

サイトカイン測定の意義とその留意点

大阪ラボラトリー 白井 雅子・川口 美和・大岡 香織・曾根原 和彦

サイトカインは造血系や免疫系への機能を持つ分泌型糖タンパク質であり、最新の分類では6つのファミリーに分類される。サイトカインそのもの、またはサイトカイン受容体を標的とする医薬品が上市されているほか、臨床検査、免疫療法における副作用指標に利用されるなど、生体試料中のサイトカイン測定の意義が高まっている。Multiplexを含むligand binding assayでの測定が汎用されているが、測定バリデーションに関する規制、測定結果に影響を与える種々の要因に注意を払う必要がある。当社はお客様の求める分析仕様を第一に考え、サービス提供してまいります。

1 はじめに

サイトカインについては、1950年代におけるIFN(interferon)- α の発見から半世紀超を経て、関係するリガンド・受容体の構造や、細胞内伝達形式の知見が集まり、その機能・分類の整理が進んだ。30種類に迫る治療応用も実現し、アンメット・メディカル・ニーズすなわち、それまでに有効な治療方法がないとされていた疾患に対する医療ニーズの、充足の一翼を担って来た。また、一昨年からSARS-CoV-2の感染症(COVID-19)の報道により、サイトカインストームという言葉も広く認知されるようになった。本稿では生体試料中のサイトカイン測定の意義と分析における留意点について述べる。

2 サイトカイン

2.1 サイトカインとは

サイトカインは造血系および免疫系にて炎症反応を制御する細胞間メッセンジャーとして機能する分泌型糖タンパク質である。「cytokine」という用語は、ギリシャ語の「細胞と運動」を語源とし、免疫細胞を感染と炎症の部位に動員する能力を意味する¹⁾。サイトカインの一種であるinterleukin(IL)は、特異的な受容体に結合し、白血球間の情報伝達を担うタンパク質の意味で名付けられている²⁾。ケモカインは、化学誘因性サイトカイン(chemoattractant cytokines)のファミリーで、血液・組織間の小静脈を介した細胞移動、および化学物質に応答した細胞運動の誘導に重要な役割を果たす³⁾。

2.2 サイトカインの分類

サイトカインは、配列の相同性、受容体鎖の類似性または機能特性に基づいて各ファミリーに分類される。サイトカインの主要なファミリーは次の6つ、すなわちTNF(tumor necrosis factor)類、IL-1ファミリーメンバー、TGF- β (transforming growth factor- β)類、受容体チロシンキナーゼを介して

シグナルを伝達する因子類、ケモカイン、およびJAK/STAT(Janus kinase/ signal transduction and activator of transcription)経路を介するサイトカイン類に分類される²⁾。

TNFおよびTNF受容体(TNFR)スーパーファミリーは、19のリガンドと29の受容体を含む。TNF- α との配列相同性に基づいて、LT- β (lymphotoxin-beta)、CD27L、CD30L、CD40L、FasL、4-1BBL、OX40L、RANKL、APRIL、EDA-A1、EDA-A2、LIGHT、BAFF、TRAIL、TWEAK、TL1A、GITRLなどのメンバーが同定された⁴⁾。

IL-1およびIL-1受容体(IL-1R)スーパーファミリーは、11種のサイトカイン(IL-1、IL-18、IL-33、IL-37、IL-38等)と10種の受容体より構成され、自然免疫と呼ばれる炎症性および宿主防御特性を担い、非特異性を特徴とする^{5) 6)}。

TGF- β ファミリータンパク質は33の遺伝子にコードされ、TGF- β アイソフォーム、inhibin β 、BMP/GDFファミリーを含むとされる⁷⁾。

M-CSFとIL-34の受容体であるCSF1Rは、受容体チロシンキナーゼのType III(PDGFファミリー)に位置づけられる⁸⁾。

IL-8類、MCP(monocyte chemoattractant protein)類を含み、50種以上が同定されているケモカイン類の受容体は、ヒト7回膜貫通Gタンパク質共役型構造を持つ。サイトカイン類(ILsの名前を冠するものを除く)が機能に基づき定義されているの対照的に、ケモカイン類は一次構造で定義される。ほとんどが70~80アミノ酸より成り、N末端システインの数と間隔に応じて4つに細分して名付けられている(CXCL、CCL、XCL、CX3CL)⁹⁾。

50種を超えるJAK/STAT関連のサイトカインは、IL-2、IL-3、IL-6のファミリーを含むClass Iサイトカインと、IFN類及びIL-10ファミリー等を含むClass IIサイトカインに分類される²⁾。

3 サイトカイン測定の意義

3.1 医薬品とその分子標的としてのサイトカイン

サイトカインそのもの、あるいはサイトカイン受容体等を分子標的とする医薬品が多数上市されている（表 1）。サイトカインの遺伝子組換えタンパク質自体が医薬品であるものは、その薬物動態特性の確認の目的で濃度測定が行われる。また、サイトカインあるいはその受容体に対する抗体が医薬品である場合は、その抗体医薬品の効果や濃度測定に与える影響の有無評価のため測定されることがある。

3.2 臨床検査におけるサイトカイン

非ホジキンリンパ腫、成人T細胞性白血病（ATL）、急性リンパ球性白血病（ALL）における sIL-2R、アトピー性皮膚炎における TARC、COVID-19 の重症化リスクに対する IFN- γ 3、全身性炎症反応症候群、多臓器障害、敗血症における IL-6 は、各疾患の指標として臨床検査の保険項目に収載されている。これらは CLEIA（chemiluminescent enzyme immunoassay）などの方法にて測定されている。

3.3 副作用指標としてのサイトカイン

免疫チェックポイント阻害薬、Bispecific T-cell Engager（BiTE）法、Car-T 療法などの強力な免疫療法の臨床応用に伴い、潜在的に致命的な副作用、特にサイトカイン放出症候群（CRS）の認識が高まっている。

CRS のグレーディングは CTCAE（有害事象共通用語規準）において、軽度より Grade 1（全身症状の有無は問わない発熱）、Grade 2（輸液反応性低血圧、40% 未満の）低濃度酸素投与反応性の低酸素症）、Grade 3（昇圧剤反応性低血圧、40% 以上の）要高濃度酸素投与の低酸素症）、Grade 4（生命を脅かす結果、人工呼吸器等の要緊急処置）と規定されている¹⁰⁾。

Grade 1, 2 では、T 細胞の活性化や免疫細胞の溶解により、IFN- γ や TNF- α の放出が誘導される。それに続き、マクロファージ、樹状細胞、その他の免疫細胞、内皮細胞が活性化され、炎症性サイトカインが放出される。Grade 3, 4 では、特にマクロファージと内皮細胞は大量の IL-6 を産生し、正のフィードバックループにて T 細胞や他の免疫細胞を活性化しサイトカインストームを引き起こす¹¹⁾。

開発段階でのサイトカイン放出プロファイルの確認が、免疫療法の潜在的リスクの推定や、有害事象発生時の処置準備の手助けとなる。

4 サイトカイン測定の実際

4.1 測定方法

4.1.1 汎用測定法

血清または血漿などの生体試料中のサイトカイン類の測定には、抗原-抗体の特異的結合を利用した LBA（ligand binding assay）法が実用的に用いられている。特異的な 2 種の抗体で analyte を検出するサンドイッチイムノアッセイの市販キットの活用が可能である。単一 analyte を分析する ELISA（enzyme-linked immuno sorbent assay）kit の他、多項目同時測定が可能な ECL（electro chemiluminescence, Meso Scale Diagnostics, LLC）、Luminex（Luminex Corp.）、EllaTM（Protein Simple）等の kit が、対応 analyte、検体種、感度等を勘案の上、選択される。

表1 サイトカインに関係の医薬品

	分類	適応症
サイトカイン・ホルモン	IFN- α （Interferon alfa）	C 型慢性肝炎、胃癌他
	IFN- β （Interferon beta）	C 型慢性肝炎、芽腫、多発性硬化症等
	IFN- γ （Interferon gamma 1a）	腎癌
	EPO（Epoetin）	腎性貧血
	G-CSF（Filgrastim）	各種好中球減少症
	IL-2（Celmoleukin, Teceleukin）	血管肉腫
	bFGF（Trafermin）	褥瘡、皮膚潰瘍
	GH（Somatropin, Somapacitan）	下垂体性小人症他
	Leptin（Metreleptin）	脂肪萎縮症
抗体	抗 TNF- α 抗体（Infliximab, Adalimumab, Golimumab）	関節リウマチ他
	抗 IL-6R 抗体（Tocilizumab）	関節リウマチ他
	抗 IL-12/IL23-p40 抗体（Ustekinumab）	尋常性乾癬他
	抗 IL-1 β 抗体（Canakinumab）	クリオピリン関連周期性症候群他
	抗 CCR4 抗体（Mogamulizumab）	T 細胞リンパ腫他
	抗 IL-17A 抗体（Secukinumab）	尋常性乾癬
	抗 IL-5 抗体（Mepolizumab）	気管支喘息他
	抗 IL-17 抗体（Ixekizumab）	尋常性乾癬他
	抗 IL-17R 抗体（Brodalumab）	尋常性乾癬他
	抗 IL-6R α サブユニット抗体（Sarilumab）	関節リウマチ
	抗 IL-4R α サブユニット抗体（Dupilumab）	アトピー性皮膚炎他
	抗 IL-5R α サブユニット抗体（Benralizumab）	気管支喘息
	抗 IL-23 抗体（Guselkumab）	尋常性乾癬他
	抗 IL-23 α （p19）サブユニット抗体（Risankizumab）	尋常性乾癬他
	pH 依存的結合性抗 IL-6R 抗体（Satralizumab）	視神経脊髄炎スペクトラム障害
融合タンパク質	可溶性 TNFR-Fc 融合タンパク質（Etanercept）	関節リウマチ
	TPO（Fc-TPOR アゴニストペプチド融合タンパク質）（Romiplostim）	血小板減少
低分子	CCR5 阻害剤（Maraviroc）	HIV 感染症治療薬
	CXCR4 拮抗薬（Plerixafor）	末梢血中への動員促進薬

4.1.2 超高感度測定法

サイトカイン類は一般にその血中濃度が数十 pg/mL 以下と低いことから、市販の汎用キットではしばしば検出限界以下となる。S-PLEX (Meso Scale Diagnostics, LLC.), Simoa (Quanterix), SMCxPro (Merck KGaA), Immuno-PCR (RayBiotech, Inc.) などの測定プラットフォームでは、一部のサイトカインの Single-plex でサブ pg/mL 以下の超高感度測定が可能であり、その性能が期待される。

4.1.3 サイトカインの LC-MS での測定

サイトカイン類は、血漿プロテオーム中での存在量が数十 pg/mL 以下と低く、albumin や IgG などの HAP (高濃度タンパク質) の除去や、affinity 精製等による前処理を介した多次元 MS を経ても実用的な解析が困難である¹²⁾。上位 14 HAPs (albumin, IgG, transferrin, haptoglobin, alpha 1-antitrypsin, IgA, fibrinogen, alpha2 macroglobulin, alpha1 acid-glycoprotein, IgM, apolipoprotein AI, apolipoprotein AII, complement C3 及び transthyretin) の multiple affinity removal system (MARS-14) immuno-depletion column (Agilent Technologies, Inc.) での除去など、種々の除去法が試みられている¹³⁾。

4.1.4 *In vitro* サイトカイン誘導アッセイ

臨床でのモノクローナル抗体医薬品の重篤なインフュージョンリアクションや、治療用オリゴヌクレオチドに対する全身性のサイトカイン反応の予測の手段として、*In vitro* 全血アッセイ (WBA: whole blood assay) の有用性が提案されている^{14) 15)}。

4.2 サイトカイン測定の留意点

4.2.1 Multiplex 測定の留意点

サイトカイン等の multiplex 測定では、単一 well 内で複数の LBA を実施するため、測定試料の希釈倍率は均一な 1 条件で実施せざるを得ず、一部の項目にて希釈超過による感度不足や、希釈不足によるマトリックス効果で希釈直線性を得られないことがある。正確な定量値取得のため、該当項目について別途アッセイを設定する必要がある。また、サイトカイン等の multiplex 測定の市販キットに内包の calibrator の中には、analyte がカクテルになっているものもある。calibrator を用いて QC 試料を調製する際の濃度は、複数の analyte について、感度、レンジ、内因性濃度を考慮の上決定する必要がある。

4.2.2 アイソフォーム

IFN- α は、ヒトにおいて 23 のアイソフォーム (異分子種) が報告されている¹⁾。特定の分子種 (医薬品の IFN- α 2) の pharmacokinetics, toxicokinetics 測定などの目的でなく、バイオマーカーとしての広範な I 型 IFN 類の測定を目的とする

場合、multi-subtype 検出のキットを選択する必要がある。多数の分子種のあるその他のサイトカインについても同様である。

4.2.3 翻訳後修飾

サイトカインの市販のキットに内包の calibrator は、ヒト細胞あるいはヒト生体試料由来のもの以外に、大腸菌、CHO (Chinese hamster ovary) または昆虫細胞から製造されたものがある。後者の場合、ペプチド骨格のリン酸化やグリコシル化など翻訳後修飾の様相がヒト由来のものとは異なることにより、タンパク質の安定性、タンパク質間相互作用、タンパク質の折り畳み及び抗原性に影響を与える可能性がある。

4.2.4 サイトカイン試料の安定性

一部のサイトカインについて、採血管の種類、-80℃凍結保存期間、凍結融解回数がその測定結果に大きな影響を及ぼすとの報告がある¹⁶⁾。

4.2.5 サイトカインの可溶性受容体

サイトカインの受容体は、免疫細胞の表面受容体として存在する他、多くのサイトカインで可溶性受容体の存在が報告されている。それらは受容体をコードする遺伝子から自然に生成されるもの、あるいは膜受容体の派生物などである。それらの大多数は受容体阻害的に機能するが、受容体のダウンレギュレーションを起こすもの、受容体アゴニスト活性を示すもの、サイトカイン結合タンパク質として機能するものもある¹⁷⁾。疾患やモデル実験での可溶性受容体 sIL-6R の IL-6 作用の増強の報告もある¹⁸⁾。サイトカインの可溶性受容体は、サイトカインの機能や測定値だけでなく、疾患状態にも影響することを考慮する必要がある。

4.2.6 サイトカインと自己抗体

全身性エリテマトーデス (SLE) 患者、癌患者のみならず、健康人血清中に、I, II 型 IFN 類 (IFN- α , IFN- β , IFN- γ 等) の IgG 及び IgM タイプの自己抗体の存在報告があり¹⁹⁾、IFN 類の機能や、定量値への影響を考慮する必要があるかもしれない。サイトカインの multiplex 測定における NIBSC/WHO standards と定量値の解離の改善策として、Ig (免疫グロブリン) 結合タンパク質である Protein L による前処理が奏功との報告もある¹⁶⁾。

4.3 サイトカイン測定のバリデーションに関する規制

サイトカインを含む狭義のバイオマーカー (流体ベースのバイオマーカーすなわち血漿、尿、唾液などに可溶性タンパク質、ペプチド、脂質またはその他の化学物質) の医薬品等の申請資料への活用のための測定のバリデーションに関して Lee et al. (2006)²⁰⁾、FDA (2018)²¹⁾、Piccoli et al. (2019)²²⁾ の報告は重要である。その骨子として、context of use (利用

状況)を勘案の上, fit for purpose (目的に合致) にて, バリデーションの実施が求められる。また, 生体試料中の薬物濃度測定との相違点として, 内因性濃度, 平行性, キットのロット間差について特に留意が必要となる。

4.4 サイトカイン測定結果の統計評価

測定法の感度不足や, 減少方向への作用にて定量値が定量下限未満 (BLQ) となった場合, 区間打ち切りデータとしての BLQ に, ある値を代入すること (deterministic imputation) により平均値, SD, CV などの算出・評価が可能となる。BLQ の取扱 (0, LLOQ (定量下限), LLOQ/2, 除外) による統計値に与えるバイアスの大きさや方向を把握し, 事前に取り決めておく必要がある²³⁾。

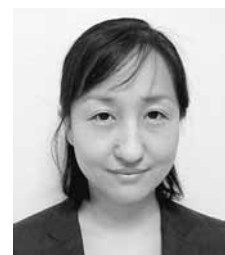
5 おわりに

現在もサイトカイン類を分子標的とする新規治療の開発候補は少なくない。また創薬ニューモダリティの拡大に伴い, サイトカインに関係するバイオマーカーの評価法も多様化している。当社では, 最新の技術・知識と豊富な経験を活かし, お客様の多様な分析ニーズに応え, 問題解決に助力することにより, 新規治療の開発に貢献していく。

文 献

- 1) R. Morris, N. J. Kershaw, J. J. Babon : *Protein Science*, **27**, 1984 (2018) .
- 2) M. Akdis et al. : *J. Allergy Clin. Immunol.*, **138**, (4) , 984 (2016) .
- 3) K. Oldham : "Chemokines: Introduction" , *British Society for Immunology*, available from<<https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/receptors-and-molecules/chemokines-introduction>>, (accessed 2021-5-28) .
- 4) C. Dostert, M. Grusdat, E. Letellier, D. Brenner : *Physiol. Rev.*, **99**, (1) , 115 (2019) .
- 5) C. A. Dinarello : *Immunol. Rev.*, **281**, (1) , 8 (2018) .
- 6) F. L. van de Veerdonk, M. G. Netea : *Front. Immunol.*, **4**, (167) , (2013) .
- 7) M. Morikawa, R. Derynck, K. Miyazono : *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, **8**, a021873 (2016) .
- 8) S. H. Mun, P. S. U. Park, K.H. P. Min : *Experimental & Molecular Medicine*, **52**, 1239 (2020) .
- 9) F. Bachelier et al. : *Pharmacol. Rev.*, **66**, (1) , 1 (2014) .
- 10) National Cancer Institute, *Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v5.0*, available from<https://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/ctc.htm#ctc_50>, (accessed 2021-5-28) .
- 11) A. S. Vornhagen et al. : *Journal for Immuno Therapy of Cancer*, **6**, (56) , (2018) .
- 12) N. L. Anderson, N. G. Anderson : *Mol Cell Proteomics*, **1**, (11) , 845 (2002) .
- 13) S. B. Ahn, A. Khan : *EuPa Proteomics*, **3**, 78 (2014) .
- 14) Y. Iwata et al. : *The journal of toxicological science*, **41**, (4) , 523 (2016) .
- 15) C. Coch, et al. : *Plos One*, **8**, (8) , e71057 (2013) .
- 16) W. de Jager, K. Bourcier, G. T. Rijkers, B. J. Prakken, V. S. Margolis : *BMC Immunol*, **10**, (52) , (2009) .

- 17) M. L. Heaney, D. W. Golde : *Journal of Leukocyte Biology*, **64**, 135 (1998) .
- 18) T. Tamura et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **90**, 11924 (1993) .
- 19) C. Ross, M. B. Hansen, T. Schyberg, K. Berg : *Clin. exp. Immunol.*, **82**, (1) , 57 (1990) .
- 20) J W Lee et al. : *Pharmaceutical Research*, **23**, (2) , 312 (2006) .
- 21) FDA, : "Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation" , (2018) , available from<<https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>>, (accessed 2021-5-28) .
- 22) S. P. Piccoli, J. M. Sauer, Biomarker Assay Collaborative Evidentiary Considerations Writing Group, Critical Path Institute : "Points to Consider Document: Scientific and Regulatory Considerations for the Analytical Validation of Assays Used in the Qualification of Biomarkers in Biological Matrices" , (2019) , available from<<https://c-path.org/wp-content/uploads/2019/06/evidconsid-whitepaper-analyticalsectionv2019.pdf>>, (accessed 2021-5-28) .
- 23) 橋本敏夫, 山田雅之, 笠井英史 : 計量生物学, **36**, S19 (2015) .



白井 雅子
(しらい まさこ)
大阪ラボトリー



川口 美和
(かわぐち みわ)
大阪ラボトリー



大岡 香織
(おおおか かおり)
大阪ラボトリー



曽根原 和彦
(そねはら かずひこ)
大阪ラボトリー