

(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2005-151854

(P2005-151854A)

(43) 公開日 平成17年6月16日(2005.6.16)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/47	C O 7 K 14/47	4 B O 6 3
C O 7 K 16/18	C O 7 K 16/18	4 B O 6 4
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 A	4 H O 4 5
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53 D	
審査請求 未請求 請求項の数 19 O L (全 14 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-393161 (P2003-393161)	(71) 出願人	503360115 独立行政法人科学技術振興機構
(22) 出願日	平成15年11月21日(2003.11.21)		埼玉県川口市本町4丁目1番8号
		(74) 代理人	100107984 弁理士 廣田 雅紀
		(72) 発明者	久保田 基夫 千葉県千葉市緑区おゆみ野中央4-5-1 6
		(72) 発明者	町田 利生 千葉県千葉市若葉区加曾利町1475-8 0
		(72) 発明者	内野 福生 千葉県千葉市緑区あすみが丘9-30-1 0
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ヒトくも膜下出血診断用マーカー及びその使用

(57) 【要約】

【課題】 くも膜下出血病変の検出及び診断に用いる、くも膜下出血病変を特異的に検出可能なくも膜下出血診断用ポリペプチドマーカー及びくも膜下出血診断用遺伝子マーカー、該くも膜下出血診断用ポリペプチドに特異的に結合する抗体、該くも膜下出血診断用遺伝子の発現を検出するプローブ、更には該マーカーを用いたくも膜下出血病変の検出及び診断方法を提供すること。

【解決手段】 配列表の配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、又は23に示されるアミノ酸配列のポリペプチド、及び、その遺伝子を、くも膜下出血病変を特異的に検出することが可能なくも膜下出血診断用ポリペプチドマーカー及びくも膜下出血診断用遺伝子マーカーとして用いる。本発明は、該くも膜下出血診断用ポリペプチドマーカーを検出するための抗体、及び、該くも膜下出血診断用遺伝子マーカーを検出するためのDNAプローブ等を包含する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列表の配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、又は 23 に示されるアミノ酸配列、又はその部分アミノ酸配列を有するヒトくも膜下出血診断用ポリペプチドマーカ。

【請求項 2】

請求項 1 記載のポリペプチドをコードする塩基配列からなるヒトくも膜下出血診断用遺伝子マーカ。

【請求項 3】

塩基配列が、配列表の配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、又は 24 に示される DNA 配列を有することを特徴とする請求項 2 記載のヒトくも膜下出血診断用遺伝子マーカ。 10

【請求項 4】

請求項 1 記載のポリペプチドを用いて誘導され、該ポリペプチドに特異的に結合することを特徴とする抗体。

【請求項 5】

抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 4 記載の抗体。

【請求項 6】

抗体が、ポリクローナル抗体であることを特徴とする請求項 4 記載の抗体。

【請求項 7】

請求項 2 又は 3 記載の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA 配列を有するヒトくも膜下出血マーカ遺伝子検出用プローブ。 20

【請求項 8】

請求項 3 記載の塩基配列のアンチセンス鎖の全部又は一部からなる請求項 7 記載のヒトくも膜下出血マーカ遺伝子検出用プローブ。

【請求項 9】

請求項 7 又は 8 記載の DNA の少なくとも 1 つ以上を固定化させたことを特徴とするヒトくも膜下出血マーカ遺伝子検出用マイクロアレイ又は DNA チップ。

【請求項 10】

請求項 4 ~ 6 のいずれか記載の抗体を用いて、被検試料におけるヒトくも膜下出血診断用マーカポリペプチドの発現を検出することを特徴とするヒトくも膜下出血病変の検出及び診断方法。 30

【請求項 11】

ヒトくも膜下出血診断用マーカポリペプチドの発現の検出を、ウェスタンブロット法、ELISA 法、プロテインアレイ法、放射線免疫検定法、蛍光抗体法、又は SEREX 法を用いて行うことを特徴とする請求項 10 記載の動脈硬化の検出及び診断方法。

【請求項 12】

被験体からの血清を、請求項 1 記載のヒトくも膜下出血診断用マーカポリペプチドと反応させ、被験体における血清抗体の発現を検出することを特徴とするヒトくも膜下出血病変の検出及び診断方法。 40

【請求項 13】

請求項 7 又は 8 記載の診断用プローブを用いて、被検細胞におけるヒトくも膜下出血マーカ遺伝子の発現を検出することを特徴とするヒトくも膜下出血病変の検出及び診断方法。

【請求項 14】

ヒトくも膜下出血マーカ遺伝子の発現の検出を、ノーザンブロット法を用いて行うことを特徴とする請求項 13 記載のヒトくも膜下出血病変の検出及び診断方法。

【請求項 15】

ヒトくも膜下出血マーカ遺伝子の発現の検出を、請求項 9 記載のヒトくも膜下出血マーカ遺伝子検出用マイクロアレイ又は DNA チップを用いて行うことを特徴とする請求項 50

13記載のヒトくも膜下出血病変の検出及び診断方法。

【請求項16】

請求項13～14のいずれか記載のヒトくも膜下出血マーカー遺伝子の発現の検出が、定量的又は半定量的PCRの使用を含んでいることを特徴とするヒトくも膜下出血病変の検出及び診断方法。

【請求項17】

定量的又は半定量的PCRの使用が、RT-PCR法であることを特徴とする請求項16記載の動脈硬化の検出及び診断方法。

【請求項18】

被検細胞における遺伝子を、所定のセンスプライマー及びアンチセンスプライマーの少なくとも1対以上のプライマーを用いて増幅し、増幅した遺伝子を請求項7又は8記載の動脈硬化マーカー遺伝子検出用プローブを用いて検出することを特徴とする請求項13記載のヒトくも膜下出血病変の検出及び診断方法。

10

【請求項19】

請求項7又は8記載のヒトくも膜下出血マーカー遺伝子検出用プローブ、該プローブを固定した請求項9記載のヒトくも膜下出血マーカー遺伝子検出用マイクロアレイ又はDNAチップ、及び請求項4～6のいずれか記載の抗体の少なくとも一つ以上を装備してなるヒトくも膜下出血病変の検出及び診断用キット。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトくも膜下出血病変の検出及び診断に関し、特に、ヒトくも膜下出血病変を特異的に検出及び診断するのに用いるヒトくも膜下出血診断用ポリペプチドマーカー及びヒトくも膜下出血診断用遺伝子マーカー、更には該マーカーを用いたヒトくも膜下出血病変の検出及び診断方法に関する。

【背景技術】

【0002】

くも膜下出血の病変は、クモ膜下腔に出血する病徴であり、その原因は脳動脈瘤破裂によるものが最大の原因となっている。動脈瘤は動脈が内圧に対する抵抗性を減じて瘤状に拡張した状態であり、その原因は、動脈瘤一般には、(1)動脈硬化、(2)外傷、(3)非特異性動脈炎、(4)特発性嚢状中膜壊死、(5)梅毒、(6)細菌感染、(7)狭窄後拡張などが挙げられる。近年は、動脈硬化に起因するものが多いと報告されている。くも膜下出血の病変の症状は、クモ膜下腔に広がった血液による髄膜刺激症状及び脳圧亢進症状が前景となり、前者では頂部硬直、Kernig徴候、Brudzinski徴候などの髄膜刺激症状が出、後者では、頭痛、吐気、咽吐、更には眼底出血などが出現する。破裂脳動脈瘤による出血では、意識障害が出現する。脳動脈瘤の発生には、疫学的調査により、比較的強い遺伝的背景があることが知られている(Neurosurgery, 46(6)1301-1306, 2000)。

30

【0003】

脳動脈瘤の診断は、従来実用的には、血液・生化学的診断法は採用されておらず、MRIやCT scanなどの放射線学的診断方法が行われている。

40

【0004】

最近、脳動脈瘤の診断に関連して、いくつかの生化学的診断法が開示されている。例えば、ヒト・エラスチン遺伝子のイントロンの部分の遺伝子多型を同定することにより、脳動脈瘤の発症のリスクの存在を判定するもの(特開2002-238577号公報)、 $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$ 共輸送体タンパク質の抗体を用いて脳梗塞やクモ膜下出血等の脳障害の診断を行うもの(特開2000-236885号公報、WO00/37637)、体液試料中のヒト脳型プロスタグランジンD合成酵素(hPGDS)の濃度を指標としてクモ膜下出血等の頭蓋内出血を検出するもの(WO98/49599)、クレアチンキナーゼアイ

50

ソザイムBBを測定し、血管障害性疾患の検出を行うもの(WO98/40749)、ヒト平滑筋ミオシンに対するモノクローナル抗体やその活性フラグメントを用いて、動脈瘤のような血管障害性疾患の診断を行うもの(WO97/29784)等が開示されている。

【0005】

このように、クモ膜下出血の病変の診断に関する生化学的検査については、最近いくつかの方法が開示されているが、それらの検出は必ずしも脳動脈瘤のようなクモ膜下出血の病変に特異的な検出及び診断方法とは言えず、従って、動脈硬化の病変の特異的診断のためには、該病変を特異的に検出できるマーカーの更なる開発が要望されている。

【特許文献1】特開2002-238577号公報。

10

【特許文献2】特開2000-236885号公報。

【特許文献3】WO00/37637。

【特許文献4】WO98/49599。

【特許文献5】WO98/40749。

【特許文献6】WO97/29784。

【非特許文献1】Neurosurgery, 46(6)1301-1306, 2000。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の課題は、クモ膜下出血病変の検出及び診断に用いる、クモ膜下出血病変を特異的に検出可能なクモ膜下出血診断用ポリペプチドマーカー及びクモ膜下出血診断用遺伝子マーカー、該クモ膜下出血診断用ポリペプチドに特異的に結合する抗体、該クモ膜下出血診断用遺伝子の発現を検出するプローブ、更には該マーカーを用いたクモ膜下出血病変の検出及び診断方法を提供することにある。

20

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者は、クモ膜下出血病変を特異的に検出することが可能な脳動脈瘤の発症を検出して、クモ膜下出血の診断を可能とする診断用マーカーを見い出すべく、脳動脈瘤患者の血清中に発現するタンパク質について、探索を行った結果、脳動脈瘤患者血清から得られたcDNAを大腸菌に導入し発現させたタンパク質の中から、多くの患者血清と陽性反応を示す12クローンを選抜し、該クローンが脳動脈瘤の発症を検出して、クモ膜下出血の診断を可能とする診断用マーカーとなることを見出し、本発明を完成するに至った。本発明は、本発明のクモ膜下出血診断用ポリペプチドマーカー、該ポリペプチドマーカーを検出するための、該ポリペプチドマーカーに特異的に結合する抗体を含むものである。本発明のクモ膜下出血診断用ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列表の配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、及び23に示される。

30

【0008】

すなわち、本発明のクモ膜下出血診断用ポリペプチドは、以下の遺伝子がコードするポリペプチドからなる。

(1) 脳動脈瘤マーカー - 1 (配列表の配列番号1)

40

クローン名: 3A1

Accession No.: NM#015874

遺伝子名: H-2K binding factor-2

遺伝子の説明: MHC class I 遺伝子のNF B siteに結合する転写因子。

文献: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (14), 8490-8495, 2003

(2) 脳動脈瘤マーカー - 2 (配列表の配列番号3)

クローン名: 6T1

Accession No.: XM#039236

遺伝子名: molecule interacting with Rab13

遺伝子の説明: calponin domainを有しRab13に関係すると思われるタンパク質であるが

50

機能の詳細は不明である。

文献：未刊行

(3) 脳動脈瘤マーカー - 3 (配列表の配列番号5)

クローン名：11C1

Accession No.: NM#004446

遺伝子名：Glutamyl-prolyl-tRNA synthetase

文献：Genomics 19 (2), 280-290, 1994

(4) 脳動脈瘤マーカー - 4 (配列表の配列番号7)

クローン名：11D1

Accession No.: NM#002337

遺伝子名：Low density lipoprotein-related protein-associated protein 1

遺伝子の説明：LDLレセプターの安定化に寄与。細胞内シグナル伝達に関係するとの報告がある。

文献：J. Biol. Chem. 278 (20), 17986-17992, 2003

(5) 脳動脈瘤マーカー - 5 (配列表の配列番号9)

クローン名：1112

Accession No.: NM#014497

遺伝子名：NP220 nuclear protein

遺伝子の説明：核内タンパク質のひとつ。2本鎖DNAに結合し転写の制御に関係する。

文献：J. Cell. Biochem. 84 (3), 556-566, 2002

(6) 脳動脈瘤マーカー - 6 (配列表の配列番号11)

クローン名：11P1

Accession No.: BC014861

遺伝子名：Actin, beta

遺伝子の説明：細胞骨格構成タンパク質。

文献：Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26), 16899-16903, 2002

(7) 脳動脈瘤マーカー - 7 (配列表の配列番号13)

クローン名：14C1

Accession No.: NM#003563

遺伝子名：Speckle-type POZ protein

遺伝子の説明：自己抗原性を有するタンパク質。POZ domainを有しDNAまたはアクチン結合性をもちタンパク質相互作用を調節する。

文献：FEBS Lett. 418 (1-2), 23-25, 1997

(8) 脳動脈瘤マーカー - 8 (配列表の配列番号15)

クローン名14N

Accession No.: BC004544.

遺伝子名：hypothetical protein BC004544

遺伝子の説明：機能不明。

文献：Submitted (14-MAR-2001) National Institutes of Health Mammalian Institute

(9) 脳動脈瘤マーカー - 9 (配列表の配列番号17)

クローン名：16A

Accession No.: NM#014832.

遺伝子名：TBC1 domain family, member 4

遺伝子の説明：機能不明。

文献：Genomics 79 (2), 154-161, 2002

(10) 脳動脈瘤マーカー - 10 (配列表の配列番号19)

クローン名：17L

Accession No.: BC043617

遺伝子名：DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha

遺伝子の説明：胚発達の過程で必要なDNAメチル化を行う

10

20

30

40

50

文献：Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99(26), 16899-16903, 2002

(11) 脳動脈瘤マーカー - 11 (配列表の配列番号21)

クローン名：41D3

Accession No.: NM#005531

遺伝子名：interferon, gamma-inducible protein 16

遺伝子の説明：ミエロイドの分化に関与すると推定される他のインターフェロン誘導タンパク質と200残基を共有する。

文献：Oncogene 22 (31), 4831-4840, 2003

(12) 脳動脈瘤マーカー - 12 (配列表の配列番号23)

クローン名：44Q2

Accession No.: NM#001810

遺伝子名：centromere protein B, 80kDa

遺伝子の説明：細胞周期の中間期、分裂期の核においてセントロメア構造物を集める機能を持つタンパク質。抗セントロメア抗体患者の自己抗原として知られる。

動脈硬化病変マーカー

文献：Mol. Cell. Biol. 22 (7), 2229-2241, 2002

更に、本発明は、本発明のくも膜下出血診断用ポリペプチドをコードする塩基配列からなるくも膜下出血診断用遺伝子マーカー、該塩基配列にストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNA配列を有するくも膜下出血診断用マーカー遺伝子検出用プローブを含むものである。本発明のくも膜下出血診断用マーカー遺伝子の塩基配列は配列表の配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、又は24に示される。

【0009】

また、本発明は、本発明のくも膜下出血診断用ポリペプチドマーカー及びくも膜下出血診断用遺伝子マーカーを利用した脳動脈瘤の発症に起因するくも膜下出血病変の検出及び診断方法、及び該検出及び診断方法に用いるキット等を含むものである。

【0010】

本発明において、発明を完成するに至った経緯について説明すると、本発明者は、くも膜下出血病変を特異的に検出することが可能なくも膜下出血診断用マーカーを見い出すべく、病院、及び協力施設に入院したくも膜下出血病変罹患患者の血清を本人、または家族の了解を得てスクリーニングを行った。得られたcDNAクローンはプラスミドpBlueScr

iptIIに組み込みシーケンス。その後プラスミドpGEXに組み替え大腸菌に導入し、IPTGを加えてタンパク質を大量発現させタンパク質抽出液を調製した。それを用いて多数の患者血清との反応をウェスタン法により調べた。その結果、本発明のマーカーである12クローンが複数の脳動脈瘤患者血清と陽性反応を示し脳動脈瘤罹患、若しくは脳動脈瘤破裂予測のマーカーとして有用であることを見い出した。そして、これらのクローンの抗原性や遺伝子のプローブを利用し、くも膜下出血病変の検出及び診断方法を開発し、更には該検出及び診断方法に用いる遺伝子及びプロテインアレイでの診断キットの作製を可能とした。

【0011】

すなわち具体的には本発明は、配列表の配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、又は23に示されるアミノ酸配列、又はその部分アミノ酸配列を有するヒトくも膜下出血診断用ポリペプチドマーカー(請求項1)や、請求項1記載のポリペプチドをコードする塩基配列からなるヒトくも膜下出血診断用遺伝子マーカー(請求項2)や、塩基配列が、配列表の配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、又は24に示されるDNA配列を有することを特徴とする請求項2記載のヒトくも膜下出血診断用遺伝子マーカー(請求項3)や、請求項1記載のポリペプチドを用いて誘導され、該ポリペプチドに特異的に結合することを特徴とする抗体(請求項4)や、抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項4記載の抗体(請求項5)や、抗体が、ポリクローナル抗体であることを特徴とする請求項4記載の抗体(請求項6)や、請求項2又は3記載の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズ

10

20

30

40

50

するDNA配列を有するヒトくも膜下出血マーカー遺伝子検出用プローブ（請求項7）や、請求項3記載の塩基配列のアンチセンス鎖の全部又は一部からなる請求項7記載のヒトくも膜下出血マーカー遺伝子検出用プローブ（請求項8）や、請求項7又は8記載のDNAの少なくとも1つ以上を固定化させたことを特徴とするヒトくも膜下出血マーカー遺伝子検出用マイクロアレイ又はDNAチップ（請求項9）からなる。

【0012】

また本発明は、請求項4～6のいずれか記載の抗体を用いて、被検試料におけるヒトくも膜下出血診断用マーカーポリペプチドの発現を検出することを特徴とするヒトくも膜下出血病変の検出及び診断方法（請求項10）や、ヒトくも膜下出血診断用マーカーポリペプチドの発現の検出を、ウェスタンブロット法、ELISA法、プロテインアレイ法、放射線免疫検定法、蛍光抗体法、又はSEREX法を用いて行うことを特徴とする請求項10記載の動脈硬化の検出及び診断方法（請求項11）や、被験体からの血清を、請求項11記載のヒトくも膜下出血診断用マーカーポリペプチドと反応させ、被験体における血清抗体の発現を検出することを特徴とするヒトくも膜下出血病変の検出及び診断方法（請求項12）や、請求項7又は8記載の診断用プローブを用いて、被検細胞におけるヒトくも膜下出血マーカー遺伝子の発現を検出することを特徴とするヒトくも膜下出血病変の検出及び診断方法（請求項13）や、ヒトくも膜下出血マーカー遺伝子の発現の検出を、ノーザンブロッティング法を用いて行うことを特徴とする請求項13記載のヒトくも膜下出血病変の検出及び診断方法（請求項14）や、ヒトくも膜下出血マーカー遺伝子の発現の検出を、請求項9記載のヒトくも膜下出血マーカー遺伝子検出用マイクロアレイ又はDNAチップを用いて行うことを特徴とする請求項13記載のヒトくも膜下出血病変の検出及び診断方法（請求項15）や、請求項13～14のいずれか記載のヒトくも膜下出血マーカー遺伝子の発現の検出が、定量的又は半定量的PCRの使用を含んでいることを特徴とするヒトくも膜下出血病変の検出及び診断方法（請求項16）や、定量的又は半定量的PCRの使用が、RT-PCR法であることを特徴とする請求項16記載の動脈硬化の検出及び診断方法（請求項17）や、被検細胞における遺伝子を、所定のセンスプライマー及びアンチセンスプライマーの少なくとも1対以上のプライマーを用いて増幅し、増幅した遺伝子を請求項7又は8記載の動脈硬化マーカー遺伝子検出用プローブを用いて検出することを特徴とする請求項13記載のヒトくも膜下出血病変の検出及び診断方法（請求項18）や、請求項7又は8記載のヒトくも膜下出血マーカー遺伝子検出用プローブ、該プローブを固定した請求項9記載のヒトくも膜下出血マーカー遺伝子検出用マイクロアレイ又はDNAチップ、及び請求項4～6のいずれか記載の抗体の少なくとも一つ以上を装備してなるヒトくも膜下出血病変の検出及び診断用キット（請求項19）からなる。

【発明の効果】

【0013】

くも膜下出血病変動脈硬化の病変の診断は、従来から、MRIやCTscanなどの放射線学的診断方法が行われているが、くも膜下出血の病変の診断を早期発見に繋げるためには、生化学的検査による方法が重要である。本発明のポリペプチドマーカーや遺伝子マーカーを利用することにより、くも膜下出血の病変の特異的な検出診断が可能となり、くも膜下出血の病変の早期発見に繋げることが可能となる。また、本発明のポリペプチドマーカーや遺伝子マーカーの検出のために、本発明のマーカーポリペプチドに結合する抗体や本発明のマーカー遺伝子にハイブリダイズするDNAプローブ等をチップやアレイの形で用意することにより、簡便な操作でくも膜下出血の病変の検出及び診断を行うことが可能となり、くも膜下出血の早期発見に大きく貢献することが期待できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明は、くも膜下出血の病変で特異的に発現する、くも膜下出血診断用マーカーポリペプチド又はくも膜下出血診断用マーカー遺伝子の発現を検出して、くも膜下出血の病変の検出及び診断を行うことよりなる。本発明において、くも膜下出血診断用のポリペプチドマーカーとなるポリペプチドは、配列表の配列番号1、3、5、7、9、11、13、

15、17、19、21、及び23に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。また、本発明においてくも膜下出血診断用遺伝子マーカーとなる遺伝子は、配列表の配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、及び24に示される塩基配列を有する遺伝子である。

【0015】

配列表の配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、及び23に示されるポリペプチドは、前記脳動脈瘤マーカー1～12に示されるようにいずれも公知のポリペプチドである。また、その遺伝子も公知の遺伝子である。該本発明の動脈瘤の検出による、くも膜下出血診断用マーカーポリペプチド及びマーカー遺伝子のアミノ酸配列及びDNA配列情報は、NCBIの遺伝子データベースにおいて、アクセッション
10
ナンバー：NM__015874、XM__039236、NM__004446、NM__002337、NM__014497、BC014861、NM__003563、BC004544、NM__014832、BC043617、NM__005531、及び、NM__001810としてアプローチすることができる。

【0016】

本発明において、本発明のくも膜下出血診断用マーカー遺伝子の発現を検出するには公知の遺伝子の発現の検出方法を用いることができる。例えば、本発明のくも膜下出血診断用マーカー遺伝子の発現を検出するために、ノーザンブロッティング法を用いることができる。また、本発明の遺伝子マーカーにより、くも膜下出血の病変を検出、識別するために、本発明のくも膜下出血診断用遺伝子マーカーのDNA配列とストリンジентな条件
20
下でハイブリダイズするDNA配列を有するプローブを用いることができる。該プローブを用いてくも膜下出血の病変を検出するには、公知の方法を用いて適宜実施することができる。例えば、配列表に示した遺伝子マーカーのDNA配列から適宜の長さのDNAプローブを作製し、適宜蛍光標識等の標識を付与しておき、これを被検体とハイブリダイズすることにより、くも膜下出血のマーカー遺伝子の発現の検出を行う。該DNAプローブとしては、配列表に示した本発明の遺伝子マーカーの塩基配列のアンチセンス鎖の全部又は一部からなるくも膜下出血診断用マーカー遺伝子検出用プローブを用いることができる。また、該プローブを、少なくとも1つ以上を固定化させたマーカー遺伝子検出用のマイクロアレイ又はDNAチップの形で用いることもできる。

【0017】

なお、上記DNAプローブの作製に際して、本発明の塩基配列において、「くも膜下出血診断用マーカー遺伝子のDNA配列とストリンジентな条件下でハイブリダイズする」条件としては、例えば、42でのハイブリダイゼーション、及び1×SSC(0.15M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウム)、0.1%のSDS(Sodium dodecyl sulfate)を含む緩衝液による42での洗浄処理を挙げることができ、65でのハイブリダイゼーション、及び0.1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による65での洗浄処理をより好ましく挙げることができる。なお、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響を与える要素としては、上記温度条件以外に種々の要素があり、当業者であれば種々の要素を組み合わせて、上記例示したハイブリダイゼーションのストリンジエンシーと同等のストリンジエンシーを実現することが可能である。
40

【0018】

本発明において、本発明のくも膜下出血診断用ポリペプチドマーカーの検出を行うには、該ポリペプチドによって誘導され、該ポリペプチドに特異的に結合する抗体を用いて行うことができる。該抗体としては、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を挙げることができる。該抗体の作製は、本発明のポリペプチドマーカーを抗原として、常法により作製することができる。本発明の抗体を用いて、被検試料におけるくも膜下出血診断用マーカーポリペプチドの発現を検出するには、公知の抗体を用いた免疫学的測定法を用いて実施することができる。該免疫学的測定法としては、例えばウェスタンブロット法、ELISA法、放射線免疫検定法、蛍光抗体法を挙げることができる。また、組換え発現クローニングによる血清学的抗原同定法であるSEREX(Serological iderecombinant e
50

xpression cloning) 法を用いることもできる。

【0019】

本発明においては、本発明のくも膜下出血診断用マーカー遺伝子検出用プローブ及び/又は本発明のくも膜下出血診断用マーカーポリペプチド検出用抗体及び/又は本発明のくも膜下出血診断用マーカー抗体検出用抗原ポリペプチドを用いて、被検試料におけるくも膜下出血診断用マーカー遺伝子及び/又はくも膜下出血診断用マーカーポリペプチド及び/又はくも膜下出血診断用マーカー抗体の発現を検出し、くも膜下出血の病変を診断することができる。被検細胞におけるくも膜下出血診断用マーカー遺伝子の検出に際しては、被検試料における遺伝子を増幅するために、定量的又は半定量的PCRを用いることができる。該PCRとしてはRT-PCR(逆転写PCR)を用いることができる。該PCRを行うに際しては、本発明のくも膜下出血診断用マーカー遺伝子を増幅するためのセンスプライマー及びアンチセンスプライマーからなるプライマーを用いる。該プライマーの構築は、配列表の配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、及び24に示される塩基配列に基づいて適宜行うことができる。

10

【0020】

本発明において、くも膜下出血の病変の検出及び診断を行うには、被検試料の細胞における遺伝子を、上記のセンスプライマー及びアンチセンスプライマーの少なくとも1対以上のプライマーを用いて増幅し、増幅した遺伝子を本発明のくも膜下出血診断用マーカー遺伝子検出用プローブを用いて検出する。

【0021】

本発明の抗体を用いて蛍光抗体法を用いて、被検試料細胞におけるくも膜下出血診断用マーカーポリペプチドの発現を検出し、可視的にくも膜下出血の病変の検出を行うことができる。蛍光抗体法によりくも膜下出血診断用マーカーポリペプチドを発現試料細胞を標識化するには、本発明のくも膜下出血診断用ポリペプチドマーカーに特異的に結合する抗体を蛍光標識し、これを抗原を発現している試料細胞に結合させて、くも膜下出血診断用ポリペプチドマーカーを発現する細胞を標識化する(直接蛍光抗体法)か、或いは、抗原を発現している細胞に、未標識の本発明の特異抗体を結合させた後に、標識化した二次抗体(抗免疫グロブリン抗体)を結合させてくも膜下出血診断用ポリペプチドを標識化し(間接蛍光抗体法)、該標識化したくも膜下出血診断用ポリペプチドを発現する細胞を検出し、診断を行う。

20

30

【0022】

本発明のくも膜下出血病変の検出及び診断に用いるくも膜下出血診断用マーカー遺伝子検出用プローブ、該プローブを固定したくも膜下出血診断用マーカー遺伝子検出用マイクロアレイ又はDNAチップ、及び本発明のくも膜下出血診断用マーカーポリペプチド検出用の抗体は、それらを装備したくも膜下出血病変の検出及び診断用キットとして製品化しておくことができる。

【0023】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

【実施例1】

40

【0024】

[実験手順 - SEREX法、ウェスタン法、ELISA法]

(試料の調製)

(1) 病院および研究協力施設を受診した頸動脈狭窄症患者を対象とし、外来受診者の中から性別・年齢(±5歳)を一致させた、正常被験者をコントロールとして選択した。外来受診時又は脳神経外科入院時に、1) 研究目的や研究協力の任意性などを家族に説明しインフォームド・コンセントを得た上で、2) 家族歴・既往歴・飲酒や喫煙難などのライフスタイル、作業態様に関する問診を行い、3) 採血を行って血清と血球成分を分離凍結保存する。さらに、4) 医師の診療録を基に、臨床的重症度、治療経過、血液検査所見などを記載する。解析対象の患者血液は血清分離後マイナス80度にて研究開始まで凍結保

50

存されたものを使用する。

(2) 血清によるスクリーニング対象はヒト臍帯静脈内皮(HUVEC)由来cDNAライブラリーを組み込んだ市販 ZAP IIファージベクター(STRATAGENE)を用いる。

【0025】

(SEREX法実験手順)

(3) SEREX法によるスクリーニングはSahinらの方法に準じて実施する。

1) 上記(2)のファージベクターを大腸菌(XL1-Blue)に感染させ、15cmNZY寒天プレート培地上で培養する。

2) プラークが出現したのを確認後、IPTG(isopropyl thiogalactoside)処理したニトロセルロース膜を培地上にのせ膜にファージ由来タンパク質を発現、転写させる。

3) 0.5%BSAで2000倍希釈した患者血清と膜と一夜インキュベートし発現タンパク質と血清中抗体を反応させる。

4) 洗浄後2次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgG抗体を膜と反応させる。

5) 発色試薬としてNBT、BCIPを使い血清IgG認識クローンを同定する。

6) 陽性クローンは2、3次スクリーニング(10cmプレート)を行い、偽陽性クローンを排除する。

7) 選択されたファージをExAssist helper phage system(Stratagene, La Jolla, CA)によりpBlueScriptにクローニングする。

8) Rapid plasmid miniprep system(Marigen)を用いプラスミドを精製する。

9) 塩基配列決定は外部委託もしくはDNA Sequencing kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems)を使用しABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems)により実施する。得られた塩基配列を公開されているデータベース上の塩基配列と照合し得られえたクローンの相同性検索を行う。この時点で読み枠の違ったクローンを除外し残ったものを抗原タンパク質候補としタンパク質精製の過程へと進める。

【0026】

(ELISA法実験手順)

(4) 2次スクリーニングとしてのELISA法の準備

1) 抗原タンパク候補のインサートを含むpBlueScriptをタンパク質発現、精製用ベクターpGEX-4T(Amersham Bioscience)への組み替えを行う。得られた塩基配列情報よりpBlueScriptよりpGEXへの組み換えに適した制限酵素、pGEXプラスミド(4T1-3)を選択し制限酵素処理を行う。

2) ポリアクリルアミドゲル電気泳動後目的のバンドを精製キットGeneElute Minus EtBr Spin Columns(SIGMA)を用い切り出し、制限酵素処理されたインサートおよびpGEXを回収する。

3) Ligation kit ver.2(Takara)を用いインサートとpGEXをライゲーションしインサートを含むプラスミドを作製する。

4) クローンにより適当な制限酵素が存在しない場合にはPCR法によりインサートを作製する。あらかじめ制限酵素認識部位を持つプライマーを外注により作製し動脈瘤組織より抽出したRNAを鋳型に逆転写PCRを行い、cDNAを作製、さらにPCRを行い全長のインサートを得る。以下は同様に制限酵素、ライゲーションキットを用いたライゲーションを行う

5) 真核細胞タンパク質発現用に改良された大腸菌コンピテントセルBL21(DE3)RIL codon plus(STRATAGENE)に得られたpGEXを形質転換する

6) アンピシリン入りLB培地で培養、IPTGでインサートDNA由来タンパク質の発現を誘導する。

7) 大腸菌を遠心分離回収し超音波破碎、可溶画分と不溶画分に分離する

8) 目的タンパク質が不溶画分に入る場合は尿素を用い可溶化を行う

9) 得られた可溶タンパク質を、GSTrapFF(Amersham Bioscience)を用いGST融合タ

10

20

30

40

50

ンパク質のみを精製する

10) カラムよりのタンパク質の抽出はトロンピン切断により行う。

【0027】

(ウェスタン法実験手順)

(5) ウェスタン法による2次スクリーニング

1) 上記で得られた形質転換されたBL21(DE3) RIL codon plusをLBアンピシリン2mlで1夜培養する。

2) LBアンピシリン20mlに移し変え1時間培養後IPTG終濃度1mMとなるように加えたものとコントロールをさらに3時間培養する。

3) 培養液を遠心後、大腸菌を回収しサンプルバッファーにて溶解、ウェスタン法のサンプルとする。 10

4) 12%ポリアクリルアミドゲル上でサンプルを電気泳動後、平板転写装置でニトロセルロース膜にタンパク質を転写する。

5) 1%スキムミルクでブロッキング後、5000倍患者血清を1次抗体として加え、1夜インキュベートする。

6) TBS-Tで洗浄後、1万倍希釈HRP標識ヤギ抗ヒトIgG抗体を加え20分間反応させる

7) TBS-Tで洗浄後、発色試薬Immunostar (WAKO)を使い発色させる。

8) フィルムに感光させる。

9) コントロールに無くIPTG誘導に存在するバンドを陽性バンドとする。 20

【0028】

(ELISA法実験手順)

(6) ELISA法による2次スクリーニング

1) SEREX法にて得られた精製タンパク質をELISA法の固相とする。96穴ELISAプレートに50µg/mlの濃度の精製タンパク質を入れ一晩4℃で保存、固相化させる。

2) 前述のタンパク質精製によりクローンあたり5mgの精製タンパク質の採取を目標とする。

3) PBS洗浄、0.5%スキムミルクでブロッキング後患者血清、および対照血清を5000倍希釈し固相化したタンパク質と反応させる。 30

4) PBS洗浄後HRP標識ヤギ抗ヒトIgG抗体を加える

5) 基質を加え発色させプレートリーダーにてODを測定する

6) 各タンパク質、血清とも3回の実験を行い、平均を血清抗体値とする。

【0029】

[ウェスタンプロット法によるペプチドマーカの検出]

病院、及び協力施設に入院した脳動脈瘤罹患患者の血清を本人、または家族の了解を得てスクリーニングに用いた。得られたcDNAクローンはプラスミドpBlueScriptIIに組み込みシーケンス。その後プラスミドpGEXに組み替え大腸菌に導入し、IPTGを加えてタンパク質を大量発現させタンパク質抽出液を調製した。それを用いて多数の患者血清との反応をウェスタン法により調べた。 40

【0030】

ウェスタン法による解析には、ZAPIIをベクターとするヒト臍帯静脈内皮細胞由来cDNAライブラリーを使用した。組み込まれたcDNAをIPTG処理より発現させ、脳動脈瘤罹患患者に存在する抗体と反応するものを単離した。単離したcDNAクローンについてさらにpGEXプラスミドに組み替えタンパク質の大量発現を行った後、脳動脈瘤罹患患者の反応をウェスタン法により解析し、陽性反応を示すクローンを選択した。

【0031】

ウェスタン法により検出したクローンのプロットングの写真を図1a、1b、1c、1d、図2a、2b、2c、2d、及び、図3a、3b、3c、3dに示す。

[SEREX法によるペプチドマーカ遺伝子の確認]

検出したクローンの遺伝子の配列決定をS E R E X法を用いて行った。得られたDNA配列を、公開されている遺伝子データベース上の塩基配列と照合した結果、得られたクローンの遺伝子は、それぞれ前記脳動脈瘤マーカー1～12に記載のポリペプチドをコードするDNA配列と一致した。

【図面の簡単な説明】

【0032】

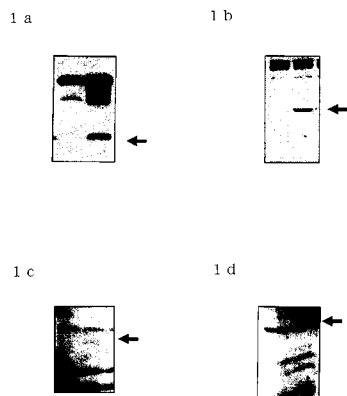
【図1】1a～1dは、本発明の実施例において、検出した動脈硬化診断用のポリペプチドの発現をウェスタン法により検出した、クローンの脳動脈瘤マーカーのプロットングの写真である。

【図2】2a～2dは、本発明の実施例において、検出した動脈硬化診断用のポリペプチドの発現をウェスタン法により検出した、クローンの脳動脈瘤マーカー1～4のプロットングの写真である。

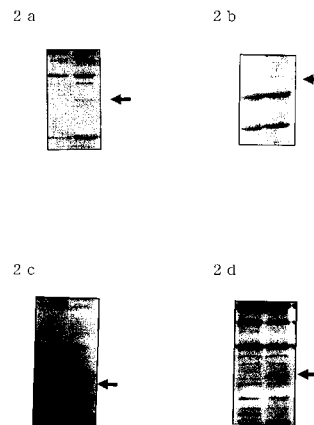
10

【図3】3a～3dは、本発明の実施例において、検出した動脈硬化診断用のポリペプチドの発現をウェスタン法により検出した、クローンの脳動脈瘤マーカー5～8のプロットングの写真である。

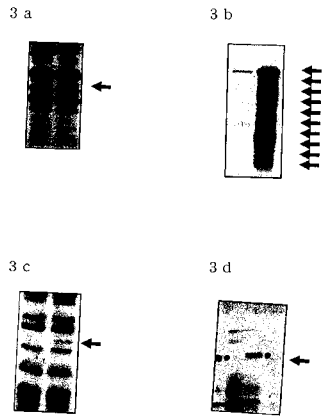
【図1】



【図2】



【 図 3 】



【 配列表 】

2005151854000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 33/53	M
// C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	C 1 2 N 15/00	F
	C 1 2 P 21/08	

(72)発明者 小林 英一
千葉県千葉市中央区青葉町1281-11

(72)発明者 佐伯 直勝
千葉県千葉市中央区東千葉3-11-5

(72)発明者 山浦 晶
千葉県長生郡長柄町上野521-21

(72)発明者 日和佐 隆樹
千葉県千葉市中央区星久喜1063-28

(72)発明者 滝口 正樹
千葉県船橋市前原1-14-17-107

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA80 CA01 CA04 CA07 CA09 DA06 EA03 EA04 FA10
GA11 HA03 HA12 HA15
4B063 QA13 QA19 QQ03 QQ42 QQ79 QQ96 QR32 QR55 QR62 QR82
QS16 QS25 QS33 QS34 QS35 QS36 QX01 QX07
4B064 AG27 DA13
4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 CA42 DA75 DA76 DA86 EA50 FA73
FA74 GA01 GA21

专利名称(译)	用于诊断人蛛网膜下腔出血的标记物及其用途		
公开(公告)号	JP2005151854A	公开(公告)日	2005-06-16
申请号	JP2003393161	申请日	2003-11-21
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构		
申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构		
[标]发明人	久保田基夫 町田利生 内野福生 小林英一 佐伯直勝 山浦晶 日和佐隆樹 滝口正樹		
发明人	久保田 基夫 町田 利生 内野 福生 小林 英一 佐伯 直勝 山浦 晶 日和佐 隆樹 滝口 正樹		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/68 G01N37/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N15/00.F C12P21/08 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/09.200		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS35 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX07 4B064/AG27 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA42 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA73 4H045/FA74 4H045/GA01 4H045/GA21		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

甲在检测和蛛网膜下腔出血病灶，蛛网膜下腔出血病灶特异性检测的蛛网膜下腔出血的诊断多肽标志物和蛛网膜下腔出血的诊断标志物的基因的诊断，所述蛛网膜下腔出血诊断多肽用于特异性结合的探针，用于检测蛛网膜下腔出血诊断基因的表达，进一步的抗体，以提供使用标记蛛网膜下腔出血损伤的检测和诊断方法。甲SEQ ID NO：1,3,5,7,9,11,13,15,17,19,21，或在序列表中23所示的氨基酸序列的多肽，并且所述基因，蛛网膜下腔出血用作特异性检测蛛网膜下腔出血诊断多肽标志物和蛛网膜下腔出血的诊断的基因标记，其可为病变。本发明包括抗体，以检测用于蛛网膜下腔出血诊断多肽标志物，和DNA探针或类似物用于检测蛛网膜下腔出血诊断基因标记。

1 a



1 b

