

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-16453

(P2020-16453A)

(43) 公開日 令和2年1月30日(2020.1.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	Z N A 2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D 4 H O 4 5
CO 7 K 14/47 (2006.01)	CO 7 K 14/47	

審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 31 頁)

(21) 出願番号	特願2018-137627 (P2018-137627)	(71) 出願人	504150782
(22) 出願日	平成30年7月23日 (2018. 7. 23)		株式会社プロトセラ
			大阪府大阪市淀川区西中島4丁目3番22号
		(74) 代理人	110000796
			特許業務法人三枝国際特許事務所
		(72) 発明者	若林 一郎
			兵庫県西宮市武庫川町1-1 学校法人兵庫医科大学内
		(72) 発明者	田中 憲次
			大阪市淀川区西中島4丁目3番22号 新大阪長谷ビル3F 株式会社プロトセラ内
		(72) 発明者	李 良子
			大阪市淀川区西中島4丁目3番22号 新大阪長谷ビル3F 株式会社プロトセラ内
			最終頁に続く

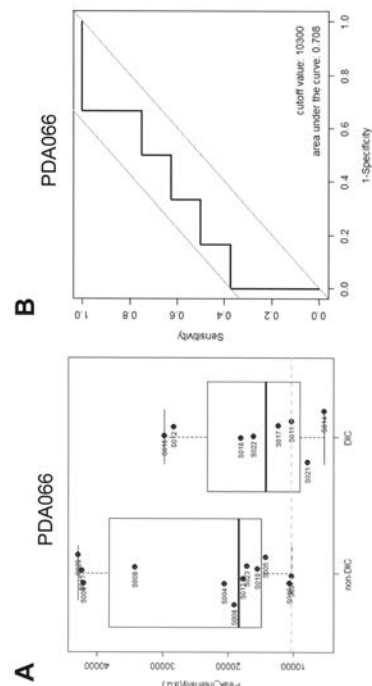
(54) 【発明の名称】 敗血症に関連する疾患のペプチドマーカー

(57) 【要約】

【課題】播種性血管内凝固症候群の検出のための新規なペプチドマーカーの提供。

【解決手段】被験者における播種性血管内凝固症候群(DIC)の検出方法は、被験者の生物試料中の、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号3で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号4で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号5で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号6で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号7で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、及び配列番号8で表されるアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択される1種又は2種以上のペプチド、その部分ペプチド、90%以上の数の同一アミノ酸配列を有するペプチド、又はその変異体ペプチドを測定することを含む。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

下記 (a)、(b)、(c) または (d) のペプチドを測定することを含む、該被験者における播種性血管内凝固症候群 (DIC) の検出方法。

(a) 被験者の生物試料中の、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 3 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 5 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 7 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、及び配列番号 8 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択される 1 種又は 2 種以上のペプチド

10

(b) 上記 (a) の各ペプチドの一部であって、配列番号 1 ~ 10 に表されるアミノ酸配列からなるペプチドの一部であって、連続する 10 個以上のアミノ酸を有する、1 種又は 2 種以上のペプチド

(c) 上記 (a) のアミノ酸配列と 90 % 以上同一のアミノ酸配列を有する、1 種又は 2 種以上のペプチド

(d) 上記 (a) のペプチドのアミノ酸配列の各々において、1 ~ 3 個のアミノ酸が付加、欠失又は置換されている、1 種又は 2 種以上のペプチド

【請求項 2】

配列番号 5 で表されるアミノ酸配列の N 末端から 4 番目のリシン、10 番目のプロリン、17 番目のプロリン、20 番目のプロリン、29 番目のプロリン、及び 34 番目のプロリンが酸化されている請求項 1 に記載の検出方法。

20

【請求項 3】

配列番号 6 で表されるアミノ酸配列の N 末端から 1 番目のプロリン、10 番目のプロリン、12 番目のプロリン、31 番目のプロリン、33 番目のプロリン、及び 36 番目のプロリンが酸化されており、28 番目のグルタミンが脱アミド化されている請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

配列番号 8 で表されるアミノ酸配列の N 末端から 1 番目のセリンがアセチル化されている請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 5】

前記生物試料が血液、血漿、血清、唾液、尿、髄液、骨髄液、胸水、腹水、関節液、涙液、眼房水、硝子体液およびリンパ液からなる群より選択される体液からなる、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

生体試料を質量分析にかけることを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記 (a)、(b)、(c) または (d) のペプチドの各々を特異的に認識する抗体を用いることを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

40

下記 (a)、(b)、(c) または (d) のペプチドの各々を特異的に認識する抗体を含む播種性血管内凝固症候群 (DIC) の検出キット。

(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 3 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 5 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 7 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、及び配列番号 8 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択される 1 種又は 2 種以上のペプチド

(b) 上記 (a) の各ペプチドの一部であって、配列番号 1 ~ 10 に表されるアミノ酸配列からなるペプチドの一部であって、連続する 10 個以上のアミノ酸を有する、1 種又

50

は 2 種以上のペプチド

(c) 上記 (a) のアミノ酸配列と 90 % 以上同一のアミノ酸配列を有する、1 種又は 2 種以上のペプチド

(d) 上記 (a) のペプチドのアミノ酸配列の各々において、1 ~ 3 個のアミノ酸が付加、欠失又は置換されている、1 種又は 2 種以上のペプチド

【請求項 9】

下記 (a)、(b)、(c) または (d) のペプチドを測定することを含む、該被験者における敗血症性ショックの検出方法。

(a) 被験者の生物試料中の、配列番号 8 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 9 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、及び配列番号 10 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択される 1 種又は 2 種以上のペプチド

(b) 上記 (a) の各ペプチドの一部であって、連続する 10 個以上のアミノ酸を有する、1 種又は 2 種以上のペプチド

(c) 上記 (a) のアミノ酸配列と 90 % 以上同一のアミノ酸配列を有する、1 種又は 2 種以上のペプチド

(d) 上記 (a) のペプチドのアミノ酸配列の各々において、1 ~ 3 個のアミノ酸が付加、欠失又は置換されている、1 種又は 2 種以上のペプチド

【請求項 10】

配列番号 8 で表されるアミノ酸配列の N 末端から 1 番目のセリンがアセチル化されている請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記生物試料が血液、血漿、血清、唾液、尿、髄液、骨髄液、胸水、腹水、関節液、涙液、眼房水、硝子体液およびリンパ液からなる群より選択される体液からなる、請求項 9 又は 10 に記載の方法。

【請求項 12】

生体試料を質量分析にかけることを含む、請求項 9 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記 (a)、(b)、(c) または (d) のペプチドを特異的に認識する抗体を用いることを特徴とする、請求項 9 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

下記 (a)、(b)、(c) または (d) のペプチドを特異的に認識する抗体を含む敗血症性ショックの検出キット。

(a) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 9 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、及び配列番号 10 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択される 1 種又は 2 種以上のペプチド

(b) 上記 (a) の各ペプチドの一部であって、連続する 10 個以上のアミノ酸を有する、1 種又は 2 種以上のペプチド

(c) 上記 (a) のアミノ酸配列と 90 % 以上同一のアミノ酸配列を有する、1 種又は 2 種以上のペプチド

(d) 上記 (a) のペプチドのアミノ酸配列の各々において、1 ~ 3 個のアミノ酸が付加、欠失又は置換されている、1 種又は 2 種以上のペプチド

【請求項 15】

下記 (a)、(b)、(c) または (d) のペプチドからなる播種性血管内凝固症候群 (DIC) の検出用ペプチド。

(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 3 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 5 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 7 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、及び配列番号 8 で表されるアミノ酸配列を有する

るペプチドからなる群から選択される１種又は２種以上のペプチド、

(b) 上記(a)の各ペプチドの一部であって、連続する１０個以上のアミノ酸を有する、１種又は２種以上のペプチド

(c) 上記(a)のアミノ酸配列と９０％以上同一のアミノ酸配列を有する、１種又は２種以上のペプチド

(d) 上記(a)のペプチドのアミノ酸配列の各々において、１～３個のアミノ酸が付加、欠失又は置換されている、１種又は２種以上のペプチド

【請求項１６】

下記 (a)、(b)、(c) または (d) のペプチドからなる敗血症性ショックの検出用ペプチド。

(a) 配列番号８で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号９で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、及び配列番号１０で表されるアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択される１種又は２種以上のペプチド

(b) 上記(a)の各ペプチドの一部であって、連続する１０個以上のアミノ酸を有する、１種又は２種以上のペプチド

(c) 上記(a)のアミノ酸配列と９０％以上同一のアミノ酸配列を有する、１種又は２種以上のペプチド

(d) 上記(a)のペプチドのアミノ酸配列の各々において、１～３個のアミノ酸が付加、欠失又は置換されている、１種又は２種以上のペプチド

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、ペプチドマーカを用いた敗血症に関連する疾患の検出方法に関し、より詳細には、ペプチドマーカを用いた敗血症に関連する疾患の判定、予防効果の判定、治療効果の判定、早期診断のための検査方法、早期治療のための検査方法、及び物質のスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【０００２】

敗血症は、感染に対する宿主生体反応の調節不全で、生命を脅かす臓器障害である。

【０００３】

敗血症が重症化すると、播種性血管内凝固症候群(DIC)の合併率が高まったり、敗血症性ショックを発症したりする。

【０００４】

DICは、国際血栓止血学会の定義によると、さまざまな原因によって引き起こされる広範な血管内の凝固亢進を特徴とする後天的な症候群であり、極めて重症になると臓器障害をきたすことがある。DICの診断基準としては、旧厚生労働省DIC診断基準、国際血栓止血学会(ISTH)DIC診断基準、日本救急医学会急性期DIC診断基準が従来から知られており、これらの基準は、基礎疾患臨床症状に加え、血小板数、フィブリン分解産物(FDP)濃度、プロトロンビン時間、フィブリノゲン濃度、等の一般的止血系検査によるスコアリングでDICの診断を行うものであるが(非特許文献１)、迅速かつ高精度なDICの診断が求められている。

【０００５】

敗血症性ショックは、敗血症のなかでも、実質的に死亡率を上昇させる重度の循環・細胞・代謝の異常を呈するものである。敗血症ショックは、循環不全と細胞機能及び代謝の異常により、死亡率が高くなった状態であるため、迅速かつ高精度なDICの早期診断が求められている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００６】

【非特許文献１】日本内科学会雑誌 第98巻 第7号・平成21年7月10日 <URL: <https://www>

10

20

30

40

50

.jstage.jst.go.jp/article/naika/98/7/98_1634/_pdf > [平成29年10月30日検索]

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、DIC及び敗血症性ショック等の敗血症に関連する疾患の迅速かつ高精度な検出方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、以下の項に記載の主題を包含する。

【0009】

項1．下記 (a)、(b)、(c)または(d)のペプチドを測定することを含む、該被験者における播種性血管内凝固症候群(DIC)の検出方法。

【0010】

(a)被験者の生物試料中の、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号3で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号4で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号5で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号6で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号7で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、及び配列番号8で表されるアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択される1種又は2種以上のペプチド

(b)上記(a)の各ペプチドの一部であって、配列番号1～10に表されるアミノ酸配列からなるペプチドの一部であって、連続する10個以上のアミノ酸を有する、1種又は2種以上のペプチド

(c)上記(a)のアミノ酸配列と90%以上同一のアミノ酸配列を有する、1種又は2種以上のペプチド

(d)上記(a)のペプチドのアミノ酸配列の各々において、1～3個のアミノ酸が付加、欠失又は置換されている、1種又は2種以上のペプチド

【0011】

項2．配列番号5で表されるアミノ酸配列のN末端から4番目のリシン、10番目のプロリン、17番目のプロリン、20番目のプロリン、29番目のプロリン、及び34番目のプロリンが酸化されている項1に記載の検出方法。

【0012】

項3．配列番号6で表されるアミノ酸配列のN末端から1番目のプロリン、10番目のプロリン、12番目のプロリン、31番目のプロリン、33番目のプロリン、及び36番目のプロリンが酸化されており、28番目のグルタミンが脱アミド化されている項1に記載の方法。

【0013】

項4．配列番号8で表されるアミノ酸配列のN末端から1番目のセリンがアセチル化されている項1に記載の方法。

【0014】

項5．前記生物試料が血液、血漿、血清、唾液、尿、髄液、骨髄液、胸水、腹水、関節液、涙液、眼房水、硝子体液およびリンパ液からなる群より選択される体液からなる、項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【0015】

項6．生体試料を質量分析にかけることを含む、項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【0016】

項7．前記(a)、(b)、(c)または(d)のペプチドの各々を特異的に認識する抗体を用いることを特徴とする、項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【0017】

10

20

30

40

50

項 8 . 下記 (a)、(b)、(c) または (d) のペプチドの各々を特異的に認識する抗体を含む播種性血管内凝固症候群 (DIC) の検出キット。

【 0 0 1 8 】

(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 3 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 5 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 7 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、及び配列番号 8 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択される 1 種又は 2 種以上のペプチド

(b) 上記 (a) の各ペプチドの一部であって、配列番号 1 ~ 1 0 に表されるアミノ酸配列からなるペプチドの一部であって、連続する 1 0 個以上のアミノ酸を有する、1 種又は 2 種以上のペプチド

(c) 上記 (a) のアミノ酸配列と 9 0 % 以上同一のアミノ酸配列を有する、1 種又は 2 種以上のペプチド

(d) 上記 (a) のペプチドのアミノ酸配列の各々において、1 ~ 3 個のアミノ酸が付加、欠失又は置換されている、1 種又は 2 種以上のペプチド

【 0 0 1 9 】

項 9 . 下記 (a)、(b)、(c) または (d) のペプチドを測定することを含む、該被験者における敗血症性ショックの検出方法。

【 0 0 2 0 】

(a) 被験者の生物試料中の、配列番号 8 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 9 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、及び配列番号 1 0 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択される 1 種又は 2 種以上のペプチド

(b) 上記 (a) の各ペプチドの一部であって、連続する 1 0 個以上のアミノ酸を有する、1 種又は 2 種以上のペプチド

(c) 上記 (a) のアミノ酸配列と 9 0 % 以上同一のアミノ酸配列を有する、1 種又は 2 種以上のペプチド

(d) 上記 (a) のペプチドのアミノ酸配列の各々において、1 ~ 3 個のアミノ酸が付加、欠失又は置換されている、1 種又は 2 種以上のペプチド

【 0 0 2 1 】

項 1 0 . 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列の N 末端から 1 番目のセリンがアセチル化されている項 9 に記載の方法。

【 0 0 2 2 】

項 1 1 . 前記生物試料が血液、血漿、血清、唾液、尿、髄液、骨髄液、胸水、腹水、関節液、涙液、眼房水、硝子体液およびリンパ液からなる群より選択される体液からなる、項 9 又は 1 0 に記載の方法。

【 0 0 2 3 】

項 1 2 . 生体試料を質量分析にかけることを含む、項 9 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 0 2 4 】

項 1 3 . 前記 (a)、(b)、(c) または (d) のペプチドを特異的に認識する抗体を用いることを特徴とする、項 9 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 0 2 5 】

項 1 4 . 下記 (a)、(b)、(c) または (d) のペプチドを特異的に認識する抗体を含む敗血症性ショックの検出キット。

【 0 0 2 6 】

(a) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 9 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、及び配列番号 1 0 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択される 1 種又は 2 種以上のペプチド

(b) 上記 (a) の各ペプチドの一部であって、連続する 1 0 個以上のアミノ酸を有す

10

20

30

40

50

る、１種又は２種以上のペプチド

(c) 上記(a)のアミノ酸配列と９０％以上同一のアミノ酸配列を有する、１種又は２種以上のペプチド

(d) 上記(a)のペプチドのアミノ酸配列の各々において、１～３個のアミノ酸が付加、欠失又は置換されている、１種又は２種以上のペプチド

【００２７】

項１５．下記 (a)、(b)、(c)または(d)のペプチドからなる播種性血管内凝固症候群(DIC)の検出用ペプチド。

【００２８】

(a) 配列番号１で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号２で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号３で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号４で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号５で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号６で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号７で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、及び配列番号８で表されるアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択される１種又は２種以上のペプチド、

(b) 上記(a)の各ペプチドの一部であって、連続する１０個以上のアミノ酸を有する、１種又は２種以上のペプチド

(c) 上記(a)のアミノ酸配列と９０％以上同一のアミノ酸配列を有する、１種又は２種以上のペプチド

(d) 上記(a)のペプチドのアミノ酸配列の各々において、１～３個のアミノ酸が付加、欠失又は置換されている、１種又は２種以上のペプチド

【００２９】

項１６．下記 (a)、(b)、(c)または(d)のペプチドからなる敗血症性ショックの検出用ペプチド。

【００３０】

(a) 配列番号８で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号９で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、及び配列番号１０で表されるアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択される１種又は２種以上のペプチド

(b) 上記(a)の各ペプチドの一部であって、連続する１０個以上のアミノ酸を有する、１種又は２種以上のペプチド

(c) 上記(a)のアミノ酸配列と９０％以上同一のアミノ酸配列を有する、１種又は２種以上のペプチド

(d) 上記(a)のペプチドのアミノ酸配列の各々において、１～３個のアミノ酸が付加、欠失又は置換されている、１種又は２種以上のペプチド

【発明の効果】

【００３１】

本発明によれば、敗血症に関連する疾患、特にDIC及び敗血症性ショックを迅速かつ極めて高い信頼性で判定できるため、該疾患の判定、予防効果の判定、治療効果の判定、早期診断、早期治療のための検査方法、及び物質のスクリーニング方法が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【００３２】

【図１】(A) １番目のバイオマーカーペプチドの箱ひげ図。縦軸：BLOTCHIP(登録商標)-MSにより分析した各ペプチドのピーク強度、横軸：(左)非DIC患者群から採取した血液のサンプル(n = 12)、(右)DIC患者群から採取した血液のサンプル(n = 8)。(B) (A)のROC曲線図。縦軸：感度(Sens;有病正診率)、横軸：特異度(Spec;無病正診率)。AUC値及びカットオフ値を図中に示した。

【図２】(A) ２番目のバイオマーカーペプチドの箱ひげ図。縦軸：BLOTCHIP(登録商標)-MSにより分析した各ペプチドのピーク強度、横軸：(左)非DIC患者群から採取した血液のサンプル(n = 12)、(右)DIC患者群から採取した血液のサンプル(n = 8)。(B) (A)のROC曲線図。縦軸：感度(Sens;有病正診率)、横軸：特異度(Spec;無病

10

20

30

40

50

正診率)。AUC値及びカットオフ値を図中に示した。

【図3】(A) 3番目のバイオマーカーペプチドの箱ひげ図。縦軸：BLOTCHIP(登録商標)-MSにより分析した各ペプチドのピーク強度、横軸：(左)非DIC患者群から採取した血液のサンプル($n = 12$)、(右)DIC患者群から採取した血液のサンプル($n = 8$)。(B) (A)のROC曲線図。縦軸：感度(Sens;有病正診率)、横軸：特異度(Spec;無病正診率)。AUC値及びカットオフ値を図中に示した。

【図4】(A) 4番目のバイオマーカーペプチドの箱ひげ図。縦軸：BLOTCHIP(登録商標)-MSにより分析した各ペプチドのピーク強度、横軸：(左)非DIC患者群から採取した血液のサンプル($n = 12$)、(右)DIC患者群から採取した血液のサンプル($n = 8$)。(B) (A)のROC曲線図。縦軸：感度(Sens;有病正診率)、横軸：特異度(Spec;無病正診率)。AUC値及びカットオフ値を図中に示した。

10

【図5】(A) 5番目のバイオマーカーペプチドの箱ひげ図。縦軸：BLOTCHIP(登録商標)-MSにより分析した各ペプチドのピーク強度、横軸：(左)非DIC患者群から採取した血液のサンプル($n = 12$)、(右)DIC患者群から採取した血液のサンプル($n = 8$)。(B) (A)のROC曲線図。縦軸：感度(Sens;有病正診率)、横軸：特異度(Spec;無病正診率)。AUC値及びカットオフ値を図中に示した。

【図6】(A) 6番目のバイオマーカーペプチドの箱ひげ図。縦軸：BLOTCHIP(登録商標)-MSにより分析した各ペプチドのピーク強度、横軸：(左)非DIC患者群から採取した血液のサンプル($n = 12$)、(右)DIC患者群から採取した血液のサンプル($n = 8$)。(B) (A)のROC曲線図。縦軸：感度(Sens;有病正診率)、横軸：特異度(Spec;無病正診率)。AUC値及びカットオフ値を図中に示した。

20

【図7】(A) 7番目のバイオマーカーペプチドの箱ひげ図。縦軸：BLOTCHIP(登録商標)-MSにより分析した各ペプチドのピーク強度、横軸：(左)非DIC患者群から採取した血液のサンプル($n = 12$)、(右)DIC患者群から採取した血液のサンプル($n = 8$)。(B) (A)のROC曲線図。縦軸：感度(Sens;有病正診率)、横軸：特異度(Spec;無病正診率)。AUC値及びカットオフ値を図中に示した。

【図8】(A) 8番目のバイオマーカーペプチドの箱ひげ図。縦軸：BLOTCHIP(登録商標)-MSにより分析した各ペプチドのピーク強度、横軸：(左)非DIC患者群から採取した血液のサンプル($n = 12$)、(右)DIC患者群から採取した血液のサンプル($n = 8$)。(B) (A)のROC曲線図。縦軸：感度(Sens;有病正診率)、横軸：特異度(Spec;無病正診率)。AUC値及びカットオフ値を図中に示した。

30

【図9】(A) 9番目のバイオマーカーペプチドの箱ひげ図。縦軸：BLOTCHIP(登録商標)-MSにより分析した各ペプチドのピーク強度、横軸：(左)敗血症性ショックに罹患していない敗血症患者群から採取した血液のサンプル($n = 10$)、(右)敗血症性ショックに罹患している敗血症患者群から採取した血液のサンプル($n = 10$) (B) (A)のROC曲線図。縦軸：感度(Sens;有病正診率)、横軸：特異度(Spec;無病正診率)。AUC値及びカットオフ値を図中に示した。

【図10】(A) 10番目のバイオマーカーペプチドの箱ひげ図。縦軸：BLOTCHIP(登録商標)-MSにより分析した各ペプチドのピーク強度、横軸：(左)敗血症性ショックに罹患していない敗血症患者群から採取した血液のサンプル($n = 10$)、(右)敗血症性ショックに罹患している敗血症患者群から採取した血液のサンプル($n = 10$) (B) (A)のROC曲線図。縦軸：感度(Sens;有病正診率)、横軸：特異度(Spec;無病正診率)。AUC値及びカットオフ値を図中に示した。

40

【図11】(A) 8番目のバイオマーカーペプチドの箱ひげ図。縦軸：BLOTCHIP(登録商標)-MSにより分析した各ペプチドのピーク強度、横軸：(左)敗血症性ショックに罹患していない敗血症患者群から採取した血液のサンプル($n = 10$)、(右)敗血症性ショックに罹患している敗血症患者群から採取した血液のサンプル($n = 10$) (B) (A)のROC曲線図。縦軸：感度(Sens;有病正診率)、横軸：特異度(Spec;無病正診率)。AUC値及びカットオフ値を図中に示した。

【発明を実施するための形態】

50

【 0 0 3 3 】

本発明は、新規かつ有用な、敗血症に関連する疾患の検出マーカーペプチド（以下、包括して「本発明のペプチド」という場合もある）を提供する。

【 0 0 3 4 】

なお、本明細書において、敗血症に関連する疾患の「検出」には、敗血症に関連する疾患の判定、予防効果の判定、治療効果の判定、診断（特には早期診断）のための検査方法、及び治療（特には早期治療）のための検査方法が含まれる。敗血症に関連する疾患の「判定」には、敗血症に関連する疾患の有無を判定することのみならず、予防的に敗血症に関連する疾患の罹患可能性を判定することや、治療後の敗血症に関連する疾患の予後を予測すること、及び敗血症に関連する疾患の治療剤の治療効果を判定することが含まれる。物質のスクリーニング方法には、敗血症に関連する疾患の「検出」、「判定」及び「治療」に有用な物質のスクリーニング方法が含まれる。

10

【 0 0 3 5 】

本明細書において、「罹患」には「発症」が含まれる。

【 0 0 3 6 】

本明細書において、「治療」とは、疾患もしくは症状の治癒又は改善、或いは症状の抑制を意味し、「予防」を含む。「予防」とは、疾患又は症状の発現を未然に防ぐことを意味する。

【 0 0 3 7 】

本発明の被験者における敗血症に関連する疾患の検出方法に用いられるペプチドは、被験者の生物試料中に見出される、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号 5 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号 6 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号 7 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドからなるペプチド、配列番号 9 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、及び配列番号 10 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドである。配列番号 1 ～ 10 のアミノ酸配列は以下の表 1 に示す通りである。

20

【 0 0 3 8 】

【表 1】

表1. 配列番号1～10で表わされるアミノ酸配列からなるペプチド

ペプチド番号	タンパク質	アミノ酸番号 (N末端/C末端)	ペプチド配列
1	α -2-HS-糖蛋白質	341-367	TVQPSVGAAAGPVWPPCPGRIRHFKV (配列番号1)
2	フィブリノーゲン α 鎖	603-629	MADEAGSEADHEGTHSTKRGHAKSRPV (配列番号2)
3	フィブリノーゲン β 鎖	45-71	GHRPLDKREEAPSLRPAPPPISGGY (配列番号3)
4	血清アルブミン	27-51	HKSEVAHRFKDLGEENFKALVIAF (配列番号4)
5	コラーゲン α -1(III)鎖	652-687	ENGKPGEPGPKGDAGAPGAPGGKGDAGAPGERGPPG (配列番号5)
6	コラーゲン α -1(I)鎖	592-628	PGKAGERGVPGPPGAVGPAGKDGEGAGAGQGPAGPA (配列番号6)
7	血清アミロイドA-2タンパク質	90-122	GAEDSLADQAANKWGRSGRDPNHFRPAGLPEKY (配列番号7)
8	血液凝固第XIII因子 A 鎖	2-38	SETSRTAFGGRRRAVPPNNSNAEEDDLPTVELQGVPR (配列番号8)
9	血清アミロイドA-1タンパク質	104-122	GRSGKDPNHFRPAGLPEKY (配列番号9)
10	フィブリノーゲン α 鎖	600-629	SYKMADEAGSEADHEGTHSTKRGHAKSRPV (配列番号10)

配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなる 1 番目のペプチドは、 α - 2 - H S - 糖蛋白質の部分配列である。配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる 2 番目のペプチドは、血液凝固第 I 因子（フィブリノーゲン） α 鎖の部分配列である。配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなる 3 番目のペプチドは、血液凝固第 I 因子（フィブリノーゲン） β 鎖の部分配列である。配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなる 4 番目のペプチドは、血清アルブミンの部分配列である。配列番号 5 で表されるアミノ酸配列からなる 5 番目のペプチド及び配列番号 6 で表されるアミノ酸配列からなる 6 番目のペプチドは、コラーゲン α - 1 の部分配列である。配列番号 7 で表されるアミノ酸配列からなる 7 番目のペプチドは、血清アミロイド A - 2 タンパク質の部分配列である。配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなる 8 番目のペプチドは、血液凝固第 XIII 因子（ γ グルタミルトランスフェラーゼ）の部分配列である。配列番号 9 で表されるアミノ酸配列からなる 9 番目のペプチドは、血清アミロイド A - 1 タンパク質の部分配列である。配列番号 10 で表されるアミノ酸配列からなる 10 番目のペプチドは、血液凝固第 I 因子（フィブリノーゲン） α 鎖の部分配列である。

10

【0040】

1 ~ 8 番目のペプチドは、DIC の検出、特に DIC の罹患の有無の判定又は診断に有用な特異的マーカーとして使用することができる。DIC 群患者では、1 ~ 6 , 8 番目のペプチドの量は非 DIC 群患者に比べて減少するが、7 番目のペプチドの量が非 DIC 群患者に比べて上昇する。

【0041】

20

8 ~ 10 番目のペプチドは、敗血症性ショックの検出、特に敗血症性ショックの罹患の有無の判定又は診断に有用な特異的マーカーとして使用することができる。敗血症性ショック患者では、8 番目及び 9 番目のペプチドの量が敗血症性ショックに罹患していない敗血症患者に比べて減少するが、10 番目のペプチドの量は敗血症性ショックに罹患していない敗血症患者に比べて上昇する。

【0042】

DIC 発病及び敗血症性ショックの発症によるこのようなペプチドの増減のデータは今までに存在しなかった。以上の成績と理論から、本特許がカバーするペプチドとそれを使用した検査、判定、診断、診察、物質スクリーニング法は、播種性血管内凝固症候群（DIC）及び敗血症性ショックを含む敗血症に関連する疾患に適応可能である。

30

【0043】

本発明においては、上記のインタクトなペプチドをマーカーとして用いることが好ましいが、配列番号 1 ~ 10 に表されるアミノ酸配列からなるペプチドの一部であるペプチド、配列番号 1 ~ 10 に表されるアミノ酸配列と 90 % 以上同一のアミノ酸配列を有するペプチド、ならびに配列番号 1 ~ 10 に表されるアミノ酸配列において、1 個または数個（好ましくは 1 ~ 3 個、より好ましくは 1 または 2 個）のアミノ酸が修飾、特に欠失、置換、付加されたアミノ酸配列からなる変異体ペプチドも、本発明の方法においてバイオマーカーとして用いることができる。

【0044】

40

本発明において使用するペプチドが配列番号 1 ~ 10 に表されるアミノ酸配列からなるペプチドの一部である場合、かかる部分ペプチドは、配列番号 1 ~ 10 の各ペプチドのアミノ酸残基のうち、連続する 10 個以上のアミノ酸を意味し、好ましくは連続する 15 個以上のアミノ酸を意味し、より好ましくは連続する 20 個以上のアミノ酸を意味し、より好ましくは連続する 23 個以上、さらにより好ましくは連続する 25 個以上のアミノ酸を意味する（ただし、配列番号 1 ~ 10 のペプチドの各ペプチドの全長を上限とする）。

【0045】

配列番号 1 ~ 10 に表される全長アミノ酸配列と 90 % 以上同一のアミノ酸配列を有するペプチドは、その全長が、配列番号 1 ~ 10 に表されるアミノ酸配列の長さ以下であることが好ましい。また、かかるペプチドの配列同一性は、配列番号 1 ~ 10 に表される全長アミノ酸配列に対し、95 % 以上であることが好ましく、98 % 以上であることがより

50

好ましい。

【0046】

さらに、本発明のペプチドは、特定のアミノ酸に酸素原子が結合して酸化されたり、リン酸化されたり、N-アセチル化されたり、S-システイン化されたりしている場合がある。このような場合も、配列番号1～10で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである限り、本発明の範囲に包含される。

【0047】

好ましくは、配列番号5で表されるアミノ酸配列のN末端から4番目のリシン、10番目のプロリン、17番目のプロリン、20番目のプロリン、29番目のプロリン、及び34番目のプロリンが酸素で酸化されている。

10

【0048】

好ましくは、配列番号6で表されるアミノ酸配列のN末端から1番目のプロリン、10番目のプロリン、12番目のプロリン、31番目のプロリン、33番目のプロリン、及び36番目のプロリンが酸素により酸化されており、28番目のグルタミンが脱アミド化されている。

【0049】

好ましくは、配列番号8で表されるアミノ酸配列のN末端から1番目のセリンがアセチル化されている。

【0050】

なお、配列番号1～10で表されるアミノ酸配列を有するペプチドの上記修飾体は、質量分析にて非修飾体（インタクト）と区別が可能であり、疾患の検出、判定及び治療等には修飾ペプチドまたは非修飾ペプチドのいずれを適切な状況で使用することも本発明の範囲に包含される。

20

【0051】

本発明は、被験者の生物試料中の、上記の10個の本発明のペプチドのうちの1種又は2種以上を測定することを含む、該被験者における敗血症に関連する疾患の検出又は判定方法を包含する。

【0052】

好ましい一つの実施形態において、被験者における敗血症に関連する疾患は播種性血管内凝固症候群（DIC）であり、本発明のペプチドは、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号3で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号4で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号5で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号6で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号7で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、及び配列番号8で表されるアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択される1種又は2種以上のペプチドである。

30

【0053】

別の一つの実施形態において、被験者における敗血症に関連する疾患は敗血症性ショックであり、本発明のペプチドは、配列番号8で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号9で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、及び配列番号10で表されるアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択される1種又は2種以上のペプチドである。

40

【0054】

被験者には、敗血症に関連する疾患に罹患していると疑われる患者を含み、「敗血症に関連する疾患に罹患していると疑われる被検者」は、被検者本人が主観的に疑いを抱く者（何らかの自覚症状がある者に限らず、単に予防検診の受診を希望する者を含む）であっても、何らかの客観的な根拠に基づく者（例えば、従来公知の臨床検査（例、心拍、血圧、血液又は尿検査）および/または診察の結果、敗血症に関連する疾患の合理的な罹患可能性があると医師が判断した者）であってもよい。

【0055】

50

「ペプチドを測定する」とはペプチドの濃度、量、又はシグナル強度を測定することを指す。

【0056】

被験試料となる被検者由来の生体試料は特に限定されないが、被検者への侵襲が少ないものであることが好ましく、例えば、血液、血漿、血清、唾液、尿、涙液など生体から容易に採取できるものや、髄液、骨髄液、胸水、腹水、関節液、眼房水、硝子体液、リンパ液など比較的容易に採取されるものが挙げられる。一実施形態では、生物試料が血液、血漿、血清、唾液、尿、髄液、骨髄液、胸水、腹水、関節液、涙液、眼房水、硝子体液およびリンパ液からなる群より選択される体液からなる。血清や血漿を用いる場合、常法に従って被検者から採血し、前処理を施さず直接、又は液性成分を分離することにより分析に 10
かける被験試料を調製することができる。検出対象である本発明のペプチドは必要に応じて、抗体カラムやスピンカラムなどを用いて、予め高分子量の蛋白質画分などを分離除去しておくこともできる。

【0057】

生体試料中の、本発明のペプチドの検出は、例えば、生体試料を各種の分子量測定法、例えば、ゲル電気泳動や、各種の分離精製法（例：イオン交換クロマトグラフィ、疎水性 20
クロマトグラフィ、アフィニティークロマトグラフィ、逆相クロマトグラフィなど）、表面プラズモン共鳴法、イオン化法（例：電子衝撃イオン化法、フィールドディソープション法、二次イオン化法、高速原子衝突法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化（MALDI）法、エレクトロスプレーイオン化法など）、および質量分析計（例：二重収束質量分 20
析計、四重極型分析計、飛行時間型質量分析計、フーリエ変換質量分析計、イオンサイクロトロン質量分析計、免疫質量分析計、安定同位体ペプチドを内部標準にした質量分析計、免疫顕微鏡計など）を組み合わせる方法等に供し、該ペプチドの分子量と一致するバンドもしくはスポット、あるいはピークを検出することにより行うことができるが、これらに限定されない。

【0058】

本発明のペプチドを精製してそれらを認識する抗体を作製し、ELISA、RIA、イムノクロマト法、表面プラズモン共鳴法、ウェスタンブロッティング、免疫質量分析法や各種イムノアッセイ、免疫顕微鏡法により該ペプチドを検出する方法もまた、好ましく用いられ得る。さらに上記方法のハイブリッド型検出法も有効である。 30

【0059】

本発明の検出又は判定方法における特に好ましい測定法の1つは、飛行時間型質量分析に使用するプレートの表面に被験試料を接触させ、該プレート表面に捕捉された成分の質量を飛行時間型質量分析計で測定する方法が挙げられる。飛行時間型質量分析計に適合可能なプレートは、検出対象である本発明のペプチドを効率よく吸着し得る表面構造（例：官能基付加ガラス、Si、Ge、GaAs、GaP、SiO₂、SiN₄、改質シリコン、種々のゲルまたはポリマーのコーティング）を有している限り、いかなるものであってもよい。

【0060】

好ましい実施態様においては、質量分析用プレートとして用いられる支持体は、ポリビニリデンジフロリド（PVDF）、ニトロセルロースまたはシリカゲル、特に好ましくはPVDF 40
で薄層コーティングされた基材である（WO 2004/031759を参照）。かかる基材は、質量分析用プレートにおいて使用されているものであれば、特に限定されず、例えば、絶縁体、金属、導電性ポリマー、それらの複合体などが挙げられる。かかるPVDFで薄層コーティングされた質量分析用プレートとして、好ましくは株式会社プロトセラ社のプロットチップ（BLOTCHIP、登録商標）などが挙げられる。BLOTCHIP（登録商標）を用いると、一つのステップでペプチドを直接転写でき、アルブミン等によるサンプルの前処理が不要であり、従来は検出できなかった低濃度（フェムトモル～ピコモル）のペプチドが検出できる。代わりに、質量分析用プレートは、支持体表面を塗布、噴霧、蒸着、浸漬、印刷、スパッタリング等の公知の手段でコーティングすることにより、公知の方法により調製することもできる。また、質量分析用プレート上の分子を質量分析する方法自体は公知である（例 50

えばWO 2004/031759)。WO 2004/031759に記載の方法を、必要に応じて適宜改変して使用することができる。

【0061】

被験試料の質量分析用プレート（支持体）への移行は、被験試料となる被検者由来の生体試料を未処理のままで、あるいは抗体カラムその他の方法で高分子タンパク質を除去、濃縮した後に、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動もしくは等電点電気泳動に付し、泳動後ゲルをプレートと接触させて転写（プロッティング）することにより行われる。転写の方法自体は公知であり、好ましくは電気転写が用いられる。電気転写時に使用する緩衝液としては、pH 7~9、低塩濃度の公知の緩衝液を用いることが好ましい（例えばトリス緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、酢酸緩衝液など）。

10

【0062】

上記の方法により支持体表面上に捕捉された被験試料中の分子を質量分析することにより、分子量に関する情報から、標的分子である本発明のペプチドの存在および量を同定することができる。質量分析装置からの情報を、任意のプログラムを用いて、非罹患がん患者、処置後の患者（フォローアップ）、もしくは健常人由来の生体試料における質量分析データと比較して、示差的な（differential）情報として出力させることも可能である。そのようなプログラムは周知であり、また、当業者は、公知の情報処理技術を用いて、容易にそのようなプログラムを構築もしくは改変することができることが理解されよう。

【0063】

高精度な質量分析結果を得るためには、高速液体クロマトグラフィに接続した三連四重極型等の質量分析装置を用いて分析する。標的分子の安定同位体標識ペプチドを合成して、それを既知量の内部標準品として被験試料に混合し、逆相固相担体等でペプチド画分の粗精製を実施する。高速液体クロマトグラフィに導入後、分離された各ペプチドは質量分析装置内でイオン化され、その後コリジョンセル内で断片化、得られたペプチドフラグメントをmultiple reaction monitoring法により定量する。この際、安定同位体標識ペプチドを内部標準として用いることでCV値が5%以下の実測データを取得できる。安定同位体標識ペプチドは、Cambridge Isotope Laboratory (MA, USA) より購入した安定同位体標識アミノ酸（アミノ酸a($^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$)は、安定同位体炭素（原子量13）6個と、安定同位体窒素（原子量15）2個で置換された質量数が元のアミノ酸より8原子量増加したアミノ酸aを例示）を元のアミノ酸の配列位置に置換して既存の合成法（たとえばF-mocによる固相反応）により得られる。質量分析は株式会社プロトセラ社のBLOTCHIP（登録商標）システムでも実施可能であり、これらの方法は抗体を使用しない検出装置として臨床使用できる。

20

30

【0064】

上記の質量分析による検出において、タンデム質量分析（MS/MS）法を用いてペプチドを同定することができ、かかる同定法としては、MS/MSスペクトルを解析してアミノ酸配列を決定するde novo sequencing法と、MS/MSスペクトル中に含まれる部分的な配列情報（質量タグ）を用いてデータベース検索を行い、ペプチドを同定する方法等が挙げられる。また、MS/MS法を用いることにより、直接本発明のペプチドのアミノ酸配列を同定し、該配列情報に基づいて該ペプチドの全部もしくは一部を合成し、これを以下の抗体に対する抗原として利用することもできる。

40

【0065】

本発明のペプチドの測定は、それに対する抗体を用いて行うこともできる。よって、本発明は、ペプチドを特異的に認識する抗体を用いた敗血症に関連する疾患の検出又は判定方法、かかる抗体を含む敗血症に関連する疾患の検出又は判定剤、ならびにかかる抗体を含む敗血症に関連する疾患の検出又は判定キットを含む。かかる方法は、最適化されたイムノアッセイ系を構築してこれをキット化すれば、上記質量分析装置のような特殊な装置を使用することなく、高感度かつ高精度に該ペプチドを検出することができる点で、特に有用である。

【0066】

本発明のペプチドに対する抗体は、例えば、本発明のペプチドを、これを発現する患者

50

由来の生体試料から単離・精製し、該ペプチドを抗原として動物を免疫することにより調製することができる。あるいは、得られるペプチドの量が少量である場合は、RT-PCRによる該ペプチドをコードするcDNA断片の増幅等の周知の遺伝子工学的手法によりペプチドを大量に調製することができ、あるいはかかるcDNAを鋳型として、無細胞転写・翻訳系を用いて本発明のペプチドを取得することもできる。さらに有機合成法により大量に調製することも可能である。

【0067】

本発明のペプチドに対する抗体（以下、「本発明の抗体」と称する場合がある）は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれであってもよく、周知の免疫学的手法により作製することができる。また、該抗体は完全抗体分子だけでなくそのフラグメントをも包含し、例えば、Fab、F(ab')₂、ScFv、およびminibody等が挙げられる。

10

【0068】

例えば、ポリクローナル抗体は、本発明のペプチドを抗原として、市販のアジュバント（例えば、完全または不完全フロイントアジュバント）とともに、動物の皮下あるいは腹腔内に2～3週間おきに2～4回程度投与し、最終免疫後に全血を採取して抗血清を精製することにより取得できる。抗原を投与する動物としては、ラット、マウス、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、モルモット、ハムスターなど、目的の抗体を得ることができる哺乳動物が挙げられる。

【0069】

また、モノクローナル抗体は、細胞融合法により作成することができる。モノクローナル抗体を調製するための技法の説明は、Stites et al, Basic and Clinical Immunology . (Lang Medical Publications Los Altos, CA, 4th Edition) and references therein , , in particular Koehler, G. & Milstein, C. Nature 256, 495-497 (1975).に見出され得る。例えば、本発明のペプチドを市販のアジュバントと共にマウスに2～4回皮下あるいは腹腔内に投与し、最終投与後に脾臓あるいはリンパ節を採取し、白血球を採取する。この白血球と骨髓腫細胞（例えば、NS-1, P3X63Ag8など）を細胞融合して該ペプチドに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得る。所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、周知のEIAまたはRIA法等を用いて抗原と特異的に結合する抗体を、培養上清中から検出することにより選択できる。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養は、インビトロ、またはマウスもしくはラット、このましくはマウス腹水中等のインビボで行うことができ、抗体はそれぞれハイブリドーマの培養上清および動物の腹水から取得することができる。

20

30

【0070】

抗体を用いる本発明の検出又は判定方法は、特に制限されるべきものではなく、被験試料中の抗原量に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法等が好適に用いられる。測定に際し、抗体または抗原は、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、または発光物質等の標識剤と結合され得る。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。これら個々の免疫学的測定法は、当業者の通常の技能により、本発明の定量方法に適用可能である。

40

【0071】

本発明のペプチドはタンパク質分解産物からなるため、未分解のタンパク質や、切断部位が共通の類似ペプチド等様々な分子が測定値に影響を与える可能性がある。そこで、第1工程において、生体試料を抗体により免疫アフィニティ精製し、抗体に結合したフラクションを、第2工程において質量分析に付し、精緻な分子量を基準に同定、定量する、いわゆる免疫質量分析法を利用することができる（例えば、Rapid Commun. Mass Spectrom . 2007, 21: 352-358を参照）。免疫質量分析法によれば、未分解のタンパク質も類似ペプチドも、質量分析計で完全に分離され、バイオマーカーの正確な分子量を基準に高い特

50

異度と感度で定量が可能となる。

【0072】

あるいは、本発明の抗体を用いる別の本発明の検出又は判定方法として、該抗体を上記したような質量分析計に適合し得るチップの表面上に固定化し、該チップ上の該抗体に被検試料を接触させ、該抗体に捕捉された生体試料成分を質量分析にかけ、該抗体が認識するマーカーペプチドの分子量に相当するピークを検出する方法が挙げられる。

【0073】

上記のいずれかの方法により測定された被検者由来試料中の本発明のペプチドのレベルが、非敗血症に関連する疾患患者、処置後の患者もしくは健常人由来の対照試料中の該ペプチドレベルに比べて有意に変動している場合、該被検者は敗血症に関連する疾患に罹患している可能性が高いと判定することができる。

10

【0074】

本発明のペプチドは、それぞれ単独でも敗血症に関連する疾患の検出マーカーとして利用することができるが、2種以上を組み合わせることにより、感度（有病正診率）および特異度（無病正診率）をより高めることができる。

【0075】

2種以上のペプチドをマーカーとして用いる場合の検出手法としては、例えば、(1) 測定対象であるすべてのペプチドについてレベルが有意に変動する場合に敗血症に関連する疾患に罹患していると判定し、いずれかのペプチドについてレベルが有意に変動しない場合に敗血症に関連する疾患に罹患していないと判定する方法、(2) 測定対象であるすべてのペプチドについてレベルが有意に変動しない場合に敗血症に関連する疾患に罹患していないと判定し、いずれかのペプチドについてレベルが有意に変動した場合に敗血症に関連する疾患に罹患していると判定する方法、(3) 測定対象であるn個のペプチドのうち、例えば、2～(n-1)個以上のペプチドについて、レベルが有意に変動する場合に敗血症に関連する疾患に罹患していると判定する方法、さらに各ペプチド間で重みを持たせる方法、ならびに(4) バギング法、ブースティング法、ランダムフォレスト法などの機械学習法、などが考えられるが、特に複数のマーカーペプチドを1つのマーカーセットとして取り扱うことが出来る解析手法である多変量ロジスティック回帰分析を用いることが好ましい。この場合、マーカーとして用いるペプチドの数は特に限定されないが、好ましくは2種以上、より好ましくは3～6種、さらにより好ましくは3～5種である。

20

30

【0076】

本願では、質量分析により特定された候補ペプチドの多変量ロジスティック回帰モデルを最尤法により構築したところ、ROCの曲線下面積（AUC）が高い（5つのマーカーペプチドで0.9を超える）極めて信頼性の高い敗血症に関連する疾患の検出又は判定が可能であることを見出した。検出又は測定されるペプチドの数が多いほど、検査の精度は向上する。

【0077】

検出又は測定されるペプチドの数は、本発明の検査方法におけるAUCが或る閾値を超える値となる数であることが好ましい。閾値は0.5を超えることが好ましく、0.6を超えることがより好ましく、0.7を超えることがさらに好ましい。ペプチドの数を増やすほど約1に近づけることが可能である。

40

【0078】

配列番号1～10で表わされるアミノ酸配列を有する複数のペプチドの血中濃度の関数であるロジスティック回帰モデルによれば、AUCがより1に近づき、高い精度で敗血症に関連する疾患を検出することができる。

【0079】

本発明の検出方法は、患者から時系列で生体試料を採取し、各試料における本発明のペプチドの発現の経時変化を調べることにより行うこともできる。生体試料の採取間隔は特に限定されないが、患者のQOLを損なわない範囲でできるだけ頻繁にサンプリングすることが望ましく、例えば、血漿もしくは血清を試料として用いる場合、約1日～約1週間

50

の間隔で採血を行うことが好ましい。

【0080】

さらに、上記時系列的なサンプリングによる敗血症に関連する疾患の検出方法は、前回サンプリングと今回サンプリングとの間に、被検者である患者に対して該疾患の治療措置が講じられた場合に、当該措置による治療効果を評価するのに用いることができる。即ち、治療の前後にサンプリングした試料について、治療後の状態が治療前の状態と比較して病態の改善が認められると判定された場合に、当該治療の効果があったと評価することができる。一方、治療後の状態が治療前の状態と比較して病態の改善が認められない、あるいはさらに悪化していると判定された場合には、当該治療の効果がなかったと評価することができる。

10

【0081】

さらに、上記時系列的なサンプリングによる敗血症に関連する疾患の検出のための検査方法は、食事療法、禁煙、運動療法、有害環境からの隔離等、敗血症に関連する疾患の罹患リスク低減措置後の予防効果を評価するのに用いることができる。即ち、罹患リスクの低減措置の施行の前後にサンプリングした試料について、施行後の状態が施行前の状態と比較して病態の発症もしくは進行が認められないと判定された場合に、当該措置の施行の効果があったと評価することができる。一方、治療後の状態が治療前の状態と比較して病態の改善が認められない、あるいはさらに悪化していると判定された場合には、当該措置の施行の効果がなかったと評価することができる。

20

【0082】

従って、本発明のペプチドならびに方法は、敗血症に関連する疾患を診断または検出するマーカーのみならず、敗血症に関連する疾患の予後を予測するマーカー、ならびに治療効果判定のマーカーともなり得る。すなわち、本発明のペプチドならびに方法は、敗血症に関連する疾患の治療の創薬標的分子のスクリーニングに、および/または患者（リスボンダー）の選別もしくは薬の投与量（用量）の調節のためのコンパニオン診断薬として使用することができる。

30

【0083】

また、本発明のペプチドならびに方法は、物質のスクリーニング方法に使用できる。この場合の物質には、敗血症に関連する疾患を未病段階で防止する健康食品やトクホ製品などの食品類、敗血症に関連する疾患を診断または検出するマーカー類、及び罹患後の敗血症に関連する疾患を治療する治療薬医薬品類が含まれる。

40

【0084】

一実施形態において、本発明は、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号3で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号4で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号5で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号6で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号7で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号8で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号9で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、及び配列番号10で表されるアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択される1種又は2種のペプチド、配列番号1～10に表されるアミノ酸配列からなるペプチドの一部であって、連続する10個以上のアミノ酸を有するペプチド、配列番号1～10に表されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択される1種又は2種のペプチド、配列番号1～10に表されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択される1種又は2種のペプチド、または配列番号1～10に表されるアミノ酸配列において、1個または数個（好ましくは1～3個、より好ましくは1または2個）のアミノ酸が修飾、特に欠失、置換、付加されたアミノ酸配列からなるペプチドからなる群から選択される1種又は2種のペプチドの各々に対する抗体を含む敗血症に関連する疾患の検出キットを包含する。

50

【0085】

上記検出キットの好ましい一つの実施形態において、被験者における敗血症に関連する疾患は播種性血管内凝固症候群（DIC）であり、上記抗体は、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号3で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号4で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号5で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号6で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号7で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、及び配列番号8で表されるアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択される1種又は2種以上のペプチド、配列番号1～10に表されるアミノ酸配列からなるペプチドの一部であって、連続する10個以上のアミノ酸を有するペプチド、配列番号1～10に表されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択される1種又は2種のペプチド、または配列番号1～8に表されるアミノ酸配列において、1個または数個（好ましくは1～3個、より好ましくは1または2個）のアミノ酸が修飾、特に欠失、置換、付加されたアミノ酸配列からなるペプチドからなる群から選択される1種又は2種のペプチドの各々に対する抗体である。

10

【0086】

上記検出キットの別の好ましい一つの実施形態において、敗血症に関連する疾患は敗血症性ショックであり、上記抗体は、配列番号8で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号9で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、及び配列番号10で表されるアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択される1種又は2種以上のペプチド、配列番号8～10に表されるアミノ酸配列からなるペプチドの一部であって、連続する10個以上のアミノ酸を有するペプチド、配列番号8～10に表されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択される1種又は2種のペプチド、または配列番号8～10に表されるアミノ酸配列において、1個または数個（好ましくは1～3個、より好ましくは1または2個）のアミノ酸が修飾、特に欠失、置換、付加されたアミノ酸配列からなるペプチドからなる群から選択される1種又は2種のペプチドの各々に対する抗体である。

20

【0087】

本発明のペプチドは、敗血症に関連する疾患の創薬ターゲットを提供することにもできる。即ち、該ペプチドそれ自体が該疾患の治療（寛解）方向に生理機能を持つ（「治療ペプチド」という）場合、該ペプチドの量もしくは活性を増大させる物質を患者に投与することにより、該疾患を治療することができる。

30

【0088】

本発明はまた、治療ペプチドとしての本発明のペプチドの量もしくは活性を増大させる物質を含有してなる、敗血症に関連する疾患の治療剤を提供する。そのような治療ペプチドとしての本発明のペプチドの量もしくは活性を増大させる物質の有効量が、敗血症に関連する疾患の患者に投与される。

【0089】

上記治療剤の好ましい一つの実施形態において、被験者における敗血症に関連する疾患は播種性血管内凝固症候群（DIC）であり、上記治療ペプチドは、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号3で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号4で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号5で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号6で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号7で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、及び配列番号8で表されるアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択される1種又は2種以上のペプチド、配列番号1～10に表されるアミノ酸配列からなるペプチドの一部であって、連続する10個以上のアミノ酸を有するペプチド、配列番号1～10に表されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択される1種又は2種のペプチド、または配列番号1～8に表されるアミノ酸配列において、1個または数個（好ましくは1～3個、より好ましくは1または2個）のアミノ酸が修飾、特に欠失、置換、付加されたアミノ酸配列からなるペプチド

40

50

からなる群から選択される 1 種又は 2 種のペプチドである。

【0090】

上記治療剤の別の好ましい一つの実施形態において、敗血症に関連する疾患は敗血症性ショックであり、上記治療ペプチドは、配列番号 8 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号 9 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、及び配列番号 10 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択される 1 種又は 2 種以上のペプチド、配列番号 8 ~ 10 に表されるアミノ酸配列からなるペプチドの一部であって、連続する 10 個以上のアミノ酸を有するペプチド、配列番号 8 ~ 10 に表されるアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択される 1 種又は 2 種のペプチド、または配列番号 8 ~ 10 に表されるアミノ酸配列において、1 個または数個（好ましくは 1 ~ 3 個、より好ましくは 1 または 2 個）のアミノ酸が修飾、特には欠失、置換、付加されたアミノ酸配列からなるペプチドからなる群から選択される 1 種又は 2 種のペプチドである。

10

【0091】

具体的には、治療ペプチドとしての本発明のペプチドの活性を増大させる物質としては、該ペプチド自体あるいはそれと同様のアゴニスト作用を有する分子が挙げられる。あるいは、治療ペプチドとしての本発明のペプチドの活性を増大させる物質として、該ペプチドの非中和抗体、好ましくはアゴニスト抗体なども挙げることができる。

【0092】

治療ペプチドとしての本発明のペプチドの量もしくは活性を増大させる物質は、常套手段に従って製剤化することができる。

20

【0093】

例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。かかる経口剤には、脳血管障壁(BBB)を通過する性状を持つものも含まれる。

【0094】

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤F、点滴注射剤、関節内注射剤などの剤形を包含する。注射剤、坐剤などでは、有効成分（該ペプチド）の血中濃度の延長や吸収効率の増加を目的に、既存の方法による化学修飾（糖鎖、PEGその他）体が使用される。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記化合物またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記化合物またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。かかる注射剤には、脳血管障壁(BBB)を通過する性状を持つものも含まれる。

30

【0095】

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり非生物学的製剤では通常 5 ~ 500 mg、とりわけ注射剤では 5 ~ 100 mg、その他の剤形では 10 ~ 250 mg の上記化合物が含有され、生物学的製剤の注射剤では 10 ~ 50000 mg の上記化合物が含有されていることが好ましい。

40

【0096】

なお前記した各組成物は、上記治療ペプチドとしての本発明のペプチドの量もしくは活性を増大させる物質との配合により、好ましくない相互作用を生じない限り、他の活性成分を含有してもよい。

50

【 0 0 9 7 】

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトに対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

【 0 0 9 8 】

治療ペプチドとしての本発明のペプチドの量もしくは活性を増大させる物質の投与量は、その作用、投与ルート、患者の重篤度、年齢、体重、薬物受容性などにより差異はあるが、例えば、成人1日あたり活性成分量として非生物学的製剤では約0.0008～約25mg/kg、好ましくは約0.008～約2mg/kgの範囲であり、これを1回もしくは数回に分けて投与することができる。生物学的製剤の注射剤では10～5000mg/kg、好ましくは約10～約2000mg/kgの範囲であり、これを1回もしくは数回に分けて投与することができる。

10

【 0 0 9 9 】

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明がこれらに限定されないことは言うまでもない。

【 0 1 0 0 】

本明細書中に引用されているすべての特許出願および文献の開示は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれるものとする。

【 実施例 】

【 0 1 0 1 】

実施例 1

20

(材料および方法)

1. 被験者

入院中の敗血症に罹患した20名の成人患者が本研究に参加した。これらの患者はDIC発症の有無でDIC未発症検体群(non-DIC)およびDIC発症検体群(DIC)の2群に群分けされると共に、敗血症性ショックの有無で敗血症性ショックに罹患していない敗血症検体群(敗血症)と敗血症性ショックに罹患している敗血症性ショック検体群(敗血症性ショック)との群分けされた(表2)。

DICの診断基準

International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH)によるDIC診断基準(Thromb Haemost. 2001 Nov;86(5):1327-30参照)を用いた。

30

敗血症の診断基準

感染によって発症した全身性炎症反応症候群(SIRS)と定義し、SIRSはBoneらの基準(Crit Care Med 1989; 17(5): 389-93参照)により診断した。

敗血症性ショックの診断基準

重症敗血症の中で、血圧低下を伴い、十分な急速輸液負荷をおこなっても血圧が回復しないものと定義し、American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conferenceによる診断基準(Crit Care Med 1992; 20(6): 864-74参照)を用いた。

【 0 1 0 2 】

【表 2】

表2

検体No.	DIC	敗血症	検体ID
1	DIC	敗血症	S011
2	non-DIC	敗血症	S004
3	non-DIC	敗血症	S005
4	non-DIC	敗血症	S006
5	non-DIC	敗血症	S007
6	non-DIC	敗血症	S008
7	non-DIC	敗血症	S009
8	non-DIC	敗血症	S010
9	non-DIC	敗血症	S019
10	non-DIC	敗血症	S023
11	DIC	敗血症性ショック	S012
12	DIC	敗血症性ショック	S014
13	DIC	敗血症性ショック	S016
14	DIC	敗血症性ショック	S017
15	DIC	敗血症性ショック	S018
16	DIC	敗血症性ショック	S021
17	DIC	敗血症性ショック	S022
18	non-DIC	敗血症性ショック	S013
19	non-DIC	敗血症性ショック	S015
20	non-DIC	敗血症性ショック	S020

10

20

【 0 1 0 3 】

2 . 血液サンプルの採取

患者の動脈血のサンプルを22G針を用いて橈骨動脈より動脈血を採取し、血液採取管に入れた。それらのサンプルを室温で1時間静置し、3,000rpmで10分間室温にて遠心分離し、血清を得た。上清を使用するまで-80 で分けて保存した。

【 0 1 0 4 】

3 . BLOTCHIP (登録商標) による質量分析

血清中の質量分析によるペプチド解析を、ペプチドームプロファイリングの迅速定量法である、ワンステップの直接転写技術のBLOTCHIP (登録商標) 質量分析により行った (Biochem . Biophys . Res . Commun . 2009;379(1):110-4)。

30

【 0 1 0 5 】

まず、血清サンプルをドデシル硫酸ナトリウム (SDS) ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) に供し、ペプチドをタンパク質と分離した。次に、ゲル中のペプチドをBLOTCHIP (登録商標) (株式会社プロトセラ、尼崎市所在) に電気転写した。転写終了後、チップの表面を超純水でリンスし、BLOTCHIP (登録商標) に直接マトリックス (α-シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸, Sigma-Aldrich Co., アメリカ合衆国ミズーリ州) を塗布後、UltraFlex II TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics社製、アメリカ州マサチューセッツ州) の反射モードで、Proteomics 11:2727-2737. に記載された通りに質量分析を行い、ペプチドプロファイルを得た。

40

【 0 1 0 6 】

4 . ペプチドの統計解析

サンプルはBLOTCHIP (登録商標) 質量分析により4回繰り返し解析した。より統計学的に有意なピークを見出すために、4つのデータを独立データとして使用し、解析ソフトClinProTools 2.2 (Bruker Daltonics社製) を使用してウィルコクソン検定のP値を計算し、P値が0.05以下の場合に有意差ありとみなした。

【 0 1 0 7 】

統計解析ソフトR (R Core Team (2013) . R: A language and environment for statistical computing . R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria . URL <http://www.R-project.org/>)

50

p://www.R-project.org/.) によりウィルコクソン検定の p 値を計算するために、一つのサンプル当たりの4つのデータの平均値を用いてペプチドの診断性能を評価した。モデルの構築には統計解析ソフトR (R Core Team (2013))を使用した。

【 0 1 0 8 】

構築したモデルの診断能の評価のために R O C 分析を実施した。Rのパッケージである "Epi パッケージ" (A package for statistical analysis in epidemiology、Version 1.1 49、<http://cran.r-project.org/web/packages/Epi/index.html>) を用いた。A U C は R O C 曲線から計算した。診断のための最適カットオフ値は、Cancer 1950;3:32-5のYouden 's indexに従って決定でき、95%信頼区間は、ノンパラメトリックなブートストラップ抽出を用いて推定した。

10

【 0 1 0 9 】

5 . ペプチドの同定

各標的ペプチドを含む血清を、その同定のために採取した。ペプチドは、Sep-Pak C18 固相抽出カートリッジ (Waters Corporation、アメリカ合衆国マサチューセッツ州ミルフォード) を用いて、0.1%トリフルオロ酢酸を含む水に80%v/v アセトニトリル (ACN) で抽出した。溶出液をCC-105 遠心濃縮器 (株式会社トミー精工、東京) を用いて100 μ L以下に濃縮した。次に溶液を0.065% TFAを含む2%v/v CAN水溶液400 μ L (溶離液Aと称する) に希釈し、C 1 8 シリカカラム (COSMOSIL (登録商標) 5C18-AR-II) (ナカライテスク株式会社、京都) を装備したAEKTA精製装置 (GE Healthcare UK Ltd、英国バッキンガムシャー州) にかけた。溶出液を、溶離液Aに対し0.05% TFAを含む80%v/v CANの水溶液で1.0mL/分の流速で0-100%の線形勾配により20個の画分 (各1mL) に分けた。各画分をCC-105遠心濃縮器で10 μ L以下に濃縮し、ペプチドの配列をMALDI-TOF/TOF (UltraFlex II TOF/TOF) 及びLC-MS/MS (Q-Exactive; Thermo Fisher Scientific Inc、アメリカ合衆国マサチューセッツ州ワルサム) を用いて分析した。

20

【 0 1 1 0 】

(結果)

1 . 敗血症患者の血清のペプチド解析

血清のペプチド解析をBLOTCHIP (登録商標) 質量分析により行った。各ペプチドームプロファイルより得られた質量スペクトルのデータをデータベースに保存した。すべてのMS測定が完了した後、解析ソフトFlexAnalysis2.4を用いて、non-DIC群とDIC群、敗血症群と敗血症性ショック群の各々の2群間でのディファレンシャル解析をそれぞれ行い、ピークごとに2群間で統計的に有意差があるか検討を行った。

30

【 0 1 1 1 】

2 . 同定されたペプチド

上記で有意差のあったピークについて、逆相クロマトグラフィーで部分的に精製した血清ペプチドによりMALDI-TOF/TOF及びLC-MS/MSペプチド配列決定分析を行い、10個のペプチドを同定した (表3)。

【 0 1 1 2 】

5番目、6番目、及び8番目のペプチドは修飾を受けていた。

具体的には、5番目のペプチドは、アミノ酸配列のN末端から4番目のリシン、10番目のプロリン、17番目のプロリン、20番目のプロリン、29番目のプロリン、及び34番目のプロリンが酸素で酸化されていた。

40

6番目のペプチドは、アミノ酸配列のN末端から1番目のプロリン、10番目のプロリン、12番目のプロリン、31番目のプロリン、33番目のプロリン、及び36番目のプロリンが酸素により酸化されており、28番目のグルタミンが脱アミド化されていた。

配列番号8のペプチドは、アミノ酸配列のN末端から1番目のセリンがアセチル化されていた。

【 0 1 1 3 】

【表 3】

表3. 同定ペプチド

ペプチド番号	ペプチド名	タンパク質	モノアイソトピック 質量計算値 [M+H] ⁺	アミノ酸番号 (N末端/C末 端)	イオンスコア	Swiss-prot アク セション番号	ペプチド配列 (修飾)
1	PDA066	α -2-HS-糖蛋白質	2739.52	341-367	51	P02765	TVQPSVGAAGPWPPCPGRIRHFKV
2	PDA072	フィブリノーゲン α 鎖	2861.34	603-629	77	P02671	MADEAGSEADHEGTHSTKRGHAKSRPV
3	PDA086	フィブリノーゲン β 鎖	2882.54	45-71	45	P02675	GHRPLDKKREEAPSLRPAPPPISGGGY
4	PDC006	血清アルブミン	2898.56	27-51	32	P02768	HKSEVAHFRFKDLGEENFKALVIAF ENGK(酸化)PGEPGP(酸化)KGDAGAP(酸化)GAP(酸化) (655位のKの酸化と5つのPの酸化) P(酸化)GKAGERGV(酸化)GP(酸化)
5	PDC007	コラーゲン α -1(III)鎖	3259.48	652-687	97	P02461	PGAVGPAGKDGGEAGAAQ(脱アミド化)GPP(酸化)GP(酸化)AGP(酸化)A (619位のQの脱アミド化及び6つのPの酸化)
6	PDC008	コラーゲン α -1(I)鎖	3282.56	592-628	37	P02452	GAEDSLADQAAANKWGRSDPNHFRPAGLPEKY
7	PDC009	血清アミロイドA-2タンパク質	3610.75	90-122	45	P0DJ9	SETSRTAFGGRRRAVPPNNSNAEEDDLPTVELQGWPR (タンパク質N末端の2位のセリンのアセチル化)
8	PDB001	血液凝固第XIII因子 A 鎖	3949.98	2-38	58	P00488	GRSGKDPNHFRPAGLPEKY
9	PDC005	血清アミロイドA-1タンパク質	2126.09	104-122	32	P0DJ8	
10	PDA078	フィブリノーゲン α 鎖	3239.53	600-629	44	P02671	SYKMADEAGSEADHEGTHSTKRGHAKSRPV

3. 各ペプチドの変化率と診断性能

上記のディファレンシャル解析において有意差のあった10個のピークに対し、ピークごとに2群間で統計的に有意差があるか検討を行った。

【0115】

表4に示すように、DIC群では、非DIC群患者に比べて、1～6, 8番目のペプチドの量がそれぞれ77%、78%、77%、46%、51%、47%、62%に有意に減少し、7番目のペプチドの量が非DIC群患者に比べて140%に有意に上昇していた。

【0116】

また、表5に示すように、敗血症性ショック群では、敗血症群に比べて、8番目と9番目のペプチドの量がそれぞれ87%、53%に有意に減少し、10番目のペプチドの量が敗血症群に比べて152%に有意に上昇していた。

10

【0117】

図1～11は得られた10個のペプチドの2群間でのピーク強度ROC曲線図を示す。図1～8によると、DIC群では、非DIC群患者に比べて1～6, 8番目のペプチドの量が有意に減少し、7番目のペプチドの量が有意に上昇していたことが理解される。図9～11によると、敗血症性ショック群では、敗血症群に比べて8番目と9番目のペプチドの量が有意に減少し、10番目のペプチドの量が有意に上昇していたことが理解される。

【0118】

これらの結果から、試験された10個のすべてのペプチドは、DICの有無及び敗血症性ショックの有無のうちの少なくとも一方を迅速かつ非常に高い診断性能でもっぱら区別でき、バイオマーカーとして有用であることが示された。

20

【0119】

【 表 4 】

表4. 各マーカーペプチドを用いたDIC診断性能

ペプチド 番号	ペプチド	non DIC (N)	DIC (N)	AUC	CI1	CI2	sn (%)	sp (%)	cutt off	メジアン比 (DIC/non DIC)	ClinProTools P値*1
1	PDA066	12	8	0.708	0.46	0.95	37.5	100	10,261	0.77	1.00E-06
2	PDA072	12	8	0.646	0.39	0.91	37.5	91.7	8,188	0.78	5.26E-06
3	PDA086	12	8	0.594	0.30	0.89	50	91.7	4,934	0.77	1.00E-06
4	PDC006	12	8	0.719	0.48	0.96	75	66.7	4,833	0.46	1.00E-06
5	PDC007	12	8	0.719	0.47	0.97	87.5	58.3	6,623	0.51	1.00E-06
6	PDC008	12	8	0.677	0.42	0.94	62.5	83.3	2,270	0.47	1.00E-06
7	PDC009	12	8	0.698	0.43	0.96	87.5	58.3	1,657	1.40	1.00E-06
8	PDB001	12	8	0.76	0.53	0.99	62.5	91.7	15,086	0.62	9.18E-05

*1 Wilcoxon rank-sum test. P値 < 0.05を統計学的に有意とみなした。

【 0 1 2 0 】

10

20

30

40

【表 5】

表5. 各マーカーパーペプチドを用いた敗血症シヨック診断性能

ペプチド 番号	ペプチド	敗血症 (N)	敗血症性 シヨック (N)	AUC	CI1	CI2	sn (%)	sp (%)	cutt off	メジアン比 (敗血症性シヨッ ク/敗血症)	ClinProTools P値*1
9	PDC005	10	10	0.720	0.46	0.98	90.0	60.0	21,710	0.53	1.00E-06
10	PDA078	10	10	0.700	0.45	0.95	80.0	60.0	1,862	1.52	2.03E-06
8	PDB001	10	10	0.590	0.31	0.87	50.0	90.0	15,086	0.87	6.37E-04

*1 Wilcoxon rank-sum test. P値 < 0.05を統計学的に有意とみなした。

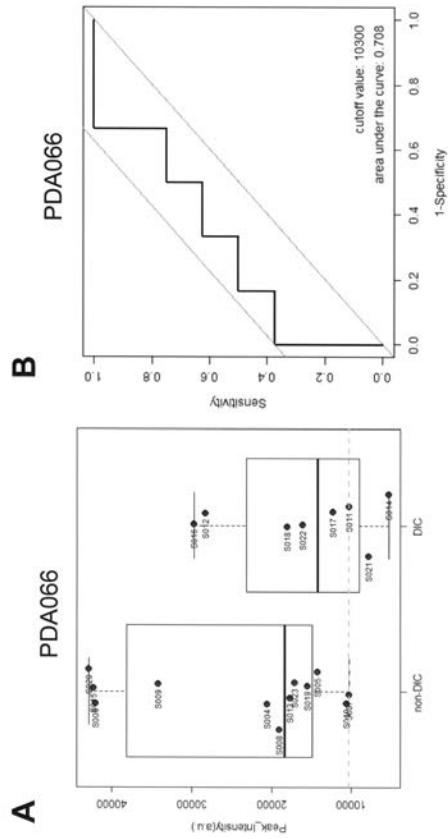
10

20

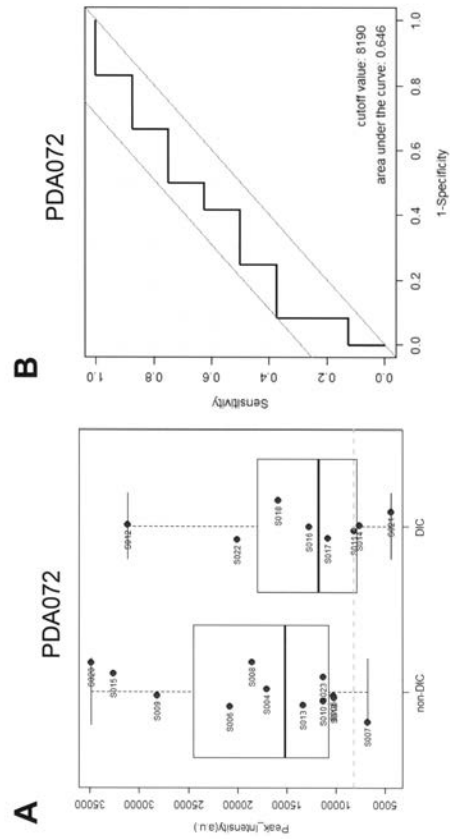
30

40

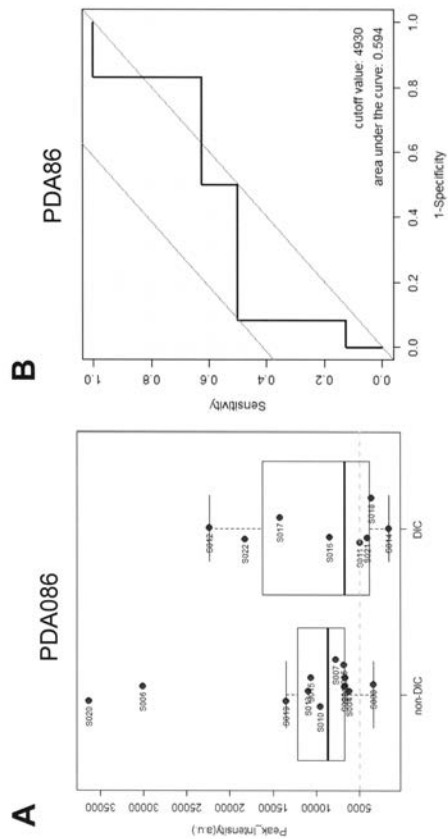
【図 1】



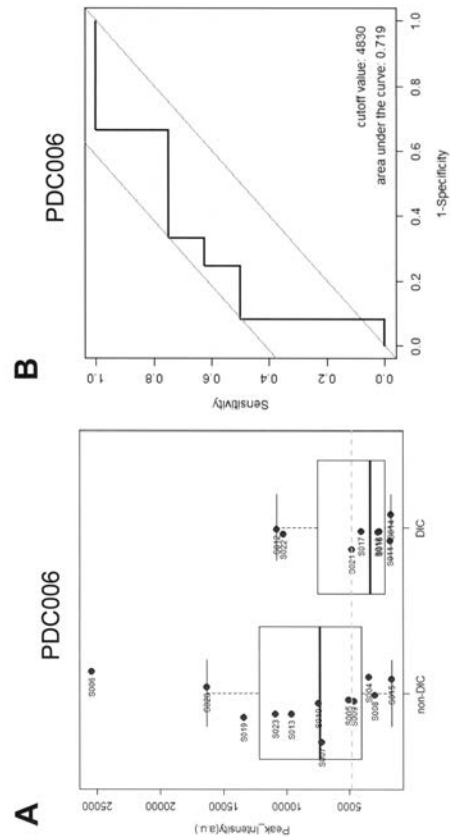
【図 2】



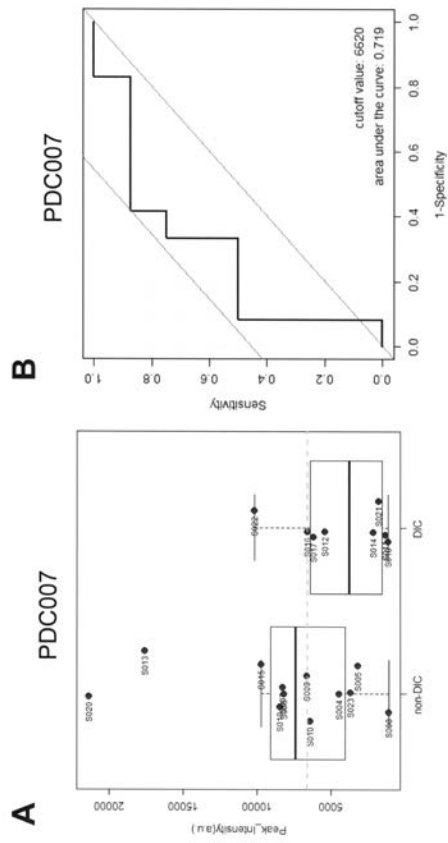
【図 3】



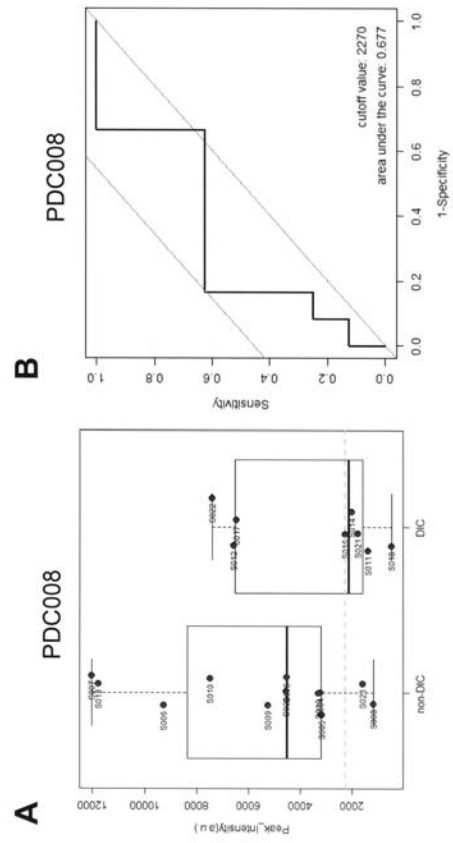
【図 4】



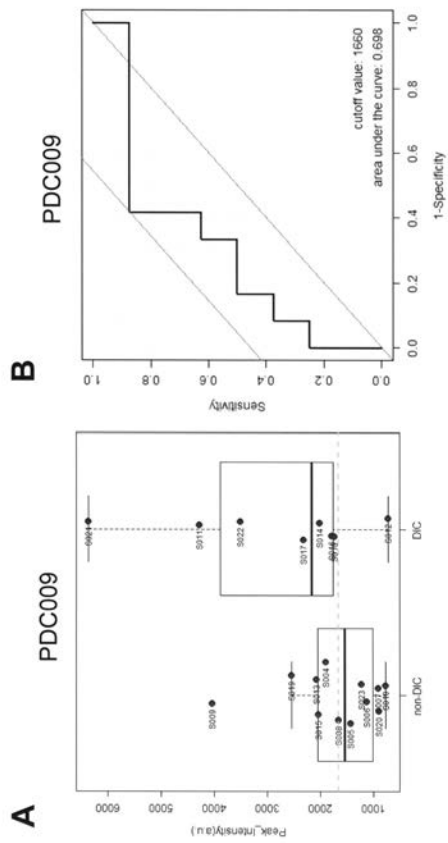
【 図 5 】



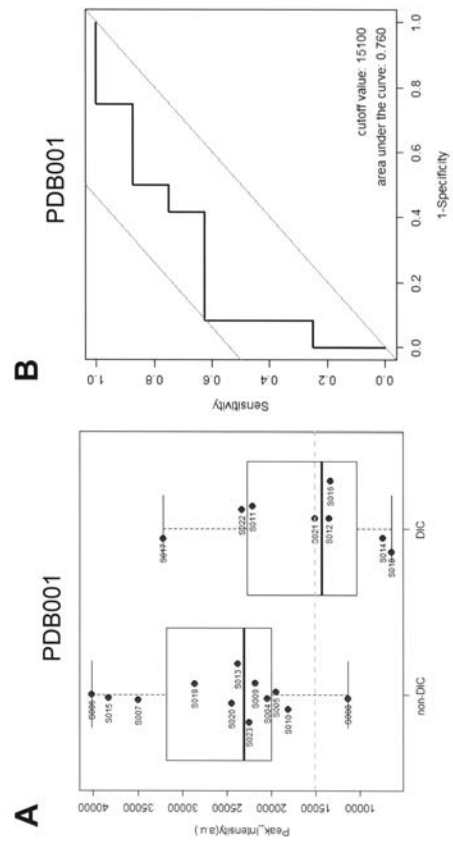
【 図 6 】



【 図 7 】

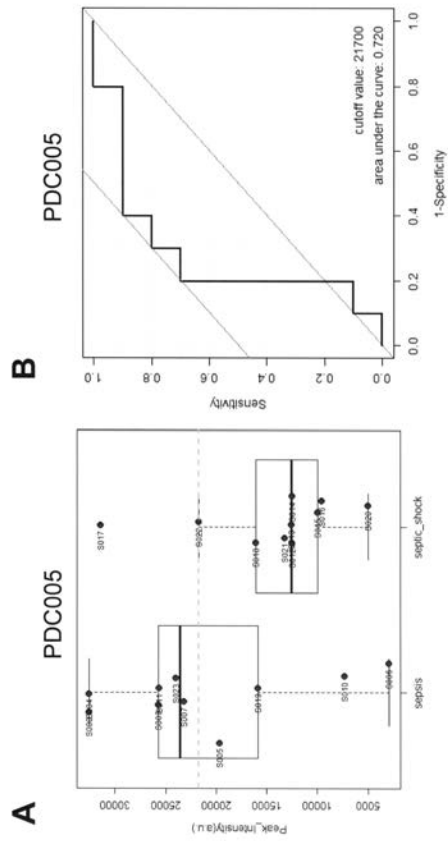


【 図 8 】

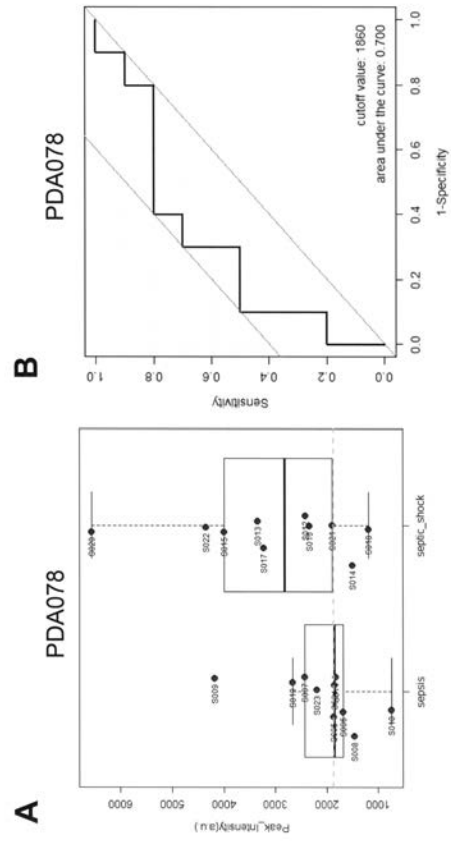


non DIC vs DIC

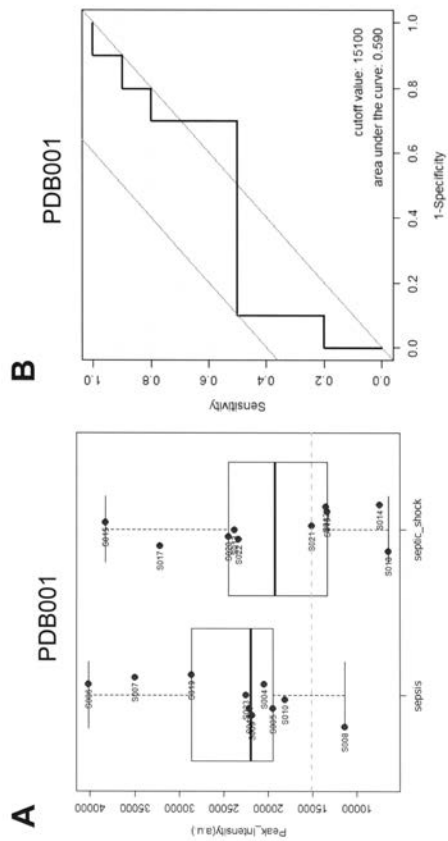
【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 11 】



【配列表】

2020016453000001.app

フロントページの続き

F ターム(参考) 2G045 AA25 DA36 FB03 FB06
4H045 BA10 BA17 BA18 BA19 CA40 EA50

专利名称(译)	败血病相关肽标记		
公开(公告)号	JP2020016453A	公开(公告)日	2020-01-30
申请号	JP2018137627	申请日	2018-07-23
申请(专利权)人(译)	株式会社プロトセラ		
[标]发明人	田中憲次 李良子		
发明人	若林 一郎 田中 憲次 李 良子		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 C07K14/47		
FI分类号	G01N33/68.ZNA G01N33/53.D C07K14/47		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB06 4H045/BA10 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/BA19 4H045/CA40 4H045/EA50		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

为了提供一种新的用于检测弥散性血管内凝血的肽标记物。解决方案：一种检测受试者弥散性血管内凝血（DIC）的方法包括测量受试者生物样品的肽，例如：一种，两种或更多种肽选自具有由序列号1、2、3、4、5、6、7和8表示的氨基酸序列的肽的组；相同的部分肽；具有90%或更多相同氨基酸序列的肽；或相同的突变肽。图1：

