

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5689426号  
(P5689426)

(45) 発行日 平成27年3月25日 (2015. 3. 25)

(24) 登録日 平成27年2月6日 (2015. 2. 6)

(51) Int. Cl.	F I	
<b>GO 1 N 33/493</b> (2006. 01)	GO 1 N 33/493	A
<b>GO 1 N 33/53</b> (2006. 01)	GO 1 N 33/53	D
<b>GO 1 N 33/68</b> (2006. 01)	GO 1 N 33/53	V
<b>CO 7 K 7/08</b> (2006. 01)	GO 1 N 33/68	
<b>CO 7 K 14/47</b> (2006. 01)	CO 7 K 7/08	Z N A
請求項の数 21 (全 37 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-546555 (P2011-546555)	(73) 特許権者	507084073
(86) (22) 出願日	平成22年1月27日 (2010. 1. 27)		インダストリアル テクノロジー リサー
(65) 公表番号	特表2012-516431 (P2012-516431A)		チ インスティテュート
(43) 公表日	平成24年7月19日 (2012. 7. 19)		I N D U S T R I A L T E C H N O L O
(86) 国際出願番号	PCT/CA2010/000097		G Y R E S E A R C H I N S T I T U
(87) 国際公開番号	W02010/085879		T E
(87) 国際公開日	平成22年8月5日 (2010. 8. 5)		台湾 3 1 0 4 0 シンチュ チュートウ
審査請求日	平成23年8月1日 (2011. 8. 1)		ン チュン シン ロード セクション
(31) 優先権主張番号	61/147, 778		4 ナンバー 1 9 5
(32) 優先日	平成21年1月28日 (2009. 1. 28)	(74) 代理人	100075409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 植木 久一
前置審査		(74) 代理人	100129757
			弁理士 植木 久彦
		(74) 代理人	100115082
			弁理士 菅河 忠志
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 糖尿病性ネフロパシーに関連する尿および血清のバイオマーカー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被検者が糖尿病性ネフロパシーを患っている可能性を推定する方法であって、  
糖尿病性ネフロパシーを患っていると疑われる被検者の尿サンプル中のバイオマーカー  
のレベルを決定するステップであって、前記バイオマーカーは、

VVSLGSPSGEVSHPRKT (配列番号 1) および MGVVSLGSPSGEVSHPRKT (配列番号 2) よりなる  
群から選択される、 - 2 - H S - 糖タンパク質のフラグメント、および  
KGKWERPFVEKDTTEEDF (配列番号 3)、MIEQNTKSPFLMGKVVNPTQK (配列番号 4)、EDPQGDA  
AQKTDTSHHDDQDHPTFNKITPNLAE (配列番号 5)、および EDPQGDAAQKTDTSHHDDQDHPTFNKITPNLAE  
A (配列番号 6) よりなる群から選択される、 - 1 抗トリプシンのフラグメントである  
ステップと；

前記バイオマーカーのレベルに基づいて、前記被検者が糖尿病性ネフロパシーを患っ  
ているか評価するステップと；

からなり、

糖尿病性ネフロパシーを患わない被検者と比較して、前記バイオマーカーのレベルが増  
加するとき、前記被検者は糖尿病性ネフロパシーを患っている可能性が増加していること  
を示すことを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記バイオマーカーは、前記被検者の尿サンプル中の - 1 酸性糖タンパク質のフラグ  
メントを更に含み、前記 - 1 酸性糖タンパク質のフラグメントは、GQEHFAHLLILRDTKTYM



前記臨床学的因子が、年齢、性別、HbA1c、アルブミン/クレアチニン比、および糸球体ろ過量よりなる群から選択されるステップと；

前記バイオマーカーのレベルに基づいて、疾患スコアを計算するステップと；

前記疾患スコアに基づいて、異なる糖尿病性ネフロパシーのステージを示す所定のカットオフ値と比較して、被検者の糖尿病性ネフロパシーステージを評価するステップと；  
からなることを特徴とする方法。

【請求項 1 1】

前記バイオマーカーは、前記被検者の尿サンプル中の - 1 酸性糖タンパク質のフラグメントを更に含み、前記 - 1 酸性糖タンパク質のフラグメントは、GQEHFAHLLILRDTKTYM LAFDVNDEKNWGLS (配列番号 7) である請求項 1 0 に記載の方法。

10

【請求項 1 2】

前記バイオマーカーは、前記被検者の血清サンプル中のオステオポンチンのフラグメントを更に含み、前記オステオポンチンのフラグメントは、YPDVATWLNPDPSQKQKQKLLAPQNAVSS EETNDFKQETLPSK (配列番号 8) およびKYPDAVATWLNPDPSQKQKQKLLAPQTLPSK (配列番号 9) よりなる群から選択される請求項 1 0 または 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記疾患スコアは、リッジ回帰分析、因子分析、判別関数分析、およびロジスティック回帰分析よりなる群から選択される分析により計算される請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4】

被検者中の糖尿病性ネフロパシーの進行をモニタリングする方法であって、  
糖尿病性ネフロパシーを患っていると疑われる被検者の第一と第二の尿サンプル中のバイオマーカーのレベルを決定し、選択的に一つ、またはそれ以上の臨床学的因子を決定するステップであって、前記第二のサンプルは、前記第一のサンプルの 2 週 ~ 1 2 ヶ月後の前記被検者からのものであり、前記バイオマーカーは、  
VVSLGSPSGEVSHPRKT (配列番号 1) および MGVVSLGSPSGEVSHPRKT (配列番号 2) よりなる群から選択される、  
- 2 - H S - 糖タンパク質のフラグメント、および  
KGKWERPFVEKDTTEEDF (配列番号 3)、MIEQNTKSPFLMGKVVNPTQK (配列番号 4)、EDPQGDA  
AQKTDTSHHDDQDHPTFNKITPNLAE (配列番号 5)、および EDPQGDA  
AQKTDTSHHDDQDHPTFNKITPNLAE  
A (配列番号 6) よりなる群から選択される、  
- 1 抗トリプシンのフラグメントであり

20

30

前記臨床学的因子が、年齢、性別、HbA1c、アルブミン/クレアチニン比、および糸球体ろ過量よりなる群から選択されるステップと；

前記第一および第二のサンプルのバイオマーカーのレベルのそれぞれに基づいて、第一の疾患スコアおよび第二の疾患スコアを計算するステップと；

前記被検者の疾病進行を評価するステップと；

からなり、

前記第二の疾患スコアが前記第一の疾患スコアより高いとき、糖尿病性ネフロパシーの悪化を示すことを特徴とする方法。

【請求項 1 5】

前記バイオマーカーは、前記被検者の尿サンプル中の - 1 酸性糖タンパク質のフラグメントを更に含み、前記 - 1 酸性糖タンパク質のフラグメントは、GQEHFAHLLILRDTKTYM LAFDVNDEKNWGLS (配列番号 7) である請求項 1 4 に記載の方法。

40

【請求項 1 6】

前記バイオマーカーは、前記被検者の血清サンプル中のオステオポンチンのフラグメントを更に含み、前記オステオポンチンのフラグメントは、YPDVATWLNPDPSQKQKQKLLAPQNAVSS EETNDFKQETLPSK (配列番号 8) およびKYPDAVATWLNPDPSQKQKQKLLAPQTLPSK (配列番号 9) よりなる群から選択される請求項 1 4 または 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記疾患スコアは、リッジ回帰分析、因子分析、判別関数分析、およびロジスティック

50

回帰分析よりなる群から選択される分析により計算される請求項 14 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

被検者の糖尿病性ネフロパシー治療の有効性を評価する方法であって、  
前記被検者の第一と第二のサンプルのバイオマーカーのレベルを決定し、選択的に一つ、またはそれ以上の臨床学的因子を決定するステップであって、前記第一のサンプルは、前記治療前の前記被検者からのものであり、前記第二のサンプルは、前記治療後の前記被検者からのものであり、前記バイオマーカーは、

VVSLGSPSGEVSHPRKT (配列番号 1) および MGVVSLGSPSGEVSHPRKT (配列番号 2) よりなる群から選択される、  
- 2 - H S - 糖タンパク質のフラグメント、および

KGKWERPFVKDTEEDF (配列番号 3)、MIEQNTKSPFMGKVVNPTQK (配列番号 4)、EDPQGDAQKTDTSHHDDHPTFNKITPNLAE (配列番号 5)、および EDPQGDAQKTDTSHHDDHPTFNKITPNLAEF A (配列番号 6) よりなる群から選択される、  
- 1 抗トリプシンのフラグメントであり

、  
前記臨床学的因子が、年齢、性別、HbA1c、アルブミン/クレアチニン比、および糸球体ろ過量よりなる群から選択されるステップと；

前記第一および第二のサンプルのバイオマーカーのレベルのそれぞれに基づいて、第一の疾患スコアおよび第二の疾患スコアを計算するステップと；

前記被検者の治療の効果を評価するステップと；

からなり、

前記第二の疾患スコアが前記第一の疾患スコア以下であるとき、前記治療が有効であることを示すことを特徴とする方法。

【請求項 19】

前記バイオマーカーは、前記被検者の尿サンプル中の  
- 1 酸性糖タンパク質のフラグメントを更に含み、前記  
- 1 酸性糖タンパク質のフラグメントは、GQEHFAHLLILRDTKTYM LAFDVNDEKNWGLS (配列番号 7) である請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記バイオマーカーは、前記被検者の血清サンプル中のオステオポンチンのフラグメントを更に含み、前記オステオポンチンのフラグメントは、YDPAVATWLNPDPSQKQNLAPQNAVSS EETNDFKQETLPSK (配列番号 8) および KYDPAVATWLNPDPSQKQNLAPQTLPSK (配列番号 9) よりなる群から選択される請求項 18 または 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記疾患スコアは、リッジ回帰分析、因子分析、判別関数分析、およびロジスティック回帰分析よりなる群から選択される分析により計算される請求項 18 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、糖尿病性ネフロパシーに関連する尿および血清のバイオマーカーに関するものである。本願は、2009年1月28日に出願された米国仮出願 No. 61/147, 778 の優先権を主張するものであり、これらの内容は、本明細書中に参考として取り込まれる。

【背景技術】

【0002】

糖尿病性ネフロパシー (DN) は、長期の糖尿病に伴う進行性の肝臓疾病である。それは、異常な流体ろ過を生じ、尿中アルブミンの排泄を増加させ、最終的には、腎臓障害を引き起こす。

【0003】

DN は、その早期の経過では無症状である。よって、この疾病を初期に検出することは困難である。事実、現在の DN の診断は、微量アルブミン尿の進行に基づくが、そのとき

10

20

30

40

50

はすでに腎臓傷害が発生している。早期の診断検査がないことは、早期DNの効果的な治療を阻止している。

【0004】

よって、早期DNを診断するのに有用な信頼性のあるバイオマーカーを同定することが非常に重要である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、上記の問題を解決するため、糖尿病性ネフロパシーに関連する尿および血清のバイオマーカーを提供することを目的とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、数個の尿と血清タンパク質とそれらのフラグメントは、単独でも、組み合わせても、DNを患わない被検者と比較して、DN患者中で異なって存在するとの予期せぬ発見に基づくものである。よって、これらのタンパク質分子は、早期DNを診断する有効なマーカーである。

【0007】

よって、本発明の一態様は、被検者中のDNを診断する方法である。本方法は、(i) DNを有することが疑われる被検者中のバイオマーカーのレベルを決定するステップと、(ii) バイオマーカーのレベルに基づいて、被検者がDNを有するかどうか評価するステップと、の少なくとも二つのステップを含む。DNを患わない被検者と比較して、バイオマーカーのレベルの増加は、被検者がDNを有することを示す。

20

【0008】

この診断法で用いられるバイオマーカーは、以下でリストされる4個のタンパク質分子の一つである：

(i) 第一の尿タンパク質分子は、-2-HS-糖タンパク質前駆体、または少なくとも10個のアミノ酸残基を有するフラグメント、例えば、成熟した-2-HS-糖タンパク質、VWSLGSPSGEVSHPRKT(配列番号1)、またはMGVVSLGSPSGEVSHPRKT(配列番号2)である；

(ii) 第二の尿タンパク質分子は、-1抗トリプシン、または少なくとも10個のアミノ酸残基を有するフラグメント、例えば、KGKWERPFEVKDTEEDF(配列番号3)；MIEQNTKSPFLMGKVVNPTQK(配列番号4)、EDPQGDAQKTDTSHHDQDHPFNKITPNLAE(配列番号5)、またはEDPQGDAQKTDTSHHDQDHPFNKITPNLAEFA(配列番号6)である。

30

(iii) 第三の尿タンパク質分子は、少なくとも10個のアミノ酸残基を有する-1酸性糖タンパク質のフラグメント、例えば、GGEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS(配列番号7)である。

(iv) 血清タンパク質分子は、オステオポンチン、または少なくとも10個のアミノ酸残基を有するフラグメント、例えば、YPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQNAVSSSEETNDFKQETLPSK(配列番号8)、またはKYPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQTLPSK(配列番号9)である。

【0009】

40

上述の診断法は更に、評価ステップの後、バイオマーカーレベルとDNの状態(即ち、早期か末期か)を関連付けるステップを含む。バイオマーカーがタンパク質分子(i)、または(iv)のとき、DNを患わない被検者に比較して、そのレベルの増加は、末期のDNを示す。タンパク質分子(ii)、または(iii)のバイオマーカーについては、早期と末期DNを示す所定の参照バイオマーカーレベルと比較し、そのレベルはDNの状態を示す。

【0010】

別の態様において、本発明の特徴は、被検者(例えば、ヒト患者、または実験動物)のDN治療の有効性を評価する方法にある。本方法は、被検者の治療前と治療後の(i)、(ii)、(iii)、または(iv)のタンパク質分子のレベルを決定し、治療後のバ

50

バイオマーカのレベルの変化に基づいて、治療の効果を評価するステップを含む。治療前のバイオマーカのレベルと比較して、バイオマーカの治療後のレベルが同じか、または低下する場合、その治療が効果的であることを示す。

【0011】

更に別の態様において、本発明の特徴は、DNのステージを決定する方法にあり、少なくとも四つのステップ、(i)糖尿病性ネフロパシーを患ったと疑われる被検者から、尿サンプル、および選択的に血清サンプルを得るステップと、(ii)前の段落でリストされるバイオマーカの一つのレベルを決定するステップと、(iii)バイオマーカのレベルに基づいて、疾患スコアを計算するステップと、(iv)疾患スコアに基づいて、種々の糖尿病性ネフロパシーのステージを示す所定のカットオフ値と比較して、被検者の糖尿病性ネフロパシーのステージを評価するステップと、を含む。この方法において、上記の計算ステップは、リッジ回帰分析、因子分析、判別関数分析、およびロジスティック回帰分析により実行される。

10

【0012】

上述のDN病期診断方法に用いられるバイオマーカは、以下の五種のタンパク質分子の少なくとも二つからなる：前述の(i)-(iv)タンパク質分子、および尿中オステオポンチン、またはそのフラグメントであるタンパク質分子(v)である。一つの例において、バイオマーカは、五種のタンパク質分子の全てからなる。別の例において、(i)-(iii)と(v)タンパク質分子の少なくとも二つからなる。

【0013】

或いは、バイオマーカは、上述の5種のタンパク質分子の少なくとも二種と、一つ、またはそれ以上の臨床学的因子、例えば、年齢、性別、HbA1c、アルブミン/クレアチニン比(ACR)、糸球体ろ過量(GFR)からなる。

20

【0014】

更に別の態様において、本発明は、上述した任意のバイオマーカのレベルに基づいてDNの進行をモニタリングする方法を提供する。本方法は、2週間から12ヶ月の期間(例えば2-24週、または3-12ヶ月)、DNを有することが疑われる被検者から、二つの尿サンプル、および選択的に二つの血清サンプルを得るステップと、バイオマーカの一つのレベルを決定するステップと、バイオマーカレベルに基づいて、疾患スコアを計算するステップと、疾患スコアに基づいて、被検者のDNの進行を評価するステップと、からなる。後に得られたサンプルの疾患スコアが、先に得られたサンプルより高いとき、DNの悪化を示す。

30

【0015】

上述のバイオマーカもまた、DN治療の効果の評価に用いることができる。バイオマーカの一つの治療後のレベルが、同じバイオマーカの治療前のレベルと比較して変化しないか、または低下する場合、この治療は効果的である。

【0016】

本発明は更に、上述の方法で使用される任意のキットを提供する。このキットは、種々の抗原特異性を有する2、3、または4種類の抗体を含む。これらの各抗体は、(i)-2-HS-糖タンパク質、(ii)-1抗トリプシン、(iii)-1酸性糖タンパク質、および(iv)オステオポンチンの一つと結合することができる。一つの例において、このキットは、ここに記載した方法の一つを実施するための、検出用抗原(例えば、DNに関連するバイオマーカ)に特異的な抗体のみを含む。すなわち、キットは、基本的に、このような抗体からなる。

40

【0017】

本発明の範囲にはまた、以下のペプチドの一つに特異的に結合する分離した抗体を含む：

MGVVSLGSPSGEVSHPRKT (配列番号2)、

KGKWERPFVEKDEEEDF (配列番号3)、

MIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK (配列番号4)、

50

EDPQGDAAQKTDTSHHDDHPTFNK ITPNLAEFA (配列番号 6)、  
 GQEHFAHLL ILRDTKYMLADVNDKKNWGLS (配列番号 7)、  
 YPDAVATWLNPDPSQKQ NLLAPQNAVSSEETNDFKQETLPSK (配列番号 8)、および  
 KYPDAVATWLNPDPSQKQ NLLAPQTLPSK (配列番号 9)。

【0018】

ここに用いられる「分離した抗体」の用語は、実質的に、天然に存在する分子を含まない抗体を意味する。より具体的には、その抗体を含む調製物であって、当該調製物中の天然に存在する分子が最大で、乾燥重量の20%を占めるとき、「分離した抗体」とみなされる。純度は、適切な方法、例えば、カラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、およびHPLCで測定することができる。

10

【0019】

上述のいかなる抗体も、本発明の方法を実行するのに有用なキットの作製に用いることができる。

【0020】

以下、本発明の一またはそれ以上の実施形態の詳細を詳述する。本発明の他の特徴または利点は、以下の図および幾つかの実施形態の詳細な説明、更にはまた、添付の特許請求の範囲から明らかである。

【発明の効果】

【0021】

本発明により、糖尿病性ネフロパシーに関連する尿および血清のバイオマーカーを提供することができた。

20

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1A】図1Aは、DN患者の様々な群中の尿中 - 2 - HS - 糖タンパク質 (uDN2) のボックスプロットを示す図である。図1A ~ 図1Dにおいて、ボックスの上端と下端は、ボックス中の横線である中央値に対する25%値と75%値を示す。上の点線は、上のフェンス以下の最大値であり、75%値に1.5四分位範囲を加えた最大値を示しており、下の点線は、下のフェンス以上の最小値であり、25%値から1.5四分位範囲を引いた最小値を示す。

【図1B】図1Bは、DN患者の様々な群中の尿中 - 1 抗トリプシン (uDN5) のボックスプロットを示す図である。

30

【図1C】図1Cは、DN患者の様々な群中の尿中 - 1 酸性糖タンパク質 (uGR3) のボックスプロットを示す図である。

【図1D】図1Dは、DN患者の様々な群中の血清オステオポンチン (sDNO) のボックスプロットを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0023】

DNは、糖尿病に関連する腎臓疾患である。それは、5個の進行段階を有する：

ステージ1：特徴は、正常なGFRと正常なアルブミン尿 (ACR < 30 mg / g) の糖尿病；

40

ステージ2：特徴は、糸球体過剰ろ過 (120 mL / 分 / 1.73 m<sup>2</sup>より大きい)、および正常なGFRと正常なアルブミン尿 (ACR < 30 mg / g) を伴う腎腫大；

ステージ3：特徴は、微量アルブミン尿；

ステージ4：特徴は、顕在的アルブミン尿、およびGFRの進行性低下；および

ステージ5：特徴は、15 mL / 分 / 1.73 m<sup>2</sup>より低いGFR。

一般に、ステージ1 - 3は早期とみなされ、ステージ4と5は末期とみなされる。

【0024】

本発明らは、DN、特に、様々なステージのDNと関連する複数のバイオマーカーを同定した。これらのバイオマーカーは、尿中、または血清中のいずれにおいても、以下の四種のタンパク質、およびそれらのフラグメントの一つ、またはそれ以上からなる：(a)

50

- 2 - HS - 糖タンパク質 (GenBank accession no. NP\_001613; 10 - Jan - 2010); (b) - 1 - 抗トリプシン (GenBank accession no. AAB59495; 10 - Jan - 2010); (c) - 1 酸性糖タンパク質 (GenBank accession no. EAW87416; 10 - Jan - 2010); および (d) 分泌型リンタンパク質 1a (GenBank accession no. NP\_001035147; 17 - Jan - 2010)、および分泌型リンタンパク質 1b (GenBank accession no. NP\_000573; 10 - Jan - 2010, ) として知られている二個のアイソフォームを含むオステオポンチンである。

【0025】

10

これらの4種のタンパク質のフラグメントは、最小長さで10個のアミノ酸を有し、好ましくは、最大長さで190~410個のアミノ酸である。例えば、タンパク質(a)、(b)、(c)、および(d)のフラグメントは、それぞれ、357、408、191、および290個のアミノ酸残基を含む。

【0026】

本発明者らはまた、上述のタンパク質/フラグメントの一つ、またはそれ以上からなるバイオマーカー、並びに一つまたはそれ以上の臨床学的因子(例えば、年齢、性別、HbA1c、ACR、およびGFR)は異なるステージのDNに関連することを見出した。

【0027】

よって、本発明の一態様は、上述した任意のバイオマーカーを用いるDNの診断法に関連する。本方法を実施するため、DNを有することが疑われる被検者から、尿サンプルを採集し、必要時、血清サンプルを採集し、常法、例えば、質量分析と免疫分析により、上述の4種のタンパク質またはそれらのフラグメントの一つまたはそれ以上の、尿と血清レベルが決定される。必要であれば、常法により臨床学的因子も決定される。

20

【0028】

バイオマーカーが一つのタンパク質分子を含むとき、被検者のそのレベルを基準点と比較し、被検者がDNを有するか決定する。DNを患わない被検者中の同じバイオマーカーのレベルを示す基準点は、DN患者とDNを患わない被検者の群のバイオマーカーの代表レベルに基づいて決定される。例えば、それはこれらの二群の平均レベルの中間点であり得る。基準点より高いバイオマーカーレベルは、DNを示す。

30

【0029】

バイオマーカーが、少なくとも二つのタンパク質分子、および選択的に少なくとも一つの臨床学的因子を含むとき、タンパク質分子のレベルと臨床学的因子の値は、適切な分析により、バイオマーカーのレベルを特徴とする疾患スコア(例えば、数字で表示される)を生成することができる。この分析の例は、これらに限定されないが、判別関数分析、ロジスティック回帰分析、リッジ回帰分析、主成分分析、因子分析、および一般化線形モデルを含む。次に、疾患スコアを、DNを患わない被検者中の同じバイオマーカーのレベルを示す基準点と比較する。この基準点は、公知の方法により決定され得る。例えば、それは、タンパク質分子の平均レベルを分析することにより得られるスコアで、必要時、同じ分析により、DNを患わない被検者中の臨床学的因子の平均値により得られる。基準点より高い疾患スコアは、DNの存在を示す。

40

【0030】

本発明の別の態様は、上述した任意のバイオマーカーに基づいたDNステージの決定方法に関する。本方法を実施するため、好ましくは、疾患スコアにより表示されるDN患者のバイオマーカーレベルを、異なるDNステージを区分する一組の所定のカットオフ値と比較し、被検者のDNのステージを決定する。このカットオフ値は、同じ分析により、異なるステージのDN患者の同じバイオマーカーの代表レベルを分析することにより判断される。

【0031】

以下の記述は、異なるステージのDNに関連するバイオマーカーに基づいて、上述のカ

50

ットオフ値を決定する工程の例である。

【 0 0 3 2 】

( 1 ) それらの疾病状況 ( 例えば、DN のステージおよび危険因子 ) に従って、DN 患者を異なる群に分ける；

( 2 ) 各患者群中、バイオマーカーを構成するタンパク質分子と臨床学的因子のレベル / 値を決定する。

( 3 ) タンパク質レベルと臨床学的因子の値に適切な分析を行い、疾患スコアを計算するモデル ( 例えば、公式 ) を構築する。

( 4 ) 各患者群を示す疾患スコア ( 例えば、平均値 ) とその他の関連要因、例えば、感度、特異性、陽性予測値 ( P P V ) と陰性予測率 ( N P V ) に基づいて、各疾病のステージのカットオフ値を決定する。

10

【 0 0 3 3 】

このようにして得られる任意のモデルは、受信者動作特性 ( R O C ) 分析により R O C 曲線を生成し、その診断値を評価することができる。任意の多変数モデルは、R O C 分析で、大きい濃度曲線下面積 ( A U C ) を提供する。このモデルとして、以下の例 1 - 3 を参照する。

【 0 0 3 4 】

更に別の態様において、本発明は、上述した任意のバイオマーカーに基づいて被検者のネフロパシーの進行をモニタリングする方法に関する。より具体的には、被検者からの二つの尿サンプル、および / または血清サンプルを、適切な期間 ( 例えば、2 週 ~ 1 2 ヶ月 ) で得て検査し、バイオマーカーの一つのレベルを決定することができる。次に、上述のように、疾患スコアを決定する。後で得られたサンプル中、バイオマーカーのレベルを示す疾患スコアが、先に得られたサンプルより高い場合、それは被検者のDNの悪化を示す。

20

【 0 0 3 5 】

モニタリング方法は、DNを患うヒト被検者、またはDNのリスク者に応用することができる。被検者がDNのリスク者、または早期DNにあるとき、バイオマーカーのレベルは6 ~ 1 2 ヶ月ごとに一回検査し、DNの進行をモニタリングする。被検者がすでに末期DNのとき、好ましくは3 ~ 6 ヶ月ごとに一回、バイオマーカーのレベルを検査する。

【 0 0 3 6 】

上述のモニタリング方法はまた、DNを研究するため、以下に記載の一般方法に基づいて実験動物に応用することができる。ここに用いられる「実験動物」の用語は通常、動物試験に用いられる脊椎動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ、猫、犬、豚、およびヒト以外の霊長類である。好ましくは、2 ~ 2 4 週毎に一回、実験動物を検査し、バイオマーカーのレベルを決定する。

30

【 0 0 3 7 】

任意のバイオマーカーはまた、必要に応じて、被検者の ( 即ち、ヒトのDN患者、またはDNを患う実験動物 ) のDN治療の有効性を評価するのに用いることができる。この方法において、治療前、治療中、および治療後、上述のバイオマーカーの一つのレベルを示す疾患スコアが決定される。治療の過程において、疾患スコアが、同じまま維持されるか、または低下する場合、この治療が効果的であることを示す。

40

【 0 0 3 8 】

ここではまた、上述した任意の方法を実施するのに有効なキットも開示される。このキットは、異なる抗原特異性を有する、2、3、または4種類の抗体を含む。これらの各抗体は、( i ) - 2 - H S - 糖タンパク質、( i i ) - 1 抗トリプシン、( i i i ) - 1 酸性糖タンパク質、または( i v ) オステオポンチンの一つと結合することができる。タンパク質 ( i )、( i i )、( i i i )、および( i v ) に特異的な抗体は、それらのフラグメントであるMGVSVSLGSPSGEVSHPRKT ( 配列番号 2 )、KGKWERPFVEKDTTEEDF ( 配列番号 3 )、MIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK ( 配列番号 4 )、EDPQGDAAQKTDTSHHDQDHPFNKITPNLAEFA ( 配列番号 6 )、GQEHFAHLLILRDTKTYMLADVNDKKNWGLS ( 配列番号 7 )、YPDVATWLNPDPSQ

50

KQNLLAPQNAVSSEETNDFKQETLPSK (配列番号 8)、およびKYPDAVATWLNPDPSQKQNLLAPQTLPSK (配列番号 9) に結合することができ、即ち、これらのフラグメントに含まれるすべての抗体のエピトープに特異的である。一つの例において、このキットは、ここに記載された方法の一つを実施するための検出用抗原 (例えば、DN に関連するタンパク質分子) に特異的な抗体だけを含む。よって、このキットは基本的に、このような抗体からなる。

【0039】

上述のキットは、同じ抗原に結合される二つの異なる抗体 (コーティング抗体と検出抗体) を含み得る。通常、検出抗体は、それ自身により、または他の試薬への結合を介して、検出可能な信号を発光する分子に抱合される。ここに用いられる「抗体」の用語は、全免疫グロブリン、またはそのフラグメント、例えば、抗原 - 結合活性を保留する Fab、  
10  
または F (ab')<sub>2</sub> である。抗体は自然発生するか、または遺伝子操作 (例えば、一本鎖抗体、キメラ抗体、またはヒト化抗体) で生成され得る。

【0040】

本発明のキットに含まれる抗体は、民間のベンダーから入手することができる。あるいは、または公知の方法により調製することができる。例えば、Harlow and Lane, (1988) 抗体: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York を参照。上記のリストされた特定のバイオマーカーに対する抗体を作製するため、任意でキャリアタンパク質 (例えば、KLH) に結合されるマーカーをアジュバントと混合し、宿主動物に注射することができる。次に、動物内で生成される抗体をアフィニティークロマトグラフィーによっ  
20  
て精製することができる。一般的に使用される宿主動物は、ウサギ、マウス、モルモット、およびラット等を含む。免疫反応を増加するのに用いられる様々なアジュバントは、宿主動物種に基づいて選択することができ、フロインドアジュバント (完全、または不完全)、ゲル状鉱物、例えば、水酸化アルミニウム、CpG、表面活性剤、例えば、リゾレシチン、プルロニックポリオール、多価陰イオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシアニン、およびジニトロフェノールを含む。有用なヒトアジュバントは、BCG (カルメット・ゲラン桿菌 (bacille Calmette - Guerin)) およびコリネバクテリウム - パルヴムを含む。ポリクローナル抗体、即ち、抗体分子の不均一集団は、免疫動物の血清中に存在する。

【0041】

モノクローナル抗体、即ち、抗体分子の均質集団は、標準のハイブリドーマ技術 (例えば、Kohler et al. (1975) Nature 256, 495; Kohler et al. (1976) Eur. J. Immunol. 6, 511; Kohler et al. (1976) Eur J Immunol 6, 292; and Hammerling et al. (1981) モノクローナル抗体と T 細胞ハイブリドーマ, Elsevier, N.Y.) を用いて調製され得る。特にモノクローナル抗体は、培養下の連続細胞株により、抗体分子の生成を提供する任意の技術により得られ、例えば、Kohler et al. (1975) Nature 256, 495、および米国特許番号第 4, 376, 110; ヒト B 細胞ハイブリドーマ技術 (Kosbor et al. (1983) Immunol Today 4, 72; Cole et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2026  
40  
、および EBV ハイブリドーマ技術 (Cole et al. (1983) モノクローナル抗体と癌治療, Alan R. Liss, Inc., pp. 77 - 96) などに記載されている。このような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgD、およびそれらのサブクラスを含む免疫グロブリンクラスであり得る。本発明のモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマは、体内、または体外で培養され得る。体内で、モノクローナル抗体の高力価を生成する能力により、特に効果的な生産方法となる。

【0042】

更に抗体フラグメントは、既知の技術により生成することができる。例えば、このようなフラグメントは、これに限定されないが、抗体分子のペプシン消化により生成される F  
50

( a b ' )<sub>2</sub>フラグメント、およびF ( a b ' )<sub>2</sub>フラグメントのジスルフィド架橋を減少させることにより生成されるF a bフラグメントを含む。

【 0 0 4 3 】

更なる説明はないが、当業者なら、前述の説明に基づいて、本発明を最大限に利用することができる。よって、以下の特定の実施形態は、単なる説明とみなされ、いかなる方式でも、本発明の開示を制限しない。ここに記載された全ての公開情報は参照されて組み込まれる。

【 0 0 4 4 】

例 1 : 尿中 - 2 - H S - 糖タンパク質、尿中 - 1 抗トリプシン、尿中 - 1 酸性糖タンパク質、または血清オステオポンチンに基づくDNの診断

10

【 0 0 4 5 】

材料および方法

( i ) 被検者

台湾台北市の三軍総医院 ( T r i - G e n e r a l M i l i t a r y H o s p i t a l ) で、83人の糖尿病患者 ( 「 D M 被検者」と称される )、および82人のDN患者 ( 「 D N 被検者」と称される ) が募集されたが、これは、米国糖尿病協会に基づいて設立された下記基準によるものである :

D M : 糖尿病を患っているが、DNを有していない ( 基準は以下のとおり ) ;

D N : 糖尿病を患い、尿タンパク質の分泌濃度が一日当たり1gより高く、生検により、DNまたは尿毒症が確定される。

20

【 0 0 4 6 】

全被検者を、7 : 3の比率で訓練群とテスト群に分けた。

【 0 0 4 7 】

( i i ) サンプルの収集と処理

上述の各被検者から、朝一番に排出された尿サンプルと血清サンプルを採集した。尿サンプルに含まれるペプチドは、尿のマトリクス支援レーザー脱離 / イオン化飛行時間型質量分析装置 ( M A L D I - T O F - M S )、および i T R A Q ( i s o b a r i c t a g s f o r r e l a t i v e a n d a b s o l u t e q u a n t i f i c a t i o n ) により測定した。

【 0 0 4 8 】

- 2 - H S - 糖タンパク質 ( D N 2 )、- 1 抗トリプシン ( D N 5 )、オステオポンチン ( D N O )、および - 1 酸性糖タンパク質 ( G R 3 ) を含むタンパク質分子は、E L I S A により、尿中と血清サンプル中の濃度を測定するために調べた。具体的には、尿サンプルをプロテアーゼ阻害剤と混合し、希釈バッファで1 : 100に希釈し、血清サンプルを1 : 10に希釈した。希釈した検体は、E L I S A プレートで三回実験した。D N O、D N 2、D N 5、およびG R 3の濃度レベルは、標準のサンドイッチE L I S 方法により測定した。

30

【 0 0 4 9 】

濃度計算には5 - パラメータ標準曲線を用いた。% C V が15以下の標準品とサンプルだけが含まれ、基準に符合しないものは、上述のステップを繰り返した。尿サンプル中のタンパク質レベルは、同じ尿サンプル中、クレアチニンレベルで規格化され、Q u a n t i c h r o m クレアチニンアッセイ ( バイオアッセイシステム、( H a y w a r d ) C a l i f o r n i a , U S A ) により測定した。

40

【 0 0 5 0 】

( i i i ) 統計分析

検査した各タンパク質の尿と血清タンパク質濃度のデータを統計分析し、DN被検者とDM被検者を区別する独自の能力を示すのに a u R O C 範囲 0 . 4 4 - 0 . 8 7 で表した。各被検者に対する、数値の相関関係は、常態テストの結果に基づき、S p e a r m a n や P e a r s o n 分析により決定した。群の平均または中央値の比較は、S t u d e n t T - t e s t、または N o n p a r a m e t r i c M a n n - W h i t n e y T e

50

s tにより適切に行った。p < 0 . 0 5 のとき、統計的有意性が得られた。統計は、平均値 ± 標準誤差 ( S E M )、または [ 2 5 % , 7 5 % ] を伴う中央値で示した。

【 0 0 5 1 】

結果

( i ) 患者の特徴

下記の表 1 と表 2 に、訓練群とテスト群中の患者の特徴、および D M 群と D N 群の患者の特徴を示す。

【 0 0 5 2 】

【表 1】

表 1. 訓練群とテスト群の患者の特徴

	訓練 (n=118)	テスト (n=47)	P 値
年齢、 平均値 (SD)	59. 94 ( 9. 37 )	60. 28 ( 9. 48 )	0. 8362
女性, n (%)	83 (70)	27 (57)	0. 16
MDRD_S_GFR, 平均値 (SD)	86. 56 ( 33. 11 )	83. 05 ( 43. 96 )	0. 5785
ACR (ug/mg), 平均値 (SD)	737. 82 ( 1465. 47 )	1084. 18 ( 2030. 98 )	0. 2239
尿中 TP/Cr (mg/mg), 平均値 (SD)	1. 01 ( 2. 01 )	1 ( 1. 78 )	0. 9963
血清クレアチニン (mg/dL), 平均値 (SD)	1. 02 ( 0. 87 )	1. 34 ( 1. 44 )	0. 0903
HbA1c (%), 平均値 (SD)	8. 49 ( 1. 5 )	8. 29 ( 2. 19 )	0. 5356
マーカー(クレアチニン-調整), 平均値 (SD)			
uDNO (ng/mg)	1452. 71 ( 1416. 7 )	1488. 77 ( 1222. 2 )	0. 8687
sDNO (ng/ml)	40. 65 ( 34. 52 )	38. 35 ( 34. 13 )	0. 6926
uDN2 (ng/mg)	4225. 77 ( 9279. 63 )	5999. 64 ( 10305. 95 )	0. 2983
uDN5 (ng/mg)	15951. 12 ( 94956. 78 )	45479. 82 ( 199827. 84 )	0. 3228
uGR3 (ng/mg)	32823. 47 ( 62290. 96 )	42709. 23 ( 103787. 54 )	0. 5333

【 0 0 5 3 】

10

20

30

40

【表 2】

表 2. DM 群と DN 群の患者の特徴

	訓練 (n=118)			テスト (n=47)		
	DM (n=61)	DN (n=57)	P 値	DM (n=22)	DN (n=25)	P 値
年齢, 平均値 (SD)	57.11 (8.05)	62.96 (9.8)	0.0006	59.09 (8.82)	61.32 (10.09)	0.4230
女性, n (%)	43 (70)	40 (70)	1.00	12 (55)	15 (60)	0.93
MDRD_S_GFR, 平均値 (SD)	111.21 (15.75)	60.18 (25.59)	<.0001	115.6 (33.66)	54.41 (29.79)	<.0001
ACR (ug/mg), 平均値 (SD)	11.35 (6.81)	1515.26 (1815.72)	<.0001	9.63 (5.61)	2029.78 (2432.31)	0.0004
尿中 TP/Gr (mg/mg), 平均値 (SD)	0.17 (0.51)	1.9 (2.56)	<.0001	0.17 (0.32)	1.7 (2.18)	0.0019
血清クレアチニン (mg/dL), 平均値 (SD)	0.66 (0.12)	1.42 (1.12)	<.0001	0.67 (0.15)	1.92 (1.79)	0.0019
HbA1c (%), 平均値 (SD)	8.34 (1.48)	8.7 (1.53)	0.2311	8.37 (1.61)	8.22 (2.66)	0.8238

マーカー(クレアチニン調整), 平均値 (SD)

uDNO (ng/mg)	1422.18 (1105.46)	1366.77 (1347.92)	0.8083	1769.54 (1260.15)	1516.44 (1945.7)	0.5953
sDNO (ng/ml)	29.03 (19.32)	46.17 (37.32)	0.0026	26.2 (11.53)	64.52 (50.47)	0.0010
uDN2 (ng/mg)	1968.47 (4218.58)	8084.87 (13101.68)	0.0013	968.79 (1144.47)	7348.69 (10865.95)	0.0074
uDN5 (ng/mg)	390.24 (1327.63)	40036.86 (147186.58)	0.0467	336.21 (568.08)	71802.69 (264863.27)	0.1899
uGR3 (ng/mg)	3576.06 (13562.8)	67470.92 (105208.28)	<.0001	2447.77 (2742.38)	71693.1 (82996.86)	0.0003

【0054】

DN 被検者と DM 被検者の間で、GFR、ACR、タンパク質、および血清クレアチニンレベルに統計的有意差が観察された。群の間で性別分布の差はなかった。

【0055】

(ii) DN に関連するタンパク質分子

尿中プロテオーム分析により、以下の表 3 でリストされるペプチドは、DM 被検者と DN 被検者からの尿サンプルで異なって存在することが分かった。

【0056】

10

20

30

40

【表3】

ペプチド配列	対応するタンパク質
VVSLGSPSGEVSHPRKT (配列番号 1)	$\alpha$ -2-HS 糖タンパク質 (DN2)
MGVVSLGSPSGEVSHPRKT (配列番号 2)	
KGKWERPFVVDTEEDF (配列番号 3)	$\alpha$ -1-抗トリプシン (DN5)
MIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK (配列番号 4)	
EDPQGDAAQKTDTSHHDQDHTFNKITPNLAE (配列番号 5)	
EDPQGDAAQKTDTSHHDQDHTFNKITPNLAEFA (配列番号 6)	オステオポンチン (DN0)
YPDAVATWLNPDPSQKQ NLLAPQNAVSSEETNDFKQETLPSK (配列番号 8)	
GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (配列番号 7)	$\alpha$ -1 酸性糖タンパク質 (GR3)

10

## 【0057】

ELISA分析により、3つの尿タンパク質分子、即ち、uDN2、uGR3、およびuDN5と、一つの血清タンパク質分子、即ち、sDN0は、DNと関連することが発見された。図1のA-Dおよび表2を参照。より具体的には、DM(DNを患わない者)と比較して、DN被検者中のuDN2、uDN5、uGR3、およびsDN0のレベルが増加することが見出されたが、これは、これらが信頼性のあるDNマーカーであることを示す。更に、マクロアルブミン尿(ACR>300mg/g)を有するDN被検者中のuDN5とuGR3のレベルは、微量アルブミン尿(ACR30mg/g~300mg/g)を示すDN被検者より高かった。マクロアルブミン尿は末期DNの指標であり、微量アルブミン尿は早期DNの指標である。

20

## 【0058】

例2: uDN2、uDN5、uGR3、uDN0、およびsDN0の組み合わせに基づいたDNの病期診断

二つのタンパク質モデル

30

DM被検者とDN被検者中のuDN2、uDN5、uGR3、uDN0、およびsDN0の二つの組み合わせレベルに対し、判別関数分析、ロジスティック回帰分析、およびリッジ回帰分析を行った。これらの研究で得られた結果は、五種のタンパク質、またはそれらのフラグメントの任意の二つの組み合わせが、DNのステージを決定する信頼できるマーカーとして利用できることを示している。

## 【0059】

以下に、二つのタンパク質モデル、即ち、uDN5とuGR3であって、これらの二つのタンパク質分子の組み合わせレベルに基づいて疾患スコアを計算する式の例を示す。以下の表(即ち、表4-9)に、この二つのタンパク質モデルのカットオフ値、感度、特異性、陽性予測値(PPV)、および陰性予測率(NPV)、並びにROC曲線下の面積(AUROC)をリストする。

40

## 【0060】

判別関数分析:

疾患スコア =  $0.3303 \times \log_2 [uDN5] (ng/mg) + 0.2732 \times \log_2 [uGR3] (ng/mg) + 5$

## 【0061】

【表4】

表 4. 尿中アルブミンレベルにより示される DN の早期と末期を示すカットオフ値

	訓練組 (n=118)		テスト組 (n=47)	
	DM 対 DN	DM, 微量アルブミン尿 対 マクロアルブミン尿	DM 対 DN	DM, 微量アルブミン尿 対 マクロアルブミン尿
カットオフ	11.227	11.691	11.227	11.691
感度 (%)	93	93	96	100
特異性 (%)	90	90	77	83
PPV (%)	90	83	83	78
NPV (%)	93	96	94	100
AUROC	0.95	0.96	0.98	0.96

10

【0062】

【表5】

表 5. DN のステージ 1-5 を示すカットオフ値

DN のステージ	訓練組 (n=118)				テスト組 (n=47)			
	1 対 2-5	1-2 対 3-5	1-3 対 4-5	1-4 対 5	1 対 2-5	1-2 対 3-5	1-3 対 4-5	1-4 対 5
カットオフ	11.066	11.227	11.691	14.017	11.066	11.227	11.691	14.017
感度 (%)	75	93	93	75	84	96	100	100
特異性 (%)	89	90	90	90	75	77	83	80
PPV (%)	92	90	83	21	87	83	78	18
NPV (%)	69	93	96	99	71	94	100	100
AUROC	0.86	0.95	0.96	0.95	0.9	0.98	0.96	0.91

20

30

40

【0063】

ロジスティック回帰分析:

$$\text{疾患スコア} = \exp(\text{Logit\_value}) / (1 + \exp(\text{Logit\_value}))$$

$$\text{ここで、Logit\_value} = -12.5332 + 0.7197 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) + 0.4941 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg})$$

【0064】

【表6】

表 6. 尿中アルブミンレベルにより示されるDNの早期と末期を示すカットオフ値

	訓練組 (n=118)		テスト組 (n=47)	
	DM 対 DN	DM, 微量アルブミン尿 対 マクロアルブミン尿	DM 対 DN	DM, 微量アルブミン尿 対 マクロアルブミン尿
カットオフ	0.445	0.676	0.445	0.676
感度 (%)	93	93	100	100
特異性 (%)	90	90	82	83
PPV (%)	90	83	86	78
NPV (%)	93	96	100	100
AUROC	0.95	0.96	0.98	0.97

10

【0065】

【表7】

表 7. DNのステージ1-5を示すカットオフ値

DNのステージ	訓練組 (n=118)				テスト組 (n=47)			
	1 対 2-5	1-2 対 3-5	1-3 対 4-5	1-4 対 5	1 対 2-5	1-2 対 3-5	1-3 対 4-5	1-4 対 5
カットオフ	0.383	0.445	0.676	0.996	0.383	0.445	0.676	0.996
感度 (%)	75	93	93	75	84	100	100	50
特異性 (%)	89	90	90	90	75	82	83	80
PPV (%)	92	90	83	21	87	86	78	10
NPV (%)	69	93	96	99	71	100	100	97
AUROC	0.86	0.95	0.96	0.95	0.9	0.98	0.97	0.88

20

30

【0066】

リッジ回帰分析：

$$\text{疾患スコア} = -1.7697 + 0.1520 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) + 0.2254 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg})$$

【0067】

40

【表 8】

表 8. 尿中アルブミンレベルにより示される DN の早期と末期を示すカットオフ値

	訓練組 (n=118)		テスト組 (n=47)	
	DM, 微量アルブミン尿		DM, 微量アルブミン尿	
	DM 対 DN	対 マクロアルブミン尿	DM 対 DN	対 マクロアルブミン尿
カットオフ	2.254	2.606	2.254	2.606
感度 (%)	93	93	100	94
特異性 (%)	90	90	77	79
PPV (%)	90	83	83	74
NPV (%)	93	96	100	96
AUROC	0.94	0.96	0.98	0.96

10

【0068】

【表 9】

20

表 9. DN のステージ 1-5 を示すカットオフ値

DN のステージ	訓練組 (n=118)				テスト組 (n=47)			
	1	1-2	1-3	1-4	1	1-2	1-3	1-4
	対 2-5	対 3-5	対 4-5	対 5	対 2-5	対 3-5	対 4-5	対 5
カットオフ	2.185	2.254	2.606	4.016	2.185	2.254	2.606	4.016
感度 (%)	75	93	93	75	84	100	94	100
特異性 (%)	89	90	90	90	75	77	79	84
PPV (%)	92	90	83	21	87	83	74	22
NPV (%)	69	93	96	99	71	100	96	100
AUROC	0.86	0.94	0.96	0.95	0.89	0.98	0.96	0.91

30

【0069】

3 種のタンパク質モデル

40

DM 被検者と DN 被検者中の uDN2、uDN5、uGR3、uDNO、および sDN0 の三つの組み合わせレベルに対し、判別関数分析、ロジスティック回帰分析、因子分析、およびリッジ回帰分析を行なった。この結果は、三つのタンパク質の任意の組み合わせが、DN の病期診断の信頼できるマーカーとして用いることができることを示す。

【0070】

以下に、三つのタンパク質モデル、即ち、uDN2、uDN5、および uGR3 であって、これらの三つのタンパク質分子の組み合わせレベルに基づいて疾患スコアを計算する式の例を示す。以下の表（即ち、表 10 - 17）に、この三つのタンパク質モデルのカットオフ値、感度、特異性、PPV、NPV、および AUROC をリストする。

【0071】

50

## 判別関数分析

疾患スコア =  $0.3340 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) - 0.0142 \times \log_2[\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.2784 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg}) + 5$

【 0 0 7 2 】

【表 1 0 】

表 10. 尿中アルブミンレベルにより示される DN の早期と末期を示すカットオフ値

	訓練組 (n=118)		テスト組 (n=47)	
	DM, 微量アルブミン尿		DM, 微量アルブミン尿	
	DM 対 DN	対マクロアルブミン尿	DM 対 DN	対マクロアルブミン尿
カットオフ	11.190	11.663	11.190	11.663
感度 (%)	93	93	96	100
特異性 (%)	90	90	77	83
PPV (%)	90	83	83	78
NPV (%)	93	96	94	100
AUROC	0.95	0.96	0.98	0.96

【 0 0 7 3 】

【表 1 1 】

表 11. DN のステージ 1-5 を示すカットオフ値

DN のステージ	訓練組 (n=118)				テスト組 (n=47)			
	1	1-2	1-3	1-4	1	1-2	1-3	1-4
	対 2-5	対 3-5	対 4-5	対 5	対 2-5	対 3-5	対 4-5	対 5
カットオフ	11.064	11.190	11.663	13.986	11.064	11.190	11.663	13.986
感度 (%)	75	93	93	75	84	96	100	100
特異性 (%)	89	90	90	90	75	77	83	82
PPV (%)	92	90	83	21	87	83	78	20
NPV (%)	69	93	96	99	71	94	100	100
AUROC	0.87	0.95	0.96	0.95	0.9	0.98	0.96	0.91

【 0 0 7 4 】

## 関数分析

疾患スコア =  $0.9190 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) + 0.6997 \times \log_2[\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.9003 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg})$

10

20

30

40

50

【 0 0 7 5 】

【 表 1 2 】

表 12. 尿中アルブミンレベルにより示される DN の早期と末期を示すカットオフ値

	訓練組 (n=118)		テスト組 (n=47)	
	DM, 微量アルブミン尿		DM, 微量アルブミン尿	
	DM 対 DN	対 マクロアルブミン尿	DM 対 DN	対 マクロアルブミン尿
カットオフ	26.356	28.057	26.356	28.057
感度 (%)	84	93	88	100
特異性 (%)	90	90	91	86
PPV (%)	89	83	92	82
NPV (%)	86	96	87	100
AUROC	0.93	0.95	0.99	0.97

10

【 0 0 7 6 】

【 表 1 3 】

表 13. DN のステージ 1-5 を示すカットオフ値

DN のステージ	訓練組 (n=118)				テスト組 (n=47)			
	1	1-2	1-3	1-4	1	1-2	1-3	1-4
	対 2-5	対 3-5	対 4-5	対 5	対 2-5	対 3-5	対 4-5	対 5
カットオフ	25.669	26.356	28.057	36.464	25.669	26.356	28.057	36.464
感度 (%)	68	84	93	75	84	88	100	50
特異性 (%)	89	90	90	90	88	91	86	84
PPV (%)	91	89	83	21	93	92	82	12
NPV (%)	63	86	96	99	74	87	100	97
AUROC	0.83	0.93	0.95	0.95	0.91	0.99	0.97	0.86

30

【 0 0 7 7 】

ロジスティック回帰分析：

$$\text{疾患スコア} = \exp(\text{Logit\_value}) / (1 + \exp(\text{Logit\_value}))$$

ここで、 $\text{Logit\_value} = -11.2820 + 0.8810 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) - 0.3478 \times \log_2[\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.5576 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg})$

【 0 0 7 8 】

40

【表 14】

表 14. 尿中アルブミンレベルにより示される DN の早期と末期を示すカットオフ値

	訓練組 (n=118)		テスト組 (n=47)	
	DM, 微量アルブミン尿		DM, 微量アルブミン尿	
	DM 対 DN	対 マクロアルブミン尿	DM 対 DN	対 マクロアルブミン尿
カットオフ	0.462	0.798	0.462	0.798
感度 (%)	91	88	96	94
特異性 (%)	90	90	82	83
PPV (%)	90	82	86	77
NPV (%)	92	93	95	96
AUROC	0.95	0.96	0.97	0.95

10

【0079】

20

【表 15】

表 15. DN のステージ 1-5 を示すカットオフ値

DN のステージ	訓練組 (n=118)				テスト組 (n=47)			
	1	1-2	1-3	1-4	1	1-2	1-3	1-4
	対 2-5	対 3-5	対 4-5	対 5	対 2-5	対 3-5	対 4-5	対 5
カットオフ	0.361	0.462	0.798	0.997	0.361	0.462	0.798	0.997
感度 (%)	75	91	88	75	90	96	94	100
特異性 (%)	89	90	90	90	75	82	83	82
PPV (%)	92	90	82	21	88	86	77	20
NPV (%)	69	92	93	99	80	95	96	100
AUROC	0.88	0.95	0.96	0.95	0.89	0.97	0.95	0.93

30

リッジ回帰分析：

$$\text{疾患スコア} = -1.2900 + 0.1800 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) - 0.1013 \times \log_2[\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.2505 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg})$$

【0080】

40

【表 16】

表 16. 尿中アルブミンレベルにより示される DN の早期と末期を示すカットオフ値

	訓練組 (n=118)		テスト組 (n=47)	
	DM, 微量アルブミン尿		DM, 微量アルブミン尿	
	DM 対 DN	対 マクロアルブミン尿	DM 対 DN	対 マクロアルブミン尿
カットオフ	2.122	2.831	2.122	2.831
感度 (%)	95	85	100	94
特異性 (%)	90	90	68	86
PPV (%)	90	81	78	81
NPV (%)	95	92	100	96
AUROC	0.95	0.95	0.97	0.95

10

【0081】

【表 17】

表 17. DN のステージ 1-5 を示すカットオフ値

DN のステージ	訓練組 (n=118)				テスト組 (n=47)			
	1	1-2	1-3	1-4	1	1-2	1-3	1-4
	対 2-5	対 3-5	対 4-5	対 5	対 2-5	対 3-5	対 4-5	対 5
カットオフ	2.083	2.122	2.831	3.943	2.083	2.122	2.831	3.943
感度 (%)	78	95	85	75	87	100	94	100
特異性 (%)	89	90	90	90	69	68	86	82
PPV (%)	92	90	81	21	84	78	81	20
NPV (%)	71	95	92	99	73	100	96	100
AUROC	0.88	0.95	0.95	0.95	0.89	0.97	0.95	0.93

20

30

【0082】

4つのタンパク質モデル

DM被検者とDN被検者中のuDN2、uDN5、uGR3、uDNO、およびsDNOの4つの組み合わせレベルに対し、判別関数分析、ロジスティック回帰分析、因子分析、およびリッジ回帰分析を行なった。この結果は、五種のタンパク質、またはそれらのフラグメントの任意の四つの組み合わせが、DNステージを判断する信頼性のあるマーカーとして利用できることを示す。

【0083】

以下に、uDN2、uDN5、uGR3、およびsDNOの四つのタンパク質モデルであって、これらの四つのタンパク質分子の組み合わせレベルに基づいて疾患スコアを計算

40

50

する式の例を示す。以下の表（即ち、表18 - 25）に、この四つのタンパク質モデルの  
カットオフ値、感度、特異性、PPVs、NPVs、およびAUROCをリストする。

【0084】

判別関数分析：

$$\text{疾患スコア} = 0.2972 \times \log_2 [\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) + 0.0159 \times \log_2 [\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.2014 \times \log_2 [\text{uGR3}] (\text{ng/mg}) + 0.5688 \times \log_2 [\text{sDNO}] (\text{ng/ml}) + 5$$

【0085】

【表18】

10

表 18. 尿中アルブミンレベルにより示される DN の早期と末期を示すカットオフ値

	訓練組 (n=118)		テスト組 (n=47)	
	DM 対 DN	DM, 微量アルブミン尿 対 マクロアルブミン尿	DM 対 DN	DM, 微量アルブミン尿 対 マクロアルブミン尿
カットオフ	12.945	13.520	12.945	13.520
感度 (%)	88	95	96	100
特異性 (%)	90	90	82	86
PPV (%)	89	83	86	82
NPV (%)	89	97	95	100
AUROC	0.94	0.96	0.97	0.97

20

【0086】

【表19】

30

表 19. DN のステージ 1-5 を示すカットオフ値

DN のステージ	訓練組 (n=118)				テスト組 (n=47)			
	1 対 2-5	1-2 対 3-5	1-3 対 4-5	1-4 対 5	1 対 2-5	1-2 対 3-5	1-3 対 4-5	1-4 対 5
カットオフ	12.887	12.945	13.520	15.560	12.887	12.945	13.520	15.560
感度 (%)	73	88	95	100	81	96	100	100
特異性 (%)	89	90	90	90	81	82	86	82
PPV (%)	91	89	83	27	89	86	82	20
NPV (%)	67	89	97	100	68	95	100	100
AUROC	0.87	0.94	0.96	0.97	0.93	0.97	0.97	0.89

40

【0087】

因子分析：

$$\text{疾患スコア} = 0.9132 \times \log_2 [\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) + 0.6950 \times 1$$

50

$$\log_2[uDN2](ng/mg) + 0.9080 \times \log_2[uGR3](ng/mg) + 0.4549 \times \log_2[sDNO](ng/ml)$$

【0088】

【表20】

表 20. 尿中アルブミンレベルにより示される DN の早期と末期を示すカットオフ値

	訓練組 (n=118)		テスト組 (n=47)	
	DM 対 DN	DM , 微量アルブミン尿 対 マクロアルブミン尿	DM 対 DN	DM , 微量アルブミン尿 対 マクロアルブミン尿
カットオフ	28.459	30.095	28.459	30.095
感度 (%)	82	93	92	100
特異性 (%)	90	90	91	83
PPV (%)	89	83	92	78
NPV (%)	85	96	91	100
AUROC	0.93	0.96	0.99	0.98

10

20

【0089】

【表21】

表 21. DN のステージ1-5 を示すカットオフ値

DN のステージ	訓練組 (n=118)				テスト組 (n=47)			
	1 対 2-5	1-2 対 3-5	1-3 対 4-5	1-4 対 5	1 対 2-5	1-2 対 3-5	1-3 対 4-5	1-4 対 5
カットオフ	28.347	28.459	30.095	38.624	28.347	28.459	30.095	38.624
感度 (%)	67	82	93	75	81	92	100	50
特異性 (%)	89	90	90	90	94	91	83	84
PPV (%)	91	89	83	21	96	92	78	12
NPV (%)	62	85	96	99	71	91	100	97
AUROC	0.84	0.93	0.96	0.95	0.92	0.99	0.98	0.86

30

40

【0090】

ロジスティック回帰分析：

$$\text{疾患スコア} = \exp(\text{Logit\_value}) / (1 + \exp(\text{Logit\_value}))$$

$$\text{ここで、Logit\_value} = -13.7529 + 0.9460 \times \log_2[uDN5](ng/mg) - 0.3110 \times \log_2[uDN2](ng/mg) + 0.4957 \times \log_2[uGR3](ng/mg) + 0.4787 \times \log_2[sDNO](ng/ml)$$

【0091】

50

【表 2 2】

表 22. 尿中アルブミンレベルにより示される DN の早期と末期を示すカットオフ値

	訓練組 (n=118)		テスト組 (n=47)	
	DM 対 DN	DM, 微量アルブミン尿 対	DM 対 DN	DM, 微量アルブミン尿 対
		マクロアルブミン尿		マクロアルブミン尿
カットオフ	0.423	0.804	0.423	0.804
感度 (%)	91	88	96	100
特異性 (%)	90	90	77	86
PPV (%)	90	82	83	82
NPV (%)	92	93	94	100
AUROC	0.96	0.96	0.97	0.96

10

【 0 0 9 2 】

【表 2 3】

表 23. DN のステージ 1-5 を示すカットオフ値

	訓練組 (n=118)				テスト組 (n=47)			
	DN のステージ 1 対 2-5	1-2 対 3-5	1-3 対 4-5	1-4 対 5	1 対 2-5	1-2 対 3-5	1-3 対 4-5	1-4 対 5
カットオフ	0.341	0.423	0.804	0.998	0.341	0.423	0.804	0.998
感度 (%)	75	91	88	75	90	96	100	100
特異性 (%)	89	90	90	90	75	77	86	82
PPV (%)	92	90	82	21	88	83	82	20
NPV (%)	69	92	93	99	80	94	100	100
AUROC	0.89	0.96	0.96	0.96	0.91	0.97	0.96	0.9

20

30

【 0 0 9 3 】

リッジ回帰分析：

$$\text{疾患スコア} = -1.7588 + 0.1729 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) - 0.0971 \times \log_2[\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.2381 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg}) + 0.1312 \times \log_2[\text{sDNO}] (\text{ng/ml})$$

40

【 0 0 9 4 】

【表 2 4】

表 24. 尿中アルブミンレベルにより示される DN の早期と末期を示すカットオフ値

	訓練組 (n=118)		テスト組 (n=47)	
	DM 対 DN	DM, 微量アルブミン尿	DM 対 DN	DM, 微量アルブミン尿
		対 マクロアルブミン尿		対 マクロアルブミン尿
カットオフ	2. 261	2. 854	2. 261	2. 854
感度 (%)	91	85	96	94
特異性 (%)	90	90	77	90
PPV (%)	90	81	83	85
NPV (%)	92	92	94	96
AUROC	0. 95	0. 95	0. 97	0. 95

10

【 0 0 9 5】

【表 2 5】

表 25. DN のステージ 1-5 を示すカットオフ値

DN のステージ	訓練組 (n=118)				テスト組 (n=47)			
	1	1-2	1-3	1-4	1	1-2	1-3	1-4
	対 2-5	対 3-5	対 4-5	対 5	対 2-5	対 3-5	対 4-5	対 5
カットオフ	2. 079	2. 261	2. 854	3. 950	2. 079	2. 261	2. 854	3. 950
感度 (%)	77	91	85	75	87	96	94	100
特異性 (%)	89	90	90	90	69	77	90	82
PPV (%)	92	90	81	21	84	83	85	20
NPV (%)	70	92	92	99	73	94	96	100
AUROC	0. 89	0. 95	0. 95	0. 95	0. 89	0. 97	0. 95	0. 93

20

30

【 0 0 9 6】

5 つのタンパク質モデル

DM 被検者と DN 被検者中の uDN2、uDN5、uGR3、uDNO、および sDN0 の組み合わせレベルに対し、判別関数分析、ロジスティック回帰分析、因子分析、およびリッジ回帰分析を行なった。この結果は、これらの 5 つのタンパク質、またはそれらのフラグメントの組み合わせが、DN のステージを判断する信頼できるマーカーとして利用できることを示す。

【 0 0 9 7】

以下に、これらの 5 つのタンパク質分子の組み合わせレベルに基づいて疾患スコアを計算する式を示すと共に、表 (即ち、表 2 6 - 3 3) に、この 5 タンパク質モデルのカット

40

50

オフ値、感度、特異性、NPVs、PPVs、およびAUROCをリストする。

【0098】

判別関数分析：

$$\text{疾患スコア} = 0.2780 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) + 0.0231 \times \log_2[\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.2236 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg}) + 0.6043 \times \log_2[\text{sDNO}] (\text{ng/ml}) - 0.1513 \times \log_2[\text{uDNO}] (\text{ng/mg}) + 5$$

【0099】

【表26】

10

表 26. 尿中アルブミンレベルにより示される DN の早期と末期を示すカットオフ値

	訓練組 (n=118)		テスト組 (n=47)	
	DM, 微量アルブミン尿		DM, 微量アルブミン尿	
	DM 対 DN	対 マクロアルブミン尿	DM 対 DN	対 マクロアルブミン尿
カットオフ	11.818	12.164	11.818	12.164
感度 (%)	86	98	96	100
特異性 (%)	90	90	86	86
PPV (%)	89	83	89	82
NPV (%)	87	99	95	100
AUROC	0.94	0.97	0.98	0.98

20

【0100】

【表27】

30

表 27. DN のステージ 1-5 を示すカットオフ値

	訓練組 (n=118)				テスト組 (n=47)			
	DN のステージ 1 対 2-5	1-2 対 3-5	1-3 対 4-5	1-4 対 5	1 対 2-5	1-2 対 3-5	1-3 対 4-5	1-4 対 5
カットオフ	11.766	11.818	12.164	14.432	11.766	11.818	12.164	14.432
感度 (%)	73	86	98	100	81	96	100	100
特異性 (%)	89	90	90	90	88	86	86	82
PPV (%)	91	89	83	27	93	89	82	20
NPV (%)	67	87	99	100	70	95	100	100
AUROC	0.86	0.94	0.97	0.98	0.94	0.98	0.98	0.91

40

【0101】

因子分析：

$$\text{疾患スコア} = 0.9117 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) + 0.6949 \times \log_2[\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.9095 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg})$$

50

$+ 0.4554 \times \log_2 [sDNO] (ng/ml) + 0.0384 \times \log_2 [uDN$   
 $O] (ng/mg)$

【0102】

【表28】

表 28. 尿中アルブミンレベルにより示される DN の早期と末期を示すカットオフ値

	訓練組 (n=118)		テスト組 (n=47)	
	DM, 微量アルブミン尿		DM, 微量アルブミン尿	
	DM 対 DN	対 マクロアルブミン尿	DM 対 DN	対 マクロアルブミン尿
カットオフ	29.475	30.541	29.475	30.541
感度 (%)	81	93	88	100
特異性 (%)	90	90	91	83
PPV (%)	88	83	92	78
NPV (%)	83	96	87	100
AUROC	0.93	0.96	0.99	0.98

【0103】

【表29】

表 29. DN のステージ 1-5 を示すカットオフ値

DN のステージ	訓練組 (n=118)				テスト組 (n=47)			
	1	1-2	1-3	1-4	1	1-2	1-3	1-4
	対 2-5	対 3-5	対 4-5	対 5	対 2-5	対 3-5	対 4-5	対 5
カットオフ	28.740	29.475	30.541	39.042	28.740	29.475	30.541	39.042
感度 (%)	67	81	93	75	81	88	100	50
特異性 (%)	89	90	90	90	94	91	83	84
PPV (%)	91	88	83	21	96	92	78	12
NPV (%)	62	83	96	99	71	87	100	97
AUROC	0.84	0.93	0.96	0.95	0.92	0.99	0.98	0.86

【0104】

ロジスティック回帰分析：

疾患スコア =  $\exp(\text{Logit\_value}) / (1 + \exp(\text{Logit\_value}))$ 、

ここで、 $\text{Logit\_value} = -11.4318 + 0.8188 \times \log_2 [uDN5] (ng/mg) - 0.5376 \times \log_2 [uDN2] (ng/mg) + 0.7561 \times \log_2 [uGR3] (ng/mg) + 0.3940 \times \log_2 [sDNO] (ng/ml) - 0.1741 \times \log_2 [uDNO] (ng/mg)$

【 0 1 0 5 】

【 表 3 0 】

表 30. 尿中アルブミンレベルにより示される DN の早期と末期を示すカットオフ値

	訓練組 (n=118)		テスト組 (n=47)	
	DM, 微量アルブミン尿		DM, 微量アルブミン尿	
	DM 対 DN	対 マクロアルブミン尿	DM 対 DN	対 マクロアルブミン尿
カットオフ	0.436	0.780	0.436	0.780
感度 (%)	91	93	96	100
特異性 (%)	90	90	77	86
PPV (%)	90	83	83	82
NPV (%)	92	96	94	100
AUROC	0.96	0.96	0.97	0.96

10

【 0 1 0 6 】

【 表 3 1 】

表 31. DN のステージ 1-5 を示すカットオフ値

	訓練組 (n=118)				テスト組 (n=47)			
	DN のステージ 1 対 2-5	1-2 対 3-5	1-3 対 4-5	1-4 対 5	1 対 2-5	1-2 対 3-5	1-3 対 4-5	1-4 対 5
カットオフ	0.329	0.436	0.780	0.997	0.329	0.436	0.780	0.997
感度 (%)	75	91	93	100	90	96	100	100
特異性 (%)	89	90	90	90	75	77	86	80
PPV (%)	92	90	83	27	88	83	82	18
NPV (%)	69	92	96	100	80	94	100	100
AUROC	0.89	0.96	0.96	0.96	0.91	0.97	0.96	0.91

20

30

【 0 1 0 7 】

リッジ回帰分析：

$$\begin{aligned} \text{疾患スコア} = & -1.3112 + 0.1648 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) - \\ & 0.0968 \times \log_2[\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.2468 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg}) \\ & + 0.1426 \times \log_2[\text{sDNO}] (\text{ng/ml}) - 0.0552 \\ & \times \log_2[\text{uDNO}] (\text{ng/mg}) \end{aligned}$$

40

【 0 1 0 8 】

【表 3 2】

	訓練組 (n=118)		テスト組 (n=47)	
	DM, 微量アルブミン尿		DM, 微量アルブミン尿	
	DM 対 DN	対 マクロアルブミン尿	DM 対 DN	対 マクロアルブミン尿
カットオフ	2.244	2.729	2.244	2.729
感度 (%)	91	88	96	100
特異性 (%)	90	90	82	90
PPV (%)	90	82	86	86
NPV (%)	92	93	95	100
AUROC	0.95	0.95	0.98	0.97

10

【 0 1 0 9】

【表 3 3】

20

表 33. DN のステージ 1-5 を示すカットオフ値

DN のステージ	訓練組 (n=118)				テスト組 (n=47)			
	1	1-2	1-3	1-4	1	1-2	1-3	1-4
	対 2-5	対 3-5	対 4-5	対 5	対 2-5	対 3-5	対 4-5	対 5
カットオフ	2.043	2.244	2.729	3.913	2.043	2.244	2.729	3.913
感度 (%)	77	91	88	100	87	96	100	100
特異性 (%)	89	90	90	90	69	82	90	80
PPV (%)	92	90	82	27	84	86	86	18
NPV (%)	70	92	93	100	73	95	100	100
AUROC	0.89	0.95	0.95	0.96	0.9	0.98	0.97	0.93

30

【 0 1 1 0】

例 3 : uDN2、uDN5、uGR3、および年齢の組み合わせに基づく DN の病期診断

40

以下に、3つのタンパク質分子、即ち、uDN2、uDN5、およびuGR3と、臨床学的因子、即ち、年齢からなるバイオマーカーのレベルに基づいて判別関数分析、因子分析、ロジスティック回帰分析、およびリッジ回帰分析により決定される疾患スコアを計算する式を示す。また、以下の表（即ち、表 3 4 - 4 1）に、このモデルのカットオフ値、感度、特異性、PPVs、NPVs、およびAUROCをリストする。

【 0 1 1 1】

判別関数分析：

$$\text{疾患スコア} = 0.3342 \times \log_2 [\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) - 0.0201 \times \log_2 [\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.2826 \times \log_2 [\text{uGR3}] (\text{ng/mg}) + 0.0059 \times \text{年齢} (\text{歳}) + 5$$

50

【 0 1 1 2 】

【 表 3 4 】

表 34. 尿中アルブミンレベルにより示される DN の早期と末期を示すカットオフ値

	訓練組 (n=118)		テスト組 (n=47)	
	DM, 微量アルブミン尿		DM, 微量アルブミン尿	
	DM 対 DN	対 マクロアルブミン尿	DM 対 DN	対 マクロアルブミン尿
カットオフ	11.515	12.088	11.515	12.088
感度 (%)	93	93	100	100
特異性 (%)	90	90	77	79
PPV (%)	90	83	83	75
NPV (%)	93	96	100	100
AUROC	0.95	0.96	0.98	0.97

10

20

【 0 1 1 3 】

【 表 3 5 】

表 35. DN のステージ 1-5 を示すカットオフ値

DN のステージ	訓練組 (n=118)				テスト組 (n=47)			
	1	1-2	1-3	1-4	1	1-2	1-3	1-4
	対 2-5	対 3-5	対 4-5	対 5	対 2-5	対 3-5	対 4-5	対 5
カットオフ	11.353	11.515	12.088	14.343	11.353	11.515	12.088	14.343
感度 (%)	75	93	93	75	84	100	100	100
特異性 (%)	89	90	90	90	75	77	79	80
PPV (%)	92	90	83	21	87	83	75	18
NPV (%)	69	93	96	99	71	100	100	100
AUROC	0.87	0.95	0.96	0.95	0.9	0.98	0.97	0.9

30

40

【 0 1 1 4 】

因子分析:

疾患スコア =  $0.9184 \times \log_2 [uDN5] (ng/mg) + 0.7006 \times \log_2 [uDN2] (ng/mg) + 0.9005 \times \log_2 [uGR3] (ng/mg) + 0.1863 \times \text{年齢 (歳)}$

【 0 1 1 5 】

【表 3 6】

表 36. 尿中アルブミンレベルにより示される DN の早期と末期を示すカットオフ値

	訓練組 (n=118)		テスト組 (n=47)	
	DM, 微量アルブミン尿		DM, 微量アルブミン尿	
	DM 対 DN	対 マクロアルブミン尿	DM 対 DN	対 マクロアルブミン尿
カットオフ	38.341	40.075	38.341	40.075
感度 (%)	82	85	96	100
特異性 (%)	90	90	86	83
PPV (%)	89	81	89	78
NPV (%)	85	92	95	100
AUROC	0.93	0.94	0.99	0.98

10

【0116】

【表 3 7】

表 37. DN のステージ 1-5 を示すカットオフ値

DN のステージ	訓練組 (n=118)				テスト組 (n=47)			
	1	1-2	1-3	1-4	1	1-2	1-3	1-4
	対 2-5	対 3-5	対 4-5	対 5	対 2-5	対 3-5	対 4-5	対 5
患者数 (%)	73 (62)	57 (48)	41 (35)	4 (3)	31 (66)	25 (53)	18 (38)	2 (4)
カットオフ	38.341	38.341	40.075	48.538	38.341	38.341	40.075	48.538
感度 (%)	66	82	85	50	81	96	100	50
特異性 (%)	89	90	90	90	88	86	83	89
PPV (%)	91	89	81	15	93	89	78	17
NPV (%)	62	85	92	98	70	95	100	98
AUROC	0.82	0.93	0.94	0.91	0.9	0.99	0.98	0.77

30

【0117】

ロジスティック回帰分析：

$$\text{疾患スコア} = \exp(\text{Logit\_value}) / (1 + \exp(\text{Logit\_value}))$$

40

ここで、 $\text{Logit\_value} = -15.9748 + 0.8688 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) - 0.4966 \times \log_2[\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.6436 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg}) + 0.0879 \times \text{年齢} (\text{歳})$

【0118】

【表 3 8】

表 38. 尿中アルブミンレベルにより示される DN の早期と末期を示すカットオフ値

	訓練組 (n=118)		テスト組 (n=47)	
	DM, 微量アルブミン尿		DM, 微量アルブミン尿	
	DM 対 DN	対 マクロアルブミン尿	DM 対 DN	対 マクロアルブミン尿
カットオフ	0.321	0.889	0.321	0.889
感度 (%)	93	80	100	94
特異性 (%)	90	90	77	83
PPV (%)	90	80	83	77
NPV (%)	93	90	100	96
AUROC	0.96	0.95	0.97	0.95

10

【0119】

【表 3 9】

20

表 39. DN のステージ 1-5 を示すカットオフ値

DN のステージ	訓練組 (n=118)				テスト組 (n=47)			
	1	1-2	1-3	1-4	1	1-2	1-3	1-4
	対 2-5	対 3-5	対 4-5	対 5	対 2-5	対 3-5	対 4-5	対 5
カットオフ	0.301	0.321	0.889	0.997	0.301	0.321	0.889	0.997
感度 (%)	75	93	80	75	87	100	94	100
特異性 (%)	89	90	90	90	75	77	83	89
PPV (%)	92	90	80	21	87	83	77	29
NPV (%)	69	93	90	99	75	100	96	100
AUROC	0.89	0.96	0.95	0.92	0.88	0.97	0.95	0.91

30

【0120】

リッジ回帰分析：

$$\text{疾患スコア} = -2.1690 + 0.1771 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) - 0.1074 \times \log_2[\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.2474 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg}) + 0.0168 \times \text{年齢} (\text{歳})$$

【0121】

40

【表 4 0】

表 40. 尿中アルブミンレベルにより示される DN 早期と末期を示すカットオフ値

	訓練組 (n=118)		テスト組 (n=47)	
	DM , 微量アルブミン尿		DM , 微量アルブミン尿	
	DM 対 DN	対 マクロアルブミン尿	DM 対 DN	対 マクロアルブミン尿
カットオフ	2.139	2.880	2.139	2.880
感度 (%)	93	85	100	89
特異性 (%)	90	90	73	83
PPV (%)	90	81	81	76
NPV (%)	93	92	100	92
AUROC	0.96	0.95	0.98	0.96

10

【 0 1 2 2】

【表 4 1】

20

表 41. DN のステージ 1-5 を示すカットオフ値

DN のステージ	訓練組 (n=118)				テスト組 (n=47)			
	1	1-2	1-3	1-4	1	1-2	1-3	1-4
	対 2-5	対 3-5	対 4-5	対 5	対 2-5	対 3-5	対 4-5	対 5
カットオフ	2.128	2.139	2.880	4.051	2.128	2.139	2.880	4.051
感度 (%)	75	93	85	75	84	100	89	100
特異性 (%)	89	90	90	90	69	73	83	89
PPV (%)	92	90	81	21	84	81	76	29
NPV (%)	69	93	92	99	69	100	92	100
AUROC	0.89	0.96	0.95	0.92	0.89	0.98	0.96	0.92

30

【 0 1 2 3】

別の実施形態

本明細書で開示される全ての特徴は、任意の組み合わせで組み合わせても良い。本明細書で開示される各特徴は、同等、等価、または類似の目的により代替することができる。よって、明確な説明がない限り、開示される全特徴は、単に相同または類似の特徴による一般的な例である。

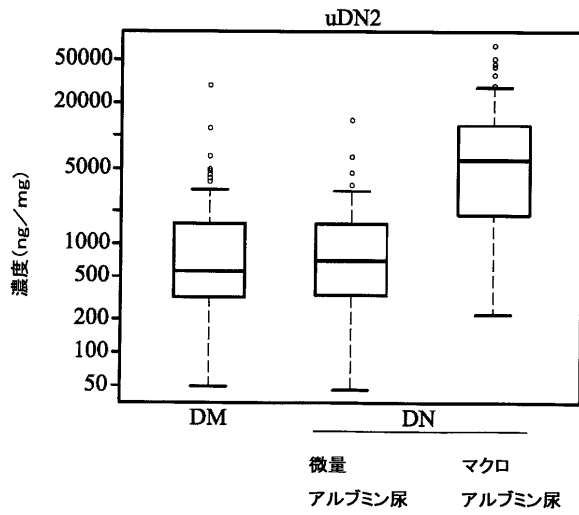
【 0 1 2 4】

上記の記載から、当業者であれば、本発明の必須の特徴を容易に確定することができ、本発明の精神および範囲を逸脱することなしに、種々の使用および状態に適合できるように本発明の種々の変更および改変を行なうことができる。従って、他の実施形態もまた、特許請求の範囲の範囲内に包含される。

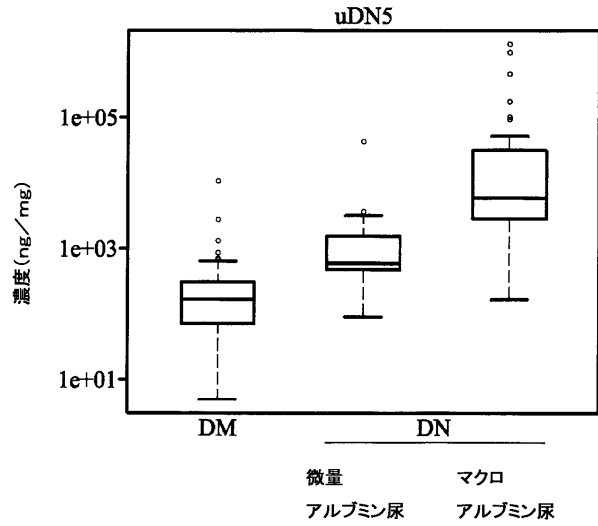
40

50

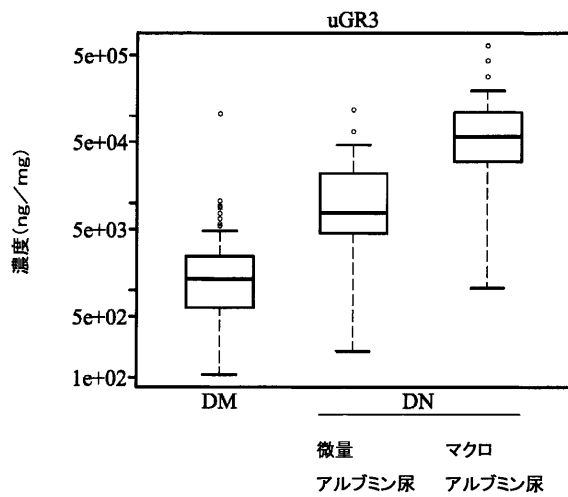
【 図 1 A 】



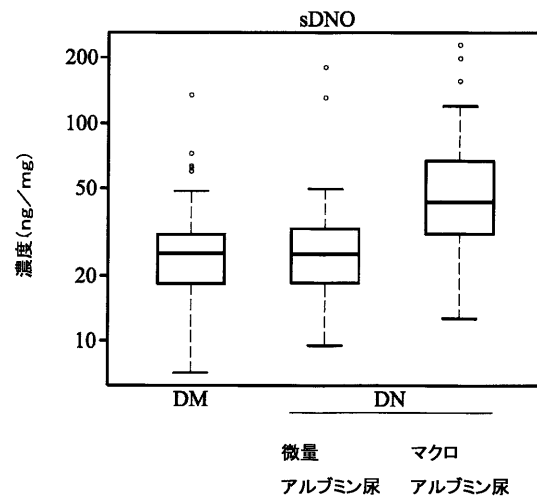
【 図 1 B 】



【 図 1 C 】



【 図 1 D 】



【配列表】

0005689426000001.xml

## フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I  
C 0 7 K 14/47
- (74)代理人 100125243  
弁理士 伊藤 浩彰
- (74)代理人 100125173  
弁理士 竹岡 明美
- (72)発明者 リン, ウェイ - ヤ  
台湾, 4 1 2 ダリ シティ, タイチュン カウンティ, ジーシャン ロード, ナンバー 1 0 6
- (72)発明者 イェ, マリー ヤ - ピン  
台湾, 1 0 5 タイペイ シティ, ソンシャン ディストリクト, ベイド ロード, セクション 2  
, レーン 2 1 0, ナンバー 1 0, フロア 1
- (72)発明者 ツォン, ツユ - リン  
台湾, 6 0 0 チャイ シティ, イースト ディストリクト, ダイエ ストリート, レーン 1 7 6  
, アリー 1 4, ナンバー 5 5
- (72)発明者 チェン, ピン - フウ  
台湾, 5 2 4 シジョウ タウンシップ, チャーンホワ カウンティ, ジュワーンアン レーン,  
ナンバー 1 - 1 3
- (72)発明者 シュ, ツァイ - ウェイ  
台湾, 3 3 0 タオユアン シティ, タオユアン カウンティ, ジョーンシャン ロード, レーン  
9 5 6, ナンバー 1 0
- (72)発明者 リー, ホウン - イ  
台湾, 7 3 0 シンイー シティ, トゥク タイナン カウンティ, ナンバー 7 7
- (72)発明者 チェン, イ - ティン  
台湾, 3 2 5 ロンタン タウンシップ, タオユアン カウンティ, ミンズ ロード, レーン 4 7  
3, ナンバー 1 7
- (72)発明者 リン, ユウ - フェン  
台湾, 1 1 6 タイペイ シティ, ウェンシャン ディストリクト, ジンシン ロード, レーン 1  
3 7, ナンバー 8, フロア 2
- (72)発明者 チェン, ジン - シュエン  
台湾, 1 0 0 タイペイ シティ, ジョンジュヨン ディストリクト, ティーンジョウ ロード,  
セクション 3, レーン 2 4, アリー 2, ナンバー 1, フロア 4
- (72)発明者 リー, イェン - ボン  
台湾, 1 0 6 タイペイ シティ, ダアン ディストリクト, ヘピン イースト ロード, セクシ  
ョン 2, レーン 1 1 8, アリー 4, ナンバー 2 3, フロア 7

審査官 藤田 都志行

- (56)参考文献 特開 2 0 0 2 - 0 9 0 3 6 5 ( J P , A )  
特表 2 0 0 3 - 5 3 2 8 9 9 ( J P , A )  
Paturi V. Rao, Minfang Lu, Melissa Standley, et al. , "Proteomic Identification of Urinary Biomarkers of Diabetic Nephropathy" , Diabetes Care , 米国, The American Diabetes Association , 2 0 0 7 年 3 月 , Vol. 30, No. 3 , p. 629-637  
Sanju A. Varghese, T. Brian Powell, Milos N. Budisavjevic, et al. , "Urine Biomarkers Predict the Case of Glomerular Disease" , Journal of the American Society of Nephrology , 米国, The American Society of Nephrology , 2 0 0 7 年 3 月 , Vol. 18, No. 3 , p. 913-922  
Hiroshi Yamaguchi, Masahiko Igarashi, Akihiko Hirata, et al. , "Progression of Diabetic

Nephropathy Enhances the Plasma Osteopontin Level in Type 2 Diabetic Patients", Endocrine Journal, 日本, The Japan Endocrine Society, 2004年10月, Vol. 51, No. 5, p. 499-504

宮本 聡, 四方 賢一, 榎野 博史, 「糖尿病性腎症の概念・病期分類・診断」, 日本臨床, 株式会社日本臨床社, 2008年11月28日, Vol. 66, 増刊号9, p. 230-233

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/493

G01N 33/53

G01N 33/68

C07K 7/08

C07K 14/47

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CiNii

医中誌WEB

专利名称(译)	尿液和血清的生物标志物与糖尿病肾病有关		
公开(公告)号	<a href="#">JP5689426B2</a>	公开(公告)日	2015-03-25
申请号	JP2011546555	申请日	2010-01-27
[标]申请(专利权)人(译)	财団法人工业技术研究院		
申请(专利权)人(译)	工业技术研究院		
当前申请(专利权)人(译)	工业技术研究院		
[标]发明人	リンウェイヤ イエマリーヤピン ツオンツユリン チェンピンフウ シュツアイウエイ リーホウンイ チェンイティン リンユウフェン チェンジンシュエン リーイエンボン		
发明人	リン,ウェイ-ヤ イエ,マリー ヤ-ピン ツオン,ツユ-リン チェン,ピン-フウ シュ,ツアイ-ウエイ リー,ホウン-イ チェン,イ-ティン リン,ユウ-フェン チェン,ジン-シュエン リー,イエン-ボン		
IPC分类号	G01N33/493 G01N33/53 G01N33/68 C07K7/08 C07K14/47		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2333/4728 G01N2333/52 G01N2333/71 G01N2333/8125 G01N2800/347 G01N2800/52 G01N2800/56		
FI分类号	G01N33/493.A G01N33/53.D G01N33/53.V G01N33/68 C07K7/08.ZNA C07K14/47		
代理人(译)	Kankawa忠 伊藤 浩彰		
优先权	61/147778 2009-01-28 US		
其他公开文献	JP2012516431A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供与糖尿病肾病有关的尿液和血液生物标志物。尿液和血液的生物标志物用于诊断糖尿病肾病，糖尿病肾病的分期，监测糖尿病肾病的进展，以及评价治疗糖尿病肾病的效果。这些生物标志物包括尿 $\alpha$ -2-HS-糖蛋白前体，尿 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶，尿 $\alpha$ -1酸性糖蛋白，尿骨桥蛋白，血清骨桥蛋白，其片段及其包括组合。背景技术

