



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104704365 B

(45)授权公告日 2016.07.27

(21)申请号 201380053407.4

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

(22)申请日 2013.10.03

代理人 苗堃 金世煜

(30)优先权数据

(51)Int.Cl.

2012-228417 2012.10.15 JP

G01N 33/53(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(56)对比文件

2015.04.13

JP 2012013415 A, 2012.01.19,

(86)PCT国际申请的申请数据

WO 2012/056232 A1, 2012.05.03, 全文.

PCT/JP2013/076918 2013.10.03

WO 2011/109440 A1, 2011.09.09, 全文.

(87)PCT国际申请的公布数据

审查员 王在竹

W02014/061456 JA 2014.04.24

(73)专利权人 国立大学法人名古屋大学

地址 日本爱知县

(72)发明人 尾崎纪夫 永井拓 吉见阳

山田真之亮 平川晃弘 国本正子

松本友里惠

权利要求书1页 说明书12页

序列表16页 附图6页

(54)发明名称

精神分裂症标记物组及其利用

(57)摘要

本发明的课题在于提供能够高精度地辨别精神分裂症的生物标记物的组合及其用途。本发明提供一种精神分裂症标记物组,其由选自三官能团嘌呤生物合成蛋白质腺苷-3、尿嘧啶原脱羧酶、干扰素诱导GTP结合蛋白质Mx1、谷氧还蛋白-3、微管相关蛋白RP/EB家族成员1、微管蛋白折叠辅助因子B、免疫球蛋白mu链C区以及70kDa热休克蛋白4L中的2个以上的蛋白质分子的组合构成。另外,本发明提供以该标记物组在检体中的水平值为指标的精神分裂症检查法。

Table with 4 columns: No., Sequence, and two unlabeled columns. It contains a list of amino acid sequences for various proteins.

1. 一种精神分裂症标记物组,由干扰素诱导GTP结合蛋白质Mx1、三官能团嘌呤生物合成蛋白质腺苷-3、尿卟啉原脱羧酶、谷氧还蛋白-3、微管相关蛋白RP/EB家族成员1、以及微管蛋白折叠辅助因子B的组合构成。

2. 一种精神分裂症标记物组,由干扰素诱导GTP结合蛋白质Mx1、三官能团嘌呤生物合成蛋白质腺苷-3、尿卟啉原脱羧酶、以及谷氧还蛋白-3的组合构成。

3. 一种精神分裂症标记物组,由干扰素诱导GTP结合蛋白质Mx1和三官能团嘌呤生物合成蛋白质腺苷-3的组合构成。

4. 一种非诊断目的的检查法,包括以下步骤(1)~(2):

(1)准备来自被检查者的检体的步骤;以及

(2)检测所述检体中的构成权利要求1~3中任一项所述的精神分裂症标记物组的各蛋白质分子的步骤。

5. 根据权利要求4所述的检查法,其中,所述检体是血液、血浆、血清、口腔粘膜、鼻粘膜、皮肤、血液细胞、或者使从被检查者采集的血液淋巴细胞永生化的类淋巴母细胞。

6. 一种精神分裂症检查试剂盒,包括用于检测构成权利要求1~3中任一项所述的精神分裂症标记物组的各蛋白质分子的试剂、以及操作说明。

7. 根据权利要求6所述的精神分裂症检查试剂盒,其中,所述试剂分别由针对作为其靶标的蛋白质分子的抗体构成。

精神分裂症标记物组及其利用

技术领域

[0001] 本发明涉及对检查精神分裂症有用的精神分裂症标记物。详细而言,涉及能够用于判定精神分裂症的发病可能性(患病概率)的生物标记物的组合(生物标记物组)以及利用该生物标记物组的精神分裂症的检查法等。本申请基于2012年10月15日申请的日本专利申请第2012-228417号要求优先权,通过参照而援用该专利申请的全部内容。

背景技术

[0002] 精神分裂症是在青春期・青少年期发病的慢性・进行性的精神疾病,以阳性症状(幻觉、妄想、紊乱的语言或动作等)、阴性症状(情感麻痹、思考困难、积极性下降等)和认知障碍(注意障碍、工作记忆下降、执行功能障碍等)为主要症状。认为精神分裂症是遗传因素和环境因素参与的多因素疾病,但是由于关于精神分裂症的病症的分子生物学机制,依然有很多不明白的部分,结果没有找到一种生物化学的检查法。

[0003] 精神分裂症的诊断一直以来是按照以医师的问诊、患者的申述为基础的症候学进行的,基于生物化学的 checks 的诊断法还没有确立。认为精神分裂症在发病后数年病情恶化,引起不可逆的障碍,产生社会功能的永久性障碍,但由于没有对诊断有用的检查法,所以治疗介入迟缓,其结果,现状是难治的病例不少。迫切期望开发出对精神分裂症的诊断有用的检查法,但是认为该疾病是由于脑内分子的异常而发病的,另一方面,测知脑的分子病症是极其困难的,检查法的开发没有进展。

[0004] 根据双胞胎研究等的结果,明确了遗传因素与精神分裂症的发病有很大关系。目前,根据对精神分裂症患者和健康人进行的基因解析,鉴定出启示与精神分裂症的发病有关的一些候选基因(例如非专利文献1~3),但由于使这些基因和精神分裂症的病症明确化的线索少,所以尚未弄清楚疾病的发病分子机制。其结果,现状是本疾病的病症生理依然不明,基于生物化学的 checks 的诊断法还未确立。

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献1:日本特开2012-013415号公报

[0007] 非专利文献

[0008] 非专利文献1:Arcos-Burgos M.et al.,Am J Hum Genet 77,6p937-44,2005

[0009] 非专利文献2:Lewis CM.et al.,Am J Hum Genet 73,34-48,2003

[0010] 非专利文献3:Badner JA.and Gershon ES.,Mol Psychiatry 7,405-11,2002

发明内容

[0011] 本发明的课题在于提供一种能够对精神分裂症进行高精度的辨别的生物标记物的组合以及其用途(检查法、检查试剂、检查试剂盒等)。

[0012] 本发明人等为了找出精神分裂症特异性的生物标记物,着眼于末梢血液中含有的淋巴细胞而进行研究。作为其成果,报告了在患者组和健康人组之间在表达水平值上看到显著差别的22种蛋白质(专利文献1)。成功鉴定的这些蛋白质的大部分被确认在脑内也表

达,强烈地启示了与精神分裂症的病症形成密切相关的可能性大。

[0013] 鉴定出的22种蛋白质即便分别单独使用,其利用价值也很大。然而,在临床领域要求尽可能高的辨别精度,使用单一的生物标记物时,难以应对这样的要求。另外,像精神分裂症这样因各种因素而发病的疾病的辨别中,为了实现更高的精度,认为并用多个生物标记物是有利的。基于这样的观点,目标是运用统计学的方法确定出能够进行高精度的辨别的生物标记物的组合。其结果,成功地发现特别有效的生物标记物,并且确定出具有非常高的辨别精度的生物标记物的组合。使用了所确定的生物标记物的组合的检查的实用性极高,期待有助于精神分裂症的诊断技术的飞跃性的提高。以下所示的发明主要基于以上的成果。

[0014] [1]一种精神分裂症标记物组,由选自三官能团嘌呤生物合成蛋白质腺苷-3、尿嘧啶原脱羧酶、干扰素诱导GTP结合蛋白质Mx1、谷氧还蛋白-3、微管相关蛋白RP/EB家族成员1、微管蛋白折叠辅助因子B、免疫球蛋白mu链C区、以及70kDa热休克蛋白4L中的2个以上的蛋白质分子的组合构成。

[0015] [2]根据[1]所述的精神分裂症标记物组,至少包含三官能团嘌呤生物合成蛋白质腺苷-3、尿嘧啶原脱羧酶、干扰素诱导GTP结合蛋白质Mx1、以及谷氧还蛋白-3。

[0016] [3]根据[2]所述的精神分裂症标记物组,进一步包含微管相关蛋白RP/EB家族成员1和/或微管蛋白折叠辅助因子B。

[0017] [4]根据[1]所述的精神分裂症标记物组,由三官能团嘌呤生物合成蛋白质腺苷-3、尿嘧啶原脱羧酶、干扰素诱导GTP结合蛋白质Mx1、谷氧还蛋白-3、微管相关蛋白RP/EB家族成员1、以及微管蛋白折叠辅助因子B的组合构成。

[0018] [5]根据[1]所述的精神分裂症标记物组,由三官能团嘌呤生物合成蛋白质腺苷-3、尿嘧啶原脱羧酶、干扰素诱导GTP结合蛋白质Mx1、以及谷氧还蛋白-3的组合构成。

[0019] [6]根据[1]所述的精神分裂症标记物组,至少包含三官能团嘌呤生物合成蛋白质腺苷-3和干扰素诱导GTP结合蛋白质Mx1。

[0020] [7]根据[1]所述的精神分裂症标记物组,由三官能团嘌呤生物合成蛋白质腺苷-3和干扰素诱导GTP结合蛋白质Mx1的组合构成。

[0021] [8]根据[1]所述的精神分裂症标记物组,包含选自三官能团嘌呤生物合成蛋白质腺苷-3、干扰素诱导GTP结合蛋白质Mx1、以及70kDa热休克蛋白4L中的1个以上的蛋白质分子。

[0022] [9]一种精神分裂症检查法,以[1]~[8]中任一项所述的精神分裂症标记物组在检体中的水平值为指标。

[0023] [10]根据[9]所述的精神分裂症检查法,包括以下步骤(1)~(3):

[0024] (1)准备来自被检查者的检体的步骤;

[0025] (2)检测上述检体中的构成上述标记物组的各蛋白质分子的步骤;以及

[0026] (3)基于检测结果,判定精神分裂症在现在或将来发病的可能性的步骤。

[0027] [11]根据[10]所述的精神分裂症检查法,其中,关于三官能团嘌呤生物合成蛋白质腺苷-3、尿嘧啶原脱羧酶、谷氧还蛋白-3、微管相关蛋白RP/EB家族成员1、微管蛋白折叠辅助因子B、以及70kDa热休克蛋白4L,检测值低就表示精神分裂症的发病可能性高,

[0028] 关于干扰素诱导GTP结合蛋白质Mx1和免疫球蛋白mu链C区,检测值高就表示精神

分裂症的发病可能性高。

[0029] [12]根据[10]或[11]所述的精神分裂症检查法,其中,使用Logistic模型进行步骤(3)的判定。

[0030] [13]根据[9]~[12]中任一项所述的精神分裂症检查法,其中,上述检体是血液、血浆、血清、口腔粘膜、鼻粘膜、皮肤、血液细胞、或者使从被检查者采集的血液淋巴细胞永生化的类淋巴母细胞。

[0031] [14]一种精神分裂症检查试剂盒,包括用于检测构成[1]所述的精神分裂症标记物组的各蛋白质分子的试剂、以及操作说明。

[0032] [15]根据[14]所述的精神分裂症检查试剂盒,其中,上述试剂分别由针对作为其靶标的蛋白质分子的抗体构成。

附图说明

[0033] 图1是表达解析(免疫印迹和2D-DIGE法)的结果。示出了各解析的S/C(精神分裂症患者组与健康人组的比)和p值(Student's t-test)。

[0034] 图2是表示修正型AUC大的上位30个模型的特征的表。

[0035] 图3是表示候选模型1所含的蛋白质的比值的表。

[0036] 图4是表示候选模型2所含的蛋白质的比值的表。

[0037] 图5是被选择的生物标记物的有效性的验证。使用生物标记物的筛选中使用的30个检体(筛选数据)和另外的30个检体(验证数据)进行验证。

[0038] 图6是被选择的生物标记物的有效性的验证。总结了各生物标记物的功能说明和验证结果。

[0039] 图7是使用了验证数据集的4种生物标记物(MX1、GART、UROD以及GLRX3)的验证。用4变量模型进行评价。

[0040] 图8是使用了验证数据集的4种生物标记物(MX1、GART、UROD以及GLRX3)的验证。评价4变量模型对验证数据的预测性能。AUC为0.724。根据数据个数(N=30),可以说重现性好。

[0041] 图9是使用了验证数据集的6种生物标记物(MX1、GART、UROD、GLRX3、MAPRE1以及TBCB)的验证。用6变量模型进行评价。

[0042] 图10是使用了验证数据集的6种生物标记物(MX1、GART、UROD、GLRX3、MAPRE1以及TBCB)的验证。评价6变量模型对验证数据的预测性能。AUC为0.664。

[0043] 图11表示MX1、GART和HSPA4L的相关关系(验证数据中的相关系数,综合两方数据时的相关系数)。

[0044] 图12是各种预测模型及其辨别精度。上段的4个预测模型是用筛选数据集进行预测模型的构建并用验证数据集进行评价的。中段的4个预测模型是用验证数据集进行预测模型的构建并用筛选数据集进行评价的。下段的4个预测模型中,用筛选数据集和验证数据集构建预测模型。S:筛选数据集,V:验证数据集,1:将筛选数据集和验证数据集进行综合。

具体实施方式

[0045] 1.精神分裂症标记物组

[0046] 本发明的第1方面涉及一种精神分裂症特异性蛋白质分子(生物标记物)的组合,即精神分裂症标记物组(以下也称为“本发明的生物标记物组”)。本发明的生物标记物组在判定·评价精神分裂症在现在或将来发病的可能性方面有用。“现在发病的可能性”表示检查时是否精神分裂症在患病或发病(是否为精神分裂症)、或者患病或发病的概率。另一方面,“将来发病的可能性”表示精神分裂症将来发病的可能性(风险)。“精神分裂症”是以精神功能的分裂为基础的精神疾病群的统称。根据世界卫生组织(WHO)的疾病与相关健康问题的国际统计分类(1CD),被分成妄想型、青春型、紧张型、未分化型、精神分裂症后抑郁、残留型、单纯型。

[0047] 本发明的生物标记物组由确认了与精神分裂症的相关性的蛋白质分子的组合构成。具体而言,由选自以下列举的8种蛋白质中的2个以上的蛋白质分子构成本发明的生物标记物组。优选由3个以上,更优选由4个以上的蛋白质分子构成本发明的生物标记物组。

[0048] 三官能团嘌呤生物合成蛋白质腺苷-3(以下,称为“GART”。序列号1);

[0049] 尿卟啉原脱羧酶(以下,称为“UROD”。序列号2);

[0050] 干扰素诱导GTP结合蛋白质Mx1(以下,称为“MX1”。序列号3);

[0051] 谷氧还蛋白-3(以下,称为“GLRX3”。序列号4);

[0052] 微管相关蛋白RP/EB家族成员1(以下,称为“MAPRE1”。序列号5);

[0053] 微管蛋白折叠辅助因子B(以下,称为“TBCB”。序列号6);

[0054] 免疫球蛋白mu链C区(以下,称为“IGHM”。序列号7);

[0055] 70kDa热休克蛋白4L(以下,称为“HSPA4L”。序列号8)

[0056] 作为本发明的生物标记物组,可采用上述蛋白质的各种组合。其中,如后述的实施例(特别是图2的表)所示,GART、UROD、MX1、GLRX3在能够进行精度极高的辨别这方面特别有用且重要。因此,在本发明的优选的一个方式中,提供至少包含这4个蛋白质分子的精神分裂症标记物组。另一方面,显示了MAPRE1和TBCB仅次于上述4个蛋白质分子,也是有用的。因此,还优选除上述4个蛋白质分子以外,还组合MAPRE1和TBCB中的2个或者1个而构成精神分裂症标记物组。

[0057] 以下列举本发明的生物标记物组的具体例。应予说明,它们是利用统计学方法进行解析的结果,被确定为具有高辨别精度的组合。

[0058] GART、UROD、MX1、GLRX3、MAPRE1、TBCB的组合

[0059] GART、UROD、MX1、GLRX3、MAPRE1、TBCB、IGHM的组合

[0060] GART、UROD、MX1、GLRX3、MAPRE1、TBCB、HSPA4L的组合

[0061] GART、UROD、GLRX3、MAPRE1、TBCB的组合

[0062] GART、UROD、MX1、GLRX3、MAPRE1、TBCB、IGHM、HSPA4L的组合

[0063] GART、UROD、MX1、MAPRE1、TBCB的组合

[0064] GART、UROD、MX1、GLRX3、TBCB、IGHM的组合

[0065] GART、UROD、MX1、GLRX3、MAPRE1、HSPA4L的组合

[0066] GART、UROD、MX1、MAPRE1、TBCB、HSPA4L的组合

[0067] GART、UROD、GLRX3、MAPRE1、TBCB、HSPA4L的组合

[0068] GART、UROD、MX1、GLRX3、MAPRE1、IGHM、HSPA4L的组合

[0069] GART、MX1、GLRX3、MAPRE1、TBCB、IGHM、HSPA4L的组合

- [0070] GART、UROD、MX1、GLRX3、TBCB、HSPA4L的组合
- [0071] GART、UROD、GLRX3、MAPRE1、TBCB的组合
- [0072] GART、UROD、MX1、GLRX3的组合
- [0073] GART、UROD、MX1、GLRX3、TBCB、IGHM、HSPA4L的组合
- [0074] GART、UROD、MX1、MAPRE1、IGHM的组合
- [0075] GART、UROD、MX1、MAPRE1、TBCB、IGHM的组合
- [0076] GART、UROD、MX1、GLRX3、MAPRE1、IGHM的组合
- [0077] GART、UROD、GLRX3、MAPRE1、TBCB、IGHM、HSPA4L的组合
- [0078] GART、UROD、MX1、GLRX3、TBCB、HSPA4L的组合
- [0079] GART、UROD、MX1、MAPRE1、TBCB、IGHM的组合
- [0080] GART、UROD、MX1、GLRX3、HSPA4L的组合
- [0081] GART、MX1、GLRX3、MAPRE1、IGHM、HSPA4L的组合
- [0082] GART、UROD、MX1、GLRX3、IGHM、HSPA4L的组合
- [0083] GART、UROD、MX1、GLRX3、IGHM的组合
- [0084] GART、MX1、GLRX3、MAPRE1、TBCB、IGHM、HSPA4L的组合
- [0085] GART、UROD、MX1、GLRX3、MAPRE1、IGHM的组合
- [0086] GART、UROD、MX1、TBCB、IGHM的组合
- [0087] GART、UROD、MX1、TBCB、IGHM、HSPA4L的组合

[0088] 以上组合中,GART、UROD、MX1、GLRX3、MAPRE1、TBCB的组合显示出最高的辨别精度。考虑到该事实,可以说该组合是最佳的生物标记物组之一。另外,基于统计学中的奥卡姆剃刀(Occam's razor)这样的理论,只要辨别精度为同等程度,则辨别中使用的蛋白质的个数越少越好(详细内容后述)。最符合该理论的组合是GART、UROD、MX1、GLRX3的组合。

[0089] 如后述的实施例所示,根据重现性的验证结果,判明GART和MX1的重现性好。鉴于该认识,优选在生物标记物组中包含GART和MX1。特别优选由GART和MX1这两者构成生物标记物组。另一方面,在GART和MX1的重现性好的认识的基础上,以HSPA4L的重现性也较好的认识为根据,在本发明的优选的一个方式中,以包含选自GART、MX1和HSPA4L中的1个以上的蛋白质分子的方式构成生物标记物组。

[0090] 2. 精神分裂症检查法

[0091] 本发明的第2方面涉及上述本发明的生物标记物组的用途,提供检查精神分裂症在现在或将来发病的可能性的方法(以下,也称为“本发明的检查法”)。本发明的检查法作为用于判定是否精神分裂症在患病或者发病的手段,或者作为用于判定精神分裂症将来发病的可能性的手段是有用的。本发明的检查法给予对诊断精神分裂症有用的信息。根据本发明的检查法,能够简便且客观地判定精神分裂症的发病可能性。

[0092] 但是,将从精神分裂症等的精神病发病到开始药物治疗法为止的时间延迟称为精神病未治疗期(Duration of untreated psychosis;DUP)。已知DUP越长,临床恢复越不好。另一方面,发病后的数年是影响预后的重要时期,称为临界期(critical period)。在脑神经图像解析的认识中,报告了DUP越长,则作为左颞上回的一部分的颞平面的体积越小(Takahashi et al.:Psychiatry Res 154:209-219,2007),该认识启示了在病初期(临界期)的未治疗期进行脑形态变化,而且,不仅缩短DUP、而且也改善临界期中的神经生物学变

化的早期介入是极其重要的。本发明的检查法还能够用于筛选精神分裂症,还有助于精神分裂症的早期发现·早期治疗。

[0093] 本发明的检查法中,将来自被检查者的检体中的本发明的生物标记物组的水平值作为指标使用。这里的“水平值”典型的是“量”或者“浓度”。但是,根据惯例和技术常识,在表达能否检测出检测对象的分子(即,有无表观上的存在)时也使用用语“水平值”。应予说明,只要考虑到所要求的精度、检查的简便性等而决定所采用的生物标记物组即可。

[0094] 本发明的检查法中进行以下步骤。

[0095] (1)准备来自被检查者的检体的步骤

[0096] (2)检测构成上述检体中的标记物组(即,选自GART、UROD、MX1、GLRX3、MAPRE1、TBCB、IGHM、HSPA4L中的2个以上(优选为3个以上,更优选为4个以上)的蛋白质分子的组合)的各蛋白质分子的步骤

[0097] (3)基于检测结果,判定精神分裂症在现在或将来发病的可能性的步骤

[0098] 步骤(1)中准备来自被检查者的检体。作为检体,可以使用被检查者的血液、血浆、血清、口腔粘膜、鼻粘膜、皮肤等。另外,可以使用从被检查者来源中采集的血液细胞作为检体。可以使用从血液细胞分离的淋巴细胞、B细胞或者T细胞作为检体。另外,可以使用次代培养后的细胞。另一方面,也可以将使从被检查者采集的血液淋巴细胞永生化而得的类淋巴母细胞作为检体。“类淋巴母细胞”是与分化为成熟淋巴细胞前的细胞类似的细胞,可以通过利用EB(Epstein-Barr)病毒使从血液分离的淋巴细胞永生化而制备。形成细胞株的类淋巴母细胞与新鲜血液细胞相比,可以说显示出更反映出疾病的特征·性状的蛋白质表达谱。因此,如果将类淋巴母细胞作为检体,能够防止该疾病以外的要素,即采集时的被检查者的状态(状态依赖性因素)掩盖本来应该显示的表达谱(即,用本检测法应该检测出的表达谱)。其结果,可得到更反映出疾病的特征·性状的可信度高的检查结果。由于以血液、血浆或者血清等为检体的检查操作简便,所以作为筛选性检查特别有用,另一方面,由于以类淋巴母细胞为检体的检查给予可信度更高的结果,所以作为2次检查或作为确诊的手段特别有用。因此,如果通过以血液、血浆或者血清等为检体的检查来排查高危人群(发病的可能性高的人)后,再进行以类淋巴母细胞为检体的检查,能够进行高效率且可信度高的诊断。

[0099] 被检查者没有特别限定。即,对于需要判定精神分裂症在现在或将来发病的可能性(即,是否精神分裂症在患病或发病、精神分裂症发病的可能性的程度、精神分裂症将来发病的可能性的程度)的人,都能广泛适用于本发明。例如,对于通过医师的问诊等而被诊断为精神分裂症的患者适用本发明时,基于蛋白质的表达水平值这样的客观指标,能够判定该诊断是否正确。即,若采用本发明的检查法,则可得到辅助或支持以往的诊断的信息。该信息对决定更适当的治疗方针有益,促进治疗效果的提高、患者的QOL(Quality of Life,生活质量)的提高。另一方面,在患病状态的监控中利用本发明,还能够实现难治化、病重化、复发等的防止。

[0100] 由家族背景等被推定精神分裂症的患病风险高的人(高危人)也是合适的被检查者。对于这样的被检查者在显现精神分裂症的症状之前应用本发明,能够阻止或延迟发病,或者能够进行早期的治疗介入。出于确定精神分裂症的患病风险高的人的目的,本发明也是有用的。这样的确定使得通过例如预防措施、生活习惯改善等而降低发病的可能性(患病

可能性)成为可能。没有自觉症状的人等、在以往的诊断中无法或者难以判定是否为精神分裂症的人也是本发明的合适的受检者。应予说明,可以将本发明作为健康诊断的一个项目来实施。

[0101] 步骤(2)中检测检体中的各生物标记物。不需要严格地定量各生物标记物的水平值。即,只要在后续的步骤(3)中能够判定精神分裂症的发病可能性的程度检测各生物标记物的水平值即可。例如,也能够以可辨别检体中的各生物标记物的水平值是否超过规定的基准值的方式进行检测。

[0102] 各生物标记物的检测方法没有特别限定,但优选利用免疫学的方法。若采用免疫学的方法,则能够进行快速且灵敏度高的检测。另外,操作也简便。在利用免疫学的方法进行的测定中,使用对所采用的生物标记物具有特异结合性的物质。作为该物质,通常可使用抗体,但并不局限于抗体,只要是对该生物标记物具有特异结合性且能够测定其结合量的物质,就可以采用。应予说明,并不局限于市售的抗体,可以采用利用免疫学的方法、噬菌体展示法、核糖体展示法等而新制备的抗体。

[0103] 作为测定法,可例示乳胶凝集法、荧光免疫测定法(FIA法)、酶免疫测定法(EIA法)、放射免疫测定法(RIA法)、免疫印迹法。作为优选的测定法,可举出FIA法和EIA法(包括ELISA法)。若采用这些方法,则能够高灵敏度、快速且简便地进行检测。FIA法中使用经荧光标记的抗体,将荧光作为信号来检测抗原抗体复合物(免疫复合物)。另一方面,EIA法中使用经酶标记的抗体,将基于酶反应的发色或发光作为信号来检测免疫复合物。

[0104] ELISA法具有检测灵敏度高、特异性高、定量性优异、操作简便、适合多检体的同时处理等很多优点。以下示出利用ELISA法时的具体操作法的一个例子。首先,将抗生物标记物抗体固定于不溶性支撑体。具体而言,例如用抗生物标记物单克隆抗体敏化(涂布)微量滴定板的表面。使检体与这样固相化的抗体接触。该操作的结果是,如果针对固相化的抗生物标记物抗体的抗原(作为生物标记物的蛋白质分子)存在于检体中,则形成免疫复合物。通过清洗操作,除去非特异性结合成分后,添加与酶结合的抗体而标记免疫复合物,接着与酶的底物反应而发色。然后,以发色量为指标而检测免疫复合物。应予说明,ELISA法的详细内容记载在很多专著、论文中,设定各方法的实验步骤、实验条件时可以参考这些专著、论文。应予说明,并不局限于非竞争法,也可以采用竞争法(与检体一起添加抗原进行竞争的方法)。另外,可以采用利用标记化抗体直接检测检体中的生物标记物的方法,或者可以采用夹心法。夹心法中使用表位不同的2种抗体(捕获用抗体和检测用抗体)。

[0105] 可以采用蛋白质阵列、蛋白质芯片等能够同时检测多个检体的手段。探针使用例如靶标的生物标记物特异性抗体。

[0106] 步骤(3)中,基于检测结果判定精神分裂症在现在或将来发病的可能性。为了能够进行精度好的判定,可以在将步骤(2)中得到的检测值与对照检体(对照物)的检测值进行比较的基础上进行判定。发病可能性的判定可以是定性、定量中的任一种。应予说明,这里的判定由其判定基准可知,即便不依靠医师、检查技师等具有专业知识的人的判断,也可以自动/机械地进行。

[0107] 本发明中,作为原则,对于各生物标记物,采用以下的基准。即,对于GART、UROD、GLRX3、MAPRE1、TBCB、HSPA4L,检测值低就表示精神分裂症的发病可能性高(检测值与发病可能性呈负的相关关系),对于MX1、IGHM,检测值高就表示精神分裂症的发病可能性高(检

测值与发病可能性呈正的相关关系)。

[0108] 步骤(3)的判定可以使用与所采用的生物标记物组对应的Logistic模型(统计模型)进行。以下,示出具体例(使用由GART、UROD、MX1、GLRX3、MAPRE1、TBCB构成的生物标记物组的情况)。

[0109] <使用Logistic模型的判定>

[0110] 以下的Logistic模型中,计算p。具体而言,将各蛋白质分子的水平值(检测值)代入以下的式子中,求出精神分裂症的发病可能性(精神分裂症患病概率)。

$$[0111] \quad p = \frac{\exp(11.54 - 4.64GART - 2.67UROD + 2.04MX1 - 3.14GLRX3 - 1.65MAPRE1 - 2.01TBCB)}{1 + \exp(11.54 - 4.64GART - 2.67UROD + 2.04MX1 - 3.14GLRX3 - 1.65MAPRE1 - 2.01TBCB)}$$

[0112] 另一方面,预先设定基准值或CUT-OFF值,按照以下的(a)、(b)作出定性的判定。应予说明,判定中使用的基准值、CUT-OFF值考虑使用的检体的种类、状态,要求的精度(可信度)等决定即可。

[0113] (a)将生物标记物组所含的生物标记物全部为阳性(CUT-OFF值以上)的情况判定为阳性(例如发病可能性为50%以上),将除其以外的情况判定为阴性(例如发病可能性低于50%)。

[0114] (b)将生物标记物组所含的生物标记物中有1个为阳性(CUT-OFF值以上)的情况判定为阳性(例如发病可能性为50%以上),将除其以外的情况判定为阴性(例如发病可能性低于50%)。

[0115] 可以预先设定多个判定区间,并作出定量或者半定量判定。定量判定的情况下,例如,预先设定与各生物标记物的水平值的范围相关的多个判定区间(各判定区间中规定精神分裂症的发病可能性),并由各生物标记物的水平值确定出检体属于的判定区间。判定区间的个数和与各判定区间相关的各生物标记物的水平值以及判定结果没有特别限定,可以通过预实验等任意地设定。例如,以规定的阈值为边界而判定发病可能性的高低时的“阈值”、与发病可能性的高低涉及的区间相关的“生物标记物的水平值范围”可以通过使用了多个检体的统计解析来决定。利用统计处理进行解析时,一般设定高风险组和低风险组是有效的。作为高风险组,例如,在精神分裂症患者的群体、家族中精神分裂症患者多的人的群体符合,作为低风险组,例如,在健康人的群体、家族中没有精神分裂症患者的人的群体符合。

[0116] 在本发明的一个方式中,将对同一个被检查者在某时间点测定的各生物标记物的水平值与过去测定的各生物标记物的水平值进行比较,分析各生物标记物的水平值有无增减和/或增减的程度。其结果得到的与生物标记物组的水平值变化有关的数据是对于监控精神分裂症的发病可能性的变化有用的信息。即,根据生物标记物组的水平值变动,能够进行从上次的检查到这次的检查之间发病可能性变高或者变低或者没有变化这样的判定。如果将这样的评价与精神分裂症的治疗同时进行,则能确认治疗效果自不必说,还能够预先掌握精神分裂症复发的征兆。由此,能够决定更适当的治疗方针。这样,本发明能够对治疗效果的最大化和患者的QOL(生活质量)提高有巨大的贡献。

[0117] 3. 精神分裂症检查试剂盒

[0118] 本发明还进一步提供用于检查精神分裂症的发病可能性的试剂盒。本发明的试剂盒包括用于检测构成精神分裂症标记物组的各蛋白质分子的试剂。对各生物标记物(蛋白

质分子),准备试剂。各试剂由向对应的生物标记物显示特异结合性的物质(以下,称为“结合分子”)构成。例如,如果为GART用的试剂,则使用对GART显示特异结合性的物质作为试剂。作为结合分子的例子,可举出特异性识别生物标记物的抗体、核酸适配体和肽适配体。结合分子只要具有对采用的生物标记物的特异结合性,其种类、来源等就没有特别限定。另外,为抗体时,可以为多克隆抗体、寡克隆抗体(数种~数十种的抗体的混合物)以及单克隆抗体中的任一种。作为多克隆抗体或者寡克隆抗体,除来自进行动物免疫而得的抗血清的IgG组分以外,还可以使用利用抗原的亲精制抗体。抗生物标记物抗体可以是Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv抗体等抗体片段。

[0119] 结合分子可以用常规方法制备。如果能够获得市售品,则可以使用该市售品。例如,如果为抗体,则可以利用免疫学的方法、噬菌体展示法、核糖体展示法等制备。利用免疫学的方法的多克隆抗体制备可以按照下述步骤进行。制备抗原(生物标记物或其一部分),使用该抗原对兔子等动物实施免疫。可以通过对生物体试样进行精制而得到抗原。另外,也可以使用重组型抗原。重组型抗原例如可以通过使用载体将编码生物标记物的基因(也可以为基因的一部分)导入适当的宿主中,使其在得到的重组细胞内表达而制备。

[0120] 为了增强免疫诱导作用,可以使用与载体蛋白结合的抗原。作为载体蛋白,使用KLH(Keyhole Limpet Hemocyanin:钥孔血蓝蛋白)、BSA(Bovine Serum Albumin:牛血清白蛋白)、OVA(Ovalbumin:卵白蛋白)等。载体蛋白的结合可使用碳化二亚胺法、戊二醛法、重氮缩合法、MBS(马来酰亚胺苯甲酰氧基琥珀酰亚胺)法等。另一方面,也可以采用使生物标记物分子(或者其一部分)表达为与GST、 β 半乳糖苷酶、麦芽糖结合蛋白、或者组氨酸(His)标签蛋白等的融合蛋白的抗原。这样的融合蛋白可以利用通用的方法简便地精制。

[0121] 根据需要反复进行免疫,在抗体值充分上升的时刻采血,通过离心处理等得到血清。对得到的抗血清进行亲和精制,制成多克隆抗体。

[0122] 另一方面,单克隆抗体可以按照下述步骤制备。首先,按照与上述相同的步骤实施免疫操作。根据需要反复进行免疫,在抗体值充分上升的时刻从免疫动物取出产生抗体的细胞。接下来,将得到的产生抗体的细胞与骨髓瘤细胞融合而得到杂交瘤。接着,将该杂交瘤单克隆化后,选择产生对目标蛋白质具有高的特异性的抗体的克隆体。通过对被选择的克隆体的培养液进行精制而得到目标抗体。另一方面,也可以使杂交瘤增殖到所希望的个数以上后,将其移植到动物(例如小鼠)的腹腔内,使其在腹水内增殖并精制腹水,从而获得目标抗体。上述培养液的精制或者腹水的精制优选采用使用了蛋白G、蛋白A等的亲和层析。另外,也可以采用将抗原固相化的亲和层析。还可以进一步使用离子交换色谱、凝胶过滤色谱、硫酸铵盐析以及离心分离等方法。这些方法可以单独使用或者任意组合使用。

[0123] 作为保持对生物标记物的特异结合性的条件,可以对得到的抗体实施各种改型。可以将这样的改型抗体作为本发明的试剂。

[0124] 如果使用标记抗体作为特异性结合分子,则可以将标记量作为指标而直接检测结合抗体量。因此,能够构建更简便的检查法。相反,存在需要准备与标记物结合的抗体且检测灵敏度一般变低这样的问题点。因此,优选利用与标记物结合的二级抗体的方法、利用二级抗体和标记物结合的聚合物的方法等间接检测方法。这里的二级抗体是指对采用的生物标记物特异性抗体具有特异结合性的抗体。例如,制备生物标记物特异性抗体作为兔子抗体时,可以使用抗兔子IgG抗体作为二级抗体。市售可对兔子、山羊、小鼠等的各种抗体使用

的标记二级抗体有市售(例如FUNAKOSHI株式会社、Cosmo Bio株式会社等),可以根据本发明的试剂适当地选择合适的二级抗体使用。

[0125] 作为标记物的例子,有过氧化物酶、微过氧化物酶、辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶、 β -D-半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶以及葡萄糖-6-磷酸脱氢酶等酶,异硫氰酸荧光素(FITC)、四甲基罗丹明异硫氰酸酯(TRITC)和铈等荧光物质,鲁米诺、异鲁米诺和吡啶衍生物等化学发光物质,NAD等辅酶、生物素,以及 ^{131}I 和 ^{125}I 等放射性物质。

[0126] 一个方式中,本发明的试剂根据其用途进行固相化。固相化中使用的非溶性支撑体没有特别限定。例如可以使用由聚苯乙烯树脂、聚碳酸酯树脂、有机硅树脂、尼龙树脂等树脂,玻璃等不溶于水的物质构成的非溶性支撑体。抗体向非溶性支撑体上的担载可以通过物理吸附或者化学吸附来进行。

[0127] 本发明的试剂盒中通常附带操作说明书。试剂盒中也可以包括实施检查法时使用的其它试剂(缓冲液、阻断用试剂、酶的底物、发色试剂等)和/或装置或器具(容器、反应装置、吸收分光光度计、荧光检测仪等)。另外,优选试剂盒中包含构成生物标记物组的各蛋白质分子或者其片段作为标准样品。

[0128] 实施例

[0129] 根据之前的研究,鉴定出确认与精神分裂症的相关性的22种蛋白质(专利文献1)。为了确定出能够进行高精度的辨别的生物标记物的组合,进行了以下的研究。

[0130] 1.利用免疫印迹进行的表达解析

[0131] (1)方法

[0132] 以30名精神分裂症患者(男性15名:43.7 \pm 12.6岁,女性15名:43.1 \pm 8.9岁)和30名健康人(男性15名:44.4 \pm 12.9岁,女性15名:43.2 \pm 9.6岁)为对象,利用免疫印迹法对鉴定出的22种蛋白质进行表达量的再确认。

[0133] (2)结果

[0134] 在22种蛋白质中,确认了表达量的显著差异(Student's t-test, $p < 0.05$)的蛋白质为8种。在精神分裂症患者组中,确认了表达上升的蛋白质为2个(MX1、IGHM),确认了表达下降的蛋白质为6个(MAPRE1、TBCB、GLRX3、UROD、HSPA4L、GART)(图1)。

[0135] 2.利用统计学的方法制作疾病辨别模型

[0136] 采用统计假设检验对精神分裂症患者组和健康人组的蛋白质表达量的平均值的差进行比较,结果存在显著差异的蛋白质为8种(Student's t-test, $p < 0.05$)(与上述结果相同)。从该8种中,鉴定出对精神分裂症患者组和健康人组的辨别有用的蛋白质,制成能够高精度辨别疾病的统计模型(Logistic模型)。Logistic模型是用于辨别下式(式(1))表示的二值响应(这里为精神分裂症患者和健康人)的统计模型。

$$[0137] \quad p = \frac{\exp(\beta_0 + \beta_1 \text{蛋白质 } 1 + \dots + \beta_k \text{蛋白质 } k)}{1 + \exp(\beta_0 + \beta_1 \text{蛋白质 } 1 + \dots + \beta_k \text{蛋白质 } k)} \quad (1)$$

[0138] 这里, p 为患精神分裂症的概率,蛋白质1~蛋白质 k 为辨别中使用的蛋白质的表达量。 β_0 为截距, $\beta_1 \sim \beta_k$ 为表示各蛋白质的表达量对患精神分裂症的概率的影响的大小的参数,由蛋白质表达数据推定。 β 为为正(负)是指如果其蛋白质的表达量大,则患精神分裂症的概率高(低)。为了制作高精度的疾病辨别模型,需要从总共255(= $8C_1 + 8C_2 + 8C_3 + 8C_4 + 8C_5 + 8C_6 + 8C_7 + 8C_8$)个蛋白质的组合中选定最佳的组合。利用以下的统计方法,鉴定出2个适合疾病辨

别的蛋白质的组合(辨别模型)。

[0139] <辨别模型1>

[0140] 对255个蛋白质的组合,基于偏差修正型曲线下面积(AUC:area under the curve)、L00交叉验证(L00CV:leave one out cross validation)分别算出预测误差。修正型AUC越接近1.0,意味着基于L00CV的预测误差越小,其组合的辨别精度越高。应予说明,两个指标均是统计学的教科书和论文中推荐的评价指标。图2表示修正型AUC大的上位30个蛋白质的组合。由图2的表可知采用GART、UROD、MX1、GLRX3、MAPRE1、TBCB的模型(以下,辨别模型1)的辨别精度最高(修正型AUC:0.877,预测误差:0.164)。辨别模型1的Logistic模型如下(式(2))。

[0141]

$$p = \frac{\exp(11.54 - 4.64GART - 2.67UROD + 2.04MX1 - 3.14GLRX3 - 1.65MAPRE1 - 2.01TBCB)}{1 + \exp(11.54 - 4.64GART - 2.67UROD + 2.04MX1 - 3.14GLRX3 - 1.65MAPRE1 - 2.01TBCB)} \quad (2)$$

[0142] 由式(2)可知MX1越大,患精神分裂症的概率越高,其它的蛋白质的值越大,患精神分裂症的概率越低。

[0143] <辨别模型2>

[0144] 统计学中具有奥卡姆剃刀(Occam's razor)这样的理论。该理论是“只要能够同样地说明某种现象,假设的数目越少越好”。具体而言,使用统计模型,用多个解释变量(蛋白质)的测定数据说明因变量(精神分裂症的有无)时,越增加统计模型所包含的解释变量的个数,使模型变得越复杂,则对“其测定数据”的拟合度变得越好好。但是,该统计模型会与“其测定数据(过去的的数据)”过拟合,与新测定的数据的拟合变差。即,统计模型与现有的数据过拟合(Overfitting)。为了避免该问题,统计模型所包含的解释变量越少越好。基于该理论,如果辨别精度为同等程度,则辨别中使用的蛋白质个数越少越好。由图2的表可知采用GART、UROD、MX1、GLRX3的模型(以下,辨别模型2)是符合该理论的模型(修正型AUC:0.860,预测误差:0.178)。辨别模型2的Logistic模型(式(3))如下。

$$p = \frac{\exp(6.44 - 3.82GART - 2.18UROD + 2.48MX1 - 2.84GLRX3)}{1 + \exp(6.44 - 3.82GART - 2.18UROD + 2.48MX1 - 2.84GLRX3)} \quad (3)$$

[0146] 可知参数的正负与辨别模型1相同,各蛋白质对患精神分裂症的概率的影响在辨别模型1和2中相同。

[0147] <辨别模型1和2的比较>

[0148] 将辨别模型1和2所含的蛋白质的比值比分别示于图3和图4。两个模型所含的蛋白质对精神分裂症患病概率的影响在统计学上是显著($p < 0.05$)或者边缘显著($p < 0.10$)时,表示是适合辨别的蛋白质。另外,采用逐步变量选择法这样的统计方法,选定适合辨别的蛋白质的组合。其结果,选择GART、UROD、MX1、GLRX3,辨别模型2的有用性也得到不同的统计方法的支持。此外,由图2的表可知按GART、UROD、MX1、GLRX3、MAPRE1、TBCB、IGHM、HSPA4L的顺序包含在模型中的次数多。

[0149] 以上的研究结果启示了以下的内容。

[0150] • 辨别模型1和2的精神分裂症辨别精度在统计学上几乎相同。

[0151] • 精神分裂症的辨别中,图2的几乎所有模型中包含的GART、UROD、MX1、GLRX3特别重要。

[0152] • 辨别模型1所含的MARPRE1和TBCB对辨别的有用性也高。

[0153] <使用辨别模型的精神分裂症的判定>

[0154] 使用辨别模型1或2判定是否为精神分裂症时,计算精神分裂症患病概率(式(2)或(3)中的p)。例如,使用辨别模型1时,测定患者的GART、UROD、MX1、GLRX3、MAPRE1、TBCB,将该值代入式(2),求出精神分裂症患病概率。

[0155] 3. 生物标记物的有效性的验证

[0156] 使用另外的临床检体验证被选择的8种生物标记物的有效性。将利用免疫印迹验证的结果示于图5、6。关于MX1、GART和HSPA4L,筛选数据(上述1.中使用的30个检体的数据)和验证数据(另外的30个检体的数据)显示向相同方向的变化(存在统计的显著性),具有重现性。

[0157] 使用验证数据集验证4种生物标记物(MX1、GART、UROD以及GLRX3)的有效性,结果MX1和GART重现了显著性(图7、8)。另外,使用验证数据集验证6种生物标记物(MX1、GART、UROD、GLRX3、MAPRE1以及TBCB)的有效性时,MX1和GART重现了显著性(图9、10)。应予说明,结果是4变量模型的预测精度更好。

[0158] 基于MX1、GART和HSPA4L具有重现性,通过多变量解析对这3个分子的相关关系进行分析。将结果示于图11。括弧内的数值从左依次为筛选数据中的相关系数、验证数据中的相关系数、将两方的数据综合时的相关系数。3个分子间完全没有相关关系。应予说明,估计多变量解析中没有看到HSPA4L的显著性的原因不是多重共线性的影响。

[0159] 另一方面,基于MX1和GART重现了显著性,特别着眼于这些生物标记物,并且构建了使用的生物标记物的种类和个数不同的多个预测模型,对8种生物标记物(MX1、GART、UROD、GLRX3、MAPRE1、TBCB、HSPA4L、IGHM)进行了进一步的验证。将验证结果示于图12。除一部分预测模型以外,看到高的重现性。从预测精度和重现性的观点考虑,可以说MX1和GART的2变量模型最优异。应予说明,各预测模型与上述的式(1)同样地表示。例如,图12的最上段的辨别模型是 $p = \exp(-0.234 + 3.012MX1 - 2.852GART) / \{1 + \exp(-0.234 + 3.012MX1 - 2.852GART)\}$ 。

[0160] 由以上的研究结果启示了以下内容。

[0161] • MX1和GART的重现性好,为优异的生物标记物。

[0162] • HSPA4L重现性也较好,利用价值高。

[0163] • 用MX1和GART这两者辨别时可得到精度最高的结果。

[0164] 产业上的可利用性

[0165] 本发明的检查法能够高精度辨别精神分裂症。本发明的检查法作为用于判定精神分裂症是否发病的手段有用。另外,作为用于掌握将来发病的可能性的手段也有用。通过利用本发明的检查法的早期发现•早期治疗,可期待实现防止精神分裂症的难治化、病重化(病情发展)、复发等。

[0166] 该发明不限于上述发明的实施方式和实施例的说明。只要不脱离专利申请请求保护的范围的记载,在本领域技术人员能够容易想到的范围内,各种变型方式也包含在本发明中。本说明书中明示的论文、公开专利公报和专利公报等的内容通过援用其全部的内容而引用。

序列表

<110> 国立大学法人名古屋大学
 <120> 精神分裂症标记物组及其利用
 <130> IP1562703P
 <150> JP P2012-228417
 <151> 2012-10-15
 <160> 8
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 1010
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 1
 Met Ala Ala Arg Val Leu Ile Ile Gly Ser Gly Gly Arg Glu His Thr
 1 5 10 15
 Leu Ala Trp Lys Leu Ala Gln Ser His His Val Lys Gln Val Leu Val
 20 25 30
 Ala Pro Gly Asn Ala Gly Thr Ala Cys Ser Glu Lys Ile Ser Asn Thr
 35 40 45
 Ala Ile Ser Ile Ser Asp His Thr Ala Leu Ala Gln Phe Cys Lys Glu
 50 55 60
 Lys Lys Ile Glu Phe Val Val Val Gly Pro Glu Ala Pro Leu Ala Ala
 65 70 75 80
 Gly Ile Val Gly Asn Leu Arg Ser Ala Gly Val Gln Cys Phe Gly Pro
 85 90 95
 Thr Ala Glu Ala Ala Gln Leu Glu Ser Ser Lys Arg Phe Ala Lys Glu
 100 105 110
 Phe Met Asp Arg His Gly Ile Pro Thr Ala Gln Trp Lys Ala Phe Thr
 115 120 125
 Lys Pro Glu Glu Ala Cys Ser Phe Ile Leu Ser Ala Asp Phe Pro Ala
 130 135 140
 Leu Val Val Lys Ala Ser Gly Leu Ala Ala Gly Lys Gly Val Ile Val
 145 150 155 160
 Ala Lys Ser Lys Glu Glu Ala Cys Lys Ala Val Gln Glu Ile Met Gln
 165 170 175
 Glu Lys Ala Phe Gly Ala Ala Gly Glu Thr Ile Val Ile Glu Glu Leu
 180 185 190
 Leu Asp Gly Glu Glu Val Ser Cys Leu Cys Phe Thr Asp Gly Lys Thr
 195 200 205
 Val Ala Pro Met Pro Pro Ala Gln Asp His Lys Arg Leu Leu Glu Gly

[0001]

Gly Gln Asp Leu Val Ala Met Cys Val Asn Asp Ile Leu Ala Gln Gly
 515 520 525

Ala Glu Pro Leu Phe Phe Leu Asp Tyr Phe Ser Cys Gly Lys Leu Asp
 530 535 540

Leu Ser Val Thr Glu Ala Val Val Ala Gly Ile Ala Lys Ala Cys Gly
 545 550 555 560

Lys Ala Gly Cys Ala Leu Leu Gly Gly Glu Thr Ala Glu Met Pro Asp
 565 570 575

Met Tyr Pro Pro Gly Glu Tyr Asp Leu Ala Gly Phe Ala Val Gly Ala
 580 585 590

Met Glu Arg Asp Gln Lys Leu Pro His Leu Glu Arg Ile Thr Glu Gly
 595 600 605

Asp Val Val Val Gly Ile Ala Ser Ser Gly Leu His Ser Asn Gly Phe
 610 615 620

Ser Leu Val Arg Lys Ile Val Ala Lys Ser Ser Leu Gln Tyr Ser Ser
 625 630 635 640

Pro Ala Pro Asp Gly Cys Gly Asp Gln Thr Leu Gly Asp Leu Leu Leu
 645 650 655

[0003] Thr Pro Thr Arg Ile Tyr Ser His Ser Leu Leu Pro Val Leu Arg Ser
 660 665 670

Gly His Val Lys Ala Phe Ala His Ile Thr Gly Gly Gly Leu Leu Glu
 675 680 685

Asn Ile Pro Arg Val Leu Pro Glu Lys Leu Gly Val Asp Leu Asp Ala
 690 695 700

Gln Thr Trp Arg Ile Pro Arg Val Phe Ser Trp Leu Gln Gln Glu Gly
 705 710 715 720

His Leu Ser Glu Glu Glu Met Ala Arg Thr Phe Asn Cys Gly Val Gly
 725 730 735

Ala Val Leu Val Val Ser Lys Glu Gln Thr Glu Gln Ile Leu Arg Asp
 740 745 750

Ile Gln Gln His Lys Glu Glu Ala Trp Val Ile Gly Ser Val Val Ala
 755 760 765

Arg Ala Glu Gly Ser Pro Arg Val Lys Val Lys Asn Leu Ile Glu Ser
 770 775 780

Met Gln Ile Asn Gly Ser Val Leu Lys Asn Gly Ser Leu Thr Asn His
 785 790 795 800

Phe Ser Phe Glu Lys Lys Lys Ala Arg Val Ala Val Leu Ile Ser Gly
 805 810 815

Thr Gly Ser Asn Leu Gln Ala Leu Ile Asp Ser Thr Arg Glu Pro Asn
820 825 830

Ser Ser Ala Gln Ile Asp Ile Val Ile Ser Asn Lys Ala Ala Val Ala
835 840 845

Gly Leu Asp Lys Ala Glu Arg Ala Gly Ile Pro Thr Arg Val Ile Asn
850 855 860

His Lys Leu Tyr Lys Asn Arg Val Glu Phe Asp Ser Ala Ile Asp Leu
865 870 875 880

Val Leu Glu Glu Phe Ser Ile Asp Ile Val Cys Leu Ala Gly Phe Met
885 890 895

Arg Ile Leu Ser Gly Pro Phe Val Gln Lys Trp Asn Gly Lys Met Leu
900 905 910

Asn Ile His Pro Ser Leu Leu Pro Ser Phe Lys Gly Ser Asn Ala His
915 920 925

Glu Gln Ala Leu Glu Thr Gly Val Thr Val Thr Gly Cys Thr Val His
930 935 940

Phe Val Ala Glu Asp Val Asp Ala Gly Gln Ile Ile Leu Gln Glu Ala
945 950 955 960

[0004] Val Pro Val Lys Arg Gly Asp Thr Val Ala Thr Leu Ser Glu Arg Val
965 970 975

Lys Leu Ala Glu His Lys Ile Phe Pro Ala Ala Leu Gln Leu Val Ala
980 985 990

Ser Gly Thr Val Gln Leu Gly Glu Asn Gly Lys Ile Cys Trp Val Lys
995 1000 1005

Glu Glu
1010

<210> 2
<211> 367
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Met Glu Ala Asn Gly Leu Gly Pro Gln Gly Phe Pro Glu Leu Lys Asn
1 5 10 15

Asp Thr Phe Leu Arg Ala Ala Trp Gly Glu Glu Thr Asp Tyr Thr Pro
20 25 30

Val Trp Cys Met Arg Gln Ala Gly Arg Tyr Leu Pro Glu Phe Arg Glu
35 40 45

Thr Arg Ala Ala Gln Asp Phe Phe Ser Thr Cys Arg Ser Pro Glu Ala
50 55 60

Cys Cys Glu Leu Thr Leu Gln Pro Leu Arg Arg Phe Pro Leu Asp Ala
 65 70 75 80
 Ala Ile Ile Phe Ser Asp Ile Leu Val Val Pro Gln Ala Leu Gly Met
 85 90 95
 Glu Val Thr Met Val Pro Gly Lys Gly Pro Ser Phe Pro Glu Pro Leu
 100 105 110
 Arg Glu Glu Gln Asp Leu Glu Arg Leu Arg Asp Pro Glu Val Val Ala
 115 120 125
 Ser Glu Leu Gly Tyr Val Phe Gln Ala Ile Thr Leu Thr Arg Gln Arg
 130 135 140
 Leu Ala Gly Arg Val Pro Leu Ile Gly Phe Ala Gly Ala Pro Trp Thr
 145 150 155 160
 Leu Met Thr Tyr Met Val Glu Gly Gly Gly Ser Ser Thr Met Ala Gln
 165 170 175
 Ala Lys Arg Trp Leu Tyr Gln Arg Pro Gln Ala Ser His Gln Leu Leu
 180 185 190
 Arg Ile Leu Thr Asp Ala Leu Val Pro Tyr Leu Val Gly Gln Val Val
 195 200 205
 [0005] Ala Gly Ala Gln Ala Leu Gln Leu Phe Glu Ser His Ala Gly His Leu
 210 215 220
 Gly Pro Gln Leu Phe Asn Lys Phe Ala Leu Pro Tyr Ile Arg Asp Val
 225 230 235 240
 Ala Lys Gln Val Lys Ala Arg Leu Arg Glu Ala Gly Leu Ala Pro Val
 245 250 255
 Pro Met Ile Ile Phe Ala Lys Asp Gly His Phe Ala Leu Glu Glu Leu
 260 265 270
 Ala Gln Ala Gly Tyr Glu Val Val Gly Leu Asp Trp Thr Val Ala Pro
 275 280 285
 Lys Lys Ala Arg Glu Cys Val Gly Lys Thr Val Thr Leu Gln Gly Asn
 290 295 300
 Leu Asp Pro Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Glu Glu Glu Ile Gly Gln Leu
 305 310 315 320
 Val Lys Gln Met Leu Asp Asp Phe Gly Pro His Arg Tyr Ile Ala Asn
 325 330 335
 Leu Gly His Gly Leu Tyr Pro Asp Met Asp Pro Glu His Val Gly Ala
 340 345 350
 Phe Val Asp Ala Val His Lys His Ser Arg Leu Leu Arg Gln Asn
 355 360 365

<210> 3
 <211> 662
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 3

Met Val Val Ser Glu Val Asp Ile Ala Lys Ala Asp Pro Ala Ala Ala
 1 5 10 15

Ser His Pro Leu Leu Leu Asn Gly Asp Ala Thr Val Ala Gln Lys Asn
 20 25 30

Pro Gly Ser Val Ala Glu Asn Asn Leu Cys Ser Gln Tyr Glu Glu Lys
 35 40 45

Val Arg Pro Cys Ile Asp Leu Ile Asp Ser Leu Arg Ala Leu Gly Val
 50 55 60

Glu Gln Asp Leu Ala Leu Pro Ala Ile Ala Val Ile Gly Asp Gln Ser
 65 70 75 80

Ser Gly Lys Ser Ser Val Leu Glu Ala Leu Ser Gly Val Ala Leu Pro
 85 90 95

Arg Gly Ser Gly Ile Val Thr Arg Cys Pro Leu Val Leu Lys Leu Lys
 100 105 110

[0006]

Lys Leu Val Asn Glu Asp Lys Trp Arg Gly Lys Val Ser Tyr Gln Asp
 115 120 125

Tyr Glu Ile Glu Ile Ser Asp Ala Ser Glu Val Glu Lys Glu Ile Asn
 130 135 140

Lys Ala Gln Asn Ala Ile Ala Gly Glu Gly Met Gly Ile Ser His Glu
 145 150 155 160

Leu Ile Thr Leu Glu Ile Ser Ser Arg Asp Val Pro Asp Leu Thr Leu
 165 170 175

Ile Asp Leu Pro Gly Ile Thr Arg Val Ala Val Gly Asn Gln Pro Ala
 180 185 190

Asp Ile Gly Tyr Lys Ile Lys Thr Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Gln Arg
 195 200 205

Gln Glu Thr Ile Ser Leu Val Val Val Pro Ser Asn Val Asp Ile Ala
 210 215 220

Thr Thr Glu Ala Leu Ser Met Ala Gln Glu Val Asp Pro Glu Gly Asp
 225 230 235 240

Arg Thr Ile Gly Ile Leu Thr Lys Pro Asp Leu Val Asp Lys Gly Thr
 245 250 255

Glu Asp Lys Val Val Asp Val Val Arg Asn Leu Val Phe His Leu Lys
 260 265 270

Lys Gly Tyr Met Ile Val Lys Cys Arg Gly Gln Gln Glu Ile Gln Asp
 275 280 285
 Gln Leu Ser Leu Ser Glu Ala Leu Gln Arg Glu Lys Ile Phe Phe Glu
 290 295 300
 Asn His Pro Tyr Phe Arg Asp Leu Leu Glu Glu Gly Lys Ala Thr Val
 305 310 315 320
 Pro Cys Leu Ala Glu Lys Leu Thr Ser Glu Leu Ile Thr His Ile Cys
 325 330 335
 Lys Ser Leu Pro Leu Leu Glu Asn Gln Ile Lys Glu Thr His Gln Arg
 340 345 350
 Ile Thr Glu Glu Leu Gln Lys Tyr Gly Val Asp Ile Pro Glu Asp Glu
 355 360 365
 Asn Glu Lys Met Phe Phe Leu Ile Asp Lys Val Asn Ala Phe Asn Gln
 370 375 380
 Asp Ile Thr Ala Leu Met Gln Gly Glu Glu Thr Val Gly Glu Glu Asp
 385 390 395 400
 Ile Arg Leu Phe Thr Arg Leu Arg His Glu Phe His Lys Trp Ser Thr
 405 410 415
 [0007] Ile Ile Glu Asn Asn Phe Gln Glu Gly His Lys Ile Leu Ser Arg Lys
 420 425 430
 Ile Gln Lys Phe Glu Asn Gln Tyr Arg Gly Arg Glu Leu Pro Gly Phe
 435 440 445
 Val Asn Tyr Arg Thr Phe Glu Thr Ile Val Lys Gln Gln Ile Lys Ala
 450 455 460
 Leu Glu Glu Pro Ala Val Asp Met Leu His Thr Val Thr Asp Met Val
 465 470 475 480
 Arg Leu Ala Phe Thr Asp Val Ser Ile Lys Asn Phe Glu Glu Phe Phe
 485 490 495
 Asn Leu His Arg Thr Ala Lys Ser Lys Ile Glu Asp Ile Arg Ala Glu
 500 505 510
 Gln Glu Arg Glu Gly Glu Lys Leu Ile Arg Leu His Phe Gln Met Glu
 515 520 525
 Gln Ile Val Tyr Cys Gln Asp Gln Val Tyr Arg Gly Ala Leu Gln Lys
 530 535 540
 Val Arg Glu Lys Glu Leu Glu Glu Glu Lys Lys Lys Ser Trp Asp
 545 550 555 560
 Phe Gly Ala Phe Gln Ser Ser Ser Ala Thr Asp Ser Ser Met Glu Glu

565 570 575
 Ile Phe Gln His Leu Met Ala Tyr His Gln Glu Ala Ser Lys Arg Ile
 580 585 590
 Ser Ser His Ile Pro Leu Ile Ile Gln Phe Phe Met Leu Gln Thr Tyr
 595 600 605
 Gly Gln Gln Leu Gln Lys Ala Met Leu Gln Leu Leu Gln Asp Lys Asp
 610 615 620
 Thr Tyr Ser Trp Leu Leu Lys Glu Arg Ser Asp Thr Ser Asp Lys Arg
 625 630 635 640
 Lys Phe Leu Lys Glu Arg Leu Ala Arg Leu Thr Gln Ala Arg Arg Arg
 645 650 655
 Leu Ala Gln Phe Pro Gly
 660
 <210> 4
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 4
 Met Ala Ala Gly Ala Ala Glu Ala Ala Val Ala Ala Val Glu Glu Val
 1 5 10 15
 Gly Ser Ala Gly Gln Phe Glu Glu Leu Leu Arg Leu Lys Ala Lys Ser
 20 25 30
 Leu Leu Val Val His Phe Trp Ala Pro Trp Ala Pro Gln Cys Ala Gln
 35 40 45
 Met Asn Glu Val Met Ala Glu Leu Ala Lys Glu Leu Pro Gln Val Ser
 50 55 60
 Phe Val Lys Leu Glu Ala Glu Gly Val Pro Glu Val Ser Glu Lys Tyr
 65 70 75 80
 Glu Ile Ser Ser Val Pro Thr Phe Leu Phe Phe Lys Asn Ser Gln Lys
 85 90 95
 Ile Asp Arg Leu Asp Gly Ala His Ala Pro Glu Leu Thr Lys Lys Val
 100 105 110
 Gln Arg His Ala Ser Ser Gly Ser Phe Leu Pro Ser Ala Asn Glu His
 115 120 125
 Leu Lys Glu Asp Leu Asn Leu Arg Leu Lys Lys Leu Thr His Ala Ala
 130 135 140
 Pro Cys Met Leu Phe Met Lys Gly Thr Pro Gln Glu Pro Arg Cys Gly
 145 150 155 160
 Phe Ser Lys Gln Met Val Glu Ile Leu His Lys His Asn Ile Gln Phe

[0008]

100 105 110
 Lys Phe Phe Asp Ala Asn Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Asn Pro Leu Leu
 115 120 125
 Ala Arg Gln Gly Gln Asp Val Ala Pro Pro Pro Asn Pro Gly Asp Gln
 130 135 140
 Ile Phe Asn Lys Ser Lys Lys Leu Ile Gly Thr Ala Val Pro Gln Arg
 145 150 155 160
 Thr Ser Pro Thr Gly Pro Lys Asn Met Gln Thr Ser Gly Arg Leu Ser
 165 170 175
 Asn Val Ala Pro Pro Cys Ile Leu Arg Lys Asn Pro Pro Ser Ala Arg
 180 185 190
 Asn Gly Gly His Glu Thr Asp Ala Gln Ile Leu Glu Leu Asn Gln Gln
 195 200 205
 Leu Val Asp Leu Lys Leu Thr Val Asp Gly Leu Glu Lys Glu Arg Asp
 210 215 220
 Phe Tyr Phe Ser Lys Leu Arg Asp Ile Glu Leu Ile Cys Gln Glu His
 225 230 235 240
 Glu Ser Glu Asn Ser Pro Val Ile Ser Gly Ile Ile Gly Ile Leu Tyr
 245 250 255
 Ala Thr Glu Glu Gly Phe Ala Pro Pro Glu Asp Asp Glu Ile Glu Glu
 260 265 270
 His Gln Gln Glu Asp Gln Asp Glu Tyr
 275 280
 <210> 6
 <211> 244
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 6
 Met Glu Val Thr Gly Val Ser Ala Pro Thr Val Thr Val Phe Ile Ser
 1 5 10 15
 Ser Ser Leu Asn Thr Phe Arg Ser Glu Lys Arg Tyr Ser Arg Ser Leu
 20 25 30
 Thr Ile Ala Glu Phe Lys Cys Lys Leu Glu Leu Leu Val Gly Ser Pro
 35 40 45
 Ala Ser Cys Met Glu Leu Glu Leu Tyr Gly Val Asp Asp Lys Phe Tyr
 50 55 60
 Ser Lys Leu Asp Gln Glu Asp Ala Leu Leu Gly Ser Tyr Pro Val Asp
 65 70 75 80
 Asp Gly Cys Arg Ile His Val Ile Asp His Ser Gly Ala Arg Leu Gly

[0010]

85 90 95
 Glu Tyr Glu Asp Val Ser Arg Val Glu Lys Tyr Thr Ile Ser Gln Glu
 100 105 110
 Ala Tyr Asp Gln Arg Gln Asp Thr Val Arg Ser Phe Leu Lys Arg Ser
 115 120 125
 Lys Leu Gly Arg Tyr Asn Glu Glu Glu Arg Ala Gln Gln Glu Ala Glu
 130 135 140
 Ala Ala Gln Arg Leu Ala Glu Glu Lys Ala Gln Ala Ser Ser Ile Pro
 145 150 155 160
 Val Gly Ser Arg Cys Glu Val Arg Ala Ala Gly Gln Ser Pro Arg Arg
 165 170 175
 Gly Thr Val Met Tyr Val Gly Leu Thr Asp Phe Lys Pro Gly Tyr Trp
 180 185 190
 Ile Gly Val Arg Tyr Asp Glu Pro Leu Gly Lys Asn Asp Gly Ser Val
 195 200 205
 Asn Gly Lys Arg Tyr Phe Glu Cys Gln Ala Lys Tyr Gly Ala Phe Val
 210 215 220
 Lys Pro Ala Val Val Thr Val Gly Asp Phe Pro Glu Glu Asp Tyr Gly
 225 230 235 240

[0011]

Leu Asp Glu Ile

<210> 7
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 7

Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn
 1 5 10 15
 Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp
 20 25 30
 Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser
 35 40 45
 Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys
 50 55 60
 Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln
 65 70 75 80
 Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn
 85 90 95
 Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys

	100	105	110
	Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg 115 120 125		
	Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile 130 135 140		
	Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr 145 150 155 160		
	Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr 165 170 175		
	Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln 180 185 190		
	Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln 195 200 205		
	Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val 210 215 220		
	Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr 225 230 235 240		
[0012]	Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr 245 250 255		
	Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn 260 265 270		
	Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala 275 280 285		
	Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr 290 295 300		
	Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg 305 310 315 320		
	Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro 325 330 335		
	Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu 340 345 350		
	Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg 355 360 365		
	Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro 370 375 380		
	Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val 385 390 395 400		

Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala
405 410 415

His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser
420 425 430

Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr
435 440 445

Ala Gly Thr Cys Tyr
450

<210> 8
<211> 839
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

Met Ser Val Val Gly Ile Asp Leu Gly Phe Leu Asn Cys Tyr Ile Ala
1 5 10 15

Val Ala Arg Ser Gly Gly Ile Glu Thr Ile Ala Asn Glu Tyr Ser Asp
20 25 30

Arg Cys Thr Pro Ala Cys Ile Ser Leu Gly Ser Arg Thr Arg Ala Ile
35 40 45

[0013]

Gly Asn Ala Ala Lys Ser Gln Ile Val Thr Asn Val Arg Asn Thr Ile
50 55 60

His Gly Phe Lys Lys Leu His Gly Arg Ser Phe Asp Asp Pro Ile Val
65 70 75 80

Gln Thr Glu Arg Ile Arg Leu Pro Tyr Glu Leu Gln Lys Met Pro Asn
85 90 95

Gly Ser Ala Gly Val Lys Val Arg Tyr Leu Glu Glu Glu Arg Pro Phe
100 105 110

Ala Ile Glu Gln Val Thr Gly Met Leu Leu Ala Lys Leu Lys Glu Thr
115 120 125

Ser Glu Asn Ala Leu Lys Lys Pro Val Ala Asp Cys Val Ile Ser Ile
130 135 140

Pro Ser Phe Phe Thr Asp Ala Glu Arg Arg Ser Val Met Ala Ala Ala
145 150 155 160

Gln Val Ala Gly Leu Asn Cys Leu Arg Leu Met Asn Glu Thr Thr Ala
165 170 175

Val Ala Leu Ala Tyr Gly Ile Tyr Lys Gln Asp Leu Pro Pro Leu Asp
180 185 190

Glu Lys Pro Arg Asn Val Val Phe Ile Asp Met Gly His Ser Ala Tyr
195 200 205

Gln Val Leu Val Cys Ala Phe Asn Lys Gly Lys Leu Lys Val Leu Ala
 210 215 220

Thr Thr Phe Asp Pro Tyr Leu Gly Gly Arg Asn Phe Asp Glu Ala Leu
 225 230 235 240

Val Asp Tyr Phe Cys Asp Glu Phe Lys Thr Lys Tyr Lys Ile Asn Val
 245 250 255

Lys Glu Asn Ser Arg Ala Leu Leu Arg Leu Tyr Gln Glu Cys Glu Lys
 260 265 270

Leu Lys Lys Leu Met Ser Ala Asn Ala Ser Asp Leu Pro Leu Asn Ile
 275 280 285

Glu Cys Phe Met Asn Asp Leu Asp Val Ser Ser Lys Met Asn Arg Ala
 290 295 300

Gln Phe Glu Gln Leu Cys Ala Ser Leu Leu Ala Arg Val Glu Pro Pro
 305 310 315 320

Leu Lys Ala Val Met Glu Gln Ala Asn Leu Gln Arg Glu Asp Ile Ser
 325 330 335

Ser Ile Glu Ile Val Gly Gly Ala Thr Arg Ile Pro Ala Val Lys Glu
 340 345 350

[0014] Gln Ile Thr Lys Phe Phe Leu Lys Asp Ile Ser Thr Thr Leu Asn Ala
 355 360 365

Asp Glu Ala Val Ala Arg Gly Cys Ala Leu Gln Cys Ala Ile Leu Ser
 370 375 380

Pro Ala Phe Lys Val Arg Glu Phe Ser Ile Thr Asp Leu Val Pro Tyr
 385 390 395 400

Ser Ile Thr Leu Arg Trp Lys Thr Ser Phe Glu Asp Gly Ser Gly Glu
 405 410 415

Cys Glu Val Phe Cys Lys Asn His Pro Ala Pro Phe Ser Lys Val Ile
 420 425 430

Thr Phe His Lys Lys Glu Pro Phe Glu Leu Glu Ala Phe Tyr Thr Asn
 435 440 445

Leu His Glu Val Pro Tyr Pro Asp Ala Arg Ile Gly Ser Phe Thr Ile
 450 455 460

Gln Asn Val Phe Pro Gln Ser Asp Gly Asp Ser Ser Lys Val Lys Val
 465 470 475 480

Lys Val Arg Val Asn Ile His Gly Ile Phe Ser Val Ala Ser Ala Ser
 485 490 495

Val Ile Glu Lys Gln Asn Leu Glu Gly Asp His Ser Asp Ala Pro Met
 500 505 510

Glu Thr Glu Thr Ser Phe Lys Asn Glu Asn Lys Asp Asn Met Asp Lys
 515 520 525

Met Gln Val Asp Gln Glu Glu Gly His Gln Lys Cys His Ala Glu His
 530 535 540

Thr Pro Glu Glu Glu Ile Asp His Thr Gly Ala Lys Thr Lys Ser Ala
 545 550 555 560

Val Ser Asp Lys Gln Asp Arg Leu Asn Gln Thr Leu Lys Lys Gly Lys
 565 570 575

Val Lys Ser Ile Asp Leu Pro Ile Gln Ser Ser Leu Cys Arg Gln Leu
 580 585 590

Gly Gln Asp Leu Leu Asn Ser Tyr Ile Glu Asn Glu Gly Lys Met Ile
 595 600 605

Met Gln Asp Lys Leu Glu Lys Glu Arg Asn Asp Ala Lys Asn Ala Val
 610 615 620

Glu Glu Tyr Val Tyr Asp Phe Arg Asp Arg Leu Gly Thr Val Tyr Glu
 625 630 635 640

Lys Phe Ile Thr Pro Glu Asp Leu Ser Lys Leu Ser Ala Val Leu Glu
 645 650 655

[0015] Asp Thr Glu Asn Trp Leu Tyr Glu Asp Gly Glu Asp Gln Pro Lys Gln
 660 665 670

Val Tyr Val Asp Lys Leu Gln Glu Leu Lys Lys Tyr Gly Gln Pro Ile
 675 680 685

Gln Met Lys Tyr Met Glu His Glu Glu Arg Pro Lys Ala Leu Asn Asp
 690 695 700

Leu Gly Lys Lys Ile Gln Leu Val Met Lys Val Ile Glu Ala Tyr Arg
 705 710 715 720

Asn Lys Asp Glu Arg Tyr Asp His Leu Asp Pro Thr Glu Met Glu Lys
 725 730 735

Val Glu Lys Cys Ile Ser Asp Ala Met Ser Trp Leu Asn Ser Lys Met
 740 745 750

Asn Ala Gln Asn Lys Leu Ser Leu Thr Gln Asp Pro Val Val Lys Val
 755 760 765

Ser Glu Ile Val Ala Lys Ser Lys Glu Leu Asp Asn Phe Cys Asn Pro
 770 775 780

Ile Ile Tyr Lys Pro Lys Pro Lys Ala Glu Val Pro Glu Asp Lys Pro
 785 790 795 800

Lys Ala Asn Ser Glu His Asn Gly Pro Met Asp Gly Gln Ser Gly Thr
 805 810 815

Glu Thr Lys Ser Asp Ser Thr Lys Asp Ser Ser Gln His Thr Lys Ser
820 825 830

[0016]

Ser Gly Glu Met Glu Val Asp
835

SSP No.	基因符号	蛋白质	免疫印迹		2D-BIICE		确认解析
			S.C	P值	S.C	P值	
SSP 3602	MX1	干鼠类病毒GTP结合蛋白Mx1	1.22	0.01	1.14	0.01	**
SSP 6017	EGHM	兔类病毒的核衣壳	1.03	0.04	1.43	0.03	*
SSP 0110	MAFBE1	微管相关蛋白B75B家族成员1	0.76	0.01	0.87	0.00	**
SSP 5306	GAAT	三官能团嘌呤生物合成蛋白蔗糖苷-3	0.75	0.02	0.93	0.04	*
SSP 3226	TBCB3	微管蛋白折叠辅助因子B	0.68	0.02	0.87	0.00	*
SSP 1208	UPRO1	紫外敏感肌球蛋白	0.77	0.01	0.84	0.06	**
SSP 1208	CEPAX3	谷氨酰胺蛋白-3	0.74	0.00	0.82	0.04	**
SSP 3714	HSP90L	70kDa热休克蛋白90L	0.82	0.02	0.78	0.04	*
SSP 2409	HAER5	5L氨酰基tRNA合成酶, 加胞质	1.09	0.59	0.94	0.08	NS
SSP 3822	EFM22	EP-hand结构域蛋白D2	0.89	0.91	0.87	0.00	NS
SSP 6370	KIF11	驱动蛋白样蛋白KIF11	1.31	0.28	1.2	0.00	NS
SSP 6370	EEF1G	延伸因子1γ	1.16	0.19	1.18	0.06	NS
SSP 2901	UCHL1	泛素羧基末端水解酶同功酶11	0.97	0.92	0.93	0.01	NS
SSP 0108	ANXA5	膜联蛋白A5	0.86	0.11	0.91	0.02	NS
SSP 2002	APRT	腺嘌呤磷酸核糖转移酶	0.88	0.24	0.92	0.02	NS
SSP 1108	PPA1	无机焦磷酸酶	0.98	0.86	0.83	0.03	NS
SSP 6826	VP335	膜泡蛋白分泌关联蛋白35	0.88	0.30	1.73	0.00	NS
SSP 1718	HSP90AB1	热休克蛋白HSP 90-β	1.12	0.39	0.91	0.04	NS
SSP 1519	LCP1	Plastin-2	1.04	0.79	0.88	0.05	NS
SSP 6131	LACTB2	含吡哆胺依赖的脱氢酶结构域的蛋白1	1.10	0.80	0.91	0.04	NS
SSP 6131	LACTB2	β内酰胺酶样蛋白7	1.10	0.36	0.88	0.04	NS
SSP 6131	TATDN1	Pyruvate dehydrogenase TATDN1	1.14	0.19	0.88	0.04	NS

图1

蛋白质个数	修正型AIC	预测误差	模型中包含的蛋白质							
4(候选模型1)	0.877	0.184	GART	UROD	MX1	GLRX3	MAPRE1	TBCB		
7	0.872	0.181	GART	UROD	MX1	GLRX3	MAPRE1	TBCB	IGHM	
7	0.871	0.171	GART	UROD	MX1	GLRX3	MAPRE1	TBCB		HSPPLA
5	0.871	0.189	GART	UROD		GLRX3	MAPRE1	TBCB		
8	0.870	0.182	GART	UROD	MX1	GLRX3	MAPRE1	TBCB	IGHM	HSPPLA
9	0.868	0.167	GART	UROD	MX1		MAPRE1	TBCB		
6	0.868	0.178	GART	UROD	MX1	GLRX3		TBCB	IGHM	
8	0.865	0.174	GART	UROD	MX1	GLRX3	MAPRE1			HSPPLA
8	0.863	0.174	GART	UROD	MX1		MAPRE1	TBCB		HSPPLA
6	0.863	0.173	GART	UROD		GLRX3	MAPRE1	TBCB		HSPPLA
7	0.863	0.180	GART	UROD	MX1	GLRX3	MAPRE1		IGHM	HSPPLA
8	0.862	0.178	GART		MX1	GLRX3	MAPRE1	TBCB	IGHM	HSPPLA
5	0.862	0.172	GART	UROD	MX1	GLRX3		TBCB		HSPPLA
6	0.861	0.177	GART	UROD		GLRX3	MAPRE1	TBCB		
4(候选模型2)	0.860	0.178	GART	UROD	MX1	GLRX3				
7	0.859	0.168	GART	UROD	MX1	GLRX3		TBCB	IGHM	HSPPLA
6	0.857	0.177	GART	UROD	MX1		MAPRE1		IGHM	
7	0.856	0.185	GART	UROD	MX1		MAPRE1	TBCB	IGHM	
5	0.856	0.186	GART	UROD	MX1	GLRX3	MAPRE1		IGHM	
7	0.855	0.189	GART	UROD		GLRX3	MAPRE1	TBCB	IGHM	HSPPLA
6	0.855	0.183	GART	UROD	MX1	GLRX3		TBCB		HSPPLA
6	0.854	0.176	GART	UROD	MX1		MAPRE1	TBCB	IGHM	
5	0.853	0.179	GART	UROD	MX1	GLRX3				HSPPLA
6	0.853	0.184	GART		MX1	GLRX3	MAPRE1		IGHM	HSPPLA
6	0.853	0.182	GART	UROD	MX1	GLRX3			IGHM	HSPPLA
5	0.852	0.189	GART	UROD	MX1	GLRX3			IGHM	
7	0.850	0.189	GART		MX1	GLRX3	MAPRE1	TBCB	IGHM	HSPPLA
6	0.848	0.190	GART	UROD	MX1	GLRX3	MAPRE1		IGHM	
5	0.826	0.188	GART	UROD	MX1			TBCB	IGHM	
6	0.824	0.200	GART	UROD	MX1			TBCB	IGHM	HSPPLA

图2

蛋白质	比值比	95%可信区间		p值
GART	0.01	<0.01	0.34	0.011
UROD	0.07	0.01	0.56	0.012
MX1	7.68	0.79	74.81	0.079
GLRX3	0.04	<0.01	0.74	0.030
MAPRE1	0.19	0.03	1.34	0.095
TBCB	0.13	0.02	1.00	0.050

图3

蛋白质	比值比	95%可信区间		p值
GART	0.02	<0.01	0.34	0.006
UROD	0.11	0.02	0.60	0.011
MX1	11.91	1.56	90.91	0.017
GLRX3	0.06	<0.01	0.84	0.036

图4

SSP No	鉴别符号	蛋白质	SS-ORGE		筛选数据		验证数据		综合	
			OR	p值	OR	p值	OR	p值	OR	p值
SSP 3802	MX1	干扰素诱导GTP结合蛋白MX1	1.14	0.096 **	1.89	0.096 **	1.82	0.096 **	1.29	0.091 **
SSP 3893	GART	三官能烟酰胺生物合成蛋白类糖苷-3	0.84	0.042 *	0.79	0.024 *	0.73	0.002 **	0.74	0.001 **
SSP 3225	UROD	尿卟啉原脱羧酶	0.84	0.048 *	0.77	0.01 *	1.03	0.031 *	0.67	0.118
SSP 1295	GLRX3	谷氨酰胺蛋白-3	0.82	0.049 *	0.74	0.002 **	1.12	0.102	0.68	0.079
SSP 0119	MAP3K1	微管相关蛋白3P/ER家族成员1	0.67	0.003 **	0.76	0.008 **	1.15	0.016 *	0.89	0.182
SSP 0119	TSCD	微管蛋白新度辅助因子B	0.67	0.003 **	0.65	0.023 *	0.85	0.028 *	0.62	0.035 *
SSP 8617	MDM1	无核糖蛋白mdm1C区	1.48	0.001 *	1.8	0.008 *	0.76	0.338	0.8	0.488
SSP 3714	HSP44L	70kDa热休克蛋白4L	0.78	0.058 *	0.82	0.018 *	0.75	0.014 *	0.65	0.017 *

	对照			精神分裂症		
	N	年龄 ± SD	SD	N	年龄 ± SD	SD
筛选数据						
男性	15	44.4 ± 12.5	15	42.7 ± 12.8		
女性	15	43.2 ± 9.8	15	43.1 ± 8.9		
合计	30	43.8 ± 11.2	30	43.4 ± 10.8		
验证数据						
男性	15	34.0 ± 8.5	15	37.0 ± 11.2		
女性	15	41.3 ± 12.8	15	45.1 ± 10.0		
合计	30	38.1 ± 11.0	30	41.1 ± 11.1		

图5

基因符号	高通量筛选的结果		验证的结果		蛋白质的功能	
	克隆印迹	2D-DIGE	(SCZ)	克隆印迹 重现性		
MX1	↑	↑	增加	↑	+	调节细胞活性
GART	↓	↓	减少	↓	+	控制嘌呤的从头生物合成中所需的酶活性 [脊椎动物中高度保守, 参与甲腺苷酰胺核苷酸的产生]
UROD	↓	↓	减少			催化脱羧反应(参与维生素D的产生) PDR结合钙离子依赖性磷酸酯酶(PP2C)等
GLRX3	↓	↓	减少			催化谷胱甘肽二硫化物氧化还原酶反应 (还原低分子量二硫化物和蛋白质)
MAPRE1	↓	↓	减少	↑		细胞骨架, 细胞增殖和分裂 (通过稳定化的微管体固定)
TBCB	↓	↓	减少			轴突伸长的负调控因子 (微管蛋白异源二聚体解离反应的辅因子)
IGHM	↑	↑	增加			在B细胞和浆细胞中重要, 诱导小淋巴细胞凋亡的细胞因子
HSPA4L	↓	↓	减少	↓	+	阻碍柠檬酸盐合成酶的组装, 具有分子伴侣活性(高热)

↑:增加 ↓:减少 +:有重现性

图6

变量	筛选数据				验证数据			
	OR	95% CI		P值	OR	95% CI		P值
MX1	11.91	1.56	90.91	0.017	28.57	1.84	383.55	0.016
GART	0.02	<0.01	0.34	0.006	0.01	<0.001	0.24	0.006
UROD	0.11	0.02	0.6	0.011	0.55	0.05	5.54	0.609
GLRX3	0.06	<0.01	0.84	0.036	4.99	0.04	570.62	0.507

图7

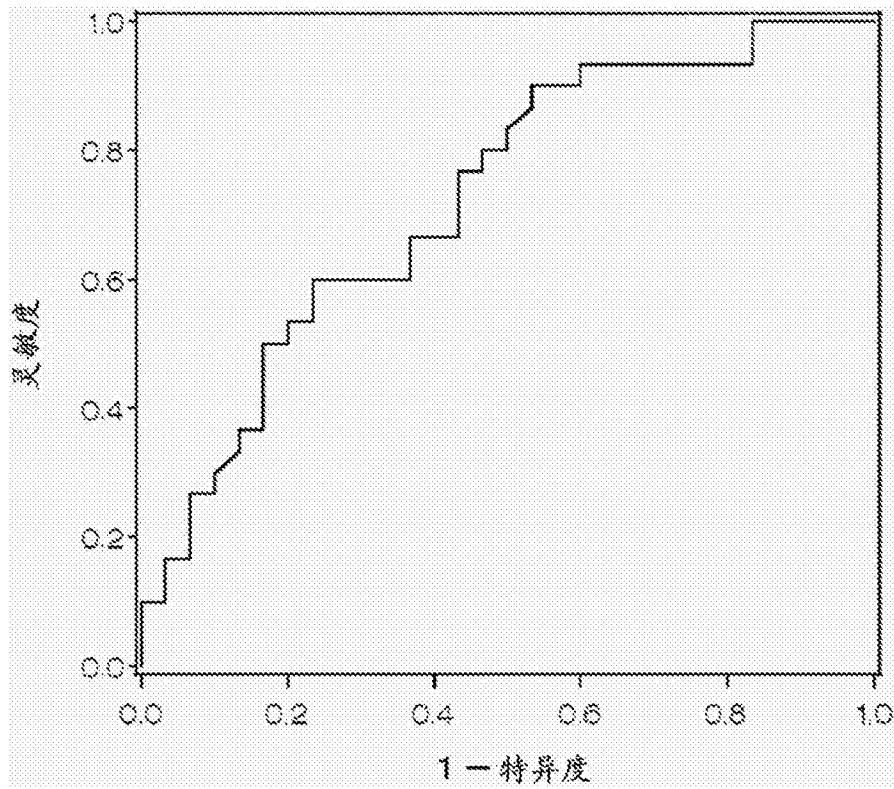


图8

变量	筛选数据			验证数据		
	OR	95% CI	P值	OR	95% CI	P值
MX1	7.68	0.79 - 74.81	0.079	15.72	1.02 - 279.53	0.049
GART	0.01	<0.01 - 0.34	0.011	0.003	<0.001 - 0.22	0.008
UROD	0.07	0.01 - 0.56	0.012	0.79	0.04 - 14.57	0.875
GLRX3	0.04	<0.01 - 0.74	0.03	2.37	0.01 - 391.90	0.741
MAPRE1	0.19	0.03 - 1.34	0.095	103.76	0.97 - >999.99	0.052
TBCB	0.13	0.02 - 1	0.05	1.93	0.15 - 24.91	0.616

图9

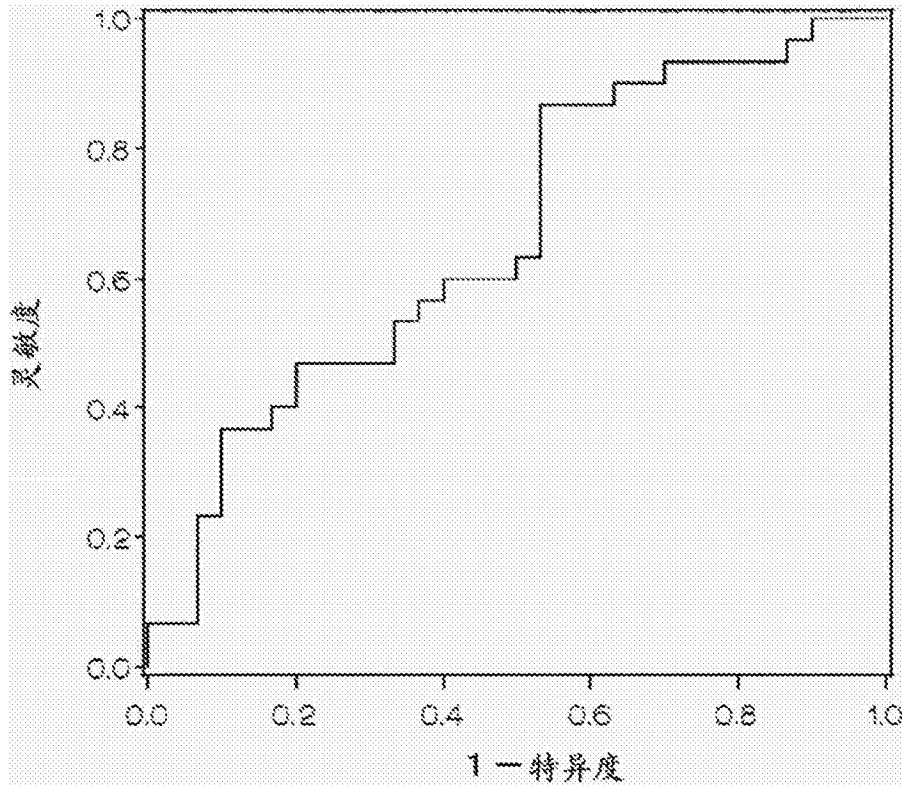


图10

	MX1	GART	HSPA4L
MX1	(1, 1, 1)	(0.14, 0.02, 0.10)	(-0.17, 0.03, -0.15)
GART		(1, 1, 1)	(-0.10, 0.13, -0.13)
HSPA4L			(1, 1, 1)

图11

建模	验证 (Validation)	截距 (B0)	MX1 (B1)	GART (B2)	LRDD (B3)	GLRX3 (B4)	MLPRE1 (B5)	TRC8 (B6)	HSPA4L (B7)	IGYH1 (B8)	AUC	修正型 AUC	验证的 AUC
s	v	6.234	3.013	-3.851	0.000	0.300	0.300	0.000	0.000	0.000	0.80	0.78	0.82
		6.480	2.477	-3.823	2.130	-2.881	0.000	0.100	0.000	0.000	0.89	0.86	0.72
		11.287	2.038	-4.641	-2.678	-3.139	-1.681	-2.312	0.000	0.000	0.00	0.88	0.66
		11.378	2.177	-4.264	-2.910	-3.333	-1.884	-1.888	-0.833	2.221	0.93	0.87	0.83
v	s	1.368	3.495	-4.995	0.000	0.000	0.000	0.100	0.000	0.000	0.83	0.81	0.76
		0.730	3.380	-4.909	0.000	1.607	0.000	0.000	0.000	0.000	0.84	0.80	0.75
		1.667	2.817	-5.741	0.234	0.882	-4.642	0.895	0.000	0.000	0.68	0.66	0.49
		-2.841	3.997	-0.190	0.552	-4.384	-4.095	1.337	-6.967	0.000	0.00	0.84	0.61
		0.337	3.360	-3.529	0.100	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.81	0.80	0.80
		2.883	1.988	-4.434	0.621	0.769	0.000	0.000	0.000	0.000	0.64	0.64	0.62
3.175	3.019	-4.387	0.883	-0.236	-0.222	-0.863	0.000	0.000	0.85	0.84	0.84		
4.130	3.113	-4.478	0.917	-0.758	-0.333	-0.743	-0.465	0.078	0.86	0.81	0.81		

图12

专利名称(译)	精神分裂症标记物组及其利用		
公开(公告)号	CN104704365B	公开(公告)日	2016-07-27
申请号	CN201380053407.4	申请日	2013-10-03
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人名古屋大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人名古屋大学		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人名古屋大学		
[标]发明人	尾崎纪夫 永井拓 吉见阳 山田真之亮 平川晃弘 国本正子 松本友里惠		
发明人	尾崎纪夫 永井拓 吉见阳 山田真之亮 平川晃弘 国本正子 松本友里惠		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/6896 G01N2800/302 G01N2800/50 G01N2800/60		
代理人(译)	苗堃		
优先权	2012228417 2012-10-15 JP		
其他公开文献	CN104704365A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的课题在于提供能够高精度地辨别精神分裂症的生物标记物的组合及其用途。本发明提供一种精神分裂症标记物组，其由选自三官能团嘌呤生物合成蛋白质腺苷-3、尿嘧啶原脱羧酶、干扰素诱导GTP结合蛋白质Mx1、谷氧还蛋白-3、微管相关蛋白RP/EB家族成员1、微管蛋白折叠辅助因子B、免疫球蛋白mu链C区以及70kDa热休克蛋白4L中的2个以上的蛋白质分子的组合构成。另外，本发明提供以该标记物组在检体中的水平值为指标的精神分裂症检查法。

SSP No.	基因符号	蛋白质	免疫印迹		2D-DIGE		确认解析
			S/C	p值	S/C	p值	
SSP 3002	Mx1	干扰素诱导GTP结合蛋白Mx1	1.20	0.01	1.14	0.01	sp
SSP 0817	ICP4	免疫球蛋白链C区	1.00	0.04	1.46	0.03	sp
SSP 0110	MAP6B1	微管相关蛋白1/EB家族成员1	0.78	0.01	0.65	0.05	sp
SSP 3006	GMPT	三官能团嘌呤生物合成蛋白质腺苷-3	0.75	0.02	0.83	0.04	sp
SSP 3228	URD3	尿嘧啶原脱羧酶	0.68	0.02	0.87	0.05	sp
SSP 1268	OLP43	谷胱甘肽转氨酶-3	0.77	0.01	0.84	0.05	sp
SSP 3714	HSP90L	70kDa热休克蛋白4L	0.82	0.02	0.78	0.04	sp
SSP 2409	HARS	组氨酸腺苷(THA)合成酶, 细胞质	1.09	0.59	0.94	0.05	NS
	EFHD2	EF-hand结构域蛋白2	0.96	0.91	0.87	0.05	NS
SSP 3022	KIF11	驱动蛋白样蛋白1(F1)	1.31	0.29	1.2	0.05	NS
SSP 0320	EEF1G	延伸因子1γ	1.16	0.15	1.18	0.05	NS
SSP 2001	UCHL1	泛素羧基末端水解酶同源物1	0.97	0.82	0.93	0.01	NS
SSP 0106	ANKA5	膜联蛋白A5	0.88	0.11	0.91	0.02	NS
SSP 2002	APRT	腺嘌呤核苷酸转氨酶	0.99	0.24	0.92	0.02	NS
SSP 1108	PPA1	无机磷酸酶	0.99	0.95	0.93	0.01	NS
SSP 1656	VP35	膜蛋白分泌蛋白35	0.86	0.30	1.79	0.05	NS
SSP 1718	HSP90AB1	热休克蛋白HSP 90-β	1.12	0.29	0.91	0.04	NS
SSP 1519	LOP1	Plastin-2	1.04	0.79	0.98	0.05	NS
	POXDC1	含吡咯酮基的脱羧酶结构的蛋白1	1.10	0.80	0.91	0.04	NS
SSP 6151	LACTB2	β内酰胺酶样蛋白2	1.10	0.26	0.88	0.04	NS
	TATDN1	Putative decarboxylase TATDN1	1.14	0.19	0.89	0.04	NS