

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-252366

(P2007-252366A)

(43) 公開日 平成19年10月4日(2007.10.4)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12Q 1/68 (2006.01)</b>	C12Q 1/68 ZNAA	2GO45
<b>C12Q 1/02 (2006.01)</b>	C12Q 1/02	4BO24
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 A	4BO63
<b>GO1N 33/53 (2006.01)</b>	GO1N 33/53 M	
<b>GO1N 33/50 (2006.01)</b>	GO1N 33/53 D	

審査請求 有 請求項の数 19 O L 外国語出願 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-14253 (P2007-14253)  
 (22) 出願日 平成19年1月24日 (2007.1.24)  
 (31) 優先権主張番号 60/761, 959  
 (32) 優先日 平成18年1月24日 (2006.1.24)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 390023582  
 財団法人工業技術研究院  
 INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE  
 台湾新竹縣竹東鎮中興路四段195號  
 195 Chung Hsing Rd.  
 , Sec. 4, Chutung, Hsin-Chu, Taiwan R. O. C

(71) 出願人 506008984  
 財団法人國家衛生研究院  
 台湾苗栗縣竹南鎮科研路35號

(74) 代理人 100065226  
 弁理士 朝日奈 宗太

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肝線維性傷害のバイオマーカー

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 線維症および/または肝硬変を含む肝線維性傷害の検出方法の提供。

【解決手段】 生体サンプルについて、63の特定遺伝子、およびそのヒトオーソログから選択されるタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子の差別的発現を分析することにより、少なくとも1つの遺伝子の差別的発現が肝線維症または肝硬変の存在を示す方法。さらに該63遺伝子およびそのヒトオーソログによりコードされるタンパク質の差別的発現を分析することによって、肝線維症および/または肝硬変を検出するための核酸プローブまたは抗体を含むキット。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

肝線維症および/または肝硬変の検出方法であって、  
患者から生体サンプルを得る工程、および  
該サンプルについて配列番号 1 ~ 配列番号 63 およびそのヒトオーソログから選択されるタンパク質をコードする少なくとも 1 つの遺伝子の差異的発現を分析する工程、  
を含み、少なくとも 1 つの遺伝子の差異的発現が肝線維症および/または肝硬変の存在を示す方法。

## 【請求項 2】

前記ヒトオーソログには、配列番号 64 ~ 配列番号 120 から選択されるタンパク質をコードする少なくとも 1 つの遺伝子が含まれる請求項 1 記載の方法。

10

## 【請求項 3】

配列番号 7 ~ 配列番号 23 と配列番号 42 ~ 配列番号 63 とそのヒトオーソログとから選択されるタンパク質をコードする少なくとも 1 つの遺伝子の増加した発現が、肝線維症および/または肝硬変の存在を示す請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 4】

配列番号 68 ~ 配列番号 82 および配列番号 100 ~ 配列番号 120 から選択されるタンパク質をコードする少なくとも 1 つの遺伝子の増加した発現が、肝線維症および/または肝硬変の存在を示す請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 5】

配列番号 1 ~ 配列番号 6 と配列番号 24 ~ 配列番号 41 とそのヒトオーソログとから選択されるタンパク質をコードする少なくとも 1 つの遺伝子の減少した発現が、肝線維症および/または肝硬変の存在を示す請求項 1 記載の方法。

20

## 【請求項 6】

配列番号 64 ~ 配列番号 67 および配列番号 83 ~ 配列番号 99 から選択されるタンパク質をコードする少なくとも 1 つの遺伝子の減少した発現が、肝線維症および/または肝硬変の存在を示す請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 7】

肝線維症および/または肝硬変の検出方法であって、  
患者から生体サンプルを得る工程、および  
該サンプルについて配列番号 1 から配列番号 120 を含む配列由来のタンパク質をコードする少なくとも 1 つの遺伝子の差異的発現を分析する工程、  
を含み、少なくとも 1 つの遺伝子の該差異的発現が、肝線維症および/または肝硬変の存在を示す方法。

30

## 【請求項 8】

前記差異的に発現される遺伝子が、がん、細胞周期および細胞形態学において機能する、配列番号 9、配列番号 69、配列番号 12、配列番号 72、配列番号 4、配列番号 65、配列番号 17、配列番号 76、配列番号 7、配列番号 68、配列番号 19、配列番号 78、配列番号 5、配列番号 66、配列番号 20、配列番号 79、配列番号 22、配列番号 81、配列番号 21 および配列番号 80 を含む配列から選択されるタンパク質をコードする請求項 7 記載の方法。

40

## 【請求項 9】

前記差異的に発現される遺伝子が脂質代謝、低分子生化学、臓器損傷および異常において機能する、配列番号 10、配列番号 70、配列番号 3、配列番号 64、配列番号 14、配列番号 73、配列番号 15 および配列番号 74 を含む配列から選択されるタンパク質をコードする請求項 7 記載の方法。

## 【請求項 10】

前記差異的に発現される遺伝子が、血液病、内分泌系の発達と機能、および神経系の発達と機能において機能する配列番号 13 を含むタンパク質をコードする請求項 7 記載の方法。

50

## 【請求項 1 1】

前記差別的に発現される遺伝子が、がん、細胞形態学、皮膚病および病変において機能する、配列番号 8、配列番号 4 4、配列番号 1 0 2、配列番号 4 5、配列番号 1 0 3、配列番号 4 8、配列番号 1 0 6、配列番号 3 1、配列番号 9 0、配列番号 3 5、配列番号 9 3、配列番号 5 0、配列番号 1 0 8、配列番号 5 1、配列番号 1 0 9、配列番号 4 0 および配列番号 9 8 を含む配列から選択されるタンパク質をコードする請求項 7 記載の方法。

## 【請求項 1 2】

前記差別的に発現される遺伝子が、脂質代謝、低分子生化学、分子輸送において機能する、配列番号 2 5、配列番号 8 4、配列番号 4 2、配列番号 1 0 0、配列番号 2 7、配列番号 8 6、配列番号 4 7、配列番号 1 0 5、配列番号 3 6、配列番号 9 4、配列番号 5 3、配列番号 1 1 1、配列番号 3 7、配列番号 9 5、配列番号 3 8、配列番号 9 6 および配列番号 1 0 7 を含む配列から選択されるタンパク質をコードする請求項 7 記載の方法。

10

## 【請求項 1 3】

前記差別的に発現される遺伝子が、がん、細胞運動、細胞成長および増殖において機能する、配列番号 5 9、配列番号 1 1 7、配列番号 4 6、配列番号 1 0 4、配列番号 3 0、配列番号 8 9、配列番号 5 2、配列番号 1 1 0、配列番号 5 8、配列番号 1 1 6、配列番号 5 5、配列番号 1 1 3、配列番号 3 9、配列番号 9 7、配列番号 5 6、配列番号 1 1 4、配列番号 5 7 および配列番号 1 1 5 を含む配列から選択されるタンパク質をコードする請求項 7 記載の方法。

## 【請求項 1 4】

配列番号 7 ~ 配列番号 2 3 と配列番号 4 2 ~ 配列番号 6 3 とそのヒトオーソログとから選択されるタンパク質をコードする少なくとも 1 つの遺伝子の差別的発現を減少させる化合物を同定する方法であって、

20

配列番号 7 ~ 配列番号 2 3 と配列番号 4 2 ~ 配列番号 6 3 とそのヒトオーソログとから選択されるタンパク質をコードする少なくとも 1 つの遺伝子を発現する細胞を提供する工程、

該細胞をテスト化合物に接触させる工程、ならびに

該少なくとも 1 つの遺伝子の該差別的発現が該テスト化合物の存在下で減少するか否かを判定する工程

を含み、該減少した差別的発現が、肝線維症および / または肝硬変を食い止めるまたは回復させる徴候である方法。

30

## 【請求項 1 5】

配列番号 1 ~ 配列番号 6 と配列番号 2 4 ~ 配列番号 4 1 とそのヒトオーソログとから選択されるタンパク質をコードする少なくとも 1 つの遺伝子の差別的発現を増加させる化合物を同定する方法であって、

配列番号 1 ~ 配列番号 6 と配列番号 2 4 ~ 配列番号 4 1 とそのヒトオーソログとから選択されるタンパク質をコードする少なくとも 1 つの遺伝子を発現する細胞を提供する工程、該細胞をテスト化合物に接触させる工程、ならびに

該少なくとも 1 つの遺伝子の差別的発現が該テスト化合物の存在下で増加するか否かを判定する工程

40

を含み、該増加した差別的発現が、肝線維症および / または肝硬変を食い止めるまたは回復させる徴候である方法。

## 【請求項 1 6】

肝線維症および / または肝硬変の診断方法であって、

肝線維症および / または肝硬変でない第 1 の対象から第 1 の生体サンプルを得る工程、

肝線維症および / または肝硬変に罹患していることがわかっているまたは疑われる第 2 の対象から第 2 の生体サンプルを得る工程、ならびに

該第 1 および第 2 の生体サンプルにおける配列番号 1 から配列番号 1 2 0 より選択される少なくとも 1 つのタンパク質の量を測定する工程

を含み、該第 1 の対象由来の第 1 の生体サンプルに存在する該タンパク質の量と、該第 2

50

の対象由来の第2の生体サンプルに存在する該タンパク質の量との間の差異が、該第2の対象が肝線維症および/または肝硬変に罹患していることを示す方法。

【請求項17】

前記少なくとも1つのタンパク質の量がウェスタンブロットまたはELISAによって測定される請求項16記載の方法。

【請求項18】

前記少なくとも1つのタンパク質が、配列番号1から配列番号63より選択されるものである請求項17記載の方法。

【請求項19】

前記少なくとも1つのタンパク質が、配列番号64から配列番号120より選択されるものである請求項17記載の方法。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本発明は、参照することにより全体として本明細書に明示的に組み込まれる2006年1月24日出願の米国仮特許出願第60/761,959号に関連し、かつ、米国特許法第119条(e)に基づいて、その利益を主張する。

【0002】

本明細書に記載するのは、多種のタンパク質の差異的発現(differential expression)に基づく肝線維症および/または肝硬変の検出方法、ならびに線維症および/または肝硬変を診断するためのキットである。 20

【背景技術】

【0003】

肝線維症は、肝臓の構造を崩壊させ、肝機能を低下させる総肝コラーゲンおよびその他のマトリックスタンパク質の増加に特徴を有する連続的な疾患スペクトラムを意味する(1、2)。肝臓における線維化の進行は壊死性炎症性(necroinflammatory)変化への応答である。総体的に見て、肝線維化のプロセスはダイナミックな炎症および修復の1つであり、治癒する可能性を有している(3)。線維症は、患者の肝臓における癒痕形成としてとらえられている。肝臓が不可逆的に損傷および癒痕化した場合、その状態を肝硬変と呼ぶ。 30

【0004】

肝線維症および/または肝硬変は肝細胞癌(HCC)の主要危険因子である。例えばB型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、肝臓毒、代謝異常およびアルコール依存症など多種の要因が、表現型を共通にする肝線維症および/または肝硬変の両方を引き起こす可能性があり(3~7)、線維化の末期は肝硬変となる。しかし、どのタイプの遺伝子が関与しているか、あるいはそれらは肝臓の損傷と修復が起こったときにどう作用するのかは明らかではない。さらに、これらの危険因子によって生じる肝硬変は潜在的に進行することが多い。肝硬変末期の患者は、5年生存率が75%である肝臓移植を受けない限り、1年以内に死亡し得る(3)。 40

【0005】

過去の生化学研究によれば、39個の既知の線維化または肝硬変マーカーがあると報告されているが(3、8、9)、いくつかのマーカーは侵襲的試料採取によって得られるものである。

【0006】

さらなるマーカーについての研究が、定量的プロテオミクスに加え、さらにトランスクリプトームのマイクロアレイ解析に基づき進められている。マイクロアレイ技術は包括的遺伝子発現解析に広く用いられている。特に、遺伝子発現の大規模マイクロアレイ解析により、研究者たちは、数千の遺伝子の同時に生じる変化を分析し、かつ、有意なパターンを同定できるようになった(10、11)。これまで、差異的(differential)プロテオ 50

ミクス研究において最も広く利用されてきた技術は、2次元ゲル電気泳動(2DE)と液体クロマトグラフィーベースの同位体コードアフィニティータギング(ICAT)技術であった(12)。最近になって、ICAT技術の変形、iTRAQ(相対および絶対的定量的のための同重体タグ(Isobaric tags))が取り入れられている。ICATおよびiTRAQタギングの両方は、オンライン上での多数のマーカの同定とそれらタンパク質の相対定量を可能とする。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、肝線維症および/または肝硬変の検出方法を提供することにある。

10

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、差異解析、例えばマイクロアレイmRNA発現プロファイリングおよび定量的タンパク質プロファイリングを用い、肝線維症および/または肝硬変の診断と治療に潜在的に価値のある、さらなるユニークかつ識別可能なシグネチャー(signature)を発見するに至った。

【0009】

本発明は、患者から生体サンプルを得る工程、ならびに該サンプルについて、配列番号1~配列番号63およびそのヒトオーソログから選択されるタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子の差異的発現を分析する工程を含み、少なくとも1つの遺伝子の差異的発現が、肝線維症および/または肝硬変の存在を示す、肝線維症および/または肝硬変を検出する方法を提供する。

20

【0010】

また、前記生体サンプルについて上述したヒトオーソログの差異的発現を分析することにより、肝線維症および/または肝硬変を検出する方法をも提供し、該ヒトオーソログには、配列番号64~配列番号120より選択されるタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子が含まれる。

【0011】

また、配列番号1~配列番号63およびそのヒトオーソログから選択されるタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子の核酸分子にハイブリダイズする1つまたはそれ以上の核酸プローブと、肝線維症および/または肝硬変の検出に使用されることを表示する包装物(packaging)とを含む肝線維症および/または肝硬変を診断するためのキットも提供する。

30

【0012】

さらに、1つまたはそれ以上の上述した核酸プローブを含み、前記ヒトオーソログが配列番号64~配列番号120より選択されるタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子を含む、肝線維症を診断するためのキットをも提供する。

【0013】

本発明はさらに、配列番号1~配列番号63およびそのヒトオーソログから選択される配列によってコードされる少なくとも1つのタンパク質に特異的に結合する1つまたはそれ以上の抗体と、肝線維症および/または肝硬変の検出に使用されることを表示する包装物とを含む肝線維症および/または肝硬変を診断するためのキットを提供する。

40

【0014】

また、1つまたはそれ以上の上述した抗体を含み、前記ヒトオーソログが配列番号64~配列番号120より選択されるタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子を含む、肝線維症および/または肝硬変の診断に用いるキットをも提供する。

【0015】

本発明はまた、配列番号7~配列番号23と配列番号42~配列番号63とそのヒトオーソログとより選択されるタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子の差異的発現を減少させる化合物を同定する方法であって、少なくとも1つの上述した遺伝子を発現す

50

る細胞を提供する工程、細胞をテスト化合物に接触させる工程、および、少なくとも1つの遺伝子の差別的発現がテスト化合物の存在下で減少するか否かを判定する工程を含み、減少した差別的発現が、肝線維症および/または肝硬変を食い止める(halting)または回復させる(reversing)ことの徴候(indication)である方法をも提供する。

【0016】

本発明はさらに、配列番号1～配列番号6と配列番号24～配列番号41とそのヒトオースログとから選択されるタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子の差別的発現を増加させる化合物を同定する方法であって、少なくとも1つの上述した遺伝子を発現する細胞を提供する工程、細胞をテスト化合物に接触させる工程、および、少なくとも1つの遺伝子の差別的発現がテスト化合物の存在下で増加するか否かを判定する工程を含み、増加した差別的発現が、肝線維症および/または肝硬変を食い止めるまたは回復させることの徴候である方法を提供する。

10

【0017】

本発明のさらなる目的および長所は、以下の記載でも説明されるが、ある程度当該記載から明らかとなる、または本発明を実施することで知ることにもできる。かかる本発明の目的および長所は、添付の特許請求の範囲において詳細に示した構成要素および組み合わせを用いることにより実現かつ達成される。

【0018】

言うまでもなく、前述した概要および後述する詳細な説明はいずれも例示的かつ説明的なものに過ぎず、特許請求の範囲に記載された本発明を限定するものではない。

20

【0019】

本明細書の一部であって本明細書を構成する添付の図面は、本発明のいくつかの実施形態を図解し、かつ、記載と共に本発明の原理を説明するのに用いられる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

表1は、コントロールラットと比較した6週間にわたるジメチルニトロソアミン(DMN)処理ラット血清の生化学分析結果である。

【0021】

表1 処理群および未処理群のラットにおける臨床、化学および線維化パラメータ

数値変数	コントロール				DMN処理		
	1~2週(n) <sup>a</sup>	3~4週(n) <sup>a</sup>	5~6週(n) <sup>a</sup>	1~2週(n) <sup>a</sup>	3~4週(n) <sup>a</sup>	5~6週(n) <sup>a</sup>	
アルブミン(g/dl)	4.4±0.4(7)	4.6±0.2(8)	4.7±0.2(8)	3.9±0.7(7)	3.5±0.6(11)	3.2±0.1(7)	
GPT(U/l)	61.1±26.7(8)	65.9±19.7(7)	50.3±4.9(8)	459.5±78.5(8)	566.6±313.5(11)	763.6±405.2(7)	
GOT(U/l)	110.3±37.6(8)	84.0±23.5(7)	109.1±23.5(8)	661.5±134.4(8)	1006.1±749.6(11)	1572.9±965.3(7)	
ビリルビン(mg/dl)	0.13±0.05(8)	0.10±0.01(8)	0.13±0.05(8)	0.72±0.53(8)	1.01±0.74(11)	1.13±1.00(7)	
AKP(KA)	46.0±3.7(4)	44.8±2.2(4)	47.0±13.6(4)	600.8±93.0(4)	668.3±222.0(3)	468±12.7(2)	
LDH(IU/l)	262.3±75.1(4)	289.3±31.7(3)	292.3±31.3(4)	414.8±102.7(4)	562.0±120.8(3)	853.5±91.2(2)	
グロブリン(g/dl)	6.9±0.3(3)	6.9±0.5(4)	7.3±0.2(4)	6.7±0.1(2)	5.0±0.8(4)	3.6±0.3(2)	
AFP(ng/dl)	0.32±0.04(4)	0.2±0.01(2)	0.24±0.03(4)	0.40±0.19(4)	0.38±0.05(4)	0.35±0.07(2)	
CHOL(mg/dl)	88±5(4)	71±20(4)	91±5(4)	77±8(4)	70±13(6)	67±18(5)	
BUN(mg/dl)	31±2(4)	25±6(4)	26±9(4)	33±4(4)	36±2(4)	31±5(2)	
ACP(mg/dl)	2.3±0.8(4)	2.6±0.5(4)	2.3±0.8(4)	1.9±0.6(4)	6.2±1.1(4)	8.2±0.6(2)	
PT(sec)	14±1(7)	13±1(8)	13±1(7)	18±4(8)	20±4(9)	22±5(6)	
PLT(10 <sup>3</sup> /-l)	741±245(8)	981±124(8)	893±109(8)	407±72(7)	300±165(11)	229±302(7)	

GPT: グルタミン酸ビリルビン酸トランスアミナーゼ; GOT: グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ; ビリルビン: 総ビリルビン; AKP: アルカリホスファターゼ; LDH: 乳酸脱水素酵素; AFP: α-フェトプロテイン; CHOL: コレステロール; BUN: 血中尿素窒素; ACP: 酸ホスファターゼ; PT: プロトロンビン時間; PLT: 血小板

a: 処理群および未処理群における1~2、3~4または5~6週目の数値の平均値±SD

## 【0022】

表2は、遺伝子発現に有意な変化を示した遺伝子およびそのヒトオーソログのリストである。これら遺伝子はマイクロアレイ解析および定量的プロテオームの結果の組み合わせ

から選び出したものであって、その線維化との関連が公開文献には未開示のものである。

【0023】

表2 選び出した63個の遺伝子とそのヒトオソログ

ID	手法	発現	タンパク質名-ラット	公式記号	遺伝子 ID	ID	ヒトオソログ名	公式記号	ヒトオソログ遺伝子ID
配列番号1	プロテオミクス	低下	シクロム P450, ファミリー 2, サブファミリー c, ポリペプチド 23	Cyp2c23	83790				-
配列番号2	プロテオミクス	低下	シクロム P450, ファミリー 2, サブファミリー d, ポリペプチド13	Cyp2d13	24303				-
配列番号3	プロテオミクス	低下	脂肪酸シクターゼ	Fasn	50671	配列番号64	脂肪酸シクターゼ	FASN	2194
配列番号4	プロテオミクス	低下	ヒドロキシステロイド(17-ベータ)デヒドロゲナーゼ 2	Hsd17b2	79243	配列番号65	ヒドロキシステロイド(17-ベータ)デヒドロゲナーゼ 2	HSD17B2	3294
配列番号5	プロテオミクス	低下	エストロゲンホルモントランスフェラーゼ、アインフォーム 2	Ste2	-	配列番号66	ホルモントランスフェラーゼ、エストロゲンアプリアリンゲ (estrogen-prefering)	SULT1E1	6783
配列番号6	プロテオミクス	低下	cDNA配列BC022133類似体		362399	配列番号67	ZXDファミリー 亜鉛フィンガーC	ZXDC	79364
配列番号7	プロテオミクス	上昇	S100カルシウム結合タンパク質A9 (カルグラニユリン B)	S100a9	94195	配列番号68	S100 カルシウム結合タンパク質A9	S100A9	6280
配列番号8	プロテオミクス	上昇	アクチン、ガンマ、細胞質	Actg (Actg1)	287876	-	-	-	-
配列番号9	プロテオミクス	上昇	アルデヒドデヒドロゲナーゼ、ファミリー 1、メンバー A1	Aldh1a1	24188	配列番号69	アルデヒドデヒドロゲナーゼ1 A1	ALDH1A1	216
配列番号10	プロテオミクス	上昇	Rho GDP 解離阻害因子(GDI) アルファ	Arhgdia	360678	配列番号70	Rho GDP 解離阻害因子 (GDI)アルファ	ARHGDI A	396
配列番号11	プロテオミクス	上昇	カルボニックアンヒドラーゼI (推定)	Ca1_推定	310218	配列番号71	カルボニックアンヒドラーゼI	CA1	759
配列番号12	プロテオミクス	上昇	カルボニックアンヒドラーゼ 2	Ca2	54231	配列番号72	カルボニックアンヒドラーゼII	CA2	760

10

20

30

40

50

ID	手法	発現	タンパク質名	ラット	公式記号	遺伝子 ID	ID	ヒトオンログ名	公式記号	ヒトオモログ遺伝子ID
配列番号13	プロテオミクス	上昇	シトクロム P450	2c13	Cyp2c13	171521	-	-	-	-
配列番号14	プロテオミクス	上昇	甲状腺自己抗原		G22p1	25019	配列番号73	ATP依存性DNAヘリカーゼII、70kDa サブユニット	XRCC6	2547
配列番号15	プロテオミクス	上昇	ミオシン、重鎖ポリペプチド9	Myh9	Myh9	25745	配列番号74	ミオシン、重鎖ポリペプチド9、非筋肉型	MYH9	4627
配列番号16	プロテオミクス	上昇	ミオシン軽鎖ポリペプチド6	MyI6	MyI6	-	配列番号75	ミオシン軽鎖ポリペプチド6 類似体(ミオシン軽鎖アルカリ3)(ミオシン軽鎖3)(MLC-3)(LC17)		124685
配列番号17	プロテオミクス	上昇	プロサポシン(prosaposin)	Psap	Psap	25524	配列番号76	プロサポシン	PSAP	5660
配列番号18	プロテオミクス	上昇	ミオシン調節性軽鎖2-A類似体、平滑筋インフォーム(ミオシンRLC-A)(推定)	RGD1309537_推定	RGD1309537_推定	501203	配列番号77	ミオシン調節性軽鎖MRCL3		10627
配列番号19	プロテオミクス	上昇	溶質キャリアファミリー4、メンバ-1	Sic4a1	Sic4a1	24779	配列番号78	溶質キャリアファミリー4、陰イオン交換体、メンバ-1(赤血球膜タンパク質バ-1)	SLC4A1	6521
配列番号20	プロテオミクス	上昇	トランスゲリン 2(推定)	Tagln2	Tagln2	304983	配列番号79	トランスゲリン 2	TAGLN2	8407
配列番号21	プロテオミクス	上昇	トロポミオシン 3、ガンマ	Tpm3	Tpm3	117557	配列番号80	トロポミオシン 3	TPM3	7170
配列番号22	プロテオミクス	上昇	タリン	Tln	Tln	313494	配列番号81	タリン 1	TLN1	7094
配列番号23	プロテオミクス	上昇	仮説タンパク質D4Ertid765e類似体(推定)	RGD1308525_推定	RGD1308525_推定	298381	配列番号82	エノイルコエンザイムAヒドラーターゼドメイン含有体2	ECHDC2	55268

ID	手法	発現	タンパク質名-ラット	公式記号	遺伝子ID	ID	ヒトオノログ名	公式記号	ヒトオノログ遺伝子ID
配列番号24	マイクロアレイ	低下	アミノアジピン酸アミノトランスフェラーゼ	Aadat	29416	配列番号83	アルブア-アミノアジピン酸アミノトランスフェラーゼ	AADAT	51166
配列番号25	マイクロアレイ	低下	アシルCoAシンセターゼ長鎖鎖アミラー メンバー1	Acs11	25288	配列番号84	アシルCoAシンセターゼ長鎖鎖アミラー メンバー1	ACSL1	2180
配列番号26	マイクロアレイ	低下	アルデヒドデヒドロゲナーゼ1 ファミラー、メンバーL1	Fthfd	64392	配列番号85	アルデヒドデヒドロゲナーゼ1 ファミラー、メンバー L1	ALDH1L1	10840
配列番号27	マイクロアレイ	低下	アルギニノコハク酸シンセターゼ	Ass	25698	配列番号86	アルギニノコハク酸シンセターゼ	ASS	445
配列番号28	マイクロアレイ	低下	ジメチルグリニンデヒドロゲナーゼ	Dmgdh	245961	配列番号87	ジメチルグリニンデヒドロゲナーゼ	DMGDH	29958
配列番号29	マイクロアレイ	低下	ジヒドロピリミジナーゼ	Dpys	65135	配列番号88	ジヒドロピリミジナーゼ	DPYS	1807
配列番号30	マイクロアレイ	低下	ホスホジエステラーゼ1/スクレオチドピロホスファターゼ2	Enpp2	84050	配列番号89	エクトスクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼ2(オートタキシン)	ENPP2	5168
配列番号31	マイクロアレイ	低下	脂肪酸アミドヒドロラーゼ	Faah	29347	配列番号90	脂肪酸アミドヒドロラーゼ	FAAH	2166
配列番号32	マイクロアレイ	低下	酢酸グアニジンメチルトランスフェラーゼ	Gamt	25257	配列番号91	酢酸グアニジンN-メチルトランスフェラーゼ	GAMT	2593
配列番号33	マイクロアレイ	低下	L-グルノ-ガンマ-ラクトンオキシダーゼ	Gulo	60671	-	-	-	-
配列番号34	マイクロアレイ	低下	3-ヒドロキシイン酪酸デヒドロゲナーゼ	Hibadh	63938	配列番号92	3-ヒドロキシイン酪酸デヒドロゲナーゼ	HIBADH	11112
配列番号35	マイクロアレイ	低下	ケトヘキソキナーゼ	Khk	25659	配列番号93	ケトヘキソキナーゼ	KHK	3795

ID	手法	発現	タンパク質名-ラット	公式記号	遺伝子ID	ID	ヒトオースログ名	公式記号	ヒトモログ 遺伝子ID
配列番号36	マイクロアレイ	低下	キヌレニナーゼ(L-キヌレニンヒドロラーゼ)	Kynu	116682	配列番号94	キヌレニナーゼ(L-キヌレニンヒドロラーゼ)	KYNU	8942
配列番号37	マイクロアレイ	低下	ピルビン酸カルボキシラーゼ	Pc	25104	配列番号95	ピルビン酸カルボキシラーゼ	PC	5091
配列番号38	マイクロアレイ	低下	ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、キナーゼ2 サブユニットp45 (PDK2)	Pdk2	81530	配列番号96	ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、キナーゼ、アインエンザイム2	PDK2	5164
配列番号39	マイクロアレイ	低下	溶質キャリア ファミリー10、メンバー 1	Slc10a1	24777	配列番号97	溶質キャリア ファミリー10 (ナトリウム/胆汁酸共輸送体ファミリー)、メンバー1	SLC10A1	6554
配列番号40	マイクロアレイ	低下	溶質キャリア ファミリー37(グリセロール-6-リン酸輸送体)、メンバー4	Slc37a4	29573	配列番号98	溶質キャリア ファミリー37 (グリセロール-6-リン酸輸送体)、メンバー4	SLC37A4	2542
配列番号41	マイクロアレイ	低下	スルホトランスフェラーゼK2類似体(rSULT1C2A)	-	501086	配列番号99	スルホトランスフェラーゼファミリー、細胞質、1C、メンバー1	SULT1C1	6819
配列番号42	マイクロアレイ	上昇	アラキドン酸5-リポキシゲナーゼ活性化タンパク質	Alox5ap	29624	配列番号100	アラキドン酸5-リポキシゲナーゼ活性化タンパク質	ALOX5AP	241
配列番号43	マイクロアレイ	上昇	アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(推定)	Aprt_推定	292072	配列番号101	アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ	APRT	353
配列番号44	マイクロアレイ	上昇	脳アバンドラント、膜付着シグナルタンパク質1	Basp1	64160	配列番号102	脳アバンドラント、膜付着シグナルタンパク質1	BASP1	10409
配列番号45	マイクロアレイ	上昇	ベンゾジアゼピン受容体	Bzrp	24230	配列番号103	末梢型ベンゾジアゼピン受容体	BZRP	706
配列番号46	マイクロアレイ	上昇	カルボニル還元酵素	Cbr1	29224	配列番号104	カルボニル還元酵素1	CBR1	873

ID	手法	発現	タンパク質名-ラット	公式記号	遺伝子ID	ID	ヒトオ-ソログ名	公式記号	ヒトモログ 遺伝子ID
配列番号47	マイクロアレイ	上昇	CD47抗原 (Rh関連抗原、インテグリン関連シグナルトランスデュサー)	Cd47	29364	配列番号105	CD47抗原	CD47	961
配列番号48	マイクロアレイ	上昇	エンピジン	Emb	114511	配列番号106	エンピジンホモログ	EMB	133418
配列番号49	マイクロアレイ	上昇	骨髄分化一次応答遺伝子 1 16	Myd116	171071	配列番号107	タンパク質ホスファターゼ 1、調節サブユニット 15A	PPP1R15A	23645
SEQ I D N O:50	マイクロアレイ	上昇	N-myc 下流制御遺伝子 2	Ndrg2	171114	配列番号108	N-myc 下流制御遺伝子 2	NDRG2	57447
SEQ I D N O:51	マイクロアレイ	上昇	非転移細胞1において発現されるタンパク質 (NM23A) (ヌクレオシドニリン酸キナーゼ)	Nme1	191575	配列番号109	非転移細胞1において発現されるタンパク質 (NM23A)	NME1	4830
配列番号52	マイクロアレイ	上昇	ニューレグリン 1	Nrg1	112400	配列番号110	ニューレグリン 1	NRG1	3084
配列番号53	マイクロアレイ	上昇	酸化低比重リポタンパク質 (レクチン様) 受容体 1	Oldlr1	140914	配列番号111	酸化低比重リポタンパク質 (レクチン様) 受容体 1	OLR1	4973
配列番号54	マイクロアレイ	上昇	タンパク質チロシンキナーゼ9	Ptk9	315265	配列番号112	ツインフィリン (Twinfilin) 様 タンパク質	PTK9L	11344
配列番号55	マイクロアレイ	上昇	シンデカン結合タンパク	Sdcbp	83841	配列番号113	シンデニン	SDCBP	6386
配列番号56	マイクロアレイ	上昇	セリンプロテアーゼ阻害因子、Kazal 1型	Spink1	24833	配列番号114	セリンプロテアーゼ阻害因子、Kazal 1型	SPINK1	6690
配列番号57	マイクロアレイ	上昇	チロシン3/トリプトファン5- モノオキシゲナーゼ活性化タ ンパク質、eta ポリペプチド	Ywhah	25576	配列番号115	チロシン3/トリプトファン5- モノオキシゲナーゼ活性化タ ンパク質、eta ポリペプチド	YWHAH	7533

ID	手法	発現	タンパク質名-ラット	公式記号	遺伝子ID	ID	ヒトオーソログ名	公式記号	ヒトホモログ 遺伝子ID
配列番号58	マイクロアレイ	上昇	S100 カルシウム結合タンパク質 A10	S100a10	81778	配列番号116	S100 カルシウム結合タンパク質 A10	S100A10	6281
配列番号59	マイクロアレイ	上昇	B-細胞転移遺伝子2	Btg2	29619	配列番号117	B-細胞転移遺伝子2	BTG2	7832
配列番号60	マイクロアレイ	上昇	3'-ホスホアデニン5'-ホスホ硫酸シターゼ 2(推定)	Papss2— 推定	294103	配列番号118	3'-ホスホアデニン5'-ホスホ硫酸シターゼ1	PAPSS1	9061
配列番号61	マイクロアレイ	上昇	リンノーム関連オルガネラ複合体-1の生合成体、サブユニット 2	Bloc1s2	293938	配列番号119	リンノーム関連オルガネラ複合体-1の生合成体、サブユニット 2	BLOC1S2	282991
配列番号62	マイクロアレイ	上昇	RIKEN cDNA 6720467C0 3 類似体(推定)	RGD131 0681— 推定	297903				—
配列番号63	マイクロアレイ	上昇	形質転換マウス 3T3 細胞二重微小(double minute)2(推定)	Mdm2— 推定	314856	配列番号120	マウス二重微小 2 ホモログ	MDM2	4193

10

20

30

40

## 【 0 0 2 4 】

表 3 は、オリゴヌクレオチドマイクロアレイ(表 3 A)および i T R A Q プロテオーム(表 3 B)試験において発現に有意な変化を示したタンパク質の相互作用ネットワーク分

50

析の結果である。本試験においてネットワークで同定され、肝傷害と関連することがまだ報告されていないタンパク質は太字で示した。

【 0 0 2 5 】

表3A マイクロアレイ試験により選ばれたタンパク質の相互作用ネットワーク分析

遺伝子*	遺伝子*	主要機能
1	<u>ACTG1</u> , ADARB1, <u>AHCY</u> , AKT1, ALDOA, <u>BASP1</u> , <u>BZRP</u> , CD63, Crisp1 (MGI:102553), <u>EMB</u> , <u>FAAH</u> , GLI1, <u>GNMT</u> , HRAS, IFNG, <u>KHK</u> , KRT18, MYC, MYCN, <u>NDRG2</u> , <u>NME1</u> , OTC, PPARG, <u>RHOB</u> , RPL23, RPL27, RPL35, RPL38, RPL41, Rplm12, RPS16, RPS27, RT1-A, SARDH, <u>SLC37A4</u>	がん、細胞形態学、皮膚病および病変
2	<u>ACSL1</u> , <u>ALOX5AP</u> , ANXA1, <u>ASS</u> , ATF3, <u>CD47</u> , CIDEA, CP, DF, FABP1, GPD1, HOXA11, <u>KYNU</u> , MMP16, MTP, <u>MYL6</u> , <u>OLR1</u> , <u>PC</u> , <u>PDK2</u> , PF4, PLIN, PLP1, PPARG, <u>PPP1R15A</u> , <u>PRO</u> , PTGES, RGS7, SLC27A1, SPHK1, <u>TIMP1</u> , TNF, UBQLN2, UCP2, UCP3, Wap	脂質代謝、低分子生化学、分子輸送
3	ACO2, AKR1B10, <u>BTG2</u> , <u>CBR1</u> , DAD1, DUSP5, ELF3, <u>ENPP2</u> , FGF2, GBP1, GLG1, GPI, GRIN2C, HSPA1A, IGFALS, IL1B, JUN, KCNH2, <u>MAOE</u> , MT1L, MT2A, NR3C1, <u>NRG1</u> , P53AIP1, PHKG1, <u>S100A10</u> , <u>SDCBP</u> , SHBG, <u>SLC10A1</u> , SLC10A2, <u>SPINK1</u> , SPRY1, TP53, <u>YWHAH</u> , ZFP36L2	がん、細胞運動、細胞成長および増殖

※ 本試験において同定された遺伝子に下線が引かれている。下線が引かれた遺伝子のうち、肝傷害と関連することがまだ報告されていないものは太字で示されている。

表3B iTRAQプロテオーム試験により選ばれたタンパク質の相互作用ネットワーク分析

	遺伝子*	主要機能
1	ADD1, ALB, <u>ALDH1A1</u> , <u>CA2</u> , CASP3, CNN2, CTNBN1, DIA1, ENPP1, GB A, GM2A, HGF, <u>HSD17B2</u> , IL1B, ITPA, JTV1, KRT17, LMNA, LMNB2, MAP4, MYC, OAT, PLS3, <u>PSAP</u> , <u>S100A9</u> , SERPINH1, <u>SLC4A1</u> , SRM, <u>SULT1E1</u> , <u>TAGLN2</u> , TGFB1, <u>TLN1</u> , <u>TPM3</u> , UGDH, <u>VIM</u>	がん、細胞周期、細胞形態学
2	ACADM, <u>ACTC</u> , ADCY7, ALDH2, <u>ALDOA</u> , ALDOB, ARG2, <u>ARHGDI</u> , CD 276, CNR2, CPS1, CROT, Cyp4a10, Cyp4a14, EHHADH, <u>EPHX1</u> , FAAH, <u>FASN</u> , <u>FNI</u> , <u>G22P1</u> , <u>GNMT</u> , GOT2, HOXD4, <u>HPX</u> , HRSP12, Ifi1, IFNG, I L4, LEP, <u>Mug1</u> , <u>MYH9</u> , MYOD1, PPARA, SORD, <u>TGM2</u>	脂質代謝、低分子生化学、臓器損傷および異常
3	ALB, ANXA1, CLU, <u>CYP2C13</u> , CYP3A2, FGA, FGB, <u>FGG</u> , FLI1, GAL, GFAP, GH1, GHRH, GHRH, <u>HBA1</u> , <u>HBA2</u> , <u>HBB</u> , Hbb-ar, Hbb-b1, Hbb -b2, Hbb-bh1, Hbb-y, HBD, HBE1, HBG1, HBG2, HBQ1, HBZ, IL6, NTS, SOCS2, Stat5, TF, TG, <u>TTR</u>	血液病、内分泌系の発達と機能、神経系の発達と機能

※ 本試験において同定された遺伝子は下線が引かれている。下線が引かれた遺伝子のうち、肝傷害と関連することがまだ報告されていないものは太字で示されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 6 】

## 定義

本明細書において、「生体サンプル」という語は、対象の細胞、組織または器官から採取した任意の生体由来物質のことをいう。生体サンプルのソースは、診断される対象における特定の症状に応じて変えることができる。生体サンプルは採取後直ちに分析しても、

あるいは保存してもよい。保存する場合、そのサンプルを適当な保存バッファーで平衡化して、4、-20、-70で保存してもよいし、または低温液体、例えば液体窒素もしくは液体ヘリウム中で保存してもかまわない。1実施形態において、生体サンプルは血液、血清または血漿からなる。別の実施形態において、生体サンプルは生検または組織サンプルからなる。本発明のさらなる実施形態では、生体サンプルは、羊水、乳汁、唾液、脳脊髄液、リンパ液、汗、粘液、滑液、涙液、またはその他の臨床材料もしくはサンプルからなる。

【0027】

本明細書において、「患者」という語は、限定はされないが、ヒト、霊長類の動物、家畜哺乳動物、実験用哺乳動物などの哺乳動物ことについていう。

10

【0028】

本明細書において、「差異的発現」という語は、正常な遺伝子発現と対比しての、RNA/mRNAレベル、タンパク質レベル、またはRNA/mRNAおよびタンパク質レベルの両方における遺伝子発現、例えば、RNA/mRNAレベル、タンパク質レベル、またはRNA/mRNAおよびタンパク質レベルの両方において増加したまたは減少した遺伝子発現のことをいう。

【0029】

本明細書において、「遺伝子」および「タンパク質をコードする遺伝子」なる語は、タンパク質のコードまたは転写において機能的役割を有する任意の核酸配列またはその一部分のことをいう。かかる遺伝子には、特定の配列番号の機能タンパク質のコーディングに参与するすべての核酸、または特定の配列番号のタンパク質のコーディングもしくは発現に参与する核酸の一部のみが含まれる。核酸配列には、エクソン、イントロン、開始もしくは終止領域、プロモーター配列、その他の調節配列、またはその遺伝子に特異な隣接領域(unique adjacent regions to the gene)内の遺伝的異常のみならず、正常な配列も含まれる。

20

【0030】

本明細書において、「ヒトオースログ」という語は、非ヒト遺伝子およびヒト遺伝子がヒトおよび非ヒトの最も近い共通の祖先における単一の先祖遺伝子から派生し、かつ同一の機能を有しているような対応するヒト遺伝子のことをいう。

【0031】

本明細書において、「プローブ」という語は、塩基特異的な方式で核酸の相補鎖に結合するオリゴヌクレオチドであるハイブリダイゼーションプローブのことをいう。かかるプローブには、Nielsenら、1991、(13)に記載されているようなペプチド核酸、ならびにその他の核酸アナログおよび核酸様物質(nucleic acid mimetic)が含まれる。参照として本明細書に組み込まれる米国特許第6,156,501号明細書を参照されたい。

30

【0032】

本明細書において、「核酸」という語は、例えば組織サンプル中に存在する染色体、ミトコンドリア、ウイルスおよび/またはバクテリアの核酸のほか、合成核酸などの任意のDNAまたはRNA/mRNAのことをいう。「核酸」という語には二本鎖核酸分子の鎖のうち的一方または両方が包含され、かつ、インタクトな(intact)核酸分子の任意のフラグメントまたは部位が含まれる。

40

【0033】

本明細書において、「包装物」という語は、通常、外部ラベルおよび容器に入った内部材料など包装する材料のことをいい、限定はされないが、キットの使用説明書が含まれる。

【0034】

本明細書において、「抗体」という語は、免疫グロブリンまたはそのフラグメントもしくは誘導体のことをいい、かつ、生体外あるいは生体内のどちらで産出されたかにかかわらず、抗原結合サイトを含む任意のポリペプチドを包含する。この用語には、限定はされないが、ポリクローナル、モノクローナル、単一特異的、多特異的、ヒト化、一本鎖、キ

50

メラ、合成、組み換え、ハイブリッド、変異およびグラフトされた抗体が含まれる。また「抗体」という語には、例えばFab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv、Fd、dAbなどの抗体フラグメント、および抗原結合機能、つまり特定の抗原に結合する能力を保持しているその他の抗体フラグメントも含まれる。一般に、そのようなフラグメントには、抗原結合ドメイン、すなわち、抗体と抗原間の特異的結合に關与するアミノ酸を含む抗体分子の一部が含まれ得る。抗原結合ドメインは通常、抗体軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)および抗体重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)を含むが、必ずしも両方を備えていなければならないということはない。例えば、いわゆるFd抗体フラグメントはV<sub>H</sub>ドメインのみからなるが、インタクトな抗体の一部抗原結合機能を依然保持している。

#### 【0035】

本明細書において、「特異的に結合」またはこれに同種の語は、2つの分子が、生理条件下で比較的安定である複合体(例えば安定な抗原/抗体複合体)を形成するというこゝを意味する。この用語はまた、例えば、多くの分子において見出されるような、抗原結合ドメインが特定のエピトープに特異であるという場合にも適用される。よつて、抗体は多数のタンパク質と、その各々に存在するエピトープに結合する場合に、特異的に結合し得る。特異的な結合は、たいていの場合、低から中程度の容量における高親和性を含む選択的相互作用に特徴を有する。非特異的な結合とは通常は低い選択的相互作用のことであり、かつ、中から高程度の容量における低親和性を備え得る。一般に結合は、その親和性が少なくとも $10^5 M^{-1}$ 、 $10^6 M^{-1}$ 、 $10^7 M^{-1}$ または $10^8 M^{-1}$ である場合に、特異的であると見みなされる。必要であれば、結合条件を変えることにより、特異的な結合に實質上影響を及ぼさずして非特異的結合を減らすこともできる。かかる条件は当該分野では既知であり、当業者は普段よく使う技術を用いて適当な条件を選択することができる。該条件は通常、抗体の濃度、溶液のイオン強度、温度、結合時間、無関係な分子の濃度(例えば血清アルブミンまたはミルクカゼインのようなブロック剤)などについて定められる。Morganら、“The Matrix Effects on Kinetic Rate Constants of Antibody-Antigen Interactions Reflect Solvent Viscosity,” J. Immunol. Meth. 217:51:60(1998)、およびZhuangら、“Measurement of Association Rate Constant of Antibody -Antigen Interactions in Solution Based on Enzyme-Linked Immunosorbent Assay,” J. Biosci. Bioeng. 92(4):330-336(2001)を参照されたい。

#### 【0036】

本明細書において、「タンパク質」という語は、任意のアミノ酸長の高分子フォームのものをいい、それには、天然または合成アミノ酸ならびにコードされたおよびコードされていないアミノ酸、環状、二環式、デプシ環状(depsicyclic)のペプチド、デプシペプチド、ポリペプチド、またはデプシ二環式(depsibicyclic)ペプチドバックボーン、一本鎖タンパク質さらに多量体タンパク質、そしてさらにインタクトなタンパク質分子の任意のフラグメントまたは部位が含まれる。

#### 【0037】

本明細書において、「化合物」という語は、任意の比率および任意の構造の1つ以上の化学成分を含んでいる物質のことをいい、限定はされないが、環状、二環式、分岐または直鎖のものが含まれる。化合物は有機または無機の化合物であつてよい。また化合物は、1つ以上の化学成分、1つ以上の薬草/植物成分もしくは薬草/植物抽出物、または化学成分と薬草/植物成分もしくは抽出物との両方を含む組成物のことをもいう。

#### 【0038】

#### 実施形態

慢性肝疾患は、アジアにおいてよく見られる致死となり得る疾患である。通常、肝細胞癌(HCC)の発生の前に、線維症末期に生じる肝硬変が先行する。肝硬変と線維症の両方には同一のタンパク質が発現する。線維症および/または肝硬変の診断に役立つ肝線維症のマーカーを同定するために、肝線維症期間中におけるこれらタンパク質の遺伝子発現の変化を分析する。本研究は肝線維症モデルの確立から開始する。Jezequel A.M.ら(14)に記載されているように、非遺伝毒性の肝臓毒、ジメチルニトロソアミン(DMN)

10

20

30

40

50

を用い、ヒト肝傷害の研究に用いられる既知のモデルである(15)ラット壊死性炎症(necroinflammatory)および肝線維症を誘発する。6週間にわたる時間経過を通し、組織病理学、生化学および定量的RT-PCR解析によってラットモデル系における肝線維症の発生が確認された。

#### 【0039】

マイクロアレイとiTRAQ定量的プロテオミクス技術を用いた。iTRAQ技術は、複数のタンパク質の同時同定、そしてもちろんそれらタンパク質の相対定量を可能にする。アプライドバイオシステム社のiTRAQ試薬は、4種の同重体試薬のマルチプレックスなセットである。かかる4種の試薬はアミンに特異であり、ペプチドを標識する。標識されたペプチドは質量において同一であり、よって単一のMSモードにおいても同一である。これらは、最大4種類の異なるサンプルの同時定量を可能とする強力な診断用の低質量MS/MSシグネチャーイオンを生じる。定量は、量の多い4種類のプロダクトイオンつまり、4種類の可能性のあるタグのうち1つからそれぞれ切断された114、115、116および117ダルトンのプロダクトイオンの差異によって行う。すべてのペプチドにタグが付加されているため、プロテオームのカバレッジが広がり、かつ、1つのタンパク質につき複数のペプチドを解析することにより、それら同定されたものの信頼度が向上する(16)。iTRAQ技術のマルチサンプル能力は、それぞれ異なる肝臓の状態のタンパク質発現プロファイルを同時に比較する手段を提供する。

10

#### 【0040】

本研究に採用したモデルはヒト肝臓研究用モデルに非常に類似しているため、本研究の成果はヒトの臨床に応用され得る。本研究では、強力な非遺伝毒性の肝臓毒であるDMNを用いて肝線維症をシミュレートした(17、18)。上述したようにDMNが急激に肝傷害を引き起こすということは実証されており、かつ、ヒト線維症形成の研究に有用であるということも実験的に証明されている(14、15、19)。また、表1を参照されたいが、コントロールラットと対比して、本研究で確立したラット肝線維症モデルにて発現に有意な差異を示した血清マーカーは、ヒト肝線維症の血清マーカー、例えば、アルブミン、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT)、総ビリルビン、アルカリホスファターゼ(AKP)、酸ホスファターゼ(ACP)、 $\alpha$ -フェトプロテイン(AFP)、血中尿素窒素(BUN)、コレステロール(CHOL)、乳酸脱水素酵素(LDH)、グロブリン、プロトロンビン時間(PT)および血小板(PLT)の13個の血清マーカーと同じであった。したがって、本研究により同定されたこれらマーカーは、ヒトの肝線維症および/または肝硬変を診断するのに利用することができる。

20

30

#### 【0041】

##### 検出方法

本研究では、肝線維性傷害のバイオマーカーとしてほぼ97個の遺伝子を同定した。PubMed文献検索の結果により、マイクロアレイおよびプロテオミクスの方法を用い本研究で同定した発現差異のある遺伝子のほぼ30%が、線維症または肝硬変に関連していることが判明した。残りの70%はどの文献にも未だ報告されていない。マイクロアレイおよび定量的プロテオミクス技術から得た全情報を組み合わせることによって、それらすべてがDMN処理群とDMN未処理群の間で発現に有意な変化を示したがこれまでにいかなる文献にも肝線維症または肝硬変との関連が報告されたことのない63個の遺伝子を選び出した(表2)。DMN処理ラットにおけるこれら63個の遺伝子は、正常な遺伝子発現と比較した場合に、RNA/mRNAレベルおよび/またはタンパク質レベルで遺伝子発現に差異を有している。いくつかの遺伝子は上方制御され、一方、他の遺伝子は下方制御されている。それら63個のラット遺伝子を、EnsemblおよびHomologousデータベースにおけるオーソログアサーション(ortholog assertion)に基づいて、そのヒトオーソログ遺伝子に変換した(表2配列番号1~配列番号120)。

40

#### 【0042】

よって、本発明は、本明細書に記載する肝傷害に関する差別的遺伝子発現研究をベース

50

にした肝線維性傷害を検出する方法を提供する。当該検出方法において、タンパク質をコードする遺伝子の差別的発現には、全長タンパク質をコードする全長遺伝子、またはタンパク質の一部をコードする遺伝子の一部の差別的発現が含まれる。

【0043】

したがって、本発明は、患者から生体サンプルを得る工程、ならびに、該サンプルについて、配列番号1から配列番号63およびそのヒトオーソログより選択されるタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子の差別的発現を分析する工程を含み、少なくとも1つの遺伝子の差別的発現が肝線維症および/または肝硬変の存在を示す、肝線維症および/または肝硬変を検出する方法を提供する。別の実施形態において、本発明は、該サンプルについて、配列番号64から配列番号120を含むヒトオーソログより選択されるタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子の差別的発現を分析することにより、肝線維症および/または肝硬変を検出する方法を提供する。

10

【0044】

本研究で同定されたタンパク質のヒトオーソログは、[http://www.ensembl.org/Rattus\\_norvegicus/](http://www.ensembl.org/Rattus_norvegicus/)上のEnsemblデータベースと共に<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=homologene>上のHomologene NCBIデータベースにある遺伝子/タンパク質を利用する検索から導き出すことができる。

【0045】

本発明の実施において、差別的遺伝子発現は、転写解析または定量的プロテオーム解析、例えばマイクロアレイ、Q-RT-PCR、ICATおよびiTRAQ、または当業者に知られたその他任意の適当な方法によって分析することができる。

20

【0046】

別の実施形態において、本発明は、配列番号7～配列番号23と配列番号42～配列番号63とそのヒトオーソログとから選択されるタンパク質をコードする1つまたはそれ以上の遺伝子の上方制御または増加した発現を分析することに関し、該増加した発現は肝線維症および/または肝硬変の存在を示す。さらに別の実施形態において、本発明は、配列番号68～配列番号82および配列番号100～配列番号120を含むヒトオーソログから選択されるタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子の増加した発現を分析することに関する。

【0047】

また本発明は、別の実施形態において、配列番号1～配列番号6と配列番号24～配列番号41とそのヒトオーソログとから選択されるタンパク質をコードする1つまたはそれ以上の遺伝子の下方制御または減少した発現を分析することに関し、該減少した発現は、肝線維症および/または肝硬変の存在を示す。さらに別の実施形態において、本発明は、配列番号64～配列番号67および配列番号83～配列番号99を含むヒトオーソログから選択されるタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子の減少した発現を分析することに関する。

30

【0048】

本発明はまた機能グループによる遺伝子のクラスタリングも提供する。よって本発明は、肝線維症および/または肝硬変を検出する方法であって、生体サンプルについて、配列番号9、配列番号69、配列番号12、配列番号72、配列番号4、配列番号65、配列番号17、配列番号76、配列番号7、配列番号68、配列番号19、配列番号78、配列番号5、配列番号66、配列番号20、配列番号79、配列番号22、配列番号81、配列番号21および配列番号80を含む配列から選択される、がん、細胞周期および細胞形態学において機能するタンパク質と、配列番号10、配列番号70、配列番号3、配列番号64、配列番号14、配列番号73、配列番号15および配列番号74を含む配列から選択される、脂質代謝、低分子生化学(small molecule biochemistry)、臓器(organismal)損傷および異常(abnormalities)において機能するタンパク質と、血液病、内分泌系の発達と機能、神経系の発達と機能において機能する配列番号13を含むタンパク質と、配列番号8、配列番号44、配列番号102、配列番号45、配列番号103、配列

40

50

番号48、配列番号106、配列番号31、配列番号90、配列番号35、配列番号93、配列番号50、配列番号108、配列番号51、配列番号109、配列番号40および配列番号98を含む配列から選択される、がん、細胞形態学、皮膚病および病変において機能するタンパク質と、配列番号25、配列番号84、配列番号42、配列番号100、配列番号27、配列番号86、配列番号47、配列番号105、配列番号36、配列番号94、配列番号16、配列番号75、配列番号53、配列番号111、配列番号37、配列番号95、配列番号38、配列番号96および配列番号107を含む配列から選択される、脂質代謝、低分子生化学、および分子輸送において機能するタンパク質と、配列番号59、配列番号117、配列番号46、配列番号104、配列番号30、配列番号89、配列番号52、配列番号110、配列番号58、配列番号116、配列番号55、配列番号113、配列番号39、配列番号97、配列番号56、配列番号114、配列番号57および配列番号115を含む配列から選択される、がん、細胞運動、細胞成長および増殖において機能するタンパク質とをコードする少なくとも1つの遺伝子の差異的発現を分析する工程を含む方法を提供する。

10

20

30

40

50

#### 【0049】

##### 診断キット

本発明はまた、上述した遺伝子および/またはタンパク質をベースとする診断キットをも提供する。1実施形態において、配列番号1～配列番号63およびそのヒトオーソログから選択されるタンパク質マーカーをコードする少なくとも1つの遺伝子の核酸分子にハイブリダイズする1つまたはそれ以上の核酸プローブと、肝線維症の検出に使用されることを表示する包装物と、を含む肝線維症および/または肝硬変を診断するためのキットがある。該キットは、これら遺伝子の差異的発現、例えば上方制御または下方制御を検出することができ、該差異的発現は肝線維症および/または肝硬変を示唆する。別の実施形態において、本発明は、配列番号1～配列番号63およびそのヒトオーソログから選択されるタンパク質マーカーをコードする少なくとも1つの遺伝子の核酸分子にハイブリダイズする核酸プローブを含む線維症および/または肝硬変を診断するキットをも提供する。該遺伝子の差異的発現は線維症および/または肝硬変を示唆する。別の実施形態において、該診断キットは、肝線維症および/または肝硬変を診断するために、配列番号64～配列番号120から選択されるタンパク質を含むヒトオーソログをコードする少なくとも1つの遺伝子の核酸分子にハイブリダイズする1つまたはそれ以上の核酸プローブを含む。

#### 【0050】

前記キットは、当業者に知られた手法によって提供することができる。例として、検出を容易にするため、限定はされないが放射標識または蛍光標識など当業者に知られた標識法を用いてプローブを標識することができる。プローブは、二本鎖核酸分子の一方または両方の鎖であり、かつインタクトな核酸分子の任意のフラグメントまたは部位を含む核酸分子にハイブリダイズすることができる。

#### 【0051】

核酸ハイブリダイゼーションは、当業者には容易に理解され得るように、塩濃度、温度または有機溶剤、さらに塩基組成、相補鎖の長さ、およびハイブリダイズする核酸間のヌクレオチド塩基のミスマッチ数などのような条件の影響を受ける。ストリンジェントな条件は、当該分野で周知である手法により決定することができる、核酸の長さと塩基組成によって決まる。一般に、ストリンジェンシーは、例えばハイブリダイゼーションおよび洗浄時の温度と塩濃度を操作することにより変えるまたは制御することができる。例として、高温および低塩濃度の組み合わせはストリンジェンシーを高める。かような条件は当業者には知られており、かつ、例えばStrauss, W.M. "Hybridization With Radioactive Probes," in Current Protocols in Molecular Biology 6.3.1-6.3.6, (John Wiley & Sons, N.Y. 2000) 中に見出すことができる。当該技術に示されている水性および非水条件の両方を用いることができる。

#### 【0052】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例は、50 またはそれ以上におけ

る、 $0.1 \times \text{SSC}$  ( $15 \text{ mM}$  塩化ナトリウム /  $1.5 \text{ mM}$  クエン酸ナトリウム) 中でのハイブリダイゼーションである。もう一つのストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件の例は、 $50\%$  ホルムアミド、 $1 \times \text{SSC}$  ( $150 \text{ mM}$   $\text{NaCl}$ 、 $15 \text{ mM}$  クエン酸ナトリウム)、 $50 \text{ mM}$  リン酸ナトリウム ( $\text{pH} 7.6$ )、 $5 \times$  デンハート液、 $10\%$  ( $w/v$ ) 硫酸デキストラン、および  $20 \mu\text{g/ml}$  の変性剪断サケ精子 DNA 中にて  $42^\circ\text{C}$  で一晩ハイブリダイゼーションした後、約  $65^\circ\text{C}$  にて  $0.1 \times \text{SSC}$  中で洗浄するというものである。高度にストリンジेंटな条件には、例えば、 $6 \times \text{SSC}$  ( $20 \times \text{SSC}$  は  $3.0 \text{ M}$   $\text{NaCl}$  および  $0.3 \text{ M}$  クエン酸ナトリウムを含む)、 $1\%$  ( $w/v$ ) ドデシル硫酸ナトリウム ( $\text{SDS}$ ) 中にて  $65^\circ\text{C}$  で約  $8$  時間 (またはそれ以上) 水性 (aqueous) ハイブリダイゼーション (例えばホルムアミドを含まない) を行ってから、 $65^\circ\text{C}$  にて  $0.2 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\%$   $\text{SDS}$  中で  $1$  回またはそれ以上洗浄するというものなどが含まれる。

10

**【0053】**

中程度にストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件は、核酸が、これに対して少なくとも約  $60\%$ 、少なくとも約  $75\%$ 、少なくとも約  $85\%$ 、または約  $90\%$  をこえる同一性を有する相補的核酸に結合できるようにする条件である。ハイブリダイゼーションのストレンジエンシーは一般に、ハイブリダイゼーションおよび洗浄の温度を低くすること、ハイブリダイゼーションバッファーにホルムアミドを添加すること、または洗浄バッファーの塩濃度を高めること、を単独でまたは組み合わせて行うことにより低減される。中程度のストリンジेंट条件には、例えば、 $6 \times \text{SSC}$ 、 $1\%$  ( $w/v$ )  $\text{SDS}$  中にて  $65^\circ\text{C}$  で約  $8$  時間 (またはそれ以上) 水性 (aqueous) ハイブリダイゼーション (例えばホルムアミドを含まない) を行ってから、室温下  $2 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\%$   $\text{SDS}$  で  $1$  回またはそれ以上洗浄するというものが含まれる。中程度のストリンジエンシー下でのその他のハイブリダイゼーションの例には、 $6 \times \text{SSC}$ 、 $5 \times$  デンハート試薬、 $0.5\%$  ( $w/v$ )  $\text{SDS}$ 、および、任意で  $100 \mu\text{g/ml}$  の超音波破碎されたサケまたはニシン精子 DNA 中にて約  $42^\circ\text{C}$  でハイブリダイゼーションを行ってから、 $2 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\%$  ( $w/v$ )  $\text{SDS}$  中にて  $65^\circ\text{C}$  で洗浄するというものなどがある。その他の置換および可能性は、当業者には容易に理解され得るはずであり、本発明の範囲内において均等であると見なされる。

20

30

**【0054】**

また、別の実施形態において、本発明は、配列番号  $1 \sim$  配列番号  $63$  およびそのヒトオースログから選択される配列でコードされる少なくとも  $1$  つのタンパク質に特異的に結合する  $1$  つまたはそれ以上の抗体を含み、肝線維症および / または肝硬変の検出に使用されることを表示する包装物をさらに含む肝線維症および / または肝硬変を診断するためのキットを提供する。他の実施形態において、該キットは、配列番号  $64 \sim$  配列番号  $120$  から選択される配列でコードされる少なくとも  $1$  つのヒトオースログタンパク質に特異的に結合する  $1$  つまたはそれ以上の抗体を含み、肝線維症および / または肝硬変の検出に使用されることを表示する包装物をさらに含む。それら遺伝子の差別的発現は線維症および / または肝硬変の存在を示す。

40

**【0055】**

タンパク質に特異な抗体は、当業者に知られるモノクローナルまたはポリクローナル技術によって得ることができる。抗体は、例として Current Protocols in Immunology ( $20$ ) に記載されている手法を用い、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$  および  $^{131}\text{I}$  のような放射性同位体で標識してもよい。その放射能はシンチレーション計数によって測定することができる。また抗体は、例えば、希土類キレート (ユーロピウムキレート)、Texas Red、ローダミン、フルオレセイン、ダンシル、Lissamine、ウンベリフェロン、フィコクリテリン (phycocrytherin)、フィコシアニン、もしくは SPECTRUM ORANGE (登録商標) および SPECTRUM GREEN (登録商標) のような市販のフルオロフォア、ならびに / または上述のうち任意の  $1$  つもしくはそれ以上の誘導体で蛍光標識することもできる。蛍光標識は、例えば上述の Current Protocols in Immunol

50

ogyに開示された手法を用いて抗体にコンジュゲートできる。

【0056】

差別的タンパク質発現は、ウェスタンブロットティングまたは酵素免疫測定法 (ELISA) のような当該分野では知られた、よく用いられている方法により、抗体を利用して分析することができる。ウェスタンブロットティングは、当該分野で知られている標準法にしたがい、目的の生体サンプルから得たタンパク質をドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) でサイズと電磁電荷 (electromagnetic charge) により分ける電気泳動ステップから開始する。例えば、Sambrookら、3 Molecular Cloning: A Laboratory Manual A8.40-A8.45 (2001) (SDS-PAGEによるタンパク質電気泳動の各種試薬および方法が記載してある) を参照されたい。次いで、ゲルの内容物を、同じく当該分野において知られる標準法により、ニトロセルロース、ナイロン、PVD F、あるいは固定およびウェスタンブロットティングに適したその他の膜またはフィルターに転写する。転写は、浸漬、セミドライブロットティングまたは当該分野で知られたその他の類似する方法で行うことができる。続いて、ウェスタンブロットティングを含むいくつかのハイブリダイゼーション、洗浄および染色ステップにて目的のタンパク質が損失するのを防ぐため、そのフィルターまたは膜を固定する。固定は、加熱、紫外光による架橋またはその他の当該分野で知られた類似の方法により達成される。例えばSambrookら、3 Molecular Cloning: A Laboratory Manual A8.52-A8.55 (免疫ブロットティングと抗原/抗体複合体の検出に用いられる各種試薬および方法が記載してある) を参照されたい。

10

【0057】

固定されたフィルターまたは膜上の非特異的抗体結合サイトを、例えば0.5% (w/v) 低脂肪粉乳または5% (w/v) ウシ血清アルブミン (BSA) のようなブロッキング剤を含有したバッファー溶液 (例えばリン酸緩衝生理食塩水 (「PBS」) または同種のもの) でブロックする。ブロッキング後、そのフィルターまたは膜に対して一次抗体インキュベーションを行う。一次抗体インキュベーションが終わったら、そのフィルターまたは膜を洗浄し、発色 (chromogenic)、蛍光または化学発光手段で標識された二次抗体を用いて抗体-抗原複合体の存在を検出する。次いで、比色分析 (例えば西洋ワサビペルオキシダーゼおよびTMBを用いる) で、または、オートラジオグラフィ (例えばアルカリホスファターゼ) により抗体-抗原複合体を検出する。比色分析で、または、化学発光により検出する場合、蛍光の色量はルミノメーター、分光光度計、またはその他類似の計器を用いて測定することができる。オートラジオグラフィで検出する場合、結合した抗体の量を、デントシメーターまたは類似の計器を用い、感光させたX線フィルムにより測定することができる。例えばSambrookら、3 Molecular Cloning: A Laboratory Manual A8.52-A8.55を参照されたい。

20

30

【0058】

ウェスタンブロットティングに用いられる二次抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルのどちらであっても、従来の手法を用いてリガンド (例えばビオチン) または検出可能なマーカー (例えば蛍光基もしくは酵素) で標識することができる。適した標識には、フルオロフォア、発色団、電子密度の高い試薬 (例えば銀または金)、酵素、および特異的な結合パートナーを有するリガンドが含まれる。西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼのような酵素は主にその活性により検出される。例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼは、テトラメチルベンジジン (TMB) を分光光度計による定量が可能な青色色素に変える能力によって検出され得る。その他の適したリガンドおよび/または検出可能なマーカーには、ビオチンおよびアビジンまたはストレプトアビジン、IgGおよびプロテインA、ならびに当該分野で知られている多数のさらなる受容体-リガンドの組などがある。その他の置換物および可能性のある物は、当業者には容易に理解されるはずであり、本発明の範囲内において均等であると見なされる。

40

【0059】

ELISAは、標的抗原または複数の標的抗原をマイクロタイタープレートのウェルに吸着させる抗原吸着ステップから始める。例えば、<http://www.kpl.com/docs/techdocs/c>

50

hapters%201%20-%204.pdf (最も最近のアクセスは2007年1月12日)において閲覧可能なKierkegaard & Perry Laboratories, Inc., Technical Guide for ELISA 9-13 (2003)を参照されたい。最もよく用いられる抗体の吸着バッファーは、50 mM カーボネート・pH = 9.6、10 mM トリス-HCl・pH = 8.5、および10 mM PBS・pH = 7.2である。これらのバッファーは、多くのタンパク質に対して効果的に作用する。標的抗原がマイクロタイタープレートの表面に容易に吸着しない場合は、その表面にタンパク質が共有結合されるようさまざまな化学的手段によって表面が修飾または誘導体化されたプレートが、広く商業的供給業者から入手できる。時間と温度は、吸着されるタンパク質の量に影響する最も重要な要素である。

#### 【0060】

マイクロタイタープレートのウェルに目的の抗原または複数の目的の抗原を塗布したら、非特異的抗体の結合をブロックすると共に偽陽性の結果を最小限に抑えるため、ブロッキングバッファーで洗浄する。例えば、上記文献の13および14(マイクロタイタープレートのブロッキングに用いる方法と試薬について論じている)を参照されたい。よく使用されるブロッキング剤は、例えばBSA(通常1%から5%(w/v)の濃度でPBS、pH = 7.0中に使用される)、脱脂粉乳、カゼイン(脱脂粉乳の主タンパク質成分)もしくはカゼイネート(水酸化ナトリウムによる部分消化で生じるカゼインのより溶解性の高いもの)、正常血清(通常1%から5%(v/v)の濃度で使用される)、およびゼラチン(通常1%から5%(w/v)の濃度で使用される)のようなタンパク質溶液、または、例えばTween-20(登録商標)およびTriton X-100(登録商標)のような非イオン性界面活性剤である。

#### 【0061】

洗浄剤は、特異的抗原-抗体相互作用の検出能力に影響を与え得る各種反応成分間の低親和性相互作用を阻止する能力により選択する。例えば上記文献の14および15(マイクロタイタープレートの洗浄に用いられる方法と試薬について論じている)を参照されたい。洗浄溶液は一般に、抗原とその同種抗体の変性を阻止するため、かつ、酵素活性を保つために、生理的バッファーを含んでいる。例えば中性pHのPBS、トリス生理食塩水またはイミダゾール緩衝生理食塩水などのバッファーが広く用いられている。通常は、特定のアッセイに用いられる検出の方法を基に具体的なバッファーが選ばれる。反応成分間の低親和性、非特異的相互作用を阻止するため、洗浄バッファーにも例えばTween-20(登録商標)、Triton X-100(登録商標)またはこれらの同種の非イオン性界面活性剤が0.01%から0.05%(v/v)の濃度で含まれていなければならない。

#### 【0062】

ブロッキングステップ後、マイクロタイタープレートのウェルを洗浄する。続いて、吸着された抗原に対し一次抗体インキュベーションを行い、その後再度洗浄する。次に、発色(例えば西洋ワサビペルオキシダーゼおよびTMB)、蛍光または化学発光(例えばアルカリホスファターゼ)手段で標識された二次抗体を用い、抗体/抗原複合体を検出する。例えば上記文献の15~21(抗体の調製および使用、さらによく用いられる検出分子について論じている)を参照されたい。色または蛍光の量はルミノメーター、分光光度計またはその他類似の計器によって測定することができる。よく用いられる標準ELISAプロトコルの変法は多くあり、競合ELISA、サンドイッチELISA、それからその他にも数多くある。当業者は、検出すべき抗原、分析に用いる抗原および/または一次抗体のソース、ならびにその他任意の関連する実験パラメータに応じ、使用に適したプロトコルを選択することができる。これらおよびその他多くの置換物は、当業者には容易に理解され得るはずであり、本発明の範囲内において均等物であると見なされる。

#### 【0063】

##### スクリーニングの方法

また、配列番号7~配列番号23と配列番号42~配列番号63とそのヒトオーソログとから選択されるタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子の差別的発現を減少さ

10

20

30

40

50

せ得る化合物を同定する方法についても記載する。該方法はこれら遺伝子のうちの少なくとも1つを発現する細胞を提供し、該細胞をテスト化合物に接触させてテスト化合物の存在下で差別的発現が減少するか否かを判定するもので、該差別的発現は、肝線維症および/または肝硬変を食い止めるまたは回復させることの徴候となる。同方法は、配列番号1～配列番号6と配列番号24～配列番号41とそのヒトオーソログとから選択されるタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子の差別的発現を増加させ得る化合物を同定することもできる。

#### 【0064】

本発明のその他の実施形態は、詳細な説明の検討および本明細書に開示された本発明の実施を通して当業者には明らかとなるであろう。詳細な説明と実施例は単なる例として見なされることを意図しており、本発明の実際の範囲および精神は以下の特許請求の範囲によって示される。

10

#### 【0065】

定義されない限り、本明細書で用いるすべての技術および科学用語の意味は、本発明が属する分野の当業者によって普通に解される意味である。さらに当業者は、本明細書に記載されたものと類似するまたは均等な任意の方法および構成要素もまた、本発明を実施または試験するために使用可能であるということを理解できるはずである。また、本明細書において言及したすべての刊行物は参照することにより組み入れられる。

#### 【0066】

値の範囲に関し、本発明は、文言に明確に指定しない限り、上限と下限、および当該範囲の上限と下限の間の、上限と下限の少なくとも10分の1の単位までの中間の各値を包含する。さらに本発明は、その他任意の指定された中間の値をも含める。

20

#### 【0067】

加えて、本明細書および特許請求の範囲において用いられる、成分、反応条件、純度のパーセント、ポリペプチド、およびポリヌクレオチドの長さなどの量を表すすべての数は、指定しない限り、「約」という語で修飾される。したがって、本明細書および特許請求の範囲において記載する数値パラメータは、本発明の所望の特性に応じて変わり得る近似値である。最低でも、かつ、クレームの範囲についての均等論の適用を制限しようとする試みとしてではなく、各数値パラメータは少なくとも、通常の上捨五入法を適用し、報告される有効桁の数を考慮に入れて理解されなければならない。とはいうものの、特定の実施例で記載されている数値は可能な限り正確に報告している。しかしながら、あらゆる数値は、その実測の標準偏差からの一定の誤差を本来的に含んでいるものである。

30

#### 【0068】

文言に明確に示さない限り、本明細書および添付の特許請求の範囲において用いられる単数形の「1つの」、「または」および「該」には複数の指示対象が含まれ、かつ複数の指示対象には単数形が含まれる。したがって、例えば「目的のポリペプチド」という言い方には複数のかかるポリペプチドが含まれ、「該薬剤」という言い方には1つまたはそれ以上の薬剤および当業者に知られるその均等物への言及が含まれ、「(複数の)核酸分子」という言い方には1つまたはそれ以上の核酸分子への言及が含まれ、さらに、「(複数の)抗体」という言い方には1つまたはそれ以上の抗体への言及が含まれる、などである。

40

#### 【0069】

以下の実施例は本発明をさらに説明するものである。これらは本発明を説明するに過ぎず、かつ、本発明の特定の形態の各種の有利な特徴を開示するものである。下記の実施例を本発明を限定するものと解するべきではない。

#### 【0070】

##### 実施例

本発明の実施には、表示しない限り、当該分野の通常技術レベル内にある差別的遺伝子発現、差別的プロテオーム発現、および組織病理学の研究に用いられる従来の手法を採用する。

50

## 【0071】

以下の実施例は、動物モデルを使用しての肝線維症における異なるタンパク質発現の研究を説明するものである。

## 【0072】

**実施例 1：ラット肝線維症モデルの確立**

DMNを使用することによりラット肝線維症モデルを作製した。DMNは肝臓を特異的に標的とする強力な肝臓毒であり、肝線維症を引き起こし得る。DMN処理により生じる組織病理学的変化は、線維症の主要タンパク質でありかつ肝硬変の進行にとって重要なコラーゲンの急速な沈着を伴う。ラットにおけるDMN誘発肝傷害は、例えば門脈圧亢進症腹水など多くの特徴のほか、さらにその他たくさんの組織病理学および生化学的異常を呈する。これまでの研究により、ラットのDMN誘発肝傷害はヒト肝線維症および/または肝硬変に生じる諸変化を反映するということが示されている(15)。DMN誘発肝線維症モデルは、Jezequel A.Mら(14)に記述されているとおりに扱った。実験には体重300から350グラムの雄Sprague-Dawleyラット(Slc:SD; 日本SLC、静岡、日本)を用いた。6週間にわたる経時実験を通して肝線維症を誘発するため、最初の連続する3週間の間、投与量6.7mg/kg体重で腹腔内注射により生理食塩水中に溶解したDMN(シグマ、セントルイス、MO)を1週に3日連続してラットに与えた。注射の時点は図1の逆三角形に示されるとおりである。注射は、投与量を100mg/kg/日とするような別の実験に用いられるよりもはるかに低い投与量とした。より高い投与量はラット肝臓に毒性を生じさせる可能性がある(21、22)。

10

20

## 【0073】

各時点において2から7匹のラットをDMNあるいはコントロールとしてのDMNを含まない等量の生理食塩水のいずれかで処理した(26匹のDMN処理ラットおよび24匹のコントロールラット)。11、18、25、32、39および46日目にそれぞれラットを評価し、犠牲死させた(犠牲死の時点は図1Aの三角形に示されるとおり)。これら三角形の時点は1から6の週で示した(図1A)。

## 【0074】

ラット肝線維症モデルの確立を確認するために、Q-RT-PCR、血清分析および組織病理学的分析を用いた。

30

## 【0075】

**DMN誘発肝傷害の組織病理学的試験**

犠牲死させた後直ちに肝臓組織を摘出し組織病理学的試験に用いた。次いで、固定した肝臓サンプルを処理してパラフィン包埋した。5マイクロメートル(5µm)の切片を作り、ヘマトキシリンおよびエオシン染色(壊死性炎症(necroinflammatory)と脂肪変化を評価するため)、ならびにシリウスレッド/ファストグリーンのコラーゲン染色(線維化を評価するため)を行った(23)。脂肪変化は存在(+ )または非存在(- )で分類した。

## 【0076】

DMN誘発肝傷害により生じた表現型の変化が図2Aに示されている。図2Aにおいて、DMN誘発ラット肝線維症の典型的な表現型を、4つの組織病理学的特徴(壊死、炎症、線維化および脂肪変化)を次のようにスコアリングすることによって特徴付けた。壊死のスコアはN0からN3とし(1番目のパネル)、炎症のスコアはI0からI3とした。肝線維化度を観察するためのスコアリングシステムは、肝炎活性指数(HAI)(29、30)のスコアリングシステムに修正を加えたものとした。線維化を4スコア:正常(F0)、門脈域の線維性拡大(F1)、線維性架橋形成(F2)、および高頻度な(frequent)局所結節形成を伴う線維性架橋形成(F3)に分けた。脂肪変化は存在(+ )または非存在(- )でそれぞれ評価した(最下のパネル)。脂肪変化の画像は倍率200倍で示しているが、その他は倍率100倍で示している(図2A)。

40

## 【0077】

50

図2Bは、ラットモデルの組織病理学的スコアの要約を示すものである。結果は時間経過にしたがって並べた。壊死性炎症スコアは壊死と炎症のスコアの和であり、範囲はA0からA6までである。壊死性炎症変化を3グレード、A0 = なし、A(1~3) = 軽度およびA(4~6) = 中程度の壊死性炎症、に分けた。線維化の変化は2グレード、F(0~1) = 正常から門脈域の線維性拡大、F(2~3) = 線維性架橋形成から高頻度の結節形成を伴う線維性架橋形成、に分けた。脂肪変化は存在(+ )または非存在(- )で示した。ラットの数をカウントし、各時点における各組織病理学的レベルの百分率を計算するために用いた。

#### 【0078】

図2Bに示されるように、最初の2週間において、DMN処理ラットの75%がなし(F0)または低度の線維化(F1)を示した。3から4週目には、DMN処理ラットのほぼ90%が高度の線維化、つまり線維性架橋形成(F2)から高頻度の局所結節形成を伴う線維性架橋形成(F3)を示した。最後の2週間において、DMN処理ラットの78%にF2およびF3が依然存在していた。脂肪変化は少数の処理ラット(3.7%)にしか存在していなかった。これに対し、コントロール群には異常な病理学的パターンが全くなかった。さらに、DMN処理および正常ラットの腎臓または脾臓に明らかな異常は見られなかった(データに示していない)。同時に、DMN誘発肝傷害進行の詳細な壊死性炎症および線維化スコアリングシステムは、肝傷害進行の初期(1~4週目)に急激な壊死と炎症が生じた後、3から6週目に線維化形成が生じるということを示す。DMN処理の3週間後、胆管増殖、小葉中心性壊死、線維性架橋および中心静脈周辺の線維化と共に、ラット肝臓にコラーゲン線維の沈着が観察された。

#### 【0079】

##### 定量リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(Q-RT-PCR)

確立された動物モデルについてさらなる情報を得るため、Q-RT-PCRを用いて、脂肪細胞の形質転換を促進し得る肝線維症のエフェクター細胞中の最も強力な既知の線維成長誘導因子(24~27)、形質転換成長因子-1(Tgf-1)の遺伝子発現プロファイルを評価した。同じ総RNAサンプルをマイクロアレイとQ-RT-PCRの両方の解析に用いた。RNAの調製および解析は、アフィメトリック社(Affymetric)(サンタクララ、CA、米国)の使用説明書にしたがって行った。各サンプル対しそれぞれ3回繰り返しの方式(triplicate)でTaqMan(登録商標)アッセイを行い、平均値を用いて発現レベルを計算した。目的の遺伝子の定量を標準化するため、各サンプルからの18SリボソームRNA(18S rRNA)を同一のプレート上で目的の遺伝子と共に定量した。Q-RT-PCRの結果は、コントロールラットにおいてよりも、DMN処理ラットの肝臓においてより高いレベルのTgf-1のmRNA発現が観察されたことを示した(図1B)。この変化は、Jezequel A.Mら、(14)に記載されている観察結果と一致していた。つまり、これらの試験はDMN誘発ラット肝線維症モデルを支持する。

#### 【0080】

##### DMN誘発肝線維症ラットモデル実験の血清生化学データの解析

全50匹の各ラットの血清に対し肝傷害に関する各種生化学検査を行った。死体解剖時に動物から集めた血液サンプルを用い、血清濃度またはアルブミン、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT)、総ビリルビン、アルカリホスファターゼ(AKP)、酸ホスファターゼ(ACP)、 $\alpha$ -フェトプロテイン(AFP)、血中尿素窒素(BUN)、コレステロール(CHOL)、乳酸脱水素酵素(LDH)、グロブリン、プロトロンビン時間(PT)および血小板(PLT)の活性をHitachi747とACL3000臨床化学アナライザーシステム(MYCO、レントン、ワシントン)で測定した。DMN処理サンプルとコントロールを比較したところ、13の血清マーカーが有意な差異を示し、DMN処理群が肝傷害に罹患したことが確認された。DMN処理群の生化学的データは、多くの血清マーカーに変化があったということ、および、そのタンパク質発現レベルまたは身体的反応がヒト肝傷害の表現型に類似する、ということを示す(1、2)。これらの実験で同定された13の血

清マーカーは、ヒト肝線維症の血清マーカーと同じである。

【0081】

実施例2：DMN誘発肝線維症期間中の遺伝子発現プロファイルの構築

マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析に用いる総RNAの質をSpectra Max Plus (モレキュラーデバイス、サニーベール、CA、米国)を用いて判定すると、 $A_{260}/A_{280}$ 比は1.9から2.1の範囲であった。ハイブリダイゼーションのプロトコールおよび試薬、洗浄ならびに染色はアフィメトリック社の使用説明書 (<http://www.affymetrix.com/support/technical/manuals.affx>) にしたがった。アフィメトリック社製Rat Genome U34A Arrayへのハイブリダイゼーションの前に、その質を確認するため、

10

【0082】

データ解析とクラスター化アルゴリズム

アフィメトリック社が開発したGeneChip (登録商標) Operating Software (GCOS)を用い、マイクロアレイイメージを、強度情報を含むテキストファイルに変換した。続いて、そのマイクロアレイデータセットをGenespring (登録商標) 7.2ソフトウェア (シリコンジェネティクス、レッドウッドシティー、CA、米国)により解析した。

【0083】

20

遺伝子発現プロファイリング

6週間にわたる経時実験を通して12匹のコントロール動物と12匹のDMN処理ラットの肝臓組織を選び出し (各時点にそれぞれ2匹のラット)、マイクロアレイ実験を行った。そのマイクロアレイデータを何らかの統計的分析にかける前に、再現性を評価した。すべての遺伝子チップから、遺伝子を、それらがアフィメトリックのパーフェクトマッチ (PM) / ミスマッチ (MM) アルゴリズムにより有 (present) コールと指定された場合に、有として選び出した (28)。解析した8799のプローブセットのうち、チップ上の2385個の転写産物の全体的な発現パターンが有と判定された ( $P < 0.05$ )。サンプル内 (intra-sample) の変動がコントロール群とDMN処理群間の差異を分かりにくくしていないということを証明するため、そしてさらに、有意であると認められる倍率の変化 (fold-change) を決定するため、24のコントロールのデータセット間で発現プロファイルの比較を行った。マイクロアレイ上に提示された2385個の転写産物の発現レベルの散布グラフを互いに比較した。マイクロアレイ解析における実験用チップ間の関係を直線回帰により分析した。全体的に見て統計的な差異はなく、2倍以上離れたのは転写産物の3.2%であった。時間経過の変動を詳しく調べるため、コントロールの第1週から第6週の間におけるこれら2385のプローブセットの信頼できる信号を計算した。同様に統計的な差異はなく、2倍以上離れたのは転写産物の4.6%であった。これとは対照的に、コントロール群とDMN処理群との間には有意な散布 (significant scatter) が見出され、2倍以上離れたのは転写産物の28.7%であった。

30

【0084】

40

偽陽性の可能性を最小限に抑えるための第1のステップとして、マイクロアレイデータから独立した2つのクラスターを作ると共に、発現に差異があるものを同定することにより、すべての転写産物をフィルターにかけた。より詳細に解析するため、第1のクラスターにて前述した2385個の転写産物を作成した。コントロール群とDMN処理群を比較すると、これらのうち268個が、1.5倍またはそれ以上高いあるいは低い差で差別的に発現した転写産物であった。「検出フラグ」抽出 (24) を用いる第2の方法では、DMN処理群において23個の転写産物が「有」と判定されたが、コントロール群ではされなかった。反対に、全DMN処理群において「無」と判定された転写産物はたった1つだけあり、コントロール群では「有」と判定された。

【0085】

50

全体として見ると、DMN処理群とコントロール群を比較したとき、上方制御された137個と下方制御された119個の遺伝子を含む256個の遺伝子を表す292個の転写産物が発現差のある遺伝子発現パターンを示した。階層的クラスター解析により、図3Aに示されるような、24サンプルにわたるこれら292個の転写産物の遺伝子発現パターンのデンドログラムを作成した。行(row)は個々の転写産物を示し、カラムは経時サンプルを示す。各セルの色は、その平均発現レベルと対比した、対応する組織の発現レベルを反映している。スケールは、全サンプルについて平均レベルに対して蛍光ラジオ0.25から4に拡張する。

【0086】

#### 定量リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(Q-RT-PCR)

10

マイクロアレイデータの妥当性を検証するため、メタロプロテイナーゼ1の組織阻害因子(Timp1)、メタロプロテイナーゼ2の組織阻害因子(Timp2)、マトリックスメタロプロテイナーゼ3(Mmp3)およびガンマグルトタミントランスプепチターゼ(Ggtp)についてQ-RT-PCR解析を行った。検証のためにこれらの遺伝子を選んだのは、これら遺伝子が当GeneChip試験およびこれまでの研究の両方で出現したためである。

【0087】

Q-RT-PCRにより測定したところ、DMN処理サンプルにおいてTimp1(図3B)、Timp2、Mmp3、Ggtp(データは示していない)およびTgf1(図1Bにおいて先に示した)が上昇していた。これら5つの遺伝子のQ-RT-PCR解析結果は、これら個々のマーカーを分析する過去の報告(8、9)と一致していた。

20

【0088】

さらに、マイクロアレイデータとQ-RT-PCR結果の間で倍率の変化(fold change)に基づく高い一致性が観察された。図3Bに示されるように、Timp1の発現は、マイクロアレイおよびQ-RT-PCR実験の両方で、DMN処理ラットにおいて20倍をこえ上昇していた。各サンプルにつきTaqMan(登録商標)アッセイを3回繰り返しの方式で実施し、平均値を発現レベルの計算に用いた(四角形で示してある)。Timp1転写産物の定量を標準化するために、図右側の対数目盛り示されるように、各サンプルからの18S rRNAを同一のプレート上で目的遺伝子として定量した。2つのTimp1転写産物、rc\_AI169327\_atとrc\_AI169327\_g\_at(丸と三角形でそれぞれ示す)の発現レベルを、図左側の目盛り示される全遺伝子発現レベルの平均値との比較で示した。Timp1の発現パターンはQ-RT-PCR結果とGeneChip解析間で高い相関性があり(ピアソンの相関係数はそれぞれ0.79と0.92であった)(図3B)、その遺伝子発現結果が、より詳細な解析を行った場合に信頼できるものであるということを示している。

30

【0089】

#### 線維症候補遺伝子

壊死性炎症および線維化がラットモデルにおける肝硬変の進行に重要な役割を果たすということはすでに示されている(8、23、24、29、30)。組織病理学的な表現型に關与する因子を明らかにするため、図2Bにおいて先に述べた壊死性炎症(A0~A6)および線維化(F0~F3)の組織病理学的スコアを用いた組織病理学的評価により、すべてのラットサンプルを分類した。線維化スコアでは2つのサブグループ(F(0~1)とF(2~3))の変動をベースとしたため、線維化関連遺伝子解析にはスチューデントのt検定による統計的分析を用いた。0.05未満のP値を統計学的に有意であると見なした。

40

【0090】

本発明者らは、スチューデントのt検定を用い、コントロールラットに比べ、DMN誘発ラットでの発現が1.5倍またはそれ以上高いあるいは低い256個の遺伝子を解析した。線維化のF(0~1)からF(2~3)レベルの間にある合計62個の差別的に発現した遺伝子(32個は上方制御、30個は下方制御)を特定し、線維化スコアの2つのサ

50

ブグループの変動のみを用い、5%の有意水準で評価した。Timp1、CD63およびアネキシンA1 (Anxa1)を含む3つの遺伝子が肝線維化期間において類似する遺伝子発現パターンを示し、過去の研究と一致していた(31~34)。

#### 【0091】

Timp1は周知の線維症マーカーであり、肝線維症の進行に重要な役割を果たすことが証明されている。肝傷害の後期において、肝星細胞(HSC)は、正常な肝臓マトリクスを分解する能力を有するマトリクスメタロプロテナーゼ(MMP)の組み合わせを発現し、同時に肝線維化中に蓄積する線維状コラーゲンの分解を阻害する。Timp1の発現の増加は、間質コラーゲナーゼ(MMP-1/MMP-13)による線維状肝臓コラーゲン分解のより広範な阻害をもたらす(35)。図3Bに示されるように、Timp1の発現はマイクロアレイ中のDMN処理ラットにおいて20倍をこえて上昇する。

10

#### 【0092】

先に観察された線維症遺伝子シグネチャーの1つである膜貫通タンパク質、CD63もまた、DMN処理後に上方制御されていた。慢性障害の後、HSCは活性化し、または筋線維芽細胞様細胞に分化し、収縮性、炎症性および線維形成性を獲得する。活性化したHSCは、組織修復の部位に移動して蓄積し、線維化進行中に大量の細胞外マトリクスタンパク質を分泌する。活性化したHSCは、肝臓損傷時における主要なコラーゲン産生細胞(コラーゲンは細胞外マトリクスタンパク質である)および肝線維症の開始物質であることが確認されている(7)。CD63の阻害が、損傷を受けた肝臓の新規な診断マーカーとなり得ることはすでに実証されている。

20

#### 【0093】

アルコール性肝臓疾患(ALD)研究において、アネクシンA1(Anxa1)は肝損傷後に高度に発現する(34)。アルコールに起因する肝傷害は炎症を経て生じる。ALDの進行には、継続的な肝損傷、線維化、および肝再生不全が含まれる。Anxa1が線維症の進行に関与し得ることはすでに示唆がされている。

#### 【0094】

上述した3つの遺伝子について本研究が過去の研究と一致するという事実は、オリゴヌクレオチドマイクロアレイ解析が、発生機序が未知である肝傷害と修復時の分子事象をモニターするための強力なアプローチであるということを示す。また、本研究において同定されたシグネチャー遺伝子は、低スコアと高スコアの組織病理群の間ではっきりと区別された。同時に、これら遺伝子は線維症形成に関与すると見られ、線維化検出の有力なマーカーである。

30

#### 【0095】

**実施例3**：DMN誘発肝線維症期間におけるタンパク質発現プロファイル

肝線維症で差別的に発現するタンパク質を同定するためにiTraqタギングを用いた実験を行った。

#### 【0096】

**同重体タギング法(Isobaric Tagging Method)：サンプル調製と試薬標識**

6匹のコントロールラットおよび6匹のDMN処理ラットの肝組織を用い、2回繰り返しの方式(duplicate)でiTraq標識実験を行った。肝組織を液体窒素中で凍結させてから、液体窒素で予冷しておいた乳鉢と乳棒を用い粉碎して粉末にした。次に、液体窒素を蒸発させ、粉末となった組織を分離してチューブに移し、-80で保存した。20倍量(volume)(w/v)の溶解バッファー(2%(w/v)SDS含有20mMリン酸緩衝液、pH7.6)を、粉末となった組織に加え、室温で1時間インキュベートした。サンプルを12000rpmで10分遠心分離機にかけ、その上清を取り、6倍量(volume)の冷アセトンサンプルのチューブに加えることによってアセトン沈殿を行った。沈殿が形成されるまでチューブを-20でインキュベートした。アセトンの上清を除去した(decanting)後、0.1%SDSおよび6M尿素を含む溶解バッファー(iTraq Reagents Kit、アプライドバイオシステム、フォスターシティ、CA、米国のものを用いた)中に沈殿物を再懸濁させた。

40

50

## 【0097】

Coomassie Plus Protein Assay Reagent (ピアス (PIERCE)、ロックフォード (Rockford)、IL、米国) を用いて総タンパク質含有量を測定した。200  $\mu$ g のタンパク質を取り、等量 (w/v) の 0.1% (w/v) SDS 含有溶出バッファーで希釈した。iTRAQ プロトコール (アプライドバイオシステム、フォスターシティー、CA、米国) に記述されているように、タンパク質を還元し、システインをブロックした。4倍量の溶出バッファーを各チューブに加え、20  $\mu$ g のトリプシンで 37  $^{\circ}$ C 16時間インキュベートした。コントロールラットおよび DMN 処理ラットの肝組織から抽出したトリプシンペプチドを、実験の各時点において iTRAQ 114 および 115 でそれぞれ標識した。

10

## 【0098】

ペプチドの分離および解析

異なる同重体タグを有するペプチドをプールし、10 mM リン酸と混合する (25% (v/v) アセトニトリルおよび 75% の H<sub>2</sub>O 中) ことにより酸性化して全量 4.0 mL とし、強陽イオン交換 (SCX) クロマトグラフィーを行った。その結果得られたサンプルを、5  $\mu$ m 300  $\mu$ m ピーズが充填された 2.1 mm x 200 mm ポリスルフォエチル A カラム (ポリ LC、コロンビア、MD、米国) を用いた液体クロマトグラフィーシステム (Ettan、GEヘルスケアバイオサイエンス、ウーメオ (Umea)、スウェーデン) に流速 0.08 mL/分で注入した。分析カラムの上流に同材質のガードカラムを取り付けた。バッファーには、バッファー A として 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、25% (v/v) アセトニトリル、pH 3.0 を、バッファー B として 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1 M KCl、25% (v/v) アセトニトリル、pH 3.0 を用いた。溶出のグラジエントを、バッファー B 16 mL で 0 から 40%、次いでバッファー B の別の 4 mL で 100% まで直線的に変化させた。合計 30 の画分を回収し、高速真空遠心 (speed vacuuming centrifugation) により乾燥させた。すべての画分を pepClean (登録商標) C-18 スピカラム (ピアス、ロックフォード、IL、米国) で脱塩した。各 SCX 画分の脱塩されたペプチドを高速真空遠心により乾燥させてから、nano LC ハイブリッド質量分析計で分析した。nano LC システムは LC Packings 社 (アムステルダム、オランダ) 製のもので、API QSTAR Pulsar ハイブリッド QqTOF 質量分析計 (アプライドバイオシステム / MDS シエックス (Sciex)、フォスターシティー、CA、米国) に接続させた。ペプチドの分離は、逆相 C<sub>18</sub> カラム (直径 75  $\mu$ m x 長さ 15 cm、3  $\mu$ m 粒子) を使い、5 ~ 50% バッファー A 45 分間、および 50 ~ 95% バッファー B 10 分間、流速 0.2  $\mu$ l/分の 2 段階リニアグラジエント (バッファー A : 2% (v/v) アセトニトリル、0.1% (w/v) ギ酸 ; バッファー B : 80% (v/v) アセトニトリル、0.1% (w/v) ギ酸) により行った。MS および タンデム MS (MS/MS) の m/z 走査範囲はそれぞれ 400 ~ 1200 および 75 ~ 1500 Da とした。MS/MS 質量スペクトルを 10 mm I.D. 溶融シリカチップを用い、連続フローモードで分析した。MS/MS スペクトルを ProQUANT 2.0 (アプライドバイオシステム / MDS シエックス、フォスターシティー、CA、米国) により NCB I の rat.fasta データベースと対比させて分析した。ペプチド同定の精度の許容範囲はそれぞれ MS で 0.5 Da、MS/MS で 0.5 Da とした。信頼度についてカットオフの設定は 95 とし、スコアについては 20 とした。ペプチドの相対定量を、ピーク下面積の比を用い、MS/MS 走査により行った。同定された構成ペプチドを平均することにより、タンパク質の相対定量を達成した。

20

30

40

## 【0099】

上記方法および iTRAQ プロテオーム研究から得られた結果の妥当性を確認するため、iTRAQ 実験において質量分析により定量されたピメンチンの発現変化を、抗ピメンチン抗体を用いたウェスタンブロットで得られたものと比較した。コントロールラットおよび DMN 誘発ラットの肝臓から、2% (w/v) SDS を含む 20 mM リン酸緩衝液、pH 7.6 でタンパク質を抽出した。12% SDS-PAGE で分離した後、タンパク質

50

をポリビニリデンジフルオライド膜に転写し、次いで、免疫染色をマウス抗ヒメンチンモノクローナル抗体（ケミコン（Chemicon）、テメクラ（Temecula）、CA、米国）で1時間、引き続き西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ラットIgGでさらに1時間行った。増強化学発光（enhanced chemiluminescence）システム（ECL、パーキン-エルマーライフィサイエンス、ウェルズリー、MA、米国）を用いて、免疫反応性バンドを検出した。図4に示されているように、ウェスタンブロットで観察された結果は、質量分析により測定された傾向と一致していた。

#### 【0100】

##### 結果

信頼度の閾値（confidence threshold）を95%に設定した場合に、同定された識別できるペプチドの数は624～1591の範囲にあった。有意数のこれらペプチドについては、2回以上の確認を行った。各実験において351個を超える特異なタンパク質（unique protein）が同定された。コントロールラットと対比して、F2およびF3の線維化スコアを有するDMN処理ラット肝組織のタンパク質発現において、39個のタンパク質が有意なかつ整合性のある差異（1.5倍以上）を示した。これら39個のタンパク質のうちいくつかは、フィブリノゲンおよびフィブロネクチンなど、線維化形成に関連してすでに報告されていたものであった。

#### 【0101】

本研究においてフィブリノゲンはDMN誘発ラットにて上方制御されていることが見出された。これは、モデルCC1<sub>4</sub>誘発ラットの肝傷害におけるフィブリノゲン遺伝子発現の結果と一致している。また、CC1<sub>4</sub>誘発ラットの肝傷害は、短期間の肝傷害と肝臓の線維成長の間に、フィブリノゲンのmRNAレベルの増加およびフィブリノゲン/フィブリン沈着をも示した。このことは、フィブリノゲンが短期間の肝傷害と肝線維化において「凝固の様な過程（clotting-like process）」に関与することを示唆し得る（36）。フィブロネクチンは2本のポリペプチド鎖からなる。それはコラーゲン、フィブリンおよびヘパリンの細胞への接着を媒介するものであり、故にこれら構造の細胞への付着を促すことで血栓の組織および創傷治癒にかかわっている。フィブロネクチンならびにI型およびIII型コラーゲンは、肝硬変の状態の特性としてCC1<sub>4</sub>誘発肝硬変ラットモデルに使用されている（37）。

#### 【0102】

さらに、グリシンN-メチルトランスフェラーゼ（Gnmt）、アルドラーゼA（Aldoa）、ミオシン軽鎖ポリペプチド6（My16）および細胞質アクチン（Act）が、RNA発現マイクロアレイとプロテオーム研究の両方において、差別的発現を示すものであるとして確認されている。

#### 【0103】

##### 実施例4：ネットワーク解析

線維症肝において差別的に発現する遺伝子をさらに絞り込むため、Ingenuity Pathway Analysis（IPA）ソフトウェア（インジェニユイティーシステム、マウンテンビュー、CA、米国）を用いてネットワーク解析を実行した。マイクロアレイとiTRAQプロテオーム解析により同定された遺伝子に対し相互作用ネットワーク分析を行った。遺伝子のアクセッション番号をIPAソフトウェアに取り込んだ。これらネットワークにより、文献において既知である相互作用をベースに、遺伝子産物間の機能的関係が示された。そして、IPAツールで、既知の生物学的経路にこれらネットワークを関連付けた。マイクロアレイ試験で同定された62個の遺伝子のうち、42個の遺伝子が3つのグループ、つまり、1)がん、細胞形態学および皮膚病と病変；2)脂質代謝、低分子生化学、分子輸送；ならびに3)がん、細胞運動、細胞成長と増殖に関連する遺伝子ネットワークに分類された。表3Aを参照されたい。プロテオーム試験において同定された39個のうち22個のタンパク質が、1)がん、細胞周期および細胞形態学；2)脂質代謝、低分子生化学、臓器損傷および異常；ならびに3)血液病、内分泌系の発達と機能、神経系の発達と機能に関連する別の3つのネットワークに分類された。図3B

10

20

30

40

50

を参照されたい。表 3 A および 3 B には、ネットワークのタンパク質の機能および構成要素がリストしてある。本研究で同定された遺伝子には下線を引いた。該下線を引いた遺伝子の、肝傷害との関係が報告されていないものは太字で示している。

【 0 1 0 4 】

**実施例 5** : D M N 誘発肝線維症ラットモデルにおいて同定されたバイオマーカーのヒトサンプルを用いた臨床評価

D M N 誘発肝線維症ラットモデルで同定されたバイオマーカーがヒトの肝線維症または肝硬変の診断に使用可能であるということを裏付けるため、ウェスタンブロット解析によりヒト血清中の酵素であるカルボニックアンヒドラーゼ I (表 2 参照、配列番号 1 1 および 7 1 ) の発現を調べた。健常志願者と B 型肝炎関連肝硬変に罹患した患者とから採取した血清サンプル (各患者からそれぞれ 8  $\mu$  l ) を、先ず P r o t e o P r e p (登録商標) 2 0 P l a s m a I m m u n o d e p l e t i o n K i t (シグマ-アルドリッチ、セントルイス、MO、米国) を用い、含有量の高い上位 2 0 種の血清タンパク質を除去するべく処理した。除去後、低含有量の血清タンパク質を 5 倍量 (volume) の冷アセトンを用い - 2 0 で 2 時間沈殿させた。次いで、タンパク質 / アセトン混合物を 1 2 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心分離にかけた。そのタンパク質沈殿物を再懸濁し、1 2 % S D S - P A G E ゲル上で電気泳動することにより分離してから、0 . 4 5  $\mu$  m のポリビニリデンジフルオライド ( P V D F ) 膜 (ミリポア、ビルリカ、MA、米国) に転写した。5 % ( w / v ) 脱脂乳でブロッキングした後、その膜を T B S T バッファー ( 2 0 m M T r i s - H C l , p H 7 . 6 , 1 3 7 m M N a C l , 0 . 1 % ( v / v ) T w e e n - 2 0 ) で洗浄し、カルボニックアンヒドラーゼ I に特異なヤギポリクローナル抗体 (アブカム (Abcam)、ケンブリッジ、英国) で 1 時間インキュベートした。その膜を T B S T バッファーで再度洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートロバ抗ヤギ I g G (ジャクソン イムノリサーチ ラボラトリー、PA、米国) で免疫染色した。その免疫反応のバンドを増強化学発光システム ( E C L , パーキン - エルマー ライフィサイエンス、ウェルズリー、MA、米国) を用いて視覚化した。ウェスタンブロットは、肝硬変患者から採取したいくつかの血清サンプルのカルボニックアンヒドラーゼ I 濃度が、肝硬変を罹っていない健常者から採取したサンプルよりも高いことをはっきりと示している。この結果は、肝線維症および / または肝硬変のラットモデルにおいて同定されたマーカーが、ヒトの肝線維症および / または肝硬変にも関与するということを裏付ける。

【 0 1 0 5 】

本明細書で言及した刊行物は、単にその開示が本出願の出願日より前であったために提示したまでである。本明細書のいかなる記載も、本発明が先行発明の理由によりかかる刊行物に先行し得ないことを認めるものであると解釈されるべきではない。また、提示した発行日は実際の発行日とは異なっている可能性があり、所定の機関による確認を必要とするかもしれない。

【 0 1 0 6 】

参考文献

1. Friedman, S.L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury, *J. Biol. Chem.* 275:2247-2250 (2000) .
2. Friedman, S.L. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies, *N. Engl. J. Med.* 328:1828-1835 (1993) .
3. Iredale, J.P. Cirrhosis: new research provides a basis for rational and targeted treatments, *BMJ* 327:143-147 (2003) .
4. Okita, K., Sakaida, I., and Hino, K. Current strategies for chemoprevention of hepatocellular carcinoma, *Oncology* 62 Suppl. 1:24-28 (2002) .
5. Iizuka, N., Oka, M., Yamada-Okabe, H., Mori, N., Tamesa, T., Okada, T., and Takemoto, N. Differential gene expression in distinct virologic types of hepatocellular carcinoma: association with liver cirrhosis, *Oncogene* 22:3007-3014 (2003) .

- 3) .
6. Day, C.P. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) : where are we now and where are we going?, *Gut* 50:585-588 (2002) .
  7. Batailler, R., and Brenner, D.A. Liver fibrosis, *J. Clin. Invest.* 115:209-218 (2005) .
  8. Friedman, S.L. Liver fibrosis - from bench to bedside, *J. Hepatol.* 38 Suppl. 1:S38-53 (2003) .
  9. Hayasaka, A., and Saisho, H. Serum markers as tools to monitor liver fibrosis, *Digestion* 59:381-384 (1998) .
  10. Hippo, Y., Taniguchi, H., Tsutsumi, S., Machida, N., Chong, J.-M., and Fukayama, M. Global gene expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays, *Cancer Res.* 62:233-240 (2002) .
  11. Ji, J., Chen, X., Leung, S. Y., Chi, J.-T. A., Chu, K. M., and Yuen, S. T. Comprehensive analysis of the gene expression profiles in human gastric cancer cell lines, *Oncogene* 21:6549-6556 (2002) .
  12. Wright, M.E., Han, D.K., and Aebersold, R. Mass spectrometry-based expression profiling of clinical prostate cancer, *Mol. Cell. Proteomics* 4(4) :545-54 (2005) .
  13. Nielsen, P.E., Egholm, M., Berg, R.H., and Buchardt, O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide, *Science.* 254 ( 5037) :1497-500 (1991) .
  14. Jezequel, A.M., Mancini, R., Rinaldesi, M.L., Macarri, G., Venturini, C., and Orlandi, F. A morphological study of the early stages of hepatic fibrosis induced by low doses of dimethylnitrosamine in the rat, *J. Hepatol.* 5:174-181 (1987) .
  15. George, J., Rao, K.R., Stern, R., and Chandrakasan, G. Dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats: the early deposition of collagen, *Toxicol.* 156:129-138 (2001) .
  16. DeSouza, L., Diehl, G., Rodrigues, M.J., Guo, J., Romaschin, A.D., Colgan, T.J., and Siu, K.W. Search for cancer markers from endometrial tissues using differentially labeled tags iTRAQ and cICAT with multidimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry, *J. Proteome Res.* 4(2) :377-86 (2005) .
  17. Mirsalis, J.C., and Butterworth, B.E. Detection of unscheduled DNA synthesis in hepatocytes isolated from rats treated with genotoxic agents: an in vivo-in vitro assay for potential carcinogens and mutagens, *Carcinogenesis* 1:621-625 (1980) .
  18. Haggerty, H.G., and Holsapple, M.P. Role of metabolism in dimethylnitrosamine-induced immunosuppression: a review, *Toxicol.* 63:1-23 (1990) .
  19. Ala-Kokko, L., Pihlajaniemi, T., Myers, J.C., Kivirikko, K.I., and Savolainen, E.R. Gene expression of type I, III and IV collagens in hepatic fibrosis induced by dimethylnitrosamine in the rat, *Biochem. J.* 244:75-79 (1987) .
  20. Coligen, J.E.. *Current Protocols in Immunology*, Volumes 1 and 2, (Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1991) .
  21. Waring, J.F., Jolly, R.A., Ciurlionis, R., Lum, P.Y., Praestgaard, J.T., Morfitt, D.C., and Buratto, B. Clustering of hepatotoxins based on mechanism of toxicity using gene expression profiles, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 175:28-42 (2001) .
  22. Waring, J.F., Ciurlionis, R., Jolly, R.A., Heindel, M., and Ulrich, R.G. Microarray analysis of hepatotoxins in vitro reveals a correlation between gene expression profiles and mechanisms of toxicity *Toxicol. Lett.* 120:359-368 (2001) .

- .
23. Lopez-De Leon, A., and Rojkind, M.. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections, *J. Histochem. Cytochem.* 33:737-743 (1985) .
  24. Schuppan, D., Krebs, A, Bauer, M., and Hahn, E.G. Hepatitis C and liver fibrosis, *Cell Death Differ.* 10 Suppl. 1:S59-67 (2003) .
  25. Gressner, A.M., Weiskirchen, R., Breitkopf, K., and Dooley, S. Roles of TGF- $\beta$  in hepatic fibrosis, *Front. Biosci.* 7:d793-807 (2002) .
  26. Bauer, M., and Schuppan, D. TGF- $\beta$  1 in liver fibrosis: time to change paradigms?, *FEBS Lett.* 502:1-3 (2001) . 10
  27. Dooley, S., Delvoux, B., Streckert, M., Bonzel, L., Stopa, M., ten Dijke, P., and Gressner, A.M. Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. TGF- $\beta$  signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells, *FEBS Lett.* 502:4-10 (2001) .
  28. Marvanova, M., Menager, J., Bezard, E., Bontrop, R.E., Pradier, L., and Wong, G. Microarray analysis of nonhuman primates: validation of experimental models in neurological disorders, *FASEB J.* 17:929-931 (2003) .
  29. Knodell, R.G., Ishak, K.G., Black, W.C., Chen, T.S., Craig, R., Kaplowitz, N., and Kiernan, T.W. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis, *Hepatology.* 1:431-435 (1981) . 20
  30. Ishak, K., Baptista, A., Bianchi, L., Callea, F., De Groote, J., Gudat, F., and Denk, H., et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis, *J. Hepatology.* 22:696-699 (1985) .
  31. Iredale, J.P.. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29:43-54 (1997) .
  32. Arthur, M.J., Mann, D.A., and Iredale, J.P. Tissue inhibitors of metalloproteinases, hepatic stellate cells and liver fibrosis, *J. Gastroenterol. Hepatology.* 13 Suppl.:S33-38 (1998) . 30
  33. Mazzocca, A., Carloni, V., Sciammetta, S., Cordella, C., Pantaleo, P., Caldini, A., and Gentilini, P. Expression of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins and their role in hepatic stellate cell motility and wound healing migration, *J. Hepatology.* 37:322-330 (2002) .
  34. Seth, D., Leo, M.A., McGuinness, P.H., Lieber, C.S., Brennan, Y., Williams, R., and Wang, X.M., Gene expression profiling of alcoholic liver disease in the baboon (*Papio hamadryas*) and human liver, *Am. J. Pathol.* 163:2303-2317 (2003) .
  35. Benyon, R.C. and Arthur, M.J. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells, *Semin. Liver Dis.* 21 (3) :373-84 (2001) . 40
  36. Neubauer, K., Knittel, T., Armbrust, T., and Ramadori, G. Accumulation and cellular localization of fibrinogen/fibrin during short-term and long-term rat liver injury, *Gastroenterol.* 108 (4) :1124-35 (1995) .
  37. Hernandez-Munoz, R., Diaz-Munoz, M., Suarez-Cuenca, J.A., Trejo-Solis, C., Lopez, V., Sanchez-Sevilla, L., Yanez, L., De Sanchez, V.C. Adenosine reverses a preestablished CCl<sub>4</sub>-induced micronodular cirrhosis through enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell proliferation in rats, *Hepatology.* 34 (4 Pt 1) :677-87 (2001) .
  38. Morgan et al., "The Matrix Effects on Kinetic Rate Constants of Antibody-Antigen Interactions Reflect Solvent Viscosity," *J. Immunol. Meth.* 217:51-60 (19 50

98) .

39. Zhuang et al., "Measurement of Association Rate Constant of Antibody-Antigen Interactions in Solution Based on Enzyme-Linked Immunosorbent Assay," J. Bio sci. Bioeng. 92 (4) :330-336 (2001) .

40. Strauss, W.M. "Hybridization With Radioactive Probes," in Current Protocols in Molecular Biology 6.3.1-6.3.6, (John Wiley & Sons, N.Y. 2000) .

41. Sambrook et al., 3 Molecular Cloning: A Laboratory Manual A8.40-A8.45, and A8.52-A8.55 (2001) .

【図面の簡単な説明】

【0107】

【図1A】ラットに線維症を誘発するためのDMN処理の概略説明図である。各ラットに、連続3週間、週に3度DMNを注射（逆三角形で示す）、あるいはコントロールとして生理食塩水を注射した。毎週ラットを評価し、犠牲死させた（三角形で示す。11日目開始し、これを第1週とし、第6週まで）。生化学分析のために血液サンプルを採取し（表1に要約）、肝臓を摘出して重さを量った。次いで、肝臓を、組織病理学試験用にホルムアルデヒドに固定、あるいはマイクロアレイおよびiTRAQプロテオーム試験用にRNAとタンパク質を単離するのに用いた。

【図1B】最も強力な既知の線維成長誘導因子、Tgf $\beta$ 1（形質転換成長因子-1）の、DMN処理ラットにおける定量リアルタイムPCR（Q-RT-PCR）結果であり、Tgf $\beta$ 1発現のレベルがより高くなっている。

【図2A】DMN処理ラットから採取した肝組織の組織病理学的実験の結果を示している。該ラット肝組織の典型的な表現型を、次の4つの組織病理学的特徴をスコアリングすることにより明らかとした。壊死のスコアをN0からN3（1番目の列）、炎症のスコアをI0からI3（2番目の列）、線維化のスコアをF0からF3（3番目の列）とし、最終列の脂肪変化のスコアは存在または非存在（+と-）とした。

【図2B】ラットモデルの組織病理学的スコアの要約である。結果は時間経過に沿って並べてある。壊死性炎症変化は3グレード：A0 = なし、A（1～3） = 軽度およびA（4～6） = 中程度の壊死性炎症、に分けられている。線維化変化は2グレード：F（0～1） = 正常から門脈域の線維性拡大、F（2～3） = 線維性架橋形成から高頻度な結節形成を伴う線維性架橋形成、に分けられている。脂肪変化は存在または非存在（+ / -）で示される。ラットの数のカウントし、各時点の各組織病理学的レベルにおけるラットの百分率を計算するのに用いた。

【図3A】ラットにおけるDMN誘発線維症モデルから得られた256個の遺伝子パターンの発現のデンドログラムを示す。

【図3B】Timp1（メタロプロテイナーゼ1の組織阻害因子）発現のQ-RT-PCR結果とマイクロアレイデータ間での比較を示しており、両方の結果の間の高い一致性が示されている。Timp1のQ-RT-PCR分析では、発現レベル（四角形で示す）は、全遺伝子発現の平均と比較され、図右側の対数目盛りによって測定される。2つのTimp1転写産物、rc\_AI169327\_atとrc\_AI169327\_g\_at（丸と三角形でそれぞれ示す）の発現レベルは、全遺伝子発現レベルの平均と比較され、図左側に示される目盛りにより測定される。

【図4A】iTRAQプロテオミクスにより測定された2、4および6週目におけるDMN処理ラットおよびコントロールラットのビメンチン発現の比率を示す。ラットがDMN処理されている場合に、その肝臓におけるビメンチン発現は2.4から3.4倍増加した。

【図4B】DMN誘発ビメンチン発現のウェスタンブロット解析の結果を示す。観察された結果は、iTRAQプロテオーム実験における質量分析により測定された傾向と一致している。

【図5】健常志願者とB型肝炎関連肝硬変の患者より採取したヒト血清中のカルボニックアンヒドラーゼI発現を比較するウェスタンブロット解析の結果を示す。

10

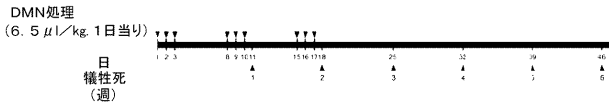
20

30

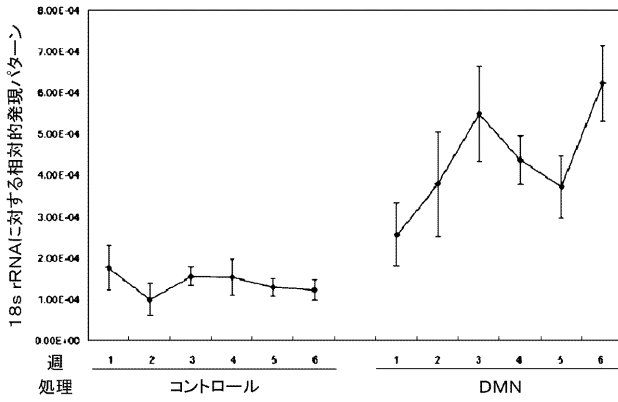
40

50

【 図 1 A 】



【 図 1 B 】

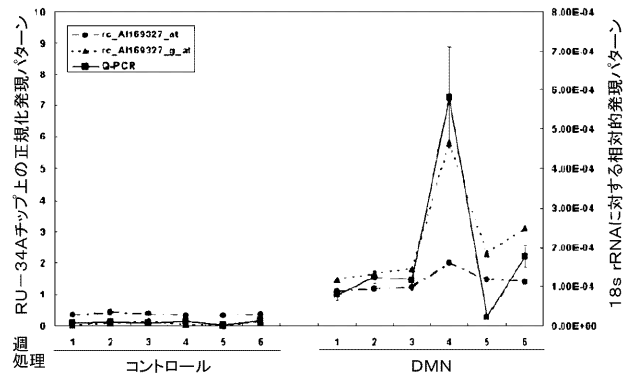


【 図 2 B 】

因子(スコア)	DMN処理			コントロール
	1-2 wk n (%)	3-4 wk n (%)	5-6 wk n (%)	
壊死性炎症	A0	0 (0)	1 (9)	4 (44)
	A(1-3)	5 (62.5)	3 (27)	4 (44)
	A(4-6)	3 (36.5)	7 (64)	1 (12)
線維化	F(0-1)	6 (75)	1 (9)	2 (22)
	F(2-3)	2 (25)	10 (91)	7 (78)
脂肪変化	-	7 (87.5)	11 (100)	9 (100)
	+	1 (12.5)	0 (0)	0 (0)

n: ラットの数

【 図 3 B 】

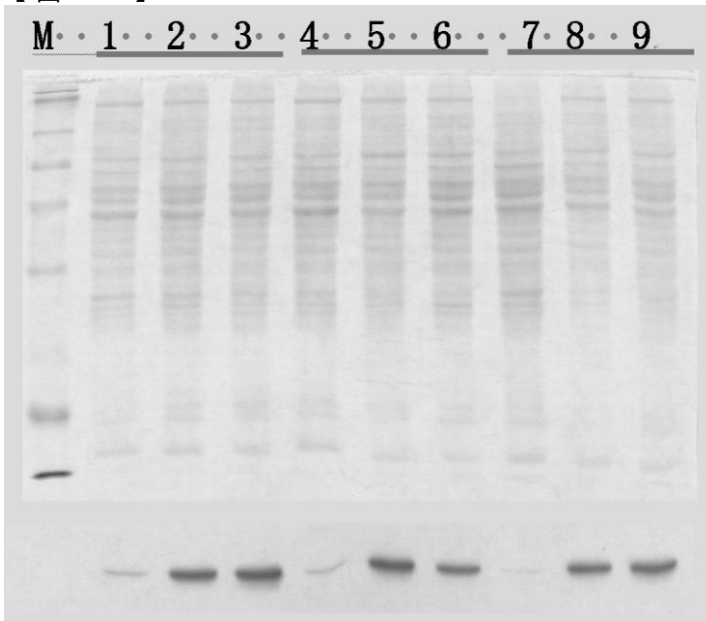


【 図 4 A 】

2、4および6週目におけるDMN処理ラットとコントロールラットのビメンチンの比		
2週目	4週目	6週目
2.43	3.41	3.44



【 図 4 B 】



M: マーカー

1: コントロール2週目

2: DMN2週目-1

3: DMN2週目-2

4: コントロール4週目

5: DMN4週目-1

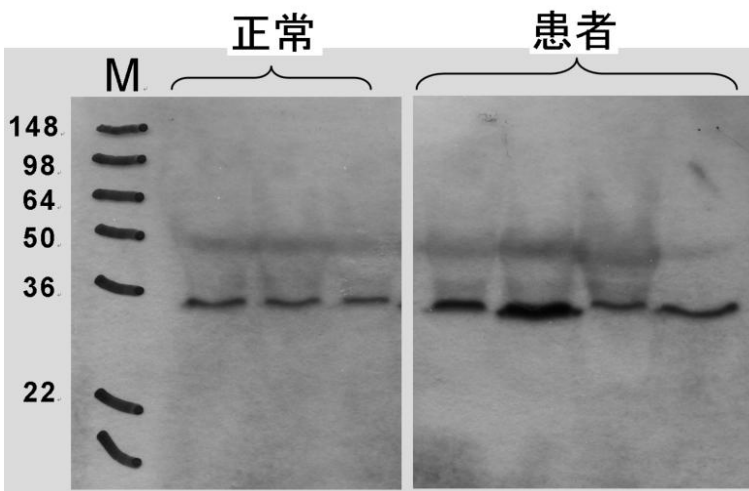
6: DMN4週目-2

7: コントロール6週目

8: DMN6週目-1

9: DMN6週目-2

【 図 5 】



【 誤訳訂正書 】

【 提出日 】 平成19年3月20日 (2007.3.20)

【 誤訳訂正 1 】

【 訂正対象書類名 】 明細書

【 訂正対象項目名 】 配列表

【 訂正方法 】 追加

【 訂正の内容 】

【 配列表 】

[2007252366000001.app](#)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>G 0 1 N 33/15 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/50	Z	
		G 0 1 N 33/15	Z	

(72)発明者 謝 惠珠  
台湾彰化縣社頭鄉 なん 底村永興路3 1 號

(72)発明者 會 鎰 れい  
台湾嘉義市大業街1 7 6 巷1 4 弄5 5 號

(72)発明者 蘇 立仁  
台湾台北市松山区撫遠街3 0 0 巷1 2 號3 樓

(72)発明者 黄 奇英  
台湾台北市中山区遼寧街1 0 1 巷3 1 號4 樓

(72)発明者 徐 士蘭  
台湾台北市大安区辛亥路3 段3 號8 樓之5

F ターム(参考) 2G045 AA25 CB01 DA12 DA13 DA14 DA36  
4B024 AA01 AA11 BA80 CA02 CA05 CA09 FA10 HA14  
4B063 QA06 QA08 QA13 QA18 QA19 QQ08 QQ43 QQ52 QQ79 QR32  
QR35 QR48 QR55 QR62 QR77 QS25 QS34

【外国語明細書】

[2007252366000001.pdf](#)

[2007252366000002.pdf](#)

[2007252366000003.pdf](#)

[2007252366000004.pdf](#)

专利名称(译)	肝纤维化损伤的生物标志物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007252366A</a>	公开(公告)日	2007-10-04
申请号	JP2007014253	申请日	2007-01-24
[标]申请(专利权)人(译)	财团法人工业技术研究院		
申请(专利权)人(译)	财团法人工业技术研究院 财团法人国家卫生研究院		
[标]发明人	謝惠珠 會錙れい 蘇立仁 黃奇英 徐士蘭		
发明人	謝惠珠 會錙▲れい▼ 蘇立仁 黃奇英 徐士蘭		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/02 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15		
CPC分类号	G01N33/6893 C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N33/5023 G01N2800/085		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12Q1/02 C12N15/00.A G01N33/53.M G01N33/53.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z C12Q1/68.AZN.A C12Q1/6883.C C12Q1/6883.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA05 4B024/CA09 4B024/FA10 4B024/HA14 4B063/QA06 4B063/QA08 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34		
优先权	60/761959 2006-01-24 US		
其他公开文献	JP4297942B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种检测包括纤维化和/或肝硬化在内的肝纤维化损伤的方法。通过分析63种特定基因和至少一种编码选自其人直系同源物的蛋白质的基因的差异表达，在生物样品中分析至少一种基因的差异表达。一种指示疾病或肝硬化存在的方法。一种试剂盒，包含通过进一步分析人类直系同源基因编码的63种基因和蛋白质的差异表达来检测肝纤维化和/或肝硬化的核酸探针或抗体。[选择图]无

表1. 処理群および対照群のプラットにおける臨床、化学および組織的パラメータ

検査値	コントロール			DMN処理		
	1~2週目	3~4週目	5~6週目	1~2週目	3~4週目	5~6週目
77kDa(μg/dl)	4.4±0.4(7)	4.6±0.2(8)	4.7±0.2(8)	3.9±0.7(7)	3.5±0.6(11)	3.2±0.1(7)
67kDa(μg/dl)	61.1±26.7(8)	65.9±19.7(7)	50.3±4.9(8)	453.5±78.3(8)	566.6±203.5(11)	783.6±405.2(7)
607kDa(μg/dl)	110.3±37.6(8)	84.0±23.5(7)	104.1±23.5(8)	661.5±134.4(8)	1006.1±748.6(11)	1572.9±955.3(7)
α2(I)mg/dl	0.13±0.05(8)	0.10±0.01(8)	0.13±0.05(8)	0.72±0.50(8)	1.01±0.74(11)	1.13±1.00(7)
AKP(U/L)	46.0±3.7(4)	44.8±2.2(4)	47.0±3.6(4)	600.8±183.0(4)	688.9±222.0(3)	468±12.7(2)
LDH(U/L)	292.3±75.1(4)	299.3±31.7(3)	292.3±31.3(4)	444.8±102.7(4)	562.0±120.8(3)	853.5±93.2(2)
γ-GT(U/L)	6.9±0.3(8)	6.9±0.5(4)	7.3±0.2(4)	6.7±0.1(2)	5.0±0.8(4)	3.6±0.3(2)
AST(U/L)	0.32±0.04(4)	0.2±0.01(2)	0.24±0.03(4)	0.49±0.19(4)	0.38±0.05(4)	0.35±0.07(2)
CHOL(mg/dl)	88±5(4)	71±20(4)	91±5(4)	77±9(4)	70±13(6)	67±18(5)
BUN(mg/dl)	31±2(4)	25±6(4)	29±9(4)	35±4(4)	38±2(4)	31±5(2)
ALT(mg/dl)	2.2±0.8(4)	2.4±0.5(4)	2.3±0.8(4)	1.9±0.6(4)	6.2±1.1(4)	8.2±1.6(2)
PT(sec)	14±1(7)	13±1(8)	13±1(7)	15±1(7)	20±4(9)	22±5(6)
PLT(10 <sup>9</sup> /-)	741±245(8)	391±124(8)	896±109(8)	407±72(7)	300±165(11)	228±20(7)

GPT: γ-グルタミン转氨酶; AST: アスパラギン转氨酶; GOT: γ-グルタミン转氨酶; ALP: アルカリ性リン酸转氨酶; LDH: ラクト脱氢酶; AFP: α-フェトプロテイン; C101: コリスチロール; BUN: 血中尿素窒素; ALT: 肝转氨酶; PT: プロトロンビンは時間; PLT: 血小板  
 a: 処理群および対照群における1~2, 3~4または5~6週目の平均値±SD