

(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2016-206072

(P2016-206072A)

(43) 公開日 平成28年12月8日 (2016. 12. 8)

(51) Int.Cl.

GO 1 N 33/53 (2006.01)

F I

GO 1 N 33/53

N

GO 1 N 33/53

B

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2015-89735 (P2015-89735)

(22) 出願日 平成27年4月24日 (2015. 4. 24)

特許法第30条第2項適用申請有り 公開日：平成26
年10月26日 Endocrine Journal
2015, 62 (2), 153-160

(71) 出願人 598135980

株式会社コスミックコーポレーション
東京都文京区小石川2-7-3 富坂ビル

(74) 代理人 100100549

弁理士 川口 嘉之

(74) 代理人 100126505

弁理士 佐貫 伸一

(74) 代理人 100131392

弁理士 丹羽 武司

(72) 発明者 梶村 益久

愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立
大学法人名古屋大学内

(72) 発明者 清田 篤志

愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立
大学法人名古屋大学内

最終頁に続く

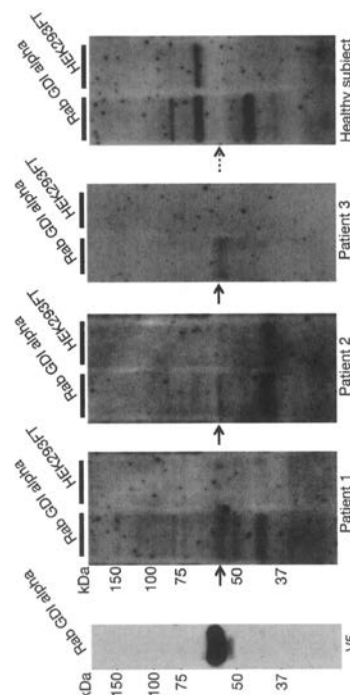
(54) 【発明の名称】 副腎皮質刺激ホルモン単独欠損症又はリンパ球性下垂体前葉炎の検査方法及び検査試薬

(57) 【要約】

【課題】 副腎皮質刺激ホルモン単独欠損症又はリンパ球性下垂体前葉炎の検査方法及び検査試薬を提供する。

【解決手段】 検体中の、Rab GDI α と免疫学的に反応する抗体を検出することにより副腎皮質刺激ホルモン単独欠損症又はリンパ球性下垂体前葉炎を検査する。この抗体の検出は、例えば、この抗体と免疫学的に反応する抗原を用いる免疫学的方法により行われる。

【選択図】 図3



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

検体中の、Rab GDI α と免疫学的に反応する抗体を検出することにより副腎皮質刺激ホルモン単独欠損症又はリンパ球性下垂体前葉炎を検査することを特徴とする副腎皮質刺激ホルモン単独欠損症又はリンパ球性下垂体前葉炎の検査方法。

【請求項 2】

前記抗体が、ヒト Rab GDI α 又は抗原性を有するその部分断片と免疫学的に反応する請求項 1 記載の検査方法。

【請求項 3】

前記抗体と免疫学的に反応する抗原を用いることにより前記抗体を検出する請求項 1 又は 2 に記載の検査方法。

10

【請求項 4】

請求項 3 記載の検査方法に用いるための、前記抗体と免疫学的に反応する抗原を含む、副腎皮質刺激ホルモン単独欠損症又はリンパ球性下垂体前葉炎用の検査試薬。

【請求項 5】

前記抗原が、ヒト Rab GDI α 又は抗原性を有するその部分断片である請求項 4 記載の検査試薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本発明は、副腎皮質刺激ホルモン単独欠損症又はリンパ球性下垂体前葉炎の検査方法及び検査試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

副腎皮質刺激ホルモン単独欠損症 (IAD) は、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の産生が不十分であることを特徴とする。副腎皮質刺激ホルモン放出因子に対する ACTH 応答がないことによって示されるように、IAD は下垂体に原因があると思われる。その発症機序は未だ解明されていないが、部分的には IAD は自己免疫機序によって引き起こされ则认为られている。IAD は他の自己免疫障害、例えば、慢性甲状腺炎を伴うことが多い [非特許文献 1]。くわえて、IAD は特発性副甲状腺機能低下症および 1 型糖尿病も伴うことがあり、すべてではないが IAD の幾つかの型に多腺性自己免疫不全プロセスが、関与することが示唆されている [非特許文献 2 ~ 4]。これらの知見は、IAD の発症機序に自己免疫プロセスが関与することを強く示唆する。IAD において抗下垂体抗体が存在することを示唆する証拠が幾つかある [非特許文献 5 ~ 9]。さらに、IAD 患者の血清が下垂体の ACTH 分泌細胞を選択的に標的とすることが報告されている [非特許文献 8、10、11]。Sauter らは、ラット下垂体組織で間接免疫蛍光法を用いて IAD 患者の血清を抗下垂体抗体の存在に関して検討した [非特許文献 8]。陽性免疫染色が前葉および中葉で観察され、免疫陽性の細胞が副腎皮質刺激ホルモン産生細胞の超微細構造上の特徴を有することが免疫電子顕微鏡法によって明らかにされた [非特許文献 8]。De Bellis らによる研究では、若年のヒトの脳下垂体試料を基質として使用して、IAD における抗下垂体抗体が下垂体の ACTH 分泌細胞を選択的に標的とし、抗体が標的とする副腎皮質刺激ホルモン産生細胞は IAD 患者の下垂体および ACTH 分泌障害に関わる自己免疫プロセスの信頼できるマーカーと考えられうることを報告されている [非特許文献 10、11]。よって、自己抗原の同定は IAD の病理学に重要な見識をもたらすと思われ、抗下垂体抗体の標的の同定は IAD のより信頼できる診断マーカーの開発につながるかもしれない。しかし、IAD 患者に存在する自己抗原はわかっていない。

30

40

【0003】

また、リンパ球性下垂体前葉炎が IAD の原因とも考えられているが、リンパ球性下垂体前葉炎の有用な診断マーカーは未だない。

【先行技術文献】

50

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Murakami T, Wada S, Katayama Y, Nemoto Y, Kugai N, et al. (1993) Thyroid dysfunction in isolated adrenocorticotrophic hormone (ACTH) deficiency: case report and literature review. *Endocr J* 40: 473-478.

【非特許文献2】Kojima I, Nejima I, Ogata E (1982) Isolated adrenocorticotropin deficiency associated with polyglandular failure. *J Clin Endocrinol Metab* 54: 182-186.

【非特許文献3】Tillil H, Kobberling J (1988) Isolated ACTH deficiency and type 1 diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest* 11: 815.

【非特許文献4】Nagai Y, Ieki Y, Ohsawa K, Kobayashi K (1997) Simultaneously found transient hypothyroidism due to Hashimoto's thyroiditis, autoimmune hepatitis and isolated ACTH deficiency after cessation of glucocorticoid administration. *Endocr J* 44: 453-458.

【非特許文献5】Kikuchi T, Yabe S, Kanda T, Kobayashi I (2000) Antipituitary antibodies as pathogenetic factors in patients with pituitary disorders. *Endocr J* 47: 407-416.

【非特許文献6】Yamamoto M, Murakami Y, Nishiki M, Kato Y (2002) A case of autoimmune hypophysitis associated with Graves' disease. *Endocr J* 49: 583-587.

【非特許文献7】Yamamoto T, Fukuyama J, Hasegawa K, Sugiura M (1992) Isolated corticotropin deficiency in adults. Report of 10 cases and review of literature. *Arch Intern Med* 152: 1705-1712.

【非特許文献8】Sauter NP, Toni R, McLaughlin CD, Dyess EM, Kritzman J, et al. (1990) Isolated adrenocorticotropin deficiency associated with an autoantibody to a corticotroph antigen that is not adrenocorticotropin or other proopiomelanocortin-derived peptides. *J Clin Endocrinol Metab* 70: 1391-1397.

【非特許文献9】Bensing S, Kasperlik-Zaluska AA, Czarnocka B, Crock PA, Hulting A (2005) Autoantibodies against pituitary proteins in patients with adrenocorticotropin-deficiency. *Eur J Clin Invest* 35: 126-132.

【非特許文献10】De Bellis A, Pane E, Bellastella G, Sinisi AA, Colella C, et al. (2011) Detection of antipituitary and antihypothalamus antibodies to investigate the role of pituitary or hypothalamic autoimmunity in patients with selective idiopathic hypopituitarism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 75: 361-366.

【非特許文献11】De Bellis A, Sinisi AA, Pane E, Dello Iacovo A, Bellastella G, et al. (2012) Involvement of hypothalamus autoimmunity in patients with autoimmune hypopituitarism: role of antibodies to hypothalamic cells. *J Clin Endocrinol Metab* 97: 3684-3690.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、IAD又はリンパ球性下垂体前葉炎の検査方法及び検査試薬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】

【0006】

本発明者らは、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法（LC-MS/MS）を使用してIAD患者における候補自己抗原を同定し、その結果を候補自己抗原の組換えタンパク質および免疫ブロット法を用いて確認した。さらに、IADにおける自己抗体の特異性を評価した。本発明者は、これらの知見に基づき、本発明を完成した。

【0007】

本発明は、検体中の、Rab GDI α と免疫学的に反応する抗体を検出することによりIADを

検査することを特徴とするIAD又はリンパ球性下垂体前葉炎の検査方法を提供する。

Rab GDI α と免疫学的に反応する抗体は、好ましくは、ヒトRab GDI α 又は抗原性を有するその部分断片と免疫学的に反応するものである。Rab GDI α と免疫学的に反応する抗体は、好ましくは、その抗体と免疫学的に反応する抗原を用いることにより検出される。

【0008】

また、本発明は、本発明の検査方法に用いるための、Rab GDI α と免疫学的に反応する抗体と免疫学的に反応する抗原を含む、IAD又はリンパ球性下垂体前葉炎用の検査試薬を提供する。

抗原は、ヒトRab GDI α 又は抗原性を有するその部分断片が好ましい。

【発明の効果】

10

【0009】

IAD又はリンパ球性下垂体前葉炎を、Rab GDI α に対する自己抗体の検出により検査できる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】IAD患者又は健常者の血清による下垂体前葉タンパク質の認識を示す免疫ブロット法の結果を示す（写真）。S p、可溶性の上澄み画分；P、不溶性のペレット画分。

【図2】組み換え完全長ヒトRab GDI α およびセロトランスフェリンタンパク質の発現を示す免疫ブロット法の結果を示す（写真）。

【図3】IAD患者血清における抗Rab GDI α 抗体の、免疫ブロット法による検出結果を示す（写真）。血清については、HEK293FT細胞に発現させた組み換え完全長ヒトRab GDI α (Rab GDI alpha、左レーン)に加えて、および空ベクターを用いてトランスフェクションしたHEK293FT細胞の全細胞溶解物(HEK293FT、右レーン)の結果も示す。

【図4】下垂体前葉におけるRab GDI α の発現の検出結果を示す（写真）。Aは免疫ブロット法、B～Iは免疫組織化学の結果である。スケールバーは100 μ mを示す(B～E)。スケールバーは50 μ mを示す(F～I)。AP、下垂体前葉；PP、下垂体後葉；IL、中葉。

【発明を実施するための形態】

【0011】

以下、本発明の実施の形態を説明する。先ず、本発明検査方法について説明する。

30

本発明検査方法は、検体中の、Rab GDI α と免疫学的に反応する抗体(以下、「抗Rab GDI α 抗体」とも表記する)を検出することによりIAD又はリンパ球性下垂体前葉炎を検査することを特徴とする。

【0012】

検出の方法としては、抗Rab GDI α 抗体を検出できる限り限定されない。通常には、抗Rab GDI α 抗体と免疫学的に反応する抗原または抗体を用いる免疫学的方法が挙げられる。抗体よりも抗原の方が、調製が容易であることから、抗Rab GDI α 抗体と免疫学的に反応する抗原を用いる免疫学的方法が好ましい。免疫学的方法としては、一般に広く使用されているELISA法が挙げられる。

【0013】

40

抗原は、検体に存在する抗Rab GDI α 抗体と免疫学的に反応するものであればよく、ヒトまたは動物から精製したRab GDI α を使用できる。リコンビナント技術によりRab GDI α を調製してもよい。例えば、ヒトRab GDI α のアミノ酸配列(GenBank: BAA08078.1、配列番号1)、及びこれをコードする塩基配列(GenBank: NM_001493.2)が公知である。また、検体に存在するRab GDI α 抗体と免疫学的に反応するものである限り、Rab GDI α の部分断片を使用することもできる。

【0014】

抗Rab GDI α 抗体と免疫学的に反応するRab GDI α の部分断片の長さは、免疫学的な反応に十分なもの、すなわち抗原性を有するものであればよい。免疫学的に反応する部分断片は、抗原としてRab GDI α の断片に対応するペプチドを合成し、そのペプチドを用いたELI

50

SAを行って、自己抗体に対する抗原性を調べることにより特定できる。Rab GDI α は種間の相関性が高いため、他の動物由来の場合でも相当する部分断片を使用できる。

【0015】

測定対象となる検体は、通常には、血清や血漿であるが、反応工程の反応を妨げる物質が含まれていない限り、特に限定はされない。

【0016】

検出の条件は、従来の免疫学的方法と同様の条件で行うことができる。すなわち、各反応物質の添加順序や量、反応温度、反応時間等の条件は、従来の免疫学的方法と同様でよく、例えば、ビーズ、チューブまたはプレート等などの固相に固定した抗原と、血清を反応させ、血清中に含まれる未結合のIgGを除去した後、抗原に結合した抗体に、酵素標識した抗IgG抗体を結合させ、酵素の反応により検出する方法が挙げられる。

10

【0017】

抗Rab GDI α 抗体の量は、通常には、標識の測定値として算出される。あるいは、既知濃度の抗Rab GDI α 抗体を含む標準試料により検量線を作成して検量線により濃度を求めてもよい。

【0018】

陽性の判定は、健常者の値と比較することによって行うことができる。同時に測定した、あるいは、予め測定された健常者の値から有意に値が高い場合（例えば、2.5 SD以上高い、統計学的テストにより有意に高い）に、陽性と判定できる。陽性には、IAD又はリンパ球性下垂体前葉炎の疑いがあることも含まれる。

20

【0019】

本発明検査方法により測定される抗Rab GDI α 抗体の上昇は、IAD又はリンパ球性下垂体前葉炎と関連しているため、本発明検査方法によれば、IAD又はリンパ球性下垂体前葉炎が疑われる場合において、IAD又はリンパ球性下垂体前葉炎の鑑別に有用な指標を提供できる。また、本発明検査方法は、IAD又はリンパ球性下垂体前葉炎の鑑別のためにさらに他の検査を行うべき対象をスクリーニングする方法として有用である。

【0020】

次に、本発明検査試薬について説明する。本発明検査試薬は、本発明検査方法を実施するためのものであって、抗Rab GDI α 抗体と免疫学的に反応する抗原を含む。

【0021】

抗Rab GDI α 抗体と免疫学的に反応する抗原については、本発明検査方法に関し説明した通りである。

30

【0022】

さらに、本発明検査試薬は、免疫学的測定に必要な試薬類、例えば、陽性コントロール、緩衝液等を必要に応じ含んでいてもよく、キットとして提供することもできる。

【0023】

本発明検査試薬の各構成要素は、溶液状態であってもよいし、凍結乾燥品などの乾燥状態であってもよい。乾燥状態である場合には、使用前に溶液状態にするための緩衝液等をさらに本発明検査試薬に含めてもよい。各構成要素の量や形態は、測定方法の条件に合わせて調整される。

40

【0024】

例えば、ELISAのキットの場合、抗原を固定した固相プレート、洗浄液、検体希釈液、酵素標識抗Rab GDI α 抗体溶液、基質液、及び、反応停止液を含むキットとすることができる。また、イムノクロマト法のキットでは、反応デバイス及び展開液を含むキットとすることができる。

【実施例】

【0025】

以下、実施例により本発明を説明する。なお、実施例中、「%」は、特記しない限り重量%を示す。

【0026】

50

<実施例 1> IAD患者における抗Rab GDI α 抗体の検出

(1) IAD患者

IAD患者の全員において、8:00~10:00に測定した、ACTHおよびコルチゾールの朝のベース血清レベルは低く、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) に対するACTHの応答はなかった。CRHテストでは、ヒトCRHの単回投与 (100 μ g) を静注した。注射前ならびに注射の30分後、60分後、90分後、および120分後に血液試料を採取した。また、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、成長ホルモン (GH)、黄体形成ホルモン (LH)、卵巣刺激ホルモン (FSH) を含む他の下垂体ホルモンの血清レベル、ならびにそれぞれの標的器官のホルモン (遊離T4、遊離T3、インスリン様成長因子I、テストステロン、およびエストラジオール) も、正常ベースレベルの範囲内であった。くわえて、TSH、GH、LH、およびFSHは、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン2、および黄体形成ホルモン放出ホルモン刺激を含む刺激テストに適切に応えた。血清プロラクチンのベースレベルは正常であった。尿崩症はいずれの患者でもみられなかった。異常所見は磁気共鳴映像法によって観察されなかった。いずれの患者でも下垂体手術も放射線療法も行われなかった。患者は全員、IADの原因が不明であった。ヒドロコルチゾン (15~20mg/日) がIAD患者全員に投与された。IAD患者のプロファイルは次の通りであった。#1、男性、77歳；#2、男性、67歳；#3、女性、70歳；#4、男性、62歳；#5、男性、33歳。IAD発症から血液試料採取までの期間は、それぞれ約1年、1年、1年、13年、および2年であった。対照として、ストックサンプルから健康者 (健康な対象) の5つのサンプルを無作為に選んだ。健康な対象のプロファイルは次の通りであった。男性、30歳；男性、31歳；男性、33歳；男性、51歳；女性、53歳。試料は名古屋大学および日本の別の施設から、各施設の施設内審査委員会のプロトコールの認可を受けた後に入手した。

【0027】

(2) IAD患者の血清と反応する下垂体自己抗原を検出するためのウェスタンブロット解析

雄スプラッグ・ドーリーラット (体重250~300g；中部科学資材株式会社 (Chubu Science Materials)、名古屋、日本) を、自由に飼料および水にアクセスさせ、22℃の室温にて12時間/12時間の明/暗サイクルで無菌施設において飼育し、7~8週齢のときに使用した。犠牲にした際に、スプラッグ・ドーリーラットのラット下垂体を取り、プロテアーゼ阻害剤カクテル (シグマ・アルドリッチ社、ミズーリ州セントルイス、アメリカ合衆国) を補充したRIPAバッファー (シグマ・アルドリッチ社) 中でホモジナイゼーションした。可溶性の上澄みおよび不溶性のペレット画分を、文献 [Wang S, Watanabe T, Noritake J, Fukata M, Yoshimura T, et al. (2007) J Cell Sci 120: 567-577.] に記載されているように超遠心分離によって分離し、-80℃で保存した。上澄みおよびペレットを分離し、SDS-PAGEに供した後、タンパク質をPVDF膜 (ミリポア社、アメリカ合衆国) に移した。次に、膜を4%脱脂乳でブロックし、4℃にて一晚、患者および健康な対象の血清 (1:100) とインキュベーションした。

【0028】

結果を図1に示す。免疫ブロット法において、下垂体前葉抽出物の不溶性のペレット画分(P)中の~51kDaバンド (図中、矢尻で示す) および可溶性の上澄み画分(Sp)中の~75kDaバンド (図中、矢印で示す) が、2名のIAD患者 (患者1および2) の血清試料によって検出されたが、健康な対象の血清試料によっては検出されなかった。IAD患者の血清は脳下垂体前葉の自己抗原を認識することが示唆された。

【0029】

(3) ゲル内消化および質量分光分析

自己抗原を同定するために、~51kDaバンドおよび~75kDaバンドについてLC-MS/MS分析を行った。

【0030】

上記(2)で分画した下垂体前葉タンパク質をSDS-PAGEによって分離し、和光銀染色キ

ット（和光純薬工業株式会社（Wako）、東京、日本）を用いた銀染色に供した。次に、IAD患者血清が認識するタンパク質に対応するゲルのバンドを切り取り、アセトニトリル（ACN）を用いて脱染色した。タンパク質を10 mMのDTTを用いて還元した後、ヨードアセトアミドを用いてそれらをアルキル化し、トリプシン（プロメガ社）を用いて消化した。結果として得られたペプチドを、ACN中の0.1%トリフルオロ酢酸（TFA）を用いてゲルから順次抽出した。抽出物を蒸発させ、5%ACN中の0.1%TFAを用いて溶かした。固相抽出チップ（C-チップ）を用いて脱塩を行った。次に、試料を液体クロマトグラフィー（LC）システム（Paradigm MS4; AMR社）にかけ、文献[Amano M, Tsumura Y, Taki K, Harada H, Mori K, et al. (2010) PLoS One 5: e8704.、及びKato K, Yazawa T, Taki K, Mori K, Wang S, et al. (2012) Mol Biol Cell 23: 2593-2604.]に記載されているように、LCシステムに直接つながったタンデムMS/MS（LTQ Orbitrap XL; サーマフィッシャーサイエンティフィック社）によって分析した。直径が0.1mmで長さが50または150mmのMagic C18AQカラム（ミクロム・バイオリソース社（Michrom BioResources））を付けたParadigm MS4 HPLCシステムに試料を注入した。逆相クロマトグラフィーを、溶媒A（0.1%ギ酸を含む2%ACN）と溶媒B（0.1%ギ酸を含む90%ACN）の直線勾配（0分、5%B; 100分、50%B）を用いて1μL/分の推定流量で行った。イオン化した後、400~2000の質量電荷比（m/z）を用いて前駆体イオンスキャンをMS/MS分析前に行った。データを Mascot ソフトウェア（マトリックスサイエンス社、マサチューセッツ州ボストン、アメリカ合衆国）を用いて解析して、Swiss-Protデータベース検索した。>95.0%の確率をもつ少なくとも2つの同定ペプチドを含んでなるタンパク質同定を許容した[Kato K, et al. (2012) Mol Biol Cell 23: 2593-2604.]。

【0031】

分析の結果、切り取ったバンド中に数種のタンパク質を検出した。Swiss-Protデータベースに対する検索から分子量がバンドのサイズに相当するタンパク質を取得した。GDP解離阻害因子（GDI）1（Rab GDI α）（mascotスコア、173.0; 配列包括度、10.0%）およびセロトランスフェリン（mascotスコア、3,412.2; 配列包括度、51.2%）が、それぞれ51 kDaおよび75 kDaバンドにおいて高いスコアで検出された。ラットRab GDI α（UniProtKB/Swiss-Prot: P50398）は、447個のアミノ酸残基を含み、50,537 Daの分子量を有する。ラットセロトランスフェリン（UniProtKB/Swiss-Prot: P12346）は、698個のアミノ酸残基を含み、76,395 Daの分子量を有する。これらの二種のタンパク質を自己抗原候補とした。

【0032】

（4）プラスミドおよび組換えタンパク質

IAD患者の血清によるRab GDI αおよびセロトランスフェリンの認識を確認するために、組み換え完全長ヒトタンパク質を発現するHEK293FT細胞を作成した。

【0033】

Rab GDI αおよびセロトランスフェリンの完全長cDNAを含有するベクトルは、オープンバイオシステムズ社から購入した。各オープンリーディングフレームをPCRによって増幅し、発現ベクターpcDNA3.1D/V5-His-TOPO（インビトロジェン社、カリフォルニア州カールズバッド、アメリカ合衆国）に挿入し、ジェネティックアナライザシーケンサー（アプライドバイオシステムズ社、カリフォルニア州フォスターシティー、アメリカ合衆国）を使って配列を完全に読んだ。文献[Wang S, Watanabe T, Noritake J, Fukata M, Yoshimura T, et al. (2007) J Cell Sci 120: 567-577.]に記載されているように、リポフェクタミン2000試薬（インビトロジェン社）を用いて、10 cmディッシュで培養したHEK293FT細胞に各ベクターまたは対照空ベクターを製造業者の取扱説明書に従ってトランスフェクションした。48時間後、トランスフェクションしたHEK293FT細胞を集めた。各組換えタンパク質の発現を抗V5抗体（インビトロジェン）を用いたウェスタンブロッティングによって確認した（図2）。

【0034】

（4）患者血清における抗自己抗原候補タンパク質抗体の検出および抗Rab GDI α抗体の

保有率

患者血清試料に抗体が存在することを評価するために、上記（３）のHEK293FT細胞から調製した、Rab GDI α またはセロトランスフェリン組み換え完全長ヒトタンパク質および対照溶解物を 7.5 % ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動し、PVDF膜に移し、それを各血清試料（１：５０希釈）または陽性対照として抗 V5 抗体（１：１，０００）を用いた免疫ブロット法に供した。

【００３５】

患者１、２および３並びに健康な対象１名の結果を図３に示す。ヒトRab GDI α のアミノ酸残基の数は、ラットRab GDI α のアミノ酸残基の数と同じであり、ヒトとラットのアミノ酸配列相同性は高い（９８．７％）。質量分光分析と一致して、２名のIAD患者（患者１および２）の血清は、組み換えRab GDI α を認識した一方で、健康な対象の血清は認識しなかった。組み換えセロトランスフェリンは、IAD患者の血清によっても健康な対象の血清によっても認識されなかった（データ示さず）。抗Rab GDI α 自己抗体は、残り３名のIADの患者のうち１名（患者３）で検出されたが、４名の健康な対象で存在しなかった（データ示さず）。これらのデータを表１にまとめる。全体で、抗Rab GDI α 抗体の検出に関する感度はIAD患者において６０％（５中３）であった（表１）。抗Rab GDI α 自己抗体は５名の健康な対象には存在しなかった。なお注目すべきは、患者（患者１、２、および３）の試料におけるIAD発症から血液試料採取までの期間は１年以内であった。

【００３６】

【表１】

表１

Number	Sex	Age of IAD onset	Duration from IAD onset to blood sample collection	Anti-Rab GDI α antibody
1	Male	77	1 year	Positive
2	Male	67	1 year	Positive
3	Female	70	1 year	Positive
4	Male	62	13 years	Negative
5	Male	33	2 years	Negative

【００３７】

以上から、少なくとも発症後一定期間におけるIAD患者の血清は組み換え完全長ヒトRab GDI α を認識することが示された。

【００３８】

（５）下垂体におけるRab GDI α の発現を検出するためのウェスタンブロット解析及び免疫組織化学

下垂体前葉でのRab GDI α の発現を調べた。

【００３９】

ウェスタンブロット解析によるRab GDI α の発現の評価には、下垂体の前葉および後葉溶解物をSDS-PAGEによって分離し、PVDF膜に移した。次に、その膜を４℃にて一晚、ヤギ抗Rab GDI α 抗体（１：２００、sc-20447、サンタクルーズバイオテクノロジー社、テキサス州ダラス、アメリカ合衆国）とインキュベーションした。ツイーン２０を含有するリン酸緩衝食塩水（PBST）で３回洗浄した後、文献 [Iwama S, De Remigis A, Callahan MK, Slovin SF, Wolchok JD, et al. (2014) Sci Transl Med. 6: 230ra245.] に記載されているように、膜を室温にて１時間、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）結合ヒトIgGまたは抗ヤギIgG-HRP抗体（１：２００、ダコ社、アメリカ合衆国）と６０分間インキュベーションした。PBSTで１０分間３回洗浄した後、膜を増感化学発光（GEヘルスケア社、ニュージャージー州ピスカタウェイ、アメリカ合衆国）とインキュベーションし、X線フィルム（コダック社、東京、日本）に当てた。

【００４０】

免疫組織化学については、経心腔的灌流によって投与したエーテル深麻酔下で犠牲にし

たラットの脳下垂体のクライオスタット切片（7 μ m）を、リン酸緩衝食塩水中の4%パラホルムアルデヒドを用いて作製した。免疫染色を文献 [Takagi H, Sugimura Y, Suzuki H, Iwama S, Izumida H, et al. (2014) *Kidney Int.* 86(5):954-64.] に記載されているように行った。蛍光染色された切片はすべて、蛍光顕微鏡（BZ-8000；キーエンス社、大阪、日本）を用いて調べた。次の抗体を使用した。マウスモノクローナル抗ACTH抗体（1：50、ab8615；アブカム社、マサチューセッツ州ケンブリッジ、アメリカ合衆国）、ヤギ抗Rab GDI α 抗体（1：50、sc-20447、サンタクルーズバイオテクノロジー社）、ロバ抗マウスIgG AlexaFluor 488（インビトロジェン）、およびロバ抗ヤギIgG AlexaFluor 594（インビトロジェン）。すべての手順は、アメリカ国立衛生研究所の動物管理ガイドラインに準拠する名古屋大学の動物管理に関する施設ガイドラインに従って行った。

10

【0041】

結果を図4に示す。Rab GDI α が下垂体前葉に発現していたことが示された（図4のA）。LC-MS/MS分析および免疫ブロット法の結果と一致して、免疫組織化学的分析は、Rab GDI α 免疫反応性が主に下垂体前葉で観察されることを示した（図4のB～I）。くわえて、Rab GDI α の発現は部分的にACTHの発現と共局在した（図4のB～I）。Rab GDI α は下垂体前葉に発現していることが示された。下垂体前葉でRab GDI α が実際に発現していることから、IAD患者で観察される抗Rab GDI α 抗体は自己抗体であると考えられる。

【0042】

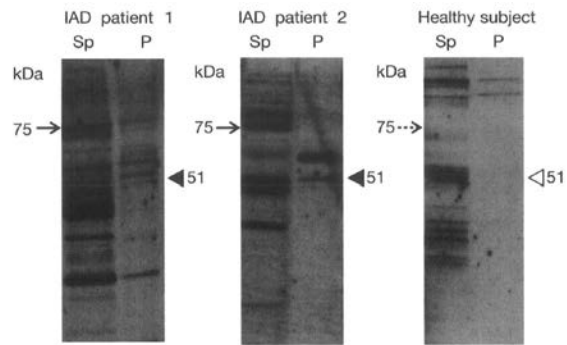
以上の結果から、IADと抗Rab GDI α 抗体とが相関することが示された。したがって、抗Rab GDI α 抗体の検出が、IADの検査や診断に有用であることが分かる。

20

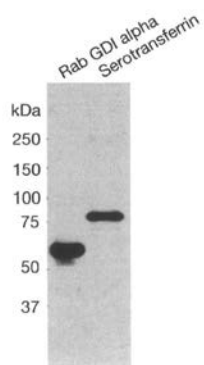
【0043】

IADは、リンパ球性下垂体前葉炎に随伴すると考えられている（Jensen MD, Handwerger BS, Scheithauer BW, Carpenter PC, Mirakian R, et al. (1986) *Ann Intern Med* 105: 200-203, Escobar-Morreale H, Serrano-Gotarredona J, Varela C (1994) *J Endocrinol Invest* 17: 127-131, Caturegli P, Newschaffer C, Olivi A, Pomper MG, Burger PC, et al. (2005) *Endocr Rev* 26: 599-614）。したがって、抗Rab GDI α 抗体の検出は、リンパ球性下垂体前葉炎の検査や診断にも有用であると考えられる。

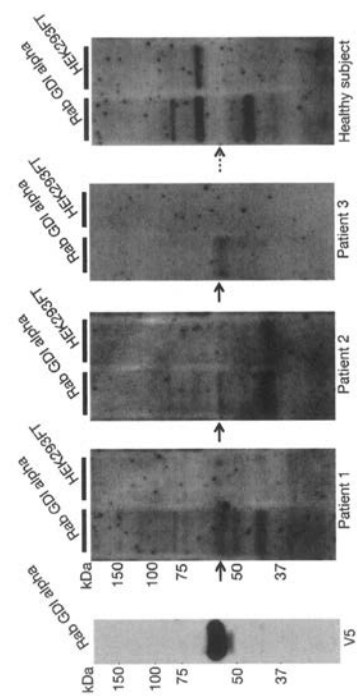
【図 1】



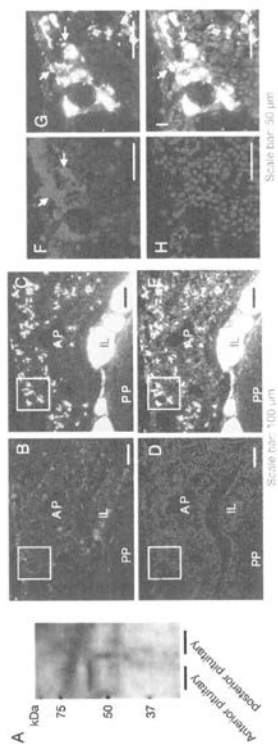
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【配列表】

2016206072000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 大磯 ユタカ
愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内
- (72)発明者 岩間 信太郎
愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内

专利名称(译)	促肾上腺皮质激素单一缺陷或淋巴细胞垂体前叶分裂的方法和检查试剂		
公开(公告)号	JP2016206072A	公开(公告)日	2016-12-08
申请号	JP2015089735	申请日	2015-04-24
[标]申请(专利权)人(译)	コスミック集团		
申请(专利权)人(译)	宇宙有限公司总公司		
[标]发明人	梶村益久 清田篤志 大磯コタカ 岩間信太郎		
发明人	梶村 益久 清田 篤志 大磯 コタカ 岩間 信太郎		
IPC分类号	G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/53.B		
代理人(译)	川口义行		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供单独的促肾上腺皮质激素缺乏或淋巴细胞垂体前叶炎症的测试方法和测试试剂。通过检测与样品中的RabGDI α 发生免疫反应的抗体来检测肾上腺。检查单独使用促肾上腺皮质激素或淋巴细胞垂体前叶炎症。例如，通过使用与抗体免疫反应的抗原的免疫学方法进行抗体的检测。[选中图]图3

