

リアルワールドデータ解析に基づく  
抗 TNF- $\alpha$  抗体医薬品の適正使用に関する研究

2022

増井 翔



# 目 次

緒 言	01
第I章 日本の保険請求データベースを利用したインフリキシマブ治療継続率調査	03
I-1 方法	04
I-2 IFX 処方継続率の解析	07
I-3 IFX 処方継続率に関連する患者特性の評価	11
I-4 IFX 処方中止後の治療パターンの記述	18
I-5 考察	18
第II章 自施設コホート調査に基づく関節リウマチ患者における血中インフリキシマブ濃度測定の有用性評価	23
第1節 血中 IFX 濃度測定による二次不応答評価	23
II-1-1 方法	24
II-1-2 対象患者の選定	26
II-1-3 RA 患者血中 IFX 濃度と臨床効果との関連性	26
II-1-4 血中 IFX 濃度に基づく患者背景および疾患活動性の比較	31
II-1-5 血中 IFX 濃度と ADA 陽性率との相関	34
II-1-6 考察	35
第2節 血中 IFX および IL-6 濃度測定による二次不応答予測	37
II-2-1 方法	37
II-2-2 対象患者	39
II-2-3 トラフ血清中 IFX および他のバイオマーカーの濃度の相関	40
II-2-4 IFX 治療中止の予測	44
II-2-5 その他の臨床イベント	44
II-2-6 考察	49

第III章	質量分析系を用いた生体内投与後のエタネルセプト構造変化の解析	51
III-1	方法	52
III-2	分析系の確立	57
III-3	RA 患者血中 ETN の N 末端プロファイル	58
III-4	マウス血中における ETN の N 末端切断	59
III-5	In vitro における ETN の N 末端切断と DPP-4 の寄与	59
III-6	考察	66
結	論	68
謝	辞	70
論	文 目 録	72
引	用 文 献	73

## 緒言

抗体医薬品は昨今の悪性腫瘍や慢性炎症性疾患の治療において不可欠な存在である。腫瘍壊死因子 (TNF)  $\alpha$  を標的とする抗 TNF- $\alpha$  抗体医薬品は、種々の慢性炎症性疾患の治療成績向上に貢献してきた<sup>13</sup>。一方、その血中薬物濃度低下に起因する治療応答性の減弱が大きな課題とされる<sup>46</sup>。血中濃度低下因子として、治療開始時の高い血中 TNF- $\alpha$  濃度<sup>7</sup>、医薬品の免疫原性に惹起され産生される抗薬物抗体 (ADA)<sup>8</sup> などが発見されてきた。抗 TNF- $\alpha$  抗体医薬品の血中濃度が治療応答性と相関することが明らかとなっており<sup>9-12</sup>、個別化投与設計支援ツールである治療薬物モニタリング (TDM) がその治療最適化に貢献すると考えられる。加えて、抗体医薬品の薬物動態を評価するうえでは、その生体内構造変化 (バイオトランスフォーメーション) を考慮する必要がある。タンパク質医薬品の開発段階において代謝物研究は不必要とされるものの、構造変化の情報は適切に薬物を定量するうえでも重要となる<sup>13</sup>。以上より、抗体医薬品を用いた治療の最適化において、その体内動態を正確に理解し評価する必要性が示唆される。

近年、臨床現場における薬物治療の実態や長期の臨床転帰の評価を目的とした、実臨床 (リアルワールド) データの活用が注目されている。治験などの無作為化比較試験は内的妥当性の最も高い研究手法であり、治療薬の有効性と安全性の評価に絶対的な役割を担う。しかし、その厳格な試験デザインに起因する研究限界が存在し<sup>14</sup>、結果はしばしば実臨床での患者集団に対する外的妥当性を欠く。無作為化比較試験の結果を補完する手段として、リアルワールドデータを用いた観察研究の実施が重要とされる<sup>15,16</sup>。リアルワールドデータはさまざまなソースから収集可能である<sup>17</sup>。保険請求データは医療保険の請求にあたって使用されたデータであり、副次的に後方視的観察研究に活用される。全国規模の医療データを利用可能であることからサンプルサイズが大きく、慢性炎症性疾患を含む希少疾患の治療実態を把握、評価するうえで役立つ。しかし、格納されるデータ種が限られ、臨床転帰や検査値は不明、あるいは欠損を伴う。また、保険診療の枠組みの中では測定されない検査項目なども利用できない。他方、電子カルテデータや患者レジストリでは、サンプルサイズが制限されるものの、患者レベルの詳細な疾病管理情報を評価可能な点に優れ、継続的なデータ収集を通じて患者の臨床転帰を経時的に調査できる。また、患者由来

の試料を利用できる場合、注目する物質の定量・定性が可能となり、治療の有効性や安全性との相関評価や因果推論を通じた新規バイオマーカーの同定が期待される。このように、リアルワールドデータはその種類に応じて格納される情報の規模や網羅性などの特徴に差異があることから、各特性を活かしたリアルワールドエビデンスの構築とそれらの統合的活用を通じて、実臨床における薬物治療の最適化が実現されうる。

以上の背景のもと、著者は抗 TNF- $\alpha$  抗体医薬品の適正使用のためのエビデンスを構築すべく、実臨床での治療応答性や体内動態に影響する因子の解明を目的に、種々のリアルワールドデータに基づく検討を行った。第 I 章では日本の保険請求データを用いて実臨床における抗 TNF- $\alpha$  抗体医薬品インフリキシマブ (IFX) の治療継続率を記述し、IFX 継続率は疾患ごとに異なること、無作為化比較試験の結果とも必ずしも一致しえないことを明らかにした。第 II 章では、自施設の関節リウマチ (RA) 患者コホート調査から、血中 IFX 濃度評価が二次不応答患者の発見につながることを見出した。また、血中 IFX 濃度と血中インターロイキン (IL) -6 濃度をあわせて評価することで、二次不応答発生のリスクを予測しうる可能性を示した。第 III 章では質量分析系を活用した構造分析により、抗 TNF- $\alpha$  抗体医薬品エタネルセプト (ETN) のバイオトランスフォーメーションを検証し、ETN の N 末端 2 アミノ酸が生体内で切断されることを見出した。

以下、本研究によって得られた結果を論述する。

## 第 I 章 日本の保険請求データベースを利用したインフリキシマブ治療継続率調査

IFX はヒト TNF- $\alpha$  に対して特異的に結合するキメラ型モノクローナル抗体医薬品である。本剤は 2002 年 1 月にクローン病 (CD) 治療の効能・効果で厚生労働省より製造販売承認を取得し、その後に潰瘍性大腸炎 (UC)、乾癬 (Pso)、RA などの適応症で追加承認を取得している。IFX の導入により、従来の治療法に抵抗性を示す患者の生活の質 (QOL) が改善された<sup>18</sup>。しかし、IFX の長期投与に伴う薬効の低下が一部患者において認められ、治療上の課題とされる<sup>6,19,20</sup>。これまでに、抗体医薬品の薬物動態および治療応答性における個体間変動に関連するいくつかの要因が報告されている<sup>21</sup>。例として、抗体医薬品の免疫原性や使用期間の長さ、疾患の活動性の高さおよび罹病期間の長さ、患者の肥満度の高さなどが、治療効果の早期消失と関連する<sup>8,22-25</sup>。このように治療効果の予測因子を理解することは、IFX 治療の個別化と患者予後の改善に役立つと考えられる。

無作為化比較試験は治療介入の有効性を評価するための標準的試験デザインである<sup>26,27</sup>。有効性とは試験環境下における治療に関連した利益や改善の程度を意味するが、そのような有効性は実臨床での有用性につながるとは限らない<sup>28</sup>。被験者には、年齢、病期、併用治療、臨床検査値などの患者特性に基づく適格基準を満たすことが要求される。また、試験期間は一般に遅発性イベントの検出には短い場合がある。このような試験デザインの制約により、無作為化比較試験は必ずしも現実の治療状況を模倣していない可能性がある<sup>14</sup>。抗体医薬品による治療を受けた RA<sup>29</sup> および CD<sup>30</sup> 患者に関する過去の研究では、無作為化比較試験の適格基準を満たす患者はそうでない患者よりも奏功率が向上したことが示されている。安全性に関しても、無作為化比較試験への参加が不適格とされた Pso 患者集団における有害事象リスクの増大が検出された<sup>31,32</sup>。これらの報告は、実臨床から得られるエビデンスを提供し、治療特性に関連する未知の側面を明らかにしうる観察研究の必要性を強調するものである<sup>15</sup>。治療継続期間は、有効性の持続のみならず、不応答、効果消失、有害事象など治療の負の側面も反映する、実臨床での治療有用性の指標とされる<sup>28</sup>。治療継続期間をアウトカムとした非介入かつ縦断的な観察研究は、実臨床における治療実態を評価し、IFX 治療の有用性を推定するために不可欠である。

本章では、臨床現場における IFX の長期的な治療実態を明らかにすることを目的に、

CD、UC、Pso、RA 患者における IFX 治療の 5 年継続率について、日本における大規模な保険請求データベースに基づき検討した。さらに、各疾患群における IFX 治療継続率に関連する患者因子を探索した。

## I-1 方法

### I-1-1 データベースと研究デザイン

株式会社日本医療データセンター (JMDC; Tokyo, Japan) が構築した保険請求データベース (JMDC データベース) を利用した<sup>33</sup>。JMDC データベースは 2015 年以降の複数の雇成型社会保険加入者とその被扶養者に関する情報から構成されている。日本国内の病院や地域薬局から健康保険組合に毎月提出される診療報酬請求書に基づき、患者の人口統計情報 (性別、年齢、保険種別)、入院・外来診療報酬請求データ、臨床診断の情報が格納されている。本研究では、2005 年 1 月から 2017 年 6 月までの加入者データを解析対象とし、JMDC データベースから抽出した CD、UC、Pso、RA 患者のデータに基づき後方視的な記述疫学研究を実施した。

### I-1-2 倫理的配慮

本研究は京都大学大学院医学研究科・医学部及び医学部附属病院医の倫理委員会の承認 (承認番号: R2517) を得て実施した。すべてのデータは被保険者ごとに作成された固有の識別番号と紐付けられており、個人を特定可能なデータは本研究では使用していない。患者情報はデータベース提供者によって匿名化されているため、インフォームドコンセントは取得しなかった。個人情報を含むオリジナルデータへのアクセスは不可能であった。

### I-1-3 IFX 治療継続率調査

#### (1) 患者組入基準

解析対象者は、国際疾病分類第 10 版 (ICD-10) および解剖学的治療化学分類 (ATC) の各コードに基づき同定した。IFX 投与の保険請求 (ATC: L04AB02、先行品とバイオシミラーとの区別なし) および CD、UC、Pso、RA いずれかの診断の両方を、調査期



間中に少なくとも一度でも受けた患者を解析対象として選択した。既報を参考に各疾患に対応する ICD-10 コードを定義し (Table I-1) <sup>34-37</sup>、これに則り患者を 4 つの疾患カテゴリーのいずれかに分類した。一部の患者は、除外できない鑑別診断として複数の診断コードを有した (例: K50、K51)。このような場合、IFX 治療期間中に最も頻繁に登録されたものを主たる診断病名とした。IFX 治療期間中に異なる複数の診断コードが同じ回数登録された場合は、IFX 治療期間を含む全期間中において最も多く登録されたコードに基づく診断病名を選択した。

Table I-1. ICD-10 codes-based definitions of diseases used in data analysis

Diseases	International Classification of Diseases 10th Revision (ICD-10) codes
CD	K50
UC	K51
Pso	L40
RA	M058, M059, M060, M068, M069

IFX 投与開始日の 4 ヶ月前から 12 ヶ月後までの間に、JMDC データベースに継続的に登録されていた患者を解析対象とした。Index date は調査期間中の IFX 初回処方日とした。無作為化比較試験と同様に、IFX の新規使用者のみを含めるため、最初の IFX 処方より少なくとも 4 ヶ月間前の期間中に IFX 処方歴がない患者のみを選択した。

## (2) 除外基準

上述の患者選択フローを経てもなお CD、UC、Pso、RA のうち複数の診断コードが登録されていた患者は除外した。また、維持療法としての用法が厚生労働省から承認される前に IFX の処方が開始された患者も除外した。日本では、2003 年 7 月に RA、2007 年 11 月に CD、2010 年 1 月に Pso、2010 年 6 月に UC で、IFX の維持療法が承認された。

#### I-1-4 変数とアウトカムの定義

本研究の主要評価項目は、IFX 治療の 5 年間継続率とした。IFX 治療の継続期間は、index date から IFX 処方中止または各観察期間（保険継続期間）の終了までとした。IFX の処方中止は、少なくとも 4 ヶ月間連続して IFX の保険請求がないことと定義した。

患者情報のうち、観察期間、IFX 開始時の年齢、および IFX の平均投与量は連続変数として解析に用いた。カテゴリカル変数は、性別、IFX 開始前 12 ヶ月以内の他の抗体医薬品の使用、IFX 開始前および開始後 3 ヶ月以内の併用薬の使用とした。IFX 開始前に使用した抗体医薬品には、日本において 2017 年 6 月までに CD、UC、Pso または RA の治療に承認されていた Table I-2 に示す医薬品を含めた。併用薬はアザチオプリン (AZA、ATC: L04AX01)、メトトレキサート (MTX、ATC: L04AX03)、プレドニゾロン (PSL、ATC: H02AB06) とした。

Table I-2. ATC codes of biologics approved for CD、UC、Pso, or RA treatment

Biologics	Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) codes
Abatacept	L04AA24
Adalimumab	L04AB04
Brodalumab	L04AC12
Certolizumab pegol	L04AB05
Etanercept	L04AB01
Golimumab	L04AB06
Ixekizumab	L04AC13
Secukinumab	L04AC10
Tocilizumab	L04AC07
Ustekinumab	L04AC05

#### I-1-5 IFX 中止後治療パターン調査

IFX 中止後 3 ヶ月および 12 ヶ月以内における再治療パターンに関するサブ解析を実施した。解析期間中に IFX 治療を中止し、その後少なくとも 6 ヶ月の追跡調査期間があった患者集団を対象とした。再治療は、上述の IFX 以外の抗体医薬品 (Table I-2)、または外用薬を除くタクロリムス (ATC : L04AD02)、シクロスポリン (ATC : S01XA18) の新規処方と定義した。

### I-1-6 統計解析

IFX 処方継続率を示すために、Kaplan-Meier 曲線を描画した。継続率の差の評価には log-rank 検定を用いた。Cox モデルにおいて、各変数が各疾患群における IFX 処方継続率に及ぼす影響の有意性を Wald 検定で検証した。各疾患群内で、Wald 検定から抽出された有意な変数に基づき患者を 2 群に分け、2 群間で IFX 治療の継続率を比較した。粗解析で有意差が認められた場合、1:1 の傾向スコア (PS) マッチングを用いて 2 群間の患者背景の差を調整し、調整後の患者集団における再解析を実施した。PS を推定するためにロジスティック回帰モデルを当てはめ、適合の正確さを評価するために c-index を算出した。最近傍マッチング法を用いて、各患者はキャリパー (0.2×標準偏差) 内で最も近い PS を持つ別の患者とマッチングした。患者背景 (Table I-3) に示した変数は、各群間の比較で着目したものを除き、すべて PS モデルに含まれた。統計的有意性は  $p < 0.05$  とした。解析には JMP® Pro 15 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) を使用した。

## I-2 IFX 処方継続率の解析

患者選択の流れを Fig I-1 に示す。観察期間中に少なくとも 1 回 IFX を処方された 1,933 名の患者データを入手した。除外基準に則り 1,155 人を解析から除外し、合計 778 名 (CD: 281 名、UC: 234 名、Pso: 41 名、RA: 222 名) を解析対象とした。対象患者の特徴を Table I-3 に示す。RA 患者を除き、患者の過半数が男性であった (CD, 82.9%; UC, 65.0%; Pso, 82.9%; RA, 30.6%)。IFX 投与開始前の 12 ヶ月間における抗体医薬品の使用は、いずれの疾患群も約 90% の患者には認められなかった (CD, 86.5%; UC, 92.7%; Pso, 92.7%; RA, 91.4%)。IFX 投与前に AZA を使用していたのは、CD 患者の 17.1%、UC 患者の 28.2% であった。IFX 投与開始後は、CD 患者の 18.9%、UC 患者の 31.2% が AZA を併用した。RA 治療において、IFX 開始前 86.0%、開始後 91.0% の患者が MTX の投与を受けた。

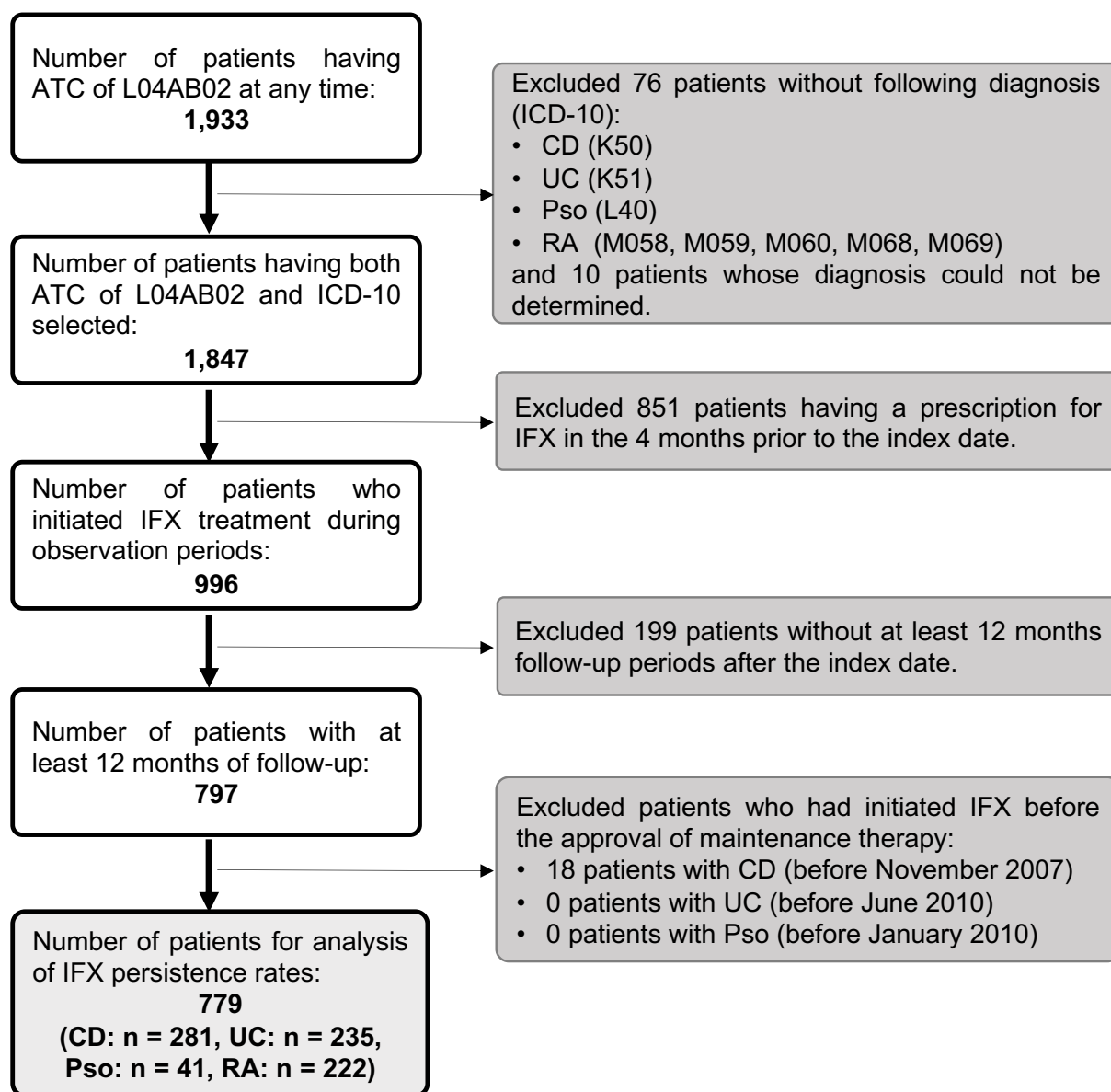


Fig I-1. Flow chart of the study selection. Abbreviations: ATC, Anatomical Therapeutic Chemical; CD, Crohn's disease; ICD-10, International Classification of Diseases 10th Revision; IFX, infliximab; Pso, psoriasis; RA, rheumatoid arthritis; UC, ulcerative colitis.

Table I-3. Demographics of patients for the analysis of IFX persistence

	CD (n=281)	UC (n=234)	Pso (n=41)	RA (n=222)
Observation (insurance) period, mean months (SD)				
	86.0 (39.0)	82.4 (36.4)	91.4 (38.2)	87.5 (37.6)
Sex, n (%)				
Male	233 (82.9)	152 (65.0)	34 (82.9)	68 (30.6)
Female	48 (17.1)	82 (35.0)	7 (17.1)	154 (69.4)
Age at IFX initiation, mean years (SD)				
	32.8 (11.6)	37.0 (13.0)	47.7 (9.1)	48.1 (11.7)
Dose of IFX (mg)				
mean (SD)	379.2 (108.2)	325.9 (70.4)	399.3 (82.9)	276.0 (89.1)
median	356.7	300.0	400.0	256.3
Pre-IFX biologics within 12 months before IFX initiation, n (%)				
None	243 (86.5)	217 (92.7)	38 (92.7)	203 (91.4)
Abatacept	NA	NA	NA	3 (1.4)
Adalimumab	38 (13.5)	17 (7.3)	2 (4.9)	3 (1.4)
Etanercept	NA	NA	NA	7 (3.2)
Tocilizumab	NA	NA	NA	6 (2.7)
Ustekinumab	0 (0.0)	NA	1 (2.4)	NA
Drug use within 3 months before IFX initiation, n (%)				
Azathioprine (ATC index: L04AX01)				
No	233 (82.9)	168 (71.8)	41 (100.0)	220 (99.1)
Yes	48 (17.1)	66 (28.2)	0 (0.0)	2 (0.9)
Methotrexate (ATC index: L04AX03)				
No	281 (100.0)	229 (97.9)	36 (87.8)	31 (14.0)
Yes	0 (0.0)	5 (2.1)	5 (12.2)	191 (86.0)
Prednisolone (ATC index: H02AB06)				
No	223 (82.9)	101 (43.2)	36 (87.8)	110 (49.6)
Yes	48 (17.1)	133 (56.8)	5 (12.2)	112 (50.5)
Drug use within 3 months of IFX initiation, n (%)				
Azathioprine (ATC index: L04AX01)				
No	228 (81.1)	161 (68.8)	41 (100.0)	220 (99.1)
Yes	53 (18.9)	73 (31.2)	0 (0.0)	2 (0.9)
Methotrexate (ATC index: L04AX03)				
No	279 (99.3)	230 (98.3)	37 (90.2)	20 (9.0)
Yes	2 (0.7)	4 (1.7)	4 (9.8)	202 (91.0)
Prednisolone (ATC index: H02AB06)				
No	237 (84.3)	114 (48.7)	34 (82.9)	99 (44.6)
Yes	44 (15.7)	120 (51.3)	7 (17.1)	123 (55.4)

Abbreviations: ATC, Anatomical Therapeutic Chemical; CD, Crohn's disease; IFX, infliximab; NA, not applicable; Pso, psoriasis; RA, rheumatoid arthritis; SD, standard deviation; UC, ulcerative colitis.

Fig I-2 は各疾患群における IFX 継続率の Kaplan-Meier 曲線である (log-rank  $p < 0.001$ )。IFX 処方後の 5 年継続率 (95%信頼区間) は、CD 群で 62.9% (55.8–69.4%)、UC 群で 38.7% (31.4–46.5%)、Pso 群で 22.1% (11.1–39.2%)、RA 群で 28.1% (21.2–36.2%) であった。UC、Pso、RA 群の IFX 治療継続期間の中央値は、それぞれ 24 カ月、12 カ月、27 カ月であった。CD 群では、50%以上の患者が IFX 治療を継続したため、継続期間の中央値は推定されなかった。

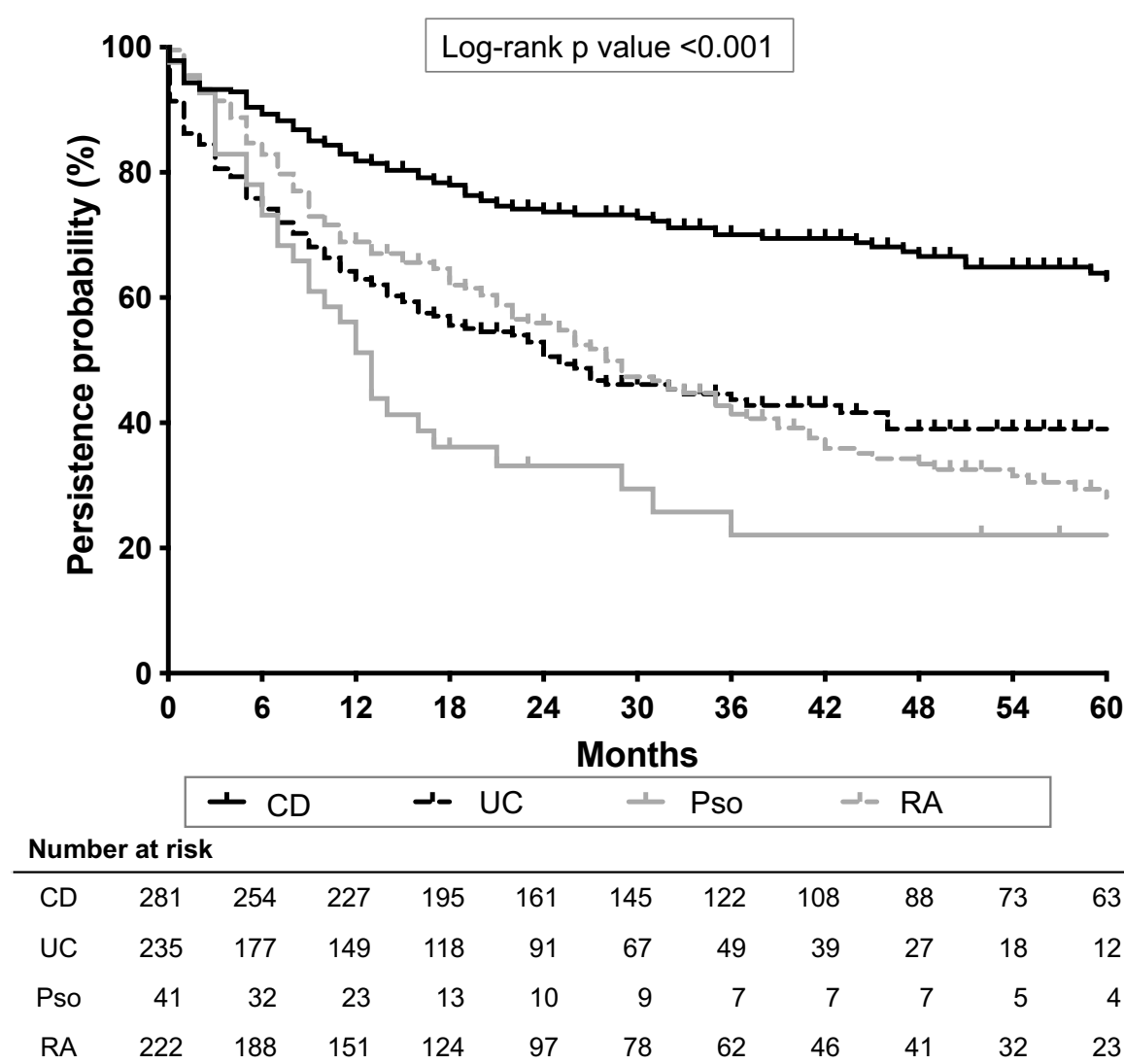


Fig I-2. Kaplan-Meier curve for IFX persistence among patients with CD, UC, Pso, and RA. Abbreviations: CD, Crohn's disease; IFX, infliximab; Pso, psoriasis; RA, rheumatoid arthritis; UC, ulcerative colitis.

### I-3 IFX 処方継続率に関連する患者特性の評価

Wald 検定に基づき、各疾患群における IFX 治療継続率への患者特性の影響の有意性を評価した。CD、UC、RA 群における個体内平均 IFX 投与量、RA 群における性別および抗体医薬品の使用歴、Pso 群における IFX 開始後 3 ヶ月以内の MTX の併用が、各推定モデルで有意な独立の共変量として抽出された (Table I-4)。MTX を併用した Pso 患者数が少なかったため、以降の解析では IFX 投与量、性別、抗体医薬品の使用歴に着目した。

Table I-4. Wald test for the significance of variables on the persistence of IFX therapy

	CD			UC			Pso			RA		
	df	$\chi^2$	p value*	df	$\chi^2$	p value*	df	$\chi^2$	p value*	df	$\chi^2$	p value*
Continuous variables												
Observation (insurance) period	1	1.598	0.206	1	2.362	0.124	1	1.975	0.160	1	0.000	0.998
Age at IFX initiation	1	2.258	0.133	1	1.436	0.231	1	3.525	0.060	1	0.320	0.572
Average dose of IFX (mg)	1	4.773	<i>0.029</i>	1	8.689	<i>0.003</i>	1	2.482	0.115	1	8.708	<i>0.003</i>
Categorical variables												
Sex	1	0.420	0.517	1	0.075	0.785	1	0.592	0.442	1	11.743	< <i>0.001</i>
Pre-IFX biologics within 12 months before IFX initiation	1	0.443	0.506	1	0.319	0.572	1	1.425	0.233	1	6.917	<i>0.009</i>
AZA use within 3 months before IFX initiation	1	0.010	0.921	1	0.266	0.606	0	0.000	—	1	1.008	0.315
MTX use within 3 months before IFX initiation	0	0.000	—	1	0.053	0.819	1	0.475	0.491	1	1.091	0.296
PSL use within 3 months before IFX initiation	1	1.207	0.272	1	0.012	0.913	1	0.620	0.431	1	0.002	0.968
AZA use within 3 months of IFX initiation	1	2.591	0.108	1	2.812	0.094	0	0.000	—	1	0.513	0.474
MTX use within 3 months of IFX initiation	1	0.156	0.693	1	0.228	0.633	1	7.351	<i>0.007</i>	1	0.545	0.461
PSL use within 3 months of IFX initiation	1	0.000	0.996	1	0.067	0.796	1	2.125	0.145	1	0.634	0.426

\* *Italics* were statistically significant. Abbreviations: AZA, azathioprine; CD, Crohn's disease; df, degree of freedom; IFX, infliximab; MTX, methotrexate; PSL, prednisolone; Pso, psoriasis; RA, rheumatoid arthritis; UC, ulcerative colitis.

Fig I-3 に示すように、高用量（中央値以上）の IFX 投与を受けた CD および UC 患者では、治療継続率が有意に高かった（log-rank  $p = 0.007$  (CD)、 $p < 0.001$  (UC)）。両群の CD および UC 患者の属性を Table I-5 に示す。背景因子の調整のため、投与量以外の変数を用いて 1:1 の PS マッチングを実施した（CD:  $n = 108$  ずつ;  $c\text{-index} = 0.660$ 、UC:  $n = 82$  ずつ;  $c\text{-index} = 0.745$ ）。マッチング後の両群の変数分布に有意な偏りは見られなかった。マッチング後においても同様のパターンが観察され、高用量投与群におけるより良好な継続傾向が記述された（CD: log-rank  $p = 0.082$ 、UC: log-rank  $p = 0.026$ ）。

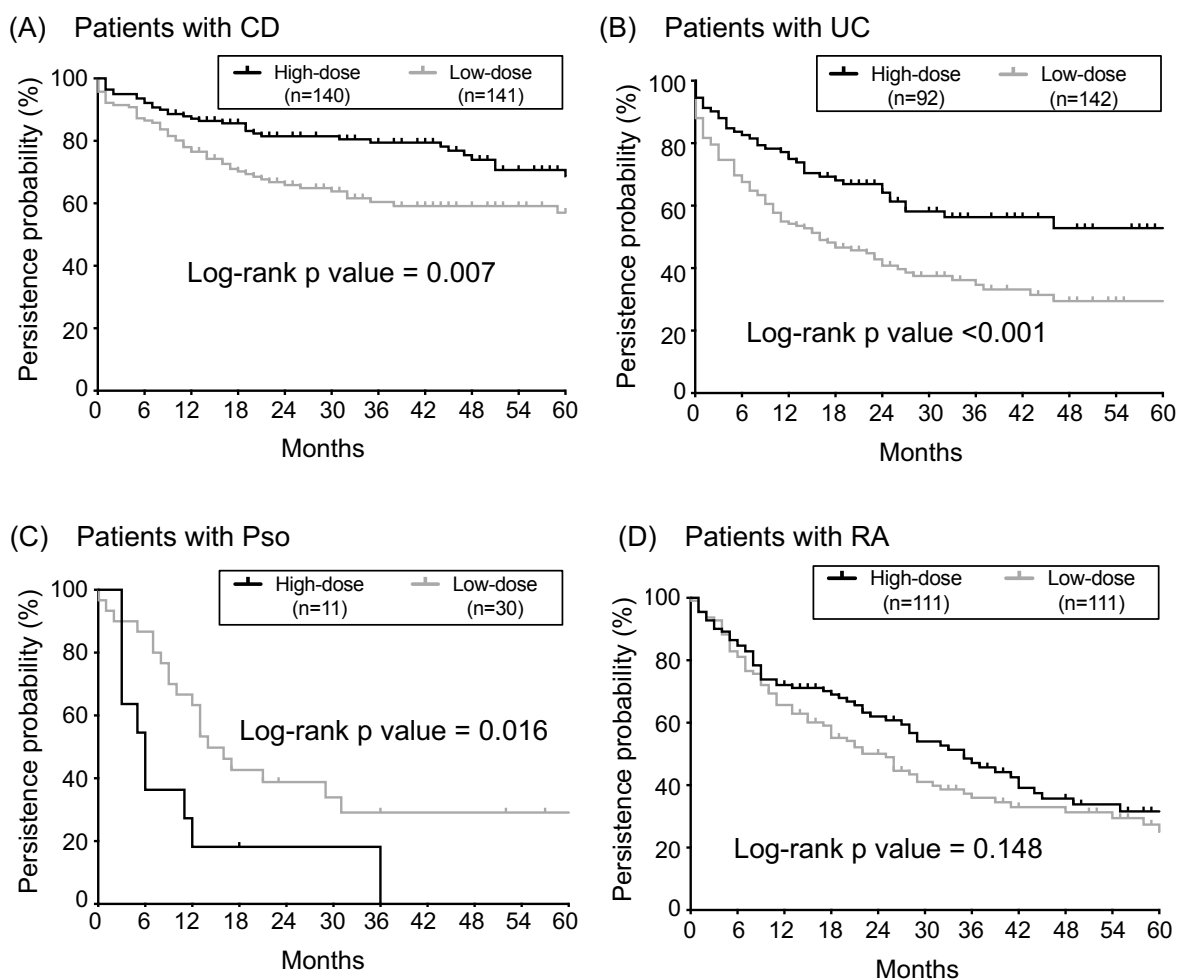


Fig I-3. Kaplan-Meier curve for IFX persistence in patients with (A) CD, (B) UC, (C) Pso, and (D) RA comparing high-dose and low-dose IFX. Abbreviations: CD, Crohn's disease; IFX, infliximab; Pso, psoriasis; RA, rheumatoid arthritis; UC, ulcerative colitis.



Table I-5. Demographic characteristics of patients with (a) CD and (b) UC before and after propensity score matching

(A) CD

	Unmatched groups			p value *	Matched groups		
	High-dose n= 140	Low-dose n= 141			High-dose n= 108	Low-dose n= 108	p value *
Observation (insurance) period, mean months (SD)							
	87.2 (37.3)	84.8 (40.7)	0.484	88.7 (37.9)	88.7 (41.6)	0.922	
Sex, n (%)							
Male	129 (92.1)	104 (73.8)	<0.001	97 (89.8)	97 (89.8)	1.000	
Female	11 (7.9)	37 (26.2)		11 (10.2)	11 (10.2)		
Age at IFX initiation, mean years (SD)							
	33.6 (11.0)	32.0 (12.2)	0.268	32.9 (10.9)	33.2 (11.8)	0.849	
Pre-IFX biologics within 12 months before IFX initiation, n (%)							
None	115 (82.1)	128 (90.8)	0.034	95 (88.0)	98 (90.7)	0.508	
Adalimumab	25 (17.9)	13 (9.2)		13 (12.0)	10 (9.3)		
Drug use within 3 months before IFX initiation, n (%)							
Azathioprine (ATC index: L04AX01)							
No	119 (85.0)	114 (80.9)	0.356	90 (83.3)	93 (86.1)	0.571	
Yes	21 (15.0)	27 (19.1)		18 (16.7)	15 (13.9)		
Methotrexate (ATC index: L04AX03)							
No	140 (100.0)	141 (100.0)	---	108 (100.0)	108 (100.0)	---	
Yes	0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)		
Prednisolone (ATC index: H02AB06)							
No	115 (82.1)	118 (83.7)	0.731	93 (86.1)	92 (85.2)	0.846	
Yes	25 (17.9)	23 (16.3)		15 (13.9)	16 (14.8)		
Drug use within 3 months of IFX initiation, n (%)							
Azathioprine (ATC index: L04AX01)							
No	115 (82.1)	113 (80.1)	0.668	89 (82.4)	91 (84.3)	0.715	
Yes	25 (17.9)	28 (19.9)		19 (17.6)	17 (15.7)		
Methotrexate (ATC index: L04AX03)							
No	140 (100.0)	139 (98.6)	0.498	108 (100.0)	108 (100.0)	---	
Yes	0 (0.0)	2 (1.4)		0 (0.0)	0 (0.0)		
Prednisolone (ATC index: H02AB06)							
No	121 (86.4)	116 (82.3)	0.337	94 (87.0)	92 (85.2)	0.694	
Yes	19 (13.6)	25 (17.7)		14 (13.0)	16 (14.8)		

## (B) UC

	Unmatched groups		p value *	Matched groups		p value *
	High-dose n = 92	Low-dose n = 142		High-dose n = 82	Low-dose n = 82	
Observation (insurance) period, mean months (SD)						
	89.3 (37.0)	77.9 (35.5)	<i>0.019</i>	89.6 (37.0)	84.0 (35.6)	0.408
Sex, n (%)						
Male	80 (87.0)	72 (50.7)	<i>&lt;0.001</i>	72 (87.8)	72 (87.8)	1.000
Female	12 (13.0)	70 (49.3)		10 (12.2)	10 (12.2)	
Age at IFX initiation, mean years (SD)						
	38.8 (11.2)	35.9 (13.9)	0.073	38.6 (11.1)	37.4 (14.3)	0.399
Pre-IFX biologics within 12 months before IFX initiation, n (%)						
None	84 (91.3)	133 (93.7)	0.497	75 (91.5)	74 (90.2)	0.787
Adalimumab	8 (8.7)	9 (6.3)		7 (8.5)	8 (9.8)	
Drug use within 3 months before IFX initiation, n (%)						
Azathioprine (ATC index: L04AX01)						
No	66 (71.7)	102 (71.8)	0.988	57 (69.5)	54 (65.9)	0.616
Yes	26 (28.3)	40 (28.2)		25 (30.5)	28 (34.1)	
Methotrexate (ATC index: L04AX03)						
No	88 (95.6)	141 (99.3)	0.080	82 (100.0)	82 (100.0)	---
Yes	4 (4.4)	1 (0.7)		0 (0.0)	0 (0.0)	
Prednisolone (ATC index: H02AB06)						
No	38 (41.3)	63 (44.4)	0.644	34 (41.5)	36 (43.9)	0.752
Yes	54 (58.7)	79 (55.6)		48 (58.5)	46 (56.1)	
Drug use within 3 months of IFX initiation, n (%)						
Azathioprine (ATC index: L04AX01)						
No	66 (71.7)	95 (66.9)	0.435	58 (70.7)	53 (64.6)	0.404
Yes	26 (28.3)	47 (33.1)		24 (29.3)	29 (35.4)	
Methotrexate (ATC index: L04AX03)						
No	88 (95.6)	142 (100.0)	<i>0.023</i>	82 (100.0)	82 (100.0)	---
Yes	4 (4.4)	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	
Prednisolone (ATC index: H02AB06)						
No	44 (47.8)	70 (49.3)	0.826	39 (47.6)	43 (52.4)	0.532
Yes	48 (52.2)	72 (50.7)		43 (52.4)	39 (47.6)	

\* Statistical difference was assessed using the Wilcoxon test for continuous variables and by the chi-squared test or Fisher's exact test for categorical variables. *Italics* were statistically significant. Abbreviations: ATC, Anatomical Therapeutic Chemical; CD, Crohn's disease; IFX, infliximab; SD, standard deviation; UC, ulcerative colitis.

RA 群において、男性患者よりも女性患者の IFX 継続率が高かった (log-rank  $p=0.016$ 、Fig I-4)。RA 患者の男性、女性間の背景因子の差異を Table I-6 に示す。性別以外の変数を用いた 1:1 の PS マッチングの実施後、群間の変数分布に有意差は観察されず ( $n=59$  ずつ; c-index=0.737)、マッチング後も同様の IFX 治療継続パターンが観察された (log-rank  $p=0.011$ )。また、Fig I-5 に示すように、抗体医薬品の使用歴がない RA 患者では、より長期に IFX 治療を継続する傾向が見られた (log-rank  $p=0.052$ )。

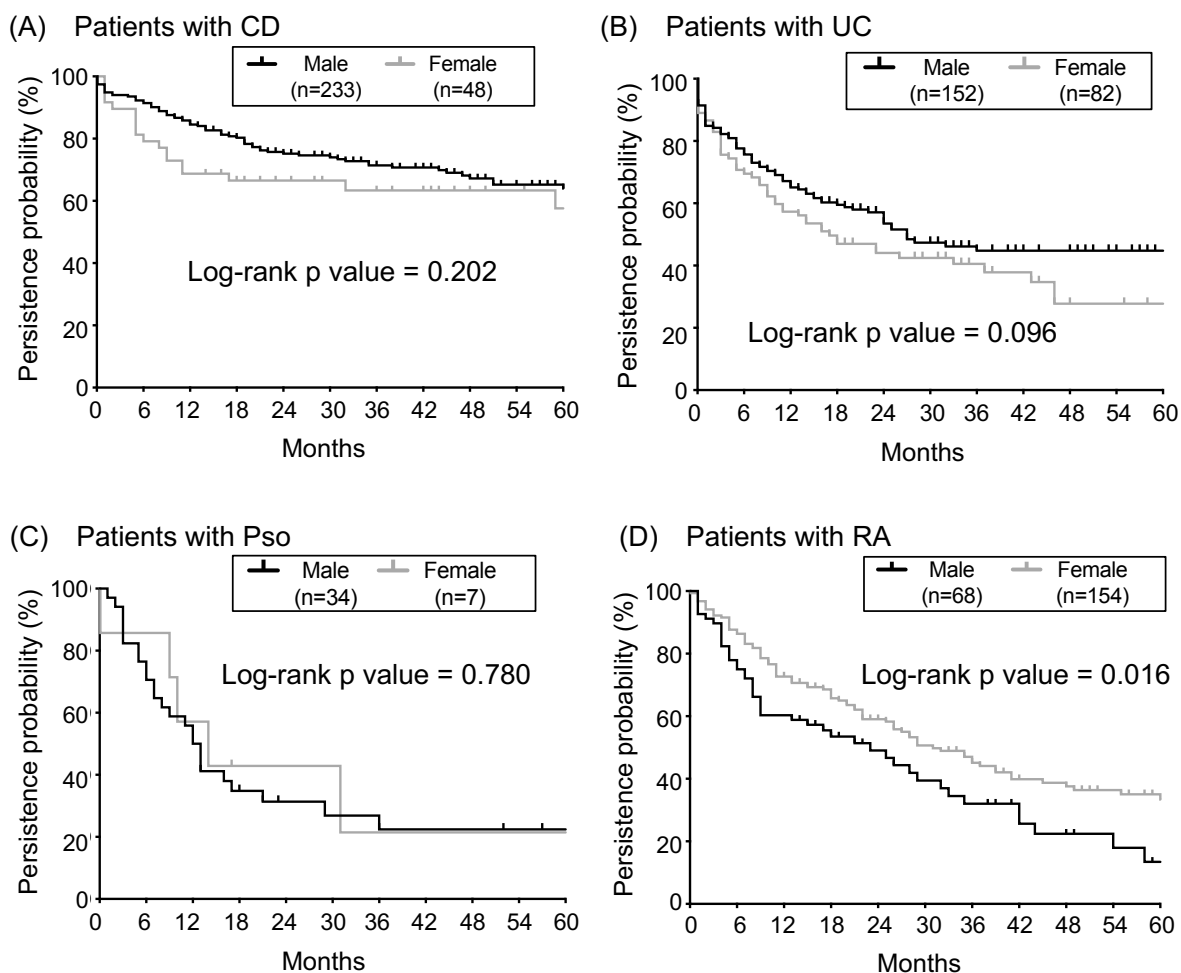


Fig I-4. Kaplan-Meier curve for IFX persistence comparing sex in patients with (A) CD, (B) UC, (C) Pso, and (D) RA. Abbreviations: CD, Crohn's disease; IFX, infliximab; Pso, psoriasis; RA, rheumatoid arthritis; UC, ulcerative colitis.

Table I-6. Demographic characteristics of patients with RA before and after propensity score matching

	Unmatched groups		p value*	Matched groups		p value*
	Male n = 68	Female n = 154		Male n = 59	Female n = 59	
Observation (insurance) period, mean months (SD)						
	86.7 (38.9)	87.9 (37.2)	0.656	89.0 (39.5)	97.3 (37.8)	0.211
Age at IFX initiation, mean years (SD)						
	46.4 (11.9)	48.9 (11.5)	0.187	46.4 (12.3)	47.4 (11.5)	0.773
Average dose of IFX (mg), mean (SD)						
	319.8 (109.7)	256.7 (70.6)	< 0.001	299.0 (79.8)	290.5 (83.5)	0.543
Pre-IFX biologics within 12 months before IFX initiation, n (%)						
None	64 (94.1)	139 (90.3)	0.343	55 (93.2)	55 (93.2)	0.763
Abatacept	0 (0.0)	3 (1.9)		0 (0.0)	0 (0.0)	
Adalimumab	0 (0.0)	3 (1.9)		0 (0.0)	0 (0.0)	
Etanercept	2 (2.9)	5 (3.3)		2 (3.4)	3 (5.1)	
Tocilizumab	2 (2.9)	4 (2.6)		2 (3.4)	1 (1.7)	
Drug use within 3 months before IFX initiation, n (%)						
Azathioprine (ATC index: L04AX01)						
No	68 (100.0)	152 (98.7)	1.000	59 (100.0)	59 (100.0)	---
Yes	0 (0.0)	2 (1.3)		0 (0.0)	0 (0.0)	
Methotrexate (ATC index: L04AX03)						
No	14 (20.6)	17 (11.0)	0.059	9 (15.2)	11 (18.6)	0.624
Yes	54 (79.4)	137 (89.0)		50 (84.8)	48 (81.4)	
Prednisolone (ATC index: H02AB06)						
No	26 (38.2)	84 (54.6)	0.025	23 (39.0)	24 (40.7)	0.851
Yes	42 (61.8)	70 (45.4)		36 (61.0)	35 (59.3)	
Drug use within 3 months of IFX initiation, n (%)						
Azathioprine (ATC index: L04AX01)						
No	67 (98.5)	153 (99.4)	0.520	59 (100.0)	59 (100.0)	---
Yes	1 (1.5)	1 (0.6)		0 (0.0)	0 (0.0)	
Methotrexate (ATC index: L04AX03)						
No	8 (11.8)	12 (7.8)	0.341	6 (10.2)	5 (8.5)	1.000
Yes	60 (88.2)	142 (92.2)		53 (89.8)	54 (91.5)	
Prednisolone (ATC index: H02AB06)						
No	28 (41.2)	71 (46.1)	0.496	22 (37.3)	24 (40.7)	0.706
Yes	40 (58.8)	83 (53.9)		37 (62.7)	35 (59.3)	

\* Statistical difference was assessed using the Wilcoxon test for continuous variables and by the chi-squared test or Fisher's exact test for categorical variables. *Italics* were statistically significant. Abbreviations: ATC, Anatomical Therapeutic Chemical; IFX, infliximab; RA, rheumatoid arthritis; SD, standard deviation.

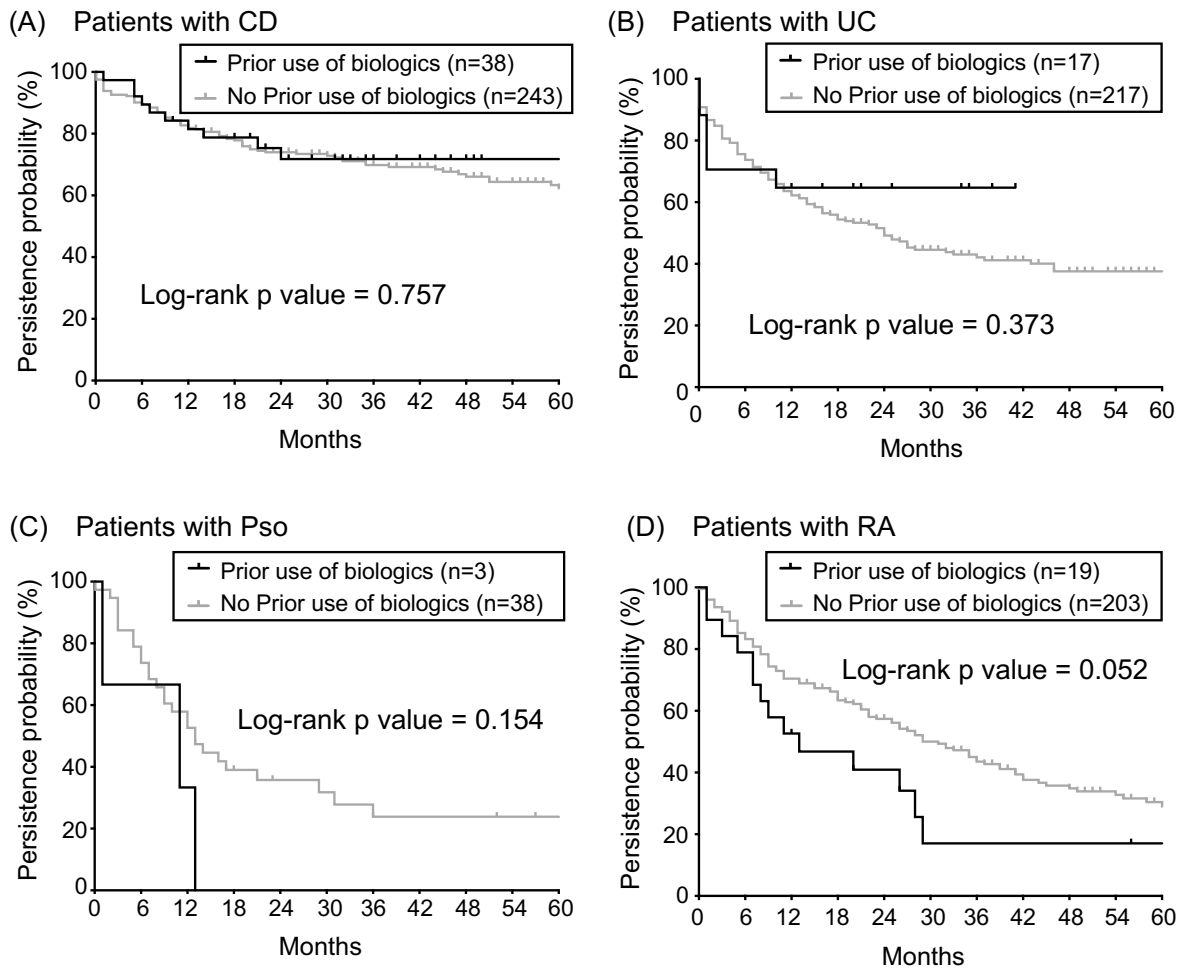


Fig I-5. Kaplan-Meier curve for IFX persistence in patients with (A) CD, (B) UC, (C) Pso, and (D) RA, comparing the presence or absence of prior exposure to other biologic agents within 12 months before IFX initiation. Abbreviations: CD, Crohn's disease; IFX, infliximab; Pso, psoriasis; RA, rheumatoid arthritis; UC, ulcerative colitis.

#### I-4 IFX 処方中止後の治療パターンの記述

解析期間中に IFX 治療を中止した患者を対象に、IFX 治療の再開を含む再治療パターンの副次的解析を行った。継続率解析に登録された 778 名の患者のうち、IFX 投与中止後 6 ヶ月間の追跡調査期間を完了しなかった 415 名を除外し、363 名を対象に解析を行った (CD: n=85、UC: n=120、Pso: n=30、RA: n=128)。IFX 投与中止後 3 ヶ月および 12 ヶ月以内の再治療の発生数と割合を Table I-7 に示した。Pso と RA では、半数以上の患者が投与中止後 3 ヶ月以内に他の抗体医薬品やカルシニューリン阻害剤を投与された。Pso 患者での新規治療開始割合が最も高く、アダリムマブあるいはウステキヌマブを用いた再治療の頻度が高かった (12 ヶ月以内にアダリムマブ: 36.7%、ウステキヌマブ: 30.0%)。ETN、ゴリムマブ、トシリズマブの投与開始が、RA 患者の 10%以上において認められた (12 ヶ月以内に ETN: 12.5%、ゴリムマブ: 10.9%、トシリズマブ: 17.2%)。CD 患者において、アダリムマブによる再治療が最も多く認められた (12 ヶ月以内に 42.4%)。UC 患者においては、3 ヶ月および 12 ヶ月以内にそれぞれ 63.3%および 53.3%の患者がいずれの再治療も開始しなかったが、アダリムマブによる再治療が最も多く認められた (3 ヶ月、12 ヶ月以内にそれぞれ 22.5%、25.0%)。

#### I-5 考察

観察研究において治療継続期間は、治療有用性を反映する重要な指標とされる。これまでの代表的な無作為化比較試験の報告では、IFX の 1 年後の奏効率は CD 患者群で 40%、UC 患者群で 45%、Pso 患者群で 60%、RA 患者群で 52%であった<sup>38,41</sup>。CD 患者で比較的低い奏効率が報告されたにもかかわらず、本研究では CD 群での IFX 治療 5 年継続率が最も高く記述された<sup>38</sup>。1 年継続率に関しては、本研究の結果 (78%) は既報<sup>38</sup> (79%) と同程度であった。他方、Pso 群および RA 群における IFX 治療 1 年継続率 (それぞれ 52%および 69%) は、無作為化比較試験での結果 (Pso 群では 78 週目に 80%、RA 群では 54 週目に 79%) に比べて低かった<sup>40,41</sup>。これらの結果から、無作為化比較試験にて観察された結果は、必ずしも実臨床における治療継続率を反映しえないことが示唆された。

Table I-7. Number (proportions) of patients who started biologics or immunosuppressants within 3 and 12 months of discontinuation of IFX

	CD (n=85)			UC (n=120)			Pso (n=30)			RA (n=128)		
	3 M	12 M	$\Delta^*$	3 M	12 M	$\Delta^*$	3 M	12 M	$\Delta^*$	3 M	12 M	$\Delta^*$
None	52 (61.2)	28 (32.9)	-24	76 (63.3)	64 (53.3)	-12	10 (33.3)	4 (13.3)	-6	63 (49.2)	47 (36.7)	-16
Biologics												
Abatacept	NA		—	NA		—	NA		—	4 (3.1)	4 (3.1)	$\pm 0$
Adalimumab	33 (38.8)	36 (42.4)	+3	27 (22.5)	30 (25.0)	+3	9 (30.0)	11 (36.7)	+2	8 (6.3)	9 (7.0)	+1
Etanercept	NA		—	NA		—	NA		—	15 (11.7)	16 (12.5)	+1
Golimumab	NA		—	0 (0.0)	0 (0.0)	$\pm 0$	NA		—	13 (10.2)	14 (10.9)	+1
Infliximab	—	21 (24.7)	+21	—	8 (6.7)	+8	—	1 (3.3)	+1	—	12 (9.4)	+12
Secukinumab	NA		—	NA		—	3 (10.0)	3 (10.0)	$\pm 0$	NA		—
Tocilizumab	NA		—	NA		—	NA		—	21 (16.4)	22 (17.2)	+1
Ustekinumab	0 (0.0)	0 (0.0)	$\pm 0$	NA		—	7 (23.3)	9 (30.0)	+2	NA		—
Immunosuppressant (Calcineurin inhibitor)												
Tacrolimus	0 (0.0)	0 (0.0)	$\pm 0$	16 (13.3)	17 (14.2)	+1	0 (0.0)	1 (3.3)	+1	4 (3.1)	4 (3.1)	$\pm 0$
Cyclosporine	NA		—	1 (0.8)	1 (0.8)	$\pm 0$	1 (3.3)	1 (3.3)	$\pm 0$	NA		—

Analysis was conducted for patients who discontinued IFX during the study period and had at least a 6-month follow-up period. \* $\Delta$  was defined as the difference in the number of patients from 3- to 12-month (M). Abbreviations: CD, Crohn's disease; IFX, infliximab; NA, not applicable; Pso, psoriasis; RA, rheumatoid arthritis; UC, ulcerative colitis.

加えて、本研究では IFX 治療の継続率が疾患によって異なることが示された。CD<sup>34,42,43</sup>、UC<sup>35,44</sup>、Pso<sup>36,45</sup>、RA<sup>37,46-48</sup> 患者における過去の長期の観察研究では、調査期間、患者選択基準、治療中止の定義などのデザインは各研究で異なったものの、本研究と同様の結果が報告されている。IFX 治療に対する二次不応答の原因の一つに、免疫原性に起因する ADA の形成が考えられる。しかし、過去に報告された各疾患における IFX に対する ADA 発現率<sup>22</sup>は、本研究での IFX 処方継続率との関連を示さなかった。治療継続期間は治療効果の持続だけでなく、副作用や効果の消失、服薬遵守率などを考慮した複合的な尺度であるため<sup>28</sup>、ADA という単一の要因では説明できないと考えられる。IFX 治療継続率が疾患によって異なる根本的メカニズムは不明であるものの、疾患ごとの IFX に対する感受性の相違、有害事象の特徴、代替治療法の多さなどが要因として考えられる。

本研究では、IFX 治療の継続に関連する因子を探索、評価した。CD および UC 患者において、IFX 高用量投与群でのより高い治療継続率が示された。CD 患者を対象とした無作為化比較試験では、維持用量 10 mg/kg 投与群において 5 mg/kg 投与群より高い奏率が示された<sup>38</sup>。一方、UC 患者を対象とした試験では、5 mg/kg および 10 mg/kg 投与群の間で臨床効果に有意差は認められなかった<sup>39</sup>。これらの結果に基づき、日本では 2011 年より CD 治療において IFX の 10 mg/kg までの用量設定が承認されている一方、UC 治療における IFX 最大用量は 5 mg/kg とされ、増量は承認されていない。本研究では体重に関するデータは利用できなかったが、CD の単回投与量の中央値 (356.7 mg) は UC (300.0 mg) よりも高く、各疾患での承認用量と関連していることが確認された。このことから、CD および UC の患者において、IFX の高用量投与は治療応答性低下の回避に寄与する可能性が示唆された。

いくつかの疾患群では性差が認められた。本検討では、CD および UC の女性患者は IFX 治療を中止しやすい傾向が示された。一方、女性の RA 患者は男性よりも有意に長く IFX 治療を継続した。これまでの報告では、女性であることが抗 TNF 療法継続の予後不良因子とされている<sup>23,25,49</sup>。このメカニズムについて、Pso の女性患者では副作用に関連して治療満足度が低いことが報告された<sup>49</sup>。また、女性の RA 患者では血中 IFX 濃度が低く ADA 陽性を示す傾向にあることが示された<sup>50</sup>。体脂肪率および脂肪分布における性差もメカニズムとして議論されている<sup>51</sup>。一方、IFX 治療継続性に性別は影響しないと報告する研究もあり<sup>52-54</sup>、性差の影響は依然として重要な研究課題である。さまざまな研究から治療継続率が報告されている一方、その評価方法には研究間で顕著な異質性が存在する<sup>55</sup>。本研究では、同一のデータベースに格納される種々の炎症性疾患患者データについて同一の解析方法を用いて調査したことで、結果の直接の比較が可能であった。本研究において、性別の影響が CD/UC 患者と RA 患者間で異なる理由は不明であるが、喫煙状況などの未測定および未調整の交絡因子に起因する可能性が考えられる<sup>56</sup>。IFX の治療継続性に及ぼす性別の影響を明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

IFX を用いた一次治療と二次治療における継続率の差異が観察された。本研究において、抗体医薬品による治療歴のある RA 患者では IFX の継続期間が比較的短いことが示された。一方、CD/UC 患者ではそのような差は認められなかった。Gil-Candel らの研究で



は、CD/UC 患者に対する IFX の一次治療と二次治療において同様の継続率が記述されており<sup>57</sup>、本研究結果と同様の傾向が示された。RA 患者を対象とした既報は、以前に使用した抗体医薬品に抵抗性を示した患者に対して IFX への切り替えが有効であると報告している<sup>58-60</sup>。しかし、これらの研究ではサンプルサイズが比較的小さく、研究期間が短いことが限界として指摘されている。さらに、他の研究においては、抗体医薬品による治療歴は治療効果や寛解率の低下と有意に関連することが報告されている<sup>61,62</sup>。IFX による二次治療の有用性は一次治療に比して低い可能性があり、二次治療を受ける RA 患者にはより慎重なモニタリングが必要である。

本研究は保険請求データベースを用いた記述的後ろ向き観察研究であり、結果の解釈においては以下の点に留意が必要である。第一に、本研究に用いたデータは日本の被雇用者保険制度における従業員とその家族の保険請求データから成る JMDC データベース由来のものであるため、対象集団に若年層への偏りがあり、すべての患者（特に高齢者）を代表する結果とはなりえない。第二に、データベースの特性上、有害事象などの毒性による治療中止と寛解による治療中止との区別は不可能であった。JMDC データベースには、疾患活動性、検査データ、薬剤中止理由など、いくつかの臨床データは格納されない。有害事象は一般的な治療中止理由の一つとして報告されている一方、臨床的寛解は中止の主な理由ではない<sup>63,64</sup>。本研究では、IFX 中止後 3 ヶ月以内に約 40~70% の患者で再治療が開始された。また、寛解達成後の抗体医薬品の使用中止はいくつかの臨床試験において試みられているが、実臨床においてははまだ一般的ではない<sup>65-68</sup>。第三に、Pso 患者群のサンプルサイズが非常に小さかった。今後、Pso 療法における IFX 継続率の影響因子を検証するために、より大きなサンプルサイズの患者集団での研究が必要である。最後に、他のすべての保険請求データ解析と同様に、データベース上の不適切なコーディングの可能性もある。本研究においては、患者を治療期間または観察期間中に最も多く記録された CD、UC、Pso、RA の診断コードに従って分類した。

以上、本章において IFX 治療の継続率は種々の慢性炎症性疾患ごとに異なり、疾患により治療への応答性が異なる可能性が明らかとなった。また、無作為化比較試験で報告された臨床効果は、必ずしも日常臨床における治療継続率を反映しえないことが示唆された。加えて、治療継続率に影響しうるいくつかの臨床情報を同定した。性別や抗体医

薬品への曝露歴などの患者特性は、RA 治療における IFX 治療継続性に影響を与える可能性が示された。CD および UC 患者における IFX 治療は、投与量の漸増に応じてより長期に継続できる可能性が考えられた。持続的な治療効果を得るため、患者特性に基づいた IFX 適切使用の重要性が示唆される。

## 第Ⅱ章 自施設コホート調査に基づく関節リウマチ患者における血中インフリキシマブ濃度測定の有用性評価

IFX 治療は RA の治療成績を大幅に改善した<sup>41,69</sup>。しかし、一部の患者では IFX 治療の効果が十分に得られない（一次不応答）、あるいは治療の経過とともに減弱、消失すること（二次不応答）が報告されている<sup>39,70-72</sup>。治療開始後 1 年間に RA 患者の約半数が二次不応答を経験するという報告があり<sup>19</sup>、また別の研究では効果不十分を理由とする IFX の中止率は治療開始後 36 ヶ月時点で 32.1%と示された<sup>73</sup>。IFX 治療における課題のひとつは、長期治療における二次不応答を回避することである。

近年、抗体医薬品の薬物動態とその影響因子が徐々に明らかとなってきた。ADA は血中薬物濃度を低下させ、治療応答性の消失の主要因となる<sup>8,74,75</sup>。IFX を投与された RA 患者の約 10~60%において、投与開始後 6 ヶ月以内に ADA が発現することが報告されている<sup>9,22,76,77</sup>。また、治療開始前の血中 TNF- $\alpha$ 濃度も血中 IFX 濃度を低下させる要因の一つとされる<sup>7</sup>。胎児性 Fc 受容体 (FcRn) は、抗体のリサイクリング機能を介してその体内動態に作用する<sup>78,79</sup>。抗体医薬品の薬物動態における大きな個体間・個体内変動が報告されており<sup>21</sup>、IFX 治療戦略を開発するうえでもそうした変動を考慮する必要がある。

### 第 1 節 血中 IFX 濃度測定による二次不応答評価

TDM は医薬品の個別化投与設計を支援するツールであり、臨床現場では免疫抑制薬や抗てんかん薬などを対象にその血中濃度測定に基づいた投与量の調整に利用される。著者らは小児希少疾患に対する IFX 治療において、TDM に基づく投与量調整が血中薬物濃度の上昇をもたらし、病勢管理に寄与した症例を経験した<sup>80</sup>。RA 患者では、本邦で実施された RISING 試験<sup>10</sup>をはじめ、無作為化比較試験のサブ解析において血中 IFX 濃度と疾患活動性との相関が示されている。非介入の後方視的観察研究においても、治療開始後 52 週時点の血中 IFX 濃度が奏功率と関連することが報告されている<sup>9</sup>。このように血中 IFX 濃度と治療効果との関係は複数の研究で示されており<sup>9-12</sup>、治療最適化に TDM の活用が期待される。しかし、日常診療における血中 IFX 濃度測定の臨床的意義やその実装方法は依然として確立していない。

本節では、自施設の RA 患者コホートデータベースを利用し、実臨床における IFX の TDM の実用性を検討することを目的に後方視的観察研究を実施した。

## II-1-1 方法

### II-1-1-1 対象患者

京都大学医学部附属病院リウマチセンターが 2011 年に設立した Kyoto University Rheumatoid Arthritis Management Alliance (KURAMA) コホートに登録された RA 患者を対象とした<sup>8)</sup>。すべての患者は 1987 年改訂版米国リウマチ学会 (ACR) または 2010 年版 ACR/欧州対リウマチ連盟 (EULAR) の RA 分類基準を満たした。本研究では、2011 年 1 月 1 日から 2018 年 12 月 31 日までの KURAMA コホート登録データを使用した。本研究への参加登録について、すべての患者から書面によるインフォームドコンセントを得た。本研究は「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」を遵守し、京都大学大学院医学研究科・医学部及び医学部附属病院医の倫理委員会の承認 (承認番号: R0357) を得て実施した。

### II-1-1-2 データ収集と疾患活動性の評価

ベースラインの患者の臨床情報として年齢、体重、性別、RA 罹病期間、週あたりの MTX 投与量、経口糖質コルチコイド使用有無、従来型合成疾患修飾性抗リウマチ薬 (csDMARDs) 使用有無、圧痛関節数 (TJC)、腫脹関節数 (SJC)、C 反応タンパク質 (CRP) 値、リウマトイド因子 (RF) のデータを収集した。また、採血時点での IFX 治療期間を調査した。csDMARDs にはアクタリット、金チオリンゴ酸ナトリウム、オーラノフィン、ブシラミン、イグラチモド、レフルノミド、ミゾリビン、サラゾスルファピリジン、シクロスポリン、タクロリムスを含めた。疾患活動性は、the 28 joint disease activity score incorporating erythrocyte sedimentation rate (DAS28-ESR)、clinical disease activity index (CDAI)、simplified disease activity index (SDAI)、および health assessment questionnaire-disability index (HAQ-DI) に基づき評価した。ベースラインは IFX 治療導入前 3 ヶ月以内の最後のデータとした。EULAR 反応基準に基づき、IFX 治療に good/moderate response を示した患者を responder、no response を示した患者を non-responder と定義した。

### II-1-1-3 血中IFX濃度測定

患者の血清試料をIFX投与直前に採取した（トラフ血清）。血中IFX濃度はトリプル四重極型逆相液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計（LC-MS/MS; Nexera ×2 および LCMS-8060、Shimadzu, Kyoto, Japan）を用いて測定した<sup>82-84</sup>。血清中免疫グロブリン G（IgG）の抗原結合領域（Fab）からペプチドを得るために、nSMOL™ Antibody BA Kit（Shimadzu, Kyoto, Japan）を用いて、付属のプロトコルにしたがって血清試料の前処理を実施した。本測定系におけるIFXの定量下限は0.293 µg/mLであった。

### II-1-1-4 血中ADAの検出

電気化学発光（ECL）法によりIFXに対するADAの検出を行った<sup>85,86</sup>。ストレプトアビジンを固相したマイクロプレート（MSD GOLD 96-well Streptavidin QUICKPLEX Plate, Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD, USA）に150 µL/wellのブロッキング溶液（3% MSD BlockerA）を添加し、一晩4°Cに静置することでブロッキングした。20 µg/mLのビオチン化IFXと20 µg/mLのルテニウム標識IFXをassay diluent（1% MSD BlockerA）中に1:1の割合で混和しmaster mixを調製した。96 wellプレートの各ウェルにassay diluentで10倍希釈した血清試料25 µLとmaster mix 50 µLを加え、穏やかに攪拌しながら23°Cで2時間インキュベートした。200 µLの洗浄液（0.05% Tween 20 in PBS）で3回洗浄後、前述の調製試料50 µLをストレプトアビジン固相マイクロプレートの対応する各ウェルに移し、プレートを穏やかに攪拌しながら23°Cで1時間インキュベートした。その後プレートを3回洗浄し、150 µLの反応試薬（MSD Read Buffer T [4×]を超純水で2倍希釈したもの）を各ウェルに添加した。MESO QuickPlex SQ120（Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD, USA）を用いて、溶液からのECLシグナルを測定した。

### II-1-1-5 統計解析

統計解析はGraphPad Prism 7（GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA）を用いて実施した。非正規分布データは中央値で表し、ノンパラメトリック検定（Mann-Whitney U 検定またはWilcoxon signed-rank 検定）を用いて分析した。カテゴリカルデータは割合で表示し、フィッシャーの正確検定を使用して分析した。初回の治療応答までの時間と応答消

失までの時間を評価するために、Kaplan-Meier法を使用した。治療応答性を予測するための最適な血中 IFX 濃度のカットオフ値を決定するために、JMP<sup>®</sup> Pro14 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) を用いて受信者動作特性 (ROC) 曲線をプロットした。解析結果は、 $p < 0.05$  をもって統計的に有意とみなした。

## II-1-2 対象患者の選定

IFX を投与された 311 名の RA 患者のうち、210 名は維持療法中のトラフ血清試料が得られなかったため除外された。IFX は、導入期では 0、2、6 週目に投与され、以降の維持期では 8 週ごとに投与されるが、本研究では開始後 112 日目 (16 週目) を維持期の開始と定義した。さらに、IFX の開始日および測定日の DAS28-ESR データが得られなかった 55 名の患者が除外された。なお、IFX 投与開始日および測定日の当日に DAS28-ESR が記録されていない場合は、IFX 投与開始前 56 日以内の来院時、および IFX 測定前後 56 日以内の来院時の DAS28-ESR 値を使用した。また、IFX 導入前にすでに臨床的寛解 (DAS28-ESR  $< 2.6$ ) に達していた 5 名の患者を除外し、41 名の患者が解析の対象となった (Fig II-1)。全患者 (n=311) と解析対象患者 (n=41) のベースラインにおける患者背景を Table II-1 に示した。

## II-1-3 RA 患者血中 IFX 濃度と臨床効果との関連性

Fig II-2 (A) に IFX 治療導入後の DAS28-ESR の変化を示した。大きな日間変動および個体間差が認められた。Kaplan-Meier 曲線から、実臨床では IFX 導入後 12 週間以内に 80% 以上の患者が奏効を示し (Fig II-2 (B))、また最初の奏効から 48 週間以内に約 40% の患者が奏効を消失した (Fig II-2 (C))。

血中薬物濃度測定時点では responder が 34 名、non-responder が 7 名であった (Fig II-3 (A))。血中 IFX 濃度は、non-responder に比べ responder において有意に高かった (Fig II-3 (B))。ROC 曲線から responder と non-responder を区別するカットオフ値は  $0.319 \mu\text{g/mL}$  (Fig II-3 (C))、 $\text{AUC} = 0.87$ 、感度 = 94.1%、特異度 = 85.7%) と算出された。これをもとに、以降の解析ではカットオフ値を  $0.32 \mu\text{g/mL}$  に設定した。

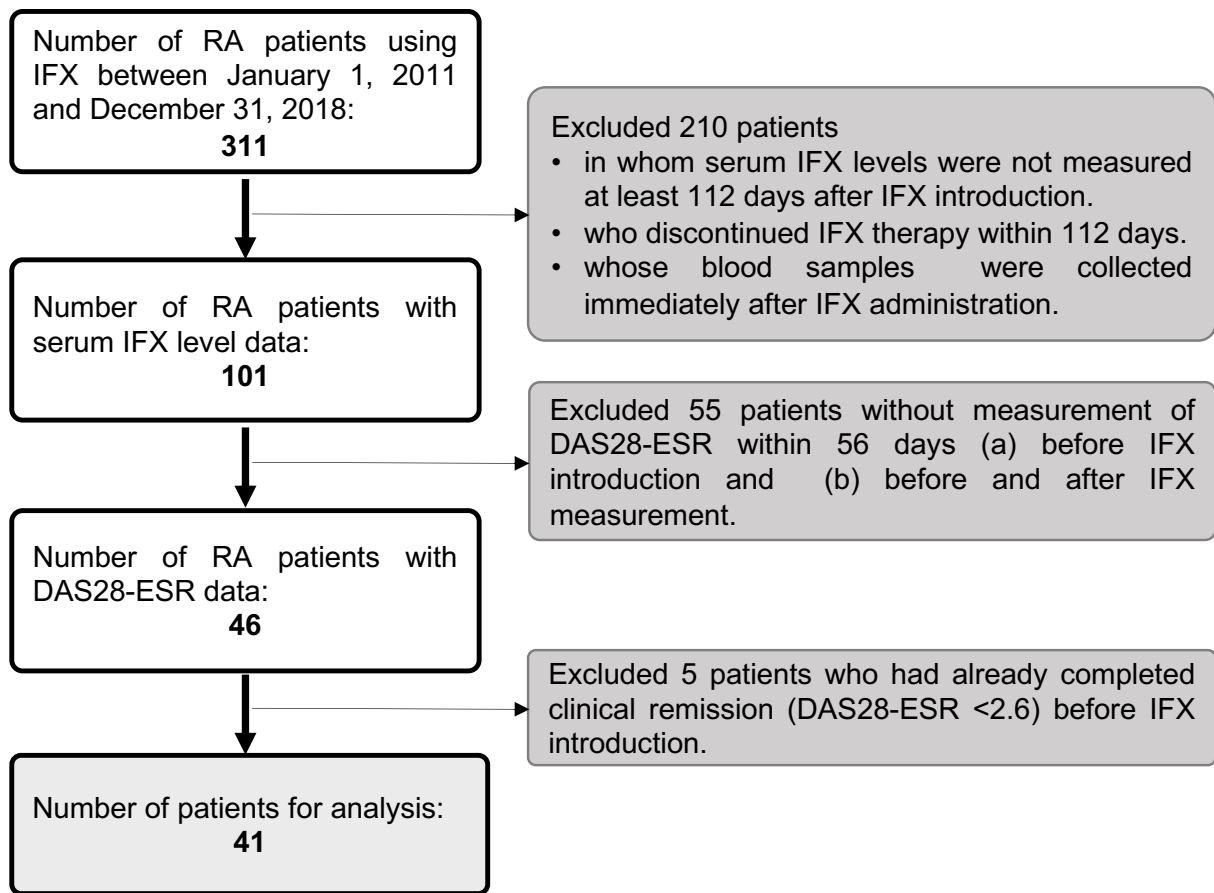


Fig II-1. Flowchart on patient inclusion and exclusion. Abbreviations: DAS28-ESR, the 28 joint disease activity score incorporating erythrocyte sedimentation rate; IFX, infliximab; RA, rheumatoid arthritis.

Table II-1. Baseline demographics and clinical characteristics of the patients in total population and study cohort

Characteristics	Total population (n=311)		Study cohort (n=41)		p value
Year of IFX initiation	n=299		n=41		<i>&lt; 0.01</i>
–2010/12/31, no. (%)		157 (52.5)		0 (0.0)	
2011/1/1 – 2014/12/31, no. (%)		105 (35.1)		26 (63.4)	
2015/1/1 – 2018/12/31, no. (%)		37 (12.4)		15 (36.6)	
Age, mean (SD), (years)	n=299	53.4 (14.5)	n=41	58.5 (14.9)	<i>0.016</i>
Body weight, mean (SD), (kg)	n=210	56.4 (10.7)	n=41	56.2 (9.7)	0.96
Female, no. (%)	n=311	242 (77.8)	n=41	32 (78.0)	0.97
Disease duration, mean (SD), (years)	n=271	7.1 (8.7)	n=41	3.9 (3.4)	0.16
Weekly MTX dose, mean (SD), (mg/week)	n=136	7.8 (4.3)	n=41	8.8 (3.4)	0.26
Oral glucocorticoid use, no. (%)	n=136	39 (28.7)	n=41	13 (31.7)	0.71
csDMARDs use, no. (%)	n=136	28 (20.6)	n=41	10 (24.4)	0.60
TJC, mean (SD)	n=104	3.7 (5.0)	n=41	4.5 (5.4)	0.19
SJC, mean (SD)	n=104	3.5 (4.7)	n=41	4.6 (4.9)	<i>0.039</i>
CRP level, mean (SD), (mg/dL)	n=104	1.73 (2.82)	n=41	2.06 (3.13)	0.52
RF positive, no. (%)	n=104	72 (69.2)	n=41	30 (73.2)	0.64
CDAI, mean (SD)	n=103	15.4 (12.6)	n=41	18.1 (13.0)	0.12
SDAI, mean (SD)	n=103	17.1 (14.3)	n=41	20.2 (15.1)	0.11
HAQ-DI, mean (SD)	n=104	0.93 (0.90)	n=41	1.06 (0.94)	0.39
DAS28-ESR, mean (SD)	n=103	4.10 (1.63)	n=41	4.66 (1.39)	0.067

Demographics and clinical characteristics at baseline are represented as means  $\pm$  standard deviation (SD) for continuous data and numbers (percentages) for categorical data. csDMARDs include actarit, aurothiomalate, auranofin, bucillamine, iguratimod, leflunomide, mizoribine, salazosulfapyridin, cyclosporine, and tacrolimus. Analysis of variance and Chi-square test were used to compare the clinical characteristics among the different groups for continuous variables and categorical variables, respectively. *Italics* were statistically significant. Abbreviations: CDAI, clinical disease activity index; csDMARDs, conventional synthetic disease modifying anti-rheumatic drugs; CRP, C-reactive protein; DAS28-ESR, the 28 joint disease activity score incorporating erythrocyte sedimentation rate; HAQ-DI, physical disability by health assessment questionnaire-disability index; IFX, infliximab; MTX, methotrexate; SDAI, simplified disease activity index; SJC, swollen joint count; TJC, tender joint count; RF, rheumatoid factor.



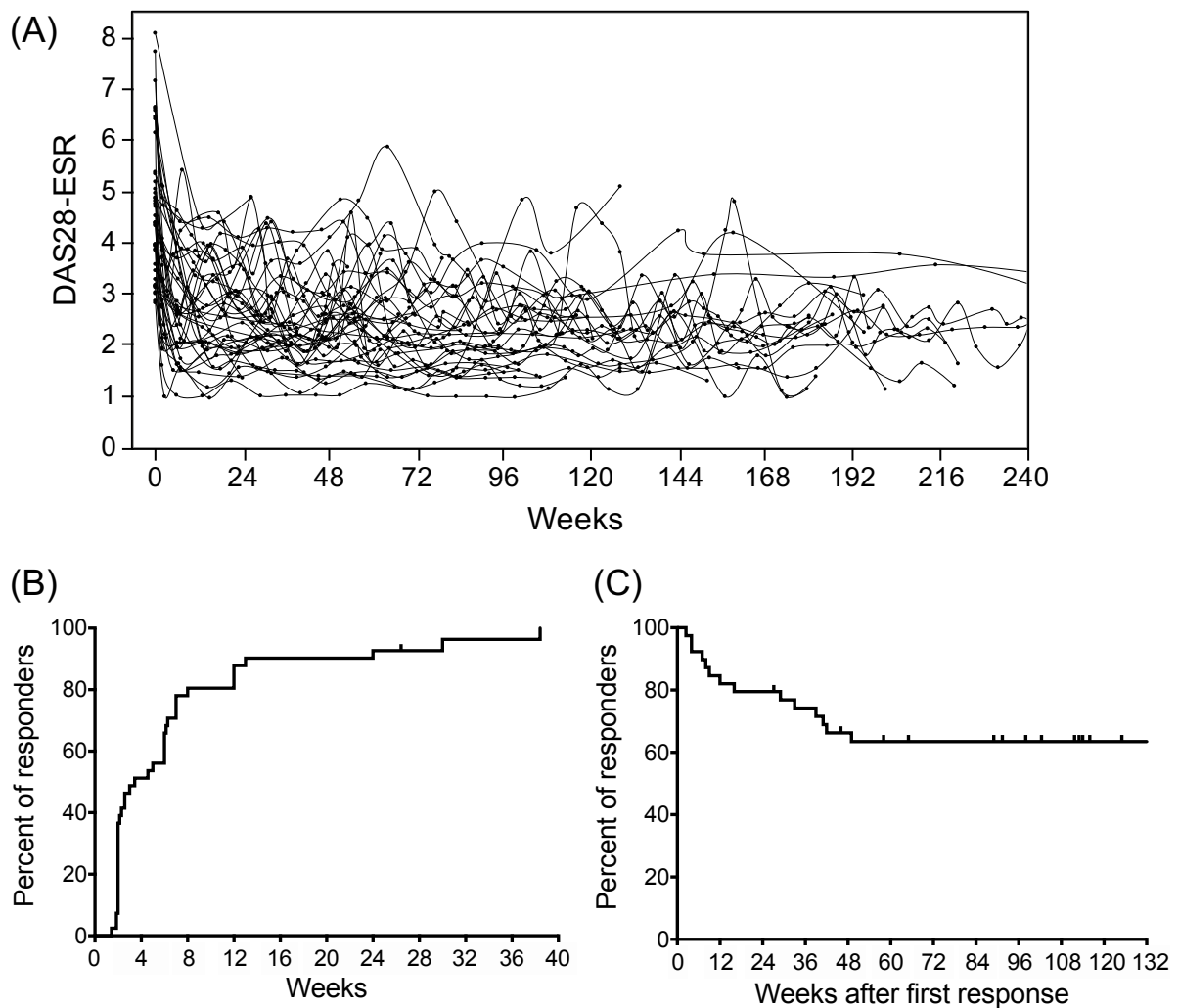


Fig II-2. Clinical efficacy of IFX. (A) Change in DAS28-ESR over time. The x-axis represents time after introduction of IFX. The y-axis represents values of DAS28-ESR. (B) Kaplan-Meier curve showing time to first response. Responders represent patients with “good or moderate response” based on the EULAR response criteria. The baseline (Day 0) was defined as the day of IFX introduction. (C) Kaplan-Meier curve showing time to loss of response. A change from responder to non-responder was defined as “loss of response.” The baseline (Day 0) was defined as the time point when the first response was observed. Patients who never showed any response during observation periods were excluded (n = 40). Abbreviations: DAS28-ESR, the 28 joint disease activity score incorporating erythrocyte sedimentation rate; EULAR, European League Against Rheumatism; IFX, infliximab.

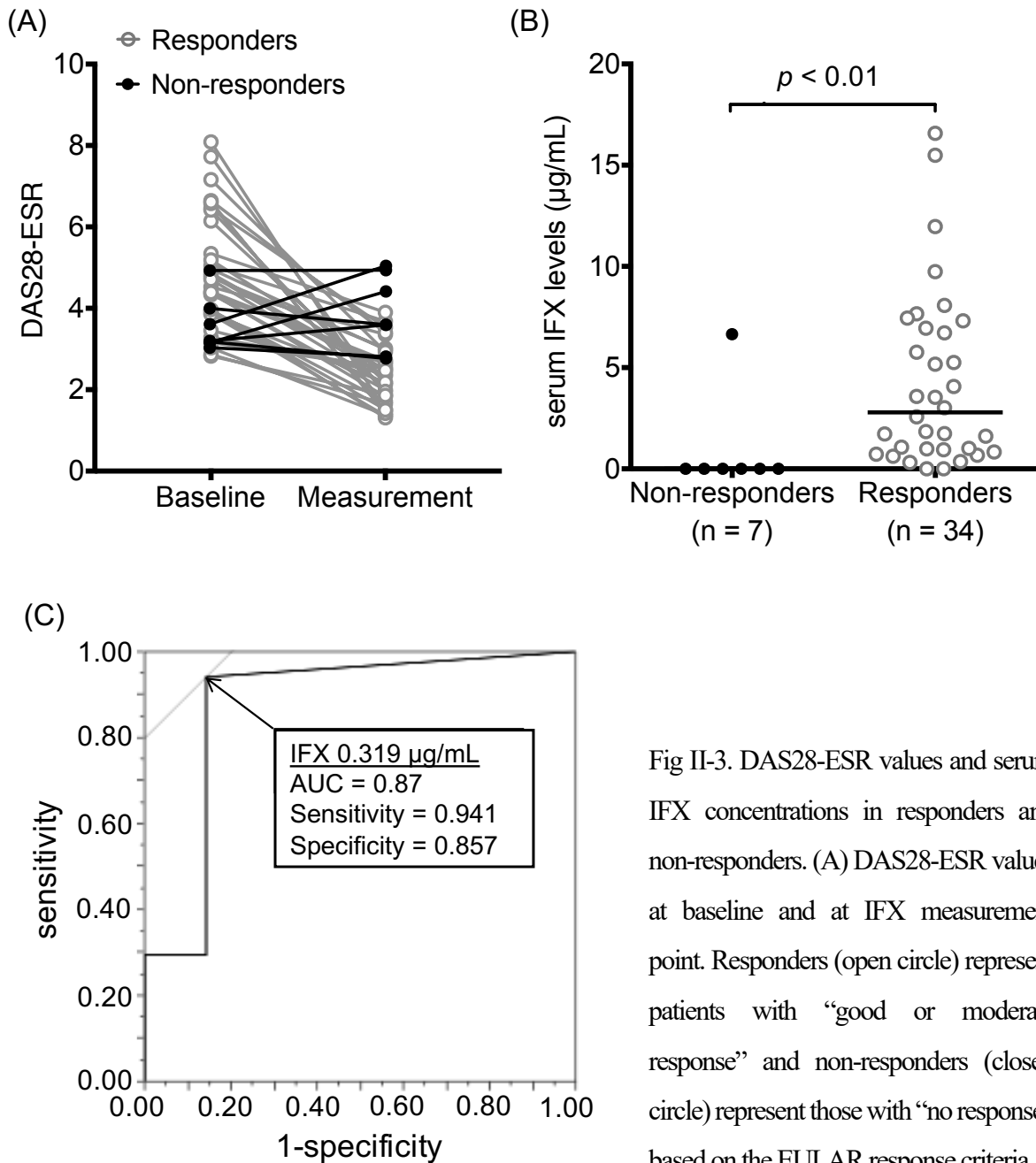


Fig II-3. DAS28-ESR values and serum IFX concentrations in responders and non-responders. (A) DAS28-ESR values at baseline and at IFX measurement point. Responders (open circle) represent patients with “good or moderate response” and non-responders (closed circle) represent those with “no response” based on the EULAR response criteria.

(B) Serum IFX levels were measured in non-responders and responders. Each dot represents each patient’s serum IFX level and the bars indicate the median. Differences between the groups were assessed by Mann-Whitney U test. (C) ROC curve for the determination of the optimal IFX cut-off value for predicting persistent responder (AUC = 0.87). Abbreviations: AUC, area under the curve; DAS28-ESR, the 28 joint disease activity score incorporating erythrocyte sedimentation rate; EULAR, European League Against Rheumatism; IFX, infliximab; ROC, receiver operating characteristic.

## II-14 血中 IFX 濃度に基づく患者背景および疾患活動性の比較

血中薬物濃度に基づき、患者を IFX <0.32 µg/mL の Low-IFX 群 (n=9) と IFX ≥0.32 µg/mL の High-IFX 群 (n=32) に分類した。両群の患者背景を Table II-2 にまとめた。血中薬物濃度測定時点での IFX 治療期間は平均して約 1 年であった。年齢と疾患活動性の一部 (TJC、CDAI、SDAI、HAQ-DI、DAS28-ESR) は、High-IFX 群に比べ Low-IFX 群において有意に低かった。High-IFX 群の患者のみ経口糖質コルチコイドを服用していたが、糖質コルチコイド使用と重症度との間に有意な相関は認められなかった。体重、性別、罹病期間、IFX 投与期間、SJC、CRP 値、RF 陽性者、MTX と csDMARDs の併用状況に有意差はなかった。

Table II-2. Demographics and clinical characteristics of the patients at baseline and IFX measurement point

Characteristics	IFX <0.32 µg/mL (n=9)	IFX ≥0.32 µg/mL (n=32)	p value
<b>Baseline</b>			
Age, mean (SD), (years)	47.4 (19.4)	61.6 (12.1)	<i>0.03</i>
Body weight, mean (SD), (kg)	57.8 (12.8)	55.8 (8.9)	0.85
Women, no. (%)	7 (77.8)	25 (78.1)	1.00
Disease duration, mean (SD), (years)	3.28 (2.01)	4.14 (3.71)	0.95
Weekly MTX dose, mean (SD), (mg/week)	9.3 (3.0)	8.7 (3.5)	0.63
Oral glucocorticoid use, no. (%)	0 (0.0)	13 (40.6)	<i>0.04</i>
csDMARDs use, no. (%)	2 (22.2)	8 (25.0)	1.00
TJC, mean (SD)	1.4 (1.2)	5.4 (5.8)	<i>0.01</i>
SJC, mean (SD)	1.9 (1.4)	5.4 (5.3)	0.07
CRP level, mean (SD), (mg/dL)	0.56 (0.61)	2.48 (3.42)	0.18
RF positive, no. (%)	8 (88.9)	22 (68.8)	0.24
CDAI, mean (SD)	9.9 (3.9)	20.4 (13.7)	< <i>0.01</i>
SDAI, mean (SD)	10.5 (4.1)	22.9 (15.9)	< <i>0.01</i>
HAQ-DI, mean (SD)	0.47 (0.35)	1.22 (0.99)	<i>0.04</i>
DAS28-ESR, mean (SD)	3.69 (0.65)	4.93 (1.43)	<i>0.02</i>
<b>Measurement point</b>			
Duration of IFX treatment, median (min-max), (days)	332 (147-539)	429 (112-882)	0.34
Dose of IFX, mean (SD), (mg)	207.8 (80.4)	247.1 (101.5)	0.29

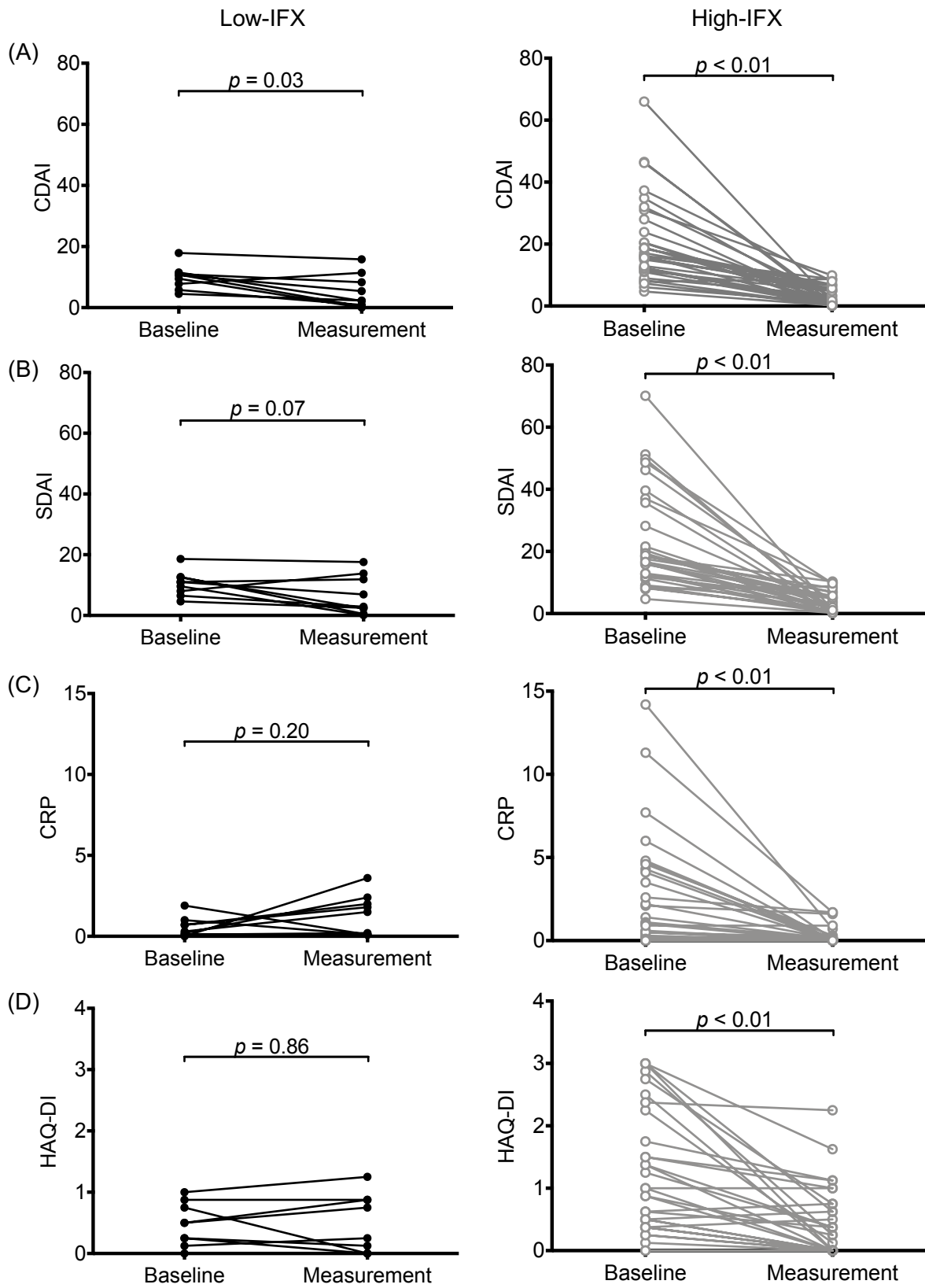
Demographics and clinical characteristics are represented as means ± standard deviation (SD) for continuous data and numbers (percentages) for categorical data. Analysis of variance and Fisher's exact test were used to compare the clinical characteristics among the different groups for continuous variables and categorical variables, respectively. *Italics* were statistically significant. Abbreviations: CDAI, clinical disease activity index; csDMARDs, conventional synthetic disease modifying anti-rheumatic drugs; CRP, C-reactive protein; DAS28-ESR, the 28 joint disease activity score incorporating erythrocyte sedimentation rate; HAQ-DI, physical disability by health assessment questionnaire-disability index; IFX, infliximab; MTX, methotrexate; SDAI, simplified disease activity index; SJC, swollen joint count; TJC, tender joint count; RF, rheumatoid factor.

解析に際し、IFX 治療導入 (baseline) から血中濃度測定 (measurement) までの間に DAS28-ESR が最も低下した時点を最大効果時点 (maximum effect point) と定義した。最大効果時点における non-responder は 41 名中 2 名 (4.9%) のみであり、Low-IFX 群と High-IFX 群の間で responder の割合に差はなかった (Table II-3,  $p = 0.40$ )。しかし、血中濃度測定時点 (measurement point) でさらに 5 名が non-responder となり、Fisher の正確検定により両群間の responder 割合に有意差が認められた ( $p < 0.01$ )。両群の導入時点と測定時点の各種疾患活動性の推移を Fig II-4 に示す。Low-IFX 群では CDAI のみが有意に改善した一方、High-IFX 群では CDAI、SDAI、CRP、HAQ-DI スコアが有意に改善された。

Table II-3. Number (percentages) of responders and non-responders at maximum effect and measurement point in each group

	Responders	Non-responders	p value
<b>maximum effect point</b>			
IFX <0.32 µg/mL, n (%)	8 (88.9)	1 (11.1)	0.40
IFX ≥0.32 µg/mL, n (%)	31 (96.9)	1 (3.1)	
Total (%)	39 (95.1)	2 (4.9)	
<b>measurement point</b>			
IFX <0.32 µg/mL, n (%)	3 (33.3)	6 (66.7)	<i>&lt;0.01</i>
IFX ≥0.32 µg/mL, n (%)	31 (96.9)	1 (3.1)	
Total (%)	34 (82.9)	7 (17.1)	
<b>measurement point</b>			
ADA positive, n (%)	2 (50.0)	2 (50.0)	0.14
ADA negative, n (%)	30 (85.7)	5 (14.3)	
Total (%)	32 (82.1)	7 (17.9)	

The “maximum effect point” was defined as the date when DAS28-ESR was the lowest during the IFX therapy between after its introduction point and at the measurement point. Responders had “good and moderate responses,” and non-responders had “no responses” based on the EULAR response criteria. ADAs in two patients could not be examined due to sample shortage. Values were considered statistically significant at a p value less than 0.05, based on two-sided Fisher’s exact test. *Italics* were statistically significant. Abbreviations: ADA, anti-drug antibody; DAS28-ESR, the 28 joint disease activity score incorporating erythrocyte sedimentation rate; EULAR, European League Against Rheumatism; IFX, infliximab.



(See the figure on previous page.)

Fig II-4. Changes in (A) CDAI, (B) SDAI, (C) CRP, and (D) HAQ-DI from the baseline to the IFX measurement point. The left figures show the data of patients with IFX level  $<0.32 \mu\text{g/mL}$  (closed circles), and the right figures show the data of patients with IFX level  $\geq 0.32 \mu\text{g/mL}$  (open circles). Each line corresponds to each patient. The data were analyzed by Wilcoxon signed-rank test. Abbreviations: CDAI, clinical disease activity index; CRP, C-reactive protein; HAQ-DI, physical disability by health assessment questionnaire-disability index; IFX, infliximab; SDAI, simplified disease activity index.

#### II-1-5 血中 IFX 濃度と ADA 陽性率との相関

41名中39名の患者の血清においてADAの検出を実施可能であり、4名(10.3%)が陽性と判定された。陽性患者はすべて糖質コルチコイド非投与群に属していた。血中IFX濃度は陰性群に比べ陽性群において有意に低かった (Fig II-5,  $p < 0.01$ )。陽性群のうち2名(50.0%)および陰性群のうち30名(85.7%)がIFX治療に応答性を示したが、responderの割合に有意差はなかった (Table II-3)。ADA陰性患者35名中、6名(17.1%)の血中IFX濃度が $0.32 \mu\text{g/mL}$ 未満であった。

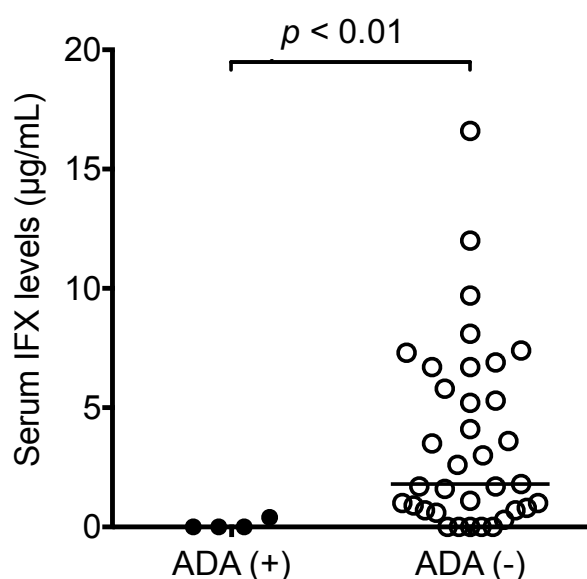


Fig II-5. Comparison of serum IFX levels between ADA positive group (ADA(+)) and negative group (ADA (-)). Each dot represents each patient's serum IFX level and the bars indicate the median. Differences between groups were assessed by Mann-Whitney U test. Abbreviations: ADA, anti-drug antibody; IFX, infliximab.

## II-1-6 考察

本邦で実施された介入試験である RISING 試験において、RA 患者は 0、2、6 週目に 3 mg/kg の IFX を投与された後、10 週目に 3 つの治療群（3、6、10 mg/kg 投与群）に無作為に割り付けられた<sup>10</sup>。54 週目の奏効率は、3、6、10 mg/kg 群のそれぞれにおいて 10%、56%、100%であり、IFX の投与量が多い患者ほど良好な有効性が得られた。また、血中 IFX 濃度が 1.0 µg/mL 以上の患者の 98.8%に臨床効果が認められた。IFX の治療濃度域はいまだ明確に定義されていないが、RA<sup>11,12</sup> や他の慢性炎症性疾患<sup>87-90</sup> に対するいくつかの観察研究および臨床試験のポストホック解析では、トラフ濃度が高いことが臨床転帰の改善と関連した。本研究では、最大効果時点において対象患者 41 名中 39 名（95.1%）に IFX 治療への応答性が見られた。この結果は、臨床現場においては血中薬物濃度を測定せずとも一次不応答を適切に回避できていることを示唆している。

一方、一部の患者において IFX の継続使用に伴う二次不応答が認められた。血中濃度の測定時点において、EULAR 反応基準に基づき DAS28-ESR の改善度をもって評価した治療応答性は High-IFX 群に比べ Low-IFX 群で有意に低く、血中 IFX 濃度の低下により治療効果が低下する可能性が示唆された。IFX の長期使用下において二次不応答を確実に判断することは困難であり、血中 IFX 濃度に関する情報は医師の患者評価に役立つ可能性がある。Low-IFX 群において二次不応答は、最短で 185 日で観察された。また、一次不応答は治療開始後 6 ヶ月以内に判断される<sup>91</sup>。以上より、IFX 治療開始後半年以降において血中薬物濃度を測定し、その低下の検出を介して二次不応答の評価を促すような、IFX の TDM に基づく治療アルゴリズムが提案されうる。

臨床効果を予測するためのカットオフ値を決定することは临床上重要である。RISING 試験では、トラフ血中 IFX 濃度 1.0 µg/mL が治療開始後 52 週時点での臨床効果のカットオフ値とされた<sup>10</sup>。Wolbink からも同様の結果を報告しており、トラフ血中 IFX 濃度が低い（1.2 µg/mL 未満）患者では、DAS28 スコアの改善が比較的低いことが示されている<sup>92</sup>。本研究では ROC 解析の結果から、最適なカットオフ値は 0.32 µg/mL と決定された。血中 IFX 濃度 1.0 µg/mL をカットオフ値とした場合にも同様の結果が得られ、RISING 試験の結果とも矛盾しない<sup>10</sup>。血清中の抗体医薬品の定量には酵素免疫測定法（ELISA）が汎用されるが、ELISA 法では非特異的なシグナルが検出される可能性が指摘されている<sup>93,94</sup>。本研究では、

米国食品医薬品局の基準<sup>95</sup>に基づきバリデーションが実施された nSMOL proteolysis 法による前処理を応用した LC-MS/MS 法を採用し、IFX に特異的なペプチドを定量した<sup>83</sup>。臨床現場で用いるカットオフ値の設定には、使用する分析法を考慮しなければならない。分析法によらないカットオフ値を決定するためには、さらなる研究が必要である。

IFX の薬物動態に影響を与える主要因の一つとして ADA が挙げられる<sup>8,74,75</sup>。ADA は IFX と結合し、そのクリアランスを増加させることで血中 IFX 濃度を低下させる。本研究で ADA を測定した 39 例中 4 例 (10.3%) が陽性と判定され、陰性患者と比較して血中 IFX 濃度が有意に低かった。また、陽性患者は全例が糖質コルチコイド非使用群に属し、High-IFX 群と Low-IFX 群の間での糖質コルチコイド使用割合に有意差が生じた原因であると考えられた。加えて、EULAR 反応基準を満たす responder の割合は、有意ではないものの陽性群で低い傾向にあった。ADA は IFX の薬物動態に影響を与えるが、IFX の有効性に重要な因子は血中 IFX 濃度そのものである。血中 IFX 濃度に影響を与える因子は他にも考えられるため、臨床効果を評価するうえでは血中 IFX 濃度のモニタリングが最適なツールとなりうる。他方、炎症性腸疾患患者を対象とした過去の研究において、ADA 陰性患者に比べ陽性患者では IFX の増量による治療効果改善が得られにくいと報告された<sup>96,97</sup>。ADA の測定は、二次不応答患者において用量増量か他剤変更かという、適切な二次治療戦略の決定を支援するものと期待される。

本研究は後方視的観察研究であるため、結果の妥当性に影響を与える、以下の点に注意が必要である。第一に、サンプルサイズが小さかった。2011 年以前の臨床データは KURAMA コホートに含まれず、IFX 投与開始前の DAS28-ESR の情報がない多数の患者を除外せざるをえなかった。全患者 (n=311) と解析対象患者 (n=41) 間のベースラインの患者背景はほぼ同様であったが、選択バイアスを完全に排除することはできなかった (Table II-1)。第二に、最大効果時点における血中 IFX 濃度は測定できず、当該時点における DAS28-ESR の低下と血中 IFX 濃度の関連性を検討することはできなかった。第三に、ベースラインの患者背景の一部が High-IFX 群と Low-IFX 群で異なった。Low-IFX 群では High-IFX 群に比べ疾患活動性の軽度な患者割合が多く、治療効果の評価に一部影響を及ぼす可能性がある。本研究は観察研究であり、交絡因子を制御、除外するための無作為化を行うことはできなかった。しかし、DAS28-ESR による EULAR 反応基準に基づき High-IFX



群、Low-IFX群ともに約90%の患者が一次奏功を示したことから、二次不応答に係る解析において患者特性分布の偏りによる影響は少なかったと考えられる。

以上、本研究では実臨床のコホートデータに基づき、血中IFX濃度は長期の継続使用下でのIFX治療効果と相関を示すことを明らかにした。臨床現場では血中薬物濃度を測定せずともIFXの一次不応答を回避可能と思われる一方、IFXの血中濃度測定により二次不応答患者の識別が容易になり、ひいてはIFXの適正使用促進に貢献するものと考えられる。

## 第2節 血中IFXおよびIL-6濃度測定による二次不応答予測

第1節において、IFXのTDMによって採血時点での二次不応答患者の特定を容易にする可能性を示した。IFX治療において二次不応答は、その後の治療中止につながる重大な臨床課題である。カナダの2つのレジストリデータを分析した以前の研究では、各解析期間（それぞれ2,632人年、1,114人年）内の抗TNF治療非奏功者のうち、二次不応答患者の割合はそれぞれ68.3%と55.7%と報告された<sup>98</sup>。また、二次不応答例のうち87.0%および60.9%の患者が、抗TNF治療開始12ヵ月以降に治療中止を経験した<sup>98</sup>。別のコホート研究においても、一次奏功を示した患者の55%が、治療開始後1年間に主に二次不応答を理由にIFX治療を中止した<sup>19</sup>。IFX治療に対する二次不応答の管理において、治療中止を予測し回避することも重要である。本節では、血中IFX濃度やその他のバイオマーカーの測定が二次不応答によるIFX治療中止の予測に有用であるかを検証した。

### II-2-1 方法

#### II-2-1-1 対象患者

第1節同様、KURAMAコホートデータベースを用いて単施設の後方視的観察研究を実施した。本研究では2011年1月1日から2020年12月31日の間に収集されたコホートデータを解析した。すべての患者はRAの1987年改訂版ACRまたは2010年版ACR/EULARの分類基準を満たし、研究参加へ書面により同意した。すべてのデータは非特定化され、匿名で分析された。本研究は「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」を遵守し、京都大学大学院医学研究科・医学部及び医学部附属病院医の倫理委員会の承認（承認番号：R0357）を得て実施した。

### II-2-1-2 データ収集と疾患活動性の評価

採血時点での年齢、体重、性別、RA 罹病期間、IFX 治療期間、週あたりの MTX 投与量、経口糖質コルチコイド使用有無、その他の csDMARD の使用有無、CRP 値、赤血球沈降速度（1 時間値、ESR\_1h）、ACPA（anticic citrullinated peptide antibody）値、RF 値などの患者背景情報を入手した。csDMARDs の定義は第 1 節同様とした。RA の疾患活動として TJC、SJC、CDAI、SDAI、DAS28-ESR を、機能性の指標として HAQ-DI を評価した。RF と ACPA の値がそれぞれ 15 IU/mL および 4.5 U/mL より高値の場合を陽性とした。

### II-2-1-3 臨床イベント

KURAMA コホート上では薬剤の投与中止理由が 1) 効果不十分、2) 寛解、3) 有害事象、4) その他の理由、の 4 つに分類、登録される。一次不応答は治療開始後 6 ヶ月以内の応答性消失とされるため<sup>91</sup>、本研究では投与開始 24 週終了後の効果不十分（二次不応答）を理由とする IFX 治療中止を主要評価項目とし、採血後 1 年間の治療継続率を評価した。副次的アウトカムとして、採血後 1 年間の疾患活動性の悪化と IFX 治療の強化を評価した。疾患活動性の悪化は、個々の患者において DAS28-ESR が最小スコアから 1.2 以上増加し、EULAR 基準で中等度から重度の疾患活動性（DAS28-ESR>3.2）を示すものと定義した。IFX 治療の強化は、個々人の DAS28-ESR 最小スコア時の投与量および投与間隔と比較して、投与量の増量（少なくとも 100 mg）または投与間隔の短縮（14 日間以上の短縮を連続 2 回以上）とした。

### II-2-1-4 血中 IFX、TNF- $\alpha$ 、IL-6 濃度の測定

トラフ血中 IFX 濃度は第 1 節同様に測定した<sup>82-84</sup>。血清中の TNF- $\alpha$  および IL-6 濃度は、市販の V-PLEX Human キット（Meso Scale Discovery, Rockville, MD, USA）を用いて、付属の説明書に従って分析した。この分析系では遊離型 TNF- $\alpha$  のみを検出し、IFX と複合体を形成した結合型 TNF- $\alpha$  は検出されなかった（data not shown）。溶液からの ECL シグナルを MESO QuickPlex SQ120（Meso Scale Discovery, Rockville, MD, USA）を用いて測定し、解析には MSD Discovery Workbench ソフトウェア（Meso Scale Discovery, Rockville, MD, USA）を使

用した。各患者について、研究期間中に採取された最初のサンプルのみを分析対象とした。

#### II-2-1-5 血中ADAの検出

第1節同様、IFXに対する血中ADAを検出するため Meso Scale Discovery<sup>®</sup> プラットフォーム上でECLアッセイを活用した。ADA陽性検体を同定するためのスクリーニングアッセイとその特異性を決定するための確認アッセイを含む多層的なアプローチを採用した。溶液からのECLシグナルは、MESO QuickPlex SQ120 (Meso Scale Discovery, Rockville, MD, USA) を用いて測定した。

#### II-2-1-6 統計解析

統計解析は GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) および JMP<sup>®</sup> Pro15 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) を用いて実施した。連続データは平均値±標準偏差 (SD) または中央値 (最小値 - 最大値) で表し、ノンパラメトリック検定 (Wilcoxon rank-sum test) を用いて解析した。パーセンテージで表したカテゴリカルデータは、カイ二乗検定またはフィッシャーの正確検定を用いて分析した。p < 0.05 を統計的に有意とした。Kaplan-Meier法により、効果不十分を理由にIFX治療を中止するまでの時間を評価した。1年以上治療を継続した患者、または中止せずに観察期間が1年未満の患者を打ち切りとした。また、効果不十分以外の理由で治療を中止した患者も打ち切りとした。ROC解析により、採血後1年以内に効果不十分を理由にIFX治療を中止する必要性を予測する最適なIFX、TNF- $\alpha$ 、IL-6の血中濃度のカットオフ値を求めた。

## II-2-2 対象患者

KURAMA コホートデータベースに登録された患者全体の310名から、選択基準に基づき解析対象患者を抽出した (Fig II-6)。まず、維持治療期間中にトラフ血清検体が得られなかった (残渣血清が保存されていなかった、または投与直後に採血された) 219名の患者を本解析から除外した。すべての患者はIFX導入療法 (IFX治療開始後112日間) を完了していることが求められた。次に、治療開始後24週間以内にIFX治療を中止した一次

不応答患者を解析の対象外とした (n=4)。また、観察期間中に臨床試験に参加した患者も除外した (n=3)。最終的に、84名の患者が本解析の対象となった。

### II-2-3 トラフ血清中 IFX および他のバイオマーカーの濃度の相関

登録された 84 名の患者において、IFX のトラフ血中濃度の中央値は 1.62  $\mu\text{g/mL}$  (四分位範囲 : 0.31-5.23) であった。ROC 解析により、IFX のトラフ血中濃度 0.59  $\mu\text{g/mL}$  を投与中止の必要性を予測する最適なカットオフ値とした (Fig II-7)。トラフ血中 IFX 濃度のカットオフ値に基づき患者を 2 群に分け、その特徴を Table II-4 にまとめた。採血時点において、血中 IL-6 濃度、TJC、SJC、CRP、ESR\_1h、RF 陽性割合、CDAI、SDAI、DAS28-ESR において両群間に有意差を認め、Low IFX 群 (IFX < 0.59  $\mu\text{g/mL}$ ) の患者はより重症であった。

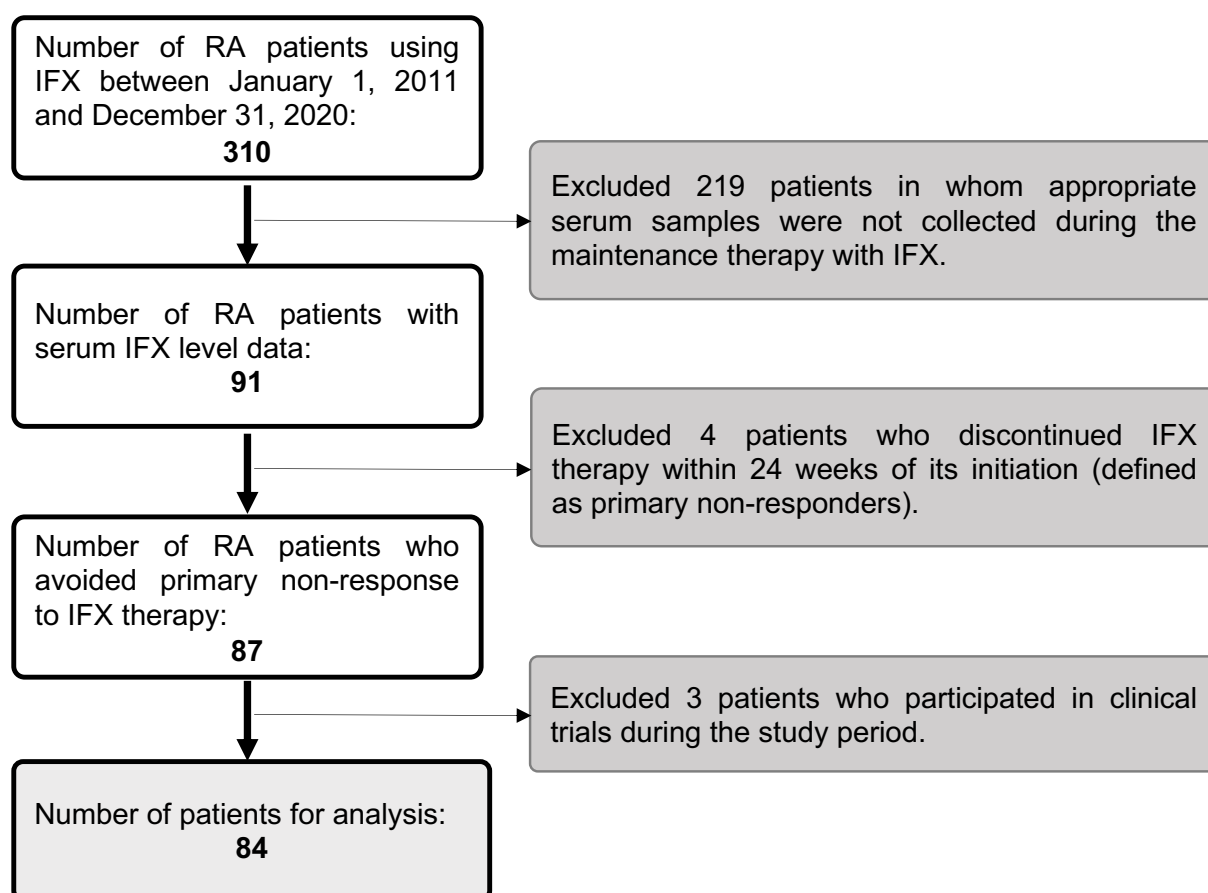


Fig II-6. Flowchart of inclusion/exclusion of patients in the study. Abbreviations: IFX, infliximab; RA, rheumatoid arthritis.

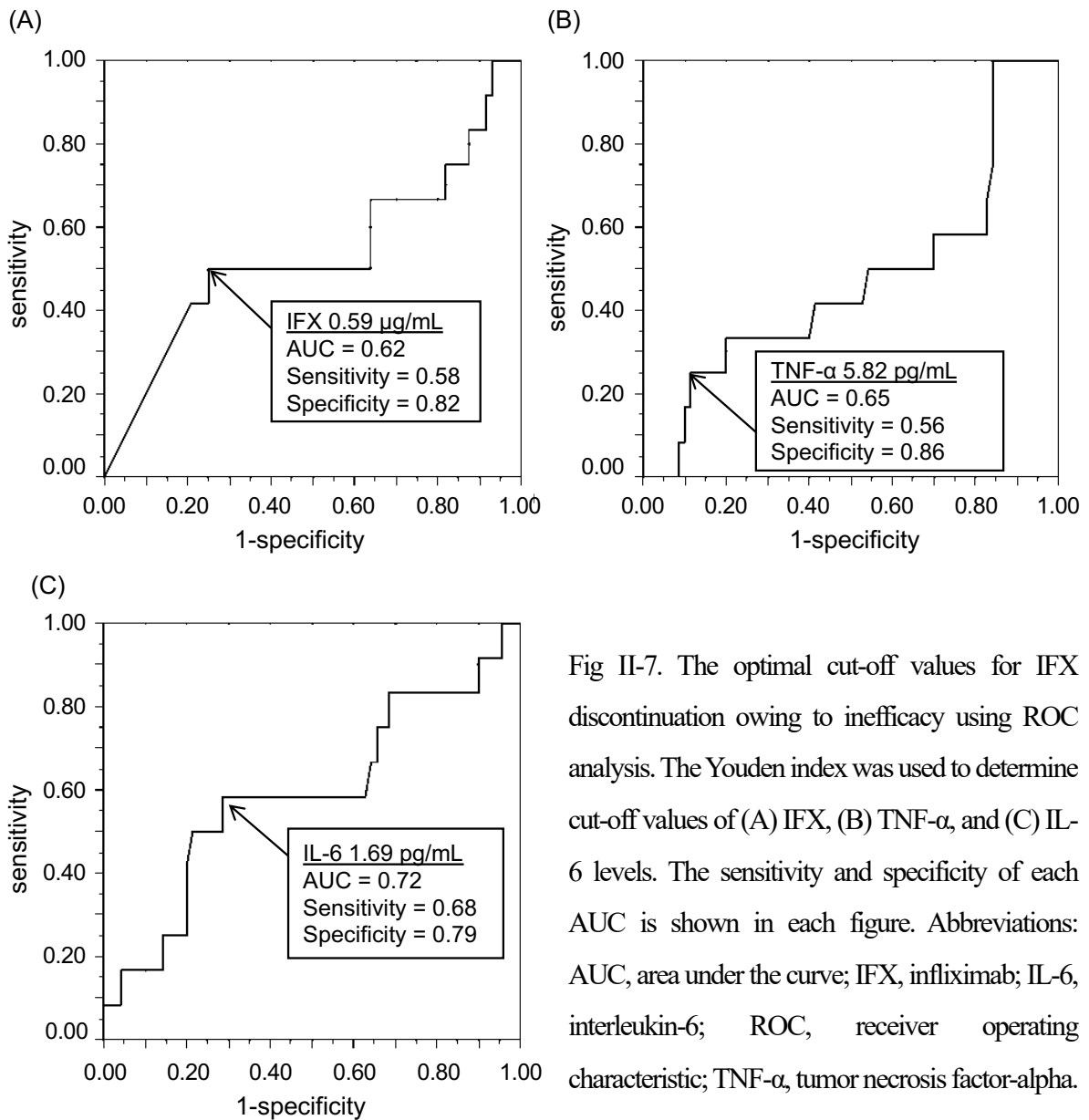


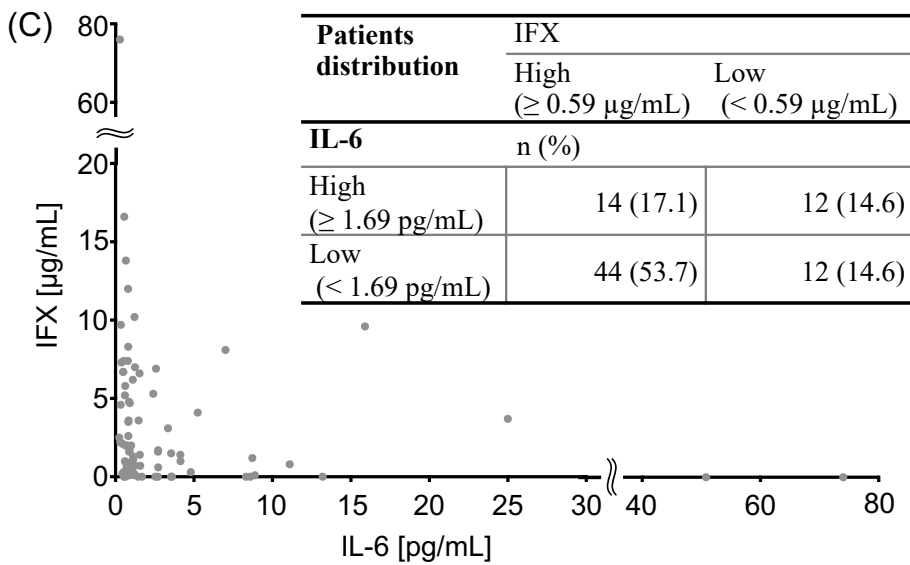
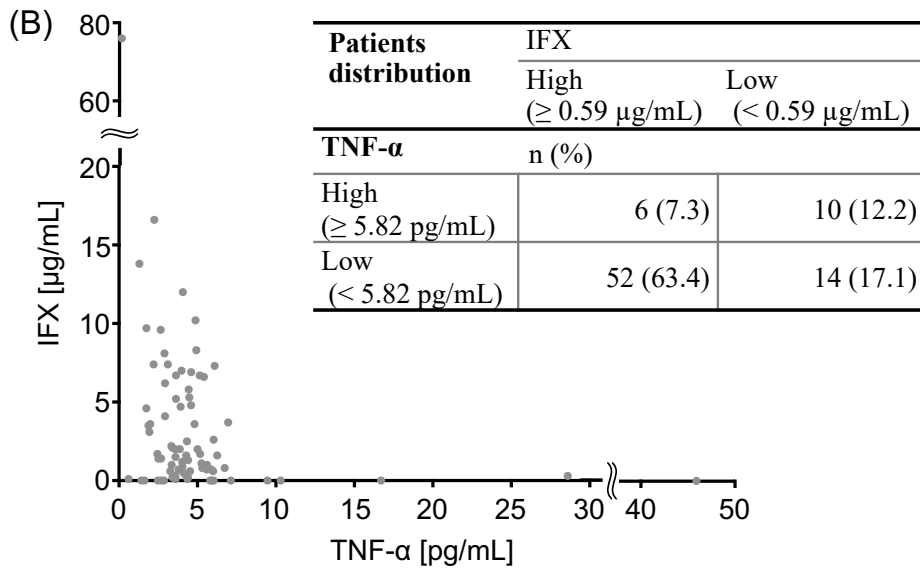
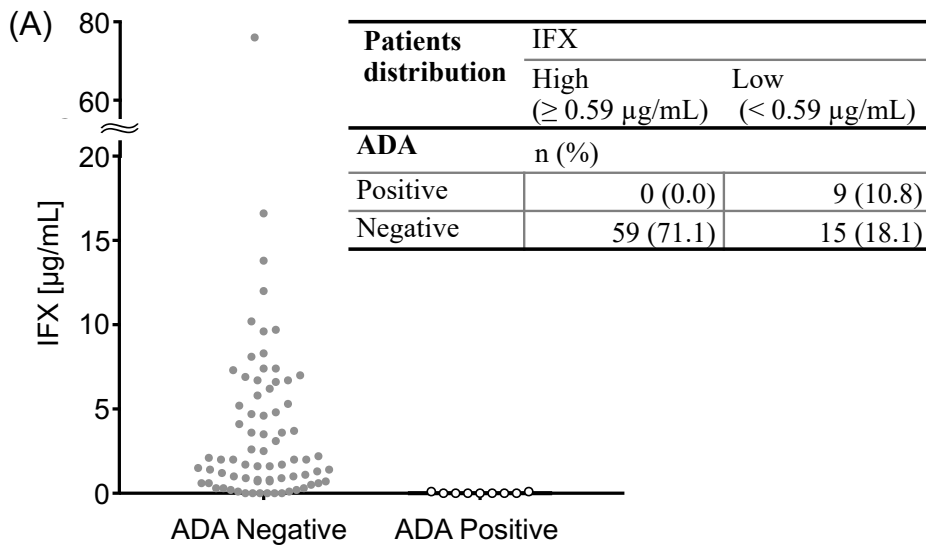
Fig II-7. The optimal cut-off values for IFX discontinuation owing to inefficacy using ROC analysis. The Youden index was used to determine cut-off values of (A) IFX, (B) TNF- $\alpha$ , and (C) IL-6 levels. The sensitivity and specificity of each AUC is shown in each figure. Abbreviations: AUC, area under the curve; IFX, infliximab; IL-6, interleukin-6; ROC, receiver operating characteristic; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor-alpha.

血中 IFX 濃度と ADA 陽性、TNF- $\alpha$  および IL-6 濃度との相関および患者分布を Fig II-8 に示した。ROC 解析により、TNF- $\alpha$  は 5.82  $\text{pg/mL}$ 、IL-6 は 1.69  $\text{pg/mL}$  が、最適なカットオフ値として設定された (Fig II-7)。ADA 陽性患者のすべてにおいて、血中 IFX 濃度はカットオフ値より低値であった。登録された患者のうち、7.3%が High-IFX / High-TNF- $\alpha$  群、17.1%が High IFX / High-IL-6 群に分類された。

Table II-4. Baseline demographics and clinical characteristics of patients enrolled in this study

Characteristics	IFX <0.59 µg/mL (n = 24)	IFX ≥0.59 µg/mL (n = 60)	p value
Age, mean (SD), (years)	57.6 (15.4)	60.0 (14.1)	0.48
Body weight, mean (SD), (kg)	57.0 (9.9)	55.6 (9.5)	0.60
Women, n/N (%)	18/24 (75.0)	48/60 (80.0)	0.77
Disease duration, mean (SD), (years)	9.5 (11.8)	11.8 (11.2)	0.19
Duration of IFX treatment, median (min–max), (days)	501.5 (185–3913)	789.5 (154–5073)	0.85
Dose of IFX, mean (SD), (mg)	252.9 (103.6)	267.0 (101.9)	0.46
Weekly MTX dose, mean (SD), (mg/week)	8.3 (3.4)	7.6 (3.2)	0.18
Oral glucocorticoid use, n/N (%)	2/24 (8.3)	14/60 (23.3)	0.14
csDMARDs use, n/N (%)	6/24 (25.0)	8/60 (13.3)	0.21
Trough IFX level, mean (SD), (µg/mL)	0.07 (0.17)	5.45 (9.93)	<0.001
TNF-α level, mean (SD), (pg/mL)	15.3 (37.9)	4.0 (1.4)	0.10
IL-6 level, mean (SD), (pg/mL)	8.1 (17.4)	2.3 (4.1)	0.024
ADA-positive, n/N (%)	9/24 (37.5)	0/59 (0.0)	<0.001
RF-positive, n/N (%)	17/20 (85.0)	31/54 (57.4)	0.031
RF, median (min–max), (IU/mL)	31.3 (8.0–563.9)	16.5 (8.0–387.9)	0.006
ACPA-positive, n/N (%)	13/14 (92.9)	28/41 (68.3)	0.086
ACPA, median (min–max), (U/mL)	29.5 (0.6–500)	32.7 (0.5–902)	0.29
CRP level, mean (SD), (mg/dL)	1.00 (1.04)	0.25 (0.72)	<0.001
ESR_1h, mean (SD), (mg/dL)	28.8 (18.7)	18.4 (12.0)	0.024
TJC, mean (SD)	1.62 (2.04)	0.69 (1.55)	0.005
SJC, mean (SD)	1.00 (1.41)	0.60 (1.40)	0.030
CDAI, mean (SD)	6.77 (6.00)	4.08 (5.37)	0.023
SDAI, mean (SD)	7.74 (6.42)	4.24 (5.71)	0.005
DAS28-ESR, mean (SD)	3.28 (1.27)	2.47 (1.00)	0.008
HAQ-DI, mean (SD)	0.39 (0.43)	0.56 (0.75)	0.86

The patients were divided into two groups; low-IFX (IFX <0.59 µg/mL) and high-IFX (IFX ≥0.59 µg/mL). Demographics and clinical characteristics at the sampling point (baseline) are represented as mean ± standard deviation (SD) for continuous data and numbers (percentages) for categorical data. csDMARDs include actarit, aurothiomalate, auranofin, bucillamine, iguratimod, leflunomide, mizoribine, salazosulfapyridin, cyclosporine, and tacrolimus. To compare patient characteristics between the groups, the Wilcoxon rank sum test and Fisher's exact test were used for continuous and categorical variables, respectively. *Italics* were statistically significant. Abbreviations: ACPA, anti-cyclic citrullinated peptide antibody; ADA, anti-drug antibody; CDAI, clinical disease activity index; csDMARDs, conventional synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs; CRP, C-reactive protein; DAS28-ESR, the 28 joint disease activity score incorporating erythrocyte sedimentation rate; ESR\_1h, erythrocyte sedimentation rate at one hour; HAQ-DI, physical disability by health assessment questionnaire-disability index; IFX, infliximab; IL-6, interleukin-6; MTX, methotrexate; RF, rheumatoid factor; SDAI, simplified disease activity index; SJC, swollen joint count; TJC, tender joint count; TNF-α, tumor necrosis factor-alpha.



(See the figure on previous page.)

Fig II-8. Associations between levels of IFX and (A) ADA positivity, (B) TNF- $\alpha$  and (C) IL-6 levels. Distribution of patients in each group is shown in the table. Abbreviations: ADA, anti-drug antibody; IFX, infliximab; IL-6, interleukin-6; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor-alpha.

#### II-2-4 IFX 治療中止の予測

血中 IFX、TNF- $\alpha$ 、IL-6 濃度のカットオフ値および ADA の検出に基づき患者を各 2 群に分けた。採血後 1 年間に IFX 治療を中止するまでの時間を、Kaplan-Meier 法および log-rank 検定により 2 群間で比較した (Fig II-9)。いずれの因子においても、2 群間に有意差は認められなかった。

次に、血中 IFX 濃度と ADA、TNF- $\alpha$  濃度、IL-6 濃度の各組み合わせに則り患者を 4 群に分けた (Fig II-10)。IFX の投与中止までの期間について、IFX と ADA、TNF- $\alpha$  濃度の組み合わせによる各 4 群間で有意差は認められなかった。他方、IFX と IL-6 の血中濃度によって患者を分類すると、IFX が低く IL-6 が高い患者群では治療継続率が最も低かった ( $p = 0.030$ 、12 ヶ月時点で継続率 71.3%)。IFX および IL-6 の濃度に基づいて分類された 4 グループの各患者背景を Table II-5 に示す。

#### II-2-5 その他の臨床イベント

血中 IFX および IL-6 濃度に基づき分類された 4 グループにおいて、採血後 1 年間の疾患活動性の悪化および IFX 治療の強化を評価した (Table II-6)。Low-IFX / High-IL-6 群では、他の 3 群に比べ疾患活動性の悪化が有意に多く発生した (90.9%,  $p < 0.001$ )。IFX 治療の強化を要した患者の割合については、4 群間で有意差は認められなかった ( $p = 0.89$ )。



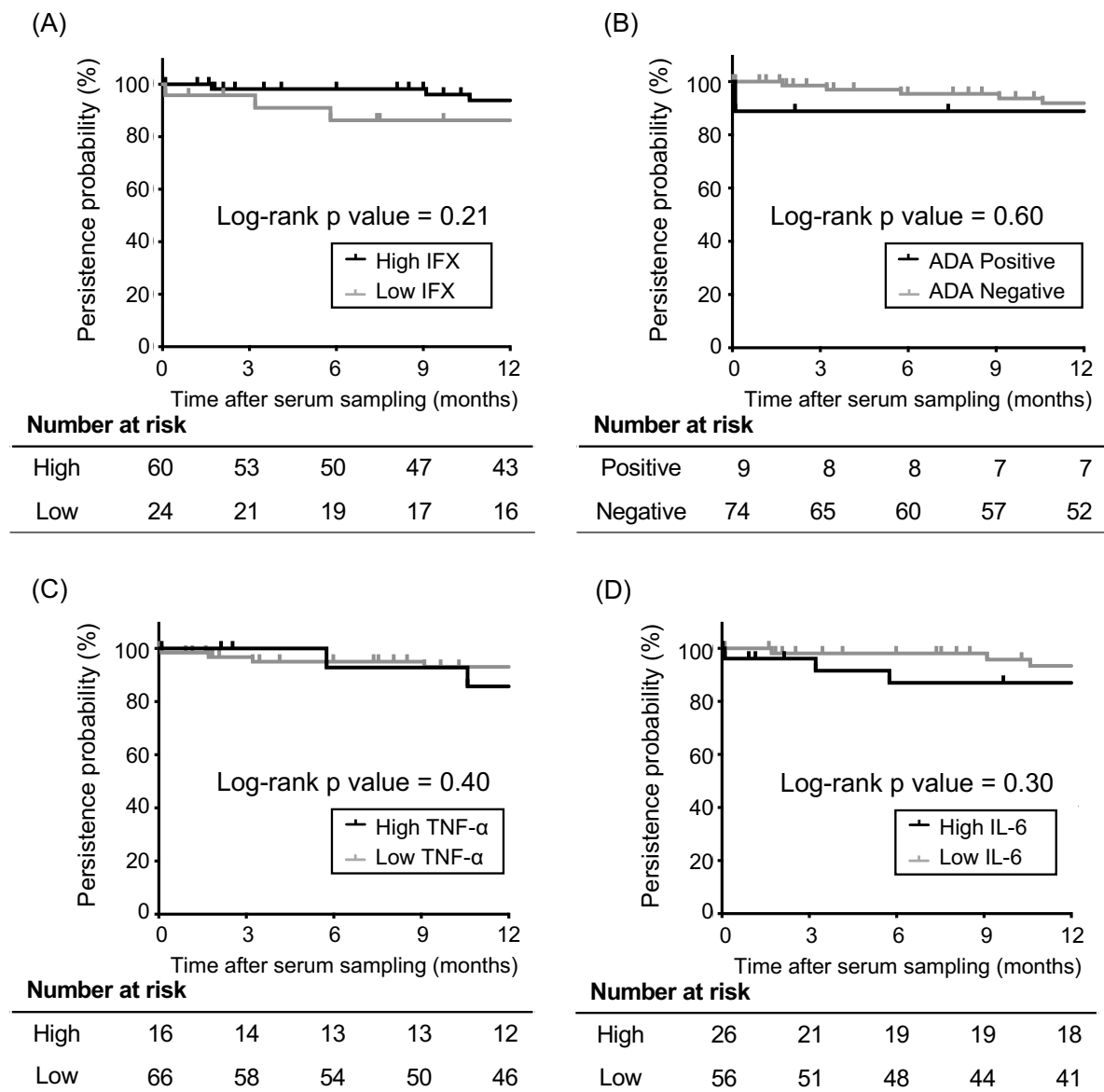


Fig II-9. One-year IFX persistence rates in patients with RA by (A) IFX levels, (B) ADA positivity, (C) TNF- $\alpha$  levels, and (D) IL-6 levels. The x-axis represents months after blood sampling. The y-axis represents the rate of IFX persistence. Cutoff values for classification were given by ROC analyses. Patients who had over one-year IFX persistence had less than one year of observation without discontinuation or discontinued IFX therapy for reasons other than insufficient efficacy were censored. Abbreviations: ADA, anti-drug antibody; IFX, infliximab; IL-6, interleukin-6; RA, rheumatoid arthritis; ROC, receiver operating characteristic; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor-alpha.

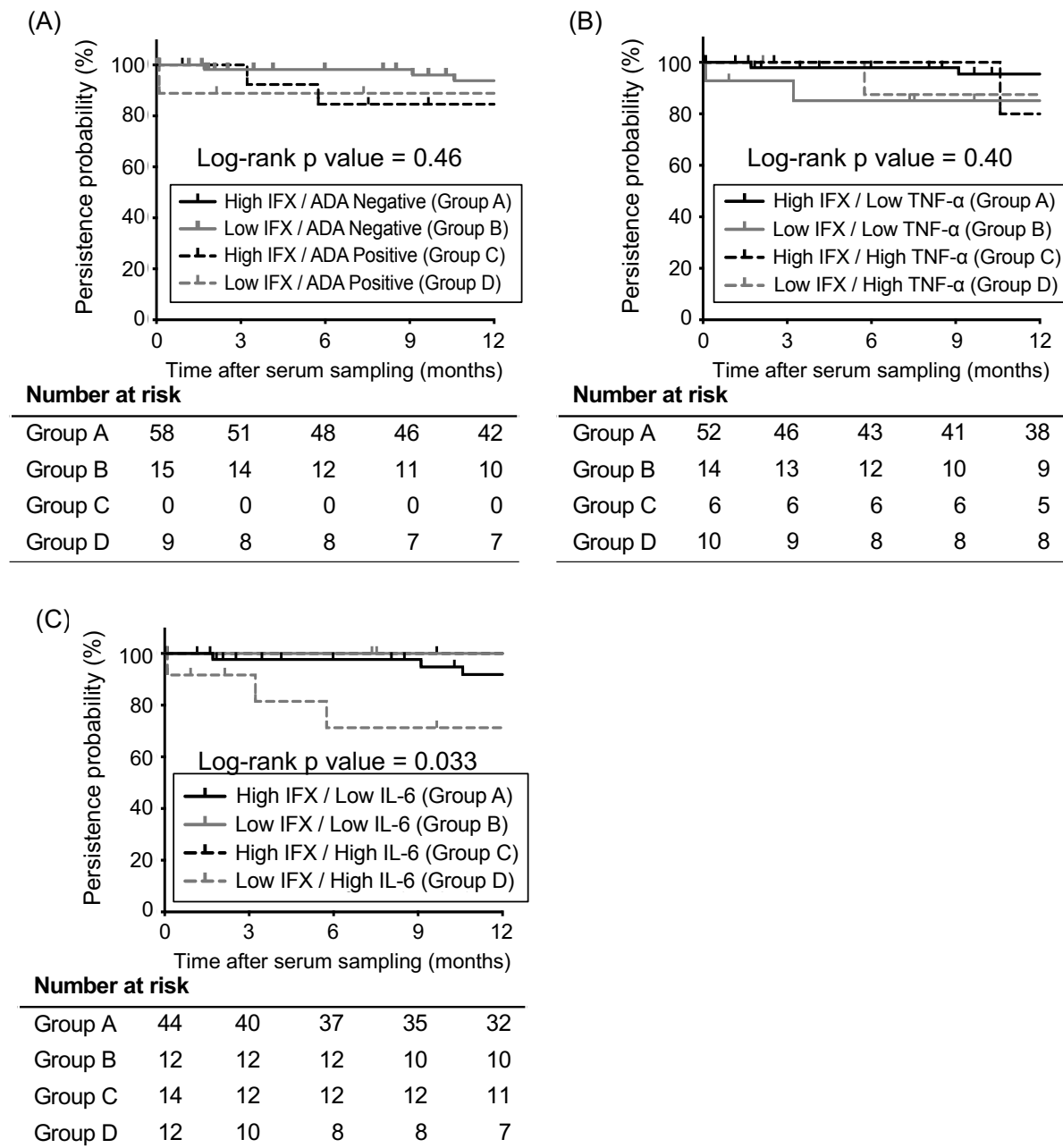


Fig II-10. Persistence of IFX therapy in the four groups classified by serum IFX levels in combination with (A) ADA positivity, (B) TNF- $\alpha$  levels, or (C) IL-6 levels. The x-axis represents months after blood sampling. The y-axis represents the rate of IFX persistence. Cutoff values for classification were given by ROC analyses. Patients who had over one-year IFX persistence and less than one year of observation without discontinuation or discontinued IFX therapy for reasons other than insufficient efficacy were censored. Abbreviations: ADA, anti-drug antibody; IFX, infliximab; IL-6, interleukin-6; ROC, receiver operating characteristic; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor-alpha.

Table II-5. Demographic characteristics of the patients divided into four groups based on both serum levels of IFX and IL-6

Characteristics	High-IFX / Low-IL-6 (n = 44)	Low-IFX / Low-IL-6 (n = 12)	High-IFX / High-IL-6 (n = 14)	Low-IFX / High-IL-6 (n = 12)	p value
Age, mean (SD), (years)	58.1 (14.6)	54.4 (17.7)	63.9 (11.4)	60.8 (12.6)	0.50
Body weight, mean (SD), (kg)	57.0 (8.8)	56.4 (9.4)	53.5 (10.2)	57.5 (10.8)	0.47
Women, n/N (%)	34/44 (77.3)	10/12 (83.3)	12/14 (85.7)	8/12 (66.7)	0.67
Disease duration, mean (SD), (years)	12.0 (11.6)	11.0 (11.7)	11.5 (10.6)	7.7 (12.4)	0.51
Duration of IFX treatment, median (min–max), (days)	795 (154–5073)	1762 (198–3913)	718 (168–4164)	385 (185–2653)	0.20
Dose of IFX, mean (SD), (mg)	271.6 (106.7)	265.0 (129.4)	262.0 (92.9)	240.8 (73.3)	0.84
Weekly MTX dose, mean (SD), (mg/week)	7.4 (3.1)	8.5 (3.0)	8.3 (3.6)	8.2 (3.9)	0.56
Oral glucocorticoid use, n (%)	7 (15.9)	0 (0.0)	6 (42.9)	2 (16.7)	0.022
csDMARDs use, n (%)	6 (13.6)	1 (8.3)	2 (14.3)	5 (41.7)	0.16
Trough IFX level, mean (SD), (µg/mL)	6.07 (11.44)	0.09 (0.17)	3.58 (2.87)	0.05 (0.17)	<0.001
TNF-α level, mean (SD), (pg/mL)	4.0 (1.4)	7.1 (7.3)	3.9 (1.5)	23.6 (52.9)	0.38
IL-6 level, mean (SD), (pg/mL)	0.8 (0.3)	0.9 (0.4)	7.0 (6.5)	15.3 (22.8)	<0.001
ADA-positive, n (%)	0 (0.0)	3 (25.0)	0 (0.0)	6 (50.0)	<0.001
RF-positive, n (%)	20 (50.0)	8 (88.9)	10 (83.3)	9 (81.8)	0.019
RF, median (min–max), (IU/mL)	15.2 (8.0–169.3)	30.1 (13.0–167.7)	27.0 (8.0–387.9)	71.8 (8.0–563.9)	0.005
ACPA-positive, n (%)	18 (62.1)	5 (100.0)	9 (90.0)	8 (88.9)	0.051
ACPA, median (min–max), (U/mL)	19.8 (0.5–362)	247 (14–500)	107.5 (3.3–902)	18.9 (0.6–500)	0.022
CRP level, mean (SD), (mg/dL)	0.08 (0.08)	0.26 (0.21)	0.85 (1.41)	1.66 (1.04)	<0.001
ESR_1h, mean (SD), (mg/dL)	14.6 (8.6)	16.4 (10.9)	31.9 (13.4)	40.1 (17.2)	<0.001
TJC, mean (SD)	0.73 (1.55)	1.00 (1.56)	0.58 (1.73)	2.18 (2.32)	0.010
SJC, mean (SD)	0.39 (0.86)	0.60 (0.70)	1.25 (2.45)	1.36 (1.80)	0.080
CDAI, mean (SD)	3.68 (4.53)	4.14 (4.83)	5.40 (7.87)	9.16 (6.14)	0.027
SDAI, mean (SD)	3.61 (4.56)	4.40 (4.94)	6.25 (8.61)	10.78 (6.25)	0.034
DAS28-ESR, mean (SD)	2.28 (0.91)	2.57 (1.09)	3.06 (1.14)	3.92 (1.09)	<0.001
HAQ-DI, mean (SD)	0.46 (0.66)	0.21 (0.41)	0.83 (0.93)	0.56 (0.40)	0.10

(See the table on previous page.)

The patients were divided into four groups based on a combination of IFX (cut-off 0.59 µg/mL) and IL-6 levels (cut-off 1.69 pg/mL). Demographics and clinical characteristics at the sampling point (baseline) are represented as mean ± standard deviation (SD) for continuous data and numbers (percentages) for categorical data. csDMARDs include actarit, aurothiomalate, auranofin, bucillamine, iguratimod, leflunomide, mizoribine, salazosulfapyridin, cyclosporine, and tacrolimus. To compare patient characteristics between the groups, the Kruskal-Wallis ANOVA test and the chi-square test were used for continuous and categorical variables, respectively. *Italics* were statistically significant. Abbreviations: ACPA, anti-cyclic citrullinated peptide antibody; ADA, anti-drug antibody; ANOVA, analysis of variance; CDAI, clinical disease activity index; csDMARDs, conventional synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs; CRP, C-reactive protein; DAS28-ESR, the 28 joint disease activity score incorporating erythrocyte sedimentation rate; ESR\_1h, erythrocyte sedimentation rate at one hour; HAQ-DI, physical disability by health assessment questionnaire-disability index; IFX, infliximab; IL-6, interleukin-6; MTX, methotrexate; SDAI, simplified disease activity index; SJC, swollen joint count; TJC, tender joint count; TNF-α, tumor necrosis factor-alpha; RF, rheumatoid factor.

Table II-6. Comparison of the proportion of patients with disease worsening or treatment intensification

	Occurrence of disease worsening, n/N (%)	Intensification of IFX treatment, n/N (%)
High-IFX / Low-IL-6	10/38 (26.3)	12/42 (28.6)
Low-IFX / Low-IL-6	1/10 (10.0)	2/12 (16.7)
High-IFX / High-IL-6	3/12 (25.0)	3/14 (21.4)
Low-IFX / High-IL-6	10/11 (90.9)	3/12 (25.0)
Total	24/71 (33.8)	20/80 (25.0)
Chi-square p-value	< 0.001	0.89

The patients were classified into four groups based on serum IFX and IL-6 concentrations. The number of patients (%) with worsening of DAS28-ESR or intensification of IFX therapy during one year from the serum sampling is shown. Disease worsening was defined as an increase in the individual DAS28-ESR score of 1.2 or more resulting in moderate to severe disease activity (DAS28-ESR >3.2) by EULAR criteria. Intensification of IFX treatment was defined as a dose escalation (at least 100 mg) and/or a shorter interval between infusions (at least 14 days at least twice in a row) from those at the time of the individual minimum DAS28-ESR scores. Patients with missing data on DAS28-ESR and IFX dosage were excluded from the analysis. Chi-squared test was used to investigate statistical significance. Abbreviations: DAS28-ESR, the 28 joint disease activity score incorporating erythrocyte sedimentation rate; EULAR, European League Against Rheumatism; IFX, infliximab; IL-6, interleukin-6.

## II-2-6 考察

IFX 治療の有効性はそのトラフ血中濃度と相関を示すことがすでに知られており<sup>9-11,99,100</sup>、第1節でも同様の結果が確認された。この関係を示す研究の多くは、DAS28-ESRなどの標準的な臨床スコアを用いて疾患活動性を測定し、RAの重症度を評価している<sup>101,102</sup>。一方、実臨床においては患者の服薬継続期間も治療有用性を反映する重要な指標である<sup>28</sup>。第1章で示したとおり、無作為化比較試験から報告された臨床効果は必ずしも実臨床における治療継続率を反映しなかった。疾患活動性にに基づき評価される治療の有効性は、治療継続を介して評価される有用性と完全には相関しえないと考えられる。本研究においても、血中薬物濃度に基づき分類した2群間において、採血後1年間のIFX治療継続率に有意差は認められなかった。血中IFX濃度は採血時点でのDAS28-ESRと関連するものの、その測定だけでは二次不応答を理由に治療中止に至る患者を識別することは困難であることが示された。

IFX治療中のRA患者における血中IL-6濃度の評価は、疾患活動性の評価に有用であることが示唆されている。既報において、54週目の血中IFX濃度が高く血中IL-6濃度が低い群で最も低い疾患活動性が観察された<sup>103</sup>。さらに、治療開始前の血中IL-6濃度が低い患者は、IFXの増量に良好な反応を示し、血中薬物濃度の上昇と疾患活動性の低下をもたらした<sup>104</sup>。本研究から、治療中に血中IFX濃度が低く血中IL-6濃度が高い患者では採血後1年間の治療継続率が比較的lowであった一方、他の群では有効性の消失により治療を中止した患者はほとんどいなかったという新しい知見を得た。IFXとIL-6の両血中濃度をモニターすることで治療効果を維持しやすい患者を特定し、有効性の消失による治療中止を回避することが期待される。

その他のバイオマーカーもIFX治療の効果に影響を与える可能性が考えられる。TNF- $\alpha$ はRAの病態において中心的な役割を担っており、治療開始前の血中TNF- $\alpha$ 濃度はIFXの血中濃度に影響する<sup>7</sup>。また、ADAの存在は、免疫複合体の形成を介したIFXの血中半減期の短縮につながる<sup>8,105</sup>。しかし本研究では、血中TNF- $\alpha$ 濃度またはADA有無と血中IFX濃度との組み合わせは、IFX治療継続率の相違とは関連しなかった。原因として、それらの因子が血中IFX濃度を直接に反映する代用指標となる可能性が考えられた。TNF- $\alpha$ はIL-6放出を誘導する因子の一つであるため、IFXはTNF- $\alpha$ の中和を介してIL-6の産生を間接

的に低下させる<sup>106,107</sup>。TNF-IL-6 軸は RA の病態形成において主要な役割を果たすが、TNF 非依存的 IL-6 軸も RA 患者のサブセットにおいて疾患の進行に寄与している可能性がある<sup>108</sup>。これらのデータは、TNF- $\alpha$  や ADA に比べ、IFX や IL-6 の血中濃度測定が重要であることを支持する。

単施設コホートデータの後方視的解析に基づく本研究結果の考察にあたり、以下の点を考慮しなければならない。まず、サンプルサイズが比較的小さかった ( $n=84$ )。第二に、二次不応答による治療中止までの時間というハードエンドポイントを選択したため、イベント発生率が低かった。対象患者全体における採血から 1 年後の IFX 投与中止率は 8.4% であり、Low-IFX / High-IL-6 の患者群でも 28.7% であった。第三に、不死時間バイアスの可能性を考慮する必要がある。本研究は後方視的観察研究であり、血清試料は維持療法期間中の無作為な時点で採取された。すなわち、採血時点での IFX 治療期間は患者によって異なり、このことが治療中止の発生率に影響する可能性が考えられる。しかし、IFX と IL-6 の両濃度に基づき分類した 4 群間において、IFX の治療期間に有意差はなかった (Table II-5)。したがって、不死時間バイアスのリスクは大きくないことが推測される。第四に、カットオフ値を推定した ROC 解析の AUC および感度・特異度は、推定精度が高くないことを示している。本研究では RA 治療効果に関連する血中 IFX 濃度と炎症性マーカーである TNF- $\alpha$  および IL-6 の濃度を評価したが、未測定因子が投与中止により大きく寄与している可能性がある。最後に、単一施設では参加者が限られており、本検討結果の他の患者集団への一般化可能性は明らかでない。

以上、本研究では、血中 IFX、TNF- $\alpha$ 、IL-6 濃度および ADA 有無は RA 患者における IFX 治療中止の独立した予測因子となりえなかった一方、IFX と IL-6 の血中濃度の組み合わせにより治療継続性を予測可能なことを明らかにした。本結果は、RA 患者の長期におよぶ維持療法の有効性を推定するため、IFX および IL-6 の両濃度を定量することの臨床的有用性を示唆するものである。

### 第 III 章 質量分析系を用いた生体内投与後のエタネルセプト構造変化の解析

抗体医薬品は生体の生合成過程を利用して製造されるため、分子構造上不均一なものが産生される。不均一性の原因として、抗体医薬品の産生過程における翻訳後修飾<sup>109-111</sup>や、生体内での代謝（バイオトランスフォーメーション）<sup>13</sup>が挙げられる。低分子医薬品の開発では代謝研究が不可欠とされる一方、タンパク質の医薬品候補では不必要と考えられている<sup>13,112</sup>。他方、バイオトランスフォーメーションは医薬品の薬理作用や薬物動態などへ影響する可能性があり、また複数の分析法の結果間の差異につながりうる<sup>13</sup>。抗体医薬品の真の体内動態を理解するうえで、構造変化に関する情報の解明が重要となる。

ETN はヒト IgG1 の結晶化可能領域（Fc）に可溶性 TNF 受容体が融合したタンパク質であり、TNF- $\alpha$  および TNF- $\beta$ （lymphotoxin- $\alpha$ ）に結合し、それらの作用を阻害する<sup>113,114</sup>。他の抗 TNF- $\alpha$  抗体医薬品と同様、ETN は RA の治療に貢献し、csDMARDs 治療に抵抗性の患者の疾患活動性、身体機能、QOL、死亡率を劇的に改善した<sup>115,116</sup>。臨床試験において、血中 ETN 濃度は ELISA 法を用いて測定されてきた<sup>117-119</sup>。ELISA 法は抗体医薬品の定量に汎用される標準的分析法であるが、構造変化に関する情報は得られない。対して質量分析（MS）は、医薬品の構造的特徴を明らかにするために不可欠な分析ツールとみなされている<sup>120</sup>。既報において、投与前の製剤中 ETN は 3 種類の N 末端形態で存在することが報告されている<sup>121</sup>。一方、生体内での ETN の構造変化に関する情報は今までにない。CD26 としても知られるジペプチジルペプチダーゼ 4（DPP-4）は、ポリペプチドの N 末端で X-プロリンまたは X-アラニンジペプチド（ただし X は任意のアミノ酸を表す）を切断するセリンエキソペプチダーゼである<sup>122,123</sup>。Fig III-1 に示すように、ETN は N 末端から 2 番目のアミノ酸位置にプロリン基を持つことから、その N 末端は体内で DPP-4 により切断されると推定される。

本章では、ETN の N 末端におけるバイオトランスフォーメーションについて検討し、DPP-4 の寄与ならびに抗原結合能などの機能特性への影響を評価した。





研究は「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」を遵守し、京都大学大学院医学研究科・医学部及び医学部附属病院医の倫理委員会の承認（承認番号：R0357）を得て実施した。

Table III-1. Patients' demographics and characteristics

Characteristic	Patients under etanercept therapy (n=6)
Female, n (%)	5 (83.3)
Age, median (min-max)	60.5 (43-77)
Body weight [kg], median (min-max)	50.7 (49.5-86.3)
Dose [mg/week], median (min-max)	37.5 (25.0-50.0)
Time from the last dose to blood collection [days], median (min-max)	7 (1-9)

### III-1-3 動物実験

C57BL/6 J マウス（7 週齢、雄性）を株式会社日本エスエルシー（Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan）より購入した。合計 31 匹のマウスを本研究に用いた。マウスは病原体のない特定施設に収容し（1 ケージにつき最大 6 匹）、12 時間の明暗サイクル下で温度制御のなされた環境で飼育した。マウスを体重に基づき無作為に 2 群に割り付けた（7-8 匹/群）。マウスは実験中、固形餌と水を自由に摂取可能であった。0 h 時点で ETN（100 µg/body、100 µL 生理食塩水で希釈）をマウスの皮下（うなじ）または静脈内（後眼窩）に投与した。滅菌水またはシタグリプチン（100 mg/kg、BioVision, Inc., Milpitas, California, USA）溶液を-8、0、8、16 h 時点で強制経口投与した（10 mL/kg、各群 n=7-8）。3、6、12、24 h 時点において、各マウスの尾静脈からヘパリン添加 Micro-Hematocrit Capillary tube（Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA）を用いて末梢血（70 µL）を採取し、4°Cで遠心分離（2,000×g, 10 min, TOMY MX-307 mini refrigerator centrifuge, TOMY Seiko Co, Japan）した。上清の血漿画分を採取し、LC-MS/MS による分析まで-80°Cで保存した。動物実験は京都大学の「動物実験指針」に基づいて行われ、京都大学大学院医学研究科動物実験委員会の承認を得た（MedKyo:21113）。

### III-1-4 血中DPP-4 活性の測定

マウス血漿中の DPP-4 活性を、蛍光測定キット (BioVision, Inc., Milpitas, California, USA) を用いて、付属のプロトコルに従って測定した。マウス血漿はキットに付属のアッセイバッファーで 10 倍に希釈した後に測定した。蛍光強度はマイクロプレートリーダー (Mithras LB 940, Berthold Japan K.K., Tokyo, Japan) を用いて測定した。

### III-1-5 *In vitro* での ETNN 末端の切断

#### (1) DPP-4 およびシタグリプチンとの反応条件

0.1% Tween<sup>®</sup> 20 Detergent を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBST0.1) 中に、ETN (10 µg/mL) をヒト組替え (rh) DPP-4 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA、10 µg/mL) と 1:1 (w/w) で混合し、37°C で 24 h 反応させた。また、シタグリプチン (BioVision, Inc., Milpitas, California, USA、500 µg/mL) も併せて反応にかけたサンプルも別途用意した。

#### (2) $K_D$ 値の推定

既報<sup>124</sup>を参考に in-house ELISA を実施した。コーティングバッファー (15 mM carbonate and 28.5 mM bicarbonate, pH 9.6) 中に rhTNF- $\alpha$  (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) または rhTNF- $\beta$  (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を調製し、Nunc-Immuno<sup>™</sup> MicroWell<sup>™</sup> 96 well plate (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) の各ウェルに添加、4°C で一晩インキュベーションした。コーティングされたプレートをブロッキングした後に、各ウェルにサンプルを添加し 23°C で 1 h インキュベートした。西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) で標識したチキン抗ヒト IgG (Fab) 抗体 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) を 60,000 倍に希釈し、各ウェルに添加し 23°C で 90 分間インキュベートした。HRP 基質 (KPL/SeraCare, Milford, MA, USA) を加え、23°C、暗所で 5 min インキュベートした。反応を 1 N HCl で酸性化して停止し、450 nm で吸光度を測定した (VERSAmax; Molecular Devices, Silicon Valley, CA, USA)。描画された飽和曲線から、最高シグナル (プラトー) の半値に達した ETN 濃度を  $K_D$  値として導出した。

### III-1-6 LC-MS/MS 分析

#### (1) 前処理

nSMOL™ Antibody BA Kit (Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて、各サンプルを指定のプロトコルに従い前処理した<sup>82,125</sup>。トリプシン消化後、N 末端ペプチドを LC-MS/MS を用いて測定した。全 ETN 濃度の測定のため、シグネチャーペプチド VFCTK (aa.43-47, m/z 299.05 > m/z 498.05 (y4+))、定量範囲：0.195 - 100 µg/mL) をモニターした<sup>125</sup>。

#### (2) N 末端ペプチドの相対的存在量の算出

ETN の 3 種類の N 末端構造に応じた以下の合成ペプチドをスクラム社 (Scrum, Inc., Tokyo, Japan) より購入した。

- LPAQVAFTPYAPEPGSTCR (full length; FL)
- PAQVAFTPYAPEPGSTCR (cleavage of 1 amino acid; Δ1AA)
- AQVAFTPYAPEPGSTCR (cleavage of 2 amino acids; Δ2AA)

これらの混合物を LC-MS/MS を用いて測定し、相対的な測定強度 (count per second; cps) を推定した。得られた cps に基づき、FL ペプチドに対する Δ1AA および Δ2AA ペプチドの cps 比を算出し、各ペプチドの相対存在量を以下のように定義した。ここで、a および b はそれぞれ、FL ペプチドに対する Δ1AA および Δ2AA ペプチドの cps 比を表す。

- the relative abundance of the FL form  
=  $\text{cps\_FL} / (\text{cps\_FL} + a \times \text{cps\_}\Delta 1\text{AA} + b \times \text{cps\_}\Delta 2\text{AA})$
- the relative abundance of the Δ1AA form  
=  $a \times \text{cps\_}\Delta 1\text{AA} / (\text{cps\_FL} + a \times \text{cps\_}\Delta 1\text{AA} + b \times \text{cps\_}\Delta 2\text{AA})$
- the relative abundance of the Δ2AA form  
=  $b \times \text{cps\_}\Delta 2\text{AA} / (\text{cps\_FL} + a \times \text{cps\_}\Delta 1\text{AA} + b \times \text{cps\_}\Delta 2\text{AA})$

FL ペプチドの多重反応モニタリング (MRM) 条件を Table III-2 に記す<sup>125</sup>。N 末端ペプチドの定量下限は、バリデートされた ETN のシグネチャーペプチド (VFCTK, aa.43-47) と同等である。

Table III-2. Analytical method using LC-MS/MS to detect three peptides of ETN

	FL	$\Delta$ 1AA	$\Delta$ 2AA
Peptide sequence	LPAQVAFTPYAPEPG STCR	PAQVAFTPYAPEPGS TCR	AQVAFTPYAPEPGST CR
MRM transition	668.90 (3+) → 423.70 (y8++)	631.50 (3+) → 423.70 (y8++)	599.25 (3+) → 423.70 (y8++)
Relative intensity ([peptide cps]/[IS cps])	3.1 ± 0.078	1.0 ± 0.020	0.49 ± 0.015
cps ratio to FL peptide	1.0	3.0	6.4

The cps ratio of three peptides (FL: LPAQVAFTPYAPEPGSTCR,  $\Delta$ 1AA: PAQVAFTPYAPEPGSTCR, and  $\Delta$ 2AA: AQVAFTPYAPEPGSTCR) on the N-terminus of etanercept in nSMOL-proteolyzed peptide mixture generated from control human serum using triple quadrupole LC-MS/MS. One pmol of each peptide and 1 fmol of P14R internal standard were injected into a triple quadrupole LC-MS/MS, and cps values were calculated using LabSolutions software (Shimadzu). Abbreviations:  $\Delta$ 1AA, cleavage of 1 amino acid;  $\Delta$ 2AA, cleavage of 2 amino acids; cps, count per second; ETN, etanercept; FL, full length; IS, internal standard; LC-MS/MS, liquid chromatograph-tandem mass spectrometer; MRM, multiple reaction monitoring; nSMOL, nano-surface and molecular-orientation limited.

### (3) LC-MS/MS 条件

ETN の N 末端分析および定量を、既報の LC-MS/MS 条件に従って実施した。溶媒 A には 0.1% ギ酸水溶液、溶媒 B には 0.1% ギ酸含有アセトニトリルを用いた。カラムは Shim-pack GISS C18 (2.1×50 mm, 1.9  $\mu$ m, 20 nm pore (Shimadzu, Kyoto, Japan) を用い、カラム温度は 50°C に設定した。流量は 0.4 mL/min とし、グラジエントプログラムを以下のように設定した ; 0–1.5 min: %B = 1, 1.5–5 min: %B = 1–40 gradient, 5–6 min: %B = 95, 6–7 min: %B = 1。ESI プローブ温度、脱溶媒ライン、ヒートブロックをそれぞれ 300°C、

250°C、400°Cとした。ネブライザー、ヒーティングガス、ドライイングガスの流量はそれぞれ 3 L/min、10 L/min、10 L/min に設定した。各 MRM トランジションにおける測定対象物質のデータ取り込み時間 (Dwell Time) は 10 ms とした。ペプチドフラグメントの MRM モニターイオンは、高分解能四重極飛行時間型質量分析計 (Q-TOF-MS) 分析による構造同定フラグメントの測定値から決定した。Q2 セル内の衝突解離アルゴン分圧は 270 kPa に設定した。MRM トランジションの  $m/z$  候補はコンピューターにより設定され、Q1 プリバイアス、コリジョンセル Q2、Q3 プリバイアスの電極電圧、最も高感度のプリカーサーイオンおよびフラグメントイオンの  $m/z$  は LabSolutions (Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて最適化した。

### III-1-7 統計解析

GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) を用いて統計解析を実施した。結果は平均±標準偏差として示し、2 群間の差について Student's t-test または Wilcoxon rank-sum 検定を用いて有意性を評価した。3 群間の比較は、一元配置分散分析 (ANOVA) およびポストホックの Tukey の多重比較検定を使用して行った。統計的有意性は  $p < 0.05$  とした。

## III-2 分析系の確立

LC-MS/MS を用いた分析法を確立し、3 種類の N 末端ペプチドを検出した。これら 3 種類の N 末端ペプチドは、トリプシンで ETN を切断することによって生成される<sup>121</sup>。FL、 $\Delta 1AA$ 、 $\Delta 2AA$  の合成ペプチドの定量値を用いて、単位量あたりの FL ペプチドに対する  $\Delta 1AA$ 、 $\Delta 2AA$  の cps 比を算出した (Table III-2)。FL ペプチドの cps 1.0 に対し、 $\Delta 1AA$  ペプチドの cps が 3.0、 $\Delta 2AA$  ペプチド cps が 6.4 の場合、MRM 分析ではモル比で同等量であるとした。

### III-3 RA 患者血中 ETN の N 末端プロファイル

RA 患者の血中に含まれる ETN の N 末端ペプチドを LC-MS/MS でモニターし、N 末端構造の不均一性を評価した。5 つの異なるロットの製剤中において、平均 91.2% の ETN が FL 型の N 末端を有した (Fig III-2)。一方、ETN を投与された 6 名の RA 患者の血中では  $\Delta 2AA$  型が最も多く平均 95.0% であり、FL 型は平均 3.1% しか検出されなかった。 $\Delta 1AA$  型の相対的な存在量にも、製剤中と患者血中との間で有意差が見られた ( $p < 0.05$ )。

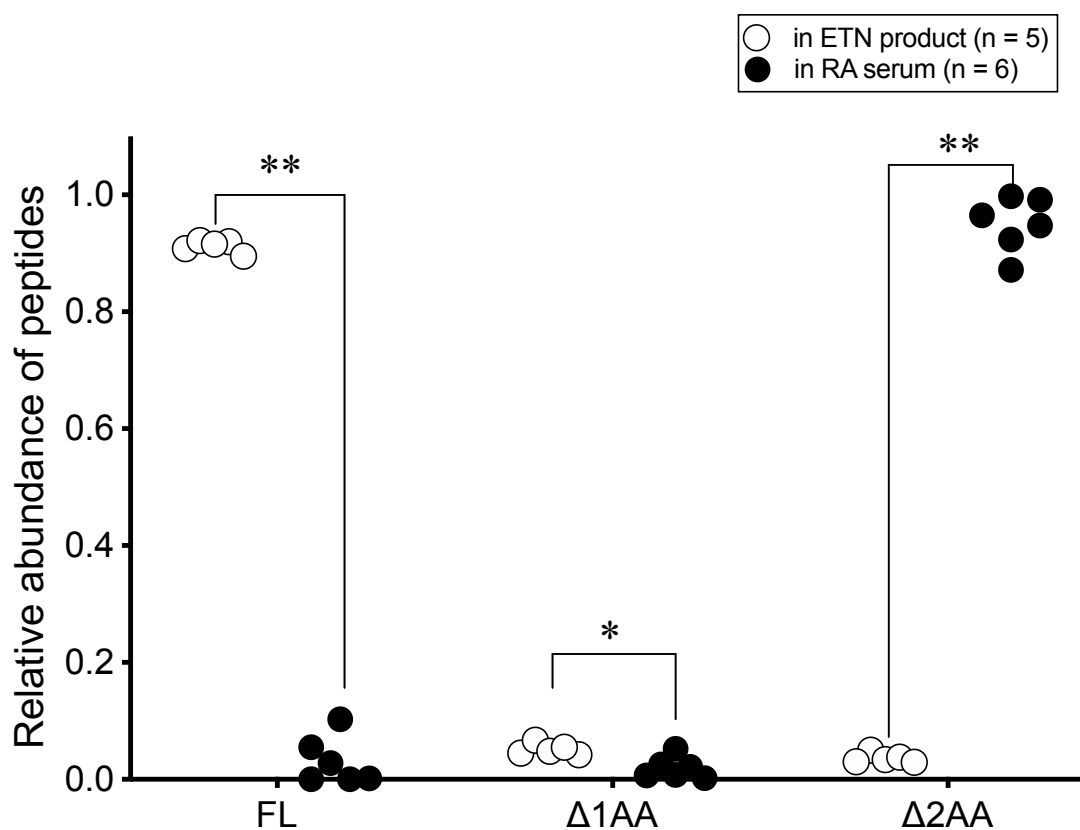


Fig III-2. Biotransformation of the N-terminus of ETN in a human. Open circles represent the ratios of peptides with the FL,  $\Delta 1AA$ , and  $\Delta 2AA$  form in the product of Enbrel<sup>®</sup> among the five different lots. Closed circles represent the serum of patients with rheumatoid arthritis who underwent etanercept therapy (n = 6). A comparison between groups was performed using Wilcoxon rank-sum test. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ . Abbreviations:  $\Delta 1AA$ , cleavage of 1 amino acid;  $\Delta 2AA$ , cleavage of 2 amino acids; ETN, etanercept; FL, full length; RA, rheumatoid arthritis.

### III-4 マウス血中における ETN の N 末端切断

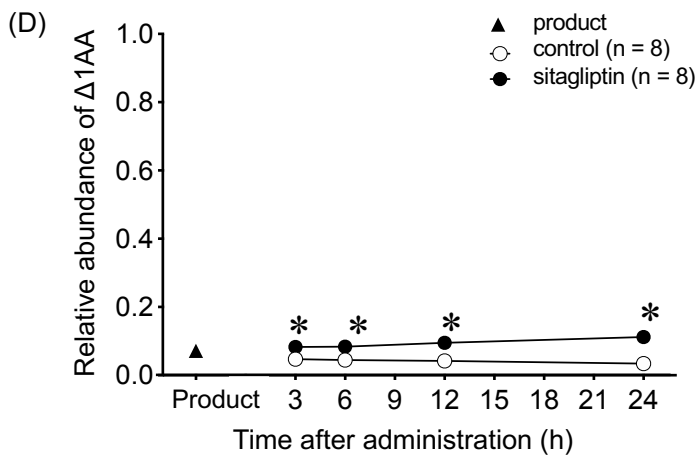
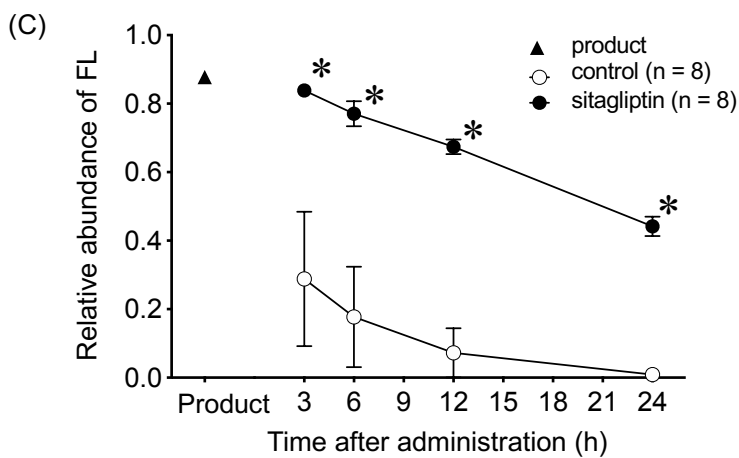
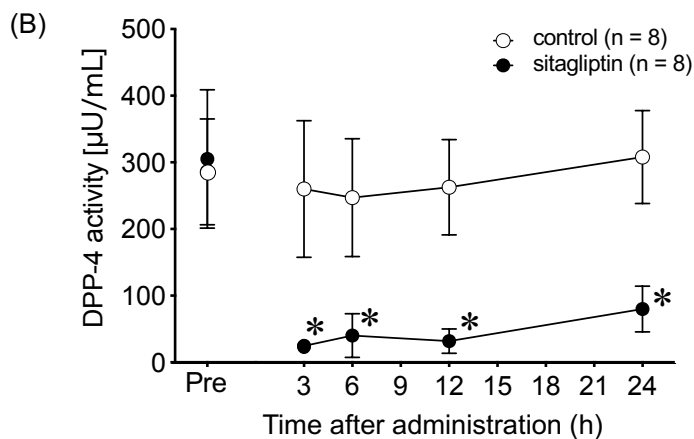
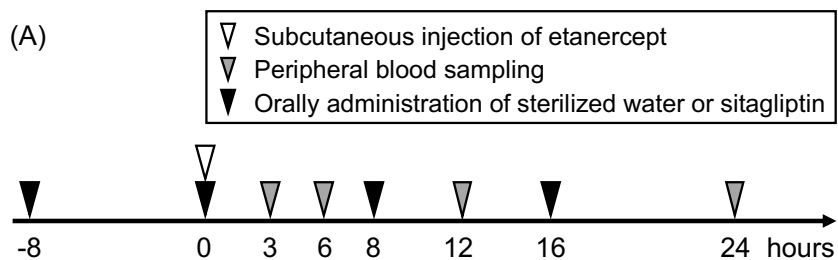
In vivo での ETN 切断における DPP-4 の寄与を評価するため、ETN (100  $\mu$ g、皮下投与) とシタグリプチン (DPP-4 阻害薬、100 mg/kg/8h、強制経口投与) を投与したマウス血中における FL、 $\Delta$ 1AA、 $\Delta$ 2AA 型 N 末端ペプチドの存在比を解析した。実験スケジュールを Fig III-3 (A) に示す。シタグリプチンは血漿中の DPP-4 活性を有意に抑制した (Fig III-3 (B)、いずれの時点でも  $p < 0.001$ )。コントロール群のマウス血中では、ETN の N 末端は急速に切断され  $\Delta$ 2AA 型となった。FL 型の相対量はシタグリプチン投与群においてコントロール群より有意に多かった (Fig III-3 (C)、いずれの時点でも  $p < 0.001$ )。シタグリプチン投与群では  $\Delta$ 1AA 型の相対量も高く、 $\Delta$ 2AA 型の相対量はコントロール群より低かった (Fig III-3 (D-E))。血漿中の ETN 濃度についてはいずれの時点でも両群間に有意差は認められなかった (Fig III-3 (F))。

FL 型の相対量はシタグリプチン投与群でも徐々に減少した (Fig III-3 (C))。ETN の N 末端が投与部位である皮下で切断されている可能性を検討するため、次に ETN (100  $\mu$ g) を静脈内投与したマウスを用いて N 末端切断を評価した (Fig III-4 (A))。シタグリプチン投与後、血漿中の DPP-4 活性の抑制が見られた (Fig III-4 (B))。皮下投与の場合と同様に、シタグリプチン投与群では非投与群より FL 型および  $\Delta$ 1AA 型の相対量が多く  $\Delta$ 2AA 型の相対量は少なかった (Fig III-4 (C-E))。ETN の血漿中濃度には有意差は認められなかった (Fig III-4 (F))。静脈内投与の場合も皮下投与と同様に、シタグリプチン投与群であっても FL 型の相対量が徐々に減少した (Fig III-4 (C))。

### III-5 In vitro における ETN の N 末端切断と DPP-4 の寄与

In vitro での DPP-4 による N 末端切断を評価するため、ETN に rhDPP-4 を反応させた。反応後、FL 型および  $\Delta$ 1AA 型は検出されず、 $\Delta$ 2AA 型の相対量が著しく増加した (Fig III-5、 $p < 0.001$ )。この現象はシタグリプチンの共処置でほぼ完全に阻害された。

TNF- $\alpha$  および TNF- $\beta$  への結合親和性に対する N 末端切断の影響を調べるため、ETN の推定  $K_D$  値を rhDPP-4 処置の有無で比較した。処置の有無によらず、用量反応曲線は同等の結合量を示し (Fig III-6 (A-B))、rhTNF- $\alpha$  および rhTNF- $\beta$  に対する  $K_D$  値に有意差は認められなかった (Fig III-6 (C-D))。





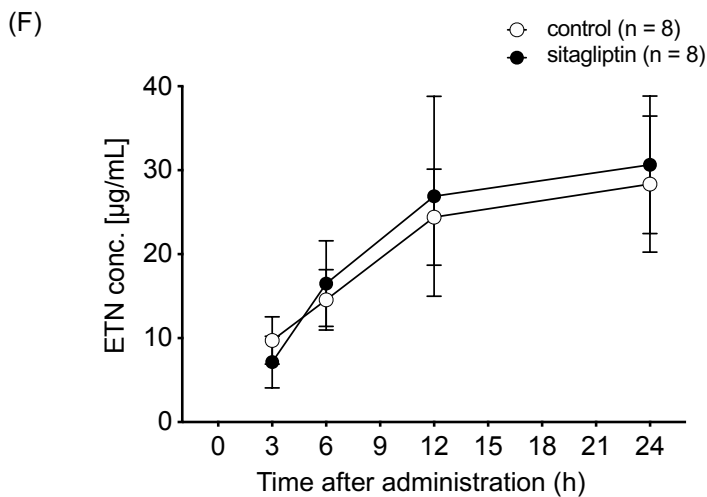
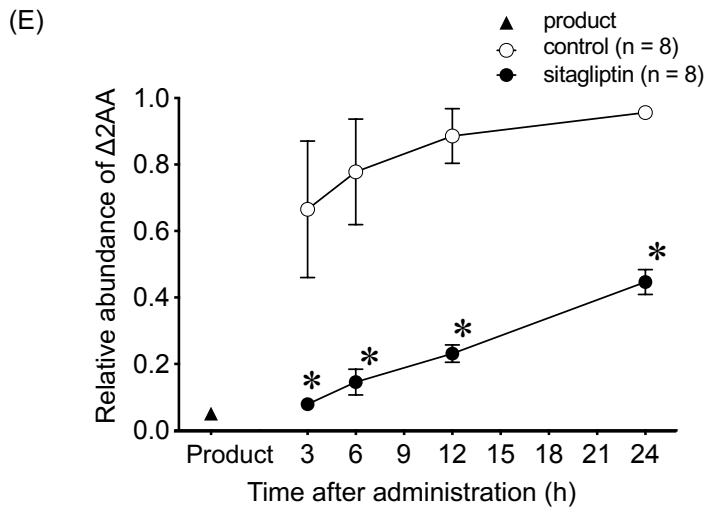
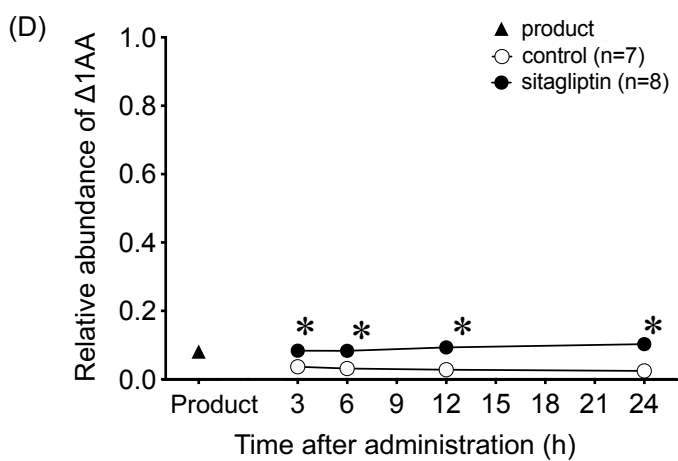
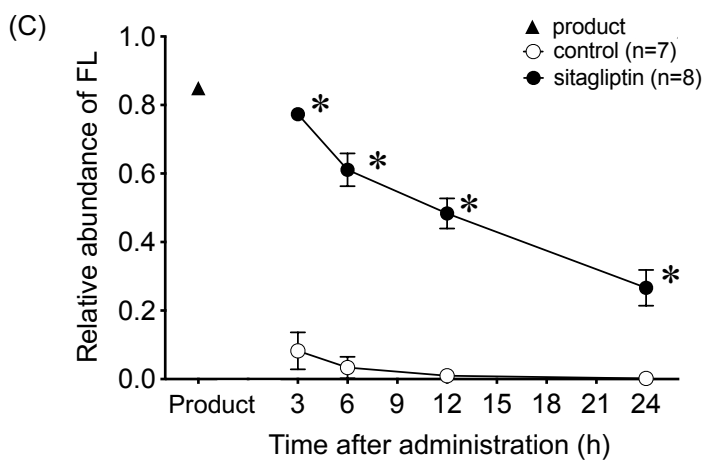
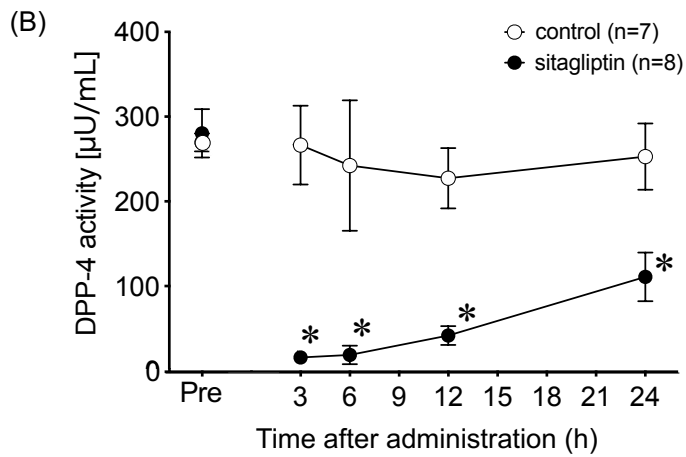
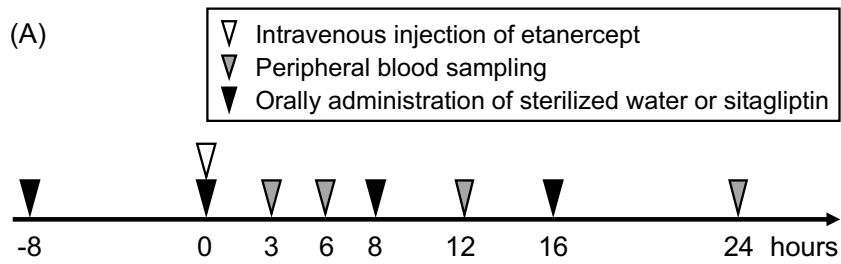


Fig III-3. Biotransformation at the N-terminus of ETN in mice. (A) Experimental design for the in vivo study. ETN (100  $\mu g/body$ ) was subcutaneously administered to mice at 0 h. Sterilized water (n = 8) or sitagliptin (n = 8) was orally administered at -8, 0, 8, and 16 h. Peripheral blood was collected at 3, 6, 12, and 24 h. (B) DPP-4 activity levels in plasma from mice treated with sterilized water (open circles) or sitagliptin (closed circles). The “Pre” plasma samples were obtained before the treatments with sterilized water or sitagliptin. (C–E) The ratios of N-terminal peptide with the FL form (C),  $\Delta 1AA$  form (D),  $\Delta 2AA$  form (E). The “Product” sample was an ETN product prior to administration prepared in mice serum (closed triangle). The 3, 6, 12, and 24 h samples were plasma from mice treated with sterilized water (open circles) or sitagliptin (closed circles). (F) Changes in concentrations of ETN in mice plasma treated with sterilized water (open circles) or sitagliptin (closed circles). Bars represent the mean  $\pm$  standard deviation. Data were analyzed using Student's t-test, compared to the control group at the same time point. \*: p < 0.001. Abbreviations:  $\Delta 1AA$ , cleavage of 1 amino acid;  $\Delta 2AA$ , cleavage of 2 amino acids; DPP-4, dipeptidyl peptidase-4; ETN, etanercept; FL, full length.



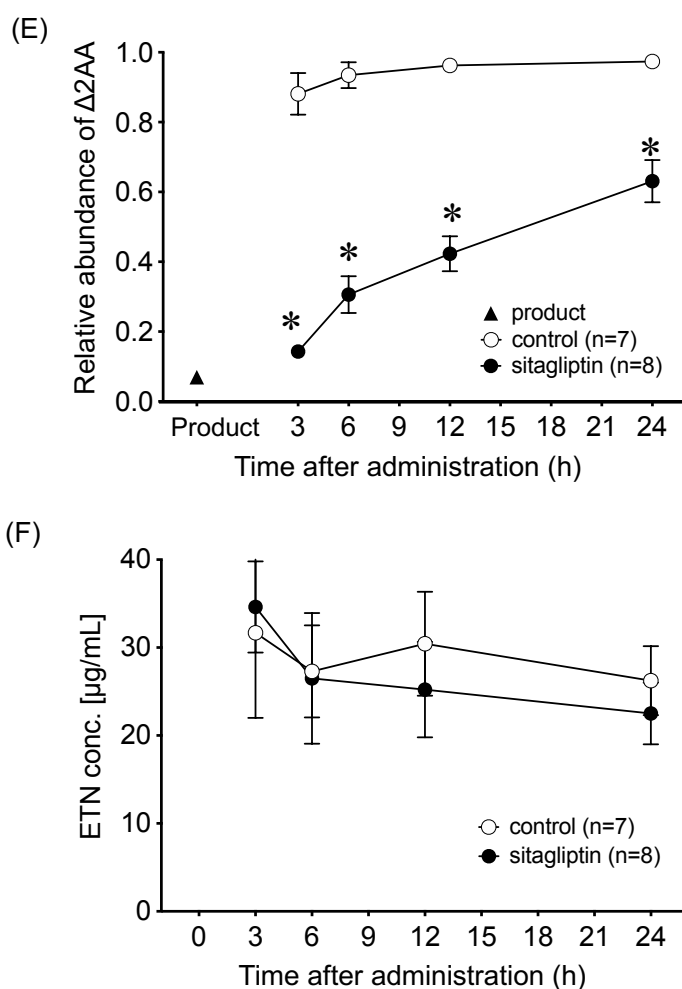


Fig III-4. N-terminal forms and concentration profiles of intravenously administered ETN in the presence or absence of sitagliptin treatment. (A) Experimental design for in vivo study. ETN (100  $\mu\text{g/body}$ ) was intravenously administered to mice at 0 h. Sterilized water (n = 7) or sitagliptin (n = 8) was orally administered at -8, 0, 8, and 16 h. Peripheral blood was collected at 3, 6, 12, and 24 h. (B) DPP-4 activity levels in plasma from mice treated with sterilized water (open circles) or sitagliptin (closed circles). The “Pre” plasma samples were obtained before the treatments with sterilized water or sitagliptin. (c–e) The ratios of N-terminal peptide with the FL form (C),  $\Delta 1AA$  form (D), and  $\Delta 2AA$  form (E). The “Product” sample was an etanercept product prior to administration prepared in mice serum (closed triangle). The 3, 6, 12, and 24 h samples were plasma from mice treated with sterilized water (open circles) or sitagliptin (closed circles). (F) Changes in concentrations of etanercept in mice plasma treated with sterilized water (open circles) or sitagliptin (closed circles). Bars represent the mean  $\pm$  standard deviation. Data were analyzed using Student's *t*-test, comparing to the control group at the same time point. \*:  $p < 0.001$ . Abbreviations:  $\Delta 1AA$ , cleavage of 1 amino acid;  $\Delta 2AA$ , cleavage of 2 amino acids; DPP-4, dipeptidyl peptidase-4; ETN, etanercept; FL, full length.

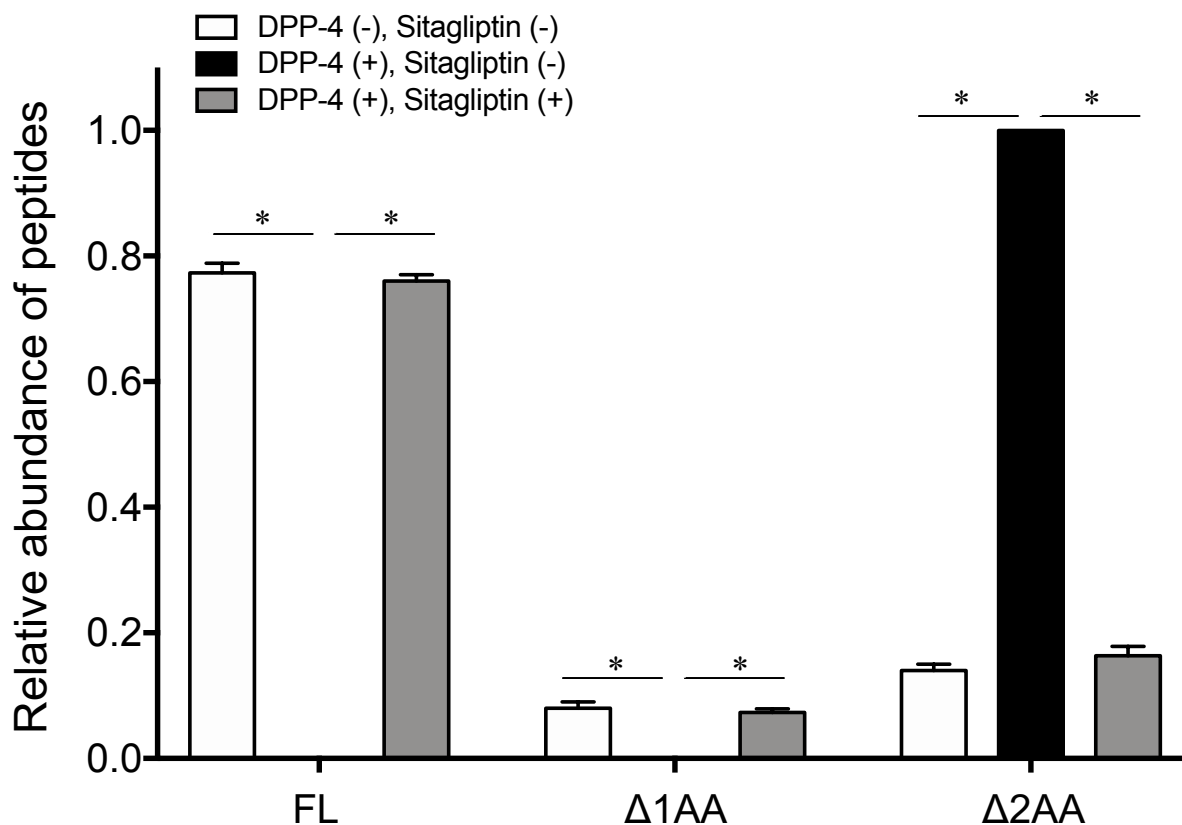


Fig III-5. Cleavage of etanercept using rhDPP-4. Calculated relative abundance of FL,  $\Delta$ 1AA, and  $\Delta$ 2AA forms of etanercept are shown. ETN (10  $\mu$ g/mL) was incubated for 24 h with rhDPP-4 (10  $\mu$ g/mL) in the absence or presence of sitagliptin (500  $\mu$ g/mL). Error bars indicate standard deviation. One-way ANOVA with post-hoc Tukey's multiple comparisons test was conducted to compare differences among the three groups. \*:  $p < 0.001$ . Abbreviations: ANOVA, analysis of variance;  $\Delta$ 1AA, cleavage of 1 amino acid;  $\Delta$ 2AA, cleavage of 2 amino acids; DPP-4, dipeptidyl peptidase-4; ETN, etanercept; FL, full length; rh, recombinant human.

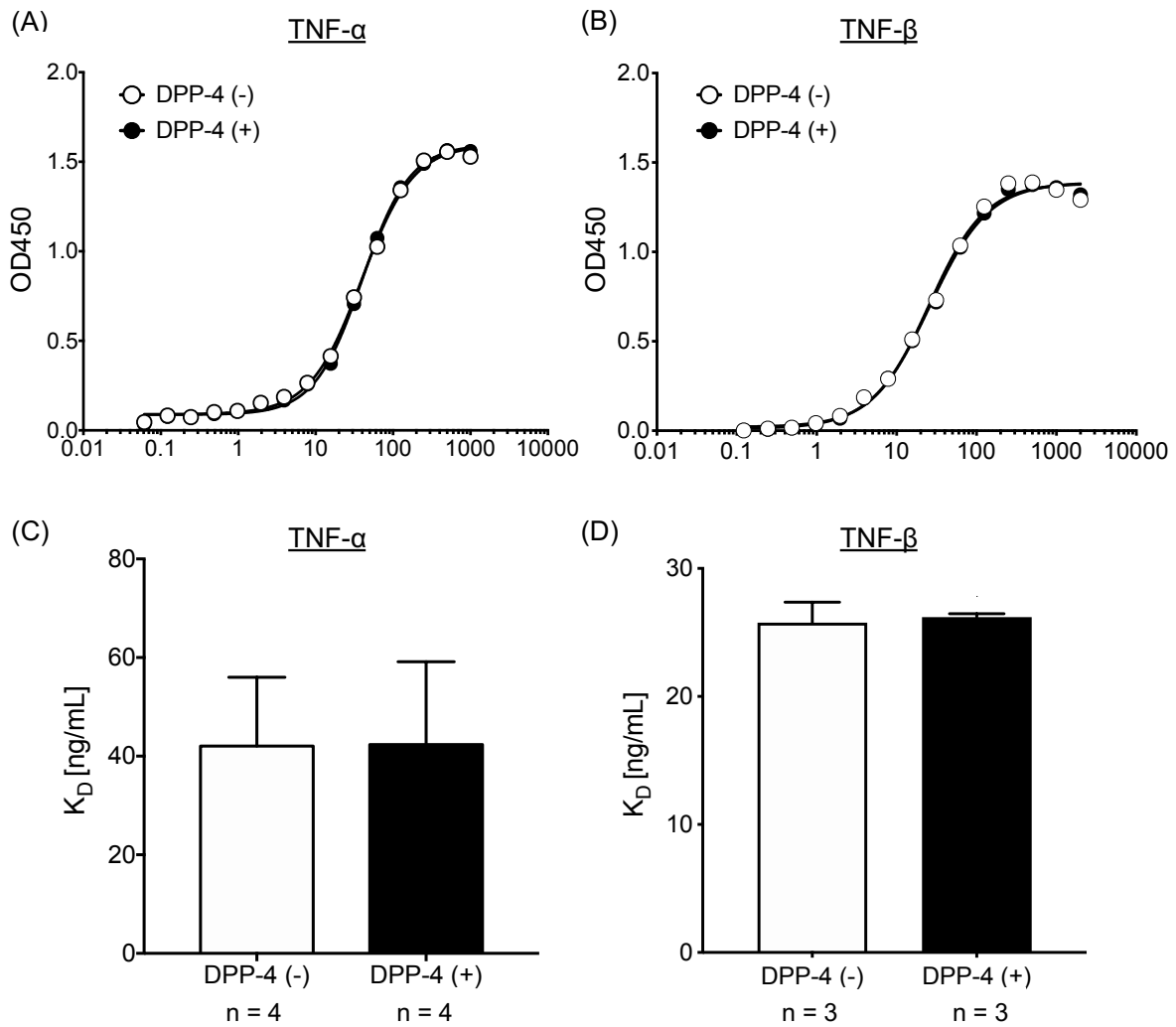


Fig III-6. Binding affinities of ETN treated with/without rhDPP-4 to rhTNF- $\alpha$  or rhTNF- $\beta$ . (A-B) Binding curves of ETN incubated with (closed circles) or without (open circles) rhDPP-4 against plate-immobilized rhTNF- $\alpha$  (A) or rhTNF- $\beta$  (B). (C-D) Calculated  $K_D$  values for rhTNF- $\alpha$  (C) or rhTNF- $\beta$  (D). Data are the averages of at least three independent experiments. The Student's t-test was performed for the analysis of differences. Abbreviations: DPP-4, dipeptidyl peptidase-4; ETN, etanercept;  $K_D$ , dissociation constant; OD450, optimal density of 450 nm light; rh, recombinant human; TNF, tumor necrosis factor.

### III-6 考察

本研究では、生体内投与後の ETN の N 末端領域における構造変化を評価した。投与前の製剤中での N 末端構造の不均一性は過去に報告されており、 $\Delta 1AA$  型と  $\Delta 2AA$  型がそれぞれ 23%と 3%の割合で存在した<sup>121</sup>。本研究においても同様の構造体が ETN 製剤中に観察された。N 末端構造の割合分布は異なったが、これはロット間のばらつきに起因している可能性が考えられる。低分子化合物とは異なり、抗体医薬品に対する代謝物研究は一般的に行われていないが<sup>126</sup>、本研究では RA 患者血中に  $\Delta 2AA$  型 ETN が製剤中よりも高値で検出された。この結果は、ETN が N 末端上のバイオトランスフォーメーションを受けることを示唆する。

生体内の抗体医薬品の分析において、近年では従来のリガンド結合アッセイに代わる MS を用いたアプローチが確立されている<sup>127</sup>。この技術により、タンパク質に由来する特定のペプチド断片の検出や定量が可能になった。本研究での分析結果から、ETN の N 末端由来の FL ペプチドはアミノ酸の切断を受けるため循環血液中では検出されないことが示された。これまでも MS ベースの分析系はいくつかのバイオトランスフォーメーションの解明に貢献しており<sup>128,129</sup>、不均一性を有する抗体医薬品の構造的特徴の理解に不可欠なツールである。

ETN の特性評価は、製剤中の主要な形態として見出されている FL 型を対象に実施されてきた<sup>121</sup>。一方、本研究では投与後に体内で見られた主な形態である  $\Delta 2AA$  型の特性を評価した。N 末端を切断した ETN において、TNF- $\alpha$  や TNF- $\beta$  への結合親和性や短期間の血中濃度推移に変化は観察されなかった。ETN は TNF 受容体 II 型の細胞外ドメインとヒト IgG1 の Fc 部分が結合した融合タンパク質であり<sup>113,114</sup>、TNF 結合部位には ETN や TNF 受容体 II 型の N 末端は含まれない<sup>130,131</sup>。また、FcRn を介したリサイクリングは抗体医薬品や Fc 融合タンパク質の薬物動態に重要な役割を果たすが<sup>132</sup>、FcRn との結合には N 末端ではなく C 末端フラグメント (Fc 領域) のサブドメイン CH2-CH3 が関与する<sup>133</sup>。したがって、N 末端の切断が TNF との結合能や ETN の体内動態に直接影響を与えることはないと考えられる。

DPP-4 はポリペプチドの N 末端で X-プロリンまたは X-アラニンジペプチドを切断するセリンエキソペプチダーゼであり、種間で保存性が高い<sup>134,135</sup>。インクレチンホルモンの

グルコース依存性インスリン分泌促進ポリペプチドやグルカゴン様ペプチド-1の調節に重要な役割を担っており、その阻害薬は2型糖尿病の治療に汎用される<sup>136,137</sup>。またDPP-4は、コロニー刺激因子、インターロイキン-3、エリスロポエチンなどの内因性基質のN末端を切断し、それらの生理活性を低下させることが報告されている<sup>138</sup>。一方、その外因性基質として同定された医薬品に関する報告は限られおり、治療薬としての承認がなされていない融合タンパク質：テトラネクチン-アポリポプロテインA1のみについて *in vivo* および *in vitro* でのバイオトランスフォーメーションが報告されている<sup>139,140</sup>。本研究はDPP-4がETNを基質として認識し、内因性タンパク質だけでなく外因的に投与された抗体医薬品の切断にも寄与しうることを明らかにした。

本研究での *in vivo* 実験において、ETNをマウスへ皮下投与した場合だけでなく静脈内投与した場合にも、そのN末端切断が観察された。また、シタグリプチンの高用量投与により血漿中のDPP-4活性が持続的に抑制されたにもかかわらず、N末端切断の抑制は維持されなかった。したがって、他の酵素もN末端切断に関与している可能性が考えられる。DPP-8やDPP-9など、DPP-4と類似の基質特異性を有するペプチダーゼが存在し<sup>141</sup>、これらもETNのN末端切断に寄与している可能性がある。

以上、本章ではETNが体内でN末端切断を受け、DPP-4がその反応に寄与する証拠を提示した。MSベースの分析技術はバイオトランスフォーメーションの検出に有用であり、抗体医薬品の真の薬物動態の理解に貢献しうるものと考えられる。

## 結 論

以上、三章にわたり、著者は抗TNF- $\alpha$ 抗体医薬品の適正使用に必要なエビデンス構築を目的とした検討を行い、以下の結論を得た。

### 第 I 章 日本の保険請求データベースを利用したインフリキシマブ治療継続率調査

実臨床での IFX 治療の 5 年継続率は適応症によって異なり、疾患によって IFX 治療に対する治療応答性が異なる可能性が示唆された。また、無作為化比較試験で報告された有効性は必ずしも実臨床における治療継続率を反映しえないことが示された。IFX の治療継続率に影響を与える因子として、RA では性別や抗体医薬品での前治療歴が、CD および UC 患者では投与量が示された。これらの知見は、実臨床で IFX 治療効果を安定的に持続させる治療戦略考案の一助となりうる。

### 第 II 章 自施設コホート調査に基づく関節リウマチ患者における血中インフリキシマブ濃度測定の有用性評価

実臨床の RA 治療において血中 IFX 濃度は治療効果と相関することを示し、二次不応答患者を識別するマーカーとしての活用が期待された。また、血中 IFX 濃度が低く血中 IL-6 濃度が高い患者では、その後 1 年以内に投与が中止されやすいことが明らかとなった。RA 患者に対する IFX 治療において、血中 IFX 濃度や IL-6 濃度の測定は二次不応答の判断や予測に役立ち、治療最適化に貢献しうることが示唆された。

### 第 III 章 質量分析系を用いた生体内投与後のエタネルセプト構造変化の解析

ETN の N 末端 2 アミノ酸は RA 患者への投与後に生体内で切断を受けることを見出した。N 末端アミノ酸配列から DPP-4 が ETN の N 末端切断に寄与すると仮説を立て、種々の実験からそれを証明した。MS は抗体医薬品のバイオトランスフォーメーションの検出に有力な分析技術であり、抗体医薬品の真の薬物動態の解明に貢献することが期待された。



以上、著者は保険請求データベースや自施設コホートのリアルワールドデータ解析を行い、実臨床における抗 TNF- $\alpha$  抗体医薬品 IFX を用いた薬物治療の最適化に、患者因子や血中薬物濃度の評価が有用であることを明らかにした。また、抗 TNF- $\alpha$  抗体医薬品 ETN のバイオトランスフォーメーションを解明し、適切な分析方法の選択と構造理解に基づく抗体医薬品の真の体内動態評価の必要性を示した。本研究成果は、医薬品の適正使用を推進するうえでのリアルワールドデータの価値を裏付けるとともに、抗体医薬品の体内動態に対する深い理解に基づく患者個別の最適化医療の実現につながる有用な情報であると考えられる。

## 謝 辞

終わりに臨み、本研究に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学医学部附属病院薬剤部 松原 和夫 名誉教授（現 和歌山県立医科大学薬学部 教授／和歌山県立医科大学附属病院薬剤部 薬剤部長）ならびに 寺田 智祐 教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、研究遂行や論文執筆にあたり直接御指導を賜り、平素より有益な御助言を戴きました京都大学大学院薬学研究科／京都大学医学部附属病院薬剤部 米澤 淳 准教授に心から感謝申し上げます。多くの有益な御助言と御指導を戴きました京都大学医学部附属病院 中川 貴之 准教授、今井 哲司 講師、中川 俊作 助教、平 大樹 助教に深く感謝いたします。多大な御助言と御指導を戴きました弘前大学医学部附属病院薬剤部 早狩 誠 元教授、神戸大学医学部附属病院 糸原 光太郎 特命助教に感謝の意を表します。また、本研究の実施にあたり多大なる御協力を賜りました京都大学医学部附属病院リウマチセンター 森信 暁雄 教授、田中 真生 特定准教授、橋本 求 特定講師（現 大阪公立大学大学院医学研究科 膠原病内科学／大阪公立大学医学部附属病院 膠原病リウマチ内科 教授）、大西 輝 特定講師、鬼澤 秀夫 特定助教、藤井 貴之 特定助教、村田 浩一 特定助教、京都大学医学部附属病院整形外科 松田 秀一 教授、京都大学大学院医学研究科附属がん免疫総合研究センター 村上 孝作 特定准教授、昭和大学 統括薬剤部／薬学部病院薬剤学講座 百 賢二 准教授、株式会社 島津製作所 嶋田 崇 博士、岩本 典子 博士、横山 琴子 氏、国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 石井 明子 博士、柴田 寛子 博士、西村 和子 氏に心からの感謝と御礼を申し上げます。

本研究の遂行にあたり、共同研究者として御協力を戴きました京都大学医学部附属病院薬剤部研究室 中江 一統 氏、中村 美由紀 氏に深く感謝申し上げます。御指導、御助言を戴きました荻原 孝史 博士、小柳 円花 博士、金 叢芸 博士、Ntogwa Mpumelelo 博士をはじめ、諸先輩方に感謝いたします。増田 崇 氏、中山 葵 氏、島田 美緒 氏をはじめ、京都大学医学部附属病院薬剤部研究室の諸氏に日々の感謝を申し上げます。

本研究は藤多仁生奨学金ならびに JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム JPMJSP2110 の支援を受けたものです。故 藤多 哲朗 名誉教授と御遺族・関係者の皆様、京都大学大学院教育支援機構の皆様に謹んで御礼申し上げます。

最後に、研究活動に専念できるよう多大な御支援を賜り、どのような状況においても応援くださいました、著者の良き理解者である父実、母恵子、兄諒、祖母康枝、そして最愛の妻祥子に心からの感謝を申し上げます。

## 論文目録

本研究の内容は、以下の論文に発表した。

Masui S, Yonezawa A, Momo K, Nakagawa S, Itohara K, Imai S, Nakagawa T, Matsubara K  
Infliximab Treatment Persistence among Japanese Patients with Chronic Inflammatory Diseases: A  
Retrospective Japanese Claims Data Study.

*Biol. Pharm. Bull.* 2022; 45 (3): 323-332.

Nakae K\*, Masui S\*, Yonezawa A, Hashimoto M, Watanabe R, Murata K, Murakami K, Tanaka M, Ito H,  
Yokoyama K, Iwamoto N, Shimada T, Nakamura M, Denda M, Itohara K, Nakagawa S, Ikemi Y, Imai S,  
Nakagawa T, Hayakari M, Matsubara K.

\*: Contributed equally to this work

Potential application of measuring serum infliximab levels in rheumatoid arthritis management: A  
retrospective study based on KURAMA cohort data.

*PLoS. One.* 2021;16 (10): e0258601.

Masui S, Yonezawa A, Yokoyama K, Iwamoto N, Shimada T, Onishi A, Onizawa H, Fujii T, Murakami K,  
Murata K, Tanaka M, Nakagawa S, Hira D, Itohara K, Imai S, Nakagawa T, Hayakari M, Matsuda S,  
Morinobu A, Terada T, Matsubara K.

N-terminus of Etanercept is Proteolytically Processed by Dipeptidyl Peptidase-4.

*Pharm Res.* 2022; 39 (10): 2541-2554.

## 引用文献

1. Feldmann M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2(5): 364-371.
2. Lawson MM, Thomas AG, Akobeng AK. Tumour necrosis factor alpha blocking agents for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006; (3): CD005112.
3. Behm BW, Bickston SJ. Tumor necrosis factor-alpha antibody for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008; (1): CD006893.
4. Roda G, Jharap B, Neeraj N, Colombel JF. Loss of Response to Anti-TNFs: Definition, Epidemiology, and Management. *Clin Transl Gastroenterol*. 2016; 7 (1): e135.
5. Wong U, Cross RK. Primary and secondary nonresponse to infliximab: mechanisms and countermeasures. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2017; 13 (10): 1039-1046.
6. Fine S, Papamichael K, Cheifetz AS. Etiology and Management of Lack or Loss of Response to Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2019; 15 (12): 656-665.
7. Takeuchi T, Miyasaka N, Tatsuki Y, et al. Baseline tumour necrosis factor alpha levels predict the necessity for dose escalation of infliximab therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011; 70 (7): 1208-1215.
8. Baert F, Noman M, Vermeire S, et al. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2003; 348 (7): 601-608.
9. Siljehult F, Ärlestig L, Eriksson C, Rantapää-Dahlqvist S. Concentrations of infliximab and anti-drug antibodies in relation to clinical response in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 2018; 47 (5): 345-350.
10. Takeuchi T, Miyasaka N, Inoue K, Abe T, Koike T; RISING study. Impact of trough serum level on radiographic and clinical response to infliximab plus methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: results from the RISING study. *Mod Rheumatol*. 2009; 19 (5) :478-487.
11. Mulleman D, Méric JC, Paintaud G, et al. Infliximab concentration monitoring improves the control of disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2009 ;11 (6): R178.
12. Price S. Rheumatoid arthritis: monitoring serum concentration of infliximab might improve RA disease control. *Nat Rev Rheumatol*. 2010 ;6 (2): 66.
13. Schadt S, Hauri S, Lopes F, et al. Are Biotransformation Studies of Therapeutic Proteins Needed?

- Scientific Considerations and Technical Challenges. *Drug Metab Dispos.* 2019; 47 (12): 1443-1456.
14. Rogers AS. Adverse drug events: identification and attribution. *Drug Intell Clin Pharm.* 1987; 21 (11): 915-920.
  15. Monti S, Grosso V, Todoerti M, Caporali R. Randomized controlled trials and real-world data: differences and similarities to untangle literature data. *Rheumatology (Oxford).* 2018; 57 (57 Suppl 7): vii54-vii58.
  16. Black N. Why we need observational studies to evaluate the effectiveness of health care. *BMJ.* 1996; 312 (7040): 1215-1218.
  17. Garrison LP Jr, Neumann PJ, Erickson P, Marshall D, Mullins CD. Using real-world data for coverage and payment decisions: the ISPOR Real-World Data Task Force report. *Value Health.* 2007; 10 (5): 326-335.
  18. Sfikakis PP. The first decade of biologic TNF antagonists in clinical practice: lessons learned, unresolved issues and future directions. *Curr Dir Autoimmun.* 2010; 11: 180-210.
  19. Buch MH, Bingham SJ, Bryer D, Emery P. Long-term infliximab treatment in rheumatoid arthritis: subsequent outcome of initial responders. *Rheumatology (Oxford).* 2007; 46 (7): 1153-1156.
  20. Subedi S, Gong Y, Chen Y, Shi Y. Infliximab and biosimilar infliximab in psoriasis: efficacy, loss of efficacy, and adverse events. *Drug Des Devel Ther.* 2019; 13: 2491-2502.
  21. Gill KL, Machavaram KK, Rose RH, Chetty M. Potential Sources of Inter-Subject Variability in Monoclonal Antibody Pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet.* 2016; 55 (7): 789-805.
  22. Strand V, Balsa A, Al-Saleh J, et al. Immunogenicity of Biologics in Chronic Inflammatory Diseases: A Systematic Review. *BioDrugs.* 2017; 31 (4): 299-316.
  23. Chen C, Hartzema AG, Xiao H, et al. Real-world Pattern of Biologic Use in Patients With Inflammatory Bowel Disease: Treatment Persistence, Switching, and Importance of Concurrent Immunosuppressive Therapy. *Inflamm Bowel Dis.* 2019; 25 (8): 1417-1427.
  24. Mourad A, Straube S, Armijo-Olivo S, Gniadecki R. Factors predicting persistence of biologic drugs in psoriasis: a systematic review and meta-analysis. *Br J Dermatol.* 2019; 181 (3): 450-458.
  25. Lauper K, Finckh A. Predictive factors of treatment persistence in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine.* 2020; 87 (6): 531-534.
  26. Schulz KF, Altman DG, Moher D; CONSORT Group. CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMC Med.* 2010; 8: 18.
  27. Murad MH, Asi N, Alsawas M, Alahdab F. New evidence pyramid. *Evid Based Med.* 2016; 21 (4): 125-127.

28. Wolfe F. The epidemiology of drug treatment failure in rheumatoid arthritis. *Baillieres Clin Rheumatol*. 1995; 9 (4): 619-632.
29. Zink A, Strangfeld A, Schneider M, et al. Effectiveness of tumor necrosis factor inhibitors in rheumatoid arthritis in an observational cohort study: comparison of patients according to their eligibility for major randomized clinical trials. *Arthritis Rheum*. 2006; 54 (11): 3399-3407.
30. Ha C, Ullman TA, Siegel CA, Kombluth A. Patients enrolled in randomized controlled trials do not represent the inflammatory bowel disease patient population. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012; 10 (9): 1002-e78.
31. Garcia-Doval I, Carretero G, Vanaclocha F, et al. Risk of serious adverse events associated with biologic and nonbiologic psoriasis systemic therapy: patients ineligible vs eligible for randomized controlled trials. *Arch Dermatol*. 2012; 148 (4): 463-470.
32. Mason KJ, Barker JNWN, Smith CH, et al. Comparison of Drug Discontinuation, Effectiveness, and Safety Between Clinical Trial Eligible and Ineligible Patients in BADBIR. *JAMA Dermatol*. 2018; 154 (5): 581-588.
33. Japan Medical Data Center.: <https://www.jmdc.co.jp/en/>, accessed 5 January, 2021.
34. Yokoyama K, Yamazaki K, Katafuchi M, Ferchichi S. A Retrospective Claims Database Study on Drug Utilization in Japanese Patients with Crohn's Disease Treated with Adalimumab or Infliximab. *Adv Ther*. 2016; 33 (11): 1947-1963.
35. Kobayashi T, Udagawa E, Uda A, Hibi T, Hisamatsu T. Impact of immunomodulator use on treatment persistence in patients with ulcerative colitis: A claims database analysis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2020; 35 (2): 225-232.
36. Sruamsiri R, Iwasaki K, Tang W, Mahlich J. Persistence rates and medical costs of biological therapies for psoriasis treatment in Japan: a real-world data study using a claims database. *BMC Dermatol*. 2018; 18 (1): 5.
37. Sugiyama N, Kawahito Y, Fujii T, et al. Treatment Patterns, Direct Cost of Biologics, and Direct Medical Costs for Rheumatoid Arthritis Patients: A Real-world Analysis of Nationwide Japanese Claims Data. *Clin Ther*. 2016; 38 (6): 1359-1375.e1.
38. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet*. 2002; 359 (9317): 1541-1549.
39. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2005; 353 (23): 2462-2476.

40. Torii H, Nakagawa H; Japanese Infliximab Study investigators. Infliximab monotherapy in Japanese patients with moderate-to-severe plaque psoriasis and psoriatic arthritis. A randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial. *J Dermatol Sci*. 2010; 59 (1): 40-49.
41. Lipsky PE, van der Heijde DM, St Clair EW, et al. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *N Engl J Med*. 2000; 343 (22): 1594-1602.
42. Eshuis EJ, Peters CP, van Bodegraven AA, et al. Ten years of infliximab for Crohn's disease: outcome in 469 patients from 2 tertiary referral centers. *Inflamm Bowel Dis*. 2013; 19 (8): 1622-1630.
43. Juillerat P, Sokol H, Froehlich F, et al. Factors associated with durable response to infliximab in Crohn's disease 5 years and beyond: a multicenter international cohort. *Inflamm Bowel Dis*. 2015; 21 (1): 60-70.
44. Oussalah A, Evesque L, Laharie D, et al. A multicenter experience with infliximab for ulcerative colitis: outcomes and predictors of response, optimization, colectomy, and hospitalization. *Am J Gastroenterol*. 2010; 105 (12): 2617-2625.
45. Sbidian E, Mezzarobba M, Weill A, Coste J, Rudant J. Persistence of treatment with biologics for patients with psoriasis: a real-world analysis of 16 545 biologic-naïve patients from the French National Health Insurance database (SNIIRAM). *Br J Dermatol*. 2019; 180 (1): 86-93.
46. Flouri I, Markatseli TE, Voulgari PV, et al. Comparative effectiveness and survival of infliximab, adalimumab, and etanercept for rheumatoid arthritis patients in the Hellenic Registry of Biologics: Low rates of remission and 5-year drug survival. *Semin Arthritis Rheum*. 2014; 43 (4): 447-457.
47. Souto A, Maneiro JR, Gómez-Reino JJ. Rate of discontinuation and drug survival of biologic therapies in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis of drug registries and health care databases. *Rheumatology (Oxford)*. 2016; 55 (3): 523-534.
48. Emery P, Vlahos B, Szczypa P, et al. Longterm Drug Survival of Tumor Necrosis Factor Inhibitors in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol*. 2020; 47 (4): 493-501.
49. van der Schoot LS, van den Reek JMPA, Groenewoud JMM, et al. Female patients are less satisfied with biological treatment for psoriasis and experience more side-effects than male patients: results from the prospective BioCAPTURE registry. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019; 33 (10): 1913-1920.
50. Hambarzumyan K, Hermanrud C, Marits P, et al. Association of female sex and positive rheumatoid factor with low serum infliximab and anti-drug antibodies, related to treatment failure in early rheumatoid arthritis: results from the SWEFOT trial population. *Scand J Rheumatol*. 2019; 48 (5): 362-366.
51. Olivera P, Thiriet L, Luc A, Baumann C, Danese S, Peyrin-Biroulet L. Treatment Persistence for



- Infliximab Versus Adalimumab in Crohn's Disease: A 14-Year Single-Center Experience. *Inflamm Bowel Dis.* 2017; 23 (6): 976-985.
52. Kristensen LE, Kapetanovic MC, Gülfe A, Söderlin M, Saxne T, Geborek P. Predictors of response to anti-TNF therapy according to ACR and EULAR criteria in patients with established RA: results from the South Swedish Arthritis Treatment Group Register. *Rheumatology (Oxford).* 2008; 47 (4): 495-499.
  53. Mahlich J, Sruamsiri R. Persistence with biologic agents for the treatment of rheumatoid arthritis in Japan. *Patient Prefer Adherence.* 2016; 10: 1509-1519.
  54. Bonafede MMK, McMorrow D, Proudfoot C, Shinde S, Kuznik A, Chen CI. Treatment Persistence and Healthcare Costs Among Patients with Rheumatoid Arthritis After a Change in Targeted Therapy. *Am Health Drug Benefits.* 2018; 11 (4): 192-202.
  55. Maniadakis N, Toth E, Schiff M, et al. A Targeted Literature Review Examining Biologic Therapy Compliance and Persistence in Chronic Inflammatory Diseases to Identify the Associated Unmet Needs, Driving Factors, and Consequences. *Adv Ther.* 2018; 35 (9): 1333-1355.
  56. Matthey DL, Brownfield A, Dawes PT. Relationship between pack-year history of smoking and response to tumor necrosis factor antagonists in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2009; 36 (6): 1180-1187.
  57. Gil-Candel M, Gascón-Cánovas JJ, Urbietta-Sanz E, Rentero-Redondo L, Onteniente-Candela M, Iniesta-Navalón C. Comparison of drug survival between infliximab and adalimumab in inflammatory bowel disease. *Int J Clin Pharm.* 2020; 42 (2): 500-507.
  58. Furst DE, Gaylis N, Bray V, et al. Open-label, pilot protocol of patients with rheumatoid arthritis who switch to infliximab after an incomplete response to etanercept: the opposite study. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66 (7): 893-899.
  59. Fleischmann R, Goldman JA, Leirisalo-Repo M, et al. Infliximab efficacy in rheumatoid arthritis after an inadequate response to etanercept or adalimumab: results of a target-driven active switch study. *Curr Med Res Opin.* 2014; 30 (11): 2139-2149.
  60. Umeda M, Koga T, Ichinose K, et al. Efficacy of infliximab as a switched biologic in rheumatoid arthritis patients in daily clinical practice. *Immunol Med.* 2018; 41 (4): 181-186.
  61. Lloyd S, Bujkiewicz S, Wailoo AJ, Sutton AJ, Scott D. The effectiveness of anti-TNF-alpha therapies when used sequentially in rheumatoid arthritis patients: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatology (Oxford).* 2010; 49 (12): 2313-2321.
  62. Rendas-Baum R, Wallenstein GV, Koncz T, et al. Evaluating the efficacy of sequential biologic therapies

- for rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibitors. *Arthritis Res Ther*. 2011; 13 (1): R25.
63. Oei HB, Hooker RS, Cipher DJ, Reimold A. High rates of stopping or switching biological medications in veterans with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2009; 27 (6): 926-934.
  64. Menter A, Papp KA, Gooderham M, et al. Drug survival of biologic therapy in a large, disease-based registry of patients with psoriasis: results from the Psoriasis Longitudinal Assessment and Registry (PSOLAR). *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016; 30 (7): 1148-1158.
  65. Goekoop-Ruiterman YP, de Vries-Bouwstra JK, Allaart CF, et al. Clinical and radiographic outcomes of four different treatment strategies in patients with early rheumatoid arthritis (the BeSt study): a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum*. 2005; 52 (11): 3381-3390.
  66. Tanaka Y, Takeuchi T, Mimori T, et al. Discontinuation of infliximab after attaining low disease activity in patients with rheumatoid arthritis: RRR (remission induction by Remicade in RA) study. *Ann Rheum Dis*. 2010; 69 (7): 1286-1291.
  67. Torres J, Boyapati RK, Kennedy NA, Louis E, Colombel JF, Satsangi J. Systematic Review of Effects of Withdrawal of Immunomodulators or Biologic Agents From Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2015; 149 (7): 1716-1730.
  68. Hashimoto M, Furu M, Yamamoto W, et al. Factors associated with the achievement of biological disease-modifying antirheumatic drug-free remission in rheumatoid arthritis: the ANSWER cohort study. *Arthritis Res Ther*. 2018; 20 (1): 165.
  69. Maini R, St Clair EW, Breedveld F, et al. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet*. 1999; 354 (9194): 1932-1939.
  70. Hanauer SB, Wagner CL, Bala M, et al. Incidence and importance of antibody responses to infliximab after maintenance or episodic treatment in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004; 2 (7): 542-553.
  71. Chaudhari U, Romano P, Mulcahy LD, Dooley LT, Baker DG, Gottlieb AB. Efficacy and safety of infliximab monotherapy for plaque-type psoriasis: a randomised trial. *Lancet*. 2001; 357 (9271): 1842-1847.
  72. Yanai H, Hanauer SB. Assessing response and loss of response to biological therapies in IBD. *Am J Gastroenterol*. 2011; 106 (4): 685-698.

73. Ebina K, Hashimoto M, Yamamoto W, et al. Drug retention and discontinuation reasons between seven biologics in patients with rheumatoid arthritis -The ANSWER cohort study. *PLoS One*. 2018; 13 (3): e0194130.
74. Plasencia C, Jurado T, Villalba A, et al. Effect of Infliximab Dose Increase in Rheumatoid Arthritis at Different Trough Concentrations: A Cohort Study in Clinical Practice Conditions. *Front Med (Lausanne)*. 2015; 2: 71.
75. Kalden JR, Schulze-Koops H. Immunogenicity and loss of response to TNF inhibitors: implications for rheumatoid arthritis treatment. *Nat Rev Rheumatol*. 2017; 13 (12): 707-718.
76. Bendtzen K, Geborek P, Svenson M, Larsson L, Kapetanovic MC, Saxne T. Individualized monitoring of drug bioavailability and immunogenicity in rheumatoid arthritis patients treated with the tumor necrosis factor alpha inhibitor infliximab. *Arthritis Rheum*. 2006; 54 (12): 3782-3789.
77. Pascual-Salcedo D, Plasencia C, Ramiro S, et al. Influence of immunogenicity on the efficacy of long-term treatment with infliximab in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2011; 50 (8): 1445-1452.
78. Tzaban S, Massol RH, Yen E, et al. The recycling and transcytotic pathways for IgG transport by FcRn are distinct and display an inherent polarity. *J Cell Biol*. 2009; 185 (4): 673-684.
79. Kuo TT, Aveson VG. Neonatal Fc receptor and IgG-based therapeutics. *MAbs*. 2011; 3 (5): 422-430.
80. Masui S, Yonezawa A, Izawa K, et al. Plasma infliximab monitoring contributes to optimize Takayasu arteritis treatment: a case report. *J Pharm Health Care Sci*. 2019;5:9.
81. Terao C, Hashimoto M, Yamamoto K, et al. Three groups in the 28 joints for rheumatoid arthritis synovitis—analysis using more than 17,000 assessments in the KURAMA database. *PLoS One*. 2013; 8 (3): e59341.
82. Iwamoto N, Shimada T, Umino Y, et al. Selective detection of complementarity-determining regions of monoclonal antibody by limiting protease access to the substrate: nano-surface and molecular-orientation limited proteolysis. *Analyst*. 2014; 139 (3): 576-580.
83. Iwamoto N, Yokoyama K, Takanashi M, Yonezawa A, Matsubara K, Shimada T. Verification between Original and Biosimilar Therapeutic Antibody Infliximab Using nSMOL Coupled LC-MS Bioanalysis in Human Serum. *Curr Pharm Biotechnol*. 2018; 19 (6): 495-505.
84. Iwamoto N, Takanashi M, Yokoyama K, et al. Multiplexed monitoring of therapeutic antibodies for inflammatory diseases using Fab-selective proteolysis nSMOL coupled with LC-MS. *J Immunol Methods*. 2019; 472: 44-54.
85. Reinisch W, Jahnsen J, Schreiber S, et al. Evaluation of the Cross-reactivity of Antidrug Antibodies to CT-

- P13 and Infliximab Reference Product (Remicade): An Analysis Using Immunoassays Tagged with Both Agents. *BioDrugs*. 2017; 31 (3): 223-237.
86. Shibata H, Nishimura K, Miyama C, et al. Comparison of different immunoassay methods to detect human anti-drug antibody using the WHO erythropoietin antibody reference panel for analytes. *J Immunol Methods*. 2018; 452: 73-77.
87. Pallagi-Kunstar É, Farkas K, Szepes Z, et al. Utility of serum TNF- $\alpha$ , infliximab trough level, and antibody titers in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2014; 20 (17): 5031-5035.
88. Dannepond C, Maruani A, Machet L, Ternant D, Paintaud G, Samimi M. Serum infliximab concentrations in psoriatic patients treated with infliximab: a systematic review. *Acta Derm Venereol*. 2015; 95 (4): 401-406.
89. Vande Castele N, Ferrante M, Van Assche G, et al. Trough concentrations of infliximab guide dosing for patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2015; 148 (7): 1320-9.e3.
90. Warman A, Straathof JW, Derijks LJ. Therapeutic drug monitoring of infliximab in inflammatory bowel disease patients in a teaching hospital setting: results of a prospective cohort study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2015; 27 (3): 242-248.
91. Vallejo-Yagüe E, Keystone EC, Kandhasamy S, Micheroli R, Finckh A, Burden AM. Primary and secondary non-response: in need of operational definitions in observational studies. *Ann Rheum Dis*. 2021; 80 (8): 961-964.
92. Wolbink GJ, Voskuyl AE, Lems WF, et al. Relationship between serum trough infliximab levels, pretreatment C reactive protein levels, and clinical response to infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005; 64 (5): 704-707.
93. Güven E, Duus K, Lydolph MC, Jørgensen CS, Laursen I, Houen G. Non-specific binding in solid phase immunoassays for autoantibodies correlates with inflammation markers. *J Immunol Methods*. 2014; 403 (1-2): 26-36.
94. Jourdil JF, Lebert D, Gautier-Veyret E, et al. Infliximab quantitation in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: towards a standardization of the methods?. *Anal Bioanal Chem*. 2017; 409 (5): 1195-1205.
95. U.S. Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry.: < <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>>, accessed 5 January, 2021.
96. Kothari MM, Nguyen DL, Parekh NK. Strategies for overcoming anti-tumor necrosis factor drug

- antibodies in inflammatory bowel disease: Case series and review of literature. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 2017; 8 (3): 155-161.
97. Afif W, Loftus EV Jr, Faubion WA, et al. Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2010; 105 (5): 1133-1139.
  98. Keystone EC, Rampakakis E, Movahedi M, et al. Toward Defining Primary and Secondary Nonresponse in Rheumatoid Arthritis Patients Treated with Anti-TNF: Results from the BioTRAC and OBRI Registries. *J Rheumatol.* 2020; 47 (4): 510-517.
  99. St Clair EW, Wagner CL, Fasanmade AA, et al. The relationship of serum infliximab concentrations to clinical improvement in rheumatoid arthritis: results from ATTRACT, a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2002; 46 (6): 1451-1459.
  100. Wolbink GJ, Voskuyl AE, Lems WF, et al. Relationship between serum trough infliximab levels, pretreatment C reactive protein levels, and clinical response to infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005; 64 (5): 704-707.
  101. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995; 38 (1): 44-48.
  102. Smolen JS, Landewé RBM, Bijlsma JWJ, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann Rheum Dis.* 2020; 79 (6): 685-699.
  103. Takeuchi T, Miyasaka N, Tatsuki Y, et al. Inhibition of plasma IL-6 in addition to maintenance of an efficacious trough level of infliximab associated with clinical remission in patients with rheumatoid arthritis: analysis of the RISING Study. *Ann Rheum Dis.* 2012; 71 (9): 1583-1585.
  104. Takasugi K, Nishida K, Natsumeda M, Yamashita M, Yamamoto W, Ezawa K. IL-6 is an independent predictive factor of drug survival after dose escalation of infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2018; 28 (3): 452-460.
  105. van Schouwenburg PA, Rispens T, Wolbink GJ. Immunogenicity of anti-TNF biologic therapies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2013; 9 (3): 164-172.
  106. Charles P, Elliott MJ, Davis D, et al. Regulation of cytokines, cytokine inhibitors, and acute-phase proteins following anti-TNF-alpha therapy in rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 1999; 163 (3): 1521-1528.
  107. Dain L, Braun-Moscovici Y, Baum E, Nahir AM, Hoffer E. Modification of neutrophil function by

- plasma of rheumatoid arthritis patients treated with infliximab. *Clin Exp Rheumatol*. 2006; 24 (1): 38-44.
108. Takeuchi T. Treatment of rheumatoid arthritis with biological agents - as a typical and common immune-mediated inflammatory disease. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2017; 93 (8): 600-608.
109. Walsh G, Jefferis R. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat Biotechnol*. 2006; 24 (10): 1241-1252.
110. Jenkins N, Murphy L, Tyther R. Post-translational modifications of recombinant proteins: significance for biopharmaceuticals. *Mol Biotechnol*. 2008; 39 (2): 113-118.
111. Liu H, Gaza-Bulseco G, Faldu D, Chumsae C, Sun J. Heterogeneity of monoclonal antibodies. *J Pharm Sci*. 2008; 97 (7): 2426-2447.
112. ICH. S6 (R1) Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals.: <  
<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/s6r1-preclinical-safety-evaluation-biotechnology-derived-pharmaceuticals>>, accessed 22 June, 2022.
113. Moreland LW, Baumgartner SW, Schiff MH, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *N Engl J Med*. 1997; 337 (3): 141-147.
114. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther*. 2008; 117 (2): 244-279.
115. Lethaby A, Lopez-Olivo MA, Maxwell L, Burls A, Tugwell P, Wells GA. Etanercept for the treatment of rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013; (5): CD004525.
116. Zhao S, Mysler E, Moots RJ. Etanercept for the treatment of rheumatoid arthritis. *Immunotherapy*. 2018; 10 (6): 433-445.
117. Korth-Bradley JM, Rubin AS, Hanna RK, Simcoe DK, Lebsack ME. The pharmacokinetics of etanercept in healthy volunteers. *Ann Pharmacother*. 2000; 34 (2): 161-164.
118. Kawai S, Sekino H, Yamashita N, Tsuchiwata S, Liu H, Korth-Bradley JM. The comparability of etanercept pharmacokinetics in healthy Japanese and American subjects. *J Clin Pharmacol*. 2006; 46 (4): 418-423.
119. Takeuchi T, Miyasaka N, Kawai S, et al. Pharmacokinetics, efficacy and safety profiles of etanercept monotherapy in Japanese patients with rheumatoid arthritis: review of seven clinical trials. *Mod Rheumatol*. 2015; 25 (2): 173-186.
120. Zhang Z, Pan H, Chen X. Mass spectrometry for structural characterization of therapeutic antibodies. *Mass Spectrom Rev*. 2009; 28 (1): 147-176.
121. Lee JH, Yeo J, Park HS, et al. Biochemical characterization of a new recombinant TNF receptor-hyFc

- fusion protein expressed in CHO cells. *Protein Expr Purif.* 2013; 87 (1): 17-26.
122. Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand J Immunol.* 2001; 54 (3): 249-264.
123. Matteucci E, Giampietro O. Dipeptidyl peptidase-4 (CD26): knowing the function before inhibiting the enzyme. *Curr Med Chem.* 2009; 16 (23): 2943-2951.
124. Hampson G, Ward TH, Cummings J, et al. Validation of an ELISA for the determination of rituximab pharmacokinetics in clinical trials subjects. *J Immunol Methods.* 2010; 360 (1-2): 30-38.
125. Iwamoto N, Yokoyama K, Takanashi M, Yonezawa A, Matsubara K, Shimada T. Application of nSMOL coupled with LC-MS bioanalysis for monitoring the Fc-fusion biopharmaceuticals Etanercept and Abatacept in human serum. *Pharmacol Res Perspect.* 2018; 6 (4): e00422.
126. Hamuro LL, Kishnani NS. Metabolism of biologics: biotherapeutic proteins. *Bioanalysis.* 2012; 4 (2): 189-195.
127. Neubert H, Alley SC, Lee A, et al. 2020 White Paper on Recent Issues in Bioanalysis: BMV of Hybrid Assays, Acoustic MS, HRMS, Data Integrity, Endogenous Compounds, Microsampling and Microbiome (Part 1 - Recommendations on Industry/Regulators Consensus on BMV of Biotherapeutics by LCMS, Advanced Application in Hybrid Assays, Regulatory Challenges in Mass Spec, Innovation in Small Molecules, Peptides and Oligos). *Bioanalysis.* 2021; 13 (4): 203-238.
128. Chu KO, Liu DT, Chan KP, et al. Quantification and structure elucidation of in vivo bevacizumab modification in rabbit vitreous humor after intravitreal injection. *Mol Pharm.* 2012; 9 (12): 3422-3433.
129. Otani Y, Yonezawa A, Tsuda M, et al. Time-Dependent Structural Alteration of Rituximab Analyzed by LC/TOF-MS after a Systemic Administration to Rats. *PLoS One.* 2017; 12 (1): e0169588.
130. Banner DW, D'Arcy A, Janes W, et al. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell.* 1993; 73 (3): 431-445.
131. Mukai Y, Nakamura T, Yoshikawa M, et al. Solution of the structure of the TNF-TNFR2 complex. *Sci Signal.* 2010; 3 (148): ra83.
132. Liu L. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *Protein Cell.* 2018; 9 (1): 15-32.
133. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7 (9): 715-725.
134. Aertgeerts K, Ye S, Shi L, et al. N-linked glycosylation of dipeptidyl peptidase IV (CD26): effects on enzyme activity, homodimer formation, and adenosine deaminase binding. *Protein Sci.* 2004; 13 (1):

- 145-154.
135. Zhong J, Kankanala S, Rajagopalan S. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition: insights from the bench and recent clinical studies. *Curr Opin Lipidol.* 2016; 27 (5): 484-492.
  136. Drucker DJ. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition and the treatment of type 2 diabetes: preclinical biology and mechanisms of action. *Diabetes Care.* 2007; 30 (6): 1335-1343.
  137. Deacon CF. Dipeptidyl peptidase 4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2020; 16 (11): 642-653.
  138. Broxmeyer HE, Hoggatt J, O'Leary HA, et al. Dipeptidylpeptidase 4 negatively regulates colony-stimulating factor activity and stress hematopoiesis. *Nat Med.* 2012; 18 (12): 1786-1796.
  139. Zell M, Husser C, Staack RF, et al. In Vivo Biotransformation of the Fusion Protein Tetranectin-Apolipoprotein A1 Analyzed by Ligand-Binding Mass Spectrometry Combined with Quantitation by ELISA. *Anal Chem.* 2016; 88 (23): 11670-11677.
  140. Schadt S, Husser C, Staack RF, et al. The In Vitro Biotransformation of the Fusion Protein Tetranectin-Apolipoprotein A1. *Sci Rep.* 2019; 9 (1): 4074.
  141. Waumans Y, Baerts L, Kehoe K, Lambeir AM, De Meester I. The Dipeptidyl Peptidase Family, Prolyl Oligopeptidase, and Prolyl Carboxypeptidase in the Immune System and Inflammatory Disease, Including Atherosclerosis. *Front Immunol.* 2015; 6: 387.