

(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2007-230986

(P2007-230986A)

(43) 公開日 平成19年9月13日(2007.9.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/47 (2006.01)	C07K 14/47 Z N A	4C084
A61K 38/00 (2006.01)	A61K 37/02	4H045
A61P 1/16 (2006.01)	A61P 1/16	
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18	
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 Y	
審査請求 未請求 請求項の数 15 書面 (全 22 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2006-92246 (P2006-92246)

(22) 出願日 平成18年3月2日(2006.3.2)

(71) 出願人 506106132

高橋 直躬

東京都世田谷区桜上水5-2-9

(72) 発明者 高橋 直躬

東京都世田谷区桜上水5-2-9

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA17
 BA23 BA44 NA14 ZA751 ZA752
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA15
 BA17 CA40 DA75 EA28 EA50
 FA71 HA05 HA14

(54) 【発明の名称】新規蛋白質ならびに治療、診断方法

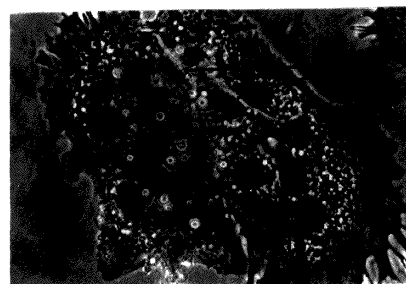
(57) 【要約】 (修正有)

【課題】肝臓疾患を高感度に検出し、応用治療可能な技術を提供する。

【解決手段】肝障害時に増減が見られるHepatestineおよび抗コネキシン32自己抗体を利用して肝臓疾患の診断、治療に用いることができる。Hepatestineは、正常肝臓組織より障害時において極早期にその発現量が低くなった後一過性に上昇する。また、抗コネキシン32自己抗体は障害が大きく、長くなるほど発現が大きくなる。それ故、Hepatestineおよび抗コネキシン32自己抗体の発現を同時に確認することは、より疾患の状況を的確に把握し、治療、再生に役立てることにつながる。

【選択図】 図1

初代培養肝細胞(13日)で確認された微胆管



Bile canaliculuslike ducts (arrows) were formed.←

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Hepatestine 蛋白質もしくはその変異体からなる肝臓疾患診断用マーカーならびに肝疾患に対する再生医療的応用可能な蛋白質。

【請求項 2】

Hepatestine 蛋白質が配列表の配列番号 1 のアミノ酸配列を有する蛋白質であり、その変異体が配列番号 1 のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列を有しかつ肝臓疾患診断マーカーならびに肝疾患に対する再生医療的応用可能な機能を有する蛋白質であり、請求項 1 の肝臓疾患診断用マーカーならびに肝疾患に対する医療効果を有する遺伝子もしくはそれに基づく構造を有する蛋白質。 10

【請求項 3】

Hepatestine 蛋白質が配列表の配列番号 1 のアミノ酸配列を有する蛋白質であり、その分子量が約 1 万 2 千、pI が 4.75 の蛋白質で、かつ肝臓疾患診断マーカーならびに肝疾患に対する医療効果を示す機能を有する蛋白質であり、請求項 1 の肝臓疾患診断用マーカーならびに肝疾患に対する医療効果を示す蛋白質。

【請求項 4】

検体中の Hepatestine 蛋白質もしくはその変異体の有無もしくは量を調べて、肝臓疾患を診断する診断方法。

【請求項 5】

検体中の Hepatestine 蛋白質もしくはその変異体を、Hepatestine 蛋白質もしくはその変異体に対する抗体と反応させ、該抗体と抗原抗体反応した検体中の Hepatestine 蛋白質もしくはその変異体の有無もしくは量から肝臓疾患を診断する請求項 4 の診断方法。 20

【請求項 6】

組織免疫染色法または酵素結合イムノソルベントアッセイ法 (ELISA) により、抗体と抗原抗体反応した検体中の Hepatestine 蛋白質の有無もしくは量を調べる請求項 5 の診断方法。

【請求項 7】

組織免疫染色法または酵素結合イムノソルベントアッセイ法 (ELISA) により、抗体と抗原抗体反応した検体中の Hepatestine 蛋白質もしくはその変異体の有無もしくは量を調べる請求項 5 の診断方法。 30

【請求項 8】

請求項 4～6 の診断方法のための診断用キットであって、Hepatestine 蛋白質もしくはその変異体に対する抗体を含む上記診断用キット。

【請求項 9】

コネキシン蛋白質もしくはその変異体を認識する自己抗体。

【請求項 10】

コネキシン 32 蛋白質もしくはその変異体を認識する自己抗体。

【請求項 11】

請求項 5 から 6 のいずれかの自己抗体を利用した診断用キットであって、コネキシン 32 蛋白質もしくはその変異体またはその一部と結合することができる抗コネキシン 32 自己抗体を成分として含む上記診断用キット。 40

【請求項 12】

検体中の抗コネキシン 32 自己抗体を、コネキシン蛋白質もしくはその変異体と反応させ、コネキシン蛋白質と抗原抗体反応した検体中の抗コネキシン 32 自己抗体もしくはその変異体の有無もしくは量から肝臓疾患を診断する請求項 11 の診断方法。

【請求項 13】

組織免疫染色法または酵素結合イムノソルベントアッセイ法 (ELISA) により、抗体と抗原抗体反応した検体中の抗コネキシン 32 自己抗体の有無もしくは量を調べる請求 50

項 1 2 の診断方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 2 または 1 3 の診断方法のための診断用キットであって、抗コネキシン 3 2 自己抗体もしくはその変異体を含む上記診断用キット。

【請求項 1 5】

請求項 6 ～ 7 及び、請求項 1 2 ～ 1 3 を同時に利用して肝臓疾患の状態をより正確に判断する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アポトーシスならびに他の要因による哺乳動物小腸上皮粘膜組織細胞の崩壊に由来する新規蛋白質に関する。更には、アポトーシスその他の要因に基づく本物質濃度、コネキシン 3 2 自己抗体血清中濃度の変化を測定することにより生体内の変化に関する情報を認識・解析することで、本新規蛋白質は病理診断ならびに治療にも利用することが出来ると判断される。したがって、本発明者は、これまでの検索により肝臓に外科的損傷ならびに病理的障害を受けたラットに、ウシ、メンヨウなどの小腸上皮組織ホモジネートエキスを投与した結果、損傷を受けた肝組織ならびに肝細胞に対し顕著な修飾効果を及ぼす多くの事実を測定、観察し、その効果の本質は主として本発明者が今回、発見分離した Hepat est ine 群の新規蛋白質に基づく結果と判断した。本新規蛋白質は肝実質細胞その他の臓器細胞の増殖・新生・機能促進などにも効力を有し、再生医療の立場からも利用可能な物質と考える。

10

20

【背景技術】

【0002】

本発明を説明するに当たり、はじめにアポトーシス、次に小腸、肝臓について説明したい。

1990年代後半以降、“アポトーシス”(apoptosis)という細胞死のメカニズムが、生物学の様々な分野で脚光をあびた後、この分野は現在まで急速な研究の進展を見せている。歴史的には従来、細胞死とは、外傷その他の要因などにより一群の細胞集団が死ぬ“病理的細胞死”である“ネクローシス(Necrosis)(壊死)”のみが知られていた。アポトーシスは、1972年、Kerr、Wyllie及びCurrieという3人の病理学者達によって、壊死と形態学的違いから見出され、名付けられたプログラム細胞死である。アポトーシスは、その形態のみならず、機能においてもネクローシスと異なり、細胞分裂ならびに新生・増殖などと表裏一体となって組織の細胞動態に深く関わっているものとして提起された。アポトーシスは、多くの病理的要因によっても生じるが、発生、免疫、ホルモン作用など生理的現象の発現に必須な“生理的細胞死”としても重要な役割を果たし、しかも生体内臓器の種類及びそれらの機能の相違などにより、それぞれのプログラムの速度経過が異なることが知られている。

30

【0003】

アポトーシスという名称は、ギリシャ語のapo(離れて)、ptosis(落ちること)からとられた。細胞分裂(mitosis)に匹敵する重要な細胞機能を、語感の上からもわからせる造語である。

40

アポトーシスの形態的特色として、細胞膜と細胞核の内部構造の変化を伴う急速な細胞縮小が上げられる。まず、クロマチンが正常の網状構造を失い、核膜辺縁に凝集し、細胞核を含め細胞質全体が縮小する。細胞表面に大小の突起が多数出現し、やがてちぎれて多くの粒子に断片化する。この様に断片化した細胞をアポトーシス小体という。アポトーシス小体は、次いで、周りの他の貪食細胞やマクロファージ細胞に取り込まれ、貪食除去される。アポトーシスの大きな特徴は、ネクローシスと異なり組織内で散発的に生じ、一旦開始すると速やかに進行し、さらには死に至った細胞が炎症を伴わず急速に除去される点にある。アポトーシスの過程では、細胞内外の多様な生理的及び病理的因子が細胞死の開始のシグナルとして働き、多様な経路を辿って細胞中に情報伝達され、細胞死に関する遺

50

伝子の発現などを介して死の決定がなされ、特徴的な細胞学的、生化学的変化を誘発する細胞死の実行過程へと進行する。

【0004】

アポトーシスに伴う生化学的変化として、クロマチンDNAが180-200塩基対の整数倍のオリゴヌクレオゾーム単位に断片化する現象が観察されている。このDNA断片は、アガロースゲル電気泳動により梯子状の“ladder”として検出され、これがアポトーシスの重要な指標のひとつとされている。

【0005】

ヒト生体内においては発生期において男女関係なく、将来女性生殖器になるミュラー管と男性生殖器になるウオルフ管という2つの管が両方つくられるが、ある段階で男性ではミュラー管が、女性ではウオルフ管が消えて性分化を行う。また、指間細胞の脱落により五指を形成することも有名である。

10

【0006】

そして、最も大切なことは消化管上皮細胞のTurn Overもまた、アポトーシスの一部であることである。胃、大腸、小腸などの消化管上皮細胞は常に外部環境との接点にありながら、特殊な機能を求められている。そのため、パイエル板のような特殊な免疫構造によって消化管免疫を発達させ、上皮細胞の生まれ変わり自体が非常に速やかで激しいアポトーシスを起こし、崩壊した死細胞群は直ちに速やかに管内へ脱落してゆくことになる。これらの全ての脱落細胞の殆どは消化管内で消化分解されたり微生物分解を受けるものと考えられるが、その量は単位時間当たりでも他臓器に較べても極めて多量に達する。この分解物、即ちアポトーシス関連物質はどう利用されるのかこれまでに論じた報告は殆どなかった。

20

【0007】

ここで小腸について考えてみると、小腸(small intestine)とは消化管の一部で消化と吸収を行う器官である。それは胃と大腸の間にあり、動物の種類によって長さはそれぞれ異なり、例えばヒトでは十二指腸(約30cm)、空腸(約250cm)、回腸(約350cm)からなり、全長は6m以上に達する。肝臓からの胆汁やすい臓からの酵素は十二指腸へ分泌され、消化反応のかかなりの部分がここで行われる。小腸の壁面には数百万もの柔毛と呼ばれる指状の突起があり、これが小腸の表面積を増大させている。さらに、柔毛の表面には数千の微柔毛があり、さらに表面積を増やしている。一つの細胞からおよそ600の微柔毛が突き出している。小腸で吸収された成分は栄養血管である門脈を通して肝臓に達し、同化、異化をうながす。

30

【0008】

一方、肝臓は非常に多様で複雑な機能と構造から成り、これを人為的に再構築することは困難と考えられている。しかし、実際には生体肝移植や肝部分切除手術後の過程で示されるように非常に強い再生能力を有しており、そのメカニズムの解明こそが難しかった。実験動物を例にとっても、ラットでは70%の肝部分切除を行っても、わずか2週間程度の時間で湿重量が90%以上にまで回復することはよく知られた事実である。最近、国内外で「再構成肝組織(ミニ肝臓)」に関する報告がなされ、その構築の可能性が見えてきた。「ミニ肝臓」とは、体外あるいは体内で異所性に作った類似肝組織をさす。実際分離したラット肝細胞をマイクロキャリアビーズに張り付け、回転培養することで肝細胞塊を作ったり、VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor)遺伝子導入マウス肝細胞をマウス体内に移植し、細胞塊に血管を誘導することで肝組織を作ろうという試みがなされている。しかしいまだに肝臓の再生を制御することは難しい。

40

【0009】

非常によく知られている事実は、肝臓が増殖を行う際には肝実質細胞が脱分化とも考えられる状態になり、その細胞周期はG₀期からG₁期にシフトすると考えられていることである。この際にアルブミンなどの合成能力が低下する一方で、腫瘍マーカーでもあるアルファフェトプロテイン(AFP)や急性期反応蛋白質(APP)が合成されることは有

50

名である。

【0010】

しかし変化するのは蛋白質合成だけではない。この肝実質細胞増殖期には蛋白質合成だけではなく細胞の接着様式も変化する。ギャップ結合は細胞間結合の一つであり細胞膜に存在し、細胞間シグナル伝達に直接的に関与する。ギャップ結合を構成する半チャンネルをコネクソンといい、コネクソンはコネキシン蛋白によって構成されている。

【0011】

ギャップ結合の機能としては1. 2 K D a以下の細胞内シグナル伝達物質を隣り合う細胞へ直接輸送する機能を持ち、細胞分化・増殖やホメオスタシスの維持に役立つことがわかっていてる。マウス肝臓においてはコネキシン26 (C x - 26) とコネキシン32 (C x - 32) の発現が報告されており、平常時には隣接する肝実質細胞同士の情報伝達を司っているが、肝実質細胞増殖期には結合が解除されたり、コネキシンの発現が低下したりしていることが報告されている (C e l l T i s s u e R e s . 2 0 0 0 A p r ; 3 0 0 (1) : 1 1 1 - 7 .) 。

10

【0012】

このコネキシンは細胞膜上にあるため抽出して研究することは難しく、T r i t o n - X 1 0 0などの界面活性剤を利用して分解後に研究を行ってきた (E M B O J . 1 9 8 3 ; 2 (9) : 1 4 7 9 - 8 6 .) 。その一方で免疫組織学的、遺伝子工学的な研究は進んでおり、発癌により蛋白質発現レベルが低下することや (C R A c a d S c i I I I . 1 9 9 9 F e b - M a r ; 3 2 2 (2 - 3) : 1 5 1 - 9 .) 肝炎時にはL P S (リポポリサッカライド) が翻訳後転写調節に関与することが報告されている (J C e l l P h y s i o l . 1 9 9 6 F e b ; 1 6 6 (2) : 4 6 1 - 7 .) 。更にはC x - 3 2のC末端アミノ酸を合成蛋白質抗原としてポリクローナル抗体を作製し、定量的にC x - 3 2が肝再生時にいったん減少した後に再合成されることを示している (T i s s u e C e l l . 1 9 9 2 ; 2 4 (1) : 6 1 - 7 3 .) 。また、コネキシン26の発現レベルを指標として癌転移能の検査ができ、治療にも応用できる可能性があるという報告がされている (特願平11-198032) 。

20

【0013】

本発明者はラットを用いて慢性肝炎や複数回に及ぶ肝疾患モデルを作製した場合、その血清中に抗コネキシン32自己抗体が現れることを確認した。これによって炎症が長期にわたる場合などは自己抗体の肝実質細胞結合により細胞障害性を現すことがわかる。また、この自己抗体の血清中濃度測定によって肝疾患の予後を判定できることができた。

30

【0014】

更に本発明者はこれまでに明らかに種類の異なる様々な動物の小腸上皮粘膜より肝実質細胞増殖能を有する因子群を単離精製し、I n V i t r oにおける初代培養肝細胞系で有効であることを報告した。以下に述べる。

【0015】

当初この研究における有効な因子群が外部からの刺激によって生産されるものなのか、内在性のものなのか何れかという大きい問題があった。外因性の吸収される物質で一番刺激となるもののひとつは前出したL P S (リポポリサッカライド) である。通常、小腸上皮細胞から進入するL P Sは血液中に入り、殆どが肝臓で代謝される。L P Sは低濃度では免疫賦活物質であり、免疫担当細胞の活性化に働く。しかし肝炎などの疾患になるとL P Sの血中濃度が高くなってL P SがH e a t s c h o c k反応やA c u t e p h a s e反応、免疫反応を通してのT N F - α からアポトーシスを引き起こす可能性があることが報告されている (C r i t C a r e M e d . 1 9 9 8 J u l ; 2 6 (7) : 1 2 1 3 - 7 .) 。しかし本発明者は既に1988年にはL P Sの濃度が上昇している門脈血中にリンパ球を刺激する因子が存在することを報告している。(N a t u r w i s s e n s c h a f t e n . 1 9 8 8 7 5 : 5 1 9 - 2 1) 。

40

【0016】

50

また、これまでも他の要因による小腸のアポトーシスについて全く報告が無いわけではない。たとえば *In Vitro* の実験系でもラット小腸上皮細胞を使用した実験において細胞株 IEC-6 が *Protein phosphatase 2A* (PP2A) によってアポトーシスの調整を受けているとか (*J Biol Chem.* 2005 Jul 1)、*Bovine Milk alpha-Lactalbumin* が細胞死を誘導するという報告はあった (*Biosci Biotechnol Biochem.* 2005 Jun; 69 (6) : 1082-9.)。また、ガンマ線による細胞死が生じた際にどのような蛋白質発現差ができるかということについても MALDI TOF-Mass と二次元電気泳動を使用して比較した報告がある (*Proteomics.* 2005 Feb; 5 (2) : 426-32.)。

10

【0017】

こうして、日常小腸上皮細胞で *Turn Over* が原因で起こるアポトーシスから複数の蛋白質が発現することは確かである。発明者ははじめこの小腸上皮粘膜由来の有効因子群を包括的に *SIMFs* (*Small Intestine Mucosal Factors*) と命名した。例えば本発明者は1989年に既にウシの小腸上皮粘膜由来の物質が *In Vitro* においてラットの肝実質細胞を刺激して増殖させることを報告している (*INT. J. TISS. REAC.* 1989 11 (1) : 7-13)。更に本発明者は1989年当時にウシの小腸上皮因子を用いたラット肝実質細胞の長期培養によって *Micro Organ* ともいえる *In Vitro* における細胞塊 (クラスター) の作製に成功していた (*IN VITRO CELLULAR DEVELOPMENTAL BIOLOGY.* 1989. APRIL 25 (4) : 365-372)。この時 *In Vitro* での *SIMFs* を初代培養肝実質細胞に添加すると容易に細胞分裂、細胞増殖を進行させ、コロニーを形成する。*Spheroid* を形成した細胞群間には *Bile Canaliculus-like Ducts* が確認され、培養10数日になるとビリルビン、中性脂肪、コレステロール等の肝特有物質を生成するなど形態的、機能的分化を促進することが確認された (図1)。更に驚くべきことに90日にも及ぶ長期培養の結果 *Micro Liver* が観察されている (図2)。これは先に述べたように、現在でも非常に難しいとされる技術であり他に報告例がない。*SIMFs* を使用した場合には肝組織形成機構の機能的解析と人工培養過程における肝特有の分泌生成の過程と機構が明らかにされたことが大きな特徴と言える。今回、先のアポトーシス関連物質が *SIMFs* に含まれる物質であるのかどうか、またどのような物質で、どのような機能を有しているのかという点について研究を行った。その結果、本発明の物質は *SIMFs* に含まれていた物質であり、小腸から再吸収されて生体のホメオスタシスに役立っている新規生体物質であることがわかった。

20

30

【0018】

更に本発明者は、これまでの研究によって、ラットの *SIMFs* を含めてウシ、メンヨウ、ヤギ、ウサギなどの *SIMFs* はいずれも同様にラットの肝実質細胞の増殖を促進することを培養実験によって確認し、この *SIMFs* は哺乳動物の種類の相違にもかかわらず何れも等しくラットの肝実質細胞の増殖に有効な共通因子群に属することも明らかにした (*Bull. Faculty of Agr. Meiji Univ.* 1984. 65 : 1-13) (*Bull. Faculty of Agr. Meiji Univ.* 1992. 19 : 21-44)。これら哺乳動物の種類の相違にかかわらず共通に作用する事実は、その構造が比較的共通である一連の因子群の存在を裏づけしている。

40

【0019】

この事実は何れ医薬品として製品化する場合材料資源として世界各地に豊富に存在することの有用性のみならず、今回のようにその化学構造が明らかにされた以上、今後は合成有機化学に基づく製造法、更にこの因子を精製する遺伝子の発現と採取、生体内導入による遺伝子治療法の開発など、今世紀の人類の健康維持・寿命の更なる延長に対して極めて意義ある発見であるといえる。

【0020】

50

本発見を総括すると、はじめにアポトーシスによる小腸上皮粘膜組織細胞崩壊によって腸管内に放出される物質中には、肝実質細胞の維持増殖や肝機能の保持ならびに他臓器機能の維持・促進などの広範囲な生体全般に関するホメオスタシス (H o m e o s t a s i s) の保持に役立っている成分が含まれ、しかもそれは、各種哺乳動物の小腸上皮粘膜組織のホモジネートより得られてきた有効因子と同様か、かなり類似の構造を有する一群の新規蛋白質集団に属する物質と判断した。この物質を測定することは肝疾患の予後判定に役立つ。

【0021】

そこで本発明者はこのアポトーシスによって小腸上皮粘膜組織より現れ、肝実質細胞増殖能を有し、更には臨床検査上有効な情報を与えるこの一連の物質群に対して、小腸 (S m a l l I n t e s t i n e) と肝実質細胞 (H e p a t o c y t e) よりヘパテスチン・グループ (H e p a t e s t i n e G r o u p) と命名した。また抗コネキシン32自己抗体の存在確認もまた肝疾患の予後判定に役立ち、更に同時に測定すればより効果的であった。したがって、本発明者は今回の研究において、まずアポトーシス関連物質がどのような物質で、どのような機能を有しているのかということから解析を試みた結果、幾つかの新しい知見が得られた。更に疾患の診断に使用できるマーカー2種類を発見した。

10

【非特許文献1】C e l l T i s s u e R e s . 2 0 0 0 A p r ; 3 0 0 (1) : 1 1 1 - 7 .

【非特許文献2】E M B O J . 1 9 8 3 ; 2 (9) : 1 4 7 9 - 8 6 .

20

【非特許文献3】C R A c a d S c i I I I . 1 9 9 9 F e b - M a r ; 3 2 2 (2 - 3) : 1 5 1 - 9 .

【非特許文献4】J C e l l P h y s i o l . 1 9 9 6 F e b ; 1 6 6 (2) : 4 6 1 - 7 .

【非特許文献5】T i s s u e C e l l . 1 9 9 2 ; 2 4 (1) : 6 1 - 7 3 .

【非特許文献6】C r i t C a r e M e d . 1 9 9 8 J u l ; 2 6 (7) : 1 2 1 3 - 7 .

【非特許文献7】N a t u r w i s s e n s c a f t e n . 1 9 8 8 7 5 : 5 1 9 - 2 1

【非特許文献8】J B i o l C h e m . 2 0 0 5 J u l 1

30

【非特許文献9】B i o s c i B i o t e c h n o l B i o c h e m . 2 0 0 5 J u n ; 6 9 (6) : 1 0 8 2 - 9 .

【非特許文献10】P r o t e o m i c s . 2 0 0 5 F e b ; 5 (2) : 4 2 6 - 3 2 .

【非特許文献11】I N T . J . T I S S . R E A C . 1 9 8 9 1 1 (1) : 7 - 1 3

【非特許文献12】I N V I T R O C E L L U R A R D E V E L O P M E N T A L B I O L O G Y . 1 9 8 9 . A P R I L 2 5 (4) : 3 6 5 - 3 7 2

【非特許文献13】B u l l . F a c u l t y o f A g r . M e i j i U n i v . 1 9 8 4 . 6 5 : 1 - 1 3

【非特許文献14】B u l l . F a c u l t y o f A g r . M e i j i U n i v . 1 9 9 2 . 1 9 : 2 1 - 4 4

40

【発明が解決しようとする課題】

【0022】

従って、本発明は肝臓疾患時に現れるコネキシン32 (C x - 3 2) に対する自己抗体、及び小腸細胞のアポトーシスにより発見された新規蛋白質を測定して疾患診断用マーカーとして利用すること、もしくは新規蛋白質が有する細胞増殖能およびそれを利用した再生医療的使用法、治療法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0023】

本発明者は、小腸細胞株 I E C - 6 にアポトーシスを発生させ、2次元電気泳動法によ

50

ってアポトーシス特異的蛋白質を解析し、アポトーシス特異的蛋白質に対するモノクローナル抗体作製に成功した。また、本発明者らは目的蛋白質に対する測定系を構築し、さまざまなラット疾患モデルで目的蛋白質が検出、評価できることを見出した。また同時にラット疾患モデルで血清中にコネキシン32 (Cx-32) に対する自己抗体が存在し、これを測定することで疾患の状況や予後が判定できることがわかった。更に抗Cx-32自己抗体を新規物質とともに測定することで更に感度が向上し、より正確に予後を推定できることがわかった。更には、この新規蛋白質が肝実質細胞増殖誘導物質として有用であることを確認し、この一連の有効新規蛋白質群をヘパテスチン・グループ (Hepatestine Group) と命名した。本発明はかかる知見に基づいて完成されたものである。

10

【0024】

従って、本発明は、Hepatestine蛋白質もしくはその変異体、コネキシン32からなる肝臓疾患、炎症性腸疾患診断用マーカー蛋白質である。

更に、本発明は検体中のHepatestine蛋白質もしくはその変異体、コネキシン32自己抗体の有無もしくは量を調べて、肝臓疾患、炎症性疾患を診断する診断方法である。

更に、本発明は、検体中のHepatestine蛋白質もしくはその変異体を、Hepatestine蛋白質もしくはその変異体に対する抗体と反応させ、該抗体と抗原抗体反応した検体中のHepatestine蛋白質もしくはその変異体の有無もしくは量から肝臓疾患、炎症性疾患を診断する診断方法である。

20

【0025】

更に、本発明は、検体中のコネキシン32自己抗体もしくはその変異体自己抗体を、コネキシン32蛋白質もしくはその変異体と反応させ、該抗体と抗原抗体反応した検体中の自己抗体もしくはその変異自己抗体の有無もしくは量から肝臓疾患、炎症性疾患を診断する診断方法である。

【0026】

更に、本発明は、上記診断方法のための診断用キットであって、Hepatestine蛋白質もしくはその変異体、コネキシン32自己抗体に対する抗体を含む、上記診断用キットである。

【発明を実施するための最良の形態】

30

【0027】

本発明者らは、通常状態で培養した小腸上皮細胞株IEC-6と、アポトーシス誘導状態で培養した小腸上皮細胞株との間で培養上清中に現れる蛋白質の発現状態を比較することによって、アポトーシスに関連して誘導される蛋白質を見出すことができると考えた。具体的には、化学物質で誘導したアポトーシス小腸上皮細胞の培養上清と通常培養した小腸上皮細胞上清の蛋白質発現レベルを質量分析法、2次元電気泳動法で解析することで比較した。

【0028】

質量分析法には、表面増強レーザー脱離イオン化 (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization) 飛行時間型質量分析計 (SELDI-TOF MS法)、マトリックス支援レーザーイオン化 (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) 飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS法)、ESI法 (Electrospray Ionization) を用いる方法を例示できる。

40

【0029】

SELDI型は、チップ表面の官能基に目的物質を均一に捕捉したまま不純物を除去し、レーザー光でイオン化するため、再現性のあるSN比の高いイオンスペクトルが得られるので好ましい。SELDI-TOF MS法の場合、通常、検体を、前処理した後、チップに吸着させて、SELDI-TOF MS質量計に付す。検体が血清の場合、アルブミンの吸着剤を用いるか、イオン交換チップでアルブミンが電荷をもたなくなるまでバッフ

50

ァーで洗浄してアルブミンを系から除去することが好ましい。

【0030】

等電点電気泳動（1次元目）と、SDS-PAGE（2次元目）を組み合わせた電気泳動を、通常2次元電気泳動（2D-PAGE）と呼ぶ。等電点電気泳動とはアミノ酸がそれぞれに等電点（pI）を持っており、アミノ酸からなるタンパク質もまたそれぞれ固有のpIを持っていることを利用する方法である。以下簡単に説明する。等電点電気泳動は細長いゲル等を用いる。このゲルは一定の範囲でpHがグラジェントになっており、このゲルにサンプルをアプライする。そうすると、タンパク質を構成するアミノ酸のアミノ残基と呼ばれる部分でそのpHに応じて電子が遊離したりくっついたりして電荷が発生し、それはタンパク質を一つの分子として見た場合でも同じ事が起きる。そのようにして個々のタンパク質はそれぞれ固有のpHへ次第に収束する。これによって蛋白質を分離する方法である。次に2次元目のSDS-PAGEである。タンパク質は、多数のアミノ酸がペプチド結合したもので、そのアミノ酸の数（アミノ酸の種類は20種）や組み合わせはタンパク質によって異なっている。蛋白質を分離する方法の一つにSDS-PAGEがある。これはアクリルアミドと呼ばれる化合物で出来たゲル中にタンパク質を通過させることで、一定時間での移動度と蛋白質を構成するアミノ酸の数が比例することから、蛋白質を分類する方法である。つまり、2次元電気泳動法は同じ条件で2種類のサンプルを処理し、一次元目として等電点電気泳動を、二次元目として分子量依存的なPAGEを行うことでスポットとして蛋白質を分離する方法といえる。

10

【0031】

このような2次元電気泳動法を用いた解析により、通常状態で培養した小腸株細胞とアポトーシス誘導状態で培養した小腸上皮細胞との間で蛋白質の発現レベルを比較し、発現パターンの違っているスポットを選択した。選択されたスポットを蛋白質の銀染色をもとに複数個選択して、選択されたスポットは切り出してトリプシン消化をさせ、N-末端解析を行うことで蛋白質の同定を行うことに成功した。LC-MS/MSの結果より、すべてのプリカーサーイオンについて得られたプロダクトイオンの数値をMascotを利用して全ての生物種（All Entries）を対照にデータベース（NCBI nr）探索を行い、score 45を超える場合に有意とした。結果としてこれまでに報告の無い新規蛋白質であることがわかった。かくして、新規発見された本物質をHepatetineと命名し肝臓疾患、炎症性疾患診断用マーカーならびに肝疾患への再生医療的治療効果を有する機能的蛋白質となり得ることが明らかになった。より具体的には、Hepatetineは、配列表の配列番号1に示されるN末端アミノ酸配列を有し、分子量約1万2千、等電点4.75の蛋白質である。

20

30

【0032】

本発明においては、Hepatetine蛋白質の変異体も肝臓疾患診断用マーカーならびに肝疾患に対する治療効果を有する蛋白質となり得る。かかる変異体は、Hepatetine遺伝子の突然変異やHepatetine遺伝子の翻訳後の修飾、Hepatetine蛋白質の発現後のプロテアーゼなどによる分解などにより生じ得ると考えられるものである。変異体としては、より具体的には、例えば、Hepatetine蛋白質のアミノ酸配列である配列番号13のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列を有し、かつ炎症性腸疾患診断マーカーとしての機能を有する蛋白質が挙げられる。また、コネキシン32自己抗体の認識するコネキシン32蛋白質にもHepatetine同様に変異が考えられることはいうまでもない。

40

【0033】

本発明では、このような肝臓疾患診断マーカー蛋白質、コネキシン32自己抗体に基づいて、肝臓疾患の診断を行うことができる。即ち、検体中のHepatetine蛋白質もしくはその変異体の有無もしくは量、またはコネキシン32自己抗体、またその変異体認識自己抗体を調べて、肝臓疾患を診断することができる。検体としては、肝臓疾患が疑われる患者からの血液、血清、リンパ球、組織、細胞、リンパ節、尿などの生物学的試

50

料が挙げられる。

【0034】

本発明においては、検体中のHepatestine蛋白質もしくは変異体の有無もしくは量を測定することによっても肝臓疾患の診断を行うことができる。この場合、Hepatestine蛋白質もしくは変異体に対する抗体を用いるのが好ましい。Hepatestine蛋白質またはそのアミノ酸配列の一部を有するポリペプチドを、Hepatestine蛋白質もしくは変異体に対する特異抗体を作成するための免疫抗原として好適に利用できる。この抗原を利用することにより、所望の抗血清、ポリクローナル抗体、及びモノクローナル抗体を取得することができる。

【0035】

Hepatestine蛋白質またはそのアミノ酸配列の一部を有するポリペプチドは、それらをコードする遺伝子が宿主細胞中で発現できる組換えDNA（発現ベクター）を作成し、これを宿主細胞に導入して形質転換し、該形質転換体を培養し、次いで得られる培養物から回収することにより得ることができる。発現ベクターとしては、通常の融合蛋白発現ベクターを利用でき、例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）との融合蛋白として発現させるためのpGEX（Promega社）などを例示できる。これらの発現ベクターを用いた組換えDNAによる蛋白質もしくはポリペプチドの調製法は、既に当業者に周知の技術であり、それらの技術をそのまま採用できる。また、Hepatestine蛋白質またはその一部のポリペプチドは、一般的な化学合成法により製造することもでき、化学的合成方法には、通常の液相法及び固相法によるペプチド合成法が採用できる。

【0036】

これら蛋白質もしくはポリペプチドを抗原とする抗体の製造法自体は、当業者によく理解されているところであり〔例えば、続生化学実験講座「免疫生化学研究法」、日本生化学会編（1986）など参照〕、本発明においてもこれら常法に従うことができる。例えば、Hepatestine蛋白質もしくはその一部のポリペプチドを動物に免疫し、その動物から抗血清を採取することにより、また更に抗血清を精製することによりポリクローナル抗体を得ることができる。

【0037】

モノクローナル抗体を得るには次の方法が採用できる。即ち、上記のHepatestine蛋白質もしくはその一部のポリペプチドを、公知のアジュバントと共に数回に分けてマウス、ラット等の動物にすることによって免疫する。次いで免疫された動物からの脾臓等に由来する抗体産生細胞と骨髓腫瘍細胞（ミエローマ細胞）等の試験管内で増殖能力を有する細胞とを融合する。融合法としては、既にそれ自体公知であるケーラーとミルスタインの定法（Nature, 256, 495, 1975）によってポリエチレングリコール（PEG）を用いることで融合できる。センダイウィルス、電気融合法によっても融合を行うことができる。融合した細胞からHepatestine蛋白質もしくはその一部のポリペプチドを認識する抗体を産生するハイブリドーマを、Hepatestine蛋白質もしくはその一部のポリペプチドを固定化したアッセイプレートを用いた酵素結合免疫ソルベントアッセイ法（ELISA）によりスクリーニングして選択できる。

【0038】

かくして得られるモノクローナル抗体としては、配列番号1に示すHepatestine蛋白質のアミノ酸配列中1～9番目に相当する領域（以下、Hepatestine 1-9と記載することもある）のポリペプチドを抗原として得られたハイブリドーマNThep-1が産生するモノクローナル抗体が挙げられる。ハイブリドーマ NThep-1は、平成17年8月23日に独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託され、受託番号としてFERM ABP-10406が付与されている。

【0039】

かくして得られる抗体を用いて検体中のHepatestine蛋白質もしくはその変異体の有無もしくは量を測定し、その結果から、肝臓疾患の診断を行うことができる。

Hepatestine 蛋白質もしくはその変異体を測定する方法としては、組織免疫染色法やサンドイッチ法を含む、酵素結合イムノソルベントアッセイ法（ELISA）、放射線免疫検定法（RIA）、免疫放射線検定法（IRMA）、免疫酵素法（IEMA）等が挙げられる。

【0040】

組織免疫染色法によるHepatestine 蛋白質もしくはその変異体を検出するときの具体例を以下に示す。例えば、大腸由来の組織細胞を検体とし、その検体を常法によりホルマリン固定をした後、パラフィンに抱埋をしてミクロトームにて薄切し、組織検体として使用する。組織切片はキシレンの処理で完全にパラフィンを除き、アルコール溶液をくぐらせた後、水洗する。続いて、緩衝液中、121℃等の高温で処理し、抗原を賦活化する。その後室温程度まで冷却し、流水にて水洗を行い、正常ヤギ血清にてブロッキングする。ブロッキング終了後の組織に、1次抗体溶液を反応させ、次いで、その組織をTBSにて洗浄した後、ビオチン標識2次抗体を室温30分間反応させる。反応終了後TBSにて洗浄し、更に、3%過酸化水素加TBSに浸漬し、内因性ペルオキシダーゼ活性を失活させる。続いて、ABC試薬（和光純薬工業社）に浸漬させ、TBS洗浄した後、DAB試薬にて発色を行なう。このとき、対比染色としてヘマトキシリン核染色を行なう。次いでこれらの組織を水洗し、アルコール溶液、ついで、キシレン槽をくぐらせた後に染色後の組織に封入剤を滴下し、カバーガラスをかぶせて顕微鏡にて観察し、染色度を観察することにより、検体中のHepatestine 蛋白質もしくはその変異体を検出できる。それにより、肝臓疾患の診断、発見または臨床的重症度の判定に利用することができる。

10

20

【0041】

本発明においては、ELISA法によりHepatestine 蛋白質もしくはその変異体を測定するには、一次抗体でプレートをコートし、検体中に存在するHepatestine 蛋白質もしくはその変異体を結合させた後、二次抗体と反応させることにより、Hepatestine 蛋白質もしくはその変異体を測定することが簡便である。また、抗体が認識するエピトープに対するポリペプチドまたはオリゴペプチドを用いた競争阻害による測定も可能である。ELISA法によるHepatestine 蛋白質もしくはその変異体を検出するときの具体例を以下に示す。

初めにポリスチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリエチレン、マイロン、ポリメタクリレートなどのそれ自体公知である固相に直接または間接的に物理結合や化学結合、アフィニティーを利用して抗Hepatestine 抗体（例えばモノクローナル抗体NTh e p - 1）を一次抗体として結合させる。感作抗体量は、通常、1ng～100mg/mlの範囲である。物理結合や化学結合、アフィニティーなどによって固相に結合した一次抗体に、検体を加えて一次反応させる。一定時間反応させた後、固相を洗浄し、二次標識抗体（例えばHRP標識モノクローナル抗体NTh e p - 1）を加えて二次反応させる。固相を再度洗浄し、固相に結合した標識部分を測定する。標識物質にHRPを用いた場合、基質には既知のDAB、TMB、OPDなどを用いることができる。また、標識物質には、HRPのような酵素だけではなく、金コロイド、ユーロピウムなどの標識金属やFITC、ローダミン、Texas Red、Alexa、GFPなどの化学的、生物学的各種蛍光物質、 ^{32}P 、 ^{51}Cr などの放射性物質など標識可能なあらゆる物質が挙げられる。

30

40

【0042】

また、以下の方法でもHepatestine は測定できる。まず、一次抗体として、抗Hepatestine モノクローナル抗体、例えば、上記したハイブリドーマNTh e p - 1が産生するモノクローナル抗体をプレートに吸着させ、次いで、検体中のHepatestine 蛋白質もしくはその変異体を上記モノクローナル抗体と反応させる。その際、陽性及び陰性対照についても同様の処理を施す。次いでビオチン化した2次抗体、例えば、Hepatestine 蛋白質に対するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を反応させ、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと反応させた後、発色反応

50

を行うことにより、Hepatestine蛋白質もしくはその変異体を検出することができる。

本発明では、放射線免疫検定法（RIA）、免疫放射線検定法（IRMA）、免疫酵素法（IEMA）等の免疫測定法を採用することもでき、これらの測定法はそれ自体周知であり、周知の方法をそのまま適用することができる。

【0043】

上記した本発明の測定は、検体中のHepatestine蛋白質を検出する診断用キットを利用することによって、簡便に実施することができる。キットは、例えば、Hepatestine蛋白質またはその一部のポリペプチドに対する抗体を必須構成成分として含んでいればよく、他の成分として、標識剤などが含まれていてもよい。標識剤としては、放射性同位元素又は蛍光物質などの化学修飾物質などが挙げられる。更にキットには、測定の実施の便益のために適当な、発色試薬、反応希釈液、標準抗体、緩衝液、洗浄剤、反応停止液などが含まれていてもよい。

10

【0044】

本発明においては、ELISA法によりコネキシン32自己抗体もしくはその変異体認識抗体を測定するには、精製コネキシン32でプレートをコートし、検体中に存在するコネキシン32自己抗体もしくはその変異体認識抗体を結合させた後、二次抗体である抗ヒトイムノグロブリン標識抗体と反応させることにより、コネキシン32自己抗体もしくはその変異体認識抗体を測定することが簡便である。また、抗体が認識するエピトープに対するポリペプチドまたはオリゴペプチドを用いた競争阻害による測定も可能である。ELISA法によるコネキシン32自己抗体もしくはその変異体認識抗体を検出するときの具体例を以下に示す。

20

【0045】

初めにポリスチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリエチレン、マイロン、ポリメタクリレートなどのそれ自体公知である固相に直接または間接的に物理結合や化学結合、アフィニティーを利用してコネキシン32を抗原として結合させる。感作抗体量は、通常、 $1\text{ ng} \sim 100\text{ mg/ml}$ の範囲である。物理結合や化学結合、アフィニティーなどによって固相に結合した一次抗体に、検体を加えて一次反応させる。この時に合成ペプチドや遺伝子組換え体、変異体を利用することもできる。一定時間反応させた後、固相を洗浄し、標識抗体（例えばHRP標識抗ヒトイムノグロブリンポリクローナル抗体）を加えて二次反応させる。固相を再度洗浄し、固相に結合した標識部分を測定する。標識物質にHRPを用いた場合、基質には既知のDAB、TMB、OPDなどを用いることができる。また、標識物質には、HRPのような酵素だけではなく、金コロイド、ユーロピウムなどの標識金属やFITC、ローダミン、Texas Red、Alexa、GFPなどの化学的、生物的各種蛍光物質、 ^{32}P 、 ^{51}Cr などの放射性物質など標識可能なあらゆる物質が挙げられる。

30

本発明では、放射線免疫検定法（RIA）、免疫放射線検定法（IRMA）、免疫酵素法（IEMA）等の免疫測定法を採用することもでき、これらの測定法はそれ自体周知であり、周知の方法をそのまま適用することができる。

【実施例】

40

【0046】

以下本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

【実施例1】

【0047】

In VivoにおけるSIMFs存在の確認

肝炎モデルを作製するためにSD系雄性ラット6週齢3匹に対して四塩化炭素：オリーブオイルが1：1に混合されたものを $1\text{ mL/Rat} \cdot \text{kg}$ となるように投与して実験急性肝炎ラットを作製した。四塩化炭素投与後2週間間隔で6週間ウシSIMFsを腹腔内投与した（図3 実験区2）。コントロールとして生理食塩水を投与した実験区を準備し

50

ている（図3 実験区1）。このラットの血清中肝疾患マーカー（GOT, GPT, C a t h e p s i n D, A L P）を測定すると、健常ラット区に比して生理食塩水だけを投与した実験区2では各肝疾患マーカーは高値を示した。しかし、S I M F sを投与した実験区1では実験区2に比して有意にマーカー群は低値を示した（図3）。これはS I M F s中に肝障害進行を抑止、修飾する効果のあることが生体内直接投与によって立証されたことを示す。更に四塩化炭素以外にも肝臓に対する物理的外科障害、化学発癌誘導物質（ジアミノアゾベンゼン）、薬物肝炎誘導物質（ガラクトサミン、アセトアミノフェン）による肝障害でも同様の進行抑制と修飾効果が認められることがわかった。

【0048】

In V i t r oにおけるアポトーシスサンプルの作製

10

次にこのIn V i v oにおける効果がIn V i t r oにおけるアポトーシス実験でも認められるかを確認した。そのために小腸上皮細胞株を培養し、アポトーシスを起こさせて増殖能効果を判定した。ラット小腸上皮細胞株I E C - 6（A T C C C R L - 1 5 9 2）は10%牛胎児血清（FCS）（Invitrogen, Japan）を含むDMEM（Invitrogen, Japan）で37℃、5%CO₂条件下で培養し、徐々に血清濃度を下げ最終的には無血清培地ASF301（Ajinomoto, Japan）に置き換えて馴化させた。アポトーシスを誘導するために無血清培地に馴化したI E C - 6にアポトーシス誘導試薬（Calbiochem 178486）を添加して60分間刺激を行い、4時間、6時間、12時間、24時間後に培養上清を回収した。細胞は12、24時間を経ると既にほぼアポトーシスにより完全に剥離していた。回収したサンプルは細胞片を遠心除去した後に硫酸、スピンカラムによる濃縮後、20mMトリス緩衝液（pH7.0）に透析した。

20

【0049】

培養ラット肝実質細胞による増殖能検定

発明者はラット小腸上皮細胞株I E C - 6（A T C C C R L - 1 5 9 2）のアポトーシスによって産生された蛋白質群の細胞増殖能をラット肝実質細胞の培養細胞法を利用して確認した。ラット肝実質細胞は灌流法により行った。ラットはW i s t e r系雄性、6週齢を使用し、ノーマルの他にH i g g i n s & A n d e r s o nの方法により肝臓を70%部分切除し、48時間後の残存肝からの肝実質細胞から成る実験区を作成して培養をおこなった。細胞増殖活性はMTT法によって確認した。添加した培養上清蛋白質はコントロールとして非誘導I E C - 6培養上清、実験区としてアポトーシス上清を使用した。以下実験結果を示す（図4）。実験結果として、正常I E C - 6上清蛋白質添加実験では全ての実験区で細胞の増殖能は全く確認されなかった（図4A）。一方、アポトーシス上清を添加した実験区では肝部分切除後48時間後の培養細胞で添加3日後に添加蛋白質濃度0.1μg/mL、10μg/mLの両方の濃度で増殖能力が確認された（図4B）。アポトーシス誘導時間としては12時間までは弱かったが、12時間、24時間誘導ではほぼ同様の結果が得られた。ところが同量のアポトーシス上清蛋白質を添加した実験区でも正常肝実質細胞培養区では増殖能は確認されなかった。この結果よりアポトーシス誘導I E C - 6上清には誘導12時間以降に細胞増殖能が存在するがそのレセプターは部分切除後48時間後の細胞に発現していることがわかったのである。つまり肝実質細胞は正常時には増殖に関するレセプターは殆ど発現しておらず、障害などによってそのレセプターが誘導された時に増殖に転じることが予想された。そこで本発明者はこのアポトーシスによって小腸上皮粘膜組織より現れ、肝実質細胞増殖能を有する一連の物質群は広義のS I M F sに含まれる物質群であるが、アポトーシスに起因することが新規グループであるもと

30

40

【0050】

SAXIIプロテインチップアレイを用いるマーカーの同定

既にsurface enhanced laser desorption ionization

50

zation (SELDI) と飛行型質量分析計を組み合わせたプロテインチップテクノロジーが米国 Ciphergen 社により開発され、新規マーカーの検出など臨床応用が始まっている。本発明者は本テクノロジーを応用し、各種ラット血清とアポトーシス培養上清を使用し新規の血清タンパクまたはペプチドを同定することに成功した。以下、本発明をさらに詳細に説明する。

各種ラット血清とアポトーシス培養上清を使用し、SAXII プロテインチップアレイ (Ciphergen Biosystems, Inc) を用いて SIMFs を検索した。SAXII チップとは Strong Anion Exchange Chip のことであり、検体中の正電荷物質を結合させるという特徴を持っている。サンプルとして四塩化炭素投与肝炎ラット血清、前述アポトーシス培養上清を用いた。以下にプロテインチップアレイ実験操作法を簡単に述べる。サンプルは 8 M 尿素 (SIGMA) / 1 % CHAPS (SIGMA) 溶液で 10 倍に希釈した。10 分間氷上処理を行なった後、50 mM トリス (SIGMA) 緩衝液 (pH 9.0) にて更に 10 倍希釈し、4,000 rpm、5 分間の遠心分離操作を行なってその上清を希釈サンプルとして用いた。SAXII チップは Biprocessor に取り付けて実験している。Biprocessor とは金属チップ上に立体的ウェルを簡易作製する穴付プラスチック製アダプターであり、この方法によって希釈サンプルを大量にアプライできるのである。初めに 150 μ L の 50 mM トリス緩衝液 (pH 9.0) をウェル状になったチップに加え、振とう機上で 5 分間洗浄を行なった。これを 2 回行なった後に先の希釈サンプル 100 μ L を添加し、室温で 20 分間振とうしてチップと反応させた。続いて希釈サンプルを除き、150 μ L の 50 mM トリス緩衝液 (pH 9.0) を加えて振とう機上で 5 分間洗浄を行なった。この操作を 3 回繰り返した。その後 400 μ L の蒸留水で 2 回洗浄し、チップを Biprocessor から取り外した。チップが乾いた後、PAPen (Zymed) で蛋白質の接着しているスポットを囲み、0.5 μ L の飽和シナピン酸 (Ciphergen Biosystems, Inc) / 50 % アセトニトリル (Wako) / 0.25 % TFA (Wako) 溶液を 2 回添加した。作製したプロテインチップアレイは、プロテイン・バイオロジー・システム II・マス・スペクトロメーター (Ciphergen Biosystems, Inc) によって読み取った。

図 5 に、代表的な測定データを示す。このデータフォーマットでは、SAXII プロテインチップから脱着されたサンプルのタンパク質の分子量を横軸に、その分子量で検出器に到達した分析物の量を反映するピークを縦軸で表すことができる。よって図 5 から明らかなように、四塩化炭素投与 48 時間に認められる約 12,070 のピークは正常血清には一定量が認められ、肝炎時に上昇する。更にこのピークは IEC-6 アポトーシス上清中に認められ、通常培養上清には認められなかった。

【0051】

2 次元電気泳動

アポトーシスを起こさせた細胞の培養上清は一般的な 2 次元電気泳動法 (Amersham Biosciences) によって解析した。以下、簡単に方法を示す。上記調整された培養上清の蛋白質濃度を測定して電気泳動サンプルとした。固定化 pH 勾配等電点電気泳動用の乾燥ストリップゲルはバッファーにひたして一晩膨潤し、サンプルをしみ込ませたろ紙をピンセットでゲルの端の電極濾紙の近くに置く。白金電極を、電極濾紙に接触する位置に装着し、低粘度シリコンオイルを注いで、ゲルおよび電極濾紙全体をオイルでカバーし、フタを閉めて通電をした。一次元目の泳動終了後、ストリップゲルを取り出し、純水中で軽くすすいでオイルを除いた後に、SDS 処理液中に浸し、30 分間振盪しながらインキュベートした。次にこのストリップゲルを通常のポリアクリルゲルで泳動した。するとおおよそ分子量 1 万から 20 万までのタンパク質がスポットとして観察できた (図 6)。Cypuro Ruby 染色をもとにスポットを選択して、スポットの切り出しをおこない、トリプシン消化を施して、N 末端解析を行うことで蛋白質の同定を行うことに成功した。LC-MS/MS の結果より、すべてのプリカーサーイオンについて得られたプロダクトイオンの数値を Mascot を利用して全ての生物種 (All Entries

s)を対照にデータベース(NCBI nr)探索を行い、score 45を超える場合に有意とした。結果としてこれまでに報告の無い新規蛋白質であることがわかった。新規蛋白質はN末端蛋白質配列が表の配列番号1のアミノ酸配列を有する蛋白質で、その分子量が約1万2千、pIが4.75の蛋白質であった。この質量分析と2次元電気泳動法で同時に見つかった蛋白質をHepat est ineと命名した。

【0052】

抗Hepat est ineモノクローナル抗体の作製

次にHepat est ine蛋白質に対する抗体作製を行った。

解析データより合成ペプチドを作成し、マウスに免疫を行い、モノクローナル抗体を作成した。合成ペプチドはC末端にキャリアープロテインとするゴカイヘモシアニン(KLH)結合を目的としてシステインを導入し、アミノ酸数を合計10個として、KLHに結合させた。配列表1に示す。抗原ペプチドはSIGMA-Genosys社に合成を依頼して作製された。以後このキャリアー結合合成ペプチドをHEP-KLHと呼ぶ。HEP-KLHを1000 μ g/mlとなるようにリン酸緩衝液(pH 7.0)で希釈し、100 μ g(100 μ l)をとってフロインド完全アジュバンド(和光純薬工業社)100 μ lと乳化するまでよく混和した。調製した乳化懸濁液(エマルジョン)をBalb/c 6週齢雌マウス(日本クレア社)にジエチルエーテル麻酔下にて腹腔内投与した。2週間後には同量のHEP-KLHをフロインド不完全アジュバンド(和光純薬工業社)と混和してフロインド完全アジュバンドの時と全く同様の操作によりエマルジョンとし、それぞれマウスに感作した。以降2週間後に同様の操作を行い、5回目には最終免疫として1 μ g/ μ L PBSの抗原HEP-KLH溶液50 μ Lをマウス尾静脈注射により投与した。

【0053】

最終免疫より3日後にHEP-KLHにより感作済みのマウスよりジエチルエーテル麻酔下にて外科的摘出された脾臓を無菌的に分散し脾臓細胞を調製した。融合はケーラーとミルスタインの方法(Nature. 256, 495. 1975)に従って行われ、ポリエチレングリコール(PEG 6000)(メルク社)を用いて脾細胞と骨髓腫細胞P3-X63-Ag8-U1(P3U1)を融合した。融合比率は脾臓細胞数 1.2×10^8 個に対して骨髓腫細胞P3-X63-Ag8-U1(P3U1) 2×10^7 個で、6:1であった。融合細胞は10% FCS(INVITROGEN社)DMEM(IRVINE社)HAT(コスモバイオ社)培地に分散し96穴マイクロタイターカルチャープレート(ベクトン・ディッキンソン社)に分注して37℃、5% CO₂条件にて培養した。

【0054】

約2週間後にコロニーの生育を確認してスクリーニングを実施した。スクリーニングの実施法を以下に述べる。スクリーニング用プレートを作製するために上記実施例にて免疫したHEP-KLHを50 mMリン酸緩衝液(PBS)中に溶解し、0.5 μ g/100 μ l/wellとなるように96穴ウエル(Nunc社)に分注した。この時、HEP-KLHを結合させたキャリアープロテインであるゴカイヘモシアニン(KLH)を同様にプレートに分注し、コントロールプレートとした。プレートを4℃で2晩静置した後に0.05% Tween 20を含むPBS緩衝液で3回洗浄し、非特異的反応を抑えるために1.5% BSA溶液を200 μ l分注して、更に4℃で1晩静置した。完成したプレートを0.05% Tween 20を含むトリス緩衝液で3回洗浄した後に培養上清100 μ lを反応させ、更に洗浄を行った後に2次抗体である西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識抗マウスIgGグロブリン抗体(Zymed社)を加えて反応させた。洗浄後にHRPの発色基質である3 mg/ml オーフェニレンジアミン(OPD)(SIGMA社)クエン酸発色溶液を100 μ l加えて一定時間の発色後、1 N硫酸を停止液として更に100 μ l添加し、測定波長492 nmにて吸光度を測定した。上記のようにしてHEP-KLHに陽性になり、コントロールのKLHが陰性になったクローンは限界希釈法によって再クローニングされ上清を再度チェックした。この実験より発明者は抗Hepat est ineモノクローナル抗体であるハイブリドーマNTh ep-1を樹立した。

【0055】

得られた抗体をモノクローナル抗体タイピングキット（アマシャムファルマシア社）にて検定した結果、以下のような結果であった。

	クラス	軽鎖
クローンNTh ep-1	I g G 1	κ

【0056】

モノクローナル抗体の工業的生産性

実験例で得られたハイブリドーマNTh ep-1 5×10^7 細胞個をプリスタン（SIGMA-Aldrich社）0.5ml投与後2週間のBalb/cマウス（日本クレア社）、12週齢、雌性に腹腔内投与し、約2週間後にマウス腹腔内に貯留した腹水をジエチルエーテル麻酔下にて外科的に採取した。スクリーニングで行ったELISA法により、腹水をサンプルとして段階希釈して確認すると高濃度のモノクローナル抗体が含まれていた。この腹水を硫酸40%で処理し、PBSに透析した後、プロテインGカラム（Amersham Bioscience社）により精製してSDS-PAGEにより確認した。すると非還元では分子量約150,000に単一の、メルカプトエタノール還元では分子量約50,000のバンドと25,000の2本のバンドが確認された。精製された抗体はマウス1匹あたり約30mgであって工業的利用を行うには十分量であった。

【0057】

抗Hepat est ineポリクローナル抗体の作製

次に発明者はHEP-KLHと反応するポリクローナル抗体を作製した。免疫はウサギを用いて行われ、実験はSIGMA-Genosys社に依頼して行った。タイターをチェックした後、採血されたサンプルより先のモノクローナル抗体の腹水産生と同様にプロテインGカラムにて抗体を精製した。

【0058】

ウエスタン・ブロッティング

実際の検体中に作製した抗体と反応する理論蛋白質が存在するかを確認するためにウエスタン・ブロッティングを行った。サンプルは正常ラット血清及び肝部分切除ラット血清、四塩化炭素肝障害ラット血清である。以下簡単に方法を述べる。肝部分切除血清はHiggins & Andersonの方法により肝臓を70%部分切除した後一定時間後（6、12、24、48、72、96、120、144、192時間後）に採血を行って-80℃に保管した。四塩化炭素肝障害モデルは投与前24時間に絶食させた6週齢Wister系雌性ラットに、オリーブオイルと四塩化炭素を1:1で混合し、1ml/Rat Kgになるよう、ラット体重にあわせて腹腔内投与し、麻酔下にて経時的（45分、90分、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、96時間、120時間、144時間、192時間）に採血した。血液は血清サンプルとして使用するまで-80℃に保管した。上記の血清をPBSにて50倍に希釈し、2-メルカプトエタノールを含むSDSサンプル緩衝液と1:1で混合してその20μLをアプライした。還元条件下にて10mAでSDS-PAGEを行い、セミドライ法によるウエスタン・ブロッティングによりアクリルアミドよりPVD F膜へ蛋白質を転写して、ブロックエース（大日本製薬）によって4℃、一晚ブロッティングを行った。ブロッティング後、抗NTh ep-1抗体を37℃で2時間反応させた。その後、PBS-0.05%Tween 20で3回洗浄して、抗マウスIgG-HRP抗体（Zymed）を反応させ、Western blotting検出キット（Wako）を利用して発色させた。反応性を確認したところNTh ep-1は理論どおり分子量約1万2千の蛋白質と反応していた。しかも、その蛋白質は部分切除や肝炎によって増減していた。Hepat est ineは正常時一定の濃度で発現している。しかし物理的障害や炎症などが起きるとその血中濃度は障害早期（6時間）に低下する。そしてすぐに血中値上昇に転じ、一定の障害が回復すると血中濃度は上昇することがわかった（図7）。

【0059】

ELISA法による測定

モノクローナル抗体がHepatestineを認識することが証明されたため、次に発明者はELISA（免疫酵素測定法）による濃度測定を試みた。以下に簡単に方法を述べる。はじめに抗Hepatestineポリクローナル抗体を $5\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ PBS/wellで96穴ウエル（Nunc社）に分注した。プレートを 4°C で2晩静置した後に 0.05% Tween 20を含むPBS緩衝液で3回洗浄し、非特異的反応を抑えるために 1.5% BSA溶液を $200\mu\text{L}$ 分注して、更に 4°C で1晩静置した。完成したプレートを 0.05% Tween 20を含むトリス緩衝液で3回洗浄した後に緩衝液（ 3% BSA-PBS）溶液を $50\mu\text{L}$ 分注した。そこに血清サンプル $50\mu\text{L}$ を添加して合計 $100\mu\text{L}$ をよく振とうして、 37°C 、1時間反応させた。反応させた後に 0.05% Tween 20を含むPBS緩衝液で3回洗浄し、後に2次抗体である西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識NTHep-1抗体を加えて 37°C 、1時間反応させた。反応終了後、3回の洗浄を行ってHRPの発色基質である $3\text{mg}/\text{mL}$ 0-フェニレンジアミン（OPD）（SIGMA社）クエン酸発色溶液を $100\mu\text{L}$ 加えて一定時間の発色後、 1N 硫酸を停止液として更に $100\mu\text{L}$ 添加し、測定波長 492nm にて吸光度を測定した。結果を図8に示す。この結果よりウエスタン・ブロッティングの結果は裏付けられた。つまり、障害時にはその血中濃度が増加していたのである。障害が治癒しはじめるとその値は減少した。

【0060】

障害時特異的自己抗体の検出

発明者は上記のようなELISA実験において、障害が慢性化してくると、よく非特異反応が認められることを確認した。これは血液中に自己蛋白質に対する抗体が産生されて、酵素標識二次抗体（抗IgG、A、Mなど）がラット抗体と交差するために起こるものであろうと予想した。つまり、慢性化すると特異的自己抗体が現れる可能性があると思われたのである。そこで肝臓をホモジネートして可溶性蛋白質、膜蛋白質、核蛋白質などに分けてその後、界面活性剤Triton-Xにより可溶化し（EMBO J. 1983; 2(9): 1479-86.）、ポリアクリルアミド電気泳動後ウエスタン・ブロッティングを行った。一次抗体の代わりに各種 20% ラット血清- 3% BSA-PBSを用いて反応させ、二次抗体には抗ラットイムノグロブリン-HRP標識抗体を使用した。すると四塩化炭素を繰り返し投与して肝障害を長期誘導した肝炎モデルラットでは幾つかのバンドが確認されたが、一番増減した蛋白質は膜画分に存在することがわかった。発明者は分子量、抗体との反応性などからこの蛋白質をコネキシン32（Cx-32）と同定した。

【0061】

抗コネキシン32自己抗体検出系の構築

そこで本発明者はすでに既知のコネキシン32合成ペプチドを用いた実験方法を参考として（Tissue Cell. 1992; 24(1): 61-73.）、測定系構築を試みた。発明者はNCBI情報データベースよりラットコネキシン32遺伝子、及び蛋白質情報を調査し（NM_017251）、合成ペプチドを作成した（Sigma-Genosys）。配列表2に示す。選択配列はC末端17個（264-280）であり、本合成ペプチドを前出のキャリアープロテイン（KLH）と結合させ、コネキシン抗原（Cx32-KLH）とした。Cx32-KLHを 50mM リン酸緩衝液（PBS）中に溶解し、 $0.5\mu\text{g}/100\mu\text{L}/\text{well}$ となるように96穴ウエル（Nunc社）に分注した。この時、Cx32-KLHを結合させたキャリアープロテインであるゴカイヘモシアニン（KLH）を同様にプレートに分注し、コントロールプレートとした。プレートを 4°C で2晩静置した後に 0.05% Tween 20を含むPBS緩衝液で3回洗浄し、非特異的反応を抑えるために 1.5% BSA溶液を $200\mu\text{L}$ 分注して、更に 4°C で1晩静置した。完成したプレートを 0.05% Tween 20を含むトリス緩衝液で3回洗浄した後に緩衝液（ 3% BSA-PBS）溶液を $100\mu\text{L}$ 分注した。そこに血清サンプル $100\mu\text{L}$ を添加して合計 $200\mu\text{L}$ をよく振とうして、 37°C 、1時間反応させた。反応させた後に 0.05% Tween 20を含むPBS緩衝液で更に3回洗浄し、後に2次抗体である西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識抗ラットイムノグロブリン抗体（Zym

ed社)を加えて37℃、1時間反応させた。反応終了後、3回の洗浄を行ってHRPの発色基質である3mg/ml 0-フェニレンジアミン(OPD)(SIGMA社)クエン酸発色溶液を100μl加えて一定時間の発色後、1N硫酸を停止液として更に100μl添加し、測定波長492nmにて吸光度を測定した。結果を図9に示す。

【発明の効果】

【0062】

以上に詳細に説明した通り、本発明によれば、肝障害時に増減が見られるHepatestineおよび抗コネキシン32自己抗体を利用して肝臓疾患の診断、治療に用いることができる。Hepatestineは、正常肝臓組織より障害時においてその発現量が低くなる。また、抗コネキシン32自己抗体は障害が大きく、長くなるほど発現が大きくなる。それ故、Hepatestineおよび抗コネキシン32自己抗体の発現を同時に確認することは、より疾患の状況を的確に把握し、治療、再生に役立てることにつながる。本発明の利用によって、肝臓疾患を高感度に検出し、応用治療可能な技術が提供できる。

10

【図面の簡単な説明】

【0063】

【図1】 図1はSIMFs添加初代培養肝細胞(13日)に観察されたIn Vivoでの微胆管を示す。

【図2】 図2はSIMFs添加90日後に初代培養肝臓細胞から形成されたMicro Liverを示す。

【図3】 図3は薬物肝炎時におけるSIMFsのIn Vivoでの治療効果を示す。四塩化炭素肝障害後にSIMFsを腹腔内投与した実験区では肝炎マーカーが低値を示し、治療効果が認められる。

20

【図4】 図4は、ラット小腸上皮細胞株IEC-6アポトーシス蛋白質のラット肝実質細胞培養結果を示す。図1Aでは正常肝実質細胞で増殖効果が無いことを示す。図1BではPH48時間後の細胞ではアポトーシス蛋白質にのみ増殖能が認められたことを示す。

【図5】 図5はSELDI TOF-MSを利用したHepatestine存在確認を示す。正常血清、肝部分切除48時間血清、アポトーシス培養上清に共通して存在した。

【図6】 図6は、IEC-6アポトーシス蛋白質の2次元電気泳動結果を示す。矢印は差が認められて解析を進めた蛋白質を示す。

30

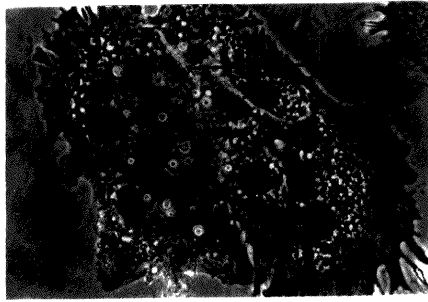
【図7】 図7は、各種肝障害症例血清の電気泳動後にウェスタン・ブロッティングを行い、Hepatestine蛋白質に対するモノクローナル抗体NThep-1を用いて検出した時の結果を示す。肝障害直後に減少したHepatestineが血清中で増加していくことがわかる。

【図8】 図8は、Hepatestine蛋白質に対するポリクローナル抗体とモノクローナル抗体NThep-1を用いてELISAを構築した時の結果を示す。192時間までにHepatestine蛋白質の一過性ピークが認められる。

【図9】 図9は、四塩化炭素肝障害によるラット抗Cx32自己抗体の出現を表す。薬物肝障害を起こす回数が増えるほど、血清中に自己抗体が多く現れることがわかる。

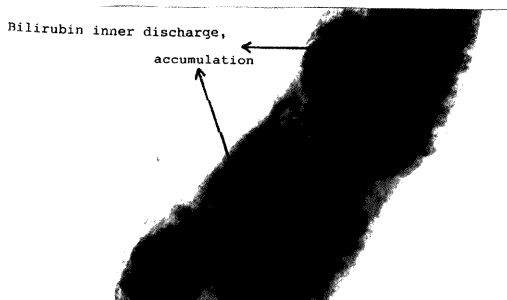
【図 1】

初代培養肝細胞(13日)で確認された微胆管



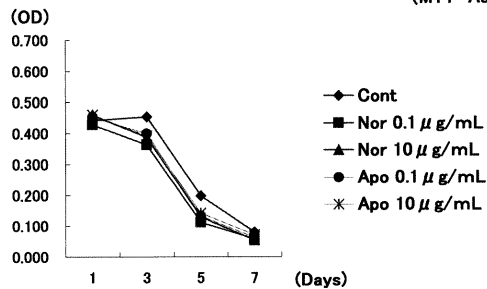
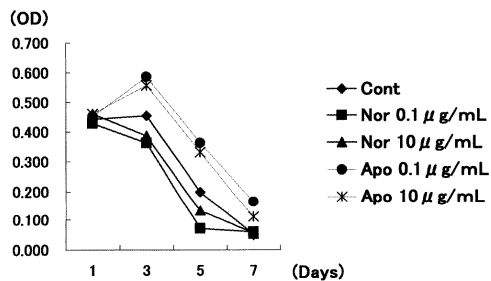
Bile canaliculuslike ducts (arrows) were formed.←

【図 2】

SIMFs添加90日後に初代培養肝臓細胞から形成された
Micro Liver

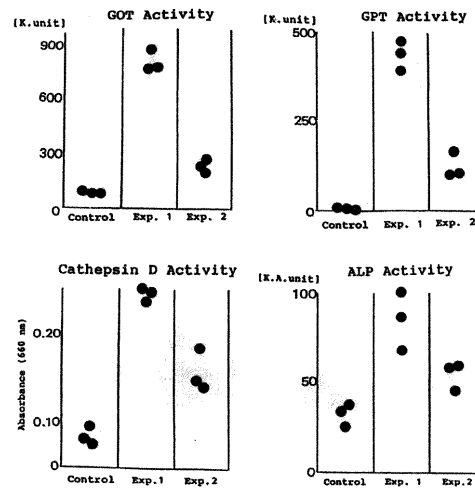
【図 4】

IEC-6アポトーシス蛋白質の肝実質細胞培養への影響

(図4A)各種培養上清中因子の正常ラット肝実質細胞に与える影響
(MTT Assay)(図4B)各種培養上清中因子のPH48時間ラット肝実質細胞に与える影響
(MTT Assay)

【図 3】

SIMFsのIn Vivoにおける治療効果確認

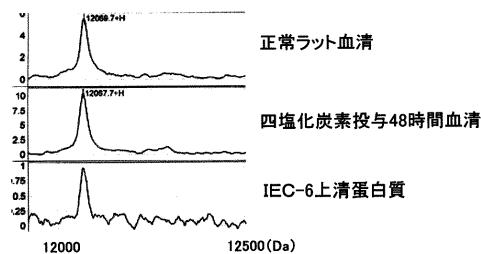


Control 未処置群

Exp. 1 四塩化炭素肝障害実験区+生理食塩水投与群

Exp. 2 四塩化炭素肝障害実験区+SIMFs投与群

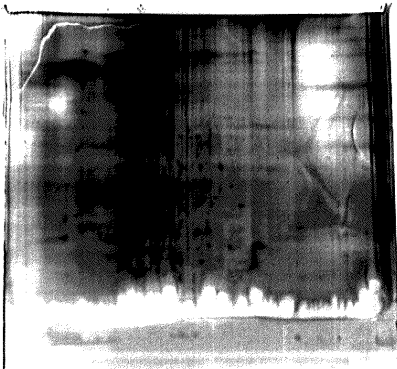
【図 5】

SELDI TOF-Mass法によるHepatestine
の検出

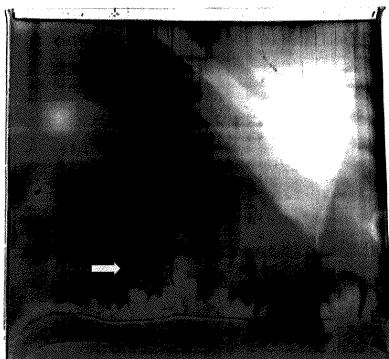
【図 6】

IEC-6アポトーシス蛋白質

正常IEC-6蛋白質



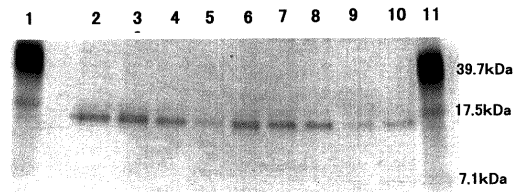
アポトーシスIEC-6蛋白質



→ は解析蛋白質

【図 7】

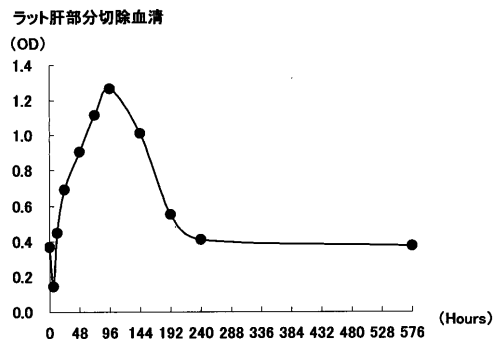
ウエスタン・ブロッティング



- 1 分子量マーカー
- 2 肝部分切除72時間血清
- 3 肝部分切除48時間血清
- 4 肝部分切除24時間血清
- 5 肝部分切除12時間血清
- 6 肝部分切除6時間血清
- 7 四塩化炭素肝障害48時間血清
- 8 四塩化炭素肝障害90分時間
- 9 四塩化炭素肝障害45分時間
- 10 正常ラット血清
- 11 分子量マーカー

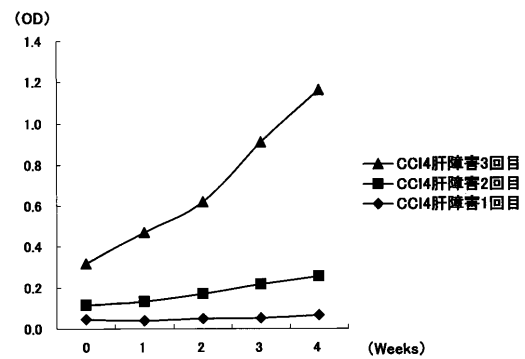
【図 8】

ラット肝部分切除後血清中 Hepatestine 濃度測定



【図 9】

四塩化炭素肝障害によるラット抗Cx32自己抗体測定



【配列表】

2007230986000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード (参考)

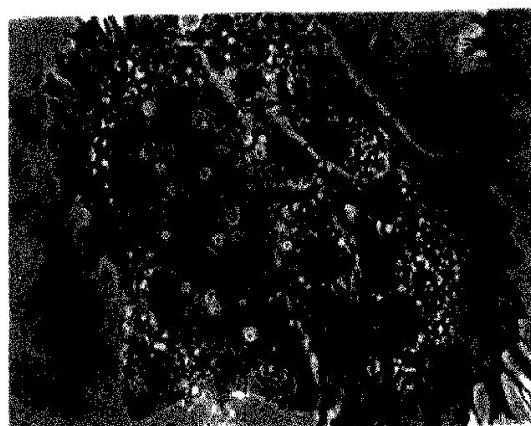
G O 1 N 33/53

D

专利名称(译)	新型蛋白质和治疗和诊断方法		
公开(公告)号	JP2007230986A	公开(公告)日	2007-09-13
申请号	JP2006092246	申请日	2006-03-02
申请(专利权)人(译)	高桥 直躬		
[标]发明人	高橋直躬		
发明人	高橋 直躬		
IPC分类号	C07K14/47 A61K38/00 A61P1/16 C07K16/18 G01N33/53		
FI分类号	C07K14/47.ZNA A61K37/02 A61P1/16 C07K16/18 G01N33/53.Y G01N33/53.D A61K38/00		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA17 4C084/BA23 4C084/BA44 4C084/NA14 4C084/ZA751 4C084/ZA752 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA15 4H045/BA17 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/HA05 4H045/HA14		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种能够以高灵敏度应用和治疗肝脏疾病的技术。
 解决方案：肝损伤时肝素和抗连接蛋白32自身抗体的增加/减少，可用于肝病的诊断和治疗。与正常肝组织相比，在损伤的极早期阶段，肝素的表达水平降低后，其表达水平瞬时升高。另外，抗连接蛋白32自身抗体具有很大的障碍，并且表达时间越长，表达越大。因此，同时确认肝素和抗连接蛋白32自身抗体的表达将导致对疾病状态的更准确了解，这将对治疗和再生有用。[选型图]图1



canaliculuslike ducts (arrows) were formed.