

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6687245号
(P6687245)

(45) 発行日 令和2年4月22日(2020.4.22)

(24) 登録日 令和2年4月6日(2020.4.6)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/68	(2006.01)	GO 1 N 33/68	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D
CO 7 K 16/18	(2006.01)	CO 7 K 16/18	

請求項の数 5 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2016-521042 (P2016-521042)	(73) 特許権者	507148456
(86) (22) 出願日	平成27年5月11日 (2015.5.11)		学校法人 岩手医科大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2015/063511		岩手県紫波郡矢巾町医大通一丁目1番1号
(87) 国際公開番号	W02015/178237	(74) 代理人	100106611
(87) 国際公開日	平成27年11月26日 (2015.11.26)		弁理士 辻田 幸史
審査請求日	平成30年5月10日 (2018.5.10)	(74) 代理人	100087745
(31) 優先権主張番号	特願2014-102917 (P2014-102917)		弁理士 清水 善廣
(32) 優先日	平成26年5月17日 (2014.5.17)	(74) 代理人	100098545
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国 (JP)		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
		(72) 発明者	及川 里百合
			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) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

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、頸動脈 IMT (内膜中膜複合体厚) の程度が強いことを示す、頸動脈 IMT の程度を階層化するための方法。

【請求項2】

C3a-desArg の血液中の存在量の測定を、C3a-desArg 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】

S100A12 の血液中の存在量の測定を、S100A12 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4】

C3a-desArg を特異的に認識する抗体、および/または、S100A12 を特異的に認識する抗体の、頸動脈 IMT の程度を階層化するための使用。

【請求項5】

C3a-desArg を特異的に認識する抗体、および/または、S100A12 を特異的に認識する抗体を少なくとも含む、頸動脈 IMT の程度を階層化するためのキット。

【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。

【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。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

20

【0003】

【特許文献1】特表2008-512094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】

30

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C3a（C3a-desArg）とカルシウム結合性タンパク質であるS100A12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IMT（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。

【0006】

上記の知見に基づいてなされた本発明の頸動脈IMTの程度を階層化するための方法は、請求項1記載の通り、C3a-desArg、および/または、S100A12の血液中の存在量が多いほど、頸動脈IMTの程度が強いことを示すことによる。

40

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、C3a-desArgの血液中の存在量の測定を、C3a-desArg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、S100A12の血液中の存在量の測定を、S100A12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、C3a-desArgを特異的に認識する抗体、および/または、S100A12を特異的に認識する抗体の、頸動脈IMTの程度を階層化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、C3a-desArgを特異的に認識する抗体

50

、および/または、S100A12を特異的に認識する抗体を少なくとも含む、頸動脈IMTの程度を階層化するためのキットである。

【発明の効果】

【0007】

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、C3a-desArg、および/または、S100A12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】

【0008】

【図1】実施例1における、C3a-desArgとS100A12のそれぞれの血中濃度に基づいて、ATIS関連患者の群とCEA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、C3a-desArgとS100A12のそれぞれの血中濃度に基づいて、頸動脈IMT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、C3a-desArgの血中濃度に基づいて、ATIS関連患者の群とCEA患者の群を区別することができることと、頸動脈IMT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】

【0009】

本発明の動脈壁肥厚の程度を検知方法は、C3a-desArg、および/または、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。動脈壁肥厚の程度を検知は、C3a-desArgとS100A12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。

【0010】

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C3a-desArgは、補体成分であるC3aの分解産物であり、血液中でC3aのC末端のアルギニンが切除されることで生成し、C3a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2010-210408号公報を参照のこと）。

【0011】

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。

【0013】

10

20

30

40

50

本発明の動脈壁肥厚の程度の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。

10

20

【実施例】

【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'-ggatccttaggccaggcccagggtggctggcccgcgc-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。

30

【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'-gaattccatcatcatcatcatcatcctccgtgcagctcacggagaagcgaatggac-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メラ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。

40

【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DNA断片（C3a-desArg cDNA）を、メーカーの推奨する方法に従ってpGEM-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

50

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100 µg/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。

【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 Kit(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(Software 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、Gene 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。

10

【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0.5 µgを、制限酵素反応液20 µl[50 mM Tris-HCl(pH7.5)、10 mM MgCl₂、1 mMジチオスレイトール、100 mM NaCl、15単位のEcoRIおよび15単位のBamHI酵素]中、37 °C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。

20

【0020】

次に、発現ベクターであるpATtrpEのプラスミド0.5 µgを、制限酵素反応液20 µl[50 mM Tris-HCl(pH7.5)、10 mM MgCl₂、1 mMジチオスレイトール、100 mM NaCl、15単位のEcoRIおよび15単位のBamHI酵素]中、37 °C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、pATtrpE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ベクターのEcoRI - BamHI断片の連結反応を、10×リガーゼ用緩衝液[660 mM Tris-HCl(pH7.5)、66 mM MgCl₂、100 mMジチオスレイトール、1 mM ATP]5 µlとT4リガーゼ1 µl(350単位/µl)に水を加えて50 µlとし、16 °Cで一晩保温して行なった。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100 µg/mlとなるよう加えた2YT培地にて培養した。

30

【0022】

1.5 mlの菌培養液を遠心して集菌し、プラスミドDNAのミニプレパ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DNA1 µgを、制限酵素反応液20 µl[50 mM Tris-HCl(pH7.5)、10 mM MgCl₂、1 mMジチオスレイトール、100 mM NaCl、15単位のEcoRIおよび15単位のBamHI酵素]中、37 °C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260 bpのEcoRI - BamHI断片が生じるpATtrpE - C3a-desArg発現プラスミドを選別した。

40

【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、5

50

0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含む 3 ml の 2 Y T 培地に接種し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 9 時間培養した。得られた培養液 1 ml を、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含む 100 ml の M9 - CA 培地 (0.6% Na_2HPO_4 、0.5% KH_2PO_4 、0.5% NaCl 、0.1% NH_4Cl 、0.1 mM CaCl_2 、2 mM MgSO_4 、0.5% カザミノ酸、0.2% グルコース) に植え継ぎ、37 $^{\circ}\text{C}$ で培養した。OD 600 = 0.3 の時に終濃度 40 mg/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 5 K rpm で 10 分間遠心して集菌した。

【0024】

集めた菌体に、20 ml の 0.15 M NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.3) (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 2 g 得た。得られた菌体を PBS 10 ml 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 6 M と 2 mM 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。

10

【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、10 μg (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 10 μg を最終免疫として尾静脈内に投与した。

20

【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 \times g で 5 分間遠心した後、上清を除去し、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 1 ml をゆっくりと加え、さらに RPMI - 1640 培地 10 ml を加えて細胞融合させた。

30

【0027】

得られた融合細胞を、200 \times 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 ウェ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。

40

【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 $^{\circ}\text{C}$ 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

50

体を用いたアイソタイプタイピングキット (Z y m e d) により、サブクラスを同定した結果、 I g G 2 a であることがわかった。また、 C 3 a d - 5 が産生するモノクローナル抗体は、市販のヒト C 3 a - d e s A r g 精製物 (C a l b i o c h e m) に反応するが、市販のヒト C 3 a 精製物 (C a l b i o c h e m) に反応しないことから、 C 3 a - d e s A r g 特異的モノクローナル抗体であることがわかった。

【 0 0 3 0 】

参考例 3 : ヒト C 3 a - d e s A r g 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 C 3 a - d e s A r g の N 端側 1 6 アミノ酸ペプチド (K R M D K V G K Y P K E L R K C : 配列番号 4) の K L H 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 : C 3 N - 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、 I g G 1 であることがわかった。また、 C 3 N - 6 が産生するモノクローナル抗体は、市販のヒト C 3 a - d e s A r g 精製物および市販のヒト C 3 a 精製物に反応することから、ヒト C 3 a - d e s A r g 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。

10

【 0 0 3 1 】

実施例 1 : 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く頸動脈 I M T 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 7 7 名の患者 (A T I S 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 (C E A) の施行が必要と判断された 3 9 名の患者 (C E A 患者) について、それぞれの患者から同意を得て、 C 3 a - d e s A r g と S 1 0 0 A 1 2 の血中濃度を測定した。 C 3 a - d e s A r g と S 1 0 0 A 1 2 の血中濃度の測定は、それぞれ後述する E L I S A 法により行った。結果を表 1 に示す。

20

【 0 0 3 2 】

【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)
A1	464	25	A40	1228	78	C1	646	50
A2	1221	45	A41	1152	34	C2	1089	196
A3	292	11	A42	899	41	C3	1482	113
A4	427	16	A43	717	139	C4	2250	129
A5	397	24	A44	500	47	C5	1045	177
A6	893	31	A45	225	12	C6	826	82
A7	586	44	A46	739	100	C7	958	50
A8	855	73	A47	927	36	C8	1368	62
A9	1267	37	A48	522	139	C9	2069	133
A10	760	78	A49	680	54	C10	1386	33
A11	638	34	A50	846	83	C11	1367	89
A12	1019	41	A51	672	223	C12	553	18
A13	338	139	A52	471	117	C13	855	73
A14	756	47	A53	596	141	C14	1084	51
A15	158	12	A54	630	45	C15	671	84
A16	683	100	A55	303	77	C16	985	106
A17	1717	36	A56	332	34	C17	2254	118
A18	1579	139	A57	1289	115	C18	2406	89
A19	968	54	A58	1245	17	C19	1629	84
A20	781	83	A59	427	117	C20	1443	136
A21	1651	223	A60	732	28	C21	945	69
A22	358	117	A61	172	35	C22	2739	178
A23	1175	141	A62	542	147	C23	575	65
A24	829	45	A63	393	125	C24	1702	46
A25	605	71	A64	311	156	C25	3278	250
A26	536	37	A65	500	52	C26	1250	59
A27	428	131	A66	418	104	C27	752	73
A28	278	26	A67	591	220	C28	778	48
A29	674	150	A68	282	70	C29	117	26
A30	458	43	A69	397	86	C30	3567	140
A31	571	84	A70	562	96	C31	1377	46
A32	471	43	A71	332	112	C32	848	85
A33	230	39	A72	558	333	C33	1938	665
A34	576	16	A73	496	116	C34	620	44
A35	964	24	A74	517	118	C35	1295	160
A36	551	31	A75	645	99	C36	3167	430
A37	351	44	A76	1637	52	C37	1161	71
A38	1471	73	A77	225	22	C38	1375	440
A39	237	37				C39	1599	166

10

20

30

【0033】

ATIS関連患者の77例とCEA患者の39例の両群のC3a-desArgとS100A12のそれぞれの血中濃度の測定結果を、Mann-Whitney検定により比較したところ、それぞれ $p < 0.0001$ と $p = 0.0102$ で両群を区分することができた(図1)。さらに、頸動脈IMTの測定を行っているATIS関連患者の77例とCEA患者の31例の合計108例について、左右の総頸動脈の遠位壁(far wall)の最大IMT(IMT-Cmax)の合計値で2群(壁肥厚が3mm未満の軽度な群と3mm以上の重度な群)に分け、C3a-desArgとS100A12のそれぞれの血中濃度の測定結果を、Mann-Whitney検定により比較したところ、それぞれ $p < 0.0001$ と $p = 0.0254$ で両群を区分することができた(図2)。この結果は、Kruskal-Wallis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、C3a-desArgとS100A12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なり、これらの血中濃度に基づいて、頸動脈IMT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3mm未満の軽度な群と3mm以上の重度な群)の区別、C3a-desArgとS100A12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10-fold cross-validationで検証したところ、ABI(足関節/上腕インデックス)を説明変数として予測したROC曲線のAUC(曲線下面積)が0.636であるのに対して、C3a-desArgとS100A12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ROC曲線のAUCは0.787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づつ分注した。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。

【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づつ分注した。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 $p < 0 . 0 0 0 1$ で区分することができた。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 $p < 0 . 0 0 0 1$ で区分することができた。

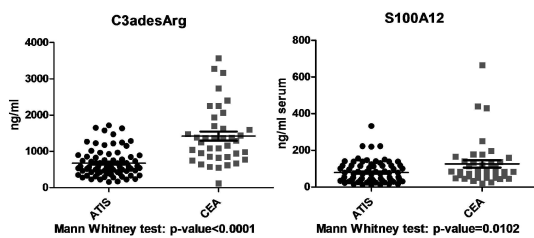
10

【 産 業 上 の 利 用 可 能 性 】

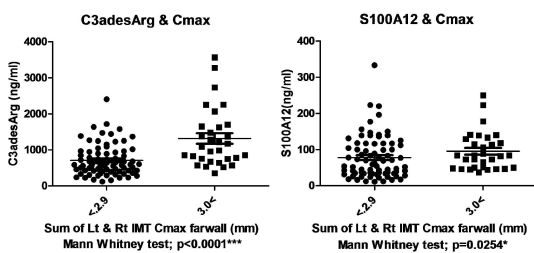
【 0 0 3 7 】

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。

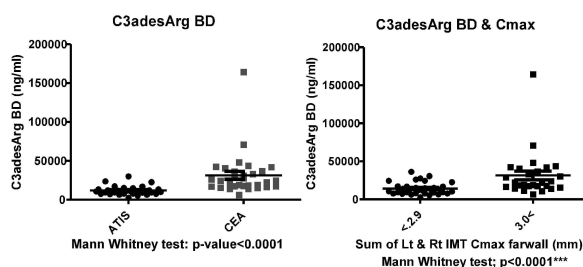
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



【配列表】

0006687245000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 榎 昇
埼玉県和光市丸山台2丁目10番23号 株式会社先端生命科学研究室内
- (72)発明者 菅又 泰博
埼玉県和光市丸山台2丁目10番23号 株式会社先端生命科学研究室内
- (72)発明者 飯田 久美子
埼玉県和光市丸山台2丁目10番23号 株式会社先端生命科学研究室内
- (72)発明者 大植 千春
埼玉県和光市丸山台2丁目10番23号 株式会社先端生命科学研究室内

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 特開2010-085242(JP,A)
Azhar Abbas, et al., High Levels of S100A12 Are Associated With Recent Plaque Symptomatology in Patients With Carotid Atherosclerosis, Stroke, 米国, American Heart Association, 2012年3月1日, volume 43, Issue 5, p.1347-1353, Materials and Methods, Results, Figure 1.
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, 米国, American Heart Association, 2010年10月21日, volume 31 / Issue 2, p.337-344, ApoE-Null Mice That Express Human S100A12 in VSMC Have Increased Vascular Calcification, Table1.
Allen P. Burke, et al., Morphologic Findings of Coronary Atherosclerotic Plaques in Diabetics A Postmortem Study, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biolog, 米国, American Heart Association, 2004年5月13日, Volume 24 / Issue 7, p.1266-1271
Ling Yan, et al., Beneficial effects of quinoline-3-carboxamide (ABR-215757) on atherosclerotic plaque morphology in S100A12 transgenic ApoE, Atherosclerosis, Elsevier Ireland Ltd., 2013年2月28日, Volume 228, p.69-79

(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)	如何检测动脉壁增厚程度		
公开(公告)号	JP6687245B2	公开(公告)日	2020-04-22
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		
当前申请(专利权)人(译)	学校法人 岩手医科大学		
[标]发明人	人見次郎 及川里百合 榎昇 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 榎 昇 菅又 泰博 飯田 久美子 大植 千春		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 C07K16/18		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/68		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D C07K16/18		
代理人(译)	阿部真一		
优先权	2014102917 2014-05-17 JP		
其他公开文献	JPWO2015178237A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明解决了提供一种用于检测动脉壁增厚程度的方法的问题，所述方法可用于确定动脉粥样硬化血栓形成事件的风险和确定对动脉粥样硬化血栓形成的治疗效果。这种用于检测动脉壁增厚程度的方法基于以下结论：血液中存在的精氨酸缺陷补体成分C3a (C3a-desArg) 和/或钙结合蛋白S100A12的数量越大，壁增厚。可以使用采用特异性识别这些蛋白质的抗体的免疫学方法来测量血液中这些蛋白质的含量。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特 許 公 報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6687245号 (P6687245)
(45) 発行日 令和2年4月22日 (2020. 4. 22)	(24) 登録日 令和2年4月6日 (2020. 4. 6)	
(5) Int. Cl. F I		
G O 1 N 33/68 (2006. 01)	G O 1 N 33/68	
G O 1 N 33/53 (2006. 01)	G O 1 N 33/53	D
C O 7 K 16/18 (2006. 01)	C O 7 K 16/18	
請求項の数 5 (全 12 頁)		
(21) 出願番号 特願2016-521042 (P2016-521042)	(73) 特許権者 507148456 学校法人 岩手医科大学 岩手県紫波郡矢巾町医大通一丁目1番1号	
(86) (22) 出願日 平成27年5月11日 (2015. 5. 11)	(74) 代理人 弁理士 辻田 幸史 100106611	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2015/063511	(74) 代理人 弁理士 清水 善廣 100087745	
(87) 国際公開番号 W02015/178237	(74) 代理人 弁理士 阿部 伸一 100098545	
(87) 国際公開日 平成27年11月26日 (2015. 11. 26)	(72) 発明者 人見 次郎 岩手県盛岡市内丸1-9番1号 学校法人岩手医科大学内	
審査請求日 平成30年5月10日 (2018. 5. 10)	(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	
(31) 優先権主張番号 特願2014-102917 (P2014-102917)		
(32) 優先日 平成26年5月17日 (2014. 5. 17)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国 (JP)		

(54) 【発明の名称】 動脈壁厚の程度の検知方法

最終頁に続く