

(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2017-75833

(P2017-75833A)

(43) 公開日 平成29年4月20日(2017.4.20)

(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 D	2 G O 4 5
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P	
GO 1 N 33/49 (2006.01)	GO 1 N 33/49 X	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	
	GO 1 N 33/53 K	

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願2015-202954 (P2015-202954)  
 (22) 出願日 平成27年10月14日 (2015.10.14)

(出願人による申告)平成27年度、国立研究開発法人日本医療研究開発機構、難治性疾患実用化研究事業「稀少小児遺伝性血液疾患に対する次世代シーケンサーを利用した診断システムの開発に関する研究」委託研究開発、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(71) 出願人 803000056  
 公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団  
 東京都千代田区岩本町二丁目11番1号  
 (74) 代理人 110001427  
 特許業務法人前田特許事務所  
 (72) 発明者 國島 伸治  
 愛知県名古屋市中区三の丸四丁目1番1号  
 独立行政法人国立病院機構 名古屋医療センター内  
 Fターム(参考) 2G045 AA25 DA36

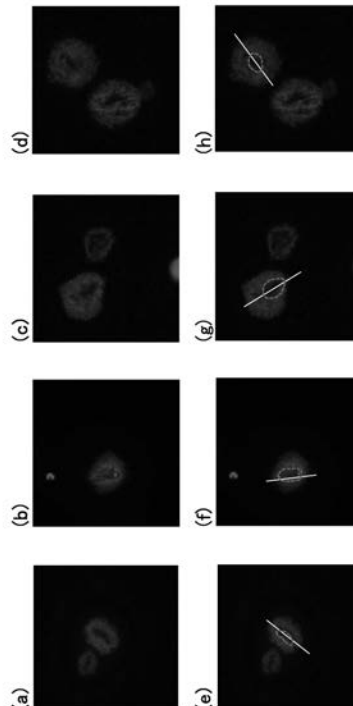
(54) 【発明の名称】 ACTN1 遺伝子変異を伴う先天性巨大血小板症の診断補助方法及び診断キット

(57) 【要約】

【課題】ACTN1遺伝子変異を伴う先天性巨大血小板症の簡易且つ明確な診断補助方法を提供する。

【解決手段】生物学的試料中の血小板をスライドガラス上に接着させて血小板を進展させる工程と、進展させた血小板に抗非筋ミオシン重鎖IIA抗体を作用させて免疫染色を行う工程と、非筋ミオシン重鎖IIA蛋白が血小板の辺縁部に位置する場合は被験者は正常であるが、中央部に位置する場合はACTN1遺伝子変異を伴う先天性巨大血小板症であると診断補助する。

【選択図】図1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

被験者の生物学的試料をスライドガラス上に載置して、前記生物学的試料中の血小板を前記スライドガラス上に接着させて血小板を進展させる工程と、

進展させた血小板に抗非筋ミオシン重鎖IIA抗体を作用させて免疫染色を行い、免疫染色標本を作製する工程と、

前記免疫染色標本における非筋ミオシン重鎖IIA蛋白を観察し、血小板の進展とともに非筋ミオシン重鎖IIA蛋白が血小板の辺縁部に位置する場合、前記被験者は正常であるが、非筋ミオシン重鎖IIA蛋白が血小板の中央部に位置する場合、前記被験者はACTN1遺伝子変異を伴う先天性巨大血小板症であると診断補助する工程と、を有することを特徴とするACTN1遺伝子変異を伴う先天性巨大血小板症の診断補助方法。

10

**【請求項 2】**

前記診断補助する工程では、血小板の中央部における非筋ミオシン重鎖IIA蛋白の蛍光強度を観察することを特徴とする請求項 1 記載のACTN1遺伝子変異を伴う先天性巨大血小板症の診断補助方法。

**【請求項 3】**

前記生物学的試料は末梢血であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のACTN1遺伝子変異を伴う先天性巨大血小板症の診断補助方法。

**【請求項 4】**

被験者の生物学的試料をスライドガラス上に載置して、前記生物学的試料中の血小板を前記スライドガラス上に接着させて血小板を進展させた後、その進展させた血小板に作用させて免疫染色を行い免疫染色標本を作製するための抗非筋ミオシン重鎖IIA抗体と、

20

前記免疫染色標本における非筋ミオシン重鎖IIA蛋白を観察し、血小板の進展とともに非筋ミオシン重鎖IIA蛋白が血小板の辺縁部に位置する場合、前記被験者は正常であるが、非筋ミオシン重鎖IIA蛋白が血小板の中央部に位置する場合、前記被験者はACTN1遺伝子変異を伴う先天性巨大血小板症であると診断補助する説明書と、を備えることを特徴とする、ACTN1遺伝子変異を伴う先天性巨大血小板症の診断キット。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

30

本発明は、ACTN1遺伝子変異を伴う先天性巨大血小板症の診断補助方法及び診断キットに関する。

**【背景技術】****【0002】**

先天性巨大血小板症は先天的に巨大血小板と血小板減少症を呈する疾患群の総称である。従来、本疾患群は極めてまれであると考えられてきたが、日常診療で十分遭遇する頻度で存在し、慢性あるいは難治性の特発性血小板減少症紫斑病(以下、ITPと略することがある。)と診断され、不必要な治療を受ける症例が少なくないことが判明している。ITPの診断基準は基本的には除外診断であり、難治性ITP症例の中には、先天性血小板減少症症例が含まれている可能性が高い。

40

**【0003】**

非特許文献 1 には、先天性巨大血小板症のうち高頻度に発現する、Bernard-Soulier症候群とMay-Hegglin異常(MHA)に代表されるMYH9異常症が記載されている。MHAは、巨大血小板、血小板減少及び顆粒球封入体を特徴とする代表的な先天性巨大血小板症である。類縁疾患として、封入体形態が異なるSebastian症候群、Alport症状(腎炎, 難聴, 白内障)を合併するFechtner症候群、封入体を認めずAlport症状を合併するEpstein症候群が知られている。MHAを含めた白血球封入体を伴う巨大血小板性血小板減少症は、臨床検査所見及び血液異常に合併する臨床症状が異なるため、それぞれは独立した疾患と考えられていたが、何れの疾患もMYH9遺伝子異常が原因であることが判明している。この非特許文献 1 には、非筋ミオシン重鎖IIA免疫染色を行い、白血球での非筋ミオシン重鎖IIA局在解析

50

によるMYH9遺伝子異常を伴う先天性巨大血小板症の診断方法が記載されている。

【0004】

非特許文献2には、既知の原因遺伝子に異常を認めない先天性巨大血小板性血小板減少症の6家族について、染色体上において全ての蛋白質に翻訳される遺伝情報領域であるエクソンの配列を抽出し、その塩基配列を高速に決定する方法である全エクソン解析を次世代遺伝子解析装置にて実施し、同定された候補遺伝子異常の確認のために7家系を追加解析したところ、解析した13家系中6家系(46%)でACTN1遺伝子変異が同定され、その結果、ACTN1遺伝子変異から産生される変異型ACTN1蛋白が、正常なアクチン線維形成に影響を与え、巨核球からの血小板産生を阻害することが判明したことが記載されている。

【先行技術文献】

10

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】先天性巨大血小板症の鑑別診断 國島伸治 日本小児血液・がん学会雑誌 第49巻第3号第382-6頁 2012年

【非特許文献2】ACTN1 mutations cause congenital macrothrombocytopenia American Journal of Human Genetics第92巻第3号第431-8頁 2013年

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

血小板の形態形成にはアクチンを中心とした細胞骨格蛋白の再構成が働く。ACTN1蛋白は細胞骨格蛋白のアクチンを架橋することでアクチン線維の構造と機能を正常に保つ。アクチンは主要な細胞骨格蛋白であるミオシンと常に挙動を共にする。しかしながら、血小板内でACTN1蛋白の多くはアクチンと結合していないため、少量のアクチン結合ACTN1蛋白(の異常局在)を同定することは困難である。

20

【0007】

本発明はかかる問題点を鑑みてなされたものであって、ACTN1遺伝子変異を伴う先天性巨大血小板症の簡易且つ明確な診断補助方法及び診断キット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】

【0008】

本発明にかかるACTN1遺伝子変異を伴う先天性巨大血小板症の診断補助方法は、被験者の生物学的試料をスライドガラス上に載置して、前記生物学的試料中の血小板を前記スライドガラス上に接着させて血小板を進展させる工程と、進展させた血小板に抗非筋ミオシン重鎖IIA抗体を作用させて免疫染色を行い、免疫染色標本を作製する工程と、前記免疫染色標本における非筋ミオシン重鎖IIA蛋白を観察し、血小板の進展とともに非筋ミオシン重鎖IIA蛋白が血小板の辺縁部に位置する場合、前記被験者は正常であるが、非筋ミオシン重鎖IIA蛋白が血小板の中央部に位置する場合、前記被験者はACTN1遺伝子変異を伴う先天性巨大血小板症であると診断補助する工程と、を特徴とする。

30

【0009】

本発明にかかるACTN1遺伝子変異を伴う先天性巨大血小板症の診断キットは、被験者の生物学的試料をスライドガラス上に載置して、前記生物学的試料中の血小板を前記スライドガラス上に接着させて血小板を進展させた後、その進展させた血小板に作用させて免疫染色を行い、免疫染色標本を作製するための抗非筋ミオシン重鎖IIA抗体と、前記免疫染色標本における非筋ミオシン重鎖IIA蛋白を観察し、血小板の進展とともに非筋ミオシン重鎖IIA蛋白が血小板の辺縁部に位置する場合、前記被験者は正常であるが、非筋ミオシン重鎖IIA蛋白が血小板の中央部に位置する場合、前記被験者はACTN1遺伝子変異を伴う先天性巨大血小板症であると診断補助する説明書と、を備えることを特徴とする。

40

【発明の効果】

【0010】

本発明によれば、ACTN1遺伝子変異を伴う先天性巨大血小板症を簡易且つ明確に診断可

50

能である。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】抗非筋ミオシン重鎖IIA抗体で免疫染色を行った標本における非筋ミオシン重鎖IIA局在の観察結果を示す写真図である。

【図2】抗非筋ミオシン重鎖IIA抗体で免疫染色を行った標本における進展血小板の中心部の蛍光強度の測定図である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

以下、添付の図面を参照して本発明の実施形態について具体的に説明するが、当該実施形態は本発明の原理の理解を容易にするためのものであり、本発明の範囲は、下記の実施形態に限られるものではなく、当業者が以下の実施形態の構成を適宜置換した他の実施形態も、本発明の範囲に含まれる。

10

【0013】

本実施形態にかかるACTN1遺伝子変異を伴う先天性巨大血小板症の診断補助方法は下記工程を有する。

(i)被験者の生物学的試料をスライドガラス上に載置して、生物学的試料中の血小板をスライドガラス上に接着させて血小板を進展させる工程；

(ii)進展させた血小板に抗非筋ミオシン重鎖IIA抗体を作用させて免疫染色を行い、免疫染色標本作製する工程；

20

(iii)免疫染色標本における非筋ミオシン重鎖IIA蛋白を観察し、血小板の進展とともに非筋ミオシン重鎖IIA蛋白が血小板の辺縁部に位置する場合、被験者は正常であるが、非筋ミオシン重鎖IIA蛋白が血小板の中央部に位置する場合、被験者はACTN1遺伝子変異を伴う先天性巨大血小板症であると診断補助する工程；

巨大血小板の定義は、これに限定されるものではないが、例えば、末梢血塗抹標本上、正常血小板の大きさの2倍程度(直径4 $\mu$ m)は大型血小板、赤血球大(直径8 $\mu$ m)以上は巨大血小板と判別される。

【0014】

生物学的試料は、特に限定されるものではなく、例えば、末梢血又は骨髓液を挙げることができ、好ましくは末梢血である。

30

【0015】

ACTN1遺伝子変異は、ACTN1遺伝子の塩基配列の点変異、挿入/欠失変異、ACTN1遺伝子を含む領域の染色体異常等によりACTN1遺伝子によりコードされるACTN1蛋白の機能に影響を及ぼすものである。

【0016】

血小板の進展とは、円盤状の血小板が、長い偽足を出し中央部が隆起した目玉焼き形状の胞体になることを意味する。

【0017】

本実施形態においては、上述のように、血小板内でACTN1蛋白の多くはアクチンと結合していないため、少量のアクチン結合ACTN1蛋白(の異常局在)を同定することは困難であるが、本発明者は、ACTN1蛋白の代理指標(バイオマーカー)として非筋ミオシン重鎖IIA蛋白局在を調べることを新知見として見出し、かかる事実に基づいて本発明を完成させた。即ち、本発明者は、血小板をスライドガラス上に進展させ、抗非筋ミオシン重鎖IIA抗体を用いた免疫蛍光染色を施行して非筋ミオシン重鎖IIA局在を観察し、正常では血小板進展とともに非筋ミオシン重鎖IIA蛋白は血小板の辺縁に移動するが、ACTN1変異があると血小板の中央部に位置することを見出した。ACTN1変異がある場合、異常ACTN1と結合した非筋ミオシン重鎖IIAは移動できないため中心部に残ると考えられうる。

40

【0018】

本実施形態にかかるACTN1遺伝子変異を伴う先天性巨大血小板症の診断キットは、被験者の生物学的試料をスライドガラス上に載置して、前記生物学的試料中の血小板を前記ス

50

ライドガラス上に接着させて血小板を進展させた後、その進展させた血小板に作用させて免疫染色を行い免疫染色標本を作製するための抗非筋ミオシン重鎖IIA抗体と、前記免疫染色標本における非筋ミオシン重鎖IIA蛋白を観察し、血小板の進展とともに非筋ミオシン重鎖IIA蛋白が血小板の辺縁部に位置する場合、前記被験者は正常であるが、非筋ミオシン重鎖IIA蛋白が血小板の中央部に位置する場合、前記被験者はACTN1遺伝子変異を伴う先天性巨大血小板症であると診断補助する説明書と、を備える。

【0019】

抗非筋ミオシン重鎖IIA抗体は、その抗体の種類として、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化(camelised)抗体、キメラ抗体、一本鎖Fv(scFv)、一本鎖抗体、単ドメイン抗体、ドメイン抗体、Fab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片が包含される。

10

【実施例】

【0020】

クエン酸ナトリウムにて抗凝固した末梢血を遠心分離(400g、10分程度)あるいは1,2時間程度静置することにより血小板多血漿を分離し、血小板数を計測した。血小板数が1万/μl程度になるように血小板多血漿原液をTyrode's緩衝液(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 3.3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.8 mM HEPES, 0.1% glucose, 0.1% ウシ血清アルブミン, pH7.4)にて希釈した。100 μlの希釈した血小板浮遊液をセルカルチャースライド(8区画程度に区分けしたスライドガラス。ミリポア社Millicell EZセルカルチャースライド等)に加え、37℃、30分、湿潤箱に置いた。血小板をスライドガラス上に接着させ、進展させた。

20

【0021】

スライドガラスをリン酸緩衝生理食塩水を満たしたスライド染色バットに浸け、1、2回上下させることにより洗浄した。スライドガラスを4%パラホルムアルデヒド溶液を入れたスライド染色バットに入れ、室温にて15分間固定させた。スライドガラスをリン酸緩衝生理食塩水を満たしたスライド染色バットに浸け10分間洗浄した。スライドガラス上の血小板が進展した区画に50 μlの10%正常ヤギ血清を含むリン酸緩衝生理食塩水を載せ、10分間反応させた。10%正常ヤギ血清を含むリン酸緩衝生理食塩水を吸い取り、50 μlの200倍希釈した抗非筋ミオシン重鎖IIA抗体(BT561, Biomedical Technologies社)を載せ、1時間反応させた。

30

【0022】

スライドガラスをリン酸緩衝生理食塩水を満たしたスライド染色バットに浸け10分間洗浄した。50 μlの400倍希釈した蛍光(Alexa Fluor555)標識抗ウサギIgGヤギ抗体(Invitrogen社)を載せ、1時間反応させた。スライドガラスをリン酸緩衝生理食塩水を満たしたスライド染色バットに浸け10分間洗浄した。蛍光退色防止剤(SlowFade、Invitrogen社)を用いてカバーガラスにて封入させた。

【0023】

染色標本につき蛍光顕微鏡で非筋ミオシン重鎖IIA局在を観察した。図1は、抗非筋ミオシン重鎖IIA抗体で免疫染色を行った標本における非筋ミオシン重鎖IIA局在の観察結果を示す写真図であり、そのうち(a)と(e)は同一の写真図であって正常者の標本であり、(b)と(f)は同一の写真図であってACTN1遺伝子変異を伴う先天性巨大血小板症患者その1の標本であり、(c)と(g)は同一の写真図であってACTN1遺伝子変異を伴う先天性巨大血小板症患者その2の標本であり、(d)と(h)は同一の写真図であってACTN1遺伝子変異を伴う先天性巨大血小板症患者その3の標本である。

40

【0024】

図1(a)(e)に示されるように、正常では血小板進展とともに非筋ミオシン重鎖IIA蛋白は血小板の辺縁に移動したが、図1(b)(c)(d)(f)(g)(h)に示されるように、ACTN1異常症患者の血小板では異常ACTN1と結合した非筋ミオシン重鎖IIA蛋白は移動できないため中心部に残った。

【0025】

50

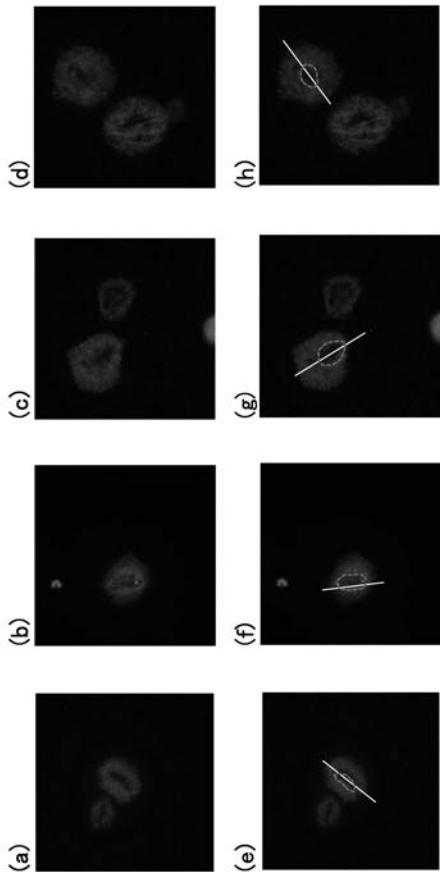
次に、各染色標本につき、進展血小板の中心部に沿った図1における白色点線上の蛍光強度を測定した。図2は、各染色標本につき進展血小板の中心部の蛍光強度の測定図であり、そのうち(a)は正常者の標本であり、(b)はACTN1遺伝子変異を伴う先天性巨大血小板症患者その1の標本であり、(c)はACTN1遺伝子変異を伴う先天性巨大血小板症患者その2の標本であり、(d)はACTN1遺伝子変異を伴う先天性巨大血小板症患者その3の標本である。図2に示されるように、正常血小板では蛍光強度は中心部で一様に低く測定されるが、患者血小板では蛍光強度は低値でなく、高値又は一定値を示さない状態であり、正常とは容易に区別されるものであった。

【産業上の利用可能性】

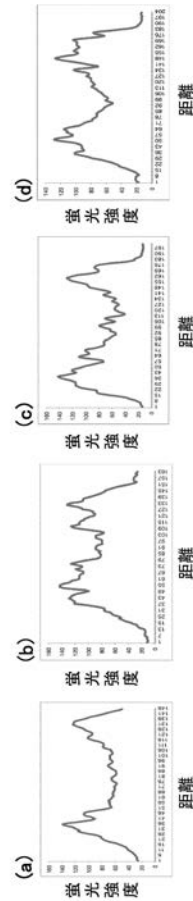
【0026】

先天性巨大血小板症の診断に利用できる。

【図1】



【図2】



专利名称(译)	先天性巨血小板疾病伴actn1基因突变的诊断辅助方法和诊断试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JP2017075833A</a>	公开(公告)日	2017-04-20
申请号	JP2015202954	申请日	2015-10-14
[标]申请(专利权)人(译)	NAT癌症CENT		
申请(专利权)人(译)	基金会人文科学基金会		
[标]发明人	國島伸治		
发明人	國島 伸治		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48 G01N33/49 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/48.P G01N33/49.X G01N33/543.575 G01N33/53.K		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/DA36		
其他公开文献	JP6587896B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：为ACTN1基因突变的先天性巨大血小板增多症提供一种简单明了的诊断辅助方法。通过在载玻片上的生物样品中的血小板附着推进血小板，并通过抗非肌肉肌球蛋白重链抗体IIA血小板的作用进行免疫染色的工序A是进步，非肌肉肌球蛋白重链IIA蛋白位于血小板的边缘如果是，受试者是正常的，位于中心时是诊断助剂为涉及ACTN1蛋白突变先天性巨血小板疾病。

