

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5593502号
(P5593502)

(45) 発行日 平成26年9月24日(2014.9.24)

(24) 登録日 平成26年8月15日(2014.8.15)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53

D

請求項の数 5 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2009-549988 (P2009-549988)	(73) 特許権者	504150450
(86) (22) 出願日	平成21年1月16日(2009.1.16)		国立大学法人神戸大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2009/000143		兵庫県神戸市灘区六甲台町 1 - 1
(87) 国際公開番号	W02009/090880	(73) 特許権者	000206956
(87) 国際公開日	平成21年7月23日(2009.7.23)		大塚製薬株式会社
審査請求日	平成24年1月13日(2012.1.13)		東京都千代田区神田司町 2 丁目 9 番地
(31) 優先権主張番号	特願2008-8265 (P2008-8265)	(74) 代理人	110000084
(32) 優先日	平成20年1月17日(2008.1.17)		特許業務法人アルガ特許事務所
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ケマリン濃度の測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

糖尿病を診断する目的で、血液、血清又は血漿中のケマリン濃度を測定する方法。

【請求項 2】

ケマリン濃度の測定が、免疫学的方法による測定である請求項 1 記載の測定方法。

【請求項 3】

糖尿病が 2 型糖尿病である請求項 1 又は 2 記載の測定方法。

【請求項 4】

糖尿病の診断が、糖尿病自体の診断及び / 又は糖尿病治療経過の診断である請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の測定方法。

【請求項 5】

血液、血清又は血漿中のケマリン濃度測定試薬を含有する糖尿病診断剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、糖尿病の新たな診断方法に関する。

【背景技術】

【0002】

糖尿病は、糖代謝異常疾患であり、その患者数は全世界で 2 億人に達すると予想されている。糖尿病は、大きく 1 型と 2 型に分類されている。1 型糖尿病はインスリン依存型糖

尿病ともいい、膵臓のランゲルハンス島でインスリンを分泌しているβ細胞が死滅するために、インスリンの分泌が低下するために血中の糖が異常に増加する疾患である。1型糖尿病の治療は、インスリンの補充により行われる。

【0003】

一方2型糖尿病は、インスリン非依存型であり、インスリン分泌低下とインスリン感受性低下を原因とする。2型糖尿病の発症には、肥満、過食、運動不足、ストレス等が大きく関与するといわれており、一般食事療法と運動療法が基本となる。しかし、2型糖尿病の発症原因は未だ完全に解明されているとはいえないため、早期発見、早期治療が重要であるが、早期発見ができないのが現状である。

【0004】

このような現状から、糖尿病、特に2型糖尿病の診断は重要であり、新たな診断手段の開発が望まれている。

【0005】

一方、ケマリン (Chemerin) は、1997年にTIG2 (Tazarotene-induced gene 2) として線維芽細胞において、レチノイン酸によって誘導されてくる遺伝子として報告されたが、その機能や構造の詳細については不明であった。その後、Orphan G protein coupled receptorとしてクローニングされていたChemR23がTIG2をリガンドとしていることが報告された。TIG2は21~157アミノ酸残基に活性を持ち、この活性部分がケマリンと命名された (非特許文献1~3)。

しかし、このケマリンと糖尿病との関連性についての報告はない。

【非特許文献1】J. Invest. Dermatol. 1997; 109 (1): 91 - 95

【非特許文献2】J. Exp. Med. 2003; 198 (7): 977 - 985

【非特許文献3】FEBS Lett. 2003; 555 (3): 495 - 499

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的は、新たな糖尿病診断手段、特に2型糖尿病の診断手段を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

そこで本発明者等は、機能が明確になっていないケマリンの血中濃度を測定し、種々の疾患との関係について検討したところ、ケマリン濃度と2型糖尿病とが有意な相関関係を有し、ケマリン濃度を測定すれば、糖尿病が診断できることを見出し、本発明を完成した。

【0008】

すなわち、本発明は、試料中のケマリン濃度を測定することを特徴とする糖尿病の診断方法を提供するものである。

また本発明は、ケマリン濃度測定試薬を含有する糖尿病診断剤を提供するものである。

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、糖尿病、特に2型糖尿病の診断又は判定が可能になる。従って、2型糖尿病の早期発見により、早期治療が可能になる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】3T3L1細胞におけるケマリンの発現 (ノザンプロットティング) を示す。ACがケマリンである。

【図2】マウス組織におけるノザンプロットティング結果を示す。ACがケマリンである。

【図3】3T3L1脂肪細胞培養上清中の抗ケマリン抗体によるイムノプロットティング結

10

20

30

40

50

果を示す。図3中、mAC1はマウスケマリンであり、rhAC1はリコンビナントヒトケマリンである。

【図4】固相抗体としてD0101を用い、標識抗体としてPoAb及びD0102をそれぞれ用いたELISA系にて、血清を測定した結果を示す。

【図5】固相抗体としてD0101を用い、標識抗体としてPoAb及びD0102をそれぞれ用いたELISA系にて、血漿を測定した結果を示す。

【図6】ゲル濾過精製した血清におけるELISA結果(Superdex200 Φ1.0cm×60cm)を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

10

本発明者らは、脂肪細胞を用いて脂肪分化とともに発現が増強する分泌蛋白をコードする遺伝子としてケマリンを同定した。ケマリンは、ノザンブロッティングにより脂肪分化とともに強く発現することを見出した。また、ケマリンは肝臓及び脂肪組織で強く発現しており、脂肪細胞の培養上清中に分泌されていることから、脂肪細胞から分泌されるアディポカインのひとつであることを明らかにした。

【0012】

本発明において測定とは、定量的又は非定量的な測定を含み、例えば、非定量的な測定としては、単にケマリンが存在するか否かの測定、ケマリンが一定の量以上存在するか否かの測定、ケマリンの量を他の試料(例えば、コントロール試料など)と比較する測定などを挙げることができる。定量的な測定としては、ケマリンの濃度の測定、ケマリンの量

20

【0013】

試料とは、ケマリンが含まれる可能性のある試料であれば特に制限されないが、哺乳類などの生物の体から採取された試料が好ましく、さらに好ましくはヒトから採取された試料である。試料の具体的な例としては、例えば、血液、間質液、血漿、血管外液、脳脊髄液、滑液、胸膜液、血清、リンパ液、唾液、尿、腸組織などを挙げることができるが、好ましいのは血液、血清、血漿である。

【0014】

患者より試料を採取し、試料のケマリン濃度を測定し、健常人のケマリン濃度の分布より求められた基準値と比較して高値であれば糖尿病と診断できる。

30

【0015】

本発明方法においては、ケマリン濃度の測定は、抗ケマリン抗体を用いる免疫学的測定法が好ましい。以下、抗ケマリン抗体を用いた測定法について詳細に説明する。

【0016】

本発明で用いられる抗ケマリン抗体はケマリンに特異的に結合すればよい。抗体の由来、種類(モノクローナル、ポリクローナル)及び形状を問わない。具体的には、マウス抗体、ラット抗体、ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト型化抗体などの公知の抗体を用いることができる。抗体はポリクローナル抗体でもよいが、モノクローナル抗体であることが好ましい。

【0017】

40

また、免疫学的測定法において支持体に固定される抗ケマリン抗体と標識物質で標識される抗ケマリン抗体はケマリン分子の同じエピトープを認識してもよいし、異なるエピトープを認識してもよい。

【0018】

本発明で使用される抗ケマリン抗体は、公知の手段を用いてポリクローナル又はモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗ケマリン抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマにより産生されるもの、及び遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものを含む。

【0019】

50

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、ケマリンを感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

【 0 0 2 0 】

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。

まず、抗体取得の感作抗原として使用されるケマリンを、入手可能な細胞の培養上清から精製して得る。

次に、この精製ケマリンを感作抗原として用いる。

10

【 0 0 2 1 】

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、その他、ウサギ、サル等が使用される。

【 0 0 2 2 】

感作抗原の動物への免疫は公知の方法に従って行うことができる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate - Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものに所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4 ~ 21日毎に数回投与する。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。特に分子量の小さい部分ペプチドを感作抗原として用いる場合には、アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン等の担体タンパク質と結合させて免疫することが望ましい。

20

【 0 0 2 3 】

このように哺乳動物を免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を採取し、細胞融合に付されるが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

【 0 0 2 4 】

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞を用いる。このミエローマ細胞は、公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3 x 63 Ag8 . 653) (J . Immunol . (1979) 123 , 1548 - 1550)、P3 x 63 Ag8 U . 1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81 , 1 - 7)、NS - 1 (Kohler . G . and Milstein , C . Eur . J . Immunol . (1976) 6 , 511 - 519)、MPC - 11 (Margulies . D . H . et al . , Cell (1976) 8 , 405 - 415)、SP2 / 0 (Shulman , M . et al . , Nature (1978) 276 , 269 - 270)、FO (de St . Groth , S . F . et al . , J . Immunol . Methods (1980) 35 , 1 - 21)、S194 (Trowbridge , I . S . J . Exp . Med . (1978) 148 , 313 - 323)、R210 (Galfré , G . et al . , Nature (1979) 277 , 131 - 133) 等が好適に使用される。

30

40

【 0 0 2 5 】

前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には公知の方法、たとえば、ケーラーとミルSTEINらの方法 (Kohler . G . and Milstein , C . , Methods Enzymol . (1981) 73 , 3 - 46) 等に準じて行うことができる。

【 0 0 2 6 】

より具体的には、前記細胞融合は、例えば細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルス (HVJ) 等が使用され、さらに所望により融合効率を高めるためにジメチ

50

ルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

【0027】

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定することができる。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1～10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI 1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清(FCS)等の血清補液を併用することもできる。

【0028】

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め37 程度に加熱したポリエチレングリコール(PEG)(例えば平均分子量1000～6000程度)溶液を通常30～60%(w/v)の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞(ハイブリドーマ)を形成する。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去する。

【0029】

このようにして得られたハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えばHAT培養液(ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培養液)で培養することにより選択される。上記HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞(非融合細胞)が死滅するのに十分な時間(通常、数日～数週間)継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニング及び単一クローニングを行う。

【0030】

目的とする抗体のスクリーニング及び単一クローニングは、公知の抗原抗体反応に基づくスクリーニング方法で行えばよい。例えば、ポリスチレン等でできたビーズや市販の96ウェルのマイクロタイタープレート等の担体に抗原を結合させ、ハイブリドーマの培養上清と反応させ、担体を洗浄した後に酵素標識第2次抗体等を反応させることにより、培養上清中に感作抗原と反応する目的とする抗体が含まれるかどうか決定できる。目的とする抗体を産生するハイブリドーマを限界希釈法等によりクローニングすることができる。この際、抗原としては免疫に用いたものを用いればよい。

【0031】

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。当該ハイブリドーマの例としては、D0101及びD0102が挙げられる。これらのハイブリドーマは、2008年12月9日に(独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(日本国 〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に、D0101をFERM ABP-11069として、D0102をFERM ABP-11070としてそれぞれ寄託した。

【0032】

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法に従い培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

【0033】

また、これらの抗体は、ケマリン遺伝子によってコードされる蛋白質の全長又は一部を認識する特性を失わない限り、抗体断片(フラグメント)等の低分子化抗体や抗体の修飾物などであってもよい。抗体断片の具体例としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Diabodyなどを挙げることができる。このような抗体断片を得るには、ペプシンやパインによりIgGのFc部分を消化する方法や、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現さ

10

20

30

40

50

せればよい(例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968 - 2976; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476 - 496; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497 - 515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652 - 663; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663 - 669; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132 - 137 参照)。

【0034】

前記のように産生された抗体は、細胞、宿主動物から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用する抗体の分離、精製はアフィニティークラムを用いて行うことができる。例えば、プロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D、POROS、Sepharose F.F. (GEヘルスケア社製)等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、上記アフィニティークラム以外のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせることにより、抗体を分離、精製することができる(Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

【0035】

試料に含まれるケマリンの検出方法は特に限定されないが、抗ケマリン抗体を用いた免疫学的方法により検出することが好ましい。免疫学的方法としては、例えば、ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、発光イムノアッセイ、免疫沈降法、免疫比濁法、ウエスタンブロット、免疫染色、免疫拡散法などを挙げることができるが、好ましくはエンザイムイムノアッセイであり、特に好ましいのは酵素結合免疫吸着定量法(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)(例えば、sandwich ELISA)である。ELISAなどの上述した免疫学的方法は当業者に公知の方法により行うことが可能である。

【0036】

これらの免疫学的測定にあたっては、固相化抗体及び標識抗体の両方又はいずれか一方にモノクローナル抗体を用いるのが好ましい。両方にモノクローナル抗体を用いる場合は、それぞれ異なる部位を認識するモノクローナル抗体を組み合わせる用いるのが望ましい。一方にモノクローナル抗体を使用し、他方にポリクローナル抗体を使用することもできる。このような測定系に用いられるモノクローナル抗体としては、前記ハイブリドーマD0101又はD0102が産生するモノクローナル抗体が特に好ましい。さらに固相化抗体としてD0101又はポリクローナル抗体を用い、標識抗体としてD0102を用いた測定系は、検出感度が高く特に好ましい。

【0037】

抗ケマリン抗体を用いた一般的な検出方法としては、例えば、抗ケマリン抗体を支持体に固定し、ここに試料を加え、インキュベーションを行い抗ケマリン抗体とケマリンを結合させた後に洗浄して、抗ケマリン抗体を介して支持体に結合したケマリンを検出することにより、試料中のケマリンの検出を行う方法を挙げることができる。

【0038】

本発明において用いられる支持体としては、例えば、アガロース、セルロースなどの不溶性の多糖類、シリコーン樹脂、ポリスチレン樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、ナイロン樹脂、ポリカーボネイト樹脂などの合成樹脂や、ガラスなどの不溶性の支持体を挙げることができる。これらの支持体は、ビーズやプレートなどの形状で用いることが可能である。ビーズの場合、これらが充填されたカラムなどを用いることができる。プレートの場合、マルチウェルプレート(96穴マルチウェルプレート等)、やバイオセンサーチップな

どを用いることができる。抗ケマリン抗体と支持体との結合は、化学結合や物理的な吸着などの通常用いられる方法により結合することができる。これらの支持体はすべて市販のものを用いることができる。

【0039】

抗ケマリン抗体とケマリンとの結合は、通常、緩衝液中で行われる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、Tris緩衝液、クエン酸緩衝液、ホウ酸塩緩衝液、炭酸塩緩衝液、などが使用される。また、インキュベーションの条件としては、すでによく用いられている条件、例えば、4 ~ 室温にて1時間 ~ 24時間のインキュベーションが行われる。インキュベート後の洗浄は、ケマリンと抗ケマリン抗体の結合を妨げないものであれば何でもよく、例えば、Tween 20等の界面活性剤を含む緩衝液などが使用される。

10

【0040】

本発明のケマリン測定方法においては、ケマリンを検出したい試料の他に、コントロール試料を設置してもよい。コントロール試料としては、ケマリンを含まない陰性コントロール試料やケマリンを含む陽性コントロール試料などがある。この場合、ケマリンを含まない陰性コントロール試料で得られた結果、ケマリンを含む陽性コントロール試料で得られた結果と比較することにより、試料中のケマリンを検出することが可能である。また、濃度を段階的に変化させた一連のコントロール試料を調製し、各コントロール試料に対する検出結果を数値として得て、標準曲線を作成し、試料の数値から標準曲線に基づいて、試料に含まれるケマリンを定量的に検出することも可能である。

【0041】

20

抗ケマリン抗体を介して支持体に結合したケマリンの測定の好ましい態様として、標識物質で標識された抗ケマリン抗体を用いる方法を挙げることができる。

例えば、支持体に固定された抗ケマリン抗体に試料を接触させ、洗浄後に、ケマリンを特異的に認識する標識抗体を用いて検出する。

【0042】

抗ケマリン抗体の標識は通常知られている方法により行うことが可能である。標識物質としては、蛍光色素、酵素、補酵素、化学発光物質、放射性物質などの当業者に公知の標識物質を用いることが可能であり、具体的な例としては、ラジオアイソトープ (^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{131}I など)、フルオレセイン、ローダミン、ダンシルクロリド、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、ホースラディッシュパーオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、ピオチンなどを挙げることができる。標識物質としてピオチンを用いる場合には、ピオチン標識抗体を添加後に、アルカリホスファターゼなどの酵素を結合させたアビジンをさらに添加することが好ましい。標識物質と抗ケマリン抗体との結合には、グルタルアルデヒド法、マレイミド法、ピリジルジスルフィド法、過ヨウ素酸法、などの公知の方法を用いることができる。

30

【0043】

抗体の酵素標識法としては、ヒンジ法とノンヒンジ法の2つが挙げられるがこれに限定しない。ヒンジ法は、抗体IgGの抗原結合能を有するF(ab')₂部分との間のヒンジ部と呼ばれる部分にあるジルスフィド結合を還元して生成するチオール基を利用してF(ab')₂と酵素分子を結合する方法である。一方、ノンヒンジ法は、抗体のいずれの反応基を利用するかは特定しないが、多くの場合、抗体のアミノ基を利用して抗体分子と酵素分子を結合する方法である。

40

【0044】

具体的には、抗ケマリン抗体を含む溶液をプレートなどの支持体に加え、抗ケマリン抗体を支持体に固定する。プレートを洗浄後、タンパク質の非特異的な結合を防ぐため、例えばBSA、ゼラチン、アルブミンなどでブロッキングする。再び洗浄し、試料をプレートに加える。インキュベートの後、洗浄し、標識抗ケマリン抗体を加える。適度なインキュベーションの後、プレートを洗浄し、プレートに残った標識抗ケマリン抗体を検出する

50

。検出は当業者に公知の方法により行うことができ、例えば、放射性物質による標識の場合には液体シンチレーションやRIA法により検出することができる。酵素による標識の場合には基質を加え、基質の酵素的変化、例えば発色を吸光度計により検出することができる。基質の具体的な例としては、2, 2 - アジノビス (3 - エチルベンゾチアゾリン - 6 - スルホン酸) ジアンモニウム塩 (ABTS)、1, 2 - フェニレンジアミン (オルソ - フェニレンジアミン)、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン (TMB) などを挙げることができる。蛍光物質の場合には蛍光光度計により検出することができる。

【0045】

本発明のケマリン測定方法の特に好ましい態様として、抗体IgGの抗原結合能とは関係のないFc部分を除去し、一般的な酵素標識法記載の方法で標識をした抗体を用いる方法を挙げることができる。

10

【0046】

具体的には、抗ケマリン抗体を含む溶液をプレートなどの支持体に加え、抗ケマリン抗体を固定する。プレートを洗浄後、タンパク質の非特異的な結合を防ぐため、例えばBSAなどでブロッキングする。再び洗浄し、試料をプレートに加える。インキュベーションの後、洗浄し、ペルオキシダーゼ直接標識抗ケマリン抗体を加える。適度なインキュベーションの後、プレートを洗浄し、酵素に対応した基質を加え、基質の酵素的変化などを指標にケマリンを検出する。

【0047】

本発明のケマリン測定方法の他の態様として、ケマリンを特異的に認識する一次抗体を一種類以上、及び該一次抗体を特異的に認識する二次抗体を一種類以上用いる方法を挙げることができる。

20

【0048】

本発明の測定方法は、種々の自動検査装置を用いて自動化することもでき、一度に大量の試料について検査を行うことも可能である。

【0049】

本発明の診断剤は、ケマリン測定試薬を含む。ケマリン測定試薬は、前記ケマリン測定方法に必要な成分、例えば抗ケマリン抗体が含まれる。ここで診断剤には、キットも含まれる。該診断剤がELISA法に基づく場合は、抗体を固相化する担体を含んでいてもよく、抗体があらかじめ担体に結合していてもよい。該診断薬がラテックス等の担体を用いた凝集法に基づく場合は抗体が吸着した担体を含んでいてもよい。また、該診断薬は、適宜、ブロッキング溶液、反応溶液、反応停止液、試料を処理するための試薬等を含んでいてもよい。

30

【実施例】

【0050】

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ない。

【0051】

参考例 1

3T3L1脂肪細胞を用いて脂肪分化とともに発現が増強する分泌蛋白をコードする遺伝子としてディファレンシャルディスプレイ法を用いて検索しケマリンを同定した。

40

【0052】

分化誘導開始時、誘導2日後、6日後、9日後の3T3-L1脂肪細胞よりTotal RNAを抽出した。このRNA 15 µgを電気泳動し、マウスケマリン特異的プローブを用いてノザンプロットングを行ったところ、脂肪分化とともに強い発現増強を認めた(図1)。

【0053】

マウス組織より抽出したTotal RNA 15 µgを電気泳動し、マウスケマリン特異的プローブを用いてノザンプロットングによって解析したところ、肝臓に加えて脂肪組織で強い発現を認めた(図2)。

50

【0054】

3 T 3 - L 1 培養上清 10 μ L 及びリコンビナントヒトケマリン 15 ng を用いて S D S - P A G E を行い、ヒトケマリン特異的ポリクローナル抗体でイミュノブロッティングを行った。ケマリンは 3 T 3 L 1 脂肪細胞培養上清中に分泌されており（図 3）、脂肪細胞より分泌されるアディポカインのひとつであることが明らかになった。

【0055】

実施例 1

(1) リコンビナントヒトケマリン作成方法

ヒト脂肪組織 c D N A (C l o n t e c h 社製) より P C R 法によりヒトケマリン遺伝子を増幅し、発現ベクター p E T 1 4 b ベクター (N o v a g e n 社) にクローニングした。ヒトケマリン遺伝子をクローニングした p E T 1 4 b ベクターを大腸菌 B L 2 1 (D E 3) p L y s S 株 (タカラバイオ社製) に、形質転換し、リコンビナントヒトケマリンを発現する大腸菌を得た。この大腸菌を培養し、その抽出液を H i s T r a p H P カラム (G E ヘルスケアライフサイエンス社製) を用いて精製し、リコンビナントヒトケマリンを得た。

10

【0056】

(2) マウス抗リコンビナントヒトケマリンモノクローナル抗体作成法

このリコンビナントヒトケマリンを T i t e r M a x P r o (T i t e r M a x 社) と混合し、乳化後、マウスに 1 4 日毎に 5 回皮下投与した。

このマウスから脾臓を取り出し脾臓中の免疫細胞とマウスミエローマ細胞 P 3 x 6 3 A g 8 U . 1 と細胞融合した。

20

細胞融合は、ミエローマ細胞に対して、前記免疫細胞を 5 倍量となるように R P M I 1 6 4 0 培養液中でよく混合し、予め 3 7 $^{\circ}$ に加温した平均分子量 1 5 0 0 のポリエチレングリコール (P E G) を 5 0 % (w / v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) を形成した。

H A T (ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン) を含む R P M I 1 6 4 0 培地で 1 週間培養した。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニング及び単一クローニングを行った。

目的とする抗体のスクリーニング及び単一クローニングは、以下に示す方法で行った。9 6 ウェルのマイクロタイタープレートに免疫抗原として用いたリコンビナントヒトケマリンを結合させ、ハイブリドーマの培養上清と反応させ、担体を洗浄した後に西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウス I g G 抗体を反応させることにより、培養上清中にヒトケマリンと反応する抗体が含まれるかどうか決定した。目的とする抗体を産生するハイブリドーマを限界希釈法によりクローニングした。

30

このハイブリドーマを、H y b r i d o m a - S F M 培地 (I n v i t r o g e n 社製) を用いて、3 7 $^{\circ}$ 、5 % 二酸化炭素下で培養し、培養上清を回収した。この培養上清を硫酸アンモニウムによる塩析法により濃縮した。濃縮した溶液をリン酸緩衝生理食塩水で溶液交換した後、プロテイン A カラム (G E ヘルスケアバイオサイエンス社製) 及び S e p h a c r y l S - 3 0 0 ゲル濾過カラム (G E ヘルスケアバイオサイエンス社製) を用いて、マウス抗ヒトケマリンモノクローナル抗体を精製した。

40

ここで得られたハイブリドーマは、D 0 1 0 1 又は D 0 1 0 2 と命名し、2 0 0 8 年 1 2 月 9 日に (独) 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国 〒3 0 5 - 8 5 6 6 茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) に、D 0 1 0 1 を F E R M A B P - 1 1 0 6 9 として、D 0 1 0 2 を F E R M A B P - 1 1 0 7 0 としてそれぞれ寄託した。

【0057】

(3) ウサギ抗ヒトケマリンポリクローナル抗体作成法

リコンビナントヒトケマリンをフロイント完全アジュバントと混合し、乳化後、ウサギに 1 4 日毎に 5 回皮下投与した。9 6 ウェルのマイクロタイタープレートに免疫抗原として用いたリコンビナントヒトケマリンを結合させ、免疫感作したウサギから採取した抗血

50

清と反応させ、担体を洗浄した後に酵素標識抗ウサギIgG抗体を反応させることにより、抗血清中にヒトケマリンと反応する抗体が含まれることを確認した。このように血清中に抗ヒトケマリン抗体レベルが上昇するのを確認した後に、ウサギ血清を採取しプロテインAカラム（GEヘルスケアバイオサイエンス社製）及びSephacryl S-300ゲル濾過カラム（GEヘルスケアバイオサイエンス社製）を用いてウサギ抗ヒトケマリンポリクローナル抗体（PoAb）を精製した。

【0058】

（４）ケマリン濃度の測定

患者等から採取した血清を、緩衝液を用いて100倍に希釈し、希釈検体溶液とした。マウス抗ヒトケマリンモノクローナル抗体D0102を固相した96ウェルのマイクロタイタープレートに、この希釈検体溶液と予め濃度を定めたリコンビナントヒトケマリンを含む標準液を添加した後、2時間静置し溶液中のケマリンをウェル上のマウス抗ヒトケマリンモノクローナル抗体に結合させた。ウェルを洗浄後、ビオチン標識抗ヒトケマリンポリクローナル抗体液を添加した後、1時間静置した。ウェルを洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン溶液を添加した後、1時間静置した。3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン及び過酸化水素を含む基質液を加えて10分間発色させ、その吸光度を450nmで測定し、同時に測定した標準液の吸光度から検体中のヒトケマリン濃度を算出した。

【0059】

健常者172例、2型糖尿病患者170例についての血中ケマリン濃度の測定結果を表1に示した。

【0060】

【表1】

	健常者	糖尿病患者	P値
ケマリン濃度 (ng/mL)	202.6	172.0	<0.001

【0061】

表1に示したように、糖尿病患者の血中ケマリン濃度は、健常者と比較して統計的に有意に低値を示した。このことから、血中ケマリン濃度を測定することは、糖尿病診断の指標として有用である。

【0062】

実施例2

ウサギ抗ヒトケマリンポリクローナル抗体（PoAb）及びマウス抗ヒトケマリンモノクローナル抗体（D0101又はD0102）の3種類の抗体から2種類をそれぞれ組み合わせて、サンドイッチELISA測定系を構築し、リコンビナントヒトケマリンを標準品として、検出感度を比較した。

すなわち、1次反応としてリコンビナントヒトケマリンを5000pg/mLから2倍段階希釈し、あらかじめ抗体を固相したプレートに25 μ L、2時間静置にて反応させた。次いで、2次反応としてビオチン標識した各抗体1 μ g/mLとなるように調製し、25 μ L、2時間静置にて反応させた。次に3次反応として、HRP標識ストレプトアビジンをブランクにおける吸光度が0.05以下となるように調製し、25 μ L、1時間静置にて反応させた。

【0063】

【表 2】

		OD450nm (Δブランク)					
	固相抗体	PoAb	PoAb	D0101	D0102	D0101	D0102
	標識抗体	D0101	D0102	PoAb	PoAb	D0102	D0101
ケマリン (pg/mL)	5000	2.464		3.158	2.975		3.482
	2500	1.175	3.163	1.839	1.715	3.196	2.395
	1250	0.429	2.656	0.791	0.787	2.428	1.064
	625	0.162	1.602	0.294	0.295	1.534	0.390
	313	0.058	0.916	0.105	0.101	0.814	0.162
	156		0.491			0.431	0.064
	78.1		0.264			0.220	
	39.1		0.122			0.097	
	19.5		0.061			0.053	
	ブランク	0.028	0.021	0.053	0.050	0.021	0.016

10

【 0 0 6 4 】

その結果、表 2 に示すように、いずれの組み合わせでもケマリンの測定が可能であった。このうち、標識抗体として D 0 1 0 2 を用いた測定系は、ポリクローナル抗体を標識抗体とした場合に比べて 1 0 0 倍程度高感度であった。

【 0 0 6 5 】

20

実施例 3

固相抗体として D 0 1 0 1 を用い、標識抗体として P o A b 及び D 0 1 0 2 をそれぞれ用いた E L I S A 測定系にて、ヒト血漿又は血清 2 0 例をそれぞれ測定した。その結果、R 0 . 6 以上の良好な相関を示した (図 4 及び図 5)。

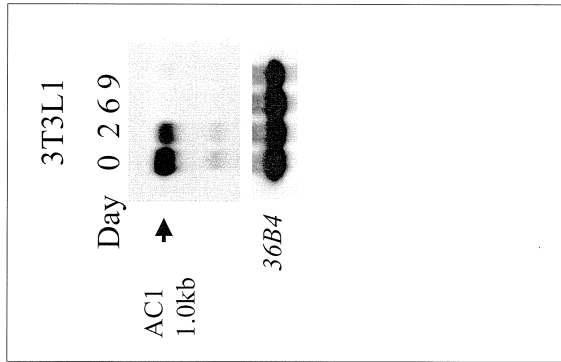
モノクローナル抗体測定系 / 評価キットの回帰直線の傾きが 1 . 7 7 ~ 2 . 0 4 となり、モノクローナル抗体測定系において高値になる傾向が見られた。

【 0 0 6 6 】

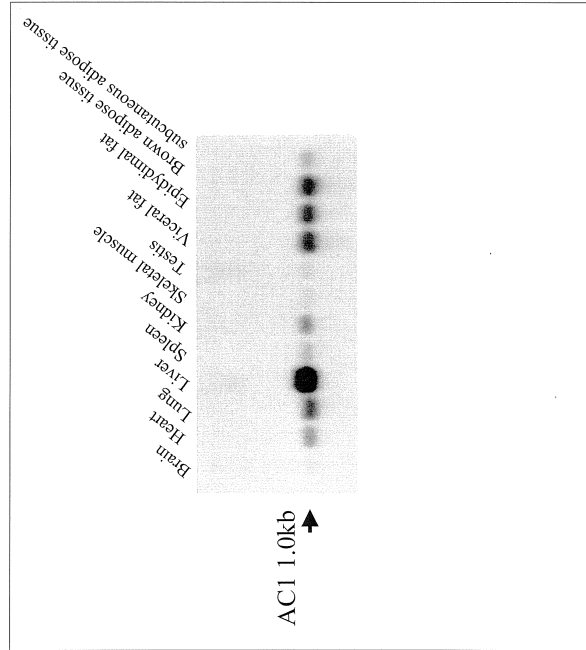
固相抗体として D 0 1 0 1 を用い、標識抗体として P o A b 及び D 0 1 0 2 をそれぞれ用いた E L I S A 測定系にて、ヒト P o o l 血清をゲル濾過したフラクションを測定した結果、両測定系は、ほぼ同一のフラクションを認識していることが判明した (図 6)。

30

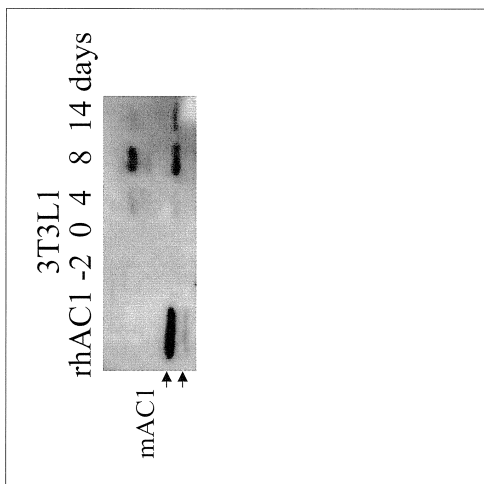
【 図 1 】



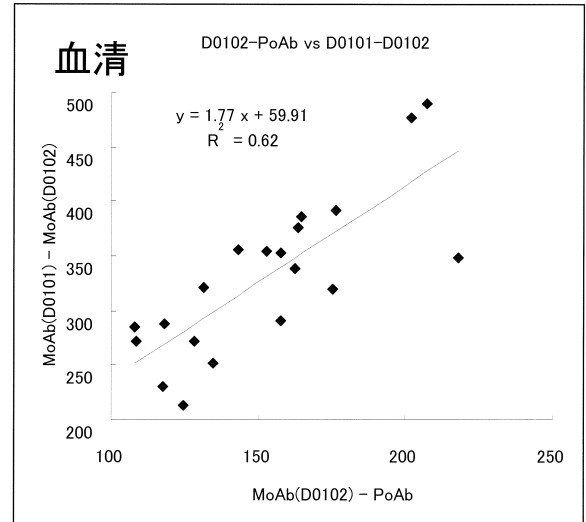
【 図 2 】



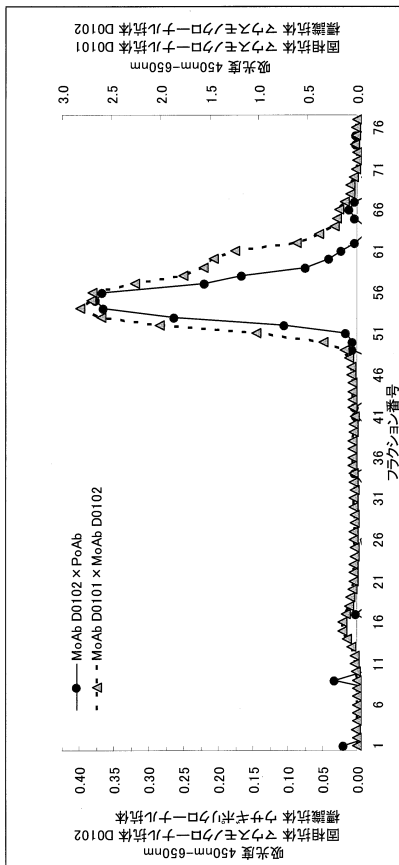
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 6 】



フロントページの続き

- (74)代理人 100117156
弁理士 村田 正樹
- (74)代理人 100111028
弁理士 山本 博人
- (72)発明者 高橋 裕
兵庫県神戸市灘区六甲台町 1 - 1 国立大学法人神戸大学内
- (72)発明者 千原 和夫
兵庫県神戸市灘区六甲台町 1 - 1 国立大学法人神戸大学内
- (72)発明者 古賀 大輔
大阪府大阪市中央区道修町 1 - 7 - 1 大塚製薬株式会社内

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 Kiymet Bozaoglu, Kristy Bolton, Janine McMillan, Paul Zimmet, Jeremy Jowett, Greg Collier, Ken Walder and David Segal, Chemerin is a Novel Adipokine Associated with Obesity and Metabolic Syndrome, Endocrinology, 2007, Vol.148, No.10, Page.4687-4694
- Kerry B. Goraliski, Tanya C. McCarthy, Elysha A. Hanniman, Brian A. Zabel, Eugene C. Butcher, Sebastian D. Parlee, Shanmugam Muruganandan, and Christopher J. Sinal, Chemerin, a Novel Adipokine That Regulates Adipogenesis and Adipocyte Metabolism, J. Biol. Chem., 2007, Vol.282, No.38, Page.28175-28188
- Michiko Takahashi, Yutaka Takahashi, Kenichi Takahashi, Fyodor N. Zolotaryov, Kyoung Su Hong, Riko Kitazawa, Keiji Iida, Yasuhiko Okimura, Hidesuke Kaji, Sohei Kitazawa, Masato Kasuga and Kazuo Chihara, Chemerin enhances insulin signaling and potentiates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes, FEBS Letters, 2008.03.05, Vol.582, No.5, Page.573-578

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 5 3

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A P l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)

专利名称(译)	测量凯莫瑞浓度的方法		
公开(公告)号	JP5593502B2	公开(公告)日	2014-09-24
申请号	JP2009549988	申请日	2009-01-16
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人神戸大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人神戸大学 大冢制药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人神戸大学 大冢制药有限公司		
[标]发明人	高橋裕 千原和夫 古賀大輔		
发明人	高橋 裕 千原 和夫 古賀 大輔		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2333/4703 G01N2800/042		
FI分类号	G01N33/53.D		
代理人(译)	村田正树		
审查员(译)	三木隆		
优先权	2008008265 2008-01-17 JP		
其他公开文献	JPWO2009090880A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了一种新型的糖尿病诊断剂。还公开了一种确定糖尿病发生的方法，其特征在于测量样品中的凯莫瑞水平。

	健康者	糖尿病患者	P値
ケマリン濃度 (ng/mL)	202.6	172.0	<0.001