

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02017/126514

発行日 平成30年12月20日 (2018.12.20)

(43) 国際公開日 平成29年7月27日 (2017.7.27)

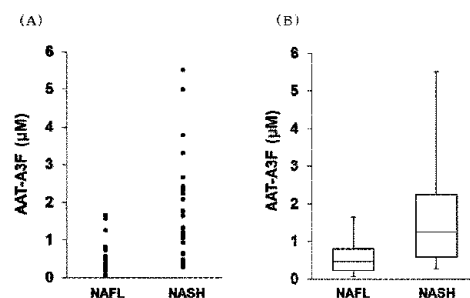
(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/576 (2006.01)	GO 1 N 33/576 Z	2 GO 4 1
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	2 GO 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 S	4 BO 6 3
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62 V	4 HO 4 5
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	GO 1 N 27/62 X	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2017-562826 (P2017-562826)	(71) 出願人	000001926
(21) 国際出願番号	PCT/JP2017/001450		塩野義製薬株式会社
(22) 国際出願日	平成29年1月18日 (2017.1.18)		大阪府大阪市中央区道修町 3 丁目 1 番 8 号
(31) 優先権主張番号	特願2016-8048 (P2016-8048)	(71) 出願人	504173471
(32) 優先日	平成28年1月19日 (2016.1.19)		国立大学法人北海道大学
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		北海道札幌市北区北 8 条西 5 丁目
		(74) 代理人	100113789
			弁理士 杉田 健一
		(74) 代理人	100209598
			弁理士 渡部 秀昭
		(72) 発明者	坂本 直哉
			北海道札幌市北区北 8 条西 5 丁目 国立大 学法人北海道大学内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 非アルコール性脂肪肝炎検出方法

(57) 【要約】

本発明は、NASHの検出の指標（特に、NASHとNAFLを区別する指標）となる新規のマーカー、該マーカーを用いたNASHの検出方法、さらに該マーカーによりNASHを検出するためのキットを提供する。具体的には、該マーカーは $\alpha 1$ -アンチトリプシンに結合している糖鎖A3Fである。

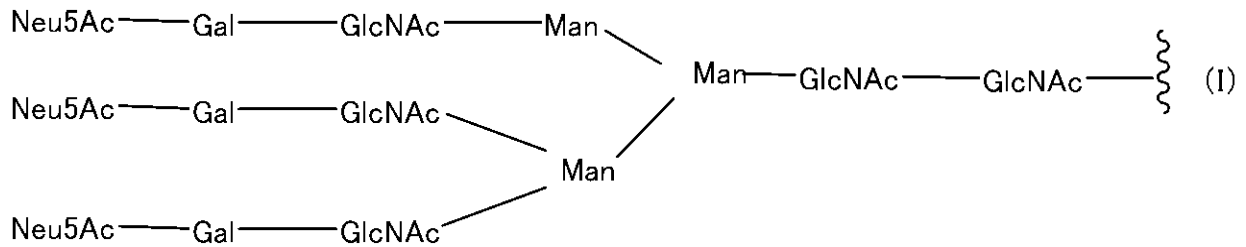


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被検試料における、 α 1 - アンチトリプシンに結合している式 (I) :

【化 1】



で示される構造を含むフコシル化糖鎖の量を測定することを特徴とする、非アルコール性脂肪肝炎の検出方法。

【請求項 2】

非アルコール性脂肪肝炎に罹患していない被検体由来の対照試料における量と比較して、被検試料における量が多いことを、該被検試料が非アルコール性脂肪肝炎に罹患している被検体由来の試料であることの指標とする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

該非アルコール性脂肪肝炎に罹患していない被検体が、非アルコール性脂肪肝に罹患している被検体である、請求項 2 記載の方法。 20

【請求項 4】

被検試料が、非アルコール性脂肪性肝疾患に罹患している被検体由来である、請求項 1 ~ 3 いずれかに記載の方法。

【請求項 5】

該被検試料が血液又は血清である、請求項 1 ~ 4 いずれかに記載の方法。

【請求項 6】

該測定が、免疫測定法、質量分析法又は液体クロマトグラフィーを用いて行うものである、請求項 1 ~ 5 いずれかに記載の方法。

【請求項 7】

該免疫測定法が E L I S A である請求項 6 記載の方法。 30

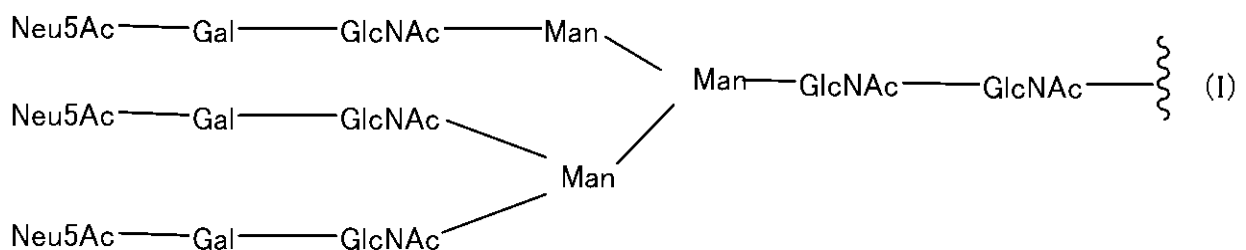
【請求項 8】

該質量分析法が M A L D I 法、L C / M S 法又は L C / M S / M S 法である請求項 6 記載の方法。

【請求項 9】

α 1 - アンチトリプシンに結合している式 (I) :

【化 2】

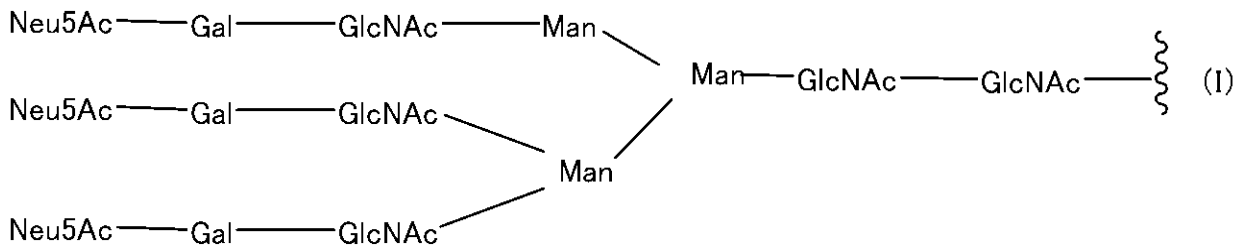


で示される構造を含むフコシル化糖鎖からなる、非アルコール性脂肪肝炎検出用マーカー。

【請求項 10】

式 (I) :

【化 3】



で示される構造を含むフコシル化糖鎖及び／又は
 α 1 - アンチトリプシンに対する抗体若しくはその断片
 を含む、非アルコール性脂肪肝炎検出用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の検出の指標となるマーカー、該マーカーを用いたNASHの検出方法及び該マーカーを含むNASH検出用キットに関する。

【背景技術】

【0002】

ウイルス性、自己免疫性等の慢性肝疾患を除く、明らかな飲酒歴のない人に発生する疾患群は、一括して非アルコール性脂肪性肝疾患（non-alcoholic fatty liver disease：以下、NAFLDと記す）と定義される。NAFLDは、さらに、非アルコール性脂肪肝（non-alcoholic fatty liver：以下、NAFLと記す）と非アルコール性脂肪肝炎（non-alcoholic steatohepatitis：以下、NASHと記す）とに分類される。NAFLは病態が進行することは稀で病的意義は少ない。一方、肥満、糖尿病等の生活習慣病を背景とするNASHは肝硬変を経て肝癌又は肝関連死のリスクをもたらす予後の悪い疾患であり、早期の診断と治療が必要である。

【0003】

NAFLDに罹患しているか否かは、画像検査による脂肪肝の確認、血液検査によるウイルス性でないことの確認、飲酒歴の問診による多量の飲酒が原因ではないことの確認により診断が可能であるが、NAFLDと診断された患者がNAFLではなく、NASHに罹患していることの確定診断は、現在、肝生検にて行われ、小葉内の炎症、肝細胞の風船様変性、マロリー・デンク体あるいは線維化の有無に基づくMatteoni分類（非特許文献1）を用いた病理判定や脂肪蓄積、炎症、肝細胞風船様肥大の各スコアから算出されるNAFLD Activity Score（NAS）や肝線維化の病理判定（非特許文献2）が診断基準となる。しかし、肝生検は患者への負担が大きいうえ、サンプリングエラーや評価者間のバラつき等の課題も多いため、肝生検に代わる非侵襲診断法の開発が求められている。

【0004】

また、近年、タンパク質結合糖鎖を癌等の疾患の診断マーカーとして用いるための研究が行われている。例えば、Mac-2結合蛋白糖鎖修飾異性体（M2BPGi）がC型肝炎患者のデータをもとに、肝臓の線維化ステージの進展を反映する糖鎖マーカーとして知られており（非特許文献3）、日本において測定キットが上市されている（HISCL（登録商標）M2BPGi試薬、シスメックス株式会社）。タンパク質結合糖鎖マーカーとNASHの関連としては、例えば、非特許文献4では、M2BPGiがNASH患者における線維化ステージの進展を反映することが記載されているが、NASH患者とNAFL患者の選別に関しては記載も示唆もされていない。なお、非特許文献5では、フコシル化Mac-2結合タンパク質（Mac2bp）はMac2bpの総量と関連しているとして、糖鎖ではなく、Mac2bpの総量を測定し、非NASH（NAFL）患者と比較して

10

20

30

40

50

NASH患者でMac2bpが有意に増加していることが記載されている。

非特許文献6には、血清のフコシル化ハプトグロビン（Fuc-Hpt）が非NASH（NAFL）患者と比べてNASH患者において顕著に増加することが記載されている。また、非特許文献7には、Fuc-HptとMac2bpの併用により、より効率的にNAFLD患者からNASH患者を選別可能であることが記載されている。

【0005】

$\alpha 1$ -アンチトリプシン（AAT）は血中の最も主要なプロテアーゼインヒビターであって、種々のセリンプロテアーゼを阻害する。主に肝細胞で生成され、種々の炎症時に血中に増加する急性相反応物質の一つであり、炎症性疾患、悪性腫瘍の指標となることが知られている。また、非特許文献8には、血液中のAATに結合している糖鎖A3F（3）1G3S3（アウターアームフコシル化）の量が、健常者と比較してC型肝炎起因の肝硬変患者、C型肝炎起因の肝癌患者において上昇することが記載されている。但し、AATとNASHの関係、あるいは、AATに結合している糖鎖とNASHの関係は知られていない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Gastroenterology, Volume 116, Issue 6, 1413-1419 (1999)

【非特許文献2】Hepatology, Volume 41, Issue 6, 1313-1321 (2005)

【非特許文献3】Scientific Reports, Volume 3, 1065 (2013)

【非特許文献4】Journal of Gastroenterology, Volume 50, 776-784 (2015)

【非特許文献5】Proteomics Clinical Applications, Volume 7, 648-656 (2013)

【非特許文献6】PLOS ONE, Volume 8, Issue 6, e66328 (2013)

【非特許文献7】Hepatology, Volume 62, Issue 5, 1433-1443 (2015)

【非特許文献8】PLOS ONE, Volume 5, Issue 8, e12419 (2010)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

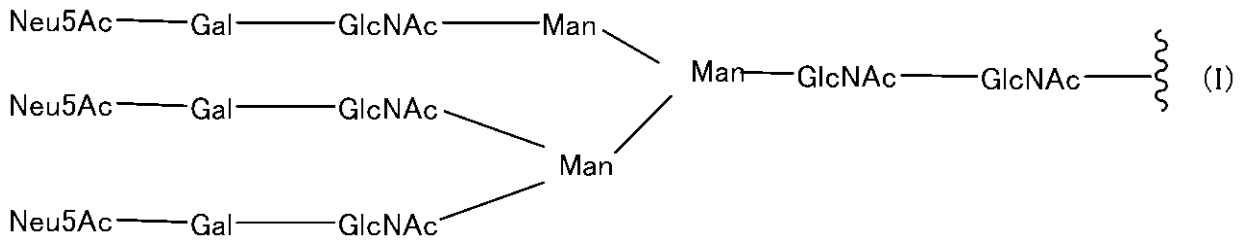
本発明の目的は、NASHの検出の指標（特に、NASHとNAFLを区別する指標）となる新規のマーカー、該マーカーを用いたNASHの検出方法、さらに該マーカーによりNASHを検出するためのキットを提供することにある。また、該マーカーを用いたNASHの診断方法、NASHの進行又は軽減のモニタリング方法、NASHの治療効果の評価方法、NASHを治療するための物質の有効性の評価方法に関する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、鋭意研究の結果、 $\alpha 1$ -アンチトリプシン（AAT）に結合している約20種の糖鎖の中から、式（I）

【化 1】



(式中、Neu5AcはN-アセチルノイラミン酸、Galはガラクトース、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、Manはマンノースを意味する。) 10

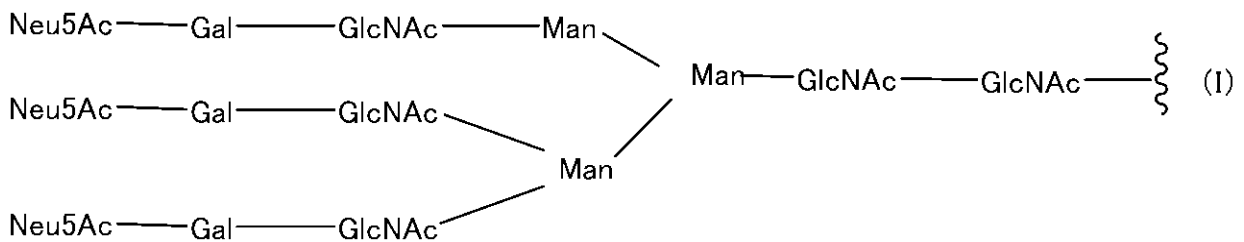
で示される構造を含むフコシル化糖鎖のみ、NAFL患者と比較してNAFH患者において有意に増加することを見出し、新規のNAFH検出用マーカーとして同定した。本明細書において式(I)の構造を含むフコシル化糖鎖を「A3F」ともいう。本明細書において、上記本発明のマーカーを「AAT結合糖鎖A3F」とも言う。

【0009】

すなわち、本発明は、以下に関する。

(1) 被検試料における、 $\alpha 1$ -アンチトリプシンに結合している式(I)：

【化 2】



で示される構造を含むフコシル化糖鎖の量を測定することを特徴とする、非アルコール性脂肪肝炎 (NAFH) の検出方法。

(2) 非アルコール性脂肪肝炎 (NAFH) に罹患していない被検体由来の対照試料における量と比較して、被検試料における量が多いことを、該被検試料が非アルコール性脂肪肝炎 (NAFH) に罹患している被検体由来の試料であることの指標とする、(1) 記載の方法。 30

(3) 該非アルコール性脂肪肝炎 (NAFH) に罹患していない被検体が、非アルコール性脂肪肝 (NAFL) に罹患している被検体である、(2) 記載の方法。

(4) 被検試料が、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) に罹患している被検体由来である、(1) ~ (3) いずれかに記載の方法。

(5) 該被検試料が血液又は血清である、(1) ~ (4) いずれかに記載の方法。

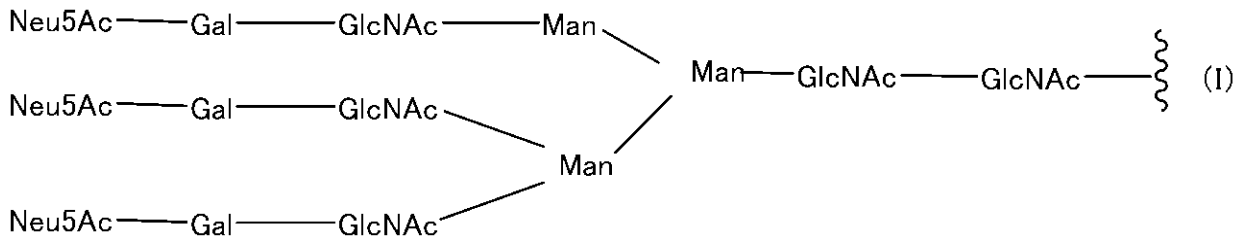
(6) 該測定が、免疫測定法、質量分析法又は液体クロマトグラフィーを用いて行うものである、(1) ~ (5) いずれかに記載の方法。 40

(7) 該免疫測定法がELISAである(6)記載の方法。

(8) 該質量分析法がMALDI法、LC/MS法又はLC/MS/MS法である(6)記載の方法。

(9) $\alpha 1$ -アンチトリプシンに結合している式(I)：

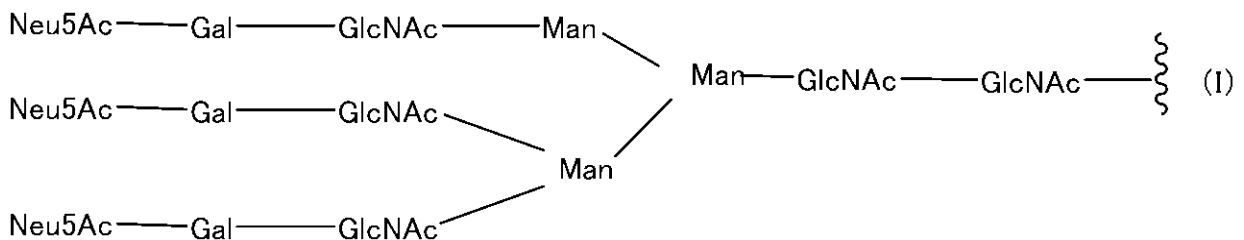
【化 3】



で示される構造を含むフコシル化糖鎖からなる、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）検出用マーカー。 10

（10）式（I）：

【化 4】



20

で示される構造を含むフコシル化糖鎖及び／又は

α 1 - アンチトリプシンに対する抗体若しくはその断片

を含む、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）検出用キット。

（11） α 1 - アンチトリプシンに対する抗体を用いて、被検試料における、 α 1 - アンチトリプシンに結合している式（I）で示される構造を含むフコシル化糖鎖の量を測定することを特徴とする、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の検出方法。

（12）（2）～（8）いずれかに記載の方法で非アルコール性脂肪肝炎（NASH）を検出する工程、及び

薬物療法、運動療法及び食事療法からなる群より選ばれる1以上の治療により非アルコール性脂肪肝炎（NASH）が検出された被検体を治療する工程を含む、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）治療方法。 30

（13）被検試料における、AAT結合糖鎖A3Fの量が、 $0.8 \mu\text{M}$ 以上である場合に、該被検試料が非アルコール性脂肪肝炎（NASH）に罹患している被検体由来の試料であるとする、（2）～（8）いずれかに記載の方法。（実施例1）

（14）被検試料における、AAT結合糖鎖A3Fの量が、 $0.3 \mu\text{M}$ 以上である場合に、該被検試料が非アルコール性脂肪肝炎（NASH）に罹患している被検体由来の試料であるとする、（2）～（8）いずれかに記載の方法。（実施例1）

（15）被検試料における、AAT結合糖鎖A3Fの量が、 $9 \mu\text{M}$ 以上である場合に、該被検試料が非アルコール性脂肪肝炎（NASH）に罹患している被検体由来の試料であるとする、（2）～（8）いずれかに記載の方法。（実施例2） 40

【0010】

また、本発明には、以下も含まれる。

（1-1）（A）被検試料における、AAT結合糖鎖A3Fの量を測定する工程、

（B）非アルコール性脂肪肝炎（NASH）に罹患していない被検体由来の対照試料における量と比較して、工程（A）で測定した被検試料における量が多いことを、該被検試料が非アルコール性脂肪肝炎（NASH）患者由来の試料であることの指標とする工程を含む、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）患者のスクリーニング方法。

（1-2）被検試料における、AAT結合糖鎖A3Fの量を測定することを特徴とする、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の進行又は軽減をモニタリングする方法。 50

(1-3) 被検試料における、AAT結合糖鎖A3Fの量を測定することを特徴とする、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の治療効果を評価する方法。

(1-4) 被検試料における、AAT結合糖鎖A3Fの量を測定することを特徴とする、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)を治療するための物質の有効性の評価方法。

【発明の効果】

【0011】

本発明のマーカーは、NASHとNAFLを区別してNASHを検出することができ、NASHの診断方法、NASHの進行又は軽減のモニタリング方法、NASHの治療効果の評価方法、NASHを治療するための物質の有効性の評価に有用である。さらに、血液又は血清を用いて測定が可能であり、肝生検と比べて、患者や医療従事者の負担も軽く、より迅速かつ簡便に上記診断や評価等が可能である。

10

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】 (A) AAT結合糖鎖A3Fの検体ごとの血清中濃度、及び、(B) (A) から作成した箱ひげ図 (実施例1)

【図2】 NASHの診断におけるAAT結合糖鎖A3FのROC曲線 (実施例1)

【図3】 (A) AAT結合糖鎖A3Fの検体ごとの血清中濃度、及び、(B) (A) から作成した箱ひげ図 (実施例2)

【図4】 NASHの診断におけるAAT結合糖鎖A3FのROC曲線 (実施例2)

【発明を実施するための形態】

20

【0013】

本明細書において使用される用語は、特に言及する場合を除いて、当該分野で通常用いられる意味で用いられる。

【0014】

「被検試料」とは、被検体から単離した生物学的材料を意味する。例えば、血液、リンパ液、髄液、尿及びその処理物等が用いられるが、好ましくは血液、さらに好ましくは該血液を分離して得られる血清、血漿が用いられる。

【0015】

「被検体」とは任意の動物を意味する。例えば、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ等の哺乳類が挙げられる。好ましくは、ヒト又はマウスである。

30

【0016】

以下に、本発明の具体的態様を記載するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。

【0017】

I. NASH検出用マーカー

本明細書の実施例に示す通り、AAT結合糖鎖A3Fを新規のNASH検出用マーカーとして見出した。つまり、本発明は、AAT結合糖鎖A3Fからなる、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)検出用マーカーを包含する。

【0018】

本発明のマーカーであるAAT結合糖鎖A3Fは公知物質である。

40

【0019】

α 1-アンチトリプシン(AAT、アルファ-1-アンチトリプシン)は418アミノ酸からなるタンパク質であり、配列は、アクセッション番号AAB59375として、GenBankに登録され、公表されている。また、アクセッション番号P01009として、Uniprotに登録されており、その中で、アイソフォームや数多くの自然変異体が公表されている。

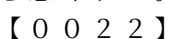
AATの配列上のN-グリコシル化位置として、70位、107位又は271位のアスパラギンが知られている(J Proteome Res. 2014, ; 13(7): 3131-43)。本発明のマーカーがNASH検出用マーカーとして利用可能である理由としては、NAFL患者と比較してNASH患者において、該3ヶ所のグリコシル化位

50

【 0 0 2 0 】

【 0 0 2 1 】

【化 5】

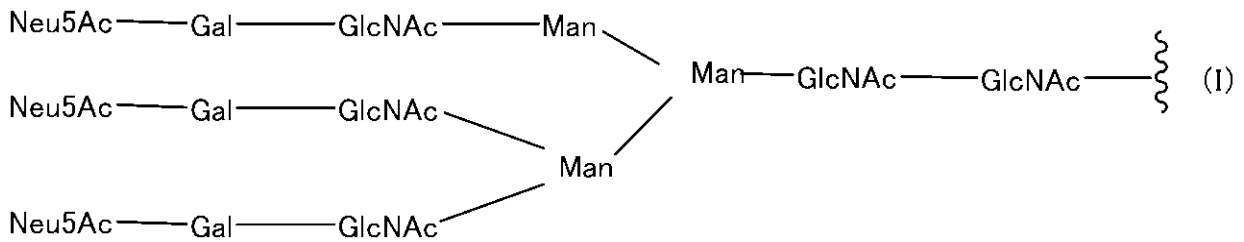


【 0 0 2 3 】

試料における、

A A T に結合している式 (I)

【化 7】



10

で示される構造を含むフコシル化糖鎖 (A 3 F) の量を測定することにより、N A S Hを検出することができる。

【 0 0 2 4 】

A A T 結合糖鎖 A 3 F の量の測定方法としては、例えば、免疫測定法や質量分析を用いた方法等が挙げられる。下記実施例を参照に測定することもできる。

【 0 0 2 5 】

免疫測定法としては、公知の免疫学的方法を利用することができる。公知の免疫学的方法としては、例えば、E L I S A 法、R I A 法、ウェスタンブロット法等が例示される。

【 0 0 2 6 】

質量分析法としては、具体的には、例えば、

(a) 被検試料から A A T を分離する工程、及び、

(b) 分離された A A T に結合している A 3 F の量を測定する工程を含む方法等が挙げられる。

20

【 0 0 2 7 】

工程 (a) としては、A A T を特異的に認識して、その他のタンパク質も含む被検試料から A A T を分離し得る方法であればいずれのものでもよい。この際、A A T は A 3 F が結合している部位が含まれていれば、野生型であっても変異型であってもよいし、全長であっても断片であってもよい。より具体的には、A A T の配列上の 7 0 位、1 0 7 位又は 2 7 1 位のアスパラギンを含むタンパク質又は断片であればよい。

【 0 0 2 8 】

具体的には、例えば、抗 A A T 抗体を用いた免疫沈降法、抗体アフィニティーカラムにより A A T を被検試料から分離する方法が挙げられる。

30

まず、アガロースビーズ又は磁気ビーズに A A T に対する抗体を結合させる。ここで、結合の様式は共有結合でもよいし、ビオチン-アビジンによる結合でもよい。次に、抗体結合ビーズに対して被検試料を接触させ、ビーズ上の抗体に被検試料中の A A T を結合させた後、ビーズを十分に洗浄し、さらに酸、アルカリ、又は高塩濃度の溶液を用いてビーズ上の抗体から A A T を遊離させることで、A A T を分離する。

【 0 0 2 9 】

工程 (b) としては、工程 (a) で分離された A A T に結合している A 3 F の量を測定し得る方法であればいずれのものでもよい。例えば、公知の質量分析又はクロマトグラフィーにより測定する方法等が例示される。M S 法、M S / M S 法、L C / M S 法、L C / M S / M S 法、H P L C、ガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー等が例示される。また、工程 (a) と同様に公知の免疫学的測定方法も利用可能である。

40

【 0 0 3 0 】

なお、本発明のマーカーである A A T 結合糖鎖 A 3 F の量として、その絶対量を必ずしも求める必要はなく、上記測定方法等で検出された個々の A A T 結合糖鎖 A 3 F 固有のピークを数値化したり、基準とするピークとの比を求めたりすることによっても求めることもできる。この具体的な方法としては、検出された各ピークの高さを数値化する方法、ピーク面積を数値化する方法等があり、液体クロマトグラフィーでは定量性を有する測定方法であるのでどちらかに限定されるものではないが、M S 法ではピーク面積を数値化する

50

方法が、精度がよく、好ましい。

【0031】

質量分析により測定する方法とは、具体的には、工程（a）で分離されたAATをプロテアーゼ等によりペプチド断片化し、得られたAAT断片の混合物から、本発明のマーカであるA3Fを有するAAT断片を質量分析装置で検出する方法が挙げられる。工程（a）で分離されたAATは変性後、還元アルキル化し、プロテアーゼを使い、ペプチド断片化する。プロテアーゼはタンパク質をペプチド断片に分解するものであればどのようなものでもよいが、トリプシン、リシルエンドペプチターゼ等が挙げられる。AAT断片はそのまま質量分析装置で計測しても問題ないが、抗体やレクチン等を用いて予め濃縮することが望ましい。具体的には、例えば、AAL（*Aleuria aurantia lectin*）、AOL（*Aepergillus oryzae L-fucose-specific lectin*）、LTL（*Lotus tetragonolobus lectin*）、UEA I（*Ulex europeus I agglutinin*）、LCA（*Lens culinaris agglutinin-A*）等のようにフコースに結合するレクチンを使ってAATを濃縮することが望ましい。質量分析装置による計測は、質量分析装置単体でも問題ないが、液体クロマトグラフィーやキャピラリー電気泳動等のクロマトグラフィーと組み合わせることが望ましい。A3Fの量を測定する方法としては、ピーク面積を計測する方法が挙げられる。

10

【0032】

また、工程（a）で分離されたAATの糖鎖部分を、グリカナーゼやヒドラジンを使って分解して遊離させた後、測定の対象とする該糖鎖部分（A3F）を必要に応じて誘導体化又は化学修飾して、その量を測定することができる。または、液体クロマトグラフィー等によりA3Fを分離して、その量を測定することができる。

20

【0033】

AATから糖鎖部分を分解する方法としては、ヒドラジン分解法や、酵素（N-グリカナーゼ）消化法等が挙げられる。これらのうち、定量的に糖鎖を切断するには酵素（N-グリカナーゼ）消化法が好ましい。

【0034】

上述のようにして調製した糖鎖において、検出したいA3Fを標識、誘導体化する方法としては、特に限定されるものではないが、質量分析法装置を使う場合はイオン化効率を高める標識法、より具体的には、N^a-((aminooxy)acetyl)tryptophanylarginine methyl ester (aowR)を用いる標識方法が特に好ましい。蛍光検出器を使う場合は2-アミノピリジンにより糖鎖部分を標識することが好ましい。また、上述のようにして標識した糖鎖部分を誘導体化する方法として、標識にaowRを用いる場合は、例えば、J. Frukawa et al., Anal. Chem. 80 (2008) 1094-1101に記載の方法等が用いられ、標識に2-アミノピリジンを用いる場合はY. Otake et al., J Biochem (Tokyo) 129 (2001) 537-42に記載の方法等が用いられる。

30

【0035】

上述のようにして、標識、誘導化されたA3Fを分離する方法としては、液体クロマトグラフィーの他、電気泳動等を用いることができる、好ましくは液体クロマトグラフィーを用いることができる。液体クロマトグラフィーの条件は特に限定されるものではないが、逆相又は順相カラムが望ましく、溶離液が安定的に送液できるものであればどのような仕様でもよく、特に限定されるものではない。

40

【0036】

次に、A3Fの量の測定を行なうが、この方法としては、A3Fを選択的に検出できるものであれば、特に限定されるものではない。具体的な測定方法としては、紫外可視光吸収法、蛍光検出法、質量分析法、核磁気共鳴法、本発明の糖鎖部に特異的な抗体を用いる方法等が挙げられ、中でも、質量分析法や蛍光検出法が望ましい。

50

【0037】

蛍光検出法を用いて検出する場合は、上述の2-アミノピリジン等の蛍光物質で予め糖鎖を標識化する必要がある。蛍光検出法の検出条件は、検出対象とする糖鎖（A3F）を検出できるものであれば、特に限定されるものではない。2-アミノピリジンを標識化合物に使った場合は、励起光に波長280nm～330nm、蛍光検出に波長350nm～420nmを選択することが好ましい。

【0038】

また、質量分析法を使う場合は上述のa o W Rにより予め糖鎖にイオン性化合物を付加することが望ましい。質量分析法を用いて検出する場合、質量分析装置の検出範囲としては、検出対象とする糖鎖（A3F）を検出できる範囲であれば、特に限定されるものではない。イオン化法はMALDI、ESI（エレクトロスプレーイオン化）の他、APCI（大気圧化学イオン化）等でもよいが、MALDIが最も好ましい。質量分析装置は四重極型、TOF型、イオントラップ型、磁場型、フーリエ変換型のいずれでもよいが、定量性の高い四重極型、感度の高いTOF型、イオントラップ型が特に好ましい。また、検出するイオンは、親イオンに限定されるものではなく、フラグメントイオン、付加イオン、2量体イオン等関連イオンであってもよい。このようにして求められる本発明のNASHマーカーの量を測定する方法としては、検出対象とする糖鎖（A3F）に相当するピークのピーク面積を計測する方法等が挙げられる。なお、質量分析法を用いて検出する場合、液体クロマトグラフィーの機能も有するLS/MSを用いることもできる。

【0039】

また、上述した方法の他、被検試料から、本発明のマーカーであるA3Fを有する糖タンパク質を分離する工程と、分離されたA3Fをもつ糖タンパク質に含まれるAATの量を測定する工程とを含む方法を用いることもできる。すなわち、本発明の方法におけるマーカーを測定する工程が、

（c）前記体液中の全糖タンパク質からA3Fを有する糖タンパク質を分離する工程、及び

（d）該分離された糖タンパク質におけるAATの量を測定する工程、を含むNASH検出方法である。

【0040】

2以上の測定値を比較する場合、1種又は複数の統計的分析（例えば、t-検定、ウェルチのT検定、ウィルコクソンの順位和検定、ANOVA、再帰的分割、ランダムフォレスト等）を使用して、比較することができる。

【0041】

本発明のマーカーは単独で用いられてもよいが、他のNASHの検出が可能であることが知られているマーカー（例えば、Fuc-Hpt、Mac2bp等）と組み合わせて利用することもできる。

【0042】

I I I . N A S H の 診 断 方 法

上記「I . N A S H 検出用マーカー」を用いて、NASHの診断が可能である。本発明のマーカーは、健常人及びNAFL患者では被検試料中の量が少なく、NASH患者において被検試料中の量が有意に上昇する。よって、「I I . N A S H の 検出方法」において、NASHに罹患していない被検体（健常人及び／又はNAFL患者）由来の対照試料における量と比較して、被検試料における量が多いことを、該被検試料がNASHに罹患している被検体由来の試料であることの指標とすることにより、NASHを検出することができる。

つまり、本発明は、

（A）被検試料における、AAT結合糖鎖A3Fを測定する工程、

（B）NASHに罹患していない被検体由来の対照試料における量と比較して、工程（A）で測定した被検試料における量が多いことを、該被検試料がNASH患者由来の試料であることの指標とする工程を含む、NASH患者のスクリーニング方法を包含する。

【0043】

臨床においては、現在、NAFLDは、診断基準が確立しており、画像検査による脂肪肝の確認、HBs抗原、HCV抗体、各種自己抗体等を用いた公知の血液検査によるウイルス性疾患でないことの確認、飲酒歴の問診による多量の飲酒が原因ではないことの確認（例えば、飲酒量がエタノール換算で20g未満／日又は140g未満／週）により診断可能である。よって、NAFLDと診断された患者が、病態が進行することが稀なNAFLではなく、予後の悪いNAshに罹患していることの確定診断が重要となり、本発明のマーカーは、特に、公知の診断方法によりNAFLDに罹患していると診断された被験者に関し、NAshに罹患しているか否かの診断を可能にする点で非常に有用である。つまり、「II. NAshの検出方法」において、測定したNAFLD患者由来の被検試料における量を、NAshに罹患しておらず、かつ、NAFLDに罹患している被検体（つまり、NAFLに罹患している被検体）由来の対照試料における量と比較して、被検試料における量が多いことを、被検試料がNAshに罹患している被検体由来の試料であることの指標とすることにより、NAshを検出（診断）し、NAsh患者をスクリーニングすることができる。

10

【0044】

対照試料における量とは、複数のサンプルの平均値を用いることが好ましい。対照試料における量は被検試料と同時に測定してもよいし、予め測定してカットオフ値を設定してもよい。

【0045】

「本発明のNAshマーカーの量」は、NAshに罹患していない被検体由来の被検試料では少ないが、NAsh患者由来の被検試料では顕著に多くなる。従って、「II. NAshの検出方法」において被検試料中の「本発明のNAshマーカーの量」又は該NAshマーカーの量に基づく算出値が前記「対照試料における量」より有意に大きいとき又は予め設定されたカットオフ値より大きいときに、その被検試料はNAsh患者由来の試料である可能性が高いといえることができる。

20

【0046】

なお、本発明における「カットオフ値」とは、「II. NAshの検出方法」により得られたNAshマーカーの量又はNAshマーカーの量に基づく算出値と比較して、NAsh患者とNAshに罹患していない被検体（健常人及び／又はNAFL患者）を区別する値を指す。カットオフ値の決定方法は、特に限定されないが、下記実施例のように、ROC曲線を用いてカットオフ値を決定してもよい。

30

カットオフ値を用いてNAshを検出する場合、NAshの定義やマーカーの測定方法によって、カットオフ値が変わってくる。従って、目的とするマーカーについて、NAshに罹患していない被検体、NAsh患者の測定値を事前に確認して、カットオフ値を決めて、それに従って検出することが好ましい。本発明の実施例に従って、被験者の血清を用いてマーカーの測定を行う場合には、本発明の実施例で得られた数値を参考にNAshを検出することができる。

【0047】

上記のように本発明のマーカーを用いて診断し、NAsh患者の治療を行うことも可能である。具体的には、「II. NAshの検出方法」において、NAshに罹患していない被検体由来の対照試料における量と比較して、被検試料における量が多いことを、該被検試料がNAshに罹患している被検体由来の試料であることの指標とすることにより、NAshを検出する工程、及び薬物療法、運動療法及び食事療法からなる群より選ばれる1以上の治療によりNAshが検出された被検体を治療する工程を含む、NAsh治療方法である。

40

つまり、本発明は、

(A) 被検試料における、AAT結合糖鎖A3Fの量を測定する工程、

(B) NAshに罹患していない被検体由来の対照試料における量と比較して、工程(A)で測定した被検試料における量が多いことを、被検試料がNAsh患者由来の試料であ

50

ることの指標とすることにより、NASHを検出する工程、

(C) 薬物療法、運動療法及び食事療法からなる群より選ばれる1以上の治療によりNASHが検出された被検体を治療する工程を含む、NASH治療方法を包含する。

薬物療法としては、インスリン抵抗性改善薬（例えば、ピオグリタゾン）、ビタミンE（例えば、 α トコフェノール）等が挙げられる。

【0048】

IV. NASHの進行／軽減のモニタリング方法

上記「I. NASH検出用マーカー」を用いて、被検体におけるNASHの進行／軽減のモニタリングを行うことができる。具体的には、被検試料における、AAT結合糖鎖A3Fの量を測定することを特徴とする方法により、NASHの進行又は軽減をモニタリング

10

つまり、本発明は、

(D) 第1の被検試料における、AAT結合糖鎖A3Fの量を測定する工程、

(E) 同一の被検体由来の第2の被検試料における、AAT結合糖鎖A3Fを測定する工程、

(F) 第1の被検試料の測定値と第2の被検試料の測定値を比較する工程

を含む、NASHの進行又は軽減をモニタリングする方法を包含する。該方法の結果は、被検体におけるNASHの経過（すなわち、変化があるならば、進行又は軽減）を示す。

【0049】

本発明のマーカーを一定期間以上の間を空けて少なくとも2回測定し、測定値を比較する。一定期間以上の間を空けて複数回行い、測定値の経時的変化を比較してもよい。本発明のマーカーの測定値の経時的な変化がある場合、該変化は、被検体におけるNASHの進行又は軽減を示し得る。第1の被検試料の測定値と第2の被検試料の測定値を比較することにより、本発明のマーカーの測定値が経時的に増加している場合、その結果は、該被検体におけるNASHの進行（悪化）を意味する。第1の被検試料の測定値と第2の被検試料の測定値を比較することにより、本発明のマーカーの測定値が経時的に減少している場合、その結果は、該被検体におけるNASHの軽減を意味する。

20

【0050】

該方法は、NASHに罹患している被検体におけるNASHの経過をモニタリングするために実施することができる。また、NASHに対する素因のレベルをモニタリングするために、NASHを有さない被検体（例えば、NASHを発症しやすいと疑われる被検体）で 사용할ことができる。被験者のマーカー測定値がNASHに罹患していない者（健常者又はNAFL患者）の測定値に近づくほど、NASHが重篤ではないことが示唆される。逆に、被験者のマーカー測定値がNASHに罹患していない者（健常者又はNAFL患者）の測定値から遠くなるに従い、NASHが重篤である、あるいは、病態の悪化が示唆される。

30

【0051】

V. NASHの治療効果の評価方法

上記「I. NASH検出用マーカー」を用いて、被検体におけるNASHの治療効果の評価を行うことができる。具体的には、被検試料における、AAT結合糖鎖A3Fの量を測定することを特徴とする方法により、NASHの治療効果を評価することができる。

40

つまり、本発明は、上記工程(D)～(F)をNASHの治療前、治療期、治療後等、経時的に行うことにより、NASHの治療効果を評価する方法を包含する。該方法の結果は、被検体におけるNASHの治療効果を示す。

【0052】

本発明のマーカーを一定期間以上の間を空けて少なくとも2回測定し、測定値を比較する。一定期間以上の間を空けて複数回行い、測定値の経時的変化を比較してもよい。本発明のマーカーの測定値の経時的な変化がある場合、該変化は、被検体におけるNASHの治療効果の有無を示し得る。第1の被検試料の測定値と第2の被検試料の測定値を比較することにより、本発明のマーカーの測定値が減少している場合、その結果は、該被検体に

50

におけるNASHの治療に効果があることを意味する。第1の被検試料の測定値と第2の被検試料の測定値を比較することにより、本発明のマーカーの測定値が増加している場合あるいは変化がない場合、その結果は、該被検体におけるNASHの治療に効果がないことを意味する。

【0053】

NASHの治療とは、薬物療法、運動療法、食事療法、その他NASHの治療を目的として行われる外科的治療等の治療方法を含む。本発明において、NASHの治療が行われている期間をNASHの治療期という。

本発明の治療効果の評価のための方法は、NASHの治療が一定期間以上行われ、本発明のマーカーの測定がNASH治療期に一定期間以上の間を空けて行われることが望ましい。本発明において一定期間とは特に限定されないが、好ましくは1週間、より好ましくは1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1年であり、1年以上の期間であってもよい。例えば、3ヶ月毎に定期的に被験者の被検試料におけるマーカーが測定される態様も望ましい。

【0054】

VI. NASHを治療するための物質の有効性の評価方法

上記「I. NASH検出用マーカー」を用いて、NASHを治療するための物質の有効性の評価を行うことができる。具体的には、被検試料における、AAT結合糖鎖A3Fの量を測定することの特徴とする方法により、NASHを治療するための物質の有効性の評価を行うことができる。

つまり、上記工程(D)～(F)を、NASHを治療するための物質の投与前、投与期、投与後等、経時的に行うことにより、該物質の有効性を評価する方法を含有する。該方法の結果は、該物質の有効性を示す。

【0055】

本発明のマーカーを一定期間以上の間を空けて少なくとも2回測定し、測定値を比較する。一定期間以上の間を空けて複数回行い、測定値の経時的変化を比較してもよい。本発明のマーカーの測定値の経時的な変化がある場合、該変化は、該物質の有効性の有無を示し得る。第1の被検試料の測定値と第2の被検試料の測定値を比較することにより、本発明のマーカーの測定値が減少している場合、その結果は、該物質がNASHの治療に有効であることを意味する。第1の被検試料の測定値と第2の被検試料の測定値を比較することにより、本発明のマーカーの測定値が増加している場合あるいは変化がない場合、その結果は、該物質がNASHの治療に効果がないことを意味する。

【0056】

VII. NASH検出用キット

本発明は、上記I～Vの方法に用いられるNASH検出用キットを包含する。詳しくは、AAT結合糖鎖A3Fを含む、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)検出用キットが挙げられる。

【0057】

また、 $\alpha 1$ -アンチトリプシン(AAT)に対する抗体若しくはその断片を含む、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)検出用キットも挙げられる。該キットは、A3Fが結合しているAATの被検試料からの単離やA3Fが結合しているAATの被検試料中の量の測定に利用可能である。

該抗体は、AATに特異的結合性を有する限り、その種類や由来等は特に限定されない。モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を使用できるが、好ましくはモノクローナル抗体である。また、該抗体は標識されていてもよい。

該抗体作製方法は、特に限定されず、公知の方法が利用可能である。具体的には、AAT又はその部分配列ペプチドで動物を免疫して、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を作製することができる。

【実施例】

【0058】

以下に、本発明の実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに

10

20

30

40

50

より限定されるものではない。

【0059】

実施例 1

検体

肝生検により N A F L と診断された患者の血清（17 検体）、肝生検により N A S H と診断された患者の血清（28 検体）を用いて解析を行った。N A F L 及び N A S H の診断は、病理所見に基づく M a t t e o n i 分類によって行った。M a t t e o n i 分類とは、小葉内の炎症、肝細胞の風船様変性、マロリー・デンク体あるいは線維化の有無に基づく非アルコール性脂肪性肝疾患の分類法であり、脂肪肝のみでは 1 型、1 型に小葉内炎症を伴う場合は 2 型、1 型に肝細胞の風船様変性を伴う場合は 3 型、3 型にマロリー・デンク体あるいは線維化を伴う場合は 4 型と分類される。1 型及び 2 型が N A F L、3 型及び 4 型が N A S H と診断される。

10

【0060】

A A T の分離

N A F L 及び N A S H 患者の血清 50 μ L を 0.22 μ m のフィルター（Cellulose Acetate Spin Filters, Agilent, Santa Clara, CA）で濾過した後、150 μ L の B u f f e r A（Agilent, Santa Clara, CA）で希釈した。希釈した血清を、B u f f e r A で平衡化した M A R S H S A / I g G スピンカートリッジ（Agilent, Santa Clara, CA）に供した。遠心（100 x g, 2 分間, 4 $^{\circ}$ C）し、溶出液 1 を回収した。M A R S H S A / I g G スピンカートリッジを 267 μ L の B u f f e r A で 3 回洗浄し、全ての溶出液を溶出液 1 と合わせて溶出液 2 とした。約 1000 μ L の溶出液 2 のうち、200 μ L を B u f f e r A で平衡化した M A R S H u m a n - 14 スピンカートリッジ（Agilent, Santa Clara, CA）に供した。遠心（100 x g, 2 分間, 4 $^{\circ}$ C）し、5 分間室温で静置した後、267 μ L の B u f f e r A で 3 回洗浄し、2.5 mL の B u f f e r B（Agilent, Santa Clara, CA）で A A T を含む画分を溶出した。この A A T を含む画分の溶媒を、S p i n C o n c e n t r a t o r s, 5 K M W C O（Agilent, Santa Clara, CA）を用いてリン酸緩衝生理食塩水に置換した。この溶液に N u P A G E L D S S a m p l e B u f f e r（4 X）（Invitrogen, Waltham, MA）を加え、70 $^{\circ}$ C で 15 分間加熱しタンパク質を変性させた。変性させたタンパク質 10 μ g を N u P A G E N o v e x 4 - 12 % B i s - T r i s G e l 1.0 m m, 10 W e l l（Invitrogen, Waltham, MA）で分離し、タンパク質を S i m p l y B l u e S a f e S t a i n（Invitrogen, Waltham, MA）で染色した。A A T に当たるバンドを切り出し、I n - G e l T r y p t i c D i g e s t i o n K i t（Pierce Biotechnology, Waltham, MA）を用いてゲルからのタンパク質の抽出とトリプシン消化を行った。トリプシン消化後のゲルに対して 200 μ L の精製水を加え、室温で 30 分間振とうし、上清を新しいサンプルチューブに移した（サンプル溶液 A）。次に、ゲルに対して 400 μ L の 12.5 mM 重炭酸アンモニウム緩衝液 / 50 % アセトニトリルを加え、室温で 30 分間振とうし、上清をサンプル溶液 A と合わせた（サンプル溶液 B）。さらに、ゲルに対して 200 μ L のアセトニトリルを加え、室温で 30 分間振とうし、上清をサンプル溶液 B と合わせた。この溶液を減圧乾固させた後、100 μ L の 25 mM 重炭酸アンモニウム緩衝液で溶解し、90 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱した後に氷上で冷却した（サンプル溶液 C）。

20

30

40

【0061】

A A T の糖鎖解析

サンプル溶液 C に 1 U の P N G a s e F（Basel, Switzerland）を加え、37 $^{\circ}$ C で一晩静置した。この溶液のうち、50 μ L 中に含まれる糖鎖を B l o t G l y c o（Sumitomo Bakelite Co. Ltd., Tokyo, Japan）を用いたグライコプロッティング法により a o W R 標識した。この際、サンプル中のシアル酸が持つ C O O H 基を 1 - メチル - 3 - p - トリルトリアゼン（Tokyo Chemical Industry Co., Ltd, Tokyo, japan）によってメチルエステル化した。上記のグライコプロッティングを行う際、A 3 g l y c a n（Ludger, Ox

50

fordshire, UK) を併せて a o W R 標識した。A 3 g l y c a n 中のシアル酸が持つ C O O H 基を 1-エチル-3-ポトリルトリアゼン (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd, Tokyo, japan) によってエチルエステル化した。a o W R 標識反応後、標識糖鎖を 100 μ L の精製水で溶出した。このうちの 50 μ L に対し、a o W R 標識を行った A 3 g l y c a n を 2.5 p m o l 添加し、G l y c o W o r k s H I L I C u E l u t i o n P l a t e (Waters, Milford, MA) によって糖鎖を精製した。2, 5-ジヒドロキシ安息香酸 (10 m g / m L) をマトリクスとして、U l t r a F l e x I I (Bruker Daltonics GmbsH, Bremen, Germany) により M A L D I - T O F (/T O F) 解析を行った。サンプル中の A 3 F のピークと A 3 g l y c a n のピーク比から、A 3 F の定量を行った。

10

【0062】

糖鎖解析に供した血清量を基に、A A T 結合糖鎖 A 3 F の血清中濃度を算出し、N A F L 患者と N A S H 患者とで比較した。A A T 結合糖鎖 A 3 F の検体ごとの血清中濃度を図 1 (A) に、図 1 (A) から作成した箱ひげ図を図 1 (B) に示す。また、N A F L 及び N A S H それぞれの平均値 (M e a n) 及び標準偏差 (S D) を表 1 に示す。有意差の検定には t 検定を用いた。

【0063】

【表 1】

	N A F L (M e a n $\pm$ S D)	N A S H (M e a n $\pm$ S D)	p 値 (t 検定)
A A T 結合糖鎖 A 3 F (μ M)	0.60 $\pm$ 0.48	1.6 $\pm$ 1.4	0.0011

20

【0064】

N A S H 患者血清中の A A T 結合糖鎖 A 3 F 濃度は、N A F L 患者と比較して有意に上昇していた。従って、A A T 結合糖鎖 A 3 F が、N A S H マーカーとして N A S H 患者を N A F L 患者と区別するという点で有用であることが示された。

N A S H の診断における A A T 結合糖鎖 A 3 F の R O C (受信者動作特性: r e c e i v e r o p e r a t i n g c h a r a c t e r i s t i c s) 曲線を図 2 に示した。R O C 曲線は R (V e r 3.3.2) を用いて作成した。R O C 曲線から求めた R O C 曲線下面積は 0.775 であった。R O C 曲線において、特異度と感度との和が最大となる点をカットオフ値とすると、その値は 0.8 μ M であった。カットオフ値を 0.8 μ M とした場合、N A S H の診断における感度は 64%、特異度は 82% であった。

30

N A S H 患者血清中の A A T 結合糖鎖 A 3 F 濃度は 0.3 μ M 以上であったことから、カットオフ値を 0.3 μ M とすることで、偽陰性を排除することができる。カットオフ値を 0.3 μ M とした場合、N A S H 診断における感度は 100%、特異度は 29.4% であった。

【0065】

実施例 2

検体

40

肝生検により N A F L と診断された患者の血清 (31 検体)、肝生検により N A S H と診断された患者の血清 (38 検体) を用いて解析を行った。N A F L 及び N A S H の診断は、実施例 1 と同様に病理所見に基づく M a t t e o n i 分類によって行った。

【0066】

免疫沈降法による A A T の精製

0.45 μ m の遠心式フィルターユニット (Ultrafree-MC HV Centrifugal Filter, Millipore, Billerica, Massachusetts) に 300 μ L の A f f i - G e l B l u e G e l (Bio-Rad, Alfred Nobel Drive Hercules, CA) と 70 μ L の P r o t e i n G S e p h a r o s e 4 F a s t F l o w (GE Healthcare, Chicago, Illinois) を入れ、20 m M リン酸ナトリウム緩衝液 (p H 7.0) で平衡化し、カラム A とした。

50

N A F L 及び N A S H 患者の血清 5 0 μ L を 1 5 0 μ L の 2 0 m M リン酸ナトリウム緩衝液 (p H 7 . 0) で希釈し、0 . 4 5 μ m の遠心式フィルターユニット (Ultrafree-MC HV Centrifugal Filter) で濾過した。濾過した血清をカラム A に供し、室温で 1 0 分間振とうして混和した。遠心 (2 5 0 0 x g , 1 分間, 室温) し、溶出液を再度カラム A に供し、室温で 1 0 分間振とうして混和した。遠心 (2 5 0 0 x g , 1 分間, 室温) し、溶出液を回収した (溶出液 3) 。カラム A を 2 5 0 μ L の 2 0 m M リン酸ナトリウム緩衝液 (p H 7 . 0) で洗浄し、洗浄液を溶出液 3 と合わせて溶出液 4 とした。新しい 0 . 4 5 μ m の遠心式フィルターユニット (Ultrafree-MC HV Centrifugal Filter) に 2 0 μ L の A l p h a - 1 A n t i t r y p s i n S e l e c t (GE Healthcare) を入れ、1 5 0 m M 塩化ナトリウム / 2 0 m M リン酸ナトリウム緩衝液 (p H 7 . 0) で平衡化し、カラム B とした。溶出液 4 に 5 M 塩化ナトリウム水溶液を加えることで溶媒を 1 5 0 m M 塩化ナトリウム / 2 0 m M リン酸ナトリウム緩衝液 (p H 7 . 0) とし、カラム B に供して室温で 3 0 分間振とうして混和した。遠心 (1 0 0 x g , 5 分間, 室温) し、溶出液を再度カラム B に供し、室温で 3 0 分間振とうして混和した。遠心 (1 0 0 x g , 5 分間, 室温) し、カラム B を 2 0 0 μ L の 1 5 0 m M 塩化ナトリウム / 2 0 m M リン酸ナトリウム緩衝液 (p H 7 . 0) で 3 回洗浄した。カラム B に 2 0 0 μ L の 2 M 塩化マグネシウム / 2 0 m M トリスー塩酸緩衝液 (p H 7 . 0) を添加し、室温で 1 分間振とうして混和した。遠心 (1 0 0 0 x g , 1 分間, 室温) し、A A T を含む溶出液 5 を回収した。カラム B に再度 2 0 0 μ L の 2 M 塩化マグネシウム / 2 0 m M トリスー塩酸緩衝液 (p H 7 . 0) を添加し、室温で 1 分間振とうして混和した。遠心 (1 0 0 0 x g , 1 分間, 室温) し、溶出液を溶出液 5 と合わせた。この溶液の溶媒を、Amicon (登録商標) U l t r a 0 . 5 m L C e n t r i f u g a l F i l t e r s (M W C O = 3 k D a) (Millipore) を用いて 1 0 m M 重炭酸アンモニウム溶液に置換し、精製 A A T 溶液とした。

10

20

30

40

50

【0067】

E L I S A による A A T 濃度測定

血清及び精製 A A T 溶液の A A T 濃度を H u m a n S e r p i n A 1 D u o S e t E L I S A (R&D Systems, Inc., McKinley Place NE, MN) で測定した。N u n c (登録商標) M a x i S o r p TM 3 8 4 w e l l p l a t e (N u n c , R o s k i l d e , D e n m a r k) にリン酸緩衝生理食塩水で 4 0 0 n g / m L とした捕捉抗体を 1 5 μ L / ウェルで加え、4 $^{\circ}$ C で 1 晩静置した。9 0 μ L の洗浄液 (0 . 0 5 % T w e e n 2 0 / P B S) で 3 回洗浄し、7 0 μ L の 5 % T w e e n 2 0 / P B S でブロッキングした。9 0 μ L の洗浄液で 2 回洗浄し、5 % T w e e n 2 0 / P B S で懸濁した試料を 1 5 μ L / ウェルで添加し、室温で 2 時間静置した。9 0 μ L の洗浄液で 4 回洗浄し、5 % T w e e n 2 0 / P B S で 1 5 0 n g / m L とした検出抗体を 1 5 μ L / ウェルで加え、室温で 2 時間静置した。9 0 μ L の洗浄液で 4 回洗浄し、5 % T w e e n 2 0 / P B S で 1 0 0 0 倍に希釈した H R P 標識ストレプトアビジン溶液を 1 5 μ L / ウェルで加え、室温で 3 0 分間静置した。9 0 μ L の洗浄液で 4 回洗浄し、T M B 溶液 (Dako , Santa Clara, California) を 1 5 μ L / ウェルで加え、室温で 3 0 分間静置した。1 5 μ L の 1 N 硫酸で反応を停止し、B e n c h m a r k P l u s (Bio-Rad) を用いて 4 5 0 n m における吸光度を測定した。A A T 定量における標品として S i g m a 社 (St . Louis, Missouri) から購入したヒト血漿由来 A A T を用い、試料中の A A T 濃度を定量した。

【0068】

A A T の糖鎖解析

1 0 μ g の A A T に対して還元・アルキル化処理を行い、0 . 1 μ g のトリプシンを加えて 3 7 $^{\circ}$ C で一晩静置した。9 0 $^{\circ}$ C , 1 0 分間の加熱によってトリプシンを失活させた後、1 U の P N G a s e F (Roche, Basel, Switzerland) を加えて 3 7 $^{\circ}$ C で一晩静置した。9 0 $^{\circ}$ C , 1 0 分間の加熱によって酵素を失活させた。A A T から遊離した糖鎖を実施例 1 の「A A T の糖鎖解析」と同様の方法で定量した。A A T に由来する A 3 F の正確な定

量を目的とし、 $1\text{ }\mu\text{g}$ あたり 15 pmol のA3Fを含むと報告されている (Anal Chim Acta. (2015) 25;866:59-68.) $\alpha 1\text{-acid glycoprotein}$ に由来する糖鎖で検量線を作成し、A3Fの定量値を算出した。

【0069】

MALDI-TOF MSによるA3F定量値 ($\text{pmol}/\mu\text{g AAT}$) と、ELISAで測定した血清中AAT濃度 (mg/mL) から、AAT-A3Fの血清中濃度 (μM) を算出し、その値をNAFL患者とNASH患者とで比較した。AAT結合糖鎖A3Fの検体ごとの血清中濃度を図3 (A) に、図3 (A) から作成した箱ひげ図を図3 (B) に示す。また、NAFL及びNASHそれぞれの平均値 (Mean) 及び標準偏差 (SD) を表2に示す。有意差の検定にはt検定を用いた。

10

【0070】

【表2】

	NAFL (Mean $\pm$ SD)	NASH (Mean $\pm$ SD)	p値 (t検定)
AAT結合糖鎖A3F (μM)	7.4 $\pm$ 5.1	11 $\pm$ 7.7	0.020

【0071】

NASH患者血清中のAAT結合糖鎖A3F濃度は、NAFL患者と比較して有意に上昇していた。従って、AAT結合糖鎖A3Fが、NASHマーカーとしてNASH患者をNAFL患者と区別するという点で有用であることが示された。

20

NASHの診断におけるAAT結合糖鎖A3FのROC曲線を図4に示した。ROC曲線はR (Ver 3.3.2) を用いて作成した。ROC曲線から求めたROC曲線下面積は0.655であった。ROC曲線において、特異度と感度との和が最大となる点をカットオフ値とすると、その値は $9\text{ }\mu\text{M}$ であった。カットオフ値を $9\text{ }\mu\text{M}$ とした場合、NASHの診断における感度は58%、特異度は74%であった。

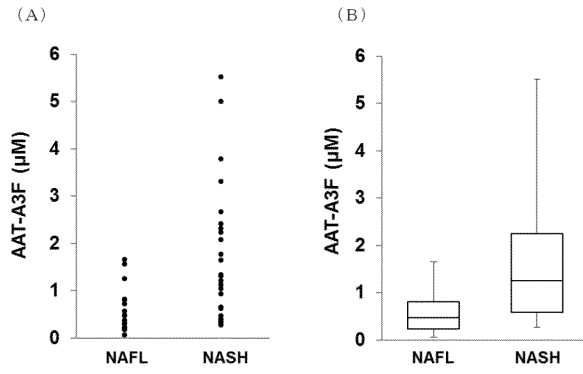
【産業上の利用可能性】

【0072】

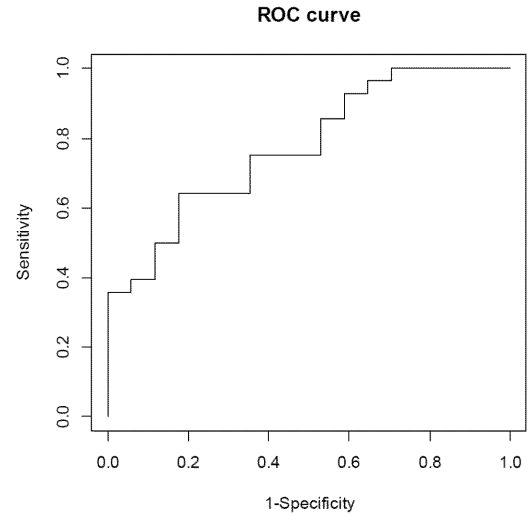
本発明のマーカーは、NASHとNAFLを区別することができ、NASHの診断方法、NASHの進行又は軽減のモニタリング方法、NASHの治療効果の評価方法、NASHを治療するための物質の有効性の評価に有用である。

30

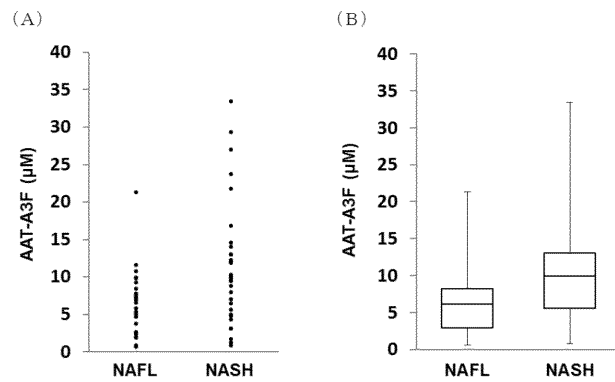
【図 1】



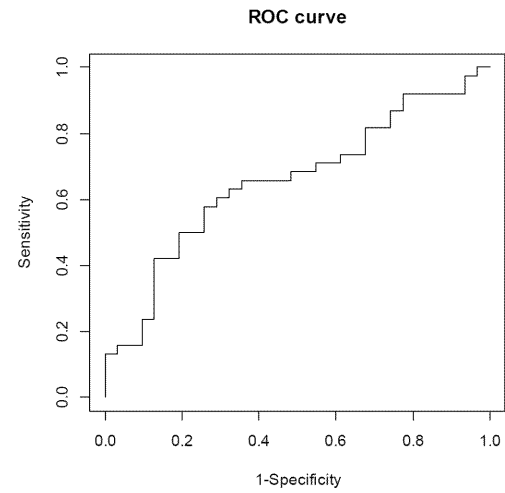
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/001450

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/576(2006.01)i, G01N33/50(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)

G01N33/576, G01N33/50

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	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDREAMIII), CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOHLI Rohit et al., High serum alpha-1-antitrypsin levels are associated with more fibrosis in NASH, hepatology, 2012.10, Vol.56, No.4.supple., PP.893A-894A	1-10
A	Eiji MIYOSHI et al., "Kanshikkan no Tosa Biomarker to shitenno Fucosylation Haptoglobin", The Japanese Society of Carbohydrate Research Nenkai Yoshishu, 01 July 2015 (01.07.2015), vol.34th, page 85	1-10
A	Yutaka AOYAGI, "Glycosylation patterns of serum glycoprotein with reference to disease category", Jpn. J. Electroph., 1996.06, vol.40, no.3, pages 123 to 128	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ 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
10 April 2017 (10.04.17)Date of mailing of the international search report
18 April 2017 (18.04.17)Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/001450

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009/090882 A1 (The University of Tokyo), 23 July 2009 (23.07.2009), claims (Family: none)	1-10
A	WO 2012/105590 A1 (Astellas Pharma Inc.), 09 August 2012 (09.08.2012), claims (Family: none)	1-10

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 0 1 4 5 0	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/576(2006.01)i, G01N33/50(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. G01N33/576, G01N33/50			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2017年 日本国実用新案登録公報 1996-2017年 日本国登録実用新案公報 1994-2017年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/BIOSIS (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	
A	KOHLI Rohit et al., High serum alpha-1-antitrypsin levels are associated with more fibrosis in NASH, hepatology, 2012.10, Vol.56, No.4. suppl., PP.893A-894A	1-10	
A	三善英知 ほか, 肝疾患の糖鎖バイオマーカーとしてのフコシル化ハプトグロビン, 日本糖質学会年会要旨集, 2015.07.01, Vol.34th, P.85	1-10	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 10.04.2017		国際調査報告の発送日 18.04.2017	
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) 海野 佳子 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2 J 3906

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 0 1 4 5 0
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	青柳豊, 血清糖蛋白糖鎖変異とその疾患特異性, Jpn. J. Electroph., 1996.06, Vol. 40, No. 3, PP. 123-128	1-10
A	W0 2009/090882 A1 (国立大学法人東京大学) 2009.07.23, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-10
A	W0 2012/105590 A1 (アステラス製薬株式会社) 2012.08.09, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-10

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
C O 7 K 14/47 (2006.01) C 1 2 Q 1/37
 C O 7 K 14/47

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, DJ, 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, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

(72)発明者 篠原 康郎
 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内
 (72)発明者 小川 浩司
 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内
 (72)発明者 古川 潤一
 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内
 (72)発明者 須田 剛生
 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内
 (72)発明者 沼田 義人
 大阪府豊中市二葉町3丁目1番1号 塩野義製薬株式会社内
 (72)発明者 東野 賢一
 大阪府豊中市二葉町3丁目1番1号 塩野義製薬株式会社内
 (72)発明者 内藤 正一
 大阪府豊中市二葉町3丁目1番1号 塩野義製薬株式会社内
 (72)発明者 吉田 康伸
 大阪府豊中市二葉町3丁目1番1号 塩野義製薬株式会社内
 (72)発明者 小林 隆史
 大阪府豊中市二葉町3丁目1番1号 塩野義製薬株式会社内

Fターム(参考) 2G041 CA01 DA04 EA03 EA04 EA12 FA12 FA13 GA09 HA01 JA02
 JA04 LA08
 2G045 AA25 CA25 CA26 DA44
 4B063 QA01 QA11 QA18 QA19 QQ03 QQ67 QQ79 QR16 QS10 QS13
 QS14 QS28 QS39
 4H045 AA10 AA30 BA10 BA53 CA40 DA56 EA50 GA01 GA10 GA15

(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。

专利名称(译)	检测非酒精性脂肪性肝炎的方法		
公开(公告)号	JPWO2017126514A1	公开(公告)日	2018-12-20
申请号	JP2017562826	申请日	2017-01-18
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人北海道大学		
申请(专利权)人(译)	塩野义制薬株式会社 国立大学法人北海道大学		
[标]发明人	坂本直哉 篠原康郎 小川浩司 古川潤一 須田剛生 沼田義人 東野賢一 内藤正一 吉田康伸 小林隆史		
发明人	坂本 直哉 篠原 康郎 小川 浩司 古川 潤一 須田 剛生 沼田 義人 東野 賢一 内藤 正一 吉田 康伸 小林 隆史		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/50 G01N33/53 G01N27/62 C12Q1/37 C07K14/47		
CPC分类号	G01N33/50 G01N33/576		
FI分类号	G01N33/576.Z G01N33/50.Z G01N33/53.S G01N27/62.V G01N27/62.X C12Q1/37 C07K14/47		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/DA04 2G041/EA03 2G041/EA04 2G041/EA12 2G041/FA12 2G041/FA13 2G041/GA09 2G041/HA01 2G041/JA02 2G041/JA04 2G041/LA08 2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA44 4B063/QA01 4B063/QA11 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ67 4B063/QQ79 4B063/QR16 4B063/QS10 4B063/QS13 4B063/QS14 4B063/QS28 4B063/QS39 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA53 4H045/CA40 4H045/DA56 4H045/EA50 4H045/GA01 4H045/GA10 4H045/GA15		
代理人(译)	杉田賢一 渡边秀明		
优先权	2016008048 2016-01-19 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种新颖的标记物，其用作检测NASH的指示剂（特别是区分NASH和NAFL的指示剂），使用该标记物检测NASH的方法以及使用该标记物检测NASH的试剂盒。。具体而言，标记是与 α 1-抗胰蛋白酶结合的糖链A3F。

