

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/016096

発行日 平成29年3月2日 (2017.3.2)

(43) 国際公開日 平成27年2月5日 (2015.2.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/564 (2006.01)	GO 1 N 33/564 Z N A Z	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 K	4 B O 2 4
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	4 B O 6 3
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/53 P	4 H O 4 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁) 最終頁に続く

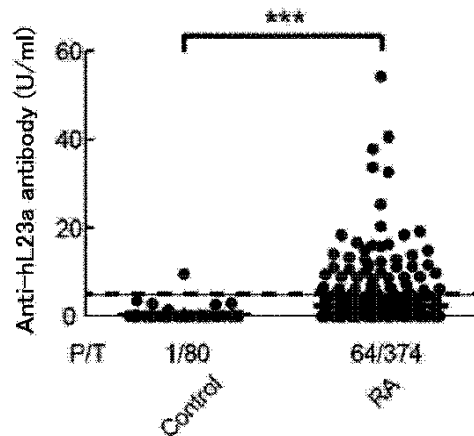
出願番号 特願2015-529522 (P2015-529522)	(71) 出願人 504132272 国立大学法人京都大学 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1
(21) 国際出願番号 PCT/JP2014/069306	
(22) 国際出願日 平成26年7月22日 (2014.7.22)	
(31) 優先権主張番号 特願2013-159815 (P2013-159815)	(74) 代理人 100077012 弁理士 岩谷 龍
(32) 優先日 平成25年7月31日 (2013.7.31)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 坂口 志文 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内
	(72) 発明者 伊藤 能永 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内
	Fターム(参考) 2G045 AA25 CA18 CA25 CA26 CB03 CB04 DA36 DA37 FB03

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己免疫性関節炎の判定方法および自己免疫性関節炎惹起性T細胞活性化抑制物質のスクリーニング方法

(57) 【要約】

被験者由来の試料中に存在する(1)リボソームタンパク質L23aに対する抗体、または(2)リボソームタンパク質L23aと反応するCD4陽性T細胞を検出することを特徴とする自己免疫性関節炎の発症または発症の見込みを判定する方法、および、リボソームタンパク質L23aと反応するT細胞に被験物質を接触させる工程、該T細胞にリボソームタンパク質L23aまたはそのフラグメントを接触させる工程、該T細胞から分泌される炎症性サイトカインを測定する工程、被験物質依存的な炎症性サイトカイン分泌量の変化を分析する工程を含むことを特徴とする自己免疫性関節炎惹起性T細胞の活性化を抑制する物質のスクリーニング方法。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

自己免疫性関節炎の発症または発症の見込みを判定する方法であって、被験者由来の試料中に存在する以下の(1)または(2)を検出することを特徴とする判定方法。

(1) リボソームタンパク質 L 2 3 a に対する抗体

(2) リボソームタンパク質 L 2 3 a と反応する C D 4 陽性 T 細胞

【請求項 2】

リボソームタンパク質 L 2 3 a が配列番号 1 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質である請求項 1 に記載の判定方法。

【請求項 3】

被験者が、抗 C C P 抗体陰性であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の判定方法。

【請求項 4】

自己免疫性関節炎の発症または発症の見込みを判定するためのリボソームタンパク質 L 2 3 a またはそのフラグメントの使用であって、リボソームタンパク質 L 2 3 a またはそのフラグメントを用いてリボソームタンパク質 L 2 3 a に対する抗体、またはリボソームタンパク質 L 2 3 a と反応する C D 4 陽性 T 細胞を検出することを特徴とする使用。

【請求項 5】

リボソームタンパク質 L 2 3 a が配列番号 1 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質である請求項 4 に記載の使用。

【請求項 6】

リボソームタンパク質 L 2 3 a のフラグメントが、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の第 7 1 位～第 9 0 位を含むことを特徴とする請求項 4 に記載の使用。

【請求項 7】

自己免疫性関節炎惹起性 T 細胞の活性化を抑制する物質のスクリーニング方法であって、リボソームタンパク質 L 2 3 a と反応する T 細胞に被験物質を接触させる工程、該 T 細胞にリボソームタンパク質 L 2 3 a またはそのフラグメントを接触させる工程、該 T 細胞の活性化状態を測定する工程、該 T 細胞の被験物質依存的な活性化状態の変化を分析する工程を含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項 8】

前記 T 細胞の活性化状態を測定する工程において、該 T 細胞から分泌される炎症性サイトカイン、該 T 細胞の増殖、または該 T 細胞の活性化表面マーカーを測定することを特徴とする請求項 7 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 9】

リボソームタンパク質 L 2 3 a が配列番号 1 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質である請求項 7 または 8 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 10】

リボソームタンパク質 L 2 3 a のフラグメントが、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の第 7 1 位～第 9 0 位を含むことを特徴とする請求項 7 または 8 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 11】

リボソームタンパク質 L 2 3 a のフラグメントであって、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の一部からなり、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の少なくとも連続する 5 アミノ酸残基を含むことを特徴とするフラグメント。

【請求項 12】

配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の第 7 1 位～第 9 0 位を含むことを特徴とする請求項 11 に記載のフラグメント。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

10

20

30

40

50

本発明は、自己免疫性関節炎の判定方法および自己免疫性関節炎惹起性T細胞活性化抑制物質のスクリーニング方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

関節リウマチは、全身の関節を中心に慢性炎症や組織破壊を引き起こす自己免疫性疾患で、全人口の約1%が罹患する。関節リウマチにおいては、獲得免疫細胞（T細胞やB細胞）による病的な自己免疫反応と、炎症性サイトカインによる慢性炎症が、病態の2つの柱である。炎症性サイトカインについては近年、抗サイトカイン療法によって良好なコントロールが得られるようになった。しかし、そのような場合でも病的な自己免疫反応は是正できていないために、抗サイトカイン療法中止後の疾患の再燃が大きな問題となっている。関節リウマチで起こっている病的な自己免疫反応の中心的な担い手として、CD4陽性T細胞が重要であることが指摘されてきたが、疾患惹起性CD4陽性T細胞の認識する自己抗原は長らく不明であった。そして、そのことが自己免疫反応の抗原特異的なコントロールや、疾患惹起性CD4陽性T細胞の解析を妨げていた。

10

【0003】

これまでに、自己免疫性関節炎を引き起こすT細胞が認識する自己抗原は、特殊な免疫を行う必要のある自己免疫性関節炎の系、あるいはB細胞や自己抗体が必須の自己免疫性関節炎の系でのみ知られていた。例えば、DBA/1系統のマウスに、II型コラーゲン100mgをCFA（コンプリートフロインドアジュバント）と共に皮下投与し、さらに20日後にII型コラーゲン100mgをIFA（インコンプリートフロインドアジュバント）と共に皮下投与すると関節炎を発症させることができることが報告されている（II型コラーゲン誘導性関節炎、非特許文献1参照）この系ではCD4陽性T細胞が必要なことは分かっているが、免疫の結果体内に産生されるII型コラーゲンに対する自己抗体も関節炎を起こすことができることが知られており、II型コラーゲン特異的CD4陽性T細胞が、自己抗体非存在下で関節炎を起こすことができるかどうかははっきりしていない。

20

【0004】

また、加齢に伴って自己免疫疾患を自然発症するK/BxNマウスでは、糖代謝酵素GPIが標的自己抗原であることが知られている（非特許文献2、3参照）この系では、自己反応性CD4陽性T細胞によるB細胞の活性化の結果GPIに対する自己抗体が産生され、その自己抗体が関節炎を引き起こすことが分かっている。ただし、この系においても、自己反応性CD4陽性T細胞は自己抗体の非存在下で関節炎を引き起こすことができない。

30

【0005】

関節リウマチ等の自己免疫性関節炎については未だ不明な点が多く、自己免疫性関節炎を惹起する新規な自己抗原を見出すことは重要な課題である。なかでも、CD4陽性T細胞依存性かつ自己抗体非依存性に引き起こされる自己免疫性関節炎の自己抗原はこれまでに報告されておらず、このような自己抗原を見出すことができれば、自己免疫性関節炎のメカニズム解析および治療法の開発に繋がることが期待される。

【先行技術文献】

40

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, Martin A, Mosedale B. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* 1980;283:666-8

【非特許文献2】論文名Kouskoff, V. et al. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* 87, 811-822 (1996).

【非特許文献3】論文名Matsumoto, I., Staub, A., Benoist, C. & Mathis, D. Arthritis is provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science* 286, 1732-1735 (1999).

50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、CD4陽性T細胞依存性かつ自己抗体非依存性に引き起こされる自己免疫性関節炎の自己抗原を見出すことを課題とする。さらに、そのような自己抗原を用いて自己免疫性関節炎の発症または発症の見込みを判定する方法を提供すること、およびそのような自己抗原と反応してT細胞依存性の自己免疫性関節炎を惹起するCD4陽性T細胞の活性化を抑制する物質をスクリーニングする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】

【0008】

本発明は、上記課題を解決するために以下の各発明を包含する。

[1] 自己免疫性関節炎の発症または発症の見込みを判定する方法であって、被験者由来の試料中に存在する以下の(1)または(2)を検出することを特徴とする判定方法。

(1) リボソームタンパク質L23aに対する抗体

(2) リボソームタンパク質L23aと反応するCD4陽性T細胞

[2] リボソームタンパク質L23aが配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質である前記[1]に記載の判定方法。

[3] 被験者が、抗CCP抗体陰性であることを特徴とする前記[1]または[2]に記載の判定方法。

[4] 自己免疫性関節炎の発症または発症の見込みを判定するためのリボソームタンパク質L23aまたはそのフラグメントの使用であって、リボソームタンパク質L23aまたはそのフラグメントを用いてリボソームタンパク質L23aに対する抗体、またはリボソームタンパク質L23aと反応するCD4陽性T細胞を検出することを特徴とする使用。

[5] リボソームタンパク質L23aが配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質である前記[4]に記載の使用。

[6] リボソームタンパク質L23aのフラグメントが、配列番号1で示されるアミノ酸配列の第71位～第90位を含むことを特徴とする前記[4]に記載の使用。

[7] 自己免疫性関節炎惹起性T細胞の活性化を抑制する物質のスクリーニング方法であって、リボソームタンパク質L23aと反応するT細胞に被験物質を接触させる工程、該T細胞にリボソームタンパク質L23aまたはそのフラグメントを接触させる工程、該T細胞の活性化状態を測定する工程、該T細胞の被験物質依存的な活性化状態の変化を分析する工程を含むことを特徴とするスクリーニング方法。

[8] 前記T細胞の活性化状態を測定する工程において、該T細胞から分泌される炎症性サイトカイン、該T細胞の増殖、または該T細胞の活性化表面マーカーを測定することを特徴とする前記[7]に記載のスクリーニング方法。

[9] リボソームタンパク質L23aが配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質である前記[7]または[8]に記載のスクリーニング方法。

[10] リボソームタンパク質L23aのフラグメントが、配列番号1で示されるアミノ酸配列の第71位～第90位を含むことを特徴とする前記[7]または[8]に記載のスクリーニング方法。

[11] リボソームタンパク質L23aのフラグメントであって、配列番号1で示されるアミノ酸配列の一部からなり、配列番号1で示されるアミノ酸配列の少なくとも連続する5アミノ酸残基を含むことを特徴とするフラグメント。

[12] 配列番号1で示されるアミノ酸配列の第71位～第90位を含むことを特徴とする前記[11]に記載のフラグメント。

【発明の効果】

【0009】

本発明により、自己免疫性関節炎の発症または発症の見込みを判定する方法を提供することができる。また、T細胞依存性の自己免疫性関節炎を惹起するCD4陽性T細胞の活性化を抑制する物質をスクリーニングする方法を提供することができる。また、これらの

10

20

30

40

50

方法や自己免疫性関節炎の研究に好適に用いることができるタンパク質断片を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】関節炎を発症したレトロジェニックマウスの写真である。

【図2】関節炎惹起性T細胞受容体のアミノ酸配列を示す図である。

【図3】リボソームタンパク質L23aによる関節炎惹起性T細胞受容体の活性化を検討した結果を示す図である。

【図4】リボソームタンパク質L23aの抗原フラグメントを同定した結果を示す図である。

10

【図5】関節炎惹起性T細胞受容体発現レトロジェニックマウスの血清中に抗リボソームタンパク質L23a抗体を検出した結果を示す図である。

【図6】関節リウマチ患者の血清中に抗リボソームタンパク質L23a抗体を検出した結果を示す図である。

【図7】関節リウマチ患者の関節液中にリボソームタンパク質L23a反応性T細胞を検出した結果を示す図である。

【図8】抗CCP抗体陰性の関節リウマチ患者の血清中に抗リボソームタンパク質L23a抗体を検出した結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

20

本発明者らは、関節リウマチに酷似した自己免疫性関節炎を引き起こすSKGマウスを樹立し（特許第3467520号）、解析を進めてきた。SKGマウスは、T細胞シグナル伝達因子ZAP70の点突然変異を持ち、そのために胸腺でのT細胞の選択異常が起こり、関節炎を起こす自己反応性T細胞が末梢に出現して関節炎を引き起こす（Sakaguchi, N. et al. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature* 426, 454-460, doi:10.1038/nature02119 (2003)、Hirota, K. et al. T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17+ Th cells that cause autoimmune arthritis. *The Journal of experimental medicine* 204, 41-47, doi:10.1084/jem.20062259 (2007)）。SKGマウスの関節炎は、CD4陽性T細胞依存的である。すなわち、CD4陽性T細胞を免疫不全マウスへ移入することで、レシピエントマウスは関節炎を発症する。

30

本発明者らは、後段の実施例に示すように、SKGマウスを用いて自己抗体非依存的に関節炎を惹起するCD4陽性T細胞を見出し、当該CD4陽性T細胞の認識抗原を探索した結果、CD4陽性T細胞依存性の自己免疫性関節炎を惹起する自己抗原としてリボソームタンパク質L23aを同定した。さらにこの自己抗原について研究を進めた結果、本願発明を完成させた。

【0012】

〔自己免疫性関節炎の判定方法〕

本発明は、自己免疫性関節炎の発症または発症の見込みを判定する方法を提供する。本発明の判定方法は、被験者由来の試料中に存在する（1）リボソームタンパク質L23aに対する抗体、または（2）リボソームタンパク質L23aと反応するCD4陽性T細胞を検出することにより行うことができる。

40

本発明の判定対象である自己免疫性関節炎は、自己抗体または自己反応性T細胞によって発症する関節炎であればどのような関節炎でもよい。例えば、関節リウマチ、反応性関節炎、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、膠原病関連関節炎などが挙げられる。好ましくは関節リウマチである。

被験者は特に限定されないが、関節炎を発症している者または関節炎の発症が疑われる者が好ましい。関節炎の発症が疑われる者としては、関節炎の自覚症状が認められる者が挙げられる。また、被験者は抗CCP抗体陰性であることが好ましい。具体的には、関節炎を発症しているが抗CCP抗体陰性の被験者、または関節炎の発症が疑われるが抗CC

50

P抗体陰性の被験者であることが好ましい。

【0013】

被験者由来の試料としては、抗体またはT細胞が含まれる試料であれば特に限定されないが、例えば、血液、血清、血漿、組織液、リンパ液、脳脊髄液、膿、粘液、鼻水、喀痰、尿、糞便、腹水等の体液類を好適に用いることができる。

リボソームタンパク質L23a（以下「L23a」と記す）に対する抗体は、L23aに特異的に結合する抗体であればよい。L23aと反応するCD4陽性T細胞は、L23aと特異的に反応して活性化されるCD4陽性T細胞であればよい。

【0014】

L23aに対する抗体の検出およびL23aと反応するCD4陽性T細胞の検出には、L23aまたはそのフラグメントを用いることができる。用いるL23aの由来は特に限定されないが、哺乳動物のL23aが好ましい。哺乳動物としては、ヒト、チンパンジー、サル、イヌ、ウシ、ヒツジ、ウサギ、マウス、ラット、モルモットなどが好ましく、より好ましくはヒトである。哺乳動物のL23aはよく保存されており、少なくともヒト、アカゲザル、ウシ、ヒツジ、ラット、マウスのL23aのアミノ酸配列は同一である、（配列番号1）。各種動物のL23aのアミノ酸配列およびそれをコードする遺伝子の塩基配列は、例えば表1に示すアクセッション番号で公知のデータベース（DDBJ/GenBank/EMBL等）から取得することができる。

【0015】

【表1】

	アミノ酸配列	塩基配列
ヒト	NP_000975	NM_000984
アカゲザル	NP_001180494	NM_001193565
ウシ	NP_001039423	NM_001045958
ヒツジ	NP_001171148	NM_001177677
ラット	NP_001101753	NM_001108283
マウス	NP_997406	NM_207523
ウサギ	NP_001192153	NM_001205224

【0016】

L23aのフラグメントは、L23aの一部からなるものであれば特に限定されないが、哺乳動物のL23aの一部からなるものであることが好ましく、配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるL23aの一部であることがより好ましい。L23aのフラグメントのアミノ酸残基数は特に限定されないが、5残基以上であることが好ましい。上限は特に限定されないが、約140残基以下が好ましく、約120残基以下がより好ましく、約100残基以下がさらに好ましく、約80残基以下がさらに好ましく、約60残基以下がさらに好ましく、約40残基以下がさらに好ましく、約20残基以下が特に好ましい。

また、L23aのフラグメントは、L23aのアミノ酸配列（配列番号1）の第71位～第90位のアミノ酸配列（LDHYAI IKFPLTTESAMKKI、配列番号3）を含むフラグメントであることが好ましく、より好ましくは配列番号3で示されるアミノ酸配列からなるフラグメントである。

【0017】

L23aおよびL23aのフラグメントは、例えば公知の遺伝子工学的手法により、L23aまたはそのフラグメントをコードする遺伝子を発現可能に挿入した組み換え発現ベクターを構築し、これを適当な宿主細胞に導入して組み換えタンパク質として発現させ、精製することにより製造することができる。また、L23aおよびL23aのフラグメントは、例えばin vitro転写・翻訳系を用いて製造することができる。また、L23aおよびL23aのフラグメントは、公知の一般的なペプチド合成のプロトコールに従って、固相合成法（Fmoc法、Boc法）または液相合成法により製造することができ

る。

【0018】

L23aに対する抗体の検出方法は特に限定されず、抗原と特異的に結合する抗体を検出するための公知の方法を適宜選択して使用することができる。例えば、ELISA法を好適に用いることができる。ELISA法を用いてL23aに対する抗体の検出を行う場合、L23aまたはそのフラグメントをプレートに固相化し、被験者由来に血清を添加して反応させ、適当な二次抗体を用いて検出することができる。

【0019】

L23aに対する抗体が陽性であることの判断基準は、例えば、関節炎に関して正常な個体（例えば、関節炎の自覚症状のないヒト）を対照とし、対照のL23aに対する抗体量に基づいて定めることができる。例えば、被験者のL23aに対する抗体を検出するための方法と同じ方法を用いて、複数の対照のL23aに対する抗体量を測定し、平均値および標準偏差（SD）を算出し、対照の平均値+3SDを基準値として、それ以下を正常、それを超えるものを陽性と判定する方法が挙げられる。ただし、これに限定されるものではない。対照の抗体量を背景データとして蓄積し、蓄積データを用いて基準値を算出することもできる。

10

【0020】

L23aと反応するCD4陽性T細胞の検出方法は特に限定されず、抗原と特異的に反応するT細胞を検出するための公知の方法を適宜選択して使用することができる。例えば、L23aと反応することにより炎症性サイトカインを分泌する細胞を検出する方法、L23a反応性CD4陽性T細胞の増殖を検出する方法、活性化表面マーカー（CD154など）を検出する方法などを好適に用いることができる。具体的には、例えば、被験者の血液から公知の方法でCD4陽性T細胞を分離し、得られた細胞をL23aまたはそのフラグメントと接触させ、炎症性サイトカインを分泌する細胞をフローサイトメーターで検出する方法などが挙げられる。炎症性サイトカインとしては、IFN-、TNF-、IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、IL17、IL-18などが挙げられる。

20

【0021】

L23aと反応するCD4陽性T細胞が検出された場合に、当該被験者はL23a反応性CD4陽性T細胞が陽性であると判断できる。

【0022】

L23aに対する抗体およびL23aと反応するCD4陽性T細胞の少なくとも一方が陽性と判断された場合、被験者は自己免疫性関節炎の発症している、または自己免疫性関節炎を発症する見込みがあると判定することができる。自己免疫性関節炎の発症または発症の見込みを判定することにより、より早期の効果的な治療介入、あるいはより慎重な経過観察による疾患発症の判定が可能となる。

30

さらに、抗CCP抗体陰性の関節リウマチ患者血清の過半数にL23aに対する抗体が検出されたことから（実施例参照）、本発明の判定方法は、関節炎を発症しているが抗CCP抗体陰性の者または関節炎の発症が疑われるが抗CCP抗体陰性の者を対象とすることができ、これらの被験者における自己免疫性関節炎の発症または発症の見込みを判定できる点で、非常に有用である。

40

【0023】

〔スクリーニング方法〕

本発明は、自己免疫性関節炎惹起性T細胞の活性化を抑制する物質のスクリーニング方法を提供する。本発明のスクリーニング方法は、L23aと反応するT細胞に被験物質を接触させる工程、該T細胞にL23aまたはそのフラグメントを接触させる工程、該T細胞の活性化状態を測定する工程、該T細胞の被験物質依存的な活性化状態の変化を分析する工程を含むものであればよい。本発明のスクリーニング方法によって得られる物質は、自己免疫性関節炎の予防または治療薬の有効成分として有用である。

【0024】

本発明のスクリーニング方法を適用する被験物質としては、例えば、核酸、ペプチド、

50

タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、細胞培養上清、植物抽出液、哺乳動物の組織抽出液、血漿等が挙げられる。被験物質は、新規な物質であってもよいし、公知の物質であってもよい。

L23aと反応するT細胞（以下「L23a反応性T細胞」と記す）は、自己免疫性関節炎患者から、上記のL23aと反応するCD4陽性T細胞の検出方法に準じて採取することができる。また、L23a反応性T細胞は、L23aを特異的に認識するT細胞受容体遺伝子を、T細胞受容体を発現していないT細胞株（例えば5KC-73.8.20）に導入することにより、作製することができる（実施例参照）。

【0025】

L23a反応性T細胞に被験物質を接触させる工程において、L23a反応性T細胞に被験物質を接触させる方法は、細胞と被験物質とが接触できる方法であればどのような方法でもよく、特に限定されない。例えば、L23a反応性T細胞を培養している培地に被験物質を添加する方法、L23a反応性T細胞を培養している培地を被験物質を含有する培地と交換する方法などが挙げられる。なお、被験物質を接触させない対照群を設けることが好ましい。

10

また、L23a反応性T細胞にL23aまたはそのフラグメントを接触させる工程において、L23a反応性T細胞にL23aまたはそのフラグメントを接触させる方法も特に限定されず、L23a反応性T細胞を培養している培地にL23aまたはそのフラグメントを添加する方法、L23a反応性T細胞を培養している培地をL23aまたはそのフラグメントを含有する培地と交換する方法などが挙げられる。

20

【0026】

L23aと反応するT細胞に被験物質を接触させる工程、および、L23a反応性T細胞にL23aまたはそのフラグメントを接触させる工程は、どちらを先に行ってもよく、同時に行ってもよい。すなわち、L23a反応性T細胞に対して被験物質を接触させた後にL23aまたはそのフラグメントを接触させてもよく、L23a反応性T細胞に対してL23aまたはそのフラグメントを接触させた後に被験物質を接触させてもよく、L23a反応性T細胞に対して被験物質とL23aまたはそのフラグメントを同時に接触させてもよい。

【0027】

L23a反応性T細胞の活性化状態を測定する工程において、測定対象は、L23a反応性T細胞の活性化状態の指標となるものであれば特に限定されない。例えば、L23a反応性T細胞から分泌される炎症性サイトカインの測定、L23a反応性T細胞の増殖の測定、L23a反応性T細胞の活性化表面マーカーの測定などを好適に用いることができる。

30

【0028】

測定対象がL23a反応性T細胞から分泌される炎症性サイトカインである場合、L23a反応性T細胞の活性化状態を測定する工程において、L23a反応性T細胞から分泌される炎症性サイトカインを測定すればよい。測定対象の炎症性サイトカインは特に限定されず、上記に例示した公知の炎症性サイトカイン中から一種または二種以上を適宜選択すればよい。炎症性サイトカインの測定方法も特に限定されず、測定対象の炎症性サイトカインを測定できる公知の方法（例えば、ウエスタンブロット法、EIA法、ELISA法、RIA法など）から適宜選択すればよい。

40

【0029】

また、L23a反応性T細胞の被験物質依存的な活性化状態の変化を分析する工程では、被験物質依存的な炎症性サイトカイン分泌量の変化を分析すればよい。本工程において、被験物質依存的な炎症性サイトカイン分泌量の変化を分析する方法は特に限定されない。例えば、被験物質を接触させない対照群における炎症性サイトカイン分泌量と比較して、被験物質を接触させた場合に炎症性サイトカイン分泌量が減少していれば、当該被験物質を自己免疫性関節炎惹起性T細胞の活性化を抑制する物質として選択することができる。被験物質が炎症性サイトカイン分泌量を減少させる程度は特に限定されないが、例えば

50

、被験物質を接触させていない細胞の炎症性サイトカイン分泌量と比較して50%以下にさせる被験物質が好ましく、25%以下にさせる被験物質がより好ましい。

【0030】

測定対象がL23a反応性T細胞の増殖である場合、L23a反応性T細胞の活性化状態を測定する工程において、L23a反応性T細胞の増殖を測定すればよい。L23a反応性T細胞の増殖を測定する方法は特に限定されず、公知の細胞増殖測定方法のなかから適宜選択して用いることができる。例えば、トリチウム化チミジンの取り込み測定によるもの、CFSEラベルによる分裂の検出などを挙げることができる。

【0031】

また、L23a反応性T細胞の被験物質依存的な活性化状態の変化を分析する工程では、被験物質依存的な細胞増殖量の変化を分析すればよい。本工程において、被験物質依存的な細胞増殖量の変化を分析する方法は特に限定されない。例えば、被験物質を接触させない対照群における細胞増殖量と比較して、被験物質を接触させた場合に細胞増殖量が減少していれば、当該被験物質を自己免疫性関節炎惹起性T細胞の活性化を抑制する物質として選択することができる。被験物質が細胞増殖量を減少させる程度は特に限定されないが、例えば、被験物質を接触させていない細胞の細胞増殖量と比較して50%以下にさせる被験物質が好ましく、25%以下にさせる被験物質がより好ましい。

10

【0032】

測定対象がL23a反応性T細胞の活性化表面マーカーである場合、L23a反応性T細胞の活性化状態を測定する工程において、L23a反応性T細胞の活性化表面マーカーを測定すればよい。対象となる活性化表面マーカーは特に限定されず、例えばCD154などが挙げられる。表面マーカーを測定する方法は特に限定されず、細胞表面マーカーを測定できる公知の方法（例えば、フローサイトメーターを用いる方法など）から適宜選択すればよい。

20

【0033】

また、L23a反応性T細胞の被験物質依存的な活性化状態の変化を分析する工程では、被験物質依存的な活性化表面マーカー量の変化を分析すればよい。本工程において、被験物質依存的な活性化表面マーカー量の変化を分析する方法は特に限定されない。例えば、被験物質を接触させない対照群における活性化表面マーカー量と比較して、被験物質を接触させた場合に活性化表面マーカー量が減少していれば、当該被験物質を自己免疫性関節炎惹起性T細胞の活性化を抑制する物質として選択することができる。被験物質が活性化表面マーカー量を減少させる程度は特に限定されないが、例えば、被験物質を接触させていない細胞の活性化表面マーカー量と比較して50%以下にさせる被験物質が好ましく、25%以下にさせる被験物質がより好ましい。

30

【0034】

〔スクリーニングにより得られた物質を含有する医薬〕

上記、本発明のスクリーニング方法を用いて得られる物質は、自己免疫性関節炎の予防または治療薬の有効成分として有用である。したがって、本発明には、L23a反応性T細胞の活性化を抑制する物質を有効成分とする自己免疫性関節炎の予防または治療用医薬が含まれる。

40

【0035】

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる物質を、自己免疫性関節炎の予防または治療用医薬の有効成分として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。例えば、経口投与のための製剤としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などが挙げられる。これらの製剤は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。非経口投与のための製剤としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤

50

、点滴注射剤、関節内注射剤などの剤形を包含する。このような注射剤は、公知の方法に従って、例えば、上記 L 2 3 a 反応性 T 細胞の活性化を抑制する物質またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノール等）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）、非イオン界面活性剤（例えば、ポリソルベート 8 0、H C O - 5 0 等）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。直腸投与に用いられる坐剤は、上記 S I K 3 の発現または機能を抑制する物質またはその塩を通常坐薬用基剤に混合することによって調製される。

10

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

【 0 0 3 6 】

〔フラグメントの利用〕

本発明は、L 2 3 a のフラグメントを提供する。本発明のフラグメントは、上記本発明の判定方法において、L 2 3 a に対する抗体の検出および L 2 3 a と反応する C D 4 陽性 T 細胞の検出に用いることができる。また、本発明のフラグメントは、自己抗体非依存的に関節炎を惹起する C D 4 陽性 T 細胞の解析、自己抗体非依存的に関節炎のメカニズム解析等の基礎研究に用いることができる。

20

【実施例】

【 0 0 3 7 】

以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【 0 0 3 8 】

〔関節炎を引き起こす T 細胞の T 細胞受容体のクローニング〕

制御性 T 細胞の特異的転写因子である F o x p 3 と E G F P との融合蛋白質をコードする融合遺伝子をノックインした e f o x マウスを作製した。e f o x マウスは、制御性 T 細胞を E G F P のシグナルによって簡便に検出することができる。この e f o x マウスと、自己免疫性関節炎モデルマウスである S K G マウスとを掛け合わせて、e f o x S K G マウスを作製し、S P F 環境下で飼育した。e f o x S K G マウスは、約 3 か月間飼育後に関節炎を自然発症した。

30

【 0 0 3 9 】

関節炎を発症した e f o x S K G マウスの関節局所から、エフェクター C D 4 陽性 T 細胞を分取した。具体的には、足関節から滑膜組織を分離して、L i b e r a s e T M (ロシュ) 含有 R P M I 1 6 4 0 にて 3 7 1 時間分解させた。その組織をナイロンメッシュに通し、単細胞浮遊液を調製した。M o f l o c e l l s o r t e r サイクロン装置を用いて、G F P 陰性 C D 4 陽性 T 細胞を 9 6 ウェル P C R プレート上に単一細胞分取した。そのプレートは使用まで - 8 0 で保存した。

40

【 0 0 4 0 】

分取した G F P 陰性 C D 4 陽性 T 細胞の単一細胞から T 細胞受容体を n e s t e d P C R 法でクローニングした。具体的には、5 μ L / ウェルのリアクションミックス [100 mg / mL ゼラチン、0.1 % Triton X-100、4U / mL RNAsin、125ng OligodT (プロメガ)、0.5mM dNTPs、5U / mL Multiscribe RT enzyme、1xRT Buffer (High Throughput cDNA kit、アプライドバイオシステムズ)] を添加し、2 5 1 0 分間、3 7 2 時間、8 5 5 分間反応させて、逆転写を行った。反応液のうち 2 μ L ずつを T 細胞受容体 鎖、鎖遺伝子の増幅に用いた。9 5 1 分後、9 5 3 0 秒、5 0 1 分、7 2 3 0 秒を 5 サイクル、9 5 3 0 秒、5 8 1 分、7 2 3 0 秒を 3 0 サイクルの後、7 2 5 分を行った後、より内側のプライマーを使用して同様の P C R をもう一度行った。このクローニン

50

グした T 細胞受容体遺伝子を、T 細胞受容体発現用レトロウイルスベクター (Lennon, G. P. et al. T cell islet accumulation in type 1 diabetes is a tightly regulated, cell-autonomous event. *Immunity* 31, 643-653, doi:10.1016/j.immuni.2009.07.008 (2009)) にサブクローニングした。鎖は M f e I および S t u I 制限酵素認識部位、鎖は B a m H I および X h o I 制限酵素認識部位を用いてサブクローニングした。約 150 個の単一細胞から、それぞれ T 細胞受容体遺伝子をクローニングした。

【0041】

作製したレトロウイルスベクターを用いて、レトロジェニックマウスを作製した。このベクタープラスミドを、P l a t - E 細胞株へ F u g e n e 6 t r a n s f e c t i o n r e a g e n t (ロシュ) を用いて遺伝子導入した。48 時間後、72 時間後にレトロウイルスを含んだ上清を回収して、0.45 μ m フィルターに通してゴミを取り除いた。

T 細胞、B 細胞を欠損し、S K G 変異を有する R A G 2 ノックアウトマウス (S K G マウスと R A G 2 ノックアウトマウスを掛け合わせて作製) へ 150 mg / k g の 5 - f l u o r o u r a c i l を腹腔内投与した。4 日後に骨髓細胞を回収して、赤血球細胞を除いた。その後、I L - 3 (20ng/mL)、I L - 6 (40ng/mL)、S C F (50ng/mL) (ペプロテック) の存在下で、20% 牛胎児血清、ペニシリン、ストレプトマイシン、2 - M E 添加 D M E M 溶液で骨髓細胞を 2×10^6 個 / m L の濃度で培養した。培養 2 日目、3 日目に、前記レトロウイルス含有上清に I L - 3 (20ng/mL)、I L - 6 (40ng/mL)、S C F (50ng/mL) およびポリブレン (4 μ g/mL) を添加した培地に交換した後、700 g、32、90 分間遠心することにより、レトロウイルスを骨髓細胞へ感染させた。培養 4 日目に、その骨髓細胞を、600 r a d 放射線照射した R A G 2 ノックアウトマウスへ静脈内注射した。1 種類のレトロウイルスをそれぞれ感染させたレトロジェニックマウスを約 30 種作製した。

【0042】

作製されたレトロジェニックマウスは、T 細胞上の T 細胞受容体として、レトロウイルスベクターによって導入、発現された単一ペアの T 細胞受容体のみを発現する。各レトロジェニックマウスが関節炎を発症するかどうかを観察することにより、そのレトロジェニックマウスの持つ T 細胞受容体が関節炎惹起能を持つかどうかを検証することができる。

作製したレトロジェニックマウスを S P F 環境下で飼育し、関節炎を自然発症する個体を見出した。関節炎を発症したマウスの写真を図 1 (A) および (B) に示した。さらに、当該マウスに感染させたレトロウイルスを解析し、関節炎惹起性 T 細胞受容体のアミノ酸配列を特定した (図 2 参照)。図 2 中「14D-3/DV8*03」、「40*01」、「10*01」および「2-1*01」と示された配列は、例えばデータベース I M G T / L I G M - D B (<http://www.imgt.org/ligmdb/>) から取得することができる。

【0043】

〔関節炎惹起性 T 細胞受容体の認識抗原の同定〕

上記により見出した関節炎惹起性 T 細胞受容体の認識抗原の候補の絞り込みを以下のように行った。

まず、関節炎を起こすことを確認した上記の T 細胞受容体遺伝子を、T 細胞受容体が発現していない、T 細胞株 5 K C - 7 3 . 8 . 2 0 へ、上記のレトロウイルスベクター含有上清を用いて同じ方法で遺伝子導入した。この細胞株は、T 細胞受容体からの刺激によって I L - 2 を産生することが知られている。次に、B A L B / c マウスの脾臓細胞から、M A C S ビーズ (ミルテニー社) により、C D 1 1 c + 細胞、C D 1 1 b + 細胞を、M A C S システムで濃縮、回収し、抗原提示細胞 (A P C) を調製した。

他方、関節炎を発症した S K G マウス関節滑膜細胞の細胞破砕液を調製し、N A T I V E - P A G E 法を用いて各バンドに分離し、各バンドを切り出してそれぞれに含まれるタンパク質を抽出した。

【0044】

上記の T 細胞受容体遺伝子を導入した T 細胞株 (5×10^4 個 / ウェル) と上記抗原提

示細胞（ 5×10^4 個/ウェル）を、96 ウェルラウンドボトムプレートに播種し、上記各バンドから抽出したタンパク質を加えて共培養した。24 時間培養後、上清中の IL - 2 濃度を、ELISA (ebioscience) を用いて測定した。IL - 2 濃度が有意に上昇したバンドを候補バンドとして選択した。

候補バンドからの抽出タンパク質を質量分析に供し、その結果から複数の候補タンパク質を絞り込んだ。

【0045】

候補タンパク質について、それぞれ組み換えタンパク質を作製し、上記の T 細胞株と抗原提示細胞の共培養系に添加して、関節炎惹起性 T 細胞受容体の認識抗原であるか否かを IL - 2 濃度の上昇を指標に確認した。その結果、L23a (60S ribosomal protein L23a) を添加したときに、IL - 2 濃度が上昇することを見出した。

【0046】

〔L23a による関節炎惹起性 T 細胞受容体の活性化〕

ヒト L23a をコードする DNA (配列番号 2、ACCESSION:NM_000984) のコード領域を発現ベクター pGEX - 6P1 へ挿入した。この発現ベクターを大腸菌に導入し、LB 培地を用いて 37 で培養した。0.1 mM の IPTG 存在下、25 で 5 時間培養することによりタンパク質の発現を誘導した。その後、1% Triton X - 100 含有 PBS を用いて細菌を溶解し、ソニケーションによりタンパク質を溶解させた。得られたタンパク質を、Glutathione - Sepharose fastflow beads で精製し、組み換え GST - L23a を得た。コントロールとして用いる GST の組み換えタンパク質は遺伝子導入していない pGEX - 6P1 ベクターから同様の方法で作製した。

【0047】

上記の T 細胞受容体遺伝子を導入した T 細胞株、上記の抗原提示細胞 (APC)、組み換え GST - L23a、組み換え GST およびマウス骨髄腫細胞 (B 細胞) 株 P3U1 の細胞破砕液 (ポジティブコントロール) を用い、以下の表 1 の試験群を設けた。各細胞を 96 ウェルラウンドボトムプレートに播種し、試験物質を添加した培地を加えて 24 時間培養後、上清中の IL - 2 濃度を、ELISA (ebioscience) を用いて測定した。なお、本発明者は、本実験に先立って、今回クローニングした関節炎惹起性 T 細胞受容体が P3U1 細胞破砕液に反応することを確認していたため、P3U1 細胞破砕液をポジティブコントロールとして使用した。細胞破砕液は以下のように調製した。すなわち、 1×10^7 個の細胞を 1 mL の PBS に懸濁し、液体窒素で凍結後融解した。続いて、ソニケーション 30 秒を 3 回繰り返し、15000 rpm で 15 分遠心分離し、上清を細胞破砕液として使用した。

結果を図 3 に示した。図 3 から明らかなように、GST - L23a は濃度依存的に関節炎惹起性 T 細胞受容体を活性化することが示された。

【0048】

【表 2】

試験群	T細胞株 5x10 ⁴ 個/well	APC 5x10 ⁴ 個/well	P3U1細胞 破砕液	組み換え GST	組み換え GST-RPL23A
APC-	○	—	—	—	—
APC+	○	○	—	—	—
APC+/PC	○	○	200 μg/mL	—	—
APC+/GST	○	○	—	20 μg/mL	—
APC+/GST-RPL23A	○	○	—	—	20 μg/mL
APC+/GST-RPL23A	○	○	—	—	15 μg/mL
APC+/GST-RPL23A	○	○	—	—	4 μg/mL

10

20

30

40

50

【 0 0 4 9 】

〔 L 2 3 a の抗原フラグメントの同定 〕

L 2 3 a のアミノ酸配列（配列番号 1）に基づいて、約 2 0 アミノ酸残基からなる各種ペプチドを定法に従い合成した。上記の T 細胞受容体遺伝子を導入した T 細胞株、上記の抗原提示細胞（A P C）、合成した各種のペプチドおよび上記組み換え G S T - L 2 3 a（L 2 3 a 全長）を用いて、上記と同様に、各細胞を 9 6 ウェルラウンドボトムプレートに播種し、ペプチドまたは G S T - L 2 3 a を添加した培地を加えて 2 4 時間培養後、上清中の I L - 2 濃度を、E L I S A（ebioscience）を用いて測定した。なお、ペプチドの濃度は 5 0 μ g / m L、G S T - L 2 3 a の濃度は 1 0 0 μ g / m L とした。

図 4 に結果を示した。図 4 から明らかなように、L 2 3 a 7 1 - 9 0 が顕著に I L - 2 濃度を上昇させた。一方、L 2 3 a 6 - 2 5 は I L - 2 濃度を上昇させなかった。図に示していないが、L 2 3 a 7 1 - 9 0 以外のペプチドは、いずれも L 2 3 a 6 - 2 5 と同様の結果であった。この結果から、L 2 3 a の第 7 1 位～第 9 0 位のアミノ酸配列（LDHYAI IKFPLTTESAMKKI、配列番号 3）からなるフラグメントが関節炎惹起性 T 細胞受容体の認識抗原であることが明らかとなった。

【 0 0 5 0 】

〔 関節炎惹起性 T 細胞受容体発現レトロジェニックマウス血清における抗 L 2 3 a 抗体の検出 〕

関節炎を発症したレトロジェニックマウス（L 2 3 a を認識する関節炎惹起性 T 細胞受容体発現レトロジェニックマウス）から採血し、血清を得た。

P 3 U 1 細胞破碎液、組み換え G S T - L 2 3 a または組み換え G S T - ヒストン 1 . 2 を 2 M E 含有サンプルバッファーに添加し、9 5 ° C で 5 分間加熱した。1 5 % のポリアクリルアミドゲルを用いて 2 0 m A 7 5 分間電気泳動し、その後 9 0 V で 3 0 分間、I m m o b i l i o n - P T r a n s f e r M e m b r a n e（Millipore）に転写した。転写した膜に 2 0 0 倍希釈した血清を反応させ、洗浄後、2 次抗体として H R P 標識抗マウス I g G 1 抗体を 2 0 0 0 倍希釈で反応させた。洗浄後、E C L P r i m e W e s t e r n B l o t t i n g D e t e c t i o n R e a g e n t を用いて発色させ、L A S - 4 0 0 0 m i n i を用いて検出した。

なお、ヒストン H 1 . 2 は、今回クローニングした関節炎惹起性 T 細胞受容体の認識抗原候補に含まれていたが、反応性がないことが確認されたタンパク質であり、マウスヒストン H 1 . 2 をコードする D N A（ACCESSION:NM_015786）のコード領域を発現ベクター p G E X - 6 P 1 へ挿入し、G S T - L 2 3 a と同様の方法で G S T タグを付加した組み換えタンパク質として調製した。

【 0 0 5 1 】

結果を図 5 に示した。図 5 中、左側の矢印は G S T - L 2 3 a のバンドの位置を表し、右側の矢印は血清中の抗体が結合した P 3 U 1 細胞破碎液中のタンパク質の位置を表す。G S T - ヒストン 1 . 2 に結合する抗体が存在しなかったことから、L 2 3 a を認識する関節炎惹起性 T 細胞受容体発現レトロジェニックマウスの血清中に、L 2 3 a を認識する抗体が多量に存在することが明らかとなった。

【 0 0 5 2 】

〔 関節リウマチ患者血清における抗 L 2 3 a 抗体の検出 〕

関節リウマチ患者 3 7 4 例、関節リウマチに罹患していない正常人 8 0 例から血液を採取し、血清を得た。

組み換え G S T - L 2 3 a または組み換え G S T を P B S に溶解し、2 0 0 n g / m L の溶液を調製した。E L I S A 用ポリソーププレート（商品名、Nunc）のウェルにそれぞれ添加して、4 ° C で 1 6 時間吸着させた。0 . 0 5 % T w e e n 2 0 含有 P B S で 5 回洗浄後、1 % B S A 含有 P B S で 1 時間ブロッキングした。その後同様に 5 回洗浄し、1 % B S A 含有 P B S で 5 0 0 倍に希釈した血清を 1 0 0 μ L ずつ各ウェルに添加した。室温で 2 時間放置し、5 回洗浄した後、H R P 標識抗ヒト I g G（H + L）（1 % B S A 含有 P B S で 4 0 0 0 倍に希釈したもの）を添加し 1 時間室温で放置した。5 回洗浄した後、

10

20

30

40

50

TMBを加えて15分後にOD450nmの値を測定した。GST-L23aのOD値からGSTのOD値を引いた値をL23aに対する抗体のOD値とした。

【0053】

結果を図6に示した。図中Controlは正常人、RAは関節リウマチ患者を表す。単位(U/mL)は、1例の陽性の血清を基準に任意に設定したものである。正常人の平均値の+3SD以下(図中の破線以下)を正常値と判定し、それを超えるものを陽性と判定した。図6に示したように、正常人は80例中1例のみが陽性であったが、関節リウマチ患者は374例中64例が陽性であった。t検定でp値が0.0012と有意差を持っていた。

【0054】

〔関節リウマチ患者の関節液中のL23a反応性T細胞の検出〕

関節リウマチ患者1名から関節液を採取した。健常人1名から血液を採取した。それぞれ関節液および血液から単核球を分離した。具体的には、関節液または血液にフィコールを加え、2200rpmで20分間遠心して単核球を分離、回収した。得られた単核球を 1×10^6 個/ウェルで96ウェルプレートに播種し、培地に組み換えGSTまたは組み換えGST-L23aを100 μ g/mL添加して、24時間培養した。培養終了6時間前にBrefeldinAを1 μ g/mLとなるように加え、サイトカインの分泌を止めた。細胞を回収後、一般的なサイトカイン染色法によりIL-17AおよびIFN- γ を染色し、フローサイトメーターで検出した。

【0055】

結果を図7に示した。関節リウマチ患者の関節液中にはGST-L23aに反応して炎症性サイトカインであるIL-17AやIFN- γ を分泌する細胞が検出された(右下)。一方、健常人の血液中にはGST-L23aに反応して炎症性サイトカインを分泌する細胞は検出されなかった。

【0056】

〔抗CCP抗体陰性の関節リウマチ患者血清における抗L23a抗体の検出〕

抗CCP抗体(抗環状シトルリン化ペプチド抗体)は、関節リウマチ患者において陽性率が90%を超え、非常に感度の高い関節リウマチの診断マーカーとして広く用いられている。しかし、約10%の関節リウマチ患者では陰性であることが知られている。

そこで、抗CCP抗体陰性の関節リウマチ患者59例から血液を採取して血清を得、上記〔関節リウマチ患者血清における抗L23a抗体の検出〕に記載の方法(ELISA法)を用いて、血清中の抗L23a抗体を測定した。

【0057】

結果を図8に示した。正常値の上限は上記〔関節リウマチ患者血清における抗L23a抗体の検出〕において設定した数値を採用した。図8に示したように、59例中32例(54%)が陽性であった。抗CCP抗体陰性の関節リウマチ患者の過半数において抗L23a抗体が検出されたことから、本発明の判定方法の有用性が示された。

【0058】

なお本発明は上述した各実施形態および実施例に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された学術文献および特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。

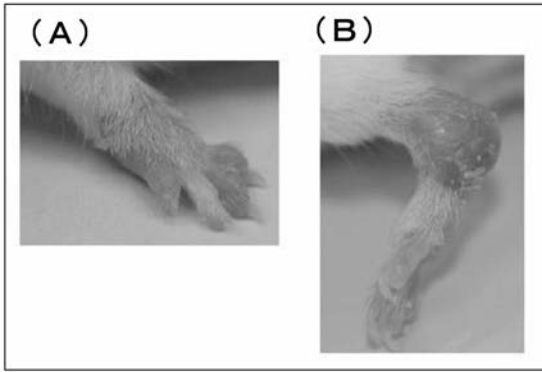
10

20

30

40

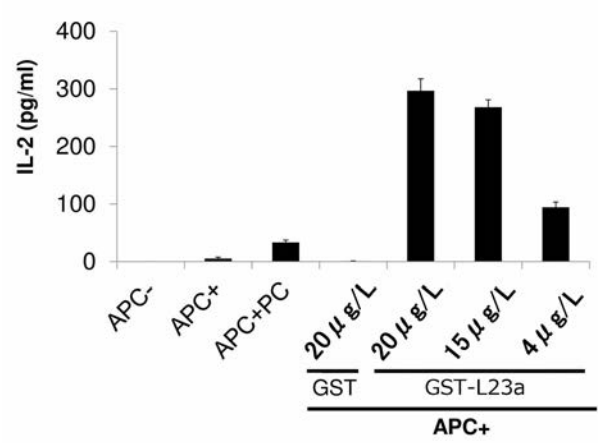
【 図 1 】



【 図 2 】

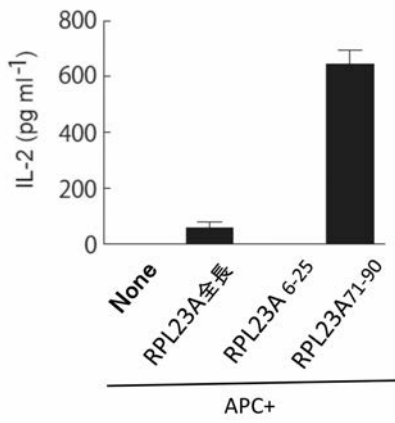
V α	J α	CDR	V β	J β	CDR
14D-3/DV8*03	40*01	CAA1YTGNYKYVF (配列番号4)	10*01	2-1*01	CASSRWGGERAEGFF (配列番号5)

【 図 3 】

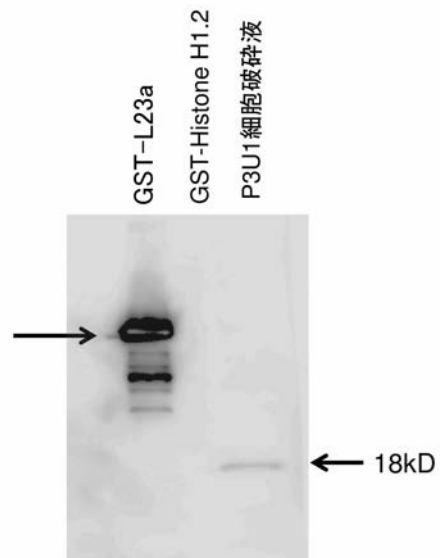


APC: 抗原提示細胞
 PC (ポジティブコントロール): B細胞株P3U1破砕液
 GST: リコンビナントGST
 GST-L23a: リコンビナントGSTタグ付きヒトL23a

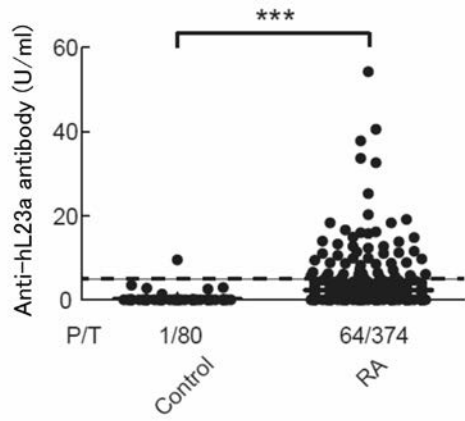
【 図 4 】



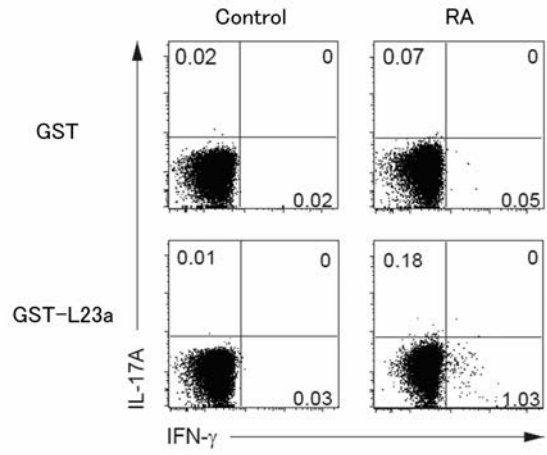
【 図 5 】



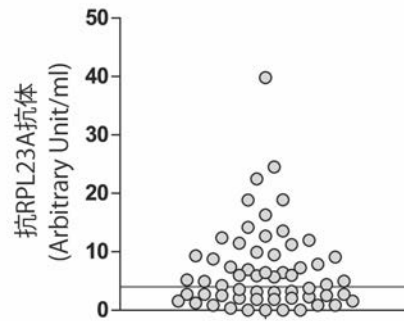
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 配列表 】

[2015016096000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2014/069306
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/564(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n 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) G01N33/564, C07K14/47, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, C12N15/09 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A/X	WO 2009/036246 A2 (IMMUNOTOPE, INC.), 19 March 2009 (19.03.2009), entire text; particularly, page 11, line 3 to page 15, line 15; table 2, SEQ ID NO:7; table 3, SEQ ID NO:265 (Family:none)	7-10/11,12
A/X	US 2008/0107668 A1 (Philip Ramila), 08 May 2008 (08.05.2008), entire text; particularly, paragraphs [0039], [0046], [0048]; table 2, SEQ ID NO:8; table 3, SEQ ID NO:129 & EP 2061503 A1 & WO 2008/088583 A2 & CA 2661651 A & AU 2007343683 A	7-10/11,12
<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 17 October, 2014 (17.10.14)		Date of mailing of the international search report 28 October, 2014 (28.10.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer Telephone No.
Facsimile No.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/069306

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98/15173 A1 (Japan Science and Technology Corp.), 16 April 1998 (16.04.1998), entire text & JP 3467520 B & US 6828472 B1	7-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/069306

Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 1-6 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: (See extra sheet)</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
Box No. III	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p> <p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/069306

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

The inventions set forth in these claims pertain to diagnostic methods to be practiced on the human body, said methods likely comprising diagnosis of a doctor, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 6 9 3 0 6									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/564(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n											
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. G01N33/564, C07K14/47, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, C12N15/09											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2014年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2014年	日本国実用新案登録公報	1996-2014年	日本国登録実用新案公報	1994-2014年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2014年										
日本国実用新案登録公報	1996-2014年										
日本国登録実用新案公報	1994-2014年										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq											
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 請求項の番号									
A/X	WO 2009/036246 A2 (IMMUNOTOPE, INC.) 2009.03.19, 全文、特に、第11頁第3行-第15頁第15行、Table 2、SEQ ID NO:7、Table 3、SEQ ID NO:265等参照 (ファミリーなし)	7-10/11, 12									
A/X	US 2008/0107668 A1 (Philip Ramila) 2008.05.08, 全文、特に、段落[0039]、[0046]、[0048]、TABLE2、SEQ ID NO:8、TABLE3、SEQ ID NO:129等参照 & EP 2061503 A1 & WO 2008/088583 A2 & CA 2661651 A & AU 2007343683 A	7-10/11, 12									
<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 17.10.2014		国際調査報告の発送日 28.10.2014									
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) 草川 貴史	2 J 4 0 7 5								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3252									

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2014/069306

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 請求項の番号
A	WO 98/15173 A1 (科学技術振興事業団) 1998.04.16, 全文等参照 & JP 3467520 B & US 6828472 B1	7-12

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 6 9 3 0 6

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 1-6 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、当該請求の範囲に記載された発明は、医者判断を含み得るヒトの身体診断方法に係るものであるから、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付があった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
	C 1 2 N 15/00	A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA61 CA01 CA07 CA09 CA11 CA20 DA02 DA06 EA04
 GA11 HA11
 4B063 QA01 QA05 QA13 QA18 QA19 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35
 QR55 QR62 QS25 QS32 QX01
 4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 DA86 EA50 FA74

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)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)	确定自身免疫性关节炎的方法和筛选自身免疫性关节炎诱导的T细胞活化抑制剂的方法		
公开(公告)号	JPWO2015016096A1	公开(公告)日	2017-03-02
申请号	JP2015529522	申请日	2014-07-22
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人京都大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人京都大学		
[标]发明人	坂口志文 伊藤能永		
发明人	坂口 志文 伊藤 能永		
IPC分类号	G01N33/564 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 C12Q1/02 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/6854 C07K14/47 G01N33/505 G01N33/564 G01N33/56972 G01N2500/10 G01N2800/102 G01N2800/50		
FI分类号	G01N33/564.ZNA.Z G01N33/53.K G01N33/50.Z G01N33/53.P G01N33/15.Z C12Q1/02 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA18 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB04 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/FB03 4B024/AA11 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QX01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2013159815 2013-07-31 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

检测自身免疫性关节炎的发作或发作，其特征在于检测 (1) 针对源自受试者的样品中存在的核糖体蛋白L23a的抗体，或 (2) 与核糖体蛋白L23a反应的CD4阳性T细胞。确定，使受试物质与与核糖体蛋白L23a反应的T细胞接触，使T细胞与核糖体蛋白L23a或其片段接触，并测定从该T细胞分泌的炎性细胞因子的方法 一种用于筛选抑制自身免疫诱导性关节炎的T细胞活化的物质的方法，该方法包括分析依赖于测试物质的炎性细胞因子分泌量变化的步骤。

