

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/178237

発行日 平成29年6月8日(2017.6.8)

(43) 国際公開日 平成27年11月26日(2015.11.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 H O 4 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 16 頁)

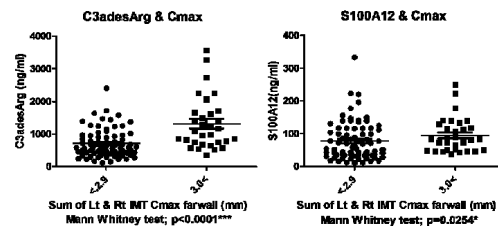
出願番号 特願2016-521042 (P2016-521042)	(71) 出願人 507148456 学校法人 岩手医科大学 岩手県盛岡市内丸19番1号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2015/063511	
(22) 国際出願日 平成27年5月11日(2015.5.11)	
(31) 優先権主張番号 特願2014-102917 (P2014-102917)	(71) 出願人 399115851 株式会社先端生命科学研究所 東京都八王子市小宮町51番地
(32) 優先日 平成26年5月17日(2014.5.17)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	(74) 代理人 100106611 弁理士 辻田 幸史
	(74) 代理人 100087745 弁理士 清水 善廣
	(74) 代理人 100098545 弁理士 阿部 伸一
	(72) 発明者 人見 次郎 岩手県盛岡市内丸19番1号 学校法人岩手医科大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 動脈壁肥厚の程度の検知方法

(57) 【要約】

本発明の課題は、アテローム血栓症のイベントリスクの判定や、アテローム血栓症に対する治療効果の判定などを行うために有用な、動脈壁肥厚の程度の検知方法を提供することである。その解決手段としての本発明の動脈壁肥厚の程度の検知方法は、アルギニン欠損型補体成分C3a(C3a-desArg)、および/または、カルシウム結合性タンパク質であるS100A12の血液中の存在量が多いほど、動脈壁肥厚の程度が強いと判断することによる。これらのタンパク質の血液中の存在量の測定は、例えばこれらのタンパク質を特異的に認識する抗体を用いて免疫学的手法によって行うことができる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アルギニン欠損型補体成分 C 3 a (C 3 a - d e s A r g)、および/または、カルシウム結合性タンパク質である S 1 0 0 A 1 2 の血液中の存在量が多いほど、動脈壁肥厚の程度が強いと判断する、動脈壁肥厚の程度の検知方法。

【請求項 2】

C 3 a - d e s A r g の血液中の存在量の測定を、C 3 a - d e s A r g を特異的に認識する抗体を用いて免疫学的手法によって行う、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

S 1 0 0 A 1 2 の血液中の存在量の測定を、S 1 0 0 A 1 2 を特異的に認識する抗体を用いて免疫学的手法によって行う、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 4】

C 3 a - d e s A r g を特異的に認識する抗体、および/または、S 1 0 0 A 1 2 を特異的に認識する抗体の、動脈壁肥厚の程度を検知するための使用。

【請求項 5】

C 3 a - d e s A r g を特異的に認識する抗体、および/または、S 1 0 0 A 1 2 を特異的に認識する抗体を少なくとも含む、動脈壁肥厚の程度を検知するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アテローム血栓症のイベントリスクの判定や、アテローム血栓症に対する治療効果の判定などを行うために有用な、動脈壁肥厚の程度の検知方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

脳梗塞などの脳血管疾患や心筋梗塞などの心血管疾患の原因となるアテローム血栓症 (A T I S : A t h e r o t h r o m b o s i s) は、動脈壁肥厚が進行した結果、血管内部に動脈硬化性のプラーク (粥腫) が形成され、内皮の損傷やプラークの破綻などによって血小板が活性化されて血栓が形成されるに至った状態であり、近年、死亡原因となる疾患として著しく増加していることは一般にもよく知られた事実である。従って、そのイベントリスクの判定を正確に行い、リスクが高い患者に対して適切な治療を行うことは、生命の危険や重篤な機能障害の発生を回避する上で非常に重要である。現在、アテローム血栓症の診断は、超音波 (エコー)、血管造影、MRI などの画像に基づいて行われている。しかしながら、こうした画像による診断は、画像の良し悪しが撮影者の技術によって左右されるため、いずれもゴールドスタンダードになり得ない。こうした点に鑑み、アテローム血栓症の指標となるバイオマーカーの探索が精力的に行われているが (例えば特許文献 1)、動脈壁肥厚の程度の指標として用いることができるバイオマーカーは見出されていないのが現状である。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

40

【特許文献 1】特表 2 0 0 8 - 5 1 2 0 9 4 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

そこで本発明は、アテローム血栓症のイベントリスクの判定や、アテローム血栓症に対する治療効果の判定などを行うために有用な、バイオマーカーを用いた動脈壁肥厚の程度の検知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】

【0005】

本発明者らは上記の点に鑑みて鋭意検討を行った結果、アルギニン欠損型補体成分 C 3

50

a (C 3 a - d e s A r g) とカルシウム結合性タンパク質である S 1 0 0 A 1 2 のそれぞれが、動脈壁肥厚の程度を検知するためのタンパク質バイオマーカーとして有用であり、これらの血液中の存在量が多いほど動脈壁肥厚の程度が強く、これらの血液中の存在量に基づいて、現在、臨床現場において頸動脈硬化の進行度の指標として用いられている頸動脈 I M T (内膜中膜複合体厚) の程度を階層化することができることを見出した。

【 0 0 0 6 】

上記の知見に基づいてなされた本発明の動脈壁肥厚の程度の検知方法は、請求項 1 記載の通り、C 3 a - d e s A r g、および/または、S 1 0 0 A 1 2 の血液中の存在量が多いほど、動脈壁肥厚の程度が強いと判断することによる。

また、請求項 2 記載の方法は、請求項 1 記載の方法において、C 3 a - d e s A r g の血液中の存在量の測定を、C 3 a - d e s A r g を特異的に認識する抗体を用いて免疫学的手法によって行うことによる。

また、請求項 3 記載の方法は、請求項 1 記載の方法において、S 1 0 0 A 1 2 の血液中の存在量の測定を、S 1 0 0 A 1 2 を特異的に認識する抗体を用いて免疫学的手法によって行うことによる。

また、本発明は、請求項 4 記載の通り、C 3 a - d e s A r g を特異的に認識する抗体、および/または、S 1 0 0 A 1 2 を特異的に認識する抗体の、動脈壁肥厚の程度を検知するための使用である。

また、本発明は、請求項 5 記載の通り、C 3 a - d e s A r g を特異的に認識する抗体、および/または、S 1 0 0 A 1 2 を特異的に認識する抗体を少なくとも含む、動脈壁肥厚の程度を検知するためのキットである。

【 発明の効果 】

【 0 0 0 7 】

本発明によれば、アテローム血栓症のイベントリスクの判定や、アテローム血栓症に対する治療効果の判定などを行うために有用な、動脈壁肥厚の程度を検知する方法として、C 3 a - d e s A r g、および/または、S 1 0 0 A 1 2 の血液中の存在量を指標とする方法を提供することができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 0 8 】

【 図 1 】 実施例 1 における、C 3 a - d e s A r g と S 1 0 0 A 1 2 のそれぞれの血中濃度に基づいて、A T I S 関連患者の群と C E A 患者の群を区別することができることを示すグラフである。

【 図 2 】 同、C 3 a - d e s A r g と S 1 0 0 A 1 2 のそれぞれの血中濃度に基づいて、頸動脈 I M T の程度を階層化することができることを示すグラフである。

【 図 3 】 実施例 2 における、C 3 a - d e s A r g の血中濃度に基づいて、A T I S 関連患者の群と C E A 患者の群を区別することができることと、頸動脈 I M T の程度を階層化することができることを示すグラフである。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 0 9 】

本発明の動脈壁肥厚の程度の検知方法は、C 3 a - d e s A r g、および/または、S 1 0 0 A 1 2 の血液中の存在量が多いほど、動脈壁肥厚の程度が強いと判断することによる。動脈壁肥厚の程度の検知は、C 3 a - d e s A r g と S 1 0 0 A 1 2 のいずれか一方の血液中の存在量に基づいて行ってもよいし、それぞれの血液中の存在量を併用して行ってもよい。

【 0 0 1 0 】

本発明において、動脈壁肥厚の程度を検知するためのバイオマーカーとして用いる C 3 a - d e s A r g は、補体成分である C 3 a の分解産物であり、血液中で C 3 a の C 末端のアルギニンが切除されることで生成し、C 3 a よりも安定かつ生物活性が低いことが知られている (必要であれば例えば特開 2 0 1 0 - 2 1 0 4 0 8 号公報を参照のこと) 。

【 0 0 1 1 】

10

20

30

40

50

また、S100A12は、カルシウム結合性タンパク質であるS100タンパク質ファミリーに属し、終末糖化産物AGEの受容体であるRAGEへの新規リガンドEN-RAGE (extracellular newly identified RAGE-binding protein)とも呼ばれ、好中球が産生することが知られている(必要であれば例えばA. KOSAKI et al., J Clin Endocrinol Metab, November 2004, 89(11): 5423-5428を参照のこと)。

【0012】

C3a-desArgとS100A12のそれぞれの血液中の存在量の測定は、例えば抗原抗体反応を利用する免疫学的手法、具体的には、ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)法、ウエスタンブロッティング法、ラテックス凝集比濁法、フローサイトメトリー法などにより、それぞれの方法の標準的なプロトコルに従って行うことができる。こうした方法に用いる抗体は、C3a-desArgとS100A12のそれぞれを特異的に認識する抗体が好適である。抗体は、モノクローナル抗体であってもよいし、ポリクローナル抗体であってもよい。また、市販の抗体や公知の抗体であってもよいし、自家作製した抗体であってもよい。抗体は、容易かつ簡便に動脈壁肥厚の程度を検知することができるように、洗浄液などとともにキット化してもよい。

10

【0013】

本発明の動脈壁肥厚の程度を検知方法において検知対象とする動脈は、壁肥厚が起こりうる動脈であれば体内のどの部位に存在する動脈であってもよいが、検知対象とする好適な動脈としては頸動脈が挙げられる。検知対象とする動脈が頸動脈の場合、本発明の方法は、例えば次のようにして利用することができる。健康診断などにおいて頸動脈におけるアテローム血栓症のイベントリスクの判定を行うために、頸動脈壁肥厚の程度を知ることが目的として、対象者から採取した血液中のC3a-desArgやS100A12の存在量を、頸動脈壁肥厚の程度が軽度と重度のそれぞれの場合の予め定めた標準存在量(例えば超音波(エコー)、血管造影、MRIなどの画像による診断によって確定されたそれぞれの集団の平均存在量)と比較する。比較の結果、対象者の存在量が、壁肥厚の程度が軽度の場合の標準存在量よりも少なければ治療の必要なし、軽度の場合の標準存在量に相当すれば薬物療法を実施する、重度の場合の標準存在量に相当すれば頸動脈内膜剥離術(CEA)を施行するといったように、治療の必要性の有無を判断したり、治療方針を策定したりする。こうした治療の必要性の有無の判断や治療方針の策定を行う際、現在、アテローム血栓症の診断に利用されている、超音波(エコー)、血管造影、MRIなどの画像による診断の結果を参考にしてもよい。また、本発明の方法は、治療を行った対象者の治療後のC3a-desArgやS100A12の血液中の存在量を、治療前の存在量と比較することによる、頸動脈におけるアテローム血栓症に対する治療効果の判定や、対象者のC3a-desArgやS100A12の血液中の存在量を、以前の存在量と比較することによる、頸動脈におけるアテローム血栓症のイベントリスクの経時的変化の判定などにも利用することもできる。

20

30

【実施例】

40

【0014】

以下、本発明を実施例によって詳細に説明するが、本発明は以下の記載に限定して解釈されるものではない。

【0015】

参考例1：標準物質として用いるTrpE-C3a-desArg融合抗原の調製

(A) C3a-desArg遺伝子のクローニング

ヒト肝癌細胞株であるHuh7細胞より、全RNAを、High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche diagnostics corporation)を用いてメーカーの推奨する方法に従って精製した。得られた核酸にC3ad-asプライマー(5'-ggatccttaggccaggcccccagggtg

50

g c t g g c c c g c g c - 3' : 配列番号1)を加え、SuperScript I
I reverse transcriptase (Invitrogen)により、メ
ーカーの推奨する条件で、42 で1時間逆転写反応を行い、cDNAを得た。

【0016】

得られた反応液にRNaseH (Invitrogen)を加え、37 で30分反応
させ、混在するRNAを分解した。この反応液の一部を用い、C3a-sプライマー(5
' - g a a t t c c a t c a t c a t c a t c a t t c c g t g c a g c t c a c
g g a g a a g c g a a t g g a c - 3' : 配列番号2)とC3ad-asプライマーの
存在下で、Takara EX Taq DNA polymerase (宝酒造)を用
い、94 で30秒、55 で30秒、72 で30秒からなる30回のサーマルサイク
ル反応によるポリマーゼチェーンリアクション(PCR)を行うことにより、C3a -
desArg遺伝子のcDNAの増幅を行った。

10

【0017】

増幅した断片を1.2%アガロースゲル電気泳動によって分離し、アガロースゲルから
、QIAquick gel purification kit (QIAGEN)を用
い、メーカーの推奨する方法に従って約260bpのDNA断片を回収した。回収したD
NA断片(C3a-desArg cDNA)を、メーカーの推奨する方法に従ってpG
EM-T easyベクター(Promega)と連結反応させた後、得られた連結反応
液を用いてDH5 株を形質転換した。アンピシリン耐性で、IPTGとX-galを加
えた寒天培地上での平板培養で白色コロニーを形成する形質転換体を選び、アンピシリン
を100µg/mlとなるよう加えた2YT培地(1.6%トリプトン、1%酵母エキス
、0.5%NaCl)にて培養した。培養した菌体からWizard Plus SV
Miniprep DNA Purification System (Promega
)を用いてプラスミドを精製した。

20

【0018】

精製したプラスミドに組み込まれているC3a-desArg cDNAの配列は、ベ
クターに適合したプライマーを用い、CEQ DTCS Quick Start Ki
t (BECKMAN・COULTER)により、メーカーの推奨する方法に従って反応を
行い、CEQ2000 XL DNA analysis system (Softwa
re version 4.0.0、BECKMAN・COULTER)により解析した
。得られたデータを基に、Sequencher (Version 4.1.2、Gen
e Codes Corporation)を用いて配列データの解析を行い、C3a -
desArg cDNAの塩基配列を決定した。

30

【0019】

(B) TrpE - C3a - desArg 融合抗原発現プラスミドの構築

クローニングされたC3a-desArgプラスミド0.5µgを、制限酵素反応液2
0µl [50mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM MgCl₂、1mMジ
チオスレイトール、100mM NaCl、15単位のEcoRIおよび15単位のBa
mHI酵素]中、37 で1時間消化し、その後、1.2%アガロースゲル電気泳動を行
い、QIAquick gel purification kitを用いて、約260
bpのEcoRI - BamHI断片を精製した。

40

【0020】

次に、発現ベクターであるpATtrpEのプラスミド0.5µgを、制限酵素反応液
20µl [50mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM MgCl₂、1mM
ジチオスレイトール、100mM NaCl、15単位のEcoRIおよび15単位のB
amHI酵素]中、37 で1時間消化し、その後、1.2%アガロースゲル電気泳動を
行い、QIAquick gel purification kitを用いて、pAT
trpEベクターのEcoRI - BamHI断片を精製した。

【0021】

C3a-desArgプラスミドのEcoRI - BamHI断片とpATtrpEベク

50

ターのEcoRI - BamHI断片の連結反応を、10×リガーゼ用緩衝液〔660mM Tris - HCl (pH7.5)、66mM MgCl₂、100mMジチオスレイトール、1mM ATP〕5μlとT4リガーゼ1μl(350単位/μl)に水を加えて50μlとし、16で一晚保温して行なった。pATtrpE - C3a - desArg発現プラスミドを得るために、得られた連結反応液を用いて大腸菌BL21株を形質転換した。アンピシリン耐性で、寒天培地上での平板培養で生育した形質転換体を選び、アンピシリンを100μg/mlとなるよう加えた2YT培地にて培養した。

【0022】

1.5mlの菌培養液を遠心して集菌し、プラスミドDNAのミニプレペレーションをアルカリ法〔Manniatissら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual(1982)〕により行なった。得られたプラスミドDNA1μgを、制限酵素反応液20μl〔50mM Tris - HCl (pH7.5)、10mM MgCl₂、1mMジチオスレイトール、100mM NaCl、15単位のEcoRIおよび15単位のBamHI酵素〕中、37で1時間消化し、その後、1.2%アガロースゲル電気泳動を行い、約260bpのEcoRI - BamHI断片が生じるpATtrpE - C3a - desArg発現プラスミドを選別した。

10

【0023】

(C) TrpE - C3a - desArg融合抗原の発現および精製

pATtrpE - C3a - desArg発現プラスミドをもつ大腸菌BL21株を、50μg/mlのアンピシリンを含む3mlの2YT培地に接種し、37で9時間培養した。得られた培養液1mlを、50μg/mlのアンピシリンを含む100mlのM9 - CA培地(0.6%Na₂HPO₄、0.5%KH₂PO₄、0.5%NaCl、0.1%NH₄Cl、0.1mM CaCl₂、2mM MgSO₄、0.5%カザミノ酸、0.2%グルコース)に植え継ぎ、37で培養した。OD600 = 0.3の時に終濃度40mg/lになるようにインドールアクリル酸を加え、さらに16時間培養した。得られた培養液を5Krpmで10分間遠心して集菌した。

20

【0024】

集めた菌体に、20mlの0.15M NaClを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.3)(PBS)を加えて懸濁し、再び遠心して、TrpE - C3a - desArg融合抗原の発現している菌体を約2g得た。得られた菌体をPBS10ml中に再懸濁し、超音波破碎により大腸菌膜を破碎した後に遠心し、TrpE - C3a - desArg融合抗原を含む可溶性画分を得た。得られた可溶性画分に、尿素とジチオスレイトールを、それぞれ最終濃度が6Mと2mMになるように添加した後、His GraviTrapカラム(GE Healthcare)を用い、メーカーの推奨する方法に従ってアフィニティークロマトを行い、TrpE - C3a - desArg融合抗原を精製した。

30

【0025】

参考例2：抗ヒトC3a - desArg特異的モノクローナル抗体の作製

(A) ハイブリドーマの作製

抗ヒトC3a - desArg特異的モノクローナル抗体を作製するため、マウスへの免疫を以下のようにして行った。免疫抗原はC3a - desArgのC末端11アミノ酸ペプチド(QHARASHLGLA：配列番号3)のKLHコンジュゲートとし、10μg(ペプチド相当)をアジュバントであるTiterMax Gold(TiterMax USA)とともにBALB/cマウスに腹腔内投与した。2~4週間ごとに同様の追加免疫を行い、さらにPBSに溶解したペプチド10μgを最終免疫として尾静脈内に投与した。

40

【0026】

最終免疫後3日目にマウスから脾臓を無菌的に摘出し、ハサミおよび金属メッシュを用いて脾臓を個々の細胞にほぐし、RPMI - 1640培地で3回洗浄した。対数増殖期のマウス骨髄腫細胞株Sp2/0 - Ag14をRPMI - 1640培地で3回洗浄後、この細胞と脾臓細胞を1：5の細胞数比で混合した。200×gで5分間遠心した後、上清を

50

除去し、細胞塊を緩やかに混合しながら50%ポリエチレングリコール(PEG)4000(Merck)を含むRPMI-1640培地1mlをゆっくりと加え、さらにRPMI-1640培地10mlを加えて細胞融合させた。

【0027】

得られた融合細胞を、200×gで5分間遠心してPEGを除いた後、10%ウシ胎児血清およびヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン(HAT)を含むRPMI-1640培地に懸濁し、96ウエル細胞培養プレートに播種した。約10日間培養してハイブリドーマのみを増殖させた後、免疫抗原に対して特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するクローンをELISA法により検索し、所望のハイブリドーマを得、限界希釈法により単クローン化を行い、ハイブリドーマを樹立した。

10

【0028】

(B) 抗ヒトC3a-desArg特異的モノクローナル抗体の作製および解析

(A)で樹立したハイブリドーマの1つ(クローン名:C3ad-5)を、無血清培地(Hybridoma-SFM、GIBCO)を用い、37℃にて5%炭酸ガス中において72~96時間培養した。培地中に産生されたモノクローナル抗体を精製するため、その培養液を、プロテインAセファロースカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにかけた。

【0029】

C3ad-5が産生するモノクローナル抗体について、抗マウスIg各アイソタイプ抗体を用いたアイソタイプタイピングキット(Zymed)により、サブクラスを同定した結果、IgG2aであることがわかった。また、C3ad-5が産生するモノクローナル抗体は、市販のヒトC3a-desArg精製物(Calbiochem)に反応するが、市販のヒトC3a精製物(Calbiochem)に反応しないことから、C3a-desArg特異的モノクローナル抗体であることがわかった。

20

【0030】

参考例3:ヒトC3a-desArgを検出するためのモノクローナル抗体の作製

免疫抗原としてC3a-desArgのN端側16アミノ酸ペプチド(KRMDKVGKYPKELRKC:配列番号4)のKLHコンジュゲートを用いること以外は参考例2と同様にして、所望のハイブリドーマを樹立した。その1つ(クローン名:C3N-6)が産生するモノクローナル抗体について、参考例2と同様にしてサブクラスを同定した結果、IgG1であることがわかった。また、C3N-6が産生するモノクローナル抗体は、市販のヒトC3a-desArg精製物および市販のヒトC3a精製物に反応することから、ヒトC3a-desArgを検出するためのモノクローナル抗体として用いることができることがわかった。

30

【0031】

実施例1:C3a-desArgとS100A12のそれぞれの血中濃度に基づく頸動脈IMTの程度の階層化

頸動脈壁肥厚が認められることでアテローム血栓症およびその危険因子を持つと判断された77名の患者(ATIS関連患者)と、頸動脈壁肥厚の程度が重度であることから頸動脈内膜剥離術(CEA)の施行が必要と判断された39名の患者(CEA患者)について、それぞれの患者から同意を得て、C3a-desArgとS100A12の血中濃度を測定した。C3a-desArgとS100A12の血中濃度の測定は、それぞれ後述するELISA法により行った。結果を表1に示す。

40

【0032】

【表 1】

ATIS関連患者 N=77	C3a-desArg (ng/ml)	S100A12 (ng/ml)	ATIS関連患者 N=77	C3a-desArg (ng/ml)	S100A12 (ng/ml)	CEA患者 N=39	C3a-desArg (ng/ml)	S100A12 (ng/ml)
A 1	464	25	A 40	1228	78	C 1	646	50
A 2	1221	45	A 41	1152	34	C 2	1089	196
A 3	292	11	A 42	899	41	C 3	1482	113
A 4	427	16	A 43	717	139	C 4	2250	129
A 5	397	24	A 44	500	47	C 5	1045	177
A 6	893	31	A 45	225	12	C 6	826	82
A 7	586	44	A 46	739	100	C 7	958	50
A 8	855	73	A 47	927	36	C 8	1368	62
A 9	1267	37	A 48	522	139	C 9	2069	133
A 10	760	78	A 49	680	54	C 10	1386	33
A 11	638	34	A 50	846	83	C 11	1367	89
A 12	1019	41	A 51	672	223	C 12	553	18
A 13	338	139	A 52	471	117	C 13	855	73
A 14	756	47	A 53	596	141	C 14	1084	51
A 15	158	12	A 54	630	45	C 15	671	84
A 16	683	100	A 55	303	77	C 16	985	106
A 17	1717	36	A 56	332	34	C 17	2254	118
A 18	1579	139	A 57	1289	115	C 18	2406	89
A 19	968	54	A 58	1245	17	C 19	1629	84
A 20	781	83	A 59	427	117	C 20	1443	136
A 21	1651	223	A 60	732	28	C 21	945	69
A 22	358	117	A 61	172	35	C 22	2739	178
A 23	1175	141	A 62	542	147	C 23	575	65
A 24	829	45	A 63	393	125	C 24	1702	46
A 25	605	71	A 64	311	156	C 25	3278	250
A 26	536	37	A 65	500	52	C 26	1250	59
A 27	428	131	A 66	418	104	C 27	752	73
A 28	278	26	A 67	591	220	C 28	778	48
A 29	674	150	A 68	282	70	C 29	117	26
A 30	458	43	A 69	397	86	C 30	3567	140
A 31	571	84	A 70	562	96	C 31	1377	46
A 32	471	43	A 71	332	112	C 32	848	85
A 33	230	39	A 72	558	333	C 33	1938	665
A 34	576	16	A 73	496	116	C 34	620	44
A 35	964	24	A 74	517	118	C 35	1295	160
A 36	551	31	A 75	645	99	C 36	3167	430
A 37	351	44	A 76	1637	52	C 37	1161	71
A 38	1471	73	A 77	225	22	C 38	1375	440
A 39	237	37				C 39	1599	166

10

20

30

【 0 0 3 3 】

A T I S 関連患者の 7 7 例と C E A 患者の 3 9 例の両群の C 3 a - d e s A r g と S 1 0 0 A 1 2 のそれぞれの血中濃度の測定結果を、M a n n - W h i t n e y 検定により比較したところ、それぞれ $p < 0 . 0 0 0 1$ と $p = 0 . 0 1 0 2$ で両群を区別することができた (図 1) 。さらに、頸動脈 I M T の測定を行っている A T I S 関連患者の 7 7 例と C E A 患者の 3 1 例の合計 1 0 8 例について、左右の総頸動脈の遠位壁 (f a r w a l l) の最大 I M T (I M T - C m a x) の合計値で 2 群 (壁肥厚が 3 m m 未満の軽度な群と 3 m m 以上の重度な群) に分け、C 3 a - d e s A r g と S 1 0 0 A 1 2 のそれぞれの血中濃度の測定結果を、M a n n - W h i t n e y 検定により比較したところ、それぞれ $p < 0 . 0 0 0 1$ と $p = 0 . 0 2 5 4$ で両群を区別することができた (図 2) 。この結果は、K r u s k a l - W a l l i s 検定による検討においても確認することができた。以上の結果から、C 3 a - d e s A r g と S 1 0 0 A 1 2 のそれぞれの血中濃度が高いほど頸動脈壁肥厚の程度が強く、これらの血中濃度に基づいて、頸動脈 I M T の程度を階層化することができることがわかった。また、上記の 2 群 (肥厚が 3 m m 未満の軽度な群と 3 m m 以上の重度な群) の区別の、C 3 a - d e s A r g と S 1 0 0 A 1 2 のそれぞれの血中濃度からの予測可能性を、ロジスティック回帰モデルを用いて 1 0 - f o l d c r o s s - v a l i d a t i o n で検証したところ、A B I (足関節 / 上腕インデックス) を説明変数として予測した R O C 曲線の A U C (曲線下面積) が 0 . 6 3 6 であるのに対して、C 3 a - d e s A r g と S 1 0 0 A 1 2 のそれぞれの血中濃度の 2 変数を説明変数として予測した R O C 曲線の A U C は 0 . 7 8 7 であり、前者よりも後者の方が予測精度が高

40

50

いことから、頸動脈壁肥厚の程度を検知する上において、C3a-desArgとS100A12のそれぞれの血中濃度を併用することの有用性を確認することができた。

【0034】

(C3a-desArgの血中濃度の測定のためのELISA法のプロトコル)

参考例2で作製した抗ヒトC3a-desArg特異的モノクローナル抗体(C3ad-5)を、終濃度が5 μ g/mlになるように0.5M NaClを含む100mM炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH9.6)で希釈し、96ウエルマイクロプレート(ヌンク社)1ウエルにつき100 μ lずつ分注した。4で一晚静置した後、0.15M NaClを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.3)(以下「洗浄液」)0.35mlを用いてそれぞれのウエルを2回洗浄した。その後、0.5%カゼイン-Naを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.3)(以下「ブロッキング液」)0.35mlをそれぞれのウエルに添加し、さらに室温で4時間静置した。ブロッキング液を除去した後、0.2M NaClと1%BSAと0.07%カゼイン-Naを含む100mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.3)90 μ lと、測定試料(血清)または段階的に希釈した標準物質(参考例1で調製したTrpE-C3a-desArg融合抗原)10 μ lを、それぞれのウエルに添加して100 μ lとし、室温で1時間反応させた。反応後、洗浄液0.35mlを用いてそれぞれのウエルを5回洗浄した。その後、参考例3で作製したヒトC3a-desArgを検出するためのモノクローナル抗体(C3N-6)をペルオキシダーゼ(POD)標識して調製した標識抗体液(0.2M NaClと1%BSAと0.07%カゼイン-Naを含む100mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.3))100 μ lをそれぞれのウエルに添加し、室温で1時間反応させた。洗浄液0.35mlを用いてそれぞれのウエルを5回洗浄した後、基質(オルトフェニレンジアミン)溶液100 μ lを添加し、室温暗所で30分間反応させた。反応後、2N硫酸溶液100 μ lをそれぞれのウエルに添加し、波長630nmの吸光度を対照として波長490nmにおける吸光度(OD490)を測定することで、C3a-desArgの血中濃度を測定した。

10

20

30

40

50

【0035】

(S100A12の血中濃度の測定のためのELISA法のプロトコル)

A. KOSAKI et al., J Clin Endocrinol Metab, November 2004, 89(11): 5423-5428に記載のELISA法を改変して行った。具体的には、次のようにして行った。抗ヒトS100A12特異的モノクローナル抗体(hCF128)を、終濃度が0.3 μ g/mlになるように0.5M NaClとBSA1 μ g/mlを含む100mM炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH9.6)で希釈し、96ウエルマイクロプレート(ヌンク社)1ウエルにつき100 μ lずつ分注した。4で一晚静置した後、0.15M NaClを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.3)(以下「洗浄液」)0.35mlを用いてそれぞれのウエルを2回洗浄した。その後、0.15M NaClと1%BSAを含む20mM HEPES緩衝液(pH7.4)(以下「ブロッキング液」)0.35mlをそれぞれのウエルに添加し、さらに室温で4時間静置した。ブロッキング液を除去した後、0.15M NaClと1%BSAと1mM EDTA-3Naを含む20mM HEPES緩衝液(pH7.4)90 μ lと、測定試料(血清)または段階的に希釈した標準物質(組換えS100A12抗原)10 μ lを、それぞれのウエルに添加して100 μ lとし、室温で30分間反応させた。反応後、洗浄液0.35mlを用いてそれぞれのウエルを4回洗浄した。その後、ヒトS100A12を検出するためのモノクローナル抗体(hCF113)をペルオキシダーゼ(POD)標識して調製した標識抗体液(0.15M NaClと1%BSAと1mM CaCl₂を含む20mM HEPES緩衝液(pH7.4))100 μ lをそれぞれのウエルに添加し、室温で30分間反応させた。洗浄液0.35mlを用いてそれぞれのウエルを4回洗浄した後、基質(オルトフェニレンジアミン)溶液100 μ lを添加し、室温暗所で20分間反応させた。反応後、2N硫酸溶液100 μ lをそれぞれのウエルに添加し、波長630nmの吸光度を対照として波長490nmにおける吸光度(OD490)を測定することで、S100A12の血中濃度を測定した。

【 0 0 3 6 】

実施例 2 : C 3 a - d e s A r g の血中濃度に基づく頸動脈 I M T の程度の階層化 (その 2)

C 3 a - d e s A r g の血中濃度の測定のために、市販の C 3 a - d e s A r g 測定用キット (H u m a n C 3 a E L I S A K i t、B D B i o s c i e n c e s) を用いること以外は、実施例 1 と同様の実験を行った (但し A T I S 関連患者は 3 0 例で C E A 患者は 3 1 例)。結果を図 3 に示す。図 3 から明らかなように、市販の C 3 a - d e s A r g 測定用キットを用いても、A T I S 関連患者の群と C E A 患者の群を $p < 0 . 0 0 0 1$ で区別することができた。また、左右の総頸動脈の遠位壁の最大 I M T の合計値が 3 m m 未満の群と 3 m m 以上の群を $p < 0 . 0 0 0 1$ で区別することができた。

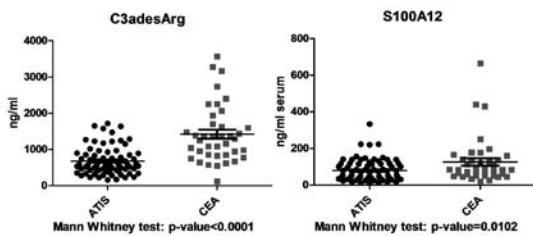
10

【 産業上の利用可能性 】

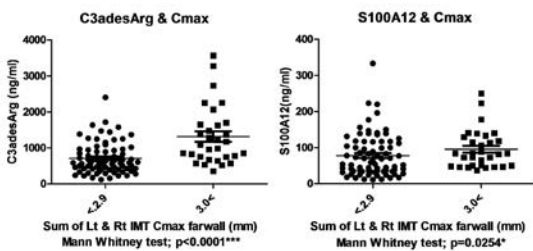
【 0 0 3 7 】

本発明は、アテローム血栓症のイベントリスクの判定や、アテローム血栓症に対する治療効果の判定などを行うために有用な、動脈壁肥厚の程度の検知方法を提供することができる点において産業上の利用可能性を有する。

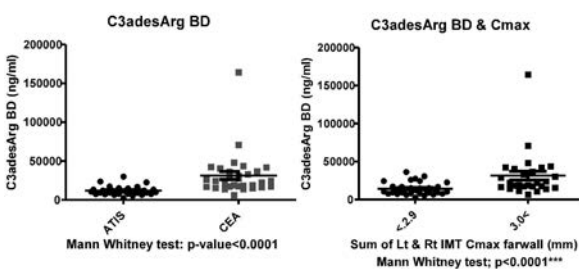
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



【配列表】

2015178237000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2015/063511
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/48-33/98 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2010-85242 A (BIOS, Inc.), 15 April 2010 (15.04.2010), claims; paragraphs [0004], [0005], [0022] to [0039], [0045]; fig. 4 to 6 (Family: none)	1, 2, 4, 5
Y	Azhar Abbas, et al., High Levels of S100A12 Are Associated With Recent Plaque Symptomatology in Patients With Carotid Atherosclerosis, Stroke, 2012.03.01, volume 43, Issue 5, p.1347-1353, Materials and Methods, Results, Figure 1.	1, 3-5
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 July 2015 (29.07.15)		Date of mailing of the international search report 11 August 2015 (11.08.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/063511

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Marion A. Hofmann Bowman, et al., S100A12 in Vascular Smooth Muscle Accelerates Vascular Calcification in Apolipoprotein E-Null Mice by Activating an Osteogenic Gene Regulatory Program, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2010.10.21, volume 31 / Issue 2, p.337-344, ApoE-Null Mice That Express Human S100A12 inVSMC Have Increased Vascular Calcification, Table1.	1,3-5
Y	Allen P. Burke, et al., Morphologic Findings of Coronary Atherosclerotic Plaques in Diabetics, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biolog, 2004.05.13, Volume 24 / Issue 7, p.1266-1271	1,3-5
Y	Ling Yan, et al., Beneficial effects of quinoline-3-carboxamide (ABR-215757) on atherosclerotic plaque morphology in S100A12 transgenic ApoE null mice, Atherosclerosis, 2013.02.28, Volume 228, p.69-79	1,3-5

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 6 3 5 1 1									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/48-33/98											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2015年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2015年	日本国実用新案登録公報	1996-2015年	日本国登録実用新案公報	1994-2015年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2015年										
日本国実用新案登録公報	1996-2015年										
日本国登録実用新案公報	1994-2015年										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII) PubMed											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X	JP 2010-85242 A (株式会社バイオス医科学研究所) 2010.04.15, [特許請求の範囲], [0004], [0005], [0022] - [0039] [0045], [図4] - [図6] (ファミリーなし)	1, 2, 4, 5									
Y	Azhar Abbas, et al., High Levels of S100A12 Are Associated With Recent Plaque Symptomatology in Patients With Carotid Atherosclerosis, Stroke, 2012.03.01, volume 43, Issue 5, p.1347-1353, Materials and Methods, Results, Figure 1.	1, 3-5									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 29.07.2015		国際調査報告の発送日 11.08.2015									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 黒田 浩一 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2 J 5704								

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2015/063511

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	Marion A. Hofmann Bowman, et al., S100A12 in Vascular Smooth Muscle Accelerates Vascular Calcification in Apolipoprotein E-Null Mice by Activating an Osteogenic Gene Regulatory Program, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2010.10.21, volume 31 / Issue 2, p. 337-344, ApoE-Null Mice That Express Human S100A12 inVSMC Have Increased Vascular Calcification, Table1.	1, 3-5
Y	Allen P. Burke, et al., Morphologic Findings of Coronary Atherosclerotic Plaques in Diabetics, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biolog, 2004.05.13, Volume 24 / Issue 7, p. 1266-1271	1, 3-5
Y	Ling Yan, et al., Beneficial effects of quinoline-3-carboxamide (ABR-215757) on atherosclerotic plaque morphology in S100A12 transgenic ApoE null mice, Atherosclerosis, 2013.02.28, Volume 228, p. 69-79	1, 3-5

 フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 及川 里百合

岩手県盛岡市内丸 1 9 番 1 号 学校法人岩手医科大学内

(72) 発明者 榎 昇

埼玉県和光市丸山台 2 丁目 1 0 番 2 3 号 株式会社先端生命科学研究所内

(72) 発明者 菅又 泰博

埼玉県和光市丸山台 2 丁目 1 0 番 2 3 号 株式会社先端生命科学研究所内

(72) 発明者 飯田 久美子

埼玉県和光市丸山台 2 丁目 1 0 番 2 3 号 株式会社先端生命科学研究所内

(72) 発明者 大植 千春

埼玉県和光市丸山台 2 丁目 1 0 番 2 3 号 株式会社先端生命科学研究所内

F ターム(参考) 4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA50

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	检测动脉壁增厚程度的方法		
公开(公告)号	JPWO2015178237A1	公开(公告)日	2017-06-08
申请号	JP2016521042	申请日	2015-05-11
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人 岩手医科大学 株式会社先端生命科学研究所		
申请(专利权)人(译)	学校法人 岩手医科大学 株式会社先端生命科学研究所		
[标]发明人	人見次郎 及川里百合 槇昇 菅又泰博 飯田久美子 大植千春		
发明人	人見 次郎 及川 里百合 槇 昇 菅又 泰博 飯田 久美子 大植 千春		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C07K16/18		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/68		
FI分类号	G01N33/53.D C12N15/00.ZNA.A C07K16/18		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50		
代理人(译)	阿部真一		
优先权	2014102917 2014-05-17 JP		
其他公开文献	JP6687245B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的目的是提供一种用于检测动脉壁增厚程度的方法，该方法可用于确定动脉粥样硬化的事件风险，确定对动脉粥样硬化的治疗效果等。作为解决问题的手段的本发明的用于检测动脉壁增厚程度的方法是精氨酸缺乏的补体成分C3a (C3a-desArg) 和/或血液中的钙结合蛋白S100A12的量。这是因为判断为动脉壁增厚程度强。可以使用例如特异性识别这些蛋白质的抗体通过免疫学技术测量血液中这些蛋白质的丰度。

