

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6698154号
(P6698154)

(45) 発行日 令和2年5月27日(2020.5.27)

(24) 登録日 令和2年4月30日(2020.4.30)

(51) Int.Cl.	F I	
C 1 2 Q 1/6809 (2018.01)	C 1 2 Q	1/6809 Z N A Z
C 1 2 Q 1/6837 (2018.01)	C 1 2 Q	1/6837 Z
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09 2 0 0
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N	33/53 M
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N	33/53 D
請求項の数 10 (全 18 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-515748 (P2018-515748)	(73) 特許権者	517423811
(86) (22) 出願日	平成28年6月3日(2016.6.3)		アプタバイオ セラピューティクス イン
(65) 公表番号	特表2018-524020 (P2018-524020A)		コーポレイテッド
(43) 公表日	平成30年8月30日(2018.8.30)		A P T A B I O T H E R A P E U T I C
(86) 国際出願番号	PCT/KR2016/005906		S I N C .
(87) 国際公開番号	W02016/195415		大韓民国, 1 6 9 5 4, キョンギード, ヨ
(87) 国際公開日	平成28年12月8日(2016.12.8)		ンインーシ, キフンーグ, フンドク 1ー
審査請求日	平成30年1月31日(2018.1.31)		ロ, 1 3, タワーードン エイ 0 5 0 4
(31) 優先権主張番号	10-2015-0079672		ーホ
(32) 優先日	平成27年6月5日(2015.6.5)	(74) 代理人	100139594
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)		弁理士 山口 健次郎
		(74) 代理人	100185915
			弁理士 長山 弘典
		(74) 代理人	100090251
			弁理士 森田 憲一
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】腎症診断用のマーカーとしてのSH3YL1の用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

SH3YL1 遺伝子の発現レベルまたはSH3YL1 タンパク質のレベルを測定することができる物質を含有する糖尿病性腎症診断用の組成物。

【請求項2】

上記SH3YL1 遺伝子の発現レベルは発現の可否、発現量及び発現パターンで構成された群から選択されることを特徴とする請求項1に記載の糖尿病性腎症診断用の組成物。

【請求項3】

上記SH3YL1 タンパク質のレベルは上記タンパク質の存在の可否、発現量及び発現パターンで構成された群から選択されることを特徴とする請求項1に記載の糖尿病性腎症診断用の組成物。

【請求項4】

上記SH3YL1 遺伝子の発現レベルを測定することができる物質はSH3YL1 遺伝子を増幅することができるプライマー対または上記SH3YL1 遺伝子とハイブリダイズすることができるプローブであることを特徴とする請求項1に記載の糖尿病性腎症診断用の組成物。

【請求項5】

上記SH3YL1 タンパク質のレベルを測定することができる物質はSH3YL1 遺伝子がコードするタンパク質に特異的に結合する抗体またはアプタマーであることを特徴とする請求項1に記載の糖尿病性腎症診断用の組成物。

【請求項 6】

糖尿病性腎症診断に必要な情報を提供するために、請求項 1 に記載の糖尿病性腎症診断用の組成物を生物学的試料に処理して、試料中の S H 3 Y L 1 遺伝子の発現レベルまたは S H 3 Y L 1 タンパク質のレベルを検出する方法。

【請求項 7】

生物学的試料は、組織、細胞、血液、血清、血漿、唾液及び尿で構成された群から選択されることを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

S H 3 Y L 1 遺伝子と特異的にハイブリダイズすることができるプローブが固定されている糖尿病性腎症診断用のマイクロアレイ。

10

【請求項 9】

S H 3 Y L 1 遺伝子または S H 3 Y L 1 遺伝子 に特異的に存在する塩基配列を含む断片を増幅することができるプライマー対、上記 S H 3 Y L 1 遺伝子と特異的にハイブリダイズすることができるプローブまたは S H 3 Y L 1 遺伝子がコードするタンパク質に特異的な抗体またはアプタマーを含有する糖尿病性腎症診断用のキット。

【請求項 10】

次の段階を含む糖尿病性腎症の予防または治療用の物質をスクリーニングする方法：

- (a) S H 3 Y L 1 遺伝子を発現する細胞に候補物質を接触させる段階；
- (b) S H 3 Y L 1 遺伝子の発現レベル及び / または S H 3 Y L 1 タンパク質のレベルを測定する段階；及び
- (c) S H 3 Y L 1 遺伝子の発現レベル及び / または S H 3 Y L 1 タンパク質のレベルが減少する場合の候補物質を糖尿病性腎症の予防または治療用の物質として選別する段階。

20

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は腎症診断用のマーカーとしての S H 3 Y L 1 の用途に関するもので、さらに詳しくは S H 3 Y L 1 遺伝子の発現レベルまたは S H 3 Y L 1 遺伝子がコードするタンパク質のレベルを測定することができる物質を含有する腎症診断用の組成物、腎症診断用のマイクロアレイ及び腎症診断用のキットに関するものである。

【背景技術】

30

【0002】

腎症疾患の中糖尿病性の血管合併症の中一つである糖尿病性腎症は末期腎不全症 (e n d s t a g e r e n a l d i s e a s e : E S R D) を誘発する第一原因の疾患で、韓国で糖尿病による E S R D 患者は 1 9 9 6 年 3 0 . 8 % から 2 0 0 6 年 4 2 . 3 % 、 2 0 1 3 年 4 8 . 0 % へ持続的に増加する傾向である。このような状況は現在まで知られている普遍的治療である食事、運動及び薬物療法が適切ではなかったという点と既存の糖尿病及び糖尿病性腎症の治療法の以外に病因に対する多様な接近が必要であることを示唆する。

【0003】

現在糖尿病による腎症を予防するためにレニン - アンジオテンシン系 (r e n i n - a n g i o t e n s i n s y s t e m : R A S) の抑制剤を主に使用している。R A S 抑制剤は血液力学的の効能だけではなく慢性炎症反応あるいは繊維化を誘導する c y t o k i n e 、 c h e m o k i n e 、 g r o w t h f a c t o r などの生成を阻害して腎臓機能を保護する優れた効果を示したが、患者個々の遺伝的性向が違って長期的治療による不作用及び治療剤に対する耐性問題があって治療効果がその期待に及ばない。

40

【0004】

また、去る数年間、腎症に対する原因究明、診断方法及び治療方法に対する集中的な研究が行われたにもかかわらず今まで腎症を効果的に治療することができる確実な治療剤が開発されていない。従って糖尿病性腎症を初期段階で発見して治療することが最も効果的な方法と言える。

50

【0005】

微細蛋白尿（24時間尿アルブミン30 - 300 mg / dまたはアルブミン排泄比率20 - 200 μ g / min）は糖尿病性腎症の進行を初期に予測して、腎症外の血管合併症を予測するバイオマーカーで最も多く使用されている。既存の観察研究によると、微細蛋白尿は糸球体濾過率が減少を予測する危険因子でありながら、慢性腎不全へ進行する独立した危険因子でもある。このような理由で、現在糖尿病の診断及び治療指針にも微細蛋白尿の測定を勧告している。

【0006】

しかしながら、最近の研究は微細蛋白尿のみで腎症を早期診断して、進行する指標で判断するには制限があると報告している。

10

【0007】

一つ目の理由で糖尿病患者で微細蛋白尿の自然所失頻度が高いということである。微細蛋白尿を示した第1型または2型の糖尿病患者で約21 - 64%の頻度で経過中微細蛋白尿の自然消失を示して、第1型の糖尿病患者の10年の追跡をした大規模の研究結果も、顕性蛋白尿へ進行した患者の頻度は28%、微細蛋白尿の自然消失を示した患者の頻度は40%で高かった。1年間2 - 3回の測定期間中、持続的に微細蛋白尿を示した第1型の糖尿病患者を5年間追跡した研究でも64%の頻度で微細蛋白尿の消失を報告した（Tabaei BP et al., Diabetes Care, 24; 1560 - 1566, 2001; Perkins BA et al., N Eng J Med, 348: 2285 - 2293, 2003; Hovind P et al., BMJ, 328: 1105, 2004; Steinke JM et al., Diabetes, 54: 2164 - 2171, 2005; De Boer IH et al., Arch Intern Med, 171: 412 - 420, 2011; Gaede P et al., Nephrol Dial Transplant, 19: 1784 - 1788, 2004; Araki S et al., Diabetes, 54: 2983 - 2987, 2005; Yamada T et al., Diabetes Care, 28: 2733 - 2738, 2005; RJ MacIsaac et al., Kidney International, 86: 50 - 57, 2014）。

20

【0008】

二つ目の理由で微細蛋白尿がなく腎機能が低下された（糸球体濾過率 $< 60 \text{ ml} / \text{min} / 1.73 \text{ m}^2$ ）糖尿病患者の頻度が高いということである。1990年代初の研究によると微細蛋白尿がなく腎機能が低下されている第1型の糖尿病患者で組織検査結果、典型的な糖尿病性腎症を示した患者群があって、第1型及び2型の糖尿病患者で約30%で腎機能の低下が進行された。また、第2型の糖尿病患者を追跡した研究では微細蛋白尿の発生に先行して腎機能の低下が発生する結果を示した（Tsalamandris C et al., 43: 649 - 655, 1994; Yokoyama H et al., Nephrol Dial Transplant, 24: 1212 - 1219, 2009; Molith ME et al., Diabetes Care, 33: 1536 - 1543, 2010; Kramer HJ et al., JAMA, 289: 3273 - 3277, 2003）。

30

40

【0009】

よって、本発明者らは腎症を早期に診断することができる新しい方法を開発しようと鋭意努力した結果、腎症患者の血液でSH3YL1遺伝子の発現レベルまたはSH3YL1タンパク質のレベルが非 - 腎症患者の血液での数値に比べ有意的に増加することを確認して本発明を完成するようになった。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の目的はSH3YL1遺伝子の発現レベル及び/またはSH3YL1タンパク質のレベルを測定して腎症を早期に診断することができる腎症診断用の組成物を提供するこ

50

とである。

【0011】

本発明の他の目的は腎症診断に必要な情報を提供するために、SH3YL1遺伝子の発現レベル及び/またはSH3YL1タンパク質のレベルを測定及び検出する方法を提供することである。

【0012】

本発明のまた他の目的はSH3YL1遺伝子の発現レベル及び/またはSH3YL1タンパク質のレベルを検出することができるマイクロアレイを提供することである。

【0013】

本発明のまた他の目的はSH3YL1遺伝子の発現レベル及び/またはSH3YL1タンパク質のレベルを測定して腎症を早期に診断することに活用されることができるキットを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0014】

上記目的を達成するために本発明はSH3YL1遺伝子の発現レベルまたはSH3YL1タンパク質のレベルを測定することができる物質を含有する腎症診断用の組成物を提供する。

【0015】

本発明はまた、腎症診断に必要な情報を提供するために、上記腎症診断用の組成物を患者から採取した生物学的試料に処理して、試料中のSH3YL1遺伝子の発現レベルまたはSH3YL1タンパク質のレベルを検出する方法を提供する。

【0016】

本発明はまた、SH3YL1遺伝子またはその断片とハイブリダイズすることができるプローブが固定されている腎症診断用のマイクロアレイを提供する。

【0017】

本発明はまた、SH3YL1遺伝子またはその断片を増幅することができるプライマー対、上記SH3YL1遺伝子とハイブリダイズすることができるプローブまたはSH3YL1遺伝子がコードするタンパク質に特異的な抗体またはアプタマーを含有する腎症診断用のキットを提供する。

【0018】

本発明はまた、(a)SH3YL1遺伝子を発現する細胞に候補物質を接触させる段階；(b)SH3YL1遺伝子の発現レベル及び/またはSH3YL1タンパク質のレベルを測定する段階；(c)SH3YL1遺伝子の発現レベル及び/またはSH3YL1タンパク質のレベルが減少される場合の候補物質を腎症の予防または治療用の物質で選別する段階を含む腎症の予防または治療用の物質をスクリーニングする方法を提供する。

【0019】

本発明はまた、SH3YL1遺伝子またはSH3YL1タンパク質の腎症診断用のマーカーとしての用途を提供する。

【0020】

本発明はまた、生物学的試料中のSH3YL1遺伝子の発現レベルまたはSH3YL1タンパク質のレベルを測定することを特徴とする腎症の診断方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】図1はSH3YL1の線形構造を示したものである。

【図2】図2はLPSによる細胞内のSH3YL1の発現増加を確認した結果を示したものである。

【図3】図3はHPMEC細胞でLPS刺激によるSH3YL1の細胞外分泌を確認した結果を示したものである。

【図4】図4は各患者群からSH3YL1の濃度変化を示したものである。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

【0022】

他の式で定義されない限り、本明細書で使用された全ての技術的及び科学的用語は本発明が属する技術分野で熟練された専門家によって通常的に理解されるものと同一な意味を有する。一般的に本明細書で使用された命名法は本技術分野でよく知られて通常的に使用されるものである。

【0023】

既存に腎症診断のためにはAlbuminuria、eGFR、UACR、血中クレアチンなどがマーカーとして使用されているが、上記マーカーによる診断は腎臓が70%以上壊れた後になってこそ可能であるという問題点があった。

【0024】

本発明では新しい腎症診断用のマーカーを発掘するために腎臓組織及び非腎臓組織で発現の違いを示す遺伝子の発現レベルまたはタンパク質のレベルを調査した結果、SH3YL1遺伝子及び/またはSH3YL1タンパク質が非腎臓組織に比べ腎臓組織で過発現されることを確認して、特にSH3YL1遺伝子及び/またはSH3YL1タンパク質が腎臓組織で過発現されたという結果を基にして上記SH3YL1遺伝子及び/またはSH3YL1タンパク質が腎臓の発病を診断及び予測することができるバイオマーカーに活用されることができるだけではなく、SH3YL1遺伝子の発現及び/またはSH3YL1タンパク質のレベルを抑制することができる物質が腎臓の予防及び治療の用途に活用されることができるとを発見した。

【0025】

本発明において、「SH3YL1タンパク質」は配列番号1のアミノ酸配列を有するタンパク質、またはこれと90%以上、好ましくは95%以上、さらに好ましくは99%以上の配列相同性を有するアミノ酸配列のタンパク質を意味する。

【0026】

また、「SH3YL1遺伝子」または「sh3yl1」は「SH3YL1タンパク質」のアミノ酸配列をコードする遺伝子として、配列番号2の核酸配列、またはこれと90%以上、好ましくは95%以上、最も好ましくは99%以上の配列相同性を有する核酸配列の遺伝子を意味する。

【0027】

本発明における「SH3YL1タンパク質レベル」はSH3YL1タンパク質の体内での濃度または活性を意味し、「SH3YL1遺伝子発現レベル」は「SH3YL1遺伝子」の体内での発現量を意味する。

【0028】

本発明で、「診断」という用語は病理状態を確認することを意味することとして、本発明の目的上、上記診断は腎臓診断マーカーの発現の有無を確認して腎臓の進行程度を確認することを意味し、また、本発明での「診断」は腎臓診断マーカーの発現の有無及び発現の程度を確認して腎臓の発症及び軽減などを判断することも含む。

【0029】

したがって、本発明は一観点から、SH3YL1遺伝子の発現レベルまたはSH3YL1遺伝子がコードするタンパク質のレベルを測定することができる物質を含有する腎臓診断用の造成物に関するものである。

【0030】

本発明の一様態では炎症誘発因子であるLPSを処理したHAEC(human aortic endothelial cell)、HPMEC(human pulmonary microvascular endothelial cell)でSH3YL1遺伝子の発現が増加して、細胞外SH3YL1タンパク質の分泌が増加することを確認した。

【0031】

本発明の他の様態では腎臓患者群のalbuminuriaの等級によって血液でSH3YL1遺伝子の発現量及びタンパク質の量を正常群と比較した結果、正常群に比べて腎

10

20

30

40

50

症患者の場合 S H 3 Y L 1 遺伝子の発現量がさらに増加したことを確認することができた。

【 0 0 3 2 】

本発明において、上記 S H 3 Y L 1 遺伝子の発現レベルは発現の可否、発現量及び発現パターンで構成された群から選択されることを特徴とすることができ、上記 S H 3 Y L 1 遺伝子がコードするタンパク質のレベルは上記タンパク質の存在の可否、量及び発現パターンで構成された群から選択されることを特徴とすることができる。

【 0 0 3 3 】

本発明で上記 S H 3 Y L 1 遺伝子の発現レベルを測定することができる物質は S H 3 Y L 1 遺伝子を増幅することができるプライマー対または上記 S H 3 Y L 1 遺伝子とハイブリダイズすることができるプローブであることを特徴とすることができる。

10

【 0 0 3 4 】

本発明において、上記 S H 3 Y L 1 遺伝子の発現量またはタンパク質の量を測定する方法は逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcriptase - polymerase chain reaction)、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (real time - polymerase chain reaction)、ウエスタンブロット、ノーザンブロット、ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)、放射線免疫測定法 (RIA : radioimmunoassay)、放射免疫拡散法 (radioimmunodiffusion) 及び免疫沈降分析法 (immunoprecipitation assay) でなっている群の中から選択されるものであることができる。

20

【 0 0 3 5 】

本発明で上記 S H 3 Y L 1 遺伝子のレベルは、好ましく S H 3 Y L 1 遺伝子が発現された mRNA のレベル、すなわち、mRNA の量を意味し、上記レベルを測定することができる物質では S H 3 Y L 1 遺伝子に特異的なプライマーまたはプローブを含むことができる。本発明で上記 S H 3 Y L 1 遺伝子に特異的なプライマーまたはプローブは配列番号 2 で示す S H 3 Y L 1 遺伝子全体または遺伝子の特定領域を特異的に増幅することができるプライマーまたはプローブであることができ、上記プライマーまたはプローブは当業界に知られた方法を通じてデザインすることができる。

【 0 0 3 6 】

本発明で上記「プライマー」という用語は適切な温度及び緩衝液内で適した条件 (即ち、4種の異なるヌクレオチド三リン酸及び重合反応酵素) の下で鋳型 - 指示 DNA 合成の開始点として作用することができる単鎖のオリゴヌクレオチドを意味する。プライマーの適合した長さは多様な要素、例えば、温度とプライマーの用途によって変化のあることができる。また、プライマーの配列は鋳型の一部の配列と完全に相補的な配列を有する必要はなく、鋳型とハイブリダイズされてプライマー固有の作用ができる範囲内の十分な相補性を有していれば十分である。したがって、本発明でのプライマーは鋳型である S H 3 Y L 1 遺伝子のヌクレオチド配列に完璧に相補的な配列を有する必要はなく、この遺伝子配列にハイブリダイズされてプライマーの作用ができる範囲内で十分な相補性を有すると十分である。また、本発明によるプライマーは遺伝子増幅反応に利用されることができるものである。

30

40

【 0 0 3 7 】

上記「増幅反応」は核酸分子を増幅する反応をいい、このような遺伝子の増幅反応に対しては当業界によく知られていて、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT - PCR)、リガーゼ連鎖反応 (LCR)、転写介在増幅 (TMA)、核酸塩基配列ベース増幅 (NASBA) などが含まれることができる。

【 0 0 3 8 】

本発明において、上記「プローブ」という用語は自然のまたは変形されたモノマーまたは連鎖 (linkages) の線形オリゴマーを意味し、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含み、ターゲットヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイズするこ

50

とができ、自然的に存在するかまたは人為的に合成されたものをいう。本発明によるプローブは単一鎖であることができ、好ましくはオリゴデオキシリボヌクレオチドであることができる。本発明のプローブは自然 dNMP (即ち、dAMP、dGMP、dCMP 及び dTMP)、ヌクレオチド類似体または誘導体を含むことができる。また、本発明のプローブはリボヌクレオチドも含むことができる。例えば、本発明のプローブは、骨格の変形されたヌクレオチド、例えば、ペプチド核酸 (PNA) (M. Egholm et al., Nature, 365: 566 - 568 (1993))、ホスホリチオエート DNA、ホスホジチオエート DNA、ホスホアミデート DNA、アミド結合 DNA、MMI 結合 DNA、2'-O-メチル RNA、アルファ-DNA 及びメチルホスホン酸 DNA、糖修飾されたヌクレオチド、例えば、2'-O-メチル RNA、2'-フルオロ RNA、2'-アミノ RNA、2'-O-アルキル DNA、2'-O-アリル DNA、2'-O-アルキニル DNA、ヘキソース DNA、ピラノシル RNA 及びアンヒドロヘキシトール DNA 及び塩基修飾を有するヌクレオチド、例えば、C-5 置換されたピリミジン (置換基は、フルオロ-、プロモ-、クロロ-、ヨード-、メチル-、エチル-、ビニル-、ホルミル-、エチニル-、プロピニル-、アルキニル-、チアゾリル-、イミダゾリル-、ピリジル-を含む)、C-7 置換基を有する 7-デアザプリン (置換基は、フルオロ-、プロモ-、クロロ-、ヨード-、メチル-、エチル-、ビニル-、ホルミル-、アルキニル-、アルケニル-、チアゾリル-、イミダゾリル-、ピリジル-を含む)、イノシン及びジアミノプリンを含むことができる。

【0039】

本発明において、上記 SH3YL1 タンパク質のレベルを測定することができる物質は SH3YL1 タンパク質に特異的な物質であることを特徴としており、好ましくは抗体 (antibody) またはアプタマー (aptamer) であることができるが、これに限られることなく、SH3YL1 タンパク質に特異的に結合できる物質ならば、どれでも制限なしに使用可能である。

【0040】

本発明で、上記の抗体はポリクローン抗体、単クローン抗体及び組換え抗体などを含む概念で、完全な抗体 (whole antibody) だけではなく、抗体の断片 (antibody fragment) も含む。本発明での抗体は免疫グロブリン分子のすべての類型 (例: IgG、IgE、IgM、IgD、及び IgA) 及びその下位部類 (例: IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 及び IgA2) であることができ、どのような種から由来されたものでも使用可能で、本発明での「抗体の断片」は少なくとも抗原に対する結合機能を保有している断片を意味し、単鎖抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、Fab 断片、F(ab')₂ 断片、Fd、scFv、ドメイン抗体、ミニボディ、スキャブ (single chain antibody, scAb)、抗体不変領域の誘導体、タンパク質スキャフォールド (protein scaffolds) に基づいた人工抗体などを含む。

【0041】

本発明において、上記記述したことのように腎症を診断することができるマーカータンパク質として SH3YL1 タンパク質が究明されたので、上記のタンパク質を利用して抗体を生成する方法は、当該技術分野の一般的技術者が公知された技術を利用して容易に製造することができる。例えば、ポリクローン抗体の場合には SH3YL1 抗原を動物に注射して動物から採血して抗体を含む血清を収得する当業界に広く公知された方法によって生産することができ、このようなポリクローン抗体はヤギ、兎、羊、猿、馬、豚、牛、犬などの任意の動物種の宿主から製造可能である。単クローン抗体の場合には当業界に広く公知されたハイブリドーマ (hybridoma) 方法 (Koler et al., European Journal of Immunology, 6, 511 - 519, 1976) を利用して製造することができるが、またはファージ抗体ライブラリー (Clackson et al., Nature, 352, 624 - 628, 1991; Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581 - 597, 199

10

20

30

40

50

1) 技術を利用して製造することができる。また、本発明による抗体は二つの全長の軽鎖及び二つの全長の重鎖を有する完全な形態だけではなく、抗体分子の機能的な断片を含むことができる。抗体分子の機能的な断片というものは少なくとも抗原結合機能を保有している断片を意味し、Fab、F(ab')、F(ab')₂及びFvなどがある。

【0042】

SH3YL1 (SH3 domain containing Ysc84-like 1) はカルボキシル末端領域にSrc homology domain 3 (SH3) を有していると、アミノ末端領域にはSYLF (SH3YL1、Ysc84p/Lsb4p、Lsb3p、and plant FYVE proteins that contain) を有しているタンパク質である (図1)。SH3YL1 遺伝子の塩基配列を配列番号2に示しており、SH3YL1タンパク質のアミノ酸配列を配列番号1に示した。

10

【0043】

SH3YL1のSH3領域はプロリン豊富部位 (proline-rich region) を認識し、SYLF領域は膜にあるホスファチジルイノシトール3、4、5-トリホスフェイト {phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate (PI(3, 4, 5)P3)} を認識する。このような機能のために成長因子であるPDGFの刺激によりSH3YL1のSYLF領域がPI(3, 4, 5)P3を認識して、細胞の移動を調節することで知られている (Hasegawa et al., JCB, 193; 901-916, 2011)。

【0044】

20

他の観点から、本発明は腎症診断に必要な情報を提供するため、上記腎症診断用の造物を生物学的試料に処理して、試料中のSH3YL1遺伝子の発現レベルまたはSH3YL1タンパク質のレベルを検出する方法に関するものである。

【0045】

また他の観点から、本発明はSH3YL1遺伝子またはSH3YL1タンパク質の腎症診断用のマーカーとしての用途に関するものである。

【0046】

また他の観点から、本発明は生物学的試料中のSH3YL1遺伝子の発現レベルまたはSH3YL1タンパク質のレベルを測定することを特徴とする腎症の診断方法に関するものである。

30

【0047】

本発明で上記「生物学的試料」ということは腎症の発生、または進行程度による上記SH3YL1遺伝子の発現レベルまたはタンパク質のレベルが正常対照群とは異なる生体から採取された試料をいい、上記試料では例えば、これに制限されることではないが、組織、細胞、血液、血清、血漿、唾液や尿などが含まれることができる。

【0048】

上記SH3YL1遺伝子の発現レベルの測定は好ましくはmRNAのレベルを測定することであり、mRNAのレベルを測定する方法としては、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)、リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、RNase保護分析法、ノーザンブロット及びDNAチップなどがあるが、これに制限されることではない。

40

【0049】

上記SH3YL1タンパク質レベルの測定はSH3YL1タンパク質に特異的に結合する物質、好ましくはSH3YL1タンパク質の特異的抗体、またはアプタマーを利用することができるが、このような場合、生物学的試料内のSH3YL1マーカータンパク質とこれに特異的な抗体は結合物、すなわち、抗原-抗体複合体を形成し、抗原-抗体複合体の形成量は検出ラベル (detection label) のシグナルの大きさを通じて定量的に測定することができる。このような検出ラベルは酵素、蛍光物、リガンド、発光物、微小粒子 (microparticle)、酸化還元分子及び放射線同位元素からなっているグループの中から選択することができ、これに制限されることではない。タンパク質レベルを測定するための分析方法としては、これに制限されないが、ウエスタンブロ

50

ット、E L I S A、放射線免疫分析、放射線免疫拡散法、オークタロニー免疫拡散法、ロケット免疫電気泳動、組織免疫染色、免疫沈降分析法、補体結合反応分析法、F A C S、タンパク質チップなどがある。

【 0 0 5 0 】

したがって、本発明は上記のような検出方法を通じて、対照群の S H 3 Y L 1 の m R N A 発現量またはタンパク質の量と腎症患者または腎症疑心患者での S H 3 Y L 1 の m R N A 発現量またはタンパク質の量を確認することができ、上記発現量の程度を対照群と比較することによって腎症発病の可否、進行段階または予後などを予測及び診断することができる。

【 0 0 5 1 】

本発明の実施例によると、腎症患者を含む腎臓疾患患者の血液を収得して上記血液から血清を分離した後、S H 3 Y L 1 特異的抗体を利用した E L I S A 方法を遂行し、各患者の試料から S H 3 Y L 1 タンパク質の量を測定した後、上記測定値を対照群と比較分析する過程を通じて遂行した。

【 0 0 5 2 】

また他の観点で本発明は S H 3 Y L 1 遺伝子またはその断片とハイブリダイズすることができるプローブが固定されている腎症診断用のマイクロアレイに関するものである。

【 0 0 5 3 】

本発明のマイクロアレイにおいて、S H 3 Y L 1 タンパク質またはこれを暗号化する遺伝子の発現レベルを測定することができるプライマー、プローブまたは抗体はハイブリダイズ可能なアレイ要素 (h y b r i d i z a b l e a r r a y e l e m e n t) として利用され、基質 (s u b s t r a t e) 上に固定化される。好ましい基質は適合した堅固性または半 - 堅固性支持体として、例えば、膜、フィルター、チップ、スライド、ウェハー、ファイバ、磁気性ビーズまたは非磁気性ビーズ、ゲル、チュービング、プレート、高分子、微小粒子及び毛細管を含むことができる。上記ハイブリダイズ可能なアレイ要素は、上記基質上に配列されて固定化され、このような固定化は化学的結合方法または UV のような共有結合的方法により遂行されることができる。たとえば、上記ハイブリダイズ可能なアレイ要素はエポキシ化合物またはアルデヒド基を含むように変形されたガラスの表面に結合されることができて、またポリリジンコーティング表面で UV にとり結合されることができる。また、上記ハイブリダイズ可能なアレイ要素はリンカー (例 : エチレングリコールオリゴマー及びジアミン) を通じて基質に結合されることができる。

【 0 0 5 4 】

一方、本発明のマイクロアレイに適用される試料が核酸である場合には標識 (l a b e l l i n g) されることができて、マイクロアレイ上のアレイ要素とハイブリダイズされることができる。ハイブリダイズの条件は多様であることができて、ハイブリダイズ程度の検出及び分析は標識物質によって多様に実施されることができる。

【 0 0 5 5 】

また、他の観点で、本発明は S H 3 Y L 1 遺伝子またはその断片を増幅することができるプライマー対、上記 S H 3 Y L 1 遺伝子とハイブリダイズできるプローブまたは S H 3 Y L 1 遺伝子がコードするタンパク質に特異的な抗体またはアプタマーを含有する腎症診断用のキットを提供する。

【 0 0 5 6 】

本発明の腎症診断用のキットに含まれる腎症診断用の造成物は S H 3 Y L 1 タンパク質またはこれを暗号化する遺伝子の発現レベルを測定することができるプライマー、プローブまたは抗体を含むことができて、これらの定義は先に記述されたことのようなものである。

【 0 0 5 7 】

本発明の腎症診断用のキットがもし P C R 増幅の過程に適用される場合、本発明のキットは選択的に P C R 増幅に必要な試薬、例えば、緩衝液、DNA ポリメラーゼ (例えば、T h e r m u s a q u a t i c u s (T a q)、T h e r m u s t h e r m o p h i l u s (T t h)、T h e r m u s f i l i f o r m i s、T h e r m i s f l a v

10

20

30

40

50

us、Thermococcus litoralis また Pyrococcus furiosus (Pfu) から取得した熱安定性の DNA ポリメラーゼ)、DNA ポリメラーゼ助因子及び dNTPs を含むことができ、本発明の腎症診断用のキットが免疫分析に適用される場合、本発明のキットは選択的に、二次抗体及び標識の基質を含むことができる。ひいては、本発明によるキットは上記した試薬の成分を含む多数の別途のパッケージングまたはコンパートメントで製作されることができる。

【0058】

また、他の観点から、(a) SH3YL1 遺伝子を発現する細胞に候補物質を接触させる段階；(b) SH3YL1 遺伝子の発現レベル及び/または SH3YL1 タンパク質レベルを測定する段階；及び(c) SH3YL1 遺伝子の発現レベル及び/または SH3YL1 タンパク質レベルが減少される場合の候補物質を腎症の予防または治療用の物質で選別する段階を含む腎症の予防または治療用の物質をスクリーニングする方法に関するものである。

10

【0059】

本発明の方法によると、先ず SH3YL1 遺伝子または SH3YL1 タンパク質を含む細胞に分析しようとする試料を接触させることができる。ここで上記「試料」または「候補物質」は SH3YL1 遺伝子の発現量、SH3YL1 タンパク質の量または SH3YL1 タンパク質の活性に影響を及ぼすかの可否を検査するため、スクリーニングで利用される未知の物質を意味する。上記「試料」または「候補物質」は化学物質、ヌクレオチド、アンチセンス-RNA、siRNA (small interference RNA) 及び天然物の抽出物を含むことができるが、これに制限されない。以後、試料が処理された細胞で SH3YL1 遺伝子の発現量、SH3YL1 タンパク質レベルを測定することができ、測定結果、SH3YL1 遺伝子の発現量、SH3YL1 タンパク質のレベルが減少されることが測定されると、上記試料は腎症を治療または予防することができる物質に判定されることができる。

20

【0060】

上記で SH3YL1 遺伝子の発現量、SH3YL1 レベルを測定する方法は当業界に公知された多様な方法を通じて遂行されることができるが、例を挙げると、これに制限されることではないが、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction)、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (real time polymerase reaction)、ウエスタンブロット、ノーザンブロット、ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)、放射線免疫測定法 (RIA: radioimmunoassay)、放射免疫拡散法 (radioimmunodiffusion) 及び免疫沈降分析法 (immunoprecipitation assay) などを利用して遂行することができる。

30

【0061】

本発明はまた、上記 SH3YL1 遺伝子発現レベルまたは SH3YL1 タンパク質レベルを減少させることができる物質である腎症治療剤及びこれを含む腎症治療用の造成物に関するものである。

40

【0062】

本発明で上記 SH3YL1 遺伝子発現レベルを減少させることができる物質には好ましくは化学物質、ヌクレオチド、SH3YL1 遺伝子に特異的な siRNA、SH3YL1 遺伝子に特異的なアンチセンス、miRNA などを含むことができる。

【0063】

本発明で上記 SH3YL1 タンパク質レベルを減少させることができる物質には SH3YL1 タンパク質に特異的な抗体、アプタマーまたは化学物質 (small molecule) などを含むことができる。

【0064】

また、本発明で上記本発明の治療用の造成物は薬学的に許容される担体を追加で含むこ

50

とができる。上記で「薬学的に許容される」ということは生理学的に許可されてヒトに投与されるとき、通常的に胃腸障害、めまいなどのようなアレルギー反応またはそれに類似した反応を引き起こさない造成物をいう。薬学的に許容される担体には、例えば、ラクトース、澱粉、セルロース誘導体、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸などのような経口投与用担体及び水、適合したオイル、食塩水、水性グルコース及びグリコールなどのような非経口投与用担体などがあり、安定化剤及び保存剤を追加で含むことができる。適合した安定化剤では亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウムまたはアスコルビン酸のような抗酸化剤がある。適合した保存剤ではベンザルコニウムクロリド、メチル - またはプロピルパラベン及びクロロブタノールがある。その他の薬学的に許容される担体としては次の文献に記載されているものを参考にすることができる (Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton PA, 1995)。

10

【0065】

本発明による治療用の造成物は、前述したことのような薬学的に許容される担体とともに当業界に公知された方法によって適した形態で剤形化されることができる。すなわち、本発明の薬学的造成物は公知の方法によって多様な非経口または経口投与用の形態で製造されることができ、非経口投与用の剤形の代表的なものとしては注射用剤形で等張性の水溶液または懸濁液が好ましい。注射用剤型は適合した分散剤または湿潤剤及び懸濁化剤を使用して当業界に公知された技術によって製造することができる。例えば、各成分を食塩水または緩衝液に溶解させて注射用に剤形化されることができる。また、経口投与用の剤形には、これに限定されることではないが、粉末、顆粒、錠剤、丸薬及びカプセルなどがある。上記のような方法で剤形化された薬学的造成物は有効量で経口、経皮、皮下、静脈または筋肉を含めたさまざまな経路を通じて投与されることができるが、上記「投与」とはどのような適切な方法で患者に所定の物質を導入することを意味し、物質の投与経路は目的の組織に到達することができる限りどのような一般的な経路を通じて投与されることができる。

20

【0066】

また、上記で「有効量」とは患者に投与した時、予防または治療効果を示す量をいう。本発明による薬学的造成物の投与量は患者の疾患の種類及び重症度、年齢、性別、体重、薬物に対する敏感度、現在治療法の種類、投与方法、敵細胞など多様な要因によって異なることができ、当該分野の専門家によって、容易に決定されることができる。また、本発明の薬学的造成物は従来の治療剤と併用して投与されることができ、従来の治療剤とは順次的または同時に投与されることができ、単一または多重投与されることができる。好ましくは上記要素をすべて考慮して不作用なしに最小限の量で最大効果の得られる量を投与ことができ、さらに好ましくは1 ~ 10000 µg / 体重kg / day、もっと好ましくは10 ~ 1000 mg / 体重kg / dayの有効容量で1日に数回繰り返して投与されることができる。

30

【実施例】

【0067】

以下、実施例を通じて本発明をさらに詳細に説明しようとする。これらの実施例は単に本発明を例示するためのものとして、本発明の範囲がこれらの実施例により制限されるものと解釈されないことは当業界で通常の知識を有した者において明らかである。

40

【0068】

実施例1 . LPS処理による細胞内のSH3YL1レベル分析

SH3YL1は細胞質タンパク質で存在し、細胞の移動に関係するが、細胞の炎症誘発刺激であるLPS (100 ng / ml) 処理後、HAEC (human aortic endothelial cell, Lonza, cc-2535)、HPMEC (human pulmonary microvascular endothelial cell, Promo Cell, c-12281) でSH3YL1の発現レベルを確認した。

50

【0069】

HAECはLonzaのEndothelial Cell Growth Medium 2 Kit (cc-6162)を、HPMECはPromo CellのEndothelial Cell Growth Medium MV kit (c-22120)を使用して37.5%CO₂条件の培養基で培養した。細胞にLPS (100ng/ml)を24時間処理後cell lysateでSH3YL1 levelを確認した。

【0070】

その結果、図2に示したことのようSH3YL1はLPSによる炎症刺激により細胞内でその発現が増加されることを知ることができた。

10

【0071】

実施例2．発現が増加されたSH3YL1の細胞外部への分泌可否の確認

炎症刺激因子であるLPSによって発現が増加したSH3YL1が細胞外部へ分泌されるのかを確認した。

【0072】

HPMEC細胞にLPS (100ng/ml)を時間帯別に処理して培養した後、取得した培養液を遠心分離して、培養上層液と細胞分画でSH3YL1のタンパク質の量を測定した。BCA protein assay (Pierce)を通じて濃度を測定し、同量のsampleにLaemmli's SDS-PAGE sample bufferを添加して95℃で10分間、沸騰させてloading sampleを作る。sampleはSDS-PAGEを遂行し、以後にnitrocellulose membraneにelectrotransferして5% skim milkで30分間、非特異的なbandを除去する。その後1次antibodyを5% skim milkに希釈して4℃で一晩反応させる。TBS-T bufferを利用して10分ずつ3回洗浄してHorseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouseまたはRabbit IgG (santacruz biotechnology)をRTで1時間の間つけて再びTBS-T bufferに10分ずつ3回洗浄した後、LAS-3000 (Fuji film)機械を利用してchemiluminescent imageを得て分析した。

20

【0073】

その結果、図3に示したことのよう培養上層液 (supernatant) の分画でSH3YL1タンパク質が確認されて、LPS刺激によりSH3YL1タンパク質の細胞外部へ分泌されることを確認した。

30

【0074】

実施例3．糖尿病性腎症患者で血漿内のSH3YL1タンパク質の濃度増加確認

糖尿病性腎症患者の血漿で実質的にSH3YL1タンパク質の濃度が増加するかを確認した。

【0075】

総236名の患者を対象にして、総65名の正常対照群及び171名の第2型糖尿病患者を含めた断面調査研究 (Cross-sectional) で単一の研究機関で行われた。

40

【0076】

総223名の患者で血漿SH3YL1タンパク質の濃度をMyobiosource社の酵素免疫測定法 (ELISA) キット (MBS936559) を使用して定量した。この試薬はサンドイッチ型の酵素免疫測定法の原理を活用し、血清または血漿SH3YL1の濃度を測定する。

【0077】

SH3YL1の特異抗体が付着された96-well microplateに五つの濃度の標準物質、blank、陽性及び陰性対照物質とともに血清の検体を添加し、2時間の間反応させて洗浄後、biotinが付着された2次抗体を添加後、再び1時間反応

50

させた。洗浄後、streptavidinとともにhorse-radish peroxidaseが付着されたconjugate溶液を添加して1時間反応させて洗浄した後、光を避けて発色試薬を添加して30分後450nmで吸光度を測定した。

【0078】

五つの濃度の標準物質及びblank物質で測定した吸光度を利用して標準曲線を導出した後、各検体で測定した吸光度をSH3YL1 (pg/ml)の濃度に換算した。測定可能な濃度は31.25~2000pg/mlであって、検査内精密度 (intra-assay precision)の変動係数 (Coefficient of variation, CV%)は<8%であり、検査間の精密度 (inter-assay precision)のCV%は<10%であった。

10

【0079】

糖尿病患者群は糖尿病性腎症の段階によって各々正常蛋白尿群 (アルブミン-クレアチニン比30µg/mgCr未満)、微細アルブミン尿群 (アルブミン-クレアチニン比30-300mgCrの間)及び顕性蛋白尿群 (300mg/mgCrまたは300mg/日以上)に分類した。患者の義務記録及び診察を通じて基底疾患、性別、年齢、身長、体重、体質量指数及び血圧などの資料を確認した。

【0080】

患者の血液サンプルを収集して血色素、白血球、血小板、C-反応性タンパク質、血中尿素 (bun)、クレアチニン、脂質の数値を測定した。糖尿病性腎症の他のバイオマーカーとされるレチノール結合タンパク質4 (Retinol binding protein 4, RBP4)の濃度もPhoenix社のキットを使用して定量した。

20

【0081】

蛋白尿の測定のために尿のサンプルを収集して尿の微細アルブミン対クレアチニン比 (microalbumin to creatinine ratio)及び尿タンパク対クレアチニン比 (protein to creatinine ratio)を計算した。糸球体濾過率の計算のために計算式CKD-EPIの公式 (糸球体濾過率 = $141 \times \min(\text{Scr}/, 1) \times \max(\text{Scr}/, 1) - 1.209 \times 0.993$ 年齢 $\times 1.018$ (女性) $\times 1.159$ (黒人)、 = 0.7 (女性)、 = 0.9 (男性)、 = 0.329 (女性)、 = -0.411 (男性)を使用して、インスリン抵抗数値をHOMA-IR (homostatic model assessment of insulin resistance = (空腹血中インスリン (mU/I) \times 空腹血糖 (nmol/l) / 22.5)の公式を使用して計算した。

30

【0082】

資料分析のためにIBM SPSS Statistic 20プログラムを利用しており、p値が0.05の有意水準で、両側の検証で分析した。非正規分布を示す変数値を正規分布化するためにlog型値に変換して分析した。連続型試料の場合、正規性の仮定満足可否によって、t-testまたはWilcoxon rank sum test、ANOVA test with post hoc analysisを施行し、二分型資料の場合、期待度数の分布によってChi-square testまたはFisher's exact testを実施して、関連性を確認するためにPearson's correlation coefficient、linear及びmultiple regression analysisを使用した。

40

【0083】

その結果、各群間の年齢、男女比間の差はなかったが、対照群と比較して糖尿病性腎症全体群の腎臓の機能が有意に低く、収縮期血圧及びインスリン抵抗数値が有意に高かった (表1)。その他、C反応性タンパク質及び脂質数値の差は観察されなかった。

【0084】

SH3YL1濃度は正常対照群に比べて糖尿病患者で有意に高く、これは正常蛋白尿群及び微細蛋白尿、顕性蛋白尿群で全て有意に高かった。顕性蛋白尿を示す患者で顕著に増加されていることを確認した (図4)。

50

【 0 0 8 5 】

S H 3 Y L 1 が基底腎機能に影響を受けることができ、その独立的な関連性を確認しようとした。単純の相関関係を分析した結果、S H 3 Y L 1 は蛋白尿及び微細蛋白尿、R B P 4 の濃度、体質量指数、収縮期血圧及びインスリン抵抗数値と陽の相関関係を示しており、糸球体濾過率と関連性を示さなかった（表 2 及び表 3）。年齢、性別及び糸球体濾過率を補正した後にも S H 3 Y L 1 濃度と微細蛋白尿は独立的な陽の相関関係を示しており、その他にも R B P 4 の濃度と陽の相関関係、体質量指数と陰の相関関係を示していた（表 4）。

【 0 0 8 6 】

上記の結果を通じて、糖尿病性腎症の進行の診断及び治療の目標になる微細蛋白尿と S H 3 Y L 1 の関連性を確認することができて、糖尿病性腎症進行の予測マーカーとして S H 3 Y L 1 タンパク質を使用できるということを確認することができた。

【 0 0 8 7 】

【表 1】

	Normal control group n=65	Diabetic normal proteinuria group n=66	Diabetic microalbuminuria group n=52	Diabetic prominent proteinuria n=53	P value ANOVA
Age (years)	54.8±12.3	55.4±10.9	56.5±13.5	55.6±12.0	0.909
sex: male (%)	29(45)	32(48)	22(42)	25(47)	
Glomerular filtration rate	96.2±22.9 ^A	88.8±28.1 ^B	83.6±34.2 ^B	82.3±28.6 ^C	0.035
Proteinuria excretion rate	335.1±427.5 ^A	337.1±340.4 ^A	822.0±1584.4 ^A	5588874.9±143787 ^B	<0.001
Microalbuminuria excretion rate	10.87±7.116	9.87±5.234	70.23±57.077	1893.05±1729.600	<0.001
Body mass index	23.9±3.67	23.9±3.00	24.6±2.94	22.9±4.57	0.125
Systolic blood pressure	116.6±14.03 ^A	124.7±13.69 ^B	133.5±18.88 ^C	139.8±18.34 ^C	<0.001
Diastolic blood pressure	73.4±11.91	72.8±10.19	78.8±11.46	78.8±12.76	0.010
Insulin resistance HOMA-IR	1.62±1.218 ^A	7.04±5.170 ^B	5.12±3.778 ^B	6.11±7.886 ^B	<0.001
C-reactive protein	0.26±0.339	0.37±0.321	0.58±1.175	0.46±0.981	0.214
Fasting blood glucose	98.5±11.13 ^A	141.7±92.25 ^B	122.1±45.01 ^C	122.1±46.39 ^C	0.001
2 hours postprandial blood glucose	111.5±29.78 ^A	178.2±104.62 ^B	154.5±75.89 ^B	168.1±105.28 ^B	<0.001
Total cholesterol	189.2±38.87	195.9±45.65	186.6±31.13	186.3±36.63	0.507
LDL cholesterol	116.7±38.46	117.6±36.79	113.5±32.08	111.5±37.9	0.812
HDL cholesterol	48.2±14.85	44.3±12.62	44.1±10.25	47.7±19.68	0.329
Triglyceride	127.2±78.23	152.5±106.93	147.6±99.21	153.4±123.34	0.460

1) 同じ英文の大文字間の事後分析を通じた統計学的差はなかった。

【 0 0 8 8 】

10

20

30

40

【表 2】

	Pearson correlation	Significance probability (two-sided)
Body mass index	-0.168	0.016
2 hours postprandial blood glucose	0.151	0.034
Systolic blood pressure	0.214	0.003
Insulin resistance	0.259	<0.001
Microalbuminuria excretion rate (log)	0.306	<0.001
Proteinuria excretion rate (log)	0.334	<0.001
RBP4	0.358	<0.001

10

1) 従属変数：SH3YL1

【0089】

【表 3】

	Non-standardized coefficient (standard error)	Standardized coefficient	Significance probability
Body mass index	-0.018(0.007)	-0.168	0.017
Systolic blood pressure	0.003(0.002)	0.159	0.030
Insulin resistance	0.011(0.005)	0.164	0.020
Microalbuminuria excretion rate (log)	0.126(0.026)	0.315	<0.001
Proteinuria excretion rate (log)	0.088(0.022)	0.263	<0.001
RBP4	9.724E ^{-0.5} (2.1596E ^{-0.6})	0.292	<0.001
Glomerular filtration rate	-0.001(0.001)	-0.055	0.417

20

1) 従属変数：SH3YL1 (log)

【0090】

【表 4】

	Non-standardized coefficient (standard error)	Standardized coefficient	Significance probability
Microalbuminuria excretion rate (log)	0.123(0.030)	0.334	<0.001
RBP4	7.029E ^{-0.5} (0.001)	0.228	0.008
Body mass index	-0.019(0.009)	-0.180	0.027

30

1) 従属変数：SH3YL1 (log)

2) 補正因子：蛋白尿の排泄比率 (log)、糸球体濾過率、C反応性タンパク質。
食後2時間の血糖、収縮期血圧、年齢、性別

【0091】

【表 5】

SH3YL1		
Amino acid sequence	MNNPIPSNLK SEAKKAAIL REFTEITSRN GPKIIPAHV IAKAKGLAIL SVIKAGFLVT ARGGSGIVVA RLPDGKWSAP SAIGIAGLGG GFEIGIEVSD LVILNYDRA VEAFKGGNL TLGGNLTAVAV GPLGRNLEGN VALRSSAAVF TYCKSRGLFA GVSLEGSCLI ERKETNRKFY CQDIRAYDIL FGDTPRPAQA EDLYEILDSF TEKYENEGQR INARKAAREQ RKSSAKELPP KPLSRPQQSS APVQLNSGSQ SNRNEYKLYP GLSSYHERVG NLNQPIEVTA LYSFEGQQPG DLNFQAGDRI TVISKTDSHF DWWEGKLRGQ TGIFPANYVT MN	配列番号: 1
Nucleotide sequence	atgaataacc ctatacttc caattgaaa tcagaagcaa aaaaggctgc caaatatta agagaattca cagaataac tccagaaat ggacctgata agatcattcc tgctcacgta attgcgaagg ctaaaggcct tgcattctg tctgtgatca aagccgggtt cctggtgact gccagaggag gcagcgggat ttagtgggcg cgccttcag atggaaaatg gtctgcaccc tcagccattg ggatagctgg ccttggtgga ggattgaaa taggaattga ggtatcagac ttggtgataa ttctgaatta tgacctgct gtagaagctt ttgcaaaagg cggaatctg accctcggag ggaacttgac tgtggcgggt gggccttgg gaaggactt ggaaggaaac gtggccctga gaagctccgc tgccgtctc acgtactgca agtcaagggg actctttgca ggcgtgtctt tagaaggag ctgtttgatt gaaaggaaag aactaatag aaaatttat tgcaagata tccagacta tgacatttta ttggagata caccgaggcc tgctcaagcc gaagatctt atgaattct tgattcttt actgaaaagt atgaaaatga aggacaacga atcaatgcaa gaaaagcagc aaggagcag aggaagtctt ctgctaaaga attacctca aagccattgt caagaccaca gcagctatct gcaccagtc agctgaactc tggctctcaa agtaacagaa atgaatataa gctctatct ggactttcca gctatcatga gagagtggc aattgaatc aacctataga agtgacagcg ctgtattcat ttgaaggaca gcagcctggg gatttgaatt tcaagctgg agacagaate acagttatat caaaaacaga ttcacattt gattggtggg aaggaaaact tcgaggtcaa actggcattt tccagccaa ctacgtaacc atgaattaa	配列番号: 2

【産業上の利用可能性】

【0092】

本発明によると、腎症を早期に迅速で正確に診断及び予測することができる効果があり、患者の血液だけでも正確な診断が可能で、さらに腎症治療剤の開発のための標的に活用することができる効果がある。

【0093】

以上で本発明内容の特定な部分を詳細に記述したところ、当業界の通常の知識を有した者において、このような具体的技術は単に好ましい実施態様に過ぎず、これにより本発明の範囲が制限されないことは明らかである。したがって、本発明の実質的な範囲は添付された請求項とそれらの等価物によって定義されるといえる。

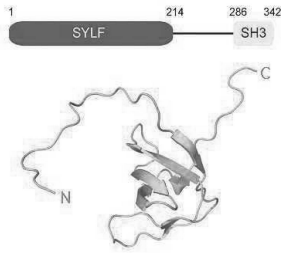
10

20

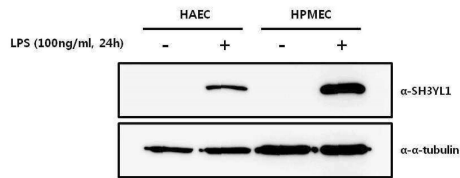
30

40

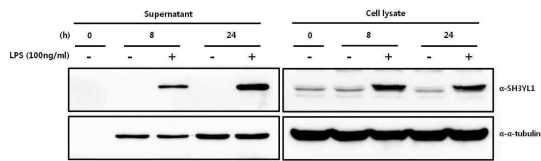
【 図 1 】



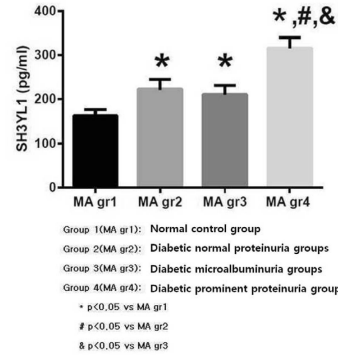
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 配列表 】

0006698154000001.app

フロントページの続き

- (51) Int.Cl. F I
 G 0 1 N 33/15 (2006.01) G 0 1 N 33/50 Z
 G 0 1 N 37/00 (2006.01) G 0 1 N 33/15 Z
 G 0 1 N 37/00 1 0 2
- (72)発明者 チャ デリョン
 大韓民国, 0 6 9 4 3, ソウル, トンジャク - ク, ヨウイデパン - 口, 2 5 0, 1 0 4 - 7 0 4
- (72)発明者 カン ヨンソン
 大韓民国, 0 4 4 2 1, ソウル, ヨンサン - グ, イチョン - 口, 1 8 1, 1 0 8 - 2 0 2
- (72)発明者 チャ ジンジュ
 大韓民国, 0 6 6 4 9, ソウル, ソチョ - グ, パンボ - デロ 2 0 - ギル, 4 2, 1 0 2 - ホ
- (72)発明者 ペ ユンス
 大韓民国, 1 0 4 0 2, キョンギ - ド, コヤン - シ, イルサンドン - グ, ホス - 口, 6 0 6, A -
 1 0 0 9
- (72)発明者 ユ ジョンヨン
 大韓民国, 0 7 2 2 5, ソウル, ヨンドウンポ - グ, ポドゥナル - 口, 1 3 0, 3 0 8 - 5 0 1
- (72)発明者 ムン ソンファン
 大韓民国, 1 6 2 2 2, キョンギ - ド, スウォン - シ, ヨントン - グ, ウェルビーイング タウン
 - 口, 7 0, 8 7 0 6 - 6 0 3
- (72)発明者 イ スジン
 大韓民国, 1 6 7 0 9, キョンギ - ド, スウォン - シ, ヨントン - グ, チョンミョン - 口, 1 0 0
 , 4 2 4 - 1 7 0 2

審査官 坂崎 恵美子

- (56)参考文献 特表2000 - 512123 (JP, A)
 特開2011 - 141177 (JP, A)
 特表2012 - 516430 (JP, A)
 特開2007 - 289184 (JP, A)
 国際公開第2011 / 010372 (WO, A1)
 特開2003 - 235573 (JP, A)
 韓国公開特許第10 - 2011 - 0137278 (KR, A)
 国際公開第2008 / 129265 (WO, A1)
 Kidney International, 2010年, Vol.78, p.396-407

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 Q 1 / 6 8
 C 1 2 N 1 5 / 0 9
 G 0 1 N 3 3 / 5 3
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / W P I D S / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

专利名称(译)	sh3yl1用作诊断肾病的标志物		
公开(公告)号	JP6698154B2	公开(公告)日	2020-05-27
申请号	JP2018515748	申请日	2016-06-03
[标]申请(专利权)人(译)	APTABIO THERAPEUTICS		
[标]发明人	チャデリオン カンヨンソン チャジンジュ ペユンス ユジョンヨン ムンソンファン イスジン		
发明人	チャ デリオン カン ヨンソン チャ ジンジュ ペ ユンス ユ ジョンヨン ムン ソンファン イスジン		
IPC分类号	C12Q1/6809 C12Q1/6837 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/112 C12Q2600/118 C12Q2600/158 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/68		
FI分类号	C12Q1/6809.ZNA.Z C12Q1/6837.Z C12N15/09.200 G01N33/53.M G01N33/53.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N37/00.102		
代理人(译)	山口健次郎 森田健一		
优先权	1020150079672 2015-06-05 KR		
其他公开文献	JP2018524020A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及SH3YL1作为用于肾病诊断的标志物的用途，更具体地，涉及用于肾病诊断的组合物，用于肾病诊断的微阵列和用于肾病诊断的试剂盒，其包含使得可以测量表达水平的物质。SH3YL1基因的表达水平或SH3YL1基因编码的蛋白质的水平。根据本发明，获得了在早期阶段迅速准确地诊断肾病的效果，并且仅使用患者的血液就可以实现准确的诊断，此外，可以提供开发肾病治疗剂的目标。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6698154号 (P6698154)
(45) 発行日 令和2年5月27日(2020.5.27)	(24) 登録日 令和2年4月30日(2020.4.30)	
(51) Int. Cl.	F I	
C12Q 1/6809 (2018.01)	C12Q 1/6809 ZNAZ	
C12Q 1/6837 (2018.01)	C12Q 1/6837 Z	
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/09 200	
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 M	
G01N 33/50 (2006.01)	G01N 33/53 D	
請求項の数 10 (全 18 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2018-515748(P2018-515748)	(73) 特許権者 517423811 アプタバイオ セラピューティクス イン コーポレイテッド APTABIO THERAPEUTIC S I N C . 大韓民国, 16954, キョンギド, ヨ ンインシ, キフンク, フドク 1ー ロ, 13, タワードン エイ 0504 ーホ	
(86) (22) 出願日 平成28年6月3日(2016.6.3)	(74) 代理人 弁理士 山口 健次郎	
(65) 公表番号 特表2018-524020(P2018-524020A)	(74) 代理人 100185915 弁理士 長山 弘典	
(43) 公表日 平成30年8月30日(2018.8.30)	(74) 代理人 100090251 弁理士 森田 意一	
(86) 国際出願番号 PCT/KR2016/005906		
(87) 国際公開番号 W02016/195415		
(87) 国際公開日 平成28年12月8日(2016.12.8)		
(87) 審査請求日 平成30年1月31日(2018.1.31)		
(31) 優先権主張番号 10-2015-0079672		
(32) 優先日 平成27年6月5日(2015.6.5)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関 韓国(KR)		
最終頁に続く		

(54) 【発明の名称】 腎症診断用のマーカーとしてのSH3YL1の用途