

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5998318号
(P5998318)

(45) 発行日 平成28年9月28日(2016.9.28)

(24) 登録日 平成28年9月9日(2016.9.9)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)
 GO 1 N 33/53 N
 GO 1 N 33/53 P

請求項の数 4 (全 19 頁)

| | |
|---|--|
| <p>(21) 出願番号 特願2012-534948 (P2012-534948)</p> <p>(86) (22) 出願日 平成23年5月12日 (2011.5.12)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/JP2011/060970</p> <p>(87) 国際公開番号 W02012/039161</p> <p>(87) 国際公開日 平成24年3月29日 (2012.3.29)</p> <p>審査請求日 平成26年5月12日 (2014.5.12)</p> <p>(31) 優先権主張番号 特願2010-212756 (P2010-212756)</p> <p>(32) 優先日 平成22年9月22日 (2010.9.22)</p> <p>(33) 優先権主張国 日本国(JP)</p> <p>前置審査</p> | <p>(73) 特許権者 304021831 国立大学法人 千葉大学 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号</p> <p>(73) 特許権者 505246789 学校法人自治医科大学 東京都千代田区平河町二丁目6番3号</p> <p>(74) 代理人 110000671 八田国際特許業務法人</p> <p>(72) 発明者 鈴木 和男 千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院 医学研究院 内</p> |
|---|--|

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規血管炎の検査方法および検査用試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

血管炎の細分類のために、モエシンに対する自己抗体とミエロペルオキシダーゼを特異的に認識する抗体を、それぞれ検出することを特徴とする、モエシンに対する自己抗体の反応性の血管炎病態マーカーとしての使用。

【請求項2】

前記血管炎が小血管炎と中血管炎とを合併するものである、請求項1に記載のモエシンに対する自己抗体の反応性の血管炎病態マーカーとしての使用。

【請求項3】

前記血管炎が顕微鏡的多発血管炎、アレルギー性肉芽腫性血管炎(チャグ・ストラウス症候群)、またはウェゲナー肉芽腫症である、請求項1または2に記載のモエシンに対する自己抗体の反応性の血管炎病態マーカーとしての使用。

【請求項4】

顕微鏡的多発血管炎の細分類のために、モエシンに対する自己抗体とミエロペルオキシダーゼを特異的に認識する抗体を、それぞれ検出することを特徴とする、モエシンに対する自己抗体の反応性の血管炎病態マーカーとしての使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規な血管炎の検査方法および検査用試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

ミエロペルオキシダーゼ (myeloperoxidase : MPO) に対する好中球自己抗体 (MPO-ANCA (Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody)) は、半月体形成腎炎や顕微鏡的多発血管炎 (MPA)、アレルギー性血管炎 (AGA、Churg-Straus症候群 (CSS)) などの難治性血管炎に関連している。そして、これらの患者の血清中のMPO-ANCAの力価は疾患の活動性と相関していることから、MPO-ANCAはこれらの疾患の特異的マーカーとして、診断や治療判定に用いられている (例えば、非特許文献1を参照)。

【0003】

しかしながら、MPO-ANCAをマーカーとして用いた場合であっても、血清中のMPO-ANCAの力価と病態とが必ずしも一致しない場合がある。このことから、MPO-ANCAのみが好中球に作用して血管炎を誘発したり血管炎の発症後に関与しているわけではなく、他の血管炎の誘発分子や機構が存在することが示唆されている。そして近年、好中球のMPO以外にも自己抗体の標的分子が存在する可能性について議論されている。その結果、Lamp2などのいくつかの標的分子の関与も報告されている (非特許文献2および3を参照)。また、血管炎の発症や病態の進展のメカニズムとして、MPO-ANCAをはじめとする自己抗体による血管内皮細胞の活性化機構の解明が試みられ、これまで、自己抗体陽性の血管炎患者の血清がヒト臍静脈内皮細胞 (HUVEC) のICAM-1の発現を誘導すること (非特許文献4を参照) や、Wegener肉芽腫症患者の抗プロテインナーゼ-3自己抗体 (PR3-ANCA) が、ICAM-1、VCAM-1それぞれの発現を誘導すること (非特許文献5および6を参照) が報告されている。しかしながら、血管内皮細胞に対するMPO-ANCAの直接的な効果については報告されていない。したがって、MPO-ANCAやLamp2抗体以外の分子が血管炎の病態に関与しているか否かは依然として不明である。また、MPO欠損マウスでも同様に抗マウスMPO抗体 (rmMPO抗体) による反応が見られることから、血管内皮細胞においてMPO以外の分子が標的となっていることが示唆されている。さらに、血管炎患者の血清や自己抗体がHUVECを活性化することが報告されてきたが、その病因性や反応する分子は明らかとなっていない。

【0004】

また、本発明者らは、抗rmMPO抗体 (MPO-ANCA) がマウス系球体内皮細胞 (mGEC) を活性化することを報告している。しかしながら、MPO-ANCAやLamp2抗体の他に血管炎の病態に対する因子については、依然として不明のままであった。

【0005】

このように、血管炎の診断等に臨床的に用いられているMPO-ANCA以外にも血管炎の病態に関与している因子の存在が示唆されつつも、その本態が明らかとはなっていないのが現状である。上述したようにMPO-ANCAによる診断や治療判定も必ずしも真の病態を完全に反映したものであるとは限らないことから、MPO-ANCA以外の因子を同定することは、MPO-ANCAによる診断等を補完する、またはこれに代わる新たな臨床マーカーを提供できる可能性を秘めており、その臨床上の意義はきわめて重大である。なお、発明者らはMPO-ANCA以外の因子として、Protein Mを見出した。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Goeken JA. Antineutrophil cytoplasmic antibody-A useful serological marker for vasculitis. *J Clin Immunol* 1991; 11: 61-74

【非特許文献2】Kallenberg CG, Stegeman CA, Heeringa P. Autoantibodies vex the vasculature. *Nat. Med.* 2008 Oct;14(10):1018-9.

【非特許文献3】Kain R, Exner M, Brandes R, Ziebertmayr R, Cunningham D, Alderson CA, Davidovits A, Raab I, Jahn R, Ashour O, Spitzauer S, Sunder-Plassmann G, Fukuda M, Klemm P, Rees AJ, Kerjaschki D. Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis. *Nat. Med.* 2008 Oct;14(10):1088-96. Epub 2008 Oct 5.

10

20

30

40

50

【非特許文献4】Johnson PA, Alexander HD, McMillan SA, Maxwell AP. Up-regulation of the endothelial cell adhesion molecule intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) by autoantibodies in autoimmune vasculitis. Clin Exp Immunol, 1997; 108: 234-242

【非特許文献5】Mayet WJ, Schwarting A, Orth T, Duchmann R, Meyer zum Buschenfelde KH. Antibodies to proteinase 3 mediate expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). Clin Exp Immunol 1996; 103: 259-267

【非特許文献6】De Bandt M, Meyer O, Hakim J, Pasquier C. Antibodies to proteinase-3 mediate expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD 54). Br J Rheumatol 1997; 36: 839-846

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

上述したような従来技術に鑑み、本発明は、MPO-ANCAに代わる血管炎の新たな病態マーカーを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上述した課題を解決することを目指して、鋭意研究を行なった。その結果、驚くべきことに、モエシンに対する自己抗体（以下、「MO-ANCA」とも称する）が糸球体内皮細胞のモエシンに作用して当該細胞を活性化することにより、炎症を誘導することを見出した。そして、この知見に基づいて、血管炎患者の血清中に存在するMO-ANCAの反応性を解析したところ、その反応性はMPO-ANCAの反応性と完全に相関せず、むしろ、するものではなかったことから、血清中のMO-ANCAの反応性に基づき血管炎を細分類することが可能となることを見出し、本発明を完成させるに至った。

20

【0009】

このようにして、本発明者らの研究によれば、先に述べたProtein Mはモエシンであることが同定されたのである。このモエシン(moesin; membrane-organizing extension spike protein)は、ウシの子宮より分離されたタンパク質であり、ヘパラン硫酸の受容体タンパク質としての可能性が示唆されている(Lankes, W. T. et al., The Biochemical Journal 1988; 251: 831-842)。また、cDNAクローニングにより、ヒトモエシンは通常、577アミノ酸からなることが示されている(Lankes, W. T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1991; 88: 8297-8301)。ただし、このモエシンを特異的に認識する抗体が血管炎の患者の血清中に見られることは全く知られていない。

30

【0010】

すなわち、本発明の第1の形態によれば、生体試料中の、モエシンを特異的に認識する抗体を検出することを含む、血管炎の検査方法が提供される。当該検査方法において、生体試料が血清試料であり、抗体がモエシンに対する自己抗体であることが好ましい。

【0011】

また、上記検査方法は、上記生体試料中の、ミエロペルオキシダーゼを特異的に認識する抗体（例えば、MPO-ANCA）を検出することをさらに含んでもよい。

40

【0012】

さらに、上記検査方法が検査の対象とする血管炎は、顕微鏡的多発血管炎(MPA)、アレルギー性肉芽腫性血管炎(チャージ・ストラウス症候群(CSS))、ウェゲナー肉芽腫症、ギラン・バレー症候群、血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)、特発性血小板減少性紫斑病、IgA腎症、急速進行性糸球体腎炎、特発性間質性肺炎、サルコイドーシス、びまん性汎細気管支炎、ベーチェット病、全身性エリテマトーデス(SLE)、シェーグレン症候群、高安病(大動脈炎症候群)、パージャー病、結節性多発動脈炎、悪性関節リウマチ、側頭動脈炎、抗リン脂質抗体症候群、強皮症、好酸球性筋膜炎、または天疱瘡であることが好ましく、顕微鏡的多発血管炎(MPA)、アレルギー性肉芽腫性血管炎(チャージ・ストラウス症候群(CSS))、またはウェゲナー肉芽腫症であることがより好ましく、最も好

50

ましくはMPAである。

【0013】

また、本発明の第2の形態によれば、生体試料中の、モエシンを特異的に認識する抗体を検出する物質を含む、血管炎の検査用試薬が提供される。当該検査用試薬において、当該物質は、モエシンおよび/またはその部分ペプチドであることが好ましい。また、当該検査用試薬は、上記抗体を認識する標識化二次抗体をさらに含むことが好ましい。

【発明の効果】

【0014】

本発明によれば、MPO-ANCAに代わる血管炎の新たな病態マーカーが提供されうる。さらに例えば、本発明により提供される新たな血管炎マーカー（例えば、抗モエシン抗体）を従来公知の血管炎マーカーであるMPO-ANCAと組み合わせて用いれば、血管炎の病態との相関の有無やマーカーの定量値などの情報に基づいて、血管炎の病態を細分類したり、その治療効果を判定したりすることが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】実施例において、mGECにおけるモエシンの発現を確認することを目的としてウェスタンブロッティングを行なった結果を示す図である。

【図2】実施例において、二次元電気泳動を行なった後にゲルをCBB染色した結果を示す図である。

【図3】実施例において、二次元電気泳動を行なった後にウェスタンブロッティングを行なった結果を示す図である。

【図4】実施例において、図2に示すCBB染色後に切り出したスポット（ゲル）についてOF-MS解析を行なった結果を示す図である。

【図5】実施例において、MPO-ANCA陽性を呈するANCA関連血管炎の患者の血清中に含まれる抗モエシン抗体（MO-ANCA）がモエシンタンパク質を認識することを、当該抗モエシン抗体を一次抗体として用いたウェスタンブロッティング法により確認した結果を示す図である。

【図6】実施例において、MPO-ANCA陽性を呈するANCA関連血管炎の患者から採取した血清試料中の抗モエシン抗体（MO-ANCA）およびMPO-ANCAを定量した結果を示すグラフである。

【図7】実施例において、患者の血清試料における、抗モエシン抗体（MO-ANCA）の定量結果とMPO-ANCAの定量結果との関連について解析を行なった結果を示すグラフである。

【図8】実施例において、患者の血清試料における、抗モエシン抗体（MO-ANCA）の定量結果とMPO-ANCAの定量結果との関連について解析を行なった結果を示すグラフである。

【図9】実施例において、ELISA法により、血管炎患者の血漿中のMPO-ANCA力価および抗モエシン抗体価を測定し、それらの多重比較を行なった結果を示すグラフである。

【図10】実施例において、MPO-ANCA力価および抗モエシン抗体価と各種臨床検査値との関係を調べる中で、MPO-ANCA力価および抗モエシン抗体価を測定した血管炎患者について、血清中のクレアチニン値を測定し、図9に示す4つの領域ごとに血清クレアチニン値を比較した結果を示すグラフである。

【図11】実施例において、抗モエシン抗体刺激による健常者好中球からのサイトカイン・ケモカイン産生プロファイルを測定した結果を示すグラフである。

【図12】実施例において、抗モエシン抗体刺激による健常者単球からのサイトカイン・ケモカイン産生プロファイルを測定した結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明の第1の形態は、生体試料中の、モエシンを特異的に認識する抗体を検出することを含む、血管炎の検査方法である。

【0017】

本発明の検査方法を適用することができる対象としては、動物であれば特に限定されな

10

20

30

40

50

いが、例えば、哺乳動物等が挙げられる。哺乳動物としては、例えば、霊長類、実験用動物、家畜、ペット等が挙げられ特に限定されるものではないが、具体的には、例えば、ヒト、サル、ラット、マウス、ウサギ、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコなどが挙げられる。好ましくは、対象動物はヒトである。

【0018】

本発明の方法に用いられうる生体試料としては、特に限定されないが、例えば、検査対象である動物由来の組織、細胞、細胞抽出成分、体液等が挙げられる。組織としては、脾臓、リンパ節、腎臓、肺、心臓、肝臓等が、細胞としては、脾細胞、リンパ細胞、好中球、単球、マクロファージ、樹状細胞、抗体産生細胞等が、体液としては、血液、血清、血漿、尿、汗、脊髄液等が挙げられる。検出の容易性を考慮すると、生体試料としては

10

【0019】

本発明の検査方法において検査される「血管炎」の具体的な形態について特に制限はなく、本技術分野において「血管炎」として認識されうるすべての疾患、症状、障害などがいずれも包含されうる。血管炎の一例としては、例えば、顕微鏡的多発血管炎(MPA)、Wegener肉芽腫症、アレルギー性肉芽腫性血管炎(AGA)、CSSなどが挙げられるが、これらには限定されない。ただし、本発明の検査方法は、顕微鏡的多発血管炎(MPA)およびCSSを主とした検査方法であり、さらに好ましくはMPAである。

【0020】

本発明の検査方法において検出される抗体(以下、「抗モエシン抗体」という場合もある)により認識されるモエシンとは、一般に細胞骨格に結合したタンパク質ファミリー(Ezrin Radixin Moesin:ERMファミリー)に属するタンパク質であり、ヒトでは通常577アミノ酸からなる。モエシンとしては、上述の哺乳動物由来のものであれば特に限定されないが、好ましくはヒト由来のモエシンである。ヒトモエシンとしては、例えば、GenBank登録番号NM002444のアミノ酸配列からなるタンパク質、またはその天然のアレル変異体等が挙げられる。

20

【0021】

抗体としては、特にそのクラスは限定されず、IgG、IgD、IgE、IgA、sIgA、IgM等のいずれのものであってもよい。また、抗体の結合性断片(Fab、Fab'、F(ab')₂等)等も、モエシンに対して特異的に結合する限り、「抗体」に含まれる。

30

【0022】

本発明で検出される抗体は、自己のモエシンを特異的に認識する自己抗体であることが好ましい。例えば、生体試料がヒト由来である場合には、好ましくは、ヒトのモエシンを特異的に認識するヒト抗体が検出される。この際、生体試料は血清試料であることが特に好ましい。場合によっては、モエシンがMPOと交差反応する配列部分もあるため、MPO-ANCAの一部であることもある。

【0023】

生体試料中のモエシンを特異的に認識する抗体を検出する方法としては、自体公知の方法を用いることができ、特に限定されないが、液相または固相で起こる反応(例えば抗原抗体反応)を直接測定する方法や、阻害物質を加えることにより免疫反応の阻害を測定する方法などを利用することができる。

40

【0024】

上記方法としては、例えば、モエシンまたはその部分ペプチドを生体試料と接触させ、生体試料中の抗体のモエシンまたはその部分ペプチドに対する特異的結合を、直接的または間接的に検出する方法が挙げられる。

【0025】

上記方法に用いられるモエシンは、上述のモエシンタンパク質のうち、検査対象動物の自己抗体である抗モエシン抗体により特異的に認識されうるものであれば特に限定されないが、好ましくは検査対象動物由来のモエシンである。例えば、検査対象がヒトであれば

50

、ヒトモエシン（例えば、GenBank登録番号NM002444のアミノ酸配列からなるタンパク質、またはその天然のアレル変異体等）を用いることが好ましい。

【0026】

また、本発明においてモエシンの部分ペプチドとしては、本発明で検出される抗モエシン抗体が認識する抗原決定基を含む部分ペプチドであれば特にその長さは限定されない。一般的にタンパク質抗原の抗原決定基は、少なくとも5～6個のアミノ酸残基により構成されるため、少なくとも5個以上、好ましくは8個以上、より好ましくは10個以上のアミノ酸残基を含むモエシンの部分ペプチドを、本発明では用いることができる。

【0027】

モエシンまたはその部分ペプチドは修飾されていてもよい。このような修飾としては、例えば、リン酸、糖または糖鎖、リン脂質、脂質、ヌクレオチド等による修飾などが挙げられる。

10

【0028】

本発明で用いられるモエシンまたはその部分ペプチドは、上述したヒトやその他の動物から公知の方法によって得ることができる。例えば、脾臓、子宮、腎臓等のようなモエシン発現組織またはその培養細胞、またはUT-7等のモエシン発現細胞株などを用いて、モエシンを精製することができる。具体的には、当該動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸等で抽出を行い、当該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等のクロマトグラフィーを組み合わせるにより精製単離することができる。

20

【0029】

本発明のモエシンまたはその部分ペプチドは、モエシンまたはその部分ペプチドをコードする核酸を含有する発現ベクターを導入した形質転換体を培養してモエシンまたはその部分ペプチドを生成し、得られる培養物からモエシンまたはその部分ペプチドを分離・精製することによっても製造できる。

【0030】

本発明で用いられるモエシンまたはその部分ペプチドは、公知のペプチド合成法により製造することもできる。このようなペプチド合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれであってもよい。モエシンを構成しうる部分ペプチドまたはアミノ酸と残余部分とを縮合し、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより、モエシンまたはその部分ペプチドを製造することができる。

30

【0031】

本発明で用いられるモエシンの部分ペプチドは、上述または後述のいずれかの方法により得られるモエシンを、適当なペプチダーゼで切断することによっても製造することができる。

【0032】

モエシンまたはその部分ペプチドは、精製作業等を容易にすることを目的に、適当なタグが連結されたものであってもよい。このようなタグとしては、イムノグロブリンFc領域、マルトース結合タンパク質(MBP)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、c-Mycタグ、FLAGタグ、HAタグ、Hisタグ等が挙げられる。

40

【0033】

抗体を検出するための検出方法としては、特に限定されないが、より具体的には以下の方法が挙げられる。

(1) 血球やゼラチン粒子の表面に、モエシンまたはその部分ペプチド(抗原)を被覆し、生体試料を加えることにより抗原抗体反応を起こさせ、凝集塊を作らせる凝集反応；

(2) モエシンまたはその部分ペプチドを含む抽出液と生体試料とを寒天ゲル内で拡散させて沈降反応を起こさせる二重免疫拡散法(DID: double immune diffusion: オクタロニ法)；

(3) 精製したモエシンまたはその部分ペプチドをプレートに固相化し、生体試料を加えて反応させた後、

50

i) 酵素と結合した二次抗体をさらに反応させて、基質の発色を分光光度計で検出する E L I S A 法；

i i) 蛍光色素と結合した二次抗体をさらに反応させて、蛍光発色を測定する蛍光免疫測定法 (F I A) ；または、

i i i) 化学発光物質と結合した二次抗体をさらに反応させて、化学蛍光 (ケミルミネッセンス) を測定する化学発光免疫測定法 (C L I A) ；

(4) ラテックス粒子やガラスビーズなどの表面をモエシンまたはその部分ペプチドで被覆し、当該粒子が抗体と遭遇したときに起こる凝集反応液に光をあて、その透過光を測定する免疫比濁法またはその散乱光を測定する免疫比濁法 (ネフロメトリー法) ；

(5) モエシンまたはその部分ペプチドを放射性同位元素で標識し、生体試料と反応させ抗原抗体反応を検出するラジオイムノアッセイ；

(6) モエシンまたはその部分ペプチドを含む組織の凍結薄切片または細胞をスライドガラス上に貼り付け、生体試料を切片上に滴下することにより反応させ、蛍光色素と結合した二次抗体とさらに反応させて、蛍光を顕微鏡下で検出する蛍光抗体法；

(7) モエシンまたはその部分ペプチドをチップ上に固定して生体試料を流すことにより親和性をみる表面プラズモン共鳴解析法；

(8) 電気泳動により分離展開したゲル内のモエシンまたはその部分ペプチドを、ニトロセルロース膜等に転写し、生体試料と反応させ抗原抗体反応を検出するウェスタンブロッティング法。

【 0 0 3 4 】

例えば検出手段が E L I S A 法の場合、具体的には、下記のように検出および / または定量を行なうことができる。すなわち、慣用の E L I S A の手法に従い、例えば、モエシンまたはその部分ペプチドで被覆したマルチウェルプレートの各ウェルに生体試料を供し、各ウェルに酵素標識した二次抗体を添加して反応させ、酵素基質を添加した後、当該酵素により生じた産物を検出および / または定量することにより、抗原抗体反応の検出および / または定量を行なうことができる。

【 0 0 3 5 】

上述した E L I S A 法の場合、標識に用いられる酵素としては、通常 E L I S A 法に用いられる慣用の酵素であればよく、例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、
- D - ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、エステラーゼ、
- D - グルクロニダーゼなどが挙げられる。より高感度で安定な検出を達成することが可能であるという観点からは、ペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼが公的に用いられる。また、酵素基質は、用いる酵素により適宜選択することができ、例えば、ペルオキシダーゼの場合、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジンなどが用いられ、アルカリホスファターゼの場合、パラニトロフェニルリン酸ナトリウムなどが用いられる。

【 0 0 3 6 】

酵素により生じた産物の検出および / または定量は、当該産物の吸光度を測定することにより行なうことができる。例えば、酵素基質として、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジンを用いた場合には、655 nm における吸光度を測定すればよい。

【 0 0 3 7 】

例えば、検出手段が蛍光免疫測定法 (F I A) の場合、蛍光色素としては、F I T C (Fluorescein Isothiocyanate)、P E (phycoerythrin)、A P C (Allophycocyanin)、C y - 3、C y - 5 等が挙げられる。

【 0 0 3 8 】

また、例えば、検出手段が化学発光免疫測定法 (C L I A) の場合、化学蛍光 (ケミルミネッセンス) としては、アクリジニウムエステル等が挙げられる。

【 0 0 3 9 】

生体試料中にモエシンを特異的に認識する抗体が検出された場合、当該生体試料の由来する対象は、血管炎を発症する / している可能性が高いと判断することができる。この場

10

20

30

40

50

合、生体試料中のモエシンを特異的に認識する抗体価が高いほど血管炎を発症する／している可能性が高いとすることもできる。逆に、生体試料中にモエシンを特異的に認識する抗体が検出されない場合、当該生体試料の由来する対象は、血管炎を発症する／している可能性が低いと判断することができる。

【0040】

上述した発症可能性を判断する場合、その判断基準は抗体の検出・未検出のみに限定されるわけでない。例えば、健常対象由来の生体試料中のモエシンを特異的に認識する抗体量の平均値 $\pm 3SD$ 等をカットオフ値と設定し、カットオフ値以上であれば対象は血管炎を発症する／している可能性が高いと判断し、逆にカットオフ値以下であれば対象は血管炎を発症する／している可能性が低いと判断してもよい。

10

【0041】

また、血液中のMPO-ANCAの存在の有無やその存在量その他の指標によって血管炎を発症していることが判明している患者において、本発明の検査方法により、モエシンを特異的に認識する抗体が検出された場合、当該患者は血管炎を発症、再発、治療効果の弱さを示している可能性が高いと判定することができる。言い換えると、本発明の第1の形態の検査方法は、生体試料中の、ミエロペルオキシダーゼ(MPO)を特異的に認識する抗体を検出することをさらに含んでもよいということもできる。なお、上記抗体としては、例えば、MPO-ANCAが挙げられ、その検出方法については、モエシンを特異的に認識する抗体の検出について上述した形態が同様に採用されうるため、ここでは詳細な説明を省略する。

【0042】

20

上述したようにモエシンを特異的に認識する抗体(モエシンに対する自己抗体)とミエロペルオキシダーゼ(MPO)を特異的に認識する抗体(MPOに対する自己抗体(MPO-ANCA))とをそれぞれ検出することで、血管炎の病態を細分類することが可能である。すなわち、本発明によれば、「血管炎の細分類のために、モエシンに対する自己抗体とミエロペルオキシダーゼを特異的に認識する抗体を、それぞれ検出することを特徴とする、モエシンに対する自己抗体の反応性の血管炎病態マーカーとしての使用」もまた、提供されうる。ここで、細分類の対象とされる血管炎について特に制限はなく、上述したものやその他従来公知の血管炎が細分類の対象とされうるが、一例として、小血管炎と中血管炎とを合併するものが挙げられる。かような血管炎としては、例えば、アレルギー性肉芽腫性血管炎(チャグ・ストラウス症候群;CSS)、ウェゲナー肉芽腫症(WG)、顕微鏡的多発血管炎(MPA)、川崎病、関節リウマチ、SLE、ベーチェット病によるものが挙げられる。なかでも、上述した2つのそれぞれの抗体を検出することは、顕微鏡的多発血管炎、アレルギー性肉芽腫性血管炎(チャグ・ストラウス症候群(CSS))、またはウェゲナー肉芽腫症(特に、顕微鏡的多発血管炎)の病態を細分類する目的で、反応性の血管炎病態マーカーとして用いられることが好ましい。とりわけ、これらの血管炎への治療による寛解、再発、治療抵抗性を判定するための病態マーカーとしても有効に用いられうる。

30

【0043】

さらに、モエシンを特異的に認識する抗体が検出された場合には、以下のような血管炎由来の症状、疾患が疑われ、より詳細な因果関係等が解明されれば、該症状や疾患の治療による寛解、再発、治療抵抗性を判定するための病態マーカーとして非常に有用である：

循環器病疾患(高血圧、脳梗塞、心筋梗塞、脳卒中、動脈瘤)、多発性硬化症、ギラン・バレー症候群、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、ライソゾーム病、特発性血栓症、血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)、特発性血小板減少性紫斑病、IgA腎症、急速進行性糸球体腎炎、難治性ネフローゼ症候群、特発性間質性肺炎、サルコイドーシス、びまん性汎細気管支炎、自己免疫性肝炎、ベーチェット病、全身性エリテマトーデス(SLE)、シェーグレン症候群、高安病(大動脈炎症候群)、バージャー病、結節性多発動脈炎、悪性関節リウマチ、側頭動脈炎、抗リン脂質抗体症候群、強皮症、好酸球性筋膜炎、天疱瘡。

40

【0044】

また、本発明の第2の形態によれば、生体試料中のモエシンを特異的に認識する抗体を検出する物質を含む、血管炎の検査用試薬が提供される。

50

【 0 0 4 5 】

本形態の検査用試薬に含まれる上記「物質」としては、上述の方法においてモエシンを特異的に認識する抗体の検出を達成しうるものであれば特に限定されないが、好ましくはモエシンまたはその部分ペプチドである。また、本発明で検出される抗モエシン抗体が、複数の抗原決定基を認識する抗体群である場合、モエシン中に存在する多くの抗原決定基に、それぞれ特異的に認識する抗体を網羅的に検出させることにより、検出感度を向上させるという観点から、当該物質はモエシン（タンパク質の全長）であることが好ましい。

【 0 0 4 6 】

モエシンまたはその部分ペプチドは、粉末、溶液等の形態で提供されてもよく、血球、ゼラチン粒子、プレート、ラテックス粒子、ガラスビーズ、スライドガラス、チップ、マイクロタイタープレート、遠心管、マイクロビーズ、メンブレン、ペーパーディスク等の不溶性担体に担持された形で提供されてもよい。なお、容器上の担体においては、当該担体に保持される溶液が接触する部位、例えばマイクロタイタープレートの場合には、ウェルの部位にモエシンまたはその部分ペプチドが担持される。なお、モエシンまたはその部分ペプチドの不溶性担体への担持は、公知の方法により行なうことができる。

【 0 0 4 7 】

本発明の検査用試薬を用いれば、上述の方法により、容易に血管炎を検査することができる。

【 0 0 4 8 】

本発明の検査用試薬はまた、上述の検出方法で使用される試薬等をさらに含む、血管炎検査用キットとすることもできる。上記試薬等として具体的には、試薬や生体試料を希釈するための緩衝液、蛍光色素、反応容器、陽性対照、陰性対照、検査プロトコルを記載した指示書等が挙げられる。これらの要素は、必要に応じて予め混合しておくこともできる。このキットを使用することにより、本発明の血管炎の検査が簡便となり、早期の治療方針決定に非常に有用である。

【 実施例 】

【 0 0 4 9 】

以下、実施例を用いて本発明を詳述するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【 0 0 5 0 】

1. マウス系球体内皮細胞 (mouse glomerular endothelial cell : mGEC) の培養
C57BL/6から単離したmGECを用いた。細胞の維持のため、コンフルエントの状態の細胞の培養上清を取り除いてPBSで洗浄した後、トリプシン/PBS (Gibco) を1ml加えて、約5分間温めたのち、軽く叩いて細胞を剥がした。次に細胞を回収し、培養液で希釈してコーゲンコート10cm 培養皿 (Iwaki) で、37℃、5% CO₂ インキュベーターにて培養した。なお、培養液には、RPMI-1640 (Sigma) [10% 非働化FBS (Sigma)、5ng/ml vascular endothelial growth factor (VEGF) (Peprotech)、10ng/ml epidermal growth factor (EGF) (Sigma)、10ng/ml fibroblast growth factor basic (bFGF) (Sigma)、20U/ml ヘパリン(味の素)、1μg/ml ハイドロコルチゾン (Sigma)、50U/ml ペニシリン、50μg/ml ストレプトマイシン (Gibco) を含む] を用いた。

【 0 0 5 1 】

2. ウサギ抗組換えマウスミエロペルオキシダーゼ抗体 (ウサギ抗rmMPO抗体) の調製
マウス (C57BL/6) のMPO cDNAを含むプラスミドを用いて大腸菌 (Escherichia coli) を形質転換させ、常法に従って培養後、発現組換えタンパク質であるマウスMPO (rmMPO) を回収した。このrmMPOは、Hisタグ標識したマウスMPOのL鎖 - H鎖からなる。次いで、得られたrmMPOを精製したものをを用いてウサギを免疫し、得られたポリクローナル抗体のIgGフラクションをプロテインAを用いて血清から単離することにより、抗rmMPO IgGを得た。なお、コントロール用のウサギIgGは、rmMPOで免疫せずに上記と同様の手法により得た。

【 0 0 5 2 】

3. 抗rmMPO抗体と反応するmGECの細胞分子のバンドの検出

3.1 細胞溶解液の調製

上記1. で培養したmGEC細胞を、PBS中でセルスクレイパーを用いて回収し、遠心してペレット状にした。このペレット状の細胞をPBSで洗浄した後、RIPA buffer (150mM NaCl、10mM Tris-HCl、0.1% SDS、1.0% Triton X-100、1.0% Sodium deoxycholate、5mM EDTA) に溶解し、超音波によって細胞を破砕して細胞溶解液を得た。

【0053】

3.2 プロットティング

上記3.1 で得られたニトロセルロースメンブレンを0.05% Tween 20 / TBS [50mM Tris-HCl / 150mM NaCl (pH7.6)] で軽く洗浄した後、5%BSA / 0.05% Tween 20 / TBSを用いて 4 にて一晚ブロッキングを行なった。次に、メンブレンを、室温にて1.5時間、一次抗体 (バッファー: 5%BSA / 0.05% Tween 20 / TBS) と反応させた。その後、メンブレンを0.05% Tween 20 / TBSで3回洗浄し、次いで室温にて1.5時間、HRP標識二次抗体 (バッファー: 5% BSA / 0.05% Tween 20 / TBS) と反応させた。その後、メンブレンを0.05% Tween 20 / TBSで3回洗浄し、ECL (GE healthcare) 液に1分間反応させた。最後に、暗室においてX線フィルム (GE healthcare) に感光させ、現像機 (富士フィルム株式会社) により現像を行なった。その結果を図1に示す。図1に示すように、68kDaのモエシンが検出され、mGEC細胞でモエシンが発現していることが確認された。

【0054】

4. 二次元電気泳動

4.1 細胞溶解液の調製

上記1. で培養したmGEC細胞を、PBS中でセルスクレイパーを用いて回収し、遠心してペレット状にした。このペレット状の細胞をPBSで洗浄した後、RIPA buffer (150mM NaCl、10mM Tris-HCl、0.1% SDS、1.0% Triton X-100、1.0% Sodium deoxycholate、5mM EDTA) に溶解し、超音波によって細胞を破砕して細胞溶解液を得た。

【0055】

4.2 一次元目等電点電気泳動

上記3.1 で得た細胞溶解液に、終濃度50%となるようにサンプルバッファー (Invitrogen) を加えた。ゲルとしては、IEFゲルpH3-10 (Invitrogen) を用いた。このゲルを泳動槽 (Invitrogen) に装填した後、下層に陽極バッファー (Invitrogen)、上層に陰極バッファー (Invitrogen) を注ぎ、サンプルを15 μ lアプライした。等電点電気泳動は、100Vで1時間、200Vで1時間、500Vで30分間行なった。なお、マーカーとしては、IEFマーカー (SERVA) を用いた。

【0056】

4.3 二次元目SDS-PAGE

上記3.2 で得られた等電点電気泳動のゲルを12% TCAで30分間固定した。次に、ゲルをDDWで2回洗浄した後、SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen) の手順に従い、Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色を行なった。染色したゲルをDDWで洗浄した後、2回、20%エタノールでそれぞれ10分間振盪した。次に、ゲルのサンプルを流したレーンを切り取り、20%エタノール / 2 \times サンプルバッファーで5分間振盪した。次に、ゲルをrunning buffer (Invitrogen) で軽く洗浄し、SDS-PAGEのゲルのウェルに装填し、SDS-PAGEを200Vで約1時間15分行なった。なお、マーカーとしては、Novex (登録商標) Sharp Protein Standard (Invitrogen) を用いた。CBB染色の結果を図2に示す。図2に丸印で囲んで示すスポットを、後述するウェスタンプロットティングの現像後にメスを用いて切り出し、後述するPMF解析に用いた。

【0057】

5. ウェスタンプロットティング

5.1 SDS-PAGEからニトロセルロースメンブレンへのトランスファー

上記3.2 で得られたSDS-PAGE後のゲルを、ニトロセルロースメンブレン (GE healthcare) とともにトランスファー装置 (Invitrogen) に装填し、30Vにて1時間、トランスフ

10

20

30

40

50

ア-を行なった

5.2.1 ブロッティング

上記5.1で得られたニトロセルロースメンブレンを0.05% Tween 20 / TBS [50mM Tris-HCl / 150mM NaCl (pH7.6)] で軽く洗浄した後、5%BSA / 0.05% Tween 20 / TBSを用いて4 にて一晚ブロッキングを行なった。次に、メンブレンを、室温にて1.5時間、一次抗体（バッファー：5%BSA / 0.05% Tween 20 / TBS）と反応させた。その後、メンブレンを0.05% Tween 20 / TBSで3回洗浄し、次いで室温にて1.5時間、HRP標識二次抗体（バッファー：5% BSA/0.05% Tween 20/TBS）と反応させた。その後、メンブレンを0.05% Tween 20 / TBSで3回洗浄し、ECL（GE healthcare）液に1分間反応させた。最後に、暗室においてX線フィルム（GE healthcare）に感光させ、現像機（富士フィルム株式会社）により現像を行なった。現像の結果を図3に示す。図3に示すように、分子量67kDa、p16.2の位置にスポットが確認された。

【0058】

なお、本実施例を通して、各種抗体としては、以下のものを使用した。

【0059】

一次抗体：抗rmMPO抗体 5 μ g/ml、コントロールウサギIgG 5 μ g/ml、ウサギ抗ヒトモエシンモノクローナル抗体（Abcam）1 μ g/ml、ウサギ抗ヒトモエシンポリクローナル抗体（Upstate）1 μ g/ml

二次抗体：HRP標識抗ウサギIgG抗体（Sigma）1/20000希釈。

【0060】

6. PMF（Peptide Mass Fingerprint）解析およびアミノ酸配列のホモロジー解析

6.1 抗rmMPO抗体と反応したmGECの細胞分子の同定

4.3の二次元電気泳動でのゲルをCBB染色後に切り出したスポット（ゲル）を、TOF-MS解析した。その結果を図4に示す。図4に示す結果から、得られたスポットに含まれるタンパク質は、モエシンであると同定された。

【0061】

6.2 抗rmMPO抗体とモエシンの分子結合を推定

次いで、抗rmMPO抗体とモエシンの分子結合を推定するために、モエシンおよびMPOのアミノ酸配列について、Protein BLASTによってホモロジー検索を行なった。検索の結果、5つの類似配列が見られた。また、最も類似性の高い配列では、同じ6つのアミノ酸を有する配列であった。

【0062】

7. 抗モエシン抗体による血管内皮細胞のシグナル伝達に対する影響（Cell ELISA）

続いて、以下の手法（Cell ELISA法）により、抗モエシン抗体が抗rmMPO抗体（MPO-ANCA）と同様に血管内皮細胞のICAM-1発現を促進する効果を有するのではないかとの仮説を検証した。

【0063】

すなわち、上記1.で培養したmGEC細胞を、コラーゲンコート96穴プレート（Iwaki）に 4×10^3 cells/ウェルの濃度で播種した。一日培養した後、温めた1%FBSを含むRPMI-1640（試験培地）で細胞を洗浄した後、新たに試験培地を加えて1時間培養した。次に、細胞を刺激するための抗体とTNF- α とを試験培地で希釈し、ウェルに加えて6時間培養した。その後、細胞をPBSで3回洗浄し、0.2%グルタルアルデヒドにより、4 にて5分間固定した。非特異的結合は、ウシ血清アルブミン（BSA）を含むダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 - 0.05% Tween 20（シグマ社製、code:30-5450-5）（PBST）（1%BSA/PBST）により、4 にて一晚ブロッキングし、続いて0.5 μ g/mlのラット抗マウスICAM-1モノクローナル抗体（eBioscience）を加えて1.5時間、室温で反応させた。次いで、HRP標識抗ラットIgG抗体（Sigma）と1.5時間室温で反応させた。発色には、1-StepTM Turbo TMB-ELISA（Pierce）を用い、0.5M硫酸（和光純薬）にて反応停止後に450nmで吸光度を測定し、定量した。

【0064】

10

20

30

40

50

なお、細胞の刺激には以下の抗体を用いた。

【 0 0 6 5 】

ラット抗マウスモエシンモノクローナル抗体（三光純薬）10 μg/ml、抗rmMPO抗体 100 μg/ml、コントロールウサギIgG 100 μg/ml、コントロールラットIgG2a（R&D systems）10 μg/ml。

【 0 0 6 6 】

上記試験の結果、抗モエシン抗体によるICAM-1発現の促進が確認され、上記仮説は実証された。

【 0 0 6 7 】

8 . 血管炎患者血清中に抗モエシン抗体が存在することの確認

10

ヒト肺上皮細胞A549細胞溶解液中のモエシンと反応する抗体が抗モエシン抗体であることを、以下の手法（ウェスタンブロッティング法）により確認した。

【 0 0 6 8 】

8 . 1 ウェスタンブロッティング

ヒト肺上皮細胞A549細胞溶解液を用い、上記3 . 1と同様に得られたニトロセルロースメンブレンを0.05% Tween 20 / TBS [50mM Tris-HCl / 150mM NaCl (pH7.6)] で軽く洗浄した後、5%BSA / 0.05% Tween 20 / TBSを用いて4 にて一晩ブロッキングを行なった。次に、メンブレンを、室温にて1 . 5時間、バッファー：5%BSA / 0.05% Tween 20 / TBSで50倍希釈した患者血漿と反応させた。その後、メンブレンを0.05% Tween 20 / TBSで3回洗浄し、次いで室温にて1 . 5時間、HRP標識二次抗体（抗ヒトIgG抗体：バッファー：5% BSA/0.05% Tween 20/TBS）と反応させた。その後、メンブレンを0.05% Tween 20 / TBSで3回洗浄し、ECL（GE healthcare）液に1分間反応させた。最後に、暗室においてX線フィルム（GE healthcare）に感光させ、現像機（富士フィルム株式会社）により現像を行なった。その結果、ヒトモエシタンパク質に相当するバンドが確認され、血管炎患者血清中に抗モエシン抗体が存在することが確認された。なお、患者の血清中に含まれる抗モエシン抗体（MO-ANCA）がモエシタンパク質を認識することを、当該抗モエシン抗体を一次抗体として用いたウェスタンブロッティング法により確認した（図5）。

20

【 0 0 6 9 】

9 . 血管炎患者の血清中の抗モエシン抗体の定量

以下の手法（ELISA法）によりMPO-ANCA関連血管炎である難治性血管炎患者の血漿を用いて解析した。

30

【 0 0 7 0 】

9 . 1 ELISA法による血管炎患者の血漿中の抗モエシン抗体の定量

組換えヒトモエシンを、炭酸緩衝液で0.2 μg/ウェル（50 μL、2mg/ml）の濃度に希釈し、96穴プレートのウェルにコーティングした。一日培養した後、PBST（PBS-0.1%Tween20）で2回洗浄した後、1% BSA/PBST 100 μLで1 . 5時間ブロッキングし、PBSTで2回洗浄した。1% BSA/PBSTで50倍に希釈した患者または健常者の血漿を加え、1 . 5時間室温で放置し、PBSTで2回洗浄した後、AP-標識抗ヒトIgG抗体でさらに1 . 5時間室温で放置した。PBSTで2回洗浄した後、AP基質緩衝液と反応させ、405～650nmにて吸光度を測定し、定量を行なった。結果を図6に示す。図6に示すように、MPO-ANCA関連血管炎に罹患した患者の血清中には、抗モエシン抗体（MO-ANCA）が存在した。なお、上記と同様の手法により、「MPO-ANCA」の定量も同時に行ない、結果は図6に併せて示されている。ここで、図6において「Pt A:anti-M high/MPO-ANCA low」とあるのは左の2つのバーで示される2人の患者（A1、A2）に対応し、抗モエシン抗体の量が多くMPO-ANCAの量が少なかった患者である。一方、図6において「Pt B:anti-M low/MPO high」とあるのは、その右のバーで示される1人の患者に対応し、抗モエシン抗体の量が少なくMPO-ANCAの量が多かった患者である。なお、図6に示す右端の2つのバーは健常者コントロールに対応する。

40

【 0 0 7 1 】

10 . MO-ANCAおよびMPO-ANCAによる血管炎の細分類

患者の血清試料における、抗モエシン抗体（MO-ANCA）の定量結果とMPO-ANCAの定量結

50

果との関連について解析を行なった。その結果、上述した図6、並びに、図7および図8に示すように、それぞれの定量結果に基づいて、血管炎の病態が、(1)抗モエシン抗体(MO-ANCA)とMPO-ANCAとの間に正の相関のある病態(図7)、(2)抗モエシン抗体(MO-ANCA)とMPO-ANCAとの間に負の相関のある病態(図8)、(3)抗モエシン抗体(MO-ANCA)が高値(陽性)で、MPO-ANCAが低値(陰性)の病態(図6のPt-A)、(4)MPO-ANCAが高値だが、抗モエシン抗体(MO-ANCA)が低値の病態(図6のPt-B)、の4つの群に分類されることが判明した。このことから、本発明の知見を利用し、これを従来存在するMPO-ANCAに基づく検査結果と組み合わせることで、MPAなどの血管炎を細分類するための新たな基準が提供されうる。そして、このような細分類基準を用いることで、患者血清中のMO-ANCAおよびMPO-ANCAの存在の有無およびその存在量に基づき、血管炎の病態やこれ

10

【0072】

11. MPO-ANCA力価および抗モエシン抗体価による多重比較

上記9.1と同様の手法(ELISA法)により、血管炎患者(n=76)の血漿中のMPO-ANCA力価および抗モエシン抗体価を測定し、それらの多重比較を行なった。結果を図9に示す。

【0073】

図9に示すように、MPO-ANCA高力価または抗モエシン抗体陽性を示す患者のほとんどはこれらのいずれか一方のみについて高力価/陽性を示しており、MPO-ANCA高力価かつ抗モエシン抗体陽性を示した患者は4例のみであった。このことから、抗モエシン抗体とMPO-ANCAとの交差反応は、非常に弱い可能性が示唆された。このように、本発明は、従来用いられているMPO-ANCAを利用する技術とは異なる新規な血管炎の検査手段を提供するものであり、臨床上きわめて優位性の高い技術であると言える。

20

【0074】

12. MPO-ANCA力価および抗モエシン抗体価と各種臨床検査値との関係

上記11.においてMPO-ANCA力価および抗モエシン抗体価を測定した血管炎患者について、常法により、血清中のクレアチニン値を測定した。そして、図9に示す4つの領域ごとに、血清クレアチニン値を比較した。結果を図10に示す。

【0075】

図10に示すように、抗モエシン抗体単独陽性群では、両陰性群およびMPO-ANCA単独高力価群のそれぞれと比較して有意に高い血清クレアチニン値を示した。

30

【0076】

同様に、上記11.においてMPO-ANCA力価および抗モエシン抗体価を測定した血管炎患者のうち、MPO-ANCA単独高力価群および抗モエシン抗体単独陽性群について、常法により、血清中のアスパルテートアミノトランスフェラーゼ(AST)、尿素窒素(BUN)および乳酸脱水素酵素(LDH)の値を測定した。そして、測定された値を2つの群間で比較し、Kruskal-wallis検定およびTukey検定により統計的に処理した。結果を下記の表1に示す。

【0077】

【表 1】

| | AST | BUN | LDH |
|--------------------|-----|-----|-----|
| 抗モエシン抗体 単独陽性群 | ↑** | ↑* | ↓* |
| MPO-ANCA 単独高力価群 | ↓** | ↓* | ↑* |

**有意差あり(有意水準1%)

*有意差あり(有意水準5%)

10

【 0 0 7 8 】

表 1 に示す結果から、抗モエシン抗体単独陽性群では、MPO-ANCA単独高力価群と比較して、血清中のASTおよびBUNの値が有意に高く、一方で血清中のLDHの値は有意に低かった。上述した血清クレアチニン値の測定結果も合わせて見ると、抗モエシン抗体は血管炎患者における腎機能の低下に関与していることが示唆された。

【 0 0 7 9 】

1 3 . 抗モエシン抗体刺激による健常者好中球からのサイトカイン・ケモカイン産生測定

20

抗モエシン抗体が好中球と反応することが認められたことから、抗モエシン抗体によって好中球を刺激したときのサイトカイン・ケモカインの産生プロファイルを測定し、抗モエシン抗体による好中球刺激に対する反応を *in vitro* で分析した。

【 0 0 8 0 】

まず、健常者の血漿試料から好中球を単離し、 2×10^6 cells/ml で10%FBS/RPMIに懸濁した。

【 0 0 8 1 】

続いて、96穴プレートに、好中球を100 μ Lずつ播種した。次いで、マウスモノクローナル抗モエシン2287抗体(20 μ g/ml)を100 μ Lずつ添加し、CO₂インキュベーター中で37 $^{\circ}$ Cにて24時間培養した後、プレートを1000 \times g で20 $^{\circ}$ Cにて10分間遠心し、上清を回収した。

30

【 0 0 8 2 】

このようにして回収した上清を用い、各種サイトカイン・ケモカインの産生量をmultiple cytokine assay(Bio-Plex)にて測定した。なお、コントロール群として、マウスモノクローナル抗モエシン2287抗体に代えてマウスモノクローナル抗体IgG2aを用いて同様の実験を行った。結果を図 1 1 に示す。

【 0 0 8 3 】

図 1 1 に示すように、好中球を抗モエシン抗体で刺激して24時間後の培養上清において、MCP-1およびIL-8が高値を示した。このことから、生体内において抗モエシン抗体とIL-8とが相互作用していることが示唆された。なお、IL-8は、好中球走化性を有するサイトカインであり、炎症局所への好中球の遊走や、血中への好中球の動員の増加を介して炎症を増強させるサイトカインである。つまり、抗モエシン抗体は、好中球を活性化させ、炎症性サイトカインの産生を誘導することが示されたのである。

40

【 0 0 8 4 】

1 4 . 抗モエシン抗体刺激による健常者単球からのサイトカイン・ケモカイン産生測定
抗モエシン抗体が単球と反応することが認められたことから、上記と同様に、抗モエシン抗体によって単球を刺激したときのサイトカイン・ケモカインの産生プロファイルを測定し、抗モエシン抗体による単球刺激に対する反応を *in vitro* で分析した。

【 0 0 8 5 】

まず、PBMC(末梢血単核球)を単離し、 2×10^6 cells/ml で10%FBS/RPMIに懸濁した。

【 0 0 8 6 】

50

続いて、96穴プレートに、PBMCを100 μ Lずつ播種した。次いで、CO₂インキュベーター中で37 $^{\circ}$ Cにて2時間培養した後にPBMCを2回洗浄し、ウェルに残っている細胞群を接着性単球として以下の実験に用いた。

【0087】

上記で得られた接着性単球を含むウェルに、マウスモノクローナル抗モエシン2287抗体(10 μ g/ml)を200 μ Lずつ添加し、CO₂インキュベーター中で37 $^{\circ}$ Cにて24時間培養した後、プレートを1000 \times gで20 $^{\circ}$ Cにて10分間遠心し、上清を回収した。

【0088】

このようにして回収した上清を用い、各種サイトカイン・ケモカインの産生量をmultiple cytokine assay(Bio-Plex)にて測定した。なお、コントロール群として、マウスモノクローナル抗モエシン2287抗体に代えてマウスモノクローナル抗体IgG2aを用いて同様の実験を行った。結果を図12に示す。

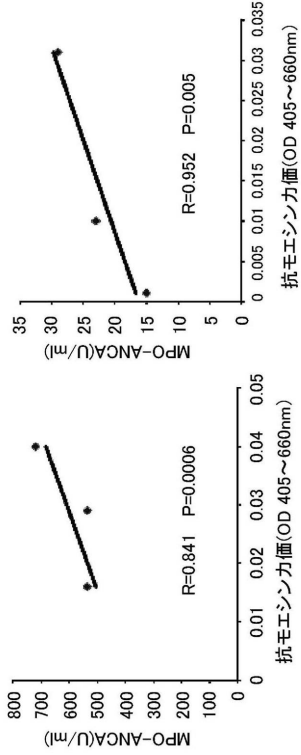
10

【0089】

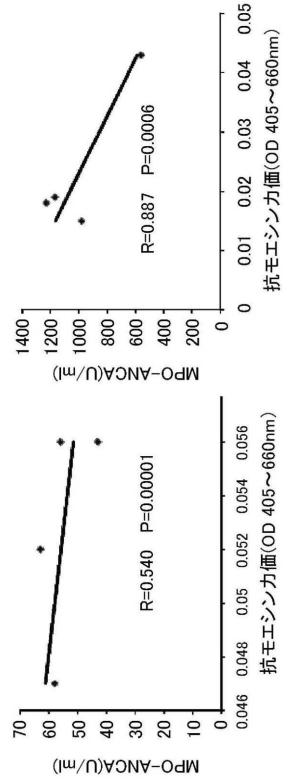
図12に示すように、単球を抗モエシン抗体で刺激して24時間後の培養上清において、抗モエシン抗体陽性患者群において有意に高値であったサイトカインを含め、GM-CSF、TNF- α 、IL-6、IL-8、MCP-1などの多数の炎症性サイトカインの増加が見られた。このことから、生体内において抗モエシン抗体は数多くの炎症性サイトカインと相互作用し、それによって各種の炎症誘導に関与しているものと考えられた。このことから、血管炎患者において、生体試料中の抗モエシン抗体(自己抗体)の存在またはその量を検出するだけでなく、抗モエシン抗体による各種サイトカイン・ケモカインの産生プロファイルを測定することで、血管炎をさらに別の観点から細分類することもできると考えられる。すなわち、本発明のさらに他の形態によれば、単球および/または好中球を抗モエシン抗体で刺激することにより得られる、サイトカインおよび/またはケモカインの前記単球および/または好中球における産生プロファイルの血管炎の再分類への使用もまた、提供される。これにより、本発明により提供される血管炎の検査手段の特異性のさらなる向上がもたらされ、血管炎の診断手法としてきわめて優位性の高い技術が提供されることになる。

20

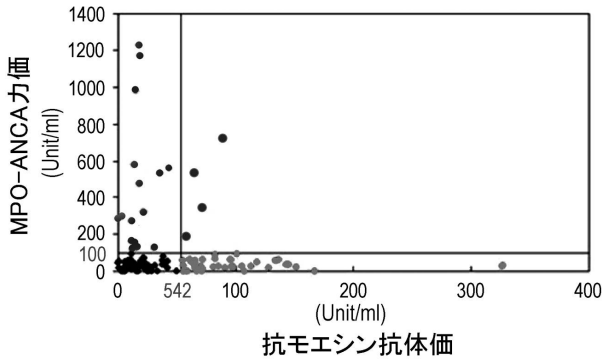
【 図 7 】



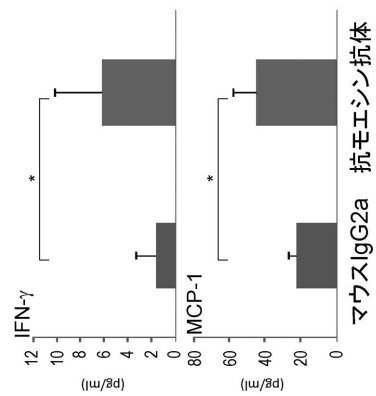
【 図 8 】



【 図 9 】

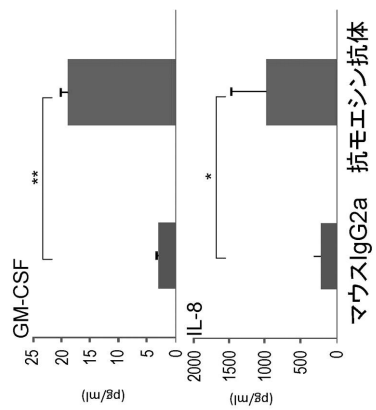
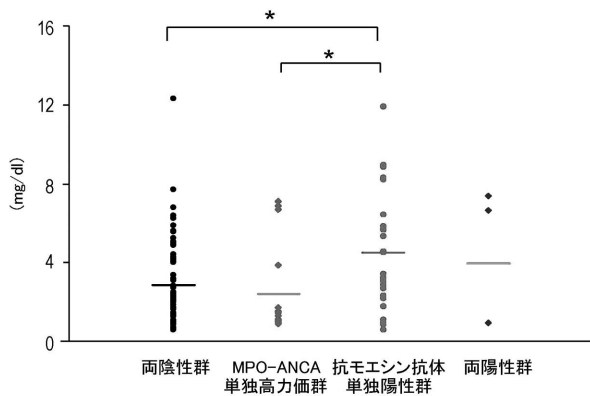


【 図 1 1 】

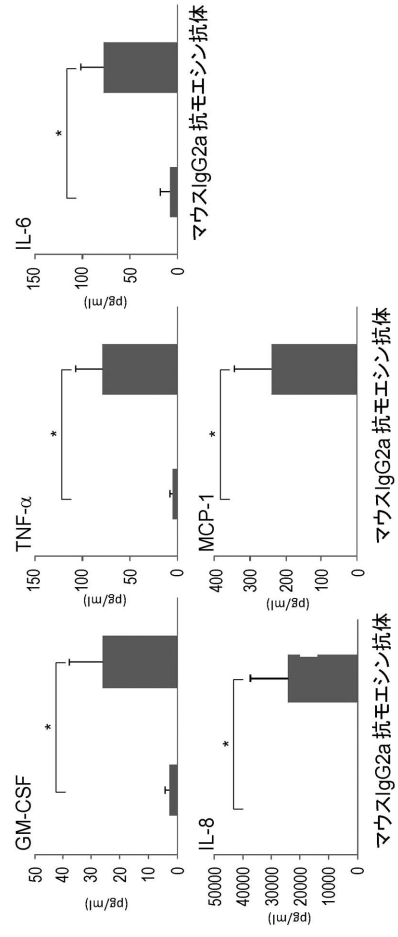


【 図 1 0 】

血清クレアチニン



【 図 1 2 】



フロントページの続き

- (72)発明者 中山 俊憲
千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院 医学研究院内
- (72)発明者 中島 裕史
千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院 医学研究院内
- (72)発明者 長尾 朋和
千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院 医学研究院内
- (72)発明者 湯村 和子
栃木県下野市薬師寺3311-1 学校法人自治医科大学内

審査官 西浦 昌哉

- (56)参考文献 特表2010-527917(JP,A)
特表2010-526107(JP,A)
石川優樹 他,ステロイドが著効した抗モエシン抗体/抗リボゾム抗体陽性骨盤内肉芽腫性血管炎の1例,日本リウマチ学会総会・学術集会/国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集, 2010年 3月19日, Vol.54th-19th, Page.709
川上民裕,免疫学的検査 4)抗好中球細胞質抗体(ANCA),皮膚科の臨床, 2006年, Vol.48 No.10, Page.1273-1277, 全文全図
吉田秀雄,全身性血管炎とさまざまな自己抗体,月刊呼吸器科, 2008年, Vol.14 No.4, Page.327-333
斉藤隆三,手許に置きたい診断基準とその解説 顕微鏡的多発血管炎,皮膚科の臨床, 2004年, Vol.46 No.10, Page.1436-1441
小林茂人 他,血管炎の分類に関する世界的動向,脈管学, 2009年, Vol.49 No.Supplement, Page.S94
橋本博史,リウマチ性疾患 免疫と炎症とその制御 リウマチ性疾患治療の最新知見 血管炎症候群の最近の進歩,内科, 2000年, Vol.86 No.2, Page.332-337

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-98
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CPlus/MEDLINE/BIOSIS(STN)