

(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2016-101092

(P2016-101092A)

(43) 公開日 平成28年6月2日(2016.6.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	Z N A A 2 G O 4 5
G O 1 N 33/68 (2006.01)	G O 1 N 33/68	4 B O 2 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D 4 B O 6 3
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C O 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	

審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-239550 (P2014-239550)
 (22) 出願日 平成26年11月27日 (2014.11.27)

(71) 出願人 504150450
 国立大学法人神戸大学
 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1
 (74) 代理人 100088904
 弁理士 庄司 隆
 (74) 代理人 100124453
 弁理士 資延 由利子
 (74) 代理人 100135208
 弁理士 大杉 卓也
 (74) 代理人 100152319
 弁理士 曾我 亜紀
 (72) 発明者 駒井 浩一郎
 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大
 学法人神戸大学内

最終頁に続く

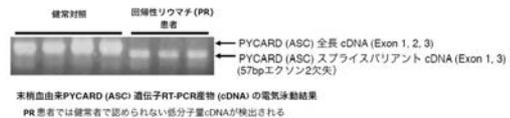
(54) 【発明の名称】 回帰性リウマチ検査用バイオマーカー及び検査方法

(57) 【要約】

【課題】 回帰性リウマチの検査用マーカーを提供する。
 また回帰性リウマチの検査のための測定方法を提供する。

【解決手段】 PYCARD (ASC) 遺伝子のうち、エクソン2
 部分が欠失したポリヌクレオチドからなるバイオマーカー
 による。また、PYCARD (ASC) 遺伝子のうち、エクソ
 ン2部分が欠失した遺伝子から発現したPYCARD (ASC)
 タンパク質からなるバイオマーカーによる。これらのマ
 ーカーを指標とした検査方法による。

【選択図】 図2



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 1 に示すアミノ酸配列のうち、位置92のグリシンから110のプロリンまで、又は位置93のセリンから111のグリシンまでのアミノ酸配列を欠失したPYCARD (ASC) タンパク質をマーカーとする、回帰性リウマチの検査用バイオマーカー。

【請求項 2】

配列番号 1 に示すアミノ酸配列のうち、位置92のグリシンから110のプロリンまで、又は位置93のセリンから111のグリシンまでのアミノ酸配列を欠失するPYCARD (ASC) タンパク質のアミノ酸配列が、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含む配列である、請求項 1 に記載の回帰性リウマチの検査用バイオマーカー。

10

【請求項 3】

配列番号 2 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドをマーカーとする回帰性リウマチの検査用バイオマーカー。

【請求項 4】

配列番号 3 に示す塩基配列で特定されるポリヌクレオチドのうち、位置381 - 437位のヌクレオチドを欠損してなるポリヌクレオチドをマーカーとする、回帰性リウマチの検査用バイオマーカー。

【請求項 5】

配列番号 2 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列が、配列番号 4 に示す塩基配列で特定されるポリヌクレオチドからなる、請求項 3 に記載の回帰性リウマチの検査用バイオマーカー。

20

【請求項 6】

位置381 - 437位のヌクレオチドを欠損してなるポリヌクレオチドが、配列番号 4 に示す塩基配列で特定されるポリヌクレオチドを含む、請求項 4 に記載の回帰性リウマチの検査用バイオマーカー。

【請求項 7】

生体から採取された検体より、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 に記載の検査用バイオマーカーを検出することを特徴とする、回帰性リウマチ診断の補助のための検査方法。

【請求項 8】

請求項 1 又は 2 に記載の検査用バイオマーカー、あるいは請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 に記載の検査用バイオマーカーの転写産物を、免疫学的手法により検出することを特徴とする、請求項 7 に記載の検査方法。

30

【請求項 9】

請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 に記載の検査用バイオマーカーを、遺伝子増幅手段により検出することを特徴とする、請求項 7 に記載の検査方法。

【請求項 10】

検査が、回帰性リウマチ発症の判定又は発症予測のための検査である、請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 に記載の検査方法。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 に記載の検査用バイオマーカーと相互作用しうる物質を含む、回帰性リウマチの検査用試薬。

40

【請求項 12】

検査用バイオマーカーと相互作用しうる物質が抗体、プライマー、プローブから選択される、請求項 11 に記載の検査用試薬。

【請求項 13】

請求項 2 ~ 6 のいずれか 1 に記載の検査用バイオマーカーを増幅しうるプライマーセットを少なくとも含む回帰性リウマチの検査用キット。

【請求項 14】

請求項 12 に示す検査用バイオマーカーと相互作用しうる物質のいずれかを、少なくとも 2 種以上含む、回帰性リウマチの検査用キット。

50

【請求項 15】

正常型PYCARD (ASC) タンパク質又は正常型PYCARD (ASC) タンパク質を産生するためのPYCARD (ASC) タンパク質遺伝子を有効成分として含む、抗回帰性リウマチ剤。

【請求項 16】

配列番号 1 に示すアミノ酸配列のうち、位置92のグリシンから110のプロリンまでのアミノ酸配列、又は位置93のセリンから111のグリシンまでのアミノ酸配列を欠失したPYCARD (ASC) タンパク質の機能抑制物質を有効成分として含む、抗回帰性リウマチ剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、回帰性リウマチの検査用バイオマーカーに関し、更には該バイオマーカーを指標とする回帰性リウマチの検査方法及び回帰性リウマチの治療剤に関する。

【背景技術】

【0002】

回帰性リウマチ (Palindromic rheumatism: PR) は、手指や手関節、膝や肩などに関節炎が生じる炎症期と炎症が自然に消失する非炎症期を繰り返す特徴を持つ疾患である。病因は明らかになっておらず、30-60歳で発症することが多い。また回帰性リウマチの診断を受けた患者のうち、30%程度が関節リウマチに移行するとされている他、関節炎の発作持続は半日から数日におよぶこともあり、本疾患患者は身体的にも精神的にも大きな苦痛を生涯に亘って背負うことになる。回帰性リウマチでは基本的に非発作時の全身状態は良好であるが、関節外症状として関節に近い軟部組織に発赤や熱感、腫脹や痛みが出現することがある。また、手の腱や指腹に圧痛を伴う辺縁不明瞭な小さな皮下結節が一時的に生じることもある。

【0003】

現在、回帰性リウマチの診断は、Paseroの提唱する基準などを参考に病歴や局所の所見や検査所見より総合して行われている。すなわち、短時間の突発性・単関節炎の既往があること、最低1回の発作を医師が確認すること、過去2年間に5回以上の発作があること、発作毎に罹患関節が異なり少なくとも3つの別の関節が侵されること、X線・炎症所見が正常であること、痛風、軟骨石灰化症、間欠性関節水腫症等が否定できること、の6項目である (非特許文献1: Pasero G et al., Clin. Exp. Rheumatol. 4: 197, 1986)。

しかしながら受診時に症状がない場合は診断が困難であるだけでなく、関節リウマチや痛風との鑑別が重要であるにも関わらず、疾患マーカーなどによる明確な診断基準は存在しない。

【0004】

回帰性リウマチの治療については、発作時には非ステロイド抗炎症薬がある程度有効であることが知られているが、症状の軽減はみられるものの十分な効果が得られているとはいえない。繰り返す発作を予防する最良の治療法は現在のところ知られておらず、回帰性リウマチでは不定周期な発作を繰り返すため、発作を抑制する為の薬剤効果を評価することは困難である。

【0005】

インフラマソーム (inflammasome) は細胞質に存在するタンパク質の複合体で、炎症に際して活性化され、主にはIL-1 やIL-18の分泌を引き起こさせる作用を示す。インフラマソームとして、NLRP1 (NALP1) Inflammasome、NLRP3 (NALP3) Inflammasome、IPAF (NLRC4) Inflammasome、AIM2 Inflammasome等が報告されており、バクテリア生菌、微生物由来毒素、生体異物、PAMPs (病原体関連分子パターン)、DAMPs (ダメージ関連分子パターン) など様々な刺激により活性化されることが知られている。インフラマソームに関連するMEFV遺伝子及びNALP3遺伝子を解析し、遺伝子多型やエクソンの欠損が回帰性リウマチの発症と関連していることが示唆されたことが報告されている (非特許文献2、3)。しかしながら、これまでの変異報告は単一民族に限定されていることに加え、健常対照においても一部に認められることから未だ決定的な要因と断定することはできず、今後さらな

10

20

30

40

50

る大規模な症例-対象検討が必要である。

【0006】

インフラマソームを構成する連結因子の一種であるPYCARD (PYD and CARD domain containing) (同義でASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing caspase recruitment domain)ともいう。以下、「PYCARD (ASC)」という。)は、アポトーシス、炎症、自然免疫において機能するタンパク質であり、癌の抑制にも寄与しているといわれており、pyrinドメインとカルボキシ末端のcaspase-recruitmentドメイン (CARD) を有する。すなわちPYCARD (ASC) タンパク質はNLRP3などの外因性物質の受容体とCaspase-1などのエフェクターを連結するアダプターとして機能することで外因性物質刺激に応じたCaspase-1依存性のIL-1 やIL-18分泌のための信号伝達を介在する。例えば、乳癌組織でPYCARD (ASC) 遺伝子のDNAメチル化により発現が抑制された遺伝子の産物としてTMS (target of methylation-induced silencing) 1が命名されている。また、培養細胞 (in vitro) におけるエクソン2脱落型PYCARD (ASC) タンパク質の機能について報告がある (非特許文献4、5)。非特許文献4では、エクソン2脱落型PYCARD (ASC) タンパク質が過剰応答することによる炎症について報告されており、非特許文献5ではエクソン2脱落型はPYCARD (ASC) タンパク質の機能が低下することが報告されている。しかしながら、エクソン2脱落型PYCARD (ASC) タンパク質と回帰性リウマチとの関係については一切言及されていない。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

20

【0007】

【非特許文献1】Pasero G et al., Clin. Exp. Rheumatol. 4: 197, 1986

【非特許文献2】日本リウマチ学会総会・学術集会プログラム抄録集(2014) 58th, 574

【非特許文献3】日本リウマチ学会総会・学術集会プログラム抄録集(2013) 58th, 540

【非特許文献4】Mediators of Inflammation, Vol. 2009, Article ID 287387, 6 pages, doi:10.1155/2009/287387

【非特許文献5】Journal of Inflammation 2010, 7:23, <http://www.journal-inflammation.com/content/7/1/23>

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0008】

本発明は、回帰性リウマチ (PR) の検査用マーカーを提供することを課題とし、また回帰性リウマチの検査のための測定方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、回帰性リウマチ患者において、部分欠失型PYCARD (ASC) mRNAが検出されることを初めて見出した。さらに研究を重ね、部分欠失型PYCARD (ASC) mRNAによって発現が予想されるタンパク質を構成するアミノ酸配列を解析すると、PYCARD (ASC) 遺伝子のうちエクソン2部分が欠失した遺伝子から発現したタンパク質であることが確認された。そこで、部分欠失型PYCARD (ASC) mRNA及びタンパク質が回帰性リウマチ検査用マーカーになりうることを見出し、本発明を完成した。さらに、係るマーカーを検出することによる回帰性リウマチの診断の補助のための検査方法に係る発明を完成した。

40

【0010】

すなわち本発明は、以下よりなる。

1. 配列番号1に示すアミノ酸配列のうち、位置92のグリシンから110のプロリンまで、又は位置93のセリンから111のグリシンまでのアミノ酸配列を欠失したPYCARD (ASC) タンパク質をマーカーとする、回帰性リウマチの検査用バイオマーカー。

2. 配列番号1に示すアミノ酸配列のうち、位置92のグリシンから110のプロリンまで、又は位置93のセリンから111のグリシンまでのアミノ酸配列を欠失するPYCARD (ASC) タン

50

パク質のアミノ酸配列が、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含む配列である、前項 1 に記載の回帰性リウマチの検査用バイオマーカー。

3. 配列番号 2 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドをマーカーとする回帰性リウマチの検査用バイオマーカー。

4. 配列番号 3 に示す塩基配列で特定されるポリヌクレオチドのうち、位置 381 - 437 位のヌクレオチドを欠損してなるポリヌクレオチドをマーカーとする、回帰性リウマチの検査用バイオマーカー。

5. 配列番号 2 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列が、配列番号 4 に示す塩基配列で特定されるポリヌクレオチドからなる、前項 3 に記載の回帰性リウマチの検査用バイオマーカー。

6. 位置 381 - 437 位のヌクレオチドを欠損してなるポリヌクレオチドが、配列番号 4 に示す塩基配列で特定されるポリヌクレオチドを含む、前項 4 に記載の回帰性リウマチの検査用バイオマーカー。

7. 生体から採取された検体より、前項 1 ~ 6 のいずれか 1 に記載の検査用バイオマーカーを検出することを特徴とする、回帰性リウマチ診断の補助のための検査方法。

8. 前項 1 又は 2 に記載の検査用バイオマーカー、あるいは前項 3 ~ 6 のいずれか 1 に記載の検査用バイオマーカーの転写産物を、免疫学的手法により検出することを特徴とする、前項 7 に記載の検査方法。

9. 前項 3 ~ 6 のいずれか 1 に記載の検査用バイオマーカーを、遺伝子増幅手段により検出することを特徴とする、前項 7 に記載の検査方法。

10. 検査が、回帰性リウマチ発症の判定又は発症予測のための検査である、前項 7 ~ 9 のいずれか 1 に記載の検査方法。

11. 前項 1 ~ 6 のいずれか 1 に記載の検査用バイオマーカーと相互作用しうる物質を含む、回帰性リウマチの検査用試薬。

12. 検査用バイオマーカーと相互作用しうる物質が抗体、プライマー、プローブから選択される、前項 11 に記載の検査用試薬。

13. 前項 2 ~ 6 のいずれか 1 に記載の検査用バイオマーカーを増幅しうるプライマーセットを少なくとも含む回帰性リウマチの検査用キット。

14. 前項 12 に示す検査用バイオマーカーと相互作用しうる物質のいずれかを、少なくとも 2 種以上含む、回帰性リウマチの検査用キット。

15. 正常型 PYCARD (ASC) タンパク質又は正常型 PYCARD (ASC) タンパク質を産生するための PYCARD (ASC) タンパク質遺伝子を有効成分として含む、抗回帰性リウマチ剤。

16. 配列番号 1 に示すアミノ酸配列のうち、位置 92 のグリシンから 110 のプロリンまでのアミノ酸配列、又は位置 93 のセリンから 111 のグリシンまでのアミノ酸配列を欠失した PYCARD (ASC) タンパク質の機能抑制物質を有効成分として含む、抗回帰性リウマチ剤。

【発明の効果】

【0011】

本発明の回帰性リウマチの検査用マーカーにより、従来は患者の症状のみから診断されていた回帰性リウマチを、より正確に早期に診断可能となった。従来の Pasero の提唱する基準などでは、既往を医師が確認できない場合には診断がつけられず、また長期の観察を要することから、診断できた時点で症状が進行している場合も考えられた。しかしながら、本発明の回帰性リウマチの検査用マーカーの発明により、早期に診断することができ、発症の予測も可能である。患者にとって、発作等の苦痛が少ない段階で早期に診断されることで治療も早期に開始することができ、患者の苦痛も早期に軽減化でき、有利である。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図 1】PYCARD (ASC) ゲノム DNA 構造模式を示す図である。

【図 2】末梢血由来 PYCARD (ASC) 遺伝子 RT-PCR 産物 (cDNA) の電気泳動結果を示す写真図である。(実施例 1)

【図 3】末梢血由来 PYCARD (ASC) 遺伝子 RT-PCR 産物の配列分析結果を示す図である。(

10

20

30

40

50

実施例 1)

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明は、回帰性リウマチの検査用バイオマーカーに関し、更には該バイオマーカーを指標とする回帰性リウマチの検査方法及び回帰性リウマチの治療剤に関する。本明細書において、特にことわらない限り、A、C、G及びTは、各々アデニン、シトシン、グアニン及びチミンの各塩基を示す。アミノ酸及びアミノ酸残基は、IUPAC及びIUBの定める1文字又は3文字表記を使用する。転写産物とは、ゲノムが転写及び翻訳される結果生じる産物であり、例えばmRNA、cDNA及びタンパク質などが挙げられる。

【0014】

インフラマソームを構成する連結因子の一種であるPYCARD (ASC) タンパク質は、アポトーシス、炎症、自然免疫において機能するタンパク質であり、癌の抑制にも寄与しているといわれており、pyrinドメインとカルボキシ末端のcaspase-recruitment ドメイン (CARD) を有し、PYCARD (ASC) 遺伝子 (Genbank Accession No. NG_029446) より生合成される。本遺伝子はヒト第16染色体に位置し、3つのエクソンから構成されている (図1参照)。これらが全て使用されてmRNAに転写、翻訳されると正常型PYCARD (ASC) タンパク質が産生される。

【0015】

本発明の回帰性リウマチの検査用バイオマーカーは、PYCARD (ASC) 遺伝子のうち、エクソン2が欠失した遺伝子より生合成された部分欠失型PYCARD (ASC) タンパク質である。本発明の回帰性リウマチの検査用バイオマーカーとしては、以下の配列番号1に示すアミノ酸配列のうち、位置92のグリシンから110のプロリンまで、又は位置93のセリンから111のグリシンまでのアミノ酸配列を欠失したPYCARD (ASC) タンパク質、以下の配列番号2に示すアミノ酸配列を含むPYCARD (ASC) タンパク質が挙げられる。ここで、PYCARD (ASC) タンパク質とは、アポトーシス、炎症、自然免疫において機能するタンパク質であり、癌の抑制にも寄与しているといわれており、pyrinドメインとカルボキシ末端のcaspase-recruitment ドメイン (CARD) を有する。すなわちPYCARD (ASC) タンパク質はNLRP3などの外因性物質の受容体とCaspase-1などのエフェクターを連結するアダプターとして機能することで外因性物質刺激に応じたCaspase-1依存性のIL-1 やIL-18分泌のための信号伝達を介在する。PYCARD (ASC) 遺伝子のエクソン2はPYCARD (ASC) タンパク質内のpyrinドメイン (PYD) とcaspase recruit domain (CARD) を接続するPGR (proline and glycine-rich) ドメインをコードしており、エクソン2脱落によりPGRドメインを欠くタンパク質は活性状態と非活性状態の切り替えが不安定になっていることが示唆されている (非特許文献4)。

【0016】

配列番号1 (正常型PYCARD (ASC) タンパク質のアミノ酸配列) : 下線部はエクソン2によってコードされる部分を示す。

MGRARDAILDALLENLTAEELKKFKLKLLSVPLREGYGRIPRGALLSMDALDLTDKLVSFYLETYGAELTANVLRDMGLQE
MAGQLQAATHQSGGAAPAGIQAPPQSAAKPGLHFIDQHRAAL I ARVTNVEWLLDALYGKVLTDQYQAVRAEPTNPSKMR
KLFSFTPAWNWTCKDLLLLQALRESQSYLVEDLERS

【0017】

配列番号2 (エクソン2欠失型PYCARD (ASC) タンパク質のアミノ酸配列)

MGRARDAILDALLENLTAEELKKFKLKLLSVPLREGYGRIPRGALLSMDALDLTDKLVSFYLETYGAELTANVLRDMGLQE
MAGQLQAATHQGLHFIDQHRAAL I ARVTNVEWLLDALYGKVLTDQYQAVRAEPTNPSKMRKLFSFTPAWNWTCKDLLLLQ
ALRESQSYLVEDLERS

【0018】

本発明の回帰性リウマチのさらなる検査用バイオマーカーとしては、配列番号2に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドが挙げられる。アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの例として、配列番号3に示す塩基配列で特定されるポリヌクレオチドのうち、位置381-437位のヌクレオチドを欠損してなるポリヌクレオチド

10

20

30

40

50

をマーカーとすることができる。具体的には、配列番号4に示す塩基配列で特定されるポリヌクレオチドが挙げられる。配列番号2に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列として、上記配列番号4に示す塩基配列の他、さらにコドンの縮重性 (degeneracy) により予測されるどのような塩基配列であってもよい。これらの塩基配列は全て本発明に包含される。

【0019】

配列番号3 (正常型PYCARD (ASC) mRNA由来cDNA) : 下線部を付したATGは開始コドンを意味し、TGAは終止コドンを意味する。その他の下線部はエクソン2領域を示す。

gagtgggagg aaggcgggga gtccagggtc cgccccggag ccgacttcct cctggtcggc ggctgcagcg ggg
 tgagcgg cggcagcggc cggggatcct ggagccATGg ggcgcgcgcg cgacgccatc ctggatgcmc tggaga
 acct gaccgccgag gagctcaaga agttcaagct gaagctgctg tccgtgccgc tgcgcgaggg ctacggggcg
 c atcccgcggg ggcgcgtgct gtccatggac gccttggacc tcaccgacaa gctggtcagc ttctacctgg a
 gacctacgg cgccgagctc accgctaacg tgctgcgcga catgggcctg caggagatgg ccgggcagct gcag
 gcggcc acgcaccagg gctctggagc cgcgccagct gggatccagg ccccctcctca gtcggcagcc aagccag
 gcc tgcactttat agaccagcac cgggctgcmc ttatcgcgag ggtcacaac gttgagtggc tgctggatgc
 tctgtacggg aaggtcctga cggatgagca gtaccaggca gtgcggggcg agcccaccaa cccaagcaag at
 gcggaagc tcttcagttt cacaccagcc tggaaactgga cctgcaagga ctgtctcctc caggccctaa gggag
 tcca gtctacctg tggaggacc tggagcggag cTGAaggctcc tcccagcaa cactccggtc agcccctg
 gc aatcccacca aatcatcctg aatctgatct tttatatac aatatacga aagccagctt gaacttgtgt
 gt

10

20

【0020】

配列番号4 (エクソン2欠失型PYCARD (ASC) mRNA由来cDNA) : 下線部を付したATGは開始コドンを意味し、TGAは終止コドンを意味する。

gagtgggagg aaggcgggga gtccagggtc cgccccggag ccgacttcct cctggtcggc ggctgcagcg ggg
 tgagcgg cggcagcggc cggggatcct ggagccATGg ggcgcgcgcg cgacgccatc ctggatgcmc tggaga
 acct gaccgccgag gagctcaaga agttcaagct gaagctgctg tccgtgccgc tgcgcgaggg ctacggggcg
 c atcccgcggg ggcgcgtgct gtccatggac gccttggacc tcaccgacaa gctggtcagc ttctacctgg a
 gacctacgg cgccgagctc accgctaacg tgctgcgcga catgggcctg caggagatgg ccgggcagct gcag
 gcggcc acgcaccagg gcctgcactt tatagaccag caccgggctg cgcttatcgc gagggtcaca aacgttg
 agt ggctgctgga tgctctgtac ggaaggtcc tgacggatga gcagtaccag gcagtgcggg ccgagccccac
 caacccaagc aagatgcgga agctcttcag ttccacacca gcctggaact ggacctgcaa ggacttgctc ct
 ccaggccc taaggagtc ccagtcctac ctggaggagg acctggagcg gaggTGAaggc tccttcccag caaca
 ctccg gtcagcccct ggcaatccca ccaaatcctc ctgaatctga tctttttata cacaatatac gaaaagcc
 ag ctggaacttg tgtgt

30

【0021】

本発明は、生体から採取された検体より、上記の検査用バイオマーカーを検出する、回帰性リウマチの検査のための測定方法にも及ぶ。本明細書において、「生体から採取された検体」としては、特に限定されるものではなく、被検者の遺伝子 (ゲノム)、遺伝子の転写産物、例えばmRNA、cDNA及びタンパク質など本発明のバイオマーカーを含む可能性のある生体検体であれば良い。例えば、唾液、血液、血漿、血清、尿、汗、涙、鼻汁、痰及び/又は咽頭ぬぐい液等の体液、毛髪、各臓器等が挙げられる。また、被験者のゲノムは、常法により生体の全ての細胞より得ることが可能である。例えば、毛髪、各臓器、末梢リンパ球などから得ることができる。

40

【0022】

本発明は、生体から採取された検体より上記本発明の検査用バイオマーカーを検出することによる、回帰性リウマチの検査方法にも及ぶ。さらには、生体から採取された検体より、上記本発明の検査用バイオマーカーを検出する、回帰性リウマチの検査のための測定方法にも及ぶ。本発明の回帰性リウマチの検査や測定は、回帰性リウマチの診断の補助のために行われ、具体的には回帰性リウマチ発症しているか、又は回帰性リウマチの発症危険性があるか否かを判定し、診断するための補助のために行うことができる。

50

【0023】

本発明の回帰性リウマチの検査方法において、回帰性リウマチの検査のための検査用バイオマーカーは、例えば免疫学的手法、質量分析、アミノ酸シーケンスの解析等により検出することができる。具体的には、変異型タンパク質のみを認識する抗体を作製し、ELISA法等の免疫学的手法で検出する方法、タンパク質を単離し、直接又は必要に応じ、酵素等で切断し、プロテインシーケンサーを利用して変異を検出する方法、アミノ酸の等電点の変異を検出する方法及び質量分析により質量の差を検出する方法が挙げられ、好ましくは、変異型タンパク質のみを認識する抗体を作製し、ELISA法で検出する方法が挙げられる。

【0024】

本発明の回帰性リウマチの検査方法において、回帰性リウマチの検査のための検査用バイオマーカーが、ポリヌクレオチドからなる回帰性リウマチの検査用バイオマーカーの場合は、mRNA、cDNA及びタンパク質などの転写産物の測定により検出することができる。

【0025】

例えば、転写産物としてmRNAを検出する場合は必要に応じてcDNAに変換して検出することもできる。配列番号3の位置381-437位の欠失変異は、例えば以下の欠失領域を挟んだ位置に対するプライマーセットを用いて、例えばリアルタイムPCR法(RT-PCR法)による増幅産物を測定することで検出することができる。増幅産物の測定は常法に従って行うことができ、例えばインターカレーター法や蛍光標識プローブ等を用いて測定することができる。また、増幅産物について、直接シーケンスする方法などによって変異を検出することができる。プライマーやプローブは、配列番号3に示す塩基配列の情報や、配列番号3の位置381-437位の欠失部位の塩基配列の情報に基づいて、自体公知の方法により設計し、作製することができる。配列番号3の位置381-437位の欠失部位を挟んだ領域に位置するプライマーの例として、具体的には例えば配列番号3の位置159-178位のセンスプライマーと配列番号3の位置732-749のアンチセンスプライマー等を例示することができるが、本明細書において使用可能なプライマーは、これらの部位に対応するプライマーに限定されるものではない。ゲノムの変異の他の検出方法として、例えば、アレル特異的オリゴヌクレオチドプローブ法、オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ(Oligonucleotide Ligation Assay)法、PCR_SSCP法、PCR_CFLP法、PCR_PHFA法、インベーター法、RCA(Rolling Circle Amplification)法、プライマーオリゴベースエクステンション(Primer Oligo Base Extension)法などを適用することができる。尚、配列番号3の位置381-437の塩基配列は、cDNAとしてジーンバンクに登録されている配列(Genbank Accession No. NG_029446)の5574-5630番目である。

【0026】

転写産物の内、タンパク質については、上記回帰性リウマチの検査のための検査用バイオマーカー、即ち配列番号1に示すアミノ酸配列のうち、位置92のグリシンから110のプロリンまで、又は位置93のセリンから111のグリシンまでのアミノ酸配列を欠失したPYCARD(ASC)タンパク質からなる回帰性リウマチの検査用バイオマーカーや、配列番号2に示すアミノ酸配列を含む配列からなる回帰性リウマチの検査用バイオマーカーと同様に、例えば免疫学的手法、質量分析、アミノ酸シーケンスの解析等により検出することができる。免疫学的手法の例として、例えばイムノブロットングが挙げられる。

【0027】

本発明の回帰性リウマチの検査方法や回帰性リウマチの検査のための測定方法により、被験者から採取された検体より上記本発明の検査用バイオマーカーが検出された場合に、被験者は回帰性リウマチが発症しているか、又は回帰性リウマチの発症危険性があるものと予測することができる。例えば、手指や手関節、膝や肩などに関節炎が生じる炎症期と炎症が自然に消失する非炎症期を繰り返す特徴を持つ症状が現れた場合であっても、回帰性リウマチが否か診断がつかないような場合に、本発明のバイオマーカーを検出することで回帰性リウマチと診断することができる。また、症状が認められない場合でも、本発明のバイオマーカーを検出することで、回帰性リウマチの発症可能性があることが予測され

10

20

30

40

50

、症状が悪化する前に早期に対策を講じることが可能となる。

【0028】

本発明は、本発明の回帰性リウマチの検査方法や回帰性リウマチの検査のための測定方法に使用するための検査用試薬にも及ぶ。検査用試薬は、本発明の検査用バイオマーカと相互作用しうる物質を含む。当該本発明の検査用バイオマーカと相互作用しうる物質の例として、配列番号1に示すアミノ酸配列のうち、位置92のグリシンから110のプロリンまで、又は位置93のセリンから111のグリシンまでのアミノ酸配列を欠失したPYCARD (ASC) タンパク質、又は配列番号2に示すアミノ酸配列を含むPYCARD (ASC) タンパク質等の変異型タンパク質のみを認識する抗体、配列番号2に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドを増幅しうるプライマー、配列番号2に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドを認識しうるプローブなどが挙げられる。

10

【0029】

本発明は、本発明の回帰性リウマチの検査方法や回帰性リウマチの検査のための測定方法に使用するための検査用試薬キットにも及ぶ。当該検査用キットには、上述の検査用試薬のうち少なくとも1種を含み、さらにその他の試薬を含んでいてもよい。例えば遺伝子を増幅させるための少なくとも一組のプライマーセットを含むキットであってもよい。プライマーセットとしては、例えば配列番号3の位置159-178のセンスプライマーと配列番号4の位置732-749のアンチセンスプライマーのセットが挙げられる。その他の試薬の例としては、配列番号2に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドからなるRNAを検出できるように設計されたプローブ、制限酵素、マクサムギルバート法及びチェーンターミネーター法などの塩基配列決定法に利用される試薬などが挙げられる。また、好ましくは、蛍光標識されたダイデオキシヌクレオチドを含むキットであってもよい。さらに、プライマー成分に加えて、本発明にかかる変異の存在の検出に応じた1~複数個の試薬を組み合わせたものであってもよい。なお、かかる試薬は、採用される検出方法に応じて適宜選択採用されるが、例えばdATP、dUTP、dTTP、dGTPDNA合成酵素、RNA合成酵素等を挙げることができる。さらに、変異の検出の妨げとならない適当な緩衝液及び洗浄液等が含まれていてもよい。

20

【0030】

本発明は、正常型PYCARD (ASC) タンパク質又は正常型PYCARD (ASC) タンパク質を産生するためのPYCARD (ASC) 遺伝子を有効成分として含む、抗回帰性リウマチ剤にも及ぶ。回帰性リウマチ患者においては、上記部分欠失型PYCARD (ASC) タンパク質の発現が認められることから、正常なPYCARD (ASC) タンパク質の発現量は健常人に比べ低いものと考えられる。そこで、正常なPYCARD (ASC) タンパク質又は正常型PYCARD (ASC) タンパク質を産生するためのPYCARD (ASC) 遺伝子を有効成分として含む、抗回帰性リウマチ剤により、必要なPYCARD (ASC) タンパク質が補充され、有効である。また、回帰性リウマチ患者は、上記異常型の部分欠失型PYCARD (ASC) タンパク質が存在し、何らかの機能を有することで、回帰性リウマチの症状を呈するものと考えられる。そこで、上記部分欠失型PYCARD (ASC) タンパク質の機能を抑制しうる物質についても抗回帰性リウマチ効果を発揮しうると考えられる。本発明は、例えば配列番号1に示すアミノ酸配列のうち、位置92のグリシンから110のプロリンまで、若しくは位置93のセリンから111のグリシンまでのアミノ酸配列を欠失したPYCARD (ASC) タンパク質の機能抑制物質を有効成分として含む、抗回帰性リウマチ剤にも及ぶ。

30

40

【0031】

本発明の抗回帰性リウマチ剤は、投与経路としては、皮下注射、静脈注射、局所投与等のいずれでもよい。また、製剤としては、通常、製薬的に許容される担体や賦形剤、その他添加剤を用いて製造した注射剤や経皮製剤等の非経口剤が挙げられる。製薬的に許容される担体や賦形剤、その他添加剤としては、グルコース、ラクトース、ゼラチン、マンニトール、でんぷんペースト、トリケイ酸マグネシウム、コーンスターチ、ケラチン、コロイド状シリカ等があり、さらには、安定剤、増量剤、着色剤及び芳香剤の様な補助剤を含

50

有してもよい。これらの製剤は、各々当業者に公知慣用の製造方法により製造できる。

【実施例】

【0032】

本発明の理解を深めるために、本発明の内容を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではないことは明らかである。

【0033】

(実施例1) PYCARD (ASC) mRNAの変異した塩基配列の検出

(1) RNAは、PAXgene™ Blood RNA kit (ベクトン・ディッキンソン社製)を用いて健康者及び回帰性リウマチ患者の末梢血から調製した。

【0034】

(2) 得られたtotal RNA 0.3 µgを逆転写反应用キット (RNA PCR Kit : Life Technologies社製)を用い、通常の逆転写反応によりcDNAを調製した。

【0035】

(3) 得られたcDNA溶液1 µlに10×Ex-Taq緩衝液 (TAKARA Bio社製) 5 µL、2mM dNTP溶液4 µL、10 µMセンス、アンチセンスプライマーをそれぞれ1 µL、DNAポリメラーゼ試薬 (Ex Taq DNA polymerase : Takara Bio社製) 1.25Uを加え、滅菌水により全量を50 µLとし、PCR反応をおこなった。PCR反応は、熱変性96 °Cで30秒間、アニーリング55 °Cで30秒間、伸長反応72 °Cで2分間を30サイクル、最後に72 °Cで5分間の伸長反応の条件で行った。得られた増幅産物を含む溶液を、本実施例では「RT-PCR溶液」という。当該反応に使用したセンス、アンチセンスプライマーは、以下のとおりである。

センスプライマー : 5' - AGGAGCTCAAGAAGTTCAAG -3' (配列番号5)

アンチセンスプライマー : 5' -AGGATGATTTGGTGGGAT -3' (配列番号6)

【0036】

(4) 得られたRT-PCR溶液を分子量マーカー (100bp ladder : TAKARA Bio社製) と共にアガロースゲル (1% Agarose S : ニッポンジーン社製) にてTAE緩衝液中で電気泳動し、エチジウムブロマイド溶液にて可視化した。結果を図2にした。回帰性リウマチ患者由来cDNAでは全て正常型分子量のPYCARD (ASC) を発現しておらず、57bp短いバリエーション分子を有意に発現していることが明らかとなった。

【0037】

(5) 上記得られたRT-PCR溶液に含まれるPCR増幅産物を、市販キット (QIAquick PCR purification Kit : キアゲン社製) を用いて精製した。得られたPCR増幅産物20ngを受託分析会社ユーロフィンジェノミクス社に送付し、塩基配列分析を行った。結果を図3に示した。健康者由来の正常型分子量のPYCARD (ASC) cDNAはエクソン1-2が接続されているのに対し、回帰性リウマチ患者由来の57bp短いバリエーションPYCARD (ASC) cDNAはエクソン2が欠失していることが明らかとなった。

【産業上の利用可能性】

【0038】

以上詳述したように、本発明の回帰性リウマチの検査用マーカーにより、従来は患者の症状のみから診断されていた回帰性リウマチを、より正確に早期に診断可能となった。従来のPaseroの提唱する基準などでは、短時間の突発性・単関節炎の既往があるが、最低1回の発作を医師が確認すること、過去2年間に5回以上の発作があることその他、複数の所見に基づいて判断しなければならず、既往を医師が確認できない場合には診断がつけられなかった。また、診断にまた長期の観察を要することから、診断できた時点で症状が進行している場合も考えられた。しかしながら、本発明の回帰性リウマチの検査用マーカーの発明により、早期に診断することができ、発症の予測も可能であることから、患者にとって、発作の苦痛が少ない段階で、早期に診断され、治療も早期に開始することができ、有利であり、医療経済にも貢献しうる。

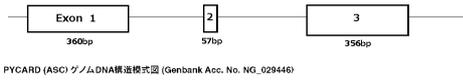
10

20

30

40

【 図 1 】



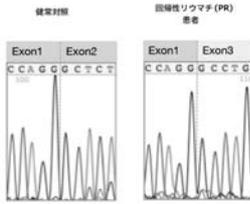
PYCARD (ASC) グラムDNA構造模式図 (Genbank Acc. No. NG_029446)

【 図 2 】



末梢血由来PYCARD (ASC) 遺伝子RT-PCR産物 (cDNA) の電気泳動結果
*RLP患者では健康者で認められない低分子量cDNAが検出される

【 図 3 】



末梢血由来PYCARD (ASC) 遺伝子RT-PCR産物の配列分析結果

健康者由来PYCARD cDNAはエクソン1,2が正常に接続されているが、
回帰性リウマチ患者由来cDNAはエクソン1,3が接続されており、
エクソン2が欠落している

回帰性リウマチ患者におけるPYCARD (ASC) スプライスバリエーション発現

【 配列表 】

2016101092000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I			テーマコード(参考)		
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00		1 0 1		
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02				
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00			A	

(72)発明者 井上 康二

大阪府大阪市自然田 9 4 0 医療法人交詢医会大阪リハビリテーション病院内

F ターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 CB03 CB07 CB08 CB11 CB12 DA14 DA36
 FB02 FB03
 4B024 AA11 CA01 CA09 CA12 HA08 HA12
 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QQ42 QQ53 QR08 QR32
 QR36 QR42 QR50 QR55 QR62 QR72 QR77 QS25 QS28 QS34
 QS36 QS39 QX02
 4C084 AA02 AA13 BA01 BA08 BA22 CA53 DA01 NA14 ZA96 ZB02
 ZB07 ZB08 ZB15 ZC02

专利名称(译)	生物标志物用于复发性风湿病的检查和检查方法		
公开(公告)号	JP2016101092A	公开(公告)日	2016-06-02
申请号	JP2014239550	申请日	2014-11-27
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人神戸大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人神戸大学		
[标]发明人	駒井浩一郎 井上康二		
发明人	駒井 浩一郎 井上 康二		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/68 G01N33/53 A61K38/00 A61K48/00 A61P29/00 A61P19/02 C12N15/09		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/68 G01N33/53.D A61K37/02 A61K48/00 A61P29/00.101 A61P19/02 C12N15/00.A A61K38/00 A61K38/16 A61K38/19 C12N15/09.Z C12Q1/68.AZN.A C12Q1/686.Z C12Q1/6876.Z C12Q1/6883.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/CB08 2G045/CB11 2G045/CB12 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/HA08 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/DA01 4C084/NA14 4C084/ZA96 4C084/ZB02 4C084/ZB07 4C084/ZB08 4C084/ZB15 4C084/ZC02		
代理人(译)	庄司隆 Shinobe百合子		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：要检测复发性风湿病提供一个标记，以及用于检测回文rheumatism.SOLUTION提供用于测量的方法：该问题是通过包括PYCARD (ASC) 基因的多核苷酸具有缺失外显子的一个生物标志物解决2部分。此外，该问题是通过包括从PYCARD (ASC) 表示PYCARD (ASC) 蛋白基因的缺失外显子2部分的生物标志物解决。该问题由一个检测方法，包括使用该标记作为indicator.SELECTED附图解决：图2

