

(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2018-112403

(P2018-112403A)

(43) 公開日 平成30年7月19日(2018.7.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A D	2 G O 4 5
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	4 B O 2 4
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	4 B O 5 0
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	C 1 2 Q 1/37	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 C O 8 4
審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 23 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-101759 (P2015-101759)	(71) 出願人	510136312 国立研究開発法人国立成育医療研究センター
(22) 出願日	平成27年5月19日 (2015.5.19)	(71) 出願人	511031618 L S I Pファンド運営合同会社 東京都千代田区丸の内一丁目7番12号
		(74) 代理人	100080791 弁理士 高島 一
		(74) 代理人	100125070 弁理士 士井 京子
		(74) 代理人	100136629 弁理士 鎌田 光宜
		(74) 代理人	100121212 弁理士 田村 弥栄子
		最終頁に続く	

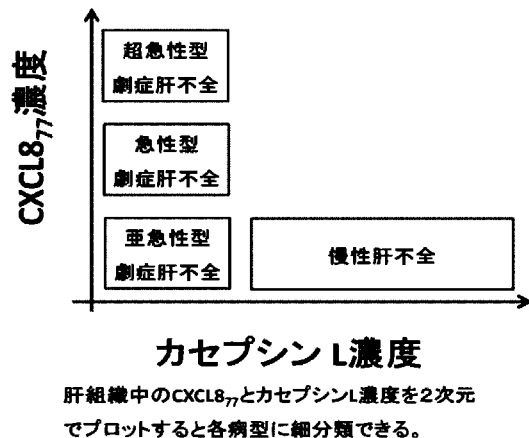
(54) 【発明の名称】 劇症肝不全の診断方法、及び予防又は治療剤

(57) 【要約】

【課題】客観的指標に基づく劇症肝不全の重症度の診断技術、及び新たな作用機序に基づく劇症肝不全の予防又は治療剤を提供すること。

【解決手段】被験者から単離された生体試料における、CXCL8₇₇及びカセプシンLの各タンパク質発現量を測定し、測定された発現量に基づき、被験者における、劇症肝不全の発症可能性及び/又は急性度を判定することができる。また、カセプシンL又はその発現ベクターを投与し、カセプシンLの発現が低下した劇症肝不全の肝臓にカセプシンLを補充することにより、劇症肝不全を予防又は治療することができる。

【選択図】図3 - 2



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下の工程を含む、劇症肝不全の検査方法：

(1) 被験者から単離された生体試料における、CXCL8₇₇及びカセプシンLの各タンパク質発現量を測定すること；並びに

(2) (1)において測定した発現量と、劇症肝不全の発症可能性及び/又は急性度とを相関付けること。

【請求項 2】

(2)における相関付けが、(1)において測定した各発現量を、CXCL8₇₇発現量が、相対的に高く、且つカセプシンL発現量が、相対的に低い場合には、劇症肝不全を発症している可能性が高いという基準と比較することを含む、請求項1記載の方法。

10

【請求項 3】

(2)における相関付けが、(1)において測定したCXCL8₇₇発現量を、CXCL8₇₇発現量が高い程、劇症肝不全の急性度が高いという基準と比較することを含む、請求項1又は2記載の方法。

【請求項 4】

CXCL8₇₇発現量の測定を、免疫学的測定法により行う、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

免疫学的測定法が、CXCL8₇₇のN末端の5アミノ酸の一部又は全部をエピトープ内に含む、CXCL8₇₇に特異的に結合する抗体を用いて行われる、請求項4記載の方法。

20

【請求項 6】

生体試料が肝組織である、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7】

以下の物質を含む、劇症肝不全の診断用キット：

(1) CXCL8₇₇に特異的に結合する抗体、及び

(2) カセプシンLに特異的に結合する抗体、又はカセプシンLの基質。

【請求項 8】

CXCL8₇₇に特異的に結合する抗体が、CXCL8₇₇のN末端の5アミノ酸の一部又は全部をエピトープ内に含む、請求項7記載の診断用キット。

30

【請求項 9】

カセプシンL又はその発現ベクターを含む、劇症肝不全の予防又は治療剤。

【請求項 10】

以下の工程を含む、劇症肝不全の予防又は治療剤の候補物質のスクリーニング方法：

(1) 被検物質が、カセプシンLの発現を促進するか否か評価すること、及び

(2) カセプシンLの発現を促進した被検物質を、劇症肝不全の予防又は治療剤の候補物質として選択すること。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

40

本発明は、劇症肝不全のバイオマーカーを用いた、劇症肝不全の診断方法及び診断薬；劇症肝不全の予防又は治療剤；劇症肝不全の予防又は治療剤の候補物質のスクリーニング方法等に関する。

【背景技術】**【0002】**

小児劇症型肝不全は、成人と異なり肝炎ウイルスの関与がまれであり依然としてその病態には不明な点が多い。本症に対して血液浄化療法と肝移植との集学的治療が積極的に取り組まれているが、乳児症例での救命率は54%と依然として低い。この理由として、小児劇症肝不全の病態メカニズムが依然と不明であること、客観的指標に基づく重症度分類が確立されていないこと、病態特異的な治療介入が不十分であったこと等が挙げられる。

50

【 0 0 0 3 】

成人のアルコール肝障害やHCV肝硬変、肝不全動物モデルでは、すでに炎症性ケモカインやサイトカインであるCXCL6、CXCL8、TNF- α 等の機能解析の報告が散見されるが、その臨床的意義には一定の見解を得ていない（非特許文献1～3）。

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 0 4 】

【 非特許文献 1 】 Simpson KJ, et al. Chemokines in the pathogenesis of liver disease: so many players with poorly defined roles. Clin Sci. 2003; 104: 47-63.

【 非特許文献 2 】 Kuboki S, et al. Hepatocyte signaling through CXC chemokine receptor-2 is detrimental to liver recovery after ischemia/reperfusion in mice. Hepatology. 2008; 48: 1213-1223. 10

【 非特許文献 3 】 Hogaboam CM, et al. Novel CXCR2-dependent liver regenerative qualities of ELR-containing CXC chemokines. FASEB J. 1999; 13: 1565-1574.

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 5 】

本発明は、客観的指標に基づく劇症肝不全の重症度の診断技術を提供することを目的とする。また、本発明は、新たな作用機序に基づく劇症肝不全の予防又は治療剤を提供することを目的とする。 20

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 6 】

本発明者らは上記課題を解決すべく、鋭意検討の結果、小児劇症肝不全の肝組織を用いたプロテオーム解析で、症状の進展とCXCL8の特定のアイソタイプであるCXCL8₇₇(77 amino-acids)の発現レベルとが相関することを見出した。さらに解析を進めることにより、以下の2点を見出した。

1) CXCL8はアイソタイプ毎に肝細胞への生理活性が異なる。すなわち、CXCL8₇₇は細胞アポトーシスを誘導するが、CXCL8₇₂(72 amino-acids)は細胞増殖因子である。

2) カセプシンLはCXCL8₇₇N末端の5アミノ酸残基を切断し、アイソタイプをCXCL8₇₂に変換する。 30

【 0 0 0 7 】

また、劇症肝不全では、肝組織中のカセプシンLの発現レベルが極低値であり、このことがCXCL8₇₇のクリアランス低下を招き、肝障害を増悪させる要因となっていることが示唆された。以上のことから、肝細胞障害性ケモカインCXCL8₇₇とその制御因子であるカセプシンLを測定することにより、劇症肝不全の急性度の予測が可能であることが示された。また、カセプシンL補充療法によりCXCL8₇₇の肝再生因子(CXCL8₇₂)への変換を促進することで、劇症肝不全を予防又は治療しできる可能性が示された。

【 0 0 0 8 】

本発明者らは、上記知見に基づき更に検討を加え、本発明を完成するに至った。即ち、本発明は以下に関する。 40

【 0 0 0 9 】

[1] 以下の工程を含む、劇症肝不全の検査方法：

(1) 被験者から単離された生体試料における、CXCL8₇₇及びカセプシンLの各タンパク質発現量を測定すること；並びに

(2) (1)において測定した発現量と、劇症肝不全の発症可能性及び／又は急性度とを相関付けること。

[2] (2)における相関付けが、(1)において測定した各発現量を、CXCL8₇₇発現量が、相対的に高く、且つカセプシンL発現量が、相対的に低い場合には、劇症肝不全を発症している可能性が高いという基準と比較することを含む、[1]記載の方法。

[3] (2)における相関付けが、(1)において測定したCXCL8₇₇発現量を、CXCL8₇₇発 50

現量が高い程、劇症肝不全の急性度が高いという基準と比較することを含む、[1] 又は [2] 記載の方法。

[4] CXCL8₇₇発現量の測定を、免疫学的測定法により行う、[1] ~ [3] のいずれかに記載の方法。

[5] 免疫学的測定法が、CXCL8₇₇のN末端の5アミノ酸の一部又は全部をエピトープ内に含む、CXCL8₇₇に特異的に結合する抗体を用いて行われる、[4] 記載の方法。

[6] 生体試料が肝組織である、[1] ~ [5] のいずれかに記載の方法。

[7] 以下の物質を含む、劇症肝不全の診断用キット：

(1) CXCL8₇₇に特異的に結合する抗体、及び

(2) カセプシンLに特異的に結合する抗体、又はカセプシンLの基質。

[8] CXCL8₇₇に特異的に結合する抗体が、CXCL8₇₇のN末端の5アミノ酸の一部又は全部をエピトープ内に含む、[7] 記載の診断薬。

[9] カセプシンL又はその発現ベクターを含む、劇症肝不全の予防又は治療剤。

[10] 以下の工程を含む、劇症肝不全の予防又は治療剤の候補物質のスクリーニング方法：

(1) 被検物質が、カセプシンLの発現を促進するか否か評価すること、及び

(2) カセプシンLの発現を促進した被検物質を、劇症肝不全の予防又は治療剤の候補物質として選択すること。

【発明の効果】

【0010】

本発明により、客観的な指標に基づく、劇症肝不全の診断が可能となる。慢性肝不全においても、健常者と比較して、肝組織中のCXCL8₇₇濃度が高いが、劇症肝不全では、慢性肝不全よりも肝組織中のCXCL8₇₇濃度が更に高い。一方、慢性肝不全においては、健常者と比較して、肝臓中のカセプシンL濃度が高いが、劇症肝不全では、健常者よりも肝臓中のカセプシンL濃度はむしろ低い。このような基準に基づき、劇症肝不全の患者を、健常者や慢性肝不全から識別することが可能である。また、劇症肝不全の急性度が高い程、肝組織中のCXCL8₇₇濃度が高いので、このような基準に基づき、劇症肝不全の急性度の診断が可能となる。本発明により、中枢神経合併症のハイリスクである超急性型劇症肝不全の早期診断が可能となるので、被験者が劇症肝不全を発症している可能性が高い、或いは、被験者の劇症肝不全の急性度が高いと判定された場合、該被験者の肝移植施設への救急搬送、肝移植のドナー確保等の肝移植の準備に早急に着手することができる。また、当該被験者に、早急に肝移植を施すことにより、劇症肝不全の予後を大きく改善することができる。

【0011】

また、本発明により、劇症肝不全の患者にカセプシンLを補充し、CXCL8₇₇のCXCL8₇₂への変換を促進する、という新たな機序に基づく劇症肝不全の予防又は治療技術が提供される。カセプシンL補充は、病因物質である肝障害性サイトカイン（CXCL8₇₇）を肝再生因子（CXCL8₇₂）に変換できるため、劇症肝不全における革新的な治療となる。カセプシンLのプロテアーゼ活性はアミノ酸配列に特異的であり、このことは分子標的治療薬の開発の点でも有利である。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】劇症肝不全の肝組織におけるCXCL8、GRO及びMCP-1のタンパク質発現上昇。

【図2】CXCL8₇₇特異的な検出アッセイシステムの確立。(1) ウェスタンブロッティング、(2) ELISA、(3) 免疫組織化学。(3) は正常（A、B）、胆道閉鎖症（C、D）、及び劇症肝不全（E、F）の肝臓におけるCXCL8₇₇の発現を示す。CIV、中心静脈；PV、門脈；A、動脈。

【図3 - 1】劇症肝不全の肝組織におけるCXCL8₇₇濃度の上昇及びカセプシンL濃度の低下。左及び真ん中のグラフは、健常肝、慢性肝不全及び劇症肝不全の肝組織中のCXCL8₇₇濃度（左）及びカセプシンL濃度（右）を示す。右のグラフは、劇症肝不全（超急性、亜急

10

20

30

40

50

性、急性)及び慢性肝不全の肝組織におけるCXCL8₇₇濃度及びカセプシンL濃度の分布を示す。

【図3-2】劇症肝不全(超急性、亜急性、急性)及び慢性肝不全の肝組織におけるCXCL8₇₇濃度及びカセプシンL濃度の分布の模式図。

【図4】カセプシンLによるCXCL8₇₇のCXCL8₇₂への変換。

【図5】CXCL8₇₇、CXCL8₇₂、及びCXCL8₇₇をカセプシンLで処理した産物の肝細胞の細胞増殖(1)及びアポトーシス(2)に対する効果。

【発明を実施するための形態】

【0013】

1. 劇症肝不全の検査方法

本発明は、以下の工程を含む、劇症肝不全の検査方法を提供するものである：

(1)被験者から単離された生体試料における、CXCL8₇₇及びカセプシンLの各タンパク質発現量を測定すること；並びに

(2)(1)において測定した含有量と、劇症肝不全の発症可能性及び/又は急性度とを相関付けること。

【0014】

超急性型：黄疸出現から7日以内に脳症発症。

急性型：黄疸出現から8～28日に脳症が出現。

亜急性型：発症4週以降に脳症が出現。

超急性型>急性型>亜急性型の順で急性度(即ち、疾患の進行の速さ)が高い。

【0015】

本発明の方法における被験者は、ヒトである。特に、劇症肝不全に罹患していることが疑われるヒト及び/又は劇症肝不全に罹患しているヒトが、被験者となり得る。劇症肝不全に罹患していることが疑われるヒトとしては、具体的には、肝不全又は肝炎の症状を呈するヒト、肝炎ウイルス感染者、慢性肝不全の経過中に急性増悪した患者、突然に劇症肝不全の症状を発症したヒト等が挙げられる。

【0016】

本発明の方法において使用する生体試料としては、肝組織、胆汁、腹腔液、血液、血清、血漿、骨髓等を挙げることができるが、これらに限定されない。好ましくは、肝組織を用いる。肝組織は、バイオプシー等の周知の方法により、容易に被験者から単離することが出来る。

【0017】

本発明の方法においては、被験者から単離された生体試料における、CXCL8₇₇及びカセプシンLの各タンパク質発現量を測定する(工程(1))。

【0018】

CXCL8₇₇は、公知のケモカインCXCL8(IL-8ともいう)のアイソタイプの1つであり、77アミノ酸からなる。ヒトCXCL8₇₇の代表的なアミノ酸配列を、配列番号1に示す。CXCL8の別のアイソタイプとして、72アミノ酸からなるCXCL8₇₂が存在する。ヒトCXCL8₇₂の代表的なアミノ酸配列を、配列番号2に示す。CXCL8₇₇は、CXCL8₇₂には存在しない5アミノ酸(AVLPR、配列番号3)からなる付加配列をN末端に有している点で、CXCL8₇₂とは異なる。

【0019】

カセプシンLは、公知のシステインプロテアーゼである。ヒトカセプシンLの代表的なアミノ酸配列を配列番号5に、ヒトカセプシンLの代表的なcDNA配列を配列番号4に、それぞれ示す。配列番号5で表されるアミノ酸配列は、ヒトカセプシンLのプレプロタンパク質であり、第1～17アミノ酸からなるシグナル配列の切断によりプレプロカセプシンLからプロカセプシンL(配列番号5における第18～333アミノ酸)へ変換され、更に自己触媒のプロセッシング(プロ領域の切断を含む分子内切断)により、プロカセプシンLから、重鎖(配列番号5における第114～288アミノ酸)及び軽鎖(配列番号5における第292～333アミノ酸)からなる成熟カセプシンLに変換される。本発明においては、成熟カセプシンL単独；又はプレプロカセプシンL、プロカセプシンL、及び成熟カセプシンLの総量が測定さ

10

20

30

40

50

れる。

【 0 0 2 0 】

CXCL8₇₇及びカセプシンLの各タンパク質発現量の測定方法は、特に限定されないが、例えば、各マーカータンパク質に特異的に結合する抗体（CXCL8₇₇に特異的に結合する抗体、カセプシンLに特異的に結合する抗体）を用いた免疫学的測定法、トリプシン等のエンドペプチダーゼによる限定分解と質量分析とを組み合わせた方法（例、MALDI-TOF MS等）等を挙げることが出来るが、これらに限定されない。

【 0 0 2 1 】

免疫学的手法においては、被検試料中の抗原量に対応した抗体 - 抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線と比較することにより、被検試料中の抗原量を算出する。免疫学的手法としては、サンドイッチ法、競合法、イムノメトリック法、ネフメトリー法、ウェスタンブロッティング、凝集法等を挙げることができる。

10

【 0 0 2 2 】

サンドイッチ法は測定対象の抗原と特異的に結合する2種類の抗体を使用する方法であり、例えば、片方の抗体をプレートやビーズ等の固相に固定化したものに試料溶液を反応させ、試料中の抗原を固相上の抗体と結合させた後、酵素、ビオチン、放射性同位元素、蛍光物質等で標識したもう一方の抗体を反応させて、固相上の抗体と結合した抗原にさらに該標識抗体を結合させ、該標識抗体の結合量を標識物質を利用して測定し、その結合量から本抗原を定量する方法があげられる。例えば、5～10点の濃度を決めた抗原の溶液を調製し、この溶液を試料溶液とした場合の、標識抗体への結合量を測定して、抗原の濃度と標識の結合量をプロットした検量線を作成し、抗原を定量する試料溶液についての、標識抗体の結合量を検量線にあてはめることにより、試料溶液の抗原を定量することができる。

20

【 0 0 2 3 】

競合法では、被検試料中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させた後、未反応の標識抗原（F）と、抗体と結合した標識抗原（B）とを分離し（B/F分離）、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検試料中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

30

【 0 0 2 4 】

イムノメトリック法では、被検試料の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検試料中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させた後、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検試料中の抗原量を定量する。

【 0 0 2 5 】

ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検試料中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合には、レーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

40

【 0 0 2 6 】

ウェスタンブロットは、試料に含まれるタンパク質およびペプチドをSDS - ポリアクリルアミドゲルで分離した後、ゲルからポリフッ化ビニリデン（PVDF）膜、ニトロセルロース膜等にタンパク質およびペプチドをブロットし、酵素、ビオチン、放射性同位元素等で標識した抗体を反応させた後、標識物質を利用して抗体を検出し、膜上の抗原を検出する方法である。

【 0 0 2 7 】

凝集法は、抗体を固定化したラテックス等の粒子と、試料溶液とを反応させて、試料中の抗原に粒子上の抗体が結合することにより生ずる粒子の凝集を、吸光度の測定により検

50

出または定量する方法である。

【0028】

本明細書において、抗体の抗原Agへの「特異的な結合」とは、抗原抗体反応における、抗体の抗原Agに対する結合親和性についての K_D 値が 1×10^{-7} M以下（好ましくは、 1×10^{-8} M以下、 1×10^{-9} M以下、 1×10^{-10} M以下、 1×10^{-11} M以下）であることを意味する。

【0029】

本明細書において、「抗体が抗原Agに対して特異的に結合しない」とは、抗原抗体反応における、抗体の抗原Agに対する結合親和性についての K_D 値が 1×10^{-5} M以上（好ましくは、 1×10^{-4} M以上、 1×10^{-3} M以上、 1×10^{-2} M以上、 1×10^{-1} M以上）であることを意味する。

10

【0030】

上記各マーカータンパク質に特異的に結合する抗体（CXCL8₇₇に特異的に結合する抗体、カセプシンLに特異的に結合する抗体）は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれであってもよく、周知の方法により作成することができる。また、該抗体には完全抗体分子だけでなくその結合性断片も包含される。結合性断片とは、特異的結合活性を有する前述の抗体の一部分の領域を意味する。結合性断片としては例えばF(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、sFv、dsFv、sdAb等が挙げられる。例えば、ポリクローナル抗体は、上記タンパク質又はその部分ペプチド（必要に応じて、ウシ血清アルブミン、KLH（Keyhole Limpet Hemocyanin）等のキャリアタンパク質に架橋した複合体とすることもできる）を抗原として、市販のアジュバント（例えば、完全または不完全フロイントアジュバント）とともに、動物の皮下あるいは腹腔内に2～3週間おきに2～4回程度投与し（部分採血した血清の抗体価を公知の抗原抗体反応により測定し、その上昇を確認しておく）、最終免疫から約3～約10日後に全血を採取して抗血清を精製することにより取得できる。抗原を投与する動物としては、ラット、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ハムスターなどの哺乳動物が挙げられる。

20

【0031】

また、モノクローナル抗体は、細胞融合法等により作成することができる。例えば、上記各マーカータンパク質もしくはその部分ペプチドを市販のアジュバントと共にマウスに2～4回皮下あるいは腹腔内に投与し、最終投与の約3日後に脾臓あるいはリンパ節を採取し、白血球を採取する。この白血球と骨髓腫細胞（例えば、NS-1、P3X63Ag8など）を細胞融合して該ペプチドに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得る。細胞融合はPEG法、電圧パルス法等により実施することができる。所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、周知のEIAまたはRIA法等を用いて抗原と特異的に結合する抗体を、培養上清中から検出することにより選択できる。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養は、インビトロ、またはマウスもしくはラット、このましくはマウス腹水中等のインビボで行うことができ、抗体はそれぞれハイブリドーマの培養上清および動物の腹水から取得することができる。測定系の安定性の観点からは、モノクローナル抗体が好適に用いられる。

30

【0032】

上記各マーカータンパク質へ特異的に結合する抗体（CXCL8₇₇に特異的に結合する抗体、カセプシンLに特異的に結合する抗体）が認識するエピトープは、当該マーカータンパク質を免疫学的方法により定量可能な限り特に限定されない。

40

【0033】

ここで、CXCL8₇₇のタンパク質発現量の測定にあたっては、CXCL8₇₇とCXCL8₇₂とを区別し、CXCL8₇₇とCXCL8₇₂のタンパク質発現量の合計値ではなく、（CXCL8₇₂のタンパク質発現量を含まない）CXCL8₇₇単独のタンパク質発現量を測定することが肝要である。CXCL8₇₇とCXCL8₇₂とは、肝細胞に対する生理活性が異なり、CXCL8₇₇は肝細胞のアポトーシスを誘導するが、CXCL8₇₂は細胞増殖を誘導し、この肝細胞アポトーシス誘導因子であるCXCL8₇₇と劇症肝不全の発症可能性及び急性度が相関するからである。

50

【0034】

免疫学的測定法により、CXCL8₇₇のタンパク質発現量を測定する場合、その測定に用いるCXCL8₇₇に特異的に結合する抗体としては、CXCL8₇₂とCXCL8₇₇の両方に特異的に結合する抗体を用いても、CXCL8₇₇にのみ特異的に結合し、CXCL8₇₂へは特異的に結合しない抗体を用いてもよい。CXCL8₇₂とCXCL8₇₇の両方に特異的に結合する抗体としては、CXCL8₇₂とCXCL8₇₇の双方に共通する領域（即ち、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる領域）内にエピトープを有する抗体を挙げることが出来る。CXCL8₇₇にのみ特異的に結合し、CXCL8₇₂へは特異的に結合しない抗体としては、CXCL8₇₇のN末端の5アミノ酸（即ち、配列番号3で表されるアミノ酸配列からなる領域）の一部又は全部をエピトープ内に含む抗体を挙げることができる。そのような特定のエピトープを有する抗体は、所望のエピトープを含む抗原を免疫原として用いて、上述の抗体作成プロセスを実施することにより得ることが出来る。CXCL8₇₂とCXCL8₇₇の両方に特異的に結合する抗体を用いる場合、CXCL8₇₂とCXCL8₇₇とを物性（分子量、等電点等）に基づき分離する工程を含む、免疫学的測定法を採用することにより、CXCL8₇₇単独のタンパク質発現量を測定することが可能である。例えば、ウェスタンブロッティングにより、電気泳動でCXCL8₇₂とCXCL8₇₇とを分離し、CXCL8₇₂とCXCL8₇₇の両方に特異的に結合する抗体で、CXCL8₇₂及びCXCL8₇₇の双方のバンドを検出し、分子量の差に基づきCXCL8₇₇のバンドのみを定量することにより、CXCL8₇₇単独のタンパク質発現量を測定することができる。但し、CXCL8₇₂とCXCL8₇₇とを物性に基づき分離する操作は、煩雑であるので、このような分離操作を要することなく、CXCL8₇₇単独のタンパク質発現量を測定できれば、操作が簡便であり、望ましい。このような、観点から、CXCL8₇₇にのみ特異的に結合し、CXCL8₇₂へは特異的に結合しない抗体（例えば、CXCL8₇₇のN末端の5アミノ酸の一部又は全部をエピトープ内に含む、CXCL8₇₇に特異的に結合する₇抗体）が、免疫学的測定法において好適に用いられる。

10

20

【0035】

CXCL8₇₇にのみ特異的に結合し、CXCL8₇₂へは特異的に結合しない抗体を用いる場合、CXCL8₇₂とCXCL8₇₇の両方に特異的に結合する抗体を併用してもよい。抗原の捕捉と、捕捉した抗原の検出に、それぞれ異なるエピトープを認識する抗体を組み合わせ用いて免疫学的測定法を実施することにより、高い特異性で抗原の量を測定することが可能だからである。例えば、CXCL8₇₇の捕捉に、CXCL8₇₇にのみ特異的に結合し、CXCL8₇₂へは特異的に結合しない抗体、及びCXCL8₇₂とCXCL8₇₇の両方に特異的に結合する抗体のいずれか一方の抗体を使用し、捕捉した抗原の検出に他方の抗体を使用することにより、高い特異性でCXCL8₇₇のタンパク質発現量を測定することが可能である。

30

【0036】

プレプロカセプシンL及びプロカセプシンLは、その内部に成熟カセプシンLを含むので、成熟カセプシンL内にエピトープを有する抗体は、通常、プレプロカセプシンL、プロカセプシンL、及び成熟カセプシンLに特異的に結合する。したがって、免疫学的測定法により、カセプシンLのタンパク質発現量を測定する場合、その測定に用いる抗体として、成熟カセプシンL内にエピトープを有する、プレプロカセプシンL、プロカセプシンL、及び成熟カセプシンLに特異的に結合する抗体を用いることにより、プレプロカセプシンL、プロカセプシンL、及び成熟カセプシンLの総量を測定することができる。但し、成熟カセプシンL内のエピトープであって、プロ領域により、プレプロカセプシンL及びプロカセプシンLではマスクされており、成熟化により、成熟カセプシンLにおいてのみ現れるエピトープを有する抗体は、成熟カセプシンLのみに特異的に結合し、プレプロカセプシンL及びプロカセプシンLに特異的に結合しない。従って、免疫学的測定法により、カセプシンLのタンパク質発現量を測定する場合、その測定に用いる抗体として、成熟カセプシンLのみに特異的に結合する抗体を用いることにより、成熟カセプシンL単独の発現量を測定することが出来る。

40

【0037】

成熟化により、成熟カセプシンLにおいてのみ現れるエピトープにおいて、成熟カセプシンLに特異的に結合する抗体と、成熟カセプシンL内のエピトープにおいて、プレプロカ

50

セブシンL、プロカセブシンL、及び成熟カセブシンLに特異的に結合する抗体とを併用してもよい。例えば、カセブシンLの捕捉に、成熟カセブシンLにおいてのみ現れるエピトープにおいて、成熟カセブシンLに特異的に結合する抗体、及び成熟カセブシンL内のエピトープにおいて、プレプロカセブシンL、プロカセブシンL、及び成熟カセブシンLに特異的に結合する抗体のいずれか一方の抗体を使用し、捕捉した抗原の検出に他方の抗体を使用することにより、高い特異性で成熟カセブシンL単独のタンパク質発現量を測定することが可能である。

【0038】

尚、カセブシンLのタンパク質発現量は、カセブシンLの生理活性（即ち、プロテアーゼ活性）を測定することによって定量してもよい。プレプロカセブシンL及びプロカセブシンLは非活性なので、カセブシンLの生理活性（即ち、プロテアーゼ活性）を測定することにより、成熟カセブシンL単独のタンパク質発現量を測定することができる。カセブシンLの生理活性は、カセブシンL含有試料を、カセブシンLの基質（例、カセブシンLのペプチド基質（例、FR、HRYS）に、カセブシンLによる消化により発色、蛍光又は発光を生じ得るように、発色、蛍光又は発光色素を結合させた合成基質（例、Ac-FR-AFC、Ac-HRYS-ACC）、CXCL8₇₇）と反応させて、基質の分解産物の量を、発色等を指標に測定することにより、定量することができる。

10

【0039】

次に、工程（1）において測定した含有量と、被験者の劇症肝不全の発症可能性及び／又は急性度とを相関付ける。

20

【0040】

生体試料は、サンプル間の総タンパク質濃度の変動が大きいので、相関付けに際しては、工程（1）において測定したタンパク質発現量を補正することが好ましい。補正の基準としては、(i)総タンパク質濃度、(ii)生体試料の重量、(iii)生体試料の体積等を挙げることができるが、好ましくは、総タンパク質濃度を基準に補正する。例えば、工程（1）において測定した生体試料中のCXCL8₇₇及びカセブシンLの各タンパク質発現量を、当該試料の総タンパク質濃度で除することにより、単位タンパク質量あたりの相対的発現量を算出し、この相対的含有量と被験者の劇症肝不全の発症可能性及び／又は急性度とを相関付ける。従って、総タンパク質濃度を基準に補正する場合、工程（1）においては、各生体試料の総タンパク質濃度を併せて測定することが好ましい。

30

【0041】

（劇症肝不全の発症可能性の判定）

例えば、測定したCXCL8₇₇及びカセブシンLの各タンパク質発現量を、健常者及び／又は慢性肝不全患者における当該マーカータンパク質の発現量と比較する。あるいは、測定したCXCL8₇₇及びカセブシンLの各タンパク質発現量を、あらかじめ求めておいた、健常者及び／又は慢性肝不全患者における当該マーカータンパク質の発現量の平均値、劇症肝不全の患者における当該マーカータンパク質の発現量の平均値、劇症肝不全患者と、健常者及び／又は慢性肝不全患者における当該マーカータンパク質発現量の相関図（分布図）などと比較してもよい。各マーカータンパク質の発現量の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行われる。

40

【0042】

後述の実施例に示すように、劇症肝不全では、健常者と比較して、CXCL8₇₇濃度が高く、カセブシンL濃度は低い。従って、このような相関（CXCL8₇₇濃度と劇症肝不全の発症可能性との間の正の相関、及びカセブシンL濃度と劇症肝不全の発症可能性との間の負の相関）に基づき、劇症肝不全の発症可能性を判定することが出来る。例えば、工程（1）において測定したCXCL8₇₇及びカセブシンLの各タンパク質発現量を、CXCL8₇₇発現量が、相対的に高く、且つカセブシンL発現量が、相対的に低い場合には、劇症肝不全を発症している可能性が高いという基準と比較する。被験者におけるCXCL8₇₇発現量が、相対的に高く、且つカセブシンL発現量が、相対的に低い場合には、被験者は劇症肝不全を発症している可能性が高いと判定することが出来る。

50

【 0 0 4 3 】

また、後述の実施例に示すように、慢性肝不全においても、健常者と比較して、CXCL8₇₇濃度が高いが、劇症肝不全では、慢性肝不全よりもCXCL8₇₇濃度が更に高い。一方、慢性肝不全においては、健常者と比較して、カセプシンL濃度が高いが、劇症肝不全では、健常者よりもカセプシンL濃度はむしろ低い。従って、このような相関に基づき、劇症肝不全を慢性肝不全から識別することが出来る。例えば、被験者におけるCXCL8₇₇発現量が、慢性肝不全患者よりも相対的に高く、且つカセプシンL発現量が、健常者よりも相対的に低い場合には、慢性肝不全ではなく、劇症肝不全を発症している可能性が高いと判定することが出来る。一方、被験者におけるCXCL8₇₇発現量が、健常者と比較して高いものの、カセプシンL発現量も健常者と比較して高い場合には、劇症肝不全ではなく、慢性肝不全

10

【 0 0 4 4 】

また、CXCL8₇₇及びカセプシンLの各タンパク質発現量のカットオフ値をあらかじめ設定しておき、測定した発現量とこのカットオフ値とを比較してもよい。例えば、CXCL8₇₇の発現量が前記カットオフ値を上回り、且つ、カセプシンLの発現量がカットオフ値を下回る場合には、被験者は劇症肝不全を発症している可能性が高いと判定することが出来る。更に、CXCL8₇₇のカットオフ値として、劇症肝不全と慢性肝不全との識別を可能にする値を設定した場合、CXCL8₇₇の発現量が当該カットオフ値を上回り、且つ、カセプシンLの発現量がカットオフ値を下回る場合には、被験者は、慢性肝不全ではなく、劇症肝不全を発症している可能性が高いと判定することが出来る。

20

【 0 0 4 5 】

「カットオフ値」は、その値を基準として疾患の診断を行った場合に、高い診断感度及び高い診断特異度の両方を満足できる値である。例えば、劇症肝不全の患者で高い陽性率を示し、かつ、健常者及び／又は慢性肝不全の患者で高い陰性率を示す、CXCL8₇₇及びカセプシンLの各タンパク質発現量をカットオフ値として設定することが出来る。

【 0 0 4 6 】

カットオフ値の算出方法は、この分野において周知である。例えば、劇症肝不全患者、及び健常者及び／又は慢性肝不全患者の、CXCL8₇₇及びカセプシンLの各タンパク質発現量を測定し、測定された値における診断感度および診断特異度を求め、これらの値に基づき、市販の解析ソフトを使用してROC (Receiver Operating Characteristic) 曲線を作成する。そして、診断感度と診断特異度が可能な限り100%に近いときの値を求めて、その値をカットオフ値とすることができる。また、例えば、検出された値における診断効率(全症例数に対する、劇症肝不全患者を「劇症肝不全」と正しく判定した症例と、健常者(又は慢性肝不全患者)を「健常」(又は慢性肝不全)と正しく判定した症例との合計数の割合)を求め、最も高い診断効率が算出される値をカットオフ値とすることができる。

30

【 0 0 4 7 】

一例として、CXCL8₇₇のカットオフ値として、健常者におけるCXCL8₇₇のタンパク質発現量の平均値+SD~平均値+3SD(例、平均値+2SD)を設定し、カセプシンLのカットオフ値として、健常者におけるカセプシンLのタンパク質発現量の平均値-SD~平均値-3SD(例、平均値-2SD)を設定する。CXCL8₇₇の発現量が前記カットオフ値を上回り、且つ、カセプシンLの発現量がカットオフ値を下回る場合には、被験者は劇症肝不全を発症している可能性が高いと判定することが出来る。

40

【 0 0 4 8 】

他の一例として、CXCL8₇₇のカットオフ値として、慢性肝不全におけるCXCL8₇₇のタンパク質発現量の平均値+SD~平均値+3SD(例、平均値+2SD)を設定し、カセプシンLのカットオフ値として、慢性肝不全におけるカセプシンLのタンパク質発現量の平均値-SD~平均値-3SD(例、平均値-2SD)を設定する。CXCL8₇₇の発現量が前記カットオフ値を上回り、且つ、カセプシンLの発現量がカットオフ値を下回る場合には、被験者は慢性肝不全ではなく、劇症肝不全を発症している可能性が高いと判定することが出来る。

50

【0049】

更なる一例として、CXCL8₇₇のカットオフ値として、慢性肝不全におけるCXCL8₇₇のタンパク質発現量の平均値 + SD ~ 平均値 + 3SD (例、平均値 + 2SD) を設定し、カセプシンLのカットオフ値として、健常者におけるカセプシンLのタンパク質発現量の平均値 - SD ~ 平均値 - 3SD (例、平均値 - 2SD) を設定する。CXCL8₇₇の発現量が前記カットオフ値を上回り、且つ、カセプシンLの発現量がカットオフ値を下回る場合には、被験者は健常者又は慢性肝不全ではなく、劇症肝不全を発症している可能性が高いと判定することが出来る。

【0050】

(劇症肝不全の急性度の判定)

例えば、測定したCXCL8₇₇のタンパク質発現量を、あらかじめ求めておいた、劇症肝不全の急性度とCXCL8₇₇のタンパク質発現量との相関図(分布図)と比較する。

10

【0051】

後述の実施例に示すように、劇症肝不全では、急性度が高くなるほど、CXCL8₇₇濃度が高い。従って、上述の判定において劇症肝不全を発症している可能性が高いと判断された患者、及び劇症肝不全患者について、このような相関(CXCL8₇₇濃度と劇症肝不全の急性度との間の正の相関)に基づき、劇症肝不全の急性度を判定することが出来る。例えば、工程(1)において測定したCXCL8₇₇及びカセプシンLの各タンパク質発現量を、CXCL8₇₇発現量が、相対的に高い場合には、劇症肝不全の急性度が高いという基準と比較する。被験者におけるCXCL8₇₇発現量が、相対的に高い場合には、被験者の劇症肝不全の急性度は高く、逆に、CXCL8₇₇発現量が、相対的に低い場合には、劇症肝不全の急性度は低いと判定することが出来る。

20

【0052】

慢性肝不全と劇症肝不全とは、従来の血清生化学検査および臨床症状の推移等に基づき区分することができるが、そのような従来の検査が適用困難な緊急を要する場合、例えば、突然に劇症肝不全の症状を発症した患者や、慢性肝不全が劇症転化した患者において、カセプシンLとCXCL8₇₇の発現量を検討することで、確度の高い劇症肝不全の発症可能性及び/又は急性度の臨床診断が可能となる。

【0053】

被験者が劇症肝不全を発症している可能性が高い、或いは、被験者の劇症肝不全の急性度が高いと判定された場合、該被験者の肝移植施設への救急搬送、肝移植のドナー確保等の肝移植の準備に早急に着手することができる。また、当該被験者に、早急に肝移植を施すことにより、劇症肝不全の予後を大きく改善することができる。従って、本発明により、確度の高い治療方針(肝移植の要否等)の決定を行うことができる。

30

【0054】

2. 劇症肝不全の診断用キット

本発明は、以下の物質を含む、劇症肝不全の診断用キットを提供するものである：

(1) CXCL8₇₇に特異的に結合する抗体、及び

(2) カセプシンLに特異的に結合する抗体、又はカセプシンLの基質。

本発明の診断用キットを用いれば、上記本発明の検査方法により、劇症肝不全の発症可能性及び/又は急性度を診断することが可能である。

40

【0055】

各マーカータンパク質、抗体を含む各用語の定義は、特に言及しない限り、上記1に記載したものと同一である。

【0056】

各抗体が認識するエピトープは、上記マーカータンパク質を免疫学的方法により定量可能な限り特に限定されない。

【0057】

(1)のCXCL8₇₇に特異的に結合する抗体としては、CXCL8₇₂とCXCL8₇₇の両方に特異的に結合する抗体(例、CXCL8₇₂とCXCL8₇₇の双方に共通する領域(即ち、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる領域)内にエピトープを有する抗体)を用いても、CXCL8₇₇に

50

のみ特異的に結合し、CXCL8₇₂へは特異的に結合しない抗体（例、CXCL8₇₇のN末端の5アミノ酸（即ち、配列番号3で表されるアミノ酸配列からなる領域）の一部又は全部をエピトープ内に含む抗体）を用いてもよい。物性に基づくCXCL8₇₂とCXCL8₇₇の分離操作を要することなく、CXCL8₇₇単独のタンパク質発現量を測定する観点から、（1）の抗体は、好ましくは、CXCL8₇₇にのみ特異的に結合し、CXCL8₇₂へは特異的に結合しない抗体（例、CXCL8₇₇のN末端の5アミノ酸の一部又は全部をエピトープ内に含む抗体）である。

【0058】

上述のように、高い特異性で免疫学的測定法を行う観点から、抗原の捕捉と、捕捉した抗原の検出のために、（1）CXCL8₇₇に特異的に結合する抗体及び（2）のカセプシンLに特異的に結合する抗体のそれぞれについて、異なるエピトープを認識する複数の抗体を組み合わせて用いることが好ましい。

10

【0059】

例えば、（1）の抗体として、CXCL8₇₇にのみ特異的に結合し、CXCL8₇₂へは特異的に結合しない抗体（例、CXCL8₇₇のN末端の5アミノ酸の一部又は全部をエピトープ内に含む抗体）と、CXCL8₇₂とCXCL8₇₇の両方に特異的に結合する抗体（例、CXCL8₇₂とCXCL8₇₇の双方に共通する領域（即ち、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる領域）内にエピトープを有する抗体）との組み合わせを用いる。このような組み合わせを用いることにより、CXCL8₇₇のタンパク質発現量を高い特異性で測定することが可能である。

【0060】

本発明の診断用キットに含まれる抗体は、標識剤により標識されていてもよい。標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質、ビオチンなどが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、¹²⁵I、¹³¹I、³H、¹⁴Cなどが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。

20

【0061】

上記抗体は、適切な支持体の上に固相化して提供してもよい。支持体としては、当該分野で通常用いられている支持体であれば特に限定されず、例えば、マイクロプレート（例、96穴プレート）、ビーズ、メンブレン（例えば、ナイロン膜）、アレイチップなどが挙げられる。

30

【0062】

本発明の診断用キットは、肝組織のバイオブシーに用いる針を更に含んでもよい。

【0063】

本発明の診断用キットは、免疫学的測定方法の種類に応じて、標識二次抗体、発色基質、ブロッキング液、洗浄緩衝液、ELISAプレート、プロットティング膜等をさらに含むことができる。

【0064】

本発明の診断用キットに含まれる各構成要素は、適宜、各々別個に（あるいは可能であれば混合した状態で）水もしくは適当な緩衝液（例：TEバッファー、PBSなど）中に適当な濃度となるように溶解されるか、あるいは凍結乾燥された状態で、適切な容器中に収容される。

40

【0065】

3. 劇症肝不全の予防又は治療剤

後述する実施例において示すように、カセプシンLはCXCL8₇₇を切断し、CXCL8₇₂に変換する。CXCL8₇₇は肝細胞に対してアポトーシスを誘導するが、CXCL8₇₂は肝細胞に対してむしろ細胞増殖因子として作用する。更に、劇症肝不全においては、肝組織中のカセプシンLの発現レベルが極低値であり、このことが、CXCL8₇₇のクリアランス（CXCL8₇₂への変換）の低下を招き、肝障害を増悪させる要因となっている。従って、カセプシンL又はその

50

発現ベクターを投与して、肝組織において、カセプシンLを補充することにより、CXCL8₇₇の肝再生因子(CXCL8₇₂)への変換を促進することにより、劇症肝不全を予防又は治療することが期待できる。そこで、本発明は、カセプシンL又はその発現ベクターの有効量を含む、劇症肝不全の予防又は治療剤を提供する。

【0066】

プロカセプシンLは、自己触媒的プロセッシングにより、成熟カセプシンLに変換されるので、カセプシンL(タンパク質)を投与する場合、投与するカセプシンLとして、プロカセプシンL及び成熟カセプシンLから選択されるいずれの型を用いてもよいが、好ましくは、成熟カセプシンLを用いる。一方、成熟カセプシンLは、ヘテロ二量体なので、両方の鎖を別々の又は同一のベクターで発現させて、生体内でヘテロ二量体を形成させることも、技
10
術的には可能であるが、発現系が複雑になるので、プレプロカセプシンL又はプロカセプシンLをコードするポリヌクレオチドを含む、プレプロカセプシンL又はプロカセプシンLの発現ベクターを投与するのが好ましい。発現したプレプロカセプシンL又はプロカセプシンLは、シグナル配列の切断及び/又は自己触媒的プロセッシングにより、成熟カセプシンLに変換される。

【0067】

当該発現ベクターにおいては、カセプシンL(好ましくは、プレプロカセプシンL又はプロカセプシンL)をコードするヌクレオチド配列(例えば、配列番号4で表されるヌクレ
20
オチド配列)を含むポリヌクレオチド(好ましくはDNA)が、投与対象であるヒトの細胞(好ましくは、肝細胞)内でプロモーター活性を発揮し得るプロモーターに機能的に連結されている。

【0068】

当該発現ベクターにおいて使用されるプロモーターとしては、通常、p o l I I系プロモーターが使用される。具体的には、SV40由来初期プロモーター、サイトメガロウイルスLTR等のウイルスプロモーター、β-アクチン遺伝子プロモーター等の哺乳動物の構成蛋白質遺伝子プロモーター等を挙げることが出来る。また、肝細胞特異的プロモーターを用いることにより、肝細胞に特異的にカセプシンLを発現させ、これを肝組織特異的に補充することが出来る。肝細胞特異的プロモーターとしては、アルブミンプロモーター
30
等を挙げることが出来る。

【0069】

当該発現ベクターは、好ましくはカセプシンLをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの下流に転写終結シグナル、すなわちターミネーター領域を含有する。さらに、形質転換細胞選択のための選択マーカー遺伝子(テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン等の薬剤に対する抵抗性を付与する遺伝子、栄養要求性変異を相補する遺伝子等)をさらに含有することもできる。

【0070】

当該発現ベクターに使用されるベクターの種類は特に制限されないが、ヒトへの投与に好適なベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等のウイルスベクター、及びプラスミドベクターが挙げられる。このうち、アデノウイルスは、
40
遺伝子導入効率が極めて高く、非分裂細胞にも導入可能である等の利点を有する。但し、導入遺伝子の宿主染色体への組込みは極めて稀であるので、遺伝子発現は一過性で通常約4週間程度しか持続しない。治療効果の持続性を考慮すれば、比較的遺伝子導入効率が高く、非分裂細胞にも導入可能で、且つ逆位末端繰り返し配列(ITR)を介して染色体に組み込まれ得るアデノ随伴ウイルスの使用もまた好ましい。

【0071】

本発明の予防又は治療剤は、有効量のカセプシンL又はこれを発現し得る発現ベクターが肝組織(好ましくは、劇症肝不全の疾患部位)に到達し得るように、経口的又は非経口的に、その必要がある投与対象ヒトへ投与される。投与対象としては、劇症肝不全の患者、劇症肝不全を発症していることが疑われる患者(例えば、上述の本発明の検査方法において、劇症肝不全を発症している可能性が高いと判断された患者)、劇症肝不全を発症す
50

る可能性があるヒト（例えば、劇症肝不全ではない肝不全の患者、肝炎ウイルス感染者）等を挙げることが出来る。非経口的投与は、通常は、注射剤等の形態で静脈内、動脈内、皮下、皮内、筋肉内、腹腔内への投与により行われる。肝組織（好ましくは、劇症肝不全の疾患部位）内に、直接、局所的に、カセプシンL又はこれを発現し得る発現ベクターを投与してもよい。

【0072】

本発明の予防又は治療剤は、カセプシンL又はこれを発現し得る発現ベクターに加え、任意の担体、例えば医薬上許容される担体を含むことができる。

【0073】

医薬上許容される担体としては、例えば、ショ糖、デンプン等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル等の滑剤、クエン酸、メントール等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水等の希釈剤、ベースワックス等が挙げられるが、それらに限定されるものではない。

【0074】

発現ベクターの細胞内への導入を促進するために、本発明の予防又は治療は更に核酸導入用試薬を含むことができる。発現ベクターがウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターである場合には、遺伝子導入試薬としてはレトロネクチン、フィブロネクチン、ポリブレン等を用いることができる。また、発現ベクターがプラスミドベクターである場合は、リポフェクチン、リポフェクタミン（lipofectamine）、DOGS（トランスフェクタム）、DOPE、DOTAP、DDAB、DHDEAB、HDEAB、ポリブレン、あるいはポリ（エチレンイミン）（PEI）等の陽イオン性脂質を用いることが出来る。

【0075】

経口投与に好適な製剤としては、液剤、カプセル剤、サッシェ剤、錠剤、懸濁液剤、乳剤等を挙げることができる。

【0076】

非経口的な投与（例えば、皮下注射、筋肉注射、局所注入、腹腔内投与など）に好適な製剤としては、水性および非水性の等張な無菌の注射液剤があり、これには抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性および非水性の無菌の懸濁液剤が挙げられ、これには懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。当該製剤は、アンプルやバイアルのように単位投与量あるいは複数回投与量ずつ容器に封入することができる。また、有効成分および医薬上許容される担体を凍結乾燥し、使用直前に適当な無菌のビヒクルに溶解または懸濁すればよい状態で保存することもできる。

【0077】

医薬組成物中の上述のポリヌクレオチドの含有量は、例えば、医薬組成物全体の約0.001ないし100重量%である。

【0078】

本発明の予防又は治療剤の投与量は、有効成分の活性や種類、病気の重篤度、投与対象となる動物種、投与対象の薬物受容性、体重、年齢等によって異なり一概に云えないが、通常、成人1日あたり有効成分量として約0.001～約500mg/kg程度である。

【0079】

カセプシンLは、肝細胞に対するアポトーシス誘導因子であるCXCL8₇₇を、細胞増殖因子であるCXCL8₇₂に変換することにより、劇症肝不全における肝細胞の障害を抑制するので、本発明の予防又は治療剤を、劇症肝不全の患者、劇症肝不全を発症していることが疑われる患者（例えば、上述の本発明の検査方法において、劇症肝不全を発症している可能性が高いと判断された患者）、劇症肝不全を発症する可能性があるヒト（例えば、劇症肝不全ではない肝不全の患者、肝炎ウイルス感染者）等に投与することにより、劇症肝不全を

予防又は治療することが出来る。

【0080】

4. 劇症肝不全の予防又は治療剤の候補物質のスクリーニング方法

上述のように、肝組織におけるカセプシンLの補充が、劇症肝不全を予防又は治療することが期待できるので、カセプシンLの発現を促進する物質をスクリーニングすることにより、劇症肝不全の予防又は治療剤の候補物質を得ることが出来る。そこで、本発明は、以下の工程を含む、劇症肝不全の予防又は治療剤の候補物質のスクリーニング方法を提供する：

- (1) 被検物質が、カセプシンLの発現を促進するか否かを評価すること、及び
- (2) カセプシンLの発現を促進した被検物質を、劇症肝不全の予防又は治療剤の候補物質として選択すること。

【0081】

一実施形態では、本発明のスクリーニング方法は、下記の工程(a)～(c)を含む：

- (a) 被検物質とカセプシンLの発現を測定可能な細胞とを接触させる工程；
- (b) 被検物質を接触させた細胞におけるカセプシンLの発現量を測定し、該発現量を被検物質を接触させない対照細胞におけるカセプシンLの発現量と比較する工程；及び
- (c) 上記(b)の比較結果に基づいて、カセプシンLの発現を促進した被検物質を劇症肝不全の予防又は治療剤の候補物質として選択する工程。

【0082】

スクリーニング方法に供される被検物質は、いかなる公知化合物及び新規化合物であってもよく、例えば、核酸、糖質、脂質、蛋白質、ペプチド、有機低分子化合物、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリー、固相合成やファージディスプレイ法により作製されたランダムペプチドライブラリー、あるいは微生物、動植物、海洋生物等由来の天然成分等が挙げられる。

【0083】

上記方法の工程(a)では、被検物質がカセプシンLの発現を測定可能な細胞とインビトロ又はインビボにおいて接触条件下におかれる。インビトロの系においては、カセプシンLの発現を測定可能な細胞に対する被検物質の接触は、カセプシンLの発現を測定可能な細胞を被検物質の存在下で培養することにより行われ得る。インビボの系においては、カセプシンLの発現を測定可能な細胞に対する被検物質の接触は、カセプシンLの発現を測定可能な細胞を含む非ヒト動物（好ましくは、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、サル等の非ヒト哺乳動物）に、被検物質を投与することにより行われる。

【0084】

カセプシンLの発現を測定可能な細胞とは、カセプシンL遺伝子の産物、例えば、転写産物、翻訳産物の発現レベルを直接的又は間接的に評価可能な細胞をいう。カセプシンL遺伝子の産物の発現レベルを直接的に評価可能な細胞は、カセプシンLを天然で発現可能な細胞（例、カセプシンLを天然で発現している細胞）であり得、一方、カセプシンL遺伝子の産物の発現レベルを間接的に評価可能な細胞は、カセプシンL遺伝子転写調節領域についてレポーターアッセイを可能とする細胞であり得る。カセプシンLの発現を測定可能な細胞は、動物細胞、例えばマウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、サル、ヒト等の哺乳動物細胞、ニワトリ等の鳥類細胞であり得る。

【0085】

カセプシンLを天然で発現可能な細胞（例、カセプシンLを天然で発現している細胞）は、カセプシンLを潜在的に発現するものである限り特に限定されない。かかる細胞は、当業者であれば容易に同定でき、初代培養細胞、当該初代培養細胞から誘導された細胞株、市販の細胞株、セルバンクより入手可能な細胞株などを使用できる。カセプシンL遺伝子を天然で発現している細胞としては、例えば、肝細胞、血球細胞等や、これらの細胞の細胞株（HepG2、Huh7、K562等）が挙げられる。劇症肝不全の予防又は治療剤の候補物質をスクリーニングする目的に鑑み、肝臓におけるカセプシンLの発現に寄与する細胞、例えば、肝細胞や、これらの細胞の細胞株（HepG2、Huh7等）が好適に用いられる。

【0086】

カセプシンL遺伝子転写調節領域についてレポーターアッセイを可能とする細胞は、カセプシンL遺伝子転写調節領域、当該領域に機能可能に連結されたレポーター遺伝子を含む細胞である。カセプシンL遺伝子転写調節領域、レポーター遺伝子は、発現ベクター中に挿入され得る。カセプシンL遺伝子転写調節領域は、カセプシンL遺伝子の発現を制御し得る領域である限り特に限定されないが、例えば、転写開始点から上流約2kbpまでの領域、あるいは該領域の塩基配列において1以上の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、且つカセプシンL遺伝子の転写を制御する能力を有する領域などが挙げられる。レポーター遺伝子は、検出可能な蛋白質又は検出可能な物質を生成する酵素をコードする遺伝子であればよく、例えばGFP（緑色蛍光蛋白質）遺伝子、GUS（ β -グルクロニダーゼ）遺伝子、LUC（ルシフェラーゼ）遺伝子、CAT（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ）遺伝子等が挙げられる。

10

【0087】

カセプシンL遺伝子転写調節領域、当該領域に機能可能に連結されたレポーター遺伝子が導入される細胞は、カセプシンL遺伝子転写調節機能を評価できる限り、即ち、該レポーター遺伝子の発現量が定量的に解析可能である限り特に限定されない。しかしながら、カセプシンL遺伝子に対する生理的な転写調節因子を発現し、カセプシンL遺伝子の発現調節の評価により適切であると考えられることから、該導入される細胞としては、上述のカセプシンLを天然で発現可能な細胞（例、カセプシンLを天然で発現している細胞）が好ましい。

20

【0088】

被検物質とカセプシンLの発現を測定可能な細胞とが接触される培養培地は、用いられる細胞の種類などに応じて適宜選択されるが、例えば、約5～20%のウシ胎仔血清を含む最少必須培地（MEM）、ダルベッコ改変最少必須培地（DMEM）、RPMI 1640培地、199培地などである。培養条件もまた、用いられる細胞の種類などに応じて適宜決定されるが、例えば、培地のpHは約6～約8であり、培養温度は通常約30～約40であり、培養時間は約12～約72時間である。

【0089】

上記方法の工程（b）では、まず、被検物質を接触させた細胞におけるカセプシンLの発現量が測定される。発現量の測定は、用いた細胞の種類などを考慮し、自体公知の方法により行われ得る。例えば、カセプシンLの発現を測定可能な細胞として、カセプシンLを天然で発現可能な細胞を用いた場合、発現量は、カセプシンL遺伝子の産物、例えば、転写産物又は翻訳産物を対象として自体公知の方法により測定できる。例えば、転写産物の発現量は、細胞からtotal RNAを調製し、RT-PCR、ノザンブロッティング等により測定され得る。また、翻訳産物の発現量は、細胞から抽出液を調製し、免疫学的手法により測定され得る。免疫学的手法としては、上述のものが挙げられる。一方、カセプシンLの発現を測定可能な細胞として、カセプシンL遺伝子転写調節領域についてレポーターアッセイを可能とする細胞を用いた場合、発現量は、レポーターのシグナル強度に基づき測定され得る。

30

【0090】

次いで、被検物質を接触させた細胞におけるカセプシンLの発現量が、被検物質を接触させない対照細胞におけるカセプシンLの発現量と比較される。発現量の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行なわれる。被検物質を接触させない対照細胞におけるカセプシンLの発現量は、被検物質を接触させた細胞におけるカセプシンLの発現量の測定に対し、事前に測定した発現量であっても、同時に測定した発現量であってもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定した発現量であることが好ましい。

40

【0091】

上記方法の工程（c）では、カセプシンLの発現を促進した被検物質が、劇症肝不全の予防又は治療剤の候補物質として選択される。

【0092】

50

更に、得られた候補物質の効果を生体内において確認してもよい。例えば、該候補物質を劇症肝不全モデル非ヒト哺乳動物（例えば、インビトロ方法で増殖阻害活性が確認された接着性癌細胞を移植した非ヒト哺乳動物）へ投与し、該非ヒト哺乳動物における劇症肝不全の症状をコントロール非ヒト哺乳動物（候補物質を投与しないこと以外の飼育条件が候補物質を投与した劇症肝不全モデル非ヒト哺乳動物と同一）と比較する。劇症肝不全モデルとしては、例えば、BMC Genomics 2010, 11:240等に記載されたConA誘導肝炎モデル等が知られている。そして、比較結果に基づき該非ヒト哺乳動物における劇症肝不全の症状を抑制した候補物質を、生体内における有効性が確認された劇症肝不全の予防又は治療剤として選択することができる。

【0093】

本明細書中で挙げられた特許及び特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、本明細書での引用により、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

【0094】

以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下に示す実施例によって何ら限定されるものではない。

【実施例】

【0095】

1. 劇症肝不全で高値を示すケモカインの同定

RayBiotech社のプロテインアレイシステム(Human Cytokine Antibody Array 3)を用いて、正常肝臓(生体肝移植ドナー)、小児慢性肝不全、小児劇症肝不全の3群の肝組織で炎症性サイトカインの網羅的解析を行った。その結果、劇症肝不全で高値を示す3つのケモカイン(CXCL8、GRO、MCP-1)を同定し、CXCL8の発現濃度と臨床急性度(進行の速度)とに相関性を認めた(図1)。

【0096】

2. CXCL8₇₇特異的な検出アッセイシステムの確立

(1) ウェスタンブロッティング

CXCL8₇₇のN末端に対するモノクローナル抗体として、N11(eBioscience社)(Journal of immunological methods. 2002;270(1):37-51)を使用した。CXCL8のC末端に対するモノクローナル抗体として、M801(Thermo社)を使用した。

CXCL8₇₇及びCXCL8₇₂の二種類のリコンビナント蛋白をSDS電気泳動で分離して、PVDF膜にブロットし、CXCL8₇₇のN末端に対するモノクローナル抗体及びCXCL8のC末端に対するモノクローナル抗体でインキュベートし、二次抗体で検出した。結果を図2(1)に示す。CXCL8₇₇のN末端に対するモノクローナル抗体を用いた場合、CXCL8₇₇が特異的に検出できた。CXCL8のC末端に対するモノクローナル抗体は、CXCL8₇₇及びCXCL8₇₂の両方に反応したが、分子量の差で、CXCL8₇₇とCXCL8₇₂とを識別することができた。

【0097】

(2) 酵素免疫測定法(ELISA)

96ウェルプレートに、上述のCXCL8₇₇のN末端に対するモノクローナル抗体、CXCL8のC末端に対するモノクローナル抗体で固相化し、サンドイッチ法による酵素免疫測定法(ELISA)で解析した。即ち、NUNC Maxisorp 96-well プレートに対して、CXCL8のN末端およびC末端に対するマウスモノクローナル抗体をそれぞれ1ウェルあたり2.5 µg/ml(100 µl; 50mM carbonate buffer pH9.5)添加し一晩固相化した。洗浄後にタンパク質ライセートおよび標準リコンビナントタンパク質を常温で2時間反応させた。洗浄の後、R&D Human CXCL8/IL-8 Quantikine HS ELISA Kit(HS800)の検出試薬(IL-8 conjugate、substrate、amplifier等)を用いて検出シグナルを求めた。その結果、肝組織中のCXCL8₇₇濃度を検出限界10 pg/ml(10~500 pg/ml)で定量解析することに成功した(図2(2))。

【0098】

(3) 免疫組織化学

健常者及び劇症型肝不全症患者の肝臓組織のパラフィン包埋切片を、上述のCXCL8₇₇の

10

20

30

40

50

N末端に対するモノクローナル抗体でインキュベートし、アルカリフォスファターゼ標識した二次抗体により処理し、ニューフクシン染色により赤色に発色させた。結果を図2(3)に示す。CXCL8₇₇は、正常肝及び胆道閉鎖症でも門脈域で弱く発現した。しかしながら、中心静脈の血管壁の肥厚と、周囲の結合組織のCXCL8₇₇は、劇症型肝不全症に特異的な所見であった。

【0099】

3. 小児劇症肝不全患者の肝組織中のCXCL8₇₇及びカセプシンL濃度の解析

肝組織を細切断してRayBiotechのCell Lysis Bufferに懸濁してタンパク質を抽出した。上清中のタンパク質濃度をBCA法で定量し、タンパク質濃度を0.1 mg/mlに希釈調整した。同サンプルを用いて、1 g liver proteinに含まれるCXCL8₇₇タンパク質量をELISA法で導出した。肝組織中のCXCL8₇₇は、健常肝(生体肝移植のドナー)では測定感度以下または低値を示したが、慢性肝不全では軽度上昇しており、その平均値は236 ng (23~670 ng)であった(図3-1左)。そのmean+2SDである630 ngを肝組織CXCL8₇₇濃度のカットオフ値として、劇症肝不全症例を解析した。本試験にエントリーした小児劇症肝不全患者、及び慢性肝不全(胆道閉鎖症)患者の年齢(月齢)を下の表に示す。

【0100】

【表1】

	(月)
劇症肝不全	14
	10
	9
	90
	1
	13
	5
	6
	62
	41
	6
	50
	23
	1
胆道閉鎖症	155
	40
	86
	117
	248
	48
	75

【0101】

その結果、小児劇症肝不全8症例中、カットオフ値以上を示す症例は7例(陽性率 88%)であった。そのうち発症から10日以内に肝性昏睡に陥った最重症型の超急性型の4症例は全例3,000 ngを超える高値を示した(図3-1左及び右)。同時にCXCL8₇₇濃度を制御し

ているカセプシンLもELISA法で測定し、健常肝の-2SDの値である875 μ gをカットオフとした。慢性肝不全では肝組織カセプシンLは高値であったが、劇症肝不全は全例低値であった(図3-1中)。劇症肝不全の進行の速度が速い程、肝組織CXCL8₇₇濃度は高かった(図3-1右)。

【0102】

以上の結果から、肝生検が施行された症例では、通常の血清生化学および病理学的検索に加え、肝組織中のCXCL8₇₇およびカセプシンLの2つのバイオマーカーを測定することで、確度の高い慢性肝不全と劇症肝不全との判別、及び劇症肝不全の急性度診断が可能であることが示された(図3-1右、図3-2)。例えば、肝組織中のCXCL8₇₇濃度が3,000 ng以上かつカセプシンLが875 μ g以下の場合は、最重症型の劇症肝不全症と判断することにより、遅滞なく生体肝移植のバックアップ体制をとり、血液浄化療法を含めた集学的治療の適応判断をすることが出来る。

10

【0103】

4. カセプシンLによるCXCL8₇₇のCXCL8₇₂への変換

1レーンあたり2 μ gのCXCL8リコンビナントタンパク質(CXCL8₇₇及びCXCL8₇₂のコントロール、並びにカセプシンLと30分インキュベートしたCXCL8₇₇)を、SDSポリアクリルアミドゲル(15%)を用いた電気泳動で分離し、PVDF膜に転写し、クマシーブリリアントブルーで染色した。CXCL8₇₇、CXCL8₇₂、及びカセプシンLで処理したCXCL8₇₇は分子量の違いで区別できた(図4上)。その後、各バンドを切り出し、エドマン分解によりN末端アミノ酸配列を決定した。その結果、カセプシンLがCXCL8₇₇の5番目のアルギニンを切断し、CXCL8₇₇をCXCL8₇₂に変換したことを確認した(CXCL8₇₇が、最初のN末端がSerから始まるCXCL8₇₂に変換された)(図4下)。

20

【0104】

5. CXCL8₇₇とCXCL8₇₂の生理活性の比較

HepG2細胞を用いてCXCL8₇₇、CXCL8₇₂、及びCXCL8₇₇をカセプシンLで処理した産物の細胞増殖に与える影響についてバイオアッセイを行った。具体的には、細胞培養上清に各アイソタイプのCXCL8を添加して3日後の細胞増殖率を、CXCL8非添加コントロールに対する相対的な増殖率として求めた。更に、Promega社のCaspase-Glo3/7を用いて、最終濃度1 ng/mlのCXCL8で処理された細胞のカスパーゼ3/7活性をCXCL8非添加コントロールに対する相対的な活性として求めた。

30

【0105】

その結果、CXCL8₇₂はCaspase-活性(細胞アポトーシス)を抑制して濃度依存性に細胞増殖を誘導するが、CXCL8₇₇はむしろ細胞アポトーシスを誘導して細胞増殖を抑制した(図5)。カセプシンL処理を受けたCXCL8₇₇は、カスパーゼ3活性を抑制し、細胞増殖を誘導した。従って、カセプシンL処理は、CXCL8₇₇(アポトーシス誘導因子)をCXCL8₇₂(肝細胞増殖因子)に転換することにより、CXCL8₇₇による肝細胞のアポトーシスを抑制することが示唆された。

【0106】

6. 成人劇症肝不全における肝組織中のCXCL8₇₇及びカセプシンL濃度の解析

成人劇症肝不全患者10例でもCXCL8₇₇とカセプシンLの発現解析を行った。その結果、小児と同様に、血管周囲の結合組織に強いCXCL8₇₇の発現局在とカセプシンLの発現低下を認めた。従って、成人劇症肝不全でもCXCL8₇₇及びカセプシンLの発現解析が病勢把握に有用であることが示唆された。

40

【0107】

7. 考察

劇症肝不全は、急激な肝細胞死により重篤な肝機能障害と多臓器不全を呈する症候群である。本発明者らは、本試験において、線維芽細胞が産生するCXCL8₇₇が肝細胞障害因子であることを見出した。慢性肝不全ではCXCL8₇₇は門脈域の結合組織に弱く発現するが、肝組織中の平均CXCL8₇₇濃度は236.3 ng/g/liver proteinであった。その一方で、劇症肝不全では肝中心静脈の血管壁と周囲の結合組織に強発現し、その発現度は血管障害の重症

50

度と相関していた。また、肝組織中のCXCL8₇₇濃度は3537.5 ng/g/liver protein(分布 350-8,250)と著増していた。CXCL8₇₇の分解酵素であるカセプシンLは、慢性肝不全では健常者と比較して高値であるが、劇症肝不全では著減していた。このことも、劇症肝不全ではCXCL8₇₇が分解されず異常高値を示す原因の一つと考えられた。

【0108】

劇症肝不全は臨床的多様性があるが、発症に至る時間経過(急性経過)とその重症度には一定の相関があると考えられる。英国の診断基準では黄疸発症から肝性脳症までの時間経過に基づき病型分類がなされている。小児劇症肝不全で、発症から肝移植が施行される期間(0~7日間、8~28日間、29~72日間)に基づき病型分類を行い急性度と肝組織中のCXCL8₇₇濃度との相関解析をした。その結果、急性度とCXCL8₇₇濃度とに強い相関を認めた。以上のことから、CXCL8₇₇とカセプシンLの生物学的特性と、これまでの臨床データに基づくことで、劇症肝不全の患者を、健常者や慢性肝不全から識別し、かつ確度の高い治療方針の決定が可能となる。

10

【0109】

本症は生命予後も不良であり、客観的指標に基づく重症度の評価を行うことは、患者家族への病状説明、肝移植施設への救急搬送、肝移植のドナー確保等の救命の連鎖(chain of survival)を円滑にできる可能性があり、本症の予後を大きく改善できる可能性がある。

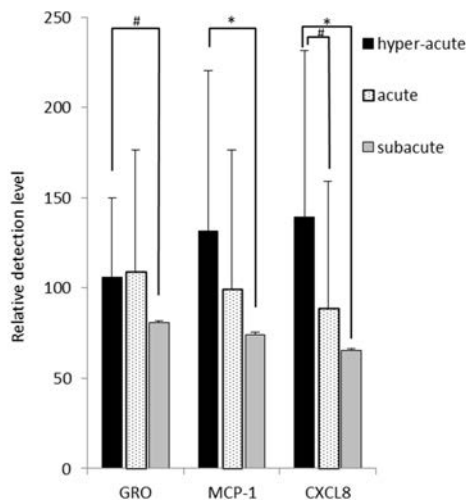
【産業上の利用可能性】

【0110】

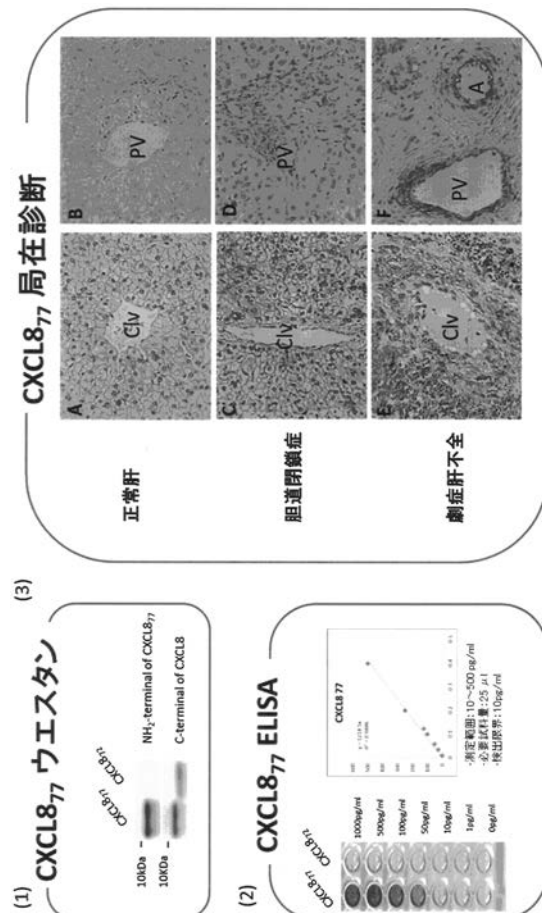
本発明により、客観的な指標に基づく、劇症肝不全の診断や急性度の判別が可能となる。また、本発明により、劇症肝不全の患者にカセプシンLを補充し、CXCL8₇₇のCXCL8₇₂への変換を促進する、という新たな機序に基づく劇症肝不全の予防又は治療技術が提供される。

20

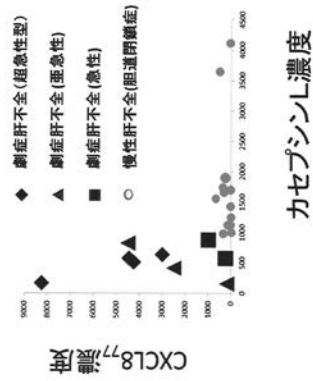
【図1】



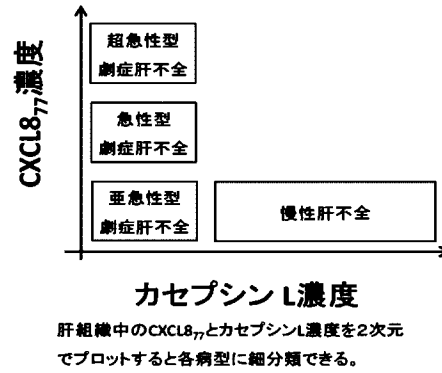
【図2】



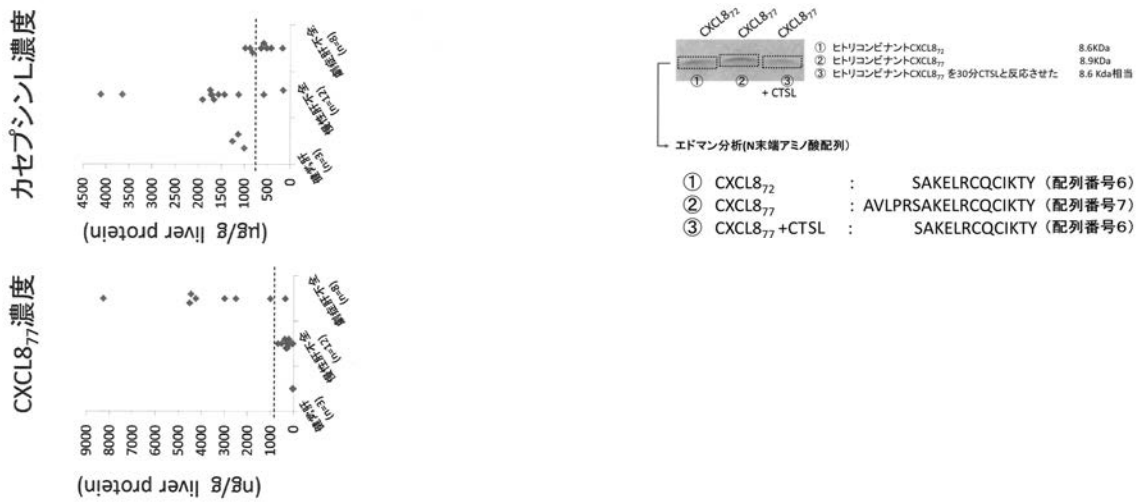
【図 3 - 1】



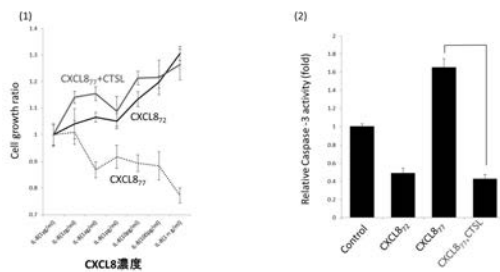
【図 3 - 2】



【図 4】



【図 5】



【配列表】

2018112403000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	38/46	(2006.01)	A 6 1 K	37/54	4 C 0 8 7	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	4 H 0 4 5	
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A	
C 0 7 K	16/24	(2006.01)	C 0 7 K	16/24		
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K	16/18		
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K	14/47		
C 1 2 N	9/64	(2006.01)	C 1 2 N	9/64		

- (74)代理人 100117743
弁理士 村田 美由紀
- (74)代理人 100163658
弁理士 小池 順造
- (74)代理人 100174296
弁理士 當麻 博文
- (72)発明者 小林 健一郎
東京都世田谷区大蔵 2 - 1 0 - 1 国立研究開発法人国立成育医療研究センター内
- (72)発明者 笠原 群生
東京都世田谷区大蔵 2 - 1 0 - 1 国立研究開発法人国立成育医療研究センター内
- (72)発明者 中澤 温子
東京都世田谷区大蔵 2 - 1 0 - 1 国立研究開発法人国立成育医療研究センター内
- (72)発明者 清河 信敬
東京都世田谷区大蔵 2 - 1 0 - 1 国立研究開発法人国立成育医療研究センター内

F ターム(参考) 2G045 AA40 DA36 FB03

4B024 AA01 AA11 BA14 CA01 CA09 CA11 CA20 DA02 DA03 EA02
EA04 GA11 HA01 HA12

4B050 DD11 KK20 LL01 LL03

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ36 QQ42 QQ52 QR16 QR32
QR35 QR48 QR55 QR62 QR72 QR77 QS16 QS32 QS36 QX01
QX02

4C084 AA01 AA02 BA01 BA08 BA22 BA23 DC07 MA52 MA55 MA56
MA65 MA66 NA05 NA14 ZA751 ZA752

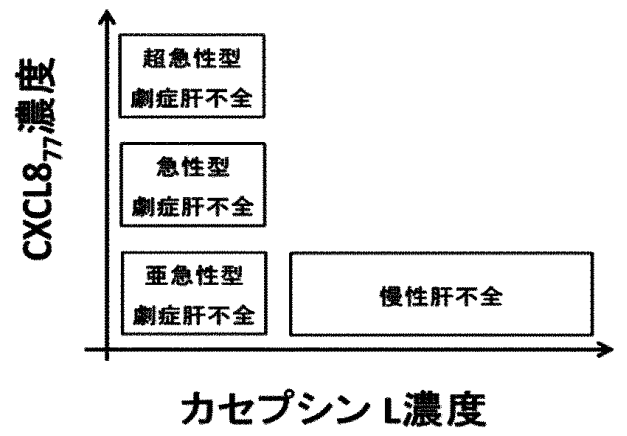
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA05 NA14 ZA75

4H045 AA30 BA10 CA40 DA01 DA75 EA50

专利名称(译)	诊断暴发性肝衰竭的方法，预防或治疗剂		
公开(公告)号	JP2018112403A	公开(公告)日	2018-07-19
申请号	JP2015101759	申请日	2015-05-19
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人国立成育医疗研究中心 LSIP基金运营联合公司		
申请(专利权)人(译)	国家研究与发展研究所国家中心儿童健康与发展 LSIP基金管理公司联合		
[标]发明人	小林健一郎 笠原群生 中澤温子 清河信敬		
发明人	小林 健一郎 笠原 群生 中澤 温子 清河 信敬		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 C12Q1/37 C12Q1/68 A61K38/46 A61P1/16 A61K35/76 C12N15/09 C07K16/24 C07K16/18 C07K14/47 C12N9/64		
CPC分类号	A61P1/16 A61K38/46 C07K14/5421 C12N9/6472 C12Y304/22015 C07K16/18 C07K16/24 C12Q1/68 G01N33/6863 G01N33/6893 G01N2800/08		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z C12Q1/37 C12Q1/68.A A61K37/54 A61P1/16 A61K35/76 C12N15/00.A C07K16/24 C07K16/18 C07K14/47 C12N9/64 A61K38/46 A61K38/48 G01N33/53.DZN.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA14 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA12 4B050/DD11 4B050/KK20 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ36 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR16 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS16 4B063/QS32 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/DC07 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA56 4C084/MA65 4C084/MA66 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZA751 4C084/ZA752 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/NA05 4C087/NA14 4C087/ZA75 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA75 4H045/EA50		
代理人(译)	高岛肇 当麻 博文		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：基于新的作用机制，基于客观指标和暴发性肝衰竭的预防或治疗剂，提供暴发性肝衰竭严重程度的诊断技术。 解决方案：测量从受试者分离的生物样品中CXCL8 77 和Casepsin L的每种蛋白质的表达水平，并且基于测量的表达水平，暴发性肝衰竭和/或可以确定急性程度。此外，通过给予酪蛋白L或其表达载体，将Caespecin L补充至暴露性肝衰竭的肝脏，其中胰蛋白酶L的表达降低可以预防或治疗暴发性肝衰竭。 【选图】图3-2



肝組織中のCXCL8₇₇とカセプシンL濃度を2次元でプロットすると各病型に細分類できる。