

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09754

研究課題名(和文) 乾癬患者におけるTNF アンタゴニスト二次無効のメカニズム解析

研究課題名(英文) Therapeutic drug monitoring of patients with psoriasis during tumour necrosis factor (TNF)- α antagonist treatment using a novel interleukin-8 reporter cell line

研究代表者

木村 裕 (Kimura, Yutaka)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：90375056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：抗TNF- α 抗体製剤で治療されている乾癬患者において、その治療効果とTHP-1細胞をベースとしたIL-8レポーター細胞を用いて測定された患者血清中のTNF- α 中和活性の間に有意な相関が認められ有用な試験系であることを見出した。また、患者血清中の抗TNF- α 中和活性がELISAで測定した血清中の抗TNF- α 抗体製剤の濃度と相関した。一方、ヒトT細胞JurkatをベースとしたIL-2レポーター細胞においてJAK阻害剤等の種々の薬剤によりIL-2レポーター活性の抑制が認められ、各種のレポーター細胞を用いることにより今後様々な薬剤の治療効果を類推できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：There was a significant correlation between change in PASI and inhibitory rate of TNF- α induced IL-8 promoter activity. Therapeutic monitoring of patients with psoriasis during TNF- α antagonist therapy using IL-8 reporter cell line, THP-G8 can provide a useful tool to determine objectively the efficacy of the administered TNF- α antagonists. Furthermore, using IL-2 reporter cell line, several drugs including JAK inhibitors inhibited IL-2 promoter activity.

研究分野：皮膚科学

キーワード：乾癬 TNF- α 阻害剤 ルシフェラーゼアッセイ インターロイキン-8 薬物動態 THP-1 生物学的製剤

1. 研究開始当初の背景

TNF- α アンタゴニストは関節性リウマチ、強直性脊椎炎、炎症性腸疾患や乾癬などの多くの免疫の関与する慢性炎症性疾患に対する治療の主流となっている。そのような薬剤として現在、TNF- α 特異的なモノクローナル抗体である infliximab, adalimumab, golimumab 等が臨床用として認可されており慢性炎症性疾患の治療に劇的な変化をもたらした。しかし、TNF- α アンタゴニストを用いた乾癬治療では、これまでの経験でいくつかの問題点が明らかになってきている。TNF- α アンタゴニストの効果に個人差があること、効果が減弱すること、感染症や投与時反応などの副作用、そして薬剤が高価であることが問題として挙げられている。コストの問題は患者個人ばかりでなく、医療費全体の高騰の要因の一つとなっている。この問題を克服するため、TNF- α アンタゴニストのバイオ後続品(biosimilar)がEUやアメリカで利用可能である。しかしながら、生物製剤は構造が複雑であることから正確に複製することが困難である。したがって、U.S. Food and Drug Administration, Health Canada そして European Medicines Agency は、もとの生物製剤との類似性を示すさらなる invitro 研究を求めている。効果の個人差や効果の減弱(二次無効)については、血清薬剤濃度をモニター(therapeutic drug monitoring: TDM)すること、抗薬剤抗体(anti-drug-antibodies: ADAs)の検出がその解決に役立つことが報告されている。臨床面での効果率が infliximab の血中濃度に比例することが報告され、adalimumab、etanercept についても同様の報告がされた。薬剤の効果の減弱はTNF- α アンタゴニストの血中濃度の低下とこれらの薬剤に対する抗体の出現と関連付けられることが示されている。したがって、TDM と ADA 検出の組み合わせがTNF- α アンタゴニストに対する効果減弱を検出する手段として適しているように思われる。TNF- α アンタゴニスト治療中の患者においては、ADA による効果減弱、消失を早期にみだし、無効な薬剤の使用をできるだけ短期間とし、より有効な治療薬への変更、場合によっては増量などが求められる。しかしながら、TNF- α アンタゴニスト濃度、ADA 濃度が患者の病勢を反映しないとの報告(1)もあり、現時点では明らかな二次無効のメカニズムは解明されていない。またADA の検出は必ずしも容易ではなく、現在対応できるTNF- α アンタゴニストは限られている。

一方、IL-8 はTNF- α やIL-1 に反応し産生されるケモカインであり、好中球、樹状細胞に対する走化性を有し炎症性疾患における重要な役割を示すものである。われわれはヒト単球系細胞株であるTHP-1 細胞株に由来したIL-8 レポーター細胞株、THP-G8 を作製した。それらはIL-8 プロモーターに制御されたSLO ルシフェラーゼ遺伝子、G3PDH プロモーターに制御されたSLR ルシフェラーゼ遺伝子を導

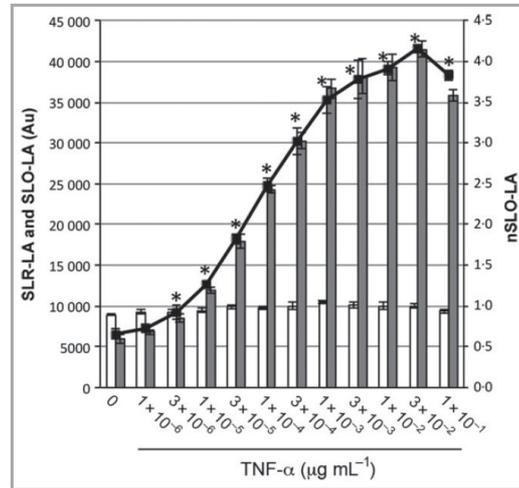


図1 TNF- α によるIL-8レポーター活性の上昇 (白: GAPDHレポーター活性、灰色: IL-8レポーター活性、実線: ノーマライズされたIL-8レポーター活性)

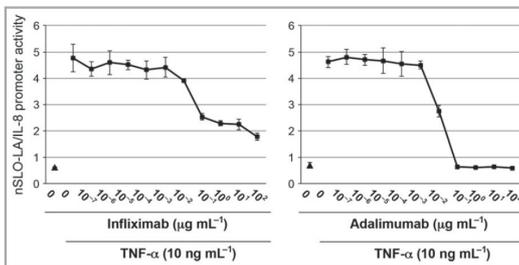


図2 Infliximab (左)、Adalimumab (右)によるIL-8レポーター活性の抑制

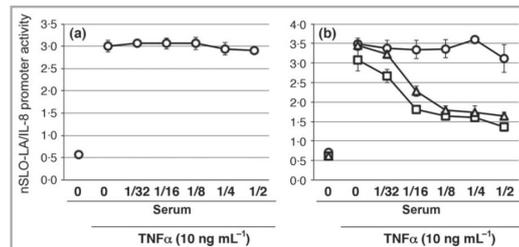


図3 健常人血清(a)およびinfliximabを投与された患者血清(b) (○: 投与前、□: 投与1週間後、◇: 投与2週間後)のIL-8レポーター活性への影響

入されたものである。THP-G8 細胞はヒトTNF- α を加えることで濃度依存性にSLO-LA ルシフェラーゼ活性(SLO-LA)の増加が認められた(図1)。続いて、TNF- α アンタゴニストの前処理がヒトTNF- α に誘導されるSLO-LAを抑制するかどうかを検討した。もし抑制が認められれば、THP-G8細胞を用いて、TNF- α アンタゴニストを投与された乾癬患者の血清中の活性のあるTNF- α アンタゴニスト量をモニターできる可能性、そしてバイオ後続品を含めた異なるTNF- α アンタゴニストの抗TNF- α 活性を比較できる可能性を示唆する。実際、TNF- α を infliximab、adalimumab と前処理したものではTNF- α 単独で刺激したものに比べSLO-LA の誘導が濃度依存性に抑制された。さらにそれぞれのEC50 が89.5 ng/ml、13.9 ng/ml と算出され、TNF- α アンタゴニスト間の抗TNF- α 活性の比較が可能であった(図2)。われわれは東北大学病院臨床研究倫

理委員会の承認を得て、TNF- アンタゴニストを投与された少人数の乾癬患者の血清中のSLO-LA 抑制能を測定した。健常人の血清にはSLO-LA 抑制能は認められなかった。乾癬患者でもTNF- アンタゴニストの投与前に採血された血清ではSLO-LA抑制能は認められなかったが、TNF- アンタゴニスト投与1 週後および2 週後に採血された血清ではSLO-LA 抑制能が認められた(図3)。

測定時間についても培養時間は6 時間であり、採血してその日のうちに結果を知ることができる。ELISA に比べhigh throughputな測定が可能であり創薬の現場での活用も期待できる。

2. 研究の目的

ヒト単球細胞株をベースとした

Interleukin(IL)-8 レポーター細胞を用いヒト血清中の抗TNF- 活性を簡易かつ迅速に測定する系の確立を目指す。その系を用いた結果と従来のELISA 法によるTNF- アンタゴニスト濃度測定、抗TNF- アンタゴニスト抗体濃度測定の結果と比較し、乾癬患者におけるTNF- アンタゴニスト二次無効のメカニズムの一端を明らかにするとともに早期診断法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

THP-G8 細胞を段階希釈した健常人または患者の血清の前処理後に 10 ng/mL のヒトリコンピナント TNF-a を加え、6 時間後ルシフェラーゼ活性を測定した。以下の式により血清中の抗 TNF- 中和活性の指標となる%suppression を計算した。 $\% \text{suppression} = (1 - \text{血清存在下の TNF- 添加後の nSLO-LA} / \text{血清非存在下の TNF- 添加後の nSLO-LA}) \times 100$ 。乾癬患者血清の%suppression とATA療法による Psoriasis Area and Severity Index (PASI)スコアの改善率との相関を検討した。infliximab を投与された患者 2 名、adalimumab を投与された患者 3 名について血清中の TNF- アンタゴニストの濃度と抗TNF- アンタゴニスト濃度をそれぞれELISA 法、RIA 法により測定した。

4. 研究成果

研究開始後、東北大学病院皮膚科乾癬外来における検体数を増やしさらに他施設からもデータを集積し、25 人の乾癬患者において PASI スコアの改善率と%suppression との関連を検討した。その結果、両者の間に有意な相関が認められた(図4、 $p=5.61 \times 10^{-5}$)。このことから THP-G8 細胞が個々の患者におけるATA 療法の治療効果と相関する血清中の抗TNF- 中和活性を評価する有用な試験系であることが示唆された。

PASI75 を達成したレスポナーと達成しなかったノンレスポナー間の%suppression 値の閾値を検討するため receiver-operator characteristic (ROC)カーブを作成した。(図5) Area under the curve は0.88 と1.0に

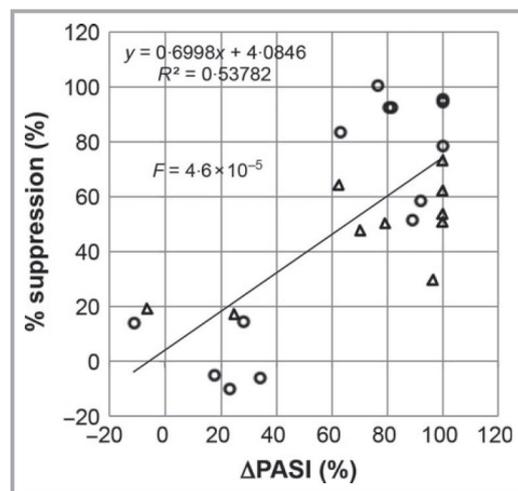


図4 乾癬患者におけるPASIスコアの改善率と%suppressionとの関連

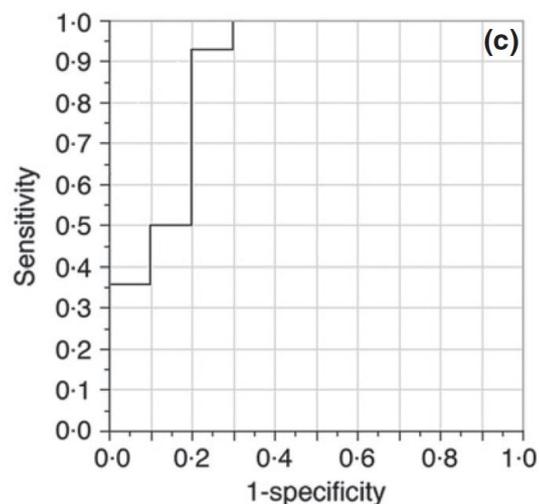


図5 %suppressionを指標としたROCカーブ

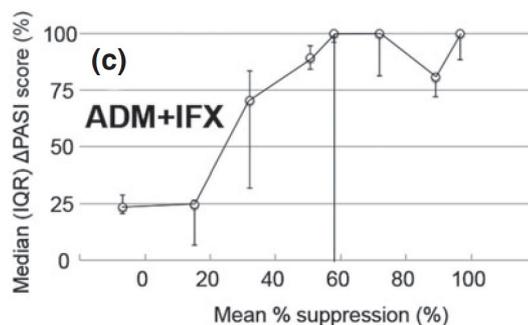


図6 Concentration effect curve

近く精度の高いアッセイ方法であることが示唆された。閾値となる%suppression は50.3%でありこの時の感度は92.9%、特異度は80.0%であった。

Concentration effect curve からは臨床的に最大の効果を得られた%suppression の最小値は57.9%であった。(図6) ROC curve、Concentration effect curve で得られた値は2種の TNF- アンタゴニストでのデータを合わせたものであるがそれぞれの TNF- アンタゴニスト個別で算出した値も近似の値であり、このアッセイ方法が今後新しく開発される TNF- アンタゴニストにおいても同

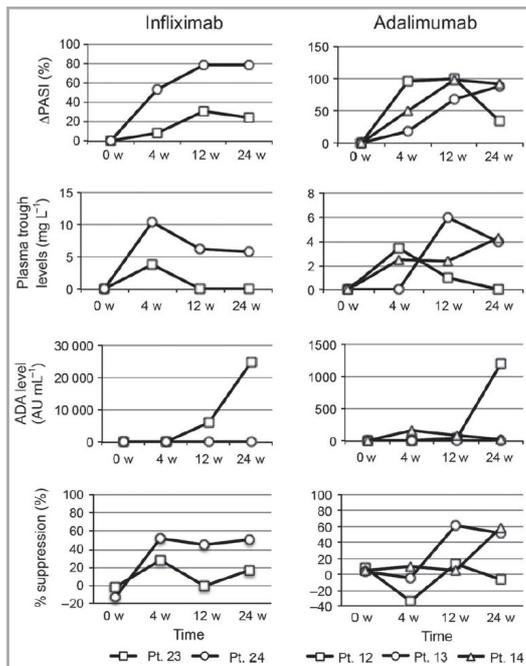


図7 Infliximabを投与された患者2名(左)、Adalimumab(右)を投与された患者3名におけるPASI改善率、血清中のTNF-アンタゴニスト濃度、抗TNF-アンタゴニスト抗体濃度、%suppressionの経時的変化。

一の指標で評価できる可能性が示唆された。

25例中 infliximab を投与された患者2名、adalimumab を投与された患者3名について血清中の TNF-アンタゴニストの濃度と抗TNF-アンタゴニスト抗体濃度と%suppressionとの関連を検討した。図7に示すように%suppression が血清中の TNF-アンタゴニストの濃度と相関すること、TNF-アンタゴニストの濃度の低下が抗TNF-アンタゴニスト抗体の産生と関連することが明らかになった。(図7) これらをまとめ British Journal of Dermatology 誌に投稿し論文発表した²。

このアッセイ系をその他の乾癬に対する生物学的製剤(抗p40抗体製剤、抗IL-17抗体製剤)、その他の疾患に対する生物学的製剤(抗IL-6抗体製剤)についても応用できるかを検討するため、THP-G8細胞およびヒト表皮細胞HaCaTをベースとするIL-8レポーター細胞におけるIL-2, IL-23, IL-17, IL-6に対する反応性を検討したがいずれもレポーター活性の上昇は認められなかった。

ヒトT細胞JurkatをベースとしたIL-2レポーター細胞³においてDimethyl fumarate, JAK阻害剤(Ruxolitinib, Tofacitinib citrate, Baricitinib, Lestaurtinib)によりIL-2レポーター活性の抑制が認められ(図8)、各種のレポーター細胞を用いることにより今後様々な薬剤の治療効果を類推できる可能性が示唆された。

<引用文献>

(1) Finckh A et al. Joint Bone Spine. 77(4),

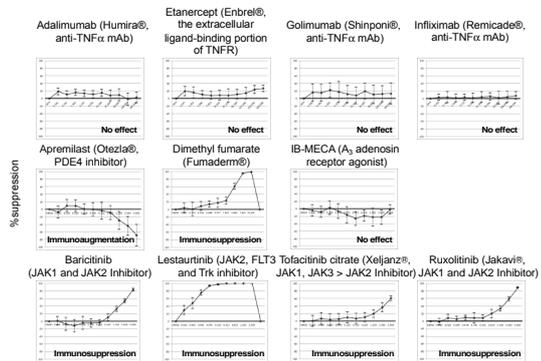


図8 種々の薬剤のIL-2レポーター活性への影響

313-8 (2010)

- (2) Takahashi et al. An In Vitro Test to Screen Skin Sensitizers Using a Stable THP-1-Derived IL-8 Reporter Cell Line, THP-G8. Toxicological Sciences 124(2), 359-369 (2011)
- (3) Kimura et al. Therapeutic drug monitoring of patients with psoriasis during tumour necrosis factor (TNF)-alpha antagonist treatment using a novel interleukin-8 reporter cell line. Br J Dermatol 175, 979-987 (2016)
- (4) Kimura et al. Evaluation of the Multi-ImmunoTox Assay composed of 3 human cytokine reporter cells by examining immunological effects of drugs. Toxicol In Vitro 28, 759-768 (2014)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)
Kimura, Y., Shimada-Omori, R., Takahashi, T., Tsuchiyama, K., Kusakari, Y., Yamasaki, K., Nishikawa, R., Nishigori, C., Aiba, S., 2016. Therapeutic drug monitoring of patients with psoriasis during tumour necrosis factor (TNF)-alpha antagonist treatment using a novel interleukin-8 reporter cell line. Br J Dermatol 175, 979-987.

6. 研究組織

- (1)研究代表者
 木村 裕 (KIMURA, Yutaka)
 東北大学・大学病院・助教
 研究者番号: 90375056
- (2)研究分担者
 相場 節也 (AIBA, Setsuya)
 東北大学・医学系研究科・教授
 研究者番号: 80159269