

(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2014-102135

(P2014-102135A)

(43) 公開日 平成26年6月5日(2014.6.5)

(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 2GO45
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/53	Y 4HO45
CO 7 K 14/705 (2006.01)	GO 1 N 33/48	P
	CO 7 K 14/705	

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願2012-253784 (P2012-253784)	(71) 出願人	305060567 国立大学法人富山大学 富山県富山市五福3190
(22) 出願日	平成24年11月20日 (2012.11.20)	(72) 発明者	布村 さゆり 富山県富山市杉谷2630 富山大学杉谷 キャンパス内
		(72) 発明者	福岡 順也 富山県富山市婦中町増田81-24
		Fターム(参考)	2G045 AA24 AA25 BA13 BB22 BB24 CB01 CB26 DA36 FB01 FB02 FB03 FB12 GB01 GC12 GC15 4H045 AA11 AA30 CA40 DA86 EA50

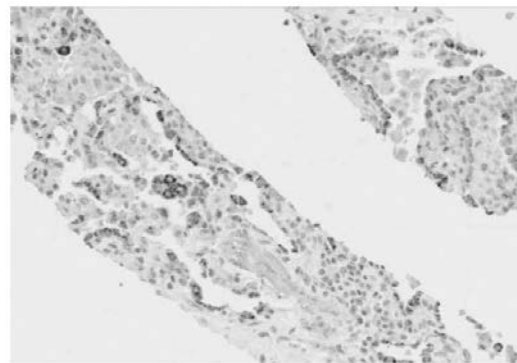
(54) 【発明の名称】 間質性肺炎の病態の評価方法および間質性肺炎の病態の評価用マーカー

(57) 【要約】

【課題】 予後不良である肺線維症の病態進行度をよりの確に推測し、治療方針を決定することができる新たなマーカーを提供する。

【解決手段】 肺サーファクタント蛋白C (SP-C) の前駆蛋白 (proSP-C) の発現レベルを定性的あるいは定量的に観察することで、予後不良である肺線維症の病態の進行度をよりの確に推測し、治療方針を決定することができる。

【選択図】 図2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

肺サーファクタント蛋白 C (S P - C) の前駆蛋白質 (p r o S P - C) の発現を指標とする間質性肺炎の病態の評価方法。

【請求項 2】

間質性肺炎の病態が肺線維症である請求項 1 記載の評価方法。

【請求項 3】

p r o S P - C の発現を免疫染色により観察する請求項 1 または 2 記載の評価方法。

【請求項 4】

免疫染色された p r o S P - C の染色強度と肺胞上皮細胞全体に占める割合を数値化する請求項 1 ~ 3 のいずれかの項記載の評価方法。 10

【請求項 5】

p r o S P - C に係る数値と数値化された病理組織学的所見を比較する請求項 4 項記載の評価方法。

【請求項 6】

数値化された病理組織学的所見が、弾性繊維、蜂巢構造、線維化、マクロファージおよび炎症かから選ばれる一つ以上の所見である請求項 5 記載の評価方法。

【請求項 7】

間質性肺炎の病態の評価するための指標としての肺サーファクタント蛋白 C (S P - C) の前駆蛋白 (p r o S P - C) の使用。 20

【請求項 8】

間質性肺炎の病態が肺線維症である請求項 7 記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、間質性肺炎の病態を評価するための方法および間質性肺炎の病態を評価するための肺サーファクタント蛋白 C (S P - C) の前駆蛋白質 (p r o S P - C) の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

肺サーファクタントは、肺胞 II 型上皮細胞で産生され肺胞へ分泌されるリン脂質・蛋白質複合体であり、その機能の一つは、肺胞表面張力を低下させることで肺胞虚脱の防止である。

肺サーファクタントには、4 種の特異蛋白質が含まれており、サーファクタント蛋白 A ~ D (S P - A、S P - B、S P - C、S P - D) と命名された。このうち、S P - B および S P - C は疎水性が強く、S P - A および S P - D は親水性である (非特許文献 1) 。

【0003】

一方、間質性肺炎は、肺の間質に炎症が起きる病気の総称であり、進行して炎症組織が線維化したものが肺線維症と呼ばれている。

肺の線維化の血清マーカーとして、肺胞 I I 型細胞の膜構成蛋白の糖蛋白抗原 (K r e b s v o n d e n L u n g e n - 6 : 以下、K L - 6)、サーファクタント蛋白 A (S P - A)、サーファクタント蛋白 D (S P - D) が知られている (非特許文献 2) 。

また、K L - 6、S P - A、S P - D 以外に、血清中の抗 a n n e x i n 抗体、抗 p h o s p h g l y c e r a t e k i n a s e 抗体などの自己抗体を特発性肺線維症のマーカーとして利用する試みがなされている (特許文献 1)

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献 1】分子呼吸器病，16 (1)，151 - 156，2012。

【非特許文献 2】検査と技術，38 (10)，926 - 930，2010。 40 50

【特許文献1】WO2006/098144

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

KL-6、SP-AおよびSP-Dは、特発性肺線維症や非特異性間質性肺炎などの特発性間質性肺炎でも高率に陽性となり、病態のモニタリング、治療反応性の評価に有用とされているが、これらは血清学的なマーカーであり、患者の病理組織標本を用いて病理組織学的に、病態の進行度や、予後を予測するに至るマーカーは未だ報告されていない。予後不良である肺線維症の病態進行度をよりの確に推測し、治療方針を決定することができる新たなマーカーが求められている。

10

【課題を解決するための手段】

【0006】

サーファクタント蛋白C (SP-C) は、家族性間質性親子症例で、SP-C遺伝子の欠損変異が同定されたことなどから注目された。

SP-Cは、SP-C遺伝子が翻訳され小胞体でproSP-Cが生成し、細胞内切断修飾によりSP-Cとなる(非特許文献1)

肺線維症に対する新規マーカー探索の中で、病理組織標本の薄切片を用い、proSP-Cに対する免疫染色の組織学的所見と病理組織学検討から、proSP-Cが肺線維症の病態進行度のマーカーとして有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。

以下、本発明を詳細に説明する。

20

【0007】

本発明は、肺サーファクタント蛋白C (SP-C) の前駆蛋白質 (proSP-C) の発現を指標とする間質性肺炎の病態の評価方法および間質性肺炎の病態の評価するための指標としての肺サーファクタント蛋白C (SP-C) の前駆蛋白質 (proSP-C) の使用である。

具体的には、間質性肺炎の患者から得られる病理組織標本において、proSP-Cの発現を定性的あるいは定量的に観察することで、予後不良である肺線維症の病態進行度をよりの確に推測し、治療方針を決定することができる。

【0008】

本発明に用いる病理組織標本は、手術やバイオプシーなどで得られた病理組織をパラフィン、セロイジン、カーボワックス、ゼラチン、OCTコンパウンドなど包埋剤で包埋した組織標本ブロックから薄切やコア抜きして得られる組織片であれば、特に限定されないが、パラフィン包埋組織ブロックから薄切される組織片が好ましい。

30

また、パラフィン包埋組織ブロックからコア抜きした柱状組織片をアレイ状に配置した組織アレイやパラフィン包埋組織ブロックから薄切した組織片をロール状に成形しアレイ状に配置したスパイラル組織アレイを用いてもよい。

【0009】

proSP-Cを検出するための手法は、特に限定されないが、免疫染色法、in situハイブリダイゼーション法のいずれでもよいが、免疫染色法が好ましい。

免疫染色は、酵素抗体法、蛍光抗体法のいずれでもよいが、酵素抗体法が好ましい。

40

免疫染色に使用する一次抗体は、proSP-Cに対するポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれでもよいが、ポリクローナル抗体が好ましい。

【0010】

proSP-Cの発現を定性的あるいは定量的に評価するためには、例えば、proSP-Cの免疫染色の強度を数値化することが好ましい。さらに、数値化した免疫染色の強度と肺胞上皮細胞全体に占める割合を掛け合わせproSP-Cの所見の数値とすることが好ましい。

【0011】

proSP-Cを、間質性肺炎の病態の評価に使用するには、proSP-Cの発現に係る数値を、病理学組織学的所見、例えば、弾性繊維、蜂巢状構造、線維化、II型肺胞上皮

50

細胞、マクロファージ、炎症などから選ばれる一つ以上の病理学組織学的所見を数値化したものと比較することにより行えばよい。

【発明の効果】

【0012】

proSP-Cの値は、線維化の強い病変部位では低値となり、細胞湿潤の強い病変部位では高値となる。proSP-Cは肺の線維化の程度と強く相関することから、proSP-Cの発現レベルを観察することは、病態の進行度を評価するために有用である。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】HE染色したスパイラル組織アレイである。

10

【図2】免疫染色したスパイラル組織アレイの拡大図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

以下、本発明を実施例で説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1

<試料>

米国、メーヨー・クリニックとの共同研究において、移植肺46症例のパラフィン包埋組織ブロックから得られた薄切された組織片を用い、特許4625909の記載に準じてスパイラル組織アレイを作製した。

【0015】

20

<免疫染色>

スパイラル組織アレイの未染標本に対し、一次抗体としてproSP-Cのポリクローナル抗体(ミリポア社製)を800倍に希釈して室温で30分間反応させた後、デキストランポリマーとペルオキシダーゼを用いる増感法試薬(EnVision+Dual LinkHRP:ダコ社製)を使用して室温で30分間二次抗体反応を行った。

【0016】

<免疫染色の数値化>

(1) proSP-Cの染色強度を0~3の4段階に分類

(2) 肺上皮細胞全体に対する割合を10%ごとに評価

(3) 染色強度のスコアとその割合をそれぞれ掛け合わせたものを総和し、100で割ってproSP-Cの染色所見を数値化した。

30

【0017】

・図2の数値化

$(0 \times 30\% + 1 \times 20\% + 2 \times 40\% + 3 \times 10\%) \div 100 = 1.3$

【0018】

<組織所見の数値化と統計解析>

ヘマトキシリン・エオシン染色(HE染色)した病理組織標本を用いて、病理組織学的所見(弾性繊維、炎症、マクロファージ、扁平上皮化生、血管壁の厚さ、フィブリン沈着、リンパ球の集族、巨細胞、毛細血管性血管腫、蜂巣状構造、線維化、II型肺胞上皮細胞、平滑筋の増生、線維芽細胞、活動性、正常肺領域)に関してスコアリングし、その程度によってネガティブとポジティブの2群に分け、proSP-Cの数値との関係について統計解析を行った。統計解析は、ウィルコクソン(Wilcoxon)の順位和検定およびフィッシャー(fisher)の正確確率検定を用いて、 $p < 0.05$ を有意差「有」とみなした。

40

その結果、弾性繊維($p = 0.0025$)、蜂巣状構造($p = < 0.0001$)、線維化($p = 0.0015$)、II型肺胞上皮細胞($p = 0.0025$)が強い症例でproSP-Cの値は低くなり、一方、マクロファージ($p = 0.0006$)と炎症($p = 0.0143$)が強い症例では、proSP-Cの値は高くなっていた。

【0019】

以下に、蜂巣状構造、線維化、II型肺胞上皮細胞、マクロファージおよび炎症の病理組織学的所見スコアとproSP-Cスコアを表1に示す。

50

【 0 0 2 0 】

【 表 1 】

proSP-Cスコア		病理組織学的所見スコア			
		0	1	2	3
病理組織学的所見	蜂巣状構造	1.54	1	0.74	0.53
	線維化	—	1.46	1.35	0.9
	II型肺胞上皮細胞	1.15	1.1	1.15	1.69
	マクロファージ	0.98	1.15	1.76	—
	炎症	0.66	1.28	1.06	1.7

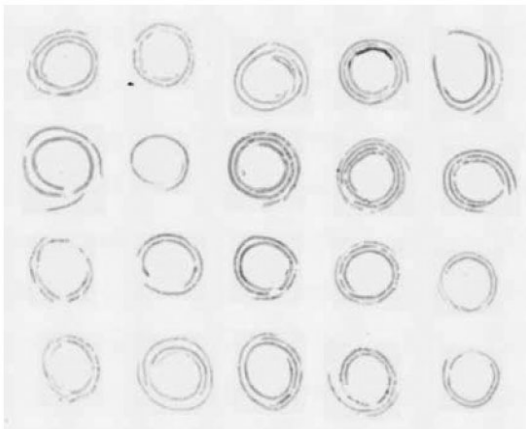
10

【 産業上の利用可能性 】

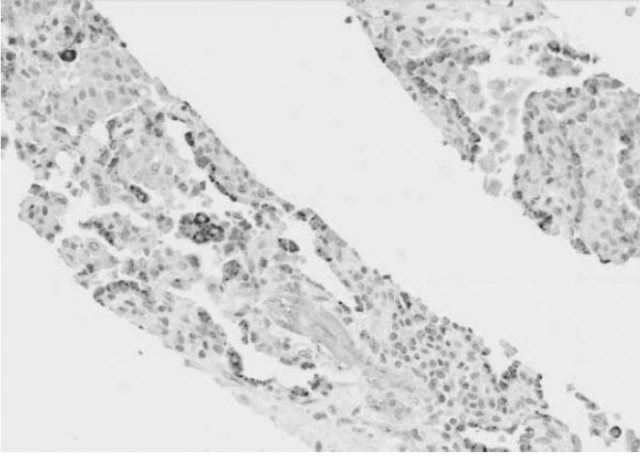
【 0 0 2 1 】

proSP-Cの値は、線維化の強い病変部位では低値となり、細胞浸潤の強い病変部位では高値となる。proSP-Cは肺実質の線維化と強く相関することから、proSP-Cの発現レベルを定性的あるいは定量的に観察することで、予後不良である肺線維症の病態進行度をよりの確に推測し、治療方針を決定することができる。

【 図 1 】



【 図 2 】



专利名称(译)	评估间质性肺炎病理生理学的方法和评估间质性肺炎病情的标志物		
公开(公告)号	JP2014102135A	公开(公告)日	2014-06-05
申请号	JP2012253784	申请日	2012-11-20
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人富山大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人富山大学		
[标]发明人	布村さゆり 福岡順也		
发明人	布村 さゆり 福岡 順也		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48 C07K14/705		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.Y G01N33/48.P C07K14/705		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA25 2G045/BA13 2G045/BB22 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/CB26 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GB01 2G045/GC12 2G045/GC15 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA50		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种新的标记物，能够更准确地推测肺纤维化的病理进展程度，预后不良，并确定治疗方案。 解决方案：通过定性或定量观察肺表面活性蛋白C (SP-C) 祖细胞蛋白 (proSP-C) 的表达水平，肺纤维化的病理进展程度，预后不良，可以精确估计和决定治疗政策。
The

