

〈特集：検査技術の新たな展望（2）〉

バイオマーカー・プロファイリングによる 関節リウマチ新規診断法の検討

宇賀 均¹⁾、宮本 佳昭¹⁾、岡澤 貴裕¹⁾、熊谷 俊一^{2),3)}、倉田 寛一¹⁾

Biomarker profiles are useful for evaluating pathological conditions of rheumatoid arthritis and diagnosing anti-CCP antibody-negative patients

Hitoshi Uga¹⁾, Yoshiaki Miyamoto¹⁾, Takahiro Okazawa¹⁾,
Shunichi Kumagai^{2),3)} and Hirokazu Kurata¹⁾

Summary Interleukin 17-producing helper T (Th17) cells play pathogenic roles in autoimmune diseases, including rheumatoid arthritis (RA). Identification of novel Th17 cell-specific molecules may be useful for discovery of diagnostic markers in RA. We performed a comparative microarray analysis on *in vitro* differentiated Th1, Th2, Treg and Th17 cells. We found that podoplanin was expressed abundantly and specifically on the surface of the Th17 cells. Moreover, at the inflamed synovium of arthritic SKG mice, most of the accumulating Th17 cells were podoplanin-positive.

We also measured serum levels of cytokines and evaluated their usefulness as diagnostic markers for RA. By using multiple logistic regression model, we revealed that the combination of four cytokines can clearly discriminate not only anti-CCP antibody (ACPA)-positive but also ACPA-negative RA patients from non-RA arthritic patients.

These results indicate that the profiling of Th cell-specific molecules would be useful as a novel diagnostic marker for RA.

Key words: Th17, Cytokine, Rheumatoid arthritis, Biomarker, Diagnosis

I. はじめに

関節リウマチ（RA）は、関節滑膜を病変の主座とする原因不明の炎症性疾患である。長年、難治性の疾患とされ、対症療法として抗リウマ

チ薬・ステロイド・免疫抑制剤などが投与されてきたが、いずれは骨・軟骨の破壊が起こりQOL低下は避けられなかった。しかし、メソトレキセートや抗TNF α 抗体医薬（抗サイトカイン療法）が登場して以降は、発症早期の積極的

¹⁾シスメックス株式会社 中央研究所
〒651-2271 神戸市西区高塚台4-4-4

²⁾神戸大学大学院医学研究科 臨床検査医学分野

³⁾神鋼病院 膠原病リウマチセンター

¹⁾Systemex Corporation

4-4-4 Takatsukadai, Nishi-ku, Kobe 651-2271, Japan

²⁾Kobe University Graduate School of Medicine,

³⁾Shinko Hospital,

治療により、劇的な症状改善や、初期患者の完全寛解が可能になってきている（リウマチ治療のパラダイム・シフト）。

一方、RAの病因・病態の全容が解明されていないことから、的確な病型・病勢マーカーや科学的根拠に基づく診断指標が求められている。現在、RAの確定診断は、患者の関節の腫れ・痛み、症状の持続時間などの臨床所見と、血清中の自己抗体価などのスコア化によって行われ、基準を超えた場合に診断が確定する。しかし、医師の肉眼的所見や経過観察への依存度が高く、客観性・迅速性に乏しいことから、診断確定が遅れるケースも多く、早期治療の機会を逸する患者が存在することが問題となっている。また、RAの病勢診断も、主に、自覚症状・肉眼所見をもとにした診断スコア（DAS-28）により行われている。やはり定量性・客観性に乏しく、薬剤過剰投与による副作用（免疫抑制、感染症）を招いたり、潜在的な病勢の悪化を見逃したり、逆に治療が奏功しても寛解を正確に判定できないなどの問題が生じている。

これらの現行診断法の問題を解決するべく、免疫細胞の動態や炎症強度を定量的に測定する検査が待望されている。動物実験などからヘルパーT（Th）細胞や種々のサイトカインが病態悪化に重要な役割を担っていることが明らかになっている。本稿の前半では、近年RAへの関連が注目されるTh17細胞のマーカー候補を遺伝子発現プロファイル解析によって抽出し、SKG関節炎モデルマウスを用いて病態に関係するマ-

ーカーを検証した研究を紹介する。また、後半では、RA患者血清中の複数のサイトカインのプロファイリングによる新規診断法開発の取り組みを紹介する。

II. ヘルパーT細胞と関節リウマチ

RAをはじめとする自己免疫疾患の正確な診断のためには、免疫系細胞を分子生物学的レベルで理解することが重要である。ヘルパーT（Th）細胞は獲得免疫系において重要な役割を担う細胞である。ナイーブTh細胞は、樹状細胞・マクロファージ・B細胞などの抗原提示細胞によるTCR刺激を受けることにより、エフェクターTh細胞に分化するが、周囲のサイトカイン環境の違いにより機能的に異なるサブセットへ分化する（図1）。これらのThサブセットは、特徴的なサイトカインを分泌する¹⁻⁵⁾。

Th1細胞は、主にIFN- γ を産生することにより、ウイルス感染に対する防御機能や炎症反応に関与している。Th2細胞は、主にIL-4、IL-13を産生することにより寄生虫免疫やアレルギーに関与している。また、制御性T細胞（Treg細胞）は、細胞間相互作用や栄養因子、IL-10などの抑制性サイトカインを介して過剰な免疫反応や自己免疫の惹起を抑制するが、胸腺内で発生するnTreg細胞と、炎症により分化誘導されるiTreg細胞の少なくとも2種類のサブタイプが存在することが知られている。

我々が特に注目しているのはTh17細胞であ

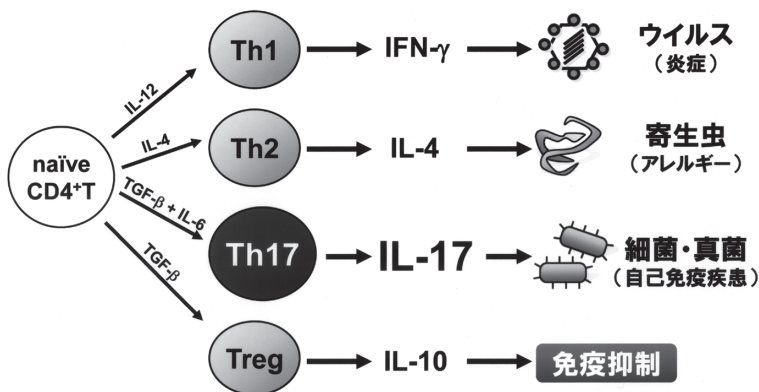


図1 ヘルパーT細胞の種類とその機能

る。Th17細胞は、炎症性サイトカインであるIL-17、TNF- α などを産生して細菌や真菌への防御に働く一方で、RAなどの自己免疫疾患の病態において重要な役割を担うことが知られている^{4),6-11)}。IL-17欠損マウスでは、II型コラーゲン誘導関節炎(CIA)が抑制され、Th17細胞の分化や維持に関連する分子(IL-17、IL-6、TGF- β 、IL-23)欠損マウスにおいても実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の発症が抑制される¹²⁾。ヒトにおいてもRA患者の関節組織や関節液中のTh17細胞増加が報告されており^{7-9),11-13)}、また、クローン病・乾癬・多発性硬化症におけるTh17細胞の関与や、抗IL-17抗体であるixekizumabがRAおよび乾癬に対して治療効果を示すことが報告されている^{13),14)}。これらの報告から、Th17細胞の解析が、RAの病態メカニズムの解明や、新たな検査マーカーの同定につながる事が示唆される。

1) Th細胞サブセットの分化培養とTh17細胞マーカー候補の抽出

Th17細胞には、IL-17A、ROR γ t、IL-23R、CCR6が発現していることが知られているが、網羅的にTh17細胞の遺伝子発現解析を実施した報告は少ない。我々は、Th17細胞を特徴づけるマーカー分子の同定を目的として、BALB/cマウス由来のナイーブTh細胞から*in vitro*分化培養によって得たTh17細胞の発現マイクロアレイによる

網羅的遺伝子発現解析を実施した。比較対照として、同じく*in vitro*分化培養により得たTh1細胞、Th2細胞、およびiTreg細胞を用いた。我々は、マーカー同定の精度を向上させるために、可能な限り高純度のTh17細胞の取得に努めた。Th17細胞の分化培養には、IL-6とTGF- β が必須であるが、これらだけでは高い分化効率を得られなかったため、Th17細胞の分化促進や維持に働くことが報告されているIL-1 β 、IL-23およびTNF- α を培養系に追加し、さらに、Th17細胞分化抑制因子であるIFN- γ 、IL-4およびIL-2を抗体により中和することにより、約90%の純度のTh17細胞を得ることに成功した^{4),15-18)}(図2A)。

得られたTh17細胞と、既報の分化培養法に従って得られたTh1細胞、Th2細胞およびTreg細胞の計4種類のTh細胞について発現マイクロアレイ比較解析を実施したところ、Th17細胞のみに高発現(発現比3.0倍以上、かつ、P<0.05:ANOVA)する120種類の遺伝子を見出し、Th17細胞マーカー候補とした(図2B)。これらの中には、既知のTh17細胞マーカーであるIL-17やROR γ tなどが含まれていたことから、解析の信頼性は高いと判断した。データベース検索によって、これらのマーカー候補が、接着分子などの細胞膜局在タンパク質29種、サイトカインなどの分泌タンパク質19種、細胞質タンパク質32種、核内タンパク質13種などをコードしている

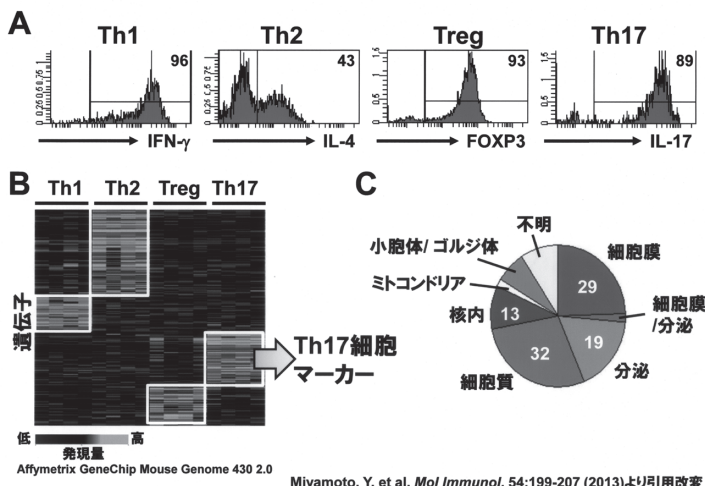


図2 Th細胞サブセットの発現マイクロアレイ解析

ことがわかった¹⁸⁾ (図2C)。

2) SKG関節炎モデルマウスによるTh17細胞マーカーの検証

見出したTh17細胞マーカー候補のRAとの関連性を評価するために、SKGマウス関節炎発症モデルを利用した。このマウスは、T細胞シグナル分子の一つであるZAP-70に点突然変異を有し、胸腺分化段階においてT細胞シグナル伝達異常をきたす¹⁹⁾。そのため、通常はアポトーシスにより死滅する禁止クローン（関節炎惹起T細胞）が排除されずに末梢中へ循環することとなり、関節炎を自然発症する。関節外病変を伴いリウマチ因子（RF）も産生されることなどから、ヒトのRAに類似したモデルとされる。また、発症や病態形成にTh17細胞の関与が強く示唆されているため²⁰⁾、Th17細胞マーカー評価には最適のモデルである。

SKG関節炎マウスの関節病変組織における、細胞膜局在タンパク質をコードする29種類のTh17細胞マーカー候補遺伝子の発現を解析したところ、関節炎増悪に伴い発現量が増加する分子であるpodoplanin遺伝子を見出した。さらに、関節炎浸潤Th17細胞を採取してフローサイトメトリー解析を行ったところ、多くのTh17細胞がpodoplanin陽性を示すことが確認された¹⁸⁾ (図3)。

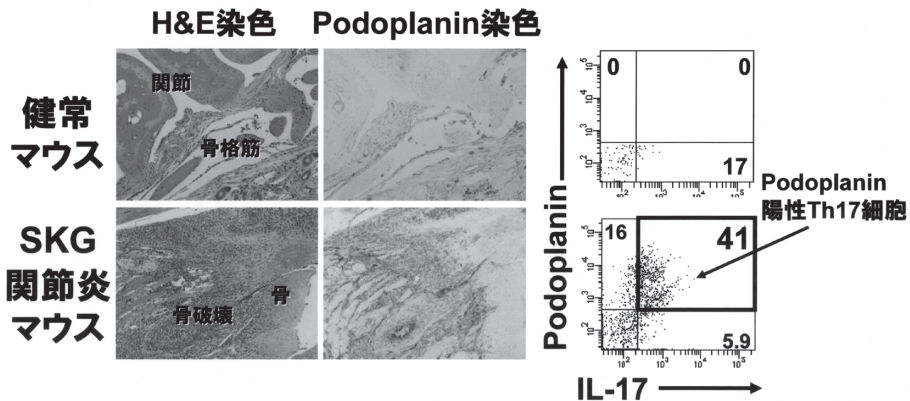
podoplaninは、滑膜細胞、ケラチノサイト、リンパ管内皮細胞、および癌細胞などに発現し、IFN- γ 、TGF- β 、TNF- α およびIL-1 β 刺激によ

り発現が増強する^{21), 22)}。また、好中球、単球、血小板上のC-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2)と結合して炎症性サイトカインを誘導することが報告されており、Th17細胞と好中球等の相互作用による自己免疫疾患の炎症増悪に重要な役割を担うことが示唆される^{23), 24)}。さらに、Petersらは、podoplanin陽性細胞がEAEマウスにおいて異所性リンパ濾胞形成に関与することを報告している²⁵⁾。

これらの報告から、podoplanin陽性Th17細胞がリウマチの病態増悪に有用な指標となる可能性が示唆される。最近では、Th17細胞のなかにも病原性を示すものと非病原性のものなど複数のサブセットの存在が示唆されており²⁶⁻²⁸⁾、現在、podoplaninと病原性Th17細胞との関係や、RA病態との関係について解析を進めている。さらに今後、病態に関係するTh1、Th2およびTreg細胞サブセットを検出するマーカーも同様に同定し、個々の患者のTh1、Th2、TregおよびTh17細胞のプロファイル分析を進め、新たな診断法につなげたいと考えている。

Ⅲ. サイトカインと関節リウマチ

RA患者の滑膜からサイトカインをはじめとする様々な炎症メディエーターが産生され、骨・軟骨破壊を促進させる。特に、生物学的製剤治療の標的である、TNF α 、IL-6、IL-17などの炎症性サイトカインの濃度が、RA患者の関節組織



Miyamoto, Y. et al. *Mol Immunol.* 54:199-207 (2013)より引用改変

図3 関節病変のPodoplanin陽性Th17細胞

や関節液において上昇していることが報告されており^{29,34)}、また、発症前から、末梢血において各種サイトカイン動態が変動している可能性も示唆されている³⁵⁾。このように検査マーカーとして有望と考えられるサイトカインであるが、単独で決定的なマーカーはいまだ見出されていない。その理由として、まず、①測定感度の問題がある。血中のサイトカインは微量であり、発色ELISA法では検出できないことが多い。また、②疾患特異性の問題も挙げられる。リウマチに限らず、感染症や怪我などの要因でもサイトカインの血清レベルは変動する。そのため解析対象の患者に合併症などが存在する場合には、異なるサイトカイン・プロファイルを示す可能性がある。我々は、①測定感度を改善するため、化学発光検出法を導入し、高感度測定ELISA系を構築した。また、②疾患特異性を確保するため、複数のサイトカインのパターン分析（プロファイル）を応用することを考えた。

RAに関する既存の検査は、自己抗体やCRP等の一般的な炎症マーカーに限られている。自己抗体のうち抗CCP抗体は現在リウマチ確定診断に最も有用な血清マーカーとされる。しかし、感度が低く、全RA患者の約30%が抗CCP抗体陰性であり、診断確定と治療開始が遅延することが問題となっている。我々は、血清サイトカイン測定によって抗CCP抗体陰性RA患者と非リウマチ性の関節炎患者との明確な鑑別が可能かどうか検討した。文献情報などからRAに関連する可能性のあるサイトカイン28項目を選び、患者血清におけるそれぞれの発現量を化学発光

ELISA法で測定した（図4）。

1) 健常人・非リウマチ患者と関節リウマチ患者の鑑別

RA患者（神鋼病院）および健常者の血清検体を用いて、サイトカイン28項目を化学発光ELISA法にて測定した。健常者に比べRA患者ではサイトカインレベルは全般的に高い傾向はあるものの、健常者と同様に測定限界値以下を示す患者も多く認められた（図5）。このことから、単項目のサイトカイン測定値によってRA患者を鑑別することは困難であることが再確認された。

そこで、我々は、RA患者に特徴的な複数のサイトカインの発現パターンを分析し、リウマチ鑑別に利用できるかを検討した。サイトカインの多重ロジスティック回帰分析を試みたところ、28項目のうち4項目のサイトカインを用いたリウマチ判別式によって、RA患者と健常者を感度：92.6%、特異度：88.7%で判別することができた（図6）。さらに、別施設のRA患者（神戸大病院）および健常者（ボランティア）の血清検体を用いて、上記のサイトカイン4項目によるリウマチ判別式の性能を検証したところ、RA患者と健常者を感度：82.0%、特異度：85.0%と、ほぼ同等の性能で判別することができた（図6）。

以上の検討から、少なくとも血清サイトカイン4項目のパターン分析（多重ロジスティック回帰分析）によって、リウマチ患者と健常人・非リウマチ関節炎患者を精度よく鑑別できる可

化学発光ELISA測定

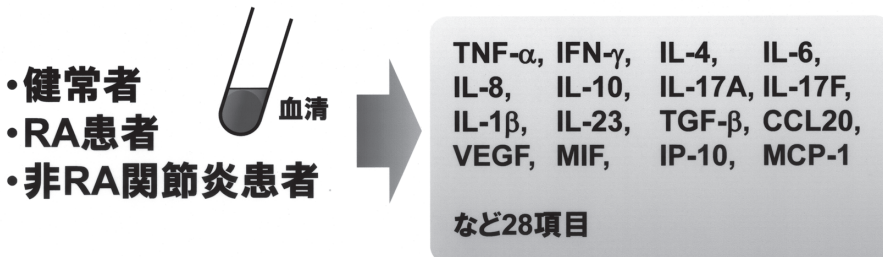


図4 リウマチ患者血清のサイトカイン測定

能性が示された。

2) 抗CCP抗体陰性リウマチ患者の鑑別

次に、抗CCP抗体陰性RA患者および非RA関節炎患者の血清検体を用いて、多重ロジスティック回帰分析を実施した。その結果、サイトカイン28項目のうち4項目の測定値を用いたリウマチ判別式によって、抗CCP抗体陰性RA患者と非RA関節炎患者を感度：92.0%、特異度：93.7%で判別することができた（図7）。さらに、別施設の抗CCP抗体陰性RA患者および非RA関節炎患者の血清検体を用いて、上記のサイトカイン4項目によるリウマチ判別式の性能を検証することができた（感度：85.7%、特異度：70.6%）（図7）。

以上の検討から、少なくとも血清サイトカイン4項目の測定パターン分析（多重ロジスティック回帰分析）によって、抗CCP抗体陰性RA患者と非RA関節炎患者を鑑別できる可能性が示された。

IV. おわりに

これまでに、サイトカインやT細胞などの免疫系をターゲットとした生物学的製剤が、RA治療に多大な成功を収め、いまや治療目標は関節破壊の進行を完全に阻止する寛解導入へとシフトしている。現在治験中の分子標的薬も複数あり、今後、ますます治療法の選択肢は増えていくと考えられる。しかし、一方で、高額な薬剤

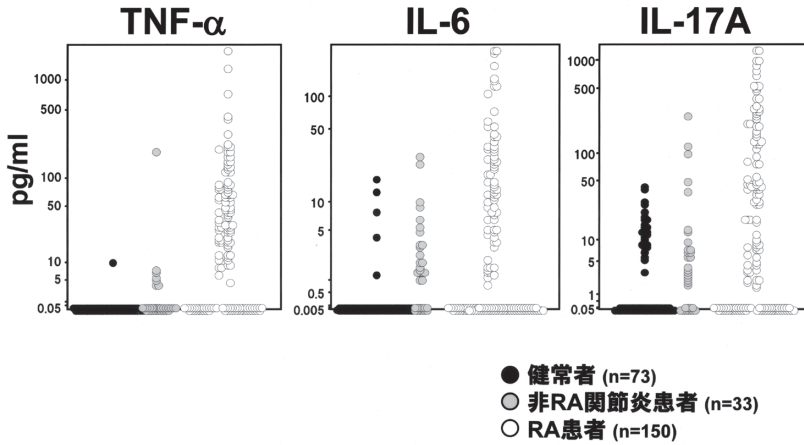


図5 患者血清におけるサイトカイン測定値

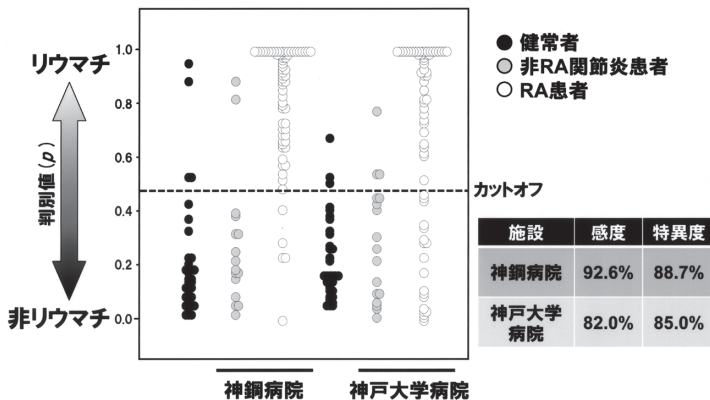


図6 サイトカイン4項目の多変量解析によるRA鑑別

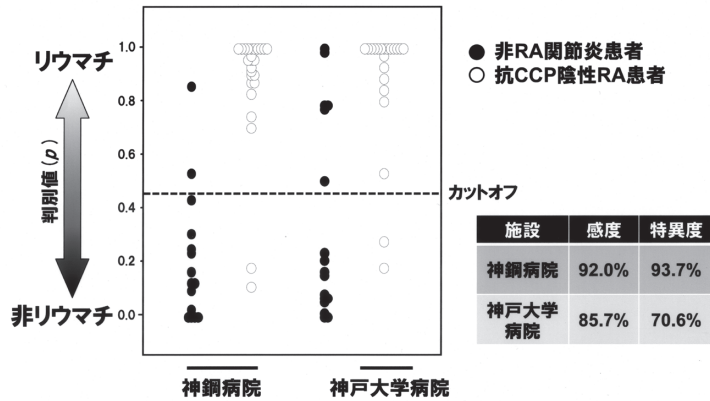


図7 サイトカイン4項目の多変量解析による抗CCP抗体陰性RAの鑑別

費による医療経済の圧迫や、感染症などの有害事象の問題がRA医療においてより顕在化しつつある。こうした背景を受けて、早期診断や、治療効果・寛解を正確に判定する検査、さらには個々の患者に最適な分子標的薬を選択するコンパニオン診断の必要性がより高まってきている。

我々は、これに応えるために、免疫分子生物学に基づく検査法の確立を目指して、Th細胞プロファイルとサイトカイン・プロファイルの2通りのアプローチに取り組んだ。その中で抗CCP抗体検査にサイトカイン検査を組み合わせることにより、早期診断の確率を向上できる可能性のあることを示した。すでに、米国では、血清因子12項目の測定値からRA活動性スコアを算出する新たな病態診断法の実用化が進んでおり、プロファイリングを診断に応用する動きは急速な展開を見せ始めている³⁶⁻³⁹⁾。我々も開発スピードを速め、免疫関連分子プロファイルに基づく新たな診断コンセプトを開拓していきたいと考えている。

参考文献

- 1) Bettelli E, Korn T, Oukka M, & Kuchroo VK: Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 453: 1051-1057, 2008.
- 2) Dong C & Flavell RA: Th1 and Th2 cells. *Curr Opin Hematol*, 8: 47-51, 2001.
- 3) Glimcher LH & Murphy KM: Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes & development*, 14: 1693-1711, 2000.

- 4) Miossec P, Korn T & Kuchroo VK: Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med*, 361: 888-898, 2009.
- 5) Mosmann TR & Coffman RL: TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 7: 145-173, 1989.
- 6) Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E & Romagnani S: Type 17 T helper cells-origins, features and possible roles in rheumatic disease. *Nature reviews. Rheumatology*, 5: 325-331, 2009.
- 7) Huang W, Na L, Fidel PL & Schwarzenberger P: Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. *J Infect Dis*, 190: 624-631, 2004.
- 8) Ishigame H, et al.: Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucocutaneous bacterial infection and allergic responses. *Immunity*, 30: 108-119, 2009.
- 9) Saijo S, et al.: Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against Candida albicans. *Immunity*, 32: 681-691, 2010.
- 10) van Beelen AJ, Teunissen MB, Kapsenberg ML & de Jong EC: Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 7: 374-381, 2007.
- 11) Ye P, et al.: Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med*, 194: 519-527, 2001.
- 12) Nakae S, Nambu A, Sudo K & Iwakura Y: Suppression

- of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol*, 171: 6173-6177, 2003.
- 13) Genovese MC, et al.: LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: A phase I randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study. *Arthritis Rheum*, 62: 929-939, 2010.
 - 14) Leonardi C, et al.: Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N Engl J Med*, 366: 1190-1199, 2012.
 - 15) Chung Y, et al.: Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*, 30: 576-587, 2009.
 - 16) Kryczek I, et al.: Cutting edge: opposite effects of IL-1 and IL-2 on the regulation of IL-17+ T cell pool IL-1 subverts IL-2-mediated suppression. *J Immunol*, 179: 1423-1426, 2007.
 - 17) Laurence A, et al.: Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*, 26: 371-381, 2007.
 - 18) Miyamoto Y, et al.: Podoplanin is an inflammatory protein upregulated in Th17 cells in SKG arthritic joints. *Mol Immunol*, 54: 199-207, 2013.
 - 19) Sakaguchi N, et al.: Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature*, 426: 454-460, 2003.
 - 20) Hirota K, et al.: Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med*, 204: 2803-2812, 2007.
 - 21) Ekwall AK, et al.: The tumour-associated glycoprotein podoplanin is expressed in fibroblast-like synoviocytes of the hyperplastic synovial lining layer in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 13: R40, 2011.
 - 22) Honma M, Minami-Hori M, Takahashi H & Iizuka H: Podoplanin expression in wound and hyperproliferative psoriatic epidermis: regulation by TGF-beta and STAT-3 activating cytokines, IFN-gamma, IL-6, and IL-22. *J Dermatol Sci*, 65: 134-140, 2012.
 - 23) Kerrigan AM, et al.: CLEC-2 is a phagocytic activation receptor expressed on murine peripheral blood neutrophils. *J Immunol*, 182: 4150-4157, 2009.
 - 24) Solpov A, et al.: Platelets enhance CD4+ lymphocyte adhesion to extracellular matrix under flow conditions: role of platelet aggregation, integrins, and non-integrin receptors. *Thromb Haemost*, 95: 815-821, 2006.
 - 25) Peters A, et al.: Th17 cells induce ectopic lymphoid follicles in central nervous system tissue inflammation. *Immunity*, 35: 986-996, 2011.
 - 26) Ghoreschi K, et al.: Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature*, 467: 967-971, 2010.
 - 27) Kleinschek MA, et al.: Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *J Exp Med*, 206: 525-534, 2009.
 - 28) Lee Y, et al.: Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nature immunology*, 13: 991-999, 2012.
 - 29) Chabaud M, et al.: Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum*, 42: 963-970, 1999.
 - 30) Kirkham BW, et al.: Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). *Arthritis Rheum*, 54: 1122-1131, 2006.
 - 31) Nistala K, et al.: Interleukin-17-producing T cells are enriched in the joints of children with arthritis, but have a reciprocal relationship to regulatory T cell numbers. *Arthritis Rheum*, 58: 875-887, 2008.
 - 32) Pene J, et al.: Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *J Immunol*, 180: 7423-7430, 2008.
 - 33) Raza K, et al.: Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthritis Res Ther*, 7: R784-R795, 2005.
 - 34) Shahrara S, Huang Q, Mandelin AM: 2nd & Pope, RM: TH-17 cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 10: R93, 2008.
 - 35) Kokkonen H, et al.: Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 62: 383-391, 2010.
 - 36) Bakker MF, et al.: Performance of a multi-biomarker score measuring rheumatoid arthritis disease activity in the CAMERA tight control study. *Ann Rheum Dis*, 71: 1692-1697, 2012.
 - 37) Centola M, et al.: Development of a multi-biomarker disease activity test for rheumatoid arthritis. *PLoS one* 8, e60635, 2013.
 - 38) Hirata S, et al.: A multi-biomarker score measures rheumatoid arthritis disease activity in the BeSt study. *Rheumatology*, 52: 1202-1207, 2013.
 - 39) Li W, Sasso EH, Emerling D, Cavet G & Ford K: Impact of a multi-biomarker disease activity test on rheumatoid arthritis treatment decisions and therapy use. *Curr Med Res Opin*, 29: 85-92, 2013.