

201229032A

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

末梢血単核球の網羅的遺伝子発現解析による関節リウマチに対する  
トシリズマブの薬効予測と効果発現機序の解明に関する研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 池田 啓

平成 25 (2013) 年 5 月

## 目 次

I.	総括研究報告	
	末梢血単核球の網羅的遺伝子発現解析による関節リウマチに対する トシリズマブの薬効予測と効果発現機序の解明に関する研究 -----	2
	池田 啓	
II.	分担研究報告	
1.	関節リウマチに対するトシリズマブの薬効予測のための症例蓄積と薬効判定 --	10
	高取宏昌	
2.	関節リウマチに対するトシリズマブの薬効予測と正確な薬効評価のための 関節エコーによる滑膜炎評価 -----	13
	池田 啓	
3.	末梢血単核球の網羅的遺伝子発現解析による関節リウマチに対する トシリズマブの薬効予測 -----	19
	中島裕史	
4.	末梢血単核球における定量的 PCR による関節リウマチに対する トシリズマブの薬効予測モデルの構築 -----	24
	廣瀬晃一	
5.	ヒト末梢血 CD4 陽性 T 細胞においてトシリズマブ投与で発現低下する遺伝子 X の ヘルパー T 細胞分化および関節炎における役割の解明に関する研究 -----	26
	加々美新一郎	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	28

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）

総括研究報告書

末梢血単核球の網羅的遺伝子発現解析による関節リウマチに対する  
トシリズマブの薬効予測と効果発現機序の解明に関する研究

研究代表者 池田 啓

千葉大学医学部附属病院アレルギー・膠原病内科 助教

研究要旨

本研究では、末梢血単核球（PBMC）および CD4 陽性 T 細胞の網羅的遺伝子発現解析のデータをもとに、1) トシリズマブ（TCZ）の薬効予測モデルを構築し実用化すること、2) TCZ の新規薬効評価マーカーを同定すること、3) TCZ 効果発現の分子機構を解明することを目的とした。

TCZ を新規に投与した RA 患者を 6 ヶ月間経過観察し、治療効果判定を行った。TCZ 治療前後の PBMC および CD4 陽性 T 細胞における遺伝子発現の網羅的解析を DNA アレイを用いて行い、治療効果予測マーカーおよび治療効果判定マーカーの抽出を行った。候補マーカーについては半定量的 PCR による遺伝子発現の確認を行った。さらに TCZ 有効例特異的に治療前後で CD4 陽性 T 細胞において発現の変化する遺伝子を抽出し、その CD4 陽性 T 細胞分化における役割を解析した。

TCZ を新規に投与した RA 患者 37 症例において、CDAI 変化量および医師総合評価による無効群と有効群がそれぞれ同定された。それぞれの治療効果判定基準での無効群と有効群で、治療前の PBMC における標準化シグナル値の比が 1.5 倍より大きく、Welch の t 検定にて p 値が 0.05 を下回るプローブを抽出したところ、共通する 58 プローブ 58 遺伝子が同定された。58 遺伝子中上位 10 遺伝子につき、複数検体で real-time PCR と DNA アレイのシグナル値との相関を解析し、10 遺伝子中 5 遺伝子において両者の高い相関が認められた。

TCZ 有効例特異的に治療前後で CD4 陽性 T 細胞において発現の変化するプローブが 18 個抽出された。その中で従来ヘルパー T 細胞分化に関する知見のない遺伝子 X に注目した。ヒト末梢血およびマウス脾臓由来のナイーブ CD4 陽性 T 細胞から各種条件で分化誘導した細胞では、Th17 細胞において遺伝子 X の mRNA 発現が亢進していた。マウス脾臓由来の CD4 陽性 T 細胞に bicistronic retrovirus を用いて遺伝子 X を強制発現させると、Th17 細胞分化が低下したが、Treg 細胞分化に対する影響はなかった。T 細胞特異的 STAT3 欠損マウス由来の Th17 細胞では遺伝子 X の mRNA 発現が著明に低下していた。

TCZ 投与 RA 患者の PBMC の網羅的遺伝子発現解析により薬効予測遺伝子候補が抽出され、実用化にむけ検証を行っている。薬効反映遺伝子候補のうち、遺伝子 X に関しては Th17 細胞分化への関与が明らかとなり、TCZ の効果発現の新規メカニズムの可能性がある。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

廣瀬晃一・千葉大学大学院医学研究院遺伝子制御学准教授

中島裕史・千葉大学大学院医学研究院遺伝子制御学教授

加々美新一郎・千葉大学医学部附属病院アレルギー・膠原病内科講師

高取宏昌・千葉大学医学部附属病院アレルギー・膠原病内科助教

## A. 研究目的

本研究では、末梢血単核球 (PBMC) および CD4 陽性 T 細胞の網羅的遺伝子発現解析のデータをもとに、1) トシリズマブ (TCZ) の薬効予測モデルを構築し実用化すること、2) TCZ の新規薬効評価マーカーを同定すること、3) TCZ 効果発現の分子機構を解明することを目的とした。

## B. 方法

1) 症例の組み入れ、評価項目、ならびに効果判定 (池田、高取)

TCZ を新規に投与した RA 患者 77 症例 (トレーニングコホート 37 症例、バリデーションコホート 40 症例)、またコントロールとしてメトトレキサート (MTX)、インフリキシマブ (IFX)、エタネルセプト (ETN)、アダリムマブ (ADA) ならびにアバタセプト (ABT) を新規に投与した RA 患者それぞれ 5 症例ずつを 6 ヶ月間経過観察する。治療前、治療開始 12 週後、および治療開始 24 週後の DAS (Disease Activity Score) 28、SDAI (Simplified Disease Activity Index)、CDAI (Clinical Disease Activity Index)、さらに関節超音波による 38 関節 (DAS28 関節+足関節+第 2-5 指 MTP 関節) の半定量スコア (OMERACT システム) を記録する。治療 6 ヶ月での治療効果判定を CDAI 変化量および医師総合評価により判定した。

2) 末梢血単核球 (PBMC) および CD4 陽性 T 細胞における遺伝子発現の網羅的解析 (須藤、鈴木)

TCZ (n = 37)、抗 TNF  $\alpha$  製剤 (n = 15)、および MTX (n = 5) を投与する RA 患者の、治療前、治療開始 12 週後、および治療開始 24 週後に全血 20 mL をヘパリン採血する。速やかに PBMC を分離、さらにその 3/4 を CD4 陽性 T 細胞へ純化し、それぞれの細胞における遺伝子発現を DNA アレイを用いて包括

的に解析する。DNA アレイはかずさ DNA 研究所において Agilent 社製遺伝子発現用マイクロアレイ Human Whole Genome を用いて行う。ラベル化方法は Agilent 社製 Quick Amp Labeling Kit (1color) を使用する。

3) TCZ の治療効果を予測する臨床情報ならびに予測候補遺伝子の抽出 (池田、中島)

トレーニングコホート (n = 20) の CDAI 変化量と医師総合評価による無効例と有効例において有意差のある患者背景、および TCZ 治療開始前の臨床所見、血液検査所見、ならびに関節超音波所見を、単変量解析を用いて抽出する。同様に TCZ 投与前の PBMC で発現に違いのある遺伝子を単変量解析で抽出する (t 検定  $p < 0.05$ かつ fold change  $> 1.5$ )。抽出されたプローブによりクラスター解析を行い、無効群と有効群を分離できるか否かを検討する。CDAI 変化量と医師総合評価の二種類の効果判定基準で抽出されたそれぞれ上位遺伝子 20 の中で共通するものを抽出する。

4) 定量的 PCR を用いた TCZ の薬効予測モデルの確立 (廣瀬)

3) により抽出された遺伝子の発現レベルを real-time PCR を用いて解析し、DNA アレイのシグナル値との相関を検証する。相関の高い遺伝子による薬効予測モデルを構築し、バリデーションコホート (n = 40) において薬効予測の精度を測定する。

5) 血清マーカーを用いた TCZ の薬効予測モデルの確立 (池田)

3) により抽出された遺伝子より分泌蛋白、ならびに膜蛋白を同定し、トレーニングコホートの有効群と無効群の血清における蛋白発現の差を ELISA を用いて確認する。発現の差を検出できる蛋白による予測モデルを構築し、バリデーションコホート (n = 40) において薬効予測の精度を測定する。

6) TCZ の効果発現機序の解明 (加々美、渡邊)

トレーニングコホートの CD4 陽性 T

細胞におけるTCZ-非TCZ間、有効群-無効群間での比較からTCZ有効群特異的に発現が変化する遺伝子を抽出する。バリデーションコホートにおいて、関連する表面抗原ならびにサイトカイン産生の解析を行い、IL-6シグナルの阻害とその治療効果発現との関連を解析する。さらにヒト及びマウスCD4陽性T細胞を用いたRNAiノックダウン実験、およびレトロウイルス発現法を用いた過剰発現実験にて同分子のT細胞分化における役割を検討する。さらにそれらの遺伝子欠損マウスに実験的関節炎を惹起し、その重症度およびCD4陽性T細胞分化を解析する。

#### 7) 新規薬効評価マーカーの同定 (池田、加々美)

全症例において、CDAI/超音波総ワードプラスコアと同時に採取したPBMC/CD4陽性T細胞での発現が相関する遺伝子を抽出する。また有効群と無効群の間で、投与12週での発現の変化の差が大きい遺伝子を抽出する。これらを発現量、あるいは分泌蛋白、膜蛋白で絞り込み、定量的PCRあるいはELISAで発現を確認する。治療12週でのSRM (standardized response mean)、あるいは52週での総シャープスコアとの相関を解析することにより、新規薬効評価マーカーとしての有用性を検討する。

#### C. 結果

TCZ 治療開始 6 ヶ月後、CDAI カテゴリ変化による無効群 (n=4) と有効群 (n=29)、また医師総合評価による無効群 (n=6) と有効群 (n=30) がそれぞれ同定された。それぞれの治療効果判定基準での無効群と有効群で t 検定にて p 値の低い遺伝子を抽出したところ、共通する 58 遺伝子が同定された。同定された 58 遺伝子を用いたクラスター解析では、いずれの効果判定方法でも無効群 3 症例が異なる発現パターンとして分離された。58 遺伝子中 10 遺伝子につき、複数検体で real-time PCR と DNA アレイのシグナル値との相関を解析し、10 遺

子中 5 遺伝子において両者の高い相関が認められた。

TCZ 投与症例およびコントロール薬剤投与症例の有効例において、末梢血 CD4 陽性 T 細胞の DNA アレイ解析で治療後 12 週で有意にシグナル値の変動するプローブをそれぞれ上位 100 個ずつ抽出した。その中で TCZ 特異的に発現が変動している遺伝子が 18 個抽出され、17 遺伝子は TCZ により発現が低下する遺伝子であった。その中で従来ヘルパー T 細胞分化に関する知見のない遺伝子 X に注目した。

ヒト末梢血およびマウス脾臓由来のナイーブ CD4 陽性 T 細胞から各種条件で分化誘導した細胞では、Th17 細胞において遺伝子 X の mRNA 発現が亢進していた。マウス脾臓由来の CD4 陽性 T 細胞に bicistronic retrovirus を用いて遺伝子 X を強制発現させると、Th17 細胞分化が低下したが、Treg 細胞分化に対する影響はなかった。T 細胞特異的 STAT3 欠損マウス由来の Th17 細胞では遺伝子 X の mRNA 発現が著明に低下していた (論文投稿中)。

#### D. 考察

ヒト化抗 IL-6 受容体抗体である TCZ は RA に対して高い臨床効果が示されているが、その一方効果発現が比較的遅く、有効な薬効予測法の確立が期待されている。RA では単球/マクロファージの産生するサイトカインが病態に深く関わることが知られているが、近年 RA の病態における Th17 細胞の重要性が示され、IL-6 は Th17 細胞分化に重要な役割をはたし、TCZ の効果には CD4 陽性 T 細胞の分化も深く関与していることが示唆される。これまでの RA における DNA アレイ解析の多くは全血を用いたものであり、我々の用いた PBMC/CD4 陽性 T 細胞での網羅的遺伝子解析では、より RA の病態形成に関わる遺伝子が抽出されることが期待される。

TCZ 投与患者では治療効果の有無に関わらず殆どの症例で炎症反応の著明な

低下を認めるため、治療効果判定方法は炎症反応を含む DAS28 や SDAI ではなく CDAI および医師総合評価を選択した。両者の評価は殆どの症例で共通しており、また関節超音波の結果ともほぼ一致していたため、信頼性の高い効果判定がなされたと考えられる。今回 PBMC により抽出された 17 遺伝子は実際に無効群を明瞭に分離できるものであり（特願 2011-156921）、バリデーションコホートによる確認ならびに実用化が強く期待される。

今回 CD4 陽性 T 細胞において TCZ 特異的に発現の変動する遺伝子として抽出された 18 遺伝子の中には IL-6 により発現が誘導され Th17 細胞分化に関わることが知られている Bcl-3 が含まれ、機能的な抽出がなされていることが示唆された。前述の通り TCZ では炎症反応蛋白による治療効果判定が困難であり、他の客観的血液マーカーに対する期待も大きい。上記抽出遺伝子の解析により新規薬効評価マーカーが同定されることが期待される。

また今回同定されたヘルパー T 細胞分化における役割が未知である遺伝子 X は Th17 分化に伴って STAT3 依存性に発現し、Th17 細胞分化を抑制する負のフィードバック機構として働いていることが示唆された。本遺伝子に関わる経路は、RA のより特異的な新規治療ターゲットの候補と考えられた。

## E. 結論

TCZ 投与 RA 患者の末梢血単核球の網羅的遺伝子発現解析により薬効予測遺伝子候補ならびに薬効反映遺伝子候補が抽出された。薬効反映遺伝子候補のうち、遺伝子 X に関しては既に Th17 細胞分化への関与を明らかにしている。次年度以降の追加の検証とより詳細な解析により、TCZ の薬効予測の実用化、新規薬効評価マーカーの同定、TCZ 効果発現の分子機構の解明が期待される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

英文

1. 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.
2. Tanaka S, Ikeda K, Uchiyama K, Iwamoto T, Sanayama Y, Okubo A, Nakagomi D, Takahashi K, Yokota M, Suto A, Suzuki K, Nakajima H. [<sup>18</sup>F] FDG uptake in proximal muscles assessed by PET/CT reflects both global and local muscular inflammation and provides useful information in the management of patients with polymyositis/dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)*, in press.
3. Ikeda K, Seto Y, Ohno S, Sakamoto F, Henmi M, Fukae J, et al. Analysis of the factors which influence the measurement of synovial power Doppler signals with semi-quantitative and quantitative measures - a pilot multicenter exercise in Japan. *Mod Rheumatol* 2013, in press.
4. Kobayashi Y, Iwata A, Suzuki K, Suto A, Kawashima S, Saito Y, Owada T, Kobayashi M, Watanabe N, Nakajima H. B and T lymphocyte attenuator inhibits LPS-induced endotoxic shock by suppressing Toll-like receptor 4 signaling in innate immune cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(13):5121-6.

5. Nakagomi D, Suzuki K, Hosokawa J, Kobayashi Y, Suto A, Takatori H, Watanabe N, Matsue H, Murphy TL, Murphy KM, Shimada S, Nakajima H. Therapeutic potential of B and T lymphocyte attenuator expressed on CD8+ T cells for contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol.* 2013;133(3):702-11.
  6. Nakagomi D, Suzuki K, Nakajima H. Critical roles of I $\kappa$ B kinase subunits in mast cell degranulation. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012;158 Suppl 1:92-5.
  7. Nakagomi D, Ikeda K, Kawashima H, Kobayashi Y, Suto A, Nakajima H. Bucillamine-induced yellow nail in Japanese patients with rheumatoid arthritis: two case reports and a review of 36 reported cases. *Rheumatol Int.* 2013;33(3):793-7.
  8. Iwata A, Ikeda K, Hirose K, Takatori H, Takahashi K, Sanayama Y, Tanaka S, Suto A, Nakajima H. Pre-dinner administration increases the efficacy of proton pump inhibitors on refractory GERD symptoms in connective tissue disease patients. *Mod Rheumatol.* 2013;23(2):357-64.
  9. Nakagomi D, Ikeda K, Okubo A, Iwamoto T, Sanayama Y, Takahashi K, Yamagata M, Takatori H, Suzuki K, Takabayashi K, Nakajima H. Ultrasound can improve the accuracy of the 2010 ACR/EULAR classification criteria for rheumatoid arthritis to predict methotrexate requirement. *Arthritis Rheum.* 2013;65(4):890-8.
  10. Iwamoto T, Ikeda K, Nakajima H, Suga M, Kumano K, Hiraguri M, Imaeda T, Harada D, Shiga Y, Oku R, Nakanishi K. Extracorporeal membrane oxygenation is indicated for status asthmaticus refractory to maximal conventional therapy. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2013;110(4):300-1.
  11. Tsutsuki H, Yahiro K, Suzuki K, Suto A, Ogura K, Nagasawa S, Ihara H, Shimizu T, Nakajima H, Moss J, Noda M. Subtilase cytotoxin enhances Escherichia coli survival in macrophages by suppression of nitric oxide production through the inhibition of NF- $\kappa$ B activation. *Infect Immun.* 2012;80(11):3939-51.
  12. Wakefield R, D'Agostino MA, Naredo E, Buch M, Iagnocco A, Terslev L, Ostergaard M, Grassi W, Dougados M, Burmester G, Saleem B, De Miguel E, Estrach C, Ikeda K, Gutierrez M, Thompson R, Emery P. After Treat-to-Target: Can a targeted ultrasound initiative improve RA outcomes? *Ann Rheum Dis.* 2012;71(6):799-803.
  13. Wakefield R, D'Agostino MA, Naredo E, Buch M, Iagnocco A, Terslev L, Ostergaard M, Grassi W, Dougados M, Burmester G, Saleem B, De Miguel E, Estrach C, Ikeda K, Gutierrez M, Thompson R, Emery P. After Treat-to-Target: Can a targeted ultrasound initiative improve RA outcomes? *Postgrad Med J.* 2012;88(1042):482-6.
  14. Saito Y, Kagami S, Kawashima S, Takahashi K, Ikeda K, Hirose K, Oshitari T, Yamamoto S, Okamoto Y, Nakajima H. Roles of CRTH2+ CD4+ T cells in immunoglobulin G4-related lacrimal gland enlargement. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012;158 Suppl 1:42-6.
  15. Kawashima S, Hirose K, Iwata A, Takahashi K, Ohkubo A, Tamachi T, Ikeda K, Kagami SI, Nakajima H.  $\beta$ -Glucan Curdlan Induces IL-10-Producing CD4+ T Cells and Inhibits Allergic Airway Inflammation. *J Immunol.* 2012;189(12):5713-21.
- 和文
1. 池田啓, 中込大樹, 中島裕史. 筋骨格超音波による関節リウマチ診断の精度の向上 *MEDIX* 2013; 58: 28-33.
  2. 山形美絵子, 池田 啓, 中島裕史. 血管炎における IL-17 産生ヘルパーT細胞

- (Th17 細胞) の役割 *日本臨床* 2013; 71(Suppl.1): 582-7.
3. 池田啓, 眞山快枝. 関節リウマチの診断と治療における超音波検査の活用 *Medical Practice* 2013; 30(4): 625-33.
  4. 森 雅裕, 池田 啓. *今日の神経疾患治療指針第2版* 6 自己免疫性疾患・傍腫瘍性症候群 全身性強皮症 医学書院, 2013.
  5. 池田 啓. *関節リウマチ治療実践バイブル* (編集: 竹内 勤) 第II章, 7c CT, 7d 関節エコー 南江堂, 2013.
  6. 池田 啓 訳. *EULAR リウマチ性疾患超音波検査テキスト* (原著: Richard Wakefield, Maria Antonietta D' Agostino 監訳: 大野 滋) 第1-5, 22, 26章 メディカルサイエンスインターナショナル, 2012.
  7. 池田 啓. 関節エコーによる関節リウマチの疾患活動性モニタリング. *リウマチ科* 2012; 48(5): 509-13.
  8. 池田啓. 関節リウマチ診療において構造的寛解の達成に画像的寛解は必要か? *臨床リウマチ* 2012; 24: 314-9.
  9. 池田啓, 中島裕史. サイトカインと病態: アレルギー. *臨床免疫・アレルギー科* 2012; 57: S715-20
  10. 池田啓, 中込大樹, 中島裕史. 関節リウマチ診療における関節エコーの有用性. *治療* 2012; 94: 214-20
  11. 池田啓. 生物学的製剤使用下での画像診断の有用性. *最新医学* 2012; 67: 226-31.
  12. 池田啓. リウマチ診療における超音波検査の有用性. *新医療* 2012; 39: 6.

#### 国際学会

1. Ikeda K, Nakagomi D, Sanayama Y, Okubo A, Iwamoto T, Takahashi K, Nakajima H. The optimization of the management of rheumatoid arthritis using musculoskeletal ultrasound. *Japan College of Rheumatology The 22<sup>nd</sup> International Rheumatology Symposium*. Apr 2013,

Kyoto, Japan.

2. Ikeda K, Nakagomi D, Sanayama Y, Yamagata M, Okubo A, Iwamoto T, Kawashima H, Takahashi K, Nakajima H. Time-integrated synovitis activity assessed by power doppler ultrasound significantly correlates with radiographic progression in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate alone but not in those treated with TNF antagonists. *2012 American College of Rheumatology Annual Meeting*. Nov 2012, Washington DC, USA.
3. Nakagomi D, Ikeda K, Okubo A, Iwamoto T, Sanayama Y, Takatori H, Suzuki K, Takabayashi K, Nakajima H. Ultrasonographic assessment of synovitis improves the accuracy of 2010 American College of Rheumatology/ European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis to predict development of a methotrexate-requiring disease. *2012 European League Against Rheumatism Congress*. Jun 2012, Berlin, Germany.
4. Takahashi K, Kawashima S, Niwa Y, Iwata A, Kobayashi Y, Kagami S, Suto A, Hirose K, Watanabe N, Nakayama T, Nakajima H. (2012) IL-22 attenuates IL-25 production by lung epithelial cells and inhibits antigen-induced eosinophilic airway inflammation. *99<sup>th</sup> Annual Meeting of The American Association of Immunologists*. 2012, Boston, USA
5. Ikeda K, Makita S, Hosokawa J, Yamagata M, Nakagomi D, Nakajima H. Optic neuropathy associated with Churg-Strauss syndrome: a report of two cases. *The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012*. Mar 2012, Tokyo, Japan

#### 国内学会

1. 田中 繁, 池田 啓, 岩本太郎, 眞山快枝, 大久保綾子, 中込大樹, 横田雅也, 高橋健太郎, 須藤 明, 鈴木浩太



- 郎, 中島裕史. 多発筋炎/皮膚筋炎患者における<sup>[18F]</sup>FDG-PET/CTの診断および臨床評価における有用性の検討. **第57回日本リウマチ学会総会・学術集会**. 2013年4月, 京都.
2. 山中 寿, 瀬戸洋平, 長岡章平, 西岡雄一, 原岡ひとみ, 笠間 毅, 齋藤和義, 池田 啓, 植木幸孝, 宗像靖彦, 西成田 眞, 天野宏一, 長嶺隆二, 縄田泰史, 田村直人, 金物壽久, 難波大夫, 富田哲也, 田中良哉, 竹内 勤, ENCOURAGE Studyグループ. 中等度活動性を有する関節リウマチ患者におけるエタネルセプト療法の有効性の検討 - ENCOURAGE Study (ENBREL Outcome in RA patients for Growing Evidence): 第1期(1年投与)の成績 -. **第57回日本リウマチ学会総会・学術集会**. 2013年4月, 京都.
  3. 中込大樹, 池田 啓, 眞山快枝, 小林芳久, 神戸直智, 松江弘之, 中島裕史. 超音波により滑膜病変の病勢評価を行った多中心性細網組織球症 (Multicentric reticulohistiocytosis) の1例. **第57回日本リウマチ学会総会・学術集会**. 2013年4月, 京都.
  4. 池田 啓, 中込大樹, 眞山快枝, 山形美絵子, 大久保綾子, 岩本太郎, 川島広稔, 高橋健太郎, 中島裕史. 滑膜パワー Doppler プラシグナルの時間累積値はメソトレキサート単独治療下では X 線スコアの進行と有意に相関するが TNF 阻害薬治療下では相関しない. **第57回日本リウマチ学会総会・学術集会**. 2013年4月, 京都.
  5. 池田啓, 中込大樹, 眞山快枝, 山形美絵子, 大久保綾子, 岩本太郎, 川島広稔, 高橋健太郎, 中島裕史. シンポジウム S10「RAの寛解基準」臨床的寛解基準を補完する関節エコーの活用. **第57回日本リウマチ学会総会・学術集会**. 2013年4月, 京都.
  6. 池田啓. 教育研修講演 関節リウマチの診断と疾患活動性モニタリングにおける関節エコーの活用. **第57回日本リウマチ学会総会・学術集会**. 2013年4月, 京都.
  7. 池田啓. ランチョンセミナー 関節リウマチの診断における関節エコーの活用. **第57回日本リウマチ学会総会・学術集会**. 2013年4月, 京都.
  8. 池田啓. Meet the Expert リウマチ性疾患における関節エコーによる滑膜評価の実践. **第57回日本リウマチ学会総会・学術集会**. 2013年4月, 京都.
  9. 池田啓. モーニングセミナー 関節エコーを用いた関節リウマチ診療の最適化. **第45回九州リウマチ学会**. 2013年3月, 沖縄.
  10. 池田啓. ランチョンセミナー リウマチ診療における超音波検査の有用性. **第48回日本超音波医学会中国地方会学術集会**. 2012年9月, 広島.
  11. 池田啓. ハンズオンセッション リウマチ診療における超音波検査. **第85回日本超音波医学会学術集会**. 2012年5月, 東京.
  12. 牧田荘平, 鈴木快枝, 池田啓, 細川淳一, 山形美絵子, 岩本太郎, 大久保綾子, 小林芳久, 中込大樹, 渡邊紀彦, 中島裕史. 全身性エリテマトーデスを合併した関節リウマチ 3 症例に対するアバタセプトの有効性の検討. **第56回日本リウマチ学会総会・学術集会**. 2012年4月, 東京.
  13. 細川淳一, 鈴木浩太郎, 中込大樹, 岩本太郎, 池田啓, 中島裕史. 中枢神経ループス患者における脳脊髄液中 BAFF 値の検討. **第56回日本リウマチ学会総会・学術集会**. 2012年4月, 東京.
  14. 中込大樹, 池田啓, 細川淳一, 山形美絵子, 大久保綾子, 岩本太郎, 鈴木快枝, 川島広稔, 星野東明, 高橋健太郎, 若新英史, 高取宏昌, 鈴木浩太郎, 高林克日己, 中島裕史. 超音波滑膜評価による2010年ACR/EULAR関節リウマチ分類基準の精度の向上. **第56回日本リウマチ学会総会・学術集会**. 2012年4月, 東京.

15. 松村竜太郎, 鈴木智, 杉山隆夫, 北靖彦, 海辺剛志, 中川典明, 李泰鉉, 池田啓, 平栗雅樹, 縄田泰史. 生物学的製剤使用中の関節リウマチ患者は経済面から生物学的製剤の費用、効果をどう評価しているか? *第56回日本リウマチ学会総会・学術集会*. 2012年4月, 東京.
  16. 池田啓. 関節エコーによる滑膜炎評価方法と関節リウマチ診療応用の国際的な流れ. *第56回日本リウマチ学会総会・学術集会, イブニングセミナー「日本における関節エコーの可能性 -RAの早期診断・治療に向けて-*」. 2012年4月, 東京.
  17. 池田啓. 関節エコーによる関節リウマチの滑膜炎評価 -日本リウマチ学会関節エコー撮像ガイドラインの活用-. *第56回日本リウマチ学会総会・学術集会, ハンズオンセミナー*. 2012年4月, 東京.
  18. 池田啓. リウマチ性疾患における関節エコーによる滑膜評価の実践. *第56回日本リウマチ学会総会・学術集会, Meet the Expert*. 2012年4月26日, 東京.
  19. 山形美絵子, 田中繁, 中込大樹, 岩田有史, 池田啓, 須藤明, 加々美新一郎, 廣瀬晃一, 中島裕史. 膠原病治療中に生じたノカルジア感染症の臨床的検討. *第56回日本リウマチ学会総会・学術集会*. 2012年4月, 東京.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
「関節リウマチに対する抗 IL-6 受容体抗体療法の有効性の予測方法」特願 2011-156921
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）

末梢血単核球の網羅的遺伝子発現解析による関節リウマチに対する  
トシリズマブの薬効予測と効果発現機序の解明に関する研究

分担研究報告書 1

関節リウマチに対するトシリズマブの薬効予測のための症例蓄積と薬効判定

研究分担者 高取 宏昌

千葉大学医学部附属病院アレルギー・膠原病内科 助教

#### 研究要旨

本研究では RA に対する TCZ の薬効予測方法を確立し、効果発現機序を解明するため、TCZ およびコントロール薬剤投与症例を集積し効果判定を行うことを目的とした。

千葉県内の 7 施設において TCZ を新規に投与した RA 患者 37 症例、またコントロールとしてメトトレキサート (MTX)、インフリキシマブ (IFX)、エタネルセプト (ETN)、アダリムマブ (ADA) ならびにアバタセプト (ABT) を新規に投与した RA 患者それぞれ 5 症例ずつが 6 ヶ月間経過観察され、CDAI (Clinical Disease Activity Index) および医師総合評価により、それぞれ無効、有効が判定された。その結果、TCZ 投与症例では、CDAI カテゴリ変化による無効群 (n = 4) と有効群 (n = 29)、また医師総合評価による無効群 (n = 6) と有効群 (n = 30) がそれぞれ同定された。

これらをトレーニングコホートとして用い、同時に収集する臨床情報、画像情報、遺伝子発現情報との関連を解析することにより TCZ 特異的な薬効予測モデルを構築し効果発現機序を解明することが可能と考えられる。

#### A. 研究目的

関節リウマチ (RA) は滑膜炎と関節破壊を特徴し、有効な治療介入なしでの身体機能予後は不良である。近年、生物学的製剤の臨床応用により治療の選択肢は増えたが、その有効性には著しい個人差があり、治療戦略の最適化が急務である。

トシリズマブ (TCZ) はヒト化抗 IL-6 受容体抗体であり、高い臨床効果が示されている。しかしながら TCZ の効果発現は比較的遅く、治療前の有効性予測が他の製剤と比して特に有用と考えられる。

また IL-6 は、近年 RA の病態における重要性が明らかとなった IL-17 を産生する Th17 細胞の分化において重要な役割

を果たしているが、TCZ の RA に対する効果発現の詳細な機序は未だ不明である。IL-6 は肝臓での急性炎症蛋白の誘導における主要なサイトカインでもあり、TCZ 投与患者では効果の有無に関わらず血中急性炎症蛋白はほぼ陰性となる。TCZ の詳細な効果発現機序を解明し、特異的な治療効果反映マーカーを同定することの臨床的意義は大きい。

本研究では RA に対する TCZ の薬効予測方法を確立し、効果発現機序を解明するため、TCZ およびコントロール薬剤投与症例を集積し効果判定を行うことを目的とした。

## B. 方法

TCZ を新規に投与した RA 患者 37 症例、またコントロールとしてメトトレキサート (MTX)、インフリキシマブ (IFX)、エタネルセプト (ETN)、アダリムマブ (ADA) ならびにアバタセプト (ABT) を新規に投与した RA 患者それぞれ 5 症例ずつを 6 ヶ月間経過観察した。治療および経過観察は千葉県 の 7 箇所の関節リウマチ専門施設 (千葉大学医学部附属病院アレルギー・膠原病内科、国保旭中央病院、松戸市立病院、国立病院機構千葉東病院、済生会習志野病院、国立病院機構下志津病院、成田赤十字病院) で行われた。

治療 6 ヶ月での治療効果判定には、CDAI (Clinical Disease Activity Index) および医師総合評価 (無効、有効、著効) を使用した。CDAI はさらにカテゴリ (寛解、低疾患活動性、中等度疾患活動性、高疾患活動性) の変化により、無効 (カテゴリ変化なし)、有効 (1 カテゴリの変化)、著効 (2 カテゴリ以上の変化) と判定された。

## C. 結果

TCZ 治療開始 6 ヶ月後、CDAI カテゴリ変化による無効群 (n = 4) と有効群 (n = 29)、また医師総合評価による無効群 (n = 6) と有効群 (n = 30) がそれぞれ同定された。同様に MTX では CDAI カテゴリ変化による無効群 (n = 2) と有効群 (n = 3)、また医師総合評価による無効群 (n = 2) と有効群 (n = 3)、IFX では CDAI カテゴリ変化による無効群 (n = 1) と有効群 (n = 3)、また医師総合評価による無効群 (n = 1) と有効群 (n = 4)、ETN では CDAI カテゴリ変化による無効群 (n = 1) と有効群 (n = 3)、また医師総合評価による無効群 (n = 1) と有効群 (n = 4)、ADA では CDAI カテゴリ変化による無効群 (n = 1) と有効群 (n = 4)、また医師総合評価による無効群 (n = 1) と有効群 (n = 4)、ABT では CDAI 変化量による無効群 (n = 0) と有効群 (n = 3)、また医師総合評価による無効群 (n = 0) と有効群 (n = 4)、がそれぞれ同定された。

## D. 考察

TCZ 投与患者では治療効果の有無に関わらず殆どの症例で炎症反応の著明な低下を認めるため、治療効果判定方法は炎症反応を含む DAS (Disease Activity Score) や SDAI (Simplified Disease Activity Index) ではなく CDAI および医師総合評価が選択された。感染の合併等により 7 症例にて 6 ヶ月後の CDAI が評価困難であったが、残りの症例で抽出されたプローブの多くが医師総合評価を用いた場合と共通しており、信頼性の高い効果判定がなされたと考えられる。

これらをトレーニングコホートとして用い、同時に収集する臨床情報、画像情報、遺伝子発現情報との関連を解析することにより TCZ 特異的な薬効予測モデルを構築し効果発現機序を解明することが可能と考えられる。

## E. 結論

TCZ およびコントロール薬剤を投与された RA 症例の無効例と有効例の臨床判断がされ、TCZ 特異的な薬効予測モデルの構築、効果発現機序解明のための基盤が確立された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

英文

1. Nakagomi D, Suzuki K, Hosokawa J, Kobayashi Y, Suto A, Takatori H, Watanabe N, Matsue H, Murphy TL, Murphy KM, Shimada S, Nakajima H. Therapeutic potential of B and T lymphocyte attenuator expressed on CD8+ T cells for contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol.* 2013;133(3):702-11.
2. Iwata A, Ikeda K, Hirose K, Takatori H, Takahashi K, Sanayama Y, Tanaka S, Suto A, Nakajima H. Pre-dinner administration increases the efficacy of

proton pump inhibitors on refractory GERD symptoms in connective tissue disease patients. *Mod Rheumatol.* 2013;23(2):357-64.

3. Nakagomi D, Ikeda K, Okubo A, Iwamoto T, Sanayama Y, Takahashi K, Yamagata M, Takatori H, Suzuki K, Takabayashi K, Nakajima H. Ultrasound can improve the accuracy of the 2010 ACR/EULAR classification criteria for rheumatoid arthritis to predict methotrexate requirement. *Arthritis Rheum.* 2013;65(4):890-8.

#### 国際学会

1. Nakagomi D, Ikeda K, Okubo A, Iwamoto T, Sanayama Y, Takatori H, Suzuki K, Takabayashi K, Nakajima H. Ultrasonographic assessment of synovitis improves the accuracy of 2010 American College of Rheumatology/ European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis to predict

development of a methotrexate-requiring disease. *2012 European League Against Rheumatism Congress.* Jun 2012, Berlin, Germany.

#### 国内学会

1. 中込大樹, 池田啓, 細川淳一, 山形美絵子, 大久保綾子, 岩本太郎, 鈴木快枝, 川島広稔, 星野東明, 高橋健太郎, 若新英史, 高取宏昌, 鈴木浩太郎, 高林克日己, 中島裕史. 超音波滑膜評価による2010年ACR/EULAR関節リウマチ分類基準の精度の向上. *第56回日本リウマチ学会総会・学術集会.* 2012年4月, 東京.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）

末梢血単核球の網羅的遺伝子発現解析による関節リウマチに対する  
トシリズマブの薬効予測と効果発現機序の解明に関する研究

分担研究報告書 2

関節リウマチに対するトシリズマブの薬効予測と正確な薬効評価のための  
関節エコーによる滑膜炎評価

研究分担者 池田 啓

千葉大学医学部附属病院アレルギー・膠原病内科 助教

#### 研究要旨

トシリズマブ（TCZ）投与関節リウマチ（RA）患者では効果の有無に関わらず血中急性炎症蛋白はほぼ陰性となり、正確な新規薬効評価方法が必要である。本研究では TCZ 投与前後の RA 患者の滑膜炎を筋骨格超音波（関節エコー）で評価し、それ自体の TCZ 薬効評価における有用性を検証し、他のバイオマーカー抽出のための指標とすることを目的とした。

TCZ を新規に投与した RA 患者 37 症例、またコントロールとしてメトトレキサート（MTX）、インフリキシマブ（IFX）、エタネルセプト（ETN）、アダリムマブ（ADA）ならびにアバタセプト（ABT）を新規に投与した RA 患者それぞれ 5 症例ずつを 6 ヶ月間経過観察し、網羅的な超音波検査を施行、各関節毎にグレースケール（GS）およびパワードプラ（PD）につき 0-3 の半定量スコアを記録した。

全 62 症例において、治療開始 0 週では総 GS スコアおよび総 PD スコアの平均（標準偏差）はそれぞれ 24.2 (9.4) および 9.8(4.1) であった。TCZ 治療開始 6 週では総 GS スコアおよび総 PD スコアの平均（標準偏差）はそれぞれ 15.0(5.4) および 4.7(1.9) であった。

TCZ およびコントロール薬剤を投与された RA 症例の網羅的な超音波画像所見が記録された。これにより TCZ の薬効予測の画像評価基盤が確立され、またおよび薬効反映遺伝子同定のための正確な滑膜炎情報が収集された。

#### A. 研究目的

IL-6 は肝臓での急性炎症蛋白の誘導における主要なサイトカインであり、トシリズマブ（TCZ）投与関節リウマチ（RA）患者では効果の有無に関わらず血中急性炎症蛋白はほぼ陰性となり、正確な新規薬効評価方法が必要である。本研究では TCZ 投与前後の RA 患者の滑膜炎を筋骨格超音波（関節エコー）で評価し、それ自体の TCZ 薬効評価における有用性を検証し、他のバイオマーカー抽出のための指標とすることを目的とした。

#### B. 方法

TCZ を新規に投与した RA 患者 37 症例、またコントロールとしてメトトレキサート（MTX）、インフリキシマブ（IFX）、エタネルセプト（ETN）、アダリムマブ（ADA）ならびにアバタセプト（ABT）を新規に投与した RA 患者それぞれ 5 症例ずつを 6 ヶ月間経過観察し、0 週、12 週、24 週の時点で 38 関節（DAS28 関節+足関節+第 2-5 指 MTP 関節）に超音波検査を施行した。評価は OMERACT によるスコアリングシステムを用い、各関節毎にグレース

ケール (GS) およびパワードプラ (PD) につき 0-3 の半定量スコアが記録した。また各関節の代表的画像が全て保存した。

上記結果を用いて TCZ 有効群と無効群において有意に差のある超音波所見を抽出した。また DNA アレイ解析により同定された新規薬効反映マーカーと総 PD スコアの相関を検証した。

### C. 結果

全 62 症例において、治療開始 0 週では総 GS スコアおよび総 PD スコアの平均 (標準偏差) はそれぞれ 24.2 (9.4) および 9.8 (4.1) であった。TCZ 治療開始 6 週では総 GS スコアおよび総 PD スコアの平均 (標準偏差) はそれぞれ 15.0 (5.4) および 4.7 (1.9) であった。

### D. 考察

超音波画像による滑膜炎の分布と性状の情報は診察所見よりも遥かに正確であり、薬効予測因子ならびに薬効反映マーカーの両者になり得る可能性がある。同時に収集された薬効情報との関連を解析することにより超音波検査による TCZ 薬効予測所見が同定され、また網羅的遺伝子発現情報との関連を解析することにより、TCZ 投与下での滑膜炎の活動性関連遺伝子が同定されることが期待される。

### E. 結論

TCZ およびコントロール薬剤を投与された RA 症例の網羅的な超音波画像所見が記録された。これにより TCZ の薬効予測の画像評価基盤が確立され、またおよび薬効反映遺伝子同定のための正確な滑膜炎情報が収集された。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

英文

1. 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.

2. Tanaka S, Ikeda K, Uchiyama K, Iwamoto T, Sanayama Y, Okubo A, Nakagomi D, Takahashi K, Yokota M, Suto A, Suzuki K, Nakajima H. [<sup>18</sup>F] FDG uptake in proximal muscles assessed by PET/CT reflects both global and local muscular inflammation and provides useful information in the management of patients with polymyositis/dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)*, in press.
3. Ikeda K, Seto Y, Ohno S, Sakamoto F, Henmi M, Fukae J, et al. Analysis of the factors which influence the measurement of synovial power Doppler signals with semi-quantitative and quantitative measures - a pilot multicenter exercise in Japan. *Mod Rheumatol* 2013, in press.
4. Nakagomi D, Ikeda K, Kawashima H, Kobayashi Y, Suto A, Nakajima H. Bucillamine-induced yellow nail in Japanese patients with rheumatoid arthritis: two case reports and a review of 36 reported cases. *Rheumatol Int.* 2013;33(3):793-7.
5. Iwata A, Ikeda K, Hirose K, Takatori H, Takahashi K, Sanayama Y, Tanaka S, Suto A, Nakajima H. Pre-dinner administration increases the efficacy of proton pump inhibitors on refractory GERD symptoms in connective tissue

- disease patients. *Mod Rheumatol*. 2013;23(2):357-64.
6. Nakagomi D, Ikeda K, Okubo A, Iwamoto T, Sanayama Y, Takahashi K, Yamagata M, Takatori H, Suzuki K, Takabayashi K, Nakajima H. Ultrasound can improve the accuracy of the 2010 ACR/EULAR classification criteria for rheumatoid arthritis to predict methotrexate requirement. *Arthritis Rheum*. 2013;65(4):890-8.
  7. Iwamoto T, Ikeda K, Nakajima H, Suga M, Kumano K, Hiraguri M, Imaeda T, Harada D, Shiga Y, Oku R, Nakanishi K. Extracorporeal membrane oxygenation is indicated for status asthmaticus refractory to maximal conventional therapy. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2013;110(4):300-1.
  8. Wakefield R, D'Agostino MA, Naredo E, Buch M, Iagnocco A, Terslev L, Ostergaard M, Grassi W, Dougados M, Burmester G, Saleem B, De Miguel E, Estrach C, Ikeda K, Gutierrez M, Thompson R, Emery P. After Treat-to-Target: Can a targeted ultrasound initiative improve RA outcomes? *Ann Rheum Dis*. 2012;71(6):799-803.
  9. Wakefield R, D'Agostino MA, Naredo E, Buch M, Iagnocco A, Terslev L, Ostergaard M, Grassi W, Dougados M, Burmester G, Saleem B, De Miguel E, Estrach C, Ikeda K, Gutierrez M, Thompson R, Emery P. After Treat-to-Target: Can a targeted ultrasound initiative improve RA outcomes? *Postgrad Med J*. 2012;88(1042):482-6.
  10. Saito Y, Kagami S, Kawashima S, Takahashi K, Ikeda K, Hirose K, Oshitari T, Yamamoto S, Okamoto Y, Nakajima H. Roles of CRTH2+ CD4+ T cells in immunoglobulin G4-related lacrimal gland enlargement. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;158 Suppl 1:42-6.
  11. Kawashima S, Hirose K, Iwata A, Takahashi K, Ohkubo A, Tamachi T, Ikeda K, Kagami SI, Nakajima H.  $\beta$ -Glucan Curdlan Induces IL-10-Producing CD4+ T Cells and Inhibits Allergic Airway Inflammation. *J Immunol*. 2012;189(12):5713-21.
- 和文
1. 池田啓, 中込大樹, 中島裕史. 筋骨格超音波による関節リウマチ診断の精度の向上 *MEDIX* 2013; 58: 28-33.
  2. 山形美絵子, 池田 啓, 中島裕史. 血管炎における IL-17 産生ヘルパーT 細胞(Th17 細胞)の役割 *日本臨床* 2013; 71(Suppl. 1): 582-7.
  3. 池田啓, 眞山快枝. 関節リウマチの診断と治療における超音波検査の活用 *Medical Practice* 2013; 30(4): 625-33.
  4. 森 雅裕, 池田 啓. *今日の神経疾患治療指針第2版* 6 自己免疫性疾患・傍腫瘍性症候群 全身性強皮症 医学書院, 2013.
  5. 池田 啓. *関節リウマチ治療実践バイブル* (編集: 竹内 勤) 第II章, 7c CT, 7d 関節エコー 南江堂, 2013.
  6. 池田 啓 訳. *EULAR リウマチ性疾患超音波検査テキスト* (原著: Richard Wakefield, Maria Antonietta D' Agostino 監訳: 大野 滋) 第1-5, 22, 26 章 メディカルサイエンスインターナショナル, 2012.
  7. 池田 啓. 関節エコーによる関節リウマチの疾患活動性モニタリング. *リウマチ科* 2012; 48(5): 509-13.
  8. 池田啓. 関節リウマチ診療において構造的寛解の達成に画像的寛解は必要か? *臨床リウマチ* 2012; 24: 314-9.
  9. 池田啓, 中島裕史. サイトカインと病態: アレルギー. *臨床免疫・アレルギー科* 2012;57:S715-20
  10. 池田啓, 中込大樹, 中島裕史. 関節リウマチ診療における関節エコーの有用性. *治療* 2012; 94: 214-20



11. 池田啓. 生物学的製剤使用下での画像診断の有用性. *最新医学* 2012; 67: 226-31.
12. 池田啓. リウマチ診療における超音波検査の有用性. *新医療* 2012; 39: 6.

国際学会

1. Ikeda K, Nakagomi D, Sanayama Y, Okubo A, Iwamoto T, Takahashi K, Nakajima H. The optimization of the management of rheumatoid arthritis using musculoskeletal ultrasound. *Japan College of Rheumatology The 22<sup>nd</sup> International Rheumatology Symposium*. Apr 2013, Kyoto, Japan.
2. Ikeda K, Nakagomi D, Sanayama Y, Yamagata M, Okubo A, Iwamoto T, Kawashima H, Takahashi K, Nakajima H. Time-integrated synovitis activity assessed by power doppler ultrasound significantly correlates with radiographic progression in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate alone but not in those treated with TNF antagonists. *2012 American College of Rheumatology Annual Meeting*. Nov 2012, Washington DC, USA.
3. Nakagomi D, Ikeda K, Okubo A, Iwamoto T, Sanayama Y, Takatori H, Suzuki K, Takabayashi K, Nakajima H. Ultrasonographic assessment of synovitis improves the accuracy of 2010 American College of Rheumatology/ European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis to predict development of a methotrexate-requiring disease. *2012 European League Against Rheumatism Congress*. Jun 2012, Berlin, Germany.
4. Ikeda K, Makita S, Hosokawa J, Yamagata M, Nakagomi D, Nakajima H. Optic neuropathy associated with Churg-Strauss syndrome: a report of two cases. *The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012*.

Mar 2012, Tokyo, Japan

国内学会

1. 田中 繁, 池田 啓, 岩本太郎, 眞山快枝, 大久保綾子, 中込大樹, 横田雅也, 高橋健太郎, 須藤 明, 鈴木浩太郎, 中島裕史. 多発筋炎/皮膚筋炎患者における [<sup>18</sup>F]FDG-PET/CT の診断および臨床評価における有用性の検討. *第57回日本リウマチ学会総会・学術集会*. 2013年4月, 京都.
2. 山中 寿, 瀬戸洋平, 長岡章平, 西岡雄一, 原岡ひとみ, 笠間 毅, 齋藤和義, 池田 啓, 植木幸孝, 宗像靖彦, 西成田 眞, 天野宏一, 長嶺隆二, 縄田泰史, 田村直人, 金物壽久, 難波大夫, 富田哲也, 田中良哉, 竹内 勤, ENCOURAGE Study グループ. 中等度活動性を有する関節リウマチ患者におけるエタネルセプト療法の有効性の検討 - ENCOURAGE Study (ENBREL Outcome in RA patients for Growing Evidence): 第1期 (1年投与) の成績 -. *第57回日本リウマチ学会総会・学術集会*. 2013年4月, 京都.
3. 中込大樹, 池田 啓, 眞山快枝, 小林芳久, 神戸直智, 松江弘之, 中島裕史. 超音波により滑膜病変の病勢評価を行った多中心性細網組織球症 (Multicentric reticulohistiocytosis) の1例. *第57回日本リウマチ学会総会・学術集会*. 2013年4月, 京都.
4. 池田 啓, 中込大樹, 眞山快枝, 山形美絵子, 大久保綾子, 岩本太郎, 川島広稔, 高橋健太郎, 中島裕史. 滑膜パワードプラシグナルの時間累積値はメソトレキサート単独治療下ではX線スコアの進行と有意に相関するがTNF阻害薬治療下では相関しない. *第57回日本リウマチ学会総会・学術集会*. 2013年4月, 京都.
5. 池田啓, 中込大樹, 眞山快枝, 山形美絵子, 大久保綾子, 岩本太郎, 川島広稔, 高橋健太郎, 中島裕史. シンポジ

- ウム S10「RA の寛解基準」臨床的寛解基準を補完する関節エコーの活用. **第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会**. 2013 年 4 月, 京都.
6. 池田啓. 教育研修講演 関節リウマチの診断と疾患活動性モニタリングにおける関節エコーの活用. **第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会**. 2013 年 4 月, 京都.
  7. 池田啓. ランチョンセミナー 関節リウマチの診断における関節エコーの活用. **第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会**. 2013 年 4 月, 京都.
  8. 池田啓. Meet the Expert リウマチ性疾患における関節エコーによる滑膜炎評価の実践. **第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会**. 2013 年 4 月, 京都.
  9. 池田啓. モーニングセミナー 関節エコーを用いた関節リウマチ診療の最適化. **第 45 回九州リウマチ学会**. 2013 年 3 月, 沖縄.
  10. 池田啓. ランチョンセミナー リウマチ診療における超音波検査の有用性. **第 48 回日本超音波医学会中国地方会学術集会**. 2012 年 9 月, 広島.
  11. 池田啓. ハンズオンセッション リウマチ診療における超音波検査. **第 85 回日本超音波医学会学術集会**. 2012 年 5 月, 東京.
  12. 牧田荘平, 鈴木快枝, 池田啓, 細川淳一, 山形美絵子, 岩本太郎, 大久保綾子, 小林芳久, 中込大樹, 渡邊紀彦, 中島裕史. 全身性エリテマトーデスを合併した関節リウマチ 3 症例に対するアバタセプトの有効性の検討. **第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会**. 2012 年 4 月, 東京.
  13. 細川淳一, 鈴木浩太郎, 中込大樹, 岩本太郎, 池田啓, 中島裕史. 中枢神経ループス患者における脳脊髄液中 BAFF 値の検討. **第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会**. 2012 年 4 月, 東京.
  14. 中込大樹, 池田啓, 細川淳一, 山形美絵子, 大久保綾子, 岩本太郎, 鈴木快枝, 川島広稔, 星野東明, 高橋健太郎, 若新英史, 高取宏昌, 鈴木浩太郎, 高林克日己, 中島裕史. 超音波滑膜炎評価による 2010 年 ACR/EULAR 関節リウマチ分類基準の精度の向上. **第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会**. 2012 年 4 月, 東京.
  15. 松村竜太郎, 鈴木智, 杉山隆夫, 北靖彦, 海辺剛志, 中川典明, 李泰鉉, 池田啓, 平栗雅樹, 縄田泰史. 生物学的製剤使用中の関節リウマチ患者は経済面から生物学的製剤の費用、効果をどう評価しているか? **第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会**. 2012 年 4 月, 東京.
  16. 池田啓. 関節エコーによる滑膜炎評価方法と関節リウマチ診療応用の国際的な流れ. **第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会, イブニングセミナー「日本における関節エコーの可能性 -RA の早期診断・治療に向けて-」**. 2012 年 4 月, 東京.
  17. 池田啓. 関節エコーによる関節リウマチの滑膜炎評価 -日本リウマチ学会関節エコー撮像ガイドラインの活用-. **第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会, ハンズオンセミナー**. 2012 年 4 月, 東京.
  18. 池田啓. リウマチ性疾患における関節エコーによる滑膜炎評価の実践. **第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会, Meet the Expert**. 2012 年 4 月 26 日, 東京.
  19. 山形美絵子, 田中繁, 中込大樹, 岩田有史, 池田啓, 須藤明, 加々美新一郎, 廣瀬晃一, 中島裕史. 膠原病治療中に生じたノカルジア感染症の臨床的検討. **第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会**. 2012 年 4 月, 東京.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
「関節リウマチに対する抗 IL-6 受容体抗体療法の有効性の予測方法」特願 2011-156921
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）

末梢血単核球の網羅的遺伝子発現解析による関節リウマチに対する  
トシリズマブの薬効予測と効果発現機序の解明に関する研究

分担研究報告書 3

末梢血単核球の網羅的遺伝子発現解析による  
関節リウマチに対するトシリズマブの薬効予測に関する研究

研究分担者 中島 裕史  
千葉大学大学院医学研究院遺伝子制御学 教授

#### 研究要旨

本研究では末梢血単核球 (PBMC) の網羅的遺伝子発現解析のデータをもとに、トシリズマブ (TCZ) の薬効予測遺伝子を抽出することを目的とした。

TCZ を新規に投与する関節リウマチ (RA) 患者 37 症例の、治療前の PBMC の網羅的遺伝子発現を DNA アレイを用いて包括的に解析した。治療 6 ヶ月での CDAI (Clinical Disease Activity Index) カテゴリ変化および医師総合評価により無効群と有効群を同定し、両群でシグナル値に差のあるプローブを抽出した。

その結果 2 つの治療効果判定方法で共通するプローブが 56 個抽出され、遺伝子の重複は認められなかった。これらの遺伝子による薬効予測の検証が行われている。

#### A. 研究目的

末梢血単核球 (PBMC) の網羅的遺伝子発現解析のデータをもとに、トシリズマブ (TCZ) の薬効予測遺伝子を抽出することを目的とした。

#### B. 方法

TCZ を新規に投与した RA 患者 37 症例、またコントロールとしてメトトレキサート (MTX)、インフリキシマブ (IFX)、エタネルセプト (ETN)、アダリムマブ (ADA) ならびにアバタセプト (ABT) を新規に投与した RA 患者それぞれ 5 症例ずつを 6 ヶ月間経過観察した。0 週、12 週、24 週の時点で全血 5 mL をヘパリン採血し、Ficoll-Paque TM PLUS を用いて速やかに PBMC を分離後、mRNA を抽出し DNA アレイを用いて遺伝子発現を包括的に解析した。さらに MACS 細胞分離システムを用いて CD4 陽性 T 細胞に分離し、mRNA を抽出し DNA アレイを用いて遺伝子発現を包括的に解析した。DNA アレイはか

ずさ DNA 研究所において Agilent 社製遺伝子発現用マイクロアレイ Human Whole Genome を用いて行う。ラベル化方法は Agilent 社製 Quick Amp Labeling Kit (1color) を使用した。

治療 6 ヶ月での治療効果判定を CDAI (Clinical Disease Activity Index) 変化量および医師総合評価により判定し、無効群と有効群で発現シグナル値に有意差のある上位プローブを抽出した。

#### C. 結果

TCZ 治療開始後 6 ヶ月後、CDAI 変化量により無効群 (n = 4) と有効群 (n = 29)、また医師総合評価による無効群 (n = 6) と有効群 (n = 30) がそれぞれ同定された。それぞれの治療効果判定基準での無効群と有効群で、ベースラインにおけるシグナル値が Welch の t 検定にて有意に異なり (p < 0.05)、シグナル値の比が 1.5 を超えるプローブを抽出したところ、共通する 56 プロー