

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6296615号  
(P6296615)

(45) 発行日 平成30年3月20日(2018.3.20)

(24) 登録日 平成30年3月2日(2018.3.2)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>CO7K</b>	<b>14/435</b>	<b>(2006.01)</b>	CO7K 14/435 ZNA
<b>CO7K</b>	<b>16/18</b>	<b>(2006.01)</b>	CO7K 16/18
<b>C12Q</b>	<b>1/02</b>	<b>(2006.01)</b>	C12Q 1/02
<b>GO1N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	GO1N 33/53 V
<b>GO1N</b>	<b>33/68</b>	<b>(2006.01)</b>	GO1N 33/68

請求項の数 13 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-545794 (P2014-545794)
(86) (22) 出願日	平成25年11月6日(2013.11.6)
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/080614
(87) 国際公開番号	W02014/073708
(87) 国際公開日	平成26年5月15日(2014.5.15)
審査請求日	平成28年10月12日(2016.10.12)
(31) 優先権主張番号	特願2012-244752 (P2012-244752)
(32) 優先日	平成24年11月6日(2012.11.6)
(33) 優先権主張国	日本国(JP)
(31) 優先権主張番号	特願2013-33651 (P2013-33651)
(32) 優先日	平成25年2月22日(2013.2.22)
(33) 優先権主張国	日本国(JP)

(73) 特許権者	504224153 国立大学法人 宮崎大学 宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地
(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(74) 代理人	100120905 弁理士 深見 伸子
(72) 発明者	北村 和雄 宮崎県宮崎市清武町木原5200 国立大 学法人宮崎大学医学部内
(72) 発明者	永田 さやか 宮崎県宮崎市清武町木原5200 国立大 学法人宮崎大学医学部内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規ペプチドおよびその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

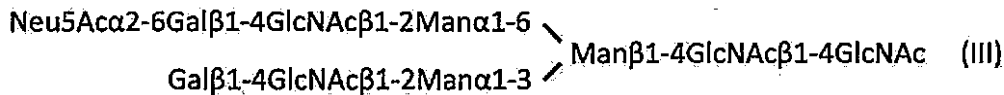
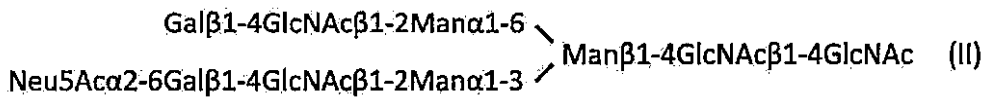
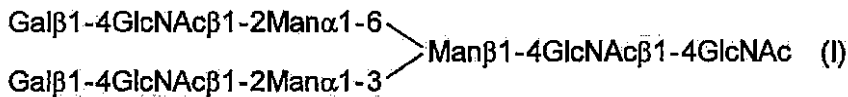
配列番号1に示すアミノ酸配列からなり、該アミノ酸配列の14位のアスパラギン残基にN-結合型糖鎖が付加され、かつ18位のシステイン残基にジスルフィド結合を介してシステイン残基が結合していることを特徴とする、ペプチド。

【請求項2】

N-結合型糖鎖が非還元末端にシアル酸が結合していてもよい糖鎖であって、該糖鎖を構成する糖としてガラクトース、N-アセチルグルコサミン、およびマンノースを含む、請求項1に記載のペプチド。

【請求項3】

N-結合型糖鎖が下記式(I)、(II)、または(III)のいずれかに示される構造を有する、請求項1または2に記載のペプチド。



10

(上記式(I)、(II)、(III)中、Galはガラクトース、Manはマンノース、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、Neu5AcはN-アセチルノイラミン酸を示す。)

【請求項4】

腎臓疾患の診断用マーカーである、請求項1～3のいずれかに記載のペプチド。

【請求項5】

キマーゼの基質となる、請求項1～3のいずれかに記載のペプチド。

20

【請求項6】

被験体より採取した生体試料における請求項1～3のいずれかに記載のペプチドの量を測定することを含む、腎臓疾患の診断のための検査方法。

【請求項7】

治療前後に被験体から採取した生体試料における請求項1～3のいずれかに記載のペプチドの量の変化を調べることを特徴とする、腎臓疾患の治療効果の判定方法。

【請求項8】

生体試料が尿である、請求項6または7に記載の方法。

【請求項9】

被験物質を哺乳動物由来の系球体上皮細胞に接触させるか、または、被験物質を非ヒト哺乳動物に投与し、前記細胞または尿における請求項1～3のいずれかに記載のペプチドの量を測定し、その変化を調べることを特徴とする、腎臓疾患の治療薬のスクリーニング方法。

30

【請求項10】

ペプチドの量の測定が、該ペプチドに特異的に結合する抗体を用いた免疫学的測定法により行われる、請求項6～9のいずれかに記載の方法。

【請求項11】

請求項1～3のいずれかに記載のペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項12】

請求項1～3のいずれかに記載のペプチドに特異的に結合する抗体を含有する、腎臓疾患の診断薬。

40

【請求項13】

請求項1～3のいずれかに記載のペプチドに特異的に結合する抗体を含有する、腎臓疾患の診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、レニン・アンジオテンシン系に關与する新規なペプチド、ならびに該ペプチドの腎臓疾患または循環器疾患の診断などの用途に關する。

【背景技術】

50

## 【 0 0 0 2 】

レニン・アンジオテンシン系 (Renin-Angiotensin System: RAS) は、血圧および体液バランスにおいて重要な役割を果たしており、腎臓疾患または循環器疾患の発症や進展に深く関与している。高齢化社会を迎え、これらの疾患の患者数は年々増加している。そのためRASを抑制する薬剤(アンジオテンシン受容体拮抗薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬等)や生化学検査によるRASの評価は、現在の腎臓疾患または循環器疾患の治療・診断に欠かせないものとなっている。

循環血中のRASの機序は次の通りである。まず、主に肝臓で合成される452個のアミノ酸からなるアンジオテンシノーゲンが、腎臓から分泌されるレニンによって、アンジオテンシノーゲンのN末端に存在する10個のアミノ酸からなるアンジオテンシンI (Ang I) に変換される。続いて、アンジオテンシンI (Ang I) は肺毛細血管に存在するアンジオテンシン変換酵素(ACE)によってアンジオテンシンII (Ang II) に変換される。このアンジオテンシンII (Ang II) は、その受容体であるアンジオテンシンII受容体に結合することによって血管の収縮、アルドステロンの分泌、ナトリウム

10

の再吸収を促し、血圧上昇を惹起する。RASは、これまで上記のような昇圧システムとして血中での作用が着目されてきたが、近年では、局所組織で生成される組織RASの存在が指摘され、レニン非依存的なアンジオテンシン産生経路も示唆されている。組織RASは、血中RASとは独立して、血圧調節だけではなく、各種臓器障害に関与することがわかってきている。このように、生体内のアンジオテンシン産生経路に関しては諸説あり、その生成機構や役割に関しては未だに不明な点が多いのが現状である。よって、非レニン依存性のアンジオテンシンII産生経路が明確になれば新たな医薬品開発の可能性が期待される。

20

発明者らは、これまでに、ラットの組織(小腸)からプロアンジオテンシン-12を発見した。プロアンジオテンシン-12は、アンジオテンシンIよりもC末側に2アミノ酸長い12アミノ酸(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Tyr)からなり、ラットのアンジオテンシノーゲン(1-12)に相当するペプチドである。また、ヒトのアンジオテンシノーゲン(1-12)に相当するポリペプチドがヒトの組織(胎盤)にも存在することを証明している(特許文献1)。また、最近では、アンジオテンシンII由来のペプチドであるアンジオテンシン(1-7)、アンジオテンシンIII、アンジオテンシンIVの報告もある(非特許文献1、2)。

30

これまで、上記のRASが関わる生体内における作用に基づき、アンジオテンシノーゲン、アンジオテンシンI、アンジオテンシンII、レニン等のRASの構成要素やアンジオテンシンIIで産生が促進されるアルドステロンなどが、循環器疾患や高血圧による臓器障害のバイオマーカーとして用いられている。RASの新たな構成要素が発見されれば、上記疾患や障害の新たなバイオマーカーとなることが強く期待できる。一方、腎障害のバイオマーカーとしては、尿中のアルブミンがよく使用されている。また近年、尿中のアンジオテンシノーゲンが、腎症や高血圧、食塩負荷などで上昇することが報告されており、腎障害における新しいバイオマーカーとして期待されている。しかしながら、アルブミンの分子量は66,000、アンジオテンシノーゲンの分子量は約50,000と大きく、尿中に排泄される場合は、糸球体障害がかなり亢進しており、腎障害の早期発見のバイオマーカーが望まれている。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】特開2008-007482

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Science 184(1974)994-996

【非特許文献2】Am J Physiol 268(1995)L302-308

50

## 【発明の概要】

【0005】

上記のように腎臓疾患または循環器疾患の発症に関連するレニン・アンジオテンシン系（RAS）の新たな構成要素またはアンジオテンシンの新たな産生経路が発見されれば、新たな医薬品開発の可能性が大きく広がる。

従って、本発明は、RASにおける新たな構成要素を見出し、これを腎臓疾患または循環器疾患の新たなバイオマーカーとして提供することを課題とする。

本発明者らは、上記課題を解決するために、アンジオテンシノーゲンのN末端付近を特異的に認識するラジオイムノアッセイ（RIA）を利用して生体内のRASにおける新たな構成要素を探索したところ、ヒト尿中に新規なペプチドが存在していることを見出した。この新規ペプチドは、N末側にアンジオテンシンIIを有し、N型糖鎖とシステイン（Cys）が付加した25個のアミノ酸からなる特徴的な構造をもつこと、また、糸球体上皮細胞（ポドサイト）に特異的に局在していること、糖尿病に伴う腎障害患者の尿においてその濃度が上昇していること、尿中当該ペプチドのクレアチニンに対する比が尿蛋白や糸球体濾過率（eGFR）と正の相関があることを明らかにした。この新規ペプチドは、アンジオテンシンI、アンジオテンシンIIに関連するペプチドであると考えられたため、ビッグアンジオテンシン-25（Big angiotensin-25（BAng-25））と命名した。

本発明者らはまた、BAng-25に付加している糖鎖の有無・種類を変化させ、レニンまたはキマーゼに対する作用を調べたところ、BAng-25は、レニンの基質にはならず、キマーゼの特異的な基質となることが確認され、BAng-25は非レニン依存性のアンジオテンシンII産生経路に関与する新規物質であるという知見を得た。さらに、BAng-25は腎臓のみならず、心臓、血管、神経・内分泌組織、生殖組織にも高濃度に存在することを確認し、腎臓・循環器疾患、神経・内分泌疾患、生殖疾患の新たな標的分子になりうるという知見を得た。

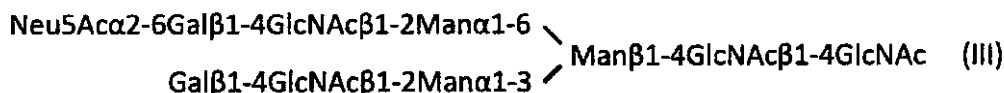
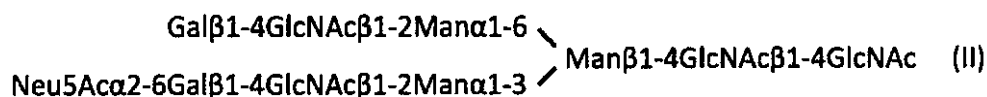
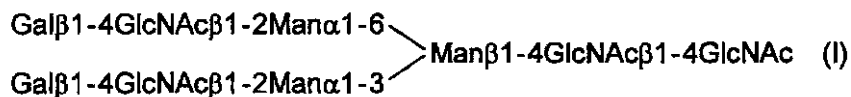
本発明はかかる知見により完成されたものである。

即ち、本発明は以下の発明を包含する。

（1）配列番号1に示すアミノ酸配列または配列番号1に示すアミノ酸配列において14位のアスパラギン残基を除く1～数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、該アミノ酸配列の14位のアスパラギン残基にN-結合型糖鎖が付加されていることを特徴とする、ペプチド。

（2）N-結合型糖鎖が非還元末端にシアル酸が結合していてもよい糖鎖であって、該糖鎖を構成する糖としてガラクトース、N-アセチルグルコサミン、およびマンノースを含む、（1）に記載のペプチド。

（3）N-結合型糖鎖が下記式（I）、（II）、または（III）のいずれかに示される構造を有する、（1）または（2）に記載のペプチド。



10

20

30

40

50

(上記式(I)、(II)、(III)中、Galはガラクトース、Manはマンノース、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、Neu5AcはN-アセチルノイラミン酸を示す。)

(4) 配列番号1に示すアミノ酸配列または配列番号1に示すアミノ酸配列において14位のアスパラギン残基を除く1~数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列の18位のシステイン残基にジスルフィド結合を有する、(1)~(3)のいずれかに記載のペプチド。

(5) 腎臓疾患または循環器疾患の診断用マーカーである、(1)~(4)のいずれかに記載のペプチド。

(6) キマーゼの基質となる、(1)~(4)のいずれかに記載のペプチド。

10

(7) 被験体より採取した生体試料における(1)~(4)のいずれかに記載のペプチドの量を測定することを含む、腎臓疾患または循環器疾患の診断のための検査方法。

(8) 治療前後に被験体から採取した生体試料における(1)~(4)のいずれかに記載のペプチドの量の変化を調べることを特徴とする、腎臓疾患または循環器疾患の治療効果の判定方法。

(9) 生体試料が尿である、(7)または(8)に記載の方法。

(10) 被験物質を哺乳動物由来の糸球体上皮細胞に接触させるか、または、被験物質を非ヒト哺乳動物に投与し、前記細胞または尿における(1)~(4)のいずれかに記載のペプチドの量を測定し、その変化を調べることを特徴とする、腎臓疾患または循環器疾患の治療薬のスクリーニング方法。

20

(11) ペプチドの量の測定が、該ペプチドに特異的に結合する抗体を用いた免疫学的測定法により行われる、(7)~(10)のいずれかに記載の方法。

(12) (1)~(4)のいずれかに記載のペプチドに特異的に結合する抗体。

(13) (1)~(4)のいずれかに記載のペプチドに特異的に結合する抗体を含有する、腎臓疾患または循環器疾患の診断薬。

(14) (1)~(4)のいずれかに記載のペプチドに特異的に結合する抗体を含有する、腎臓疾患または循環器疾患の診断用キット。

本願は、2012年11月6日に出願された日本国特許出願2012-244752号、および2013年2月22日に出願された日本国特許出願2013-033651号の優先権を主張するものであり、該特許出願の明細書に記載される内容を包含する。

30

#### 発明の効果

本発明によれば、非レニン依存性のアンジオテンシンII産生経路に関与する新規なペプチドであるビッグアンジオテンシン-25(BAng-25)が提供される。BAng-25は、腎組織(特に、ポドサイト)に局在しており、また、蛋白尿を伴う糖尿病患者の尿中濃度が有意に上昇していることから、腎障害や糖尿病性腎症のバイオマーカーとして有用である。従って、BAng-25を利用することにより、被験者に負担をかけることなく、腎臓疾患や循環器疾患を早期かつ簡便に診断することが可能であり、また、前記疾患患者の治療効果の確認や経過観察、新たな治療薬のスクリーニングにも利用できる。また、BAng-25は腎臓・心臓などの臓器に加え、副腎髄質や膵臓のランゲルハンス氏島、腸管の神経叢などの神経・内分泌組織、胎盤や精巣などの生殖組織にも高濃度存在

40

することから、腎臓疾患や心臓等循環器の疾患以外にも、神経・内分泌・生殖疾患の新たな標的分子になる可能性がある。

さらに、BAng-25に付加した糖鎖構造はレニン抵抗性およびキマーゼとの反応性を有し、アンジオテンシン産生を制御することができることから、糖鎖修飾は、アンジオテンシンの産生を調整する新たな手段となる。また、近年アンジオテンシンやアンジオテンシン受容体に対するワクチン療法も試みられていることから、BAng-25をRASワクチンとして利用することにより腎保護や降圧効果が期待される。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0006】

図1Aは、ヒト尿をゲル濾過し、各画分の免疫活性N-末端AngIIをラジオイムノ

50

アッセイで測定した結果を示す(矢印:免疫活性N-末端Ang II含有画分を示す)。図1Bは、免疫活性画分のRP-HPLCによる最終精製を示す。図1Cは、四重極飛行時間型質量分析装置による精製ペプチドの構造解析を示す。図1Dは、プロテインシーケンサーによる精製ペプチドのアミノ酸解析を示す。

図2Aは、精製ペプチドに含まれるN型糖鎖の一次構造解析を示す。図2Bは、精製ペプチドに含まれるN型糖鎖の二次構造解析を示す。図2Cは、精製ペプチド(ビッグアンジオテンシン-25)の構造を示す(25個のアミノ酸からなり、14番目のAsnにN型糖鎖、18番目のアミノ酸にCysが付加している)。

図3は、ビッグアンジオテンシン-25(糖鎖あり;BAng-25)、ビッグアンジオテンシン-25(糖鎖なし;Non-glycosyl chain BAng-25)、ビッグアンジオテンシン-25(GlcNAc置換;BAng-25+GlcNAc)の構造を示す。

図4A、Bは、ビッグアンジオテンシン-25(糖鎖あり;BAng-25)に対するレニンの反応性をHPLCで解析した結果を示す(図4A:レニンなし、図4B:100Uレニン)。図4C、Dは、ビッグアンジオテンシン-25(糖鎖なし;Non-glycosyl chain BAng-25)に対するレニンの反応性をHPLCで解析した結果を示す(図4C:レニンなし、図4D:100Uレニン)。図4E、Fは、ビッグアンジオテンシン-25(GlcNAc置換;BAng-25+GlcNAc)に対するレニンの反応性をHPLCで解析した結果を示す(図4E:レニンなし、図4F:100Uレニン)。

図5は、ビッグアンジオテンシン-25(糖鎖なし;Non-glycosyl chain BAng-25)とビッグアンジオテンシン-25(糖鎖あり;BAng-25)をレニン20Uで24時間反応後のAng I生成量を示す(黒丸:Non-glycosyl chain BAng-25、白丸:BAng-25)。

図6A、Bは、ビッグアンジオテンシン-25(糖鎖あり;BAng-25)に対するキマーゼの反応性をHPLCで解析した結果を示す(図6A:キマーゼなし、図6B:43.4mUキマーゼ)。図6C、Dは、ビッグアンジオテンシン-25(糖鎖なし;Non-glycosyl chain BAng-25)に対するキマーゼの反応性をHPLCで解析した結果を示す(図6C:キマーゼなし、図6D:43.4mUキマーゼ)。図6E、Fは、ビッグアンジオテンシン-25(GlcNAc置換;BAng-25+GlcNAc)に対するキマーゼの反応性をHPLCで解析した結果を示す(図6E:キマーゼなし、図6F:43.4mUキマーゼ)。

図7は、ビッグアンジオテンシン-25(糖鎖あり;BAng-25)、ビッグアンジオテンシン-25(糖鎖なし;Non-glycosyl chain BAng-25)、ビッグアンジオテンシン-25(GlcNAc置換;BAng-25+GlcNAc)をキマーゼ20Uで24時間反応後のAng II生成量を示す(菱形:BAng-25、四角:Non-glycosyl chain BAng-25、三角:BAng-25+GlcNAc)。

図8Aは腎におけるビッグアンジオテンシン-25の免疫染色を示す(左:バー100 $\mu$ m、右:バー50 $\mu$ m)。図8Bは、ビッグアンジオテンシン-25/尿中クレアチニン比(BAng-25/UCre)と糸球体濾過率(eGFR)の関係を示す。図8Cは、ビッグアンジオテンシン-25/尿中クレアチニン比(BAng-25/UCre)と糖尿病患者の蛋白尿との関係を示す(Upro(-):蛋白尿陰性、Upro(+):蛋白尿陽性)。図8Dは、ビッグアンジオテンシン-25/尿中クレアチニン比(BAng-25/UCre)と尿蛋白(クレアチニン補正)の相関関係を示す。

図9は心臓(左心室)におけるビッグアンジオテンシン-25の免疫染色を示す。

図10は食道の重層扁平上皮(上のパネル)、食道の平滑筋細胞(下のパネル)におけるビッグアンジオテンシン-25の免疫染色を示す。

図11は副腎(上のパネル)、副腎髄質(下のパネル)におけるビッグアンジオテンシン-25の免疫染色を示す。

10

20

30

40

50

図12は膵臓ランゲルハンス氏島におけるビッグアンジオテンシン - 25の免疫染色を示す。

図13は胃の胃腸内分泌細胞(上のパネル)、胃の粘膜下層神経線維(左下のパネル)、胃のアウエルバッハ神経叢(右下のパネル)におけるビッグアンジオテンシン - 25の免疫染色を示す。

図14は大腸の胃腸内分泌細胞におけるビッグアンジオテンシン - 25の免疫染色を示す。

図15は胎盤の絨毛膜(上のパネル)、胎盤の脱落膜(下のパネル)におけるビッグアンジオテンシン - 25の免疫染色を示す。

図16は卵管におけるビッグアンジオテンシン - 25の免疫染色を示す。

10

図17は精巣におけるビッグアンジオテンシン - 25の免疫染色を示す。

【発明を実施するための形態】

【0007】

1. ビッグアンジオテンシン - 25 (BAng - 25)

本発明のレニン・アンジオテンシン系に關与する新規なペプチドであるビッグアンジオテンシン - 25 (以下、単に「BAng - 25」と記載する場合がある)は、Asp - Arg - Val - Tyr - Ile - His - Pro - Phe - His - Leu - Val - Ile - His - Asn - Glu - Ser - Thr - Cys - Glu - Gln - Leu - Ala - Lys - Ala - Asnのアミノ酸配列(配列番号1)からなり、該アミノ酸配列の14位のアスパラギン残基にN - 結合型糖鎖が付加された特徴的な構造を有する。

20

本発明のBAng - 25は、配列番号1のアミノ酸配列の18位のシステイン残基にジスルフィド結合を有していてもよい。典型的には、当該システイン残基に、システインがジスルフィド結合により付加される。このとき、配列番号1のアミノ酸配列の18位はシスチン(Cys - Cys)である。

血中ではアンジオテンシノーゲンは速やかにレニンによりアンジオテンシンIに変換される。これに対し、BAng - 25(配列番号1に示すアミノ酸配列からなり、該アミノ酸配列の14位のアスパラギン残基にN - 結合型糖鎖が付加されたペプチド)は、後記実施例に示されるように、N - 結合型糖鎖が付加しているとレニンが作用せず、アンジオテンシンIが生成されないが、N - 結合型糖鎖が付加されていないBAng - 25にはレニンが作用して速やかにアンジオテンシンIが生成されるという興味深いレニンに対する酵素反応性を有する。また、BAng - 25は、糖鎖の有無にかかわらず、キマーゼが作用し、アンジオテンシンIIが生成される。すなわち、BAng - 25は、レニンの基質にはならず、キマーゼの特異的な基質となる。

30

従って、本発明のBAng - 25は、レニン抵抗性およびキマーゼとの反応性を有する限り、その改変ペプチドであってもよく、改変ペプチドとしては、例えば、配列番号1に示すアミノ酸配列において14位のアスパラギン残基を除く1~数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。ここで、「1~数個」の範囲は、1~5個、好ましくは1~3個、より好ましくは1又は2個(配列番号1に示すアミノ酸配列との相同性が少なくとも80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは99%以上)をいう。本発明において「レニン抵抗性」とは、レニンとの反応性が全くないか、あるいは反応性に乏しいことをいう。すなわち、レニンにより対象物質(基質)からのアンジオテンシンI生成反応が全くないか、あるいはアンジオテンシンI生成反応速度が遅く生成反応が進行しにくいことを意味する。レニンと基質の反応速度は、酵素反応速度論のKm値により評価することができ、Km値が大きいほど反応性に乏しい。レニンの代表的な基質であるアンジオテンシノーゲンと対象物質のKm値を比較し、対象物質のKm値が50倍以上、好ましくは80倍程度以上大きければ、レニンとの反応性に乏しいとすることができる。

40

アミノ酸の欠失とは、配列番号1に示されるアミノ酸配列の中から、14位のアスパラギンを除く任意のアミノ酸を選択して欠失させることをいう。また、アミノ酸の付加とは、配列番号1に示されるアミノ酸配列のN末端またはC末端側に、1~数個のアミノを付

50

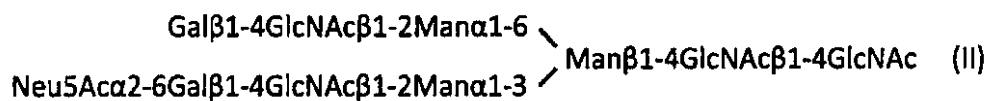
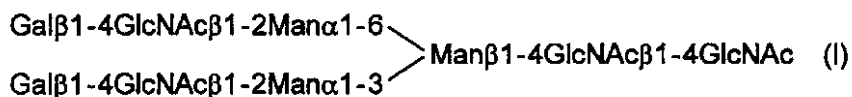
加させることをいう。アミノ酸の置換としては、例えば保存的アミノ酸置換が挙げられる。保存的アミノ酸置換は、例えば構造的、電気的、極性もしくは疎水性などの性質が類似したアミノ酸間の置換を意味する。このような性質は、例えばアミノ酸側鎖の類似性で分類することも可能である。塩基性側鎖を有するアミノ酸は、リシン、アルギニン、ヒスチジンからなり、酸性側鎖を有するアミノ酸は、アスパラギン酸、グルタミン酸からなり、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸は、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システインなどを含み、疎水性側鎖を有するアミノ酸は、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニンなどを含み、分岐側鎖を有するアミノ酸はトレオニン、バリン、ロイシン、イソロイシンからなり、ならびに、芳香族側鎖を有するアミノ酸は、チロシン、トリプトファン、フェニルアラニン、ヒスチジンからなる。

10

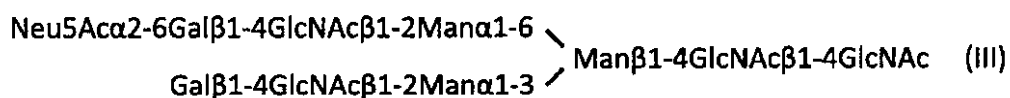
本発明のペプチドにおけるN-結合型糖鎖は、非還元末端にシアル酸が結合していてもよい糖鎖であって、該糖鎖を構成する糖としてガラクトース(Gal)、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、およびマンノース(Man)を含み、その糖鎖修飾により配列番号1に示すアミノ酸配列からなるペプチドにレニン抵抗性を付与する活性を有する限り、グルコース(Glc)、フコース(Fuc)、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、グルクロン酸(GlcA)、イズロン酸(IdoA)、キシロース(Xyl)、ガラクトツロン酸(GlcA)を含んでいてもよい。糖鎖が分岐する場合、分岐数は、典型的には二本であるが、三本以上であってもよい。

上記N-結合型糖鎖の好ましい例としては、下記式(I)、(II)、または(III)のいずれかに示されるN-結合型糖鎖が挙げられる。

20



30



(上記式(I)、(II)、(III)中、Galはガラクトース、Manはマンノース、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、Neu5AcはN-アセチルノイラミン酸を示す。)

本発明の上記N-結合型糖鎖が付加したペプチドの製造は、例えば、Convergent法、Stepwise法、化学酵素-合成法(Chemo-enzymatic method)などの公知の方法により行うことができる。Convergent法は、糖鎖部分とペプチド部分をそれぞれ合成しておき、それらを縮合させて糖ペプチドを合成する方法である。Stepwise法は、糖アミノ酸(例えば、アスパラギンにN-アセチルグルコサミンが結合したグリコシルアスパラギン)を用いてペプチド固相合成を行い伸長させて糖ペプチドを合成する方法である。また、化学酵素-合成法(Chemo-enzymatic method)は、N-アセチルグルコサミンを有する糖ペプチドを合成し、これを糖鎖受容体とし、天然の様々なN-結合型糖タンパク質を糖鎖供与体として用い、エンド-N-アセチルグルコサミナーゼ(Endo-Mなど)によって糖鎖供与体から糖鎖転移反応により糖鎖を糖鎖受容体に転移付加し、糖ペプチドを合成する方法である。

40

50

さらに、本発明の B A n g - 2 5 は、必要に応じて塩の形態、好ましくは生理学的に許容される酸付加塩の形態であってもよい。そのような塩としては、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）の塩、有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）の塩等が挙げられる。

## 2. ビッグアンジオテンシン - 2 5 ( B A n g - 2 5 ) の診断用途

ビッグアンジオテンシン - 2 5 ( B A n g - 2 5 ) は、後記実施例に示すように、糸球体上皮細胞（ポドサイト）に特異的に局在し、蛋白尿を伴う糖尿病患者や重度腎障害者において尿中 B A n g - 2 5 濃度、尿中 B A n g - 2 5 / クレアチニン比が有意に上昇し、尿中 B A n g - 2 5 / クレアチニン比が尿蛋白や糸球体濾過率（e G F R）と正の相関がある。従って、B A n g - 2 5 は糖尿病性腎症などの腎臓疾患の診断用マーカーとして利用できる。また、B A n g - 2 5 は、R A S 関連ペプチドであるから、アンジオテンシン I ( A n g I )、アンジオテンシン II ( A n g II ) などの他の R A S 関連ペプチドと同様に、高血圧症に起因する循環器疾患の診断用マーカーとなりうる。

よって、本発明によれば、被験体より採取した生体試料における B A n g - 2 5 の量を測定することを含む、腎臓疾患または循環器疾患の診断のための検査方法が提供される。

本発明において「被験体」は哺乳動物であれば限定されないが、ヒトが特に好ましい。ヒト以外の被験体としては、例えば、サル、チンパンジー等の非ヒト霊長類や、イヌ、ウシ、マウス、ラット、モルモット等の他の哺乳動物が挙げられる。

「生体試料」としては、前記 B A n g - 2 5 が存在する体液または組織であれば特に限定はされない。例えば、体液として尿、血液、汗、唾液、髄液、腹水、リンパ液等が、組織として腎臓、心臓、血管、脳、副腎、脾臓、卵巣、胎盤、精巣等に由来する組織、胃腸内分泌細胞、脂肪細胞が挙げられる。このうち、尿、血液、腎組織が好ましい。尿や血液は、被験体に負荷が少なく、生体試料として通常頻繁に用いられているため、尿や血液を用いることが特に好ましい。非侵襲的に生体試料を採取できる点において尿がさらに好ましい。

本発明の方法において「診断のための検査」とは、B A n g - 2 5 の量の測定および必要により対照との比較すること、診断のためのデータを取得することをいう。B A n g - 2 5 の量の測定は、標準サンプルとの比較などにより絶対量を測定してもよいが、必ずしも B A n g - 2 5 の絶対的な量を測定する必要はなく、対照サンプルにおける B A n g - 2 5 の量との相対的な関係が明らかになれば十分である。

本発明において「診断」とは、典型的には、被験体が腎臓疾患や循環器疾患に罹患しているか否かの判定（狭義の診断）を意味するが、これには限定されず、該疾患の重症度の判定、該疾患に対する治療効果の判定、および治療後に該疾患を再発する危険性が存在するか否かの判定をも包含する概念（広義の診断）である。

本発明の方法により診断できる腎臓疾患としては、例えば、糖尿病性腎症、良性腎硬化症、巣状性糸球体硬化症、膜性腎症、微小変化型ネフローゼ症候群、膜性増殖性糸球体腎炎、急速進行性糸球体腎炎、メサンギウム増殖性腎炎、I g A 腎症、ループス腎炎、急性腎炎、慢性腎炎（慢性糸球体腎炎）、急性腎不全、慢性腎不全、血尿、蛋白尿、電解質異常、悪性高血圧などが挙げられる。また、循環器疾患としては、高血圧症によって引き起こされる動脈硬化症、狭心症、心筋梗塞、不整脈、弁膜症、心不全、脳卒中などが挙げられる。

B A n g - 2 5 の測定は、免疫学的測定方法、質量分析方法（L C / M S、M S / M S、L C / M S / M S 等）などの公知の測定方法により行うことができる。

免疫学的測定方法により行う場合は、B A n g - 2 5 に特異的に結合し得る抗体を用いて行う。B A n g - 2 5 に特異的に結合する抗体は、B A n g - 2 5、又は B A n g - 2 5 の部分配列からなるペプチドを抗原として用い、常法により作成された抗体を好適に使用できる。B A n g - 2 5 と A n g I 及び A n g II とは N 末端が共通していることから、B A n g - 2 5 を抗原として誘導された抗体が、A n g I 及び A n g II にも結合性を示す可能性がある。その場合は、B A n g - 2 5 の C 末端を含む部分配列からな

10

20

30

40

50

るペプチド（例えば B A n g - 2 5 の 1 8 番目 ~ 2 5 番目までのペプチド）を用いたアフィニティカラムにより B A n g - 2 5 特異的抗体を精製することが好ましい。また、B A n g - 2 5 の C 末端端を含む上記部分配列からなるペプチドを抗原として用いることにより、B A n g - 2 5 特異的抗体を調製することもできる。

抗体はポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。また抗体は B A n g - 2 5 に特異的に結合し得る限り断片として使用することもできる。抗体の断片としては、例えば、F a b 断片、F ( a b ' ) 2 断片、単鎖抗体 ( s c F v ) 等が挙げられる。

モノクローナル抗体は例えば次の手順で作製することができる。

上記の抗原を、動物に対して、抗原の投与により抗体産生が可能な部位に、それ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与する。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。用いられる動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギなどの哺乳動物が挙げられるが、マウスが好ましい。抗血清中の抗体価の測定は常法により行うことができる。

10

抗原を免疫された動物から抗体価の認められた個体を選択し、最終免疫の 2 ~ 5 日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。融合操作は既知の方法、例えば、N a t u r e 2 5 6 : 4 9 5 ( 1 9 7 5 ) 記載の方法に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール ( P E G ) などが挙げられる。骨髄腫細胞としては、例えば、N S - 1、P 3 U 1、S P 2 / 0 などが挙げられる。

20

モノクローナル抗体の選別は、公知の方法あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常は H A T ( ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン ) を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様の、例えば塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体 ( 例えば、D E A E ) による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテイン A またはプロテイン G などを用いた特異的精製法による免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

30

一方、ポリクローナル抗体は例えば次の手順で作製することができる。

ポリクローナル抗体は、例えば、抗原とキャリアとの複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から B A n g - 2 5 に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。ポリクローナル抗体の作製に使用する抗原はモノクローナル抗体の作製におけるのと同様である。抗原とキャリアとの複合体を形成する際に、キャリアの種類および抗原とキャリアとの混合比は、キャリアに架橋させた抗原に対して抗体が効率よくできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよい。キャリアとしては、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等が用いられる。また、抗原とキャリアのカップリングには、種々の縮合剤を用いることができ、具体的にはグルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

40

抗原とキャリアとの複合体は、免疫される動物に対して、抗体産生が可能な部位に、それ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約 2 ~ 6 週毎に 1 回ずつ、計約 3 ~ 1 0 回程度行なうことができる。用いられる動物としては、モノクローナル抗体作製の場合と同様の哺乳動物が挙げられる。ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取

50

することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の手順で行なうことができる。

本発明の抗体は検出のために適宜標識していてもよい。標識物質は、酵素、放射性同位体、蛍光色素を使用することができる。また、抗体を標識せずに、該抗体に特異的に結合する物質、例えば、プロテインAやプロテインGを標識して間接的に検出することもできる。

本発明の抗体を用いるB A n g - 2 5の量の免疫学的測定法としては、特に制限はなく、従来公知の方法、例えば酵素免疫測定法（E I A法）、ラテックス凝集法、免疫クロマトグラフィー法、ウエスタンブロット法、放射免疫測定法（R I A法）、蛍光免疫測定法（F I A法）、ルミネッセンス免疫測定法、スピン免疫測定法、抗原抗体複合体形成に伴う濁度を測定する比濁法、抗体固相膜電極を利用し抗原との結合による電位変化を検出する酵素センサー電極法、免疫電気泳動法などを採用することができる。これらの中でもE I A法またはウエスタンブロット法が好ましい。なお、E I A法には、競合的酵素免疫測定法や、サンドイッチ酵素結合免疫固相測定法（サンドイッチE L I S A法）等が含まれる。

例えば、サンドイッチE L I S A法の場合は、上記のB A n g - 2 5に特異的に結合する抗体を固相に結合させ、これに被験体から採取した生体試料、好ましくは尿を加えて反応させ、固相を洗浄した後、アルカリホスファターゼやパーオキシダーゼなどの酵素で標識されたヒト免疫グロブリンに対する二次抗体を加えて反応させ、前記酵素に応じた基質（発色剤）を添加し、生じた発色を、分光光度計、蛍光光度計などを用いて反応液の吸光度を測定することにより生体試料中のB A n g - 2 5を定量することができる。固相としては、例えばポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、フッ素樹脂、ガラス、金属などが使用できる。担体の形状としては、プレート、ビーズ、セル、試験管などが挙げられる。好ましくは、エンザイムイムノアッセイ用のマイクロタイタープレート（96穴マイクロタイタープレート）などの市販の固相を使用すればよい。

上記のような方法にて測定したB A n g - 2 5の量を用いて被験体の腎臓疾患または循環器疾患の診断を行う場合、基準値との比較により行うことが好ましい。例えば、疾患の有無の判定を行なう場合は、健常体から採取した生体試料におけるB A n g - 2 5の量を基準値とすることができる。また、治療の効果の判定の際には、治療前の被験体から採取した生体試料におけるB A n g - 2 5の量を基準値とすることもできる。本発明では、比較対象となるこれらの検体を「対照」と称する。

対照との比較において診断する場合、被験体から採取した生体試料におけるB A n g - 2 5の量が、対照のB A n g - 2 5量と比較して有意に多いときに、被験体が腎臓疾患や循環器疾患に罹患している、あるいは対照と比較してより重度の腎臓疾患や循環器疾患であると判断される。

より典型的な例では、尿を用いて被験体が腎臓疾患または循環器疾患に罹患しているか否かを判定する場合は、被験体から採取した尿サンプル中のB A n g - 2 5の量を測定し、当該量と、対照として健常体から採取した尿サンプル中のB A n g - 2 5の量とを対比し、前者が後者より有意に多いときに、該被験体が腎臓疾患または循環器疾患に罹患している可能性が高いと診断することができる。また、腎臓疾患または循環器疾患に対する治療効果を判定する場合は、対照として治療前の被験体から採取した尿サンプルを用い、治療後の当該被験体から採取した尿サンプル中のB A n g - 2 5の量が対照（すなわち、治療前）よりも有意に減少していれば、治療効果があったと判定することができる。この場合、対照の尿サンプル中のB A n g - 2 5の量の測定は、被験体の尿サンプル中のB A n g - 2 5の測定と同様の手順で行うことができる。対照の尿サンプル中のB A n g - 2 5の量は、被験体の尿の測定のたびに測定してもよいし、事前に測定しておいてもよい。また、診断または判定に際しては、尿サンプル中のB A n g - 2 5量と尿クレアチニン量との比を指標としてもよい。血液等を生体試料とする場合にも、上記の尿の場合と同様の手

10

20

30

40

50

法によることができる。

### 3. 腎臓疾患または循環器疾患の治療薬のスクリーニング方法

本発明はまた、腎臓疾患または循環器疾患の治療薬をスクリーニングする方法に関する。

本発明のスクリーニング方法は、被験物質を哺乳動物由来の糸球体上皮細胞に接触させるか、または、被験物質を非ヒト哺乳動物に投与し、前記細胞、尿または血液における  $B A n g - 2 5$  の量を測定し、その変化を調べることにより行なう。被験物質が、 $B A n g - 2 5$  の量を減少させる場合には当該被験物質は腎臓疾患または循環器疾患の治療薬の候補となりうる。

被験物質を接触させる細胞は、糸球体上皮細胞のほか、心筋細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、メサングウム細胞、近位尿細管上皮細胞、線維芽細胞、免疫細胞、間質細胞等の腎臓、心臓、血管に由来する細胞を使用することが望ましい。このほかにも、アンジオテンシノーゲンを産生する臓器である、脳、副腎、卵巣等に由来する細胞や脂肪細胞を用いることも可能である。細胞は、ヒト、非ヒト哺乳動物のいずれに由来するものであってもよい。

被験物質を非ヒト哺乳動物に投与する場合、腎障害または高血圧症のモデル動物（例えば、ポドサイト障害誘発モデルマウス（ $N E P 2 5$  マウス）、 $H I G A$  マウス、高血圧自然発症（ $S H R$ ）ラット、 $D a h 1$  食塩感受性ラット、 $S H R S P$  脳卒中易発症ラット、つくば高血圧マウス、遺伝性ネフローゼ  $I C G N$  マウス等）を使用することが好ましい。

本発明のスクリーニング方法の対象となる被験物質の種類は特に限定されない。例えば、動・植物組織の抽出物もしくは微生物培養物等の複数の化合物を含む混合物、またそれらから精製された標品；天然に生じる分子（例えば、アミノ酸、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸、脂質、ステロイド、糖タンパク質、プロテオグリカンなど）；あるいは天然に生じる分子の合成アナログ又は誘導体（例えば、ペプチド擬態物など）；及び天然に生じない分子（例えば、コンビナトリアルケミストリー技術等を用いて作成した低分子有機化合物）；ならびにそれらの混合物などを挙げることができる。また、被験物質としては単一の被験物質を独立に試験しても、いくつかの候補となる被験物質の混合物（ライブラリーなどを含む）について試験をしてもよい。複数の被験物質を含むライブラリーとしては、合成化合物ライブラリー、ペプチドライブラリーなどが挙げられる。

### 4. 腎臓疾患または循環器疾患の診断薬および診断用キット

本発明はまた、 $B A n g - 2 5$  に特異的に結合する抗体を含有する、腎臓疾患または循環器疾患の診断薬に関する。

本発明の診断薬は、必要な試薬とともにキット化することもできる。例えばキットには、前記の  $B A n g - 2 5$  に特異的に結合する抗体、標識化された二次抗体、検出のための試薬等の必要な構成要素が含まれ得る。キットにはさらに、標準試料、緩衝液、溶解液、洗浄液、反応停止液、使用説明書が含まれていてもよい。

また、 $B A n g - 2 5$  に特異的に結合する抗体はチップ上に高密度に貼り付けてプロテインチップとしてよく、このようなプロテインチップも本発明の診断薬に包含される。

以下、実施例によって本発明を更に具体的に説明するが、これらの実施例は本発明の範囲を限定するものでない。

#### 【実施例 1】

#### 【0008】

#### 1. 実験方法

##### (1) 精製方法

3名の健常者から 5.5 L の尿を採取した。次にこの尿を  $S e p - P a k C 1 8$  カートリッジにアプライし、0.1% トリフルオロ酢酸（ $T F A$ ）含有 60% アセトニトリルで溶出した。溶出サンプルを、0.1 M  $N H _ 4 C O O H$ （ $p H 4 . 0$ ）で溶出した  $C M 5 2$  カラムにアプライし、そして  $S e p h a d e x C - 5 0$  を用いたゲルろ過に供した。ペプチド抽出物を、ジフェニルカラムを使用した逆相高性能液体クロマトグラフィー

10

20

30

40

50

(RP-HPLC)、および、抗-N末端Ang I I抗血清を用いて調製したアフィニティカラム(Affi-Gel 10 Active Ester Agarose; Bio Rad製)に供した。最後に、精製したペプチドをODS-120Aカラムを用いるRP-HPLCに供した(溶出グラジエント: 0.1%トリフルオロ酢酸に溶解した10%~60%のアセトニトリルの直線勾配を1ml/minの流出速度で60分間)。

これらの精製ステップは既報(S. Nagata, et al., Isolation and identification of proangiotensin-12, a possible component of the renin-angiotensin system, Biochem Biophys Res Commun 350(2006)1026-1031.)に記載のとおり、ラジオイムノアッセイ(RIA)を用いて免疫反応性N末端Ang I Iをモニタリングしながら行なった。

10

## (2) 構造決定

精製したペプチドのアミノ酸配列及び分子量を決定するために、タンデム質量分析を、QSTAR Elite Hybrid LC/MS/MS System(AB SCIEX, 米国)を用いるポジティブエレクトロスプレーイオン化法およびProCise 494 HT Protein Sequencing System(Applied Biosystems, 米国)を用いて実施した。試料を0.1%ギ酸含有50%アセトニトリル溶液に溶解した。糖鎖を決定するための酵素的除去、蛍光標識、N-グリカンの分離および構造同定のための条件は、既報(H. Nakagawa, et al., Identification of neutral and sialyl N-linked oligosaccharide structures from human serum glycoproteins using three kinds of high-performance liquid chromatography, Anal Biochem 226(1995)130-138.; H. Yagi, et al., Development of structural analysis of sulfated N-glycans by multidimensional high performance liquid chromatography mapping methods, Glycobiology 15(2005)1051-1060.)に従った。すなわち、脱脂した抽出物をペプシンとグリコアマミダーゼAを用いてタンパク分解し、得られたペプチドをさらにプロナーゼ(pronase)で処理してアミノ酸にした。Bio-Gel P-2クロマトグラフィーによる精製後、脱離したN-グリカンの還元末端を蛍光2-アミノピリジンで標識化した。Sephadex G-15クロマトグラフィーによって過剰な試薬を除去した後、ピリミジルアミノ(PA)-グリカンをTSK-gel diethylaminoethyl(DEAE)-5PWカラム(東ソー; 東京、日本)を用いて電荷に基づいて分離した。各分離画分をさらに疎水性に基づいて分離するためのShim-pack HRC octadecyl silica(ODS)column(島津製作所; 京都、日本)にアプライし、各ピークの溶出時間を糖単位(GU)値と表した。各PA-グリカン画分の分子量はMALDI-TOF-MSによって解析した。2種のグリカンを含む画分をTSK-gel Amide-80 column(Tosoh)によって分子量サイズに従ってさらにサブフラクション化し、そして溶出位置をGU値において算出した。PA-グリカン試料をそれらのGUおよび分子量値に基づいてマッピングし、そして、それらの座標をGALAXYデータベース上の参照PA-グリカンのそれらと比較した。

20

30

40

## (3) ビッグアンジオテンシン-25の変換

### (3-1) レニン(Renin)反応性の検討

(2)で構造決定したペプチドに相当するビッグアンジオテンシン-25(BAng-25)、ビッグアンジオテンシン-25からN-型糖鎖を除いたビッグアンジオテンシン-25(Non-glycosyl chain BAng-25)、およびビッグアンジオテンシン-25のN-型糖鎖をGlcNAcに置換したビッグアンジオテンシン-25(BAng-25+GlcNAc)の3種のペプチドを合成した。

50

上記3種のペプチドの各々10 $\mu$ gを、組換えヒトレニン (AnaSpec, Inc., 米国) (100U) *in vitro*でインキュベートした。インキュベーションは100mM NaClを含む50mM Tris-HCl (pH8.0) 200 $\mu$ L中で、37 $^{\circ}$ Cにて1時間行なった。各反応産物の半量 (5 $\mu$ g) を前述したグラジエントを用いるRP-HPLCに供した。

#### (3-2) キマーゼ (Chymase) 反応性の検討

上記3種のペプチドの各々10 $\mu$ gを、ヒト皮膚マストセル由来キマーゼ (ELASTIN PRODUCTS COMPANY, INC., 米国) 43.4mUと*in vitro*でインキュベートした。インキュベーションは3M NaClを含む600mM Tris-HCl (pH8.0) 200 $\mu$ L中で、25 $^{\circ}$ Cにて1時間行なった。各反応産物の半量 (5 $\mu$ g) をRP-HPLCに供した。

・条件

カラム: ODS

Buffer: A 水:アセトニトリル:10%TAF = 90:10:1

B 水:アセトニトリル:10%TAF = 40:60:1

A-Buffer 100%から1時間でB-Buffer 100%へグラジエントをかける。

#### (4) ヒトビッグアンジオテンシン - 25の免疫染色

ヒトビッグアンジオテンシン - 25を特異的に検出するために、該ペプチドのC末端部分に対する抗血清を用いた。抗体を用いる免疫染色はScrum Inc. (東京、日本) のビッグアンジオテンシン - 25の(18-25)を用いて調製した。常套的にホルマリン固定し、パラフィン包埋した組織ブロックを4 $\mu$ mの切片にカットし、抗-ウサギポリクローナル抗体 (PBSで100倍希釈) を用いて免疫組織学的に染色した。陰性コントロールは、非免疫ウサギ血清 (Dako Japan Inc.) を用いた。切片をEnVision+ (Dako Japan Inc.) で染色した。ホースラディッシュパーオキシダーゼ活性を、過酸化水素を含む3,3'-ジアミノベンジジンで可視化し、該切片をマイヤーのヘマトキシリンで対比染色した。

#### (5) 尿試料採取およびビッグアンジオテンシン - 25の測定

518被験者を宮崎県宮崎市内の医療機関から募った。尿試料をSep-Pak C18カートリッジにアプライし、0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) 含有60%アセトニトリルで溶出し、各試料の免疫活性N-末端ビッグアンジオテンシン - 25をRIAで測定した。尿蛋白、尿中クレアチニン、および血清クレアチニンはSRL, Inc. (東京、日本) で測定した。推定される糸球体濾過率 (eGFR) は下記式を用いて算出した。

$$eGFR (mL/min/1.73m^2) = 194 \times \text{年齢 (オ)}^{-0.287} \times \text{血清クレアチニン (mg/dL)}^{-1.094}$$

(女性の場合は $\times 0.739$ )

#### (6) 統計学的分析

蛋白尿陽性 (+) 群および蛋白尿陰性 (-) 群間でのデータ比較を独立t-検定 (unpaired t-test) を用いて行なった。eGFRデータの比較は分散分析 (ANOVA) により行い、次いでBonferroni's検定を行うことにより行なった。数値は平均値 $\pm$ S.E.で示す。統計的な有意差は $P < 0.05$ に設定した。

## 2. 結果

### (1) ビッグアンジオテンシン - 25の構造解析

ヒト尿をゲル濾過後、アンジオテンシノーゲンN末端に特異的なラジオイムノアッセイ (RIA) で各画分の免疫活性を測定した結果、分子量が約5,000のところに高い活性を持つ画分があった (図1A)。すなわち、この画分中に、尿中に存在するアンジオテンシンに関連するペプチドのうち、最も主要なペプチドが存在することが明らかとなった。次に、高い免疫活性が見られた画分をイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティ精製法、および逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) で精製を繰り返し (溶出グラジエント: 0.1%トリフルオロ酢酸に溶解した10%~60%のアセトニトリル

の直線勾配を  $1 \text{ ml} / \text{min}$  の流出速度で 60 分間)、最終的に単一のピークを得た (図 1 B)。

この精製ペプチドサンプルを質量分析に供したところ、6 価イオン ( $780.2 \text{ m/z}$ )、5 価イオン ( $936.0 \text{ m/z}$ )、4 価イオン ( $1169.8 \text{ m/z}$ ) のピークが検出された (図 1 C)。これらのデータから分子量が  $4675.1$  であることが判明したが、構造解析には至らず、糖鎖の付加を示すピークが検出された。さらに、精製ペプチドのこの糖鎖を N - グルコシダーゼによって切断し、質量分析に供したところ、5 価イオン ( $611.71 \text{ m/z}$ ) および 4 価イオン ( $764.39 \text{ m/z}$ ) が検出された (データは示さず)。

精製ペプチドのアミノ酸配列をプロテインシーケンサーにより解析したところ、25 個のアミノ酸が検出され、18 位には Cys のデヒドロ体が検出された。この配列は、アンジオテンシノーゲンの N 末端に相当しており、14 位のアミノ酸は Asn であることと質量分析で糖鎖の存在が確認されたことから、14 位のアミノ酸に N 型糖鎖が付加していると考えられた (図 1 D)。また、18 位のアミノ酸は質量分析の結果、Cys - Cys (シスチン) であることが明らかとなった (図 1 D)。

精製ペプチドに含まれる N 型糖鎖 (N - グリカン) の一次解析の結果、1 種類の中性糖 (分子量  $1720 \text{ Da}$ 、糖組成 (Hex) 5 (HexNAc) 4 (PA) 1) が検出された (図 2 A)。この N 型糖鎖をさらにアミドカラムによって分画し、その糖鎖構造を HPLC 溶出位置 (ODS カラムの溶出位置:  $9.8$ 、アミドカラムの溶出位置:  $6.9$ ) と MALDI - TOF - MS データに基づきマッピング法によって同定した結果、N 型糖鎖の座標は GALAXY の公知の参照 N 型糖鎖 (code no. 200.4) のそれらと一致した。この候補糖鎖と精製糖鎖の共クロマトグラフィー (co - chromatography) を行なったところ、ピークが一致した (図 2 B)。

上記の精製ペプチドをビッグアンジオテンシン - 25 と命名した。ビッグアンジオテンシン - 25 は 25 個のアミノ酸からなり (配列番号 1)、14 位のアミノ酸に N - 型糖鎖が付加されており、さらに、18 位のアミノ酸にシステインが付加した特異的な構造を有していた (図 2 C)。

(2) ビッグアンジオテンシン - 25 のアンジオテンシン I (Ang I)、アンジオテンシン II (Ang II) への変換

(2 - 1) レニン (Renin) 反応性

ビッグアンジオテンシン - 25 (糖鎖あり; BAng - 25)、ビッグアンジオテンシン - 25 (糖鎖なし; Non - glycosyl chain BAng - 25)、ビッグアンジオテンシン - 25 (GlcNAc 置換; BAng - 25 + GlcNAc) の 3 種のペプチド (図 3) をレニンとインキュベートした結果を図 4 に示す。BAng - 25 はレニンによって切断されず、Ang I が生成しなかったが (図 4 B)、Non - glycosyl chain BAng - 25 (図 4 D) と BigAng - 25 + GlcNAc (図 4 F) はレニンによって切断され Ang I が生成された。

図 5 はビッグアンジオテンシン - 25 (糖鎖なし; Non - glycosyl chain BAng - 25) およびビッグアンジオテンシン - 25 (糖鎖あり; BAng - 25) をレニン 20 U で 24 時間反応した結果を示す。糖鎖なしの場合は速やかに Ang I が生成されているのに対し、糖鎖がある場合は 24 時間たっても Ang I が生成されなかった。これらの結果は、糖鎖が付加されている BAng - 25 はレニン抵抗性を有することを示している。このように、糖鎖の有無はレニンの酵素特異性に深く関わっていると考えられた。

(2 - 2) キマーゼ (Chymase) 反応性

ビッグアンジオテンシン - 25 (糖鎖あり; BAng - 25)、ビッグアンジオテンシン - 25 (糖鎖なし; Non - glycosyl chain BAng - 25)、ビッグアンジオテンシン - 25 (GlcNAc 置換; BAng - 25 + GlcNAc) の 3 種のペプチドをキマーゼとインキュベートした結果を図 6 に示す。BAng - 25 (図 6 B) と Non - glycosyl chain BAng - 25 (図 6 E) はキマーゼによ

10

20

30

40

50

って切断され、Ang IIが生成したが、BAng - 25 + GlcNAc (図6F)はキマーゼによって切断されず、Ang IIが生成されなかった。BAng - 25がキマーゼとの反応でAng IIが生成されたことは、非レニン依存性のAng II産生経路の存在を示唆するものである。

図7は、ビッグアンジオテンシン - 25 (糖鎖あり; BAng - 25)、ビッグアンジオテンシン - 25 (糖鎖なし; Non-glycosyl chain BAng - 25)、ビッグアンジオテンシン - 25 (GlcNAc置換; BAng - 25 + GlcNAc)の3種のペプチド(各10 $\mu$ g)を緩衝液(0.6M Tris-HCl, pH8.0, 0.3M NaCl:190 $\mu$ l)中でキマーゼ(0.4 $\mu$ l)と25にて24時間反応させた結果を示す。BAng - 25とNon-glycosyl chain BAng - 25は速やかにAng IIが生成されているのに対し、BAng - 25 + GlcNAcは24時間たってもAng IIが生成されなかった。

10

以上のビッグアンジオテンシン - 25と酵素反応性の結果をまとめると次のようになる。

ビッグアンジオテンシン - 25は、アンジオテンシノーゲンやN-結合型糖鎖を有しないBAng - 25ペプチドに比較してレニン抵抗性を有するが、キマーゼには反応性を有する。糖鎖無しの場合には、レニンにもキマーゼにも反応性を有する。GlcNAc置換の場合には、レニンとの反応性を有するが、キマーゼとは反応しない。

このように、糖鎖の有無や種類によってレニン、キマーゼの作用が異なることがわかった。

20

### (3) ヒトビッグアンジオテンシン - 25の腎臓における発現

組織染色を外科手術標本の腎臓内で可視化したところ、糸球体上皮細胞(ポドサイト)が特異的に染色されていた(図8A)。

### (4) 尿中ビッグアンジオテンシン - 25との相関関係

図8Bは、3群(eGFR(ml/min/1.73m<sup>2</sup>): >90、90-30、<30)における尿中ビッグアンジオテンシン - 25/クレアチニン比を示す。尿中ビッグアンジオテンシン - 25/クレアチニン比は、eGFR < 30(重度腎障害)の群では他の2群に比べて顕著に高かった。また、糖尿病患者で尿蛋白が陽性の場合(Upro(+))と陰性の場合(Upro(-))と比較すると、尿中ビッグアンジオテンシン - 25/クレアチニン比は尿蛋白が陽性の場合(Upro(+))は陰性の場合(Upro(-))と比べて有意に高かった(図8C)。また、ビッグアンジオテンシン - 25/尿中クレアチニン比と尿蛋白(クレアチニン補正)とは正の相関があった(図8D)。

30

### (5) ヒトビッグアンジオテンシン - 25の他の組織における発現

外科手術標本から作成した各臓器(心臓、食道、副腎、膵臓、胃、大腸、胎盤、卵管、精巣)の組織ブロックの免疫染色を可視化した(図9~17)。その結果、心筋細胞、膵臓のランゲルハンス氏島、副腎髄質、精巣のセルトリ細胞、卵管の平滑筋細胞(SMC)、胎盤の絨毛外栄養膜細胞において強く染色された細胞が観察された(表1)。

【表 1】

表 1

臓器	組織	発現	
腎臓	糸球体上皮細胞	++	
心臓	左心室、心筋細胞	++	
肺	肺動脈、SMC(平滑筋細胞)	+	
	細気管支、上皮	+	
食道	重層扁平上皮(基底層)	+	
胃	腺(内分泌細胞)	+	10
	神経叢(粘膜下またはアウレルパツハ)	+	
大腸	クリプト細胞(内分泌細胞)	+	
肝臓	肝細胞	+	
脾臓	組織球	+	
膵臓	膵島(ランゲルハンス氏島)	++	
	外分泌腺(腺房/管)	-	
副腎	髄質	++	
	皮質	-	
リンパ節	組織球	+	
	樹状細胞	+	
精巣	セルトリ細胞	++	20
卵管	SMC(平滑筋細胞)	++	
胎盤	卵管上皮	+	
	絨毛外栄養膜細胞	++	
	絨毛	-	

## 【産業上の利用可能性】

## 【0009】

本発明は、腎臓疾患または循環器疾患の治療薬の診断薬またはキットの製造分野において利用できる。

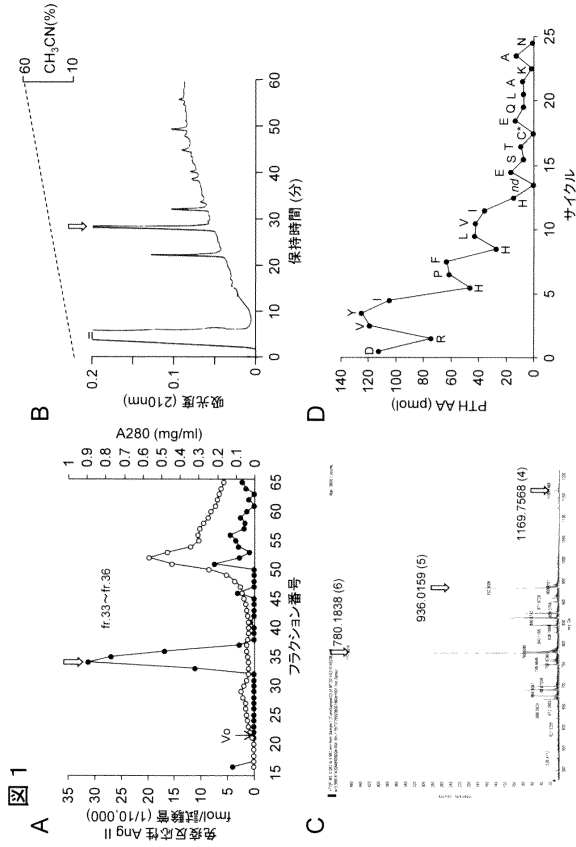
本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書に組み入れるものとする。 30

[配列表]

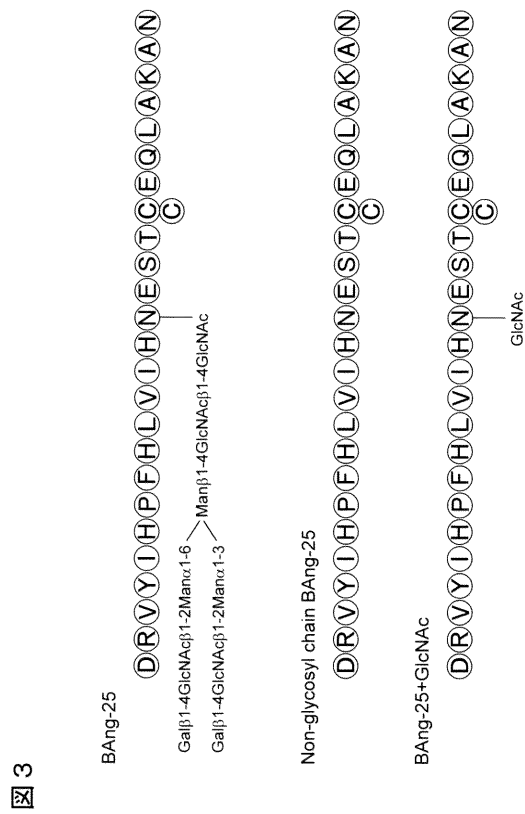
## SEQUENCE LISTING

<110> University of Miyazaki  
 <120> Novel peptide and uses thereof  
 <130> PH-5739-PCT  
 <150> JP 2012-244752  
 <151> 2012-11-06  
 <150> JP 2013-033651  
 <151> 2013-02-22  
 <160> 1  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1  
 Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe His Leu Val Ile His Asn Glu Ser  
 1                    5                                    10                                    15  
 Thr Cys Glu Gln Leu Ala Lys Ala Asn  
                   20                                    25

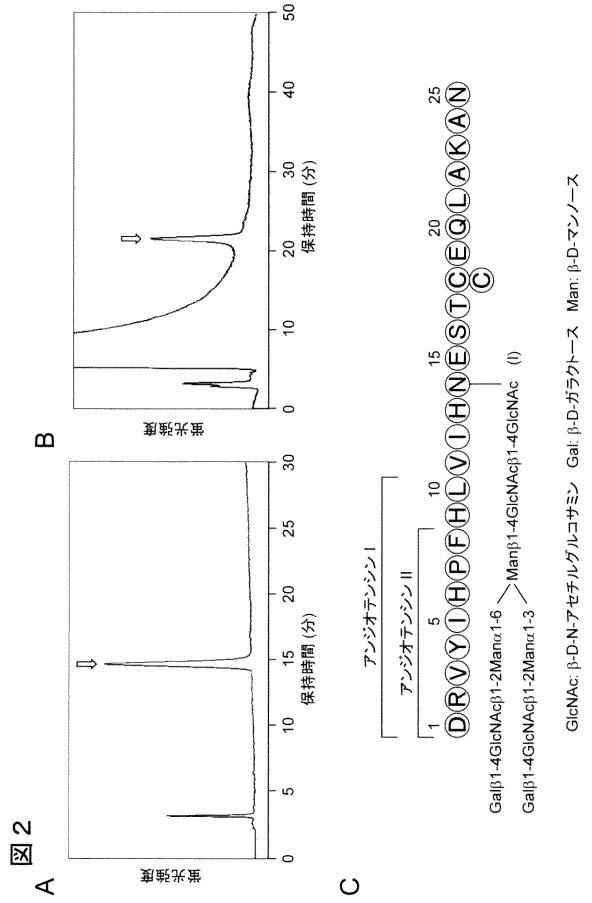
【 図 1 】



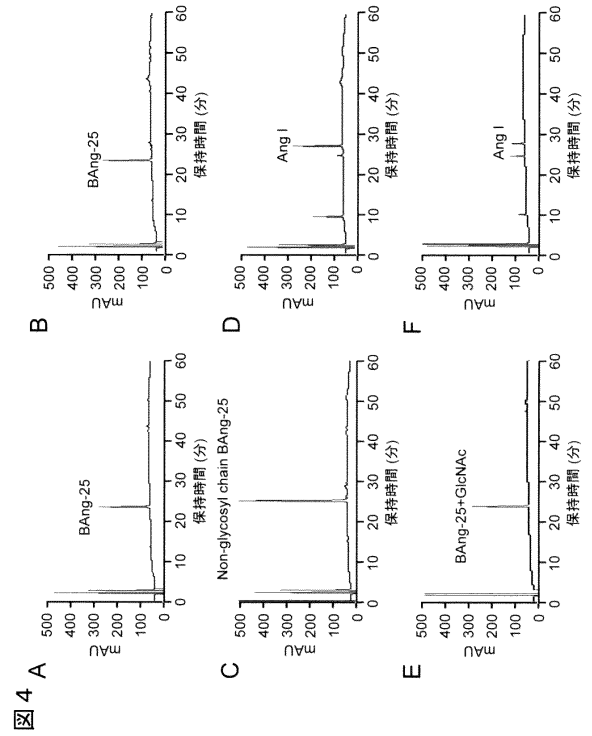
【 図 3 】



【 図 2 】



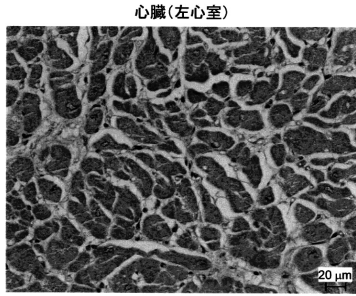
【 図 4 】



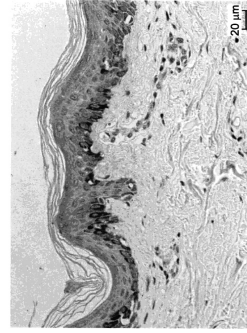


【 図 9 】

図 9

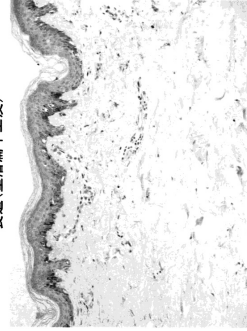


【 図 1 0 】

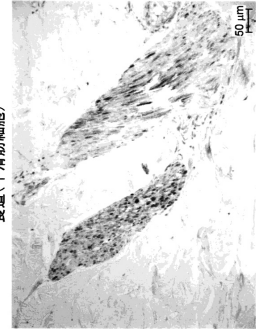


食道(重層扁平上皮)

図 1 0

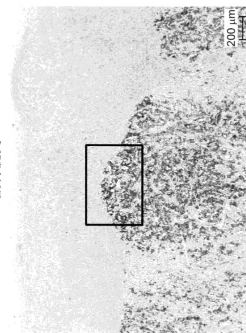
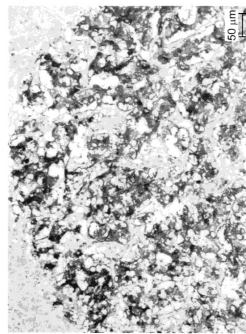
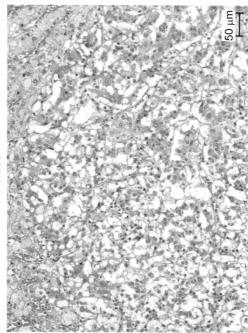


食道(平滑筋細胞)



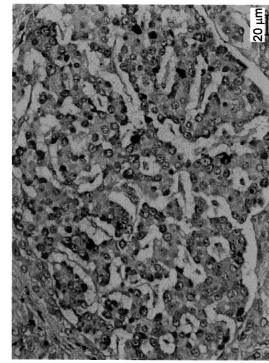
【 図 1 1 】

図 1 1

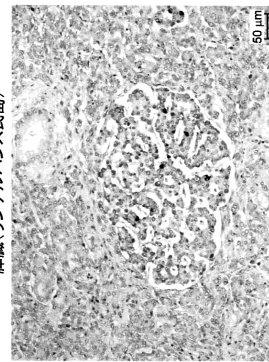


【 図 1 2 】

図 1 2



副腎(ランゲルハンス氏島)



【 図 1 3 】

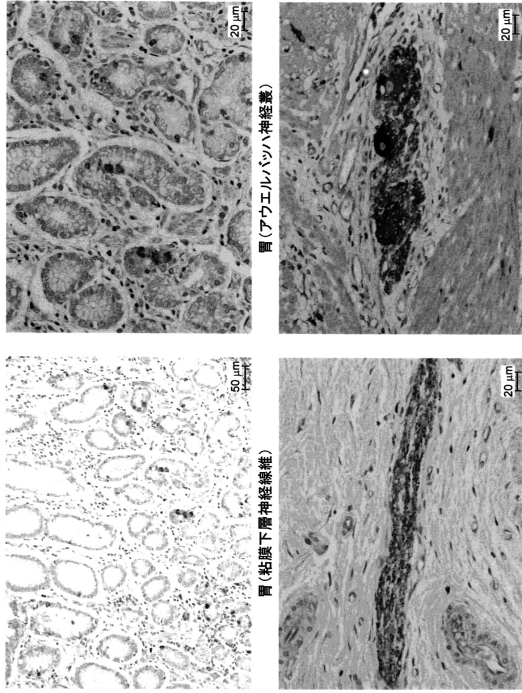


図 1 3

【 図 1 5 】

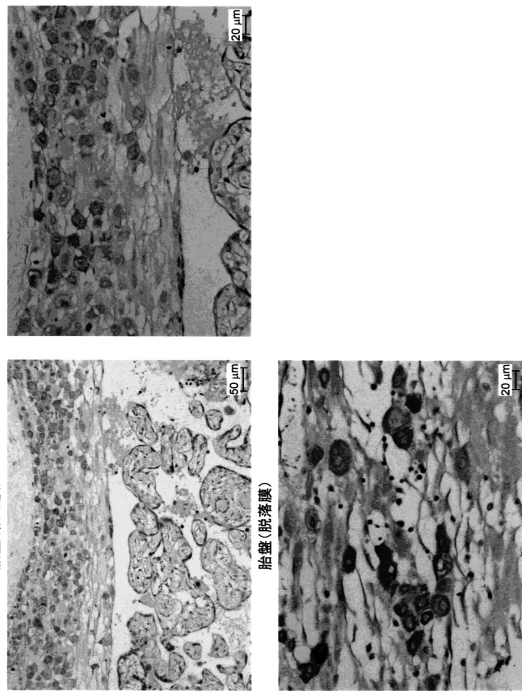
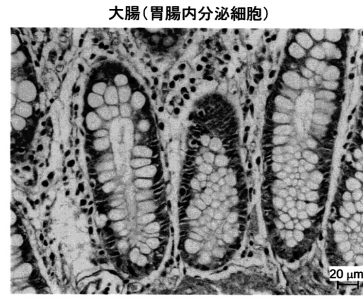


図 1 5

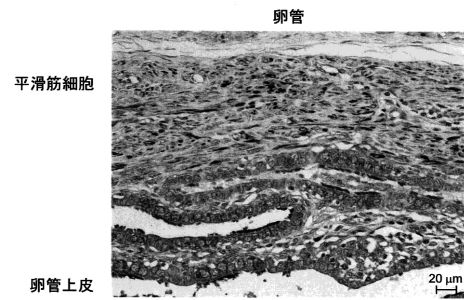
【 図 1 4 】

図 1 4



【 図 1 6 】

図 1 6



【 図 17 】

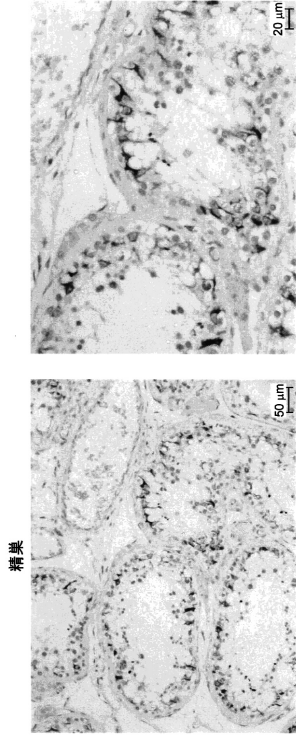


図 17

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			
<b>G 0 1 N 33/15</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N	33/15		Z
<b>G 0 1 N 33/50</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N	33/50		Z

(72)発明者 浅田 祐士郎  
宮崎県宮崎市清武町木原5200 国立大学法人宮崎大学医学部内

審査官 池上 文緒

(56)参考文献 国際公開第2005/114221(WO, A1)  
国際公開第2007/047796(WO, A1)  
独立行政法人産業技術総合研究所, 産総研ブックス きちんとわかる糖鎖工学, 白日社, 2008年9月, p.139-152  
NAGATA S., et al., Isolation and identification of proangiotensin-12, a possible component of the renin-angiotensin system, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006年, vol. 350, no.4, p.1026-1031  
AHMAD S., et al., Chymase-dependent generation of angiotensin II from angiotensin-(1-12) in human atrial tissue, PLoS ONE, 2011年, vol.6, no.12, e28501  
WESTWOOD BM., et al., Divergent pathways for the angiotensin-(1-12) metabolism in the rat circulation and kidney, Peptides, 2012年6月, vol.35, no.2, p.190-195

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

G 0 1 N

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

U n i P r o t / G e n e S e q

专利名称(译)	新型肽及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP6296615B2</a>	公开(公告)日	2018-03-20
申请号	JP2014545794	申请日	2013-11-06
申请(专利权)人(译)	国立大学法人宫崎		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人宫崎		
[标]发明人	北村和雄 永田さやか 浅田祐士郎		
发明人	北村 和雄 永田 さやか 浅田 祐士郎		
IPC分类号	C07K14/435 C07K16/18 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/68 G01N33/15 G01N33/50		
CPC分类号	C07K14/575 C07K7/14 C07K16/26 C07K2317/34 G01N33/6893 G01N33/74 G01N2333/96433 G01N2333/96483 G01N2500/04 G01N2800/32 G01N2800/347		
FI分类号	C07K14/435.ZNA C07K16/18 C12Q1/02 G01N33/53.V G01N33/68 G01N33/15.Z G01N33/50.Z		
优先权	2012244752 2012-11-06 JP 2013033651 2013-02-22 JP		
其他公开文献	JPWO2014073708A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明的一个目的是发现肾素 - 血管紧张素系统 (RAS) 的新组分并提供其作为心血管疾病或肾病的新生物标志物。本发明提供了一种与肾素 - 血管紧张素系统相关的新肽, 其包含SEQ ID NO: 1所示的氨基酸序列或通过缺失, 取代或添加除天冬酰胺外的一至几个氨基酸而衍生的氨基酸序列。第14位的残基和第14位天冬酰胺残基上加入的N-连接聚糖。使用这种肽作为生物标志物, 可以在早期阶段以简单的方式诊断肾病或心血管疾病而不强加一个主题的负担。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6296615号 (P6296615)
(45) 発行日 平成30年3月20日 (2018. 3. 20)	(24) 登録日 平成30年3月2日 (2018. 3. 2)	
(5) Int. Cl. F 1		
C07K 14/435 (2006.01)	C07K 14/435	ZNA
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18	
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53	V
G01N 33/68 (2006.01)	G01N 33/68	
請求項の数 13 (全 24 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2014-545794 (P2014-545794)	(73) 特許権者 504224153 国立大学法人 宮崎大学	
(86) (22) 出願日 平成25年11月6日 (2013. 11. 6)	宮崎県宮崎市学園木花台西 1 丁目 1 番地	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2013/080614	100091096	
(87) 国際公開番号 W02014/073708	(74) 代理人 弁理士 平本 祐輔	
(87) 国際公開日 平成26年5月15日 (2014. 5. 15)	100118773	
審査請求日 平成28年10月12日 (2016. 10. 12)	(74) 代理人 弁理士 藤田 郎	
(31) 優先権主張番号 特願2012-244752 (P2012-244752)	100120905	
(32) 優先日 平成24年11月6日 (2012. 11. 6)	(74) 代理人 弁理士 深見 伸子	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 北村 和雄	
(31) 優先権主張番号 特願2013-33651 (P2013-33651)	宮崎県宮崎市清武町木原 5 2 0 0 国立大	
(32) 優先日 平成25年2月22日 (2013. 2. 22)	学法人宮崎大学医学部内	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 永田 さやか	
	宮崎県宮崎市清武町木原 5 2 0 0 国立大	
	学法人宮崎大学医学部内	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 新規ペプチドおよびその用途		