

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6628303号  
(P6628303)

(45) 発行日 令和2年1月8日(2020.1.8)

(24) 登録日 令和1年12月13日(2019.12.13)

(51) Int.Cl.		F I			
<b>GO 1 N</b>	<b>33/564</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N	33/564	Z
<b>GO 1 N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N	33/53	N
<b>C 1 2 M</b>	<b>1/34</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N	33/53	D
			C 1 2 M	1/34	F

請求項の数 6 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2015-100974 (P2015-100974)	(73) 特許権者	504136568
(22) 出願日	平成27年5月18日 (2015.5.18)		国立大学法人広島大学
(65) 公開番号	特開2016-217805 (P2016-217805A)		広島県東広島市鏡山1丁目3番2号
(43) 公開日	平成28年12月22日 (2016.12.22)	(74) 代理人	100095407
審査請求日	平成30年4月19日 (2018.4.19)		弁理士 木村 満
		(74) 代理人	100138955
			弁理士 末次 渉
		(72) 発明者	山崎 聡士
			広島県広島市南区霞一丁目2番3号 国立
			大学法人広島大学大学病院内
		(72) 発明者	杉山 英二
			広島県広島市南区霞一丁目2番3号 国立
			大学法人広島大学大学病院内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己免疫疾患の診断用キットおよび自己免疫疾患の診断を補助する判定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞内に形成されたストレス顆粒を構成するタンパク質を標識する第1の試薬と、ヒト抗体を標識する第2の試薬と、を備える、自己免疫疾患の診断用キット。

【請求項2】

前記第1の試薬は、前記タンパク質に結合する一次抗体と、前記一次抗体に結合する、蛍光色素で標識された二次抗体と、を含む、請求項1に記載の自己免疫疾患の診断用キット。

10

【請求項3】

細胞内のストレス顆粒の形成を誘導する誘導剤をさらに備える、請求項1または2に記載の自己免疫疾患の診断用キット。

【請求項4】

前記タンパク質は、e I F 3 エータである、請求項1から3のいずれか一項に記載の自己免疫疾患の診断用キット。

【請求項5】

細胞内に形成されたストレス顆粒を構成するタンパク質に対する抗体を、被検者から採取された試料から検出する検出ステップを含み、

20

前記検出ステップの結果が、前記被検者が自己免疫疾患に罹患しているか否かを判定するために用いられる、

自己免疫疾患の診断を補助する判定方法。

【請求項 6】

前記自己免疫疾患は、

関節リウマチである、

請求項 5 に記載の自己免疫疾患の診断を補助する判定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、自己免疫疾患の診断用キットおよび自己免疫疾患の診断を補助する判定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

自己免疫疾患では、免疫システムの異常により自己反応性の細胞および自己抗体が出現する。自己免疫疾患における自己抗体の診断的価値は大きく、自己抗体の検出に関して精力的に研究が行われている。全身性エリテマトーデスにおける抗二重鎖DNA抗体および関節リウマチにおける抗環状シトルリン化ペプチド抗体などのように、自己抗体の検出は、自己免疫疾患の診断または疾患活動性の評価などにおいて不可欠な検査となっている（非特許文献 1 参照）。

【0003】

基本的な自己抗体の検出法として抗核抗体検査が非特許文献 2 に開示されている。現在頻用されている抗核抗体（Anti Nuclear Antibody：ANA）の検出法は、HEp-2細胞を基質とした間接蛍光抗体法である。該間接蛍光抗体法では、スライド上のHEp-2細胞を患者血清に暴露し、抗原抗体反応を起こした患者血清をフルオレセインイソチオシアネート（fluorescein isothiocyanate、FITC）標識抗ヒトイムノグロブリンにより検出する。抗核抗体は、その染色パターンによって、均等型、辺縁型、斑紋型、核小体型、細胞質型、PCNA型、およびセントロメア型（散在斑紋型）に分類される。各々の染色パターンに対応した抗原が知られており、ANAの検出は、診断またはその後の検査の選択に大きな意義を有する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献 1】竹内 健、外 2 名、「全身性エリテマトーデス」、医学検査、日本臨床衛生検査技師会、2002年、51(9)、1256～1264

【非特許文献 2】三森 経世、「抗核抗体研究の進歩 - 自己抗体が認識する核および細胞質蛋白の構造と機能 -」、リウマチ、1992年、32(4)、366～378

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかし、抗核抗体検査は、健常人であっても陽性率が高い。また、染色パターンの判定に客観性を欠く場合がある。このため、抗核抗体検査による自己免疫疾患の診断精度は十分高いとは言い難い。抗核抗体検査と同等の検査により、さらに診断に有用な情報が得られることが大変望ましい。

【0006】

本発明は、上記実情に鑑みてなされたものであり、自己免疫疾患の診断精度を向上させることができる自己免疫疾患の診断用キット、および自己免疫疾患の罹患をより正確に判定することができる自己免疫疾患の診断を補助する判定方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

## 【0007】

本発明の第1の観点に係る自己免疫疾患の診断用キットは、  
細胞内に形成されたストレス顆粒を構成するタンパク質を標識する第1の試薬と、  
ヒト抗体を標識する第2の試薬と、  
を備える。

## 【0008】

この場合、前記第1の試薬は、  
前記タンパク質に結合する一次抗体と、  
前記一次抗体に結合する、蛍光色素で標識された二次抗体と、  
を含む、

10

## 【0009】

また、細胞内のストレス顆粒の形成を誘導する誘導剤をさらに備える、  
こととしてもよい。

## 【0010】

また、前記タンパク質は、  
eIF3エータである、  
こととしてもよい。

## 【0014】

本発明の第2の観点に係る自己免疫疾患の診断を補助する判定方法は、  
細胞内に形成されたストレス顆粒を構成するタンパク質に対する抗体を、被検者から採  
取された試料から検出する検出ステップを含み、  
前記検出ステップの結果が、前記被検者が自己免疫疾患に罹患しているか否かを判定す  
るために用いられる。

20

## 【0015】

この場合、前記自己免疫疾患は、  
関節リウマチである、  
こととしてもよい。

## 【発明の効果】

## 【0016】

本発明によれば、自己免疫疾患の診断精度を向上させることができる。また、本発明に  
よれば、自己免疫疾患の罹患をより正確に判定することができる。

30

## 【図面の簡単な説明】

## 【0017】

【図1】実施例における抗ストレス顆粒抗体陽性症例の染色例を示す図である。aは細胞  
質に形成されたストレス顆粒のマーカであるCy2の蛍光を示す図である。bはヒト抗  
体のマーカであるCy3の蛍光を示す図である。cはaとbとを重ね合わせた図である  
。

【図2】実施例における抗ストレス顆粒抗体陽性かつ抗核抗体陽性の症例の染色例を示す  
図である。aは細胞質に形成されたストレス顆粒のマーカであるCy2の蛍光を示す図  
である。bはヒト抗体のマーカであるCy3の蛍光を示す図である。cはaとbとを重ね  
合わせた図である。

40

## 【発明を実施するための形態】

## 【0018】

本発明に係る実施の形態について説明する。なお、本発明は下記の実施の形態および図  
面によって限定されるものではない。

## 【0019】

(実施の形態1)

まず、実施の形態1について説明する。実施の形態1に係る自己免疫疾患の診断用キッ  
トは、細胞内に形成されたストレス顆粒を構成するタンパク質を標識する第1の試薬と、

50

ヒト抗体を標識する第2の試薬と、を備える。

【0020】

ストレス顆粒 (Stress Granule、以下単に「SG」ともいう) は、ストレスに反応し細胞質内に形成されるタンパク質とRNAとの凝集塊である。ストレスとは、環境条件の急激な変化であって、例えば、熱ショック、酸化ストレス、虚血、ウイルス感染ならびに変性タンパク質および二本鎖RNAの形成などである。ストレス顆粒の形成は、ストレスにより翻訳が停止されたmRNAおよび翻訳の機構を一時的に保存し、ストレスの解除後に速やかに翻訳を開始するためであると考えられている。ストレス顆粒を構成する分子として、mRNA、60Sを除くリボソームRNA、RNA結合タンパク質などが知られている。

【0021】

ストレス顆粒を構成するタンパク質は、例えば、表1に挙げられる。第1の試薬は、表1に挙げられたタンパク質の少なくとも1種を標識するものであれば特に限定されない。好適には、第1の試薬は、ストレス顆粒を構成するタンパク質として、eIF3エータを標識する。

【0022】

## 【表 1】

ストレス顆粒を構成するタンパク質	
Ago1 (Argonaute-1)	
Ago2 (Argonaute-2)	
APOBEC3G (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G)	
Ataxin-2	
Caprin-1	
CPEB (cytoplasmic polyadenylation element-binding protein)	
DIS1 (Disrupted-in-Schizophrenia)	
eIF3エータ(η) (eukaryotic translation initiation factor 3 eta)	
eIF3 (eukaryotic translation initiation factor 3)	10
eIF4E (eukaryotic translation initiator factor 4E)	
eIF4G (eukaryotic translation initiator factor 4G)	
FAST (Fas-activated serine/threonine kinase)	
FMRP (fragile X mental retardation protein)	
FXR1 (fragile X mental retardation-related protein 1)	
FBP (FUZE-binding protein)	
KSRP (KH-type splicing regulatory protein)	
G3BP (Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein)	
HuR (Hu antigen R)	
Importin 8	
IP5K (1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase)	20
Lin28 (Lineage28)	
LINE 1 ORF1p (long interspersed nuclear element 1 transposon open reading frame 1)	
Lsm14	
MEX3B	
MLN51	
Musashi 1	
PABP-1 (Poly(A)-binding protein 1)	
PCBP2	
RCK (p54)	
Roquin	
Plakophilin	
PMR1 (polysome-associated RNAse 1)	30
Pumilio 2	
Rap55 (RNA-associated protein 55)	
Rpb4 (RNA polymerase II subunit B32)	
SRC3 (steroid coactivator 3)	
Staufen	
SMN (survival of motor neurons)	
Smaug	
TIA-1 (T cell internal antigen-1)	
TIAR (TIA-1-related)	
TRAF2 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 2)	
TTP (tristetraprolin)	
BRF-1	40
Xrn1 (Exoribonuclease 1)	
YB-1	
ZBP1 (zipcode binding protein 1)	

## 【0023】

より詳細には、第1の試薬は、例えば、ストレス顆粒を構成するタンパク質に結合する標識された抗体である。標識された抗体は、好ましくは、放射性同位体、発色反応で用いる酵素および蛍光色素などを担持する。標識された抗体は、免疫反応によってタンパク質を標識することができる。放射性同位体を担持させた抗体を用いる場合、免疫反応後に放射性同位体の放射線を検出すればよい。発色反応で用いる酵素を担持させた抗体を用いる

場合、免疫反応後に当該酵素に対する発色基質を反応させ、生じた色によってタンパク質を検出することができる。蛍光色素を担持させた抗体を用いる場合、免疫反応の後に蛍光色素に対する励起波長の光を当て、その蛍光を検出すればよい。

【0024】

放射性同位体としては、例えば、重水素 ( $^2\text{H}$ )、三重水素 ( $^3\text{H}$ )、 $^{10}\text{B}$ 、 $^{11}\text{B}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{18}\text{O}$ などが挙げられる。発色反応で用いる酵素は、公知の酵素、例えばアルカリホスファターゼおよびペルオキシダーゼなどである。蛍光色素は、公知の任意のものが使用できるが、例えば、FITC、Cy2、Cy3、フルオレセイン、ローダミン、ダンシル、カルボシアニン誘導体など、あるいは蛍光タンパク質としての緑色蛍光タンパク質およびその変異体などである。

10

【0025】

好ましくは、第1の試薬は、上記のタンパク質に結合する一次抗体と、一次抗体に結合する、蛍光色素で標識された二次抗体と、を含む。この場合、例えば、一次抗体として、ヒト以外の動物、例えばヤギで作製した上記タンパク質に対するヤギ抗体を使用し、二次抗体として、蛍光色素で標識されたロバ抗ヤギ抗体を使用すればよい。一次抗体および二次抗体は、間接蛍光抗体法により、上記のタンパク質の少なくとも1種を標識できる。

【0026】

第2の試薬は、ヒト抗体を標識するものであれば特に限定されない。第2の試薬は、例えば、標識された、ヒト免疫グロブリン抗体などのヒト抗体である。ヒト免疫グロブリン抗体は、特に限定されず、抗ヒトIgG抗体、抗ヒトIgM抗体、抗ヒトIgA抗体、抗ヒトIgD抗体および抗ヒトIgE抗体であってもよい。

20

【0027】

上記のタンパク質に対する抗体は、公知の方法で作製したものをを用いてもよいし、市販の抗体を用いてもよい。抗体は、ロバ、ヤギ、マウス、ウサギ、ラット、ヒツジ、ブタ、トリなど任意の動物種で作製されたものをを用いることができる。

【0028】

なお、第1の試薬および第2の試薬としては、抗体に限らず、上述のタンパク質に結合する、標識されたアプタマー、化合物またはペプチドなどであってもよい。また、抗体の標識には、アビジン - ビオチンシステムを用いてもよい。

【0029】

細胞は、特に限定されず、細胞内にストレス顆粒が形成されるものであれば任意の細胞を用いることができる。例えば、細胞は、初代培養細胞でも各種細胞株でもよく、好ましくは癌細胞株、特に骨肉腫細胞株であるU2OSなどである。

30

【0030】

次に、上記診断用キットの使用方法について説明する。例えば、第1の試薬および第2の試薬として抗体を用いる場合、当該診断用キットは、公知の免疫染色法で使用するのが好ましい。まず、ホルムアルデヒドなどで固定された、細胞質内にストレス顆粒が形成された細胞に対して、ブロッッキング処理を施す。次に、第1の試薬および被検者の血清に、細胞を暴露する。続いて、洗浄処理によって未反応の第1の試薬を除去した後、第2の試薬に細胞を暴露する。洗浄処理後、スライドガラスに細胞を固定し、蛍光顕微鏡で観察する。

40

【0031】

第1の試薬による標識は、ストレス顆粒の存在を示す。第2の試薬による標識は、ヒト抗体の存在を示す。したがって、第1の試薬の標識と第2の試薬の標識とが重なっていれば、細胞内に形成されたストレス顆粒を構成するタンパク質に対する自己抗体が被検者の血清中に含まれていることになる。

【0032】

下記実施例に示すように、ストレス顆粒を構成するタンパク質に対する自己抗体は、自己免疫疾患と関連する。本診断用キットを使用することで、自己免疫疾患の患者を診断できる。特に、従来抗核抗体検査および抗細胞質抗体検査が陰性の被検者に対して、本診

50

断用キットを使用することで、該被検者の自己免疫疾患を診断あるいは自己免疫疾患への易罹患性を判定できる。

【0033】

ここで、自己免疫疾患とは、免疫系を原因とする種々の疾患であり、より詳細には、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、水疱性類天疱瘡、パセドウ病、慢性甲状腺炎、A型胃炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、セリアックスブルー、インスリン依存性糖尿病、アジソン病、グッドパスチャー症候群、半月体形成性糸球体腎炎、多発性硬化症、ギラン・バレー症候群、重症筋無力症、自己免疫性溶血性貧血、赤芽球癆、突発性血小板減少性紫斑病、拡張型心筋症、慢性心筋炎、全身性エリテマトーデスおよび自己免疫性不妊症などである。特に、自己免疫疾患は、関節リウマチ、シェーグレン症候群、膠原病、強皮症、関節炎、レイノー病、RS3PE (Remitting Seronegative Symmetrical Synovitis With Pitting Edema) 症候群、および変形性関節症などである。

10

【0034】

なお、本実施の形態に係る診断用キットは、細胞内のストレス顆粒の形成を誘導する誘導剤をさらに備えてもよい。誘導剤としては、亜ヒ酸ナトリウム、マレイン酸ジエチル (DEM)、 $H_2O_2$ 、ツニカマイシン、タブシガルギン、ジチオトレイトール、エトポシドおよびテノイルトリフルオロアセトンなどが挙げられる。

【0035】

以上詳細に説明したように、本実施の形態に係る診断用キットによれば、自己免疫疾患を精度よく診断することができる。また、該診断用キットは、ヒト抗体を標識する第2の試薬を備えるので、試料中の抗核抗体の有無もわかる。

20

【0036】

なお、第1の試薬は一次抗体と二次抗体とを含んでもよいこととした。一次抗体と二次抗体とを用いる間接蛍光抗体法は、一次抗体に複数の二次抗体が反応するため、蛍光強度など標識のシグナルを増強させることができ、診断が容易になる。また、ストレス顆粒を構成するタンパク質に特異的な一次抗体があれば、共通の二次抗体を使用できるので二次抗体の汎用性が高まる。

【0037】

また、上記診断用キットは、誘導剤を備えてもよいこととした。誘導剤によって、継代細胞、細胞株などの各種の細胞で、ストレス顆粒の形成を誘導することができるので、本診断用キットの利便性がさらに高まる。

30

【0038】

なお、第1の試薬および第2の試薬として抗体を用いる場合、ストレス顆粒を構成するタンパク質およびヒト抗体を、蛍光抗体補体法で標識してもよい。

【0039】

(実施の形態2)

次に、実施の形態2について説明する。上述のように、ストレス顆粒はストレスに反応し細胞質内に形成される。このため、細胞に誘導剤などでストレスを負荷することで細胞内にストレス顆粒を形成させることができる。これに対し、実施の形態2に係る細胞は、細胞内のストレス顆粒の形成を誘導しなくても、ストレス顆粒が細胞内に形成される。本実施の形態に係る細胞は、人為的にストレス顆粒の形成を誘導せずに、例えば、Eagle's Minimum Essential Medium培地などの塩、非必須アミノ酸、グルタミンおよび重炭酸ナトリウムなどを必要最小限含む培地で培養してもストレス顆粒が細胞内に形成される。

40

【0040】

本実施の形態に係る細胞は、ストレス顆粒の形成に関与する、あるいはストレス顆粒の形成機序を促進するタンパク質をコードする遺伝子を細胞に導入することで作製できる。当該タンパク質は、例えば、表1に示すストレス顆粒を構成するタンパク質である。この場合、1種または複数種のタンパク質をコードする各遺伝子を細胞に導入してもよい。

50

## 【0041】

遺伝子は、公知の生物学的、化学的または物理的な手法で細胞に導入できる。例えば、ストレス顆粒を構成するタンパク質をコードする遺伝子を組み込んだベクターを、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法およびリポフェクション法などの公知の方法で細胞に導入すればよい。また、トランスポゼース遺伝子を有するトランスポゾンベクターを用いて、ストレス顆粒を構成するタンパク質をコードする遺伝子を細胞に導入してもよい。

## 【0042】

遺伝子の導入では、プログラマブルエンドヌクLEASE (programmable endonuclease) で細胞のゲノムを任意の部位で切断し、相同組換え修復を利用して、ストレス顆粒を構成するタンパク質をコードする遺伝子をゲノムに挿入してもよい。プログラマブルエンドヌクLEASEは、特に限定されないが、例えば、transcription activator-like effector nuclease (TALEN)、zinc finger nuclease (ZFN) および CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat and Crispr associated protein) システムなどである。プログラマブルエンドヌクLEASEは、ゲノムの切断部位近傍の塩基配列に応じて、公知の方法で設計される。好ましくは、転写活性が高い遺伝子の下流にストレス顆粒を構成するタンパク質をコードする遺伝子を挿入すればよい。

## 【0043】

ストレスに暴露された細胞におけるストレス顆粒の形成には、a regulatory subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2) complex の Ser 51 のリン酸化が必要である。したがって、本実施の形態に係る細胞は、eIF2 complex の Ser 51 のリン酸化を促進するタンパク質などの因子を細胞内に導入することも作製できる。

## 【0044】

好適には、細胞内に形成されるストレス顆粒を構成する少なくとも1種のタンパク質が、標識されている。タンパク質の標識としては、例えば、緑色蛍光タンパク質 (GFP) が好ましい。GFPで標識する場合、ストレス顆粒を構成するタンパク質を、GFPとの融合タンパク質として発現させればよい。

## 【0045】

人為的に誘導しなくてもストレス顆粒が細胞内に形成されたことは、例えば、ストレス顆粒を構成するタンパク質を標識する上記第1の試薬で確認することができる。当該細胞を培養し、ストレス顆粒を構成するタンパク質、例えば、eIF が細胞質内で観察されれば、ストレス顆粒が細胞内に形成されたと判断できる。この場合、陽性対照として、誘導剤に暴露した上記U2OSと比較することで、ストレス顆粒の形成が確認しやすい。また、ストレス顆粒の形成に特異的な遺伝子の発現を定量することでも、ストレス顆粒の形成を確認できる。

## 【0046】

以上詳細に説明したように、本実施の形態に係る細胞によれば、誘導剤を使用しなくても、ストレス顆粒が細胞内に形成されるので、ストレス顆粒を構成するタンパク質に対するヒト抗体を被検者の血清などから検出する際に有用である。細胞に誘導剤を作用させる工程が不要になるので、試験時間を短縮でき、試験を簡便に行うことができる。当該ヒト抗体は、自己免疫疾患と関連するので、本実施の形態に係る細胞は、自己免疫疾患の診断用キットに好適である。

## 【0047】

なお、本実施の形態では、細胞内に形成されるストレス顆粒を構成する少なくとも1種のタンパク質が、標識されていてもよいこととした。これにより、細胞内の該タンパク質

10

20

30

40

50

の局在が把握できるので、ストレス顆粒の形成機序を観察または解析しやすくなる。また、当該細胞に作用させたヒト抗体の標識の位置と細胞内の該タンパク質の局在との対比で細胞内の該タンパク質に対するヒト抗体の有無を簡便に決定することができる。

【0048】

別の実施の形態では、本実施の形態に係る細胞と、ヒト抗体を標識する試薬と、を備える自己免疫疾患の診断用キットが提供される。当該診断用キットによれば、細胞においてストレス顆粒の形成を誘導しなくても、被検者の血清などに含まれるストレス顆粒を形成するタンパク質に対するヒト抗体を検出できるので、迅速および簡便に自己免疫疾患を診断できる。

【0049】

(実施の形態3)

続いて、実施の形態3について説明する。本実施の形態に係る自己免疫疾患への易罹患性の判定方法は、検出ステップと、判定ステップとを含む。

【0050】

検出ステップでは、ストレス顆粒を構成するタンパク質に対する抗体を、被検者から採取された試料から検出する。当該タンパク質は、例えば表1に示されるタンパク質である。抗体はヒト抗体で検出できる。当該抗体は、標識された、ヒト免疫グロブリン抗体などのヒト抗体で上述のように検出できる。

【0051】

試料は、被検者の血液、尿、関節液、胆汁、胃液、腸液、唾液、脳脊髄液などである。好適には、試料は血清である。

【0052】

判定ステップでは、検出ステップの結果に基づいて、被検者の自己免疫疾患への易罹患性を判定する。例えば、試料から抗体が検出された場合、試料から抗体が検出されない場合よりも被検者が自己免疫疾患に罹り易いと判定する。一方、試料から抗体が検出されない場合、試料から抗体が検出された場合よりも被検者が自己免疫疾患に罹りにくいと判定してもよい。

【0053】

自己免疫疾患は、上述の免疫系を原因とする種々の疾患であれば特に限定されないが、好ましくは関節リウマチ、シェーグレン症候群、膠原病、強皮症、関節炎、レイノー病、RS3PE症候群および変形性関節症などである。

【0054】

以上詳細に説明したように、本実施の形態に係る自己免疫疾患への易罹患性の判定方法は、自己免疫疾患の発症または易罹患性と関連する、ストレス顆粒を構成するタンパク質に対する抗体を被検者由来の試料から検出するので、被検者の自己免疫疾患への易罹患性を精度よく判定することができる。

【0055】

なお、当該判定方法は、特に関節リウマチの易罹患性の判定に有効である。抗核抗体検査は、偽陽性が比較的多く、染色パターンの判定に客観性を欠くことがあるため、関節リウマチの易罹患性の判定精度を向上させる点で、本判定方法の臨床的意義は極めて高い。本判定方法は、関節リウマチの易罹患性の判定において単独で用いられてもよいし、抗核抗体検査と併用されてもよい。また、当該判定方法は、リウマチ因子または抗環状シトルリン化ペプチド抗体(Anti-cyclic citrullinated peptide antibody: ACPA)による検査の代用としてもよいし、リウマチ因子またはACPAによる検査を補助するために用いられてもよい。

【0056】

別の実施の形態では、自己免疫疾患の診断方法が提供される。当該診断方法は、上記検出ステップと、検出ステップの結果に基づいて、被検者が自己免疫疾患に罹患しているか否かを診断する診断ステップとを含む。例えば、診断ステップでは、ストレス顆粒を構成するタンパク質に対する抗体が被検者から採取された試料から検出された場合、被検者が

10

20

30

40

50

自己免疫疾患に罹患していると診断する。

【0057】

他の実施の形態では、自己免疫疾患の予後予測方法が提供される。当該予後予測方法は、上記検出ステップと、検出ステップの結果に基づいて、被検者の自己免疫疾患の予後を予測する予測ステップとを含む。例えば、予測ステップでは、ストレス顆粒を構成するタンパク質に対する抗体が被検者から採取された試料から検出された場合、該抗体が試料から検出されない場合よりも、被検者の自己免疫疾患の予後が不良であると予測する。

【実施例】

【0058】

以下の実施例により、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【0059】

(対象症例)

診断を知らされていない担当者が、広島大学病院リウマチ・膠原病科受診症例のうち、抗核抗体検査が行われた90症例を無作為に選択し、以下の検討の対象とした。

【0060】

(ストレス顆粒の誘導と細胞の固定)

24ウェルの組織培養プレートにカバースリップを設置した。各ウェルに $2.0 \times 10^5$ 個の骨肉腫細胞株U2OSを播種した。播種した細胞を、10%の胎児牛血清を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)で、37°Cの5%の二酸化炭素存在下で一晩培養した。培養することで細胞をプレートに接着させた。

【0061】

ストレス顆粒を誘導するため、各ウェルに、0.5 mMの亜ヒ酸ナトリウムを100 μMになるように添加し、37°Cの5%の二酸化炭素存在下で細胞を40分培養した。Phosphate buffer saline (PBS)で各ウェルを洗浄後、PBSに希釈した4%ホルムアルデヒドで細胞を固定した。次に、100%メタノールで-20°Cにて15分間、細胞を固定し、さらに70%エタノールに細胞を浸して、4°Cで4時間以上脱水を行った。その後、細胞をPBSに浸し、染色まで4°Cで保存した。

【0062】

(抗ストレス顆粒抗体の検出)

ストレス顆粒誘導後の固定した細胞を、5%の正常馬血清を含むPBSを用いてブロッキングした。続いて、ストレス顆粒のマーカーとしてのヤギ抗eIF3抗体(Santa Cruz社製)と患者血清とを、抗体が1 μg/mlに、患者血清が40倍希釈となるようにブロッキング溶液と混合し、各ウェルに添加した。次に、プレートを4°Cで1時間インキュベートした。各ウェルをPBSで3回洗浄後、Cy2ラベルしたロバ抗ヤギ抗体とCy3ラベルしたロバ抗ヒト抗体と、核染色用のHoechst 33258 (1 ng/ml)とをPBSに希釈し、各ウェルに添加した。プレートを室温で1時間インキュベートした。PBSで3回洗浄後、スライドグラスに細胞を固定し、蛍光顕微鏡(オリンパスシステム生物顕微鏡BX53)で観察した。

【0063】

(結果)

eIF3に結合したヤギ抗eIF3抗体には、Cy2ラベルしたロバ抗ヤギ抗体が結合するので、Cy2の蛍光により細胞質内に凝集したSGを検出できる。患者血清に抗SG抗体が存在する場合、ストレス顆粒に結合した抗SG抗体にCy3ラベルしたロバ抗ヒト抗体が結合するので、Cy2で検出されたストレス顆粒の位置に重なってCy3の蛍光が観察される。

【0064】

患者血清に抗SG抗体が検出された症例、すなわち抗SG抗体陽性症例の染色例を図1および図2に示す。図1aの矢印は、Cy2の蛍光を示し、細胞質に形成されたSGの局

10

20

30

40

50

在を示す。図 1 b の矢印は、C y 3 の蛍光を示し、ヒト抗体 ( I g G ) の局在を示す。図 1 c は、図 1 a と図 1 b とを重ね合わせた画像を示す。S G の局在を示す C y 2 の蛍光とヒト抗体の局在を示す C y 3 の蛍光の位置が一致している。このため、当該症例の患者血清には、抗 S G 抗体が含まれていることが示された。

【 0 0 6 5 】

図 2 は、抗 S G 抗体陽性かつ抗核抗体陽性である症例の染色例を示す。図 1 と同様に、図 2 a、図 2 b および図 2 c から抗 S G 抗体陽性を確認できる。さらに、ヒト抗体の局在を示す C y 3 の蛍光が H o e c h s t 3 3 2 5 8 で染色された核内に確認できるので ( 図 2 b )、当該症例の患者血清には、抗核抗体が含まれていることが示された。なお、抗核抗体のパターンは、F L U O R O H E P A N A T E S T で検出されたパターンと同一であった。このことから、本方法によれば、抗核抗体の検出能を維持しながら抗 S G 抗体の検出が可能である。

【 0 0 6 6 】

本方法で抗 S G 抗体を検出したところ、90 症例のうち 15 症例 ( 17% ) が抗 S G 抗体陽性症例であった。表 2 は、陽性症例の特徴を示す。なお、図 1 及び図 2 は、表 1 の症例 13 および症例 14 の結果を示す。

【 0 0 6 7 】

【表 2】

症例	主訴	診断	抗核抗体	リウマチ因子	ACPA
1	関節痛	診断未確定関節炎	-	78.1*	1.1
2	関節痛	関節リウマチ	-	<6.0	0.7
3	関節痛	全身性強皮症	-	6.7	N.D.
4	関節痛	RS3PE	斑紋型	<6.0	2.4
5	関節痛	変形性関節症	-	<6.0	0.4
6	レイノー	レイノー現象	-	<6.0	N.D.
7	関節痛	クローン病	-	<6.0	0.8
8	関節痛	診断未確定関節炎	-	15.3	0.7
9	関節痛	診断未確定関節炎	-	<6.0	0.6
10	関節痛	診断未確定関節炎	-	27.4*	0.6
11	関節痛	関節リウマチ	-	12.2.	9.9*
12	関節痛	診断未確定関節炎	-	<6.0	<0.5
13	関節痛	関節リウマチ	-	39.9*	156.2*
14	関節痛	シェーグレン症候群	斑紋型	20*	N.D.
15	関節痛	関節リウマチ	-	<6.0	<0.5

【 0 0 6 8 】

陽性症例の診断は、診断未確定関節炎 5 例、関節リウマチ 4 例、R S 3 P E、クローン病、全身性強皮症、レイノー現象、シェーグレン症候群、変形性関節症が各々一例であった。一例のレイノー現象を除く症例が関節痛を主訴とする症例であった。

【 0 0 6 9 】

抗 S G 抗体陽性の 15 症例の中で、抗核抗体陽性の症例は 2 例のみであった。抗核抗体陽性の 2 症例は、いずれも斑紋型であった。抗細胞質抗体は全例で陰性であった。抗 S G 抗体陽性の 15 症例には、リウマチ因子 ( R F ) 陽性が 4 症例 ( 症例 1、10、13、1

4)、ACPA陽性が2例(症例11、13)であった。なお、リウマチ因子の正常範囲は、15.0IU/ml未満である。ACPAの正常範囲は、4.5U/ml未満である。表2中の「N.D.」は未決定を意味する。

【0070】

リウマチ因子陽性の4例およびACPA陽性の2例を除く9例は、関節リウマチ関連の自己抗体が陰性であったにも関わらず、抗SG抗体が検出された点の特筆に値する。関節リウマチの確定診断に至った症例は4例あったが(症例2、11、13、15)、RFおよびACPAがともに明らかに陽性であった症例は症例13のみで、他の3症例はRFおよびACPAがともに陰性(症例2、15)、あるいはACPAのみが低タイターで陽性であった(症例11)。

10

【0071】

本実施例で示された結果により、関節リウマチに関連する自己抗体が陰性の症例であっても、抗SG抗体の検出によって関節リウマチなどの自己免疫疾患の症例または自己免疫疾患を発症する可能性のある症例を見出すことができる。したがって、抗SG抗体の検出は、これまで診断し得なかった自己免疫疾患の診断の一助になるうえ、自己免疫疾患への易罹患性を判定に有効である。

【0072】

上述した実施の形態は、本発明を説明するためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。すなわち、本発明の範囲は、実施の形態ではなく、特許請求の範囲によって示される。そして、特許請求の範囲内およびそれと同等の発明の意義の範囲内で施される様々な変形が、本発明の範囲内とみなされる。

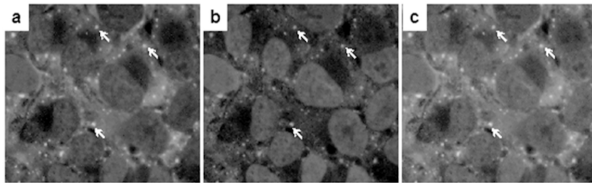
20

【産業上の利用可能性】

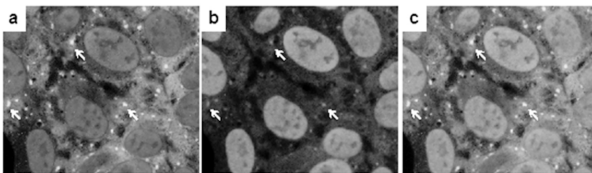
【0073】

本発明は、自己免疫疾患の診断および治療に好適である。

【図1】



【図2】



---

フロントページの続き

(72)発明者 森本 隆行

広島県広島市南区霞一丁目2番3号 国立大学法人広島大学大学病院内

審査官 西浦 昌哉

(56)参考文献 米国特許出願公開第2010/0330583 (US, A1)

特表2011-524977 (JP, A)

YANG, W-H. et al., RNA-associated protein 55 (RAP55) localizes to mRNA processing bodies and stress granules, RNA, RNA Society, 2006年4月, Vol.12/No.4, p547-554

YANG, W-H. et al., Probing the mRNA processing body using protein macroarrays and "autoantigenomics", RNA, RNA Society, 2007年5月, vol.13/No.5, pp.704-712

GOTTSCHALD, O.R. et al., TIAR and TIA-1 mRNA-Binding Proteins Co-aggregate under Conditions of Rapid Oxygen Decline and Extreme Hypoxia and Suppress the HIF-1 Pathway, JOURNAL OF MOLECULAR CELL BIOLOGY, Oxford University Press, 2010年10月27日, Vol.2/No.6, pp.345-356

YU, J.H. et al., Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body, RNA, RNA Society, 2005年12月, Vol.11/No.12, pp.1795-1802

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

C12M 1/00 - 3/10

C12Q 1/00 - 3/00

C12N 1/00 - 7/08

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	诊断自身免疫性疾病的试剂盒和辅助诊断自身免疫性疾病的测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP6628303B2</a>	公开(公告)日	2020-01-08
申请号	JP2015100974	申请日	2015-05-18
申请(专利权)人(译)	国立大学法人広島大学		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人広島大学		
[标]发明人	山崎 聡士 杉山 英二 森本 隆行		
发明人	山崎 聡士 杉山 英二 森本 隆行		
IPC分类号	G01N33/564 G01N33/53 C12M1/34		
FI分类号	G01N33/564.Z G01N33/53.N G01N33/53.D C12M1/34.F C12N5/00.102 C12N5/00.202.A C12N5/071 C12N5/10 C12Q1/02 G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/BB11 4B029/BB17 4B029/CC01 4B029/CC02 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/FA12 4B029/FA15 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QR48 4B063/QR50 4B063/QR56 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QX02 4B065/AA93X 4B065/AC12 4B065/AC20 4B065/BC12 4B065/BD50 4B065/CA46		
代理人(译)	木村 充		
其他公开文献	JP2016217805A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

解决的问题：提供用于诊断自身免疫性疾病的试剂盒和能够提高自身免疫性疾病的诊断准确性的细胞，以及能够更准确地确定关于发病风险的自身免疫性疾病的自身免疫性疾病的发病风险确定方法。 解决方案：用于诊断自身免疫性疾病的试剂盒包括：第一试剂，用于标记构成细胞内部形成的应激颗粒的蛋白质；以及用于标记人抗体的第二试剂。自身免疫性疾病的病态风险的确定方法包括：检测步骤，其从从受试者收集的样品中检测构成细胞内形成的应激颗粒的蛋白质的抗体；以及根据检测步骤的结果确定受试者自身免疫性疾病的发病风险的确定步骤。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6628303号 (P6628303)
(45) 発行日 令和2年1月8日(2020.1.8)	(24) 登録日 令和1年12月13日(2019.12.13)	
(51) Int. Cl.	F I	
GO1N 33/564 (2006.01)	GO1N 33/564	Z
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53	N
C12M 1/34 (2006.01)	GO1N 33/53	D
	C12M 1/34	F
請求項の数 6 (全 13 頁)		
(21) 出願番号 特願2015-100974(P2015-100974)	(73) 特許権者 504138568	
(22) 出願日 平成27年5月18日(2015.5.18)	国立大学法人広島大学	
(65) 公開番号 特願2016-217805(P2016-217805A)	広島県広島市東区山1丁目3番2号	
(43) 公開日 平成28年12月22日(2016.12.22)	100095407	
審査請求日 平成30年4月19日(2018.4.19)	弁理士 木村 満	
	100138955	
	弁理士 末次 渉	
	山崎 聡士	
	広島県広島市南区露一丁目2番3号 国立	
	大学法人広島大学大学院内	
	杉山 英二	
	広島県広島市南区露一丁目2番3号 国立	
	大学法人広島大学大学院内	
最終頁に続く		

(54) 【発明の名称】 自己免疫疾患の診断用キットおよび自己免疫疾患の診断を補助する判定方法