

201307035A

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 25 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 26(2014)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 25 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 26(2014)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（臨床検体および臨床情報の収集） 竹 内 勤	8
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	11
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	16
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	22
5. 抗 leucine rich alpha-2 glycoprotein (LRG) 抗体の開発と ELISA システムの構築 服 部 有 宏	28

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

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抗 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、抗 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抗 IL-6 受容体抗体を開発中である。次世代型抗 IL-6 受容体抗体は、最新の抗体工学技術(Igawa T et al, Nat Biotechnol 2010)を用いて現行の抗 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、研究分担者の服部等が開発した LRG の天然の立体構造を認識するモノクローナル抗体によって構築された血液中の LRG を定量出来る ELISA システムを用いて、抗 IL-6 受容体抗体投与時の血中 LRG 濃度を定量した結果、CRP 低値(CRP<0.2)の患者において、疾患活動性のある患者(CDAI>2.8)を検出できることを明らかにした。このことは次世代型抗 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	リウマチ内科	教授
南木敏宏	帝京大学医学部	臨床研究医学講座	特任准教授
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抗 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 が抗 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抗 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、抗 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抗 IL-6 受容体抗体を開発中である。次世代型抗 IL-6 受容体抗体とは、最新の抗体工学技術 (Igawa T *et al*, Nat Biotechnol. 2010) を用いて現行の抗 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 は次世代型抗 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抗 IL-6 受容体抗体投与前後の RA 患者血清の LRG が抗 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した。分担研究者の服部有宏のグループで構築された LRG の天然の立体構造を認識する抗体を用いた LRG の ELISA システムを用いて、抗 IL-6 受容体抗体治療時の関節リウマチ患者血清中の LRG の定量を行い、血中 LRG 濃度と疾患活動性との関係について解析した。

B. 研究方法

(1) LRG の天然の立体構造を認識する抗体を用いた関節リウマチ患者血清中 LRG の定量

分担研究者の服部有宏のグループで構築された LRG の天然の立体構造を認識するモノクローナル抗体 (固相化用抗体 LRB00091、検出用抗体 LRB00048) を用いた LRG の ELISA システムを用いて、抗 IL-6 受容体抗体治療時の関節リウマチ患者血清中の LRG の定量を行った。血中 LRG 濃度と CRP 濃度、疾患活動性スコア (CDAI) を用いた。血清サンプルと臨床情報は研究分担者の竹内勤教授、南木敏宏特任准教授、緒方篤講師より提供していただいた。

(2) 次世代型抗 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、帝京大学、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、次世代型抗 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、次世代型抗 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、まず従来型の抗 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 25 年 11 月時点で 62 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。抗 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、帝京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、帝京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、緒方篤講師、帝京大学医学部附属病院においては臨床研究医学講座、南木敏宏特任准教授、慶應義塾大学附属病院においては大学院生の西川あゆみ氏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、帝京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され、提供される情報は年齢、性別、病名、生化学データとした。

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) LRG の天然の立体構造を認識する抗体を用いた関節リウマチ患者血清中 LRG の定量

関節リウマチ患者において抗 IL-6 受容体抗体による治療を受けると、疾患活動性がまだ残っているのに対して、IL-6 依存性の血清マーカーである CRP は陰性化してしまうため、CRP は疾患活動性マーカーとして機能しない。そこで、我々が発見した新規マーカータンパク質である LRG が抗 IL-6 受容体抗体により治療を受ける関節リウマチ患者において、疾患活動性マーカーとなり得るかどうかを検討した。

研究分担者の服部等が開発した LRG の ELISA システムを用いて抗 IL-6 受容体抗体により治療を受ける関節リウマチ患者血清(治療開始後 12 週後、24 週後)の LRG 濃度を定量した。その結果、治療 12 週後、24 週後において、CRP<0.2 かつ CDAI>2.8(活動期)の関節リウマチ患者集団の一部において、血清中の LRG 濃度が高値を示す患者が検出された(図 1)。LRG の発現誘導には IL-6 以外にも IL-22、TNF- α など様々なサイトカインが関与していることから、CRP よりも LRG の方が疾患活動性を検出するマーカーとして適している可能性が示唆された。今後、より患者検体数を増やして解析を進める。

E. 結論

本研究にて、ヒト血液中の LRG を定量するキットの開発に成功した。抗 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 では検出出来ない疾患活動性を有する関節リウマチ患者について、血中 LRG 濃度を定量する事により疾患活動性を正確に把握する事が出来たため、抗 IL-6 受容体抗体治療時の疾患活動性マーカーとして血清 LRG 濃度

を測定する事の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. Ota M, Serada S, **Naka T**, Mori Y.
MHC class I molecules are incorporated into human herpesvirus-6 viral particles and released into the extracellular environment
Microbiol Immunol. 2013 In Press
2. Sadaoka T, Serada S, Kato J, Hayashi M, Gomi Y, **Naka T**, Yamanishi K, Mori Y.
Varicella-zoster virus ORF49 functions in the efficient production of progeny virus through its interaction with essential tegument protein ORF44. J Virol. 2013 In Press
3. Matsuzaki S, Enomoto T, Serada S, Yoshino K, Nagamori S, Morimoto A, Yokoyama T, Kim A, Kimura T, Ueda Y, Fujita M, Fujimoto M, Kanai Y, Kimura T, **Naka T**. Annexin A4-conferred platinum resistance is mediated by the copper transporter ATP7A. Int J Cancer. 2013 In Press
4. Shimada K, Serada S, Fujimoto M, Nomura S, Nakatsuka R, Harada E, Iwahori K, Tachibana I, Takahashi T, Kumanogoh K, Kishimoto T, **Naka T**. The molecular mechanism underlying anti-proliferative effect of SOCS-1 in non-small cell lung cancer cells. Cancer Sci.

2013 In Press

5. Umegaki-Arao N, Tamai K, Nimura K, Serada S, **Naka T**, Nakano H, Katayama I.
Karyopherin alpha2 is essential for rRNA transcription and protein synthesis in proliferative keratinocytes. PLoS One. 2013;8(10):e76416.
6. Ishii H, Tanabe S, Ueno M, Kubo T, Kayama H, Serada S, Fujimoto M, Takeda K, **Naka T**, Yamashita T. IFN-g-dependent secretion of IL-10 from Th1 cells and microglia/macrophages contributes to functional recovery after spinal cord injury. Cell Death Dis. 2013;4:e710.
7. Yamada M, Mugnai G, Serada S, Yagi Y, **Naka T**, Sekiguchi K. Substrate-attached materials are enriched with tetraspanins and are analogous to the structures associated with rear-end retraction in migrating cells, Cell Adh Migr. 2013;7(3):304-14.
8. Takahashi T, Serada S, Ako M, Fujimoto M, Miyazaki M, Nakatsuka R, Ikezoe I, Yokoyama A, Taguchi T, Shimada K, Kurokawa Y, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Takiguchi S, Mori M, Doki Y, **Naka T**, Nishida T. New findings of kinase switching in gastrointestinal stromal tumor under imatinib using phosphoproteomic analysis. Int J Cancer. 2013;133(11):2737-43.
9. Tang H, Serada S, Kawabata A, Ota M, Hayashi E, **Naka T**, Yamanishi K, Mori Y.
CD134 is a cellular receptor specific for human herpesvirus-6B entry. Proc Natl

Acad Sci U S A. 2013;110(22):9096-9.

10. Nishioka C, Ikezoe T, Furihata M, Yang J, Serada S, Naka T, Nobumoto A, Kataoka S, Tsuda M, Uda K, Yokoyama A. CD34(+) /CD38(-) acute myelogenous leukemia cells aberrantly express CD82 which regulates adhesion and survival of leukemia stem cells. Int J Cancer. 2013;132(9):2006-19.

11. He P, Kuhara H, Tachibana I, Jin Y, Takeda Y, Tetsumoto S, Minami T, Kohmo S, Hirata H, Takahashi R, Inoue K, Nagatomo I, Kida H, Kijima T, Naka T, Morii E, Kawase I, Kumanogoh A. Calretinin mediates apoptosis in small cell lung cancer cells expressing tetraspanin CD9. FEBS Open Bio. 2013;3:225-30.

12. 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. 2013;19(2):321-31.

G-2. 学会発表

- 第 41 回 日本臨床免疫学会総会
11 月 27 日 (水) 海峡メッセ下関 10 階・国際会議場)
新たな炎症マーカーLRG の臨床応用
仲哲治、世良田聡、藤本穰
- 第 34 回 日本炎症・再生医学会
7 月 2 日 (火) (国立京都国際会館)
炎症性疾患の新たなバイオマーカー・創薬標

的分子としての Leucine rich $\alpha 2$ glycoprotein (LRG)

仲哲治

3. EULAR 2013 congress to be held in the Madrid, Spain from 12 to 15 June 2013.
BLOCADE OF CD28 COSTIMULATORY SIGNAL REDUCES AUTOIMMUNE UVEITIS IN MICE MODEL
C. Iwahashi-Shima, M. Fujimoto, S. Serada, T. Naka

H. 知的財産権の出願・登録状況

名称 : 気道内炎症検査用バイオマーカー
発明者 : 仲哲治、世良田聡、藤本穰、横山彰仁
出願人 : 独立行政法人医薬基盤研究所、国立大学法人高知大学
出願日 : 2014 年 1 月 22 日
出願番号 : 特願 2014-009713

名称 : 悪性腫瘍の治療薬
発明者 : 仲哲治、世良田聡、藤本穰、豊浦雅義、庄屋雄二
出願人 : 独立行政法人医薬基盤研究所、株式会社ファーマフーズ
出願日 : 2013 年 12 月 27 日
出願番号 : 特願 2013-272084

名称 : 食道がんのマーカーおよびその利用
発明者 : 仲哲治、世良田聡、藤本穰、豊浦雅義、庄屋雄二
出願人 : 独立行政法人医薬基盤研究所、株式会社ファーマフーズ
出願日 : 2013 年 12 月 27 日
出願番号 : 特願 2013-272085

名称 : 炎症性疾患の予防・治療剤、
並びに炎症性疾患予防・治療薬の
スクリーニング方法

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 : 2013 年 4 月 11 日

出願番号 : 特願 2013-083397

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

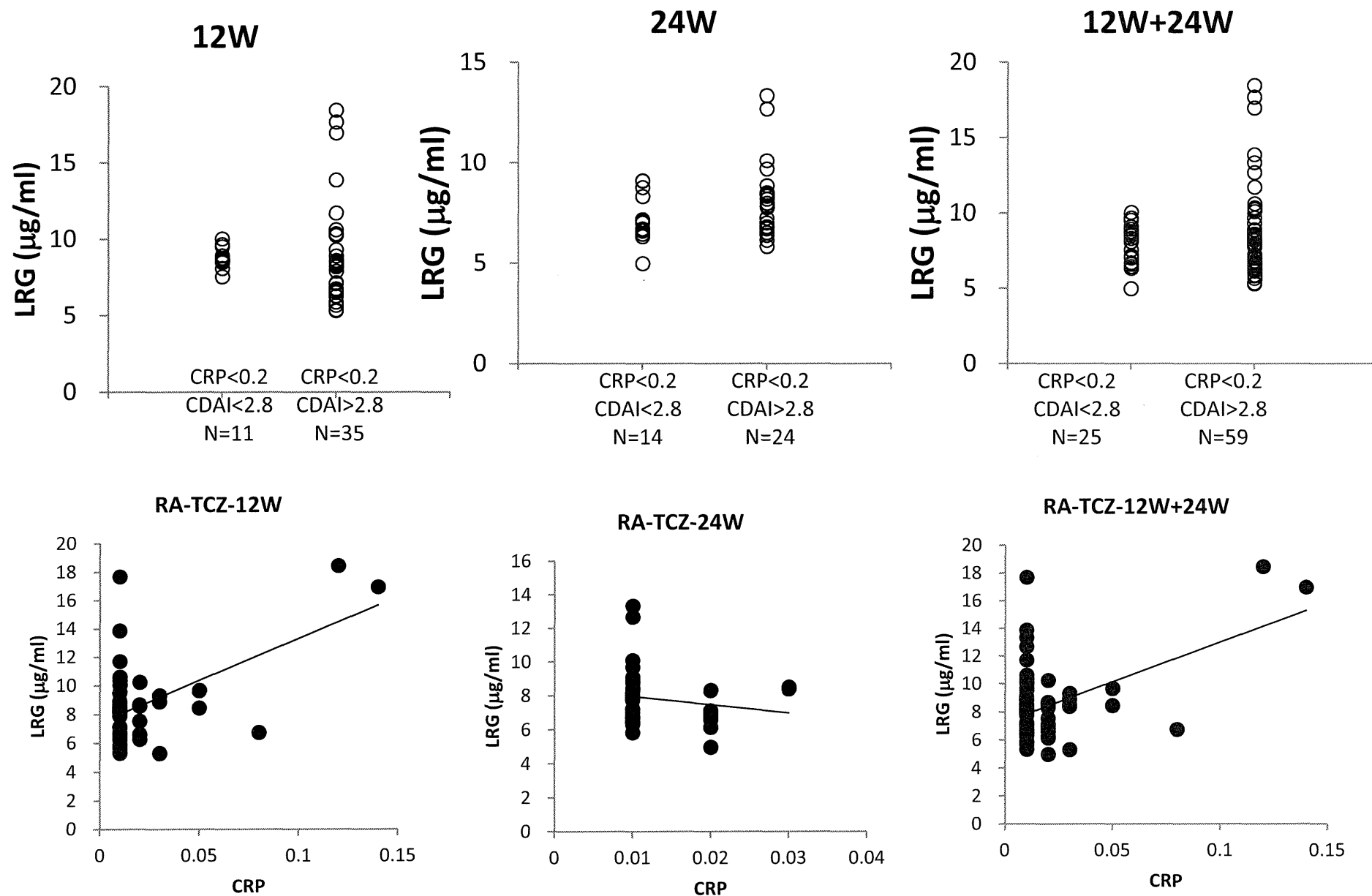


図1.アクテムラ投与時のRA患者において、CRP低値かつ疾患活動性のある患者にて、LRGが疾患活動性を検出出来る検体がある

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（臨床検体および臨床情報の収集）

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。昨年度に研究計画の倫理委員会承認手続きを終了し、本年度は 1) 臨床検体情報データベースの構築、2) 臨床検体の収集にむけた準備を引き続き行った。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ー先端的抗体医薬品・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) 臨床検体情報データベースの構築、2) 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) 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。

2) 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、検討すべき課題を抽出した。

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**, Kawai S, Yamamoto K, Harigai M, Ishida K and Miyasaka N. Post-marketing surveillance of the safety and effectiveness of tacrolimus in 3267 Japanese patients with rheumatoid arthritis. Mod Rheum. 2013 In Press.
2. Kaneko Y, Kondo H and **Takeuchi T**. ACR/EULAR remission criteria maintains strict performance when evaluated in 44 joints. J Rheumatology. 2013 In Press.
3. Koike T, Harigai M, Inokuma S, Ishiguro N, Ryu J, **Takeuchi T**, Tanaka Y, Yamanaka H, Hirose T, Yoshinaga T, and Suzukawa M. Safety and effectiveness of 6 months

etanercept monotherapy and combination therapy in Japanese patients with Rheumatoid Arthritis: Effect of concomitant disease-modifying anti-rheumatic drugs. J Rheumatology. 2013 In Press.

4. Nishina N, Kaneko Y, Kameda H, Kuwana M, and **Takeuchi T**. Reduction of plasma IL-6, but not TNF- α by methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis: a potential biomarker for radiographic progression. Clinical Rheumatology. 2013 In Press.

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, and 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. 2013 In Press.

6. **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. 2013 In Press.

7. Tsuboi H, Hagiwara S, Asashima H, Umehara H, Kawakami A, Nakamura H, Sano H, Tsubota K, Ogawa Y, Takamura E, Saito I, Inoue H, Nakamura S, Moriyama M, **Takeuchi T**, Tanaka Y, Hirata S, Mimori

T, Matsumoto I, and Sumida T. Validation of different sets of criteria for the diagnosis of Sjogren's syndrome in Japanese patients. Mod Rheum. 2013;23:219-25.

8. **Takeuchi T** and Suzuki K. CD247 variants single nucleotide polymorphisms observed in systemic lupus erythematosus. Rheumatology. 2013;52(9):1551-5.

9. **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. 2013;23(2):226-35.

10. **Takeuchi T**, Harigaya M, Tanaka Y, Yamanaka 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. 2013;72(9):1488-95.

11. **Takeuchi T**, Miyasaka N, Zang C, Alvarez D, Fletcher T, Wajdula J, Yuasa H, and 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. 2013;23(4):623-33.

G-2. 学会発表

なし

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 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 帝京大学医学部 臨床研究医学講座 特任准教授

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、生物学的製剤を新規に初めて使用する 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

生物学的製剤は、関節リウマチ（以降 RA）に対して広く用いられるようになり、著明な炎症抑制効果、骨破壊抑制効果を認めている。現在本邦では RA に対する生物学的製剤として、5 種類の TNF 阻害薬（infliximab, etanercept, adalimumab, golimumab, certolizumab pegol）、及び IL-6 受容体抗体（tocilizumab）、T 細胞の副刺激阻害薬（CTLA-4-Ig: abatacept）が用いられている。Tocilizumab は IL-6 受容体 α に結合することにより IL-6 からのシグナルを阻害する。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の抗 IL-6 受容体抗体と同様である。そのため、tocilizumab 投与患者では、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。本年度も、RA 患者の血清を収集し、疾患活動性、治療内容を検討した。

B. 研究方法

患者血清の収集

帝京大学倫理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 患者で、新規に初めて生物学的製剤を投与する 5 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

本研究は帝京大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

帝京大学医学部臨床研究医学講座、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。基盤研には帝京大学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 5 人の血清を採取した。男女比 3:2、年齢 73.6 $\pm$ 13.2 歳 (平均 $\pm$ SD)。RA の活動性評価に関しては、圧痛関節数 (28 関節中) 3.0 $\pm$ 3.4、腫脹関節数 (28 関節中) 6.0 $\pm$ 5.1、赤沈 30.6 $\pm$ 12.7 mm/hr、CRP 1.5 $\pm$ 1.4 mg/dl、MMP-3 230.8 $\pm$ 194.1 ng/ml、患者 VAS 4.5 $\pm$ 3.7 cm/10 cm、医師 VAS 5.0 $\pm$ 2.5 cm/10 cm であった。また、Disease activity score (DAS) 28-ESR 4.5 $\pm$ 0.8、DAS28-CRP 3.4 $\pm$ 1.0、simple disease activity index (SDAI) 20.9 $\pm$ 11.4、clinical disease activity index (CDAI) 19.3 $\pm$ 10.9。

投与開始された生物学的製剤の内訳は golimumab 2 人、etanercept 1 人、tocilizumab 1 人、abatacept 1 人であった。また、副腎皮質ステロイド薬は 4 人に投与されていた。

D. 考察

血清を収集した RA 患者は tocilizumab 含めた生物学的製剤を新規に初めての生物学的製剤として投与開始した。今後、定期的に血清を収集し、RA の疾患活動性と、血清 LRG レベル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. Cho S, Sakai R, **Nanki T**, Koike R, Watanabe K, Yamazaki H, Amano K, Tanaka Y, Nakajima A, Atsumi T, Ihata A, Ezawa K, Sung Y, Bae S, Miyasaka N, Harigai M, for the RESEARCH investigators and the REAL Study Group. A comparison of incidence and factors influencing development of serious adverse events in patients with rheumatoid arthritis between biologic DMARDs registries in Korea and Japan. Mod. Rheumatol. 2013 In Press.

2. Komazaki Y, Miyazaki Y, Fujie T, Sakashita H, Tsuchiya K, Tamaoka M, Sumi T, Maruyama Y, **Nanki T**, Inase N. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in rheumatoid arthritis. Respiration. 2013 In Press.

3. 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. 2013 In Press.

4. 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. 2013 In Press.

5. Watanabe K, Sakai R, Koike R, Sakai F, Sugimaya H, Tanaka M, Komano Y, Akiyama Y, Mimura T, Kaneko M, Tokuda H, Iso T, Motegi M, Ikeda K, Nakajima Y, 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. 2013;23(6): 1085-93.

6. Miyabe Y, Miyabe C, Iwai Y, Takayasu A, Fukuda S, Yokoyama W, Nagai J, Jona M, Tokuhara Y, Ohkawa R, Albers HM, Ovaa H, Aoki J, Chun J, Yatomi Y, Ueda H, Miyasaka M, Miyasaka N, **Nanki T**. Necessity of Lysophosphatidic Acid

Receptor 1 for Development of Arthritis.
Arthritis Rheum. 2013;65(8):2037-47.

7. 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. 2013;40(6):1026-28.

8. **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. 2013;72(6): 1100-02.

9. Uto-Konomi A, McKibben B, 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. 2013;431(4): 772-76.

G-2. 学会発表

1. 第 34 回日本炎症・再生医学会

我が国の関節リウマチ患者における生物学的製剤使用期間と悪性腫瘍発現の関連性。針谷正祥、**南木敏宏**、小池竜司、田中みち、渡部香織、駒野有希子、酒井良子、山崎隼人、小池隆夫、宮坂信之。

2. 第 54 回関東リウマチ研究会

皮膚筋炎治療中に発症した好中球 CD64 高値を伴う粟粒結核の一例。大久保麻衣、津久井大輔、浅子来美、岡本明子、菊地弘敏、**南木**

敏宏、小口洋子、一志邦夫、本田善一郎、西村慶太、西野仁樹、河野肇。

3. ヨーロッパリウマチ学会

Leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a potential disease activity marker under IL-6 suppression in autoimmune arthritis. Honda H, Serada S, Fujimoto M, Hattori K, Ogata A, **Nanki T**, Takeuchi T, Naka T.

4. ヨーロッパリウマチ学会

Lysophosphatidic acid receptor LPA₁ is essential for development of arthritis. Miyabe Y, Miyabe C, Iwai Y, Takayasu A, Fukuda S, Yokoyama W, Nagai J, Jona M, Tokuhara Y, Ohkawa R, Albers HM, Ovaa H, Aoki J, Chun J, Yatomi Y, Ueda H, Miyasaka M, Miyasaka N, **Nanki T**.

5. ヨーロッパリウマチ学会

The benefit-risk balance of treatment with tumor necrosis factor inhibitors has been improved with the change of time: a report from the REAL database. Sakai R, Cho S, Tanaka M, **Nanki T**, Yamazaki H, Watanabe K, Koike R, Miyasaka N, Harigai M, for the REAL Study Group.

6. 第 57 回日本リウマチ学会総会

リゾフォスファチジン酸受容体 1(LPA₁)欠損による関節炎抑制。宮部斉重、宮部千恵、福田真、横山和佳、宮坂信之、**南木敏宏**。

7. 第 57 回日本リウマチ学会総会

REAL を用いた関節リウマチ患者における TNF 阻害薬の重篤な有害事象発症リスクの経年変化。酒井良子、趙秀卿、**南木敏宏**、山崎隼人、渡部香織、田中みち、小池竜司、宮坂信之、針谷正祥。

8. 第 57 回日本リウマチ学会総会

膠原病における免疫抑制療法下の肺感染症に関する前向き研究(PREVENT 研究)。山崎隼人、酒井良子、小池竜司、田中みち、南木敏宏、渡部香織、宮坂信之、針谷正祥。

9. 第 57 回日本リウマチ学会総会

Lysophosphatidic acid receptor 1 (LPA₁) is essential for the development of arthritis. Miyabe Y, Miyabe C, Fukuda S, Yokoyama W, Miyasaka N, Nanki T.

10. 第 57 回日本リウマチ学会総会

Safety of tocilizumab and TNF inhibitors in patients with rheumatoid arthritis in clinical practice: analyses from the REAL database. Cho S, Sakai R, Nanki T, Yamazaki H, Watanabe K, Tanaka M, Koike R, Miyasaka N, Harigai M, the REAL Study Group.

11. 第 57 回日本リウマチ学会総会

Assessment of risks for pulmonary infection in patients receiving immunosuppressive treatment for rheumatic diseases: A report from a large-scale prospective cohort study (PREVENT study). Yamazaki H, Sakai R, Koike R, Tanaka M, Nanki T, Watanabe K, Miyasaka N, Harigai M.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

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 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

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、IL-6 に強く影響を受ける疾患活動性マーカーは IL-6 阻害療法を行なう時に疾患活動性を正確に反映しない事があり、IL-6 の影響の少ないマーカーが期待されている。これまで研究主任の仲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 IL-6 の影響を受けにくい 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、血液中の LRG を定量出来る ELISA システムを構築してきた。我々は、この ELISA キットを用いて、関節リウマチ患者の血清を測定できるように、大阪大学医学部附属病院において免疫関連疾患の病態解析のための検体バンクの構築を行なった。この検体バンクのシステムを用いて、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だけでなく、従来の治療を受ける関節リウマチ患者、それ以外にも炎症性疾患、自己免疫疾患など多彩な疾患の貴重な血液サンプルを収集するシステムを整備した。

A. 研究目的

本研究の目的は現在開発中の次世代型 IL-6 受容体抗体を含めて IL-6 受容体抗体治療における実用的な血清炎症マーカーがないための不利益を克服するための新規 IL-6 非依存性の炎症性マーカーとして開発され、実用化を目指している leucine-rich alpha-2 glycoprotein (LRG)の ELISA キットの実臨床における有用性を検証するための患者検体収集システムの構築を目的としている。

分担研究者が所属する大阪大学においては免疫学フロンティアセンターを始めとする基礎免疫の研究が盛んであり、基礎免疫学の成果を臨床に応用するための臨床データを完備した患者検体に対するニーズがもともとあった。これまで、研究分担者は個別の臨床検体のニーズに対して個別に必要な検体を準備することとして対応していたが、個別の研究計画書を倫理委員会に提出して承認を得てから患者検体の収集をしていたため、非常に煩雑であり、検体の収集に時

間がかかるという問題点があった。そのため、臨床研究に利用する目的で検体を収集する包括同意のもと検体を常時収集する検体バンクを作成し、すみやかに基礎研究への臨床検体提供を行なうシステムの構築を行なった。本研究においてもこのシステムを用いて検体を供給する予定である。

B. 研究方法

研究分担者が中心となり、大阪大学付属病院において臨床検体の収集し検体バンクに集積するために「免疫関連疾患の病態解析のための検体バンクの構築」という課題名で、大阪大学医学部付属病院の臨床研究倫理審査委員会において承認を得た（承認番号 11122）。この検体バンクシステムは、研究分担者が所属する大阪大学呼吸器免疫アレルギー内科が中心に大阪大学付属病院にて検体の収集を行ない、大阪大学呼吸器免疫アレルギー内科と免疫学フロンティアセンターに検体を保存する。臨床データの収集と管理は大阪大学呼吸器免疫アレルギー内科において行い必要があれば臨床検体を提供する体制を整備する。将来的に検体を収集でき施設を増やし、バンクの充実を図って行く予定である。図 1 参照

（倫理面への配慮）

インフォームドコンセント

大阪大学医学部医学倫理委員会により承認を得て、文書により包括同意を得て、検体を収集する。本研究への利用に関してはすでに大阪大学医学部付属病院の倫理委員会

にて承認を得ている。いずれも医薬基盤研究所を共同研究者、研究協力者として承認を得ている。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載した。

D. 結果・考察

検体バンクとして包括同意のもと、検体の収集を開始している。現在は次世代型 IL-6 受容体抗体の臨床試験が開始されていないので、従来型 IL-6 受容体抗体治療患者を特に重点的に検体収集を行なっているが、現時点で本研究の対象とならないものも含めて 800 検体以上のサンプルが集積され、検体バンクとしてのシステムは順調に稼働している。関連施設も含めたシステムをさらに拡充していく予定であるが、本年度は公立学校共済近畿中央病院、大阪府立急性期総合医療センター、日生病院、NTT 西日本大阪病院の 4 施設が参加し各施設での倫理委員会などの手続きを行なっている。

E. 結論

本研究において必要な臨床検体の収集するためのシステムが構築でき、順調に検体を蓄積しており、さらに検体の集積を広く行なっていく準備が整った。

F. 健康危険情報

該当無し。