitinib (CP-690,550) in patients with rheumatoid arthritis on methotrexate: 12 month data from a 24 month Phase 3 randomized radiographic study. *Arthritis Rheum* (in press)
5. Tanaka Y, Harigai M, Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Yamamoto K, Mitasaka N, Koike T, Kanazawa M, Oba T, Baker D & the GO-FORTH study group. Golimumab, a human anti-TNF- $\alpha$  monoclonal antibody, injected subcutaneously every 4 weeks in Japanese patients with active rheumatoid arthritis in combination with methotrexate: results of the Phase 2/3, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled GO-FORTH study through 24 weeks. *Ann Rheum Dis* (2012) 71, 817-824
  6. Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Miyasaka N, Mukai M, Matsubara T, Uchida s, Akama H, Kupper H, Aprora V, Tanaka Y. Adalimumab a human anti-TNF monoclonal antibody, outcome study for the prevention of joint damage in Japanese patients with early rheumatoid arthritis: the HOPEFUL 1 study. *Ann Rheum Dis* (in press)
  7. Iwata S, Yamaoka K, Niuro H, Nakano K, Wang S-P, Akashi K, Tanaka Y. Amplification of toll-like receptor-mediated signaling through Syk in human B cell activation. *J Allergy Clin Immunol* (2012) 129, 1594-1601
  8. Iwata S, Saito K, Tokunaga M, Tanaka Y. B-cell or T-cell-dominant recurrence after rituximab therapy in patients with SLE. *Ann Rheum Dis* (2012) 71, 1749-1750
  9. Tanaka Y, Maeshima Y, Yamaoaka K. In vitro and in vivo analysis of a Jak inhibitor in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* (2012) 71, i70-i74
  10. Iwata S, Saito K, Hirata S, Tanaka Y. Phenotypic changes of lymphocyte in a patients with IgG4-related disease after corticosteroid therapy. *Ann Rheum Dis* (2012) 71, 2058-2059
  11. Tak PP, Mease PJ, Genovese MC, Kremer J, Haraoui B, Tanaka Y, Bingham III CO, Ashrafzadeh A, Travers H, Safa-Leathers S, Kumar S, Dummer W. Efficacy and safety of ocrelizumab in patients with active rheumatoid arthritis with an inadequate response to at least one TNF inhibitor: results from the phase III SCRIPT trial. *Arthritis Rheum* (2012) 64, 360-370
  12. Sonomoto K, Yamaoka K, Oshita K, Fukuyo S, Zhang X, Nakano K, Okada Y, Tanaka Y. IL-1 $\beta$  induces differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts via the Wnt5a/Ror2 pathway. *Arthritis Rheum* (2012) 64, 3355-3363
  13. Maeshima K, Yamaoaka K Kubo s, Nakano K, Iwata S, Saito K, Ohishi M, Miyahara H, Tanaka S, Ishi K, Yoshimatsu H, Tanaka Y. A JAK inhibitor tofacitinib regulates synovitis through inhibition of IFN- $\gamma$  and IL-17 production by human CD4<sup>+</sup> T cells. *Arthritis Rheum* (2012) 64, 1790-1798
  14. Sawamukai N, Satake A, Schmidt AM, Lamborn IT, Tanaka Y, Kambayashi T. Cell autonomous role of TGF $\beta$  and IL-2

- receptor in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> inducible regulatory T cell generation during graft-versus-host disease. *Blood* (2012) 119: 5575-83
15. Oshita K, Yamaoka K, Udagawa N, Fukuyo S, Sonomoto K, Tanaka Y. Human mesenchymal stem cells inhibit osteoclastogenesis through osteoprotegerin production. *Arthritis Rheum* (2011) 63, 1658-1667
  16. Nakano K, Yamaoka K, Hanami K, Saito K, Sasaguri Y, Tanaka Y. Dopamine induces IL-6-dependent IL-17 production via D1-like receptor on CD4 naïve T-cells and a D1-like receptor antagonist SCH-23390 inhibits cartilage destruction in a human rheumatoid arthritis/SCID mouse chimera model. *J Immunol* (2011) 186, 3745-3752
  17. Tanaka Y, Suzuki M, Nakamura H, Toyozumi S, Twillich S. Phase 2 study of tofacitinib (CP-690,550) combined with methotrexate in patients with rheumatoid arthritis and inadequate response to methotrexate. *Arthritis Care Res* (2011) 63, 1150-1158
  18. Sawamukai N, Yukawa s, Saito K, Nakayamada S, Kambayashi T, Tanaka Y. Mast cell-derived tryptase inhibits apoptosis of human rheumatoid synovial fibroblasts via rho-mediated signaling. *Arthritis Rheum* (2010) 62, 952-959
  19. Tanaka Y, Takeuchi T, Mimori T, Saito K, Nawata M, Kameda H, Nojima T, Miyasaka N, Koike T. Discontinuation of infliximab after attaining low disease activity in patients with rheumatoid arthritis, RRR (remission induction by remicade in RA) study. *Ann Rheum Dis* (2010) 69, 1286-1291
2. 学会発表
    1. Y. Tanaka. The Maximization of Efficacy of Tocilizumab for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. The 8th International Congress on Autoimmunity, Granada, Spain. May/2012
    2. Y. Tanaka. Treatment of SLE with biologics. The 15th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology, APLAR 2012, Dead Sea, Jordan, Sep/2012
    3. Y. Tanaka, S Hirata, S Fukuyo, M Nawata, S Kubo, K Yamaoka, K Saito. Discontinuation of Adalimumab without Functional and Radiographic Damage Progression After Achieving Sustained Remission in Patients with Rheumatoid Arthritis (the HONOR study): 1-Year Results. The 78th Annual Congress of American College of Rheumatology, 2012, Washington DC, USA, Nov/2012
    4. Tanaka Y. In vivo and in vitro analysis of a Jak inhibitor in RA. Advances in Targeted Therapies 2011, Dubrovnik
    5. Tanaka Y. Is biologic-free remission possible in patients with RA? Advances in Targeted Therapies 2011, Dubrovnik
    6. Y. Tanaka, S. Hirata, M. Nawata, S. Kubo, K. Saito. Discontinuation of adalimumab after attaining remission in patients with rheumatoid arthritis. The Annual European Congress of Rheumatology 2011, London, England
    7. Y. Tanaka, M. Harigai, T. Takeuchi, H. Yamanaka, N. Ishiguro, K. Yamamoto, et al. Golimumab, a human anti-TNF- $\alpha$  monoclonal antibody administered subcutaneously every four weeks as monotherapy in patients with active

- rheumatoid arthritis  
despite methotrexate therapy: 4-week  
results of clinical and radiographic  
assessments. The Annual European  
Congress of Rheumatology 2011,  
London, England
8. Y. Tanaka, T. Takeuchi, T. Mimori, N.  
Miyasaka, T. Koike. The possibility of  
maintaining low disease activity after  
discontinuation of infliximab in RA  
patients: An interim report for the  
second year of the RRR study. The  
Annual European Congress of  
Rheumatology 2010, Roma, Italy
9. Tanaka Y. Paradigm shift of the  
treatment of rheumatoid arthritis by  
TNF-targeting biologics. The 14th  
International Congress of Immunology  
(ICI), Kyoto
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
1. 特許取得  
特になし
  2. 実用新案登録  
特になし
  3. その他  
特になし



厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）  
平成 22 年度～平成 24 年度 総合研究報告書

関節リウマチ患者に対するトシリズマブ使用の最適化  
ーバイオマーカーと末梢血遺伝子発現プロファイルに基づく効果予測ー

研究分担者 西本 憲弘 和歌山県立医科大学免疫制御学講座 教授（～平成 24 年 11 月）  
東京医科大学医学総合研究所難病分子制御学部門（同年 12 月～）  
研究協力者 村上 美帆、松谷 隆治 和歌山県立医科大学免疫制御学講座  
中村 誠二、谷野 元彦、的場 亮 DNA チップ研究所

### 研究要旨

生物学的製剤は従来の抗リウマチ薬に比べ優れた治療効果を示すが、寛解にいたる症例は限られている。もし、長期の治療効果を治療開始前に予測することができれば、個々の患者に応じた治療薬の選択が可能となる。トシリズマブ（TCZ）は、既存の抗リウマチ薬で効果不十分な関節リウマチ（RA）患者に対し、臨床的寛解、構造的寛解、機能的寛解の 3 つの寛解を高頻度に達成する。さらに、血中 IL-6 の正常化は体内での IL-6 産生そのものの低下、すなわち真の疾患活動性の消失を意味し、ドラッグフリー寛解の可能性を示唆する。そこで、TCZ 治療開始前の RA 患者末梢血の遺伝子発現を、DNA チップを用いて網羅的に解析し、TCZ 治療開始 24 週後の治療効果（臨床的寛解）、ドラッグフリー寛解の指標となる IL-6 正常化を予測する方法を確立することを目的とした。また、既存抗リウマチ薬では構造的寛解を達成できない患者を、種々のバイオマーカーや臨床スコア、代謝マーカーなどを用いて予測し、そのようなリスク因子を有する患者に対する TCZ の効果を検討した。

RA 患者の治療開始前の患者末梢血全血の網羅的な遺伝子発現解析の結果、ACR 改善基準（ACR20、ACR50、ACR70）、DAS28 寛解、IL-6 の正常化を予測する分子群が抽出された。IL-18、AKT1 substrate 1、IL-23 receptor、Family with sequence similarity member B（FAM20B）が判別遺伝子として選択され、RA の病態形成に関わる可能性がある。さらに weighted voting algorithm 法、Support Vector Machine、Decision Tree、Naïve Bayes、Logistic regression の判別手法により、効果予測精度は大きく変わった。今後効果予測精度を上げるためには、DNA チップの種類と判別遺伝子の選別方法、判別方法において、至適条件の評価が必要である。

既存抗リウマチ薬治療下での 1 年後の骨びらんと関節列隙の狭小化のリスク因子として、治療開始前の尿中 C-terminal crosslinking telopeptide（CTX-II）レベル、pyridinoline/deoxypyridinoline 比（PYD/DPD）、関節列隙の狭小化（JSN）スコア、Body Mass Index（BMI）が抽出された。これらのリスクを有する症例に対し、トシリズマブ群は Sharp スコアの増加を有意に抑制した。また、1 年後の Sharp スコアの増加に寄与する独立した因子として、治療開始後 12 週間での MMP-3 の低下、CRP の陰性化、ならびに N-peptide of type IIA procollagen（PIIANP）の低下が抽出され、低下度が大きいほど、関節破壊の進行が予防できた。これらのバイオマーカーを用いることでトシリズマブ使用の最適化が可能であると思われる。

## A. 研究目的

生物学的製剤は従来の抗リウマチ薬に比べ優れた治療効果を示すが、すべての患者に有効であるわけではない。ましてや、寛解にいたる症例は限られている。もし、長期の治療効果を治療開始前に予測することができれば、個々の患者に応じた治療薬の選択が可能となり、患者の QOL をより確実に改善できるとともに、医療経済的にも大きなメリットがある。

ヒト化抗 IL-6 受容体抗体であるトシリズマブ(TCZ)は、既存の抗リウマチ薬で効果不十分な関節リウマチ (RA) 患者に対し、メトトレキサートの併用の有無に関わらず、臨床的寛解、構造的寛解、機能的寛解の 3 つの寛解を高頻度に達成することが示されている。さらに、血中 IL-6 の正常化は体内での IL-6 産生そのものの低下、すなわち真の疾患活動性の消失を意味し、TCZ を急激な再燃なく休薬できる可能性、いわゆるドラッグフリー寛解の可能性を示唆する。実際に、TCZ 休薬後の効果持続率を検討した DREAM 試験では、休薬開始時点で血中 IL-6 が低下していた症例でドラッグフリー寛解が 1 年以上にわたり有意に高い頻度で持続した。

本研究では、TCZ 治療開始前の RA 患者末梢血の遺伝子発現を、DNA チップを用いて網羅的に解析し、TCZ 治療開始 24 週後の治療効果 (臨床的寛解)、ならびに寛解達成後の TCZ 休薬の指標となる IL-6 正常化を予測する方法を確立することを目的とした。そして、実臨床に利用可能なカスタムチップ化を目指して、治療効果判別遺伝子の選択を行うとともに、その遺伝子の機能分類を行い、RA の病態形成における役割を検討した。

一方、従来の合成抗リウマチ薬であっても、MTX をアンカードラッグとして組み合わせることにより臨床的寛解のみならず構造的寛解を少なからず達成することが可能である。実際に SAMURAI 研究では、既存抗リウマチ薬群でも 39% の患者に構造的寛解が見られた (ただし、既存抗リウマチ薬群の患者の

56% は MTX と他の合成抗リウマチ薬の併用療法であった)。医療経済的なメリットを考えると、本来、生物学的製剤は、既存抗リウマチ薬では治療が困難な症例に限って使用すべきであると考ええる。そこで、既存抗リウマチ薬では構造的寛解を達成できない患者を、種々のバイオマーカーや臨床スコア、代謝マーカーなどを用いて予測し、そのようなリスク因子を有する患者に対する TCZ の効果を検討した。

## B. 研究方法

### ① TCZ 投与前の末梢血遺伝子発現プロファイルに基づいた治療効果予測法の確立

H22 年度は、Agilent Whole Human Genome4×44K<sup>®</sup>を用いて、RA 患者 85 名 (TCZ 43 名、MTX から TCZ へのスイッチ 42 例) の治療開始前の患者末梢血全血の網羅的な遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現量の評価は 1 色法 (Cy3) で行い、データ正規化は Gaussian Quantile Normalization を用いた。Gaussian Quantile Normalization は、全 Probe 数の発現値の分布を、ランダムに発生させた正規分布にしたもので (平均 0、分散 1 になるようにしている)、その特徴は、特に低発現領域の発現差を強調する傾向がある。

TCZ 治療群 43 名を学習セットとして、ACR response (CR20、ACR50、ACR70)、DAS 寛解 (DAS28ESR<2.6、DAS28CRP<2.6)、ならびに IL-6 正常化 (IL-6<20pg/ml、IL-6<35pg/ml) の「達成」、「未達成」の 2 群間で signal to noise ratio(SNR)にて比較し、さらに上位 300 プローブの中から weighted voting algorithm を用いて判別用遺伝子セットを抽出した。次に MTX から TCZ にスイッチした 43 例で判別能力を前向き試験でテストした。

### ② 治療判別手法の違いによる予測精度の上昇の可能性の検討

H23 年度は、判別手法を変えることにより、さらなる正確度の改善が可能であるかを検討

した。また、新たに治療を開始した症例（主に今までに生物学的製剤を使用したことのない症例、いわゆるバイオナীব症例）で、24 週後の TCZ の効果予測を試みた。

75 percentile shift normalization で正規化の後、TCZ 治療群 43 名を学習セットとして、ACR70、EULAR good response ならびに IL-6 正常化( $\leq 35$  pg/mL)の「達成」、「未達成」の 2 群比較で、

- (1)Mann-Whitney U Test( $p \leq 0.01$ )にて有意差のある遺伝子
- (2)治療効果基準間で重複して有意差のある遺伝子

の 2 つの方法で判別遺伝子を決めた。

次に

- (1)Support Vector Machine(SVM)、
- (2)Decision Tree(DT)、
- (3)Naïve Bayes (NB)、
- (4)Logistic regression(LR)

の 4 種の判別手法で、MTX 治療から TCZ にスイッチした 43 例で判別能力を前向き試験でテストし効果予測率を比較した。

また、2 群間で signal to noise ratio(SNR)にて比較し、上位プローブの中から weighted voting algorithm 法にて決定した遺伝子セットによる従来の判別法(WVA)と比較した。

さらに新たに TCZ 治療を開始した 41 例（殆どがバイオナীব症例）で 24 週後の効果予測をテストした。

### ③種々のバイオマーカーによる関節破壊リスク因子の決定とリスク因子の有無による TCZ の有効性の検討

H24 年度は、種々のバイオマーカーを用いて、関節破壊と関連するリスク因子を明らかにするとともに、リスク因子の有無によるトシリズマブの有効性を検討した。

罹病期間 5 年未満の RA 患者におけるトシリズマブの関節破壊の進行に対する抑制効果を検討した SAMURAI 研究のデータを用いた。コントロール群に無作為に割り付けられた患者において、van der Heijde's modified Sharp 法により、構造的寛解を達成した症例

と達成できなかった症例を、種々のバイオマーカー（骨代謝、軟骨代謝、炎症マーカー、サイトカインなど）、臨床的な評価（腫脹関節数、圧痛関節数、DAS28）、Body Mass Index (BMI) などを用いて識別し、関節破壊と関連するリスク因子を明らかにした。次に、トシリズマブ群に割り付けられた患者データを用いて、コントロール群で同定されたリスク因子の有無によるトシリズマブの有効性を検討した。また、トシリズマブを用いても構造的寛解が達成できない患者を治療開始後 12 週間での種々のマーカーの変化量を用いて特定を試みた。

（倫理面への配慮）

臨床試験は GCP に準拠して行った。患者のインフォームドコンセントを得た上で検査を行った。患者情報に関しては、治療施設・氏名・生年月日・住所などの情報を一切削除し、匿名化の下に行った。

## C. 研究結果

### ①TCZ 投与前の末梢血遺伝子発現プロファイルに基づいた治療効果予測法の確立

ACR20、ACR50、ACR70、DAS28 寛解、IL-6 正常化 ( $\leq 35$  pg/mL) の予測に対し、層間比較にて最小数で最大のパフォーマンスを示す分子としてそれぞれ 5、17、22、16、5 分子が抽出され、正確度はそれぞれ 74%、53%、31%、52%、60%、陽性的中率 82%、40%、14%、40%、81%であり、陰性的中率 38%、68%、69%、64%、47%であった。これらの識別分子の中には、IL-18、AKT1 substrate 1、IL-23 receptor 等の分子が含まれていた。

### ②治療判別手法の違いによる予測精度の上昇の可能性の検討

ACR70、EULAR good response、IL-6 正常化 ( $\leq 35$  pg/mL) の達成 v.s. 非達成の比較で、Mann-Whitney U Test ( $p \leq 0.01$ ) にて有意差のある遺伝子がそれぞれ、83、74、67 遺伝子が抽出された。これらを用いて判別を行ったところ、ACR70 達成予測の正確度は、

SVM、DT、NB、LR で、それぞれ 71%、64%、74%、74%であった。EULAR good response は、それぞれ 67%、62%、50%、45%であった。IL-6 正常化の予測の正確度は、それぞれ 48%、50%、52%、43%であった。従来の WVA 法では、IL-6 正常化予測の正確度は 60%であり、今回予測率が低下したが、逆に ACR70 達成予測は 31.0%から大幅に改善した。これらの予測率（正確度）は、新たにリクルートした 41 例でもほぼ同等であった。

一方、治療効果基準間重複有意差遺伝子として、Family with sequence similarity, member B(FAM20B)が選ばれた。この分子を用いた ACR70、EULAR good response、IL-6 正常化の予測の正確度は、それぞれ 74%、50%、64%であった。しかし、新たにリクルートした患者でのテストでは 42-49%と精度は低かった。

### ③種々のバイオマーカーによる関節破壊リスク因子の決定とリスク因子の有無による TCZ の有効性の検討

治療開始前の尿中 C-terminal crosslinking telopeptide (CTX-II) レベル、pyridinoline/deoxypyridinoline 比 (PYD/DPD)、関節列隙の狭小化 (JSN) スコア、BMI が 1 年後の骨びらん ( $r=0.31$ 、 $r=0.26$ 、 $r=0.35$ 、 $r=-0.24$ 、respectively) ならびに関節列隙の狭小 ( $r=0.26$ 、 $r=0.18$ 、 $r=0.43$ 、 $r=-0.21$ 、respectively) と相関した。

多変量ロジスティック回帰により、CTX-II が 500 以下に比べ 1000 ng/mmol/creatinine 以上の症例、PYD/DPD が中間値より大きい症例、JSN がベースラインで存在する症例、BMI が 18.5 以下の症例で骨びらんと関節列隙が有意に進行した。

これらのリスクを有する症例に対するトシリズマブの効果をコントロール群と比較したところ、尿中 CTX-II 高値、PYD/DPD 高値、JSN の存在、BMI 低値のいずれのリスク因子を有する患者においても TCZ 群はコントロール群に比べて Sharp スコアの増加は有意に少なかった。しかし、リスク因子のない患

者群では、TCZ 使用群と既存の DMARDs 治療群で Sharp スコアの増加、骨びらんと JSN スコアの増加に差はなかった。

次に TCZ 使用群において、1 年後の Sharp スコアの増加に寄与する因子を検討したところ、治療開始後 12 週間での MMP-3 の低下、CRP の陰性化、ならびに N-peptide of type IIA procollagen (PII ANP) の低下が独立した因子として抽出され、低下度が大きいほど、関節破壊の進行が抑制された。

## D. 考察

### ①TCZ 投与前の末梢血遺伝子発現プロフィールに基づいた治療効果予測法の確立

今回の解析では weighted voting algorithm を用いて判別用遺伝子セットを抽出したが、サポートベクターマシンの用いた方が、より正確な効果予測結果を示した。概ね 60%前後の正診率であり、必ずしもすべてが満足できるレベルとは言えないが、カスタムチップを作成するための候補となる。

IL-6 の正常化予測の際に、より少ない判別遺伝子で比較的良好な結果を得た。一方、ACR20 に関しては、「達成」、「未達成」の割合が偏っているため、見かけ上良い成績（正確度）が達成されたと考えられる。ACR70 はテストセットの成績が学習セットに比べて極端に落ちたが、これは過学習が生じたと考えられる。

識別分子には IL-18、AKT1 substrate 1、IL-23 receptor が判別遺伝子として選択された。IL-18 はマクロファージから産生され、滑膜細胞からのマトリックス分解酵素の産生を促すとともに IL-6 やケモカインの産生を介して血管新生や骨・軟骨破壊に関与すると考えられる。また、AKT1 は IL-17 のシグナルに関わり、IL-23 は Th17 細胞の分化に重要である。

### ②治療判別手法の違いによる予測精度の上昇の可能性の検討

weighted voting algorithm (WVA) 法では、IL-6 正常化予測の正確度は 60%であり、SVM、

DT、NB、LR のいずれの判別手法を用いても予測率は向上しなかったが、ACR70 達成予測は SVM、DT、NB、LR のいずれの判別手法を用いても 31.0%から大幅に改善した。

同じ対象群を別の DNA チップ (Acegene human 30K®) で解析して得られた分子を用いて、Support Vector Machine (SVM) で解析したところ、いずれの評価も 80%前後の正確度が得られており、チップの種類により適切な判別手法を選ぶ必要がある。

治療効果基準間重複有意差遺伝子として選択された Family with sequence similarity, member B (FAM20B) の機能は未だ不明だが、軟骨の骨化に関わるとの報告がある。

### ③種々のバイオマーカーによる関節破壊リスク因子の決定とリスク因子の有無による TCZ の有効性の検討

TCZ は、リスク因子 (尿中 CTX-II 高値、PYD/DPD 高値、ベースラインで JSN の存在、BMI 低値) を有する症例に用いて初めてそのメリットが発揮されると考えられる。リスク因子の無い症例では、既存の DMARDs でも構造的寛解が殆どの症例で達成できる。これにより TCZ 治療を真に必要とする症例を治療開始前に選択することが可能であり、限られた医療費を有効利用することができる。

一方、12 週時点で 1 年後の関節破壊の進行を予測することの意義は大きい。治療開始後 12 週間での MMP-3 の低下、CRP の陰性化、ならびに P II ANP の低下が不十分な症例では、TCZ モノテラピーでは Sharp スコアの増加を完全に抑制することが困難である。そのような症例では、関節破壊の抑制効果を最大限に発揮させるために TCZ に合成抗リウマチを追加する、あるいは他の生物学的製剤にスイッチする必要があると示唆される。

これらのマーカーと DNA チップによる末梢血の遺伝子発現プロファイルを用いた治療効果予測、IL-6 の正常化予測法と組み合わせることにより、RA 患者に対する TCZ 使用の最適化が可能であると思われる。

## E. 結論

種々のバイオマーカーや遺伝子発現プロファイルを用いた RA 患者に対するトシリズマブ使用の最適化の可能性が示された。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

平成 22 年度

1. Nishimoto N. Interleukin-6 as a therapeutic target in candidate inflammatory diseases. Clin Pharmacol Ther 87:483-487, 2010.
2. Nishimoto N, Ito K, Takagi N. Safety and efficacy profiles of tocilizumab monotherapy in Japanese patients with rheumatoid arthritis - meta-analysis of 6 initial trials and 5 long-term extensions -. Mod Rheumatol 20: 222-232, 2010.
3. Sugino H, Lee HM, Nishimoto N. DNA microarray analysis of rheumatoid arthritis susceptibility genes identified by genome-wide association studies (GWAS). Arthritis Res Ther 12:401, 2010.
4. Nishimoto N, Takagi N. Assessment of the validity of the 28-joint disease activity score using erythrocyte sedimentation rate (DAS28-ESR) as a disease activity index of rheumatoid arthritis in the efficacy evaluation of 24-week treatment with tocilizumab: subanalysis of the SATORI study. Mod Rheumatol 20:539-47, 2010

平成 23 年度

5. Hashimoto J, Garner P, van der Heijde D, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Yoshikawa H, Nishimoto N. Humanized

- anti-interleukin-6-receptor antibody (tocilizumab) monotherapy is more effective in slowing radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis at high baseline risk for structural damage evaluated with levels of biomarkers, radiography, and BMI: data from the SAMURAI study. *Mod Rheumatol* 21:10-15, 2011.
6. Murakami M, Nishimoto N. The value of blocking IL-6 outside of rheumatoid arthritis: current perspective. *Curr Opin Rheumatol*. 23:273-7. 2011
  7. Lee HM, Sugino H, Aoki C, Shimaoka Y, Suzuki R, Ochi K, Ochi T, Nishimoto N. Abnormal networks of immune response-related molecules in bone marrow cells from patients with rheumatoid arthritis as revealed by DNA microarray analysis. *Arthritis Res Ther*. 13:R89. 2011
  8. Hirao M, Yamasaki N, Oze H, Ebina K, Nampei A, Kawato Y, Shi K, Yoshikawa H, Nishimoto N, Hashimoto J. Serum level of oxidative stress marker is dramatically low in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab. *Rheumatol Int* 2011 Sep 11. [Epub ahead of print]
- 平成 24 年度
9. Mori S, Tokuda H, Sakai F, Johkoh T, Mimori A, Nishimoto N, Tasaka S, Hatta K, Matsushima H, Kaise S, Kaneko A, Makino S, Minota S, Yamada T, Akagawa S, Kurashima A; and the NTM-BIORA (NTM infection in Biologic-treated RA patients) Study Investigators. Radiological features and therapeutic responses of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease in rheumatoid arthritis patients receiving biological agents: a retrospective multicenter study in Japan. *Mod Rheumatol* 22:727-37, 2012.
  10. Schoels MM, van der Heijde D, Breedveld FC, Burmester GR, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Gabay C, Gibofsky A, Gomez-Reino JJ, Jones G, Kvien TK, Murakami M, Nishimoto N, Smolen JS. Blocking the effects of interleukin-6 in rheumatoid arthritis and other inflammatory rheumatic diseases: systematic literature review and meta-analysis informing a consensus statement. *Ann Rheum Dis*. 2012 Nov 10. [Epub ahead of print]
  11. Smolen JS, Schoels MM, Nishimoto N, Breedveld FC, Burmester GR, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Gabay C, Gibofsky A, Gomez-Reino JJ, Jones G, Kvien TK, Murakami M, Betteridge N, Bingham C 3rd, Bykerk V, Choy EH, Combe B, Cutolo M, Graninger W, Lanasa A, Martin-Mola E, Montecucco C, Ostergaard M, Pavelka K, Rubbert-Roth A, Sattar N, Scholte-Voshaar M, Tanaka Y, Trauner M, Valentini G, Winthrop KL, de Wit M, van der Heijde D. Consensus statement on blocking the effects of interleukin-6 and in particular by interleukin-6 receptor inhibition in rheumatoid arthritis and other inflammatory conditions. *Ann Rheum Dis*. 2012 Nov 21. [Epub ahead of print]
  12. Hirao M, Hashimoto J, Nishimoto N. Anti-cytokine agents to combat oxidative stress. In: Alcaraz MJ, Gualillo D, Sánchez-Pernaute, O. *Oxidative Stress in Advanced Basic Research and Clinical Practice. Studies on Arthritis and Joint Diseases.*

Springer (in press)

## 2. 学会発表

平成 22 年度

1. 西本憲弘, トシリズマブによる RA の治療 (完結編) - ドラッグフリーへの挑戦 - 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会シンポジウム 神戸. 2010.4.23-26
2. 杉野英彦、李慧敏、安達康雄、青木千恵子、西本憲弘, GWAS から得られた関節リウマチ感受性遺伝子の DNA マイクロアレイによる発現検討 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会シンポジウム 神戸. 2010.4.23-26
3. 西本憲弘, 関節リウマチに対するトシリズマブ休薬後の効果持続期間の検討 (DREAM 試験) 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会 神戸. 2010.4.23-26
4. 西本憲弘, RA 患者における TCZ 休薬後の再燃に対する再投与の安全性と有効性 (RESTORE 試験) 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会 神戸. 2010.4.23-26
5. 西本憲弘、橋本 淳. 関節リウマチに対する IL-6 阻害治療から学んだ骨代謝における IL-6 の役割 第 25 回日本骨代謝学会シンポジウム 東京. 2010.7.21
6. 西本憲弘, 関節リウマチに対する IL-6 阻害治療と DNA チップによる効果予測. 第 31 回日本臨床薬理学会シンポジウム 2010.12.1
7. Nishimoto N, Drug free REmission after cessation of Actemra Monotherapy (DREAM study) EULAR2010. Roma. 2010.6.17.
8. Nishimoto N, Retreatment Efficacy and Safety of TOcilizumab in patients with rheumatoid arthritis at REcurrence (RESTORE study) EULAR2010. Roma. 2010.6.17.
9. Nishimoto N. Drug free REmission after cessation of tocilizumab

(Actemra) Monotherapy (DREAM study) ACR/ARHP 2009. Atlanta. USA. 2010.10.16-23

平成 23 年度

10. 川合眞一、西本憲弘, シンポジウム. 日本初の創薬をめざして. わが国の成功例: 抗 IL-6 受容体抗体、トシリズマブの基礎と臨床開発. 第 28 回日本医学会総会 2011. 2011.4.8-10
11. 西本憲弘, シンポジウム. 免疫システムの臨床応用: 課題と今後の展望. 抗 IL-6 受容体抗体による炎症性免疫疾患の治療. 第 28 回日本医学会総会 2011. 2011.4.8-10
12. 西本憲弘, シンポジウム. 生物学的製剤の効果から見た成人の RA の炎症病態. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 神戸ポートピアホテル. 兵庫. 2011.7.18-20
13. 西本憲弘, シンポジウム臨床薬理と最新治療: リウマチ膠原病. 関節リウマチに対する分子標的治療. 第 32 回日本臨床薬理学会年会. 2011.12.1
14. Lee HM, Sugino H, Aoki C, Shimaoka Y, Ochi T, Nishimoto N. Comparisons of MHC class I molecule expressions in bone marrow (BM) cells and peripheral blood cells (PBCS) of rheumatoid arthritis (RA). EULAR2011. London. 2011.5.25-28.
15. Lee HM, Sugino H, Aoki C, Murakami M, Matsutani T, Ochi T, Nishimoto N. Correlations between S100 gene expression levels and the local and systemic inflammatory markers (matrix metalloproteinase-3, MMP3; erythrocyte sedimentation rate, ESR) in rheumatoid arthritis patients. ACR/ARHP 2011. Chicago. USA. 2011.11.5-9.
16. Nishimoto N, Murakami M, Matsutani T, Hashimoto J, Takagi N.

Interleukin-6 as a therapeutic target in locomotor disorders. Bio-Rheumatology International Congress. Tokyo. Japan. 2011.11.14-16.

平成 24 年度

17. Lee HM, Aoki C, Murakami M, Matsutani T, Nishimoto N. Overexpressions of S100A4/A6/A9/A11/A12 in the patients with RA, SLE, and JIA and correlations of their expression levels with the local and systemic inflammatory biomarkers in RA patients. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会・第 21 回国際リウマチシンポジウム. 東京. 2012.4.26-28
18. Nishimoto N. Interleukin-6 as a therapeutic target in inflammatory autoimmune diseases. -From rheumatoid arthritis to vasculitis syndromes-. The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop2012. Tokyo, conference center. Tokyo, Japan. 2012.3.29
19. Nishimoto N, Lee HM, Murakami M, Aoki C, Li Y, Matsutani T. Expressions

of immune response related genes were normalised after Tocilizumab treatment in rheumatoid arthritis (RA) patients. EULAR 2012. Messe Berlin. Berlin. Germany. 2012.6.6-9.

20. Nishimoto N. Advanced therapeutic strategy using anti-IL6 receptor antibody, tocilizumab, in RA. 第 21 回国際リウマチシンポジウム. 東京. 2012.4.26-28
21. Nishimoto N. Discovery of IL-6 and its clinical application - The journey from IL-6 to tocilizumab-第 41 回日本免疫学会学術集会 International Symposium 12. Translational Research in Immunology 神戸 2012.12.5-7

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得  
特記すべきことなし
2. 実用新案登録  
特記すべきことなし
3. その他  
特記すべきことなし



厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）  
平成 22 年度～平成 24 年度 総合研究報告書

関節リウマチにおける軟骨破壊の病態に関する研究

研究分担者 石黒 直樹 名古屋大学大学院医学研究科 整形外科 教授  
研究協力者 小嶋 俊久 名古屋大学医学部附属病院 整形外科 講師

研究要旨

関節リウマチ (RA) の治療目標である長期の身体機能維持のため正常な関節機能にとって軟骨は必須である。RA 治療においてより軟骨の維持が重要とされる荷重大関節の関節破壊抑制効果の評価はいまだ不十分である。本研究では、膝関節破壊に対する治療効果についてコンピュータ計測支援ソフト (KOACAD) を用いた画像評価を含めて検証し、軟骨破壊についてのバイオマーカー開発を目的とした。膝関節については、高疾患活動性患者に見られ、治療介入の遅れが、高度の関節破壊進行と関連することが確認された。KOCAD は再現性と定量性から、有用なツールであり、軟骨基質の分解産物など関節破壊のバイオマーカーと合わせ、より厳密な評価をしていくことが、長期成績を検討する上で重要であると考えられた。

A. 研究目的

メトトレキサートおよび生物学的製剤 (Bio) の登場により、関節リウマチ (RA) 治療は劇的に変化した。近年広く提唱される「寛解」、機能障害生じさせないという高い治療目標のためには、長期的関節機能を決定する軟骨の評価と、寛解率の高いといわれる病早期の関節炎の病態理解が必要である。これには、高い精度の画像評価と関節炎、もしくは軟骨破壊についてのバイオマーカーの開発が不可欠である。

そこで今回、本研究において

1) いまだ不明な点の多い Bio 治療の、荷重大関節に対する中、長期治療成績について、後ろ向き研究により 3 年以上、平均 5 年間の、膝関節破壊抑制効果について検証すること、そして

2) 局所炎症の病態および軟骨破壊に関連する血清バイオマーカーの開発として軟骨分解産物に注目し、患者結成において、全身的臨床パラメータとの関係について検討することとした。このバイオマーカーについては、

軟骨基質変性における MMPs (特に collagenase)、MMPs と異なる発現機序を持つとされる cathepsin K に注目し、*in vivo*、*in vitro* にて研究を継続してきた。今回、関節破壊マーカーとして collagenase による II 型コラーゲンの分解産物、さらに cathepsin K による I、II 型コラーゲンの分解産物を測定しすることとした。

B. 研究方法

1) 膝関節破壊抑制効果の検証

2008 年 5 月までに名古屋大学病院において Bio 療法を開始した RA156 例 (infliximab 80 例、etanercept 76 例) を対象として、開始時および最終経過観察時における疾患活動性 (DAS28-CRP)、膝関節炎の有無、膝関節の X 線評価 Larsen grade (LG) と、コンピューターレントゲン計測支援ソフト KOACAD (Oka et al.2008、最小計測可能幅 0.15mm) による関節列隙計測を行った。人工膝関節置換術 (TKA) を endpoint とした膝関節生存を Kaplan-Meier 法を用いて算出

した。また、観察期間から、関節裂隙狭小化の yearly progression を算出した。

## 2) 軟骨破壊、関節炎に関するバイオマーカーの開発

名古屋大学整形外科にて治療中の関節リウマチ患者から、説明と、同意を得て、血液サンプルを採取し、血清を分離し、-80℃で保存した。それぞれの患者について年齢、性、罹病期間、手術歴、腫脹、疼痛関節数、CRP、ESR、MMP-3 の炎症マーカー、疾患活動性指標 DAS28-CRP、ESR を計算した。軟骨破壊マーカーとして共同研究者 Dr. Poole、Mort らにより開発された II 型コラーゲンの collagenase、cathepsin K によるそれぞれの特異的切断端 (C2C、C1、2K) に対する抗体を用いた ELISA により (Poole et al. J Immunol Methods 2004, Mort et al. Am J pathol 2008)、それぞれの血中濃度を計測した。

(倫理面への配慮)

治療に対する介入研究ではなく、観察研究であり、倫理的な問題はないと考えられる。また、個人情報 は 厳重に管理されている。

## C. 研究結果

### 1) 膝関節破壊抑制効果について

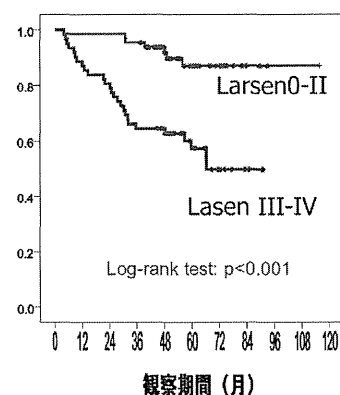
治療開始年齢 52.4 歳、罹病期間 11.2 年、DAS28-CRP 5.20、観察期間は平均 62 ヶ月 (37-115 ヶ月) であった。膝関節生存については 95% 追跡可能であった。膝関節炎は、141 関節にあり (有群)、130 膝は無症状であった (無群)。有群で開始時有意に疾患活動性は高かった (DAS28-CRP 有群 5.21 vs 無群 4.96 p=0.03)。開始時レントゲン評価について、49% は、すでに LG III-IV であった (表 1)。

表 1: 開始時レントゲン評価 (Larsen grade)

X-p 評価 (Larsen)	膝症状			
	なし	(%)	あり	(%)
0	17	21.0	6	4.6
I	41	50.6	26	19.8
II	22	27.2	35	26.7
III	1	1.0	39	29.8
IV	0	0	25	19.1
total	81	100	131	100

無群で 1 膝、有群で 34 膝 TKA が施行された。LG III-IV 群の膝生存率は 5 年で約 60%、開始時 LG0-II は約 10% であった (p<0.001、手術までの平均観察期間はそれぞれ 17.9 ヶ月、34.8 ヶ月) (図 1)。TKA された膝の 77% (27/35 例) は開始時すでに LG III-IV であった。

図 1: 開始時関節破壊と人工膝関節置換術施行の関連



開始時 X 線評価 LG0-II は 147 例で、うち 67 膝に関節炎を認めた。開始時関節炎存在群において、最終観察時、64% の関節炎が消失していた。関節炎残存群で高度の進行を認めた TKA 実施を除くと、LG では 43%、KOACAD による 0.15mm 以上の変化は 71% に認めた。一方、関節炎消失群において、LG の増悪は 13% に過ぎなかったが、KOACAD 0.15mm 以上の変化は 46% に見られ、画像上の進行例は少なくないことが確認された。

さらに、KOACAD 計測で 1mm 以上の yearly progression は関節炎残存群 69%、消失群 9% に確認された。一方、開始時、最終観察時ともに関節炎がなかった群でも 9% に確認された。(表 2)

表 2: KOACAD による関節裂隙計測

Yearly progression = 内側 and/or 外側の0.15mm以上の最小関節裂隙の狭小化の和/観察期間(年)

1) Bio開始時関節炎あり(N=38)

		KOACAD		
		<0.15mm	0.15 ≤ ≤1.0mm	1.0mm>
なし	n	14	6	2
	%	63.6%	27.3%	9.1%
あり	n	4	3	9
	%	25.0%	6.0%	69.0%

2) Bio開始時膝関節炎なし(N=43)

		<0.15mm	0.15 ≤ ≤1.0mm	1.0mm>
なし	n	24	8	3
	%	68.6%	22.9%	8.6%
あり	n	4	1	3
	%	50.0%	12.5%	37.5%

2) II 型コラーゲン分解産物の関節リウマチにおける測定意義

RA 患者 175 名について解析を行った。男性 35 名 女性 140 名 年齢 59.1 歳、罹病期間 13.1 年、疾患活動性 DAS-CRP 2.70、DAS-ESR 3.34、CRP 0.52mg/dl、ESR 27mm/h、VAS 30mm、MMP-3 146ng/ml であり、C2C 63.4 ng/ml、C1,2K 57.7 ng/ml (平均) であった。相関を見てみると C2C と C1,2K、C2C と MMP-3 に有意な相関を認めた (r=0.285 p<0.001, r=0.188 p=0.01 表 3)。

また、MMP の高い群 (上位 4 分位 >183) では C2C は有意に高値を示した (p=0.03)

表 3: 軟骨破壊マーカーと疾患活動性との相関

cartilage markers	Inflammation markers						Disease activity score			
	CRP		ESR		MMP		DASCRP		DASESR	
	r	p-value	r	p-value	r	p-value	r	p-value	r	p-value
serum C2C	0.06	0.42	0.01	0.93	0.20	0.01	0.03	0.74	-0.03	0.65
serum C2K	0.03	0.72	0.03	0.69	0.02	0.76	0.00	0.99	-0.07	0.33

D. 考察

1) 膝関節炎を有する例は高疾患活動性であり、現状では Bio 開始時に約半数が関節破壊進行例で、経時的に TKA となっていた。しかしながら、現在の手術症例の多くは、Bio 開始時すでに関節破壊は高度であり、積極的

治療介入が早期からされていなかったことが推察された。膝関節炎の無い症例は Bio 治療後に膝関節炎が出現してくる確率は低く、膝関節炎出現前、または出現早期の介入により関節破壊進行を抑制し、膝温存率は改善すると考える。

従来報告のある手足の画像評価と同様に、膝関節においても臨床的に把握される炎症持続は軟骨破壊と強く関連することが示された。より高い治療目標を考えるとき、より定量性のあるデータが求められる。KOACAD による関節裂隙の計測により Larsen grade より精密に軟骨破壊を把握することが可能と考えられた。関節炎鎮静していても、また、本研究での観察期間中、膝関節炎が認められなかった膝関節においても関節裂隙の狭小化の進行する例があり、二次的に関節破壊が進行したと考えられた。より速やかに関節炎を鎮静させる必要があると考えられた。一方、これらの症例の多くは、全身的コントロールはついており、膝関節のみの関節破壊であれば、人工関節置換術により、高い機能回復ができると思われた。

2) 軟骨の破壊は、炎症程度と持続時間の積分値により規定されていると想定している。したがって、計測時点のみの炎症マーカー、疾患活動性との相関は少ないと考えられた。MMP-3 は、本来滑膜細胞由来である点から滑膜炎の指標と考えられる細胞外基質分解酵素であるが、collagenase の活性化に関与する酵素であり C2C との相関があったと考えられる。また、炎症の継続時間と関連する要素がありうると推論した。軟骨コラーゲンの分解と関連したことは早期の炎症鎮静化が軟骨保護、すなわち長期にわたる真の関節破壊抑制に必要であることを示している可能性がある。

軟骨マトリクス分解産物により炎症自体への関与も示唆する方向は以前よりあり、これら分解産物と炎症との関連についても今後、縦断的に経時的要素を加え、検討する必要がある。

## E. 結論

膝関節炎を有する症例では、早期から積極的な薬物治療が必要である。関節炎症による軟骨破壊により、局所炎症の遷延の可能性、鎮静後の二次性変形性関節症の発生があり、積極治療の導入タイミングのみならず、炎症鎮静までの速度も治療成績のさらなる向上のための重要なポイントと思われる。

詳細なレントゲン計測による軟骨破壊の評価の可能性が示された。現在までのエビデンスに、このようなレントゲン評価、関節破壊マーカーによって、より精密に軟骨破壊を評価し、治療予後を考えることは、手術療法まで含めた、長期に渡る治療戦略を策定する上で重要である。

バイオマーカーについては、コラゲナーゼによるII型コラーゲン分解産物はMMP-3と関連し、予後予測因子となりうることが示された。また、Cathepsin K活性もRAの骨、軟骨基質破壊と関連し、collagenase活性とは異なる病態との関与を示し、両者の比較は軟骨破壊について、さらなる病態理解につながる可能性がある。

## F. 健康危険情報

観察研究でとくに本研究による健康危険情報は無い。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ishiguro N, Yamamoto K, Katayama K, Kondo M, Sumida T, Mimori T, Soen S, Nagai K, Yamaguchi T, Hara M; Igratimod-Clinical Study Group. Concomitant igratimod therapy in patients with active rheumatoid arthritis despite stable doses of methotrexate: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Mod Rheumatol*. [Epub ahead of print]
2. Hirabara S, Kojima T, Takahashi N,

Hanabayashi M, Ishiguro N. Hyaluronan inhibits TLR-4 dependent cathepsin K and matrix metalloproteinase 1 expression in human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 430(2):519-22, 2013

3. Kojima T, Yabe Y, Kaneko A, Hirano Y, Ishikawa H, Hayashi M, Miyake H, Takagi H, Kato T, Terabe K, Wanatabe T, Tsuchiya H, Kida D, Shioura T, Funahashi K, Kato D, Matsubara H, Takahashi N, Hattori Y, Asai N, Ishiguro N. Monitoring C-reactive protein levels to predict favourable clinical outcomes from tocilizumab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. [Epub ahead of print]
4. Nakajima A, Saito 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 Rheumatol*. [Epub ahead of print]
5. Takahashi N, Kojima T, Terabe K, Kaneko A, Kida D, Hirano Y, Fujibayashi T, Yabe Y, Takagi H, Oguchi T, Miyake H, Kato T, Fukaya N, Ishikawa H, Hayashi M, Tsuboi S, Kato D, Funahashi K, Matsubara H, Hattori Y, Hanabayashi M, Hirabara S, Yoshioka Y, Ishiguro N.; Clinical efficacy of abatacept in Japanese rheumatoid arthritis patients. *Mod Rheumatol*. [Epub ahead of print]
6. Kaneko A, Hirano Y, Fujibayashi T, Hattori Y, Terabe K, Kojima T, Ishiguro N.; Twenty-four-week clinical results of