

(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 I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 GO 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
(22) 出願日	平成25年3月18日 (2013.3.18)		国立大学法人 長崎大学
			長崎県長崎市文教町 1 - 1 4
		(74) 代理人	100080791
			弁理士 高島 一
		(74) 代理人	100125070
			弁理士 土井 京子
		(74) 代理人	100136629
			弁理士 鎌田 光宜
		(74) 代理人	100121212
			弁理士 田村 弥栄子
		(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。 40

【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 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（トロンボスポンジン-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、トロンボスポンジン-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 】

10

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にアクセッション番号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にアクセッション番号NP_689969として登録されている。

20

【 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

30

【 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。

40

【 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

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、I g G、I g M、I g A、I g DまたはI g Eが含まれ、さらにI g GにはI g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4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タ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。ペプチターゼ(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。

10

【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。

20

【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0.5 µmから約100 µmのものが好ましく、より好ましくは約1 µmから約50 µm、さらに好ましくは約3 µmから約5 µm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。

30

【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。

40

【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〔Accclaim(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〔Accclaim(R) PepMap300 C18〕、〔Accclaim(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

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、分離の際に必要な応じて、硫安、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。

【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。

20

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るが、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、ウェスタンブロット等)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にアクセッション番号NP_001159506、NP_940940またはNP_001159507、RictorについてGenBankにアクセッション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方法、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

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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で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で一晩培養した。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フロープリッター（Accurate, Dionex, Sunnyvale, CA, USA）付きのLCポンプ（Surveyor MS pump, Thermo Fihser 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 µl) 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 µm i.d. × 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 µm, i.d., Acclaim PepMap 100 C18, 3 µm, 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。欧州バイオインフォマティクス研究所 (EBI, Cambridge, UK) によって提供されるInternational Protein Index version 3.67 (ダウンロード日；2009年12月10日) の公開されている非重複タンパク質データベースからヒトサブデータベースに対して以下のサーチパラメータでスペクトルを検索した：質量型、モノアイソトピック前駆体および断片；酵素、トリプシン (KR)；酵素限界、2つまでの誤開裂を許容する全酵素的開裂；ペプチド許容、2.0 原子質量単位；断片イオン許容、1.0 原子質量単位；スコア結果数、250；計測されるイオンおよびイオンシリーズ、BおよびYイオン；静的修正、C (カルボキシメチル化)；特異的修飾、M (酸化)；NおよびQ (アミド分解)。経験的に決定されるタンパク質誤発見率 (FDR) 0、すなわちランダムヒットがゼロとなるようにフィルター基準値 (関連ファクター [XCORR] およびタンパク質確率 [P] を有するシングル、ダブル、トリプル電荷ペプチド) を調整した。リバーズデータベースの固有ペプチドの数をフォワードデータベースの重要な固有ペプチドの数で割って、FDRを計算した。タンパク質は6アミノ酸長以上のペプチドについて同定した。仮に複数のタンパク質が見出されたペプチドを有するアミノ酸配列を共有していれば、それらのうち最も低い確率のタンパク質が最も一致すると判断され、セラチンやトリプシンは潜在的な一致として除外された。

【0042】

結果

NPSLE患者およびコントロール患者に対するプロテオーム解析によって同定されたタンパク質を表1に略記する。

【0043】

10

20

30

40

【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	
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	

【 0 0 4 4 】

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

【 0 0 4 5 】

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 當麻 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)	高岛肇 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。