

(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2013-145178

(P2013-145178A)

(43) 公開日 平成25年7月25日(2013.7.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53</b> (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 B O 2 4
<b>C 1 2 Q 1/68</b> (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M	4 H O 4 5
C O 7 K 14/47 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	
	C 1 2 N 15/00 Z N A A	
審査請求 未請求 請求項の数 18 O L (全 23 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-5616 (P2012-5616)	(71) 出願人	307014555
(22) 出願日	平成24年1月13日 (2012.1.13)		北海道公立大学法人 札幌医科大学 北海道札幌市中央区南1条西17丁目29 1番地85
特許法第30条第1項適用申請有り	・刊行物名 臨床 化学 第40巻 補冊1号 第51回 日本臨床化学会 年次学術集会要旨集 発行日 2011年7月31日 発行所 一般社団法人日本臨床化学会	(74) 代理人	110000338 特許業務法人原謙三国際特許事務所
・刊行物名 臨床 血液 Vol. 52, No. 9 2011 Sept ember The 73rd Annual Mee ting of the Japanese Soci ety of Hematology (第73回日本血 液学会) プログラム・抄録集 発行日 2011年9月 30日 発行所 社団法人 日本血液学会	・刊行物名 臨 床血液 Vol. 52, No. 9 2011 Sept ember The 73rd Annual Mee ting of the Japanese Soci ety of Hematology (第73回日本血 液学会) プログラム・抄録集 発行日 2011年9月 30日 発行所 社団法人 日本血液学会	(72) 発明者	栗林 景晶 北海道札幌市中央区南1条西17丁目 北 海道公立大学法人札幌医科大学内
2011年 臨床病理 Vol. 59 補冊 第58 回 日本臨床検査医学会学術集会 発行日 平成23年 10月15日 発行所 日本臨床検査医学会	2011年 臨床病理 Vol. 59 補冊 第58 回 日本臨床検査医学会学術集会 発行日 平成23年 10月15日 発行所 日本臨床検査医学会	(72) 発明者	後藤 真希 北海道札幌市中央区南1条西17丁目 北 海道公立大学法人札幌医科大学内
		(72) 発明者	渡邊 直樹 北海道札幌市中央区南1条西17丁目 北 海道公立大学法人札幌医科大学内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 再生不良性貧血のマーカーおよびその利用

(57) 【要約】

【課題】再生不良性貧血に特異的なマーカー、および当該マーカーを用いた再生不良性貧血の鑑別技術を提供すること。

【解決手段】配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13もしくは15のアミノ酸配列からなるタンパク質またはそのフラグメント、あるいは、配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14もしくは16のヌクレオチド配列からなる遺伝子またはそのフラグメントを、被験体サンプル中にて検出することによって再生不良性貧血の鑑別を容易にする。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

配列番号 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 もしくは 15 のアミノ酸配列からなるタンパク質に対する抗体を少なくとも 1 つ備えている、再生不良性貧血を鑑別するためのキット。

**【請求項 2】**

配列番号 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 もしくは 16 のヌクレオチド配列からなる遺伝子またはそのフラグメントにハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドを少なくとも 1 つ備えている、再生不良性貧血を鑑別するためのキット。

**【請求項 3】**

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号 17 ~ 32 のいずれかに示されるヌクレオチド配列またはその相補配列からなる、請求項 2 に記載のキット。

**【請求項 4】**

配列番号 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 もしくは 15 のアミノ酸配列からなるタンパク質またはそのフラグメントを少なくとも 1 つ備えている、再生不良性貧血を鑑別するためのキット。

**【請求項 5】**

再生不良性貧血に対する免疫抑制療法の効果を予測するために用いられる、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のキット。

**【請求項 6】**

配列番号 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 もしくは 15 のアミノ酸配列からなるタンパク質に対する抗体を少なくとも 1 つ含んでいる、請求項 1 または 5 に記載のキットを作製するための、組成物。

**【請求項 7】**

配列番号 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 もしくは 16 のヌクレオチド配列からなる遺伝子またはそのフラグメントにハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドを少なくとも 1 つ含んでいる、請求項 2 または 5 に記載のキットを作製するための、組成物。

**【請求項 8】**

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号 17 ~ 32 のいずれかに示されるヌクレオチド配列またはその相補配列からなる、請求項 7 に記載の組成物。

**【請求項 9】**

配列番号 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 もしくは 15 のアミノ酸配列からなるタンパク質またはそのフラグメントを少なくとも 1 つ含んでいる、請求項 4 または 5 に記載のキットを作製するための、組成物。

**【請求項 10】**

配列番号 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 もしくは 15 のアミノ酸配列からなるタンパク質またはそのフラグメントを、被験体サンプル中にて検出する工程を包含する、再生不良性貧血を鑑別する方法。

**【請求項 11】**

前記工程が、前記タンパク質に対する抗体を用いる免疫アッセイによって行われる、請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 12】**

配列番号 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 もしくは 16 のヌクレオチド配列からなる遺伝子またはそのフラグメントを、被験体サンプル中にて検出する工程を包含する、再生不良性貧血を鑑別する方法。

**【請求項 13】**

前記工程が、前記遺伝子またはそのフラグメントに核酸プローブをハイブリダイズさせることによって行われる、請求項 12 に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記核酸プローブが、配列番号 17 ~ 32 のいずれかに示されるヌクレオチド配列また

10

20

30

40

50

はその相補配列からなるオリゴヌクレオチドからなる、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

配列番号 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 もしくは 15 のアミノ酸配列からなるタンパク質に対する抗体を、被験体サンプル中にて検出する工程を包含する、再生不良性貧血を鑑別する方法。

【請求項 16】

前記工程が、前記抗体と特異的に結合するタンパク質を用いる免疫アッセイによって行われる、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記被験体が、汎血球減少症を呈する患者である、請求項 10 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 18】

再生不良性貧血に対する免疫抑制療法の効果を予測するために用いられる、請求項 10 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、再生不良性貧血を鑑別するためのマーカーおよびその利用に関するものであり、より詳細には、再生不良性貧血の診断に好適なマーカーの検出方法および当該方法に用いられるツールに関するものである。

20

【背景技術】

【0002】

再生不良性貧血（以下、AAともいう。）は、汎血球減少症を呈する症候群である。一般に、再生不良性貧血は、血液中の血球数が低下していること、骨髓の細胞密度が低い（低形成）こと、他の血液疾患でないことを確認すること等によって診断される。AAを、他の疾患、特に骨髓異形成症候群（MDS）と鑑別することが困難な症例が少なくない。AAおよびMDSを総称して骨髓不全症候群ということもあるが、これらに対する治療内容は全く異なる。一般に、AAと診断されると免疫抑制剤による治療または骨髓移植が行われ、MDSと診断されると抗がん剤による治療が行われる。

【0003】

AAの50~70%は免疫抑制剤が奏功する。このことから、免疫異常がAAの病態形成に深く関与しているといえる。一般に、自己免疫疾患において自己細胞成分に対する多種類の抗体（自己抗体）が検出され、その抗体が臨床症状と密接な関係を有することが知られている。近年、多くの自己抗体に対する抗原（自己抗原）が細胞内のタンパク質であることが明らかになっている。AA患者の血清中に存在する自己抗体を測定することによって、免疫異常のマーカーとなるタンパク質を同定しようとする研究が、これまでにいくつか報告されている。例えば、非特許文献1ではキネクチンが、特許文献1および非特許文献2ではモエシンが、非特許文献3ではPMS-1が、非特許文献4ではhnRNPKが、マーカータンパク質として挙げられている。

30

【先行技術文献】

40

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開2006-145299号公報（平成18年6月8日公開）

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Hirano et al., Blood; 102, 4567-75, 2003

【非特許文献2】Takamatsu et al., Blood; 109, 2514-20, 2007

【非特許文献3】Hirano et al., Br J Haematol, 128; 221-223, 2004

【非特許文献4】Qi et al., Ann Hematol, 89, 1255-63, 2010

【発明の概要】

50

**【発明が解決しようとする課題】****【0006】**

しかし、上述した報告に開示されたタンパク質はあくまでも免疫異常のマーカーであり、AAに特異的なマーカーとはいえない。また、特許文献1には、モエシンを用いて、自己免疫性再生不良性貧血と造血幹細胞異常性再生不良性貧血とを判別することができる旨が開示されているが、AAをAA以外の疾患と識別する（すなわち、AAを鑑別する）ことについて、何ら示されていない。しかも、特許文献1には、モエシンに対する自己抗体が慢性関節リウマチ患者の血清中に存在することが記載されている。すなわち、AAに特異的な免疫反応の詳細はこれまで知られていない。

**【0007】**

本発明は、上記の問題点を鑑みてなされたものであり、その目的は、AAに特異的な診断マーカー、および当該マーカーを用いたAAの判別技術を提供することにある。

**【課題を解決するための手段】****【0008】**

上記の課題を解決するために、本発明者らは、serological identification of antigens by recombinant cDNA expression cloning (SEREX)法を用いて、AAにおいて自己抗体が認識する分子の同定を試み、本発明を完成するに至った。

**【0009】**

本発明の第1のキットは、配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13もしくは15のアミノ酸配列からなるタンパク質に対する抗体を少なくとも1つ備えていることを特徴としている。

**【0010】**

本発明の第2のキットは、配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14もしくは16のヌクレオチド配列からなる遺伝子またはそのフラグメントにハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドを少なくとも1つ備えていることを特徴としている。

**【0011】**

本発明の第2のキットは、上記オリゴヌクレオチドが、配列番号17~32のいずれかに示されるヌクレオチド配列またはその相補配列からなることが好ましい。

**【0012】**

本発明のキットは、再生不良性貧血に対する免疫抑制療法の効果を予測するために用いられなくてもよい。

**【0013】**

本発明の第3のキットは、再生不良性貧血を鑑別するために、配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13もしくは15のアミノ酸配列からなるタンパク質またはそのフラグメントを少なくとも1つ備えていることを特徴としている。

**【0014】**

本発明の第1の組成物は、第1のキットを作製するために、配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13もしくは15のアミノ酸配列からなるタンパク質に対する抗体を少なくとも1つ含んでいることを特徴としている。

**【0015】**

本発明の第2の組成物は、第2のキットを作製するために、配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14もしくは16のヌクレオチド配列からなる遺伝子またはそのフラグメントにハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドを少なくとも1つ含んでいることを特徴としている。

**【0016】**

本発明の第2の組成物は、上記オリゴヌクレオチドが、配列番号17~32のいずれかに示されるヌクレオチド配列またはその相補配列からなることが好ましい。

**【0017】**

本発明の第3の組成物は、第3のキットを作製するために、配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13もしくは15のアミノ酸配列からなるタンパク質またはそのフラグメント

10

20

30

40

50

を少なくとも1つ含んでいることを特徴としている。また、本発明の第3の組成物は、第1のキットを構成する抗体を惹起するために用いられてもよい。

【0018】

本発明の第1の方法は、再生不良性貧血を鑑別するために、配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13もしくは15のアミノ酸配列からなるタンパク質に対する抗体を、被験体サンプル中にて検出する工程を包含することを特徴としている。

【0019】

本発明の第1の方法は、上記工程が、上記抗体と特異的に結合するタンパク質を用いる免疫アッセイによって行われることが好ましく、上述した第1のキットを用いて行われてもよい。

【0020】

好ましくは、本発明の第1の方法は、配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13もしくは15のアミノ酸配列からなるタンパク質に対する抗体を被験体サンプルとインキュベートする工程、および被験体サンプルに由来するタンパク質またはそのフラグメントと上記抗体との結合が形成されているか否かを確認する工程を包含し得る。

【0021】

本発明の第2の方法は、再生不良性貧血を鑑別するために、配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14もしくは16のヌクレオチド配列からなる遺伝子またはそのフラグメントを、被験体サンプル中にて検出する工程を包含することを特徴としている。

【0022】

本発明の第2の方法は、上記工程が、上記遺伝子またはそのフラグメントに核酸プローブをハイブリダイズさせることによって行われることが好ましく、上述した第2のキットを用いて行われてもよい。

【0023】

本発明の第2の方法において、上記核酸プローブは、配列番号17~32のいずれかに示されるヌクレオチド配列またはその相補配列からなるオリゴヌクレオチドからなることが好ましい。

【0024】

好ましくは、本発明の第2の方法は、配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14もしくは16のヌクレオチド配列からなる遺伝子またはそのフラグメントを被験体サンプルとインキュベートする工程、および被験体サンプルに由来するポリヌクレオチドと上記オリゴヌクレオチドとの結合が形成されているか否かを確認する工程を包含し得る。

【0025】

本発明の第3の方法は、再生不良性貧血を鑑別するために、配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13もしくは15のアミノ酸配列からなるタンパク質またはそのフラグメントを、被験体サンプル中にて検出する工程を包含することを特徴としている。

【0026】

本発明の第3の方法は、上記工程が、上記タンパク質に対する抗体を用いる免疫アッセイによって行われることが好ましく、上述した第3のキットを用いて行われてもよい。

【0027】

好ましくは、本発明の第3の方法は、配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13もしくは15のアミノ酸配列からなるタンパク質またはそのフラグメントを被験体サンプルとインキュベートする工程、および被験体サンプルに由来する自己抗体と上記タンパク質またはそのフラグメントとの結合が形成されているか否かを確認する工程を包含し得る。

【0028】

本発明の方法において、上記被験体は、汎血球減少症を呈する患者であることが好ましい。

【0029】

本発明の方法は、再生不良性貧血の鑑別の判断基準を提供するために用いられても、再生不良性貧血に対する免疫抑制療法の効果を予測するために用いられてもよい。

10

20

30

40

50

## 【発明の効果】

## 【0030】

本発明を用いれば、再生不良性貧血であるか否かの診断が容易になる。また、本発明を用いれば、再生不良性貧血に対する免疫抑制療法の効果を予測する基準を提供することができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0031】

【図1】h T S - 5細胞に対する自己抗体よりもK 5 6 2細胞に対する自己抗体が、A Aの血清中に検出されることを示す図である。

【図2】S E R E Xによって同定された抗原に対する自己抗体がA Aの血清中に検出されることを示す図である。

【図3】S E R E Xによって同定された抗原がK 5 6 2細胞およびC D 3 4陽性骨髄単核細胞 (bone marrow mononuclear cells、B M M N C) に発現していることを示す図である。

【図4】H S P B 1 1が再生不良性貧血患者に特異的に発現していることを示す図である。

【図5】C L I C 1、R P L 4 1およびR P S 2 7に対するI g G型自己抗体の抗体価が、免疫抑制療法に対する奏効率とポジティブに相関することを示す図である。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0032】

## 〔1. A Aを鑑別するマーカー〕

汎血球減少症を呈する再生不良性貧血 (A A) では、クローナルなT細胞が存在し、治療に伴い消失すること、血中I F N濃度が上昇していること、骨髄C D 3 4陽性細胞でF A Sが発現増強していることなどが報告されている。さらに、A Aの治療に用いられるステロイド、シクロスポリンや抗胸腺細胞グロブリンは、T細胞を標的としている。すなわち、その病態形成に細胞性免疫が重要な役割を担っていることは、疑う余地がない。近年、自己抗体の存在も報告されているが、その標的細胞や分子に関しては、未だ不明な点が少ない。

## 【0033】

本発明者らは、S E R E X法を用いて、A Aにおいて自己抗体が認識する抗原分子を同定し、これらの分子に対する自己抗体の認識パターンは、患者間で異なっており、極めて多彩であることを見出した。このように、本発明は、A Aを鑑別するに好適なマーカーを提供する。一実施形態において、本発明に用いられるマーカーはS E R E X抗原タンパク質またはそのフラグメントである。他の実施形態において、本発明に用いられるマーカーはS E R E X抗原タンパク質をコードする遺伝子 (S E R E X抗原遺伝子) またはそのフラグメントである。

## 【0034】

本明細書中で使用される場合、S E R E X抗原タンパク質は、以下の(A) ~ (C)のいずれかであることが好ましい：(A) 配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13または15に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；(B) 配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13または15に示されるアミノ酸配列の1または数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなりかつS E R E X抗原活性を有するポリペプチド；(C) (A)に記載のポリペプチドと80%以上の同一性を有するポリペプチド。また、S E R E X抗原タンパク質は、以下の(D) ~ (G)のいずれかであってもよい：(D) 配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14または16に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；(E) 配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14または16に示されるヌクレオチド配列の1または数個の塩基が欠失、置換または付加されたヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドによってコードされかつS E R E X抗原活性を有するポリペプチド；(F) 配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14または16に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリ

10

20

30

40

50

ンジェントな条件下でハイブリダイズし得るポリヌクレオチドによってコードかつ S E R E X 抗原活性を有するポリペプチド；( G ) 配列番号 2 , 4 , 6 , 8 , 1 0 , 1 2 , 1 4 または 1 6 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと 8 0 % 以上の同一性を有するポリヌクレオチドによってコードかつ S E R E X 抗原活性を有するポリペプチド。

#### 【 0 0 3 5 】

本明細書中で使用される場合、用語「 S E R E X 抗原活性」は、 S E R E X 抗原を用いて惹起される抗体との結合能が意図され、より好ましくは、 A A 患者の血清中に存在する自己抗体との結合能が意図される。なお、 S E R E X 抗原タンパク質は、リコンビナントのヒトタンパク質であっても単離精製された天然のヒトタンパク質であってもよい。

10

#### 【 0 0 3 6 】

本明細書中で使用される場合、 S E R E X 抗原遺伝子は、以下の ( a ) ~ ( c ) のいずれかであることが好ましい：( a ) 配列番号 1 , 3 , 5 , 7 , 9 , 1 1 , 1 3 または 1 5 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；( b ) 配列番号 1 , 3 , 5 , 7 , 9 , 1 1 , 1 3 または 1 5 に示されるアミノ酸配列の 1 または数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなりかつ S E R E X 抗原活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；( c ) 上記 ( A ) に記載のポリペプチドと 8 0 % 以上の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。また、 S E R E X 抗原遺伝子は、以下の ( d ) ~ ( g ) のいずれかであってもよい：( d ) 配列番号 2 , 4 , 6 , 8 , 1 0 , 1 2 , 1 4 または 1 6 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；( e ) 配列番号 2 , 4 , 6 , 8 , 1 0 , 1 2 , 1 4 または 1 6 に示されるヌクレオチド配列の 1 または数個の塩基が欠失、置換または付加されたヌクレオチド配列からなりかつ S E R E X 抗原活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；( f ) 配列番号 2 , 4 , 6 , 8 , 1 0 , 1 2 , 1 4 または 1 6 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るポリヌクレオチドでありかつ S E R E X 抗原活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；( g ) 配列番号 2 , 4 , 6 , 8 , 1 0 , 1 2 , 1 4 または 1 6 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと 8 0 % 以上の同一性を有するポリヌクレオチドでありかつ S E R E X 抗原活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

20

30

#### 【 0 0 3 7 】

本明細書中で使用される場合、用語「ポリペプチド」は、「ペプチド」または「タンパク質」と交換可能に使用され、アミノ酸の重合体が意図される。また、ポリペプチドの「フラグメント」は、当該ポリペプチドの部分断片が意図される。本発明に係るポリペプチドはまた、組換え的に生成されても、化学合成されても、天然供給源より単離されてもよい。

#### 【 0 0 3 8 】

ポリペプチド ( アミノ酸 ) の観点で用いられる場合、「 1 または数個」は、当業者が、過度の実験を行うことなく、部位特異的突然変異誘発法等の公知の変異ペプチド作製法によって欠失、置換もしくは付加し得る程度の数が意図され、 1 ~ 3 0 個の範囲内であることが好ましく、 2 0 個以下であることがより好ましく、 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9 または 1 0 個 ( すなわち 1 0 個以下 ) であることがさらに好ましく、 1、 2、 3、 4 または 5 個 ( すなわち 5 個以下 ) であることがなおさらに好ましい。なお、当業者は、目的のポリペプチドの長さに応じて、用語「 1 または数個」によって示されるアミノ酸数の範囲がどの程度であるのかを容易に理解し得るとともに、過度の実験を行うことなく、「 1 または数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたポリペプチド」を作製し得る。また、このようなポリペプチドは、人為的に導入された変異を有するポリペプチドに限定されず、天然に存在するポリペプチドを単離精製したものであってもよい。そして、当業者は、本明細書中に記載の手順に従って、上記ポリペプチドが所望の活性を有しているか否かを、試行錯誤することなく確認することができる。

40

50

## 【0039】

本明細書中で使用される場合、目的のポリペプチドについての同一性は、80%以上であることが好ましく、85%以上であることがより好ましく、90%以上であることがさらに好ましく、95%以上であることがなおさらに好ましく、99%以上であることが最も好ましい。

## 【0040】

本明細書中で使用される場合、用語「ポリヌクレオチド」は、「遺伝子」、「核酸」または「核酸分子」と交換可能に使用され、ヌクレオチドの重合体が意図される。また、ポリヌクレオチドの「フラグメント」は、当該ポリヌクレオチドの部分断片が意図される。本明細書中で使用される場合、用語「ヌクレオチド配列」は、「核酸配列」または「塩基配列」と交換可能に使用される。

10

## 【0041】

ポリヌクレオチド（塩基）の観点で用いられる場合、「1または数個」は、1～100個の範囲内であることが好ましく、1～50個の範囲内であることがより好ましく、1～30個の範囲内であることがさらに好ましく、1～15個の範囲内であることがなおさらに好ましい。なお、当業者は、目的のポリヌクレオチドの長さに応じて、用語「1または数個」によって示される塩基数の範囲がどの程度であるのかを容易に理解し得る。

## 【0042】

本明細書中で使用される場合、目的のポリヌクレオチドについての同一性は、80%以上であることが好ましく、85%以上であることがより好ましく、90%以上であることがさらに好ましく、95%以上であることがなおさらに好ましく、99%以上であることが最も好ましい。

20

## 【0043】

本発明に係るポリヌクレオチドは、RNA（例えば、mRNA）の形態、またはDNAの形態（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）で存在し得る。DNAは、二本鎖または一本鎖であり得る。一本鎖DNAまたはRNAは、コード鎖（センス鎖としても知られる）であり得るか、または、非コード鎖（アンチセンス鎖としても知られる）であり得る。

## 【0044】

本明細書中で使用される場合、用語「オリゴヌクレオチド」は、ヌクレオチドが数個ないし数十個結合したものが意図され、「ポリヌクレオチド」と交換可能に使用される。

30

## 【0045】

本明細書中で使用される場合、用語「ストリンジェントな（ハイブリダイゼーション）条件」は、ハイブリダイゼーション溶液（50%ホルムアミド、5×SSC（150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム）、50mMのリン酸ナトリウム（pH7.6）、5×デンハート液、10%硫酸デキストラン、および20μg/mLの変性剪断サケ精子DNAを含む）中にて42℃で一晩インキュベーションした後、約65℃にて0.1×SSC中でフィルターを洗浄することが意図されるが、ハイブリダイゼーションさせるポリヌクレオチドによって、高ストリンジェンシーでの洗浄条件は適宜変更され、例えば、哺乳類由来DNAを用いる場合は、0.1% SDSを含む0.5×SSC中にて65℃での洗浄（好ましくは15分間×2回）が好ましく、E.coli由来DNAを用いる場合は、0.1% SDSを含む0.1×SSC中にて68℃での洗浄（好ましくは15分間×2回）が好ましく、RNAを用いる場合は、0.1% SDSを含む0.1×SSC中にて68℃での洗浄（好ましくは15分間×2回）が好ましく、オリゴヌクレオチドを用いる場合は、0.1% SDSを含む0.1×SSC中にてハイブリダイゼーション温度での洗浄（好ましくは15分間×2回）が好ましい。

40

## 【0046】

本発明に用いられるマーカーはAAの鑑別基準を提供することができるので、本発明に用いられるマーカーを利用することにより、AAであるか否かの診断が容易になる。また、後述する実施例に示されるように、本発明に用いられるマーカーを利用することにより、再生不良性貧血に対する免疫抑制療法の効果を予測する基準を提供することができるので

50

で、免疫抑制療法の効果を期待し得るか否かの診断が容易になる。

【0047】

〔2.キット、組成物および方法〕

本発明は、AAを鑑別するマーカーを検出するためのキットを提供する。本発明に係るキットは、被験体サンプル中のSEREX抗原タンパク質またはSEREX抗原遺伝子を検出するためのツールを備えていることを特徴としている。本発明に係るキットを用いて目的のマーカーを検出することによって、AAを鑑別することができる。なお、「SEREX抗原タンパク質」、「SEREX抗原遺伝子」については、上記〔1. AAを鑑別するマーカー〕の項を参照のこと。

【0048】

本明細書中において使用される場合、「被験体サンプル」は、被験体から採取された任意の組織（血液等の体液を含む。）または細胞が意図され、これらに由来する調製物もまた被験体サンプルに包含され得る。本発明に用いるに好ましい被験体サンプルとしては、血清および骨髄が挙げられるがこれらに限定されない。なお、サンプル取得の第一段階として組織または細胞を被験体から直接取り出す工程は、医師によるものであり、本発明の範囲外である。また、本発明の方法によって得られた結果を用いて、疾患か否かの判定を下す工程もまた、医師によるものであり、本発明の範囲外である。

【0049】

本発明の対象とされるべき被験体は、汎血球減少症を呈する患者（すなわち、AAに罹患している可能性がある患者）が好ましく、AAを発症している患者がより好ましいが、正常な患者であってもよい。本発明に係る方法において、上記被験体サンプルは汎血球減少症を呈する患者から採取された血清もしくは骨髄またはその培養物であることが好ましいが、これに限定されない。サンプルの取得手順は、目的に応じて適宜選択され得ることを当業者は容易に理解する。

【0050】

一実施形態において、本発明に係るキット（第1のキット）は、SEREX抗原タンパク質またはそのフラグメントを検出するための抗体を備えている。上記抗体は、SEREX抗原に対する抗体であることが好ましい。なお、本実施形態に係るキットは、上記抗体を検出するための試薬をさらに備えていることが好ましいが、上述したように、SEREX抗原タンパク質またはそのフラグメントを検出するための抗体を含有している組成物として提供されてもよい。

【0051】

他の実施形態において、本発明に係るキット（第2のキット）は、SEREX抗原遺伝子またはそのフラグメントを検出するためのオリゴヌクレオチドを備えている。上記オリゴヌクレオチドは、SEREX抗原遺伝子またはそのフラグメントにハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドであることが好ましく、SEREX抗原遺伝子またはそのフラグメントに対するハイブリダイゼーションプローブまたはPCRプライマーであることが好ましい。なお、本実施形態に係るキットは、上記オリゴヌクレオチドを検出するための試薬をさらに備えていることが好ましいが、上述したように、SEREX抗原遺伝子またはそのフラグメントを検出するためのオリゴヌクレオチドを含有している組成物として提供されてもよい。

【0052】

さらなる実施形態において、本発明に係るキット（第3のキット）は、SEREX抗原タンパク質またはそのフラグメントを備えている。上述したように、本発明に用いられるマーカーはAAに特異的な自己抗体に対する抗原（自己抗原）である。被験体に上記マーカーが存在することによって惹起された自己抗体を検出すれば、AAを鑑別することができる。すなわち、本発明はまた、AAに特異的な自己抗体を検出するためのキットを提供する。本実施形態に係るキットは、被験体サンプル中の、SEREX抗原タンパク質によって惹起された自己抗体を検出するためのツールを備えていることを特徴としている。なお、本実施形態に係るキットは、上記抗体を検出するための試薬をさらに備えていること

10

20

30

40

50

が好ましいが、上述したように、S E R E X 抗原タンパク質またはそのフラグメントを含有している組成物として提供されてもよい。

【0053】

第1のキットを用いれば、目的のS E R E X 抗原を検出することによって、A A を鑑別することができる。第2のキットを用いれば、目的のS E R E X 抗原遺伝子を検出することによって、A A を鑑別することができる。第3のキットを用いれば、目的の自己抗体を検出することによって、A A を鑑別することができる。このように、本発明に係る第1～第3のキットは、A A を鑑別するためのキットであることが好ましいが、A A の鑑別の判断基準を提供するためのキットでもあり得る。また、後述する実施例に示されるように、本発明に用いられるマーカーを利用することにより、再生不良性貧血に対する免疫抑制療法 10  
の効果を予測することができる。すなわち、本発明に係るキットは、再生不良性貧血に対する免疫抑制療法の効果を予測するためのキットであり得る。

【0054】

本明細書中において使用される場合、用語「キット」は、特定の材料を、容器（例えば、ボトル、プレート、チューブ、ディッシュなど）に内包された態様にて備えた包装が意図されるが、組成物としての一物質中に材料を含有している形態もまた、用語「キット」に包含される。キットは、各材料を使用するための指示書を備えていることが好ましく、指示書には、本発明の目的を達成するための手順（例えば、A A を鑑別するための、上記材料の使用手順や、再生不良性貧血に対する免疫抑制療法の効果を予測するための、上記材料の使用手順）が記載されていることが好ましい。記載されるべき手順としては、後述 20  
する方法の各工程が挙げられるが、これに限定されない。本明細書中においてキットの局面において使用される場合、「備えた（備えている）」は、キットを構成する個々の容器のいずれかの中に上記材料が内包されている状態が意図される。また、本発明に係るキットは、複数の異なる組成物を1つに梱包した包装であり得、溶液形態の場合は容器中に内包されていてもよい。「指示書」は、紙またはその他の媒体に書かれていても印刷されていてもよく、あるいは磁気テープ、コンピューター読み取り可能ディスクまたはテープ、C D - R O M などのような電子媒体に付されてもよい。本発明に係るキットはまた、希釈剤、溶媒、洗浄液またはその他の試薬を内包した容器を備え得る。さらに、本発明に係るキットは、被験体サンプルを採取するために必要な器具および試薬を備えていてもよい。また、本発明に係るキットは、被験体サンプルに由来する調製物を生成するために必要な 30  
器具および試薬を備えていてもよい。

【0055】

なお、S E R E X 抗原タンパク質に対する抗体を少なくとも1つ含んでいる組成物（第1の組成物）は、第1のキットを作製するために利用され、S E R E X 抗原遺伝子またはそのフラグメントにハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドを少なくとも1つ含んでいる組成物（第2の組成物）は、第2のキットを作製するために利用され、S E R E X 抗原タンパク質またはそのフラグメントを少なくとも1つ含んでいる組成物（第3の組成物）は、第3のキットを作製するために利用される。すなわち、上述したキットを作製するための組成物もまた、本発明の範囲内である。

【0056】

このように、本発明に係るキットは、A A を鑑別するためのキットであることが好ましいが、A A の鑑別の判断基準を提供するためのキットでもあり得る。また、後述する実施例に示されるように、本発明に用いられるマーカーを利用することにより、A A に対する免疫抑制療法の効果を予測することができる。すなわち、本発明に係るキットは、A A に対する免疫抑制療法の効果を予測するためのキットであり得、A A に対する免疫抑制療法の効果を予測するための判断基準を提供するためのキットでもあり得る。

【0057】

本発明は、A A を鑑別する方法を提供する。本発明に係る方法は、上述した第1～第3のキットを用いることが好ましい。第1のキットを用いる場合、被験体サンプル中のS E R E X 抗原タンパク質を検出する工程を包含する。第2のキットを用いる場合、被験体サ 50

ンプル中の S E R E X 抗原遺伝子を検出する工程を包含する。第 3 のキットを用いる場合、被験体サンプル中の、S E R E X 抗原に対する自己抗体を検出する工程を包含する。

【 0 0 5 8 】

第 1 のキットを用いて S E R E X 抗原タンパク質を検出する実施形態（第 1 の方法）において、S E R E X 抗原を検出する工程は、S E R E X 抗原に対する抗体を用いる免疫アッセイであり得る。また、第 3 のキットを用いて S E R E X 抗原に対する自己抗体を検出する実施形態において、S E R E X 抗原に対する自己抗体を検出する工程は、S E R E X 抗原タンパク質またはそのフラグメントを用いる免疫アッセイであり得る。

【 0 0 5 9 】

本明細書中で使用される場合、用語「免疫アッセイ」は、抗原抗体反応に基づいた免疫学的な結合反応を利用して行われるアッセイが意図される。免疫学的な結合反応を利用したアッセイとしては、ウエスタンブロット、免疫沈降法、サンドイッチ E L I S A アッセイ、放射性イムノアッセイ、および抗体アッセイ（例えば免疫拡散アッセイ）、ならびにアフィニティクロマトグラフィー、免疫組織化学、免疫電子顕微鏡法などが挙げられる。これらの技術は、当該分野において周知であり、当業者は、容易に本発明を実行し得る。これらの免疫アッセイは、治療前の鑑別診断に用いられることが好ましく、診断または治療の方針を速やかに決定し得る。

【 0 0 6 0 】

第 1 のキットを用いる場合、本発明の方法は、( I ) S E R E X 抗原タンパク質に対する抗体を被験体サンプルとインキュベートする工程、( I I ) 上記抗体を回収し、洗浄する工程、( I I I ) 回収した上記抗体とともに S E R E X 抗原タンパク質が存在するか否かを確認する工程、を包含する方法であり得る。また、上記 ( I I ) に次いで、( I I ' ) S E R E X 抗原タンパク質に対する抗体に特異的に結合する因子（例えば抗体）を洗浄後の S E R E X 抗原タンパク質に対する抗体とインキュベートする工程、( I I ' ' ) インキュベート後の上記因子を回収し、洗浄する工程、を包含してもよく、この場合、上記 ( I I I ) の代わりに ( I I I ' ) S E R E X 抗原タンパク質が上記因子とともに存在するか否かを確認する工程を包含すればよい。なお、本発明を構成する工程はこれらに限定されず、被験体サンプル中のタンパク質成分を固相（膜、ウエルなど）に固定化しておけば、上記固相を S E R E X 抗原タンパク質に対する抗体とインキュベートすることによって上記 ( I ) を実行する工程、インキュベート後の固相表面を洗浄する工程、固相表面に上記抗体が存在するか否かを確認する工程を包含すればよい。この場合、例えば、識別可能な標識化合物（例えば、蛍光物質、放射性物質など）を上記抗体に予め結合させておけば、上記標識化合物が固相表面上に存在するか否かを確認すればよい。もちろん、本発明の方法は、S E R E X 抗原タンパク質に対する抗体と上記標識化合物とを結合させる工程（すなわち、S E R E X 抗原タンパク質に対する抗体を標識する工程）をさらに包含してもよい。

【 0 0 6 1 】

このように、本発明の第 1 の方法は、S E R E X 抗原タンパク質に対する抗体を被験体サンプルとインキュベートする工程、および被験体サンプルに由来するタンパク質と上記抗体との結合が形成されているか否かを確認する工程、を包含すればよいといえる。

【 0 0 6 2 】

第 3 のキットを用いる場合、本発明の第 3 の方法は、( I ) S E R E X 抗原タンパク質を被験体サンプルとインキュベートする工程、( I I ) 上記タンパク質を回収し、洗浄する工程、( I I I ) 回収した上記タンパク質とともに自己抗体が存在するか否かを確認する工程、を包含する方法であり得る。また、上記 ( I I ) に次いで、( I I ' ) S E R E X 抗原タンパク質に特異的に結合する因子（例えば抗体）を洗浄後の S E R E X 抗原タンパク質とインキュベートする工程、( I I ' ' ) インキュベート後の上記因子を回収し、洗浄する工程、を包含してもよく、この場合、上記 ( I I I ) の代わりに ( I I I ' ) 自己抗体が上記因子とともに存在するか否かを確認する工程を包含すればよい。なお、本発明を構成する工程はこれらに限定されず、被験体サンプル中のタンパク質成分を固相（膜、

10

20

30

40

50

ウエルなど)に固定化しておけば、上記固相をS E R E X抗原タンパク質とインキュベートすることによって上記(I)を実行する工程、インキュベート後の固相表面を洗浄する工程、固相表面に上記タンパク質が存在するか否かを確認する工程を包含すればよい。この場合、例えば、識別可能な標識化合物(例えば、蛍光物質、放射性物質など)を上記タンパク質に予め結合させておけば、上記標識化合物が固相表面上に存在するか否かを確認すればよい。もちろん、本発明の方法は、S E R E X抗原タンパク質と上記標識化合物とを結合させる工程(すなわち、S E R E X抗原タンパク質を標識する工程)をさらに包含してもよい。

【0063】

このように、本発明の第3の方法は、S E R E X抗原タンパク質を被験体サンプルとインキュベートする工程、および被験体サンプルに由来する自己抗体と上記タンパク質との結合が形成されているか否かを確認する工程、を包含すればよいといえる。

10

【0064】

第2のキットを用いてS E R E X抗原遺伝子を検出する実施形態(第2の方法)において、S E R E X抗原遺伝子を検出する工程は、核酸プローブを、S E R E X抗原遺伝子またはそのフラグメントにハイブリダイズさせる工程であり得る。本明細書中で使用される場合、「核酸プローブ」は、目的の核酸にハイブリダイズし得るものであれば特に限定されず、いわゆるハイブリダイゼーションプローブであってもP C Rプライマーであってもよい。ハイブリダイゼーション技術およびP C R技術は、当該分野において周知であり、当業者は、容易に本発明を実行し得る。

20

【0065】

核酸プローブは、S E R E X抗原遺伝子(またはその相補鎖)の部分配列を含むオリゴヌクレオチドであれば特に限定されず、配列番号17~32に示されるヌクレオチド配列またはその相補配列からなるオリゴヌクレオチドであってもよい。また、核酸プローブは、上記「S E R E X抗原タンパク質のフラグメント」をコードするオリゴヌクレオチドであってもよい。

【0066】

ハイブリダイゼーション技術を用いる場合、核酸プローブは、配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13または15に示されるヌクレオチド配列またはその相補配列の、15~50個連続する塩基からなるオリゴヌクレオチドが好ましく、より好ましくは20~50個、さらに好ましくは20~45個、最も好ましくは25~40個連続する塩基からなるオリゴヌクレオチドである。また、P C R技術を用いる場合、核酸プローブ(P C Rプライマー)は、配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13または15に示されるヌクレオチド配列またはその相補配列の、15~50個連続する塩基からなるオリゴヌクレオチドが好ましく、より好ましくは15~40個、さらに好ましくは15~35個、最も好ましくは15~30個連続する塩基からなるオリゴヌクレオチドである。

30

【0067】

なお、本実施形態に係る方法は、S E R E X抗原遺伝子を検出する工程を包含することを特徴としているが、上述したS E R E X抗原タンパク質を検出する工程をさらに包含してもよい。このように、本発明の第2の方法は、S E R E X抗原遺伝子に由来するオリゴヌクレオチドを被験体サンプルとインキュベートする工程、および被験体サンプルに由来するポリヌクレオチドと上記オリゴヌクレオチドとの結合が形成されているか否かを確認する工程、を包含すればよいといえる。

40

【0068】

このように、本発明に係る方法は、A Aを鑑別する方法であることが好ましいが、A Aの鑑別の判断基準を提供する方法でもあり得る。また、後述する実施例に示されるように、本発明に用いられるマーカーを利用することにより、A Aに対する免疫抑制療法の効果を予測することができる。すなわち、本発明に係る方法は、A Aに対する免疫抑制療法の効果を予測する方法であり得、A Aに対する免疫抑制療法の効果を予測するための判断基準を提供する方法でもあり得る。

50

## 【 0 0 6 9 】

本発明の目的は、再生不良性貧血を鑑別するマーカーを提供するとともに、当該マーカーを検出することによる再生不良性貧血の診断基準を提供することにある。またさらに、本発明の目的は、再生不良性貧血に対する免疫抑制療法の効果を予測するためのマーカーを提供するとともに、当該マーカーを検出することによる再生不良性貧血に対する免疫抑制療法の診断基準を提供することにある。本明細書を読んだ当業者は、本明細書中の記載および技術常識に基づいて、種々の形態にて本発明を実行し得ることを容易に理解する。

## 【 実施例 】

## 【 0 0 7 0 】

〔材料および方法〕

〔患者〕

再生不良性貧血の患者（17例）、低形成性骨髄を示す不応性貧血の患者（6例）、および健常ボランティア（20例）から血清を得た。個々の患者からインフォームドコンセントを得た。免疫抑制療法に対する反応を、Kosakaら（Blood, 111, 1054-1059 (2008)）に記載の基準を用いて評価した。

## 【 0 0 7 1 】

〔細胞培養〕

ヒト慢性骨髄性白血病細胞株 K 5 6 2 を、10% F B S (Hyclone, Logan, UT) で補完した R P M I で、5% C O <sub>2</sub> の加湿環境下にて培養した。不死化したヒトストローマ細胞株 h T S 5 (札幌医科大学・小船博士より供与いただいた。) を、12.5% ウマ血清 (Gibco BRL, Rockville, MD)、12.5% ウシ胎児血清 (Gibco BRL)、 $1 \times 10^{-6}$  M ヒドロコルチゾン (Sigma, St Louis, MO)、および  $1 \times 10^{-4}$  M -メルカプトエタノール (Sigma) で補完した M E M (最小必須培地) を用い、5% C O <sub>2</sub> の加湿環境下にて 37 で培養した。

## 【 0 0 7 2 】

〔フローサイトメリー分析による自己抗体の検出〕

K 5 6 2 細胞および h T S - 5 細胞をメタノールで 4、10 分間固定し、これらのサンプルを、リン酸化緩衝液で 1 : 20 に希釈した患者血清とインキュベートした。これらのサンプルを洗浄し、フルオレセインイソチオシアネート複合体化抗ヒト I g G (Dako, Cambridgeshire, UK) とインキュベートし、EPICS XL-MCL cytometer (Beckman Coulter, Tokyo, Japan) を用いて 1 サンプルあたり 20,000 個の細胞を分析した。蛍光強度のカットオフ値を、20 例の健常ボランティアからのサンプルの平均 + 2 標準偏差を用いて決定した。

## 【 0 0 7 3 】

〔cDNAライブラリーの構築〕

K 5 6 2 細胞から、RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) を用いて、総 R N A を製造業者の指示書に従い調製した。SMART cDNA Library Construction Kit (Clontech, Paolo Alto, CA) を用い、抽出した総 RNA から c D N A 発現ライブラリーを製造業者の指示書に従い構築した。すなわち、3 μ g の総 R N A を、SMART IVオリゴヌクレオチドと CDS III/3' PCR プライマー (それぞれ S f i I A サイトと S f i I B サイトを有する。) を用い c D N A に逆転写した。c D N A を R N a s e で消化し、フェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿にて精製した後、ポリメラーゼ鎖反応 (P C R) で増幅した。P C R 産物をプロテイナーゼ K で消化し、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿法により精製し、S f i I で消化した後に、再度フェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿法にて精製した。CHROMA SPIN-400 (Clontech) を用い小さな D N A を除去し、エタノール沈殿により濃縮した。これを、TripleEx2ベクター (Clontech) 内へ、方向を合せて連結し、Gigapack III Gold Packaging Extract (Agilent Technology, La Jolla, CA) を用いファージ粒子中へパッケージングし、XL1-blue super competent cells (Agilent Technology) へ形質導入した。オリジナルライブラリーのサイズは、 $1.2 \times 10^7$  プラーク形成単位 (p f u) であった。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 4 】

〔 S E R E X 法による、自己抗原の血清学的スクリーニング 〕

形質導入した細菌を、トッパアガー上に100 mm LBアガープレートあたり約3,000 p f u のファージ密度でプレティングした。ブランクを、PROTRAN nitrocellulose membrane (Whatman, Kent, UK)上に転写し、一晩、10 mM イソプロピル - D - 1チオガラクトピラノシド ( I P T G ) で予め湿潤させ、リコンビナントタンパク質を誘導した。この転写膜を、1% ECL Advance Blocking Agent (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK; blocking buffer)を含むT B S T (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.05% Tween-20)を用い、室温 ( R T ) で1時間ブロッキングした。K 5 6 2 のフローサイトメトリー分析で陽性となった9名の患者から得たプール血清を、c D N A 挿入物のないファージを用いて吸収した。これをブロッキング緩衝液で1 : 1 0 0 に希釈し、転写膜と4 で一晩インキュベートした。次に、転写膜を洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体化抗ヒト抗体 (Dako) とともにインキュベートし、洗浄した後に、TMB Stabilized Substrate for Horseradish Peroxidase (Promega, Madison, WI)を用いて発色した。陽性ファージを形質導入したB M 2 5 . 1 E . c o l i からプラスミドを調製し、塩基配列を決定した後に、ヌクレオチドB L A S T データベースを参照し抗原を同定した。

10

## 【 0 0 7 5 】

〔 S E R E X 法によって同定された抗原の発現および精製 〕

S E R E X 法によって同定された抗原のc D N A をP C R により増幅し、pGEX-6P-1 (G E Healthcare)ベクターのBamHI-XhoI部位へクローニングし、G S T 融合タンパク質として発現させた。これらのc D N A の増幅に用いたプライマーを表1に挙げた。

20

## 【 0 0 7 6 】

## 【表1】

SEQ ID No:	Gene name of SEREX antigens	Forward primers harbored with BamHI	Reverse primers harbored with XhoI
1,2	Ribosomal protein S27	5'-GGATCCATGCCTCTCGCAAAGGATC-3' (SEQ ID No:17)	5'-CTCGAGTGCITTTTAGTCTGCTT-3' (SEQ ID No:18)
3,4	Heat shock protein family B (small), member 11	5'-GGATCCATGAGAAAAATTGATCTCTG-3' (SEQ ID No:19)	5'-CTCGAGCATTTTGTATCATTAT-3' (SEQ ID No:20)
5,6	Ribosomal protein L41	5'-GGATCCATGAGGCCAAGTGGAGG-3' (SEQ ID No:21)	5'-CTCGAGGGCGATGAAGTTCTAGG-3' (SEQ ID No:22)
7,8	Chloride intracellular channel 1	5'-GGATCCCGGAAGAATTCGCTTCC-3' (SEQ ID No:23)	5'-CTCGAGTGCCTCCAGGATCCCTGC-3' (SEQ ID No:24)
9,10	Chromosome 14 open reading frame 156	5'-GGATCCATGGCGGCTCAGCAGCGAG-3' (SEQ ID No:25)	5'-CTCGAGTCTCAAAAATCTTTCTTT-3' (SEQ ID No:26)
11,12	NHP2 non-histone chromosome protein 2-like 1	5'-GGATCCATGACTGAGGCTGATGTGAA-3' (SEQ ID No:27)	5'-CTCGAGGTTTAGACTAAGAGCCTT-3' (SEQ ID No:28)
13,14	Recombination activating gene 1 activating protein 1	5'-GGATCCATGGAGGGCGGGCTTTCT-3' (SEQ ID No:29)	5'-CTCGAGCCTCAGGTTTGCAGGAGC-3' (SEQ ID No:30)
15,16	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide F	5'-GGATCCATGAGTTTACCCTCAATCC-3' (SEQ ID No:31)	5'-CTCGAGATGCTATTCTCTCATTTTC-3' (SEQ ID No:32)

30

40

## 【 0 0 7 7 】

プラスミドベクターをB L 2 1 コンピテント細胞 (Agilent Technology) に形質導入し、0.1 mM I P T G によりリコンビナントタンパク質を誘導した。誘導タンパク質を、Glutathione Sepharose 4B (GE healthcare)を用い製造業者の指示書に従い精製した。S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動の後に、抗G S T 抗体 (GE healthcare)を用い

50

たウエスタンブロッティングとクーマシーブリリアントブルー染色で、タンパク質の特異性および純度を、それぞれ確認した(データは示さず)。

【0078】

〔S E R E X法により同定された抗原の、半定量性逆転写ポリメラーゼ鎖反応解析〕

QIAGEN RNeasy kit (Qiagen, Tokyo, Japan)を用い、総RNAを抽出した。Taqman Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems)を用い、cDNAを合成した。合成したcDNAを、表1に挙げたプライマーを用いPCRに供した。GAPDHを内部標準とし、フォワードプライマー5'-GCAGGGGGAGCCAAAAGG-3'(配列番号33)とリバースプライマー5'-TGCCAGCCCAAGCGTCAAG-3'(配列番号34)で増幅した。20サイクルのPCRの後に、5サイクル毎にアガロースゲル電気泳動に供し、PCR産物を半定量した。

10

【0079】

〔骨髄からのCD34陽性細胞の精製〕

健常ボランティアの腸骨陵から骨髄を吸引し、単核細胞を、Ficoll-Paque (GE Healthcare)を用い精製した。単核細胞をFITC複合体化抗ヒトCD34抗体(8G12, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)とインキュベートし、リン酸緩衝化生理食塩水で2回洗浄した後に、BD FACS AriaSE (Becton Dickinson)を用い、CD34陽性細胞およびCD34陰性細胞を収集した。

【0080】

〔患者血清サンプルにおける自己抗体の検出〕

S E R E X抗原(50ng/ウエル)を、96ウエルの酵素免疫アッセイ(EIA)/放射免疫アッセイ(RIA)プレート(Corning, NY)にコーティングし、4で一晩静置した。このプレートを、Block Ace (DS Pharma Biomedical, Japan, Osaka)で、4で一晩ブロッキングした。ブロッキング試薬を除去した後に、ウエルを、0.02% Tween-20で補完したリン酸緩衝化生理食塩水(PBS-T)で3回洗浄した。サンプルをウエルに添加しRTで30分間インキュベートした。ウエルをPBS-Tで4回洗浄した後に、100μLの西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)複合体化抗ヒトIgG抗体(Dako)をウエルに加え、RTで30分間インキュベートし、ウエルを洗浄した後に、TMB Blue (DAKO)で20分間発色し、1M硫酸で反応を停止した。450nmの吸光度を、Infinite 2000 plate reader (TECAN, Japan, Kawasaki)で測定した。参照値の作成には、抗GST抗体(GE-Healthcare)を用いた。20例の健常ボランティアからのサンプルの平均+2標準偏差を用い、カットオフ値を決定した。

20

30

【0081】

〔結果〕

〔後天性AA血清サンプルはK562細胞と反応する〕

後天性AAの免疫異常が血球を標的としていることが明らかとなっている。一方、骨髄ストローマ細胞の機能不全が、後天性AAの病因に関与することも数多く報告されている。後天性AAの免疫異常が、血球と骨髄ストローマ細胞のどちらを標的としているのかを調べる目的で、患者血清中の自己抗体の発現を、血球細胞株K562と骨髄ストローマ細胞株hTS-5を用いFACS解析した。カットオフ値を、健常ボランティア血清を用い決定した。

40

【0082】

結果を図1に示す。図1は、hTS-5細胞に対する自己抗体よりもK562細胞に対する自己抗体が、AAの血清中に検出されることを示している。図1Aには、AA患者の血清中の自己抗体の発現を、標的化する細胞としてK562細胞およびhTS-5細胞を用いて、本明細書中に記載の方法に従って試験した結果を示す。図中の点線は、21例の健常者から得た平均+2標準偏差の値を用いて定めた、蛍光強度のカットオフ値である。図1Bは、各AA患者における自己抗体の発現を要約した表である。NI; 健常者、AA; 再生不良性貧血患者。

【0083】

50

図 1 に示すように、サンプルの 42.9% (9/21) が K562 細胞と反応し、サンプルの 14.2% (3/21) が hTS-5 細胞と反応した。hTS-5 に対する陽性サンプルは、K562 細胞とも反応した。これらの結果は、後天性 AA の免疫異常が、骨髓ストローマ細胞よりも血球細胞を標的としていることを示唆する。

#### 【0084】

〔AA における S E R E X 抗原の同定〕

後天性 AA の自己抗体を同定するために、K562 の cDNA ライブラリーを作製し、S E R E X に供した。合計 168 個のプラークを一次スクリーニングし、30 個の免疫反応性クローンを得た。これらのクローンをさらに二次スクリーニングに供し、8 個の S E R E X 抗原を同定した。これらは、リボソームタンパク質 S27 (Rps27, NM\_001030)、ヒートショックタンパク質ファミリー B メンバー 11 (HspB11, BC005245)、リボソームタンパク質 L41 (Rpl41, NM\_001035267)、クロライド細胞内チャンネル 1 (Clc1, NM\_001288)、染色体 14 オープンリーディングフレーム 156 (C14orf156, NM\_031210)、NHP2 非ヒストン染色体タンパク質 2 様 1 (Nhp2l1, BC095439)、リコンビネーション活性化遺伝子 1 活性化タンパク質 1 (Rag1ap1, BC009621)、および小核リボヌクレオタンパク質ポリペプチド F (Snrpf, NM\_003095) であった。これらのアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 および 15 によって示され、これらをコードするヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 および 16 によって示される。

10

20

#### 【0085】

〔AA は S E R E X 抗原に対する自己抗体を発現する〕

後天性 AA 患者の血清が S E R E X 抗原に対する自己抗体を発現しているかどうかを確認するために、S E R E X 法により同定された抗原をクローニングし、GST 融合タンパク質として発現させ、これを抗原とした E L I S A を行った。

#### 【0086】

結果を図 2 に示す。図 2 は、S E R E X によって同定された抗原に対する自己抗体が AA の血清中に検出されることを示す図である。S E R E X によって同定された抗原に対する I g G 型自己抗体の発現を、本明細書中に記載の方法に従い E L I S A によって試験した結果を示す。図中の点線は、21 例の健常者から得た平均 + 2 標準偏差の値を用いて定めた、蛍光強度のカットオフ値である。NI; 健常者、AA; 再生不良性貧血患者、MDS; 骨髓異形成症候群、RA; 関節リウマチ。

30

#### 【0087】

図 2 に示されるように、CLIC1, HSPB11, RPL41 および RPS27 に対する自己抗体は、健常ボランティア、MDS 患者または間接リウマチ患者によりも後天性 AA において高かった。14 例の MDS 患者のサンプル 2 つが、HSPB11、RPL41 および RPS27 で陽性となった。これら 2 つの陽性サンプルは、同一の症例から得られた。表 1 に示されるように、I g G 型の自己抗体は、RPS27 (配列番号 1), HSPB11 (配列番号 3), RPL41 (配列番号 5), CLIC1 (配列番号 7), ステロイドレセプター RNA アクチベータステムループ相互作用 RNA 結合タンパク質 (SRA-RNABP (配列番号 9), C14orf156 によってコードされるタンパク質), NHP2L1 (配列番号 11), RAG1AP1 (配列番号 13), および snRNP-F (配列番号 15) に対して、AA 血清サンプル中のそれぞれ 52.2% (12/23), 34.8% (8/23), 30.4% (7/23), 39.1% (9/23), 4.3% (1/23), 4.3% (1/23), 17.4% (4/23), および 21.7% (5/23) が陽性であった。

40

#### 【0088】

〔S E R E X 法により同定された抗原は、K562 細胞と CD34 陽性血球細胞に発現している〕

S E R E X 法により同定された抗原を血球細胞が発現しているかどうか、RT-PCR

50

法で確認した。

【0089】

結果を図3に示す。図3は、SEREX法により同定された抗原がK562細胞およびCD34陽性BMMNCに発現していることを示す図である。(A)には、SEREX法により同定された抗原の、K562細胞およびhTS-5細胞における発現レベルを、本明細書中に記載の方法に従って、RT-PCR法で半定量した結果を示す。(B)には、健常ボランティアから回収した骨髓単核細胞を用い、CD34陽性画分およびCD34陰性画分の、SEREX法により同定された抗原の発現レベルを、本明細書中に記載の方法に従って行った、RT-PCR法で半定量した結果を示す。

【0090】

図3(A)に示されるように、SEREXによって同定された抗原の全てが、K562細胞に発現している。hTS-5細胞と比較した場合、これらの抗原のほとんどがK562細胞で、より高い発現レベルを示した。続いて、これらの抗原が健常ボランティアの血球細胞に発現されているかどうかを調べた。図3(B)に示されるように、Clc1, Nhp2l1, Rag1ap1, Rpl41, Rps27およびSnrpfが骨髓単核細胞に発現されていた。また、その遺伝子のほとんどが、CD34陰性細胞よりもCD34陽性細胞において、より高いレベルで発現していた。

【0091】

図3(B)に示すように、健常者においてHSPB11が発現していない。そこで、HSPB11の発現が再生不良性貧血患者に特異的であるか否かを確認するために、RT-PCR法での半定量を行った(図4)。具体的には、自己抗体陰性の再生不良性貧血(AA)の患者(図中1)、自己抗体陽性の骨髓異形成症候群(MDS)の患者(図中2)、自己抗体陰性のMDSの患者(図中3および4)、および健常者(図中5~7)から得た骨髓単核球画分を用いて、HSPB11の発現レベルを、本明細書中に記載の方法に従って、RT-PCR法で半定量した。図4の上段にHSPB11の結果を示し、下段に内部標準として用いたGAPDHの結果を示した。

【0092】

図4に示されるように、AAと自己抗体陽性のMDSにおいて、HSPB11の発現が認められた。一方、健常者と自己抗体陰性のMDSにおいてはHSPB11の発現が認められなかった。これらの結果から、骨髓でのHSPB11の発現は、AAまたは免疫異常を有する患者(MDSとAAの症状が重複する患者)を診断するに有用である。

【0093】

[CLIC1, RPL41およびRPS27のIgG抗体価が免疫抑制療法に対する奏効率と相関する]

続いて、IgM型自己抗体の抗体価を調べたが、健常ボランティアと顕著な差異を示さなかった(表2)。

【0094】

10

20

30

【表 2】

Case	Dx	Age/Sex	Result of ELISA using SEREX antigens				Clinical course	
			CLC1 (IgM/IgG)	HSPB11 (IgM/IgG)	RPL41 (IgM/IgG)	RPS27 (IgM/IgG)	IS-therapy	Response
1	MAA	63/M	0.49/ <u>2.51</u>	1.13/2.48	1.84/6.19	0.47/5.64	CyA	CR
2	MAA	64/F	0.31/2.13	0.60/2.08	1.23/7.11	0.23/4.97	None	
3	MAA	67/M	0.71/1.52	1.14/ <u>6.73</u>	1.78/4.83	0.94/4.14	CyA	PR
4	MAA	68/F	0.78/1.65	1.69/ <u>3.56</u>	3.07/5.22	1.86/3.76	None	
5	MAA	69/F	1.03/1.68	2.64/ <u>6.32</u>	<u>5.83/10.8</u>	<u>5.37/9.88</u>	CyA	CR
6	MAA	72/F	2.78/1.40	3.13/1.11	4.07/4.43	2.59/3.89	CyA	NR
7	MAA	76/F	1.20/ <u>2.37</u>	2.11/0.85	2.95/ <u>10.3</u>	1.31/ <u>8.05</u>	None	
8	MAA	81/M	1.02/ <u>2.42</u>	2.78/2.58	2.46/ <u>9.12</u>	1.84/ <u>8.63</u>	CyA	PR
9	SAA	32/F	1.61/1.89	1.89/2.68	2.67/7.16	2.26/5.05	None	
10	SAA	37/F	2.29/1.27	3.36/1.33	4.07/5.13	<u>4.23/4.52</u>	ATG+CyA	NR
11	SAA	39/F	<u>2.97/0.31</u>	<u>4.60/0.81</u>	<u>6.32/1.88</u>	<u>3.90/0.08</u>	ATG+CyA	NR
12	SAA	57/F	1.29/1.42	2.75/ <u>4.55</u>	3.85/8.65	2.47/ <u>9.44</u>	ATG+CyA	CR
13	SAA	62/M	1.13/1.73	2.38/2.87	2.56/4.26	1.81/3.04	CyA	NR
14	SAA	68/M	1.28/1.28	2.50/3.13	3.14/3.96	3.18/ <u>7.17</u>	ATG+CyA	PR
15	SAA	75/M	2.27/1.56	2.42/1.75	4.91/6.03	1.89/4.47	CyA	PR
16	SAA	75/F	1.30/ <u>2.71</u>	2.30/ <u>6.19</u>	4.83/6.81	2.50/ <u>8.57</u>	CyA	PR
17	SAA	78/M	0.57/2.21	1.11/0.75	1.90/7.93	0.63/ <u>7.17</u>	ATG+CyA	PR
18	RA	39/F	0.99/1.02	2.04/1.78	3.06/ <u>12.2</u>	1.14/ <u>9.85</u>	None	
19	RA	62/F	0.51/ <u>2.43</u>	1.34/ <u>3.58</u>	1.88/8.46	0.50/ <u>7.18</u>	None	
20	RA	68/M	<u>2.57/2.53</u>	2.42/0.94	2.76/ <u>13.6</u>	2.38/6.22	CyA	PR
21	RA	74/M	0.22/ <u>2.50</u>	1.81/ <u>3.57</u>	2.05/ <u>17.8</u>	1.63/ <u>8.18</u>	CyA	PR
22	RA	75/M	1.03/ <u>3.67</u>	<u>4.58/3.77</u>	3.99/9.26	2.35/ <u>8.03</u>	CyA	PR
23	RA	76/M	<u>2.66/2.49</u>	2.42/3.01	3.05/ <u>13.8</u>	1.08/ <u>12.7</u>	None	

MAA: Moderate aplastic anemia,

SAA: Severe aplastic anemia,

RA: Refractory anemia with hypoplastic bone marrow,

IS-therapy; Immunosuppressive therapy,

ATG; Anti-thymocyte globulin,

CyA; Cyclosporine A,

CR; Complete response,

PR; Partial response,

NR; No response

## 【 0 0 9 5 】

自己抗体の発現パターンから、AA患者は以下の4群に分類される：IgM陽性かつIgG陽性（ケース5, 20, 22, 23）；IgM陽性かつIgG陰性（ケース10, 11）；IgM陰性かつIgG陽性（ケース1, 3, 4, 7, 8, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 21）；および、IgM陰性かつIgG陰性（ケース2, 6, 9, 13, 15, 22）。自己抗体の発現パターンと免疫抑制療法に対する反応との関係を調べると、12例の中11例が、いずれかのSEREX抗原に対するIgG型自己抗体を発現していた。一方、本研究における4例の非反応例では、IgG型自己抗体を発現していなかった。さらに、IgG型自己抗体の抗体価と免疫抑制療法に対する反応性との関係を調べた

10

20

30

40

50

。

【0096】

結果を図5に示す。図5は、CLIC1、RPL41およびRPS27に対するIgG型自己抗体の抗体価が、免疫抑制療法に対する奏効率とポジティブに相関することを示す図である。

【0097】

図5に示されるように、免疫抑制療法の非応答者よりも応答者において、CLIC1、RPL41またはRPS27に対するIgG型自己抗体の抗体価は、より高かった。さらに、CLIC1、RPL41またはRPS27に対するIgG型自己抗体の抗体価が高ければ高いほど、免疫抑制療法に対する奏効率が高かった。CLIC1、RPL41およびRPS27の相関係数は、それぞれ0.828、0.830および0.949であった。以上の結果は、CLIC1、RPL41またはRPS27に対するIgG型自己抗体の抗体価が高いほど、免疫抑制療法に対する良好な結果が予測されることを、示している。

10

【0098】

〔考察〕

本研究において、後天性AAにおける新規SEREX抗原を標的とする自己抗体を同定した。これらの抗原のほとんどが、K562細胞およびCD34陽性の骨髄単核細胞において、より強く発現していた。さらに、これらの自己抗体は、hTS-5ストローマ細胞よりもK562血球細胞を標的としていた。

【0099】

これらの自己抗体陽性率は、再生不良性貧血で52.2%、骨髄不全症候群で14.3%であった。MDS陽性の2例は、5q-症候群とRAEB2患者であった。すなわち、これらの2例は、血球異常と免疫異常とを合併する症例であった可能性がある。現在、再生不良性貧血を診断するための血清マーカーはない。よって、MDSとAA（特に、低形成骨髄で染色体異常がなく、異形成に乏しい症例）との鑑別は、困難を極める。本研究によって同定された自己抗体を測定することで、骨髄不全症候群の中で、AAの鑑別（免疫学的病因を有する患者を抽出すること）が期待される。

20

【0100】

CLIC1、RPS27およびRPL41のIgG抗体価が、免疫抑制療法の反応性と高い相関性を示したことから、これらの抗体価を測定することにより、免疫抑制療法に対する効果を予測できる可能性がある。すなわち、本マーカーは、免疫抑制療法の開始や中止、あるいは骨髄移植を行う際の判断材料となることが期待できる。特に、骨髄移植を行うにはある一定の準備期間を必要とする。骨髄移植までの前治療の期間と骨髄移植の成功率との間には逆相関関係があることから、本研究で見出したマーカーは、骨髄移植を必要とする患者の予後の改善に寄与するであろう。

30

【0101】

このように、本発明は、AAにおける新規な自己抗体を提供する。本発明の自己抗体は、AAでの免疫抑制療法の結果を予測するに有力なツールであり得る。

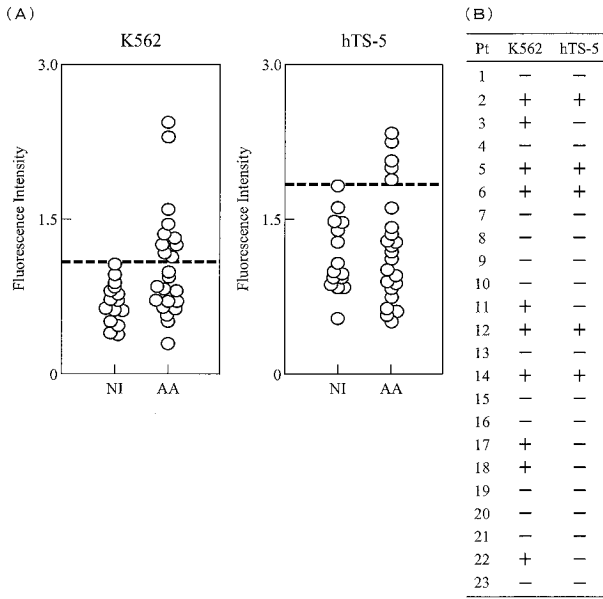
【産業上の利用可能性】

【0102】

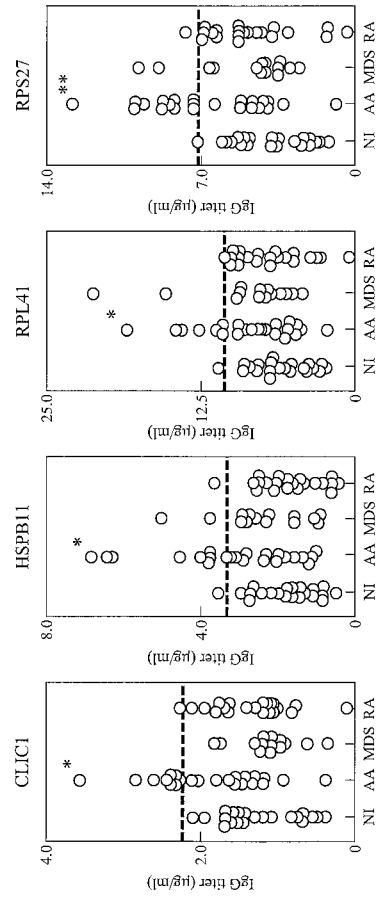
本発明を用いれば、再生不良性貧血の鑑別、および再生不良性貧血に対する免疫抑制療法の効果の予測が容易になる。このように優れたツールを提供する本発明は、医学、薬学の分野において利用可能であり、医薬品、生化学試薬の開発に大いに寄与することができる。

40

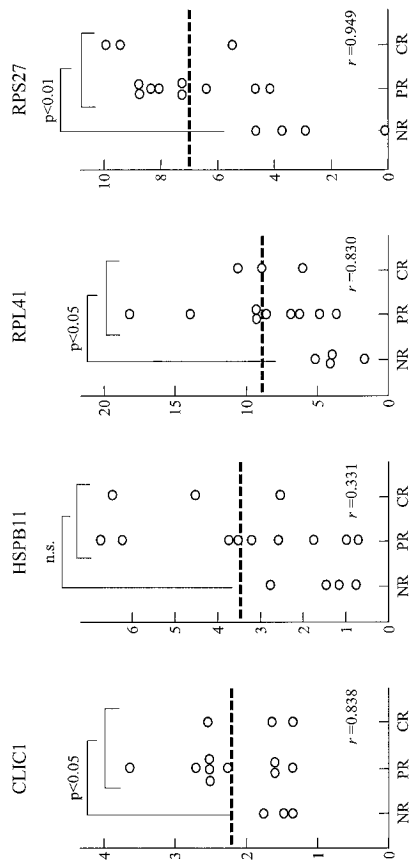
【 図 1 】



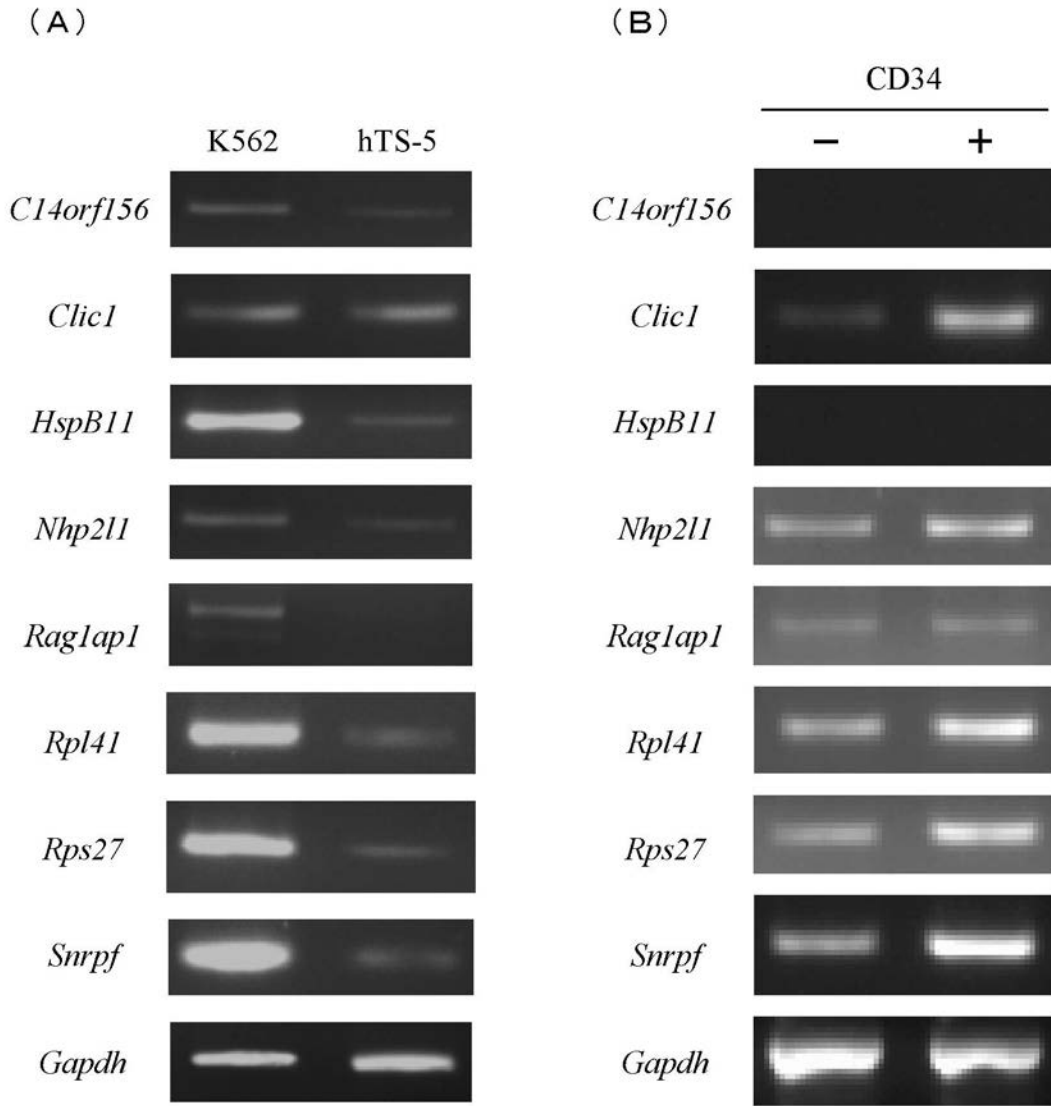
【 図 2 】



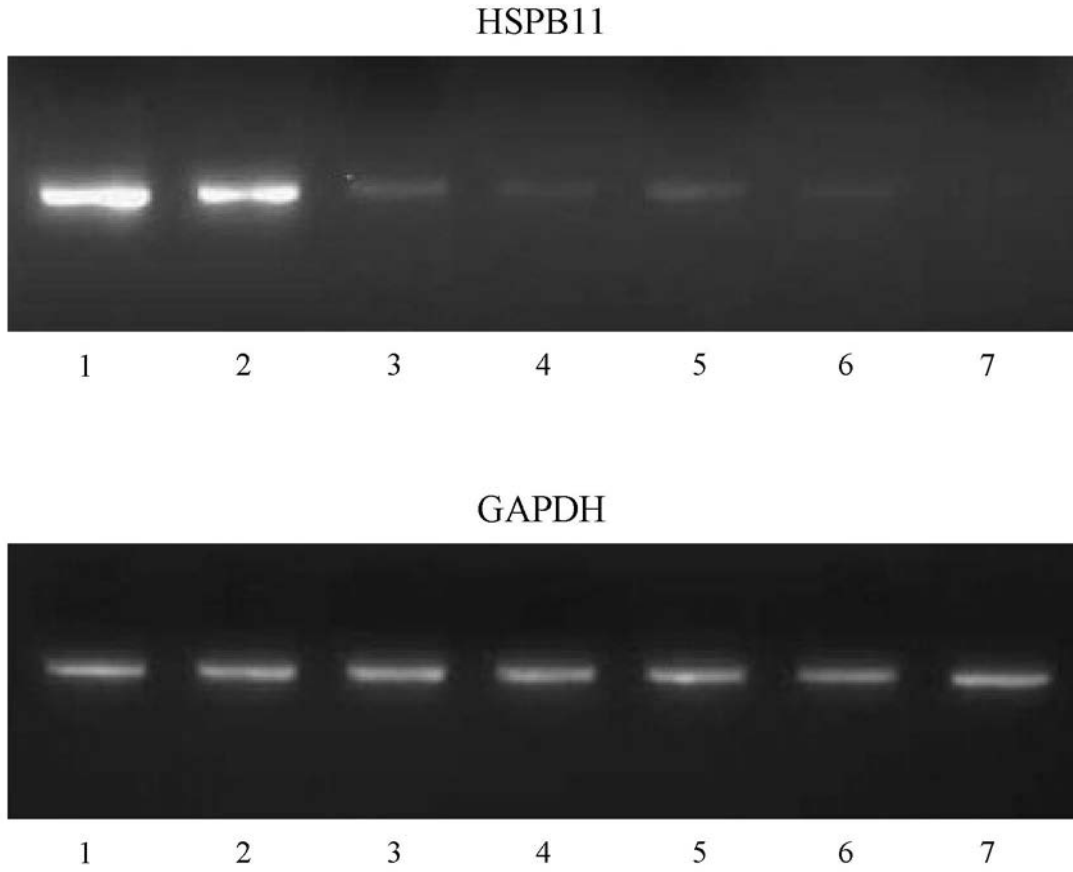
【 図 5 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 配列表 】

2013145178000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

C 0 7 K 14/47

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA09 CA11 CA20 DA05 GA11  
4B063 QA01 QA19 QQ52 QR08 QR55 QR62 QS25 QS33 QS34  
4H045 BA10 CA40 DA75 DA86 EA50 FA74

专利名称(译)	再生障碍性贫血的标志物及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2013145178A</a>	公开(公告)日	2013-07-25
申请号	JP2012005616	申请日	2012-01-13
申请(专利权)人(译)	北海道公立大学法人 札幌医科大学		
[标]发明人	栗林景晶 後藤真希 渡邊直樹		
发明人	栗林 景晶 後藤 真希 渡邊 直樹		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/68 C12N15/09 C07K14/47		
FI分类号	G01N33/53.D C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/53.N C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/12 C12Q1/6813.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA05 4B024/GA11 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA74		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

摘要：要解决的问题：使用标记物提供再生障碍性贫血特异性标记物和再生障碍性贫血的鉴别技术。解决方案：通过检测由序列号1,3,5,7,9,11,13或15的氨基酸序列或其片段或由a组成的基因组成的蛋白质，可以轻松区分再生障碍性贫血。测试对象样品中序列号为2,4,6,8,10,12,14或16的核苷酸序列或其片段。

