

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4105156号
(P4105156)

(45) 発行日 平成20年6月25日(2008.6.25)

(24) 登録日 平成20年4月4日(2008.4.4)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N	33/53 (2006.01)	GO 1 N	33/53 D
GO 1 N	21/78 (2006.01)	GO 1 N	33/53 N
GO 1 N	33/574 (2006.01)	GO 1 N	21/78 C
CO 7 K	14/47 (2006.01)	GO 1 N	21/78 Z
CO 7 K	16/18 (2006.01)	GO 1 N	33/574 Z

請求項の数 14 外国語出願 (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-382611 (P2004-382611)	(73) 特許権者	390023582
(22) 出願日	平成16年12月17日(2004.12.17)		財団法人工業技術研究院
(65) 公開番号	特開2005-181342 (P2005-181342A)		INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE
(43) 公開日	平成17年7月7日(2005.7.7)		台湾新竹縣竹東鎮中興路四段195號
審査請求日	平成17年2月4日(2005.2.4)		195 Chung Hsing Rd.
(31) 優先権主張番号	92136309		, Sec. 4, Chutung, Hsin-Chu, Taiwan R. O. C
(32) 優先日	平成15年12月19日(2003.12.19)	(74) 代理人	100082005
(33) 優先権主張国	台湾(TW)		弁理士 熊倉 禎男
		(74) 代理人	100084009
			弁理士 小川 信夫
		(74) 代理人	100084663
			弁理士 箱田 篤

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肝臓疾患用バイオマーカーおよびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:20又はSEQ ID NO:23に記載されたアミノ酸配列に対する抗体から選択される、肝臓疾患用バイオマーカー。

【請求項 2】

該肝臓疾患が肝硬変または肝臓癌である、請求項 1 記載のバイオマーカー。

【請求項 3】

SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:20又はSEQ ID NO:23に記載されたアミノ酸配列から選択される、抗原、及び

該抗原のいずれか 1 種に対する自己抗体を認識できる、二次抗体を含むことを特徴とする、肝臓疾患用の検出キット。

【請求項 4】

該肝臓疾患が肝硬変または肝臓癌である、請求項 3 記載の検出キット。

【請求項 5】

肝臓疾患をスクリーニングする方法であって、SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:20又はSEQ ID NO:23に記載されたアミノ酸配列から選択される抗原を用いて、試料中の自己抗体を同定し、かつ捕獲する工程と；

該自己抗体を認識し、かつ吸着する二次抗体を使用する工程を含むことを特徴とする、上記スクリーニング方法。

【請求項 6】

10

20

該試料が、全血または血清である、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

該試料が血清である、請求項 5 記載の方法。

【請求項 8】

該抗原を、検出用のキットとすることができる、請求項 5 記載の方法。

【請求項 9】

該抗原を、まず基板上に固定化する、請求項 5 記載の方法。

【請求項 10】

該基板が、イムノアッセイ用プレートまたはバイオチップである、請求項 9 記載の方法

。

【請求項 11】

該試料を、まず蛍光マーカーで標識する、請求項 5 記載の方法。

【請求項 12】

該二次抗体が、発色反応、放射能または蛍光によって検出できる特別な官能基により修飾されている、請求項 5 記載の方法。

【請求項 13】

該自己抗体の検出を、蛍光スキャナーを用いて、蛍光標識された自己抗体を検出することにより達成する、請求項 5 記載の方法。

【請求項 14】

該自己抗体の検出を、酵素結合イムノソーベントアッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)または免疫蛍光により、該二次自己抗体を検出することにより達成する、請求項 5 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、肝臓疾患用バイオマーカーおよびその使用方法に関連し、そこでは、自己抗原をスクリーニングする方法を使用して、肝臓疾患を検出するために使用できる、バイオマーカーを同定する。これらの同定されたバイオマーカーは、更に肝臓疾患のスクリーニングのために、試料(検体)における自己抗体または自己抗原の存在を検出するための、検出用キットへと発展させられる。

【背景技術】

【0002】

損なわれた免疫機能を持つ人々は、免疫疾患を発症する傾向がある。多くのヒト疾患の病因学は、以下に記載する3つの状態の何れかにおいて、その原因を、我々の免疫系にまで遡ることを可能とする。その第一の状態は、低い免疫性、免疫細胞のより低い活性、または免疫細胞数の低下であり、例えばヒトの身体が、侵入してくる細菌、ウイルスまたは真菌を撃退することができず、かつ伝染性の疾患、例えば感冒、流行性感冒、肺炎、腸炎、または肝炎およびAIDSに対しても罹り易くなる。その第二の状態は、免疫不全または免疫系の過剰反応であり、そこでは該侵入する物質は微生物ではなく、些細な花粉または摂取した食物における巨大タンパクであり、それらに対して該免疫系が大量の抗体を放出する。このような攻撃および防御は、我々の細胞内で起こり、連鎖反応を生じ、これはまたアレルギーとも呼ばれる。真の病原体、例えば細菌、ウイルスまたは真菌が、この時点で人の身体を攻撃した場合には、該免疫系は最早抵抗性を高めることは不可能である。該損なわれた免疫系の第三の状態は、ヒトの身体内で免疫細胞が正常な細胞を攻撃することであり、これはリウマトイド関節炎、紅斑性狼ソウ(エリテマトーデス)およびヘルペスの場合におけるように、自己免疫疾患と呼ばれる。このような免疫疾患は、自己抗体が、ヒト身体自体の細胞に対して生成され、組織の損傷および疾病をもたらすという、識別、確認の問題を含む我々自身の免疫系に起因する。

【0003】

現在では、自己抗体が自己免疫疾患だけに存在する訳ではないことは、公知である。益

10

20

30

40

50

々多数の研究が、癌に対する免疫応答において、自己抗原(腫瘍由来)および自己抗体(身体由来)が、幾つかの場合において存在することを示している。従って、身体の応答を引出す、腫瘍自己抗原の検出は、癌のテスト、診断、または予後、および更に疾患の治療のために、かつこれらにおいて適用することができる。

米国特許第6,631,330号、同第5,137,807号、同第5,830,667号、同第6,264,949号および同第5,985,542号は、硬変、線維症または自己免疫性肝炎(AIH)の診断における、バイオマーカーの使用を開示しており、米国特許第4,994,374号および同第5,175,084号は、肝細胞癌の診断における、バイオマーカーの使用を開示しており、米国特許第6,410,724号は、診断手段として、肝細胞癌に関連するDNAプライマーを使用している。しかし、これらの特許に記載されているバイオマーカーは、正確さに劣り、あるいはある程度まで、干渉に影響され易い。

10

【0004】

米国特許第5,891,436号および公開No.20030138860は、原発性胆汁性肝硬変または肝細胞癌に対する診断手段として、ヒト血清中の自己抗体の存在を検出するために、バイオマーカーを用いることを開示している。これらの特許は、癌患者における自己抗体の存在を明らかにし、またその結果として、癌のスクリーニングにおけるバイオマーカーの使用に関する、合理性を確立している。

癌は、1982年以来、台湾における主な死因となっており、また肝癌は、男性、女性両者における第一の死因としてランク付けされている。従って、早期診断および早期治療が、その死亡率を下げるのに役立つことを期待しつつ、高い正確性を持ち、干渉に影響され難いバイオマーカーを見出すことが重要であり、またこれらのバイオマーカーを使用して、肝硬変および癌用の検出キットを開発し、肝臓疾患に罹患した患者を効率よくスクリーニングすることが重要である。

20

【発明の開示】

【0005】

上記公知技術の諸欠点を処理するために、本発明は、肝臓疾患用のバイオマーカーを提供し、該マーカーは、更に発展させて、自己抗体の存在に係る知見に基いて、肝硬変および肝臓癌を診断するための、検出キットとすることができる。

本発明の目的は、SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:24に記載されたアミノ酸配列またはその誘導体またはフラグメントまたはその変異型もしくはこれらの組み合わせあるいは該アミノ酸配列に対する抗体の何れかから選択される、肝硬変および肝臓癌を検出するためのバイオマーカーを提供することにある。

30

本発明によれば、上記変異型は、1種以上のアミノ酸を、該バイオマーカーのアミノ酸配列におけるアミノ酸と置換し、該アミノ酸配列から削除し、そこに挿入し、および/または付加することにより得られ、この変異型のアミノ酸配列と、該バイオマーカーのアミノ酸配列とは、80%を越える配列相同性を持つ。

本発明の他の目的は、SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:24に記載されたアミノ酸配列またはその誘導体またはフラグメントまたはその変異型もしくはこれらの組み合わせの何れかから選択される、一組のバイオマーカーを含む、肝臓疾患用の検出キットを提供することにある。

40

【0006】

本発明の一態様において、上記検出キットは、更にSEQ ID NO:1~SEQ ID NO:24に記載されたアミノ酸配列またはその誘導体またはフラグメントまたはその変異型の何れか1種に対する抗体を認識できる、二次抗体をも含むことができる。

本発明の、更なる目的は、肝臓疾患をスクリーニングするための方法を提供することであり、この方法は、試料(または検体)を調製する工程; SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:24に記載されたアミノ酸配列またはその誘導体またはフラグメントまたはその変異型もしくはこれらの組み合わせの何れか1種から選択されるバイオマーカーを用いて、該試料中の自己抗体を捕獲する工程; および該自己抗体を検出する工程、を含む。

更に別の本発明の目的は、SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:24に記載されたアミノ酸配列の何

50

れか一つに対する一連の抗体を含む、肝臓疾患用の検出キットを提供することにある。

本発明の更なる目的は、肝臓疾患をスクリーニングするために、上記検出キットを使用する方法を提供することであり、該方法は、試料を調製する工程；SEQ ID NO:1～SEQ ID NO:24に記載されたアミノ酸配列の何れか1種に対する抗体を使用して、該試料中の抗原を捕獲する工程；および該抗体-抗原錯体を検出する工程を含む。

【0007】

本発明は、自己抗原スクリーニング法の利用に基くものであり、この方法は、まず正常なヒト、肝硬変患者および肝癌患者由来の抗体各々を精製する工程およびこれら抗体を異なるカラム内に固定化する工程；肝臓疾患関連細胞系(HepG2 C3AおよびSNU-387)由来の細胞抽出物を、順次該正常抗体カラムおよび患者抗体カラムに通して、肝硬変および肝癌と関連する自己抗原を得る工程；これらの自己抗原を、酵素結合イムノソーベントアッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)または免疫蛍光と組み合わせた、バイオマーカーキットとして使用して、該スクリーニングした試料における該自己抗原に対する自己抗体の存在を検出し、かつこの検出結果に基いて、該患者が、肝硬変または肝癌に罹患しているか否かを決定する工程を含む。これらのバイオマーカーは、既存の自己抗体に基いて同定されるので、これらを診断キットに発展させ、該バイオマーカーに対する自己抗体の存在に基いて、該患者が、このような疾患に罹っているか否かを決定することができる。このような方法は、該抗原の直接的なスクリーニングよりも著しく容易であり、かつより高い精度および感度をもたらす。

10

【発明を実施するための最良の形態】

20

【0008】

本発明は、肝臓疾患、例えば肝硬変および肝癌の検出において使用できる、バイオマーカーを同定するための、自己抗原スクリーニング法の利用に関する。図1に示すような、該自己抗原スクリーニング法は、以下のような諸工程を含む：まず正常なヒトおよび患者由来の血清サンプルを得、かつ抗体を捕獲して、該血清サンプル中に含まれる該抗体を精製することのできる、アフィニティーカラムに、該各サンプルを通す工程；次いで、得られる精製された正常抗体および患者抗体各々をカラムに充填して、正常なヒト由来の抗体を含むカラム(正常抗体カラム)および患者由来の抗体を含むカラム(患者抗体カラム)を得る工程、ここで抗体は、該抗体と該カラム内の化学的な官能基との間に形成される、化学的な結合を介して固定化される；および疾患関連細胞系または病理学的な組織からの抽出物であり得る、サンプルを得る工程。ここで、上記血清サンプルは、単一の患者のサンプルまたは複数の患者由来の血清を含む、混合サンプル何れであっても良い。

30

【0009】

この手順を継続するために、疾患関連細胞系または病理学的な組織からの抽出物由来のサンプルが、該正常抗体カラムに通される。該カラムでは、正常抗体の特異的なアフィニティーを介して、非-特異的な抗原が捕獲され、かつ該カラム内に保持される。この工程は、該患者抗体カラムを使用して、該サンプル中の自己抗原をスクリーニングする前の、該サンプルの予備処理であると考えることができる。非-特異的な抗原を除去した後、該サンプルは、特異的な抗原のみで構成されることになる。次いで、該サンプルを、患者抗体を充填したカラムに通して、疾患関連抗原をスクリーニングする。非-特異的な抗原が、正常血清抗体によって除去されているので、患者の抗体により同定されることになる該自己抗原は、更に一層特異的なものとなる。

40

最後に、該患者抗体カラムから置換された自己抗原は、マススペクトル技術による測定にかけられ、この測定手順では、マススペクトル図からのシグナルと、データベースとの比較を行って、該自己抗原に関する情報を得る。

【0010】

肝臓疾患関連細胞系内の自己抗原は、上記方法に従って精製され、かつ同定される。これらの自己抗原が、患者血清中の抗体によって同定された場合には、該自己抗原またはその誘導体またはフラグメントもしくは変異型またはそれらの組み合わせを、バイオマーカーとして利用し、かつ検出用キットへと発展させることができる。スクリーニングすべき

50

検体における自己抗体の存在を検出することにより、該患者が肝硬変または他の肝臓疾患に罹患しているか否かを、決定することができる。バイオマーカーに加えて、該検出キットは、更に該バイオマーカーに対する自己抗体を認識して、この検出法の適用を容易にすることができる、二次抗体を含むことができる。

図2に示したように、上記検出キットを利用するこの方法は、以下のような諸工程を含む：試料を調製する工程；およびバイオマーカーを使用して、該試料中の自己抗体を検出する工程。該バイオマーカーは、該自己抗原スクリーニング法によりスクリーニングされた自己抗原またはその誘導体またはフラグメントもしくは変異型またはそれらの組み合わせから選択される。上記試料は、全血または血清である。

【0011】

この検出を容易にするために、上記のバイオマーカーは、任意の形状であり得、検出キットまたは基板上に予め固定化したものを含むが、これらに限定されず、該基板は、イムノアッセイプレートまたはバイオチップであり得る。該バイオマーカーにより捕獲された、該試料中の自己抗体を、該二次抗体によって認識し、かつ吸着でき、該二次抗体は発色反応、放射性検出または蛍光検出用の、特殊な官能基を持つ、変性された抗体である。

自己抗体を該二次抗体によって吸着した後、特別な試薬を添加して、発色反応させ、また酵素結合イムノソーブントアッセイ(ELISA)を利用して、該二次抗体の存在を決定し、その結果から、該患者が肝臓疾患または肝硬変に罹っているか否かを決定するための基礎として、該自己抗体の存在を突き止める。該二次抗体の存在およびその結果としての該自己抗体の存在は、またラジオイムノアッセイ(RIA)または免疫蛍光法により決定することも可能である。

【0012】

上記スクリーニング法が、該二次抗体を含まない場合、該試料は、該バイオマーカーと反応させる前に、蛍光マーカー(例えば、cy3またはCy5)で標識することができる。該バイオマーカーによりスクリーニングされた、この蛍光-標識を施した自己抗体は、次いで該二次抗体を使用すること無しに、蛍光スキャナーにより検出できる。

該自己抗体存在の検出に加えて、該抗原の検出も、患者が肝硬変または肝臓癌に罹っているか否かを決定するための基礎として利用することができる。この目的を達成するために、本発明は抗体を含む検出用キットをも提供し、該抗体は、肝臓疾患をスクリーニングするための、該自己抗原スクリーニング法により同定された自己抗原を認識することができる。

肝硬変または肝臓癌をスクリーニングするための、上記検出キットを使用する方法は、以下の工程を含む：血清試料を調製する工程；上記抗体を用いて、該血清中の該抗原を認識し、かつ捕獲する工程；および生成する抗体-抗原錯体を検出する工程。

【実施例】

【0013】

本発明の利点は、更に実際の例を示すことにより説明されるが、以下の実施例における説明は、本発明の実際の適用に、何等制限を加えるものではない。

実施例1：肝臓疾患に罹っている患者の血清中の自己抗体を用いた、自己抗原のスクリーニング、該血清サンプル中の自己抗体の精製

まず、肝硬変または肝臓癌に罹っている患者の血清を得、該血清を結合バッファー(20mMのPBS、pH 7.0)で1:10の割合にて希釈し、次いで0.45 μ mのメンブランフィルタを用いて、この希釈された血清を濾過し、後の段階におけるカラムの詰まりを回避し、次いでプロテインG(Protein G)アフィニティーカラムを、1ml/分なる流速で、該カラム体積の10倍量の上記結合バッファーで洗浄し、次に該濾過した血清サンプルを、0.2ml/分なる流量で該プロテインGアフィニティーカラムに通して、そのアフィニティーにより該抗体を該カラム内に保持し、再度該プロテインGアフィニティーカラムを、1ml/分なる流速で、該カラム体積の5-10倍量の上記結合バッファーで洗浄して、該血清サンプル中の、該カラムとアフィニティー結合を形成しない物質を除去する。1ml/分なる流速で、該カラム体積の2-5倍量の溶出バッファー(0.1Mグリシン-HCl、pH 2.7)を用いて、該カラムから抗体を溶出し

10

20

30

40

50

、予め60-200 μ lのTris-HCl溶液(1M、pH 9.0)を加えた試験管に、該溶出された抗体を集めた。最後に、該サンプルを、結合バッファー(0.2M NaHCO_3 、0.5M NaCl、pH 8.3)に移して、該血清サンプル中の自己抗体(IgG)の精製を完了する。

【0014】

本発明の方法は、各々1種の正常なIgGおよび患者IgGカラムを必要とする。従って、正常なヒトおよび患者由来の血清を得、これらを上記の精製段階に掛ける必要がある。

自己抗体を含むカラムの調製

酸性化溶液(1mM HCl、氷浴内)1滴を、ピペットでNHS-活性化カラムに滴下し、泡の生成を阻止する。このカラムの上端部に注射器またはポンプを接続した後、該カラムの底部におけるアダプタを取外す。該カラム体積の2倍量の該酸性化溶液で、該カラム内のイソプロパノールを洗い流す。この洗浄段階を3回繰り返した後、自己抗体を含む該サンプルを、該カラムに注入する。精製された自己抗体を含む上記結合バッファーを、該カラム体積と等価な体積および0.5-10mg/mlなる濃度を持つ溶液とした。自己抗体を含む上記サンプルを、該カラムに通した後に、このカラムを封止し、かつこの反応を25℃にて15-30分間、または4℃にて4時間に渡り行って、化学結合により、該抗体を該カラムに固定化させた。

【0015】

該自己抗体と該カラムとを結合させた後、該カラムを、その体積の2倍量の、遮断バッファー(0.5Mのエタノールアミン、0.5MのNaCl、pH 8.3)で溶出し、これら段階を3回繰り返した。次に、このカラムを、その体積の2倍量の、洗浄バッファー(0.1Mのアセテート、0.5MのNaCl、pH 4)で洗浄し、同様にこれら段階を3回繰り返した。再度、各々該カラム体積の2倍量の、上記遮断バッファーを用いて、該カラムを3回溶出し、次にこのカラムを15-30分間反応させて、自己抗体と結合しない、該カラム内の官能基を遮断し、かつ不活性化した。この遮断反応の完了後、各々該カラム体積の2倍量の、上記洗浄バッファーを用いて、該カラムを3回洗浄し、次に該カラム体積の2倍量の、上記遮断バッファーを用いて、該カラムを3回溶出して、自己抗体と結合しない全ての官能基を、確実に遮断した。再度、各々該カラム体積の2倍量の、上記洗浄バッファーを用いて、該カラムを3回洗浄した。最後に、該カラム体積の2-5倍量の、中性pHを持つバッファーで溶出して、該自己抗体を充填したカラムの調製を完了した。

【0016】

肝臓疾患関連細胞系の抽出物由来の、自己抗原の同定

まず、培地を除去した、2.68mgのHepG2 C3A細胞を、氷浴で処理したTrisの塩溶液(50mM Tris、pH 7.5、150mM NaCl、1.5mM PMSF、ホスファターゼ阻害剤)で2度洗浄し、次いで1mlのトリトン(Triton)抽出液(15mM Tris、pH 7.5、120mM NaCl、25mM KCl、2mM EGTA、0.1mM DTT、0.5% Triton X-100、10 μ g/mlのロイペプチン、0.5mM PMSF、およびホスファターゼ阻害剤)に添加し、4℃にて30分間放置した。この時点で、細胞は分解し、かつタンパク質を遊離し始めた。この溶液を、4℃にて15分間、(テーブルトップ式遠心機で)14,000rpmにて遠心分離処理して、固形分、不溶性細胞構成物を除去した。その上澄みを集めて、イムノアフィニティークロマトグラフィーにかけた。

【0017】

回収した細胞抽出物を、1:10の割合で、上記結合バッファーで希釈し、0.45 μ mのメンブランフィルタに通して、後の段階における該カラムの閉塞を防止した。該サンプルを、該IgGカラムに注入する前に、1ml/分なる流速で、該カラム体積の10倍量の上記結合バッファーで、該正常および患者抗体カラムを洗浄した。次いで、濾過した細胞抽出物を、0.2ml/分なる流速で、該正常抗体カラムに通した。該正常抗体カラムを、1ml/分なる流速で、該カラム体積の5-10倍量の結合バッファーで溶出した。この時点において、該正常抗体により同定され、かつ捕獲された、該細胞抽出物中の抗原は、該カラム内に保持されるはずである。この段階の目的は、該HepG2 C3A細胞内の非-特異的な抗原を除去することである。結果として、該カラムを通過する該細胞抽出物は、非-特異的な抗原を含まない。得られた細胞抽出物を、該患者抗体カラムに注入した。このカラムを、1ml/分なる流速で、

10

20

30

40

50

該カラム体積の5-10倍量の結合バッファーで溶出した。この時点において、該細胞抽出物中に存在する自己抗原は、該患者由来の自己抗体により捕獲され、かつ該カラム内に保持されるであろう。該細胞抽出物を該正常抗体カラムに通した場合、該正常抗体により捕獲される抗原は、該カラム内に保持され、一方抗原を含まない細胞抽出物は、該正常抗体により同定し、かつ捕獲することができ、該患者抗体により同定し、かつ捕獲できる抗原のみが、該カラムに保持されるであろう。該患者抗体カラム内に保持された抗原を、1ml/分なる流速で、該カラム体積の2-5倍量の溶出バッファーを用いて溶出し、かつ捕集した。該カラムを通過した部分を、トリプシンを用いてタンパク加水分解にかけ、得られたペプチドをマススペクトル技術を利用して検定した。得られたスペクトル図を、データベースと比較して、該タンパクに関する情報を得た。

10

【 0 0 1 8 】

肝臓疾患関連細胞系を、肝硬変または肝臓に罹っている患者の血清中の自己抗体によってスクリーニングすることにより、以下の自己抗原を得た：

1. ヌクレオシドジホスフェートキナーゼ(gi|1421609, SEQ ID NO:1)
2. NM23タンパク(gi|35068, SEQ ID NO:2)
3. ATPシンターゼ -鎖、ミトコンドリア[プリカーサ] (gi|28940, SEQ ID NO:3)
4. 14-3-3 -タンパク(チロシン3/トリプトファン5-モノオキシゲナーゼ活性化タンパク) (gi|4507953, SEQ ID NO:4)
5. 14-3-3 -タンパク(チロシン3/トリプトファン5-モノオキシゲナーゼ活性化タンパク) (gi|4507953, SEQ ID NO:5)
6. タンパクジスルフィドイソメラーゼ-関連タンパク5(gi|1710248, SEQ ID NO:6)
7. 命名されていないタンパク製品(gi|21750187, SEQ ID NO:7)
8. トロポミオシン 3 (gi|37403, SEQ ID NO:8)
9. トリポミオシン(trypomyosin) 4 (gi|10435300, SEQ ID NO:9)
10. カルレティキュリンプリカーサ(gi|4757900, SEQ ID NO:10)
11. ヒトブレ-mRNAスプライシング因子SF2p32 (gi|338043, SEQ ID NO:11)

20

【 0 0 1 9 】

12. 腫瘍壊死因子タイプIレセプタ関連タンパクTRAP-1 (gi|1082886, SEQ ID NO:12)
13. 腫瘍拒絶抗原(gp96) 1; グルコース調節タンパク(gi|4507677, SEQ ID NO:13)
14. 熱ショックタンパク質90- (gi|72222, SEQ ID NO:14)
15. 熱ショックタンパク質90- (gi|123678, SEQ ID NO:15)
16. 熱ショック60kDaタンパク質 1 (gi|31542947, SEQ ID NO:16)
17. HMG-1 (gi|968888, SEQ ID NO:17)
18. KIAA0144遺伝子生成物(NICE-4タンパク質) (gi|13111995, SEQ ID NO:18)
19. パロシン(Valosin)含有タンパク質(p97); 転移性小胞体ATPアーゼ (gi|6005942, SEQ ID NO:19)
20. グリセロアルデヒド3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、肝臓(gi|30157565, SEQ ID NO:20)
21. サイトケラチン(gi|1419564, SEQ ID NO:21)
22. IGF-II mRNA-結合タンパク質 1 (gi|4191608, SEQ ID NO:22)
23. NADPH: キノンレダクターゼ(gi|13236495, SEQ ID NO:23)
24. ヒトコ-シャペロンP23の結晶構造(hsp-90コ-シャペロン) (gi|9257073, SEQ ID NO:24)

30

40

【 0 0 2 0 】

肝臓疾患関連細胞系由来の抗体で同定した自己抗原を以下の表1に示す。表1の左側には、GI番号およびそのタンパク質名を、およびその右側には、肝硬変または肝臓に罹っている患者の血清を用いて、細胞系から同定できる自己抗原を示す。示されたように、これらの自己抗原は、単一の肝臓疾患においてのみ存在するのではなく、これらは繰返し、起源を異にする血清中の自己抗体を用いて、様々な細胞系において同定されており、このことは肝臓疾患との密接な相関関係の存在を示している。表1に掲載したタンパク質の幾つか

50

は、2つのGI番号を持つ。これは、該タンパク質およびその変異型が、マスペクトルにおいて同様な結果を示すからである。

10

20

【 0 0 2 1 】

【表1】

表1：肝臓疾患関連細胞系からスクリーニングされた自己抗原

GI番号	タンパク質名	肝硬変血清vs. HepG2 C3A	肝癌血清vs. HepG2 C3A	肝硬変血清vs. SNU-387	肝癌血清vs. SNU-387
1421609	スクレオシドジホスフェートキナーゼ (=NM23タンパク)	●	●	●	●
28940	ATPシンターゼβ-鎖、ミトコンドリア[プリカーサ]	●		●	
4507953, 5803225	14-3-3タンパク	●		●	
1710248	タンパクジスルフィドイソメラーゼ-関連タンパク5		●		●
21750187	gi 21750187命名されていないタンパク製品 (RAN rec mot.)		●		
37403, 10435300	トロポミオシン			●	●
4757900	カルレティキュリンプリカーサ	●	●		
338043	ヒトプレ-mRNAスプライシング因子SF2p32、完全配列	●	●		
1082886	腫瘍壊死因子タイプIレセプタ関連タンパクTRAP-1	●	●		
4507677	腫瘍タンパク抗原 (gp96) 1; グルコース調節タンパク	●	●		
72222, 123678	熱ショックタンパク質90	●	●		
31542947	熱ショック60kDaタンパク質 1 (シャペロニン); ミトコンドリアマトリックスタンパクP1	●			
968888	HMG-1(高-移動度群-1)	●			
13111995	KIAA0144遺伝子生成物 (NICE-4タンパク質)	●			
6005942	バロシン含有タンパク質 (p97); 転移性小胞体ATPアーゼ	●			
30157565	グリセロアルデヒド3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、肝臓	●			
1419564	サイトケラチン	●			
4191608	IGF-II mRNA-結合タンパク 1	●			
13236495	NADPH: キノンレダクターゼ		●		
9257073	ヒトコ-シャペロンP23の結晶構造 (hsp-90コ-シャペロン)		●		

【0022】

実施例2：上記自己抗原スクリーニング法により同定される自己抗原の入手性の測定

実施例1で同定された24種の自己抗原の入手性を立証するために、正常なヒト、肝硬変患者および肝癌患者由来の血清サンプルに関するアッセイを、イムノアッセイ(ELISA、RIAまたは免疫蛍光法)および上記24種のバイオマーカーを使用して、実施した。このアッセイ法は、図2に示すように、以下に説明する段階を含む。試料を調製する工程；SEQ ID NO

10

20

30

40

50

:1~SEQ ID NO:24に記載されたアミノ酸配列またはその誘導体またはフラグメントまたはその変異型もしくはこれらの組み合わせの何れか1種から選択されるバイオマーカーを用いて、該試料中の自己抗体を捕獲する工程；および該自己抗体を検出する工程。

酵素結合免疫ソープトアッセイ(ELISA)の例においては、以下の段階を採用する：まず、該バイオマーカーを被覆バッファー(a. 50mMの Na_2HCO_3 , pH=9.6;またはb. 20mMのTris-HCl, pH=8.5;またはc. 10mMのPBS, pH=7.4から選択)で、0.5~10 $\mu\text{g/ml}$ なる濃度まで希釈し、ここで該被覆バッファーは、該バイオマーカーのPI値に従って選択され、好ましくはpIよりも高いpH1~2を持つバッファーを選択する。100 μl /ウエルのバイオマーカー液をELISAプレートに添加し、4 にて一夜これを放置して、固定化させた。

【0023】

手順を継続するために、該プレートを、PBSTバッファー(PBSTバッファー：PSBバッファー+0.05%Tween-20)で2回洗浄することにより、未結合のバイオマーカーを除去し、次いで200 μl /ウエルの遮断バッファー(a. ゼラチン-NET: 0.5%ゼラチン、0.15MのNaCl、5mMのEDTA \cdot 2Na、0.05%のTween-20、50mMのTris塩基、またはb. 1% BSA-PBS, pH=7.4、またはc. 5%の脱脂ミルク-PBS、pH=7.4から選択)を添加し、周囲温度下で、少なくとも2時間遮断反応を行い；この反応の完了後、PBSTバッファーで3回洗浄し、100 μl /ウエルの血清溶液をアッセイに供した(血清溶液は、該血清サンプルを、該遮断バッファーで1000倍に希釈することにより得た)。この時点において、該血清中の自己抗体は、固定化したバイオマーカーと反応するであろう。周囲温度での少なくとも2時間の反応の後、該プレートをPBSTバッファーで4回洗浄し、次に100 μl /ウエルの二次抗体(該遮断バッファーで5000倍に希釈)を添加した。この時点で、該二次抗体は、該自己抗体を認識し、かつ吸着するであろう。周囲温度での少なくとも1時間の反応の後、該プレートをPBSTバッファーで5回洗浄した。次いで、100 μl /ウエルのTMBを添加し、30分間に渡り発色反応を誘発させた。その後、100 μl /ウエルの0.5M H_2SO_4 を添加し、また450nmにおける吸光度を測定した。

【0024】

該自己抗体の発現を、肝硬変および/または肝癌の診断において、確実に使用可能とするために、ELISAを使用して、夫々の自己抗原によって同定された如き、正常なヒト、肝硬変患者および肝癌患者由来の血清中の自己抗体の吸光度値を得る。5種のタンパク質、即ちGADPH、NADPH、HMG-1、NM23およびサイトケラチンから導かれたデータを、生物統計学的解析およびウイルクソン/マン/ホイットニーテスト(Wilcoxon-Mann-Whitney Test)に掛けた。以下の表に示すように、95%の信頼度で、以下のような結果を得た。

【0025】

【表2】

	GADPH	NADPH	HMG-1	NM23	サイトケラチン
正常なヒト vs. 肝硬変患者	p=0.001	p=0.001	p=0.00006	p=0.0001	p=0.001
正常なヒト vs. 肝癌患者	p=0.017	p=0.016	p=0.015	p=0.002	p=0.016
肝硬変患者 vs. 肝癌患者	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05

正常なヒト：N=10；肝硬変患者：N=15；肝癌患者：N=21(p<0.05なる仮説は妥当である)。

【0026】

正常なヒト、肝硬変患者および肝癌患者におけるバイオマーカーにより検出される自己抗体の発現間には差異があるものと仮定すると、上記表は、このような仮定が、正常なヒト vs. 肝硬変患者および正常なヒト vs. 肝癌患者において妥当であることを示しており、このことは、正常なヒトと肝硬変患者との間および正常なヒトと肝癌患者との間において見られる、バイオマーカーにより検出される自己抗体の発現レベルにおける差が、統計的に有意であることを意味している。

【0027】

統計処理は、正常なヒトおよび肝硬変患者における、GADPH-検出自己抗体の発現レベル

10

20

30

40

50

が、8.375倍異なっており、一方正常なヒトおよび肝癌患者におけるそれは、4.86倍異なっていることを示し、また正常なヒトおよび肝硬変患者における、HMG-1-検出自己抗体の発現レベルは、74倍異なっており、かつ正常なヒトおよび肝硬変患者における、NM23-検出自己抗体の発現レベルは、24倍異なっており、一方で正常なヒトおよび肝癌患者におけるそれは、8.545倍異なっていることを示している。これらの結果は、ここに与えられた24種の自己抗原によって検出されるような、肝硬変および肝臓癌患者の、抗体発現レベルが、正常なヒトにおけるこれらの値よりも高いことを証明している。従って、イムノアッセイと組み合わせた、これら24種の自己抗原を使用する検出キットは、スクリーニングされる検体における自己抗体の発現レベルに基いて、肝硬変および肝癌をスクリーニングすることを可能とする。

上記のような好ましい本発明の態様は、本発明を限定することを意味するものではない。本発明の精神および添付した特許請求の範囲を逸脱すること無しに、当業者によってなし得るあらゆる改良並びに変更は、本発明の保護されるべき範囲および特許請求の範囲に入るはずである。

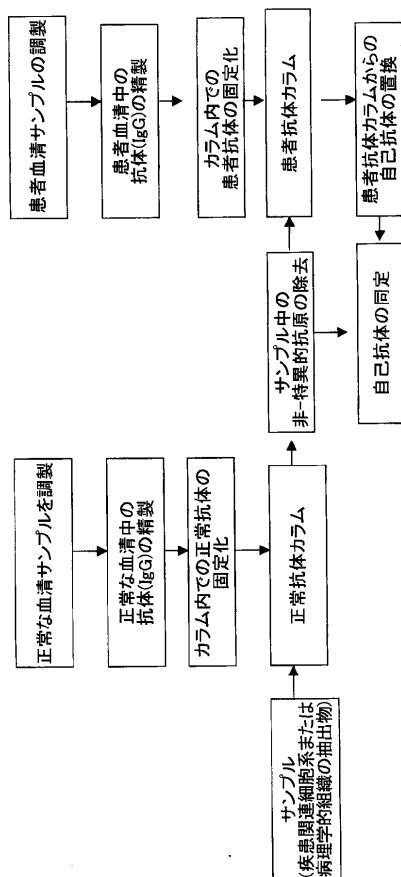
【図面の簡単な説明】

【0028】

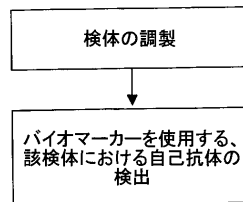
【図1】本発明による自己抗原スクリーニング法の工程系統図である。

【図2】本発明により、自己抗体をスクリーニングするための、バイオマーカーの利用に関する工程系統図である。

【図1】



【図2】



【配列表】

0004105156000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 0 7 K 14/47 Z N A
 C 0 7 K 16/18

(74)代理人 100093300
 弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100114007
 弁理士 平山 孝二

(72)発明者 ツェン ツー リン
 台湾嘉義市大業街176巷14弄55號

(72)発明者 鄭平福
 台湾彰化縣溪州鄉成功村庄南巷1-13號

審査官 白形 由美子

(56)参考文献 特開平11-316227(JP,A)
 特開平10-319019(JP,A)
 Shibuya, A. & Ikewaki, N., High serum glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase levels in patients with liver cirrhosis, *Hepatology Research*, 2002年, Vol. 22, p.174-179
 Xiao, C.-Z. et al., Relationship between expression of CD44v6 and nm23-H1 and tumor invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma, *World J Gastroenterol.*, 1998年, Vol.4, No.5, p.412-414
 Huang, B., et al., Expression of nm23 gene in hepatocellular carcinoma tissue and its relation with metastasis, *World J Gastroenterol.*, 1998年, Vol.4, No.3, p.266-267
 Cresteil, T. & Jaiswal, A. K., High levels of expression of the NAD(P)H:Quinone oxidoreductase(NQO1) gene in tumor cells compared to normal cells of the same origin, *Biochemical Pharmacology*, 1991年, Vol.42, No.5, p.1021-1027

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
 P u b M e d
 J M E D P l u s (J D r e a m 2)
 J S T P l u s (J D r e a m 2)

专利名称(译)	用于肝病的生物标志物及其使用方法		
公开(公告)号	JP4105156B2	公开(公告)日	2008-06-25
申请号	JP2004382611	申请日	2004-12-17
[标]申请(专利权)人(译)	财団法人工业技术研究院		
申请(专利权)人(译)	财団法人工业技术研究院		
当前申请(专利权)人(译)	财団法人工业技术研究院		
[标]发明人	ツェンツーリン 鄭平福		
发明人	ツェン ツー リン 鄭平福		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/78 G01N33/574 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/543 G01N33/567 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/57438 G01N33/6893 G01N2800/08 G01N2800/085		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.N G01N21/78.C G01N21/78.Z G01N33/574.Z C07K14/47.ZNA C07K16/18 G01N33/543.541.B G01N33/543.575 G01N33/574.A		
F-TERM分类号	2G054/AA07 2G054/AB04 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/EA06 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/CA41 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA71 4H045/GA26		
代理人(译)	小川伸男		
审查员(译)	白形 由美子		
优先权	092136309 2003-12-19 TW		
其他公开文献	JP2005181342A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：为肝脏疾病提供生物标志物及其使用方法。 解决方案：选自SEQ ID NO：1至SEQ ID NO：24中描述的氨基酸序列或其衍生物或片段或其变体，其组合或针对氨基酸序列的抗体的肝病生物标志物。一种用于肝病的检测试剂盒，其特征在于包含所述生物标志物。准备样品；使用生物标记物鉴定和捕获样品中的自身抗体；并检测自身抗体。

【选择图】无

表1：肝臓疾患関連細胞系からスクリーニングされた自己抗原

G1番号	タンパク質名	肝臓癌 血清vs. HepG2 CSA	肝臓癌 血清vs. H epG2 C3 A	肝臓癌 血清vs. S SNU-38 7	肝臓癌 血清vs. S NU-387
1421609	ヌクレオシドジホスフェートキナーゼ (=NM23タンパク)	●	●	●	●
28940	ATPシンターゼβ-鎖、ミトコンドリア[プリカーサ]	●	●	●	●
4507953, 5803225	14-3-3タンパク	●	●	●	●
1710248	タンパク質スルフィドイソメラーゼ-関連タンパクB	●	●	●	●
21750187	g1121750187命名されていないタンパク製品(RAN rec. mot.)	●	●	●	●
37493, 10435300 4757990	トロポミオシン	●	●	●	●
4757990	カルレティキュリンプリカーサ	●	●	●	●
338043	ヒトプレmRNAスプライシング因子SF2p52、完全配列	●	●	●	●
1082886	腫瘍壊死因子リセプター関連タンパクTRAP-1	●	●	●	●
4507677	腫瘍タンパク抗原 (gp96) 1；グルコース調節タンパク	●	●	●	●
72225, 123678	熱ショックタンパク質90	●	●	●	●
31542947	熱ショック60kDaタンパク質 1 (シャペロニン)；ミトコンドリアマトリックスタンパクP1	●	●	●	●
968888	HMG-1(高-移動度群-1)	●	●	●	●
13111995	KIAA0144遺伝子生成物(NICE-4タンパク質)	●	●	●	●
6005942	ペロシリン含有タンパク質 (p97)；転移性小胞体ATPアーゼ	●	●	●	●
30157565	グリセロールヒド3-ホスファートデヒドロゲナーゼ、肝臓	●	●	●	●
1419564	サイトケラチン	●	●	●	●
4191608	IGF-1I mRNA 結合タンパク 1	●	●	●	●
13236495	NADPH：キノンレダクターゼ	●	●	●	●
9257073	ヒトコキシペロニンP269結晶構造 (hsp-90コキシペロニン)	●	●	●	●