

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業  
産学連携医療イノベーション創出プログラム 基本スキーム (ACT-M)  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 潰瘍性大腸炎の特異的自己抗原の同定による新規体外診断薬の開発  
(英語) Development of novel diagnostic kit by identification of pathogenic auto-antibody for ulcerative colitis

研究開発実施期間：令和元年8月1日～令和4年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 塩川 雅広  
(英語) Masahiro Shiokawa

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
(日本語) 国立大学法人京都大学 医学研究科 消化器内科学講座 助教  
(英語) Department of Gastroenterology and Hepatology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Associate professor

## II 研究開発の概要

### 1. 研究開発の目的

潰瘍性大腸炎 ulcerative colitis (UC)は大腸に潰瘍を形成する原因不明の疾患であり、我が国の難病に指定されている。日本で20万人、世界で1000万人以上が罹患している。UCの発症メカニズムとして、自己免疫学機序が病態形成に深く関与していると報告されてきたが、その詳細は不明であり、正確な診断には、病態に基づいた疾患特異的バイオマーカーの発見が課題となっていた。今回、申請者らはUCの患者血清中に、疾患特異性の高い抗インテグリン $\alpha V\beta 6$ 自己抗体を同定した。本研究開発では、「抗インテグリン $\alpha V\beta 6$ 自己抗体」の発見を基に、汎用性のある抗インテグリン $\alpha V\beta 6$ 自己抗体の新規診断キットを開発した。

目的の達成のために、下記の研究開発をおこなった。

#### ① 市販可能な診断キットの開発および体外診断用医薬品申請に向けたデータの取得

抗インテグリン $\alpha V\beta 6$ 自己抗体診断キットの研究開発を進め体外診断用医薬品薬事承認に向けた申請データを取得するとともに、診断キットの量産化の準備を目指した。

## ② 開発した診断キットの臨床的有用性の証明

本研究で開発した診断キットの臨床的有用性を検証すべく臨床研究を行った。

## ③ UC の発症機序の解明

抗インテグリン $\alpha V\beta 6$ 自己抗体のUC発症メカニズムとのかかわりを検証した。これにより抗インテグリン $\alpha V\beta 6$ 自己抗体のUC診断マーカーとしての基盤情報の構築を目指した。

## 2. 研究開発の成果

### ① 市販可能な診断キットの開発および体外診断用医薬品申請に向けたデータの取得

概要：抗インテグリン $\alpha V\beta 6$ 自己抗体を測定する高い精度（高い診断感度・特異度）を持つ診断キットを開発するために、1. 校正用基準物質（ポジティブコントロール）の作製、2. 固相抗原（インテグリン $\alpha V\beta 6$ ）の大量・安定的製法の検討、3. 量産試作品による基礎的な性能検討、4. 薬事申請に必要な臨床性能試験のプロトコル案作成を行った。

#### 1. 校正用基準物質（ポジティブコントロール）の作製

標準物質として組み換え型の抗インテグリン $\alpha V\beta 6$ 自己抗体の作製に成功した。低コストで大量、安定供給が可能になった。

#### 2. 固相抗原（インテグリン $\alpha V\beta 6$ ）の大量・安定的製法の検討

培養上清中にインテグリン $\alpha V\beta 6$ を分泌発現するCHO細胞の樹立に成功した。発現量の高い発現株の取得、発現条件の至適化を実施し、大量かつ、高精製度でインテグリン $\alpha V\beta 6$ を発現・精製させることに成功した。得られたインテグリン $\alpha V\beta 6$ はUC患者の抗インテグリン $\alpha V\beta 6$ 自己抗体と反応性を持っていることが確認された。

#### 3. 量産試作品による基礎的な性能検討

診断キットの最終製品（研究用試薬仕様）での設計検証ではUCの診断感度、特異度共に97%を確認し、目標スペックの感度70%、特異度90%以上をクリアした。この結果を持って製造法を社内製造部への移管を行い製造法は確立された。製造部では3lotでの試作を行い、全てのlotで社内規格をクリアし、量産試作品の基礎性能の試験では良好な再現性（日内、日間とも）、保存性においても良好な結果を得た。量産試作品も目標スペックの感度70%、特異度90%以上をクリアした。

#### 4. 薬事申請に必要な臨床性能試験のプロトコル案作成

上記の結果から臨床性能試験のためのデータを集積した。

量産試作品は京都大でも評価を行い、UC患者に対して診断感度70%、特異度90%以上の目標をクリアした。また上記の如く、臨床性能試験に向けたデータを取得した。以上の、状況を踏まえ、2022年4月5日に研究用試薬として製品の発売を行った。

## ② 開発した診断キットの臨床的有用性の証明

臨床性能試験に必要な患者150例以上、コントロール150例以上の検体を収集し、それによってELISA診断キットの性能を評価し、UCの診断感度88.7%(192/224)、特異度96.0%(266/277)と目標としていた感度70%以上、特異度90%以上の性能を得た。

また、開発した診断キットの有用性を更に検証してエビデンス（科学的なデータ）を高めるために、厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班とも連携して、より大規模な試験も開始した。

### ③ UC の発症機序の解明

申請者らが同定した抗インテグリン $\alpha V\beta 6$ 自己抗体の知見を基に、同疾患の病態解明を目指した。このために、1. まずインテグリン $\alpha V\beta 6$ をマウスへ免疫し、モデル動物を作製した。2. 次に、抗インテグリン $\alpha V\beta 6$ 自己抗体の機能を解析した。3. 最後に抗インテグリン $\alpha V\beta 6$ 自己抗体を用い、インテグリン $\alpha V\beta 6$ のエピトープ(抗体結合部位)を同定した。

#### 1. モデル動物作製

軽症 UC マウスモデルは確立できた。

#### 2. 抗インテグリン $\alpha V\beta 6$ 抗体の機能解析

抗インテグリン $\alpha V\beta 6$ 自己抗体は細胞内の IL17 シグナルというシグナルを活性化することが明らかになった。IL17 シグナルは UC で重要なシグナルと言われており、抗インテグリン $\alpha V\beta 6$ 自己抗体がそのシグナルに関与しうることが示唆された。

#### 3. エピトープ解析

抗インテグリン $\alpha V\beta 6$ 自己抗体の結合部位がインテグリン $\alpha V\beta 6$ の2量体によって形成される高次構造に存在することが明らかになった。インテグリン $\alpha V$ やインテグリン $\beta 6$ の単量体には抗体は結合しなかった。

目的としていた診断キットの基盤データは増加した。

### 3. 研究開発の意義等

#### ① UC の診断、病勢評価に貢献

本研究で開発した市販可能な抗インテグリン $\alpha V\beta 6$ 自己抗体測定キットは UC の診断にとって有用であると考えられ、広く臨床で使用されることにより、UC 患者さんの負担を軽減し、より適切な診療に貢献できる。広く臨床で使用していただくには、薬事承認、保険収載が必要であり、下記に今後の計画を示す。

**国内** ; 今回の ACT-M の支援にて、市販可能な抗インテグリン $\alpha V\beta 6$ 自己抗体測定キットが完成した。今後、薬事承認、保険収載が課題である。そのため上記「日本医療研究開発機構 難治性疾患実用化研究事業 エビデンス創出」の助成を受け、同抗体測定による UC の診断の有用性についてさらなるエビデンスを創出する。それをもって、PMDA 相談により薬事承認、保険収載を行う。更に、同助成にて、抗インテグリン $\alpha V\beta 6$ 自己抗体測定キットによる病勢評価も行い、薬事承認、保険収載を目指す。

**海外** ; 今後、抗インテグリン $\alpha V\beta 6$ 自己抗体診断薬キットの海外展開も課題である。すでに、欧米と中国の国際特許は取得している。また、欧米の UC 患者でも同抗体が陽性であることが 2023 年度に他グループから発表された。今後、各国のメーカーと交渉し、グローバルに展開し世界中の UC 患者の診断、病勢評価に貢献したい。

#### ② 治療薬開発について

今回の ACT-M の支援にて、抗インテグリン $\alpha V\beta 6$ 自己抗体の機能解析が深まった。しかし、いまだ課題も多い。また、同抗体をターゲットとした治療薬開発も期待できる。これまでの UC 治療薬にないアプローチであるため、既存の UC 治療薬の効果がない患者にとって、有効な治療薬になりうる。そのため更に同抗体の解析を進めるとともに、同抗体をターゲットとした治療薬開発を行っていく。

### ③ 社会的、経済的インパクト

今回開発した診断キットに基づいた UC 診断・病勢評価が確立できれば、現在課題となっている UC の特異的診断法および疾患活動性バイオマーカーとして新たな診療体系を我が国から発信することとなり、極めて大きな国際的インパクトを与える。さらに本検査方法は血液検査であるため、現行の診断、病勢評価方法である内視鏡検査よりも格段に侵襲性が低いため、患者の QOL 向上に大きく寄与するものと期待される。また、本検査方法の検査経費は数千円程度と想定しており、こちらも内視鏡検査の約 2 万円に対して優位であり、医療経済低減化への貢献も期待できる。

## Purpose of research and development

Ulcerative colitis (UC) is a disease of unknown cause that forms ulcers in the large intestine, and is designated as an intractable disease in Japan. It affects 200,000 people in Japan and more than 10 million people worldwide. It has been reported that autoimmune mechanisms are deeply involved in the pathogenesis of UC, but autoantigens and autoantibodies are unknown. The discovery of targeted biomarkers has been a challenge. Here, the applicants identified highly disease-specific anti-integrin  $\alpha V\beta 6$  autoantibodies in UC patient sera. Based on the discovery of "anti-integrin  $\alpha V\beta 6$  autoantibodies," the purpose of this development research is to develop a new diagnostic kit for general-purpose anti-integrin  $\alpha V\beta 6$  autoantibodies and to establish a new medical treatment system for this disease.

## 1. Research and development results

### ① Acquisition of data for developing diagnostic kits and applying for in-vitro diagnostics

In order to develop a diagnostic kit with high sensitivity and specificity necessary for the measurement of autoantibodies against integrin  $\alpha V\beta 6$ , 1. Preparation of a standard material for calibration (positive control), 2. Large amount and stability of solid-phase antigen 3. Fundamental performance review using mass-produced prototypes; 4. Drafting of protocol for clinical performance test; PMDA protocol consultation. Based on the above situation, we launched the product as a research reagent on April 5, 2022.

### ② Proof of clinical usefulness of this development product

In a retrospective study, specimens from 150 patients and 150 controls required for clinical performance studies were collected as planned, thereby evaluating the performance of the ELISA diagnostic kit, with a diagnostic sensitivity for UC of 88.7% (192/224), A specificity of 96.0% (266/277) was obtained, which was the target sensitivity of 70% or higher and specificity of 90% or higher.

### ③ Elucidation of the pathogenesis of UC

We aimed to elucidate the pathogenesis of the disease. To this end, 1. First, mice were immunized with the antigen integrin  $\alpha V\beta 6$ , and the formation of the pathology similar to UC was analyzed. 2. Next, anti-integrin  $\alpha V\beta 6$  monoclonal antibody was prepared from patient lymphocytes and administered to mouse and human colon organoids, and the function of anti-integrin  $\alpha V\beta 6$  autoantibody was analyzed. 3. Finally, using anti-integrin  $\alpha V\beta 6$  monoclonal antibody, we identified the epitope (antigen-binding site) of the self-antigen integrin  $\alpha V\beta 6$ .

## 2. Significance of research and development

If we can establish UC diagnosis and disease activity evaluation based on the diagnostic kit which we developed this time, we will be able to disseminate a new medical treatment system from Japan as a specific diagnostic method and disease activity biomarker for UC. Furthermore, since this test method is a blood test, it is much less invasive than the current diagnostic method, endoscopy, and is expected to greatly contribute to improving the quality of life of patients. In addition, the examination cost of this examination method is assumed to be around several thousand yen, which is also superior to the approximately 20,000 yen of endoscopy, and can be expected to contribute to the reduction of the medical economy.

### III 事後評価総合所見

目標とした感度 70%、特異度 90%以上の性能をもつキットを完成させた。本開発キットの臨床的有用性の証明は完了はしなかったが、これまでにない性能をもつ UC の診断キットとなる可能性があり、本格的な臨床性能試験を厚労省研究班と連携して実行できるようになったことは目標を上回る結果である。さらに抗インテグリン $\alpha$  V $\beta$ 6 自己抗体の同定は原因不明の疾患の病態解明にも繋がる成果であり課題の目標はほぼ達成されたと評価された。

一方で軽症 UC マウスモデルは確立できたものの、重症マウス UC モデルについては構築できていない。厚労省研究班との連携による多施設共同前向き試験は未達の状況であるなどの課題もあり、臨床性能試験の結果を踏まえ、今後の体外診断薬としての実用化に向けた展開を期待する。