

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2006/098144

発行日 平成20年8月21日 (2008. 8. 21)

(43) 国際公開日 **平成18年9月21日 (2006. 9. 21)**

(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
CO7K 16/18 (2006.01)	CO7K 16/18 ZNA	4H045
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543 5O1A	
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 N	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 31 頁)

出願番号	特願2007-508057 (P2007-508057)	(71) 出願人	304021831 国立大学法人 千葉大学 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2006/303699	(72) 発明者	黒須 克志 千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内
(22) 国際出願日	平成18年2月28日 (2006. 2. 28)	(72) 発明者	滝口 裕一 千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内
(31) 優先権主張番号	特願2005-78252 (P2005-78252)	(72) 発明者	岡田 理 千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内
(32) 優先日	平成17年3月17日 (2005. 3. 17)	(72) 発明者	栗山 喬之 千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2005-271021 (P2005-271021)		
(32) 優先日	平成17年9月16日 (2005. 9. 16)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特発性肺線維症の検出マーカー、検出キット及び検出方法

(57) 【要約】

本発明の目的は、容易に特発性肺線維症を検出するための検出マーカー、検出キット及び検出方法等を提供することである。

本発明は、抗annexin 1抗体、抗phosphoglycerate kinase 1抗体、抗annexin 4抗体、抗bax inhibitor 1抗体、抗cytochrome c oxidase subunit Va抗体、抗aldehyde dehydrogenase 1抗体、抗cytochrome c-1抗体、抗macrophage migration inhibitory factor抗体、抗annexin 2抗体、抗cytochrome c reductase core 1抗体、及び、抗heme oxygenase 1抗体から成る群から選択される、特発性肺線維症の血清中に存在する自己抗体、該自己抗体から成る特発性肺線維症の検出マーカー、検出キット、及び、検出方法等に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

特発性肺線維症の血清中に存在する自己抗体。

【請求項2】

抗annexin 1抗体、抗phosphoglycerate kinase 1抗体、抗annexin 4抗体、抗bax inhibitor 1抗体、抗cytochrome c oxidase subunit Va抗体、抗aldehyde dehydrogenase 1抗体、抗cytochrome c-1抗体、抗macrophage migration inhibitory factor抗体、抗annexin 2抗体、抗cytochrome c reductase core 1抗体、及び、抗heme oxygenase 1抗体から成る群から選択される、特発性肺線維症の血清中に存在する自己抗体。 10

【請求項3】

特発性肺線維症の血清中に存在する自己抗体から成る特発性肺線維症の検出マーカー。

【請求項4】

抗annexin 1抗体、抗phosphoglycerate kinase 1抗体、抗annexin 4抗体、抗bax inhibitor 1抗体、抗cytochrome c oxidase subunit Va抗体、抗aldehyde dehydrogenase 1抗体、抗cytochrome c-1抗体、抗macrophage migration inhibitory factor抗体、抗annexin 2抗体、抗cytochrome c reductase core 1抗体、抗heme oxygenase 1抗体、及び、それらの二つ以上の任意の組み合わせから成る群から選択される、特発性肺線維症の血清中に存在する自己抗体から成る特発性肺線維症の検出マーカー。 20

【請求項5】

annexin 1、phosphoglycerate kinase 1、annexin 4、bax inhibitor 1、cytochrome c oxidase subunit Va、aldehyde dehydrogenase 1、cytochrome c-1、macrophage migration inhibitory factor、annexin 2、cytochrome c reductase core 1、heme oxygenase 1、及び、それらの二つ以上の任意の組み合わせから成る群から選択される抗原蛋白を構成要素として含む特発性肺線維症の検出キット。 30

【請求項6】

抗原蛋白を基材に吸着させて成る、請求項5記載の特発性肺線維症の検出キット。

【請求項7】

前記抗原蛋白に標識が付されていることを特徴とする、請求項5又は6記載の特発性肺線維症の検出キット。

【請求項8】

標識がHis-tag標識である、請求項7記載の検出キット。 40

【請求項9】

検体中における請求項1又は2記載の自己抗体の濃度を測定することを特徴とする、特発性肺線維症の検出方法。

【請求項10】

請求項6記載の検出キットを用いて、固相酵素免疫測定法（ELISA）により測定することを特徴とする、請求項9記載の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は特発性肺線維症の検出マーカー、検出キット及び検出方法等に関する。 50

【背景技術】

【0002】

特発性肺線維症は原因不明の疾患であるが、肺胞上皮に apoptosis が亢進し、肺胞上皮基底膜の破壊に伴って間質の線維芽細胞の異常増殖を伴う疾患である。

【0003】

現在の特発性肺線維症の診断には開胸／胸腔鏡下肺生検が重要な位置を占めているが、病状が進行した症例では検査による侵襲が大きな問題である。その問題を解決するために気管支肺胞洗浄検査 (Bronchoalveolar lavage : 以下「BAL」) が行われている。特発性肺線維症においては、BAL で採取した BAL 液中に好中球の軽度の増加が確認されたことの報告があり、肺胞腔や間質に浸潤した好中球が病態に重要な役割を果たしているのではないかと示唆がある (例えば、下記非特許文献 1 参照)。

10

【0004】

ところで、SEREX (Serological analysis of recombinant cDNA expression libraries) 法は、約 1 万個の cDNA の中で数個程度しか存在しない自己抗原発現 cDNA に対しても検出が可能であり、微量の自己抗原の検出に適した方法である。この SEREX 法により肺癌をはじめとする様々な腫瘍関連抗原が同定されている。同定された抗原には、転写因子、細胞の分化抗原、細胞構成蛋白などに加え、新規遺伝子も含まれている。即ち、SEREX 法は自己抗原検索においては強力で有用な手法であり、これを用いた報告として、全身性エリテマトーデス (SLE) や過敏性肺臓炎関連自己抗体の検索に関する報告がある (例えば、下記非特許文献 2 参照)。

20

【0005】

また、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法による BAL 液中の T 細胞 V β 鎖遺伝子再構成の検索では、抗原特異的な T 細胞増生が BAL 液中に認められ、肺胞局所において疾患特異的な抗原の存在が示唆されている (例えば、下記非特許文献 3 参照)。

【0006】

【非特許文献 1】 Wellset al., "Bronchoalveolar lavage cellularity: lone cryptogenic fibrosing alveolitis compared with the fibrosing alveolitis of systemic sclerosis", Am J Respir Crit Care Med, 1998, Vol.157, p.1474-1482

30

【非特許文献 2】 Matsunaga et al., "A novel protein antigen of Trichosporon asahii, in summer-type hypersensitivity pneumonitis.", Am J Respir Crit Care Med 2002, Vol.167, p.991-998

【非特許文献 3】 Shimizudani et al., "Conserved CDR3 region of T cell receptor BV gene in lymphocytes from bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis", Clin Exp Immunol 2002, Vol.129, p.140-149

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

確かに、上記非特許文献 1 において好中球が何らかの病態に関与していることを示唆されているが、好中球が増加する機序や肺が線維化する機序は大部分が不明であり、しかも、好中球の増加のみによっては特発性肺線維症の診断を行うことは極めて困難である。また特に、BAL によって確かに侵襲の問題を和らげることはできるが、より患者に負担のかからない非侵襲な診断も望まれる。

40

【0008】

また、SEREX 法については、殆どが腫瘍関連抗原の同定のために用いられているものであって、腫瘍関連抗原以外のものに適用した例は極めて稀である。これを用いた過敏性肺臓炎関連の報告としては上記非特許文献 2 の例があるが、これ一例に過ぎないだけでなくこの例も夏型過敏性肺臓炎に対する真菌抗原の報告に過ぎず、特発性肺線維症につい

50

での報告ではない。

【0009】

更に、上記非特許文献3に記載の報告では、抗原特異的なT細胞増生が認められているが、PCR法のみでは症例間でHLA抗原が異なること、認識している抗原は抗原提示細胞によって断片化されていること、から認識抗原の決定は極めて困難である。

【0010】

そこで、本発明は、上記課題を鑑み、より容易に特発性肺線維症を検出するための検出マーカー及び検出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】

【0011】

10

発明者らは、上記課題につき検討したところ、特発性肺線維症において肺胞局所に疾患特異的な抗原が存在し、肺において疾患特異的な抗原/抗体反応が生じているのであれば、B細胞による抗体産生にはCD4陽性T細胞の援助が必要不可欠であり、BAL液中のT細胞は抗原特異的なV α /V β 鎖を有したT細胞が特異的に増生していると考えられ、特発性肺線維症においても、特定の抗原特異的なV α /V β 鎖を有したT細胞がoligoclonalに増生しているのではないかと検討を行った。この検討の結果、特定の抗原特異的なV α /V β 鎖を有したCD4陽性T細胞がoligoclonalに増生し疾患特異的な抗原抗体反応が強く生じた特発性肺線維症と、特定の抗原特異的なV α /V β 鎖の増生がみられず疾患特異的な抗原抗体反応が生じていない特発性肺線維症があることを見出した(図1参照)。

20

【0012】

そこで、更に本発明者らが上記について検討を行ったところ、上記の例のうち図1の(B)はoligoclonalにSEREX法による自己抗体解析しやすい症例であり、図1(A)はそうでない症例であると考え、SEREX法による自己抗体の解析をしやすい症例を用いて、特発性肺線維症の主な病変部位である肺胞上皮が発現する蛋白を非常に鋭敏な方法(SEREX法)で解析を行うことで、特発性肺線維症の患者血清中に存在する自己抗体の検出が可能であることを見だし、本発明を完成した。

【0013】

即ち、本発明は以下の態様に係るものである。

[態様1] 特発性肺線維症の血清中に存在する自己抗体。

30

[態様2] 抗annexin 1抗体、抗phosphoglycerate kinase 1抗体、抗annexin 4抗体、抗bax inhibitor 1抗体、抗cytochrome c oxidase subunit Va抗体、抗aldehyde dehydrogenase 1抗体、抗cytochrome c-1抗体、抗macrophage migration inhibitory factor抗体、抗annexin 2抗体、抗cytochrome c reductase core 1抗体、及び、抗heme oxygenase 1抗体から成る群から選択される、特発性肺線維症の血清中に存在する自己抗体。

[態様3] 特発性肺線維症の血清中に存在する自己抗体から成る、特発性肺線維症の検出マーカー。

40

[態様4] 抗annexin 1抗体、抗phosphoglycerate kinase 1抗体、抗annexin 4抗体、抗bax inhibitor 1抗体、抗cytochrome c oxidase subunit Va抗体、抗aldehyde dehydrogenase 1抗体、抗cytochrome c-1抗体、抗macrophage migration inhibitory factor抗体、抗annexin 2抗体、抗cytochrome c reductase core 1抗体、抗heme oxygenase 1抗体、及び、それらの二つ以上の任意の組み合わせから成る群から選択される、特発性肺線維症の血清中に存在する自己抗体から成る特発性肺線維症の検出マーカー。

[態様5] annexin 1、phosphoglycerate kinase 1

50

、annexin 4、bax inhibitor 1、cytochrome c oxidase subunit Va、aldehyde dehydrogenase 1、cytochrome c-1、macrophage migration inhibitory factor、annexin 2、cytochrome c reductase core 1、heme oxygenase 1、及び、それらの二つ以上の任意の組み合わせから成る群から選択される抗原蛋白を構成要素として含む特発性肺線維症の検出キット。

【態様6】抗原蛋白を基材に吸着させて成る、態様5記載の特発性肺線維症の検出キット。

【態様7】前記抗原蛋白に標識が付されていることを特徴とする、態様5又は6記載の特発性肺線維症の検出キット。

【態様8】標識がHis-tag標識である、態様7記載の検出キット。

【態様9】検体中における態様1又は2記載の自己抗体の濃度を測定することを特徴とする、特発性肺線維症の検出方法。

【態様10】態様6記載の検出キットを用いて、固相酵素免疫測定法(ELISA)により測定することを特徴とする、態様9記載の検出方法。

【発明の効果】

【0014】

本発明によって、特発性肺線維症に見られる自己抗体、該自己抗体から成る特発性肺線維症の検出マーカー、特発性肺線維症の検出方法及び検出キットが提供される。該自己抗体、特に、以下に示す11種類の具体的な自己抗体は比較的高頻度で特発性肺線維症症例の血清中に存在し、これらを組み合わせることによって、特発性肺線維症の正確な検出、特発性肺線維症の急性増悪の予測等の病勢フォローに、及び血清学的診断が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】SEREX法による自己抗体解析に適した症例と適さない症例の典型例を示す電気泳動の写真。

【図2】T細胞V β 鎖サブファミリーに対するPCR法に用いたプライマーを示す図。

【図3】SEREX法の概略図を示す図。

【図4】特発性肺線維症におけるBAL液中のCD4陽性T細胞V β 鎖レパートリーの解析結果を示す図。

【図5】SEREX法によって検出した11種類の特発性肺線維症特異的自己抗体の認識する自己抗原蛋白とその発現頻度を示す図。

【図6】BAL液とBALから3ヶ月後に得られた胸腔鏡下肺生検組織において一部に共通の抗原を認識するT細胞V β 鎖の増生を示す電気泳動の写真。

【図7】特発性肺線維症例(Case 2)のBAL液および胸腔鏡下肺生検組織中のT細胞の抗原認識部分であるV β 鎖と特発性肺線維症特異的自己抗原の一部に強い相同性が認められを示す図。

【図8】RT-PCR法によって11種類の自己抗原蛋白の発現が、II型肺胞上皮癌培養株(A549)および単球系培養株(THP-1)の双方に確認されたことを示す電気泳動の写真。AG1はannexin 1、AG2はphosphoglycerate kinase 1、AG3はannexin 4、AG4はbax inhibitor 1、AG5はcytochrome c oxidase subunit Va、AG6はaldehyde dehydrogenase 1、AG7はcytochrome c-1、AG8はmacrophage migration inhibitory factor、AG9はannexin 2、AG10はcytochrome c reductase core 1、AG11はheme oxygenase 1の自己抗原蛋白を示す。

【図9-1】11種類の特発性肺線維症特異的自己抗体認識抗原遺伝子を増幅するために用いたPCRプライマーを示す図。

【図9-2】11種類の特発性肺線維症特異的自己抗体認識抗原遺伝子を増幅するために

用いたPCRプライマーを示す図。

【図10】さまざまな肺疾患における血清中およびBAL液中の特発性肺線維症特異的自己抗体発現頻度を示す図。nは解析した症例数を示す。AG1からAG11は図8で示した自己抗原蛋白を示す。

【図11】特発性肺線維症急性増悪症例(Acute exacerbation of IPF)および安定症例(Stable IPF)における血清中およびBAL液中の特発性肺線維症特異的自己抗体発現頻度を示す図。AG1からAG11は図8で示した自己抗原蛋白を示す。右上に*で示した自己抗体は、安定した肺線維症に比較して特発性肺線維症急性増悪例で頻度および発現強度(405nmの吸光度)が有意に増加している抗体を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

10

【0016】

以下、本発明の実施形態について説明する。

「自己抗体」とは、自己の構成成分(自己抗原)に反応する抗体を意味する。本発明の特発性肺線維症の血清中に存在する自己抗体、特に、抗annexin 1抗体、抗phosphoglycerate kinase 1抗体、抗annexin 4抗体、抗bax inhibitor 1抗体、抗cytochrome c oxidase subunit Va抗体、抗aldehyde dehydrogenase 1抗体、抗cytochrome c-1抗体、抗macrophage migration inhibitory factor抗体、抗annexin 2抗体、抗cytochrome c reductase core 1抗体、及び、抗heme oxygenase 1抗体は、これまでに報告されていない新規な物質である。

20

【0017】

尚、これらの自己抗体は、例えば、特発性肺線維症患者の血清又はBAL液等を出発原料として、当業者に耕地の適当な方法で調製することが可能である。例えば、以下に記載の自己抗体認識抗原を結合させたアフィニティクロマトグラフィを使用することによって容易に精製することが可能である。

【0018】

既に記載したように、本発明者は、これらの自己抗体が比較的高頻度で特発性肺線維症症例の血清又はBAL液中に有意に存在することを新たに見出した。従って、これらの濃度を測定することによって、特発性肺線維症の正確な検出、又は、血清学的診断が可能となる。即ち、本発明の自己抗体は、特発性肺線維症の検出マーカーとしての用途を有するものである。特に、上記の11種類の自己抗体は既存には報告されておらず、特発性肺線維症以外の症例ではほとんどの自己抗体は検出されず、診断検査としての利用価値が高い。

30

【0019】

従って、本発明の特発性肺線維症の検出キットは、上記の自己抗体が認識する抗原蛋白(自己抗体認識抗原)、例えば、annexin 1、phosphoglycerate kinase 1、annexin 4、bax inhibitor 1、cytochrome c oxidase subunit Va、aldehyde dehydrogenase 1、cytochrome c-1、macrophage migration inhibitory factor、annexin 2、cytochrome c reductase core 1、heme oxygenase 1、及び、それらの二つ以上の任意の組み合わせから成る群から選択される抗原蛋白を構成要素として含むことを特徴とするものである。このような検出キットを用いて、特発性肺線維症の疑いのある患者から採取した、血清又はBAL液等の適当な検体中に抗体が存在しているか否か、又はそれらの濃度を測定し、それに応じて特発性肺線維症の検出、又はその診断をすることができる。

40

【0020】

上記の抗原蛋白に代表される自己抗体認識抗原自体は物質としては公知であり、それらの遺伝子には本明細書中の図5に示されるような登録番号(受託番号)が付与されて夫々

50

の寄託機関に保存されており、一般に入手可能である。従って、本発明の検出キットに含まれる自己抗体認識抗原は、当業者に公知の任意の方法で調製することができる。例えば、本明細書の実施例に記載されているように、これら自己抗体認識抗原をコードする遺伝子が発現するように形質転換した、例えば、大腸菌等の各種細胞株を培養し、該形質転換細胞に自己抗体認識抗原を産生させ、それから適宜精製することによって得ることが出来る。

【0021】

又、自己抗体認識抗原の調製に際して、例えば、産生された自己抗体認識抗原の溶解度の向上、精製効率の向上（アフィニティ精製）等の目的で、自己抗体認識抗原を当業者に公知の各種の標識と融合した融合蛋白質として調製し、そのまま使用することも出来る。10
このような標識物質の例として、大腸菌を宿主とした系では、GST（グルタチオン-S-トランスフェラーゼ）、ヒスチジン（His6）標識、MBP（マルトース結合蛋白質）標識、Trx（チオレドキシニン）標識、FLAG（DYKDDDDK）標識、及びAvitag標識等を挙げる事が出来る。

【0022】

更に、上記の自己抗体認識抗原は、本発明の自己抗体と特異的な抗原抗体反応を示すことができる限り、元のアミノ酸配列の一部、例えば、1個又は数個が置換、欠失、挿入などにより変異したアミノ酸配列を有する蛋白質であっても良い。尚、このよう蛋白質をコードするDNA配列は、以下に述べるような、当業者に公知の部位特異的突然変異誘発等を利用して容易に作成することが出来る。20

【0023】

又、上記の自己抗体認識抗原をコードする遺伝子は、例えば、II型肺胞上皮癌培養株（A549）及び単球系培養株（THP-1）等の市販されている適当な細胞株を用いるRT-PCR、適当なcDNAライブラリーを鋳型として使用する各種のPCR及びICAN法等の当業者に公知の任意のDNA増幅技術を用いて容易に調製することが可能である。尚、例えば、本明細書の図9に示されるプライマーに代表される、このようなDNA増幅技術に使用するプライマーは、自己抗体認識抗原の公知の塩基配列情報に基づいて当業者であれば適宜設計・選択することが出来る。

【0024】

又、上記遺伝子は、公知の方法（例えば、Carruthers (1982) Cold Spring Harbor Symp. 30
Quant. Biol. 47:411-418; Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661; Belousov (1997)
) Nucleic Acid Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859; 米
国特許第4,458,066号）に記載されているような周知の化学合成技術により、in vitroにおいて合成することも出来る。

【0025】

或いは、上記遺伝子は当業者に周知の方法により上記cDNAライブラリーをスクリーニングすることによって単離することができる。更に、該遺伝子のcDNAに当業者に公知の部位特異的突然変異誘発に基づき、市販のミュートーションシステム等を用いて自己抗体認識抗原をコードする遺伝子に塩基変異を導入して調製することも可能である。40

【0026】

当業者に周知の任意の方法に従い、上記の自己抗体認識抗原をコードする遺伝子及び必要に応じて上記の標識（蛋白質又はペプチド）をコードするDNAを、プラスミドベクター、ファージベクター、及び各種の混成ベクター等の適当な組換え用DNAに挿入し、こうして得られた発現ベクターを用いて各種の細胞を形質転換することができる。この組換え用DNAは、当業者に公知の通常の組換えDNA手法によって取り扱うことが可能な任意のベクターである。これらのベクターは、その導入すべき宿主細胞に依存して適当に選択することが出来る。該ベクターは、宿主細胞の中に導入され、自己抗体認識抗原を一過性で発現したり、或いは、宿主細胞のゲノムの中にその全体あるいはその一部がゲノム中50

の1箇所以上に組込まれることができる。このようなベクターとして、当業者に公知の各種の市販のベクターを使用することができる。

【0027】

上記の発現ベクターには、典型的には、当業者に公知の、構成的発現プロモーター又は各種の誘導型発現プロモーター等の各種プロモーター、エンハンサー及びサイレンサー等の各種調節配列、リボソーム結合部位、シグナル配列、および翻訳開始配列等の各種要素ならびにその他の外来性あるいは内在性タンパク質をコードする遺伝子、各種薬剤耐性遺伝子、栄養要求性を相補する遺伝子等を任意に含むことができる。

【0028】

上記発現ベクターによって形質転換される宿主細胞として、原核微生物、真核微生物、植物細胞、昆虫細胞、鳥類細胞、哺乳類細胞等を用いることができる。たとえば、原核微生物の例としてはエシェリヒア属、バチルス属、又は、ストレプトマイセス・グリセウス若しくはストレプトコッカス・セリカラー等のストレプトマイセス属を宿主とすることができる。真核生物としては、サッカロミセス属及びピヒア属等の酵母、アスペルギルス・オリゼ及びアスペルギルス・ソーエ等のアスペルギルス属、ペニシリウム属、リゾプス属、メタリチウム属、モナスカス属、アクレモニウム属、及びムコール属等の糸状菌、並びに、トリコデルマ属等の担子菌などから選択することができる。昆虫細胞としてはキイロシヨウジョウバエ、カイコ等の細胞を用いることができる。

【0029】

これらの発現ベクター（組換え用DNA）は、例えば、塩化カルシウム法、プロトプラスト-PEG法、エレクトロポレーション法、Tiプラスミド法、パーティクルガン法、バキュロウイルス法などの当業者に公知の任意の方法によって宿主細胞へと導入でき、形質転換体を作成することができる。更に、複数種の組換えDNAを用いるコトランスフェクション法によっても可能である。

【0030】

上記発現ベクターの代わりに、PCR増幅等により取得される自己抗体認識抗原をコードする遺伝子を含む適当なDNA断片自体を用いて形質転換体を得ることも可能である。そのような場合には、かかるDNA断片に加えてさらに適当な緩衝液及びその他の助剤を任意に含む溶液等の組成物として形質転換に使用することができる。

【0031】

自己抗体認識抗原を発現する形質転換体を該抗原蛋白の生産に好ましい条件で培養して該抗原蛋白を発現させ、その宿主細胞および／または培地から回収することにより製造することができる。宿主細胞の培養に用いる培地は、当業者に公知である任意の培地の中から、使用する発現ベクターの構成（プロモーターの種類等）及び宿主の種類等に応じて適当なものを適宜選択することができる。

【0032】

宿主細胞により産生された自己抗体認識抗原は、当業者に公知の任意の手段の適当な組み合わせ、例えば、遠心または濾過による培地と細胞の分離、および硫酸アンモニウムの様な塩による培地のタンパク質成分の沈殿、及びこれに続く疎水クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、各種の標識との親和性を利用するアフィニティークロマトグラフィー、又はその他のクロマトグラフィーの使用により培地から回収することができる。或いは、自己抗体認識抗原は化学合成法により製造することも可能である。

【0033】

本発明の検出キットには、構成要素として含まれる上記の自己抗体認識抗原に加えて、自己抗体の測定方法及び原理等に応じて、当業者に公知の他の要素又は成分、例えば、標識抗体（二次抗体）、各種試薬、基質、酵素、緩衝液、反応プレート（容器）等が適宜含まれていても良い。

【0034】

既に記載したように、本発明においては、血清又はBAL液等の適当な検体中における本発明の自己抗体の濃度を測定することにより、特発性肺線維症を検出することができる。

专利名称(译)	特发性肺纤维化的检测标志物，检测试剂盒和检测方法		
公开(公告)号	JPWO2006098144A1	公开(公告)日	2008-08-21
申请号	JP2007508057	申请日	2006-02-28
申请(专利权)人(译)	国立大学法人千叶		
[标]发明人	黒須克志 滝口裕一 岡田理 栗山喬之		
发明人	黒須 克志 滝口 裕一 岡田 理 栗山 喬之		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/564 G01N2800/12		
FI分类号	C07K16/18.ZNA G01N33/543.501.A G01N33/53.N		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA42 4H045/DA75 4H045/EA50		
优先权	2005078252 2005-03-17 JP 2005271021 2005-09-16 JP		
其他公开文献	JP4521575B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的目的是提供用于容易地检测特发性肺纤维化的检测标记，检测试剂盒，检测方法等。本发明的抗抗连接蛋白1抗体，抗磷酸甘油酸激酶1抗体，抗连接蛋白4抗体，抗bax抑制剂1抗体，抗细胞色素c氧化酶亚基Va抗体，抗醛脱氢酶1抗体，抗细胞色素c-1抗体，抗巨噬细胞迁移 选自抑制因子抗体，抗annexin 2抗体，抗细胞色素c还原酶核心1抗体和抗血红素加氧酶1抗体，存在于特发性肺纤维化血清中的自身抗体，选自所述自身抗体 本发明涉及特发性肺纤维化的检测标记，检测试剂盒，检测方法等。