

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-286279

(P2010-286279A)

(43) 公開日 平成22年12月24日(2010.12.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	V
GO 1 N 33/564 (2006.01)	GO 1 N 33/564	Z

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2009-138408 (P2009-138408)	(71) 出願人	505314022
(22) 出願日	平成21年6月9日(2009.6.9)		独立行政法人医薬基盤研究所
			大阪府茨木市彩都あさぎ7丁目6番8号
		(71) 出願人	504176911
			国立大学法人大阪大学
			大阪府吹田市山田丘1番1号
		(74) 代理人	100080791
			弁理士 高島 一
		(74) 代理人	100125070
			弁理士 土井 京子
		(74) 代理人	100136629
			弁理士 鎌田 光宜
		(74) 代理人	100121212
			弁理士 田村 弥栄子

最終頁に続く

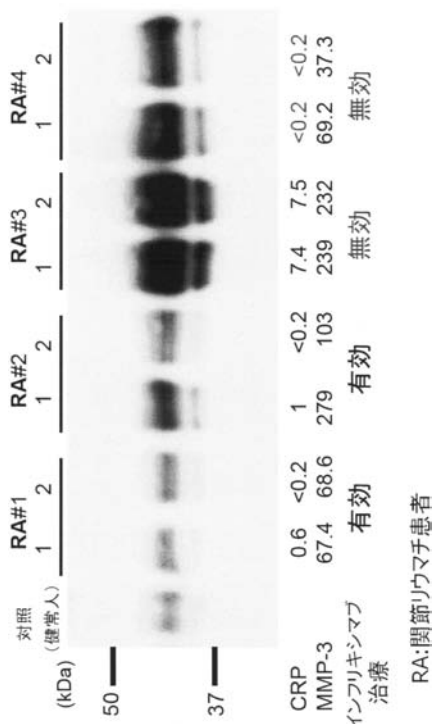
(54) 【発明の名称】 自己免疫疾患検査用バイオマーカー及び検査方法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、自己免疫疾患において、疾患活動性を判断しうる自己免疫疾患検査用バイオマーカー、さらに詳しくは治療薬の有効性を判断しうるバイオマーカーを提供することを課題とし、並びに検査方法を提供することを課題とする。

【解決手段】自己免疫疾患の活動性と相関しうるロイシンリッチα2グリコプロテイン(leucine rich alpha 2 glycoprotein: LRG)が、自己免疫疾患の新規バイオマーカーとなる。さらに、自己免疫疾患患者にTNF-αを阻害する生物学的製剤を投与した場合に、生物学的製剤抵抗性患者ではLRGの発現が有意に高値を示したが、有効な患者ではLRGの発現が抵抗性患者に比べて低かったことから、LRGは自己免疫疾患に対する薬剤投与に伴う疾患活動性の指標マーカーともなりうる。

【選択図】 図3



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ロイシンリッチ $\alpha 2$ グリコプロテインからなる、自己免疫疾患検査用バイオマーカー。

【請求項 2】

自己免疫性疾患が、ベーチェット病、キャッスルマン氏病、クローン病又は関節リウマチである、請求項 1 に記載の自己免疫疾患検査用バイオマーカー。

【請求項 3】

生体から分離した生体検体について、請求項 1 又は 2 に記載のバイオマーカーを検出または定量することを特徴とする自己免疫疾患検査方法。

【請求項 4】

生体検体が血清である、請求項 3 に記載の自己免疫疾患検査方法。

【請求項 5】

バイオマーカーの検出または定量を、免疫学的手法若しくはプロテオーム解析により行う、請求項 3 又は 4 に記載の自己免疫疾患検査方法。

【請求項 6】

生体から分離した生体検体について、請求項 1 又は 2 に記載のバイオマーカーを検出または定量することを特徴とする、自己免疫疾患に対する TNF- α 阻害療法の奏功性の予測方法。

【請求項 7】

抗ロイシンリッチ $\alpha 2$ グリコプロテイン抗体を含む、請求項 3～6 のいずれか 1 に記載の自己免疫疾患検査用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、自己免疫疾患検査用バイオマーカーに関する。より詳しくは、自己免疫疾患において、疾患活動性を判断しうるバイオマーカー、さらに詳しくは治療薬の有効性を判断しうるバイオマーカーに関し、さらに該バイオマーカーを検出又は定量することによる自己免疫疾患の検査方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ベーチェット病、関節リウマチ、クローン病、キャッスルマン氏病などの自己免疫疾患の治療薬として、キメラ型モノクローナル抗体製剤であるインフリキシマブ(Infliximab)や可溶性TNF受容体であるエタネルセプト(Etanercept)などのTNF- α を阻害する生物学的製剤が用いられている。しかし、TNF- α 阻害療法に抵抗性を示す患者が一部存在し、このような患者は他の薬剤の投与やその他の治療方法に切り替える必要がある。

【0003】

上記例示したような自己免疫疾患の炎症マーカーとして、C-reactive protein (CRP)が临床上よく使われている(非特許文献1)。CRPは、炎症に伴って上昇するインターロイキン-6(IL-6)などの炎症性サイトカインによって肝臓で合成される急性期タンパク質のひとつである。急性期タンパク質には、CRPの他に $\alpha 1$ -アシドグリコプロテイン、ハプトグロビン、シアル酸などがあり、血清中のこれらの物質の濃度増加は、炎症性疾患の診断や経過の推移の判定に用いられる。これらの炎症マーカーは、体内に炎症があればその程度に応じて異常値を示すが、炎症性疾患のみならず、炎症マーカーによっては、組織破壊や細胞壊死を伴う悪性腫瘍や、急性心筋梗塞、貧血、溶血、妊娠、外傷など様々な病態で異常値を示すことがあり、各マーカーにより各疾患に対する特異度や感度が異なる場合がある。

【0004】

上述のごとく、CRP値の確認だけでは、自己免疫疾患の疾患活動性を把握できず、例えばCRP値が正常レベルでも疾患活動性を認めたり、CRP値が正常レベルでも炎症を示す患者が存在する。このように、上記マーカーでは、必ずしも正確な疾患活動性を評価しうると

10

20

30

40

50

はいえず、例えば上述したように、TNF- α を阻害する生物学的製剤に対して抵抗性を有する患者の見極めや新たな治療方法の選択において、十分とはいえない。そこで、自己免疫疾患患者について、診断を行い、治療方針を決定するために、より正確に評価できるバイオマーカーが臨床上必要とされている。

【0005】

ロイシンリッチ α 2グリコプロテイン (LRG)、フィブリノーゲンガンマ、C4a及びアルブミン前駆体からなる群から選択される少なくともひとつのタンパク質を含むことを特徴とする腹膜機能マーカーについて報告がある (特許文献1)。LRGは血清タンパク質のひとつで、約50kDaの糖タンパク質であり、好中球から分泌されることが報告されている (非特許文献2)。しかしながら、これらのマーカーと自己免疫疾患との関係については、

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2007-132927号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】臨床検査データブック 2007-2008 (医学書院、2007年03月発行)

【非特許文献2】J Leukoc Biol. 2002 72(3):478-85. 2002

【発明の概要】

20

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、自己免疫疾患において、疾患活動性を判断しうる自己免疫疾患検査用バイオマーカー、さらに詳しくは治療薬の有効性を判断しうるバイオマーカーを提供することを課題とし、並びに検査方法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、プロテオミクス手法を用いて鋭意研究を重ねた結果、自己免疫疾患の活動性と相関しうる新規バイオマーカーとしてロイシンリッチ α 2グリコプロテイン (leucine rich alpha 2 glycoprotein: LRG) を検出した (以下、単に「LRG」ともいう。)。自己免疫疾患患者にTNF- α を阻害する生物学的製剤を投与した場合に、生物学的製剤抵抗性患者ではLRGの発現が有意に高値を示したが、有効な患者ではLRGの発現が抵抗性患者に比べて低かったことから、LRGは自己免疫疾患のバイオマーカー及び薬剤投与に伴う疾患活動性の指標マーカーとなりうることを確認し、本発明を完成した。

30

【0010】

すなわち、本発明は以下よりなる。

1. LRGからなる、自己免疫疾患検査用バイオマーカー。
2. 自己免疫性疾患が、ベーチェット病、キャッスルマン氏病、クローン病又は関節リウマチである、前項1に記載の自己免疫疾患検査用バイオマーカー。
3. 生体から分離した生体検体について、前項1又は2に記載のバイオマーカーを検出または定量することを特徴とする自己免疫疾患検査方法。
4. 生体検体が血清である、前項3に記載の自己免疫疾患検査方法。
5. バイオマーカーの検出または定量を、免疫学的手法若しくはプロテオーム解析により行う、前項3又は4に記載の自己免疫疾患検査方法。
6. 生体から分離した生体検体について、前項1又は2に記載のバイオマーカーを検出または定量することを特徴とする、自己免疫疾患に対するTNF- α 阻害療法の奏功性の予測方法。
7. 抗LRG抗体を含む、前項3～6のいずれか1に記載の自己免疫疾患検査用キット。

40

【発明の効果】

50

【0011】

本発明の新規自己免疫疾患検査用バイオマーカーであるLRGは、自己免疫疾患、とりわけベーチェット病、キャスルマン氏病、クローン病又は関節リウマチの検査用バイオマーカーとなりうる。LRGをバイオマーカーとして検出又は定量することにより、上記自己免疫疾患の検査を行うことができ、疾患活動性を評価することができる。また、生物学的製剤などの自己免疫疾患治療薬を投与したときの治療効果を評価しうるバイオマーカーともなる。具体的には、インフリキシマブ(Infliximab)及び／又はエタネルセプト(Etanercept)などのTNF- α を阻害する生物学的製剤を投与した場合の疾患活動性を、本発明のバイオマーカーにより評価することができる。これにより、上記生物学的製剤の有効性を確認したり、薬剤抵抗性を有する患者を早期に発見することができる。その結果、例えば薬剤投与終了時の判断や投与薬剤や治療方針の変更などに対して、最も効果的な方法を選択することができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】インフリキシマブを投与したベーチェット病患者の血清LRGをウエスタンブロット法により定量した結果を示す図である。(実施例2)

【図2】インフリキシマブを投与したベーチェット病患者の血清LRGをウエスタンブロット法により定量した結果を示す図である。(実施例3)

【図3】インフリキシマブを投与した関節リウマチ患者の血清LRGをウエスタンブロット法により定量した結果を示す図である。(実施例4)

20

【図4】エタネルセプトを投与した関節リウマチ患者の血清LRGをウエスタンブロット法により定量した結果を示す図である。(実施例5)

【図5】インフリキシマブ投与が有効又は無効なクローン病患者の血清LRGをELISA法により定量した結果を示す図である。(実施例6)

【図6】IL-6の刺激の有無による顆粒球におけるLRG量をRT-PCR法により定量した結果を示す図である。(参考例1)

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明においてはLRGが自己免疫疾患検査用バイオマーカーとして用いられる。本発明のバイオマーカーにより検査しうる自己免疫疾患は、好ましくはベーチェット病、キャスルマン氏病、クローン病又は関節リウマチである。ここでLRGとは、上記のごとくロイシンリッチ α 2グリコプロテインで、約50kDaの糖タンパク質であり、健常人血清では約3.0 μ g/mL濃度含まれていることが知られている。またLRGは好中球から分泌されることが報告されている(非特許文献2)。また、LRGは顆粒球で発現することも報告されているが、LRGの発現はIL-6の刺激により誘導されるものではないことが本発明者らにより確認された。一方、自己免疫疾患のマーカーとして汎用されていたCRPは、背景技術の欄で説明したように、炎症に伴って上昇するIL-6などの炎症性サイトカインによって肝臓で合成される急性期タンパク質のひとつであるので、LRGはCRPとは異なるメカニズムにより発現するバイオマーカーといえることができる。即ち、LRGはIL-6の影響を受けにくいことから、より正確な自己免疫疾患検査用バイオマーカーとして機能しうる。例えば、自己免疫疾患治療薬の投与によりIL-6の発現を抑制した場合でも、疾患活動性が抑制されない場合もあるが、このような場合であっても、LRGは薬剤の影響を受けることなく正確なバイオマーカーとなりうる。

30

40

【0014】

本発明に用いられるLRGは哺乳動物由来である。哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類やウサギ等の実験動物、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ等の家畜、イヌ、ネコ等のペット、ヒト、サル、オランウータン、チンパンジーなどの霊長類を挙げることが出来る。哺乳動物は好ましくは霊長類、より好ましくはヒトである。

【0015】

50

本発明の自己免疫疾患検査用バイオマーカーとして、LRGが同定された経緯を以下に示す。本発明者らは、ベーチェット病、キャッスルマン氏病、クローン病又は関節リウマチなどの自己免疫疾患患者からインフォームドコンセントにより得られた血清を、ハイスループットなタンパク質の発現又は定量解析が可能なiTRAQTM試薬（ABI社）及び質量分析計の組み合わせによりプロテオーム解析し、これらの疾患特異的に発現量が異なるタンパク質であるLRGを検出した。さらに、インフリキシマブ又はエタネルセプトなどのTNF- α を阻害する生物学的製剤を投与した場合の疾患活動性と、LRGの発現量との関係について解析した結果、自己免疫疾患、好適にはベーチェット病、キャッスルマン氏病、クローン病又は関節リウマチの患者血清において、上記LRGが有意に高値を示したことが確認された。上記により、LRGはこれらの疾患の検出用バイオマーカー又は疾患活動性の指標マーカーとなりうる。

10

【0016】

本発明において、自己免疫疾患の検査は、被験者より採取した生体検体に含まれるLRGを検出又は定量することによる。本発明の自己免疫疾患検査方法において、生体検体は被験者から採取した血液が挙げられ、好ましくは該血液から分離取得した血清を検査用検体とすることができる。血清の取得方法は特に限定されず、自体公知の方法、例えば血液から臨床検査用検体として取得する血清の分離方法に準じることができる。具体的には、血液検体を静置した後の上清や、遠心分離したときの上清などから取得することができる。また検査用検体は、LRGの検出を容易にするために、予め発現量の高い血清タンパク質、例えばアルブミン、免疫グロブリンG（IgG）、トランスフェリン、免疫グロブリンA（IgA）、ハプトグロビン、 α 1アンチトリプシン、フィブリノゲン、 α 2マクログロブリン、免疫グロブリンM（IgM）、 α 1-アシドグリコプロテイン、補体C3、アポリポタンパク質AI、アポリポタンパク質AII、トランスサイレチンなどを除去するための前処理を行っても良い。

20

【0017】

本発明の検査方法において、LRGの検出又は定量的方法は、LRGタンパク質の検出又は定量が可能な方法であれば良く、特に限定されない。ここで定量とは、LRGタンパク質の量を定量することであり、具体的には免疫学的手法や上述のプロテオーム解析による方法を適用することができる。

【0018】

免疫学的手法としては、例えば、抗LRG抗体を用いてLRGとの抗原抗体反応を利用して測定する方法が挙げられる。固相担体に抗LRG抗体を固着し、検査用検体を固相担体と接触させて検体中のLRGを抗LRG抗体で捕捉し、捕捉したLRGを、標識物質を用いて測定する方法が挙げられる。具体的には、酵素免疫定量法（Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA法）やイムノブロットィング法が挙げられる。また、検査用検体を電気泳動したもののについて、抗LRG抗体によりLRGを検出又は定量するウェスタンブロットィング法により検査することもできる。

30

【0019】

プロテオーム解析による方法では、種々の電気泳動やクロマトグラフィーを組み合わせで分離された少量のタンパク質を断片化してその質量を測定し、得られたデータをゲノム解析から推定されるタンパク質のアミノ酸配列データと比較して同定したり、定量することなどにより行うことができる。

40

【0020】

本発明の自己免疫疾患検査方法において、本発明のバイオマーカーの検出又は定量により、自己免疫疾患の検査を行うことができる。自己免疫疾患の検査には、自己免疫疾患の診断や、治療後の疾患活動性の評価を行うことも含まれる。自己免疫疾患としては、上述したように好ましくはベーチェット病、キャッスルマン氏病、クローン病又は関節リウマチが挙げられる。

【0021】

後述の実施例に示されるように、健常人と比較して自己免疫疾患の患者においてLRG発

50

現量が高い。自己免疫疾患の診断は、LRGの発現量と自己免疫疾患への罹患率との間のこのような正の相関に基づき行われる。

【0022】

例えば、健常人及び対象患者からの生体検体におけるLRGの発現量を定量し、対象患者からの生体検体におけるLRGの発現量を、健常人からの生体検体におけるLRGの発現量と比較する。あるいは、LRGの発現量と自己免疫疾患の罹患の有無との相関図をあらかじめ作成しておき、対象患者におけるLRG発現量をその相関図と比較してもよい。発現量の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行われる。

【0023】

そして、対象患者においてLRGが、健常人に比べて高値で検出若しくは定量された場合には、上記のような自己免疫疾患に罹患している可能性が高いと判断することができる。

10

【0024】

後述の実施例に示されるように、疾患活動性と、LRGの発現量との関係について解析した結果、自己免疫疾患、好ましくはベーチェット病、キャスルマン氏病、クローン病又は関節リウマチの患者血清において、疾患活動性の高い患者は、LRGが有意に高値を示したことが確認された。自己免疫疾患の疾患活動性の評価は、LRG発現レベルと疾患活動性との間のこのような正の相関に基づき行われる。

【0025】

例えば、活動性の高い自己免疫疾患の患者及び、活動性の低い自己免疫疾患の患者から、生体検体を採取し、対象患者から採取された生体検体におけるLRG発現量が活動性の高い自己免疫疾患の患者及び活動性の低い自己免疫疾患のそれと比較される。あるいは、生体検体におけるLRG発現量と自己免疫疾患の疾患活動性との間の相関図をあらかじめ作成しておき、対象患者から採取された生体検体におけるLRG発現量をその相関図と比較してもよい。発現量の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行われる。

20

【0026】

そして、LRG発現量の比較結果より、対象患者のLRG発現量が相対的に高い場合には、自己免疫疾患の疾患活動性が高いと判断することができる。

【0027】

したがって、自己免疫疾患治療薬投与、具体的にはインフリキシマブやエタネルセプトなどのTNF- α を阻害する生物学的製剤などの投与に伴い、患者の血清LRGを定量し、解析することで、自己免疫疾患の疾患活動性を評価することができ、投与した自己免疫疾患治療薬の有効性や、薬剤抵抗性などを客観的に判断することができる。

30

【0028】

ここで、投与した自己免疫疾患治療薬の有効性や、薬剤抵抗性などを客観的に判断するための検査は、自己免疫疾患治療薬の投与前後に採取して得た血清LRGを定量し、各LRG量を比較することにより、行うことができる。

【0029】

具体的には、以下の工程を含む方法による。

1) 自己免疫疾患治療剤の投与前及び投与後に対象患者から生体検体(例、血清)を分離取得し、各検査用検体とする工程;

40

2) 上記1)の検査用検体について、本発明の自己免疫疾患検査方法により検査を行う工程;

3) 上記2)で得られた結果をもとに、自己免疫疾患治療剤の投与前及び投与後の各検査用検体中のLRG量比を算出する工程。

【0030】

更に、後述の実施例に示されるように、自己免疫疾患の患者において、生体検体中のLRG発現量が高いほど、TNF- α 阻害療法に対する抵抗性が高い。このような、LRG発現量とTNF- α 阻害療法に対する抵抗性との間の正の相関に基づき、自己免疫疾患に対するTNF- α 阻害療法の奏功性を予測することが出来る。

【0031】

50

例えば、TNF- α 阻害療法に対して抵抗性があり、該療法が無効な自己免疫疾患の患者（ポジティブコントロール）及び、TNF- α 阻害療法に対して抵抗性がなく、該療法が有効な自己免疫疾患の患者（ネガティブコントロール）から、生体検体を採取し、対象患者から採取された生体検体におけるLRG発現量がポジティブコントロール及びネガティブコントロールのそれと比較される。あるいは、自己免疫疾患患者の生体検体におけるLRG発現量とTNF- α 阻害療法の奏功性との間の相関図をあらかじめ作成しておき、対象患者から採取された生体検体におけるLRG発現量をその相関図と比較してもよい。発現量の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行われる。

【0032】

そして、LRG発現量の比較結果より、対象患者のLRG発現量が相対的に高い場合には、TNF- α 阻害療法に抵抗性であり、該療法の奏功性が低い可能性が高いと判断することができる。

【0033】

ここで、TNF- α 阻害療法とは、TNF- α やその受容体に対する特異的抗体や、可溶性TNF- α 受容体等により、TNF- α とその受容体との結合を阻害することを含む治療法を意味する。

【0034】

本発明は、自己免疫疾患検査用のキット（診断剤）にも及ぶ。本発明の自己免疫疾患検査用キットは、上述の本発明の検査方法（TNF- α 阻害療法の奏功性の予測方法を含む）を簡便に実施するためのキットであればよく、特に限定されない。免疫学的手法による場合は、本発明の自己免疫疾患検査用キットには、キットの構成として抗LRG抗体を含むことができる。さらには、抗体の固相用担体、標識抗体、緩衝液など必要な試薬又は器具等を適宜含めることができる。プロテオーム解析による場合は、市販の試薬、例えばiTRAQTM 試薬やICATTM 試薬（いずれもABI社）などを用いることができる。

【実施例】

【0035】

以下に、実施例を示して本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではないことは明らかである。

【0036】

（実施例1）自己免疫疾患患者血清のプロテオーム解析

1）生物学的製剤による治療

インフリキシマブ（抗TNF-抗体製剤）治療を受けているベーチェット病患者より採血し、生体検体を得た。採血は、インフリキシマブ3回目投与直前及びインフリキシマブ8回目投与直前に行った。インフリキシマブによる治療は1回目から3回目までが2週間間隔、それ以降は8週間間隔の投与で行った。

CRP値及び眼炎症、口内炎、結節性紅斑、発熱、関節炎などの症状より炎症所見を確認した結果、インフリキシマブ投与3回目直前は、著明な疾患活動性の低下が見られたが、インフリキシマブ投与8回目直前において、炎症所見の上昇など疾患活動性が高いことが確認された。CRP値はインフリキシマブ3回目投与直前(<0.2)からインフリキシマブ8回目投与直前(4.45)にかけて上昇していた。ここで、CRP値は<0.2が正常値と判断される。

【0037】

2）検査用試料の調製

上記のベーチェット病患者2名より得た生体検体を、各々血清分離用試験管に採り、室温で10分間3500rpm遠心分離して血清を得た。得られた血清中のタンパク質の発現変動をiTRAQTM (isobaric tags for relative and absolute quantitation) 法にて効率よく定量解析するため、血清を以下の方法にて前処理し、検査用試料とした。健康人5名の血清をプールし、同様の処理で得た検査用試料を対照とした。

【0038】

マルチプルアフィニティ除去Hu-14カラム(Agilent社 4.6 x 100 mm)を用いて血清中の発現量の高い14種類の血清タンパク質（アルブミン、免疫グロブリンG（IgG）、トラン

10

20

30

40

50

スフェリン、免疫グロブリンA (IgA)、ハプトグロビン、 α 1アンチトリプシン、フィブリノゲン、 α 2マクログロブリン、免疫グロブリンM (IgM)、 α 1-アシドグリコプロテイン、補体 C3、アポリポタンパク質 AI、アポリポタンパク質 AII、トランスサイレチン) をカラムに吸着させることで除去し、血清の素通り画分を回収し、検査用試料として以降の解析に用いた。

【0039】

3) iTRAQTM解析

ベーチェット病患者1におけるインフリキシマブ3回目投与直前とインフリキシマブ8回目投与直前の検査用試料のタンパク質の発現変動を、iTRAQTM法を用いて解析した。iTRAQTM試薬(ABI社)により、各試料中のペプチドを修飾し、114標識(インフリキシマブ3回目投与直前)、115標識(インフリキシマブ8回目投与直前)及び117標識(対照)とした。標識した全ての検査用試料を混合した。

10

ベーチェット病患者2におけるインフリキシマブ3回目投与直前とインフリキシマブ6回目投与直前の検査用試料のタンパク質の発現変動についても同様に、iTRAQTM法を用いて解析した。iTRAQTM試薬(ABI社)により、各試料中のペプチドを修飾し、114標識(インフリキシマブ3回目投与直前)、115標識(インフリキシマブ6回目投与直前)及び117標識(対照)とした。標識した全ての検査用試料を混合した。

【0040】

混合試料中の多種類のペプチドを含む溶液に対し、LC/MSによるタンパク質の同定、定量を効率よく行うため、オフラインでの強陽イオン交換HPLCによりペプチド溶液を23分画した。それぞれのペプチドをナノLC-MS/MSシステムQSTAR^(R)-XL(アプライドバイオシステムズ社)にて測定した。得られた23回分の測定データをProtein Pilot 2.0 (ABI社)にてSwiss Protに対してデータベースサーチを行い、タンパク質の同定と定量を行った。タンパク質の同定はデータベースサーチにより95%以上の信頼性を示すものを採用した。カットオフ値は、1.3倍以上、0.7倍以下とした。

20

【0041】

タンパク質は、混合試料のMS/MSスペクトルについて114標識、115標識及び117標識された面積を算出して定量した。114標識(インフリキシマブ3回目投与直前、即ちベーチェット病患者血清で生物学的製剤投与により疾患活動性が低い状態)、又は117標識(対照)を分母にし、115標識(インフリキシマブ8回目投与直前、即ち114と同じベーチェット病患者で疾患活動性が高い状態)を分子にして比率をタンパク質毎に示した。

30

【0042】

4) 結果

iTRAQTM解析結果を表1～3に示した。混合した検査用試料中に88種類のタンパク質が同定された(表1)。同定されたタンパク質について解析した結果、ベーチェット病患者1について、インフリキシマブ3回目投与直前、即ち生物学的製剤投与により疾患活動性が低い状態のときに比べて、同剤8回目投与直前、即ち疾患活動性が高い状態では、LRGの量が、6.55倍に増加したことが確認された(表2:解析1)。また、同様にベーチェット病患者2について、インフリキシマブ3回目投与直前、即ち生物学的製剤投与により疾患活動性が低い状態のときに比べて、同剤6回目投与直前、即ち疾患活動性が高い状態では、LRG量が、4.79倍に増加したことが確認された(表3:解析2)。解析1及び解析2で用いた8回目投与直前及び6回目投与直前の検査用試料のLRG量は、対照と比較した結果、各々8.36倍及び8.10倍であった。

40

【0043】

【表 1】

カットオフ	検出されたタンパク質
>1.3 (信頼性 95%以上)	88

	1.3以上	0.7以下		1.3以上	0.7以下
115/114	15	15	114/117	14	11
			115/117	22	17

10

【 0 0 4 4 】

【表 2】

ベータシート#1

Accession #	Name	115:114
gb AAH34389.1	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	6.559
spt P01024	Complement C3 precursor	2.7475
spt P02748	Complement component C9 precursor	2.3531
spt P00751	Complement factor B precursor	1.6207
spt P05155	Plasma protease C1 inhibitor precursor	1.5744
emb CAA68416.1	unnamed protein product	1.5497
spt P02743	Serum amyloid P-component precursor (SAP)	1.5334
emb CAA48671.1	alpha 1-antichymotrypsin	1.5292
spt Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 precursor	1.5086
spt P00450	Ceruloplasmin precursor (EC 1.16.3.1) (Ferroxidase)	1.4629
emb CAD91166.1	hypothetical protein	1.4247
pir C4HU	complement C4A precursor [validated] - human	1.3616
spt P06681	Complement C2 precursor (EC 3.4.21.43)	1.3246
spt P04003	C4b-binding protein alpha chain precursor (C4bp)	1.3232
cra hCP1812472	complement component 6	1.3041

【 0 0 4 5 】

10

20

30

40

【表 3】

ベーチェット#2

Accession #	Name	115:114
spt P02750	Leucin-rich alpha-2-glycoprotein precursor	4.7886
spt P02671	Fibrinogen alpha/alpha-E chain precursor	1.7927
spt Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 precursor	1.6
spt P02748	Complement component C9 precursor	1.5969
spt P02743	Serum amyloid P-component precursor	1.5465
rf NP_997647.1	fibronectin 1 isoform 1 preproprotein	1.5376
spt P04278	Sex hormone-binding globulin precursor	1.4057
spt P00450	Ceruloplasmin precursor (EC 1.16.3.1) (Ferroxidase)	1.3999
pir C1HUQC	complement subcomponent C1q chain C precursor	1.3957
spt P00751	Complement factor B precursor	1.3752
pir C4HU	complement C4A precursor	1.3613
spt P51884	Lumican precursor	1.3329

【0046】

(実施例2) ベーチェット病患者の血清LRGの評価1 (ウエスタンブロット法)

実施例1のインフリキシマブ治療を受けているベーチェット病患者2名及び健常人より採血し、実施例1の2)に示す方法と同手法にて検査用試料を調製した。各検査用試料を10 µgずつ用いて、ウエスタンブロット法により血清LRG発現を評価した。一次抗体は抗LRG抗体(ウサギポリクローナル抗体、Protein Tech Group, INC)、二次抗体は抗ウサギIgG-抗体HRP標識(ラクダポリクローナル抗体、GE healthcare社)を用いた。

10

20

30

40

50

【0047】

その結果、患者1では薬剤投与6回目及び8回目直前の検査用試料で、投与前及び3回目投与直前に比べてLRGの濃いバンドが認められ、患者2についても薬剤投与6回目～8回目直前の検査用試料では、投与前及び3回目投与直前に比べてLRGの濃いバンドが認められた(図1)。各々についてCRPの検査も並行して行った。これにより、LRG発現量はCRP値及び疾患活動性とほぼ同様の動態を示すことが確認された。

【0048】

(実施例3) ベーチェット病患者の血清LRGの評価2 (ウエスタンブロット法)

インフリキシマブ治療を受けているベーチェット病患者5名及び健常人より採血し、実施例1の2)に示す方法と同手法にて検査用試料を調製した。各検査用試料を10 μ gずつ用いて、実施例2と同手法によりウエスタンブロット法により血清LRG発現を評価した。 10

【0049】

患者3～7について評価した結果、患者3では薬剤投与6回目及び8回目直前の検査用試料で、投与前及び3回目投与直前に比べてLRGの濃いバンドが認められ、患者4では薬剤投与3回目～6回目直前の検査用試料で、投与前に比べてLRGの濃いバンドが認められた。また、患者5～7では、LRGの濃いバンドは認められなかった(図2)。各々CRPの検査も並行して行った。これにより、LRG発現量はCRP値及び疾患活動性とほぼ同様の動態を示すことが確認された。

【0050】

(実施例4) 関節リウマチ患者の血清LRGの評価1 (ウエスタンブロット法) 20

インフリキシマブ治療を受けている関節リウマチ患者(RA患者)4名及び健常人より採血し、実施例1の2)に示す方法と同手法にて検査用試料を調製した。採血は、インフリキシマブ投与直後、及び投与後1年目に行った。各検査用試料を10 μ gずつ用いて、実施例2と同手法によりウエスタンブロット法により血清LRG発現を評価した。

【0051】

RA患者1～4について評価した結果、インフリキシマブ治療が有効であった患者1及び2では、いずれの場合もLRGの濃いバンドは認めなかったのに対し、インフリキシマブ治療が無効のRA患者3及び4ではLRGの濃いバンドを認めた(図3)。各々CRP及び慢性関節リウマチで早期から上昇する血中の関節破壊バイオマーカーであるマトリックスメタロプロテアーゼ-3(matrix metalloproteinase-3: MMP-3)の検査も並行して行った。RA患者4は、インフリキシマブ治療が無効で疾患活動性が高いにもかかわらず、CRP及びMMP-3の発現量は低く抑えられていたが、LRG発現量は、疾患活動性とほぼ同様の動態を示した。これにより、LRGはインフリキシマブを投与したときの治療効果を評価しうる優れたバイオマーカーともなり得ることが確認された。疾患活動性は、関節症状、CRP値とMMP3値などの評価により行った。ここで、CRP値は<0.2が正常値、MMP-3は男性で<120、女性で<60が正常範囲と判断した。 30

【0052】

(実施例5) ウエスタンブロット法による血清LRGの評価2 (ウエスタンブロット法)

エタネルセプト(可溶性TNF受容体制剤)治療を受けている関節リウマチ患者(RA患者)5名及び健常人より採血し、実施例1の2)に示す方法と同手法にて検査用試料を調製した。採血は、インフリキシマブ投与直後、及び投与後1年目に行った。各検査用試料を10 μ gずつ用いて、実施例4と同手法によりウエスタンブロット法により血清LRG発現を評価した。 40

【0053】

RA患者5～9について評価した結果、エタネルセプト治療が有効であった患者5～6では、いずれの場合もLRGの濃いバンドは認められなかったのに対し、エタネルセプト治療が無効の患者7～9ではLRGの濃いバンドを認めた(図4)。各々CRP及びMMP-3の検査も並行して行った。LRG発現量は、各種マーカー及び疾患活動性とほぼ同様の動態を示し、エタネルセプト抵抗性関節リウマチ患者では、LRGが高発現することが確認された。これにより、LRG発現量の検査は、エタネルセプトを投与したときの治療効果を評価しうる優 50

れたバイオマーカーともなり得ることが確認された。疾患活動性は、関節症状、CRP値とMMP3値などの評価により行った。ここで、CRP値は<0.2が正常値、MMP-3は男性で<120、女性で<60が正常範囲と判断した。

【0054】

(実施例6) ELISA法による血清LRGの評価 (ELISA法)

インフリキシマブ治療前のクローン病患者 (CD患者) 12名 (治療有効例8名、治療無効例4名) より採血し、血清を調製した。血清は500倍に希釈し、血清中LRG濃度をELISA法により測定した。ELISAにはHuman LRG Assay Kit (IBL社)を使用した。

【0055】

その結果、血清中LRG濃度はインフリキシマブ治療有効例に比べ、インフリキシマブ治療無効例で有意に高値を示した (図5)。これにより、LRG発現量の検査は、クローン病においてインフリキシマブ治療奏功性を評価 (又は予測) し得るバイオマーカーともなり得ることが確認された。

【0056】

(参考例1) IL-6刺激の有無による顆粒球中のLRG量

健常人より10 mL採血し、密度勾配遠心法により顆粒球を精製した。20 ng/mL IL-6 (PeproTech社) による刺激の有無で顆粒球を2時間培養した。培養後、顆粒球よりRneasy mini kit (キアゲン社) にてRNAを抽出し、Quantitect™ (キアゲン社) を用いてRT-PCR法によりLRGの発現を確認した。

【0057】

その結果、LRGは顆粒球で発現することも報告されているが、LRGの発現はIL-6刺激による影響はないことが確認された (図6)。自己免疫疾患のバイオマーカーとして公知のCRPは、炎症に伴って上昇するIL-6などの炎症性サイトカインによって肝臓で合成される急性期タンパク質のひとつであるので、LRGはCRPとは異なるメカニズムにより発現するバイオマーカーであることが確認された。即ち、LRGはIL-6の影響を受けにくいことから、より正確な自己免疫疾患検査用バイオマーカーとして機能しうる。例えばインフリキシマブやエタネルセプト等の生物学的製剤の投与により、IL-6が抑制され、その結果CRPの発現が抑制されるような場合でも、LRGはより正確に疾患活動性を評価しうるバイオマーカーとなりうることが示唆された。

【産業上の利用可能性】

【0058】

以上詳述したように、本発明の自己免疫疾患検査用バイオマーカーであるLRGは、自己免疫疾患、とりわけベーチェット病、キャスルマン氏病、クローン病又は関節リウマチの検査用バイオマーカーとなりうる。LRGをバイオマーカーとして、検出又は定量することにより、上記自己免疫疾患の検査を行うことができ、疾患活動性を評価することができる。

また生物学的製剤などの自己免疫疾患治療薬を投与したときの治療効果を評価しうるバイオマーカーともなる。具体的には、インフリキシマブ及び／又はエタネルセプトなどのTNF- α を阻害する生物学的製剤を投与した場合の疾患活動性を、本発明のバイオマーカーにより評価することができる。これにより、上記生物学的製剤に対して、薬剤の有効性を確認したり、薬剤抵抗性を有する患者を早期に発見することができる。その結果、例えば薬剤投与終了時の判断や投与薬剤の変更などに対して、最も効果的な方法を選択することができる。例えば生物学的製剤などの高価な治療薬を投与しても、治療効果が認められない場合などは、他の治療方法を早期に模索することができ、患者自身にとっても有用のみならず、医療経済を考慮しても優れた効果を有する。

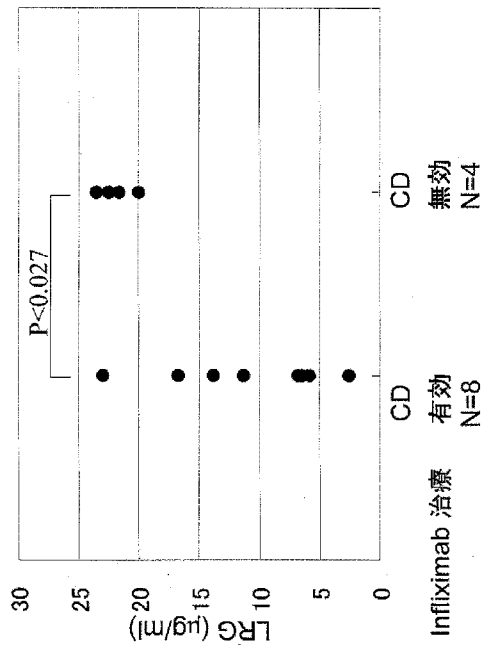
10

20

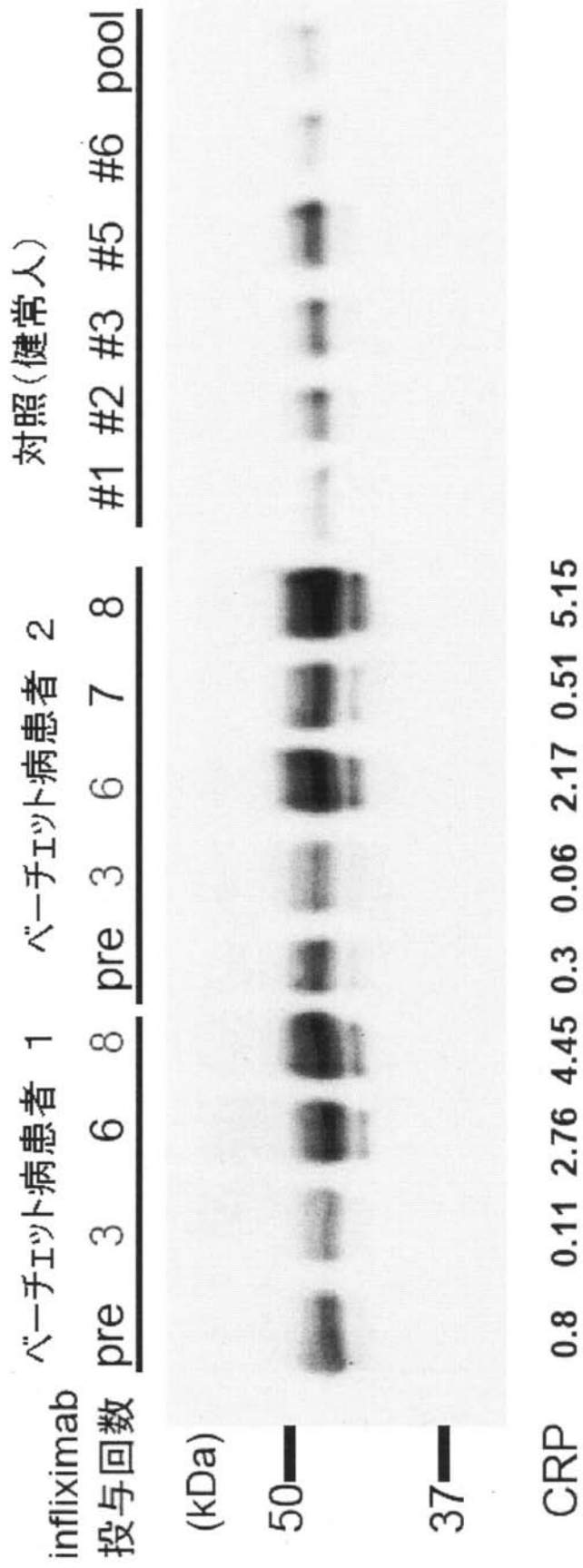
30

40

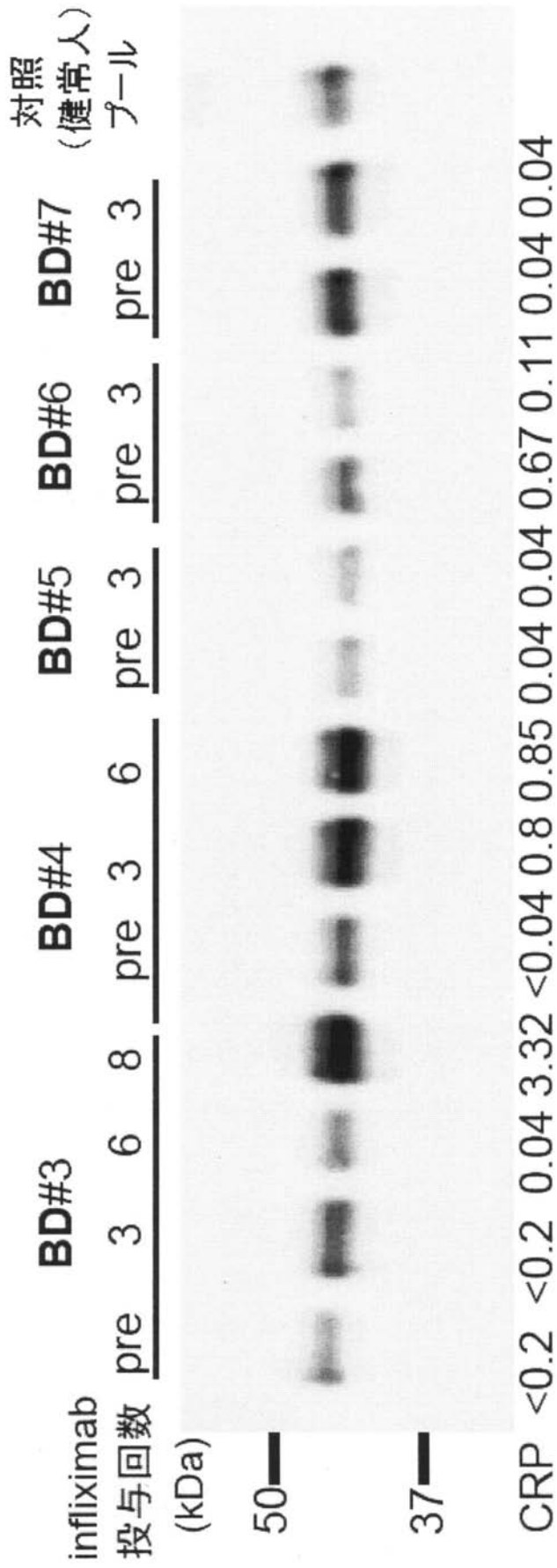
【図 5】



【図 1】

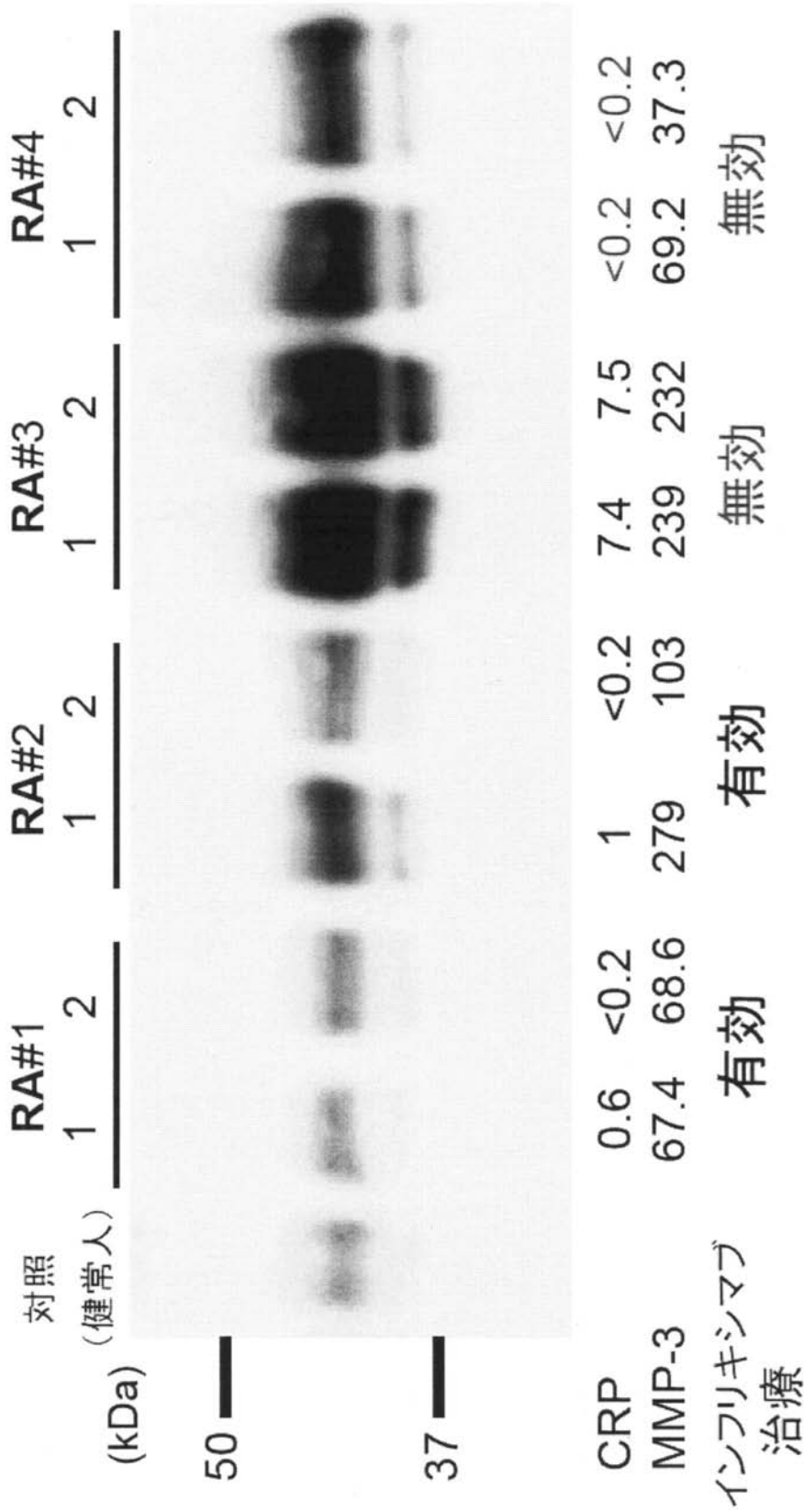


【図 2】



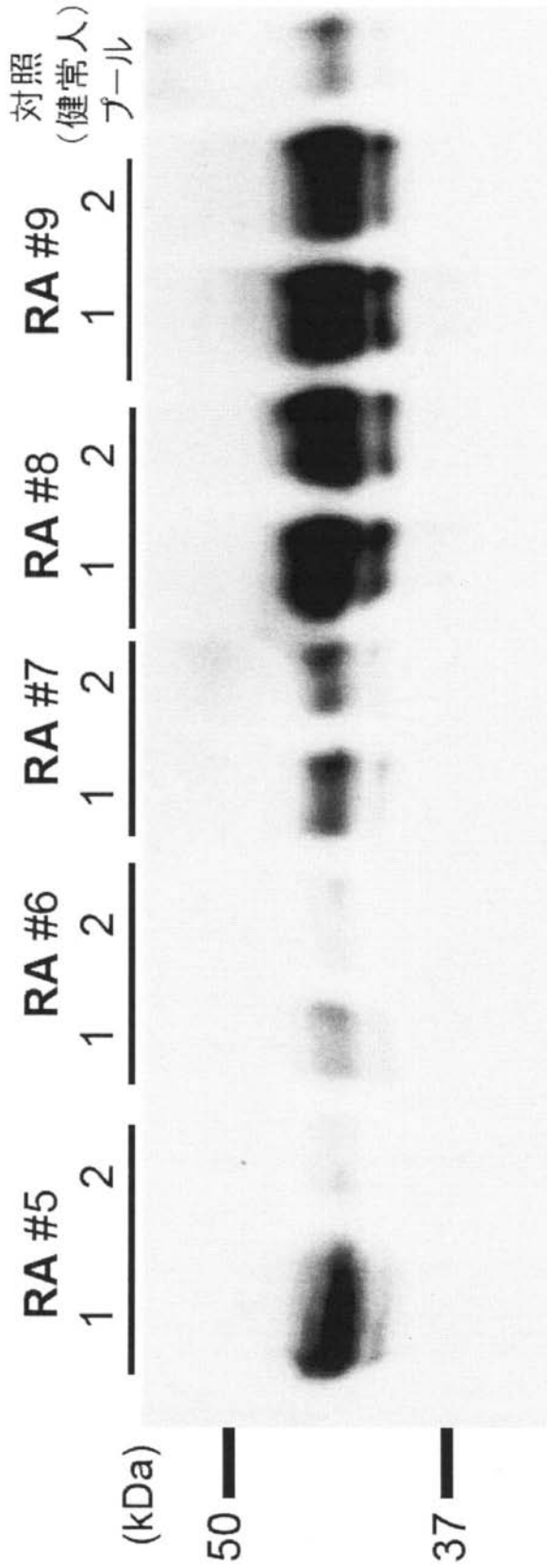
BD: ベーチット病患者

【図3】



RA:関節リウマチ患者

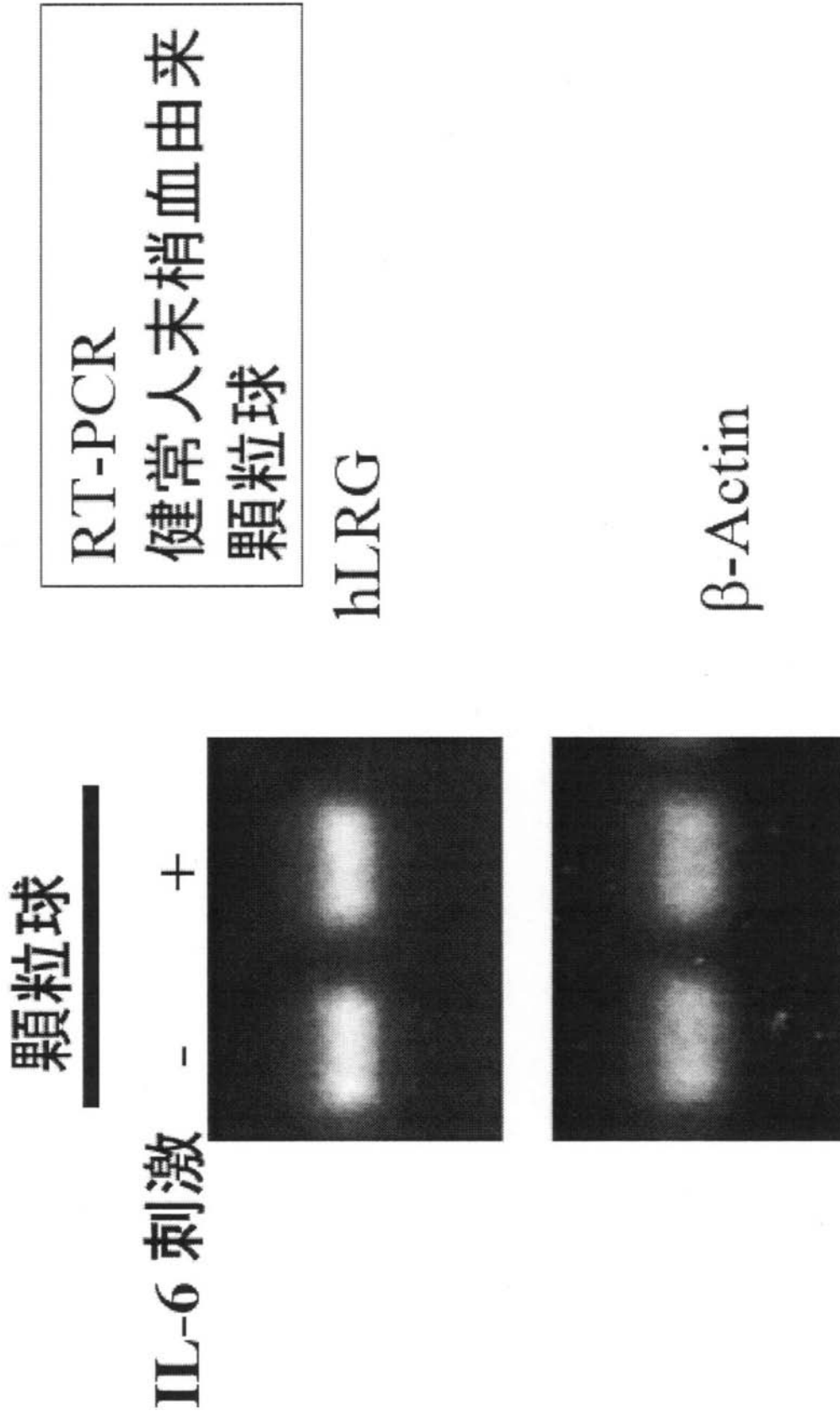
【図4】



CRP	1	<0.2	2.6	<0.04	2.6	0.3	5.7	3.2	8.9	2.9
MMP-3	254	81.2	204	31.7	141	185	97.6	53.1	479	216
エタネルセプト 治療		有効	有効	有効	無効	無効	無効	無効	無効	無効

RA: 関節リウマチ患者

【図 6】



フロントページの続き

(74)代理人 100122688

弁理士 山本 健二

(74)代理人 100117743

弁理士 村田 美由紀

(74)代理人 100163658

弁理士 小池 順造

(72)発明者 仲 哲治

大阪府茨木市彩都あさぎ7丁目6番8号 独立行政法人医薬基盤研究所内

(72)発明者 世良田 聡

大阪府茨木市彩都あさぎ7丁目6番8号 独立行政法人医薬基盤研究所内

(72)発明者 岸本 忠三

大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内

专利名称(译)	用于测试自身免疫疾病的生物标志物和测试方法		
公开(公告)号	JP2010286279A	公开(公告)日	2010-12-24
申请号	JP2009138408	申请日	2009-06-09
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人大阪大学		
申请(专利权)人(译)	独立行政法人医薬基盤研究所 国立大学法人大阪大学		
[标]发明人	仲哲治 世良田 聡 岸本忠三		
发明人	仲 哲治 世良田 聡 岸本 忠三		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/564		
FI分类号	G01N33/53.V G01N33/564.Z		
代理人(译)	高島肇 山本健二		
其他公开文献	JP5246709B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：为能够判断自身免疫疾病中的疾病活动的自身免疫疾病测试提供生物标志物，更具体地，提供能够判断治疗剂的有效性的生物标志物，和并提供检查方法。 解决方案：富含亮氨酸的α2糖蛋白（LRG）与自身免疫性疾病的活性相关，成为自身免疫性疾病的新型生物标志物。此外，当向患有自身免疫性疾病的患者施用抑制TNF-α的生物制剂时，LRG的表达在生物抗性患者中显着升高，但在有效患者中，LRG的表达低于耐药患者，LRG可以作为与自身免疫疾病的药物施用相关的疾病活动的指示标记。 点域

疾患活動性
カー、さら
オマーカー
を提供する
うるロイシ
ch alpha 2
規バイオマ
TNF-αを阻
学的製剤抵
こが、有効
低かったこ
司に伴う疾

