

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2003 - 304873

(P2003 - 304873A)

(43)公開日 平成15年10月28日(2003.10.28)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 9/64	Z 2 G 0 5 4
	9/64	C 1 2 Q 1/37	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/37		1/68	A 4 B 0 5 0
	1/68	G 0 1 N 21/76	4 B 0 6 3
G 0 1 N 21/76		21/77	Z

審査請求 未請求 請求項の数 28 O L (全 10数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2003 - 73573(P2003 - 73573)

(22)出願日 平成15年3月18日(2003.3.18)

(31)優先権主張番号 10212246.6

(32)優先日 平成14年3月19日(2002.3.19)

(33)優先権主張国 ドイツ(DE)

(31)優先権主張番号 10238429.0

(32)優先日 平成14年8月16日(2002.8.16)

(33)優先権主張国 ドイツ(DE)

(71)出願人 597070264

アベンティス・ベーリング・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング

ドイツ連邦共和国デー - 35002マルブルク・ポストファハ1230

(72)発明者 シュテファン・キーヒル

オーストリア国6170ツィルル・エウエレヴェーク12デー

(74)代理人 100091731

弁理士 高木 千嘉 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 動脈血栓症の危険因子としての第VII因子 - 活性プロテアーゼ (F S A P) のマールブルク I 突然変異体

(57)【要約】

【課題】 動脈血栓症の危険因子としての第VII因子 - 活性プロテアーゼ (F S A P) のマールブルク I 突然変異体の提供。

【解決手段】 特に第VII凝固因子 - 活性プロテアーゼ (= F S A P) の確認された突然変異体のうちの1つから成る新規な動脈血栓症危険因子が記載されている。さらに、凝固因子として確認されたこれらの突然変異体を検出するための診断測定方法が記載されている。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 第VII凝固因子 - 活性プロテアーゼ (= F S A P) の突然変異体を含むアテローム性動脈硬化症危険因子。

【請求項2】 シグナルペプチドを含んでいる F S A P 酵素前駆体の突然変異体がアミノ酸位置 5 3 4 で G l y / G l u 交換を有する請求項1に記載の危険因子。

【請求項3】 シグナルペプチドを含んでいる F S A P 酵素前駆体の DNA 配列の突然変異体がヌクレオチド位置 1 6 0 1 で G / A 塩基交換を有する請求項1に記載の危険因子。

【請求項4】 F S A P 突然変異体が単鎖プラスミノーゲン活性化因子を活性化する能力を失っているか、またはこの能力が減少している請求項1に記載の危険因子。

【請求項5】 F S A P 突然変異体がプロウロキナーゼを活性化する能力を失っているか、またはこの能力が減少している請求項1または4に記載の危険因子。

【請求項6】 特に動脈のアテローム性動脈硬化症の発生の遺伝子的疾病素因を指示する請求項1～5のいずれかに記載の危険因子。

【請求項7】 血栓症、特に動脈血栓症の発生の遺伝子的疾病素因を指示する請求項1～5のいずれかに記載の危険因子。

【請求項8】 アテローム性動脈硬化性疾患または血栓症疾患の発生、およびそれらの動脈および静脈の閉塞疾患などの後遺症の素因を指示する請求項1に記載の危険因子。

【請求項9】 アテローム性動脈硬化性または血栓症の器官機能制限の発生の素因を指示する請求項8に記載の危険因子。

【請求項10】 狭心症、心筋梗塞または脳梗塞の発生の素因を指示する請求項8または9に記載の危険因子。

【請求項11】 単鎖プラスミノーゲン活性化因子、特にプロウロキナーゼの活性化のためのポテンシャルが減少しているアテローム性動脈硬化症危険因子。

【請求項12】 血液中、特に血漿中の F S A P 濃度減少を通じて、単鎖プラスミノーゲン活性化因子、特にプロウロキナーゼの活性化のためのポテンシャルが減少している請求項11に記載のアテローム性動脈硬化症危険因子。

【請求項13】 減少した F S A P 抗原濃度または低下した F S A P 活性をドナーの体液、特に血漿中で測定することを含む、アテローム性動脈硬化症の発生または血栓症の形成に対する遺伝子的疾病素因を識別するための診断方法。

【請求項14】 単鎖プラスミノーゲン活性化因子の活性化のためのポテンシャルがドナーの体液中で測定される、請求項13に記載の診断方法。

【請求項15】 プロウロキナーゼの活性化のためのポテンシャルがドナーの体液中で測定される請求項14に

記載の診断方法。

【請求項16】 ヌクレオチド位置 1 6 0 1 で G / A 塩基交換を有する F S A P 酵素前駆体遺伝子のヘテロ接合またはホモ接合変異体が、ドナーのゲノム DNA またはそこから誘導される mRNA の分析によって検出される請求項13に記載の診断方法。

【請求項17】 突然変異体がタンパク質レベルで検出される請求項13に記載の診断方法。

【請求項18】 突然変異体が特異的モノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いて検出される請求項17に記載の診断方法。

【請求項19】 突然変異体が組織上のまたは組織から抽出される溶液中の組織学的調査によって検出される請求項13に記載の診断方法。

【請求項20】 a) 危険因子を含んでいるかもしれない試料を固体支持体に固定された一次抗体とインキュベートし、それから洗浄し、その後、ラベルされた二次抗体または野生型に対するラベルされた抗体を加え、再び洗浄し、そして二次抗体によって引き出されるシグナルを測定する；または、

b) 危険因子を含んでいるかもしれない試料を固体支持体に固定された野生型に対する一次抗体とインキュベートし、それから洗浄し、次に、ラベルされた二次抗体を加え、再び洗浄し、そして二次抗体によって引き出されるシグナルを測定する；または、

c) 危険因子の存在が調査される試料が支持体に固定され、それがラベルされた抗体のみで、またはラベルしていない抗体との混合物で検出され、続いて、ラベルされた抗体が検出される；または、

d) 支持体上に固定された抗体を、危険因子の存在が調査される試料と、ラベルされた突然変異体の存在下で混合し、そして、標識によって引き出されるシグナルを測定する、請求項13に記載の診断方法。

【請求項21】 F S A P 活性が、プロテアーゼを含有する試料を、プロテアーゼに対する抗体がすでに結合されている固体支持体上でインキュベートし、そして、

結合していない支持体を洗い流した後、支持体の上に固定されたプロテアーゼをその活性の測定を可能にする試薬と共にインキュベートすることにより測定される請求項13に記載の診断方法。

【請求項22】 免疫組織学のためのウエスタンブロット、蛍光活性化セルソーティング (F A C S)、または匹敵する方法において、突然変異体の検出のために抗体が使われる、請求項13～21のいずれかに記載の診断方法。

【請求項23】 請求項13～22に記載の診断方法を実施するための試験システム。

【請求項24】 抗体を含んでいるかもしれない試料を、固体支持体に固定された F S A P および / または F

SAP突然変異体に作用させ、次に洗浄し、そしてプロテアーゼに結合した抗体を検出することを含む、第VII因子 - 活性プロテアーゼ (= F S A P) に対する抗体および/または一つまたは複数のアミノ酸の交換によって形成されるF S A P突然変異体に対する抗体を検出するための診断方法。

【請求項25】 結合したヒト抗体を、ラベルされた抗ヒト免疫グロブリンまたはそのフラグメント、または、ラベルされたプロテインAまたはプロテインGとインキュベートし、結合した、ラベルされた物質によって発されるシグナルを測定する、請求項24に記載の診断方法。

【請求項26】 酵素が結合した抗ヒト抗体またはそのフラグメント、またはプロテインAまたはプロテインGによる、適した色素原性基質または蛍光発生基質の開裂によって生じる吸光の光度測定により、抗体が検出される請求項24に記載の診断方法。

【請求項27】 抗体が、蛍光基でラベルされた結合物質によって生じる蛍光の計測によって検出される、請求項24に記載の診断方法。

【請求項28】 抗体が、放射性基でラベルされた結合物質の放射分析計測によって検出される、請求項24に記載の診断方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】この発明は、第VII因子 - 活性プロテアーゼ (F S A P) の突然変異体、および、アテローム性動脈硬化症の発生と進行の指標としてのF S A Pの血漿レベル増加、そして、その結果として起こる病態生理学的後遺症に関する。

【0002】アテローム性動脈硬化症とは、なかでも、動脈の硬化、肥厚化および弾力の減失と関連し、心筋梗塞および脳梗塞、そして、他の疾患の主な原因と考えられる動脈の病理学的変化である。非常に多くの外生および内生要因がアテローム性動脈硬化症の開始および進行の原因となると思われる、例えば、高血圧、高脂血症、糖尿病、毒素、ニコチン、過剰アルコール消費、そして、炎症などである。これらの影響は、危険因子とされる。しかし、近年の一層の研究および改良分析法により、アテローム性動脈硬化のための更なる危険因子が発見された。

【0003】危険因子は、現場の専門家の中で周知になったBruneck研究などの疫学研究で調査されている。Bruneck (イタリア) の住民1000人が、1990年のこの研究のために集められた。頸動脈の超音波検査および数多くの血液パラメータの分析、および被験者への問診は、アテローム性動脈硬化症の発生およびその進行についての更なる追跡調査のための幅広いデータベースの確立を可能にした。これらの検査は同じ被験者について続けられ、5年間隔で分析された。アテローム性動脈硬化症の発生およびその進行のモデルは、そこから引き出さ

れた。この研究の第1の結果として、アテローム性動脈硬化症の発生と周知の従来危険因子 (例えば上述した高脂血症および他の要因) との間の関連が発見された。しかし、アテローム硬化性プラークが、血管が最高40%塞がれる程度まで付着する場合、他の危険因子が重要になって、アテローム性動脈硬化および血管閉塞の更なる進行に有意に影響する可能性がある。これらの要因は、特に止血に介在する血漿タンパク質を含む。凝固 - 抑制ポテンシャルの減少は、これ (例えばアンチトロンビンまたはプロテインCレベルの減少または他のいわゆるA P C耐性 (活性プロテインC)) に寄与する。したがって、線維素溶解ポテンシャルの減少は、血管閉塞の進行に対する決定的な影響を有することができ、例えば血液中のリポタンパク質 (a) のレベルが増えるときに観察される。

【0004】現在までに、静脈閉塞性の疾患の危険因子 (例えばA P C耐性 (F Vライデン)) が特に確認された。そして、それは、A P C耐性のない被験者と比較して、この突然変異のヘテロ接合体において“ 8 ”のいわゆるオッズ比、すなわち、危険率増加の尺度を有する。他方、動脈の領域においては、この危険因子は、わずかに約“ 2 ”のオッズ比を有するだけである。

【0005】したがって、Bruneck研究の被験者から入手可能な血漿試料およびDNAは、アテローム性動脈硬化症に対する他の危険因子の存在下でもう一度調査され、最近見出された第VII凝固因子 - 活性プロテアーゼ (= F S A P) の突然変異体が特に注目され、今後これをF S A PマールブルクI突然変異体と称する。

【0006】ドイツ特許出願199 03 693 . 4は、血漿から分離されることができ、そして、第VII凝固因子を活性化することが可能であるプロテアーゼを開示している。このプロテアーゼは、また、第VII因子 - 活性プロテアーゼ (F S A P) (または、プラズマヒアルロン酸 - 結合 (セリン) プロテアーゼに対応して、P H B PもしくはP H B S Pとも) とも称する。したがって、F S A Pは、凝結促進性性質を有する。F S A P特有の性質は、プロウロキナーゼなどの単鎖プラスミノーゲン活性化因子または単鎖組織プラスミノーゲン活性化因子 (s c t - P A) を活性化することである。しかし、F S A Pは、単独で、あるいはプラスミノーゲン活性化因子と組み合わせられて、それ相応に使われてフィブリン溶解の助けとなることもできる。例えば血栓症の合併症の場合である。

【0007】現在利用できて、ドイツ特許出願199 03 693 . 4、および199 26 531 . 3に記載されている試験系は、F S A Pを検出するだけでなくF S A P抗原を定量し、血漿中のその活性を測定することも可能にする。抗原測定は、E L I S A試験により行われるのが好ましい。他方、活性は、原則として、プロウロキナーゼのウロキナーゼへの活性化および色素原

性基質の変換を介して、続く吸光度差計測により、測定することができる。

【0008】ドイツ特許出願10052319.6は、平均FSA P抗原含量を有するが、プロウロキナーゼ活性化のためのポテンシャルが著明に減少している被験者の5~10%の確認を可能とするための、健康な血液ドナーの調査でのこれらの試験系の使用を開示する。これは多分、単離された個々のプロテアーゼに当てはまるので、対応するDNAが血液細胞から更なる調査のために分析された。驚くことに、この場合に、特に突然変異を確認することは、可能だった(一塩基変異多型; SNP; 位置1601でのG/A)。この変更は、成熟したタンパク質の位置511、またはシグナルペプチドを含んでいるFSA P酵素前駆体のアミノ酸位置534のGly/Gluアミノ酸交換を、タンパク質にもたらず。このアミノ酸交換は、結果として、プロウロキナーゼをウロキナーゼに活性化する能力の損失、または少なくとも活性の相当な減少をFSA Pにもたらず。上述した突然変異は、FSA PマールブルクIと呼ばれ、平均抗原含量を有するが、プロウロキナーゼからのウロキナーゼ形成における活性が減少している全ての試料において、現在までに見つけられている。

【0009】この突然変異のための確立されたPCR試験は、Bruneck研究のために集められた被験者のDNAを調査するために用いられた。FSA PマールブルクI突然変異は分析された全ての試料の4.5%で見つかった。そして、これらの所見は、アテローム性動脈硬化症の進行および悪化を評価する研究の間に集められた個々のデータを用いて評価された。これにより、FSA PマールブルクI突然変異体が、動脈の血栓症およびアテローム性動脈硬化の悪化の危険因子を表すことが見いだされた。

【0010】したがって、本発明は、第VII凝固因子 - 活性プロテアーゼ (= FSA P) の突然変異体から成るアテローム性動脈硬化症危険因子に関する。これに関連する特に重要な危険因子は、明らかに、シグナルペプチドを含んでいるFSA P酵素前駆体がアミノ酸位置534でGly/Glu交換を有する突然変異体である。

【0011】シグナルペプチドを含んでいるFSA P酵素前駆体の対応するDNA配列は、この場合、ヌクレオチド位置1601でG/A塩基交換を示している。

【0012】驚くべきことに、この突然変異は、特に動脈血栓症を進行させる危険率増加と相関する。“6.6”のオッズ比は、これ、すなわち、静脈領域のAPC耐性の危険率に肩を並べる動脈側の危険率のために算出された。この点について特に驚くべきなのは、この突然変異が、互いに独立した危険因子を表すこと、言い換えれば、すでに知られている全ての危険因子を考慮した後、アテローム性動脈硬化症の発生および進行にそれ自体著しく寄与することである。したがって、特にFSA

PマールブルクI突然変異のこの認識および決定は、アテローム性動脈硬化によっておこる心臓病および血管疾患の診断および治療への期待を高めることができる。このように、アテローム性動脈硬化症は、例えば、狭心症に至り、その後にはしばしば心筋梗塞になる。影響を受ける血管によって、その血管により供給される器官が巻き込まれる。頸動脈の場合、これが栄養および酸素が十分に供給されない脳に起こり、最悪のケースで、脳梗塞に至ることがある。しかし、アテローム性動脈硬化によって影響を受ける他の器官、および、血管閉塞疾患およびその結果としてなる後遺症の危険にさらされる被験者はまた、FSA PマールブルクI突然変異体の影響を受けている。これは結果として、腎臓、肝臓、肺の疾患、および他の疾患に関する問題となり得る。

【0013】FSA PマールブルクI突然変異体を測定するための方法は、上述したドイツ特許出願、特にドイツ特許出願10052319.6に記載されている。これらの方法は、プロテアーゼ活性の測定、好ましくはFSA P抗原試験と合わされた測定、および、適当な試験系による突然変異した領域のヌクレオチド配列の決定を含む。

【0014】したがって本発明のアテローム性動脈硬化症危険因子は、単鎖プラスミノーゲン活性化因子を活性化する能力を失った、またはこの能力が少なくとも正常に機能しないFSA P突然変異体として記載することができる。危険因子は、プロウロキナーゼを活性化する能力を失った、または、この能力が少なくとも低下したFSA P突然変異体によって、特に特徴づけられる。前記FSA P突然変異体の検出は、特に、動脈血栓症の発生の素因、並びに、アテローム性動脈硬化症または血栓症疾患およびそれらの後遺症(例えば動脈および静脈閉塞疾患)の発生の素因をも表す。アテローム性動脈硬化症または血栓症の器官機能制限の進行の素因は、狭心症、心筋梗塞または脳梗塞のよくある原因である。単鎖プラスミノーゲン活性化因子の活性化のためのポテンシャル、特にプロウロキナーゼの活性化のためのポテンシャルが減少することは、全てのケースであることである。この活性化ポテンシャルの減少は、血液において検出されるが、特に血漿で検出される。

【0015】アテローム性動脈硬化症危険因子としてのFSA P突然変異体の大きな重要性を思えば、それを検出するための診断方法は非常に重要である。これは、ドナーの体液、特に血漿中の、減少したFSA P抗原濃度および/またはFSA Pの減少した活性を測定することに基づいている。これは、前記体液中の、単鎖プラスミノーゲン活性化因子の活性化のためのポテンシャル(特に、プロウロキナーゼの活性化のためのポテンシャル)の測定を必要とする。

【0016】特に信頼性が高い方法は、ヌクレオチド位置1601でG/A塩基交換を有するFSA P酵素前駆

体遺伝子のヘテロ接合またはホモ接合変異体を、ドナーのゲノムDNAまたはそこから誘導されるmRNAの分析によって検出することからなる。

【0017】しかし、タンパク質レベルで前記FSA P突然変異体を検出することも同様に可能である。特異的モノクローナルまたはポリクローナル抗体の使用は、特にこれに適している。しかし、最終的には、組織上または組織から抽出される溶液中の組織学的調査方法も利用できる。

【0018】信頼性が高い診断方法は、FSA P突然変異体を含むかもしれない試料を固体支持体に固定した一次抗体とインキュベートすること、それから洗浄すること、続いて、二次の、ラベルされた抗体または野生型に対するラベルされた抗体を加え、再び洗浄すること、そして、二次抗体によって引き出されるシグナルを測定することから成る。

【0019】別の方法は、FSA P突然変異体を含むかもしれない試料を、固体担体に固定された野生型に対する一次抗体とインキュベートし、それから洗浄し、その後、ラベルされた二次抗体を加え、再び洗浄し、二次抗体によって引き出されるシグナルを測定することから成る。

【0020】利用できる更なる方法は、FSA P突然変異体の存在のために調査される試料が支持体に固定されており、そして、それがラベルされた抗体のみで、またはラベルしていない抗体との混合物で検出され、そしてラベルされた抗体を検出するものである。

【0021】最後に、支持体に固定された抗体を、ラベルされた突然変異体の存在下で、FSA P突然変異体の存在のために調査される試料と混合し、そして、標識によって引き出されるシグナルを測定することも可能である。

【0022】FSA P活性が、プロテアーゼを含有する試料を、プロテアーゼに対する抗体がすでに結合されている固体支持体上でインキュベートし、次に、結合していない支持体を洗い落としした後、その上に固定されたプロテアーゼをその活性の測定を可能にする試薬と共にインキュベートすることにより測定される診断方法もまた、役立つと判明した。

【0023】免疫組織学のためのウエスタンブロット、蛍光活性化セルソーティング(FACS)、または匹敵する方法において、突然変異体の検出のために抗体が使われる診断方法もまた、利用可能である。

【0024】本発明の診断方法は、ELISA技術により行われるのが好ましい。これは、FSA Pおよび/またはFSA P突然変異体が、マトリックス例えばマイクロタイタープレートに結合していることを必要とする。FSA Pおよび/またはFSA P突然変異体の最適な提示のために、あらかじめプレートをモノクローナルまたはポリクローナル抗体、または、そのF(ab)₂フラ

グメントまたはFab フラグメントでコーティングし、続いて、FSA Pおよび/またはFSA P突然変異体をローディングすることもできる。FSA Pおよび突然変異体が硫酸デキストラン、ヘパリンおよび類似物質と非常によく結合するので、これらの作用物質であらかじめコーティングすることもまた、FSA Pを結合することによって可能である。支持体またはマイクロタイタープレートが洗われたあと、界面活性剤またはアルブミンなどの、この目的において公知の作用物質により適したところがブロックされ、洗浄され、次に、試験される溶液と共にインキュベートされる。FSA P抗体を含んでいる溶液は、血清、血漿および他の体液と同様、滑液、CSF、唾液、涙、精漿または他の細胞溶菌液であってもよい。

【0025】支持体のインキュベーションおよび洗浄の後、適した検出試薬を使用する。IgG、IgM、IgA、IgEおよび関連したサブクラスなどのさまざまなクラスの抗体を検出するために必要な試験物質は、ラベルをつけられた試薬として市販されている。抗体価の検出および定量化は、抗ヒト抗体に結合した酵素による、色素原性基質の開裂によって誘発される吸光度を測定する光度測定によって行うことができる。しかし、検出のために使用される抗体に結合している蛍光基によって発せられる蛍光を測定することも可能である。最後に、検出のために使用される物質が、放射性基でラベルされている場合、放射分析計測によって検出を実行することも可能である。結合したヒト抗体を、ラベルされた抗ヒト免疫グロブリンまたはそのフラグメント、または、ラベルされたプロテインAまたはプロテインGとインキュベートし、そして、結合した、ラベルされた物質によって発せられるシグナルを測定する診断方法は、多くの例において非常に適しているとすでに立証されている。

【0026】同様に、酵素が結合した抗ヒト抗体またはそのフラグメントまたはプロテインAまたはプロテインGによる、適した色素原性基質または蛍光発生基質の開裂によって生じる吸光の光度測定による、抗体の検出もまた可能である。抗体が、蛍光基でラベルされた結合物質によって生じる蛍光の計測によって検出される診断方法もまた、適している。

【0027】Bruneck研究

研究テーマ：Bruneck研究は、頸動脈アテローム性動脈硬化症を、疫学および病因学的に明らかにすることを目的とする見込み母集団研究である(1-6)。研究個体群は、性別と年齢により階層化された試料として1990年代に集められ、全て40から79歳までのBruneck住民であった(50歳代から80歳代まで各125人の女性と125人の男性、n=1000)。全体で93.6%が参加し、919のデータ収集が完了した。1990年夏から1995年の追跡調査の間(5年間、(Q₁))に、62人の部分群が死亡し、その一方で、

1人の被験者が移転した。残留する個体群の追跡調査は、96.5%完了していた(n=826)(1-3)。研究への参加前、研究についての説明を受けた後で、全ての参加者が同意した。1995年の追跡調査の一部として、DNAを得るために血液試料が採取された。満足できないPCR産物は16のケースにおいて得られた、すなわち、男性と女性810人が主要な分析のために残った。これらの被験者の内、1995年の夏から2000年までの間(5年間 Q_2)に、94人が死亡した。合計675人の被験者が、2000年に再び超音波検査を受けた(生存者の追跡調査比94.3%)(6)。

【0028】病歴および検査：研究プロトコルは、心的および神経学的項目のためにより重要な臨床検査、および、潜在的血管危険因子に起因する、現在または過去の危険度に関する標準化されたアンケートを含んでいた(3-5)。喫煙者および喫煙経験者については、毎日喫煙したタバコの平均と、そして、年あたりのパック数が記録された。アルコール消費量は、1日当りのグラム数として定量化され、4つのカテゴリに分類された(3)。最高血圧および最低血圧は3回測定の平均値をとり、毎回10分休んだ後で測定した。高血圧は、血圧が160/95、または抗高血圧薬の摂取により定義された(WHO定義)。標準化された経口ブドウ糖負荷試験は、糖尿病であることがすでに分かっている被験者を除いて、全ての被験者に行われた。糖尿病は、現在、空腹時血糖濃度が140mg/dl(7.8mmol)、および/または2時間レベルの200mg/dl(11.0のmmol/L)(経口ブドウ糖負荷試験)を有する被験者について記入された。

【0029】実験室方法：被験者が少なくとも12時間絶食および禁煙した後、肘前静脈から採血した(3-6)。総コレステロールおよび高密度リポタンパク質を有するコレステロールは、酵素的に測定され(CHOD-PAP方法、メルク、ダルムシュタット、ドイツ)、そして、リポタンパク質濃度は、ELISA(免疫、ウィーン、オーストリア)を用いて測定された。低密度リポタンパク質を有するコレステロールは、Freidwald式から算出された。フィブリノーゲンは、クラウスの方法により測定され、およびアンチトロンビンIIIは、色原体のアッセイを使用して測定された。第V因子のライデン突然変異は、対立遺伝子特異的PCR増幅によって検出された(3)。

【0030】FSAP抗原濃度およびscuPA-活性化効果は、最近記載されているように測定された(7、8)。簡単に述べると、FSAPに対するモノクローナル抗体(mAb)を用いたELISAが、抗原の定量のために用いられた。抗体がコーティングされたマイクロタイプレート上での免疫吸着、洗浄工程、および、次のFSAPによるプロウロキナーゼの活性化から成る活

性化の分析は、ウロキナーゼに対する色素原性基質のアミド分解を光度測定観測することにより定量化された。200人以上の健康な血液ドナーからプールされた血漿は、両方の分析のための任意の標準として用いられた。血漿当量単位(PEU)は、プールされた血漿1ミリリットル当りに存在するFSAP抗原性活性として定義された。そして、それは平均して12μg/mlに相当する(8)。

【0031】DNA抽出およびFSAP遺伝子型：高品質のDNAは、GenomicPrep血液DNA単離キット(Amersham Pharmacia Biotech)を使用して、凍結された全血から得られた。10mlの抽出されたDNAは、対応するエキソン特異的な前方及び後方プライマー50pmol、1.5mMのMgCl₂、0.2mMのdNTP、およびTaq DNAポリメラーゼ(パーキンエルマー、ランゲン、ドイツ)2.5単位を含んでいるPCR標準反応緩衝液100μl中で増幅された；最初の2分、94で変性した後、94で30秒、50で30秒、および72で40秒の各熱サイクルを35サイクル行い、最後の伸長工程を72で5分間行った。使用される一組のプライマーは、最近詳述されている。

【0032】スキャンングプロトコルおよび超音波終点の定義：超音波検査では、両側の内部頸動脈(球状で末梢部の部分)および総頸動脈(近位で末梢部の部分)が、10MHzのプロープおよび5MHzのドップラーを使用してスキャンされた(1、2)。アテローム性動脈硬化症病変は、2つの超音波の判定基準によって定義された：1)壁面(内腔への突出)、そして、2)壁組織(エコー源性)である。プラークの最大軸直径は、16の血管部分の各々において測定された(血管部分に依存する、10%または15%内部目視ばらつき係数)。脈管内膜媒体の厚みは、総頸動脈の奥の壁で計測された(内部目視ばらつき係数7.9%(n=100))(2)。スキャンは同じ経験豊かな超音波専門家によって、1990年、1995年および2000年に実行された。そして、被験者の臨床所見および実験室値は超音波専門家に知らされていなかった。

【0033】アテローム性動脈硬化の発生は、以前は正常であった部分の新たなプラークの出現によって特徴づけられた。0.7mm(総頸動脈)および1.0mm(内部頸動脈)の閾値は、アテローム性動脈硬化の発生の定義におけるプラーク直径に関する最小限の必要条件として発表された。なぜなら、より小さい病変は、病巣の/拡散した壁の厚くなった部分から見分けることは困難だったからである(1)。非-狭窄性病変の進行は、プラーク直径の測定誤差の2倍を超える相対的な拡大として定義された。現在の分析では、両方の経過は混合され、より簡単な提示のための「初期のアテローム発生」と称される単一の結果カテゴリとされる、なぜなら、記載されている危険因子の大部分がこれらの経過に共通だったとい

う現実のためである。悪化の判定基準が満たされたときはいつでも「進んだアテローム発生」と仮定された、そして、内腔は $>40\%$ 狭くなった。他で記載されているように(1-5)、 40% での分画は我々の個体群の生物学的閾値と一致するように見え、プラークの発育動力学(目立った病変のまばらに発生する病巣の拡大に対する、連続する、ゆっくりとした、そして拡散する成長)、危険率プロフィール(凝血促進危険因子に対する従来の危険因子)、そして、血管再生の経過(不十分である、または無いに等しいことに対する、補填または過度の補填)において著しい変化が起こった、このことは、従来のアテローム発生からアテローム性動脈硬化症への根本的な発病機序のスイッチを示唆している。

【0034】超音波カテゴリの再現性は、「ほとんど完全」だった(>0.8 のカッパ係数、 $n=100$ の再現性試験における、同じ超音波専門家によって実行された2つの独立計測から得られた)(1-3)。

【0035】統計分析: F S A P突然変異とアテローム発生さまざまな病期との間で考えられる関連性は、ロジスティック回帰分析によって調べられた。ベースモデルは、年齢および性に関してのみ調整された。多変量の方程式は、すでに記載されているように、段階的進行の選択手順によってはめ込まれた(記入および除外のp値は、それぞれ、 0.10 および 0.15)(3、10)。個体群試料の年齢および性構造を考慮するため、追加として年齢および性がこれらのモデルに書き込まれた。主な分析は、1990年および1995年の間の(Q_1)期間に集中した。進行したアテローム発生の分析は、研究の開始時にすでに、アテローム性動脈硬化症を患っていた被験者($n=326$)に限定された。

【0036】回帰-標準化されたアテローム発生危険率は、多くの危険因子について算出された。回帰修正手順の最低限の方法が用いられた。なぜなら、それは奇病の仮定に基づかないからである(11)。

【0037】結果

Bruneck研究群($n=810$)において、36人の被験者はF S A PのマルブルクI突然変異体に対してヘテロ接合であり(17人の男性および20人の女性)、被験者1人はホモ接合であった。これは 4.4% (3.0% から 5.8%)の一般住民における全体の保有者比率(95% C I)に対応していた。37人の個体のうち、16人(43パーセント、8人の男性および8人の女性)において、F S A PのマルブルクII突然変異体(E370Q)の同時分離が観察され、その一方で、残りの21人の被験者(57パーセント、9人の男性および12人の女性)において、単離中にマルブルクI突然変異体が生じた。

【0038】部分母集団($n=82$)由来の血漿試料は、F S A P抗原濃度および対応するプロウロキナーゼ-活性化効果について調査された。野生型F S A Pを有

する76人の被験者において、平均($\pm 2 \times S D$)抗原濃度、活性濃度および活性/抗原比率は、それぞれ、 0.991 (0.552 から 1.430) P E U / ml、 1.036 (0.614 から 1.458) P E U / mlおよび 1.07 (0.63 から 1.51)であった。それに対して、この部分群において、マルブルクI突然変異体保有者6人全員が、プロウロキナーゼを活性化するin vitroでの能力(<0.150 から 0.626)および 0.38 から 0.58 の活性/抗原比率において際立った減少を示した。2つの遺伝群において、これらのパラメータの分布には重複がほとんどなかった。

【0039】1990年から1995年の5年追跡調査の間(Q_1)に、研究の810人の被験者のうち計384人(47.4%)が、新たなアテローム性動脈硬化性病変を発生するか、または非狭窄病変の拡大(初期のアテローム発生)を示した、そして、存在前のプラークを有する326人のうち92人(28.2%)は、狭窄変形(進行の進んだアテローム発生)を示した。予想通りに、マルブルクI突然変異体と初期アテローム発生との間に関連は見られなかった(年齢/性は調整された、 0.6 ($0.3 \sim 1.4$)および 0.7 ($0.3 \sim 1.7$)の多変量オッズ比(95% のC I))。これと一致して、野生型F S A Pの保有者(0.95 mm)とF S A PのマルブルクI突然変異体の保有者(0.94 mm; 偏差のための $P=0.853$)との間で、総頸動脈の脈管内膜媒体の厚みに差異はなかった。しかし、このことは、突然変異体が、アテローム発生において進行の進んだ想定されるアテローム性血栓病期への強力な危険因子であることをはっきりさせた(年齢/性調整されたオッズ比(95% C I) 3.5 (1.1 から 11.4)、 $p=0.036$)。この関連性は、他の関連した危険因子についてのロジスティック回帰モデルの調整において、依然として統計的に有意のままだった(表1)。進行の進んだ狭窄アテローム性動脈硬化症のための危険率プロフィールはまた、糖尿病、高いフィブリノーゲン濃度、低いアンチトロンピン濃度、高い血小板算定、喫煙、アルコール消費量(少量では保護的)、 $L p(a) > 0.32$ g / lおよび第V因子のライデン突然変異も含んでいた。危険因子に性特異的な差異は無く、また、年齢、危険率レベル、および生活様式にあわせてまとめられた部分母集団において、マルブルクI突然変異体の差別的な効果の証拠は見られなかった。アスピリン、抗高血圧剤、抗糖尿病薬または脂質低下剤を服用している被験者の除外は同様に、結果に影響を及ぼさなかった。多くの主な危険因子(マルブルクI突然変異体、I G T / 糖尿病、高リポタンパク質(a)濃度、喫煙、第V因子突然変異、高いフィブリノーゲン濃度および低いアンチトロンピン濃度)について、進行の進んだアテローム発生の回帰-標準化された危険率を表1に示す。2つ以上の因子の群を有する被験者はほぼ無条件に進行の進んだアテローム

発生を経験したのに対し、危険因子を全く有していない被験者は、頸動脈狭窄の発生/進行の危険率が低かった。

【0040】マールブルクII突然変異体は、単鎖プラスミノーゲン活性化因子のFSAPによるin vitroでの活性化に対して効果を有しなかった。したがって、この突然変異およびアテローム発生間の関連が我々の分析において見られなかったことは、予想外ではなかった。野生型FSAPを有する被験者と、マールブルクII突然変異体またはマールブルクI突然変異体の保有者、および両方の遺伝子偏向の保有者との比較において、進行したアテローム性動脈硬化の多変量オッズ比(95%CI)は、1.6(0.2から13.7)、(P=0.669)、6.2(1.1から36.0)、(P=0.048)、および*

*7.1(1.1から45.1)、(P=0.037)であった。

【0041】我々の所見がまた、より長い期間にわたって整合していることを証明するために、1990年から2000年の間の10年間の追跡調査期間(Q₁₊₂)のデータについて、計算を繰り返した。これらの方程式において、FSAPのマールブルクI突然変異体と進行したアテローム発生との間の多変量関係(最初の分析に関してと同じ調整)は、さらに統計学的に有意であった(多変量オッズ比(95%CI) 4.1(1.1から14.8)、P=0.045)。

【0042】

【表1】

表1: 年齢、性、FSAPのマールブルクI突然変異体および他の潜在的な血管危険因子による、進行したアテローム発生の多変量ロジスティック回帰分析

変数	平均 ± 標準偏差 (%)		オッズ比 (95% CI)	P 値	工程
	AS - (n=234)	AS + (n=92)			
年齢, 才	64.9±9.2	67.8±8.0	1.87(1.19-2.92)	.0064	0
女性	109(46.6%)	32(34.8%)	0.56(0.25-1.25)	.1555	0
耐糖能				<.0001	1
IGT	20(8.5%)	16(17.4%)	3.31(1.37-7.99)	.0081	
DM	10(8.1%)	21(22.8%)	6.38(2.71-14.99)	<.0001	
タバコ本/日	3.2±7.2	6.6±9.6	1.77(1.30-2.40)	.0003	2
Lp(a) >0.32 g/l	36(15.4%)	25(27.2%)	4.06(1.83-8.96)	.0005	3
アルコール消費量				.0043	4
<1 g/d	114(48.7%)	42(45.6%)	1.00		
1-50 g/d	60(25.7%)	15(16.3%)	0.26(0.10-0.66)	.0046	
51-99 g/d	37(15.8%)	17(18.5%)	1.03(0.40-2.70)	.9475	
≥ 100 g/d	23(9.8%)	18(19.6%)	1.90(0.63-5.69)	.2535	
フィブリノーゲン, g/l	2.7±0.6	2.9±0.6	1.53(1.12-2.09)	.0083	5
マールブルク I FSAP 突然変異	5(2.1%)	8(8.7%)	6.63(1.58-27.72)	.0099	6
第V因子突然変異	5(2.1%)	7(7.6%)	4.70(1.19-18.55)	.0291	7
アンチトロンビンIII, %	96.3±13.0	92.8±16.4	0.74(0.55-1.00)	.0500	8
血小板算定, ×10 ⁹ /l	217.4±56.5	230.3±56.	1.32(0.98-1.77)	.0769	9

【0043】オッズ比(OR)、95%信頼区間(95%CI)、およびP値(P)は、進行したアテローム性動脈硬化症(狭窄性の頸動脈アテローム性硬化症の進行/悪化)の年齢、性、および血管危険因子に関するロジスティック回帰分析から導き出された。モデルは、ステップワイズなプログレッシブセレクションプロセス(ステップ...ステップ入力)によってフィットさせ

られた。ORは、与えられた変数の1-S D単位変更のために算出された。

AS- : 進行の進んだアテローム発生のない群、AS+ : 進行の進んだアテローム発生を有する群。この分析は、1990年の研究の開始時にすでにアテローム性動脈硬化症を罹患していた326人の被験者に焦点が合わせられた。

【0044】参考文献:

1. Kiechl S, Willeit J. The natural course of atherosclerosis. Part I: incidence and progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1480-90.

2. Kiechl S, Willeit J. The natural course of atherosclerosis. Part II: vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1491-8.

3. Willeit J, Kiechl S, Oberhollenzer F, et al. Distinct risk profiles of early and advanced atherosclerosis. Prospective results from the Bruneck Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 529-37.

4. Kiechl S, Egger G, Mayr M, et al. Chronic infections and the risk of carotid atherosclerosis. Prospective results from a large population study. *Circulation* 2001; 103: 1064-70.

5. Kiechl S, Willeit J, Egger G, Poewe W, Oberhollenzer F. Body iron stores and the risk of carotid atherosclerosis. Prospective results from the Bruneck Study. *Circulation* 1997; 96: 3300-7.

6. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, Willeit J, Schwartz DA. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis in humans. *N Engl J Med* 2002; 347 (in press).

7. Roemisch J, Feussner A, Stohr HA. Quantification of the factor VII- and single-chain plasminogen

activator-activating protease in plasmas of healthy subjects. *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 2001; 12: 375-83.

8. Kannemeier C, Feussner A, Stohr HA, Weisse J, Preissner KT, Roemisch J. Factor VII and single-chain plasminogen activator-activating protease: activation and autoactivation of the proenzyme. *Eur J Biochem*. 2001; 268: 3789-96.

9. Roemisch J, Feussner A, Nerlich C, Stoehr HA, Weimer T. The frequent Marburg I polymorphism impairs the prourokinase activating potency of the factor VII-activating protease (FSAP). *Blood Coag Fibrinol* 2002; 13. in press.

10. Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied Logistic Regression*. New York: John Wiley & Sons, 1988.

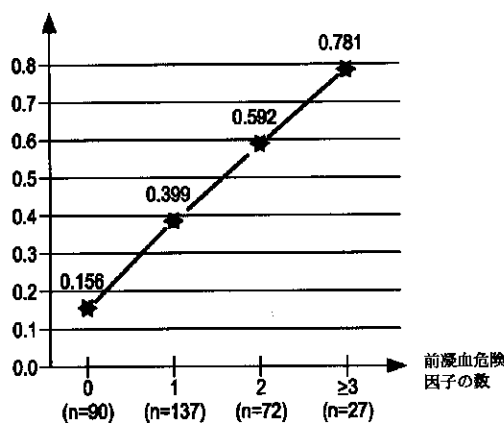
11. Wilcosky TC, Chambless LE. A comparison of direct adjustment and regression adjustment of epidemiological measures. *J. Chron Dis* 1985; 38: 849-56.

【図面の簡単な説明】

20 【図1】 個体に存在する血管危険因子（第VII因子 - 活性プロテアーゼのマルブルク I 突然変異体、IGT / 糖尿病、リポタンパク質 (a) 濃度 > 0.32 g / l、喫煙、第V因子のライデン突然変異、フィブリノーゲン濃度 (Q₅、> 3.2 g / l) およびアンチトロンビン濃度 (Q₁、< 84%)) の機能として、進行したアテローム発生の回帰 - 調整された危険率を示す。

【図1】

進行したアテローム発生 - アテローム性血管症の危険率



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

G 0 1 N 21/77
 21/78
 33/53

識別記号

F I

G 0 1 N 21/78
 33/53

テ-マコード (参考)

Z
 D
 M

			33/543	5 7 5	
	33/543	5 7 5	33/573		A
	33/573		33/577		B
	33/577		C 1 2 N 15/00		A
(72)発明者	ヨハン・ヴィルライト オーストリア国6020インスブルック・ドム プラッツ2		(72)発明者	ハンス - アルノルト・シュテアー ドイツ連邦共和国35083ヴェター・シュー ルシュトラーク66	
(72)発明者	クリスティアン・ヨーゼフ・ヴィーダーマ ン オーストリア国6020インスブルック・ライ トマンシュトラーク35		(72)発明者	フォルカー・デルサム ドイツ連邦共和国35041マルブルク・エー ミール - フォン - ベーリング - シュトラーク セ21	
(72)発明者	ユアゲン・レーミシュ オーストリア国2331フェーゼンドルフ・ラ クセンブルガーシュトラーク152		Fターム(参考)	2G054 AB03 CA22 CA23 CE02 EA03 EA04 GE01 JA01 4B024 AA11 BA14 CA02 CA09 CA12 CA20 GA25 HA11 HA12 HA15 4B050 CC01 DD11 LL03 4B063 QA13 QA17 QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QQ36 QQ44 QQ53 QR08 QR32 QR35 QR40 QR42 QR48 QR56 QR62 QS25 QS33 QS34 QS36 QX01 QX02	
(72)発明者	トーマス・ヴァイマー ドイツ連邦共和国35075グラードンバッハ. リヒャルト - ヴァーグナー - シュトラーク 8				
(72)発明者	アネット・フォイスナー ドイツ連邦共和国35043マルブルク・ラン ゲヴィーゼンヴェーク10				

专利名称(译)	Marburg I因子VII活性蛋白酶 (FSAP) 的突变体是动脉血栓形成的危险因素		
公开(公告)号	JP2003304873A	公开(公告)日	2003-10-28
申请号	JP2003073573	申请日	2003-03-18
申请(专利权)人(译)	安万特灵公司GESELLSCHAFT米特Beshurenkuteru-有限公司		
[标]发明人	シュテファンキーヒル ヨハンヴィルライト クリスティアンヨーゼフヴィーダーマン ユアゲンレーミシュ トーマスヴァイマー アネッテフォイスナー ハンスアルノルトシュテーア フォルカーデルサム		
发明人	シュテファン・キーヒル ヨハン・ヴィルライト クリスティアン・ヨーゼフ・ヴィーダーマン ユアゲン・レーミシュ トーマス・ヴァイマー アネッテ・フォイスナー ハンス-アルノルト・シュテーア フォルカー・デルサム		
IPC分类号	G01N33/53 C12N9/64 C12N15/09 C12Q1/37 C12Q1/68 G01N21/76 G01N21/77 G01N21/78 G01N33/543 G01N33/573 G01N33/577 G01N33/86		
CPC分类号	C12N9/647 G01N33/86		
FI分类号	C12N9/64.Z C12Q1/37 C12Q1/68.A G01N21/76 G01N21/77.Z G01N21/78.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/543.575 G01N33/573.A G01N33/577.B C12N15/00.A G01N21/78.C		
F-TERM分类号	2G054/AB03 2G054/CA22 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/EA04 2G054/GE01 2G054/JA01 4B024/AA11 4B024/BA14 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/GA25 4B024/HA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B050/CC01 4B050/DD11 4B050/LL03 4B063/QA13 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ36 4B063/QQ44 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02		
优先权	10212246 2002-03-19 DE 10238429 2002-08-16 DE		
其他公开文献	JP4348097B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供因子VII-活性蛋白酶 (FSAP) 的Marburg I突变体作为动脉血栓形成的危险因素。特别描述了一种新的动脉血栓形成危险因素，其由已鉴定的因子VII凝血因子活性蛋白酶 (= FSAP) 突变体之一组成。此外，已经描述了用于检测被鉴定为凝血因子的突变体的诊断测定方法。

【図 1】

進行したアテローム発生-アテローム性血管症の危険率

