

201322041A

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 25 年度

総括研究報告書

研究代表者 池田 啓

平成 26 (2014) 年 6 月

目 次

I.	総括研究年度終了報告	
	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.	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	----- 7
	中島裕史	
2.	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	----- 9
	廣瀬晃一	
3.	末梢血 CD4 陽性 T 細胞における経時的な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新規薬効評価マーカーの同定と 効果発現機序の解明	----- 11
	高取宏昌	
4.	AT-rich interactive domain-containing protein 5a (ARID5A) の ヘルパーT 細胞分化における役割の解明に関する研究	----- 13
	池田 啓	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	----- 16
IV.	研究成果の刊行物・別冊	----- 17

総括研究年度終了報告書

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、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、TCZ の新規薬効評価マーカーを同定すること、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。

トレーニングコホートにおいて無効例と有効例で TCZ 投与前の PBMC におけるシグナル値に有意差を認め、かつ一定のシグナル強度を示す 68 プローブを同定した。それらの中で、重複して同定されたもの、同一ファミリー遺伝子、および免疫あるいは炎症反応に直接関連する 19 遺伝子 23 プローブに注目した。さらにそれらの中で、qPCR による発現と DNA マイクロアレイシグナル値との相関が確認できた 15 遺伝子を予測候補遺伝子とした。バリデーションコホートにおいて、無効例と有効例の間で TCZ 投与前の PBMC における qPCR による発現値に有意な差を認めたものは、15 遺伝子中 4 遺伝子（*IFI6*, *MX2*, *OASL*, *MT1G*）であった。これらの遺伝子を用いた TCZ の薬効予測モデルでは、ROC 解析の曲線下面積が 0.947、感度 73.3%、特異度 100%と良好な結果が得られた（*Arthritis Rheumatol* 2014;66:1421）。臨床情報ならびに関節超音波所見は、TCZ の薬効予測には寄与しなかった。

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 ARID5A の mRNA 発現が亢進していた。興味深いことに、マウス脾臓由来の CD4 陽性 T 細胞にレトロウイルスベクターを用いて ARID5A を強制発現させると、Th17 細胞分化が低下した。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 ARID5A の mRNA 発現が著明に低下していた。レポーター解析では ARID5A の強制発現は ROR γ t による IL-17 発現を抑制し、またウェスタンブロットにより ARID5A と ROR γ t の直接結合が示された（*Arthritis Rheum* 2014;66:1185）。

DNA マイクロアレイならびに qPCR による PBMC の網羅的遺伝子発現解析により、RA における TCZ の薬効を高精度に予測する 4 遺伝子が同定された。RA の病態における I 型 IFN やメタロチオネインの関与が示唆された。また RA 患者の末梢血 CD4 陽性 T 細胞において、TCZ 投与により発現低下する遺伝子として ARID5A が同定され、Th17 細胞分化の新規抑制分子であることが示された。TCZ 特異的薬効評価マーカーならびに新規治療ターゲット経路の候補と考えられた。

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

中島裕史・千葉大学大学院医学研究院アレルギー・臨床免疫学教授
廣瀬晃一・千葉大学大学院医学研究院アレルギー・臨床免疫学准教授
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、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、TCZ の新規薬効評価マーカーを同定すること、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、中島)

TCZを新規に投与したRA患者60症例 (トレーニングコホート40症例、バリデーショコホート20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) を新規に投与するRA患者それぞれ5症例ずつを24週間経過観察した。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) のグレースケール (GS) およびパワー Doppler (PD) の半定量スコア (OMERACTシステム) を記録した。治療24週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 (池田、中島、高取)

TCZ (n = 20)、TNF阻害薬 (n = 15)、およびMTX (n = 5) を投与するRA患者の、治療前および治療開始12週後に全血20 mLをへパリン採血した。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を用いて行った。ラベル化方法はAgilent社製Quick Amp Labeling Kitを使用した。

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) の医師総合評価とCDAI変化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した。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した (t検定 $p < 0.05$ かつfold change > 1.5)。

4) 定量的PCRを用いたTCZの薬効予測モデルの確立 (池田、廣瀬、中島)

3) により抽出された遺伝子の発現レベルを定量的リアルタイムPCRを用いて解析し、DNAマイクロアレイのシグナル値との相関を検証した。相関の高い遺伝子による薬効予測モデルを構築し、バリデーショコホート (n = 20) において薬効予測の精度を測定した。

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)

4) により抽出された遺伝子より分泌蛋白、膜蛋白、ならびに関連血清蛋白を同定し、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を用いて確認した。

6) TCZの効果発現機序の解明 (池田、中島、高取)

TCZ著効症例の末梢血CD4陽性T細胞において、TCZ投与後に発現の低下している AT-rich interactive domain-containing protein 5a (ARID5A)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細胞から分化誘導したTh1細胞、Th2細胞、Th17細胞、Tfh細胞、Treg細胞におけるARID5Aの発現をリアルタイムPCR法で解析した。マウス脾臓由来のCD4陽性T細胞にレトロウイルスベクターを用いてARID5AをGFPと共に強制発現させ、各ヘルパーT細胞の分化誘導条件で培養した際のヘルパーT細胞分化への影響を細胞内サイトカイン染色法により解析した。またT細胞特異的STAT3/ROR γ t欠損マウスの脾臓由来のナイーブCD4陽性T細胞を各種条件で分化誘導した際のARID5Aの発現を解析した。

7) 新規薬効評価マーカーの同定 (高取、池田)

全症例において、CDAI/超音波総PD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した。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した。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で発現を確認した。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した。

C. 結果

トレーニングコホートにおいて無効例 (n=8) と有効例 (n=29) でTCZ投与前のPBMCにおけるシグナル値に有意差を認め (図1)、かつ一定のシグナル強度を示す68プローブを同定した。それらの中で、重複して同定されたもの、同一ファミリー遺伝子、および免疫あるいは炎症反応に直接関

連する19遺伝子23プローブに注目した。さらにそれらの中で、qPCRによる発現とDNAマイクロアレイシグナル値との相関が確認できた15遺伝子を予測候補遺伝子とした。バリデーションコホートにおいて、無効例 (n=5) と有効例 (n=15) の間でTCZ投与前のPBMCにおけるqPCRによる発現値に有意な差を認めたものは、15遺伝子中4遺伝子 (*IFI6*, *MX2*, *OASL*, *MTIG*) であった (表1)。これらの遺伝子を用いたTCZの薬効予測モデルでは、Receiver operating characteristic (ROC)解析の曲線下面積が0.947、感度73.3%、特異度100%と良好な結果が得られた (Arthritis Rheumatol 2014;66:1421)。臨床情報ならびに関節超音波所見は、TCZの薬効予測には寄与しなかった。

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ARID5AのmRNA発現が亢進していた。興味深いことに、マウス脾臓由来のCD4陽性T細胞にレトロウイルスベクターを用いてARID5Aを強制発現させると、Th17細胞分化が低下した (図2)。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ARID5AのmRNA発現が著明に低下していた。レポーター解析ではARID5Aの強制発現はROR γ tによるIL-17発現を抑制し (図3)、またウェスタンブロットによりARID5AとROR γ tの直接結合が示された (Arthritis Rheum 2014;66:1185)。

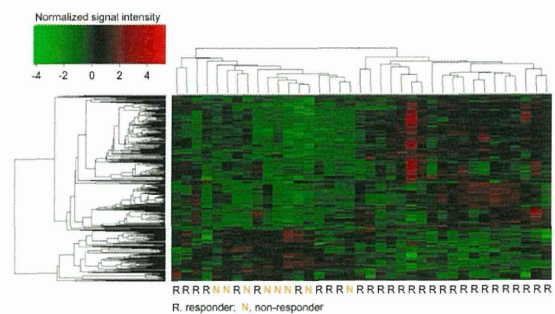


図1. 無効例と有効例の間でシグナル値が有意に異なったプローブのクラスター解析

Gene	Expression relative to GAPDH, mean \pm SD		P
	Nonresponders	Responders	
<i>CCL3L3</i>	0.22908 \pm 0.11719	0.71191 \pm 1.14197	0.128
<i>CCL4</i>	0.47432 \pm 0.52809	0.32468 \pm 0.16105	0.565
<i>CD83</i>	0.09453 \pm 0.06540	0.12588 \pm 0.20742	0.623
<i>CXCR4</i>	2.02442 \pm 0.52763	2.60166 \pm 1.34114	0.186
<i>FOSL2</i>	0.12600 \pm 0.05244	0.15703 \pm 0.13811	0.477
<i>HP</i>	0.01959 \pm 0.01192	0.03599 \pm 0.03659	0.148
<i>IFI6</i>	0.01166 \pm 0.00514	0.01517 \pm 0.01106	0.038
<i>LY6E</i>	0.21193 \pm 0.09510	0.41288 \pm 0.45754	0.128
<i>MT1G</i>	0.00039 \pm 0.00030	0.00164 \pm 0.00128	0.003
<i>MT2A</i>	0.26977 \pm 0.10763	0.35474 \pm 0.24362	0.299
<i>MX2</i>	0.07054 \pm 0.02718	0.13847 \pm 0.08220	0.012
<i>OASL</i>	0.03208 \pm 0.00883	0.07313 \pm 0.06817	0.038
<i>RABGEF1</i>	0.03439 \pm 0.01607	0.05279 \pm 0.03053	0.107
<i>THBS1</i>	0.12593 \pm 0.10264	0.24968 \pm 0.26263	0.149
<i>WARS</i>	0.42023 \pm 0.15457	0.51446 \pm 0.28856	0.371

表 1. バリデーションコホートの TCZ 投与前の PBMC における 15 遺伝子の発現

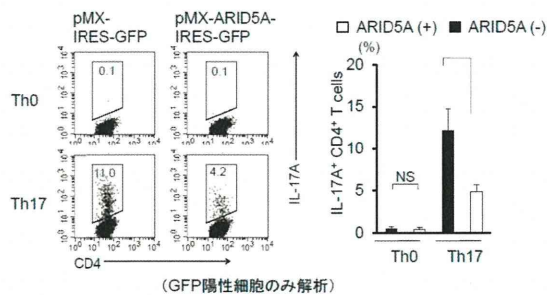


図 2. マウス CD4 陽性 T 細胞における ARID5A の強制発現による Th17 細胞分化の低下

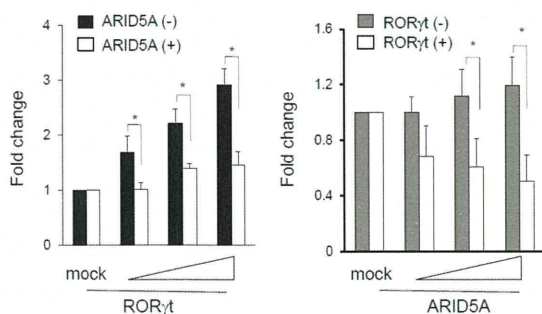


図 3. ARID5A および ROR γ t の強制発現による IL-17 プロモーター活性の変化

D. 考察

TCZ 薬効予測遺伝子として抽出された 4 遺伝子中、*IFI6*, *MX2*, *OASL* はいずれも Type I interferon (IFN) response gene (IRG) であり、その他候補となった 19 遺伝子のうち *LY6E* も IRG であった。IRG の末梢血における高発現は、TNF 阻害薬においても良好な薬効予測因子であることが報告されているが、B 細胞標的薬であるリツキシマブでは逆に治

療不応性の予測因子であることが示されており、IRG 発現は薬剤選択に有用なバイオマーカーであることが示唆される。I 型 IFN は Th17 分化により自己免疫を促進することが示されており、そのような病態においては IL-6 シグナル阻害による Th17 分化抑制が RA の病態改善に有効である可能性が示唆された。また *MT1G* はメタロチオネインファミリー遺伝子の 1 つであるが、メタロチオネインは IL-6 により直接発現誘導される。メタロチオネイン遺伝子発現が IL-6 依存性炎症を反映している可能性が示唆された。現在 4 遺伝子によるカスタムアレイを作成中であり、関連血清マーカーとともに大規模での TCZ の薬効予測精度を検証予定である。

ARID5A 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、その分子機構として ROR γ t との直接結合による阻害が示唆された。近年 ARID5A の IL-6 mRNA の安定性を介した自己免疫への関与が報告されているが、その関節炎モデルにおける役割を現在検討中である。

複数の IRGs、メタロチオネイン I/II ファミリー遺伝子、さらに ARID5A は、TCZ 有効群において疾患活動性の低下に伴いその発現が低下した。TCZ 投与下における特異的な疾患活動性/薬効評価マーカーとしての有用性が示唆され、他の抗リウマチ薬投与患者を含め検証中である。

E. 結論

DNA マイクロアレイならびに qPCR による PBMC の網羅的遺伝子発現解析により、RA における TCZ の薬効を高精度に予測する 4 遺伝子が同定された。RA の病態における I 型 IFN やメタロチオネインの関与が示唆された。また RA 患者の末梢血 CD4 陽性 T 細胞において、TCZ 投与により発現低下する遺伝子として ARID5A が同定され、Th17 細胞分化の新規抑制分子であることが示された。TCZ 特異的薬効評価マーカーならびに新規治療ターゲット経路の候補と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

英文

1. Sanayama Y, Ikeda K, Saito Y, Kagami S, Yamagata M, Furuta S, Kashiwakuma D, Iwamoto I, Umibe T, Nawata Y, Matsumura R, Sugiyama T, Sueishi M, Hiraguri M, Nonaka K, Ohara O, Nakajima H. Prediction of therapeutic responses to tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis: biomarkers identified by analysis of gene expression in peripheral blood mononuclear cells using genome-wide DNA microarray. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:1421-31.
2. Saito Y, Kagami S, Sanayama Y, Ikeda K, Suto A, Kashiwakuma D, Furuta S, Iwamoto I, Nonaka K, Ohara O, Nakajima H. AT-rich-interactive domain-containing protein 5A functions as a negative regulator of retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor gamma-induced Th17 cell differentiation. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:1185-94.

国際学会

1. Sanayama Y, Ikeda K, Saito Y, Kagami S,

Yamagata M, Furuta S, Kashiwakuma D, Iwamoto I, Umibe T, Nawata Y, Matsumura R, Sugiyama T, Sueishi M, Hiraguri M, Nonaka K, Ohara O, Nakajima H. Prediction of therapeutic responses to tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis using biomarkers identified by genome-wide dna microarray analysis in peripheral blood mononuclear cells. **2014 European Colleague Against Rheumatism Congress**, Jun 2014, Paris.

国内学会

1. 齊藤ゆかり、加々美新一郎、眞山快枝、池田啓、岩本逸夫、小原収、中島裕史. AT-rich interactive domain-containing protein 5a functions as a negative regulator of ROR γ t-induced Th17 cell differentiation. 第42回日本免疫学会 総会・学術集会. 2013年12月, 千葉.

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

分担研究年度終了報告書 1

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アレルギー・臨床免疫学 教授

研究要旨

末梢血単核球（PBMC）の網羅的遺伝子発現解析により、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を新規に投与したRA患者40症例（トレーニングコホート）を6ヵ月間経過観察した。DNAマイクロアレイ（Agilent社製遺伝子発現用マイクロアレイ Human Whole Genome [19,416 遺伝子、41,000 プローブ]）を用いて治療前のPBMCの遺伝子発現を包括的に解析した。治療6ヵ月での治療効果判定を医師総合評価およびCDAI (Clinical Disease Activity Index) 変化により判定し、無効群と有効群で発現シグナル値に有意差のあるプローブを抽出した。

トレーニングコホートにおいて無効例と有効例でTCZ投与前のPBMCにおけるシグナル値に有意差を認め、かつ一定のシグナル強度を示す68プローブを同定した。それらの中で、重複して同定されたもの、同一ファミリー遺伝子、および免疫あるいは炎症反応に直接関連する19遺伝子23プローブを同定した。それらの中には、メタロチオネインI/II（4遺伝子、6プローブ）、インターフェロン関連遺伝子（4遺伝子、4プローブ）、ケモカイン/ケモカイン受容体（2遺伝子、3プローブ）等が含まれていた。

A. 研究目的

末梢血単核球（PBMC）の網羅的遺伝子発現解析により、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40症例（トレーニングコホート）を6ヵ月間経過観察した。0週、12週の時点で全血5mLをヘパリン採血し、Ficollを用いて速やかにPBMCを分離後、mRNAを抽出しDNAマイクロアレイを用いて遺伝子発現を包括的に解析した。DNAマイクロアレイはかずさ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（19,416 遺伝子、41,000

プローブ）を用いて行った。治療6ヵ月での治療効果判定を医師総合評価およびCDAI (Clinical Disease Activity Index) 変化により判定し、無効群と有効群で発現シグナル値に有意差のあるプローブを抽出した。

C. 結果

トレーニングコホートにおいて無効例（n=8）と有効例（n=29）でTCZ投与前のPBMCにおけるシグナル値に有意差を認め（図1）、かつ一定のシグナル強度を示す68プローブを同定した。それらの中で、重複して同定されたもの、同一ファミリー遺伝子、および免疫あるいは炎症反応に直接関連する19遺伝子23プローブに注目した。それらの中には、メタ

ロチオネイン I/II (4 遺伝子、6 プローブ)、インターフェロン関連遺伝子 (4 遺伝子、4 プローブ)、ケモカイン/ケモカイン受容体 (2 遺伝子、3 プローブ) 等が含まれていた。

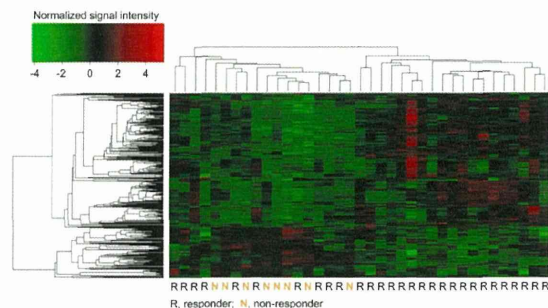


図 1. 無効例と有効例の間でシグナル値が有意に異なったプローブのクラスター解析

D. 考察

これらの候補遺伝子の発現を定量的リアルタイム PCR で確認し、さらに独立したコホートによりその薬効予測価値を確認し、予測モデルの確立を行った。

E. 結論

PBMC の網羅的遺伝子発現解析により、TCZ の薬効予測候補遺伝子が同定された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

英文

- Sanayama Y, Ikeda K, Saito Y, Kagami S, Yamagata M, Furuta S, Kashiwakuma D, Iwamoto I, Umibe T, Nawata Y, Matsumura R, Sugiyama T, Sueishi M, Hiraguri M, Nonaka K, Ohara O, Nakajima H. Prediction of therapeutic responses to tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis: biomarkers identified by analysis of gene expression in peripheral blood mononuclear cells using genome-wide DNA microarray. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:1421-31.

- Saito Y, Kagami S, Sanayama Y, Ikeda K, Suto A, Kashiwakuma D, Furuta S, Iwamoto I, Nonaka K, Ohara O, Nakajima H. AT-rich-interactive domain-containing protein 5A functions as a negative regulator of retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor gammat-induced Th17 cell differentiation. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:1185-94.

国際学会

- Sanayama Y, Ikeda K, Saito Y, Kagami S, Yamagata M, Furuta S, Kashiwakuma D, Iwamoto I, Umibe T, Nawata Y, Matsumura R, Sugiyama T, Sueishi M, Hiraguri M, Nonaka K, Ohara O, Nakajima H. Prediction of therapeutic responses to tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis using biomarkers identified by genome-wide dna microarray analysis in peripheral blood mononuclear cells. *2014 European Colleague Against Rheumatism Congress*, Jun 2014, Paris.

国内学会

- 齊藤ゆかり、加々美新一郎、眞山快枝、池田啓、岩本逸夫、小原収、中島裕史. AT-rich interactive domain-containing protein 5a functions as a negative regulator of ROR γ t-induced Th17 cell differentiation. 第 42 回日本免疫学会 総会・学術集会. 2013 年 12 月, 千葉.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 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
- 実用新案登録
なし
- 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

分担研究年度終了報告書 2

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に関する研究

研究分担者 廣瀬 晃一

千葉大学大学院医学研究院アレルギー・臨床免疫学 准教授

研究要旨

末梢血単核球（PBMC）の網羅的遺伝子発現解析のデータにより抽出された 19 遺伝子の、定量的リアルタイム PCR（qPCR）による発現解析により、関節リウマチ（RA）に対するトシリズマブ（TCZ）の薬効予測モデルを構築することを目的とした。

19 遺伝子に対して特異的なプライマーを設定し、健常者ならびに RA 患者の PBMC の RNA 検体において qPCR と DNA マイクロアレイのシグナル値との相関を検討した。相関の高い遺伝子を用いて TCZ 薬効予測モデルを構築し、バリデーションコホート（n = 20）を用いてその精度を検証した。

19 遺伝子中、15 遺伝子で qPCR による発現と DNA マイクロアレイシグナル値との相関が確認できた。バリデーションコホートにおいて、無効例（n=5）と有効例（n=15）の間で TCZ 投与前の PBMC における qPCR による発現値に有意な差を認めたものは、15 遺伝子中 4 遺伝子（*IFI6*, *MX2*, *OASL*, *MT1G*）であった。これらの遺伝子を用いた TCZ の薬効予測モデルでは、Receiver operating characteristic（ROC）解析の曲線下面積が 0.947、感度 73.3%、特異度 100%と良好な結果が得られた。

DNA マイクロアレイならびに qPCR による PBMC の網羅的遺伝子発現解析により、RA における TCZ の薬効を高精度に予測する 4 遺伝子が同定された。RA の病態における I 型 IFN やメタロチオネインの関与が示唆された。

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により抽出された遺伝子の、定量的リアルタイム PCR（qPCR）による発現解析により、関節リウマチ（RA）に対するトシリズマブ（TCZ）の薬効予測モデルを構築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 40 症例の PBMC の DNA マイクロアレイを用いて、有効例と無効例で発現の異なる予測遺伝子

を抽出した。それぞれの遺伝子に対して特異的なプライマーを設定し、健常者ならびに RA 患者の PBMC の RNA 検体において qPCR と DNA マイクロアレイのシグナル値との相関を検討した。相関の高い遺伝子を用いて TCZ 薬効予測モデルを構築し、バリデーションコホート（n = 20）を用いてその精度を検証した。

C. 結果

トレーニングコホートにおいて無効例（n=8）と有効例（n=29）で TCZ 投与前

のPBMCにおけるシグナル値に有意差を認め、かつ一定のシグナル強度を示す68プローブを同定した。それらの中で、重複して同定されたもの、同一ファミリー遺伝子、および免疫あるいは炎症反応に直接関連する19遺伝子23プローブに注目した。さらにそれらの中で、qPCRによる発現とDNAマイクロアレイシグナル値との相関が確認できた15遺伝子を予測候補遺伝子とした。バリデーションコホートにおいて、無効例(n=5)と有効例(n=15)の間でTCZ投与前のPBMCにおけるqPCRによる発現値に有意な差を認められたものは、15遺伝子中4遺伝子(*IFI6*, *MX2*, *OASL*, *MTIG*)であった(表1)。これらの遺伝子を用いたTCZの薬効予測モデルでは、Receiver operating characteristic (ROC)解析の曲線下面積が0.947、感度73.3%、特異度100%と良好な結果が得られた。

Gene	Expression relative to GAPDH, mean \pm SD		P
	Nonresponders	Responders	
<i>CCL3L3</i>	0.22908 \pm 0.11719	0.71191 \pm 1.14197	0.128
<i>CCL4</i>	0.47432 \pm 0.52809	0.32468 \pm 0.16105	0.565
<i>CD83</i>	0.09453 \pm 0.06540	0.12588 \pm 0.20742	0.623
<i>CXCR4</i>	2.02442 \pm 0.52763	2.60166 \pm 1.34114	0.186
<i>FOSL2</i>	0.12600 \pm 0.05244	0.15703 \pm 0.13811	0.477
<i>HP</i>	0.01959 \pm 0.01192	0.03599 \pm 0.03659	0.148
<i>IFI6</i>	0.01166 \pm 0.00514	0.01517 \pm 0.01106	0.038
<i>LY6E</i>	0.21193 \pm 0.09510	0.41288 \pm 0.45754	0.128
<i>MTIG</i>	0.00039 \pm 0.00030	0.00164 \pm 0.00128	0.003
<i>MT2A</i>	0.26977 \pm 0.10763	0.35474 \pm 0.24362	0.299
<i>MX2</i>	0.07054 \pm 0.02718	0.13847 \pm 0.08220	0.012
<i>OASL</i>	0.03208 \pm 0.00883	0.07313 \pm 0.06817	0.038
<i>RABGEF1</i>	0.03439 \pm 0.01607	0.05279 \pm 0.03053	0.107
<i>THBS1</i>	0.12593 \pm 0.10264	0.24968 \pm 0.26263	0.149
<i>WARS</i>	0.42023 \pm 0.15457	0.51446 \pm 0.28856	0.371

表1. バリデーションコホートのTCZ投与前のPBMCにおける15遺伝子の発現

D. 考察

IFI6, *MX2*, *OASL* はいずれも Type I interferon (IFN) response gene (IRG) であり、その他候補となった19遺伝子のうち *LY6E* も IRG であった。IRG の末梢血における高発現

は、TNF 阻害薬においても良好な薬効予測因子であることが報告されているが、B 細胞標的薬であるリツキシマブでは逆に治療不応性の予測因子であることが示されており、IRG 発現は薬剤選択に有用なバイオマーカーであることが示唆される。I 型 IFN は Th17 分化により自己免疫を促進することが示されており、そのような病態においては IL-6 シグナル阻害による Th17 分化抑制が RA の病態改善に有効である可能性が示唆された。また *MTIG* はメタロチオネインファミリー遺伝子の1つであるが、メタロチオネインは IL-6 により直接発現誘導される。メタロチオネイン遺伝子発現が IL-6 依存性炎症を反映している可能性が示唆された。

E. 結論

DNA マイクロアレイならびに qPCR による PBMC の網羅的遺伝子発現解析により、RA における TCZ の薬効を高精度に予測する4遺伝子が同定された。RA の病態における I 型 IFN やメタロチオネインの関与が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

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 CD4 陽性 T 細胞における経時的な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新規薬効評価マーカーの同定と
効果発現機序の解明に関する研究

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

関節リウマチに対するトシリズマブの新規薬効評価マーカーの同定と効果発現機序の解明のため、トシリズマブ投与により末梢血 CD4 陽性 T 細胞において発現の変動する遺伝子を抽出することを目的とした。

TCZ を新規に投与した RA 患者 20 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 週の時点で全血 10mL をヘパリン採血し、Ficoll-Paque を用いて速やかに PBMC を分離、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。

TCZ 投与症例およびコントロール薬剤投与症例において P 値の低いプローブがそれぞれ上位 100 個ずつ抽出された。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 により発現の低下している遺伝子であった。

抽出遺伝子中、これまでヘルパー T 細胞分化に関する知見のない遺伝子 AT-rich interactive domain-containing protein 5a (ARID5A) につき機能解析を行った。またその他 3 遺伝子につき現在解析が進行中である。TCZ 投与により末梢血 CD4 陽性 T 細胞において TCZ 有効症例特異的に変動する遺伝子が抽出され、TCZ の新規薬効評価マーカーの同定と効果発現機序の解明のための関連候補遺伝子が明らかとなった。

A. 研究目的

関節リウマチに対するトシリズマブの新規薬効評価マーカーの同定と効果発現機序の解明のため、トシリズマブ投与により末梢血 CD4 陽性 T 細胞において発現の変動する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 20 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 週の時点で全血 10mL をヘパリン採血し、Ficoll-Paque を用いて速やかに PBMC を分離、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。CDAI 変化量および医師総合評価にて有効であった TCZ 投与 17 症例、ならびにコントロール薬剤投与 16 症例において、0 週

から12週でのシグナル値の変動が1.5倍以上かつt検定でのP値が0.05未満のプローブを、それぞれ抽出した。

C. 結果

TCZ 投与症例およびコントロール薬剤投与症例においてP値の低いプローブがそれぞれ上位100個ずつ抽出された。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により発現の低下している遺伝子であった。

D. 考察

TCZ による薬効評価では血液検査による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が大きい。上記抽出遺伝子の解析により、TCZ 効果発現機序がより詳細に解明され得るとともに、新規薬効評価マーカーの開発が期待される。変動遺伝子中、これまでヘルパーT細胞分化に関する知見のない遺伝子 AT-rich interactive domain-containing protein 5a (ARID5A)につき機能解析を行った(図1)。またその他3遺伝子につき現在解析が進行中である。

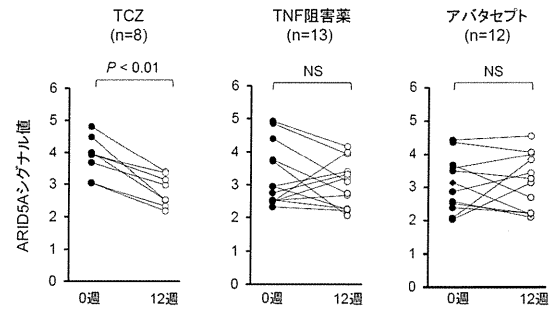


図1. TCZ 治療によるPBMCにおけるARID5Aの発現変動

E. 結論

TCZ 投与により末梢血CD4陽性T細胞においてTCZ有効症例特異的に変動する遺伝子が抽出され、TCZの新規薬効評価マーカーの同定と効果発現機序の解明のための関連候補遺伝子が明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

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 4

AT-rich interactive domain-containing protein 5a (ARID5A) の
ヘルパーT細胞分化における役割の解明に関する研究

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

トシリズマブ投与により RA 患者の末梢血 CD4 陽性 T 細胞で発現の低下する遺伝子として抽出された AT-rich interactive domain-containing protein 5a (ARID5A) の、ヘルパーT細胞分化における役割を解明することを目的とした。

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 ARID5A の mRNA 発現が亢進していた。興味深いことに、マウス脾臓由来の CD4 陽性 T 細胞にレトロウイルスベクターを用いて ARID5A を強制発現させると、Th17 細胞分化が低下した。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 ARID5A の mRNA 発現が著明に低下していた。レポーター解析では ARID5A の強制発現は ROR γ t による IL-17 発現を抑制し、またウェスタンブロットにより ARID5A と ROR γ t の直接結合が示された。

RA 患者の末梢血 CD4 陽性 T 細胞において、TCZ 投与により発現低下する遺伝子として ARID5A が同定され、Th17 細胞分化の新規抑制分子であることが示された。TCZ 特異的薬効評価マーカーならびに新規治療ターゲット経路の候補と考えられた。

RA 患者の末梢血 CD4 陽性 T 細胞において、TCZ 投与により発現低下する遺伝子として ARID5A が同定され、Th17 細胞分化の新規抑制分子であることが示された。TCZ 特異的薬効評価マーカーならびに新規治療ターゲット経路の候補と考えられた。

A. 研究目的

トシリズマブ投与により RA 患者の末梢血 CD4 陽性 T 細胞で発現の低下する遺伝子として抽出された AT-rich interactive domain-containing protein 5a (ARID5A) の、ヘルパーT細胞分化における役割を解明することを目的とした。

B. 方法

ヒト末梢血およびマウス脾臓由来のナイーブ CD4 陽性 T 細胞から分化誘導した Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞、Tfh 細胞、Treg

細胞における ARID5A の発現をリアルタイム PCR 法で解析した。マウス脾臓由来の CD4 陽性 T 細胞にレトロウイルスベクターを用いて ARID5A を GFP と共に強制発現させ、各ヘルパーT細胞の分化誘導条件で培養した際のヘルパーT細胞分化への影響を細胞内サイトカイン染色法により解析した。また T 細胞特異的 STAT3/ROR γ t 欠損マウスの脾臓由来のナイーブ CD4 陽性 T 細胞を各種条件で分化誘導した際の ARID5A の発現を解析した。

C. 結果

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 ARID5A の mRNA 発現が亢進していた (図 1)。興味深いことに、マウス脾臓由来の CD4 陽性 T 細胞にレトロウイルスベクターを用いて ARID5A を強制発現させると、Th17 細胞分化が低下した (図 2)。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 ARID5A の mRNA 発現が著明に低下していた。レポーター解析では ARID5A の強制発現は ROR γ t による IL-17 発現を抑制し (図 3)、またウェスタンブロットにより ARID5A と ROR γ t の直接結合が示された。

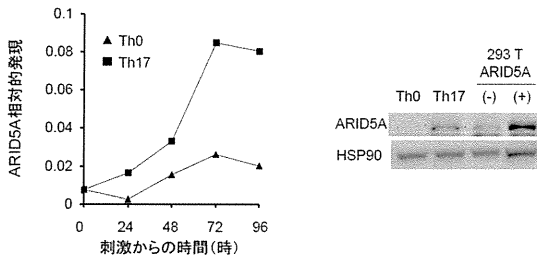


図 1. マウス Th17 分化における ARID5A の発現

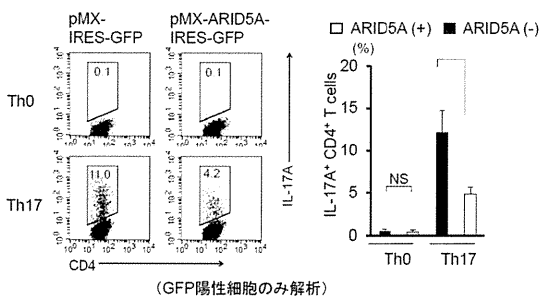


図 2. マウス CD4 陽性 T 細胞における ARID5A の強制発現による Th17 細胞分化の低下

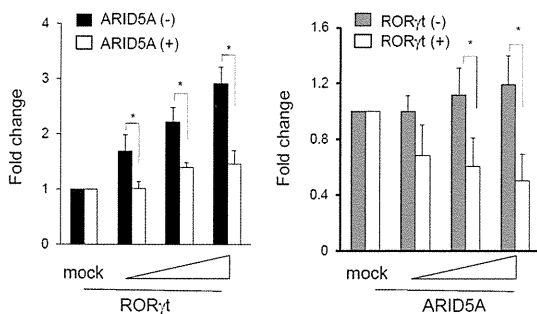


図 3. ARID5A および ROR γ t の強制発現によ

る IL-17 プロモーター活性の変化

D. 考察

ARID5A 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、その分子機構として ROR γ t との直接結合による阻害が示唆された。

E. 結論

RA 患者の末梢血 CD4 陽性 T 細胞において、TCZ 投与により発現低下する遺伝子として ARID5A が同定され、Th17 細胞分化の新規抑制分子であることが示された。TCZ 特異的薬効評価マーカーならびに新規治療ターゲット経路の候補と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

英文

- Sanayama Y, Ikeda K, Saito Y, Kagami S, Yamagata M, Furuta S, Kashiwakuma D, Iwamoto I, Umibe T, Nawata Y, Matsumura R, Sugiyama T, Sueishi M, Hiraguri M, Nonaka K, Ohara O, Nakajima H. Prediction of therapeutic responses to tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis: biomarkers identified by analysis of gene expression in peripheral blood mononuclear cells using genome-wide DNA microarray. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:1421-31.
- Saito Y, Kagami S, Sanayama Y, Ikeda K, Suto A, Kashiwakuma D, Furuta S, Iwamoto I, Nonaka K, Ohara O, Nakajima H. AT-rich-interactive domain-containing protein 5A functions as a negative regulator of retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor gamma-induced Th17 cell differentiation. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:1185-94.

国際学会

1. Sanayama Y, Ikeda K, Saito Y, Kagami S, Yamagata M, Furuta S, Kashiwakuma D, Iwamoto I, Umibe T, Nawata Y, Matsumura R, Sugiyama T, Sueishi M, Hiraguri M, Nonaka K, Ohara O, Nakajima H. Prediction of therapeutic responses to tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis using biomarkers identified by genome-wide dna microarray analysis in peripheral blood mononuclear cells. *2014 European Colleague Against Rheumatism Congress*, Jun 2014, Paris.

国内学会

1. 齊藤ゆかり、加々美新一郎、眞山快枝、

池田啓、岩本逸夫、小原収、中島裕史.
AT-rich interactive domain-containing protein 5a functions as a negative regulator of ROR γ t-induced Th17 cell differentiation. 第42回日本免疫学会 総会・学術集会. 2013年12月, 千葉.

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

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・頁	出版年
Sanayama Y, Ikeda K, Saito Y, Kagami S, Yamagata M, Furuta S, Kashiwakuma D, Iwamoto I, Umibe T, Nawata Y, Matsumura R, Sugiyama T, Sueishi M, Hiraguri M, Nonaka K, Ohara O, Nakajima H.	Prediction of therapeutic responses to tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis: biomarkers identified by analysis of gene expression in peripheral blood mononuclear cells using genome-wide DNA microarray	<i>Arthritis Rheumatol</i>	66:1421-31	2014
Saito Y, Kagami S, Sanayama Y, Ikeda K, Suto A, Kashiwakuma D, Furuta S, Iwamoto I, Nonaka K, Ohara O, Nakajima H.	AT-rich-interactive domain-containing protein 5A functions as a negative regulator of retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor gamma-induced Th17 cell differentiation	<i>Arthritis Rheumatol</i>	66:1185-94	2014

Prediction of Therapeutic Responses to Tocilizumab in Patients With Rheumatoid Arthritis

Biomarkers Identified by Analysis of Gene Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells Using Genome-Wide DNA Microarray

Yoshie Sanayama,¹ Kei Ikeda,¹ Yukari Saito,¹ Shin-ichiro Kagami,² Mieko Yamagata,² Shunsuke Furuta,² Daisuke Kashiwakuma,³ Itsuo Iwamoto,³ Takeshi Umibe,⁴ Yasushi Nawata,⁵ Ryutaro Matsumura,⁶ Takao Sugiyama,⁷ Makoto Sueishi,⁷ Masaki Hiraguri,⁸ Ken Nonaka,⁹ Osamu Ohara,⁹ and Hiroshi Nakajima¹

Objective. The aim of this prospective multicenter study was to identify biomarkers that can be used to predict therapeutic responses to tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (RA).

Methods. We recruited patients with RA who were treated with tocilizumab for the first time, and determined therapeutic responses at 6 months. In the training cohort (n = 40), gene expression in peripheral blood

mononuclear cells (PBMCs) at baseline was analyzed using genome-wide DNA microarray, with 41,000 probes derived from 19,416 genes. In the validation cohort (n = 20), expression levels of the candidate genes in PBMCs at baseline were determined using real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis.

Results. We identified 68 DNA microarray probes that showed significant differences in signal intensity between nonresponders and responders in the training cohort. Nineteen putative genes were selected, and a significant correlation between the DNA microarray signal intensity and the qPCR relative expression was confirmed in 15 genes. In the validation cohort, a significant difference in relative expression between nonresponders and responders was reproduced for 3 type I interferon response genes (*IFI6*, *MX2*, and *OASL*) and *MTIG*. Receiver operating characteristic curve analysis of models incorporating these genes showed that the maximum area under the curve was 0.947 in predicting a moderate or good response to tocilizumab in the validation cohort.

Conclusion. Using genome-wide DNA microarray analyses, we identified candidate biomarkers that can be used to predict therapeutic responses to tocilizumab in patients with RA. These findings suggest that type I interferon signaling and metallothioneins are involved in the pathophysiology of RA.

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease characterized by joint swelling, joint tenderness, and destruction of synovial joints, which

Supported by the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan (Health Labor Sciences Research Grant on Allergic Disease and Immunology) and the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (through the Regional Innovation Strategy Support Program and Grants-in-Aids for Scientific Research).

¹Yoshie Sanayama, MD, Kei Ikeda, MD, PhD, Yukari Saito, MS, Hiroshi Nakajima, MD, PhD: Chiba University Hospital, Chiba, Japan; ²Shin-ichiro Kagami, MD, PhD, Mieko Yamagata, MD, Shunsuke Furuta, MD, PhD: Chiba University Hospital, Chiba, Japan, and Asahi General Hospital, Asahi, Japan; ³Daisuke Kashiwakuma, MD, PhD, Itsuo Iwamoto, MD, PhD: Asahi General Hospital, Asahi, Japan; ⁴Takeshi Umibe, MD, PhD: Matsudo City Hospital, Matsudo, Japan; ⁵Yasushi Nawata, MD, PhD: Chibaken Saiseikai Narashino Hospital, Narashino, Japan; ⁶Ryutaro Matsumura, MD, PhD: National Hospital Organization Chiba-East Hospital, Chiba, Japan; ⁷Takao Sugiyama, MD, PhD, Makoto Sueishi, MD, PhD: National Hospital Organization Shimoshizu Hospital, Yotsukaido, Japan; ⁸Masaki Hiraguri, MD: Narita Red Cross Hospital, Narita, Japan; ⁹Ken Nonaka, MS, Osamu Ohara, PhD: Kazusa DNA Research Institute, Kisarazu, Japan.

Dr. Nakajima has received consulting fees, speaking fees, and/or honoraria (more than \$10,000) as well as research grant funding from Chugai Pharmaceutical Company, Ltd.

Address correspondence to Kei Ikeda, MD, PhD, or Hiroshi Nakajima, MD, PhD, Department of Allergy and Clinical Immunology, Chiba University Hospital, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba-shi, Chiba 260-8670, Japan. E-mail: K.Ikeda@faculty.chiba-u.jp or nakajimh@faculty.chiba-u.jp.

Submitted for publication November 28, 2013; accepted in revised form February 4, 2014.

cause disability and premature mortality (1,2). Accumulating evidence supports the notion that immune cells, including T cells, B cells, dendritic cells, and the macrophages and proinflammatory cytokines produced by these cells (such as tumor necrosis factor α [TNF α] and interleukin-6 [IL-6]), play essential roles in the pathogenesis of RA (3–5). In fact, treatment with biologic antirheumatic drugs, which specifically inhibits these cytokines or cellular interactions, has substantially improved clinical, structural, and functional outcomes of RA (2,4,6). However, treatment with a biologic agent is not universally efficacious in all patients, reflecting the heterogeneous molecular and cellular mechanisms underlying the pathophysiology of RA (4,5).

Considering the cost and the risk of infection, biologic agents should be prescribed only to patients in whom therapeutic responses to the drug are likely to be achieved. However, studies that assessed the predictive values of clinical and laboratory information for therapeutic responses to TNF antagonists have yielded neither consistent results nor clinically applicable strategies. Although some genetic factors have been identified as potentially predictive markers of therapeutic responses to TNF antagonists, a meta-analysis and data from a large registry showed no association between therapeutic response to TNF antagonists and TNF-308 polymorphisms (7) or shared epitope motifs (8), the genetic markers that have been considered the most promising candidates. These data suggest that clinical information and genetic markers may not be accurate predictors of responses to treatment with biologic agents.

DNA microarray analysis enables assessment of expression of messenger RNA (mRNA) for multiple genes in the target cells or tissues. Previous studies showed that mRNA expression analyses of a set of genes using microarray techniques predicted clinical responses to infliximab (9–12) or rituximab (13) in RA patients. These data indicate that DNA microarray is a powerful tool that can be used to identify genes that may be biomarkers for the prediction of clinical responses to certain antirheumatic treatments in RA patients.

Tocilizumab (TCZ) is a humanized anti-IL-6 receptor (anti-IL-6R) monoclonal antibody that inhibits IL-6 signaling by blocking the binding of IL-6 to IL-6R. Although the overall rate of response to TCZ in RA patients is high (14–16), the improvement of synovitis in these patients is frequently slow to become clinically apparent as compared with improvement seen in patients treated with TNF antagonists. Therefore, it can take months to determine whether TCZ treatment has lacked effectiveness, thereby possibly exposing patients

to unnecessary risks, including damage progression and side effects, at a disproportionate cost. Thus, predicting therapeutic responses can be particularly beneficial for TCZ, but such methods of prediction, with sufficient accuracy, have not been established yet. This prospective multicenter study aimed to identify biomarkers that can be used to predict therapeutic responses to TCZ in patients with RA. We used genome-wide DNA microarray to analyze comprehensive gene expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

PATIENTS AND METHODS

Patients and healthy subjects. Patients who fulfilled the American College of Rheumatology (ACR) 1987 revised criteria for the classification of RA (17) and who received treatment with TCZ for the first time at a participating hospital (Chiba University Hospital, Asahi General Hospital, Matsudo City Hospital, Chibaken Saiseikai Narashino Hospital, National Hospital Organization Chiba-East Hospital, National Hospital Organization Shimoshizu Hospital, or Narita Red Cross Hospital) were consecutively recruited. Forty patients were recruited for the training cohort for identification of candidate genes, and another 20 patients were recruited for the validation cohort for confirming predictive values of these genes. Patients received routine clinical care and underwent clinical and laboratory assessment at baseline and at 3 and 6 months after initiation of TCZ treatment. Healthy subjects who did not have any arthritis symptoms were also recruited as controls. The study design was approved by the Ethics Committee of Chiba University, and written informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki.

Clinical and laboratory assessment. Clinical and laboratory assessment included 28-joint counts for swelling and tenderness, patient's global assessment and physician's global assessment of disease activity on a visual analog scale (VAS), Health Assessment Questionnaire Disability Index (18), erythrocyte sedimentation rate (ESR), and C-reactive protein (CRP) level. Rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated protein antibody levels were investigated at baseline only.

Response to therapy with TCZ. Because IL-6 blockade with TCZ substantially decreases markers of acute inflammation, such as ESR and serum CRP levels, regardless of therapeutic response (19,20), response criteria that include these markers, such as ACR or European League Against Rheumatism (EULAR) response criteria, were not used in this study. Instead, clinical responses to TCZ treatment were determined primarily by physician's global assessment (good/moderate/no response) at 6 months. This assessment was determined by consensus among the physicians (Yoshie Sanayama, KI, SK, SF, DK, TU, YN, RM, TS, MS, or MH) and an independent rheumatologist (Yoshie Sanayama or KI) through a review of comprehensive clinical information. The change in Clinical Disease Activity Index (CDAI) category (high = >22, moderate = >10–22, low = >2.8–10, or remission = \leq 2.8) (21) at 6 months was also used to supplement the physician's global assessment.

Table 1. Baseline characteristics of the patients in the training and validation cohorts*

Baseline variable	Training cohort			Validation cohort		
	Total (n = 40)†	Nonresponder (n = 8)	Responder (n = 29)	Total (n = 20)	Nonresponder (n = 5)	Responder (n = 15)
Age, mean ± SD years	58.4 ± 15.2	54.3 ± 10.2	59.5 ± 16.8	60.9 ± 9.9	61.6 ± 11.1	60.7 ± 9.8
Female, no. (%)	31 (78)	5 (63)	23 (79)	16 (80)	4 (80)	12 (80)
Disease duration, median (IQR) months	57.5 (18.3–173.8)	92 (25.3–188.8)	58 (13–171)	44.5 (19–120.8)	46 (43–359)	39 (17.5–94)
Rheumatoid factor positive, no. (%)	34 (85)	7 (88)	25 (86)	18 (90)	4 (80)	14 (93)
ACPA positive, no. (%)	34 (85)	8 (100)	25 (86)	15 (75)	4 (80)	11 (73)
Antinuclear antibody positive, no. (%)	24 (60)	4 (50)	19 (66)	8 (40)	2 (40)	6 (40)
Anti-SSA antibody positive, no. (%)	6 (15)	0 (0)	6 (21)	5 (25)	1 (20)	4 (27)
Extraarticular manifestation present, no (%)	11 (28)	4 (50)	6 (21)	1 (5)	0 (0)	1 (7)
Smoking history, no. (%)						
Never smoked	28 (70)	6 (75)	20 (69)	16 (80)	5 (100)	11 (73)
Ex-smoker	10 (25)	2 (25)	7 (24)	1 (5)	0 (0)	1 (7)
Current smoker	2 (5)	0 (0)	2 (7)	3 (15)	0 (0)	3 (20)
Tender joint count, median (IQR)	5 (1–7.8)	5 (0.8–10.5)	5 (1–7)	4 (2–8.3)	4 (2–8)	4 (1.5–7.5)
Swollen joint count, median (IQR)	8.5 (4–11)	7 (3.5–9.3)	9 (5–12)	8 (2–9.5)	2 (1–3)	8 (2.5–10)
CDAI, median (IQR)	24.2 (20.3–31.23)	25.25 (19.8–28.8)	24.9 (20.5–31.9)	21.4 (14.95–25)	19.5 (13–21.8)	22.6 (15.85–25)
ESR, median (IQR) mm/hour	44 (30.3–68.8)	47.5 (28.5–79.8)	44 (32–67)	52 (36–67)	45 (37–61)	55.5 (37.8–70.8)
CRP, median (IQR) mg/dl	2.355 (0.75–4.1)	2.375 (1.528–5.11)	2.41 (0.79–4.1)	1.025 (0.415–2.585)	0.99 (0.9–1.05)	1.52 (0.38–3.275)
DAS28 score based on ESR, median (IQR)	5.35 (4.475–6.033)	5.365 (4.145–6.388)	5.34 (4.595–5.975)	5.09 (4.41–5.47)	4.73 (4.44–5.33)	5.21 (4.46–5.485)
MMP-3 level, median (IQR) ng/ml	199.5 (121.5–323.75)	233.5 (121.3–358.0)	196 (124–320)	224 (125–328.5)	138 (133–245.8)	239 (134–364.5)
Dosage of MTX, median (IQR) mg/week	8 (0–10.5)	6 (4.5–7.6)	8 (0–12.5)	6.8 (3–13)	10 (6–12)	6 (0–14)
Dosage of prednisolone, median (IQR) mg/day	3.9 (0–5)	5.5 (2.8–6.8)	3 (0–5)	1 (0–5)	0 (0–2.5)	1 (0–5)
Treatment with TNF antagonists, no. (%)						
Never	15 (38)	3 (38)	12 (41)	7 (35)	2 (40)	5 (33)
Previous	3 (8)	1 (13)	2 (7)	4 (20)	1 (20)	3 (20)
Current	22 (55)	4 (50)	15 (52)	9 (45)	2 (40)	7 (47)

* There were no statistically significant differences between responders and nonresponders in either the training cohort or the validation cohort. IQR = interquartile range; ACPA = anti-citrullinated protein antibody; CDAI = Clinical Disease Activity Index; ESR = erythrocyte sedimentation rate; CRP = C-reactive protein; DAS28 = Disease Activity Score in 28 joints; MMP-3 = matrix metalloproteinase 3; MTX = methotrexate; TNF = tumor necrosis factor.

† Three patients were not classified as responder or nonresponder because tocilizumab treatment was discontinued before they had received 3 months of treatment.

DNA microarray analysis. At baseline, PBMCs from patients in the training and validation cohorts, as well as from healthy controls, were isolated using Ficoll-Paque Premium 1.073 (GE Healthcare). PBMCs were also isolated from patients in the training cohort at 3 months (which is earlier than the time at which a therapeutic response can be determined) to assess the more direct effects of TCZ on gene expression. Total cellular RNA was extracted from PBMCs using Isogen solution (Nippon Gene). For patients in the training cohort and for healthy controls, DNA microarray analysis was performed using a Quick Amp labeling kit and a Whole Human Genome DNA Microarray 4×44K according to the protocol of the manufacturer (Agilent). Microarray data were analyzed

using GeneSpring GX11.5.1 software (Agilent). Signal intensity was normalized by adjusting data to a 75th percentile baseline.

Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis. Real-time qPCR analysis was performed in both the training and validation cohorts at baseline. The genes and the corresponding primers used are listed in Supplementary Table 1, available on the *Arthritis & Rheumatology* web site at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.38400/abstract>. Reverse transcription of extracted RNA was performed using an iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad). Expression levels were measured with an ABI Prism 7300 instrument according to the standard protocol recommended