

201407020B

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

課題番号 (H24-バイオ-一般-002)

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

平成 24 年度～26 年度 総合研究報告書

研究代表者 仲 哲治

独立行政法人医薬基盤研究所

平成 27(2015)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

課題番号 (H24-バイオ一般-002)

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

平成 24 年度～26 年度 総合研究報告書

研究代表者 仲 哲治

独立行政法人医薬基盤研究所

平成 27(2015)年 3 月

目 次

I. 総合研究報告

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（総合）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	15
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	19
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	28
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	35
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	39

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	49
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	70
-----------------------	----

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

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

研究要旨

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

H24 年度から H26 年度にかけて、LRG モノクローナル抗体を作成し、血液中の LRG を定量出来る ELISA システムを構築した。本 ELISA システムはヒト LRG 以外にもカニクイザル血漿 LRG も定量可能であった。ELISA システムを用いて、次世代型 IL-6 受容体抗体投与時のカニクイザルコラーゲン誘発関節炎モデルの血漿 LRG を定量した結果、血中 LRG 濃度が CRP よりも関節炎スコアおよび病理スコアとより強く相関することを明らかにした。抗 IL-6 受容体抗体による治療を受ける RA 患者 106 例より血清を収集し、血液中の LRG 濃度を定量した結果、疾患活動性の高い患者において血清 LRG が有意に高いことを明らかにした。これらの結果、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、疾患活動性を正確に把握する上で血中 LRG 濃度を定量する事の有用性が示唆された。

研究分担者

竹内勤	慶應義塾大学 医学部 リウマチ内科学	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	准教授
角田慎一	医薬基盤研究所 創薬基盤研究部 バイオ創薬プロジェクト	プロジェクトリーダー
服部有宏	中外製薬株式会社 富士御殿場研究所 研究本部 探索研究部	探索研究部長

A. 研究目的

本研究の目的は、治験が予定されている次世代型 IL-6 受容体抗体(スーパー特区で開発中)投与前後の関節リウマチ(RA)患者血清の leucine-rich alpha-2 glycoprotein (LRG) を測定し、LRG が IL-6 受容体抗体投与時にも信頼性の高い新たな炎症マーカーであることと、生物学的製剤使用時に併発する感染症を早期に検出できるマーカーとなる事を証明し、最終的には臨床検査として血清 LRG 測定を実用化することである。

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

され、IL-6 阻害時にも上昇することを明らかにした(Serada S, Naka T. *et al*, Inflamm Bowel Dis. 2012)。さらに、結核や重症感染症においても血中 LRG 濃度が上昇するというデータも持ち合わせている。したがって、LRG は次世代型 IL-6 受容体抗体投与時にも薬剤に影響されずに正確に疾患活動性を反映するマーカーであることが大いに期待される。なお、感染症併発時にも LRG は上昇すると期待されるが、原疾患の悪化か感染症併発かは臨床症状から十分鑑別可能と考えられる。

本研究では、治験が予定されている次世代型抗 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、次世代型 IL-6 受容体抗体投与時のカニクイザルコラーゲン誘発関節炎モデルの血漿 LRG 濃度と疾患活動性スコア、病理スコアとの相関を解析した。さらに、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)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 106 例収集し、それに対応する詳細な臨床情報についても収集した。

(2) ヒトの結成中の LRG をに対する抗体の開発

ウサギ(N=3)にヒト LRG-FLAG/His タンパク質を 4 回免疫し、末梢血リンパ球と脾臓より IgG 陽性の B 細胞を MACS で精製し、LRG と結合する抗体を持つ細胞を FACS にて選択した。抗体の可変領域の DNA 配列解析を行い、動物細胞に抗体遺伝子を導入して培養上清から抗体を精製した。Octet システムを用いた相互作用解析により、native な立体構造の LRG と結合する抗体を選別した。

サンドイッチ ELISA では、2 種類の抗体を組み合わせる必要があるが、2 種類ともウサギモノクローナル抗体であると、検出が困難となる。そこで、効率的にサンドイッチ ELISA システムを開発できるように、それぞれのクローン(ウサギモノクローナル抗体)について、Fc 領域をヒト IgG1 型に変換したものを作成し、固相化用抗体にはヒト IgG1 型、検出用抗体にはウサギ IgG 型抗体を使用した。

(3) 次世代型抗 IL-6 受容体抗体の投与を受けたカニクイザルコラーゲン関節炎モデルの血漿中 LRG の定量

研究分担者の服部有宏のグループによりカニクイザルコラーゲン関節炎モデルを誘導し、次世代型抗 IL-6 受容体抗体を投与した際の血漿を CRP 値、関節炎スコア、病理スコアとともに基盤研に輸送した。

病理スコアは以下のようにスコア化した。

- ・滑膜細胞の過形成:滑膜細胞の増加(1点)、滑膜細胞の著しい増加(2点)、
- ・肉芽組織形成:関節腔の 30%未満(0.5点)、関節腔の 30-80%(1点)、関節腔の 80%以上(2点)
- ・線維症:低密度な線維(1点)、豊富で密な線維および癭痕細胞(2点)
- ・関節軟骨の破壊:関節軟骨の表面が粗い、

軟骨中の輪状・紡錘状の軟骨細胞の消失(0.5点)、好酸性な関節軟骨、軟骨細胞の変性壊死、部分的破壊(1点)、関節軟骨の広範囲な破壊(2点)

・骨破壊:部分的な骨の破壊(1点)、髄質腔の骨破壊(2点)

・骨形成:骨芽細胞の増加と骨新生血管新生(1点)、マクロファージ浸潤(1点)

(4) 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、緒方篤准教授より提供していただいた。

(倫理面への配慮)

動物実験は実験動物委員会の承認を得、適切な取り扱いを行った。

インフォームドコンセント

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

個人情報保護

大阪大学医学部附属病院においては呼吸

器・免疫アレルギー内科、立花功助教、東京医科歯科大学医学部附属病院においては薬害監視学講座、南木敏宏寄附講座准教授、慶應義塾大学附属病院においては西川あゆみ助教を個人情報管理者とし連結可能匿名化することで個人情報の管理を行った。医薬基盤研究所には大阪大学医学部附属病院、東京医科歯科大学医学部附属病院、慶應義塾大学附属病院において連結可能匿名化された情報が試料とともに提供し、提供される情報は年齢、性別、病名、生化学データとした。試料(血清)は、医薬基盤研究所、免疫シグナルプロジェクトの鍵のかかる冷凍庫内に保管した。

C. 研究結果

結果はD項にまとめて記載した。

D. 結果・考察

(1) 血液中のLRGを定量するELISAシステムの開発

精製した遺伝子組み換えヒトLRGタンパク質をウサギに免疫し、LRGに対して高い結合活性を有する抗体を94種類選抜した。これらの抗体の定常領域をウサギ型とヒト型に組み換えた抗LRG抗体を調製し、サンドイッチELISAを効率良く開発できるように全抗体の競合ELISAを実施した。選抜した抗体を用いて、ヒトLRGを検出できるELISAシステムの構築に成功し、同様にカニクイザルのLRGも検出できることを明らかにした

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

研究分担者の服部有宏のグループにて次世代型IL-6受容体抗体投与時のカニクイザルコラーゲン誘発関節炎血漿サンプルを調製し、研究代表者の研究室に輸送した。これらの検体に対して独自に開発したLRGキットを用いて、血漿中LRG濃度を定量した。その結果、

LRG次世代型IL-6受容体抗体投与時のカニクイザルコラーゲン誘発関節炎モデルにおいて血中LRG濃度がCRPよりも疾患活動性スコアと強く相関することが認められた(図1)。次世代型IL-6受容体抗体を投与することにより、CRP値と関節炎スコアが共に低下している検体もあるが、IL-6のシグナルを完全に抑えられないため、CRP値と関節炎スコアの両方が高い検体も見られた。興味深いことに、次世代型IL-6受容体抗体投与により、CRP値が陰性で、関節炎スコアが高い検体が2例見られた。これらの検体に対して、血漿中LRG濃度は高い値を示していた(#1、#2)。さらに、関節の病理学的スコアを付け、病理学的スコアと血漿中LRG濃度およびCRP値との相関を調べた結果、LRGはCRPよりも病理学的スコアと強く相関を示した(図2)。測定された検体の内、個体#13、#17のように病理学的スコアが高い個体においてCRPは陰性であるが、LRG濃度は高値を示しており、LRG濃度が病理学的スコアを反映している事が示された。また、次世代型IL-6受容体抗体投与後のカニクイザルCIAにおいて、CRP陰性でもLRG上昇例では、関節炎が存在することが確認された(図3)。CRPはIL-6により肝臓から産生されるが、LRGはIL-6以外にもI1-22やTNF-alphaにより炎暑局所から産生されるため、より疾患活動性を正確に反映していると考えられる。即ち、カニクイザルコラーゲン誘発関節炎モデルにおいて血漿LRG濃度はCRP値では検出出来ない疾患活動性を検出出来るマーカーとなりえると考えられる。

(3) 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24週以降)のLRG濃度を定量した。その結果、治療24週以降において、CRP<0.2かつCDAIが2.8以下の関節リウマチ患者の寛解期と比べ、CRP<0.2かつCDAI>2.8(活動期)の関節リウマチ患者にて有意な血清中LRG濃度の上昇が認められ、CRP<0.2かつCDAI>2.8(活動期)の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4)。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。

E. 結論

本研究にて、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. Furukawa K, Kawamoto K, Eguchi H, Tanemura M, Tomimaru Y, Akita H, Hama N, Wada H, Kobayashi S, Nonaka Y, Takamatsu S, Shinzaki S, Kumada T,

Satomura S, Ito T, Serada S, **Naka T**, Mori M, Doki Y, Miyoshi E, Nagano H. Clinico-Pathological Significance of Leucine-Rich Alpha-2-Glycoprotein-1 in Sera of Patients with Pancreatic Cancer. *Pancreas*. 2015 Jan;44(1):93-98.

2. Yang L, Fujimoto M, Murota H, Serada S, Fujimoto M, Honda H, Yamada K, Suzuki K, Nishikawa A, Hosono Y, Yoneda Y, Takehara K, Imura Y, Mimori T, Takeuchi T, Katayama I, **Naka T**. Proteomic identification of heterogeneous nuclear RNP-K as a novel cold-associated autoantigen in patients with secondary Raynaud's phenomenon. *Rheumatology*. 2014 In Press

3. Kawabata A, Serada S, **Naka T**, Mori Y. Human herpesvirus 6 gM/gN complex interacts with v-SNARE in infected cells. *Journal of General Virology* 2014 Dec;95(Pt 12):2769-77.

4. Azuma K, Serada S, Takamatsu S, Terao N, Takeishi S, Kamada Y, **Naka T**, Miyoshi E. Identification of sialylated glycoproteins in doxorubicin-treated hepatoma cells with glycoproteomic analyses. *Journal of Proteome Research* 2014 Nov 7;13(11):4869-77.

5. Morimoto A, Serada S, Enomoto T, Kim A, Matsuzaki S, Yokoyama T, Takahashi T, Ueda Y, Yoshino K, Fujita M, Fujimoto M, Kimura T, **Naka T**. Annexin A4 induces platinum resistance in a chloride- and calcium-dependent manner. *Oncotarget*. 2014 Sep 15;5(17):7776-87.

6. Kotobuki Y, Yang L, Serada S, Tanemura A, Yang F, Nomura S, Kudo A, Izuhara K, Murota H, Fujimoto M, Katayama I, **Naka T**. Periostin Accelerates Human Malignant Melanoma Progression by Modificating the Melanoma Microenvironment. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014 Jul;27(4):630-9.
7. Oji Y, Tatsumi N, Fukuda M, Nakatsuka S, Aoyagi S, Hirata E, Nanchi I, Fujiki F, Nakajima H, Yamamoto Y, Shibata S, Nakamura M, Hasegawa K, Takagi S, Fukuda I, Hoshikawa T, Murakami Y, Mori M, Inoue M, **Naka T**, Tomonaga T, Shimizu Y, Nakagawa M, Hasegawa J, Nezu R, Inohara H, Izumoto S, Nonomura N, Yoshimine T, Okumura M, Morii E, Maeda H, Nishida S, Hoson N, Tsuboi A, Oka Y, Sugiyama H. The translation elongation factor eEF2 is a novel tumor-associated antigen overexpressed in various types of cancers. *Int J Oncol.* 2014 May;44(5):1461-9.
8. Yang L, Murota H, Serada S, Fujimoto M, Kudo A, **Naka T**, Katayama I. Histamine Contributes to Tissue Remodeling via Periostin Expression. *J Invest Dermatol.* 2014 Aug;134(8):2105-13.
9. 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.* 2014 Apr 15;134(8):1796-809.
10. 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. *Journal of Virology.* 2014 Jan;88(1):188-201.
11. 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.* 2014 Feb;58(2):119-25.
12. 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.
13. 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 Nov;104(11):1483-91.
14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. 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 Feb;19(2):321-31.

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

19. Iwahori K, Serada S, Fujimoto M, Ripley B, Nomura S, Mizuguchi H, Shimada K, Takahashi T, Kawase I, Kishimoto T, **Naka T**. SOCS-1 gene

delivery cooperates with cisplatin plus pemetrexed to exhibit preclinical antitumor activity against malignant pleural mesothelioma. *Int J Cancer*. 2013;132(2):459-71.

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

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

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

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

24. Ontsuka K, Kotobuki Y, Shiraishi H,

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

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

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

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

28. Uebi T, Itoh Y, Hatano O, Kumagai A, Sanosaka M, Sasaki T, Sasagawa S, Doi J, Tatsumi K, Mitamura K, Morii E, Aozasa K, Kawamura T, Okumura M, Nakae J, Takikawa H, Fukusato T, Koura M, Nish

M, Hamsten A, Silveira A, Bertorello A M, Kitagawa K, Nagaoka Y, Kawahara H, Tomonaga T, **Naka T**, Ikegawa S, Tsumaki N, Matsuda J, Takemori H. Involvement of SIK3 in glucose and lipid homeostasis in mice. *PLoS One*. 2012; 7(5): e37803.

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

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

G-2. 学会発表

1. 2014年 ACR/ARHP Annual Meeting: November 14 - 19 Boston, Massachusetts
Boston Convention & Exhibition Center
Leucine-Rich Alpha-2 Glycoprotein Is a Potential Disease Activity Marker Under IL-6 Suppression in Autoimmune Arthritis
Yusuke Takahashi, Minoru Fujimoto, Satoshi Serada and **Tetsuji Naka**

2. 2014 ICIS: 26th - 29th October 2014
Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne.
Leucine-rich α2 glycoprotein promotes TGFβ1-induced apoptosis in the lewis lung carcinoma cell lines.
Norihiko Takemoto, Tomoshige Matsumoto, Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, **Tetsuji**

Naka

3. EULAR2014 Paris: June 14 2014
Measurement of serum leucine-rich
alpha-2 glycoprotein a novel disease
activity biomarker in rheumatoid arthritis
for the detection of biologic-associated
tuberculosis. Tomoharu Ohkawara, Minoru
Fujimoto, Satoshi Serada, **Tetsuji Naka**.

4. 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

5. 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 α 2
glycoprotein (LRG)
仲哲治

6. 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

7. ACR/ARHP Annual Meeting, in
Washington, DC, November 09 - 14, 2012.
November 12 (ACR 2012 第 78 回米国リウ
マチ学会議)
Heterogeneous Nuclear RNP-K Is a Novel
Cold-Related Autoantigen in Patients with
Raynaud's Phenomenon. Satoshi Serada,
Minoru Fujimoto, **Tetsuji Naka**.

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

9. International Cytokine Society 2012
UP-REGULATION OF INTERLEUKIN 8
AND CXCL1 CHEMOKINE LIGAND 1 BY
COLD STIMULATION IN HUMAN
DERMAL MICROVASCULAR
ENDOTHELIAL CELLS: A ROLE IN
WINTER ULCERATION AND COLD
URTICARIA
L. Yang, H. Murota, M. Fujimoto, S.
Serada, M. Yong, T. Ohkawara, **T. Naka, I.**
Katayama

10. 31th EULAR 2012 Berlin, Germany 6
- 9 June 2012
PERIOSTIN, A NOVEL
MATRICELLULAR PROTEIN, IS
REQUIRED FOR CUTANEOUS
SCLEROSIS IN A MOUSE MODEL OF
SCLERODERMA
L. Yang, S. Serada, M. Fujimoto, H.
Murota, Y. Kotobuki, S. Kitaba, **T. Naka, I.**
Katayama

H. 知的財産権の出願・登録状況

名称 : 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

名称 : 自己免疫疾患検査用バイオマーカ
ー及び検査方法
登録日 : 2013年4月19日
登録番号 : 特許第5246709号
発明者 : 仲哲治、世良田聡、岸本忠三
出願人 : 独立行政法人医薬基盤研究所
出願日 : 2009年6月9日
出願番号 : 特願 2009-138408

名称 : 結核検査用バイオマーカ
発明者 : 仲哲治、藤本穰、世良田聡、

松本智成
出願人 : 独立行政法人医薬基盤研究所
出願日 : 2012年4月3日
出願番号 : 特願 2012-84996号

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

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
武本憲彦	医薬基盤研究所 免疫シグナルプロジェクト
本田宏美	医薬基盤研究所 免疫シグナルプロジェクト
岩橋千春	医薬基盤研究所 免疫シグナルプロジェクト

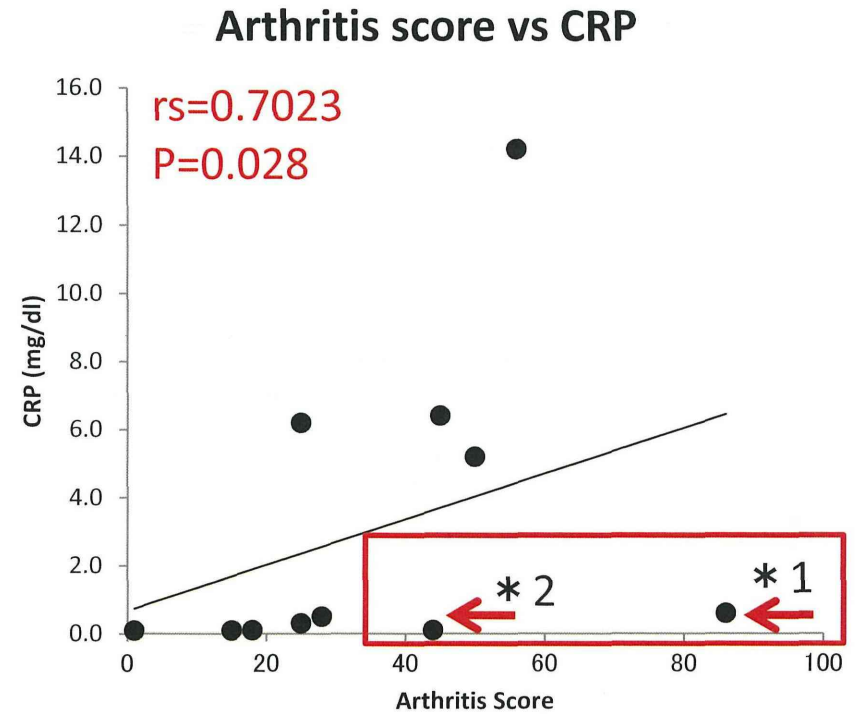
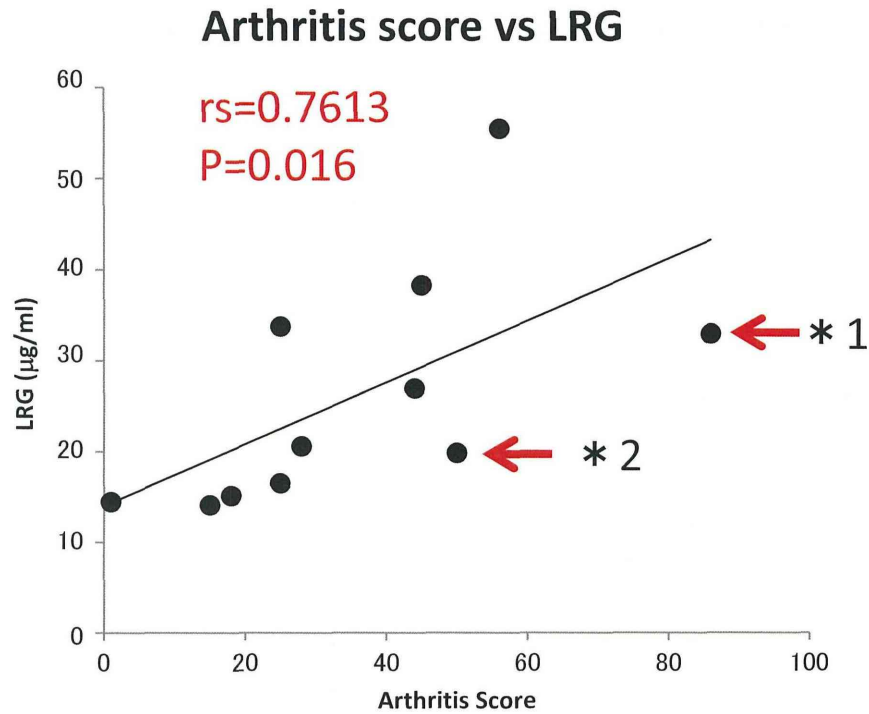
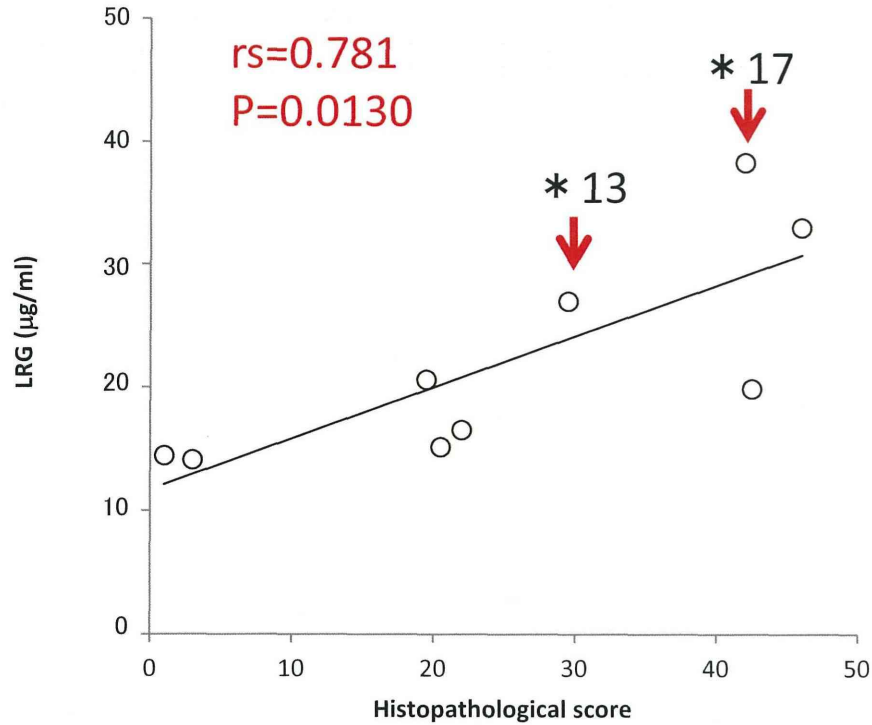


図1.次世代型抗IL-6受容体抗体投与時のカニクイザル関節炎(CIA)モデルにおいて、CRPが陰性かつ疾患活動性のあるカニクイザルCIAにて、LRGにより疾患活動性を検出出来る個体がある

LRG vs Histopathological score



CRP vs Histopathological score

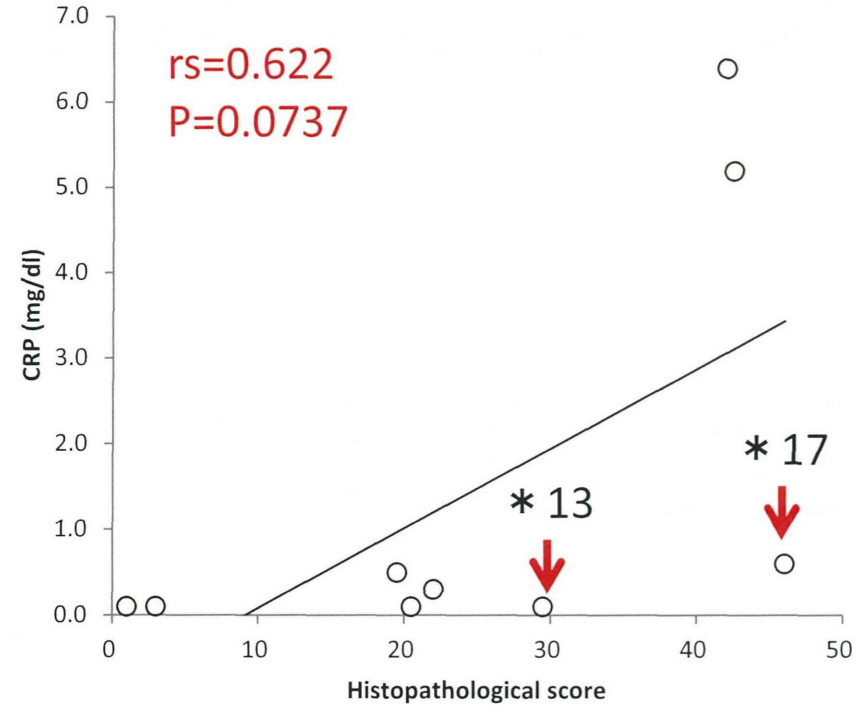


図2.次世代型抗IL-6受容体抗体投与時のカニクイザル関節炎(CIA)モデルにおいて、血漿中LRGはCRPよりも病理学的スコアと高く相関する

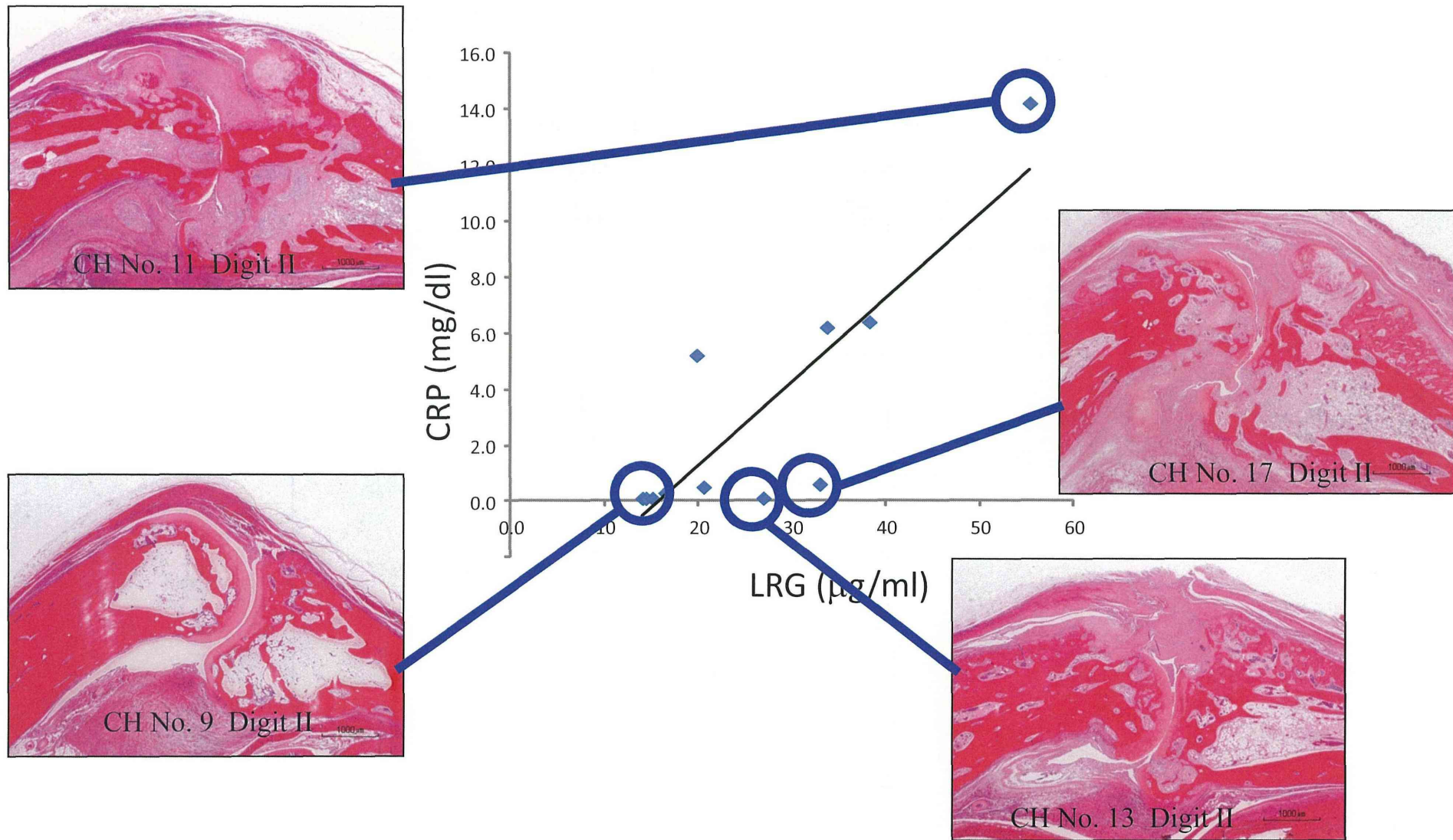


図3.次世代型IL-6受容体抗体投与後のカニクイザルCIAにおいて、CRP陰性でもLRG上昇例では、関節炎が存在する

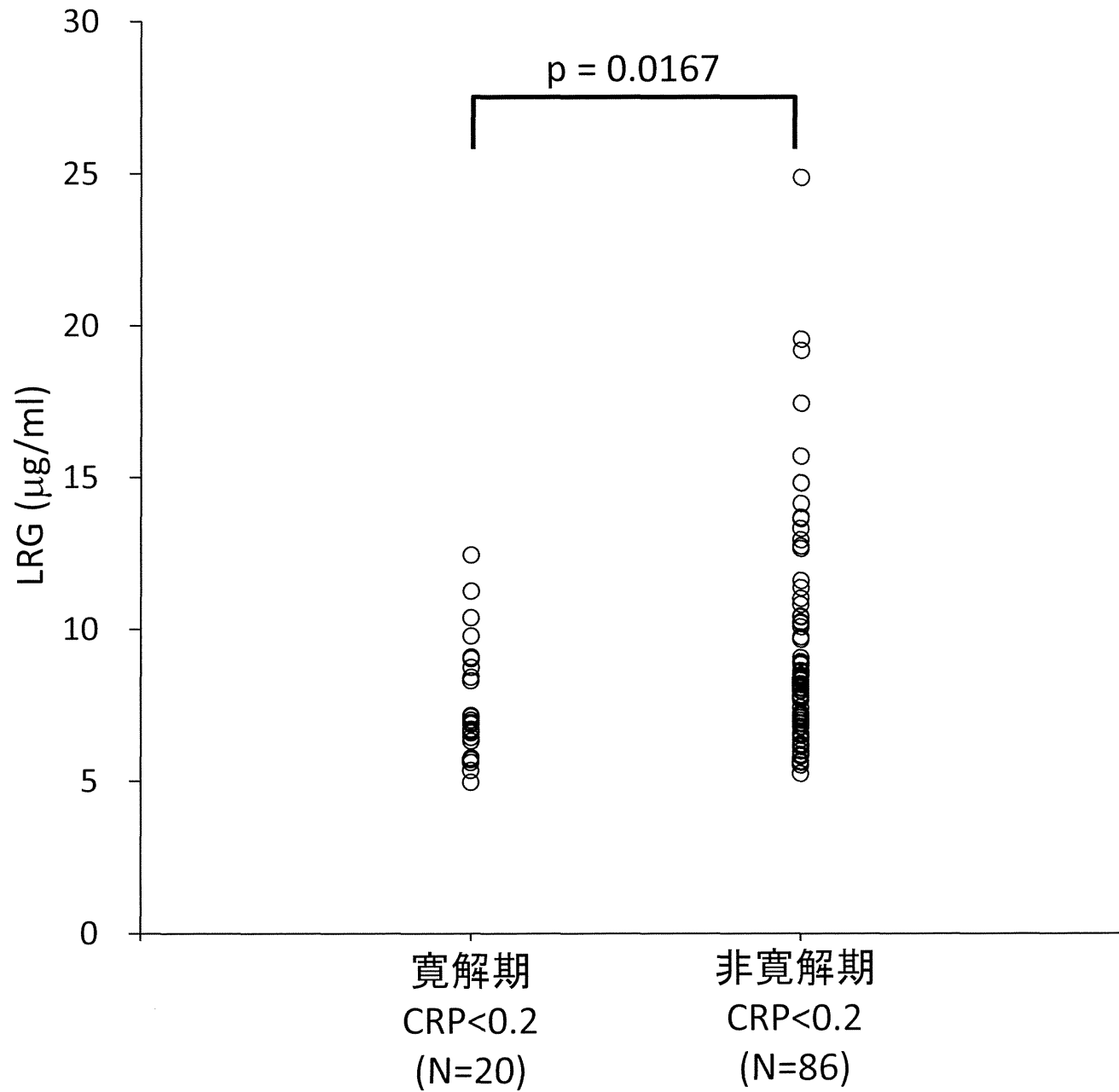


図4. アクテムラ投与時のRA患者において、疾患活動性のある患者にて、LRGが疾患活動性を検出出来る検体がある

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学 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。平成 24 年度に研究計画の倫理委員会承認手続きを終了し、平成 25-26 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した予備検討が完了した。研究班の創薬基盤の構築の推進に役立てていきたい。

A.研究目的

本研究班の目的は、今後治験が予定されている次世代型 IL-6 受容体抗体(スーパー特区、免疫先端医薬品開発プロジェクト-先端的抗体医薬品・アジュバントの革新的技術の開発、代表岸本忠三)による治療を受ける関節リウマチ(RA)患者において、血清 leucine-rich alpha-2 glycoprotein (LRG)レベルが RA の治療効果を正確に反映するバイオマーカーであることを本研究期間内に証明し、臨床検査として血清 LRG 測定を実用化することである。本研究班では H24 年度に血中 LRG を定量できるシステムを構築し、H25 年度に次世代型 IL-6 受容体抗体投与時のサルコラーゲン関節炎血清 LRG の定量と疾患活動性マーカーとしての有用性の評価、H26 年度以降には多数例(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 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

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た予備的検討を行いシステム構築、人的整備をした。

また今後、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

該当無し。

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. Shirai Y, Okazaki Y, Inoue Y, Tamura Y, Yasuoka H, **Takeuchi T**, and Kuwana M. Elevated pentraxin 3 in systemic sclerosis: Associations with vascular manifestations and defective vasculogenesis. *Arthritis & Rheumatology*, February;67(2)498-507, 2015

2. **Takeuchi T**, Matsubara T, Ohta S, Mukai M, Amano K, Tohma S, Tanaka Y, Namanaka H, and Miyasaka N. Biologic-free remission of established rheumatoid arthritis after discontinuation of abatacept: a prospective multi-center, observational study in Japan. *Rheumatology*, online September 24 2014.

3. Kaneko Y, Koike T, Oda H, Yamamoto K, Miyasaka N, Harigai M, Yamanaka H,

Ishiguro N, Tanaka Y, and **Takeuchi T**. Obstacles to the implementation of the treat-to-target strategy for rheumatoid arthritis and safety of certolizumab pegol in Japanese rheumatoid arthritis in clinical practice in Japan. *Mod Rheum*, online June 20, 2014.

4. Akiyama M, Kaneko Y, Hanaoka H, Kuwana M, and **Takeuchi T**. Polychondritis presenting with oculomotor and abducens nerve palsies as initial manifestation. *Mod Rheum*, online June 2, 2014.

5. Inaba T, Hisatsune C, Sasaki Y, Sasaki Y, Ogawa Y, Ebisu E, Ogawa N, Matsui M, **Takeuchi T**, Mikoshiba K, and Tsubota T. Mice lacking inositol 1,4,5-triphosphate receptors exhibit dry eye. *Plos One* 9:e99205, 2014.

6. 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.

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

8. **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.

9. **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.

10. **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.

11. Tanaka Y, Yamanaka H, Saito K, Iwata S, Miyagawa I, Seto Y, Momohara S, Nagasawa H, Kameda H, Kaneko Y, Izumi K, Amano K, **Takeuchi T**. Structural damages disturb functional improvement in patients with rheumatoid arthritis treated with etanercept. *Mod Rheum.* 2012;22:186-94.

12. **Takeuchi T**, Tanaka Y, Kaneko Y, Tanaka E, Hirata S, Kurasawa T, Kubo S, Shidara K, Kimura N, Nagasawa H, Kameda H, Amano K, Yamanaka H. Effectiveness and safety of adalimumab in Japanese patients with

rheumatoid arthritis: Retrospective analyses of data collected during the first year of adalimumab treatment in routine clinical practice (HARMONY study). *Mod Rheum.* 2012;22:327-338.

13. Tanaka Y, Harigaya M, **Takeuchi T**, Yamanaka H, Ishiguro N, Yamamoto K, Miyasaka N, Koike T, Kanazawa M, Ohba T, Yoshinari T, Baker D, and the GO-FORTH study group. Golimumab in combination with methotrexate in Japanese patients with active rheumatoid arthritis: results of the GO-FORTH study. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(6):817-24

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

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

G-2 学会発表

該当無し。

H.知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1.特許取得

該当無し。

2.実用新案登録

該当無し。

3.その他