

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790139  
 研究課題名（和文） クロウン病治療薬インフリキシマブの薬効発現の変動因子を考慮した  
 投与設計法の構築  
 研究課題名（英文） Establishment of personalized administration method of infliximab  
 for Crohn' s disease  
 研究代表者  
 大関 健志 (OZEKI TAKESHI)  
 東京薬科大学・薬学部・講師  
 研究者番号：30334402

## 研究成果の概要：

インフリキシマブの薬効発現に影響をおよぼす *TNF $\alpha$*  遺伝子-857 C/T 多型の影響を解析し、この多型により約1.4倍の転写活性の差が引き起こされることが示唆された。そこで、この *TNF $\alpha$*  発現量の差をインフリキシマブの速度論モデルに外挿したところ、-857 T/T を有する個体ではより治療効果が低く推移することが示された。以上のことから、構築したモデルに-857 C/T 多型情報を加味することにより、クロウン病に対するインフリキシマブの最適な投与方法を構築できる可能性が示された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,800,000	0	2,800,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	150,000	3,450,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：オーダーメイド医療、遺伝子、免疫学、薬剤反応性、発現制御、薬物動態学

## 1. 研究開始当初の背景

クロウン病は、腹痛、下痢、体重減少、瘻孔などを主症状とし、消化管全ての部位において炎症が起こりうる肉芽腫性炎症性病変である。また、再燃と寛解を繰り返し、消化管以外にも転移性病変が起こることがある。未だその病態は不明な部分が多く、厚生労働省難病特定疾患に指定されている。

近年では、クロウン病の病態には免疫異常

が深く関係していると考えられている。炎症誘発性サイトカインのうち、*TNF $\alpha$*  はクロウン病における炎症誘発に重要な因子となっており、これを標的とする薬物が、抗ヒト *TNF $\alpha$*  モノクローナル抗体であるインフリキシマブ (IFX) である。

IFX は、クロウン病の治療に体重1 kg 当たり5 mg を1回あるいは3回 (初回、2週後、6週後) 点滴静注で用いられているが、このIFX の特殊な投与方法について理論的な解析

はなされておらず、IFX の効果発現への TNF  $\alpha$  の関与についても詳細な検討は行われていなかった。また期待された IFX の効果が十分に得られない患者も存在することから、TNF  $\alpha$  の変動因子を同定することは治療効果の予測に重要である。

以上の背景から、申請者らはこれまで、IFX のクローン病治療における薬効発現過程の理論的解析および IFX の治療効果の予測因子としての *TNF $\alpha$*  遺伝子の遺伝的多型の解析を行ってきた。前者においては、クローン病に対する IFX の効果発現過程に関するモデルを構築し、クローン病患者に対する適切な IFX 投与計画の構築に有用な方法論を構築できた。また後者においては、クローン病に対する IFX の効果の予測因子として遺伝的因子、環境的因子、バイオマーカー等様々な因子が研究されている。その中でも、IFX の治療効果に影響する遺伝的要因について多くの研究がされており、TNF  $\alpha$  遺伝子領域に関してもいくつかの遺伝的多型が報告されている。TNF  $\alpha$  遺伝子調節領域の遺伝的多型としては、代表的なものとして-249G>A、-319 G>A、-857 C>T、-874 C>A および -1042 T>C が報告されている。また、TNF  $\alpha$  および LTA 遺伝子領域付近のマイクロサテライトとしては TNF $\alpha$ 、b、c、d および e が報告されている。この中でも、特に TNF  $\alpha$  遺伝子 5' 上流領域の-319 塩基における遺伝子多型と IFX 治療効果との関連性について多く検討されてきたが、近年、この遺伝子多型と IFX による治療効果との間には関連性が乏しいということが報告されている。また、日本人においては、TNF  $\alpha$  遺伝子-319 塩基が A である変異型の頻度は非常にまれであり、-319 塩基の遺伝子多型が IFX の治療効果におよぼす影響はほとんどないと考えられる。一方マイクロサテライトに関しては、TNF $\alpha$  と連鎖不均衡の関係にある LTA NcoI および aa13L、さらにその aa13L と連鎖不均衡の関係にある aa26 のハプロタイプを 1-1-1-1 (LTA NcoI-TNF $\alpha$ -aa13L-aa26 の順で表記) のホモ接合体で有するクローン病患者は、IFX 治療効果が低いという報告がされている。この報告に対し、申請者らは、クローン病の病態およびその IFX による治療効果への TNF  $\alpha$  の関与は示唆されているものの、特定の LTA ハプロタイプによる IFX 治療効果の個人差発現には、同ハプロタイプと連鎖して存在する TNF  $\alpha$  の量的変動に直接的に関与している遺伝的要因の存在を考え、TNF  $\alpha$  遺伝子 5' 上流領域において LTA ハプロタイプ 1-1-1-1 とリンクする遺伝子多型を解析し、TNF  $\alpha$  の量的変化をもたらす可能性のある遺伝的多型 -857 C>T の存在を明らかにした。

これらの結果より、申請者は *TNF $\alpha$*  遺伝子多型 -857 C>T と TNF  $\alpha$  発現との関係を定量的に解析し、構築した IFX の効果発現過程に

関するモデルに組み込むことにより、クローン病に対する IFX の患者個別の薬物療法に適用可能な方法論を構築できると考え、当該研究を立案した。

## 2. 研究の目的

当該研究において、申請者は以下のことを明らかにしていくことを目的とした。

### (1) *TNF $\alpha$* 遺伝子 -857 C>T 多型の TNF $\alpha$ 遺伝子発現におよぼす影響の定量的解析

*TNF $\alpha$*  遺伝子 -857 C>T 多型により、*TNF $\alpha$*  遺伝子の経時的発現にどの程度の違いがみられるかを、定常状態もしくは TNF  $\alpha$  の誘導剤存在下において明らかにする。

### (2) *TNF $\alpha$* 遺伝子 -857 C>T 多型情報を組み入れた IFX の薬効発現過程に関するモデルの構築

*TNF $\alpha$*  遺伝子-857 C>T 多型を有する検体において、同多型により IFX の効果発現がどの程度変化するかを推定し、得られた結果より、TNF  $\alpha$  遺伝子-857 C>T 多型を加味した患者個別の IFX 薬物投与計画法を立案する。

## 3. 研究の方法

### (1) *TNF $\alpha$* 遺伝子 -857 C>T 多型の TNF $\alpha$ 遺伝子発現におよぼす影響の定量的解析

上記の遺伝的多型による TNF  $\alpha$  遺伝子発現におよぼす影響の解析のため、申請者は以下の実験を行った。

① *TNF $\alpha$*  遺伝子-857 C>T 多型を含む同遺伝子 5' 上流領域を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドを構築し、培養細胞 HL60 を用いたルシフェラーゼアッセイを行うことにより、各多型を有するレポータープラスミド間における同遺伝子の転写活性の経時的変化の違いを調べた。

### (2) *TNF $\alpha$* 遺伝子 -857 C>T 多型情報を組み入れた IFX の薬効発現過程に関するモデルの構築

上記モデルの構築にあたり、申請者は以下の検討を行った。

① *TNF $\alpha$*  遺伝子-857 C>T 多型を有する検体における TNF  $\alpha$  転写活性誘導データ (ルシフェラーゼアッセイにおける時間あたりの発現量相対変化) または TNF  $\alpha$  mRNA 発現量の時間変化を効果発現過程に関する PK/PD モデルに外挿し、同多型により IFX の効果発現がどの程度変化するかをシミュレートした。得られた結果より、TNF  $\alpha$  遺伝子-857 C>T 多型を加味した患者個別の IFX 薬物投与計画法を立案した。

#### 4. 研究成果

##### (1) *TNF $\alpha$* 遺伝子 -857 C>T 多型の *TNF $\alpha$* 遺伝子発現におよぼす影響の定量的解析

-857C/T 多型をそれぞれ有する *TNF $\alpha$*  遺伝子 5'-上流領域 (-899~+181) を PCR 法により単離し、ルシフェラーゼアッセイ用ベクター pGL4.12 に組み込んだプラスミドを構築し、MEG-01 細胞における *TNF $\alpha$*  遺伝子の転写活性の経時変化を検討した。

-857C または T を有する *TNF $\alpha$*  遺伝子の転写活性を比較したところ、concanavalin A (Con A) 未処理群、処理群ともに、-857 T を有する検体において高い転写活性が認められた。また、各検体における転写活性の積算値を算出したところ、-857 C に比べて -857 T ではそれぞれ約 1.4 倍 (Con A 未処理) または約 1.4 倍 (Con A 処理) 高い値を示した (Fig. 1)。

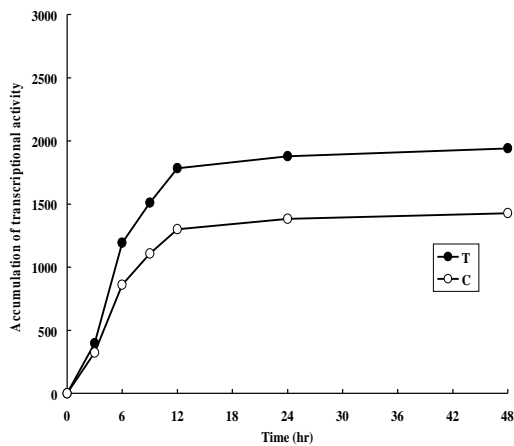


Fig. 1. Accumulation of transcriptional activity of 5'-flanking region of the *TNF $\alpha$*  gene containing -857C / T polymorphism.

これらの結果から、細胞モデルにおいては、-857 C>T 多型により上述の転写活性の差が引き起こされることが示唆された。認められた差をインフリキシマブの薬効発現モデルに変動パラメータとして組み込むことで、同多型を考慮したクローン病治療における投与设计が可能となることが期待される。

##### (2) *TNF $\alpha$* 遺伝子 -857 C>T 多型情報を組み入れた IFX の薬効発現過程に関するモデルの構築

-857 C/T 多型をそれぞれ有する *TNF $\alpha$*  遺伝子 5'-上流領域を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドを用い、MEG-01 細胞における *TNF $\alpha$*  遺伝子の転写活性の経時変化を検討した。48 hr 後における -857T の累積転写活性は、約 1.33 倍 -857C よりも高かった。そこで、多型間での *TNF $\alpha$*  発現量の差を 1.33

倍として、IFX の速度論モデルに外挿したところ、クローン病患者に対する IFX 投与のシミュレーションカーブから、-857 T/T を有する個体では -857 C/C を有する個体よりも治療効果が低く推移することが示された。よって、-857 T/T を有する個体が -857 C/C を有する個体と同等の治療効果を得るためには、投与量を調節する必要があることが示唆された (Fig. 2)。

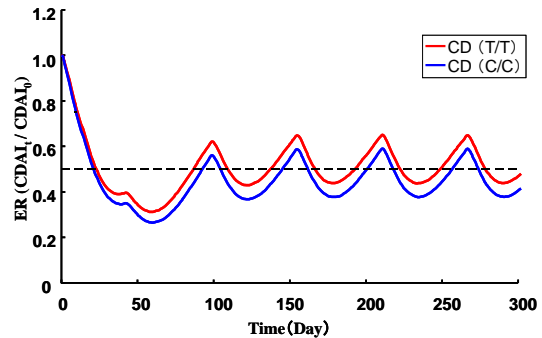


Fig. 2. Simulation of the effect of IFX for Crohn's disease (CD) by -857C / T polymorphism. Dashed line, upper limit of CDAI ratio corresponding to positive clinical response.

そこで、-857 T/T を有する個体における IFX の投与量を変化させたときのフィッティングラインを -857 C/C シミュレーションカーブと比較すると、投与量を約 1.4 倍に増量したとき、両者はよく一致した。以上のことから、構築したモデルに *TNF $\alpha$*  遺伝子 -857 C/T 多型情報を加味することにより、クローン病における IFX の最適な投与法を構築できる可能性が示された。

#### 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)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 木村耕二、大関健志、高柳理早、横山晴子、山田安彦、インフリキシマブの薬効発現に関する変動因子を考慮した投与計画の検討、日本薬学会第 129 年会、2009. 3. 26、京都
- ② 木村耕二、大関健志、古屋陽子、高柳理早、横山晴子、山田安彦、クローン病および関節リウマチに対するインフリキシマブの効果発現に関するモデル解析、医療薬学フォーラム 2008、2008. 7. 12、東京
- ③ 大関健志、桃井宏樹、横山晴子、高柳理早、山田安彦、クローン病治療薬インフリキシマブの薬効における個人差発現におよぼす *TNF- $\alpha$*  遺伝子多型の影響、第

17 回日本医療薬学会、2007. 9. 29、群馬

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大関 健志 (OZEKI TAKESHI)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：30334402

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：