

201442057A

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患実用化研究事業))

**新規治療標的分子LRGの炎症性腸疾患における
役割の解明と創薬への応用**

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 仲 哲治

独立行政法人 医薬基盤研究所

平成 27(2015)年 3 月

本報告書は、厚生労働省の平成 26 年度厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、独立行政法人医薬基盤研究所が実施した平成 26 年度「新規治療標的分子LRGの炎症性腸疾患における役割の解明と創薬への応用」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患実用化研究事業))

**新規治療標的分子LRGの炎症性腸疾患における
役割の解明と創薬への応用**

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 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. 委託業務成果報告（総括）

新規治療標的分子 LRG の炎症性腸疾患における役割の解明と創薬への応用 仲 哲 治	1
---	---

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. IBD の治療標的としての LRG の全般的評価及び臨床試験の準備に関する研究 竹 内 勤 （資料）炎症性腸疾患の病態における LRG の評価①	9
2. IBD の治療標的としての LRG の全般的評価及び臨床試験の準備に関する研究 金 井 隆 典 （資料）炎症性腸疾患の病態における LRG の評価②	15
3. IBD の治療標的としての LRG の全般的評価及び臨床試験の準備に関する研究 飯 島 英 樹 （資料）治療標的としての LRG の全般的評価①	18
4. IBD の治療標的としての LRG の全般的評価及び臨床試験の準備に関する研究 田 中 敏 郎 （資料）治療標的としての LRG の全般的評価②	22
5. 抗 LRG 抗体の機能阻害活性及び安全性の評価に関する研究 角 田 慎 一 （資料）炎症性腸疾患における LRG の機能解析と抗体の評価	25
6. 抗 LRG 抗体の作製及び改良に関する研究 服 部 有 宏 （資料）阻害抗体のプロトタイプ作製	30

III. 学会等発表実績

36

IV. 研究成果の刊行物・別刷

60

新規治療標的分子 LRG の炎症性腸疾患における役割の解明と創薬への応用

業務主任者 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

近年、炎症性腸疾患（IBD）等の免疫難病に対して様々なバイオ医薬品が実用化され、強力な治療効果を発揮している。一方、現行バイオ医薬品に抵抗性の難治症例も認められ、新たな治療標的の探索が急務である。本研究は、医薬基盤研究所が、製薬企業及び拠点病院との共同体制のもと、LRG（Leucine rich alpha-2 glycoprotein）を標的とする抗体医薬品の実用化に向け、前臨床試験の完遂及び臨床試験への橋渡しを目指す。

LRG は業務主任者である仲らが免疫難病患者血清の網羅的解析により同定した糖蛋白質である。LRG は、IBD の重症度・疾患活動性を反映する血清バイオマーカーとして有望で、エーディア（株）との共同体制で、PMDA の薬事戦略相談と並行しつつ慶應義塾大学及び大阪大学において臨床性能試験を進めている。最近、LRG の血管新生作用について Wang らが Nature 誌に報告するなど、LRG の機能にも注目が集まっている。仲らも LRG が血管新生作用を有することを独自に確認し（特許申請中）、さらに LRG が免疫系に直接的に作用することを示す実験結果を得ている。また、仲らは LRG 欠損マウスを独自に作製し、IBD 様腸炎を誘導した LRG 欠損マウスにおいて、野生型マウスよりも炎症が軽度であることを明らかにしている。一連の結果は、LRG が IBD の新たな治療標的として有望であることを示唆している。

本研究では、LRG 欠損マウスを用いた IBD モデル解析を進め、LRG が IBD 様病態において炎症細胞の浸潤や炎症性サイトカイン産生に関わることを明らかにした。同時に、中外製薬（株）とともに抗 LRG 抗体作製を行い、抗体の特性および LRG 阻害活性のスクリーニングを開始した。本研究成果は臨床試験拠点病院とともに評価し、臨床試験に向けた問題点について検討を加えながら、実用化を最終目標として進めている。

担当責任者

竹内 勤 慶應義塾大学・医学部・内科学・リウマチ研究室・教授

金井 隆典 慶應義塾大学・医学部・内科学・消化器内科研究室・教授

飯島 英樹 大阪大学大学院医学系研究科・消化器内科学・講師

田中 敏郎 大阪大学大学院医学系研究科・抗体医薬臨床応用学寄附講座・教授

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

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

炎症性腸疾患においては、サイトカイン TNF- α を標的とする抗体医薬品が実用化され、既存薬にない効果を発揮している。しか

し、今なお寛解導入が困難な症例、更には治療に不応の難治症例も認められ、新規治療標的の探索が世界的規模で進められている。本研究の目的は、研究施設（医薬基盤研究所）、

製薬企業（中外製薬）及び臨床試験拠点病院（慶應義塾大学及び大阪大学）の連携体制のもと、新規治療標的分子 LRG に着目し、炎症性腸疾患に対する抗体医薬品開発を最終的な目標として、炎症性腸疾患モデルマウスを用いた病態解明及び前臨床試験を実施することである。

B. 研究方法

（１）マウス

野生型マウス（C57BL/6 系統）は医薬基盤研究所実験動物施設にて繁殖中のものを使用し、必要時にはオリエンタル酵母から購入した。LRG 欠損マウスは業務主任者仲らが作製し、医薬基盤研究所実験動物施設にて維持繁殖を行った。

（２）DSS 腸炎

LRG 欠損マウスおよび野生型マウス（いずれも C57BL/6 系統）に対し、dextran sulfate sodium (DSS; MP biomedical) を溶解させた滅菌水（4% DSS Wt/Vol）を自由飲水で 5 日間投与した。

（３）免疫組織化学染色

ホルマリン固定後のマウス腸組織を、ブロッキングワン（ナカライ）でブロッキングし、抗 LRG 抗体（clone 322, IBL）もしくは抗 Ly6G 抗体（Biologend）で処理して ChemMate ENVISION Kit (DAKO) で発色させた。カウンターステインはヘマトキシリンで行った。

（４）抗体作製

服部らの項を参照

（５）免疫沈降

免疫沈降は 0.1 μ L のマウス血清を、抗 LRG 抗体（服部らの項を参照）の各クローンを混合し 4 度で一時間反応させた。その後、Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) を添加し、4 度で 1 時間反応させた。ビーズを RIPA バッファー（10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1%

protease-inhibitor cocktail, and 1% phosphatase-inhibitor cocktail) で 5 回洗浄し、20 μ l の 2 \times SDS-PAGE sample バッファーを加えて 95 度で 5 分間加熱することで溶出し、ウェスタンブロット解析に用いた。

（６）ウェスタンブロット解析

上記の免疫沈降後のサンプルを SDS-PAGE (5-20% グラジエントゲル (和光純薬)) にアプライし、40mA で 50min 泳動したのち、PVDF 膜に 100mA、1 時間で転写した。転写後、5% Skim milk/TBST (TBS+ 0.1% Tween20) にてブロッキングし、抗 LRG 抗体（clone 322, IBL）および HRP 標識抗ウサギ抗体（GE healthcare）にて処理して、Chemi-Lumi One Super（ナカライ）により検出を行った。

（７）サイトカイン検出

角田らの項を参照。

（８）抗体の機能阻害活性評価

角田らの項を参照

C. 研究結果

本年度において、業務主任者の仲らのグループは、野生型マウスに IBD 様腸炎（DSS 腸炎）を誘導し、腸炎局所における LRG 発現について免疫組織化学染色を行った。その結果、LRG の発現上昇が、腸上皮細胞および浸潤した好中球・マクロファージ細胞において認められた（図 1）。さらに繁殖させた LRG 欠損マウス及び野生型マウスに対して IBD 様腸炎（DSS 腸炎）誘導を行い、両者の病状の違いを比較した。基礎データである体重変化と便性状の評価を行うとともに、角田（医薬基盤研究所）らのグループとともに組織学的評価およびサイトカイン産生能評価を行ったところ、LRG 欠損マウスにおいて腸炎の病理学的スコアが軽減するとともに、好中球など炎症性細胞浸潤が軽減しており（図 2）、炎症性サイトカイン産生が低下するという結果が得られた（角田らの項を参照）。現在、LRG 欠損マウス及び野生型マウスを対比させつつ、病変

局所における免疫関連分子や各種表面抗原発現のプロファイリングを進めるべく、解析を行っている。

担当責任者の服部（中外製薬）のグループでは、抗 LRG 抗体の作製を行い、LRG に対する結合能のスクリーニングにより選択したクローンについて、大量精製を行った。仲らのグループではマウス血清を用いた免疫沈降実験により、今回得られた抗 LRG 抗体のクローンがいずれも、生体内の LRG と良好に結合することを確認した（図 3）。また LRG を発現しない細胞に対し、抗体添加により細胞の生存および増殖に特に問題が生じないことを確認した。抗体の機能阻害活性については、仲らのグループおよび服部らのグループが連絡を取りながら LLC 細胞等を用いた実験系の構築を進めている。

得られた結果は、担当責任者である竹内、金井（慶応義塾大学）、飯島、田中（大阪大学）に提示し、臨床的観点を加えて評価を行っている。

D. 考察

DSS 腸炎モデルの解析により、LRG の腸管での発現が経時的に変化することが明らかになった。すなわち、正常の腸管粘膜では LRG の発現がほとんど認められないが、DSS 腸炎誘導により粘膜上皮から LRG 産生が誘導され、さらに浸潤する好中球・マクロファージからの LRG 産生が加わることが明らかになった。LRG 欠損マウスにおいては、従来より DSS 腸炎が軽減することが明らかになっていたが、今回の解析により、腸粘膜における好中球などの細胞浸潤が LRG 欠損マウスで減少していることが明らかになった。さらに、DSS 腸炎誘導後の大腸におけるサイトカイン産生も、LRG 欠損マウスにおいて減少していた。以上から、LRG を阻害することで腸炎局所における炎症性細胞浸潤および炎症性サイトカイン産生の抑制が期待できると考えられた。

担当責任者の服部のグループが作製した抗 LRG 抗体については、いずれのクローンもマウス血清由来の LRG に非常に良好に結合した。LRG には糖鎖修飾の異なる分子が存在しており（未発表データ）、いずれのクローンがどのような LRG をより強く認識するのかについては、今後検討する必要がある。また、LRG の機能阻害活性のスクリーニングについては、LLC 細胞を利用した系のバリデーションを行っている。強力な中和活性をもつクローンはまだ同定されていないが、抗体が選択出来れば、担当責任者の服部らのグループでは、抗体医薬品作製および改良に関する技術の蓄積があり、そのノウハウを活用してさらなる抗体の改良を行う予定である。

E. 結論

本研究により、IBD 様腸炎において LRG が細胞遊走やサイトカイン産生に重要であるという役割が明らかになってきた。また、抗 LRG 抗体作製が順調に進んでおり、現在、抗体クローンのスクリーニングを進めている。

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 Modifying 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, Hosen 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. Annexin A4-conferred platinum resistance is mediated by the copper transporter ATP7A 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**. *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.

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号
国際出願番号 : PCT/JP2014/060552
出願日 : 2014年11月13日

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年ICIS 26th - 29th October 2014
Melbourne Convention and Exhibition
Centre, Melbourne
Leucine-rich α 2 glycoprotein promotes
TGF β 1-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

I. 研究協力者

藤本 穰 (独)医薬基盤研究所 免疫シグナル
プロジェクト サブプロジェクトリーダー
世良田 聡 (独)医薬基盤研究所 免疫シグ
ナルプロジェクト 研究員
鎌田 春彦 (独)医薬基盤研究所 バイオ創
薬プロジェクト サブプロジェクトリーダー
松岡 克善 慶應義塾大学医学部 内科学消
化器内科研究室 専任講師
新崎 信一郎 大阪大学大学院医学系研究科
消化器内科学 助教
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
檜崎 雅司 大阪大学大学院医学系研究科
呼吸器・免疫アレルギー内科学 講師

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

図1. DSS腸炎誘導後(day 14)の大腸におけるLRG発現
(IHC:抗マウスLRG抗体)

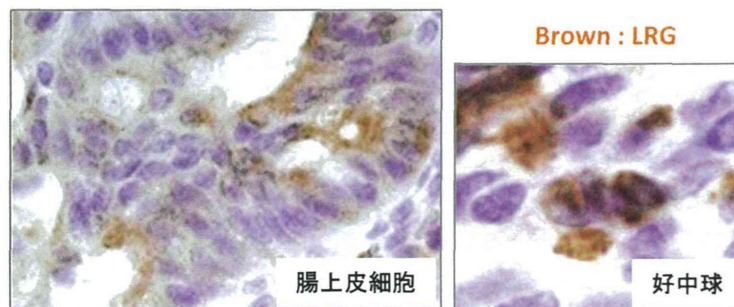
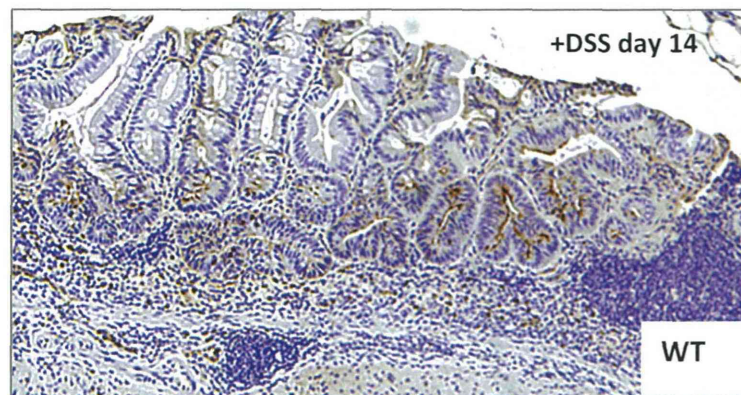


図2. DSS腸炎誘導後 (day 14) の野生型 (WT) およびLRG欠損 (KO) マウスの大腸における好中球浸潤
(IHC: 抗マウスLy6G抗体)

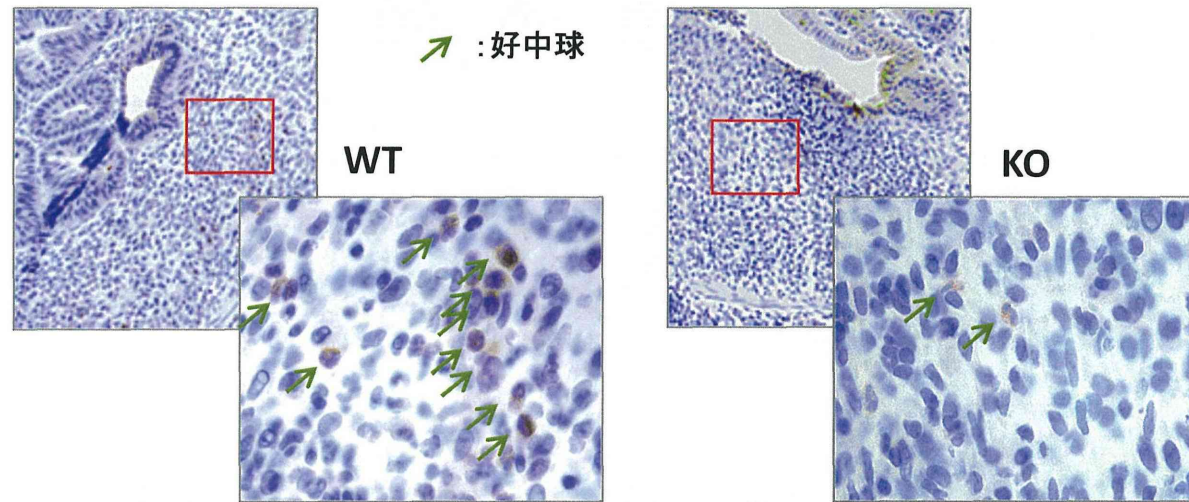
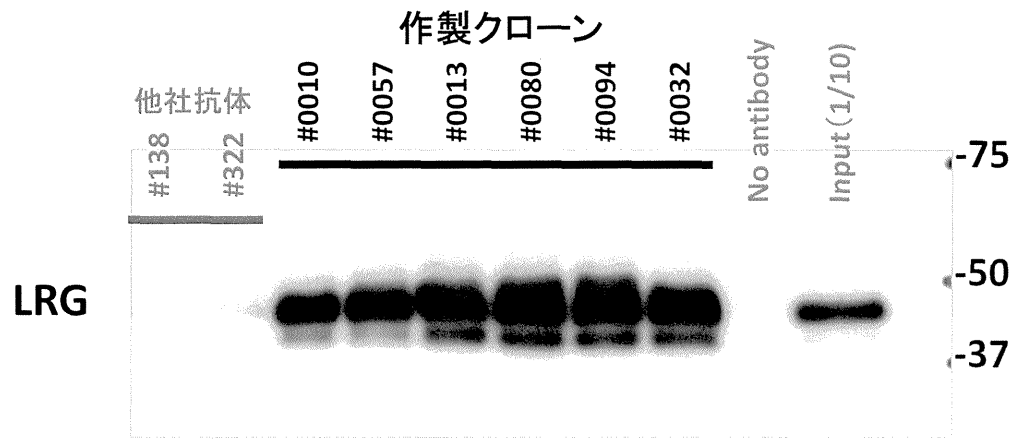


図3. 作製した抗LRG抗体クローンの内在性LRGに対する結合



炎症性腸疾患の病態における LRG の評価①

担当責任者 竹内 勤 慶應義塾大学医学部 内科学リウマチ研究室 教授

研究要旨

近年、炎症性腸疾患（IBD）等の免疫難病に対して様々なバイオ医薬品が実用化され、強力な治療効果を発揮している。一方、現行バイオ医薬品に抵抗性の難治症例も認められ、新たな治療標的の探索が急務である。本研究は、研究施設、製薬企業及び拠点病院の共同体制のもと、LRG（Leucine rich alpha-2 glycoprotein）を標的とする抗体医薬品の実用化に向け、前臨床試験の完遂及び臨床試験への橋渡しを目指す。

LRG は業務主任者である仲らが免疫難病患者血清の網羅的解析により同定した糖蛋白質である。LRG は、IBD の重症度・疾患活動性を反映する血清バイオマーカーとして有望で、エーディア（株）との共同体制で、PMDA の薬事戦略相談と並行しつつ慶應義塾大学及び大阪大学において臨床性能試験を進めている。最近、LRG の血管新生作用について Wang らが Nature 誌に報告するなど、LRG の機能にも注目が集まっている。仲らも LRG が血管新生作用を有することを独自に確認し（特許申請中）、さらに LRG が免疫系に直接的に作用することを示す実験結果を得ている。また、仲らは LRG 欠損マウスを独自に作製し、IBD 様腸炎を誘導した LRG 欠損マウスにおいて、野生型マウスよりも炎症が軽度であることを明らかにしている。一連の結果は、LRG が IBD の新たな治療標的として有望であることを示唆している。

本研究では、LRG 欠損マウスを用いた IBD モデル解析のデータより、LRG が IBD 様病態において炎症細胞の浸潤や炎症性サイトカイン産生に関与していることを明らかにしてきている。また、中外製薬（株）とともに作製した抗 LRG 抗体については、その特性および LRG 阻害活性のスクリーニングを開始した。臨床試験拠点病院である慶應義塾大学では、得られたデータを臨床的視点から評価し、臨床試験への移行を目指して検討を加えながら、実用化を最終目標として進めている。

A. 研究目的

近年、関節リウマチなどの炎症性疾患に対し、さまざまな抗体医薬品が開発され、難治症例に広く使用されるようになった。炎症性腸疾患においては、サイトカイン TNF- α を標的とする抗体医薬品が実用化され、既存薬にない効果を発揮している。しかし、今なお寛解導入が困難な症例、更には治療に不応の難治症例も認められ、新規治療標的の探索が世界的規模で進められている。本研究の目的は、研究施設（医薬基盤研究所）、製薬企業（中外製薬）及び臨床試験拠点病院（慶應義塾大学及び大阪大学）の連携体制のもと、新規治療

標的分子 LRG に着目し、炎症性腸疾患に対する抗体医薬品開発を最終的な目標として、炎症性腸疾患モデルマウスを用いた病態解明及び前臨床試験を実施することである。

B. 研究方法

（1）DSS 腸炎

仲らの項を参照。

（2）HE 染色

ホルマリン固定後のマウス腸組織を、ヘマトキシリン・エオジンにて染色した。

（3）ウェスタンブロット解析

仲らの項を参照。

(4) メッセンジャーRNA 解析

マウス組織等より RNeasy mini kit (キアゲン)を用いて mRNA を抽出した。QuantiTect Reverse Transcription Kit (キアゲン)により cDNA に変換し、SYBR Premix Ex taq (タカラバイオ)により発現定量を行った。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載した。

D. 結果・考察

業務主任者の仲らのグループを中心に行った DSS 腸炎モデルの解析により、DSS 腸炎モデルの解析により腸炎誘導後の粘膜上皮および浸潤する好中球・マクロファージからの LRG が産生されることが明らかになった。また、LRG 欠損マウスにおいては、DSS 腸炎が軽減しており、腸粘膜における好中球などの細胞浸潤が減少していることが明らかになった。さらに、DSS 腸炎誘導後の大腸におけるサイトカイン産生も、LRG 欠損マウスにおいて減少していた。本研究のデータを検討した結果、抗 LRG 抗体の使用により、IBD における炎症性細胞浸潤および炎症性サイトカイン産生が抑制され、IBD への治療効果が期待できるものと考えられた。

担当責任者の竹内および金井らのグループは、研究代表者の仲らのグループとともに、血清 LRG のバイオマーカーとしての可能性について以前から検討している。LRG は、LRG は関節リウマチのような炎症性自己免疫疾患にかぎらず、IL-6 に依存しない炎症を捉えるマーカーとして、IBD の重症度・疾患活動性を反映する新規マーカーとして有望である。さらに、抗 LRG 抗体を実用化するにあたっては、血清 LRG がコンパニオン診断薬として有用であることが考えられ、臨床試験を行う際にも検討すべきと考えられた。

E. 結論

本研究により、IBD 様腸炎において LRG が細胞遊走やサイトカイン産生に重要であるという役割が明らかになってきており、LRG は IBD の標的として有望である。今後、作製中の抗 LRG 抗体のスクリーニングが完了すれば、抗体治療の有効性について検討していく必要がある。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. 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* in press.
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. Mok CC, Yap DY, Navarra SV, Liu Z-H, Zao M-H, Lu L, **Takeuchi T**, Avihingsanon Y, Yu X-Q, Lapid EA, Lague-Lizardo LR, Smethkul V, Shen N, Chen S-L, and Chan TM, for the Asian Lupus Nephritis Network. Overview of lupus nephritis management guidelines and perspective from Asia. *Nephrology* 19:11-20, 2014.
7. Izumi K, Kaneko Y, Yasuoka H, Seta N, Kameda H, Kuwana M, and **Takeuchi T**. Tocilizumab is clinically, functionally and radiographically effective and safe either with or without low-dose methotrexate in active rheumatoid arthritis patients with inadequate responses to DMARDs and/or TNF inhibitors. A single center retrospective cohort study (KEIO-TCZ study) at 52 week. *Mod Rheum*, online April, 2014.
8. Kaneko Y, Kuwana M, Kondo H, and **Takeuchi T**. Discordance in global assessments between patient and estimator in patients with newly diagnosed rheumatoid arthritis: associations with progressive joint destruction and functional impairment. *J Rheumatology*, 40:1061-66, 2014.
9. **Takeuchi T**, Matubara T, Urata Y, Suematsu E, Ohta S, Honjyo S, Abe T, Yamamoto A, Miyasaka N, and the Japan Abatacept Study Group. Phase III, multicenter, open-label, long-term study of the safety of abatacept in Japanese patients with rheumatoid arthritis and inadequate response to methotrexate conventional or biologic disease-modifying anti-rheumatic drugs. *Mod Rheum* 24:744-753, 2014.
10. **Takeuchi T**, Kawai S, Yamamoto K, Harigai M, Ishida K, and Miyasaka M. Post-marketing surveillance of the safety and effectiveness of tacrolimus in 3267 Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheum*, 24:8-16, 2014.
11. **Takeuchi T**, Yamanaka H, Ishiguro N, Miyasaka N, Mukai M, Matsubara T, Uchida S, Akama H, Hartmut K, Vipin A, and Tanaka Y. Adalimumab, a Human anti-TNF monoclonal antibody, outcome study for the prevention of joint damage in Japanese patients with early RA; the HOPEFUL 1 study. *Ann Rheum Dis*, 73:536-543, 2014.
12. Nishina N, Kikuchi J, Hashizume M, Yoshimoto K, Kameda H, and **Takeuchi T**. Baseline levels of soluble interleukin-6 receptor predict clinical remission in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab: implications

- for molecular targeted therapy. *Ann Rheum Dis*, 73:945-7, 2014.
13. Kaneko Y, Hanaoka H, Hirakata M, **Takeuchi T**, and Kuwana M. Distinct arthropaties of the hands in patients with anti-aminoacyl tRNA synthetase antibodies: usefulness of autoantibody profiles in classifying patients. *Rheumatology*, 53:1120-24, 2014.
 14. Nishimoto N, Koichi Amano, Yasuhiko Hirabayashi, Takahiko Horiuchi, Tomonori Ishii, Mitsuhiro Iwahashi, Masahiro Iwamoto, Hitoshi Kohsaka, Masakazu Kondo, Tsukasa Matsubara, Toshihide Mimura, Hisaaki Miyahara, Shuji Ohta, Yukihiko Saeki, Kazuyoshi Saito, Hajime Sano, Kiyoshi Takasugi, **Tsutomu Takeuchi**, Shigeto Tohma, Tomomi Tsuru, Yukitaka Ueki, Jiro Yamana, Jun Hashimoto, Takaji Matsutani, Miho Murakami, Nobuhiro Takagi. Drug free REmission/low disease activity after cessation of tocilizumab (Actemra) Monotherapy (DREAM) study. *Mod Rheum*, 24:17-25, 2014.
 15. Nishimoto N, Koichi Amano, Yasuhiko Hirabayashi, Takahiko Horiuchi, Tomonori Ishii, Mitsuhiro Iwahashi, Masahiro Iwamoto, Hitoshi Kohsaka, Masakazu Kondo, Tsukasa Matsubara, Toshihide Mimura, Hisaaki Miyahara, Shuji Ohta, Yukihiko Saeki, Kazuyoshi Saito, Hajime Sano, Kiyoshi Takasugi, **Tsutomu Takeuchi**, Shigeto Tohma, Tomomi Tsuru, Yukitaka Ueki, Jiro Yamana, Jun Hashimoto, Takaji Matsutani, Miho Murakami, Nobuhiro Takagi. Retreatment efficacy and safety of tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis in recurrence (RESTORE) study. *Mod Rheum*, 2:426-32, 2014.
 16. Kaneko Y, Kuwana M, and **Takeuchi T**. Osteolytic change in distal interphalangeal joint and sacroiliac joints in subluxing arthropathy in anti-jo-1 antibody. *Joint Bone & Spine*, in press.
 17. Koike T, Harigai M, Inokuma S, Ishiguro N, Ryu J, **Takeuchi T**, Takei S, Tanaka Y, Sano Y, Yamaguchi H, and Yamanaka H. Characteristics related to good effectiveness and safety with tocilizumab: Post-marketing surveillance of 7901 rheumatoid arthritis patients in Japan. *J Rheumatology*, in press.
 18. Nishimoto T, Seta N, Anan R, Yamamoto T, Kaneko Y, **Takeuchi T**, and kuwana M. A single nucleotide polymorphism of TRAF1 predicts the clinical response to anti-TNF treatment in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheum*, 32:211-7, 2014.
 19. Kurasawa T, Nagasawa H, Kishimoto M, Amano K, **Takeuchi T**, and Kameda H. Addition of another disease-modifying anti-rheumatic drug to methotrexate reduces the flare rate within 2 years after infliximab discontinuation in patients with rheumatoid arthritis: An open, randomized, controlled trial. *Mod Rheum* 24:561-6, 2014.

20. Yamamoto K, **Takeuchi T**, Yamanaka H, Ishiguro N, Tanaka Y, Eguchi K, Watanabe A, Origasa H, Shoji T, Sakamaki Y, van der Heijde D, Miyasaka N, and Koike T. Efficacy and safety of certolizumab pegol plus methotrexate in Japanese rheumatoid arthritis patients with inadequate response to methotrexate: the J-RAPID randomized, placebo-controlled trial. *Mod Rheum*, 24:715-24, 2014.
21. Yamamoto K, **Takeuchi T**, Yamanaka H, Ishiguro N, Tanaka Y, Eguchi K, Watanabe A, Origasa H, Iwai K, Sakamaki Y, van der Heijde D, Miyasaka N, and Koike T. Efficacy and safety of certolizumab pegol without methotrexate co-administration in Japanese patients with active rheumatoid arthritis: the HIKARI randomized, placebo-controlled trial. *Mod Rheum*, 24:552-60, 2014.
22. Tanaka Y, Yamamoto K, **Takeuchi T**, Yamanaka H, Ishiguro N, Eguchi K, Watanabe A, Origasa H, Shoji T, Miyasaka N, and Koike T. Long-term efficacy and safety of certolizumab pegol in Japanese rheumatoid arthritis patients who could not receive methotrexate: 52-week results from an open-label extension of the HIKARI study. *Mod Rheum*, 24:725-33, 2014.
23. Tanaka Y, Yamamoto K, **Takeuchi T**, Yamanaka H, Ishiguro N, Eguchi K, Watanabe A, Origasa H, Shoji T, Miyasaka N, and Koike T. Long-term efficacy and safety of certolizumab pegol in Japanese rheumatoid arthritis patients with inadequate response to methotrexate: 52-week results from an open-label extension of the J-RAPID study. *Mod Rheum*, 24:734-43, 2014.
24. Tanaka Y, Kubo S, Yamanaka H, Amano K, Hirata S, Tanaka E, Nagasawa H, Yasuoka H, and **Takeuchi T**. Efficacy and safety of abatacept in routine care of patients with rheumatoid arthritis: Orenzia as Biological Intensive Treatment for RA (ORBIT) study. *Mod Rheum*, 24:754-62, 2014.
25. Yamanaka H, Ishiguro N, **Takeuchi T**, Miyasaka N, Mukai M, Matsubara T, Uchida S, Akama H, Kupper H, Arora V, and Tanaka Y. Recovery of clinical but not radiographic outcomes by the delayed addition of adalimumab to methotrexate-treated Japanese patients with early rheumatoid arthritis: 52-week results of the HOPEFUL-1 trial. *Rheumatology*, 53:904-13, 2014.
26. Iwahashi M, Inoue H, Matsubara T, Tanaka T, Amano K, Kanamono T, Nakano T, Uchimura S, Izumihara T, Yamazaki A, Karyekar C, and **Takeuchi T**. Efficacy, safety, pharmacokinetics and immunogenicity of abatacept administered subcutaneously or intravenously in Japanese patients with rheumatoid arthritis and inadequate response to methotrexate: a phase II/III, randomized study. *Mod Rheum*, 7 April 2014.

G-2. 学会発表

1. Nishikawa A, Takeuchi T: A Phase 2b study of an oral JAK Inhibitor ASP015K monotherapy in Japanese patients with moderate to severe rheumatoid arthritis. The European League Against Rheumatism. Paris, France 2014.6.13

2. Takeuchi T: Biomarkers in RA(Treatment response or joint damage). Clinical Research Center for Rheumatoid Arthritis. Seoul, Korea. 2014.10.17

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し。

I. 研究協力者

該当無し。

炎症性腸疾患の病態における LRG の評価②

担当責任者 金井 隆典 慶應義塾大学医学部 内科学消化器内科研究室 教授

研究要旨

近年、炎症性腸疾患（IBD）等の免疫難病に対して様々なバイオ医薬品が実用化され、強力な治療効果を発揮している。一方、現行バイオ医薬品に抵抗性の難治症例も認められ、新たな治療標的の探索が急務である。本研究は、研究施設、製薬企業及び拠点病院の共同体制のもと、LRG（Leucine rich alpha-2 glycoprotein）を標的とする抗体医薬品の実用化に向け、前臨床試験の完遂及び臨床試験への橋渡しを目指す。

LRG は業務主任者である仲らが免疫難病患者血清の網羅的解析により同定した糖蛋白質である。LRG は、IBD の重症度・疾患活動性を反映する血清バイオマーカーとして有望で、エーディア（株）との共同体制で、PMDA の薬事戦略相談と並行しつつ慶應義塾大学及び大阪大学において臨床性能試験を進めている。最近、LRG の血管新生作用について Wang らが Nature 誌に報告するなど、LRG の機能にも注目が集まっている。仲らも LRG が血管新生作用を有することを独自に確認し（特許申請中）、さらに LRG が免疫系に直接的に作用することを示す実験結果を得ている。また、仲らは LRG 欠損マウスを独自に作製し、IBD 様腸炎を誘導した LRG 欠損マウスにおいて、野生型マウスよりも炎症が軽度であることを明らかにしている。一連の結果は、LRG が IBD の新たな治療標的として有望であることを示唆している。

本研究では、LRG 欠損マウスを用いた IBD モデル解析のデータより、LRG が IBD 様病態において炎症細胞の浸潤や炎症性サイトカイン産生に関与していることを明らかにしてきている。また、中外製薬（株）とともに作製した抗 LRG 抗体については、その特性および LRG 阻害活性のスクリーニングを開始した。臨床試験拠点病院である慶應義塾大学では、得られたデータを臨床的視点から評価し、臨床試験への移行を目指して検討を加えながら、実用化を最終目標として進めている。

A. 研究目的

炎症性腸疾患においては、サイトカイン TNF- α を標的とする抗体医薬品が実用化され、既存薬にない効果を発揮している。しかし、今なお寛解導入が困難な症例、更には治療に不応の難治症例も認められ、新規治療標的の探索が世界的規模で進められている。本研究の目的は、研究施設（医薬基盤研究所）、製薬企業（中外製薬）及び臨床試験拠点病院（慶應義塾大学及び大阪大学）の連携体制のもと、新規治療標的分子 LRG に着目し、炎症性腸疾患に対する抗体医薬品開発を最終的な目標として、炎症性腸疾患モデルマウスを用

いた病態解明及び前臨床試験を実施することである。

B. 研究方法

（1）DSS 腸炎

LRG 欠損マウスおよび野生型マウス（いずれも C57BL/6 系統）に対し、dextran sulfate sodium (DSS; MP biomedical) を溶解させた滅菌水（4% DSS Wt/Vol）を自由飲水で5日間投与した。

（2）HE 染色

ホルマリン固定後のマウス腸組織を、ヘマトキシリン・エオジンにて染色した。

(3) ウェスタンブロット解析

仲らの項を参照。

(4) メッセンジャーRNA 解析

マウス組織等より RNeasy mini kit (キアゲン)を用いて mRNA を抽出した。QuantiTect Reverse Transcription Kit (キアゲン)により cDNA に変換し、SYBR Premix Ex taq (タカラバイオ)により発現定量を行った。

(5) 免疫組織化学染色

仲らの項を参照。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載した。

D. 結果・考察

業務主任者の仲らのグループを中心に行った DSS 腸炎モデルの解析により、腸炎誘導後の粘膜上皮および浸潤する好中球・マクロファージからの LRG が産生されることが明らかになった。また、LRG 欠損マウスにおいては、DSS 腸炎が軽減しており、腸粘膜における好中球などの細胞浸潤が減少していることが明らかになった。さらに、DSS 腸炎誘導後の大腸におけるサイトカイン産生も、LRG 欠損マウスにおいて減少していた。本研究のデータを検討した結果、抗 LRG 抗体の使用により、IBD における炎症性細胞浸潤および炎症性サイトカイン産生が抑制され、IBD への治療効果が期待できるものと考えられた。

担当責任者の竹内および金井らのグループは、業務主任者の仲らのグループとともに、血清 LRG のバイオマーカーとしての可能性について以前から検討している。LRG は関節リウマチのような炎症性自己免疫疾患にかぎらず、IL-6 に依存しない炎症を捉えるマーカーとして、IBD の重症度・疾患活動性を反映する新規マーカーとして有望である。さらに、抗 LRG 抗体を実用化するにあたっては、血清 LRG がコンパニオン診断薬として有用であることが考えられ、臨床試験を行う際にも検討

すべきと考えられた。

E. 結論

本研究により、IBD 様腸炎において LRG が細胞遊走やサイトカイン産生に重要であるという役割が明らかになってきており、LRG は IBD の標的として有望である。今後、作製中の抗 LRG 抗体のスクリーニングが完了すれば、抗体治療の有効性について検討していく必要がある。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Matsuoka K, **Kanai T**. Gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Seminars in Immunopathol.* 2014 in press
2. Mikami Y, Mizuno S, Nakamoto N, Hayashi A, Sujino T, Sato T, Kamada N, Matsuoka K, Hisamatsu T, Ebinuma H, Hibi T, Yoshimura A, **Kanai T**. Macrophages and dendritic cells emerge in the liver during intestinal inflammation and predispose the liver to inflammation. *PLoS One.* 2014;2:9:e84619
3. Saigusa K, Hisamatsu T, Handa T, Sujino T, Mikami Y, Hayashi A, Mizuno S, Takeshita K, Sato T, Matsuoka K, **Kanai T**. Classical Th1 cells obtain colitogenicity by co-existence of ROR γ t-expressing T cells in experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2014; 20:1820-7.