

(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2018-80976

(P2018-80976A)

(43) 公開日 平成30年5月24日(2018.5.24)

(51) Int.Cl.

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

F I

G O 1 N 33/53

N

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願2016-222657 (P2016-222657)
(22) 出願日 平成28年11月15日 (2016.11.15)(71) 出願人 000224123
藤倉化成株式会社
東京都板橋区蓮根三丁目20番7号
(71) 出願人 304021831
国立大学法人千葉大学
千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号
(74) 代理人 100103160
弁理士 志村 光春
(72) 発明者 黒田 英行
埼玉県久喜市桜田5丁目13番1号 藤倉
化成株式会社 開発研究所内
(72) 発明者 中村 利華
埼玉県久喜市桜田5丁目13番1号 藤倉
化成株式会社 開発研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 動脈硬化の検出方法

(57) 【要約】

【課題】動脈硬化の進行を直接的に把握可能なマーカーを見出して、動脈硬化自体の予防又は治療動機を提供すること、さらに的確な動脈硬化症を含む動脈硬化関連疾患の病状把握を行う手段を提供することを目的とする。

【解決手段】体液検体中のSH3BP5蛋白質又はその一部、に対する抗体レベルを測定することにより、動脈硬化の進行に関する直接的なデータを取得できることを見出した。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

体液検体中の S H 3 B P 5 蛋白質又はその一部、に対する抗体レベルを測定することを特徴とする、動脈硬化の進行に関するデータ取得方法。

【請求項 2】

抗体レベルは、配列番号 2 のアミノ酸配列の蛋白質又はその一部、に結合する抗体のレベルであることを特徴とする、請求項 1 に記載のデータ取得方法。

【請求項 3】

配列番号 2 のアミノ酸配列の一部におけるアミノ酸残基の個数は、7 - 4 5 5 個であることを特徴とする、請求項 2 に記載のデータ取得方法。

10

【請求項 4】

配列番号 2 のアミノ酸配列の一部は、配列番号 5 に示されるアミノ酸配列であることを特徴とする、請求項 3 に記載のデータ取得方法。

【請求項 5】

配列番号 2 の全部又は一部のアミノ酸配列は、10%以下の個数（小数点以下切り捨て）のアミノ酸残基が、欠失、置換、又は、追加されていることを特徴とする、請求項 2 - 5 のいずれか 1 項に記載のデータ取得方法。

【請求項 6】

体液検体は、血液検体であることを特徴とする、請求項 1 - 6 のいずれか 1 項に記載のデータ取得方法。

20

【請求項 7】

血液検体は、血清又は血漿であることを特徴とする、請求項 7 に記載のデータ取得方法。

【請求項 8】

動脈硬化の進行に関するデータは、動脈硬化関連疾患の検出データであることを特徴とする、請求項 1 - 7 のいずれか 1 項に記載のデータ取得方法。

【請求項 9】

動脈硬化関連疾患の検出データは、動脈硬化症の検出データであることを特徴とする、請求項 8 に記載のデータ取得方法。

【請求項 10】

抗体レベル測定法は、E L I S A 法、A l p h a L I S A 法、間接蛍光抗体法、ウェスタンブロット法（免疫ブロット法）、比濁法、比臙法、ラテックス凝集比濁法、又は、C L E I A 法であることを特徴とする、請求項 1 - 9 のいずれか 1 項に記載のデータ取得方法。

30

【請求項 11】

請求項 1 - 10 のいずれか 1 項に記載のデータ取得方法を行うための、データ取得用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は疾患の検出手段に関する発明であり、より具体的には S H 3 B P 5 蛋白質に対する血液等の体液における抗体を検出することによる、動脈硬化の進行についての把握手段に関する発明である。本発明により、動脈硬化が関連する疾患の検出を行うことも可能である。

40

【背景技術】

【0002】

動脈硬化は、「動脈の壁が厚くなったり、硬くなったりして本来の構造が壊れ、働きが悪くなる病変」の病理学的な総称であり、無症状で進行する。動脈硬化のうち最も典型的な粥状動脈硬化（アテローム性動脈硬化）は、心臓を養う冠状動脈、大動脈、さらに脳、頸部、腎臓、内臓、手足の動脈に起こりやすく、動脈壁の内膜の中にコレステロールが蓄

50

積し、次第に脂肪分が沈着して、血管が狭くなり、血栓や潰瘍が形成され易くなる。これらが原因となって、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、脳出血、大動脈瘤、腎硬化症、閉塞性動脈硬化症、手足の壊死等の動脈硬化症が引き起こされる。

【0003】

脳梗塞や心筋梗塞等の動脈硬化症は、直接死に至る場合も多く、たとえ死に至らなくともその後の長いリハビリを余儀なくされる。患者本人やその家族にとって負担が重いものであり、社会的にも国民医療費の増大につながり、その発症の予防は重要な課題である。もし、動脈硬化の進行状況を把握し、その後の脳梗塞や心筋梗塞の発症を予測できるなら、発症前の治療や生活習慣の改善により、動脈硬化症全般を予防できる可能性が極めて高い。

10

【0004】

そこで、動脈硬化症の病状把握のために、high-density lipoprotein (LDL)-cholesterol、low-density lipoprotein (HDL)-cholesterol、total cholesterol (TC)、glycohemoglobin (HbA1c) (非特許文献1)、uric acid (非特許文献2)等の血液検査が一般的に用いられている。

【0005】

さらに血液抗体マーカーとしては、心血管障害に関し phospholipid (非特許文献3)、apolipoprotein A-1 (非特許文献4)、oxidized low-density lipoprotein (非特許文献5)、heat shock proteins (Hsps) (非特許文献6)、脳卒中の Hsp60 (非特許文献7)、糖尿病の insulin (非特許文献8)、glutamic acid decarboxylase (GAD) (非特許文献9)、protein tyrosine phosphatase IA-2 (非特許文献10、11)等が知られている。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Rollins KE, Varadhan KK, Dhataria K, Lobo DN (2015) Systematic review of the impact of HbA1c on outcomes following surgery in patients with diabetes mellitus. Clin Nutr S0261-5614: 00082-5.

30

【非特許文献2】Nakanishi N, Okamoto M, Yoshida H, Matsuo Y, Suzuki K, et al. (2003) Serum uric acid and risk for development of hypertension and impaired fasting glucose or type II diabetes in Japanese male office workers. Eur J Epidemiol 18: 523-530.

【非特許文献3】Liang, K. P., Kremers, H. M., Crowson, C. S., Snyder, M. R., The rneau, T. M., Roger, V. L. and Gabriel, S. E. Autoantibodies and the risk of cardiovascular events. J. Rheumatol., 2009, 36, 2462-2469.

【非特許文献4】Montecucco, F., Vuilleumier, N., Pagano, S., Lenglet, S., Bertolotto, M., Braunersreuther, V., Pelli, G., Kovari, E., Pane, B., Spinella, G., Pende, A., Palombo, D., Dallegri, F., Mach, F. and Roux-Lombard, P. Anti-apolipoprotein A-1 auto-antibodies are active mediators of atherosclerotic plaque vulnerability. Eur. Heart J., 2011, 32, 412-421.

40

【非特許文献5】Fesmire, J., Wolfson-Reichlin, M. and Reichlin, M. Effects of autoimmune antibodies anti-lipoprotein lipase, anti-low density lipoprotein, and anti-oxidized low density lipoprotein on lipid metabolism and atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. Rev. Bras. Reumatol., 2010, 50, 539-551.

【非特許文献6】Carbone, F., Nencioni, A., Mach, F., Vuilleumier, N. and Montecucco, F. Evidence on the pathogenic role of auto-antibodies in acute cardiovascular diseases. Thromb. Haemost., 2013, 109, 854-868.

50

【非特許文献7】Kramer, J., Harcos, P., Prohaszka, Z., Horvath, L., Karadi, I., Singh, M., Csaszar, A., Romics, L. and Fust, G. Frequencies of certain complement protein alleles and serum levels of anti-heat-shock protein antibodies in cerebrovascular diseases. *Stroke*, 2000, 31, 2648-2652.

【非特許文献8】Palmer, J. P., Asplin, C. M., Clemons, P., Lyen, K., Tatpati, O., Raghu, P. K. and Paquette, T. L. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science*, 1983, 222, 1337-1339.

【非特許文献9】Baekkeskov, S., Aanstoot, H., Christgau, S., Reetz, A., Solimena, M. S., Cascalho, M., Folli, F., Richter-Olsen, H. and DeCamilli, P. Identification of the 64K autoantigen in insulin dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature*, 1990, 347, 151-156. 10

【非特許文献10】Payton, M. A., Hawkes, C. J. and Christie, M. R. Relationship of the 37,000- and 40,000-M(r) tryptic fragments of islet antigens in insulin-dependent diabetes to the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 (ICA512). *J. Clin. Invest.*, 1995, 96, 1506-1511.

【非特許文献11】Taplin, C. E. and Barker, J.M. Autoantibodies in type 1 diabetes. *Autoimmunity*, 2008, 41, 11-18.

【非特許文献12】Matsushita, M., Yamadori, T., Kato, S., Takemoto, Y., Inazawa, J., Baba, Y., Hashimoto, S., Sekine, S., Arai, S., Kunikata, T., Kurimoto, M., Kishimoto, T., Tsukada, S. Identification and characterization of a novel SH3-domain binding protein, Sab, which preferentially associates with Bruton's tyrosine kinase (Btk). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, 245, 337-343. 20

【非特許文献13】Yamadori, T., Baba, Y., Matsushita, M., Hashimoto, S., Kurosaki, M., Kurosaki, T., Kishimoto, T. and Tsukada, S. Bruton's tyrosine kinase activity is negatively regulated by Sab, the Btk-SH3 domain-binding protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 6341-6346.

【非特許文献14】Win, S., Than, T. A., Le, B. H., Garcia-Ruiz, C., Fernandez-Checa, J. C. and Kaplowitz, N. Sab (Sh3bp5) dependence of JNK mediated inhibition of mitochondrial respiration in palmitic acid induced hepatocyte lipotoxicity. *J. Hepatol.*, 2015, 62(6), 1367-1374. 30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

上記のように、動脈硬化症の病状把握を行う試みが種々のマーカーにより行われているが、これらのマーカーによる病状把握の試みは、動脈硬化症のリスクファクター側からの試みであり、いわば間接的な病状把握方式である。このような病状把握方式においては、特定のリスクファクターに基づいた動脈硬化症の病状把握が可能である一方で、全ての動脈硬化症のリスクファクターに対応している訳では無いので、動脈硬化症自体の進行を見落としてしまう可能性が認められる。

【0008】 40

本発明は、動脈硬化の進行を直接的に把握可能なマーカーを見出して、動脈硬化自体の予防又は治療動機を提供すること、さらに的確な動脈硬化症を含む動脈硬化関連疾患の病状把握を行う手段を提供することを目的とするものである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、体液中のSH3BP5蛋白質に対する抗体レベルを測定することにより、動脈硬化の進行を的確に把握することができることを見出し、本発明を完成した。

【0010】

本発明において「動脈硬化」とは、「動脈の壁が厚くなったり、硬くなったりして本来の構造が壊れ、働きが悪くなる病変」であり、「動脈硬化関連疾患」とは、「動脈硬化に 50

関係する疾患」であり、「動脈硬化が原因となって発症する疾患」と「動脈硬化の原因となる疾患」の双方を含むものである。「動脈硬化症」とは、前記の「動脈硬化が原因となって発症する疾患」であり、動脈硬化関連疾患の下位概念である。

【0011】

本発明は、第一に、体液検体中のSH3BP5蛋白質又はその一部、に対する抗体レベルを測定することを特徴とする、動脈硬化の進行に関するデータ取得方法（本発明のデータ取得方法）を提供する。

【0012】

本発明のデータ取得方法における測定対象である体液抗体を捕捉する基礎である、抗原としてのSH3BP5蛋白質は、別名SH3 domain-binding protein 5、又はSabと称され、アクセッションナンバー「NM_004844」としてNCBIに登録されている。SH3BP5蛋白質はBruton tyrosine kinase（BTK）に結合し、その活性を阻害する蛋白質として発見された（非特許文献12、13）。また、c-Jun N末端キナーゼ（JNK）とともに脂質毒性や非アルコール性脂肪肝（NAFLD）を誘導することが知られている（非特許文献14）。

10

【0013】

SH3BP5蛋白質をコードする遺伝子（SH3BP5遺伝子）の塩基配列と、当該蛋白質のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号1（塩基配列）、配列番号2（アミノ酸配列）に示す通りである。

【0014】

本発明のデータ取得方法の別の表現として、例えば、「体液検体中のSH3BP5蛋白質又はその一部、に対する抗体レベルを測定することを特徴とする、動脈硬化の進行の把握方法」が挙げられる。

20

【0015】

さらに、本発明は、第二に、本発明のデータ取得方法を行うための、データ取得用キット（以下、本発明のキットともいう）を提供する。

【0016】

本発明のデータ取得用キットの別の表現として、例えば、「体液検体中のSH3BP5蛋白質又はその一部、に対する抗体レベルを測定することを特徴とする動脈硬化の進行の把握方法を行うためのキット」が挙げられる。

30

【発明の効果】

【0017】

本発明により、体液抗体マーカーによって、直接的に動脈硬化の進行を把握する手段が提供される。これにより動脈硬化自体の予防又は治療動機の提供、及び、的確な動脈硬化症を含む動脈硬化関連疾患の病状把握を行う手段が提供される。また、本発明を用いることにより、個々の動脈硬化関連疾患を積極的に検出することも可能である。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】SH3BP5蛋白質由来のペプチドを搭載したアレイでの体液抗体捕捉アッセイの結果を示す図面である。

40

【図2】糖尿病（DM）患者と健常者（HD）血清におけるSH3BP5抗体レベルの比較をAlphaLISA法により行った結果を示す図面である。本図2は、a-dの4図面で構成されている。SH3BP5蛋白質抗原を用いた場合の結果をaに、SH3BP5ペプチド抗原を用いた時の結果をcに、それぞれ箱髭図で示している。これらの箱髭図の縦軸はAlpha Countであり、各箱髭に示された境界は、下から、10番目（最下段の横バー）、20番目（箱の底辺）、50番目（箱の中心線）、80番目（箱の上辺）、90番目（最上段の横バー）のパーセントイルを示す。bとdはそれぞれaとcの結果を反映するROC曲線である。bとdのROC図中に示した4段の数値は、上から順番にカットオフ値（感度、特異度）、P値、areas under the curve（AUC）値、95% CIを示す。

50

【図3-1】一過性脳虚血発作（TIA）患者と急性期脳梗塞（aCI）患者と健常者におけるSH3BP5血清抗体レベルの比較をAlphaLISA法により行った結果を示す図面である。図3全体はa-fの6図面で構成されており、本図3-1は、それらのうちa-cの3図面を示している。aは、SH3BP5蛋白質を体液抗体捕捉抗原として用いた場合の結果を示す箱髭図であり、bは、当該aのうちTIAについての結果を示すROC曲線であり、cは、当該aのうちaCIについての結果を示すROC曲線である。ROC曲線図中に示された4段の数字の意味は、上記図2b等と同様である。

【図3-2】上記図3のうち、SH3BP5ペプチドを抗体捕捉抗原として用いたd-fの3図面を示している。dは、SH3BP5ペプチドを用いた場合の結果を示す箱髭図であり、eは、当該dのうちTIAについての結果を示すROC曲線であり、fは、当該dのうちaCIについての結果を示すROC曲線である。ROC曲線図中に示された4段の数字の意味は、上記図2b等と同様である。

【図4】健常者と心血管障害患者におけるSH3BP5血清抗体レベルの比較検討を行った結果を示す図面である。本図4は、a-dの4図面で構成されている。SH3BP5蛋白質抗原を用いた場合の結果をaに、SH3BP5ペプチド抗原を用いた時の結果をcに、それぞれ箱髭図で示している。bとdはそれぞれaとcの結果を反映するROC曲線である。ROC曲線図中に示された4段の数字の意味は、上記図2b等と同様である。

【図5-1】健常者と慢性腎臓病（CKD）患者におけるSH3BP5血清抗体レベルの比較をAlphaLISA法により行った結果を示す図面である。図5全体はa-hの8図面で構成されており、本図5-1は、それらのうちa-dの4図面を示している。aは、SH3BP5蛋白質を体液抗体捕捉抗原として用いた場合の結果を示す箱髭図であり、bは、当該aのうちタイプ1についての結果を示すROC曲線であり、cは、同タイプ2についての結果を示すROC曲線であり、dは、同タイプ3についての結果を示すROC曲線である。ROC曲線図中に示された4段の数字の意味は、上記図2b等と同様である。

【図5-2】健常者と慢性腎臓病（CKD）患者におけるSH3BP5血清抗体レベルの比較をAlphaLISA法により行った結果を示す図面である。図5全体はa-hの8図面で構成されており、本図5-2は、それらのうちe-hの4図面を示している。eは、SH3BP5ペプチドを体液抗体捕捉抗原として用いた場合の結果を示す箱髭図であり、fは、当該eのうちタイプ1についての結果を示すROC曲線であり、gは、同タイプ2についての結果を示すROC曲線であり、hは、同タイプ3についての結果を示すROC曲線である。ROC曲線図中に示された4段の数字の意味は、上記図2b等と同様である。

【発明を実施するための形態】

【0019】

(1) 本発明のデータ取得方法

(a) 体液検体

本発明のデータ取得方法におけるデータ取得の対象として用いられる「体液検体」の体液とは、血液、リンパ液等であり、「検体」とは、身体から分離された状態の当該体液そのもの、又は、処理物である。体液検体の中でも血液検体が好適である。血液検体としては、全血、血清、血漿等が挙げられるが、血清又は血漿が好ましく、血清が特に好ましい。血液検体は、ヘパリン処理等の凝固防止処理が施されていてもよい。本発明における体液検体中の標的検出物質は、SH3BP5に対する抗体（体液抗体、自己抗体又は体液自己抗体として明細書中に記載されている）である。

【0020】

(b) 体液抗体捕捉抗原

本発明のデータ取得方法における体液抗体を捕捉する基礎であるSH3BP5蛋白質は、そのアミノ酸配列である配列番号2の全部を体液抗体捕捉抗原として用いることも、一部を用いることも可能である。配列番号2のアミノ酸配列の一部を体液抗体捕捉抗原として用いる場合は、配列番号2のアミノ酸配列から7-455個の連続したアミノ酸配列を

10

20

30

40

50

選んで体液抗体捕捉抗原とすることが可能である。より効率的な検出系の確立のために、比較的短い鎖長のアミノ酸配列（ペプチド）を選択することも可能であり、その場合のアミノ酸配列の個数は、7 - 30個程度が好適であり、さらに好適には10 - 20個程度である。

【0021】

また、配列番号2のアミノ酸配列の全部又は一部のうち、10%以下の個数のアミノ酸残基（小数点以下は切り捨て）が、改変（欠失、置換、又は、追加）されていてもよい。この場合、目的の体液抗体の捕捉が可能な限りのアミノ酸配列の改変であることが好ましい。

【0022】

「欠失」とは、対象となるアミノ酸配列におけるいずれかのアミノ酸残基が欠失しており、当該欠失したアミノ酸残基のN末端側（前）とC末端側（後）のアミノ酸残基がペプチド結合で結ばれた状態であり（N末端アミノ酸残基とC末端アミノ酸残基の欠失の場合は、当該アミノ酸残基が単に欠失した状態である）、当該欠失残基の個数が「アミノ酸欠失の個数」として数えられる。「置換」とは、対象となるアミノ酸配列におけるいずれかのアミノ酸残基が「他のアミノ酸残基」に入れ替わっており、当該入れ替わったアミノ酸残基が、N末端側（前）とC末端側（後）の各アミノ酸残基とペプチド結合で結ばれた状態であり（N末端アミノ酸残基の置換の場合はC末端側のアミノ酸残基とのペプチド結合のみであり、C末端アミノ酸残基の置換の場合はN末端側のアミノ酸残基とのペプチド結合のみである）、当該置換残基の個数が「アミノ酸置換の個数」として数えられる。「付加」とは、対象となるアミノ酸配列における、いずれか1箇所以上のペプチド結合の位置に、各々1個以上の新たなアミノ酸残基が挿入された状態で新たなペプチド結合が形成された状態である。N末端とC末端における新たな1個以上のアミノ酸残基の付加も、この「付加」の概念に含まれる。これらの「付加」されたアミノ酸残基の個数が「アミノ酸付加の個数」として数えられる。

【0023】

また、上記の「目的の体液抗体の捕捉が可能」とは、アミノ酸残基を改変した体液抗体捕捉抗原候補が、本願明細書の実施例の手法と同様の手法で体液抗体の捕捉を行った場合に、その捕捉抗体レベルに基づいて、目的とする動脈硬化症の病状把握が可能な程度を意味するものである。

【0024】

体液抗体捕捉抗原として用いられるペプチドのアミノ酸配列の具体例としては、配列番号3（SH3BP5-43:FRSVLVEATVKLDE）、配列番号4（SH3BP5-149:VHKETAARYNAAMG）、配列番号5（SH3BP5-161:MGRMRQLEKCLKRA）、配列番号6（SH3BP5-185:KAKYYVQLEQLKKT）、及び、配列番号7（SH3BP5-327:EFGMFPVLGPRSE）を挙げることができる。これらの体液抗体捕捉抗原として用いられるペプチドの中でも、配列番号5に示すアミノ酸配列のペプチドが好適である。これらの捕捉ペプチドのアミノ酸配列の改変可能な個数は、上記の基準より1個である。

【0025】

所定のアミノ酸配列の体液抗体捕捉抗原は、常法に従って確保することが可能である。具体的には、例えば上記の配列番号1に示す塩基配列等に基づいて、SH3BP5遺伝子の塩基配列の全部又は一部を有する二本鎖DNAを増幅するための核酸増幅用プライマーを設計し、当該増幅用プライマーを用いたPCR法等による遺伝子増幅産物を、SH3BP5遺伝子の全部又は一部として得て、これを用いてpGEX-4T等の原核細胞発現ベクターに組み込み、当該ベクターが組み込まれて形質転換した形質転換体を選択し、さらにIPTG(isopropyl-D-thiogalactoside)等の薬物を添加することにより所定のSH3BP5遺伝子の全部又は一部の発現を誘導し、発現されたSH3BP5蛋白質の全部又は一部を、例えば、glutathione-Sephrose(GE Healthcare Life Sciences)を用いたアフィニティークロマトグラフィー等により精製することができる。また、サイトスペシフィ

10

20

30

40

50

ック・ミュータジェネシス (Methods in Enzymology, 154, 350, 367-382 (1987); 同 100, 468 (1983); Nucleic Acids Res., 12, 9441 (1984)) 等の常法を用いることにより、SH3BP5 遺伝子の塩基配列の欠失、置換、又は、追加を行うことにより、対応する改変がなされた SH3BP5 蛋白質を得ることができる。

【0026】

特に、SH3BP5 蛋白質の一部の配列を持つペプチド (典型的には、上記のアミノ酸残基数 7 - 30 個の体液抗体捕捉抗原として用いられるペプチド) は、公知のペプチドの化学合成法に従い容易に製造することが可能である。ペプチド合成に関しては、今や常法として確立している液相ペプチド合成法、又は、固相ペプチド合成法を用いて製造することが可能である。そして、一般的に好適な化学合成法として認識されている固相ペプチド合成法として、Boc 固相法又は Fmoc 固相法を用いることが可能である。

10

【0027】

SH3BP5 蛋白質は、市販品を用いることも可能である。市販品には、既製品はもとより、注文に応じて製造される外注品も含まれる。

【0028】

また、これらの体液抗体捕捉抗原として用いられる蛋白質又はペプチド (体液抗体捕捉のための本質部分) には、必要に応じて適宜修飾構造を付加することができる。例えば、後述するように、AlphaLISA (Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay - Linked Immunosorbent Assay) 法において用いられる、GST (glutathione S-transferase) - 融合化蛋白質又はペプチドや、ビオチン融合化蛋白質又はペプチドとすること等も可能である。

20

【0029】

(c) 動脈硬化の進行に関するデータ取得方法について

本発明のデータ取得方法は、血液検体等の体液検体中の SH3BP5 蛋白質又はペプチドに対する体液抗体を定量し、その定量値が標準値よりも大きい場合に、体液検体提供者における SH3BP5 蛋白質の存在の亢進を認定し、これを指標として当該被験試料提供者の動脈硬化の進行に関するデータとすることが可能である。

【0030】

動脈硬化には、粥状動脈硬化 (アテローム性動脈硬化) の他に、細動脈硬化、中膜硬化が含まれる。

30

【0031】

本発明では、動脈硬化の進行に関する直接的なデータを取得することが可能である。すなわち、動脈硬化の進行による具体的な症状が認められない状態においても、動脈硬化の存在を把握することが可能である。この無症状の段階における動脈硬化に対して、リスクファクターを減ずる措置、例えば、食事指導、運動指導、禁煙指導等の生活習慣改善指導を行うことにより、動脈硬化の進行を抑制することが可能である。また、別個の手段により、高脂血症や高血圧が認められる場合には、抗コレステロール薬、降圧剤、血栓治療剤等の適切な薬剤の処方により、これらの動脈硬化のリスクファクターの進展を抑制することが可能である。

40

【0032】

また、本発明における動脈硬化の進行に関するデータは、動脈硬化関連疾患の検出データであり得る。すなわち、動脈硬化関連疾患の直接的な指標データとして、体液検体提供者における SH3BP5 蛋白質の存在の亢進データを用いることが可能である。

【0033】

上述したように動脈硬化関連疾患は、「動脈硬化に関係する疾患」であり、「動脈硬化が原因となって発症する疾患 (動脈硬化症)」と「動脈硬化の原因となる疾患」の双方を含むものである。動脈硬化の原因となる疾患としては、糖尿病、慢性腎臓病、脂質異常症、家族性高コレステロール血症、高血圧症、非心原性脳梗塞・末梢動脈疾患、睡眠時無呼吸症候群等が挙げられる。動脈硬化症としては、狭心症、心筋梗塞等の心血管障害の他、

50

脳梗塞、一過性脳虚血発作、脳出血、くも膜下出血、大動脈瘤、腎硬化症、閉塞性動脈硬化症、手足の壊死等が挙げられる。

【0034】

本発明では特に、上記動脈硬化関連疾患の検出データが、上記動脈硬化症の検出データである態様が挙げられる。

【0035】

被験試料におけるSH3BP5蛋白質に対する体液抗体レベルの標準値は、一般的な検査により動脈硬化が認められないと推定される者の標本集団を設定し、当該標本集団における当該被験試料のSH3BP5蛋白質に対する当該体液抗体の定量値を求め、これに統計処理を施して、平均、標準偏差等を求めることにより、カットオフ値を含めて導き出すことができる。

10

【0036】

当該体液抗体レベルの測定は、例えば、上述した体液抗体捕捉抗原（蛋白質、及びペプチドを含む）の固定化物に体液検体を接触させ、当該体液検体内のSH3BP5蛋白質に対する抗体（体液抗体）の当該体液抗体捕捉抗原との抗原抗体反応に基づく結合をシグナルとして検出することにより、行うことができる。具体的には、AlphaLISA法、ELISA法、間接蛍光抗体法、ウェスタンブロット法（免疫ブロット法）、比濁法、比臙法、ラテックス凝集比濁法、CLEIA法等の手段を用いて定量測定を行うことができる。ここに例示したいずれの定量測定手段も、定量標的物質を体液検体中の抗体とした場合の、確立した定量測定手段である。例えば、AlphaLISA法では、GST-融合SH3BP5抗原（蛋白質又はペプチド）を体液抗体捕捉抗原とする場合は、glutathione-結合ドナービーズを用い、biotin化SH3BP5体液抗体捕捉抗原とする場合はstreptavidin-結合ドナービーズを用い、体液抗体捕捉抗原、血液検体、及び抗ヒトIgG抗体を結合させたアクセプタービーズを混合し、数時間から数日、室温でインキュベートし、形成された抗原抗体複合体に680nmの光を照射し、発生した520-620nmの光を検出することにより、所望の体液抗体の定量を行うことができる。間接蛍光抗体法では、所定の体液抗体捕捉抗原を固定化したプロテインアレイに体液検体を接触させて、形成された体液抗体捕捉抗原-抗SH3BP5体液抗体複合体に対して、さらに蛍光標識を施した二次抗体を接触させて、SH3BP5に対する体液抗体を定量することができる。ELISA法は、間接蛍光抗体法で用いる二次抗体の標識を酵素標識として定量を行うものである。二次抗体の標識は多様に選択可能である。ウェスタンブロット法では、体液抗体捕捉抗原をSDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後に、ゲルからニトロセルロース膜等の担体に転写させ、体液検体を接触させて、生じた体液抗体捕捉抗原-抗SH3BP5体液抗体複合体を、二次抗体を用いて検出することにより定量測定を行うことができる。比濁法や比臙法では、体液検体と体液抗体捕捉抗原を接触させることにより形成された体液抗体捕捉抗原-抗SH3BP5体液抗体複合体を、濁度（比濁法）や、散乱光強度の変化（比臙法）で検出することにより定量を行うことができる。ラテックス凝集比濁法では、体液抗体捕捉抗原を結合させたラテックス粒子と体液検体とを接触させることにより、当該ラテックス粒子の凝集体をラテックス粒子に結合した体液抗体同士の相互作用により形成させて、これを検出することにより定量を行うことができる。CLEIA法では、体液抗体捕捉抗原の結合磁性粒子と体液検体を接触させて、磁性粒子上に体液抗体捕捉抗原-抗SH3BP5抗体複合体を形成させて集磁を行い、未反応物を除去して、適切な蛍光処理等を施して当該複合体を検出することにより定量測定を行うことができる。

20

30

40

【0037】

(2) 本発明のキットについて

本発明のキットにおいては、例えば、GST-融合SH3BP5抗原（蛋白質又はペプチド）、glutathione-結合ドナービーズ、及びアクセプタービーズの組、あるいは、biotin化SH3BP5抗原（蛋白質又はペプチド）、streptavidin-結合ドナービーズ及びアクセプタービーズの組を、AlphaLISA法を定量

50

測定手段として行うためのキットの構成として挙げることができる。

【0038】

また、体液抗体捕捉抗原を固定化したプレート、体液抗体に対する標識がなされた二次抗体、二次抗体の標識を顕在化させるための試薬を、ELISA法を定量測定手段として行うためのキットの構成として挙げることができる。

【0039】

また、体液抗体捕捉抗原を結合させたラテックス粒子を、ラテックス凝集比濁法を行うためのキット構成として挙げることができる。

【0040】

また、体液抗体捕捉抗原を結合させた磁性粒子と、体液抗体に対する標識がなされた二次抗体、二次抗体の標識を顕在化させるための試薬を、CLEIA法を行うためのキット構成として挙げることができる。

10

【0041】

ここに挙げたこれらのキットの構成はあくまでも例示であり、他の定量測定手段を行うためのキットも本発明キットの範囲に含まれる。さらに、ここに例示された上記の要素の構成をさらに少なくして、検査の外注又は自己調達の度合いを増やすように設定することも可能であり、逆に、希釈液や試薬用のチューブ等を構成として増やして、本発明のキットの即時使用を設定することも可能である。また、具体的な検査に応じた他の要素を加味することも可能である。

【実施例】

20

【0042】

以下、本発明の実施例を開示する。

【0043】

1. SH3BP5蛋白質の発現と精製

ヒトU2OS骨肉腫細胞からHigh Pure RNA Isolation Kit (Roche, Basel, Switzerland)を用いて全RNAを単離し、Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Thermo Fisher Scientific)を用いてcDNAを合成した。それを鋳型として、Pyrobest DNA polymerase (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)を用いたPCR法により、SH3BP5の全長cDNAを増幅し、Glutathione S-transferase (GST) 遺伝子部位がクローニングサイトの上流に設けられているプラスミドベクターpGEX-4T-1 (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA)のEcoRI/SalI部位に挿入して、遺伝子発現用の組換えプラスミドであるpGEX-4T-1-SH3BP5を作製し、DNAシーケンシングにより塩基配列を確認した。さらに、pGEX-4T-1-SH3BP5を大腸菌BL-21に導入して形質転換を行い、0.1mM IPTG (isopropyl-b-D-thiogalactoside)による、25、4時間処理により、SH3BP5 cDNAの発現を誘導した。誘導後、当該大腸菌を回収し、Bug Buster Master Mix (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)を加えて溶解し、蛋白質抽出液を得た。当該蛋白質抽出液中のGST-SH3BP5蛋白質は、glutathione-Sepharose (GE Healthcare Life Sciences)カラムクロマトグラフィーにより精製し、緩衝液をPBSに交換し、これをSH3BP5タンパク質抗原とした。対照としてGSTを同様に精製した。

30

40

【0044】

2. ペプチドアレイの作製

SH3BP5蛋白質の公開されているアミノ酸配列(配列番号2)からウェブ公開のエピトープ検索サイトプログラムProPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred/>)を用いて抗体認識部位を検索した。その結果、以下の5ヶ所の配列を得た。コント

50

ロールとしてC9orf156のエピトープ部位 (Accession number : NM_001080507) を検索し、当該エピトープの配列 (下記配列番号8) を得た。

【0045】

それぞれのアミノ酸配列を持つペプチド、合計6種類をKatoらの方法 (Kato R, Kaga C, Kunimatsu M, Kobayashi T, Honda H (2006) Peptide array-based interaction assay of solid-bound peptides and anchorage-dependent cells and its effectiveness in cell adhesive peptide design. J Biosci Bioeng 101: 485-495.) によりFmoc法を用いてメンブレン上で合成したペプチドアレイを作製した。

SH3BP5-43: FRSVLVEATVKLDE (配列番号3)

SH3BP5-149: VHKETAARYNAAMG (配列番号4)

SH3BP5-161: MGRMRQLEKCLKRA (配列番号5)

SH3BP5-185: KAKYYVQLEQLKKT (配列番号6)

SH3BP5-327: EFGMMFPVLGPRSE (配列番号7)

C9orf156-428: HMTGPPVGLVSLGS (配列番号8)

10

【0046】

このメンブレンをPBS-T-BSA [phosphate-buffered, 1% (w/v) bovine serum albumin, 0.05% Tween-20, 0.05% Na₂CO₃] で5回洗浄し、頸動脈のエコー検査で狭窄が認められなかった健常者血清 (検体番号HD#1)、及び、頸動脈のエコー検査で狭窄が認められた動脈硬化患者血清 (検体番号P#7) を200倍希釈して18時間反応させ、次いでこのメンブレンをPBS-T-BSAで5回洗浄し、さらに、10000倍希釈したFITC-conjugated goat anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) と1時間反応させ、再度の洗浄後、488nm/520nmフィルターを用いて検出される蛍光を、Typhoon 9400 Imager (GE Healthcare Life Sciences) で測定した。

20

【0047】

図1に、上記ペプチドアレイでのアッセイの結果を示す。具体的には、上記6種類のペプチドを搭載したメンブレンを、上記健常者血清 (検体番号HD#1)、及び動脈硬化患者血清 (検体番号P#7) と反応させ、6種類各々のペプチドに結合した血清IgGを、蛍光標識二次抗体を用いて検出し、これらの検出結果を蛍光レーザースキャナーによるイメージとして示す。矢印は患者血清IgGと反応した陽性スポットを示す。

30

【0048】

図1に示す通り、動脈硬化患者の血清に対してペプチド「SH3BP5-161」 (配列番号5) が特に強く反応し、動脈硬化患者の血清において当該ペプチドに対する抗体、すなわち、SH3BP5蛋白質に対する抗体が存在することが明らかになった。

【0049】

3. AlphaLISA法による解析

(1) AlphaLISA法

AlphaLISA法 (Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay) を、上記の試験で血清中のSH3BP5抗体に最も鋭敏に反応したペプチドタイプの体液抗体捕捉抗原であるSH3BP5-161 (配列番号5: 以下の実施例で「SH3BP5ペプチド」と記載されているものは、特に断らない限りは、この配列番号5のアミノ酸配列のペプチドである) と、SH3BP5蛋白質 (配列番号2: 以下の実施例で「SH3BP5蛋白質」と記載されているものは、特に断らない限りは、この配列番号2の全アミノ酸配列の蛋白質である) を主な検出対象として行った。具体的には、384穴マイクロタイタープレート (white opaque OptiPlate™, Perkin Elmer, Waltham, MA) を用いて行った。各ウェルに、AlphaLISA専用緩衝液 (25mM HEPES, p

40

50

H7.4, 0.1% casein, 0.5% Triton X-100, 1mg/mL dextran-500, 0.05% Proclin-300)で100倍希釈した血清を、2.5 μ L、及び、抗原となるGST、またはGST-SH3BP5蛋白質(10 μ g/mL)、又はビオチン化ペプチド(bSH3BP5-161)(400ng/mL)を、AlphaLISA専用緩衝液に希釈して混合した。6-8時間室温でインキュベートした後、anti-human IgG-conjugated acceptor beads(2.5 μ L at 40 μ g/mL)、及び、glutathione-、またはstreptavidin-conjugated donor beads(2.5 μ L at 40 μ g/mL)をAlphaLISA専用緩衝液に希釈して混合した。1-14日間、室温で放置した後、EnSpire Alpha microplate reader(PerkinElmer)で生じた光子の数を測定して、「Alpha Count」とした。GST-SH3BP5タンパク質の場合はコントロールのGSTを、bSH3BP5-161ペプチドの場合は緩衝液コントロールの値を差し引いてSH3BP5抗原に特異的な抗体レベルを算出した。

10

【0050】

(2) AlphaLISA法を用いた糖尿病患者における検討

AlphaLISA法により、糖尿病(DM)患者と健常者におけるGST-SH3BP5蛋白質、及びbSH3BP5-161ペプチド、に対する血清抗体レベルを測定した。DM患者血清、及び、健常者血清は千葉大学医学部附属病院において、各被験者のインフォームドコンセントを得て採取した。GST-SH3BP5蛋白質、及びbSH3BP5-161ペプチドに対する血清抗体レベルはどちらも健常者血清に比べ、DM患者血清において有意に高かった(図2、表1)。

20

【0051】

表1は、DM患者血清と健常者血清におけるSH3BP5抗体レベルの比較解析結果、すなわち、図2に示すAlphaLISA法による結果のデータ解析結果を示している。表1の上から、健常者検体の平均値、SD、カットオフ値(平均値+2SD)、全検体数、カットオフ値以上を示す陽性検体数、陽性率、及び、DM患者検体の平均値、SD、全検体数、カットオフ値以上を示す陽性検体数、陽性率、及び、健常者検体と患者検体を比較した時のP値を示す。P値が0.05以下、または陽性率が10%以上の値を太字で示した。

30

【0052】

【表 1】

		SH3BP5-GST	bSH3BP5-161
HD	Average	1,850	1,387
	SD	955	737
	Cut-off value	3,760	2,861
	Total No.	81	81
	Positive No.	3	5
	Positive rate (%)	3.7%	6.2%
DM	Average	3,087	2,428
	SD	2,244	2,202
	Total No.	275	275
	Positive No.	61	76
	Positive rate (%)	22.2%	27.6%
<i>P</i> value		4.75E-12	9.90E-11

10

20

【0053】

カットオフ値を健常者検体の平均値 + 2SD に設定したときの陽性率は、健常者で 3.7%、DM で 22.2% であった (表 1)。ROC (receiver operating curve) 解析で得られた AUC 値 (areas under the curve) は SH3BP5 蛋白質で 0.722、SH3BP5 ペプチドで 0.702 であった。同様に ROC 解析で得られた SH3BP5 蛋白質における感度は 53.5%、特異度は 83.5%、SH3BP5 ペプチドにおける感度は 53.1%、特異度は 81.2% であった (図 2 b、d)。このことは SH3BP5 - 161 ペプチドのエピトープ領域が、タンパク質全体の血清抗体との反応を反映していることを示している。

【0054】

(3) AlphaLISA 法を用いた一過性脳虚血発作 (TIA) 患者と急性期脳梗塞 (aCI) 患者における検討

次に TIA 患者と aCI 患者における GST - SH3BP5 蛋白質、及び bSH3BP5 - 161 ペプチドに対する血清抗体レベルを AlphaLISA 法により検討した。健常者検体はポートスクエア柏戸クリニックにおいて頭部 MRI 検査で異常の認められない被験者から得た。TIA と aCI の患者血清は千葉県立佐原病院、千葉労災病院、千葉市立青葉病院、及び千葉メディカルセンターにおいて入手した。AlphaLISA 法による結果は、GST - SH3BP5 蛋白質、及び bSH3BP5 - 161 ペプチドの抗体レベルは TIA、aCI のどちらの患者血清においても有意に高かった (図 3 a、3 b)。カットオフ値を健常者検体の平均値 + 2SD に設定した時の SH3BP5 蛋白質の抗体レベルの陽性率は、健常者で 0.8%、TIA 患者で 15.6%、aCI 患者で 15.2% であった (表 2)。表 2 は、TIA 患者と aCI 患者と健常者血清における SH3BP5 抗体レベルの比較解析結果、すなわち、図 3 に示す AlphaLISA 法によるデータ解析結果、を示している。表 2 に表示されている数値の種類は表 1 と同様である。

30

40

【0055】

【表 2】

		SH3BP5-GST	bSH3BP5-161
HD	Average	11820	2575
	SD	4,336	1,374
	Av+2SD (Cut-off)	20,492	5,323
	Total No.	123	123
	Positive No.	1	6
	Positive (%)	0.8%	4.9%
TIA	Average	15,188	3,641
	SD	5,693	2,217
	Total No.	77	77
	Positive No.	12	14
	Positive (%)	15.6%	18.2%
	P (P vs HD)	0.00002	0.00025
aCI	Average	14,285	3,485
	SD	5,901	2,270
	Total No.	158	158
	Positive No.	24	25
	Positive (%)	15.2%	15.8%
	P (P vs HD)	0.00007	0.00004

10

20

【0056】

SH3BP5ペプチドに対する抗体レベルの陽性率はそれぞれ4.9%、18.2%、15.8%であった。ROC解析により得られたTIAのAUC値はSH3BP5タンパク質抗原で0.670、SH3BP5ペプチド抗原で0.655であった。aCIのAUC値はそれぞれ0.614と0.620であった(図3c、3f)。従って、SH3BP5の抗体マーカーはTIAとaCIの診断に有用である。

30

【0057】

(4) AlphaLISA法を用いた心血管障害(CVD)患者と睡眠時無呼吸症候群(OSA)患者における検討

次に急性心筋梗塞や不安定狭心症等を含むCVDの患者血清におけるSH3BP5抗体レベルをAlphaLISA法により検討した。CVD患者血清は千葉大学医学部附属病院、及び、京都大学医学部附属病院において採取した。SH3BP5蛋白質、及びSH3BP5ペプチドに対する抗体レベルは、どちらの体液抗体捕捉抗原においても、健常者血清に比べてCVD患者血清において有意に高かった(図4a、4c)。

40

【0058】

さらに睡眠時無呼吸症候群obstructive sleep apnea(OSA)は動脈硬化に関係し、CIやCVDの高リスク因子であるので、これに関してもSH3BP5抗体レベルを検討した。OSA患者血清は千葉大学医学部附属病院において採取した。SH3BP5蛋白質、及びSH3BP5ペプチドに対する抗体レベルは、どちらも健常者血清に比べて、OSA患者血清において有意に高かった(表3)。

表3は、上述のようにCVDとOSAの患者血清と健常者血清におけるSH3BP5抗体レベルの比較解析結果を示している。表3中表示されている数値の種類は表1と同様である。

50

【 0 0 5 9 】

【 表 3 】

		SH3BP5-GST	bSH3BP5-161
HD	HD Av	2,470	872
	HD SD	1,316	798
	HD Av+2SD	5,103	2,468
	HD Av+3SD	6,419	3,266
	HD Total No.	78	78
	HD Positive No.	5	5
	HD Positive (%)	6.4%	6.4%
CVD	P Av	3,092	1,336
	P SD	1,666	1,090
	P Total No.	100	100
	P Positive No.	8	13
	P Positive (%)	8.0%	13.0%
	P (P vs HD)	0.0060	0.0013
OSA	P Av	3,124	1,335
	P SD	2,074	1,578
	P Total No.	86	86
	P Positive No.	10	11
	P Positive (%)	11.6%	12.8%
	P (P vs HD)	0.016	0.018

10

20

30

【 0 0 6 0 】

表 3 において、SH3BP5 蛋白質に対する抗体レベルの陽性率は健常者で 6.4%、CVD 患者で 8.0%、OSA 患者で 11.6%であった。SH3BP5 ペプチドに対する抗体レベルの陽性率は健常者で 6.4%、OSA 患者で 12.8%であった。また、SH3BP5 ペプチドに対する抗体レベルの陽性率は健常者で 6.4%、CVD 患者で 13.0%、OSA 患者で 12.8%であった。

【 0 0 6 1 】

一方、ROC 解析により得られた AUC 値は、SH3BP5 蛋白質で 0.653、SH3BP5 ペプチドで 0.687 であった (図 4 b、4 d)。

【 0 0 6 2 】

これらの結果は、SH3BP5 血清抗体レベルは、健常者に対して CVD と OSA の患者を識別できることを示している。

40

【 0 0 6 3 】

(5) AlphasLISA 法を用いた慢性腎臓病 (CKD) 患者における検討

次に動脈硬化に関連する CKD の患者血清における SH3BP5 抗体レベルを、AlphasLISA 法を用いて調べた。CKD 患者血清は熊本コホートにより収集した。CKD はタイプ 1 : 糖尿病性腎症、タイプ 2 : 腎硬化症、タイプ 3 : 糸球体腎症、に分類した。健常者検体は千葉大学医学部附属病院において採取したものをを用いた。SH3BP5 蛋白質、及び SH3BP5 ペプチドに対する抗体レベルは共に、健常者血清に比べて全てのタイプの CKD 患者血清において有意に高かった (図 5 a、4 e)。SH3BP5 蛋白質を用いた時の陽性率は、健常者で 2.4%、タイプ 1 で 15.2%、タイプ 2 で 12.5%、

50

タイプ3で4.1%であり、ペプチド抗原を用いた時の陽性率は、健常者で2.4%、タイプ1で25.5%、タイプ2で28.1%、タイプ3で13.0%であった(表4)。ROC解析により得られたタイプ2CKDのAUC値は、SH3BP5タンパク質抗原で0.789、ペプチド抗原で0.839と非常に高かった(図5c、5g)。

【0064】

表4は、CKDタイプ1、タイプ2、タイプ3の患者血清と健常者血清におけるSH3BP5抗体レベルの比較解析結果を示している。表4に表示されている数値の種類は表1と同様である。

【0065】

【表4】

		SH3BP5-GST	bSH3BP5-161
HD	HD Av	1,839	1,839
	HD SD	1,887	902
	HD Av+2SD	5,614	3,644
	HD Total No.	82	82
	HD Positive No.	2	2
	HD Positive (%)	2.4%	2.4%
Type 1 CKD	P Av	3,467	3,011
	P SD	3,094	1,660
	P Total No.	145	145
	P Positive No.	22	37
	P Positive (%)	15.2%	25.5%
	P (P vs HD)	1.67E-06	5.61E-11
Type 2 CKD	P Av	3,392	3,052
	P SD	2,530	1,183
	P Total No.	32	32
	P Positive No.	4	9
	P Positive (%)	12.5%	28.1%
	P (P vs HD)	0.0029	0.0000041
Type 3 CKD	P Av	2,335	2,602
	P SD	1,692	1,347
	P Total No.	123	123
	P Positive No.	5	16
	P Positive (%)	4.1%	13.0%
	P (P vs HD)	0.057	0.0000024

【0066】

(6) AlphaLISA法を用いた癌患者における検討

多くの体液自己抗体が、癌患者において検出されるので、食道扁平上皮癌(esophageal squamous cell carcinoma)、及び大腸癌(colon carcinoma)の患者検体について、上記と同様にAlphaLISA法を用いて、血清中のSH3BP5抗体レベルを調べた。患者血清は東邦大学附属病院において採取した。SH3BP5蛋白質に対する抗体レベルは、健常者血清に比べて食道癌、及び大腸癌の患者血清において有意に高かったが、陽性

10

20

30

40

50

率はともに10%以下であった(表5)。SH3BP5ペプチドに対する抗体レベルは食道癌で高値を示したが、P値は0.011程度であり、大腸癌では有意差を認めなかった。このことは、SH3BP5蛋白質抗原よりもSH3BP5ペプチド抗原に対する抗体レベルの方が動脈硬化症により特異的に対応するマーカーであることを示す。

【0067】

表5は、食道癌(Eso SCC)、及び大腸癌(Colon Ca)の患者血清と健常者血清におけるSH3BP5抗体レベルの比較解析結果を示している。表示されている数値の種類は表1と同様である。

【0068】

【表5】

10

		SH3BP5-GST	bSH3BP5-161
HD	HD Av	1,072	4,902
	HD SD	1,166	3,258
	HD Av+2SD	3,405	11,419
	HD Total No.	64	64
	HD Positive No.	1	3
	HD Positive (%)	1.6%	4.7%
Eso SCC	P Av	1,786	6,766
	P SD	977	4,746
	P Total No.	64	64
	P Positive No.	6	7
	P Positive (%)	9.4%	10.9%
	P (P vs HD)	0.00027	0.011
Colon Ca	P Av	1,653	5,928
	P SD	1,370	3,332
	P Total No.	64	64
	P Positive No.	6	4
	P Positive (%)	9.4%	6.3%
	P (P vs HD)	0.011	0.081

20

30

【0069】

4. 相関解析

次に、SH3BP5ペプチドに対する血清抗体レベルと被験者データについて、Spearmanの相関解析、及び多変量解析を行った。被験者データは以下のものを用いた。

40

【0070】

年齢、性別、身長、体重、body mass index (BMI)、血圧、現在の症状[aCI、TIA、慢性脳梗塞(cCI)、無症候性脳梗塞(asympt CI)]、最大頸動脈内膜中膜肥厚(maximum intima-media thickness; max IMT)、生活習慣(喫煙習慣、喫煙期間、飲酒習慣、飲酒頻度)、合併症(高血圧、CVD、DM、高脂血漿)、及び、血液検査データ[LDL-cholesterol(LDL-C)、alkaline phosphatase(ALP)、total cholesterol(T-CHO)、chlorine(Cl)、HDL-cholesterol(HDL-C)、potassium(K)、cre

50

atinine (CRE)、g-glutamyl transpeptidase (g-GTP)、uric acid (UA)、glycated hemoglobin (HbA1c)、albumin (ALB)、total Protein (TP)、sodium (Na)、alanine aminotransferase (ALT)、triglyceride (TG)、estimated glomerular filtrating ratio (eGFR)、aspartate aminotransferase (AST)、cholinesterase (CHE)、blood urea nitrogen (BUN)、total bilirubin (tBil)、blood sugar (BS)、lactate dehydrogenase (LDH)、albumin/globulin ratio (A/G)]である。

10

【0071】

上記の相関解析を、県立佐原病院において採取した741血清検体について行った。その内訳は、健常者：139例、白質軟化：79例、asympt CI：15例、TIA：29例、aCI：227例、cCI：58例、及び疾患対照群：194例である。多変量解析の結果は、SH3BP5ペプチドに対する抗体レベルは、cCIやasympt CIよりも、aCIやTIAにより相関していることを示していた(表6)。Spearman相関解析と多変量解析の両者とも、max IMT、喫煙期間、及び年齢と相関していることを示した。また、Spearman相関解析は血圧、及び、合併症の高血圧と相関関係を示した。これらの結果から、SH3BP5血清抗体マーカーは高血圧や喫煙習慣により引き起こされる動脈硬化症に起因するcCIやTIAを識別していると考えられた。

20

【0072】

上記のように表6は、SH3BP5ペプチド抗原に対する血清抗体レベルと被験者データの相関解析の結果、すなわち、千葉県立佐原病院において採取された741血清検体についてSpearmanの相関解析、及び多変量解析を行った結果を示している。表6(表6-1と表6-2に分割)には、各解析による相関係数とP値を示す。太字は有意な相関解析を示す。

【0073】

【表 6 - 1】

	Subjects' information	Abbreviation	Spearman		Multivariate		
			r value	P value	r value	P value	
General	Age		0.123	0.0016	0.123	0.0022	
	Gender		-0.020	0.6079	0.046	0.2534	
	Body height	Height	-0.070	0.0710	-0.042	0.3002	
	Body weight	Weight	-0.037	0.3361	0.030	0.4597	10
	Body mass index	BMI	0.008	0.8336	-0.027	0.4981	
	Blood pressure	BP	0.121	0.0023	0.043	0.2817	
Present disease	Acute-phase cerebral infarction	aCI	0.123	0.0015	-0.247	4.3E-10	
	Transient ischemic attack	TIA	0.020	0.6062	-0.070	0.0790	
	Chronic-phase cerebral infarction	cCI	0.093	0.0170	-0.077	0.0550	20
	Asymptomatic cerebral infarction	asympt-CI	0.029	0.4505	-0.047	0.2403	
Artery stenosis	Maximum intima-media thickness	max IMT	0.159	0.0007	0.081	0.0443	
Life style	Smoking habit (Yes/No)		0.092	0.0174	-0.048	0.2356	
	Smoking period		0.135	0.0005	0.150	0.0002	30
	Alcohol intake habit (Yes/No)		0.030	0.4346	0.019	0.6338	
	Alcohol intake frequency		0.070	0.0737	0.033	0.4054	
Blood test	LDL-cholesterol	LDL-C	-0.108	0.0449			
	Alkaline phosphatase	ALP	0.082	0.0458	0.070	0.0818	
	Total cholesterol	T-CHO	-0.068	0.1047	-0.028	0.4820	40
	Chlorine	Cl	0.056	0.1536	-0.017	0.6775	
	HDL-cholesterol	HDL-c	-0.053	0.2696	0.022	0.5873	

【 0 0 7 4 】

【表 6 - 2】

	Subjects' information	Abbreviation	Spearman		Multivariate		
			r value	P value	r value	P value	
Blood test	Potassium	K	0.030	0.4415	0.006	0.8854	
	Creatinine	CRE	0.030	0.4447	0.014	0.7266	
	Gamma-glutamyl transpeptidase	γ -GTP	0.030	0.4660	0.020	0.6196	10
	Uric acid	UA	0.024	0.5948	0.054	0.1766	
	Glycated hemoglobin	HbA1c	0.023	0.6079	0.017	0.6773	
	Albumin	ALB	-0.018	0.6444	0.062	0.1228	
	Total Protein	TP	-0.016	0.6827	-0.054	0.1761	
	Sodium	Na	0.014	0.7159	0.042	0.2970	
	Alanine aminotransferase	ALT (GPT)	0.012	0.7503	-0.002	0.9638	20
	Triglyceride	TG	0.013	0.7872	0.003	0.9463	
	Estimated glomerular filtrating ratio	eGFR	-0.011	0.8026	0.004	0.9193	
	Aspartate aminotransferase	AST (GOT)	0.008	0.8330	-0.040	0.3132	
	Cholinesterase	CHE	-0.005	0.9054	-0.025	0.5275	
	Blood urea nitrogen	BUN	-0.003	0.9349	0.011	0.7897	30
	Total bilirubin	tBil	-0.002	0.9609	-0.034	0.3965	
	Blood sugar	BS	-0.001	0.9761	0.037	0.3596	
	Lactate dehydrogenase	LDH	0.000	0.9932	0.026	0.5101	
Albumin/globulin ratio	A/G	0.000	0.9967	-0.057	0.1538		
Complication	Hypertension (Yes/No)	HT	0.130	0.0008	0.025	0.5364	40
	Cardiovascular disease (Yes/No)	CVD	0.065	0.0958	0.067	0.0930	
	Diabetes mellitus (Yes/No)	DM	0.026	0.4987	-0.013	0.7453	
	Dyslipidemia (Yes/No)		0.007	0.8503	-0.018	0.6500	

【産業上の利用可能性】

【0075】

S H 3 B P 5 血清抗体レベルの上昇が、直接動脈硬化の存在と関わり合っていたことと

50

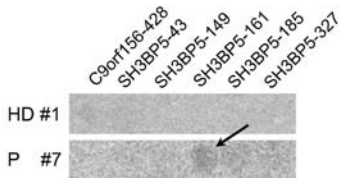
併せて、DM、TIA、aCI、CVD、CKD等の多様な動脈硬化関連疾患の患者血清において上昇していること、及び、max IMTや高血圧と相関していることから、SH3BP5血清抗体レベルの上昇は、動脈硬化自体の進行度を反映するマーカーであると考えられる。このマーカーは高血圧や喫煙習慣に相関していることから、このマーカーが陽性の被験者は、血圧低下や禁煙に務めることにより、進行している動脈硬化を抑制することが可能であると考えられる。

【0076】

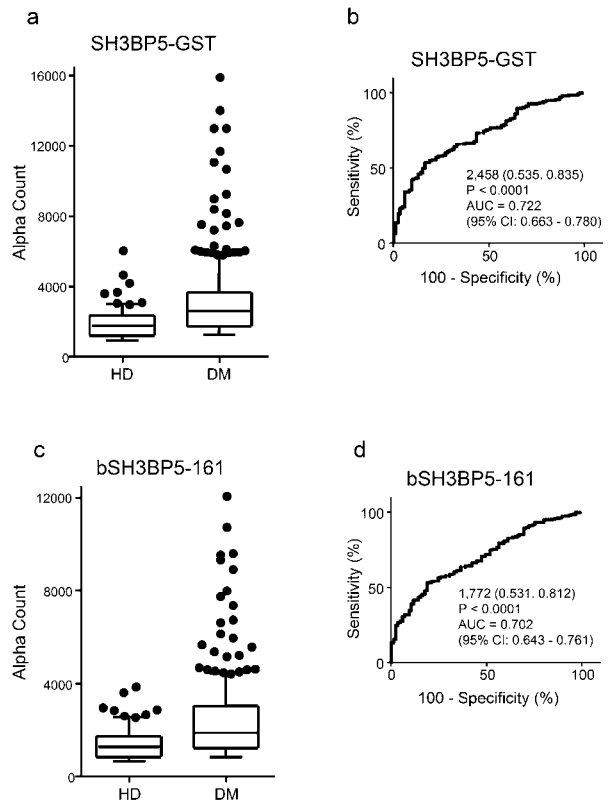
aCIやCVDの患者検体は発症後2週間以内に採取したものであり、その間に新しく自己抗体が出現する可能性は低いことから、SH3BP5血清抗体は発症前から存在していたと考えられる。従って、このマーカーは動脈硬化症の発症予測にも適用可能である。特に、脳梗塞や心筋梗塞の発症を予測することにより発症予防が可能になれば、社会的に大きな意味を持つ。実際に、aCIの前段階と言われるTIAの患者血清においてもSH3BP5自己抗体が高値であったことは、実施例に示した通りである。

10

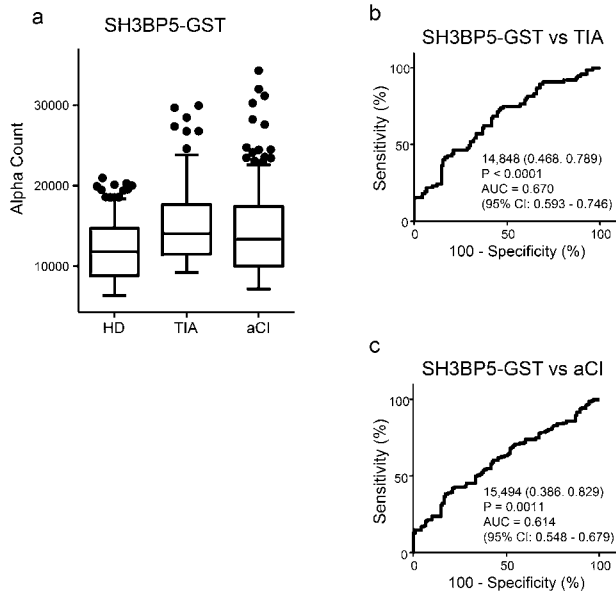
【図1】



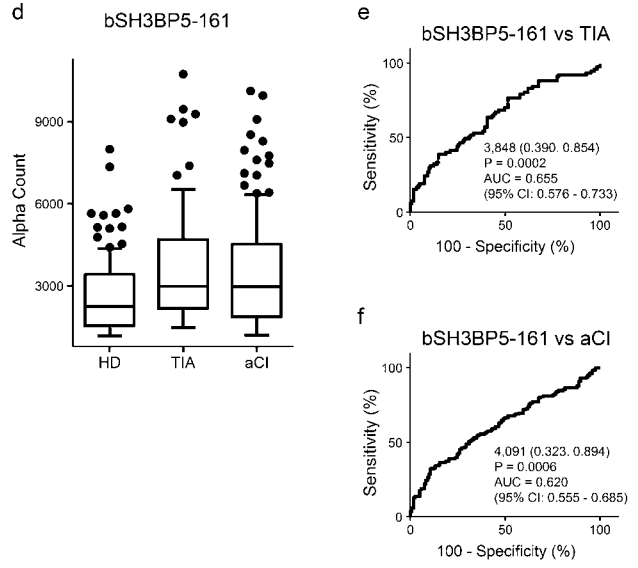
【図2】



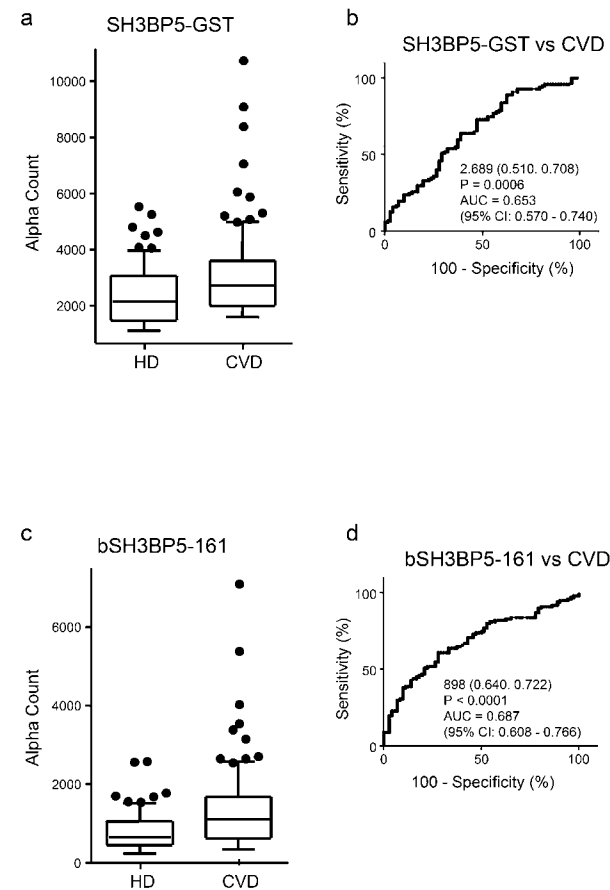
【 図 3 - 1 】



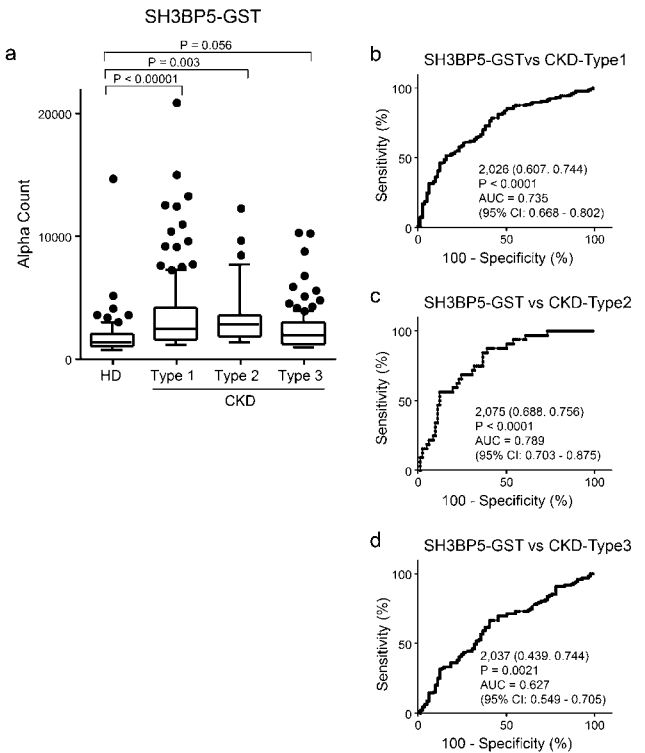
【 図 3 - 2 】



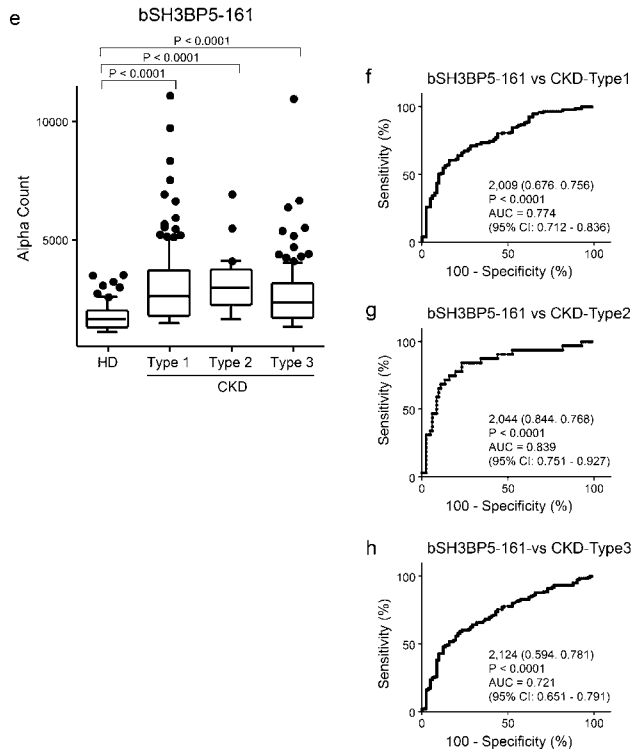
【 図 4 】



【 図 5 - 1 】



【 図 5 - 2 】



【 配 列 表 】

[2018080976000001.app](#)

フロントページの続き

(72)発明者 富吉 郷

埼玉県久喜市桜田5丁目13番1号 藤倉化成株式会社 開発研究所内

(72)発明者 日和佐 隆樹

千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内

专利名称(译)	检测动脉硬化的方法		
公开(公告)号	JP2018080976A	公开(公告)日	2018-05-24
申请号	JP2016222657	申请日	2016-11-15
[标]申请(专利权)人(译)	藤仓化成株式会社		
申请(专利权)人(译)	藤仓化成株式会社 国立大学法人千叶大学		
[标]发明人	黒田英行 中村利華 富吉郷 日和佐隆樹		
发明人	黒田 英行 中村 利華 富吉 郷 日和佐 隆樹		
IPC分类号	G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.N		
代理人(译)	志村光晴		
其他公开文献	JP2018080976A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：寻找能够直接掌握动脉硬化进展的标志物，提供预防或治疗动脉硬化本身的动机，以及掌握动脉硬化相关疾病的病理学手段，包括准确的动脉硬化待用。解决方案：已经发现，通过测量体液样本中针对SH3BP5蛋白或其部分的抗体水平，可以获得关于动脉硬化进展的直接数据。【选择图】无

(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2018-80976 (P2018-80976A)
		(43) 公開日 平成30年5月24日(2018.5.24)
(51) Int. Cl. G01N 33/53 (2006.01)	F I G01N 33/53 N	テーマコード(参考)
	審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 24 頁)	
(21) 出願番号 (22) 出願日	特願2016-222657 (P2016-222657) 平成28年11月15日(2016.11.15)	(71) 出願人 000224123 藤倉化成株式会社 東京都板橋区蓮根三丁目2-0番7号 304021831 国立大学法人千葉大学 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番3-3号 100103160 弁理士 志村 光晴
		(72) 発明者 黒田 英行 埼玉県久喜市核田5丁目1-3番1号 藤倉化成株式会社 開発研究所内 中村 利華 埼玉県久喜市核田5丁目1-3番1号 藤倉化成株式会社 開発研究所内
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】	動脈硬化の検出方法	