

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6347477号
(P6347477)

(45) 発行日 平成30年6月27日(2018.6.27)

(24) 登録日 平成30年6月8日(2018.6.8)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/68	(2018.01)	C 1 2 Q 1/68 A
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K	16/28	(2006.01)	C O 7 K 16/28
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N 33/53 M
			G O 1 N 33/53 D

請求項の数 7 (全 30 頁)

(21) 出願番号 特願2013-270961 (P2013-270961)
 (22) 出願日 平成25年12月27日(2013.12.27)
 (65) 公開番号 特開2015-123031 (P2015-123031A)
 (43) 公開日 平成27年7月6日(2015.7.6)
 審査請求日 平成28年12月26日(2016.12.26)

(73) 特許権者 304021831
 国立大学法人千葉大学
 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号
 (73) 特許権者 596175810
 公益財団法人かずさDNA研究所
 千葉県木更津市かずさ鎌足2-6-7
 (73) 特許権者 501002172
 株式会社DNAチップ研究所
 東京都港区海岸一丁目15番地1号 スズ
 エベイディウム5階
 (74) 代理人 100088904
 弁理士 庄司 隆
 (74) 代理人 100124453
 弁理士 資延 由利子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 関節リウマチ患者に対する抗IL-6受容体抗体治療の有効性予測方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

関節リウマチに対する抗IL-6受容体抗体による治療の有効性を予測するための方法であって、(1) 関節リウマチ患者から単離された末梢血単核球試料において、以下の薬効マーカー遺伝子からなる群(A)~(E)から選択される少なくとも1つの群に記載の遺伝子の発現レベルを測定すること、並びに(2) 前記(1)において測定した遺伝子の発現レベルと、関節リウマチに対する抗ヒトIL-6受容体抗体による治療の有効性とを相関付けることを含む、方法。

(A) MT1G

(B) MT1G + MX2

(C) IF16 + MT1G + MX2

(D) MT1G + MX2 + OASL

(E) IF16 + MT1G + MX2 + OASL

【請求項2】

前記(2)における、測定した遺伝子の発現レベルと関節リウマチに対する抗ヒトIL-6受容体抗体による治療の有効性とを相関付けることが、測定した遺伝子の発現レベルと該遺伝子の発現レベルのカットオフ値との比較により行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記抗 I L - 6 受容体抗体がトシリズマブである、請求項 1 または請求項 2 に記載の関節リウマチに対する抗 I L - 6 受容体抗体による治療の有効性を予測するための方法。

【請求項 4】

以下の薬効マーカー遺伝子からなる群 (A) ~ (E) から選択される少なくとも 1 つの群に記載の遺伝子の転写産物またはその相補的核酸を特異的に検出し得る核酸プローブ若しくは核酸プライマー、または、当該薬効マーカー遺伝子からなる群から選択される少なくとも 1 組又は 1 つの遺伝子の翻訳産物に特異的に結合する抗体を含む、関節リウマチに対する抗 I L - 6 受容体抗体による治療の有効性を予測するための診断薬。

(A) M T 1 G

(B) M T 1 G + M X 2

(C) I F 1 6 + M T 1 G + M X 2

(D) M T 1 G + M X 2 + O A S L

(E) I F 1 6 + M T 1 G + M X 2 + O A S L

10

【請求項 5】

前記抗 I L - 6 受容体抗体がトシリズマブである、請求項 4 に記載の診断薬。

【請求項 6】

請求項 4 または請求項 5 に記載の診断薬に加え、前記核酸プローブ若しくは核酸プライマー、または前記抗体を検出するための試薬をさらに含む、関節リウマチに対する抗 I L - 6 受容体抗体による治療の有効性を予測するための診断用試薬キット。

20

【請求項 7】

下記プライマーセットから選択される少なくとも 1 のプライマーセットを含む、関節リウマチに対する抗 I L - 6 受容体抗体による治療の有効性を予測するための診断用試薬キット：

(i) 配列番号 3 1 に記載のヌクレオチド配列で表される核酸および配列番号 3 2 に記載のヌクレオチド配列で表される核酸からなるプライマーセット、

(i i) 配列番号 2 5 に記載のヌクレオチド配列で表される核酸および配列番号 2 6 に記載のヌクレオチド配列で表される核酸からなるプライマーセット、

(i i i) 配列番号 3 7 に記載のヌクレオチド配列で表される核酸および配列番号 3 8 に記載のヌクレオチド配列で表される核酸からなるプライマーセット、並びに

(i v) 配列番号 3 9 に記載のヌクレオチド配列で表される核酸および配列番号 4 0 に記載のヌクレオチド配列で表される核酸からなるプライマーセット。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、関節リウマチ患者に対する抗 I L - 6 受容体抗体治療の有効性予測方法に関する。詳しくは本発明は、4 つの遺伝子からなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子の発現レベルを測定すること、並びに当該測定した遺伝子の発現レベルと、関節リウマチに対する抗ヒト I L - 6 受容体抗体による治療の有効性とを相関付けることを含む、関節リウマチ患者に対する抗 I L - 6 受容体抗体治療の有効性予測方法に関する。

【背景技術】

【0002】

関節リウマチ (以下、R A と略称することがある) は全身性の慢性炎症性疾患であり、関節の腫脹、関節の疼痛、滑膜関節の破壊を特徴とし、障害や早期死亡をもたらす (非特許文献 1、2)。R A 患者数は日本全国で約 70 万人と推定され、さらに毎年 1.5 万人

40

50

が新規に発病している。

【0003】

RAの病因には、T細胞、B細胞、樹状細胞、およびマクロファージなどの免疫細胞やこれら細胞から産生される腫瘍壊死因子 - (TNF -) およびインターロイキン - 6 (IL - 6) などの炎症性サイトカインが本質的役割を果たしていることが、それらの証拠の蓄積により証明されてきた(非特許文献3 - 5)。

【0004】

近年、これら炎症性サイトカインや細胞間相互作用を標的に多くの生物学的製剤が開発され、その使用により、RAの臨床的、構造的、および機能的な転帰が実質的に改善されている(非特許文献2、4、6)。さらに、RAにおける非可逆的な関節破壊は従来予測されていたより早期から始まることが明らかになり、既存の疾患修飾抗リウマチ薬(Disease Modifying Anti Rheumatic Drugs: DMARDs)より高い関節破壊抑制作用を示す生物学的製剤を早期から積極的に使用することが推奨されている。しかしながら、RAの病因を成す分子・細胞メカニズムが不均一であることを反映して、生物学的製剤治療は全ての患者に普遍的に有効なものではない(非特許文献4、5)。

10

【0005】

生物学的製剤は、一方で、薬剤費が高く、無効例も一定の割合で存在し、肺炎や結核などの感染症などの重篤な副作用も比較的高頻度に認められる(非特許文献7)。したがって、この様なリスクを考慮すると、生物学的製剤は、該製剤の有効性を見込める患者に限定して適用すべきであろう。各生物学的製剤の有効性を予測するバイオマーカーの確立とそれを利用したテーラーメイド医療の達成が、非可逆的な関節破壊を最小限にするとともに、無駄な薬剤の使用を抑え、医療経済にも大きく寄与すると期待される。

20

【0006】

これまでに、生物学的製剤の効果予測法の開発を目的として、患者背景、臨床所見、血清所見、あるいは遺伝子多型解析を用いた研究が多数行われてきたが、いずれも一致した結果が得られず、実用化されていない。例えば、腫瘍壊死因子(TNF)アンタゴニスト治療に対する反応性に関して臨床情報および検査情報の予測値を評価した研究では、一貫性のある結果も臨床応用が可能な方法も得ることはできなかった。また、TNFアンタゴニスト治療に対する反応性を予測するマーカーとして、いくつかの遺伝的素因が見込みがあると認められた。しかし、最も有望な候補と考えられていた2つの遺伝子マーカーであるTNF - 308多型(非特許文献8)または共有エピトープモチーフ(非特許文献9)は、TNFアンタゴニスト治療に対する反応性との間に何ら関連がないことが、メタ解析および大規模レジストリーからのデータにより示された。これら従来の研究結果は、生物学的製剤治療に対する治療応答を臨床情報および遺伝子マーカーにより正確に予測できないことを示唆する。

30

【0007】

近年、DNAマイクロアレイ解析により末梢血全血の網羅的遺伝子発現を解析することにより効果予測バイオマーカーを同定する手法が注目されている。DNAマイクロアレイ解析では、標的の細胞や組織における複数遺伝子のmRNA発現の評価が可能である。従前の研究では、マイクロアレイ技術を使用して同定された一組の遺伝子のmRNA発現解析により、RAにおけるインフリキシマブ(非特許文献10 - 13、特許文献1)またはリツキシマブ(非特許文献14)に対する治療反応性を予測したことが示されている。抗ヒトTNF - モノクローナル抗体製剤であるインフリキシマブについては、その投与14週後の治療の効果を、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を用いて予測する診断支援サービスが自由診療として開始されている。このように、DNAマイクロアレイは、ある抗リウマチ治療に対するRA患者の臨床応答を予測するバイオマーカーとなる遺伝子を同定するために見込みのある手段である。

40

【0008】

RA治療に生物学的製剤として使用されているトシリズマブ(TCZ)は、ヒト化抗イ

50

ンターロイキン - 6 受容体 (I L - 6 R) モノクローナル抗体であり、 I L - 6 の I L - 6 R への結合を遮断することにより I L - 6 シグナル伝達を阻害する。 T C Z 治療に対する R A 患者の全体的な奏効率が高い (非特許文献 7、 15 - 16) が、関節腫脹などの臨床的兆候の改善効果の発現は、 T N F アンタゴニストで治療した患者と比較するとより遅い。また、 T C Z は、発熱を抑制したり、 C - 反応性タンパク質 (C R P) などの炎症マーカーの発現を強く抑制するため、肺炎などの重篤な感染症に罹患しても、それに伴う生体変化をマスクしてしまい、感染症の発見が遅れ、重篤化する場合がある。したがって、 T C Z で治療した患者で有効性がないことを確認するには何ヶ月もかかり、損傷の進行や副作用に関する不必要なリスク、および不要な費用が患者に生じる可能性がある。このように、 T C Z 治療に対する反応性を予測することは R A 患者にとって特に有益であり、そのような方法の開発が期待されている。

10

【 0 0 0 9 】

抗 I L - 6 受容体阻害抗体である T C Z の治療効果を予測するのに有用なバイオマーカーとして、 196 のマーカー遺伝子を抽出したことが報告されている (特許文献 2)。また、抗ヒト I L - 6 受容体阻害抗体による治療の有効性を予測するための方法であって、対象関節リウマチ患者から単離された末梢血単核球における、 87 の薬効マーカー遺伝子群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子の発現レベルを測定することを含む方法が報告されている (特許文献 3)。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

20

【 0 0 1 0 】

【 特許文献 1 】 特開 2011 - 04743 号公報

【 特許文献 2 】 特開 2009 - 92508 号公報

【 特許文献 3 】 特開 2013 - 21932 号公報

【 0 0 1 1 】

【 非特許文献 1 】 Pincus T, Callahan LF, Sale WG, Brooks AL, Payne LE, Vaughn WK. Severe functional declines, work disability, and increased mortality in seventy-five rheumatoid arthritis patients studied over nine years. *Arthritis Rheum* 1984;27:864-72.

【 非特許文献 2 】 Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2010;376:1094-108.

30

【 非特許文献 3 】 Feldmann M, Maini SR. Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics. *Immunol Rev* 2008;223:7-19.

【 非特許文献 4 】 Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet* 2007;370:1861-74.

【 非特許文献 5 】 McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011;365:2205-19.

【 非特許文献 6 】 Ikeda K, Cox S, Emery P. Aspects of early arthritis. Biological therapy in early arthritis-overtreatment or the way to go? *Arthritis Res Ther* 2007;9:211.

40

【 非特許文献 7 】 Nishimoto N, Hashimoto J, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, et al. Study of active controlled monotherapy used for rheumatoid arthritis, an IL-6 inhibitor (SAMURAI): evidence of clinical and radiographic benefit from an x ray reader-blinded randomised controlled trial of tocilizumab. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1162-7.

【 非特許文献 8 】 Pavy S, Toonen EJ, Miceli-Richard C, Barrera P, van Riel PL, Criswell LA, et al. Tumour necrosis factor alpha -308G->A polymorphism is not associated with response to TNFalpha blockers in Caucasian patients with rheumatoid arthritis: systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1022-8.

【 非特許文献 9 】 Potter C, Hyrich KL, Tracey A, Lunt M, Plant D, Symmons DP, et a

50

l. Association of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide positivity, but not carriage of shared epitope or PTPN22 susceptibility variants, with anti-tumour necrosis factor response in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;68:69-74.

【非特許文献 1 0】Lequerre T, Gauthier-Jauneau AC, Bansard C, Derambure C, Hiron M, Vittecoq O, et al. Gene profiling in white blood cells predicts infliximab responsiveness in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R105.

【非特許文献 1 1】Sekiguchi N, Kawauchi S, Furuya T, Inaba N, Matsuda K, Ando S, et al. Messenger ribonucleic acid expression profile in peripheral blood cells from RA patients following treatment with an anti-TNF-alpha monoclonal antibody, infliximab. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:780-8. 10

【非特許文献 1 2】Tanino M, Matoba R, Nakamura S, Kameda H, Amano K, Okayama T, et al. Prediction of efficacy of anti-TNF biologic agent, infliximab, for rheumatoid arthritis patients using a comprehensive transcriptome analysis of white blood cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;387:261-5.

【非特許文献 1 3】Lindberg J, Wijbrandts CA, van Baarsen LG, Nader G, Klareskog L, Catrina A, et al. The gene expression profile in the synovium as a predictor of the clinical response to infliximab treatment in rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2010;5:e11310.

【非特許文献 1 4】Raterman HG, Vosslander S, de Ridder S, Nurmohamed MT, Lems WF, Boers M, et al. The interferon type I signature towards prediction of non-response to rituximab in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 2012;14:R95. 20

【非特許文献 1 5】Genovese MC, McKay JD, Nasonov EL, Mysler EF, da Silva NA, Alecock E, et al. Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab reduces disease activity in rheumatoid arthritis with inadequate response to disease-modifying antirheumatic drugs: the tocilizumab in combination with traditional disease-modifying antirheumatic drug therapy study. *Arthritis Rheum* 2008;58:2968-80.

【非特許文献 1 6】Gabay C, Emery P, van Vollenhoven R, Dikranian A, Alten R, Pavelka K, et al. Tocilizumab monotherapy versus adalimumab monotherapy for treatment of rheumatoid arthritis (ADACTA): a randomised, double-blind, controlled phase 4 trial. *Lancet* 2013;381:1541-50. 30

【非特許文献 1 7】Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24.

【非特許文献 1 8】Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010;62:2569-81.

【非特許文献 1 9】Aletaha D, Smolen J. The Simplified Disease Activity Index (SDAI) and the Clinical Disease Activity Index (CDAI): a review of their usefulness and validity in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2005;23:S100-8. 40

【非特許文献 2 0】Karin M, Richards RI. Human metallothionein genes--primary structure of the metallothionein-II gene and a related processed gene. *Nature* 1982;299:797-802.

【非特許文献 2 1】Richards RI, Heguy A, Karin M. Structural and functional analysis of the human metallothionein-IA gene: differential induction by metal ions and glucocorticoids. *Cell* 1984;37:263-72.

【非特許文献 2 2】Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:627-47. 50

【非特許文献 2 3】Schroeder JJ, Cousins RJ. Interleukin 6 regulates metallothionein gene expression and zinc metabolism in hepatocyte monolayer cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:3137-41.

【非特許文献 2 4】Lee DK, Carrasco J, Hidalgo J, Andrews GK. Identification of a signal transducer and activator of transcription (STAT) binding site in the mouse metallothionein-I promoter involved in interleukin-6-induced gene expression. *Biochem J* 1999;337 (Pt 1):59-65.

【非特許文献 2 5】Abdel-Mageed AB, Agrawal KC. Activation of nuclear factor kappaB: potential role in metallothionein-mediated mitogenic response. *Cancer Res* 1998;58:2335-8.

10

【非特許文献 2 6】Sakurai A, Hara S, Okano N, Kondo Y, Inoue J, Imura N. Regulatory role of metallothionein in NF-kappaB activation. *FEBS Lett* 1999;455:55-8.

【非特許文献 2 7】Mocchegiani E, Costarelli L, Giacconi R, Cipriano C, Muti E, Tessei S, et al. Nutrient-gene interaction in ageing and successful ageing. A single nutrient (zinc) and some target genes related to inflammatory/immune response. *Mech Ageing Dev* 2006;127:517-25.

【非特許文献 2 8】Kayaalti Z, Sahiner L, Durakoglugil ME, Soylemezoglu T. Distributions of interleukin-6 (IL-6) promoter and metallothionein 2A (MT2A) core promoter region gene polymorphisms and their associations with aging in Turkish population. *Arch Gerontol Geriatr* 2011;53:354-8.

20

【非特許文献 2 9】Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2005;23:307-36.

【非特許文献 3 0】van der Pouw Kraan TC, Wijbrandts CA, van Baarsen LG, Voskuyl AE, Rustenburg F, Baggen JM, et al. Rheumatoid arthritis subtypes identified by genomic profiling of peripheral blood cells: assignment of a type I interferon signature in a subpopulation of patients. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1008-14.

【非特許文献 3 1】Mavragani CP, La DT, Stohl W, Crow MK. Association of the response to tumor necrosis factor antagonists with plasma type I interferon activity and interferon-beta/alpha ratios in rheumatoid arthritis patients: a post hoc analysis of a predominantly Hispanic cohort. *Arthritis Rheum* 2010;62:392-401.

30

【非特許文献 3 2】Thurlings RM, Boumans M, Tekstra J, van Roon JA, Vos K, van Westing DM, et al. Relationship between the type I interferon signature and the response to rituximab in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2010;62:3607-14.

【非特許文献 3 3】Higgs BW, Liu Z, White B, Zhu W, White WI, Morehouse C, et al. Patients with systemic lupus erythematosus, myositis, rheumatoid arthritis and scleroderma share activation of a common type I interferon pathway. *Ann Rheum Dis* 2011;70:2029-36.

【非特許文献 3 4】O'Hanlon TP, Rider LG, Gan L, Fannin R, Paules RS, Umbach DM, et al. Gene expression profiles from discordant monozygotic twins suggest that molecular pathways are shared among multiple systemic autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R69.

40

【非特許文献 3 5】Vosslamber S, Raterman HG, van der Pouw Kraan TC, Schreurs MW, von Blomberg BM, Nurmohamed MT, et al. Pharmacological induction of interferon type I activity following treatment with rituximab determines clinical response in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2011;70:1153-9.

【非特許文献 3 6】van Baarsen LG, Wijbrandts CA, Rustenburg F, Cantaert T, van der Pouw Kraan TC, Baeten DL, et al. Regulation of IFN response gene activity during infliximab treatment in rheumatoid arthritis is associated with clinical res

50

ponse to treatment. Arthritis Res Ther 2010;12:R11.

【非特許文献 3 7】Hogan VE, Holweg CT, Choy DF, Kummerfeld SK, Hackney JA, Teng YK, et al. Pretreatment synovial transcriptional profile is associated with early and late clinical response in rheumatoid arthritis patients treated with rituximab. Ann Rheum Dis 2012;71:1888-94.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

従前、RA患者におけるインフリキシマブまたはリツキシマブへの臨床応答を予測するために、マーカーとなる遺伝子の抽出を、末梢血全血を試料としてDNAマイクロアレイ解析により実施したことが報告されている（非特許文献10-14、特許文献1）。しかしながら、自己免疫疾患である関節リウマチのバイオマーカー検索では、リンパ球および単球系細胞、例えば単球やマクロファージなどにおける遺伝子発現が重要であり、全血中に存在する顆粒球が遺伝子発現解析の妨げとなっている可能性がある。

10

【0013】

また、抗IL-6受容体阻害抗体であるTCZの治療効果を予測するのに有用なバイオマーカーとして196遺伝子が報告されている（特許文献2）。これら遺伝子の抽出の指標として用いた治療効果判定基準には、血液中の炎症反応に対する治療効果が含まれている。一方、TCZ投与患者では治療効果の有無に関わらず高率に炎症反応が著明に低下するため、これら196遺伝子の中には、TCZの治療効果を予測するバイオマーカーとして有用でない遺伝子が含まれている可能性がある。

20

【0014】

さらに、抗ヒトIL-6受容体阻害抗体による治療の有効性を予測するための方法であって、RA患者から単離された末梢血単核球における、87の遺伝子群から選択される少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを測定することを含む方法が報告されている（特許文献3）。しかし、これら遺伝子と比較してマーカーとしてより好ましい遺伝子を見出すことにより、より高い感度で抗IL-6受容体抗体治療の有効性を予測することができる。

【0015】

本発明の課題は、従来報告されている方法より高い感度で、RA患者における抗IL-6受容体抗体治療の有効性を、該治療を開始する前に予測するためのバイオマーカーを提供し、該バイオマーカーを使用して、RA患者における抗IL-6受容体抗体治療の有効性を予測する方法を提供することにある。

30

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意検討を行う中で、RA患者の末梢血単核球の遺伝子発現をDNAマイクロアレイ解析により測定し、TCZ治療に対する反応例（responder）と無反応例（non-responder）との間で遺伝子発現に著しい差異のある4遺伝子を見出した。さらに、これら4遺伝子について、TCZ治療に対する臨床反応の予測を受信者動作特性（ROC）解析により行い、これら遺伝子を用いることによりTCZ治療に対する中等度から良好な反応を予測できることを見出し、本発明を完成した。ここで、反応例とはTCZ治療により有効以上の効果を示した症例であり、無反応例とはTCZ治療により無効または増悪した症例を意味する。

40

【0017】

すなわち、本発明は、関節リウマチに対する抗IL-6受容体抗体による治療の有効性を予測するための方法であって、（1）関節リウマチ患者から単離された末梢血単核球試料において、MT1G、IFI6、MX2、およびOASLの薬効マーカー遺伝子からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを測定すること、並びに（2）前記（1）において測定した遺伝子の発現レベルと、関節リウマチに対する抗ヒトIL-6受容体抗体による治療の有効性とを相関付けることを含む、方法に関する。

【0018】

50

また本発明は、前記(2)における、測定した遺伝子の発現レベルと関節リウマチに対する抗ヒトIL-6受容体抗体による治療の有効性とを相関付けることが、測定した遺伝子の発現レベルと該遺伝子の発現レベルのカットオフ値との比較により行われる、前記方法に関する。

【0019】

さらに本発明は、前記抗IL-6受容体抗体がトシリズマブである、前記いずれかの方法に関する。

【0020】

さらにまた本発明は、MT1G、IFI6、MX2、およびOASLの薬効マーカー遺伝子からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子の転写産物またはその相補的核酸を特異的に検出し得る核酸プローブ若しくは核酸プライマー、または、当該薬効マーカー遺伝子からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子の翻訳産物に特異的に結合する抗体を含む、関節リウマチに対する抗IL-6受容体抗体による治療の有効性を予測するための診断薬に関する。

【0021】

また本発明は、前記抗IL-6受容体抗体がトシリズマブである、前記診断薬に関する。

【0022】

さらに本発明は、前記いずれかの診断薬に加え、前記核酸プローブ若しくは核酸プライマー、または前記抗体を検出するための試薬をさらに含む、関節リウマチに対する抗IL-6受容体抗体による治療の有効性を予測するための診断用試薬キットに関する。

【0023】

さらにまた本発明は、下記プライマーセットから選択される少なくとも1のプライマーセットを含む、関節リウマチに対する抗IL-6受容体抗体による治療の有効性を予測するための診断用試薬キットに関する：

(i) 配列番号31に記載のヌクレオチド配列で表される核酸および配列番号32に記載のヌクレオチド配列で表される核酸からなるプライマーセット、

(ii) 配列番号25に記載のヌクレオチド配列で表される核酸および配列番号26に記載のヌクレオチド配列で表される核酸からなるプライマーセット、

(iii) 配列番号37に記載のヌクレオチド配列で表される核酸および配列番号38に記載のヌクレオチド配列で表される核酸からなるプライマーセット、並びに

(iv) 配列番号39に記載のヌクレオチド配列で表される核酸および配列番号40に記載のヌクレオチド配列で表される核酸からなるプライマーセット。

【発明の効果】

【0024】

本発明に係る方法を用いれば、従来報告されている方法より高い感度で、RA患者における抗IL-6受容体抗体治療の有効性を予測することができ、そのため、該治療の有効性を予め確認した上で該治療を実施することができる。その結果、例えば、当該治療の有効性が見込める患者に対して該治療を適用し、有効性が見込めない患者に対しては治療方針を変更するなど、治療方針の選択判断が可能になる。したがって、本発明に係る方法は、抗IL-6受容体抗体治療の有効性が見込めない患者にとって、該治療を受けることによる損傷の進行や副作用に関する不必要なリスクを避けることができると共に、不要な費用の発生を防止することができる。さらに、無駄な薬剤の使用を抑え、医療経済にも大きく寄与すると期待される。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】DNAマイクロアレイ解析における個々のRA患者のシグナル強度パターン、およびTCZに対する無反応例と反応例の比較により同定されたDNAマイクロアレイプローブを説明する図である。トレーニングコホートの患者37症例における409プローブの正規化シグナル強度(Normalized signal intensity)を

10

20

30

40

50

ヒートマップに示した。また、個々のRA患者およびDNAマイクロアレイプロブについて、シグナル強度パターンを階層的クラスター化して示す。図中、Rは反応例を、Nは無反応例を示す。(実施例1)

【図2】バリデーションコホート中の個々のRA患者および候補遺伝子について、相対的発現パターンをクラスター化して示した図である。バリデーションコホート中の20症例における15遺伝子の相対的発現(Relative expression)をヒートマップに示した。また、個々のRA患者および候補遺伝子について、相対的発現パターンを階層的クラスター化して示す。図中、Rは反応例を、Nは無反応例を示す。(実施例1)

【図3】DNAマイクロアレイのシグナル強度を健常人、無反応例、および反応例の間で比較した結果、並びにベースライン時(Baseline)の該強度と3ヶ月間(3 months)のTCZ治療後の該強度を比較した結果を説明する図である。健常人(HC)およびRA患者におけるDNAマイクロアレイシグナル強度(平均±標準偏差)を、4つの遺伝子、すなわちIFI6、MT1G、MX2、およびOASLについて示す。縦軸は正規化シグナル強度(Normalized signal intensity)を示す。無反応例は「N」、反応例は「R」と表示する。白カラムおよび黒カラムはそれぞれベースライン時および3ヶ月間のTCZ治療後の標本を表す。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ 、 $***P < 0.001$ は、二標本t検定または対応のあるt検定において有意差があることを示す。NSは有意差がないことを示す。(実施例1)

【発明を実施するための形態】

【0026】

本発明は、関節リウマチに対する抗IL-6受容体抗体による治療の有効性を予測するための方法に関する。本発明に係る方法は、(1)関節リウマチ患者から単離された末梢血単核球試料において、後述する4つの薬効マーカー遺伝子からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを測定すること、並びに(2)前記(1)において測定した遺伝子の発現レベルと、関節リウマチに対する抗ヒトIL-6受容体抗体による治療の有効性とを相関付けることを含む。

【0027】

抗IL-6受容体抗体は、好ましくは抗IL-6受容体阻害抗体である。抗IL-6受容体阻害抗体とは、IL-6受容体の細胞外ドメインに特異的に結合し、IL-6の当該受容体への結合を阻止することにより、IL-6刺激による当該受容体を介した生体反応を阻害する抗体をいう。

【0028】

本明細書において、抗体の抗原への「特異的な結合」とは、抗原抗体反応における、抗体の抗原に対する親和性が、抗原以外の抗原に対する親和性よりも強いことを意味する。

【0029】

抗IL-6受容体阻害抗体は、より好ましくは抗ヒトIL-6受容体阻害抗体である。抗ヒトIL-6受容体阻害抗体とは、ヒトIL-6受容体の細胞外ドメインに特異的に結合し、IL-6の当該受容体への結合を阻止することにより、IL-6刺激による当該受容体を介した生体反応を阻害する抗体をいう。

【0030】

ヒトIL-6受容体は公知の受容体であり、そのアミノ酸配列も公知である。ヒトIL-6受容体の代表的なアミノ酸配列はGenBankアクセッション番号にNP_000556.1として登録されている。ヒトIL-6は公知のサイトカインであり、そのアミノ酸配列も公知である。ヒトIL-6の代表的なアミノ酸配列はGenBankアクセッション番号にNP_000591.1として登録されている。

【0031】

本明細書において、抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体などの天然型抗体、および遺伝子組換え技術を用いて製造され得るキメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体や一本鎖抗体などが含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、抗体はモノクローナ

10

20

30

40

50

ル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である。抗体のクラスは、特に限定されず、I g G、I g M、I g A、I g D、またはI g Eなどのいずれのアイソタイプの抗体をも包含する。

【0032】

抗IL-6受容体抗体は、最も好ましくはトシリズマブである。トシリズマブは、マウスで作成された抗ヒトIL-6受容体モノクローナル抗体をもとに、遺伝子組換え技術により産生されたヒト化モノクローナル抗体である。

【0033】

本発明に係る方法の適用対象となるRA患者は、ヒトRA患者である。RAの診断は、1987年米国リウマチ学会(ACR)分類基準(非特許文献17)、および2010年ACR/欧州リウマチ学会(EULAR)分類基準(非特許文献18)に基づき実施することができる。本発明に係る方法は、ACR/EULAR分類基準を満たし、且つ臨床疾患活動性指標(CDAI、非特許文献19)が10以上であるRA患者に好ましく適用することができる。

10

【0034】

RAに対する抗IL-6受容体抗体による治療の有効性とは、当該治療によるRAの寛解の程度または有無をいう。RAの寛解の程度または有無は、骨の変形や破壊、関節の腫脹、疼痛、こわばりなどの症状の改善の程度を、EULAR改善基準および/またはCDAI、好ましくはCDAI、に基づき評価することにより判断することができる。好ましくは、治療の有効性は、抗IL-6受容体抗体による治療の開始から、遅くとも6ヶ月以内にRAが部分的または完全に寛解するか否かで判断される。なお、関節の腫脹、疼痛、こわばりなどの症状の改善を伴わず、C-反応性タンパク質(CRP)などの炎症性マーカーの低下のみが認められる症例は、RAの寛解例や改善例には含まない。

20

【0035】

本明細書において、抗IL-6受容体抗体治療により有効以上の効果を示した症例を反応例と称し、抗IL-6受容体抗体治療により無効または増悪した症例を無反応例と称することができる。

【0036】

本発明に係る方法においては、RA患者から単離された末梢血単核球における、4つの薬効マーカー遺伝子からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを測定する。これらの遺伝子のうちの複数、例えば2以上、好ましくは3以上、より好ましくは4遺伝子の発現レベルを測定し、抗IL-6受容体抗体による治療の有効性と相関付けることにより、より高い精度で、抗IL-6受容体抗体による治療の有効性を予測することが期待できる。

30

【0037】

本明細書において、「薬効マーカー遺伝子」とは、患者から単離された細胞などの試料中に検出される遺伝子であって、その発現や消失、および発現の変化などにより、該患者に投与した薬剤の効果を判定することのできる指標となる遺伝子を意味する。

【0038】

本発明に係る方法で使用される薬効マーカー遺伝子は、MT1G、IFI6、MX2、およびOASLの4遺伝子である。

40

【0039】

MT1Gは、メタロチオネイン(MTs)のアイソタイプの1つであるメタロチオネイン-1のサブタイプであるメタロチオネイン-1Gをコードする遺伝子である。MTsは、金属結合ドメインを有し、それにより毒性金属解毒および酸化ストレスに対する防御を含むさまざまな役割に参与している(非特許文献20-22)。MTsの遺伝子発現はIL-6などの炎症性サイトカインにより上方制御され(非特許文献22-24)、そしてMTsはその詳細なメカニズムは不明ではあるが免疫反応および炎症反応に参与することが報告されている(非特許文献22、25-28)。MT1Gの代表的なヌクレオチド配列はGenBankアクセッション番号BC020757.1として登録されている。

50

MT1G cDNAの代表的なヌクレオチド配列および該ヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列をそれぞれ配列表の配列番号1および2に記載する。

【0040】

IFI6は、インターフェロン - 誘導性タンパク質6をコードする遺伝子である。IFI6の代表的なヌクレオチド配列はGenBankアクセッション番号BC011601.2およびBC015603.2として登録されている。これらアクセッション番号で登録されているIFI6 cDNAの代表的なヌクレオチド配列を配列表の配列番号3および5に記載する。また、これらヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列をそれぞれ配列番号4および6に記載する。

【0041】

MX2は、ミクソウイルス耐性2をコードする遺伝子である。MX2の代表的なヌクレオチド配列はGenBankアクセッション番号BC035293.1として登録されている。MX2 cDNAの代表的なヌクレオチド配列および該ヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列をそれぞれ配列表の配列番号7および8に記載する。

【0042】

OASLは2'-5'-オリゴアデニレートシテターゼ様遺伝子である。OASLの代表的なヌクレオチド配列はGenBankアクセッション番号BC117408.1およびBC117410.1として登録されている。これらアクセッション番号で登録されているヌクレオチド配列は同一であり、その配列を配列表の配列番号9に記載する。また、このヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列を配列番号10に記載する。

【0043】

IFI6、MX2、およびOASLはI型インターフェロン(IFN)応答遺伝子(IRGs)であり、これら遺伝子の発現はI型IFNシグナル伝達により誘導される。I型IFNsは、IFNsとIFNであり、ウイルスに対する内因性免疫応答の媒介にとって不可欠の機能を有し、リンパ球分化、恒常性維持、寛容性、および記憶などのいくつかの免疫学的過程に決定的な役割をもつ(非特許文献29)。末梢血液試料中のI型IFN活性またはIRGs発現がRA患者で増加しているという報告がなされている(非特許文献30-35)。また、血漿中のIFNs活性の増加がTNFアンタゴニストにより治療したRA患者の良好な臨床反応の予測となったこと(非特許文献31)、そしていくつかのIRGsの発現もまた、良好な反応を示したRA患者で増加したことが認められたことが報告されている(非特許文献36)。対照的に、末梢血細胞や関節組織中でのIRGsおよびIFNの発現レベルの増加が、B細胞上に発現したCD20を標的とするモノクローナル抗体であるリツキシマブに対する治療無反応に関連することが報告されている(非特許文献14、32、37)。これらデータは、I型IFNシグネチャーが、ある種の生物学的薬剤の恩恵を優先的に受けるだろう患者の特定に使用できるかもしれないが、有効な抗リウマチ薬に対するRA患者の治療反応を普遍的に予測する予知マーカーではないことを示すものである。

【0044】

本明細書において、上記4つの遺伝子のヌクレオチド配列および該ヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列は、本明細書の配列表に例示されたものに限定されず、例示された配列と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは99%以上、の配列同一性を有しており、且つ当該遺伝子または該遺伝子によりコードされるタンパク質の機能が維持されている限りにおいて、いずれの配列であってもよい。

【0045】

末梢血からの単核球の単離は、従来公知の単離方法を使用して実施することができる。具体的には、ヘパリンやクエン酸などの抗凝固剤で処理した末梢血を、単核球分離用に適切に比重が調整された分離剤、例えばフィコールやリンホプレップ、に積層するか、または該分離剤と混合し、遠心分離操作を行い、単核球を単核球以外の血球成分から分離することにより実施することができる。

10

20

30

40

50

【0046】

「細胞の単離」とは、目的とする細胞以外の細胞を除去する操作がなされていることを意味する。「単離された単核球」における単核球の純度は、通常70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、最も好ましくは実質的に100%である。尚、本発明に係る方法において使用する単核球からは、顆粒球ができる限り除かれていることが好ましい。本発明に係る方法において使用する単離された単核球中に混入する顆粒球の頻度は、通常1%以下、好ましくは0.1%以下、より好ましくは0.01%以下である。最も好ましくは、単離された単核球は、顆粒球の混入を実質的に含まない。

【0047】

各薬効マーカー遺伝子の発現レベルの測定は、各薬効マーカー遺伝子の転写産物、すなわち、各遺伝子をコードするmRNAやその相補的核酸であるcRNAまたはcDNA、を特異的に検出し得る核酸プローブまたは核酸プライマーを用いて、自体公知の方法により実施することができる。このような測定方法としては、例えば、cDNAアレイ、リアルタイム-ポリメラーゼ連鎖反応(以下、RT-PCRと略称することがある)、ノザンプロットング、*in situ*ハイブリダイゼーションなどの方法を例示できる。

10

【0048】

各遺伝子の転写産物やその相補的核酸を特異的に検出し得る核酸プローブとしては、各遺伝子のcDNA配列に含まれる、約15塩基以上、好ましくは約18~約500塩基、より好ましくは約18~約20塩基、さらに好ましくは約18~約50塩基の連続したヌクレオチド配列またはその相補配列を含むポリヌクレオチドを挙げることができる。

20

【0049】

各薬効マーカー遺伝子の転写産物やその相補的核酸を特異的に検出し得る核酸プライマーは、各薬効マーカー遺伝子のcDNA配列からなるポリヌクレオチドの一部または全部の領域を特異的に増幅し得るように設計されたものであればいかなるものであってもよい。例えば、各薬効マーカー遺伝子のcDNA配列の相補配列の一部にハイブリダイズする、約15~約50塩基、好ましくは約18~約30塩基のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドと、このハイブリダイゼーション部位より3'末端側の当該cDNA配列の一部にハイブリダイズする、約15~約50塩基、好ましくは約18~約30塩基のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドとの組み合わせであり、それらによって増幅される核酸の断片長が約50~約1,000塩基、好ましくは約50~約500塩基、より好ましくは約50~約200塩基である、一組のポリヌクレオチドが挙げられる。

30

【0050】

核酸プローブおよび核酸プライマーは、特異的検出に支障を生じない範囲で付加的配列、すなわち検出対象のポリヌクレオチドと相補的でないヌクレオチド配列、を含んでいてもよい。

【0051】

また、核酸プローブおよび核酸プライマーは、適当な標識剤、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質、ビオチンなどで標識されていてもよい。好ましい放射性同位元素として、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S などを例示できる。好ましい酵素として、 α -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などを例示できる。好ましい蛍光物質として、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどを例示できる。好ましい発光物質として、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどを例示できる。あるいは、FAM^{商標}やVIC^{登録商標}などのレポーター蛍光色素の近傍に該蛍光色素の発する蛍光エネルギーを吸収するクエンチャー(消光物質)がさらに結合されていてもよい。かかる実施態様においては、検出反応の際に蛍光色素とクエンチャーとが分離して蛍光が検出される。

40

【0052】

核酸プローブおよび核酸プライマーは、DNAであってもRNAであってもよく、また、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。二本鎖の場合は二本鎖DNA、二本鎖RNA

50

、DNA/RNAハイブリッドのいずれであってもよい。したがって、本明細書においてあるヌクレオチド配列を有する核酸について記載する場合、該記載は、特に断らない限り、該ヌクレオチド配列を有する一本鎖ポリヌクレオチド、該ヌクレオチド配列と相補的な配列を有する一本鎖ポリヌクレオチド、それらのハイブリッドである二本鎖ポリヌクレオチドをすべて包含する意味で用いられている。

【0053】

上記核酸プローブおよび核酸プライマーは、例えば、本明細書に記載されたヌクレオチド配列の情報に基づいて、DNA/RNA自動合成機を用いて常法に従って合成することができる。

【0054】

また、各薬効マーカー遺伝子の発現レベルの測定は、各薬効マーカー遺伝子の翻訳産物、すなわちタンパク質、に特異的に結合する抗体を用いて、免疫学的手法により、該翻訳産物を定量することにより実施できる。免疫学的手法としては、フローサイトメトリー解析、放射性同位元素免疫測定法（RIA法）、酵素免疫固相法（ELISA法）、ウェスタンブロッティング、免疫組織染色などを例示できる。所望の抗体は、各薬効マーカー遺伝子の翻訳産物であるタンパク質、または該タンパク質の抗原性を有する部分ペプチドを免疫原として用い、既存の一般的な製造方法によって製造することができる。あるいは、市販されている所望の抗体を使用することもできる。

【0055】

各薬効マーカー遺伝子の発現レベルの測定において使用される核酸や抗体は、適切な支持体の上に結合させて核酸アレイや抗体アレイとして提供されたものであってもよい。支持体としては、ポリヌクレオチドを固定できるものであれば特に限定されるものではなく、どのような形状や材質であっても良い。具体的には、ガラス、シリコンウエハウ、ビーズ、樹脂、金属などの無機素材の支持体、またニトロセルロースなどの天然高分子材料やナイロンなどの合成高分子材料の支持体を例示できる。

【0056】

MT1Gの発現レベルの測定に好ましく使用される核酸プライマーとして、配列番号31に記載のヌクレオチド配列で表される核酸および配列番号32に記載のヌクレオチド配列で表される核酸からなるプライマーセットを例示できる。

【0057】

IFI6の発現レベルの測定に好ましく使用される核酸プライマーとして、配列番号25に記載のヌクレオチド配列で表される核酸および配列番号26に記載のヌクレオチド配列で表される核酸からなるプライマーセットを例示できる。

【0058】

MX2の発現レベルの測定に好ましく使用される核酸プライマーとして、配列番号37に記載のヌクレオチド配列で表される核酸および配列番号38に記載のヌクレオチド配列で表される核酸からなるプライマーセットを例示できる。

【0059】

OASLの発現レベルの測定に好ましく使用される核酸プライマーとして、配列番号39に記載のヌクレオチド配列で表される核酸および配列番号40に記載のヌクレオチド配列で表される核酸からなるプライマーセットを例示できる。

【0060】

各薬効マーカー遺伝子の発現レベルを測定した後に、測定した薬効マーカー遺伝子の発現レベルと、RAに対する抗IL-6受容体抗体による治療の有効性とを相関付ける。例えば、測定した薬効マーカー遺伝子の発現レベルを、抗IL-6受容体抗体による治療が有効であったRA患者の当該治療開始前の末梢血単核球における当該薬効マーカー遺伝子の発現レベル、および抗IL-6受容体抗体による治療が無効であったRA患者の当該治療開始前の末梢血単核球における当該薬効マーカー遺伝子の発現レベルと比較する。あるいは、測定した薬効マーカー遺伝子の発現レベルを、あらかじめ求めておいた評価基準と比較してもよい。かかる評価基準として、抗IL-6受容体抗体による治療が有効であっ

10

20

30

40

50

た R A 患者の当該治療開始前の末梢血単核球における当該薬効マーカー遺伝子の発現レベルの平均値を例示できる。また、別の評価基準として、抗 I L - 6 受容体抗体による治療が無効であった R A 患者の当該治療開始前の末梢血単核球における当該薬効マーカー遺伝子の発現レベルの平均値を例示できる。あるいは、抗 I L - 6 受容体抗体による治療が有効 / 無効であった多数の R A 患者の当該治療開始前の末梢血単核球における当該薬効マーカー遺伝子の発現レベルの分布図などと比較することにより、測定した薬効マーカー遺伝子の発現レベルと、R A に対する抗 I L - 6 受容体抗体による治療の有効性とを相関付けることができる。遺伝子発現レベルの比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行われる。

【 0 0 6 1 】

後述する実施例に示すように、抗ヒト I L - 6 受容体阻害抗体による治療が有効な R A 患者においては、本発明に係る 4 つの薬効マーカー遺伝子、M T 1 G、I F I 6、M X 2、および O A S L の末梢血単核球における発現レベルが、当該治療が無効な R A 患者と比較して高かった。したがって、末梢血単核球におけるこれら薬効マーカー遺伝子の発現レベルと、抗 I L - 6 受容体抗体による治療の有効性との間の正の相関に基づき、抗 I L - 6 受容体抗体による治療の有効性を予測することができる。例えば、末梢血単核球において、これら薬効マーカー遺伝子からなる群から選択される少なくとも 1 つの薬効マーカー遺伝子の発現レベルが相対的に高いと評価された場合には、当該 R A 患者は抗 I L - 6 受容体抗体による治療が有効である可能性が高いと判定することができる。さらに、これらの遺伝子のうちの複数、例えば 2 以上、好ましく 3 以上、より好ましくは 4 遺伝子、の発現レベルが相対的に高いと評価された場合には、より高い精度で、当該 R A は抗 I L - 6 受容体抗体による治療が有効である可能性が高いと判定することができる。

【 0 0 6 2 】

また、末梢血単核球中の各薬効マーカー遺伝子の発現レベルのカットオフ値をあらかじめ設定しておき、R A 患者の末梢血単核球中の測定した各薬効マーカー遺伝子の発現レベルとこのカットオフ値とを比較してもよい。例えば、本発明に係る 4 つの薬効マーカー遺伝子、M T 1 G、I F I 6、M X 2、および O A S L の末梢血単核球における発現レベルが、前記カットオフ値以上である場合には、当該 R A 患者は抗ヒト I L - 6 受容体阻害性抗体による治療が有効である可能性が高いと判定することができる。

【 0 0 6 3 】

「カットオフ値」とは、閾値ともいい、その値を基準として治療の有効性の判定をした場合に、高い診断感度および高い診断特異度の両方を満足できる値をいう。ここで、感度とは、真の陽性率を意味する。また、特異度とは真の陰性率を意味する。例えば、抗 I L - 6 受容体抗体による治療が有効である R A 患者で高い陽性率を示し、かつ、抗 I L - 6 受容体抗体による治療が無効である R A 患者で高い陰性率を示す、末梢血単核球中の薬効マーカー遺伝子の発現レベルをカットオフ値として設定することができる。

【 0 0 6 4 】

カットオフ値の設定は、自体公知の方法により実施できる。例えば、診断検査の有用性を検討する手法として一般的に用いられている R O C 解析 (r e c e i v e r o p e r a t i n g c h a r a c t e r i s t i c a n a l y s i s) により、カットオフ値の設定を行うことができる。R O C 解析では、閾値を変化させていった場合に、それぞれの閾値における感度 (S e n s i t i v i t y) を縦軸に、F P F (F a l s e P o s i t i v e F r a c t i o n、偽陽性率：1 - 特異度 (S p e c i f i c i t y)) を横軸にプロットした R O C 曲線が作成される。R O C 曲線では、全く診断能のない検査は、対角線上の直線となるが、診断能が向上するほど、対角線が左上方に弧を描くような曲線となり、診断能 1 0 0 % の検査は、左辺 - 上辺上を通る曲線となる。カットオフ値の設定としては、例えば、感度と特異度の優れた独立変数の R O C 曲線は、左上隅に近づいていくという事実から、この左上隅との距離が最小となる点をカットオフ値にする方法がある。また、R O C 曲線における曲線下面積 (a r e a u n d e r t h e c u r v e、A U C と略称される) が 0 . 5 0 0 となる斜点線から最も離れたポイントをカットオフ

10

20

30

40

50

値にする方法、つまり、(感度 + 特異度 - 1) を計算して、その最大値となるポイントであるヨーデン指標 (Youden index) をカットオフ値に設定することもできる。

【 0 0 6 5 】

具体的には、抗 I L - 6 受容体抗体による治療が有効であった R A 患者、すなわち反応例、および抗 I L - 6 受容体抗体による治療が無効であった R A 患者、すなわち無反応例の、当該治療開始前に採取した末梢血単核球中の各薬効マーカー遺伝子の発現レベルを測定し、測定された値における診断感度および診断特異度を求め、これらの値に基づき、市販の解析ソフトを使用して R O C 曲線を作成する。そして、診断感度と診断特異度が可能な限り 1 0 0 % に近いときの値を求めて、その値をカットオフ値とすることができる。また、例えば、検出された値における診断効率、すなわち治療が有効であった患者を「有効」と正しく診断した症例と、治療が無効であった患者を「無効」と正しく診断した症例との合計数の全症例数に対する割合、を求め、最も高い診断効率が算出される値をカットオフ値とすることができる。

10

【 0 0 6 6 】

本発明はまた、M T 1 G、I F I 6、M X 2、および O A S L からなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子の転写産物若しくはその相補的核酸を特異的に検出し得る核酸プローブまたは核酸プライマー、あるいはこれら遺伝子からなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子の翻訳産物に特異的に結合し得る抗体を含む、R A に対する抗 I L - 6 受容体抗体による治療の有効性を予測するための診断薬に関する。本発明に係る診断薬は、上記本発明に係る方法に使用される。

20

【 0 0 6 7 】

測定対象の各薬効マーカー遺伝子の翻訳産物に特異的に結合する抗体や、各薬効マーカー遺伝子の転写産物やその相補的核酸を特異的に検出し得る核酸プローブは、適切な支持体の上に結合して、核酸アレイや、抗体アレイとして提供してもよい。支持体としては、当該分野で通常用いられている支持体であれば特に限定されず、例えば、ナイロン膜などのメンブレン、ビーズ、ガラス、プラスチック、および金属などを挙げることができる。

【 0 0 6 8 】

本発明に係る診断薬は、単核球分離用に適切に比重が調整された分離剤、例えばフィコールやリンホプレップ、をさらに含んでもよい。

30

【 0 0 6 9 】

本発明に係る診断薬に含まれる各構成要素は、各々別個に、あるいは可能であれば混合した状態で、水若しくは適当な緩衝液、例えば T E バッファーやリン酸緩衝生理食塩水 (P B S)、中に適当な濃度となるように溶解されるか、または凍結乾燥された状態で、適切な容器中に収容される。

【 0 0 7 0 】

本発明に係る診断薬は、薬効マーカー遺伝子の発現レベルの測定方法に応じて、当該方法の実施に必要な他の成分や試薬をさらに含む診断用試薬キットとして提供することができる。例えば、本発明に係る診断薬が、薬効マーカー遺伝子の転写産物またはその相補的核酸を特異的に検出し得る核酸プローブまたは核酸プライマーを含むものであれば、R T - P C R、ノザンプロットティング、i n s i t u ハイブリダイゼーション、c D N A アレイなどにより薬効マーカー遺伝子の発現レベルを測定することにより、抗 I L - 6 受容体抗体による治療の有効性を予測することができる。R T - P C R を測定に用いる場合には、本発明に係る診断薬は、P C R 反応緩衝液、反応に必要な各種塩溶液、d N T P s 水溶液、T a q D N A ポリメラーゼ、および逆転写酵素などをさらに含む試薬キットとして提供することができる。ノザンプロットティングや核酸アレイを測定に用いる場合には、本発明に係る診断薬は、プロットティング緩衝液、標識化試薬、プロットティング膜などをさらに含むことができる。i n s i t u ハイブリダイゼーションを測定に用いる場合には、本発明に係る診断薬は、標識化試薬、発色基質などをさらに含むことができる。

40

【 0 0 7 1 】

50

本発明に係る診断薬が、薬効マーカー遺伝子の翻訳産物に特異的に結合する抗体を含むものであれば、免疫学的手法により薬効マーカー遺伝子の発現レベルを測定することにより、抗IL-6受容体抗体による治療の有効性を予測することができる。この場合、本発明に係る診断薬は、標識二次抗体、発色基質、ブロッキング液、洗浄緩衝液、ELISAプレート、プロットング膜などをさらに含む診断用試薬キットとして提供することができる。

【0072】

以下、実施例にて、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこの実施例に限定されない。また、本発明に係る技術的思想を逸脱しない範囲で種々の変更が可能である。

【実施例1】

【0073】

RA患者におけるトシリズマブ（以下、TCZと略称する）治療への反応性を予測するためのバイオマーカーを、末梢血単核球（以下、PBMCsと略称することがある）における網羅的遺伝子発現解析により同定することを試みた。

【0074】

具体的には、TCZ治療を初めて受けるRA患者の末梢血単核球を試料として用い、網羅的遺伝子発現解析を次のように行った。

【0075】

1. 患者および健常人

2010年ACR/EULAR RA分類基準（非特許文献18）を満たし、且つCDAI（非特許文献19）が10以上であるRA患者であって、TCZ治療を初めて受ける患者を継続的に募った。40症例のRA患者を候補遺伝子の同定のためのトレーニングコホートとし、一方、別の20症例のRA患者をそれら遺伝子の予測値を確認するためのバリデーションコホートとして採用した。患者は、日常的臨床ケアを受け、そして、治療開始前（以下、ベースライン時と称する）、並びにTCZ治療の開始後3ヶ月目および6ヶ月目に臨床的および検査的な評価を受けた。関節炎症状のない健常人を対照として採用した。研究デザインは千葉大学倫理委員会により承認されたものであり、ヘルシンキ宣言に則って解析対象者から書面による同意書を得ている。

【0076】

2. 臨床的および検査的な評価

臨床的および検査的な評価は、28関節の腫脹関節数および疼痛関節数、医師および患者の総合評価のための視覚的評価スケール（VAS）、健康度評価質問票障害指数（HAQ-DI）、赤血球沈降速度（ESR）、およびC-反応性タンパク質（CRP）について行った。リウマトイド因子（RF）および抗環状シトルリン化タンパク質抗体（ACPA）は、ベースライン時にのみ検討した。

【0077】

3. TCZ治療に対する反応の評価

TCZによるIL-6遮断療法は、治療反応に関わらず、ESRや血清CRPなどの急性炎症マーカーを実質的に低減するため、ACR反応判定基準やEULAR反応判定基準などのこれらマーカーを含む反応判定基準は本研究では採用しなかった。その代わりに、TCZ治療に対する臨床反応は、主として医師の6ヶ月目の総合評価（良好/中等度/無反応）により決定した。この評価の決定は、11名の医師および2名のリウマチ学者の間で、網羅的臨床情報を概観することにより得られた合意によって行った。6ヶ月目のCDAIカテゴリー（高度/中等度/低度の疾病活動度または緩解）も、医師の総合評価を補足するために使用した。

【0078】

4. DNAマイクロアレイ解析

ヘパリン採血試料より末梢血中の単核球を分離し、その遺伝子発現をDNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。DNAアレイ解析用試料を採取後、速やかにTCZ8mg/kg/4週間の加療を開始し、6ヶ月後に医師総合評価により治療効果判定を行った

10

20

30

40

50

。

【0079】

具体的には、PBMCsの分離は、Ficoll - Paque PREMIUM 1.073 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) を使用して行った。PBMCsの分離は、ベースライン時には、トレーニングコホートおよびバリデーションコホートの両方、並びに健常対照について実施し、また、3ヶ月目にはトレーニングコホートについて実施した。PBMCから細胞総RNAを、ISOGEN溶液 (Nippon GENE Co., LTD, Tokyo, Japan) を用いて抽出した。トレーニングコホートおよび健常対照において、DNAマイクロアレイ解析を、Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) および Whole Human Genome DNA Microarray 4x44K (Agilent Technologies Inc.) を使用して製造説明書に従って実施した。マイクロアレイデータは、GeneSpring GX11.5.1ソフトウェア (Agilent Technologies Inc.) を使用して分析した。シグナル強度は、各データを75パーセントイルベースラインに調整することにより正規化した。

10

【0080】

5. リアルタイム定量的PCR解析

リアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応解析 (以下、qPCRと略称する) を、ベースライン時に、トレーニングコホートおよびバリデーションコホートの両方について実施した。本解析は、TCZ治療に対する無反応例と反応例との間で、上記DNAマイクロアレイ解析における発現レベルに有意な差異が認められた18遺伝子について実施した。プライマーは、表1に記載のプライマーセットを使用した。抽出RNAの逆転写はiScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA) を使用して行った。発現レベルはABI PRISM 7300装置 (Applied Biosystems, Foster City, CA) により標準手順書を使用して測定した。グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) の発現レベルを内因性コントロールとして用い、データを正規化した。

20

【0081】

【表 1】

表 1

候補遺伝子	フォワードプライマー	配列番号	リバースプライマー	配列番号
<i>CCL3L3</i>	AGTGAGGAGTGGGTCCAGAA	1 1	GTAGCTGTGGAGGTCACACG	1 2
<i>CCL4</i>	CTGTGCTGATCCCAGTGAATC	1 3	TCAGTTCAGTTCAGGTCATACA	1 4
<i>CD83</i>	GAGAAACCTAAGTGGCAAGGTG	1 5	AGGACAATCTCCGCTCTGTAT	1 6
<i>CXCR4</i>	ACGCCACCAACAGTCAGAG	1 7	AGTCGGGAATAGTCAGCAGGA	1 8
<i>FOSL2</i>	CAGAAATCCGGGTAGATATGCC	1 9	GGTATGGGTTGGACATGGAGG	2 0
<i>HP</i>	CAGCACAGTCCCCGAAAAGAA	2 1	CAGTCGCATACCAGGTGTCC	2 2
<i>HPR</i>	GCGTGTGGGTTACGTGTCT	2 3	GTTATGCAATCGTATTGGTCAGC	2 4
<i>IFI6</i>	TGCTACCTGCTGCTCTTCAC	2 5	CGAGCTCTCCGAGCACTTTT	2 6
<i>IL27</i>	CTGGTCTCGCCAGCTATTT	2 7	CATCGGGCCCAAGACAATA	2 8
<i>LY6E</i>	GGGAATCTCGTGACATTTGGC	2 9	ACACCAACATTGACGCCTTCT	3 0
<i>MT1G</i>	GACAGCCCTGCTCCCAAGTA	3 1	AAAAGGGAATGTAGCAAAGGGG	3 2
<i>MT1L</i>	CTTCGCCTCTCCCGTCATTT	3 3	CTTTGCACTTGCAAGGAGCTG	3 4
<i>MT2A</i>	ACCTGTCCCGACTCTAGCC	3 5	AGGTGCATTTGCACTCTTTGC	3 6
<i>MX2</i>	CAGAGGCAGCGGAATCGTAA	3 7	TGAAGCTCTAGCTCGGTGTTC	3 8
<i>OASL</i>	CTGATGCAGGAACTGTATAGCAC	3 9	CACAGCGTCTAGCACCTCTT	4 0
<i>RABGEF1</i>	ATGTGGATCAATCGGATCTCCT	4 1	GCTTTGTGGTACTCTCCCTCC	4 2
<i>THBS1</i>	AGACTCCGCATCGAAAGG	4 3	TCACCACGTTGTTGTCAAGGG	4 4
<i>WARS</i>	AGCACCTACCAGTAATCATGGC	4 5	TCCAAACCGAACAATGAGCTT	4 6

10

20

【 0 0 8 2 】

6 . 統計解析

統計解析は、SPSS バージョン 21 . 0 (IBM Japan , Tokyo , Japan) を使用して実施した。正規分布の連続型データは平均値および標準偏差 (SDs) を用いてまとめ、パラメトリック検定、具体的には二標本 t 検定 (2 つの変数が等しいと考えられないときはウエルチの t 検定) または対応のある t 検定 (paired t - test) を使用して解析した。非正規分布データは中央値および四分位数範囲 (IQRs) を用いてまとめ、非パラメトリック検定 (マン・ホイットニーの U 検定) を使用して解析した。多変量解析はロジスティック回帰モデルを使用して実施した。0 . 05 より小さい P 値を有意差があると看做した。

30

【 0 0 8 3 】

7 . 結果

7 . 1 患者および疾患の特徴

トレーニングコホートおよびバリデーションコホートの患者の特徴および疾患の特徴を表 2 に示す。患者は全て日本人であり、それぞれ、平均年齢が 58 . 4 歳および 60 . 9 歳、女性が 77 . 5 % および 88 . 0 %、疾患期間の中央値が 57 . 5 ヶ月および 44 . 5 ヶ月である。72 . 5 % および 75 . 0 % がメトトレキサート (MTX) を服用し (投与量中央値は毎週 8 mg および 6 . 75 mg)、そして 57 . 5 % および 55 . 0 % がコルチコステロイドを服用していた (プレドニソロンの投与量中央値が毎日 3 . 875 mg および 1 mg)。TNF アンタゴニストは患者の 37 . 5 % および 33 . 3 % に投与されていた。トレーニングコホートの患者の 1 人は、TCZ 治療を開始する以前に、リツキシマブの投与を悪性リンパ腫の治療処方計画の一環として 4 年前に受けていた。その他の生物学的薬剤は従前には使用されていなかった。

40

【 0 0 8 4 】

【表 2】

表 2

ペーラスラインの値	トレニンングコホート			パリエーショナルコホート			P 値
	合計 n = 40	無反応例 n = 8	反応例 n = 29	合計 n = 20	無反応例 n = 5	反応例 n = 15	
年齢, 平均 ± SD 才	58.4 ± 15.2	54.3 ± 10.2	59.5 ± 16.8	60.9 ± 9.9	61.6 ± 11.1	60.7 ± 9.8	0.860
女性の数 (%)	31 (78)	5 (63)	23 (79)	16 (80)	4 (80)	12 (80)	1.000
罹患期間の中央値 (IQR) 月	57.5 (18.3-173.8)	92 (25.3-188.8)	58 (13.1-71)	44.5 (19-120.8)	46 (4.3-359)	39 (17.5-94)	0.735
リウマチ因子陽性の数 (%)	34 (85)	7 (88)	25 (86)	18 (90)	4 (80)	14 (93)	0.263
ACPA 陽性の数 (%)	34 (85)	8 (100)	25 (86)	15 (75)	4 (80)	11 (73)	1.000
抗核抗体陽性の数 (%)	24 (60)	4 (50)	19 (66)	8 (40)	2 (40)	6 (40)	1.000
抗 SS-A 抗体陽性の数 (%)	6 (15)	0 (0)	6 (21)	5 (25)	1 (20)	4 (27)	1.000
関節外症状が存在する数 (%)	11 (28)	4 (50)	6 (21)	1 (5)	0 (0)	1 (7)	0.750
喫煙者数 (%)							
喫煙経験の無い患者	28 (70)	6 (75)	20 (69)	16 (80)	5 (100)	11 (73)	
前喫煙者	10 (25)	2 (25)	7 (24)	1 (5)	0 (0)	1 (7)	0.435
喫煙者	2 (5)	0 (0)	2 (7)	3 (15)	0 (0)	3 (20)	
疼痛関節数の中央値 (IQR)	5 (1-7.8)	5 (0.8-10.5)	5 (1-7)	4 (2-8.3)	4 (2-8)	4 (1.5-7.5)	0.553
腫脹関節数の中央値 (IQR)	8.5 (4-11)	7 (3.5-9.3)	9 (5-12)	8 (2-9.5)	2 (1-3)	8 (2.5-10)	0.168
CDAI の中央値 (IQR)	24.2 (20.3-31.23)	25.25 (19.8-28.8)	24.9 (20.5-31.9)	21.4 (14.95-25)	19.5 (13-21.8)	22.6 (15.85-25)	0.497
ESR の中央値 (IQR) mm/hour	44 (30.3-68.8)	47.5 (28.5-79.8)	44 (32-67)	52 (36-67)	45 (37-61)	55.5 (37.8-70.8)	0.391
CRP レベルの中央値 (IQR) mg/dl	2.355 (0.75-4.1)	2.375 (1.528-5.11)	2.41 (0.79-4.1)	1.025 (0.415-2.585)	0.99 (0.9-1.05)	1.52 (0.38-3.275)	0.395
DA528 (ESR-based) の中央値 (IQR)	5.35 (4.475-6.033)	5.365 (4.145-6.388)	5.34 (4.595-5.975)	5.09 (4.41-5.47)	4.73 (4.44-5.33)	5.21 (4.46-5.485)	0.754
MMP-3 レベルの中央値 (IQR) ng/ml	199.5 (121.5-323.75)	233.5 (121.3-358.0)	196 (124-320)	224 (125.5-328.5)	138 (133-245.8)	239 (134-364.5)	0.391
MTX 投与量の中央値 (IQR) mg/week	8 (0-10.5)	6 (4.5-7.6)	8 (0-12.5)	6.8 (3-13)	10 (6-12)	6 (0-14)	0.395
プレドニソン投与量の中央値 (IQR) mg/day	3.9 (0-5)	5.5 (2.8-6.8)	3 (0-5)	1 (0-5)	0 (0-2.5)	1 (0-5)	0.612
TNFアンタゴニスト治療例の数 (%)							
治療経験の無い患者	15 (38)	3 (38)	12 (41)	7 (35)	2 (40)	5 (33)	
投与経験のある患者	3 (8)	1 (13)	2 (7)	4 (20)	1 (20)	3 (20)	0.959
現在投与している患者	22 (55)	4 (50)	15 (52)	9 (45)	2 (40)	7 (47)	

【 0 0 8 5 】

表 2 に示す P 値は、無反応例と反応例との差異を二標本 t 検定、マン・ホイットニー -

10

20

30

40

50

U検定、カイ二乗検定、またはフィッシャーの正確確率検定を使用して算出した。表1中、SDは標準偏差、IQRは四分位数範囲、ACPAは抗シトルリン化タンパク質抗体、CDAIは臨床疾患活動度指数、ESRは赤血球沈降速度、CRPはC反応性タンパク質、DAS28は疾患活動性スコア28、MMP-3はマトリックスメタロプロテイナーゼ-3、MTXはメトトレキサートを意味する。

【0086】

本研究に登録された13人の健常提供者は、年齢の平均 \pm SDが47.5 \pm 8.3歳であり、10人(76.9%)が女性であった。

【0087】

7.2 TCZ治療に対する反応

トレーニングコホートでは、医師の総合評価に基づくと、29症例で6ヶ月間のTCZ治療により良好または中等度の反応を認めたが、8症例では反応は認められなかった。1症例が頸椎症の急性増悪により外科手術を要したことから脱落し、2症例がTCZ投与のための来院予定を遵守しなかったことから脱落した。

【0088】

バリデーションコホートでは、全症例について解析適格性を認めた。15症例で良好または中等度の反応を認めたが、5症例では反応を認めなかった。

【0089】

医師の総合評価により反応例であると決定された症例では、無反応例と比較して、CDAI測定において顕著または数値的に大きな改善を認めた。その差異はバリデーションコホートにおける有意差よりは小さかったが、これは症例数が少なかったことに起因する(表3)。CDAI分類は、トレーニングコホートの29症例の反応例のうち28症例、ならびにバリデーションコホートの15症例の反応例の全てにおいて改善し、例えば、CDAIの中等度から低度への改善が認められた。

【0090】

10

20

【表 3】

表 3

疾患活動性指標 (Disease activity measure)	トレーニングコホート			バリデーションコホート				
	合計 n = 37	無反応例 n = 8	反応例 n = 29	P 値	合計 n = 20	無反応例 n = 5	反応例 n = 15	P 値
疼痛関節数 (28)	-3.3 ± 5.3	-3.0 ± 4.4	-4.0 ± 4.5	0.638	-3.8 ± 4.3	-2.5 ± 4.5	-4.2 ± 4.3	0.494
腫脹関節数 (28)	-5.0 ± 4.2	-0.5 ± 1.9	-6.3 ± 3.5	< 0.001***	-4.5 ± 4.6	-3.0 ± 7.2	-4.9 ± 3.9	0.472
患者の総合評価 VAS (100 mm)	-25.7 ± 25.0	-9.2 ± 19.3	-29.9 ± 24.9	0.065	-24.4 ± 24.0	0.5 ± 29.0	-31.1 ± 18.3	0.015*
医師の総合評価 VAS (100 mm)	-28.5 ± 20.7	-8.5 ± 19.5	-33.1 ± 18.8	0.007**	-35.5 ± 20.8	-22.5 ± 20.6	-39.0 ± 20.0	0.164
CDAI	-13.7 ± 10.2	-5.3 ± 6.6	-16.6 ± 8.2	0.003**	-14.4 ± 10.7	-7.7 ± 15.8	-16.1 ± 8.8	0.167
赤血球沈降速度 (mm/hour)	-40.5 ± 30.1	-33.1 ± 45.1	-43.4 ± 26.3	0.462	-39.9 ± 18.5	-31.9 ± 22.9	-42.2 ± 17.3	0.343
C-反応性タンパク質 (mg/dl)	-3.0 ± 3.2	-2.5 ± 3.8	-3.2 ± 3.2	0.644	-2.1 ± 2.7	-0.8 ± 0.6	-2.5 ± 2.9	0.288

【 0 0 9 1 】

表 3 は、トレーニングコホートおよびバリデーションコホートにおける、ベースライン

10

20

30

40

50

および6ヶ月間のTCZ治療後のCDAIの変動を示す。変動の値は平均±標準偏差で示す。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ は、二標本t検定で有意差があることを示す。

【0092】

7.3 無反応例と反応例との間の、患者特性および疾患特性の差異

表1に示したように、ベースライン時の患者特性および疾患特性についての、無反応例と反応例との間の差異は、トレーニングコホートでもバリデーションコホートでも認められなかった。

【0093】

7.4 候補遺伝子の同定

8症例の無反応例および29症例の反応例において、19,416遺伝子に対する41,000プローブのシグナル強度の値を取得した。まず、全ての検体でバックグラウンドレベルのシグナル強度(< 100 相対蛍光単位)であった5,755遺伝子に対する15,564プローブを除外した。次に、次の2条件を満たす409プローブを同定した：正規化されたシグナル強度の、無反応例と反応例との間の差異に関する二標本t検定のP値が0.05より小さい(< 0.05)；正規化されたシグナル強度の、無反応例と反応例との間の差異が1.5倍より大きい(> 1.5 倍)。

【0094】

図1は、これら409プローブの正規化されたシグナル強度のヒートマップおよび階層的クラスタ解析を示す。無反応例の遺伝子発現パターンが同じブランチにクラスタ化されたことから、これら一組の遺伝子は、TCZ治療により改善すると予想されない患者を同定するための高感度のバイオマーカーになり得ることが示唆される。

【0095】

次に、候補遺伝子を、次の3条件を適用することにより、68プローブに絞った：CDAI分類の変化により測定された、無反応例と反応例との間の差異に関する二標本t検定のP値が0.05より小さい(< 0.05)；CDAI分類の変化により測定された、無反応例と反応例との間の差異が1.5倍より大きい(> 1.5 倍)；正規化されたシグナル強度の平均(\log_2 スケール)が無反応例と反応例のどちらかで0より大きい(> 0)。

【0096】

続いて、19遺伝子を代表する23プローブを選択した(表4)。これら遺伝子は、次のいずれかの判定基準により選択した：複数プローブが確認された遺伝子、例えば、RABGEF1；同じファミリーに属する複数遺伝子、例えば、MT1G、MT1L、およびMT1A；免疫/炎症反応に直接的に関与する遺伝子、例えば、IL-27。

【0097】

10

20

30

【表4】

表4

遺伝子 記号	DNA マイクロアレイ プローブ	正規化シグナル強度における差異					qPCR 発現レベルとの 相関	
		シグナル強度 (log ₂ 変換, 平均 ± SD)		絶対的 差倍率	反応者における 上方/下方制御	P 値†	r	P 値
		無反応例	反応例					
<i>CCL3L3</i>	A_23_P321920	0.753 ± 1.034	1.987 ± 1.873	2.4	Up	0.023*	0.994	< 0.001***
	A_24_P228130	0.871 ± 1.054	2.064 ± 1.826	2.3	Up	0.028*	0.998	< 0.001***
<i>CCL4</i>	A_23_P207564	3.394 ± 0.846	4.251 ± 1.138	1.8	Up	0.034*	0.859	0.001**
<i>CD83</i>	A_23_P70670	2.450 ± 1.257	3.718 ± 1.489	2.4	Up	0.031*	0.858	0.001**
<i>CXCR4</i>	A_23_P102000	6.331 ± 0.430	7.032 ± 0.674	1.6	Up	0.002**	0.839	0.002**
<i>FOSL2</i>	A_23_P218555	-0.352 ± 0.780	0.526 ± 1.017	1.8	Up	0.020*	0.868	0.001**
<i>HP</i>	A_23_P206760	4.187 ± 0.890	3.204 ± 1.485	2.0	Down	0.030*	0.839	0.002**
<i>HPR</i>	A_23_P421493	0.262 ± 0.970	-0.710 ± 1.496	2.0	Down	0.041*	0.623	0.055
<i>IFI6</i>	A_23_P201459	1.755 ± 0.489	2.698 ± 1.232	1.9	Up	0.003**	0.633	0.049*
<i>IL27</i>	A_23_P315320	2.216 ± 0.765	1.193 ± 1.553	2.0	Down	0.016*	0.230	0.620
<i>LY6E</i>	A_24_P317762	-0.300 ± 0.403	0.437 ± 0.956	1.7	Up	0.003**	0.671	0.048*
<i>MT1B</i>	A_23_P37983	1.956 ± 0.427	2.601 ± 0.776	1.6	Up	0.006**	ND	ND
<i>MT1G</i>	A_23_P60933	2.293 ± 0.402	2.923 ± 0.795	1.5	Up	0.005**	0.663	0.037*
<i>MT1L</i>	A_23_P427703	2.091 ± 0.383	2.689 ± 0.772	1.5	Up	0.006**	0.482	0.158
<i>MT2A</i>	A_23_P106844	4.476 ± 0.411	5.120 ± 0.867	1.6	Up	0.006**	0.672	0.033*
	A_23_P252413	4.012 ± 0.455	4.624 ± 0.908	1.5	Up	0.015*	0.663	0.037*
	A_24_P361896	4.246 ± 0.427	4.969 ± 0.813	1.7	Up	0.003**	0.787	0.007**
<i>MX2</i>	A_24_P117294	0.767 ± 0.340	1.410 ± 0.912	1.6	Up	0.004**	0.861	0.001**
<i>OASL</i>	A_23_P139786	1.407 ± 0.640	2.190 ± 1.255	1.7	Up	0.024*	0.942	< 0.001***
<i>RABGEF1</i>	A_23_P250825	-0.229 ± 0.675	0.425 ± 1.038	1.6	Up	0.048*	0.923	< 0.001***
	A_24_P232049	-0.456 ± 0.723	0.234 ± 1.045	1.6	Up	0.047*	0.920	< 0.001***
<i>THBS1</i>	A_24_P142118	-0.341 ± 1.349	1.088 ± 1.732	2.7	Up	0.026*	0.841	0.002**
<i>WARS</i>	A_23_P65651	2.685 ± 0.389	3.355 ± 0.642	1.6	Up	0.002**	0.897	< 0.001***

10

20

【0098】

表4は、トレーニングコホートにおける無反応例と反応例の比較により同定された候補DNAマイクロアレイプローブを示す。候補遺伝子はアルファベット順に列記した。†は二標本t検定を、‡はピアソンの相関計数を示し、* P < 0.05、** P < 0.01、*** P < 0.001は、有意差があることを示す。SDは標準偏差、qPCRはリアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応、NDは未測定、Upは上方制御、Downは下方制御を意味する。

30

【0099】

7.5 DNAマイクロアレイシグナル強度とqPCR解析により測定された相対的発現との相関

19遺伝子の相対的発現を、ランダムに選択した10検体のcDNA試料を使用して、qPCR解析により評価し、そしてDNAマイクロアレイシグナル強度と比較した。MT1Bについては、いかなる別個のプライマーセットを使用しても、意味のある増幅曲線は得られなかった。残りの18遺伝子のうち、DNAマイクロアレイシグナル強度とqPCR解析により測定された相対的発現との間で統計的有意差異のある相関が確認されたのは15遺伝子であった(表2、右の2列)。

40

【0100】

7.6 独立のコホートにおける無反応例と反応例との間で差異のある遺伝子発現の検証

これら遺伝子のPBMCsでの発現レベルの差異を、バリデーションコホートにおける無反応例と反応例との間で比較した。図2は、相対的発現レベルのヒートマップとそれらパターンの階層化を示している。無反応例の遺伝子発現パターンが同じブランチにクラスター化されたことから、これら遺伝子がTCZ治療により改善すると予想されない患者を同定するための高感度のバイオマーカーになり得ることが再度示唆される。これら15遺

50

伝子のうち、バリデーションコホートの反応例において顕著に高い発現レベルが再現されたのは次の4遺伝子であった：IFI6、MT1G、MX2、およびOASL（表5）。

【0101】

【表5】

表5

遺伝子記号	相対的発現 (平均 ± SD)		P 値	
	無反応例	反応例		
<i>CCL3L3</i>	0.22908 ± 0.11719	0.71191 ± 1.14197	0.128	10
<i>CCL4</i>	0.47432 ± 0.52809	0.32468 ± 0.16105	0.565	
<i>CD83</i>	0.09453 ± 0.06540	0.12588 ± 0.20742	0.623	
<i>CXCR4</i>	2.02442 ± 0.52763	2.60166 ± 1.34114	0.186	
<i>FOSL2</i>	0.12600 ± 0.05244	0.15703 ± 0.13811	0.477	
<i>HP</i>	0.01959 ± 0.01192	0.03599 ± 0.03659	0.148	
<i>IFI6</i>	0.01166 ± 0.00514	0.01517 ± 0.01106	0.038*	
<i>LY6E</i>	0.21193 ± 0.09510	0.41288 ± 0.45754	0.128	20
<i>MT1G</i>	0.00039 ± 0.00030	0.00164 ± 0.00128	0.003**	
<i>MT2A</i>	0.26977 ± 0.10763	0.35474 ± 0.24362	0.299	
<i>MX2</i>	0.07054 ± 0.02718	0.13847 ± 0.08220	0.012*	
<i>OASL</i>	0.03208 ± 0.00883	0.07313 ± 0.06817	0.038*	
<i>RABGEF1</i>	0.03439 ± 0.01607	0.05279 ± 0.03053	0.107	
<i>THBS1</i>	0.12593 ± 0.10264	0.24968 ± 0.26263	0.149	
<i>WARS</i>	0.42023 ± 0.15457	0.51446 ± 0.28856	0.371	30

【0102】

表5は、バリデーションコホートにおける無反応例と反応例の間の、候補遺伝子のベースライン時の相対発現の差異を示す。候補遺伝子はアルファベット順に列記した。* P < 0.05、** P < 0.01、*** P < 0.001は、有意差があることを示す。SDは標準偏差を意味する。

【0103】

7.7 健常対照とRA患者との間、および、TCZ治療の前後での比較

同定された4遺伝子の正規化DNAマイクロアレイシグナル強度は、TCZ治療に対して反応したRA患者で健常患者と比較して顕著に高かった（図3）。さらに、正規化シグナル強度は、反応例において3ヶ月間のTCZ治療後に減少する傾向が認められたが、無反応例では認められなかった（図3）。これらデータは、これら遺伝子のPBMCsでの発現がTCZ治療に反応すると予想されるRA患者で概ね増加していることを示すものである。

【0104】

7.8 TCZ治療に対する臨床反応の予測モデル

予測値の評価および最適カットオフレベルの設定を行うために、ROC解析を、同定した4遺伝子のそれぞれについて実施した。バリデーションコホートにおいてTCZ治療に中等度から良好な反応を予測するためのROC曲線下面積(AUCs)は、それぞれ、IFI6については0.693、MT1Gについては0.920、MX2については0.8

10

20

30

40

50

13、そしてOASLについては0.627であった(表6)。
 【0105】
 【表6】

遺伝子	ROC 解析		診断値		
	AUC	最適カットオフ値	感度 (%)	特異度 (%)	NPV (%)
単一遺伝子 [†]					
IFI6	0.693	≥ 0.85295	80	60	50
MTIG	0.920	≥ 0.00054	87	80	67
MX2	0.813	≥ 0.06587	87	80	67
OASL	0.627	≥ 0.04068	47	100	39
合計スコア [†]					
IFI6	0.887	≥ 2	73	100	56
IFI6	0.807	≥ 2	80	80	57
IFI6	0.793	≥ 1	80	60	50
MTIG	0.947	≥ 2	73	100	56
MTIG	0.880	≥ 1	87	80	67
MTIG	0.880	≥ 1	87	80	67
MTIG	0.913	≥ 3	73	100	56
MTIG	0.887	≥ 2	73	100	56
MTIG	0.853	≥ 2	80	80	57
MTIG	0.947	≥ 2	73	100	56
MTIG	0.913	≥ 3	73	100	56

【0106】

表6は、バリデーションコホートにおいてTCZ治療に中等度から良好な反応を予測す

10

20

30

40

50

るための、各遺伝子および合計スコアに関するROC解析および診断値を示す。†ROC解析は各遺伝子の相対発現レベルについて実施した。‡ROC解析は含まれる遺伝子の合計スコアについて実施した。ROCは反応受信者動作特性、AUCは曲線下面積、PPVは陽性予測値、NPVは陰性予測値を意味する。

【0107】

次に、バリデーションコホートにおけるTCZ治療に対する中等度から良好な反応について、同定した遺伝子の独立の予測値を設定するために、多変量ロジスティック回帰解析を実施した。しかしながら、連続変数も二分変数も、おそらく試料数が少ないことに起因して、有意な予測変数として確認されなかった。

【0108】

そこで、それぞれの遺伝子に対して、カットオフ値より上の高い相対的発現を示した場合に1ポイントを等しく割り当て、これらポイントを合計することにより総合スコアを算出した。4遺伝子の可能性ある組み合わせの全てについての総合スコアの予測値を表4に示す。MT1GおよびMTX2を含む総合スコアまたはMT1G、MX2およびOASLを含む総合スコアが、最も大きいAUC0.947を、2以上のカットオフ値で与えた。バリデーションコホートにおけるTCZ治療への中等度から良好な反応について、これらモデルの陽性予測値および陰性予測値はそれぞれ100%および55.6%であった。

【産業上の利用可能性】

【0109】

本発明に係る方法を用いれば、RA患者における抗IL-6受容体抗体治療の有効性をその開始前に確認した上で、該治療を実施することができる。その結果、例えば、当該治療の有効性が見込める患者に対しては、該治療を適用し、有効性が見込めない患者に対しては治療方針を変更するなど、治療方針の選択判断が可能となる。したがって、本発明に係る方法は、当該治療の有効性が見込めない患者にとって、該治療を受けることによる損傷の進行や副作用に関する不必要なリスクを避けることができると共に、不要な費用の発生を防止することができる。さらに、無駄な薬剤の使用を抑え、医療経済にも大きく貢献する。

【配列表フリーテキスト】

【0110】

配列番号1：メタロチオネイン 1G (MT1G) 遺伝子
 配列番号3：インターフェロン - 誘導性タンパク質6 (IFI6) 遺伝子
 配列番号5：インターフェロン - 誘導性タンパク質6 (IFI6) 遺伝子
 配列番号7：ミクソウイルス耐性2 (MX2) 遺伝子
 配列番号9：2'-5'-オリゴアデニレートシテターゼ様 (OAS1) 遺伝子
 配列番号11：CCCL3L3 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
 配列番号12：CCCL3L3 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
 配列番号13：CCCL4 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
 配列番号14：CCCL4 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
 配列番号15：CD83 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
 配列番号16：CD83 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
 配列番号17：CXCR4 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
 配列番号18：CXCR4 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド

10

20

30

40

50

- 配列番号 19 : F O S L 2 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
- 配列番号 20 : F O S L 2 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
- 配列番号 21 : H P 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
- 配列番号 22 : H P 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
- 配列番号 23 : H P R 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド 10
- 配列番号 24 : H P R 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
- 配列番号 25 : I F I 6 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
- 配列番号 26 : I F I 6 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
- 配列番号 27 : I L 2 7 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
- 配列番号 28 : I L 2 7 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド 20
- 配列番号 29 : L Y 6 E 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
- 配列番号 30 : L Y 6 E 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
- 配列番号 31 : M T 1 G 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
- 配列番号 32 : M T 1 G 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
- 配列番号 33 : M T 1 L 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド 30
- 配列番号 34 : M T 1 L 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
- 配列番号 35 : M T 2 A 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
- 配列番号 36 : M T 2 A 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
- 配列番号 37 : M X 2 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
- 配列番号 38 : M X 2 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド 40
- 配列番号 39 : O A S L 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
- 配列番号 40 : O A S L 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
- 配列番号 41 : R A B G E F 1 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
- 配列番号 42 : R A B G E F 1 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド
- 配列番号 43 : T H B S 1 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマー用オリゴヌクレオチド 50

【配列表】

0006347477000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100135208
弁理士 大杉 卓也
- (74)代理人 100152319
弁理士 曾我 亜紀
- (72)発明者 中島 裕史
千葉県千葉市中央区亥鼻 1 丁目 8 番 1 号 国立大学法人千葉大学大学院 医学研究院内
- (72)発明者 池田 啓
千葉県千葉市中央区亥鼻 1 丁目 8 番 1 号 国立大学法人千葉大学大学院 医学研究院内
- (72)発明者 加々美 新一郎
千葉県千葉市中央区亥鼻 1 丁目 8 番 1 号 国立大学法人千葉大学大学院 医学研究院内
- (72)発明者 鈴木 快枝
千葉県千葉市中央区亥鼻 1 丁目 8 番 1 号 国立大学法人千葉大学大学院 医学研究院内
- (72)発明者 中山 俊憲
千葉県千葉市中央区亥鼻 1 丁目 8 番 1 号 国立大学法人千葉大学大学院 医学研究院内
- (72)発明者 小原 収
千葉県木更津市かずさ鎌足 2 - 6 - 7 公益財団法人かずさDNA研究所内
- (72)発明者 野中 謙
千葉県木更津市かずさ鎌足 2 - 6 - 7 公益財団法人かずさDNA研究所内
- (72)発明者 的場 亮
神奈川県小田原市成田 5 4 0 株式会社DNAチップ研究所内

審査官 福間 信子

- (56)参考文献 特開 2 0 1 1 - 1 8 2 7 8 0 (J P , A)
特開 2 0 1 3 - 0 2 1 9 3 2 (J P , A)
SANAYAMA Y. et al. , Prediction of treatment response of Tocilizumab for Rheumatoid Arthritis with comprehensive gene expression analysis in peripheral blood mononuclear cells , EULAR 2012, FRI0208

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 9 0

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

专利名称(译)	预测类风湿性关节炎患者的抗IL-6受体抗体疗法的有效性的方法		
公开(公告)号	JP6347477B2	公开(公告)日	2018-06-27
申请号	JP2013270961	申请日	2013-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	DNA芯片RES		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人千叶 基金会上总DNA研究所 有限责任公司的DNA芯片的研究		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人千叶大学 基金会上总DNA研究所 有限责任公司的DNA芯片的研究		
[标]发明人	中島裕史 池田啓 加々美新一郎 鈴木快枝 中山俊憲 小原收 野中謙 的場亮		
发明人	中島 裕史 池田 啓 加々美 新一郎 鈴木 快枝 中山 俊憲 小原 收 野中 謙 的場 亮		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 C07K16/28 G01N33/53		
FI分类号	C12Q1/68.A C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 G01N33/53.M G01N33/53.D C07K16/18 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/09.200 C12Q1/6837.Z C12Q1/686.Z C12Q1/6876.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA12 4B024/DA03 4B024/HA14 4B024/HA15 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50		
代理人(译)	庄司隆 Shinobe百合子		
其他公开文献	JP2015123031A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在类风湿性关节炎患者的抗IL-6受体抗体治疗的功效，生物标记物提供了预测施用处理，使用生物标志物，在类风湿性关节炎患者的抗前一种预测IL-6受体抗体治疗有效性的方法。预测用抗IL-6受体抗体治疗类风湿性关节炎的有效性的方法，包括给予MT1G，IFI6，MX2并且选自OASL组成的药理学标记基因群中的至少一个还包括测量一种基因的表达水平并将测量的药物标志物基因的表达水平与用抗人IL-6受体抗体治疗类风湿性关节炎的功效相关联，提供了在该方法中使用的诊断剂和诊断试剂盒。【选型图】无

(45) 発行日 平成30年6月27日 (2018. 6. 27)

(24) 登録日 平成30年6月8日 (2018. 6. 8)

(5) Int. Cl.			F I		
C 1 2 Q	1/68	(2018. 01)	C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 N	15/00	(2006. 01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C O 7 K	16/28	(2006. 01)	C O 7 K	16/28	
G O 1 N	33/53	(2006. 01)	G O 1 N	33/53	M
			G O 1 N	33/53	D

請求項の数 7 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2013-270961 (P2013-270961)	(73) 特許権者	304021831 国立大学法人千葉大学
(22) 出願日	平成25年12月27日 (2013.12.27)		千葉県千葉市稲毛区弥生町 1 番 3 3 号
(65) 公開番号	特開2015-123031 (P2015-123031A)	(73) 特許権者	596175810 公益財団法人かずき DNA 研究所
(43) 公開日	平成27年7月6日 (2015. 7. 6)		千葉県木更津市かずき鎌足 2 - 6 - 7
審査請求日	平成28年12月26日 (2016.12.26)	(73) 特許権者	501002172 株式会社 DNA チップ研究所
			東京都港区海岸一丁目 1 5 番地 1 号 スズ エベイデアム 5 階
		(74) 代理人	100088904 弁理士 庄司 隆
		(74) 代理人	100124453 弁理士 齋延 由利子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 関節リウマチ患者に対する抗 I L - 6 受容体抗体治療の有効性予測方法