

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6628178号
(P6628178)

(45) 発行日 令和2年1月8日(2020.1.8)

(24) 登録日 令和1年12月13日(2019.12.13)

(51) Int.Cl.		F I		
C 1 2 Q	1/6804	(2018.01)	C 1 2 Q	1/6804 Z N A Z
G O 1 N	33/50	(2006.01)	G O 1 N	33/50 Z
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N	33/53 M
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/09 2 0 0

請求項の数 6 (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願2015-181355 (P2015-181355)
 (22) 出願日 平成27年9月15日 (2015. 9. 15)
 (65) 公開番号 特開2017-55684 (P2017-55684A)
 (43) 公開日 平成29年3月23日 (2017. 3. 23)
 審査請求日 平成30年9月11日 (2018. 9. 11)

(73) 特許権者 504145364
 国立大学法人群馬大学
 群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地
 (74) 代理人 100100549
 弁理士 川口 嘉之
 (74) 代理人 100126505
 弁理士 佐貫 伸一
 (72) 発明者 滝沢 琢己
 群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地 国立大
 学法人群馬大学内
 (72) 発明者 荒川 浩一
 群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地 国立大
 学法人群馬大学内

審査官 中野 あい

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 I g E 非依存性アレルギー疾患検査方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

I g E 非依存性消化管アレルギー疾患の検査の指標とするために、該アレルギー疾患におけるミルク抗原刺激によりその発現量が変動する IL-1、INH A、CXCL5、CXCL1、IL-6、CD69、CD134、CD25 及び CCL3 からなる群より選ばれる 1 種又は 2 種以上のマーカー遺伝子の発現量を測定する方法であって、被検者から得られた血液、血漿、血清又は末梢血単核球である試料にミルク抗原を添加して培養し、当該培養試料中の細胞が発現するマーカー遺伝子の発現量を測定する工程を含む、方法。

【請求項 2】

前記培養の時間が、18 ~ 72 時間である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記測定が、マイクロアレイ、リアルタイムPCR、ELISA法、ウエスタンブロット法、FACS 解析法、分光光度法、蛍光光度法、質量分析法、及びクロマトグラフィーからなる群より選ばれる 1 種又は 2 種以上により行われる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

I g E 非依存性消化管アレルギー疾患治療薬のスクリーニング方法であって、I g E 非依存性消化管アレルギー疾患に罹患している被検者から得られた血液、血漿、血清又は末梢血単核球である試料に、候補治療薬およびミルク抗原、またはミルク抗原のみを添加して培養して、当該培養試料中の細胞が発現するマーカー遺伝子の発現量を測定し、候補治療薬およびミルク抗原を添加した培養試料中のマーカー遺伝子の発現量と、ミルク抗原の

み添加した培養試料中のマーカー遺伝子の発現量とを比較する工程を含む、方法であって、該マーカー遺伝子は、該アレルギー疾患におけるミルク抗原刺激によりその発現量が変動する遺伝子であって、IL-1、INH A、CXCL5、CXCL1、IL-6、CD69、CD134、CD25及びCCL3からなる群より選ばれる1種又は2種以上の遺伝子である、方法。

【請求項5】

I g E非依存性消化管アレルギー疾患治療薬のスクリーニング方法であって、候補治療薬を投与されたI g E非依存性消化管アレルギー疾患に罹患している被検者から得られた血液、血漿、血清又は末梢血単核球である試料にミルク抗原を添加して培養し、当該培養試料中の細胞が発現するマーカー遺伝子の発現量を測定し、候補治療薬投与前のマーカー遺伝子の発現量と、候補治療薬投与後のマーカー遺伝子の発現量とを比較する工程を含む、方法であって、該マーカー遺伝子は、該アレルギー疾患におけるミルク抗原刺激によりその発現量が変動する遺伝子であって、IL-1、INH A、CXCL5、CXCL1、IL-6、CD69、CD134、CD25及びCCL3からなる群より選ばれる1種又は2種以上の遺伝子である、方法。

10

【請求項6】

IL-1、INH A、CXCL5、CXCL1、IL-6、CD69、CD134、CD25及びCCL3からなる群より選ばれる1種又は2種以上のマーカー遺伝子の発現量を測定し得る試薬、並びにミルク抗原を含む、I g E非依存性消化管アレルギー疾患検査用またはI g E非依存性消化管アレルギー疾患治療薬スクリーニング用のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、I g E非依存性アレルギー疾患の検査方法および当該検査に使用する検査用キットに関する。また、本発明は、I g E非依存性アレルギー疾患治療薬のスクリーニング方法および当該スクリーニング用のキットに関する。

【背景技術】

【0002】

アレルギー疾患の原因となるアレルゲンとしては、花粉、ハウスダスト、ダニ、食物等の様々なものが挙げられる。その中には、死に至るほど重篤となるものや、患者のQuality of lifeを著しく低下させるものがあるため、アレルゲンに対する免疫反応を測定することの意義は大きく、それがアレルギー疾患の予防及び治療の第一歩となる。アレルゲンに対する免疫反応を測定する方法としては、アレルゲンと思われる物質を直接皮膚に貼るパッチテスト等が汎用されているが、パッチテストは被検者においてアレルギー反応を実際に再現するものであり、アナフィラキシーショックを誘発する危険性や、新たなアレルギー反応を誘発する危険性があるため、被検者の負担は大きい。他には、アレルゲンに反応する血液中のI g E抗体量を検査する方法が、簡便で一度に複数種類のアレルゲンに対する免疫反応を測定できることから、汎用されている。しかし、この方法では、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシー等のI g E抗体が関与するアレルギーを検査することはできるものの、消化管アレルギーや薬剤アレルギー等のI g E非依存性アレルギー疾患を検査することはできない。

30

【0003】

また、特定の疾患マーカーを測定することによりアレルギー性疾患を診断する方法も知られている(特許文献1, 2)。しかし、それらの方法は、主にIgEが関与すると言われている喘息及びアレルギー性鼻炎を診断対象として含んでおり、I g E非依存性アレルギー疾患を特異的に検出することを意図したものではない。アナフィラキシー等を起こし得るI g E依存性アレルギーは、アレルゲンとの接触から数時間でアレルギー反応が出現するため、比較的アレルゲンを特定しやすいが、I g E非依存性アレルギーは、アレルゲンとの接触から半日から数日経過後にアレルギー症状が出現するため、その頃には自分がかかっているアレルゲンと接触していたのかを思い出すことが出来ない等、アレルゲンの特定が困難となることが多い。さらに、I g E非依存性アレルギーは、下痢、嘔吐、腹部膨満などの症状を示すことが多いが、症状は非特異的であり、もともとそのような症状を有す

40

50

る傾向がある患者であれば、単なる体調不良であると思ひ込み、アレルギーであるとは気付かないこともある。そのため、そのような疾患を検査できる方法が望まれていた。

【0004】

これまで、I g E 非依存性アレルギー疾患の検査方法としては、アレルギー特異的リンパ球刺激試験 (ALST)、薬剤誘発リンパ球刺激試験 (DLST) が知られている (非特許文献 1)。これらの試験は、被検者末梢血単核球 (PBMC) を分離採取した後、アレルギーと共に約 6 日間培養し、培養終了前日に放射性アイソトープであるトリチウム・サイミジンを添加して増殖した細胞をラベリングして、当該アイソトープを測定することにより細胞増殖を評価するものである。

【0005】

しかし、ASLTおよびDLSTには、いくつかの問題点がある。それら検査方法は、培養に約 1 週間を要するため、迅速な判断が得られない。また、それら検査には、たいてい 5 ml 以上の新鮮な血液が必要であり、特に小児では、この採血量が大きな負担となる。さらに、それらの検査方法では、被検者試料からの PBMC の分離採取およびアイソトープ測定をすることが必要なため、遠心分離機やアイソトープ施設等の適切な機器や施設を備えていなければ行うことができない。そして、検査結果が得られたとしても、当該検査結果はアレルギー刺激により誘導された細胞増殖の総量を検出したものであるため、増殖した細胞はどのような種類の細胞であったのかを知ることはできず、よってアレルギー刺激により特異的に誘導された結果であるのかは厳密には不明である。以上のように、現在知られている I g E 非依存性アレルギー疾患の検査方法には、迅速性、侵襲性、設備面、特異性等において、改善すべき問題点があった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献 1】特開 2006 - 174740 号公報

【特許文献 2】特開 2014 - 076009 号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献 1】鈴木 完ら、日本小児外科学会雑誌、Vol. 50 (2014) No. 7、p.1092-1098

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、I g E 非依存性アレルギー疾患の検査方法および当該検査に使用する検査用キットを提供することを課題とする。また、本発明は、I g E 非依存性アレルギー疾患治療薬のスクリーニング方法および当該スクリーニング用のキットを提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた。その結果、被検者から得られた試料にアレルギーを添加して培養し、当該培養試料中の細胞が発現するマーカー遺伝子の発現量を測定することにより、I g E 非依存性アレルギー疾患の検査が可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0010】

すなわち、本発明は以下の通りである。

[1] I g E 非依存性アレルギー疾患の検査の指標とするために、該アレルギー疾患におけるアレルギー刺激によりその発現量が変動するマーカー遺伝子の発現量を測定する方法であって、被検者から得られた試料にアレルギーを添加して培養し、当該培養試料中の細胞が発現するマーカー遺伝子の発現量を測定する工程を含む、方法。

[2] 前記培養の時間が、18 ~ 72 時間である、[1] に記載の方法。

10

20

30

40

50

[3]前記 I g E 非依存性アレルギー疾患が、食物アレルギーまたは薬剤アレルギーである、[1]または[2]に記載の方法。

[4]前記食物アレルギーが、消化管アレルギーである、[3]に記載の方法。

[5]前記試料が、血液である、[1]~[4]のいずれか 1 に記載の方法。

[6]前記アレルゲンが、牛乳、母乳、大豆、米または麦である、[1]~[5]のいずれか 1 に記載の方法。

[7]前記測定が、マイクロアレイ、リアルタイムPCR、ELISA法、ウエスタンブロット法、F A C S 解析法、分光光度法、蛍光光度法、質量分析法、及びクロマトグラフィーからなる群より選ばれる 1 種又は 2 種以上により行われる、[1]~[6]のいずれか 1 に記載の方法。

10

[8]マーカー遺伝子が、IL-1 、INH A、IER3、IL-1 F9、CXCL5、CXCL1、IL-6、TGF 1、CD69、CD134、LRRC32、CD25及びCCL3からなる群より選ばれる 1 種又は 2 種以上である、[1]~[7]のいずれか 1 に記載の方法。

[9]I g E 非依存性アレルギー疾患治療薬のスクリーニング方法であって、I g E 非依存性アレルギー疾患に罹患している被検者から得られた試料に、候補治療薬およびアレルゲン、またはアレルゲンのみを添加して培養して、当該培養試料中の細胞が発現するマーカー遺伝子の発現量を測定し、候補治療薬およびアレルゲンを添加した培養試料中のマーカー遺伝子の発現量と、アレルゲンのみ添加した培養試料中のマーカー遺伝子の発現量とを比較する工程を含む、方法であって、該マーカー遺伝子は、該アレルギー疾患におけるアレルゲン刺激によりその発現量が変動するものである、方法。

20

[1 0]I g E 非依存性アレルギー疾患治療薬のスクリーニング方法であって、候補治療薬を投与された I g E 非依存性アレルギー疾患に罹患している被検者から得られた試料にアレルゲンを添加して培養し、当該培養試料中の細胞が発現するマーカー遺伝子の発現量を測定し、候補治療薬投与前のマーカー遺伝子の発現量と、候補治療薬投与後のマーカー遺伝子の発現量とを比較する工程を含む、方法であって、該マーカー遺伝子は、該アレルギー疾患におけるアレルゲン刺激によりその発現量が変動するものである、方法。

[1 1]IL-1 、INH A、IER3、IL-1 F9、CXCL5、CXCL1、IL-6、TGF 1、CD69、CD134、LRRC32、CD25及びCCL3からなる群より選ばれる 1 種又は 2 種以上のマーカー遺伝子の発現量を測定し得る試薬、並びにアレルゲンを含む、I g E 非依存性アレルギー疾患検査用または I g E 非依存性アレルギー疾患治療薬スクリーニング用のキット。

30

【発明の効果】

【 0 0 1 1 】

本発明の方法により、I g E 非依存性アレルギー疾患の検査が可能となる。本発明の方法における好ましい態様では、これまで I g E 非依存性アレルギー疾患の検査方法として用いられてきたALST等の方法と比べて、培養が短時間で済み、PBMCを分離する必要もなく、短時間で簡便に結果を得ることができる。また、アイソトープ等の施設も必要なく、採血量も比較的少量で済む。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 2 】

【図 1】消化管アレルギー患者から採取した血液を、抗原刺激あり又はなしで培養をした後に、total RNAを抽出し、発現アレイ解析を行った結果を示す図。

40

【図 2】消化管アレルギー患者における抗原刺激の有無による倍率変化を定量PCRおよびマルチプレックスにて測定し、両者の測定結果の相関性を検討した結果を示す図。縦軸は定量PCRにより得られたmRNAの倍率変化を示し、横軸はマルチプレックスにより得られたサイトカインの倍率変化を示す。上段左はIL-1 、上段右はINH A、中段左はIER3、中段右はIL-1 F9、下段左はCD134、下段右はLRRC32の結果を示す。

【図 3】消化管アレルギー患者における抗原刺激の有無による倍率変化を定量PCRおよびマルチプレックスにて測定し、両者の測定結果の相関性を検討した結果を示す図。縦軸は定量PCRにより得られたmRNAの倍率変化を示し、横軸はマルチプレックスにより得られたサイトカインの倍率変化を示す。上段左はCD25、上段右はCD69、中段左はTGF 1、中段右

50

はIL-6、下段左はCXCL1、下段右はCCL3の結果を示す。

【図4】健常者と患者における抗原刺激によるサイトカイン値の変動を示す図。縦軸は、抗原刺激なしの群におけるサイトカイン値に対する、抗原刺激ありの群におけるサイトカイン値の比を表す。上段左はCD134、上段右はLRRC32、中段左はCD25、中段右はCD69、下段はTGF β 1の結果を示す。

【図5】健常者と患者における抗原刺激によるサイトカイン値の変動を示す図。縦軸は、抗原刺激なしの群におけるサイトカイン値に対する、抗原刺激ありの群におけるサイトカイン値の比を表す。左上はIL-1 β 、右上はINH A、左下はIER3、右下はIL-1 F9の結果を示す。

【図6】健常者と患者における、抗原刺激後のサイトカイン濃度を示す図。縦軸はサイトカイン濃度を示す。上段左はCXCL5、上段右はCXCL1、中段左はIL-1 β 、中段右はIL-6、下段左はCCL3の結果を示す。

【図7】各マーカーのROC曲線を示す。上段左はIL-1 β 、上段右はINH A、中段左はIER3、中段右はIL-1 F9、下段はTGF β 1。

【図8】各マーカーのROC曲線を示す。上段左はCXCL5、上段右はCXCL1、中段左はIL-1 β 、中段右はIL-6、下段左はCCL3。

【図9】各マーカーのROC曲線を示す。上段左はCD134、上段右はLRRC32、下段左はCD25、下段右はCD69。

【図10】本発明の方法により得られたサイトカイン濃度と、ALST法により得られた結果との相関を示す図。縦軸がサイトカイン濃度を、横軸がALST法の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

以下、本発明の実施の形態を詳細に説明するが、以下にて述べる態様は、全ていかようにも組合せ可能である。

【0014】

(1) I g E非依存性アレルギー疾患の検査方法

本発明は、I g E非依存性アレルギー疾患の検査の指標とするために、当該アレルギー疾患におけるアレルゲン刺激によりその発現量が変動するマーカー遺伝子の発現量を測定する方法であって、被検者から得られた試料にアレルゲンを添加して培養し、当該培養試料中の細胞が発現するマーカー遺伝子の発現量を測定する工程を含む方法に関する。

【0015】

本発明における「I g E非依存性アレルギー疾患」には、アレルギー反応がI g E以外のものにより媒介されるアレルギー疾患全てが含まれる。たとえば、アレルギー分類のI型以外、すなわちII型、III型、IV型、およびV型に分類されるアレルギー疾患が含まれ、I g E依存性アレルギーとの併発であっても含まれ得る。中でも、細胞性免疫が関与する疾患、たとえば食物アレルギー、薬剤アレルギーまたは金属アレルギーが好ましく例示されるが、これに限定されない。また、I g Eがアレルギー反応に関与するとしても、細胞性免疫の関与も合わせて認められる混合型であれば、本発明の範囲に包含される。

【0016】

食物アレルギーには、食物によって引き起される抗原特異的な免疫学的機序を介して生体にとって不利益な症状が惹起される現象全てが含まれる。食物を経口摂取した場合だけでなく、食物の皮膚接触や吸入等で摂取した場合も含まれ、症状惹起の経路に制限はない。また、食物アレルギーには、新生児・乳児期に好発する消化管アレルギーが含まれる。消化管アレルギーは育児用ミルクまたは母乳の摂取を開始した後に発症するため、育児用ミルクに使われている牛乳や母乳に対するアレルギーと考えられているが、米、大豆(豆乳)および小麦等に対しても反応を起こすことがある。消化管アレルギーには、I g E非依存型であるFood Protein-Induced Enterocolitis Syndrome (FPIES)、Food Protein-Induced Proctocolitis Syndrome (Proctocolitis)、Food Protein-Induced Enteropathy Syndrome (Enteropathy)、およびCeliac Diseaseと、I g Eと細胞性免疫の混合型と考えられているEosinophilic Esophagitis (EoE)およびEosinophilic Gastroenteritis (EG

10

20

30

40

50

E)が含まれる。

【0017】

本発明において、「被検者」は、I g E非依存性アレルギー疾患が疑われる動物であれば如何なるものでもよく、具体的には、ヒト、サルその他、マウスやラット等のげっ歯類等、イヌ、ネコ、ブタ、フェレット等が挙げられる。本発明の検査方法は、このうち、I g E非依存性アレルギー疾患の疑いのあるヒト、あるいはI g E非依存性アレルギー疾患発症後、I g E非依存性アレルギー疾患治療中又は治療後等のヒトにおいて特に好ましく行われる。また、アレルギー疾患には、I g E抗体と細胞性免疫の両方が関与する混合型も存在することから、I g E抗体の上昇が検出された被検者においても、本発明の方法により検査する意義は十分にある。被検者の年齢に特に制限はないが、消化管アレルギーが疑われる場合には、好ましくは生後一日目～7才、より好ましくは生後一日目～4才、さらに好ましくは生後一日目～3才に本発明の方法を適用できる。

10

【0018】

本発明における「試料」としては、アレルゲンとの培養により、マーカー遺伝子のmRNAまたはタンパク質の発現が測定できる程度に細胞が含まれているものであれば特に制限はない。具体的には、血液、血漿、血清、尿、唾液等が挙げられる。これらのうち、血液、血漿、血清が、簡便に採取でき、保存が容易で且つ採取量が多いため、好ましく用いられる。上記血液等は、採取後すぐにヘパリン処置をすることが好ましい。

【0019】

本発明の方法において、試料が血液である場合、血液から末梢血単核球(PBMC)を分離する工程を含めてもよい。PBMCの分離方法は、密度勾配遠心分離等の公知の方法を使用可能である。しかし、本発明の方法によれば、そのような特段の処理をせずとも、I g E非依存性アレルギー疾患の検査の十分な指標を得ることが可能である。そして、PBMCを分離しない場合には、採血量が比較的少量で済むというメリットがある。

20

【0020】

本発明における「アレルゲン」としては、I g E非依存性アレルギーを起こし得るアレルゲンであれば使用可能であるが、特に、牛乳、母乳、育児用ミルク、米、大豆(豆乳)、小麦、野菜、果物、魚、肉等の食物の成分や、種々の薬剤およびその代謝物、またはニッケル、コバルト、クロム等の金属またはそれら金属イオンとタンパク質との結合体が好ましく例示される。

30

【0021】

試料採取後、アレルゲンは可能な限り早く試料に添加し、培養することが好ましい。培養に用いられ得る培地には、RPMI1640、Ham's F12、DMEM、MEM等が例示されるが、これに限定されない。培養時間は、18～72時間が例示されるが、迅速に検査を行いたい場合には18～48時間の培養でも検査は可能であり、さらに18～24時間でも可能である。培養温度は、25～45が好ましく、30～40がより好ましく、37がさらに好ましい。

【0022】

培養後は、すぐに試料中の細胞からmRNAまたはタンパク質を抽出してもよいが、忙しい時あるいは、遠隔地で測定する場合は、冷蔵保存または凍結保存を行い、都合がつくときに抽出操作を行い、マーカー遺伝子の発現量を測定してもよい。これにより、多忙な病院業務においても、スケジュールに合わせて検査を行うことができたため、利便性が高い。血液試料の保存方法としては、マーカー遺伝子の発現量が変化しない条件であれば特に制限は無いが、例えばmRNAの場合は、RNA抽出用の試薬を添加して-80又は液体窒素下で凍結保存するか、RNA安定化試薬を添加して室温保存することが好ましい。タンパク質の場合は、-30以下での冷凍、0～10の凍結しない程度の低温条件、暗所条件および無振動条件下で保存することが好ましい。

40

【0023】

試料にアレルゲンを添加し培養後、当該培養試料中の細胞が発現するマーカー遺伝子の発現量を測定するには、試料中の有核細胞から抽出したmRNA若しくはタンパク質、または

50

培養液中に分泌されたタンパク質の量を測定することで行うことができる。その測定方法としては、mRNA又はタンパク質の量が測定できる方法であれば特に制限はないが、例えば、mRNAの測定としては、PCR法、マイクロアレイ法、ノーザンブロット法、分光光度法、蛍光光度法等が挙げられる。特に、PCR法によるリアルタイムPCRは、測定の簡便さと迅速さの点で好ましい。PCRに使用するプライマーは、マーカー遺伝子配列に基づき公知の方法で設計することができる。

【0024】

タンパク質の測定方法としては、FACS解析法、質量分析法、クロマトグラフィーの他、該タンパク質に対する抗体を用いた既存の免疫測定法や、クロマトグラフィー技術と飛行時間型質量分析(TOF-MS)を組み合わせて、クロマト担体(例:カチオン交換体、アニオン交換体、疎水性クロマト担体、金属イオンなど)に一定条件下で捕捉されるすべての成分の質量を一括して測定する方法、二次元ゲル電気泳動法等が用いられる。免疫測定法としては、ウエスタンブロット法、酵素免疫定量法に従い定量検出する方法、蛍光免疫測定法、化学発光免疫測定法等で測定する方法等が好ましく、具体的には、enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)法やマルチプレックスサスペンションアレイ法等が知られている。

【0025】

上記測定を行う際に用いられる抗体等(抗体断片を含む)は、対象のマーカー遺伝子にコードされるタンパク質を抗原として、公知の方法によって得ることができる。ただし、対象のマーカー遺伝子にコードされるタンパク質を抗原として製造されたものである必要はなく、該タンパク質と少なくとも交差反応性を示し、その含有量を測定することができるものであれば何れのものでよい。

【0026】

本発明において測定されるマーカー遺伝子としては、たとえば、下記表2において示される遺伝子が挙げられ、具体的には、インターロイキン1(IL-1)、インヒピンA(INH A)、immediate early response 3(IER3)、インターロイキン1F9(IL-1F9)、ケモカイン(CXCモチーフ)リガンド5(CXCL5)、ケモカイン(CXCモチーフ)リガンド1(CXCL1)、インターロイキン6(IL-6)、transforming growth factor 1(TGF1)、CD69、CD134(TNFRSF4)、LRR32、CD25(IL2R)及びケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド3(CCL3)からなる群より選ばれる1種又は2種以上が例示される。さらに、それらマーカー遺伝子と同様の機能を有する断片、誘導体、前駆体および変異体も含まれる。たとえば、IL-1は前駆体タンパク質として産生され、その後プロセッシングにより構造の一部が切断されることにより成熟体となることが知られているところ、本発明においてIL-1の発現量を測定するには、前駆体タンパク質を測定してもよいし、プロセッシングを受けた後の成熟体を測定してもよい。しかし、本発明におけるマーカー遺伝子としては、上述のものに限定されるものではなく、IgE非依存性アレルギー疾患において、アレルギー刺激によりその発現量が変動することが知られている遺伝子であれば、いずれのものでよい。それらの遺伝子を複数組み合わせることは、検査の精度が高くなり好ましい。

【0027】

本発明の方法においては、被検者から得られた試料中のマーカー遺伝子の発現量を測定して、これを指標として、IgE非依存性アレルギー疾患を検査することができる。被検者から得られた試料中のマーカー遺伝子の発現量と、健常者から得られた試料中のマーカー遺伝子の発現量とを比較し、被検者における発現量が有意に高い又は有意に低い場合には、被検者はIgE非依存性アレルギー疾患である可能性があることを示す。健常者から得られた試料中のマーカー遺伝子の発現量は、被検者試料と同時に測定してもよいし、予め測定しておき、健常者範囲を設定しておいてもよい。

【0028】

(2) IgE非依存性アレルギー疾患治療薬のスクリーニング方法

本発明の他の態様は、IgE非依存性アレルギー疾患治療薬のスクリーニング方法であ

って、I g E 非依存性アレルギー疾患に罹患している被検者から得られた試料に、候補治療薬およびアレルギー、またはアレルギーのみを添加して培養して、当該培養試料中の細胞が発現するマーカー遺伝子の発現量を測定し、候補治療薬およびアレルギーを添加した培養試料中のマーカー遺伝子の発現量と、アレルギーのみ添加した培養試料中のマーカー遺伝子の発現量とを比較する工程を含む方法であって、該マーカー遺伝子は、該アレルギー疾患におけるアレルギー刺激によりその発現量に変動するものである、方法である。

【0029】

I g E 非依存性アレルギー疾患に罹患している被検者には、ヒト、サルその他、マウスやラット等のげっ歯類等、イヌ、ネコ、ブタ、フェレット等が挙げられるが、I g E 非依存性アレルギー疾患に罹患しており、マーカー遺伝子の発現量を測定するのに十分な量の試料が得られる動物であれば、いずれのものでよい。

10

【0030】

これらの被検体に投与するI g E 非依存性アレルギー疾患候補治療薬（以下、「候補治療薬」と称することがある）としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、低分子合成化合物などが挙げられ、これらの化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。また、これらの化合物を含む、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などでもよい。

その投与量、投与方法、処理時間等は、用いる被検体に従って適宜選択すればよい。

【0031】

候補治療薬およびアレルギーを試料に添加して培養するときには、候補治療薬とアレルギーは、同時に添加してもよいし、候補治療薬を添加して培養してからアレルギーを添加して培養してもよいし、その逆であってもよい。

20

【0032】

候補治療薬を添加して培養した試料中のマーカー遺伝子の発現量を測定する方法としては、試料に適した方法により行うことができ、上記(1)で述べたものを適用できる。例えば、試料が血液の場合には、公知の方法に従って血液中の白血球等からRNAを抽出し、これを測定することができる。例えば、RNAを試料とする場合には、リアルタイムPCR法等により検出を行うことができる。これらの試料は、検出の結果得られた数値を正確に比較・解析できるように、あらかじめ抽出したRNA量をそろえることが好ましい。

【0033】

候補治療薬及びアレルギーを添加して培養した試料におけるマーカー遺伝子の発現量が、アレルギーのみ添加した培養試料中のマーカー遺伝子の発現量と比べて、有意に減少または増加する場合、該候補治療薬はI g E 非依存性アレルギー疾患治療効果を有すると判定することができる。

30

【0034】

さらなる本発明の他の態様は、I g E 非依存性アレルギー疾患治療薬のスクリーニング方法であって、候補治療薬を投与されたI g E 非依存性アレルギー疾患に罹患している被検者から得られた試料にアレルギーを添加して培養し、当該培養試料中の細胞が発現するマーカー遺伝子の発現量を測定し、候補治療薬投与前のマーカー遺伝子の発現量と、候補治療薬投与後のマーカー遺伝子の発現量とを比較する工程を含む方法であって、該マーカー遺伝子は、該アレルギー疾患におけるアレルギー刺激によりその発現量に変動するものである、方法である。

40

【0035】

当該I g E 非依存性アレルギー疾患に罹患している被検者としては、上述のスクリーニング方法における説明をほぼそのまま適用できるが、ヒトは含まれない。

【0036】

候補治療薬を投与した被験者におけるマーカー遺伝子の発現量が、候補治療薬投与前の被検者におけるマーカー遺伝子の発現量と比べて、有意に減少または増加する場合、該候補治療薬はI g E 非依存性アレルギー疾患治療効果を有すると判定することができる。

【0037】

50

(2)におけるその他の用語については、(1)における説明をそのまま適用できる。

【0038】

(3)キット

本発明には、IgE非依存性アレルギー疾患検査用またはIgE非依存性アレルギー疾患治療薬スクリーニング用のキットも含まれる。キットの内容は、機器または試薬の組み合わせにより構成されるが、以下に述べる各構成要素と本質的に同一、またはその一部と本質的に同一な物質が含まれていれば、構成または形態が異なっても、本発明のキットに包含される。

【0039】

試薬としては、例えば、PCR法によりマーカー遺伝子の発現量を測定する場合には、当該遺伝子を特異的に増幅することが可能なプライマーを含む。当該プライマーは、マーカー遺伝子のDNA配列情報をGenbank等から入手し、その情報を元に公知の方法で作製すればよい。また、必要に応じて、逆転写酵素、Taqポリメラーゼ、反作用緩衝液等を含めてもよい。リアルタイムPCRの場合には、蛍光試薬、蛍光光度計、サーマルサイクラー等も含まれる。

10

【0040】

マイクロアレイによりマーカー遺伝子の発現量を測定する場合には、当該遺伝子断片をスポットしたガラス、プラスチック、シリコン又はメンブレン等の支持体を含む。また、必要に応じて、ラベル化試薬、ハイブリダイゼーション用バッファー、フラグメンテーション用バッファー等を含めてもよい。

20

【0041】

免疫測定法によりマーカー遺伝子の発現量を測定する場合には、当該遺伝子によりコードされるタンパク質に対する抗体を含む。また、必要に応じ、生体試料の希釈液、抗体固定化固相、反応緩衝液、洗浄液、標識された二次抗体またはその抗体断片、標識体の検出用試薬、標準物質なども含まれる。生体試料の希釈液としては、界面活性剤、緩衝剤などにBSAやカゼインなどの蛋白質を含む水溶液などが挙げられる。

【0042】

抗体固定化固相としては、各種高分子素材を用途に合うように整形した素材に、抗マーカー抗体またはそれらの抗体断片を固相化したものが用いられる。形状としてはチューブ、ビーズ、プレート、ラテックスなどの微粒子、スティック等が、素材としてはポリスチレン、ポリカーボネート、ポリビニルトルエン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリメタクリレート、ゼラチン、アガロース、セルロース、ポリエチレンテレフタレート等の高分子素材、ガラス、セラミックスや金属等が挙げられる。抗体の固相化の方法としては物理的方法と化学的方法またはこれらの併用方法等、公知の方法が挙げられる。例えば、ポリスチレン製96ウェルの免疫測定用マイクロタイタープレートに抗体または抗体断片等を疎水固相化したものが挙げられる。

30

【0043】

反応緩衝液は、抗体固定化固相の抗体と生体試料中の抗原とが結合反応をする際の溶媒環境を提供するものであればいかなるものでもよいが、界面活性剤、緩衝剤、BSAやカゼインなどの蛋白質、防腐剤、安定化剤、反応促進剤等を含む反応緩衝液が挙げられる。

40

【0044】

標識された二次抗体またはその抗体断片としては、本発明に用いられる抗体または抗体断片に西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、ウシ小腸アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼなどの標識用酵素をラベルしたものの、緩衝剤、BSAやカゼインなどの蛋白質、防腐剤などを混合したものが用いられる。

【0045】

標識体の検出用試薬としては前記の標識用酵素に応じて、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼであれば、テトラメチルベンジジンやオルトフェニレンジアミンなどの吸光測定用基質、ヒドロキシフェニルプロピオン酸やヒドロキシフェニル酢酸などの蛍光基質、ルミノールなどの発光基質が、アルカリホスファターゼであれば、4-ニトロフェニルフォス

50

フェートなどの吸光度測定用基質、4-メチルウンベリフェリルフォスフェートなどの蛍光基質等が挙げられる。

【0046】

アレルゲンやその他の用語については、上記(1)または(2)において説明したとおりである。

【実施例】

【0047】

以下に非限定的な例を参照して、本発明を更に説明する。

【0048】

<サンプル>

消化管アレルギー患者3名および健常者コントロールボランティア3名より、ヘパリン加末梢血を採取した。ALST法に用いる試料のために、さらに末梢血単核球細胞(PBMC)を分離した。分離は比重分離法(Lymphoprep:Axis-Shield Poc AS)を用いて行った。

【0049】

<抗原刺激、培養>

本発明の方法による全血を用いた刺激培養には、末梢血をRPMI培地(Lifetechnologies社)で4倍希釈した後、チューブあたり400 μ Lを分注して用いた。ALST法に用いるPBMCは、 1×10^6 細胞/mLの濃度でAIM培地(Lifetechnologies社)に懸濁した。その懸濁した細胞を、96ウェルプレートに100 μ L/ウェルずつ分注し、刺激培養に供した。抗原は、代表的なミルク抗原であるラクトアルブミン、ラクトグロブリン、カゼイン、カゼイン(全てシグマ社)を混合し、各抗原の終濃度が100 μ g/mLになるように添加した。対照は、ポジティブコントロールとしてPHA-M(Roche Applied Science社)を10 μ g/mL添加したものを、また、ネガティブコントロールとして、無添加区を設定した。

【0050】

<発現アレイ解析>

全血を抗原で刺激後3、6、12、24時間目にTotal RNAを抽出し、発現アレイ解析に供した。発現アレイは、SurePrint G3 Human GEマイクロアレイ 8x60K v2(Agilent Technologies社)を用い、プロトコールに従って測定した。測定結果は、統計解析ソフトR(ver. R-3.1.0)のlimmaパッケージ(Bioconductor)を用いて、刺激-無刺激間で統計学的に有意な差がみられる遺伝子を抽出した。

【0051】

<定量PCR>

全血を抗原で刺激して24時間後に、AGPC法(ToTally RNA Isolation Kit: LifeTechnologies社)を用いてTotal RNAを抽出した。逆転写反応は、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits(Life Technologies)を用いて行った。定量PCRは、Taqman プローブ法を用い、各マーカー遺伝子の発現量を18s rRNA遺伝子(Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control、製品番号: 4319413E)でノーマライズした。定量PCRに使用したプライマーの一部を下記表1及び表2に示す。

【0052】

10

20

30

【表1】

表1

	Taqman Probe
CD69	Hs00934003_m1
CD134	Hs00937194_g1
LRRC32	Hs00194136_m1
CD25	Hs00907779_m1
18srRNA	4319413E

10

【0053】

【表2】

表2

IL-1 β	Forward	AAGCCCTTGCTGTAGTGGTG	配列番号1
	Reverse	GAAGCTGATGGCCCTAAACA	配列番号2
INH β A	Forward	ATCTCGAAGTGCAGCGTCTT	配列番号3
	Reverse	GGAGGGCAGAAATGAATGAA	配列番号4
IER3	Forward	TGGTGAGCAGCAGAAAGAGA	配列番号5
	Reverse	CGCAGGGTTCTCTACCCTC	配列番号6
IL-1 F9	Forward	TGGCACGGTAGAAAAGGAAG	配列番号7
	Reverse	GTTGGAGAACAGCCACATT	配列番号8
CXCL5	Forward	AAACTTTTCCATGCGTGCTC	配列番号9
	Reverse	TTGTCTTGATCCAGAAGCCC	配列番号10
CXCL1	Forward	CTTCTCCTCCCTTCTGGTC	配列番号11
	Reverse	GAAAGCTTGCCTCAATCCTG	配列番号12
IL-6	Forward	GTCAGGGGTGGTTATTGCAT	配列番号13
	Reverse	AGTGAGGAACAAGCCAGAGC	配列番号14
CCL3	Forward	TGAAATTCTGTGGAATCTGCC	配列番号15
	Reverse	GGCTCTCTGCAACCAGTTCT	配列番号16
18s rRNA	Forward	GATATGCTCATGTGGTGTG	配列番号17
	Reverse	AATCTTCTTCAGTCGCTCCA	配列番号18
TGF β 1	Forward	TTGAGAGTGGTAGGGCTGCT	配列番号19
	Reverse	CCAAAGGAAAATCTGTGGCA	配列番号20

20

30

40

【0054】

< サイトカイン測定 >

全血を刺激後24時間目に、培養上清を回収し、マルチプレックスサスペンションアレイ法 (BioPlex : BioRad社) を用いてケモカイン・サイトカインの測定を行った。BioPlex カスタム 5 Plexキットを用いて、メーカーのプロトコールに従い測定した。

【0055】

< ALST法 >

50

PBMCを抗原で刺激する培養を行って5日目に、BrdU((Roche Applied Science社) 10 μ Mを添加し、6時間後に検出を行った。BrdUの測定は、BrdU 発色キット (Roche Applied Science社)のプロトコールに従い行った。

【 0 0 5 6 】

< 統計 >

ROCの統計学的解析は、GraphPad Prism ver.5.4(GrapPad社)を用いて行った。

【 0 0 5 7 】

< 結果 >

全血を抗原刺激して得られたRNAを発現アレイ解析にかけた結果を、図 1 に示す。発現変動の有意性を調整済P値で示したものの一部を、下記表 3 にて示す。

【 0 0 5 8 】

【表 3】

表3

No	GeneName	Also known as	NM number	P.Value	
1	IL1B		NM_000576	1.41E-05	配列番号21
2	INHBA		NM_002192	6.79E-04	配列番号22
3	IER3		NM_003897	1.07E-03	配列番号23
4	IL1F9		NM_019618	7.11E-03	配列番号24
5	CXCL5		NM_002994	3.15E-04	配列番号25
6	CXCL1		NM_001511	9.99E-06	配列番号26
7	IL6		NM_000600	7.40E-03	配列番号27
8	TGFBI		NM_000358	1.08E-03	配列番号28
9	CD69		NM_001781		配列番号29
10	CD134	TNFRSF4	NM_003327		配列番号30
11	LRRC32		NM_005512		配列番号31
12	CD25	IL2RA	NM_000417		配列番号32
13	CCL3		NM_002983	2.13E-04	配列番号33

【 0 0 5 9 】

上記表 3 に記載の遺伝子の発現を調べるために、さらに定量PCRおよびサイトカイン測定を行った。その結果を、図 2 ~ 6 に示す。図 2 及び 3 は、定量PCRにより得られた刺激の有無によるmRNAの倍率変化の結果と、サイトカイン測定における刺激の有無による倍率変化の結果との相関性を示す。図 4 ~ 6 は、各マーカー候補のサイトカイン測定の結果であり、図 4 および 5 は、抗原刺激なしの群におけるサイトカイン値に対する、抗原刺激ありの群におけるサイトカイン値の比を表し、図 6 は、抗原刺激後のサイトカイン濃度を示す。

【 0 0 6 0 】

それらマーカー候補がマーカーとして使用し得るものであるかを検討するために、定量PCRの結果に基づいて、ROC解析を行った。その結果のROC曲線を図 7 ~ 9 に示す。この結果から、IL-1、INH A、IER3、IL-1 F9、CXCL5、CXCL1、IL-6、TGF 1、CD69、CD134、LRRC32、CD25およびCCL3はマーカーとして有用である可能性が示された。

【 0 0 6 1 】

次に、本発明による方法と、ALSTにより得られる結果との相関性を検討した。その結果を図 10 に示す。結果は、本発明の方法により測定されたサイトカイン濃度と、ALSTにより得られる結果との間に、有意な相関性があることが示された。

【 0 0 6 2 】

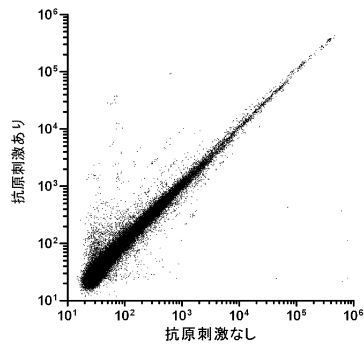
以上から、本発明の方法によれば、被検者試料とアレルゲンとの培養が短時間であっても、マーカー遺伝子の発現量を測定することにより、消化管アレルギー等の I g E 非依存性アレルギー疾患の検査が可能であることが示された。そして、本発明の方法は、培養が短時間であるにも関わらず、これまで I g E 非依存性アレルギー疾患の検査に使用されてきたALST法と、少なくとも同等の指標になり得ることが示された。

【産業上の利用可能性】

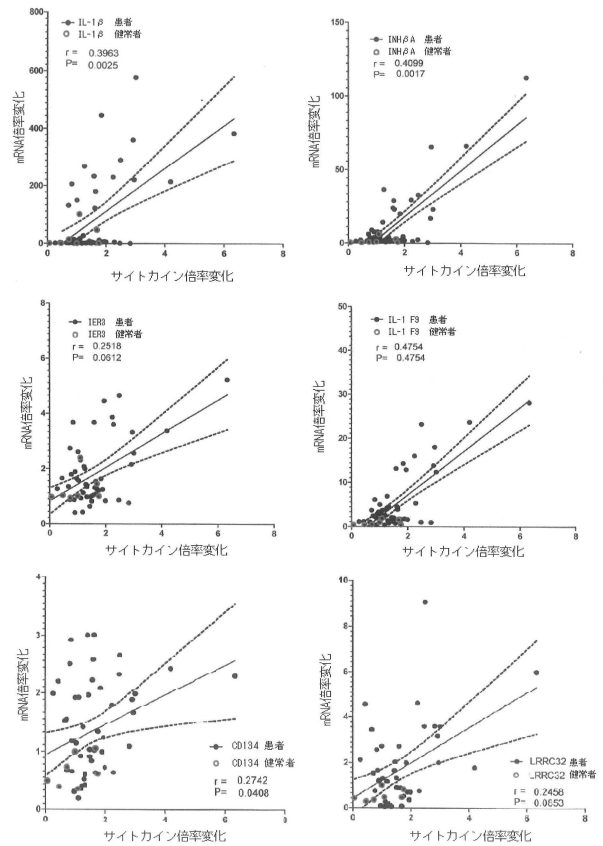
【 0 0 6 3 】

本発明の方法によれば、I g E 非依存性アレルギー疾患の検査を行うことができ、医療や診断の分野で有用である。

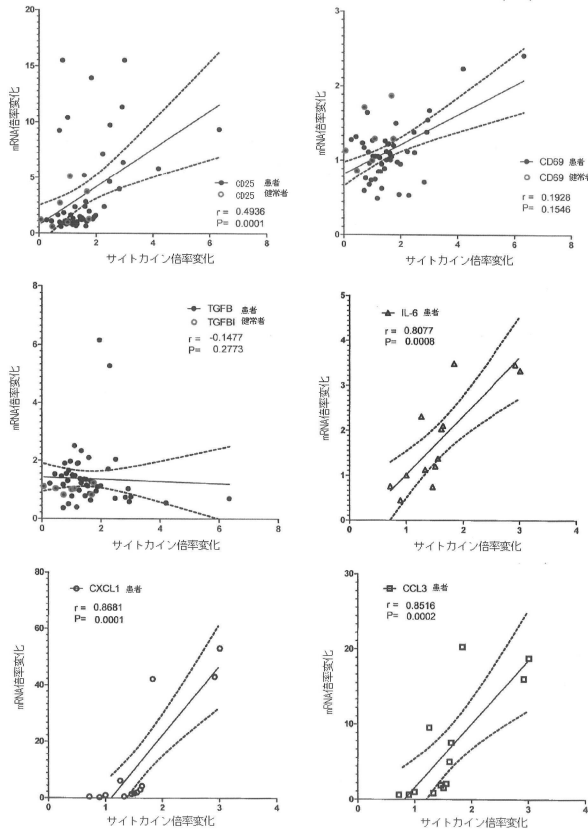
【 図 1 】



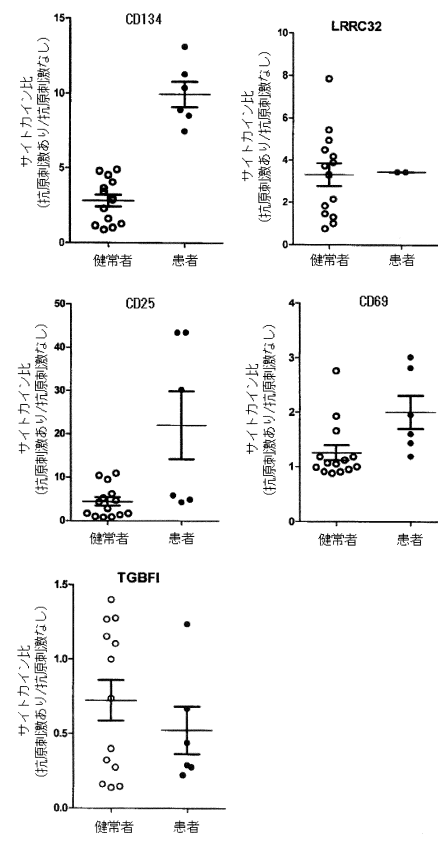
【 図 2 】



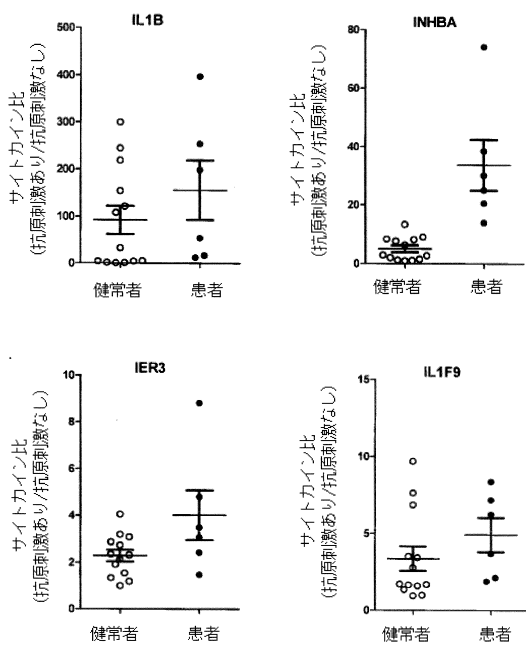
【 図 3 】



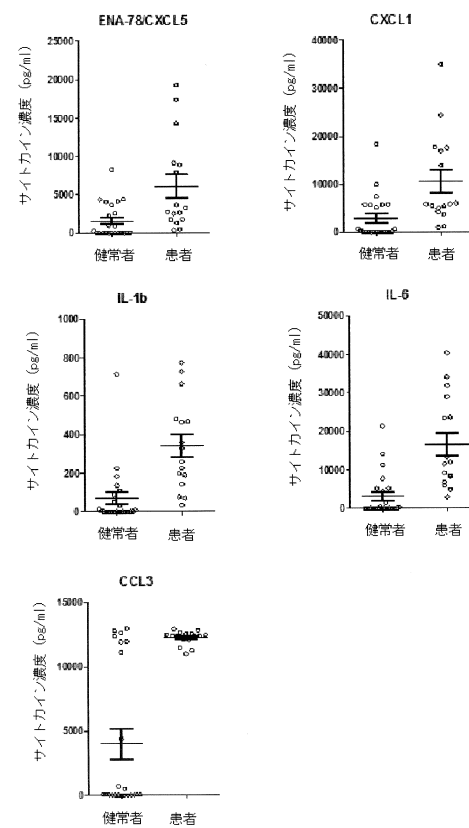
【 図 4 】



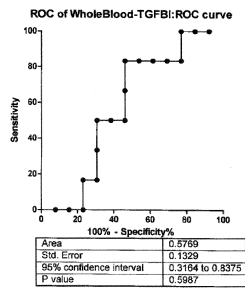
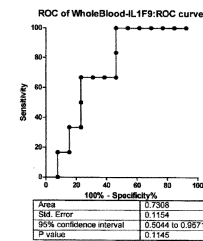
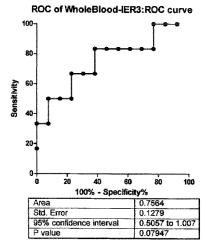
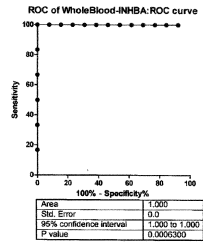
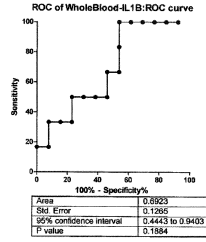
【 図 5 】



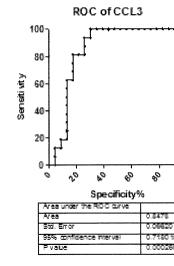
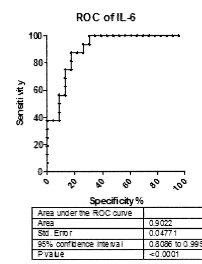
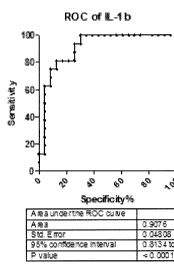
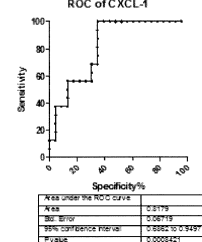
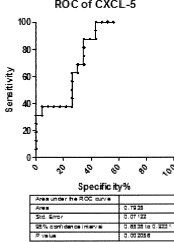
【 図 6 】



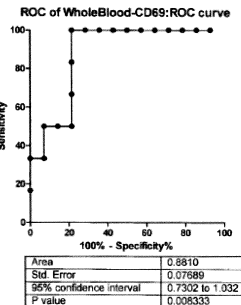
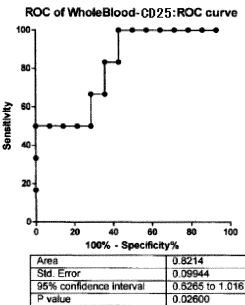
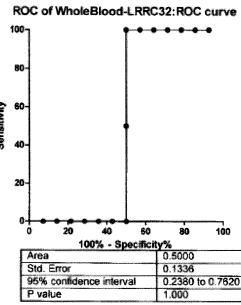
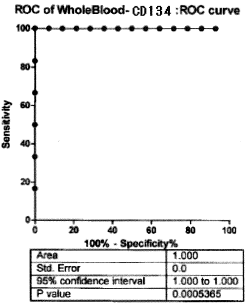
【 7 】



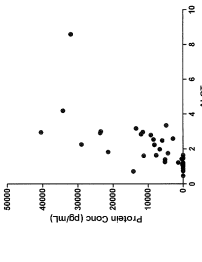
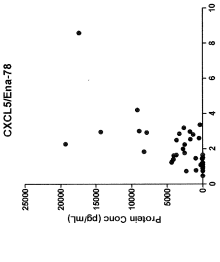
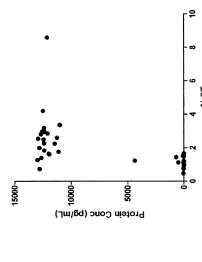
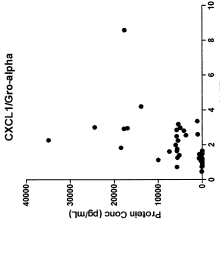
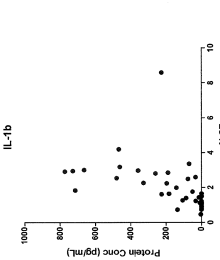
【 8 】



【 9 】



【 10 】



Parameter	Value	Unit	Reference
IL-1b	0.5301	pg/ml	0.0000
IL-6	0.7256	pg/ml	0.0000
CXCL10Gro-alpha	0.0000	pg/ml	0.0000
CCL3/MIP-1a	0.0000	pg/ml	0.0000
CXCL5Etna78	0.0000	pg/ml	0.0000
CD134	0.0000	pg/ml	0.0000
CD25	0.0000	pg/ml	0.0000
CD69	0.0000	pg/ml	0.0000
HER3	0.0000	pg/ml	0.0000
INHBA	0.0000	pg/ml	0.0000
TGFBI	0.0000	pg/ml	0.0000

【配列表】

0006628178000001.app

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開2008-195618(JP,A)
特開2011-173800(JP,A)
特開2012-246293(JP,A)
八木久子 他、「新生児・乳児消化管アレルギーにおけるリンパ球刺激試験有用性の検討」, アレルギー, 2013年10月, vol.62, no.9/10, p. 1364 (034-2)
「2013年度実施状況報告書(研究課題/領域番号 24659488)アレルギー病態理解と新規治療法開発に向けたリンパ球刺激試験法の改良」, URL, <https://kaken.nii.ac.jp/ja/report/KAKENHI-PROJECT-24659488/246594882013hokoku/>
「2012年度実施状況報告書(研究課題/領域番号 24659488)アレルギー病態理解と新規治療法開発に向けたリンパ球刺激試験法の改良」, URL, <https://kaken.nii.ac.jp/ja/report/KAKENHI-PROJECT-24659488/246594882012hokoku/>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00-3/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

专利名称(译)	测试与年龄无关的过敏性疾病的方法		
公开(公告)号	JP6628178B2	公开(公告)日	2020-01-08
申请号	JP2015181355	申请日	2015-09-15
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人群馬大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人群馬大学		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人群馬大学		
[标]发明人	滝沢琢己 荒川浩一		
发明人	滝沢 琢己 荒川 浩一		
IPC分类号	C12Q1/6804 G01N33/50 G01N33/53 C12N15/09		
FI分类号	C12Q1/6804.ZNA.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M C12N15/09.200 C12N15/00.F C12Q1/68.AZN.A C12Q1/6804.ZZN.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB30 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/ FB03 2G045/FB06 2G045/FB20 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/GA11 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR62 4B063/ /QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	川口义行		
其他公开文献	JP2017055684A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种不依赖IgE的过敏性疾病的检查方法，一种用于治疗不依赖IgE的过敏性疾病的药剂的检查方法以及使用该检查方法和检查方法的试剂盒。解决方案：根据本发明 可以通过向从受试者获得的样本中添加变应原，然后进行孵育，并测量孵育样本中细胞中表达的标志物基因的表达来检查IgE非依赖性过敏性疾病。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6628178号 (P6628178)
(45) 発行日 令和2年1月8日 (2020.1.8)	(24) 登録日 令和1年12月13日 (2019.12.13)	
(51) Int. Cl. C12Q 1/6804 (2018.01) G01N 33/50 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)	FI C12Q 1/6804 ZNAZ G01N 33/50 Z G01N 33/53 M C12N 15/09 200	請求項の数 6 (全 17 頁)
(21) 出願番号 特願2015-181355 (P2015-181355)	(73) 特許権者 504145364 国立大学法人群馬大学	
(22) 出願日 平成27年9月15日 (2015.9.15)	(74) 代理人 100100549 弁理士 川口 嘉之	
(65) 公開番号 特願2017-55684 (P2017-55684A)	(74) 代理人 100126505 弁理士 佐實 伸一	
(43) 公開日 平成29年3月23日 (2017.3.23)	(72) 発明者 滝沢 琢己 群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地 国立大 学法人群馬大学内	
審査請求日 平成30年9月11日 (2018.9.11)	(72) 発明者 荒川 浩一 群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地 国立大 学法人群馬大学内	
	審査官 中野 あい	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 IgE非依存性アレルギー疾患検査方法