

(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2011-141177

(P2011-141177A)

(43) 公開日 平成23年7月21日(2011.7.21)

(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	D	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	GO 1 N 33/53	M	
C 1 2 Q 1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A	
		C 1 2 Q 1/02		

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2010-1638 (P2010-1638)
 (22) 出願日 平成22年1月7日 (2010.1.7)

(71) 出願人 502285457
 学校法人順天堂
 東京都文京区本郷2-1-1
 (74) 代理人 110000084
 特許業務法人アルガ特許事務所
 (74) 代理人 100068700
 弁理士 有賀 三幸
 (74) 代理人 100077562
 弁理士 高野 登志雄
 (74) 代理人 100096736
 弁理士 中嶋 俊夫
 (74) 代理人 100117156
 弁理士 村田 正樹
 (74) 代理人 100111028
 弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 慢性腎疾患の診断方法

(57) 【要約】

【課題】 慢性腎疾患の新たな診断薬の提供。

【解決手段】 被験体由来の試料中のミンディン又はその遺伝子の発現量を測定することを特徴とする慢性腎疾患の判定方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体由来の試料中のミンディン又はその遺伝子の発現量を測定することを特徴とする慢性腎疾患の判定方法。

【請求項 2】

慢性腎疾患が、糖尿病性腎症である請求項 1 記載の判定方法。

【請求項 3】

ミンディン又はその遺伝子の発現量が、正常群に比較して高い場合に慢性腎疾患であると判定する請求項 1 又は 2 記載の判定方法。

【請求項 4】

ミンディン又はその遺伝子の発現量の測定が、免疫学的手法又は遺伝子検出手法によるものである請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の判定方法。

【請求項 5】

抗ミンディン抗体、ミンディン遺伝子又はそのフラグメントを含有することを特徴とする慢性腎疾患診断薬。

【請求項 6】

慢性腎疾患が、糖尿病性腎症である請求項 5 記載の診断薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、糖尿病性腎症等の慢性腎疾患の診断方法及び診断薬に関する。

【背景技術】

【0002】

腎疾患には、腎不全、原発性糸球体腎炎、ネフローゼ症候群、膠原病腎、糖尿病性腎症、腎アミロイドーシス、遺伝性腎疾患等があるが、腎不全は、各種腎疾患により腎機能が破綻した状態である。これらの慢性腎疾患は、重症化すると透析が必要となり、完全な治癒は困難である。従って、早期に発見し、その原因に対する治療が重要である。

【0003】

糖尿病性腎症は、米国、日本及びヨーロッパにおける終末期腎疾患の主因であり（非特許文献 1）、その早期発見は特に重要である。現在、糖尿病性腎症の診断法としては、尿中微量アルミブンの、尿タンパク等の測定が行われている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献 1】 Science 232:1629-1632(1986)

【非特許文献 2】 Dev. Biol. 192:211-227(1997)

【非特許文献 3】 Development 126:3637-3648(1999)

【非特許文献 4】 Nat. Immunol. 5:88-97(2004)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかし、これらの従来のマーカーが陽性になったときには、既にかかなり症状が進行しており、さらに新たなマーカーの開発が求められている。

【課題を解決するための手段】

【0006】

そこで本発明者は、慢性腎疾患の新たな診断法を開発すべく種々検討した結果、分泌性細胞外マトリックス蛋白であるミンディン（Mindin：別名 spondin 2）の発現増強が尿中微量アルミブンの出現時期よりも早期にみられ、ミンディンの発現を検査すれば、従来の診断手段よりも早期に慢性腎疾患の診断が可能になることを見出し、本発明を完成した。

10

20

30

40

50

【0007】

すなわち、本発明は、被験体由来の試料中のミンディン又はその遺伝子の発現量を測定することを特徴とする慢性腎疾患の判定方法を提供するものである。

また、本発明は、抗ミンディン抗体、ミンディン遺伝子又はそのフラグメントを含有することを特徴とする慢性腎疾患診断薬を提供するものである。

【発明の効果】

【0008】

本発明方法による尿等の試料中のミンディン発現量が健常者に比べて高くなる時期は、従来用いられているマーカーである微量アルミブリンが検出される時期よりも早期であり、従来法よりも早期に腎障害が生じていることを診断できる。従って、従来法よりも、病状が進行する前に慢性腎疾患を発見でき、適正な患者指導、治療計画ひいては、末期腎不全への進行抑制に役立つものである。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】高脂肪食群（HFD）及び通常固形食群（chow）の体重（a）、尿アルミブリン／クレアチニン比（b）（ACR）及び血中HbA1c（c）の変化を示す。

【図2】高脂肪食群（HFD）及び通常固形食群（chow）の糸球体におけるミンディンmRNAの発現（a）及び腎臓全体におけるミンディンmRNAの発現（b）、さらにミンディンの免疫組織化学染色結果（c）及びウエスタンブロットの結果（d）を示す。

【図3】高脂肪食群（HFD）及び通常固形食群（chow）の糸球体顕微鏡観察結果を示す。（a）は糸球体光学顕微鏡写真、（b）は糸球体電子顕微鏡写真である。

【図4】高グルコース培地（HG）と通常培地（NG）における上皮細胞培養物中のミンディン蛋白発現量を示す。

【図5】高脂肪食群（HFD）及び通常固形食群（chow）、並びに高グルコース培地（HG）及び通常培地（NG）における β 1-インテグリンと β -アクチンの発現量を示す。

【図6】高脂肪食群（HFD）及び通常固形食群（chow）における尿中ミンディン量（a）、及び糖尿病性腎症患者の尿中ミンディン蛋白発現レベルを示す。

【図7】尿中ミンディン／クレアチニン比（ACR）（a）及び尿中ミンディン蛋白（b）の発現の経時変化を示す。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明の慢性腎疾患の新たなマーカーはミンディンである。ミンディンは、分泌性細胞外マトリックス（ECM）蛋白である、ミンディン-Fスポンディン・ファミリーの一員である。この蛋白は当初ゼブラフィッシュにおいて同定され、基底板に蓄積することが見出された（非特許文献2）。ラットミンディンは、インビトロで胚の海馬ニューロンの生長と接着を測定する分泌性蛋白である（非特許文献3）。最近の研究によると、ミンディンは先天的免疫応答の開始に必須であること、及び細菌性病原体について、ECMにおけるユニークなパターン認識分子であることが知られている（非特許文献4）。しかし、ミンディンと慢性腎疾患の進行との関係については、全く知られていない。

【0011】

本発明の判定は診断の対象となる慢性腎疾患としては、糖尿病性腎症、糸球体腎炎、遺伝性腎疾患等があるが、糖尿病性腎症が特に好ましい。

【0012】

本発明の診断対象である被験体としては、慢性腎疾患を発症し得る哺乳類であればよいが、ヒトが好ましい。また被験体由来の試料としては、尿、血液、腎組織等が挙げられるが、尿が特に好ましい。

【0013】

被験体由来試料中のミンディン又はその遺伝子の発現量の測定は、ミンディン又はその遺伝子を検出できる手段であれば特に限定されず、免疫学的手法、遺伝子検出手法のい

10

20

30

40

50

れでもよい。免疫学的手法の場合には、抗ミンディン抗体を用いた免疫学的測定法が好ましい。また、遺伝子検出手法としては、各種ハイブリダイゼーション法、PCR法等が挙げられる。このうち、尿を試料とし、精度良く測定できる点から、抗ミンディン抗体を用いた免疫学的測定法が特に好ましい。

【0014】

抗ミンディン抗体としては、精製したミンディンと反応する抗体であれば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のいずれでも良いが、モノクローナル抗体が好ましく用いられる。当該抗体の作製は周知の方法にて作製することができる。例えば、ポリクローナル抗体の作製には、免疫する動物としてマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ニワトリなどが用いられる。抗血清は、抗原を動物の皮下、皮内、腹腔などに一回又は複数回投与した後、血清から得ることができる。タンパク質、ペプチドを抗原として用いる時は、免疫賦活効果を有するアジュバントとの混合物の免疫がより好ましい。

また、モノクローナル抗体の作製には、公知のモノクローナル抗体作製方法、例えば、長宗香明、寺田弘共著、「単クローン抗体」廣川書店（1990年）や、Jame W. Golding, "Monoclonal Antibody", 3rd edition, Academic Press, 1996年に従い作製することができる。また、DNA免疫法によりモノクローナル抗体を作製することもでき、Nature 1992 Mar 12; 356 152-154やJ. Immunol Methods Mar 1; 249 147-154を参考に作製することができる。

【0015】

当該モノクローナル抗体は、常法に従い作成したハイブリドーマを培養し、培養上清から分離する方法、該ハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳類動物に投与し、腹水として回収する方法により製造できる。

【0016】

抗体は、必要に応じてそれをより精製して使用することができる。抗体を精製・単離する手法としては、従来公知の方法、例えば、硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、イオン交換クロマトグラフィ法、プロテインAカラムなどによるアフィニティ精製法などがある。

【0017】

抗ミンディン抗体を用いた免疫学的測定法としては、例えば免疫染色（ウエスタンブロット）、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、免疫比濁法（TIAやLTIA）、エンザイムイムノアッセイ、化学発光イムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ等が挙げられる。

【0018】

尚、ミンディンの測定において、定量値、もしくは半定量値を得るためには、基準となるミンディン量／濃度と比較することが好ましい。この場合、基準となるミンディン量／濃度としては、既知濃度の尿中ミンディンの使用が好ましい。

【0019】

次に、得られた測定値を健常者群のミンディン測定値と比較する。

【0020】

健常者群のミンディン測定値は、前記の被験体由来試料の場合と同様の方法で予め測定しておくのが好ましい。比較には、健常者群のミンディン測定値を統計学的に処理して求めた基準値を使用するのが好ましい。この基準値は、対象疾患毎に統計学的に求めることが好ましい。

【0021】

慢性腎疾患が存在している場合には、被験体由来試料のミンディン濃度又は量は、後述の実施例に記載の如く、前記基準値よりも有意に高いことが判明した。従って、被験体由来試料のミンディン濃度又は量と、この基準値との対比により、慢性腎疾患の有無を判定することができる。また、治療中の慢性腎疾患患者由来の試料を用いた場合には、治療方法の選択又は効果判定ができる。

【0022】

また、慢性腎疾患の存在等の判定にあたっては、ミンディンの測定値だけでなく、従来の腎疾患マーカー、例えば尿中微量アルミブン、尿蛋白、尿中ケトン体等の測定値と組み合わせて判定してもよい。

【0023】

本発明の診断薬は、抗ミンディン抗体、ミンディン遺伝子又はそのフラグメントを含有する。当該試薬には、測定に必要な他の要素、例えば反応緩衝液、反応容器、プロトコルが含まれる。

【実施例】

【0024】

以下、実施例により、本発明を具体的に説明する。但し、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0025】

実施例 1

(実験方法)

【0026】

(1) 動物

本研究に記載された全てのプロトコルは、順天堂大学の「実験動物委員会」によってレビューされ承認された。雄性KK/TaJclマウス(4週令)は、日本クレア社(日本国、東京)から購入した。マウスは個々にプラスチックのケージに入れ、実験期間中、自由給餌・給水とした。KK/Taマウスには、4週令からスタートして16週間、高脂肪食(HFD群; 脂肪60% kcal; D12492; リサーチ・ダイエツト)か、通常の固形食(固形飼料群; 脂肪10% kcal; D12450B; リサーチ・ダイエツト)を与えた。これらの食事はカロリーが異なり、高脂肪食は5.2 kcal/g、通常食は3.8 kcal/gであった。全てのマウスは、通常の条件下で同一室内に置き、規則正しい12時間ずつの明/暗サイクルとし、温度は24℃±1℃にコントロールした。マウスは20週令でペントバルビタール麻酔下で犠牲にし、糸球体を単離するための腎臓サンプルを得た。

【0027】

(2) 生化学的検査

4、8、12、16及び20週令において、尿中アルブミン/クレアチニン比(ACR)、血中ヘモグロビンA1c(HbA1c)、及び絶食体重を測定した。絶食血清インスリン、トリグリセリド(TG)及び総コレステロール(T-Chol)の各レベルを20週令で測定した。尿サンプルは、マウス代謝ケージ(クレアジャパン社)を用いて24時間採取した。HbA1c、尿中アルブミン及びクレアチニンは、イムノアッセイ(DCA2000システム、ジューメンスAG、ドイツ国ミュンヘン)で測定した。絶食血清インスリンは、マウスインスリン酵素結合免疫吸着アッセイキット(森永生科学研究所、日本国東京)で測定した。血漿リポ蛋白は、Lipid Res. 43:805-814(2002)記載のように、スカイライト・バイオテック社(日本国秋田)による高速液体クロマトグラフィーで、コレステロールとトリグリセリド同時定量のためのオンライン・デュアル酵素法によって分析した。

【0028】

(3) 糸球体の単離

単離糸球体サンプルは、Am. J. Pathol. 161:799-805(2002)記載のように、ダイナビーズ(ダイナルA.S.社、ノルウェー国オスロ)による灌流で20週令のマウス腎から得た。即ち、マウスを、直径4.5µmの磁性ダイナビーズ(Dynabeads)で心臓を通して灌流した。腎臓は細断し、コラゲナーゼで消化し、濾過してから磁石で収集した。糸球体サンプルの純度を顕微鏡下で調べ、平均純度97%を超えていることが確認された。

【0029】

(4) マイクロアレイ遺伝子発現

A f f y m e t r i x GeneCh ip 発現分析テクニカルマニュアル (A f f y m e t r i x 社、米国カリフォルニア州、サンタクララ) に詳細に記載された手続きに基本的に従った。即ち、R N e a s y Miniキット (キアーゲン社) を用いて、糸球体サンプルから全RNAを抽出した。およそ100ngのRNAを2サイクルcDNA合成キット (アフィメトリクス社) に付した。ビオチン標識cRNAは、cDNAのインビトロ・トランスクリプション (I V T 標識キット) (アフィメトリクス社) によって得た。アフィメトリクスのF l u i d i c s S t a t i o n 450で、フラグメントcRNA (20 μg) をGeneCh ipマウスゲノム430 2.0アレイにハイブリダイズした。アレイは、指示プロトコルに従って洗浄し染色した。GeneCh ipをGeneC h i p スキャナ3000 (アフィメトリクス社) でスキャンし、データはGeneS p r i n g 7. 3. 1ソフトウェア (アジレント・テクノロジーズ) で分析した。ソフトウェアGeneS p r i n g 7. 3. 1によって、準備した各アレイに対し、高脂肪食及び通常固形食のKK/Taマウス間でデータの正規化及び基準化を行った。可能性のあるバイオマーカー候補を特定するため、インジェヌイティ・パスウェイ分析 (I P A) を行った (インジェヌイティ・システムズ社、www. i n g e n u i t y. c o m) 。

10

【0030】

(5) リアルタイムPCR

20週令の糸球体でのミンディンのmRNA発現をリアルタイムPCRで評価した。ランダムデカマープライマー (アンビオン社、米国テキサス州オースチン) とMMLV逆転写酵素 (ライフテクノロジーズ社、米国カリフォルニア州、カールスバッド) でRNAを逆転写した。TaqManリアルタイムPCRは、製造業者 (アプライド・バイオシステムズ社、米国カリフォルニア州、フォスター・シティ) の指示書に従って行い、解析した。リアルタイムPCRは、アプライド・バイオシステムズ社 (Mm00513596 __m1) から商業的に入手可能なアッセイと共に提供されたプライマーを用いて各組織フラクションにおけるミンディンの発現を決定するために行った。各データポイントについて測定を3回繰返し行った。サンプル中の相対mRNAレベルは、GAPDH量について正規化した。

20

【0031】

(6) 光学顕微鏡観察及び免疫組織化学的染色

光学顕微鏡観察については、切片を3 μmに細断し、パラフィン包埋した後、パス (P A S) 試薬で染色した。免疫組織化学法は、基本的にD i a b e t e s Res. C l i n. P r a c t. 83:183-189 (2009) 記載の方法に従って行った。モノクローナルマウス抗-S P O N 2 抗体 (アブノヴァ・コーポレイション、台湾) を用いた。

30

【0032】

(7) ウェスタンブロット分析

標準技法に従ってドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とウェスタンブロット分析を行い、エンハンスド・ケミルミネッセンス・イムノブロット検出キット (アマーシャム・ファルマシア・バイオテック社、英国バッキンガムシャー、リトルシヤルフォント) で可視化した。本研究で用いた第一抗体は次の通りであった: モノクローナルマウス抗-S P O N 2 (ミンディン) 抗体 (アブノヴァ・コーポレイション)、モノクローナルマウス抗-β1インテグリン抗体 (BDトランスダクションラボラトリーズ、BDバイオサイエンス社、米国カリフォルニア州)、モノクローナルマウス抗-βアクチン抗体 (シグマ社)。また、本研究ではHRP-結合第二抗体 (ジャクソン・イムノリサーチ・ラボラトリーズ社、米国ペンシルバニア州ウェストグローブ) を用いた。

40

【0033】

(8) 電子顕微鏡観察

0.1mol/Lのリン酸バッファー中2%のグルタルアルデヒド (GA) によって組織を4℃で120分間固定して電顕観察に付した。組織片は通常のダイヤモンドナイフで切断し、並の薄さの (s e m i - t h i n) 切片とごく薄い切片とを得た。1%トルイジ

50

ンブルーで染色した並薄の切片（厚さ $1\ \mu\text{m}$ ）を光学顕微鏡観察に用いた。極薄の切片は、 100 メッシュの銅グリッド上に集め、 4% ウラニルアセテートとクエン酸鉛で二重染色した。日立の 7100 透過型電子顕微鏡（日立ハイテクノロジーズ、日本国東京）を $75\ \text{kV}$ で操作して切片を調べた。

【0034】

（9）上皮細胞の培養

上皮細胞の培養は *Exp. Cell Res.* 236:248-258 (1997) 記載に従って行った。分化を誘導するため、上皮細胞（細胞数： 5×10^4 個）を、タイプ I コラーゲンでコーティングされたディッシュ（イワキガラス社、日本国、東京）に低密度で γ インターフェロンの非存在下、 37°C で播種した。分化した上皮細胞を 24 時間、 0.1% ウシ胎児血清（FCS）含有のダルベッコ修飾イーグル培地（DMEM）で飢餓状態で培養した。次いで細胞を 2 群に分割した：（1）正常グルコース群（NG）；コントロールとして $5.5\ \text{mM}$ グルコースを含有させた DMEM 中でインキュベート、及び（2）高グルコース群（HG）； $25\ \text{mM}$ グルコースを含有させた DMEM 中でインキュベート。全ての実験は、各条件について最低 3 回行った。全実験において、継代数 15 と 20 の間の上皮細胞を使用した。

【0035】

（10）患者

この研究は順天堂大学医学部の倫理委員会で承認されたものである。すべての患者が実験に参加する前に書面でインフォームド・コンセントを提出した。患者の蛋白尿発現は糖尿病発症が記録されてから 5 年超経過後であり、尿中の沈澱物には赤血球や細胞円柱は含まれていなかった。尿サンプルは早朝に採集した。コントロールの尿サンプルは健常成人ボランティアから採取した。これらのサンプルは -80°C で保存し、使用前に遠心操作に付して尿酸塩類を除去した。尿中アルブミン及びミンディンの濃度を尿中クレアチニンに対して補正した。

【0036】

（11）統計解析

全てのデータは平均 $\pm$ 標準誤差（SE）で表した。 2 種のパラメータ間の比較はスチューデント・アンペア *t* 検定で解析した。 0.05 未満の *P* 値を統計的に有意であるとした。

【0037】

（結果）

（1）高脂肪食 KK/Ta マウスの表現型の特徴付け

高脂肪食（HFD）或いは通常固形食（chow）を給餌した、週令の異なる KK/Ta マウスの表現型値を図 1 に示す。HFD 群中、 8 、 12 、 16 及び 20 週令の体重と ACR は通常固形食群におけるそれらより顕著に高かった（ $p < 0.01$ ）。HFD 群中、 12 、 16 及び 20 週令の HbA1c レベルもまた、通常固形食群におけるそれらより顕著に高かった（ $p < 0.01$ ）。血清 TG と総コレステロールについては、 20 週令で、HFD 群と通常固形食群との間で顕著な差はなかった（表 1）。しかし、HFD 群の血清低密度リポ蛋白コレステロール（LDL-C）は、固形飼料群におけるデータより顕著に高く（ $p < 0.05$ ）、HFD 群の血清高密度リポ蛋白コレステロール（HDL-C）は、固形飼料群におけるデータより低かった（ $p < 0.05$ ）。HFD 群の絶食血清インスリンレベルは、固形飼料群のレベルと比べ顕著に上昇していた（ $p < 0.01$ ）。

【0038】

【表 1】

20週令における高脂肪食群(HFD)と通常固形食群(Chow)の生化学的データの差

	HFD(n=5)	Chow(n=5)	P-values
Totalcholesterol(mg/dL)	134.3 ± 9.6	141.1 ± 10.9	NS
Triglyceride(mg/dL)	45.6 ± 4.6	68.3 ± 14.2	NS
LDLcholesterol(mg/dL)	17.2 ± 2.5	10.1 ± 0.8	P<0.05
HDLcholesterol(mg/dL)	96.9 ± 2.4	122.3 ± 9.5	P<0.05
nsulin(ng/dL)	2.8 ± 0.5	1.2 ± 0.2	P<0.01

Data expressed as means±SE.

Abbreviations: NS, not significant. LDL, low density lipoprotein. HDL, high density lipoprotein.

10

【0039】

(2) HFD群の糸球体におけるミンディンのmRNA発現

表2は、IPAバイオマーカーによってフィルタリングしGeneChip上に置かれたHFD群の糸球体において発現量増大を示した上位20の遺伝子を示す。ミンディンの発現は高脂肪が誘導した遺伝子で最も高い増大倍数を示した。この結果をリアルタイムPCRで確認した(図2a)。

ミンディンのmRNA発現は、高脂肪食、20週令の糸球体で顕著に発現量が増加した(p<0.005)。しかしながら、全腎臓では、HFD群と通常固形食群でミンディンのmRNA発現量に大きな差はなかった(図2b)。

20

【0040】

【表2】

Gene name	Description	Fold change
Mindin (SPON2)	spondin2,extracellular matrix protein	12.2
C1QC	complement component 1, q subcomponent, C chain	8.761
CNTN1	contactin 1	8.604
IGHM	immunoglobulin heavy constant mu	6.773
TREML4	triggering receptor expressed on myeloid cells-like 4	6.674
PTPN6	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6	6.185
CSF3R	colony stimulating factor 3 receptor	6.122
RBX1	ring-box 1	6.071
FAM125A	family with sequence similarity 125, member A	5.645
RDH16	retinol dehydrogenase 16	5.425
CLEC4A	C-type lectin domain family 4, member A	5.148
FLJ78302	chemokine (C-C motif) receptor 2-like	4.915
C1QA	complement component 1, q subcomponent, A chain	4.68
ATP8B4	ATPase, class I, type 8B, member 4	4.628
CX3CR1	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	4.531
TGM1	transglutaminase 1	4.5
CYBB	cytochrome b-245, beta polypeptide	4.378
FRZB	frizzled-related protein	4.262
SLC16A14	solute carrier family 16, member 14	4.017
MESDC2	mesoderm development candidate 2	4.016

30

40

【0041】

(3) 糸球体におけるミンディンの蛋白発現

免疫組織化学染色を行ってみると、ミンディン蛋白は主として上皮細胞に局在している(図2c)。ウェスタンブロット分析の結果、20週令のHFD群の糸球体におけるミン

50

ディンの蛋白発現レベルも、通常固形飼料群でのレベルより顕著に高いことが判明した（図2 d）。

【0042】

（4）HFD群における糸球体傷害

光学顕微鏡観察では、HFD群でメサンギウム基質の増生・拡大が見られ、これは通常固形飼料群の場合と比べ僅かに高レベルであった（図3 a）。電子顕微鏡観察において、上皮細胞の足突起は20週令のHFD群においては融合していた（図3 b）。

【0043】

（5）上皮細胞によるミンディン蛋白の産生

高グルコース刺激がミンディン蛋白の産生を増大させるかどうかを決定するため、高グルコース培地でインキュベートした上皮細胞培養物を調べた。ミンディンは分泌性ECM蛋白であるため、上清に検出された。高グルコース刺激下での上清におけるミンディン蛋白発現レベルは、通常のグルコース刺激下での発現レベルより顕著に高かった（ $p < 0.05$ 、図4）。

【0044】

（6）糸球体及び培養上皮細胞における $\beta 1$ -インテグリン蛋白発現

糸球体における $\beta 1$ -インテグリン蛋白発現については、HFD群と固形飼料群とでそのレベルに統計的に有意な差はなかった（図5 a）。しかしながら、高グルコース条件での、上皮細胞溶解産物における $\beta 1$ -インテグリンの発現は、通常のグルコース条件下での発現に比べ増大していた（ $p < 0.05$ 、図5 b）。

【0045】

（7）マウス及びヒトの糖尿病性腎症から得た尿サンプル中のミンディン

上皮細胞が高グルコース条件でミンディンを分泌するという前提のもと、次にマウス及びヒトの尿中のミンディンの発現を調べた。HFD群における尿中ミンディンの発現レベルは固形飼料群におけるそれよりも顕著に高かった（図6 a）。

糖尿病性腎症の患者における尿中ミンディンの蛋白発現レベルもまた、健常コントロールのレベルと比べと高かった（図6 b）。尿中ミンディンレベルは糖尿病性腎症の進行と共に漸増した。

【0046】

（8）尿中ミンディン発現の早期増加

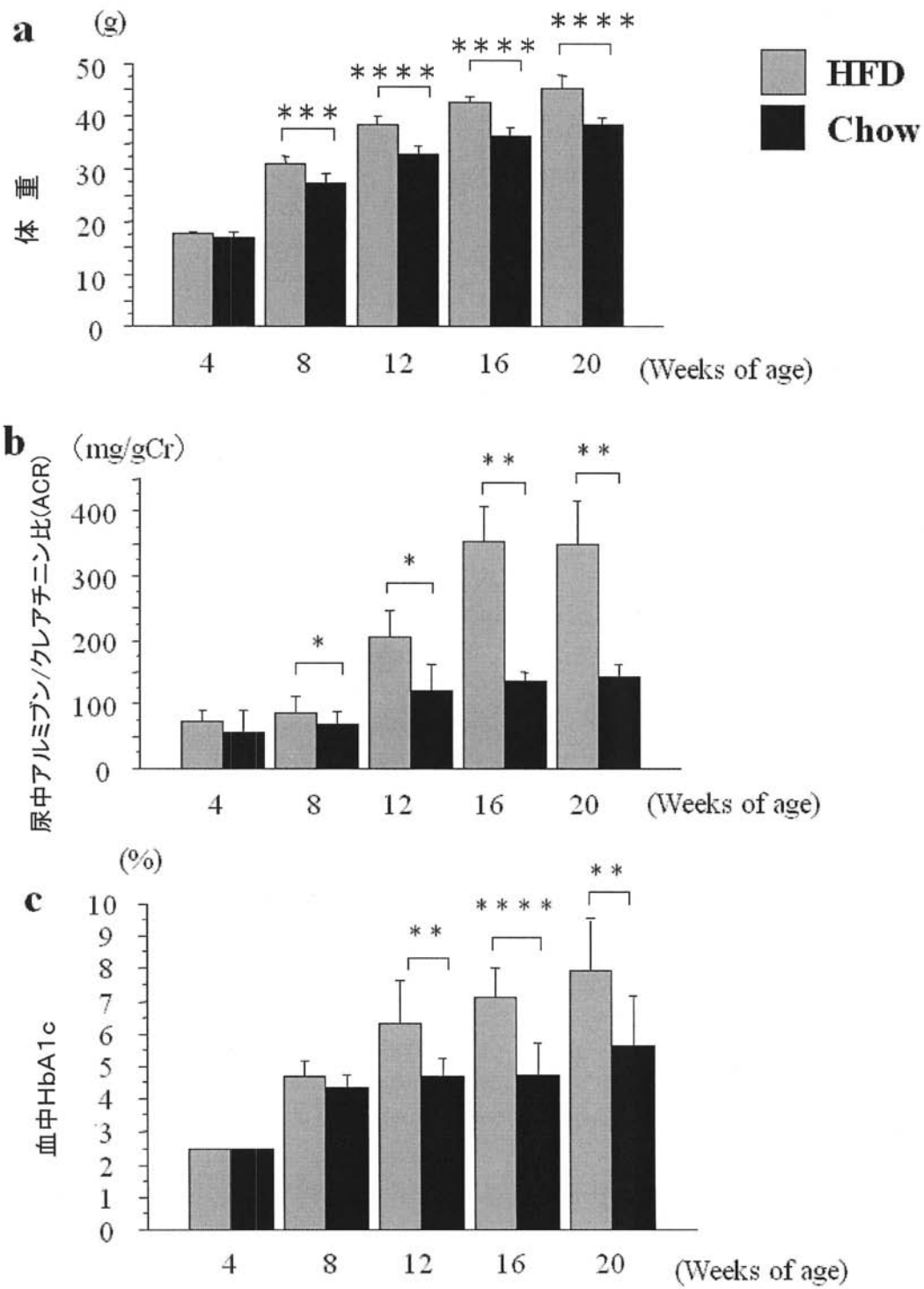
固形飼料群では、尿中（アルブミン／クレアチニン比）（ACR）レベルは12週令でプラトーに達し平坦化した。12週令で高脂肪食に変えた群では、尿中ACRレベルは20上昇した（図7 a）。尿中のミンディン発現は16週令で増強した（図7 b）。尿中ミンディンの発現は尿中ACRより早く増加した。

【0047】

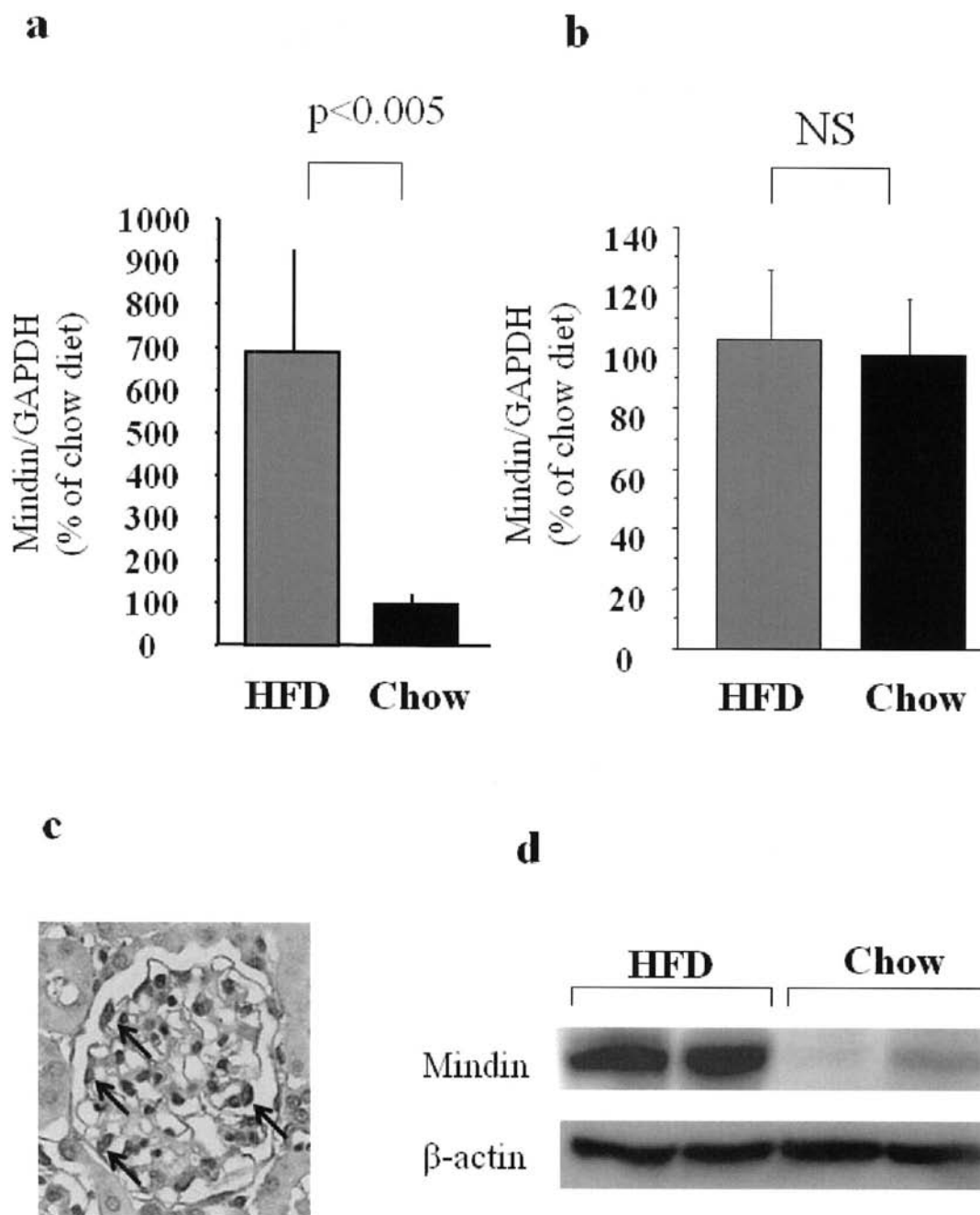
ミンディンはヒト及びマウスの尿中で検出可能であった。ミンディンの発現は、健常コントロールの場合と比べ糖尿病患者で増加しており、これは糖尿病性腎症の臨床病期を反映していた。ミンディンが免疫組織化学法では主として上皮細胞に検出されることから、尿中ミンディンは上皮細胞から排出されると仮定し、上皮細胞はミンディンを上皮細胞培養物中に産生することを確認した。糸球体傷害の重症度を評価するため、少なくとも2つの観点を検討する必要がある。それらは糸球体傷害の影響（results）と進行中の障害の重篤度である。食事を通常固形食から高脂肪食に変え、尿中ミンディンは尿中ACRよりも早期に上昇した。ミンディンの発現は、糸球体傷害の早期マーカー及び／又はアクティブな糸球体傷害のリアルタイムのインジケータであると考えられる。

臨床期によっては糖尿病性腎症患者の尿中に、ミンディンの検出が可能であった。尿中ミンディンは糖尿病性腎症を有する患者における上皮細胞傷害の新しい尿中マーカーとなりうると思われる。

【図 1】



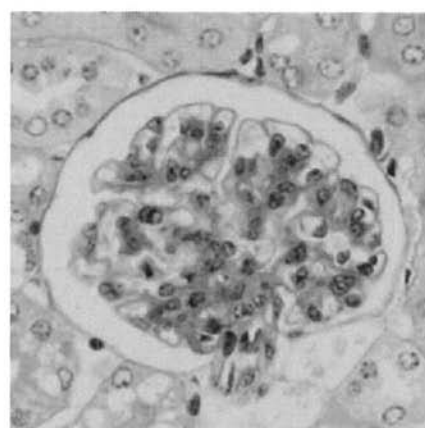
【 図 2 】



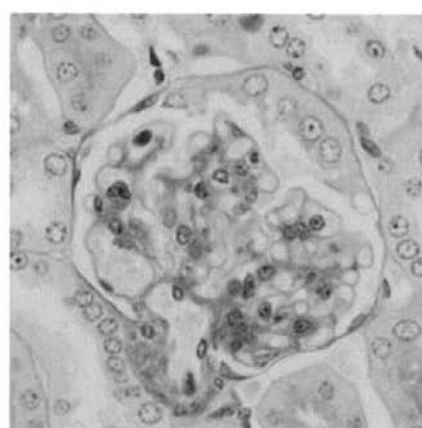
【図 3】

a

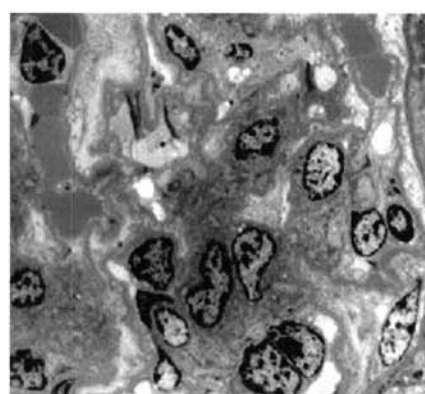
HFD



Chow

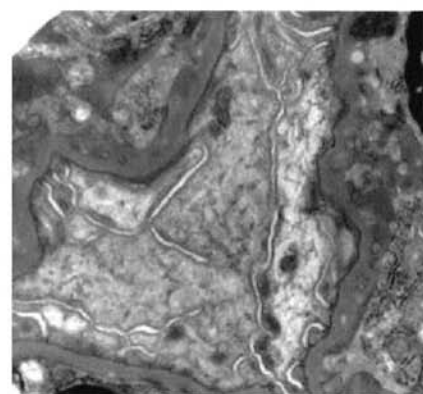
**b**

× 2500

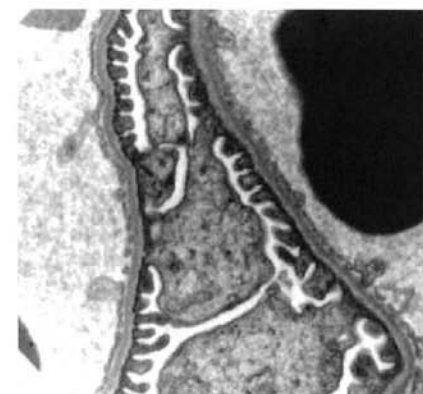
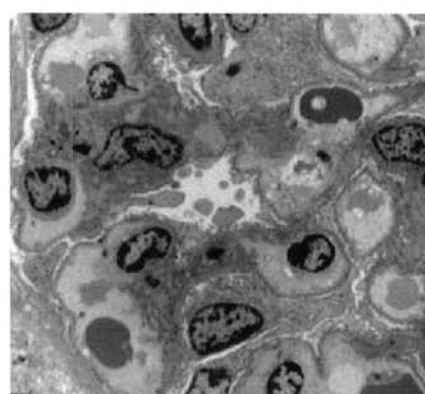


HFD

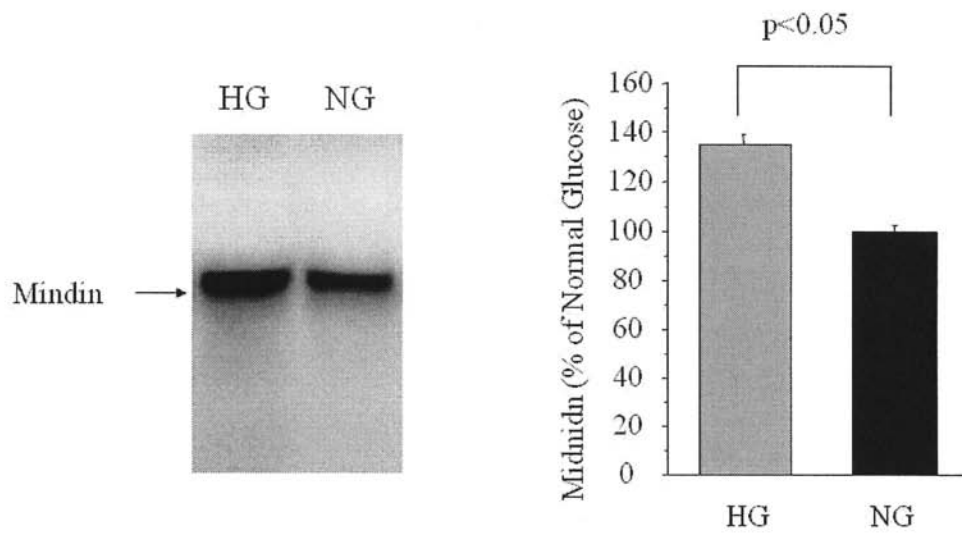
× 15000



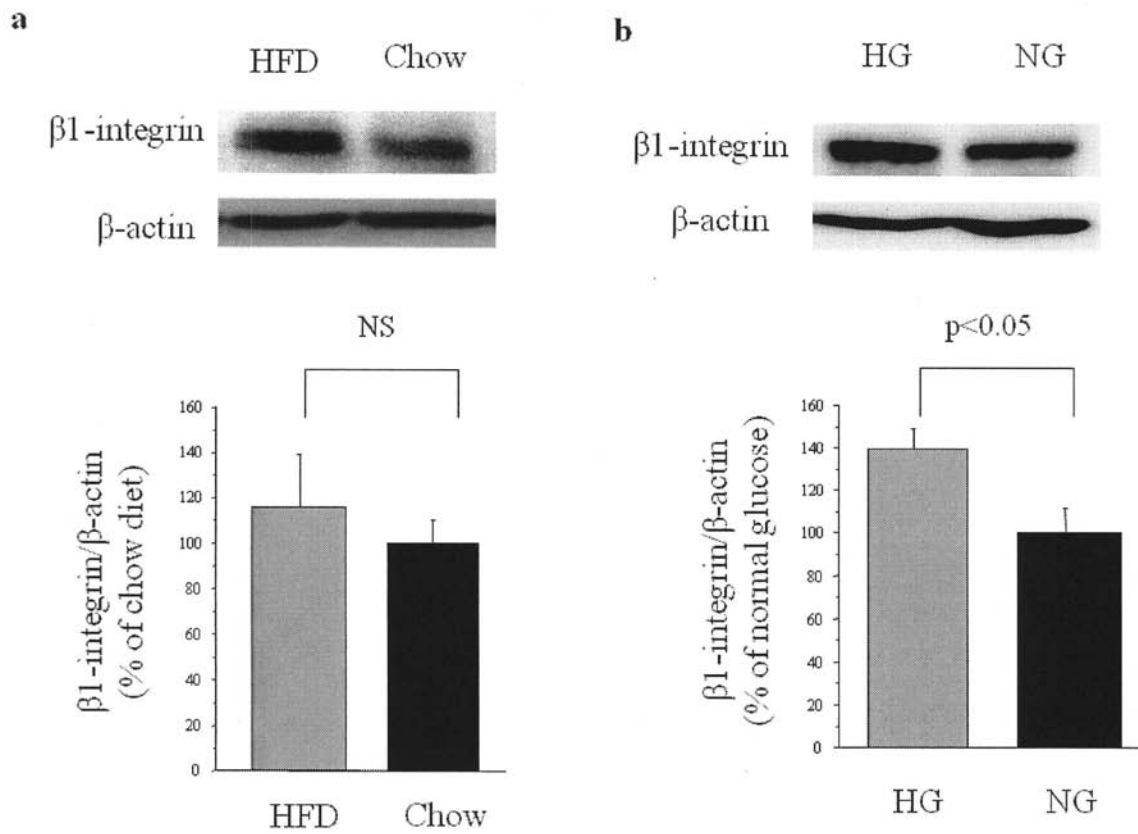
Chow



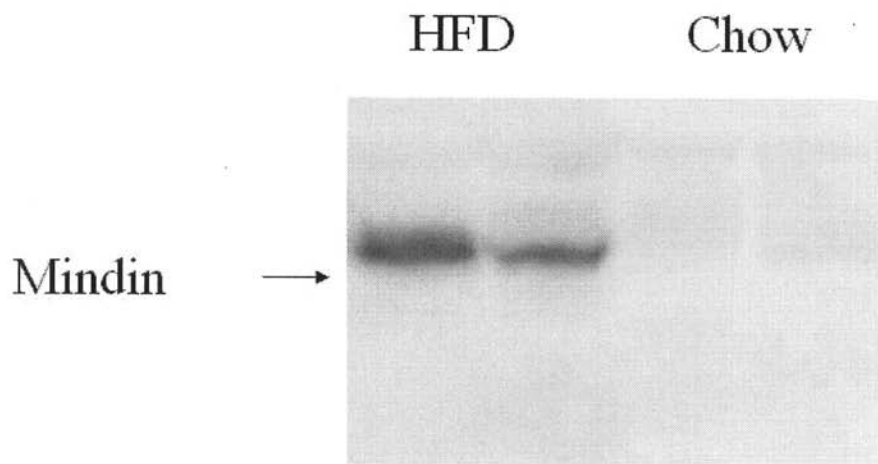
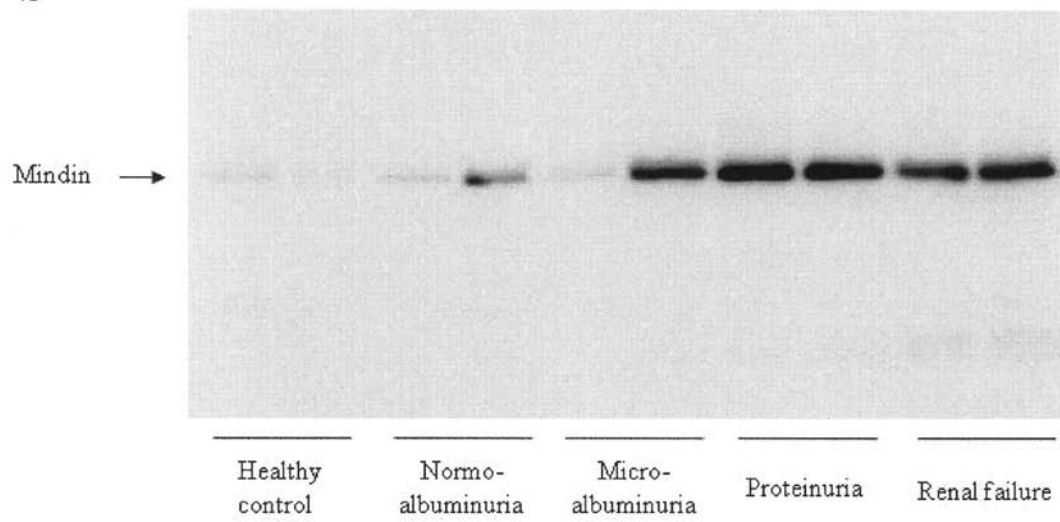
【 図 4 】



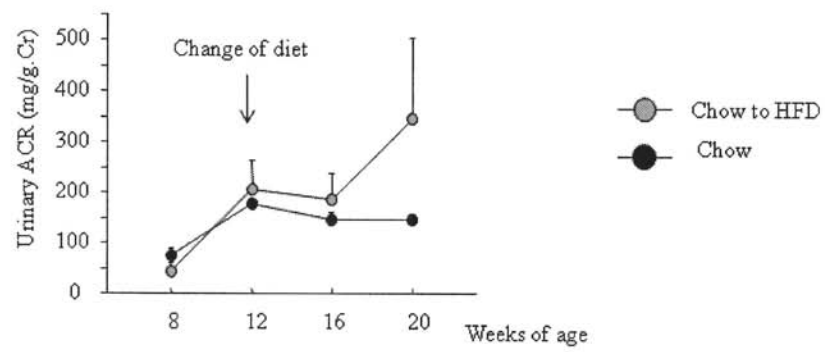
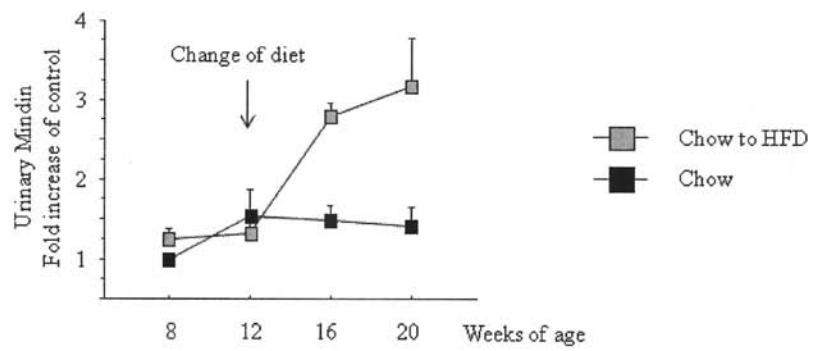
【 図 5 】



【図 6】

a**b**

【 図 7 】

a**b**

フロントページの続き

(72)発明者 村越 真紀
東京都文京区本郷 2-1-1 順天堂大学内

(72)発明者 谷本 光生
東京都文京区本郷 2-1-1 順天堂大学内

(72)発明者 合田 朋仁
東京都文京区本郷 2-1-1 順天堂大学内

(72)発明者 萩原 晋二
東京都文京区本郷 2-1-1 順天堂大学内

(72)発明者 富野 康日己
東京都文京区本郷 2-1-1 順天堂大学内

Fターム(参考) 4B063 QA19 QQ08 QQ42 QQ53 QR32 QR36 QR55 QR77 QS34 QX01

专利名称(译)	慢性肾病的诊断方法		
公开(公告)号	JP2011141177A	公开(公告)日	2011-07-21
申请号	JP2010001638	申请日	2010-01-07
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人顺天堂		
申请(专利权)人(译)	学校法人顺天堂		
[标]发明人	村越真紀 谷本光生 合田朋仁 萩原晋二 富野康日己		
发明人	村越 真紀 谷本 光生 合田 朋仁 萩原 晋二 富野 康日己		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/68 C12Q1/02		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.M C12Q1/68.A C12Q1/02 C12Q1/6813.Z C12Q1/6837.Z C12Q1/686.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR55 4B063/QR77 4B063/QS34 4B063/QX01		
代理人(译)	村田正树		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

问题得到解决：为慢性肾病提供一种新型诊断药物。解决方案：这种用于判断慢性肾病的方法的特征在于测量源自检查目标或其基因的样品中的mindin的表达量。Ž

Gene name	Description	Fold change
Mindin (SPON2)	spondin2,extracellular matrix protein	12.2
C1QC	complement component 1, q subcomponent, C chain	8.761
CNTN1	contactin 1	8.604
IGHM	immunoglobulin heavy constant mu	6.773
TREML4	triggering receptor expressed on myeloid cells-like 4	6.674
PTPN6	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6	6.185
CSF3R	colony stimulating factor 3 receptor	6.122
RBX1	ring-box 1	6.071
FAM125A	family with sequence similarity 125, member A	5.645
RDH16	retinol dehydrogenase 16	5.425
CLEC4A	C-type lectin domain family 4, member A	5.148
FLJ78302	chemokine (C-C motif) receptor 2-like	4.915
C1QA	complement component 1, q subcomponent, A chain	4.68
ATP8B4	ATPase, class I, type 8B, member 4	4.628
CX3CR1	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	4.531
TGM1	transglutaminase 1	4.5
CYBB	cytochrome b-245, beta polypeptide	4.378
FRZB	frizzled-related protein	4.262
SLC16A14	solute carrier family 16, member 14	4.017
MESDC2	mesoderm development candidate 2	4.016