

(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2008-151517

(P2008-151517A)

(43) 公開日 平成20年7月3日(2008.7.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D 4 B O 6 3
GO 1 N 33/493 (2006.01)	GO 1 N 33/493	A
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48	A
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	Z

審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2006-336706 (P2006-336706)
 (22) 出願日 平成18年12月14日 (2006.12.14)

特許法第30条第1項適用申請有り Kidney International (2006) 70, 1948-1954. <http://www.nature.com/ki/journal/v70/n11/abs/5001941a.html> published online 11 October 2006

(71) 出願人 304027279
 国立大学法人 新潟大学
 新潟県新潟市西区五十嵐2の町8050番地
 (74) 代理人 100080089
 弁理士 牛木 護
 (74) 代理人 100137800
 弁理士 吉田 正義
 (74) 代理人 100140394
 弁理士 松浦 康次
 (74) 代理人 100119312
 弁理士 清水 栄松
 (72) 発明者 坂爪 実
 新潟県新潟市旭町通1番町754番地 新潟大学医歯学総合病院内

最終頁に続く

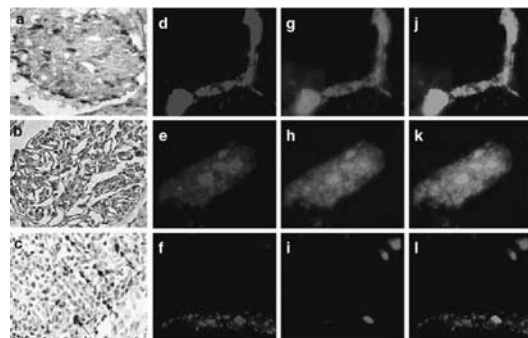
(54) 【発明の名称】 腎障害の判定方法

(57) 【要約】

【課題】腎障害、とくに糸球体上皮障害を非浸襲的な検出方法で判定することが可能な腎障害の判定方法を提供する。

【解決手段】尿中のアログラフト炎症因子 1 (AIF 1) 蛋白を検出することにより腎障害を判定する。AIF 1蛋白の検出には、免疫化学的方法またはPCR法またはELISA法が好適に用いられる。免疫化学的方法は、抗AIF 1抗体を用いて免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察することにより行う。PCR法は、AIF 1特異的プライマーを用いて行う。ELISA法は、抗AIF 1抗体を用いて行う。そして、尿は、遠心分離法により得られた尿沈渣または尿上清である。このように、腎障害、とくに糸球体上皮障害を非浸襲的な検出方法で判定することができる。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

尿中のアログラフト炎症因子 1 (A I F 1) 蛋白を検出することを特徴とする腎障害の判定方法。

【請求項 2】

前記アログラフト炎症因子 1 蛋白の検出を免疫化学的方法または P C R 法または E L I S A 法により行うことを特徴とする請求項 1 記載の腎障害の判定方法。

【請求項 3】

前記免疫化学的方法を抗アログラフト炎症因子 1 抗体を用いて免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察することにより行うことを特徴とする請求項 2 記載の腎障害の判定方法。

10

【請求項 4】

前記 P C R 法をアログラフト炎症因子 1 特異的プライマーを用いて行うことを特徴とする請求項 2 記載の腎障害の判定方法。

【請求項 5】

前記 E L I S A 法を抗アログラフト炎症因子 1 抗体を用いて行うことを特徴とする請求項 2 記載の腎障害の判定方法。

【請求項 6】

前記尿が遠心分離法により得られた尿沈渣または尿上清であることを特徴とする請求項 1 記載の腎障害の判定方法。

【請求項 7】

前記腎障害が糸球体上皮障害であることを特徴とする請求項 1 ~ 6 記載の腎障害の判定方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、腎障害、とくに、糸球体上皮障害を判定する腎障害の判定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

現在、腎障害（腎不全）治療のための透析医療費は 1 兆円を超え、全医療費の約 3% を占め、腎障害患者数は年々増加している。そして、その腎障害の中で、糸球体上皮が様々な原因により機能的あるいは構造的な障害を受けるものを糸球体上皮障害という。そして、その糸球体上皮障害の原因としては、炎症細胞から放出される活性酸素、蛋白分解酵素、あるいは血清中の毒素やメディエーターなどが考えられている。また、糸球体上皮障害は、腎硬化症に直接結びつく病態である。そのため、糸球体上皮障害を非浸襲的な方法で検出することは、糸球体上皮障害の早期発見につながり、腎硬化症への進展を阻止する早期治療を行うためにも、非常に重要である。

30

【0003】

これまでに、非浸襲的な検出方法であり、ポドカリキシンなどの糸球体上皮特異蛋白をマーカーとして、糸球体上皮障害を判定しようとする例がある。

【0004】

引用文献 1 には、簡便で所要時間が短く、かつ、ヒトポドカリキシンの定量も可能な、腎炎の診断に適用することができる、ヒトポドカリキシンの測定方法が開示されている。引用文献 1 の方法によれば、固相に結合した第 1 の抗ヒトポドカリキシン抗体と検体とを反応させた後、前記第 1 の抗ヒトポドカリキシン抗体とは対応エピトープが異なる第 2 の抗ヒトポドカリキシンモノクローナル抗体を反応させ、次いで固相に結合した該第 2 の抗ヒトポドカリキシンモノクローナル抗体を測定することにより、検体中のヒトポドカリキシンを測定することができる。

40

【0005】

また、引用文献 2 には、腎障害に関連して見られる物質、例えば尿中のポドカリキシンおよび / またはネフリンを測定することによる、簡便な腎障害の検査手段が開示されてい

50

る。引用文献2の方法によれば、腎障害に関連して見られるポドサイトの表面に存在するタンパク質を細胞表面から遊離させる処理を施すことにより、尿中に含有される細胞表面に存在する物質および/または遊離の物質を測定することができる。

【特許文献1】特開平6-11507号公報

【特許文献2】国際公開第WO2002/037099号パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

ここで、糸球体上皮は、障害を受けると特異蛋白を欠失しやすく、従来、ポドカリキシン以外には尿で検出できる蛋白が報告されていなかった。

10

【0007】

そのため、糸球体上皮が障害を受けた際に、ポドカリキシン以外に尿で検出できる蛋白を発見することは、その蛋白を糸球体上皮障害の判定に利用するためのマーカーとして使用するためにも、非常に重要であった。

【0008】

そこで、本発明は、障害を受けると特異蛋白を欠失しやすい糸球体上皮の、ポドカリキシン以外に尿で検出できる蛋白をマーカーとして使用し、非侵襲的な方法で糸球体上皮障害を判定することが可能な、腎障害の判定方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、DNAマイクロアレイを用いて腎臓に発現する遺伝子を網羅的に検出した本発明者らの研究(J Immunol 2003 Mar 15;170(6):3377-85)から、これまでに腎臓での発現が知られていなかった蛋白、アログラフト炎症因子 1 (Allograft Inflammatory Factor: AIF 1) が糸球体上皮に発現することを見出した(Kidney International 2006 Dec;70(11):1948-1954)。また、AIF 1は、糸球体上皮細胞障害のないヒトの尿検体では検出できず、腎生検で糸球体上皮細胞障害が明らかな患者の尿検体で検出されることを発見した。そこで、本発明者らは、尿中におけるAIF 1蛋白の同定を行い、ポドカリキシンとほぼ同等の検出感度があることを明らかにした。このことから、本発明者らは、上皮細胞障害を示す各種腎疾患において、AIF 1陽性の糸球体上皮が尿中出现することが、糸球体上皮障害を判定するための、マーカーの1つとなりうることを発見した。

20

30

【0010】

ここで、上述のように、糸球体上皮は、障害を受けると特異蛋白を欠失しやすく、従来、ポドカリキシン以外には尿で検出できる蛋白が報告されていなかった。そのため、AIF 1蛋白が糸球体上皮に発現すること、そして、糸球体上皮障害を判定するためのマーカーの1つとなりうること、という今回の発見は重要であった。しかも、ポドカリキシンは細胞膜蛋白であるが、AIF 1は細胞質蛋白であるので、今後の検討により、両者の臨床的意義に重要な相異が見出される可能性がある。

【0011】

このように、上記課題に鑑みて鋭意検討した結果、AIF 1蛋白を免疫化学的方法またはPCR法またはELISA法により検出するという、非侵襲的な検出方法で、腎障害、とくに糸球体上皮障害を判定できることを見出し、本発明に想到した。

40

【0012】

本発明における請求項1記載の腎障害の判定方法は、尿中のAIF 1蛋白を検出することを特徴とする。

【0013】

本発明における請求項2記載の腎障害の判定方法は、請求項1において、前記AIF 1蛋白の検出を免疫化学的方法またはPCR法またはELISA法により行うことを特徴とする。

【0014】

50

本発明における請求項 3 記載の腎障害の判定方法は、請求項 2 において、前記免疫化学的方法を抗 A I F 1 抗体を用いて免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察することにより行うことを特徴とする。

【0015】

本発明における請求項 4 記載の腎障害の判定方法は、請求項 2 において、前記 P C R 法を A I F 1 特異的プライマーを用いて行うことを特徴とする。

【0016】

本発明における請求項 5 記載の腎障害の判定方法は、請求項 2 において、前記 E L I S A 法を抗 A I F 1 抗体を用いて行うことを特徴とする。

【0017】

本発明における請求項 6 記載の腎障害の判定方法は、請求項 1 において、前記尿が遠心分離法により得られた尿沈渣または尿上清であることを特徴とする。

【0018】

本発明における請求項 7 記載の腎障害の判定方法は、請求項 1 ~ 6 において、前記腎障害が糸球体上皮障害であることを特徴とする。

【発明の効果】

【0019】

糸球体上皮障害は腎硬化症に直接結びつく病態である。そのため、これを非侵襲的な尿検査で検出できることは、糸球体上皮障害の早期発見につながり、腎硬化症への進展を阻止する早期治療を実施することができる。また、糸球体上皮障害を早期に発見し、早期治療を実施することにより、透析療法を必要とする腎不全患者の増加に歯止めをかけることが期待できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

以下、本発明について詳細に説明する。

【0021】

本発明における腎障害の判定方法は、尿中のアログラフト炎症因子 1 (A I F 1) 蛋白を検出することを特徴とする。

【0022】

ここで、A I F 1 (Allograft Inflammatory Factor) は、143 のアミノ酸から成り、進化的に保存された、ヒトにおけるヒト白血球抗原クラス III ゲノム領域内でエンコードされたカルシウム結合タンパク質である。そして、その発現は、炎症過程に関与することが知られている。また、A I F 1 は、糸球体上皮細胞障害のないヒトの尿検体では検出できず、腎生検で糸球体上皮細胞障害が明らかな患者の尿検体では検出された。したがって、尿中の A I F 1 蛋白を検出することにより、腎障害を判定することができる。

【0023】

そして、特定の方法に限定されるものではないが、前記 A I F 1 蛋白の検出には、免疫化学的方法または P C R 法または E L I S A 法が好適に用いられる。

【0024】

そして、前記免疫化学的方法は、抗 A I F 1 抗体を用いて免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察することにより行う。

【0025】

そして、前記 P C R 法は、A I F 1 特異的プライマーを用いて行う。

【0026】

そして、前記 E L I S A 法は、抗 A I F 1 抗体を用いて行う。

【0027】

そして、前記尿は、遠心分離法により得られた尿沈渣または尿上清である。

【0028】

ここで、A I F 1 蛋白の検出を、免疫化学的方法により行う場合、及び、P C R 法により行う場合は、尿沈渣が好適に用いられる。そして、E L I S A 法により行う場合は、

10

20

30

40

50

尿上清が好適に用いられる。

【0029】

また、本発明の実施例1で述べているように、AIF 1は、尿炎症細胞(CD3⁺、CD14⁺)においても発現していることが明らかにされた。このことから、AIF 1蛋白の検出は、PCR法及びELISA法よりも、免疫化学的方法により行うことが望ましい。

【0030】

このように、本発明における腎障害の判定方法により、腎障害、とくに糸球体上皮障害を非侵襲的な検出方法で判定することができる。

【0031】

以下に本発明の実施例によって、本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら制限されるものではない。

【実施例1】

【0032】

近年、尿沈渣におけるポドサイトの検出は、糸球体における激しいポドサイトの損傷の出現を示唆することが報告されている。我々の知るところ、ポドカリキシンは、ヒト尿沈渣におけるポドサイトとそれらのフラグメントの最も確実なマーカーである。このため、我々は、AIF 1蛋白が、尿沈渣におけるポドサイトとそれらのフラグメントのマーカーとして有用であるかの評価を試みた。

【0033】

(対象症例)

尿サンプルと腎臓標本は、2000年から2006年にかけて、9人の患者から得た。その患者は、3人の腎臓移植のドナー(44, 49, 及び53歳, 女性, 尿タンパク値, 0.01 - 0.04 g / 1日)、急性拒絶を伴う腎臓移植レシピエント(バンフ診断基準A)(30歳, 男性)、及び腎生検によりIgA腎症と診断された5人の患者(40 - 51歳(平均, 45.2歳), 尿タンパク値, 0.47 - 3.3 g / 1日(平均, 1.8 g / 1日))であった。そのドナー腎臓は、ノーマルコントロールと見なした。本研究は、新潟大学病院の倫理委員会により承認された。患者の研究協力に際しては研究の主旨を説明し、インフォームドコンセントを得た。

【0034】

(免疫組織化学法)

定法によりパラフィン中に包埋されたヒト腎臓組織(4 μm)は、キシレン中で脱パラフィン化し、アルコール系勾配中で再水和した。そして、PBSで洗浄した。全ての試料は、抗原回復のために121 で15分間、10 mMクエン酸塩溶液中で高圧滅菌により水和する前処理を施した。スライドは、10分間3%過酸化水素水で固定し、そして、15分間、3%ウシ血清アルブミンでブロッキングした。AIF 1検出のために、そのスライドを、ヤギ抗ラットAIF 1ポリクローナル抗体、また、ヒトAIF 1ポリクローナル抗体(アブカム, ケンブリッジ, UK)で4 で1晩処理した。そして、そのスライドを、2次抗体として、1 / 100希釈したペルオキシダーゼ ウサギ抗ヤギIgG抗体複合体(ダコ, カーピンテリア, CA, USA)で処理した。その免疫複合体は、3, 3'-ジアミノベンジジン4塩酸塩(ダコ)で検出した。そして、ヘマトキシリンで対比染色を行った。コントロール試料は、抗AIF 1抗体の代わりに、ノーマルヤギIgG(ジムド ラボラトリーズ, サウス サン フランシスコ, CA, USA)で処理した。

【0035】

(免疫蛍光顕微鏡法)

新鮮尿50 - 200 mlから遠心分離法により尿沈渣を得、氷冷PBSで2回洗浄し、そして、遠心分離により沈殿物を得た。それらの尿沈渣は、その後、スライドガラス上に処理し(サイトスピン処理)、4 で5分間アセトン中で固定した。尿沈渣は、室温で90分間、抗AIF 1抗体(5 μg / ml)で処理した。そして、2次抗体として、1 / 40に希釈したウサギ抗ヤギIgGフルオレセインイソチオシアネート複合体(ジムド

10

20

30

40

50

ラボラトリーズ)で室温において60分間処理した。PBSで十分洗浄した後、そのスライドは、ポドサイトマーカーとしてマウス抗ポドカリキシンモノクローナル抗体(4D5)、また、フィコエリトリン-マウス抗ヒトCD14モノクローナル抗体複合体(BDバイオサイエンス、サンノゼ、CA, USA)、また、フィコエリトリン マウス抗ヒトCD3モノクローナル抗体複合体(BDバイオサイエンス)で処理した。イソチオシアン酸テトラメチルローダミン ウサギ抗マウス免疫グロブリン複合体(ダコ)は、4D5の2次抗体として使用した。その免疫蛍光シグナルは、免疫電子顕微鏡法により検出した。コントロール試料は、アイソタイプにマッチしたコントロール抗体;抗AIF1抗体の代わりにヤギIgG(ジムド ラボラトリーズ)、及び、4D5の代わりにマウスIgG2a(BDバイオサイエンス)で処理した。

10

【0036】

(結果と考察)

まず、本発明者らは、ヒトの腎臓標本において免疫組織化学的研究を行った(図1a-c)。(図1a及びb)正常ヒト腎臓組織を、抗AIF1抗体で染色した。また、(図1c)急性拒絶を伴うヒト腎臓組織を、抗AIF1抗体(茶)で染色した。

【0037】

この結果、正常の腎臓標本において、AIF1蛋白はポドサイトに検出された(茶)。そして、移植された急性拒絶を伴う腎臓移植片標本において、AIF1蛋白は、ポドサイトと同様に浸潤炎症細胞においても検出された(茶)。

20

【0038】

つぎに、免疫グロブリン(Ig)A腎炎の5人の患者の尿沈渣を、免疫蛍光顕微鏡法により、抗AIF1抗体及び抗ポドカリキシン抗体で二重染色した。また、(図1d-1)5人のIgA腎症患者の尿沈渣において、(図1d-f)抗AIF1抗体(緑)と(図1g-h)抗ポドカリキシン抗体(赤)、あるいは、(図1i)抗CD14抗体(赤)を用いた間接的二重染色による免疫蛍光顕微鏡的研究を行った。(図1j-l)融合した写真(黄)は、ポドサイトとそれらのフラグメントにおいて、AIF1蛋白が存在すること、それらはまた、ポドカリキシン成分を有していること、そして、AIF1陽性のいくつかの細胞成分は、CD14に対して陽性であったことを示している。写真は、5人のIgA腎症患者から作成したスライドの代表である(オリジナル倍率; a-c, x400, d-1, x400)。

30

【0039】

この結果、図1d-1は、IgA腎炎の患者の尿沈渣におけるポドサイトとそれらのフラグメントに対する抗ポドカリキシン抗体及び抗AIF1抗体の反応が同一であることが明らかになった。アイソタイプマッチしたコントロール抗体で処理された全ての試料において、有意なシグナルは検出されなかった(データ示さず)。これらの結果は、AIF1がヒトにおけるポドサイトと尿中に検出されるポドサイトの新規のマーカーであることを示唆している。

【0040】

ここで、抗ポドカリキシン抗体及び抗AIF1抗体の反応パターンは、全ての沈渣においてほとんど同じであったが、いくつかのAIF1陽性細胞はポドカリキシンに対して陰性であった。

40

【0041】

次に、AIF1は、活性化系球体腎炎の尿における炎症細胞と炎症T細胞、及び、マクロファージにおいて発現するので、我々は、IgA腎炎の3人の患者の尿沈渣において、抗CD3(T細胞マーカー)、また、抗CD14(マクロファージマーカー)を用いて二重染色による免疫蛍光顕微鏡法を行った。我々は、いくつかのAIF1陽性細胞成分は、CD3あるいはCD14に対して陽性であること(図1f、i及びl)、そしてそれは、AIF1陽性細胞は、一部分において、T細胞あるいはマクロファージを含んでいる可能性のあることを見出した。

【0042】

50

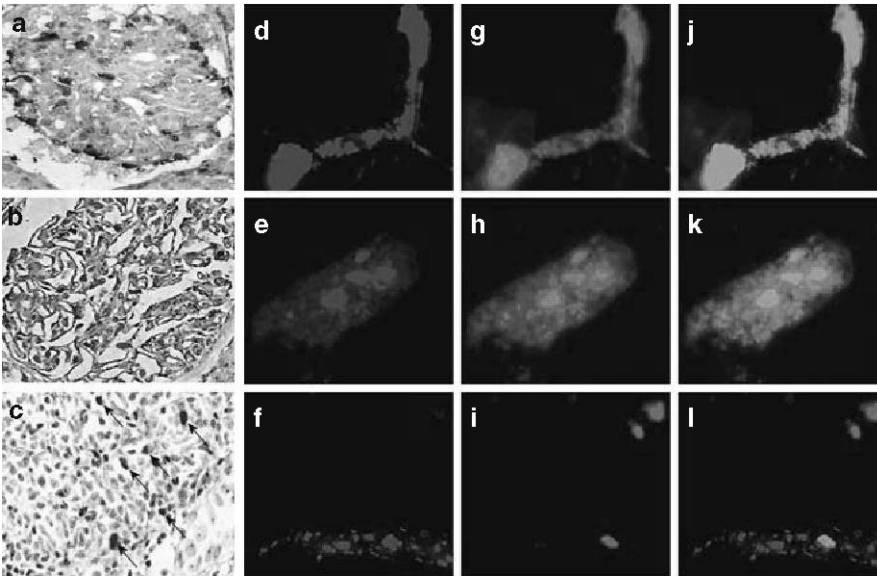
本発明のための研究において、尿ポドサイトとポドカリキシン陽性粒状構造は、抗 A I F 1 抗体と抗ポドカリキシン抗体にほとんど同程度に陽性であることを示した。それゆえ、A I F 1 は、ヒト尿沈渣におけるポドサイトマーカーのひとつであると考えられた。本発明者らは初めて、A I F 1 は、ポドサイトの新規細胞質成分であり、そして、尿ポドサイトの数少ないマーカーの一つであることを見出した。また、A I F 1 は、糸球体上皮細胞障害のないヒトの尿検体では検出できず、腎生検で糸球体上皮細胞障害が明らか患者の尿検体では検出された。したがって、尿中の A I F 1 を検出することにより、腎障害、とくに糸球体上皮細胞障害を判定することができる。

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図1】本発明の実施例1における、ヒト腎臓組織における免疫組織化学法及びヒト尿沈渣における免疫蛍光顕微鏡法の結果を示す写真である（オリジナル倍率；a - c , x 400 , d - l , x 4000）。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 下条 文武

新潟県新潟市学校町通2番町5274番地 新潟大学医歯学総合研究科内

(72)発明者 成田 一衛

新潟県新潟市学校町通2番町5274番地 新潟大学医歯学総合研究科内

(72)発明者 津畑 豊

新潟県新潟市学校町通2番町5274番地 新潟大学医歯学総合研究科内

(72)発明者 小川 麻

新潟県新潟市学校町通2番町5274番地 新潟大学医歯学総合研究科内

Fターム(参考) 2G045 AA15 CB03 DA36 FA16 FB12

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ42 QQ52 QR08 QR42 QR62 QS25 QS36

QX01

专利名称(译)	判断肾损伤的方法		
公开(公告)号	JP2008151517A	公开(公告)日	2008-07-03
申请号	JP2006336706	申请日	2006-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人，新泻		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人，新泻		
[标]发明人	坂爪 実 下条 文武 成田 一衛 津畑 豊 小川 麻		
发明人	坂爪 実 下条 文武 成田 一衛 津畑 豊 小川 麻		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 G01N33/493 G01N33/48 C12Q1/68		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D G01N33/493.A G01N33/48.A C12Q1/68.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA15 2G045/CB03 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FB12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX01		
代理人(译)	吉田 正义 清水 栄松		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种确定肾脏疾病的方法，该方法能够通过使用非侵入性检测方法确定肾脏疾病，尤其是肾小球上皮病变。ŽSOLUTION：通过检测尿液中的同种异体移植炎症因子1 (AIF-1) 蛋白来确定肾脏疾病。免疫化学方法，PCR方法或ELISA方法优选用于检测AIF-1蛋白。免疫化学方法通过使用抗AIF-1抗体对AIF-1蛋白进行免疫染色并用荧光显微镜观察染色的蛋白质来进行。通过使用AIF-1特异性引物进行PCR方法，并且通过使用抗AIF-1抗体进行ELISA方法。此外，尿液是尿液沉淀残留物或尿液上清液。以这种方式，肾病，尤其是肾小球上皮病变可以通过非侵入性检测方法来确定。Ž

