

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6618107号
(P6618107)

(45) 発行日 令和1年12月11日(2019.12.11)

(24) 登録日 令和1年11月22日(2019.11.22)

(51) Int.Cl.			F I		
GO 1 N	33/564	(2006.01)	GO 1 N	33/564	Z
GO 1 N	33/543	(2006.01)	GO 1 N	33/543	5 4 5 A
GO 1 N	33/53	(2006.01)	GO 1 N	33/53	N
C 1 2 N	15/00	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A
C O 7 K	14/47	(2006.01)	C O 7 K	14/47	

請求項の数 8 (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2015-106859 (P2015-106859)
 (22) 出願日 平成27年5月26日(2015.5.26)
 (65) 公開番号 特開2016-223774 (P2016-223774A)
 (43) 公開日 平成28年12月28日(2016.12.28)
 審査請求日 平成30年5月9日(2018.5.9)

(73) 特許権者 504139662
 国立大学法人名古屋大学
 愛知県名古屋市千種区不老町1番
 (74) 代理人 100114362
 弁理士 萩野 幹治
 (72) 発明者 相村 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 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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リンパ球性漏斗下垂体後葉炎検査試薬及びその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ラブフィリン3aの590番アミノ酸～615番アミノ酸又はその近傍も含めた580番アミノ酸～625番アミノ酸の部分配列からなり、抗ラブフィリン3a抗体のエピトープを含む、アミノ酸の数が6～30個のペプチドで構成されたリンパ球性漏斗下垂体後葉炎検査試薬。

【請求項2】

前記ペプチドが配列番号4のアミノ酸配列からなる、請求項1に記載の検査試薬。

【請求項3】

前記ペプチドが不溶性支持体に固定化されている、請求項1又は2に記載の検査試薬。

10

【請求項4】

請求項1～3のいずれか一項に記載の検査試薬を含む、リンパ球性漏斗下垂体後葉炎検査キット。

【請求項5】

ELISA用である、請求項4に記載の検査キット。

【請求項6】

以下のステップ(1)及び(2)を含む、リンパ球性漏斗下垂体後葉炎検査法：

(1) 被検者由来の血液、血漿又は血清からなる検体と、請求項1～3のいずれか一項に記載の試薬を接触させるステップ；

(2) ステップ(1)で生ずる免疫複合体を検出するステップであって、抗ラブフィリ

20

ン3a抗体のレベルが高いことが、罹患している疾患がリンパ球性漏斗下垂体後葉炎であることの指標、及びリンパ球性漏斗下垂体後葉炎の発症可能性が高いことの指標となるステップ。

【請求項7】

ステップ(2)で得られた検出値と対照検体の検出値が比較される、請求項6に記載の検査法。

【請求項8】

ステップ(2)で得られた検出値と、同一の被検者から過去に採取された検体中の検出値が比較される、請求項6に記載の検査法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明はリンパ球性漏斗下垂体後葉炎の検査に関する。詳しくは、リンパ球性漏斗下垂体後葉炎検査試薬及びその用途(検査法など)に関する。

【背景技術】

【0002】

リンパ球性漏斗下垂体後葉炎(以下、「LINH」と略称する)の診断は困難な場合があり、確定診断には下垂体の生検が必要であるが侵襲的であるため施行されることは少なく誤診されることがある。これまでに、リンパ球性下垂体炎の非侵襲的な血清を用いた診断マーカーに関し、いくつか報告されているが(非特許文献1~5)、いずれも、感度、特異度がともに優れておらず臨床応用されていない。また、リンパ球性下垂体炎の中でもリンパ球性漏斗下垂体後葉炎(LINH)特異的な診断マーカーについては報告されていなかった。本発明者らは、LINHの診断マーカーの開発を目指して検討し、その成果を報告した(特許文献1)。具体的には、プロテオミックスなどの手法を利用することによってLINH特異的な分子、「ラブフィリン3a」を見出したこと、及びLINH患者特異的に当該分子に対する自己抗体の存在が認められたこと、を報告した。換言すれば、ラブフィリン3aに対する自己抗体(抗ラブフィリン3a抗体)がLINHのバイオマーカーとして有用であり、当該抗体を指標にすれば感度及び特異度の高いLINHの検査が可能であることが明らかになった。従来、極めて侵襲性の高い下垂体の生検しかLINHの診断方法はなかったが、このバイオマーカーを利用することにより、血液検査による診断が可能になると期待される。

20

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】国際公開第2013/080811号パンフレット

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】J Clin Endocrinol Metab. 87(2):752-7, 2002

【非特許文献2】Horm Res. 55(6):288-92, 2001

【非特許文献3】Eur J Endocrinol. 147(6):767-75, 2002

【非特許文献4】J Endocrinol Invest, 30(2):153-62, 2007

【非特許文献5】Clin Endocrinol. 69(2):269-78, 2008

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

ラブフィリン3a抗体を指標としたLINHの検査は画期的なものであり、その臨床応用が多いに期待される。当該検査法の有用性を高め、実用化を進めるためには、感度及び特異度の更なる向上が望まれる。

【課題を解決するための手段】

【0006】

先の報告(特許文献1)では、患者検体中の抗ラブフィリン3a抗体は全長ラブフィリン

50

3aに対する抗体として検出され、抗ラブフィリン3a抗体のエピトープは同定されていない。非特異的な反応（結合）を減らし、検出感度及び特異度を向上させるためには、全長ラブフィリン3aではなく、患者検体中の抗ラブフィリン3a抗体の結合部位、即ちエピトープを含む断片ペプチドを検査試薬に用いることが望まれる。そこで本発明者らは、ラブフィリン3aのエピトープを同定することを目指し、検討することにした。まず、全長ヒトラブフィリン3aリコンビナントタンパク（a.a.1-690）の他に、部分長ヒトラブフィリン3aリコンビナントペプチドを4種類（a.a.1-197、a.a.198-515、a.a.198-690、a.a.516-690）作成し、これらペプチドとLINH患者血清との反応性を調べた。その結果、C2 Bドメインを含むペプチド（a.a.516-690）に高い反応性が認められ、C2 Bドメインにエピトープが存在することが示唆された。そこで、C2 Bドメインの部分配列に対応する、複数のペプチド（平均疎水性値、電荷密度のアルゴリズムなどに基づき抗原部位を評価・推定することで使用する配列を決定した）を合成し、各ペプチドのLINH患者血清に対する反応性を評価した。その結果、a.a.590-615とLINH患者血清との反応が特異的であり、この部位とその近傍を含めた領域にエピトープが存在することが判明した。

10

以下の発明は、主として上記の成果に基づく。

[1] ラブフィリン3aの580番アミノ酸～625番アミノ酸の中の連続する少なくとも6個のアミノ酸を含み、抗ラブフィリン3a抗体が特異的に結合するペプチドを含む、リンパ球性漏斗下垂体後葉炎検査試薬。

[2] 前記ペプチドが、ラブフィリン3aの590番アミノ酸～615番アミノ酸の中の連続する少なくとも6個のアミノ酸を含む、[1]に記載の検査試薬。

20

[3] 前記ペプチドを構成するアミノ酸の数が6～30個である、[1]又は[2]に記載の検査試薬。

[4] 前記ペプチドが配列番号4のアミノ酸配列からなる、[3]に記載の検査試薬。

[5] 前記ペプチドが不溶性支持体に固定化されている、[1]～[4]のいずれか一項に記載の検査試薬。

[6] [1]～[5]のいずれか一項に記載の検査試薬を含む、リンパ球性漏斗下垂体後葉炎検査キット。

[7] ELISA用である、[6]に記載の検査キット。

[8] 以下のステップ(1)～(4)を含む、リンパ球性漏斗下垂体後葉炎検査法：

(1) 被検者由来の検体を用意するステップ；

30

(2) 前記検体と、[1]～[5]のいずれか一項に記載の試薬を接触させるステップ；

(3) ステップ(2)で生ずる免疫複合体を検出するステップ；及び

(4) 検出結果に基づいて、罹患している疾患がリンパ球性漏斗下垂体後葉炎であるか否か、又はリンパ球性漏斗下垂体後葉炎の発症可能性、を判定するステップ。

[9] 抗ラブフィリン3a抗体のレベルが高いことが、罹患している疾患がリンパ球性漏斗下垂体後葉炎であることの指標、及びリンパ球性漏斗下垂体後葉炎の発症可能性が高いことの指標となる、[8]に記載の検査法。

[10] ステップ(3)で得られた検出値と対照検体の検出値との比較に基づきステップ(4)の判定を行う、[8]又は[9]に記載の検査法。

40

[11] ステップ(3)で得られた検出値と、同一の被検者から過去に採取された検体中の検出値との比較に基づきステップ(4)の判定を行う、[8]又は[9]に記載の検査法。

[12] 前記検体が血液、血漿、血清、脳脊髄液又は尿である、[8]～[11]のいずれか一項に記載の検査法。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】 ヒトラブフィリン3aの構造と、作成した部分長ラブフィリン3aの位置。

【図2】 部分長ラブフィリン3aのSDS-PAGEの結果。各部分長ラブフィリン3aの発現が確認された。

50

【図3】ウエスタンブロットの結果。各部分長ラブフィリン3aとLINH患者血清との反応性を検討した。左はSDS-PAGE後に染色したゲル。レーン1～3：全長ラブフィリン3aに対して偽陽性の反応が認められた健常者血清。

【図4】部分長ラブフィリン3a (a.a.516-690) を固相化したプレートを用いたELISAの結果。右のグラフでは、検出値を統計処理して表した。

【図5】抗原部位予測解析に用いたアルゴリズム。それぞれの計算で得られた各アミノ酸に関する数値を特定の判定基準でスコアリングし、その後、スコアの総合点の高いアミノ酸が連続する領域を候補配列として抽出した。

【図6】抗原部位(エピトープ)予測解析によって抽出された候補配列とその特徴。

【図7】ラブフィリン3aの部分ペプチド(a.a.590-615)を固相化したプレートを用いたELISAの結果。C9～C15は健常者血清。

【発明を実施するための形態】

【0008】

1. リンパ球性漏斗下垂体後葉炎(LINH)検査試薬及びキット

本発明の第1の局面はLINHの検査に有用な試薬及びキットに関する。本発明の試薬は、LINH特異的自己抗体(抗ラブフィリン3a抗体)のエピトープの存在位置を明らかにした成果(後述の実施例)に基づき、ラブフィリン3aの580番アミノ酸～625番アミノ酸中の連続する少なくとも6個のアミノ酸を含み、抗ラブフィリン3a抗体が特異的に結合するペプチドを含む。換言すれば、本発明の試薬はLINH特異的自己抗体(抗ラブフィリン3a抗体)のエピトープを含むことによって特徴付けられる。尚、「抗ラブフィリン3a抗体が特異的に結合する」という特徴を備えるか否かは、例えば、LINH陽性検体(例えばLINH患者の血清)との反応性を調べることにより評価できる。

【0009】

ラブフィリン3aは全長690アミノ酸からなり、そのN末端側にはRab結合ドメインが存在し、N末端側にはC2Aドメイン及びC2Bドメインが存在する。ラブフィリン3aのアミノ酸配列及びそれをコードするヌクレオチド配列を配列表の配列番号1及び配列番号2にそれぞれ示す(DEFINITION: Homo sapiens rabphilin 3A homolog (mouse), mRNA (cDNA clone MGC:29559 IMAGE:3510158), complete cds. ACCESSION: BC017259)。また、ラブフィリン3aの580番アミノ酸～625番アミノ酸の配列を配列番号3に示す。

【0010】

本発明の試薬を構成するペプチドは、好ましくは、ラブフィリン3aの590番アミノ酸～615番アミノ酸(配列番号4)中の連続する少なくとも6個のアミノ酸、ラブフィリン3aの580番アミノ酸～615番アミノ酸(配列番号5)中の連続する少なくとも6個のアミノ酸、又はラブフィリン3aの590番アミノ酸～625番アミノ酸(配列番号6)中の連続する少なくとも6個のアミノ酸を含む。具体例を挙げれば、KAKHKTQIKK(配列番号7: 597番アミノ酸～606番アミノ酸)、VKLWLKPDGM(配列番号8: 586番アミノ酸～595番アミノ酸)及びNPEFNEEFFY(配列番号9: 610番アミノ酸～619番アミノ酸)である。尚、590番アミノ酸～615番アミノ酸は、後述の実施例で使用され、LINH患者血清との良好な反応性が認められたペプチド(a.a.590-615)に対応する。

【0011】

本発明の試薬を構成するペプチドの長さ(アミノ酸数)は、LINH患者特異的な自己抗体、即ち、抗ラブフィリン3a抗体が特異的に結合する限り特に限定されないが、例えば、アミノ酸数6個～30個、好ましくはアミノ酸数10個～20個である。

【0012】

本発明の試薬を構成するペプチドは、例えば、公知のペプチド合成法(例えば固相合成法、液相合成法)によって製造することができる。遺伝子工学的手法を用いて本発明のペプチドを調製してもよい。即ち、本発明のペプチドをコードする核酸を適当な宿主細胞に導入し、形質転換体内で発現されたペプチドを回収することにより本発明のペプチドを調製することもできる。回収したペプチドは必要に応じて精製される。回収したペプチドを

10

20

30

40

50

適当な置換反応に供し、所望の修飾ペプチドに変換することもできる。無細胞合成系を用いて、本発明の試薬を構成するペプチドを調製することにしてもよい。無細胞合成系（無細胞転写系、無細胞転写／翻訳系）とは、生細胞を用いるのではなく、生細胞由来の（或いは遺伝子工学的手法で得られた）リボソームや転写・翻訳因子などを用いて、鋳型である核酸（DNAやmRNA）からそれがコードするmRNAや蛋白質をin vitroで合成することをいう。

【0013】

本発明の試薬を構成するペプチドとして標識化されたものを使用すれば、標識量を指標に結合抗体量を直接検出することが可能である。従って、操作が簡便な検査法を構築できる。一方、標識物質を結合させた二次抗体を利用する方法、二次抗体と標識物質を結合させたポリマーを利用する方法など、間接的検出方法を利用することも、検出感度の観点などから好ましい。

【0014】

標識物質の例は、ペルオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ、 α -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ及びグルコース-6-リン酸脱水素酵素などの酵素、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、テトラメチルローダミンイソチオシアネート（TRITC）及びユーロピウムなどの蛍光物質、ルミノール、イソルミノール及びアクリジニウム誘導体などの化学発光物質、NADなどの補酵素、ビオチン、並びに ^{131}I 及び ^{125}I などの放射性物質である。

【0015】

一態様では、本発明の試薬はその用途に応じて固相化されている。固相化に用いる不溶性支持体は特に限定されない。例えばポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂、ナイロン樹脂等の樹脂や、ガラス等の水に不溶性の物質からなる不溶性支持体を用いることができる。不溶性支持体への固定化は物理吸着又は化学吸着によって行うことができる。

【0016】

本発明のキットは主要構成要素として本発明の試薬を含む。検査法を実施する際に使用するその他の試薬（緩衝液、ブロッキング用試薬、酵素の基質、発色試薬など）及び／又は装置ないし器具（容器、反応装置、蛍光リーダーなど）をキットに含めてもよい。尚、通常、本発明のキットには取り扱い説明書が添付される。

【0017】

2. LINH検査法

本発明の第2の局面は上記本発明の試薬の用途に関し、罹患している疾患がLINHであるか否か、又はLINHの発症可能性を検査する方法（以下、「本発明の検査法」とも呼ぶ）を提供する。本発明の検査法によればLINHの鑑別が可能になる（罹患している疾患がLINHであるか否かを判定する場合）。本発明の検査法は、LINHを現在発症しているか否かを判定するための手段として、或いはLINHを将来発症する可能性を判定するための手段としても有用である（LINHの発症可能性を判定する場合）。このように、本発明の検査法はLINHの診断上、有用な情報を与える。本発明の検査法は、例えば、簡便且つ客観的なLINHの確定診断に役立つ。ここでの「鑑別」は、被験者が罹患している疾患がLINHであるか、それとも別の疾患であるかを判定することである。特に、尿崩症の患者がLINHを罹患しているか否かを把握する上で本発明の検査法は有用である。とりわけ、LINHに伴う中枢性尿崩症と、腫瘍性病変に伴う尿崩症とを区別するための手段として本発明の検査法は重要である。

【0018】

本発明の検査法では以下のステップを行う。

- (1) 被検者由来の検体を用意するステップ
- (2) 前記検体と、本発明の試薬を接触させるステップ
- (3) ステップ(2)で生ずる免疫複合体を検出するステップ
- (4) 検出結果に基づいて、罹患している疾患がリンパ球性漏斗下垂体後葉炎であるか

10

20

30

40

50

否か、又はリンパ球性漏斗下垂体後葉炎の発症可能性、を判定するステップ

【0019】

ステップ(1)では被検者由来の検体を用意する。検体としては被検者の血液、血漿、血清、脳脊髄液、尿等を用いることができる。被検者は特に限定されない。即ち、LINHの鑑別が必要な者、LINHの現在又は将来の発症可能性(即ち、LINHを発症しているか否か、LINHを発症している可能性の程度、LINHを将来発症する可能性の程度)の判定が必要な者に対して広く本発明を適用することができる。例えば、中枢性尿崩症の症状を認める者が「LINHの鑑別が必要な者」に該当し得る。また、医師の問診やその他の検査などによってLINHであると診断された患者に対して本発明を適用した場合、バイオマーカー(抗ラプフィリン3a抗体)のレベルという客観的な指標に基づいて当該診断の当否を判定することができる。即ち、本発明の検査法によれば従来の診断を補助或いは裏付ける情報を得ることも可能である。当該情報は、より適切な治療方針の決定に有益であり、治療効果の向上や患者のQOL(Quality of Life、生活の質)の向上を促す。一方、罹患状態のモニターに本発明を利用し、難治化、重篤化、再発等の防止を図ることもできる。

10

【0020】

MRI検査などの画像検査で下垂体茎の肥厚や下垂体の腫大が認められる症例はLINHの罹患リスクが高いと推定され(高リスク者)、好適な被検者である。このような被検者に対してLINHの症状が現れる前に本発明を適用することは、発症の阻止又は遅延或いは早期の治療介入を可能にする。LINHの罹患リスクが高い者を特定する目的にも本発明は有用である。このような特定は、例えば、予防的措置や生活習慣の改善等による発症可能性(罹患可能性)の低下を可能にする。自覚症状がない者など、従来の診断ではLINHであるか否かの判定が不能又は困難な者も本発明の好適な被検者である。尚、健康診断の一項目として本発明を実施することにしてもよい。

20

【0021】

本発明では、LINH特異的なバイオマーカー、即ち抗ラプフィリン3a抗体を検出するため、ステップ(1)で用意した検体と本発明の試薬を接触させる(ステップ(2))ことによって免疫複合体を形成させ(検体中に抗ラプフィリン3a抗体が存在しない場合には免疫複合体は形成されない)、当該免疫複合体を検出する(ステップ(3))。このように本発明の検査法では免疫学的手法を利用して、検体中に存在し得る抗ラプフィリン3a抗体を検出する。免疫学的手法によれば迅速且つ感度のよい検出が可能である。また、操作も簡便である。

30

【0022】

測定法として、ラテックス凝集法、蛍光免疫測定法(FIA法)、酵素免疫測定法(EIA法)、放射免疫測定法(RIA法)、ウエスタンブロット法を例示することができる。好ましい測定法としては、FIA法及びEIA法(ELISA法を含む)を挙げることができる。これらの方法によれば高感度、迅速且つ簡便に検出可能である。FIA法では蛍光標識した抗体を用い、蛍光をシグナルとして免疫複合体を検出する。一方、EIA法では酵素標識した抗体を用い、酵素反応に基づく発色ないし発光をシグナルとして免疫複合体を検出する。

【0023】

ELISA法は検出感度が高いことや特異性が高いこと、定量性に優れること、操作が簡便であること、多検体の同時処理に適することなど、多くの利点を有する。非競合法、競合法のいずれを用いることにしてもよい。ELISA法の詳細については数多くの成書や論文に記載されており、各方法の実験手順や実験条件を設定する際にはそれらを参考にできる。

40

【0024】

プロテインアレイやプロテインチップ等、多数の検体を同時に検出可能な手段を用いることにしてもよい。

【0025】

ステップ(4)では、検出結果に基づいて、罹患している疾患がLINHであるか否かを判定する。別の態様では、検出結果に基づいて、LINHの発症可能性を判定する。精度のよい判定を可能にするため、ステップ(3)で得られた検出値を対照検体(コントロール)の

50

検出値と比較した上で判定を行うとよい。対象検体としては、健常者の検体、腫瘍性病変に伴う尿崩症患者の検体、特発性若しくは二次性中枢性尿崩症患者の検体、他の自己免疫疾患患者の検体などを用いることができる。判定は定性的、定量的のいずれであってもよい。尚、ここでの判定は、その判定基準から明らかな通り、医師や検査技師など専門知識を有する者の判断によらずとも自動的／機械的に行うことができる。

【 0 0 2 6 】

(定性的判定の例 1 : 鑑別)

基準値よりも検出値 (例えば標識量や蛍光量) が高いときに「罹患している疾患はLINHである」と判定し、基準値よりも検出値が低いときに「罹患している疾患はLINH以外である」と判定する。特定の疾患との鑑別を行う場合にあっては、典型的には、基準値よりも検出値が高いときに「罹患している疾患はLINHである」と判定し、基準値よりも検出値が低いときに「罹患している疾患は当該特定の疾患である」と判定する。ここでの「特定の疾患」は、例えば、リンパ球性下垂体前葉炎症、尿崩症を伴うIgG4関連下垂体炎症、尿崩症を伴う腫瘍性病変である (以下の例でも同様) 。

10

【 0 0 2 7 】

(定性的判定の例 2 : 鑑別)

反応性が認められた (陽性の) ときに「罹患している疾患はLINHである」と判定し、反応性が認められない (陰性の) ときに「罹患している疾患はLINH以外である」と判定する。特定の疾患との鑑別を行う場合にあっては、典型的には、反応性が認められた (陽性の) ときに「罹患している疾患はLINHである」と判定し、反応性が認められない (陰性の) ときに「罹患している疾患は当該特定の疾患である」と判定する。

20

【 0 0 2 8 】

(定性的判定の例 3 : 発症可能性)

基準値よりも検出値 (例えば標識量や蛍光量) が高いときに「LINHを発症している可能性が高い」と判定し、基準値よりも検出値が低いときに「LINHを発症していない」又は「LINHを発症していない可能性が高い」と判定する。将来の発症可能性を判定する場合にあっては、基準値よりも検出値が高いときに「LINHを発症する」又は「LINHを発症する可能性が高い」と判定し、基準値よりも検出値が低いときに「LINHを発症しない」又は「LINHを発症しない可能性が高い」と判定する。

30

【 0 0 2 9 】

(定性的判定の例 4 : 発症可能性)

反応性が認められた (陽性の) ときに「LINHを発症している」又は「LINHを発症している可能性が高い」と判定し、反応性が認められない (陰性の) ときに「LINHを発症していない」又は「LINHを発症していない可能性が高い」と判定する。将来の発症可能性を判定する場合にあっては、反応性が認められた (陽性の) ときに「LINHを発症する」又は「LINHを発症する可能性が高い」と判定し、反応性が認められない (陰性の) ときに「LINHを発症しない」又は「LINHを発症しない可能性が高い」と判定する。

【 0 0 3 0 】

(定量的判定の例 1 : 鑑別)

以下に示すように検出値の範囲毎に「罹患している疾患がLINHである可能性 (%) 」を予め設定しておき、検出値から「罹患している疾患がLINHである可能性 (%) 」を判定する。

40

検出値 a ~ b : LINHである可能性は 1 0 % 以下

検出値 b ~ c : LINHである可能性は 1 0 % ~ 3 0 %

検出値 c ~ d : LINHである可能性は 3 0 % ~ 5 0 %

検出値 d ~ e : LINHである可能性は 5 0 % ~ 7 0 %

検出値 e ~ f : LINHである可能性は 7 0 % ~ 9 0 %

【 0 0 3 1 】

(定量的判定の例 2 : 発症可能性)

以下に示すように測定値の範囲毎に発症可能性 (%) を予め設定しておき、測定値から

50

発症可能性 (%) を判定する。

測定値 a ~ b : 発症可能性は 10 % 以下

測定値 b ~ c : 発症可能性は 10 % ~ 30 %

測定値 c ~ d : 発症可能性は 30 % ~ 50 %

測定値 d ~ e : 発症可能性は 50 % ~ 70 %

測定値 e ~ f : 発症可能性は 70 % ~ 90 %

【 0 0 3 2 】

判定区分の数、及び各判定区分に関連付けられるバイオマーカー（抗ラブフィリン3a抗体）のレベル及び判定結果はいずれも上記の例に何らとらわれることなく、予備実験等を通して任意に設定することができる。例えば、所定の閾値を境界としてLINHであるか否かの判定（鑑別）を行う場合やLINHの発症可能性の高低を判定する場合の「閾値」や、LINHであるか否かの判定（鑑別）又はLINHの発症可能性の高低に係る区分に関連づける「バイオマーカーのレベル範囲」は、多数の検体を用いた統計的解析によって決定することができる。

10

【 0 0 3 3 】

本発明の一態様では、同一の被検者について、ある時点で測定されたバイオマーカー（抗ラブフィリン3a抗体）のレベルと、過去に測定されたバイオマーカーのレベルとを比較し、バイオマーカーのレベルの増減の有無及び/又は増減の程度を調べる。その結果得られる、バイオマーカーのレベル変化に関するデータはLINHの発症の有無又は発症可能性をモニターするため、治療効果を把握するため、或いは予後推定に有用な情報となる。具体的には例えば、バイオマーカーレベルの変動を根拠として、前回の検査から今回の検査までの間に発症可能性が高くなった又は低くなった或いは変化がないとの判定を行うことができる。このような評価をLINHの治療と並行して行えば、治療効果の確認が行えることはもとより、LINHの再発の兆候を事前に把握することができる。これによって、より適切な治療方針の決定が可能となる。このように本発明は、治療効果の最大化及び患者のQOL（生活の質）向上に多大な貢献をし得る。

20

【 実施例 】

【 0 0 3 4 】

< 抗ラブフィリン3a抗体のエピトープの探索 >

1 . 部分長ラブフィリン3a (Rabphilin3a) の作成

30

全長ラブフィリン3a (a. a. 1-690) からエピトープ部位を絞り込むため、部分長ラブフィリン3aを4種類 (ラブフィリン3a (a. a. 1-197)、ラブフィリン3a (a. a. 198-690)、ラブフィリン3a (a. a. 198-515)、ラブフィリン3a (a. a. 516-690)) を作成した。各部分長ラブフィリン3aを含むpGEX 6Pベクターを構築し、大腸菌で発現させ、GST融合部分長ラブフィリン3a蛋白を得た (図 1、2)。

【 0 0 3 5 】

2 . 血清収集

LINH患者の血清、特発性中枢性尿崩症患者の血清、脳腫瘍で尿崩症を呈する疾患コントロール症例の血清、及び健常者の血清を常法で収集した。

【 0 0 3 6 】

40

3 . 部分長ラブフィリン3a蛋白と患者血清との反応性

(1) ウエスタンブロット

次に、部分長ラブフィリン3a蛋白をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) で展開し、患者および健常者血清を一次抗体として、部分長ラブフィリン3a蛋白との反応性をウエスタンブロット法で検討した。ウエスタンブロットの結果 (代表例) を図 3 に示す。LINH患者においてGST融合ラブフィリン3a (a. a. 516-690) に対する自己抗体が認められた。一方、全長ラブフィリン3aに対して偽陽性の反応が認められた健常者3名においてはラブフィリン3a (a. a. 516-690) に対する自己抗体が認められなかった (レーン 1 ~ 3)。つまり、LINHに係るエピトープはC2 Bドメインを含むラブフィリン3a (a. a. 516-690) に存在する可能性が高く、またこの部分長をターゲットにした検査法によれば、全長ラブフ

50

イリン3aを用いた場合より特異度が改善されることが期待された。

【0037】

(2) ELISA法の構築と測定

(2-1) 抗原固相化ELISAプレート作成

まず、冷PBSにラブフィリン3a抗原を溶解して抗原水溶液(濃度0.5~10 µg/mL)を作成した。抗原水溶液を100 µL/wellでELISAプレートに分注し、4℃で一晩静置した。抗原水溶液を捨て、ブロッキングバッファーを200 µL/wellでELISAプレートに入れ、4℃で一晩静置した。続いて、ブロッキングバッファーを捨て、実験台の上で十分に乾燥させた後、使用まで4℃で保存した。

【0038】

(2-2) ELISA測定

まず、血清に反応用バッファーを加えて患者血清希釈液を作成した。抗原固相化プレートに、患者血清希釈液を100 µL/wellで添加し、1時間室温で静置し、反応させた。その後、患者血清希釈液を捨て、洗浄バッファーを用いて、ELISAプレートを洗浄した。次に、2次抗体液Anti-Human IgG (κ chain) -HRPをELISAプレートに100 µL/wellずつ添加し、1時間室温で静置した。2次抗体液を捨て、洗浄バッファーを用いてELISAプレートを洗浄した。続いて、4℃反応基質液をELISAプレートに100 µL/wellずつ添加し、30分室温で静置した。反応停止液を100 µL/well添加し、反応を停止させた後、波長450nm(副波長620nm)を測定した。

【0039】

(2-3) ラブフィリン3a(a.a.516-690)抗原固相化ELISAの結果

LINH 9例、健常者5例、腫瘍に伴う尿崩症5例で検討を行った結果、LINH 9例中8例でラブフィリン3a(a.a.516-690)に対する吸光度の上昇が認められた(図4)。また、特発性DIはその中の多くの原因に自己免疫機序としてLINHが関与することが知られているが、3例中2例(2/3)で吸光度の上昇が認められたこと(図4)は、当該2例がLINHの可能性が高いことを示すとともに、本ELISAの有効性を裏づける。以上の結果から、ラブフィリン3a(a.a.516-690)の部分にLINH特異的なエピトープが存在する可能性が高いと考えられた。

【0040】

4. 合成ペプチドを用いたエピトープの探索

(1) 抗原部位予測

全長ラブフィリン3a(配列番号1)において、図5に示したアルゴリズムをもとに、ユーロフィンジェノミクス株式会社のプログラムを用いて抗原部位(エピトープ)予測解析を行った。その結果、いくつかの候補配列が得られた(図6)。

【0041】

(2) 抗原部位予測解析の結果に基づいた合成ペプチドの作成

以下の8種類のペプチドをFmoc固相合成法を用いて合成した(純度>80%; HPLC分析による)。尚、No.8を除き、抗原調製用のシステインを付加したペプチドとした。

No.1: C+HPGGQPDRQRKQEELTDEEKEI(位置32-53、アミノ酸数23、配列番号10)

No.2: C+PKHPARAPARGDSEDRRGPQKT(位置190-212、アミノ酸数24、配列番号11)

No.3: C+PEVAPSDPGTTAPPREERTG(位置311-330、アミノ酸数21、配列番号12)

No.4: C+PGASKSNKLRKTLRNT(位置434-450、アミノ酸数18、配列番号13)

No.5: C+IGETRFSLKCLKPNQRKNFN(位置490-509、アミノ酸数21、配列番号14)

No.6: C+ALYEEEQVERVGDIEERGK(位置531-549、アミノ酸数20、配列番号15)

No.7: C+LKPDMGKKAKHKHTQIKKKTLNPEFNE(位置590-615、アミノ酸数27、配列番号16)

)

No.8: CLKNKDKKIERWHQLQENHVSSD(位置667-690、アミノ酸数24、配列番号17)

【0042】

(3) 合成ペプチドを用いたELISA

上記の各ペプチドを抗原として使い、3.(2-1)と同様に抗原固相化ELISAプレー

10

20

30

40

50

トを作成した。このELISAプレートを用い、3.(2-2)の方法に準じてELISA測定を実施した。尚、抗原水溶液は、2.5 µg/mL又は5.0 µg/mLの濃度で作成した。

【0043】

LINH患者2名、健常者7名の血清を用いて検討した結果、LINH患者血清はNo.7ペプチド(ラプフィリン3aのa.a.590-615)に対して特異的に吸光度の上昇が認められた。さらに、No.7ペプチドに対する反応を、検体を増やして検討した。LINH患者6名、健常者6名の血清を用いた検討の結果を図7に示す。健常者6名と比較し、患者6名のうち3名で吸光度の上昇が認められた。以上の結果より、ラプフィリン3aのa.a.590-615がLINHの有力なエピトープ候補である可能性が示された。

【0044】

5.まとめ

LINH特異的な抗原蛋白ラプフィリン3aにおいて、a.a.590-615が有力なエピトープ候補であることを見出すことに成功した。部分長のラプフィリン3aによる検討で、LINHに係するエピトープはラプフィリン3a(a.a.516-690)の存在する可能性が高いことを示したが、a.a.590-615はその部分長に含まれる。このことは、a.a.590-615とその近傍を含めた領域にLINH特異的な自己抗体(抗ラプフィリン3a抗体)のエピトープが存在することを強く支持するものである。当該エピトープに対する抗体(抗ラプフィリン3a抗体)を指標にすれば、極めて高い感度及び特異度をもってLINHの検査(例えば鑑別や病態把握)が可能になる。従って、当該エピトープはLINHの検査用試薬として極めて有用である。

【産業上の利用可能性】

【0045】

本発明はLINHの検査に有用な試薬を提供する。本発明の試薬を利用することにより、極めて高い感度及び特異度を持ってLINHの鑑別等が可能となる。従って、本発明の試薬を利用した検査の結果は、誤診の防止、適切な治療方針の決定などに多いに役立つものといえる。

【0046】

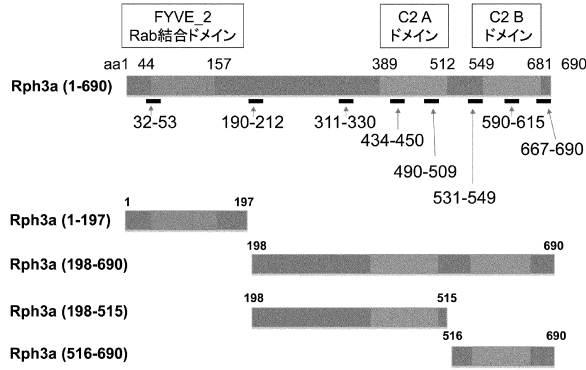
この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

10

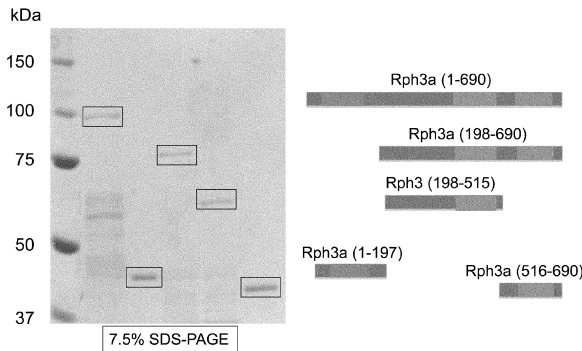
20

30

【 図 1 】



【 図 2 】



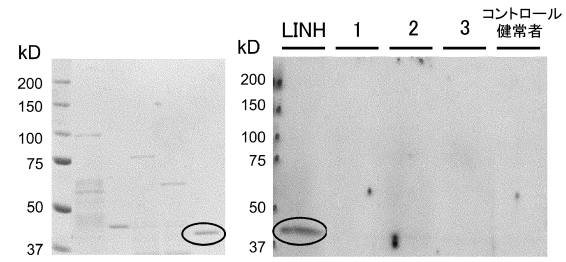
【 図 5 】

計算式	スコア	条件
Hopp/Woods antigenicity	$\geq 0.5 \Rightarrow$ Score 1	Antigenicity の高い数値に高得点
Parker antigenicity	$\geq 3.0 \Rightarrow$ Score 1	Antigenicity の高い数値に高得点
Protrusion Index antigenicity	$\geq 4.5 \Rightarrow$ Score 1	Antigenicity の高い数値に高得点
Welling antigenicity	$\geq 0.0 \Rightarrow$ Score 1	Antigenicity の高い数値に高得点
KD hydrophobicity	$\leq 0.1 \Rightarrow$ Score 1	hydrophobicity の低い数値に高得点
von Heijne hydrophilicity	$\geq 0.1 \Rightarrow$ Score 1	hydrophilicity の高い数値に高得点
Chou Fasman-Helix	$\geq 1.0 \Rightarrow$ Score 0.5	helix 性の高い数値に低得点
Chou Fasman-Sheet	$< 1.0 \Rightarrow$ Score 0.5	sheet 性の低い数値に低得点
Chou Fasman-Turn	$\geq 0.25 \Rightarrow$ Score 1	turn 性の高い数値に高得点
Robson Garnier-Helix	$\geq 0.0 \Rightarrow$ Score 0.5	helix 性の高い数値に低得点
Robson Garnier-Sheet	$< 0.0 \Rightarrow$ Score 0.5	sheet 性の低い数値に低得点
Robson Garnier-Turn	$\geq 0.0 \Rightarrow$ Score 1	turn 性の高い数値に高得点

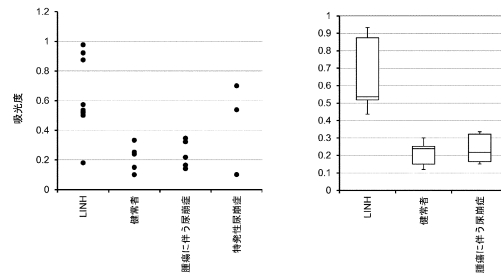
【 図 6 】

No.	位置	長さ (AA)	配列	m.w.	平均疎水性	電荷密度
1	32-53	23	C+HPGGQPDQRKQEELTD EEEKI (配列番号 1 0)	2722.90	-2.13	0.57
2	190-212	24	C+PKHPARAPARGDSEDRR GPGQKT (配列番号 1 1)	2587.83	-1.84	0.46
3	311-330	21	C+PEVAPSDPGTTAPPREER TG (配列番号 1 2)	2167.31	-1.16	0.38
4	434-450	18	C+PGASKSNKLRTKTLRNT (配列番号 1 3)	1975.28	-1.19	0.39
5	490-509	21	C+IGETRFSLKLPNQRKNF N (配列番号 1 4)	2521.94	-1.21	0.43
6	531-549	20	C+ALYEEEQVERVGDIEERG K (配列番号 1 5)	2352.53	-1.10	0.60
7	590-615	27	C+LKPDMGKAKHKTIQKKK TLNPEFNE (配列番号 1 6)	3155.74	-1.46	0.48
8	667-690	24	CLKNKDKIERWHQLQENH VSSD (配列番号 1 7)	2950.25	-1.74	0.46

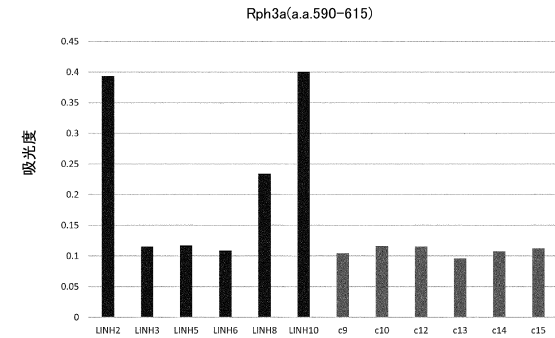
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 7 】



【配列表】

0006618107000001.app

フロントページの続き

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 国際公開第2013/080811(WO, A1)

特開平06-184199(JP, A)

S IWAMA、他21名、Rabphilin-3A as a Targeted Autoantigen in Lymphocytic Infundibulo-Neurohypophysitis, The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2015年4月28日, Vol.100, No.7, E946-E954

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	淋巴细胞漏斗垂体后部炎症试验试剂		
公开(公告)号	JP6618107B2	公开(公告)日	2019-12-11
申请号	JP2015106859	申请日	2015-05-26
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人名古屋大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人名古屋大学		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人名古屋大学		
[标]发明人	梶村益久 大磯ユタカ 岩間信太郎		
发明人	梶村 益久 大磯 ユタカ 岩間 信太郎		
IPC分类号	G01N33/564 G01N33/543 G01N33/53 C12N15/00 C07K14/47		
FI分类号	G01N33/564.Z G01N33/543.545.A G01N33/53.N C12N15/00.ZNA C07K14/47 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/12		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/HA11 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA14 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA33		
代理人(译)	萩野 干治		
其他公开文献	JP2016223774A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种灵敏且高特异性的淋巴细胞漏斗状神经垂体炎的检测方法。解决方案：提供一种淋巴细胞漏斗状漏斗状神经垂体炎的检测试剂，该试剂至少含有580个至625个氨基酸中的六个连续氨基酸rabphilin-3a以及抗rabphilin 3a抗体特异性结合的肽。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6618107号 (P6618107)
(45) 発行日 令和1年12月11日(2019.12.11)	(24) 登録日 令和1年11月22日(2019.11.22)	
(51) Int. Cl.	F I	
G O 1 N 33/564 (2006.01)	G O 1 N 33/564 Z	
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 4 5 A	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 N	
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A	
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	
請求項の数 8 (全 13 頁)		
(21) 出願番号 特願2015-106859(P2015-106859)	(73) 特許権者 504139662 国立大学法人名古屋大学	
(22) 出願日 平成27年5月26日(2015.5.26)	(74) 代理人 弁理士 萩野 幹治 100114362	
(65) 公開番号 特願2016-223774(P2016-223774A)	(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	
(43) 公開日 平成28年12月28日(2016.12.28)	(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	
審査請求日 平成30年5月9日(2018.5.9)	(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	
最終頁に続く		

(54) 【発明の名称】 リンパ球性漏斗下垂体後葉炎検査試薬及びその用途