

(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2017-125720

(P2017-125720A)

(43) 公開日 平成29年7月20日(2017.7.20)

(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	Z N A N 4 H O 4 5
CO 7 K 16/42 (2006.01)	GO 1 N 33/53	Y
	CO 7 K 16/42	

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2016-4054 (P2016-4054)	(71) 出願人	502285457
(22) 出願日	平成28年1月13日 (2016.1.13)		学校法人順天堂
			東京都文京区本郷2-1-1
(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、「腎疾患実用化研究事業」「新規バイオマーカーを用いたスコア法によるIgA腎症早期発見・早期診断を介した透析移行ゼロ化に向けた試み」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		(74) 代理人	110000084
			特許業務法人アルガ特許事務所
		(74) 代理人	100077562
			弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736
			弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100117156
			弁理士 村田 正樹
		(74) 代理人	100111028
			弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腎炎の鑑別方法

(57) 【要約】

【課題】 IgA腎症及び紫斑病性腎炎と他の腎炎との鑑別方法の提供。

【解決手段】 免疫グロブリンA1の重鎖遺伝子によってコードされるポリペプチドのヒンジ領域におけるガラクトースが結合していないセリン/スレオニン結合型糖鎖(以下、糖鎖異常IgA1)を特異的に認識し、当該糖鎖異常IgA1と結合するモノクローナル抗体又はその断片を用いて、腎炎患者由来の腎組織に沈着する糖鎖異常IgA1を検出することを特徴とする、IgA腎症及び紫斑病性腎炎と他の腎炎との鑑別方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫グロブリン A 1 の重鎖遺伝子によってコードされるポリペプチドのヒンジ領域におけるガラクトースが結合していないセリン/スレオニン結合型糖鎖（以下、糖鎖異常 I g A 1）を特異的に認識し、当該糖鎖異常 I g A 1 と結合するモノクローナル抗体又はその断片を用いて、腎炎患者由来の腎組織に沈着する糖鎖異常 I g A 1 を検出することを特徴とする、I g A 腎症及び紫斑病性腎炎と他の腎炎との鑑別方法。

【請求項 2】

腎炎患者由来の腎組織に沈着する糖鎖異常 I g A 1 の検出が、抗体組織染色である請求項 1 記載の鑑別方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、種々の腎炎のうち、I g A 腎症と紫斑病性腎炎と他の腎炎とを区別して鑑別する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

I g A 腎症は、世界で最も頻度の高い原発性糸球体腎炎で、約 30 ~ 40 % は末期腎不全に至る予後不良の疾患である。I g A 腎症は、このように予後不良であることから、確定診断及び定義は極めて重要である。最近、I g A 腎症は、血尿、蛋白尿等の尿所見を呈し、優位な I g A 沈着を糸球体に認め、その原因となり得る基礎疾患が認められないものである、と定義されるようになった（非特許文献 1）。

20

【0003】

このように定義されていることからわかるように、I g A 腎症の診断には腎組織所見が必須である。糸球体の I g A 沈着部位は主にメサンギウム領域で、多くは C 3 の沈着を同時に認める。一方で、I g A 腎症では、腎糸球体に I g A が優位に沈着することが定義とされているものの、I g G や I g M、あるいは両者が沈着するケースなど、多様性に富む疾患であることも知られている。

【0004】

近年、腎生検をすることなく I g A 腎症を診断する試みが検討され、免疫グロブリン A 1 の重鎖遺伝子によってコードされるポリペプチドのヒンジ領域におけるガラクトースが結合していないセリン/スレオニン結合型糖鎖（以下、糖鎖異常 I g A 1）を特異的に認識し、当該糖鎖異常 I g A 1 と結合するモノクローナル抗体を用いて、血中の糖鎖異常 I g A 1 を測定することが可能となった。血中糖鎖異常 I g A 1、また血中糖鎖異常 I g A 1 に対する自己抗体、免疫複合体などを組み合わせて I g A 腎症を診断する方法が報告された（特許文献 1）。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献 1】国際公開第 2011/081189 号

40

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】エビデンスに基づく I g A 腎症診療ガイドライン 2014

【非特許文献 2】Pediatr Nephrol 25:19-26, 2010

【非特許文献 3】Nephrol Dial Transplant, 30:1315-21, 2015

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

血中の糖鎖異常 I g A 1 は、I g A 腎症だけでなく紫斑病性腎炎（HSPN）でも有意に高値を示すが、その他の腎炎患者や健常者と同等の値を示す症例もある（非特許文献 2

50

、 3)。紫斑病性腎炎は、 I g A 腎症と同様に腎系球体メサンギウム領域に I g A 優位の沈着が認められ、組織学的には I g A 腎症と鑑別が困難であるだけでなく、感染を契機に尿所見異常が悪化すること、糖鎖異常 I g A 1 の産生亢進など、病態も I g A 腎症と極めて類似している。しかし、 H S P N は紫斑を先行所見とすることから、臨床上 H S P N と I g A 腎症の鑑別は可能である。腎生検組織上、 I g A 腎症と鑑別が困難な疾患として、ループス腎炎、関節リウマチ、セリアック病、肝硬変に伴うもの、 H C V 関連腎炎、 H I V 腎症などが挙げられる。

【 0 0 0 8 】

従って、本発明の課題は、 I g A 腎症及び紫斑病性腎炎と他の腎炎との新たな鑑別方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 9 】

そこで本発明者は、 I g A 腎症及び紫斑病性腎炎と他の類似する腎炎とを明確に鑑別する手法を見出すべく検討した結果、糖鎖異常 I g A 1 に特異的なモノクローナル抗体を用いて、血中でなく、腎炎患者の腎組織に沈着する糖鎖異常 I g A 1 を検出すれば、 I g A 腎症及び紫斑病性腎炎と他の腎炎とが明確に区別できることを見出し、本発明を完成した。

【 0 0 1 0 】

すなわち、本発明は、次の〔 1 〕及び〔 2 〕を提供するものである。

【 0 0 1 1 】

〔 1 〕糖鎖異常 I g A 1 を特異的に認識し、当該糖鎖異常 I g A 1 と結合するモノクローナル抗体又はその断片を用いて、腎炎患者由来の腎組織に沈着する糖鎖異常 I g A 1 を検出することを特徴とする、 I g A 腎症及び紫斑病性腎炎と他の腎炎との鑑別方法。

〔 2 〕腎炎患者由来の腎組織に沈着する糖鎖異常 I g A 1 の検出が、抗体組織染色である〔 1 〕記載の鑑別方法。

【発明の効果】

【 0 0 1 2 】

本発明方法によれば、腎生検組織にて I g A 腎症と鑑別が困難であった、ループス腎炎、関節リウマチ、セリアック病、肝硬変に伴うもの、 H C V 関連腎炎、 H I V 腎症等が、 I g A 腎症及び紫斑病性腎炎と明確に鑑別できる。従って、早期に正確な治療計画を立てることができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 3 】

【図 1】血中の糖鎖異常 I g A 1 の検出結果を示す図である。

【図 2】腎組織への糖鎖異常 I g A 1 の沈着を検出した結果を示す。

【図 3】腎組織への糖鎖異常 I g A 1 の沈着を検出した結果を示す。

【図 4】腎組織への糖鎖異常 I g A 1 の沈着を検出した結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 4 】

本発明方法に用いられるモノクローナル抗体は、免疫グロブリン A 1 の重鎖遺伝子によってコードされるポリペプチド (I g A 1 重鎖) のヒンジ領域におけるガラクトースが結合していないセリン / スレオニン結合型糖鎖 (糖鎖異常 I g A 1) を特異的に認識し、当該糖鎖異常 I g A 1 と結合するモノクローナル抗体である。このようなモノクローナル抗体の例としては、 W O 2 0 1 1 / 0 8 1 1 8 9 に記載のモノクローナル抗体が挙げられる。

【 0 0 1 5 】

前記糖鎖異常 I g A 1 が、 - N - アセチルガラクトサミン - セリン / スレオニン (以下、 T n 抗原) 又はシアリル T n 抗原から選ばれる糖鎖異常 I g A 1 であるのが好ましい。

【 0 0 1 6 】

10

20

30

40

50

I g A 1 重鎖のアミノ酸配列を配列番号 1 に示す。ヒンジ領域は、配列番号 1 の VPSTPP TPSPSTPPTSPSPS である (Mol Cell Proteomics 9: 2545-2557, 2010)。

【0017】

さらに具体的には、ハイブリドーマ KM 4 1 3 7 (FERM BP - 1 1 2 1 4)、KM 4 1 4 0 (FERM BP - 1 1 2 1 5)、KM 4 1 4 4 (FERM BP - 1 1 2 1 6) 及び KM 5 5 から選ばれるハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体が好ましい。

【0018】

これらのモノクローナル抗体は、WO 2 0 1 1 / 0 8 1 1 8 9 に記載の方法により製造することができる。

【0019】

前記モノクローナル抗体は、遺伝子組み換え抗体であってもよく、さらにヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体及びヒト抗体から選ばれる抗体であってもよい。

【0020】

前記モノクローナル抗体の断片としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体 (scFv)、二量化 V 領域 (Diabody)、ジスルフィド安定化 V 領域 (dsFv) 及び CDR を含むペプチドから選ばれる抗体断片が挙げられる。

【0021】

本発明においては、前記のモノクローナル抗体を用いて、腎炎患者由来の腎組織に沈着する糖鎖異常 I g A 1 を検出する。腎炎患者としては、I g A 腎症や紫斑病性腎炎を含む急性又は慢性の糸球体腎炎、すなわち溶連菌感染後糸球体腎炎、膜性腎症、膜性増殖性糸球体腎炎、ANCA関連腎炎、ループス腎炎、関節リウマチ、セリアック病、肝硬変に伴うもの、HCV関連腎炎、HIV腎症等が挙げられる。腎炎患者由来の腎組織としては、腎炎患者の腎臓から採取した組織が用いられる。

【0022】

腎炎患者由来の腎組織に沈着する糖鎖異常 I g A 1 を検出する手段としては、前記モノクローナル抗体を用いる抗体組織染色法が好ましい。より具体的には、腎組織と前記モノクローナル抗体を反応させた後、FITCなどの蛍光標識、ペルオキシダーゼなどの酵素標識、ビオチン標識などを施した抗イムノグロブリン抗体又は結合断片を反応させた後、該標識を可視化し、顕微鏡にて顕鏡する方法が挙げられる。

【0023】

腎組織に糖鎖異常 I g A 1 の沈着が認められる場合には、I g A 腎症又は紫斑病性腎炎と鑑別できる。一方、腎組織に糖鎖異常 I g A 1 の沈着が認められない場合には、I g A 腎症及び紫斑病性腎炎以外の腎炎と鑑別できる。

従来 of 腎組織への I g A の沈着では、I g A 腎症及び紫斑病性腎炎以外の腎炎、例えば、ループス腎炎、関節リウマチ、セリアック病、肝硬変に伴うもの、H C V 関連腎炎、H I V 腎症等も陽性になるが、本発明によれば I g A 腎症及び紫斑病性腎炎と他の腎炎とが正確に鑑別できる。

【実施例】

【0024】

次に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明する。

【0025】

参考例 1

(血中の糖鎖異常 I g A 1 測定)

血中糖鎖異常 I g A 1 値は、KM 5 5 を用いた E L I S A 法により測定する。まず 9 6 w e l l の E L I S A プレートに KM 5 5 を固相化する。1%のBovine serum albumin (B S A) P B S 溶液にてブロッキング後に、血清サンプルを反応させる。ペルオキシダーゼ標識の抗ヒト I g A 1 抗体で同定する (Nephrol Dial Transplant. 30: 1315-1321, 2015)。

【0026】

10

20

30

40

50

その結果を図 1 に示す。図 1 の結果から、I g A 腎症であっても血中の糖鎖異常 I g A 1 陰性の患者もあり、一方血中の糖鎖異常 I g A 1 陽性であっても他の腎炎患者である例も存在する。

【 0 0 2 7 】

実施例 1

(腎組織の糖鎖 I g A 1 沈着の測定)

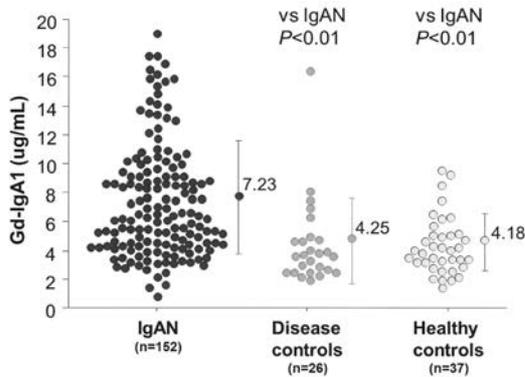
パラフィンブロックの腎生検組織を 3 μ m に薄切し、プレパラートにサンプルをのせ、脱パラフィンを行う。5 分間、流水洗浄後、プロテアーゼ溶液 : Protease from Bacillus licheniformis (S I G M A P 5 3 8 0) を用いて室温 2 時間で抗原賦活処理を行う。5 分間、流水洗浄後、Protein Block Serum Free(Dako X090930)を用いて室温 3 0 分でブロッキングする。K M 5 5 抗体を抗体希釈液 : REAL Antibody Diluent (Dako S2022) を用いて 1 0 0 μ g / m l に希釈して反応させる (3 7 、 3 0 分) 。 0 . 0 5 % T w e e n + P B S 溶液 (P B S - T) にて 3 回洗浄後、Alexa Fluor 555 Goat anti-Rat IgG (I nvitrogen A21434) を 1 0 0 0 倍希釈で反応させる (3 7 、 3 0 分) 。 P B S - T にて 3 回洗浄後、プレパラートに封入剤を用いてカバーガラスをかける。

10

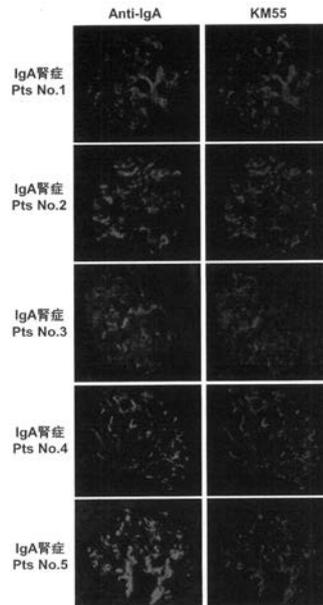
【 0 0 2 8 】

その結果を図 2 ~ 図 4 に示す。図 2 ~ 図 4 から明らかなように、本発明のモノクローナル抗体を用いて腎組織への糖鎖異常 I g A 1 の沈着を検出すれば、I g A 腎症と紫斑病性腎炎と他の腎炎が正確に鑑別できる。

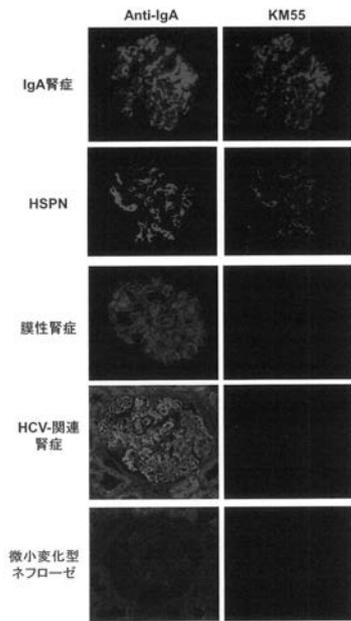
【 図 1 】



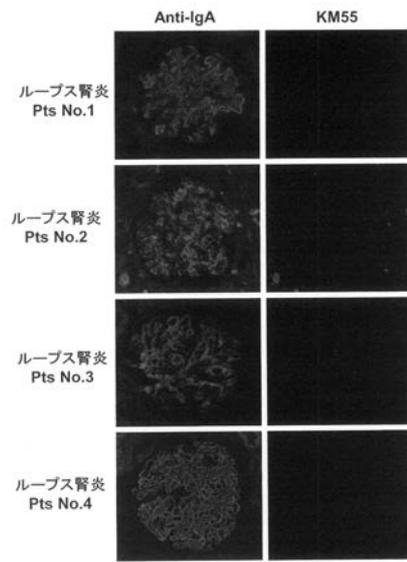
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 配 列 表 】

2017125720000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 鈴木 仁

東京都文京区本郷2 - 1 - 1 順天堂大学内

(72)発明者 鈴木 祐介

東京都文京区本郷2 - 1 - 1 順天堂大学内

Fターム(参考) 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA53 CA40 DA75 EA50 FA71

专利名称(译)	分化肾炎的方法		
公开(公告)号	JP2017125720A	公开(公告)日	2017-07-20
申请号	JP2016004054	申请日	2016-01-13
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人顺天堂		
申请(专利权)人(译)	学校法人顺天堂		
[标]发明人	鈴木仁 鈴木祐介		
发明人	鈴木仁 鈴木祐介		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/42		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.N G01N33/53.Y C07K16/42		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA53 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA71		
代理人(译)	村田正树		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 问题得到解决：提供一种区分IgA肾病和紫癜性肾炎与其他肾炎的方法。在多肽的较链区上的半乳糖未绑定到由免疫球蛋白A1（在下文中，糖异常IGAL）特异性识别，所述的重链基因丝氨酸/苏氨酸 - 连接的糖链进行编码Glycoconugation异常IgA1结合单色使用纳鲁抗体或其片段，和检测沉积肾组织从患者肾炎中，IgA肾病和紫癜肾炎等肾炎的分化方法的糖链异常的IgA1。

(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2017-125720 (P2017-125720A) (43) 公開日 平成29年7月20日 (2017.7.20)
(51) Int. Cl. G01N 33/53 (2006.01) C07K 16/42 (2006.01)	F I G O 1 N 33/53 Z N A N G O 1 N 33/53 Y C O 7 K 16/42	テーマコード (参考) 4 H O 4 5
審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 7 頁)		
(21) 出願番号 特願2016-4054 (P2016-4054) (22) 出願日 平成28年1月13日 (2016.1.13)	(71) 出願人 502285457 学校法人順天堂 東京都文京区本郷2-1-1 11000084 (74) 代理人 特許業務法人アルガ特許事務所 100077562 (74) 代理人 弁理士 高野 登志雄 100096736 (74) 代理人 弁理士 中嶋 俊夫 100117156 (74) 代理人 弁理士 村田 正樹 10011028 (74) 代理人 弁理士 山本 博人	
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 腎炎の鑑別方法		