

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：15201  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2021～2023  
課題番号：21K08438  
研究課題名(和文)炎症性サイトカインIL-18を標的とした難治性炎症疾患に対する抗体治療の基盤研究  
  
研究課題名(英文)Basic research on antibody therapy against inflammatory cytokine IL-18 for refractory inflammatory diseases  
  
研究代表者  
浦野 健(Urano, Takeshi)  
  
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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：活性型のみ IL-18 濃度を正確に測定するキットを開発し、難治性炎症疾患である炎症性腸炎(潰瘍性大腸炎・クローン病)のうち、既存の抗腫瘍壊死因子(TNF)-抗体及び抗IL-12/23抗体治療に対して抵抗性腸炎では、前駆体および活性型 IL-18 の血清濃度が高いことを明らかにした。さらに、機能阻害活性を有するマウス活性型IL-18 断端に対する新規モノクローナル抗体を作製し、急性および慢性炎症性腸炎(潰瘍性大腸炎・クローン病)のマウスモデルにおいて治療実験を実施した。実際に腸炎を改善し、この抗体が炎症性腸炎の革新的な治療選択肢となることを証明した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

「活性型 IL-18」のみを認識し、強い機能阻害効果を持つモノクローナル抗体を作製・報告した。この抗体を用いて、すでに IL-18 の関与が示唆されている炎症性腸炎(潰瘍性大腸炎・クローン病)のモデルマウスに対して治療実験を行い、有効性を確認したことで、本当に IL-18 が病因として関与していることを明らかにした。また、活性型のみ IL-18 濃度を正確に測定するキットを開発したことで、既存の抗体治療に抵抗性を示した患者では、前駆体および活性型 IL-18 の血清濃度が高いことを明らかにした。活性型 IL-18 断端を認識するこの抗体が炎症性腸炎の革新的な治療選択肢となることを証明した。

研究成果の概要(英文)：We developed a kit to measure IL-18 concentrations in the active form accurately. We found that precursor and active IL-18 serum levels were higher in inflammatory bowel diseases (ulcerative colitis and Crohn's disease) refractory to existing anti-tumor necrosis factor (TNF)- and anti-IL-12/23 antibodies.

Furthermore, we generated a monoclonal antibody that recognizes only "active IL-18" and has a strong inhibitory effect on its function. We utilized this antibody to conduct therapeutic experiments in mouse models of acute and chronic inflammatory bowel inflammation (ulcerative colitis and Crohn's disease). The antibody improved enteritis and proved an innovative therapeutic option for inflammatory enteritis.

研究分野：バイオ医薬品開発

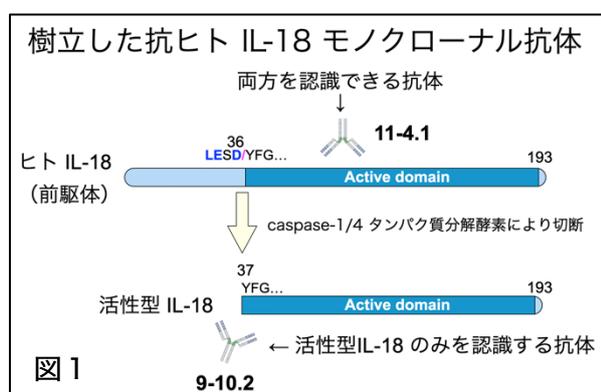
キーワード：インターロイキン-18(IL-18) 機能阻害抗体 炎症性腸炎 クローン病 潰瘍性大腸炎 バイオ医薬品 活性型 IL-18 測定キット

## 1. 研究開始当初の背景

インターロイキン (Interleukin / IL) はリンパ球やマクロファージなどが分泌するタンパク質の一種で、これまでに30種類以上が同定されている。産生されたインターロイキンは標的細胞 (主に T 細胞や B 細胞、マクロファージ) が持つ特異的な受容体に結合し、シグナルを伝えることで炎症誘導/抑制といった生理作用を引き起こす。

IL-18 は、IL-1 $\beta$ 、IL-6 や TNF- $\alpha$  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。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である“自己炎症性疾患”をはじめ、炎症性腸炎、自己免疫疾患や生活習慣病、神経変性疾患などさまざまな難治性炎症疾患と密接に関連していることが知られている。

近年、IL-18 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プーシ 1 を活性化させる細胞内タンパク質複合体である。活性化されたカスプーシ 1 はプロ体 IL-18<sup>1-193</sup> から N 末端を切断分離し、活性型 IL-18<sup>37-193</sup> に転換する (図 1)。



本研究の学術的「問い」は非常にシンプルで、IL-18 の関与が示唆されている難治性炎症疾患である 1) 炎症性腸炎 (潰瘍性大腸炎・クローン病)、および 2) マクロファージ活性化症候群において本当に IL-18 が病因として関与しているのか? その問いをモデル動物の治療実験で検証し、実臨床に繋げたいと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、マウス IL-18 に対する機能阻害活性を有する新規モノクローナル抗体を用いて、IL-18 の関与が示唆されている難治性炎症疾患である 1) 炎症性腸炎 (潰瘍性大腸炎・クローン病)、および 2) マクロファージ活性化症候群のモデル動物において治療実験を行い、実際に IL-18 が病因として関与していることを明らかにすることである。また、これまで開発されていない活性型のみ IL-18 濃度を正確に測定するキットをコンパニオン診断法として開発することである。

## 3. 研究の方法

① IL-18 阻害抗体 11-4.1 を用いた炎症性腸炎 (潰瘍性大腸炎タイプ) モデルマウスの治療実験:

デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発マウス腸炎モデルは、潰瘍性大腸炎と類似の症状 (下痢、下血、体重減少など) を引き起こることが知られている。野生型マウスに 5 日間 DSS を投与し、その途中で 2 回抗体を腹腔内投与する予備実験ですでに本抗体は治療効果を有することが判明していた。実臨床で使用されている抗 TNF- $\alpha$  抗体医薬との比較および併用効果を検討する。

② IL-18 阻害抗体 11-4.1 を用いた炎症性腸炎 (クローン病タイプ) マウスモデルの治療実験:

トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 誘発マウス腸炎モデルはヒトのクローン病モデルになるとされている。TNBS 誘発腸炎に対して①と同様に、治療効果を検討する。

③ IL-18 阻害抗体 11-4.1 を用いたマクロファージ活性化症候群マウスモデルの治療実験：

CpG ホスホロチオネートオリゴデオキシヌクレオチドの野生型マウスへの腹腔内投与によりマクロファージ活性化症候群を誘発することができる (Behrens, JCI, 2011)。IL-6 抗体医薬との比較および併用効果を検討する。

④ 抗 IL-18 抗体を用いた活性型 IL-18 測定キットの構築：

図 1 に示す活性型 IL-18 のみを認識する抗体 9-10.2 を用いて、血清中活性型 IL-18 を簡便に、かつ高感度で測定するサンドイッチ酵素結合免疫吸着法 (ELISA) を構築する。標準曲線用には大腸菌で発現精製した IL-18<sup>37-193</sup> を用いる。

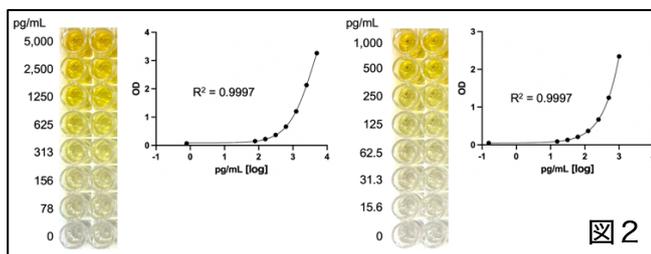
⑤ マウス活性型 IL-18 断端を認識するモノクローナル抗体の作製：

①～③で使用される IL-18 阻害抗体 11-4.1 は、ヒト IL-18 を免疫して樹立した。11-4.1 の認識部位を決定したところ、マウス IL-18 とは完全には一致しておらず交差反応していることが判明した。また、申請者が有しているヒト活性型 IL-18 のみを認識するモノクローナル抗体 9-10.2 (図 1) は、活性型断端配列が異なるため、「マウス活性型 IL-18」を認識・阻害することができなかった。ヒト IL-18 の活性化断端を認識するモノクローナル抗体はすべて強い IL-18 の阻害効果を有していたため、マウスを使ったモデル実験系をより正確に遂行するためには、「マウス活性型 IL-18」を特異的に認識する、より強力な阻害効果を持つモノクローナル抗体を作製する必要がある。そのため、ヒト IL-18 の活性型断端のみを認識するモノクローナル抗体を作製した時と同様に、マウス IL-18 の活性型断端ペプチドを用いて、常法に従って、「マウス活性型 IL-18」を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製する。「マウス活性型 IL-18」を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いて、再度①～③ の実験を繰り返すことで、確固たる“概念実証”を行う。

## 4. 研究成果

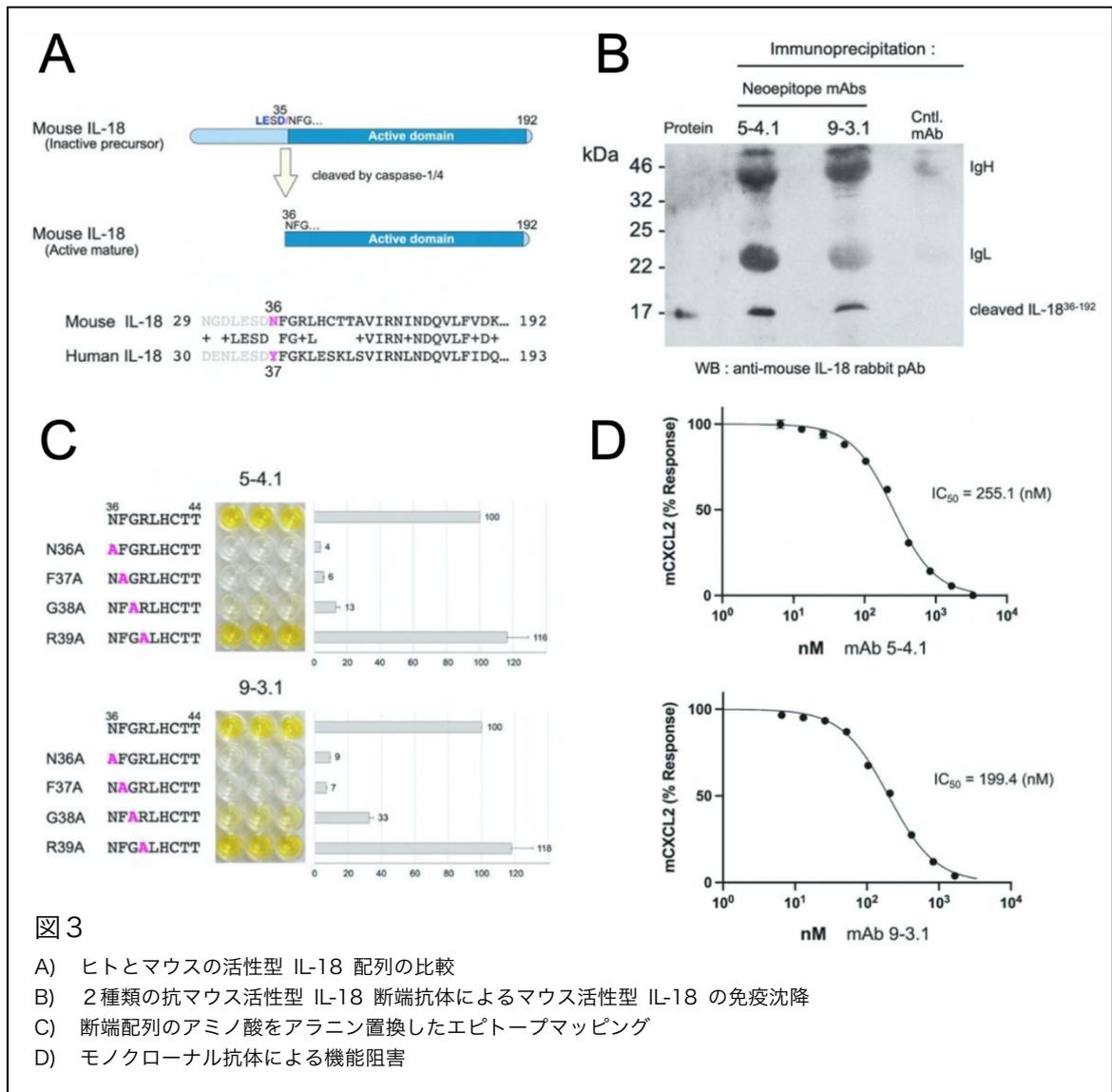
④ 抗 IL-18 抗体を用いた活性型 IL-18 測定キットの構築：

活性化断端モノクローナル抗体およびウサギポリクローナル抗体など我々が保有するすべての抗体の組み合わせを検討した上で、ヒト活性型 IL-18 サンドイッチ酵素結合免疫吸着法 (ELISA) キットの開発に成功した。図 1 に示すヒト活性型 IL-18 のみを認識する抗体 9-10.2 およびウサギポリクローナル抗体の組み合わせを用いて、大腸菌で発現精製したヒト活性型 IL-18<sup>37-193</sup> を 5,000 pg/mL、あるいは 1,000 pg/mL から段階希釈して測定した (図 2)。活性型 IL-18 を 50 pg/mL 以下の濃度から検出できた。したがって、臨床で患者血清中の活性型 IL-18 を測定し、解析することが可能となった。



⑤ マウス活性型 IL-18 断端を認識するモノクローナル抗体の作製：

「マウス活性型 IL-18」断端ペプチドを用いて、常法に従って、「マウス活性型 IL-18」を特異的に認識し、機能阻害効果を持つモノクローナル抗体を 5-4.1 および 9-3.1 の 2 種類を作製した (図 2)。論文#4 として、報告した。



① 抗マウス活性型 IL-18 断端抗体 5-4.1 を用いた炎症性腸炎（潰瘍性大腸炎タイプ）モデルマウスの治療実験：

C57/BL6 マウスにデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を投与して大腸炎を誘発し、その後⑤で樹立した抗マウス活性型 IL-18 断端抗体 5-4.1 による治療実験を行なった。本抗体の投与は、急性および慢性 DSS 誘発大腸炎を改善し、インターフェロン- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、ケモカイン (CXC モチーフ) リガンド-2 の産生および上皮細胞透過性を低下させ、杯細胞機能・腸内細菌叢組成を回復させた。抗活性型 IL-18 断端抗体の抑制効果は、IL-18 全長および活性型の両方を認識する抗体よりも優れていた。さらに、抗 TNF- $\alpha$  抗体との併用療法は、急性および慢性大腸炎を相加的に抑制した。結論として、抗活性型 IL-18 断端抗体は急性および慢性大腸炎を改善し、この抗体が炎症性腸炎の革新的な治療選択肢となることを示唆した。論文#2 として、報告した。

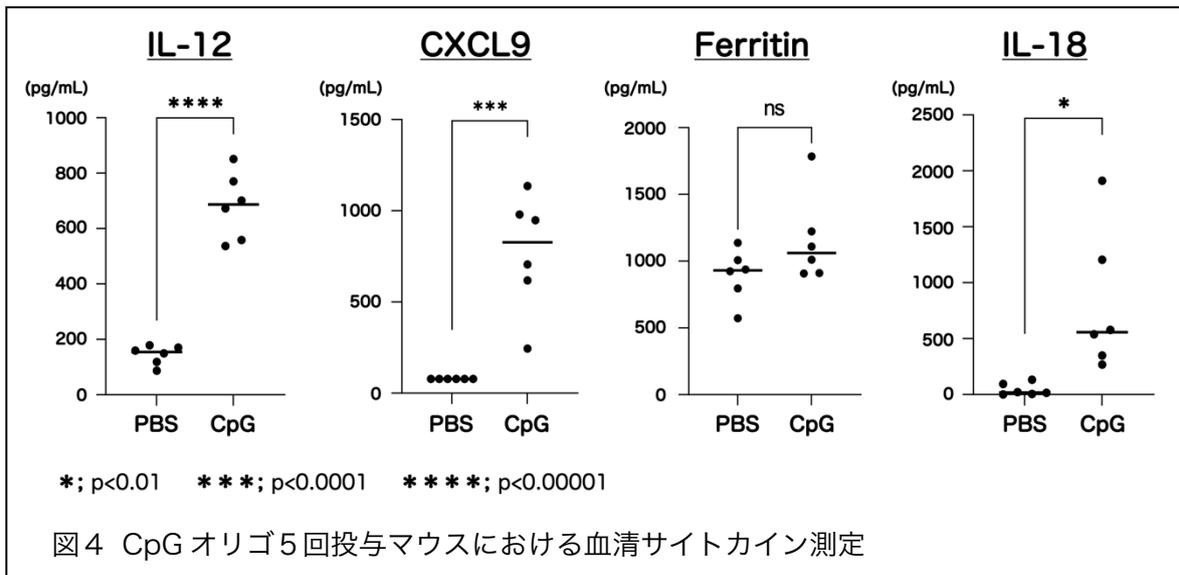
② 抗マウス活性型 IL-18 断端抗体 5-4.1 を用いた炎症性腸炎（クローン病タイプ）マウスモデルの治療実験：

トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 誘発マウス腸炎モデルはヒトのクローン病モデルになるとされている。TNBS 誘発腸炎に対して①と同様に、抗マウス活性型 IL-18 断端抗体 5-4.1 による治療効果を検討し結果、杯細胞機能を修復し粘液層を回復させることにより、誘発された大腸炎を改善した。結論として、新しく開発された抗活性型 IL-18 断端抗体は、クローン病の代替治療薬として有望であることを示唆した。論文#1 として、報告した。

③ 抗マウス活性型 IL-18 断端抗体を用いたマクロファージ活性化症候群マウスモデルの  
治療実験：

マクロファージ活性化症候群 (macrophage activated syndrome; MAS) は成人発症スティル  
病、小児若年性特発性関節炎、ウイルス感染症、悪性腫瘍などに続発する病態である。発熱など  
の全身症状の他に血球減少、肝障害、凝固異常、IFN- $\gamma$ をはじめとする高サイトカイン血症など  
を引き起こし、致命的となることもある。これまでの MAS 研究では CpG ホスホロチオネート  
オリゴデオキシヌクレオチド (CpG オリゴ) の反復投与によるマウスモデルが汎用されており、  
我々もこのモデルを利用して研究を進めていたが、このマウスモデルはヒトの MAS 病態と異な  
る点が多々あることに気づいた。1) フェリチンの誘導はほとんど確認されなかった (図4)。  
2) 健常人と比較すると MAS 患者では 10,000 倍以上増加する血中 IL-18 も、マウスモデル  
ではごくわずかな上昇が認められるだけであった (図4)。

そのため、従来の CpG オリゴ反復投与による MAS モデルマウスよりも、さらにヒト MAS の  
病態に近いモデルマウスを作製し、その病態解明と治療法の確立を目指すことにした。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mu Jingxi, Maeda Keiko, Ohashi Ayako, Urano Takeshi, Nariai Yuko, Kamino Hiroki, Nakamura Masanao, Yamamura Takeshi, Sawada Tsunaki, Ishikawa Eri, Murate Kentaro, Yamamoto Kenta, Hirose Takashi, Furukawa Kazuhiro, Fujishiro Mitsuhiro, Kawashima Hiroki	4. 巻 -
2. 論文標題 Monoclonal Antibodies Against Mature Interleukin-18 Ameliorate Colitis and Repair Goblet Cell Function	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Digestive Diseases and Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10620-024-08453-2	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 Ikegami Shuji, Maeda Keiko, Urano Takeshi, Mu Jingxi, Nakamura Masanao, Yamamura Takeshi, Sawada Tsunaki, Ishikawa Eri, Yamamoto Kenta, Muto Hisanori, Oishi Akina, Iida Tadashi, Mizutani Yasuyuki, Ishikawa Takuya, Kakushima Naomi, Furukawa Kazuhiro, Ohno Eizaburo, Honda Takashi, Ishigami Masatoshi, Kawashima Hiroki	4. 巻 -
2. 論文標題 Monoclonal Antibody Against Mature Interleukin-18 Ameliorates Colitis in Mice and Improves Epithelial Barrier Function	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Inflammatory Bowel Diseases	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ibd/izad292	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 Hotta Takamasu, Nariai Yuko, Kajitani Naoyo, Kadota Kyuichi, Maruyama Riruke, Tajima Yoshitsugu, Isobe Takeshi, Kamino Hiroki, Urano Takeshi	4. 巻 208
2. 論文標題 Generation of the novel anti-FXYD5 monoclonal antibody and its application to the diagnosis of pancreatic and lung cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochimie	6. 最初と最後の頁 160 ~ 169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biochi.2023.01.002	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 Uchida Yuki, Nariai Yuko, Obayashi Eiji, Tajima Yoshitsugu, Koga Tomohiro, Kawakami Atsushi, Urano Takeshi, Kamino Hiroki	4. 巻 727
2. 論文標題 Generation of antagonistic monoclonal antibodies against the neopeptide of active mouse interleukin (IL)-18 cleaved by inflammatory caspases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 109322 ~ 109322
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.abb.2022.109322	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 成相 裕子, 内田 有紀, 尾林 栄治, 田島 義証, 古賀 智裕, 川上 純, 浦野 健, 加美野 宏樹
2. 発表標題 活性化型マウスIL-18のネオエピトープに対する機能阻害モノクローナル抗体の作製とその評価方法の開発
3. 学会等名 第95回 日本生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浦野健
2. 発表標題 元外科医の基礎研究者がモノクローナル抗体作製の趣味が高じて、ベンチャーを作っていました
3. 学会等名 第95回 日本生化学会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加美野宏樹、田島義証、浦野健
2. 発表標題 ヒト膵がん細胞株MIA PaCa-2は栄養飢餓によりインターロイキン-18活性化を伴うパイロトーシスを誘導し、この現象は抗がん剤5-フルオロウラシルによって増強される
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加美野宏樹、内田有紀、田島義証、浦野健
2. 発表標題 フルオロウラシル処理は低栄養培養下での膵がん細胞におけるIL-18活性化を増強する
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Urano T
2. 発表標題 Development of Biopharmaceuticals using monoclonal antibodies
3. 学会等名 2nd Nagoya University - Chittagong University Joint Biochemistry Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 活性型 I L - 1 8 検出キット、及び検査方法	発明者 浦野 健、加美野 宏 樹、成相 裕子、川上 純、古賀 智裕、他 5	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-195765	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 炎症性腸疾患を治療するための医薬組成物	発明者 前田 啓子、藤城 光 弘、池上 脩二、浦野 健	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-115458	出願年 2021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HP <a href="https://www.med.shimane-u.ac.jp/biochem2/index.html">https://www.med.shimane-u.ac.jp/biochem2/index.html</a>
---

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	加美野 宏樹  (Kamino Hiroki)  (00625692)	島根大学・医学部・特別協力研究員   (15201)	

6. 研究組織（つづき）

	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)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関