

(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2014-181967

(P2014-181967A)

(43) 公開日 平成26年9月29日(2014.9.29)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 G 0 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2013-55543 (P2013-55543)	(71) 出願人	504205521 国立大学法人 長崎大学 長崎県長崎市文教町 1-14
(22) 出願日	平成25年3月18日 (2013.3.18)	(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 光宣
		(74) 代理人	100121212 弁理士 田村 弥栄子
		(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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 中枢神経ループス (N P S L E) 診断用バイオマーカー

(57) 【要約】

【課題】 中枢神経ループスの診断のための検査方法および診断キットなどの提供。

【解決手段】 被験者由来の試料から回収された免疫複合体における、suprabasinおよび/またはRictorを検出することを含む、中枢神経ループスの検査方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被験者由来の試料から回収された免疫複合体における、suprabasinおよび／またはRictorを検出することを含む、中枢神経ループスの検査方法。

【請求項 2】

suprabasinがsuprabasin isoform 1 precursorである、請求項 1 の検査方法。

【請求項 3】

試料が脳脊髄液である、請求項 1 または 2 の検査方法。

【請求項 4】

プロテイン G またはプロテイン A を用いて免疫複合体を回収する請求項 1 ~ 3 の何れか 1 項に記載の検査方法。 10

【請求項 5】

治療中または治療を受けた中枢神経ループス患者から経時的に採取された試料から回収した免疫複合体における、suprabasinおよび／またはRictorを検出することを含む、中枢神経ループス患者に対する治療効果の評価方法。

【請求項 6】

suprabasinがsuprabasin isoform 1 precursorである、請求項 5 の評価方法。

【請求項 7】

試料が脳脊髄液である、請求項 4 または 5 の評価方法。

【請求項 8】

プロテイン G またはプロテイン A を用いて免疫複合体を回収する請求項 5 ~ 7 の何れか 1 項に記載の評価方法。 20

【請求項 9】

suprabasinを特異的に認識する抗体および／またはRictorを特異的に認識する抗体を含む、中枢神経ループスの検査用キット。

【請求項 10】

suprabasinがsuprabasin isoform 1 precursorである、請求項 9 の検査用キット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

30

【0001】

本発明は中枢神経ループスの新規バイオマーカーを標的とした、中枢神経ループスの検査方法、薬効評価方法および検査キットに関する。

【背景技術】**【0002】**

抗体はBリンパ球から産生されるタンパク質の1種であり、体外から侵入する非自己（細菌、ウイルス等）を認識し、これらと結合することで白血球やマクロファージを活性化することによって生態防御に大きな役割を果たしている。このように抗体は、本来、非自己である生体異物を認識し、排除する働きをもつ。しかし、なんらかの契機で自己の正常な細胞や組織を認識する抗体が産生されると免疫複合体（イムノコンプレックス）が形成され、臓器や血管壁などの組織に沈着して障害を起こすことがある。このような疾患は自己免疫疾患と呼ばれ、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、バセドウ病を始めとする非常に多くの疾患が知られている。また、このほか、免疫複合体はウイルスや細菌感染、腫瘍などでも高値を示すことが知られている。このことから、液性免疫が関わる多くの感染症・自己免疫疾患では、産生される抗体の有無や量をもとに病態解明、診断および重症度判定が一般的に行われている。

【0003】

近年、プロテオーム解析が多くの生命分析科学研究領域において利用され始め、疾患の原因や発症のメカニズムの解明手段として有望視されてきている。特に全てのタンパク質を酵素分解によりペプチド断片化し、これを高速液体クロマトグラフィー／タンデム質量

40

50

分析計（LC-MS/MS）で解析するショットガンプロテオミクスが開発され（非特許文献1）、疾患マーカーの探索などが迅速、効率的かつ再現性良く行えるようになってきた。また、特定疾患の解明を目的として、抗体を用いて抗原を精製し、その同定をLC-MS/MSによって行った例も報告されている（非特許文献2）。以前、本発明者らは、免疫複合体を捕集してプロテオミクスによって免疫複合体中の抗原を網羅的に同定する“イムノコンプレキソーム解析法”を開発し、該方法を用いて関節リウマチ（RA）患者、変形性関節症患者および健常人の比較を行った結果、RA患者でのみ特異的に検出される2種類の自己抗原タンパク質（トロンボスpongin-1、血小板第4因子）を特定することに成功した（特許文献1）。さらに、既存の血液検査では陰性で臨床診断が困難な早期RA患者の解析を行ったところ、トロンボスpongin-1が患者の約50%で検出され、RAの早期診断に有望なバイオマーカーになることを見出した（特許文献1）。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開2012-103238号公報

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】D. Figeys, Anal. Chem., 75, 2891-2905, 2003

【非特許文献2】H. Tjalsma et al., Proteomics Clin. Appl., 2, 167-180, 2008

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的は、中枢神経ループスの診断のための検査、薬効評価方法および検査キットなどを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、中枢神経ループス患者の脳脊髄液から網羅的に回収した免疫複合体をトリプシン分解し、高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計に供試することで抗原解析を行い、それによって中枢神経ループスの新規マーカーを見出した。

30

本発明者らは、これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち本発明は、

[1] 被験者由来の試料から回収された免疫複合体における、suprabasinおよび/またはRictorを検出することを含む、中枢神経ループスの検査方法；

[2] suprabasinがsuprabasin isoform 1 precursorである、前記[1]の検査方法；

[3] 試料が脳脊髄液である、前記[1]または[2]の検査方法；

[4] プロテインGまたはプロテインAを用いて免疫複合体を回収する前記[1]～[3]の何れか1つに記載の検査方法；

40

[5] 治療中または治療を受けた中枢神経ループス患者から経時的に採取された試料から回収した免疫複合体における、suprabasinおよび/またはRictorを検出することを含む、中枢神経ループス患者に対する治療効果の評価方法；

[6] suprabasinがsuprabasin isoform 1 precursorである、前記[5]の評価方法；

[7] 試料が脳脊髄液である、前記[4]または[5]の評価方法；

[8] プロテインGまたはプロテインAを用いて免疫複合体を回収する前記[5]～[7]の何れか1つに記載の評価方法；

[9] suprabasinを特異的に認識する抗体および/またはRictorを特異的に認識する抗体を含む、中枢神経ループスの検査用キット；

50

[1 0] suprabasinがsuprabasin isoform 1 precursorである、前記[9]の検査用キット；
を提供する。

【発明の効果】

【 0 0 0 9 】

本発明では、中枢神経ループス患者において免疫複合体として存在するsuprabasinおよび/またはRapamycin-insensitive companion of mTOR (Rictor)の存在を調べることにより、迅速かつ簡便に中枢神経ループスの検査、治療評価が可能になる。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 0 】

本発明は、被験者由来の試料から回収された免疫複合体における、suprabasinおよび/またはRictorを検出することを含む、中枢神経ループスの検査方法に関する。本発明において検出対象となるsuprabasinとしては、成熟タンパク質として3種類のアイソフォーム (suprabasin isoform 1, suprabasin isoform 2, suprabasin isoform 3) が存在し、さらにそれぞれの前駆体タンパク質 (suprabasin isoform 1 precursor, suprabasin isoform 2 precursor, suprabasin isoform 3 precursor) が存在する。検出されるsuprabasinはいずれのアイソフォームであってもよいが、アイソフォーム1が好ましい。また、検出されるsuprabasinは、前駆体タンパク質であっても成熟タンパク質であってもよいが、前駆体タンパク質が好ましい。従って、本発明において検出対象となるsuprabasinは、suprabasin isoform 1 precursorが最も好ましい。それぞれのsuprabasin isoform 1 precursor, suprabasin isoform 2 precursor, suprabasin isoform 3 precursorのアミノ酸配列は、GenBankにアクセション番号NP_001159506、NP_940940、NP_001159507としてそれぞれ登録されている。また、本発明において検出対象となるRictorは、GenBankにアクセション番号NP_689969として登録されている。

【 0 0 1 1 】

本発明の中枢神経ループスの検査方法は、例えば、以下の工程を含む。

(1) 被験者由来の試料から免疫複合体を回収する工程、

(2) 該免疫複合体を分解し、分解産物を分離する工程、

(3) 分離した分解産物を質量分析することによって、該免疫複合体中に含まれるsuprabasinおよび/またはRictorを検出する工程

【 0 0 1 2 】

本発明の検査方法が適用できる被験者は特に制限されないが、例えば、中枢神経ループスに罹患するおそれがあるか、もしくは罹患していることが疑われる被験者が挙げられる。

【 0 0 1 3 】

本発明の検査方法に用いられる試料としては、被験者から採取されるものであって、検出対象である抗原 (即ち、suprabasinおよびRictor) と該抗原に結合する抗体からなる免疫複合体を含有するものであれば特に制限されない。そのような試料としては、例えば、全血、血漿、血清、リンパ液、唾液、脳脊髄液、関節液等の体液もしくはそのフラクション、粘膜、生検により得られる組織標本などが挙げられる。試料中の夾雑物が少ないという利点から、脳脊髄液が好ましい。

【 0 0 1 4 】

上記試料中の免疫複合体は、自体公知の方法を用いて分離精製することができる。例えば、免疫グロブリンの分離精製法 [例：塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体 (例：D E A E) による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、プロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により免疫複合体及び抗体のみを採取し、活性吸着剤との結合を解離させて免疫複合体を得る特異的精製法] に従って分離精製することができる。具体的には、下記実施例に記載の通り、プロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤が結合した担体 (セファロースカラム、磁性ビーズなど) により脳脊髄液中から直接、免疫複合体及び抗体のみを捕集することができる。また、試料が組織で

10

20

30

40

50

ある場合であっても、公知の方法に基づき、タンパク質画分を調製し、該画分中に含まれる免疫複合体を上記の手法に従い、分離精製することができる。また、免疫複合体を構成する抗体はいずれのサブクラスであってもよく、IgG、IgM、IgA、IgDまたはIgEが含まれ、さらにIgGにはIgG1、IgG2、IgG3、IgG4が含まれてよい。

【0015】

試料から捕集された免疫複合体は、そのまま分離してもよいが、抗体のジスルフィド結合を還元するために予め還元アルキル化してもよい。還元剤としては、例えば、ジチオスレイトール(DTT)等が挙げられる。さらに、プロテアーゼまたはペプチダーゼによって免疫複合体を形成する抗体と抗原をペプチド断片に分解し、分解産物を分離することが好ましい。ペプチダーゼ(プロテアーゼ)としては、例えば、トリプシンまたはペプシンが挙げられる。

【0016】

前記分解産物の分離は、自体公知の方法に従って行うことができる。このような方法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。これらの方法は、適宜組み合わせることもできる。本発明の分解産物を分離するには、分解産物がペプチドであること、次に質量分析に供試する際に容易であることから、液体クロマトグラフィーを用いることが好ましい。

【0017】

分離の際に用いられる液体クロマトグラフィー用充填剤の担体は、シリカゲル又は、ポリビニルアルコール等の合成樹脂の球状又は破碎状のものが好ましい。また、その平均粒径は、約0.5μmから約100μmのものが好ましく、より好ましくは約1μmから約50μm、さらに好ましくは約3μmから約5μmのものである。当業者であれば、平均粒径が小さいほど単位長あたりのカラム理論段数は大きくなるが、カラムの圧力損失も大きくなることなどを考慮して、適した粒径を選択することができる。また、本発明において用いられる液体クロマトグラフィー用充填剤の担体は、該担体に、置換又は未置換の炭化水素基を結合させたものであり、特に鎖長が炭素数8以上のものを用いることが好ましい。そのような炭化水素基の例としては、特に制限をされるものではないが、オクチル基、オクタデシル基、およびこれらの末端を改変した官能基等が挙げられ、オクタデシル基が好ましく用いられる。また、保持力は炭化水素基の鎖長に依存するので、当業者であれば、炭化水素基の鎖長の炭素数を調節することで、固定相における保持力を調節することができる。また、官能基として、フェニル基、ジオール基、ニトリル基、アミノ基などを用いて固定相の極性を調節することもできる。

【0018】

鎖長が炭素数8以下の置換又は未置換の炭化水素基としては、例えばトリメチル基、ブチル基、フェニル基、シアノプロピル基、アミノプロピル基等が挙げられる。

【0019】

本発明の液体クロマトグラフィー用充填剤に適するものとして、例えば市販されているオクチル基をシリカゲルに化学的に結合させた液体クロマトグラフィー用充填剤[Acc1aim(R) PepMap100 C8]、オクタデシル基をシリカゲルに化学的に結合させた液体クロマトグラフィー用充填剤[Acc1aim(R) PepMap300 C18]、[Acc1aim(R) PepMap100 C18]などが挙げられる。これらの充填剤は、品質が安定しており、かつ入手が容易である点で適しているが、これらに制限されるものではない。

【0020】

液体クロマトグラフィー用充填剤に接触させる溶媒としては、水及び有機溶媒、例えば

10

20

30

40

50

、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、アセトニトリル、酢酸エチル、ジオキサン、テトラヒドロフラン（THF）もしくはDMSOなどの混合溶媒系に塩を含むものを用いる。本発明の場合、例えば、後述の実施例においては、アセトニトリル中にギ酸を混合した溶媒を液体クロマトグラフィー用充填剤に接触させているが、これに限定されない。また、溶媒に濃度勾配（グラディエント）を付与し、例えば後述の実施例のように、アセトニトリル濃度が低い溶媒で極性の高い分子を溶出させ、順次アセトニトリル濃度を高めることによって、極性の低い分子を溶出させることができる。また溶出する際の溶出時間についても当業者は適宜設定することができる。

【0021】

また、分離の際に必要に応じて、硫酸、クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、リン酸カリウム、リン酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム等の塩を用いて、溶媒のpHを調節することができるが、これらに制限されるものではない。

10

【0022】

溶媒のpHを調整することにより、溶質のイオン化を制御することができるが、本発明の場合、イオンモードとして、陽イオンを対象として検出するポジティブイオンモードを選択するため、pHは、2～6が好ましく、2～3がより好ましい。また、温度を一定にすることにより安定した成績を得ることが可能であるが、本実施形態における温度は0～40が好ましく、より好ましくは10～30がよい。

20

【0023】

質量分析は、イオン化された分析物を気相で測定する方法であり、該分析装置は大別すると、イオン源、イオン化された分析物の質量対電荷比（m/z）を測定する質量分析部、及びそれぞれのm/z値におけるイオンの数を記録するイオン検出部からなる。タンパク質やペプチド等の試料をイオン化するために最も一般的に用いられる技術として、例えば、エレクトロスプレーイオン化法（ESI）、大気圧化学イオン化法（APCI）及びマトリクス支援レーザー脱着/イオン化法（MALDI）等が挙げられる。ESIはキャピラリーに溶液状の試料を導入し、高電圧を印加することによって噴霧・イオン化させる方法であり、クロマトグラフィーや電気泳動などの分離手段と組み合わせて分析することができる。APCIは、400～500の高温加熱によって試料溶液を強制的に気化させた後、コロナニードルの放電を利用してイオンを生成させる方法である。MALDIは、マトリックス（芳香族有機化合物など）中に試料を混在させて得られる結晶をレーザーパルスによって、試料を昇華及びイオン化する方法である。本発明の場合、抗原となるタンパク質が分析対象であるため、適用可能な分子量範囲が大きいほうが好ましい。従って、本発明の試料のイオン化にはESIまたはMALDIを用いるのがよいが、高価イオンを発生させやすい点でESIがより好ましい。

30

【0024】

前記イオン源でイオン化された試料は、質量分析部に高電圧で印加され引き込まれる。かかる電圧は、試料を分析できる範囲であれば当業者が適宜設定できるが、電圧が低すぎた場合、イオン化された試料の質量分析部への移動が不十分となり、電圧が高すぎた場合、イオン化された試料にフラグメンテーションが生じる。本発明を実施する際には、例えば、電圧1.0kV～2.5kV、好ましくは1.2kV～2.0kVで印加することができる。

40

【0025】

質量分析部は、選択された質量対電荷比（m/z）内においてイオンを分離する。分析データの感度や分解能、質量の正確さやマススペクトルデータから得られる情報の豊富さに重要な役割を果たしている。イオンの分離方法としては、6種類の基本的なタイプに分類することができ、それらは、磁場型、電場型、イオントラップ型、飛行時間（TOF）型、四重極型、及びフーリエ変換サイクロトロン型である。これらはそれぞれ長所と短所があり、単独で又は互いに連結して用いることができる。

【0026】

50

また、質量分析の途中で試料を断片化し、断片化されたイオンを分析する質量分析方法として、タンデム質量（MS/MS）分析法が用いられる。本発明の方法を実施するためには上記いずれの質量分析法を用いてもよく、当業者であればこれらと実質的に同一か又は類似の方法により本発明の方法を実施することができる。本発明では、タンデム質量分析法が好ましく用いられ、例えば、後述の実施例ではイオントラップ型タンデム質量分析法が用いられる。

【0027】

質量分析によって得られたスペクトル（例えば、タンデム質量分析によって得られたMS/MSスペクトル）は、公知の方法で解析できるが、公共のタンパク質/ペプチドデータベースと比較して抗原を決定することもできる。そのようなデータベースとしては、例えば、The Europe Bioinformatics Instituteによって提供されているInternational Protein Indexのタンパク質データベース、National Center Biotechnology Information (NCBI) に公開されているタンパク質データベース、Swiss-Protに公開されているタンパク質データベース等が挙げられる。従って、質量分析によって得られたスペクトルデータと前記データベースを比較することによって、試料から回収した免疫複合体にsuprabasinおよび/またはRictorが含まれているかを決定することができる。

10

【0028】

あるいは、本発明の中枢神経ループスの検査方法は、以下の工程を含む。

20

- (1) 被験者由来の試料から免疫複合体を回収する工程、
- (2) 免疫学的測定法によって該免疫複合体中に含まれるsuprabasinおよび/またはRictorを検出する工程

【0029】

前記方法に用いられる試料、免疫複合体の捕集方法は前記の通りに従う。被験者由来の試料から回収された免疫複合体におけるsuprabasinおよび/またはRictorの検出は、それぞれsuprabasinを特異的に認識する抗体およびRictorを特異的に認識する抗体を用いて、免疫学的測定法（例：ELISA、FIA、RIA、ウェスタンプロット等）によって行うことができる。

30

【0030】

被験者がヒトである場合、suprabasinを特異的に認識する抗体およびRictorを特異的に認識する抗体は、suprabasin、Rictorポリペプチドやそれらの抗原性を有する部分ペプチド、具体的には、suprabasinについてGenBankにアクセス番号NP_001159506、NP_940940またはNP_001159507、RictorについてGenBankにアクセス番号NP_689969に示されるペプチド配列の全部またはエピトープに当たる部分を有する部分ペプチドを免疫原として用い、既存の一般的な製造方法によって製造することができる。本明細書において、抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（mAb）等の天然型抗体、遺伝子組換技術を用いて製造され得るキメラ抗体、ヒト化抗体や一本鎖抗体、およびこれらの結合性断片が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体又はこれらの結合性断片である。結合性断片とは、特異的結合活性を有する前述の抗体の一部分の領域を意味し、具体的には例えばF(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、sFv、dsFv、sdAb等が挙げられる（Exp. Opin. Ther. Patents, Vol. 6, No. 5, p. 441-456, 1996）。抗体のクラスは、特に限定されず、IgG、IgM、IgA、IgDあるいはIgE等のいずれのアイソタイプを有する抗体をも包含する。好ましくは、IgG又はIgMであり、精製の容易性等を考慮するとより好ましくはIgGである。

40

【0031】

個々の免疫学的測定法を本発明の検査方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えてsuprabasinおよびRictorの測定系を構築すればよい。これらの一般

50

的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。例えば、入江寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

10

20

30

40

50

【0032】

本発明の検査方法は、上記手法により、被験者由来の試料から回収した免疫複合体における、suprabasinおよび/またはRictorを検出することによって、被験者が中枢神経ループスに罹患しているか否かの検査を行うことができる。例えば、被験者由来の試料から回収した免疫複合体にsuprabasinおよび/またはRictorを検出した場合、被験者が中枢神経ループスに罹患している可能性が高いと判断することができる。特に免疫複合体にsuprabasinとRictorの両者を検出できた場合は、どちらか一方のみを検出した場合よりも、中枢神経ループスに罹患している可能性がより高いと判断できる。

【0033】

あるいは、中枢神経ループスに罹患していないことが確認されている個体(ネガティブコントロール)及び、中枢神経ループスに罹患していると臨床的に判断されている個体(ポジティブコントロール)由来の試料から免疫複合体を回収し、被験者由来の試料から回収された免疫複合体におけるsuprabasinおよび/またはRictorの検出レベル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。

【0034】

そして、suprabasinおよび/またはRictorの検出レベルの比較結果より、測定対象のsuprabasinおよび/またはRictorの検出レベルが相対的に高い場合には、中枢神経ループスである確率が相対的に高いと判定することができる。逆に、測定対象のsuprabasinおよび/またはRictorの検出レベルが相対的に低い場合には、中枢神経ループスである確率が相対的に低いと判定することができる。

【0035】

上記中枢神経ループスの検査方法を、中枢神経ループスに対する治療を施された患者や中枢神経ループス治療薬候補化合物を投与された実験動物(例、サル、イヌ、ラット、マウス等)に適用することにより、治療効果の評価を行うことができる。即ち、治療中または治療を受けた中枢神経ループス患者から経時的に採取した試料から回収した免疫複合体におけるsuprabasinおよび/またはRictorをそれぞれ測定・比較し、治療前と比較して治療後のsuprabasinおよび/またはRictorを含む免疫複合体のレベルが抑制される傾向を示すか、もしくは検出できなくなれば、治療効果が認められると判定することができる。

【0036】

本発明はまた、上記本発明の検査方法において好ましく使用され得る、中枢神経ループスを検査するための検査キットを提供する。該検査キットは、suprabasinを特異的に認識する抗体および/またはRictorを特異的に認識する抗体を含有してなる。該検査するための剤が2以上の上記抗体を含む場合、各抗体は互いにsuprabasinおよびRictorの異なるエピトープを特異的に認識し得るものである。なお、免疫複合体を形成していない遊離抗原

を検出対象から除外するため、suprabasinを特異的に認識する抗体および/またはRictorを免疫複合体として捕集した後、検出を行うことが好ましい。また、suprabasinを特異的に認識する抗体およびRictorを特異的に認識する抗体としては、本発明の検査方法において前記した抗体が挙げられる。

【0037】

本発明の検査キットを構成する試薬として、suprabasinを特異的に認識する抗体および/またはRictorを特異的に検出し得る抗体に加えて、suprabasinおよび/またはRictorを検出するための反応において必要な他の物質であって、共存状態で保存することにより反応に悪影響を及ぼさない物質をさらに含有することができる。あるいは、該試薬は、suprabasinおよび/またはRictorを検出するための反応において必要な他の物質を含有する別個の試薬とともに提供されてもよい。例えば、suprabasinおよび/またはRictorを検出するための反応が抗原抗体反応の場合、当該他の物質としては、例えば、反応緩衝液、compeptitor抗体、標識された二次抗体（例えば、一次抗体がウサギ抗ヒトsuprabasinおよび/またはウサギ抗ヒトRictor抗体の場合、ペルオキシダーゼやアルカリホスファターゼ等で標識されたマウス抗ウサギIgGなど）、ブロッキング液等が挙げられる。また、該検査キットは、免疫複合体の捕集のためのプロテインAまたはプロテインGを試薬として含有していてもよく、それらは担体（セファロースカラム、磁性ビーズなど）に固相化されていてもよい。

10

【0038】

以下に、実施例により本発明をより具体的に説明するが、この発明はこれらに限定されるものではない。

20

【実施例】

【0039】

試料の回収

中枢神経ループス（Neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus: NPSLE）患者26名（女性、20-50歳）から脳脊髄液を回収した。また、多発性硬化症（Multiple Sclerosis: MS）患者15名（男性：5名、女性：10名、28-70歳）、視神経脊髄炎（Neuromyelitis Optica: NMO）患者16名（男性：4名、女性：12名、29-80歳）からも脳脊髄液を回収し、コントロールとして用いた。

30

【0040】

免疫複合体（IC）の捕集と消化

プロテインGが固定化された磁性ビーズ（Pure Proteome, Millipore）を用いて免疫複合体を精製した。ビーズ40μlをリン酸緩衝生理食塩水（PBS, Wako Chemicals）500μlで洗浄し、PBSで希釈した脳脊髄液（脳脊髄液：PBS=1:9, v/v）100μlと共にゆっくり攪拌しながら30分間インキュベートした。免疫複合体が結合したビーズを磁石で回収し、PBS500μlで3回洗浄した。ビーズを10mMジチオスレイトール100μl中に再懸濁し、56度45分間インキュベートした後、55mMヨードアセトアミド100μlを加え、暗所、室温で30分間インキュベートした。続いて、トリプシン溶液（25mM重炭酸アンモニウム）を終濃度0.5mg/mlで添加し、混合液を37度一晩培養した。TFA（10%, v/v）を加えて、消化を停止させた後、抗原および抗体由来のペプチド消化物を含む上清を磁石を用いて回収した。最終的に、この混合液を減圧下、約80μlに濃縮した。

40

【0041】

ナノ-HPLC-MS/MSによるタンパク質同定

LCフロースプリッター（Accurate, Dionex, Sunnyvale, CA, USA）付きのLCポンプ（Surveyor MS pump, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）およびHCT-PALオートサンプラー（CTC Analytics, Zwingen, Switzerland）からなるカスタムナノLCシステムを搭載したLC-エレクトロスプレーイオ

50

ン化 - タンデム MS (LCQ Fleet, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) にペプチド混合物 (1 μ l) を供試した。インジェクションループ中のナノ - プレカラム (300 μ m i.d. \times 5.0 mm, LC-18, Chemicals and Evaluation and Research, Tokyo, Japan) に試料を注入し、2%アセトニトリル中の1%TFA を用いて洗浄した。ペプチドをナノHPLCカラム (75 μ m, i.d., Accclaim PepMap 100 C18, 3 μ m, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) で分離し、スプレー電圧 1.2 から 2.0 kV で MS にイオン噴霧した。移動相のグラディエント条件を以下のように設定し、分離を行った：移動相中の移動相 B 含量を 10 分間で 5 から 23% に増加 (90%アセトニトリル中に 0.1% ギ酸 [Kanto Kagaku, Tokyo, Japan]) (移動相 A : 0.1% ギ酸)；移動相 B 含量を 70 分間で 24 から 34% に増加；移動相 B 含量を 16 分間で 34 から 50% に増加；移動相 B 含量を 0.1 分間で 50 から 100% に増加；移動相 B 含量 100% を 9 分間維持 (総分離時間 : 115 分)。試料の全解析から最も強度の高い 3 つの前駆体質量の 3 つのタンデム MS スキャンにプロセスする (Xcaliber(R) ソフトウェア [Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA] によってリアルタイムに決定) ことによって得られるデータの質を有するデュティサイクル長を最適化するように質量分析計を設定した。衝突エネルギーは 35% とした。全体質量 / 電荷比の範囲を 400 - 1500 で全スペクトルを計測した。トランスファーキャピラリー温度を 200 に設定した。MS / MS データを Bioworks V3.3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて抽出した。

10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360
370
380
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
660
670
680
690
700
710
720
730
740
750
760
770
780
790
800
810
820
830
840
850
860
870
880
890
900
910
920
930
940
950
960
970
980
990
1000
1010
1020
1030
1040
1050
1060
1070
1080
1090
1100
1110
1120
1130
1140
1150
1160
1170
1180
1190
1200
1210
1220
1230
1240
1250
1260
1270
1280
1290
1300
1310
1320
1330
1340
1350
1360
1370
1380
1390
1400
1410
1420
1430
1440
1450
1460
1470
1480
1490
1500
1510
1520
1530
1540
1550
1560
1570
1580
1590
1600
1610
1620
1630
1640
1650
1660
1670
1680
1690
1700
1710
1720
1730
1740
1750
1760
1770
1780
1790
1800
1810
1820
1830
1840
1850
1860
1870
1880
1890
1900
1910
1920
1930
1940
1950
1960
1970
1980
1990
2000
2010
2020
2030
2040
2050
2060
2070
2080
2090
2100
2110
2120
2130
2140
2150
2160
2170
2180
2190
2200
2210
2220
2230
2240
2250
2260
2270
2280
2290
2300
2310
2320
2330
2340
2350
2360
2370
2380
2390
2400
2410
2420
2430
2440
2450
2460
2470
2480
2490
2500
2510
2520
2530
2540
2550
2560
2570
2580
2590
2600
2610
2620
2630
2640
2650
2660
2670
2680
2690
2700
2710
2720
2730
2740
2750
2760
2770
2780
2790
2800
2810
2820
2830
2840
2850
2860
2870
2880
2890
2900
2910
2920
2930
2940
2950
2960
2970
2980
2990
3000
3010
3020
3030
3040
3050
3060
3070
3080
3090
3100
3110
3120
3130
3140
3150
3160
3170
3180
3190
3200
3210
3220
3230
3240
3250
3260
3270
3280
3290
3300
3310
3320
3330
3340
3350
3360
3370
3380
3390
3400
3410
3420
3430
3440
3450
3460
3470
3480
3490
3500
3510
3520
3530
3540
3550
3560
3570
3580
3590
3600
3610
3620
3630
3640
3650
3660
3670
3680
3690
3700
3710
3720
3730
3740
3750
3760
3770
3780
3790
3800
3810
3820
3830
3840
3850
3860
3870
3880
3890
3900
3910
3920
3930
3940
3950
3960
3970
3980
3990
4000
4010
4020
4030
4040
4050
4060
4070
4080
4090
4100
4110
4120
4130
4140
4150
4160
4170
4180
4190
4200
4210
4220
4230
4240
4250
4260
4270
4280
4290
4300
4310
4320
4330
4340
4350
4360
4370
4380
4390
4400
4410
4420
4430
4440
4450
4460
4470
4480
4490
4500
4510
4520
4530
4540
4550
4560
4570
4580
4590
4600
4610
4620
4630
4640
4650
4660
4670
4680
4690
4700
4710
4720
4730
4740
4750
4760
4770
4780
4790
4800
4810
4820
4830
4840
4850
4860
4870
4880
4890
4900
4910
4920
4930
4940
4950
4960
4970
4980
4990
5000
5010
5020
5030
5040
5050
5060
5070
5080
5090
5000
5010
5020
5030
5040
5050
5060
5070
5080
5090
5100
5110
5120
5130
5140
5150
5160
5170
5180
5190
5200
5210
5220
5230
5240
5250
5260
5270
5280
5290
5300
5310
5320
5330
5340
5350
5360
5370
5380
5390
5400
5410
5420
5430
5440
5450
5460
5470
5480
5490
5500
5510
5520
5530
5540
5550
5560
5570
5580
5590
5600
5610
5620
5630
5640
5650
5660
5670
5680
5690
5700
5710
5720
5730
5740
5750
5760
5770
5780
5790
5800
5810
5820
5830
5840
5850
5860
5870
5880
5890
5900
5910
5920
5930
5940
5950
5960
5970
5980
5990
6000
6010
6020
6030
6040
6050
6060
6070
6080
6090
6000
6010
6020
6030
6040
6050
6060
6070
6080
6090
6100
6110
6120
6130
6140
6150
6160
6170
6180
6190
6200
6210
6220
6230
6240
6250
6260
6270
6280
6290
6300
6310
6320
6330
6340
6350
6360
6370
6380
6390
6400
6410
6420
6430
6440
6450
6460
6470
6480
6490
6500
6510
6520
6530
6540
6550
6560
6570
6580
6590
6600
6610
6620
6630
6640
6650
6660
6670
6680
6690
6700
6710
6720
6730
6740
6750
6760
6770
6780
6790
6800
6810
6820
6830
6840
6850
6860
6870
6880
6890
6900
6910
6920
6930
6940
6950
6960
6970
6980
6990
7000
7010
7020
7030
7040
7050
7060
7070
7080
7090
7000
7010
7020
7030
7040
7050
7060
7070
7080
7090
7100
7110
7120
7130
7140
7150
7160
7170
7180
7190
7200
7210
7220
7230
7240
7250
7260
7270
7280
7290
7300
7310
7320
7330
7340
7350
7360
7370
7380
7390
7400
7410
7420
7430
7440
7450
7460
7470
7480
7490
7500
7510
7520
7530
7540
7550
7560
7570
7580
7590
7600
7610
7620
7630
7640
7650
7660
7670
7680
7690
7700
7710
7720
7730
7740
7750
7760
7770
7780
7790
7800
7810
7820
7830
7840
7850
7860
7870
7880
7890
7900
7910
7920
7930
7940
7950
7960
7970
7980
7990
8000
8010
8020
8030
8040
8050
8060
8070
8080
8090
8000
8010
8020
8030
8040
8050
8060
8070
8080
8090
8100
8110
8120
8130
8140
8150
8160
8170
8180
8190
8200
8210
8220
8230
8240
8250
8260
8270
8280
8290
8300
8310
8320
8330
8340
8350
8360
8370
8380
8390
8400
8410
8420
8430
8440
8450
8460
8470
8480
8490
8500
8510
8520
8530
8540
8550
8560
8570
8580
8590
8600
8610
8620
8630
8640
8650
8660
8670
8680
8690
8700
8710
8720
8730
8740
8750
8760
8770
8780
8790
8800
8810
8820
8830
8840
8850
8860
8870
8880
8890
8900
8910
8920
8930
8940
8950
8960
8970
8980
8990
9000
9010
9020
9030
9040
9050
9060
9070
9080
9090
9100
9110
9120
9130
9140
9150
9160
9170
9180
9190
9200
9210
9220
9230
9240
9250
9260
9270
9280
9290
9300
9310
9320
9330
9340
9350
9360
9370
9380
9390
9400
9410
9420
9430
9440
9450
9460
9470
9480
9490
9500
9510
9520
9530
9540
9550
9560
9570
9580
9590
9600
9610
9620
9630
9640
9650
9660
9670
9680
9690
9700
9710
9720
9730
9740
9750
9760
9770
9780
9790
9800
9810
9820
9830
9840
9850
9860
9870
9880
9890
9900
9910
9920
9930
9940
9950
9960
9970
9980
9990
10000
10010
10020
10030
10040
10050
10060
10070
10080
10090
10000
10010
10020
10030
10040
10050
10060
10070
10080
10090
10100
10110
10120
10130
10140
10150
10160
10170
10180
10190
10200
10210
10220
10230
10240
10250
10260
10270
10280
10290
10300
10310
10320
10330
10340
10350
10360
10370
10380
10390
10400
10410
10420
10430
10440
10450
10460
10470
10480
10490
10500
10510
10520
10530
10540
10550
10560
10570
10580
10590
10600
10610
10620
10630
10640
10650
10660
10670
10680
10690
10700
10710
10720
10730
10740
10750
10760
10770
10780
10790
10800
10810
10820
10830
10840
10850
10860
10870
10880
10890
10900
10910
10920
10930
10940
10950
10960
10970
10980
10990
11000
11010
11020
11030
11040
11050
11060
11070
11080
11090
11100
11110
11120
11130
11140
11150
11160
11170
11180
11190
11200
11210
11220
11230
11240
11250
11260
11270
11280
11290
11300
11310
11320
11330
11340
11350
11360
11370
11380
11390
11400
11410
11420
11430
11440
11450
11460
11470
11480
11490
11500
11510
11520
11530
11540
11550
11560
11570
11580
11590
11600
11610
11620
11630
11640
11650
11660
11670
11680
11690
11700
11710
11720
11730
11740
11750
11760
11770
11780
11790
11800
11810
11820
11830
11840
11850
11860
11870
11880
11890
11900
11910
11920
11930
11940
11950
11960
11970
11980
11990
12000
12010
12020
12030
12040
12050
12060
12070
12080
12090
12100
12110
12120
12130
12140
12150
12160
12170
12180
12190
12200
12210
12220
12230
12240
12250
12260
12270
12280
12290
12300
12310
12320
12330
12340
12350
12360
12370
12380
12390
12400
12410
12420
12430
12440
12450
12460
12470
12480
12490
12500
12510
12520
12530
12540
12550
12560
12570
12580
12590
12600
12610
12620
12630
12640
12650
12660
12670
12680
12690
12700
12710
12720
12730
12740
12750
12760
12770
12780
12790
12800
12810
12820
12830
12840
12850
12860
12870
12880
12890
12900
12910
12920
12930
12940
12950
12960
12970
12980
12990
13000
13010
13020
13030
13040
13050
13060
13070
13080
13090
13100
13110
13120
13130
13140
13150
13160
13170
13180
13190
13200
13210
13220
13230
13240
13250
13260
13270
13280
13290
13300
13310
13320
13330
13340
13350
13360
13370
13380
13390
13400
13410
13420
13430
13440
13450
13460
13470
13480
13490
13500
13510
13520
13530
13540
13550
13560
13570
13580
13590
13600
13610
13620
13630
13640
13650
13660
13670
13680
13690
13700
13710
13720
13730
13740
13750
13760
13770
13780
13790
13800
13810
13820
13830
13840
13850
13860
13870
13880
13890
13900
13910
13920
13930
13940
13950
13960
13970
13980
13990
14000
14010
14020
14030
14040
14050
14060
14070
14080
14090
14100
14110
14120
14130
14140
14150
14160
14170
14180
14190
14200
14210
14220
14230
14240
14250
14260
14270
14280
14290
14300
14310
14320
14330
14340
14350
14360
14370
14380
14390
14400
14410
14420
14430
14440
14450
14460
14470
14480
14490
14500
14510
14520
14530
14540
14550
14560
14570
14580
14590
14600
14610
14620
14630
14640
14650
14660
14670
14680
14690
14700
14710
14720
14730
14740
14750
14760
14770
14780
14790
14800
14810
14820
14830
14840
14850
14860
14870
14880
14890
14900
14910
14920
14930
14940
14950
14960
14970
14980
14990
15000
15010
15020
15030
15040
15050
15060
15070
15080
15090
15100
15110
15120
15130
15140
15150
15160
15170
15180
15190
15200
15210
15220
15230
15240
15250
15260
15270
15280
15290
15300
15310
15320
15330
15340
15350
15360
15370
15380
15390
15400
15410
15420
15430
15440
15450
15460
15470
15480
15490
15500
15510
15520
15530
15540
15550
15560
15570
15580
15590
15600
15610
15620
15630
15640
15650
15660
15670
15680
15690
15700
15710
15720
15730
15740
15750
15760
15770
15780
15790
15800
15810
15820
15830
15840
15850
15860
15870
15880
15890
15900
15910
15920
15930
15940
15950
15960
15970
15980
15990
16

【表1】

タンパク質	NPSLE 患者 (n = 26)	MS 患者 (n = 15)	MNO 患者 (n = 16)	頻度
	頻度	頻度	頻度	
Desmoglein-1	4	1	0	
Rapamycin-insensitive companion of mTOR	5	0	0	
Nesprin-1	2	0	0	
NADH dehydrogenase 1 beta subcomplex subunit 5	4	0	1	10
Suprabasin isoform 1 precursor	9	0	0	

【0044】

同定された抗原タンパク質のうち、Rapamycin-insensitive companion of mTOR(Rictor)およびSuprabasin isoform 1 precursorがNPSLE患者で特異的に検出され、コントロールとして用いたMS患者およびMNO患者では検出できなかった。結果として、本発明者らは、suprabasinを含む免疫複合体およびRictorを含む免疫複合体が中枢神経ループスに特異的な信頼性のある疾患マーカーであることを見出した。

【産業上の利用可能性】

20

【0045】

本発明によれば、中枢神経ループスにおいて見出された免疫複合体中の新規バイオマーカーを調べることにより、迅速かつ簡便に中枢神経ループスの検査が可能になる。

フロントページの続き

(74)代理人 100163658
弁理士 小池 順造

(74)代理人 100174296
弁理士 畠麻 博文

(72)発明者 一瀬 邦弘
長崎県長崎市文教町 1 - 1 4 国立大学法人長崎大学内

(72)発明者 大山 要
長崎県長崎市文教町 1 - 1 4 国立大学法人長崎大学内

(72)発明者 川上 純
長崎県長崎市文教町 1 - 1 4 国立大学法人長崎大学内

(72)発明者 黒田 直敬
長崎県長崎市文教町 1 - 1 4 国立大学法人長崎大学内

(72)発明者 中嶋 秀樹
長崎県長崎市文教町 1 - 1 4 国立大学法人長崎大学内

(72)発明者 岸川 直哉
長崎県長崎市文教町 1 - 1 4 国立大学法人長崎大学内

(72)発明者 馬場 雅子
長崎県長崎市文教町 1 - 1 4 国立大学法人長崎大学内

F ターム(参考) 2G045 AA25 DA36 FA36 FB03 FB06

专利名称(译)	用于诊断中枢性神经狼疮的生物标志物 (NPSLE)		
公开(公告)号	JP2014181967A	公开(公告)日	2014-09-29
申请号	JP2013055543	申请日	2013-03-18
申请(专利权)人(译)	国立大学法人长崎		
[标]发明人	一瀬邦弘 大山要 川上純 黒田直敬 中嶋秀樹 岸川直哉 馬場雅子		
发明人	一瀬 邦弘 大山 要 川上 純 黒田 直敬 中嶋 秀樹 岸川 直哉 馬場 雅子		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/DA36 2G045/FA36 2G045/FB03 2G045/FB06		
代理人(译)	高島肇 山本健二 当麻 博文		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种用于诊断神经精神性狼疮的检查方法和诊断试剂盒。解决方案：一种神经精神性狼疮的检查方法包括检测从受试者样本中采集的免疫复合物中的上清和/或Rictor。