

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5893742号  
(P5893742)

(45) 発行日 平成28年3月23日 (2016. 3. 23)

(24) 登録日 平成28年3月4日 (2016. 3. 4)

(51) Int.Cl.		F I			
GO 1 N 33/53	(2006. 01)	GO 1 N	33/53		D
GO 1 N 33/543	(2006. 01)	GO 1 N	33/543		5 O 1 A
CO 7 K 1/32	(2006. 01)	GO 1 N	33/543		5 O 1 H
		CO 7 K	1/32		

請求項の数 30 (全 45 頁)

(21) 出願番号	特願2014-531321 (P2014-531321)	(73) 特許権者	514069333
(86) (22) 出願日	平成23年9月22日 (2011. 9. 22)		ユニベルシダ デ ロス アンデス
(65) 公表番号	特表2014-528076 (P2014-528076A)		チリ共和国 9 1 0 0 3 9 1 0 サンティ
(43) 公表日	平成26年10月23日 (2014. 10. 23)		アゴ, ラス コンデス, サン カルロ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2011/054187		ス デ アポルキンド 2 2 0 0
(87) 国際公開番号	W02013/041913	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成25年3月28日 (2013. 3. 28)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	平成26年9月19日 (2014. 9. 19)	(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(74) 代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		(74) 代理人	230113332
			弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 早期における急性腎損傷をモニタリング、診断、および／または予後診断するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体における早期急性腎損傷 (AKI) の指標として AKI マーカーを使用する方法であって、

( a ) 前記被験体に由来する尿試料を、エキソソーム画分を得るために濃縮するステップであって、前記濃縮するステップは、少なくとも 1 ステップの免疫精製を含み、前記免疫精製ステップは、近位尿細管、遠位尿細管、集合管およびヘンレループからなる群より選択される腎構造において好ましくかつ示差的に発現されるタンパク質に対する抗体により実施される、ステップと、

( b ) 前記エキソソーム画分内の前記 AKI マーカーを検出および／または定量化するステップとを含む、方法。

【請求項 2】

前記免疫精製が、前記腎構造において発現されるタンパク質のドメインに対する抗体により実施される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記免疫精製が、前記腎構造において発現されるタンパク質の細胞内ドメインに対する抗体により実施される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記免疫精製が、前記腎構造において発現されるタンパク質の細胞外ドメインに対する

抗体により実施される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記免疫精製ステップのための前記抗体が、抗アクアポリン 1 (抗 A Q P 1)、抗アクアポリン 2 (抗 A Q P 2)、抗アクアポリン 3 (抗 A Q P 3)、抗 N K C C 2、抗 N H E - 3、抗 N a P i I I 抗体、およびこれらの組合せからなる群より選択される、請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記抗体が抗 A Q P 1 である、請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記腎構造が、近位尿細管である、請求項 2 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 8】

前記免疫精製の前に、前記尿をエキソソームについて濃縮するステップをさらに含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記尿試料が、脱細胞化された尿試料である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記 A K I マーカーが、N G A L、シスタチン - 3、K I M - 1、I L - 1 ベータ、I L - 1 8、およびこれらの組合せからなる群より選択される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 11】

前記 A K I マーカーが、N G A L である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記検出が、前記 A K I マーカーに対する一次抗体との免疫反応により実施される、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記一次抗体が標識されており、そして前記標識が、酵素、蛍光化合物、赤外化合物、放射性化合物、または化合物からなる群より選択される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 14】

前記 A K I マーカーを定量化するステップが、前記 A K I マーカーのレベルを定量化することを含み、そして前記ステップが、前記被験体における処置を決定するために使用される、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 15】

早期 A K I を評価するためのキットであって、

( a ) 少なくとも 1 ステップの免疫精製を用いて、尿試料をエキソソーム画分を得るために濃縮するための抗体と、

( b ) 前記エキソソーム画分について濃縮された尿試料中の急性腎損傷 ( A K I ) マーカーを検出するための抗体と

を含み、前記抗体は、近位尿細管、遠位尿細管、集合管およびヘンレループからなる群より選択される腎構造において好ましくかつ示差的に発現されるタンパク質に対する抗体である、キット。

40

【請求項 16】

( c ) 尿試料を得るための手段をさらに含む、請求項 1 5 に記載のキット。

【請求項 17】

前記免疫精製ステップのための前記抗体が、抗アクアポリン 1 (抗 A Q P 1)、抗アクアポリン 2 (抗 A Q P 2)、抗アクアポリン 3 (抗 A Q P 3)、抗 N K C C 2、抗 N H E - 3、抗 N a P i I I、およびこれらの組合せからなる群より選択される、請求項 1 5 または 1 6 に記載のキット。

【請求項 18】

前記免疫精製の前に、前記尿試料を濃縮するための試薬をさらに含む、請求項 1 5 ~ 1

50

7のいずれか一項に記載のキット。

【請求項19】

前記A K I マーカーを検出するための前記抗体が、抗N G A L、抗シスタチン - 3、抗K I M - 1、抗I L - 1 ベータ、抗I L - 1 8、およびこれらの組合せからなる群より選択される、請求項 1 5 ~ 1 8 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項20】

前記A K I マーカーを検出するための前記抗体が標識されている、請求項 1 9 に記載のキット。

【請求項21】

標識された二次抗体をさらに含む、請求項 1 9 に記載のキット。

10

【請求項22】

前記標識が、酵素、蛍光化合物、赤外化合物、放射性化合物、および化合物からなる群より選択される、請求項 2 0 または 2 1 に記載のキット。

【請求項23】

前記キットを用いるための指示書をさらに含む、請求項 1 5 ~ 2 2 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項24】

尿試料からエキソソーム画分を精製するための方法であって、

( a ) 尿試料を、近位尿細管、遠位尿細管、集合管およびヘンレループからなる群より選択される腎構造において好ましくかつ示差的に発現されるタンパク質のドメインに対する抗体と共にインキュベートし、これにより、エキソソーム - 抗体複合体を形成するステップと、

20

( b ) ( a ) から得られる前記エキソソーム - 抗体複合体を、前記抗体を認識し、不溶性作用物質に結合しているタグと共にインキュベートし、これにより、エキソソーム - 抗体 - タグ - 不溶性作用物質複合体を形成するステップと、

( c ) 前記エキソソーム - 抗体 - タグ - 不溶性作用物質複合体を上清から分離するステップと、

( d ) 前記エキソソーム - 抗体 - タグ - 不溶性作用物質複合体を緩衝液で洗浄するステップと

を含み、ここで、前記精製されたエキソソーム画分がA K I マーカーの検出に使用される、方法。

30

【請求項25】

前記尿試料が、脱細胞化された尿試料である、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項26】

前記腎構造が、近位尿細管である、請求項 2 4 または 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項27】

前記抗体が、抗アクアポリン1 ( 抗A Q P 1 )、抗アクアポリン2 ( 抗A Q P 2 )、抗アクアポリン3 ( 抗A Q P 3 )、抗N K C C 2、抗N H E - 3、抗N a P i I I、およびこれらの組合せからなる群より選択される、請求項 2 4 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項28】

前記抗体が抗A Q P 1 である、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項29】

尿中エキソソーム画分を免疫精製するための方法であって、

近位尿細管、遠位尿細管、集合管およびヘンレループからなる群より選択される腎構造において好ましくかつ示差的に発現されるタンパク質のドメインに対する抗体または抗体の組合せを使用するステップを含み、ここで、前記免疫精製された尿中エキソソーム画分がA K I マーカーの検出に使用される、方法。

【請求項30】

50

尿中エキソソーム画分を免疫精製するための方法であって、

抗アクアポリン1（抗AQP1）、抗アクアポリン2（抗AQP2）、抗アクアポリン3（抗AQP3）、抗NKCC2、抗NHE-3、抗NaPiII、およびこれらの組合せからなる群より選択される抗体または抗体の組合せを使用するステップを含み、ここで、前記免疫精製された尿中エキソソーム画分がAKIマーカーの検出に使用される、方法

。【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、早期における急性腎損傷をモニタリング、診断、および/または予後診断し、それを患う被験体における処置を決定するための方法およびキットに関する。 10

【背景技術】

【0002】

腎臓とは、体内の複数の機能を果たす臓器であり、中でも、代謝時に産生される体内の老廃物質の除去、および身体に必要な物質の血液への還流のほか、体液の容量および組成の調節が挙げられる。体内の水電解質バランスは、腎機能により維持される（Guyton A.、Hall J.E.、2001年、Medical Physiology Treaty、10版、Mexico DF、Mexico：McGraw-Hill Interamericana）。

【0003】

腎疾患は、多くの国々において、最も重要な死亡原因のうちの1つである。米国では、1994年までに、1500万を超える人々が腎疾患を呈し、これは、患者の生活の質の悪化および死亡の原因となった（Guyton A.、Hall J.E.、2001年、Medical Physiology Treaty、10版、Mexico DF、Mexico：McGraw-Hill Interamericana）。 20

【0004】

腎疾患の臨床症状発現は、十分によく定義された症候群へと群分けすることができる。あるものは、糸球体の疾患に特異的であり、他のものは、腎構造のうちのいずれかに影響を及ぼす疾患の中に存在する。これらの疾患は、多くの国々における罹患および死亡の主要な原因の中にある（Guyton A.、Hall J.E.、2001年、Medical Physiology Treaty、10版、Mexico DF、Mexico：McGraw-Hill Interamericana）。 30

【0005】

重度の腎疾患は、2つの主なカテゴリーへと群分けすることができる。

【0006】

病態

腎不全とは、腎臓が適正に機能せず、糸球体濾過率が低減される臨床状態である。臨床的に、この欠陥は、2つの群：急性腎損傷（AKI）および慢性腎不全（CRF）へと分けられる（Guyton A.、Hall J.E.、2001年、Medical Physiology Treaty、10版、Mexico DF、Mexico：McGraw-Hill Interamericana）。 40

【0007】

腎不全

急性腎損傷

急性腎損傷の症状の中には、血中の窒素化生成物の蓄積に対応する高窒素血症を伴う乏尿または無尿（尿排出の減少または非存在）が含まれる。また、体液および塩分の過負荷を決定する水分の滞留に起因して、代謝性老廃生成物も蓄積され、この結果として、浮腫および高血圧症がもたらされる。

【0008】

症状のうちの最大の脅威の1つが、8 mEq / Lを上回るカリウムの滞留（高カリウム 50

血症)であり、これは、致死性でありうるであろう。腎臓が正常量の水素イオンを排出しない結果として、代謝性アシドーシスの症状発現がもたらされる。

【0009】

この疾病が、消散することなく持続するなら、完全な無尿に至り、8～14日間以内に死亡をもたらす( Guyton A.、Hall J.E.、2001年、Medical Physiology Treaty、10版、Mexico DF、Mexico: McGraw-Hill Interamericana)。

【0010】

AKIは、3つの主なカテゴリー：腎前性AKI、腎内性AKI、および腎後性AKIへと分けられる。

【0011】

## 【表 1 - 1】

表1:急性腎損傷の原因(Guyton A., Hall J.E., 2001年、Medical Physiology Treaty、10版、Mexico DF、Mexico:McGraw-Hill Interamericana)

腎前性急性腎損傷のいくつかの原因		
血管内容量の枯渇	出血(外傷による出血、手術による出血、産後における出血、消化器における出血)	10
	下痢	
	火傷	
原発性腎血行障害	腎動脈狭窄	20
	腎動脈または腎静脈の塞栓または血栓	
	プロスタグランジン合成の遮断過剰(アスピリン)	
末梢における血管拡張および結果としてもたらされる低血圧症	アナフィラキシーショック、敗血症、重篤な感染症	
	感覚麻痺	
腎内性急性腎損傷のいくつかの原因		
小血管、糸球体、またはこれらの両方に対する損傷	血管炎(結節性多発性動脈炎)	30
	コレステロール性塞栓	
	悪性高血圧症	
	急性糸球体腎炎	
尿細管上皮損傷(尿細管壊死)	虚血性急性尿細管壊死	40
	毒素(重金属、エチレングリコール、殺虫剤、毒キノコ、四塩化炭素)による急性尿細管壊死	
腎間質の損傷	急性腎盂腎炎	
	急性アレルギー性間質性腎炎	
腎後性急性腎損傷のいくつかの原因		
尿管または腎盂の両側性閉塞	腎臓結石	

【表 1 - 2】

	凝血塊
膀胱閉塞	
尿管閉塞	

先進諸国において、AKIとは、主に院内で獲得される病理学的状態であって、敗血症、外科的介入、特に、心臓の手術、虚血、腎毒素の投与など、複数の因子によりもたらされる状態であり、したがって、AKIの影響を防止および減殺するためには、最新の診断技術および処置が必要とされる（Vukusich A.、Alvear F.、Villanueva P.、Gonzalez C.、Olivari F.、Alvarado N.、Zehnder C.、2004年、Rev. Med. Chile、132巻：1355～1361頁）。

10

## 【0013】

AKIエピソードを発症する患者の大半は、許容されるレベルの腎機能を回復するので、彼らは透析に依存しないが、これらの患者のうちの10～20%は、最終的には、恒久的な透析を必要とする（Fauci, A.、2009年、Harrison's Principles of Internal Medicine、Mexico、F. D. Interamericana - McGraw Hill）。入院患者のうちの5～7%の間は、AKIエピソードと関連する合併症を有し、ICUにおける費用のうちの30%の原因となっている（Fauci, A.、2009年、Harrison's Principles of Internal Medicine、Mexico、F. D. Interamericana - McGraw Hill）。AKIは、重大な問題であり、このため、とりわけ、ICU患者など、危険性の高い患者における病態に対する早期の介入を開発するために、多大な努力がなされている（Vukusich A.、Alvear F.、Villanueva P.、Gonzalez C.、Olivari F.、Alvarado N.、Zehnder C.、2004年、Rev. Med. Chile、132巻：1355～1361頁；Schrier R.、2010年、Nat. Rev. Nephrol.、6巻：56～59頁）。

20

30

## 【0014】

## 慢性腎不全

前述の通り、慢性腎不全とは、機能するネフロンの中の大多数が不可逆的に失われることの帰結である。

## 【0015】

機能するネフロンの数が、正常時の20～30%を上回って保持されている限り、腎効率は、我々が大半の電解質の比較的正常な血液濃度および体液の適切な容量を維持することを可能とする。この数字を上回っていれば、重篤な臨床症状が生じることはない（Guyton A.、Hall J. E.、2001年、Medical Physiology Treaty、10版、Mexico DF、Mexico：McGraw-Hill Interamericana）。

40

## 【0016】

慢性腎不全の最も重要な原因の中には、表2において記載される原因がある。

## 【0017】

## 【表 2】

表2:慢性腎機能不全の原因(Guyton A.、Hall J.E.、2001年、Medical Physiology Treaty、10版、Mexico DF、Mexico:McGraw-Hill Interamericana)

代謝性障害	糖尿病	10
	アミロイドーシス	
腎血管障害	アテローム性動脈硬化	10
	腎硬化症-高血圧症	
免疫障害	糸球体腎炎	20
	結節性多発性動脈炎	
	エリテマトーデス	
感染症	腎盂腎炎	20
	結核	
原発性尿細管障害	腎毒素(鎮痛剤、重金属)	
尿路閉塞	腎臓結石	30
	前立腺肥大	
	尿道狭窄	
先天性障害	多嚢性疾患	30
	先天性腎組織欠損(腎形成不全)	

## 末期腎疾患 ( E S R D )

多くの症例において、腎臓の初期病変は、生存するには患者が透析または腎移植のためのプログラムに参加しなければならないところまで、腎機能の進行性の悪化およびネフロンの持続的な喪失をもたらす。この状態を慢性腎不全と称する ( Kumar V .、Co tran R .、2000年、Structural and Functional Pathology of Robbins、6版、Madrid、Spain:Elsevier )。

【 0 0 1 8 】

## 【表3】

表3:ESRDの最も高頻度の原因(Kumar V.、Cotran R.、2000年、Structural and Functional Pathology of Robbins、6版、Madrid、Spain:Elsevier)

原因	ESRDを伴う患者の百分率(%)
糖尿病	41
高血圧症	28
糸球体腎炎	11
多嚢性腎疾患	3
他の原因/未知の原因	18

10

## 腎移植

腎移植は、ESRDの最も有効な処置である。移植の成功は、ドナーの種類など、多くの因子に依存する。腎臓の移植片が由来するドナーは、死亡している場合もあり、生存している場合もある。移植される全ての臓器は、移植と関連する虚血および再灌流過程に起因する急性損傷を受ける。

20

## 【0019】

生体ドナー移植は、とりわけ、若齢患者における末期の慢性腎不全を処置するための優れた治療選択肢である。生体ドナー移植は、規定された移植前プロトコルに従い、短い虚血時間(30分間未満)と併せて、臓器の良好な生存を支援することを可能とする。生存は、10年間を超え、死体ドナーに由来する臓器による移植と比較して17~20%長い。

## 【0020】

死体ドナー移植の場合、患者は待機リストに入り、A B OおよびH L Aによる適合性の程度に関する選択がなされる。選択基準の中には、年齢、ドナーのボディマス指数とレシピエントのボディマス指数との類似性、それが初めての移植に対応するのかどうか、および移植が一方の腎臓であるのか両方の腎臓であるのかがある。この場合、臓器の虚血時間は数時間延長される可能性があり(1または2日間の可能性もあり)、これにより、移植された臓器の劣化が増大する。また、慢性透析患者には、さらなる合併症も見られる。

30

## 【0021】

腎移植患者は、まず集中治療室(ICU)または移植ユニットにおいて、後に、入院してまたは外来患者として、注意深いモニタリングを必要とする。モニタリングの間に、複数の外科的または内科的な合併症が生じうる。一部の合併症は早期であり、ICUまたは移植ユニットになおも限定している間に処置されうるが、移植を施されて長期間の後になおも合併症が生じる可能性(遅発型合併症)もあるので、このモニタリングは、患者の全生涯にわたり延長されるべきである。移植片が機能する間は、免疫抑制療法を投与して、移植された臓器の生存、患者の生存を延長し、患者の生活の質を改善することが必要である。この処置は、各患者の臨床状態および血清学的状態に対して調整される。免疫抑制剤と共に、健康な生活様式にしたがうように患者を励ますこと、24時間尿によるタンパク尿症およびクレアチニンのモニタリング、高脂血症に対する処置の投与、血圧のコントロール、デノボ糖尿病が生じる可能性、移植片の機能異常の場合は慢性腎不全が生じる可能性が含まれる、他の側面も、長期にわたる腎移植のモニタリングの範囲内で考慮に入れるべきである。

40

50

## 【0022】

腎移植された患者は、ヒトにおけるAKIの良好なモデルである。これらの患者は、被験バイオマーカーを変化させうる他の病態が存在しないという利点を有する。しかし、これらの患者は、免疫抑制薬理下にあるという欠点も有する。

## 【0023】

急性腎損傷(AKI)の診断法

急性腎損傷(AKI)は、腎機能の悪化に対応する病期に応じて、異なるレベルに分類することができる。

## 【0024】

AKIは、多様なパラメータに応じて分類されるが、最も一般的なパラメータは、血清クレアチニン(SCR)および利尿(D)の決定であるが、これらは、疾患の発症の後期において出現し、したがって、早期におけるAKIの診断法を可能とするものではない。

## 【0025】

クレアチニン

クレアチニンとは、ホスホクレアチンの分解により筋組織内で形成される代謝性副産物であり、これは、糸球体レベルでの濾過を介して体内から除去される。クレアチニンの総産生速度は、筋肉量(muscular mass)、筋活動(muscular activity)、性別、年齢、およびタンパク質の総消費に依存する。これらの変数はまた、血漿クレアチニンレベルにも影響を及ぼす。これらの限界にもかかわらず、血清クレアチニンレベルが0.6~1.2mg/dlを上回る場合のAKIの診断法に最もよく用いられる方法である。

## 【0026】

クレアチニンクリアランス

クレアチニンクリアランスとは、ある時間内に血流から除去されるクレアチニンの量である。このパラメータは、糸球体濾過を推定するために決定される。通常のクレアチニンクリアランスレベルは、125~150ml/分の間であり、女性ではわずかに低くなる。

## 【0027】

乏尿

乏尿とは、毎日産生される溶質を除去するための正常な代謝状態において放出されるべき尿の最小量を400mlと考えると、尿産生の値が1日当たり400mlを下回る尿産生の減少と定義される。

## 【0028】

尿毒症

尿毒症は、血中の尿素レベルの上昇に対応する。このパラメータの決定は、血中尿素窒素(BUN)の決定を介し、正常値では、8~18mg/dlの間にある。

## 【0029】

RIFLE(Risk, Injury, Failure, Loss of kidney function and End-stage kidney disease)

分類

RIFLEとは、AKIの異なる病期：危険性期、損傷期、不全期、腎機能喪失期、末期腎疾患を分類するために提起されているツールである。RIFLEは、患者の血清クレアチニン(SCR)レベルおよび利尿(D)レベルに基づく(Carrillo R.、Castro J.、RIFLE scale、Journal of Mexican association of critic medicine and intensive therapy、23巻(4号)：241~244頁)。本発明で用いられる通り、AKI1、AKI2、およびAKI3が、RIFLEのR、I、およびLのそれぞれの病期に対応する。

## 【0030】

好中球ゼラチナーゼ会合リボカリン(NGAL)

ゲノミクスおよびプロテオミクスを用いて、NGAL、シスタチン-3、KIM-1、IL-1ベータ、およびIL-18を含め、急性腎損傷の潜在的なマーカーとしての一連の分子が同定されている。

【0031】

NGALは通常、低濃度で発現し、上皮傷害に応じて著明に増大する(Schmidt-Ott K.M., Mori K., Kalandadze A., Li J.Y., Paragas N., Nicholas T., Devarajan P., Barasch J., 2006年、Curr Opin Nephrol Hypertens、15巻:442~449頁; Cowland J.B., Borregaard N., 1997年、Genomics、45巻:17~23頁)。

10

【0032】

NGALとは、リポカリンファミリーに属する小型のタンパク質である。ヒトNGALは、ジスルフィド架橋を伴い、178アミノ酸残基を有する質量23kDaの、単一のポリペプチド鎖およびその46kDaの二量体形態である(Kjeldsen L., Johnsen A.H., Sengelov H., Borregaard N., 1993年、J Biol Chem、268巻:10425~10432頁)。このタンパク質は、腎臓の近位尿細管の上皮を含めた特定の上皮の好中球において発現する。NGALは、分泌タンパク質であり、その構造的に保存されたポケット形態において、高分子複合体を形成する プリーツシートを介し、小型で疎水性の分子に結合するその能力によって特徴付けられる(Uttenthal L.O., 2005年、Clin Lab、29巻:39~41頁)。

20

【0033】

既に言及した通り、早期における腎傷害を検出することは極めて困難である。NGALは、この問題における一般的な障害を部分的に克服しており、急性腎損傷の診断において有用であることが実証されていることから、この診断を早期において行い示される(Zappitelli M., Washburn K.K., Arikian A.A., Loftis L., Ma Q., Devarajan P., Parikh C.R., Goldstein S.L., 2007年、Crit Care、11巻:R84頁)。

【0034】

多数の研究が、NGALは、急性腎損傷を伴う患者において著明に増大するが、対応する対照ではそれほど増大せず、この増大は最初の24~48時間以内の、クレアチニンが上昇する前にもたらされることを示している。このマーカーは、血漿および尿の両方において用いられるが、異なる臨床領域における全体的な評価をなおも必要とする(Mishra J., Dent C., Tarabishi R., Mitsnifes M.M., Ma Q., Kelly C., Ruff S.M., Zahedi K., Shao M., Bean J., Mori K., Barasch J., Devarajan P., 2005年、Lancet、365巻:1231~1238頁; Devarajan P., 2007年、Contrib Nephrol、156巻:203~212頁)。

30

40

【0035】

また、成人における心肺バイパス(Wagener G., Jan M., Kim M., Mori K., Barasch J.M., Sladen R.N., Lee H.T., 2006年、Anesthesiology、105巻:485~491頁)、経皮冠動脈介入(Bachorzewska-Gajewska H., Malyszko J., Sitniewska E., Malyszko J.S., Dobrzycki S., 2006年、Am J Nephrol、26巻:287~292頁)、冠動脈造影(Bachorzewska-Gajewska H., Malyszko J., Sitniewska E., Malyszko J.S., Dobrzycki S., 2007年、Nephrol Dial Transplant、22巻:295

50

～296頁)などの手術後の尿中では、このマーカーが上昇することも示されており、これはまた、小児における心臓手順(小児における冠動脈バイパス)(Mishra J.、Dent C.、Tarabishi R.、Mitsnefes M.M.、Ma Q.、Kelly C.、Ruff S.M.、Zahedi K.、Shao M.、Bean J.、Mori K.、Barasch J.、Devarajan P.、2005年、Lancet、365巻:1231～1238頁)においても示されている。

#### 【0036】

調査の現況について述べるなら、尿中および血漿中のNGALをAKIマーカーとして測定することの限界は、NGALが、適切な腎マーカーとしては今なお評価中なことである。加えて、NGALが、もっぱら腎由来であるなら、このバイオマーカーは、尿細管細胞について構想される最良の腎傷害マーカーのうちの1つとなることも言明されている。より重篤な腎傷害において、尿中NGALの濃度は、正常レベルの10,000倍の上昇を示す。血漿中の最大の上昇は、約100倍である。このために、NGALは、潜在的に異なる程度の腎損傷についての極めて高感度のマーカーとなっている。しかし、この広いダイナミックレンジの下端は、がんおよび他の疾患などの疾患における腎外供給源に起因するNGALの上昇により占められている(www.clinonline.com)。本発明者らの革新的な手法は、AKIの早期かつ非侵襲的な診断を確立するために、腎臓に由来するエキソソーム、特に、特異的な腎構造に由来する特異的なエキソソーム内のNGALを解析することによりこの問題に取り組もうと試みる。

#### 【0037】

アクアポリン1(AQP1)

アクアポリン1(AQP1)とは、内在性膜タンパク質であり、その種類のタンパク質のうちで最初にヒト赤血球から構造的および機能的に特徴付けられた。このタンパク質は、四量体構造を有し、そのサブユニットの各々は、それ自体で機能性を有する(Preston G.M.、Jung J.S.、Guggino W.B.、Agre P.、1993年、J Biol Chem、268巻:17～20頁)。AQP1の分子量は、28kDaであり(Friedman M.、2008年、Principles and models of biological transport、2版、New York、USA:Springer)、その発現パターンは、年齢および被験組織(腎臓、肺、脳、および眼)に依存する(Bondy C.、Chin E.、Smith B.L.、Preston G.M.、Agre P.、1993年、Proc Natl Acad Sci USA、90巻:4500～4504頁)。

#### 【0038】

このチャンネルは、腎臓の近位尿細管、その下行部分にあるヘンレループの上皮および直細血管の内皮において強く発現する。下行するヘンレループにおいてこのタンパク質の濃度が高い(全タンパク質のうちの25%である)ことは、腎臓の濃縮機構において不可欠の役割を示唆する。これは、それらの尿を濃縮できないように、AQP1遺伝子の発現をノックアウトする結果として、近位尿細管における水分透過性の減少がもたらされるトランスジェニックマウスを発生させた研究において裏付けられている(Ma T.、Yang B.、Gillespie A.、Carlson E.J.、Epstein C.J.、Verkman A.S.、1998年、J Biol Chem、273巻:4296～4299頁)。見かけは正常であるがAQP1を有さない3例の患者についての報告では、流体の取込みまたは脱水など何らかのストレスに対する生理学的応答についての解析が含まれなかったため、AQP1の欠失と関連する異常な表現型は、他の哺乳動物のアクアポリンが重要な生理学的機能を果たす可能性を提起している(Preston G.M.、Smith B.L.、Zeidel M.L.、Moulds J.J.、Agre P.、1994年、Science、265巻:1585～1587頁)。

#### 【0039】

アクアポリン2(AQP2)

アクアポリン2 (AQP2)とは、水分通過のためのチャネルとして働く内在性膜タンパク質である。このチャネルは、バソプレッシンにより調節され、腎臓の連結管および集合管の頂端領域に位置する (Fushimi K., Uchida S., Hara Y., Hirata Y., Marumo F., Sasaki S., 1993年、Nature、361巻: 549~552頁)。

【0040】

このタンパク質の重要性のために、トランスジェニックマウスによる研究が行われている。マウスは、連結管におけるこのアクアポリンは選択的に発現させるが、集合管においては発現させないように改変された。また、このタンパク質が完全に欠失したマウスも開発されている。欠失マウスが、生後(5~12日後)に死亡するのに対し、集合管における発現だけが遮断されたマウスは、体重の減少、尿産生の10倍の増大、および尿容量オスモル濃度の低下を示しながら、成体へと成長することが観察されている。3時間にわたり水分を与えずにおいても、尿容量オスモル濃度に著明な変化が見られないことから、代償機構は存在しないことが裏付けられる (Rojek A., Fuchtbauer E. M., Kwon T. H., Frokiaer J., Nielsen S., 2006年、Proc Natl Acad Sci USA、103巻: 6037~6042頁)。

【0041】

バソプレッシンの非存在下では、高張性により、10分間以内に、細胞膜内でAQP2の蓄積が誘導される。これは、ラット腎集合管の主な細胞において、in situで生じ、また、複数の腎上皮系においても生じることから、腎臓に対するストレス時におけるその重要性が裏付けられる (Hasler U., Nunes P., Bouley R., Lu H. A., Matsuzaki T., Brown D., 2008年、J Biol Chem、283巻: 26643~26661頁)。

【0042】

また、このタンパク質を発現させる遺伝子の劣性突然変異であって、腎性尿崩症をもたらす劣性突然変異が多く存在することも公知であり (Leduc-Nadeau A., Lussier Y., Arthus M. F., Lonergan M., Martinez-Aguayo A., Riveira-Munoz E., Devuyt O., Bissonnette P., Bichet DG., 2010年、J Physiol、588巻: 2205~2218頁)、また、腎性尿崩症をもたらす優性突然変異が存在することも公知である (Mulders S. M., Bichet D. G., Rijss J. P., Kamsteeg E. J., Arthus, M. F., Lonergan M., Fujiwara M., Morgan K., Leijndekker R., Van der Sluijs P., Van Os C. H., Deen P. M., 1998年、J Clin Invest、102巻: 57~66頁)。

【0043】

アクアポリン3 (AQP3)

アクアポリン3 (AQP3)とは、分子量が30kDaの内在性膜タンパク質であり (Wakayama Y., Jimi T., Inoue M., Kojima H., Shibuya S., Murahashi M., Hara H., Oniki H., 2002年、Histochem J、34巻: 331~337頁)、腎集合管の上皮細胞の側底膜において発現する。他のアクアポリンとは異なり、このタンパク質はまた、グリセロールも輸送することができる (Ma T., Frigeri A., Hasegawa H., Verkman A. S., 1994年、J Biol Chem、269巻: 21845~21849頁)。

【0044】

マウスにおけるAQP3遺伝子の発現をノックアウトした実験では、多尿症、特に、腎皮質におけるAQP2の発現の低下、および尿容量オスモル濃度の低下が観察される。こ

10

20

30

40

50

これらの変化におけるAQP3の易罹病性は、後に他のアクアポリンの発現をノックアウトすることにより実証された(Ma T., Song Y., Yang B., Gillespie A., Carlson E. J., Epstein C. J., Verkman A. S., 2000年、Proc Natl Acad Sci U S A, 97巻: 4386~4391頁)。

【0045】

例えば、ヘンレープにおけるNKCC2、ならびに近位尿細管におけるNHE-3およびNaPiIIなど、腎臓の特異的構造において好ましくかつ示差的に発現する他のタンパク質も同定されている。

【0046】

尿中エキソソーム

Mark Knepfer博士のグループが、健常ヒト尿におけるプロテオーム研究を展開している。これらの研究では、分画遠心分離により得られる尿中細胞画分およびエキソソーム画分が解析されている(Knepfer M. A., Pisitkun T., Shen R. F., 2004年、Proc Natl Acad Sci USA, 101巻: 13368~13373頁)。エキソソーム画分は、腎上皮の代表的タンパク質の豊富な供給源であると考えられているために、特別の関心を払われている。

【0047】

エキソソームは、頂端膜タンパク質のエンドサイトーシスにより産生される。この後、エンドソームが多胞体(MVB)と融合する。結果として、頂端膜タンパク質が、MVB外膜内に分離され、膜の陥入により内部化する。最後に、MVBの外膜が頂端膜と融合して、エキソソームと称するそれらの内部小胞を尿空間(urinary space)内に放出する(Knepfer M. A., Pisitkun T., Shen R. F., 2004年、Proc Natl Acad Sci USA, 101巻: 13368~13373頁)。尿中エキソソーム内で現在同定されているタンパク質は、細胞膜タンパク質(NKCC2、CD24など)、細胞質タンパク質(GAPDHなど)、および核タンパク質(AFT3およびWT-1)に対応する(Zhou H., Cheruvanky A., Hu X., Matsumoto T., Hiramatsu N., Cho M. E., Berger A., Leelahavanichkul A., Doi K., Chawla L. S., Illei G. G., Kopp J. B., Balow J. E., Austin H. A. 3rd, Yuen P. S., Star R. A., 2008年、Kidney Int, 74巻: 613~621頁)。

【0048】

技術水準

特許文献1は、診断法、例えば、疾患の病期または進行におけるバイオマーカーを検出するために用いるエキソソームについて記載し、また、細胞に由来するバイオマーカーを用いて、疾患のための処置レジメンをさらに決定し、処置の有効性を確立しうることについても記載している。

【0049】

特許文献2は、エキソソームを体液から単離することによる出産前の診断法であって、特異的なバイオマーカー、特にCD24によりエキソソームを同定する診断法について記載している。

【0050】

特許文献3は、表現型を特徴付け、被験体由来の試料中のエキソソームのバイオシグネチャーを決定することにより疾患を診断するための方法について記載している。言及されるマーカーは、miRNAプロファイルまたはCD63、CD9、CD81、B7H3、EpCam、PSCA、TNFR、MFG-E8、Rab、SETAP、PCMA、もしくは5T4を含めた抗原を含む。さらに、方法は、それを用いて、生理学的状態についてのプロファイリングするか、または表現型を決定するために、細胞由来のエキソソームを決定しうることについても言及する。

10

20

30

40

50

## 【0051】

WO2009115561は、膜小胞またはエキソソームを同定するためのポリペプチドについて記載している。さらに、該発明は、病原体または腫瘍抗原に起因する感染を防止および/または処置するための免疫原性調製物について記載している。

## 【0052】

KR20070058441は、免疫抑制反応において用いられる方法および組成物について記載している。組成物は、免疫抑制活性を有するエキソソームであって、異なる細胞型、主に、免疫系に由来しうるエキソソームを含む。さらに、エキソソームを分子へと曝露して、免疫抑制活性を増強することもできる。エキソソームは、免疫系の機能不全と関連する疾患または障害の処置において用いられている。

10

## 【0053】

US2007254351は、C型肝炎ウイルスを単離するための方法であって、ウイルスに感染した個体に由来する血漿からのエキソソーム分離を含む方法について記載している。

## 【0054】

AU2004203482は、分子(エキソソーム)を含む膜小胞であって、分子が主要組織適合性複合体に由来し、エキソソームが免疫原として用いられるか、または診断目的で用いられる膜小胞について記載している。

## 【0055】

US2004197314は、合成によるエキソソームの作製に主に焦点を絞って、小胞(エキソソーム)膜内のポリペプチドを発現させるための組成物および方法について記載している。

20

## 【0056】

CA2453198は、がん患者の生体液中の免疫抑制因子の同定および定量化において用いられるエキソソームについて記載している。これらのエキソソームは、単独で用いることもでき、がん患者についての予後診断指標としての他の免疫学的アッセイと組み合わせて用いることもできる。

## 【0057】

EP1523990は、腫瘍細胞に由来するエキソソームについて記載している。これらのエキソソームは、リンパ球を刺激するための腫瘍特異的抗原および腫瘍特異的分子を有する。

30

## 【0058】

Zhouら(2006年)は、動物における急性腎損傷モデルに由来する腎機能異常マーカーおよび構造損傷マーカーを保有する尿中エキソソームについて記載している。エキソソームを遠心分離により得たところ、腎損傷マーカーが見出された(Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury, Zhou H., Pititkun T., Apon t A., Yuen P. S., Hoffert J.D., Yasuda H., Hu. X, Chawla L., Shen R-F., Knepper M.A., Star R., 2006年, Kidney Int., 70巻(10号): 1847~1857頁)。

40

## 【0059】

Zhouら(2008年)は、ネフロンセグメントに由来する尿中エキソソームであって、腎損傷バイオマーカーに富む尿中エキソソームについて記載している。彼らは、分画遠心分離によるこれらのエキソソームの単離およびウェスタンブロット法による転写因子のさらなる検出について記載している。Zhouらは、これらのマーカーが、エキソソーム内では検出可能であるが、腎疾患を伴う被験体の全尿では検出可能でなく、正常な健康個体ではマーカーが見出されないことを見出した(Urinary exosomal transcription factors, a new class of bi

50

omarkers for renal disease、Zhou H.、Cheruvanky A.、Hu X.、Matsumoto T.、Hiramatsu N.、Cho M.E.、Berger A.、Leelahavanichkul A.、Doi K.、Chawla L.S.、Illei G.G.、Kopp J.B.、Balow J.E.、Austin H.A. 3rd、Yuen P.S.、Star R.A.、2008年、Kidney Int.、74巻：613～621頁）。

【0060】

Devarajan (2007年)は、患者における損傷の早期の検出のほか、腎損傷の転帰を予測するための急性腎損傷(AKI)マーカーのパネルについて提起している(Proteomics for biomarker discovery in acute kidney injury、Devarajan P.、Williams L.M.、2007年、Semin. Nephrol.、27巻(6号)：637～651頁)。

10

【0061】

Lock (2010年)は、腎(renalまたはkidney)損傷の症例において上方制御される遺伝子を検出するためのマイクロアレイ法の使用に焦点を絞って、腎傷害の指標として用いられうる腎マーカーについて総説している(Sensitive and early markers of renal injury: where are we and what is the way forward?、Lock E.、2010年、Toxicological Sciences、1巻(116号)：1～4頁)。

20

【0062】

Alvarezら(2010年)は、ある学会において、NGALを、腎不全マーカーとして用いることが可能であり、さらにまた、NGALを、腎移植手術後における回復についての予測因子としても用いることについて記載した(Pilot study for evaluating urinary exosomal fraction as kidney dysfunction biomarker in renal transplant. Alvarez S.、Suazo C.、Boltansky A.、Urzu M.、Carvajal D.、Innocenti G.、Vukusich A.、Hurtado M.、Campos D.、Yen C.、Villanueva S.、Flores M.、Marquez J.、Rogello A.、Irarrazabal C.E.、2010年、VII Latin American Congress of Acute Kidney Injury: 29頁、Coquimbo-Chile)。

30

【0063】

Boltanskyら(2010年)は、NGALを、腎移植の症例における臓器回復の予測因子についての潜在的なバイオマーカー指標として記載した(NGAL in urinary exosomes as a source of kidney dysfunction biomarker in renal transplantation. Boltansky A.、Alvarez S.、Vukusich A.、Hurtado M.、Ursu M.、Innocenti G.、Carvajal D.、Suazo C.、Villanueva S.、Carreno J.、Altuzarra R.、Yen C.、Tapia D.、Irarrazabal C.E.、2010年、Renal Week、Denver、CO、J Am Soc Nephrol、21巻：959頁)。

40

【0064】

当技術分野で見出される文献は、近年の試みが、その中では腎損傷を規定する腎細胞が突出する、異なる細胞型からの特異的なエキソソームに由来する転写因子およびバイオマーカー分子の記載および特徴付けに焦点を当てていることを示す。また、バイオマーカーおよび診断手順と併せて、エキソソームの単離について記載する一連の方法への取組みも

50

なされている。前記文献は、本発明と同様の調査について記載することにより、エキソソームの病態マーカーとしての使用（特許文献1、特許文献3、Zhou H.ら、2006年、Devarajan、2007年、およびLock 2010年）、特に、急性腎損傷についての病態マーカーとしての使用（Zhou, H.ら、2008年、Zhou H.ら、2006年、Devarajan、2007年、およびLock 2010年）について示唆し、例えば、KIM-1、NGAL、IL-8、およびシスタチンなど、特異的マーカーの使用について明記している。それにもかかわらず、本発明は、先行技術に対して重要な差違も示す。特に、Zhou, H.ら、2008年は、アクアポリン-1抗体、アクアポリン-2抗体、アクアポリン-3抗体（AQP抗体）、NKCC2抗体、NHE-3抗体、およびNaPiII抗体など、これらの分子（AQP、NCKK2、NHE-3、NaPiII）を含有するエキソソームの免疫精製（immunopurification）を可能とすることで、腎損傷についてのより良好でより特異的な同定および診断法を可能とする抗体の使用については記載していない。Zhou H.ら、2006年は、特異的な免疫沈降についても、本発明で用いられるいくつかのエキソソームマーカーについても記載していない。Devarajan、2007年は、抗AQP、抗NKCC2、抗NHE-3、および/または抗NaPiIIの使用に基づく、特定の腎臓領域に特異的な免疫精製の使用について記載していない。Lock 2010年は、特異的な免疫精製について記載していない。

#### 【0065】

Alvarezら（2010年）およびBoltanskyら（2010年）は、腎損傷の指標としてのNGALの使用および腎移植の症例における臓器回復の予測因子としてのNGALの使用について提起しているが、本発明とは対照的に、それらのいずれも、腎損傷マーカーをより正確に決定するための、エキソソームを免疫精製する段階については記載していない。

#### 【0066】

したがって、先行技術は、本発明の新規性にも進歩性にも影響を及ぼすのに十分な背景について記載していない。本発明は、AQP-1、AQP-2、AQP-3（AQP）、NKCC2、NHE-3、および/またはNaPiIIを含有するエキソソームの免疫精製に基づく。

#### 【0067】

さらに、適用例は、この手順が、患者における腎損傷の決定において正確であることを示す。

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0068】

【特許文献1】米国特許出願公開第2010/0203529号明細書

【特許文献2】欧州特許出願公開第2191276号明細書

【特許文献3】英国特許出願公開第2463401号明細書

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0069】

本発明は、早期における急性腎損傷をモニタリング、診断、および/または予後診断し、それを患う被験体における処置を決定するための方法であって、a)尿試料を提供するステップと、b)少なくとも1つの免疫精製ステップを用いて、尿試料を、尿試料中に存在するエキソソームについて濃縮するステップと、c)エキソソーム内の急性腎損傷（AKI）マーカーを検出するステップとを含む方法に関する。

#### 【0070】

本発明は、被験体におけるAKIの発生を簡便かつ早期に決定するために、特異的な腎損傷マーカーの存在および/またはレベルを決定するための診断用キットであって、少なくとも1つの免疫精製ステップを用いて、尿試料をエキソソームについて濃縮するための

手段と、状態についての所定の腎損傷マーカーを検出するための手段とを含むキットをさらに含む。

【0071】

発明の詳細な説明

本発明は、早期における急性腎損傷をモニタリング、診断、および/または予後診断し、それを患う被験体における処置を決定するための方法であって、a)尿試料を提供するステップと、b)少なくとも1つの免疫精製ステップを用いて、尿試料を、尿試料中に存在するエキソソームについて濃縮するステップと、c)エキソソーム内の急性腎損傷(AKI)マーカーを検出するステップとを含む方法に関する。

【0072】

一実施形態では、尿試料を、カテーテルを留置した患者については午前中に1回目の排尿から得、他の患者については2回目の排尿から得、それを解析するまで-80℃で維持する。

【0073】

本発明では、少なくとも1つの免疫精製ステップを、尿試料をエキソソームについて濃縮するための手段と考える。特に、腎臓の特異的構造において好ましくかつ示差的に発現する特定のタンパク質の細胞内ドメイン、細胞外ドメイン、または任意のドメインに対する抗体を用いることにより、エキソソームの濃縮が可能となる。したがって、本発明の方法では、腎臓の特異的構造において好ましくかつ示差的に発現されるタンパク質の細胞内ドメイン、細胞外ドメイン、または任意のドメインに対する抗体と、この抗体が、タンパク質のエキソソームの外部表面内に存在するドメインと相互作用することを可能とするのに適する緩衝液とについて検討する。

【0074】

一実施形態では、本発明の方法は、免疫精製に先立ち、エキソソームについて濃縮するための少なくとも1つのさらなる手段を含みうる。

【0075】

本発明において検討される、尿試料をエキソソームについて濃縮するための手段はまた、尿試料に由来する大型の要素であって、後の検出相において干渉しうる要素を分離するのに有用な実験法および実験デバイスでもある。例えば、干渉要素は、患者に由来する細胞でありうる。実験室の遠心分離機による処理は、エキソソームについての濃縮、例えば、細胞など、大型粒子の除去を可能とするので、遠心分離管は、濃縮手段と考えることができる。一実施形態では、試料を、5000~10000rpmで5~30分間にわたり遠心分離する。別の実施形態では、試料を、3000~4500rpmで30~120分間にわたり超遠心分離する。

【0076】

また、微細濾過は、エキソソームがマイクロフィルターを通過することを可能とし、これにより、尿試料をエキソソームについて濃縮することを可能とするので、最大0.22マイクロメートルのマイクロフィルターカートリッジ、マイクロフィルターカラム、または他のマイクロフィルター媒体も、エキソソームについて濃縮する手段であると考えられる。

【0077】

本発明の別の実施形態における方法では、所定の腎損傷マーカーに対する一次抗体と、標識とコンジュゲートされた二次抗体であって、一次抗体に対する二次抗体とを、所定の腎損傷マーカーを検出および/または定量化するための手段であると考えられる。二次抗体の標識は、蛍光マーカー、酵素、放射性マーカー、化合物、赤外化合物でありうる。

【0078】

場合によって、一次抗体は、標識と直接コンジュゲートすることができる。この場合、二次抗体は必要とされない。一次抗体はまた、蛍光マーカー、酵素、放射性マーカー、化合物、赤外化合物ともコンジュゲートすることができる。

【0079】

10

20

30

40

50

－実施形態では、特異的な腎構造に由来する特異的なエキソソーム画分の免疫精製を、抗アクアポリン - 1 ( a q u o p o r i n - 1 ) ( 抗 A Q P - 1 )、抗アクアポリン - 2 ( 抗 A Q P - 2 )、抗アクアポリン - 3 ( 抗 A Q P - 3 )、抗 N K C C 2、抗 N H E - 3、および/もしくは抗 N a P i I I、またはこれらの組合せから選択されるがこれらに限定されない抗体により実行する。

【 0 0 8 0 】

－実施形態では、特異的な腎損傷マーカーは、N G A L、シスタチン - 3、K I M - 1、I L - 1 ベータ、および/もしくは I L - 1 8、またはこれらの組合せから選択されるがこれらに限定されない。

【 0 0 8 1 】

好ましい実施形態では、特異的な腎構造に由来する特異的なエキソソーム画分の免疫精製を、抗 A Q P 1、抗 A Q P 2、抗 A Q P 3、抗 N K C C 2、抗 N H E - 3、抗 N a P i I I、またはこれらの組合せの任意のドメインに対する抗体であって、尿試料をエキソソームについて濃縮するための手段としての抗体により実行する。

【 0 0 8 2 】

さらなる好ましい実施形態では、特異的な腎損傷マーカーは、N G A L、シスタチン - 3、K I M - 1、I L - 1 ベータ、I L - 1 8、またはこれらの組合せから選択される。

【 0 0 8 3 】

より好ましい実施形態では、抗 A Q P - 1 を、特異的な腎構造に由来する特異的なエキソソーム画分を免疫精製するのに用いる場合、その存在および/またはレベルが決定される腎損傷マーカーは、N G A L および/またはシスタチン - 3 であり、抗 A Q P - 2 を、特異的な腎構造に由来する特異的なエキソソーム画分を免疫精製するのに用いる場合、その存在および/またはレベルが決定される腎損傷マーカーは、N G A L であり、抗 A Q P - 3 を、特異的な腎構造に由来する特異的なエキソソーム画分を免疫精製するのに用いる場合、その存在および/またはレベルが決定される腎損傷マーカーは、K I M - 1、I L - 1 ベータ、および/またはシスタチン - 3 である。

【 0 0 8 4 】

－実施形態では、抗 A Q P - 1 を、特異的な腎構造に由来する特異的な画分を免疫精製するのに用いる場合、エキソソーム画分は、近位尿細管に由来し、特異的なマーカーの存在および/またはレベルは、前記構造における損傷を示す。

【 0 0 8 5 】

－実施形態では、抗 A Q P - 2 を、特異的な腎構造に由来する特異的な画分を免疫精製するのに用いる場合、エキソソーム画分は、遠位尿細管に由来し、特異的なマーカーの存在および/またはレベルは、前記構造における損傷を示す。

【 0 0 8 6 】

－実施形態では、抗 A Q P - 3 を、特異的な腎構造に由来する特異的な画分を免疫精製するのに用いる場合、エキソソーム画分は、集合管に由来し、特異的なマーカーの存在および/またはレベルは、前記構造における損傷を示す。

【 0 0 8 7 】

－実施形態では、抗 N K C C 2 を、特異的な腎構造に由来する特異的な画分を免疫精製するのに用いる場合、エキソソーム画分は、ヘンレループに由来し、特異的なマーカーの存在および/またはレベルは、前記構造における損傷を示す。

【 0 0 8 8 】

－実施形態では、抗 N H E - 3 を、特異的な腎構造に由来する特異的な画分を免疫精製するのに用いる場合、エキソソーム画分は、近位尿細管に由来し、特異的なマーカーの存在および/またはレベルは、前記構造における損傷を示す。

【 0 0 8 9 】

－実施形態では、抗 N a P i I I を、特異的な腎構造に由来する特異的な画分を免疫精製するのに用いる場合、エキソソーム画分は、近位尿細管に由来し、特異的なマーカーの存在および/またはレベルは、前記構造における損傷を示す。

10

20

30

40

50

## 【0090】

方法は、場合によって、特異的な腎損傷マーカーの存在および/またはレベルに基づき、被験体におけるモニタリング、診断、予後診断、および/または処置の決定のために、被験体における急性腎損傷を評価するためのステップを含む。

## 【0091】

本発明は、被験体におけるAKIの発生を簡便かつ早期に決定するために、特異的な腎損傷マーカーの存在および/またはレベルを決定するための診断用キットであって、少なくとも1つの免疫精製ステップを用いて、尿試料をエキソソームについて濃縮するための手段と、状態についての所定の腎損傷マーカーを検出するための手段とを含むキットをさらに含む。

10

## 【0092】

場合によって、診断用キットは、尿試料を患者から得るための手段を含む。特定の実施形態では、尿試料を得るための手段は、尿試料を自分自身で提供することが患者に不可能な場合における尿プローブ、または尿試料を患者から受け取るための容器から選択される。

## 【0093】

本発明では、少なくとも1つの免疫精製ステップを、尿試料をエキソソームについて濃縮するための手段と考える。特に、好ましくは、かつ、示差的に、腎臓の特異的構造において発現する特定のタンパク質の細胞内ドメイン、細胞外ドメイン、または任意のドメインに対する抗体を用いることにより、エキソソームについての濃縮が可能となる。したがって、本発明のキットでは、好ましくは、かつ、示差的に、腎臓の特異的構造において発現されるタンパク質の細胞内ドメイン、細胞外ドメイン、または任意のドメインに対する抗体と、この抗体が、タンパク質のエキソソームの外部表面内に存在するドメインと相互作用することを可能とするのに適する反応緩衝液とについて検討する。キットはまた、ブロッキング剤またはブロッキング溶液および特異的な腎損傷マーカーの原液も含む。

20

## 【0094】

一実施形態では、キットは、96ウェルプレートを含み、そのウェルは、腎臓の特異的構造において好ましくかつ示差的に発現する特定のタンパク質の細胞内ドメイン、細胞外ドメイン、または任意のドメインに対する抗体で覆われ、エキソソームについての濃縮を可能とする。

30

## 【0095】

一実施形態では、本発明のキットは、免疫精製に先立ち、エキソソームについて濃縮するための少なくとも1つのさらなる手段を含みうる。

## 【0096】

本発明において検討される、尿試料をエキソソームについて濃縮するための手段は、尿試料に由来する大型の要素であって、後の検出相において干渉しうる要素を分離するのに有用な実験法および実験デバイスである。例えば、干渉要素は、患者に由来する細胞でありうる。実験室の遠心分離機による処理は、エキソソームについての濃縮、例えば、細胞など、大型粒子の除去を可能とするので、遠心分離管は、濃縮手段と考えることができる。また、微細濾過は、エキソソームがマイクロフィルターを通過することを可能とし、これにより、尿試料をエキソソームについて濃縮することを可能とするので、最大0.22マイクロメートルのマイクロフィルターカートリッジ、マイクロフィルターカラム、または他のマイクロフィルター媒体も、エキソソームについて濃縮する手段であると考えられる。

40

## 【0097】

本発明の別の実施形態におけるキットでは、所定の腎損傷マーカーに対する一次抗体と、標識とコンジュゲートされた二次抗体であって、一次抗体に対する二次抗体とを、所定の腎損傷マーカーを検出および/または定量化するための手段であると考えられる。二次抗体の標識は、蛍光マーカー、酵素、放射性マーカー、化合物、赤外化合物でありうる。

## 【0098】

50

場合によって、一次抗体は、標識と直接コンジュゲートすることができる。この場合、二次抗体は必要とされない。一次抗体はまた、蛍光マーカー、酵素、放射性マーカー、化合物、赤外化合物ともコンジュゲートすることができる。

【0099】

一実施形態では、キットは、抗アクアポリン - 1 (抗AQP - 1)、抗アクアポリン - 2 (抗AQP - 2)、抗アクアポリン - 3 (抗AQP - 3)、抗NKCC2、抗NHE - 3、および/もしくは抗NaPiII、またはこれらの組合せから選択されるがこれらに限定されない抗体を含む。

【0100】

一実施形態では、キットは、NGAL、シスタチン - 3、KIM - 1、IL - 1ベータ、および/もしくはIL - 18、またはこれらの組合せから選択されるがこれらに限定されないマーカーを検出するために標識とコンジュゲートされているかまたはコンジュゲートされていない一次抗体を含む。

10

【0101】

好ましい実施形態では、キットは、抗AQP1、抗AQP2、抗AQP3、抗NKCC2、抗NHE - 3、抗NaPiII、またはこれらの組合せの任意のドメインに対する抗体であって、濃縮するための方法として免疫精製を用いる場合における、尿試料をエキソソームについて濃縮するための手段としての抗体を含む。

【0102】

さらなる好ましい実施形態では、キットは、標識とコンジュゲートされているかまたはコンジュゲートされていない一次抗体であって、NGAL、シスタチン - 3、KIM - 1、IL - 1ベータ、IL - 18を検出するための一次抗体を含む。

20

【0103】

より好ましい実施形態では、抗AQP - 1を、特異的な腎構造に由来する特異的なエキソソーム画分を免疫精製するのに用いる場合、その存在および/またはレベルが決定される腎損傷マーカーは、NGALおよび/またはシスタチン - 3であり、抗AQP - 2を、特異的な腎構造に由来する特異的なエキソソーム画分を免疫精製するのに用いる場合、その存在および/またはレベルが決定される腎損傷マーカーは、NGALであり、抗AQP - 3を、特異的な腎構造に由来する特異的なエキソソーム画分を免疫精製するのに用いる場合、その存在および/またはレベルが決定される腎損傷マーカーは、KIM - 1、IL - 1ベータ、および/またはシスタチン - 3である。

30

【0104】

一実施形態では、抗AQP - 1を、特異的な腎構造に由来する特異的な画分を免疫精製するのに用いる場合、エキソソーム画分は、近位尿細管に由来し、特異的なマーカーの存在および/またはレベルは、前記構造における損傷を示す。

【0105】

一実施形態では、抗AQP - 2を、特異的な腎構造に由来する特異的な画分を免疫精製するのに用いる場合、エキソソーム画分は、遠位尿細管に由来し、特異的なマーカーの存在および/またはレベルは、前記構造における損傷を示す。

【0106】

一実施形態では、抗AQP - 3を、特異的な腎構造に由来する特異的な画分を免疫精製するのに用いる場合、エキソソーム画分は、集合管に由来し、特異的なマーカーの存在および/またはレベルは、前記構造における損傷を示す。

40

【0107】

一実施形態では、抗NKCC2を、特異的な腎構造に由来する特異的な画分を免疫精製するのに用いる場合、エキソソーム画分は、ヘンレループに由来し、特異的なマーカーの存在および/またはレベルは、前記構造における損傷を示す。

【0108】

一実施形態では、抗NHE - 3を、特異的な腎構造に由来する特異的な画分を免疫精製するのに用いる場合、エキソソーム画分は、近位尿細管に由来し、特異的なマーカーの存

50

なおよび／またはレベルは、前記構造における損傷を示す。

【0109】

一実施形態では、抗NaPiIIを、特異的な腎構造に由来する特異的な画分を免疫精製するのに用いる場合、エキソソーム画分は、近位尿細管に由来し、特異的なマーカーの存在および／またはレベルは、前記構造における損傷を示す。

【0110】

本発明のキットは、場合によって、キットを用いるための指示書を含む。

【0111】

本発明の方法およびキットは、尿中エキソソームを免疫精製するステップを含む。したがって、本発明はまた、尿中エキソソームを免疫精製するための方法、および尿中エキソソームを精製するための抗体の使用も記載する。

10

【0112】

本発明は、尿中エキソソームを精製するための方法であって、(a)尿試料または場合によって、脱細胞化された(decellularized)尿試料を、異なる腎構造の表面において好ましくかつ示差的に発現されるタンパク質の細胞内ドメイン、細胞外ドメイン、または任意のドメインに対する抗体と共にインキュベートし、これにより、エキソソーム-抗体複合体を形成するステップと、(b)(a)から得られるエキソソーム-抗体複合体を、抗体の任意の領域を認識し、不溶性作用物質に結合しているタグと共にインキュベートし、これにより、エキソソーム-抗体-タグ-不溶性作用物質複合体を形成するステップと、(c)エキソソーム-抗体-タグ-不溶性作用物質複合体を上清から分離するステップと、(d)エキソソーム-抗体-タグ-不溶性作用物質複合体を適切な緩衝液で洗浄するステップとを含む方法に関する。

20

【0113】

一実施形態では、尿試料または脱細胞化された尿試料を、抗体と共に、適切な緩衝液中、室温で20～60分間インキュベートする。

【0114】

一実施形態では、尿中エキソソームのための精製法において用いられる抗体は、抗アクアポリン-1(抗AQP-1)、抗アクアポリン-2(抗AQP-2)、抗アクアポリン-3(抗AQP-3)、抗NKCC2、抗NHE-3、および／もしくは抗NaPiII、またはこれらの組合せから選択されるがこれらに限定されない。

30

【0115】

好ましい実施形態では、尿中エキソソームのための精製法において用いられる抗体は、抗AQP1、抗AQP2、抗AQP3、抗NKCC2、抗NHE-3、抗NaPiII、またはこれらの組合せの任意のドメインに対する抗体である。

【0116】

一実施形態では、抗AQP-1を、特異的な腎構造に由来する特異的な画分を免疫精製するのに用いる場合、エキソソーム画分は、近位尿細管に由来し、特異的なマーカーの存在および／またはレベルは、前記構造における損傷を示す。

【0117】

一実施形態では、抗AQP-2を、特異的な腎構造に由来する特異的な画分を免疫精製するのに用いる場合、エキソソーム画分は、遠位尿細管に由来し、特異的なマーカーの存在および／またはレベルは、前記構造における損傷を示す。

40

【0118】

一実施形態では、抗AQP-3を、特異的な腎構造に由来する特異的な画分を免疫精製するのに用いる場合、エキソソーム画分は、集合管に由来し、特異的なマーカーの存在および／またはレベルは、前記構造における損傷を示す。

【0119】

一実施形態では、抗NKCC2を、特異的な腎構造に由来する特異的な画分を免疫精製するのに用いる場合、エキソソーム画分は、ヘンレループに由来し、特異的なマーカーの存在および／またはレベルは、前記構造における損傷を示す。

50

## 【 0 1 2 0 】

一実施形態では、抗 N H E - 3 を、特異的な腎構造に由来する特異的な画分を免疫精製するのに用いる場合、エキソソーム画分は、近位尿細管に由来し、特異的なマーカーの存在および/またはレベルは、前記構造における損傷を示す。

## 【 0 1 2 1 】

一実施形態では、抗 N a P i I I を、特異的な腎構造に由来する特異的な画分を免疫精製するのに用いる場合、エキソソーム画分は、近位尿細管に由来し、特異的なマーカーの存在および/またはレベルは、前記構造における損傷を示す。

## 【 0 1 2 2 】

一実施形態では、抗体の任意の領域を認識するタグは、アガロースビーズまたはセファロースビーズに結合させたプロテイン A もしくはプロテイン G またはこれらの一部である。

10

## 【 0 1 2 3 】

別の実施形態では、タグはビオチンまたはその一部であり、抗体に結合している。こうして、エキソソーム - 抗体 - ビオチンの複合体が形成される。この実施形態では、不溶性作用物質は、ビオチンまたはその一部に対するアフィニティーを伴う化合物であって、抗体などであるがこれらに限定されない化合物に結合する磁気ビーズである。こうして、磁気ビーズを添加すると、エキソソーム - 抗体 - ビオチン - ( ビオチン - 磁気ビーズに対するアフィニティーを伴う ) 化合物の複合体が形成され、次のステップで分離される。

## 【 0 1 2 4 】

一実施形態では、エキソソーム - 抗体 - タグ - 不溶性作用物質の上清からの分離は、遠心分離または沈降により実施される。

20

## 【 0 1 2 5 】

本発明はまた、尿中エキソソームを免疫精製するための、異なる腎構造の表面において好ましくかつ示差的に発現されるタンパク質の細胞内ドメイン、細胞外ドメイン、または任意のドメインに対する抗体または抗体の組合せの使用も開示する。

## 【 0 1 2 6 】

一実施形態では、尿中エキソソームを免疫精製するために用いられる抗体は、抗アクアポリン - 1 ( 抗 A Q P - 1 )、抗アクアポリン - 2 ( 抗 A Q P - 2 )、抗アクアポリン - 3 ( 抗 A Q P - 3 )、抗 N K C C 2、抗 N H E - 3、および/もしくは抗 N a P i I I、またはこれらの組合せから選択されるがこれらに限定されない。

30

## 【 0 1 2 7 】

好ましい実施形態では、尿中エキソソームを免疫精製するために用いられる抗体は、抗 A Q P 1、抗 A Q P 2、抗 A Q P 3、抗 N K C C 2、抗 N H E - 3、抗 N a P i I I、またはこれらの組合せの任意のドメインに対する抗体である。

## 【 0 1 2 8 】

一実施形態では、抗 A Q P - 1 を、尿中エキソソームを免疫精製するために用いる場合、特異的な腎構造に由来する特異的な画分であるエキソソーム画分は、近位尿細管に由来し、特異的なマーカーの存在および/またはレベルは、前記構造における損傷を示す。

## 【 0 1 2 9 】

一実施形態では、抗 A Q P - 2 を、尿中エキソソームを免疫精製するために用いる場合、特異的な腎構造に由来する特異的な画分であるエキソソーム画分は、遠位尿細管に由来し、特異的なマーカーの存在および/またはレベルは、前記構造における損傷を示す。

40

## 【 0 1 3 0 】

一実施形態では、抗 A Q P - 3 を、尿中エキソソームを免疫精製するために用いる場合、特異的な腎構造に由来する特異的な画分であるエキソソーム画分は、集合管に由来し、特異的なマーカーの存在および/またはレベルは、前記構造における損傷を示す。

## 【 0 1 3 1 】

一実施形態では、抗 N K C C 2 を、尿中エキソソームを免疫精製するために用いる場合、特異的な腎構造に由来する特異的な画分であるエキソソーム画分は、ヘンレループに由

50

来し、特異的なマーカーの存在および/またはレベルは、前記構造における損傷を示す。

【0132】

一実施形態では、抗NHE-3を、尿中エキソソームを免疫精製するために用いる場合、特異的な腎構造に由来する特異的な画分であるエキソソーム画分は、近位尿細管に由来し、特異的なマーカーの存在および/またはレベルは、前記構造における損傷を示す。

【0133】

一実施形態では、抗NaPiIIを、尿中エキソソームを免疫精製するために用いる場合、特異的な腎構造に由来する特異的な画分であるエキソソーム画分は、近位尿細管に由来し、特異的なマーカーの存在および/またはレベルは、前記構造における損傷を示す。

【0134】

本発明の方法およびキットは、今日まで適用されている標準的な方法では不可能な、腎損傷マーカーの特異的で簡便かつ早期の検出を提供する利点を有する。本発明の方法およびキットはまた、腎臓の特異的構造に存在する特異的なタンパク質に対して特異的抗体を用いるので、腎臓において損傷している特異的構造を同定する利点も提供する。

【0135】

本発明の方法およびキットは、任意の被験体におけるモニタリング、診断、予後診断、および/または処置の決定のために用いることができる。特に、本発明の方法およびキットは、腎移植を受けた患者における、移植と関連する虚血-再灌流過程に起因する腎損傷の発症をモニタリングするのに有用である。本発明の方法およびキットはまた、AKIを発症し、早期の検出を必要とする可能性のある、集中治療室(ICU)の患者におけるモニタリング、診断、予後診断、および/または処置の決定にも有用である。

例えば、本発明は、以下の項目を提供する：

(項目1)

早期における急性腎損傷をモニタリング、診断、および/または予後診断し、それを患う被験体における処置を決定するための方法であって、

(a) 尿試料を提供するステップと、

(b) 少なくとも1つの免疫精製ステップを用いて、上記尿試料を、上記尿試料中に存在するエキソソームについて濃縮するステップと、

(c) 上記エキソソーム内の急性腎損傷(AKI)マーカーを検出および/または定量化するステップと

を含む、方法。

(項目2)

上記免疫精製ステップが、異なる腎構造の表面において好ましくかつ示差的に発現されるタンパク質の細胞内ドメイン、細胞外ドメイン、または任意のドメインに対する抗体により実施される、項目1に記載の方法。

(項目3)

上記免疫精製ステップのための上記抗体が、抗アクアポリン1(抗AQP1)、抗アクアポリン2(抗AQP2)、および抗アクアポリン3(抗AQP3)、抗NKCC2、抗NHE-3、抗NaPiII抗体、またはこれらの組合せの中から選択される、項目2に記載の方法。

(項目4)

上記免疫精製ステップのための上記抗体が、アクアポリン1(AQP1)、アクアポリン2(AQP2)、アクアポリン3(AQP3)、NKCC2、NHE-3、およびNaPiIIの任意のドメインに対する抗体である、項目3に記載の方法。

(項目5)

上記尿試料の、エキソソームについての上記濃縮が、上記免疫精製に先立ち、エキソソームについて濃縮するための少なくとも1つのさらなる手段を含む、項目4に記載の方法。

。

(項目6)

上記尿試料の、エキソソームについての上記濃縮のための上記さらなる手段が、遠心分離ス

10

20

30

40

50

テップ、微細濾過ステップ、またはこれらの組合せであり、これにより、脱細胞化された尿試料を生成させる、項目 5 に記載の方法。

(項目 7)

上記遠心分離が、5000～10000rpmで5～30分間にわたり実施される、項目 6 に記載の方法。

(項目 8)

上記遠心分離ステップが、2段階で実施される、項目 6 または 7 に記載の方法。

(項目 9)

第 2 の遠心分離ステップが、30000～45000rpmで30～120分間にわたり実施され、これにより、全エキソソーム画分を生成させる超遠心分離ステップである、項目 8 に記載の方法。

10

(項目 10)

上記微細濾過ステップが、最大0.22マイクロメートルのマイクロフィルターを用い、これにより、脱細胞化された尿試料を生成させる、項目 6 に記載の方法。

(項目 11)

上記急性腎損傷マーカーが、NGAL、シスタチン-3、KIM-1、IL-1ベータ、IL-18、またはこれらの組合せの中から選択される、項目 1 に記載の方法。

(項目 12)

検出が、NGAL、シスタチン-3、KIM-1、IL-1ベータ、IL-18に対する一次抗体との免疫反応により実施される、項目 1 に記載の方法。

20

(項目 13)

上記一次抗体が標識されている、項目 12 に記載の方法。

(項目 14)

上記検出が、NGAL、シスタチン-3、KIM-1、IL-1ベータ、IL-18に対する上記一次抗体に対する標識された二次抗体を検出することにより実施される、項目 1 に記載の方法。

(項目 15)

上記抗体の標識が、酵素、蛍光化合物、赤外化合物、放射性化合物、化合物の中から選択される、項目 12 または 13 に記載の方法。

(項目 16)

モニタリング、診断、予後診断、および/または被験体における処置の決定のために、上記特異的腎損傷マーカーの存在および/またはレベルに基づき、上記被験体における上記急性腎損傷を評価するためのステップをさらに含む、項目 15 に記載の方法。

30

(項目 17)

早期における急性腎損傷を評価するためのキットであって、

(a) 少なくとも1つの免疫精製ステップを用いて、尿試料をエキソソームについて濃縮するための手段と、

(b) 急性腎損傷(AKI)マーカーを検出するための手段とを含む、キット。

(項目 18)

(c) 尿試料を得るための手段をさらに含む、項目 17 に記載のキット。

40

(項目 19)

上記免疫精製ステップのための抗体が、抗アクアポリン1(抗AQP1)、抗アクアポリン2(抗AQP2)、および抗アクアポリン3(抗AQP3)、抗NKCC2、抗NHE-3、抗NaPiII、またはこれらの組合せの中から選択される、項目 17 に記載のキット。

(項目 20)

上記免疫精製ステップのための上記抗体が、アクアポリン1(AQP1)、アクアポリン2(AQP2)、アクアポリン3(AQP3)、NKCC2、NHE-3、およびNaPiIIの任意のドメインに対する抗体である、項目 19 に記載のキット。

50

(項目 2 1)

上記尿試料の、エキソソームについての上記濃縮が、上記免疫精製に先立ち、エキソソームについて濃縮するための少なくとも1つのさらなる手段を含む、項目 2 0 に記載のキット。

(項目 2 2)

上記尿試料をエキソソームについて濃縮するための上記手段が、容器、試験管、遠心分離管、抗体、免疫反応緩衝液、ブロッキング剤もしくはブロッキング溶液、上記特異的腎損傷マーカーの原液、マイクロフィルター、上記抗体で覆われた96ウェルプレート、またはこれらの組合せの中から選択される、項目 2 1 に記載のキット。

(項目 2 3)

上記急性腎損傷マーカーを検出するための上記手段が、NGAL、シスタチン - 3、KIM - 1、IL - 1 ベータ、IL - 1 8、またはこれらの組合せに対する抗体の中から選択される抗体である、項目 1 7 に記載のキット。

(項目 2 4)

上記抗体が標識されている、項目 2 3 に記載のキット。

(項目 2 5)

NGAL、シスタチン - 3、KIM - 1、IL - 1 ベータ、IL - 1 8、またはこれらの組合せに対する一次抗体に対する標識された二次抗体をさらに含む、項目 2 3 に記載のキット。

(項目 2 6)

上記抗体中の上記標識が、酵素、蛍光化合物、赤外化合物、放射性化合物、化合物の中から選択される、項目 2 4 または 2 5 に記載のキット。

(項目 2 7)

上記キットを用いるための指示書をさらに含む、項目 2 6 に記載のキット。

(項目 2 8)

尿中エキソソームを精製するための方法であって、

( a ) 尿試料または場合によって、脱細胞化された尿試料を、異なる腎構造の表面において好ましくかつ示差的に発現されるタンパク質の細胞内ドメイン、細胞外ドメイン、または任意のドメインに対する抗体と共にインキュベートし、これにより、エキソソーム - 抗体複合体を形成するステップと、

( b ) ( a ) から得られる上記エキソソーム - 抗体複合体を、上記抗体の任意の領域を認識し、不溶性作用物質に結合しているタグと共にインキュベートし、これにより、エキソソーム - 抗体 - タグ - 不溶性作用物質複合体を形成するステップと、

( c ) 上記エキソソーム - 抗体 - タグ - 不溶性作用物質複合体を上清から分離するステップと、

( d ) 上記エキソソーム - 抗体 - タグ - 不溶性作用物質複合体を適切な緩衝液で洗浄するステップと

を含む、方法。

(項目 2 9)

上記抗体が、抗アクアポリン 1 ( 抗 A Q P 1 )、抗アクアポリン 2 ( 抗 A Q P 2 )、および抗アクアポリン 3 ( 抗 A Q P 3 )、抗 N K C C 2、抗 N H E - 3、抗 N a P i I I、またはこれらの組合せの中から選択される、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 0)

上記抗体が、アクアポリン 1 ( A Q P 1 )、アクアポリン 2 ( A Q P 2 )、アクアポリン 3 ( A Q P 3 )、N K C C 2、N H E - 3、および N a P i I I の任意のドメインに対する抗体である、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 3 1)

異なる腎構造の表面において好ましくかつ示差的に発現されるタンパク質の細胞内ドメイン、細胞外ドメイン、または任意のドメインに対する抗体または抗体の組合せの使用であって、上記抗体が尿中エキソソームを免疫精製するための抗体である、使用。

10

20

30

40

50

(項目32)

抗アクアポリン1 (抗AQP1)、抗アクアポリン2 (抗AQP2)、および抗アクアポリン3 (抗AQP3)、抗NKCC2、抗NHE-3、抗NaPiII、またはこれらの組合せの中から選択される抗体または抗体の組合せの使用であって、上記抗体が尿中エキソソームを免疫精製するための抗体である、使用。

(項目33)

アクアポリン1 (AQP1)、アクアポリン2 (AQP2)、アクアポリン3 (AQP3)、NKCC2、NHE-3、およびNaPiIIの任意のドメインに対する抗体または抗体の組合せの使用であって、上記抗体が尿中エキソソームを免疫精製するための抗体である、使用。

10

## 【図面の簡単な説明】

## 【0136】

【図1】図1は、移植の1、2、3、および4日後における腎移植患者の尿試料に由来する細胞画分内のNGALの存在度とエキソソーム画分内のNGALの存在度とを比較する代表的なウェスタンブロットである。

【図2】図2は、移植の1日後における患者に由来する全尿画分(U)およびエキソソーム画分(E)内のNGAL-24およびNGAL-46の存在度を示す代表的なウェスタンブロットである。

【図3】図3は、移植の1日後における患者の尿の全エキソソーム画分内のNGALについてのグラフ表示である。AU = 任意単位である。

20

【図4】図4は、NGAL-46とAQP1、2、および3との間の関係を示す図であり (\* p < 0.05、n = 5)、AU = 任意単位である。

【図5】図5は、腎移植片を有する個体におけるSCRレベルとNGALレベルとの2つのレベルの比較解析を示す図である。

【図6】図6は、AKI1 (5例の患者)、AKI2 (3例の患者)、およびAKI3 (5例の患者)として分類されたICU患者における、エキソソームを含まない尿画分(白色バー、EF-U)および全エキソソーム画分(黒色バー、TE)についてのNGALの相対存在度(任意単位)を示す図である。

【図7】図7は、AKI1 (5例の患者)、AKI2 (3例の患者)、およびAKI3 (5例の患者)として分類されたICUからの患者における、任意単位によるNGALの存在度についてのTE/EF-U比を示す図である。

30

【図8】図8は、AKI1 (5例の患者)として分類されたICU患者における、エキソソームを含まない尿(EF-U)、全エキソソーム(TE)、および免疫精製されたエキソソーム(IP-E)についてのNGALの相対存在度を示す図である。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0137】

本節では、例示的な例を指針として提示するものであり、したがって、これらの例は、限定的なものとしてみなされるべきではない。

## 【0138】

## 適用例

40

以下では、腎移植を受けた12例のヒト患者群における腎(renalまたはkidney)損傷を決定する研究に基づき、本発明の実施形態の一部が記載される。研究は、ICUに収容された28例の個体であって、46% (28例中13例)がRIFLE分類に従うAKIを発症した個体を含んだ。

## 【0139】

## (実施例1)

## 研究対象群についての記載

12例のヒト患者群に加えて、対照群としての役割を果たす健常個体を解析することにより、本発明の方法および生成物について調べた。健常対照のために用いられた組入れ基準は、腎臓の総体的症状が存在しないことであり、患者のための組入れ基準は、本研究の

50

持続期間中に腎移植を受けた全ての個体であった。患者は、説明同意文書の承認を考慮の上で登録された。

【0140】

(実施例2)

尿サンプリング

50 mlの尿検体を、研究対象の各個体から、カテーテルの挿入により得た。試料は、熟練の看護師により、午前中の1回目の排尿から採取された。移植を受けた個体の場合、移植の前日に試料を得、手術後、後続する3日間にわたり毎日1回ずつ3つの試料を得、これらのうち、手術後における第1の試料を解析用に選択した。ウェスタンブロット解析を待機する間、試料は - 80 で維持した。

10

【0141】

(実施例3)

尿中エキソソームの調製

エキソソームは、2つの異なる手法を考慮して得た。第1の手法は、遠心分離を用いる第1のステップと超遠心分離を用いる第2のステップとの2ステップの遠心分離による分離に対応した。本発明の主な特色である第2の方法では、第1段階の遠心分離と、第2ステップの免疫精製とについて検討した。

【0142】

2つの遠心分離ステップを伴う第1の方法では、10 mlの尿試料を採取し、これに、プロテアーゼ阻害剤錠 (Complete Mini protease inhibitor cocktail tablets, Roche) を添加した。第1の遠心分離は、細胞内容物を分離するために、4、17,000 gで15分間にわたり実施し、これを - 80 で保存し、第1の上清画分 (S1) を得た。第1の画分であるS1を38,000 rpmで1時間にわたりさらに超遠心分離し、これにより、第2の上清画分 (S2) および沈殿物 (全エキソソーム) を生成させた。

20

【0143】

第2のステップで免疫精製を考慮する、遠心分離の第1のステップの場合、2つの遠心分離ステップを伴う方法の第1のステップにおいて記載される通りに得られたS1の画分を、腎臓の異なる領域からエキソソームを得るための、AQP1抗体、AQP2抗体、またはAQP3抗体を用いるエキソソームの免疫精製のために用いた。試料は、ゲル中に各試料の全タンパク質100マイクログラムずつがロードされるように、ロードバッファー (100 mMのトリス-HCl、pH 6.8、200 mMのジチオトレイトール (DTT)、4%のSDS、0.2%のプロモフェノールブルー、20%のグリセリン) 中に再懸濁させた。

30

【0144】

(実施例4)

ウェスタンブロット解析

ウェスタンブロットにより、特異的抗体を用いるタンパク質の存在の同定が可能となった。タンパク質は、100 Vで90分間にわたる、7.5%および12%のアクリルアミドゲル中の電気泳動 (SDS-PAGE) を用いて、それらのサイズに従い分離した。分離したら、全てのタンパク質を、300 mAで90分間にわたり、ニトロセルロース膜へと転写した。この過程の後、膜を、一定の攪拌下で1時間にわたり、5%のスキムミルクを用いてブロッキングし、その後、4 で攪拌しながら、抗AQP1 (Santa Cruz Biotechnology) 一次抗体、抗AQP2 (Santa Cruz Biotechnology) 一次抗体、抗AQP3 (Santa Cruz Biotechnology) 一次抗体、または抗NGAL (R&D Systems) 一次抗体との一晩にわたるインキュベーションを行った。インキュベーションが終わったら、膜を、1%のPBS-Tween 20 (Winkler) で3回洗浄して、室温で2時間にわたり攪拌を伴い、二次抗体と共に継続した。最後に、さらなる処理のために、膜をPBS-Tween 20 1%で3回洗浄した。

40

50

## 【0145】

タンパク質の存在度は、Adobe Photoshop CS4ソフトウェアを用いて、ウェスタンブロットにより得られたバンドの濃度測定を使用する半定量解析により決定し、決定を標準化するように、各バンドについて2つずつの測定値（全ての試料について全バンドおよび固定サイズのバンド）を得た。

## 【0146】

タンパク質の決定

全タンパク質濃度は、市販されるキット（BCA Protein Assay Reagent, Pierce）を用いて、両方の細胞画分において決定した。

## 【0147】

統計学的解析

ANOVAの統計学的モデルを用いて記述関連研究を行った。解析は、p値 0.05を有意差と考へて、WINKS SDA 6.0ソフトウェアを用いて実施した。

## 【0148】

（実施例5）

本発明の方法に従う解析の結果

群研究の特徴

本研究では、腎移植を施された12例の患者について検討した。

## 【0149】

患者の年齢は、15～60歳の範囲にわたったが、患者の大半（12例中7例）は、40～60歳の間であった。患者の大半は、男性（91.6%）であった。25%が、死体ドナーに由来する臓器を施され、75%が生体ドナーに由来する臓器を施された（表4）。

## 【0150】

血清クレアチニンは、移植された臓器の生存率について調べるのに重要なパラメータである。移植の1日後、全ての患者の血清クレアチニン値は、正常より高く（0.8～1.4mg/dl）、死体ドナーに由来する臓器を施された患者の値がより高いことが示された（表4）。

## 【0151】

検討された他のパラメータは、移植に先立ち臓器が虚血に供された虚血時間であった。虚血時間は、27～1182分間の範囲にわたる。死体ドナーに由来する臓器を施された患者では、時間が300～1182分間の範囲にわたり、生体ドナーに由来する臓器を施される患者による27～360分間の時間と比較して、一般に長時間であった（表4）。

## 【0152】

10

20

30

【表 4】

表4:研究における患者情報

患者番号	年齢(歳)	性別	ドナーの種類	SCR day +1 (mg/dl)	虚血時間 (分)
1	60	M	CD	12.5	1182
2	57	M	LD	7.4	27
3	16	M	CD	6.1	300
4	34	M	LD	4.8	120
5	15	F	LD	2.3	N/A
6	27	M	LD	4.7	90
7	42	M	LD	9.3	360
8	46	M	LD	2.7	N/A
9	46	M	LD	6.1	N/A
10	55	M	LD	5.5	120
11	28	M	LD	2.8	60
12	42	M	CD	9.0	720

性別:M=男性、F=女性;ドナーの種類:CD=死体ドナー、LD=生体ドナー;SCR day+1=移植の1日後における血清クレアチニン;虚血時間:N/A=データ入手不能

#### 腎不全バイオマーカーの解析

本発明者らの調査チームにより得られたかつての結果、および本研究による結果は、健康個体の尿の細胞画分またはエキソソーム画分内には、検出可能なレベルのバイオマーカーが見られないことを示す (Flores M., Marquez S., 2009年、Research unit: New molecular markers for the study of kidney transplant dysfunction, Universidad de los Andes, Santiago, Chile)。また、エキソソーム画分内のバイオマーカーの発現レベルも、細胞画分内で発現するバイオマーカーの発現レベルより高い (図1)。さらに、研究対象であるバイオマーカーの高レベルの発現は、移植の1日後に生じる (図1)。最後に、ウェスタンブロットを用いると、NGALの2つのアイソフォームである、23 kDaのNGAL-23および46 kDaのNGAL-46を検出することが可能である (図1)。これにより、本研究は、移植の1日後に回収される尿試料のエキソソーム画分に由来するバイオマーカー

10

20

30

40

50

のプロファイルを決定することに焦点を絞る。

【0153】

NGAL

ウェスタンブロット法を用いて、研究に含めた12例の患者の移植の1日後における全尿中エキソソームに由来する全てのNGALアイソフォームの存在度を解析する(NGAL-23およびNGAL-46)ことから、これら12例中11例についての情報を得た。これらの結果は、NGALが症例のうちのほとんど全例において発現したことを示す。発現の範囲は、7.3~170.3AUの間であった、すなわち、極端な場合の間の差違は約20倍であった(図3)。

【0154】

ウェスタンブロットを用いてNGAL-46およびNGAL-24を同定したところ、両方のマーカーが発現するのは尿中エキソソーム画分内だけであり、上清は、非特異的なバンドのみを示す(図2)。

【0155】

11例の患者のうちで、NGAL値が高い患者は患者5および7であり、それぞれの値は170.3および83.8AUであった。

【0156】

最低レベルは、値12.6AUの患者10および7.9AUの患者2で見出された。

【0157】

免疫精製されたエキソソーム内のバイオマーカーの発現

Pisitkunは、2004年(Pisitkun T., Shen R.F., Kneppler M.A., 2004年、Proc Natl Acad Sci USA、101巻:13368~13373頁)において、正常患者に由来する尿中エキソソーム内のアクアポリン(AQP)の存在について記載した。そこで、本研究では、腎移植を受けた患者に由来する免疫精製エキソソーム内のAQP(AQP1、AQP2、AQP3)の発現について探索した。これらの成分の各々を選択したのは、その発現がネフロン内の特定の帯域と関連するためである。AQP1は通常、近位尿細管と関連し(Kneppler M.A., 1997年、Am J Physiol、272巻:F3~F12頁)、AQP2は、遠位尿細管および集合管と関連し(Ma T., Yang B., Gillespie A., Carlson E.J., Epstein C.J., Verkman A.S., 1998年、J Biol Chem、273巻:4296~4299頁)、AQP3は、ネフロン由来の集合管と関連する(Sasaki S., Ishibashi K., Marumo F., 1998年、Annu Rev Physiol、60巻:199~220頁)。

【0158】

この解析は、特定の種類のエキソソーム内に存在する各バイオマーカーの存在度を決定することを可能とする。したがって、手法は、解析される腎損傷についてのバイオマーカーの潜在的な起源の間の関係を確認する手法である。

【0159】

NGAL-46

図4は、陽性情報を伴う患者の尿中エキソソーム内のAQPレベルによる、NGAL-46アイソフォームの正常化を示す。NGAL-46は、NGAL-46の発現が、NGAL-23より高いので選択した(図1)。

【0160】

結果は、AQP1の存在度と関係するNGALの存在度が、他のAQPより統計学的に高いことを示す(図4、 $p < 0.05$ )。これらの結果は、AQP1を含有するエキソソームが、NGALの存在度がより高いことを示唆する(図4)。これらの結果に基づくと、NGAL-46は、AQP1が優先的に発現する腎領域、すなわち、集合管の近位帯域と主に関連することが示される。

【0161】

10

20

30

40

50

### 血清クレアチニンレベルのNGALレベルとの比較

NGALのレベルと血清クレアチニン（SCR）のレベルとを比較する結果として、SCRレベルが3mg/dlより低い個体（患者5、8、および11）またはSCRレベルが6mg/dlより高い個体（患者1、2、3、7、9、および12）は、NGALとの相関を有さないことが示される。（図5）。

#### 【0162】

データは、糸球体濾過のマーカー（SCR）が、腎損傷マーカー（NGAL）と相関しないことを示唆する。

#### 【0163】

##### 考察

##### 腎損傷バイオマーカーの解析

##### NGAL

FloresおよびMarquez（2009年）（Flores M.、Marquez S.、2009年、Research unit: New molecular markers for the study of kidney transplant dysfunction、Universidad de los Andes、Santiago、Chile）は、健常個体に由来する尿のエキソソーム画分内には、検出可能なレベルのNGALが見られないことを示した。情報が入手可能であった本研究の11例の患者は、腎移植を受けた患者の尿中エキソソームの100%ではNGALが検出されるが、尿の細胞画分を含まない上清では、NGALが検出されないことを示した。発現レベルは、7.9～170.3AUの間であり、極端な個体間の差違は22倍超であった。したがって、解析された画分は、全尿より代表的な画分であったので、データは、尿中エキソソーム内のNGALの検出が、腎損傷についての優れたバイオマーカーを構成することを示唆する。

#### 【0164】

##### NGALのドナーの種類との関係

ドナーが生存している場合に移植される臓器の質は、死体ドナーの場合と比較して良好であり、これは、腎損傷マーカーの発現の低さとして反映されるはずであることが公知である。この種の挙動は、NGALレベルが低く、移植された臓器も生体ドナーから施された患者2、6、9、および10において示された。同じ文脈では、患者1が高レベルのNGALを示すが、これは、この患者が、死体ドナーに由来する移植片を施されたことにより説明することができる。それにもかかわらず、このNGALの発現パターンは、死体ドナーに由来する移植片を施され、中程度のNGALレベルを示す患者3によって示されず、したがって、臓器の質として解釈されうるであろう。

#### 【0165】

患者5および7は、生体ドナーに由来する腎臓を施されたが、高レベルのNGALを示す。患者7は、移植された腎臓の機能に遅延を示し、移植後第1週に血液透析を必要とした。したがって、NGALは、腎損傷についての優れたマーカーである。

#### 【0166】

##### NGALの虚血時間との関係

虚血時間が長いほど、その臓器が有する機能は低くなるので、臓器の虚血時間は、移植前に臓器が受けている傷害の決定因子である。これは、360～1182分間の虚血時間値と関連してNGALの発現が高度である患者1および7において観察される。虚血時間値が27～90分間であった患者2および6では、逆のことが観察される。この関係は、虚血時間値が低く、NGALレベルが高い、患者11を例外とする大半の症例において確立することができる（表4、図3）。患者5は、群のうちで高レベルのNGALを示すが、虚血時間データは入手可能でない。

#### 【0167】

##### NGALの年齢および性別との関係

例えば、患者5は、研究における最若齢者であるが、最高レベルのNGALを示すので

10

20

30

40

50

、本研究で得られる結果に従うと、年齢は、各患者のNGALレベルとの関係を有さないと考えられる(図3)。研究に含めた女性は1例だけであったので、患者の性別とマーカーとの間の関係を確立することは不可能である。

#### 【0168】

免疫精製されたエキソソーム内のバイオマーカーの発現

AQP1、AQP2、およびAQP3

異なる種類のAQPにより免疫精製されたエキソソームについて、バイオマーカーの存在度を解析した。

#### 【0169】

Knepper、1997年(Knepper M.A.、1997年、Am J Physiol、272巻:F3~F12頁)は、AQP1が、近位尿細管と優先的に関連することを示したが、AQP2は、遠位尿細管および集合管と関連し(Ma T.、Yang B.、Gillespie A.、Carlson E.J.、Epstein C.J.、Verkman A.S.、1998年、J Biol Chem、273巻:4296~4299頁)、AQP3は、ネフロン由来の集合管と関連する(Sasaki S.、Ishibashi K.、Marumo F.、1998年、Annu Rev Physiol、60巻:199~220頁)。

10

#### 【0170】

Pisitkunは、2004年(Pisitkun T.、Shen R.F.、Knepper M.A.、2004年、Proc Natl Acad Sci USA、101巻:13368~13373頁)において、AQPが、正常患者の尿中エキソソーム内に存在することを示した。

20

#### 【0171】

本研究は、AQPが正常患者に由来する尿中エキソソーム内に存在するほか、また、移植時における臓器またはドナーの状態とは無関係に、腎移植に供された全ての患者においても存在すること示す(表4)。

#### 【0172】

膜成分とバイオマーカーの関係

AQP1が、ネフロン内の近位尿細管と関連し(Knepper M.A.、1997年、Am J Physiol、272巻:F3~F12頁)、AQP2が、遠位尿細管と関連し、AQP3が、集合管と関連することを考慮して、AQP1、AQP2、およびAQP3により免疫精製されたエキソソームについて、NGALの存在度を解析した。

30

#### 【0173】

NGAL

免疫精製されたエキソソームの各々におけるNGALの発現は、それらの膜内にAQP1を伴うエキソソームについては、NGALの存在度が著明に高く( $p < 0.05$ 、図4)、AQP2を伴うエキソソームおよびAQP3を伴うエキソソームがこれに続き、後二者の間では有意差が見られないことを示唆する。データは、腎臓の近位尿細管に由来するエキソソームは、腎損傷マーカーであるNGALの存在度が高いことを示唆する。

#### 【0174】

結論

移植の1日後の腎損傷におけるバイオマーカーの解析は、全尿ではなく、尿のエキソソーム画分に対してウェスタンブロット法を用いるバイオマーカーの検出を可能とした。これらのバイオマーカーは、この技法を健常患者において用いては検出不能である。

40

#### 【0175】

NGALは、解析される全ての患者において、腎移植の1日後に採取される尿試料のエキソソーム画分内に存在することから、エキソソーム内の分子的因子の発現が、移植手順と関連する移植片内の腎損傷の発症に起因することが示唆される。興味深いことに、患者1、4、および7は共に、高レベルのNGALを示した。これらの患者のうちで、患者1および7は、移植後第1週の間に、透析療法を必要とする移植片の機能に遅延を示した。

50

これらの予備的結果は、尿中エキソソーム内のNGALレベルの上昇が、腎移植における腎機能異常の確立において臨床的役割を果たすことを示す。

【0176】

これらのマーカーの存在度を決定するための定量的方法を用いると、例えば、ELISAを用いて、腎移植と関連する腎損傷の程度を決定するための限界、ならびに移植片の機能および生存率におけるそれらの関与を確立することが可能となる。

【0177】

解析に基づくと、NGALは、近位尿細管から得られる尿中エキソソーム内で主に発現される。

【0178】

(実施例6)

研究対象群についての記載

統計学的解析、試料の調製、ウェスタンブロット法のプロトコール、全尿、全エキソソーム、免疫精製されたエキソソームに関しては、前出の実施例で用いられた同じ手順を用いた。

【0179】

本実施例では、30mlの尿試料を、集中治療室(ICU)に収容された患者の2回目の排尿から得、滅菌容器内に保管した。試料は、さらなる処理およびウェスタンブロット解析まで-80で保管した。

【0180】

研究群

研究群は、ICUに収容された28例の個体であって、年齢が21~95歳の範囲にわたり、19例の男性および9例の女性を伴う個体を含んだ。46%(28例中13例)が、RIFLE分類に従うAKIを発症した。

【0181】

以下の表5に、年齢、性別、および通常の方法に従い決定されるAKI病期を示す。

【0182】

10

20

【表5 - 1】

表5:研究における患者情報

患者番号	年齢(歳)	性別	AKIの病期
1	64	M	AKI3
2	75	M	AKI3
3	34	M	N
4	59	F	N
5	95	M	AKI1
6	82	F	N
7	23	M	AKI3
8	21	M	AKI3
9	74	M	AKI1
10	79	F	AKI2
11	87	F	N
12	34	M	N
13	40	F	N
14	76	M	N
15	27	M	N
16	39	M	AKI2
17	57	F	N
18	82	M	N
19	37	M	N

10

20

30

40

【表 5 - 2】

患者番号	年齢(歳)	性別	AKIの病期
20	55	F	N
21	54	F	N
22	41	M	AKI1
23	44	F	AKI1
24	22	M	AKI2
25	48	M	AKI1
26	38	M	N
27	85	M	AKI1
28	86	M	N

10

20

M:男性、F:女性、N:AKIなし

これら 28 例の患者のうちの 46% が、AKI を伴うと診断され、9 例は女性 (32%) であり、19 例は男性 (68%) であった。AKI 病期に従う分類は、この群の主な構成員には、男性の数が多いことを示す。

30

## 【0184】

AKI 病期および年齢に関する関係は観察されていないが、57% (16 例の患者) は、45 歳より年長であった。

## 【0185】

(実施例 7)

全エクソソーム、エクソソームを含まない尿、および免疫精製されたエクソソームにおける腎損傷のバイオマーカーについての解析

ウェスタンブロット法により、AKI バイオマーカーである NGAL を、エクソソームを含まない尿 (EF-U)、全エクソソーム画分 (TE)、および免疫精製されたエクソソーム (IP-E) について解析した。ウェスタンブロット法を用いたところ、研究における 28 例の患者のうち、患者 17 は、検出可能なレベルの NGAL を示した。以下の表 6 は、研究対象である患者におけるバイオマーカーの検出についての結果を示す。

40

## 【0186】

【表 6 - 1】

表6:患者におけるバイオマーカーの検出

患者番号	NGAL	AKIの病期
1	+	AKI3
2	+	AKI3
3	-	N
4	+	N
5	+	AKI1
6	+	N
7	+	AKI3
8	+	AKI3
9	+	AKI1
10	+	AKI2
11	-	N
12	+	N
13	-	N
14	-	N
15	-	N
16	+	AKI2
17	+	N
18	-	N

10

20

30

40

【表 6 - 2】

患者番号	NGAL	AKIの病期
19	-	N
20	+	N
21	-	N
22	+	AKI1
23	+	AKI1
24	+	AKI2
25	+	AKI1
26	-	N
27	+	AKI1
28	-	N

+:バイオマーカーの存在、-:バイオマーカーの非存在

AKIを伴うと診断された患者(28例中13例)のうちの100%(13例中13例)は、被験画分のうちの少なくとも1つにおいてNGALが検出可能であった。AKIについての診断が陰性の患者の場合は、33%がNGALの陽性を示す。

## 【0188】

さらに、AKIを伴うと分類された患者では、症例のうちの85%において、エキソソーム画分内のNGALの存在度が、EF-U画分と比較して高かった。AKIの診断を伴う5例の患者が、エキソソーム画分内のNGALの優先的な発現を示した(患者5、8、9、12、および16)のに対し、EF-U画分内のそれらのNGALレベルは極めて低かった。AKIの診断およびNGALが陽性である2例の患者だけが、いずれの画分においても同等なNGALの存在度を示した(患者2および7)。

## 【0189】

AKIの診断が陰性の群では、60%が検出不能なNGALレベルを示す。AKIの診断が陰性であり、NGALが陽性であると分類された全ての患者は、エキソソーム画分内に高レベルのNGALを示した。

## 【0190】

10

20

30

40

【表 7 - 1】

表7:患者において解析された尿中画分内のNGALの相対存在度

患者番号	NGAL EF-U	全エキソソーム	AKIの病期
1	+	++	AKI3
2	++	++	AKI3
3	-	-	N
4	+	++	N
5	-	+	AKI1
6	+	++	N
7	++	++	AKI3
8	-	+	AKI3
9	-	+	AKI1
10	+	++	AKI2
11	-	-	N
12	-	++	N
13	-	-	N
14	-	-	N
15	-	-	N
16	-	+	AKI2
17	-	+	N
18	-	-	N

10

20

30

40

【表 7 - 2】

患者番号	NGAL EF-U	全エキソソーム	AKIの病期
19	-	-	N
20	-	+	N
21	-	-	N
22	+	++	AKI1
23	+	++	AKI1
24	+	++	AKI2
25	+	++	AKI1
26	-	-	N
27	+	++	AKI1
28	-	-	N

+:NGALの存在、 -:NGALの非存在

患者は、AKI 3を最も重篤とするAKIの3つの病期に分類された。AKIを伴うと診断された13例の患者のうち、5例が、AKI 1と分類され、5例(100%)が、エキソソーム画分内に高存在度のNGALを示した。AKI 2を伴うと診断された3例の患者のうち、3例が、エキソソーム画分内に高存在度のNGALを示した。AKI 3を伴うと診断された5例の患者のうち、3例(60%)が、エキソソーム画分内に高存在度のNGALを示した(表7)。

【0192】

さらに、エキソソームを含まない尿(EF-U)画分と全エキソソーム(TE)画分におけるNGALの相対存在度も解析した。

【0193】

ICUに収容され、AKI 1、AKI 2、およびAKI 3を伴うと診断された患者の尿中NGALレベルを個別に決定した。結果は、AKI 1およびAKI 2の場合、TE内のNGALの存在度がEF-U中と比較して高いが、損傷レベルが上昇すると共に、NGALの存在度もまた上昇することを明らかに示す(図6)。

【0194】

AKIの診断が陰性の患者群では、33%(15例中5例)が、TE画分内に検出可能なレベルのNGALを示した。この画分内のNGALの存在度レベルは、平均で $13.5 \pm 9.8$  AUであった。これらのレベルは、AKI 1を伴う患者のTE内で見出されるレベルより著明に低かった( $79.6 \pm 22$  AU、図6)。これは、血清クレアチニンレベルによっては検出されなかった初期の腎損傷として解釈されうるであろう。

【0195】

かつてのデータは、TE内のNGALの測定が、血清クレアチニンを用いるAKIの診断の24時間前におけるAKIの診断について感度の高い方法であることを示す。

## 【0196】

NGALの相対存在度をTE画分内とEF-U画分内とで比較するために、TE/EF-U比を計算した。結果(図7)は、AKI1の場合、TE内のNGALの存在度が、EF-U内と比較して45倍高く、AKI2の場合、13倍高いことを示す。それにもかかわらず、AKI3を伴うと診断された患者は、有意差を示さなかった。データは、血清クレアチニン法を用いてAKIの診断を確立する前の24時間において、尿中エキソソーム内のNGALは、AKI(AKI1、およびAKI2)の早期検出において高い感度を有することを示す。

## 【0197】

かつての結果は、AKI1を伴う患者における全エキソソーム(TE)内のNGALの存在度が高いことを示したので免疫精製されたエキソソーム(IP-E)内のNGALの存在度についてさらに解析した。AKI1を伴うと診断された患者におけるエキソソームを免疫精製するには、AQP1を用いた。IP-E画分内のNGALの存在度を、TE画分内およびEF-U画分内と比較した。結果は、IP-E内のNGALの存在度がTE画分内より高く、EF-U画分内よりなお高いことを示す(図8)。

10

## 【0198】

データは、エキソソームをネフロンの近位尿細管部分から免疫精製することにより、NGALの存在度が高まり、したがって、危機的な患者におけるAKIの早期検出の感度も高まることを示す。

## 【0199】

尿中NGALの決定を確立することを可能とする、本実施例の28例の患者による群についての解析は、血清中のクレアチニンレベルについての通常の方法が可能となる前の24時間においてAKIの診断についての良好な方法である。

20

## 【0200】

エキソソーム画分内のNGALの存在度は、エキソソームを含まない尿画分内より高く、したがって、特に、病期AKI1およびAKI2については、早期AKIの診断のための感度の高い方法であることが示される。

## 【0201】

エキソソームの免疫精製は、AQP1により免疫精製されたエキソソーム内のNGALの存在度が高いことに起因して、AKIの検出感度の上昇を可能とする。

30

## 【0202】

他の病態も、尿中NGALレベルを上昇させうることを踏まえると、免疫精製されたエキソソームの解析は、測定されたNGALが、腎臓に由来することを確立させ、早期AKIを検出するためのエキソソームバイオマーカーの決定における特異性が增大する。

【 図 2 】

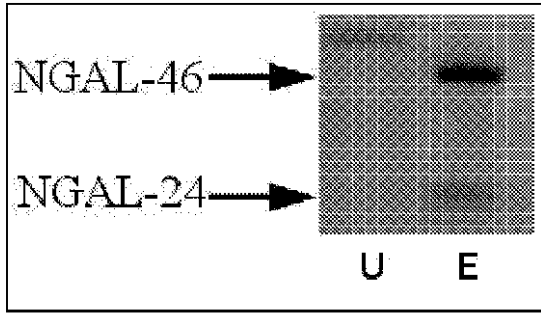


Figure 2

【 図 7 】

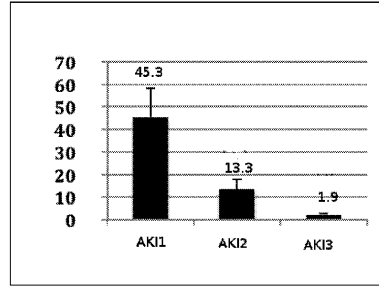


Figure 7

【 図 6 】

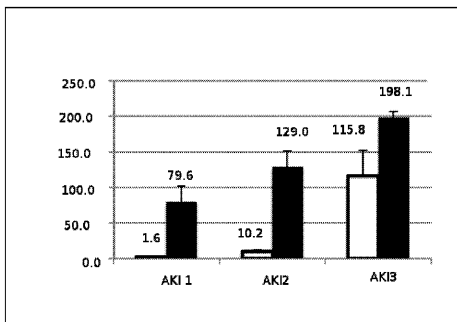


Figure 6

【 図 8 】

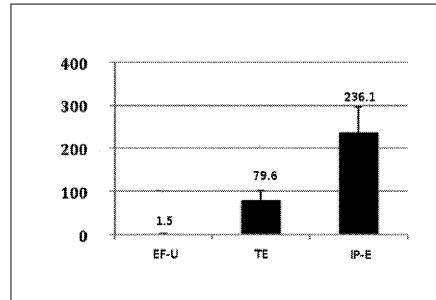


Figure 8

【 図 1 】

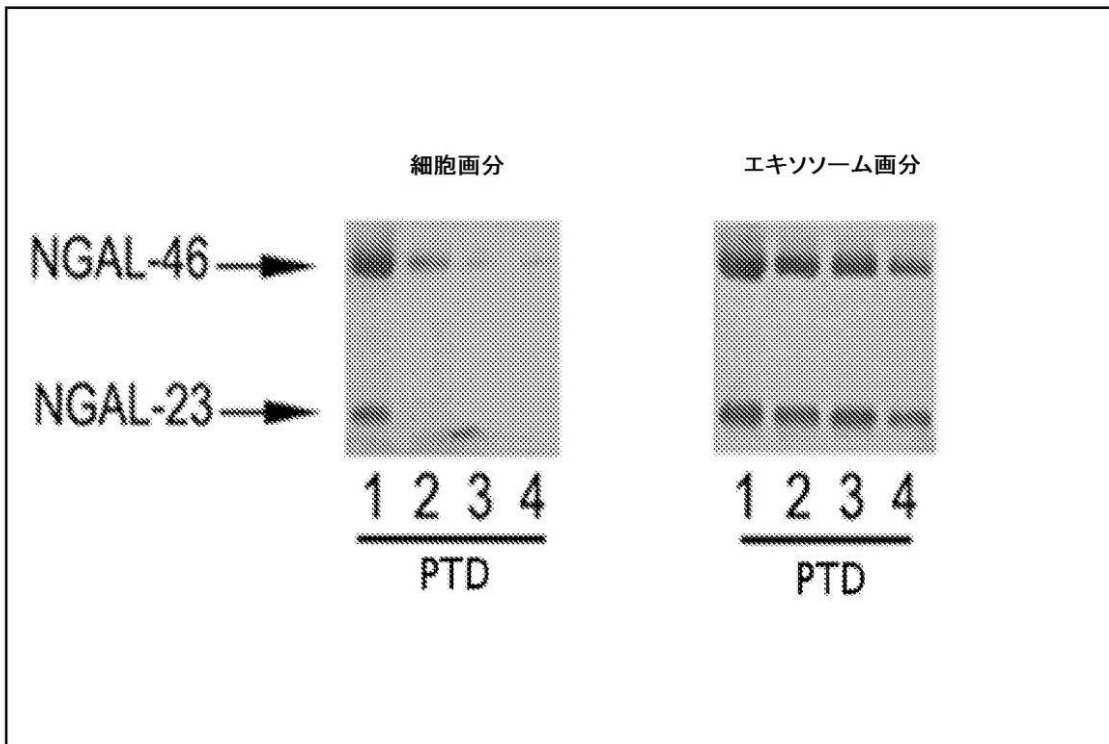


Figure 1

【 図 3 】

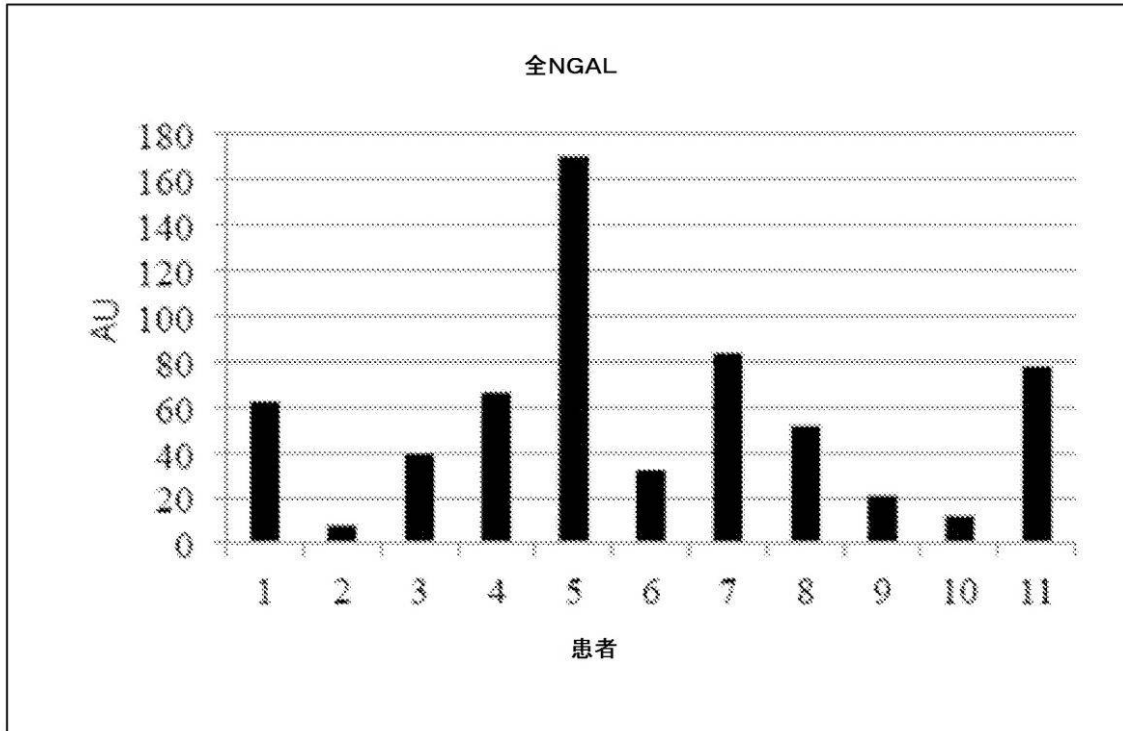


Figure 3

【 図 4 】

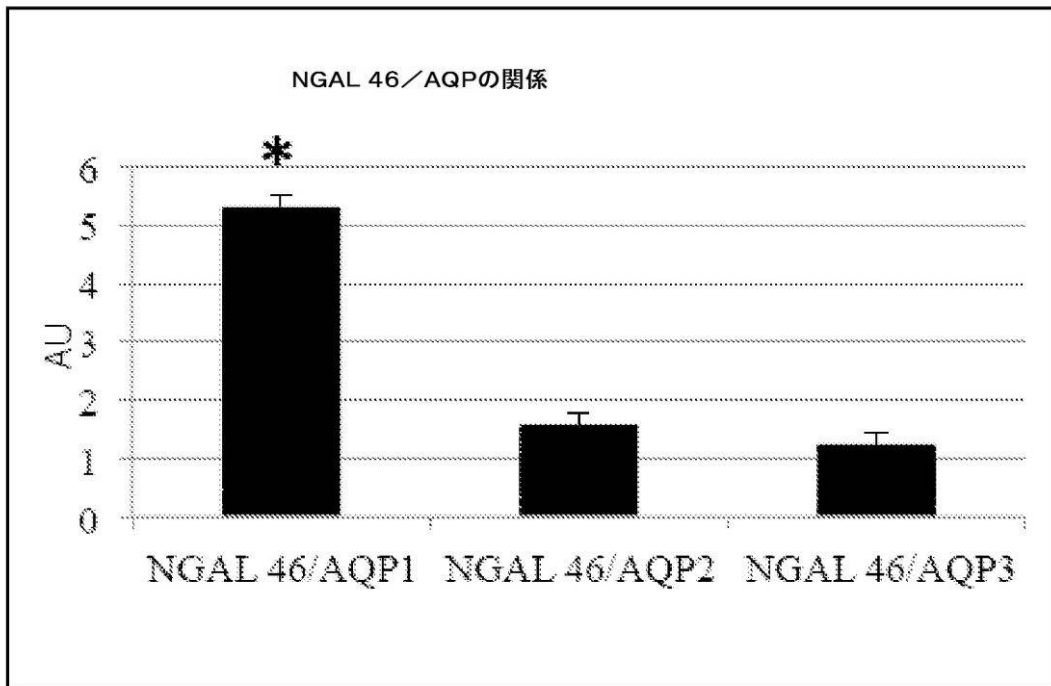


Figure 4

【 図 5 】

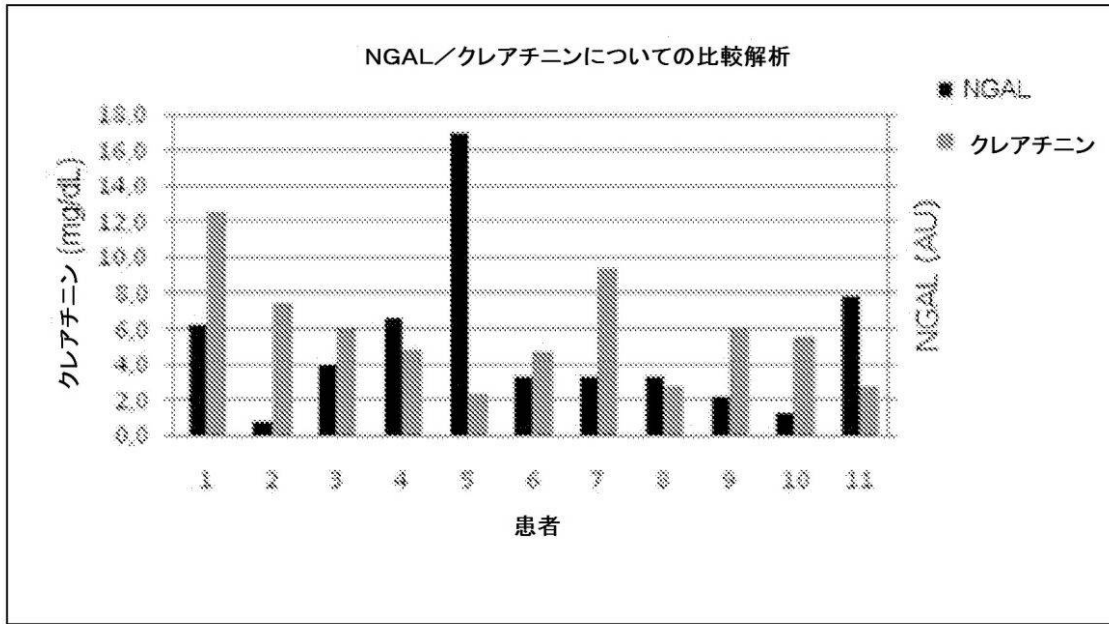


Figure 5

## フロントページの続き

(72)発明者 イララサバル ムニョス, カルロス エルネスト  
チリ共和国 7830238 サンティアゴ, マクル, ホルヘ ゴンザレス バスティアス  
3997

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 国際公開第2010/056337(WO, A2)  
国際公開第2010/070276(WO, A1)  
米国特許出願公開第2009/0258379(US, A1)  
特表2003-514523(JP, A)  
特表2008-501979(JP, A)  
特表2012-508177(JP, A)  
特表2011-510663(JP, A)  
NGAL in Urinary Exosomes as a Source of Kidney Dysfunction Biomarker in Renal Transplantation, 2010 Renal Week, Denver, CO, J Am Soc Nephrol, 2010 Vol. 21, pp959 PUB 662  
アクアポリン1タンパク質の新規尿中排泄過程に着目した腎不全診断マーカーに関する研究, 日本獣医学会学術集会講演要旨集, 2008年, Vol.146th, Page.296 J-34  
尿中exosomal aquaporin-2タンパク質のcisplatin性急性腎傷害早期診断マーカーとしての有用性の検討, 日本腎臓学会誌, 2011年 5月25日, Vol.53, No.3, Page.352 0-105  
NGAL: a biomarker of acute kidney injury and other systemic conditions, Int Urol Nephrol (2010) 42:141-150  
Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for early acute kidney injury, Crit Care Clin (2011 Apr) 27(2) 379-389  
Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: A novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury, Kidney International (2006) 70, 1847-1857  
Exosomes and the kidney: prospects for diagnosis and therapy of renal diseases, Kidney Int. 2011 December ; 80(11): 1138-1145  
Proteomic profiling of exosomes: Current perspectives, Proteomics 2008, 8, 4083-4099  
Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles, Lab Chip. 2010 February 21; 10(4): 505-511  
Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery, Proteomics, 2011年 2月, Vol.11 No.4 Page.709-720  
Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine, Proc Natl Acad Sci USA, 2004年, Vol.101, No.36, Page.13368-13373

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53

C07K 1/32

G01N 33/543

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	在早期阶段监测，诊断和/或预测急性肾损伤的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP5893742B2</a>	公开(公告)日	2016-03-23
申请号	JP2014531321	申请日	2011-09-22
申请(专利权)人(译)	Uniberushida洛斯安第斯		
当前申请(专利权)人(译)	Uniberushida洛斯安第斯		
[标]发明人	イララサバルムニョスカルロスエルネスト		
发明人	イララサバル ムニョス, カルロス エルネスト		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C07K1/32		
CPC分类号	G01N33/543 G01N33/6893 G01N2333/46 G01N2333/54 G01N2333/8139 G01N2800/347 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.501.A G01N33/543.501.H C07K1/32		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
审查员(译)	三木隆		
其他公开文献	JP2014528076A JP2014528076A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及用于在早期阶段监测，诊断，预测急性肾损伤并在患有该疾病的受试者中确定治疗的方法和试剂盒。该方法包括以下步骤：a) 提供尿液样品，b) 使用至少一个免疫纯化步骤浓缩尿液样品中存在于尿液样品中的外来体，c) 给予外泌体中的急性肾脏并检测损伤（AKI）标记。在一个方面，免疫纯化步骤通过针对细胞内结构域，细胞外结构域或蛋白质的任何结构域的抗体进行，所述蛋白质优选地在不同肾结构的表面上差异表达。

(21) 出願番号	特願2014-531321 (P2014-531321)	(73) 特許権者	514069333
(86) (22) 出願日	平成23年9月22日 (2011.9.22)		ユニベルシダ デ ロス アンデス
(65) 公表番号	特表2014-528076 (P2014-528076A)		チリ共和国 91003910 サンティ
(43) 公表日	平成26年10月23日 (2014.10.23)		アゴ, ラス コンデス, サン カルロ
(86) 国際出願番号	PCT/182011/054187		ス デ アホルキンド 2200
(87) 国際公開番号	W02013/041913	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成25年3月28日 (2013.3.28)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	平成26年9月19日 (2014.9.19)	(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(74) 代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		(74) 代理人	230113332
			弁理士 山本 健策