



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109983343 A

(43)申请公布日 2019.07.05

(21)申请号 201780070241.5

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

(22)申请日 2017.11.10

利商标事务所 11038

代理人 郑天松

(30)优先权数据

2016-222657 2016.11.15 JP

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.05.14

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2017/040538 2017.11.10

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2018/092684 JA 2018.05.24

(71)申请人 藤仓化成株式会社

地址 日本东京

申请人 国立大学法人千叶大学

(72)发明人 黑田英行 中村利华 富吉乡

权利要求书1页 说明书17页

日和佐隆树

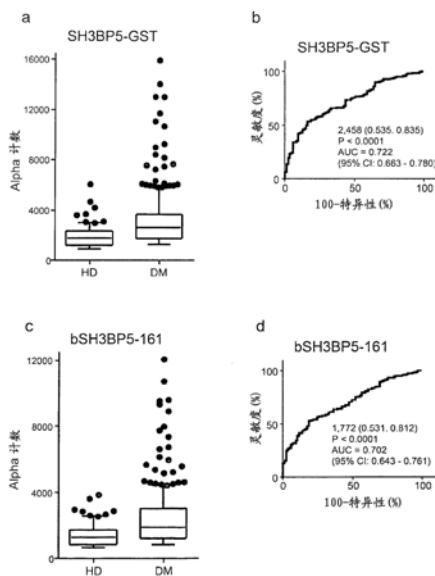
序列表5页 附图7页

(54)发明名称

动脉硬化的检测方法

(57)摘要

本发明发现能直接掌握动脉硬化的进程的标志物而旨在提供动脉硬化本身的预防或治疗动机,还提供进行确切的含动脉硬化症的动脉硬化关联疾病的病状掌握的手段,提供关于动脉硬化的进程的数据取得方法,其特征在于,对从生物体分离的体液样品中的针对SH3BP5蛋白质或其一部分的抗体水平进行测定,及,用于进行所述取得方法的,数据取得用试剂盒。



1. 关于动脉硬化的进程的数据取得方法,其特征在于,对从生物体分离的体液样品中的针对SH3BP5蛋白质或其一部分的抗体水平进行测定。

2. 权利要求1所述的数据取得方法,其特征在于,抗体水平是与SEQ ID NO:2的氨基酸序列的蛋白质或其一部分结合的抗体的水平。

3. 权利要求2所述的数据取得方法,其特征在于,SEQ ID NO:2的氨基酸序列的一部分的氨基酸残基的个数是7~455个。

4. 权利要求3所述的数据取得方法,其特征在于,SEQ ID NO:2的氨基酸序列的一部分是SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。

5. 权利要求2~4之任一项所述的数据取得方法,其特征在于,SEQ ID NO:2的全部或一部分的氨基酸序列的10%以下的个数(小数以下舍入)的氨基酸残基缺失、取代、或者追加。

6. 权利要求1~5之任一项所述的数据取得方法,其特征在于,从生物体分离的体液样品是血液样品。

7. 权利要求6所述的数据取得方法,其特征在于,血液样品是血清或血浆。

8. 权利要求1~7之任一项所述的数据取得方法,其特征在于,关于动脉硬化的进程的数据是动脉硬化关联疾病的检测数据。

9. 权利要求8所述的数据取得方法,其特征在于,动脉硬化关联疾病的检测数据是动脉硬化症的检测数据。

10. 权利要求1~9之任一项所述的数据取得方法,其特征在于,抗体水平测定法是ELISA法、AlphaLISA法、间接荧光抗体法、蛋白印迹法(免疫印迹法)、比浊法、散射比浊法、乳胶凝集比浊法、或者CLEIA法。

11. 数据取得用试剂盒,其用于进行权利要求1~10之任一项所述的数据取得方法。

动脉硬化的检测方法

【技术领域】

[0001] 本发明是涉及疾病的检测手段的发明,更具体而言,是涉及通过检测针对SH3BP5蛋白质的血液等的体液中的抗体的对于动脉硬化的进程的掌握手段的发明。也能由本发明进行与动脉硬化关联的疾病的检测。

【背景技术】

[0002] 动脉硬化是“动脉的壁变厚,或变硬而原本的结构被破坏,活动变差的病变”的病理学的总称,无症状而发展。动脉硬化之中最典型的粥样动脉硬化(粥样硬化性动脉硬化)容易发生在滋养心脏的冠状动脉、大动脉、还发生在脑、颈部、肾脏、内脏、手足的动脉,在动脉壁的内膜之中蓄积胆固醇,依次脂肪沉积而血管变狭,变得容易形成血栓或溃疡。这些成为原因,引起心绞痛、心肌梗塞、脑梗塞、脑出血、大动脉瘤、肾硬化症、闭塞性动脉硬化症、手足的坏死等的动脉硬化症。

[0003] 脑梗塞或心肌梗塞等的动脉硬化症直接致死的情况也多,即使不至死,也不得不进行其后的长期康复训练。对于患者本人或其家族是重的负担,社会上与国民医疗费的增长关联,其发病的预防是重要的课题。如果可掌握动脉硬化的进程状况,变得预测其后的脑梗塞或心肌梗塞的发病,可由发病前的治疗或生活习惯的改善预防动脉硬化症整体的可能性极高。

[0004] 从而,为了动脉硬化症的病状掌握,一般使用高-密度脂蛋白(LDL)-胆固醇、低-密度脂蛋白(HDL)-胆固醇、总胆固醇(TC),糖化血红蛋白(HbA1c)(非专利文献1)、尿酸(非专利文献2)等的血液检查。

[0005] 再者,作为血液抗体标志物,关于心血管障碍,已知磷脂(非专利文献3)、载脂蛋白A-1(非专利文献4)、氧化的低-密度脂蛋白(非专利文献5)、热休克蛋白(Hsps)(非专利文献6)、脑卒中的Hsp60(非专利文献7)、糖尿病的胰岛素(非专利文献8)、谷氨酸脱羧酶(GAD)(非专利文献9)、蛋白酪氨酸磷酸酶IA-2(非专利文献10、11)等。

[0006] 【现有技术文献】

[0007] 【非专利文献】

[0008] 非专利文献1:Rollins KE,Varadhan KK,Dhatariya K,Lobo DN(2015) Systematic review of the impact of HbA1c on outcomes following surgery in patients with diabetes mellitus.Clin NutrS0261-5614:00082-5。

[0009] 非专利文献2:Nakanishi N,Okamoto M,Yoshida H,Matsuo Y,Suzuki K,et al.(2003) Serum uric acid and risk for development of hypertension and impaired fasting glucose or type II diabetes in Japanese male office workers.Eur J Epidemiol 18:523-530。

[0010] 非专利文献3:Liang,K.P.,Kremers,H.M.,Crowson,C.S.,Snyder,M.R.,Therneau,T.M.,Roger,V.L.and Gabriel,S.E.Autoantibodies and the risk of cardiovascular events.J.Rheumatol.,2009,36,2462-2469。

- [0011] 非专利文献4:Montecucco,F.,Vuilleumier,N.,Pagano,S.,Lenglet,S., Bertolotto,M.,Braunersreuther,V.,Pelli,G.,Kovari,E.,Pane,B.,Spinella,G., Pende,A.,Palombo,D.,Dallegri,F.,Mach,F.and Roux-Lombard,P.Anti-apolipoprotein A-1auto-antibodies are active mediators of atherosclerotic plaque vulnerability.Eur.Heart J.,2011,32,412-421。
- [0012] 非专利文献5:Fesmire,J.,Wolfson-Reichlin,M.and Reichlin,M.Effects of autoimmune antibodies anti-lipoprotein lipase,anti-low density lipoprotein, and anti-oxidized low density lipoprotein on lipid metabolism and atherosclerosis in systemic lupus erythematosus.Rev.Bras.Reumatol.,2010,50, 539-551。
- [0013] 非专利文献6:Carbone,F.,Nencioni,A.,Mach,F.,Vuilleumier,N.and Montecucco,F.Evidence on the pathogenic role of auto-antibodies in acute cardiovascular diseases.Thromb.Haemost.,2013,109,854-868。
- [0014] 非专利文献7:Kramer,J.,Harcos,P.,Prohaszka,Z.,Horvath,L.,Karadi,I., Singh,M.,Csaszar,A.,Romics,L.and Fust,G.Frequencies of certain complement protein alleles and serum levels of anti-heat-shock protein antibodies in cerebrovascular diseases.Stroke,2000,31,2648-2652。
- [0015] 非专利文献8:Palmer,J.P.,Asplin,C.M.,Clemons,P.,Lyen,K.,Tatpati,O., Raghu,P.K.and Paquette,T.L.Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment.Science,1983,222,1337-1339。
- [0016] 非专利文献9:Baekkeskov,S.,Aanstoot,H.,Christgau,S.,Reetz,A.,Solimena, M.S.,Cascalho,M.,Folli,F.,Richter-Olsen,H.and DeCamilli,P.Identification of the 64K autoantigen in insulin dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase.Nature,1990,347,151-156。
- [0017] 非专利文献10:Payton,M.A.,Hawkes,C.J.and Christie,M.R.Relationship of the 37,000-and 40,000-M(r) tryptic fragments of islet antigens in insulin-dependent diabetes to the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 (ICA512).J.Clin.Invest.,1995,96,1506-1511。
- [0018] 非专利文献11:Taplin,C.E.and Barker,J.M.Autoantibodies in type 1 diabetes.Autoimmunity,2008,41,11-18。
- [0019] 非专利文献12:Matsushita,M.,Yamadori,T.,Kato,S.,Takemoto,Y.,Inazawa, J.,Baba,Y.,Hashimoto,S.,Sekine,S.,Arai,S.,Kunikata,T.,Kurimoto,M.,Kishimoto, T.,Tsukada,S.Identification and characterization of a novel SH3-domain binding protein,Sab,which preferentially associates with Bruton's tyrosine kinase (Btk).Biochem.Biophys.Res.Commun.,1998,245,337-343。
- [0020] 非专利文献13:Yamadori,T.,Baba,Y.,Matsushita,M.,Hashimoto,S.,Kurosaki, M.,Kurosaki,T.,Kishimoto,T.and Tsukada,S.Bruton's tyrosine kinase activity is negatively regulated by Sab,the Btk-SH3 domain-binding protein.Proc.Nat.Acad.Sci.USA,1999,96,6341-6346。

[0021] 非专利文献14:Win,S.,Than,T.A.,Le,B.H.,Garcia-Ruiz,C.,Fernandez-Checa,J.C.and Kaplowitz,N.Sab(Sh3bp5) dependence of JNK mediated inhibition of mitochondrial respiration in palmitic acid induced hepatocyte lipotoxicity.J.Hepatol.,2015,62(6),1367-1374。

[0022] 【发明概述】

[0023] 【发明要解决的课题】

[0024] 如上所述,进行动脉硬化症的病状掌握的尝试由各种标志物进行,但由这些标志物的病状掌握的尝试是从动脉硬化症的风险因素侧的尝试,说起来是间接的病状掌握方式。在这样的病状掌握方式中,能基于特定的风险因素的动脉硬化症的病状掌握,但另一方面,由于未对应于全部动脉硬化症的风险因素,确认到忽略了动脉硬化症本身的进程的可能性。

[0025] 本发明发现能直接掌握动脉硬化的进程的标志物,旨在提供动脉硬化本身的预防或治疗动机,还提供进行确切的含动脉硬化症的动脉硬化关联疾病的病状掌握的手段。

[0026] 【用于解决课题的手段】

[0027] 本发明人发现,通过对体液中的针对SH3BP5蛋白质的抗体水平进行测定,可确切掌握动脉硬化的进程,从而完成本发明。

[0028] 在本发明中,“动脉硬化”是指“动脉的壁变厚,或变硬而原本的结构被破坏,活动变差的病变”,“动脉硬化关联疾病”是指“与动脉硬化相关的疾病”,含“动脉硬化成为原因而患的疾病”和“成为动脉硬化的原因的疾病”的双方。“动脉硬化症”是指上述的“动脉硬化成为原因而患的疾病”,是动脉硬化关联疾病的下位概念。

[0029] 本发明首先提供关于动脉硬化的进程的数据取得方法(本发明的数据取得方法),其特征在于,对从生物体分离的体液样品中的针对SH3BP5蛋白质或其一部分的抗体水平进行测定。

[0030] 作为在本发明的数据取得方法中的捕获作为测定对象的体液抗体的基础的作为抗原的SH3BP5蛋白质的别名是SH3结构域-结合蛋白5、或者称为Sab,作为登录号“NM_004844”注册在NCBI中。SH3BP5蛋白质与Bruton酪氨酸激酶(BTK)结合,作为抑制其活性的蛋白质被发现(非专利文献12、13)。另外,已知与c-Jun N末端激酶(JNK)一同诱导脂质毒性或非醇性脂肪肝(NASH)(非专利文献14)。

[0031] 编码SH3BP5蛋白质的基因(SH3BP5基因)的碱基序列和所述蛋白质的氨基酸序列各自如SEQ ID NO:1(碱基序列)、SEQ ID NO:2(氨基酸序列)所示。

[0032] 作为本发明的数据取得方法的别的表现,可举出例如,“动脉硬化的进程的掌握方法,其特征在于,对从生物体分离的体液样品中的针对SH3BP5蛋白质或其一部分的抗体水平进行测定”。

[0033] 再者,本发明其次提供用于进行本发明的数据取得方法的数据取得用试剂盒(以下,也称为本发明的试剂盒)。

[0034] 作为本发明的数据取得用试剂盒的别的表现,可举出例如,“用于进行动脉硬化的进程的掌握方法的试剂盒,其特征在于,对从生物体分离的体液样品中的针对SH3BP5蛋白质或其一部分的抗体水平进行测定”。

[0035] 【发明的效果】

[0036] 根据本发明,提供由体液抗体标志物直接掌握动脉硬化的进程的手段。由此,提供动脉硬化本身的预防或治疗动机、及提供进行含确切的动脉硬化症的动脉硬化关联疾病的病状掌握的手段。另外,通过使用本发明,积极地检测各动脉硬化关联疾病也是可能的。

[0037] 【附图的简单的说明】

[0038] 【图1】是显示搭载SH3BP5蛋白质来源的肽的阵列中的体液抗体捕获测定的结果的附图。

[0039] 【图2】是显示由AlphaLISA法进行糖尿病(DM)患者和健康者(HD)血清中的SH3BP5抗体水平的比较的结果的附图。本图2由a~d的4附图构成。将使用SH3BP5蛋白质抗原时的结果以箱线图显示于a,将使用SH3BP5肽抗原之时的结果以箱线图显示于c。这些箱线图的纵轴是Alpha计数,示于各箱线的边界从下往上显示第10(最下段的横杠)、第20(箱的底边)、第50(箱的中心线)、第80(箱的上边)、第90(最上段的横杠)的百分率。b和d是各自反映a和c的结果的ROC曲线。b和d的ROC图中所示的4段的数值从上往下顺序地显示截止值(灵敏度、特异性)、P值、曲线下面积(AUC)值、95%CI。

[0040] 【图3-1】是显示由AlphaLISA法进行瞬时脑缺血发作(TIA)患者和急性期脑梗塞(aCI)患者和健康者中的SH3BP5血清抗体水平的比较的结果的附图。图3整体由a~f的6附图构成,本图3-1显示这些中a~c的3附图。a是显示以SH3BP5蛋白质作为体液抗体捕获抗原使用时的结果的箱线图,b是显示对于所述a之中TIA的结果的ROC曲线,c是显示对于所述a之中aCI的结果的ROC曲线。示于ROC曲线图中的4段的数字的含意与上述图2b等同样。

[0041] 【图3-2】上述图3之中,显示以SH3BP5肽作为抗体捕获抗原使用的d~f的3附图。d是显示使用SH3BP5肽时的结果的箱线图,e是显示对于所述d之中TIA的结果的ROC曲线,f是显示对于所述d之中aCI的结果的ROC曲线。示于ROC曲线图中的4段的数字的含意与上述图2b等同样。

[0042] 【图4】是显示进行在健康者和心血管障碍患者中的SH3BP5血清抗体水平的比较探讨的结果的附图。本图4由a~d的4附图构成。将使用SH3BP5蛋白质抗原时的结果以箱线图显示于a,将使用SH3BP5肽抗原之时的结果以箱线图显示于c。b和d是各自反映a和c的结果的ROC曲线。示于ROC曲线图中的4段的数字的含意与上述图2b等同样。

[0043] 【图5-1】是显示由AlphaLISA法进行健康者和慢性肾脏病(CKD)患者中的SH3BP5血清抗体水平的比较的结果的附图。图5整体由a~h的8附图构成,本图5-1显示这些中a~d的4附图。a是显示以SH3BP5蛋白质作为体液抗体捕获抗原使用时的结果的箱线图,b是显示对于所述a之中类型1的结果的ROC曲线,c是显示对于同类型2的结果的ROC曲线,d是显示对于同类型3的结果的ROC曲线。示于ROC曲线图中的4段的数字的含意与上述图2b等同样。

[0044] 【图5-2】是显示由AlphaLISA法进行健康者和慢性肾脏病(CKD)患者中的SH3BP5血清抗体水平的比较的结果的附图。图5整体由a~h的8附图构成,本图5-2显示这些中e~h的4附图。e是显示以SH3BP5肽作为体液抗体捕获抗原使用时的结果的箱线图,f是显示对于所述e之中类型1的结果的ROC曲线,g是显示对于同类型2的结果的ROC曲线,h是显示对于同类型3的结果的ROC曲线。示于ROC曲线图中的4段的数字的含意与上述图2b等同样。

【具体实施方式】

[0045] (1) 本发明的数据取得方法

[0046] (a) 从生物体分离的体液样品(以下,有时也记载为体液样品或样品)

[0047] 本发明的数据取得方法中的作为数据取得的对象使用的“从生物体分离的体液样品”是指从身体分离的状态的所述体液本身,或者,处理物,“体液”是指血液、淋巴液等。在体液样品之中,血液样品也是适宜的。作为血液样品,可举出全血、血清、血浆等,优选血清或血浆,特别优选血清。血液样品也可实施肝素处理等的凝固防止处理。在本发明中的体液样品中的目标检测物质是针对SH3BP5的抗体(作为体液抗体、自身抗体或体液自身抗体记载在说明书中)。

[0048] (b) 体液抗体捕获抗原

[0049] 在本发明的数据取得方法中的作为捕获体液抗体的基础的SH3BP5蛋白质能以作为其氨基酸序列的SEQ ID NO:2的全部作为体液抗体捕获抗原使用,也能使用一部分。在以SEQ ID NO:2的氨基酸序列的一部分作为体液抗体捕获抗原使用时,能从SEQ ID NO:2的氨基酸序列选7~455个连续的氨基酸序列而作为体液抗体捕获抗原。为了更有效的检测系统的确立,选择比较短的链长的氨基酸序列(肽)也是可能的,此时的氨基酸序列的个数适宜是7~30个左右,再优选为10~20个左右。

[0050] 另外,SEQ ID NO:2的氨基酸序列的全部或一部分之中,10%以下的个数的氨基酸残基(小数以下舍入)也可改变(缺失、取代、或者追加)。此时,优选为尽可能进行目的体液抗体的捕获的氨基酸序列的改变。

[0051] “缺失”是指在成为对象的氨基酸序列中的任何的氨基酸残基缺失,所述缺失的氨基酸残基的N末端侧(前)和C末端侧(后)的氨基酸残基由肽键连接的状态(在N末端氨基酸残基和C末端氨基酸残基的缺失的情况中是所述氨基酸残基简单缺失的状态)、所述缺失残基的个数作为“氨基酸缺失的个数”计数。“取代”是指在成为对象的氨基酸序列中的任何的氨基酸残基被“其他氨基酸残基”置换,所述改换的氨基酸残基与N末端侧(前)和C末端侧(后)的各氨基酸残基由肽键连接的状态(在N末端氨基酸残基的取代的情况中是仅与C末端侧的氨基酸残基的肽键,在C末端氨基酸残基的取代的情况中是仅与N末端侧的氨基酸残基的肽键)、所述取代残基的个数作为“氨基酸取代的个数”计数。“附加”是指在向成为对象的氨基酸序列中的任何1位置以上的肽键的位置插入各1个以上的新的氨基酸残基的状态下形成了新的肽键的状态。在N末端和C末端的新的1个以上的氨基酸残基的附加也含在此“附加”的概念内。这些“附加”的氨基酸残基的个数作为“氨基酸附加的个数”计数。

[0052] 另外,上述的“能捕获目的体液抗体”是指在改变氨基酸残基的体液抗体捕获抗原候选用与本申请说明书的实施例的方法同样的方法进行体液抗体的捕获时,基于该捕获抗体水平而能掌握作为目的的动脉硬化症的病状的程度。

[0053] 作为体液抗体捕获抗原使用的肽的氨基酸序列的具体例,可举SEQ ID NO:3(SH3BP5-43:FRSVLVEATVKLDE)、SEQ ID NO:4(SH3BP5-149:VHKETAARYNAAMG)、SEQ ID NO:5(SH3BP5-161:MGRMRQLEKLLKRA)、SEQ ID NO:6(SH3BP5-185:KAKYYVQLEQLKKT)、及SEQ ID NO:7(SH3BP5-327:EFGMMFPVGLGRSE)。在作为这些体液抗体捕获抗原使用的肽之中,SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的肽也是适宜的。这些捕获肽的氨基酸序列的改变可能的个数根据上述的基准是1个。

[0054] 指定的氨基酸序列的体液抗体捕获抗原能根据常规方法确保。具体而言,设计用于基于例如上述的SEQ ID NO:1所示的碱基序列等而扩增有SH3BP5基因的碱基序列的全部

或一部分的双链DNA的核酸扩增用引物,以由使用所述扩增用引物的PCR法等的基因扩增产物作为SH3BP5基因的全部或一部分得到,使用其而整合到pGEX-4T等的原核细胞表达载体,选择整合所述载体而转化的转化体,通过进一步添加IPTG(异丙基- β -D-硫代半乳糖苷)等的药物而诱导指定的SH3BP5基因的全部或一部分的表达,可将表达的SH3BP5蛋白质的全部或一部分由使用例如谷胱甘肽-琼脂糖(GE Healthcare Life Sciences)的亲性和层析等纯化。另外,通过使用位点特异性诱变(Methods in Enzymology, 154, 350, 367-382 (1987); 同100, 468 (1983); Nucleic Acids Res., 12, 9441 (1984))等的常规方法,通过进行SH3BP5基因的碱基序列的缺失、取代、或者追加,可得到进行对应的改变的SH3BP5蛋白质。

[0055] 特别是,具有SH3BP5蛋白质的一部分的序列的肽(典型而言,作为上述的氨基酸残基数7~30个体液抗体捕获抗原使用的肽)能根据公知的肽的化学合成法容易地制造。关于肽合成,能使用作为今或常规方法确立的液相肽合成法、或者固相肽合成法制造。进而,作为被认为是一般适宜的化学合成法的固相肽合成法,能使用Boc固相法或Fmoc固相法。

[0056] SH3BP5蛋白质使用市售品也是可能的。在市售品中,不仅有既有产品,也含根据订制而制造的外订品。

[0057] 另外,可根据需要向作为这些体液抗体捕获抗原使用的蛋白质或肽(用于体液抗体捕获的本质部分)适宜附加修饰结构。例如,如后所述,作为AlphaLISA(扩增发光邻近均相测定联免疫吸附测定)法中使用的GST(谷胱甘肽S-转移酶)-融合化蛋白质或肽,或生物素融合化蛋白质或肽等也是可能的。

[0058] (c) 对于关于动脉硬化的进程的数据取得方法

[0059] 本发明的数据取得方法对血液样品等的体液样品中的针对SH3BP5蛋白质或肽的体液抗体进行定量,在其定量值比标准值大的情况中,认定在体液样品提供者中的SH3BP5蛋白质的存在的亢进,能以其作为指标而作为关于所述受试样品提供者的动脉硬化的进程的数据。

[0060] 在动脉硬化中,在粥样动脉硬化(粥样硬化性动脉硬化)之外,还含颤动脉硬化、中膜硬化。

[0061] 在本发明中,能取得关于动脉硬化的进程的直接的数据。即,在确认不到由动脉硬化的进程导致的具体的症状的状态下也能掌握动脉硬化的存在。对于此无症状的阶段的动脉硬化,通过减风险因素的措施、例如,进行就餐指导、运动指导、禁烟指导等的生活习惯改善指导,能抑制动脉硬化的进程。另外,在由个别的手段确认高脂血症或高血压时,能由抗胆甾醇药、降压剂、血栓治疗剂等的适合的药剂的处方抑制这些动脉硬化的风险因素的进展。

[0062] 另外,本发明中的关于动脉硬化的进程的数据可为动脉硬化关联疾病的检测数据。即,作为动脉硬化关联疾病的直接的指标数据,能使用体液样品提供者中的SH3BP5蛋白质的存在的亢进数据。

[0063] 如上所述,动脉硬化关联疾病是“与动脉硬化相关的疾病”,含“动脉硬化成为原因而患的疾病(动脉硬化症)”和“成为动脉硬化的原因的疾病”的双方。作为成为动脉硬化的原因的疾病,可举出糖尿病、慢性肾脏病、脂质异常症、家族性高胆甾醇血症、高血压症、非心原性脑梗塞-末梢动脉疾病、睡眠时无呼吸综合征等。作为动脉硬化症,除了心绞痛、心肌梗塞等的心血管障碍之外、还可举出脑梗塞、瞬时脑缺血发作、脑出血、蛛网膜下出血、大

动脉瘤、肾硬化症、闭塞性动脉硬化症、手足的坏死等。

[0064] 在本发明中,特别可举出上述动脉硬化关联疾病的检测数据是上述动脉硬化症的检测数据的实施方式。

[0065] 在受试样品中的针对SH3BP5蛋白质的体液抗体水平的标准值设定推定为由一般的检查确认不到动脉硬化的者的标本集团,求出在所述标本集团中的所述受试样品的针对SH3BP5蛋白质的所述体液抗体的定量值,通过对其实施统计处理而求出平均、标准偏差等,可含截止值而导出。

[0066] 所述体液抗体水平的测定,例如,可通过使上述的体液抗体捕获抗原(含蛋白质、及肽)的固定化物接触体液样品,作为信号检测基于所述体液样品内的针对SH3BP5蛋白质的抗体(体液抗体)与所述体液抗体捕获抗原的抗原抗体反应的结合来进行。具体而言,可使用AlphaLISA法、ELISA法、间接荧光抗体法、蛋白印迹法(免疫印迹法)、比浊法、散射比浊法、乳胶凝集比浊法、CLEIA法等的手段而进行定量测定。其中例示的任何的定量测定手段也是以定量目标物质作为体液样品中的抗体时确立的定量测定手段。例如,在AlphaLISA法中,在以GST-融合SH3BP5抗原(蛋白质或肽)作为体液抗体捕获抗原时,使用谷胱甘肽-结合供体珠,作为生物素化SH3BP5体液抗体捕获抗原时使用链霉亲和素-结合供体珠,使体液抗体捕获抗原、将体液样品、及抗人IgG抗体结合的受体珠混合,数小时至数天、于室温温育,通过向形成的抗原抗体复合物照射680nm的光,检测发生的520~620nm的光,可进行期望的体液抗体的定量。在间接荧光抗体法中,使固定化指定的体液抗体捕获抗原的蛋白阵列接触体液样品,对于形成的体液抗体捕获抗原-抗SH3BP5体液抗体复合物还可使实施荧光标记的第二抗体接触,对针对SH3BP5的体液抗体进行定量。ELISA法是以在间接荧光抗体法中使用的第二抗体的标记作为酶标记而进行定量。第二抗体的标记能多样地选择。在蛋白印迹法中,使体液抗体捕获抗原在SDS-聚丙烯酰胺凝胶上电泳之后,从凝胶向硝酸纤维素膜等的载体转印,使体液样品接触,可通过使用第二抗体检测发生的体液抗体捕获抗原-抗SH3BP5体液抗体复合物来进行定量测定。在比浊法或散射比浊法中,可通过将通过使体液样品和体液抗体捕获抗原接触而形成的体液抗体捕获抗原-抗SH3BP5体液抗体复合物用浊度(比浊法)或散射光强度的变化(散射比浊法)检测来进行定量。在乳胶凝集比浊法中,可通过使体液抗体捕获抗原结合的乳胶粒子和体液样品接触,由使所述乳胶粒子的凝集体与乳胶粒子结合的体液抗体彼此的相互作用形成,通过对其进行检测来进行定量。在CLEIA法中,可通过使体液抗体捕获抗原的结合磁性粒子和体液样品接触,在磁性粒子上形成体液抗体捕获抗原-抗SH3BP5抗体复合物而进行集磁,除去未反应物,实施适合的荧光化处理等而检测所述复合物进行定量测定。

[0067] (2) 对于本发明的试剂盒

[0068] 在本发明的试剂盒中,可举例如,GST-融合SH3BP5抗原(蛋白质或肽)、谷胱甘肽-结合供体珠、及受体珠的组、或者生物素化SH3BP5抗原(蛋白质或肽)、链霉亲和素-结合供体珠及受体珠的组作为用于以AlphaLISA法作为定量测定手段进行的试剂盒的构成。

[0069] 另外,作为用于以ELISA法作为定量测定手段进行的试剂盒的构成,可举使体液抗体捕获抗原固定化的板、进行对于体液抗体的标记的第二抗体、用于使第二抗体的标记显现的试剂。

[0070] 另外,作为用于进行乳胶凝集比浊法的试剂盒构成,可举使体液抗体捕获抗原结

合的乳胶粒子。

[0071] 另外,作为用于进行CLEIA法的试剂盒构成,可举使体液抗体捕获抗原结合的磁性粒子和进行对体液抗体的标记的第二抗体、用于使第二抗体的标记显现的试剂。

[0072] 其中举的这些试剂盒的构成终究也是例示,用于进行其他定量测定手段的试剂盒也含在本发明试剂盒的范围内。再者,以进一步减少其中例示的上述的要素的构成而增加检查的外订或本身筹备的程度的方式设定也是可能的,相反,以稀释液或试剂用的管等作为构成增加而设定本发明的试剂盒的即时使用也是可能的。另外,考虑对应于具体性的检查的其他要素也是可能的。

[0073] **【实施例】**

[0074] 以下,公开本发明的实施例。

[0075] 1. SH3BP5蛋白质的表达和纯化

[0076] 从人U2OS骨肉瘤细胞使用高纯度RNA分离试剂盒(Roche,Basel,Switzerland)单离总RNA,使用Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR(Thermo Fisher Scientific)而合成cDNA。以其作为模板,由使用Pyrobest DNA polymerase(Takara Bio Inc.,Shiga,Japan)的PCR法扩增SH3BP5的全长cDNA,谷胱甘肽S-转移酶(GST)基因部位被插入到设在克隆位点的上游的质粒载体pGEX-4T-1(GE Healthcare Life Sciences,Pittsburgh,PA)的EcoRI/SalI部位而制作作为基因表达用的重组质粒的pGEX-4T-1-SH3BP5,由DNA测序确认碱基序列。再者,向大肠杆菌BL-21导入pGEX-4T-1-SH3BP5而进行转化,通过由0.1mM IPTG(异丙基- β -D-硫代半乳糖苷)于25℃处理4小时来诱导SH3BP5cDNA的表达。诱导后,回收所述大肠杆菌,加BugBuster Master Mix(Merck Millipore,Darmstadt,Germany)而溶解,得到蛋白质提取液。所述蛋白质提取液中的GST-SH3BP5蛋白质由谷胱甘肽-琼脂糖(GE Healthcare Life Sciences)柱层析纯化,将缓冲液更换为PBS,以其作为SH3BP5蛋白质抗原。作为对照,同样地纯化GST。

[0077] 2. 肽阵列的制作

[0078] 从SH3BP5蛋白质的公开的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)使用网公开的表位检索网站程序ProPred(<http://www.imtech.res.in/raghava/propred/>)检索抗体识别部位。结果,得到以下的5处的序列。作为对照,检索C9orf156的表位部位(登录号:NM_001080507),得到所述表位的序列(下述SEQ ID NO:8)。

[0079] 将具有各自的氨基酸序列的肽合计6种由Kato等的方法(Kato R,Kaga C,Kunimatsu M,Kobayashi T,Honda H(2006)Peptide array-based interaction assay of solid-bound peptides and anchorage-dependent cells and its effectiveness in cell adhesive peptide design.J Biosci Bioeng 101:485-495.),使用Fmoc法,在膜上制作合成的肽阵列。

[0080] SH3BP5-43:FRSVLVEATVKLDE(SEQ ID NO:3)

[0081] SH3BP5-149:VHKETAARYNAAMG(SEQ ID NO:4)

[0082] SH3BP5-161:MGRMRQLEKCLKRA(SEQ ID NO:5)

[0083] SH3BP5-185:KAKYYVQLEQLKKT(SEQ ID NO:6)

[0084] SH3BP5-327:EFGMMFPVLGPRSE(SEQ ID NO:7)

[0085] C9orf156-428:HMTGPVGSLSLGS(SEQ ID NO:8)

[0086] 将此膜用PBS-T-BSA[磷酸盐缓冲的1% (w/v) 牛血清白蛋白, 0.05% Tween-20, 0.05% NaN₃]清洗5次, 将用颈动脉的回波检查确认不到狭窄的健康者血清(样品编号HD#1)、及用颈动脉的回波检查确认到狭窄的动脉硬化患者血清(样品编号P#7)稀释200倍而使反应18小时, 接下来将此膜用PBS-T-BSA清洗5次, 再者, 与稀释10000倍的FITC-缀合的山羊抗-人IgG (Jackson ImmunoResearch, WestGrove, PA) 反应1小时, 再次清洗后, 将使用488nm/520nm滤器检测的荧光用Typhoon 9400Imager (GE Healthcare Life Sciences) 测定。

[0087] 图1显示上述肽阵列中的测定的结果。具体而言, 使搭载上述6种肽的膜与上述健康者血清(样品编号HD#1)、及动脉硬化患者血清(样品编号P#7)反应, 将与6种各肽结合的血清IgG使用荧光标记第二抗体进行检测, 将这些检测结果作为利用荧光激光扫描仪的像显示。箭头表示与患者血清IgG反应的阳性斑。

[0088] 如图1所示, 得知肽“SH3BP5-161”(SEQ ID NO:5)与动脉硬化患者的血清特别强烈地反应, 在动脉硬化患者的血清中, 存在对于所述肽的抗体、即, 针对SH3BP5蛋白质的抗体。

[0089] 3. 由AlphaLISA法的解析

[0090] (1) AlphaLISA法

[0091] 以作为在上述的试验中与血清中的SH3BP5抗体最敏锐地反应的肽类型的体液抗体捕获抗原的SH3BP5-161 (SEQ ID NO:5: 在以下的实施例中记载为“SH3BP5肽”, 如无特别说明, 是此SEQ ID NO:5的氨基酸序列的肽) 和SH3BP5蛋白质 (SEQ ID NO:2: 在以下的实施例中记载为“SH3BP5蛋白质”, 如无特别说明, 是此SEQ ID NO:2的全氨基酸序列的蛋白质) 作为主要的检测对象而进行AlphaLISA法(扩增发光邻近均相测定)。具体而言, 使用384孔微量滴定板 (white opaque OptiPlate™, Perkin Elmer, Waltham, MA) 而进行。在各孔中将2.5μL被AlphaLISA专用缓冲液 (25mM HEPES, pH7.4, 0.1% 酪蛋白、0.5% Triton X-100、1mg/mL 葡聚糖-500、0.05% Proclin-300) 稀释100倍的血清及成为抗原的GST-、或者GST-SH3BP5蛋白质 (10μg/mL)、或者生物素化肽 (bSH3BP5-161) (400ng/ml) 在AlphaLISA专用缓冲液中稀释而混合。于室温温育6~8小时之后, 将抗-人IgG-缀合的受者珠 (2.5μL在40μg/mL) 及谷胱甘肽-或者链霉亲和素-缀合的供者珠 (2.5μL at40μg/mL) 在AlphaLISA专用缓冲液中稀释而混合。1~14天、于室温放置之后, 用EnSpire Alpha微板阅读器 (PerkinElmer) 测定发生的光子的数而作为“Alpha计数”。在GST-SH3BP5蛋白质的情况中, 将对照的GST, 在bSH3BP5-161肽的情况中减去缓冲液对照的值而算出对SH3BP5抗原具有特异性的抗体水平。

[0092] (2) 使用AlphaLISA法的糖尿病患者中的探讨

[0093] 由AlphaLISA法测定对糖尿病 (DM) 患者和健康者中的GST-SH3BP5蛋白质、及bSH3BP5-161肽的血清抗体水平。在千叶大学医学部附属医院得到各受试者的知情同意而采集DM患者的血清样品、及健康者的血清样品。对于GST-SH3BP5蛋白质、及bSH3BP5-161肽的血清抗体水平与健康者的血清样品比, 在DM患者的血清样品中显著地高 (图2、表1)。

[0094] 表1显示在DM患者的血清样品和健康者的血清样品中的SH3BP5抗体水平的比较解析结果, 即, 图2中所示的由AlphaLISA法的结果的数据解析结果。表1自上往下, 显示健康者的血清样品的平均值、SD、截止值 (平均值+2SD)、全样品数、表示截止值以上的阳性样品数、阳性率、及DM患者的血清样品的平均值、SD、全样品数、表示截止值以上的阳性样品数、阳性

率、及对健康者的血清样品和DM患者的血清样品进行比较之时的P值。将P值0.05以下,或者阳性率10%以上的值用粗体字表示。

[0095] 【表1】

[0096]

		SH3BP5-GST	bSH3BP5-161
HD	平均值	1,850	1,387
	SD	955	737
	截止值	3,760	2,861
	全样品数	81	81
	阳性样品数	3	5
	阳性率 (%)	3.7%	6.2%
DM	平均值	3,087	2,428
	SD	2,244	2,202
	全样品数	275	275
	阳性样品数	61	76
	阳性率 (%)	22.2%	27.6%
P 值		4.75E-12	9.90E-11

[0097] 将截止值设定为健康者的血清样品的平均值+2SD之时的阳性率是:健康者是3.7%、DM是22.2%(表1)。在ROC(受试者工作曲线)解析中得到的AUC值(曲线下面积)是:SH3BP5蛋白质是0.722、SH3BP5肽是0.702。同样地,在ROC解析中得到的SH3BP5蛋白质中的灵敏度是53.5%、特异性是83.5%、在SH3BP5肽中的灵敏度是53.1%、特异性是81.2%(图2b、d)。这表明反映SH3BP5-161肽的表位区域与蛋白质整体的血清抗体的反应。

[0098] (3) 使用AlphaLISA法的瞬时脑缺血发作(TIA)患者和急性期脑梗塞(aCI)患者中的探讨

[0099] 接下来,由AlphaLISA法探讨对TIA患者和aCI患者中的GST-SH3BP5蛋白质、及bSH3BP5-161肽的血清抗体水平。健康者的血清样品从在海港广场柏户诊所中由头部MRI检查未确认到异常的受试者得到。在千叶县立佐原医院、千叶劳灾医院、千叶市立青叶医院、及千叶Medical中心得到TIA和aCI的患者的血清样品。由AlphaLISA法的结果是,GST-SH3BP5蛋白质、及bSH3BP5-161肽的抗体水平在TIA、aCI的任一方的患者的血清样品中均显著地高(图3a、3b)。将截止值设定为健康者的血清样品的平均值+2SD之时的SH3BP5蛋白质的抗体水平的阳性率是:健康者是0.8%、TIA患者是15.6%、aCI患者是15.2%(表2)。

[0100] 表2显示在TIA患者和aCI患者和健康者的血清样品中的SH3BP5抗体水平的比较解析结果,即,图3中所示的由AlphaLISA法的数据解析结果。显示于表2的数值的种类与表1同样。

[0101] 【表2】

[0102]

		SH3BP5-GST	bSH3BP5-161
HD	平均值	11820	2575
	SD	4,336	1,374
	Av+2SD (截止值)	20,492	5,323
	全样品数	123	123
	阳性样品数	1	6
	阳性率 (%)	0.8%	4.9%
TIA	平均值	15,188	3,641
	SD	5,693	2,217
	全样品数	77	77
	阳性样品数	12	14
	阳性率 (%)	15.6%	18.2%
	P (P vs HD)	0.00002	0.00025
aCI	平均值	14,285	3,485
	SD	5,901	2,270
	全样品数	158	158
	阳性样品数	24	25
	阳性率 (%)	15.2%	15.8%
	P (P vs HD)	0.00007	0.00004

[0103] 针对SH3BP5肽的抗体水平的阳性率各自是4.9%、18.2%、15.8%。由ROC解析得到的TIA的AUC值是:SH3BP5蛋白质抗原是0.670、SH3BP5肽抗原是0.655。aCI的AUC值各自是0.614和0.620(图3c、3f)。从而,SH3BP5的抗体标志物对于TIA和aCI的诊断有用。

[0104] (4) 使用AlphaLISA法的心血管障碍(CVD)患者和睡眠时无呼吸综合征(OSA)患者中的探讨

[0105] 接下来,将含急性心肌梗塞或不稳定心绞痛等的CVD的患者血清中的SH3BP5抗体水平由AlphaLISA法探讨。CVD患者的血清样品在千叶大学医学部附属医院、及京都大学医学部附属医院采集。针对SH3BP5蛋白质、及SH3BP5肽的抗体水平在任何方的体液抗体捕获抗原中均与健康者血清比而在CVD患者血清中显著地高(图4a、4c)。

[0106] 再者,由于睡眠时无呼吸综合征(obstructive sleep apnea(OSA))与动脉硬化相关,CI或CVD的高风险因素,关于其也探讨SH3BP5抗体水平。OSA患者的血清样品在千叶大学医学部附属医院采集。针对SH3BP5蛋白质、及SH3BP5肽的抗体水平均与健康者血清比,在OSA患者血清中显著地高(表3)。

[0107] 表3如上所述,显示在CVD和OSA的患者的血清样品和健康者的血清样品中的SH3BP5抗体水平的比较解析结果。显示于表3中的数值的种类与表1同样。

[0108] 【表3】

[0109]

		SH3BP5-GST	bSH3BP5-161
HD	HD 平均值	2,470	872
	HD SD	1,316	798
	HD 平均值+2SD	5,103	2,468
	HD 平均值+3SD	6,419	3,266
	HD 全样品数	78	78
	HD 阳性样品数	5	5
	HD 阳性率 (%)	6.4%	6.4%
CVD	P 平均值	3,092	1,336
	P SD	1,666	1,090
	P 全样品数	100	100
	P 阳性样品数	8	13
	P 阳性率 (%)	8.0%	13.0%
	P (P vs HD)	0.0060	0.0013
OSA	P 平均值	3,124	1,335
	P SD	2,074	1,578
	P 全样品数	86	86
	P 阳性样品数	10	11
	P 阳性率 (%)	11.6%	12.8%
	P (P vs HD)	0.016	0.018

[0110] 在表3中,针对SH3BP5蛋白质的抗体水平的阳性率是:健康者是6.4%、CVD患者是8.0%、OSA患者是11.6%。针对SH3BP5肽的抗体水平的阳性率是:健康者是6.4%、OSA患者是12.8%。另外,针对SH3BP5肽的抗体水平的阳性率是:健康者是6.4%、CVD患者是13.0%、OSA患者是12.8%。

[0111] 一方面,由ROC解析得到的AUC值是:SH3BP5蛋白质是0.653、SH3BP5肽是0.687(图4b、4d)。

[0112] 这些结果表明,SH3BP5血清抗体水平可相对于健康者而识别CVD和OSA的患者。

[0113] (5) 使用AlphaLISA法的慢性肾脏病(CKD)患者中的探讨

[0114] 接下来,使用AlphaLISA法研究在与动脉硬化关联的CKD的患者血清中的SH3BP5抗体水平。CKD患者的血清样品由熊本同群收集。CKD分类为类型1:糖尿病性肾病、类型2:肾硬化症、类型3:肾小球肾病。健康者的血清样品使用在千叶大学医学部附属医院采集的。针对SH3BP5蛋白质、及SH3BP5肽的抗体水平均与健康者血清比而在全部类型的CKD患者血清中显著地高(图5a、4e)。使用SH3BP5蛋白质之时的阳性率是:健康者是2.4%、类型1是15.2%、类型2是12.5%、类型3是4.1%,使用肽抗原之时的阳性率是:健康者是2.4%、类型1是25.5%、类型2是28.1%、类型3是13.0%(表4)。由ROC解析得到的类型2CKD的AUC值非常地高达:SH3BP5蛋白质抗原是0.789、肽抗原是0.839(图5c、5g)。

[0115] 表4显示,在CKD类型1、类型2、类型3的患者的血清样品和健康者的血清样品中的SH3BP5抗体水平的比较解析结果。显示于表4的数值的种类与表1同样。

[0116] 【表4】

[0117]

		SH3BP5-GST	bSH3BP5-161
HD	HD 平均值	1,839	1,839
	HD SD	1,887	902
	HD 平均值+2SD	5,614	3,644
	HD 全样品数	82	82
	HD 阳性样品数	2	2
	HD 阳性率 (%)	2.4%	2.4%
1 类型 CKD	P 平均值	3,467	3,011
	P SD	3,094	1,660
	P 全样品数	145	145
	P 阳性样品数	22	37
	P 阳性率 (%)	15.2%	25.5%
	P (P vs HD)	1.67E-06	5.61E-11
2 类型 CKD	P 平均值	3,392	3,052
	P SD	2,530	1,183
	P 全样品数	32	32
	P 阳性样品数	4	9
	P 阳性率 (%)	12.5%	28.1%
	P (P vs HD)	0.0029	0.0000041
3 类型 CKD	P 平均值	2,335	2,602
	P SD	1,692	1,347
	P 全样品数	123	123
	P 阳性样品数	5	16
	P 阳性率 (%)	4.1%	13.0%
	P (P vs HD)	0.057	0.0000024

[0118] (6) 使用AlphaLISA法的癌患者中的探讨

[0119] 由于多种体液自身抗体在癌患者中被检测,对于食道扁平上皮癌(esophageal squamous cell carcinoma)、及大肠癌(colon carcinoma)的患者的血清样品,与上述同样地使用AlphaLISA法而研究血清中的SH3BP5抗体水平。患者的血清样品在东邦大学附属医院采集。针对SH3BP5蛋白质的抗体水平与健康者血清比而在食道癌、及大肠癌的患者血清中显著地高,阳性率均是10%以下(表5)。针对SH3BP5肽的抗体水平在食道癌中显示高值,P值是0.011左右,在大肠癌中确认不到显著差异。这表明,相比针对SH3BP5蛋白质抗原,针对SH3BP5肽抗原的抗体水平的方是由动脉硬化症特异性地对应的标志物。

[0120] 表5显示,在食道癌(Eso SCC)、及大肠癌(Colon Ca)的患者的血清样品和健康者的血清样品中的SH3BP5抗体水平的比较解析结果。显示的数值的种类与表1同样。

[0121] 【表5】

[0122]

		SH3BP5-GST	bSH3BP5-161
HD	HD 平均值	1,072	4,902
	HD SD	1,166	3,258
	HD 平均值+2SD	3,405	11,419
	HD 全样品数	64	64
	HD 阳性样品数	1	3
	HD 阳性率 (%)	1.6%	4.7%
Eso SCC	P 平均值	1,786	6,766
	P SD	977	4,746
	P 全样品数	64	64
	P 阳性样品数	6	7
	P 阳性率 (%)	9.4%	10.9%
	P (P vs HD)	0.00027	0.011
Colon Ca	P 平均值	1,653	5,928
	P SD	1,370	3,332
	P 全样品数	64	64
	P 阳性样品数	6	4
	P 阳性率 (%)	9.4%	6.3%
	P (P vs HD)	0.011	0.081

[0123] 4. 相关解析

[0124] 接下来,对于对SH3BP5肽的血清抗体水平和受试者数据而进行Spearman的相关解析、及多变量解析。受试者数据使用以下数据。

[0125] 是年龄、性别、身高、体重、体重指数 (BMI)、血压、现在的症状 [aCI、TIA、慢性脑梗塞 (cCI)、无症状性脑梗塞 (asympt CI)]、最大颈动脉内膜中膜肥厚 (maximum intima-media thickness; max IMT)、生活习惯 (吸烟习惯、吸烟期间、饮酒习惯、饮酒频度)、并发症 (高血压、CVD、DM、高脂血浆)、及血液检查数据 [LDL-胆固醇 (LDL-C)、碱性磷酸酶 (ALP)、总胆固醇 (T-CHO)、氯 (Cl)、HDL-胆固醇 (HDL-C)、钾 (K)、肌酸酐 (CRE)、 γ -谷氨酰基转肽酶 (γ -GTP)、尿酸 (UA)、糖化血红蛋白 (HbA1c)、白蛋白 (ALB)、总蛋白 (TP)、钠 (Na)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、甘油三酯 (TG)、估计肾小球滤过率 (eGFR)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、胆碱酯酶 (CHE)、血尿素 (BUN)、总胆红素 (tBi1)、血糖 (BS)、乳酸脱氢酶 (LDH)、白蛋白/球蛋白比 (A/G)]。

[0126] 对于县立佐原医院采集的741个血清样品进行上述的相关解析。其明细是:健康者:139例、白质软化:79例、asympt CI:15例、TIA:29例、aCI:227例、cCI:58例、及疾病对照组:194例。多变量解析的结果表明,针对SH3BP5肽的抗体水平是,与cCI或asympt CI相比,更相关于aCI或TIA(表6)。Spearman相关解析和多变量解析的两者均显示与max IMT、吸烟期间、及年龄相关。另外,Spearman相关解析显示与血压、及并发症的高血压相关关系。从这些结果认为,SH3BP5血清抗体标志物识别起因于由高血压或吸烟习惯引起的动脉硬化症的cCI或TIA。

[0127] 如上所述,表6显示,针对SH3BP5肽抗原的血清抗体水平和受试者数据的相关解析的结果,即,对于千叶县立佐原医院采集的741个血清样品进行Spearman的相关解析、及多变量解析的结果。在表6中显示由各解析的相关系数和P值。粗体字表示显著的相关解析。

[0128] 【表6】

[0129]

	受试者信息	缩写	Spearman 相关解析		多变量解析	
			r 值	P 值	r 值	P 值
一般	年龄		0.123	0.0016	0.123	0.0022
	性别		-0.020	0.6079	0.046	0.2534
	身高	高度	-0.070	0.0710	-0.042	0.3002
	体重	重量	-0.037	0.3361	0.030	0.4597
	体重指数	BMI	0.008	0.8336	-0.027	0.4981
	血压	BP	0.121	0.0023	0.043	0.2817
现在的症状	急性脑梗塞	aCI	0.123	0.0015	-0.247	4.3E-10
	瞬时脑缺血发作	TIA	0.020	0.6062	-0.070	0.0790
	慢性脑梗塞	cCI	0.093	0.0170	-0.077	0.0550
	无症状性脑梗塞	asympt-CI	0.029	0.4505	-0.047	0.2403
动脉狭窄	最大颈动脉内膜中膜肥厚	max IMT	0.159	0.0007	0.081	0.0443

[0130]

生活习惯	吸烟习惯 (是/否)		0.092	0.0174	-0.048	0.2356
	吸烟期间		0.135	0.0005	0.150	0.0002
	饮酒习惯 (是/否)		0.030	0.4346	0.019	0.6338
	饮酒频度		0.070	0.0737	0.033	0.4054
血液检查	LDL-胆固醇	LDL-C	-0.108	0.0449		
	碱性磷酸酶	ALP	0.082	0.0458	0.070	0.0818
	总胆固醇	T-CHO	-0.068	0.1047	-0.028	0.4820
	氯	Cl	0.056	0.1536	-0.017	0.6775
	HDL-胆固醇	HDL-C	-0.053	0.2696	0.022	0.5873
	钾	K	0.030	0.4415	0.006	0.8854
	肌酸酐	CRE	0.030	0.4447	0.014	0.7266
	γ -谷氨酰基转肽酶	γ -GTP	0.030	0.4660	0.020	0.6196
	尿酸	UA	0.024	0.5948	0.054	0.1766
	糖化血红蛋白	HbA1c	0.023	0.6079	0.017	0.6773
	白蛋白	ALB	-0.018	0.6444	0.062	0.1228
	总蛋白	TP	-0.016	0.6827	-0.054	0.1761
	钠	Na	0.014	0.7159	0.042	0.2970
	丙氨酸氨基转移酶	ALT (GPT)	0.012	0.7503	-0.002	0.9638
	甘油三酯	TG	0.013	0.7872	0.003	0.9463
	估计肾小球滤过率	eGFR	-0.011	0.8026	0.004	0.9193
	天冬氨酸氨基转移酶	AST (GOT)	0.008	0.8330	-0.040	0.3132
	胆碱酯酶	CHE	-0.005	0.9054	-0.025	0.5275
	血脲氮	BUN	-0.003	0.9349	0.011	0.7897
	总胆红素	tBil	-0.002	0.9609	-0.034	0.3965
血糖	BS	-0.001	0.9761	0.037	0.3596	
乳酸脱氢酶	LDH	0.000	0.9932	0.026	0.5101	
白蛋白/球蛋白比	A/G	0.000	0.9967	-0.057	0.1538	
并发症	高血压 (是/否)	HT	0.130	0.0008	0.025	0.5364
	心血管疾病 (是/否)	CVD	0.065	0.0958	0.067	0.0930
	糖尿病 (是/否)	DM	0.026	0.4987	-0.013	0.7453
	血脂异常 (是/否)		0.007	0.8503	-0.018	0.6500

[0131] 【产业上的利用可能性】

[0132] 从SH3BP5血清抗体水平的升高直接与动脉硬化的存在相关的同时,在DM、TIA、aCI、CVD、CKD等的多样的动脉硬化关联疾病的患者血清中升高,及与max IMT或高血压相关,认为SH3BP5血清抗体水平的升高是反映动脉硬化本身的进程度的标志物。从此标志物与高血压或吸烟习惯相关,认为此标志物阳性的受试者能通过经血压降低或戒烟来抑制发展的动脉硬化。

[0133] aCI或CVD的患者的血清样品在发病后2周以内采集,从其间新出现自身抗体的可能性低,认为在发病前就存在SH3BP5血清抗体。从而,此标志物还能应用于动脉硬化症的发病预测。特别是,如果通过预测脑梗塞或心肌梗塞的发病而进行发病预防变得可能,则具有大的社会意义。实际上,如实施例所示,在称为aCI的前阶段的TIA的患者血清中SH3BP5自身抗体也是高值。

序列表

<110> Fujikura Kasei Co., Ltd.

National University Corporation Chiba University

<120> 动脉硬化的检测方法

<130> PFKK5

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3322

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

```

gcgctgactg ccgcggcaga aagggggcgg ccgcgccc at ttctctgct ccgccgcggc 60
cggaggatc cgcacggcg agctgcgtct cccgggtgtc ggccccggcg gctccccgac 120
cgtgcccggc tgtggcgagg cggtccagc ccagcctgtg gcagccgca cccccggggc 180
gctccggagc cactgcgcg gcgcgcgtgc cggctgcctg catggacgcg gactgaagc 240
ggagccgctc ggaggagcca gccgaaatcc tgccgcctgc ccgggacgag gaggaggagg 300
aggaagaggg gatggagcag gggctggagg aggaagaaga ggtggatccc cggatccagg 360
gagaactgga gaagttaaat cagtccacgg atgatataa cagacgggag actgaacttg 420
aggatgctcg tcagaagttc cgctctgttc tggttgaagc aacggtgaaa ctggatgaac 480
tggtgaagaa aattggcaaa gctgtggaag actccaagcc ctactgggag gcacggaggg 540
tggcgaggca ggctcagctg gaagctcaga aagccacgca ggacttccag agggccacag 600
aggtgctccg tgccccaag gagaccatct ccctggccga gcagcggctg ctggaggatg 660
acaagcggca gttcactcc gcctggcagg agatgctgaa tcacgccact cagagggtca 720
tggaggcggg gcagaccaag accaggagcg agctggtgca taaggagacg gcagccaggt 780
acaatgccgc catgggccgc atgcgacagc tggagaagaa actcaagaga gccatcaaca 840
agtccaagcc ttattttgaa ctcaaggcaa agtactatgt gcagctcgag caactgaaaa 900
agactgtgga tgacctgag gccaaactga ccctggcaaa aggcgagtac aagatggccc 960
tgaagaacct ggagatgatc tcagatgaga tccacgagcg gcggcgctcc agtgccatgg 1020
ggcctcgggg atgcggtgtt ggtgctgagg gcagcagcac atctgtggag gatctgccag 1080
ggagcaaacc tgagcctgat gccatttctg tggcctcgga ggcccttgaa gatgacagct 1140
gtagcaactt tgtgtctgaa gatgactcgg aaaccagtc cgtgtccagc ttagttcag 1200
gaccaacaag cccgtctgag atgcctgacc agttccctgc ggttgtgagg cctggcagcc 1260
tggatctgcc cagccctgtg tcctgtcag agtttgggat gatgttcca gtgttgggcc 1320
ctcgaagtga atgcagcggg gcctcctccc ctgaatgtga agtagaacga ggagacaggg 1380
cagaagggggc agagaataaa acaagtgaca aagccaaca caaccggggc ctacagagta 1440
gcagtggcag tgggtggcagc agtaagagcc aaagcagcac ctcccctgag ggccaggcct 1500
tggagaaccg gatgaagcag ctctccctac agtgcctcaa gggaagagat ggaattattg 1560

```

ctgacataaa aatgggtgcag attggctgat tcacctcctggg ccctggccga tgtgcatatc 1620
 aacatttata catggaactg gagaacattg tgccaataat catttaatat atgccaaatc 1680
 ttacacgtct actctaaact gctctaataga agtttcagtg accttgaggg ctaaagattg 1740
 ttcttctggg taagagctct tgggctgggt ttcagagca gagttcttgt tgtgggtaga 1800
 ctgtgactag gttcacagcc tttgtggaac attccgtata acggcattgt ggaagcaata 1860
 actagttcct atgaaagaac cagagctggg aagatggctg ggaagccagg ccaaagtggg 1920
 ggcaacagct tgcttctctt tctcttctca ccctcagttt gtatgggaaa atggagatgt 1980
 cctctccact ttatcccacg atatctaaat gaaaaagaaa gaaaaccac acacaaagca 2040
 aaaactcaag tattaagagc acatattttt gaccagtgagg aggcttaaaa aaaaaaaaaat 2100
 ccaagaacac aattcatttt caccacctct ggtgttcaga gggggctttt aaaaaagcgt 2160
 gtatgctggg ataccatta aaaccatttt ctagaaggct accatgagct gcactttttg 2220
 ggggtgggaaa ggtgaatgcc agtgggggatg cgggggggatg agggtaggag ggacttatag 2280
 aaggggattt gtggctgtgg gggagaaggt tctacagcat aagccttate ctgccagcca 2340
 aggggattta ttctaagaga agtgcattgt aagaatggtt gccactgtta ttagattgac 2400
 aagatgttaa tttctctgta ggttgaact ttaaaaataa atgaaattat ttaagggtta 2460
 tgctgacta gtattcctta gaggaacag ttctttaag ttaggaaagg gagtaggcag 2520
 gcatgtgttg gcaaaggctg ttaatagtag ttaagtgtta agactgcttt tctttaacgt 2580
 tttcatggta atgcatattt agagcactgt atttttgtct tgtaagaaa atttagcatt 2640
 tctaaaagaa aaaagcaacc ctctttcaa ctgttaattc tgtcacagcc tgtatatttt 2700
 agtcatttgt aaatctcttc atacaatagt gacttctttt ttgactgata cagtatctta 2760
 attacaaggt tattttgtac ttgtcttaac aactaagtg taataaaaac ggcttgagaa 2820
 aagtttctcc tttctgtgac ttcaaataag aactcccagt attgcctaaa tcttctaggc 2880
 aaccttttt ccataaggaa gagcatggag tgctgtggtc accagtaatc attttcaatt 2940
 aattaaggtc atgaacagta ataatttaag ccttgtttac caaggtttga attctacttt 3000
 tgctgttgct aaagctgtgg gcaatgagga gacacagtg cagataaaga cgaggtgggtg 3060
 acgctggagg agtgggcctc ggctgcacac tgcagtctcg aagcttaagt gttgctgtca 3120
 gtcagttctc atcccagag aattatttaa ttaattaact ggggggggta cactggggca 3180
 ttagactttt aaaagctccc cgaggaatt caaatgtgca ttcagagttg agaatcagat 3240
 ggattctttc ttttgtggaa atgttttata atattggact cttaatccgc atttcattat 3300
 taaagcatgc tgtggagaaa aa 3322

<210> 2

<211> 455

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

Met	Asp	Ala	Ala	Leu	Lys	Arg	Ser	Arg	Ser	Glu	Glu	Pro	Ala	Glu	Ile
1			5					10						15	
Leu	Pro	Pro	Ala	Arg	Asp	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Met	Glu
			20					25					30		

Gln Gly Leu Glu Glu Glu Glu Glu Val Asp Pro Arg Ile Gln Gly Glu
 35 40 45
 Leu Glu Lys Leu Asn Gln Ser Thr Asp Asp Ile Asn Arg Arg Glu Thr
 50 55 60
 Glu Leu Glu Asp Ala Arg Gln Lys Phe Arg Ser Val Leu Val Glu Ala
 65 70 75 80
 Thr Val Lys Leu Asp Glu Leu Val Lys Lys Ile Gly Lys Ala Val Glu
 85 90 95
 Asp Ser Lys Pro Tyr Trp Glu Ala Arg Arg Val Ala Arg Gln Ala Gln
 100 105 110
 Leu Glu Ala Gln Lys Ala Thr Gln Asp Phe Gln Arg Ala Thr Glu Val
 115 120 125
 Leu Arg Ala Ala Lys Glu Thr Ile Ser Leu Ala Glu Gln Arg Leu Leu
 130 135 140
 Glu Asp Asp Lys Arg Gln Phe Asp Ser Ala Trp Gln Glu Met Leu Asn
 145 150 155 160
 His Ala Thr Gln Arg Val Met Glu Ala Glu Gln Thr Lys Thr Arg Ser
 165 170 175
 Glu Leu Val His Lys Glu Thr Ala Ala Arg Tyr Asn Ala Ala Met Gly
 180 185 190
 Arg Met Arg Gln Leu Glu Lys Lys Leu Lys Arg Ala Ile Asn Lys Ser
 195 200 205
 Lys Pro Tyr Phe Glu Leu Lys Ala Lys Tyr Tyr Val Gln Leu Glu Gln
 210 215 220
 Leu Lys Lys Thr Val Asp Asp Leu Gln Ala Lys Leu Thr Leu Ala Lys
 225 230 235 240
 Gly Glu Tyr Lys Met Ala Leu Lys Asn Leu Glu Met Ile Ser Asp Glu
 245 250 255
 Ile His Glu Arg Arg Arg Ser Ser Ala Met Gly Pro Arg Gly Cys Gly
 260 265 270
 Val Gly Ala Glu Gly Ser Ser Thr Ser Val Glu Asp Leu Pro Gly Ser
 275 280 285
 Lys Pro Glu Pro Asp Ala Ile Ser Val Ala Ser Glu Ala Phe Glu Asp
 290 295 300
 Asp Ser Cys Ser Asn Phe Val Ser Glu Asp Asp Ser Glu Thr Gln Ser
 305 310 315 320
 Val Ser Ser Phe Ser Ser Gly Pro Thr Ser Pro Ser Glu Met Pro Asp
 325 330 335
 Gln Phe Pro Ala Val Val Arg Pro Gly Ser Leu Asp Leu Pro Ser Pro

	340		345		350										
Val	Ser	Leu	Ser	Glu	Phe	Gly	Met	Met	Phe	Pro	Val	Leu	Gly	Pro	Arg
	355		360		365										
Ser	Glu	Cys	Ser	Gly	Ala	Ser	Ser	Pro	Glu	Cys	Glu	Val	Glu	Arg	Gly
	370		375		380										
Asp	Arg	Ala	Glu	Gly	Ala	Glu	Asn	Lys	Thr	Ser	Asp	Lys	Ala	Asn	Asn
385			390		395										400
Asn	Arg	Gly	Leu	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Ser	Lys	Ser
			405		410										415
Gln	Ser	Ser	Thr	Ser	Pro	Glu	Gly	Gln	Ala	Leu	Glu	Asn	Arg	Met	Lys
			420		425										430
Gln	Leu	Ser	Leu	Gln	Cys	Ser	Lys	Gly	Arg	Asp	Gly	Ile	Ile	Ala	Asp
			435		440										445
Ile	Lys	Met	Val	Gln	Ile	Gly									
	450				455										
<210>	3														
<211>	14														
<212>	PRT														
<213>	智人(Homo sapiens)														
<400>	3														
Phe	Arg	Ser	Val	Leu	Val	Glu	Ala	Thr	Val	Lys	Leu	Asp	Glu		
1			5						10						
<210>	4														
<211>	14														
<212>	PRT														
<213>	智人(Homo sapiens)														
<400>	4														
Val	His	Lys	Glu	Thr	Ala	Ala	Arg	Tyr	Asn	Ala	Ala	Met	Gly		
1			5						10						
<210>	5														
<211>	14														
<212>	PRT														
<213>	智人(Homo sapiens)														
<400>	5														
Met	Gly	Arg	Met	Arg	Gln	Leu	Glu	Lys	Lys	Leu	Lys	Arg	Ala		
1			5						10						
<210>	6														
<211>	14														
<212>	PRT														

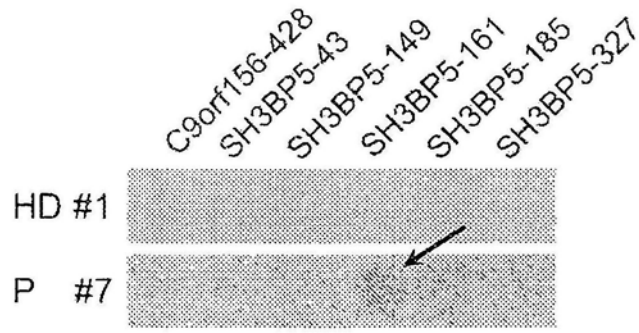


图1

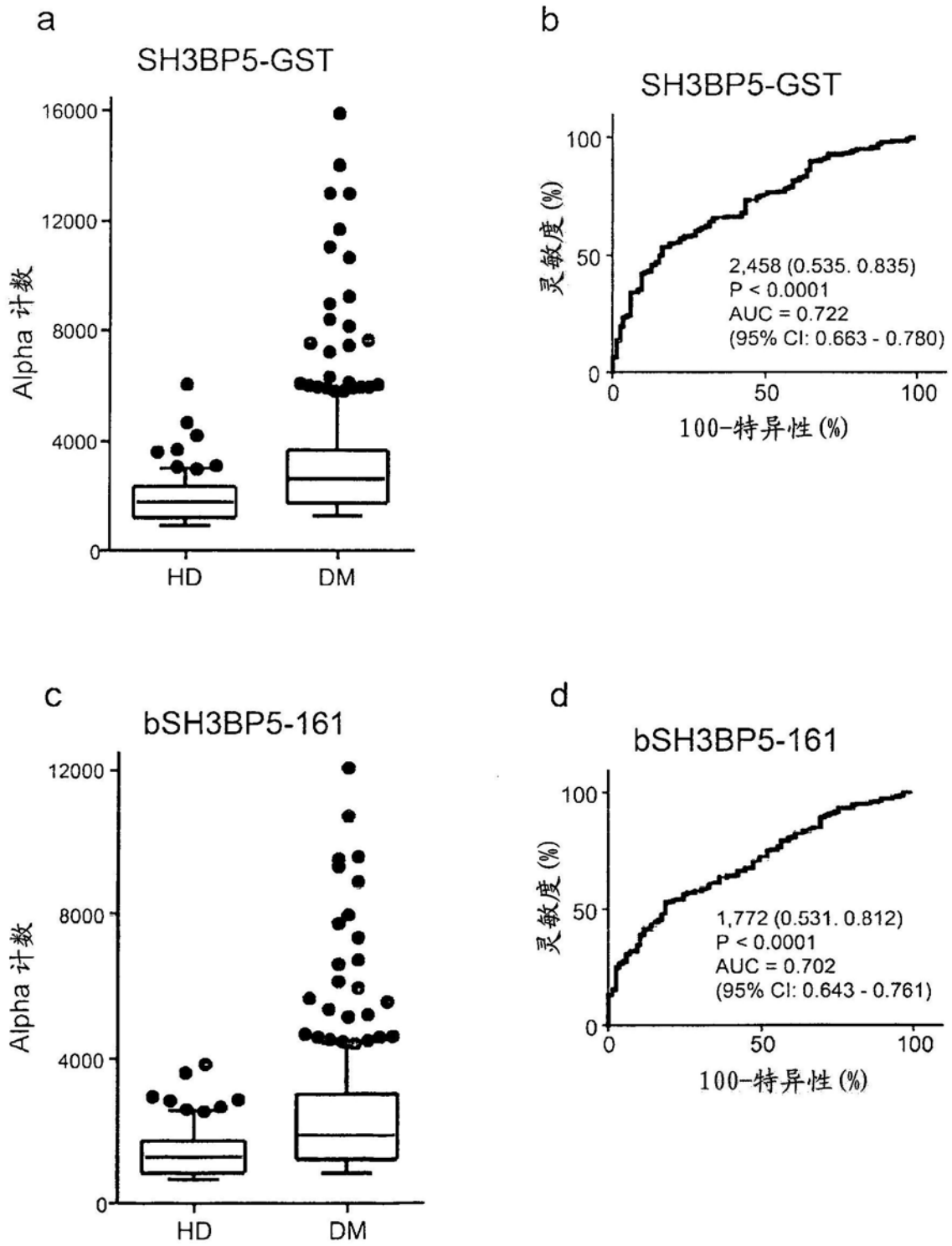


图2

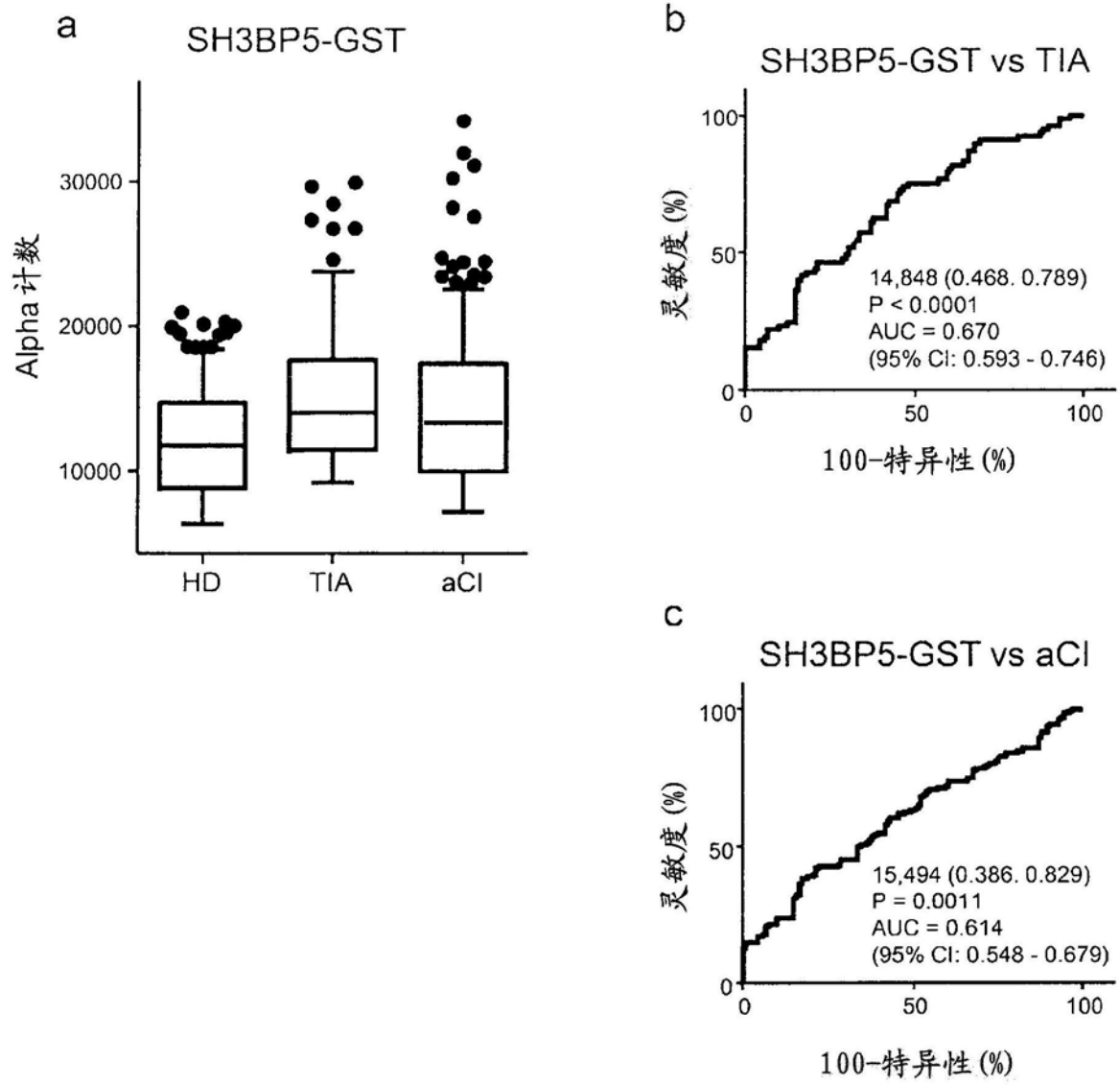


图3-1

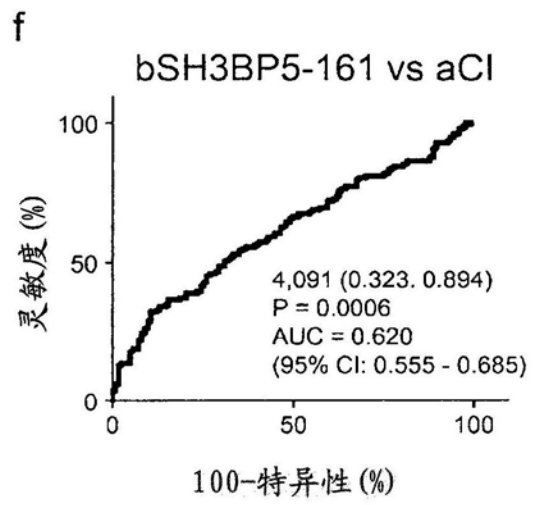
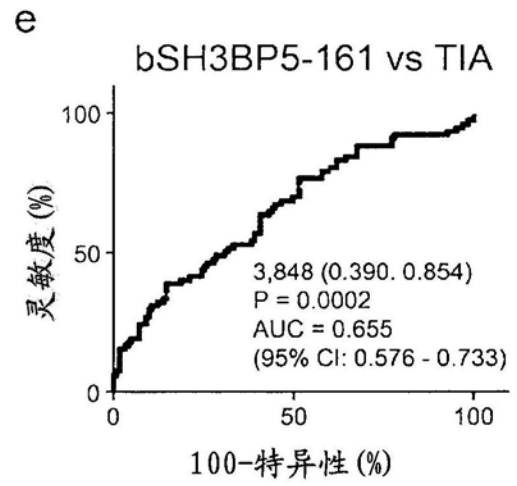
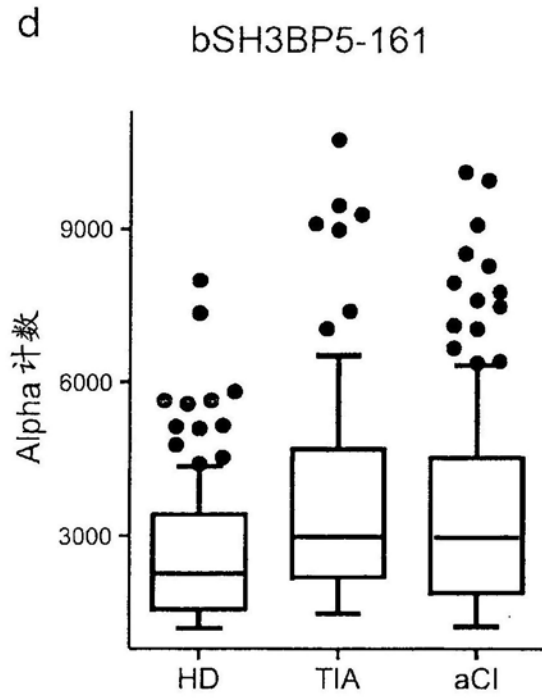


图3-2

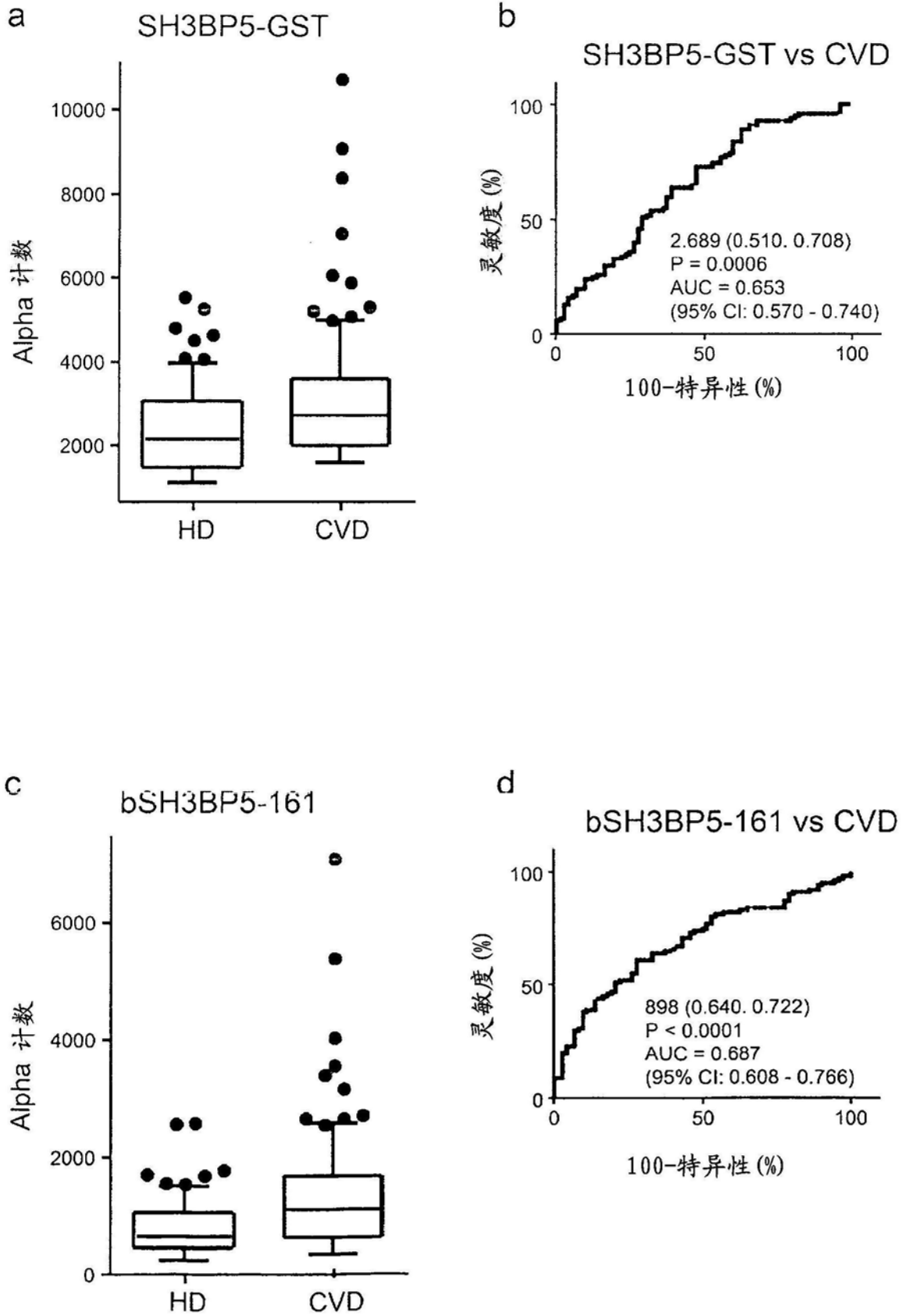


图4

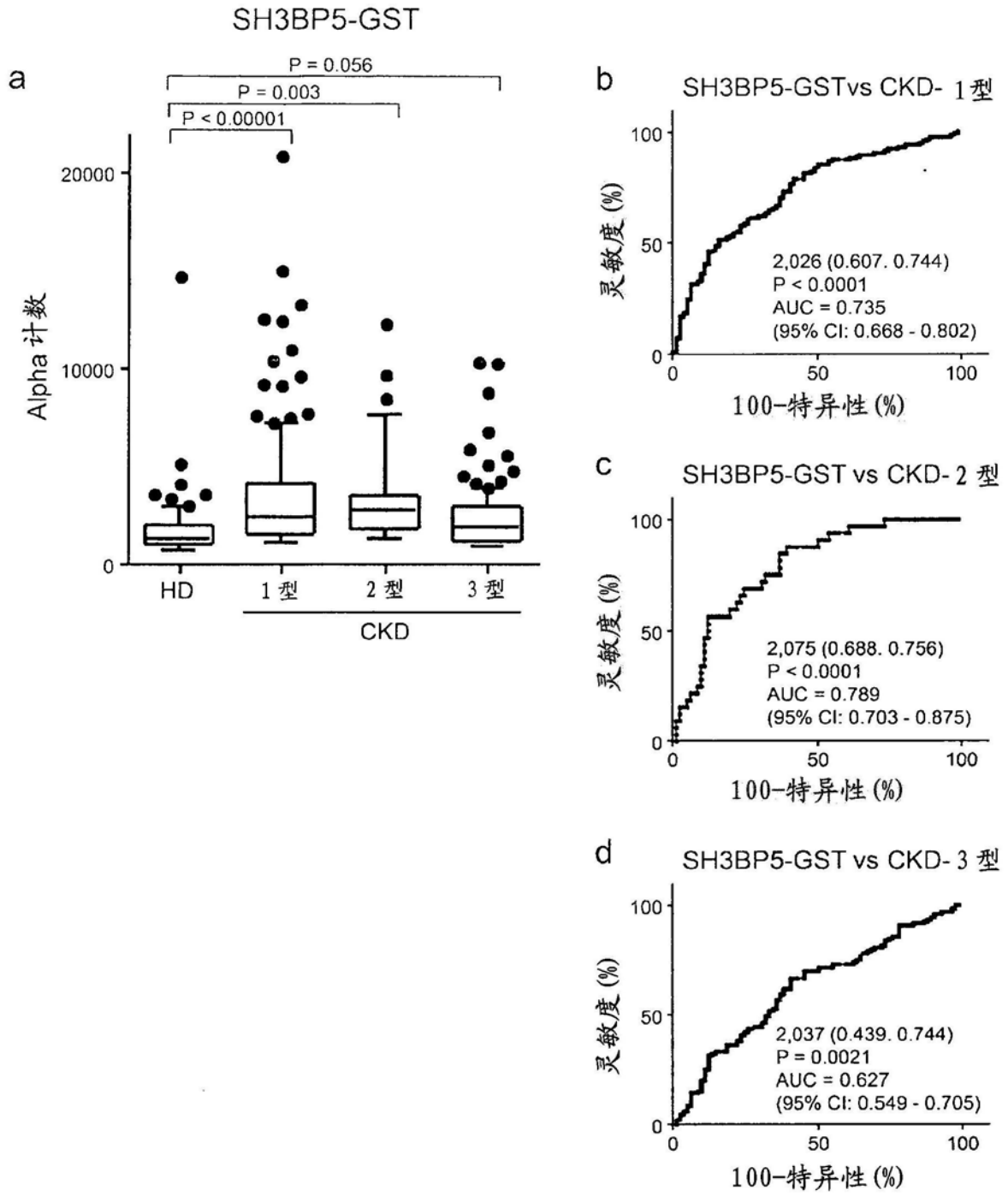


图5-1

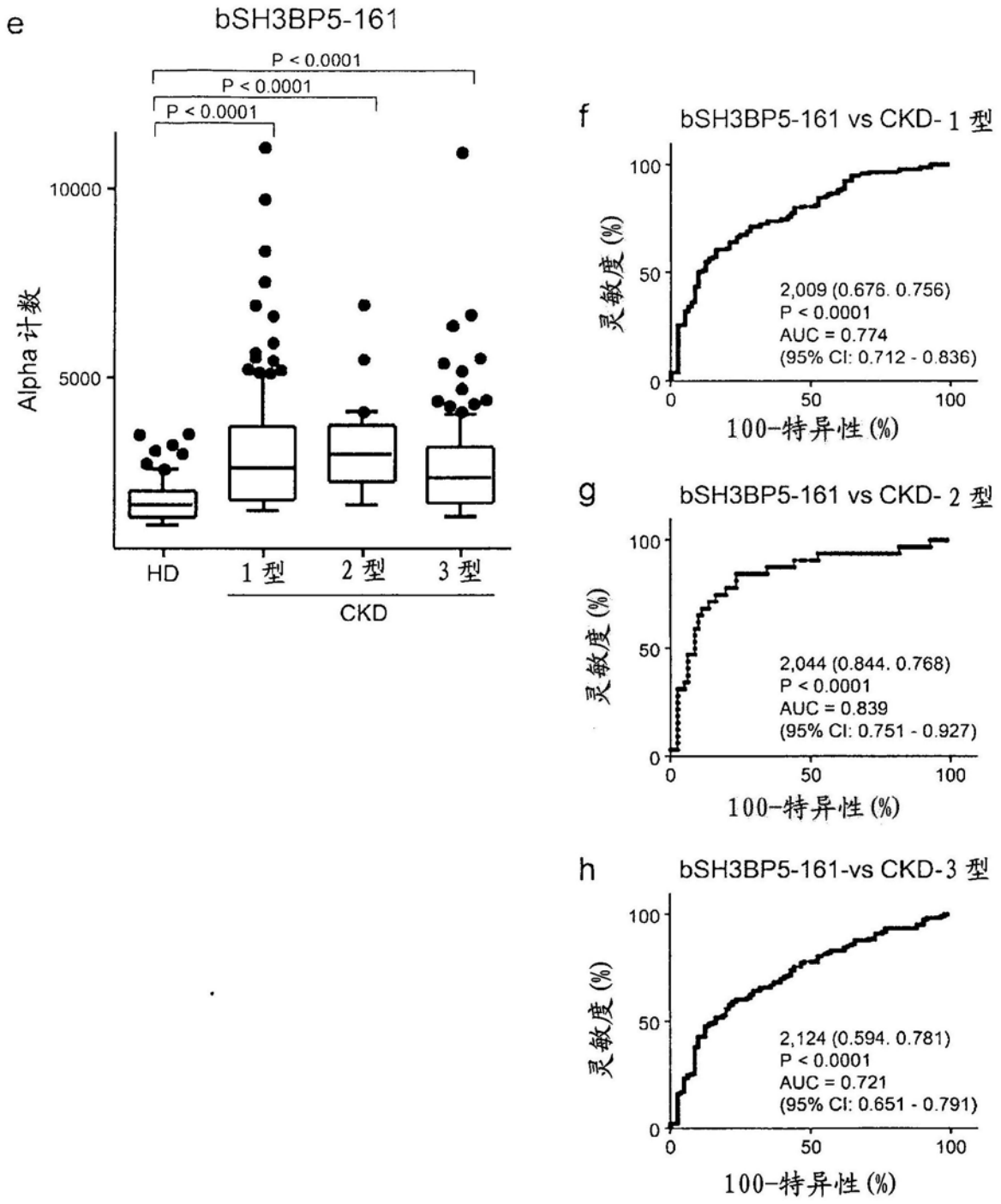


图5-2

专利名称(译)	动脉硬化的检测方法		
公开(公告)号	CN109983343A	公开(公告)日	2019-07-05
申请号	CN201780070241.5	申请日	2017-11-10
[标]申请(专利权)人(译)	藤仓化成株式会社		
申请(专利权)人(译)	藤仓化成株式会社 国立大学法人千叶大学		
当前申请(专利权)人(译)	藤仓化成株式会社 国立大学法人千叶大学		
[标]发明人	黑田英行 中村利华 富吉乡 日和佐隆树		
发明人	黑田英行 中村利华 富吉乡 日和佐隆树		
IPC分类号	G01N33/53		
优先权	2016222657 2016-11-15 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明发现能直接掌握动脉硬化的进程的标志物而旨在提供动脉硬化本身的预防或治疗动机，还提供进行确切的含动脉硬化症的动脉硬化关联疾病的病状掌握的手段，提供关于动脉硬化的进程的数据取得方法，其特征在于，对从生物体分离的体液样品中的针对SH3BP5蛋白质或其一部分的抗体水平进行测定，及，用于进行所述取得方法的，数据取得用试剂盒。

