

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-526233

(P2009-526233A)

(43) 公表日 平成21年7月16日(2009.7.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/92 (2006.01)	GO 1 N 33/92 Z	2 GO 4 1
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 W	2 GO 4 5
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62 V	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 76 頁)

(21) 出願番号 特願2008-554400 (P2008-554400)
 (86) (22) 出願日 平成19年2月9日 (2007.2.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年10月10日 (2008.10.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/003588
 (87) 国際公開番号 W02007/095126
 (87) 国際公開日 平成19年8月23日 (2007.8.23)
 (31) 優先権主張番号 60/772, 429
 (32) 優先日 平成18年2月10日 (2006.2.10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/843, 213
 (32) 優先日 平成18年9月7日 (2006.9.7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 301043487
 ザ・リージェンツ・オブ・ザ・ユニバーシ
 ティ・オブ・カリフォルニア
 The Regents of the
 University of Calif
 ornia
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9460
 7-5200・オークランド・トゥエルフ
 スフロア・フランクリンストリート 11
 11
 (74) 代理人 100064355
 弁理士 川原田 一穂

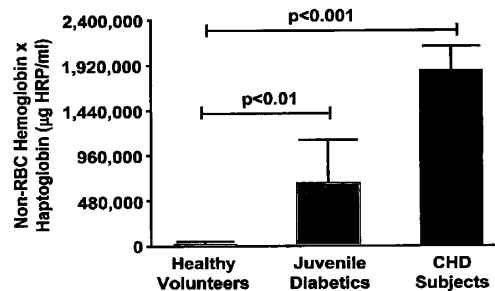
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アテローム性動脈硬化症及び異常高比重リポ蛋白質の予測用アッセイ

(57) 【要約】

本発明は異常HDLの検出用新規アッセイを提供する。前記アッセイはアテローム性動脈硬化症又は炎症反応を特徴とする他の病変の良好な診断法及び/又は予後診断法である。所定態様では、前記方法はヘム関連HDL会合蛋白質(例えばハプトグロビン、ヘモペキシン等)の測定、及び/又は血漿/血清のHDL及び非リポ蛋白質画分間のHDL会合蛋白質の相対分布の測定、及び/又は向炎症性HDLの一酸化窒素消費能の測定、及び/又はHDLのLDL凝集抑制能の測定を含む。

【選択図】 図28C



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物における向炎症性 HDL の検出又は定量方法であって、前記哺乳動物に由来し、HDL を含有する生体サンプルを準備する段階と；
m / z 比が約 9 . 3 の蛋白質、m / z 比が約 1 4 . 9 の蛋白質、m / z 比が約 1 5 . 6 の蛋白質、m / z 比が約 1 5 . 8 の蛋白質、m / z 比が約 1 6 . 2 の蛋白質、m / z 比が約 1 6 . 5 の蛋白質、m / z 比が約 1 8 . 6 の蛋白質、及び m / z 比が約 1 9 . 5 の蛋白質から構成される群から選択され、HDL と会合した 2 種以上の蛋白質を検出し、HDL と会合した前記 2 種以上の蛋白質が検出された場合に前記 HDL は向炎症性 HDL であると判定する段階を含む前記方法。

10

【請求項 2】

前記検出段階が前記蛋白質の 3 種以上を検出する段階を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記検出段階が前記蛋白質の 4 種以上を検出する段階を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記検出段階が前記蛋白質の 5 種以上を検出する段階を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記検出段階が前記蛋白質の 6 種以上を検出する段階を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記検出段階が前記蛋白質の 7 種以上を検出する段階を含む請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記検出段階が前記蛋白質の全 8 種を検出する段階を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記哺乳動物がヒトである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記哺乳動物がアテローム性動脈硬化症をもつと診断されたヒトである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記哺乳動物がアテローム性動脈硬化症の危険があると診断されたヒトである請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 11】

前記検出段階がイムノアッセイを含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

哺乳動物における向炎症性 HDL の検出又は定量方法であって、前記哺乳動物からの HDL と会合したヘム含有及び / 又はヘム結合蛋白質濃度を測定し、ヘム含有及び / 又はヘム結合蛋白質濃度が正常抗炎症性 HDL で検出されるヘム含有及び / 又はヘム結合蛋白質濃度に比較して上昇している場合に前記 HDL は向炎症性 HDL であると判定する段階を含む前記方法。

【請求項 13】

前記ヘム含有及び / 又はヘム結合蛋白質がヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、トランスフェリン、可溶性 CD 1 6 3、及びミエロペルオキシダーゼから構成される群から選択される 1 種以上の蛋白質を含む請求項 1 2 に記載の方法。

40

【請求項 14】

前記方法が HDL と会合したヘモグロビンの量を測定する段階と、HDL と会合したハプトグロビンの量を測定する段階を含む請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 15】

前記方法が HDL と会合したヘモグロビンとハプトグロビンの積を計算する段階を含む請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 16】

血漿の非リポ蛋白質画分中の同一ヘム含有及び / 又はヘム結合蛋白質の濃度を測定し、

50

血漿の非リポ蛋白質画分中のヘム含有及び／又はヘム結合蛋白質に対するHDL中のヘム含有及び／又はヘム結合蛋白質の比が正常抗炎症性HDLをもつ対象で検出される比に比較して増加している場合に前記哺乳動物からのHDLは向炎症性HDLであると判定する段階を更に含む請求項12に記載の方法。

【請求項17】

前記測定段階がイムノアッセイを含む請求項12に記載の方法。

【請求項18】

前記測定段階がELISAを含む請求項12に記載の方法。

【請求項19】

哺乳動物における向炎症性HDLの検出又は定量方法であって、
前記哺乳動物からのHDLと会合した1種以上のヘム含有及び／又はヘム結合蛋白質の濃度を測定する段階と；

10

前記哺乳動物からの血漿中の同一ヘム含有及び／又はヘム結合蛋白質の1種以上の濃度を測定し、血漿中のヘム含有及び／又はヘム結合蛋白質に対するHDL中のヘム含有及び／又はヘム結合蛋白質の比が1よりも大きい場合に前記哺乳動物からのHDLは向炎症性HDLであると判定する段階を含む前記方法。

【請求項20】

前記ヘム含有及び／又はヘム結合蛋白質がヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペクシン、トランスフェリン、可溶性CD163、及びミエロペルオキシダーゼから構成される群から選択される1種以上の蛋白質を含む請求項19に記載の方法。

20

【請求項21】

血漿中のヘム含有及び／又はヘム結合蛋白質に対するHDL中のヘム含有及び／又はヘム結合蛋白質の比が前記蛋白質の2種以上で1よりも大きい場合に前記哺乳動物からのHDLは向炎症性HDLであると判定する請求項19に記載の方法。

【請求項22】

血漿中のヘム含有及び／又はヘム結合蛋白質に対するHDL中のヘム含有及び／又はヘム結合蛋白質の比が前記蛋白質の3種以上で1よりも大きい場合に前記哺乳動物からのHDLは向炎症性HDLであると判定する請求項19に記載の方法。

【請求項23】

血漿中のヘム含有及び／又はヘム結合蛋白質に対するHDL中のヘム含有及び／又はヘム結合蛋白質の比が前記蛋白質の1種、2種、3種、又は4種で1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、及び0.2から構成される群から選択される値よりも大きい場合に前記哺乳動物からのHDLは向炎症性HDLであると判定する請求項19に記載の方法。

30

【請求項24】

哺乳動物における向炎症性HDLの検出又は定量方法であって、
前記哺乳動物からのHDLと会合したヘム濃度を測定し、HDLと会合したヘム濃度が防御性HDLと会合したヘム濃度に比較して上昇している場合に前記HDLは向炎症性HDLであると判定する段階を含む前記方法。

【請求項25】

濃度上昇が90%、95%、98%又は99%以上の信頼水準で統計的に有意である請求項24に記載の方法。

40

【請求項26】

哺乳動物における向炎症性HDLの検出又は定量方法であって、
前記哺乳動物からのHDLの鉄含量を測定し、前記HDLの鉄含量が正常抗炎症性HDLの鉄含量に比較して上昇している場合に前記哺乳動物からの前記HDLは向炎症性HDLであると判定する段階を含む前記方法。

【請求項27】

濃度上昇が90%、95%、98%又は99%以上の信頼水準で統計的に有意である請求項26に記載の方法。

50

【請求項 28】

哺乳動物における向炎症性HDLの検出又は定量方法であって、前記哺乳動物からのHDLと会合した鉄含有蛋白質濃度を測定し、前記HDLと会合した鉄含有蛋白質濃度が正常抗炎症性HDLと会合した鉄含有蛋白質濃度に比較して上昇している場合に前記哺乳動物からの前記HDLは向炎症性HDLであると判定する段階を含む前記方法。

【請求項 29】

濃度上昇が90%、95%、98%又は99%以上の信頼水準で統計的に有意である請求項28に記載の方法。

【請求項 30】

向炎症性HDLの検出又は定量方法であって、HDLの一酸化窒素消費能を測定し、HDLの一酸化窒素消費能が正常抗炎症性HDLの一酸化窒素消費能に比較して増加している場合に向炎症性HDLの存在、量又は活性を判定する段階を含む前記方法。

【請求項 31】

前記一酸化窒素を化学的に発生させる請求項30に記載の方法。

【請求項 32】

前記一酸化窒素を電子シグナルにより測定する請求項30に記載の方法。

【請求項 33】

哺乳動物における炎症反応を特徴とする病変の存在又は素因のアッセイ方法であって、請求項1から32のいずれか一項に記載のアッセイの任意1種以上を実施し、陽性試験結果を前記病変の存在又は素因の指標とする前記方法。

【請求項 34】

前記病変がアテローム性動脈硬化症、脳卒中、ハンセン病、結核、全身性紅斑性狼瘡、リウマチ性多発筋痛症、結節性多発動脈炎、強皮症、特発性肺線維症、慢性閉塞性肺疾患、喘息、アルツハイマー病、慢性腎不全、糖尿病、糖尿病網膜症、糖尿病性腎症、移植拒絶反応、移植後アテローム性動脈硬化症、虚血再灌流障害、成人呼吸器症候群、鬱血性心不全、糸球体炎、代謝症候群、多発性硬化症、敗血症症候群、鎌状赤血球症、血管性痴呆、クローン病、内皮機能不全、細動脈機能不全、エイズ、リウマチ性多発筋痛症、結節性多発動脈炎、強皮症、特発性肺線維症、冠動脈石灰化、石灰化大動脈弁狭窄症、骨粗鬆症、細菌感染症、ウイルス感染症、真菌感染症、自己免疫疾患、及び関節リウマチから構成される群から選択される請求項33に記載の方法。

【請求項 35】

炎症反応を特徴とする病変をもつヒトの治療方法であって、請求項1から32のいずれか一項に記載のアッセイの任意1種以上を実施する段階と；前記アッセイで陽性の対象に更に積極的な治療を処方する段階を含む前記方法。

【請求項 36】

哺乳動物における向炎症性HDLの検出又は定量方法であって、前記哺乳動物からのHDLをLDLと接触させる段階と、前記LDLの凝集を測定し、LDL凝集レベルが正常抗炎症性HDLと接触させたLDLの凝集に比較して上昇している場合に前記哺乳動物からのHDLは向炎症性HDLであると判定する段階を含む前記方法。

【請求項 37】

LDL凝集率を分光光度法で測定することにより前記凝集を測定する請求項36に記載の方法。

【請求項 38】

アルブミン除去カラムを使用して前記凝集を測定する請求項36に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願とのクロスリファレンス)

本願はUS N 60 / 843 , 213 (出願日2006年9月7日)及びUS N 60

10

20

30

40

50

/772, 429 (出願日2006年2月10日)の特典と優先権を主張し、言及により両出願の開示内容全体を全目的で本明細書に組込む。

【0002】

(連邦政府支援研究開発から創出された発明の権利に関する陳述)

本発明は国立衛生研究所助成番号第1RO1HL71776号及びHL30658号を助成の一部とする。米国政府は本発明に所定の権利をもつ。

【0003】

(発明の技術分野)

本発明はアテローム性動脈硬化症の診断法に関する。特に異常HDLの検出用改善型アッセイを提供する。

【背景技術】

【0004】

アテローム性動脈硬化症は大・中動脈の慢性炎症性疾患であり、西欧諸国で罹患率と死亡率の主要原因である。スタチン導入の結果、死亡率の3分の1は減少した。しかし、スタチン治療にも拘わらず、この疾患に起因する死亡率の3分の2は依然として残っている。

【0005】

低比重リポ蛋白質(LDL)の酸化はヒトアテローム性動脈硬化症の要因である(Witztum and Steinberg (2001) Trends Cardiovasc. Med., 11:93-102; Witztum and Steinberg (1991) J. Clin. Invest., 88:1785-1792)。LDLの内皮下スペース取込み及び酸化と、その後の内皮細胞と単球間の相互作用がアテローム性動脈硬化病変発症の主要プロセスである(Navabら(1996) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 16:831-842; Berlinerら(1995) Circulation 91:2488-2496)。最低限に修飾/酸化されたLDL(MM-LDL)は炎症性物質(例えばケモカイン、接着分子、及び増殖因子)を産生するように内皮細胞を誘導することが可能な生体活性分子を含む。これらの炎症性分子は単球の内皮細胞動員及び接着を促進する(Berlinerら(1995) Circulation 91:2488-2496)。数種の生体活性酸化リン脂質がMM-LDLと動物モデルのアテローム性動脈硬化病変で同定されている(Watsonら(1995) J. Clin. Invest., 95:774-782; Watsonら(1995) J. Clin. Invest., 96:2882-2891; Watsonら(1997) J. Biol. Chem., 272:13597-13607; Watsonら(1999) J. Biol. Chem., 274:24787-24798; Leitingerら(1999) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 19:1291-1298; Subbanagounderら(2000) Free Radic. Biol. Med., 28:1751-1761)。酸化-L-1-パルミトイル-2-アラキドニル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(ox-PAPC)とその3種の成分である1-パルミトイル-2-(5-オキソバレロイル)-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(POVPC)、1-パルミトイル-2-グルタロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(PGPC)及び1-パルミトイル-2-(5,6-エポキシイソプロスタンE₂)-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(PEIPC)(Watsonら(1999) J. Biol. Chem., 274:24787-24798; Leitingerら(1999) Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. (1999) 96:12010-12015; Subbanagounderら(2000) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 20:2248-2254)は単球と内皮細胞の結合を誘導し、MM-LDLによる内皮細胞の活性化に主要な役割を果たす。これらの分子の発見後、リン脂質のsn-2位の不飽和脂肪酸の酸化により形成される一連の他の酸化リン脂質が同様の生物活性をもつものとして同定されている(Berliner and Watson (2005) N. Engl. J

10

20

30

40

50

. Med . , 3 5 3 : 9 - 1 1) 。

【 0 0 0 6 】

HDLとアテローム性動脈硬化症の危険の間に負の相関があることは周知である。HDLの抗アテローム発生機能は簡単には説明できないと思われるが、その蛋白質成分に大きく依存するHDLの機能状態が冠動脈性心疾患(CHD)の重要な決定要因であることが明らかになっている(Navabら(2001)Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.,21:481-488)。パラオキシナーゼ1(PON1)、レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ(PAF-AH)、プロテインナーゼ(エラスターゼ様)、ホスホリパーゼD、アルブミン、apoJ及びapoA-IはMM-LDL形成を防止することが可能な抗アテローム発生特性をもつHDL中の蛋白質である。HDLはLDL酸化の防止に役割を果たすことが分かっている。HDLはLDLの弱い酸化を抑制し、従って、ヒト動脈壁細胞による強力な単球化学遊走性MCP-1の産生を抑制することが分かっている。

10

【 0 0 0 7 】

HDLは状況及び環境に応じて抗炎症性分子又は向炎症性分子として存在することができる。ウサギ及びヒトの急性相反応(APR)はHDLを抗炎症性形態から向炎症性形態に転換することができ、即ちHDLはLDLにより誘発される炎症に対するその防御能を低下し、その向炎症性状態では、HDLは実際にLDLにより誘発される炎症を促進する。特定理論に結び付けるものではないが、基本条件下でHDLは抗炎症性機能を果たすが、APR中に抗酸化酵素活性が低下し、apoA-Iが損傷し、HDLと会合した蛋白質の置換及び/又は交換の結果として、向炎症性HDLとなる。例えば、遺伝的にアテローム性動脈硬化症になり易いマウスにアテローム発生飼料を与えると、(遺伝的にアテローム性動脈硬化症になりにくいマウスと異なり)HDLは抗炎症性から向炎症性に転換することが示されている(Navabら(1997)J.Clin.Invest.,99:2005-2019)。その後、数件の研究が動物モデルにおける向炎症性HDLの存在と性質について報告している(Navabら(2005)Ann.Med.,37:173-178で検討されているCastellaniら(1997)J.Clin.Invest.,100:464-474)。

20

【 0 0 0 8 】

C57BL/6Jマウス(遺伝的に飼料誘発性アテローム性動脈硬化症になり易い系統)からのHDLは通常飼料を与えたマウスでは抗炎症性であったが、マウスにアテローム発生飼料を与えた場合には向炎症性であった(Shihら(1996)J.Clin.Invest.,97:1630-1639)。他方、アテローム性動脈硬化症になりにくいC3H/HeJ(C3H)マウスからのHDLはマウスに通常飼料又はアテローム発生飼料のどちらを与えたかに関係なく、抗炎症性であった(前出)。今日までに試験されているマウスモデルでマクロファージリッチ病変をもつアテローム性動脈硬化症を発症する全マウスモデルは向炎症性HDLをもつ。これらのマウスとしては、アテローム発生飼料を与えたC57BL/6Jマウス(前出)、通常飼料でapoA-IIを過剰発現するトランスジェニックマウス(Castellaniら(1997)J.Clin.Invest.,100:464-474)、アテローム発生飼料を与えたPON1ヌルマウス(前出)、apoEヌルマウス(Navabら(1997)J.Clin.Invest.,99:2005-2019)、通常飼料を与えたapoEヌルマウスとPON1ヌルマウス(Castellaniら(1997)J.Clin.Invest.,100:464-474)、高脂肪飼料を与えたLDL受容体(LDLR)ヌルマウス(Navabら(1997)J.Clin.Invest.,99:2005-2019)、及びsPLA₂を過剰発現するトランスジェニックマウス(Leitingerら(1999)Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.,19:1291-1298)が挙げられる。いずれも高脂血症であるが、いずれもアテローム性動脈硬化症を発症しない遺伝的に特異なマウスモデルでは、HDLは抗炎症性であることが分かった(N

30

40

50

avabら(2005) Ann. Med., 37: 173 - 178)。他方、いずれもマクロファージリッチ病変を特徴とするアテローム性動脈硬化症を発症した他の7種のマウスモデルは向炎症性HDLをもち(前出)、HDL機能の抗又は向炎症性はアテローム性動脈硬化症の有無の指標としてHDLコレステロール濃度よりも高感度の指標となると予想される。HDLの品質と機能は新規治療法を開発するための魅力的なターゲットとなっている(Castellaniら(1997) J. Clin. Invest., 100: 464 - 474; Navabら(2005) Ann. Med., 37: 173 - 178; Ridker(2002) Circulation, 105: 2 - 4; Ansellら(2003) Circulation, 108: 2751 - 2756)。

【0009】

多数の蛋白質及び酵素活性がHDLに関連付けられているが、どの特定蛋白質プロファイルが向炎症性HDLと関係があるかについては殆ど分かっていない。

【非特許文献1】Witztum and Steinberg(2001) Trends Cardiovasc. Med., 11: 93 - 102

【非特許文献2】Witztum and Steinberg(1991) J. Clin. Invest., 88: 1785 - 1792

【非特許文献3】Navabら(1996) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 16: 831 - 842

【非特許文献4】Berlinerら(1995) Circulation 91: 2488 - 2496

【非特許文献5】Watsonら(1995) J. Clin. Invest., 95: 774 - 782

【非特許文献6】Watsonら(1995) J. Clin. Invest., 96: 2882 - 2891

【非特許文献7】Watsonら(1997) J. Biol. Chem., 272: 13597 - 13607

【非特許文献8】Watsonら(1999) J. Biol. Chem., 274: 24787 - 24798

【非特許文献9】Leitingerら(1999) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 19: 1291 - 1298

【非特許文献10】Subbanagounderら(2000) Free Radic. Biol. Med., 28: 1751 - 1761

【非特許文献11】Leitingerら(1999) Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A. (1999) 96: 12010 - 12015

【非特許文献12】Subbanagounderら(2000) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 20: 2248 - 2254

【非特許文献13】Berliner and Watson(2005) N. Engl. J. Med., 353: 9 - 11

【非特許文献14】Navabら(2001) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 21: 481 - 488

【非特許文献15】Navabら(1997) J. Clin. Invest., 99: 2005 - 2019

【非特許文献16】Navabら(2005) Ann. Med., 37: 173 - 178

【非特許文献17】Castellaniら(1997) J. Clin. Invest., 100: 464 - 474

【非特許文献18】Shihら(1996) J. Clin. Invest., 97: 1630 - 1639

【非特許文献19】Ridker(2002) Circulation, 105: 2 - 4

【非特許文献20】Ansellら(2003) Circulation, 108: 2751 - 2756

10

20

30

40

50

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

HDLの品質と機能の測定はアテローム性動脈硬化イベントの危険のある者の検出を改善し、新型且つ新規な治療法を開発するために不可欠である。異常HDLの現在の試験はHDLの各種パラメーター及び成分を測定しており、比較的面倒で費用がかかる。

【0011】

本発明は異常HDLを予測するための簡単な新型アッセイを提供する。

【課題を解決するための手段】

【0012】

所定態様において、本発明は向炎症性HDLを正常/抗炎症性HDLから区別する蛋白質プロファイルの同定に関する。従って、アテローム性動脈硬化症、炎症反応を特徴とする他の病変の存在及び/又は素因を早期検出するためのバイオマーカーを提供し、ひいては新規治療介入ストラテジーを提供する。

【0013】

各種態様では、アッセイはヘム関連HDL会合蛋白質（例えばハプトグロビン、ヘモペキシン等）の測定、及び/又は血漿/血清のHDL及び非リポ蛋白質画分間のHDL会合蛋白質の相対分布の測定、及び/又は向炎症性HDLの一酸化窒素消費能の測定、及び/又はHDLのLDL凝集抑制能の測定を含む。

【0014】

所定態様では、本発明は哺乳動物における向炎症性HDLの検出又は定量方法を提供する。前記方法は一般に、哺乳動物に由来し、HDLを含有する生体サンプルを準備する段階と；m/z比が約9.3の蛋白質、m/z比が約14.9の蛋白質、m/z比が約15.6の蛋白質、m/z比が約15.8の蛋白質、m/z比が約16.2の蛋白質、m/z比が約16.5の蛋白質、m/z比が約18.6の蛋白質、及びm/z比が約19.5の蛋白質から構成される群から選択され、HDLと会合した2種以上、3種以上、4種以上、5種以上、6種以上、7種以上又は8種の異なる蛋白質を検出し、HDLと会合した2種以上の蛋白質が検出された場合にHDLは向炎症性HDLであると判定する段階を含む。所定態様では、哺乳動物は非ヒト哺乳動物又はヒト（例えばアテローム性動脈硬化症をもつと診断されたヒト、アテローム性動脈硬化症の危険があると診断されたヒト、炎症反応を特徴とする別の病変をもつと診断されたヒト、又は前記病変の危険があると診断されたヒト）である。

【0015】

所定態様では、哺乳動物における向炎症性HDLの検出又は定量方法を提供する。前記方法は一般に、哺乳動物からのHDLと会合したヘム含有及び/又はヘム結合蛋白質濃度を測定し、ヘム含有及び/又はヘム結合蛋白質濃度が正常抗炎症性HDLで検出されるヘム含有及び/又はヘム結合蛋白質濃度に比較して上昇している場合にHDLは向炎症性HDLであると判定する段階を含む。所定態様では、ヘム含有及び/又はヘム結合蛋白質はヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、トランスフェリン、可溶性CD163、及びミエロペルオキシダーゼから構成される群から選択される1種以上の蛋白質を含む。所定態様では、前記方法はHDLと会合したヘモグロビンの量を測定する段階と、HDLと会合したハプトグロビンの量を測定する段階を含む。所定態様では、前記方法はHDLと会合したヘモグロビンとハプトグロビンの積を計算する段階を含む。所定態様では、前記方法は血漿の非リポ蛋白質画分中の同一ヘム含有及び/又はヘム結合蛋白質濃度を測定し、血漿の非リポ蛋白質画分中のヘム含有及び/又はヘム結合蛋白質に対するHDL中のヘム含有及び/又はヘム結合蛋白質の比が正常抗炎症性HDLをもつ対象で検出される比に比較して増加している場合に前記哺乳動物からのHDLは向炎症性HDLであると判定する段階を含む。

【0016】

更に哺乳動物における向炎症性HDLの検出又は定量方法を提供する。各種態様では、

10

20

30

40

50

前記方法は哺乳動物からのHDLと会合した1種以上のヘム含有及び/又はヘム結合蛋白質の濃度を測定する段階と;哺乳動物からの血漿(又は血清)中の同一ヘム含有及び/又はヘム結合蛋白質の1種以上の濃度を測定し、血漿中のヘム含有及び/又はヘム結合蛋白質に対するHDL中のヘム含有及び/又はヘム結合蛋白質の比が1よりも大きい場合に前記哺乳動物からのHDLは向炎症性HDLであると判定する段階を含む。所定態様では、ヘム含有及び/又はヘム結合蛋白質はヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、トランスフェリン、可溶性CD163、及びミエロペルオキシダーゼから構成される群から選択される1種以上の蛋白質を含む。所定態様では、ヘム含有及び/又はヘム結合蛋白質はハプトグロビンとヘモペキシンを含む。所定態様では、血漿中のヘム含有及び/又はヘム結合蛋白質に対するHDL中のヘム含有及び/又はヘム結合蛋白質の比が前記蛋白質の2種以上、3種以上、4種以上、5種以上又は6種で1よりも大きい場合に前記哺乳動物からのHDLは向炎症性HDLであると判定する。所定態様では、血漿中のヘム含有及び/又はヘム結合蛋白質に対するHDL中のヘム含有及び/又はヘム結合蛋白質の比が前記蛋白質の1種、2種、3種、4種、5種、又は6種で1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、及び0.2から構成される群から選択される値よりも大きい場合に前記哺乳動物からのHDLは向炎症性HDLであると判定する。

10

【0017】

更に哺乳動物における向炎症性HDLの検出又は定量方法を提供する。前記方法は一般に、哺乳動物からのHDLと会合したヘム濃度を測定し、HDLと会合したヘム濃度が防御性HDLと会合したヘム濃度に比較して上昇している場合にHDLは向炎症性HDLであると判定する段階を含む。所定態様では、濃度上昇は90%、95%、98%又は99%以上の信頼水準で統計的に有意である。

20

【0018】

所定態様では、哺乳動物における向炎症性HDLの検出又は定量方法として、哺乳動物からのHDLの鉄含量を測定し、HDLの鉄含量が正常抗炎症性HDLの鉄含量に比較して上昇している場合に哺乳動物からのHDLは向炎症性HDLであると判定する段階を含む方法を提供する。所定態様では、濃度上昇は90%、95%、98%又は99%以上の信頼水準で統計的に有意である。

【0019】

各種態様では、哺乳動物における向炎症性HDLの検出又は定量方法を提供する。前記方法は一般に、哺乳動物からのHDLと会合した鉄含有蛋白質濃度を測定し、HDLと会合した鉄含有蛋白質濃度が正常抗炎症性HDLと会合した鉄含有蛋白質濃度に比較して上昇している場合に哺乳動物からのHDLは向炎症性HDLであると判定する段階を含む。所定態様では、濃度上昇は90%、95%、98%又は99%以上の信頼水準で統計的に有意である。

30

【0020】

向炎症性HDLを検出又は定量するための一酸化窒素アッセイの使用方も提供する。前記方法は一般に、HDLの一酸化窒素消費能を測定し、HDLの一酸化窒素消費能が正常抗炎症性HDLの一酸化窒素消費能に比較して増加している場合に向炎症性HDLの存在、量又は活性を判定する段階を含む。所定態様では、一酸化窒素を化学的に発生させる。所定態様では、一酸化窒素を電子シグナルにより測定する。

40

【0021】

哺乳動物における向炎症性HDLの検出又は定量用凝集アッセイも提供する。これらのアッセイは一般に、哺乳動物からのHDLをLDLと接触させる段階と、LDLの凝集を測定し、LDL凝集レベルが正常抗炎症性HDLと接触させたLDLの凝集に比較して上昇している場合に哺乳動物からのHDLは向炎症性HDLであると判定する段階を含む。所定態様では、LDL凝集率を分光光度法で測定することにより凝集を測定する。所定態様では、アルブミン除去カラムを使用して凝集を測定する。

【0022】

所定態様では、哺乳動物における炎症反応を特徴とする病変の存在又は素因のアッセイ

50

方法を提供する。前記方法は一般に、本明細書に記載するアッセイの任意1種以上を実施し、陽性試験結果を前記病変の存在又は素因の指標とする段階を含む。各種態様では、病変はアテローム性動脈硬化症、脳卒中、ハンセン病、結核、全身性紅斑性狼瘡、リウマチ性多発筋痛症、結節性多発動脈炎、強皮症、特発性肺線維症、慢性閉塞性肺疾患、喘息、アルツハイマー病、慢性腎不全、糖尿病、糖尿病網膜症、糖尿病性腎症、移植拒絶反応、移植後アテローム性動脈硬化症、虚血再灌流障害、成人呼吸器症候群、鬱血性心不全、糸球体炎、代謝症候群、多発性硬化症、敗血症症候群、鎌状赤血球症、血管性痴呆、クローン病、内皮機能不全、細動脈機能不全、エイズ、リウマチ性多発筋痛症、結節性多発動脈炎、強皮症、特発性肺線維症、冠動脈石灰化、石灰化大動脈弁狭窄症、骨粗鬆症、細菌感染症、ウイルス感染症、真菌感染症、自己免疫疾患、及び関節リウマチから構成される群から選択される。

10

【0023】

所定態様では、本明細書に記載するアッセイは非ヒト哺乳動物又はヒト（例えばアテローム性動脈硬化症をもつと診断されたヒト、アテローム性動脈硬化症の危険があると診断されたヒト、炎症反応を特徴とする別の病変をもつと診断されたヒト、又は前記病変の危険があると診断されたヒト）に由来するサンプルで実施する。

【0024】

所定態様では、本明細書に記載するアッセイで検出及び/又は定量する蛋白質はイムノアッセイ（例えばELISA）を使用して検出及び/又は定量する。

【0025】

炎症反応を特徴とする病変をもつヒト又は非ヒト哺乳動物の治療方法も提供する。前記方法は一般に、本明細書に記載するアッセイの任意1種以上を実施する段階と、アッセイで陽性の対象に更に積極的な治療（例えばスタチン、及び/又は言及により全目的で本明細書に組込む米国特許第7,166,578号、7,148,197号、7,144,862号、6,933,279号、6,930,085号、及び6,664,230号に記載の治療剤の投与）を処方する段階を含む。

20

【0026】

（定義）

本明細書では以下の略語を使用する場合がある。APR, 急性相反応; CAD, 冠動脈性疾患; HDL-C, HDLコレステロール; MM-LDL, 最低限に修飾/酸化されたLDL; PON, パラオキシナーゼ; ApoA1, アポリポ蛋白質A1; apoE, アポリポ蛋白質E; CM10, 弱カチオンチップ; CVD, 心臓血管疾患; CHD, 冠動脈性心疾患; FPLC, 高速蛋白質液体クロマトグラフィー; Hb, ヘモグロビン; Hb-, ヘモグロビン鎖; Hb-, ヘモグロビン鎖; Hp, ハプトグロビン; Hx, ヘモペキシン; HDL, 高比重リポ蛋白質; HPLC, 高性能液体クロマトグラフィー; LDL, 低比重リポ蛋白質; LDLR, LDL受容体; metHb, メトヘモグロビン; NP20チップ, 順相チップ; oxyHb, オキシヘモグロビン; PON, パラオキシナーゼ; pHDL, HDL後画分; Q10チップ, 強アニオン交換チップ; RBC, 赤血球; SELDI, 表面増強レーザー脱離/イオン化; SELDI-TOF-MS, 表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間質量分析法; μ LC-MSMS, 微量液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法; VLDL, 超低比重リポ蛋白質。

30

40

【0027】

「イムノアッセイ」とは抗体を利用して検体（例えばハプトグロビン及び/又はヘモペキシン）と特異的に結合させるアッセイである。イムノアッセイは検体を単離、ターゲティング、及び/又は定量するために特定抗体の特異的結合特性を利用することを特徴とする。

【0028】

「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「蛋白質」なる用語は本明細書では同義に使用し、アミノ酸残基のポリマーを意味する。この用語は1個以上のアミノ酸残基が対応する天然アミノ酸の人工化学的類似体であるアミノ酸ポリマーと、天然アミノ酸ポリマーに適用

50

される。

【0029】

「アテローム性動脈硬化症の1種以上の症状を改善」に関して使用する場合の「改善」なる用語はアテローム性動脈硬化症及び/又は関連病変に特徴的な1種以上の症状の緩和、予防、又は除去を意味する。このような緩和としては限定されないが、酸化リン脂質の低減又は除去、アテローム斑形成及び破裂の低減、心臓発作、狭心症又は脳卒中等の臨床イベントの低減、高血圧の低下、炎症性蛋白質生合成の低下、血漿コレステロールの低減等が挙げられる。

【0030】

「低比重リポ蛋白質」ないし「LDL」なる用語は当業者の通常の使用法に従って定義される。一般に、LDLとは超遠心により単離した場合に $d = 1.019 \sim d = 1.063$ の密度範囲に存在する脂質-蛋白質複合体を意味する。

10

【0031】

「高比重リポ蛋白質」ないし「HDL」なる用語は当業者の通常の使用法に従って定義される。一般に、「HDL」とは超遠心により単離した場合に $d = 1.063 \sim d = 1.21$ の密度範囲に存在する脂質-蛋白質複合体を意味する。

【0032】

「I群HDL」ないし「防御性HDL」ないし「正常抗炎症性HDL」なる用語は(例えば低比重リポ蛋白質中の)酸化脂質を低減するか又は酸化剤による酸化から脂質を防御する高比重リポ蛋白質又はその成分(例えば apo A-I、パラオキシナーゼ、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ等)を意味する。

20

【0033】

「異常HDL」なる用語は脂質を酸化から防御するか又は酸化脂質を修復する(例えば低減する)活性が低下又は喪失しており、これらの酸化脂質の炎症帰結を防止することが実質的にできないHDLを意味する。

【0034】

「HDL成分」なる用語は高比重リポ蛋白質(HDL)を含有する成分(例えば分子)を意味する。脂質を酸化から防御するか又は修復する(例えば酸化脂質を低減する)HDLのアッセイとしては、このような活性を示すHDL成分(例えば apo A-I、パラオキシナーゼ、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ等)のアッセイが挙げられる。

30

【0035】

「ヘモペキシン」又は「ハプトグロビン」とは夫々全長天然ヘモペキシン又はハプトグロビン、あるいはヘモペキシン又はハプトグロビンの代用マーカー(例えばヘモペキシン又はハプトグロビンフラグメント、アイソザイム等)であって、マーカーの検出/定量により全長分子の量/濃度を測定できるものを意味する。

【0036】

「抗体」なる用語は検体(抗原)と特異的に結合してこれを認識する1個以上の免疫グロブリン遺伝子又はそのフラグメントにより実質的にコードされるポリペプチドを意味する。認識される免疫グロブリン遺伝子としては、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ 、及び μ 定常領域遺伝子に加え、無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。軽鎖は κ 又は λ として分類される。重鎖は μ 、 δ 、 ϵ 、又は γ として分類され、夫々免疫グロブリンクラス Ig G、Ig M、Ig A、Ig D及びIg Eを規定する。典型的な免疫グロブリン(抗体)構造単位は四量体からなる。各四量体は各々1本の「軽鎖」(約25 kD)と1本の「重鎖」(約50~70 kD)をもつ同一のポリペプチド鎖2対から構成される。各鎖のN末端は主に抗原認識に関与する約100~110以上のアミノ酸からなる可変領域を規定する。可変領域軽鎖(V_L)及び可変領域重鎖(V_H)なる用語は夫々これらの軽鎖と重鎖を意味する。

40

【0037】

抗体は例えば無傷の免疫グロブリン又は各種ペプチダーゼによる消化により生成された多数の十分に特性決定されたフラグメントとして存在する。従って、例えば、ペプシンは

50

ヒンジ領域のジスルフィド結合下の抗体を消化し、ジスルフィド結合により $V_H - C_H 1$ と結合した軽鎖である Fab の二量体である $F(ab)'_2$ を生成する。 $F(ab)'_2$ を穏和な条件下で還元すると、ヒンジ領域のジスルフィド結合を切断し、 $F(ab)'_2$ 二量体を Fab' 単量体に変換することができる。Fab' 単量体は本質的にヒンジ領域の部分をもつ Fab である (Fundamental Immunology, Third Edition, W. E. Paul, ed., Raven Press, N. Y. 1993 参照)。各種抗体フラグメントが無傷の抗体の消化により定義されるが、当業者に自明の通り、このようなフラグメントは化学的合成又は組換え DNA 法の使用により de novo 合成することができる。従って、本明細書で使用する抗体なる用語は無傷の抗体の修飾により生成される抗体フラグメント、組換え DNA 法を使用して de novo 合成された抗体フラグメント (例えば 1 本鎖 Fv)、及びディスプレイライブラリー (例えばファージディスプレイライブラリー) に存在する抗体フラグメントも含む。

10

【0038】

「健常対照」なる用語は症状を示さないか又は該当病態 / 病変試験に陰性のほぼ同一年齢及び同一性別の個体又は個体集団を意味する。

【0039】

「血液又は血液画分中のハプトグロビン及び / 又はヘモペキシン及び / 又は他の蛋白質濃度を検出」なる用語は血液、血液画分又は血液もしくは血液画分に由来するサンプル中のハプトグロビン及び / 又はヘモペキシン及び / 又は他の蛋白質の検出及び / 又は定量を意味する。検出は無傷のハプトグロビン及び / 又はヘモペキシン及び / 又は他の蛋白質の直接検出、及び / 又はハプトグロビン及び / 又はヘモペキシン及び / 又は他の蛋白質フラグメントの検出、アイソフォームの検出、及び / 又は該当蛋白質の他の各種代用マーカーの検出を含むことができる。

20

【0040】

「哺乳動物に由来する生体サンプルを準備」なる用語はサンプル (例えば血液サンプル) を直接採取すること又は第三者により哺乳動物から採取された生体サンプルを入手もしくは準備することを意味する。

【0041】

〔図面の簡単な説明〕

〔図 1〕HDL と会合した蛋白質のウェスタン分析を示す。ウェスタン分析の結果、アテローム発生飼料 (A) を与えた C57BL/6J マウスにおけるヘモグロビン (Hb)、ハプトグロビン (Hp)、及びヘモペキシン (Hx) と HDL の会合は通常飼料 (C) に比較して 10 倍に増加することが判明した。図面から明らかなように、これらの蛋白質は VLDL 又は LDL とは会合しなかった。

30

【0042】

〔図 2〕ApoE ヌルマウス HDL が通常飼料で向炎症性であり、経口 D-4F 投与後に抗炎症性に転換することを示す。9 カ月齢雌性 apoE ヌルマウス (n = 4 匹 / 群) に通常飼料を与え、アポリポ蛋白質 A-I 模倣ペプチド D-4F (50 μ g / mL 飲料水) の投与前 (0 日) と X 軸に示す日数間投与後に採血した。apoE ヌルマウス HDL が LDL + DCF の蛍光を阻害する能力をその炎症性の尺度として測定した。データから明らかなように、投与前に apoE ヌルマウス HDL は向炎症性であった (即ち、0 日の apoE ヌル HDL を添加すると、蛍光は LDL 単独により誘導される強度よりも増加した) が、D-4F 投与後 (1 ~ 21 日) に抗炎症性となった。

40

【0043】

〔図 3〕血清ヘモペキシン濃度が D-4F 投与後に低下することを示す。上記図 2 に記載したマウスにおける血清ヘモペキシン濃度を ELISA により測定した。

【0044】

〔図 4〕血清ハプトグロビン濃度が D-4F 投与後に低下することを示す。上記図 2 に記載したマウスにおける血清ハプトグロビン濃度を ELISA により測定した。

【0045】

50

〔図5〕D-4F投与によりa p o EヌルマウスのH D L中のハプトグロビン(H p)及びヘモペキシン(H x)が低下することを示す。図2に記載したマウスからH D Lを単離し、H p、H x、及びアポリポ蛋白質A-I(A p o A-I)含量を測定した。

【0046】

〔図6〕D-4F投与の結果、R B Cに含まれるヘモグロビンと同等の分子量でネイティブP A G Eゲル上の非R B Cヘモグロビンが増加したことを示す。図2に記載したマウス4匹の各々から投与前(0日)及び21日後(21日)に採取した血清、H D L及び赤血球(R B C)をネイティブP A G E(4~15%)ゲル上で泳動させ、ウェスタン分析によりヘモグロビンを分析した。データによると、投与前には、血清及び(H D Lと非リポ蛋白質画分を含む)H D L上清中の全ヘモグロビンは溶血R B Cからのヘモグロビンよりも有意に高い見かけの分子量でネイティブP A G Eゲル上を泳動した。しかし、D-4Fを21日間投与後には、血清及びH D L上清中のヘモグロビンの有意量が溶血R B Cからのヘモグロビンと同等の見かけの分子量でゲル上を泳動した。

10

【0047】

〔図7〕アテローム発生飼料を与えた野生型C 5 7 B L / 6 Jマウスではヘモグロビンの鎖と鎖の両者が増加したことを示す。本図は更に、通常飼料を与えたa p o Eヌルマウスでもヘモグロビンの鎖と鎖の両者の含量が増加し、両鎖は図2に記載したようなD-4F投与と共に減少したことを示す。

【0048】

〔図8〕通常飼料を7日間(D 7 C)又はアテローム発生飼料を7日間(D 7 A)もしくは15週間(W 1 5 A)与えた野生型C 5 7 B L / 6 JマウスでH D L中のオキシヘモグロビンとメトヘモグロビンの含量を測定したことを示す。通常飼料を与えたa p o Eヌルマウス(a p o E)でもオキシヘモグロビンとメトヘモグロビンの含量を測定した。図面から明らかなように、アテローム発生飼料を与えたC 5 7 B L / 6 Jマウスと通常飼料を与えたa p o EヌルマウスでH D Lと会合したヘモグロビンの大部分はオキシヘモグロビンであった。

20

【0049】

〔図9〕一酸化窒素(N Oドナー)を化学的に発生させ、通常飼料を7日間与えた野生型C 5 7 B L / 6 Jマウス(D 7 C)に由来するH D Lを添加し、電流(p A)として測定した処、消費しなかったことを示す。

30

【0050】

〔図10〕化学的に発生させた一酸化窒素(N Oドナー)にオキシヘモグロビン(H b O₂)を添加し、電流(p A)として測定した処、減衰曲線の急速な一過的低下を生じたことを示す。リン酸緩衝食塩水(P B S)を添加しても自然減衰曲線は変化しなかった。他方、アテローム発生飼料を7日間与えた野生型C 5 7 B L / 6 Jマウスに由来するH D L(D 7 A H D L - H b)を添加すると、減衰曲線は急速且つ劇的に低下し、この向炎症性H D Lは一酸化窒素を急速に消費したことが分かった。

【0051】

〔図11〕向炎症性H D L(アテローム発生飼料を7日間与えた野生型C 5 7 B L / 6 Jマウスに由来するH D L; D 7 A H D L)が一酸化窒素減衰曲線の急速且つ劇的な低下を生じ、向炎症性H D Lが一酸化窒素を急速に消費したことを示す。他方、H D L中のオキシヘモグロビン(H D L - H b O₂)をメトヘモグロビン(H D L - m e t H b)に変換するK₃F e(C N)₆でこのH D Lを処理した後にH D Lを添加すると、減衰曲線は有意に変化せず、一酸化窒素は消費されないことが分かった。

40

【0052】

〔図12〕通常飼料を7日間(左上パネル)もしくは15週間(右上パネル)、又はアテローム発生飼料を7日間(左下パネル)もしくは15週間(右下パネル)与えた野生型C 5 7 B L / 6 Jマウスの血清のウェスタン分析を使用してヘモグロビン染色した二次元ゲルを示す。各パネルの左端のレーンは各病態に由来する溶血赤血球(R B C)からのヘモグロビンを示す。

50

【 0 0 5 3 】

〔 図 1 3 〕 野生型 C 5 7 B L / 6 J マウスにアテローム発生飼料を 7 日間 (D 7 A) 又は 1 5 週間 (W 1 5 A) 与えた 図 1 2 の下段パネルを示し、ヘモグロビン染色をライトブルーで示す (グレーで再現) 。

【 0 0 5 4 】

〔 図 1 4 〕 図 1 3 に示したウェスタンブロットを剥離し、ハプトグロビンに対する抗体で再プローブした。得られた画像 (マゼンタ) を 図 1 3 の画像に重ねた。ダークブルー領域はヘモグロビンとハプトグロビンの両者が同時に局在する領域に相当する。

【 0 0 5 5 】

〔 図 1 5 〕 図 1 4 に示したウェスタンブロットを剥離し、ヘモペキシンに対する抗体で再プローブした。得られた画像 (黄色) を 図 1 4 の画像に重ねた。非常に暗い画像はヘモグロビン、ハプトグロビン、及びヘモペキシンの両者が同時に局在する領域に相当する。

10

【 0 0 5 6 】

〔 図 1 6 〕 向炎症性 H D L は L D L 凝集を抑制しないが、抗炎症性 H D L は抑制することを示す。向炎症性 H D L と N C E P A T P I I I 基準による冠動脈疾患又は等価疾患をもつ対象 (C H D 患者) 4 人と健常ボランティア (正常) 4 人に由来する H D L をホスホリパーゼ C (P L C) により誘導した L D L 凝集の抑制能について試験した。H D L を添加しない陽性対照 (L D L + P L C) の値を赤線で示す。陰性対照 (L D L 単独) の値を一番下の青線で示す。データによると、4 人の C H D 患者に由来する H D L は P L C により誘導した L D L 凝集を抑制することができなかったが、4 人の健常ボランティア (正常) に由来する H D L は P L C により誘導した L D L 凝集を有意に抑制した。

20

【 0 0 5 7 】

〔 図 1 7 〕 投与前には向炎症性 a p o E ヌル H D L はホスホリパーゼ C (P L C) により誘導した L D L 凝集を抑制しないが、D - 4 F を 2 1 日間経口投与後に H D L は抗炎症性になり、P L C により誘導した L D L 凝集を抑制することを示す。図 2 に記載したような経口 D - 4 F 投与前後の a p o E ヌル H D L について、P L C により誘導した L D L 凝集の抑制能を試験した。図 2 に示すように、投与前に H D L は向炎症性であった。図 1 7 に示すように、投与前にはこの a p o E ヌル H D L は P L C により誘導した L D L 凝集を抑制することができなかった。しかし、2 1 日間投与後に H D L は抗炎症性になり (図 2) 、図 1 7 に示すように P L C により誘導した L D L 凝集を有意に抑制した。陽性対照 (L D L + P L C (H D L 不添加)) の値と、陰性対照 i) L D L + P L C + 通常飼料を与えた正常 C 5 7 B L / 6 J マウスに由来する H D L (正常マウス H D L) 及び i i) L D L (P L C 不添加) (L D L 単独) の値も示す。

30

【 0 0 5 8 】

〔 図 1 8 〕 F P L C 分画による C 5 7 B L / 6 J マウス血清サンプルのコレステロールプロファイルを示す。マウス (n = 8) からの血清プール 5 0 0 μ l を F P L C により分画した。最初の 1 0 個の 1 m L 画分を捨て、その後の各 1 m L のコレステロール含量を分析した。C - 通常飼料 7 日間、A - アテローム発生飼料 7 日間、C C - 通常飼料 2 1 日間、A C - アテローム発生飼料 7 日間後に通常飼料 1 4 日間。

【 0 0 5 9 】

〔 図 1 9 〕 C 5 7 B L / 6 J マウス血清に由来する H D L の炎症特性を示す。H D L を H D L 試薬で単離し、反応性酸素種含量 (蛍光強度) 、パラオキシナーゼ (P O N) 活性アッセイ、コレステロール流出アッセイ (% コレステロール流出) 、及びコレステロール含量 (H D L コレステロール) について分析した。C - 通常飼料 7 日間、A - アテローム発生飼料 7 日間、A C - アテローム発生飼料 7 日間後に通常飼料 1 4 日間。* は p < 0 . 0 1 を表す。

40

【 0 0 6 0 】

〔 図 2 0 〕 アテローム性動脈硬化症の 4 種のマウスモデルに高濃度の m / z 1 4 . 9 k (ヘモグロビン 鎖) 及び m / z 1 5 . 6 k (ヘモグロビン 鎖) が存在することを示す。アテローム発生飼料 (D 7 = 7 日間 , W 1 5 = 1 5 週間) もしくは西欧型飼料を 1

50

0日間(WD)与えたC57BL/6Jマウス、又は西欧型飼料を8週間与えたLDLRヌルマウス(LDLR)、又は通常飼料を与えた12週齢apoEヌルマウス(apoE)に由来する血清サンプル(n=8)をQ10(pI<7)ProteinChipアレイでSELDI分析した。アテローム発生血清中の2個の該当SELDIピーク(m/z 14.9k及びm/z 15.6k)を通常飼料の対応する対照マウス群に由来する血清のピークと比較し、又はapoEヌルマウスの場合には通常飼料の同年齢のC57BL/6Jマウスと比較し、得られた強度を統計分析した。報告するデータは各ピークの平均増加倍率である。報告するデータはいずれもp値<0.05で統計的に有意である。なお、この分析は疎水性でpI<7.0の蛋白質と複合体を除去するQ10蛋白質チップで捕捉した蛋白質のデータである。この方法により分析したヘモグロビンはHDLと会合したヘモグロビンに相当する。

10

【0061】

〔図21〕m/z 14.9k(ヘモグロビン鎖)及びm/z 15.6k(ヘモグロビン鎖)に相当するピークのpIの測定を示す。通常飼料(C)又はアテローム発生飼料(A)を7日間(D7)又は15週間(W15)与えたC57BL/6Jマウス(n=8)に由来する個々の血清サンプルを脱塩し、アニオン交換スピンカラムと各種指定pHの緩衝液を使用して分画した。溶出した画分をカチオン交換(CM10:pI>4)又はアニオン交換(Q10:pI<4)ProteinChipアレイでSELDI分析した。14.9kと15.6kの相対強度を示す。

【0062】

〔図22〕図22、22B及び22Cは非RBCヘモグロビンとRBCヘモグロビンと比較し、血清のリポ蛋白質及び非リポ蛋白質画分間の非RBCヘモグロビンの分布を比較する。血清及びリポ蛋白質を15%SDS-PAGEにロードし、ヘモグロビンに対してイムノプロットした。通常飼料を与えたマウスから得られた溶血RBCをヘモグロビンの標準としてロードした。図22A:通常飼料(C)又はアテローム発生飼料(A)を7日間(D7)又は15週間(W15)与えたC57BL/6Jマウスに由来する血清サンプル(n=8);図22B:D7及びW15群の血清サンプルプールに由来するVLDL、LDL、HDL及びHDL後(pHDL)FPLC画分。図22C:D7-C及びD7-A血清サンプルに由来するHDL及びpHDL領域をカバーする個々のFPLC画分(画分25~40)をコレステロール(OD490)とヘム(OD410)について分析した。図22Aから明らかなように、通常飼料又はアテローム発生飼料を7又は15日間与えたマウスでは非RBCヘモグロビン総量に有意差がなかった。更に同図から明らかなように、SDS-PAGEゲル上で非RBCヘモグロビンと溶血RBCに由来するヘモグロビンの分子量は同等である。図22Bから明らかなように、アテローム発生飼料を7日間又は15週間与えると、非RBCヘモグロビンでは非リポ蛋白質画分(pHDL)からHDL画分への変化を生じた。図22Cは図24Bのデータを裏付けるものであり、通常飼料を7日間与えた後に殆どヘモグロビンはHDLと会合していないが、アテローム発生飼料を7日間与えた後にHDL画分中に実質的なヘモグロビンが存在していた。

20

30

【0063】

〔図23〕図23A及び23Bはアテローム発生飼料によるアテローム発生血清及びHDL画分中の非RBCヘモグロビンが特異な性質をもつことを示す。図23A:通常飼料(C)又はアテローム発生飼料(A)を与えたC57BL/6Jマウス(n=8)に由来する血清サンプルプールをFPLCにより分画し、順相(NP20)又はアニオン交換(Q10;pI<7)ProteinChipアレイでSELDI分析した。14.9k(Hb-)及び15.6k(Hb-)の相対強度を示す。図23B:図2に記載したpH7.0及びpH4.0に相当するアニオン交換カラム画分を15%SDS-PAGEにロードし、ヘモグロビンに対してイムノプロットした。これらのシステムで測定したアテローム発生飼料による非RBCヘモグロビンの性質の変化はヘモグロビンとHDL及び他のHDL蛋白質との会合に一致する。

40

【0064】

50

〔図24〕アテローム発生血清中のヘモグロビンが特異なpI値をもつことを示す。通常飼料(C)又はアテローム発生飼料(A)を7日間(D7)又は15週間(W15)与えたC57BL/6Jマウスに由来する血清サンプル(n=8)を使用前にプールした。D7マウスからのRBCを血清勾配により単離し、洗浄し、溶血させた。血清サンプルをFPLCにより分画し、D7マウスからのHDL画分をプールした。プールした血清、HDL及び溶血RBCをIEFゲル(pH3~10)にロードし、ヘモグロビンに対してイムノプロットした。通常飼料を与えたマウスからの溶血RBC(左レーン)をヘモグロビンの標準としてロードした。同図から明らかなように、RBCヘモグロビンの特性は通常飼料又はアテローム発生飼料を与えたマウスと差異がなかった。更に同図から明らかなように、通常飼料を与えたマウスからのHDLにはヘモグロビンが会合していなかったが、アテローム発生飼料を与えたマウスからのHDLにはヘモグロビンが会合しており、そのpIはRBCヘモグロビンと著しく相違していた。

10

【0065】

〔図25〕非RBCヘモグロビンがアテローム発生飼料によるHDL画分と会合し(左パネル)、アテローム発生飼料を15週間与えた後にRBCヘモグロビンと同様に泳動する非RBCヘモグロビンが失われる(右パネル)ことを示す。通常飼料(C)又はアテローム発生飼料(A)を7日間(D7)又は15週間(W15)与えたC57BL/6Jマウス(n=8)からの血清サンプルプール(右パネル)又はD7からのHDL画分プール(左パネル)をネイティブPAGEにロードし、ヘモグロビンに対してイムノプロットした。通常飼料を与えたマウスからの溶血RBCもゲルにロードした(左パネルの左端)。

20

【0066】

〔図26〕図26A及び26BはHDL中のHbの分光光度測定の結果を示す。Beckman DU 640分光光度計を使用してHDLを含有するFPLC画分プールからHbの量と形状を測定した。全サンプル及び純粋種のスペクトルを380~700nmで走査した(図26A)。放出速度の遅いNODドナーであるNONOateをサンプルに加え、oxyHbからmetHbへの変換を観察した(図26B, 代表的グラフ)。1組の純粋種の「基本スペクトル」を線形回帰により測定スペクトルにフィットさせることにより、oxyHbとmetHbの濃度を逆重畳した(Vaughnら(2000)J. Biol. Chem., 275:2342-2348)。

30

【0067】

〔図27〕健常ボランティア10人と、NCEP ATP IIIガイドラインの定義による冠動脈心疾患(CHD)又は等価疾患をもつ患者10人に由来するHDL中のヘモグロビンと比較する。左パネルはヘモグロビンに対してイムノプロットした健常ボランティア10人(左レーン)又はCHD患者10人(右レーン)に由来する血漿プールからのHDL画分のネイティブPAGEゲルを示す。右パネルはRBCを溶血させてHDL画分の単離前に血漿に添加した後の同一分析を示す。その結果、患者では健常ボランティアよりも著しく多量のヘモグロビンがHDLと会合していた(左パネル)。更に同図から明らかなように、過剰のRBCヘモグロビンを血漿に添加すると、健常ボランティアとCHD患者の両者のHDL画分でヘモグロビンが増加したが、依然として患者のHDLのヘモグロビンのほうが有意に多量であった。

40

【0068】

〔図28〕図28A、28B及び28Cは若年性糖尿病患者とCHD患者に由来するHDLでは非RBCヘモグロビンとハプトグロビンの両者が増加していることを示す。健常ボランティア12人、若年性糖尿病患者14人(成人8人; 幼児6人)、又はスタチン投与中のCHDもしくはCHD等価疾患対象8人から血清を採取した。ヒトapoA-Iに対する抗体を96ウェルプレートにコーティングした。対象からの血清を加え、一晚4でインキュベートした。プレートを十分に洗浄し、ヒトヘモグロビン又はヒトハプトグロビンに対する一次ヤギ抗体を加えて4で一晚インキュベートした。プレートを十分に洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)で標識したヤギIgGに対する二次抗体を加え、2時間室温でインキュベートした。プレートを十分に洗浄し、HRP基質を加え、

50

光学密度 (OD) を測定した。図 28A は非 RBC ヘモグロビン (HRP $\mu\text{g}/\text{mL}$) を示す。図 28B はハプトグロビン (HRP $\mu\text{g}/\text{mL}$) を示す。図 28C は非 RBC ヘモグロビン値にハプトグロビン値を乗じた積を示す。その結果、後者方法で得られた値は健常ポランティアを糖尿病患者と CHD 患者から切り離し、全くオーバーラップしなかった。

【0069】

〔図 29〕4 カ月齢 apoE ヌルマウス ($n = 8$ 匹 / 群) の飲料水に D - 4 F を 2 カ月間添加する (+ D - 4 F) と、これらのマウスからの HDL 上清中のトランスフェリン含量は D - 4 F を添加しない飲料水を与えたマウス (D - 4 F 不添加) に比較して有意に低下したことを実証する。

10

【0070】

〔図 30〕4 カ月齢 apoE ヌルマウス ($n = 8$ 匹 / 群) の飲料水に D - 4 F を 2 カ月間添加する (+ D - 4 F) と、これらのマウスからの HDL 上清中のミエロペルオキシダーゼ含量は D - 4 F を添加しない飲料水を与えたマウス (D - 4 F 不添加) に比較して非常に有意に低下したことを実証する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0071】

本発明は異常高比重リポ蛋白質 (HDL) の新規アッセイに関する。異常 HDL (例えば向炎症性 HDL) は心疾患及び炎症反応を特徴とする他の病態の病因に関係があるとみなされている。従って、異常 HDL のアッセイはアテローム性動脈硬化症及び / 又は炎症反応を特徴とする他の病態 (例えば関節リウマチ、紅斑性狼瘡、結節性多発動脈炎、骨粗鬆症、アテローム性動脈硬化症、脳卒中、ハンセン病、結核、全身性紅斑性狼瘡、リウマチ性多発筋痛症、結節性多発動脈炎、強皮症、特発性肺線維症、慢性閉塞性肺疾患、喘息、アルツハイマー病、慢性腎不全、糖尿病、糖尿病網膜症、糖尿病性腎症、移植拒絶反応、移植後アテローム性動脈硬化症、虚血再灌流障害、成人呼吸器症候群、鬱血性心不全、糸球体炎、代謝症候群、多発性硬化症、敗血症症候群、鎌状赤血球症、血管性痴呆、クローン病、内皮機能不全、細動脈機能不全、エイズ、リウマチ性多発筋痛症、結節性多発動脈炎、強皮症、特発性肺線維症、冠動脈石灰化、石灰化大動脈弁狭窄症、骨粗鬆症、細菌感染症、真菌感染症、自己免疫疾患、関節リウマチ、鬱血性心不全、内皮機能不全、細動脈機能不全、ウイルス性疾患、多発性硬化症等) の検出及び / 又は予後診断に診断法及び予後診断法として有用である。

20

30

【0072】

HDL 炎症特性 / 抗炎症特性がアテローム性動脈硬化症等の疾患における HDL の役割の重要な決定因子であり、HDL コレステロール濃度に非依存性であることを示唆する証拠は益々増えつつある。本発明は HDL の炎症特性を測定する新規アッセイに関する。本明細書に記載するアッセイは一般に主に 2 種類に分類することができる。

【0073】

I . HDL の炎症性を反映する HDL 会合蛋白質の測定 ; 及び

【0074】

II . HDL の LDL 凝集抑制能の測定

40

【0075】

I . HDL の炎症性を反映する HDL 会合蛋白質の測定

A) アテローム性動脈硬化症 / 高脂血症のマウスモデルで HDL と会合した 8 種の蛋白質

本発明者はマウス及びヒトの両者において、HDL の炎症特性が冠動脈性心疾患 (CHD) の指標として HDL コレステロール濃度よりも高感度の指標であることを既に報告している。所定態様では、本発明は I 群 / 防御性 HDL を「異常」HDL から区別する特異的な蛋白質フィンガープリントの同定にも関する。実施例 2 及び 3 ではマウス HDL について例証するが、同一蛋白質 / 蛋白質フィンガープリント及び生理的メカニズムがヒト及び他の哺乳動物でも機能していると考えられる。特に、ProteinChip 技術を

50

表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間質量分析法 (SELDI-TOF-MS) と併用し、アテローム発生飼料を与えたマウスHDLから正常マウスHDLを区別する特異的な蛋白質フィンガープリントを同定した。C57BL/6Jマウスにアテローム発生飼料を1週間与えた結果、HDLコレステロール濃度が低下し、パラオキソナーゼ活性が低下し、反応性酸素種含量が増加し、マクロファージからのコレステロール流出を促進するHDLの能力が低下した。通常飼料に戻して更に2週間マウスに与えると、HDLの向アテローム発生特性は正常表現型に復帰した(例えば図19参照)。通常飼料を与えたマウスに由来する正常HDLと比較してアテローム発生飼料を与えたマウスに由来する向炎症性HDLに $p < 0.05$ で示差的に存在する合計88個のSELDIピークを同定した。飼料を元に戻すと、88個の血清ピークのうちの74個が正常レベルに復帰した。短期飼料交換と非アテローム発生因子に起因するアーチファクト/変化を排除するように更に分析後、向炎症性HDLと示差的に会合している蛋白質に相当する24個のSELDI m/z ピークを同定した。24個の蛋白質ピークのうちの14個はアテローム性動脈硬化症/高脂血症の他の3種の広く使用されている動物モデル、即ち西欧型飼料を与えたC57BL/6J、LDLRヌルマウス及びapoEヌルマウスに由来する向炎症性HDLと共通であることが判明した。更に、全4種の動物モデルに由来する血清サンプルの蛋白質プロファイリングの結果、向炎症性HDLの同定用血清バイオマーカーパネルとしてマウスで使用可能な8蛋白質コアシグネチャー(上記14個のSELDI m/z ピークのサブセット)が同定され、同様のシグネチャーをヒト及び他の哺乳動物でも使用することができる。これらの8コアシグネチャー蛋白質については実施例2に詳細に記載する。

【0076】

この蛋白質シグネチャーは(例えば本明細書に記載するような質量分析法及び/又は蛋白質チップ法を使用して)容易に検出することができるので、例えば患者の体内の向炎症性HDLを識別するために使用することができる。従って、アテローム性動脈硬化症及び/又は炎症反応を特徴とする他の病態の診断法及び/又は予後診断法として蛋白質シグネチャーの存在又は大きさを使用することができる。

【0077】

場合により、患者の蛋白質シグネチャーの強度を識別又は定量するための迅速な検出/定量法を提供するために、限定されないが、電気泳動、クロマトグラフィー、及び/又はイムノアッセイ等の他の標準方法を使用して蛋白質の1種以上を検出することができる。

【0078】

B)アテローム性動脈硬化症/高脂血症のマウスモデルでは非RBCヘモグロビンがHDLと会合しているという驚くべき知見

上記のように、正常/抗炎症性HDLを向炎症性HDLから区別するために個々に又は組み合わせて使用可能な強アニオン交換SELDI Protein Chip技術を使用して8種の特異的蛋白質を同定した。マウスモデルで向炎症性HDLと最も顕著に会合していたバイオマーカーピークの2個(m/z 14,900及び m/z 15,600)を更に特性決定した。微量液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法を使用し、 m/z 14,900及び m/z 15,600に相当するSELDIピークを夫々マウスヘモグロビン鎖(Hb-, 14.9kDa)及びマウスヘモグロビン鎖(Hb-, 15.9kDa)として同定した。ウェスタンブロット分析により、Hbが正常HDLと比較して向炎症性HDLと示差的に会合していることを確認した。HDLと会合したHbの生化学的特性決定の結果、向炎症性HDLと会合したHbはpIの低下(遊離HbのpI 7.5以上に対してpI 4.0及びpI 7.0)、HDLを含む画分に存在する高分子量複合体との会合等の特異な物理化学的性質をもつことも判明した。

【0079】

この非RBCヘモグロビンを詳細に分析した結果、アミノ酸配列はRBCヘモグロビンと相違しないことが判明した。実際に、向炎症性HDLと会合した非RBCヘモグロビンの物性変化はHDLと会合している他の蛋白質(例えばハプトグロビン)とこのヘモグロビンの強い会合に起因すると思われる。

10

20

30

40

50

【0080】

マウス及びヒトでは血漿及び血清中に常に少量の非RBCヘモグロビンが存在することが本発明により意外にも判明した。この非RBCヘモグロビンの濃度は10マイクロモルのオーダーである。他方、全血中のヘモグロビン濃度は1モルを上回る。従って、RBC以外に存在するのは全血中のヘモグロビンの約0.001%に過ぎない。

【0081】

正常マウス及び正常ヒトではこの少量の非RBCヘモグロビンが血漿又は血清の非リポ蛋白質画分に局在しているということも本発明により意外にも発見された。アテローム発生飼料を与えたマウス、又はアテローム性動脈硬化症を発症するように遺伝的に操作したマウス、又は糖尿病もしくはCHDをもつヒト、又は向炎症性HDLの他の原因をもつヒトではこの非RBCヘモグロビンがHDLに存在するということも本発明により意外にも発見された。

10

【0082】

HDLと会合しているヘモグロビンの主形態はオキシヘモグロビン(ox y H b)であった。ox y H bの酸化促進性により、本発明のデータはH bがアテローム発生条件下でHDLの向炎症性に寄与している可能性を示唆している。更に、特定理論に結び付けるものではないが、本発明者らはアテローム性動脈硬化症又は炎症反応を特徴とする他の病変の新規バイオマーカーとしてHDLと会合したH bを利用できると考える。これらの試験の所定の詳細については実施例3に記載する。

【0083】

C) アテローム性動脈硬化症/高脂血症のマウスモデルでHDLと会合した急性相蛋白質

20

上記のように、本発明者らは赤血球H bと著しく相違する物理化学的性質をもつヘモグロビン(H b)がアテローム性動脈硬化症の動物モデルでHDLと会合し、アテローム発生条件下でHDLの向炎症性に寄与することを発見した。従って、例えば、C57BL/6Jマウス(n=12匹/群)にアテローム発生飼料を1週間与えると、通常飼料を与えたC57BL/6Jマウスと比較して、i) HDLコレステロール濃度が低下し、ii) パラオキシナーゼ活性が低下し、iii) 反応性酸化種が増加し、iv) マクロファージからのコレステロール流出を促進するHDLの能力が低下した(例えば図19、実施例2参照)。

30

【0084】

ヘモペキシンとハプトグロビンはH bの2種の周知スカベンジャーである。ハプトグロビン(H p)はHDLと会合していることが分かっており、溶血と共に血漿濃度が増加することに加え、急性相反応中に増加する。ヘモペキシン(H x)も向炎症性HDLと会合しており、同様に急性相反応と共に増加することが本発明により意外にも発見された。

【0085】

図1に示すように、ウェスタン分析の結果、アテローム発生飼料(A)を与えたC57BL/6Jマウスcから得られたHDL画分とH b、H x、及びH p蛋白質複合体の会合は通常飼料(C)と比較して増加することが分かった(>10倍)。

【0086】

H b、H x、及びH p蛋白質複合体は通常飼料を与えたa p o EヌルマウスからのHDLとも会合していることが判明した。ヘム経路に関連するこれらのHDL会合蛋白質濃度の増加がアテローム性動脈硬化症を構成する炎症の有効な新規マーカーであるか否かを判定するために、これらのa p o Eヌルマウスにアポリポ蛋白質A-I模倣ペプチドD-4F(50µg/ml飲料水)を21日間まで投与し、そのHDLを炎症特性とヘム経路に関連するHDL会合蛋白質について分析した。

40

【0087】

D-4F投与の結果、i) HDLが向炎症性から抗炎症性に転換し(例えば図2参照)、ii) ELISAにより測定した血清中のH x(例えば図3参照)及びH p(例えば図4参照)濃度が有意に低下し、iii) HDL画分中のH x及びH p蛋白質複合体が減少

50

し（例えば図5参照）、i v) a p o Eヌル血清及びa p o EヌルH D L上清中のH bの物理化学的性質が部分的に正常（即ち赤血球中に認められる性質）に回復した（例えば図6参照）。従って、所定態様では、本発明は向炎症性H D Lの成分であるH D Lと会合したヘム関連蛋白質の検出方法を提供する。

【0088】

図7に示すように、アテローム発生飼料を与えた野生型C 5 7 B L / 6 Jマウスではヘモグロビンのアルファ（ ）鎖とベータ（ ）鎖の両者が増加した。通常飼料を与えたa p o Eヌルマウスでもヘモグロビンの 鎖と 鎖の両者の含量が増加し、両鎖はD - 4 F投与と共に減少した。

【0089】

図8に示すように、通常飼料を7日間（D 7 C）又はアテローム発生飼料を7日間（D 7 A）もしくは15週間（W 1 5 A）与えた野生型C 5 7 B L / 6 JマウスでH D L中のオキシヘモグロビンとメトヘモグロビンの含量を測定した。通常飼料を与えたa p o Eヌルマウス（a p o E）でもオキシヘモグロビンとメトヘモグロビンの含量を測定した。

【0090】

オキシヘモグロビンは一酸化窒素を消費するが、メトヘモグロビンは一酸化窒素を消費しない。図9に示すように、正常マウスH D Lを添加しても、化学的に発生させた一酸化窒素の自然減衰は変化しなかった。他方、図10に示すように、化学的に発生させた一酸化窒素（N Oドナー）にオキシヘモグロビン（H b O₂）を添加し、電流（p A）として測定した処、化学的に発生させた一酸化窒素の減衰は急速に劇的に変化し、オキシヘモグロビンにより消費されたことが分かった。更に図10に示すように、リン酸緩衝食塩水（P B S）を添加しても減衰曲線は変化せず、溶媒（P B S）の添加の結果として一酸化窒素の消費は生じなかったことが分かった。他方、アテローム発生飼料を7日間与えた野生型C 5 7 B L / 6 Jマウスに由来するH D L（D 7 A H D L - H b）を添加すると、減衰曲線は劇的に低下し、この向炎症性H D Lは一酸化窒素を急速に消費したことが分かった。

【0091】

図11に示すように、アテローム発生飼料を与えたマウスに由来する向アテローム発生H D Lを、オキシヘモグロビンをメトヘモグロビンに変換する物質[K₃ F e (C N)₆]で処理すると、一酸化窒素を急速に消費する向炎症性H D Lの能力は失われた。

【0092】

図12は通常飼料を7日間（左上パネル）もしくは15週間（右上パネル）、又はアテローム発生飼料を7日間（左下パネル）もしくは15週間（右下パネル）与えた野生型C 5 7 B L / 6 Jマウスに由来する赤血球（R B C）ヘモグロビン及び血清中のヘモグロビンの二次元ゲルを示す。図13はヘモグロビン染色をライトブルーで示す以外は、野生型C 5 7 B L / 6 Jマウスにアテローム発生飼料を7日間（D 7 A）又は15週間（W 1 5 A）与えた図12の下段パネルを再現する。図13に示したウェスタンプロットを剥離し、ハプトグロビンに対する抗体で再プローブした（図14）。図14に示したウェスタンプロットを剥離し、ヘモペキシンに対する抗体で再プローブした（図15）。

【0093】

図12～15に示す実験によると、ヘモグロビン、ハプトグロビン及びヘモペキシンはアテローム発生血清中の同一粒子に局在すると思われる。

【0094】

図1に示すように、アテローム発生飼料では、これらは主にH D Lと会合している。ハプトグロビン及び/又はヘモペキシンに対してヌルであったC 5 7 B L / 6 Jマウスにアテローム発生飼料を7日間与えた処、ハプトグロビンは向炎症性H D Lの形成に重要な役割を果たすことが判明した。要約すると、野生型（W T）又はヘモペキシン（H x）ヌル又はハプトグロビン（H p）ヌル又はヘモペキシンとハプトグロビンの両者にヌル（H p / H x）のC 5 7 B L / 6 Jマウスに通常飼料（C）又はアテローム発生飼料（A）を7日間与えた。マウスから採血し、その血漿のF P L C画分におけるコレステロール含量と

10

20

30

40

50

ヘム含量を測定した。野生型HDLは実質的にヘムを会合していなかった。これらのマウスにアテローム発生飼料を7日間与えると、HDL画分と会合したヘムが検出された(下段パネルの黄色い線)。ヘモペキシンの不在下では、通常飼料でもHDL画分と会合したヘムは認められず、アテローム発生飼料を7日間与えると、これらのマウスのHDLのヘム含量は増加した。他方、ハプトグロビンを欠損するマウスでは、アテローム発生飼料を与えてもHDLと会合したヘムは認められなかった(右下パネルの緑色の線;右下パネルの赤線)。従って、ヘムがHDLと会合するためにはハプトグロビンが必要であった。

【0095】

別の実験では、野生型(WT)又はヘモペキシンの不在型(Hx)又はハプトグロビンの不在型(Hp)又はヘモペキシンの不在型(Hp/Hx)のC57BL/6Jマウスに通常飼料又はアテローム発生飼料を7日間与えた。マウスから採血し、その血漿のFPLC画分におけるコレステロール含量と反応性酸素種(ROS)含量を測定した。HDLは実質的にROSを会合していなかった。これらのマウスにアテローム発生飼料を7日間与えると、HDL画分と会合したROSが検出された。ヘモペキシンの不在下では、通常飼料でもHDL画分と会合したROSは認められず、アテローム発生飼料を7日間与えると、これらのマウスのHDLのROS含量は増加した。他方、ハプトグロビンを欠損するマウスでは、アテローム発生飼料を与えてもHDLと会合したROSは認められなかった。従って、ROSがHDLと会合するためにはハプトグロビンが必要であった。

10

【0096】

本明細書に記載するデータから明らかのように、HDLと会合したシグネチャー蛋白質又はHDLと会合した蛋白質を含有するヘム濃度により向炎症性HDLを検出できることが意外にも判明した。本発明によると、HDLと会合したヘム含有及び/又はヘム結合蛋白質濃度と血漿/血清の非リポ蛋白質画分中のこれらの蛋白質濃度の比が向炎症性HDLの予測指標となることも意外にも判明した。更に本発明によると、HDLと会合したヘム含有及び/又はヘム結合蛋白質の不在下ではHDLは向炎症特性(例えばROS含量増加)を示すことができないことも意外にも判明した。

20

【0097】

これらの予想外の知見に基づき、向炎症性(異常)HDLを同定するための多数のアッセイを提供する。このようなアッセイとしては限定されないが、m/z比が約9.3、14.9、15.6、15.8、16.2、16.5、18.6、19.5であり、HDLと会合した蛋白質の1種、2種、3種、4種、5種、6種、7種、又は8種を検出し、これらの蛋白質がHDLと会合している場合に前記HDLは向炎症性HDLであると判定する方法が挙げられる。

30

【0098】

上記のように、本発明によると、m/z比が14.9k及び15.6kの蛋白質は夫々ヘモグロビン鎖及び鎖であることが意外にも発見された。本発明によると、m/z比が19.5kの蛋白質はXII群PLA₂であることも意外にも発見された。

【0099】

別の態様では、アッセイはHDLと会合したヘム含有及び/又はヘム結合蛋白質(例えばヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシンの不在型、ミエロペルオキシダーゼ等)、又はヘム結合蛋白質と結合する蛋白質(例えば可溶性CD163)の濃度を測定し、HDLと会合した前記蛋白質の1種以上、2種以上、3種以上又は4種の濃度が(例えば防御性HDLで検出される濃度に比較して)上昇している場合にHDLは向炎症性HDLであると判定する段階を含む。

40

【0100】

所定態様では、アッセイはHDLと会合したヘム含有及び/又はヘム結合蛋白質(例えばヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシンの不在型、ミエロペルオキシダーゼ)の濃度をHDLの非リポ蛋白質画分中のこれらのヘム含有及び/又はヘム結合蛋白質の濃度と比較測定し、(例えば防御性HDLで検出される濃度に比較して)濃度が上昇している場合にHDLは向炎症性HDLであると判定する段階を含む。各種態様では、アッセイはHDLと

50

会合したヘム含有蛋白質（例えばヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、ミエロペルオキシダーゼ）と血漿及び／又は血清の非リポ蛋白質画分中のこれらのヘム含有及び／又はヘム結合蛋白質の比を測定し、蛋白質の少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、又は4種の比が約0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、又は1以上である場合にHDLは向炎症性HDLであると判定する段階を含む。

【0101】

各種態様では、アッセイの予測値はヘム含有及び／又はヘム結合蛋白質の2種以上の測定により改善される。各種態様では、ヘム含有及び／又はヘム結合蛋白質の2種以上の測定を組み合わせることができ、及び／又は他の因子により加重することができる。従って、例えば、測定した蛋白質の各々の加重因子を決定するために判別関数分析又はクラスター分析を使用することができる。1具体例では、図28Cに示す例のように、（例えば各々の値を乗じることにより得られた値を測定して）ヘム含有又はヘム結合蛋白質の2種以上の含量の積を計算することができる。図28Cに示す例を使用し、このような分析は対象から採血中又は図27に示す例のように採血後に*in vitro*で溶血が発生する場合にアッセイの予測値を改善することができる。従って、例えば、HDLと会合したヘモグロビンとHDLと会合したハプトグロビンの値（いずれもHRP $\mu\text{g}/\text{mL}$ で表す）の積を計算し、アッセイ関数を提供することができる。

10

【0102】

各種態様では、HDLと会合したヘム濃度を測定、及び／又はHDLの鉄含量を測定、及び／又はHDLと会合した鉄含有蛋白質濃度を測定し、これらの測定値が（例えば防御性HDLで検出される濃度に比較して）上昇している場合にHDLは向炎症性HDLであると判定する段階を含む。

20

【0103】

HDLの一酸化窒素消費能を識別／定量するアッセイも提供する。

【0104】

II. HDLのLDL凝集抑制能の測定

各種態様では、本発明は向炎症性HDLがLDL凝集を防止せず、抗炎症性HDLがLDL凝集を防止するという意外な知見にも関する。従って、LDL凝集アッセイは向炎症性HDLをアッセイ及び検出する簡便な手段となる。各種LDL凝集アッセイが当業者に公知であり、本発明は特定凝集アッセイ又はフォーマットに限定されない。凝集アッセイプロトコルの1例を実施例4に記載する。

30

【0105】

図16に示すように、このアッセイはCHD又はCHD等価疾患をもつ対象から向炎症性HDLを容易に検出することができ、値は健常ボランティアから採取したHDLで得られた値と著しく相違していた。図17に示すように、このアッセイはapoEヌルマウス（アテローム性動脈硬化症のマウスモデル）から向炎症性HDLを容易に検出ことができ、値は正常マウスHDLで得られた値と著しく相違していた。更に、このアッセイはapoEヌルマウスにapoA-I模倣ペプチドD-4Fを投与する有効性を実証する簡単な手段となった。

40

【0106】

III. アッセイの使用

従って、本発明は防御性及び／又は異常（向炎症性）HDLの検出及び／又は定量用の多数のアッセイを提供し、このようなアッセイはアテローム性動脈硬化症又は炎症反応を特徴とする他の病態（例えばアテローム性動脈硬化症、脳卒中、ハンセン病、結核、全身性紅斑性狼瘡、リウマチ性多発筋痛症、結節性多発動脈炎、強皮症、特発性肺線維症、慢性閉塞性肺疾患、アルツハイマー病、エイズ、リウマチ性多発筋痛症、結節性多発動脈炎、強皮症、特発性肺線維症、冠動脈石灰化、石灰化大動脈弁狭窄症、骨粗鬆症、細菌感染症、ウイルス感染症、真菌感染症、自己免疫疾患、関節リウマチ、クローン病等）を検出するための診断法及び／又は予後診断法となる。アッセイはアテローム性動脈硬化症及び

50

(例えば上記のような)他の炎症病態の危険のある者を検出し、各種治療及び治療プロトコールの有効性をモニターするためにも非常に有用である。

【0107】

各種態様では、アッセイはヘム関連HDL会合蛋白質(例えばヘモグロビン、及び/又はハプトグロビン、及び/又はヘモペキシン、及び/又はミエロペルオキシダーゼ等)の測定、血漿/血清のHDL及び非リポ蛋白質画分間のHDL会合蛋白質の相対分布の測定、向炎症性HDLの一酸化窒素消費能の測定、及びHDLのLDL凝集抑制能の測定を含む。

【0108】

この点では、ヘモペキシンは弱い急性相反応体であることが知られているが、アテローム性動脈硬化症又は異常HDLの予測因子であるとは従来考えられていなかった。実際に、本発明者らの知るところでは、HDLとのその会合は従来立証されていなかった。この蛋白質は主にハプトグロビンと共働して過剰のヘムを循環から除去すると考えられていた。従って、ヘモペキシンがHDLと会合しており、その血漿中濃度、特にHDLと会合したヘモペキシン含量がアテローム性動脈硬化症及び異常HDLの高度予測因子であることは意外な発見であった。

【0109】

上記のように、所定態様では、本発明はアテローム性動脈硬化症又は炎症反応を特徴とする他の病態の検出のための診断法及び/又は予後診断法に関する。本明細書に記載する診断法は各種対象の治療に有用である。対象(例えば患者)が異常HDLをもつと診断される場合には、防御性HDL濃度を回復もしくは上昇させる1種以上の薬剤及び/又は各種スタチン(例えばアトルバスタチン(Lipitor(登録商標), Pfizer)、シンバスタチン(Zocor(登録商標), Merck)、プラバスタチン(Pravachol(登録商標), Bristol-Myers Squibb)、フルバスタチン(Lescol(登録商標), Novartis)、ロバスタチン(Mevacor(登録商標), Merck)、ロスバスタチン(Crestor(登録商標), AstraZeneca)、及びピタバスタチン(Sankyo)等)の良好な候補である。防御性HDL濃度を回復又は上昇させるこのような薬剤(活性剤)としては限定されないが、D4F(例えばLira(2004)Circulation, 110:1701-1705参照)、いずれも言及により本明細書に組込むPCT/US2001/26497、及び/又はPCT/US2001/26497、及び/又はPCT/US2004/026288、及び/又はPCT/US2005/028294、及び/又はPCT/US2003/09988、及び/又はUSSN 10/273,386に記載の活性剤等が挙げられる。

【0110】

当然のことながら、所定態様では、本発明のアッセイは一般に当業者が前記特定病態又は炎症反応を特徴とする病態を前記対象で同定できるような鑑別診断として実施される。

【0111】

IV. HDL会合蛋白質の検出/定量

各種態様では、本発明のアッセイは1種以上の蛋白質(例えば限定されないが、ヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、ミエロペルオキシダーゼ、トランスフェリン、可溶性CD163等のHDL会合蛋白質)を検出及び/又は定量する段階を含む。これらは周知であり、十分に特性決定された蛋白質である。例えば、ハプトグロビン(例えばGenBank NP_005134参照)は比較的共通の多形性をもつ陽性急性相蛋白質であり(Vlierbergheら(2004)Clinica Chimica Acta, 345:35-42)、一般に血液中の遊離ヘモグロビンと結合してその調節を助長する。CD163はハプトグロビン-ヘモグロビン複合体の取込みとクリアランスに関与する単球-マクロファージ特異的スカベンジャー受容体である(Aristoelira(2006)Atherosclerosis 184:342-347)。ヘモペキシンは60KDa血漿糖蛋白質である(Delanghe(2001)Clinica

10

20

30

40

50

Chimica Acta, 312:13-23) (例えばGenBank NP_000604, 蛋白質ファミリーのPFAM Pfamデータベース及びHMMアクセション番号PF00045参照)。ヘモグロビン、ミオグロビン、又はヘム含有酵素(例えばカタラーゼ)の分解中に遊離ヘムが血漿中で形成されると、ヘモペキシンと1:1の比で結合する(DeLanghe and Langlois (2001) Clinica Chimica Acta, 312:13-23; Shipulinaら(2000) J. Protein Chem., 19:239-248; Solarら(1989) FEBS Lett., 256:225-229; Kuzelovaら(1997) Biochim. Biophys. Acta, 1336:497-501)。ヘモペキシンはヘムと鉄代謝を結び付ける重要な要素であり、他の鉄トランスポーターであるハプトグロビン及びトランスフェリンと共働して肝臓による鉄ホメオスタシスを維持する(DeLanghe and Langlois (2001) Clinica Chimica Acta, 312:13-23)。

10

20

30

40

50

【0112】

ヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、ミエロペルオキシダーゼ等の検出/定量方法は当業者に周知である。例えば、医療用ハプトグロビンアッセイは急性リウマチ性疾患、胆管閉塞、消化性潰瘍、潰瘍性大腸炎等(ハプトグロビン上昇)又は慢性肝疾患、胎児赤芽球症、血腫、溶血性貧血、G6PD欠損による溶血性貧血、特発性自己免疫性溶血性貧血、免疫性溶血性貧血、薬物誘発性免疫性溶血性貧血、原発性肝疾患及び輸液反応(ハプトグロビン濃度低下)の鑑別診断で実施される。

【0113】

本発明の方法では特定蛋白質を検出/定量するための本質的に任意方法を使用することができる。このような方法としては限定されないが、キャピラリー電気泳動、ウェスタンブロット、質量分析法、クロマトグラフィー(例えばHPLC)、イムノアッセイ等が挙げられる。

【0114】

A) サンプル採取及び処理

ヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、ミエロペルオキシダーゼ等は哺乳動物、より好ましくはヒト患者に由来する生体サンプル(例えば全血、血漿等)中で定量することが好ましい。本明細書で使用する生体サンプルとは異常HDLの存在及び/又はレベルに相関させることが可能な濃度で本明細書に記載する1種以上のアッセイ蛋白質(例えばハプトグロビン及び/又はヘモペキシン)を含有する生体組織又は体液のサンプルである。所定の好ましい生体サンプルとしては限定されないが、全血又は各種血液画分(例えば血漿、血清等)が挙げられる。所定態様では、生体サンプルはHDLを含有する。所定態様では、生体サンプルは血清又は血漿を含み、あるいは血清又は血漿を含む別のサンプルを準備する。

【0115】

生体サンプルは必要に応じて所望により適切な緩衝液で希釈することにより前処理してもよいし、濃縮してもよい。生理的pHのリン酸、Tris等の各種緩衝液の1種を利用する多数の標準水性緩衝液の任意のものを使用することができる。

【0116】

上記のように、所定態様では、アッセイは全血、血清又は血漿を使用して実施される。血液及び/又は血液調製物の取得と保存は当業者に周知である。一般には静脈穿刺により採血する。当業者に周知の緩衝液又は他の試薬を加えて血液を希釈し、測定前に24時間まで2~8、又は-20以下で24時間以上保存することができる。特に好ましい態様では、血液又は血液調製物(例えば血清)は防腐剤を加えずに-70で永久的に保存される。

【0117】

各種態様では、上記のように、サンプルはHDLを含有しており、及び/又はサンプルからHDLを単離する。HDLの単離方法は当業者に周知であり、下記実施例に例証する

。

【0118】

B) 免疫結合アッセイ

好ましい1態様では、多数の周知免疫結合アッセイの任意のものを使用して生体サンプル中の蛋白質を検出及び/又は定量する(例えば米国特許第4,366,241号、4,376,110号、4,517,288号、4,837,168号、6,974,704号、6,964,872号、6,887,362号、6,878,558号、6,855,562号、6,849,457号、6,835,543号、6,830,731号、6,818,456号、6,818,455号、6,770,489号、6,737,277号、6,723,524号、6,689,317号、6,682,648号、6,673,562号、6,632,603号等参照)。一般的なイムノアッセイの概説については、Methods in Cell Biology Volume 37: Antibodies in Cell Biology, Asai, ed. Academic Press, Inc. New York (1993); Basic and Clinical Immunology 7th Edition, Stites & Terr, eds. (1991)も参照。

10

【0119】

免疫結合アッセイ(ないしイムノアッセイ)は一般に検体(この場合にはヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、ミエロペルオキシダーゼ等、及び/又はそのフラグメント)と特異的に結合し、多くの場合には固定化するための「捕捉剤」を使用する。捕捉剤は検体と特異的に結合する部分である。好ましい1態様では、捕捉剤はこの場合にはヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、ミエロペルオキシダーゼ等及び/又はそのフラグメントもしくはアイソフォームと特異的に結合する抗体である。

20

【0120】

この点では、ヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、及びミエロペルオキシダーゼ等を検出及び定量するためのモノクローナル及びポリクローナル抗体が市販されている(例えば抗ハプトグロビン抗体ab8968(ヒツジポリクローナル)、ab4248(ニワトリポリクローナル)及びab13429(マウスモノクローナル)、抗ヘモペキシン抗体ab27710(マウスモノクローナル)及びab27711(Abcam, Inc.から市販されているマウスモノクローナル)等参照)。

30

【0121】

イムノアッセイは多くの場合には捕捉剤と検体により形成される結合複合体と特異的に結合してこれを標識するための標識剤も使用する。あるいは、抗体/ハプトグロビン及び/又は抗体/ヘモペキシンと特異的に結合する第3の分子(例えば別の抗体)を標識剤としてもよい。

【0122】

所定態様では、標識剤はラベルを付けた抗ハプトグロビン及び/又は抗ヘモペキシン及び/又は抗ヘモグロビン及び/又は抗ミエロペルオキシダーゼ抗体を含む。あるいは、抗体にはラベルを付けず、抗体の起源である種の抗体に特異的な第3の標識抗体と結合してもよい。従って、例えば、第3の標識分子(例えば酵素標識ストレプトアビジン)が特異的に結合することができる検出可能な部分(例えばビオチン)で抗ハプトグロビン抗体を修飾することができる。

40

【0123】

免疫グロブリン定常領域と特異的に結合することが可能な他の蛋白質(例えばプロテインA又はプロテインG)も標識剤として使用することができる。これらの蛋白質は連鎖球菌の細胞壁の通常成分である。これらの蛋白質は種々の種に由来する免疫グロブリン定常領域に対して強い非免疫原性反応性を示す(例えばKronvalら(1973)J. Immunol, 111:1401-1406; Akerstromら(1985)J. Immunol, 135:2589-2542等参照)。

【0124】

50

アッセイ全体を通して試薬の添加後毎にインキュベーション及び/又は洗浄段階を実施することができる。インキュベーション段階は約5秒間～数時間、好ましくは約5分間～約24時間とすることができる。しかし、インキュベーション時間はアッセイフォーマット、検体、溶液容量、濃度等により異なる。通常では、アッセイは周囲温度で実施されるが、4～40等の一定範囲の温度で実施することもできる。

【0125】

1) 非競合アッセイフォーマット

各種態様では、ヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、ミエロペルオキシダーゼ等を検出又は定量するためのイムノアッセイは競合アッセイでも非競合アッセイでもよい。非競合イムノアッセイは捕捉する検体（この場合にはヘモグロビン、及び/又はハプトグロビン、及び/又はヘモペキシン、及び/又はミエロペルオキシダーゼ等）の量を直接測定するアッセイである。好ましい「サンドイッチ」アッセイの1例では、例えば、捕捉剤（例えば抗ハプトグロビン抗体、及び/又は抗ヘモグロビン抗体、及び/又は抗ヘモペキシン抗体、及び/又は抗ミエロペルオキシダーゼ抗体）を固体支持体に直接結合し、固定化する。これらの固定化抗体はその後、試験サンプル中に存在するヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、及び/又はミエロペルオキシダーゼを捕捉する。こうして固定化された捕捉蛋白質をその後、標識剤（例えばラベルを付けた第2のハプトグロビン及び/又はヘモペキシン抗体）と結合する。

10

【0126】

あるいは、第2の抗体にはラベルを付けず、第2の抗体の起源である種の抗体に特異的な第3の標識抗体と結合してもよい。第2の抗体は第3の標識分子（例えば酵素標識ストレプトアビジン）が特異的に結合することができる検出可能な部分（例えばビオチン）で修飾することができる。

20

【0127】

2) 競合アッセイフォーマット

競合アッセイでは、添加した（外来）検体（例えばハプトグロビン、ヘモペキシン、ヘモグロビン、ミエロペルオキシダーゼ等）がサンプル中に存在する検体により捕捉剤（例えば抗ヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、ミエロペルオキシダーゼ抗体）から置換される（又は競合排除される）量を測定することにより、サンプル中に存在する検体（ヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、ミエロペルオキシダーゼ等）の量を間接的に測定する。競合アッセイの1例では、この場合には既知量のヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、ミエロペルオキシダーゼ等をサンプルに添加した後に、サンプルを捕捉剤（この場合にはヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、ミエロペルオキシダーゼ等と特異的に結合する抗体）と接触させる。抗体と結合したヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、ミエロペルオキシダーゼ等の量はサンプル中に存在する検体の濃度に反比例する。

30

【0128】

所定態様では、抗体を固体支持体に固定化する。抗体に結合したヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、ミエロペルオキシダーゼ等の量は、抗体/検体複合体中に存在するヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、ミエロペルオキシダーゼ等の量を測定するか、又は結合していない残りのヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、ミエロペルオキシダーゼ等の量を測定することにより測定することができる。ヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、ミエロペルオキシダーゼ等の量は標識ヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、ミエロペルオキシダーゼ等を準備することにより測定することができる。

40

【0129】

別の適切な競合アッセイはハプテン阻害アッセイである。このアッセイでは、既知検体、この場合にはヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、ミエロペルオキシダーゼ等を固体支持体に固定化する。既知量の抗ヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、ミエロペルオキシダーゼ抗体等をサンプルに加えた後、サンプルを固定化ヘモグロビン、

50

ハプトグロビン、ヘモペキシン、ミエロペルオキシダーゼ等と接触させる。この場合には、固定化ヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、ミエロペルオキシダーゼ等と結合した抗ヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、ミエロペルオキシダーゼ抗体等の量はサンプル中に存在する検体の量に反比例する。この場合も、固定化抗体の量は固定化蛋白質画分又は溶液中に残存する抗体の画分を検出することにより検出することができる。

【0130】

抗体を標識して直接検出してもよいし、上記のように抗体と特異的に結合する標識部分を後から加えることにより間接的に検出してもよい。

【0131】

3) R I Aによる蛋白質検出

所定態様では、ラジオイムノアッセイ (R I A) を使用してサンプルのヘモグロビン、及び/又はハプトグロビン、及び/又はヘモペキシン、及び/又はミエロペルオキシダーゼ含量を定量する。ラジオイムノアッセイの詳細なプロトコールは例えば Sambrookら (1989) Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2nd ed.) Vol. 1 - 3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY等に記載されている。

【0132】

4) 他のアッセイフォーマット

別の態様では、ウェスタンブロット (イムノブロット) 分析を使用してサンプル中の検体蛋白質の存在を検出及び定量する。この技術は一般に分子量に基づいてゲル電気泳動によりサンプル蛋白質を分離する段階と、分離した蛋白質を適切な固体支持体 (例えばニトロセルロースフィルター、ナイロンフィルター、又は誘導体化ナイロンフィルター) に転写する段階と、標的検体 (例えばヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、ミエロペルオキシダーゼ等) と特異的に結合する抗体と共にサンプルをインキュベートする段階を含む。該当検体に特異的な抗体は固体支持体上に存在する検体と特異的に結合する。これらの抗体は直接標識してもよいし、あるいは抗ハプトグロビン及び/又はヘモペキシンと特異的に結合する標識抗体 (例えば標識ヒツジ抗マウス抗体) を使用して後から検出してよい。

【0133】

他のアッセイフォーマットとしては限定されないが、特定分子 (例えば抗体) と結合し、封入試薬又はマーカーを放出するように設計されたリボソームを使用するリボソームイムノアッセイ (L I A) が挙げられる。その後、放出された薬品を標準技術に従って検出する (Monroeら (1986) Amer. Clin. Prod. Rev. 5 : 34 - 41 参照) 。

【0134】

以上のアッセイは例証を目的とし、限定的ではない、本明細書の教示を使用し、他のアッセイフォーマットも当業者に想到されよう。なお、実施例には特定プロトコールも記載する。

【0135】

C. アッセイのスコアリング

本発明のアッセイは当業者に周知の標準方法に従ってスコアリングする。本発明のアッセイは一般に被験蛋白質の濃度差が検出可能な場合に陽性と判定される。所定態様では、変化は例えば提供されるデータセットに適した任意統計的検定法 (例えば t 検定、分散分析 (ANOVA)、セミパラメトリック法、ノンパラメトリック法 (例えば Wilcoxon Mann - Whitney Test, Wilcoxon Signed Ranks Test, Sign Test, Kruskal - Wallis Test 等)) を使用して判定した場合の統計的有意変化である。統計的有意変化は少なくとも 85 % の信頼水準で有意であることが好ましく、少なくとも 90 % がより好ましく、少なくとも 9

10

20

30

40

50

5%が更に好ましく、少なくとも98%又は99%が最も好ましい。所定態様では、変化は少なくとも10%の変化であり、少なくとも20%の変化が好ましく、少なくとも50%の変化がより好ましく、少なくとも90%の変化が最も好ましい。

【0136】

V. 一酸化窒素アッセイ

向炎症性HDLは一酸化窒素を消費(して硝酸を生成)するが、防御性HDLは一酸化窒素を実質的に消費しないことも本発明により発見された。従って、一酸化窒素消費/減少の測定は防御性HDLの迅速で簡便なアッセイとなる。

【0137】

一酸化窒素消費の検出方法は当業者に周知である。これらの方法は一般に一酸化窒素又一酸化窒素の化学的供与体を準備する段階と、分光光度法による吸光度測定又は電気化学的方法を使用して一酸化窒素の消費を検出する段階を含む。

【0138】

VI. LDL凝集アッセイ

所定態様では、向炎症性HDLがLDL凝集を防止しないのに対して防御性HDLがLDL凝集を防止できるという性質に基づく非防御性HDLのアッセイを提供する。アッセイは一般にLDL(例えば単離LDL)を該当HDLと接触させる段階と、LDLの凝集量又は率を測定する段階を含む。LDL凝集の測定方法は当業者に周知である。

【0139】

簡単な1態様では、LDLを単にボルテックスにより溶液に溶かし、例えば適当な対照(例えばブランク溶液、及び/又は防御性HDLによる同一実験)に対して680nmの吸光度を経時的(例えば10秒間隔)に読み取ることにより凝集率を測定する(凝集アッセイの具体例については、例えばKhooら(1988)Arteriosclerosis 8:348-358参照)。所定態様では、例えば実施例4に記載するようにアルブミン除去カラムを使用して凝集を測定する、

【0140】

VII. アッセイ最適化

本発明のアッセイは例えば生体サンプル及び/又は特定試験物質の起源及び/又は種類、及び/又は利用可能な分析施設に応じて特定状況での使用に最適化することができる。従って、例えば、最適化は結合アッセイに最適な条件、最適なサンプル処理条件(例えば好ましい単離条件)、信号対雑音比を最大にする抗体条件、スループットを改善するプロトコル等を決定する段階を含むことができる。更に、装置及び/又は試薬の入手可能性に従ってアッセイフォーマットを選択及び/又は最適化することができる。

【0141】

アッセイフォーマットの通常を選択及び最適化は当業者に周知である。

【0142】

VIII. キット

所定態様では、本発明は本明細書に記載するアッセイの1種以上を実施するためのキットに関する。一般に、このようなキットはヘモグロビン、及び/又はミエロペルオキシダーゼ、及び/又はハプトグロビン、及び/又はヘモペキシンを検出するための1種以上の試薬を含む。このような試薬としては限定されないが、各種蛋白質に特異的な抗体が挙げられる。所定態様では、キットはLDL凝集アッセイ又は一酸化窒素消費アッセイを実施するための1種以上の試薬を含む。

【0143】

キットは場合により採血、及び/又はHDL及び/又はLDLの単離等のための他の材料を含むことができる。

【0144】

更に、キットは場合により本発明の方法を実施するための手順(即ちプロトコル)を含む説明書を含むことができる。好ましい説明書はハプトグロビン及び/又はヘモペキシン濃度を測定するためにキット内容物を利用するプロトコルを提供する。説明書は一般

10

20

30

40

50

に文書又は印刷物を含むが、これらに限定されない。このような説明書を記憶し、エンドユーザーに伝達することが可能な任意媒体が本発明に含まれる。このような媒体としては限定されないが、電子記憶媒体（例えば磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、光学媒体（例えばCDROM）等が挙げられる。このような媒体はこのような説明書を提供するインターネットサイトのアドレスを含むものでもよい。

【実施例1】

【0145】

以下の実施例は本発明の例証を目的とし、限定するものではない。

【0146】

ヘモグロビン、ハプトグロビン及びヘモペキシンの測定

10

ハプトグロビン及びヘモペキシンのELISAプロトコル、HDL上清の調製プロトコル並びにapoA-I会合免疫吸着蛋白質のプロトコルを以下に示す。

【0147】

（ヒトヘモグロビンELISA）

【表1】

表1. ヘモグロビンELISAの材料

材料	供給業者	カタログ番号
1 HRP 標識ヤギ抗ヒトヘモグロビン	Novus Biologicals	ab19362
2 プレートリーダー(例えばVersaMax Tunable)	Molecular Devices	
3 ボリプロピレン製非滅菌丸底96ウェルプレート	Fisher	
4 イムノプレート	Nunc	12-565-502
5 TMB	Fisher	F25-034-03
6 H ₂ SO ₄	Fisher	

20

注：全試薬は使用前に室温に戻す。

【0148】

（磁気ビーズ試薬によるHDL単離）

1. 緑色キャップ管又は血清分離管を使用し、5にて2300rpmで20分間遠心して血漿又は血清を血液サンプルから分離する。

【0149】

2. 上清（血清又は血漿）を取り出す。注：サンプルを予め凍結している場合には、サンプルを解凍し、室温にて12,000rpmで5分間遠心する。こうして、アッセイに影響を与える可能性のある血清又は血漿中に存在する粒子を除去する。

【0150】

30

3. 上清（最大250µL/ウェル）を透明丸底96ウェルプレートに加える。

【0151】

4. 上清の総容量の1/5の磁気ビーズ試薬（最大50µL/ウェル）を各サンプルに加え、混合する。5分間静置する。

【0152】

5. 磁気粒子コンセンレーターの上にプレートを載せ、5分間置く。

【0153】

6. 上清を取り出し、マイクロ遠心管に加える。注：上清はHDLを含有している。apoBを含有する粒子は除去されている。

【0154】

40

7. 5にて12,000rpmで5分間遠心し、ビーズを除去する。

【0155】

8. 上清を取り出す。

【0156】

（緩衝液の調製）

1. コーティングバッファー：25mL ddH₂O + 8mL バッファーA + 17mL バッファーB（バッファーA：0.2M Na₂CO₃；バッファーB：0.2M NaHCO₃）を調製する。

【0157】

2. 洗浄バッファー：0.75mL Tween 20 + 150mL 10xPBS +

50

1 3 5 0 m L d d H₂ O を調製する。

【 0 1 5 8 】

3 . ブロッキング / 希釈バッファー : 2 0 m L 1 0 × P B S + 1 0 m L T w e e n
2 0 + 0 . 5 g B S A + 1 7 0 m L d d H₂ O を調製する。

【 0 1 5 9 】

4 . 停止溶液 : 1 . 3 8 m L H₂ S O₄ + 4 8 . 6 2 m L H₂ O を調製する。

【 0 1 6 0 】

(サンプル及び標準曲線の作成)

1 . サンプル (血清又は H D L 上清) をコーティングバッファーで 2 0 0 倍に希釈する
(H D L 2 . 5 μ L / コーティングバッファー 4 9 7 . 5 μ L) 。

10

【 0 1 6 1 】

2 . ヘモグロビンをコーティングバッファーで濃度 1 0 0 0 n g / m L に調製する (ヘ
モグロビン 2 μ L / コーティングバッファー 2 m L) 。

【 0 1 6 2 】

3 . 1 0 0 0 n g / m L 溶液をコーティングバッファーで 2 倍系列希釈して 5 0 0 、 2
5 0 、 1 2 5 、 6 2 . 5 、 3 1 . 2 5 、 1 5 . 6 3 n g / m L 溶液とすることにより三重
標準点を作成する。

【 0 1 6 3 】

4 . ブランクとしてコーティングバッファーのみをウェルに加える。

(サンプル及び標準のプレート添加)

20

【 0 1 6 4 】

1 . 各標準及び各サンプル 1 1 0 μ L をポリプロピレン製丸底 9 6 ウェルプレート 3 枚
に加える。

【 0 1 6 5 】

2 . マルチチャンネルピペットを使用し、各ウェルから 1 0 0 μ L を取り出し、イムロ
ンプレートに加える。

【 0 1 6 6 】

3 . 一晩 4 ℃ でインキュベートする。

【 0 1 6 7 】

4 . 抗原をバイオハザード廃棄物容器に廃棄する。

30

【 0 1 6 8 】

5 . 洗浄バッファー 3 0 0 μ L で 3 回洗浄する。プレートを逆さにし、内容物をデカン
トし、吸水性ペーパータオルの上で 4 ~ 5 回叩き、各段階で液体を完全に取り除く。

【 0 1 6 9 】

(ブロッキング及び一次抗体)

1 . ブロッキングバッファー 2 0 0 μ L を全ウェルに加え、室温で 1 時間インキュベ
ートする。

【 0 1 7 0 】

2 . 洗浄バッファー 3 0 0 μ L で 3 回洗浄する。プレートを逆さにし、内容物をデカン
トし、吸水性ペーパータオルの上で 4 ~ 5 回叩き、各段階で液体を完全に取り除く。

40

【 0 1 7 1 】

3 . H R P 標識ヤギ抗ヒトヘモグロビンを 1 0 0 0 0 倍に希釈する (抗体 1 μ L / 希釈
バッファー 1 0 m L) 。

【 0 1 7 2 】

4 . 2 0 0 0 0 倍希釈液 5 0 μ L を各ウェルに加える。

【 0 1 7 3 】

5 . 洗浄バッファー 3 0 0 μ L で 3 回洗浄する。プレートを逆さにし、内容物をデカン
トし、吸水性ペーパータオルの上で 4 ~ 5 回叩き、各段階で液体を完全に取り除く。

【 0 1 7 4 】

(T M B 及び停止溶液の添加)

50

1. TMB A 1部をTMB B 1部と混合する。

【0175】

2. TMB 混液 100 μ L を各ウェルに加え、20 分間インキュベートする。

【0176】

3. 停止溶液 100 μ L を各ウェルに加える。

【0177】

(プレートリーダーの読取り)

1. 波長を 450 nm に設定したプレートリーダーで読取る。

【0178】

(ハプトグロビン ELISA)

【表 2】

表 2. ハプトグロビン ELISA の材料

材料	供給業者	カタログ番号
AssayMax ヒトハプトグロビン ELISA キット	AssayPro	EH1003-1
プレートリーダー(例えば VersaMax Tunable) ポリプロピレン製非滅菌丸底 96 ウェルプレート	Molecular Devices Fisher	12-565-502

注: 全試薬は使用前に室温に戻す。

【0179】

(磁気ビーズ試薬による HDL 単離)

1. 緑色キャップ管又は血清分離管を使用し、5 にて 2300 rpm で 20 分間遠心して血漿又は血清を血液サンプルから分離する。

【0180】

2. 上清(血清又は血漿)を取り出す。注: サンプルを予め凍結している場合には、サンプルを解凍し、室温にて 12,000 rpm で 5 分間遠心する。こうして、アッセイに影響を与える可能性のある血清又は血漿中に存在する粒子を除去する。

【0181】

3. 上清(最大 250 μ L / ウェル)を透明丸底 96 ウェルプレートに加える。

【0182】

4. 上清の総容量の 1/5 の磁気ビーズ試薬(最大 50 μ L / ウェル)を各サンプルに加え、混合する。5 分間静置する。

【0183】

5. 磁気粒子コンセントレーターの上にプレートを載せ、5 分間置く。

【0184】

6. 上清を取り出し、マイクロ遠心管に加える。注: 上清は HDL を含有している。ApoB を含有する粒子は除去されている。

【0185】

7. 5 にて 12,000 rpm で 5 分間遠心し、ビーズを除去する。

【0186】

8. 上清を取り出す。

【0187】

(緩衝液の調製)

1. 洗浄バッファー濃厚液(キット同梱)を試薬グレード水で 10 倍に希釈する。

【0188】

2. EIA 希釈剤濃厚液(キット同梱)を試薬グレード水で 10 倍に希釈する。

【0189】

(血漿 / 血清又は HDL 上清の調製)

1. 血漿 / 血清又は HDL 上清を EIA 希釈剤(キット同梱)で 4000 倍に希釈する。

【0190】

2. まず 100 倍に希釈する(HDL 5 μ L / 希釈剤 495 μ L)。

10

20

30

40

50

【0191】

3. 100倍希釈液の40倍希釈液を調製する(100倍希釈液12.5 μ L/希釈剤487.5 μ L)。

【0192】

(標準曲線の作成)

1. ハプトグロビン標準(キット同梱)100 μ gをEIA希釈剤2mLで再構成し、濃度50 μ g/mLとする。

【0193】

2. 希釈液を調製する前に10分間標準を静かに撹拌しながら静置する。

【0194】

3. 標準溶液(50 μ g/mL)をEIA希釈剤で4倍系列希釈して12.5、3.13、0.78、0.195、及び0.049 μ g/mL溶液とすることにより三重標準点を作成する。

【0195】

(サンプルのプレート添加)

1. ビオチン化ハプトグロビン(キット同梱)をEIA希釈剤4mLで希釈する。

【0196】

2. 各標準及び各サンプル35 μ Lをポリプロピレン製丸底96ウェルプレート3枚に加える。

【0197】

3. マルチチャンネルピペットを使用し、各ウェルから25 μ Lを取り出し、ヒトハプトグロビンマイクロプレート(キット同梱)に加える。

【0198】

4. マルチチャンネルピペットを使用し、ビオチン化ハプトグロビン25 μ Lを各ウェルに加える。

【0199】

5. ウェルにシーリングテープ(キット同梱)を貼り付け、室温で静かに撹拌しながら1時間インキュベートする。

【0200】

6. 洗浄バッファ200 μ Lで5回洗浄する。プレートを逆さにし、内容物をデカントし、吸水性ペーパータオルの上で4~5回叩き、各段階で液体を完全に取り除く。

【0201】

(ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼコンジュゲートの添加)

1. ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼコンジュゲートを短時間遠沈させる。

【0202】

2. コンジュゲートをEIA希釈剤で100倍に希釈する。

【0203】

3. SPコンジュゲート50 μ Lを各ウェルに加え、30分間インキュベートする。

【0204】

4. 洗浄バッファ200 μ Lで5回洗浄する。プレートを逆さにし、内容物をデカントし、吸水性ペーパータオルの上で4~5回叩き、各段階で液体を完全に取り除く。

【0205】

(基質及び停止溶液の添加)

1. 色素基質(キット同梱)50 μ L/ウェルに加え、8分間インキュベートする。

【0206】

2. 停止溶液(キット同梱)50 μ Lを各ウェルに加える。

【0207】

(プレートリーダーの読取り)

1. 波長を450nmに設定したプレートリーダーで読取る。

【0208】

10

20

30

40

50

(ヘモペキシニン E L I S A)

【表 3】

表 3. ヘモペキシニアッセイの材料

材料	供給業者	カタログ番号
HRP 標識コトリ抗ヒトヘモペキシニン	Immunology Consultants Laboratory	CHX-80P
ヒト血漿由来ヘモペキシニン	Athens Research & Technology, Inc.	
プレートラダー(例えば VersaMax Tunable)	Molecular Devices	
ポリプロピレン製非滅菌丸底 96 ウェルプレート	Fisher	12-565-502
イコソプレート	Nunc	F25-034-03
TMB	Fisher	
H ₂ SO ₄	Fisher	

注：全試薬は使用前に室温に戻す。

10

【0209】

(磁気ビーズ試薬による HDL 単離)

1. 緑色キャップ管又は血清分離管を使用し、5 にて 2300 rpm で 20 分間遠心して血漿又は血清を血液サンプルから分離する。

【0210】

2. 上清(血清又は血漿)を取り出す。注：サンプルを予め凍結している場合には、サンプルを解凍し、室温にて 12,000 rpm で 5 分間遠心する。こうして、アッセイに影響を与える可能性のある血清又は血漿中に存在する粒子を除去する。

【0211】

3. 上清(最大 250 µL / ウェル)を透明丸底 96 ウェルプレートに加える。

20

【0212】

4. 上清の総容量の 1/5 の磁気ビーズ試薬(最大 50 µL / ウェル)を各サンプルに加え、混合する。5 分間静置する。

【0213】

5. 磁気粒子コンセントレーターの上にプレートを載せ、5 分間置く。

【0214】

6. 上清を取り出し、マイクロ遠心管に加える。注：上清は HDL を含有している。ApoB を含有する粒子は除去されている。

【0215】

7. 5 にて 12,000 rpm で 5 分間遠心し、ビーズを除去する。

30

【0216】

8. 上清を取り出す。

【0217】

(緩衝液の調製)

1. コーティングバッファー：25 mL ddH₂O + 8 mL バッファー A + 17 mL バッファー B (バッファー A：0.2 M Na₂CO₃；バッファー B：0.2 M NaHCO₃) を調製する。

【0218】

2. 洗浄バッファー：0.75 mL Tween 20 + 150 mL 10 × PBS + 1350 mL ddH₂O を調製する。

40

【0219】

3. ブロッキング/希釈バッファー：20 mL 10 × PBS + 10 mL Tween 20 + 0.5 g BSA + 170 mL ddH₂O を調製する。

【0220】

4. 停止溶液：1.38 mL H₂SO₄ + 48.62 mL H₂O を調製する。

【0221】

(サンプル及び標準曲線の作成)

1. サンプル(血漿又は HDL 上清)をコーティングバッファーで 200 倍に希釈する(HDL 2.5 µL / コーティングバッファー 497.5 µL)。

【0222】

50

2. ヘモペキシンをコーティングバッファーで濃度 1000 ng/mL に調製する (ヘモペキシン 2 μL / コーティングバッファー 2 mL)。

【0223】

3. 1000 ng/mL 溶液をコーティングバッファーで 2 倍系列希釈して 500、250、125、62.5、31.25、15.63 ng/mL 溶液とすることにより三重標準点を作成する。

【0224】

4. ブランクとしてコーティングバッファーのみをウェルに加える。

【0225】

(サンプル及び標準のプレート添加)

1. 各標準及び各サンプル 110 μL をポリプロピレン製丸底 96 ウェルプレート 3 枚に加える。

【0226】

2. マルチチャンネルピペットを使用し、各ウェルから 100 μL を取り出し、イムロプレートに加える。

【0227】

3. 一晩 4 でインキュベートする。

【0228】

4. 抗原をバイオハザード廃棄物容器に廃棄する。

【0229】

5. 洗浄バッファー 300 μL で 3 回洗浄する。プレートを逆さにし、内容物をデカントし、吸水性ペーパータオルの上で 4 ~ 5 回叩き、各段階で液体を完全に取り除く。

【0230】

(ブロッキング及び一次抗体)

1. ブロッキングバッファー 200 μL を全ウェルに加え、室温で 1 時間インキュベートする。

【0231】

2. 洗浄バッファー 300 μL で 3 回洗浄する。プレートを逆さにし、内容物をデカントし、吸水性ペーパータオルの上で 4 ~ 5 回叩き、各段階で液体を完全に取り除く。

【0232】

3. HRP 標識ニワトリ抗ヒトヘモペキシンを 20000 倍に希釈する (抗体 1 μL / 希釈バッファー 20 mL)。

【0233】

4. 20000 倍希釈液 50 μL を各ウェルに加える。

【0234】

5. 洗浄バッファー 300 μL で 3 回洗浄する。プレートを逆さにし、内容物をデカントし、吸水性ペーパータオルの上で 4 ~ 5 回叩き、各段階で液体を完全に取り除く。

【0235】

(TMB 及び停止溶液の添加)

1. TMB A 1 部を TMB B 1 部と混合する。

【0236】

2. TMB 混液 100 μL を各ウェルに加え、20 分間インキュベートする。

【0237】

3. 停止溶液 100 μL を各ウェルに加える。

【0238】

(プレートリーダーの読取り)

1. 波長を 450 nm に設定したプレートリーダーで読取る。

【0239】

(ApoA-I 会合免疫吸着蛋白質ヘモグロビン ELISA)

10

20

30

40

【表 4】

材料	供給業者	カタログ番号
1 HRP 標識ヤギ抗ヒトヘモグロビン	Novus Biologicals	Ab19362
2 全長ヒトβ ₂ ミグロブリン蛋白質 A1 ELISA キット	Alerchek	
3 ヒトヘモグロビン	Athens Research & Technology, Inc.	
4 プレートラー(例えば VersaMax Tunable)	Molecular Devices	
5 マリア [®] ヒトβ ₂ ミグロブリン製非滅菌丸底 96 ウェルプレート	Fisher	12-565-502
6 4x60mm プレート	Nunc	F25-034-03
7 TMB	Fisher	
8 H ₂ SO ₄	Fisher	

注：全試薬は使用前に室温に戻す。

10

【0240】

(磁気ビーズ試薬による HDL 単離)

1. 緑色キャップ管又は血清分離管を使用し、5 にて 2300 rpm で 20 分間遠心して血漿又は血清を血液サンプルから分離する。

【0241】

2. 上清(血清又は血漿)を取り出す。注：サンプルを予め凍結している場合には、サンプルを解凍し、室温にて 12,000 rpm で 5 分間遠心する。こうして、アッセイに影響を与える可能性のある血清又は血漿中に存在する粒子を除去する。

【0242】

3. 上清(最大 250 μL / ウェル)を透明丸底 96 ウェルプレートに加える。

20

【0243】

4. 上清の総容量の 1/5 の磁気ビーズ試薬(最大 50 μL / ウェル)を各サンプルに加え、混合する。5 分間静置する。

【0244】

5. 磁気粒子コンセントレーターの上にプレートを載せ、5 分間置く。

【0245】

6. 上清を取り出し、マイクロ遠心管に加える。注：上清は HDL を含有している。ApoB を含有する粒子は除去されている。

【0246】

7. 5 にて 12,000 rpm で 5 分間遠心し、ビーズを除去する。

30

【0247】

8. 上清を取り出す。

【0248】

(緩衝液の調製)

1. コーティングバッファー：25 mL ddH₂O + 8 mL バッファー A + 17 mL バッファー B (バッファー A：0.2 M Na₂CO₃；バッファー B：0.2 M NaHCO₃) を調製する。

【0249】

2. 洗浄バッファー：0.75 mL Tween 20 + 150 mL 10 × PBS + 1350 mL ddH₂O を調製する。

40

【0250】

3. ブロッキング/希釈バッファー：20 mL 10 × PBS + 10 mL Tween 20 + 0.5 g BSA + 170 mL ddH₂O を調製する。

【0251】

4. 停止溶液：1.38 mL H₂SO₄ + 48.62 mL H₂O を調製する。

【0252】

(サンプル及び標準曲線の作成)

1. サンプル(血清又は HDL 上清)をコーティングバッファーで 200 倍に希釈する(HDL 2.5 μL / コーティングバッファー 497.5 μL)。

【0253】

50

2. ヘモグロビンをコーティングバッファーで濃度 1000 ng/mL に調製する (ヘモグロビン 2 μL / コーティングバッファー 2 mL)。

【0254】

3. 1000 ng/mL 溶液をコーティングバッファーで 2 倍系列希釈して 500、250、125、62.5、31.25、15.63 ng/mL 溶液とすることにより三重標準点を作成する。

【0255】

4. ブランクとしてコーティングバッファーのみをウェルに加える。

【0256】

(サンプル及び標準のプレート添加)

1. 各標準及び各サンプル 110 μL をポリプロピレン製丸底 96 ウェルプレート 3 枚に加える。

【0257】

2. マルチチャンネルピペットを使用し、各ウェルから 100 μL を取り出し、抗ヒト ApoA1 をコーティングしたマイクロウェルプレート (A1 キット同梱) に加える。

【0258】

3. 一晩 4 でインキュベートする。

【0259】

4. 抗原をバイオハザード廃棄物容器に廃棄する。

【0260】

5. 洗浄バッファー 300 μL で 3 回洗浄する。プレートを逆さにし、内容物をデカン トし、吸水性ペーパータオルの上で 4 ~ 5 回叩き、各段階で液体を完全に取り除く。

【0261】

(ブロッキング及び一次抗体)

1. ブロッキングバッファー 200 μL を全ウェルに加え、室温で 1 時間インキュベ ートする。

【0262】

2. 洗浄バッファー 300 μL で 3 回洗浄する。プレートを逆さにし、内容物をデカン トし、吸水性ペーパータオルの上で 4 ~ 5 回叩き、各段階で液体を完全に取り除く。

【0263】

3. HRP 標識ヤギ抗ヒトヘモグロビンを 10000 倍に希釈する (抗体 1 μL / 希釈 バッファー 10 mL)。

【0264】

4. 20000 倍希釈液 50 μL を各ウェルに加える。

【0265】

5. 洗浄バッファー 300 μL で 3 回洗浄する。プレートを逆さにし、内容物をデカン トし、吸水性ペーパータオルの上で 4 ~ 5 回叩き、各段階で液体を完全に取り除く。

【0266】

(TMB 及び停止溶液の添加)

1. TMB A 1 部を TMB B 1 部と混合する。

【0267】

2. TMB 混液 100 μL を各ウェルに加え、20 分間インキュベートする。

【0268】

3. 停止溶液 100 μL を各ウェルに加える。

【0269】

(プレートリーダーの読取り)

1. 波長を 450 nm に設定したプレートリーダーで読取る。

【0270】

(ApoA-I 会合免疫吸着蛋白質ハプトグロビン ELISA)

10

20

30

40

【表 5】

表 5. ApoA-I 会合免疫吸着蛋白質ハプトグロビン ELISA の材料

材料	供給業者	カタログ番号
HRP 標識抗ハプトグロビン	Biogenesis	
全長ハプトグロビン蛋白質 A1 ELISA キット	Alerchek	
プレートリダー(例えば VersaMax Tunable)	Molecular Devices	
50 μg/ml 非滅菌丸底 96 ウェルプレート	Fisher	12-565-502

注：全試薬は使用前に室温に戻す。

【0271】

(磁気ビーズ試薬による HDL 単離)

1. 緑色キャップ管又は血清分離管を使用し、5 にて 2300 rpm で 20 分間遠心して血漿又は血清を血液サンプルから分離する。 10

【0272】

2. 上清(血清又は血漿)を取り出す。注：サンプルを予め凍結している場合には、サンプルを解凍し、室温にて 12,000 rpm で 5 分間遠心する。こうして、アッセイに影響を与える可能性のある血清又は血漿中に存在する粒子を除去する。

【0273】

3. 上清(最大 250 μL / ウェル)を透明丸底 96 ウェルプレートに加える。

【0274】

4. 上清の総容量の 1/5 の磁気ビーズ試薬(最大 50 μL / ウェル)を各サンプルに加え、混合する。5 分間静置する。 20

【0275】

5. 磁気粒子コンセントレーターの上にプレートを載せ、5 分間置く。

【0276】

6. 上清を取り出し、マイクロ遠心管に加える。注：上清は HDL を含有している。ApoB を含有する粒子は除去されている。

【0277】

7. 5 にて 12,000 rpm で 5 分間遠心し、ビーズを除去する。

【0278】

8. 上清を取り出す。

【0279】

(緩衝液の調製)

1. コーティングバッファー：25 mL ddH₂O + 8 mL バッファー A + 17 mL バッファー B (バッファー A：0.2 M Na₂CO₃；バッファー B：0.2 M NaHCO₃) を調製する。 30

【0280】

2. 洗浄バッファー：0.75 mL Tween 20 + 150 mL 10 × PBS + 1350 mL ddH₂O を調製する。

【0281】

3. ブロッキング/希釈バッファー：20 mL 10 × PBS + 10 mL Tween 20 + 0.5 g BSA + 170 mL ddH₂O を調製する。 40

【0282】

4. 停止溶液：1.38 mL H₂SO₄ + 48.62 mL H₂O を調製する。

【0283】

(HDL 上清の調製)

1. HDL 上清をコーティングバッファーで 4000 倍に希釈する。

【0284】

2. まず 100 倍に希釈する (HDL 5 μL / バッファー 495 μL)。

【0285】

3. 100 倍希釈液の 40 倍希釈液を調製する (100 倍希釈液 12.5 μL / バッファー 487.5 μL)。 50

- 【0286】
(標準曲線の作成)
1. ハプトグロビン標準(キット同梱) 100 μg をバッファー 2 mL で再構成し、濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とする。
- 【0287】
2. 希釈液を調製する前に 10 分間標準を静かに攪拌しながら静置する。
- 【0288】
3. 標準溶液 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) をバッファーで 4 倍系列希釈して 12.5、3.13、0.78、0.195、及び 0.049 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液とすることにより三重標準点を作成する。 10
- 【0289】
(サンプル及び標準のプレート添加)
1. 各標準及び各サンプル 110 μL をポリプロピレン製丸底 96 ウェルプレート 3 枚に加える。
- 【0290】
2. マルチチャンネルピペットを使用し、各ウェルから 100 μL を取り出し、抗ヒト ApoA1 をコーティングしたマイクロウェルプレート (A1 キット同梱) に加える。
- 【0291】
3. 一晚 4 でインキュベートする。
- 【0292】 20
4. 抗原をバイオハザード廃棄物容器に廃棄する。
- 【0293】
5. 洗浄バッファー 300 μL で 3 回洗浄する。プレートを逆さにし、内容物をデカントし、吸水性ペーパータオルの上で 4 ~ 5 回叩き、各段階で液体を完全に取り除く。
- 【0294】
(ブロッキング及び一次抗体)
1. ブロッキングバッファー 200 μL を全ウェルに加え、室温で 1 時間インキュベートする。
- 【0295】 30
2. 洗浄バッファー 300 μL で 3 回洗浄する。プレートを逆さにし、内容物をデカントし、吸水性ペーパータオルの上で 4 ~ 5 回叩き、各段階で液体を完全に取り除く。
- 【0296】
3. HRP 標識抗ヒトハプトグロビンを 20000 倍に希釈する (抗体 1 μL / 希釈バッファー 20 mL)。
- 【0297】
4. 20000 倍希釈液 50 μL を各ウェルに加える。
- 【0298】
5. 洗浄バッファー 300 μL で 3 回洗浄する。プレートを逆さにし、内容物をデカントし、吸水性ペーパータオルの上で 4 ~ 5 回叩き、各段階で液体を完全に取り除く。
- 【0299】 40
(TMB 及び停止溶液の添加)
1. TMB A 1 部を TMB B 1 部と混合する。
- 【0300】
2. TMB 混液 100 μL を各ウェルに加え、20 分間インキュベートする。
- 【0301】
3. 停止溶液 100 μL を各ウェルに加える。
- 【0302】
(プレートリーダーの読取り)
1. 波長を 450 nm に設定したプレートリーダーで読取る。
- 【0303】 50

(A p o A - I 会合免疫吸着蛋白質ヘモペキシン E L I S A)

【表 6】

表 6. ApoA-I 会合免疫吸着蛋白質ヘモペキシン ELISA の材料

材料	供給業者	カタログ番号
HRP 標識-抗ヒトヘモペキシン	Immunology Consultants Laboratory	CHX-80P
全長ヒトアポリポタン A1 ELISA キット	Alerchek	
ヒト血漿由来ヘモペキシン	Athens Research & Technology, Inc.	
プレートリーダー(例えば VersaMax Tunable)	Molecular Devices	
ポリプロピレン製非滅菌丸底 96 ウェルプレート	Fisher	12-565-502
40 ウェルプレート	Nunc	F25-034-03
TMB	Fisher	
H ₂ SO ₄	Fisher	

注：全試薬は使用前に室温に戻す。

【 0 3 0 4 】

(磁気ビーズ試薬による H D L 単離)

1. 緑色キャップ管又は血清分離管を使用し、5 にて 2 3 0 0 r p m で 2 0 分間遠心して血漿又は血清を血液サンプルから分離する。

【 0 3 0 5 】

2. 上清(血清又は血漿)を取り出す。注：サンプルを予め凍結している場合には、サンプルを解凍し、室温にて 1 2 , 0 0 0 r p m で 5 分間遠心する。こうして、アッセイに影響を与える可能性のある血清又は血漿中に存在する粒子を除去する。

【 0 3 0 6 】

3. 上清(最大 2 5 0 μ L / ウェル)を透明丸底 9 6 ウェルプレートに加える。

【 0 3 0 7 】

4. 上清の総容量の 1 / 5 の磁気ビーズ試薬(最大 5 0 μ L / ウェル)を各サンプルに加え、混合する。5 分間静置する。

【 0 3 0 8 】

5. 磁気粒子コンセントレーターの上にプレートを載せ、5 分間置く。

【 0 3 0 9 】

6. 上清を取り出し、マイクロ遠心管に加える。注：上清は H D L を含有している。A p o B を含有する粒子は除去されている。

【 0 3 1 0 】

7. 5 にて 1 2 , 0 0 0 r p m で 5 分間遠心し、ビーズを除去する。

【 0 3 1 1 】

8. 上清を取り出す。

【 0 3 1 2 】

(緩衝液の調製)

1. コーティングバッファー：2 5 m L d d H ₂ O + 8 m L バッファー A + 1 7 m L バッファー B (バッファー A : 0 . 2 M N a ₂ C O ₃ ; バッファー B : 0 . 2 M N a H C O ₃) を調製する。

【 0 3 1 3 】

2. 洗浄バッファー：0 . 7 5 m L T w e e n 2 0 + 1 5 0 m L 1 0 × P B S + 1 3 5 0 m L d d H ₂ O を調製する。

【 0 3 1 4 】

3. プロッキング / 希釈バッファー：2 0 m L 1 0 × P B S + 1 0 m L T w e e n 2 0 + 0 . 5 g B S A + 1 7 0 m L d d H ₂ O を調製する。

【 0 3 1 5 】

4. 停止溶液：1 . 3 8 m L H ₂ S O ₄ + 4 8 . 6 2 m L H ₂ O を調製する。

【 0 3 1 6 】

(サンプル及び標準曲線の作成)

1. サンプル (H D L 上清) をコーティングバッファーで 2 0 0 倍に希釈する (H D L

2 . 5 μ L / コーティングバッファー 4 9 7 . 5 μ L) 。

10

20

30

40

50

- 【0317】
2. ヘモペキシンをコーティングバッファーで濃度1000 ng/mLに調製する(ヘモペキシン2 μL/コーティングバッファー2 mL)。
- 【0318】
3. 1000 ng/mL溶液をコーティングバッファーで2倍系列希釈して500、250、125、62.5、31.25、15.63 ng/mL溶液とすることにより三重標準点を作成する。
- 【0319】
4. ブランクとしてコーティングバッファーのみをウェルに加える。
- 【0320】
(サンプル及び標準のプレート添加)
1. 各標準及び各サンプル110 μLをポリプロピレン製丸底96ウェルプレート3枚に加える。 10
- 【0321】
2. マルチチャンネルピペットを使用し、各ウェルから100 μLを取り出し、抗ヒトApoA1をコーティングしたマイクロウェルプレート(A1キット同梱)に加える。
- 【0322】
3. 一晚4 でインキュベートする。
- 【0323】
4. 抗原をバイオハザード廃棄物容器に廃棄する。 20
- 【0324】
5. 洗浄バッファー300 μLで3回洗浄する。プレートを逆さにし、内容物をデカン
トし、吸水性ペーパータオルの上で4~5回叩き、各段階で液体を完全に
取り除く。
- 【0325】
(ブロッキング及び一次抗体)
1. ブロッキングバッファー200 μLを全ウェルに加え、室温で1時間インキュ
ベートする。
- 【0326】
2. 洗浄バッファー300 μLで3回洗浄する。プレートを逆さにし、内容物をデカン
トし、吸水性ペーパータオルの上で4~5回叩き、各段階で液体を完全に
取り除く。 30
- 【0327】
3. HRP標識ニワトリ抗ヒトヘモペキシンを20000倍に希釈する(抗体1 μL/
希釈バッファー20 mL)。
- 【0328】
4. 20000倍希釈液50 μLを各ウェルに加える。
- 【0329】
5. 洗浄バッファー300 μLで3回洗浄する。プレートを逆さにし、内容物をデカン
トし、吸水性ペーパータオルの上で4~5回叩き、各段階で液体を完全に
取り除く。
- 【0330】
(TMB及び停止溶液の添加) 40
1. TMB A1部をTMB B1部と混合する。
- 【0331】
2. TMB混液100 μLを各ウェルに加え、20分間インキュベートする。
- 【0332】
3. 停止溶液100 μLを各ウェルに加える。
- 【0333】
(プレートリーダーの読取り)
1. 波長を450 nmに設定したプレートリーダーで読取る。
- 【0334】
なお、本明細書に記載するプロトコールは例証を目的とし、限定的ではない。本明細書 50

に記載する教示を使用し、他のアッセイ及びアッセイフォーマットも当業者に容易に利用可能になるであろう。

【0335】

(結果)

健常ボランティア10人と、基準によるCHD患者10人から血漿をプールした。HDLを単離し、ネイティブPAGEゲルで泳動させ、ウェスタン分析を使用してヘモグロビンに対してイムノプロットした。図27の左パネルに示すように、健常ボランティア10人からのHDLではCHD患者10人に比較して著しく多量のヘモグロビンが検出された。図27の右パネルに示すように、HDL単離前に溶血RBCを血漿に添加すると、どちらの群でもHDLと会合したヘモグロビンの量は増加したが、これらの極度溶血条件下でも健常ボランティアとCHD患者の有意差は依然として明白であった。

10

【0336】

他の実験では、別の群の健常ボランティア12人、若年性糖尿病患者14人(成人8人; 幼児6人)、及びNCEP ATP III基準によるCHD又は等価疾患をもつ対象8人から血清を採取した。最後の群の全患者はスタチンを投与中の者とした。ヒトapoa-Iに対する抗体を96ウェルプレートにコーティングした。対象からの血清を加え、一晚4℃でインキュベートした。プレートを十分に洗浄し、ヒトヘモグロビン又はヒトハプトグロビンに対する一次ヤギ抗体を加えて4℃で一晚インキュベートした。プレートを十分に洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)で標識したヤギIgGに対する二次抗体を加え、2時間室温でインキュベートした。プレートを十分に洗浄し、HRP基質を加え、光学密度(OD)を測定した。図28Aは非RBCヘモグロビン(HRP $\mu\text{g}/\text{mL}$)を示す。図28Bはハプトグロビン(HRP $\mu\text{g}/\text{mL}$)を示す。図28Cは非RBCヘモグロビン値にハプトグロビン値を乗じた積を示す。その結果、後者方法で得られた値は健常ボランティアを糖尿病患者とCHD患者から切り離し、全くオーバーラップしなかった。

20

【0337】

これらの結果から明らかなように、本明細書に報告する新規アッセイは糖尿病やCHD等の疾患をもつ対象の検出に有用であり、これらの患者を健常者から区別するための手段となる。

【実施例2】

30

【0338】

向炎症性HDLにおける蛋白質プロファイル

本発明者らはマウス及びヒトの両者において、HDLの炎症特性がアテローム性動脈硬化症の指標としてHDLコレステロール濃度よりも高感度の指標であることを既に報告している。本実施例では、ProteinChip技術を表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間質量分析法(SELDI-TOF-MS)と併用し、アテローム発生飼料を与えたマウスHDLから正常マウスHDLを区別する特異的な蛋白質フィンガープリントの同定について記載する。C57BL/6Jマウスにアテローム発生飼料を1週間与えた結果、HDLコレステロール濃度が低下し、パラオキシナーゼ活性が低下し、反応性酸素種含量が増加し、マクロファージからのコレステロール流出を促進するHDLの能力が低下した。通常飼料に戻して更に2週間マウスに与えると、HDLの向アテローム発生特性は正常表現型に復帰した。通常飼料を与えたマウスに由来する正常HDLと比較してアテローム発生飼料を与えたマウスに由来する向炎症性HDLに $p < 0.05$ で示差的に存在する合計88個のSELDIピークを同定した。飼料を元に戻すと、88個の血清ピークのうちの74個が正常レベルに復帰した。短期飼料交換と非アテローム発生因子に起因するアーチファクト/変化を排除するように更に分析後、向炎症性HDLと示差的に会合している蛋白質に相当する24個のSELDI m/z ピークを同定した。24個の蛋白質ピークのうちの14個はアテローム性動脈硬化症/高脂血症の他の3種の広く使用されている動物モデル、即ち西欧型飼料を与えたC57BL/6J、LDLRヌルマウス及びapoEヌルマウスに由来する向炎症性HDLと共通であることが判明した。更に、全4種の動

40

50

物モデルに由来する血清サンプルの蛋白質プロファイリングの結果、向炎症性HDLの同定用血清バイオマーカーパネルとして使用可能な8蛋白質コアシグネチャー（上記14個のSELDI m/zピークのサブセット）が同定された。

【0339】

（実験手順）

（動物実験）

これらの実験ではC57BL/6J、LDLRヌル/C57BL/6J及びapoEヌル/C57BL/6J雌性8~12週齢マウスを使用した。通常飼料（Ralston Purina Mouse Chow）、又は15.8%脂肪、1.25%コレステロール、及び0.5%コール酸w/w/wを含有するアテローム発生飼料（Teklad/Harlan Catalog）、又は西欧型飼料（Teklad/Harlan, Madison WI, diet No. 88137; 42%脂肪、0.15%コレステロールw/w）の3種の飼料のうちの1種を指定期間マウスに与えた。一晚絶食させたマウスから血清サンプルを単離し、従来記載されているように（Navabら（2000）J. Lipid Res., 41:1481-1494）10%スクロースで低温保存処理し、使用時まで-80 で保存した。

10

【0340】

（リポ蛋白質単離）

直列に配置したデュアルPharmacia Superose 6カラムから構成されるゲル濾過高速液体クロマトグラフィー（FPLC）システムにより血清サンプルを分画した。非金属製Beckman HPLCポンプで滅菌PBSを流速0.5ml/minで供給して血清（0.5ml）を溶出し、1ml毎に分画した。製造業者のプロトコールに従い、コレステロール試薬（Thermo, Louisville, CO）を使用して各画分のコレステロール含量を定量し、BCAアッセイ（Promega, Madison, WI）を使用して蛋白質含量を定量した。

20

【0341】

（SELDI分析及びex vivoアッセイのためのHDL単離）

LipidiDirect HDL試薬（Polymedco, Cortland Manor, NY）を製造業者のプロトコールに従って使用してHDLを新たに単離した。HDLを含有する上清のコレステロール含量とBCA蛋白質を定量し、単離後48時間以内に使用した。

30

【0342】

（HDL中の反応性酸素種（ROS））

従来記載されているように（Navabら（2001）J. Lipid Res., 42:1308-1317）2, 7, 7'-ジクロロフルオレセインジアセテート（H₂DCFDA: Invitrogen, Carlsbad, CA）を使用してHDLのROS含量を測定した。要約すると、HDLをメタノール中でH₂DCFDA（10μg/ml）と共に30分間37 でインキュベートした。485nm/525nmの蛍光強度を測定することによりROSの指標としてのDCF形成を検出した。

40

【0343】

（パラオキシナーゼ（PON）アッセイ）

従来記載されているように（Van Lentenら（1995）J. Clin. Invest., 96:2758-2767）HDL中のPON活性を測定した。HDLをパラオキシソンと共にインキュベートし、405nmの吸光度の増加を12分間測定することによりPON活性を分析した。添加したHDL 1ml当たり毎分1nmolの4-ニトロフェノールの形成としてPON活性1単位を定義した。

【0344】

（コレステロール流出）

従来記載されているように（Navabら（2004）Circulation, 109:3215-3220）細胞内コレステロール流出を実施した。要約すると、マウスR

50

AW264.7細胞を24ウェル組織培養プレートで培養し、10% FBSを添加したDMEM培地で一晚増殖させた。細胞を無血清培地で洗浄し、0.5%脂肪酸フリーBSA (Sigma, St. Louis, MO) を含有する培地に³H-コレステロール(0.5 μCi/ml)とアセチル化LDL(50 μg/ml)を添加した液を一晩加えた。標識細胞を洗浄し、0.5% BSAを含有する培地に再懸濁し、HDLと共に6時間37℃でインキュベートした。培地に放出された合計放射能カウントの百分率としてコレステロール流出を表した。

【0345】

(SELDI分析用サンプル調製)

製造業者のプロトコール(Ciphergen Biosystems, Fremont, CA)に従い、強アニオン交換(Q10)チップで血清及びHDLサンプルを処理した。要約すると、加湿チャンバーでQ10アレイスポットを結合バッファー(1×PBS/0.1% Triton X-100, pH7)で室温にて15分間平衡化した。各サンプルをまず9M尿素/2% Chaps/50mM Tris HCl, pH9.0で5倍に希釈し、更に結合バッファーで25倍に希釈した。平衡化したQ10蛋白質アレイチップに各希釈サンプル5 μlをスポットし、加湿チャンバーで30分間室温にてインキュベートした。チップを結合バッファーで2回、HPLC H₂Oで1回洗浄した後、風乾した。チップをシナピン酸溶液で先ず100%飽和溶液0.5 μl、次いで50%飽和溶液1 μlで順次処理した。シナピン酸溶液はEAM溶液(50%アセトニトリル及び0.5%トリフルオロ酢酸)をシナピン酸(3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシ桂皮酸)で飽和することにより新たに調製する。

10

20

【0346】

(Ciphergen ProteinChip SELDI-TOF-MS分析)

アレイをCiphergen ProteinChip Reader(モデルPBSII)で分析した。230~280任意単位のレーザー強度の平均65個のレーザーショットを使用することにより蛋白質の質量スペクトルを生成した。低分子量蛋白質のデータ獲得には、検出寸法範囲を2~18kDaに設定し、最大寸法25kDaとした。高分子量蛋白質には、検出寸法範囲を20~150kDaに設定し、最大寸法250kDaとした。外部校正標準(Ciphergen Biosystems)であるウシインスリン(5,733.6Da)、ヒトユビキチン(8,564.8Da)、ウシチトクロームc(12,230.9Da)、ウシスーパーオキシドジスムターゼ(15,591.4Da)、ウシラクトグロブリンA(18,363.3Da)、西洋ワサビペルオキシダーゼ(43,240Da)、BSA(66,410Da)、及びニワトリコンアルブミン77,490Da)に従い、アレイ表面で捕捉した各蛋白質の質量対電荷比(m/z)を決定した。

30

【0347】

(統計分析)

ProteinChipデータ分析ソフトウェアバージョン3.2(Ciphergen Biosystems)を使用してデータを分析した。各比較について、群の全プロファイルの総イオン電流を使用して粗強度データを正規化した。ピーク強度は低分子量範囲ではm/z 3,000~25,000Da、高分子量範囲では4,000~250,000Daの総イオン電流に正規化した。Biomarker Wizardアプリケーション(ノンパラメトリック計算; Ciphergen Biosystems)を使用して全スペクトルをコンパイルし、定量質量ピークを自動検出した。プロファイル群でサンプル統計を実施した(抗炎症性HDL対向炎症性HDL; 正常血清対アテローム発生血清)。各群間の蛋白質差(変化倍率)を計算した。一方の群に比較してその強度に統計的有意差が認められた場合(p<0.05)に蛋白質は2群間で示差的に会合しているとみなした。

40

【0348】

(結果)

50

(モデルシステム)

HedrickらはC57BL/6J低比重リポ蛋白質受容体欠損(LDLRヌル)マウスにアテローム発生飼料を短期間(7日間まで)与えると、血漿PON活性及び質量が劇減し、血漿及びHDL脂質ヒドロペルオキシドが増加することを示した(Hedrickら(2000)Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.,20:1946-1952)。興味深いことに、マウスがアテローム発生飼料を7日間消費した後に通常飼料に交換して3日間与えると、PON質量及び活性は正常レベルに戻った。他方、Hedrickらは通常飼料に交換して3日間与えても全HDL特性が完全に回復するわけではないことに注目した(前出)。本発明者らは向炎症性HDLで示差的に会合した蛋白質を同定する目的で同様のマウスモデルシステムを利用した。通常飼料を与えたC57BL/6Jマウスは抗炎症性HDLをもつが、アテローム発生飼料を与えたC57BL/6Jマウスは向炎症性HDLをもつ(Shihら(1996)J.Clin.Invest.,97:1630-1639)。図18及び19に示すように、7日目に飼料をアテローム発生飼料から通常飼料に交換し、更に14日間与えると、HDLコレステロール(図18及び図19,右下)、反応性酸素種含量(図19,左上)、PON活性(図19,右上)、及びHDLによるコレステロール流出(図19,左下)は正常レベルに回復した。これらの3種の実験条件(実験によって21日間までの全実験期間通常飼料、実験によって21日間までの全実験期間アテローム発生飼料、又は7日間アテローム発生飼料後に14日間通常飼料)からのHDLを使用することにより、HDLが向炎症性状態に転換するときHDLと会合又は解離している蛋白質を同定するためのシステムが得られるのではないかと推論した。

10

20

【0349】

(特定SELDIピークは向炎症性HDLと示差的に会合している。)

先ずSELDI分析を使用し、アテローム発生飼料でHDLと示差的に会合する蛋白質を同定した。8週齢雌性C57BL/6Jマウス(n=8匹/群)に通常飼料を7日間(C)、アテローム発生飼料を7日間(A)、通常飼料を21日間(CC)、又はアテローム発生飼料を7日間後に通常飼料を更に14日間(AC)与えた。各期間の終了時に各飼料群から血清サンプルを採取した(一晚絶食後に採取)。各血清からのHDLをLipid Direct HDL試薬で単離し、SELDI分析し、通常飼料を与えたマウスからの血清及びHDLと比較してアテローム発生飼料を与えたマウスからのアテローム発生血清及びHDLの蛋白質プロファイルと同定した。各群からの個々の血清サンプル(n=8)から蛋白質プロファイルを得た。「C」群の蛋白質プロファイルを「A」の蛋白質プロファイルと比較し、「CC」群の蛋白質プロファイルを「AC」の蛋白質プロファイルと比較した。第1組の分析では、正常血清(「C」群)からのHDLと比較してアテローム発生血清(「A」群)からのHDLで示差的に検出されたm/zピークを更にCiphergen ProteinChipソフトウェアにより従来記載されているように統計分析した(Kozakら(2003)Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,100:12343-12348)。21日間アテローム発生飼料を与えたマウスからのHDLでは、21日間通常飼料を与えたマウスからのHDLに対して有意差(p<0.05)のある合計88個のピークが検出された。

30

40

【0350】

(HDL中の蛋白質ピークは飼料交換を反映する。)

これらの蛋白質プロファイルを「AC」群に対して分析した処、88個のピークのうちの74個が通常飼料のHDLで認められる正常レベルに復帰しており、これらのピークは抗炎症性から向炎症性及びその逆のHDLの転換に関連する蛋白質プロファイルに相当すると予想された(表12)。

【0351】

(短期及び長期飼料により誘導した向炎症性HDLの両者に共通の蛋白質プロファイルが存在する。)

アテローム発生飼料を15週間(W15A)与えたC57BL/6Jマウス(n=8)

50

からのアテローム発生血清中のHDLと通常飼料を15週間(W15C)与えたマウスからの血清中のHDLを比較することにより、SELDIプロファイルも作成した。更に、短期飼料により誘導したHDL(上記74個のピーク)と長期(15週間)飼料により誘導したHDLに共通するピークを測定した。この比較により短期飼料交換に起因するアーチファクト/変化を排除できると推論した。期間に関係なくアテローム発生飼料(7日間アテローム発生飼料及び15週間アテローム発生飼料)を与えたマウスからのHDLでは、通常飼料を与えたマウスからのHDLと比較して特異的且つ有意差のある合計24個のSELDIピークを同定した(表7)。

【0352】

【表7】

10

表7. 短期又は長期アテローム発生飼料給餌後にHDLと会合した共通SELDIピーク

蛋白質ピーク m/z (x10 ³)	比較により得られた蛋白質ピークの変化倍率		
	A対C	AC対CC	W15A対W15C
5.1	(1.4)	3.1	(1.9)
6.2	1.6	NC	2.4
6.9	(1.8)	NC	(3.0)
7.4	2.5	NC	5.5
7.8	1.9	NC	3.4
9.3	(2.4)	NC	(2.1)
12.7	2.9	NC	1.5
14.9	5.9	NC	8.8
15.1	6.8	NC	7.9
15.6	4.7	3.5	8.1
15.8	5.0	NC	6.1
15.9	4.8	NC	7.5
16.2	4.0	NC	5.3
16.5	3.2	1.8	3.8
18.6	(3.1)	(1.5)	(3.5)
19.5	(3.3)	(2.4)	(1.8)
22.0	(1.3)	1.6	(1.6)
35.3	1.5	NC	1.1
73.3	(1.5)	NC	(1.7)
76.9	1.9	NC	6.3
81.0	2.6	NC	2.5
131.5	(1.5)	NC	(1.4)
163.7	(2.1)	(1.3)	(1.6)
196.8	(1.8)	NC	(1.8)

20

括弧内の数字は変化倍率が低下した蛋白質ピークを表す。NC=変化なし、C=通常飼料7日間、A=アテローム発生飼料7日間、AC=アテローム発生飼料7日間後に通常飼料を更に14日間、CC=通常飼料21日間、15wA=アテローム発生飼料15週間、15wC=通常飼料15週間。

【0353】

アテローム発生飼料は0.5%コール酸を含有しているので、コール酸を含まない西欧型飼料(WD)を与えたマウス(n=8)から得られた血清サンプルからのHDLで上記全実験を繰返し、両者高脂肪高コレステロール飼料(コール酸を含有するアテローム発生飼料とコール酸を含有しない西欧型飼料の両者)によるHDLと示差的に会合した蛋白質に相当する21個のm/zピークから構成される蛋白質シグネチャーを同定した(表8)。通常飼料を与えたマウスからのHDLと比較すると、13個の蛋白質ピークがアテローム発生飼料又は西欧型飼料を与えたマウスからのHDLと強く会合/増加しており(黒の数字)、8個の蛋白質ピーク(括弧内)がアテローム発生飼料又は西欧型飼料を与えたマウスからのHDLで解離/減少していた(表8)。

30

【0354】

【表 8】

表 8. 西欧型飼料を与えたマウスとアテローム発生飼料を与えたマウスに由来する C57BL/6J HDL と示差的に会合した共通 SELDI ピーク

蛋白質ピーク m/z (x10 ³)	比較により得られた蛋白質ピークの変化倍率			
	A	AC 対 CC	W15A 対 W15C	WD 対 C
6.2	1.6	NC	2.4	2.3
6.9	(1.8)	NC	(3.0)	(1.6)
7.4	2.5	NC	5.5	3.9
7.8	1.9	NC	3.4	2.7
9.3	(2.4)	NC	(2.1)	(1.5)
12.7	2.9	NC	1.5	1.9
14.9	5.9	NC	8.8	1.8
15.1	6.8	NC	7.9	4.3
15.6	4.7	NC	8.1	5.0
15.8	5.0	NC	6.1	4.6
15.9	4.8	NC	7.5	7.1
16.2	4.0	NC	5.3	5.1
16.5	3.2	1.8	3.8	3.1
18.6	(3.1)	(1.5)	(3.5)	(1.8)
19.5	(3.3)	(2.4)	(1.8)	(3.0)
22.0	(1.3)	1.6	(1.6)	(1.8)
73.3	(1.5)	NC	(1.7)	(1.8)
76.9	1.9	NC	6.3	12.7
81.0	2.6	NC	2.5	4.7
131.5	(1.5)	NC	(1.4)	(1.7)
163.7	(2.1)	(1.3)	(1.6)	(1.3)

括弧内の数字は変化倍率が低下した蛋白質ピークを表す。NC=変化なし、C=通常飼料 7 日間、A=アテローム発生飼料 7 日間、AC=アテローム発生飼料 7 日後に通常飼料を更に 1 4 日間、CC=通常飼料 2 1 日間、1 5 wA=アテローム発生飼料 1 5 週間、1 5 wC=通常飼料 1 5 週間、WD=西欧型飼料 7 日間。

【 0 3 5 5 】

(高脂血症マウスモデルで HDL と示差的に会合した共通蛋白質プロファイル)

アテローム性動脈硬化症のマウスモデルに由来する HDL を対照マウスに由来する HDL から区別する蛋白質プロファイルを同定したが、これを検証するために、西欧型飼料を与えた LDLR ヌルマウスと通常飼料を与えた apoE ヌルマウスを含むアテローム性動脈硬化症の他の周知マウスモデルを更に利用した。これらのマウスはアテローム性動脈硬化症になり易く、向炎症性 HDL をもつ (Navabら (2005) Ann. Med., 37: 173 - 178; Shihら (1996) J. Clin. Invest., 97: 1630 - 1639; Ridker (2002) Circulation, 105: 2 - 4)。これらのアテローム発生マウスからの HDL サンプルを SELDI 分析し、プロファイルを C57BL/6J マウスモデルと交差検証した。これらの試験により、短期飼料交換と非アテローム発生因子に起因するアーチファクト/変化を排除するのみならず、複数のアテローム発生モデルで共通の HDL のバイオマーカーを同定した。向炎症性 HDL と会合するとして C57BL/6J マウスモデルで同定された 21 個のピークのうちの 14 個は LDLR ヌルマウス及び apoE ヌルマウスに由来する HDL で検出されたピークと共通であった (表 9)。

【 0 3 5 6 】

【表 9】

表 9. アテローム性動脈硬化症の 3 種のマウスモデルに由来する HDL と示差的に会合した共通 SELDI ピーク

蛋白質ピーク m/z (x10 ³)	比較により得られた蛋白質ピークの変化倍率		
	WT	LDLR	ApoE
7.4	2.5	5.2	2.2
7.8	1.9	2.9	1.9
9.3	(2.4)	(2.4)	(2.1)
14.9	5.9	2.0	3.2
15.1	6.8	2.8	3.2
15.6	4.7	4.1	4.4
15.8	5.0	2.7	3.5
15.9	4.8	2.3	3.1
16.2	4.0	2.8	4.2
16.5	3.2	3.5	4.0
18.6	(3.1)	(3.2)	(2.2)
19.5	(3.3)	(2.2)	(2.4)
81.0	2.6	3.1	2.5
163.7	(2.1)	(2.2)	(1.7)

括弧内の数字は変化倍率が低下した蛋白質ピークを表す。WT=野生型 C57BL/6J マウスで向炎症性 HDL と示差的に会合した m/z ピーク、LDLR=LDLR ヌルマウスに由来する向炎症性 HDL と会合した m/z ピーク、ApoE=ApoE ヌルマウスに由来する向炎症性 HDL と会合した m/z ピーク。

【 0 3 5 7 】

(向炎症性 H D L と会合した潜在的血清バイオマーカー)

アテローム発生 / 高脂血症飼料による H D L と会合した蛋白質に相当する血清蛋白質プロファイルを更に同定するために、全 4 種のアテローム性動脈硬化症マウスモデルからの血清サンプルを H D L について実施したと同様に S E L D I 分析した。S E L D I 分析の結果、アテローム発生 / 高脂血症マウス血清で共通のバイオマーカーとして 1 3 個のピークが同定された (表 1 0) 。更に、アテローム発生 / 高脂血症血清で検出された 1 3 個の蛋白質ピークのうちの 8 個はアテローム発生 / 高脂血症飼料による H D L で同定されたピーク (上記 1 4 個のピーク) と共通であった (表 1 1) 。これらの結果から、同定された 8 個の蛋白質はマウス血清で直接検出可能な向炎症性 H D L と会合した潜在的バイオマーカーであると予想される。

10

【 0 3 5 8 】

【 表 1 0 】

表 1 0 . アテローム性動脈硬化症の 3 種のマウスモデルに由来する血清と示差的に会合した共通 S E L D I ピーク

蛋白質ピーク m/z (x10 ³)	比較により得られた蛋白質ピークの変化倍率		
	WT	LDLR	ApoE
9.3	(2.5)	(3.8)	(1.9)
11.6	(1.9)	(2.7)	(4.2)
14.7	8.8	2.9	3.7
14.9	13.2	3.7	5.2
15.3	18.0	2.4	3.3
15.6	16.6	2.0	3.3
15.8	14.4	5.8	3.9
16.2	7.7	3.0	8.6
16.5	5.8	2.1	3.7
18.6	(4.9)	(5.5)	(3.3)
19.5	(3.5)	(4.1)	(3.0)
34.0	1.2	2.2	1.2
90.0	(1.4)	(2.1)	(2.3)

20

括弧内の数字は変化倍率が低下した蛋白質ピークを表す。
WT = 野生型 C 5 7 B L / 6 J マウスでアテローム発生血清と示差的に会合した m / z ピーク、LDLR = LDLR ノックアウトマウスに由来するアテローム発生 / 高脂血症血清と会合した m / z ピーク、ApoE = ApoE ノックアウトマウスに由来するアテローム発生血清と会合した m / z ピーク。

【 0 3 5 9 】

【 表 1 1 】

表 1 1 . アテローム性動脈硬化症の 3 種の C 5 7 B L / 6 J マウスモデルにおける H D L 及び血清と示差的に会合した共通蛋白質シグネチャー

m/z (x10 ³)	(9.3)	14.9	15.6	15.8	16.2	16.5	(18.6)	(19.5)

30

【 0 3 6 0 】

(考察)

近年、H D L 機能はアテローム性動脈硬化症に対して H D L - C よりも選択的な治療ターゲットとなり得ることが明らかになっている (C a s t e l l a n i ら (1 9 9 7) J . C l i n . I n v e s t . , 1 0 0 : 4 6 4 - 4 7 4 ; N a v a b ら (2 0 0 5) A n n . M e d . , 3 7 : 1 7 3 - 1 7 8 ; R i d k e r (2 0 0 2) C i r c u l a t i o n , 1 0 5 : 2 - 4 ; A n s e l l ら (2 0 0 3) C i r c u l a t i o n , 1 0 8 : 2 7 5 1 - 2 7 5 6) 。多数の蛋白質及び酵素活性が H D L と関連付けられているが、どの特定蛋白質プロファイルが正常 / 抗炎症性 H D L を向炎症性 H D L からより良好に区別するのに役立つかについては殆ど分かっていない。アテローム性動脈硬化症の確立マウスモデルで P r o t e i n C h i p 技術を使用し、アテローム発生飼料を与えたマウスで H D L と示差的に会合する蛋白質に相当する m / z ピークを同定した。

40

【 0 3 6 1 】

全実験を個々のマウスサンプル (n = 8 / 群) で実施し、各サンプルを三重に測定した。更に、群間で有意差 (p < 0 . 0 5) のあった m / z ピークのみをその後の分析の候補ピークとして採用した。第 1 組の実験では、飼料をアテローム発生飼料 (7 日間) から通常飼料に交換して更に 1 4 日間与えたときに、H D L の合計 7 4 個の m / z ピーク (表 1 2) が正常レベルに戻った。飼料の短期交換に起因するアーチファクトを排除するために、アテローム発生飼料を 1 5 週間与えたマウスに由来する H D L サンプルから得られた蛋

50

白質プロファイルに対してこれらのピークを更に比較した。興味深いことに、アテローム発生飼料を15週間与えたマウスから得られたHDLで検出された元の74個のピークのうちの24個(表7)しか検出されず、残りの59個のm/zピークは短期飼料交換及び/又は非アテローム発生因子に起因するものと思われた。しかし、残りの59個のm/zピークはHDLのアテローム発生への転換の初期段階で向炎症性HDLと会合している蛋白質に相当する可能性もある。

【0362】

【表12】

表12. C57BL/6Jマウスに由来する向炎症性HDLと会合したSELDIピーク

蛋白質ピーク m/z (x 10 ³)	比較により得られたピークの変化倍率		蛋白質ピーク m/z (x 10 ³)	比較により得られたピークの変化倍率	
	A対C	AA対CC		A対C	AA対CC
5.1	(1.4)	3.1	22.0	(1.3)	1.6
5.3	(1.8)	4.0	23.9	(1.5)	1.5
5.4	(1.7)	2.2	24.8	(2.8)	NC
5.5	(1.9)	NC	25.7	(1.5)	2.0
5.7	(1.8)	1.7	28.0	(1.9)	2.2
6.0	(2.2)	2.2	35.3	1.5	NC
6.2	1.6	NC	36.5	1.8	NC
6.5	(2.1)	3.0	38.7	2.4	NC
6.9	(1.8)	NC	40.8	3.0	NC
7.1	(1.5)	NC	43.2	(1.4)	1.7
7.2	(1.8)	2.3	44.3	(1.6)	NC
7.3	(1.6)	NC	45.2	(1.7)	NC
7.4	2.5	NC	46.0	(8.7)	1.9
7.8	1.9	NC	47.4	(3.7)	NC
7.9	(1.2)	2.3	49.6	(2.5)	(1.30)
8.4	(1.9)	1.9	53.4	(1.8)	NC
8.8	(1.6)	(3.9)	65.9	1.2	NC
8.9	(2.3)	1.8	73.3	(1.5)	NC
9.3	(2.4)	NC	76.9	1.9	NC
10.3	(4.2)	NC	81.0	2.6	NC
11.6	(2.1)	1.6	85.1	(3.2)	NC
12.4	2.2	NC	88.2	(1.9)	NC
12.7	2.9	NC	98.8	(1.8)	NC
13.5	(1.5)	NC	106.6	3.3	(1.9)
13.7	1.6	NC	110.2	(2.3)	NC
14.7	2.6	(1.9)	115.6	(2.0)	1.4
14.9	5.9	NC	131.5	(1.5)	NC
15.1	6.8	NC	142.9	2.0	(1.6)
15.6	4.7	NC	154.0	(2.6)	NC
15.8	5.0	NC	163.7	(2.1)	(1.3)
15.9	4.8	NC	181.9	(2.0)	NC
16.2	4.0	NC	196.8	(1.8)	NC
16.5	3.2	1.8	210.9	2.4	NC
17.6	(2.2)	2.8	219.9	(2.5)	NC
18.6	(3.1)	(1.5)	230.2	(2.5)	NC
19.5	(3.3)	(2.4)	238.1	2.9	NC
21.2	(1.6)	1.6	245.1	(2.2)	NC

括弧内の数字は変化倍率が低下した蛋白質ピークを表す。NC=変化なし、C=通常飼料7日間、A=アテローム発生飼料7日間、AC=アテローム発生飼料7日間後に通常飼料を更に14日間、CC=通常飼料21日間。

10

20

【0363】

興味深いことに、西欧型飼料を与えたマウスから得られた蛋白質プロファイルと比較すると、アテローム発生飼料を与えたC57BL/6Jマウス(短期又は長期)からのHDLではm/z 5100、m/z 35300、及びm/z 197000の3種の蛋白質が検出されなかった(表8)。使用した2種の飼料の主な相違はコール酸であるので、これらの3種の蛋白質はコール酸代謝及び毒性に特異的な蛋白質に相当すると考えられる。これらの蛋白質の同定と特性決定は胆汁酸代謝に関連するHDL炎症特性の解明に有用であると思われる。驚くべきことに、アテローム性動脈硬化症の他の2種の動物モデル(西欧型飼料を与えたLDLRヌルマウスと通常飼料を与えたapoEヌルマウス)から得られた向炎症性HDLから蛋白質プロファイルを作成し、C57BL/6Jマウスからの向炎症性HDLの共通蛋白質プロファイルと比較した処、3種のモデル間で共通していたのは21個のピークのうちの14個のみであった(表8及び表9)。

30

40

【0364】

血清蛋白質プロファイリングは疾患診断及び/又は薬剤有効性判定におけるバイオマーカーの使用の簡単且つ効率的なストラテジーとなる。HDLから得られたプロファイルと異なる多数の血清中の蛋白質を同定した(表13)。アテローム性動脈硬化症/高脂血症の各種全マウスモデルからの13個のピークのコアシーケンスを同定した(表10)。血清プロファイリングとHDLプロファイリングから得られた最終セットの蛋白質プロファイルと比較した処、8個の蛋白質ピークの共通セットを同定した(表10)。これらの8個のピークに相当する蛋白質は向炎症性HDLを同定するために血清サンプルを直接アッセイする場合のみならず、向炎症性HDLの性質を更に解明するための試験にも非常に重要なマーカーパネルを形成することができる。

50

【 0 3 6 5 】

【表 1 3】

表 1 3 . C 5 7 B L / 6 J に由来するアテローム発生 / 高脂血症血清と示差的に会合した S E L D I ピーク
括弧内の数字は変化倍率が低下した蛋白質ピークを表す。NC = 変化なし、C = 通常飼料 7 日間、A = アテローム発生飼料 7 日間、AC = アテローム発生飼料 7 日間後に通常飼料を更に 14 日間、C C = 通常飼料 21 日間。

蛋白質 ピーク m/z (x 10 ³)	比較により得られた ピークの変化倍率		蛋白質 ピーク m/z (x 10 ³)	比較により得られた ピークの変化倍率	
	A 対 C	AA 対 CC		A 対 C	AA 対 CC
5.1	6.4	NC	18.2	2.3	NC
5.2	4.4	(2.6)	18.6	(4.9)	(2.5)
5.3	3.5	(2.8)	19.5	(3.5)	NC
5.4	(1.6)	NC	23.6	1.5	(1.9)
5.8	1.7	NC	28.0	(1.9)	1.6
6.0	2.1	NC	30.0	1.8	NC
6.2	3.7	(3.4)	30.7	2.0	1.4
6.4	9.1	NC	32.1	1.5	NC
6.8	(2.8)	NC	33.0	1.3	(1.4)
7.2	2.0	NC	34.0	1.2	(1.4)
7.5	5.9	1.5	38.8	(1.5)	NC
7.8	3.6	1.8	41.5	1.9	NC
8.0	2.6	NC	43.2	1.5	NC
8.7	(2.3)	NC	44.3	(1.9)	NC
8.8	(1.9)	NC	45.7	(1.7)	NC
9.0	(2.0)	(1.7)	47.4	(1.5)	NC
9.3	(2.5)	(1.8)	49.6	(2.6)	NC
9.5	(2.3)	NC	50.9	(2.4)	NC
9.9	4.3	NC	51.7	(1.9)	NC
10.9	2.4	2.7	53.3	(3.7)	NC
11.6	(1.9)	(1.8)	60.4	1.4	NC
12.0	(3.0)	1.3	72.3	(3.8)	NC
12.3	(1.7)	NC	75.0	(4.0)	NC
12.8	(4.0)	(1.7)	81.1	11.3	NC
13.2	2.2	1.5	82.4	2.3	NC
13.5	1.9	NC	84.5	(2.7)	NC
14.0	1.5	(1.4)	85.9	2.4	NC
14.4	(4.9)	NC	88.1	(1.3)	NC
14.7	8.8	NC	90.0	(1.40)	NC
14.9	13.2	NC	102.8	(1.6)	NC
15.1	9.4	NC	107.3	2.3	NC
15.3	18.0	4.6	115.6	91.4	NC
15.6	16.6	NC	153.9	(1.4)	NC
15.8	14.4	NC	164.5	2.5	NC
16.2	7.7	NC	181.2	(1.6)	NC
16.5	5.8	NC	210.9	7.9	NC
16.9	3.3	NC	245.1	(1.8)	NC
17.2	2.3	NC			

10

20

【 0 3 6 6 】

【表 1 4】

表 1 4 . 短期及び長期飼料により誘導した C 5 7 B L / 6 J アテローム発生 / 高脂血症血清と示差的に会合した共通 S E L D I ピーク

蛋白質 ピーク m/z (10 ³)	比較により得られた蛋白質ピークの変化倍率		
	A 対 C	AC 対 CC	W15A 対 W15C
5.1	6.4	NC	3.8
5.2	4.4	(2.6)	2.0
7.5	5.9	1.5	3.6
7.8	3.6	1.8	2.5
9.3	(2.5)	(1.8)	(3.8)
11.6	(1.9)	(1.8)	(2.3)
12.3	(1.7)	NC	(1.8)
12.8	(4.)	(1.7)	(1.7)
14.7	8.8	NC	4.8
14.9	13.2	NC	23.9
15.3	18.0	4.6	14.0
15.6	16.6	NC	19.3
15.8	14.4	NC	13.6
16.2	7.7	NC	7.1
16.5	5.8	NC	4.3
18.6	(4.9)	(2.50)	(4.4)
19.5	(3.5)	NC	(6.3)
34.0	1.2	(1.4)	1.5
60.4	1.4	NC	1.7
75.0	(4.0)	NC	(2.2)
82.4	2.3	NC	5.4
84.5	(2.7)	NC	(2.0)
88.1	(1.3)	NC	(2.4)
90.0	(1.4)	NC	(1.5)

括弧内の数字は変化倍率が低下した蛋白質ピークを表す。NC = 変化なし、C = 通常飼料 7 日間、A = アテローム発生飼料 7 日間、AC = アテローム発生飼料 7 日間後に通常飼料を更に 14 日間、C C = 通常飼料 21 日間、W15A = アテローム発生飼料 15 週間、W15C = 通常飼料 15 週間。

30

【 0 3 6 7 】

これらの m / z ピーク (表 1 1) に相当する蛋白質は高脂血症及びアテローム性動脈硬化症の C 5 7 B L / 6 J マウスモデルからの向炎症性 H D L と示差的に会合している。第 1 のスクリーンとして、各種 pH の緩衝液を使用してイオン交換カラムにより正常及びアテローム発生血清を分画した後、S E L D I 分析し、各該当蛋白質ピークの p I 値を得た (K o z a k ら (2 0 0 5) P r o t e o m i c s , 5 : 4 5 8 9 - 4 5 9 6) 。各蛋白質ピークの p I と質量情報を使用してデータベース (T a g I d e n t) を検索し、該当 S E L D I ピークに相当する候補蛋白質を得た。アテローム発生飼料を与えたマウスの H D L にはヘモグロビンが会合していると判定した。これらの試験の詳細については実施例 3 に記載する。

40

【 0 3 6 8 】

50

以上をまとめると、向炎症性HDLにおける8個のm/z SELDIバイオマーカーピークを特性決定し、これらがアテローム発生/高脂血症血清で示差的に発現していることを確認した。総合すると、これらのマーカーはマウスで正常/抗炎症性HDLから向炎症性HDLへの転換に関与する分子メカニズムの決定に役立つであろう。これらのマーカーとヒト向炎症性HDLにおけるマーカーを同定することにより、アテローム性動脈硬化症及び炎症反応を特徴とする他の病変の早期検出を改善するための臨床アッセイの開発が促進される。

【実施例3】

【0369】

アテローム発生/高脂血症飼料を与えたマウスに由来する血清中の高比重リポ蛋白質と会合したヘモグロビン

実施例2では、アテローム性動脈硬化症のマウスモデルで正常/抗炎症性HDLを向炎症性HDLから区別する強アニオン交換SELDI ProteinChip技術を使用して8個の特異的な蛋白質フィンガープリントを同定した。微量液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法を使用し、m/z 14,900及びm/z 15,600に相当するSELDIピークを夫々マウスヘモグロビン鎖(Hb-, 14.9kDa)及びマウスヘモグロビン鎖(Hb-, 15.9kDa)として同定した。ウェスタンブロット分析により、Hbが正常HDLと比較して向炎症性HDLと示差的に会合していることを確認した。HDLと会合したHbの生化学的特性決定の結果、向炎症性HDLと会合したHbはpIの低下(遊離HbのpI7.5以上に対してpI4.0及びpI7.0)、HDLを含む画分に存在する高分子量複合体との会合等の特異な物理化学的性質をもつことも判明した。HDLと会合したヘモグロビンの主形態はオキシヘモグロビン(oxyHb)であった。oxyHbの酸化促進性により、本発明のデータはHbがアテローム発生条件下でHDLの向炎症性に寄与している可能性を示唆している。更に、HDLと会合したHbはアテローム性動脈硬化症及び炎症反応を特徴とする他の病変の新規バイオマーカーとして利用できると結論する。

【0370】

(実験手順)

(動物実験)

3種のマウスモデルを比較する実験で、野生型、低比重リポ蛋白質受容体欠損(LDLRヌル)及びapoEヌルの8~12週齢C57BL/6J雌性マウス(n=8匹/群)を使用した。これらの実験では、通常飼料(Ralston Purina Mouse Chow)、又は15.8%脂肪、1.25%コレステロール及び0.5%コール酸w/w/wを含むアテローム発生飼料(Teklad/Harlan Catalog)の2種類の飼料の一方をマウスに与えた。短期試験ではマウス(n=8匹/群)に上記飼料を7日間与え、長期試験ではマウスに上記飼料を15週間与えた。一晚絶食させたマウスから血清サンプルを単離し、10%スクロースで低温保存処理し、使用時まで-70で保存した。

【0371】

(リポ蛋白質単離)

直列に配置したデュアルPharmacia Superose 6カラムから構成されるシステムにより血清サンプルプールを分画した。非金属製Beckman HPLCポンプで滅菌PBSを流速0.5ml/minで供給して血清(0.5ml)を溶出し、1ml毎に分画した。最初の10個の1ml画分を捨て、その後の各1ml画分を採取し、製造業者のプロトコールに従い、コレステロール含量(Thermo, Louisville, CO)分析と、BCA蛋白質アッセイ(Promega, Madison, WI)を実施した。全実験に備えてVLDL、LDL、HDL及びHDL後画分をプールした。実験によっては、製造業者のプロトコールに従い、Lipidirect HDL試薬(Polymedco, Cortland Manor, NY)を使用して個々の血清サンプルからのHDLを新たに単離した。HDLを含有する上清のコレステロール含量とB

10

20

30

40

50

C A 蛋白質を定量し、単離後 48 時間以内に使用した。

【0372】

(SELDI 分析用サンプル調製)

リポ蛋白質又は血清サンプルを調製し、製造業者のプロトコール (Ciphergen Biosystems, Fremont, CA) に従い、順相 (NP-20)、強アニオン交換 (Q10)、及び弱カチオン交換 (CM10) ProteinChip アレイで処理した。要約すると、NP-20、Q10 及び CM10 アレイスポットを結合バッファー (1xPBS/0.1% Triton X-100, pH7) で室温にて 10 分間平衡化した。結合バッファーで希釈したサンプル (血清 25 倍、リポ蛋白質画分 2 倍) をアレイチップにスポットし、加湿チャンバーで 30 分間室温にてインキュベートした。チップを結合バッファーで 2 回、HPLC H₂O で 1 回洗浄した後、風乾した。チップをシナピン酸溶液で先ず 100% 飽和溶液 0.5 µl、次いで 50% 飽和溶液 1 µl で順次処理した。シナピン酸溶液は EAM 溶液 (50% アセトニトリル及び 0.5% トリフルオロ酢酸) をシナピン酸 (3, 5-ジメトキシ-4-ヒドロキシ桂皮酸) で飽和することにより新たに調製した。

10

【0373】

(Ciphergen ProteinChip SELDI-TOF-MS 分析)

アレイを実施例 2 に記載したように Ciphergen ProteinChip Reader (モデル PB SII) で分析した。

【0374】

(統計分析)

実施例 2 に記載した ProteinChip データ分析ソフトウェアバージョン 3.2 (Ciphergen Biosystems, Fremont, CA) を使用してデータを分析した。

20

【0375】

(特異的 m/z ピークに相当する蛋白質の同定)

(血清蛋白質分画)

製造業者のプロトコールに従い、P-6 Micro Bio-Spin クロマトグラフィークラム (Bio-Rad, Hercules CA) で血清を脱塩した。製造業者のプロトコールに従い、pH 8.5、7.5、7.0、6.0、5.0、4.0、及び 2.0 に pH を漸減させた一連の緩衝液で溶出することにより、Q10 アニオン交換スピンカラム (Ciphergen Biosystems, Fremont, CA) を使用して血清サンプルを分画した。Q10 又は CM10 ProteinChip アレイを使用して SELDI-TOF-MS PSII で蛋白質画分を分析した。どちらのアレイも使用前に 10 mM HCl / 結合バッファーで平衡化した。

30

【0376】

(血清蛋白質精製、受動溶出及び SELDI-TOF-MS による確認)

SELDI 分析により該当ピークの有意大部分を含むことが確認された画分をプールし、遠心蒸発により乾燥した。蛋白質を含有する画分を更に SDS-PAGE で分離した後、Simply Blue Safe 染色液 (Invitrogen, Carlsbad, CA) で染色した。該当ピークに対応する分子量をもつバンドを切り出し、ゲルスライスを 2 分の 1 に切断し、ゲルスライスの 2 分の 1 を従来記載されているように受動溶出した (Le Bihan ら (2004) Proteomics, 4: 2739-2753)。要約すると、ゲルを脱水し、熱ブロックで乾燥し、有機混合物で再水和した。ゲルを音波処理した後、ボルテックスした。溶出した蛋白質を使用し、SELDI ProteinChip 分析により該当ピークの存在を確認した。残りの 2 分の 1 は下記のようにゲル消化に使用した。

40

【0377】

(トリプシン消化)

従来記載されているようにゲル内トリプシン消化を実施した (Gomez ら (2003

50

) Mol Cell Proteomics 2:1068-1085)。要約すると、(SELDIにより確認後の)該当ピークを含有する溶出液をDTTで還元し、ヨードアセトアミドでアルキル化し、トリプシン(Promega)で処理した。ゲルスライスをHPLCグレード水で飽和することによりペプチドを回収し、アセトニトリル/トリフルオロ酢酸で抽出した。抽出液を冷SAVANT Speed Vac(Global Medical Instrumentation)で乾燥し、従来記載されているように μ LC-MSMS(前出)に付した。データを使用し、Sonar ms/ms(登録商標)(Genomic Solutions)とTurboSEQUEST(登録商標)(Thermo Electron Corp)を使用してマウスデータベースを検索した。

10

【0378】

(電気泳動及びイムノプロット)

IEF、Tris/HClゲル及び他の全電気泳動用試薬はBio-Rad(Hercules, CA)から購入した。血清サンプル(2 μ L)を15%SDSPAGE、IEF(pH3~10)、Tris/HClネイティブ(4~15%)又はIEF-Tris/HCl 2Dゲルにロードした。2Dゲルでは、製造業者のプロトコル(Bio-Rad)に従い、IEFゲルからの各レーンを切り出し、ネイティブゲルに挿入した。製造業者のプロトコル(Bio-Rad)に従い、血清サンプルをゲルにロードし、ニトロセルロース膜(GE Healthcare, Piscataway, NJ)に転写した。膜をヘモグロビンに対して1000倍(MP Biomedicals, Irvine, CA)又はapoA-1に対して10,000倍(Bethyl Laboratory, Montgomery, TX)でイムノプロットした。HRP標識二次抗体(GE Healthcare)を10000倍希釈液として使用し、バンドをECL検出試薬(GE Healthcare)で可視化した。

20

【0379】

(Hbの分光光度測定)

Beckman DU 640分光光度計を使用してHbを測定するためにHDLを含有するFPLC画分をプールした。全サンプル及び純ヘモグロビン種のスペクトルを380~700nmで走査した。オキシヘモグロビン(oxyHb)を含有するサンプルに放出速度の遅いNOドナーであるスベルミンNONOate(Cayman Chemical, Michigan)を加え、oxyHbからメトヘモグロビン(metHb)への変換を観察した。1組の純粹種「基本スペクトル」を線形回帰により測定スペクトルにフィットさせることにより、oxyHbとmetHbの濃度を逆重畳した(Vaughnら(2000)J. Biol. Chem., 275:2342-2348)。oxyHbの消費とmetHbの生成が1対1の比を示し、全ヘモグロビンが全サンプルで保存されたときに逆重畳法の妥当性を確認した。

30

【0380】

(結果)

(SELDIピークm/z 14.9k及びm/z 15.6kはアテローム発生/高脂血症血清及びHDLと会合している。)

40

強アニオン交換(Q10)ProteinChipsを使用するSELDI分析の結果、m/z 14.9k及びm/z 15.6kに相当するピークはいずれもアテローム性動脈硬化症/高脂血症の4種の異なるマウスモデルから得られた血清(図20, 上段パネル)及びHDL(図20, 下段パネル)中の対照と比較して最低数倍高いことが判明した。SELDIピークm/z 14.9k及びm/z 15.6kに相当する蛋白質の同定及び特性決定に関するその後の全実験は短期間(7日間)及び長期間(15週間)アテローム発生飼料を与えたC57BL/6Jマウスから得られた血清及びHDLサンプルで実施した。

【0381】

(サイズ、pI及びTagIdentを使用する潜在的候補蛋白質SELDIピークm

50

/ z 14.9 及び m / z 15 の同定)

2 個の SELDI ピークに相当する蛋白質を同定するために、まず 2 個のピークの p I 範囲を試験した。通常飼料又はアテローム発生飼料を 7 日間 (短期) 又は 15 週間 (長期) 与えた C57BL/6J マウス (n = 8 匹 / 群) から得られた各血清サンプルを以下の方法によりアニオン交換分画した。画分を各種 pH の緩衝液で溶出し、CM10 及び Q10 SELDI チップで更に分析した (図 21)。2 個のピーク m / z 14.9 k 及び m / z 15.6 k に相当する強度の大部分は pH 7.5 ~ pH 8.0 の緩衝液で溶出した (図 21)。SELDI-TOF-MS 分析から決定したサイズとアニオン交換分画により測定した対応する p I (図 21) を使用してオンライン Tag Ident (蛋白質データベース) 検索を実施した。0.5% サイズ誤差と +2 p I 範囲を許容する検索基準を使用し、14.9 k Da 及び 15.6 k Da の潜在的候補蛋白質として夫々 Hb- 及び Hb- を同定した。文献によると、遊離 Hb の p I は 7.5 ~ 8.5 である。興味深いことに、m / z 14.9 k 及び m / z 15.6 k に相当する 2 個のピークは pH 7.0 と pH 4.0 の緩衝液で溶出したアテローム発生血清からの画分と会合していることも判明した (図 21)。これらのデータから、i) アテローム発生サンプル中の Hb は種々の化学的性質をもつか、又は ii) m / z 14.9 k 及び m / z 15.6 k に相当する蛋白質は Hb 以外のものであると予想された。以下に記載するように、その後の研究の結果、これらのピークは実際に Hb に相当し、HDL と会合した Hb が種々の物理化学的性質をもつのは他の HDL 会合蛋白質 (例えばハプトグロビン) との強い会合に起因することが判明した。

10

20

【0382】

(分画及びトリプシンペプチド断片化及びタンデム質量分析により 2 種のバイオマーカー蛋白質が Hb- 及び Hb- であることを確認した。)

2 種のバイオマーカーの同定を更に確認するために、夫々のサイズに対応するピークを脱アルブミンとアニオン交換クロマトグラフィー後にマウス血清から部分精製した。部分精製蛋白質をトリプシン消化後に μ LC-MSMS 分析し、得られたフラグメントをヒト蛋白質データベース (Sonar 及び SEQUEST) で検索した。その結果、14.9 k Da 蛋白質は Hb- であり、15.6 k Da 蛋白質は Hb- であることが確認された。

30

【0383】

(マウスモデルにおける向炎症性 HDL の潜在的マーカーとしてのヘモグロビンの同定)

アテローム発生血清及び HDL における Hb の存在を非 SELDI 法により更に検証するために、先ずアテローム発生飼料を与えたマウスからの血清サンプルを SDS-PAGE で試験した後に、Hb についてウェスタンブロッティングを実施した。血清サンプル中の Hb の総量は正常血清とアテローム発生血清の間で有意差がなかった (図 22A)。

40

【0384】

なお、血清中の総 Hb 濃度 (即ち非 RBC Hb) は 10 マイクロモルのオーダーである。他方、全血中の Hb 濃度は 1 モルを上回る。従って、RBC 以外の血液中に存在するのは Hb の約 0.001% に過ぎない。図 22A に示すように、血清中のこの非 RBC Hb の量は通常飼料を与えたマウスとアテローム発生飼料を与えたマウスで相違しない。

【0385】

他方、正常血清 (即ち通常飼料を与えたマウスからの血清) の FPLC 分画リボ蛋白質では、Hb は HDL 後画分 (pHDL) と会合していたが、アテローム発生血清中の Hb と HDL 画分と会合していた (図 22B)。更に、個々の FPLC 画分の 410 nm における OD 測定により得られた Hb のヘム含量は図 22B の結果を裏付けた (図 22C)。アテローム発生飼料を 15 週間与えたマウスでは、Hb は HDL 画分にしか検出されなかった (図 22B)。これらの実験によると、Hb はマウスにおける向炎症性 HDL のマーカーである。

50

【0386】

(アテローム発生血清と会合したヘモグロビンは特異な物理化学的性質を示す。)

血清サンプルのウェスタンブロット分析は正常血清とアテローム発生血清の間にHb質量の有意差を示さなかった(図22A)ので、HbとHDLの会合はアテローム発生飼料を与えると変化するが、ヘモグロビンの質量は一定のまま維持されると予想された。pI < 7の蛋白質を選択するQ10アレイを使用するSELDIでアテローム発生血清と会合したバイオマーカーを発見するための実験を実施した。更に、上記アニオン交換分画実験では、m/z 14.9k及びm/z 15.6kに相当する2個のピークの有意量がpH 7.0とpH 4.0の緩衝液で溶出したアテローム発生血清画分と会合していることが判明した(図21)。これらのデータから、i) Hbの質量はアテローム発生条件下で有意に変化せず、ii) 特異なpI値により立証されるようにHbの化学的性質はアテローム発生条件下で変化し(図21)、iii) アテローム発生条件下のHDLの変化及び/又はHbの変化の結果としてHbはHDLと会合し、15週間アテローム発生飼料を与えた後はHbしかHDLと会合しなくなると予想される。

10

【0387】

アテローム発生血清中のHbの特異な性質を特性決定するために、NP20及びQ10アレイを使用して長期試験(W15)からの血清サンプルとFPLCリポ蛋白質画分でSELDI分析を実施した。全蛋白質と結合するNP20アレイは正常血清サンプルとアテローム発生血清サンプルの両方から等量のHbを捕捉した(図23A, 左パネル)。更に、NP-20アレイにおいて、Hbピークは非アテローム発生サンプルではpHDL画分と会合し、アテローム発生サンプルではHDL画分と完全に会合した(図23A, 左パネル)。これらのデータは図22Bに示すSDS-PAGE後のウェスタンブロット分析と一致する。他方、Q10アレイはアテローム発生サンプルのみから得られた血清及びHDL画分中のHbを捕捉し(図23A, 右パネル)、アテローム発生血清中で会合しているHbは特異な性質をもち、HDLと会合していることが示唆された。アテローム発生条件下における特異なpIをもつHbの発生を更に試験するために、図21からのSELDIで確認したアニオン交換カラムの血清画分をSDS-PAGEにより分析後にウェスタン分析した。アテローム発生血清はpH 7及びpH 4からのアニオン交換カラム画分中にHbを含んでいた(図23B)。

20

【0388】

(HDL画分と会合したHbの特性決定)

HDLと会合したHbの物理化学的性質を更に検証するために、D7及びW15群からの血清サンプルとD7群からのHDL画分を等電点電気泳動(IEF)とネイティブゲル電気泳動で試験した。IEFゲルによると、正常HbのpIが約7.5であるのに対して、アテローム発生血清中のHbのpI値は約4に低下していることが判明した(図24)。D7群からのサンプルでは正常Hb(pI 7.5)からHb(pI 4.0)への変化が明白に認められた(図24)。同一マウス群から単離したRBCは正常pIをもつHbを示したので、これらの変化はRBCの変化に起因するものではなかった(図24)。更に、D7群からのHDL画分と会合したHbはHbの改変形を示した(図24)。ネイティブゲルはアテローム発生血清サンプル中の高分子量(HMW)粒子に対するHbの免疫反応性会合を示し、15週間アテローム発生飼料を与えた後にはHbしかHDLと会合しなくなった(図25)。更に、IEF/ネイティブ2Dゲル(図12)によると、アテローム発生血清からのHbは主にHMW粒子と会合する複数形態(pIに基づく)をもつことが確認された。HDLと会合したHbの特定形態(ox y Hb又はmet Hb)を決定するために、HDLのプール画分を分光分析した。HDLと会合したHbの主形態はox y Hbであり、met Hbは少量であることが判明した(図26及び表15)。

30

40

【0389】

【表 15】

表 15. D7及びW15マウスにおけるHDLと会合したoxyHb及びmetHb濃度

	[oxyHb]	% oxyHb	[metHb]	% metHb	Total [Hb]
7D-C	0.798	82%	0.1764	18%	0.9744
7D-A	12.42	87%	1.818	13%	14.238
W15A	14.58	92%	1.248	8%	15.828

【0390】

(考察)

蛋白質プロファイリングは血清サンプル中の示差的に発現及び/又は会合した蛋白質を判定するために有効な方法であり、生物学的に重要な機能を迅速に評価することができる。Ciphergen Biosystems (Fremont, CA)は複雑な生体混合物の蛋白質プロファイリングを容易にするために表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間質量分析法(SELDI-TOF-MS)と組み合わせたProteinChip技術を開発した(Rubin and Merchant (2000) Am. Clin. Lab. 19:28-29; Weinbergerら(2002) Curr. Opin. Chem. Biol. 6:86-91; Fungら(2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:65-69; Issaqら(2002) Biochem. Biophys. Res. Commun. 292:587-592)。SELDIは複雑なソース(血清、尿、糞便、CSF、組織培養抽出物、細胞溶解液)からの微量(低フェムトモル)検体を分析できるという点でユニークである。「予備活性化」表面ProteinChipアレイも該当標的検体が分かっているときにチップ表面と「ベイト」分子の共有結合に対する各種選択性(例えば電荷、疎水性、特異的結合親和性、抗体)のオープンプラットフォームとして利用できる。SELDI-TOF-MS技術は血清中の癌蛋白質マーカーの発見に有効であることが最近立証された(Wrightら(1999) Prostate Cancer Prostatic Dis. 2:264-276; Liら(2002) Clin. Chem. 48:1296-1304)。本発明者らはSELDI-TOF-MSシステムの利用に成功し、卵巣癌の早期検出用バイオマーカーの同定について既に報告している(Kozakら(2005) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 100:12343-12348; Kozakら(2005) Proteomics 5:4589-96)。

【0391】

m/z 14.9k及びm/z 15.6kに相当する2個のピークのpI測定(図21)後にデータベース検索した処、アテローム発生血清中の向炎症性HDLと会合した潜在的バイオマーカーとしてHb- とHb- が同定された。µLC-MSMS法を使用してこれらの知見を確認した。機械的操作及び/又はサンプル調製の結果としてRBC溶血とHb放出を生じる可能性があるため、本発明者らは当初はこの知見を疑った。しかし、その後、これらの実験を注意深く繰返した処、Hbはアーチファクトではなく、アテローム発生血清中に存在する向炎症性HDLの特異的で重要なマーカーであることが判明した。第1に、総Hb質量が通常飼料とアテローム発生飼料を与えたマウスから得られた血清サンプル間で相違しないことを示した(図22B)。血清中のHb(即ち非RBC Hb)の総濃度は10マイクロモルのオーダーである。他方、全血中のHb濃度は1モルを上回る。従って、RBC以外の血液中に存在するのはHbの約0.001%に過ぎない。図22Aに示すように、血清中のこの非RBC Hbの量は通常飼料を与えたマウスとアテローム発生飼料を与えたマウスで相違しない。

【0392】

第2に、正常HDLから向炎症性HDLへの転換(D7通常飼料とD7アテローム発生飼料)中に、同一マウスから得られた溶血RBC中のHb(質量及び品質)に何ら変化は検出されず、Hbと向炎症性HDLの会合は向炎症性条件下の特異的現象であることが再び示唆された。第3に、D7及びW15リポ蛋白質サンプル中のHbを比較すると明らかのように、Hbと向炎症性HDLの会合は向炎症性条件の程度に依存性である(図22Bと図24及び25)。最後に、通常飼料で向炎症性HDLをもつapoEヌルマウスを含

むアテローム性動脈硬化症 / 高脂血症の4種の異なるモデルにおいて、HbはHDLと会合していることが判明した。これらの結果をまとめると、HDLと会合したHbは向炎症性HDLのマーカーであると判断される。

【0393】

Hbの正常pIはpI7.0~8.0であることが報告されている。本発明者らは向炎症性HDLと会合したHbが特異なpI値をもつ少なくとも2種のHb種をもつことを見出した(図21及び図24)。15週間アテローム発生飼料を与えた後に、HDLと会合した全Hbはこの異常なpIを示した。アテローム発生飼料を与えた後のHbのpIの変化はヘモグロビンの変化に起因するのではなく、ヘモグロビンがHDL中で強く会合した蛋白質に起因することが判明した。これらの条件下のHbの大部分はオキシヘモグロビンであることが判明したので、アテローム発生飼料により誘発される酸化ストレスはこれらの変化の原因であると思われる。同一マウスからのRBC Hbにはこのような変化が存在しないことから、遊離Hbはこれらの条件下で示差的に変化していると予想される。全血清Hbが通常飼料又はアテローム発生飼料で相違しなかったという事実は、RBC溶血の増加がこのプロセスの要因でなかったことを示唆している。

10

【0394】

ハプトグロビン(Hp)とヘモペキシン(Hx)は夫々ヘモグロビン(Hb)(K_d 1 pM)及びヘム($K_d < 1$ pM)に対して最高の結合親和性をもつ血漿蛋白質である。これらは主に肝臓で発現され、急性相蛋白質ファミリーに属し、その合成は炎症プロセス中に誘導される(Bowman and Kurosky (1982) *Adv Hum Genet.* 12:189-261; Altrudaら (1985) *Nucleic Acids Res.* 13:3841-3859)。Hb(赤血球中に最も多量に存在し、機能的に最も重要な蛋白質)は一旦赤血球から放出されると、ヘムの酸化性により高毒性となり、フェントン反応に加わり、反応性酸素種を生成し、細胞傷害の原因となることは周知である(Hoffmanら (1995) *Hematology: Basic Principle and Practice*, 2nd ed. New York, NY: Churchill Livingstone)。ヘムの毒性はヘム疎水性により増加し、蛋白質と会合していない場合には脂質膜及び他の親油性区画に割り込むことができる(Ballaら (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90:9285-9289)。通常では、赤芽球の除核と老化した赤血球の破壊中に少量の血管外溶血が生じ、その結果、血漿中にHbが放出される。血管内溶血に関連する病態(例えば出血、異常ヘモグロビン症、虚血再灌流障害、又はマラリア)では、大量の遊離Hbが放出される(Wagenerら (2001) *Trends Pharmacol Sci.* 22:52-54)。一旦血漿中に放出されると、遊離HbはHpと結合している二量体中で急速に解離する。血漿Hbの代謝は組織マクロファージの主機能であるとみなされ、マクロファージはマクロファージスカベンジャー受容体CD163を介してHb-Hp複合体を取込み(Schaerら (2006) *Blood* 107:373-380; Fabrickら (2005) *Immunobiology* 210:153-160)、内在化することができる(Kristiansenら (2001) *Nature* 409:198-201)。興味深いことに、非常に最近の研究により、低比重リポ蛋白質受容体関連蛋白質(LRP)/CD91(Hvidbergら (2005) *Blood* 106:2572-2579)がヘモペキシン-ヘム複合体のスカベンジングに関与する受容体として同定された。LRP/CD91は受容体によるエンドサイトーシスによりヘム-Hx複合体を内在化することが可能なマクロファージや肝細胞等の数種の細胞型で発現される(Huntら (1996) *J Cell Physiol.* 168:71-80)。本実施例に報告する実験では、RBCからのHbの放出は認められず、HDL画分と会合する(従来報告されていない)形態への既存Hbの転換が認められた。酸化ストレス条件下では、Hb-Hp-Hx複合体が形成され、HDLと会合し、循環から迅速に除去されると考えられる。実際に、HpはHDLの主要蛋白質成分であるapoA1と会合することが報告されている(Rademacherら (1987) *Anal Biochem.* 160

20

30

40

50

: 119 - 126 ; Kunitakeら (1994) Biochemistry 33 : 1988 - 1993 ; Portaら (1999) Zygote 7 : 67 - 77 ; Spagnuoloら (2005) J. Biol. Chem. , 280 : 1193 - 1198) 。 HpとapoA1の会合はHDL機能を変化させる (Balestrieriら (2001) Mol Reprod Dev . 59 : 186 - 191 ; Ciglianoら (2001) Steroids 66 : 889 - 896) 。 図12 ~ 15のデータによると、非RBCヘモグロビン、ハプトグロビン、及びヘモペキシンはアテローム発生条件下ではいずれもHDL中で同一複合体に存在すると予想される。

【0395】

Hbは血糖症、酸化ストレス、高血圧、インスリン抵抗性、肥満症、及び糖尿病に関連する疾病及び疾患の公知マーカーである (Zhangら (2004) Proteomics 4 : 244 - 256 ; de Valk and Marx (1999) Arch Intern Med . 159 : 1542 - 1548 ; Alayashら (2001) Antioxid Redox Signal 3 : 313 - 327) 。 遊離Hbはそのヘム (Fe) 及びヘムと結合した反応性基により潜在的酸化剤でもあり (Alayash (1999) Nat Biotechnol . 17 : 545 - 549) 、このような基はin vivoでLDLを酸化することも示されている (Pagangaら (1992) FEBS Lett . 303 : 154 - 158 ; Millerら (1996) Arch Biochem Biophys . 326 : 252 - 260 ; Ziouzenkovaら (1999) J. Biol. Chem. , 274 : 18916 - 18924) ので、Hbは毒性であることも知られている。本発明者らの知見によると、酸化ストレス環境においてHbはマウスでHDL画分と会合することが初めて明らかになった。アテローム発生血清中の向炎症性HDLは脂質ヒドロペルオキシド (LOOH) を含有しており、パラオキシナーゼ活性をもたず、単球を活性化し、LDLの酸化を防止することができず、コレステロール流出が少ない。本実施例では、Hbがアテローム発生マウスで向炎症性HDLと特異的に会合することを報告する。特定理論に結び付けるものではないが、HbとHDLの会合は抗炎症性から向炎症性へのHDLの転換に関与していると考えられる。

【0396】

結論として、Hbはアテローム性動脈硬化症の動物モデルで向炎症性HDLと会合する。ヒトに敷衍すると、HDLと会合したHbは向炎症性HDLのマーカーとして利用できると考えられる。

【実施例4】

【0397】

Qiagenアルブミン除去カラムを使用するLDL凝集アッセイのプロトコール (材料)

アルブミン除去カラムを使用するLDL凝集アッセイの典型的材料を表16に示す。

【0398】

【表16】

表16. LDL凝集アッセイの材料

材料	供給業者	カタログ番号
1 Qproteome 7#7' シン/IgG 除去カラム	Qiagen	37521
2 LDL	Ultracentrifuge	N/A
3 50mM Tris, 150mM NaCl, 2mM CaCl2 緩衝液	N/A	
4 96ウェルプレート	Costar	3596
5 Bacillus cereus 由来毒素リパーゼ (PLC)	Sigma	P6621

【0399】

(方法)

(サンプルの調製)

1 . 血清又は血漿 25 μ L を希釈バッファー 75 μ L で希釈する。

【0400】

2 . アルブミン / I g G 除去スピンカラムを 500 \times g で短時間遠心し、スクリーキャップから樹脂を除去する。

10

20

30

40

50

- 【0401】
3. スクリューキャップを外し、スピнкаラムの底栓を外し、重力流により保存バッファを排出する。
- 【0402】
4. 希釈バッファの2 × 0.5 mL アリコートスピнкаラムにピペティングして重力流により各々流出させることによりスピнкаラムを平衡化する。
- 【0403】
5. スピнкаラムにQIAfilter Cartridge用キャップを装着する。
- 【0404】 10
6. ステップ1で調製したサンプルをカラムに添加する。
- 【0405】
7. スピнкаラムに蓋をし、激しく振盪して均質懸濁液を得る。シェーカーで5分間室温にてインキュベートする。
- 【0406】
8. QIAfilter Cartridgeを取り出し、スピнкаラムを透明遠心管に移す。
- 【0407】
9. カラムのキャップを4分の1回転緩める。
- 【0408】 20
10. 500 × gで10秒間遠心することによりフロースルーを集める。
- 【0409】
11. カラムを希釈バッファの2 × 100 μL アリコートで洗浄し、500 × gで10秒間遠心することにより各洗浄画分を集める。
- 【0410】
12. ステップ10からのフロースルー画分とステップ11からの2個の洗浄画分を合わせる。
- 【0411】
(ApoB含有蛋白質の除去及びコレステロール測定)
1. アルブミンを除去したサンプルからデキストラン硫酸沈殿によりApoB含有蛋白質を除去する。デキストラン硫酸沈殿に備え、デキストラン硫酸とマグネシウムイオンを含有するSigma HDLコレステロール試薬を蒸留水に溶かした。デキストラン硫酸(1.0 mg/ml) 50 μLを各サンプル500 μLと混合し、室温で5分間インキュベートした後、3,000 gで10分間遠心した。HDLを含有する上清を実験で利用した。
- 【0412】 30
2. アルブミン/ApoBを除去したHDL上清中の総コレステロールを標準コレステロールアッセイにより測定する。
- 【0413】
3. HDL上清を各ウェルに10 μgの濃度で加える。 40
- 【0414】
(ホスホリパーゼC(PLC)の調製)
1. PLCのバイアル(250単位/バイアル)に56.3単位/mLを調製するために十分なddH₂Oを加える。例えば、250単位を含むバイアルにddH₂O 4.4 mLを加える。
- 【0415】
2. 短時間ボルテックスする。
- 【0416】
3. PLC溶液200 μLをエッペンドルフチューブに分注する。
- 【0417】 50

- 20 で凍結する。

【0418】

(LDL + サンプルのインキュベーション)

1. ウェルに相応に添加する(全対照、サンプル等を三重に試験する)。

【表17】

表17. ウェル成分

サンプル	緩衝液(μ L)	LDL(μ L)	サンプル
LDL 単独	190	10	
LDL + PLC	170	10	
LDL + PLC + サンプル	130	10	40

注: 各ウェルに LDL 75 μ g を加える (例えば LDL 濃度が 8.6mg/mL の場合には 8.7 μ L を加える)。数値は LDL とサンプルの濃度により変化する場合がある。

【0419】

2. プレートを nutator で 37 にて 1 時間インキュベートする。

【0420】

3. 波長を 478 nm に設定したプレートリーダーでプレートを読取る。

【0421】

(PLC とのインキュベーション)

1. 「LDL 単独」以外の各ウェルに PLC 溶液 20 μ L を加える。

【0422】

2. 緩衝液 200 μ L を PLC 溶液 200 μ L に加える。

【0423】

3. 短時間ボルテックスする。

【0424】

4. 希釈した PLC 溶液 20 μ L を指定通りに各ウェルに加える。

【0425】

5. 0分、5分、10分、30分、45分、及び60分に478nmでプレートを読取る。

【実施例5】

【0426】

D-4F投与はマウスでヘモグロビン及びそのスカベンジャーと高比重リポ蛋白質の会合を低減させる。

(目的)

アポリポ蛋白質 A-I (apo A-I) ミメティックである D-4F がマウスとサルで HDL を向炎症性から抗炎症性に転換したことは既に報告している。ヘモグロビン (Hb) がアテローム性動脈硬化症の動物モデルで HDL と会合し、アテローム発生条件下で HDL の向炎症性に寄与することを発見したので、D-4F 投与によりアテローム性動脈硬化症の動物モデルで Hb と向炎症性 HDL の会合を低減させることができるか否かについて試験しようとした。

【0427】

(方法及び結果)

図2のデータによると、apo Eヌルマウス(アテローム性動脈硬化症のマウスモデル)から採取した HDL は向炎症性である。経口 apo A-I 模倣ペプチド (D-4F) の投与後に、HDL は抗炎症性に転換した。図3及び4に示すように、HDL の炎症特性の変化に伴い、マウスの血清中のヘモペキシンとハプトグロビンの濃度は低下した。

【0428】

マウスからの HDL の分析の結果、向炎症性 HDL から抗炎症性への転換に伴い、マウス HDL 中のハプトグロビンとヘモペキシンの含量も低下したが、HDL 中の apo A-I 含量は変化しなかった(図5)。血清及び HDL ヘモペキシン及びハプトグロビン濃度の低下に伴い、正常 RBC ヘモグロビンと同様の特性で泳動した非 RBC ヘモグロビン濃度は増加し(図6)、HDL のヘモグロビン含量は低下した(図7右端のグラフ)。図29及び30に示すように、D-4F を投与すると、HDL 上清中のトランスフェリン含量

10

20

30

40

50

とミエロペルオキシダーゼ含量も有意に低下した。

【0429】

(結論)

Hbとそのスカベンジャー蛋白質であるヘモペキシン及びハプトグロピンは向炎症性HDLの成分である。D-4Fが向炎症性HDLを抗炎症性HDLに転換するメカニズムの1つは酸化促進剤であるHbを含有する蛋白質とHDLの会合の防止及び/又は停止であると考えられる。向炎症性HDLを抗炎症性HDLに転換する物質の投与に伴い、HDLと会合したヘモグロビン、ハプトグロビン、ヘモペキシン、トランスフェリン、及びミエロペルオキシダーゼは明白に変化した。これらの結果から、本明細書に記載するアッセイは異常HDLを改善し、アテローム性動脈硬化症を緩和する治療をモニターするのに有用であると思われる。

10

【0430】

当然のことながら、本明細書に記載する実施例と態様は例証の目的に過ぎず、これらの記載に鑑み、種々の変形又は変更が当業者に示唆され、これらの変形又は変更も本願の趣旨と範囲及び特許請求の範囲に含むものとする。本明細書に引用した全刊行物、特許及び特許出願は言及によりその開示内容全体を全目的で本明細書に組込む。

【図面の簡単な説明】

【0431】

【図1】HDLと会合した蛋白質のウェスタン分析を示す。ウェスタン分析の結果、アテローム発生飼料(A)を与えたC57BL/6Jマウスにおけるヘモグロビン(Hb)、ハプトグロビン(Hp)、及びヘモペキシン(Hx)とHDLの会合は通常飼料(C)と比較して10倍に増加することが判明した。図面から明らかなように、これらの蛋白質はVLDL又はLDLとは会合しなかった。

20

【図2】ApoEヌルマウスHDLが通常飼料で向炎症性であり、経口D-4F投与後に抗炎症性に転換することを示す。9カ月齢雌性apoEヌルマウス(n=4匹/群)に通常飼料を与え、アポリポ蛋白質A-I模倣ペプチドD-4F(50µg/mL飲料水)の投与前(0日)とX軸に示す日数間投与後に採血した。apoEヌルマウスHDLがLDL+DCFの蛍光を阻害する能力をその炎症性の尺度として測定した。データから明らかなように、投与前にapoEヌルマウスHDLは向炎症性であった(即ち、0日のapoEヌルHDLを添加すると、蛍光はLDL単独により誘導される強度よりも増加した)が、D-4F投与後(1~21日)に抗炎症性となった。

30

【図3】血清ヘモペキシン濃度がD-4F投与後に低下することを示す。上記図2に記載したマウスにおける血清ヘモペキシン濃度をELISAにより測定した。

【図4】血清ハプトグロビン濃度がD-4F投与後に低下することを示す。上記図2に記載したマウスにおける血清ハプトグロビン濃度をELISAにより測定した。

【図5】D-4F投与によりapoEヌルマウスのHDL中のハプトグロビン(Hp)及びヘモペキシン(Hx)が低下することを示す。図2に記載したマウスからHDLを単離し、Hp、Hx、及びアポリポ蛋白質A-I(ApoA-I)含量を測定した。

【図6】D-4F投与の結果、RBCに含まれるヘモグロビンと同等の分子量でネイティブPAGEゲル上の非RBCヘモグロビンが増加したことを示す。図2に記載したマウス4匹の各々から投与前(0日)及び21日後(21日)に採取した血清、HDL及び赤血球(RBC)をネイティブPAGE(4~15%)ゲル上で泳動させ、ウェスタン分析によりヘモグロビンを分析した。データによると、投与前には、血清及び(HDLと非リポ蛋白質画分を含む)HDL上清中の全ヘモグロビンは溶血RBCからのヘモグロビンよりも有意に高い見かけの分子量でネイティブPAGEゲル上を泳動した。しかし、D-4Fを21日間投与後には、血清及びHDL上清中のヘモグロビンの有意量が溶血RBCからのヘモグロビンと同等の見かけの分子量でゲル上を泳動した。

40

【図7】アテローム発生飼料を与えた野生型C57BL/6Jマウスではヘモグロビンの鎖と鎖の両者が増加したことを示す。本図は更に、通常飼料を与えたapoEヌルマウスでもヘモグロビンの鎖と鎖の両者の含量が増加し、両鎖は図2に記載したような

50

D - 4 F 投与と共に減少したことを示す。

【図 8】通常飼料を 7 日間 (D 7 C) 又はアテローム発生飼料を 7 日間 (D 7 A) もしくは 15 週間 (W 15 A) 与えた野生型 C 5 7 B L / 6 J マウスで HDL 中のオキシヘモグロビンとメトヘモグロビンの含量を測定したことを示す。通常飼料を与えた apo E ヌルマウス (apo E) でもオキシヘモグロビンとメトヘモグロビンの含量を測定した。図面から明らかなように、アテローム発生飼料を与えた C 5 7 B L / 6 J マウスと通常飼料を与えた apo E ヌルマウスで HDL と会合したヘモグロビンの大部分はオキシヘモグロビンであった。

【図 9】一酸化窒素 (NO ドナー) を化学的に発生させ、通常飼料を 7 日間与えた野生型 C 5 7 B L / 6 J マウス (D 7 C) に由来する HDL を添加し、電流 (pA) として測定した処、消費しなかったことを示す。

10

【図 10】化学的に発生させた一酸化窒素 (NO ドナー) にオキシヘモグロビン (HbO₂) を添加し、電流 (pA) として測定した処、減衰曲線の急速な一過的低下を生じたことを示す。リン酸緩衝食塩水 (PBS) を添加しても自然減衰曲線は変化しなかった。他方、アテローム発生飼料を 7 日間与えた野生型 C 5 7 B L / 6 J マウスに由来する HDL (D 7 A HDL - Hb) を添加すると、減衰曲線は急速且つ劇的に低下し、この向炎症性 HDL は一酸化窒素を急速に消費したことが分かった。

【図 11】向炎症性 HDL (アテローム発生飼料を 7 日間与えた野生型 C 5 7 B L / 6 J マウスに由来する HDL ; D 7 A HDL) が一酸化窒素減衰曲線の急速且つ劇的な低下を生じ、向炎症性 HDL が一酸化窒素を急速に消費したことを示す。他方、HDL 中のオキシヘモグロビン (HDL - HbO₂) をメトヘモグロビン (HDL - metHb) に変換する K₃Fe(CN)₆ でこの HDL を処理した後に HDL を添加すると、減衰曲線は有意に変化せず、一酸化窒素は消費されないことが分かった。

20

【図 12】通常飼料を 7 日間 (左上パネル) もしくは 15 週間 (右上パネル)、又はアテローム発生飼料を 7 日間 (左下パネル) もしくは 15 週間 (右下パネル) 与えた野生型 C 5 7 B L / 6 J マウスの血清のウェスタン分析を使用してヘモグロビン染色した二次元ゲルを示す。各パネルの左端のレーンは各病態に由来する溶血赤血球 (RBC) からのヘモグロビンを示す。

【図 13】野生型 C 5 7 B L / 6 J マウスにアテローム発生飼料を 7 日間 (D 7 A) 又は 15 週間 (W 15 A) 与えた図 12 の下段パネルを示し、ヘモグロビン染色をライトブルーで示す (グレーで再現)。

30

【図 14】図 13 に示したウェスタンプロットを剥離し、ハプトグロビンに対する抗体で再プローブした。得られた画像 (マゼンタ) を図 13 の画像に重ねた。ダークブルー領域はヘモグロビンとハプトグロビンの両者が同時に局在する領域に相当する。

【図 15】図 14 に示したウェスタンプロットを剥離し、ヘモペキシンに対する抗体で再プローブした。得られた画像 (黄色) を図 14 の画像に重ねた。非常に暗い画像はヘモグロビン、ハプトグロビン、及びヘモペキシンが同時に局在する領域に相当する。

【図 16】向炎症性 HDL は LDL 凝集を抑制しないが、抗炎症性 HDL は抑制することを示す。向炎症性 HDL と NCEP ATP III 基準による冠動脈疾患又は等価疾患をもつ対象 (CHD 患者) 4 人と健常ボランティア (正常) 4 人に由来する HDL をホスホリパーゼ C (PLC) により誘導した LDL 凝集の抑制能について試験した。HDL を添加しない陽性対照 (LDL + PLC) の値を赤線で示す。陰性対照 (LDL 単独) の値を一番下の青線で示す。データによると、4 人の CHD 患者に由来する HDL は PLC により誘導した LDL 凝集を抑制することができなかったが、4 人の健常ボランティア (正常) に由来する HDL は PLC により誘導した LDL 凝集を有意に抑制した。

40

【図 17】投与前には向炎症性 apo E ヌル HDL はホスホリパーゼ C (PLC) により誘導した LDL 凝集を抑制しないが、D - 4 F を 21 日間経口投与後に HDL は抗炎症性になり、PLC により誘導した LDL 凝集を抑制することを示す。図 2 に記載したような経口 D - 4 F 投与前後の apo E ヌル HDL について、PLC により誘導した LDL 凝集の抑制能を試験した。図 2 に示すように、投与前に HDL は向炎症性であった。図 17 に

50

示すように、投与前にはこの apoE 欠乏 HDL は PLC により誘導した LDL 凝集を抑制することができなかつた。しかし、21 日間投与後に HDL は抗炎症性になり (図 2)、図 17 に示すように PLC により誘導した LDL 凝集を有意に抑制した。陽性対照 (LDL + PLC (HDL 不添加)) の値と、陰性対照 i) LDL + PLC + 通常飼料を与えた正常 C57BL/6J マウスに由来する HDL (正常マウス HDL) 及び ii) LDL (PLC 不添加) (LDL 単独) の値も示す。

【図 18】FPLC 分画による C57BL/6J マウス血清サンプルのコレステロールプロファイルを示す。マウス (n = 8) からの血清プール 500 μ l を FPLC により分画した。最初の 10 個の 1 mL 画分を捨て、その後の各 1 mL のコレステロール含量を分析した。C - 通常飼料 7 日間、A - アテローム発生飼料 7 日間、CC - 通常飼料 21 日間、AC - アテローム発生飼料 7 日間後に通常飼料 14 日間。

【図 19】C57BL/6J マウス血清に由来する HDL の炎症特性を示す。HDL を HDL 試薬で単離し、反応性酸素種含量 (蛍光強度)、パラオキシナーゼ (PON) 活性アッセイ、コレステロール流出アッセイ (%コレステロール流出)、及びコレステロール含量 (HDL コレステロール) について分析した。C - 通常飼料 7 日間、A - アテローム発生飼料 7 日間、AC - アテローム発生飼料 7 日間後に通常飼料 14 日間。* は $p < 0.01$ を表す。

【図 20】アテローム性動脈硬化症の 4 種のマウスモデルに高濃度の m/z 14.9 k (ヘモグロビン 鎖) 及び m/z 15.6 k (ヘモグロビン 鎖) が存在することを示す。アテローム発生飼料 (D7 = 7 日間, W15 = 15 週間) もしくは西欧型飼料を 10 日間 (WD) 与えた C57BL/6J マウス、又は西欧型飼料を 8 週間で与えた LDLR 欠乏マウス (LDLR)、又は通常飼料を与えた 12 週齢 apoE 欠乏マウス (apoE) に由来する血清サンプル (n = 8) を Q10 ($pI < 7$) ProteinChip アレイで SELDI 分析した。アテローム発生血清中の 2 個の該当 SELDI ピーク (m/z 14.9 k 及び m/z 15.6 k) を通常飼料の対応する対照マウス群に由来する血清のピークと比較し、又は apoE 欠乏マウスの場合には通常飼料の同年齢の C57BL/6J マウスと比較し、得られた強度を統計分析した。報告するデータは各ピークの平均増加倍率である。報告するデータはいずれも p 値 < 0.05 で統計的に有意である。なお、この分析は疎水性で $pI < 7.0$ の蛋白質と複合体を除去する Q10 蛋白質チップで捕捉した蛋白質のデータである。この方法により分析したヘモグロビンは HDL と会合したヘモグロビンに相当する。

【図 21】 m/z 14.9 k (ヘモグロビン 鎖) 及び m/z 15.6 k (ヘモグロビン 鎖) に相当するピークの pI の測定を示す。通常飼料 (C) 又はアテローム発生飼料 (A) を 7 日間 (D7) 又は 15 週間 (W15) 与えた C57BL/6J マウス (n = 8) に由来する個々の血清サンプルを脱塩し、アニオン交換スピンカラムと各種指定 pH の緩衝液を使用して分画した。溶出した画分をカチオン交換 (CM10 : $pI > 4$) 又はアニオン交換 (Q10 : $pI < 4$) ProteinChip アレイで SELDI 分析した。14.9 k と 15.6 k の相対強度を示す。

【図 22 A】図 22 A は非 RBC ヘモグロビンと RBC ヘモグロビンを比較し、血清のリポ蛋白質及び非リポ蛋白質画分間の非 RBC ヘモグロビンの分布を比較する。血清及びリポ蛋白質を 15% SDS-PAGE にロードし、ヘモグロビンに対してイムノプロットした。通常飼料を与えたマウスから得られた溶血 RBC をヘモグロビンの標準としてロードした。図 22 A : 通常飼料 (C) 又はアテローム発生飼料 (A) を 7 日間 (D7) 又は 15 週間 (W15) 与えた C57BL/6J マウスに由来する血清サンプル (n = 8)。図 22 A から明らかなように、通常飼料又はアテローム発生飼料を 7 又は 15 日間与えたマウスでは非 RBC ヘモグロビン総量に有意差がなかった。更に同図から明らかなように、SDS-PAGE ゲル上で非 RBC ヘモグロビンと溶血 RBC に由来するヘモグロビンの分子量は同等である。図 22 B から明らかなように、アテローム発生飼料を 7 日間又は 15 週間与えると、非 RBC ヘモグロビンでは非リポ蛋白質画分 (pHDL) から HDL 画分への変化を生じた。

10

20

30

40

50

【図 2 2 B】2 2 B は非 R B C ヘモグロビンと R B C ヘモグロビンを比較し、血清のリポ蛋白質及び非リポ蛋白質画分間の非 R B C ヘモグロビンの分布を比較する。血清及びリポ蛋白質を 1 5 % S D S - P A G E にロードし、ヘモグロビンに対してイムノプロットした。通常飼料を与えたマウスから得られた溶血 R B C をヘモグロビンの標準としてロードした。図 2 2 B : D 7 及び W 1 5 群の血清サンプルプールに由来する V L D L、L D L、H D L 及び H D L 後 (p H D L) F P L C 画分。図 2 2 A から明らかなように、通常飼料又はアテローム発生飼料を 7 又は 1 5 日間与えたマウスでは非 R B C ヘモグロビン総量に有意差がなかった。更に同図から明らかなように、S D S P A G E ゲル上で非 R B C ヘモグロビンと溶血 R B C に由来するヘモグロビンの分子量は同等である。図 2 2 B から明らかなように、アテローム発生飼料を 7 日間又は 1 5 週間与えると、非 R B C ヘモグロビンでは非リポ蛋白質画分 (p H D L) から H D L 画分への変化を生じた。

10

【図 2 2 C】図 2 2 C は非 R B C ヘモグロビンと R B C ヘモグロビンを比較し、血清のリポ蛋白質及び非リポ蛋白質画分間の非 R B C ヘモグロビンの分布を比較する。血清及びリポ蛋白質を 1 5 % S D S - P A G E にロードし、ヘモグロビンに対してイムノプロットした。通常飼料を与えたマウスから得られた溶血 R B C をヘモグロビンの標準としてロードした。図 2 2 A から明らかなように、通常飼料又はアテローム発生飼料を 7 又は 1 5 日間与えたマウスでは非 R B C ヘモグロビン総量に有意差がなかった。更に同図から明らかなように、S D S P A G E ゲル上で非 R B C ヘモグロビンと溶血 R B C に由来するヘモグロビンの分子量は同等である。図 2 2 B から明らかなように、アテローム発生飼料を 7 日間又は 1 5 週間与えると、非 R B C ヘモグロビンでは非リポ蛋白質画分 (p H D L) から H D L 画分への変化を生じた。図 2 2 C は図 2 4 B のデータを裏付けるものであり、通常飼料を 7 日間与えた後に殆どヘモグロビンは H D L と会合していないが、アテローム発生飼料を 7 日間与えた後に H D L 画分中に実質的なヘモグロビンが存在していた。

20

【図 2 3 A】図 2 3 A はアテローム発生飼料によるアテローム発生血清及び H D L 画分中の非 R B C ヘモグロビンが特異な性質をもつことを示す。図 2 3 A : 通常飼料 (C) 又はアテローム発生飼料 (A) を与えた C 5 7 B L / 6 J マウス (n = 8) に由来する血清サンプルプールを F P L C により分画し、順相 (N P 2 0) 又はアニオン交換 (Q 1 0 ; p I < 7) P r o t e i n C h i p アレイで S E L D I 分析した。1 4 . 9 k (H b -) 及び 1 5 . 6 k (H b -) の相対強度を示す。

【図 2 3 B】図 2 3 B はアテローム発生飼料によるアテローム発生血清及び H D L 画分中の非 R B C ヘモグロビンが特異な性質をもつことを示す。図 2 3 B : 図 2 に記載した p H 7 . 0 及び p H 4 . 0 に相当するアニオン交換カラム画分を 1 5 % S D S - P A G E にロードし、ヘモグロビンに対してイムノプロットした。これらのシステムで測定したアテローム発生飼料による非 R B C ヘモグロビンの性質の変化はヘモグロビンと H D L 及び他の H D L 蛋白質との会合に一致する。

30

【図 2 4】アテローム発生血清中のヘモグロビンが特異な p I 値をもつことを示す。通常飼料 (C) 又はアテローム発生飼料 (A) を 7 日間 (D 7) 又は 1 5 週間 (W 1 5) 与えた C 5 7 B L / 6 J マウスに由来する血清サンプル (n = 8) を使用前にプールした。D 7 マウスからの R B C を血清勾配により単離し、洗浄し、溶血させた。血清サンプルを F P L C により分画し、D 7 マウスからの H D L 画分をプールした。プールした血清、H D L 及び溶血 R B C を I E F ゲル (p H 3 ~ 1 0) にロードし、ヘモグロビンに対してイムノプロットした。通常飼料を与えたマウスからの溶血 R B C (左レーン) をヘモグロビンの標準としてロードした。同図から明らかなように、R B C ヘモグロビンの特性は通常飼料又はアテローム発生飼料を与えたマウスと差異がなかった。更に同図から明らかなように、通常飼料を与えたマウスからの H D L にはヘモグロビンが会合していなかったが、アテローム発生飼料を与えたマウスからの H D L にはヘモグロビンが会合しており、その p I は R B C ヘモグロビンと著しく相違していた。

40

【図 2 5】非 R B C ヘモグロビンがアテローム発生飼料による H D L 画分と会合し (左パネル)、アテローム発生飼料を 1 5 週間与えた後に R B C ヘモグロビンと同様に泳動する非 R B C ヘモグロビンが失われる (右パネル) ことを示す。通常飼料 (C) 又はアテローム

50

ム発生飼料 (A) を 7 日間 (D7) 又は 15 週間 (W15) 与えた C57BL/6J マウス (n = 8) からの血清サンプルプール (右パネル) 又は D7 からの HDL 画分プール (左パネル) を ネイティブ PAGE にロードし、ヘモグロビンに対してイムノプロットした。通常飼料を与えたマウスからの溶血 RBC もゲルにロードした (左パネルの左端)。

【図 26A】図 26A は HDL 中の Hb の分光光度測定の結果を示す。Beckman DU 640 分光光度計を使用して HDL を含有する FPLC 画分プールから Hb の量と形状を測定した。全サンプル及び純粋種のスペクトルを 380 ~ 700 nm で走査した (図 26A)。1 組の純粋種の「基本スペクトル」を線形回帰により測定スペクトルにフィットさせることにより、oxyHb と metHb の濃度を逆重畳した (Vaughn ら (2000) J. Biol. Chem., 275: 2342 - 2348)。

10

【図 26B】図 26B は HDL 中の Hb の分光光度測定の結果を示す。Beckman DU 640 分光光度計を使用して HDL を含有する FPLC 画分プールから Hb の量と形状を測定した。放出速度の遅い NOD ナーである NONOate をサンプルに加え、oxyHb から metHb への変換を観察した (図 26B, 代表的グラフ)。1 組の純粋種の「基本スペクトル」を線形回帰により測定スペクトルにフィットさせることにより、oxyHb と metHb の濃度を逆重畳した (Vaughn ら (2000) J. Biol. Chem., 275: 2342 - 2348)。

【図 27】健常ボランティア 10 人と、NCEP ATP III ガイドラインの定義による冠動脈心疾患 (CHD) 又は等価疾患をもつ患者 10 人に由来する HDL 中のヘモグロビンを比較する。左パネルはヘモグロビンに対してイムノプロットした健常ボランティア 10 人 (左レーン) 又は CHD 患者 10 人 (右レーン) に由来する血漿プールからの HDL 画分のネイティブ PAGE ゲルを示す。右パネルは RBC を溶血させて HDL 画分の単離前に血漿に添加した後の同一分析を示す。その結果、患者では健常ボランティアよりも著しく多量のヘモグロビンが HDL と会合していた (左パネル)。更に同図から明らかのように、過剰の RBC ヘモグロビンを血漿に添加すると、健常ボランティアと CHD 患者の両者の HDL 画分でヘモグロビンが増加したが、依然として患者の HDL のヘモグロビンのほうが有意に多量であった。

20

【図 28A】図 28A は若年性糖尿病患者と CHD 患者に由来する HDL では非 RBC ヘモグロビンとハプトグロビンの両者が増加していることを示す。健常ボランティア 12 人、若年性糖尿病患者 14 人 (成人 8 人; 幼児 6 人)、又はスタチン投与中の CHD もしくは CHD 等価疾患対象 8 人から血清を採取した。ヒト apo A - I に対する抗体を 96 ウェルプレートにコーティングした。対象からの血清を加え、一晚 4 でインキュベートした。プレートを十分に洗浄し、ヒトヘモグロビン又はヒトハプトグロビンに対する一次ヤギ抗体を加えて 4 で一晚インキュベートした。プレートを十分に洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) で標識したヤギ IgG に対する二次抗体を加え、2 時間室温でインキュベートした。プレートを十分に洗浄し、HRP 基質を加え、光学密度 (OD) を測定した。図 28A は非 RBC ヘモグロビン (HRP $\mu\text{g}/\text{mL}$) を示す。その結果、後者方法で得られた値は健常ボランティアを糖尿病患者と CHD 患者から切り離し、全くオーバーラップしなかった。

30

【図 28B】図 28B は若年性糖尿病患者と CHD 患者に由来する HDL では非 RBC ヘモグロビンとハプトグロビンの両者が増加していることを示す。健常ボランティア 12 人、若年性糖尿病患者 14 人 (成人 8 人; 幼児 6 人)、又はスタチン投与中の CHD もしくは CHD 等価疾患対象 8 人から血清を採取した。ヒト apo A - I に対する抗体を 96 ウェルプレートにコーティングした。対象からの血清を加え、一晚 4 でインキュベートした。プレートを十分に洗浄し、ヒトヘモグロビン又はヒトハプトグロビンに対する一次ヤギ抗体を加えて 4 で一晚インキュベートした。プレートを十分に洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) で標識したヤギ IgG に対する二次抗体を加え、2 時間室温でインキュベートした。プレートを十分に洗浄し、HRP 基質を加え、光学密度 (OD) を測定した。図 28B はハプトグロビン (HRP $\mu\text{g}/\text{mL}$) を示す。その結果、後者方法で得られた値は健常ボランティアを糖尿病患者と CHD 患者から切り離し、全くオーバー

40

50

ラップしなかった。

【図28C】図28Cは若年性糖尿病患者とCHD患者に由来するHDLでは非RBCヘモグロビンとハプトグロビンの両者が増加していることを示す。健常ボランティア12人、若年性糖尿病患者14人（成人8人；幼児6人）、又はスタチン投与中のCHDもしくはCHD等価疾患対象8人から血清を採取した。ヒトapoA-Iに対する抗体を96ウェルプレートにコーティングした。対象からの血清を加え、一晚4でインキュベートした。プレートを十分に洗浄し、ヒトヘモグロビン又はヒトハプトグロビンに対する一次ヤギ抗体を加えて4で一晚インキュベートした。プレートを十分に洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）で標識したヤギIgGに対する二次抗体を加え、2時間室温でインキュベートした。プレートを十分に洗浄し、HRP基質を加え、光学密度（OD）を測定した。図28Cは非RBCヘモグロビン値にハプトグロビン値を乗じた積を示す。その結果、後者方法で得られた値は健常ボランティアを糖尿病患者とCHD患者から切り離し、全くオーバーラップしなかった。

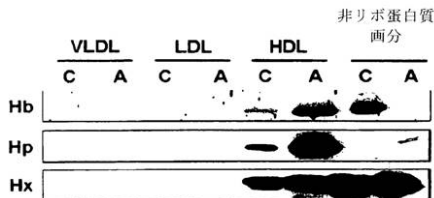
10

【図29】4カ月齢apoEヌルマウス（n = 8匹/群）の飲料水にD-4Fを2カ月間添加する（+D-4F）と、これらのマウスからのHDL上清中のトランスフェリン含量はD-4Fを添加しない飲料水を与えたマウス（D-4F不添加）に比較して有意に低下したことを実証する。

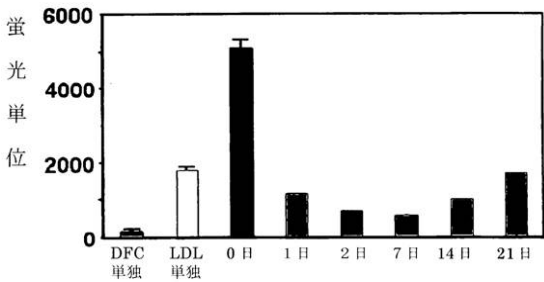
【図30】4カ月齢apoEヌルマウス（n = 8匹/群）の飲料水にD-4Fを2カ月間添加する（+D-4F）と、これらのマウスからのHDL上清中のミエロペルオキシダーゼ含量はD-4Fを添加しない飲料水を与えたマウス（D-4F不添加）に比較して非常に有意に低下したことを実証する。

20

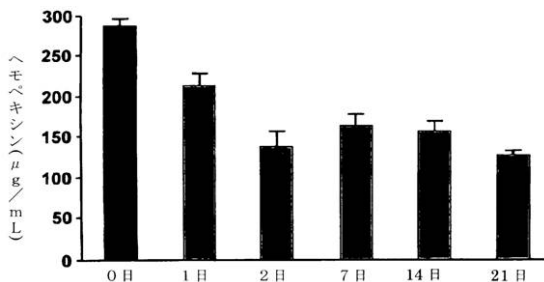
【図1】



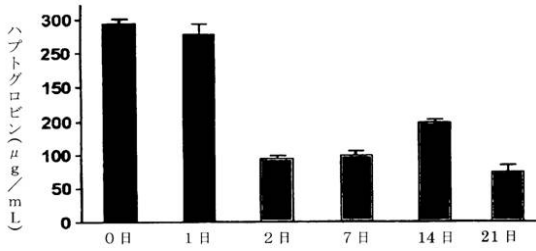
【図2】



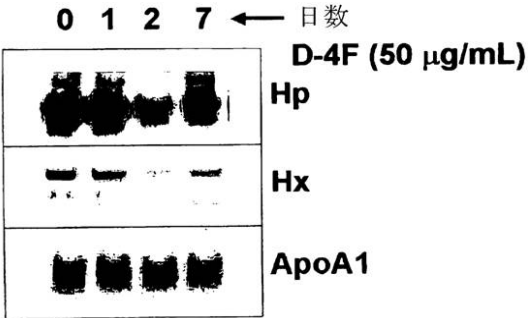
【図3】



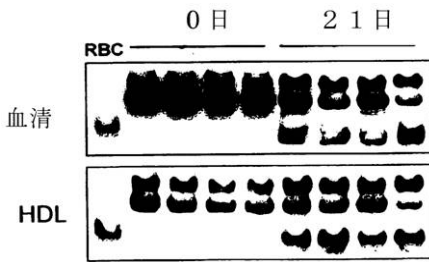
【 図 4 】



【 図 5 】

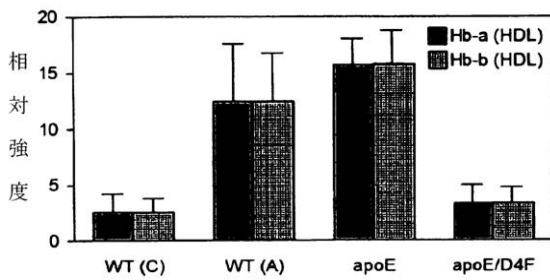


【 図 6 】



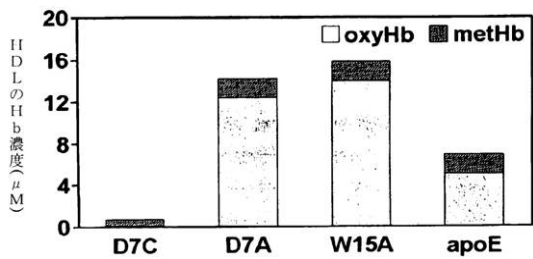
【 図 7 】

D-4F 投与による HDL の Hb 含量の低下 (p < 7)

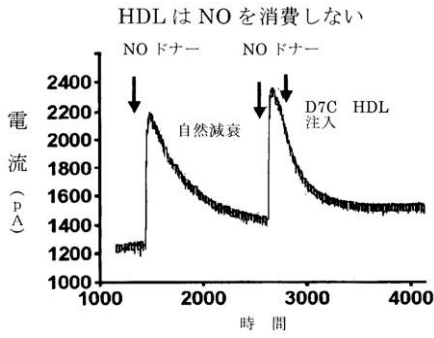


【 図 8 】

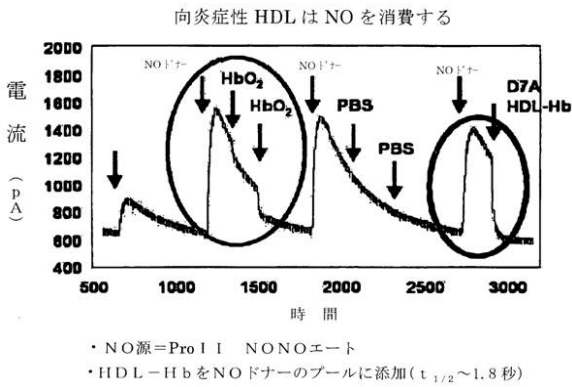
向炎症性 HDL 中の Hb の大部分は oxyHb である



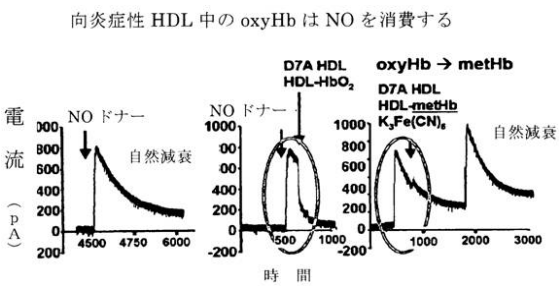
【 図 9 】



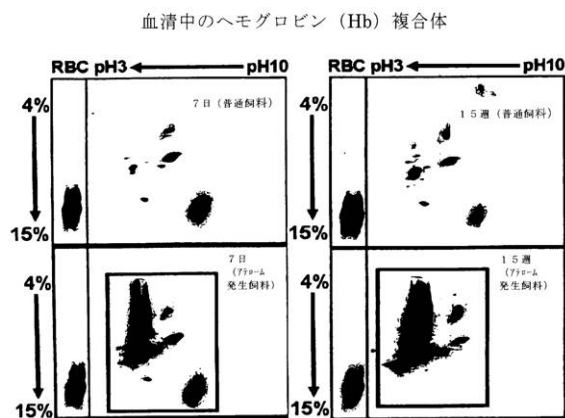
【 図 10 】



【 図 11 】

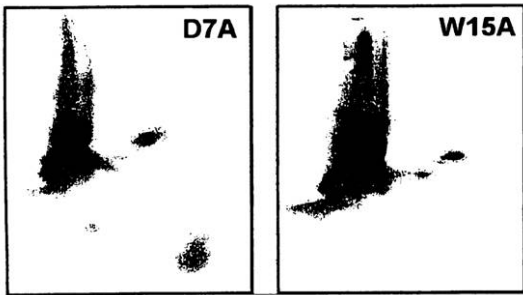


【 図 12 】



【 図 1 3 】

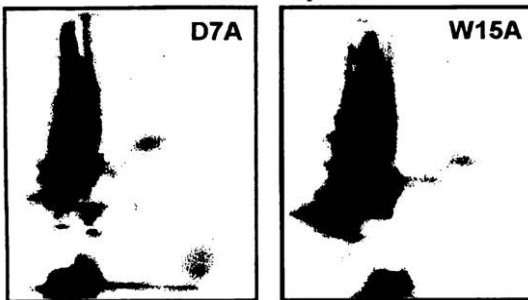
アテローム発生血清中のヘモグロビン (Hb) 複合体



【 図 1 4 】

アテローム発生血清中の Hb-Hp 複合体

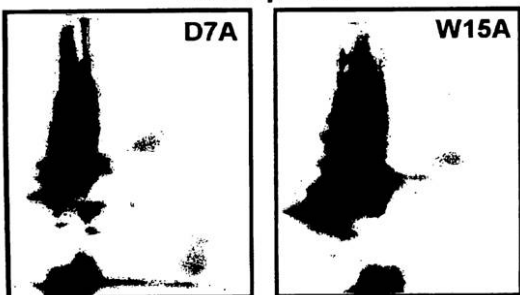
Hb + Hp



【 図 1 5 】

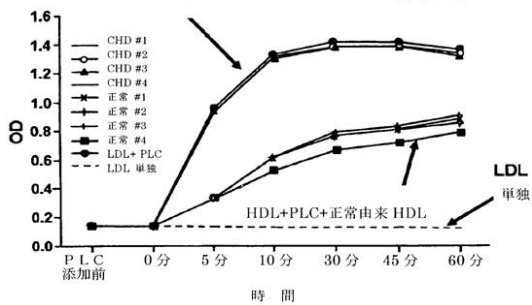
アテローム発生血清中の Hb-Hp 複合体

Hb + Hp + Hx

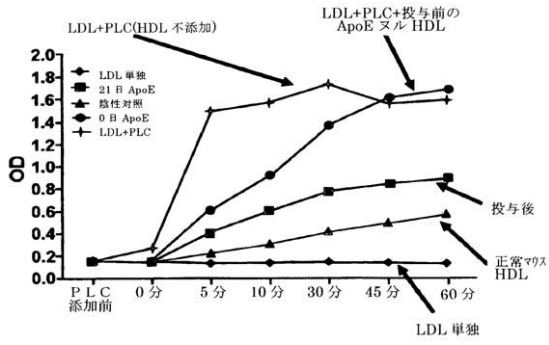


【 図 1 6 】

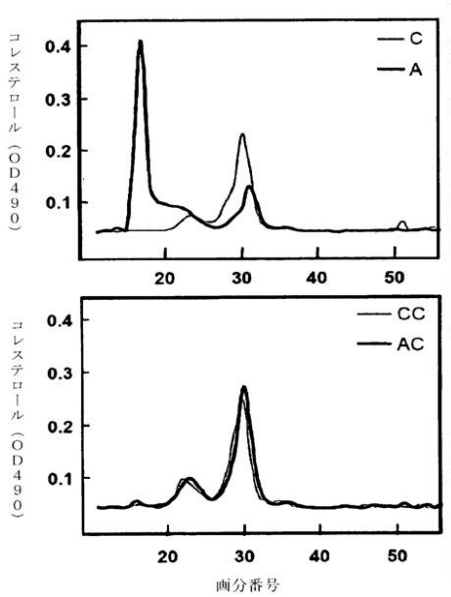
LDL+PLC 又は LDL+PLC+CHD 患者由来 HDL



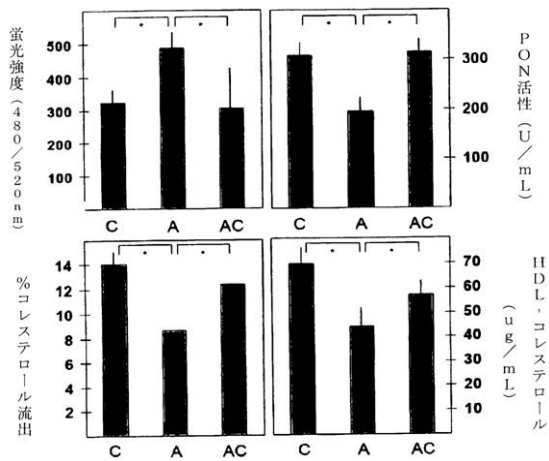
【 図 1 7 】



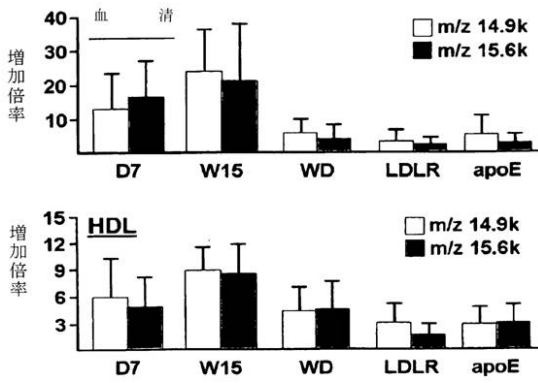
【 図 1 8 】



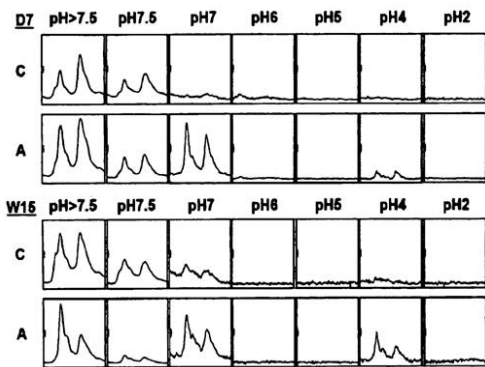
【 図 1 9 】



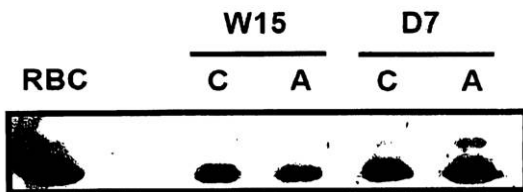
【 图 2 0 】



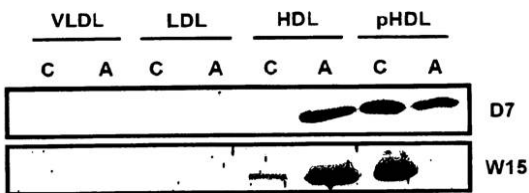
【 图 2 1 】



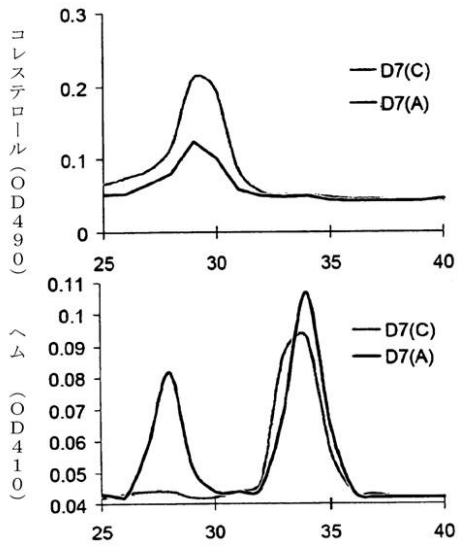
【 图 2 2 A 】



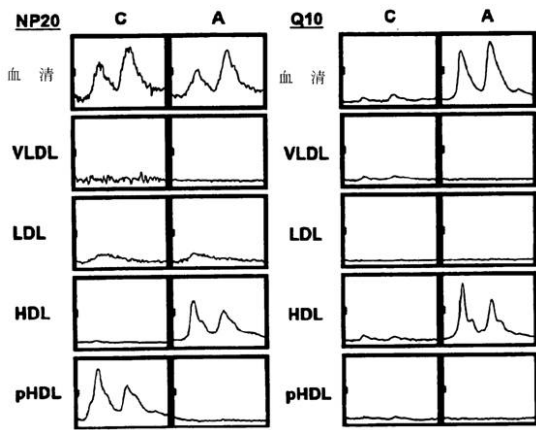
【 图 2 2 B 】



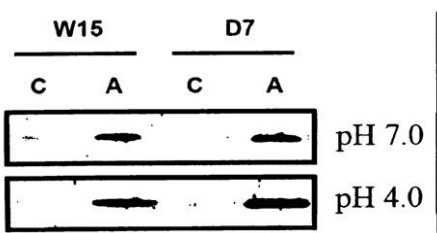
【 図 2 2 C 】



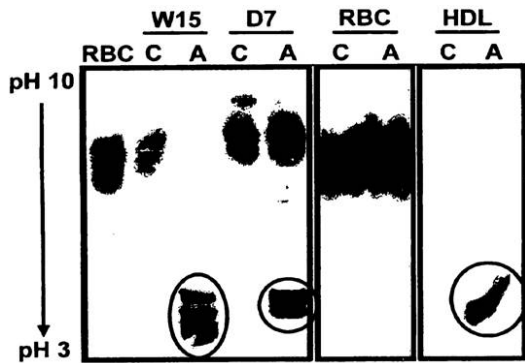
【 図 2 3 A 】



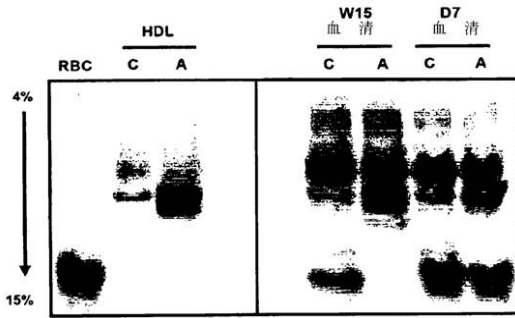
【 図 2 3 B 】



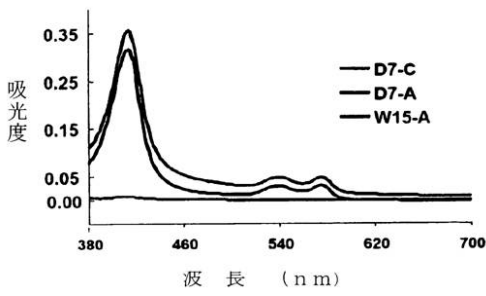
【 図 2 4 】



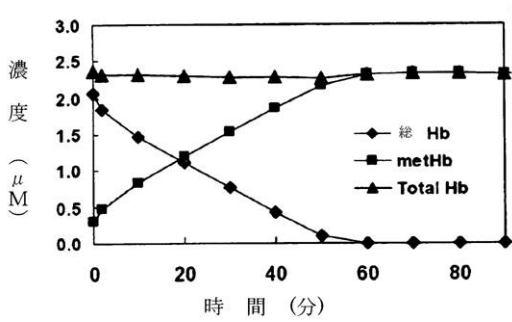
【 図 2 5 】



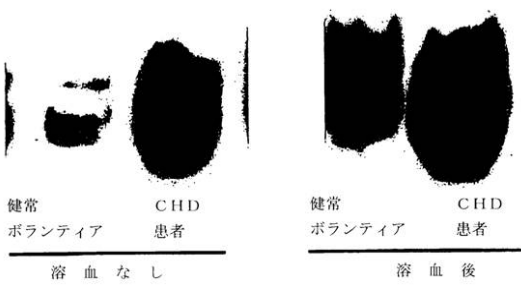
【 図 2 6 A 】



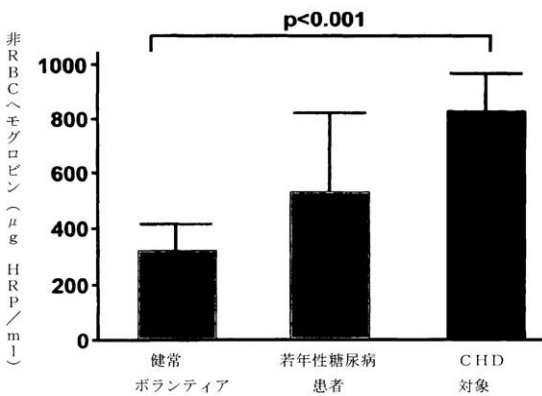
【 図 2 6 B 】



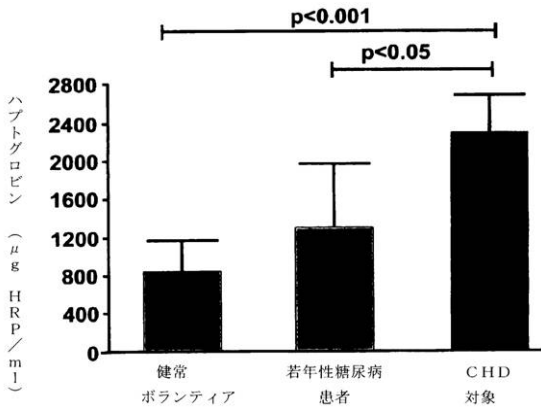
【 図 2 7 】



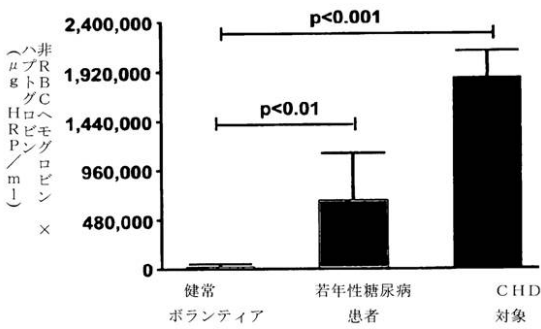
【 図 2 8 A 】



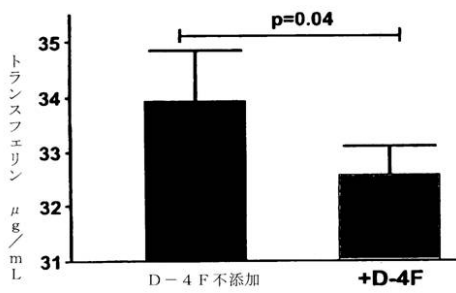
【 図 2 8 B 】



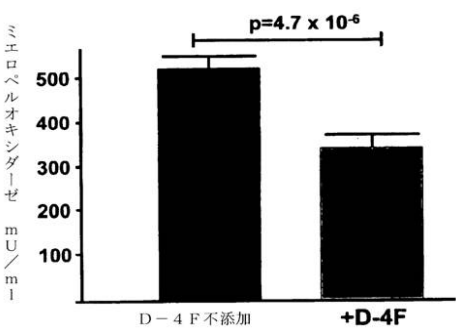
【 図 2 8 C 】



【 図 2 9 】



【 図 3 0 】



【 国際調査報告 】

60900020022



PCT/US2007/003588

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/03588

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC: G01N 33/53(2006.01)		
USPC: 435/7.1.7.21;436/501.518		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/7.1, 7.21; 436/501, 518		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MCMAHON et al., Pro-inflammatory HDL as a biomarker for atherosclerosis in SLE and RA. Arthritis and Rheumatism, September 2005, Vol.52, No.9, Supplemental S, pages S697-S698. See entire document.	1-38
A	NAVAB et al., The double jeopardy of HDL. Annals of Medicine, 2005 Vol. 37, No.3, pages 173-178. See the entire document.	1-38
A	WATSON et al., Metabolic syndrome patients have higher plasma lipid hydroperoxidase and control more pro-inflammatory HDL than dyslipidemic control subjects, even with comparable levels of HDL, hs-CRP and paraoxonase activity. Circulation, October 26, 2004, Vol. 110, No.17, Supplemental S, page 52.	1-38
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 01 September 2008 (01.09.2008)		Date of mailing of the international search report 15 OCT 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Lisa Cook <i>Lisa Cook</i> Telephone No. (571) 272-0500 15. 1. 2009

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

PCT/US2007/003588

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/03588

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
East and West patent database
STN-biosis, caplus, embase, medline, japio

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 アラン・エム．・フォーゲルマン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 90212-4107 ビヴァリー ヒルズ ヒルグリーン
 ドライヴ 481

(72)発明者 スリニヴァーサ・ティー．・レディ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 90703 セリトス カサンドラ アヴェニュー 185
 38

Fターム(参考) 2G041 CA01 DA03 EA04 EA12 FA12 GA06 HA01 JA07 LA07 LA09
 2G045 AA13 CA26 DA20 DA51 DA62 FA11 FB01 FB03 FB06

专利名称(译)	用于预测动脉粥样硬化和异常高密度脂蛋白的分析		
公开(公告)号	JP2009526233A	公开(公告)日	2009-07-16
申请号	JP2008554400	申请日	2007-02-09
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加州大学董事会		
[标]发明人	アランエムフォーゲルマン スリニヴァーサティーレディ		
发明人	アラン・エム・フォーゲルマン スリニヴァーサ・ティー・レディ		
IPC分类号	G01N33/92 G01N33/53 G01N33/543 G01N27/62		
CPC分类号	G01N33/92 G01N33/721 G01N2800/323		
FI分类号	G01N33/92.Z G01N33/53.W G01N33/543.545.A G01N27/62.V		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/DA03 2G041/EA04 2G041/EA12 2G041/FA12 2G041/GA06 2G041/HA01 2G041/JA07 2G041/LA07 2G041/LA09 2G045/AA13 2G045/CA26 2G045/DA20 2G045/DA51 2G045/DA62 2G045/FA11 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB06		
优先权	60/772429 2006-02-10 US 60/843213 2006-09-07 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于检测异常HDL的新型测定法。该测定法用于动脉粥样硬化或以炎症反应为特征的其他损伤的良好诊断和/或预后方法。在某些实施方案中，该方法包括确定HDL相关蛋白在血红蛋白相关蛋白（例如，触珠蛋白，血红素结合蛋白等）和/或HDL和血浆/血清的非脂蛋白级分中的相对分布和/或测量炎症性HDL的一氧化氮消耗能力和/或测量HDL的LDL聚集抑制能力。（图28C）

