

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6143550号
(P6143550)

(45) 発行日 平成29年6月7日(2017.6.7)

(24) 登録日 平成29年5月19日(2017.5.19)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	S
GO 1 N 30/88	(2006.01)	GO 1 N 30/88	J
GO 1 N 27/447	(2006.01)	GO 1 N 27/26	3 O 1 A
		GO 1 N 33/53	D
		GO 1 N 33/53	W

請求項の数 13 (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2013-109299 (P2013-109299)
 (22) 出願日 平成25年5月23日(2013.5.23)
 (65) 公開番号 特開2014-38087 (P2014-38087A)
 (43) 公開日 平成26年2月27日(2014.2.27)
 審査請求日 平成28年3月24日(2016.3.24)
 (31) 優先権主張番号 特願2012-162006 (P2012-162006)
 (32) 優先日 平成24年7月20日(2012.7.20)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 502285457
 学校法人順天堂
 東京都文京区本郷2-1-1
 (73) 特許権者 503332134
 日研ザイル株式会社
 静岡県袋井市春岡710-1
 (74) 代理人 100108947
 弁理士 涌井 謙一
 (74) 代理人 100117086
 弁理士 山本 典弘
 (74) 代理人 100124383
 弁理士 鈴木 一永
 (72) 発明者 山倉 文幸
 千葉県浦安市高洲2-5-1 順天堂大学
 医療看護学部内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 一酸化窒素ストレスの検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被検査タンパク質を認識すると共に、
 ニトロトリプトファンを特異的に認識する抗体を用いて当該被検査タンパク質に含まれるニトロトリプトファンを検出することにより、
 生体内において一酸化窒素ストレスが発生している位置を特定し一酸化窒素ストレスの検出の指標とする方法及び、当該特定した位置の一酸化窒素ストレスに由来する疾患の検出の指標とする方法、又は、これらの双方を行う方法であって、

前記被検査タンパク質がコラーゲン、カゼイン、ケラチンの中のいずれかであって、前記生体内の位置が皮膚であることを特徴とする方法。

【請求項2】

被検査タンパク質を認識すると共に、
 ニトロトリプトファンを特異的に認識する抗体を用いて当該被検査タンパク質に含まれるニトロトリプトファンを検出することにより、
 生体内において一酸化窒素ストレスが発生している位置を特定し一酸化窒素ストレスの検出の指標とする方法及び、当該特定した位置の一酸化窒素ストレスに由来する疾患の検出の指標とする方法、又は、これらの双方を行う方法であって、

前記被検査タンパク質がアルブミン、フィブリノーゲン、熱ショック蛋白質A12B、C反応性タンパク質、脂肪酸結合蛋白1、アルデヒドデヒドロゲナーゼ2、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アルギナーゼ、グリコーゲン合成酵素、フェトプロテイン、アシアログ

リコプロテイン受容体、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ、カルボキシルエステラーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、HMG-CoA還元酵素、リパーゼ、アルドラーゼ、チトクロムP450、カリクレイン、補体因子5、トロンピン、ハプトグロビン、レプチン、レジスチン、アポリポ蛋白E、ビトロネクチン、フィブロネクチンの中のいずれかであつて、前記生体内の位置が肝臓であることを特徴とする方法。

【請求項3】

被検査タンパク質を認識すると共に、

ニトロトリプトファンを特異的に認識する抗体を用いて当該被検査タンパク質に含まれるニトロトリプトファンを検出することにより、

生体内において一酸化窒素ストレスが発生している位置を特定し一酸化窒素ストレスの検出の指標とする方法及び、当該特定した位置の一酸化窒素ストレスに由来する疾患の検出の指標とする方法、又は、これらの双方を行う方法であつて、

前記被検査タンパク質がアポリポ蛋白E、アポリポ蛋白L2、アポリポ蛋白L3、アポリポ蛋白L4、アポリポ蛋白L6、インシュリン、グルカゴン、レプチン、レジスチン、プロラクチン、ソマトスタチン、アドレノメデュリン、レニン、アンジオテンシノーゲン、オキシトシン、エンドテリン1、エンドテリン3、ガストリン、セクレチン、ビメンチン、トロンボモジュリン、チオレドキシシン、インターロイキン1、インターロイキン1、インターロイキン2、インターロイキン4、インターロイキン10、インターロイキン25、アルギニンバソプレッシン、チトクロムP450、コルチコトロピン放出ホルモン、グリセロキナーゼ、ウロコルチン、プロミニン2、アスポリン、チロシンヒドロキシラーゼ、インヒピン

、プロヒピチン2、チログロブリン、アデニル酸シクラーゼ4、デスミン、トロンボスポンジン2、ネスチン、ラミニン、ニューロフィブロミン1、アネキシンA1、フェトプロテイン、キニノゲン1、ニューロピリン1、プリオン蛋白、インターフェロン1、インターフェロン、アルブミン、ジストロフィンのうちのいずれかであつて、前記生体内の位置が副腎であることを特徴とする方法。

【請求項4】

被検査タンパク質を認識すると共に、

ニトロトリプトファンを特異的に認識する抗体を用いて当該被検査タンパク質に含まれるニトロトリプトファンを検出することにより、

生体内において一酸化窒素ストレスが発生している位置を特定し一酸化窒素ストレスの検出の指標とする方法及び、当該特定した位置の一酸化窒素ストレスに由来する疾患の検出の指標とする方法、又は、これらの双方を行う方法であつて、

前記被検査タンパク質がアポリポ蛋白Eであつて、前記生体内の位置が高血圧の発症に関わる臓器であることを特徴とする方法。

【請求項5】

被検査タンパク質を認識すると共に、

ニトロトリプトファンを特異的に認識する抗体を用いて当該被検査タンパク質に含まれるニトロトリプトファンを検出することにより、

生体内において一酸化窒素ストレスが発生している位置を特定し一酸化窒素ストレスの検出の指標とする方法及び、当該特定した位置の一酸化窒素ストレスに由来する疾患の検出の指標とする方法、又は、これらの双方を行う方法であつて、

前記被検査タンパク質がフォンビルブランド因子、組織因子パスウェイインヒビター、トロンボモジュリン、キニノゲン、エンドセリン、アンジオポエチン、カドヘリン5、Eセレクトイン、NO合成酵素3、組織型プラスミノゲンアクチベータ、酸化LDL受容体1、トロンボスポンジン1の中のいずれかであつて、前記生体内の位置が血管内皮であることを特徴とする方法。

【請求項6】

被検査タンパク質を認識すると共に、

ニトロトリプトファンを特異的に認識する抗体を用いて当該被検査タンパク質に含まれるニトロトリプトファンを検出することにより、

10

20

30

40

50

生体内において一酸化窒素ストレスが発生している位置を特定し一酸化窒素ストレスの検出の指標とする方法及び、当該特定した位置の一酸化窒素ストレスに由来する疾患の検出の指標とする方法、又は、これらの双方を行う方法であって、

前記被検査タンパク質がClara cell protein - 16、Clara cell protein - 10、サーファクタントプロテイン - A、サーファクタントプロテイン - B、サーファクタントプロテイン - C、サーファクタントプロテイン - D、シアル化糖鎖抗原 - 6、ムチングリコプリテイン17 - Q2、ムチングリコプリテイン17 - B1の中のいずれかであって、前記生体内の位置が肺であることを特徴とする方法。

【請求項7】

被検査タンパク質を認識すると共に、
ニトロトリプトファンを特異的に認識する抗体を用いて当該被検査タンパク質に含まれるニトロトリプトファンを検出することにより、

生体内において一酸化窒素ストレスが発生している位置を特定し一酸化窒素ストレスの検出の指標とする方法及び、当該特定した位置の一酸化窒素ストレスに由来する疾患の検出の指標とする方法、又は、これらの双方を行う方法であって、

前記被検査タンパク質がカルレチクリン、カドヘリンH、カルジオトロフィン1、ミオシン重鎖7、心筋型トロポニン、ミオグロビンのの中のいずれかであって、前記生体内の位置が心臓であることを特徴とする方法。

【請求項8】

被検査タンパク質を認識すると共に、
ニトロトリプトファンを特異的に認識する抗体を用いて当該被検査タンパク質に含まれるニトロトリプトファンを検出することにより、

生体内において一酸化窒素ストレスが発生している位置を特定し一酸化窒素ストレスの検出の指標とする方法及び、当該特定した位置の一酸化窒素ストレスに由来する疾患の検出の指標とする方法、又は、これらの双方を行う方法であって、

前記被検査タンパク質がアミロイド、eomesodermi、アクアポリン4、エフリンB3、神経成長因子受容体、brain-specific angiogenesis inhibitor 3、モノアミンオキシダーゼB、ネスチン、グリア線維酸性蛋白質、プリオン、ニューロトロフィンのの中のいずれかであって、前記生体内の位置が脳であることを特徴とする方法。

【請求項9】

被検査タンパク質を認識すると共に、
ニトロトリプトファンを特異的に認識する抗体を用いて当該被検査タンパク質に含まれるニトロトリプトファンを検出することにより、

生体内において一酸化窒素ストレスが発生している位置を特定し一酸化窒素ストレスの検出の指標とする方法及び、当該特定した位置の一酸化窒素ストレスに由来する疾患の検出の指標とする方法、又は、これらの双方を行う方法であって、

前記被検査タンパク質がカドヘリン16、アクアポリン6、ウロモジュリン、mepirin A、エリスロポエチンの中のいずれかであって、前記生体内の位置が腎臓であることを特徴とする方法。

【請求項10】

被検査タンパク質を認識すると共に、
ニトロトリプトファンを特異的に認識する抗体を用いて当該被検査タンパク質に含まれるニトロトリプトファンを検出することにより、

生体内において一酸化窒素ストレスが発生している位置を特定し一酸化窒素ストレスの検出の指標とする方法及び、当該特定した位置の一酸化窒素ストレスに由来する疾患の検出の指標とする方法、又は、これらの双方を行う方法であって、

前記被検査タンパク質がアミラーゼ、ソマトスタチン、グルカゴン、膵リパーゼの中のいずれかであって、前記生体内の位置が膵臓であることを特徴とする方法。

【請求項11】

生体内において一酸化窒素ストレスが発生している位置の特定は、前記認識された被検査

10

20

30

40

50

査タンパク質が由来している生体内の位置を特定することによって行うことを特徴とする請求項 1 乃至請求項 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

被検査タンパク質を認識する工程に当該被検査タンパク質を特異的に認識する抗体を用いることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

被検査タンパク質を認識する工程に電気泳動法、液体クロマトグラフィー法、質量分析法の何れかを用いることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

この発明は、生体内における一酸化窒素ストレスの診断方法に関する。

【背景技術】

【0002】

一酸化窒素ストレスとは、一酸化窒素が生体内においてスーパーオキシドラジカルと反応することで、毒性の強いパーオキシナイトライトを形成し、細胞や臓器に対し損傷を与えることをいう。以下、本明細書において「一酸化窒素」を「NO」と表し、「一酸化窒素ストレス」を「NOストレス」と表すことがある。

【0003】

20

NOストレスは炎症性疾患をはじめ、様々な疾患に深く関与することが知られていることから、生体内におけるNOストレスの検出は、様々な疾患の早期診断、リスク評価に役立つと考えられる。

【0004】

これまでにパーオキシナイトライト修飾物であるニトロチロシンを対象とした、生体内でのNOストレス診断法が提案されている（特許文献1）。

【0005】

また、ニトロチロシンを使用して生体の循環器系における血栓症疾患を診断できる可能性が提案されている（非特許文献4）。

【0006】

30

しかしながら、既存のニトロチロシンを用いた検出法は、タンパク質および遊離のニトロチロシンの全量に対する定量法でしかなく、特定のタンパク質・臓器を標的にした検出・定量、すなわち臓器特異性、疾病特異性に関する情報を得ることは不可能であった。

【0007】

現在のところ特定疾患に関連したNOストレスの診断方法や、生体内においてNOストレスが発生している位置を特定する方法は実用化されていないのが現状である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特開2002-228648号公報

40

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Nitric Oxide 16(1): p18-28(2007)

【非特許文献2】Free Radical Biology and Medicine 50: p419-427 (2011)

【非特許文献3】Nitric Oxide 25: p176-182 (2011)

【非特許文献4】Free Radical Biology and Medicine 53: p230-236 (2012) www.elsevier.com/locate/freeradbiomed

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

50

生体内においてNOストレスが発生している位置を特定するNOストレス診断方法、当該特定した生体の位置のNOストレスに由来する疾患を診断する方法は、NOストレスが関与する様々な疾患において、疾患リスク評価、早期診断、予防法確立に有用であると考えられる。

【0011】

本発明は、生体内においてNOストレスが発生している位置を特定するNOストレス診断方法、当該特定した生体の位置のNOストレスに由来する疾患を診断する方法を提案することを目的にしている。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本願発明者等は、NOストレスによりタンパク質中に生成されるニトロトリプトファンに着目し、特定タンパク質に含まれるニトロトリプトファンを検出することにより、臓器特異的、疾患特異的なNOストレスを診断し、また、生体内においてNOストレスが発生している位置を特定することが可能であることを見出して、臓器および疾患特異的なNOストレス診断方法及び、生体内においてNOストレスが発生している位置を特定する方法を発明した。

【0013】

すなわち、本発明は、生体の特定の位置（例えば、特定の臓器など）と、当該生体の特定の位置から産生される、あるいは当該特定の位置に由来する、等、当該生体の特定の位置に関連する特定のタンパク質との組合せにより、生体内においてNOストレスが発生している位置を特定するNOストレス診断方法、又は、当該特定した生体の位置のNOストレスに由来する疾患を診断する方法、あるいはこれらの双方の診断方法である。

【0014】

ここで、本発明の診断方法は、前記特定のタンパク質を特異的に認識する抗体を用いて、あるいは、電気泳動法、液体クロマトグラフィー法、質量分析法などを用いることによって、前記特定のタンパク質を認識する工程と、前記ニトロトリプトファンを特異的に認識する抗体を用いて前記特定のタンパク質に含まれるニトロトリプトファンを検出する工程とを組み合わせた、免疫学的検出法に基づく診断方法である。

【発明の効果】

【0015】

本発明によれば、生体試料中の特定タンパク質に含まれるニトロトリプトファンを検出することにより、生体内においてNOストレスが発生している位置を特定するNOストレス診断方法、又は、当該特定した生体の位置のNOストレスに由来する疾患を診断する方法、あるいはこれらの双方の診断方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】生体内のタンパク質に含まれるチロシンがほとんどニトロ化されていない場合であっても、トリプトファンのみがニトロ化されている実例が存在することの検討結果を表す図。

【図2】本発明のNOストレス診断方法において、被検査タンパク質の認定に特異的抗体を用いた場合の、特定の臓器に由来する特定タンパク質におけるニトロトリプトファン検出の状態を表す図であって、(a)は「ヒト膵臓タンパク質抽出物」(対照)とヒト膵臓癌由来培養細胞capan-2のタンパク質抽出物(Protein Bioscience社)についての抗ニトロトリプトファン抗体を用いたウェスタンブロット解析の結果を表す図、(b)はヒト結腸タンパク質抽出物(対照)とヒト結腸癌由来培養細胞HT-29のタンパク質抽出物(Protein Bioscience社)についての抗ニトロトリプトファン抗体を用いた解析の結果を表す図。

【図3】被検査タンパク質の認定に当該被検査タンパク質を特異的に認識する抗体を用いる場合の本発明によるNOストレス診断方法の概略を表す。

【図4】被検査タンパク質の認定に当該被検査タンパク質を特異的に認識する抗体を用いる場合の本発明による他のNOストレス診断方法の概略を表す。

10

20

30

40

50

【図5】血清中に含まれる、ニトロトリプトファン修飾 - アポリポ蛋白Eの検出例を表す。

【発明を実施するための形態】

【0017】

NOストレスの原因物質であるNOは、生体内においてスーパーオキシドラジカルと反応し、パーオキシナイトライトを形成して様々な生体成分にニトロ化修飾を与える。

【0018】

タンパク質に含まれるアミノ酸のうち、トリプトファンは特にニトロ化修飾を受けやすく、パーオキシナイトライトと反応してニトロトリプトファンが生成される。

【0019】

従来技術に採用されていたチロシンも、本願発明において利用しているトリプトファンと同じくニトロ化修飾を受けるが、生体内のタンパク質に含まれるチロシンがほとんどニトロ化されていない場合であっても、トリプトファンのみがニトロ化されている実例が存在する、等、タンパク質に含まれるアミノ酸のうち、トリプトファンは特にニトロ化修飾を受けやすい。

【0020】

図1は本願の発明者が行った検討結果（神経細胞分化（+NFG）及び未分化PC12 cell中に検出された6-NO2Trp含有タンパク質の例）を表すものである。チロシンがほとんどニトロ化されていない場合であっても、トリプトファンのみがニトロ化されていた結果が示されている。

【0021】

本願の発明者等は、前述したように、タンパク質に含まれるアミノ酸のうち特にニトロ化修飾を受けやすく、汎用性が高い、トリプトファンとパーオキシナイトライトとの反応生成物であるニトロトリプトファンに着目した。

【0022】

そして、生体の特定の位置に特異的なタンパク質に含有されるニトロトリプトファンを検出することにより、生体内においてNOストレスが発生している位置を特定するNOストレス診断が可能であること、又は、当該特定した位置のNOストレスに由来する疾患の診断が可能であること、若しくは、生体内においてNOストレスが発生している位置を特定するNOストレス診断及び当該特定した位置のNOストレスに由来する疾患の診断が可能であることを見出したものである。

【0023】

本願発明の診断方法は、被検査タンパク質を認識すると共に、ニトロトリプトファンを特異的に認識する抗体を用いて当該被検査タンパク質に含まれるニトロトリプトファンを検出することにより、生体内においてNOストレスが発生している位置を特定するNOストレス診断を行う、又は、当該特定した位置のNOストレスに由来する疾患の診断を行う、あるいはこれらの双方を行う、という免疫学的検出法である。

【0024】

ここで、生体内においてNOストレスが発生している位置の特定は、前記認識された被検査タンパク質が由来している生体内の位置を特定することによって行うことができる。例えば、認識できた被検査タンパク質が生体内の特定の位置（皮膚、肝臓などの臓器や、血管内皮、肺など）で産生される特定のタンパク質や、当該特定の位置に由来する特定のタンパク質である場合、当該特定の位置にNOストレスが発生していたり、当該特定した位置のNOストレスに由来する疾患が発生していることを診断できるものである。

【0025】

前記の被検査タンパク質を認識する工程には、当該被検査タンパク質を特異的に認識する抗体を用いることができる。また、電気泳動法、液体クロマトグラフィー法、質量分析法の何れかを用いて前記の被検査タンパク質を認識することもできる。

【0026】

本願発明が提案する診断方法は、上述したように、NOストレスの原因物質であるNO

10

20

30

40

50

が生体内においてスーパーオキシドラジカルと反応して形成したパーオキシナイトライトと、生体内のタンパク質に含まれるアミノ酸であるトリプトファンが反応することによって生成されたニトロトリプトファンを検出するものである。この時、当該検出されたニトロトリプトファンがいかなるタンパク質に含有されているか、このタンパク質は生体内のいかなる位置に由来するものであるかを特定しておくことにより、生体内においてNOストレスが発生している位置を特定する、又は、当該特定した位置のNOストレスに由来する疾患の診断を行うこと、若しくは、生体内においてNOストレスが発生している位置を特定するNOストレス診断及び当該特定した位置のNOストレスに由来する疾患の診断とを行うようにしているものである。

【0027】

10

そこで、前述した工程で認識した被検査タンパク質により、生体内のいかなる位置においてNOストレスが発生しているかNOストレス診断し、また、当該特定した位置のNOストレスに由来する疾患の診断を行い、更には、生体内においてNOストレスが発生している位置を特定するNOストレス診断及び当該特定した位置のNOストレスに由来する疾患の診断とを行うことができる。

【0028】

前述した工程で認識した被検査タンパク質と、それによって行うことのできる上述したNOストレス診断、等との組み合わせとしては以下を例示することができる。

【0029】

前述した工程で認識できた被検査タンパク質：コラーゲン、カゼイン又はケラチン

20

NOストレス診断：

NOストレスが発生している生体内の位置が皮膚であるとの診断及び、皮膚のNOストレスに由来する疾患についての診断。

【0030】

前述した工程で認識できた被検査タンパク質：アルブミン、フィブリノーゲン、熱ショック蛋白質A12B、C反応性タンパク質、脂肪酸結合蛋白1、アルデヒドデヒドロゲナーゼ2、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アルギナーゼ、グリコーゲン合成酵素、フェトプロテイン、アシアログリコプロテイン受容体、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ、カルボキシルエステラーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、HMG-CoA還元酵素、リパーゼ、アルドラーゼ、チトクロムP450、カリクレイン、補体因子5、トロンピン、ハプトグロビン、レプチン、レジスチン、アポリポ蛋白E、ビトロネクチン、フィブロネクチンの中のいずれか

30

NOストレス診断：

NOストレスが発生している生体内の位置が肝臓であるとの診断及び、肝臓のNOストレスに由来する疾患についての診断。

【0031】

前述した工程で認識できた被検査タンパク質：アポリポ蛋白E、アポリポ蛋白L2、アポリポ蛋白L3、アポリポ蛋白L4、アポリポ蛋白L6、インシュリン、グルカゴン、レプチン、レジスチン、プロラクチン、ソマトスタチン、アドレノメデュリン、レニン、アンジオテンシノーゲン、オキシトシン、エンドテリン1、エンドテリン3、ガストリン、セクレチン、ビメンチン、トロンボモジュリン、チオレドキシシン、インターロイキン1、インターロイキン1、インターロイキン2、インターロイキン4、インターロイキン10、インターロイキン25、アルギニンバソプレッシン、チトクロムP450、コルチコトロピン放出ホルモン、グリセロキナーゼ、ウロコルチン、プロミニン2、アスポリン、チロシンヒドロキシラーゼ、インヒピン、プロヒピチン2、チログロブリン、アデニル酸シクラーゼ4、デスミン、トロンボスポンジン2、ネスチン、ラミニン、ニューロフィブロミン1、アネキシンA1、フェトプロテイン、キニノゲン1、ニューロピリン1、プリオン蛋白、インターフェロン1、インターフェロン、アルブミン、ジストロフィンのの中のいずれか

40

NOストレス診断：

前記生体内の位置が副腎であるとの診断及び、副腎のNOストレスに由来する疾患に

50

ついでに診断。

【0032】

前述した工程で認識できた被検査タンパク質：アポリポ蛋白E

NOストレス診断：

高血圧の発症に関わる臓器、例えば、肝臓や、副腎、あるいは、これらの双方における一酸化窒素ストレス診断。

【0033】

前述した工程で認識できた被検査タンパク質：フォンビルブランド因子、組織因子パスウェイインヒビター、トロンボモジュリン、キニノゲン、エンドセリン、アンジオポエチン、カドヘリン5、Eセレクトイン、NO合成酵素3、組織型プラスミノゲンアクチベータ、酸化LDL受容体1、トロンボスポンジン1の中のいずれか NOストレス診断：

NOストレスが発生している生体内の位置が血管内皮であるとの診断及び、血管内皮のNOストレスに由来する疾患についての診断。

【0034】

前述した工程で認識できた被検査タンパク質：Clara cell protein - 16、Clara cell protein - 10、サーファクタントプロテイン - A、サーファクタントプロテイン - B、サーファクタントプロテイン - C、サーファクタントプロテイン - D、シアル化糖鎖抗原 - 6、ムチングリコプリテイン17 - Q2、ムチングリコプリテイン17 - B1の中のいずれか

NOストレス診断：

NOストレスが発生している生体内の位置が肺であるとの診断及び、肺のNOストレスに由来する疾患についての診断。

【0035】

前述した工程で認識できた被検査タンパク質：カルレチクリン、カドヘリンH、カルジオトロフィン1、ミオシン重鎖7、心筋型トロポニン、ミオグロビンのうちのいずれか

NOストレス診断：

NOストレスが発生している生体内の位置が心臓であるとの診断及び、心臓のNOストレスに由来する疾患についての診断。

【0036】

前述した工程で認識できた被検査タンパク質：アミロイド、eomesodermi、アクアポリン4、エフリンB3、神経成長因子受容体、brain-specific angiogenesis inhibitor 3、モノアミノオキシダーゼB、ネスチン、グリア線維酸性蛋白質、プリオン、ニューロトロフィンのうちのいずれか

NOストレス診断：

NOストレスが発生している生体内の位置が脳神経であるとの診断及び、脳神経のNOストレスに由来する疾患についての診断。

【0037】

前述した工程で認識できた被検査タンパク質：カドヘリン16、アクアポリン、ウロモジュリン、mepirin A、エリスロポエチンのうちのいずれか

NOストレス診断：

NOストレスが発生している生体内の位置が腎臓であるとの診断及び、腎臓のNOストレスに由来する疾患についての診断。

【0038】

前述した工程で認識できた被検査タンパク質：アミラーゼ、ソマトスタチン、グルカゴン、膵リパーゼの中のいずれか

NOストレス診断：

NOストレスが発生している生体内の位置が膵臓であるとの診断及び、膵臓のNOストレスに由来する疾患についての診断。

【0039】

このように、本願発明は、臓器のような生体内の各位置、あるいは各疾病に関連する特

10

20

30

40

50

定タンパク質に含まれるニトロトリプトファンを検出することにより、生体内においてNOストレスが発生している位置を特定する、又は、当該特定した位置のNOストレスに由来する疾患の診断を行うこと、若しくは、生体内においてNOストレスが発生している位置を特定するNOストレス診断及び当該特定した位置のNOストレスに由来する疾患の診断とを行うものである。

【0040】

そこで、臓器のような生体内の特定の位置によって産生される、あるいは特定の位置に由来する特定のタンパク質、NOストレスが発生している生体内の特定の位置によって産生される、あるいは特定の位置に由来する特定のタンパク質に応じて、NOストレスが発生している生体内の特定の位置や疾患を特定することができる。

10

【0041】

したがって、タンパク質は上述したものに限られず、免疫グロブリン、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ、アルカリホスファターゼ、アミラーゼ、リゾチーム、酸ホスファターゼ、フコシダーゼ、N-アセチル-D-グルコサミニダーゼ、GOT、GTP、カルボニックアンヒドラーゼ、リパーゼ、スルファターゼ、ペルオキシダーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、カリクレイン、1アンチトリプシン、2マクログロブリン、セルロプラスミン、ハプトグロブリン、トランスフェリン、リポ蛋白、コラーゲン、ピトロネクチン、ヘモグロビン、アミロイドA1、アディポネクチン、レプチン、キモトリプシン、アンジオテンシン1変換酵素、パラオキシナーゼ、アミロイドA4、カベオリン、ペプシノーゲン、ミオグロビン、チログロブリン、フェリチン、レニン、フェトプロテイン、2ミクログロブリン、アラニンアミノトランスフェラーゼ、レクチン、インヒピン、カドヘリン、チトクロームC、前立腺特異抗原、アポリポ蛋白E、ペルオキシレドキシシン、ミオシン、ミオスタチン、グレリンなどを利用することもできる。

20

【0042】

そして、これらの採用した特定のタンパク質に応じて、脳、脊髄、胸腺、骨髄、腎臓、膵臓、脾臓、胆嚢、心臓、口、咽頭、食道、胃、小腸、大腸、結腸、直腸、肛門、筋組織、前立腺等、生体内の各位置におけるNOストレスの診断、これらの各位置でNOストレスが発生していることによる疾患について診断することができる。

【0043】

以下、添付図面を参照して本発明の免疫学的検出法の実施例を説明する。

30

【実施例1】

【0044】

図2は、本発明のNOストレス診断方法において、被検査タンパク質の認定に特異的抗体を用いた場合の特定バンド(特定の臓器に由来する特定タンパク質)におけるニトロトリプトファン検出の状態を表す図である。

【0045】

図2(a)の試料は図中、左側がヒト膵臓タンパク質抽出物(対照)、右側がヒト膵臓癌由来培養細胞capan-2のタンパク質抽出物(Protein Bioscience社)である。図2(b)の試料は図中、左側がヒト結腸タンパク質抽出物(対照)、右側がヒト結腸癌由来培養細胞HT-29のタンパク質抽出物(Protein Bioscience社)である。

40

【0046】

図2(a)、(b)は、これらについての、抗ニトロトリプトファン抗体を用いた、電気泳動法によるウェスタンブロット解析の結果を表すものである。

【0047】

試料(対照2例の臓器抽出物(図2(a)、(b)における左側)と、疾患2例の培養細胞抽出液(図2(a)、(b)における右側))がスポット状に膜に添付されたものに、抗ニトロトリプトファン抗体を用いて染色したところ図2(a)、(b)図示のようになった。

【0048】

50

図2(a)、(b)図示のように、癌細胞のみにニトロトリプトファン生成されている事が明らかである。

【0049】

他のヒト臓器、及びそれに対応する臓器癌の培養細胞においては、ニトロトリプトファンの生成に差が見出されていないので、このように特定臓器由来のニトロトリプトファンを検出することにより、特定臓器疾患でのNOストレスを診断することができる。

【0050】

電気泳動-LC-MSとの組み合わせにより、ニトロトリプトファン含有のタンパク質の同定も可能となる。

【実施例2】

10

【0051】

図3は、被検査タンパク質の認定に当該被検査タンパク質を特異的に認識する抗体を用いる場合の本発明によるNOストレス診断方法の概略を表すものである。

【0052】

この実施例では、反応容器の内壁に、臓器特異的あるいは疾患特異的タンパク質に対する抗体を固相化し、ニトロトリプトファンを含有している前記タンパク質の検出に抗ニトロトリプトファン抗体を用いるサンドイッチEIA法を採用した。

【0053】

アルブミンは肝臓において産生されるアミノ酸である。アルブミンに含まれるニトロトリプトファンを検出することにより、肝臓におけるNOストレスを診断することができる。

20

【0054】

容器の内壁に、抗アルブミン抗体を固相化しておき、検査試料(サンプル)を添加した。

【0055】

検査試料(サンプル)中のアルブミンは、固相化抗体と結合することにより、容器表面にトラップされる。

【0056】

洗浄後、抗ニトロトリプトファン抗体を添加した。

【0057】

30

抗ニトロトリプトファン抗体は、容器表面にトラップされたアルブミンのうち、ニトロトリプトファンを含有するもののみ結合する。

【0058】

その後、容器表面に存在する抗ニトロトリプトファン抗体を、ホースラデッシュペルオキシダーゼ標識した二次抗体、および発色基質を用いて検出した。

【0059】

こうして、検査試料(サンプル)中におけるニトロトリプトファン含有アルブミンのみを特異的に検出することができる。

【0060】

このようにして、アルブミン産生臓器である、肝臓におけるNOストレスの診断を行うことができた。

40

【実施例3】

【0061】

図4は、被検査タンパク質の認定に当該被検査タンパク質を特異的に認識する抗体を用いる場合の本発明による他のNOストレス診断方法の概略を表すものである。

【0062】

この実施例では、反応容器の内壁に、抗ニトロトリプトファン抗体を固相化し、ニトロトリプトファンを含有している臓器特異的あるいは疾患特異的タンパク質の検出に当該タンパク質に対する抗体を用いるサンドイッチEIA法を採用した。

【0063】

50

アルブミンは肝臓において産生されるアミノ酸である。アルブミンに含まれるニトロトリプトファンを検出することにより、肝臓におけるNOストレスを診断することができる。

【0064】

容器の内壁に、抗ニトロトリプトファン抗体を固相化しておき、検査試料(サンプル)を添加した。

【0065】

検査試料(サンプル)中の、ニトロトリプトファン含有アルブミンは、抗ニトロトリプトファン抗体と結合することにより、容器表面にトラップされる。

【0066】

洗浄後、抗アルブミン抗体を添加した。抗アルブミン抗体は、容器表面にトラップされたニトロトリプトファン含有蛋白質のうち、アルブミンのみに結合する。

10

【0067】

容器表面に存在する抗アルブミン抗体を、ホースラデッシュペルオキシダーゼ標識した二次抗体、および発色基質を用いて検出した。

【0068】

こうして検査試料(サンプル)中におけるニトロトリプトファン含有アルブミンのみを特異的に検出することができた。

【0069】

すなわち、アルブミン産生臓器である、肝臓におけるNOストレスの診断を行うことができた。

20

【実施例4】

【0070】

図5は、血清中に含まれる、ニトロトリプトファン修飾 - アポリポ蛋白Eの検出例を表すものである。

【0071】

この実施例では、高血圧の発症に関わる臓器である、肝臓および副腎におけるNOストレスの診断について検討を行った。

【0072】

モデル動物としてSHR-SP (Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat)を採用した。SHR-SPは本態性ヒト高血圧を反映するモデル動物であり、10~18週齢において高血圧を自然発症、脳卒中を好発する。

30

【0073】

対照としてWistar Kyoto (WKY)ラットを用いた。SHR-SPはWKYラットより系統分離されたものであり、従来から、対照としてよく用いられているものである。

【0074】

この実施例では、18.5週齢のSHR-SPおよびWKYを対象に、抗アポリポ蛋白抗体および抗ニトロトリプトファン抗体を用いて、血液中のニトロトリプトファン修飾 - アポリポ蛋白Eの検出を行った。

【0075】

その結果は図5の通りであり、SHR-SPの血清中には、WKYに比べ有意に高レベルのニトロトリプトファン修飾 - アポリポ蛋白Eを検出することができた。

40

【0076】

アポリポ蛋白Eは肝臓で合成され脂質代謝に関連するほか、血圧制御ホルモン分泌器官である副腎でも多く合成されていることから、ニトロトリプトファン修飾 - アポリポ蛋白Eの増加は、当該臓器における一酸化窒素ストレスの亢進および高血圧の発症に何らかの関わりを持つことが示唆される。

【0077】

すなわち、この実施例での、ニトロトリプトファン修飾 - アポリポ蛋白Eの検出により、アポリポ蛋白Eを産生し、高血圧の発症に関わる臓器である、肝臓および副腎におけるNOストレスの診断を行うことができた。

50

【0078】

以上、この発明の好ましい実施形態、実施例を説明したが、本発明はこれらの実施形態、実施例に限られるものではなく、特許請求の範囲の記載から把握される技術的範囲において種々に変更可能である。

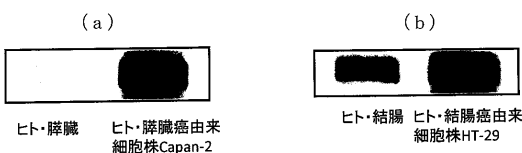
【図1】

特種細胞由来(ANGT)及び未分化PC12 cell 中に誘導されたα-NOC7p含有タンパク質の例

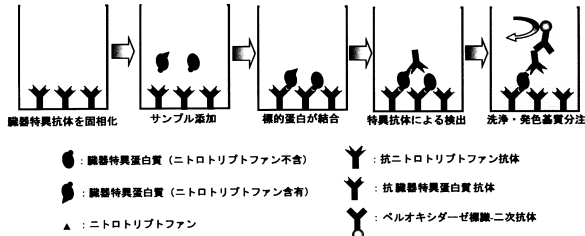
sample	Protein	Cloned site	Sequence coverage				NO ₂ Tryp*				Altered site	
			aa1	aa2	aa3	aa4	(Total Tryp)	aa1	aa2	aa3		aa4
Clon	α23 (abnormal protein) 23F		100%	66%	66%	75%	0.0	0	0	0	0	0
PC12	α23 (normal protein) 23F		100%	100%	100%	100%	0.0	2	0	0	0	0
Clon	α24 (abnormal protein) 24F		100%	74%	74%	83%	0.0	0	0	0	0	0
PC12	α24 (normal protein) 24F		100%	100%	100%	100%	0.0	1	0	0	0	0

*NO₂Tryp is the ratio of NO₂Tryp and total Tryp in the sample. **NO₂Tryp is the ratio of NO₂Tryp and total Tryp in the sample.

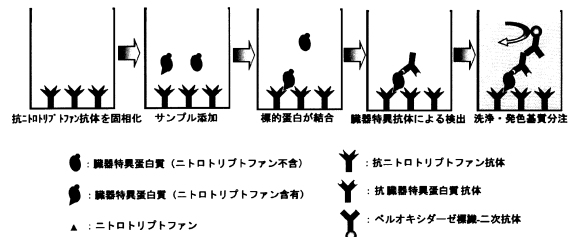
【図2】



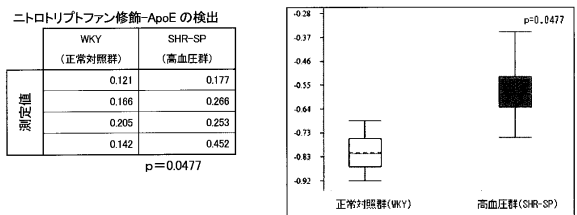
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(72)発明者 川崎 広明

千葉県印西市平賀学園台1-1 順天堂大学大学院 医学研究科内

(72)発明者 酒居 一雄

静岡県袋井市春岡710番地の1 日研ザイル株式会社 日本老化制御研究所内

審査官 海野 佳子

(56)参考文献 山倉文幸ほか, 新しい酸化ストレスマーカー・6-ニトロトリプトファンの特異的検出・定量法の確立とそれを用いた環境因子に由来する炎症性疾患の発症機構の解明, 順天堂医学, 2010年10月31日, Vol.56, No.5, P.491

山倉文幸ほか, 神経変性疾患及びアトピー性皮膚炎での6-ニトロトリプトファン修飾タンパク質の同定とその機能変化及び各病態との関連性, 順天堂医学, 2011年12月31日, Vol.57, No.6, P.665

Marissa Martinez et al., Nitrated fibrinogen is a biomarker of oxidative stress in venous thromboembolism, Free Radical Biology and Medicine, 2012年7月15日, vol.53, P230-236

Ikeda K et al., Detection of 6-nitrotryptophan in proteins by Western blot analysis and its application for peroxynitrite-treated PC12 cells, Nitric Oxide., 2007年, vol.16(1), PP.18-28

山岸 美穂ら, ペルオキシナイトライトによるチロシンとトリプトファンのニトロ化反応, 学苑生活科学紀要, 2004年12月, No.770, PP.84-88

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE//BIOSIS(STN)

专利名称(译)	检测一氧化氮应激的方法		
公开(公告)号	JP6143550B2	公开(公告)日	2017-06-07
申请号	JP2013109299	申请日	2013-05-23
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人顺天堂 日建绳		
申请(专利权)人(译)	学校法人顺天堂 日建绳有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	学校法人顺天堂 日建绳有限公司		
[标]发明人	山倉文幸 川崎広明 酒居一雄		
发明人	山倉 文幸 川崎 広明 酒居 一雄		
IPC分类号	G01N33/53 G01N30/88 G01N27/447		
FI分类号	G01N33/53.S G01N30/88.J G01N27/26.301.A G01N33/53.D G01N33/53.W G01N27/447.301.A		
代理人(译)	德宏山本 鈴木 一永		
优先权	2012162006 2012-07-20 JP		
其他公开文献	JP2014038087A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提出一种用于指定在生物体内产生NO应力的位置的NO压力诊断方法，以及用于诊断由指定的生物体位置的NO应力引起的疾病的方法。 解决方案：通过NO胁迫检测蛋白质中产生的硝基色氨酸，可以检测活体的特定位置（例如特定器官等）和特定位置与生物体的特定位置等有关的特定应激，或者通过将特定蛋白质与与生物体的特定位置相关的特定蛋白质等组合，或者在生物体内产生NO应激的位置，一种诊断由骨髓位置的NO应激引起的疾病的方法，或两者的诊断方法。【选择图】无

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6143550号 (P6143550)
(45) 発行日 平成29年6月7日 (2017.6.7)	(24) 登録日 平成29年5月19日 (2017.5.19)	
(51) Int. Cl. G01N 33/53 (2006.01) G01N 30/88 (2006.01) G01N 27/447 (2006.01)	F I G O I N 33/53 S G O I N 30/88 J G O I N 27/26 3 O I A G O I N 33/53 D G O I N 33/53 W	請求項の数 13 (全 13 頁)
(21) 出願番号 特願2013-109299 (P2013-109299)	(73) 特許権者 502285457 学校法人順天堂	
(22) 出願日 平成25年5月23日 (2013.5.23)	東京都文京区本郷2-1-1	
(65) 公開番号 特開2014-38087 (P2014-38087A)	(73) 特許権者 503332134 日研ザイル株式会社	
(43) 公開日 平成26年2月27日 (2014.2.27)	静岡県袋井市春岡710-1	
審査請求日 平成28年3月24日 (2016.3.24)	(74) 代理人 100108947 弁理士 浦井 謙一	
(31) 優先権主張番号 特願2012-162006 (P2012-162006)	(74) 代理人 100117086 弁理士 山本 典弘	
(32) 優先日 平成24年7月20日 (2012.7.20)	(74) 代理人 100124383 弁理士 鈴木 一永	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 山倉 文幸 千葉県浦安市高洲2-5-1 順天堂大学 医療看護学部内	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】一酸化窒素ストレスの検出方法