

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年3月4日(04.03.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/024089 A1

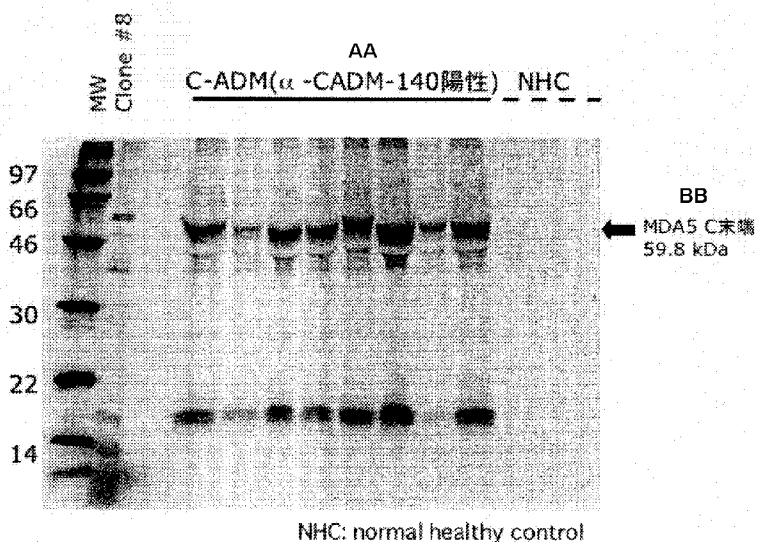
- (51) 国際特許分類:
G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/063633
- (22) 国際出願日: 2009年7月31日(31.07.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-223789 2008年9月1日(01.09.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人慶應義塾(KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田二丁目15番45号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 桑名 正隆 (KUWANA, Masataka) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 佐藤 慎二 (SATO, Shinji) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 藤田 尚志 (FUJITA, Takashi) [JP/JP]; 〒6068507 京都府京都市左京区
- 聖護院川原町53 京都大学ウイルス研究所内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所 (Sae-gusa & Partners); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ,

[続葉有]

(54) Title: DIAGNOSIS METHOD AND DIAGNOSIS KIT FOR DERMATOMYOSITIS

(54) 発明の名称: 皮膚筋炎の診断方法および診断キット

[図1]



AA C-ADM(α-CADM-140 POSITIVE)
BB MDA5 C-TERMINAL

(57) Abstract: The object aims to identify an antigen corresponding to an anti-CADM-140 antibody, produce a recombinant protein, and establish a measurement system by ELISA or the like. Disclosed is a kit for diagnosing dermatomyositis, which comprises an MDA5 protein represented by SEQ ID NO:4 or a fragment thereof capable of being recognized by an anti-CADM-140 antibody.

(57) 要約: 本発明の課題は、抗 CADM-140 抗体の対応抗原の同定、リコンビナント蛋白の作製および ELISA などによる測定系の確立することである。本発明は、配列番号 4 で示される MDA5 タンパク質または抗 CADM-140 抗体により認識されるその断片を含む、皮膚筋炎の診断キットを提供する。

WO 2010/024089 A1

CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, — 明細書の別個の部分として表した配列リスト
TD, TG). (規則 5.2(a))

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：皮膚筋炎の診断方法および診断キット

技術分野

[0001] 本発明は、皮膚筋炎の診断方法および診断キット、並びに皮膚筋炎の診断のための抗原タンパク質の使用に関する。

背景技術

[0002] 膠原病を自己免疫疾患とする基本的特徴は、種々の細胞成分に対する自己抗体の産生である。これら自己抗体の対応抗原の多くは、生命現象に必須な酵素や調節因子であることが知られており、自己抗体とその対応抗原（自己抗原）の分子構造と生物学的機能の追究は膠原病の病因解明につながることで期待される。

[0003] 多発性筋炎/皮膚筋炎（Polymyositis/ Dermatomyositis: PM/DM）は、骨格筋の炎症にともなう近位筋の筋力低下・筋痛を主症状とする炎症性筋疾患であり、特にヘリオトロープ疹やゴットロン徴候などの典型的な皮膚症状を呈する場合にはDMと診断される。本疾患は、自己免疫疾患のひとつで、様々な自己抗体が、出現することが知られている。これまで、PM/DM患者血清中には、抗アミノアシルtRNA合成酵素抗体（抗ARS抗体）、抗SRP抗体や抗Mi-2抗体などの筋炎に特異的に検出される抗体や抗U1RNP抗体や抗SS-A抗体など筋炎と関連するとされる自己抗体が報告されている。これら同一筋炎特異自己抗体陽性症例は、同様の臨床的特徴を有していることが知られており、臨床的に、診断、病型分類、治療法の選択、予後の推定などに有用である。

[0004] 一方、PM/DMのサブタイプである臨床的に筋炎症状に乏しいDM（Clinically amyopathic DM: C-ADM）症例では、自己抗体陰性がひとつの特徴とされ、特異的な自己抗体の存在は明らかではなかった。また、C-ADM症例は、臨床上、治療抵抗性で予後不良の急速進行性間質性肺炎（Rapidly progressive Interstitial Lung Disease: RP-ILD）を合併することが知られている。RP-ILDを併発したC-ADM症例に対しては、救命のため、早期から大量ステロイド療法に

免疫抑制剤を併用する強力な治療の有効性が報告され、推奨されている。かかる点で、RP-ILD併発ADMの早期診断は臨床的に重要であり、早期診断に有用な新たな指標の確立が望まれている。

- [0005] 以上のような背景をふまえ、本発明者は、C-ADMを含む膠原病、特発性間質性肺炎および健常人の血清を、免疫沈降法（Immunoprecipitation: IPP）で検討し、C-ADM患者血清に140kDa蛋白を認識する新たな自己抗体の存在を見出し、この新規自己抗体を抗CADM-140抗体と命名した（非特許文献1）。
- [0006] 抗CADM-140抗体は、C-ADM以外の膠原病、IPF（特発性肺線維症）および健常人では認められず、臨床的には、抗CADM-140抗体陽性例はRP-ILD併発が有意に高頻度で、同抗体とRP-ILDとの関連が示唆された（非特許文献2）。
- [0007] この事実は、極めて予後不良とされるRP-ILD併発C-ADMの早期診断・治療法の選択に有用と考えられ、その予後の改善につながることを期待されている。
- [0008] MAD5はSNPを有し（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=64135）、そのアミノ酸配列および塩基配列はNCBIアクセション番号NM_022168に記載され、癌との関連が特許文献1に開示されている。
- [0009] 本発明者らは、本発明の関連技術を非特許文献3に発表した。

先行技術文献

特許文献

- [0010] 特許文献1：特表2003-531581

非特許文献

- [0011] 非特許文献1：Arthritis Rheum. 46(9)：S398, 2003
非特許文献2：Arthritis Rheum. 52(5)：1571-1576, 2005
非特許文献3：Arthritis Rheum. 60(7)：2193-2200, 2009

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0012] これまで、抗CADM-140抗体の測定は、S³⁵で標識した白血病細胞由来K562細

胞抽出物あるいはHeLa細胞を用いたIPP法で測定を行ってきた。この方法は、感度、特異度ともに高い、信頼性の高い測定法であるが、アイソトープを使用すること、操作が煩雑なことなどから、一部の限られた研究室でしか測定できないのが現状であった。

[0013] 抗CADM-140抗体測定を実際の臨床診療に応用するためには、大量の検体を簡便に測定する測定系を確立することが必要になる。そのためには、抗CADM-140抗体の対応抗原の同定、リコンビナント蛋白の作製およびELISAなどによる測定系の確立が重要な課題となる。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者は、HeLa細胞cDNAライブラリーを使用して、抗CADM-140抗体の対応抗原遺伝子のクローニングを行い、対応抗原蛋白の分子配列を検討したところ、抗CADM-140抗体の対応抗原がMDA5 (Melanoma Differentiation Associated Gene 5) であることを見出し、本発明を完成した。

[0015] 本発明は、以下の皮膚筋炎の診断キットおよび皮膚筋炎の診断方法を提供するものである。

項 1. 配列番号 4 で示されるMDA5タンパク質または抗CADM-140抗体により認識されるその断片を含む、皮膚筋炎の診断キット。

項 2. 配列番号 2 で示されるMDA5タンパク質のC末端側の断片または抗CADM-140抗体により認識されるその断片を含む、項 1 に記載の皮膚筋炎の診断キット。

項 3. 皮膚筋炎が、急速進行性間質性肺炎を発症する可能性が高いタイプの筋炎症状の軽微なタイプの皮膚筋炎(C-ADM)である、項 1 に記載の診断キット。

項 4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により測定するための項 1 に記載の診断キット。

項 5.

(i) MDA5タンパク質またはその免疫原性ペプチドからなる抗原

(ii) 被験体のサンプルと(i)の抗原との反応に適した媒体、

(iii) 抗CADM-140抗体と(i)の抗原との複合体を検出するための試薬

(iv) 必要に応じて、抗CADM-140抗体を含まない基準となるサンプルを含む、項1に記載の診断キット。

項6. 被験者のサンプルをMDA5タンパク質または抗CADM-140抗体により認識されるその断片と反応させる工程、サンプル中の抗CADM-140抗体が検出された場合に皮膚筋炎と診断することを特徴とする、皮膚筋炎の診断方法。

項7. 前記サンプルが、血液、血清または血漿サンプルである項5に記載の診断方法。

項8. サンプル中の抗CADM-140抗体をELISA法により検出する、項6に記載の診断方法。

項9. 以下の工程を含む、項6に記載の診断方法：

(i) 所定量の本発明ペプチド組成物をマイクロタイタープレートの複数のウェルに沈着させる工程、

(ii) 皮膚筋炎の可能性のある被験体由来のサンプルを希釈してウェルに導入する工程、

(iii) マイクロタイタープレートをインキュベーション後に洗浄する工程、

(iv) 標識されたヒト免疫グロブリンに対する抗体をマイクロタイタープレートのウェルに導入する工程、および

(v) 結合したヒト免疫グロブリンの標識量を対照と比較して検出する工程。

項10. MDA5タンパク質または抗CADM-140抗体により認識されるその断片の皮膚筋炎の診断のための使用。

発明の効果

[0016] 本発明によれば、極めて予後不良とされる急速進行性間質性肺炎併発のリスクの高い筋炎症状に乏しい皮膚筋炎を高い確率で見出すことができる。

[0017] 本発明は、抗CADM-140抗体を多くの症例で迅速に測定することを可能とする。このことは、治療法が確立されていない極めて予後不良とされるRP-ILD併発C-ADMの早期診断・治療法の選択に有用で、予後の改善につながる事が期待される。また、同抗体陽性症例を集積することによって、特異自己抗体

の標的となるウイルスなどの外来抗原の分析を可能とし、RP-ILD併発C-ADMの病因解明への手がかりとなるものと考えられる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1] In vitro transcription/ translation systemを用いて、クローン#8 (MDA5) の蛋白を精製し、発現を確認した後、その蛋白を抗原として、免疫沈降法でC-ADM患者血清との反応を検討した結果。クローン#8 (MDA5) は、抗CADM-140抗体陽性血清全例で反応したが、健常人血清では、反応しなかった。

[図2] In vitro transcription/ translation systemを用いて、クローン#8 (MDA5) の蛋白を精製し、発現を確認した後、その(リコンビナント蛋白)を抗原として、免疫沈降法で抗CADM-140抗体陽性C-ADM、他の膠原病および健常者血清との反応を検討した結果。抗CADM-140抗体陽性C-ADM患者血清以外の膠原病および健常人血清とは反応しなかった。

[図3] IPP-IB 法での検討。抗CADM-140抗体陽性血清とMDA5 を発現させたアフリカミドリザル腎臓細胞由来COS7細胞抽出物を反応させて生成した140kDa免疫沈降物はヤギ抗MDA5抗体と反応した。

[図4] リコンビナントRIG-I、MDA5、LGP-2を抗原とした抗CADM-140抗体陽性および健常人血清の免疫ブロット法での検討。抗CADM-140抗体陽性患者血清は、リコンビナントMDA5とのみ反応したが、健常人(Normal Healthy Control; NHC)では反応しなかった。

[図5] MDA5を抗原基質としたELISA測定系による抗CADM-140抗体陽性および陰性C-ADM、PM/DM、強皮症(SSc)。全身性エリテマトーデス(SLE)、ILDおよび健常人血清の検討結果。カットオフ値は、横線で示す。このELISA測定系による analytical sensitivityは85%、analytical specificityは100%であった。

発明を実施するための形態

[0019] 本発明は、抗CADM-140抗体により特異的に認識される抗原(MAD5)を見出した点に特徴を有する。MAD5は、RIG-Iファミリータンパク質の1種であり、RIG-Iファミリータンパク質はインターフェロンI型の産生を含む固有の免疫応答に関与する。RIG-Iファミリータンパク質は相同性が高く、DexD/H-boxヘリカ

ーゼドメインを有するものであり、MDA5の他にRIG-I、LPG-2などが知られている。これらは配列および構造が非常に類似したタンパク質である。そのため、これらの蛋白が交差反応を示す可能性が十分に考えられたため、抗CADM-140抗体とRIG-Iファミリー蛋白との反応性についても、検討を行った。また、抗CADM-140抗体のMDA5との結合は抗原の高次構造に依存し、nativeな構造より部分的に変性したMAD5と優先的に反応する。これらが、抗CADM-140抗体がMAD5に対する抗体であることを突き止めることを困難にした。

[0020] また、抗CADM-140抗体を同定するにあたり、対応抗原蛋白を精製して、質量分析法を用いて、その抗原蛋白同定を試みたが、十分量の抗原蛋白を精製できず、同定は困難であった。これは、血清中の抗原量が少ないあるいは、抗原抗体反応のアフィニティが原因であったと推測された。

[0021] さらに、G-ADMは診断することが難しい疾患であり、筋症状の有無を慎重に判断するため経過観察が必要なため、病初期に他のタイプの皮膚筋炎と区別して診断することが難しい疾患である。

[0022] ところが、本発明で抗CADM-140抗体により特異的に認識されるMAD5を特定したために、ELISA測定によって皮膚筋炎(G-ADM)の臨床的感度(clinical sensitivity)は69%、臨床的特異度(clinical specificity)は99.6%であることが明らかとなった。抗CADM-140抗体陰性G-ADMの患者は従来、診断困難あるいは診断まで時間がかかる場合があったが、本発明により、迅速な診断が可能になった。

[0023] 本明細書において、「皮膚筋炎」は、いわゆるDMと、そのサブタイプである臨床的に筋炎症状のない皮膚筋炎 G-ADMを包含するが、多発性筋炎PMは包含しない。従って本発明は、DMまたはG-ADMであるのか、それ以外であるのかを診断するための診断方法および診断キットを提供するものである。DMは、特徴的な皮膚症状（ヘリオトロープ疹やゴットロン徴候など）と骨格筋の炎症による近位筋の筋力低下・筋痛を主症状とする炎症性筋疾患であり、一般的にBohan & Peterの診断基準を用いて診断される（Bohan A、 Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis. N Engl J Med 1975; 292: 344.）。しか

しながら、DMに典型的な皮疹を有しながら、臨床的に筋症状がない症例であるC-ADMは、Bohan & Peterの診断基準を満たさず、これまで診断不能であった。2002年、Sontheimerは、典型的な皮疹を有しながら、臨床的に筋症状がない症例をC-ADMとして、DMのサブタイプとする分類基準を提唱した (Sontheimer RD: Would a new name hasten the acceptance of amyopathic dermatomyositis (dermatomyositis sine myositis) as a distinctive subset within the idiopathic inflammatory dermatomyopathies spectrum of clinical illness? J Am Acad Dermatol 2002; 46: 626-36.)。本発明における診断対象のDMは、Bohan & Peterの診断基準あるいはSontheimerの分類基準をみたすものである。

[0024] 本発明の診断キットおよび診断方法では、抗CADM-140抗体を検出するために、MDA5タンパク質または抗CADM-140抗体により認識されるその断片を使用する(以下、「抗CADM-140抗体により認識されるMDA5タンパク質の断片」を「免疫原性ペプチド」と略記することがある)。配列番号4で示されるMDA5タンパク質は、そのC末端側の523個のアミノ酸配列(配列番号2)を有する断片が抗CADM-140抗体と結合するため、このC末端側に抗CADM-140抗体により認識されるエピトープが存在する。MDA5タンパク質またはその免疫原性ペプチドは、このエピトープが保存される限り、非エピトープ部分において、1または2以上のアミノ酸が欠失、置換、付加または挿入された改変体であってもよい。エピトープは、通常5~10個程度、特に5~8個程度のアミノ酸からなり、例えば配列番号2のMDA5断片のC末端側の断片において、N末端から一定の数(例えば5個)ずつずらして一定の数(例えば10個)ずつのペプチド(例えば1~10、6~15、11~20、16~25、・・・)を合成し、そのペプチド断片と抗CADM-140抗体との反応性を見ることで、MDA5のエピトープを決定することができる。エピトープを決定あるいは狭い範囲に特定した場合、抗CADM-140抗体により認識されるMDA5タンパク質の断片(免疫原性ペプチド)は短くすることができる。免疫原性ペプチドは、短い方が製造の容易性から好ましく、40個以下、30個以下、20個以下、特に5~10個程度が好ましい。MDA5によりコー

ドされるのは、RNAヘリカーゼである。

- [0025] なお、MDA5は、SNPを有することが知られており、本発明で使用するMDA5タンパク質またはその免疫原性ペプチドは、どのタイプのSNPに対応するMDA5タンパク質またはその免疫原性ペプチドであってもよい。配列番号3は、MDA5の塩基配列を示し、配列番号1は、配列番号2のMDA5断片のC末端側の断片をコードする塩基配列を示すが、これらとSNPの関係にある他のアミノ酸配列／塩基配列のMDA5、あるいはMDA5の対立遺伝子も、本明細書における「MDA5」の概念に包含される。
- [0026] 本発明のMDA5またはその免疫原性ペプチドは、遺伝子工学的に組換えタンパク質として発現させて製造することもでき、化学合成により製造してもよい。特に免疫原性ペプチドが好ましくは50個以下、より好ましくは30個以下、さらに好ましくは20個以下、特に5~10個のような短い配列を有する場合、化学合成（固相または液相）により好適に製造される。MDA5またはその免疫原性ペプチドは、モノマーで使用してもよく、例えばグルタルアルデヒドなどの多官能性架橋剤を用いて架橋したり、免疫原性ペプチドをタンデムに連結したペプチドをコードするDNAを用いて遺伝子工学的に製造してもよい。
- [0027] 抗CADM-140抗体は、被験体の血液、血清、血漿、脳脊髄液、リンパ液などのいずれのサンプルに含まれているものでもよいが、血液、血清または血漿、特に血清サンプルが好ましく使用される。
- [0028] 本発明の皮膚筋炎の診断キットは、MDA5タンパク質またはその免疫原性ペプチドを含む。このキットは、MDA5タンパク質またはその免疫原性ペプチドと抗CADM-140抗体との抗原抗体複合体を検出するための物質を含み得る。このような物質としては、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)などのペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼなどの酵素標識、FITC (fluorescein isothiocyanate)、RITC (tetramethylrhodamin isothiocyanate) などの蛍光標識などの任意の標識により標識された抗ヒト免疫グロブリン抗体、特に抗ヒトIgG抗体が挙げられる。
- [0029] 本発明の診断キット、診断方法には、免疫学的測定法が好適に用いられる

。免疫学的測定法としては、例えば酵素免疫検定法（EIA）、ELISA、蛍光免疫測定法（FIA）、化学発光免疫測定法、イムノブロット法（Immunoblotting：IB）、ウエスタンブロット法、免疫染色法などが挙げられる。

[0030] 本発明で使用するMDA5タンパク質またはその免疫原性ペプチドは、好ましくは固相に結合される。固相としてはアガロース、マイクロタイタープレートのウェル、ラテックス粒子等が利用できる。ELISA法として具体的には競合イムノアッセイやサンドイッチイムノアッセイなどが挙げられる。

[0031] 本発明の皮膚筋炎の診断方法は、被験体からのサンプルをMDA5タンパク質またはその免疫原性ペプチドと接触させ、物理学的又は化学的方法によりMDA5もしくは免疫原性ペプチド-抗CADM-140抗体複合体が存在するか否かを検出する。

[0032] 本発明の皮膚筋炎の診断方法は、例えば下記の工程を含む：

- (i) 所定量の本発明ペプチド組成物をマイクロタイタープレートの複数のウェルに沈着させ、
- (ii) 皮膚筋炎の可能性のある被験体由来の血液サンプル（血清ないし血漿）を希釈してウェルに導入し、
- (iii) マイクロタイタープレートをインキュベーション後に洗浄し、
- (iv) 酵素標識、蛍光標識などにより標識されたヒト免疫グロブリン（例えばIgG）に対する抗体をマイクロタイタープレートのウェルに導入し、
- (v) 結合したヒト免疫グロブリンの標識（酵素標識の場合には酵素によって反応された基質）の量を対照と比較して検出する。

[0033] 1つの好ましい実施形態において、本発明の診断キットは、

- (i) MDA5タンパク質またはその免疫原性ペプチドからなる抗原（マイクロタイタープレートのウェルなどに付着されていてもよく、また、bovine serum albumin (BSA)、HSAなどのアルブミン、スキムミルクなどのブロッキング剤でさらにブロッキングされていてもよい）
- (ii) 被験体のサンプルと(i)の抗原との反応に適した媒体（例えば、PBSなどのバッファー(buffer)）、

(iii) 抗CADM-140抗体と(i)の抗原との複合体を検出するための試薬(例えば抗CADM-140抗体と結合する標識された抗ヒト免疫グロブリン抗体)

(iv) 必要に応じて、抗CADM-140抗体を含まない基準となるサンプルなどが含まれ得る。

[0034] 「抗CADM-140抗体を含まない基準となるサンプル」としては、健常者の血液、血清または血漿サンプルなどが挙げられる。

[0035] 抗ヒト免疫グロブリン抗体がペルオキシダーゼで標識されている場合、テトラメチルベンジジンなどの発色剤を添加し、 H_2SO_4 で反応を停止し、プレートリーダーを用いて吸光度(450 nm: OD450)で測定することにより、抗CADM-140抗体を検出することができる。

[0036] 抗CADM-140抗体の測定値により、DMであるか否かの判定の基準は、多くのサンプルを本発明の診断キットで検出し、他の臨床的所見と比較することにより、より高精度の基準とすることができる。

実施例

[0037] 以下、本発明を実施例を用いてより詳細に説明する。

実施例1: C-ADMの早期診断法

大腸菌(XL1-Blue MRF)発現λZAPファージを用いて作製したHeLa細胞cDNAライブラリーを使用し、大腸菌に抗原蛋白質を発現させた。発現蛋白をニトロセルロース膜に転写し、抗CADM-140抗体陽性血清と反応させ、陽性クローンを単離した。次に、得られた陽性クローンにそれぞれと抗CADM-140抗体陽性C-ADM患者10血清と抗CADM-140抗体陰性14血清(C-ADM 2例、PM 2例、全身性エリテマトーデス、強皮症、間質性肺炎各1例、健常人7例)との反応性を検討した。得られた9つのクローンのうち、クローン#8は、抗CADM-140抗体陽性血清10例中9例と、抗CADM-140抗体陽性血清と高頻度に反応した。そこで、In vitro transcription/ translation assayを用いて、蛋白を精製し、発現を確認した後、その蛋白を抗原として、免疫沈降法でC-ADM患者血清と反応を検討した。クローン#8は、抗CADM-140抗体陽性血清全例で反応したが、健常人血清とは反応しなかった(図1)。さらに、クローン#8は、抗CADM-140抗体陽

性C-ADM血清以外の膠原病とも反応しなかった(図2)。さらに、クローン#8の塩基配列を決定するために、同クローンの得られたファージDNAからプラスミドDNAの切り出しを行い、プラスミドDNAを精製して塩基配列を決定した。最後に得られた塩基配列について、ホモロジーサーチを行ったところ、MDA5のC末端部分の配列と完全に一致した。

[0038] IPP-IB法で、抗CADM-140抗体陽性血清とMDA5を発現させたアフリカミドリザル腎臓細胞由来COS7細胞抽出物を反応させて生成した140kDa免疫沈降物とヤギ抗MDA5抗体の反応性を検討したところ、MDA5を発現させた場合には、ヤギ抗MDA5抗体との反応が認められた(図3)。さらに、RIG-IファミリーであるRIG-I、MDA5、LGP-2のリコンビナント精製蛋白を抗原とした抗CADM-140抗体陽性および健常人血清の免疫ブロット法で検討したが、抗CADM-140抗体陽性患者血清は、リコンビナントMDA5とのみ反応したが、健常人では反応しなかった(図4)。以上の結果から、抗CADM-140抗体の対応抗原がMDA5であることが明らかになった。

[0039] さらに、本発明者は、精製したリコンビナントMDA5を抗原として96穴プレートにコーティングして、抗CADM-140抗体測定のELISAを確立し、作成した抗CADM-140抗体測定法の診断感度および診断特異度を検討した。具体的には、リコンビナントMDA5を $0.05 \mu\text{g}/\text{well}$ の割合で、96穴ELISAプレートに固相化し、3% BSAでブロッキングを行った。測定する血清(250倍希釈)100 μl ずつをプレートに分注し、室温2時間で反応させ、2次抗体として、5,000倍希釈のPeroxidase conjugated goat anti-human-IgGを用いた。Tetra methylbenzidine (1mg/ml)を発色剤として添加し、 H_2SO_4 で反応を停止し、プレートリーダーで吸光度(450 nm: OD_{450})を測定した。この測定系を用いて、C-ADM含有膠原病、間質性肺炎(ILD)および健常人の血清を用いて測定を行った。抗CADM-140抗体陽性PM/DM患者血清は、抗CADM-140抗体陰性PM/DM患者、強皮症(SSc)患者、全身性エリテマトーデス(SLE)患者、ILD患者および健常人と比較して、より大きな反応性を示した(図5)。健常人血清の平均値+標準偏差の10倍までを正常のカットオフ値とすると、このELISA測定系による分

析感度(analytical sensitivity)は85%、分析特異度(analytical specificity)は100%となり、感度・特異度ともにきわめて優れた抗CADM-140抗体の検出法であることが明らかになった。

請求の範囲

- [請求項1] 配列番号4で示されるMDA5タンパク質または抗CADM-140抗体により認識されるその断片を含む、皮膚筋炎の診断キット。
- [請求項2] 配列番号2で示されるMDA5タンパク質のC末端側の断片または抗CADM-140抗体により認識されるその断片を含む、請求項1に記載の皮膚筋炎の診断キット。
- [請求項3] 皮膚筋炎が、急速進行性間質性肺炎を発症する可能性が高い筋炎症状の軽微なタイプの皮膚筋炎(C-ADM)である、請求項1に記載の診断キット。
- [請求項4] Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により測定するための請求項1に記載の診断キット。
- [請求項5] (i) MDA5タンパク質またはその免疫原性ペプチドからなる抗原
(ii) 被験体のサンプルと(i)の抗原との反応に適した媒体、
(iii) 抗CADM-140抗体と(i)の抗原との複合体を検出するための試薬
(iv) 必要に応じて、抗CADM-140抗体を含まない基準となるサンプルを含む、請求項1に記載の診断キット。
- [請求項6] 被験者のサンプルをMDA5タンパク質または抗CADM-140抗体により認識されるその断片と反応させる工程、サンプル中の抗CADM-140抗体が検出された場合に皮膚筋炎と診断することを特徴とする、皮膚筋炎の診断方法。
- [請求項7] 前記サンプルが、血液、血清または血漿サンプルである請求項5に記載の診断方法。
- [請求項8] サンプル中の抗CADM-140抗体をELISA法により検出する、請求項6に記載の診断方法。
- [請求項9] 以下の工程を含む、請求項6に記載の診断方法：
(i) 所定量の本発明ペプチド組成物をマイクロタイタープレートの複数のウェルに沈着させる工程、
(ii) 皮膚筋炎の可能性のある被験体由来のサンプルを希釈してウェル

に導入する工程、

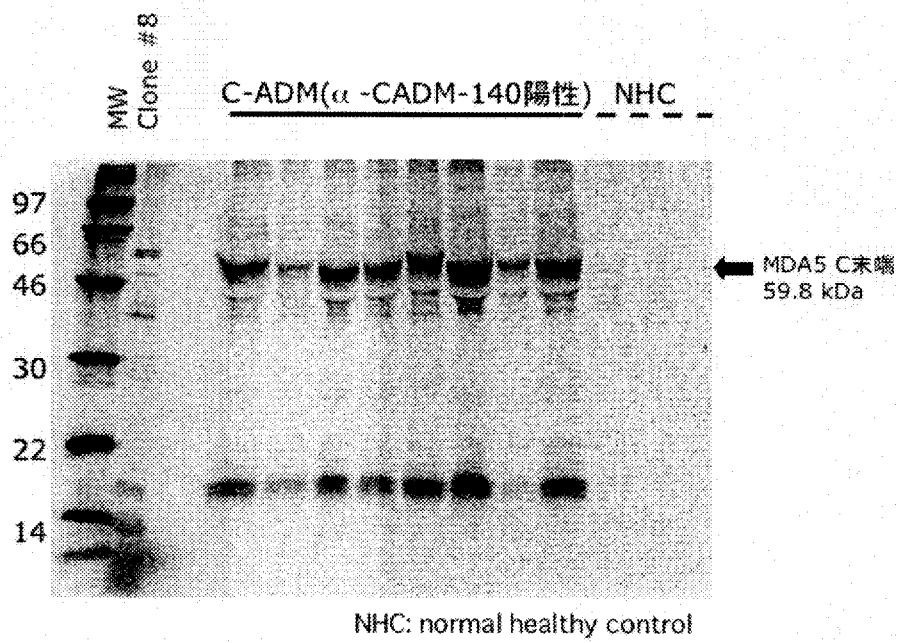
(iii) マイクロタイタープレートをインキュベーション後に洗浄する工程、

(iv) 標識されたヒト免疫グロブリンに対する抗体をマイクロタイタープレートのウェルに導入する工程、および

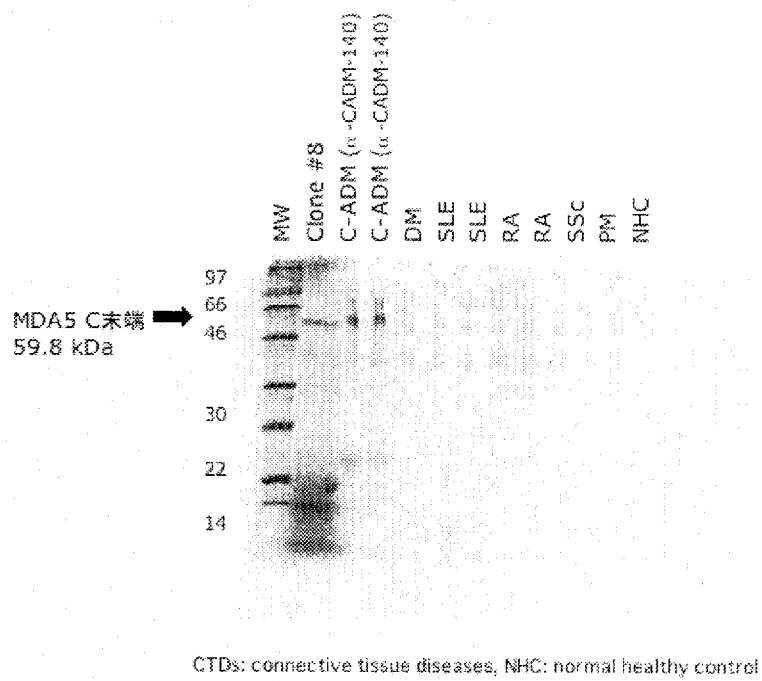
(v) 結合したヒト免疫グロブリンの標識量を対照と比較して検出する工程。

[請求項10] MDA5タンパク質または抗CADM-140抗体により認識されるその断片の皮膚筋炎の診断のための使用。

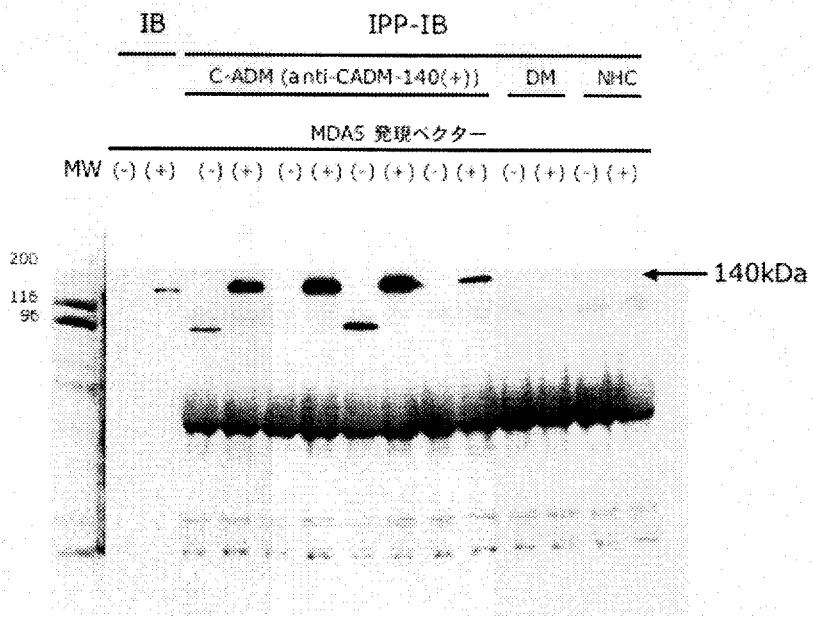
[図1]



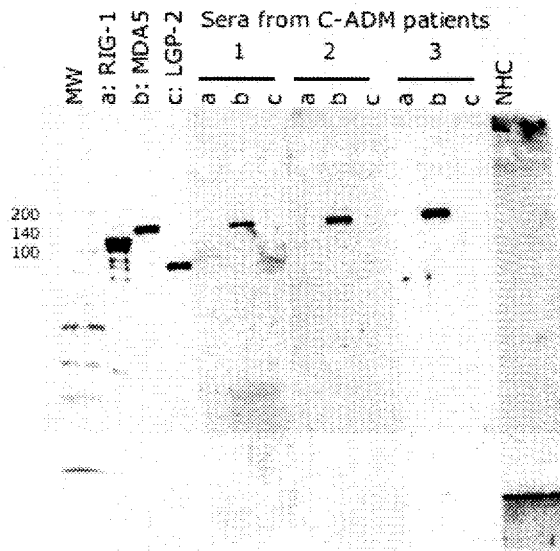
[図2]



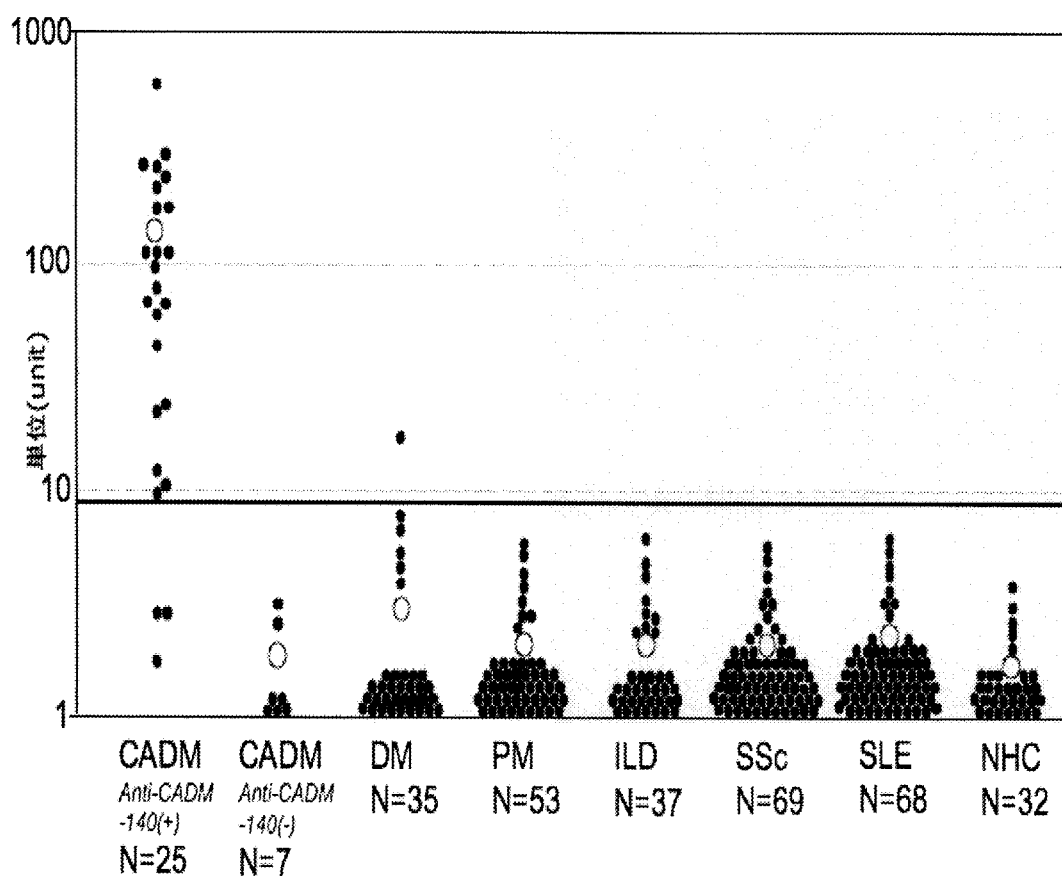
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2009/063633
--

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
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)
G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Sato S et al., Arthritis Rheum., 2005.05, 52(5), 1571-1576	1-10
A	Michito HIRAKATA, Japanese journal of chinal immunology, 2007, Vol.30, No.6, 444-454	1-10
A	Shinji SATO, Molecular Rheumatology, 2006, Vol.3, No.1, 3-8	1-10
A	Yamasaki Y et al., Arthritis Rheum., 2007.02, 56(2), 596-604	1-10
A	Villers A et al, Ann Dermatol Venereol., 2006.07, 133(6-7), 573-576	1-10

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"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)	"&" document member of the same patent family
"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 03 September, 2009 (03.09.09)	Date of mailing of the international search report 29 September, 2009 (29.09.09)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/063633

Claims 1-2 and 4-10 relate to "the diagnosis of dermatomyositis" and include DM as well as C-ADM. However, only the diagnosis of C-ADM is disclosed in the meaning within PCT Article 5. Therefore, these claims are not supported in the meaning within PCT Article 6.

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	1971-2009年
日本国実用新案登録公報	1996-2009年
日本国登録実用新案公報	1994-2009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)

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
A	Sato S et al., Arthritis Rheum., 2005.05, 52(5), 1571-1576	1-10
A	平形道人, 日本臨床免疫学会会誌, 2007, Vol. 30 No. 6, 444-454	1-10
A	佐藤慎二, 分子リウマチ, 2006, Vol. 3 No. 1, 3-8	1-10
A	Yamasaki Y et al., Arthritis Rheum., 2007.02, 56(2), 596-604	1-10

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

03.09.2009

国際調査報告の発送日

29.09.2009

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 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

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

2 J

3316

C (続き) . 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
A	Villers A et al, Ann Dermatol Venereol., 2006.07, 133(6-7), 573-576	1 - 10

請求項 1-2、4-10 は、「皮膚筋炎の診断」という、C-ADM 以外に DM も包含するものであるが、PCT 第 5 条の意味において開示されているのは、C-ADM の診断のみであり、PCT 第 6 条の意味での裏付けを欠いている。