

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/008498

発行日 平成29年3月2日 (2017.3.2)

(43) 国際公開日 平成27年1月22日 (2015.1.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/564 (2006.01)	GO 1 N 33/564	Z 4 B O 2 4
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	N
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 56 頁)

出願番号	特願2015-527186 (P2015-527186)	(71) 出願人	504176911 国立大学法人大阪大学 大阪府吹田市山田丘1番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2014/050796	(74) 代理人	100115255 弁理士 辻丸 光一郎
(22) 国際出願日	平成26年1月17日 (2014.1.17)	(74) 代理人	100129137 弁理士 中山 ゆみ
(31) 優先権主張番号	特願2013-148833 (P2013-148833)	(74) 代理人	100154081 弁理士 伊佐治 創
(32) 優先日	平成25年7月17日 (2013.7.17)	(72) 発明者	荒瀬 尚 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法 人大阪大学内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	谷村 憲司 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法 人大阪大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己抗体の検出方法、自己免疫疾患の罹患の可能性を試験する方法、自己抗体の検出試薬および自己免疫疾患用の試験試薬

(57) 【要約】

自己免疫疾患の原因となる自己抗体を、優れた精度で検出できる自己抗体の検出方法を提供する。

本発明の自己抗体の検出方法は、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラスII分子により提示された変性タンパク質を含む抗原試薬と、サンプルとを接触させる接触工程、および、前記サンプルにおける自己抗体と前記抗原試薬における前記変性タンパク質との複合体を検出する検出工程を含むことを特徴とする。そして、この検出方法により、被検体から単離した生体試料について、前記自己抗体と前記変性タンパク質との複合体を検出することで、その検出結果から、前記被検体について、自己免疫疾患の罹患可能性を試験することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

MHCクラスII分子により提示された変性タンパク質を含む抗原試薬と、サンプルとを接触させる接触工程、および、
前記サンプルにおける自己抗体と前記抗原試薬における前記変性タンパク質との複合体を検出する検出工程を含むことを特徴とする、自己抗体の検出方法。

【請求項 2】

前記変性タンパク質が、正常フォールドタンパク質のフォールディングが変性したミスフォールドタンパク質である、請求項 1 記載の検出方法。

【請求項 3】

前記変性タンパク質が、MHCクラスII分子の発現系細胞に正常フォールドタンパク質のコード遺伝子を導入することで得られる、MHCクラスII分子により提示された変性タンパク質である、請求項 1 または 2 記載の検出方法。

【請求項 4】

前記変性タンパク質が、自己免疫疾患に關与する正常フォールドタンパク質が変性したタンパク質である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の検出方法。

【請求項 5】

前記変性タンパク質が、IgG重鎖、サイログロブリン、 α 2 グリコプロテイン I および甲状腺刺激ホルモン受容体からなる群から選択された少なくとも一つが変性したタンパク質である、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の検出方法。

【請求項 6】

前記MHCクラスII分子が、HLA-DR、HLA-DPおよびHLA-DQからなる群から選択された少なくとも一つである、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の検出方法。

【請求項 7】

前記MHCクラスII分子が、HLA-DR1、HLA-DR2、HLA-DR3、HLA-DR4、HLA-DR5、HLA-DR6、HLA-DR7、HLA-DR8、HLA-DR13、HLA-DR14、HLA-DR15、HLA-DQ3、HLA-DQ6、HLA-DQ8、HLA-DP4およびHLA-DP5からなる群から選択された少なくとも一つである、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の検出方法。

【請求項 8】

前記MHCクラスII分子と前記変性タンパク質との組合せが、下記(1)から(4)からなる群から選択された少なくとも一つである、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の検出方法。

(1) 前記MHCクラスII分子が、HLA-DRを含み、前記変性タンパク質が、IgG重鎖の変性タンパク質である

(2) 前記MHCクラスII分子が、HLA-DRを含み、前記変性タンパク質が、サイログロブリンの変性タンパク質である

(3) 前記MHCクラスII分子が、HLA-DRを含み、前記変性タンパク質が、 α 2 グリコプロテイン I の変性タンパク質である

(4) 前記MHCクラスII分子が、HLA-DPを含み、前記変性タンパク質が、甲状腺刺激ホルモン受容体の変性タンパク質である

【請求項 9】

サンプルが、被検体から単離した生体試料であり、

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の自己抗体の検出方法によって、前記サンプルにおける自己抗体とMHCクラスII分子により提示された変性タンパク質との複合体を検出する検出工程、および、

前記検出工程における前記複合体の検出結果から、自己免疫疾患の罹患の可能性を試験する試験工程を含むことを特徴とする、自己免疫疾患の罹患の可能性を試験する方法。

【請求項 10】

10

20

30

40

50

前記検出工程が、前記複合体の形成量を測定する測定工程である、請求項 9 記載の試験方法。

【請求項 1 1】

前記試験工程において、前記測定工程で測定した前記複合体形成量の測定値と基準値とを比較し、前記測定値が前記基準値よりも高い場合に、前記被験者は、前記自己免疫疾患の罹患可能性があるとし、

前記基準値が、健常者から単離した生体試料における前記複合体の形成量である、請求項 1 0 記載の試験方法。

【請求項 1 2】

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の自己抗体の検出方法に用いる自己抗体の検出試薬であって、

MHC クラス II 分子により提示された変性タンパク質を含むことを特徴とする、自己抗体の検出試薬。

【請求項 1 3】

請求項 1 2 記載の検出試薬の製造方法であり、

MHC クラス II 分子の発現系細胞に、正常フォールドタンパク質をコードする遺伝子を導入することで、前記正常フォールドタンパク質が変性した前記変性タンパク質が提示された MHC クラス II 分子を調製する調製工程を含むことを特徴とする、検出試薬の製造方法。

【請求項 1 4】

サンプルが、自己免疫疾患の被検体から単離した生体試料であり、

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の自己抗体の検出方法によって、前記サンプルにおける自己抗体と MHC クラス II 分子により提示された変性タンパク質との複合体を検出する検出工程、および、

前記自己抗体との前記複合体を形成した前記変性タンパク質を、前記自己免疫疾患に関連する自己抗体に対する抗原タンパク質と判断する判断工程を含むことを特徴とする、自己免疫疾患に関連する自己抗体に対する抗原タンパク質のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、自己抗体の検出方法、自己免疫疾患の罹患の可能性を試験する方法、自己抗体の検出試薬、自己免疫疾患用の試験試薬、自己抗体の検出試薬の製造方法および自己免疫疾患に関連する自己抗体に対する抗原タンパク質のスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

自己免疫疾患の診断には、一般的に、患者の症状等に基づく直接的な判断の他に、自己免疫疾患に特異的な自己抗体の検出に基づく間接的な判断が利用されている。前記自己抗体の検出は、通常、精製した抗原タンパク質を担体に固相化し、この固相化タンパク質との結合を確認する ELISA 法等が採用されている。しかしながら、医師により、症状に基づいて自己免疫疾患と診断された場合でも、それら全ての患者において、ELISA 法により前記自己抗体が検出できるわけでは無かった。このため、ELISA 法による自己抗体の検出のみでは偽陰性となることがあり、自己免疫疾患の診断には、その他の判断方法を併用する必要がある。そこで、信頼性に優れた自己免疫疾患の診断を行うために、優れた精度で自己抗体を検出できる方法の確立が求められている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献 1】S. LOIZOU et.al., 「Measurement of anti-cardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results」、Clin. exp. Immunol., Wiley、1985年、vol.62、p

10

20

30

40

50

.738-745

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

そこで、本発明は、自己免疫疾患の原因となる自己抗体を、優れた精度で検出できる自己抗体の検出方法の提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

前記本発明の課題を解決するために、本発明の自己抗体の検出方法は、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラスII分子により提示された変性タンパク質を含む抗原試薬と、サンプルとを接触させる接触工程、および、前記サンプルにおける自己抗体と前記抗原試薬における前記変性タンパク質との複合体を検出する検出工程を含むことを特徴とする。以下、「MHCクラスII分子により提示された変性タンパク質」を、「変性タンパク質/MHCクラスII」ともいう。

10

【0006】

本発明の自己免疫疾患の罹患の可能性を試験する方法は、サンプルが、被検体から単離した生体試料であり、前記本発明の自己抗体の検出方法によって、前記サンプルにおける自己抗体とMHCクラスII分子により提示された変性タンパク質との複合体を検出する検出工程、および、前記検出工程における前記複合体の検出結果から、自己免疫疾患の罹患の可能性を試験する試験工程を含むことを特徴とする。

20

【0007】

本発明の自己抗体の検出試薬は、前記本発明の自己抗体の検出方法に用いる自己抗体の検出試薬であって、MHCクラスII分子により提示された変性タンパク質を含むことを特徴とする。また、本発明の自己免疫疾患の試験試薬は、前記本発明の自己抗体の検出試薬を含むことを特徴とする。

【0008】

本発明の自己抗体の検出試薬の製造方法は、前記本発明の検出試薬の製造方法であり、MHCクラスII分子の発現系細胞に、正常フォールドタンパク質をコードする遺伝子を導入することで、前記正常フォールドタンパク質が変性した前記変性タンパク質が提示されたMHCクラスII分子を調製する調製工程を含むことを特徴とする。

30

【0009】

本発明のスクリーニング方法は、自己免疫疾患に関連する自己抗体に対する抗原タンパク質のスクリーニング方法であり、サンプルが、自己免疫疾患の被検体から単離した生体試料であり、前記本発明の自己抗体の検出方法によって、前記サンプルにおける自己抗体とMHCクラスII分子により提示された変性タンパク質との複合体を検出する検出工程、および、前記自己抗体との前記複合体を形成した前記変性タンパク質を、前記自己免疫疾患に関連する自己抗体に対する抗原タンパク質と判断する判断工程を含むことを特徴とする。

【発明の効果】

【0010】

抗原提示細胞内において、タンパク質抗原はペプチド断片に分解され、前記ペプチド断片はMHCクラスII分子に結合して、前記細胞の表面まで運ばれ、前記細胞表面上に提示されることが知られている。しかしながら、本発明者らは、鋭意研究の結果、以下の知見を得た。すなわち、まず、前記MHCクラスII分子は、分解された前記ペプチド断片を提示するだけでなく、前記細胞の小胞体（ER）内でミスフォールドされた変性タンパク質と結合し、前記細胞表面に提示すること、さらに、自己抗体が、前記MHCクラスII分子により細胞表面に提示された前記変性タンパク質を認識して、前記変性タンパク質に結合するとの知見である。これらは、本願の出願当初には報告されていない機構であって、本発明者によって初めて見出されたものである。そして、本発明者らは、前述のように、従来のELISA法で使用される精製タンパク質、すなわち、正常にフォールディングされ

40

50

た正常フォールドタンパク質と、前記変性タンパク質/MHCクラスIIとを、それぞれ抗原試薬として使用し、自己抗体を検出した結果、前記変性タンパク質/MHCクラスIIは、前記正常フォールドタンパク質よりも高い特異性で、自己免疫疾患の患者の自己抗体に認識されることを確認し、本発明を確立に至った。このため、自己抗体を検出するための抗原試薬として、前記変性タンパク質/MHCクラスIIを使用する本発明によれば、自己免疫疾患に關与する自己抗体を優れた精度で検出できる。そして、例えば、前記正常フォールドタンパク質を使用するELISA法では検出できなかった自己抗体を検出できるため、従来のような偽陰性の問題を抑制し、優れた精度で自己免疫疾患の罹患の可能性を判断できる。このため、本発明は、例えば、臨床分野および生化学分野において極めて有用である。

10

【0011】

前記変性タンパク質/MHCクラスIIを抗原試薬とすることにより、前記正常フォールドタンパク質を抗原試薬とするよりも優れた精度で自己抗体の検出が可能である理由は、以下のように考えられる。すなわち、前記サンプルにおける自己抗体は、正常フォールドタンパク質に対しては、交差反応性で結合しているのであって、前記変性タンパク質/MHCクラスIIに対しては、特異的に結合しているためと推測される。なお、この推定は本発明を何ら制限しない。

【図面の簡単な説明】**【0012】**

【図1】図1は、実施例1Aにおける、細胞表面のIgGおよびMHCクラスII分子の発現量を示したヒストグラムである。

20

【図2】図2は、実施例1Bにおける、IgGとMHCクラスII分子との結合を示したウェスタンブロットの写真である。

【図3】図3は、実施例1Cにおける、細胞表面のIgGもしくはMHCクラスII分子の発現量またはMHCクラスII分子に提示されたIgG重鎖へのリウマチ因子もしくはRF61リウマチ因子の結合量を示したヒストグラムである。

【図4】図4は、実施例1Dにおける、MHCクラスII分子に提示されたIgGへのリウマチ因子陰性もしくは陽性患者由来の血清中のIgMの結合量を示したグラフである。

【図5】図5は、実施例1Eにおける、細胞表面におけるIgG重鎖、もしくはHLA-DRの発現量、または自己抗体の結合量を示すヒストグラムである。

30

【図6】図6は、実施例1Fにおける、異なるハプロタイプMHCクラスII分子に提示されたIgGへのRFの結合量とリウマチ感受性のオッズ比とを比較したグラフである。

【図7】図7は、実施例1Gにおける、細胞表面における自己抗体の結合量を示すヒストグラムである。

【図8】図8は、実施例1Gにおける、抗HLA-DR/IgGH複合体抗体価(aHLA-DR/IgGH)の標準曲線を示すグラフである。

【図9】図9は、実施例1Gにおける、aHLA-DR/IgGH値とRF値とを比較したグラフである。

【図10】図10は、実施例2Aにおける、異なるハプロタイプのMHCクラスII分子を用いたときの細胞表面のサイログロブリン(TG)の発現量を示すヒストグラムである。

40

【図11】図11は、実施例2Bにおける、TGとMHCクラスII分子との結合を示したウェスタンブロットの写真である。

【図12】図12は、実施例2Cにおける、異なるハプロタイプのMHCクラスII分子に提示されたTGへの抗TG抗体陰性もしくは陽性の橋本病患者または健康者由来の血清中の抗体の結合量を示したヒストグラムである。

【図13】図13は、実施例2Dにおける、異なるハプロタイプのMHCクラスII分子に提示されたTGへの連続希釈した抗TG抗体陰性または陽性の橋本病患者由来の血清中の抗体の結合量を示したグラフである。

【図14】図14は、実施例2Eにおける、異なるハプロタイプのMHCクラスII分子に提示されたTGへの橋本病患者由来の血清中の抗体の結合量を比較したグラフである。

50

【図15】図15は、実施例3Aにおける、細胞表面における 2 グリコプロテイン I (2 - G P I) もしくは M H C クラス II 分子の発現量または M H C クラス II 分子に提示された 2 - G P I への抗カルジオリピン抗体の結合量を示すヒストグラムである。

【図16】図16は、実施例3Bにおける、異なるハプロタイプの M H C クラス II 分子を用いたときの細胞表面の 2 - G P I の発現量を示すグラフである。

【図17】図17は、実施例3Bにおける、異なるハプロタイプの M H C クラス II 分子に提示された 2 - G P I への抗カルジオリピン抗体の結合量を示すグラフである。

【図18】図18は、実施例3Cにおける、 2 - G P I と M H C クラス II 分子との結合を示したウェスタンプロットの写真である。

【図19】図19は、実施例3Dにおける、抗HLA-DR/ 2-GPI複合体抗体価 (aHLA-DR/ 2-GPI) の標準曲線を示すグラフである。

【図20】図20は、実施例3Dにおける、抗リン脂質抗体症候群患者および健常者の血清のHLA-DR/ 2-GPI複合体システムによる抗リン脂質抗体算出値 (aHLA-DR/ 2-GPI 値) を示すグラフである。

【図21】図21は、実施例3Dにおいて、A P S 患者の血清について、HLA-DR/ 2-GPI 複合体システムによる自己抗体値 (aHLA-DR/ 2-GPI 値) と E L I S A 法による抗リン脂質抗体測定値または抗カルジオリピン抗体測定値とを比較したグラフである。

【図22】図22は、実施例4における、細胞表面における T S H R もしくは M H C クラス II 分子の発現量、または M H C クラス II 分子に提示された T S H R への自己抗体の結合量を示すヒストグラムである。

【発明を実施するための形態】

【0013】

< 自己抗体の検出方法 >

本発明の自己抗体の検出方法は、前述のように、M H C クラス II 分子により提示された変性タンパク質を含む抗原試薬と、サンプルとを接触させる接触工程、および、前記サンプルにおける自己抗体と前記抗原試薬における前記変性タンパク質との複合体を検出する検出工程を含むことを特徴とする。

【0014】

本発明の検出方法において、前記変性タンパク質は、例えば、正常タンパク質ではないことを意味する。本発明において、前記変性タンパク質は、例えば、正常フォールドタンパク質のフォールディングが変性したミスフォールドタンパク質である。

【0015】

本発明の検出方法において、前記変性タンパク質が、M H C クラス II 分子の発現系細胞に正常フォールドタンパク質のコード遺伝子を導入することで得られる、M H C クラス II 分子により提示された変性タンパク質であることが好ましい。本発明において、前記変性タンパク質は、例えば、正常タンパク質のフォールディングと比較して、どのようにミスフォールドしているかにはかかわらず、前記発現系細胞に前記正常タンパク質のコード遺伝子を導入することで得られる、M H C クラス II 分子により提示されたタンパク質であることが好ましい。

【0016】

本発明の検出方法において、さらに、M H C クラス II 分子の発現系細胞に、正常フォールドタンパク質をコードする遺伝子を導入することで、前記正常フォールドタンパク質が変性した前記変性タンパク質が提示された M H C クラス II 分子を調製する調製工程を含むことが好ましい。

【0017】

本発明の検出方法において、前記変性タンパク質が、例えば、自己免疫疾患に關与する正常フォールドタンパク質が変性したタンパク質である。

【0018】

本発明の検出方法において、前記変性タンパク質が、例えば、I g G 重鎖、サイログロブリン、 2 グリコプロテイン I および甲状腺刺激ホルモン受容体からなる群から選択さ

10

20

30

40

50

れた少なくとも一つが変性したタンパク質である。

【0019】

本発明の検出方法において、前記MHCクラスII分子が、HLA-DR、HLA-DPおよびHLA-DQからなる群から選択された少なくとも一つであることが好ましい。本発明において、前記MHCクラスII分子が、例えば、自己免疫疾患感受性MHCクラスII分子である。

【0020】

本発明の検出方法において、例えば、前記MHCクラスII分子が、HLA-DRを含み、前記変性タンパク質が、IgG重鎖の変性タンパク質である。これにより、例えば、関節リウマチに関連する自己抗体を検出できる。

10

【0021】

本発明において、例えば、前記MHCクラスII分子が、HLA-DRを含み、前記変性タンパク質が、サイログロブリンの変性タンパク質である。これにより、例えば、橋本病に関連する自己抗体を検出できる。

【0022】

本発明において、例えば、前記MHCクラスII分子が、HLA-DRを含み、前記変性タンパク質が、 α 2グリコプロテインIの変性タンパク質である。これにより、例えば、抗リン脂質抗体症候群に関連する自己抗体を検出できる。

【0023】

本発明において、例えば、前記MHCクラスII分子が、HLA-DPを含み、前記変性タンパク質が、甲状腺刺激ホルモン受容体の変性タンパク質である。これにより、例えば、バセドウ病(Graves病)に関連する自己抗体を検出できる。

20

【0024】

本発明の自己抗体の検出方法は、前記検出工程において、前記サンプルにおける「自己抗体」と、前記抗原試薬における「MHCクラスII分子により提示された変性タンパク質(変性タンパク質/MHCクラスII)」との複合体を形成させ、これを検出することが特徴であって、その他の工程および条件は、特に制限されない。

【0025】

本発明において、自己抗体とは、例えば、前記サンプルの由来となる被検体で生産される抗体であって、前記被検体の自己成分(自己抗原)に対する抗体を意味する。具体例として、例えば、動物個体において、前記個体の自己抗原に対して産生される抗体等があげられる。前記自己抗体は、前述のように、自己免疫疾患に関連し、その有無または量の測定が、自己免疫疾患の診断、治療または予後の判定において重要であることが知られている。このため、本発明の自己抗体の検出方法は、例えば、自己免疫疾患の診断等において、非常に有用である。

30

【0026】

(1) 抗原試薬

本発明において、自己抗体を検出するための抗原試薬は、自己抗体の検出試薬ということもできる。前記抗原試薬は、前述のように、MHCクラスII分子により提示された変性タンパク質である。前記変性タンパク質の形態は、特に制限されない。一例として、前記抗原試薬は、前記変性タンパク質が前記MHCクラスII分子の結合溝に結合した、前記変性タンパク質と前記MHCクラスII分子との複合体の形態があげられる。前記複合体は、例えば、前記複合体のみの形態でもよいし、前記複合体をその表面に提示した細胞(例えば、抗原提示細胞)の形態でもよい。また、その他の例として、前記抗原試薬は、例えば、前記MHCクラスII分子との結合を解離した、前記変性タンパク質(MHCクラスII分子未結合の変性タンパク質)の形態でもよい。

40

【0027】

本発明において、前記変性タンパク質は、例えば、正常フォールドタンパク質のフォールディングが変性したタンパク質である。前記正常フォールドタンパク質とは、例えば、正常に折りたたまれたタンパク質を意味する。

50

【 0 0 2 8 】

(2) 抗原試薬の調製

本発明において、前記変性タンパク質は、例えば、MHCクラスII分子の発現系細胞に正常フォールドタンパク質のコード遺伝子を導入することで得られる、MHCクラスII分子により提示された変性タンパク質であることが好ましい。このため、本発明は、例えば、前記接触工程に先立って、前記変性タンパク質/MHCクラスIIを調製する調製工程、すなわち、MHCクラスII分子の発現系細胞に、正常フォールドタンパク質をコードする遺伝子を導入することで、前記正常フォールドタンパク質が変性した前記変性タンパク質が提示されたMHCクラスII分子を調製する調製工程を含んでもよい。

【 0 0 2 9 】

前記MHCクラスII分子の発現系細胞に、正常フォールドタンパク質をコードする遺伝子を導入すれば、前述のように、前記発現系細胞において、前記遺伝子から発現したタンパク質は、正常フォールドタンパク質の正常なフォールディングではなく、ミスフォールドが生じ、このミスフォールドされた変性タンパク質が、発現した前記MHCクラスII分子と結合して、前記細胞の表面に提示される。

【 0 0 3 0 】

前記正常フォールドタンパク質は、例えば、自己免疫疾患に関与するタンパク質であり、具体例として、自己免疫疾患において、自己抗体の結合が知られているタンパク質があげられる。前述のように、従来から自己免疫疾患における自己抗原と考えられているタンパク質を合成し、その精製タンパク質を抗原タンパク質として担体に固定化し、前記抗原タンパク質と自己抗体との結合による複合体形成を検出することで、自己抗体の検出が行われている。しかしながら、同じ塩基配列からタンパク質を生成した場合でも、自己免疫疾患と自己抗体の検出結果との相関関係は、前述のように、従来の正常フォールドタンパク質に対して結合する自己抗体の検出結果よりも、前記MHCクラスII分子により提示されたミスフォールドされた変性タンパク質に対して結合する自己抗体の検出結果の方が、相関性に優れる。したがって、本発明においては、例えば、従来、自己抗体との結合が知られていた正常フォールドタンパク質のコード遺伝子を、前記MHCクラスII分子の発現系細胞に導入し、前記コード遺伝子から発現したタンパク質を、ミスフォールドされた変性タンパク質として、前記MHCクラスII分子により提示させ、これを抗原試薬とすることが好ましい。

【 0 0 3 1 】

前記正常フォールドタンパク質は、特に制限されず、例えば、公知のタンパク質があげられる。前記正常フォールドタンパク質の由来は、特に制限されず、例えば、ヒト、ヒトを除く非ヒト動物等があげられ、前記非ヒト動物は、例えば、マウス、ラット、イヌ、サル、ウサギ、ヒツジ、ウマ等があげられる。

【 0 0 3 2 】

前記正常フォールドタンパク質は、前述のように、自己免疫疾患に関与するタンパク質であり、具体例として、自己抗体との結合が知られているタンパク質があげられる。前記正常フォールドタンパク質は、特に制限されず、例えば、IgG重鎖、サイログロブリン、 α 2グリコプロテインI (α 2-GPI)、インスリン、サイロイドペルオキシダーゼ、甲状腺刺激ホルモン受容体(TSHR)等、後述する表1に記載したもの等があげられる。そして、本発明において、前記変性タンパク質は、例えば、これらの正常フォールドタンパク質の正常フォールドに対して、ミスフォールドが生じた変性タンパク質である。具体例として、本発明において、IgG重鎖の変性タンパク質は、例えば、関節リウマチに関連する自己抗体に対する抗原試薬となり、サイログロブリンの変性タンパク質は、例えば、橋本病に関連する自己抗体に対する抗原試薬となり、 α 2グリコプロテインIの変性タンパク質は、抗リン脂質抗体症候群に関連する自己抗体に対する抗原試薬となり、TSHRの変性タンパク質は、パセドウ病に関連する自己抗体に対する抗原試薬となる。

【 0 0 3 3 】

前記MHCクラスII分子の由来は、特に制限されず、例えば、ヒト、ヒトを除く非ヒト

10

20

30

40

50

動物等があげられ、前記非ヒト動物は、例えば、マウス、ラット、イヌ、サル、ウサギ、ヒツジ、ウマ等があげられる。前記MHCクラスII分子の由来は、例えば、前記正常タンパク質の由来と同じでもよいし、異なってもよい。

【0034】

前記MHCクラスII分子は、鎖および鎖の複合体であり、それぞれの種類は特に制限されず、これらをコードする遺伝子のハプロタイプは、特に制限されない。

【0035】

前記MHCクラスII分子がヒト由来である場合、前記MHCクラスII分子の鎖は、例えば、HLA-DPA遺伝子座、HLA-DQA遺伝子座またはHLA-DRA遺伝子座にコードされているMHCクラスII分子の鎖があげられ、前記MHCクラスII分子の鎖は、例えば、HLA-DPB遺伝子座、HLA-DQB遺伝子座またはHLA-DRB遺伝子座にコードされているMHCクラスII分子の鎖があげられる。前記各遺伝子座におけるMHCクラスII鎖および鎖のハプロタイプは、特に制限されない。前記MHCクラスII分子は、例えば、鎖および鎖のいずれか一方を含む分子であり、鎖および鎖の両方を含む分子であることが好ましい。

10

【0036】

前記MHCクラスII分子は、例えば、HLA-DR、HLA-DPおよびHLA-DQ等が好ましく、特に、後述する表1に記載した自己免疫疾患に関連したMHCクラスII分子が例示できる。

【0037】

前記HLA-DRは、例えば、HLA-DR1、HLA-DR2、HLA-DR3、HLA-DR4、HLA-DR5、HLA-DR6、HLA-DR7、HLA-DR8、HLA-DR9、HLA-DR10、HLA-DR11、HLA-DR12、HLA-DR13、HLA-DR14、HLA-DR15、HLA-DR52、HLA-DR53等があげられる。前記HLA-DRは、例えば、鎖としてHLA-DRA1等のHLA-DRAと、鎖としてHLA-DRB1、HLA-DRB3、HLA-DRB4またはHLA-DRB5等のHLA-DRBとを含む分子があげられ、具体的には、鎖として、例えば、HLA-DRA1*01等のアリル、鎖として、例えば、HLA-DRB1*01、HLA-DRB1*03、HLA-DRB1*04、HLA-DRB1*07、HLA-DRB1*08、HLA-DRB1*09、HLA-DRB1*10、HLA-DRB1*11、HLA-DRB1*12、HLA-DRB1*13、HLA-DRB1*14、HLA-DRB1*15、HLA-DRB1*16、HLA-DRB3*01、HLA-DRB4*01、HLA-DRB5*01等のアリルがあげられる。

20

30

【0038】

前記HLA-DQは、例えば、HLA-DQ1、HLA-DQ2、HLA-DQ3、HLA-DQ4、HLA-DQ5、HLA-DQ6、HLA-DQ7、HLA-DQ8等があげられる。前記HLA-DQは、例えば、鎖としてHLA-DQA1等のHLA-DQAと、鎖としてHLA-DQB1等のHLA-DQBとを含む分子があげられ、具体的には、鎖として、例えば、HLA-DQA1*01、HLA-DQA1*02、HLA-DQA1*03、HLA-DQA1*04、HLA-DQA1*05、HLA-DQA1*06、鎖として、例えば、HLA-DQB1*02、HLA-DQB1*03、HLA-DQB1*04、HLA-DQB1*05、HLA-DQB1*06等のアリルがあげられる。

40

【0039】

前記HLA-DPは、例えば、HLA-DP1、HLA-DP2、HLA-DP3、HLA-DP4、HLA-DP5等があげられる。前記HLA-DPは、例えば、鎖としてHLA-DPA1等のHLA-DPAと、鎖としてHLA-DPB1等のHLA-DPBとを含む分子があげられ、具体的には、鎖として、例えば、HLA-DPA1*01、HLA-DPA1*02、HLA-DPA1*03、HLA-DPA1*04等、鎖として、例えば、HLA-DPB1*02、HLA-DPB1*04、HLA-DPB

50

1 * 0 5、H L A - D P B 1 * 0 9 等のアリルがあげられる。

【 0 0 4 0 】

前記各アリルは、特に制限されず、例えば、後述する表 1 に示す例示があげられる。

【 0 0 4 1 】

前記 M H C クラス II 分子は、例えば、前述のように、自己免疫疾患感受性 M H C クラス II 分子であってもよい。前記自己免疫疾患感受性 M H C クラス II 分子とは、例えば、他の M H C クラス 鎖および 鎖のハプロタイプ (アリル) に対して、前記自己免疫疾患を発症する確率が相対的に高い M H C クラス 鎖および 鎖の少なくとも一方を含む M H C クラス II 分子である。前記 M H C クラス II 分子は、例えば、1 種類を使用してもよいし、2 種類以上を併用してもよい。

【 0 0 4 2 】

前記変性タンパク質 / M H C クラス II における、前記 M H C クラス II 分子と前記変性タンパク質との組合せは、特に制限されない。前記組合せの具体例として、例えば、前記自己免疫疾患、前記 M H C クラス II 分子および前記変性タンパク質との関係において、下記表 1 A ~ L の組合せがあげられる。前記組合せは、例えば、1 種類を使用してもよいし、2 種類以上を併用してもよい。

【 0 0 4 3 】

【表 1 A】

自己免疫疾患	MHCクラス II 分子	変性タンパク質
関節リウマチ	HLA-DRB1*04 アリル (DR4) HLA-DRB1*04:01 HLA-DRB1*04:02 HLA-DRB1*04:03 HLA-DRB1*04:04 HLA-DRB1*04:05 HLA-DRB1*04:06 HLA-DRB1*04:07 HLA-DRB1*04:08 HLA-DRB1*04:09 HLA-DRB1*04:10 HLA-DRB1*04:11 HLA-DRB1*04:12 HLA-DRB1*04:13	・ I g G 重鎖 ・ 2 型コラーゲン ・ フィブリノーゲン ・ α エノラーゼ ・ ビメンチン ・ Bip ・ glucose-6-phosphate isomerase
橋本病	HLA-DRB4*01 アリル HLA-DRB4*01:03 (HLA-DR53)	・ サイログロブリン ・ サイロイドペルオキシダーゼ
抗リン脂質抗体症候群	HLA-DRB1*04 アリル HLA-DRB1*04:02 HLA-DRB1*07 アリル HLA-DRB1*07:01	・ β 2 グリコプロテイン I ・ プロトロンビン
ナルコレプシー	HLA-DQB1*06 アリル HLA-DQB1*06:02	・ オレキシン
インスリン自己免疫疾患 症候群	HLA-DRB1*04 アリル HLA-DRB1*04:06	・ インスリン
Buerger 病	HLA-DRB1*04 アリル HLA-DRB1*04:05 HLA-DQB1*04:01 HLA-DQA1*03 アリル HLA-DPB1*05 アリル HLA-DPB1*05:01 HLA-DRB1*16 アリル HLA-DRB1*16:02	・ Sc1-70 ・ β 2 グリコプロテイン ・ ミエロペルオキシダーゼ ・ プロテイナーゼ 3

10

20

30

【 0 0 4 4 】

【表 1 B】

自己免疫疾患	MHCクラス II 分子	変性タンパク質
I 型糖尿病	HLA-DRB1*04 アリル HLA-DRB1*04:01 HLA-DRB1*03 アリル HLA-DRB1*03:01 HLA-DQA1*05 アリル HLA-DQA1*05:01 HLA-DQB1*02 アリル HLA-DQB1*02:01 HLA-DQA1*03 アリル HLA-DQA1*03:01 HLA-DQB1*03:02	・ インスリン ・ Glutamate decarboxylase (GAD) (GAD65) ・ Carboxypeptidase H ・ Tyrosine phosphatase-like proteins insulinoma antigen-2 (IA-2) ・ IA-2b (phogrin, ICA512) ・ Imogen-38 ・ Islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein (IGRP)
多発性硬化症	HLA-DRB1*15 アリル (DR15) HLA-DRB1*15:01 HLA-DRB1*15:02 HLA-DRB1*15:03 HLA-DRB1*15:04 HLA-DRB1*15:05 HLA-DRB1*15:07 HLA-DQB1*06 アリル (DQ6) HLA-DQB1*06:01 HLA-DQB1*06:02 HLA-DQB1*06:03 HLA-DQB1*06:04 HLA-DQB1*06:05 HLA-DQB1*06:09	・ β 2 グリコプロテイン ・ ミエロペルオキシダーゼ ・ myelin basic protein ・ proteolipid protein ・ myelin-associated oligodendrocyte basic glycoprotein ・ oligodendrocyte-specific protein
視神経脊髄炎	HLA-DPB1*05 アリル HLA-DPB1*05:01	・ AQP4
バセドウ病 (Graves 病)	HLA-DPB1*05 アリル HLA-DPB1*05:01	・ TSH 受容体 (甲状腺刺激ホルモン受容体、TSHR)

10

20

30

【 0 0 4 5 】

【表 1 C】

自己免疫疾患	MHCクラス II 分子	変性タンパク質	
原発性胆汁性肝硬変	HLA-DRB1*16 アリル HLA-DRB1*16:02	<ul style="list-style-type: none"> ・ Glycoprotein 210 ・ p62 ・ sp100 ・ sulfite oxidase ・ sarcosine dehydrogenase ・ glycogen phosphorylase ・ transglutaminase 	10
全身性エリテマトーデス	HLA-DRB1*15 アリル HLA-DRB1*15:01 HLA-DRB1*15 アリル (DR2) HLA-DRB1*15:01 HLA-DRB1*15:02 HLA-DRB1*15:03 HLA-DRB1*16 アリル (DR2) HLA-DRB1*16:01 HLA-DRB1*16:02 HLA-DRB1*03 アリル (DR3) HLA-DRB1*03:01 HLA-DRB1*03:02 HLA-DRB1*03:03 HLA-DRB1*03:04 HLA-DRB1*03:07	<ul style="list-style-type: none"> ・ NKG2A ・ β 2 グリコプロテイン ・ U1-RNP ・ U2-RNP ・ U4/6-RNP ・ U5-RNP 	20
Crohn 病	HLA-DRB1*04 アリル HLA-DRB1*04:05 HLA-DRB1*15 アリル HLA-DRB1*15:02	<ul style="list-style-type: none"> ・ Glycoprotein 2 ・ CUZD1 ・ GM-CSF 	30
潰瘍性大腸炎	HLA-DPB1*09 アリル HLA-DPB1*09:01	<ul style="list-style-type: none"> ・ Glycoprotein 2 ・ 7型コラーゲン ・ GM-CSF ・ プロテイナーゼ 3 	
混合結合組織病	HLA-DPB1*04 アリル HLA-DPB1*04:01	<ul style="list-style-type: none"> ・ nuclear ribonucleoprotein (U1-RNP) 	
グット・ハースチャー症候群	HLA-DRB1*15 アリル (DR15) HLA-DRB1*15:01 HLA-DRB1*15:02 HLA-DRB1*15:03 HLA-DRB1*15:04 HLA-DRB1*15:05 HLA-DRB1*15:07	<ul style="list-style-type: none"> ・ 4型コラーゲンα3 	40

【 0 0 4 6 】

【表 1 D】

自己免疫疾患	MHCクラス II 分子	変性タンパク質
膜性腎症	HLA-DRB1*15 アリル (DR2) HLA-DRB1*15:01 HLA-DRB1*15:02 HLA-DRB1*15:03 HLA-DRB1*16 アリル (DR2) HLA-DRB1*16:01 HLA-DRB1*16:02 HLA-DRB1*03 アリル (DR3) HLA-DRB1*03:01 HLA-DRB1*03:02 HLA-DRB1*03:03 HLA-DRB1*03:04 HLA-DRB1*03:07	・ Phospholipase A2 receptor
シェーグレン症候群	HLA-DRB1*03 アリル (DR3) HLA-DRB1*03:01 HLA-DRB1*03:02 HLA-DRB1*03:03 HLA-DRB1*03:04 HLA-DRB1*03:07	・ TRIM21 (Ro52) ・ Ro60
Wegener 肉芽腫症	HLA-DRB1*04 アリル (DR4) HLA-DRB1*04:01 HLA-DRB1*04:02 HLA-DRB1*04:03 HLA-DRB1*04:04 HLA-DRB1*04:05 HLA-DRB1*04:06 HLA-DRB1*04:07 HLA-DRB1*04:08 HLA-DRB1*04:09 HLA-DRB1*04:10 HLA-DRB1*04:11 HLA-DRB1*04:12 HLA-DRB1*04:13 HLA-DRB1*13 アリル (DR13) HLA-DRB1*13:01 HLA-DRB1*13:02 HLA-DRB1*13:03 HLA-DRB1*13:04 HLA-DRB1*13:05 HLA-DRB1*13:06 HLA-DRB1*13:07 HLA-DRB1*13:08 HLA-DRB1*13:10 HLA-DRB1*15 アリル (DR15) HLA-DRB1*15:01 HLA-DRB1*15:02 HLA-DRB1*15:03 HLA-DRB1*15:04 HLA-DRB1*15:05 HLA-DRB1*15:07	・ ミエロペルオキシダーゼ ・ プロテイナーゼ 3

10

20

30

40

【表 1 E】

自己免疫疾患	MHCクラス II 分子	変性タンパク質
拡張型心筋症	HLA-DRB1*01 アリル (DR1)	・ β 1-adrenoceptor
	HLA-DRB1*01:01 HLA-DRB1*01:02	・ M2 muscarinic receptor
	HLA-DRB1*01:03 HLA-DRB1*01:05	
	HLA-DRB1*04 アリル (DR4)	
	HLA-DRB1*04:01 HLA-DRB1*04:02	
	HLA-DRB1*04:03 HLA-DRB1*04:04	
	HLA-DRB1*04:05 HLA-DRB1*04:06	
	HLA-DRB1*04:07 HLA-DRB1*04:08	
	HLA-DRB1*04:09 HLA-DRB1*04:10	
	HLA-DRB1*04:11 HLA-DRB1*04:12	
	HLA-DRB1*04:13	
	HLA-DRB1*11 アリル (DR5)	
	HLA-DRB1*11:01 HLA-DRB1*11:02	
	HLA-DRB1*11:03 HLA-DRB1*11:04	
	HLA-DRB1*11:06 HLA-DRB1*11:09	
	HLA-DRB1*12 アリル (DR5)	
	HLA-DRB1*12:01	

10

20

【 0 0 4 8 】

【表 1 F】

自己免疫疾患	MHCクラス II 分子	変性タンパク質
天疱瘡	HLA-DRB1*04 アリル (DR4) HLA-DRB1*04:01 HLA-DRB1*04:02 HLA-DRB1*04:03 HLA-DRB1*04:04 HLA-DRB1*04:05 HLA-DRB1*04:06 HLA-DRB1*04:07 HLA-DRB1*04:08 HLA-DRB1*04:09 HLA-DRB1*04:10 HLA-DRB1*04:11 HLA-DRB1*04:12 HLA-DRB1*04:13 HLA-DRB1*08 アリル (DR8) HLA-DRB1*08:01 HLA-DRB1*08:02 HLA-DRB1*08:03 HLA-DRB1*08:04 HLA-DRB1*08:05 HLA-DRB1*08:06 HLA-DRB1*14 アリル (DR14) HLA-DRB1*14:01 HLA-DRB1*14:02 HLA-DRB1*14:03 HLA-DRB1*14:04 HLA-DRB1*14:05 HLA-DRB1*14:06 HLA-DRB1*14:07 HLA-DRB1*14:08 HLA-DRB1*14:10	・ デスマグレイン 1 ・ デスマグレイン 3
類天疱瘡	HLA-DQB1*03 アリル HLA-DQB1*03:01	・ コラーゲン 17

10

20

30

【 0 0 4 9 】

【表 1 G】

自己免疫疾患	MHCクラス II 分子	変性タンパク質
尋常性白斑	HLA-DRB1*04 アリル (DR4)	・ チロシナーゼ
	HLA-DRB1*04:01 HLA-DRB1*04:02	・ TRP-1
	HLA-DRB1*04:03 HLA-DRB1*04:04	・ TRP-2
	HLA-DRB1*04:05 HLA-DRB1*04:06	
	HLA-DRB1*04:07 HLA-DRB1*04:08	
	HLA-DRB1*04:09 HLA-DRB1*04:10	
	HLA-DRB1*04:11 HLA-DRB1*04:12	
	HLA-DRB1*04:13	
	HLA-DRB1*13 アリル (DR6)	
	HLA-DRB1*13:01 HLA-DRB1*13:02	
	HLA-DRB1*13:03 HLA-DRB1*13:05	
	HLA-DRB1*13:08	
	HLA-DRB1*14 アリル (DR6)	
	HLA-DRB1*14:01 HLA-DRB1*14:02	
	HLA-DRB1*14:03 HLA-DRB1*14:04	
	HLA-DRB1*14:05 HLA-DRB1*14:06	
	HLA-DQB1*03 アリル (DQ3)	
	HLA-DQB1*03:01 HLA-DQB1*03:02	
	HLA-DQB1*03:03 HLA-DQB1*03:04	
	HLA-DQB1*03:05	
	HLA-DRB1*14 アリル (DR14)	
	HLA-DRB1*14:01 HLA-DRB1*14:02	
	HLA-DRB1*14:03 HLA-DRB1*14:04	
	HLA-DRB1*14:05 HLA-DRB1*14:06	
	HLA-DRB1*14:07 HLA-DRB1*14:08	
	HLA-DRB1*14:10	

10

20

30

【 0 0 5 0 】

【表 1 H】

自己免疫疾患	MHCクラス II 分子	変性タンパク質	
強皮症	HLA-DRB1*11 アリル HLA-DRB1*11:04 HLA-DQB1*03 アリル HLA-DRB5*01 アリル HLA-DRB5*01:05 HLA-DRB1*15 アリル HLA-DRB1*15:02 HLA-DQB1*06 アリル HLA-DQB1*06:01 HLA-DRB1*08 アリル HLA-DRB1*08:02	<ul style="list-style-type: none"> ・ トポイソメラーゼ I ・ RNA ポリメラーゼ ・ フィブリラリン ・ Th-To ・ U1RNP 	10
多発性筋炎/皮膚筋炎	HLA-DRB1*01 アリル HLA-DRB1*01:01 HLA-DRB1*04 アリル HLA-DRB1*04:05 HLA-DRB1*03 アリル HLA-DQA1*05 アリル	<ul style="list-style-type: none"> ・ histidine-tRNA ligase (Jo1) ・ soluble nuclear antigen PM-1 ・ TIF1γ ・ CADM-140 	20
重症筋無力症	HLA-DRB1*03 アリル (DR3) HLA-DRB1*03:01 HLA-DRB1*03:02 HLA-DRB1*03:03 HLA-DRB1*03:04 HLA-DRB1*03:07 HLA-DRB1*15 アリル (DR2) HLA-DRB1*15:01 HLA-DRB1*15:02 HLA-DRB1*15:03 HLA-DRB1*16 アリル (DR2) HLA-DRB1*16:01 HLA-DRB1*16:02 HLA-DRB1*15 アリル HLA-DRB1*15:01 HLA-DQB1*03 アリル HLA-DPB1*02 アリル HLA-DPB1*02:01	<ul style="list-style-type: none"> ・ アセチルコリン受容体 	30
			40

【 0 0 5 1 】

【表 1 I】

自己免疫疾患	MHCクラス II 分子	変性タンパク質
血小板減少性紫斑病 (ITP)	HLA-DRB1*11 アリル HLA-DRB1*04 アリル HLA-DRB1*04:10 HLA-DRB1*09 アリル HLA-DRB1*09:01	・ グリコプロテイン II b ・ グリコプロテイン III a
特発性アジソン病	HLA-DRB1*03 アリル HLA-DRB1*03:01 HLA-DRB1*04 アリル HLA-DRB1*04:04	・ 21-hydroxylase (P450c21)
特発性 自己免疫性肝炎	HLA-DRB1*03 アリル HLA-DRB1*03:01 HLA-DRB3*01 アリル HLA-DRB3*01:01 HLA-DRB1*04 アリル HLA-DRB1*04:01 HLA-DRB1*07 アリル	・ チトクローム P450db1 ・ liver cytokeratin 8, 18 ・ glutathione-S-transferase (GST)
原田病	HLA-DRB1*04 アリル HLA-DRB1*04:05	・ tyrosinase-related protein (TR P) 1 ・ TRP2
ANCA 関連血管炎	HLA-DRB1*09 アリル HLA-DRB1*09:01 HLA-DRB1*04 アリル HLA-DRB1*04:05	・ ミエロペルオキシダーゼ ・ プロテイナーゼ 3
自己免疫性膵炎	HLA-DRB1*04 アリル HLA-DRB1*04:05 HLA-DQB1*04:01	・ Amylase-2 α ・ HSP-10 ・ Plasminogen-Binding Protein ・ Pancreatic Secretory Trypsin I nhibitor
萎縮性胃炎	HLA-DQA1*01 アリル HLA-DQA1*01:02	・ プロトンポンプ

10

20

30

40

【 0 0 5 2 】

【表 1 J】

自己免疫疾患	MHCクラス II 分子	変性タンパク質
原発性硬化性 胆管炎	HLA-DRB1*03 アリル HLA-DQA1*05 アリル HLA-DQA1*05:01 HLA-DQB1*02 アリル	・ プロテインース 3 ・ E2 subunits of 2-oxoacid dehydrogenase complexes ・ Sp-100/PML/SUMO ・ gp-210/NUP62
大動脈炎症候群 (高安動脈炎)	HLA-DRB1*04 アリル (DR4) HLA-DRB1*04:01 HLA-DRB1*04:02 HLA-DRB1*04:03 HLA-DRB1*04:04 HLA-DRB1*04:05 HLA-DRB1*04:06 HLA-DRB1*04:07 HLA-DRB1*04:08 HLA-DRB1*04:09 HLA-DRB1*04:10 HLA-DRB1*04:11 HLA-DRB1*04:12 HLA-DRB1*04:13	・ hHSP60 ・ β 2 グリコプロテイン I ・ annexin V
自己免疫性 溶血性貧血	HLA-DQB1*06 アリル (DQ6) HLA-DQB1*06:01 HLA-DQB1*06:02 HLA-DQB1*06:03 HLA-DQB1*06:04 HLA-DQB1*06:05 HLA-DQB1*06:09	・ 赤血球上に発現する分子
自己免疫性 内耳障害	HLA-DRB1*03 アリル HLA-DRB1*03:01 HLA-DRB3*01 アリル HLA-DRB3*01:01 HLA-DQB1*02 アリル HLA-DQB1*02:01 HLA-DPB1*04 アリル HLA-DPB1*04:01	・ 内耳に発現する分子
特発性無精子症	HLA-DRB1*13 アリル HLA-DRB1*13:02 HLA-DQB1*06 アリル HLA-DQB1*06:04	・ follicle-stimulating hormone ・ 精子に発現する分子
急性散在性 脳脊髄炎	HLA-DRB1*15 アリル HLA-DRB1*15:01 HLA-DRB1*15:03 HLA-DQB1*06 アリル HLA-DQB1*06:02	・ Myelin oligodendrocyte glycoprotein

10

20

30

40

【表 1 K】

自己免疫疾患	MHCクラス II 分子	変性タンパク質
円形脱毛症	HLA-DRB1*11 アリル HLA-DRB1*11:04 HLA-DQB1*03 アリル HLA-DQB1*03:01	<ul style="list-style-type: none"> ・ Tyrosinase ・ gp100 ・ lamin A ・ MCHR1 ・ Tyrosine hydroxylase
自己免疫性 心筋症	HLA-DQB1*03 アリル (DQ8) HLA-DQB1*03:02 HLA-DQB1*03:04 HLA-DQB1*03:05	<ul style="list-style-type: none"> ・ Laminin
慢性炎症性 脱髄性多発神経炎	HLA-DRB1*15 アリル (DR2) HLA-DRB1*15:01 HLA-DRB1*15:02 HLA-DRB1*15:03 HLA-DRB1*16 アリル (DR2) HLA-DRB1*16:01 HLA-DRB1*16:02	<ul style="list-style-type: none"> ・ Contactin-1
チャージ・ストラウス 症候群	HLA-DRB1*04 アリル	<ul style="list-style-type: none"> ・ 好中球に発現する分子
特発性肺線維症	HLA-DRB1*15 アリル HLA-DRB1*15:01	<ul style="list-style-type: none"> ・ Topoisomerase II
ギラン・バレー 症候群	HLA-DQB1*03 アリル	<ul style="list-style-type: none"> ・ Gangliosides ・ Sulfatide ・ Cardiolipin
硬化性苔癬	HLA-DRB1*12 アリル	<ul style="list-style-type: none"> ・ Circulating basement membrane zone に発現する分子
顕微鏡的 多発血管炎	HLA-DRB1*09 アリル HLA-DRB1*09:01 HLA-DQB1*03 アリル HLA-DQB1*03:03	<ul style="list-style-type: none"> ・ Proteinase 3
発作性 夜間血色素尿症	HLA-DRB1*15 アリル (DR2) HLA-DRB1*15:01 HLA-DRB1*15:02 HLA-DRB1*15:03 HLA-DRB1*16 アリル (DR2) HLA-DRB1*16:01 HLA-DRB1*16:02	<ul style="list-style-type: none"> ・ Diazepam-binding inhibitor-related protein 1

10

20

30

40

【 0 0 5 4 】

【表 1 L】

自己免疫疾患	MHCクラス II 分子	変性タンパク質
再発性多発軟骨炎	HLA-DRB1*04 アリル (DR4) HLA-DRB1*04:01 HLA-DRB1*04:02 HLA-DRB1*04:03 HLA-DRB1*04:04 HLA-DRB1*04:05 HLA-DRB1*04:06 HLA-DRB1*04:07 HLA-DRB1*04:08 HLA-DRB1*04:09 HLA-DRB1*04:10 HLA-DRB1*04:11 HLA-DRB1*04:12 HLA-DRB1*04:13	・ Type II collagen
サルコイドーシス	HLA-DRB1*11 アリル HLA-DRB1*11:01	・ 内皮細胞に発現する分子
スティッフパーソン症候群	HLA-DQB1*02 アリル HLA-DQB1*02:01	・ Amphiphysin

10

【 0 0 5 5】

20

具体例としては、例えば、前記 MHC クラス II 分子が、HLA-DR を含み、前記変性タンパク質が、IgG 重鎖の変性タンパク質である場合、関節リウマチに関連する自己抗体を検出できる。前記 HLA-DR は、例えば、鎖として HLA-DRA1*01 と、鎖として HLA-DRB1*01、HLA-DRB1*03、HLA-DRB1*04 および HLA-DRB1*15 からなる群から選択された少なくとも 1 つを含む分子が例示できる。また、例えば、前記 MHC クラス II 分子が、HLA-DR を含み、前記変性タンパク質が、サイログロブリンの変性タンパク質である場合、橋本病に関連する自己抗体を検出できる。前記 HLA-DR は、例えば、鎖として HLA-DRA1*01 と、鎖として HLA-DRB1*01、HLA-DRB1*04、HLA-DRB1*14、HLA-DRB1*15 および HLA-DRB4*01 からなる群から選択された少なくとも 1 つを含む分子が例示できる。また、例えば、前記 MHC クラス II 分子が、HLA-DR を含み、前記変性タンパク質が、2 グリコプロテイン I の変性タンパク質である場合、抗リン脂質抗体症候群に関連する自己抗体を検出できる。前記 HLA-DR は、例えば、鎖として HLA-DRA1*01 と、鎖として HLA-DRB1*04 および HLA-DRB1*07 の少なくとも一方を含む分子が例示できる。また、例えば、前記 MHC クラス II 分子が、HLA-DP を含み、前記変性タンパク質が、TSHR の変性タンパク質である場合、パセドウ病に関連する自己抗体を検出できる。前記 HLA-DP は、例えば、鎖として HLA-DPA1*02 と、鎖として HLA-DPB1*05 とを含む分子が例示できる。

30

【 0 0 5 6】

40

前記 MHC クラス II 分子の発現系細胞は、特に制限されず、例えば、前記 MHC クラス II 分子を発現する細胞であり、前記導入された前記正常フォールドタンパク質のコード遺伝子が発現できればよい。前記細胞は、前記 MHC クラス II 分子のコード遺伝子を、内在性遺伝子として有する細胞でもよいし、外来性遺伝子として有する細胞でもよい。前者の場合は、例えば、前記 MHC クラス II 分子のコード遺伝子を、内在性遺伝子として有する宿主細胞に、前記正常フォールドタンパク質のコード遺伝子を導入すればよく、後者の場合は、宿主細胞に、例えば、前記正常フォールドタンパク質のコード遺伝子と前記 MHC クラス II 分子のコード遺伝子とを共導入すればよい。

【 0 0 5 7】

50

前記正常フォールドタンパク質のコード遺伝子は、例えば、前記正常フォールドタンバ

ク質をコードするポリヌクレオチド（例えば、cDNA）、前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター等があげられる。前記MHCクラスII分子のコード遺伝子は、例えば、前記MHCクラスII分子をコードするポリヌクレオチド（例えば、cDNA）、前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター等があげられる。

【0058】

前記各コード遺伝子の導入方法は、特に制限されず、例えば、パーティクルガン等の遺伝子銃による導入法、リン酸カルシウム法、ポリエチレングリコール法、リボソームを用いるリポフェクション法、エレクトロポレーション法、超音波核酸導入法、DEAE-デキストラン法、微小ガラス管等を用いた直接注入法、ハイドロダイナミック法、カチオニックリポソーム法、導入補助剤を用いる方法、アグロバクテリウムを介する方法等があげられる。前記リポソームは、例えば、リポフェクタミンおよびカチオニックリポソーム等があげられ、前記導入補助剤は、例えば、アテロコラーゲン、ナノ粒子およびポリマー等があげられる。

10

【0059】

前記宿主細胞は、特に制限されず、例えば、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞等があげられる。前記動物細胞は、特に制限されず、例えば、HeLa細胞、293細胞、293T細胞、NIH3T3細胞、COS細胞、CHO細胞等の各種培養細胞、ES細胞、造血幹細胞等の幹細胞、T細胞、B細胞、樹状細胞、マクロファージ、グリア細胞等の免疫系細胞、初代培養細胞等の生体から単離した細胞等があげられる。前記細胞は、例えば、ヒト受精卵、ならびに、ヒト胚およびヒト個体内の細胞を除く。また、内在性遺伝子として前記MHCクラスII分子のコード遺伝子を有する宿主細胞は、例えば、前記免疫系細胞があげられる。

20

【0060】

前記発現ベクターは、例えば、前記宿主において、前記ポリヌクレオチドがコードするタンパク質を発現可能なように、機能的に前記ポリヌクレオチドが連結されていればよく、その他の構成は、特に制限されない。

【0061】

前記発現ベクターは、例えば、骨格となるベクター（以下、「基本ベクター」ともいう）に、前記ポリヌクレオチドを挿入することで作製できる。前記基本ベクターの種類は、特に制限されず、例えば、前記宿主の種類に応じて、適宜決定できる。動物細胞に形質転換を行う場合、前記基本ベクターとして、例えば、pME18S、pCAGGS等があげられる。

30

【0062】

前記発現ベクターは、例えば、前記ポリヌクレオチドの発現を調節する調節配列を有することが好ましい。前記調節配列は、例えば、プロモーター、ターミネーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル配列、複製起点配列（ori）等があげられる。前記プロモーターの由来は、特に制限されず、例えば、サイトメガロウイルス（CMV）、ラウス肉腫ウイルス（RSV）、シミアンウイルス-40（SV-40）、筋アクチンプロモーター、単純ヘルペスウイルス（HSV）等があげられる。前記プロモーターは、この他に、例えば、チミジンキナーゼプロモーター等の組織特異的プロモーター、成長ホルモン調節性プロモーター等の調節性プロモーター、lacオペロン配列の制御下にあるプロモーター、亜鉛誘導性メタロチオネインプロモーター等の誘導性プロモーター等があげられる。前記発現ベクターにおいて、前記調節配列の配置は、特に制限されない。前記発現ベクターにおいて、前記調節配列は、例えば、前記ポリヌクレオチドの発現およびこれがコードする前記サブユニットの発現を、機能的に調節できるように配置されていればよく、公知の方法に基づいて配置できる。前記調節配列は、例えば、前記基本ベクターが予め備える配列を利用してもよいし、前記基本ベクターに、さらに、前記調節配列を挿入してもよいし、前記基本ベクターが備える調節配列を、他の調節配列に置き換えてもよい。

40

【0063】

前記発現ベクターは、例えば、さらに、選択マーカーのコード配列を有してもよい。前

50

記選択マーカ―は、例えば、薬剤耐性マーカ―、蛍光タンパク質マーカ―、酵素マーカ―、細胞表面レセプターマーカ―等があげられる。

【0064】

前記宿主細胞の培養方法は、特に制限されず、前記宿主細胞の種類に応じて、適宜決定できる。

【0065】

このように、前記MHCクラスII分子の発現系細胞に、前記正常フォールドタンパク質をコードする遺伝子を導入することで、前記変性タンパク質/MHCクラスIIを提示する細胞を得ることができる。

【0066】

本発明は、例えば、前記変性タンパク質/MHCクラスIIを提示する細胞を、そのまま抗原試薬として使用してもよいし、前記変性タンパク質/MHCクラスIIを提示する細胞から、前記変性タンパク質/MHCクラスIIを解離して、これを抗原試薬として使用してもよく、さらに、前記変性タンパク質と前記MHCクラスII分子との複合体から、前記変性タンパク質を解離して、これを抗原試薬として使用することもできる。この場合、例えば、前記細胞からの前記変性タンパク質/MHCクラスIIの精製、または、前記変性タンパク質/MHCクラスIIからの前記変性タンパク質の精製を行うことが好ましい。前記精製方法は、特に制限されず、公知の手法を用いることができる。前記精製方法は、例えば、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等があげられる。

【0067】

本発明は、前記接触工程に先立って、前述のような、前記変性タンパク質/MHCクラスIIを調製する調製工程を含んでもよく、さらに、前記変性タンパク質/MHCクラスIIを精製する精製工程を含んでもよい。

【0068】

本発明において、前記抗原試薬は、例えば、前記変性タンパク質/MHCクラスIIのみを含んでもよいし、さらにその他の成分を含んでもよい。前記抗原試薬において、前記変性タンパク質/MHCクラスIIの種類は、例えば、1種類でもよいし、2種類以上を併用してもよい。

【0069】

前記変性タンパク質/MHCクラスIIは、例えば、遊離した状態で使用してもよいし、担体に固定化した状態で使用してもよい。後者の場合、前記抗原試薬は、例えば、前記その他の成分として前記担体を含む。前記担体は、特に制限されず、例えば、ウェルプレート等のプレート、ビーズ等があげられる。

【0070】

前記その他の成分は、例えば、水、生理食塩水、緩衝液、生理緩衝液、培地等があげられる。

【0071】

(3) 接触工程

本発明において、前記接触工程は、前記変性タンパク質/MHCクラスIIを含む前記抗原試薬と前記サンプルとを接触させる工程である。

【0072】

前記サンプルは、特に制限されず、例えば、自己抗体を含みうる試料があげられ、例えば、生体試料等があげられる。前記生体試料は、特に制限されず、血液、体液、組織等があげられる。前記血液試料は、例えば、全血、血清、血漿等があげられる。前記体液試料は、特に制限されず、例えば、関節液、尿、唾液等があげられる。前記組織試料は、特に制限されず、例えば、前記自己免疫疾患の標的組織があげられ、具体例として、例えば、甲状腺、脾臓、血管、大脳、小脳、脊髄、眼神経、関節、骨、唾液腺、滑膜、心臓、肝臓等があげられる。前記サンプルの由来は、特に制限されず、例えば、ヒト、ヒトを除く非ヒト動物等があげられ、前記非ヒト動物は、例えば、前述の通りである。

10

20

30

40

50

【0073】

前記サンプルは、例えば、液体でも固体でもよく、例えば、取り扱いが容易であることから、液状の形態が好ましい。前記試料が液体の場合、例えば、前記試料の未希釈液をそのままサンプルとして使用してもよく、また、前記試料を媒体に懸濁、分散または溶解した希釈液を前記サンプルとして使用してもよい。前記試料が固体の場合、例えば、前記試料を前記媒体に懸濁、分散または溶解した希釈液を前記サンプルとして使用することが好ましい。前記媒体は、特に制限されず、例えば、水、生理食塩水、緩衝液、生理食塩緩衝液等があげられる。前記緩衝液は、特に制限されず、例えば、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、クエン酸緩衝液、ペロナール緩衝液、各種のグッド緩衝液等があげられる。

10

【0074】

前記接触工程において、例えば、前記サンプルに前記抗原試薬を添加してもよいし、前記抗原試薬に前記サンプルを添加してもよい。前記サンプルと前記抗原試薬との添加割合は、特に制限されない。具体例として、前記サンプルとして血清を使用し、前記抗原試薬として前記変性タンパク質/MHCクラスIIを提示する細胞を使用することが好ましい。また、前記血清と前記細胞との添加割合は、特に制限されず、例えば、1000~2000万個(例えば、約500万個)の細胞に対して、血清0.01~1mlであり、前記血清は、例えば、50~10000倍(例えば、約300倍)に希釈した希釈血清サンプルとして添加することが好ましい。

20

【0075】

前記接触工程において、前記サンプルと前記抗原試薬とは、例えば、両者を接触させてから、一定期間インキュベートすることが好ましい。インキュベートの条件は、特に制限されず、温度は、例えば、0~37、好ましくは0~10、より好ましくは0~5であり、pHは、例えば、pH6~9、好ましくはpH7~8、より好ましくはpH7.2~7.6であり、時間は、例えば、3~120分、好ましくは10~90分、より好ましくは30~60分である。

【0076】

(4) 検出工程

本発明において、前記検出工程は、前記サンプルにおける自己抗体と前記抗原試薬における前記変性タンパク質との複合体を検出する検出工程である。前記検出工程において、例えば、前記複合体の有無の確認(定性分析)、前記複合体の量の測定(定量分析)が可能である。前記複合体は前記自己抗体を含むことから、前記複合体の検出により、間接的に、前記自己抗体を検出できる。

30

【0077】

前記複合体は、例えば、前記抗原試薬における前記変性タンパク質/MHCクラスIIの形態によって異なってもよい。前記抗原試薬が、前記変性タンパク質/MHCクラスIIを提示した細胞を含む場合、前記複合体は、例えば、前記自己抗体と、前記変性タンパク質/MHCクラスIIを提示した細胞との複合体であり、前記抗原試薬が、前記細胞から解離された前記変性タンパク質/MHCクラスIIを含む場合、前記複合体は、例えば、前記自己抗体と前記変性タンパク質/MHCクラスIIとの複合体であり、前記抗原試薬が、前記MHCクラスII分子から解離された前記変性タンパク質を含む場合、前記複合体は、例えば、前記自己抗体と前記変性タンパク質との複合体である。いずれの複合体も、例えば、前記自己抗体と前記変性タンパク質との結合により形成されていることが好ましい。

40

【0078】

前記検出工程において、前記複合体を検出する方法は、特に制限されない。前記検出方法としては、例えば、前記複合体における前記自己抗体を検出する物質を使用し、前記検出物質を測定することで、間接的に前記複合体を検出する方法があげられる。

【0079】

前記検出物質は、例えば、前記自己抗体(一次抗体)に結合する、ポリクローナル抗体等の二次抗体があげられる。前記二次抗体は、例えば、標識物質で標識された抗体が好ま

50

しい。前記標識物質は、特に制限されず、例えば、蛍光物質、色素、同位体、酵素等があげられる。前記蛍光物質は、例えば、ピレン、T A M R A、フルオレセイン、C y 3 色素、C y 5 色素等の蛍光団があげられ、前記色素は、例えば、A l e x a 4 8 8 等の A l e x a 色素等があげられ、前記同位体は、例えば、安定同位体および放射性同位体があげられ、好ましくは安定同位体である。前記酵素は、特に制限されず、例えば、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ルシフェラーゼ等があげられる。前記標識物質が前記酵素の場合、例えば、前記酵素に対する基質を併用することが好ましく、前記基質は、例えば、前記酵素の触媒反応により、例えば、蛍光、発光等を生じる物質が好ましい。

【 0 0 8 0 】

前記基質は、特に制限されず、例えば、過酸化水素、3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)、1,2-Phenylenediamine (OPD)、2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid Ammonium Salt (ABTS)、3,3'-Diaminobenzidine (DAB)、3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride Hydrate (DAB4HCl)、3-Amino-9-ethylcarbazole (AEC)、4-Chloro-1-naphthol (4C1N)、2,4,6-Tribromo-3-hydroxybenzoic Acid、2,4-Dichlorophenol、4-Aminoantipyrine、4-Aminoantipyrine Hydrochloride、ルミノール、ルシフェリン等があげられる。

【 0 0 8 1 】

また、前記検出方法は、例えば、前記複合体の形態によって、適宜選択できる。前記複合体が、前記自己抗体と、前記変性タンパク質/MHCクラスIIを提示した細胞との複合体の場合、例えば、フローサイトメトリー、蛍光強度計、蛍光顕微鏡等の方法により検出できる。

【 0 0 8 2 】

前記検出工程において、検出条件は、特に制限されず、前記検出方法に応じて、適宜決定できる。

【 0 0 8 3 】

< 自己免疫疾患の罹患の可能性を試験する方法 >

本発明の自己免疫疾患の罹患の可能性を試験する方法は、前述のように、サンプルが、被検体から単離した生体試料であり、前記本発明の自己抗体の検出方法によって、前記サンプルにおける自己抗体と前記MHCクラスII分子により提示された変性タンパク質(前記変性タンパク質/MHCクラスII)との複合体を検出する検出工程、および、前記検出工程における前記複合体の検出結果から、自己免疫疾患の罹患の可能性を試験する試験工程を含むことを特徴とする。

【 0 0 8 4 】

本発明の試験方法は、前記本発明の検出方法によって前記複合体を検出することにより、間接的に前記生体試料の自己抗体を検出することが特徴であって、その他の工程および条件は、特に制限されない。本発明の試験方法によれば、優れた精度で自己抗体を検出でき、これに伴い、優れた精度で自己免疫疾患の罹患可能性を試験できる。本発明の試験方法は、特に示さない限り、前記本発明の検出方法の記載を援用できる。

【 0 0 8 5 】

本発明の試験方法において、前記被検体は、特に制限されず、例えば、ヒト、ヒトを除く非ヒト動物等があげられ、前記非ヒト動物は、例えば、前述の通りである。

【 0 0 8 6 】

本発明の試験方法において、試験対象の自己免疫疾患は、特に制限されず、例えば、関節リウマチ、橋本病、バセドウ病(Graves病)、抗リン脂質抗体症候群、インスリン自己免疫疾患症候群、天疱瘡、類天疱瘡、強皮症、シェーグレン症候群、グッドパスチャー症候群(Goodpasture症候群)、膜性腎症、IgA腎症、全身性エリテマトーデス(ループスエリテマトーゼス)、拡張型心筋症、IgG4関連疾患、ANCA関連血管炎、重症筋無力症、原田病、ナルコレプシー、Burger病、I型糖尿病、多発性硬化症、視神経脊髄炎、原発性胆汁性肝硬変、Crohn病、潰瘍性大腸炎、混合結合組織病、Wegene

10

20

30

40

50

r 肉芽腫症、尋常性白斑、多発性筋炎/皮膚炎、血小板減少性紫斑病（ITP）、突発性アジソン病、突発性自己免疫性肝炎、自己免疫性膵炎、萎縮性胃炎、原発性硬化性胆管炎、大動脈炎症候群（高安動脈炎）、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性内耳障害、特発性無精子症、急性散在性脳脊髄炎、円形脱毛症、自己免疫性心筋症、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、チャグ・ストラウス症候群、特発性肺線維症、ギランバレー症候群、硬化性苔癬、顕微鏡的多発血管炎、発作性夜間血色素尿症、再発性多発軟骨炎、サルコイドーシス、スティッフパーソン症候群等があげられる。前記自己免疫疾患と、前記変性タンパク質および前記MHCクラスIIとの関係の具体例は、例えば、前記表1を参照できる。

【0087】

具体例として、前述のように、関節リウマチの試験の場合、例えば、前記MHCクラスII分子が、HLA-DRを含む分子であり、前記変性タンパク質が、IgG重鎖の変性タンパク質であり、橋本病の試験の場合、例えば、前記MHCクラスII分子が、HLA-DRを含む分子であり、前記変性タンパク質が、サイログロブリンの変性タンパク質であり、抗リン脂質抗体症候群の試験の場合、例えば、前記MHCクラスII分子が、HLA-DRを含む分子であり、前記変性タンパク質が、 α 2グリコプロテインIの変性タンパク質であり、パセドウ病の試験の場合、例えば、前記MHCクラスII分子が、HLA-DPを含む分子であり、前記変性タンパク質が、TSHRの変性タンパク質である。

10

【0088】

前記検出工程は、前述のように、前記本発明の自己抗体の検出方法によって、前記生体試料における自己抗体と前記変性タンパク質/MHCクラスIIとの複合体を検出する検出工程である。前記複合体は前記自己抗体を含むことから、前記複合体の検出により、間接的に、前記生体試料における前記自己抗体を検出できる。

20

【0089】

前記検出工程は、例えば、前述のように、前記複合体の形成量を測定する測定工程であってもよい。前記形成量の測定方法は、特に制限されず、例えば、前述のような前記複合体の検出方法が採用できる。前記複合体形成量から間接的に自己抗体量を求める方法は、特に制限されず、例えば、前記複合体の測定値と自己抗体量との関係を示す関係式（例えば、検量線を含む）等が利用できる。前記関係式は、例えば、前記自己抗体の量が既知の標準試料を用いて前記検出方法による複合体の検出を行うことで、前記複合体の測定値と前記自己抗体の既知量との関係を示す関係式を求めることができる。この関係式に基づけば、前記複合体の形成量の測定値から、前記関係式に基づいて前記自己抗体量を算出できる。このため、本発明において、「前記複合体の形成量」は、例えば、前記複合体の形成量から間接的に算出した「自己抗体量」ということもできる。

30

【0090】

前記試験工程は、前述のように、前記検出工程における前記複合体の検出結果から、自己免疫疾患の罹患の可能性を試験する工程である。前記複合体の検出結果は、例えば、間接的に自己抗体の検出結果といえる。そして、自己抗体は、前記自己免疫疾患の標識となり得ることから、前記複合体の検出結果、すなわち、間接的な自己抗体の検出結果から、例えば、自己免疫疾患の罹患可能性がある、自己免疫疾患の罹患可能性がない等の判断が可能である。前記罹患可能性があるとは、例えば、自己免疫疾患に罹患している、罹患している可能性がある、将来、罹患（発症ともいう）する可能性がある等を意味し、前記罹患可能性がないとは、例えば、罹患していない、罹患していない可能性がある等を意味する（以下、同様）。

40

【0091】

前記被検体の罹患可能性は、前記試験工程において、例えば、前記検出工程で前記複合体が検出された場合、前記被検体は、罹患可能性があるとして判断でき、前記複合体が検出されない場合、前記被検体は、罹患可能性がないと判断できる。

【0092】

また、前記被検体の罹患可能性は、前記試験工程において、例えば、前記測定工程で測定した前記被検体の複合体形成量の測定値と基準値との比較によって判断できる。具体的

50

には、例えば、前記試験工程において、前記測定値と基準値とを比較し、前記測定値が前記基準値よりも高い場合に、前記被検体は、罹患可能性があるとし、前記測定値が前記基準値よりも低い時に、前記被検体は、前記罹患可能性がないとすることができる。

【0093】

前記基準値は、特に制限されず、例えば、自己免疫疾患には罹患していない健常者の生体試料における前記複合体の形成量があげられる。また、前記比較対象が、前記複合体の形成量の測定値から算出した自己抗体量の場合、前記健常者の複合体の形成量も、自己抗体量が好ましい。前記健常者の生体試料は、例えば、前記被検者の生体試料と同様の条件で単離した生体試料であることが好ましい。前記健常者の生体試料における前記複合体の形成量は、例えば、前記被検者の生体試料についての前記複合体の検出と、同様の方法および条件で行うことが好ましい。

10

【0094】

なお、前記測定値と前記基準値との比較においては、前記複合体が形成された場合の測定値が正の値となることを前提として、罹患可能性の判断を例示したが、前記複合体が形成された場合の測定値が負の値となってもよい。この場合は、例えば、前記試験工程において、前記測定値と基準値とを比較し、前記測定値が前記基準値よりも低い場合に、前記被検体は、罹患可能性があるとし、前記測定値が前記基準値よりも高い時に、前記被検体は、前記罹患可能性がないとすることができる。

【0095】

< 自己免疫疾患の診断方法 >

20

前述した本発明の自己免疫疾患の罹患の可能性を試験する方法は、例えば、自己免疫疾患の診断方法ということもできる。すなわち、本発明の自己免疫疾患の診断方法は、前述のように、サンプルが、被検体から単離した生体試料であり、前記本発明の自己抗体の検出方法によって、前記サンプルにおける自己抗体と前記MHCクラスII分子により提示された変性タンパク質（前記変性タンパク質/MHCクラスII）との複合体を検出する検出工程、および、前記検出工程における前記複合体の検出結果から、自己免疫疾患を診断する診断工程を含むことを特徴とする。

【0096】

本発明の診断方法は、前述した前記本発明の試験方法の記載を援用でき、前記試験方法における罹患可能性の試験は、本発明において、自己免疫疾患に罹患しているか否かの診断を意味する。

30

【0097】

< 自己抗体の検出試薬 >

本発明の自己抗体の検出試薬は、前述のように、前記本発明の自己抗体の検出方法に用いる自己抗体の検出試薬であって、MHCクラスII分子により提示された変性タンパク質を含むことを特徴とする。

【0098】

本発明の検出試薬は、自己抗体に対する抗原試薬として、前記変性タンパク質/MHCクラスIIを含むことが特徴であって、その他の構成および条件は、特に制限されない。本発明の検出試薬は、前記本発明の検出方法における前記抗原試薬の記載を援用できる。本発明の検出試薬によれば、優れた精度で自己抗体を検出できる。

40

【0099】

前記本発明の自己抗体の検出試薬は、例えば、前記自己抗体の検出に使用でき、前記自己抗体の検出から、前述のように、自己免疫疾患を診断できる。このため、本発明の自己抗体の検出試薬は、自己免疫疾患の診断試薬とすることができる。

【0100】

< 自己抗体の検出試薬の製造方法 >

本発明の自己免疫疾患の検出試薬の製造方法は、前述のように、MHCクラスII分子の発現系細胞に、正常フォールドタンパク質をコードする遺伝子を導入することで、前記正常フォールドタンパク質が変性した前記変性タンパク質が提示されたMHCクラスII分子

50

を調製する調製工程を含むことを特徴とする。本発明の製造方法は、前記本発明の検出方法における前記抗原試薬の製造に関する記載を援用できる。

【0101】

<自己免疫疾患に関連する自己抗体に対する抗原タンパク質のスクリーニング方法>

本発明のスクリーニング方法は、自己免疫疾患に関連する自己抗体に対する抗原タンパク質のスクリーニング方法であり、前述のように、サンプルが、自己免疫疾患の被検体から単離した生体試料であり、前記本発明の自己抗体の検出方法によって、前記サンプルにおける自己抗体とMHCクラスII分子により提示された変性タンパク質との複合体を検出する検出工程、および、前記自己抗体との前記複合体を形成した前記変性タンパク質を、前記自己免疫疾患に関連する自己抗体に対する抗原タンパク質と判断する判断工程を含むことを特徴とする。

10

【0102】

本発明のスクリーニング方法によれば、自己免疫疾患に関連する自己抗体に対する抗原タンパク質をスクリーニングできる。前述のように、従来自己抗体の検出方法では、正常にフォールディングされた正常フォールドタンパク質を抗原試薬としているが、自己免疫疾患の患者について、偽陰性の問題が生じる。このため、前記正常フォールドタンパク質を自己抗原の候補タンパク質としてスクリーニングを行っても、実際には、自己免疫疾患との関連性において優れた信頼性を示す自己抗原のスクリーニングを行っていない可能性がある。これに対して、前記MHCクラスII分子により提示された変性タンパク質を自己抗原の候補タンパク質とすることによって、例えば、自己免疫疾患との関連性において優れた信頼性を示す自己抗原をスクリーニングすることが可能となる。

20

【0103】

発明のスクリーニング方法は、特に示さない限り、前記本発明の検出方法、前記本発明の試験方法等の記載を援用できる。

【0104】

本発明のスクリーニング方法において、前記自己免疫疾患の種類は、特に制限されず、例えば、自己抗原が同定されていない自己免疫疾患でもよいし、自己抗原が推定または同定されている自己免疫疾患でもよい。

【0105】

前記検出工程は、前述のように、前記本発明の自己抗体の検出方法によって、前記サンプルにおける自己抗体と前記変性タンパク質/MHCクラスIIとの複合体を検出する検出工程である。前記検出工程は、例えば、前述のように、前記複合体の形成量を測定する測定工程であってもよい。

30

【0106】

前記判断工程は、前述のように、前記自己抗体との前記複合体を形成した前記変性タンパク質を、前記自己免疫疾患に関連する自己抗体に対する抗原タンパク質と判断する判断工程である。前記判断工程において、例えば、前記検出工程で前記複合体が検出された場合、前記変性タンパク質を前記抗原タンパク質と判断でき、前記複合体が検出されない場合、前記変性タンパク質は、前記抗原タンパク質ではないと判断できる。

【0107】

また、前記抗原タンパク質か否かは、前記試験工程において、例えば、前記測定工程で測定した前記被検体の複合体形成量の測定値と基準値との比較によって判断できる。具体的には、例えば、前記試験工程において、前記測定値と基準値とを比較し、前記測定値が前記基準値よりも高い場合に、前記変性タンパク質を前記抗原タンパク質と判断し、前記測定値が前記基準値よりも低い時に、前記変性タンパク質は前記抗原タンパク質ではないと判断できる。

40

【0108】

前記基準値は、特に制限されず、例えば、自己免疫疾患には罹患していない健常者の生体試料における前記複合体の形成量があげられる。また、前記比較対象が、前記複合体の形成量の測定値から算出した自己抗体量の場合、前記健常者の複合体の形成量も、自己抗

50

体量が好ましい。前記健常者の生体試料は、例えば、前記被検者の生体試料と同様の条件で単離した生体試料であることが好ましい。前記健常者の生体試料における前記複合体の形成量は、例えば、前記被検者の生体試料についての前記複合体の検出と、同様の方法および条件で行うことが好ましい。

【 0 1 0 9 】

なお、前記測定値と前記基準値との比較においては、前記複合体が形成された場合の測定値が正の値となることを前提として、前記抗原タンパク質か否かの判断を例示したが、前記複合体が形成された場合の測定値が負の値となってもよい。この場合は、例えば、前記判断工程において、前記測定値と基準値とを比較し、前記測定値が前記基準値よりも低い場合に、前記変性タンパク質は前記抗原タンパク質であると判断し、前記測定値が前記基準値よりも高い時に、前記変性タンパク質は前記抗原タンパク質ではないと判断できる。

10

【実施例】

【 0 1 1 0 】

(1) 発現ベクターの作製

(1 - 1) HLA-DR発現ベクター、HLA-DP発現ベクター

ヒト末梢血単核細胞 (3H Biomedical社) またはヒト細胞株の c D N A から、下記表 2 A および B に示すHLA-DRの鎖および鎖、または下記表 3 A および B に示すHLA-DPの鎖および鎖をコードするポリヌクレオチドを、それぞれ、p M E 1 8 S ベクターにクローニングした。なお、前記HLA-DRの c D N A の配列情報は、IMGT/HLA Database (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/index/html>) を参照した。前記クローニングにより作製した発現ベクターは、以下、下記表における遺伝子名で示す (以下、同様) 。

20

【 0 1 1 1 】

【表 2 A】

実施例	MHC クラス II α 鎖 (HLA-DRA) 遺伝子名	IMGT/HLA アクセッション番号
1A-1G, 2A-2E, 3A-3D	HLA-DRA*01:01	HLA00662

30

【 0 1 1 2 】

【表 2 B】

実施例	MHC クラス II β 鎖 (HLA-DRB) 遺伝子名	IMGT/HLA アクセッション番号
1F, 2A, 2C-2E, 3B	HLA-DRB1*01:01	HLA00664
1F, 2A, 3B	HLA-DRB1*01:03	HLA00667
1B, 1E, 1F, 3B	HLA-DRB1*03:01	HLA00671
3B	HLA-DRB1*03:04	HLA00676
3B	HLA-DRB1*03:08	HLA00680
3B	HLA-DRB1*03:16	HLA01152
1E, 1F, 3B	HLA-DRB1*04:01	HLA00685
1F, 3B	HLA-DRB1*04:02	HLA00687
1F, 2A, 3B	HLA-DRB1*04:03	HLA00688
1A-1D, 1F, 1G, 3A, 3B	HLA-DRB1*04:04	HLA00689
3B	HLA-DRB1*04:05	HLA00690
3B	HLA-DRB1*04:06	HLA00692
1F, 3B-3D	HLA-DRB1*07:01	HLA00719
1F, 3B, 3C	HLA-DRB1*08:01	HLA00723
3B	HLA-DRB1*08:03	HLA00727
1F, 3B	HLA-DRB1*09:01	HLA00749
1F, 3B	HLA-DRB1*10:01	HLA00750
1F, 3B	HLA-DRB1*11:01	HLA00751
1F, 3B	HLA-DRB1*12:01	HLA00789
1F, 3B	HLA-DRB1*13:01	HLA00797
1F, 3B	HLA-DRB1*13:02	HLA00798
1F, 3B	HLA-DRB1*13:03	HLA00799
1F, 3B	HLA-DRB1*14:01	HLA00833
3B	HLA-DRB1*14:02	HLA00834
2A, 3B	HLA-DRB1*14:03	HLA00835
2A	HLA-DRB1*14:05	HLA00837
3B	HLA-DRB1*14:06	HLA00838
1E, 1F, 2A, 3B	HLA-DRB1*15:01	HLA00865
3B	HLA-DRB3*02:02	HLA00895
2A-2E, 3B	HLA-DRB4*01:03	HLA00908

10

20

30

40

【表 3 A】

実施例	MHC クラス II α 鎖 (HLA-DPA) 遺伝子名	IMGT/HLA アクセッション番号
4	HLA-DPA1*02:02	HLA00508

【 0 1 1 4 】

【表 3 B】

実施例	MHC クラス II β 鎖 (HLA-DPB) 遺伝子名	IMGT/HLA アクセッション番号
4	HLA-DPB1*05:01	HLA00523

【 0 1 1 5 】

(1 - 2) 抗原タンパク質発現ベクター

マウス脾臓 cDNA から、下記表 4 の分泌型 IgG 重鎖、膜型 IgG 重鎖、IgG 軽鎖、Ig α および Ig β をコードするポリヌクレオチドを、それぞれ、pME18S ベクターにクローニングした。ヒト甲状腺 cDNA から、下記表 4 のサイログロブリンをコードするポリヌクレオチドを、pME18S ベクターにクローニングした。ヒト末梢血単核球の cDNA から、下記表 4 の β 2 グリコプロテイン I (β 2-GPI) をコードするポリヌクレオチドを、pME18S ベクターにクローニングした。ヒト甲状腺 cDNA から、下記表 4 の甲状腺刺激ホルモン受容体 (TSHR) を、pME18S ベクターにクローニングした。

【 0 1 1 6 】

【表 4】

使用した実施例	遺伝子名	アクセッション番号 または 塩基配列
1A-1G	マウス 分泌型 IgG 重鎖 (sIgGH)	JQ917464
1C	マウス 膜型 IgG 重鎖 (mIgGH)	配列番号 1
1C, 1D	マウス IgG 軽鎖 (IgGL)	JQ917465
1C	マウス Ig α	NM_007655.3
1C	マウス Ig β	NM_008339.2
2A-2E	ヒト サイログロブリン (TG)	NM_003235.4
3A-3D	ヒト β 2-GPI	NM_000042.2
4	ヒト TSHR	AY429111

* : マウス分泌型 IgG 重鎖 (sIgGH) とマウス膜型 IgG 重鎖 (mIgGH) は、同じ V 領域を有する。

【 0 1 1 7 】

マウス 膜型 IgG 重鎖 (mIgGH) (配列番号 1)

GTCTTGTCAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCCTGTGCTGGTGAAACCCACAGAGACCCCTCACGCTGACCTGCAGCGT
CTCTGGGTTCTCACTCAGCAACGGTAGAATGGGTGTGAGTTGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGGTTG
GACACATTTTTTCGAATGACGACAAATCTTACACCCCATCTCTGGAGAGCAGGCTCACCATCTCCAGGACACCTTCAGA

10

20

30

40

50

AGCCAGGTGGTCCCTAACCAATTACCAACTTGGCCCCCGTGGACACAGGCACATATTATTGTGCACGAATAAGTCGTTCCAT
 TTATGGGGTGTCTTACCCCCGGCAGCGTCTGGGGCCAAAGGACCATGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAT
 CGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC
 CCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCCCTC
 AGGACTCCACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC
 ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGGCCA
 GCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCC
 TGAGGTACACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG
 TGCATAATGCCAAGACAAAAGCCGCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACAGCGTCCCTACCGTCTGCAC
 CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC
 CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCA
 GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC
 TACAAGACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG
 GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
 CCCCAGGAGTGCAACTGGAGGAGAGCTGTGCGGAGGCGCAGGACGGGGAGCTGGACGGGCTGTGGACGACCATCACCATC
 TTCATCACACTCTTCTGTAAAGCGTGTGCTACAGTGCCACCGTCACCTTCTTCAAGGTGAAGTGGATCTTCTCCTCGGT
 GGTGGACCTGAAGCAGACCATCATCCCCGACTACAGGAACATGATCGGACAGGGGGCCTAG

10

【 0 1 1 8 】

(1 - 3) その他のベクター

20

下記文献にしたがって、前記表 1 のHLA-DRB1*04:04に、リンカーペプチド（配列番号 2 : GSGSGS）と C w 3 ペプチド（配列番号 3 : GSHSMRYFYTAVSRPGR）とを結合させたCw3-pep-HLA-DRB1*04:04をコードするポリヌクレオチドを、p M E 1 8 S ベクターにクローニングした。これにより、H L A - D R のペプチド結合溝における結合性が阻害される。

文献： Scott, C. A. et al., I. A. Crystal structures of two I-A^d-peptide complexes reveal that high affinity can be achieved without large anchor residues. *Immunity* 8, 319-329, (1998).

ヒト末梢血単核球の c D N A から、下記表 5 のインバリエント鎖をコードするポリヌクレオチドを、p M E 1 8 S ベクターにクローニングした。

G F P をコードする配列番号 4 に示すポリヌクレオチドを、p M E 1 8 S ベクターにクローニングした。

30

【 0 1 1 9 】

【表 5】

使用した実施例	遺伝子名	アクセッション番号 または配列番号
1F	ヒト インバリエント鎖 (Ii)	NM_004355.2
1A, 1C-1G, 2A, 2C-2E, 3A, 3B, 3D, 4	GFP	配列番号 4

40

【 0 1 2 0 】

G F P (配列番号 4)

atggtagcaagggcgaggagctgttcaccggggtgggtgcccatcctggtagcgtggacggcgacgtaaacggccacaa
 gttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgcaccaccggcaagc
 tggccgtgcccggccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtagcgtgcttcagccgctaccccgaccacatgaag
 cagcagcactcttcaagtcggccatgccgaaggctacgtccaggagcgcacccatctcttcaaggacgacggcaacta
 caagaccgcgcccagggtgaagttcgaggcgacacccctggtagaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggagg
 acggcaacatcctggggcacaagctggagtaaacataaacagccacaacgctctatcatggccgacaagcagaagaac
 ggcatcaagggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactaccagcagaacac
 ccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccctacctgagcaccagctccgcccctgagcaaaagaccccaacg

50

agaagcgcgatcacatggctcctgctggagttcgtgaccgccgccgggatcactctcggcatggacgagctgtacaagtaa
【0121】

(2) 発現ベクターの導入

発現ベクターを導入する宿主細胞として、293T (理化学研究所 バイオリソースセンター) を使用し、トランスフェクション試薬として、PEI max (商品名、Polyscience社製) を使用した。前記293T細胞への前記発現ベクターの導入は、PEI max (コスモバイオ社) を2mg/mlとなるように精製水で溶かしたPEI max溶液を使用した。具体的には、Lipofectamine (商標) 2000 (Invitrogen社) の使用説明書に従い、Lipofectamine (商標) 2000に代えて、前記PEI max溶液を用いて、前記発現ベクターの導入を行った。前記293T細胞は、DMEM培地を使用し、37℃、培養日数2日の条件下で培養した。

10

【0122】

(3) 試薬

抗体等の試薬は、特に示さない限り、同じ名称のものは、同じ製品を使用した。

【0123】

[実施例1]

本実施例1は、関節リウマチの指標である自己抗体の検出に関する。

【0124】

(実施例1A)

HLA-DRとIgG重鎖とを発現させ、細胞表面に、HLA-DRによりIgG重鎖が提示されることを確認した。

20

【0125】

鎖用発現ベクターとして前記HLA-DRA*01:01ベクター、鎖用発現ベクターとして前記HLA-DRB1*04:04ベクター、分泌型IgG重鎖の前記sIgGHベクターおよび前記GFPベクターを、293T細胞に導入し、培養した。前記培養後の細胞を、アロフィコシアニン (APC) 標識抗ヒトIgG Fc抗体または抗HLA-DR抗体と反応させ、さらに、APC標識抗マウスIgG抗体と反応させた。そして、フローサイトメトリーによる分析を行った。具体的には、フローサイトメーター (商品名FACSCalibur (商標)、Becton Dickinson社) を用いて、GFP陽性細胞における細胞表面のIgG重鎖の発現およびHLA-DRの発現を確認した。コントロール1は、前記HLA-DR発現ベクターを導入しない以外は同様にして、また、コントロール2は、前記HLA-DR発現ベクターに代えて、前記Cw3-pep-HLA-DRB1*04:04ベクターを導入した以外は、同様にして測定した。前記Cw3-pep-HLA-DRB1*04:04ベクターは、HLA-DRのペプチド結合溝へのIgG重鎖の結合を阻害できる。

30

- ・APC標識抗ヒトIgG Fc抗体: Jackson ImmunoResearch社 Code: 109-136-098
- ・フローサイトメトリー用抗HLA-DR抗体: クローンHL-40、EXBIO社、モノクローナル抗体 (mAb)
- ・APC標識抗マウスIgG抗体: Jackson ImmunoResearch社 Code: 715-136-150

【0126】

これらの結果を図1に示す。図1は、細胞表面におけるIgGまたはHLA-DRの発現量を示すヒストグラムである。図1において、横軸は、蛍光強度であり、HLA-DRに提示されたIgG発現量またはHLA-DR発現量を示し、縦軸は、細胞のカウント数を示す。図1に示すように、HLA-DRA*01:01、HLA-DRB1*04:04およびIgG重鎖を導入した細胞 (HLA-DR0404) は、細胞表面のIgGおよびHLA-DRの発現が認められた。一方、前記コントロール1 (without HLA-DR) は、細胞表面のIgGおよびHLA-DRの発現が認められず、また、前記コントロール2 (Cw3-pep-HLA-DR0404) は、細胞表面のHLA-DRの発現は認められるが、細胞表面のIgGの発現は低かった。以上のことから、細胞表面におけるIgG重鎖の発現には、HLA-DRが必要であること、また、IgG重鎖は、HLA-DRのペプチド結合溝に結合し、細胞表面に提示されていることがわかった。なお、IgGは、重鎖と軽鎖のホモダイマーからなり、両方がなければ、正常にフォ

40

50

ールディングされず、抗体として機能しないことが知られている。本実施例では、I g G 重鎖のみを細胞に導入しており、軽鎖非存在下、重鎖のみが、H L A - D Rにより細胞表面に発現している。このことから、前記細胞表面に提示されているI g Gは、ミスフォールドタンパク質（変性タンパク質）といえる。

【 0 1 2 7 】

（実施例 1 B）

H L A - D Rを免疫沈降し、I g G重鎖が、H L A - D Rのペプチド結合溝で結合していることを確認した。

【 0 1 2 8 】

2 9 3 T細胞に、鎖発現用ベクターであるHLA-DRA*01:01の他に、後述する図 2 の図中に示す組合せとなるように各発現ベクターを導入し、培養した。前記培養後の細胞を、0 . 5 % N P - 4 0 液 (polyoxyethylene(9)octylphenyl ether) に溶解し、前記溶解液について、ビオチン化抗 H L A - D R 抗体およびストレプトアビジンセファロース (GEヘルスケア社) を用いて免疫沈降を行った。

・免疫沈降用ビオチン化抗 H L A - D R 抗体：クローンL243、ATCC社、mAb

【 0 1 2 9 】

前記免疫沈降したサンプルについて、ウエスタンブロッティングを行った。すなわち、前記サンプルを電気泳動に供し、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトI g G抗体またはウサギ抗 H L A - D R 抗体と、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギI g G抗体とを用いて、I g GおよびH L A - D Rを検出した。コントロールは、前記溶解液について、プロテインAセファロース (GEヘルスケア社) を用いて免疫沈降を行った以外は、同様にして、ウエスタンブロッティングを行った。

・ペルオキシダーゼ標識抗ウサギI g G抗体：Thermo Fisher

Scientific社 Prod#: 1858415

・ペルオキシダーゼ標識抗ヒトI g G抗体：Jackson ImmunoResearch社 Code: 709-035-149

・ウサギ抗 H L A - D R 抗体：品番FL-254、Santa Cruz Biotechnology, Inc.社

【 0 1 3 0 】

これらの結果を図 2 に示す。図 2 は、ウエスタンプロットの写真である。図 2 において、写真の上側は、レーン番号および発現ベクターの導入 (+) と未導入 (-) を示し、写真の左側は、検出したタンパク質の種類を示す。

【 0 1 3 1 】

図 2 において、I g G重鎖のみを導入した細胞 (レーン 1) およびH L A - D Rのみを導入した細胞 (レーン 2 - 4) は、1 段目および3 段目の写真に示すように、I g G重鎖またはH L A - D Rの発現は確認されたが、2 段目の写真に示すように、両者の結合は確認されなかった。これに対して、I g G重鎖とリウマチに感受性であるH L A - D R 4 (H L A - D R A * 0 1 : 0 1 / H L A - D R B 1 * 0 4 : 0 4) とを導入した細胞 (レーン 5) は、1 段目および3 段目の写真に示すように、I g G重鎖およびH L A - D Rの発現が確認され、且つ、2 段目の写真に示すように、両者の結合も確認できた。なお、I g G重鎖とリウマチに抵抗性であるH L A - D R 3 (H L A - D R A * 0 1 : 0 1 / H L A - D R B 1 * 0 3 : 0 1) とを導入した細胞 (レーン 6) は、I g G重鎖およびH L A - D Rの発現が確認されたが、リウマチに感受性であるH L A - D R 4を導入した細胞 (レーン 5) と比較して、H L A - D RとI g G重鎖との結合は低下した。また、前記HLA-DRA*01:01 / Cw3-pep-HLA-DRB1*04:04を導入した細胞 (レーン 7) は、I g G重鎖およびH L A - D Rの発現が確認されたが、ペプチド結合部位における結合性がペプチドで阻害されているため、レーン 5 の細胞 (H L A - D R 4) と比較して、H L A - D RとI g G重鎖との結合が著しく低下した。これらの結果から、I g G重鎖の細胞表面への発現には、H L A - D Rが必要であること、また、I g G重鎖は、H L A - D Rのペプチド結合溝に結合し、細胞表面に提示されていることがわかった。

【 0 1 3 2 】

（実施例 1 C）

10

20

30

40

50

リウマチ因子 (RF) および RF 6 1 リウマチ因子抗体 (RF 6 1、mAb) が、HLA - DR に提示された Ig G 重鎖を認識することを確認した。

【0133】

RF 6 1 リウマチ因子抗体の重鎖およびラムダ軽鎖の可変部領域をコードするポリヌクレオチドを、それぞれ、アクセッション No. X 5 4 4 3 7 およびアクセッション No. X 5 4 4 3 8 に基づき合成した。前記重鎖のポリヌクレオチドは、分泌型マウス Ig G 1 重鎖の定常領域をコードするポリヌクレオチド (アクセッション No. L 2 4 7 4 3 7 . 1) を含む pME 1 8 S ベクターに、前記ラムダ軽鎖のポリヌクレオチド (アクセッション No. X 0 6 8 7 6) は、ヒトラムダ鎖の定常領域をコードするポリヌクレオチドを含む pME 1 8 S ベクターに、それぞれ、機能的に連結するよう導入した。次に、前記重鎖を含むベクターおよび前記軽鎖を含むベクターを、前記実施例 1 A と同様にして、293 T 細胞に導入し、培養した。前記培養後、RF 6 1 抗体を含む培養上清を回収し、前記上清を、RF 6 1 としして用いた。

10

【0134】

前記実施例 1 A と同様にして、鎖発現用ベクターである前記 HLA-DRA*01:01 ベクター、鎖発現用ベクターである前記 HLA-DRB1*04:04 ベクター、分泌型 Ig G 重鎖の前記 s Ig G H ベクターおよび前記 GFP ベクターを導入した 293 T 細胞を培養し、前記培養した細胞を各種抗体と反応させ、GFP 陽性細胞について、フローサイトメトリー分析を行った。具体的には、RF の結合の確認には、前記細胞を、RF を含むリウマチ患者の希釈血清と反応させ、さらに、APC 標識抗ヒト Ig M 抗体を反応させた。前記希釈血清は、前記患者の血清を 300 倍希釈したものを使用した。RF 6 1 の結合の確認には、予め、前記 RF 6 1 と前記 APC 標識抗マウス Ig G Fc 抗体との 2 量体を形成させ、前記細胞を、前記 2 量体と反応させた。また、実施例 1 A と同様に、細胞表面における Ig G 重鎖または HLA - DR の発現の確認には、前記細胞を、前記抗 Ig G 抗体または前記抗 HLA - DR 抗体と反応させ、さらに、前記 APC 標識抗マウス Ig G Fab 抗体と反応させた。

20

・APC 化抗ヒト Ig M 抗体 : Jackson ImmunoResearch 社製 Code: 709-136-073

【0135】

コントロール 1 は、前記 HLA-DR 発現ベクターを導入しない以外は同様にして、また、コントロール 2 は、分泌型 Ig G 重鎖の s Ig G H ベクターに代えて、膜型 Ig G 重鎖の前記 m Ig G H ベクター、Ig G 軽鎖の前記 Ig G L ベクター、前記 Ig ベクターおよび前記 Ig ベクターを導入した以外は同様にして、フローサイトメトリー分析を行った。

30

【0136】

これらの結果を図 3 に示す。図 3 は、細胞表面における Ig G 重鎖もしくは HLA - DR の発現量、または細胞表面における RF もしくは RF 6 1 の結合量を示すヒストグラムである。図 3 において、横軸は、蛍光強度であり、HLA - DR に提示された Ig G 重鎖もしくは HLA - DR の発現量、または RF もしくは RF 6 1 の結合量を示し、縦軸は、細胞のカウント数を示す。図 3 において、上段は、分泌型 Ig G 重鎖を導入した細胞の結果であり、下段は、膜型 Ig G 重鎖、Ig G 軽鎖、Ig および Ig を導入した細胞 (コントロール 2) の結果である。

40

【0137】

図 3 の上段に示すように、HLA - DR と分泌型 Ig G 重鎖を導入した細胞 (sIgGH) では、細胞表面における Ig G 重鎖および HLA - DR の発現が確認され、且つ、RF および RF 6 1 の結合が確認された。これに対して、図 3 の下段に示すように、コントロール 2 (mIgGH+L+Ig) では、細胞表面における Ig G 重鎖および HLA - DR の発現は確認されたが、RF および RF 6 1 の結合は確認されなかった。これは、RF および RF 6 1 が、重鎖と軽鎖を含み正常にフォールドされた Ig G ではなく、HLA - DR に提示されたミスフォールド Ig G を認識するためと考えられる。これらの結果から、RF および RF 6 1 は、正常にフォールディングされた Ig G よりも、HLA - DR に提示されたミスフォールド Ig G 重鎖を認識し、強く結合することがわかった。

50

【 0 1 3 8 】

(実施例 1 D)

リウマチ患者由来の血清中の I g M が、H L A - D R に提示された I g G 重鎖を認識することを確認した。

【 0 1 3 9 】

R F 陽性患者由来の血清を採取し、300倍に希釈し、R F (+) 血清サンプル (n = 5) とした。また、R F 陰性患者由来の血清を採取し、R F (-) 血清サンプル (n = 5) とした。293 T 細胞に、鎖発現用ベクターである前記HLA-DRA*01:01ベクター、鎖発現用ベクターである前記HLA-DRB1*04:04ベクター、前記分泌型 I g G 重鎖の前記 I g G H ベクター、前記 I g G 軽鎖ベクターおよび前記 G F P ベクターを導入し、培養した。前記培養後の細胞を、前記 R F (+) サンプルまたは前記 R F (-) サンプルと反応させ、さらに、前記 A P C 化抗ヒト I g M 抗体および前記 A P C 標識ストレプトアビジンを順に反応させた。そして、前記実施例 1 C と同様にして、フローサイトメトリーにより、前記細胞表面における自己抗体の結合を測定した。コントロールは、前記HLA-DR発現ベクターを導入しない以外は、同様にしてフローサイトメトリー分析を行った。

10

【 0 1 4 0 】

これら結果を図 4 に示す。図 4 は、細胞表面における G F P の発現量および自己抗体の結合量を示すグラフである。図 4 において、横軸は、G F P の発現量を示し、縦軸は、R F の結合量を示す。図 4 において、上段は、H L A - D R 未導入の細胞 (コントロール) の結果であり、下段は、分泌型 I g G 重鎖および I g G 軽鎖と共に H L A - D R を導入した細胞の結果である。そして、左の 4 列が、R F (-) 血清サンプルの結果であり、右の 4 列が、R F (+) 血清サンプルの結果である。

20

【 0 1 4 1 】

図 4 の下段に示すように、分泌型 I g G 重鎖および I g G 軽鎖と共に H L A - D R を導入した細胞 (s I g G H + L + H L A - D R 0 4 0 4) は、R F (-) 血清サンプルを用いた場合、自己抗体の結合が確認されず、R F (+) 血清サンプルを用いた場合に、自己抗体の結合が確認された。これに対して、図 4 の上段に示すように、H L A - D R 未導入の細胞 (s I g G H + L) では、R F (+) 血清サンプルおよび R F (-) 血清サンプルの両者において、自己抗体の結合は確認されなかった。これは、H L A - D R 未導入の細胞 (s I g G H + L) では、分泌型 I g G は、細胞外へ分泌されるのみであり、H L A - D R が発現しないことから、H L A - D R によって細胞表面に I g G が提示されることがなく、I g G は細胞表面に存在しないからである。このため、R F 陽性患者由来の血清中の I g M 抗体は、分泌型 I g G のみを導入した細胞には結合しない。これらの結果から、R F 陰性患者ではなく、陽性患者の血清中のみに、H L A クラス II 分子に提示された I g G に結合する I g M 抗体が存在することがわかった。

30

【 0 1 4 2 】

(実施例 1 E)

異なるハプロタイプの H L A - D R の I g G 重鎖の提示能およびリウマチ患者由来の血清中の I g M が、前記 H L A - D R に提示された I g G 重鎖を認識することを確認した。

【 0 1 4 3 】

鎖用発現ベクターとして前記HLA-DRA*01:01ベクター、鎖用発現ベクターとして前記HLA-DRB1*03:01ベクター、前記HLA-DRB1*15:01ベクターおよび前記HLA-DRB1*04:01ベクターのいずれか1つ、前記分泌型 I g G 重鎖の前記 s I g G H ベクターおよび前記 G F P ベクターを、293 T 細胞に導入した。

40

【 0 1 4 4 】

前記細胞を培養した後、前記培養細胞について、前記実施例 1 C と同様にして、フローサイトメトリー分析によって、細胞表面における I g G 重鎖および H L A - D R の発現量、ならびに、自己抗体の結合量の確認を行った。コントロールは、293 T 細胞に、ベクターとして、前記分泌型 I g G 重鎖の前記 I g G H ベクターおよび前記 G F P ベクターを導入した以外は、同様にして測定した。

50

【0145】

これらの結果を、図5に示す。図5は、細胞表面におけるI g G重鎖、もしくはH L A - D Rの発現量、または自己抗体の結合量を示すヒストグラムである。図5において、横軸は、蛍光強度であり、H L A - D Rに提示されたI g G、もしくはH L A - D Rの発現量または自己抗体の結合量を示し、縦軸は、細胞のカウント数を示す。図5において、左列が、前記HLA-DRB1*03:01導入細胞(HLA-DR3)、中列が、前記HLA-DRB1*15:01導入細胞(HLA-DR15)、右列が、前記HLA-DRB1*04:01導入細胞(HLA-DR4)である。また、図5において、陰影をつけたヒストグラムは、前記分泌型I g G重鎖を導入した細胞(コントロール)の結果である。

【0146】

図5において、上段および下段に示すように、いずれのハプロタイプの鎖を有するH L A - D Rを導入した細胞においても、細胞表面におけるI g G重鎖およびH L A - D Rの発現が確認された。そして、中段に示すように、H L A - D Rに提示されたI g G重鎖の発現とR Fの結合を確認した結果、いずれのハプロタイプの鎖を有するH L A - D Rを導入した細胞においても、自己抗体の結合が確認された。これらの結果から、前記H L A - D Rのハプロタイプにかかわらず、前記H L A - D RがI g G重鎖を提示すること、および前記H L A - D Rのハプロタイプにかかわらず、前記H L A - D Rに提示されたI g G重鎖が自己抗体に認識されることがわかった。

【0147】

(実施例1F)

異なるハプロタイプの鎖を有するH L A - D Rについて、リウマチ感受性のオッズ比と自己抗原への自己抗体の結合量との相関関係を確認した。

【0148】

異なるハプロタイプの鎖を有するH L A - D Rについて、リウマチ感受性のオッズ比は、下記文献を参照した。

参考文献: Raychaudhuri, S. et al. Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. Nat. Genet. 44, 291-296, (2012).

【0149】

鎖用発現ベクターとして前記HLA-DRA*01:01ベクター、鎖用発現ベクターとして前記表2の各種HLA-DRBベクター、前記分泌型I g G重鎖の前記s I g G Hベクターおよび前記G F Pベクターを、293T細胞に導入し、培養した。前記培養細胞について、G F P陽性細胞において前記各H L A - D Rに提示されたI g G重鎖(自己抗原)と自己抗体との結合量を測定した。具体的には、前記培養細胞について、前記実施例1Cと同様にして、フローサイトメトリー分析を行い、G F P陽性細胞におけるR Fの平均蛍光強度を算出した。

【0150】

そして、前記平均蛍光強度と前記リウマチ感受性のオッズ比との関連性を、ピアソンの積率相関係数(Pearson product-moment correlation coefficient)により解析した。また、コントロールは、前記分泌型I g G重鎖の前記s I g G Hベクターに代えて前記置換H E Lベクターを導入し、抗F l a g抗体を用いた以外は、同様にして平均蛍光強度を測定し、前記平均蛍光強度と前記リウマチ感受性のオッズ比との関連性を解析した。

・抗F l a g抗体: クローンM2、シグマ社

【0151】

これらの結果を図6に示す。図6は、自己抗体の結合量を示す平均蛍光強度とリウマチ感受性のオッズ比との関連性を示すグラフである。図6において、横軸は、前記リウマチ感受性のオッズ比を示し、縦軸は、前記自己抗体の結合量の平均蛍光強度を示す。また、図6において、図中の数字は、HLA-DRにおけるHLA-DRB(鎖)のハプロタイプを示す。

【0152】

図6に示すように、異なるハプロタイプのH L A - D Rについて、前記H L A - D Rに

10

20

30

40

50

提示された I g G 重鎖への前記自己抗体の結合量と前記リウマチ感受性のオッズ比とは、極めて高い相関性 ($r = 0.81$ 、 $P = 0.000046$) を示した。

【0153】

(実施例 1 G)

H L A - D R に提示された I g G 重鎖へのリウマチ患者由来の血清中の自己抗体の結合量と R F 値とが相関することを確認した。

【0154】

(1) 関節リウマチ患者由来血清における自己抗体の結合量と R F 値との比較

リウマチ患者由来の血清および健常者由来の血清を採取し、300倍に希釈し、血清サンプルとした。293T細胞に、鎖発現用ベクターである前記HLA-DRA*01:01ベクター、鎖発現用ベクターである前記HLA-DRB1*04:04ベクター、前記分泌型 I g G 重鎖の前記 I g G H ベクターおよび前記 G F P ベクターを導入し、培養した。前記培養後の細胞を、前記実施例 1 C と同様にして、フローサイトメトリーで分析を行った。また、前記血清サンプルは、公知の E L I S A 法により、R F 値を確認済である。具体的には、ヒト I g G F c 断片 (Jackson ImmunoResearch社製) を、96マイクロウェルプレート (Costar社製) に吸着させた。次に、前記血清サンプルを加え、前記血清サンプル中の R F をヒト I g G F c 断片に結合させた。さらに、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヒト I g M 抗体 (Jackson ImmunoResearch社製) と反応させ、前記反応後、検出試薬 (BD OptiEIA (商標)、BD Bioscience社製) を用い、ペルオキシダーゼ活性を測定した。また、R F 値が 1060 U / m L の標準血清サンプル (GenWay Biotech, Inc社製) を用い、同様にしてペルオキシダーゼ活性を測定し、標準曲線を作製した。そして、前記標準曲線に基づき、前記血清サンプルのペルオキシダーゼ活性の測定値から、前記 R F 値を算出した。また、コントロールは、前記抗体に代えて、前記 A P C 標識抗ヒト I g M 抗体のみと反応させた以外は同様にして、測定した。

【0155】

これらの結果を図7に示す。図7は、細胞表面における自己抗体の結合量を示すヒストグラムである。図7において、横軸は、蛍光強度であり、自己抗体の結合量を示し、縦軸は、細胞のカウント数を示し、図の上の数値は、各サンプルの前記 R F 値を示す。また、陰影をつけたヒストグラムは、コントロールの結果である。そして、図7において、左3列が、リウマチ患者由来の血清サンプルの結果であり、右3列が、健常者由来の血清サンプルの結果である。

【0156】

図7に示すように、H L A - D R 未導入のコントロールでは、自己抗体の結合は確認されなかった。また、図7に示すように、健常者由来の血清サンプルでは、前記 R F 値によらず自己抗体の結合は確認されなかった。これに対し、リウマチ患者由来の血清サンプルでは、前記 R F 値と相関的に、自己抗体の結合量が増加した。

【0157】

(2) R F 標準曲線の作製

前記標準血清サンプルを、0.1% B S A 含有 H A N K S 緩衝液で、100倍希釈から 3.16倍ずつ希釈し、 3.16×10^6 倍希釈までの希釈系列を作成し、これらを標準サンプルとした。前記標準血清サンプルの R F 値は、1060 U / m l である。

【0158】

前記 R F を含むリウマチ患者の希釈血清に代えて、前記標準サンプルを用いた以外は、前記実施例 1 C と同様にして、フローサイトメトリー分析により、前記細胞に対する前記標準サンプルの H L A - D R / I g G H 複合体を認識する自己抗体の結合量を示す平均蛍光強度を算出した。このように、前記 H L A - D R と前記 I g G との複合体を抗原試薬として結合量を測定したことを、以下、「H L A - D R / I g G H 複合体システムによる測定」とし、それによって「抗 H L A - D R / I g G H 複合体抗体価」を評価した。

【0159】

次に、前記標準サンプルについて、R F 標準曲線を作製した。具体的には、前記 E L I

S A 法によって R F 値が確定している前記標準サンプルの希釈倍率に対応した測定値を暫定的に抗HLA-DR/IgGH複合体抗体価 (aHLA-DR/IgGH、自己抗体値) とし、これと、前記HLA-DR/IgGH複合体システムにより測定した前記HLA-DR4/IgGH複合体を認識する自己抗体の結合量を示す平均蛍光強度 (human IgM - MFI) とから、前記 R F 標準曲線を作製した。

【 0 1 6 0 】

この結果を図 8 に示す。図 8 は、前記 R F 標準曲線を示したグラフである。図 8 において、横軸は、前記HLA-DR/IgGH複合体システムにより測定した、前記標準サンプル中のHLA-DR4/IgGH複合体を認識する自己抗体の結合量を示す平均蛍光強度 (Human IgM - MFI) を示し、縦軸は、前記標準サンプルの E L I S A 法による既知の測定値より暫定的に決定した抗HLA-DR/IgGH複合体抗体価 (aHLA-DR/IgGH) を示す。

10

【 0 1 6 1 】

(3) 他の疾患患者由来の血清における自己抗体の結合量と R F 値との比較

リウマチ患者由来の血清 (n = 1 1 2)、全身性エリテマトーデス (S L E) 患者由来の血清 (n = 1 9) および A P S 患者由来の血清 (n = 1 1 7) を採取し、前記 (2) と同様にして、フローサイトメトリー分析により、前記細胞に対する前記血清中のHLA-DR4/IgGH複合体を認識する自己抗体の結合量を示す平均蛍光強度を算出した。さらに、前記図 8 の前記 R F 標準曲線に基づいて、間接的にaHLA-DR/IgGH複合体抗体値 (HLA-DR/IgGH複合体システムによる自己抗体値) を算出した。コントロールは、健常者由来の血清 (n = 1 2 7) を用い、同様にして、HLA-DR4/IgGH複合体を認識する自己抗体の結合量の測定、および前記検量線に基づくaHLA-DR/IgGH値 (HLA-DR/IgGH複合体システムによる自己抗体値) の算出を行った。また、前記血清サンプルは、前記 (1) と同様にして R F 値を確認済である。

20

【 0 1 6 2 】

これらの結果を図 9 に示す。図 9 は、aHLA-DR/IgGH値と R F 値とを比較したグラフである。図 9 において、横軸は、aHLA-DR/IgGH値を示し、縦軸は、R F 値を示し、グラフは左から、リウマチ患者 (R A) 由来の血清サンプル、S L E 患者由来の血清サンプル、A P S 患者由来の血清サンプルおよび健常者 (Healthy donors) 由来の血清サンプルを示す。図 9 に示すように、S L E 患者由来の血清サンプル、A P S 患者由来の血清サンプルおよび健常者由来の血清サンプルでは、前記 R F 値によらず自己抗体の結合は確認されなかった。これに対し、リウマチ患者由来の血清サンプルでは、前記 R F 値と相関的に、aHLA-DR/IgGH値が増加した。これらの結果から、前記 H L A - D R へ提示された I g G 重鎖への自己抗体の結合は、リウマチ特異的であることがわかった。

30

【 0 1 6 3 】

[実施例 2]

本実施例 2 は、橋本病の指標である自己抗体の検出に関する。

【 0 1 6 4 】

(実施例 2 A)

異なるハプロタイプの鎖を有する H L A - D R とサイログロブリン (T G) とを発現させ、細胞表面に、前記 H L A - D R により T G が提示されることを確認した。

【 0 1 6 5 】

40

鎖用発現ベクターとして前記HLA-DRB1*01:01ベクター、鎖用発現ベクターとして前記HLA-DRB1*01:03ベクター、前記HLA-DRB1*14:03ベクター、前記HLA-DRB1*15:01ベクターおよび前記HLA-DRB4*01:03(HLA-DR53)ベクターのいずれか1つ、前記 T G ベクターおよび前記 G F P ベクターを、293 T 細胞に導入し、培養した。前記培養後の細胞を、抗ヒスチジン抗体と反応させ、さらに、A P C 標識抗マウス I g G 抗体と反応させた。そして、前記実施例 1 A と同様に、G F P 陽性細胞について、フローサイトメトリー分析を行った。コントロール 1 は、前記HLA-DR発現ベクターを導入しない以外は、同様にして、また、コントロール 2 は、前記 A P C 標識抗マウス I g G 抗体のみを使用した以外は、同様にして測定した。

・抗ヒスチジン抗体 : Wako社、クローン9F2、モノクローナル抗体 (mAb)

50

・ A P C 標識抗マウス I g G 抗体 : Jackson ImmunoResearch社製 Code: 715-136-150

【 0 1 6 6 】

これらの結果を、図 1 0 に示す。図 1 0 は、細胞表面における T G の発現量を示すヒストグラムである。図 1 0 において、横軸は、蛍光強度であり、H L A - D R に提示された T G の発現量を示し、縦軸は、細胞のカウント数を示す。また、図 1 0 において、陰影をつけたヒストグラムは、コントロール 2 の結果である。

【 0 1 6 7 】

図 1 0 に示すように、いずれのハロタイプの鎖を有する H L A - D R を導入した細胞も、細胞表面において H L A - D R に提示された T G が確認された。一方、H L A - D R 未導入のコントロール 1 (Without DR) は、H L A - D R が発現されず、細胞表面において、T G の発現が認められなかった。これらの結果から、前記 H L A - D R によって T G が提示されることがわかった。

10

【 0 1 6 8 】

(実施例 2 B)

H L A - D R を免疫沈降し、T G が、H L A - D R と結合していることを確認した。

【 0 1 6 9 】

2 9 3 T 細胞に、鎖発現用ベクターである前記 H L A - D R A * 0 1 : 0 1 の他に、後述する図 1 1 の図中に示す組合せとなるように各発現ベクターを導入し、培養した。前記培養後の細胞について、前記実施例 1 B と同様に、免疫沈降によるサンプル調製およびウエスタンブロッティングを行った。前記ウエスタンブロッティングでは、抗体として、抗ヒト T G 抗体または前記ウサギ抗 H L A - D R 抗体を使用し、T G および H L A - D R を検出した。コントロールは、前記実施例 1 B と同様に、前記培養後の細胞を溶解したのみである非免疫沈降サンプルを使用した以外は、同様に、ウエスタンブロッティングを行った。

20

抗ヒト T G 抗体 : Dako 社

【 0 1 7 0 】

これらの結果を図 1 1 に示す。図 1 1 は、ウエスタンブロットの写真である。図 1 1 において、写真の上側は、レーン番号および発現ベクターの導入 (+) と未導入 (-) を示し、写真の左側は、検出したタンパク質の種類を示す。

【 0 1 7 1 】

図 1 1 において、レーン 1 は、前記コントロールであり、発現は確認されなかった。T G のみを導入した細胞 (レーン 2) および H L A - D R のみを導入した細胞 (レーン 3) は、1 段目と 3 段目の写真に示すように、T G または H L A - D R の発現は確認されたが、2 段目の写真に示すように、両者の結合は確認されなかった。これに対して、T G と H L A - D R とを導入した細胞 (レーン 4) は、1 段目および 3 段目の写真に示すように、T G および H L A - D R の発現が確認され、且つ、2 段目の写真に示すように、両者の結合も確認できた。これらの結果から、T G の細胞表面への発現には、H L A - D R が必要であること、また、T G は、H L A - D R に結合して、細胞表面に発現することがわかった。なお、抗 H L A - D R 抗体および抗 T G 抗体を用いた免疫染色により、橋本病患者由来の甲状腺組織においても、同様に、H L A - D R に T G が提示されていることが確認できた。

30

40

【 0 1 7 2 】

(実施例 2 C)

橋本病患者由来の血清中の I g G 抗体が、H L A - D R に提示された T G を認識することを確認した。

【 0 1 7 3 】

抗 T G 抗体陽性 (n = 3) の橋本病患者、抗 T G 抗体陰性 (n = 3) の橋本病患者および健常者 (n = 1) から血清を採取し (n = 5 3) 、 0 . 1 % B S A 含有 H A N K S 緩衝液で 3 0 0 倍に希釈し、血清サンプルとした。ここでいう抗 T G 抗体とは、正常にフォーディングされている T G に結合する抗体を意味する。

50

【 0 1 7 4 】

293 T細胞に、鎖用発現ベクターとして前記HLA-DRA*01:01ベクター、鎖用発現ベクターとして前記HLA-DRB1*01:01 (HLA-DR0101)ベクターまたは前記HLA-DRB4*01:03 (HLA-DR53)ベクター、前記TGベクターおよび前記GFPベクターを導入し、培養した。前記培養細胞を、前記血清サンプルと反応させ、さらに、ビオチン化抗ヒトIgG抗体および前記APC標識ストレプトアビジンを順に反応させた。そして、GFP陽性細胞について、前記実施例1Cと同様に、フローサイトメトリー分析により、前記細胞に対する前記血清中のIgG抗体の結合量を測定した。コントロール1は、前記HLA-DR発現用ベクターを導入しない以外は同様にして、また、コントロール2は、サンプルとして、前記健常者由来の血清サンプルを使用した以外は同様にして、測定した。

10

・ビオチン化抗ヒトIgG抗体：Jackson ImmunoResearch社製

【 0 1 7 5 】

これらの結果を図12に示す。図12は、血清IgG抗体の前記細胞への結合量を示すヒストグラムである。図12において、横軸は、蛍光強度であり、血清IgG抗体の前記細胞への結合量を示し、縦軸は、細胞のカウント数を示す。図12において、上段は、TGと橋本病抵抗性HLA-D R 1 (HLA-DRA*01:01/HLA-DRB1*01:01)を導入した細胞 (TG/HLA-DR0101)の結果であり、下段は、TGと橋本病感受性のHLA-D R 5 3 (HLA-DRA*01:01/HLA-DRB4*01:03)を導入した細胞 (TG/HLA-DR53)の結果である。また、図12において、左側から、Patient1-3の3列は、抗TG抗体陽性の血清サンプル、Patient4-6の3列は、抗TG抗体陰性の血清サンプル、右の1列は、健常者由来の血清サンプルを使用した結果である。

20

【 0 1 7 6 】

図12に示すように、抗TG抗体陽性の血清 (Patient1-3)を用いた場合、抵抗性HLA-D R の細胞 (TG/HLA-DR1)および感受性HLA-D R の細胞 (TG/HLA-DR53)のいずれにおいても、血清IgG抗体の結合が確認された。一方、抗TG抗体陰性の血清 (Patient4-6)を用いた場合、抵抗性HLA-D R の細胞 (TG/HLA-DR1)では、血清IgG抗体の結合は確認されなかったが、感受性HLA-D R の細胞 (TG/HLA-DR53)では、血清IgG抗体の結合が確認された。この結果から、感受性HLA-D R に提示されたTGによれば、正常にフォールディングされたTGを抗原とした場合には検出できない橋本病患者由来血清IgG抗体 (自己抗体)をも検出できることがわかった。このため、前者の正常

30

【 0 1 7 7 】

(実施例2D)

橋本病患者由来の血清中のIgG抗体が、HLA-D R に提示されたTGを認識することを確認した。

【 0 1 7 8 】

抗TG抗体陽性の橋本病患者由来の血清と抗TG抗体陰性の橋本病患者由来の血清を、それぞれ、所定の倍率 (100、300、900、2,700、8,100または24,300倍)に希釈し、希釈サンプルとした。

40

【 0 1 7 9 】

293 T細胞に、鎖用発現ベクターとして前記HLA-DRA*01:01ベクター、鎖用発現ベクターとして前記HLA-DRB1*01:01 (HLA-DR0101)ベクターまたは前記HLA-DRB4*01:03 (HLA-DR53)ベクター、前記TGベクターおよび前記GFPベクターを導入し、培養した。前記培養細胞を、前記希釈サンプルと反応させた以外は、前記実施例2Cと同様に、フローサイトメトリー分析により、前記細胞に対する前記血清中のIgG抗体の結合量を示す平均蛍光強度を算出した。

【 0 1 8 0 】

これらの結果を図13に示す。図13は、血清IgG抗体の前記細胞への結合量 (平均

50

蛍光強度)を示すグラフである。図13において、横軸は、血清の希釈倍率を示し、縦軸は、I g G抗体の結合量に対応する平均蛍光強度を示す。図13において、左側のグラフが、抗T G抗体陽性の血清サンプル、右側のグラフが、抗T G抗体陰性の血清サンプルを使用した結果である。

【0181】

図13において、左のグラフに示すように、抗T G抗体陽性血清のI g G抗体は、抵抗性H L A - D Rの細胞(TG/HLA-DR1、)および感受性H L A - D Rの細胞(TG/HLA-DR53、)のいずれに対しても、相対的に低い希釈率で、相対的に高い平均蛍光強度を示し、血清の希釈率の増加にしたがって、平均蛍光強度が低下した。また、抗T G抗体陰性血清のI g G抗体は、抵抗性H L A - D Rの細胞(TG/HLA-DR1、)に対して、いずれの希釈率でも、平均蛍光強度がほとんど検出できなかったのに対し、感受性H L A - D Rの細胞(TG/HLA-DR53、)に対して、相対的に低い希釈率で、相対的に高い平均蛍光強度を示し、血清の希釈率の増加にしたがって、平均蛍光強度が低下した。

10

【0182】

(実施例2E)

橋本病患者由来の血清中のI g G抗体が、H L A - D Rに提示されたT Gを認識することを確認した。

【0183】

53名の橋本病患者由来の血清を、前記実施例2Cと同様にして300倍に希釈し、血清サンプルとして使用した以外は、前記実施例2Dと同様にして、フローサイトメトリー分析により、G F P陽性細胞に対する血清I g G抗体の結合量を示す平均蛍光強度を算出した。

20

【0184】

これらの結果を図14に示す。図14は、血清I g G抗体の前記細胞への結合量(平均蛍光強度)を示すグラフである。図14において、横軸は、抵抗性H L A - D Rの細胞(TG/HLA-DR1)に対するI g G抗体の結合量を示し、縦軸は、感受性H L A - D Rの細胞(TG/HLA-DR53)に対するI g G抗体の結合量を示す。

【0185】

図14に示すように、抵抗性H L A - D Rの細胞(TG/HLA-DR1)へのI g G抗体の結合は、一部の橋本病患者由来の血清において検出されたのみであるのに対し、感受性H L A - D Rの細胞(TG/HLA-DR53)へのI g G抗体の結合は、全ての橋本病患者由来の血清において検出された。これらの結果から、感受性H L A - D R(H L A - D R 5 3)に提示されたT Gを検出抗原として用いることで、より正確に、自己抗体の検出に基づく橋本病患者の診断が可能となることがわかった。

30

【0186】

[実施例3]

本実施例3は、抗リン脂質抗体症候群(A P S)の指標である自己抗体の検出に関する。

【0187】

(実施例3A)

H L A - D Rと 2グリコプロテインI(2 - G P I)とを発現させ、細胞表面に、H L A - D Rにより 2 - G P Iが提示されること、および、抗 2 - G P I抗体および抗カルジオリピン抗体(a C L)が、前記H L A - D Rに提示された 2 - G P Iを認識することを確認した。

40

【0188】

鎖用発現ベクターとして前記HLA-DRA*01:01ベクター、鎖用発現ベクターとして前記HLA-DRB1*04:04ベクター、前記 2-GPIベクターおよび前記G F Pベクターを、293T細胞に導入し、培養した。前記培養後の細胞を、抗 2 - G P I抗体または抗カルジオリピン抗体(a C L)と反応させ、さらに前記A P C標識抗ヒトI g G抗体と反応させた。そして、前記実施例1Aと同様に、G F P陽性細胞について、フローサイトメトリー分

50

析を行った。コントロール1は、前記 2-GPI発現ベクターのみを導入以外は同様にして、また、コントロール2は、前記 G F P ベクターのみを導入した以外は、同様にして測定した。

- ・抗 2 - G P I 抗体：ポリクローナル抗体、Atlas antibodies社
- ・ヒト抗カルジオリピン抗体：クローンEY2C9、北海道大学医学部渥美教授より分与、下記論文参照：Ichikawa, K., M. A. Khamashta, T. Koike, E. Matsuura, and G. R. V. Hughes. 1994. P2-Glycoprotein I reactivity of monoclonal anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum.* 37:1453.

【0189】

これらの結果を図15に示す。図15は、細胞表面におけるHLA-DR発現量もしくは2-GPI発現量または抗カルジオリピン抗体の結合量を示すヒストグラムである。図15において、横軸は蛍光強度であり、左のグラフが、HLA-DRの発現量を示し、中央のグラフ列が、2-GPIの発現量を示し、右のグラフが、抗カルジオリピン抗体の結合量を示す。図15において、縦軸は、細胞のカウント数を示す。また、図15において、陰影をつけたヒストグラムは、前記GFPのみを導入した細胞(コントロール2)の結果である。

【0190】

図15に示すように、HLA-DRおよび2-GPIを導入した細胞(2-GPI+HLA-DR4)は、細胞表面においてHLA-DRに提示された2-GPIが確認されまた、抗カルジオリピン抗体の結合も認められた。一方、HLA-DR未導入のコントロール1(2GPI)は、細胞表面において、HLA-DRが発現されず、細胞表面において、2-GPIの発現が認められず、また、抗カルジオリピン抗体の結合も認められなかった。以上のことから、細胞表面における2-GPIの発現には、HLA-DRが必要であること、また、抗カルジオリピン抗体は、HLA-DRに提示されたミスフォールド2-GPIを認識し、結合することがわかった。

【0191】

(実施例3B)

異なるハプロタイプのHLA-DRによる2-GPIの提示能を確認した。

【0192】

鎖用発現ベクターとして前記HLA-DRA*01:01ベクター、鎖用発現ベクターとして前記表2の各種HLA-DRBベクター、前記2-GPIベクターおよび前記GFPベクターを、293T細胞に導入した。

【0193】

前記細胞を培養した後、前記培養後の細胞について、前記実施例3Aと同様にして、フローサイトメトリー分析によって、細胞表面における2-GPIの発現量および前記抗カルジオリピン抗体の結合量の確認を行った。具体的には、前記フローサイトメトリー分析により、GFP陽性細胞における、2-GPIおよび抗カルジオリピン抗体の平均蛍光強度を算出した。これらの結果を図16および図17に示す。

【0194】

図16は、細胞表面における2-GPIの発現量を示すグラフである。図16において、横軸は、平均蛍光強度であり、2-GPIの発現量を示し、縦軸は、前記HLA-DRBの種類を示す。

【0195】

図16に示すように、いずれの前記HLA-DRBを発現させた場合においても、2-GPIの高い発現量が確認できた。これらの結果から、前記HLA-DRのハプロタイプにかかわらず、前記HLA-DRが2-GPIを提示することがわかった。

【0196】

次に、図17は、抗カルジオリピン抗体の結合量を示すグラフである。図17において、横軸は、平均蛍光強度であり、抗カルジオリピン抗体の結合量を示し、縦軸は、前記H

10

20

30

40

50

L A - D R B の種類を示す。

【 0 1 9 7 】

図 1 7 に示すように、いずれの前記 H L A - D R B を発現させた場合においても、抗カルジオリピン抗体の高い結合量が確認できた。これらの結果から、前記 H L A - D R のハプロタイプにかかわらず、前記抗カルジオリピン抗体が、前記 H L A - D R に提示された 2 - G P I と結合することがわかった。

【 0 1 9 8 】

(実施例 3 C)

H L A - D R を免疫沈降し、 2 - G P I が、H L A - D R と結合していることを確認した。

【 0 1 9 9 】

2 9 3 T 細胞に、鎖発現用ベクターである前記 HLA-DRA*01:01 の他に、後述する図 1 8 の図中に示す組合せとなるように各発現ベクターを導入し、培養した。前記培養後の細胞について、前記実施例 1 B と同様にして、免疫沈降によるサンプル調製およびウエスタンブロッティングを行った。前記免疫沈降では、抗 H L A - D R 抗体固定化ビーズ (ピオチン化抗 H L A - D R 抗体およびストレプトアビジンセファロース (GEヘルスケア社)) を使用し、前記ウエスタンブロッティングでは、抗体として、前記抗 2 - G P I 抗体または前記ウサギ抗 H L A - D R 抗体と、ペルオキシンダーゼ標識抗ウサギ I g G 抗体とを使用し、 2 - G P I および H L A - D R を検出した。コントロール 1 は、前記 HLA-DR ベクターおよび前記 2-GPI ベクターを導入しない以外は、同様にしてウエスタンブロッティングを行った。また、コントロール 2 は、 2 - G P I の発現確認のため、前記培養後の細胞を溶解したのみである非免疫沈降サンプルを使用した以外は、同様にして、ウエスタンブロッティングを行った。

【 0 2 0 0 】

これらの結果を図 1 8 に示す。図 1 8 は、ウエスタンブロットの写真である。図 1 8 において、写真の上側は、レーン番号および発現ベクターの導入 (+) と未導入 (-) を示し、写真の左側は、検出したタンパク質の種類を示す。

【 0 2 0 1 】

図 1 8 において、レーン 1 は、前記コントロール 1 であり、発現は確認されなかった。 2 - G P I のみ導入した細胞 (レーン 2) および H L A - D R のみを導入した細胞 (レーン 3) は、2 段目および 3 段目の写真に示すように、 2 - G P I または H L A - D R の発現は確認されたが、1 段目の写真に示すように、両者の結合は確認されなかった。これに対して、 2 - G P I と A P S 感受性の H L A - D R 7 (HLA-DRA*01:01/HLA-DRB1*07:01) とを導入した細胞 (レーン 4) は、2 段目および 3 段目の写真に示すように、 2 - G P I および H L A - D R の発現が確認され、且つ、1 段目の写真に示すように、両者の結合も確認できた。これらの結果から、 2 - G P I の細胞表面への発現には、H L A - D R が必要であることがわかった。なお、抗 H L A - D R 抗体および抗 2 - G P I 抗体を用いた免疫染色により、A P S 患者由来の流産絨毛組織においても、同様に、H L A - D R に 2 - G P I が提示されていることが確認できた。

【 0 2 0 2 】

(実施例 3 D)

E L I S A 法を用いない新たな HLA-DR/ 2-GPI 複合体に対する自己抗体値 (aHLA-DR/2-GPI 値) の測定系を構築し、A P S 患者由来の血清について、自己抗体の間接的な測定を行った。

【 0 2 0 3 】

(1) A P S 標準曲線の作製

A P S 患者由来の血清を、0 . 1 % B S A 含有 H A N K S 緩衝液で、1 0 0 倍希釈から 3 . 1 6 倍ずつ希釈し、3 . 1 6 × 1 0 ⁶ 倍希釈までの希釈系列を作成し、これらを標準サンプルとした。前記 A P S 患者由来の血清は、MESACUP (商標) カルジオリピンテストを使用した公知の E L I S A 法により、抗カルジオリピン抗体測定値 (a C L) が 4 7 .

10

20

30

40

50

0 U / m lであることを確認済みである。

【0204】

293T細胞に、鎖用発現ベクターとして前記HLA-DRA*01:01ベクター、鎖用発現ベクターとして前記HLA-DRB1*07:01ベクター、前記2-GPIベクターおよび前記GFPベクターを、前記実施例1Aと同様にして、導入し培養した。そして、前記培養後の細胞を、前記標準サンプルと反応させ、さらに、前記APC標識抗ヒトIgG抗体と反応させた。そして、GFP陽性細胞について、前記実施例3Aと同様に、フローサイトメトリー分析により、前記細胞に対する前記血清中のHLA-DR7/2-GPI複合体を認識する自己抗体の結合量を示す平均蛍光強度を算出した。このように、前記HLA-DRと前記2-GPIとの複合体を抗原試薬として結合量を測定したことを、以下、「HLA-DR/2-GPI複合体システムによる測定」とし、それによって「抗HLA-DR/2-GPI複合体抗体価」を評価した。

10

【0205】

次に、前記標準サンプルについて、APS標準曲線を作製した。具体的には、前記ELISA法によってaCL測定値が確定している前記標準サンプルの希釈倍率に対応した測定値を暫定的に抗HLA-DR/2-GPI複合体抗体価(aHLA-DR/2-GPI、自己抗体値)とし、これと、前記HLA-DR/2-GPI複合体システムにより測定した前記HLA-DR7/2-GPI複合体を認識する自己抗体の結合量を示す平均蛍光強度(human IgG-MFI)とから、前記APS標準曲線を作製した。

【0206】

この結果を図19に示す。図19は、前記APS標準曲線を示したグラフである。図19において、横軸は、前記HLA-DR/GPI複合体システムにより測定した、前記標準サンプル中のHLA-DR7/2-GPI複合体を認識する自己抗体の結合量を示す平均蛍光強度(human IgG-MFI)を示し、縦軸は、前記標準サンプルのELISA法による既知の測定値より暫定的に決定した抗HLA-DR/2-GPI複合体抗体価(aHLA-DR/2-GPI)を示す。

20

【0207】

(2) APS患者由来の血清中のaHLA-DR/2-GPI値の測定

APS患者(n=120)から血清を採取し、0.1%BSA含有HANKS緩衝液で100倍に希釈し、血清サンプルとした。前記APS患者由来の血清は、前記(1)と同様に、前記ELISA法により抗カルジオリピン抗体測定値(aCL)を確認済みである。また、公知のELISA法により抗2-GPI抗体値(a2GPI)を確認した。

30

【0208】

次に、前記(1)と同様にして、前記培養後の細胞を、前記血清サンプルと反応させ、さらに、前記APC標識抗ヒトIgG抗体と反応させた。そして、GFP陽性細胞について、前記実施例3Aと同様に、フローサイトメトリー分析により、前記細胞に対する前記血清中のHLA-DR7/2-GPI複合体を認識する自己抗体の結合量を示す平均蛍光強度を算出した。さらに、前記図19の前記APS標準曲線に基づいて、間接的にaHLA-DR/2-GPI複合体抗体値(HLA-DR/GPI複合体システムによる自己抗体値)を算出した。コントロールは、健常者由来の血清(n=100)を用い、同様にして、HLA-DR7/2-GPI複合体を認識する自己抗体の結合量の測定、および前記検量線に基づくaHLA-DR/2-GPI値(HLA-DR/GPI複合体システムによる自己抗体値)の算出を行った。

40

【0209】

まず、図20に、APS患者由来(n=120)および、健常者由来(n=100)の血清サンプルに関する、HLA-DR/GPI複合体システムによる自己抗体値(aHLA-DR/2-GPI値)の分布を表すグラフを示す。図20において、横軸は、自己抗体値(aHLA-DR/2-GPI Ab)の範囲を示し、縦軸は、各aHLA-DR/2-GPI値の範囲の人数を示す。また、健常人100名のaHLA-DR/2-GPI値の99パーセントイルである、1.8U/mLを基準値とした。図20において、前記基準値以上のaHLA-DR/2-GPI値の範囲は、白抜きのバーで、基準値未満のaHLA-DR/2-GPI値の範囲は、グレーのバーで示している。図20に示すように、前記APS患者では、120名のうち100名(83.3%)が、前記基準値を

50

超える値（陽性）となった。そして、A P S患者と健常者との間で、前記a 2-GPI/DR7値は、有意差が確認された（ $p = 3.3 \times 10^{-33}$ ）。これらの結果から、HLA-DR/ 2-GPI複合体を抗原試薬とし、前記A P S標準曲線を用いて間接的にHLA-DR/GPI複合体システムによる自己抗体値を算出することで、優れた精度でA P Sの罹患の危険性を判断できることがわかった。

【0210】

次に、図21に、前記A P S患者由来の血清サンプルに関する、HLA-DR/GPI複合体システムにより算出した自己抗体値（aHLA-DR/ 2-GPI値）と前記E L I S A法による抗 2-GPI抗体測定値（a 2GPI）および抗カルジオリピン抗体測定値（aCL）をそれぞれ比較したグラフを示す。（A）において、横軸は、E L I S A法による抗 2-GPI抗体測定値を示し、（B）において、横軸は、抗カルジオリピン抗体測定値を示し、（A）および（B）において、縦軸は、HLA-DR/GPI複合体システムによる自己抗体値（aHLA-DR/ 2-GPI値）を示す。（A）において、垂直方向の点線は、抗 2-GPI抗体測定値の基準値（ 2.2 U/mL ）を示し、（B）において、垂直方向の点線は、抗カルジオリピン抗体測定値の基準値（ 18.5 U/mL ）を示し、（A）および（B）において、水平方向の点線はaHLA-DR/ 2-GPI値の基準値（ 1.8 U/mL ）を示す。なお、抗 2-GPI抗体測定値の基準値および抗カルジオリピン抗体測定値の基準値は、それぞれ、前記健常者由来の血清サンプルにおける抗 2-GPI抗体測定値および抗カルジオリピン抗体測定値の99パーセントタイルの値である。また、（A）および（B）において、白丸（○）は、前記aHLA-DR/ 2-GPI値の基準値以上の血清サンプルを示し、黒丸（●）は、前記aHLA-DR/ 2-GPI値の基準値未満の血清サンプルを示す。（A）および（B）において、図中の数字は、各分画の血清サンプルの割合を示す。

10

20

【0211】

図21（A）に示すように、前記A P S患者の35%が、抗 2-GPI抗体測定値が陽性であるのに対し、前記A P S患者の84.6%が、前記HLA-DR/GPI複合体システムによる自己抗体値が陽性であった。また、（B）に示すように、前記A P S患者の36.6%が、抗カルジオリピン抗体測定値が陽性であるのに対し、前記A P S患者の83.3%が、前記HLA-DR/GPI複合体システムによる自己抗体値が陽性であった。さらに、（A）および（B）の左上の分画に示すように、抗 2-GPI抗体測定値または抗カルジオリピン抗体測定値が陰性のA P S患者の約80%が、HLA-DR/GPI複合体システムによる自己抗体値では、陽性を示した。この結果から、HLA-DR/GPI複合体システムを抗原試薬として算出した自己抗体値によれば、例えば、従来 of E L I S A法による抗 2-GPI抗体測定値または抗カルジオリピン抗体測定値に対して、優れた精度でA P S患者を陽性と判断できることがわかった。また、従来 of E L I S A法では、陰性と判断されるA P S患者についても、正しく陽性と判断できることがわかった。このため、本発明によれば、従来 of 正常フォルド 2-GPIを用いたE L I S A法よりも、優れた精度でA P Sの罹患の危険性の判断が可能といえる。

30

【0212】

[実施例4]

本実施例4は、バセドウ病（Graves病）の指標である自己抗体の検出に関する。

40

【0213】

バセドウ病患者由来の血清中の自己抗体が、HLA-DRに提示されたTSHRを認識することを確認した。

【0214】

バセドウ病患者および健常者から血清を採取し、300倍に希釈し、血清サンプルとした。前記実施例1Aと同様にして、鎖発現用ベクターである前記HLA-DPA*02:02ベクター、鎖発現用ベクターである前記HLA-DPB*05:01ベクター、前記TSHRベクターおよび前記GFPベクターを導入した293T細胞を培養し、前記培養した細胞を各種抗体または血清とそれぞれ反応させ、GFP陽性細胞について、フローサイトメトリー分析を行った。具体的には、バセドウ病患者由来の血清中の自己抗体の結合の確認には、前記細胞

50

を、バセドウ患者の希釈血清と反応させ、さらに、APC標識抗ヒトIgM抗体を反応させた。また、細胞表面におけるTSHRまたはHLA-DPの発現の確認には、前記細胞を、抗TSHR抗体または抗HLA-DP抗体と反応させ、さらに、前記APC標識抗マウスIgG Fab抗体と反応させた以外は、前記実施例1Aと同様にして、フローサイトメトリー分析を行った。

・抗ヒトTSHR抗体：Santa Cruz社製 クローン2C11

・抗ヒトHLA-DP抗体：ExBio社製 クローンHL-38

【0215】

コントロール1は、前記HLA-DP発現ベクターを導入しなかった以外は同様にして、コントロール2は、前記抗体に代えて、前記APC標識抗ヒトIgM抗体または前記APC標識抗マウスIgG Fab抗体のみと反応させた以外は同様にして、フローサイトメトリー分析を行った。

10

【0216】

これらの結果を図22に示す。図22は、細胞表面におけるTSHRもしくはMHCクラスII分子の発現量、またはMHCクラスII分子に提示されたTSHRへの自己抗体の結合量を示すヒストグラムである。図22において、横軸は、蛍光強度であり、HLA-DP、TSHRの発現量または前記血清サンプル中の自己抗体の結合量を示し、縦軸は、細胞のカウント数を示す。図22において、上段は、TSHRを導入した細胞（コントロール1）の結果であり、下段は、TSHRおよびMHCクラスII分子を導入した細胞の結果である。

20

【0217】

図22の下段に示すように、HLA-DRとTSHRを導入した細胞（TSHR+HLA-DP5）では、細胞表面におけるTSHRおよびHLA-DPの発現が確認され、且つ、バセドウ病（GD）患者由来の血清サンプル中の自己抗体の結合が確認された。これに対して、図22の上段に示すように、コントロール1（TSHR）では、細胞表面におけるTSHRの発現は確認されたが、バセドウ病患者由来の血清サンプル中の自己抗体の結合は確認されなかった。また、いずれの細胞においても、健常者由来の血清サンプル中の抗体との結合は確認されなかった。これらの結果から、バセドウ病患者由来の血清サンプル中の自己抗体は、正常にフォールディングされたTSHRよりも、HLA-DPに提示されたミスフォールドTSHRを認識し、強く結合することがわかった。

30

【0218】

以上、実施形態を参照して本願発明を説明したが、本願発明は上記実施形態に限定されるものではない。本願発明の構成や詳細には、本願発明のスコープ内で当業者が理解し得る様々な変更をすることができる。

【0219】

この出願は、2013年7月17日に提出された日本出願特願2013-148833を基礎とする優先権を主張し、その開示の全てをここに取り込む。

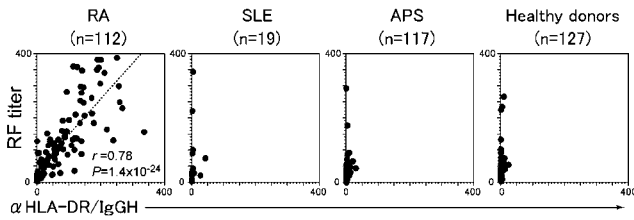
【産業上の利用可能性】

【0220】

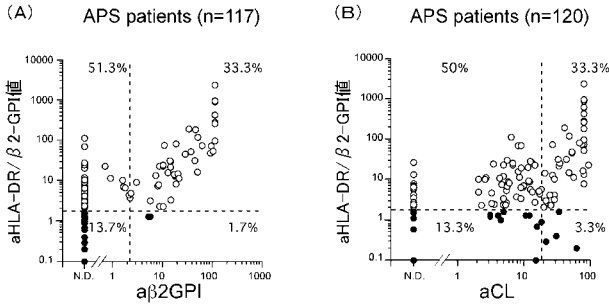
本発明によれば、自己抗体を検出するための抗原試薬として、前記変性タンパク質/MHCクラスIIを使用することにより、自己免疫疾患に關与する自己抗体を優れた精度で検出でき、これに伴い、偽陰性の問題を抑制し、優れた精度で自己免疫疾患の罹患の可能性を判断できる。このため、本発明は、例えば、臨床分野および生化学分野において極めて有用である。

40

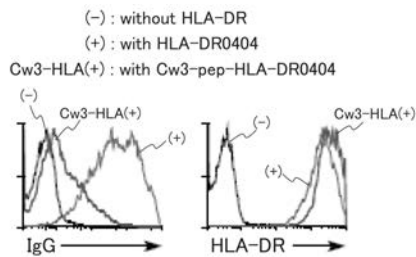
【 図 9 】



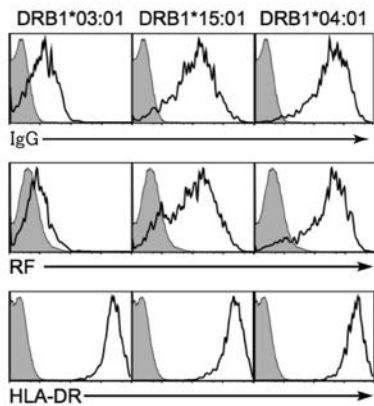
【 図 2 1 】



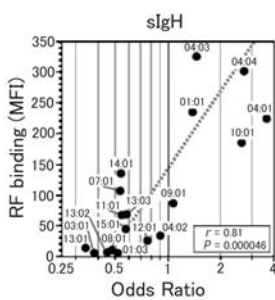
【 図 1 】



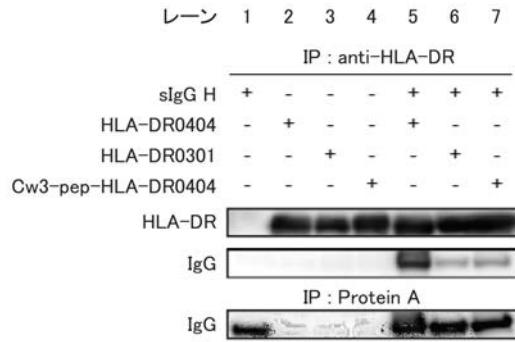
【 図 5 】



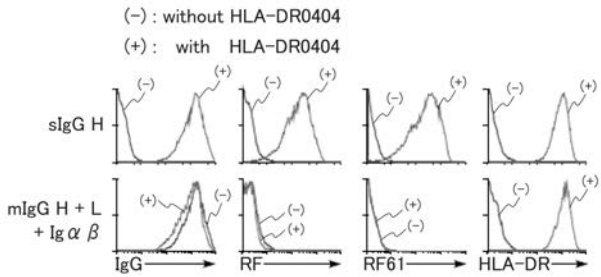
【 図 6 】



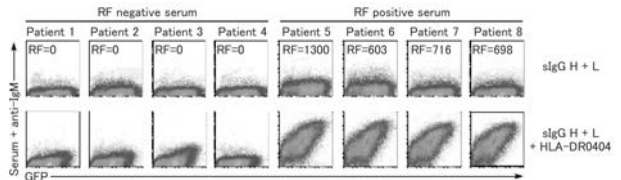
【 図 2 】



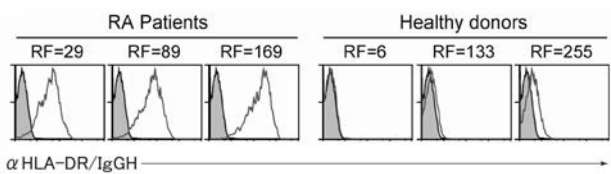
【 図 3 】



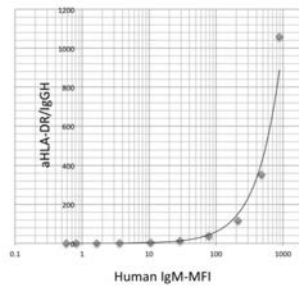
【 図 4 】



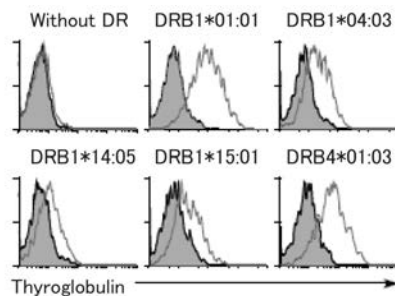
【 図 7 】



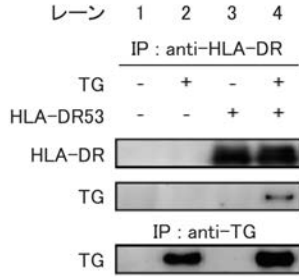
【 図 8 】



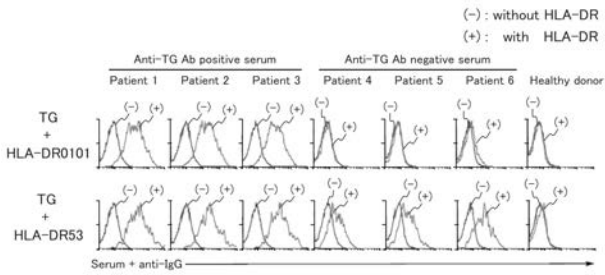
【 図 1 0 】



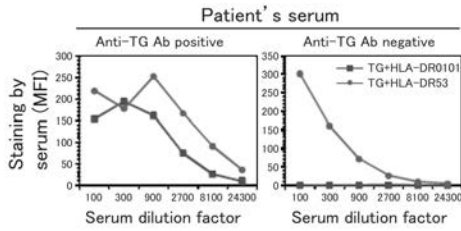
【 図 1 1 】



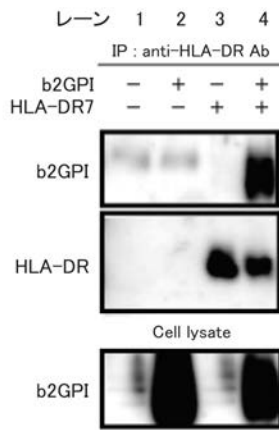
【 図 1 2 】



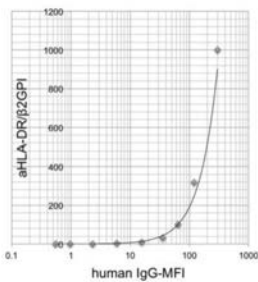
【 図 1 3 】



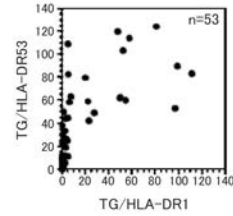
【 図 1 8 】



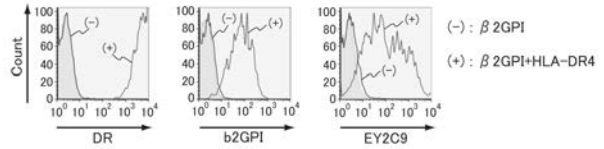
【 図 1 9 】



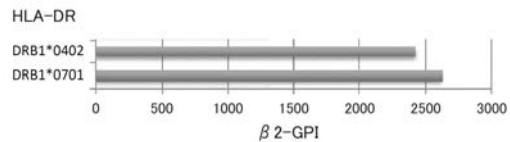
【 図 1 4 】



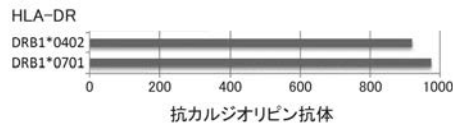
【 図 1 5 】



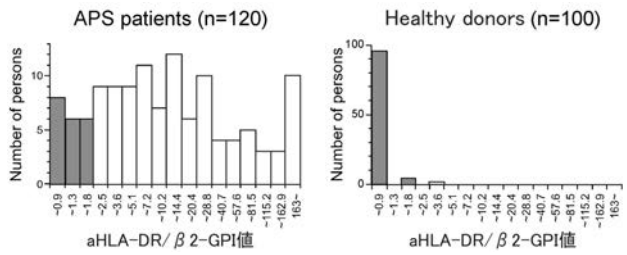
【 図 1 6 】



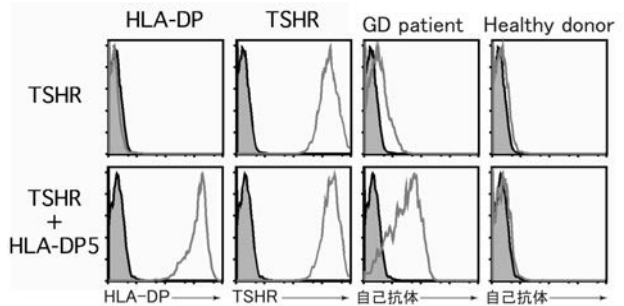
【 図 1 7 】



【 図 2 0 】



【 図 2 2 】



【配列表】

2015008498000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2014/050796
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 1996-2014 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed, BIOSIS (STN), MEDLINE (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Hisashi ARASE, "Paired Type Receptor o Hyoteki to shita Men'eki Kansen Seigy Gijutsu no Kaihatsu", [online], Japan Science and Technology Agency, 29 March 2013 (29.03.2013), [retrieval date 27 February 2014 (27.02.2014)], URL:< http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/eval/chukan/201303/c21-10/c21-10-01.pdf >	1-2, 4, 9-12, 14
Y		6-7
A		3, 5, 8, 13
Y A		6-7 3, 5, 8, 13
<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 "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 07 April, 2014 (07.04.14)		Date of mailing of the international search report 22 April, 2014 (22.04.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/050796

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2007-524583 A (London Health Sciences Center Research Inc.), 30 August 2007 (30.08.2007), entire text; all drawings & US 2007/0292347 A1 & EP 1603937 A & WO 2004/078098 A2 & CA 2518187 A & AU 2004216925 A	1, 4, 6-7, 9-12, 14 2-3, 5, 8, 13
A	Mohan JF, Unanue ER, A novel pathway of presentation by class II-MHC molecules involving peptides or denatured proteins important in autoimmunity, Mol Immunol, 2012.11.27, 55(2), 166-168	1-14

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2014/050796												
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2014年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2014年	日本国実用新案登録公報	1996-2014年	日本国登録実用新案公報	1994-2014年				
日本国実用新案公報	1922-1996年													
日本国公開実用新案公報	1971-2014年													
日本国実用新案登録公報	1996-2014年													
日本国登録実用新案公報	1994-2014年													
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), PubMed, BIOSIS (STN), MEDLINE (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	荒瀬 尚, ペア型レセプターを標的とした免疫・感染制御技術の開発, [online], 科学技術振興機構, 2013.03.29, [検索日 2014.02.27]	1-2, 4, 9-12, 14												
Y	URL:< http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/eval/chukan/201303/c21-10/c21-10-01.pdf >	6-7												
A		3, 5, 8, 13												
Y	Jiang Y et al, Transport of misfolded endoplasmic reticulum proteins to the cell surface by MHC class II molecules, Int Immunol, 2013.01.18, Vol. 25, No. 4, 235-246	6-7												
A		3, 5, 8, 13												
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。														
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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)</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献	「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	「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	「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	「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	「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)	「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	「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献	「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献													
「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	「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													
「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	「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													
「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)	「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													
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献													
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願														
国際調査を完了した日 07.04.2014	国際調査報告の発送日 22.04.2014													
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	2 J 3316												
	電話番号 03-3581-1101 内線 3252													

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 5 0 7 9 6
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
X	JP 2007-524583 A (ロンドン・ヘルス・サイエンシズ・センター・リサーチ・インコーポレーテッド) 2007.08.30, 全文、全図 & US	1, 4, 6-7, 9-12, 14
A	2007/0292347 A1 & EP 1603937 A & WO 2004/078098 A2 & CA 2518187 A & AU 2004216925 A	2-3, 5, 8, 13
A	Mohan JF, Unanue ER, A novel pathway of presentation by class II-MHC molecules involving peptides or denatured proteins important in autoimmunity, Mol Immunol, 2012.11.27, 55(2), 166-168	1-14

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, RO, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, 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, 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, TZ, UA, UG, US

特許法第30条第2項適用申請有り 電気通信回線による発表： 掲載年月日：平成25年 1月18日 掲載アドレス1：<http://intimm.oxfordjournals.org/content/25/4/235.full.pdf> 電気通信回線による発表： 掲載年月日：平成25年 3月29日 掲載アドレス2：<http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/eval/chukan/201303/c21-10/c21-10-01.pdf>

(出願人による申告)平成25年度 独立行政法人科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業(チーム型研究(CREST))による委託研究「アレルギー疾患・自己免疫疾患などの発症機構と治療技術/ペア型レセプターを標的とした免疫・感染制御技術の開発/ペア型レセプターの機能解明と制御法の開発」に係る委託業務、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(72)発明者 金 暉
大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内

(72)発明者 荒瀬 規子
大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA04 EA04 GA11 HA11

(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。