



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102341704 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 01

(21) 申请号 201080010289. 5

代理人 熊玉兰 郭文洁

(22) 申请日 2010. 02. 23

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

G01N 33/53 (2006. 01)

2009-054082 2009. 03. 06 JP

2009-223493 2009. 09. 28 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 09. 02

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2010/052738 2010. 02. 23

(87) PCT申请的公布数据

W02010/101047 JA 2010. 09. 10

(71) 申请人 持田制药株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 阿部康人 锅田基生 伊藤昌春

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 3 页

(54) 发明名称

子宫内膜异位症的判定方法以及子宫内膜异位症的诊断用试剂盒

(57) 摘要

本发明的目的在于,提供可以使用受检者的血液样品、并且与仅使用以往作为子宫内膜异位症标记物的 CA125 等的以往方法相比可以高灵敏度且高精度地判定子宫内膜异位症的判定方法,和用于实施该本发明方法的诊断用试剂盒。本发明涉及的子宫内膜异位症的判定方法的特征在于含有:进行选自血液样品中抗突触融合蛋白自身抗体、抗 PDIK1L 自身抗体和抗烯醇化酶自身抗体中至少 1 种的表达分析的步骤,和通过上述表达分析结果判定子宫内膜异位症发病的有无的步骤。

1. 子宫内膜异位症的判定方法,其特征在于包含:
进行选自血液样品中抗突触融合蛋白自身抗体、抗 PDIK1L 自身抗体和抗烯醇化酶自身抗体中至少 1 种的表达分析的步骤,以及
通过所述表达分析结果判定子宫内膜异位症发病的有无的步骤。
2. 如权利要求 1 所述的子宫内膜异位症的判定方法,其中,除了进行选自抗突触融合蛋白自身抗体、抗 PDIK1L 自身抗体和抗烯醇化酶自身抗体中至少 1 种的表达分析之外,还进行 CA125 或 CA19-9 的表达分析。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的判定方法,其中,所述表达分析通过免疫测定法进行。
4. 子宫内膜异位症的诊断用试剂盒,其特征在于含有:
选自突触融合蛋白、PDIK1L、烯醇化酶、它们的片段肽、它们的变性物、它们的修饰物中的至少一种肽,以及
可以和与所述肽特异性地结合的自身抗体结合且具有标记基团的二次抗体。
5. 如权利要求 4 所述的子宫内膜异位症的诊断用试剂盒,其中,将所述肽固定在载体上。
6. 如权利要求 4 或 5 所述的子宫内膜异位症的诊断用试剂盒,其进一步含有抗 CA125 抗体或抗 CA19-9 抗体、以及可以和与所述抗 CA125 抗体或抗 CA19-9 抗体特异性地结合的 CA125 或 CA19-9 结合且具有标记基团的二次抗体。
7. 如权利要求 6 所述的子宫内膜异位症的诊断用试剂盒,其中,将所述抗 CA125 抗体或抗 CA19-9 抗体固定在载体上。
8. 如权利要求 4 ~ 7 中任意一项所述的诊断用试剂盒,其进一步含有所述标记基团的检出试剂、正常对照样品或子宫内膜异位症对照样品中的任一种以上。
9. 选自抗突触融合蛋白自身抗体、抗 PDIK1L 自身抗体和抗烯醇化酶自身抗体中的至少一种在判定子宫内膜异位症中的应用。
10. 选自抗突触融合蛋白自身抗体、抗 PDIK1L 自身抗体和抗烯醇化酶自身抗体中的至少一种在制备子宫内膜异位症的诊断用试剂盒中的应用。

子宫内膜异位症的判定方法以及子宫内膜异位症的诊断用试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及用于判定子宫内膜异位症的有无的方法、用于诊断子宫内膜异位症的试剂盒以及抗突触融合蛋白自身抗体等的使用方法。

背景技术

[0002] 子宫内膜异位症是子宫内膜样上皮细胞、间质细胞在卵巢、输卵管及腹腔内、直肠表面等子宫腔内表面以外的组织、内脏器官中随月经周期而重复增殖、出血、再生,从而对组织带来障碍的疾病。子宫内膜异位症具有子宫内膜样组织在异位增殖等与恶性肿瘤类似的特征,但是其始终为良性的疾病。然而,子宫内膜异位症的原因尚未阐明,认为月经应激为原因之一,由于晚婚、生育年龄延迟、生育次数减少等,近年来这种患者数目有所增加。此外有数据表明,子宫内膜异位症引起炎症、疼痛、组织粘连等,并以高比率并发不孕症。由此,在早期阶段检出子宫内膜异位症并对其进行处理是重要的。

[0003] 对于子宫内膜异位症,推荐通过腹腔镜检查、剖腹术进行视诊和通过组织学诊断进行明确诊断。但是,由于这些诊断方法对患者造成痛苦和负担,一般首先进行更简便的内诊、超声波检查、血液检查等。该血液检查中,使用 CA125、CA19-9 等标记物。

[0004] 而这些 CA125 和 CA19-9 本来为卵巢癌等的肿瘤标记物,因此对于子宫内膜异位症并无特异性。此外,在使用这些标记物的诊断中,存在真阳性率低、且假阳性率高的缺点。因此,要求可以替代 CA125 等的新型子宫内膜异位症诊断用标记物。

[0005] 作为除 CA125 等之外的子宫内膜异位症诊断用标记物,例如专利文献 1 中公开了 NADH 脱氢酶等的基因,专利文献 2 中公开了组胺释放因子,专利文献 3 中公开了称为组织因子途径抑制物 (TFPI-2) 的蛋白质等。

[0006] 现有技术文献

专利文献

专利文献 1:日本特表 2003-531580 号公报

专利文献 2:日本特开 2005-49343 号公报

专利文献 3:日本特表 2007-506965 号公报。

发明内容

[0007] 如上所述,除了实用化的 CA125 和 CA19-9 之外,也对子宫内膜异位症的诊断用标记物进行了各种研究。

[0008] 但是,对于专利文献 1~2 中记载的标记物,必须测定子宫内膜细胞样品中的表达水平,因此存在在采取样品时对受检者造成痛苦等问题。此外,对于专利文献 3 的标记物,以实验示出其与卵巢中产生的子宫内膜异位症性囊肿(巧克力囊肿)的相关性,但是其与卵巢外产生的子宫内膜异位症、未发展至巧克力囊肿的轻度子宫内膜异位症的相关性不明。

[0009] 因此,本发明的目的在于,提供可以使用受检者的血液样品、并且与仅使用作为子宫内膜异位症标记物的 CA125 等的以往方法相比可以高灵敏度且高精度地判定子宫内膜异位症的判定方法,用于实施该本发明方法的诊断用试剂盒,以及应用抗突触融合蛋白自身抗体等判定子宫内膜异位症和制备子宫内膜异位症的诊断用试剂盒的方法。

[0010] 本发明人为了解决上述课题而进行精心研究,由血液中含有的成分搜索可以用作子宫内膜异位症的诊断用标记物的成分。结果发现,对于特定蛋白质的自身抗体表现出与子宫内膜异位症显著的相关性,因此用作比以往的子宫内膜异位症标记物更准确的标记物,从而完成本发明。

[0011] 本发明涉及的子宫内膜异位症的判定方法的特征在于含有:进行选自血液样品中抗突触融合蛋白自身抗体、抗 PDIK1L 自身抗体和抗烯醇化酶自身抗体中至少 1 种的表达分析的步骤,和通过上述表达分析结果判定子宫内膜异位症发病的有无的步骤。

[0012] 本发明涉及的子宫内膜异位症的诊断用试剂盒的特征在于含有:选自突触融合蛋白、PDIK1L、烯醇化酶、它们的片段肽、它们的变性物、它们的修饰物中的至少一种肽,以及可以和与上述肽特异性地结合的自身抗体结合且具有标记基团的二次抗体。

[0013] 本发明涉及的选自抗突触融合蛋白自身抗体、抗 PDIK1L 自身抗体和抗烯醇化酶自身抗体中的至少一种可以用于子宫内膜异位症的判定和子宫内膜异位症的诊断用试剂盒的制备。

附图说明

[0014] [图 1] 为表示基于本发明方法,测定由子宫内膜异位症患者、其它疾病的患者和健康者得到的血清样品中的抗 α -烯醇化酶自身抗体的相对活性的结果的图。

[0015] [图 2] 为表示基于本发明方法,测定由子宫内膜异位症患者、其它疾病的患者和健康者得到的血清样品中的抗 PDIK1L 自身抗体的相对活性的结果的图。

[0016] [图 3] 为表示基于本发明方法,测定由子宫内膜异位症患者、其它疾病的患者和健康者得到的血清样品中的抗突触融合蛋白 5 自身抗体的相对活性的结果的图。

具体实施方式

[0017] 在本发明涉及的子宫内膜异位症的判定方法中,进行选自受检者的血液样品中的抗突触融合蛋白自身抗体、抗 PDIK1L 自身抗体和抗烯醇化酶自身抗体中的至少 1 种的表达分析。

[0018] 子宫内膜异位症是子宫内膜样上皮细胞、间质细胞在卵巢、输卵管及腹腔内、直肠表面等子宫腔内表面以外的组织、内脏器官中随月经周期而重复增殖、出血、再生,从而对组织带来障碍的疾病,根据其严重程度分为 I 期~IV 期的 4 个阶段。本发明中,子宫内膜异位症的严重程度越高,则可以以越高的灵敏度和精度判定子宫内膜异位症的有无。由于作为实用化的子宫内膜异位症标记物的 CA125 和 CA19-9 也为卵巢癌等的肿瘤标记物,因此假阳性率高。与此相对地,对于本发明涉及的子宫内膜异位症标记物,根据本发明人进行的实验去除异常值,健康者、其它疾病患者的假阳性率比以往标记物低。

[0019] 对本发明方法中使用的血液样品的种类不特别限定,其含有血液自身、血浆、血清中的任意一种。但是由于作为表达分析的对象自身抗体包含在血清中,因此优选使用血

浆或血清,更优选使用血清。作为得到血浆、血清的方法,可以适用常规方法,更具体地,可以使用离心分离、过滤。

[0020] 认为本发明方法不仅对于人、而且对于其它的恒温动物也是有效的,因此,作为血液样品,不仅可以用于来源于人的血液样品,还可以用于来源于其它恒温动物的血液样品。

[0021] 由于本发明方法使用血液样品,因此没有必要从患者切除例如子宫组织等作为样品,采取血液即可。由此,利用本发明方法时,进一步降低对患者造成的痛苦。

[0022] 突触融合蛋白为形成与细胞的胞吐关联的 SNARE 复合体的细胞膜结合性蛋白质的一种。

[0023] PDIK1L 为丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶,其与同样地为激酶的 CLIK1 表现出 69% 的同一性。PDIK1L 的氨基酸序列记载于 LINGCHEN GUO 等人, *Journal of Genetics*, vol. 82, nos. 1 & 2, pp. 27-32 (2003) (该文献在本说明书中引入作为参考) 中。

[0024] 烯醇化酶为与糖酵解系统关联的酶之一,作为其同工酶,有主要存在于细胞质中的 α 型、主要存在于肌肉细胞中的 β 型、主要存在于神经元中的 γ 型。

[0025] 在本发明中,进行受检者血液样品中上述蛋白质的自身抗体的表达分析。在子宫内膜异位症患者的血液样品中,上述蛋白质的自身抗体的表达量增加的原因尚未阐明,但是通过这些自身抗体的表达分析,可以比以往的标记物更准确地判定子宫内膜异位症的有无。

[0026] 在本发明涉及的判定方法中,除了选自抗突触融合蛋白自身抗体、抗 PDIK1L 自身抗体和抗烯醇化酶自身抗体中的至少 1 种的表达分析之外,优选还进行 CA125 或 CA19-9 的表达分析。通过与抗突触融合蛋白自身抗体等一起进行 CA125 或 CA19-9 的表达分析,可以灵敏度更高地检出子宫内膜异位症。

[0027] 作为表达分析对象的抗突触融合蛋白自身抗体优选抗突触融合蛋白 5 自身抗体,抗烯醇化酶自身抗体优选抗 α -烯醇化酶自身抗体。

[0028] 在本发明涉及的判定方法中,对于针对突触融合蛋白等的自身抗体和 CA125 等的表达分析法不作特别限定。例如,不限于测定血液样品中这些自身抗体的绝对量或浓度,也可以测定相对的量或浓度。更具体地说,例如可以测定上述自身抗体等在血液样品中的量、浓度或活性。

[0029] 作为具体的表达分析方法,可以举出例如 ELISA、使用蛋白质芯片的方法、免疫比浊法、蛋白质印迹法、RIA 法、化学发光酶免疫测定法 (CLEIA 法)、胶乳凝聚法、电化学发光免疫测定法 (ECLIA 法)、红细胞凝集反应 (HA 法) 等免疫测定法。

[0030] 在这些方法中,作为用于进行上述表达分析的方法,优选免疫测定法。免疫测定法的灵敏度和精度高,即使血中的自身抗体浓度稍微变化也可以检出。

[0031] 通过 ELISA 进行本发明涉及的自身抗体的表达分析时,可以合适地使用本发明涉及的子宫内膜异位症的诊断用试剂盒。

[0032] 本发明的诊断用试剂盒含有:选自突触融合蛋白、PDIK1L、烯醇化酶、它们的片段肽、它们的变性物、它们的修饰物中的至少一种肽,以及可以和与上述肽特异性地结合的自身抗体结合且具有标记基团的二次抗体。

[0033] 作为上述诊断用试剂盒,其适当地进一步含有抗 CA125 抗体或抗 CA19-9 抗体、以及可以和与上述抗 CA125 抗体或抗 CA19-9 抗体特异性结合的 CA125 或 CA19-9 结合且具有

标记基团的二次抗体。若使用这种试剂盒,则除了进行抗突触融合蛋白自身抗体等的表达分析之外,还可以进行 CA125 或 CA19-9 的表达分析,通过将这些分析结果组合,可以进一步准确地判定子宫内膜异位症。

[0034] 突触融合蛋白等的片段肽指的是可以与上述自身抗体特异性地结合的突触融合蛋白等的一部分。作为这些片段肽,可以举出例如,突触融合蛋白等的自身抗体的表位本身、含有表位的肽等。本发明涉及的与自身抗体结合的表位可以通过 ELI 斑点测定、细胞内细胞因子染色法、流式细胞术、T 细胞增殖测定等公知方法来确定。

[0035] 突触融合蛋白等的变性物指的是通过实施加热、冷冻、紫外线等物理性处理或应用表面活性剂、变性剂等化学性处理而得到的、可以与上述自身抗体特异性地结合的变性物。例如,可以举出通过 SDS、DTT 处理而得到的变性物。

[0036] 突触融合蛋白等的修饰物指的是对 1 个以上氨基酸进行修饰而得到的、可以与上述自身抗体特异性地结合的修饰物。例如,可以举出用戊二醛处理而得到的修饰物。

[0037] 在本发明中,作为上述肽,可以使用为突触融合蛋白等的片段肽且经变性处理的肽、为变性物且为化学修饰物的突触融合蛋白等。

[0038] 上述肽可以具有 1 个或几个氨基酸残基的突变、置换、缺失和 / 或添加,只要可以与上述自身抗体特异性地结合。

[0039] 在本发明涉及的诊断用试剂盒中,可将上述肽、抗 CA125 抗体等固定在载体上。通过使用载体,产生易于将这些肽等从样品分离等优点。适于将上述肽等固定的载体为诊断用试剂盒中一般使用的载体即可,对其不作特别限定。例如,作为载体的材料,可以举出聚苯乙烯、聚酰胺、聚丙烯酰胺等树脂,硅胶、玻璃、棉等,作为载体的形状,可以举出珠、膜、丝、无纺布、无定形凝胶等。

[0040] 在使用上述诊断用试剂盒时,使受检者的血液样品作用于上述肽等。结果,若血液样品中含有针对本发明涉及的肽等的自身抗体、CA125 等,则其与肽等特异性地结合。接着,用缓冲液等将与肽等非特异性地结合的蛋白质等洗涤除去后,使上述二次抗体进行作用。二次抗体和与上述肽等结合的上述自身抗体等结合。上述二次抗体用对应于标记基团的方法检出。

[0041] 作为上述标记基团,可以使用生物化学领域中一般使用的标记基团。例如,可以举出荧光显色基团,过氧化物酶、碱性磷酸酶、萤光素酶等酶。这些酶可以通过与检出试剂作用而发光等。例如,在使用过氧化物酶作为标记基团时,可以通过利用过氧化物酶的氧化而显色的显色试剂、对应于通过过氧化物酶的作用由过氧化物盐产生的 O_2^{2-} 而显色的显色试剂等来检出。

[0042] 血液样品中含有的自身抗体的浓度或量是通过显色强度等间接得到的。可以通过校准曲线等将得到的测定值换算为相对或绝对浓度、量、活性等。

[0043] 作为本发明的诊断用试剂盒,其优选含有正常对照样品、子宫内膜异位症对照样品。若试剂盒附带这些样品,则对这些样品进行同样的实验,将其测定值和受检样品的结果进行比较,由此可以更客观地判定受检者的子宫内膜异位症的有无。

[0044] 在使用蛋白质芯片的方法中,使用负载有上述肽等的蛋白质芯片。若使血液样品作用于上述蛋白质芯片,则本发明涉及的自身抗体与其特异性地结合。接着,用缓冲液等将非特异性地结合的蛋白质等洗涤除去后,可以通过常规方法检出所结合的自身抗体。

[0045] 作为上述检出方法,可以举出例如基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MASS)、表面增强激光解吸电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MASS)等飞行时间质谱(TOF-MASS)。由TOF-MASS图,通过分子量峰、其它的片段峰、它们的强度等,可以掌握自身抗体的浓度或量。此外,与ELISA的情况同样地,也可以使用具有标记基团且可以与各自身抗体结合的二次抗体来检出与蛋白质芯片选择性地结合的自身抗体。

[0046] 在利用免疫比浊法时,使特异性抗原与血液样品中的本发明涉及的自身抗体结合后,照射特定的光,测定与所产生的不溶性复合体的量对应的浊度,由此求出自身抗体的浓度或量。由此,自身抗体的浓度或量作为对应于浊度的相对值得到,也可以通过使用事先制作的校准曲线求出绝对的量或浓度。

[0047] 在化学发光酶免疫测定法(CLEIA法)的情况下,可以将血液样品中的各自身抗体夹在固定于铁氧体粒子等上的上述肽等和标记抗体之间,形成抗原抗体反应复合体。然后,添加发光底物等对应于标记基团的检出用化合物等,由此可测定发光量。在使用铁氧体粒子时,通过使用磁铁等,可以纯化必要的复合体。

[0048] 在本发明方法中,接着由所得到的表达分析结果判定子宫内膜异位症发病的有无。即,若子宫内膜异位症发病、或其症状越重,则血液中的本发明涉及的自身抗体的浓度或量越高。由此,基于本发明涉及的自身抗体的表达分析结果,若其表达量多则可以判断为阳性,若其表达量少则可以判断为阴性。

[0049] 实际上,根据子宫内膜异位症的定义、严重程度、本发明涉及的自身抗体的表达分析方法,可以改变阳性与阴性的边界,即截断值(cutoff value)。因此,在没有一般基准的阶段,本发明方法的实施者有必要在通过预实验等事先确定表达分析方法和截断值后进行测定。

[0050] 进一步地,在本发明方法中,在进行抗突触融合蛋白自身抗体等的表达分析的同时,进行作为以往的标记物的CA125或CA19-9的表达分析,在抗突触融合蛋白自身抗体等和CA125等中的任一个超过各自的截断值时判断为子宫内膜异位症阳性,由此则可以以更高的灵敏度检出子宫内膜异位症。

实施例

[0051] 以下举出实施例对本发明进行更具体的说明,但本发明决不受下述实施例所限定,本发明可以在适合上述、后述的宗旨的范围内适当地进行变更而实施是不言而喻的,这些变更都在本发明的技术范围内。

[0052] 实施例1: 子宫内膜异位症标记物的搜索

(1) 血清样品的采取

由51位20~50岁的子宫内膜异位症患者(平均年龄:34.7±7.6(平均值±标准偏差)岁)、18位22~34岁女性健康者(平均年龄:26.4±3.7)、18位17~48岁的患有子宫内膜异位症以外的疾病的患者(平均年龄:32.8±9.3)采取血液。子宫内膜异位症以外的患者的疾病如表1所示。

[0053] [表1]

表 1

疾病	人数	疾病	人数
卵巢囊肿	4	子宫内膜癌	1
子宫平滑肌瘤	6	纵隔子宫 (septate uterus)	1
输卵管阻塞	2	原发性无月经 (特纳综合征)	1
卵巢癌	2	葡萄胎	1

[0054] 将所采取的各血液与促凝血剂一起加入到管中,室温下静置 1~2 小时。接着,取得所分离的血清部分,在 -20℃ 下保存直至用于试验。

[0055] (2) 总蛋白质的取得

得到人恶性胸膜间皮瘤细胞 (理化学研究所、ACC-Meso-1Cells),使用添加有 10% 胎牛血清和 100 μ g/mL 氨苄青霉素的达尔伯克氏改良伊格尔培养基 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (10% 达尔伯克氏改良伊格尔培养基溶液),在 5%CO₂ 中于 37℃ 下培养。将细胞用 10% 达尔伯克氏改良伊格尔培养基传代培养,一周二次。

[0056] 收集如上所述培养的人恶性胸膜间皮瘤细胞,将其与含有 8M 尿素、2% NonidetP-40 (表面活性剂)、2% 2-巯基乙醇和 10mM PMSF (蛋白酶抑制剂) 的 4 质量倍的增溶缓冲液混合,使用超声匀浆器 (ブランソン社制, Sonifier250) 溶解。在 10,000rpm、4℃ 下离心分离 12 分钟后,取得含有蛋白质的上清,在 -80℃ 下保存直至用于试验。

[0057] 在将上述上清回复到室温后,将其中的 10~50 μ g 与由 0.5%IPG 缓冲液和含有 PI3-10 (GE ヘルステアバイオサイエンス社制) 的增溶缓冲液构成的加样缓冲液混合。然后将所制备的样品加载在安装有第一维电泳凝胶 (GE ヘルステアバイオサイエンス社, Immobiline DryStrip, pH 3~10,7cm) 的等电点电泳装置 (GE ヘルステアバイオサイエンス社制, Ettan IPGphor II) 上进行电泳,接着使用作为第二维电泳凝胶的 10% 丙烯酰胺凝胶 (バイオクラフト社制) 进行第二维 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。此外,使用 D/C 蛋白质测定试剂盒 (バイオラッド社制) 另外测定细胞溶解产物中含有的总蛋白质浓度。电泳后,将凝胶中的蛋白质转移到 PVDF 膜 (ミリポア社制)。为了防止非特异性的吸附,使用 5% 脱脂乳和 0.1%Tween20 的 0.1%PBS 溶液,将该膜在室温下封闭 1 小时。

[0058] (3) 子宫内膜异位症标记物的确定

在上述 (1) 中得到的血清样品中,将来源于子宫内膜异位症患者的 3 个样品和来源于健康者的 4 个样品加温至室温,并用 5%BSA 稀释到 1000 倍。用该血清稀释样品和将 0.1%Tween20 以 0.1% 的浓度溶解在 BSA 的 5%PBS 溶液中得到的溶液,将上述 PVDF 膜室温温育 1 小时。将该 PVDF 膜用 Tween20 的 0.1%PBS 溶液洗涤 3 次,之后将膜在 HRP 标记的抗人 IgG (サンタ・クルーズ・バイオテクノロジー社制) 的 5%BSA-PBS 溶液中在室温下温育 1 小时。将膜洗涤 4 次后,使 ECL 溶液 (GE ヘルステアバイオサイエンス社制) 与膜作用,由此使与血清样品中含有的抗体特异性地结合的蛋白质斑点发光,并用化学发光膜 (GE ヘルステアバイオサイエンス社制、HyperFilm ECL) 进行拍摄。此外,将该二维电泳凝胶用考马斯亮蓝 (CBB) 另外地直接染色。

[0059] 为了指定与血液样品中含有的抗体中的子宫内膜异位症患者特异性抗体结合的蛋白质,使用 MALDI TOF-MS 系统 (アプライドバイオシステム社制, Voyager DE-PRO), 实施多肽质量指纹分析法。用刀切除 CBB 染色的二维电泳凝胶的斑点中的子宫内膜异位症患者特异性斑点。将碳酸氢铵溶解在 50% 乙腈中,得到 12.5mM 溶液 (pH 8.0),在该溶液

(400 μ L) 中, 将各斑点在室温下温育 15 分钟后, 吸引除去上清。将上述步骤重复 3 次。然后, 在 100% 乙腈 (400 μ L) 中, 将各斑点在室温下温育 5 分钟后, 吸引除去乙腈。将各斑点用蒸发器 (タイテック社制, VC-36N) 干燥后, 将其添加混合到胰蛋白酶溶解在 25mM 碳酸氢铵溶液中而成的 15 μ g/mL 溶液 (15 ~ 30 μ L, pH 8.0, プロメガ社制) 中, 在 37°C 下温育一夜。接着, 将该斑点凝胶与含有 50% 乙腈和 5% 三氟乙酸的水溶液 (25 ~ 50 μ L) 混合, 轻柔搅拌 60 分钟。再次重复上述提取操作, 合并所得到的溶液, 进行减压浓缩。将得到的残渣溶解在 0.1% 三氟乙酸水溶液 (10 μ L) 中, 通过 ZipTipC18 (ミリポア社制)。重复使用 ZipTip 和 0.1% 三氟乙酸水溶液进行的洗涤 5 次后, 将 ZipTip 内的样品用 30% 乙腈 (2 μ L) 洗脱。接着, 将洗脱液 (0.5 μ L) 加载在 MALDI TOF-MS 系统 (アプライドバイオシステム社制, Voyager DE-PRO) 的样品板上。将同容量的基质溶液、 α -氰基-4-羟基肉桂酸 (シグマ社制) 的 50% 乙腈溶液、5% 三氟乙酸混合后, 将该样品板用蒸发器干燥。使用 MALDI TOF-MS 系统 (アプライドバイオシステム社制, Voyager DE-PRO) 和 Sequezyme 肽质量标准试剂盒 (アプライドバイオシステム社制) 进行 TOF-MS 分析。使用 <http://trypsin.nichd.nih.gov/ucsfhtml3.2/msfit.htm> 的蛋白质检查页 (protein inspector page) 中的 NCBI nr. 2005. 01. 06 数据库, 用 MS-Fit 程序软件程序 ver. 3. 2. 1, 在肽质量误差 150ppm 下分析所得到的 TOF-MS 数据。此时, 考虑到每一个肽中有一个不完全断裂, 对于 pI 范围不设置限制。MALDI TOF-MS 分析对于一个样品进行最少 3 次。所指定的蛋白质如下所示。

[0060] [表 2]

表 2

	等电点	分子量
α -烯醇化酶	5.8	49478
PDIK1L	6.4	38546
突触融合蛋白 5	9.0	34086

[0061] 由以上的结果可知, 与子宫内膜异位症患者的血清样品中特异性地含有的自身抗体结合的蛋白质为 α -烯醇化酶、PDIK1L 和突触融合蛋白 5。

[0062] 实施例 2: 本发明涉及的自身抗体在各血清样品中的相对活性值的测定

(1) 重组蛋白质的制备

由人恶性胸膜间皮瘤细胞 (理化学研究所、ACC-Meso-1Cells) 制备 cDNA, 通过 PCR 反应, 扩增分别编码融合谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 的 α -烯醇化酶、PDIK1L 和突触融合蛋白 5 的基因。将所扩增的基因导入到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中进行转化, 得到 GST 融合 α -烯醇化酶、GST 融合 PDIK1L 和 GST 融合突触融合蛋白 5。

[0063] (2) 通过 ELISA 测定血清样品中各自身抗体的相对活性值

通过使用上述制备的 GST 融合蛋白质实施 ELISA, 测定上述实施例 1(1) 的血清样品中 α -烯醇化酶、PDIK1L 和突触融合蛋白 5 的自身抗体的相对活性值。

[0064] 将各 GST 融合蛋白质用 0.1M 碳酸缓冲液 (pH 9.5) 稀释, 将 100 μ L 该液体以终浓度 1 μ g/mL 加入到 ELISA 板 (コーニング社制、#3369) 的孔中。将该板在 4°C 下温育一夜使各蛋白质固定, 然后用 Tween20 的 0.05% PBS 溶液洗涤 4 次。向各孔中加入 1% BSA-PBS (100 μ L)。

[0065] 测定开始时除去 1% BSA-PBS, 将用 1% BSA-PBS 稀释至 2000 倍的血清样品 (100 μ L) 加入到孔中, 室温下温育 1 小时。然后, 加入 HRP 标记的抗人 IgG (サンタ・クル

ーズ・バイオテック社制, 100 μ L), 在室温下温育 1 小时。洗涤后, 加入在含有 0.01% 的 H_2O_2 的 0.05M 乙酸钠缓冲液 (pH 5.5) 中溶解的 10mg/mL 四甲基联苯胺溶液 (100 μ L), 在室温下温育 30 分钟。接着加入 10% 稀硫酸 (50 μ L) 停止反应。使用多重扫描 ELISA 读数器 (ラボシステムズ社制), 测定 450/620nm 的光密度。对于每一样品重复 3 次测定, 将得到的平均值用于数据分析。

[0066] 另外, 选择标准的血清, 用 1%BSA-PBS 稀释至 2000 倍后, 同样地测定光密度。进一步地, 对于稀释 125 ~ 8000 倍的血清和空白也同样地进行测定。将 2000 倍稀释液中的各自身抗体的活性假定为 1000 单位 /mL, 对于各自身抗体的相对活性值和光密度制作校准曲线。

[0067] 通过光密度的测定值和上述校准曲线求得各血清样品中的抗 α -烯醇化酶自身抗体、抗 PDIK1L 自身抗体和抗突触融合蛋白 5 自身抗体的相对活性值。通过 Welch's t 检验进行统计学分析, 计算 ROC (受者操作特征 (Receiver Operating Characteristic)) 图。抗 α -烯醇化酶自身抗体的结果如图 1 所示, 抗 PDIK1L 自身抗体如图 2 所示, 抗突触融合蛋白 5 自身抗体的结果如图 3 所示。

[0068] 如图 1 所示, 子宫内膜异位症患者血清样品中的抗 α -烯醇化酶自身抗体的相对活性值在 $p=0.0079$ 的显著性水平 (危険率) 下显著高于健康者, 在 $p=0.024$ 的显著性水平下显著高于子宫内膜异位症以外疾病的患者。

[0069] 此外, 如图 2 所示, 子宫内膜异位症患者的血清样品中抗 PDIK1L 自身抗体的相对活性值在 $p=0.00026$ 的显著性水平下显著高于健康者, 在 $p=0.0071$ 的显著性水平下显著高于子宫内膜异位症以外疾病的患者。

[0070] 进一步地, 如图 3 所示, 子宫内膜异位症患者血清样品中的抗突触融合蛋白 5 自身抗体的相对活性值在 $p=0.00070$ 的显著性水平下显著高于健康者, 在 $p=0.014$ 的显著性水平下显著高于子宫内膜异位症以外疾病的患者。

[0071] 对于作为以往的子宫内膜异位症标记物的 CA125, 在爱媛医疗研究所通过放射免疫测定法测定其在血清样品中的相对活性。结果截断值为 35 单位 /mL, 为低水平, 特别地, 在其它疾病的患者、健康者的血清样品中, 表现出超过该截断值的值的情况也相当多, 因此发现假阳性的例子。

[0072] 与此相对地, 在上述实验中, 将各截断值设定为: 在抗 α -烯醇化酶自身抗体的情况下为 400 单位 /mL, 在抗 PDIK1L 自身抗体的情况下为 310 单位 /mL, 在抗突触融合蛋白 5 自身抗体的情况下为 470 单位 /mL。如图 1 ~ 3 所示, 若采用这些截断值, 则去除其它疾病的患者和健康者的血清样品测定值中表现出异常值的几个例子, 且未发现假阳性的例子。

[0073] 如上所述证实, 根据本发明涉及的方法, 可以比以往的方法更准确地判定子宫内膜异位症的有无。

[0074] 实施例 3: CA125 的联合应用

由表 3 所示的 65 位 20 ~ 50 岁的子宫内膜异位症患者、39 位 22 ~ 51 岁女性健康者 (平均年龄: 35.0 ± 3.7)、31 位 17 ~ 50 岁的患有子宫内膜异位症以外疾病的患者 (平均年龄: 33.9 ± 9.3) 采取血液, 与上述实施例 1(1) 同样地得到血清样品。子宫内膜异位症以外的患者的疾病如表 4 所示。

[0075] [表 3]

表 3

病期	人数	年龄 (均值 ± 标准偏差, 范围)	子宫内膜异位症性囊肿的有无	痛经的有无
I	13	34.8 ± 8.0, 22-50	0/13	9/13
II	11	35.2 ± 9.0, 22-48	2/11	8/11
III	18	36.6 ± 7.8, 23-49	13/18	13/18
IV	23	33.9 ± 7.2, 20-50	21/23	19/23
总计	65	35.0 ± 7.9, 20-50	36/65	49/65

[0076] [表 4]

表 4

疾病	人数	疾病	人数
卵巢囊肿	9	子宫颈癌	2
子宫平滑肌瘤	7	子宫内膜增生	1
输卵管阻塞	3	纵隔子宫	1
不孕症	2	原发性无月经 (特纳综合征)	1
卵巢癌	2	葡萄胎	1
子宫内膜癌	2		

[0077] 与上述实施例 2(2) 同样地, 测定血清样品中含有的 α - 烯醇化酶自身抗体和 CA125 的相对活性 (U/mL), 通过 Welch' s t 检验进行统计学分析。其结果和下述实施例 4 的结果在表 7 中共同示出。

[0078] 此外, 与上述实施例 2(2) 同样地, 在以抗 α - 烯醇化酶自身抗体作为子宫内膜异位症标记物时, 将血清样品中的截断值设定为 400U/mL, 在以 CA125 作为子宫内膜异位症标记物时, 将该截断值设定为 35U/mL, 对于抗 α - 烯醇化酶自身抗体超过截断值的情况以及 α - 烯醇化酶的自身抗体和 CA125 的任何一个超过各自截断值的情况, 算出灵敏度: (真阳性者数目 / 子宫内膜异位症患者数目) \times 100、特异性: [(真阴性者数目) / (总受检者数目 - 子宫内膜异位症患者数目)] \times 100、正确诊断率: [(真阳性者 + 真阴性者数目) / 总受检者数目] \times 100。在上式中, “真阳性” 为子宫内膜异位症患者表现出阳性的情况, “真阴性” 为健康者和患有子宫内膜异位症以外疾病的患者表现出阴性的情况。其结果和下述实施例 4 的结果在表 8 中共同示出。

[0079] 实施例 4: CA125 的联合应用

由表 5 所示的 69 位 20 ~ 51 岁的子宫内膜异位症患者、44 位 22 ~ 51 岁女性健康者 (平均年龄: 34.2 ± 9.3)、38 位 18 ~ 48 岁的患有子宫内膜异位症以外疾病的患者 (平均年龄: 34.4 ± 8.2) 采取血液, 与上述实施例 1(1) 同样地得到血清样品。子宫内膜异位症以外的患者的疾病如表 6 所示。

[0080] [表 5]

表 5

病期	人数	年龄 (均值 ± 标准偏差, 范围)	子宫内膜异位症性囊肿的有无	痛经的有无
I	11	37.1 ± 8.7, 23-50	0/11	8/11
II	10	36.1 ± 10.2, 22-49	3/10	6/10
III	20	34.1 ± 7.2, 22-48	16/20	14/20
IV	28	34.9 ± 7.2, 20-51	27/28	22/28
合计	69	35.2 ± 8.0, 20-51	46/49	50/69

[0081] [表 6]

表 6

疾病	人数	疾病	人数
卵巢囊肿	9	输卵管阻塞	2
子宫平滑肌瘤	8	子宫颈癌	2
卵巢癌	4	纵隔子宫	1
子宫内膜癌	4	原发性无月经(特纳综合征)	1
不孕症	3	葡萄胎	1
子宫腺肌症(腺筋症)	3		

[0082] 与上述实施例 2(2) 同样地,测定血清样品中含有的 PDIK1L 和突触融合蛋白 5 的自身抗体以及 CA125 的相对活性 (U/mL),通过 Welch's t 检验进行统计学分析。结果如表 7 所示。在 CA125 的项目中,上部分表示实施例 3 中的结果,下部分表示实施例 4 中的结果。

[0083] [表 7]

表 7

	其它疾病的患者	健康者	子宫内膜异位症患者	显著性水平	
				健康者比子宫内膜异位症患者	其它疾病的患者比子宫内膜异位症患者
α -糖醇化酶	235.5±197	220.9±113.8	348.6±225.1	p=0.00035**	p=0.0022*
PDIK1L	203.4±129.5	155.8±95.2	370.2±212.5	p=8.4×10 ^{-11**}	p=2.4×10 ^{-5**}
突触融合蛋白5	287.9±161.8	221.5±107.2	505.4±361.0	p=2.0×10 ^{-1**}	p=9.0×10 ^{-6**}
CA125	385±542	215±51	430±443	p=0.00028**	p=0.693 ^{ns}
	281.9±1494.1	20.9±10.5	54.4±145.7	p=0.053**	p=0.36 ^{ns}

** 在显著性水平 $p < 0.001$ 下,存在显著差异的情况

* 在显著性水平 $p < 0.01$ 下,存在显著差异的情况

ns:无显著差异的情况。

[0084] 由上述结果所示,在以以往的 CA125 作为标记物时,不能显著检出子宫内膜异位症,特别是相对于患有子宫内膜异位症以外疾病的患者。与此相对地,在以本发明涉及的标记物作为指标时,证实了可以在低显著性水平下显著地检出子宫内膜异位症,这不仅相对于健康者、而且相对于子宫内膜异位症以外的患者。

[0085] 此外,与上述实施例 2(2) 同样地,在以抗 PDIK1L 自身抗体作为子宫内膜异位症标记物时,将血清样品中的截断值设定为 310U/mL,在以抗突触融合蛋白 5 自身抗体作为子宫内膜异位症标记物时,将该截断值设定为 470U/mL,在以 CA125 作为子宫内膜异位症标记物时,将该截断值设定为 35U/mL,对于抗 PDIK1L 自身抗体超过截断值的情况、抗突触融合蛋白 5 自身抗体超过截断值的情况、抗 PDIK1L 自身抗体和 CA125 的任一个超过各自截断值的情况以及抗突触融合蛋白 5 自身抗体和 CA125 的任一个超过各自截断值的情况,算出灵敏度、选择性和准确性。结果如表 8 所示。

[0086] [表 8]

表 8

	灵敏度	特异性	正确诊断率	
α -糖醇化酶	36.9%	91.4%	65.2%	
PDIK1L	58.4%	84.1%	70.2%	
突触融合蛋白5	58.0%	80.5%	70.2%	
CA125 +	α -糖醇化酶	80.0%	81.4%	71.1%
	PDIK1L	73.8%	72.0%	69.5%
	突触融合蛋白5	72.5%	67.1%	69.5%

[0087] 由上述结果示出,与仅以本发明的标记物作为指标的情况相比,在以本发明涉及的标记物和以往的 CA125 的任一个作为指标的情况下,存在选择性降低的趋势、准确性大致等同、但灵敏度显著升高。由上述结果可知,在有必要尽可能无遗漏地检出初期子宫内膜异位症时,如果除了本发明标记物外还联合应用 CA125,则可以灵敏度更高地检出子宫内膜异位症。

[0088] 工业实用性

根据本发明,与以往的子宫内膜异位症标记物相比,可以高灵敏度且高精度地判定子宫内膜异位症的有无。此外,在本发明中,没有必要取得子宫组织样品,可以用血液样品进行判定,因此对受检者造成的痛苦也少。由此,本发明可以简便且准确地判定近年来患者数目增加的子宫内膜异位症的有无,这是非常有用的。

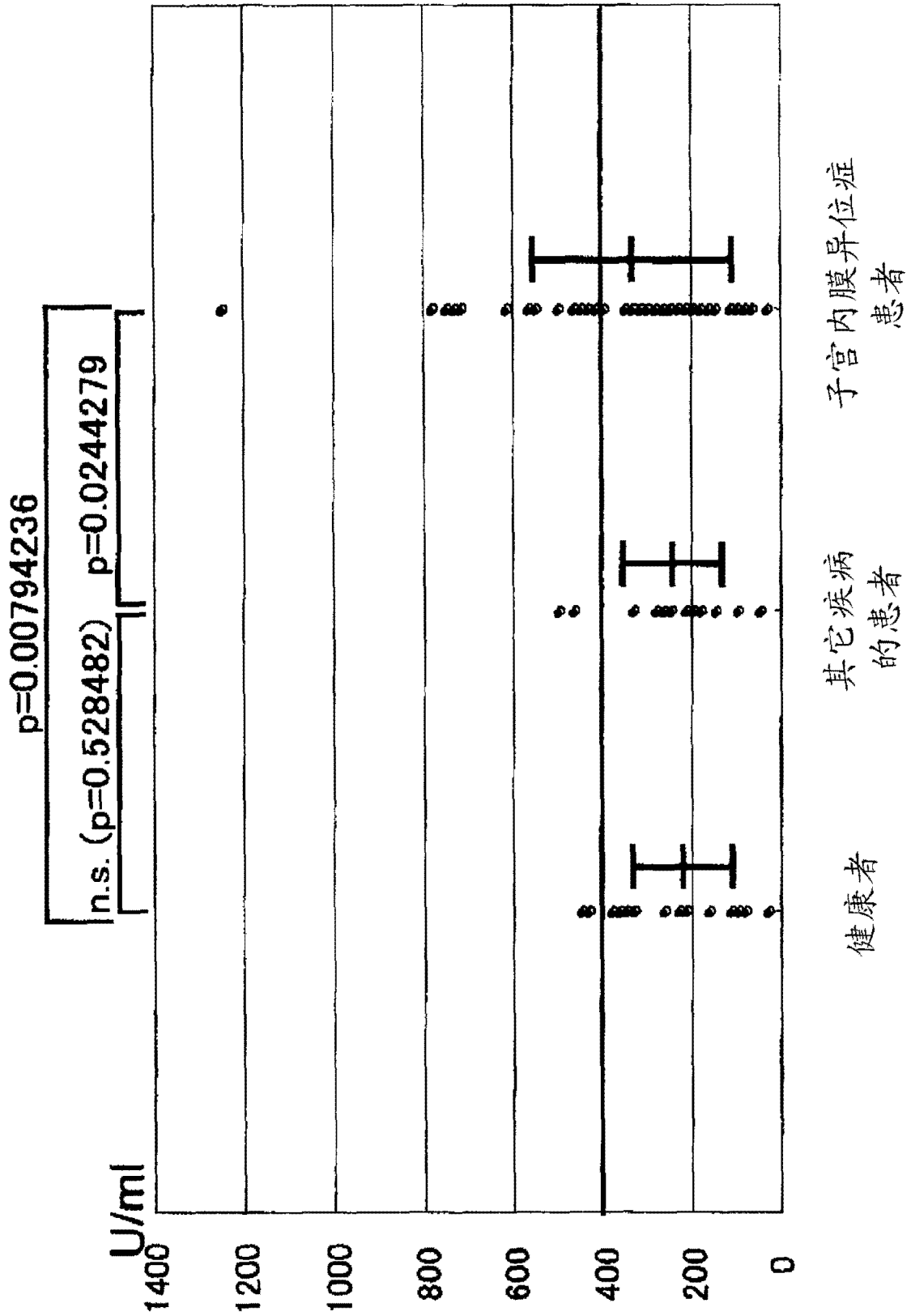


图 1

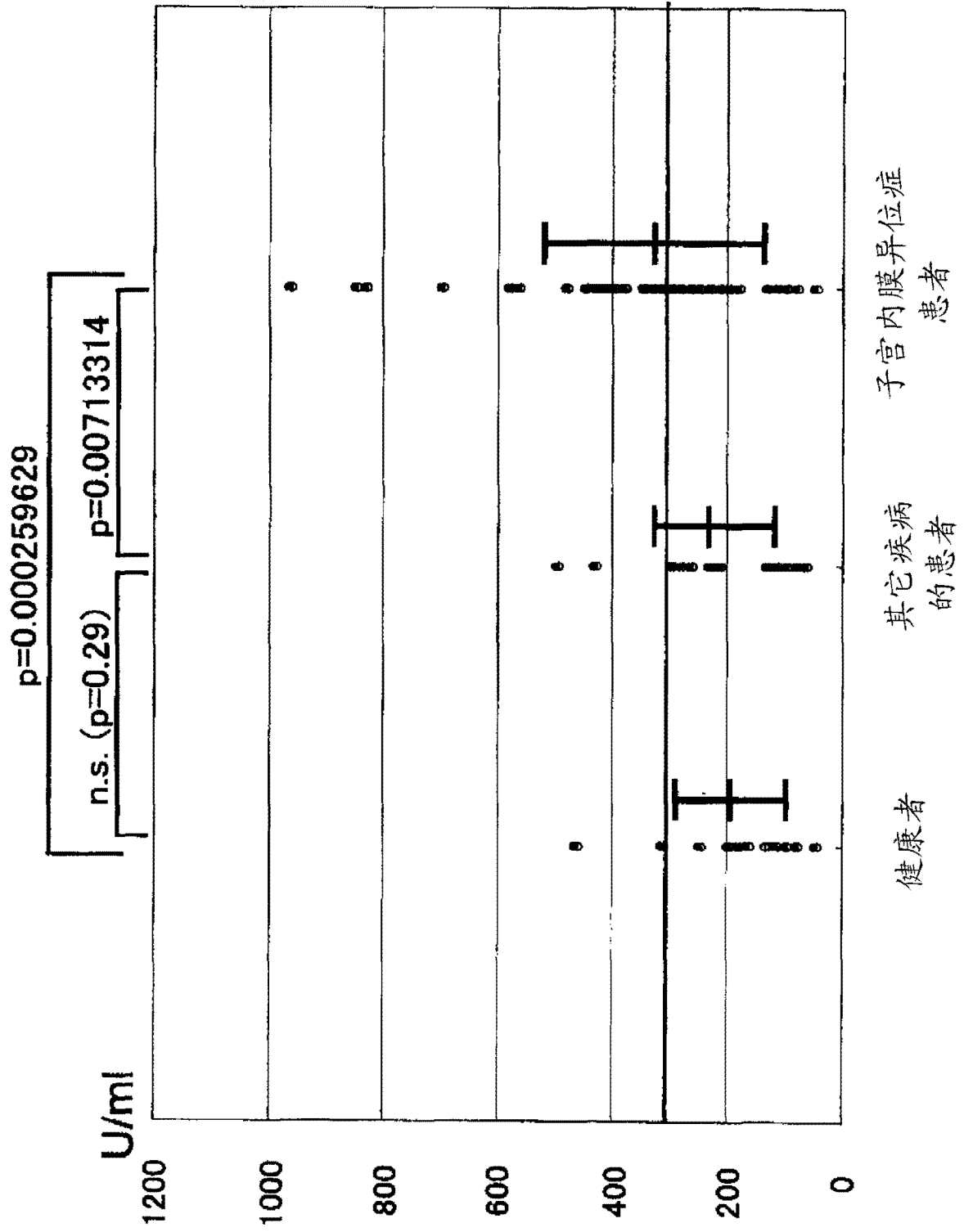


图 2

专利名称(译)	子宫内膜异位症的判定方法以及子宫内膜异位症的诊断用试剂盒		
公开(公告)号	CN102341704A	公开(公告)日	2012-02-01
申请号	CN201080010289.5	申请日	2010-02-23
申请(专利权)人(译)	持田制药株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	持田制药株式会社		
[标]发明人	阿部康人 锅田基生 伊藤昌春		
发明人	阿部康人 锅田基生 伊藤昌春		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2800/364 G01N33/57488		
代理人(译)	郭文洁		
优先权	2009054082 2009-03-06 JP 2009223493 2009-09-28 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的目的在于，提供可以使用受检者的血液样品、并且与仅使用以往作为子宫内膜异位症标记物的CA125等的以往方法相比可以高灵敏度且高精度地判定子宫内膜异位症的判定方法，和用于实施该本发明方法的诊断用试剂盒。本发明涉及的子宫内膜异位症的判定方法的特征在于含有：进行选自血液样品中抗突触融合蛋白自身抗体、抗PDIK1L自身抗体和抗烯醇化酶自身抗体中至少1种的表达分析的步骤，和通过上述表达分析结果判定子宫内膜异位症发病的有无的步骤。

