

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2007/145192

発行日 平成21年10月29日 (2009.10.29)

(43) 国際公開日 **平成19年12月21日 (2007.12.21)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/78 (2006.01)	C07K 14/78 ZNA	4C085
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18	4H045
A61K 39/00 (2006.01)	A61K 39/00 H	
A61P 13/12 (2006.01)	A61P 13/12	
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 N	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 22 頁)

出願番号	特願2008-521201 (P2008-521201)	(71) 出願人	598100346 横山 司甫 東京都東久留米市氷川台2-13-19
(21) 国際出願番号	PCT/JP2007/061779	(72) 発明者	横山 司甫 日本国東京都清瀬市中清戸5-72-11-4
(22) 国際出願日	平成19年6月12日 (2007.6.12)	Fターム(参考)	4C085 AA03 BB11 CC23 CC32 GG08 4H045 AA11 BA10 CA40 DA75 EA20 EA31 FA71
(31) 優先権主張番号	特願2006-187186 (P2006-187186)		
(32) 優先日	平成18年6月12日 (2006.6.12)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2007-137856 (P2007-137856)		
(32) 優先日	平成19年5月24日 (2007.5.24)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 I V型コラーゲン様免疫活性ペプチド

(57) 【要約】

腎炎の検出に有用な I V型コラーゲン様免疫活性ペプチドおよびこの抗体、I V型コラーゲン様免疫活性ペプチド選出方法、免疫活性抗体および免疫活性ペプチドのスクリーニング方法、腎炎モデル、慢性腎炎の検出方法、ならびにワクチンおよび腎炎治療薬を提供する。

単離した慢性腎炎由来生体試料と免疫反応する I V型コラーゲン様免疫活性ペプチドである。好ましくは、構成アルファ鎖として1鎖~6鎖の任意の1鎖以上、構成領域として7S、中央螺旋域およびNC1から選ばれる任意の1つ以上、並びに構成ペプチドとしてアミノ酸数が3個以上35個以下、からなる群から選ばれる少なくとも1つ以上を有する I V型コラーゲン様免疫活性ペプチドである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離した慢性腎炎由来生体試料と免疫反応することを特徴とする I V 型コラーゲン様免疫活性ペプチド。

【請求項 2】

構成アルファ鎖として 1 鎖～6 鎖の任意の 1 鎖以上、構成領域として 7 S、中央螺旋域および NC 1 から選ばれる任意の 1 つ以上、並びに構成ペプチドとしてアミノ酸数が 3 個以上 35 個以下、からなる群から選ばれる少なくとも 1 つ以上を有する請求項 1 記載の I V 型コラーゲン様免疫活性ペプチド。

【請求項 3】

アルファ 5 鎖である請求項 2 記載の I V 型コラーゲン様免疫活性ペプチド。

10

【請求項 4】

I V 型コラーゲンのアルファ 5 鎖のアミノ酸配列と同一性を有する請求項 3 記載の I V 型コラーゲン様免疫活性ペプチド。

【請求項 5】

構成領域が NC 1 由来である下記のアミノ酸配列、

- 1) GRGTC NYVAN SYSFW LATVD
- 2) SCLEE FR SAP FIECH GRGTC
- 3) GWDSL WIGYS FMMHT SAGAE
- 4) PFISR CAVCE APAVV IAVHS
- 5) STMPF MFCNI NNVCN FASRN

20

(式中、A はアラニン、C はシステイン、D はアスパラギン酸、E はグルタミン酸、F はフェニルアラニン、G はグリシン、H はヒスチジン、I はイソロイシン、L はロイシン、M はメチオニン、N はアスパラギン、P はプロリン、R はアルギニン、S はセリン、T はスレオニン、V はバリン、W はトリプトファンおよび Y はチロシンをそれぞれ表し、各ペプチドは連続するアミノ酸配列を N 端から 5 個単位に表す) のうちいずれか一つ以上を含む請求項 1～4 のうちいずれか一項記載の I V 型コラーゲン様免疫活性ペプチド。

【請求項 6】

前記アミノ酸配列中の 3 個以上のアミノ酸の配列と同一性を有する請求項 5 記載の I V 型コラーゲン様免疫活性ペプチド。

30

【請求項 7】

前記単離した慢性腎炎由来生体試料が、尿である請求項 1～6 のうちいずれか一項記載の I V 型コラーゲン様免疫活性ペプチド。

【請求項 8】

前記尿が、保存時には冷凍保存され、使用時には解凍されてリン酸緩衝生理食塩水中に均一分散され、遠心後沈殿が除去され、得られた上清液が凍結乾燥機で乾燥され、リン酸緩衝生理食塩水中で溶解された請求項 7 記載の I V 型コラーゲン様免疫活性ペプチド。

【請求項 9】

請求項 1～8 のうちいずれか一項記載の I V 型コラーゲン様免疫活性ペプチドと免疫反応することを特徴とする I V 型コラーゲン様免疫活性ペプチドの抗体。

40

【請求項 10】

単離した慢性腎炎由来生体試料をリガンドとして、前記慢性腎炎由来生体試料と免疫反応する請求項 1～8 のうちいずれか一項記載の I V 型コラーゲン様免疫活性ペプチドを選出することを特徴とする I V 型コラーゲン様免疫活性ペプチド選出方法。

【請求項 11】

請求項 1～8 のうちいずれか一項記載の I V 型コラーゲン様免疫活性ペプチドを用いることを特徴とする免疫活性抗体のスクリーニング方法。

【請求項 12】

前記 I V 型コラーゲン様免疫活性ペプチドのアミノ酸数が 3 個以上 35 個以下である請求項 11 記載の免疫活性抗体のスクリーニング方法。

50

【請求項 13】

請求項 9 記載の I V 型コラーゲン様免疫活性ペプチドの抗体を用いることを特徴とする免疫活性ペプチドのスクリーニング方法。

【請求項 14】

I V 型コラーゲン様免疫活性ペプチドのアミノ酸数が 3 個以上 35 個以下である請求項 13 記載の免疫活性ペプチドのスクリーニング方法。

【請求項 15】

請求項 1～8 のうちいずれか一項記載の I V 型コラーゲン様免疫活性ペプチド、および請求項 9 記載の I V 型コラーゲン様免疫活性ペプチドの抗体、から選ばれるいずれか一つ以上を惹起原とすることを特徴とする腎炎モデル。 10

【請求項 16】

請求項 1～8 のうちいずれか一項記載の I V 型コラーゲン様免疫活性ペプチド、および請求項 9 記載の I V 型コラーゲン様免疫活性ペプチドの抗体、から選ばれるいずれか一つ以上を用いることを特徴とする慢性腎炎の検出方法。

【請求項 17】

請求項 1～8 のうちいずれか一項記載の I V 型コラーゲン様免疫活性ペプチド、および請求項 9 記載の I V 型コラーゲン様免疫活性ペプチドの抗体、からなる群から選ばれるいずれか一つ以上を用いることを特徴とするワクチン。

【請求項 18】

請求項 17 記載のワクチンを含むことを特徴とする腎炎治療薬。 20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、I V 型コラーゲン様免疫活性ペプチドおよびこの抗体、I V 型コラーゲン様免疫活性ペプチド選出方法、免疫活性抗体または免疫活性ペプチドのスクリーニング方法、腎炎モデル、慢性腎炎の検出方法、ワクチンならびに腎炎治療薬に関するものである。

【背景技術】

【0002】

I V 型コラーゲンは、全て解明されているわけではない。I V 型コラーゲンは多数の分子が結合し、そこに多種類の成分が係わることで組織基底膜が形成される。また、I V 型コラーゲンは組織基底膜の主要成分であることから基底膜コラーゲンとも呼ばれる。I V 型コラーゲンはアルファ 1 鎖からアルファ 6 鎖までの 6 種の異性体があり、I V 型コラーゲン 1 分子は 3 種のアルファ鎖から構成される。3 種のアルファ鎖の構成は組織により異なり、胎盤由来の基底膜ではアルファ 1、アルファ 2 鎖に富み、全身の各組織基底膜に共通に見られる。腎由来の基底膜は特異で、アルファ 3 からアルファ 6 鎖に富むとされる。 30

【0003】

I V 型コラーゲン 1 分子は三領域に分けられ、N 末端から三本鎖らせん構造を持つ 7 S と中央螺旋部 (TH)、C 末端領域で非らせん構造の NC 1 である。生体組織から取り出す時、処理方法により得られる領域は異なり、ペプシン処理で三本鎖らせん領域を、細菌由来コラーゲナーゼ処理で NC 1 を得るのが一般的手法である (非特許文献 1)。 40

【0004】

一方、腎炎は、症状から「急性腎炎」と「慢性腎炎」に大別され、専門医により多彩に小分類された腎疾患名が与えられる。通常、腎炎と称されるものは「慢性腎炎」を指すので、本発明は、特に断らない限り「腎炎」と「慢性腎炎」を同義に用いる。「慢性腎炎」としては、いわゆる慢性腎炎、I g A 腎症、微小変化型ネフローゼ、膜性腎症、二次性腎症の糖尿病性腎症、高血圧性腎症などを含むがこれに限定されない。腎炎は、毎年 3 万人が新規透析導入例となり、本人の生活の質 (QOL) にとっても、国民医療費 (透析 1 例につき、600 万円/年) の上でも多大な負担である。透析の技術は進歩しているが、それ以前のごく初期に腎障害を特定し、直接腎炎を治療する薬剤はない。その理由としては、腎炎の発症メカニズムが解明されていないことが大きい。 50

【0005】

また、腎炎には、腎炎特有の抗原が存在するとして、世界中で様々な抗原物質が研究されている（非特許文献2）。抗原が特定されれば、そこを標的物質として診断薬や腎炎治療剤の開発が期待できる。抗原が確定している唯一の例としては、グッドパスチャー症候群（狭義の抗糸球体基底膜（GBM）抗体腎炎）がある。この抗原は、アルファ3鎖NC1のC末端36アミノ酸残基や、N末端からのアミノ酸配列17-31、及び127-141に存在する（非特許文献3）などの報告があり、いずれの抗原もその部位はアルファ3鎖上である。また、アルファ3鎖上の17-31（アミノ酸残基数15個）及び127-141（アミノ酸残基数15個）は、キメラ型アルファ1/アルファ3NC1より検索されたものである。

10

【0006】

稀な腎炎であるグッドパスチャー症候群は「急性腎炎」に属し、典型的には2週間ほどで重篤な状態になるので、速やかに確定診断することが必要とされる。確定診断には腎生検の免疫組織染色を用い、GBMに自己抗体である免疫グロブリンIgGの沈着の有無で判定される。

【非特許文献1】 Extracellular Matrix IRL PRESS/ OXFORD UNIVERSITY PRESS Oxford New York

【非特許文献2】 腎と透析 2005 July Vol59 No.1 東京医学社

【非特許文献3】 J.Biol Chem (1993) 268, 26033-26036

【発明の開示】

20

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

しかし、この検査は、検体採取で患者への苦痛と危険性があり、免疫組織染色には専門病理医の高度な診断能力が求められるという問題点があった。

【0008】

そこで、簡便法として、血中に出現する自己抗体を検出するELISAキット（商品名：ネフロスカラー・GBM、輸入元株式会社ニッショー、販売元株式会社ニプロ）が利用されている。しかしながら、前記ELISAキット添付の説明書及びそこで引用されている文献（臨床機器・試薬、Vol. 20 No. 3, 367-374 (1997)）によると、グッドパスチャー症候群のみの自己抗体が高濃度に検出され、他の腎炎は健常者と同じ程度に低くしか検出されない。同説明書によれば、用いている抗原はウシGBM抗原であり、GBMはIV型コラーゲンを主成分として多種の成分からなる。大きさを考慮すると、GBM>IV型コラーゲン>NC1>アルファ3鎖のNC1>前述の各アミノ酸残基（抗原）となる。ウシGBMを抗原に用いることは、この巨大領域には他の腎炎の抗原が無いこととなり、腎炎の検出としては不十分であった。また、現在、日本で唯一診断薬として認可され保険適用されているものの、高価でありしかも輸入品であるため使用しにくいという問題点があった。

30

【0009】

そこで本発明の目的は、腎炎の検出に有用なIV型コラーゲン様免疫活性ペプチドおよびこの抗体、IV型コラーゲン様免疫活性ペプチド選出方法、免疫活性抗体および免疫活性ペプチドのスクリーニング方法、腎炎モデル、慢性腎炎の検出方法、ならびにワクチンおよび腎炎治療薬を提供することにある。

40

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者は、上記課題を解決するために長い間腎疾患や他疾患に伴う二次性腎疾患の治療薬開発と早期検出方法に努め、鋭意検討した結果、慢性腎炎由来生体試料を用いて腎炎の抗原部位を見出すことで、IV型コラーゲン様免疫活性ペプチドおよびこの抗体、IV型コラーゲン様免疫活性ペプチド選出方法、免疫活性抗体および免疫活性ペプチドのスクリーニング方法、腎炎モデル、慢性腎炎の検出方法、ならびにワクチンおよび腎炎治療薬を確立し、本発明を完成するに至った。

50

【0011】

すなわち、本発明のI V型コラーゲン様免疫活性ペプチドは、単離した慢性腎炎由来生体試料と免疫反応することを特徴とするものである。

【0012】

また、本発明のI V型コラーゲン様免疫活性ペプチドの抗体は、前記I V型コラーゲン様免疫活性ペプチドと免疫反応することを特徴とするものである。

【0013】

さらに、本発明のI V型コラーゲン様免疫活性ペプチド選出方法は、単離した慢性腎炎由来生体試料をリガンドとして、前記慢性腎炎由来生体試料と免疫反応する前記I V型コラーゲン様免疫活性ペプチドを選出することを特徴とするものである。

10

【0014】

さらにまた、本発明の免疫活性抗体のスクリーニング方法は、前記I V型コラーゲン様免疫活性ペプチドを用いることを特徴とするものである。

【0015】

さらにまた、本発明の免疫活性ペプチドのスクリーニング方法は、前記I V型コラーゲン様免疫活性ペプチドの抗体を用いることを特徴とするものである。

【0016】

さらにまた、本発明の腎炎モデルは、前記I V型コラーゲン様免疫活性ペプチド、および前記I V型コラーゲン様免疫活性ペプチドの抗体、から選ばれるいずれか一つ以上を惹起原とすることを特徴とするものである。

20

【0017】

さらにまた、本発明の慢性腎炎の検出方法は、前記I V型コラーゲン様免疫活性ペプチド、および前記I V型コラーゲン様免疫活性ペプチドの抗体、から選ばれるいずれか一つ以上を用いることを特徴とするものである。

【0018】

さらにまた、本発明のワクチンは、前記I V型コラーゲン様免疫活性ペプチド、および前記I V型コラーゲン様免疫活性ペプチドの抗体、からなる群から選ばれるいずれか一つ以上を用いることを特徴とするものである。また、腎炎治療薬は、このワクチンを含むことを特徴とするものである。

30

【発明の効果】

【0019】

本発明により、腎炎の検出に有用なI V型コラーゲン様免疫活性ペプチドおよびこの抗体、I V型コラーゲン様免疫活性ペプチド選出方法、免疫活性抗体および免疫活性ペプチドのスクリーニング方法、腎炎モデル、慢性腎炎の検出方法、ならびにワクチンおよび腎炎治療薬を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】 健常者と尿中アルブミン高値者の比較（抗NC1抗体）を示す図である。

【図2】 疾患別抗NC1抗体の一覧を示す図である。

【図3】 同一腎炎患者での抗三本鎖抗体と抗NC1抗体の相関を示す図である。

40

【図4】 慢性腎炎TD38と糖尿病性腎炎TD42と健常者（TD31～37、TD39～41）の測定比較データ（抗NC1抗体）を示す図である。

【図5】 ヒトNC1のアルファ3鎖、アルファ4鎖、アルファ5鎖、アルファ6鎖を示す図である。

【図6】 慢性腎炎No38、糖尿病性腎炎No42、IgA腎症と健常者No31、32、33とのNC1様抗原性の比較を示す図である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

以下、本発明のI V型コラーゲン様免疫活性ペプチドについて説明をする。

【0022】

50

本発明のⅠⅤ型コラーゲン様免疫活性ペプチドは、単離した慢性腎炎由来生体試料と免疫反応することを特徴とするものである。ⅠⅤ型コラーゲン様免疫活性ペプチドを抗原、単離した慢性腎炎由来生体試料を抗体とした免疫反応である。免疫反応としては、酵素免疫反応に限定されず、ＡＢ法、ＲＩＡ、免疫発光法、沈降反応、凝集反応他を含み、酵素標識抗体としては、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を問わず、またそれを放射性物質、発光物質で標識した物、無標識物でもよい。反応形式は、サンドイッチ法に囚われず、競合法等でもよい。プレートに替え、ガラス、磁性物質、ラテックスにしてもよく、無しにして固相法を用いないことでもよい。

【0023】

また、本発明において、「慢性腎炎」としては、いわゆる慢性腎炎、ⅠｇＡ腎症、微小変化型ネフローゼ、膜性腎症、二次性腎症の糖尿病性腎症、高血圧性腎症などを含むがこれに限定されない。

【0024】

さらに、本発明のⅠⅤ型コラーゲン様免疫活性ペプチドは、慢性腎炎由来生体試料と免疫反応すれば特に限定されないが、好ましくは、構成アルファ鎖として１鎖～６鎖の任意の１鎖以上、構成領域として７Ｓ、中央螺旋域およびＮＣ１から選ばれる任意の１つ以上、並びに構成ペプチドとしてアミノ酸数が３個以上３５個以下、からなる群から選ばれる少なくとも１つ以上を有するものであり、さらに好ましくは、アルファ５鎖であることが好ましく、構成領域がＮＣ１であることがより好ましい。また、かかるⅠⅤ型コラーゲン様免疫活性ペプチドのペプチドの長さは、費用と効率の点から、アミノ酸３個以上３５個以下が好ましく、抗体の作製の容易さも考慮して、最も好ましいのは、１０個から２０個である。

【0025】

本発明のⅠⅤ型コラーゲン様免疫活性ペプチドは、単離した慢性腎炎由来生体試料に対してⅠⅤ型コラーゲンと同様の免疫反応をする。また、このⅠⅤ型コラーゲンのアルファ５鎖のアミノ酸配列と相同性を有することが好ましい。

【0026】

さらに、本発明のⅠⅤ型コラーゲン様免疫活性ペプチドが、構成領域がＮＣ１由来である下記のアミノ酸配列、

- | | | | | | |
|----------|-------|-------|-------|----------|----|
| 1) GRGTC | NYVAN | SYSFW | LATVD | No. yp13 | 30 |
| 2) SCLEE | FRSAP | FIECH | GRGTC | No. yp12 | |
| 3) GWDSL | WIGYS | FMMHT | SAGAE | No. yp10 | |
| 4) PFISR | CAVCE | APAVV | IAVHS | No. yp08 | |
| 5) STMPF | MFCNI | NNVCN | FASRN | No. yp05 | |

(式中、Ａはアラニン、Ｃはシステイン、Ｄはアスパラギン酸、Ｅはグルタミン酸、Ｆはフェニルアラニン、Ｇはグリシン、Ｈはヒスチジン、Ｉはイソロイシン、Ｌはロイシン、Ｍはメチオニン、Ｎはアスパラギン、Ｐはプロリン、Ｒはアルギニン、Ｓはセリン、Ｔはスレオニン、Ｖはバリン、ＷはトリプトファンおよびＹはチロシンをそれぞれ表し、各ペプチドは連続するアミノ酸配列をＮ端から５個単位を表す)のうちいずれか一つ以上を含むことが好ましく、前記アミノ酸配列中の３個以上のアミノ酸の配列と相同性を有することが好ましい。なお、アミノ酸配列１)～５)には、それぞれ固有の番号(No. yp13等)を付記した。

【0027】

さらにまた、前記単離した慢性腎炎由来生体試料は、抗ⅠⅤ型コラーゲン抗体を有し、さらに、構成アルファ鎖として１鎖～６鎖の任意の１鎖以上、構成領域として７Ｓ、中央螺旋域およびＮＣ１から選ばれる任意の１つ以上、並びに構成ペプチドとしてアミノ酸数が３個以上３５個以下、からなる群から選ばれる少なくとも１つ以上を有するⅠⅤ型コラーゲンと免疫反応する。また、かかる単離した慢性腎炎由来生体試料は、腎炎由来の生体試料であればヒト腎炎由来のみならず、動物腎炎由来でもよく、尿、血清、腎臓、腎臓の抽出物および培養物などがあるが、好ましくは尿である。動物由来の場合は、ヒト慢性腎

炎の「単離した腎炎由来生体試料」と比較しながら用いることがよい。

【0028】

かかる尿は、保存時には冷凍保存され、使用時には解凍されてリン酸緩衝生理食塩水（以下、PBS）中に均一分散され、遠心後沈殿が除去され、得られた上清液を凍結乾燥機で乾燥され、PBS（pH 7.4）中で溶解されたことが好ましい。また、PBSに代えて生理食塩水や注射用蒸留水を用いてもよいが、力価が落ちない様に、滅菌、除菌などの他の操作も加えて、つまり生物由来製剤を扱う当該製剤業者が払うべき注意を払うことにより、注射剤あるいは内服剤に作製することができる。また、抗原NC1を取り付けたアフィニティーカラムで精製をしたものや硫酸沈殿などで得た抗体を、再度、希釈して濃度を合わせてもよく、血清や腎臓から、抗体の免疫グロブリンを精製してもよい。

10

【0029】

また、本発明のIV型コラーゲン様免疫活性ペプチドの抗体は、前記IV型コラーゲン様免疫活性ペプチドと免疫反応することを特徴とするものであり、IV型コラーゲン様免疫活性ペプチドに対して、単離した慢性腎炎由来生体試料と同様の免疫反応を示す。

【0030】

また、本発明のIV型コラーゲン様免疫活性ペプチド選出方法は、単離した慢性腎炎由来生体試料をリガンドとして、前記慢性腎炎由来生体試料と免疫反応する前記IV型コラーゲン様免疫活性ペプチドを選出することを特徴とするものである。単離した慢性腎炎由来生体試料をリガンドとして使用することにより、腎炎検出に有用なIV型コラーゲン様免疫活性ペプチドを選出することができる。

20

【0031】

本発明のIV型コラーゲン様免疫活性ペプチド選出方法における前記単離した慢性腎炎由来生体試料およびIV型コラーゲンとしては、前記記載と同様のものを使用できる。また、選出されるIV型コラーゲン様免疫活性ペプチドも、前記記載と同様のものを使用できる。

【0032】

本発明の免疫活性抗体のスクリーニング方法は、前記IV型コラーゲン様免疫活性ペプチドを用いることを特徴とするものであり、好ましくは前記IV型コラーゲン様免疫活性ペプチドのアミノ酸数が3個以上35個以下であり、さらに好ましくは10個から20個である。具体的には、前記慢性腎炎由来生体試料に置き換えて抗アルファ5鎖NC1抗体あるいは抗アルファ5鎖NC1由来ペプチド抗体を使用して、免疫活性抗体をスクリーニングすることができる。これにより、腎炎検出に有用な免疫活性抗体をスクリーニングできる。

30

【0033】

また、本発明の免疫活性ペプチドのスクリーニング方法は、前記IV型コラーゲン様免疫活性ペプチドの抗体を用いることを特徴とするものであり、好ましくはIV型コラーゲン様免疫活性ペプチドのアミノ酸数が3個以上35個以下であり、さらに好ましくは10個から20個である。具体的には、アルファ5鎖NC1由来の合成ペプチドに置き換えて候補免疫活性ペプチドを使用することにより、免疫活性ペプチドをスクリーニングできる。これにより、腎炎検出に有用な免疫活性ペプチドをスクリーニングできる。

40

【0034】

さらに、本発明の腎炎モデルは、前記IV型コラーゲン様免疫活性ペプチド、および前記IV型コラーゲン様免疫活性ペプチドの抗体、から選ばれるいずれか一つ以上を惹起原とすることを特徴とするものである。従来、腎炎惹起抗原としては、腎糸球体基底膜（GBM）、腎糸球体由来NC1が用いられてきた。しかしながら、これらは、急性腎炎のモデルであり、ヒトの慢性腎炎のモデルには適さなかった。また、アルファ3鎖由来のペプチド例もあるが、やはり急性腎炎モデルであった。本発明の腎炎モデルでは、IV型コラーゲン様免疫活性ペプチドを使用することにより安価に一定の抗原が得られ、慢性腎炎の実験モデル作製に適している。

【0035】

50

また、従来、抗原に対する抗体（抗血清）を用いた腎炎惹起例は、GBM、NC 1、アルファ3鎖に対する抗体例が挙げられるが、いずれも急性腎炎モデルである。さらに、アルファ5鎖に対する抗体、とりわけ、ヒトアルファ5鎖のペプチドに対する抗体を用いた例は見られない。それに対して、本発明のI V型コラーゲン様免疫活性ペプチドの抗体は、ヒトの慢性腎炎モデルとして有用であり、適している。

【0036】

かかる腎炎惹起抗原としては、アルファ5鎖のNC 1が特に好ましい。腎系球体由来のNC 1で惹起した腎炎モデルでは急性腎炎の一種なので、その抗NC 1抗体の多くは、急性腎炎のグッドパスチャー症候群の自己抗体に近いので、ヒト慢性腎炎の「単離した腎炎由来生体試料」と比較しながら用いることが好ましい。動物の糖尿病モデルや高血圧モデル由来の生体試料を用いることも可能であるが、前記と同様に、ヒト慢性腎炎の「単離した腎炎由来生体試料」と比較しながら用いることが好ましい。

10

【0037】

さらにまた、本発明の慢性腎炎の検出方法は、前記I V型コラーゲン様免疫活性ペプチド、および前記I V型コラーゲン様免疫活性ペプチドの抗体、から選ばれるいずれか一つ以上を用いることを特徴とするものである。また、好ましくは、ELISA法を使用したキットであり、これにより腎炎の早期診断が可能となる。

【0038】

さらにまた、本発明のワクチンは、前記I V型コラーゲン様免疫活性ペプチド、および前記I V型コラーゲン様免疫活性ペプチドの抗体、からなる群から選ばれるいずれか一つ以上を用いることを特徴とするものであり、腎疾患の予防薬または治療薬として使用できる。また、腎炎治療薬は、このワクチンを含むことを特徴とするものである。本発明のワクチンまたは腎炎治療薬は、前記I V型コラーゲン様免疫活性ペプチドまたは前記I V型コラーゲン様免疫活性ペプチドの抗体を含むものであれば特に限定されないが、一例を挙げるとyp 12等を水に溶かしたものがあり、この溶解剤の投与により腎炎等を抑制できる。

20

【0039】

さらにまた、本発明は、腎炎血液（血清、血漿も含める）の浄化器具に関するもので、医療器具として使用できる。原理は、腎炎血液中の標的抗体あるいは標的抗原を、担体に固定した吸着機能を持つリガンド（対応する抗原あるいは抗体）に触れさせて吸着除去することにある。腎炎血液中の標的抗体が抗I V型コラーゲン抗体、抗その構成領域抗体、抗その構成ペプチド（構成ペプチドの長さは問わない）抗体である時の対応するリガンド抗原には、分離した慢性腎炎由来生体試料と反応するI V型コラーゲン様ペプチドを用いる。

30

【0040】

腎炎血液中の標的抗原がI V型コラーゲン、その構成領域、構成ペプチド（構成ペプチドの長さは問わない）である時の対応するリガンド抗体は、抗I V型コラーゲン様ペプチド抗体である。

【0041】

リガンドとしては、標的抗原に対応する抗体、標的抗体に対応する抗原が好ましく、標的抗体に対応する抗原の代わりにはプロテインAやプロテインGでもよいが、標的抗体以外の免疫グロブリンも血液から除去される可能性がある。

40

【0042】

腎炎血液の浄化には、血液を一旦、腎炎患者の上腕静脈から取り出し、血漿分離膜（または分離機）で、血漿成分と血球成分に分離することが好ましい。もちろん、血漿成分と血球成分を分けずに血液のままでもよいが、標的物質以外のアルブミンなどの正常成分が体外で余分なものに触れることになる。分離した血漿成分は、吸着機能を持つリガンド（標的物質に対応する抗原あるいは抗体）を固定した担体を内部に備えたカラムに通して、標的物質を吸着除去した後、血球成分と合流させ、体内に戻す。これら一連の血液浄化作業を無菌的に機械的に行うことで、医療用具として使用できる。なお、カラムは、標的抗

50

原に対応する抗体カラムと、標的抗体に対応する抗原カラムに分けてもよい。

【0043】

抗体カラムとしては、抗アルファ5鎖抗体カラムが好ましく、より好ましくは抗アルファ5鎖NC1抗体カラムで、さらに好ましくは、単離した慢性腎炎由来生体試料と免疫反応するアルファ5鎖由来ペプチドに対応する抗体カラムである。

【0044】

抗原カラムとしては、アルファ5鎖カラムが好ましく、より好ましくはアルファ5鎖NC1カラムで、さらに好ましくは、単離した慢性腎炎由来生体試料と免疫反応するアルファ5鎖由来ペプチドカラムである。

【0045】

以下実施例に即して、本発明を詳細に説明する。

10

【実施例】

【0046】

1. 抗NC1抗体測定法

NC1 (ウシ腎糸球体由来、収率0.0025%) を抗原とした抗NC1抗体測定法をELISAで開発し、血清や尿を測定した。図1は、健常者と尿中アルブミン高値者の比較 (抗NC1抗体) を示す図である。図1中、破線はカットオフ値 (0.072) を示し、尿アルブミンが正常で血糖も正常な7例の平均OD (0.028) + 2SD (0.044) とした。図1の左側 (Alb (mg/mL) < 30) の例数12には、尿アルブミンが正常で血糖も正常な例 (7例) の他に、尿アルブミンが正常で血糖が高値である例 (5例) を含む。結果は、グッドパスチャー症候群の血清のみならず、尿中アルブミン高値者の血清や尿 (図1)、透析患者の血清からと高頻度に抗NC1抗体を検出した。

20

【0047】

そこで、診断名の確定した腎炎の尿を検体として測定した。腎炎検体は、健常者の測定平均値 + 2SD をカットオフ値として、80%以上が陽性を示した。この結果から、NC1はグッドパスチャー症候群のみの抗原ではなく、腎炎に共通な抗原である可能性を得た。

【0048】

次に、各疾患別に抗NC1抗体の検出を前記と同様に測定した。図2は、疾患別抗NC1抗体の一覧を示す図である。慢性腎炎の成り立ちは、通常、徐々に、年単位から十年以上の単位でゆっくりと悪化するが、この慢性腎炎と同様に通常ゆっくりとした進行をする二次性腎症である糖尿病性腎症他でも抗NC1抗体が検出され、診断名と抗NC1抗体値との関係が特に見られなかった (図2)。このことから、腎炎には共通な抗原部位が存在すると考えた。

30

【0049】

さらに、ウシ腎由来IV型コラーゲン三本鎖らせん構造を持つ三本鎖領域 (7Sと中央螺旋部 (TH)、以下三本鎖) を精製し、NC1に置き換えて抗原に用いて、抗三本鎖抗体を測定した。図3は、同一腎炎患者での抗三本鎖抗体と抗NC1抗体の相関を示す図である。抗NC1抗体と抗三本鎖抗体との相関は90%以上を示した。NC1と三本鎖とが全く異なる構造とアミノ酸配列を持ちながら腎炎に対して同じ様に免疫反応したことから、同一のアルファ鎖なら抗原は三本鎖を構成する7Sでも中央螺旋域 (TH) でもよいことを示した (図3)。

40

【0050】

2. 単離した慢性腎炎由来生体試料 (以下、生体試料) を検出抗体として、IV型コラーゲンより、反応する抗原部位を見出す方法

検出抗体である生体試料として、尿を直接用いたが、腎炎からの試料である血清や腎臓 (腎臓の抽出物や培養物なども用い得る) でもよく、さらに調整した免疫グロブリンでもよい。また、生体試料には、ヒト腎炎由来のみならず、動物腎炎由来 (別冊・医学のあゆみ、腎疾患state of arts 2003-2005 医歯薬出版社) も用いることもできる。反応する抗原のペプチド作製は、一次配列の合成ペプチドで示したが、キメラ型ペプチドでも、リコ

50

ンビナントでも、その他の方法でも構わない。アミノ酸配列は、アルファ5鎖のNC1を用いたが、他のアルファ鎖のNC1でも構わず、生体試料と反応すればよい。また、アミノ酸配列は三本鎖（7S及び／または中央螺旋域）ならアルファ5鎖が好ましいが、生体試料と反応するなら他のアルファ鎖由来でもよい。抗原のペプチドの長さは、費用と効率の点から、アミノ酸3個以上35個以下が好ましく、抗体の作製の容易さも考慮して、最も好ましいのは、10個から20個である。なお、本検索方法と結果は、アルファ5鎖に限定されず、I V型コラーゲン全アルファ鎖の検索及び検索の結果にあてはまるものである。

【0051】

I V型コラーゲンNC1を用いた生体試料の選定をELISA法で測定した。ウシ腎糸球体由来のNC1 100 μ l/well (10 μ g/mL) をコートした96穴マイクロプレートに、PBS (pH7.4) で4倍希釈した生体試料（本実施例では尿）を入れ、23℃で（以下同じ温度）2時間インキュベーション後PBSで洗浄し、酵素（HRP）標識抗ヒトIgG抗体液を加え、1時間インキュベーション後洗浄し、基質液（TMB）を加え、5～30分の一定時間後（ここでは10分）に反応停止液（1N硫酸液）を加え、直ちに450nmで吸光度（OD）を測定した。

【0052】

図4は、慢性腎炎TD38と糖尿病性腎炎TD42と健常者（TD31～37、TD39～41）の測定比較データ（抗NC1抗体）を示す図である。本実験尿中の抗NC1-IgG抗体を測定し、酵素標識抗ヒトIgG抗体（ヒトHRP326）4000倍、反応60分で行なった。図中、カットオフ値はOD. 0.443（健常者/n=10；平均0.255+2SD. 0.188）で、慢性腎炎（以下A）1.008、糖尿病性腎症（以下B）2.696である。この結果、抗NC1抗体が高値で選ばれた尿をそのまま「単離した腎炎由来生体試料（生体試料）」として使用でき、一部は小分けして冷凍保存した。

【0053】

単離した腎炎由来生体試料（生体試料）の調製

酸性尿では、抗体は劣化するため、冷凍保存した尿試料を沈殿物と共に均一分散するように18℃下で1夜揺すりながら解凍した。次に正確にPBSで4倍量とし、18℃下で24時間揺すりながら均一分散液とした。これを約3000Gで5分間遠心し、沈殿を除いた。上清液量を計り、凍結乾燥機で乾燥させ、最初に計測した量の滅菌済みPBS (pH7.4) を加えて、容器を濯いで、PBSを回収した。この操作を4回～5回繰り返すことで、pH中性に置換し安定した「生体試料」が得られた。ついで、再度、抗NC1抗体値を計り、測定OD値を1mLの力価とした。PBSに代えて生理食塩水や注射用蒸留水を用いてもよいが、力価が落ちない様に、滅菌、除菌などの他の操作も加えて、つまり生物由来製剤を扱う当該製剤業者が払うべき注意を払って、注射剤あるいは内服剤に作製することができる。また、腎炎モデルの惹起原にも用いることができる。さらに、「生体試料」としては、抗原NC1を取り付けたアフィニティークラムで精製をしたものや硫酸沈殿などで得た抗体を、再度、希釈して濃度を合わせてもよく、血清や腎臓から、抗体の免疫グロブリンを精製してもよい。特に、腎炎患者自身から得た生体試料の自己投与は、親和性がよいので注射剤としても異常免疫反応は起き難い。また、経口投与剤も経口免疫寛容から好ましい。

【0054】

また、動物由来の生体試料を用いてもよい。惹起原としては、アルファ5鎖のNC1が特に好ましい。腎糸球体由来のNC1で惹起した腎炎モデルでは急性腎炎の一種なので、その抗NC1抗体の多くは、急性腎炎のグッドパスチャー症候群の自己抗体に近いので、ヒト慢性腎炎の「単離した腎炎由来生体試料」と比較しながら進めることが好ましい。動物の糖尿病モデルや高血圧モデル由来の生体試料を用いることも可能であるが、前記と同様に、ヒト慢性腎炎の「単離した腎炎由来生体試料」と比較しながら進めることが好ましい。

【0055】

単離した腎炎由来生体試料（生体試料）を用いたI V型コラーゲンNC 1様免疫活性ペプチドの選出方法

公表アミノ酸配列は複数あるが、本発明者はニノミヤらの文献（pp235-260 In Extracellular matrix-cellular interaction: Molecules to diseases, ed by Ninomiya Y et al, Japan Sci Press, Tokyo/S Karger, Basel, 1998.）記載の提示配列に従った（図5）。アルファ鎖1本のNC 1のアミノ酸残基数は約230である。アルファ鎖は6本であるから、NC 1なら総計1380アミノ酸残基を調べればよい。

【0056】

予備試験

前記ELISA法で、コート抗原のNC 1を合成ペプチドで置き換え、予備試験を行った。測定条件は、抗原濃度：10 μ g/mL（10mM PBS）を100 μ L/well、ブロッキング剤：ブロックエース（大日本製薬製）25%希釈を250 μ L/well、尿：ヒト 20~100倍希釈、第二抗体（酵素標識抗ヒトIgG抗体）： \times 800、基質液：TMB（+）（DAKO社製）とした。検体の希釈は、抗原をNC 1とした当初の4倍希釈と異なり、20~100倍希釈と希薄とした。結果は、検体A（慢性腎炎）、B（糖尿病性腎症）共に、抗原ペプチド301（アルファ3鎖NC 1上のN端から連続した20アミノ酸残基）より抗原501（アルファ5鎖NC 1上のN端から連続した20アミノ酸残基）の方が免疫反応を強く示した。そこで、アルファ5鎖のNC 1で本試験を行った。なお、301は、パソコンソフトが指定したグッドパスチャー症候群のアルファ3鎖上のN端5-18位のアミノ酸配列を含んでいた。また、301のように、アルファ5鎖以外についても同様に調べることができた。さらに、301と501のどちらも、健常者尿に比べ腎炎尿では明らかに抗体値が高く充分識別できるので、腎炎検出試薬として利用できた。

【0057】

アルファ5鎖NC 1上の抗原部位のスクリーニング

前記ELISA法を用い、コート抗原のNC 1を合成ペプチドで置き換え、他の測定条件は全く同一で実験した。図6は、慢性腎炎No 38、糖尿病性腎炎No 42、IgA腎症と健常者No 31, 32, 33とのNC 1様抗原性の比較を示す図である。

【0058】

アルファ5鎖のペプチドは、次のように作製した。アルファ5鎖NC 1をN端から20アミノ酸残基単位で、5アミノ酸残基を重ねながらアルファ5鎖NC 1の全域を20アミノ酸残基単位で15種類の合成ペプチドとした（以下、yp01~yp15と呼び（図6ではH4NA5-1~5-15）、yp15は20個のアミノ酸を超えたものを入れた）。その結果、検体A（慢性腎炎：No 38）がyp05, 08, 13, 10, 12と強く反応し、検体B（糖尿病性腎症：No 42）がyp10, 13, 08, 05, 12と強く反応し、IgA腎症がyp08, 05, 10, 13, 12と強く反応し、高値のペプチド群が一致したので、この5種類のペプチドは病因の異なる検体A、検体BおよびIgA腎症の共通の抗原部位であった。前述したように腎炎尿に対して、ウシ糸球体由来のNC 1と三本鎖の反応性はほぼ同じで、どちらも腎炎の共通の抗原と考えられるので、アルファ5鎖三本鎖（7Sまたは/及び中央螺旋域）及びそのペプチドも免疫反応性ペプチド候補としてよい。なお、アルファ5鎖全体も抗原として用いることができるが手間を要する。

【0059】

以上のように、「生体試料」はNC 1様免疫活性ペプチドをスクリーニングするのに有効なリガンドであり、見出だされたペプチドもその抗体も、同様に対応する抗体あるいは抗原ペプチド検出のリガンドとして利用できた。特に、免疫活性ペプチドより作製した抗体は、モノクローナル抗体でも、ポリクローナル抗体でも、「生体試料」に代わり、新たな免疫活性ペプチドの検出に有用であった。アルファ5鎖上から見出だされたペプチドは、いずれも、腎炎尿と健常者との反応差が大きく（図6）、腎炎検出の試薬キットに使用できた。本発明の免疫活性ペプチドは「生体試料」に対し、I V型コラーゲン様免疫反応

性を有することであり、アルファ5鎖由来に限定されない。

【0060】

3. 新規のアルファ5鎖NC1様免疫活性ペプチドのスクリーニング方法

候補免疫活性ペプチドのスクリーニングには、前記アルファ5鎖NC1由来の合成ペプチドに置き換えて候補免疫活性ペプチドを使用した。生体試料に置き換えて抗アルファ5鎖NC1抗体でもよく、抗アルファ5鎖NC1由来ペプチド抗体でもよい。その場合、標識抗体は、抗体の由来動物に合わせた。

【0061】

候補免疫活性ペプチドに用いるペプチドは、アルファ5鎖NC1由来の提示ペプチドと同等以上の免疫反応性ペプチドである限り、どのような配列でもよく、I V型コラーゲンに限定されない。また、提示ペプチドを短くしても、追加しても、改変しても、置換しても、修飾しても、合体させたアミノ酸配列でもよい。例えばyp12とyp13の合体である。提示ペプチドの一部を変更するには、簡単には動物由来の配列を用いてもよい。また、アルファ5鎖NC1のアミノ酸配列の一部を用いたペプチドで、生体より抽出精製したNC1より免疫反応性を有するものならいずれのアミノ酸配列も利用できた。

【0062】

本発明は、三本鎖（7S及び/または中央螺旋域）を含めてアルファ5鎖のアミノ酸配列全てに当てはまる。好ましくは、全域アルファ5鎖に対するよりも小さい領域、三本鎖様やNC1様免疫反応性の優れたペプチドで、より好ましくは、より短いペプチドでより免疫反応性を示すペプチドであり、費用と効果から、ペプチドの長さは3個以上35個以下が好ましく、その選定方法は、既に示したELISA法で行い得るがこれに限定されない。

【0063】

以上は、他のアルファ鎖にも同様に適用できるので、生体試料の代わりに、各種の抗体を、例えば、NC1、7S、中央螺旋域などの各領域、各アルファ鎖、I V型コラーゲン由来の各ペプチド等々に対する抗体を用いてもよい。生体試料以外の動物種の場合は、前述のヒト用試薬成分を動物種に合わせた。また、他のアルファ鎖に適用するには、単離した腎炎由来生体試料との反応性をあらかじめ、確認しておくことが好ましい。

【0064】

免疫反応としては、酵素免疫反応に限定されず、AB法、RIA、免疫発光法、沈降反応、凝集反応他を含み、酵素標識抗体としては、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を問わず、またそれを放射性物質、発光物質で標識した物、無標識物でもよい。反応形式は、サンドイッチ法に囚われず、競合法等でもよい。プレートに替え、ガラス、磁性物質、ラテックスにしてもよく、無しにして固相法を用いないことでもよい。

【0065】

プレートにペプチドをコートする時、コート物質をアビジン、ビオチン、またはこれらの結合した成分を介してもよい。プレートにコートするペプチドは、複数種を混合してもよく、後で選ばれた混合ペプチド検体を構成ペプチドに別けて選んでもよい。ペプチドは合成のみで無く、他の分野で利用されている方法ならいずれでも当業者に可能である。更に第二抗体は、抗検体IgG抗体に限定されず、抗検体IgM抗体、抗検体IgA抗体、抗検体イムノグロブリン抗体でもよいが、抗検体IgG抗体が好ましい。

【0066】

4. 免疫活性ペプチドを惹起原とした腎炎モデルの作製

選出されたペプチドは、単独及び/または複数で腎炎の惹起原に用いることができる。ペプチドにはyp08、yp12を、動物にはウサギとモルモットを示すが、ペプチド、動物及び投与方法共に、これに限定されない。

【0067】

ウサギ（雌）にペプチド0.3mg/mL（初回のみ0.15mg）を同量のFCAと共に、2週間に1回で計4回皮内に投与した。yp08は尿蛋白（#2；+2）とyp12は尿蛋白（#1；+2）と、いずれも陽性を示した。

10

20

30

40

50

【0068】

また、血清の抗体値は、マイクロプレートにペプチド y p 1 2 (10 u g / m L) をコートした E L I S A 法で初回投与7週間後に、32、000倍希釈で吸光度計の測定上限近辺の3.00に至った。

【0069】

E L I S A 抗体価； y p 0 8 (# 2 × 8, 0 0 0 ; A 4 5 0 n m / 3. 0 0)
y p 1 2 (# 1 × 3 2, 0 0 0 ; A 4 5 0 n m / 3. 0 0)

【0070】

モルモット(雌)にペプチド0.1mg/mLを同量のFCAと共に、2週間に1回で計4回皮内に投与した。y p 1 2では尿蛋白(#1; +1, #2; ±, #3; ±)と、い
ずれも弱い陽性を示した。このことは、ヒトの腎炎がゆっくり進行するので、ふさわしい
モデルであることを示した。 10

【0071】

また、モルモット血清の抗体値は、マイクロプレートにペプチド y p 1 2 (10 u g / m L) をコートした E L I S A 法で初回投与7週間後に、8、000倍希釈で吸光度計の測定上限近辺の3.00に至った。さらに、これらの抗免疫活性ペプチド抗体(抗血清)のラットやマウスの腹腔内への投与は、従来の抗NC1抗体(抗血清)の投与と異なり弱く、ヒトに近い緩徐な腎炎モデルを可能にした。

【0072】

5. 免疫活性ペプチドによる腎炎の抑制 20

水に溶かした y p 1 2 を、モルモット2匹を購入後1週間の馴化期間に、総量5~10mg与えた。その後、腎炎の惹起を前述のように行った。尿蛋白は見られず(#1; -, #2; -)、腎炎尿を呈しなかった。

【0073】

免疫活性ペプチドの経口投与は、腎炎のワクチンや治療薬を示している。免疫活性ペプチドやその抗体は経口投与剤や脱感作療法に使用でき、注射剤にも使用できた。類似の先例は特開2000-214163号公報に見られるが、本発明はペプチドをより特定することで、効果を高めるものである。

【0074】

6. 免疫活性ペプチドに対する抗体を用いたE L I S A キット 30

E L I S A 法は、抗原あるいは抗体検出の通常の測定方法であり、測定手順には大きな差は無いので、ここでは、先の抗体の組み合わせ例を示した。

【0075】

サンドイッチE L I S A 法での「抗原NC1」の測定で、「抗NC1モノクローナル抗体と抗NC1抗体(モルモット)」の代わりに、前記に示した「抗 y p 1 2 抗体(ウサギ)と抗 y p 1 2 抗体(モルモット)」及び「抗NC1モノクローナル抗体と抗 y p 1 2 抗体または抗 y p 0 8 抗体」の組み合わせで、いずれもNC1の測定が可能で、尿を検体として腎炎初期の検出に使用できた。測定範囲は、例えば、「抗NC1モノクローナル抗体(PCT/JP2005/002669)と抗NC1抗体(モルモット)」で抗NC1モノクローナル抗体(2 u g / m L)をマイクロプレートにコートし、抗NC1抗体(モルモット)(I g G A P - B i o t i n 0. 9 5 m g / m L)をAB法(A v i d i o n - H R P × 4, 0 0 0)にした時、NC1を50 n g / m L から1 n g / m L まで微量測定が可能で、用途としての腎炎、特に糖尿病性腎炎の初期で尿から検出できた。進行した尿では抗原が検出出来ないで、病気の早期の診断薬となる。その場合、y p 0 8 や y p 1 2 の抗原固相化プレートで対応する抗体(抗NC1抗体も含め)を腎炎からの試料を検体として検出した。また、「抗 y p 1 2 抗体(ウサギ)と抗 y p 1 2 抗体(モルモット)」及び「抗NC1モノクローナル抗体と抗 y p 1 2 抗体または抗 y p 0 8 抗体」の組合せは、y p 1 2 または y p 0 8 の測定ができるので、研究試薬として利用できた。 40

【0076】

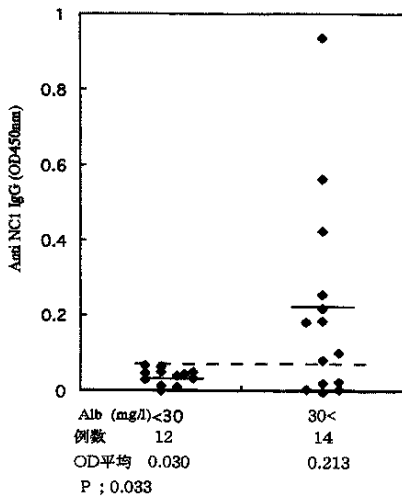
アルファ5鎖NC1で用いたのと同様な手法で、三本鎖(7S及びまたは中央螺旋域) 50

由来の免疫活性ペプチドを選出し、選出した免疫活性ペプチドに対する抗体を用いても、三本鎖（7 S 及びまたは中央螺旋域）及び／またはその免疫活性ペプチドの測定が可能である。

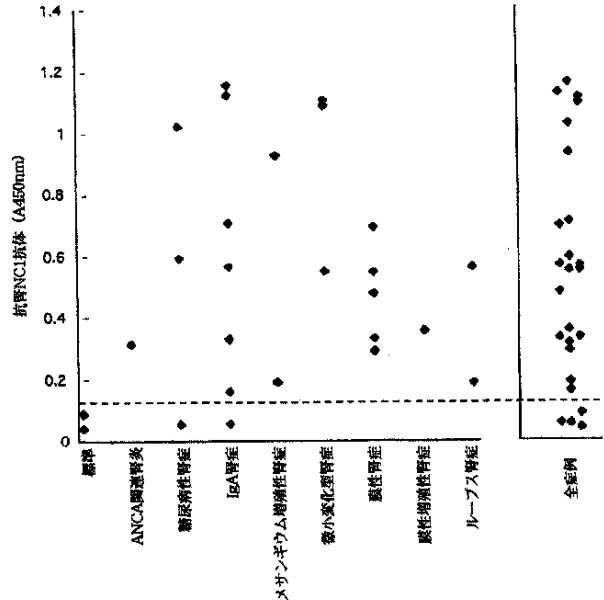
【0077】

単離した腎炎由来生体試料を用いることで、I V型コラーゲン様免疫活性ペプチドを選出することができた。また、選出したI V型コラーゲン様免疫活性ペプチドは、I V型コラーゲンの代用となり、腎炎の診断薬、腎炎治療薬、腎炎治療具、生体試料からの抗体除去や抗体採取に、また、抗I V型コラーゲン様免疫活性ペプチド抗体は、腎炎の診断薬、治療薬、腎炎治療具、生体試料からの抗原除去や抗原採取に役立った。

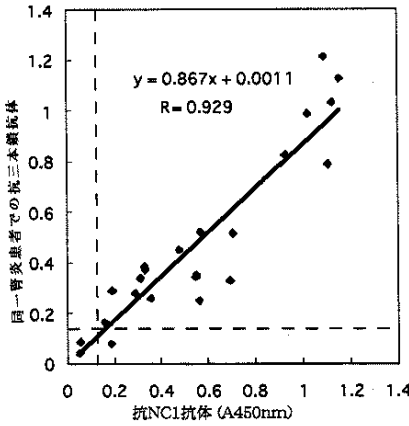
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

	実数	実数	増Ava.	標準偏差	CV
<標準>					
S0	0.078	0.072	0.075	0.004	6.657
S2	0.280	0.232	0.241	0.013	5.281
S3	0.381	0.383	0.382	0.001	0.170
S4	0.689	0.682	0.681	0.040	6.102
S5	1.142	1.083	1.118	0.035	3.101
S6	2.012	2.087	2.040	0.038	1.907
<コントロール>					
D2	0.539	0.561	0.550	0.018	2.828
Y	0.546	0.520	0.533	0.018	3.449
<QB&標準>					
O(+2)	2.745	2.856	2.701	0.063	2.330
D(+2)	0.853	0.785	0.819	0.048	6.871
E(-)(+2)	0.206	0.199	0.203	0.005	2.444
TD&					
TD31	0.218	0.187	0.192	0.035	18.093
TD32	0.218	0.220	0.229	0.001	0.322
TD33	0.198	0.198	0.198	0.000	0.000
TD34	0.255	0.248	0.252	0.005	1.868
TD35	0.314	0.324	0.318	0.007	2.217
TD36	0.319	0.278	0.298	0.030	10.220
TD37	0.401	0.380	0.391	0.018	3.803
TD38	1.059	0.857	1.008	0.072	7.155
TD39	0.139	0.138	0.138	0.000	0.000
TD40	0.149	0.137	0.143	0.008	5.934
TD41	0.408	0.383	0.401	0.011	2.848
TD42	2.728	2.864	2.890	0.045	1.679

【図5】

ヒトIV α3 NC1

PATWTRGFVFRHSQTTAIPSCPEGTVPVLYSGFSFLVQGNQRAHQDGLTGLS
 CLQRFTTMPFLFCNVNDVCFASRNDYSYWLSTPALMPMNMAPITGRALEPYISR
 CTVCEGPAIAIAVHSQTTDIPPCPHGWISLWKGFSFIMFTSAGSEGTGQALASPGS
 CLEEFRAFPFLECHGRGTGNYSYSFWLASLNPERMFRKPIPTVKAGELEKIS
 RCQVCMKKRH

ヒトIV α4 NC1

GPYGLGGFLLVLSQTDQEPCTPLGMPRLWTGYSLLYEGQKAHNQDLGLAGS
 CLPVFSTLPFAYCNHIVQVCHYAQRNDRSYWLASAAPLPMPLSEEAIRPYVSRCA
 VCEAPAVAVVHSQDQSIPPCPTWRSLWIGYSFLMHTGAGDQGGQALMSPG
 SCLEDFRAAPFLECGRGTCHFFANKYSFWLTTVKADLQFSSAPADTLKESQ
 AQRQKISRCQVCVKYS

ヒトIV α5 NC1

GTSSVAHGFLTRHSQTTDAPQCQGLTVYEGFSLLYVQGNKRAHQDGLGTAG
 SCLRRFSTMPFMCNINNVCFASRNDYSYWLSTPEPMPMSQPLKQSIQPFISR
 CAVCEAPAVVAVHSQTIQHPQGWDSLWIGYSFMMHTSAGAEGSQALASP
 GSCLEEFRAFPFLECHGRGTGNYSYSFWLATVDVSDMFSPKQSETLKAGDLR
 TRSRQCVMKRT

ヒトIV α6 NC1

GQSMRVGYLVKHSQSEVPPCPIGMSQLVWVGYSLFVVEGQKAHNQDLGFAGS
 CLPRFSTMPFYCNINEVCHYARRNDKSYWLSTAPIMMPVSTQIPQYISRCSVC
 EAFSQIAVHSQDITPQCLGWRSLWIGYSFLMHTAAGAEGGQSLVSPGSCLE
 DFRAFPFIECSGARGTCHYFANKYSFWLTTVEERQFQFELPVSETLKAGQLHTRV
 SRCQVCMSL

【図6】

TD& 31	Abs.	Average	TD& 32	Abs.	Average
H4NA5-1	0.030	0.061	0.050	0.042	0.079
H4NA5-2	0.083	0.061	0.087	0.046	0.068
H4NA5-3	0.093	0.098	0.078	0.074	0.071
H4NA5-4	0.098	0.090	0.094	0.074	0.087
H4NA5-5	0.112	0.090	0.101	0.142	0.133
H4NA5-6	0.065	0.100	0.083	0.082	0.102
H4NA5-7	0.141	0.077	0.108	0.114	0.088
H4NA5-8	0.164	0.117	0.141	0.140	0.164
H4NA5-9	0.216	0.083	0.146	0.073	0.085
H4NA5-10	0.098	0.488	0.074	0.111	0.088
H4NA5-11	0.329	0.078	0.304	0.123	0.061
H4NA5-12	0.287	0.058	0.170	0.078	0.100
H4NA5-13	0.077	0.084	0.071	0.128	0.091
H4NA5-14	0.180	0.087	0.109	0.100	0.072
H4NA5-15	0.090	0.054	0.057	0.088	0.103
H4NA3-1	0.141	0.063	0.102	0.181	0.157
TD& 33					
H4NA5-1	0.347	0.178	0.380	0.438	0.278
H4NA5-2	0.287	0.251	0.254	0.287	0.281
H4NA5-3	0.294	0.388	0.238	0.284	0.358
H4NA5-4	0.255	0.217	0.238	0.465	0.858
H4NA5-5	0.042	0.035	0.038	1.703	1.823
H4NA5-6	0.255	0.190	0.223	0.283	0.280
H4NA5-7	0.258	0.193	0.225	0.398	0.410
H4NA5-8	0.511	0.519	0.595	0.278	2.083
H4NA5-9	0.188	0.232	0.200	0.188	0.281
H4NA5-10	0.437	0.402	0.420	2.028	2.187
H4NA5-11	0.178	0.188	0.188	0.272	0.298
H4NA5-12	0.355	0.370	0.368	0.948	1.011
H4NA5-13	0.467	0.384	0.421	2.423	1.795
H4NA5-14	0.200	0.142	0.171	0.282	0.228
H4NA5-15	0.305	0.388	0.337	0.447	0.484
H4NA3-1	0.260	0.313	0.302	0.430	0.384
IgA					
H4NA5-1	0.407	0.342	0.408	0.360	0.360
H4NA5-2	0.380	0.387	0.388	0.393	0.397
H4NA5-3	0.593	0.400	0.507	0.519	0.508
H4NA5-4	2.347	2.284	2.296	2.347	2.284
H4NA5-5	0.308	0.244	0.278	0.308	0.244
H4NA5-6	0.870	0.803	0.807	0.870	0.803
H4NA5-7	2.794	2.798	2.788	0.243	0.475
H4NA5-8	0.243	0.475	0.418	2.250	2.272
H4NA5-9	0.651	0.388	0.480	1.825	1.858
H4NA5-10	1.825	1.867	1.858	2.105	2.114
H4NA5-11	2.105	2.114	2.110	0.279	0.284
H4NA5-12	0.488	0.494	0.481	0.488	0.494
H4NA5-13	0.488	0.494	0.481	0.488	0.494
H4NA5-14	0.488	0.494	0.481	0.488	0.494
H4NA5-15	0.488	0.494	0.481	0.488	0.494

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2007/061779
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K14/78(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K14/78, A61K39/00, A61K39/395, A61P13/12, A61P37/02, C07K16/18, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN), REGISTRY (STN), JSTPlus (JDream2), BIOSIS/WPI (DIALOG)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2002-302457 A (Tsukao YOKOYAMA), 18 October, 2002 (18.10.02), Full text (Family: none)	1-18
X	Tsukao YOKOYAMA et al., "Nyo to Kessei ni Okeru NC1 (Type IV Collagen NC1 Ryoiki) to Ko NC1 Kotai no Sokutei", The Cell, 2003, Vol.35, No.4, p.150-4	1-18
X	WO 2005/082940 A1 (Tsukao YOKOYAMA), 09 September, 2005 (09.09.05), Full text & EP 1712564 A1	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 June, 2007 (28.06.07)		Date of mailing of the international search report 10 July, 2007 (10.07.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/061779

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Tsukao YOKOYAMA et al., "Type IV Collagen NC1 Ryoiki NC1 Ryoiki (NC1) ni Taisuru Monoclonal Kotai (12D) no Tokusei", The Journal of Medicine, 2005, Vol.53, No.3, p.335-41	1-18
X Y	Dehan P. et al., Identification of post-transplant anti-alpha 5 (IV) collagen alloantibodies in X-linked Alport syndrome, Nephrol. Dial. Transplant., 1996, Vol.11, No.10, p.1983-8	1-8, $\frac{9}{10}$ -18
Y	Satoshi HINO, "IV Collagen α 5-sa no Seijo Soshiki Bunpu to Alport Shokogun de no Ijo", Medical Journal of Kinki University, 1995, Vol.20, No.1, p.59-69	1-18
E,X	Tsukao YOKOYAMA et al., "Jin'ennyo wa Type IV Collagen α 5-sa NC1 Jo no Doitsu peptide Hairetsu o Ninshiki suru", The Journal of Medicine, 2007 May, Vol.57, No.5, p.605-13	1-18
A	JP 2000-214163 A (Tsukao YOKOYAMA), 04 August, 2000 (04.08.00), Full text (Family: none)	1-18
A	Tsukao YOKOYAMA et al., "Shikyutai Jin'en no Futatsu no Shihyo", The Journal of Medicine, 2004, Vol.51, No.4, p.567-72	1-18
A	Tsukao YOKOYAMA et al., "Ko type IV Collagen NC1 Ryoiki (NC1) Kotai wa Hiroi Han'i no Jin'ennyo Chu ni Kenshutsu Sareru", The Journal of Medicine, 2005, Vol.53, No.3, p.343-6	1-18
A	Tsukao YOKOYAMA et al., "Type IV Collagen no NC1 Ryoiki (K35) ni yori Yu-do sareru Jin'en Model", The Cell, 2002, Vol.34, No.4, p.182-5	1-18
A	JP 08-100000 A (Morinaga & Co., Ltd.), 16 April, 1996 (16.04.96), Full text & EP 0704458 A3 & US 5741652 A1	1-18
A	JP 2002-173446 A (Tsukao YOKOYAMA), 21 June, 2002 (21.06.02), Full text (Family: none)	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/061779

Claim 1 includes any "peptide" having a property of "immunologically reacting with a chronic nephritis-derived biological sample". However, what is disclosed in the description within the meaning of PCT Article 5 is only a small part thereof, and claim 1 lacks support within the meaning of PCT Article 6.

Further, with regard to the "collagen type IV-like immunoreactive peptide characterized in that it immunologically reacts with an isolated chronic nephritis-derived biological sample", the scope of the peptide having such a property cannot be specified even if the technical knowledge at the time of filing is considered. Therefore, claim 1 also lacks the requirement of clarity within the meaning of PCT Article 6.

Thus, a search was made only for "yp5" peptide, "yp8" peptide, "yp10" peptide, "yp12" peptide, and "yp13" peptide, which are part of NC1 domain of type IV collagen alpha 5 chain specifically described in the description.

The same shall apply to claims 2 to 18.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 6 1 7 7 9	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K14/78(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K14/78, A61K39/00, A61K39/395, A61P13/12, A61P37/02, C07K16/18, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA(STN), REGISTRY(STN), JSTPlus(JDream2), BIOSIS/WPI(DIALOG)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X	JP 2002-302457 A (横山司甫) 2002.10.18, 全文 (ファミリーなし)	1-18	
X	横山司甫 他, 尿と血清に於ける NC1 (タイプ IV コラーゲン NC1 領域) と抗 NC1 抗体の測定, 細胞, 2003, Vol.35, No.4, p.150-4	1-18	
X	WO 2005/082940 A1 (横山司甫) 2005.09.09, 全文 & EP 1712564 A1	1-18	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献	
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献	
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 28.06.2007		国際調査報告の発送日 10.07.2007	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 松田 芳子	4N 3126
		電話番号 03-3581-1101	内線 3488

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 6 1 7 7 9
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	横山司甫 他, タイプ IV コラーゲン NC1 領域 NC1 領域 (NC1) に対するモノクローナル抗体 (12D) の特性, 医学と薬学, 2005, Vol. 53, No. 3, p. 335-41	1-18
<u>X</u> Y	Dehan P. et al., Identification of post-transplant anti-alpha 5 (IV) collagen alloantibodies in X-linked Alport syndrome, Nephrol. Dial. Transplant., 1996, Vol. 11, No. 10, p. 1983-8	<u>9</u> 1-8, 10-18
Y	日野聡, IV コラーゲン α 5 鎖の正常組織分布とアルポート症候群での異常, 近畿大医誌, 1995, Vol. 20, No. 1, p. 59-69	1-18
P X	横山司甫 他, 腎炎尿はタイプ IV コラーゲン α 5 鎖 NC1 上の同一ペプチド配列を認識する, 医学と薬学, 2007 May, Vol. 57, No. 5, p. 605-13	1-18
A	JP 2000-214163 A (横山司甫) 2000. 08. 04, 全文 (ファミリーなし)	1-18
A	横山司甫 他, 糸球体腎炎の二つの指標, 医学と薬学, 2004, Vol. 51, No. 4, p. 567-72	1-18
A	横山司甫 他, 抗タイプ IV コラーゲン NC1 領域 (NC1) 抗体は広い範囲の腎炎尿中に検出される, 医学と薬学, 2005, Vol. 53, No. 3, p. 343-6	1-18
A	横山司甫 他, タイプ IV コラーゲンの NC1 領域 (K35) により誘導される腎炎モデル, 細胞, 2002, Vol. 34, No. 4, p. 182-5	1-18
A	JP 08-100000 A (森永製菓株式会社) 1996. 04. 16, 全文 & EP 0704458 A3 & US 5741652 A1	1-18
A	JP 2002-173446 A (横山司甫) 2002. 06. 21, 全文 (ファミリーなし)	1-18

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2007/061779

請求の範囲1は、「慢性腎炎由来生体試料と免疫反応する」という性質を有する、あらゆる「ペプチド」を包含するものであるが、PCT第5条の意味において明細書に開示されているのは、ごくわずかな部分に過ぎず、PCT第6条の意味での裏付けを欠いている。

また、「単離した慢性腎炎由来生体試料と免疫反応することを特徴とするIV型コラーゲン様免疫活性ペプチド」は、出願時の技術常識を勘案しても、そのような性質を有するものの範囲を特定できないから、請求の範囲1は、PCT第6条の意味における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、明細書に具体的に記載されている、IV型コラーゲン α 5鎖のNC1領域の一部である、「yp5」ペプチド、「yp8」ペプチド、「yp10」ペプチド、「yp12」ペプチド、および、「yp13」ペプチドについてのみ行った。

請求の範囲2-18についても同様である。

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(注) この公表は、国際事務局（W I P O）により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願（日本語実用新案登録出願）の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	IV型胶原蛋白样免疫活性肽		
公开(公告)号	JPWO2007145192A1	公开(公告)日	2009-10-29
申请号	JP2008521201	申请日	2007-06-12
[标]申请(专利权)人(译)	横山 司甫		
申请(专利权)人(译)	横山 司甫		
[标]发明人	横山司甫		
发明人	横山 司甫		
IPC分类号	C07K14/78 C07K16/18 A61K39/00 A61P13/12 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/0008 A61P13/12 C07K16/18 G01N33/6854 G01N33/6887 G01N33/6893 G01N2333/78 G01N2500/00 G01N2800/347		
FI分类号	C07K14/78.ZNA C07K16/18 A61K39/00.H A61P13/12 G01N33/53.N		
F-TERM分类号	4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/CC23 4C085/CC32 4C085/GG08 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA31 4H045/FA71		
优先权	2006187186 2006-06-12 JP 2007137856 2007-05-24 JP		
其他公开文献	JP5156997B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

IV型胶原样免疫反应性肽及其用于肾炎的抗体，IV型胶原样免疫反应性肽的选择方法，免疫反应性抗体和免疫反应性肽的筛选方法，肾炎模型，慢性肾炎的检测方法，疫苗和提供肾炎药。它是一种IV型胶原样免疫反应性肽，可与源自慢性肾炎的分离的生物样品发生免疫反应。优选地，从1链至6链的任何一条或多条链作为组成性α链，以7S作为组成区域，选自中央螺旋区和NC1中的任何一条或多条，并且作为组成肽的氨基酸数目为3个或更多且35个或更多。以下是具有选自以下的至少一种的IV型胶原样免疫反应性肽：

【図 2】

