

該当無し。

I. 研究協力者

鈴木 勝也 慶應義塾大学医学部
リウマチ内科学 専任講師
西川 あゆみ 慶應義塾大学医学部
リウマチ内科学 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

関節リウマチ(RA)の治療として TNF 阻害薬とともに IL-6 受容体抗体(tocilizumab)も広く用いられ、劇的な治療効果を上げている。RA の活動性の評価の一つとして血清 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 の疾患活動性の低下の有無にかかわらず血清 CRP は陰性化する。また、tocilizumab 投与患者では感染症発症時にも CRP 上昇が抑制される。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。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が、上記問題点は現行型の tocilizumab と同様である。一方、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可能性を報告している。そこで、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。また、生物学的製剤投与前、投与後においても血清を収集し、疾患活動性の変化を解析した。また、これらの血清を用いて研究代表者が LRG レベルを測定し、他の協力施設からの血清とあわせ、疾患活動性との関連を検討した。

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ており、著明な炎症抑制効果、骨破壊抑制効果を認めている。本邦では RA に対する生物学的製剤として、TNF 阻害薬（infliximab, etanercept, adalimumab, golimumab, certolizumab pegol）、IL-6 受容体抗体（tocilizumab）、及び T 細胞の副刺激阻害薬（CTLA-4-Ig: abatacept）が投与されている。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 活動性のマーカーの一つとして広く用いられているが、tocilizumab 投与患者では RA の活動性に改善がみられない患者でも CRP が陰性化する。そのため治療効果の有無の判断に影響する。また、tocilizumab の重篤な副作用に

感染症があげられるが、tocilizumab 投与患者では CRP 上昇を認めないことがある。そのため感染症の発症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 受容体抗体を開発している。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 tocilizumab と同様である。そのため、IL-6 阻害薬の投与患者には、IL-6 に依存せず疾患活動性や感染症の発症を反映する新たな血清マーカーの開発が必要とされている。これまで研究代表者らは、血中 leucine-rich alpha-2 glycoprotein (LRG) レベルが 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 LRG

の上昇がみられた (Serada S, Naka T. *et al*, *Inflamm Bowel Dis*. 2012)。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、感染症発症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、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して研究を施行した。

B. 研究方法

患者血清の収集

2012 年度は東京医科歯科大学外来通院中の 1987 年 ACR 分類基準を満たす RA 患者 40 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)。

2013～2014 年度は帝京大学外来通院中の 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 7 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

本研究は東京医科歯科大学医学部医学倫理委員会、及び、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

東京医科歯科大学医学部附属病院において、膠原病・リウマチ内科、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。基盤研には東京医科歯科大学医学部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、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。また、帝京大学においては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

治療中の RA 患者 40 人の血清を採取した。男女比 9:31、年齢 63.3 \pm 13.0 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) 0.85 \pm 1.37、腫脹関節数 (28 関節中) 2.78 \pm 3.68、赤沈 14.9 \pm 13.3 mm/hr、CRP 0.11 \pm 0.14 mg/dl、MMP-3 124.7 \pm 89.4 ng/ml、患者 VAS 25.9 \pm 21.8 mm/100 mm、医師 VAS 21.3 \pm 15.8 mm/100 mm であった。また、Disease activity score (DAS)28-ESR 2.68 \pm 1.04、DAS28-CRP 2.23 \pm 0.76、simple disease activity index (SDAI) 8.45 \pm 6.64、clinical disease activity index (CDAI) 8.34 \pm 6.63。治療内容は、23 人に生物学的製剤が投与され、その内訳は infliximab 6 人、etanercept 6 人、tocilizumab 11 人であった。また、methotrexate は 27 人に、副腎皮質ステロイド薬は 26 人に投与されていた。血清は研究代表者により LRG 濃度が測定され、疾患活動性などとの関連の解析が行われた。

次に、生物学的製剤が初めて投与される RA 患者 7 人の血清を、生物学的製剤投与開始時、

及び、投与開始 6 か月後に採取した。男女比 3 : 4、年齢 66.3 +/- 15.9 歳 (平均 +/- SD)。投与開始された生物学的製剤の内訳は tocilizumab 2 人、abatacept 2 人、golimumab 1 人、etanercept 1 人、infliximab 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。生物学的製剤投与開始時の RA の活動性は、圧痛関節数 (28 関節中) 2.3 +/- 3.9、腫脹関節数 (28 関節中) 6.7 +/- 3.6、赤沈 24.7 +/- 15.0 mm/hr、CRP 1.3 +/- 1.6 mg/dl、MMP-3 214.4 +/- 194.6 ng/ml、患者 VAS 4.6 +/- 3.0 cm/10 cm、医師 VAS 4.2 +/- 2.4 cm/10 cm であった。また、DAS28-ESR 4.1 +/- 1.2、DAS28-CRP 3.6 +/- 1.3、SDAI 17.8 +/- 10.2、CDAI 19.1 +/- 10.9。

投与開始 6 か月後は、圧痛関節数 (28 関節中) 2.6 +/- 4.5、腫脹関節数 (28 関節中) 3.0 +/- 2.9、赤沈 8.4 +/- 9.0 mm/hr、CRP 0.2 +/- 0.4 mg/dl、MMP-3 122.0 +/- 122.0 ng/ml、患者 VAS 1.8 +/- 1.8 cm/10 cm、医師 VAS 1.9 +/- 1.3 cm/10 cm、DAS28-ESR 2.4 +/- 1.0、DAS28-CRP 2.3 +/- 1.3、SDAI 9.3 +/- 9.9、CDAI 9.4 +/- 9.9 であった。症例数は 7 例と少数例であるが、赤沈、CRP、DAS28-ESR は、6 か月後に統計学的有意に低下していた ($p < 0.05$)。患者血清を、研究代表者に送付し、他施設からの血清とともに LRG 濃度を測定し、疾患活動性との関連の解析に用いた。

D. 考察

治療中の RA 患者の血清 LRG レベルと疾患活動性などとの関連、及び、tocilizumab を中心に生物学的製剤投与開始前後での血清 LRG レベルの変化の解析も、多施設からの患者血清により行われた。本研究では、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された。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。LRG と既存のマーカーとの関連性、各マーカーの特徴なども評価できた。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が解明され、血清 LRG 濃度が一般の臨床で測定可能になることが期待される。

当施設で収集した 7 例の RA 患者で、生物学的製剤投与前後での疾患活動性を評価したが、少数例にもかかわらず、有意な治療効果が認められた。生物学的製剤の高い治療効果を示すものであり、その評価マーカーとして LRG の有用性も示された。

E. 結論

抗 IL-6 受容体抗体投与中の RA 患者において、血中 LRG レベルが疾患活動性の評価に有用である。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Tanaka M, Koike R, Sakai R, Saito K, Hirata S, Nagasawa H, Kameda H, Hara M, Kawaguchi Y, Tohma S, Takasaki Y, Dohi M, Nishioka Y, Yasuda S, Miyazaki Y, Kaneko Y, **Nanki T**, Watanabe K, Yamazaki H, Miyasaka N, Harigai M. Pulmonary infections following immunosuppressive treatments during hospitalization worsen the short-term vital prognosis for patients with connective tissue disease-associated interstitial pneumonia. *Mod Rheumatol.* (in press)

2. Yamazaki H, Sakai R, Koike R, Miyazaki Y, Tanaka M, **Nanki T**, Watanabe K, Yasuda S, Kurita T, Kaneko Y, Tanaka Y, Nishioka Y, Takasaki Y, Nagasaka K, Nagasawa H, Tohma S, Dohi M, Sugihara T, Sugiyama H, Kawaguchi Y, Inase N, Ochi S, Hagiyaama H, Kohsaka H, Miyasaka N, Harigai M.

Assessment of risks for pulmonary infection during 12 months after commencing or intensifying immunosuppressive treatment for active connective tissue diseases: A report from a large-scale prospective cohort study. *J Rheumatol.* (in press)

3. Miyabe Y, Miyabe C, **Nanki T**. Could retinoids be a potential treatment for rheumatic diseases? *Rheumatol Int.* 35, 35-41 (2015).

4. Sakai R, Cho S, **Nanki T**, Koike R, Watanabe K, Yamazaki H, Nagasawa H, Amano K, Tanaka Y, Sumida T, Ihata A, Atsumi T, Nakajima A, Sugihara T, Tamura N, Fujii T, Dobashi H, Miura Y, Miyasaka N, Harigai M, and for the REAL study group. The risk for serious infection in rheumatoid arthritis patients treated with tumor necrosis factor inhibitors has decreased over time: a report from the registry of Japanese rheumatoid arthritis patients for long-term safety (REAL) database. *Rheumatol Int.* 34, 1729-1736 (2014).

5. Miyabe Y, Miyabe C, Iwai Y, Yokoyama W, Harigai M, Miyasaka M, Miyasaka N, **Nanki T**. Activation of fibroblast-like synoviocytes derived from rheumatoid arthritis by lysophosphatidic acid - lysophosphatidic acid receptor 1 cascade. *Arthritis Res Ther.* 16, 461 (2014).

6. Sekine C, **Nanki T**, Yagita H. Macrophage-derived delta-like protein 1 enhances interleukin-6 and matrix metalloproteinase-3 production by fibroblast-like synoviocytes in mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis*

Rheumatol. 66, 2751-2761 (2014).

7. Yokoyama W, Kohsaka H, Kaneko K, Walters M, Takayasu A, Fukuda S, Miyabe C, Miyabe Y, Love PE, Nakamoto N, Kanai T, Watanabe K, Charvat TT, Penfold MET, Jaen J, Schall TJ, Harigai M, Miyasaka N, **Nanki T**. Abrogation of CC chemokine receptor 9 ameliorates collagen-induced arthritis of mice. *Arthritis Res Ther.* 16, 445 (2014).

8. Fukuda S, Kohsaka H, Takayasu A, Yokoyama W, Miyabe C, Miyabe Y, Harigai M, Miyasaka N, **Nanki T**. Cannabinoid receptor 2 as a potential therapeutic target in rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskelet Disord.* 15, 275 (2014).

9. 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.* 24, 685-687 (2014).

10. Cho S, Sakai R, **Nanki T**, Koike R, Watanabe K, Yamazaki H, Nagasawa H, Tanaka Y, Nakajima A, Yasuda S, Ihata A, Ezawa K, Won S, Choi C, Sung Y, Kim T, Jun J, Yoo D, Miyasaka N, Bae S, Harigai M, for the RESEARCH investigators and the REAL Study Group. A comparison of incidence and risk factors for serious adverse events in rheumatoid arthritis patients with etanercept or adalimumab in Korea and Japan. *Mod Rheumatol.* 24, 572-579 (2014).

11. 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.* 24, 537-539 (2014).

12. 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.* 87, 129-135 (2014).

13. 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.* 23, 1085-1093 (2013)

14. 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.* 65, 2037-2047 (2013).

15. 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.* 40, 1026-1028 (2013).

16. 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* 72, 1100-1102 (2013).

17. 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.* 431, 772-776 (2013).

18. Miyabe C, Miyabe Y, Miura NN, Takahashi K, Terashima Y, Toda E, Honda F, Morio T, Yamagata N, Ohno N, Shudo K, Suzuki J, Isobe M, Matsushima K, Tsuboi R, Miyasaka N, Nanki T. Am80, a retinoic acid receptor agonist, ameliorates murine vasculitis through the suppression of neutrophil migration and activation. *Arthritis Rheum.* 65, 503-512 (2013).

19. Tanaka M, Sakai R, Koike R, Komano Y, Nanki T, Sakai F, Sugiyama H, Matsushima H, Kojima T, Ohta S, Ishibe Y, Sawabe T, Ota Y, Ohishi K, Miyazato H, Nonomura Y, Saito K, Tanaka Y, Nagasawa H, Takeuchi T, Nakajima A, Ohtsubo H, Onishi M, Goto Y, Dobashi H, Miyasaka N, Harigai M. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia associated with etanercept treatment in patients with rheumatoid arthritis: a retrospective review of 15 cases and analysis of risk factors. *Mod Rheumatol.* 22, 849-858 (2012).

20. Sakai R, Tanaka M, Nanki T, Watanabe K, Yamazaki H, Koike R, Nagasawa H, Amano K, Saito K, Tanaka Y, Ito S, Sumida T, Ihata A, Ishigatsubo Y, Atsumi T, Koike T, Nakajima A, Tamura N, Fujii T, Dobashi H, Tohma S, Sugihara T, Ueki Y, Hashiramoto A, Kawakami A, Hagino N, Miyasaka N, Harigai M; REAL Study Group. Drug retention rates and relevant risk factors for drug discontinuation due to adverse events in rheumatoid arthritis patients receiving anticytokine therapy with different target molecules. *Ann Rheum Dis.* 71, 1820-1826 (2012).

21. Sakai R, Komano Y, Tanaka M, Nanki T, Koike R, Nagasawa H, Amano K, Nakajima A, Atsumi T, Koike T, Ihata A, Ishigatsubo Y, Saito K, Tanaka Y, Ito S, Sumida T, Tohma S, Tamura N, Fujii T, Sugihara T, Kawakami A, Hagino N, Ueki Y, Hashiramoto A, Nagasaka K, Miyasaka N, Harigai M; Real Study Group. Time-dependent increased risk for serious infection from continuous use of tumor necrosis factor antagonists over three years in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res.* 64, 1125-1134 (2012).

22. Yamazaki H, Nanki T, Harigai M, Miyasaka N. Successful treatment of refractory Takayasu arteritis with tacrolimus. *J Rheumatol.* 39, 1487-1488 (2012).

G-2. 学会発表

1. 第25回日本リウマチ学会関東支部学術集会リツキシマブ併用にてステロイド急速減量が可能であった顕微鏡的多発血管炎の1例。浅子来美、大久保麻衣、津久井大輔、岡本明子、菊地弘敏、本田善一郎、南木敏宏、河野肇

2. 第78回アメリカリウマチ学会
The Reduction of Serum Uric Acid Level Might Prevent Atherosclerosis in Mice. Kimura Y, Yanagida T, Onda A, Kono H, Takayama M, Asako K, Okamoto A, Kikuchi H, Nanki T

3. 第78回アメリカリウマチ学会
Atrophy of Hippocampal Region in Chronic Progressive Neuro-Behçet's Disease. Kikuchi H, Asako K, Takayama M, Kimura Y, Okamoto A, Nanki T, Kono H, Hirohata S

4. 第16回国際ベーチェット病学会
Can Behçet's disease be cured? The clinical course of 100 patients. Okubo M, Kikuchi H, Tsukui D, Asako K, Takayama M, Okamoto A, Nanki T, Yanagida T, Kono H

5. 第16回国際ベーチェット病学会
Infliximab for chronic progressive neuro-Behçet's disease: An 8-year follow-up study. Asako K, Kikuchi H, Takayama M, Tsukui D, Okubo M, Okamoto A, Nanki T, Yanagida T, Kono H, Hirohata

6. 第16回国際ベーチェット病学会
An autopsy case of Behçet's disease with vascular involvement complicated with pulmonary thromboembolism. Tsukui D, Kikuchi H, Okubo M, Asako K, Takayama M, Okamoto A, Nanki T, Yanagida T, Kono H, Hirohata

7. 第16回国際ベーチェット病学会
Correlation of the integrated cerebrospinal fluid interleukin-6 level with brainstem atrophy in chronic progressive neuro-Behçet's disease. Kikuchi H, Takayama M, Asako K, Tsukui D, Okubo M, Okamoto A, Nanki T,

Yanagida T, Kono H, Hirohata

8. ヨーロッパリウマチ学会

Correlation of the integrated cerebrospinal fluid interleukin-6 level with brainstem atrophy in chronic progressive neuro-Behçet's disease. Kikuchi H, Nogawa-Takayama M, Asako K, Okamoto A, Nanki T, Kono K, Hirohata S

9. 第 58 回日本リウマチ学会総会

関節リウマチ患者における肺気腫合併肺線維症 (CPFE) の検討。浅子来美、大久保麻衣、津久井大輔、岡本明子、菊地弘敏、本田善一郎、南木敏宏、河野肇

10. 第 58 回日本リウマチ学会総会

抗神経細胞抗体と抗 NR2 抗体の上昇を認めたループス脊髄炎の 2 例。津久井大輔、岡本明子、大久保麻衣、浅子来美、菊地弘敏、南木敏宏、本田善一郎、河野肇

11. 第 58 回日本リウマチ学会総会

マウス動脈硬化における尿酸の関与の検討。河野肇、柳田たみ子、遠田明子、高山真希、浅子来美、岡本明子、菊地弘敏、南木敏宏

12. 第 58 回日本リウマチ学会総会

皮膚筋炎治療中に破傷した好中球上 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、本田善一郎、南木敏宏、河野肇

13. 第 58 回日本リウマチ学会総会

関節リウマチにおけるキャピリア®MAC 抗体 ELISA の有用性と肺 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 症の危険因子の検討。廣瀬恒、内山隆司、伊藤健司、石塚俊晶、松本光世、根本明日香、南木敏宏

14. 第 58 回日本リウマチ学会総会

生物学的製剤使用関節リウマチ患者における罹病期間 2 年以下の患者と 2 年超の患者の安全性の比較: REAL データベースより。酒井良子、山崎隼人、横山和佳、平野史生、田中みち、小池竜司、南木敏宏、上阪等、宮坂信之、針谷正祥、REAL 研究グループ

15. 第 58 回日本リウマチ学会総会

免疫抑制療法下のリウマチ性疾患患者における ST 合剤によるニューモシスチス肺炎予防の有効性の検討。山崎隼人、酒井良子、小池竜司、田中みち、南木敏宏、今井香織、宮坂信之、上阪等、針谷正祥

16. 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

17. 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

18. 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

19. 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**

20. 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

21. 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**

22. 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

23. 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

24. 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**

25. 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

26. 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

27. 第 23 回日本リウマチ学会関東支部集会

シンポジウム 2「生物学的製剤の使い方 6 製剤時代を迎えて」、肺合併症を有する患者への生物学的製剤投与はどうすべきか? **南木敏宏**

28. 第 76 回アメリカリウマチ学会

How to assess risks for pulmonary infection in patients receiving immunosuppressive treatment for rheumatic diseases? A report from a large-scale prospective cohort study. Yamazaki H, Sakai R, Koike R, Miyazaki Y, Tanaka M, **Nanki T**, Watanabe K, Yasuda S, Kurita T, Kaneko Y, Tanaka Y, Nishioka Y, Takasaki Y, Nagasaka K, Amano K, Tohma S, Dohi M, Sugihara T, Sugiyama H, Kawaguchi S, Inase N, Ochi S, Hagiyaama H, Miyasaka N, Harigai M

29. 第 76 回アメリカリウマチ学会

Am80, a retinoic acid receptor agonist, ameliorates murine vasculitis through the suppression of neutrophil migration and activation. Miyabe C, Miyabe Y, Miura N, Takahashi K, Terashima Y, Toda E, Honda F, Morio T, Yamagata N, Ohno N, Shudo K,

Suzuki J, Isobe M, Matsushima K, Tsuboi R, Miyasaka N, **Nanki T**

30.第 33 回日本炎症・再生医学会

シンポジウム 8「脂溶性メディエーター・脂肪組織と炎症・免疫」、オートタキシン/リゾフォスファチジン酸受容体阻害による関節リウマチの新規治療開発。**南木敏宏**

31.第 33 回日本炎症・再生医学会

A comparison of incidence and associated factors of serious adverse events in rheumatoid arthritis patients receiving TNF inhibitors between Korea and Japan. 趙秀卿、酒井良子、Yoon-Kyoung Sung、**南木敏宏**、Sang-Cheol Bae、宮坂信之、針谷正祥

32.ヨーロッパリウマチ学会

Anti-IL-6 autoantibody inhibited elevation of serum C-reactive protein level in two patients with severe bacterial infection. **Nanki T**, noue I, Nagasaka K, Hirata S, Hosoya T, Ebisawa M, Sugihara T, Harigai M, Miyasaka N

33.ヨーロッパリウマチ学会

Different risk factors are associated with serious infection in rheumatoid arthritis patients with and without pulmonary comorbidities: analyses from the REAL database. Sakai R, Tanaka M, **Nanki T**, Yamazaki H, Watanabe K, Koike R, Miyasaka N, Harigai M, for the REAL Study Group

34.第 56 回日本リウマチ学会総会

Registry of Japanese rheumatoid arthritis patients for long-term safety (REAL)コホート。針谷正祥、酒井良子、**南木敏宏**

35.第 56 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重篤な有害事象に対する肺合併症の影響。酒井良子、

田中みち、**南木敏宏**、山崎隼人、渡部香織、小池竜司、宮坂信之、針谷正祥

36.第 56 回日本リウマチ学会総会

TNF 阻害薬使用関節リウマチ患者におけるニューモシスチス肺炎。渡部香織、酒井良子、田中みち、駒野有紀子、山崎隼人、**南木敏宏**、小池竜司、宮坂信之、針谷正祥

37.第 56 回日本リウマチ学会総会

Am80 による *Candida albicans* water-soluble fraction 誘導血管炎の抑制効果。宮部千恵、宮部斉重、大野尚仁、高橋啓、宮坂信之、**南木敏宏**

38.第 56 回日本リウマチ学会総会

カンナビノイドによる関節炎抑制作用。福田真、高安愛子、横山和佳、宮部千恵、宮部斉重、宮坂信之、**南木敏宏**

39.第 56 回日本リウマチ学会総会

オートタキシン/リゾフォスファチジン酸受容体を標的とした関節リウマチの新規治療法開発。宮部斉重、宮部千恵、高安愛子、福田真、横山和佳、宮坂信之、**南木敏宏**

40.第 56 回日本リウマチ学会総会

関節リウマチの病態形成における CCL25/CCR9 相互作用の関与。横山和佳、金子佳代子、高安愛子、福田真、宮部斉重、宮部千恵、宮坂信之、**南木敏宏**

41.第 56 回日本リウマチ学会総会

CCL18 による関節リウマチ線維芽細胞様滑膜細胞の活性化。高安愛子、宮部斉重、金子佳代子、宮部千恵、横山和佳、福田真、窪田哲朗、宮坂信之、**南木敏宏**

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し。

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 准教授

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い、このシステムを利用して本研究に必要な検体の供給を行なった。

B. 研究方法

研究分担者が中心となり、大阪大学附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を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時に検体を利用できるシステムの構築を行なう。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。また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最終年度までの時点で、本研究の対象とならないものも含めて 1000 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の手続きが完了し公立学校共済近畿中央病院よりの検体収集が実際に開始された。他施設からの検体搬送のシステムが確立していないため

に検体の収集が進みにくく、検体の大半が大阪大学医学部付属御病院に偏っていることが問題点としてあげられ、搬送システムの確立がなされればさらに多くの検体を収集することができると考えられる。

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よいてであり本研究のみならず様々研究に利用可能なシステムが構築できた。このシステムを用いて収集された検体を必要に応じて利用することにより本研究の進捗に寄与した。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

G-1.論文発表

1. Inoue T, Iijima H, Arimitsu J, Hagihara K, Kawai S, Shiraishi E, Hiyama S, Mukai A, Shinzaki S, Nishida T, Ogata A, Tsujii M, Takehara T. Amelioration of Small Bowel Injury by Switching from Nonselective Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs to Celecoxib in Rheumatoid Arthritis Patients: A Pilot Study. *Digestion*. 2014;89(2):124-132.

2. Ogata A, Tanimura K, Sugimoto T, Inoue H, Urata Y, Matsubara T, Kondo M, Ueki Y, Iwahashi M, Tohma S, Ohta S, Saeki Y, Tanaka T. and the MUSASHI Study Investigators. Phase III study of the efficacy and safety of subcutaneous versus intravenous tocilizumab monotherapy in

patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2014;66(3):344-54.

3. Shima Y, Hosen N, Hirano T, Arimitsu J, Nishida S, Hagihara K, Narazaki M, Ogata A, Tanaka T, Kishimoto T, Kumanogoh A. Expansion of range of joint motion following treatment of systemic sclerosis with tocilizumab. *Mod Rheumatol*. 2015;25(1):134-7.

4. Urushima H, Sanada Y, Ogata A, Yoshida M, Lin H, Hagihara K, Narazaki M, Tanaka T, Ito T, and Maeda K. Tocilizumab increases serum adiponectin and reduces serum fatty acid binding protein 4 in patients with rheumatoid arthritis. *J Endocrinol Metab* 2014 Dec;4(5-6):143-7.

5. 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.

6. Watanabe K, Sakai R, Koike R, Sakai F, Sugiyama H, Tanaka M, Komano Y, Akiyama Y, Mimura T, Kaneko M, Tokuda H, Iso T, Motegi M, Ikeda K, Hiroshi Nakajima H, Taki H, Kubota T, Kodama H, Sugii S, Kuroiwa T, Nawata Y, Shiozawa K, Ogata A, Sawada S, Matsukawa Y, Okazaki T, Mukai M, Iwahashi M, Saito K, Tanaka Y, Nanki T, Miyasaka N,

Harigai M. Clinical characteristics and risk factors for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with rheumatoid arthritis receiving adalimumab: a retrospective review and case-control study of 17 patients. *Mod Rheumatol*. 2013;23(6):1085-93.

7. Hishitani Y, Ogata A, Shima Y, Hirano T, Ebina K, Kunugiza Y, Shi K, Narazaki M, K Hagihara K, Tomita T, H Yoshikawa H, T Tanaka T, Kumanogoh A. Retention of tocilizumab and anti-tumour necrosis factor drugs in the treatment of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 2013;42(4):253-9.

8. Ogawa M, Matsuda T, Ogata A, Hamasaki T, Kumanogoh A, Toyofuku T, Tanaka T. DNA Damage in Rheumatoid Arthritis: An Age-Dependent Increase in the Lipid Peroxidation Derived DNA Adduct, Heptanone-Ethene-2'-Deoxycytidine. *Autoimmune Dis*. 2013;2013:183487.

9. Ogata A, Umegaki N, Katayama I, Kumanogoh A, Tanaka T. Psoriatic arthritis in two patients with an inadequate response to treatment with tocilizumab. *Joint Bone Spine*. 2012;79(1):85-7.

10. Hirano T, Ohguro N, Hohki S, Hagihara K, Shima Y, Narazaki M, Ogata A, Yoshizaki K, Kumanogoh A, Kishimoto T, Tanaka T. A case of Behçet's disease treated with a humanized anti-interleukin-6 receptor antibody,

tocilizumab. Mod Rheumatol. 2012;22(2):298-302.

11.Nakatsuji Y, Okuno T, Moriya M, Sugimoto T, Kinoshita M, Takamatsu H, Nojima S, Kimura T, Kang S, Ito D, Nakagawa Y, Toyofuku T, Takata K, Nakano M, Kubo M, Suzuki S, Matsui-Hasumi A, Uto-Konomi A, **Ogata A**, Mochizuki H, Sakoda S, Kumanogoh A. Elevation of Sema4A implicates Th cell skewing and the efficacy of IFN- β therapy in multiple sclerosis. J Immunol. 2012;188(10):4858-65.

12.Nojima S, Toyofuku T, Kamao H, Ishigami C, Kaneko J, Okuno T, Takamatsu H, Ito D, Kang S, Kimura T, Yoshida Y, Morimoto K, Maeda Y, **Ogata A**, Ikawa M, Morii E, Aozasa K, Takagi J, Takahashi M, Kumanogoh A. A point mutation in Semaphorin 4A associates with defective endosomal sorting and causes retinal degeneration. Nat Commun. 2012 Jan 29;4:1406. doi: 10.1038/ncomms2420.

G-2.学会発表

1.**緒方篤**, 「合併症」、シンポジウム「関節リウマチ診療のニューパラダイム」第118回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会 2012.4.7. 大阪.

2.Behcet病に対するInfliximabの中長期投与経験. 菱谷好洋、平野亨、中井慶、大黒伸行、萩原圭祐、**緒方篤**、嶋良仁、榑崎雅司、田中敏郎、熊ノ郷淳. 第109回日本内科学講演会 2012.4.13-14.京都

3.**緒方篤**, 関節リウマチに対するDMARDs非併用下でのトシリズマブ皮下投与による有効性及び安全性の検討-国内第III相二重盲検並行群間比較試験成績 (MUSASHI study). 第56回日本リウマチ学会総会・学術総会. 2012.4.26-28.東京

4.菱谷好洋、平野亨、嶋良仁、萩原圭祐、榑崎雅司、**緒方篤**、蝦名耕介、歴史賢林、柗座康夫、富田哲也、田中敏郎、熊ノ郷淳. 大阪大学における生物学的製剤の使用経験. 第56回日本リウマチ学会総会・学術総会. 2012.4.26-28.東京

5.嶋良仁、菱谷好洋、平野亨、榑崎雅司、**緒方篤**、田中敏郎、熊ノ郷淳. 3年間トシリズマブ投与を行なった強皮症患者の病状. 第56回日本リウマチ学会総会・学術総会. 2012.4.26-28. 東京

6.萩原圭祐、有光潤介、岸田友紀、中西美保、中林晃彦、森島淳仁、吉田祐志、菱谷好洋、平野亨、嶋良仁、榑崎雅司、**緒方篤**、田中敏郎、芳川秀樹、熊ノ郷淳. Bio-plex cytokine arrayによる肺高血圧症患者におけるサイトカインの病態的意義. 第56回日本リウマチ学会総会・学術総会. 2012.4.26-28.東京

7.萩原圭祐、有光潤介、岸田友紀、中西美保、中林晃彦、森島淳仁、吉田祐志、菱谷好洋、平野亨、嶋良仁、榑崎雅司、**緒方篤**、田中敏郎、芳川秀樹、熊ノ郷淳. リウマチ膠原病患者でのEPA?AAについての検討-関節リウマチ患者では、血中アラキドン酸濃度とCRPは逆相関する. 第56回日本リウマチ学会総会・学術総会. 2012.4.26-28.東京

8.蝦名耕介、史賢林、柵座康夫、富田哲也、緒方篤、平野亨、菱谷好洋、芳川秀樹. トシリズマブから他の生物学的製剤にスイッチングした関節リウマチ13症例についての検討. 第56回日本リウマチ学会総会・学術総会. 2012.4.26-28.東京

9.中林晃彦, 由良亜紀子, 吉田祐志, 森島淳仁, 菱谷好洋, 中江吉希, 檜崎雅司, 緒方篤, 田中敏郎, 熊ノ郷淳. プロピルチオウラシルにてバセドウ病治療中に発症し、薬剤中止のみで寛解が得られた多発軟骨炎の1例 第197回日本内科学会近畿地方会. 2012.5.1.神戸

10.Ogata A, and MUSASHI study Group. The MUSASHI STUDY: Comparison of subcutaneous tocilizumab monotherapy versus intravenous tocilizumab monotherapy: result from double blind, parallel-group, comparative phase III non-inferiority study in Japanese patients with rheumatoid arthritis. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR) 2012, Berlin, Germany 6 - 9 June 2012.

11.Ebina K, Shi K, Hirano M, Hashimoto J, Kunugiza Y, Tomita T, Ogata A, Hirano T, Hishitani Y and Yoshikawa H. Effect of switching tocilizumab to other biologics in patients with rheumatoid arthritis. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR) 2012, Berlin, Germany 6 - 9 June 2012.

12.緒方篤. 血清反応陰性性脊椎関節症に対する抗 IL-6 治療. 第22回日本脊椎関節炎学会.

2012.9.29.

13.Ogata A and MUSASHI study group. Effectiveness and Tolerability of Subcutaneous Tocilizumab in Rheumatoid Arthritis Patients Switched From Intravenous Tocilizumab: Results From the Extension Period of the Musashi Study. Abst #28022, 2012 ACR/ARHP Annual Scientific Meeting, Washington DC USA, 9-14 November 2012.

14.Hishitani Y, Hirano T, Shima Y, Narazaki M, Ogata A, Higihara K, Kumanogouh A, Tanaka T. Comparison of Tolerability Between Tumor Necrosis Factor-Inhibitors and Tocilizumab for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. Abst #, 2012 ACR/ARHP Annual Scientific Meeting, Washington DC USA, 9-14 November 2012.

15.森本桂子、前田悠一、西出真之、中林晃彦、西田純幸、平野亨、嶋良仁、檜崎雅司、緒方篤、熊ノ郷淳. 血小板減少の原因が肺梗塞/多発血栓症であったSLEの一例. 第199回日本内科学会近畿地方会. 2012.12.8.大阪

16.蛭名耕介、史賢林、柵座康夫、富田哲也、緒方篤、平野亨、菱谷好洋、吉川秀樹. 関節リウマチにおけるエタネルセプトとアダリムマブの一次、2次無効に対するメソトレキセートとステロイドの影響についての検討 -Osaka Biologics for Rheumatic Disease (BiRD) registry 284症例での検討-. 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会. 京都 2013.4.18-20.

17. 緒方篤. 関節リウマチ患者(RA)を対象としたトシリズマブ皮下注(TCZ-SC)単剤による長期投与及びトシリズマブ点滴静注(TCZ-IV)からTCZ-SC への切り替えにおける有効性・安全性の検討. 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会. 京都 2013.4.18-20.
18. 濱野芳匡、木田博、森島淳仁、平野亨、檜崎雅司、嶋良仁、緒方篤、立花功、田中敏郎、熊ノ郷淳. 特発性非特異的間質性肺炎(Idiopathic NSIP)における疾患特異的自己抗体検索. 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会. 京都 2013.4.18-20.
19. 森島淳仁、平野亨、緒方篤、田中敏郎、熊ノ郷淳. ベーチェット病における新規自己抗体の探索. 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会. 京都 2013.4.18-20.
20. 中林晃彦、檜崎雅司、新居卓朗、西出真之、濱野芳匡、平野亨、嶋良仁、緒方篤、田中敏郎、熊ノ郷淳. 気管支喘息、好酸球性副鼻腔炎を先行した IgG4-Mikulicz 病の一例. 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会. 横浜 2013.5.11-12.
21. Ogata A, and MUSASHI study Group. Normalization of C-reactive protein within the first 8 weeks is a predictive factor for the effectiveness of subcutaneous tocilizumab monotherapy in Japanese rheumatoid arthritis patients: Results from the MUSASHI study. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR) 2013, Madrid, Spain 12 -15 June 2013.
22. 三谷祐貴子, 中林晃彦, 高島聡士, 西出真之, 西田純幸, 平野亨, 緒方篤, 熊ノ郷淳. 出血減不明のくも膜下出血をきたした neuropsychiatric SLE (NPSLE)の1例. 第200回日本内科学近畿地方会 2013.6.8.神戸
23. Tanaka T, Shima Y, Hirano T, Narazaki M, Ogata A, Kumanogoh A, Kishimoto T. Interleukin-6 targeting strategy for immune-mediated diseases. 15th International Congress of Immunology. Milan, Italy. 22-27 August 2013.
24. 原侑紀, 西出真之, 檜崎雅司, 濱野芳匡, 中林晃彦, 平野亨, 嶋良仁, 緒方篤, 田中敏郎, 熊ノ郷淳. 無気力のみを主訴としたが、MRI で広汎な白質病変を認めた NPSLE の1例. 第201回日本内科学近畿地方会 2013.9.7.京都
25. 西出真之, 檜崎雅司, 沈嬌, 濱野芳匡, 中林晃彦, 平野亨, 嶋良仁, 緒方篤, 田中敏郎, 熊ノ郷淳. IgG4 関連疾患が疑われた無菌性髄膜炎の一例. 第23回日本リウマチ学会近畿支部学術集会. 大阪 2013.9.7.
26. Ogata A and MUSASHI study group. E Safety and Efficacy Of Subcutaneous Tocilizumab Monotherapy In a Long-Term Extension Study In Japanese Rheumatoid Arthritis Patients. Abst #1430, 2013 ACR/ARHP Annual Scientific Meeting, San Diego USA, 25-30 October 2013. 田中敏郎、西岡紘治、平野亨、嶋良仁、檜崎雅司、緒方篤、熊ノ郷淳. 免疫難病における IL-6 過剰産生の分子機構. 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会. 東京 2014.4.24-26.

27.吉田佑志、緒方篤、富田哲也、平野亨、嶋良仁、檜崎雅司、田中敏郎、熊ノ郷淳. 可溶性 Sema4D は関節リウマチ患者の血清、関節液で上昇し、疾患活動性と相関する. 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会. 東京 2014.4.24-26.

28.嶋良仁、菱谷好洋、中林晃彦、平野亨、檜崎雅司、緒方篤、田中敏郎、熊ノ郷淳. 3年間のトシリズマブ投与を行なった全身性強皮症患者の生化学データの推移. 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会. 東京 2014.4.24-26.

29.松浦良信、檜崎雅司、加藤保宏、細川貴司、西岡紘治、嶋良仁、緒方篤、熊ノ郷淳. トシリズマブの期間短縮投与で寛解に至った高疾患活動性関節リウマチの症例. 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会. 東京 2014.4.24-26.

30.加藤保宏、平野亨、菱谷好洋、緒方篤、田中敏郎、熊ノ郷淳. 関節リウマチの実地臨床におけるトシリズマブ皮下注の臨床経過—治験との比較-、再投与症例の観察-. 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会. 東京 2014.4.24-26.

31.濱野芳匡、木田博、森島淳仁、平野亨、檜崎雅司、嶋良仁、緒方篤、立花功、田中敏郎、熊ノ郷淳. 特発性非特異的間質性肺炎診断における抗 Mx1 抗体の有用性. 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会. 東京 2014.4.24-26.

32.Yoshida Y, Ogata A, Tomita T, Hirano T, Shima Y, Narazaki M, Tanaka T, Kumanogoh A. Soluble Semaphorin 4D in rheumatoid arthritis. The 58th Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of

Rheumatology, International Rheumatology Symposium. Tokyo Japan, April 24-26,2014.

33.緒方篤. 関節リウマチにおける IL-6 阻害療法-トシリズマブ皮下注療法-. 第48回九州リウマチ学会イブニングセミナー. 久留米 2014.9.6.

H. 知的財産の出願. 登録状況

該当無し。

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—

分担研究者 角田 慎一

独立行政法人医薬基盤研究所 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

研究要旨

本研究事業は、関節リウマチ(RA)の患者において、抗 IL-6R 抗体医薬等による治療効果を客観的に評価しうるバイオマーカーとして血清 leucine-rich alpha-2 glycoprotein (LRG)の有用性を明らかとし、臨床検査法への応用を図るものである。検査薬としての抗体を作成するにあたり、一般的な抗体作製法である動物への免疫とハイブリドーマの作製による方法では、必ずしも至適な抗体を取得できない場合も多い。そこで本分担研究では、検査薬として有用な抗 LRG 抗体の作製を念頭に、ファージ抗体ライブラリによる抗体の *in vitro* 迅速創製技術の確立を試みた。

マウス非免疫抗体ライブラリ、マウス免疫抗体ライブラリ、合成抗体遺伝子ライブラリを構築し、それによる各種抗原に対する抗体取得を実施することで有用性を検討した結果、いずれのライブラリからも抗体を取得することができ、検査用抗体の迅速取得に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

本研究事業は、関節リウマチ(RA)の患者において、抗 IL-6R 抗体医薬等による治療効果を客観的に評価しうるバイオマーカーとして血清 leucine-rich alpha-2 glycoprotein (LRG)の有用性を明らかとし、臨床検査法への応用を図るものである。

バイオマーカータンパク質の測定による臨床検査薬としては、抗体による定量的検出系が特異性や簡便性、コストに点から最も有望な方法の一つと考えられる。LRG については、産生細胞による糖鎖付加の違いなどにより、生理機能が異なる可能性が示唆されていることから、検出用抗体の最適化が重要になるものと考えられる。また、一般的な抗体作製法である動物への免疫とハイブリドーマの作製による方法では、必ずしも至適な抗体を取得できない場合も多い。そこで本分担研究では、検査薬として有用な抗 LRG 抗体を効率良く作製することを念

頭に、ファージ抗体ライブラリによる *in vitro* 抗体迅速創製技術の確立を試みることにした。ファージ抗体ライブラリは、多様なレパートリーの抗体 V ドメインを一本鎖化した scFv 型抗体をファージ表面に網羅的に発現させるものである。In vitro において、標的抗原に親和性を有する scFv を発現するクローンを速やかに濃縮し、最短 2 週間程度で特異的結合性の scFv 発現ファージ、および、scFv 遺伝子を取得することが可能となる。本研究では、様々な抗原に対する検査用抗体の取得を念頭に、(1) マウス生体に存在する抗体レパートリーの遺伝子をもとにした、非免疫マウス由来 scFv 抗体ファージライブラリ、(2) 免疫マウス由来の抗体からなる免疫ファージ抗体ライブラリ、(3) 安定性に優れた抗体を取得可能とする高頻度出現抗体を基本骨格とする合成抗体遺伝子ファージライブラリの構築を試み、それらの検査薬用抗体作製技術としての有用性を評価

した。

B. 研究方法

非免疫マウス scFv 遺伝子ライブラリの作製

正常マウス脾細胞 mRNA 由来の cDNA をテンプレートとして、抗体 V ドメインを網羅的に増幅可能なプライマーセットを設計した。本プライマーセットにて、VL および VH 遺伝子を増幅し、scFv 型に連結し scFv 遺伝子ライブラリを作製した。

免疫マウス由来 scFv 遺伝子ライブラリの作製

モデル抗原を免疫したマウス脾細胞から、上記方法に準じて scFv 遺伝子ライブラリを構築した。

合成抗体遺伝子ライブラリの作製

安定性に優れた抗体を取得するため、ヒトの抗体として出現頻度の高い H 鎖遺伝子 DP47, L 鎖遺伝子 DPL11, DPL16, DPK22, DPK24 を骨格とし、H 鎖 CDR3 領域を 4~7 アミノ酸のランダム配列に、L 鎖 CDR3 領域を 5 アミノ酸のランダム配列になるようライブラリを設計した。

scFv 提示ファージの作製

scFv ライブラリ遺伝子を組み込んだファージミドベクターを大腸菌 TG1 株にエレクトロポレーションし、M13KO7 ヘルパーファージを感染させることで scFv 提示ファージライブラリを得た。

スクリーニング

ファージ抗体ライブラリからのスクリーニングは、固相化抗原に対してパンニングを行うことで親和性クローンを濃縮し、その後、ライブラリをモノクローン化したのち、scFv 発現ファージ、あるいは可溶型として産生された scFv-FLAG タンパク質を用いた ELISA により行った。

倫理面への配慮

抗体遺伝子の単離のため、マウスからリンパ球を採取した。本実験は、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」に準じ、所属機関動物実験倫理委員会の承認を得て適切に行った。

C. 研究結果

D 項にあわせて記載した。

D. 研究結果・考察

本研究では、LRG をはじめとするバイオマーカーの検査薬として応用可能な抗体を迅速に取得することを念頭に、異なるタイプのファージ抗体ライブラリの構築を試みた。親和性を重視した免疫マウス由来ファージ抗体ライブラリ、および多様な抗原に対応可能な非免疫ファージ抗体ライブラリ、より安定性に優れた抗体を得るための合成抗体遺伝子ファージ抗体ライブラリを構築した。

マウス非免疫抗体ライブラリは 10 億レパートリーのライブラリが、合成遺伝子抗体ライブラリからは 100 億レパートリーのライブラリが構築できた。また、固相抗原に対するパンニング、およびモノクローン化後の ELISA で、効率よく候補抗体をスクリーニングできることが明らかとなった。いずれのライブラリからも、各種モデル抗原に対する抗体を取得できたことから、種々のバイオマーカータンパク質に対する抗体作製技術として、有用であることが示唆された。

E. 結論

本研究では、LRG をはじめとするバイオマーカーの検査薬として応用可能な抗体を迅速に取得することを念頭に、異なるタイプのファージ抗体ライブラリの構築を試みた。親和性を重視した免疫マウス由来ファージ抗体ライブラリ、および多様な抗原に対応可能な非免疫ファージ抗体ライブラリ、より安定性に優れた抗体を

得るための合成抗体遺伝子ファージ抗体ライブラリを構築した。いずれのライブラリからも、各種モデル抗原に対する抗体を取得できることが確認され、種々のバイオマーカータンパク質に対する抗体作製技術として、有用であることが示唆された。今後、本結果をもとに、LRGに対する抗体作製等を試みる予定である。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1.Kamada H, Taki S, Nagano K., Inoue M, Ando D, Mukai Y, Higashisaka K, Yoshioka Y, Tsutsumi Y, **Tsunoda S**. Generation and characterization of a bispecific Diabody targeting EPH receptor A10 and CD3. *Biochem Biophys Res Commun.* 456: 908-912,2015

2.Nagano K, Yamashita T, Inoue M, Higashisaka K, Yoshioka Y, Abe Y, Mukai Y, Kamada H, Tsutsumi Y, **Tsunoda S**. Eph receptor A10 has a potential as a target for a prostate cancer therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450: 545-549,2014

3.Nagano K, Maeda Y, Kanasaki S, Watanabe T, Yamashita T, Inoue M, Higashisaka K, Yoshioka Y, Abe Y, Mukai Y, Kamada H, Tsutsumi Y, **Tsunoda S**. Ephrin receptor A10 is a promising drug target potentially useful for breast cancers including triple negative breast cancers. *J Controlled Release.* 189: 72-79,2014

4.Takano M. Yamashita T. Nagano K. Otani M. Maekura K. Kamada H. **Tsunoda S**. Tsutsumi Y. Tomiyama T. Mori H. Matsuura

K. Matsuyama S. Proteomic analysis of the hippocampus in Alzheimer's disease model mice by using two-dimensional fluorescence difference in gel electrophoresis. *Neuroscience Letters*, 534(8): 85-89, 2013.

5.Yoshikawa M, Mukai Y, Okada Y, Tsumori Y, **Tsunoda S**, Tsutsumi Y, Aird WC, Yoshioka Y, Okada N, Doi T, Nakagawa S. Robo4 is an effective tumor endothelial marker for antibody-drug conjugates based on the rapid isolation of the anti-Robo4 cell-internalizing antibody. *Blood.* 2013;121:2804-13.

6.Morishige T, Yoshioka Y, Narimatsu S, Ikemizu S, **Tsunoda S**, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. Mutants of lymphotoxin- α with augmented cytotoxic activity via TNFR1 for use in cancer therapy. *Cytokine.* 2013;61:578-84.

7.Yamashita T. Nagano K. Kanasaki S. Maeda Y. Furuya T. Inoue M. Nabeshi H. Yoshikawa T. Yoshioka Y. Itoh N. Abe Y. Kamada H. Tsutsumi Y. **Tsunoda S**. Annexin A4 is a possible biomarker for cisplatin susceptibility of malignant mesothelioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 421(1):140-4, 2012.

8.Yamashita T. Okamura T. Nagano K. Imai S. Abe Y. Nabeshi H. Yoshikawa T. Yoshioka Y. Kamada H. Tsutsumi Y. **Tsunoda S**. Rho GDP-dissociation inhibitor alpha is associated with cancer metastasis in colon and prostate cancer. *Pharmazie*, 67(3): 253-255, 2012.

9.Higashisaka K. Yoshioka Y. Yamashita K. Morishita Y. Pan H. Ogura T. Nagano T.