

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02018/190365

発行日 令和2年5月14日 (2020.5.14)

(43) 国際公開日 平成30年10月18日 (2018.10.18)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)		
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	Z N A N	2	GO 4 5
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/53	Y		
	GO 1 N 33/48	P		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁)

出願番号 特願2019-512547 (P2019-512547)	(71) 出願人 504145342 国立大学法人九州大学 福岡県福岡市西区元岡744
(21) 国際出願番号 PCT/JP2018/015200	(74) 代理人 100106909 弁理士 棚井 澄雄
(22) 国際出願日 平成30年4月11日 (2018.4.11)	(74) 代理人 100149548 弁理士 松沼 泰史
(31) 優先権主張番号 62/484,406	(74) 代理人 100141139 弁理士 及川 周
(32) 優先日 平成29年4月12日 (2017.4.12)	(74) 代理人 100188558 弁理士 飯田 雅人
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国(US)	(72) 発明者 吉良 潤一 福岡県福岡市西区元岡744 国立大学法 人九州大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】神経障害性疼痛マーカー及びその使用

(57) 【要約】

神経障害性疼痛マーカーとしての小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体の使用。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

神経障害性疼痛マーカーとしての小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体の使用。

【請求項 2】

前記自己抗体が抗 P l e x i n D 1 抗体である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

神経障害性疼痛の検出方法であって、患者由来の血液試料中の、小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体を検出することを備え、前記自己抗体が検出されることが、前記患者が神経障害性疼痛に罹患していることを示す、方法。10

【請求項 4】

小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体を検出することが、

ヒト又は非ヒト動物由来の後根神経節組織又は脊髄後角組織に患者由来の血液試料を接触させ、前記後根神経節組織又は前記脊髄後角組織に結合したヒト I g G 抗体を検出することと、

前記後根神経節組織又は前記脊髄後角組織における有髄後根神経節ニューロン又はその神経線維を検出することと、

を含み、前記ヒト I g G 抗体が前記有髄後根神経節ニューロン以外のニューロンに結合したことが、小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体が検出されたことを示す、請求項 3 に記載の方法。20

【請求項 5】

有髄後根神経節ニューロンを検出することが、

前記後根神経節組織を抗 S 1 0 0 抗体で免疫染色することを含み、

前記抗 S 1 0 0 抗体で免疫染色されたニューロンが有髄後根神経節ニューロンである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体を検出することが、

ヒト又は非ヒト動物由来の後根神経節組織又は脊髄後角組織に患者由来の血液試料を接触させ、前記後根神経節組織又は前記脊髄後角組織に結合したヒト I g G 抗体を検出することと、

前記後根神経節組織又は前記脊髄後角組織における無髄後根神経節ニューロン又はその神経線維を検出することと、

を含み、前記ヒト I g G 抗体が前記無髄後根神経節ニューロンに結合したことが、小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体が検出されたことを示す、請求項 3 に記載の方法。30

【請求項 7】

無髄後根神経節ニューロンを検出することが、

前記後根神経節組織にイソレクチン B 4 を接触させることを含み、

前記イソレクチン B 4 が結合したニューロンが無髄後根神経節ニューロンである、請求項 6 に記載の方法。40

【請求項 8】

前記ヒト I g G 抗体が I g G 2 抗体である、請求項 3 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

。

【請求項 9】

前記自己抗体が抗 P l e x i n D 1 抗体である、請求項 3 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

神経障害性疼痛の検出方法であって、P l e x i n D 1 を発現するヒト細胞又は非ヒト動物細胞に患者由来の血液試料を接触させ、前記細胞に結合したヒト I g G 抗体を検出することを含み、50

検出された前記ヒト Ig G 抗体の量が、Plexin D1 を発現しない細胞に前記血液試料を接触させた場合に、当該細胞に結合するヒト Ig G 抗体の量と比較して多いことが、前記患者が神経障害性疼痛に罹患していることを示す、方法。

【請求項 1 1】

抗ヒト Ig G 抗体と、
有髓後根神経節ニューロンの検出薬又は無髓後根神経節ニューロンの検出薬と、
を備える、神経障害性疼痛の診断キット。

【請求項 1 2】

前記抗ヒト Ig G 抗体が、抗ヒト Ig G 2 抗体である、請求項 1 1 に記載の診断キット。
10

【請求項 1 3】

前記有髓後根神経節ニューロンの検出薬が、抗 S 1 0 0 抗体である、請求項 1 1 又は 1 2 に記載の診断キット。

【請求項 1 4】

前記無髓後根神経節ニューロンの検出薬が、イソレクチン B 4 である、請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の診断キット。

【請求項 1 5】

抗ヒト Ig G 抗体と、Plexin D1 タンパク質と、を備える、神経障害性疼痛の診断キット。

【請求項 1 6】

前記抗ヒト Ig G 抗体が、抗ヒト Ig G 2 抗体である、請求項 1 5 に記載の診断キット。
20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、神経障害性疼痛マーカー及びその使用に関する。より具体的には、神経障害性疼痛マーカー、神経障害性疼痛の検出方法、及び、神経障害性疼痛の診断キットに関する。本願は、2017年4月12日に米国に仮出願された仮出願第 62 / 484,406 号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

【背景技術】

【0002】

神経障害性疼痛 (neuropathic pain) は、国際疼痛学会 (IASP : International Association for the Study of Pain) により、「体性感覚神経系の病変や疾患によって生じる痛み」と定義される様々な病態を含む難治性疼痛の一つである (例えば、非特許文献 1 を参照。)。

【0003】

末梢神経の神経線維は、髓鞘の有無、直径、伝導速度等により、A 線維、A 線維、A 線維、B 線維、C 線維に分類される。一般に、直径が太い神経線維の方が伝導速度が速く、また、有髓である神経線維の方が伝導速度が速い傾向にある。これらの神経線維のうち、A 線維、A 線維、A 線維、B 線維は有髓線維であり、C 線維は無髓線維である。
40

【0004】

神経障害性疼痛は主に A 線維と C 線維の障害により生じると考えられている。部位のはっきりする鋭い痛みは小径有髓線維である A 線維が担っており、鈍く遅い痛みは無髓線維である C 線維が担っている。

【0005】

しかしながら、一般的な末梢神経障害の検査である神経伝導検査では、大径有髓線維である A 線維が検査される。このため、神経障害性疼痛の患者に一般的な末梢神経障害の検査を行っても異常を検出することができない。その結果、神経障害性疼痛の患者の多くが原因不明又は心因性と判断され、診断にまで至っていないのが現状である。
50

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Baron R., et al., Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment., Lancet Neurol., vol. 9 (8), 807-819, 2010.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

このような背景のもと、本発明は、神経障害性疼痛を検出する技術を提供すること目的とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は以下の態様を含む。

[1] 神経障害性疼痛マーカーとしての小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体の使用。

[2] 前記自己抗体が抗 P lexi n D 1 抗体である、[1]に記載の使用。

[3] 神経障害性疼痛の検出方法であって、患者由来の血液試料中の、小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体を検出することを備え、前記自己抗体が検出されることが、前記患者が神経障害性疼痛に罹患していることを示す、方法。

20

[4] 小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体を検出することが、ヒト又は非ヒト動物由来の後根神経節組織又は脊髄後角組織に患者由来の血液試料を接触させ、前記後根神経節組織又は前記脊髄後角組織に結合したヒト Ig G 抗体を検出することと、前記後根神経節組織又は前記脊髄後角組織における有髄後根神経節ニューロン又はその神経線維を検出することと、を含み、前記ヒト Ig G 抗体が前記有髄後根神経節ニューロン以外のニューロンに結合したことが、小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体が検出されたことを示す、[3]に記載の方法。

20

[5] 有髄後根神経節ニューロンを検出することが、前記後根神経節組織を抗 S 100 抗体で免疫染色することを含み、前記抗 S 100 抗体で免疫染色されたニューロンが有髄後根神経節ニューロンである、[4]に記載の方法。

30

[6] 小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体を検出することが、ヒト又は非ヒト動物由来の後根神経節組織又は脊髄後角組織に患者由来の血液試料を接触させ、前記後根神経節組織又は前記脊髄後角組織に結合したヒト Ig G 抗体を検出することと、前記後根神経節組織又は前記脊髄後角組織における無髄後根神経節ニューロン又はその神経線維を検出することと、を含み、前記ヒト Ig G 抗体が前記無髄後根神経節ニューロンに結合したことが、小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体が検出されたことを示す、[3]に記載の方法。

30

[7] 無髄後根神経節ニューロンを検出することが、前記後根神経節組織にイソレクチン B 4 を接触させることを含み、前記イソレクチン B 4 が結合したニューロンが無髄後根神経節ニューロンである、[6]に記載の方法。

40

[8] 前記ヒト Ig G 抗体が Ig G 2 抗体である、[3]～[7]のいずれかに記載の方法。

40

[9] 前記自己抗体が抗 P lexi n D 1 抗体である、[3]～[8]のいずれかに記載の方法。

40

[10] 神経障害性疼痛の検出方法であって、P lexi n D 1 を発現するヒト細胞又は非ヒト動物細胞に患者由来の血液試料を接触させ、前記細胞に結合したヒト Ig G 抗体を検出することを含み、検出された前記ヒト Ig G 抗体の量が、P lexi n D 1 を発現しない細胞に前記血液試料を接触させた場合に、当該細胞に結合するヒト Ig G 抗体の量と比較して多いことが、前記患者が神経障害性疼痛に罹患していることを示す、方法。

50

[11] 抗ヒト Ig G 抗体と、有髄後根神経節ニューロンの検出薬又は無髄後根神経節ニューロンの検出薬と、を備える、神経障害性疼痛の診断キット。

[12] 前記抗ヒトIgG抗体が、抗ヒトIgG2抗体である、[11]に記載の診断キット。

[13] 前記有髓後根神経節ニューロンの検出薬が、抗S100抗体である、[11]又は[12]に記載の診断キット。

[14] 前記無髓後根神経節ニューロンの検出薬が、イソレクチンB4である、[11]～[13]のいずれかに記載の診断キット。

[15] 抗ヒトIgG抗体と、PlexinD1タンパク質と、を備える、神経障害性疼痛の診断キット。

[16] 前記抗ヒトIgG抗体が、抗ヒトIgG2抗体である、[15]に記載の診断キット。

10

【発明の効果】

【0009】

本発明により、神経障害性疼痛を検出する技術を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】(a)～(f)は、実験例2の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図2】(a)～(d)は、実験例2の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図3】(a)～(d)は、実験例3の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図4】(a)～(c)は、実験例4における、患者血清とイソレクチンB4との二重染色の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

20

【図5】(a)～(c)は、実験例4における、患者血清と抗GRP抗体との二重染色の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図6】(a)～(c)は、実験例4における、患者血清と抗S100抗体との二重染色の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図7】(a)～(c)は、実験例4における、患者血清と抗TRPV1抗体との二重染色の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図8】(a)～(c)は、実験例4における、患者血清と抗P2X3抗体との二重染色の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図9】(a)～(c)は、実験例5における、患者血清と抗GRP抗体との二重染色の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

30

【図10】(a)～(c)は、実験例5における、患者血清とイソレクチンB4との二重染色の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図11】(a)～(c)は、実験例5における、患者血清と抗PKC抗体との二重染色の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図12】(a)は、実験例6の結果を示す光学顕微鏡写真である。(b)及び(c)は、実験例6の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図13】(a)～(c)は、実験例6における、患者血清と抗TH抗体との二重染色の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図14】(a)～(c)は、実験例6における、患者血清と抗VIP抗体との二重染色の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

40

【図15】(a)及び(c)は、実験例7におけるウエスタンプロッティングの結果を示す写真である。(b)は、実験例7におけるSDS-PAGE及び銀染色の結果を示す写真である。

【図16】(a)～(c)は、実験例8の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図17】(a)は、実験例9における定量的リアルタイムPCRの結果を示すグラフである。(b)は、実験例9におけるウエスタンプロッティングの結果を示す写真である。

【図18】(a)～(c)は、実験例9の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図19】(a)は、実験例9の結果を示す光学顕微鏡写真である。(b)及び(c)は、実験例9の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。(d)は、(a)～(c)の写真をマージしたものである。

50

【図20】(a)及び(b)は、実験例10の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。(c)は、(a)及び(b)の結果を数値化したグラフである。

【図21】(a)～(f)は、実験例11の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図22】(a)～(d)は、実験例12におけるウエスタンプロッティングの結果を示す写真である。

【図23】実験例13におけるウエスタンプロッティングの結果を示す写真である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

[神経障害性疼痛マーカー]

1 実施形態において、本発明は、神経障害性疼痛マーカーを提供する。実施例において後述するように、発明者らは、小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体が神経障害性疼痛のマーカーであることを明らかにした。したがって、患者血清中に、小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体が検出されることは、当該患者が神経障害性疼痛を有することを示す。

【0012】

従来、神経障害性疼痛を検出することは困難であった。これに対し、本実施形態のマーカーにより、神経障害性疼痛を容易に検出することができる。

【0013】

本実施形態は、神経障害性疼痛マーカーとしての小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体の使用を提供するものであるということもできる。あるいは、小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体を、神経障害性疼痛マーカーとして使用する方法を提供するものであるということもできる。

【0014】

小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体は、抗Plexin D1抗体であってもよいし、抗Plexin D1抗体以外の小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体であってもよい。実施例において後述するように、発明者らは、神経障害性疼痛を有する患者の血清中に、抗Plexin D1抗体が存在することを明らかにした。しかしながら、小型無髄後根神経節ニューロンに対する全ての自己抗体がPlexin D1だけを認識しているわけではないと推定される。

【0015】

なお、ヒトPlexin D1タンパク質のRefSeqIDはNP_055918であり、マウスPlexin D1タンパク質のRefSeqIDはNP_080652である。

【0016】

患者由来の血液試料中の抗Plexin D1抗体は、例えば、ラテラルフローイムノアッセイ法、ELISA法、ウエスタンプロッティング法等により検出してもよい。例えば、Plexin D1タンパク質を固定した固相に、患者由来の血液試料を反応させた後、Plexin D1タンパク質に結合した自己抗体を抗ヒトIgG抗体で検出する方法等が挙げられる。

【0017】

Plexin D1は、従来、神経発生のガイダンス因子、免疫細胞の分化や活性化に関わるセマフォリンの受容体等として知られていた分子である。従来、Plexin D1と痛みとの関係は報告されていない。

【0018】

患者の血清中に存在する抗Plexin D1抗体、又は、抗原未同定の、小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体の存在が検出されることは、当該患者が神経障害性疼痛を有することを示す。すなわち、患者の血清中に存在する抗Plexin D1抗体、又は、抗原未同定の、小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体を検出することにより、従来原因不明と診断されていた神経障害性疼痛を診断することが可能となる。

【0019】

10

20

30

40

50

本実施形態は、患者が神経障害性疼痛に罹患しているか否かを診断するためのデータ収集方法であって、患者の血清中に存在する抗 P le x i n D 1 抗体、又は、抗原未同定の、小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体の存在を検出することを含む方法であるということもできる。なお、データ収集方法は、医師が患者の状態を判断する工程を含まない。

【 0 0 2 0 】

患者の血清中に、抗小型無髄後根神経節ニューロン抗体が検出された場合、 small fiber neuropathy (小径線維ニューロパシー) であると診断することができる。小径線維ニューロパシーは免疫療法により治療することができる。

10

【 0 0 2 1 】

したがって、小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体の存在を指標とすることにより、神経障害性疼痛の治療に対する免疫療法の適応を速やかに判断することが可能となり、神経障害性疼痛の早期診断・早期治療が可能となる。

【 0 0 2 2 】

P le x i n D 1 に対する自己抗体陽性、又は、抗原未同定の、小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体陽性の神経障害性疼痛の患者は、他の原因による神経障害性疼痛患者と異なり、治療が可能である。

20

【 0 0 2 3 】

これらの患者の神経障害性疼痛は、副腎皮質ステロイド薬の投与、免疫抑制剤の投与、大量免疫グロブリン療法、血漿交換療法等の免疫療法により治療することができる。また、対症療法として、小径無髄線維を標的とする、 S C N 9 A 阻害剤、 S C N 1 0 A 阻害剤、 P 2 X 3 受容体アンタゴニスト等の鎮痛剤を投与することが効果的である。

20

【 0 0 2 4 】

[神経障害性疼痛の検出方法]

(第 1 実施形態)

1 実施形態において、本発明は、神経障害性疼痛の検出方法であって、患者由来の血液試料中の、小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体を検出することを備え、前記自己抗体が検出されることが、前記患者が神経障害性疼痛に罹患していることを示す方法を提供する。以下、本実施形態の方法を、蛍光間接抗体法 (t i s s u e - b a s e d i n d i r e c t i m m u n o f l u o r e s c e n c e a s s a y 、 I F A) という場合がある。

30

【 0 0 2 5 】

第 1 実施形態の方法は、患者が神経障害性疼痛に罹患しているか否かを診断するためのデータ収集方法であるということもできる。なお、データ収集方法は、医師が患者の状態を判断する工程を含まない。

30

【 0 0 2 6 】

本実施形態の方法において、小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体を検出することは、ヒト又は非ヒト動物由来の後根神経節組織又は脊髄後角組織に患者由来の血液試料を接触させ、前記後根神経節組織又は前記脊髄後角組織に結合したヒト I g G 抗体を検出することと、前記後根神経節組織又は前記脊髄後角組織における有髄後根神経節ニューロン又はその神経線維を検出することと、を含み、前記ヒト I g G 抗体が前記有髄後根神経節ニューロン以外のニューロンに結合したことが、小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体が検出されたことを示すものであってもよい。

40

【 0 0 2 7 】

第 1 実施形態の方法によれば、後根神経節組織又は前記脊髄後角組織に反応する自己抗体を検出するため、抗原未同定の、小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体を検出することができる。

【 0 0 2 8 】

非ヒト動物としては、特に限定されず、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、サル、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ、ウマ等が挙げられる。

50

【0029】

実施例において後述するように、発明者らは、神経障害性疼痛を有する患者由来の血清を、ヒト後根神経節の組織切片、ヒト脊髄後角の組織切片、マウス後根神経節の組織切片、マウス脊髄後角の組織切片等と反応させて、その結合を検出することにより、小型無髓後根神経節ニューロンに対する自己抗体を検出できることを明らかにした。

【0030】

また、有髓後根神経節ニューロンを検出することが、前記後根神経節組織を抗 S 100 抗体で免疫染色することを含み、前記抗 S 100 抗体で免疫染色されたニューロンを有髓後根神経節ニューロンであると判断してもよい。実施例において後述するように、発明者らは、神経障害性疼痛を有する患者由来の自己抗体が、抗 S 100 抗体とは共局在しないことを明らかにした。10

【0031】

本実施形態の方法において、小型無髓後根神経節ニューロンに対する自己抗体を検出することは、ヒト又は非ヒト動物由来の後根神経節組織又は脊髄後角組織に患者由来の血液試料を接触させ、前記後根神経節組織又は前記脊髄後角組織に結合したヒト Ig G 抗体を検出することと、前記後根神経節組織又は前記脊髄後角組織における無髓後根神経節ニューロン又はその神経線維を検出することと、を含み、前記ヒト Ig G 抗体が前記無髓後根神経節ニューロンに結合したことが、小型無髓後根神経節ニューロンに対する自己抗体が検出されたことを示すものであってもよい。

【0032】

非ヒト動物については上述したものと同様である。また、無髓後根神経節ニューロンを検出することが、前記後根神経節組織にイソレクチン B 4 を接触させることを含み、前記イソレクチン B 4 が結合したニューロンが無髓後根神経節ニューロンであると判断してもよい。実施例において後述するように、発明者らは、神経障害性疼痛を有する患者由来の自己抗体が、イソレクチン B 4 と共に局在することを明らかにした。20

【0033】

本実施形態の方法において、患者由来の血液試料に含まれる、小型無髓後根神経節ニューロンに対する自己抗体は、Ig G 2 抗体であってもよい。実施例において後述するように、発明者らは、神経障害性疼痛を有する患者由来の自己抗体の Ig G サブクラスが Ig G 2 であることを明らかにした。

【0034】

本実施形態の方法において、患者由来の血液試料に含まれる、小型無髓後根神経節ニューロンに対する自己抗体は、抗 Plexin D 1 抗体であってもよい。実施例において後述するように、発明者らは、神経障害性疼痛を有する患者由来の自己抗体が抗 Plexin D 1 抗体であることを明らかにした。30

【0035】**(第2実施形態)**

1 実施形態において、本発明は、神経障害性疼痛の検出方法であって、Plexin D 1 を発現するヒト細胞又は非ヒト動物細胞に患者由来の血液試料を接触させ、前記細胞に結合したヒト Ig G 抗体を検出することを含み、検出された前記ヒト Ig G 抗体の量が、Plexin D 1 を発現しない細胞に前記血液試料を接触させた場合に、当該細胞に結合するヒト Ig G 抗体の量と比較して多いことが、前記患者が神経障害性疼痛に罹患していることを示す方法を提供する。40

【0036】

第2実施形態の方法は、患者が神経障害性疼痛に罹患しているか否かを診断するためのデータ収集方法であるということもできる。なお、データ収集方法は、医師が患者の状態を判断する工程を含まない。

【0037】

第2実施形態の方法は、第1実施形態の方法と比較して、自己抗体の抗原が Plexin D 1 タンパク質に限定されている点において主に異なる。

【0038】

非ヒト動物については上述したものと同様である。Plexin D1を発現する細胞は、本来Plexin D1を発現する細胞であってもよいし、Plexin D1の発現ベクターを導入した結果、Plexin D1を発現するようになった細胞であってもよい。例えば、実施例において後述するように、HeLa細胞をPlexin D1を発現する細胞として用いることができる。

【0039】

また、Plexin D1を発現しない細胞は、本来Plexin D1を発現しない細胞であってもよいし、Plexin D1タンパク質をコードする遺伝子である、PLXND1遺伝子が破壊された細胞であってもよいし、Plexin D1の発現量が低下した細胞であってもよい。具体的には、例えば、実施例において後述するように、PLXND1遺伝子に対するsiRNAを導入したHeLa細胞をPlexin D1を発現しない細胞として用いることができる。

10

【0040】

第2実施形態の方法において、患者由来の血液試料に含まれる自己抗体は、IgG2抗体であってもよい。

【0041】**[神経障害性疼痛の診断キット]****(第1実施形態)**

1実施形態において、本発明は、抗ヒトIgG抗体と、有髓後根神経節ニューロンの検出薬又は無髓後根神経節ニューロンの検出薬と、を備える、神経障害性疼痛の診断キットを提供する。

20

【0042】

本実施形態のキットは、上述した第1実施形態の神経障害性疼痛の検出方法に好適に用いることができる。具体的には、ヒト又は非ヒト動物由来の後根神経節組織又は脊髄後角組織に患者由来の血液試料を接触させた後、抗ヒトIgG抗体により患者由来のIgG抗体を検出すればよい。抗ヒトIgG抗体が、抗ヒトIgG2抗体であってもよい。

【0043】

また、有髓後根神経節ニューロンの検出薬又は無髓後根神経節ニューロンの検出薬により、患者由来のIgG抗体が有髓後根神経節ニューロンに結合したか、無髓後根神経節ニューロンに結合したかを判断することができる。有髓後根神経節ニューロンの検出薬としては、抗S100抗体が挙げられる。また、無髓後根神経節ニューロンの検出薬としては、イソレクチンB4が挙げられる。

30

【0044】

小型無髓後根神経節ニューロンに対する自己抗体が検出された場合、当該患者は神経障害性疼痛患者であると判断することができる。

【0045】**(第2実施形態)**

1実施形態において、本発明は、抗ヒトIgG抗体と、Plexin D1タンパク質と、を備える、神経障害性疼痛の診断キットを提供する。

40

【0046】

本実施形態のキットによれば、例えば、ラテラルフローイムノアッセイ法、ELISA法、ウエスタンブロッティング法等により、患者由来の血液試料中に、Plexin D1タンパク質に対する自己抗体が存在するか否かを容易に検出することができる。

【0047】

より具体的には、例えば、Plexin D1タンパク質を固定した固相に、患者由来の血液試料を反応させた後、Plexin D1タンパク質に結合した自己抗体を抗ヒトIgG抗体で検出することにより、自己抗体の存在を検出することができる。

【0048】

本実施形態のキットにおいて、Plexin D1タンパク質としては、Plexin

50

D1タンパク質の全長を用いてもよいし、Plexin D1タンパク質の細胞外ドメインを用いてもよいし、自己抗体の検出に有効なPlexin D1タンパク質のエピトープ部を特定し、より短い部分ペプチドを用いてもよい。Plexin D1タンパク質としては、例えば、実施例において後述する組換えヒトPlexin D1タンパク質(型式「4160-PD」、R&Dシステムズ社、アミノ酸配列を配列番号8に示す。)等を用いることができる。

【0049】

Plexin D1タンパク質に対する自己抗体が検出された場合、当該患者は神経障害性疼痛患者であると判断することができる。上記の抗ヒトIgG抗体は、抗ヒトIgG2抗体であってもよい。

10

【0050】

[その他の実施形態]

1実施形態において、本発明は、患者の神経障害性疼痛の診断及び治療を行う方法であって、前記患者から血液試料を採取することと、前記血液試料中に小型無髄後根神経節ニューロンに対する自己抗体が存在するか否かを検出することと、前記自己抗体が存在した場合に、前記患者は神経障害性疼痛であると診断することと、神経障害性疼痛であると診断された場合に、前記患者に、有効量の、副腎皮質ステロイド薬、免疫抑制剤、SCN9A阻害剤、SCN10A阻害剤、P2X3受容体アンタゴニストからなる群より選択される薬物を投与するか、又は、大量免疫グロブリン療法若しくは血漿交換療法を実施することを含む、方法を提供する。

20

【実施例】

【0051】

次に実施例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0052】

[実験例1]

(血液試料の採取)

神経障害性疼痛を有する患者から血液試料を採取した。神経障害性疼痛を有する患者としては、国際疼痛学会が提唱する神経障害性疼痛の診断基準(Finnerup N. B., et al., *Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice.*, *Pain*, vol. 157 (8), 1599-1606, 2016.)において、probable及びdefiniteの基準を満たす110名の患者を対象とした。

30

【0053】

神経障害性疼痛を有する患者の内訳は、アトピー性脊髄炎患者22名、視神経脊髄炎(NMOSD)患者17名、再発寛解型多発性硬化症(RRMS)患者15名、慢性炎症性脱髓性多発神経炎(CIDP)患者14名、脊髄根末梢神経炎を有するシェーグレン症候群患者10名、神経サルコイドーシス患者10名、チャーチストラウス患者6名、脊髄炎と末梢神経炎を有する全身性エリテマトーデス(SLE)患者4名、神経ベーチェット病(nBd)患者3名、肢端紅痛症患者2名、薬物誘導性ニューロパシー患者2名、ビタミン欠乏性ニューロパシー患者2名、抗SGPG抗体陽性ニューロパシー患者1名、ギラン・バレー症候群患者1名、クリオグロブリン血症患者1名であった。

40

【0054】

また、対照として、健常人及び神経障害性疼痛のない患者(合計50名)からも血液試料を採取した。50名の内訳は、健常人20名、神経変性疾患患者20名(うち、6名は筋萎縮性側索硬化症であり、4名は多系統萎縮症であり、3名は脊髄小脳変性症であり、2名はパーキンソン病であり、2名は正常圧水頭症であり、1名はアルツハイマー病であり、1名は認知症であり、1名は大脳皮質基底核変性症であった。)、コラーゲン血管疾患患者10名(うち、4名が全身性エリテマトーデスであり、4名がベーチェット病であり、2名がシェーグレン症候群であった。)であった。

【0055】

50

[実験例 2]

(後根神経節ニューロンに対する自己抗体の検出)

マウス後根神経節(Dorsal root ganglion、DRG)の組織切片及びマウス脊髄(spinal cord、SC)の組織切片を用いて、実験例1で採取した血液試料中の、後根神経節ニューロンに対する自己抗体を検出した。

【0056】**《組織切片の調製》**

8~10週齢の雄のC57BL/6マウスに麻酔をかけた。続いて、リン酸緩衝生理食塩水(Phosphate buffered saline、PBS)で灌流した。続いて、4%のパラホルムアルデヒドで灌流固定を行った。続いて、腰髄レベル(L4-L6)の脊髄と後根神経節を摘出し、各組織を10%のホルムアルデヒドで固定した。続いて、各組織をパラフィン包埋し、4μm厚の組織切片を作製し、スライドガラスに張り付けた。

10

【0057】**《血液試料との反応》**

調製した組織切片をキシレンに5分間浸漬することを3回繰り返し、脱パラフィンした。続いて、組織切片を100%のエタノールに5分間浸漬することを2回繰り返し、水和させた。続いて、抗原賦活化処理を行った。具体的には、組織切片をクエン酸バッファー(pH 6.0)中で120、10分間煮沸し、室温で15分かけて徐冷し、PBSで5分間の洗浄を2回行った。

20

【0058】

続いて、組織切片に10%ヤギ血清/PBSを接触させて室温で30分間静置し、プロッキングした。続いて、組織切片に、1次抗体として60倍希釈した血液試料(血清)を接触させて37で1時間静置し、抗原抗体反応を行った。続いて、PBSで5分間の洗浄を2回行った。

【0059】

続いて、組織切片に500倍希釈した2次抗体(Alexa 488 標識抗ヒトIgG抗体、サーモフィッシュ・サイエンティフィック社)を接触させて室温で1時間静置し、抗原抗体反応を行った。続いて、PBSで5分間の洗浄を2回行った。

30

【0060】

続いて、組織切片を封入し、共焦点レーザ顕微鏡(型式「LSM 510」、カールツァイス社)で観察した。その結果、健常者由来の血清には、マウス後根神経節の組織切片やマウス脊髄の組織切片に反応する自己抗体がほとんど存在しないことが明らかとなった。

【0061】

一方、神経障害性疼痛を有する110名の患者由来の血清のうち、11名の患者由来の血清が、マウス後根神経節の組織切片の小型無髓後根神経節ニューロン及び脊髄後角に存在するその神経終末に反応する自己抗体を含んでいたことが明らかとなった。

【0062】

図1(a)は、対照血清を反応させたマウス後根神経節の組織切片の結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。スケールバーは50μmを示す。また、図1(b)~(f)は、神経障害性疼痛を有する患者(それぞれ、症例1~5)由来の血清を反応させたマウス後根神経節の組織切片のうち、自己抗体が検出された代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。スケールバーは50μmを示す。

40

【0063】

また、図2(a)は、図1(a)と同じ健常者由来の血清を反応させたマウス脊髄の組織切片の結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。スケールバーは50μmを示す。図2(b)は図2(a)と同じ試料を高倍率で撮影した蛍光顕微鏡写真である。スケールバーは50μmを示す。

【0064】

また、図2(c)は、図1(f)と同じ患者(症例5)由来の血清を反応させたマウス

50

脊髄の組織切片の結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。スケールバーは 50 μm を示す。図 2 (d) は図 2 (c) と同じ試料を高倍率で撮影した蛍光顕微鏡写真である。スケールバーは 50 μm を示す。

【0065】

以下、本実験例の方法を蛍光間接抗体法 (tissue-based indirect immunofluorescence assay、IFA) という場合がある。

【0066】

下記表 1 に結果をまとめた。表 1 中、「NeP」は神経障害性疼痛を表し、「NS」は有意差がないことを表し、「IFA」は蛍光間接抗体法を表す。連続変数の比較にはマン・ホイットニーの U 検定を用いた。また、NeP を有する患者と有しない患者の間のカテゴリ一間の変数の比較にはカイ二乗検定を行い、カイ二乗検定を適用できない場合にはフィッシャーの正確確率検定を用いた。

10

【0067】

【表 1】

	全患者 (n=160)	NePを有する患者 (n=110)	Nepを有しない患者 (n=50)	p値
男性／女性の数 (比)	60／100 (1:1.7)	37／73 (1:2.0)	23／27 (1:1.2)	NS
試験時の 年齢の中央値 (年齢)	47.0 (37.0-61.0)	49.5 (39.0-62.0)	43.5 (36.8-58.3)	NS
IFAによる陽性率 (%)	11／160 (6.9%)	11／110 (10%)	0／50 (0%)	0.018

20

【0068】

また、下記表 2 に、マウス後根神経節の組織切片に反応する自己抗体を含んでいた 11 名の患者の臨床的特徴を示す。

【0069】

【表2】

症例	性別	試験時の年齢	発症年齢	神経学的な異常	併存する異常	特徴的な神経障害性疼痛及び自律神経機能不全	免疫療法に対する応答
1	女性	26	14	肢端紅痛症	アトピー性皮膚炎	神經障害性疼痛(機械的痛覚過敏、灼熱痛)、足の腫れ、皮膚赤み	免疫療法せず
2	男性	61	50	神経サルコイドーシス	なし	神經障害性疼痛(温熱性痛覚過敏、うずき)	改善(メチルプレドニゾロン)
3	女性	48	24	視神經脊髄炎	シーグレン症候群、アレルギー性鼻炎、気管支喘息	神經障害性疼痛(圧痛)	改善(血漿交換、メチルプレドニゾロン)
4	女性	37	20	再発寛解型多発性硬化症	アレルギー性鼻炎	神經障害性疼痛(うずき)	改善(メチルプレドニゾロン)
5	女性	67	30	アトピー性脊髄炎	シーグレン症候群、アレルギー性結膜炎、葉物アレルギー	神經障害性疼痛(灼熱痛、温熱性痛覚過敏)、手の腫れ、皮膚赤み	改善(メチルプレドニゾロン)
6	女性	46	12	アトピー性脊髄炎	全身性エリテマトーデス、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎	神經障害性疼痛(灼熱痛、温熱性痛覚過敏)、皮膚温度の上昇	改善(メチルプレドニゾロン)
7	女性	55	53	アトピー性脊髄炎	アレルギー性鼻炎、気管支喘息、食道癌	神經障害性疼痛(灼熱痛、うずき)、異痛症	免疫療法せず
8	女性	27	14	アトピー性脊髄炎	アレルギー性鼻炎	神經障害性疼痛(機械的痛覚過敏、灼熱痛、異痛症)、皮膚赤み	免疫療法せず
9	女性	28	26	アトピー性脊髄炎	気管支喘息	神經障害性疼痛(灼熱痛、うずき)	改善(血漿交換、メチルプレドニゾロン)
10	女性	20	17	視神經脊髄炎	シーグレン症候群、食物アレルギー	神經障害性疼痛(圧痛)	改善(血漿交換、メチルプレドニゾロン)
11	男性	30	29	アトピー性脊髄炎	アレルギー性鼻炎	神經障害性疼痛(うずき、温熱性痛覚過敏)	免疫療法せず

【0070】

【実験例3】

(後根脊髄ニューロンに対する自己抗体のサブクラスの検討)

実験例 2において検出された、マウス後根神経節の組織切片に反応する自己抗体を含んでいた 11 名の患者由来の血清について、自己抗体の Ig G サブクラスを検討した。

【0071】

具体的には、2 次抗体反応において、ヒト Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig G 4 にそれぞれ特異的な FITC 標識マウスモノクローナル抗体（シグマアルドリッヂ社）を、それぞれ 50 倍希釈して反応させた点以外は実験例 2 と同様の蛍光間接抗体法を行った。

【0072】

図 3 (a) ~ (d) は、それぞれ、Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig G 4 である自己抗体を検出した代表的な結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。スケールバーは 50 μm を示す。その結果、11 名の患者由来の血清全てにおいて、自己抗体の Ig G サブクラスが Ig G 2 であることが明らかとなった。
10

【0073】

[実験例 4]

(自己抗体が反応する後根神経節ニューロンのサブタイプの検討)

実験例 2において検出された、マウス後根神経節の組織切片に反応する 11 名の患者由来の自己抗体について、小型無髄後根神経節ニューロン（無髄 C 線維型後根神経節ニューロン）に選択的に結合するか否かを検討した。

【0074】

《イソレクチン B 4 との二重染色》

1 次抗体反応において、60 倍希釈した患者血清に加え、非ペプチド性 C 線維型後根神経節ニューロンのマーカーであるイソレクチン B 4 (Islectin GS - IB₄ From Griffonia simplicifolia、Alexa Fluor 594 Conjugate、サーモフィッシュ・サイエンティフィック社) を 50 倍希釈して反応させた点以外は実験例 2 と同様の蛍光間接抗体法を行った。
20

【0075】

図 4 (a) は、神経障害性疼痛を有する患者由来の血清を反応させたマウス後根神経節の組織切片の結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。図 4 (b) は、図 4 (a) と同一の視野において、イソレクチン B 4 (IB 4) の結合を検出した結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。図 4 (c) は、図 4 (a) 及び図 4 (b) の写真をマージしたものである。スケールバーは 50 μm を示す。その結果、患者由来の自己抗体は、イソレクチン B 4 と共に局在したことが明らかとなった。
30

【0076】

《抗 CGRP 抗体との二重染色》

1 次抗体反応において、60 倍希釈した患者血清に加え、ペプチド性 C 線維型後根神経節ニューロンのマーカーであるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene-related peptide、CGRP) に対する抗体（ウサギポリクローナル抗体、矢内原研究所）を 500 倍希釈して反応させた点以外は実験例 2 と同様の蛍光間接抗体法を行った。

【0077】

図 5 (a) は、神経障害性疼痛を有する患者由来の血清を反応させたマウス後根神経節の組織切片の結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。図 5 (b) は、図 5 (a) と同一の視野において、抗 CGRP 抗体の結合を検出した結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。図 5 (c) は、図 5 (a) 及び図 5 (b) の写真をマージしたものである。スケールバーは 50 μm を示す。その結果、患者由来の自己抗体は、CGRP と一緒に局在したことが明らかとなった。
40

【0078】

《抗 S 100 抗体との二重染色》

1 次抗体反応において、60 倍希釈した患者血清に加え、有髄神経線維である、A 線維型後根神経節ニューロン及び A 線維型後根神経節ニューロン、並びにサテライトグリア細胞のマーカーである S 100 に対する抗体（ウサギポリクローナル抗体、アブカム

10

20

30

40

50

社)を500倍希釈して反応させた点以外は実験例2と同様の蛍光間接抗体法を行った。

【0079】

図6(a)は、神経障害性疼痛を有する患者由来の血清を反応させたマウス後根神経節の組織切片の結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。図6(b)は、図6(a)と同一の視野において、抗S100抗体の結合を検出した結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。図6(c)は、図6(a)及び図6(b)の写真をマージしたものである。スケールバーは50μmを示す。その結果、患者由来の自己抗体は、S100と共に局在しないことが明らかとなった。

【0080】

《抗TRPV1抗体との二重染色》

以上の結果から、神経障害性疼痛を有する患者由来の自己抗体は、小型無髄後根神経節ニューロンに特異的に結合することが明らかとなった。

【0081】

そこで、1次抗体反応において、60倍希釈した患者血清に加え、痛みの知覚に関与することが知られている*transient receptor potential vanilloid 1*(TRPV1)に対する抗体(ウサギポリクローナル抗体)を1,000倍希釈して反応させた点以外は実験例2と同様の蛍光間接抗体法を行った。

【0082】

図7(a)は、神経障害性疼痛を有する患者由来の血清を反応させたマウス後根神経節の組織切片の結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。図7(b)は、図7(a)と同一の視野において、抗TRPV1抗体の結合を検出した結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。図7(c)は、図7(a)及び図7(b)の写真をマージしたものである。スケールバーは50μmを示す。その結果、患者由来の自己抗体の一部は、TRPV1陽性的後根神経節ニューロンと反応したことが明らかとなった。この結果は、患者由来の自己抗体が、神経障害性疼痛と関連することを更に支持するものである。

【0083】

《抗P2X3抗体との二重染色》

1次抗体反応において、60倍希釈した患者血清に加え、痛みの知覚に関与することが知られている*P2X purinoreceptor 3*(P2X3)に対する抗体(ウサギポリクローナル抗体、アブカム社)を500倍希釈して反応させた点以外は実験例2と同様の蛍光間接抗体法を行った。

【0084】

図8(a)は、神経障害性疼痛を有する患者由来の血清を反応させたマウス後根神経節の組織切片の結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。図8(b)は、図8(a)と同一の視野において、抗P2X3抗体の結合を検出した結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。図8(c)は、図8(a)及び図8(b)の写真をマージしたものである。スケールバーは50μmを示す。その結果、患者由来の自己抗体は、主にP2X3陽性後根神経節ニューロンと反応したことが明らかとなった。この結果は、患者由来の自己抗体が、神経障害性疼痛と関連することを更に支持するものである。

【0085】

[実験例5]

(背側脊髄の組織切片に対する自己抗体の反応性の検討)

実験例2において検出された、マウス後根神経節の組織切片に反応する11名の患者由来の自己抗体について、マウス背側脊髄の組織切片への反応性を検討した。

【0086】

《抗CGRP抗体との二重染色》

1次抗体反応において、60倍希釈した患者血清に加え、ペプチド性C線維型後根神経節ニューロンのマーカーであるカルシトニン遺伝子関連ペプチド(*c a l c i t o n i n gene-related peptide*、CGRP)に対する抗体(ウサギポリクローナル抗体、矢内原研究所)を500倍希釈して反応させた点以外は実験例2と同様の

10

20

30

40

50

蛍光間接抗体法を行った。

【0087】

図9(a)は、神経障害性疼痛を有する患者由来の血清を反応させたマウス背側脊髄の組織切片の結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。図4(b)は、図4(a)と同一の視野において、抗CGRP抗体の結合を検出した結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。図4(c)は、図4(a)及び図4(b)の写真をマージしたものである。スケールバーは50μmを示す。その結果、患者由来の自己抗体の一部は、脊髄後角第I層及び第IIo層に位置するCGRP陽性の軸索末端と反応したことが明らかとなった。

【0088】

《イソレクチンB4との二重染色》

1次抗体反応において、60倍希釈した患者血清に加え、非ペプチド性C線維型後根神経節ニューロンのマーカーであるイソレクチンB4(Isolectin GS-IB4 From Griffonia simplicifolia, Alexa Fluor 594 Conjugate、サーモフィッシュ・サイエンティフィック社)を500倍希釈して反応させた点以外は実験例2と同様の蛍光間接抗体法を行った。

【0089】

図10(a)は、神経障害性疼痛を有する患者由来の血清を反応させたマウス背側脊髄の組織切片の結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。図10(b)は、図10(a)と同一の視野において、イソレクチンB4の結合を検出した結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。図10(c)は、図10(a)及び図10(b)の写真をマージしたものである。スケールバーは50μmを示す。その結果、患者由来の自己抗体の多くは、脊髄後角第IIi層に位置するイソレクチンB4染色性の軸索末端と反応したことが明らかとなった。

【0090】

《抗PKC抗体との二重染色》

1次抗体反応において、60倍希釈した患者血清に加え、抗PKC抗体(ウサギポリクローナル抗体、サンタクルーズ社)を500倍希釈して反応させた点以外は実験例2と同様の蛍光間接抗体法を行った。

【0091】

図11(a)は、神経障害性疼痛を有する患者由来の血清を反応させたマウス背側脊髄の組織切片の結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。図11(b)は、図11(a)と同一の視野において、抗PKC抗体の結合を検出した結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。図11(c)は、図11(a)及び図11(b)の写真をマージしたものである。スケールバーは50μmを示す。

【0092】

その結果、患者由来の自己抗体の大部分は、腹部側の脊髄後角第IIi層及び脊髄後角第IIo層に位置するPKC陽性のバンドとは重複せず、より背側に反応したことが明らかとなった。

【0093】

以上の結果は、患者由来の自己抗体の結合が、C線維型求心性神経の軸索末端が位置する脊髄後角第I層及び第IIo層に限られていることを示す。

【0094】

[実験例6]

(自己抗体の節後自律神経C線維への反応性の検討)

実験例2において検出された、マウス後根神経節の組織切片に反応する11名の患者由来の自己抗体について、節後自律神経C線維への反応性を検討した。

【0095】

自律神経C線維は真皮(皮膚の内層)に存在し、一般的な神経線維マーカーであるprotein gene product 9.5(PGP9.5)と類似の分布パターンを示す。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 6 】

まず、患者由来の自己抗体の後足足底の皮膚における結合パターンを検討した。図 12 (a) は、マウスの後足足底の皮膚の組織切片のヘマトキシリン・エオジン染色の結果を示す光学顕微鏡写真である。スケールバーは 50 μm を示す。図 12 (a) 中、「d e r m i s」は真皮を示し、「e p i d e r m i s」は表皮を示す。

【 0 0 9 7 】

図 12 (b) は、対照血清の免疫染色の結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。1 次抗体反応において、60 倍希釈した対照血清に加え、抗 P G P 9 . 5 抗体（ウサギポリクローナル抗体、アブカム社）を 500 倍希釈して反応させた点以外は実験例 2 と同様の蛍光間接抗体法を行った。また、4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール（D A P I）で核を染色した。スケールバーは 50 μm を示す。また、左下の枠内に矢印部分の拡大写真を示す。その結果、対照血清はマウス皮膚と反応性を示さなかった。

10

【 0 0 9 8 】

図 12 (c) は、患者由来の自己抗体の免疫染色の結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。1 次抗体反応において、60 倍希釈した患者血清に加え、抗 P G P 9 . 5 抗体（ウサギポリクローナル抗体、アブカム社）を 500 倍希釈して反応させた点以外は実験例 2 と同様の蛍光間接抗体法を行った。また、D A P I で核を染色した。スケールバーは 50 μm を示す。また、左下の枠内に矢印部分の拡大写真を示す。その結果、患者由来の自己抗体は、表皮及び P G P 9 . 5 陽性の皮膚神経線維に結合したことが明らかとなった。

20

【 0 0 9 9 】**《抗 T H 抗体との二重染色》**

続いて、マウスの後足足底の皮膚の組織切片に対し、患者由来の自己抗体が結合する自律神経線維を同定するために、交感神経のマーカーであるチロシンヒドロキシラーゼ（T H）に対する抗体との二重染色を行った。

【 0 1 0 0 】

1 次抗体反応において、60 倍希釈した患者血清に加え、抗 T H 抗体（ウサギポリクローナル抗体、アブカム社）を 500 倍希釈して反応させた点以外は実験例 2 と同様の蛍光間接抗体法を行った。また、D A P I で核を染色した。

【 0 1 0 1 】

図 13 (a) は、神経障害性疼痛を有する患者由来の血清を反応させたマウスの後足足底の皮膚の組織切片の結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。図 13 (b) は、図 13 (a) と同一の視野において、抗 T H 抗体の結合を検出した結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。図 13 (c) は、図 13 (a) 及び図 13 (b) の写真をマージしたものである。スケールバーは 50 μm を示す。その結果、患者由来の自己抗体は、T H 陽性の神経線維を染色しないことが明らかとなった。

30

【 0 1 0 2 】**《抗 V I P 抗体との二重染色》**

続いて、マウスの後足足底の皮膚の組織切片に対し、副交感神経のマーカーである v a s o a c t i v e i n t e s t i n a l p e p t i d e (V I P) に対する抗体との二重染色を行った。

40

【 0 1 0 3 】

1 次抗体反応において、60 倍希釈した患者血清に加え、抗 V I P 抗体（ウサギポリクローナル抗体、イムノスター社）を 500 倍希釈して反応させた点以外は実験例 2 と同様の蛍光間接抗体法を行った。また、D A P I で核を染色した。

【 0 1 0 4 】

図 14 (a) は、神経障害性疼痛を有する患者由来の血清を反応させたマウスの後足足底の皮膚の組織切片の結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。図 14 (b) は、図 14 (a) と同一の視野において、抗 V I P 抗体の結合を検出した結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。図 14 (c) は、図 14 (a) 及び図 14 (b) の写真をマージしたものである。スケールバーは 50 μm を示す。その結果、患者由来の自己抗体は、V I P

50

陽性の神経線維と共に局在したことが明らかとなった。

【0105】

以上の結果から、神経障害性疼痛を有する患者由来の自己抗体が、節後自律神経である副交感神経C線維にも反応することが明らかとなった。

【0106】

[実験例7]

(自己抗体が反応するタンパク質の同定)

10 ~ 12週齢の雄のC57BL/6マウスの腰椎後根神経節を採取し、直ちに液体窒素中で凍結した。続いて、凍結した組織を、Trition X-100を終濃度1%となるように添加したRIPAバッファー(ナカライトスク社)中でホモジナイズした。続いて、4で10,000×g、30分間遠心して上清を回収し、マウス後根神経節由来タンパク質抽出液とした。

【0107】

続いて、マウス後根神経節由来タンパク質抽出液をウエスタンブロッティングに供し、マウス後根神経節の組織切片に反応する患者由来自己抗体で検出した結果、11名の患者のうち10名の患者由来自己抗体で共通の免疫反応性を有するバンドが検出された。当該バンドの分子量は約220kDaであった。一方、神経障害性疼痛を有しない患者由来血清及び健常人由来血清で検出した結果、免疫反応性を有するバンドは検出されなかった。

【0108】

図15(a)はウエスタンブロッティングの結果を示す写真である。図15(a)中、「I F A positive」は蛍光間接抗体法の結果陽性であったことを表し、「I F A negative」は蛍光間接抗体法の結果陰性であったことを表し、「N e P P t . 1、2、5、6、9、11」は、それぞれ、神経障害性疼痛を有する患者1、2、5、6、9、11を表し、「H C」は健常人を表す。また、線で囲んだバンドは11名の患者のうち10名の患者由来自己抗体で共通に検出されたバンドである。

【0109】

《免疫沈降、ポリアクリルアミドゲル電気泳動及び銀染色》

患者血清から、Protein G HP Spin Trap(GEヘルスケアバイオサイエンス社)を用いてIgGサブクラス全4種類の血清IgGを精製した。

【0110】

また、1mg/mlに希釈したマウス後根神経節由来タンパク質抽出液300μLと、0.1mgのFG beads-Protein G beads(多摩川精機)を4で15分間インキュベーションした。続いて、磁気分離を行い、タンパク質抽出液中の非特異的なProtein G吸着物を除去し、粗精製した。

【0111】

続いて、粗精製したタンパク質抽出液300μLに血清IgG 3μgを加え、4で1時間インキュベーションし抗原抗体反応を起こさせた。

【0112】

続いて、0.1mgのFG beads-Protein G beads(多摩川精機)に上記のタンパク質-血清IgG反応液240μLを添加し、分散させた。続いて、ローターで攪拌しながら4で2時間インキュベーションし、ビーズとIgGとの結合反応を行った。

【0113】

続いて、磁気分離を行い、上清を除去した後に、200μLの150mM KClバッファー(150mM KCl、20mM HEPES-NaOH、1mM MgCl₂、0.2mM CaCl₂、0.2mM EDTA、10%(v/v)グリセロール、0.1%NP-40、0.2mM PMSF)で計3回ビーズを洗浄した。

【0114】

続いて、40μLの1xDye(4xDye:0.25M Tris-HCl、8%DSS、40%グリセロール、20%2-メルカプトエタノール、0.002%BPB)を

10

20

30

40

50

加えて分散させた後に、98で5分間インキュベーションした。

【0115】

続いて、室温で磁気分離を行い、上清を回収し目的タンパク質を含む試料とした。続いて、免疫沈降で得られた自己抗原タンパク質試料を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供し、銀染色を行って自己抗原タンパク質を含むバンドを確認して切り出し、LC-MS/MS による解析を行った。

【0116】

図15(b)はSDS-PAGE及び銀染色の結果を示す写真である。図15(b)中、レーン1は分子量マーカーであり、レーン2はマウス後根神経節由来タンパク質抽出液であり、レーン3は陰性対照の免疫沈降試料であり、レーン4は自己抗原タンパク質を含む免疫沈降試料である。矢印は、220kDaより少し大きな自己抗原タンパク質のバンドを示す。
10

【0117】

図15(c)は図15(b)と同様の試料をウエスタンプロットティングに供し、患者由來自己抗体で検出した結果を示す写真である。図15(c)中、レーン1は分子量マーカーであり、レーン2はマウス後根神経節由来タンパク質抽出液であり、レーン3は陰性対照の免疫沈降試料であり、レーン4は自己抗原タンパク質を含む免疫沈降試料である。矢印は、220kDaより少し大きな自己抗原タンパク質のバンドを示す。

【0118】

続いて、LC-MS/MS による解析結果を解析ソフトで解析し、自己抗原候補タンパク質を同定した。その結果、「RTITVAGERF」(配列番号1)のアミノ酸配列を有するペプチド断片が検出された。このペプチド断片は、p le x i n D1タンパク質のアミノ酸配列の第1087～1096番目のアミノ酸と一致した。
20

【0119】

P le x i n D1は約212kDaの理論的分子量を有する。これは、ウエスタンプロットティングにより検出されたバンドの分子量とほぼ一致した。P le x i n D1は、神経組織における最も分子量の大きい糖タンパク質の1つである。しかしながら、ヒト後根神経節及び脊髄におけるP le x i n D1の発現は報告されていない。

【0120】

[実験例8]

(ヒト後根神経節及び脊髄の組織切片におけるP le x i n D1の発現の検討)
30

死亡したドナー由来のヒト腰椎後根神経節及び脊髄の組織切片を調製した。続いて、各組織切片を免疫染色し、蛍光顕微鏡(型式「BZ-X700」、キーエンス社)で観察した。

【0121】

図16(a)は、ヒト後根神経節の組織切片を抗ヒトP le x i n D1抗体(ヤギポリクローナル抗体、R&Dシステムズ社)で染色した結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

【0122】

図16(b)は、図16(a)と同一の視野において、有髄線維である、A 線維型後根神経節ニューロン及びA 線維型後根神経節ニューロンのマーカーである、neuro filament heavy chain(NFH)に対する抗体(抗ヒトリン酸化NFH抗体、型式「SMI31」、マウスモノクローナル抗体、Covance社；及び、抗ヒト非リン酸化NFH抗体、型式「SMI32」、マウスモノクローナル抗体、Covance社)で染色した結果を示す蛍光顕微鏡写真である。また、DAPIで核を染色した。
40

【0123】

図16(c)は、図16(a)及び図16(b)の写真をマージしたものである。スケールバーは50 μmを示す。

【0124】

図16(d)は、ヒト脊髄の組織切片を抗ヒトP le x i n D1抗体(ヤギポリクロ

ーナル抗体、R & D システムズ社)で染色した結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

【0125】

図16(e)は、図16(d)と同一の視野において、抗ヒトN F H抗体(抗ヒトリン酸化N F H抗体、型式「SMI31」、マウスモノクローナル抗体、Covance社；及び、抗ヒト非リン酸化N F H抗体、型式「SMI32」、マウスモノクローナル抗体、Covance社)で染色した結果を示す蛍光顕微鏡写真である。また、D A P Iで核を染色した。

【0126】

図16(f)は、図16(d)及び図16(e)の写真をマージしたものである。スケールバーは100 μmを示す。

10

【0127】

その結果、Plexin D1は、N F H陽性の有髄後根神経節ニューロンとは全く共局在しないことが明らかとなった。また、脊髄の背側において、N F Hは後柱(P C)及び後角深層(D D H；脊髄後角第I I I層～第V層)に主に存在しており、後角浅層(S D H)ではより少なく存在していた。

【0128】

以上の結果は、Plexin D1が無髄後根神経節ニューロン及び後角浅層に位置するその軸索末端に存在していることを示し、この局在パターンは患者由来の自己抗体の結合パターンに類似していた。

【0129】

[実験例9]

(患者由来の自己抗体のPlexin D1に対する反応性の検討1)

20

《siRNAによるPLXND1遺伝子発現の抑制》

Plexin D1を発現するHeLa細胞(ヒト子宮頸癌由来細胞株)に、Plexin D1タンパク質をコードする遺伝子である、PLXND1遺伝子に対するsiRNA(型式「s23094」、サーモフィッシューサイエンティフィック社)及び対照siRNA(型式「#4390843」、サーモフィッシューサイエンティフィック社)を導入し、定量的リアルタイムPCRによりPLXND1遺伝子のmRNA発現量を定量した。また、ウエスタンブロッティングによりタンパク質レベルでPlexin D1タンパク質の発現量を検討した。

30

【0130】

定量的リアルタイムPCRにおいては、陽性コントロールとしてKIF11遺伝子のmRNAを増幅した。また、リファレンス遺伝子としてGAPDH遺伝子のmRNAを増幅した。定量的リアルタイムPCRにはFast SYBR Green Master Mix(サーモフィッシューサイエンティフィック社)を用い、StepOnePlusリアルタイムPCRシステム(サーモフィッシューサイエンティフィック社)でPCRを実施した。

【0131】

PLXND1特異的プライマーとして、PLXND1_Fwd(5'-AATGGCGGAACATCGTCAAG-3'、配列番号2)及びPLXND1_Rev(5'-CGAGACTGGTTGGAAACACAG-3'、配列番号3)を用いた。また、KIF11特異的プライマーとして、KIF11_Fwd(5'-TGTTGATGCCGTAAACAAG-3'、配列番号4)及びKIF11_Rev(5'-CTGAGTGGAACGACTAGAGT-3'、配列番号5)を用いた。また、GAPDH特異的プライマーとして、GAPDH_Fwd(5'-ACCCACTCCTCACCTTGAC-3'、配列番号6)及びGAPDH_Rev(5'-TGTTGCTGTAGCAAATTGTT-3'、配列番号7)を用いた。

40

【0132】

図17(a)は定量的リアルタイムPCRの結果を示すグラフである。図17(a)中、「Scrambled siRNA」は対照siRNAを導入した結果であることを示し、「PLXND1 siRNA」はPLXND1遺伝子に対するsiRNAを導入した結果であることを示す。その結果、PLXND1遺伝子に対するsiRNAの導入により

50

、PLXND1遺伝子のmRNA発現量を平均87%低下させることができたことが確認された。

【0133】

また、図17(b)はウエスタンブロッティングによりPlexin D1タンパク質の発現を検討した結果を示す写真である。ローディングコントロールとしてアクチントンパク質を検出した。

【0134】

図17(b)中、「Scramble siRNA」は対照siRNAを導入した結果であることを示し、「PLXND1 siRNA」はPLXND1遺伝子に対するsiRNAを導入した結果であることを示す。その結果、PLXND1遺伝子に対するsiRNAの導入により、Plexin D1タンパク質の発現量を82%低下させることができたことが確認された。
10

【0135】

《自己抗体の反応性の検討》

HeLa細胞にPLXND1遺伝子に対するsiRNAを導入し、神経障害性疼痛を有する患者由来の自己抗体を反応させた。また、比較のために、siRNAを導入しなかったHeLa細胞も用意した。

【0136】

まず、BioCoatコラーゲンIカルチャースライド8ウェル(コーニング社)に、1ウェル当たり終濃度7.5nMのsiRNAと0.45μLのLipofectamine RNAiMAX(インビトロジェン社)を含む調製液を加えてウェル表面全体を覆い、15分間室温で静置した。
20

【0137】

続いて、HeLa細胞を 8×10^3 個/ウェルで播種し、37、5%CO₂の条件下で培養し、リバーストランスフェクションを行った。続いて、48時間後に培地交換を行った。続いて、リバーストランスフェクションから96時間後に培地を除去し、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(和光純薬)を加えて室温で10分間静置した後、氷冷PBS(-)で細胞を3回洗浄した。

【0138】

続いて、各ウェルに0.1%Tween20(シグマ-アルドリッヂ社)を含むPBS(-)を加え、10分間室温静置して膜透過処理を行った後、PBS(-)で2回洗浄した。続いて、各ウェルに1%ゼラチンを含むPBS(-)を加え室温で1時間静置してブロッキングした。
30

【0139】

続いて、1%ウシ血清アルブミン(BSA)を含むPBS(-)中に1,000倍希釈した患者由来の血清IgG、及び、200倍希釈した抗Plexin D1抗体(ヤギポリクローナル抗体、R&Dシステムズ社)を含む、1次抗体反応液を加えて室温で1時間静置し1次抗体反応を行った後、PBS(-)で3回洗浄した。また、比較のために、患者由来の血清IgGの代わりに対照の血清IgGを反応させた試料も用意した。

【0140】

続いて、1,000倍希釈したAllexa Fluor 488標識ヤギ抗ヒトIgG(H+L)抗体(サーモフィッシュ・サイエンティフィック社)、1,000倍希釈したAllexa Fluor 594標識ウサギ抗ヤギIgG(H+L)抗体(サーモフィッシュ・サイエンティフィック社)、及び0.1μg/mLのDAPIを含む、2次抗体反応液を加えて室温で1時間、遮光下で静置し2次抗体反応を行った後、PBS(-)で3回洗浄した。続いて、蛍光顕微鏡(型式「BZ-X710」、キーエンス社)で観察した。

【0141】

図18(a)はsiRNAを導入していないHeLa細胞に結合した対照IgGを検出した結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。図18(b)は、図18(a)と同一の
50

視野において、抗 P le x i n D 1 抗体の結合を検出した結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図 18 (c) は、図 18 (a) 及び図 18 (b) の写真をマージしたものである。スケールバーは 100 μm を示す。

【 0142 】

また、図 18 (d) は s i R N A を導入していない H e L a 細胞に結合した患者由来自己抗体を検出した結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。図 18 (e) は、図 18 (d) と同一の視野において、抗 P le x i n D 1 抗体の結合を検出した結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図 18 (f) は、図 18 (d) 及び図 18 (e) の写真をマージしたものである。スケールバーは 100 μm を示す。

【 0143 】

その結果、患者由来自己抗体は H e L a 細胞に結合したのに対し、対照 I g G は H e L a 細胞に結合しないことが明らかとなった。また、患者由来自己抗体は、抗 P le x i n D 1 抗体と共に局在したことが明らかとなった。

【 0144 】

図 19 (a) は対照 s i R N A を導入した H e L a 細胞を明視野観察した顕微鏡写真である。図 19 (b) は、図 19 (a) と同一の視野において、患者由来自己抗体（症例 5 ）の結合を検出した結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図 19 (c) は、図 19 (a) と同一の視野において、抗 P le x i n D 1 抗体の結合を検出した結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図 19 (d) は、図 19 (a) 、図 19 (b) 及び図 19 (c) の写真をマージしたものである。スケールバーは 25 μm を示す。

20 【 0145 】

図 19 (e) は P L X N D 1 遺伝子に対する s i R N A を導入した H e L a 細胞を明視野観察した顕微鏡写真である。図 19 (f) は、図 19 (e) と同一の視野において、患者由来自己抗体（症例 5 ）の結合を検出した結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図 19 (g) は、図 19 (e) と同一の視野において、抗 P le x i n D 1 抗体の結合を検出した結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図 19 (h) は、図 19 (e) 、図 19 (f) 及び図 19 (g) の写真をマージしたものである。スケールバーは 25 μm を示す。

【 0146 】

その結果、 P L X N D 1 遺伝子に対する s i R N A を導入することにより、患者由来自己抗体の H e L a 細胞に対する結合が顕著に減少したことが明らかとなった。この結果は、神経障害性疼痛を有する患者由来自己抗体が認識する自己抗原が P le x i n D 1 であることを示す。

30 【 0147 】

[実験例 10]

(患者由來の自己抗体の P le x i n D 1 に対する反応性の検討 2)

マウス後根神経節の組織切片に反応する自己抗体を含んでいた 11 名の患者由來の血清を用いて、実験例 9 と同様の検討を行った。

【 0148 】

図 20 (a) は、対照 s i R N A を導入した H e L a 細胞に結合した患者由来自己抗体（症例 5 ）を検出した結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。図 20 (a) では、 D A P I で核が染色されている。スケールバーは 50 μm を示す。図 20 (b) は、 P L X N D 1 遺伝子に対する s i R N A を導入した H e L a 細胞に結合した患者由来自己抗体（症例 5 ）を検出した結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。図 20 (b) においても、 D A P I で核が染色されている。スケールバーは 50 μm を示す。

40 【 0149 】

図 20 (c) は、図 20 (a) 及び (b) の結果を数値化したグラフである。その結果、 P L X N D 1 遺伝子に対する s i R N A を導入した H e L a 細胞では、症例 5 の患者由来自己抗体の結合が有意に減少したことが明らかとなった。

【 0150 】

同様の検討を、症例 5 以外の患者由来自己抗体についても行った。その結果、 11 名の

10

20

30

40

50

患者由来自己抗体のうち 9 名の患者由来自己抗体について同様の結果が得られた。この結果は、神経障害性疼痛を有する患者由来自己抗体が認識する自己抗原が P le x i n D 1 であることを更に支持するものである。

【 0 1 5 1 】

[実験例 1 1]

(患者由来の自己抗体の P le x i n D 1 に対する反応性の検討 3)

免疫吸収実験を行い、患者由来の自己抗体の P le x i n D 1 に対する反応性を検討した。具体的には、患者由来自己抗体に、 P L X N D 1 遺伝子の細胞外ドメイン部分を発現させた組換えヒト P le x i n D 1 タンパク質（型式「 4 1 6 0 - P D 」、 R & D システムズ社、アミノ酸配列を配列番号 8 に示す。）を混合し、プレインキュベートした。続いて、マウス後根神経節の組織切片及びマウス脊髄の組織切片を用いた蛍光間接抗体法を行った。

【 0 1 5 2 】

図 2 1 (a) は、患者由来自己抗体（症例 5 ）を、マウス後根神経節の組織切片に反応させた結果を示す蛍光顕微鏡写真である。スケールバーは 5 0 μ m を示す。

【 0 1 5 3 】

図 2 1 (b) は、 0 . 5 μ g / mL の P le x i n D 1 タンパク質とプレインキュベートした患者由来自己抗体（症例 5 ）をマウス後根神経節の組織切片に反応させた結果を示す蛍光顕微鏡写真である。スケールバーは 5 0 μ m を示す。

【 0 1 5 4 】

図 2 1 (c) は、 2 μ g / mL の P le x i n D 1 タンパク質とプレインキュベートした患者由来自己抗体（症例 5 ）をマウス後根神経節の組織切片に反応させた結果を示す蛍光顕微鏡写真である。スケールバーは 5 0 μ m を示す。

【 0 1 5 5 】

図 2 1 (d) は、患者由来自己抗体（症例 5 ）を、マウス脊髄の組織切片に反応させた結果を示す蛍光顕微鏡写真である。スケールバーは 5 0 μ m を示す。矢印の部分に患者由来自己抗体の結合が認められた。

【 0 1 5 6 】

図 2 1 (e) は、 0 . 5 μ g / mL の P le x i n D 1 タンパク質とプレインキュベートした患者由来自己抗体（症例 5 ）をマウス脊髄の組織切片に反応させた結果を示す蛍光顕微鏡写真である。スケールバーは 5 0 μ m を示す。また、図 2 1 (d) と同じ位置に矢印を示す。

【 0 1 5 7 】

図 2 1 (f) は、 2 μ g / mL の P le x i n D 1 タンパク質とプレインキュベートした患者由来自己抗体（症例 5 ）をマウス脊髄の組織切片に反応させた結果を示す蛍光顕微鏡写真である。スケールバーは 5 0 μ m を示す。また、図 2 1 (d) と同じ位置に矢印を示す。

【 0 1 5 8 】

その結果、 P le x i n D 1 タンパク質とプレインキュベートすることにより、 P le x i n D 1 タンパク質の容量依存的に患者由来自己抗体（症例 5 ）の後根神経節ニューロンに対する染色性が低下したことが確認された。同様の結果が 1 1 名の患者由来自己抗体の全てで認められた。

【 0 1 5 9 】

この結果は、神経障害性疼痛を有する患者由来の自己抗体が、 P le x i n D 1 タンパク質に対する特異性を有すること、及び病原性を有することを更に支持するものである。

【 0 1 6 0 】

[実験例 1 2]

(患者由来の自己抗体の P le x i n D 1 に対する反応性の検討 4)

免疫吸収実験を行い、患者由来の自己抗体の P le x i n D 1 に対する反応性を検討

10

20

30

40

50

した。具体的には、患者由来自己抗体に、PLXND1遺伝子の細胞外ドメイン部分を発現させた組換えヒトPlexin D1タンパク質（型式「4160-PD」、R&Dシステムズ社、アミノ酸配列を配列番号8に示す。）を混合し、プレインキュベートした。続いて、実験例7と同様にして調製したマウス後根神経節由来タンパク質抽出液をウエスタンプロットティングに供し、患者由来自己抗体で検出した。

【0161】

図22(a)は、患者由来自己抗体（症例1）を反応させて自己抗原を検出した結果を示す写真である。図22(b)は、0.5 μg/mLのPlexin D1タンパク質とプレインキュベートした患者由来自己抗体（症例1）を反応させて自己抗原を検出した結果を示す写真である。

10

【0162】

図22(c)は、患者由来自己抗体（症例2）を反応させて自己抗原を検出した結果を示す写真である。図22(d)は、0.5 μg/mLのPlexin D1タンパク質とプレインキュベートした患者由来自己抗体（症例2）を反応させて自己抗原を検出した結果を示す写真である。

【0163】

その結果、Plexin D1タンパク質とプレインキュベートすることにより、220 kDa付近のバンドが消失したことが確認された。同様の結果が11名の患者由来自己抗体の全てで認められた。

20

【0164】

この結果は、神経障害性疼痛を有する患者由来の自己抗体が、Plexin D1タンパク質に対する特異性を有すること、及び病原性を有することを更に支持するものである。

【0165】

〔実験例13〕

（患者由来の自己抗体のPlexin D1に対する反応性の検討5）

組換えヒトPlexin D1タンパク質をウエスタンプロットティングに供し、患者由来自己抗体で検出することにより、患者由来の自己抗体のPlexin D1に対する反応性を検討した。

30

【0166】

組換えヒトPlexin D1タンパク質として、PLXND1遺伝子の細胞外ドメイン部分を発現させたタンパク質（型式「4160-PD」、R&Dシステムズ社、アミノ酸配列を配列番号8に示す。）を用いた。このタンパク質のバンドサイズは165 kDa ~ 175 kDaと予測された。

【0167】

図23は、蛍光間接抗体法による結果が陽性であった神経障害性疼痛患者由来自己抗体（症例1、2、5）、蛍光間接抗体法による結果が陰性であった神経障害性疼痛患者由来血清、健常人由来血清、及び、市販の抗ヒトPlexin D1抗体を用いて、組換えヒトPlexin D1タンパク質を検出した結果を示す写真である。

40

【0168】

その結果、蛍光間接抗体法による結果が陽性であった神経障害性疼痛患者由来自己抗体、及び、市販の抗ヒトPlexin D1抗体により、150 kDaと250 kDaの間のサイズである単一のバンドが検出されたことが明らかとなった。

【0169】

一方、蛍光間接抗体法による結果が陰性であった神経障害性疼痛患者由来血清、及び、健常人由来血清では、バンドが検出されなかった。

【0170】

以上の結果は、蛍光間接抗体法による結果が陽性であった神経障害性疼痛患者由来自己抗体が結合したタンパク質がPlexin D1であることを更に支持するものである。

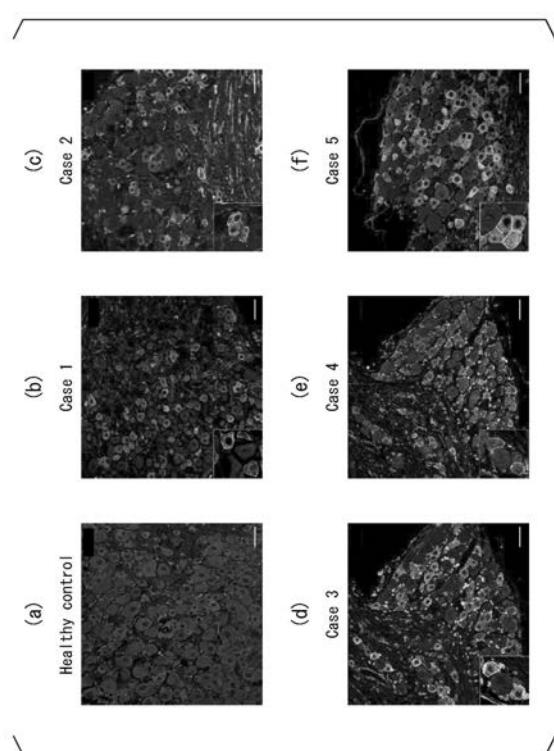
50

【産業上の利用可能性】

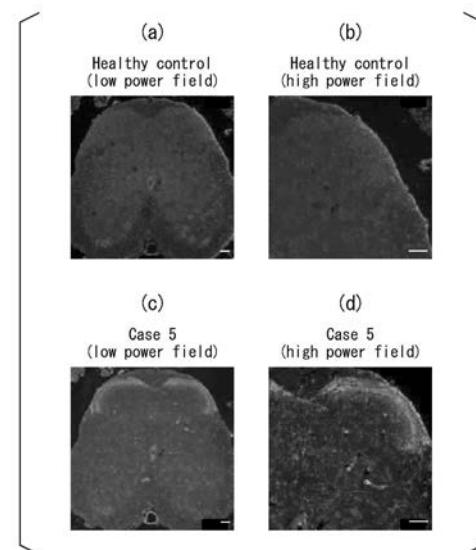
【 0 1 7 1 】

本発明により、神経障害性疼痛を検出する技術を提供することができる。

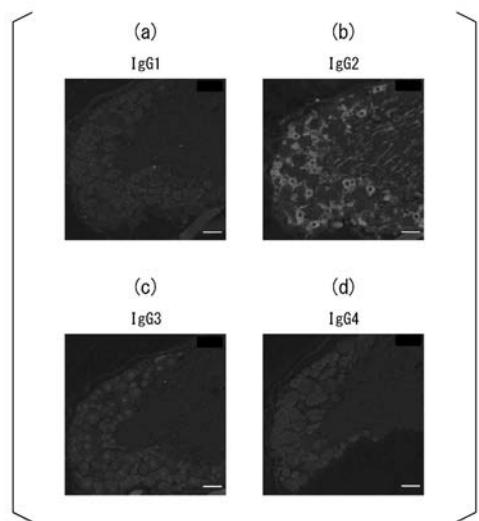
【図1】



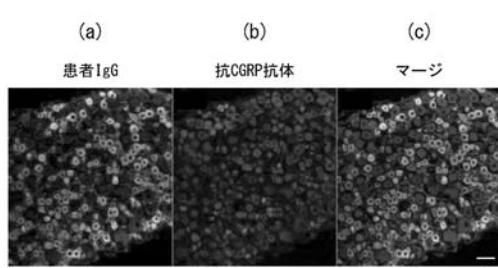
【図2】



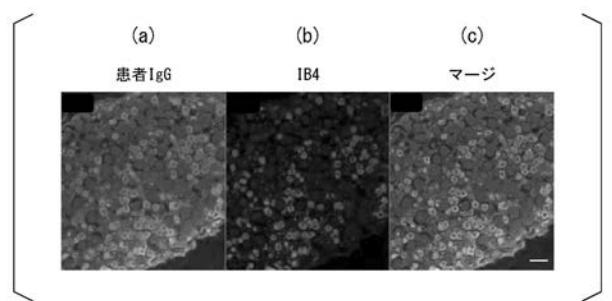
【図3】



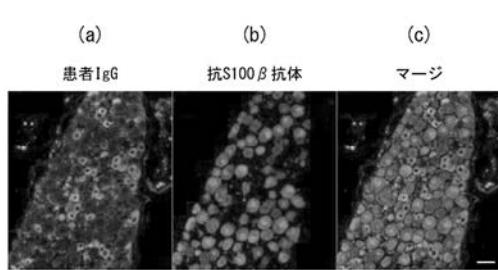
【図5】



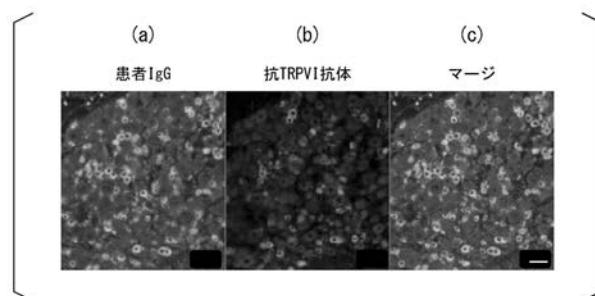
【図4】



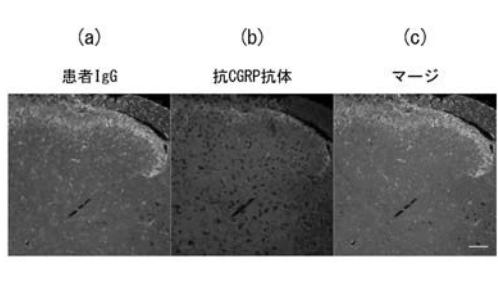
【図6】



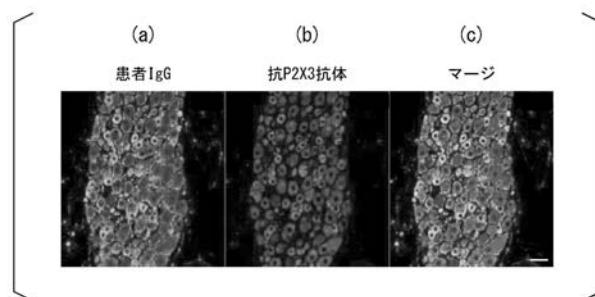
【図7】



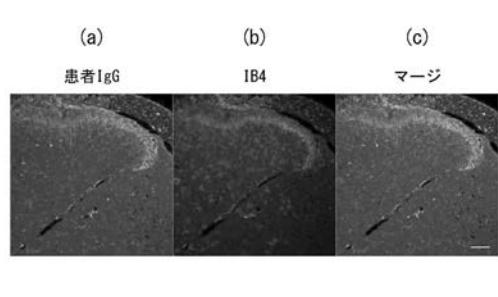
【図9】



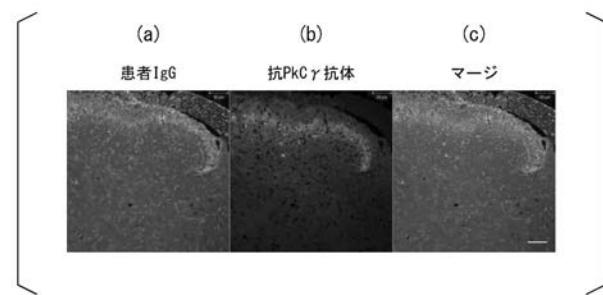
【図8】



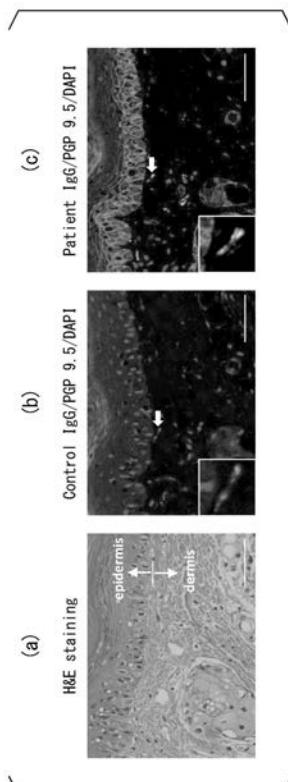
【図10】



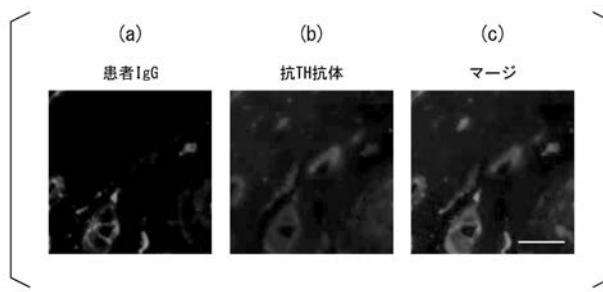
【図 1 1】



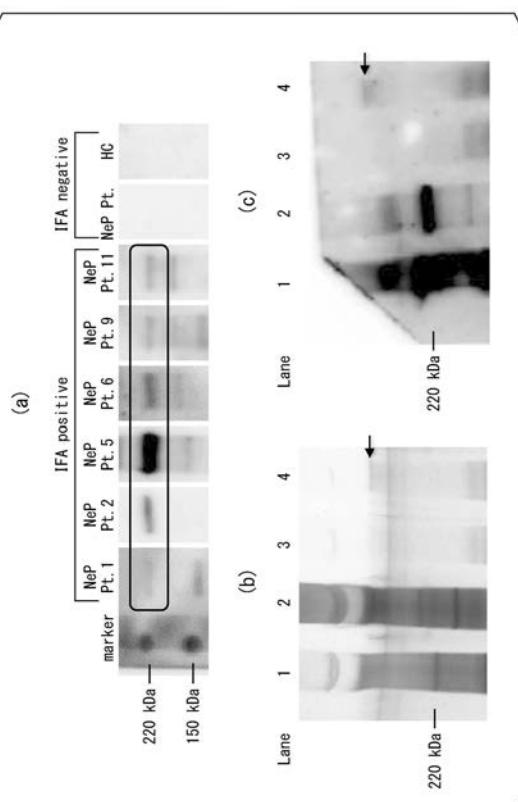
【図 1 2】



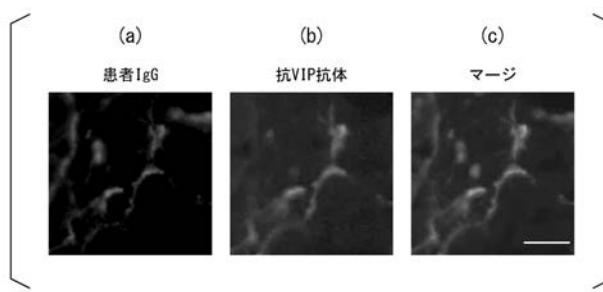
【図 1 3】



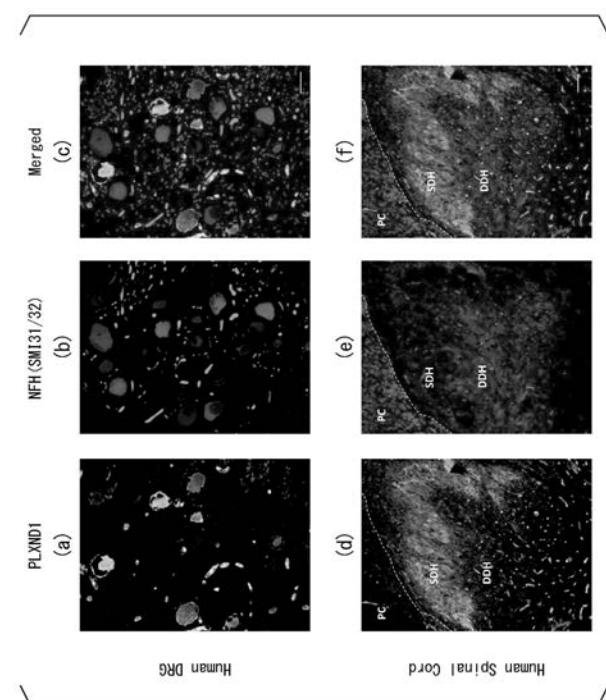
【図 1 5】



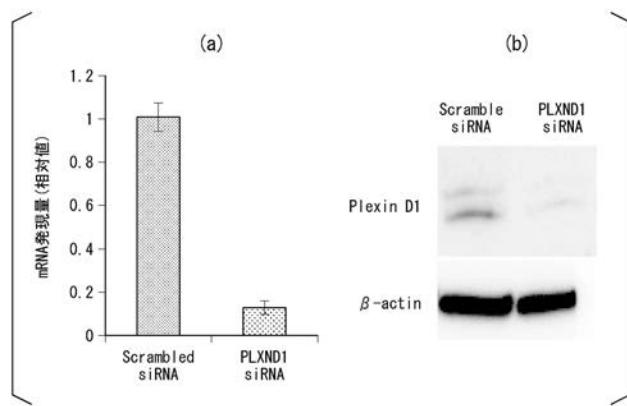
【図 1 4】



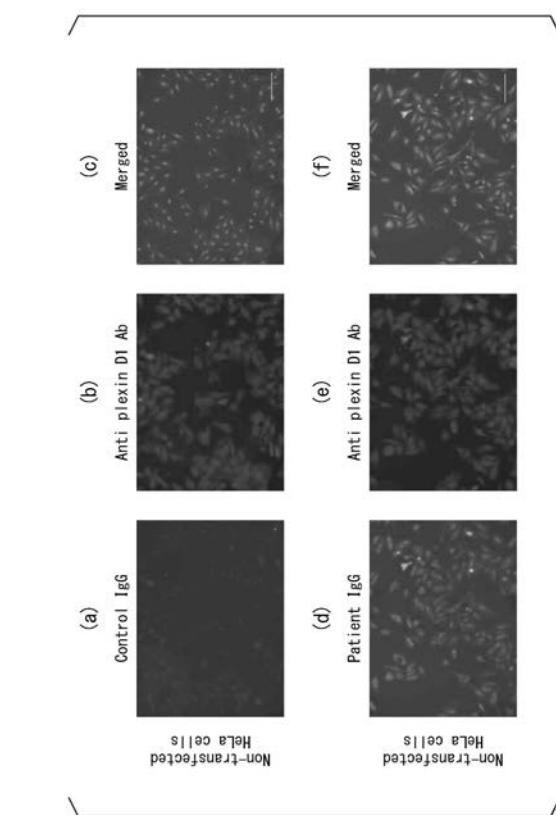
【図16】



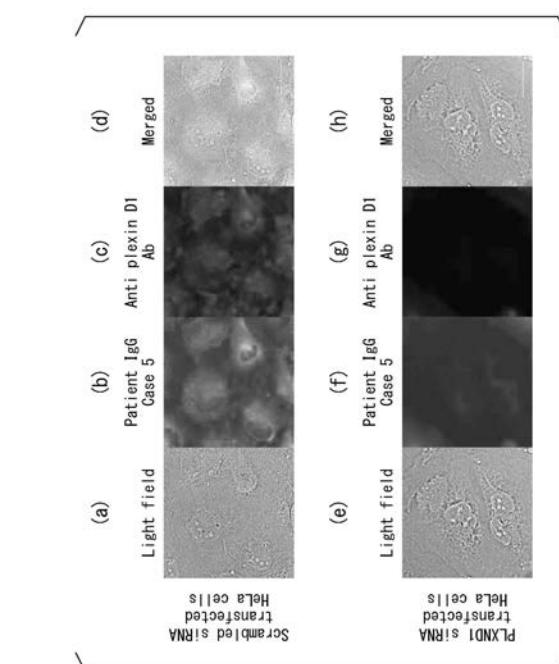
【図17】



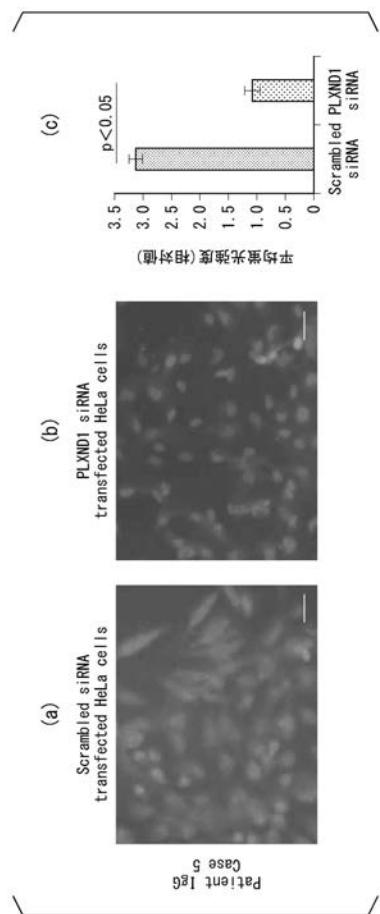
【図18】



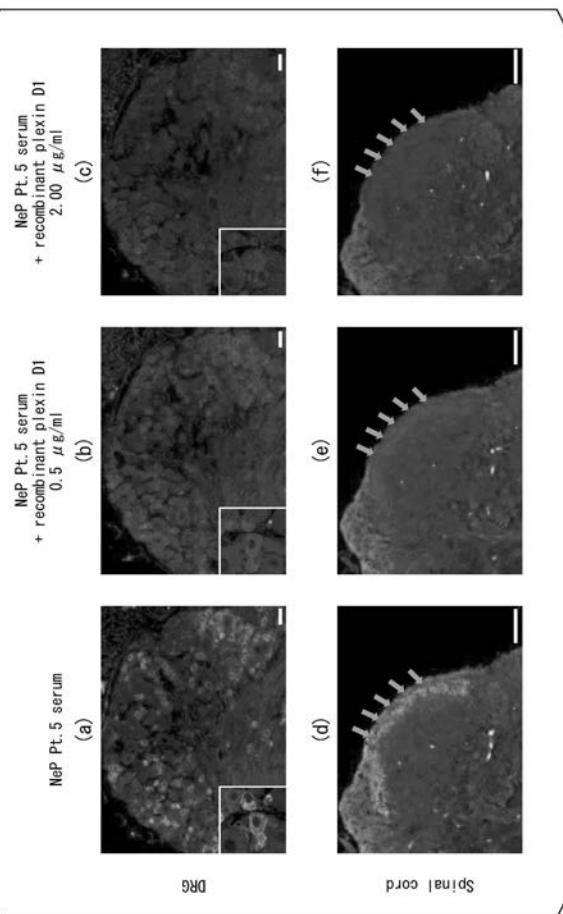
【図19】



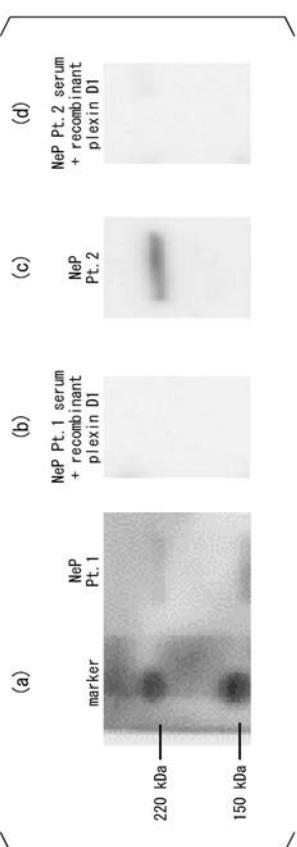
【図20】



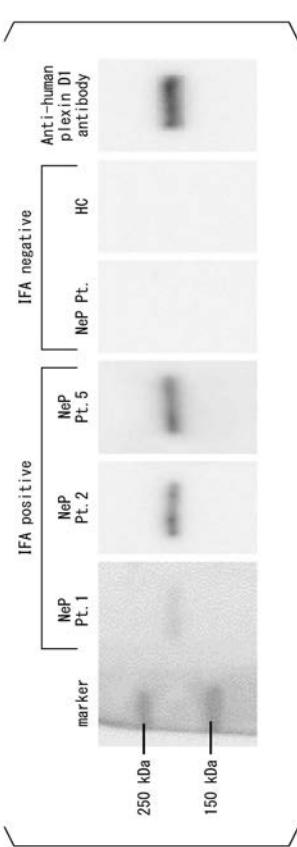
【図21】



【図22】



【図23】



【配列表】

2018190365000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2018/015200
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.C1. G01N33/53 (2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.C1. G01N33/53		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018 Registered utility model specifications of Japan 1996-2018 Published registered utility model applications of Japan 1994-2018		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2013-524220 A (BANYAN BIOMARKERS, INC.) 17 June 2013, claims, paragraph [0045] & US 2013/0029362 A1 (claims, paragraph [0054]) & WO 2011/123844 A2 & EP 2553466 A2	11-14 1-10, 15-16
A	JP 2013-504331 A (BANYAN BIOMARKERS, INC.) 07 February 2013, claims, examples & US 2013/0022982 A1 (claims, examples) & WO 2011/032155 A2 & EP 2478360 A2	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 02 July 2018 (02.07.2018)	Date of mailing of the international search report 17 July 2018 (17.07.2018)	
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2018/015200
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2007-518068 A (MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH) 05 July 2007, claims, paragraph [0015] & US 2005/0112116 A1 (claims, paragraph [0019]) & WO 2005/051178 A2 & EP 1700120 A2	1-16
A	JP 2013-47259 A (ZYMOGENETICS, INC.) 07 March 2013, entire text & US 2007/0160610 A1 (entire text) & WO 2007/133816 A2 & EP 1991581 A2	1-16
A	JP 2006-519983 A (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.) 31 August 2006, entire text & US 2004/0204359 A1 (entire text) & WO 2004/071411 A2 & EP 1589985 A2	1-16
A	JP 2009-506985 A (STICHTING KATHOLIEKE UNIVERSITEIT) 19 February 2009, entire text & US 2010/0119445 A1 & WO 2007/009816 A2 & EP 1907420 A2	1-16
A	EP 2816354 A1 (MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER) 24 December 2014, entire text & WO 2014/202707 A1	1-16
A	CHOI, Y. et al., "Dynamic control of beta-1 integrin adhesion by the plexinD1-sema3E axis", PNAS, 07 January 2014, vol. 111, no. 1, 379-384	1-16
P, X	FUJII, T. et al., "Anti-plexin D1 autoantibody-associated neuropathic pain syndrome is responsive to immunotherapies", Journal of the Neurological Sciences, 15 October 2017, vol. 381, supplement, 78-79	1-16
P, X	藤井 敏之 ほか, Plexin D1 は小径無髓後根神経節神経細胞を標的とした免疫介在性神経障害疼痛の責任自己抗原である, Peripheral Nerve, 01 December 2017, 28(2), 279, non-official translation (FUJII, Takayuki et al, "Plexin D1 is the responsible autoantigen for immune-mediated neuropathic pain, in which small-diameter unmyelinated dorsal root ganglion neurons are targeted")	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/015200

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(Invention 1) Claims 1-10 and 15-16, and claims 11-14 (parts thereof)

The inventions of claims 1-10 and 15-16, and the parts of claims 11-14 in which "a detection reagent of unmyelinated dorsal root ganglion neurons" is selected have the special technical feature of "using an autoantibody, as a marker of neuropathic pain, with respect to small unmyelinated dorsal root ganglion neurons", and are thus classified as invention 1.

(Invention 2) Claims 11-14 (parts thereof)

The inventions of the parts of claims 11-14 in which "a detection reagent of myelinated dorsal root ganglion neurons" is selected are not dependent on claim 1, and are not substantially identical or equivalent to any of the claims classified as invention 1. Therefore, the inventions of the parts of claims 11-14 in which "the detection reagent of myelinated dorsal root ganglion neurons" is selected cannot be classified as invention 1.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告	国際出願番号 PCT/JP2018/015200		
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl G01N33/53 (2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl G01N33/53			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2018年 日本国実用新案登録公報 1996-2018年 日本国登録実用新案公報 1994-2018年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X A	JP 2013-524220 A (バンヤン・バイオマーカーズ・インコーポレイテッド) 2013.06.17, 特許請求の範囲、段落 0045 & US 2013/0029362 A1(特許請求の範囲、段落 0054) & WO 2011/123844 A2 & EP 2553466 A2	11-14 1-10, 15-16	
A	JP 2013-504331 A (バンヤン・バイオマーカーズ・インコーポレイテッド) 2013.02.07, 特許請求の範囲、実施例 & US 2013/0022982 A1(特許請求の範囲、実施例) & WO 2011/032155 A2 & EP 2478360 A2	1-16	
※ C欄の続きにも文献が列挙されている。		□ パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 02.07.2018	国際調査報告の発送日 17.07.2018		
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 赤坂 祐樹	2J	3316
	電話番号 03-3581-1101 内線 3252		

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2018/015200
C (続き) . 関連すると認められる文献	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	JP 2007-518068 A (マヨ ファウンデーション フォー メディカル エデュケーション アンド リサーチ) 2007.07.05, 特許請求の範囲、段落 0015 & US 2005/0112116 A1(特許請求の範囲、段落 0019) & WO 2005/051178 A2 & EP 1700120 A2	1-16
A	JP 2013-47259 A (ザイモジエネティクス, インコーポレイテッド) 2013.03.07, 全文 & US 2007/0160610 A1(全文) & WO 2007/133816 A2 & EP 1991581 A2	1-16
A	JP 2006-519983 A (ミレニアム・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド) 2006.08.31, 全文 & US 2004/0204359 A1(全文) & WO 2004/071411 A2 & EP 1589985 A2	1-16
A	JP 2009-506985 A (ステイヒティング・カソリーケ・ユニベルシタイト) 2009.02.19, 全文 & US 2010/0119445 A1 & WO 2007/009816 A2 & EP 1907420 A2	1-16
A	EP 2816354 A1 (MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER) 2014.12.24, 全文 & WO 2014/202707 A1	1-16
A	CHOI, Y et al., Dynamic control of beta-1 integrin adhesion by the plexinD1-sema3E axis, PNAS, 2014.01.07, Vol. 111, No. 1, 379-384	1-16
P, X	FUJII, T et al., Anti-plexin D1 autoantibody-associated neuropathic pain syndrome is responsive to immunotherapies, Journal of the Neurological Sciences, 2017.10.15, Vol. 381 supplement, 78-79	1-16
P, X	藤井 敬之 ほか, Plexin D1 は小径無髓後根神経節神経細胞を標的とした免疫介在性神経障害疼痛の責任自己抗原である, Peripheral Nerve, 2017.12.01, 28(2), 279	1-16

国際調査報告	国際出願番号 PCT/JP2018/015200
第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き） <p>法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。 つまり、</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、</p> <p>3. <input checked="" type="checkbox"/> 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。</p>	
第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き） <p>次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。</p> <p>(発明1) 請求項1-10、15-16及び請求項11-14（部分的） 請求項1-10、15-16、及び、請求項11-14のうち、「有髓後根神経節ニューロンの検出薬」を選択した発明は、[神経障害性疼痛マーカーとしての小型無髓後根神経節ニューロンに対する自己抗体の使用]という特別な技術的特徴を有しているので、発明1に区分する。</p> <p>(発明2) 請求項11-14（部分的） 請求項11-14のうち、「有髓後根神経節ニューロンの検出薬」を選択した発明は、請求項1の従属請求項ではなく、発明1に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。したがって、請求項11-14のうち、「有髓後根神経節ニューロンの検出薬」を選択した発明は発明1に区分できない。</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかつた。</p> <p>3. <input checked="" type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。</p> <p>4. <input checked="" type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。</p> <p>追加調査手数料の異議の申立てに関する注意</p> <ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立て手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあつた。 <input checked="" type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつたが、異議申立て手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかつた。 <input checked="" type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付はあつたが、異議申立てはなかつた。 	

フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(72)発明者 藤井 敏之

福岡県福岡市西区元岡 744 国立大学法人九州大学内

(72)発明者 飯沼 今日子

福岡県福岡市西区元岡 744 国立大学法人九州大学内

(72)発明者 山崎 亮

福岡県福岡市西区元岡 744 国立大学法人九州大学内

(72)発明者 土本 大介

福岡県福岡市西区元岡 744 国立大学法人九州大学内

(72)発明者 中別府 雄作

福岡県福岡市西区元岡 744 国立大学法人九州大学内

F ターム(参考) 2G045 AA24 AA25 BA14 BB25 CB01 DA36 DA37 DA44

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	神经性疼痛标志物及其用途		
公开(公告)号	JPWO2018190365A1	公开(公告)日	2020-05-14
申请号	JP2019512547	申请日	2018-04-11
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人九州大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人九州大学		
[标]发明人	吉良潤一 藤井敬之 山崎亮 土本大介 中別府雄作		
发明人	吉良潤一 藤井敬之 飯沼今日子 山崎亮 土本大介 中別府雄作		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48		
CPC分类号	G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.N G01N33/53.Y G01N33/48.P		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA25 2G045/BA14 2G045/BB25 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA44		
代理人(译)	塔奈澄夫 饭田正人		
优先权	62/484406 2017-04-12 US		
外部链接	Espacenet		

(19)日本国特許庁(JP)	再公表特許(A1)	(11)国際公開番号 WO2018/190365
発行日 令和2年5月14日 (2020.5.14)		(43)国際公開日 平成30年10月18日 (2018.10.18)
(51)Int.Cl. G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 33/48 (2006.01)	F I G O I N 33/53 Z N A N G O I N 33/53 Y G O I N 33/48 P	テーマコード (参考) 2 G O 4 5
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁)
(21)出願番号 特願2019-512547 (P2019-512547) (22)国際出願番号 PCT/JP2018/015200 (23)国際出願日 平成30年4月11日 (2018.4.11) (31)優先権主張番号 62/484,406 (32)優先日 平成29年4月12日 (2017.4.12) (33)優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	(71)出願人 国立大学法人九州大学 福岡県福岡市西区元岡7 4 4 (74)代理人 弁理士 藤井 澄雄 弁理士 松沼 美史 (74)代理人 弁理士 及川 周 (74)代理人 弁理士 板田 雅人 (72)発明者 吉良 潤一 福岡県福岡市西区元岡7 4 4 国立大学法人九州大学内	
		最終頁に続く
(54)【発明の名称】神経障害性疼痛マーカー及びその使用		