

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08983

研究課題名(和文) 臨床症状を反映した血中活性型IL-1 の病態検査法の確立

研究課題名(英文) Development of refined detection system for mature and active IL-1b family proteins

研究代表者

浦野 健 (Takeshi, Urano)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授

研究者番号：70293701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：慢性炎症は、がんをはじめ、自己免疫疾患や生活習慣病、動脈硬化性疾患、神経変性疾患などさまざまな難治性疾患と密接に関連している。IL-1ファミリータンパク質は、炎症や感染防御に重要な役割を果たす実働分子である。これまでタンパク質を測定する方法は存在したが、その測定値と臨床症状との乖離が問題となっていた。本研究により開発した活性型IL-1 およびIL-18に対するモノクローナル抗体は、臨床症状を反映した簡便・迅速・正確な測定法を確立し、バイオ医薬品を開発するシーズとなる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により開発したモノクローナル抗体により、炎症状態を正確に把握した臨床症状を反映した簡便・迅速・正確な測定法を確立することができる。その測定法を利用することで、迅速な診断および正確な治療法の選択が可能となる。さらに、開発したモノクローナル抗体をヒト化することで治療用のバイオ医薬品として開発を進めている。

特に、IL-18に対するモノクローナル抗体はウエスタンブロット・免疫沈降・細胞免疫染色に利用できるばかりでなく、IL-18の機能を阻害した。既存の抗体では成し得なかった、患者血液を用いたウエスタンブロット解析で活性型IL-18を提示できるほど検出感度が優れていた。

研究成果の概要(英文)：Inflammation is a common risk factor for common diseases, such as cancer, and autoimmune disease. Interleukin 1b and IL-18 are pro-inflammatory cytokines assigned to the IL-1 family because of its structural homology, receptor utilization and signal transduction pathways. Both of IL-1b and IL-18 are initially synthesized as inactive precursors and the cleavage required for processing into mature forms is mainly mediated by pro-inflammatory caspases following the activation and assembly of macromolecular complexes called inflammasomes. Detection of these neoepitopes of mature forms should provide a unique and sensitive indicator of inflammatory action. A refined detection system for mature and active IL-1b and IL-18 could be developed by utilizing our developed neoepitope mAbs in combination with epitope-different mAbs. Such a system might be useful in inflammasome biology, and for diagnostic and therapeutic strategies for inflammatory diseases.

研究分野：病態生化学

キーワード：炎症 IL-1 IL-18 測定キット モノクローナル抗体 バイオ医薬品

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IL-1 β は、IL-6 や TNF- α などと共に、炎症や感染防御に重要な役割を果たす実働分子である。慢性炎症は、がんをはじめ、自己免疫疾患や生活習慣病、動脈硬化性疾患、神経変性疾患などさまざまな難治性疾患と密接に関連している (図 1)。

近年、IL-1 β が関与する炎症性疾患の多くがインフラマソームと呼ばれる細胞内センサーの活性化と関連している可能性が示唆され、病態解明の手がかりとして注目されている。インフラマソームは、細菌感染などで生じる外因性物質や尿酸結晶・コレステロール結晶などの内因性物質を認識し、タンパク質分解酵素であるカスパーゼ 1 を活性化させる細胞内タンパク質複合体である。活性化されたカスパーゼ 1 は前駆体型 IL-1 β ¹⁻²⁶⁹ から N 末端を切断分離し、活性型 IL-1 β ¹¹⁷⁻²⁶⁹ に転換する (図 2)。

IL-1 β ファミリーの IL-18 も IL-1 β と同様に、タンパク質分解酵素であるカスパーゼ 1 により前駆体から N 末端が切断分離され、活性型になることが知られている。

共同研究者である右田清志博士 (福島県立医大) および川上純博士 (長崎大学) は“自己免疫疾患 (関節リウマチなど獲得免疫制御異常により発症する疾患)”や“自己炎症性疾患 (繰り返す高熱発作を主な主症状とし、自然免疫制御異常により発症する比較的新しい疾患概念)”の多くの患者を診る臨床医である。自己炎症性疾患の代表的な疾患で、インフラマソームの制御タンパク質の遺伝子変異が原因で発症する“家族性地中海熱”の血中サイトカインを測定した結果、既存のキットを用いた活性型 IL-1 β および IL-18 の測定値が、血中活性化 IL-1 β や IL-18 が原因で引き起こすと考えられている発熱等の臨床症状を反映していないことに困り、抗体作製のスペシャリストである浦野に相談があった。

2. 研究の目的

臨床症状を反映した血中活性型 IL-1 β 濃度の簡便・迅速・正確な測定法を開発し、難治性炎症性疾患などの新しい治療法開発に向けた病態理解を助けるとともに、白血球数や CRP などとは異なる新しい炎症性バイオマーカーとして保険収載を目指す。すでに海外などで使用されている抗 IL-1 製剤のコンパニオン診断法として有用であるばかりか、本申請で開発するモノクローナル抗体自体が難治性炎症性疾患に対するバイオ医薬品となる可能性が大いに期待できる。

3. 研究の方法

1. 血中活性型 IL-1 β および IL-18 を認識するポリクローナル抗体およびマウスモノクローナル抗体を開発する。マウスモノクローナル抗体に関しては、エピトープの異なる 2 種類以上の抗体を作製する。
2. 血中活性型 IL-1 β および IL-18 を認識するサンドイッチ ELISA 法を確立し、全自動ウエスタンブロット法により測定した健常人および各種炎症性疾患患者の血清中活性型 IL-1 β および IL-18 との比較検討を行う。

4. 研究成果

1) 活性型 IL-1 β のみを認識するマウスモノクローナル抗体の作製と精製：タンパク質分解酵素カスパーゼ 1 により切断させる活性化断端のペプチドを用いてマウスを免疫し、活性型 IL-1 β のみを認識するモノクローナル抗体を合計 5 種類作製した。現在、機能阻害効果を有するかどうか検討を進めている。

2) 断端以外の活性型 IL-1 β を認識するマウスモノクローナル抗体の作製と精製：大腸

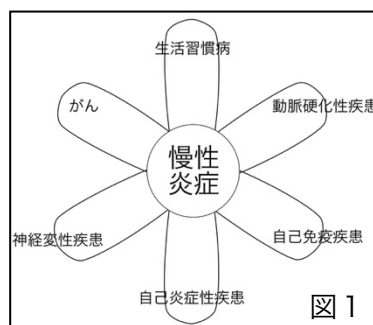


図 1

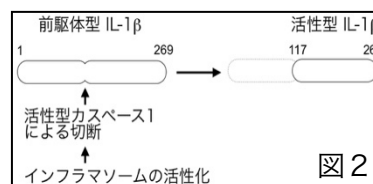


図 2

菌で発現させた活性型 IL-1 β タンパク質をマウスに免疫し、断端以外の活性型 IL-1 β を特異的に認識するモノクローナル抗体を合計7種類作製した。1) 2) で作製・精製したマウスモノクローナル抗体を用いて、その組合せから活性型 IL-1 β を認識するサンドイッチ ELISA キット化に向けて最適条件を検討し、最適な組合せを決定した。

3) 活性型 IL-18 のみを認識するマウスモノクローナル抗体の作製と精製：炎症性サイトカイン IL-1 β ファミリーの IL-18 も IL-1 β と同様にタンパク質分解酵素 caspase-1 により切断させることで活性型となる。切断部位のペプチドを用いてマウスを免疫し、取得した活性型 IL-18 を認識するモノクローナル抗体 9-10.2 はウエスタンブロット・免疫沈降・細胞免疫染色に利用できるばかりでなく、IL-18 の機能を阻害した。さらに、既存の抗体では成し得なかった、患者血液を用いたウエスタンブロット解析で活性型 IL-18 を提示できるほど同抗体は検出感度が優れていた。

4) 断端以外の活性型 IL-18 を認識するマウスモノクローナル抗体の作製と精製：大腸菌で発現させた活性型 IL-18 タンパク質をマウスに免疫し、IL-18 を特異的に認識するモノクローナル抗体5種類を作製した。そのうち 11-4.1 はウエスタンブロット・免疫沈降・細胞免疫染色に利用できるばかりでなく、IL-18 の機能を阻害した。さらに、既存の抗体では成し得なかった、患者血液を用いたウエスタンブロット解析で IL-18 を提示できるほど同抗体は検出感度が優れていた。さらに、大腸菌で作製した IL-18 タンパク質の断片を用いて、モノクローナル抗体の認識部位を詳細に同定した。

5) 活性型 IL-18 の測定キットの開発：大腸菌で発現させた活性型 IL-18 タンパク質をマウスに免疫しモノクローナル抗体を5種類した(4)で紹介した 11-4.1 を含む)。また、炎症性サイトカイン IL-1 β ファミリーの IL-18 も IL-1 β と同様にタンパク質分解酵素カスパーゼ1により切断され活性化されるため、切断部位のペプチドを用いてマウスを免疫し、活性型 IL-18 のみを認識するモノクローナル抗体を2種類作製した(3)で紹介した 9-10.2 を含む)。これらの組合せから、活性型 IL-18 のみを認識するサンドイッチ ELISA キット化に向けて最適条件を検討し、最適な組合せを決定した。

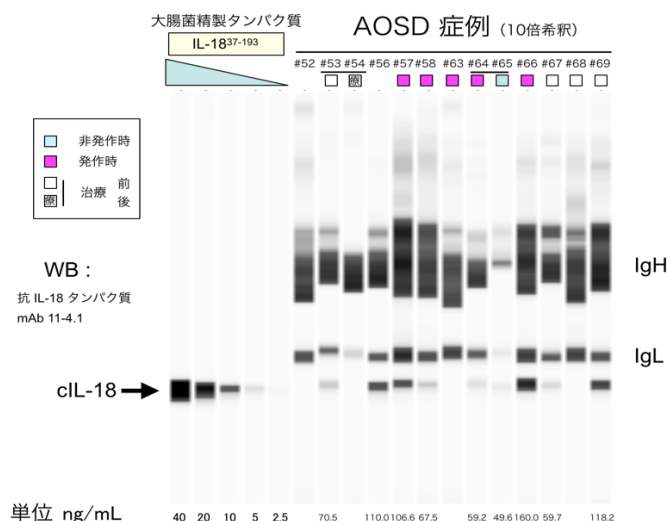


図3 抗体の評価 (II)

11-4.1 抗体はウエスタンブロットですでに IL-18 タンパク質が高値を示すことが報告されている成人発症スティル病 (AOSD, あるいは成人スティル病 ; ASD) 患者血清中の cleaved IL-18 (活性型) を検出した。申請者らが調べた限り、患者血清中で cleaved IL-18 (活性型) をウエスタンブロットで提示したのは世界で初めてである。本臨床研究に関しては、島根大学医学部医の倫理委員会に研究計画

(課題名：各種炎症性関連疾患および健常人における血清中インターロイキン-1 β およびそのファミリータンパク質濃度の測定)を申請し、研究の倫理的・科学的妥当性について審査を受け、委員会の承認を受けている(20160511-1)。

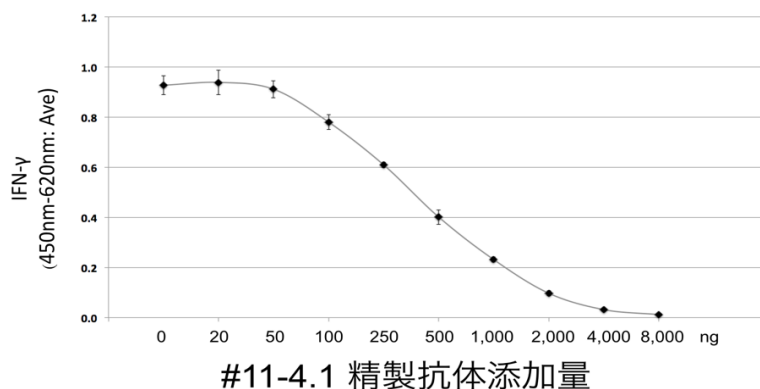


図4 抗体の評価 (III)

大腸菌で発現精製した IL-18 タンパク質 (37-193、活性型) を急性骨髄性白血病株 KG-1 (JCRB0065) に添加すると IFN- γ が産生されることが知られている (PMID_7477296)。抗体が IL-18 機能阻害抗体であれば、IL-18 による IFN- γ 産生を阻害する。11-4.1 抗体は、KG-1 細胞株における IL-18 による IFN- γ 産生を濃度依存的に阻害した。

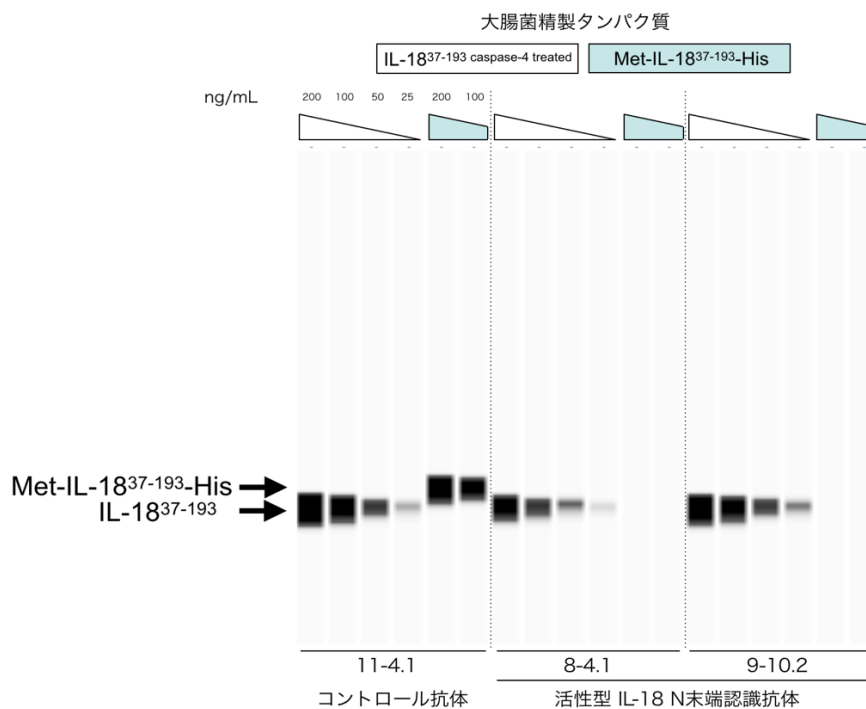


図5 抗体の評価 (IV)

11-4.1 抗体は 合成開始メチオニン (Met) の有無に関わらず IL-18 タンパク質 (37-193) をウェスタンブロット法で認識した。一方、9-10.2 抗体および 8-4.1 抗体は、合成開始メチオニン (Met) が脱離した IL-18 タンパク質 (37-193) は認識したが、合成開始メチオニン (Met) が残った IL-18 タンパク質 (37-193) を認識することはできなかった。

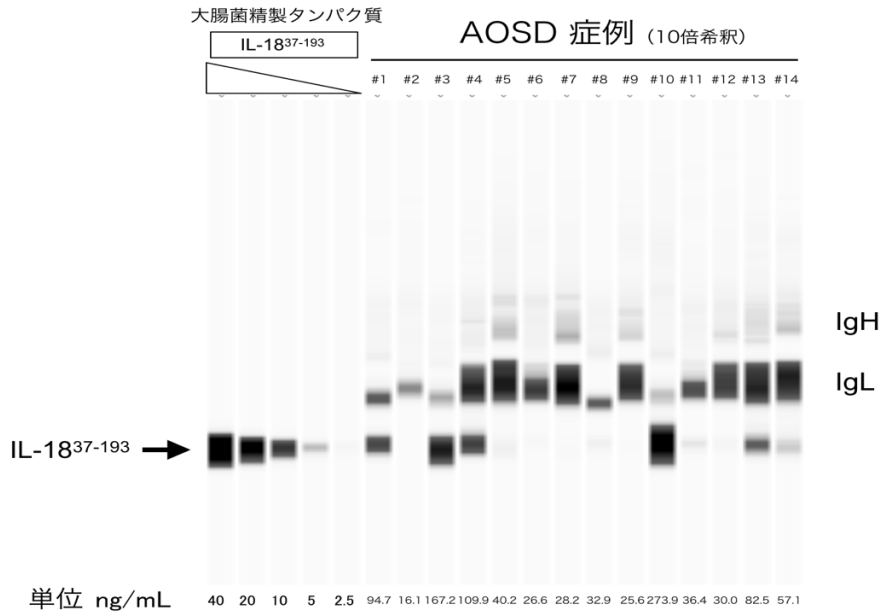


図6 抗体の評価 (V)

9-10.2 抗体はウエスタンブロットで AOSD患者血清中の cleaved IL-18 (活性型) を検出した。

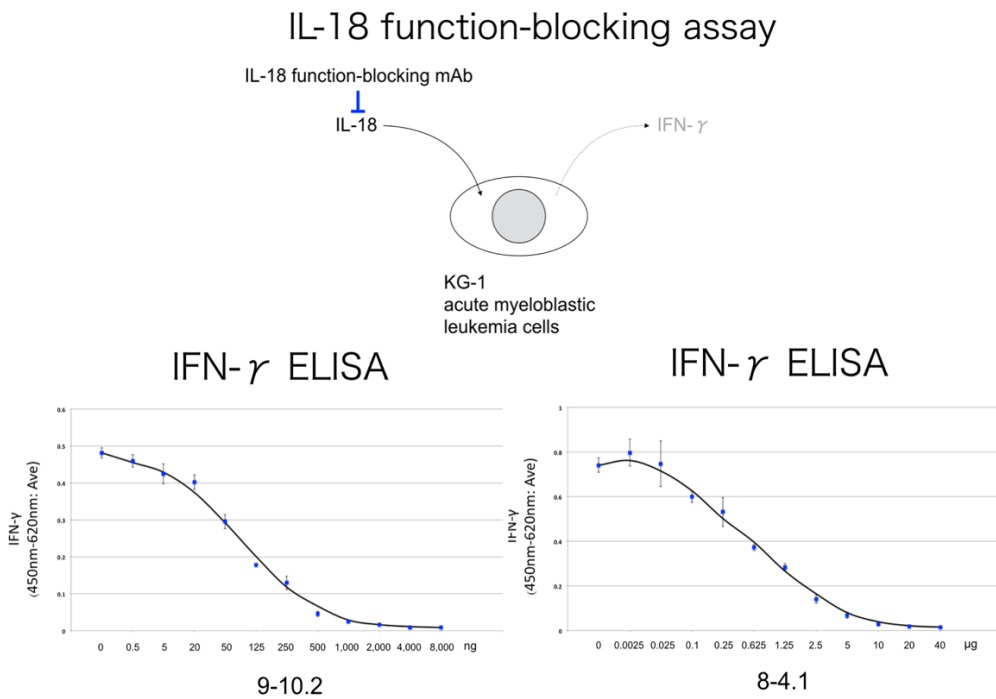


図7 抗体の評価 (VI)

9-10.2 および 8-4.1 抗体は、KG-1 細胞株における IL-18 による IFN- γ 産生を量依存的に阻害した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Nariai Y, Kamino H, Obayashi E, Kato H, Sakashita G, Sugiura T, Migita K, Koga T, Kawakami A, Sakamoto K, Kadomatsu K, Nakakido M, Tsumoto K, Urano T.	4. 巻 663
2. 論文標題 Generation and characterization of antagonistic anti-human interleukin (IL)-18 monoclonal antibodies with high affinity: Two types of monoclonal antibodies against full-length IL-18 and the neoepitope of inflammatory caspase-cleaved active IL-18.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 71-82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2019.01.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ganasen M, Togashi H, Takeda H, Asakura H, Tosha T, Yamashita K, Hirata K, Nariai Y, Urano T, Yuan X, Hamza I, Mauk AG, Shiro Y, Sugimoto H, Sawai H.	4. 巻 1
2. 論文標題 Structural basis for promotion of duodenal iron absorption by enteric ferric reductase with ascorbate.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-018-0121-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakayama N, Sakashita G, Nariai Y, Kato H, Sinmyozu K, Nakayama JI, Kyo S, Urano T, Nakayama K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Cancer-related transcription regulator protein NAC1 forms a protein complex with CARM1 for ovarian cancer progression.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 28408-28420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25400	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kato H, Okazaki K, Urano T.	4. 巻 65
2. 論文標題 How does Hsp90 function in RNAi-dependent heterochromatin assembly?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Genetics	6. 最初と最後の頁 87-91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00294-018-0866-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ichiyama T, Nakatani E, Tatsumi K, Hideshima K, Urano T, Nariai Y, Sekine J.	4. 巻 60
2. 論文標題 Expression of aquaporin 3 and 5 as a potential marker for distinguishing dry mouth from Sjogren's syndrome.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 212-220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.17-0150	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okazaki K, Kato H, Iida T, Shinmyozu K, Nakayama JI, Murakami Y, Urano T.	4. 巻 11
2. 論文標題 RNAi-dependent heterochromatin assembly in fission yeast Schizosaccharomyces pombe requires heat-shock molecular chaperones Hsp90 and Mas5.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Epigenetics & Chromatin	6. 最初と最後の頁 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13072-018-0199-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakai H, Murakami C, Matsumoto KI, Urano T, Sakane F.	4. 巻 151
2. 論文標題 Diacylglycerol kinase controls down-regulation of cyclin D1 for C2C12 myogenic differentiation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimie	6. 最初と最後の頁 45-53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biochi.2018.05.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikejiri F, Honma Y, Okada T, Urano T, Suzumiya J.	4. 巻 52
2. 論文標題 Cotylenin A and tyrosine kinase inhibitors synergistically inhibit the growth of chronic myeloid leukemia cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 2061-2068
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2018.4350	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue M, Honma Y, Urano T, Suzumiya J.	4. 巻 14
2. 論文標題 Japanese apricot extract (MK615) potentiates bendamustine-induced apoptosis via impairment of the DNA damage response in lymphoma cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 792-800
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2017.6219	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tomiyama L, Kamino H, Fukamachi H, Urano T.	4. 巻 16
2. 論文標題 Precise epitope determination of the anti-vimentin monoclonal antibody V9.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol Med Rep.	6. 最初と最後の頁 3917-3921
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2017.7102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Seo HD, Choi Y, Kim M, Kang K, Urano T, Lee D.	4. 巻 292
2. 論文標題 The 19S proteasome is directly involved in the regulation of heterochromatin spreading in fission yeast.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 17144-17155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.790824	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Fuse T, Katsumata K, Morohoshi K, Mukai Y, Ichikawa Y, Kurumizaka H, Yanagida A, Urano T, Kato H, Shimizu M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Parallel mapping with site-directed hydroxyl radicals and micrococcal nuclease reveals structural features of positioned nucleosomes in vivo.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0186974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0186974	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ikejiri F, Honma Y, Kasukabe T, Urano T, Suzumiya J.	4. 巻 15
2. 論文標題 TH588, an MTH1 inhibitor, enhances phenethyl isothiocyanate-induced growth inhibition in pancreatic cancer cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 3240-3244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2017.7713	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakashita G, Kiyoi H, Naoe T, Urano T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Analysis of the oligomeric states of nucleophosmin using size exclusion chromatography.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 4008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-22359-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujita Y, Matsuoka N, Temmoku J, Furuya MY, Asano T, Sato S, Kobayashi H, Watanabe H, Suzuki E, Urano T, Kozuru H, Yatsuhashi H, Koga T, Kawakami A, Migita K.	4. 巻 21
2. 論文標題 Hydroxychloroquine inhibits IL-1 production from amyloid-stimulated human neutrophils.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arthritis Res Ther.	6. 最初と最後の頁 250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-019-2040-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Temmoku J, Fujita Y, Matsuoka N, Urano T, Furuya MY, Asano T, Sato S, Matsumoto H, Watanabe H, Kozuru H, Yatsuhashi H, Kawakami A, Migita K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Uric acid-mediated inflammasome activation in IL-6 primed innate immune cells is regulated by baricitinib.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2020.1740410	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 活性型インターロイキン-18タンパク質のネオエピトープを認識する抗体、及びその応用	発明者 浦野 健、成相 裕子、加美野 宏樹、尾林 栄治	権利者 国立大学法人島根大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-226667	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 検出感度が向上した、炎症性サイトカイン IL-18 タンパク質に対する新規抗体およびその応用	発明者 浦野 健、成相 裕子、尾林 栄治、加美野 宏樹	権利者 国立大学法人島根大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-072006	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

島根大学医学部病態生化学ホームページ https://www.med.shimane-u.ac.jp/biochem2/index.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	杉浦 智子 (Sugiura Tomoko) (60647402)	島根大学・医学部・特別協力研究員 (15201)	