

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-145132

(P2009-145132A)

(43) 公開日 平成21年7月2日(2009.7.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 Z N A A	4 B O 2 4
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 H O 4 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2007-321240 (P2007-321240)	(71) 出願人	504136568 国立大学法人広島大学 広島県東広島市鏡山1丁目3番2号
(22) 出願日	平成19年12月12日 (2007.12.12)	(71) 出願人	507407788 財団法人朝日生命成人病研究所 東京都千代田区丸の内一丁目6番1号
		(74) 代理人	100090251 弁理士 森田 憲一
		(74) 代理人	100139594 弁理士 山口 健次郎
		(72) 発明者	浅野 知一郎 広島県広島市南区霞1-2-3 国立大学 法人広島大学大学院医歯薬学総合研究科内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 大腸癌、動脈硬化症、又はメタボリックシンドロームの検出方法

(57) 【要約】

【課題】 大腸癌、動脈硬化症、又はメタボリックシンドロームの検出方法を提供する。

【解決手段】 本発明の大腸癌、動脈硬化症、又はメタボリックシンドロームの検出方法は、レジスチン様分子 を分析することを特徴とする。大腸癌の検出用キット、動脈硬化症の検出用キット、又はメタボリックシンドロームの検出用キットは、レジスチン様分子 に特異的に結合する抗体又はその断片を含むことを特徴とする。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

レジスチン様分子 を分析することを特徴とする、大腸癌の検出方法。

【請求項 2】

前記レジスチン様分子 の分析が免疫学的分析方法である、請求項 1 に記載の大腸癌の検出方法。

【請求項 3】

レジスチン様分子 を分析することを特徴とする、動脈硬化症の検出方法。

【請求項 4】

前記レジスチン様分子 の分析が免疫学的分析方法である、請求項 3 に記載の動脈硬化症の検出方法。 10

【請求項 5】

レジスチン様分子 を分析することを特徴とする、メタボリックシンドロームの検出方法。

【請求項 6】

前記レジスチン様分子 の分析が免疫学的分析方法である、請求項 5 に記載のメタボリックシンドロームの検出方法。

【請求項 7】

レジスチン様分子 に特異的に結合する抗体又はその断片を含むことを特徴とする、大腸癌の検出用キット。 20

【請求項 8】

レジスチン様分子 に特異的に結合する抗体又はその断片を含むことを特徴とする、動脈硬化症の検出用キット。

【請求項 9】

レジスチン様分子 に特異的に結合する抗体又はその断片を含むことを特徴とする、メタボリックシンドロームの検出用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、レジスチン様分子 (Resistin like molecule : 以下 R E L M と称することがある) を分析する大腸癌、動脈硬化症、又はメタボリックシンドロームの検出方法に関する。なお、本明細書における前記「分析」には、分析対象物質の量を定量的又は半定量的に決定する「測定」と、分析対象物質の存在の有無を判定する「検出」との両方が含まれる。 30

【背景技術】

【0002】

糖尿病、高脂血症、高血圧、高尿酸血症、動脈硬化症、がん(例えば、大腸癌)などは、生活習慣が主な発症原因であると考えられており、生活習慣病と呼ばれている。また、肥満に加え、高脂血症、高血圧、高血糖などを複合する状態を、医学的にはメタボリックシンドロームと総称するようになってきている。これらの疾患又は症状の発症には、生活習慣(食事習慣、運動習慣、肥満、喫煙、飲酒など)が深く関わると考えられているが、生活習慣を改善することにより予防することが可能である。従って、早期にこれらの疾患や症状の徴候を発見し、生活習慣を改善する指導を行うことによって、生活習慣病を予防することが期待されている。しかしながら、これらの疾患や症状を検出することのできるよいバイオマーカーは見つかっていなかった。 40

【0003】

インスリン抵抗性を惹起するタンパク質として、脂肪細胞由来の分泌タンパク質であるレジスチン(Resistin)が同定された。また、レジスチンのアイソフォームとして、ヒトでは R E L M が報告されている。レジスチンは、前記のようにインスリン抵抗性を惹起するタンパク質として同定され、肥満とインスリン抵抗性及びII型糖尿病との関 50

連が推測されていたが、それらの疾患との関連性は、明確には証明されていない。

一方、レジスチンのアイソフォームである R E L M は、約 14 k D a のタンパク質であり、生体内では 2 量体又は 6 量体を形成していると考えられている。また、正常組織では、小腸と大腸に発現が見られ、気管支上皮にも発現が認められる。

R E L M について、最近、その発現を調節することによって、患者におけるアレルギー反応を減少させることが可能であることが示されている（特許文献 1）。更に、肥満マウスで R E L M の血中濃度が上昇することが報告されている（非特許文献 1）。更に、R E L M を肝臓において過剰発現するトランスジェニックマウスは、高血糖、高脂血症、脂肪肝といったメタボリック症候群を呈することも報告されている（非特許文献 2）。これらの報告は、R E L M がメタボリック症候群の発症と関連していることを強く示唆するものである（非特許文献 3）。しかしながら、R E L M の生体内における生理活性は、未だ明確には解明されていない。

【特許文献 1】特表 2006-517962 号公報

【非特許文献 1】「ダイアベトロジー (Diabetologia)」、2005 年、(イギリス) 第 48 巻、p. 984 - 992

【非特許文献 2】「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)」、2005 年、(アメリカ合衆国) 第 280 巻、p. 42016 - 42025

【非特許文献 3】「カレント・ダイアベティス・レビュー (Current Diabetes Reviews)」、2006 年 (オランダ) 第 2 巻、p. 449 - 454

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明者は、R E L M の生体内における役割について鋭意研究したところ、驚くべきことに、R E L M が大腸癌の癌組織及び動脈硬化症の病変部において発現していることを見出した。そして、大腸癌、動脈硬化症、及びメタボリックシンドロームのバイオマーカーとして有用であることを見出し、本発明を完成させた。

従って、本発明の課題は、大腸癌、動脈硬化症、又はメタボリックシンドロームの検出方法及び検出キットを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、レジスチン様分子 を分析することを特徴とする、大腸癌の検出方法に関する。

本発明による大腸癌の検出方法の好ましい態様においては、前記レジスチン様分子 の分析が免疫学的分析方法であり、特に免疫組織染色法、ウエスタンブロット法、及び酵素免疫測定法である。

また、本発明は、レジスチン様分子 を分析することを特徴とする、動脈硬化症の検出方法に関する。

本発明による動脈硬化症の検出方法の好ましい態様においては、前記レジスチン様分子 の分析が免疫学的分析方法であり、特に免疫組織染色法、ウエスタンブロット法、及び酵素免疫測定法である。

更に、本発明は、レジスチン様分子 を分析することを特徴とする、メタボリックシンドロームの検出方法に関する。

本発明によるメタボリックシンドロームの検出方法の好ましい態様においては、前記レジスチン様分子 の分析が免疫学的分析方法であり、特に免疫組織染色法、ウエスタンブロット法、及び酵素免疫測定法である。

また、本発明は、レジスチン様分子 に特異的に結合する抗体又はその断片を含むことを特徴とする、大腸癌の検出用キットに関する。

また、本発明は、レジスチン様分子 に特異的に結合する抗体又はその断片を含むことを特徴とする、動脈硬化症の検出用キットに関する。

更に、本発明は、レジスチン様分子 に特異的に結合する抗体又はその断片を含むことを特徴とする、メタボリックシンドロームの検出用キットにも関する。

【発明の効果】

【0006】

本発明によれば、大腸癌、動脈硬化症、又はメタボリックシンドロームを検出することが可能である。特に、大腸の組織において、RELM が高発現している大腸癌を検出することが可能である。更に、動脈硬化症の組織において、RELM が高発現している血管組織を検出することが可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

[1] 大腸癌、動脈硬化症、又はメタボリックシンドロームの検出方法

生活習慣病には、糖尿病、高脂血症、高血圧、高尿酸血症、動脈硬化症、がん（例えば、大腸癌）などが含まれ、生活習慣病が発症する背景として、肥満に加えて、高脂血症、高血圧、高血糖などの病態が複合した状態を、メタボリックシンドロームと呼んでいる。

【0008】

前記の生活習慣病のうち、大腸癌は、結腸癌、直腸癌、肛門癌に分けることができる。生活習慣における大腸癌のリスク要因としては、過体重及び肥満が結腸癌のリスク要因として、飲酒及び加工肉（ベーコン、ハム、ソーセージなど）が大腸癌のリスク要因であると考えられている。

大腸癌による死亡者数は年々増加しており、女性では2003年に悪性新生物による死亡原因のうちの第一位となり、男性でも2003年に2万人以上が死亡しており（第4位）、大腸癌は大きな健康問題となっている。

大腸癌の診断方法として、遺伝性大腸癌については多くの遺伝子診断が行われているが、健康診断などで実施されている一般的な診断方法としては、便潜血反応でヘモグロビンを生化学的又は免疫学的に検出する便潜血検査が用いられている。しかしながら、便潜血検査では、大腸癌以外の出血も検出するため、大腸癌の検出率としては必ずしも満足できるものではなかった。また試料に病原菌が含まれる可能性もあり、検査をする人は検体の取り扱いに注意する必要がある。

一方、新しい診断法として、血漿中の抗原又は酵素などを腫瘍マーカーとして測定することも多く検討されていて、その代表的なものとしてCA19-9、CEAが大腸癌のバイオマーカーとして使用されている。しかし、CA19-9は糖鎖抗原を認識しており、他の腫瘍マーカーと認識抗原がオーバーラップし、膵癌、胆管系の癌をはじめとする消化器癌の患者血中で上昇し、大腸癌に特異なマーカーではない。CEAも消化器癌に特異的ではあるが、正常人の大腸粘膜でも産生されていて大腸癌に特異的なマーカーになり得ない。このように、安全で簡便で検出精度の高い大腸癌の検出方法は今までなかった。

また、生検、内視鏡による肉眼分類、及び病理組織学的診断については、診断基準が整備されてきており、従来あった病理医の間における診断結果の相違は、解消されてきている。しかし、国際的には消化管上皮性腫瘍の診断には大きな格差があり、確定診断の可能な病理診断用の腫瘍マーカーもなかった。

【0009】

また、動脈硬化症は、動脈硬化症のおき方や起きる部位によって、下記の3つのタイプに分けることができる。

アテローム（粥状）硬化：大動脈、脳動脈、及び冠動脈などの比較的太い動脈に起こり、動脈の内膜にコレステロールなどの脂肪からなる粥状物質が付着し、アテロームプラック（粥状硬化斑）ができるものである。

細動脈硬化：高血圧による変化で、脳や腎臓の細い動脈に起きやすく、梗塞を起こしたり、血管壁全体が破裂して出血したりする。

メンケルベルグ型（中膜）硬化：動脈の中膜にカルシウムが溜って、硬化し中膜がもろくなるものである。

動脈硬化症は、脳動脈で起きた場合、脳梗塞及び脳出血の原因となり、冠動脈で起きた

10

20

30

40

50

場合、心筋梗塞及び狭心症などの虚血性心疾患の原因となり、大動脈で起きた場合、大動脈瘤及び大動脈解離の原因となり、腎動脈で起きた場合、腎硬化症及びそれによる腎不全の原因となり、末梢動脈で起きた場合、閉塞性動脈硬化症の原因となる。

【0010】

メタボリックシンドロームは、動脈硬化性疾患（例えば、心筋梗塞及び脳梗塞）のリスクを高める複合型リスク症候群として規定されてきた概念であり、WHO、アメリカ、及び日本においてその診断基準は、若干異なっているが、例えば、日本において日本肥満学会、日本動脈硬化学会などの8つの学会がまとめた診断基準は、以下の通りである。

まず、必須項目として、内臓脂肪蓄積（内臓脂肪面積が100平方cm以上）のマーカーとして、ウエスト周囲径が、男性で85cm以上、女性で90cm以上である。この必須項目に加え、下記の3項目のうちの2項目以上に該当する場合は、メタボリックシンドロームと診断される。

血清脂肪異常（高脂血漿）：トリグリセリド値（血清中性脂肪）が150mg/dL以上か、血清HDLコレステロール値が40mg/dL未満のいずれか、又は両方を満たすもの。

高血圧：最高（収縮期）血圧が130mmHg以上か、最低（拡張期）血圧が85mmHg以上のいずれか、又は両方を満たすもの。

高血糖：空腹時血糖が110mg/dL以上。

これらのメタボリックシンドロームの状態を長期間持続させることにより、合併症が発生する確率が高まるため、メタボリックシンドロームを解消することにより、合併症を予防することが重要となっている。

【0011】

本発明の検出方法では、RELM を分析することにより、大腸癌、動脈硬化症、又はメタボリックシンドロームを検出する。

本明細書におけるレジスチン様分子（RELM）は、レジスチンのアイソフォームである。マウスではレジスチンのアイソフォームとして、RELM、
、
の3つのアイソフォームが発見されており、RELM は脂肪組織、心臓、肺及び舌での発現、RELM は腸での発現、RELM は造血組織での発現が確認されている。一方、ヒトでは前記のように、RELM のみが発見されており、その生理的意義はまだ解明されていなかった。

RELM は、約14kDaのタンパク質であり、生体内では2量体又は6量体を形成していると考えられている

【0012】

本発明の検出法においては、RELM の組織における発現を分析することも可能であるが、体液、例えば、血液（血清、血漿を含む）、髄液、尿、唾液中のRELM を分析することも可能である。また、単量体のRELM を分析することも可能であるが、RELM に対する抗体を用いることで2量体、又は6量体のRELM をそのまま分析することも可能である。

【0013】

本発明の検出方法において、RELM を分析する方法としては、RELM を定量的又は半定量的に決定することができるか、あるいは、RELM の存在の有無を判定することができる限り、特に限定されるものではなく、例えば、抗RELM 抗体又はその断片を用いる免疫学的手法（例えば、酵素免疫測定法、ラテックス凝集免疫測定法、化学発光免疫測定法、蛍光抗体法、放射免疫測定法、免疫沈降法、免疫組織染色法、又はウエスタンブロット等）、生化学的手法（例えば、酵素学的測定法）、又はmRNA量を測定する分子生物学的手法などを挙げることができる。

【0014】

RELM の分析方法として、免疫学的分析方法を用いる場合には、RELM に対するモノクローナル抗体、又はポリクローナル抗体を用いることができる。モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体は、免疫抗原としてRELM を用いること以外は、公知の

10

20

30

40

50

方法によって作成することが可能であり、例えば、モノクローナル抗体は、Koe h l e rとM i l s t e i nの方法（N a t u r e 256：495 - 497，1975）方法に従って、作成することができる。また、ポリクローナル抗体は、例えば、ウサギの皮内に、R E L M のタンパク質を単独もしくはB S A、K L Hなどと結合させた抗原として、単独あるいはフロイント完全アジュバント等のアジュバントと混合して定期的に免疫する。血中の抗体価が上昇した時点で採血し、そのまま抗血清として、又は抗体を公知の方法で精製して使用することができる。

【0015】

前記抗体、例えばポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を取得するための免疫抗原は、特に限定されるものではなく、生体試料から精製したR E L M 抗原、遺伝子工学的に作成した組換えR E L M 抗原、又は化学的に合成したR E L M の部分ペプチドなど用いることが可能である。

但し、ヒトのR E L M タンパク質は、レジスチンと相同性を有するため、相同性の低いN末端側の約半分のペプチドを用いることが好ましく、例えば、配列番号1で表されるアミノ酸配列の16番～66番のアミノ酸配列からなるペプチドの全部又は一部を免疫抗原として用いることが好ましい。図4にレジスチンとR E L M のアミノ酸配列の相同性を記載しているが、レジスチンは108アミノ酸、R E L M は111アミノ酸からなるタンパク質である。

また、大腸菌や酵母などで発現させる組換え抗原を用いる場合は、発現を容易にするため、他のタンパク質、例えば、S O Dとの融合抗原とすることも可能である。また、精製を容易にするため、様々なT a gなどを結合させて発現させることもできる。

【0016】

本発明に用いることのできるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、免疫を行った動物から取得することができる。例えば、B A L B / Cマウスに、R E L M の16番～66番のアミノ酸配列からなるペプチドにより、前記のように定期的に、免疫を行う。抗体価の上昇を確認し、尾静脈からリン酸緩衝化生理食塩水（P B S）等に溶解したR E L M の16番～66番のアミノ酸配列からなるペプチドを接種する。その2～3日後に、マウスから抗体を産生するリンパ球を含む脾臓を無菌的に摘出する。このリンパ球を、例えば、ポリエチレングリコールの存在下で、ミエローマ細胞と細胞融合させる方法により、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマとして樹立可能である。

【0017】

細胞融合を行う場合は、例えば、ポリエチレングリコールの存在下で、リンパ球及びミエローマ細胞を融合させる。ミエローマ細胞は、各種の公知の細胞を用いることができるが、例えば、p 3・N S - 1 / 1・A g 4 . 1又はS P 2 / 0 - A g 1 4などの細胞が挙げることができる。融合した細胞は、選択培地、例えばH A T培地を用いて、融合しなかった細胞を死滅させることによって選択する。次に、増殖してきたハイブリドーマの培養上清中の抗体産生の有無をスクリーニングする。スクリーニングは、前記ペプチドに対する特異抗体の産生を固相酵素免疫測定法（E L I S A法）によって測定することによって実施することができる。

【0018】

前記ハイブリドーマは、公知の任意の培地、例えば、R P M I 1 6 4 0で継代培養することができる。モノクローナル抗体は、得られたハイブリドーマを培養することによって、調製することができるが、例えば、R P M I 1 6 4 0培地に10%ウシ胎児血清を加え、5%CO₂存在下、37℃で培養することによって、培養上清中に抗体が産生される。また、マウスの腹腔内にハイブリドーマを接種し、腹水を回収することによって、腹水中に抗体を産生させることが可能である。モノクローナル抗体は、公知の方法により精製することができるが、例えば、P r o t e i n Gを用いた精製法、R E L M 抗原を結合させたアフィニティーカラムを用いる方法、又はイオン交換カラムクロマトグラフィーを用いる方法などで精製することができる。

【0019】

免疫学的分析方法として、免疫組織染色法を用いる場合は、RELM に対する抗体を用いることを除いては、公知の免疫組織染色法に従って検出を行うことが可能である。例えば、大腸癌、動脈硬化症の疑われる患者のバイオプシーから得られる種々の組織切片を常法により調製し、RELM に対するマウスモノクローナル抗体を結合させる。西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識した抗マウス IgG 抗体を二次抗体として本発明の抗体に結合させ、3,3'-ジアミノベンジジン (3,3'-diaminobenzidine) 処理を施して染色する。染色後顕微鏡観察を行い、褐色に染色された領域がRELM の発現している領域であることを判断することができる。

【0020】

免疫学的分析方法として、ウエスタンブロット法を用いる場合も、RELM に対する抗体を用いることを除いては、公知のウエスタンブロット法に従って検出を行うことが可能である。例えば、大腸癌、動脈硬化症の疑われる患者から得られる被検試料を定法に従って調製し、電気泳動を行う。電気泳動されたタンパク質を、PVDF膜などのブロット膜に転写する。ブロット膜を、適当なブロッキング剤 (例えば、牛血清アルブミンやゼラチン等) でブロッキングする。その後、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) などの酵素で標識したRELM に結合する抗体を接触させ、RELM に結合させる。ブロット膜を洗浄し、酵素に対する発色基質や発光基質を添加し、酵素と基質を反応させることによりシグナルを検出する。

10

【0021】

また、免疫学的分析方法は、サンドイッチELISA法を利用して行うこともできる。例えば、まず、マイクロプレートやビーズなどの不溶性担体に、RELM に結合する抗体 (捕捉抗体、又は一次抗体) を固相化する。次に、捕捉抗体や不溶性担体への非特異的な吸着を防ぐために、適当なブロッキング剤 (例えば、牛血清アルブミンやゼラチン等) で不溶性担体のブロッキングを行う。捕捉抗体が固相化されたプレートやビーズに、RELM が含まれる可能性のある被検試料を一次反応液と一緒に加え、捕捉抗体とRELM を接触させ、結合させる (一次反応工程)。この後、捕捉抗体に結合しなかった抗原や夾雑物を適当な洗浄液 (例えば、界面活性剤を含むリン酸緩衝液) で洗浄する。次に、捕捉されたRELM と結合する抗体と西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) などの酵素とが結合した標識抗体 (2次抗体) を添加し、捕捉された抗原に標識抗体を結合させる (二次反応工程)。この反応により、捕捉抗体 - REML - 標識抗体の免疫複合体がマイクロプレート等の担体上に形成される。結合しなかった標識抗体を洗浄液で洗浄し、標識抗体の酵素に対する発色基質や発光基質を添加し、酵素と基質を反応させることによりシグナルを検出する。

20

30

【0022】

前記の免疫組織染色に用いる抗体、ウエスタンブロッティングに用いる抗体、及びサンドイッチ法に用いる一次抗体又は2次抗体の種類は、特に限定されないが、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組換え抗体、又はそれらの抗体の抗体フラグメントなどを挙げることができる。抗体フラグメントとしては、例えば、F(ab')₂、Fab'、Fab、又はFv等を挙げることができる。これらの抗体フラグメントは、例えば、抗体を常法によりタンパク質分解酵素 (例えば、ペプシン又はパイン等) によって消化し、続いて、常法のタンパク質の分離精製の方法により精製することにより、得ることができる。

40

【0023】

本発明の大腸癌、動脈硬化症、又はメタボリックシンドロームの検出方法において、RELM の分析に用いる被検試料としては、RELM を含有する可能性のある生体試料又は生体由来試料を挙げることができ、例えば、尿、血液、血清、血漿、便、髄液、唾液、細胞、組織、若しくは器官、又はそれらの調整物 (例えば、生検標本、特に、大腸、血管の生検標本) 等を挙げることができ、血液、血清、血漿、あるいは大腸、又は血管の生検標本が好ましい。

特に、前記サンドイッチELISA法に用いる被検試料としては、血液、血清、血漿、

50

便などを用いることが好ましい。

【0024】

本発明の検出方法では、RELM の存在の有無、あるいはRELM の量を測定することにより、大腸癌、動脈硬化症、又はメタボリックシンドロームを検出することが可能である。例えば、被検試料として大腸の生検試料を用いる場合には、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を用いた免疫組織染色法により、大腸組織でのRELM の発現を確認し、正常大腸組織との閾値を設定し比較することにより、大腸癌であるか否かを判定することができる。

また、被検試料として血管を用いる場合にも、前記免疫組織染色で、血管のRELM の発現を確認し、正常血管組織との閾値を設定し比較することにより、動脈硬化症であるか否かを判定することができる。

なお、大腸癌患者の癌組織と正常組織との閾値、及び動脈硬化症患者の血管組織と正常組織との閾値は、種々の条件、例えば、組織の調製状態、又は患者の状態などに応じて異なるため、一概には規定することはできないが、当業者であれば、正常組織と癌組織の染色性の差を比較することによって、決定することができる。

【0025】

また、被検試料として血液等を用いる場合、生活習慣病の疑いのある患者から血液を採取し、全血のままか、あるいは血清又は血漿とし、その中のRELM の量を測定し、健常者から採取した血液等中のRELM の量と比較することにより、前記患者が生活習慣病であるか否かを判定することができる。より具体的には、健常者のRELM の量の平均値と比べて、前記患者のRELM の量が有意に多い場合に前記患者は生活習慣病であると判定することができる。

【0026】

[2] 大腸癌、動脈硬化症、又はメタボリックシンドロームの検出用キット

本発明の検出用キットは、RELM に特異的に結合する抗体又はその断片を含む。前記抗体としては、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれを用いることもできる前記抗体断片としては、RELM への特異的結合能を保持する限り、特に限定されるものではなく、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、又はFvを用いることができる。

【0027】

本発明の検出用キットは、用いる免疫学的手法に応じて、所望の形態で抗RELM 抗体、あるいはその断片を含むことができる。

例えば、標識化抗体を用いる免疫学的手法、例えば、酵素免疫測定法、化学発光免疫測定法、蛍光抗体法、又は放射免疫測定法などの場合には、標識物質で標識した標識化抗体又は標識化抗体断片の形態で含むことができる。標識物質の具体例としては、酵素としてペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 α -D-ガラクトシダーゼ、又はグルコースオキシダーゼ等を、蛍光物質としてフルオレセインイソチアネート又は希土類金属キレート等を、放射性同位体として³H、¹⁴C、又は¹²⁵I等を、その他、ビオチン、アビジン、又は化学発光物質等を挙げることができる。酵素又は化学発光物質等の場合には、それ自体単独では測定可能なシグナルをもたらすことはできないことから、それぞれ

【実施例】

【0028】

以下に実施例及び比較例を示し本発明の具体的な説明を行うが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0029】

《実施例1：RELM 抗体の作製》

本実施例1では、RELM の抗原を作製し、その抗原をマウスに免疫し、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。

(A) RELM タンパク質の調製(免疫用抗原の調製)

配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするDNA断片、すなわち、RELM タンパク質の16番～66番のペプチドをコードするDNA断片を、ヒト大腸がん細胞株LS174T細胞からのmRNAを鋳型として、PCRにより取得した。このDNA断片を、発現ベクターpGEX-4T-1の制限酵素サイトEcoRIサイトに組み込んだ。得られたベクターpGEX-hRELMbeta16-66により、大腸菌DH5 株を形質転換し、GST融合RELM タンパク質(16-66)を発現させた。RELM タンパク質の発現した菌体を回収し、Glutathione Sepharose 4Bカラムを用いて精製し、10mgのGST融合RELM タンパク質(16-66)を得た。

【0030】

(B) 抗RELM モノクローナル抗体の作製

前記の工程(A)で得られた、GST融合RELM タンパク質(16-66)を用いて、モノクローナル抗体の作製を行った。

PBSに溶解したGST融合RELM タンパク質(16-66)(2mg/mL)を、等量の完全フロイントアジュバントと混合し、0.1mLを6週齢のメスのBALB/cマウスに腹腔内に接種した。1週間後に、GST融合RELM タンパク質(16-66)(2mg/mL)を、等量の不完全フロイントアジュバントと混合し、同様に免疫を行い、この追加免疫を3回繰り返した。合計5回の免疫を行った3日後に、PBSに希釈したGST融合RELM タンパク質(16-66)(0.1mg/mL)を尾静脈から注射した(最終免疫)。

【0031】

最終免疫から3日後に、マウスから脾臓を無菌的に摘出し、培地の入ったシャーレに回収した。脾臓をハサミで細切し、脾臓細胞をメッシュに通過させ、遠心チューブに回収した。RPMI1640培地を用い、遠心操作により3回洗浄後、RPMI1640培地で再懸濁した。この脾細胞を、マウスミエローマ細胞(SP2/0-Ag14)と混合し、遠心してペレットとした。このペレットに、50%ポリエチレングリコール1mLを、滴下し、穏やかに撹拌した。更に、RPMI1640培地を加え、遠心により細胞を洗浄した。96ウェル細胞培養プレートを用いてHAT培地により培養した。約10日間の培養後に、ハイブリドーマのスクリーニングを行った。

【0032】

96穴ELISA用プレートに、GST融合RELM タンパク質(16-66)1μg/mLを各100μLずつ分注し、4℃で一夜放置した。次に、このプレートの各ウェルを0.5%カゼインナトリウムを含むPBSで30分ブロッキングした。ブロッキング液を除去した後、ハイブリドーマの培養上清100μLをウェルに添加した。室温で60分放置した後、0.05%Tween20/PBSで3回洗浄した。続いて、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)標識抗マウスIgG抗体100μL(0.08μg/mL)を加え、室温で1時間放置した後、3回洗浄を行った。OPD基質溶液100μLを各ウェルに加え、25℃で30分間反応させ、1M硫酸100μLを各ウェルに加え、各ウェルの492nmにおける吸光度を測定し、陽性のウェルを選択した。同時に、コントロールとして融合タンパク質であるGSTタンパク質に対しても同様のスクリーニングを行い、陽性のウェルを非選択とし、RELM のみに作用するウェルを選択した。このスクリーニングにより、3株のハイブリドーマ1C1、3A6、1E1を取得した。以下、各ハイブリドーマから産生される抗体を、それぞれ1C1抗体、3A6抗体、1E1抗体と称する。

【0033】

《実施例2：大腸癌組織からのRELM の発現の検出》

本実施例2では、大腸癌組織において、RELM の検出を行った。

被検材料として、大腸癌を併発した潰瘍性大腸炎の生検組織を用い、定法に従い、固定し、パラフィン包埋した。被検材料を、緩衝ホルマリン[組成：10%ホルマリン原液，リン酸ナトリウム(pH7.2)]で固定した後、エタノールで脱水し、続いて、クロロ

10

20

30

40

50

ホルムで置換した後、融点56～58のパラフィンを用いて包埋した。得られたパラフィン包埋標本から、マイクロトームを用いて、連続薄切切片(約10μm)を作製し、この切片をスライドガラスに貼布し、十分に乾燥させた。次に、得られたスライドガラスを、キシレン×3回、100%エタノール×2回、95%エタノール×1回、及び80%エタノール×1回の工程を各3分間ずつ行い脱パラフィンし、精製水で洗浄した。

【0034】

免疫染色は、DAKO ENVISION Kit (DAKO社)を用いて、添付のプロトコールに従って行った。脱パラフィン操作を実施した前記スライドガラス標本を、3%過酸化水素水で5分間処理後、TBS-Tで5分間、続いて2%ブタ血清を含むTBS-Tで10分間ブロッキングを行った。ブタ血清を含むTBS-Tで2mg/mLに希釈した一次抗体(3A6抗体)で30分間インキュベート後、TBS-Tで5分間×3回洗浄し、ポリマー試薬を加え、更に30分間インキュベートした。TBS-Tで5分間×3回洗浄後、DAB(3,3'-Diaminobenzidine)を滴下し、染色した。その後、ヘマトキシリン・エオジン液で核染色を行い、透徹工程として、80%エタノール×1回、95%エタノール×1回、100%エタノール×2回、及びキシレン×3回の各工程を1分ずつ行った。組織切片をエントランニューで封入後、顕微鏡下でRELMの発現を観察した。RELMが発現している細胞は、茶褐色に染色された。

10

【0035】

図1A及び図1Bは、潰瘍性大腸炎において大腸癌を発症した症例の癌部を拡大したものである。RELMは、大腸癌の細胞質に一致して、強く発現している。特に腫瘍細胞の管腔面において、RELMの発現が強く、管腔内にも褐色の色素が見られることから、RELMが消化管内に分泌している可能性が示唆された。図には示していないが、潰瘍性大腸炎(非癌部)においては、RELMの発現は、後述の正常大腸癌組織と同じように、非常に低い発現量であった。

20

同様に、80症例の大腸癌患者から得られた大腸癌の組織について、免疫組織染色を行った。全ての症例から得られた組織において、癌部ではRELMの発現の強い発現が見られ、正常組織や潰瘍性大腸炎などの非癌部においては、RELMの発現は非常に低いものであった。

【0036】

《比較例1：RELMの正常小腸及び正常大腸での発現の検出》

30

本比較例1は、正常大腸でのRELMの発現の検出を行った。

被検材料として、正常大腸組織を用いたことを除いては、実施例1の操作を繰り返した。図1Cの正常大腸癌におけるRELMの発現は、図1A及びBの大腸癌の癌部と比較すると、非常に低い発現量であった。

【0037】

《実施例3》

本実施例3では、動脈硬化症の組織においてRELMの検出を行った。

被検材料として、大動脈粥状硬化病変組織を用いたことを除いては、実施例1の操作を繰り返した。図2Aは弱拡大像であり、図2Bは、組織球の集族層の強拡大像である。組織球の細胞質にRELMの発現が強く見られた。また、図3A及びBは、図2の症例と異なる症例の400倍拡大像である。RELMは、すべての組織球に発現しているのではなく、集族傾向の強い部分の組織球にRELMの強い発現が見られた。

40

この他に、全部で10症例の動脈硬化を起こしている患者の動脈硬化巣について、免疫組織染色を行ったが、全ての症例において組織球の細胞質に、RELMの強い発現が見られた。

【0038】

《実施例4》

本実施例4では、RELMに対するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いて、サンドイッチELISA法による免疫学的分析方法の構築を行った。

ポリクローナル抗体は、以下のように作成したものをを用いた。実施例1で作成したGS

50

T融合RELM タンパク質(16-66) 100 µg/headを、2週間おきに完全フロイントアジュバント、又はフロイントアジュバントを用いてウサギの背部及び足しょに免疫した。4回以上の免疫を行った後に、血清を採取した。ポリクローナル抗体の精製は、免疫に用いたGST融合RELM タンパク質(16-66)のGSTを除くため、トロンピンでGST部分を切断し、RELM タンパク質(16-66)を得た。このRELM タンパク質(16-66)をアフィニティーカラム(Affigel 10)に結合させ、抗血清中の抗RELM 抗体を精製した。

免疫学的分析は、まずPBSで2 µg/mLに希釈した3A6モノクローナル抗体100 µLを、96well plates(NUNC社Maxisorp)に加え、4、一晩で、固相化した。Pierce社Protein-Free T20(TBS) Blocking Bufferで、25、1時間、ブロッキングした。PBS-0.5% Tween-20(PBS-T)に1%BSAを添加した希釈液で、標準物質として前記のGSTを切断したRELM タンパク質(16-66)を100 ng/mLから1.5 ng/mLまで、段階希釈し、100 µLずつ添加した。25、2時間インキュベートした後、PBS-Tで3回洗浄を行った。0.1 µg/mLの精製したラビット抗RELM ポリクローナル抗体100 µLを加え、25、1.5時間インキュベートした。PBS-Tで3回洗浄後、PBS-Tで希釈したHRP標識抗ラビットIg抗体(0.3 µg/mL:GE社)を加え、25、1時間インキュベートした。各ウェルをPBS-Tで、4回洗浄した後、100 µLのPOD基質溶液[2.2 mM-o-フェニレンジアミン、0.03%過酸化水素水を含む0.075 Mクエン酸リン酸緩衝液(pH 5.0)] 100 µLを加え、25で15分間反応させ、1 M硫酸100 µLを各ウェルに加え、各ウェルの492 nmにおける吸光度を測定した。図5に示すように、Logistic 5 PL(Cook) CurveによくフィットしRELM の量をよく反映する検量線を得ることができた。

【産業上の利用可能性】

【0039】

本発明の検出方法及び検出キットは、大腸癌、動脈硬化症、及びメタボリックシンドロームの検出の用途に適用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】大腸癌を併発した潰瘍性大腸炎の生検組織の癌部、及び正常大腸癌組織における、RELM タンパク質の発現を免疫組織染色によって、検出した顕微鏡写真であり、RELMb(3A6)を50倍希釈して、大腸癌を合併している潰瘍性大腸炎の症例を染色したものである。(A)及び(B)は、いずれも大腸癌の部分を拡大したものであり、(C)は正常大腸組織のものである。RELMbは大腸癌の細胞質に一致して陽性像を認められる。また、腫瘍細胞は管腔面で強く染まっており、管腔内にも茶色物質が見られることから、RELMbを分泌している可能性が高いと考えられる。

【図2】大動脈粥状硬化病変組織における、RELM タンパク質の発現を免疫組織染色によって、検出した顕微鏡写真である。RELMb(3A6)を50倍希釈して、大動脈粥状硬化病変の染色を行った。(A)は弱拡大で、(B)はその拡大像を示す。バックグラウンドが強く出でおらず、染色状態は良好である。(A)に示すとおり、大動脈の粥腫内の組織球の集族層に一致してRELMbの陽性像が認められ、(B)はその拡大であるが、組織球の細胞質が染色されている。この他に、数症例の病変を検討したが、いずれも同様の結果が得られた。

【図3】大動脈粥状硬化病変組織における、RELM タンパク質の発現を免疫組織染色によって、検出した400倍の顕微鏡写真である。図2の症例と別症例の大動脈粥状硬化巣内の免疫染色の拡大であるが、すべての組織球にRELMbが発現しているわけではなく、特に集族傾向の強い部分の組織球に高い発現が見られ、RELM タンパク質が動脈硬化の成因に密接に関連している可能性が示唆された。

【図4】RELM とレジスチンのアミノ酸配列を比較した図である。レジスチンは10

10

20

30

40

50

8 アミノ酸、RELM は 111 アミノ酸である。

【図 5】モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いたREL M タンパク質のサンドイッチELISAの検量線を示したグラフである。

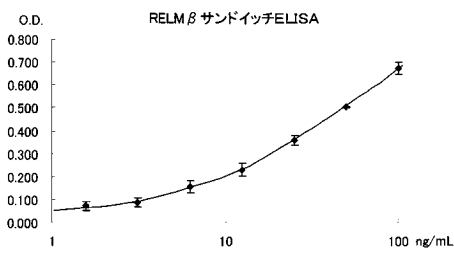
【 図 4 】

```

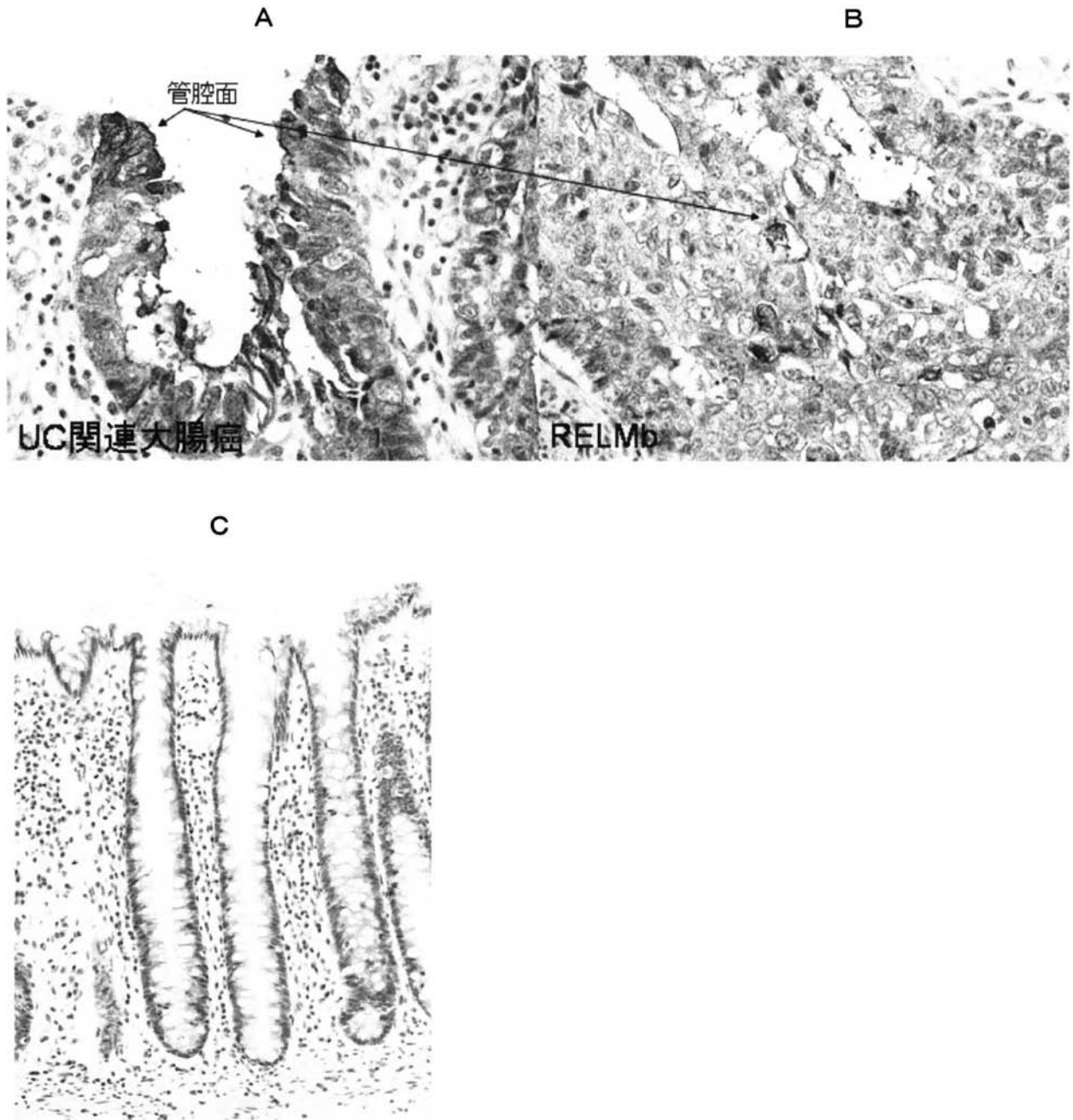
hrelmbetaaa.gpt 1 MGPSSCLLILLPDQIINPSSPQCSLDSVMDKKKDKDVLNGLYSPSPISXKDCQASVKQ 60
hresistinaa.gpt 1 MKAL-CLLIL-LRIVLGLLVSSXKLLCSHSEAINERLQZVAQSLIFRAIS-SIQLKQSVPS 56
hrelmbetaaa.gpt 61 QGRPSSCPAAMAVTGGACQYQCQSNVQLLETTCHCCQSVFVWTRCCRLT- 111
hresistinaa.gpt 57 RGLALCYRSPAVTGGCCGSAAGSNVRAEITTCCHCCQAGMDKTRARCCRVQP 108

```

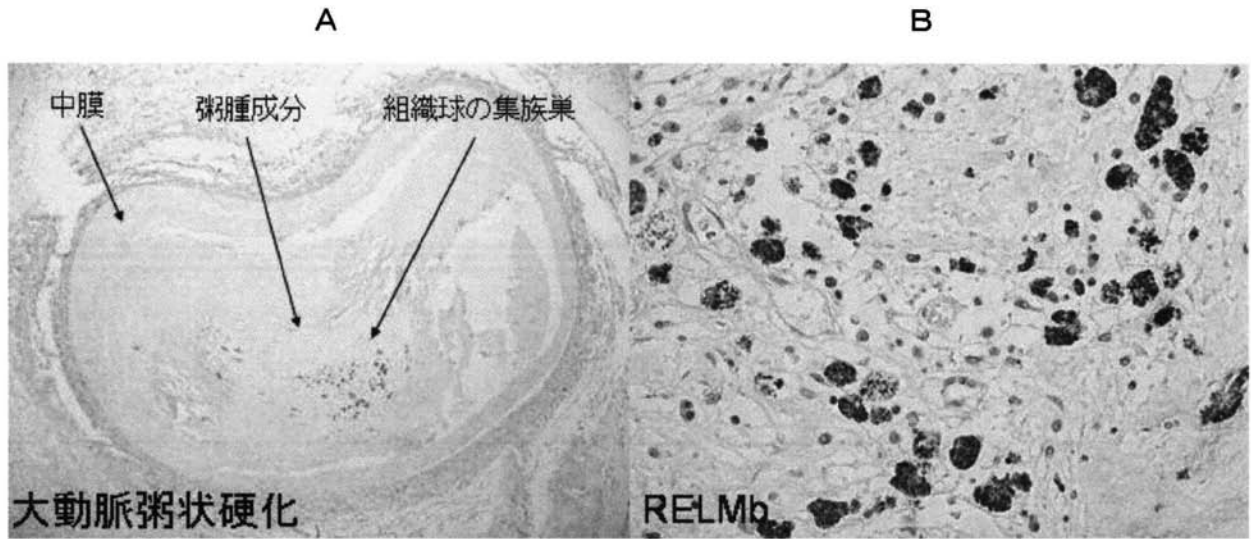
【 図 5 】



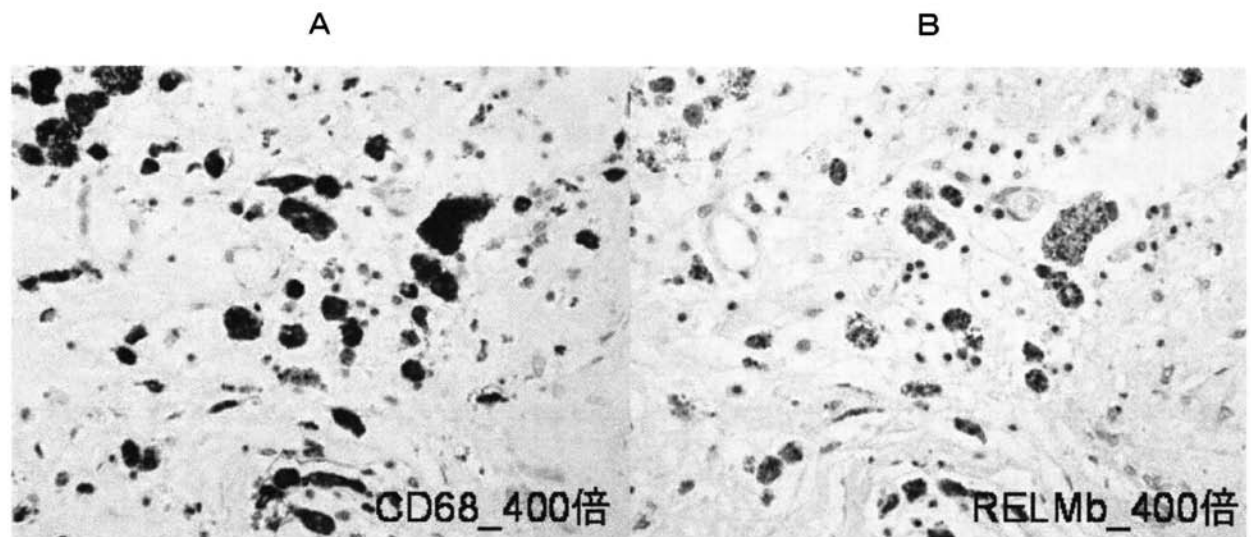
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



【 配列表 】

[2009145132000001.app](#)

フロントページの続き

(72)発明者 櫛山 暁史

東京都千代田区丸の内一丁目6番1号 財団法人朝日生命成人病研究所附属丸の内病院内

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA12 BA43 CA02

4H045 AA11 BA10 CA40 EA50 EA51 FA72 GA26

专利名称(译)	检测结肠癌，动脉硬化或代谢综合征的方法		
公开(公告)号	JP2009145132A	公开(公告)日	2009-07-02
申请号	JP2007321240	申请日	2007-12-12
申请(专利权)人(译)	国立大学法人広島大学 財団法人朝日生命成人病研究所		
[标]发明人	浅野知一郎 櫛山暁史		
发明人	浅野 知一郎 櫛山 暁史		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 C12N15/09 C07K16/18		
FI分类号	G01N33/574.ZNA.A G01N33/53.D C12N15/00.A C07K16/18 G01N33/574.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/BA43 4B024/CA02 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/GA26		
代理人(译)	森田健一 山口健次郎		
其他公开文献	JP5229866B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供结肠癌，动脉硬化或代谢综合征的检测方法。
 ŽSOLUTION：在这种结肠癌，动脉硬化或代谢综合征的检测方法中，分析抵抗素样分子β。用于检测结肠癌的试剂盒，用于检测动脉硬化的试剂盒或用于检测代谢综合征的试剂盒包括与抗性素样分子β特异性结合的抗体或其片段。Ž