

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3824173号  
(P3824173)

(45) 発行日 平成18年9月20日(2006.9.20)

(24) 登録日 平成18年7月7日(2006.7.7)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	
C O 7 K 14/715 (2006.01)	C O 7 K 14/715	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D
請求項の数 14 (全 30 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願平9-518070	(73) 特許権者	株式会社カネカ 大阪府大阪市北区中之島三丁目2番4号
(86) (22) 出願日	平成8年11月6日(1996.11.6)	(74) 代理人	弁理士 山本 秀策
(86) 国際出願番号	PCT/JP1996/003250	(72) 発明者	尾崎 承一 京都府京都市右京区西院月双町111-116
(87) 国際公開番号	W01997/017441	(72) 発明者	田中 真生 京都府京都市中京区三条通柳馬場東入ル中之町9
(87) 国際公開日	平成9年5月15日(1997.5.15)	(72) 発明者	岸村 昌明 京都府京都市伏見区城通町612-403
審査請求日	平成15年1月29日(2003.1.29)		
(31) 優先権主張番号	特願平7-288957		
(32) 優先日	平成7年11月7日(1995.11.7)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 自己抗原

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列表の配列番号5で示されるポリペプチド、または該配列番号5のアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、慢性関節リウマチ患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド。

【請求項2】

配列表の配列番号6で示されるポリペプチド、または該配列番号6のアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、慢性関節リウマチ患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド。

【請求項3】

配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、慢性関節リウマチ患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド。

【請求項4】

配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、慢性関節リウマチ患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド。

【請求項5】

慢性関節リウマチ患者に特異的な抗体に結合するポリペプチドをコードするDNAであって、以下のポリペプチド；

(a) 配列表の配列番号5で示されるポリペプチド；

(b) 配列番号5のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

- (c) 配列表の配列番号 6 で示されるポリペプチド ;  
 (d) 配列番号 6 のアミノ酸配列を有するポリペプチド ;  
 (e) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなる、慢性関節リウマチ患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド ; および  
 (f) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する、慢性関節リウマチ患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド ;  
 のいずれかをコードする、DNA。

## 【請求項 6】

慢性関節リウマチ患者に特異的な抗体に結合するポリペプチドをコードする DNA であって、配列表の配列番号 2 に記載の配列である、DNA。

10

## 【請求項 7】

慢性関節リウマチ患者に特異的な抗体に結合するポリペプチドをコードする DNA を有する発現ベクターであって、該 DNA が、以下のポリペプチド ;

- (a) 配列表の配列番号 5 で示されるポリペプチド ;  
 (b) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチド ;  
 (c) 配列表の配列番号 6 で示されるポリペプチド ;  
 (d) 配列番号 6 のアミノ酸配列を有するポリペプチド ;  
 (e) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなる、慢性関節リウマチ患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド ; および  
 (f) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する、慢性関節リウマチ患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド ;  
 のいずれかをコードする DNA である、ベクター。

20

## 【請求項 8】

慢性関節リウマチ患者に特異的な抗体に結合するポリペプチドをコードする DNA を有する発現ベクターであって、該 DNA は、配列表の配列番号 2 に記載の配列である DNA である、ベクター。

## 【請求項 9】

請求項 7 または 8 に記載の発現ベクターを有する形質転換細胞。

## 【請求項 10】

慢性関節リウマチ患者に特異的な抗体に結合するポリペプチドを含む、慢性関節リウマチ患者に特異的な抗体を検出するための組成物であって、該組成物が、以下のポリペプチドからなる群から選択される少なくとも一つのポリペプチドを含有する、組成物 :

30

- (a) 配列表の配列番号 5 で示されるポリペプチド ;  
 (b) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチド ;  
 (c) 配列表の配列番号 6 で示されるポリペプチド ;  
 (d) 配列番号 6 のアミノ酸配列を有するポリペプチド ;  
 (e) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなる、慢性関節リウマチ患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド ; および  
 (f) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する、慢性関節リウマチ患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド。

40

## 【請求項 11】

前記ポリペプチドが、請求項 9 に記載の形質転換細胞 ; を培養することにより得られたポリペプチドである、請求項 10 に記載の組成物。

## 【請求項 12】

慢性関節リウマチ患者に特異的な抗体を検出する方法であって、該慢性関節リウマチ患者に特異的な抗体と特異的に結合するポリペプチドと、被検試料とを反応させる工程、および反応生成物を検出する工程、を包含する方法であり、該ポリペプチドが、以下のポリペプチドからなる群から選択され

50

る少なくとも一つのポリペプチドである、方法：

- (a) 配列表の配列番号 5 で示されるポリペプチド；
- (b) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチド；
- (c) 配列表の配列番号 6 で示されるポリペプチド；
- (d) 配列番号 6 のアミノ酸配列を有するポリペプチド；
- (e) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなる、慢性関節リウマチ患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；および
- (f) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する、慢性関節リウマチ患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド。

【請求項 1 3】

慢性関節リウマチ患者に特異的な抗体と特異的に結合するポリペプチドを含む、慢性関節リウマチ患者に特異的な抗体を検出するためのキットであって、該ポリペプチドが、以下のポリペプチドからなる群から選択される、少なくとも一つのポリペプチドである、キット：

- (a) 配列表の配列番号 5 で示されるポリペプチド；
- (b) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチド；
- (c) 配列表の配列番号 6 で示されるポリペプチド；
- (d) 配列番号 6 のアミノ酸配列を有するポリペプチド；
- (e) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなる、慢性関節リウマチ患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；および
- (f) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する、慢性関節リウマチ患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド。

【請求項 1 4】

前記ポリペプチドが、  
請求項 9 に記載の形質転換細胞  
を培養することにより得られたポリペプチドである、請求項 1 3 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本願発明は、慢性関節リウマチ患者の抗体が特異的に反応する新規な抗原ペプチド、該抗原をコードする DNA、該抗原を用いた抗原抗体反応によってリウマチ患者に特異的に存在する抗体を検出する組成物、リウマチ患者に特異的に存在する抗体を検出するための方法およびキットに関する。

背景技術

慢性関節リウマチ ( R A ) は、原因不明の慢性進行性の難病である。疾患経過は平均 20 余年の長きにわたり、その間、増悪、寛解、再燃を繰り返し、全体的には様々な程度の肢体不自由を招来する。R A の本能は、自然治癒傾向を示さない慢性滑膜炎にあり、リンパ球の湿潤、血管新生、滑膜細胞の重層化とともに滑膜細胞の増殖が見られる。そしてこのような滑膜炎の持続と炎症組織の増殖が、やがて軟骨および骨を破壊し、その結果、関節変形さらには身体障害がもたらされる。このように、R A は長期にわたる疾患であるため、早期の段階で十分な治療を施し、成熟リウマチに進行させないように努めることが重要であることが指摘されている。R A の診断については、現在は 1987 年に改訂されたアメリカリウマチ学会による R A 診断基準 [Arnett 等、Arthritis and Rheumatism 31 p315(1988)] が広く使用されているが、それらの診断基準は、手足のこわばり、関節の腫脹などに関する診療法的な診断法である。発症 1 年未満の早期 R A については病型が定まらないものもあり、診断が困難な場合がある。したがって、早期 R A の自己抗原および自己抗体の同定などの化学的に有効な診断薬が望まれている。

R A 患者における自己抗体については種々の研究が行われている。例えば、抗フィブリリン ( fibrillar ) 抗体 [Kasturi 等、J. Exp. Med. 181 p1027(1995)]、抗 R A 3 3 抗体 [Steiner 等、J. Clin. Invest. 90 p1061(1992)]、抗カルパスタチン ( calpastatin ) 抗体 [Mimori 等、Pro. Natl. Acad. Sci. USA 92 p7267(1995)、および Despres 等、J.

10

20

30

40

50

Clin. Invest. 95 p1891(1995) ]、抗フィラグリン ( filaggrin ) 抗体 [ Sebbag等、J. Clin. Invest. 95 p2672(1995) ]、抗アネキシン抗体 [ Yoshikata等、J. Biol. Chem. 269 p4240(1994) ] などが R A で同定されているが、これらは R A だけでなく他の R A の自己抗体としても同定されており、R A 特異的ではない。さらには、R A の診断または治療に使用されているものはなく、有効な診断薬が望まれている。

#### 発明の開示

本願発明は、上記従来の課題を解決するものであり、その目的は、R A 患者の抗体が特異的に反応する新規な抗原ポリペプチドを取得すること、該抗原ポリペプチドをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する発現ベクター、該発現ベクターを有する形質転換体、および該形質転換体を用いて新規抗原ポリペプチドを提供すること、さらに、該抗原ポリペプチドを用いる R A 患者の検出、診断方法、および検出、診断のための組成物およびキットを提供することにある。

10

滑膜細胞が産生する自己抗原を解析し、R A における自己抗体に対応する抗原を特定することは、R A の診断を容易にし、治療にも道を開くものである。そこで、R A 患者の関節滑膜細胞を用いて cDNA ライブラリーを作製し、R A 患者滑液中の IgG でスクリーニングを行ったところ、リウマチ抗原として新規なポリペプチドをコードするクローン ( cloneA )、ならびにポリペプチドとしては公知であるがリウマチ抗原としては新規なフォリスタチン関連タンパク質 ( follistatin related protein、FRP ) をコードするクローンを単離することに成功した。

この cloneA でコードされる新規な抗原ポリペプチド ( 以下、cloneA ポリペプチドという ) は、インターロイキン 6 ( IL-6 ) の受容体の一つである gp130 ( Hibiら、Cell, 63 p1149(1991) ) の変異体と考えられる。gp130 は公知のタンパク質であり、IL-6、白血病増殖阻因子 ( leukemia inhibitory factor LIF )、毛様体神経栄養因子 ( ciliary neurotrophic factor: CNTF )、ある種のガン細胞増殖因子である オンコスタチン M ( Oncostatin M )、インターロイキン 11 ( IL-11 ) 等の受容体に共通のサブユニット [ Taga. および Kishimoto FASEB J. 6 p3387(1992) ] であり、細胞内にシグナルを伝える役割を有するタンパク質である。本願発明の cloneA ポリペプチドの 1 から 324 番目までのアミノ酸配列は、この gp130 ( 成熟蛋白質 ) のアミノ酸配列の 1 から 324 番目の配列と一致していたが、cloneA ポリペプチドの 325 番から 329 番目の 5 アミノ酸 ( すなわち cloneA ポリペプチドのカルボキシ末端から 5 残基のアミノ酸 ) が gp130 のそれと異なっていた。この 5 アミノ酸でポリペプチド

20

30

が終わることが、IL6 の受容体活性化に変化を与えると推察される。他方、FRP は公知のタンパク質であり、ヒト Hs683 神経膠腫 cDNA ライブラリーからクローニングされている [ Zwijsen. 等、Eur. J. Biochem., 225 p937(1994) ]。そのアミノ酸配列の類似性から、FRP と同様の活性を有することが類推されているが、滑膜組織における生理作用は不明である。

cloneA ポリペプチドあるいは FRP の研究を進めるためには、これらのポリペプチドを大量にしかも高純度で得ることが必要である。しかし、cloneA ポリペプチドを産生している R A 患者の滑膜細胞、あるいは FRP を産生しているヒト Hs683 神経膠腫 [ Zwijsen. 等、Eur. J. Biochem. 225 p937(1994) ] からの、これらのポリペプチドを単離、精製する方法は複雑であり、かつ目的蛋白質が非常に少量しか得られないという問題がある。また、Zwijsen. 等は COS1 細胞により組換え FRP を産生しているが、本願発明において診断薬として用いるためには、これらのポリペプチドを高純度でしかも大量に得る方法が渴望されていた。本発明者らは cloneA ポリペプチドおよび FRP をグルタチオン S-トランスフェラーゼ ( GST ) 融合蛋白質として発現させ、精製ポリペプチドを大量に得ることに成功した。cloneA ポリペプチドおよび FRP を大腸菌で発現させ R A 患者血清との反応性を調べた結果、FRP は R A 患者の血清と特異的に反応することがわかった。

40

さらに、cloneA ポリペプチドにおいては、変異部分のペプチドであるカルボキシ末端の 5 アミノ酸を含むポリペプチドが B 細胞抗原となる可能性が予測された。この 5 個のアミノ酸を含むカルボキシ末端からの 10 アミノ酸からなるポリペプチド ( C10 ポリペプチド ) および 15 アミノ酸からなるポリペプチド ( C15 ポリペプチド ) を化学合成し、これを抗原と

50

して用いるELISA系を構築した。そして、この抗原に対する抗体をRA患者および他の自己免疫疾患患者血清で調べたところ、驚くべきことにRA患者の血清と特異的に反応することがわかった。

従って、これらの抗原に対する抗体を検出することが、RAを予見させるマーカーあるいは診断のマーカーになり得ることを見出し、本願発明を完成させるに至った。

本願発明は、配列表の配列番号5で示されるポリペプチド、配列番号5のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または該配列番号5のアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有するポリペプチドであって、RA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチドに関する。

さらに、本願発明は、配列表の配列番号6で示されるポリペプチド、配列番号6のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または該配列番号6のアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有するポリペプチドであって、RA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチドに関する。

さらに、本願発明は配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列の一部を有するポリペプチドであって、RA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチドに関する。

また、本願発明は配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、RA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチドに関する。

さらに、本願発明は配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、または該アミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有するポリペプチドであって、RA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチドに関する。

さらに、本願発明は配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸に置換、欠失、あるいは付加を有し、かつRA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチドに関する。

また、本願発明はRA患者に特異的な抗体に結合するポリペプチドをコードするDNAに関する。

好適な実施態様においては、DNAが、以下のポリペプチド：

- (a) 配列表の配列番号5で示されるポリペプチド；
  - (b) 配列番号5のアミノ酸配列を有するポリペプチド；
  - (c) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有し、かつRA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
  - (d) 配列表の配列番号6で示されるポリペプチド；
  - (e) 配列番号6のアミノ酸配列を有するポリペプチド；
  - (f) 配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有し、かつRA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
  - (g) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるRA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
  - (h) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列の断片であって、RA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
  - (i) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する、RA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
  - (j) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有し、かつRA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
  - (k) 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列の断片であって、RA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
  - (l) 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列を有する、RA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；および
  - (m) 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有し、かつRA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
- のいずれかをコードするDNAである。

好適な実施態様においては、DNAが配列表の配列番号2または配列番号4に記載のDNA

10

20

30

40

50

Aである。

また、本願発明は R A 患者に特異的な抗体に結合するポリペプチドをコードする D N A を有する発現ベクターに関する。

好適な実施態様においては、前記 D N A が、以下のポリペプチド：

- (a) 配列表の配列番号 5 で示されるポリペプチド；
  - (b) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチド；
  - (c) 配列表の配列番号 5 に記載のアミノ酸配列の少なくとも 1 つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有し、かつ R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
  - (d) 配列表の配列番号 6 で示されるポリペプチド；
  - (e) 配列番号 6 のアミノ酸配列を有するポリペプチド；
  - (f) 配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列の少なくとも 1 つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有し、かつ R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
  - (g) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなる R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
  - (h) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の断片であって、R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
  - (i) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する、R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
  - (j) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の少なくとも 1 つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有し、かつ R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
  - (k) 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列の断片であって、R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
  - (l) 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を有する、R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；および、
  - (m) 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列の少なくとも 1 つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有し、かつ R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
- のいずれかをコードする D N A を有する発現ベクターに関する。

また、本願発明は上記発現ベクターを有する形質転換細胞に関する。

さらに本願発明は、R A 患者に特異的な抗体に結合するポリペプチドを含む、R A 患者に特異的な抗体を検出するための組成物に関する。

好適な実施態様においては、前記組成物が以下のポリペプチド：

- (a) 配列表の配列番号 5 で示されるポリペプチド；
- (b) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチド；
- (c) 配列表の配列番号 5 に記載のアミノ酸配列の少なくとも 1 つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有し、かつ R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
- (d) 配列表の配列番号 6 で示されるポリペプチド；
- (e) 配列番号 6 のアミノ酸配列を有するポリペプチド；
- (f) 配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列の少なくとも 1 つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有し、かつ R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
- (g) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなる R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
- (h) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の断片であって、R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
- (i) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する、R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
- (j) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の少なくとも 1 つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有し、かつ R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
- (k) 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列の断片であって、R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
- (l) 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を有する、R A 患者に特異的な抗体と結合

10

20

30

40

50

するポリペプチド；

(m)配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有し、かつRA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；および  
(n)配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるRA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；

からなる群から選択される、少なくとも一つのポリペプチドを含有する組成物である。

好適な実施態様においては、前記ポリペプチドが、

(1)上記発現ベクターで形質転換された形質転換細胞；

(2)配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるRA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチドをコードするDNAを有する発現ベクターを有する形質転換細胞；または

10

(3)配列表の配列番号4に記載のDNAを有する発現ベクターを有する形質転換細胞；を培養することにより得られたポリペプチドである。

また、本願発明はRA患者に特異的な抗体を検出する方法であって、該RA患者に特異的な抗体と特異的に結合するポリペプチドと、被検試料とを反応させる工程、および反応生成物を検出する工程、を包含する方法に関する。

好適な実施態様においては前記ポリペプチドが、以下のポリペプチド；

(a)配列表の配列番号5で示されるポリペプチド；

(b)配列番号5のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(c)配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有し、かつRA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；

20

(d)配列表の配列番号6で示されるポリペプチド；

(e)配列番号6のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(f)配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有し、かつRA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；

(g)配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるRA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；

(h)配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列の断片であって、RA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；

(i)配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する、RA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；

30

(j)配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有し、かつRA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；

(k)配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列の断片であって、RA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；

(l)配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列を有する、RA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；

(m)配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有し、かつRA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；および

(n)配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるRA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；

40

からなる群から選択される、少なくとも一つのポリペプチドである。

さらに、本願発明はRA患者に特異的な抗体と特異的に結合するポリペプチドを含む、RA患者に特異的な抗体を検出するためのキットに関する。

好適な実施態様においては、前記ポリペプチドが以下のポリペプチド；

(a)配列表の配列番号5で示されるポリペプチド；

(b)配列番号5のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(c)配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有し、かつRA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；

(d)配列表の配列番号6で示されるポリペプチド；

50

- (e) 配列番号 6 のアミノ酸配列を有するポリペプチド ;
- (f) 配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列の少なくとも 1 つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有し、かつ R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド ;
- (g) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなる R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド ;
- (h) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の断片であって、R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド ;
- (i) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する、R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド ;
- (j) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の少なくとも 1 つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有し、かつ R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド ; 10
- (k) 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列の断片であって、R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド ;
- (l) 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を有する、R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド ;
- (m) 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列の少なくとも 1 つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有し、かつ R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド ; および
- (n) 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなる R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド ;
- からなる群から選択される、少なくとも一つのポリペプチドである、キットに関する。 20
- 好適な実施態様においては、前記ポリペプチドが、
- (1) 上記形質転換細胞 ;
- (2) 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなる R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチドをコードする DNA を有する発現ベクターを有する形質転換細胞 ; または、
- (3) 配列表の配列番号 4 に記載の DNA を有する発現ベクターを有する形質転換細胞 ; を培養することにより得られたポリペプチドである。
- 【図面の簡単な説明】
- 図 1 本願発明の新規タンパク質 cloneA ポリペプチドを抗原として、および R A 患者滑液の IgG をプローブとして用いたウエスタンブロッティングの結果を示す図である。 30
- 図 2 FRP を抗原として、および R A 患者滑液を IgG をプローブとして用いたウエスタンブロッティングの結果を示す図である。
- 図 3 cloneA および FRP のクローニング部位を示す図である。
- 図 4 組換え cloneA ポリペプチドおよび FRP のウエスタンブロッティングの結果を示す図である。
- 図 5 化学合成した C10 ポリペプチドおよび C15 ポリペプチドの ODS カラムによる HPLC パターンを示す図である。
- 図 6 C10 ポリペプチドおよび C15 ポリペプチドを抗原として用いた ELISA 系の標準曲線を示す図である。
- 図 7 リウマチ関連疾患での抗 C10 ポリペプチド抗体測定結果を示す散布図である。 40
- 発明を実施するための最良の形態
- 本願発明に用いられるポリペプチドは、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、および配列番号 6 に記載のアミノ酸配列をからなるポリペプチド、およびその誘導体を含む。具体的には、以下の (a) から (n) のポリペプチドを包含する :
- (a) 配列表の配列番号 5 で示されるポリペプチド ;
- (b) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチド ;
- (c) 配列表の配列番号 5 に記載のアミノ酸配列の少なくとも 1 つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有し、かつ R A 患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド ;
- (d) 配列表の配列番号 6 で示されるポリペプチド ;
- (e) 配列番号 6 のアミノ酸配列を有するポリペプチド ; 50

- (f)配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有し、かつRA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
- (g)配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるRA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
- (h)配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列の断片であって、RA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
- (i)配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する、RA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
- (j)配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有し、かつRA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
- (k)配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列の断片であって、RA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
- (l)配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列を有する、RA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；
- (m)配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有し、かつRA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド；および
- (n)配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるRA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチド。

10

本願発明においては、配列番号1に示されるポリペプチドをcloneAポリペプチドといい、配列番号3に示されるポリペプチドをFRPという。また、配列番号5に示されるcloneAポリペプチドの断片であって、cloneAポリペプチドのカルボキシ末端から10個のアミノ酸からなるポリペプチドをC10ポリペプチドという。また、配列番号6に示されるcloneAポリペプチドの断片であって、cloneAポリペプチドのカルボキシ末端から15個のアミノ酸からなるポリペプチドをC15ポリペプチドという。

20

その「その誘導体」とは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、および配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または、配列番号1、配列番号3、配列番号5、および配列番号6のアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失、あるいは付加を有するポリペプチドであって、RA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチドを含む。さらに、配列表の配列番号1または配列番号3に記載のアミノ酸配列の一部（ポリペプチドの断片という場合がある）を有し、かつRA患者に特異的な抗体と結合するポリペプチドを含む。

30

ポリペプチドというときは、アミノ酸が複数結合しているものをいう。

本願発明のポリペプチドは、化学合成により、あるいは後述する発現ベクターで形質転換された形質転換細胞を培養することにより、得られる。また、ポリペプチドの断片は、適当な蛋白分解酵素を用いても作製され得る。得られたポリペプチドまたは断片が抗体と反応するか否かは、RA患者から得られた血清と反応させることにより、決定し得る。この方法は当業者には周知であり、後述の抗体の検出方法と同じ手法が用いられ得る。

本願発明のC10ポリペプチド（配列番号5）およびC15ポリペプチド（配列番号6）は、固相合成法や液相合成法等の公知の化学合成によって得られる〔例えば、「新生化学実験講座第1巻タンパク質VI合成および発現」（株）東京化学同人、1992年発行、p3-66参照〕。得られたペプチドは逆相のODSによるクロマト、疎水クロマト、イオン交換クロマトにより精製し、目的とするペプチドが得られる。

40

少なくとも1つのアミノ酸が欠失、置換、あるいは付加されたポリペプチドは、例えば、cloneAまたはFRPの遺伝子配列をもとに、周知の方法、例えば、部位特異的突然変異、M13ファージを用いる欠失突然変異などの方法で遺伝子配列を改変することにより、生産され得る。

また、本願発明のポリペプチドは、他のポリペプチドとの融合蛋白質として生産され得る。例えば、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、チオレドキシシン(TRX)あるいはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)との融合蛋白質として発現させ得る。GSTを用いる場合には、培養後、トロンピンで融合蛋白質を切断し、GSTから目的の蛋白質を遊離させ

50

、目的の蛋白質を得る。この方法を使用するキットがPharmacia社等から販売されており、利用し得る。

本願発明のR A患者に特異的な抗体と結合するポリペプチドまたはその誘導体をコードするDNAは、本願明細書に開示される配列に基づいて、当業者に周知の手法で化学合成され、あるいは、遺伝子工学的手法（ハイブリダイゼーション、PCR、等）で滑膜細胞のcDNAライブラリーから取得され得る。

本願発明のDNAとしては、上記ポリペプチドの配列をコードするDNAが好適に用いられ得る。

本願発明の発現ベクターには、上記ポリペプチドをコードするDNAが含まれる。発現ベクターとしては、ori領域と、必要により上記DNAの発現のためのプロモーター、プロモーターの制御因子等を有するプラスミド、ウイルスまたはファージベクターが挙げられる。ベクターは一つまたはそれ以上の選択的マーカー遺伝子、例えばアンピシリン耐性遺伝子等を含み得る。これらのプラスミドあるいはベクターに目的のポリペプチドを発現する遺伝子を組み込む方法は、当業者には周知である。

原核生物、例えば、大腸菌の発現ベクターは、成熟蛋白質部分をコードするDNAの5'末端に開始コドン(ATG)を有し、また3'末端には翻訳終止コドン(TAA、TGAまたはTAG)を有すDNAを適当なプロモーターの下流に接続し、大腸菌内で機能するベクターに挿入して構築され得る。プロモーターとしてはtacプロモーター、trpプロモーター、lacプロモーター、T7プロモーター等が挙げられるが、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。ベクターは、形質転換細胞に表現形質(表現型)の選択性を付与することのできるマーカー遺伝子を持つものが望ましい。例えば、pETシステムベクター、pExCell、pBR322、pUC18、pUC19等があげられるが、これらに限定されるものではない。この発現ベクターで形質転換した大腸菌を適当な培地で培養し、菌体に目的とするポリペプチドを発現させ得る。

真核細胞を宿主とする場合には、発現させようとする遺伝子の前にプロモーターやRNAスプライシング部位、後ろにポリアデニル化シグナル等を付加し、宿主に対応した発現ベクターに挿入する。このベクターには複製起源や選択マーカー等を含むものが望ましい。酵母の場合は、発現ベクターにもちいるプロモーターとしては、サッカロマイセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)のアルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)プロモーター、CYCプロモーター、PhoAプロモーターなどのプロモーターが用いられ得る。また、ピチア・パストリス(*Pichia pastris*)のアルコールオキシダーゼAOX1プロモーターを用いた発現ベクター(pHIL-D2、pPIC9等)がInvitrogen社から販売されており利用し得る。薬剤耐性マーカーとして、G418耐性遺伝子が使用され得る。

動物細胞における遺伝子発現用のプロモーターとしてはSV40プロモーター、LTRプロモーター、メタロチオネインプロモーター等があるが、これらに限定されるものではない。発現ベクターとしては、例えば、レトロウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、パピロマウイルスベクター、SV40系ベクター等があるがこれらに限定されない。

DNAからポリペプチドへの翻訳段階においては、一つのアミノ酸をコードするコドンは1~6種類(Metは1種類、Leuは6種類)知られているため、ポリペプチドのアミノ酸配列を変えることなくDNAの塩基配列を変えることが可能となる。塩基配列を変えることによって、ポリペプチドの生産性が向上することがある。

ベクターはDNAに対応するRNAの製造、宿主細胞の形質転換に用いられ得る。DNAをベクターのアンチセンス領域に挿入することでアンチセンスRNAを製造することもできる。このようなアンチセンスRNAは細胞中の当該ポリペプチドのレベルを制御することに用いることもできる。

本願発明の形質転換株は、上記発現ベクターを当業者に周知の方法で、宿主細胞に導入することによって得られる。宿主細胞としては、例えば原核生物、たとえば細菌、真核細胞として、例えば、酵母、昆虫細胞または哺乳動物細胞、植物細胞が用いられ得る。

細菌としては、大腸菌、枯草菌(*Bacillus*属細菌)等が好適に用いられ得るがこれらに限定されない。大腸菌としては、例えば、JM109、HB101、DH5 等があげられる。

10

20

30

40

50

酵母としては、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) ピチア・パストリス (*Pichia pastris*) 等が好適に用いられ得る。

動物細胞としては、株化されたものが好ましく、例えば、COS細胞、CHO細胞、3T3細胞、Hela細胞、ヒトFL細胞等が好適に用いられるが、これらに限定されるものではない。

これらの形質転換株を培養して、本願発明のポリペプチドが発現され、回収され得る。培養は、当該ポリペプチドが発現し、宿主細胞より製造される条件下で行われ得る。

ポリペプチドの精製には、公知の方法、例えば、ゲル濾過クロマトグラフィー、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、逆相液体クロマトグラフィー等のクロマトグラフィーを単独で、あるいは組み合わせて用いて、精製され得る。

本願発明の、R A患者に特異的な抗体に結合するペプチドを含む、R A患者に特異的な抗体を検出するための組成物は、上記(a)から(n)のポリペプチドからなる群から選択される、少なくとも一つのペプチドを含有している。好適には、cloneAポリペプチドあるいはFRPポリペプチド、あるいはこれらの断片(例えば、C10ポリペプチドおよびC15ポリペプチド)を含む。

10

本願発明の組成物は、R A患者に特異的な抗体を検出、診断する方法、あるいはキットに用いられ得る。

R A患者に特異的な抗体を検出、診断する方法は、該R A患者に特異的な抗体と特異的に結合する上記ポリペプチドと、被検試料とを反応させる工程、および、反応生成物を検出する工程を包含する。

抗体とは、R A患者の体液中に存在し、ある特定の抗原性の物質により惹起される、体液に含まれる成分をいう。R A患者の抗体としては、IgM、IgG、IgE、IgD、IgA等が挙げられる。

20

本願発明のポリペプチド(抗原)と抗体との反応は、当業者に周知の条件で行われる。抗原と抗体とを反応させる条件は、当業者に周知の条件が適用される。抗原抗体反応物の検出も、当業者に公知の方法が適用され得る。検出方法としては、沈降反応法、ELISA法、RIA法、ウェスタンブロットティング法等が挙げられる。例えば、適当に希釈された患者血清と抗原とを反応させ、洗浄後、2次抗体であるペルオキシダーゼ標識した抗ヒトIgG抗体を加えて反応させ、その後、ペルオキシダーゼ基質であるABTSを加えて発色させ、415nmの吸光度を測定することにより抗体が測定され得る。

本願発明のR A患者に特異的な抗体を検出するためのキットは、形成した抗原抗体複合体を検出し得るさらなる成分を含有し得る。これらの成分は、たとえば、沈降反応法、ELISA法、RIA法、ウェスタンブロットティング法等の方法に適合する成分である。

30

本願発明のキットには、本願発明のポリペプチド、例えば、cloneAポリペプチド、C10ポリペプチド、C15ポリペプチドあるいはFRPポリペプチド、あるいはこれらの誘導体が固定化されたELISA用プレートと、R A患者の抗体と結合した抗原抗体複合体を検出するための試薬とを含み得る。さらに、キットには抗原の他に、必要により発色試薬、反応停止用試薬、標準抗原試薬、サンプル前処理用試薬等の各試薬から測定法に応じた適当な試薬が適宜選択され、添付され得る。

検出するための試薬は、沈降反応法、ELISA法、RIA法、ウェスタンブロットティング法等の方法に適合する成分を含み得る。検出するための試薬としては、ELISA法では、例えば2次抗体試薬が挙げられる。2次抗体試薬は、ヤギあるいはマウスの抗ヒトIgGあるいは抗ヒト(IgA+IgG+IgM)であり、ヒトIgG、IgM、IgAと反応するものである。これら2次抗体は、一般に免疫測定法で用いられる標識剤で標識されていればよい。そのような標識剤としては、放射性同位体(例えば<sup>32</sup>P、<sup>3</sup>H、<sup>125</sup>I等)、酵素(例えば-ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、モノアミンオキシダーゼ等)、補酵素・補欠分子族(例えば、FAD、FMN、ATP、ピオチン、ヘム等)、フルオレセイン誘導體(例えば、フルオレセインイソチオシアネート、フルオレセインチオフルバミル等)、ローダミン誘導體(例えば、テトラメチルローダミンBイソチオシアネート等)、ウムベリフェロンおよび1-アニリノ-8-ナフタレンスルホン酸、ルミノール誘導體(例えば、ルミノール、イソ

40

50

ルミノール等)等が用いられ得る。好適にはアルカリフォスファターゼやペルオキシダーゼであり、前者の場合基質はパラニトロフェニルリン酸等があり、後者の場合は2-2'-アジノジ(3-エチルベンズチアゾリン)-6-スルホン酸(ABTS)やオルソフェニレンジアミン(OPD)等があるが、これらに限定されるものではない。

抗体と標識剤との結合は、成書[例えば、「続生化学実験講座5免疫生化学研究法」(株)東京化学同人、1986年発行、p102-112]に記載されているような公知の方法から適宜選択して実施し得る。また、標識2次抗体の多くは市販されており利用し得る。例えば、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG抗体はCappel社から購入し得る。

キットの形態としては、抗原が適切な容器、樹脂、膜、フィルム等の担体に含まれている形態、あるいは、抗原が、容器、樹脂、膜、フィルム等の担体に固定された形態等が挙げられる。

ポリペプチドの担体としては、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体、スチレン-無水マレイン酸共重合体、ナイロン、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、ポリアクリロニトリル、ポリプロピレン、ポリメチレンメタクリレート等の合成有機高分子化合物、デキストラン誘導体(セファデックス等)、アガロースゲル(セファロース、バイオゲル等)、セルロース(ペーパーデスク、濾紙等)等の多糖類、ガラス、シリカゲル、シリコーン等の無機高分子化合物が例示され得る。これらは、アミノ基、カルボキシル基、カルボニル基、水酸基、スルヒドリル基等の官能基が導入されたものであり得る。特にポリスチレン、ポリ塩化ビニルが好適である。

担体の形状は、平板状(マイクロタイタープレート、ディスク等)、粒子状(ビーズ等)、管状(試験管等)、繊維状、膜状、微粒子状(ラテックス粒子等)、カプセル状、小胞体状等いずれの形態であってもよく、測定法に応じて好適な形状の担体が適宜選択され得る。好適には、ELISA系において一度に大量の検体を処理できる96穴マイクロタイタープレートであり、例えば、EBプレート(ラボシステムズ社製)、Hタイププレート、Cタイププレート(住友ベークライト社製)、マキシソーププレート(Nunc社製)、E.I.A./R.I.A.プレート(Costar社製)等が例示され得る。

担体とポリペプチド(抗原)との結合は、物理的吸着法、イオン結合法、共有結合法、包括法等公知の方法[例えば、「固定化酵素」千畑一郎編、昭和50年3月20日、(株)講談社発行、Wong, S.S. Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking.(1991)CRC Press, Inc.あるいはButler, J. E. Immunochemistry of Solid-Phase Immunoassay.(1991) CRC Press, Inc.を参照]を採用し得、とりわけ、ポリペプチドの場合は物理的吸着法は簡便である点で好ましい。

また、本願発明のC10ポリペプチドおよびC15ポリペプチドは低分子ポリペプチドであるため該ポリペプチドの担体への物理的吸着はほとんど起こらないと考えられる。従って、上述の官能基が導入された担体と架橋剤等を用いて共有結合による直接固定化が採用され得、あるいはポリペプチドと担体との間に他の物質(スペーサーあるいはキャリアー)等を介しても結合し得る。低分子ポリペプチドを結合するキャリアー蛋白質は種々考えられる。例えばBSA[Shirahama等、Colloid Polym. Sci 263 p141(1985)]、Alcian Blue[Jacqueline等、J. Immunol. Methods 175 p131(1994)]あるいはポリリジン[Ball等、J. Immunol. Methods 171 p37(1994)]が挙げられるが、これらに限定されず、被検血清による非特異的な結合の少ないものが適宜選択され得る。キャリアー蛋白質とペプチドとの結合は、架橋剤[例えば、グルタルアルデヒドやm-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester)]による共有結合やキャリアー蛋白質とペプチド双方に存在する(あるいは導入した)システイン残基のジスルフィド結合を利用する方法、あるいは双方にそれぞれ導入したビオチンとアビジンによる結合を利用する方法等(上述の成書参照)が挙げられるが、これらに限定されない。これらの方法を用いられ得るアッセイ用プレートとして、例えばアミン結合プレート(Costar社製)、カーボハイドレート結合プレート(Costar社製)、スルヒドリル結合プレート(Costar社製)、アミノプレート(住友ベークライト)、カルボプレート(住友ベークライト)等が市販されており利用し得る。尚、本願発明ではC10ポリペプチドおよびC

10

20

30

40

50

15ポリペプチドをグルタルアルデヒドを用いてBSAに結合させた後、担体との物理的吸着による結合を行いELISA系を構築した例を示す。

固定された抗原は、ゼラチン、BSA等のブロッキング剤で、非特異的結合を抑制するためにブロッキング処理され得る。

このようにして調製された抗原を用いて、RA患者に特異的な抗体が検出され、診断に用いられる。

以下、RA患者の抗体と反応する抗原をスクリーニングし、その抗原が新規蛋白質（cloneAポリペプチド）およびFRPポリペプチドであることを特定する方法、その蛋白質製造方法、並びに新規蛋白質のカルボキシ末端よりなるC10ポリペプチドおよびC15ポリペプチドあるいはFRPポリペプチド抗原を用いたELISA系およびウエスタンブロットティングによる抗C10抗体および抗FRP抗体を測定する方法について説明する。

RA患者が滑膜細胞に対する特異的自己抗体を有することは、例えば、RA患者の体液、好ましくは関節滑液中のIgGをプローブとして、およびRA患者の関節滑膜細胞を抗原として用いるウエスタンブロットティング法 [ Sambrook等、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 18.60(1989) ] により確認できる。RA患者の関節滑膜切除術時に得られた滑膜組織を、適当な細胞分離用酵素、例えばコラゲナーゼ等で消化して細胞を分離した後、数週間培養することにより浮遊細胞を除去する。得られた付着細胞は滑膜細胞として種々の目的に使用され得る。ここでは、まず、この滑膜細胞を処理して潤滑細胞ライセートを得、ウエスタンブロットティングを行う。例えば、10万～50万個に相当する滑膜細胞を、2-メルカプトエタノールおよびSDSを含むサンプルバッファーで溶解し、5～10分間煮沸し、急速に氷冷した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）を行う。泳動後、常法に従ってナイロン膜にタンパク質のバンドを転写し、スキムミルク等を用いて非特異的結合をブロックする。他方、RA患者の関節より滑液を採取し、細胞質画分を遠心により除去し液性成分のみとし、カラムによりIgGを精製する。カラムにはプロテインAカラム、例えば、プロセップA（BoxyBrown社製）が用いられ得る。この精製されたIgG画分と上記ナイロン膜に転写された滑膜細胞ライセートとを反応させる。ナイロン膜を洗浄後、適当な検出試薬、例えばペルオキシダーゼ結合抗ヒトIgG抗体等を用いてさらに反応を行う。洗浄後、例えば、ECLキット（Amersham社製）等の検出剤で化学発光させて、バンドを検出することにより、抗原の存在を決定し得る。

配列表の配列番号2および4で示される塩基配列を有するcDNAの作製は、以下の工程に従って行われ得る。すなわち、(i)本願発明の自己抗原を産生する細胞、例えば、RA患者関節滑膜細胞からmRNAを分離し、(ii)そのmRNAから一本鎖cDNA、次いで二本鎖cDNAを合成し（cDNAの合成）、(iii)そのcDNAを適当なファージベクターに組み込み、(iv)得られた組換えファージのパッケージングを行って宿主細胞に感染させ、cDNAライブラリーの増幅を行い（cDNAライブラリーの作製）、(v)このcDNAライブラリーについてRA患者の体液、例えば、関節滑液より精製したIgGをプローブとしてスクリーニングを繰り返し、シングルクローンを得、そして、(vi)得られたファージシングルクローンよりプラスミドを作製して、シークエンシングによりcDNA配列および推定アミノ酸配列を決定し得る。

これらの工程をより詳しく説明すると、工程(i)では、前述の培養滑膜細胞よりRNAを回収し、さらにpolyAを有するmRNAを樹脂により精製し得る。精製用樹脂には、例えばOligo-dT付加ラテックス樹脂（TaKaRa社より販売）等が用いられ得る。

工程(ii)および(iii)は、cDNAライブラリー作製の工程であり、GublerおよびHoffmanの方法 [ Gene 25 p263(1983) ] を改変して行われ得る。また、これらの工程は、市販のcDNA合成キットおよび試薬、例えば、TimeSaver cDNA Synthesis Kit（Pharmacia社製）、逆転写酵素（Stratagene社製）、制限酵素（TaKaRa社製）等を組み合わせて行われ得る。

工程(iii)で用いられ得るファージベクターとしては、大腸菌内で機能するもの（例えば、gt10、gt11、ExCell等）が多数知られており、好適には、大腸菌内で機能するExCell（Pharmacia社製）が用いられる。

工程(iv)のパッケージングでは、ファージコートタンパク質中にファージDNAをパッケージングすることにより、ファージが大腸菌に感染し増殖できるようになる。この工程に

10

20

30

40

50

は、市販のパッケージングキット等が用いられ得、例えばギガパックIIパッケージングキット (Stratagene社製) が好ましい。用いられ得る感染用大腸菌としては多くが知られており、好ましくはパッケージングキットに添付されている大腸菌NM522株が用いられる。また、ライブラリーの増幅は種々の公知の方法 [例えば、Sambrook等、Molecular Cloning, 8.78(1989)] により行い得る。

工程(v)では、上述した関節滑液より精製したIgGをプローブとしてスクリーニングを行う。精製したIgGは、例えば、上記宿主大腸菌NM522株のライセートで処理することにより抗大腸菌抗体を除去し得 [Sambrook等、Molecular Cloning, 12.26(1989)]、これによりスクリーニング時のバックグラウンドを低くでき、スクリーニング効率を上げることができる。スクリーニングおよびクローニングは公知の方法で行われ得る [Sambrook等、Molecular Cloning, 12.11(1989)]。例えば、上記工程(iv)で作製したcDNAファージライブラリーをプレートに播き、37℃で培養してファージブランクを出現させる。次いで、例えばニトロセルロース膜 (Waters社製) をブランクの上に重ね、タンパク質合成を誘導すると同時に膜上に転写する。転写した膜をリン酸緩衝化生理食塩液 (PBS) で洗浄後、5%スキムミルク (DIFCO社製) /PBSなどでブロッキングを行う。さらにPBSで洗浄後、上述の抗大腸菌抗体を吸収した精製滑液IgGを加えて反応させる。この転写膜を、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 等で標識した抗ヒトIgG抗体で処理することにより、IgGと結合する陽性ファージの検出を行い得る。このようにして、RA患者滑液中のIgGを用いるスクリーニングにより、陽性ファージクローンをピックアップして最低3回以上クローニングを繰り返すことによって、最終的に100%陽性のファージクローンを得ることができる。工程(vi)は、例えば ExCellクローニングベクター (Pharmacia社製) 付属の説明書に従って行い得る。すなわち、インビトロ切除によりファージベクターを宿主大腸菌NM522株内でプラスミドに変換し、大腸菌を培養した後この大腸菌からプラスミドを調製し、他の大腸菌、例えばDH5 株に形質転換してより安定なプラスミド発現株を得る。この株よりプラスミドを調製して配列決定を行う。配列決定は、種々の公知の方法、例えば、ジデオキシターミネータ法により行われ得る。

上述の(i)~(vi)の工程を包含する方法により、本願発明の新規ポリペプチドcloneAポリペプチドまたは公知のFRPを含む2種のクローンが単離され、これらのポリペプチドがRAの自己抗原であることが示される。

抗原ポリペプチドをGSTとの融合蛋白質として発現させた後、GST部分から切り放すことにより目的のポリペプチドを得ることができる。以下にGST融合蛋白質発現システムであるGlutathione S-transferase (GST) Gene Fusion System (Pharmacia社製) を用いた方法を示す。(i)プラスミドpExCellに組み込まれたcDNA (cloneAあるいはFRP) を鋳型に用い、リンカープライマー法を用いたPCRにより適当な制限酵素部位を5'側と3'側に含みシグナルペプチドを含まないcDNA断片を得る。PCRに使用される耐熱性DNAポリメラーゼは種々のものが市販されているが、好適には複製率の高いPfuDNAポリメラーゼ (Stratagene社製) が用いられ得る。cDNA断片はアガロースゲル電気泳動にて分離し、目的のバンドを切り出し精製を行う。精製には、例えば、ガラスビーズ法による精製キットGENECLEAN II (BI0101社製) 等が用いられ得る。(ii)得られた精製cDNA断片をTAクローニングキット、例えばOriginal TA Cloning Kit (Invitrogen社製) 等を用いてキット付属のプラスミド (pCRTM II) にサブクローニングする。(iii)次に組換えプラスミドpCRIIから所定の制限酵素によりcDNA断片を切り出し、これも同じ制限酵素で消化した融合蛋白質発現用ベクターのpGEX-4T-3にライゲーションを行い、続いて適当な大腸菌 (例えば、NM522、TG1、DH5 等) を形質転換する。(iv)得られた形質転換体を培養しIPTGによる誘導を行いGST融合蛋白質を発現させる。(v)菌体のライセートを調製し、抗GST抗体カラムを用いてGST融合蛋白質を精製する。(vi)GST融合蛋白質をトロンピンで切断し、再び抗GST抗体カラムを用いてGSTを吸着させ、目的のポリペプチドを溶出する。このようにして精製cloneAポリペプチドあるいはFRPを得ることができる。

この精製ポリペプチドを抗原として用いてウェスタンブロッティングを行うことにより、被検血清との反応性を調べRAに対する疾患特異性を示すことができる。

10

20

30

40

50

C10ポリペプチドおよびC15ポリペプチドは化学合成によって得られる。現在のペプチドの化学合成では、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基の保護基として、主に2種類の方法が用いられている。即ち、 $\alpha$ -アミノ基をt-ブトキシカルボニル (Boc) 基、側鎖官能基をベンジルアルコール系保護基で保護するBoc法と、 $\alpha$ -アミノ基を9-フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 基、側鎖官能基をt-ブチルアルコール系保護基で保護するFmoc法の2種類である。いずれの合成方法も適用できるが、該ポリペプチドがわずか10個および15個のアミノ酸から成ることおよび構成するアミノ酸の種類からFmoc法による固相合成が適当である。具体的には、(i)有機溶媒に不溶性の支持体(樹脂)に合成すべきペプチドのC末端に対するFmocアミノ酸を適当な縮合剤[例えば、PyBOP: Benzotriazol-1-yl-oxy-tris(pyrrolidino) phosphonium hexafluorophosphateが好適である。]を用いて結合させる。ここで、側鎖官能基を有するアミノ酸、例えばThr、Tyr、Glu、Asp、AsnおよびSerにおいては、その側鎖官能基は保護しておくのが望ましい。(ii)結合したアミノ酸のFmoc基を第2級アミンであるピペリジンにより脱保護し、DMF等で洗浄する。(iii)C末端より2番目のFmocアミノ酸を(i)と同様にして結合させる。(iv)上記(ii)~(iii)の操作を交互に繰返し、ペプチド鎖をC末端から順に延長させてポリペプチド結合樹脂を得る。このポリペプチド結合樹脂はデシケーター中で減圧下乾燥させる。(v)乾燥したポリペプチド結合樹脂を弱酸、例えば95%TFA(trifluoroacetic acid)中で攪拌することにより、ポリペプチドの脱保護と樹脂からの遊離を行う。(vi)ポリペプチドのTFA溶液を、例えばジエチルエーテル等に滴下しポリペプチドを沈澱させ遠心等により回収後、乾燥させ、粗ポリペプチドを得る。なお、合成には固相合成用自動ペプチド合成機が種々市販されており利用することができる。また、合成に使用するFmocアミノ酸誘導体もすべて市販されており利用することができる。

10

20

合成ポリペプチドの精製には、公知の方法、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、逆相液体クロマトグラフィー(逆相HPLC)等のクロマトグラフィーが単独で、あるいは組み合わせ合わせて用いられ得る。好適には逆相HPLCが用いられ得る。逆相HPLC用カラムとしては、市販の種々のカラムが用いられ得るが、好適には5C18が用いられ得る。得られた精製ポリペプチドはアミノ酸配列決定機による一次配列解析およびアミノ酸組成分析等により、目的のポリペプチドであることが検定され得る。

このようにして得られたポリペプチドは、活性を最大限に維持するために新鮮であるか、4℃で保存する場合には、保存後5日以内のものが好ましい、あるいは、本願発明の合成ポリペプチドは、凍結乾燥して凍結保存することもできる。さらにまた、本ポリペプチドの溶液を凍結させたものとすることもできるが、好適には凍結乾燥したポリペプチドを用事調製することである。後述するように、本願発明のC10ポリペプチドおよびC15ポリペプチドはBSA等のキャリアー蛋白質と結合させ、ELISA用抗原として利用され得る。

30

このC10ポリペプチドおよびC15ポリペプチドをRA患者血清中の抗体と反応させるためには、例えば、グルタルアルデヒドを架橋剤に用いて該ポリペプチドをウシ血清アルブミン(BSA)に結合させたポリペプチド結合BSAを調製し、これを抗原に用いることによりELISA法による測定が可能になる。より具体的に説明すると、C10ポリペプチドあるいはC15ポリペプチドとBSAをPBSに溶解し、4℃で攪拌しながら2%グルタルアルデヒドを添加することによりポリペプチドをBSAに結合させる。PBSに対して透析を行い未反応のポリペプチドおよび試薬の除去を行う。以後は通常のELISA法に従って行えばよい、例えば、得られたポリペプチド結合BSAをマイクロタイタープレート(Costar社)の各ウェルに分注し、4℃で1晩放置する。過剰の抗原を除去後、BSA溶液でブロッキングを行い、BSA溶液で適当に希釈した被検血清を加え、室温で2時間静置する。洗浄液で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体を入れ、室温で1時間反応させる。洗浄液で洗浄後、適当なペルオキシダーゼ基質溶液、例えば0.03%過酸化水素を含む0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.2)で調製したABTS(Zymed社製)溶液を各ウェルに加え、室温で30分間放置後、415nmにおける吸光度を測定する。

40

このELISA系を用いて、RAや他の自己免疫疾患の血清中のC10ポリペプチドおよびC15ポリペプチドに対する自己抗体が測定でき、該抗体がRA患者特異的に出現することを示す

50

ことができる。さらに該抗体を測定することはRAの診断法となる可能性を示すことができる。

#### 実施例

次に、本願発明を実施例に基づいて詳細に説明するが、これらの実施例によって本願発明は何ら限定されるものではない。

#### 〔実施例1〕滑膜細胞cDNAライブラリーの構築

##### (1) mRNAの分離精製

RA患者膝関節より滑膜切除術時に得られた滑膜細胞を細片化し、10%ウシ胎児血清(FCS)を含むDMEM培地(Flow社製)中に浮遊させ、コラーゲナーゼで3時間消化した。浮遊してきた細胞を回収し、同じ培地中で2週間から3週間培養した。この間、3日~4日ごとに培地を換え、浮遊細胞を除去した後、付着細胞を滑膜細胞としてmRNA調製に用いた。約 $10^8$ 個の滑膜細胞よりトリゾール1試薬(ギブコBRL社製)を用い、試薬付属の説明書に従ってRNAを調製した。RNAを、さらに密度1.51のセシウムトリフルオロアセテート(CsTFA)溶液(Pharmacia社製)のクッションに上層し、 $120,000 \times g$ で、20時間超遠心分離することにより、mRNAをペレットとして回収した。このmRNAを滅菌水に溶解し、等量の緩衝液飽和フェノール/クロロホルムで処理して洗浄した。次いで、1/10量の5MNaClと2倍量のエタノールとを加えて攪拌し、 $-80$ にて30分間放置することにより、mRNAを沈澱させて純化した。さらに、このmRNAについて、Oligotex-dT30<sup>super</sup>(TaKaRa社より販売)を添付の処方に従って用いて、poly(A)+mRNAを精製した。

##### (2) cDNAライブラリーの作製

cDNAライブラリーを、GublerおよびHoffman[Gene 25 p263(1983)]の変法により作製した。精製したpoly(A)+mRNA(5 $\mu$ g)より、3'側プライマーとして(i)ランダムヘキサマーと(ii)Not I部位とを有するOligo-dTを用い、逆転写酵素により一本鎖DNAを合成した。続いて、二本鎖DNAを合成し、クローマスピンの400カラム(Clonetech社製)を用いて、200塩基以上長さのcDNAを選択回収した。この操作により低分子ヌクレオチド、酵素、プライマー等を除去し、cDNAを純化した。さらに、T4 DNAポリメラーゼによりcDNAの両端を完全に平滑末端にした後、(i)の場合はEcoRIアダプターのライゲーションを行い、(ii)の場合はNot I消化後にEcoRIアダプターのライゲーションを行った。これらの制限酵素部位を有するcDNAの5'側をT4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化した後、両cDNAともにクローマスピンの400カラムを用いてアダプター、酵素等を完全に除去してcDNAを純化した。上記のcDNA合成工程はTimeSaver cDNA Synthesis Kit(Pharmacia社製)を用いて行った。逆転写酵素はこのキット付属のもの、あるいはSuperScriptTMII RNaseH<sup>-</sup>(ギブコBRL社製)を用いた。また、ライゲーションにはTaKaRa社製のDNAライゲーションキットを用い、キット添付の処方に従ってライゲーションを行った。

cDNAを脱リン酸化したファージ発現ベクターのExCell(Pharmacia社製)に、(i)ではEcoRI制限酵素部位、あるいは(ii)ではEcoRIとNot Iでライゲーションした。このcDNAを組み込んだExCellをギガパックIIパッケージングキット(Stratagene社製)を用い、キット添付の処方に従い、ファージコートタンパク質中にパッケージした。パッケージしたファージの力価を大腸菌宿主菌株NM522(Stratagene社より購入)で測定した。その結果、(i)では5万、(ii)では15万の独立したクローンであると推定された。プロモクロロインドリルガラクトシド(X-gal)指示薬によって、95%がcDNAが挿入されたファージであることがわかった。これらの組換えライブラリーの増幅をパッケージングキット添付の方法に従って1回を行い、ファージを回収して7%ジメチルスルホキシド(DMSO)中に $-80$ で保存した。抗原のスクリーニングには、この1回増幅したライブラリーを用いた。

#### 〔実施例2〕スクリーニング用IgGの調製

##### (1) RA患者関節滑液中のIgGの精製

RA患者滑液中に含まれるIgGの精製を、プロテインAカラムであるプロッセップA(BoxyBrown社製)を用いて行った。RA患者の滑液を回収後リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で3倍に希釈し、これを $5,000 \times g$ にて15分間遠心分離して上清を回収することにより、IgG画分を得た。このIgG画分をPBSで平衡化したプロッセップAに通すことによりIgGを吸着

10

20

30

40

50

させた後、3倍量のPBSで洗浄し、0.1Mグリシン(pH3.0)でIgGを溶出した。溶出画分を1M Tris-HCl(pH8.0)で中和した後、もとの関節液量の2倍量になるように濃縮した。この精製IgGをRA抗原のスクリーニング用プローブあるいは抗原取得後のウェウタンブロットティング用プローブとして用いた。

#### (2) 大腸菌ライセートによる抗大腸菌抗体の吸収

精製したIgGは、Sambrook等[Molecular Cloning, 12.26(1989)]の方法に従って、宿主大腸菌NM522株のライセートで処理することにより抗大腸菌抗体を除去した。

#### 〔実施例3〕cDNAライブラリーからのクローニング

##### (1) cDNAライブラリーのスクリーニングおよびクローニング

実施例1で作製したcDNAファージライブラリーをNZY寒天培地プレート(9cm×14cm)に2万プラークになるように播き、37°Cで4時間培養してファージプラークを出現させた。IPTGで処理したニトロセルロース膜(Waters社製)をプラークの上に重ね、4時間タンパク質合成を誘導すると同時に膜上に転写した。転写膜をPBSで3回洗浄した後5%スキムミルク(DIFCO社製)/PBSで1時間ブロッキングを行った。PBSで3回洗浄後、実施例2で得た抗大腸菌抗体を吸収した滑液IgGを加え、4°Cで一晩反応させた。転写膜をPBSで3回洗浄後西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識した抗ヒトIgG抗体で1時間処理し、PBSで3回洗浄後ECRキット(Amersham社製)を用い、キット添付の処方に従ってIgGと結合する陽性ファージの検出を行った。陽性ファージを回収後、同様のスクリーニングを3回行うことにより最終的に100%陽性の2種のファージクローンを得た。

クローニングしたファージを、予め50μg/mlのスペクチノマイシン含有NZCYM培地で39°Cにて20分間培養された大腸菌NM522株中に加え、さらに39°Cで20分間インキュベートすることによりファージDNAを環状のファージミド(pExCell)に変換した。1Mのクエン酸ナトリウムを添加することにより変換を停止し、スペクチノマイシン含有2YT培地を加え、1.5時間37°Cでゆっくり培養した。pExCellを含むNM522株を、さらにアンピシリン含有LBプレートに播いて培養することにより、目的の遺伝子を含む大腸菌をクローニングした。このpExCellに変換する工程は、ExCellクローニングベクター付属の説明書(Pharmacia社製)に従って行った。NM522株からこのpExCellプラスミドを回収した後、DH5株(TOYOBO社より購入)に形質転換し、安定プラスミド発現株を得た。

##### (2) 塩基配列決定

実施例3の(1)項でクローニングした2種のプラスミド中のcDNA配列を、Applied Biosystems社のTaq Dyedeoxy Terminator Cycle Sequencing Kitにより反応させ、Applied Biosystems 373A DNA sequencerにて蛍光検出して、塩基配列を決定した。配列表の配列番号1および3にクローニングした自己抗原の推定アミノ酸配列を、ならびに配列番号2および4にそれぞれのオープンリーディングフレームの塩基配列を示す。

##### (3) 部分塩基配列のホモロジー解析

上記実施例3の(2)項で得られた2種のcDNA塩基配列について、Lipman.およびPearson.のFASTAプログラム[Proc. Natl. Aca. Sci. USA 85 p2444(1988)]を用いて、既知データベースDDBJに含まれる全ての塩基配列に対するホモロジー検索を行った。その結果、配列表の配列番号2に示すcDNA塩基配列については、一致する塩基配列がなく、新規の配列であることが明らかになった。この塩基配列から推定したアミノ酸配列(配列表の配列番号1)とホモロジーのあるポリペプチドとしては、インターロイキン6のレセプターの鎖であるgp130が挙げられた。gp130との配列の比較から、本願発明のポリペプチドをコードする塩基配列は、報告されているgp130の塩基配列[Hibi等、Cell 63 p1149(1990)]の1229位~1311位までの83塩基がスプライシングにより欠失し、フレームがずれることによりストップコドンが現れ、結果的にアミノ酸配列がArg(325)-Pro-Ser-Lys-Ala-Pro(330)-Ser-Phe-Trp-Tyr--と918位まで続くところが、Asn(325)-Ile-Ala-Ser-Phe(329)と全く異なるアミノ酸配列になり、329アミノ酸までの短いポリペプチドとなっていることがわかった。また、配列表の配列番号4に示す塩基配列は、FRP[Zwijnsen.等、Eur. J. Biochem. 225 p937(1994)]の16位~1150位の塩基配列に一致し、この全アミノ酸配列(配列表の配列番号3)を含んでいた。いずれもリウマチ抗原としては全く新規なものである。

10

20

30

40

50

## 〔実施例4〕RA患者IgGと自己抗原との反応性

上記実施例3において得られた抗原プラスミドを有する2種の大腸菌NM522株を、それぞれアンピシリン添加LB培地5mlで培養し、O.D.600が0.5の時点でIPTGを1mMになるように加え、さらに3時間培養してタンパク質合成を誘導した。大腸菌を回収してSDSで可溶化し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動後、ウエスタンブロッティングを行った。ウエスタンブロッティングは、上記実施例2の(1)項で得られたRA患者滑液IgGをプローブとして、HRP標識抗ヒトIgGを二次抗体として用い、ECRキット(Amersham社製)にてキット添付の方法に従って行った。この結果の一例を、図1および図2にそれぞれ示す。本願発明のcloneAポリペプチドを用いた場合は、陽性の患者を検出することができ(図1)、また、FRPを用いた場合も、陽性患者の存在を確認できた(図2)。

10

## 〔実施例5〕大腸菌発現ベクターの作製と発現

大腸菌によるGST融合蛋白質発現ベクターの作製、産生および目的ポリペプチドの精製はPharmacia社製のGlutathion S-transferase(GST) Gene Fusion Systemを用いてキット付属の処方に従って行った。

(1)より精製の容易な形でcDNA産物を大腸菌に大量発現させるため、cDNAの翻訳産物がグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)融合蛋白質となるようにcDNAをプラスミドpGEX-4T-3(Pharmacia社製)に組み変えた。この時まずcDNAはプラスミドpExCellに組み込んだままリンカープライマー法を用いたPCRにより後述の制限酵素部位を5'側と3'側に含みシグナルペプチドを含まないcDNA断片とした。得られたPCR産物はアガロースゲル電気泳動後、切り出したゲルからGENECLEAN II(BIO 101社製)にて添付の方法に従って精製した。精製cDNAをOriginal TA Cloning Kit(Invitrogen社製)により添付の方法に従ってプラスミドpCRIIにライゲーションを行い、続いて大腸菌TOP10F'を形質転換しプラスミドを回収した。次に、回収したプラスミドを所定の制限酵素により切断しアガロースゲル電気泳動により分離後、目的のcDNAを含むゲルを切り出しGENECLEAN IIにて精製した。一方、pGEX-4T-3も同じ制限酵素で切断し電気泳動により分離後ベクターアーム側を回収し、同様にして精製した。インサートcDNAとベクターアームのライゲーションを行い大腸菌NM522に形質転換後プラスミドを回収し目的の発現ベクターを得た。

20

図3にcloneAおよびFRPのpGEX-4T-3クローニング部位を示した。cloneAはpGEX-4T-3のマルチクローニング部位のうち挿入断片からみて5'側にBamHI、NotIを選び、cDNA産物の抗原性をなるべく変えないものとした。すなわちトロンピン消化後、GSTから切り出されるcDNA産物にはアミノ酸の置換はないが2つのアミノ酸、N末からグリシン、セリンがこの順番で付加される形となった(配列番号5)。一方、FRPは5'側にSmaI、3'側にNotIを選び同様にcDNA産物の抗原性をなるべく変えないものとした。すなわちトロンピン消化後、GSTから切り出されるcDNA産物にはアミノ酸の置換はないが6つのアミノ酸、N末からグリシン、セリン、プロリン、アスパラギン、セリン、アルギニンがこの順番で付加される形となった(配列番号6)。

30

(2)以下にPCRに用いたプライマーと方法を示す。

cloneAプライマーとして5'-AAGGATCCGAACCTTCTAGATCCATGTGG-3'(配列番号7)および5'-TTGCGGCCGCTCAAAAGGAGGCAATGTTAT-3'(配列番号8)、FRP用プライマーとして5'-AACCCGGGAGGAAGAGCTAAGGAGCAA-3'(配列番号9)および5'-TTGCGGCCGCTGTGCCTCCTCATTAGATCT-3'(配列番号10)を用いた。

40

耐熱性DNAポリメラーゼとしては複製率の高いPfu DNAポリメラーゼ(Cloned Pfu DNA Polymerase, Stratagene社製)を用いた。反応液組成は次の通りである。テンプレートはcDNAを持つプラスミド50ng、プライマーそれぞれ15pmol、バッファーとしてPfu DNAポリメラーゼに添付の10倍液を5μl、dNTPとして2.5mM dNTP Mixture(TaKaRa社製)を4μlを加え滅菌蒸留水で49μlとし最後にPfu DNAポリメラーゼを1μl加えた。以上の反応液にミネラルオイル(Aldrich chem.社製)を重層後、DNA Thermal Cycler PJ2000(Perkin Elmer社製)に設置し以下の設定でPCRを行った。すなわち94の3分後、94 30秒、55 30秒、72 2分を25サイクルとした。尚Pfu DNAポリメラーゼを用いたためTAクローニングの効率を損なわないようOriginal TA Cloning Kitの添付書の指示のとおりPCR後にTaq DNAポリメ

50

ラーゼ（ニッポンジーン社製）を添加し72 10分反応させた後、直ちにフェノールクロロホルム処理を行いDNAポリメラーゼを失活させる工程を付加した。

（3）組換え型cloneAポリペプチドおよびFRPの発現と精製

組換え型cloneAポリペプチドおよびFRPの発現と精製を上記したようにキット添付のマニュアルに従って行った。方法を簡単に示す。

それぞれのポリペプチドをコードするcDNAを組み込んだpGEXで形質転換した大腸菌を100 μg/mlアンピシリンを含む2xYT培地で、OD600が0.6～0.8になるまで37 で培養した。最終濃度1mMになるようにIPTGを加え、さらに1～2時間培養し融合蛋白質を発現させた。遠心により菌体を回収し、冷PBS中でソニケーターにより検体を破碎した。20%TritonX-100を最終濃度1%になるように加え30分攪拌することによりGST融合蛋白質を溶解した。12,000xgで4 10分間遠心し上清を回収後、0.45 μmのフィルターで濾過した。この濾液をGlutathione Sepharose 4B RedPack columnに通しGST融合蛋白質を吸着させた後、グルタチオン溶出溶液を用いて融合蛋白質の溶出を行った。この溶出液にトロンピン溶液を加え22～25 で15時間インキュベートし目的のポリペプチドをGSTポリペプチドから切り放した。この溶液を透析することによりまずグルタチオンを除去し、続いてGlutathione Sepharose 4B RedPack columnに通しGSTを吸着させることにより、目的のポリペプチドを溶出し回収した。これら精製ポリペプチドはSDS-PAGEで単一のバンドを示し、またウェスタンブロッティングによりRA患者由来滑液IgGと反応することがわかった（図4）。

〔実施例6〕リウマチ関連疾患患者での抗FRP抗体の測定。

実施例5で得られた組換えFRPを用いてウェスタンブロッティングにより、リウマチ関連疾患患者血清での抗FRP抗体の測定を行った。精製抗原0.5 μg/列を12.5%ポリアクリルアミドゲルによるSDS-PAGEを行い、続いてイモビロン膜（Millipore社製）に転写した。このイモビロン膜を5%スキムミルク/PBSでブロッキング後、自己免疫疾患患者血清あるいは健常人血清（5%スキムミルク/PBSで400倍に希釈したもの）と4 で一晩反応させた。PBS-Tween20で洗浄後、2次抗体として2000倍希釈したペルオキシダーゼ標識したヤギ抗ヒトIgG抗体（Cappel社製）を1時間反応させた。PBS-Tween20で洗浄後、ECLシステムで検出を行った。尚、用いたリウマチ関連疾患患者血清の内訳は以下の通りである。RA患者（RA）67例、全身性エリテマトーデス51例、強皮症18例、シェーグレン症候群10例、多発性筋炎/皮膚筋炎13例および健常人30例である。結果を表1に示した。

**表1 リウマチ関連疾患患者血清での抗FRP抗体陽性率**

疾患名	n	陽性数	陽性率
慢性関節リウマチ（RA）	67	20	29.9
全身性エリテマトーデス（SLE）	51	5	9.8
強皮症（SSc）	18	3	17
シェーグレン症候群（SSjS）	10	1	10
多発性筋炎/皮膚筋炎（PM/DM）	13	0	0
健常人	30	0	0

この結果から、抗FRP抗体はRA特異的に出現することがわかり、RAの診断に使用できることが示された。

また、さらにRA関節滑液（18例）と変形性関節症（OA）滑液（15例）での抗FRP抗体の測定を同様にして行った。その結果、表2に示したようにRAで44.4%と効率に検出されたが、OAでは検出されなかった。この結果からも抗FRP抗体の測定は、RAの診断に使用できることが示された。

表2 リウマチ疾患とOA疾患の関節液中の抗FRP抗体陽性率

疾患名	n	陽性数	陽性率
慢性関節リウマチ (RA)	18	8	44.4
変形性関節症 (OA)	15	0	0

[ 実施例 7 ] ペプチドの固相法による合成

C10ポリペプチドおよびC15ポリペプチドの合成を、ペプチド合成機 ( 島津製作所、PSSM-8 型 ) を用いて、Fmoc法により合成した。C末端のPheを結合した支持体であるTGS-AC-Fmoc-Phe ( 0.22mmol/g resin、全量100mg、島津社製 ) よりN末端の方向に向かって順に、脱Fmoc基反応および縮合反応を繰り返してペプチド鎖を延長した。すなわち、30%ピペリジン/DMFにより - アミノ基の保護基であるFmoc基の除去を2分間づつ2回行ない、N'-N-ジメチルフロムアミド ( DMF ) で5分間づつ5回洗浄した。1-ヒドロキシベンゾトリアゾール ( 1-hydroxybenzotriazole、HOBT ) ( 渡辺化学社製 ) 存在下でPyBOP [ benzotriazol-1-yl-oxy-tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate ] ( 渡辺化学社製 ) による縮合反応を30分行ない、DMFで洗浄する操作 ( 5分、5回 ) を繰り返した。これら脱Fmoc基から次のアミノ酸の縮合反応を繰り返すことにより目的のポリペプチドを合成した。尚、これらの合成は上記ペプチド合成機に入力されているFmoc法用合成プログラムによる自動

運転で行った。Fmocアミノ酸は、Fmoc-L-Ala、Fmoc-L-Asn ( Trt )、Fmoc-L-Asp ( OtBu )、Fmoc-L-Glu ( OtBu )、Fmoc-L-Ile、Fmoc-L-Thr ( tBu )、Fmoc-L-Ser ( tBu )、Fmoc-L-Tyr ( tBu ) およびFmoc-Glyを用いた。それらの使用量は基質に対して約10倍モル量を用いた。 ( ここで、Trt、OtBu、Boc、およびtBuは、それぞれトリチル基、tert-ブチルエステル、ブチルオキシカルボニル基、およびtert-ブチル基を表す。 )

合成終了後、ペプチド結合樹脂22  $\mu$  molスケールあたり、ジエチルエーテル10mlで洗浄した後、2mlの95%TFAを加え、室温で2時間攪拌し脱保護および樹脂からの脱離を行った。次にこの溶液を、冷ジエチルエーテル40mlの入った遠心管に、攪拌しながらゆっくりと滴下した後、氷水中で30分間静置することによりポリペプチドを沈澱させた。遠心 ( 5,000  $\times$  g 10分間、4 ) の後、上清を捨て、得られた沈澱に冷ジエチルエーテル45mlを加え、よく

攪拌した。氷水中で5分間静置後、再び遠心により沈澱を回収した。この操作を3回繰り返した後、沈澱を減圧下乾燥し、目的のポリペプチドを得た。

得られた粗ポリペプチドは以下のようにして逆相HPLCにより精製を行った。沈澱を5mlの0.1%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、0.45  $\mu$  mのフィルターでろ過し得られた濾液をHPLCに供した。HPLCは、Model LC-8Aシステム ( 島津製作所製 ) を用い、カラムは逆相系のCosmosil 5C18 ( 20 $\times$ 250mm ) ( ナカライテスク社製 ) を用いた。移動相にはA液として0.1%TFAを、B液として50% ( V/V ) アセトニトリル / 0.1%TFAを用い、0%B液から100%B液への直線濃度勾配により溶出した。溶出パターンを図5-1 ( C10ポリペプチド ) および図5-2 ( C15ポリペプチド ) に示した。ポリペプチド溶出画分を回収後凍結乾燥することにより精製ポリペプチドを得た。得られたポリペプチドは、気相プロテインシーケンサー477型 ( アプライドバイオシステムズ社製 ) により解析して、目的のアミノ酸配列のポリペプチドが得られていることを確認した。

[ 実施例 8 ] C10ポリペプチドおよびC15ポリペプチドを用いたELISA系の構築。 ( 1 ) C10ポリペプチドおよびC15ポリペプチドのウシ血清アルブミンへの結合。

グルタルアルデヒドを用いて、C10ポリペプチドおよびC15ポリペプチドをBSAに結合させた。方法を以下に示す。5mlのPBSに、5mgのBSAを溶解した後、2mgのそれぞれのポリペプチドを加えた。4 下、この溶液に、5mlの2%グルタルアルデヒド水溶液を攪拌しながらゆっくりと滴下し、1時間攪拌しながら反応させた。続いて、テトラヒドロほう酸ナトリウムを100mg加え、さらに1時間静置した。得られた反応溶液をPBSに対して透析し、ポリペプチド結合BSAを得た。

10

20

30

40

50

## (2) C10ポリペプチドおよびC15ポリペプチド結合BSAを用いたELISA

患者血清中のcloneAポリペプチドに対する自己抗体の抗体価は、以下に示すELISAにより測定した。PBSで2μg/mlに調製したポリペプチド結合BSA溶液を、マイクロタイタープレート(Costar社)の各ウェルに50μlずつ入れ、4で1晩放置した。PBSで2回洗浄した後、5%BSAを含むPBSを100μl入れ、室温で1時間放置した。0.05%Tween-20を含むPBSで2回洗浄後、5%BSAを含むPBSで100倍希釈した血清を50μl入れ室温で2時間反応させた。0.05%Tween-20を含むPBSで3回洗浄後、5%BSAを含むPBSで2000倍希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG抗体(Cappel社)を50μl入れ、室温で1時間反応させた。0.05%Tween-20を含むPBSで5回洗浄後、0.03%過酸化水素を含む0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.2)で調製したABTS(Zymed社製)溶液を各ウェルに50μlずつ入れた。室温で30分間放置後、マイクロプレートリーダー(コロナ電子製、MTP32)で、各ウェルの415nmにおける吸光度(OD)を測定した

10

各血清のクローンAに対する自己抗体の抗体価は、高い抗体価を示す1人のRA患者の血清を100単位(U)を規定して、その患者血清から得られたOD値と抗体価の関係を示す標準曲線から求めた。図6-1および図6-2にそれぞれC10ポリペプチド、C15ポリペプチドの標準曲線を示した。これらの標準曲線より該ポリペプチドを抗原に用いたELISAでの該ポリペプチド抗体の測定が可能になった。

[実施例9] リウマチ関連疾患患者での抗C10ポリペプチド抗体の測定。

C10ポリペプチドを抗原に用いたELISA系によりリウマチ関連疾患での抗C10ポリペプチド抗体の測定を行った。用いた疾患の内訳は以下の通りである、即ち、RA(RA)123例、全身性エリテマトーデス51例、強皮症14例、シェーグレン症候群7例、多発性筋炎/皮膚筋炎12例、および健常人63例である。測定結果の疾患別散布図を図7に示した。また表3に溶性率を示した。

20

**表3 リウマチ関連疾患患者血清での抗C10ペプチド抗体陽性率**

疾患名	n	陽性数	陽性率
慢性関節リウマチ(RA)	123	60	48.8
全身性エリテマトーデス(SLE)	51	4	7.8
強皮症(SSc)	14	2	14.3
シェーグレン症候群(SjS)	7	0	0
多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)	12	1	8.3
健常人	63	4	6.3

30

尚、健常者の抗体価の平均値+(2×標準偏差)の値より大きい値を示すものを陽性とした。これらの結果から、RA患者の測定値は他の疾患および健常人と比較して統計的に有意であり、該ポリペプチド抗体の測定はRA特異的であることが示された。従って、該ポリペプチド抗体の測定はRAの診断に使用できることが示された。

産業上の利用可能性

40

本願発明で得られた2種の抗原はリウマチ抗原としては新規なものであり、診断薬の開発に大きな意義を持つ。さらに、これら抗原はRA患者の関節滑膜細胞で発現されているものであり、これらの抗原がRAの病態に関わる意義を研究することにより治療薬の開発にも繋がる可能性を示すものである。

配列表

配列番号1

配列の長さ: 329

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

50





ATGTTGACGT TGCAGACTTG GGTAGTGCAA GCCTTGTTTA TTTTCCTCAC CACTGAATCT	60	
ACAGGTGAAC TTCTAGATCC ATGTGGTTAT ATCAGTCCTG AATCTCCAGT TGTACAACCT	120	
CATTCTAATT TCACTGCAGT TTGTGTGCTA AAGGAAAAAT GTATGGATTA TTTTCATGTA	180	
AATGCTAATT ACATTGTCTG GAAAACAAAC CATTTTACTA TTCCTAAGGA GCAATATACT	240	
ATCATAAACA GAACAGCATC CAGTGTCCACC TTTACAGATA TAGCTTCATT AAATATTCAG	300	
CTCACTTGCA ACATTCTTAC ATTCGGACAG CTTGAACAGA ATGTTTATGG AATCACAATA	360	
ATTTCCAGGCT TGCCTCCAGA AAAACCTAAA AATTTGAGTT GCATTGTGAA CGAGGGGAAG	420	10
AAAATGAGGT GTGAGTGGGA TGGTGGGAAG GAAACACACT TGGAGACAAA CTTCACCTTA	480	
AAATCTGAAT GGGCAACACA CAAGTTTGCT GATTGCAAAG CAAAACGTGA CACCCCCACC	540	
TCATGCACTG TTGATTATTC TACTGTGTAT TTTGTCAACA TTGAAGTCTG GGTAGAAGCA	600	
GAGAATGCCC TTGGGAAGGT TACATCAGAT CATATCAATT TTGATCCTGT ATATAAAGTG	660	
AAGCCCAATC CGCCACATAA TTTATCAGTG ATCAACTCAG AGGAACTGTC TAGTATCTTA	720	
AAATTGACAT GGACCAACCC AAGTATTAAG AGTGTATAA TACTAAAATA TAACATTCAA	780	20
TATAGGACCA AAGATGCCTC AACTTGGAGC CAGATTCCTC CTGAAGACAC AGCATCCACC	840	
CGATCTTCAT TCACTGTCCA AGACCTTAAA CCTTTTACAG AATATGTGTT TAGGATTCCG	900	
TGTATGAAGG AAGATGGTAA GGGATACTGG AGTGAAGAGC GTGAAGAAGC AAGTGGGATC	960	
ACCTATGAAG ATAACATTGC CTCCTTTTGA	990	

配列番号3

配列の長さ : 308

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列

Met Trp Lys Arg Trp Leu Ala Leu Ala Leu Ala Leu Val Ala Val Ala

1

5

10

15

Trp Val Arg Ala Glu Glu Glu Leu Arg Ser Lys Ser Lys Ile Cys Ala

30



Cys Gly Asn Trp Val Cys Thr Ala Met Thr Cys Asp Gly Lys Asn Gln  
 260 265 270  
 Lys Gly Ala Gln Thr Gln Thr Glu Glu Glu Met Thr Arg Tyr Val Gln  
 275 280 285  
 Glu Leu Gln Lys His Gln Glu Thr Ala Glu Lys Thr Lys Arg Val Ser  
 290 295 300  
 Thr Lys Glu Ile

10

## 305

配列番号4

配列の長さ：926

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

ATGTGAAAC GCTGGCTCGC GCTCGCGCTC GCGCTGGTGG CGGTCGCCTG GGTCCGCGCC	60	20
GAGGAAGAGC TAAGGAGCAA ATCCAAGATC TGTGCCAATG TGTTTTGTGG AGCCGGCCGG	120	
GAATGTGCAG TCACAGAGAA AGGGGAACCC ACCTGTCTCT GCATTGAGCA ATGCAAACCT	180	
CACAAGAGGC CTGTGTGTGG CAGTAATGGC AAGACCTACC TCAACCACTG TGAACCTGCAT	240	
CGAGATGCCT GCCTCACTGG ATCCAAAATC CAGGTTGATT ACGATGGACA CTGCAAAGAG	300	
AAGAAATCCG TAAGTCCATC TGCCAGCCCA GTTGTGTTGCT ATCAGTCCAA CCGTGATGAG	360	
CTCCGACGTC GCATCATCCA GTGGCTGGAA GCTGAGATCA TTCCAGATGG CTGGTTCTCT	420	
AAAGGCAGCA ACTACAGTGA AATCCTAGAC AAGTATTTTA AGAACTTTGA TAATGGTGAT	480	30
TCTCGCCTGG ACTCCAGTGA ATTCCTGAAG TTTGTGGAAC AGATGAAACT GCCATCAATA	540	
TTACAACGTA TCCAGACCAG GAGAACAACA AGTTGCTTAG GGGACTCTGT GTTGATGCTC	600	
TCATTGAACT GTCTGATGAA AATGCTGATT GGAACTCAG CTTCCAAGAG TTTCTCAAGT	660	
GCCTCAACCC ATCTTTCAAC CCTCCTGAGA AGAAGTGTGC CCTGGAGGAT GAAACGTATG	720	
CAGATGGAGC TGAGACCGAG GTGGACTGTA ACCGCTGTGT CTGTGCCTGT GGAAATTGGG	780	
TCTGTACAGC CATGACCTGT GACGGAAAGA ATCAGAAGGG GGCCAGACC CAGACAGAGG	840	40
AGGAGATGAC CAGATATGTC CAGGAGCTCC AAAAGCATCA GGAAACAGCT GAAAAGACCA	900	
AGAGAGTGAG CACCAAAGAG ATCTAA	926	

配列番号5

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ポリペプチド

配列

Ile Thr Tyr Glu Asp Asn Ile Ala Ser Phe

1 5 10

配列番号6

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ポリペプチド

配列

Glu Glu Ala Ser Gly Ile Thr Tyr Glu Asp Asn Ile Ala Ser Phe

10

1 5 10 15

配列番号7

配列の長さ：28

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：合成DNA

配列

AAGGA TCCGA ACTTC TAGAT CCATG TGG

28

20

配列番号8

配列の長さ：30

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：合成DNA

配列

TTGCG GCCGC TCAAA AGGAG GCAAT GTTAT

30

配列番号9

配列の長さ：27

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：合成DNA

配列

AACCC GGGAG GAAGA GCTAA GGAGC AA

27

配列番号10

配列の長さ：

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：合成DNA

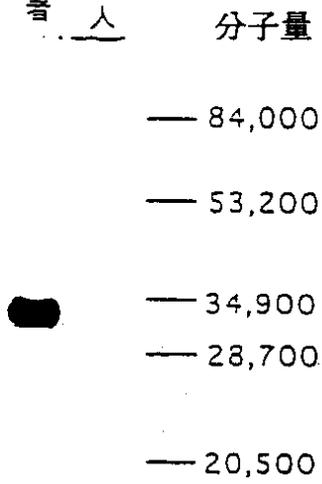
配列

TTGCG GCCGC TGTGC CTCCT CATTG GATCT

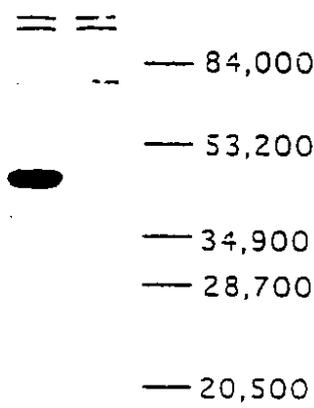
30

40

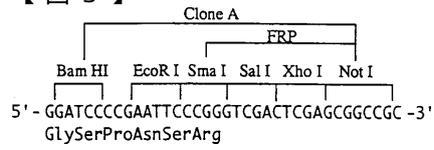
【図1】  
RA 健康  
患者 常人



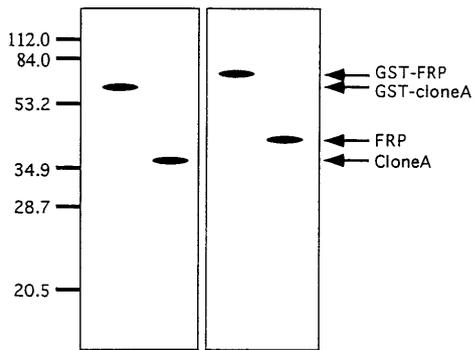
【図2】  
RA 健康  
患者 常人



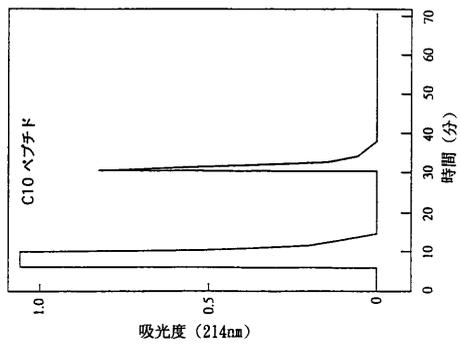
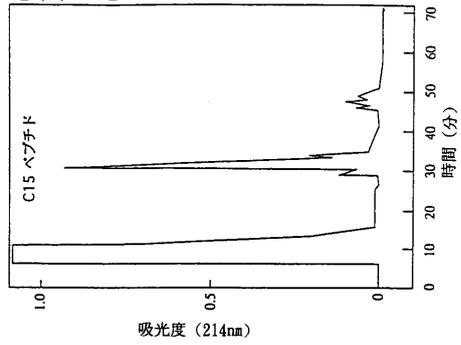
【図3】



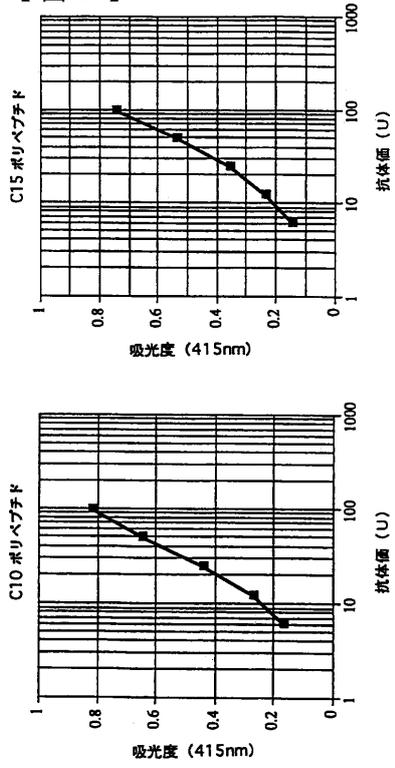
【図4】  
分子量 (kDa)



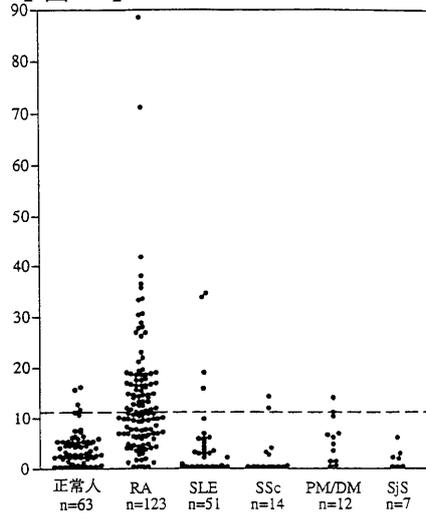
【図5】



【 図 6 】



【 図 7 】



## フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I  
**G 0 1 N 33/531 (2006.01)** G 0 1 N 33/531 A  
C 1 2 R 1/19 (2006.01) C 1 2 P 21/02 C  
C 1 2 R 1:19

(72) 発明者 中尾 一和  
京都府京都市西京区大枝北沓掛町4 - 1 - 2

(72) 発明者 小坂田 史雄  
兵庫県姫路市日出町2 - 1 9 - 2 朝日プラザ姫路東3 0 5

審査官 光本 美奈子

(56) 参考文献 国際公開第9 3 / 1 0 1 5 1 ( W O , A 1 )  
特開平4 - 0 2 9 9 9 7 ( J P , A )  
特開平6 - 0 2 2 7 8 6 ( J P , A )  
J Clin Invest 106(1) p.137-144  
日本臨床第6 0 巻第1 2 号p. 2 0 0 2 - 2 0 1 2

(58) 調査した分野(Int.Cl. , D B名)

C12N 15/00 - 15/90

C07K 14/47

C07K 14/715

SwissProt/PIR/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

PubMed