

(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2019-100811

(P2019-100811A)

(43) 公開日 令和1年6月24日 (2019.6.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53</b> (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A N	4 H O 4 5
C O 7 K 14/47 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C O 7 K 14/47	
	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2017-230639 (P2017-230639)	(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
(22) 出願日	平成29年11月30日 (2017.11.30)	(71) 出願人	510097747 国立研究開発法人国立がん研究センター 東京都中央区築地五丁目1番1号
		(71) 出願人	504171134 国立大学法人 筑波大学 茨城県つくば市天王台一丁目1番1
		(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
		(71) 出願人	504176911 国立大学法人大阪大学 大阪府吹田市山田丘1番1号

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脳梗塞の発症リスクを高感度に検出する体液抗体バイオマーカー

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 脳梗塞の発症につながる兆候を的確に把握する手段を提供する。

【解決手段】 D I D O 1 蛋白質又はその一部、並びに / 或いは、 C P S F 2 蛋白質又はその一部、に対する生体から分離された体液サンプル中の抗体レベルを測定することを特徴とする、脳梗塞の発症に関するデータ取得方法。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

D I D O 1 蛋白質（配列番号 2 のアミノ酸配列）又はその一部、並びに / 或いは、C P S F 2 蛋白質（配列番号 6 のアミノ酸配列）又はその一部、に対する生体から分離された体液サンプル中の抗体レベルを測定することを特徴とする、脳梗塞の発症に関するデータ取得方法。

**【請求項 2】**

D I D O 1 蛋白質又はその一部に対する生体から分離された体液サンプル中の抗体レベルの測定による脳梗塞の発症に関するデータ取得は、慢性腎臓病を基礎疾患とする脳梗塞の発症に関するデータ取得であることを特徴とする、請求項 1 に記載の脳梗塞の発症に関するデータ取得方法。

10

**【請求項 3】**

C P S F 2 蛋白質又はその一部に対する生体から分離された体液サンプル中の抗体レベルの測定による脳梗塞の発症に関するデータ取得は、糖尿病を基礎疾患とする脳梗塞の発症に関するデータ取得であることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の脳梗塞の発症に関するデータ取得方法。

**【請求項 4】**

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 - 2 2 4 0 個であり、配列番号 6 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 - 7 8 2 個であることを特徴とする、請求項 1 - 3 のいずれか 1 項に記載のデータ取得方法。

20

**【請求項 5】**

配列番号 2 又は配列番号 6 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 - 3 0 個であることを特徴とする、請求項 1 - 3 のいずれか 1 項に記載のデータ取得方法。

**【請求項 6】**

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は、配列番号 3 のアミノ酸配列の全部又は一部を含む、あるいは、配列番号 3 のアミノ酸配列の全部又は一部である、ことを特徴とする、請求項 1 - 5 のいずれか 1 項に記載のデータ取得方法。

**【請求項 7】**

配列番号 2 のアミノ酸配列の一部は、配列番号 4 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 6 に記載のデータ取得方法。

30

**【請求項 8】**

配列番号 6 のアミノ酸配列の一部は、配列番号 7 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 5 に記載のデータ取得方法。

**【請求項 9】**

配列番号 2 のアミノ酸配列又はその一部、並びに / 或いは、配列番号 6 のアミノ酸配列又はその一部は、1 0 % 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 1 - 8 のいずれか 1 項に記載のデータ取得方法。

**【請求項 1 0】**

生体から分離された体液サンプルは、血液サンプル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。

40

**【請求項 1 1】**

血液サンプルは、血清又は血漿であることを特徴とする、請求項 1 0 に記載のデータ取得方法。

**【請求項 1 2】**

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、比濁法、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 - 1 1 のいずれか 1 項に記載のデータ取得方法。

**【請求項 1 3】**

50

請求項 1 - 1 2 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 D I D O 1 蛋白質、C P S F 2 蛋白質、又はこれらの部分配列を持つペプチド、に対する体液抗体をバイオマーカーとして検出することによる、脳梗塞の発症リスクの把握手段に関する発明である。

【背景技術】

【0002】

10

脳梗塞は、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、寝たきりになる原因の第一位である。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、脳梗塞の微細な兆候を把握し、その後の脳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、脳梗塞発症を予防できる可能性が極めて高い。

【0003】

そこで、脳梗塞の病状把握のために、H s p 6 0 (非特許文献 1)、R P A 2 (非特許文献 2)、S O S T D C 1 (非特許文献 3) が報告されている。また、脳梗塞に関連する疾患バイオマーカーとしては、動脈硬化の *high-density lipoprotein (HDL) - cholesterol*、*low-density lipoprotein (LDL) - cholesterol*、*total cholesterol (TC)* (非特許文献 4)、アディポネクチン (非特許文献 5)、*uric acid* (非特許文献 6)、*ATP 2 B 4* (非特許文献 7)、*BMP - 1* (非特許文献 7)、*D H P S* (非特許文献 8)、*S H 3 B P 5* (非特許文献 9)、心血管障害の *phospholipid* (非特許文献 10)、*apolipoprotein A - 1* (非特許文献 11)、*oxidized low-density lipoprotein* (非特許文献 12)、*heat shock proteins (Hsps)* (非特許文献 13)、糖尿病の *insulin* (非特許文献 14)、*glycohemoglobin (Hb A 1 c)* (非特許文献 15)、*glutamic acid decarboxylase (GAD)* (非特許文献 16)、*protein tyrosine phosphatase I A - 2* (非特許文献 17) 等が知られている。

20

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献 1】Kramer J, Harcos P, Prohaszka Z, Horvath L, Karadi I, Singh M, Csaszar A, Romics L, 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 2】Machida T, Kubota M, Kobayashi E, Iwadate Y, Saeki N, et al. Identification of stroke-associated-antigens via screening of recombinant proteins from the human expression cDNA library (SEREX). *J Translat Med* 2015; 13: 71.

40

【非特許文献 3】Goto K, Sugiyama T, Matsumura R, Zhang XM, Kimura R, et al. Identification of cerebral infarction-specific antibody markers from autoantibodies detected in patients with systemic lupus erythematosus. *J Mol Biomark Diagnos* 2015; 6: 2.

【非特許文献 4】Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011; 473: 317-325.

【非特許文献 5】Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006; 116: 1784-1792.

50

【非特許文献 6】Nakanishi N, Okamoto M, Yoshida H, Matsuo Y, Suzuki K, et al. 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* 2003; 18: 523-530.

【非特許文献 7】Hiwasa T, Machida T, Zhang XM, Kimura R, Wang H, et al. Elevated levels of autoantibodies against ATP2B4 and BMP-1 in sera of patients with atherosclerosis-related diseases. *Immunome Res* 2015; 11: 097.

【非特許文献 8】Nakamura R, Tomiyoshi G, Shinmen N, Kuroda H, Kudo T, et al. An anti-deoxyhypusine synthase antibody as a marker of atherosclerosis-related cerebral infarction, myocardial infarction, diabetes mellitus, and chronic kidney disease. *SM Atheroscler J* 2017; 1: 1001.

【非特許文献 9】Hiwasa T, Tomiyoshi G, Nakamura R, Shinmen N, Kuroda H, et al. Serum SH3BP5-specific antibody level is a biomarker of atherosclerosis. *Immunome Res* 2017; 13: 2.

【非特許文献 10】Liang KP, Kremers HM, Crowson CS, Snyder MR, Therneau TM, Roger VL, Gabriel SE. Autoantibodies and the risk of cardiovascular events. *J Rheumatol* 2009; 36: 2462-2469.

【非特許文献 11】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, Roux-Lombard P. Anti-apolipoprotein A-1 auto-antibodies are active mediators of atherosclerotic plaque vulnerability. *Eur Heart J* 2011; 32: 412-421.

【非特許文献 12】Fesmire J, Wolfson-Reichlin M, 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 13】Carbone F, Nencioni A, Mach F, Vuilleumier N, Montecucco F. Evidence on the pathogenic role of auto-antibodies in acute cardiovascular diseases. *Thromb Haemost* 2013; 109: 854-868.

【非特許文献 14】Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Ragh, PK, Paquette TL. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science* 1983; 222: 1337-1339.

【非特許文献 15】Rollins KE, Varadhan KK, Dhatariya K, Lobo DN. Systematic review of the impact of HbA1c on outcomes following surgery in patients with diabetes mellitus. *Clin Nutr* 2015; S0261-5614: 00082-5.

【非特許文献 16】Baekkeskov S, Aanstoot H, Christgau S, Reetz A, Solimena MS, Cascalho M, Folli F, Richter-Olsen H, DeCamilli P. Identification of the 64K autoantigen in insulin dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 1990; 347: 151-156.

【非特許文献 17】Payton MA, Hawkes CJ, Christie MR. 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 18】Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011; 473: 317-325.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

脳梗塞等の脳血管障害は日本人の死因の第4位を占め、寝たきりになる原因の第1位となっている。脳梗塞を一度発症すると、たとえ死に至らなくとも長いリハビリと薬の服用

10

20

30

40

50

を余儀なくされる。従って、発症を未然に防ぐことが第一であり、そのためのさまざまなリスクファクターが同定され、高血圧、高脂血症、糖尿病、喫煙習慣、及び血液検査の中性脂肪、悪玉コレステロール値、低アディポネクチン値等さまざまなものが知られている（非特許文献18、5）。しかし、糖尿病等は治療が難しく、一方で、血液検査項目が異常値でもただちに脳梗塞を発症するわけではない。リスクファクターを組み合わせた発症予測も試みられているが、まだ十分とは言えない。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、体液中のDIDO1蛋白質、CPSF2蛋白質、又はそれらの部分配列を持つペプチド、に対する体液抗体レベルを測定することにより、脳梗塞の発症につながる兆候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。

10

【0007】

本発明において「脳梗塞」とは、脳の血管が動脈硬化により狭くなり、血栓が詰まることによって酸素や栄養が欠乏するために脳神経細胞が障害を受ける疾患、である。

【0008】

本発明は、第一に、DIDO1蛋白質又はその一部、並びに/或いは、CPSF2蛋白質又はその一部、に対する生体から分離された体液サンプル中の抗体レベルを測定することを特徴とする、脳梗塞の発症に関するデータ取得方法（以下、本発明のデータ取得方法ともいう）を提供する。

【0009】

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DIDO1蛋白質は、death inducer-obliterator 1とも称されるDIDO1蛋白質の、1から6までのスプライシングバリエーション（アクセッションナンバーは1から6までそれぞれNM\_022105.4、NM\_080796.3、NM\_080797.3、NM\_033081.2、NM\_001193369.1、NM\_001193370.1がNCBIに登録されている）の一つである。DIDO1スプライシングバリエーション4遺伝子の塩基配列は、配列番号1に示す通りである。DIDO1蛋白質のスプライシングバリエーション1と2は562アミノ酸、スプライシングバリエーション3と6は1189アミノ酸、スプライシングバリエーション4と5は2240アミノ酸から成る。DIDO1の最長のスプライシングバリエーション4遺伝子のアミノ酸配列を、配列番号2に示す。後述する実施例で抗原として用いたDIDO1蛋白質はN末端から275アミノ酸のN末端領域部分（配列番号3）であり、この領域はDIDO1すべてのスプライシングバリエーションで共通する配列である。また、同じく実施例で抗原として用いたDIDO1ペプチドは543-560番目のアミノ酸配列（配列番号4）であり、この領域はDIDO1スプライシングバリエーション3から6に共通する配列である。DIDO1の蛋白質抗原でもペプチド抗原でも類似の結果を得ていることから、体液抗体が認識するDIDO1蛋白質は異なるスプライシングバリエーションを識別しているものではないと考えられる。即ち、本発明のDIDO1とは特定のスプライシングバリエーションに限定されるものではない。

20

30

【0010】

CPSF2蛋白質は、別名cleavage and polyadenylation specific factor 2、又はCPSF100と称され、アクセッションナンバー「NM\_017437」としてNCBIに登録されている。CPSF2遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列は、配列番号5と6に示す通りである。

40

【0011】

本発明のデータ取得方法の別の表現として、例えば、「生体から分離された体液サンプル中の、DIDO1蛋白質又はその一部、並びに/或いは、CPSF2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、脳梗塞発症の把握方法」が挙げられる。

【0012】

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

50

ト（以下、本発明のキットともいう）を提供する。

【0013】

本発明のデータ取得用キットの別の表現として、例えば、「生体から分離された体液サンプル中の、D I D O 1 蛋白質又はその一部、並びに / 或いは、C P S F 2 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、脳梗塞発症の把握方法を行うためのキット」が挙げられる。

【発明の効果】

【0014】

本発明により、D I D O 1 蛋白質、C P S F 2 蛋白質、又はそれらの部分配列を持つペプチドに対する体液抗体、をバイオマーカーとして用いることによって、脳梗塞発症のリスクを的確に把握する手段が提供される。これにより脳梗塞発症の予防を行うこと、及び、脳梗塞の治療動機が提供される。さらに、脳梗塞発症につながる動脈硬化関連疾患の的確な病状把握を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】D I D O 1 蛋白質（スプライシングバリエーション4）のアミノ酸配列（配列番号2）を一文字表示で示し、実施例で用いたD I D O 1 ペプチドのアミノ酸配列（配列番号4）に相当する部分に下線を施した図面である。

【図2】C P S F 2 全長蛋白質のアミノ酸配列（配列番号6）を一文字表示で示し、実施例で用いたC P S F 2 ペプチドのアミノ酸配列（配列番号7）に相当する部分に下線を施した図面である。

【図3】健常者（H D）、一過性脳虚血発作（T I A）患者及び急性脳梗塞（a C I）患者における、D I D O 1 血清抗体及びC P S F 2 血清抗体レベルをA l p h a L I S A 法により定量した行った結果を示す。D I D O 1 蛋白質抗原を用いた場合の結果をaに、C P S F 2 ペプチド抗原を用いた時の結果をb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抗体レベルを示すアルファカウントであり、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）のパーセンタイルを示す。

【図4】H D、急性心筋梗塞（A M I）及び糖尿病（D M）患者における、D I D O 1 血清抗体及びC P S F 2 血清抗体レベルを、A l p h a L I S A 法により測定した結果を示す。D I D O 1 蛋白質抗原を用いた場合の結果をaに、C P S F 2 ペプチド抗原を用いた時の結果をbに、それぞれ箱髭図で示している。箱髭図は図3の説明に記載したとおりである。

【図5】H Dと慢性腎臓病（C K D）患者における、D I D O 1 血清抗体及びC P S F 2 血清抗体レベルを、A l p h a L I S A 法により測定した結果を示す。D I D O 1 蛋白質抗原を用いた場合の結果をaに、C P S F 2 ペプチド抗原を用いた時の結果をbに、それぞれ箱髭図で示している。箱髭図は図3の説明文に記載したとおりである。

【発明を実施するための形態】

【0016】

（1）本発明のデータ取得方法

（a）生体から分離された体液サンプル

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「生体から分離された体液サンプル」の体液とは、血液、リンパ液等であり、「サンプル」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。当該体液サンプルの中でも血液サンプルが好適である。血液サンプルとしては、全血、血清、血漿等のサンプルが挙げられるが、血清サンプル又は血漿サンプルが好ましく、血清サンプルが特に好ましい。血液サンプルは、ヘパリン処理等の凝固防止処理が施されていてもよい。

【0017】

（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D I D O 1 蛋白質のア

10

20

30

40

50

ミノ酸配列である配列番号2、及びCPSF2蛋白質のアミノ酸配列である配列番号6は、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7-1189個、及び配列番号6のアミノ酸配列から7-782個の連続したアミノ酸配列を選んで体液抗体捕捉抗原とすることが可能であり、DIDO1の全てのスプライシングバリエーションにおいて共通する配列番号3のアミノ酸配列の全部又は一部を含む、あるいは、配列番号3のアミノ酸配列の全部又は一部である、ことが好ましい。さらに、より効率的な検出系の確立のために、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。

10

**【0018】**

また、これら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。ただし、目的の体液抗体(DIDO1蛋白質、CPSF2蛋白質、又はそれらの部分配列を持つペプチドに対する体液抗体)の捕捉が可能であること、すなわち、アミノ酸残基を改変した体液抗体捕捉抗原候補が、例えば、本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から、目的とする脳梗塞発症のリスク把握が可能であることが必要である。

**【0019】**

「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。

20

30

**【0020】**

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好適な具体例として、DIDO1蛋白質由来としては、例えば、配列番号4(AMAASKKTAPPGSAVGKQ)が挙げられ、CPSF蛋白質由来としては、例えば、配列番号7(CPSF2-607:QVRLKDSLVSLLQFC)が挙げられる。なお、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。

40

**【0021】**

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、配列番号1に示すDIDO1遺伝子の塩基配列、又は配列番号6に示すCPSF2遺伝子に基づいて、これらの塩基配列の全部若しく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、DIDO1遺伝子、又はCPSF2遺伝子の全部若しくは一部として得て、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DIDO1遺伝子、又はCPSF2遺伝子の全部若しくは一部の発現を誘導

50

し、発現されたD I D O 1蛋白質、又はC P S F 2蛋白質の全部若しくは一部を、例えば、glutathione - Sepharose (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。

【0022】

特に、D I D O 1蛋白質、又はC P S F 2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

【0023】

D I D O 1蛋白質、又はC P S F 2蛋白質の全部若しくは一部としては、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。

【0024】

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

【0025】

(c) 脳梗塞の発症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では、血液サンプル等の生体から分離された体液サンプル中のD I D O 1蛋白質又はその一部(以下、「D I D O 1抗原」ともいう)、並びに/或いは、C P S F 2蛋白質又はその一部(以下、「C P S F 2抗原」ともいう)、に対する生体から分離された体液サンプル中の抗体レベルを定量し、その定量値が標準値(カットオフ値)よりも大きい場合に、当該体液サンプル提供者におけるD I D O 1抗原、及び/又は、C P S F 2抗原、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脳梗塞の発症に関するデータとすることが可能である。

30

【0026】

具体的には、その定量値が標準値(カットオフ値)よりも大きい場合に、生体から分離された体液サンプル提供者におけるD I D O 1抗原、又はC P S F 2抗原の亢進を認定し、これを指標として当該被験試料提供者の脳梗塞の発症に関するデータとすることが可能である。

【0027】

被験試料におけるD I D O 1抗原、又はC P S F 2抗原に対する体液抗体レベルの標準値は、頭部MRI検査において脳梗塞の兆候等の異常が認められない者からなる対照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D I D O 1抗原、又はC P S F 2抗原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。

40

【0028】

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。すなわち「D I D O 1抗原」と「C P S F 2抗原」)の固定化物に生体から分離された体液サンプルを接触させ、当該生体から分離された体液サンプル内のD I D O 1蛋白質に対する抗体、又はC P S F 2蛋白質に対する抗体(共に体液抗体)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

50

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、比濁法、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、定量標的物質を生体から分離された体液サンプル中の抗体とした場合の、確立した定量測定手段である。

#### 【0029】

例えば、AlphaLISA法では、GST-融合DIDO1抗原又はGST-融合CPSF2抗原（蛋白質）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DIDO1ペプチド又はbiotin化CPSF2ペプチドを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、血液サンプル、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生体から分離された体液サンプルを接触させて、形成された体液抗体捕捉抗原-抗DIDO1体液抗体複合体、又はCPSF2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、DIDO1蛋白質、又はCPSF2蛋白質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  
10  
20  
30  
40  
50  
60  
70  
80  
90  
100  
110  
120  
130  
140  
150  
160  
170  
180  
190  
200  
210  
220  
230  
240  
250  
260  
270  
280  
290  
300  
310  
320  
330  
340  
350  
360  
370  
380  
390  
400  
410  
420  
430  
440  
450  
460  
470  
480  
490  
500  
510  
520  
530  
540  
550  
560  
570  
580  
590  
600  
610  
620  
630  
640  
650  
660  
670  
680  
690  
700  
710  
720  
730  
740  
750  
760  
770  
780  
790  
800  
810  
820  
830  
840  
850  
860  
870  
880  
890  
900  
910  
920  
930  
940  
950  
960  
970  
980  
990  
1000  
1010  
1020  
1030  
1040  
1050  
1060  
1070  
1080  
1090  
1100  
1110  
1120  
1130  
1140  
1150  
1160  
1170  
1180  
1190  
1200  
1210  
1220  
1230  
1240  
1250  
1260  
1270  
1280  
1290  
1300  
1310  
1320  
1330  
1340  
1350  
1360  
1370  
1380  
1390  
1400  
1410  
1420  
1430  
1440  
1450  
1460  
1470  
1480  
1490  
1500  
1510  
1520  
1530  
1540  
1550  
1560  
1570  
1580  
1590  
1600  
1610  
1620  
1630  
1640  
1650  
1660  
1670  
1680  
1690  
1700  
1710  
1720  
1730  
1740  
1750  
1760  
1770  
1780  
1790  
1800  
1810  
1820  
1830  
1840  
1850  
1860  
1870  
1880  
1890  
1900  
1910  
1920  
1930  
1940  
1950  
1960  
1970  
1980  
1990  
2000  
2010  
2020  
2030  
2040  
2050  
2060  
2070  
2080  
2090  
2100  
2110  
2120  
2130  
2140  
2150  
2160  
2170  
2180  
2190  
2200  
2210  
2220  
2230  
2240  
2250  
2260  
2270  
2280  
2290  
2300  
2310  
2320  
2330  
2340  
2350  
2360  
2370  
2380  
2390  
2400  
2410  
2420  
2430  
2440  
2450  
2460  
2470  
2480  
2490  
2500  
2510  
2520  
2530  
2540  
2550  
2560  
2570  
2580  
2590  
2600  
2610  
2620  
2630  
2640  
2650  
2660  
2670  
2680  
2690  
2700  
2710  
2720  
2730  
2740  
2750  
2760  
2770  
2780  
2790  
2800  
2810  
2820  
2830  
2840  
2850  
2860  
2870  
2880  
2890  
2900  
2910  
2920  
2930  
2940  
2950  
2960  
2970  
2980  
2990  
3000  
3010  
3020  
3030  
3040  
3050  
3060  
3070  
3080  
3090  
3100  
3110  
3120  
3130  
3140  
3150  
3160  
3170  
3180  
3190  
3200  
3210  
3220  
3230  
3240  
3250  
3260  
3270  
3280  
3290  
3300  
3310  
3320  
3330  
3340  
3350  
3360  
3370  
3380  
3390  
3400  
3410  
3420  
3430  
3440  
3450  
3460  
3470  
3480  
3490  
3500  
3510  
3520  
3530  
3540  
3550  
3560  
3570  
3580  
3590  
3600  
3610  
3620  
3630  
3640  
3650  
3660  
3670  
3680  
3690  
3700  
3710  
3720  
3730  
3740  
3750  
3760  
3770  
3780  
3790  
3800  
3810  
3820  
3830  
3840  
3850  
3860  
3870  
3880  
3890  
3900  
3910  
3920  
3930  
3940  
3950  
3960  
3970  
3980  
3990  
4000  
4010  
4020  
4030  
4040  
4050  
4060  
4070  
4080  
4090  
4100  
4110  
4120  
4130  
4140  
4150  
4160  
4170  
4180  
4190  
4200  
4210  
4220  
4230  
4240  
4250  
4260  
4270  
4280  
4290  
4300  
4310  
4320  
4330  
4340  
4350  
4360  
4370  
4380  
4390  
4400  
4410  
4420  
4430  
4440  
4450  
4460  
4470  
4480  
4490  
4500  
4510  
4520  
4530  
4540  
4550  
4560  
4570  
4580  
4590  
4600  
4610  
4620  
4630  
4640  
4650  
4660  
4670  
4680  
4690  
4700  
4710  
4720  
4730  
4740  
4750  
4760  
4770  
4780  
4790  
4800  
4810  
4820  
4830  
4840  
4850  
4860  
4870  
4880  
4890  
4900  
4910  
4920  
4930  
4940  
4950  
4960  
4970  
4980  
4990  
5000  
5010  
5020  
5030  
5040  
5050  
5060  
5070  
5080  
5090  
5100  
5110  
5120  
5130  
5140  
5150  
5160  
5170  
5180  
5190  
5200  
5210  
5220  
5230  
5240  
5250  
5260  
5270  
5280  
5290  
5300  
5310  
5320  
5330  
5340  
5350  
5360  
5370  
5380  
5390  
5400  
5410  
5420  
5430  
5440  
5450  
5460  
5470  
5480  
5490  
5500  
5510  
5520  
5530  
5540  
5550  
5560  
5570  
5580  
5590  
5600  
5610  
5620  
5630  
5640  
5650  
5660  
5670  
5680  
5690  
5700  
5710  
5720  
5730  
5740  
5750  
5760  
5770  
5780  
5790  
5800  
5810  
5820  
5830  
5840  
5850  
5860  
5870  
5880  
5890  
5900  
5910  
5920  
5930  
5940  
5950  
5960  
5970  
5980  
5990  
6000  
6010  
6020  
6030  
6040  
6050  
6060  
6070  
6080  
6090  
6100  
6110  
6120  
6130  
6140  
6150  
6160  
6170  
6180  
6190  
6200  
6210  
6220  
6230  
6240  
6250  
6260  
6270  
6280  
6290  
6300  
6310  
6320  
6330  
6340  
6350  
6360  
6370  
6380  
6390  
6400  
6410  
6420  
6430  
6440  
6450  
6460  
6470  
6480  
6490  
6500  
6510  
6520  
6530  
6540  
6550  
6560  
6570  
6580  
6590  
6600  
6610  
6620  
6630  
6640  
6650  
6660  
6670  
6680  
6690  
6700  
6710  
6720  
6730  
6740  
6750  
6760  
6770  
6780  
6790  
6800  
6810  
6820  
6830  
6840  
6850  
6860  
6870  
6880  
6890  
6900  
6910  
6920  
6930  
6940  
6950  
6960  
6970  
6980  
6990  
7000  
7010  
7020  
7030  
7040  
7050  
7060  
7070  
7080  
7090  
7100  
7110  
7120  
7130  
7140  
7150  
7160  
7170  
7180  
7190  
7200  
7210  
7220  
7230  
7240  
7250  
7260  
7270  
7280  
7290  
7300  
7310  
7320  
7330  
7340  
7350  
7360  
7370  
7380  
7390  
7400  
7410  
7420  
7430  
7440  
7450  
7460  
7470  
7480  
7490  
7500  
7510  
7520  
7530  
7540  
7550  
7560  
7570  
7580  
7590  
7600  
7610  
7620  
7630  
7640  
7650  
7660  
7670  
7680  
7690  
7700  
7710  
7720  
7730  
7740  
7750  
7760  
7770  
7780  
7790  
7800  
7810  
7820  
7830  
7840  
7850  
7860  
7870  
7880  
7890  
7900  
7910  
7920  
7930  
7940  
7950  
7960  
7970  
7980  
7990  
8000  
8010  
8020  
8030  
8040  
8050  
8060  
8070  
8080  
8090  
8100  
8110  
8120  
8130  
8140  
8150  
8160  
8170  
8180  
8190  
8200  
8210  
8220  
8230  
8240  
8250  
8260  
8270  
8280  
8290  
8300  
8310  
8320  
8330  
8340  
8350  
8360  
8370  
8380  
8390  
8400  
8410  
8420  
8430  
8440  
8450  
8460  
8470  
8480  
8490  
8500  
8510  
8520  
8530  
8540  
8550  
8560  
8570  
8580  
8590  
8600  
8610  
8620  
8630  
8640  
8650  
8660  
8670  
8680  
8690  
8700  
8710  
8720  
8730  
8740  
8750  
8760  
8770  
8780  
8790  
8800  
8810  
8820  
8830  
8840  
8850  
8860  
8870  
8880  
8890  
8900  
8910  
8920  
8930  
8940  
8950  
8960  
8970  
8980  
8990  
9000  
9010  
9020  
9030  
9040  
9050  
9060  
9070  
9080  
9090  
9100  
9110  
9120  
9130  
9140  
9150  
9160  
9170  
9180  
9190  
9200  
9210  
9220  
9230  
9240  
9250  
9260  
9270  
9280  
9290  
9300  
9310  
9320  
9330  
9340  
9350  
9360  
9370  
9380  
9390  
9400  
9410  
9420  
9430  
9440  
9450  
9460  
9470  
9480  
9490  
9500  
9510  
9520  
9530  
9540  
9550  
9560  
9570  
9580  
9590  
9600  
9610  
9620  
9630  
9640  
9650  
9660  
9670  
9680  
9690  
9700  
9710  
9720  
9730  
9740  
9750  
9760  
9770  
9780  
9790  
9800  
9810  
9820  
9830  
9840  
9850  
9860  
9870  
9880  
9890  
9900  
9910  
9920  
9930  
9940  
9950  
9960  
9970  
9980  
9990  
10000

#### 【0030】

ここに「DIDO1抗原」と「CPSF2抗原」という、「生体から分離されたサンプル中の、これらの抗原に対する抗体をバイオマーカーとして測定・定量するための2種類の抗原」は、共に脳梗塞の発症リスクに対するバイオマーカーを検出する、という面において共通するが、それぞれに独自の特徴を有しており、これらを単独又は組み合わせて用いることにより、様々な状況対応した的確な脳梗塞の発症についてのデータを取得する  
40  
50  
60  
70  
80  
90  
100  
110  
120  
130  
140  
150  
160  
170  
180  
190  
200  
210  
220  
230  
240  
250  
260  
270  
280  
290  
300  
310  
320  
330  
340  
350  
360  
370  
380  
390  
400  
410  
420  
430  
440  
450  
460  
470  
480  
490  
500  
510  
520  
530  
540  
550  
560  
570  
580  
590  
600  
610  
620  
630  
640  
650  
660  
670  
680  
690  
700  
710  
720  
730  
740  
750  
760  
770  
780  
790  
800  
810  
820  
830  
840  
850  
860  
870  
880  
890  
900  
910  
920  
930  
940  
950  
960  
970  
980  
990  
1000  
1010  
1020  
1030  
1040  
1050  
1060  
1070  
1080  
1090  
1100  
1110  
1120  
1130  
1140  
1150  
1160  
1170  
1180  
1190  
1200  
1210  
1220  
1230  
1240  
1250  
1260  
1270  
1280  
1290  
1300  
1310  
1320  
1330  
1340  
1350  
1360  
1370  
1380  
1390  
1400  
1410  
1420  
1430  
1440  
1450  
1460  
1470  
1480  
1490  
1500  
1510  
1520  
1530  
1540  
1550  
1560  
1570  
1580  
1590  
1600  
1610  
1620  
1630  
1640  
1650  
1660  
1670  
1680  
1690  
1700  
1710  
1720  
1730  
1740  
1750  
1760  
1770  
1780  
1790  
1800  
1810  
1820  
1830  
1840  
1850  
1860  
1870  
1880  
1890  
1900  
1910  
1920  
1930  
1940  
1950  
1960  
1970  
1980  
1990  
2000  
2010  
2020  
2030  
2040  
2050  
2060  
2070  
2080  
2090  
2100  
2110  
2120  
2130  
2140  
2150  
2160  
2170  
2180  
2190  
2200  
2210  
2220  
2230  
2240  
2250  
2260  
2270  
2280  
2290  
2300  
2310  
2320  
2330  
2340  
2350  
2360  
2370  
2380  
2390  
2400  
2410  
2420  
2430  
2440  
2450  
2460  
2470  
2480  
2490  
2500  
2510  
2520  
2530  
2540  
2550  
2560  
2570  
2580  
2590  
2600  
2610  
2620  
2630  
2640  
2650  
2660  
2670  
2680  
2690  
2700  
2710  
2720  
2730  
2740  
2750  
2760  
2770  
2780  
2790  
2800  
2810  
2820  
2830  
2840  
2850  
2860  
2870  
2880  
2890  
2900  
2910  
2920  
2930  
2940  
2950  
2960  
2970  
2980  
2990  
3000  
3010  
3020  
3030  
3040  
3050  
3060  
3070  
3080  
3090  
3100  
3110  
3120  
3130  
3140  
3150  
3160  
3170  
3180  
3190  
3200  
3210  
3220  
3230  
3240  
3250  
3260  
3270  
3280  
3290  
3300  
3310  
3320  
3330  
3340  
3350  
3360  
3370  
3380  
3390  
3400  
3410  
3420  
3430  
3440  
3450  
3460  
3470  
3480  
3490  
3500  
3510  
3520  
3530  
3540  
3550  
3560  
3570  
3580  
3590  
3600  
3610  
3620  
3630  
3640  
3650  
3660  
3670  
3680  
3690  
3700  
3710  
3720  
3730  
3740  
3750  
3760  
3770  
3780  
3790  
3800  
3810  
3820  
3830  
3840  
3850  
3860  
3870  
3880  
3890  
3900  
3910  
3920  
3930  
3940  
3950  
3960  
3970  
3980  
3990  
4000  
4010  
4020  
4030  
4040  
4050  
4060  
4070  
4080  
4090  
4100  
4110  
4120  
4130  
4140  
4150  
4160  
4170  
4180  
4190  
4200  
4210  
4220  
4230  
4240  
4250  
4260  
4270  
4280  
4290  
4300  
4310  
4320  
4330  
4340  
4350  
4360  
4370  
4380  
4390  
4400  
4410  
4420  
4430  
4440  
4450  
4460  
4470  
4480  
4490  
4500  
4510  
4520  
4530  
4540  
4550  
4560  
4570  
4580  
4590  
4600  
4610  
4620  
4630  
4640  
4650  
4660  
4670  
4680  
4690  
4700  
4710  
4720  
4730  
4740  
4750  
4760  
4770  
4780  
4790  
4800  
4810  
4820  
4830  
4840  
4850  
4860  
4870  
4880  
4890  
4900  
4910  
4920  
4930  
4940  
4950  
4960  
4970  
4980  
4990  
5000  
5010  
5020  
5030  
5040  
5050  
5060  
5070  
5080  
5090  
5100  
5110  
5120  
5130  
5140  
5150  
5160  
5170  
5180  
5190  
5200  
5210  
5220  
5230  
5240  
5250  
5260  
5270  
5280  
5290  
5300  
5310  
5320  
5330  
5340  
5350  
5360  
5370  
5380  
5390  
5400  
5410  
5420  
5430  
5440  
5450  
5460  
5470  
5480  
5490  
5500  
5510  
5520  
5530  
5540  
5550  
5560  
5570  
5580  
5590  
5600  
5610  
5620  
5630  
5640  
5650  
5660  
5670  
5680  
5690  
5700  
5710  
5720  
5730  
5740  
5750  
5760  
5770  
5780  
5790  
5800  
5810  
5820  
5830  
5840  
5850  
5860  
5870  
5880  
5890  
5900  
5910  
5920  
5930  
5940  
5950  
5960  
5970  
5980  
5990  
6000  
6010  
6020  
6030  
6040  
6050  
6060  
6070  
6080  
6090  
6100  
6110  
6120  
6130  
6140  
6150  
6160  
6170  
6180  
6190  
6200  
6210  
6220  
6230  
6240  
6250  
6260  
6270  
6280  
6290  
6300  
6310  
6320  
6330  
6340  
6350  
6360  
6370  
6380  
6390  
6400  
6410  
6420  
6430  
6440  
6450  
6460  
6470  
6480  
6490  
6500  
6510  
6520  
6530  
6540  
6550  
6560  
6570  
6580  
6590  
6600  
6610  
6620  
6630  
6640  
6650  
6660  
6670  
6680  
6690  
6700  
6710  
6720  
6730  
6740  
6750  
6760  
6770  
6780  
6790  
6800  
6810  
6820  
6830  
6840  
6850  
6860  
6870  
6880  
6890  
6900  
6910  
6920  
6930  
6940  
6950  
6960  
6970  
6980  
6990  
7000  
7010  
7020  
7030  
7040  
7050  
7060  
7070  
7080  
7090  
7100  
7110  
7120  
7130  
7140  
7150  
7160  
7170  
7180  
7190  
7200  
7210  
7220  
7230  
7240  
7250  
7260  
7270  
7280  
7290  
7300  
7310  
7320  
7330  
7340  
7350  
7360  
7370  
7380  
7390  
7400  
7410  
7420  
7430  
7440  
7450  
7460  
7470  
7480  
7490  
7500  
7510  
7520  
7530  
7540  
7550  
7560  
7570  
7580  
7590  
7600  
7610  
7620  
7630  
7640  
7650  
7660  
7670  
7680  
7690  
7700  
7710  
7720  
7730  
7740  
7750  
7760  
7770  
7780  
7790  
7800  
7810  
7820  
7830  
7840  
7850  
7860  
7870  
7880  
7890  
7900  
7910  
7920  
7930  
7940  
7950  
7960  
7970  
7980  
7990  
8000  
8010  
8020  
8030  
8040  
8050  
8060  
8070  
8080  
8090  
8100  
8110  
8120  
8130  
8140  
8150  
8160  
8170  
8180  
8190  
8200  
8210  
8220  
8230  
8240  
8250  
8260  
8270  
8280  
8290  
8300  
8310  
8320  
8330  
8340  
8350  
8360  
8370  
8380  
8390  
8400  
8410  
8420  
8430  
8440  
8450  
8460  
8470  
8480  
8490  
8500  
8510  
8520  
8530  
8540  
8550  
8560  
8570  
8580  
8590  
8600  
8610  
8620  
8630  
8640  
8650  
8660  
8670  
8680  
8690  
8700  
8710  
8720  
8730  
8740  
8750  
8760  
8770  
8780  
8790  
8800  
8810  
8820  
8830  
8840  
8850  
8860  
8870  
8880  
8890  
8900  
8910  
8920  
8930  
8940  
8950  
8960  
8970  
8980  
8990  
9000  
9010  
9020  
9030  
9040  
9050  
9060  
9070  
9080  
9090  
9100  
9110  
9120  
9130  
9140  
9150  
9160  
9170  
9180  
9190  
9200  
9210  
9220  
9230  
9240  
9250  
9260  
9270  
9280  
9290  
9300  
9310  
9320  
9330  
9340  
9350  
9360  
9370  
9380  
9390  
9400  
9410  
9420  
9430  
9440  
9450  
9460  
9470  
9480  
9490  
9500  
9510  
9520  
9530  
9540  
9550  
9560  
9570  
9580  
9590  
9600  
9610  
9620  
9630  
9640  
9650  
9660  
9670  
9680  
9690  
9700  
9710  
9720

ルをモニタリングすることにより、当該患者における脳梗塞の発症の予測を確度良く行うことができる。また、同時に脳梗塞の発症が極めて差し迫っていることを示す指標でもあるので、このバイオマーカーが高値の場合には、腎臓病の治療や血圧管理等による早急な予防対策を講ずる必要を示すものでもある。さらに、急性脳梗塞発症後のこのバイオマーカー値の低下をモニタリングすることにより、慢性期への移行を確認することも可能である。

#### 【0033】

第2に、「CPSF2抗原」に対する生体から分離された体液サンプル中の抗体レベルの上昇を測定することにより、特に糖尿病を基礎疾患とする脳梗塞の発症に関するデータ取得を行うことができる。糖尿病の治療により、他のバイオマーカー値が低下する場合であっても、このCPSF2に対する体液抗体値が高値であれば、依然として脳梗塞の発症の高いリスクが存在することを示すものである。また、上記の「DIDO1抗原」に対する抗体レベルの上昇に比べると、脳梗塞発症の継続的なリスクに鋭敏に反応する傾向が認められ、無症状であって「CPSF2体液抗体の亢進」が認められた脳梗塞前段階に対して、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、脳梗塞のリスクを減少させることが可能である。

10

#### 【0034】

これらのそれぞれ特徴のある2種類の脳梗塞発症バイオマーカーを組み合わせることで、糖尿病や慢性腎臓病等の動脈硬化関連疾患患者における脳梗塞発症のリスクを、短期的にも、長期的にも把握することが可能である。また、特定の病態や症状に着目して、各々のバイオマーカーに絞り込んで単独で用いることにより、多数のバイオマーカーを用いる場合に比べて医療費の節約を行うことができると同時に、患者個人に合わせた脳梗塞発症のリスクを的確に把握することができる。

20

#### 【0035】

##### (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DIDO1抗原又はGST-融合CPSF2抗原(蛋白質)、glutathione-結合ドナービーズ、及び抗ヒトIgG-結合アクセプタービーズの組、あるいは、biotin化DIDO1抗原又はbiotin化CPSF2抗原(ペプチド)、streptavidin-結合ドナービーズ、及び抗ヒトIgG-結合アクセプタービーズの組を、AlphaLISA法を定量測定手段として行うための構成として挙げる事ができる。

30

#### 【0036】

また、上記の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、本発明のキットの構成として挙げる事ができる。

#### 【0037】

また、上記の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事ができる。

#### 【0038】

また、上記の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事ができる。

40

#### 【0039】

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】

50

## 【0040】

以下、本発明の実施例を開示する。

## 【0041】

## [製造例と解析手法]

<本実施例において用いた抗原蛋白質又はペプチド>

## (1) 抗原蛋白質又はペプチドのリスト

本実施例においては、下記の抗原蛋白質又はペプチドを用いた。

## 【0042】

## (a) D I D O 1

・「D I D O 1蛋白質」(配列番号3) : D I D O 1蛋白質(配列番号2)のうち、N  
末端がG S T修飾されたN末端から275アミノ酸のN末端領域部分(配列番号3)

・「D I D O 1ペプチド」(配列番号4) : 上記D I D O 1蛋白質(配列番号2)のうち、N末端がビオチン化修飾された543 - 560番目のアミノ酸配列(配列番号4)のペプチド

図1に、D I D O 1蛋白質のアミノ酸配列(配列番号2)を一文字表示で示し、D I D O 1ペプチドのアミノ酸配列(配列番号4)に相当する部分に下線を施した。

## 【0043】

## (b) C P S F 2

・「C P S F 2ペプチド」(配列番号7) : C P S F 2のDNA(配列番号5)がコードする全長蛋白質(配列番号6)のうち、N末端がビオチン化修飾された607 - 620  
番目のアミノ酸配列(配列番号7)のペプチド

図2に、C P S F 2蛋白質のアミノ酸配列(配列番号6)を一文字表示で示し、C P S F 2ペプチドのアミノ酸配列(配列番号7)に相当する部分に下線を施した。

## 【0044】

## (2) 抗原蛋白質又はペプチドの調製

上記リストの抗原蛋白質とペプチドは下記の要領で調製した。

## 【0045】

## (a) D I D O 1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、S  
uperscript 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P  
CR法により、D I D O 1蛋白質(配列番号2)のうち、N末端領域(275アミノ酸 ;  
配列番号3)を増幅し、Glutathione S-transferase (GST)  
遺伝子部位がクロ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, Pittsb  
urgh, 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 - D I D O 1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 - D I D O 1を大腸菌BL - 21に導入  
して形質転換を行い、0.1mM IPTG (isopropyl - - D - thio g  
alactoside)による、25、4時間処理により、D I D O 1cDNAの発現  
を誘導した。誘導後、当該大腸菌を回収し、BugBuster 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 - D I D O 1蛋白質は、g l u  
tathione - Sepharose (GE Healthcare Life Sc  
iences)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  
を上記の「D I D O 1蛋白質」とした。対照としてGSTを同様に精製した。

## 【0046】

10

20

30

40

50

## (b) ペプチドの設計

CPSF2蛋白質の公開されているアミノ酸配列(配列番号6)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、当該エピトープ候補の配列、CPSF2-547~550、CPSF2-607~620、CPSF2-712~725を得た。なお、各候補の数字は配列番号6においてエピトープ候補として選ばれたアミノ酸の番号:例えば、547~550であれば、配列番号6の547~550番の一連のアミノ酸配列からなるペプチドを表す。これらのエピトープ候補の各ペプチドを、N端にビオチン化修飾を持つペプチドとして、Fmoc法を用いて合成し、抗体レベルの解析によりCPSF2-607~620(配列番号7)を選別し、上記の「CPSF2ペプチド」として用いた。

10

## 【0047】

bCPSF2-607:biotin-QVRLKDSLVSLLQFC(配列番号7)

## 【0048】

DIDO1蛋白質のアミノ酸配列(配列番号2)についても、上記のCPSF2と同様に検索し、DIDO1-543~560、DIDO1-568~585、DIDO1-643~658、及びDIDO1-802~819のN末端にビオチン化修飾を持つ未精製品を合成し、抗体レベルの解析により、脳梗塞に最もよく反応したbDIDO1-543~560を選別し、上記の「DIDO1ペプチド」とした。その構造は以下のとおりである。

20

## 【0049】

bDIDO1-543:biotin-AMAAASKKTAAPPGSAVGKQ(配列番号4)

## 【0050】

<AlphaLISA法による解析>

個別の実施例の開示に先立ち、本実施例において用いたAlphaLISA法による解析の概要を以下に説明する。

## 【0051】

AlphaLISA法(Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay)は、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, pH7.4, 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2.5μL、及び、抗原となるGST、又はDIDO1蛋白質(10μg/mL)、あるいはビオチン化ペプチド(DIDO1ペプチド又はCPSF2ペプチド)(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(2.5μL at 40μg/mL)、及び、glutathione-、又はstreptavidin-conjugated donor beads(2.5μL at 40μg/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。DIDO1蛋白質の場合はコントロールのGSTを、上記ビオチン化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、CPSF2、又はDIDO1抗原に特異的な抗体レベルを算出した。

30

40

## 【0052】

[実施例1] 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

50

急性期脳梗塞 ( a C I ) とは、脳の血流が滞ることにより運動機能や感覚機能に突如大きなダメージが生じる状態を言う。一過性脳虚血発作 ( T I A ) とは、脳梗塞と同様の原因で脳神経細胞が障害を受けるが、24時間以内、多くは数分以内に回復する疾患である。それぞれの血清検体は発症後2週間以内に採取した。

【 0 0 5 3 】

健常者 ( H D )、T I A 患者、及び a C I 患者における、D I D O 1 蛋白質、及び C P S F 2 ペプチドに対する血清抗体レベルを A l p h a L I S A 法により測定した。健常者の血清サンプルはポートスクエア柏戸クリニックにおいて頭部 M R I 検査で異常の認められない被験者から得た。T I A と a C I 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。

10

【 0 0 5 4 】

検討結果を図3と表1に示す。図3の内容は、図面の簡単な説明において記した。表1は、図3に示す A l p h a L I S A 法によるデータ解析結果を示している。表1の上から、健常者サンプルの平均値、S D、カットオフ値 ( 平均値 + 2 S D )、全サンプル数、カットオフ値以上を示す陽性サンプル数、陽性率、及び、T I A 患者と a C I 患者サンプルの平均値、S D、全サンプル数、カットオフ値以上を示す陽性サンプル数、陽性率、及び、健常者サンプルと患者サンプルを比較した時の P 値を示す。P 値が 0 . 0 5 以下、又は陽性率が 1 0 % 以上の値を太字で示した。

【 0 0 5 5 】

【 表 1 】

20

Sample information	HD	TIA	aCI
Total sample number	123	77	158
Male/Female	85/38	49/28	120/38
Age (Average ± SD)	51.9 ± 8.7	69.6 ± 11.7	57.7 ± 7.6

Alpha analysis (antibody level)		DIDO1-Ab	CPSF2-Ab
HD	Average	13,842	2,587
	SD	5,710	1,478
	Cutoff value	25,263	5,543
	Positive No.	0	5
	Positive (%)	0.0%	4.1%
TIA	Average	17,829	3,129
	SD	5,659	2,485
	Positive No.	9	5
	Positive (%)	<b>11.7%</b>	6.5%
	P value (vs HD)	<b>3.1.E-06</b>	<b>0.086</b>
aCI	Average	16,471	3,210
	SD	5,914	1,733
	Positive No.	15	15
	Positive (%)	9.5%	9.5%
	P value (vs HD)	<b>2.0.E-04</b>	<b>0.0013</b>

30

40

【 0 0 5 6 】

表1において、カットオフ値を健常者サンプルの平均値 + 2 S D に設定した時の D I D

50

O1蛋白質に対する、HD、TIA、aCIの血清サンプルにおける抗体レベルの陽性率は、それぞれ0.0%、11.7%、9.5%であり、一方、CPSF2ペプチドに対する同抗体レベルの陽性率は、それぞれ4.1%、6.5%、9.5%、であったことが分かる。すなわち、図3と表1において、DIDO1蛋白質、及びCPSF2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ことを示している。

【0057】

[実施例2] AlphaLISA法を用いた急性心筋梗塞(AMI)患者と糖尿病(DM)患者における検討

AMI患者とDM患者における、DIDO1蛋白質及びCPSF2ペプチドに対する血清抗体レベルをAlphaLISA法により測定し、健常者(HD)と比較した。

10

【0058】

検討結果を図4と表2に示す。図4の内容は、図面の簡単な説明において記した。表2は、図4に示すAlphaLISA法によるデータ解析結果を示している。表中の項目は、表1について説明した通りである。

【0059】

【表 2】

Sample information		HD	CVD	DM
Total sample number		128	128	128
Male/Female		72/56	105/23	76/52
Age (Average $\pm$ SD)		58.3 $\pm$ 5.6	58.2 $\pm$ 8.5	58.4 $\pm$ 9.1

Alpha analysis (antibody level)		DIDO1-Ab	CPSF2-Ab
HD	Average	11,373	5,571
	SD	1,939	2,390
	Cutoff value	15,251	10,351
	Positive No.	4	7
	Positive (%)	3.1%	5.5%
AMI	Average	11,634	5,343
	SD	2,405	3,070
	Positive No.	10	6
	Positive (%)	7.8%	4.7%
	P (TIA vs HD)	0.342	0.508
DM	Average	11,199	7,232
	SD	2,252	3,798
	Positive No.	7	17
	Positive (%)	5.5%	<b>13.3%</b>
	P (aCI vs HD)	0.508	<b>4.1.E-05</b>

10

20

30

40

50

## 【0060】

上記の検討の結果、AMI患者とDM患者におけるDIDO1抗体レベルは、HDに比べて有意な差を認めなかった(図4a、表2)。一方、CPSF2抗体は、DM患者においてHDに比べ有意な高値を示したが、AMI患者では健常者と比較して有意な差を認めなかった(図4b、表2)。

## 【0061】

[実施例3] AlphaLISA法を用いた慢性腎臓病(CKD)患者における検討  
健常者(HD)とCKD患者における、DIDO1蛋白質及びCPSF2ペプチドに対する血清抗体レベルを、AlphaLISA法により測定し、健常者(HD)と比較した。

## 【0062】

検討結果を図5と表3に示す。図5の内容は、図面の簡単な説明において記した。表3は、図5に示すAlphaLISA法によるデータ解析結果を示している。表中の項目は

、表 1 について説明した通りである。また、「Type 1 - CKD」は糖尿病性腎症、「Type 2 - CKD」は腎硬化症を、「Type 3 - CKD」は糸球体腎症を示す。

【 0 0 6 3 】

【表 3】

Sample information	HD	Type-1 CKD	Type-2 CKD	Type-3 CKD
Total sample number	82	145	32	123
Male/Female	44/38	106/39	21/11	70/53
Age (Average ± SD)	44.1 ± 11.2	66.0 ± 10.4	76.0 ± 9.8	62.0 ± 11.7

10

Alpha analysis (antibody level)		DIDO1-Ab	CPSF2-Ab
HD	Average	850	914
	SD	572	298
	Cutoff value	1,994	1,509
	Positive No.	4	3
	Positive rate (%)	4.9%	3.7%
Type 1-CKD	Average	2,189	939
	SD	1,851	382
	Positive No.	49	7
	Positive rate (%)	<b>33.8%</b>	4.8%
	<i>P</i> (vs HD)	<b>8.8.E-14</b>	0.579
Type 2-CKD	Average	1,982	1,020
	SD	1,140	281
	Positive No.	10	2
	Positive rate (%)	<b>31.3%</b>	6.3%
	<i>P</i> (vs HD)	<b>4.5.E-06</b>	0.081
Type 3-CKD	Average	1,536	936
	SD	603	421
	Positive No.	21	10
	Positive rate (%)	<b>17.1%</b>	8.1%
	<i>P</i> (vs HD)	<b>3.7.E-14</b>	0.656

20

30

【 0 0 6 4 】

40

上記の検討の結果、DIDO1抗体レベルはいずれのタイプのCKDにおいてもHDに比べ有意な高値を示し(図5a、表3)、特にType 1-CKDにおいて大きな差を示した。一方、CPSF2抗体はいずれのタイプのCKDにおいてもHDと比べて有意な差は認められなかった(図5b、表3)。

【 0 0 6 5 】

[実施例4] ROC解析結果

上記実施例1-3により、各疾患についてAlphaLISA法により得られたDIDO1血清抗体レベル及びCPSF2に対する血清抗体レベルを、さらにROC解析して得たareas under the curve (AUC)値、95% Confidence interval (CI)、カットオフ値、感度、特異度、P値について、表4

50

(表4-1: D I D O 1、表4-2: C P S F 2) に示した。表4-1と表4-2において、ROC解析により得られた数字は、上から順番にAUC値、95% CI、カットオフ値、感度、特異度、P値を示す。表4-1において、例えば、「D I D O 1 v s T I A」と記載されている場合には、「D I D O 1 蛋白質に対するT I A 患者血清中の抗体レベル」についての欄であることを示し、「D I D O 1 - p e p v s T I A」と記載されている場合には、「D I D O 1 ペプチドに対するT I A 患者血清中の抗体レベル」についての欄であることを示している。

【 0 0 6 6 】

【表4-1】

	DIDO1 vs TIA	DIDO1 vs aCI
AUC	0.6819	0.6476
95% CI	0.5929 - 0.7709	0.5898 - 0.7053
Cutoff value	4,509	4,686
Sensitivity (%)	84.1%	74.1%
Specificity (%)	50.4%	51.8%
P value	<b>0.00028</b>	<b>&lt; 0.0001</b>

10

	DIDO1 vs AMI	DIDO1 vs DM
AUC	0.5163	0.5347
95% CI	0.4454 - 0.5875	0.4638 - 0.6057
Cutoff value	13,519	10,700
Sensitivity (%)	22.7%	46.9%
Specificity (%)	85.8%	63.8%
P value	0.650	0.338

20

	DIDO1 vs Type-1 CKD	DIDO1 vs Type-2 CKD	DIDO1 vs Type-3 CKD
AUC	<b>0.9046</b>	<b>0.8956</b>	<b>0.8517</b>
95% CI	0.8584 - 0.9507	0.8393 - 0.9518	0.7926 - 0.9109
Cutoff value	904	950.5	905.5
Sensitivity (%)	98.6%	96.9%	91.9%
Specificity (%)	72.0%	73.2%	72.0%
P value	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>&lt; 0.0001</b>

30

	DIDO1-pep vs TIA	DIDO1-pep vs aCI
AUC	0.6503	0.6611
95% CI	0.5751 - 0.7256	0.6138 - 0.7084
Cutoff value	4,662	8,413
Sensitivity (%)	87.9%	43.9%
Specificity (%)	38.3%	81.9%
P value	<b>0.0003</b>	<b>&lt; 0.0001</b>

40

50

## 【 0 0 6 7 】

【表 4 - 2】

	CPSF2 vs TIA	CPSF2 vs aCI
AUC	0.6314	0.6369
95% CI	0.5631 - 0.6997	0.5970 - 0.6768
Cutoff value	2,643	2,644
Sensitivity (%)	54.4%	57.8%
Specificity (%)	67.7%	67.7%
<i>P</i> value	<b>0.0002</b>	<b>&lt; 0.0001</b>

10

	CPSF2 vs AMI	CPSF2 vs DM
AUC	0.5522	0.6464
95% CI	0.4817 to 0.6226	0.5792 to 0.7136
Cutoff value	5,356	6,145
Sensitivity (%)	63.3%	55.5%
Specificity (%)	49.2%	70.3%
<i>P</i> value	0.149	<b>&lt; 0.0001</b>

20

	CPSF2 vs Type-1	CPSF2 vs Type-2	CPSF2 vs Type-3
	CKD	CKD	CKD
AUC	0.5040	0.6387	0.5196
95% CI	0.4262 - 0.5817	0.5274 - 0.7500	0.4395 - 0.5996
Cutoff value	641.5	901	706
Sensitivity (%)	11.7%	65.6%	29.3%
Specificity (%)	93.9%	62.2%	80.5%
<i>P</i> value	0.921	<b>0.022</b>	0.635

30

## 【 0 0 6 8 】

D I D O 1 蛋白質に対する血清抗体値は表 4 - 1 に示す通りに、C K D に対して著しく高い A U C 値を示した。T I A と a C I についても有意な高値を示したが、A M I と D M に対しては有意差を認めなかった。同様に D I D O 1 ペプチドに対する血清抗体値も T I A 及び a C I に対して高い A U C 値を示した。

## 【 0 0 6 9 】

C P S F 2 ペプチドによる C P S F 2 血清抗体値は表 4 - 2 に示す通りに、T I A 、 a C I 及び D M に対して高い A U C を示したが、A M I や T y p e 1 - C K D と T y p e 3 - C K D に対しては有意差を認めず、T y p e 2 - C K D についてもわずかな有意差を認めたのみであった。

40

## 【 0 0 7 0 】

[ 実施例 5 ] 血清抗体レベルと被験者データの相関解析

( 1 ) M a n n - W h i t n e y U 解析

次に、D I D O 1 ペプチドと C P S F 2 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、M a n n - W h i t n e y U 解析 ( 対応のない 2 群のデータについての、母集団分布の同一性の検定手法 ) を行った。

## 【 0 0 7 1 】

50

具体的には、千葉県立佐原病院において採取された851血清サンプルについて、D I D O 1 ペプチドとC P S F 2 ペプチドを抗原とした場合の、これらに対する血清抗体レベルをA l p h a L I S A 法により測定して、得られた測定値と被験者のデータの間における上記検定を行った。

【0072】

被験者データは、性別、現在の症状[無し(HD)、びまん性白質軟化(DSWMH)、無症候性脳梗塞(asympt-CI)、TIA、aCI、慢性期脳梗塞(cCI)、糖尿病(DM)、高血圧症(HT)、心血管障害(CVD)、脂質異常症(Lipidemia)]、及び生活習慣(喫煙習慣、飲酒習慣)、を群として用いた。

【0073】

結果を表5(表5-1、表5-2、表5-3)に示す。表5-1、表5-2、表5-3には、群ごとのサンプル数、D I D O 1 ペプチド抗原とC P S F 2 ペプチド抗原に対する血清抗体レベル(アルファカウント)の平均値とSD、そして各群と対照群におけるM a n n - W h i t n e y U 解析によるP値を示した。

【0074】

【表 5 - 1】

Present disease		HD	DSWMH	asympt-CI	TIA	aCI	cCI
Sample number		188	162	18	66	351	66
DIDO1pep-Ab level	Average	3,381	3,523	3,481	4,443	4,688	4,347
	SD	1,660	1,750	2,099	2,576	2,740	3,017
<i>P</i> value (vs HD)		-	0.4379	0.8467	<b>0.0024</b>	<b>1.64 E-11</b>	<b>0.0156</b>
CPSF2-Ab level	Average	7,322	7,571	8,312	11,778	8,722	10,088
	SD	3,415	2,942	2,461	16,843	3,970	4,240
<i>P</i> value (vs DM-)			0.1626	<b>0.0220</b>	<b>0.0024</b>	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>&lt; 0.0001</b>
Other disease		DM-	DM+				
Sample number		732	180				
DIDO1pep-Ab level	Average	4,059	4,047				
	SD	2,469	2,027				
<i>P</i> value (vs DM-)			0.9488				
CPSF2-Ab level	Average	8,319	9,437				
	SD	5,373	7,822				
<i>P</i> value (vs DM-)			<b>0.0153</b>				
Other disease		HT-	HT+				
Sample number		347	565				
DIDO1pep-Ab level	Average	3,830	4,196				
	SD	2,217	2,477				
<i>P</i> value (vs HT-)			<b>0.0212</b>				
CPSF2-Ab level	Average	7,699	9,065				
	SD	6,095	5,804				
<i>P</i> value (vs HT-)			<b>&lt; 0.0001</b>				

10

20

30

【 0 0 7 5 】

40

【表 5 - 2】

Other disease		CVD-	CVD+	
Sample number		861	51	
DIDO1pep-Ab level	Average	4,003	4,966	
	SD	2,360	2,673	
<i>P</i> value (vs CVD-)			<b>0.0148</b>	10
CPSF2-Ab level	Average	8,499	9,232	
	SD	6,037	4,239	
<i>P</i> value (vs CVD-)			0.1419	
Other disease		Lipidemia-	Lipidemia+	
Sample number		649	263	
DIDO1pep-Ab level	Average	4,158	3,806	20
	SD	2,497	2,073	
<i>P</i> value (vs Lipidemia-)			<b>0.0292</b>	
CPSF2-Ab level	Average	8,146	9,531	
	SD	3,583	9,534	
<i>P</i> value (vs Lipidemia-)			0.1446	
Sex		Male	Female	
Sample number		528	389	30
DIDO1pep-Ab level	Average	4,081	4,038	
	SD	2,493	2,244	
<i>P</i> value (vs Male)			0.7807	
CPSF2-Ab level	Average	8,633	8,420	
	SD	5,493	6,553	
<i>P</i> value (vs Male)			0.1549	40

【 0 0 7 6 】

【表 5 - 3】

Life style		Non-smoker	Smoker
Sample number		474	441
DIDO1pep-Ab level	Average	3,732	4,425
	SD	2,037	2,676
<i>P</i> value (vs non-smoker)		<b>1.33E-05</b>	
CPSF2-Ab level	Average	8,214	8,901
	SD	6,086	5,801
<i>P</i> value (vs non-smoker)		<b>0.0019</b>	

Life style		Alcohol-	Alcohol+
Sample number		334	581
DIDO1pep-Ab level	Average	4,001	4,103
	SD	2,236	2,476
<i>P</i> value (vs Alcohol-)		0.5270	
CPSF2-Ab level	Average	8,559	8,591
	SD	6,946	5,341
<i>P</i> value (vs Alcohol-)		0.3614	

10

20

## 【0077】

表 5 - 1、表 5 - 2、表 5 - 3 に示す通りに、D I D O 1 ペプチド抗原に対する血清抗体レベルは、D I D O 1 蛋白質抗原に対する血清抗体レベルと同様に、a C I に対して最も高値を示した。また、T I A や c C I でも有意差を認めた。また、高血圧症、心血管障害、脂質異常症と有意な相関を認めたが、糖尿病や性別とは無関係であった。また、生活習慣では喫煙習慣と強い相関が認められたが、飲酒習慣とは無関係であった。

30

## 【0078】

一方、C P S F 2 ペプチド抗原に対する抗体レベルは、a C I のみならず、c C I でも高度に有意な差を示した。さらに T I A や a s y m p t - C I でも有意差を示した。このことは、C P S F 2 抗体は脳梗塞に関係する微細な異変をも感知するものであると推定された。さらに他疾患では D M、H T には対応していたが、L i p i d e m i a や C V D では有意差が認められなかった。生活習慣では喫煙習慣と相関していたが、飲酒習慣とは無関係であった。

40

## 【0079】

## (2) Spearman の相関解析

次に、D I D O 1 ペプチドと C P S F 2 ペプチドに対する、千葉県立佐原病院において採取された 917 血清サンプルにおける上記血清抗体レベルと、被験者データについて、Spearman の相関解析 (2 変数間に、どの程度、順位づけの直線関係 (単純増加あるいは単純減少関係) があるかを数値で表す分析) を行った。被験者データは、年齢、身長、体重、body mass index (BMI)、最大頸動脈内膜中膜肥厚 (maximum intima-media thickness; max IMT)、血液検査データ [albumin/globulin ratio (A/G)]、aspartate aminotransferase (AST)、alanine amin

50

o transferase (ALT)、alkaline phosphatase (ALP)、lactate dehydrogenase (LDH)、total bilirubin (tBil)、cholinesterase (CHE)、 $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GTP)、total Protein (TP)、albumin (ALB)、blood urea nitrogen (BUN)、creatinine (CRE)、estimated glomerular filtrating ratio (eGFR)、uric acid (UA)、amylase (AMY)、total cholesterol (T-CHO)、HDL-cholesterol (HDL-C)、triglyceride (TG)、sodium (Na)、potassium (K)、chlorine (Cl)、calcium (Ca)、inorganic phosphate (IP)、iron (F)、C-reactive protein (CRP)、LDL-cholesterol (LDL-C)、white blood cell / 白血球 (WBC)、red blood cell / 赤血球 (RBC)、hemoglobin (HGB)、hamatocrit (HCT)、mean corpuscular volume / 平均赤血球容積 (MCV)、mean corpuscular hemoglobin / 平均赤血球色素量 (MCH)、mean corpuscular hemoglobin concentration / 平均赤血球色素濃度 (MCHC)、Red cell distribution width (RDW)、platelet / 血小板 (PLT)、mean platelet volume (MPV)、procalcitonin (PCT)、platelet distribution width (PDW)、blood sugar (BS)、glycated hemoglobin (HbA1c)、血圧 (BP)、及び喫煙期間 (年数)、を用いた。

10

20

【0080】

表6 (表6-1、表6-2) は、DIDO1ペプチド抗原及びCPSF2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結果を示している。これらの表では、千葉県立佐原病院において採取された917血清サンプルについて、群ごとのサンプル数、DIDO1ペプチド、及びCPSF2ペプチド抗原に対する血清抗体レベル (アルファカウント) のSperamanの相関解析により得られた順位相関係数 ( $r$ ) とP値を示した。

30

【0081】

【表 6 - 1】

Parameter	Data number of XY Pairs	DIDO1pep-Ab		CPSF2pep-Ab		
		Spearman <i>r</i>	<i>P</i> value	Spearman <i>r</i>	<i>P</i> value	
Age	851	0.2074	< 0.0001	0.1657	< 0.0001	
Height	844	-0.1227	0.0004	-0.0799	0.0202	10
Weight	848	-0.1047	0.0023	-0.0707	0.0396	
BMI	843	-0.0311	0.3679	-0.0343	0.3197	
max IMT	646	0.1908	< 0.0001	0.2161	< 0.0001	
A/G	820	-0.0303	0.3858	-0.0906	0.0094	
AST (GOT)	848	0.0605	0.0782	-0.0496	0.1490	
ALT (GPT)	847	0.0063	0.8545	-0.0800	0.0199	
ALP	786	0.0850	0.0172	0.0319	0.3716	
LDH	822	0.0718	0.0395	-0.0134	0.7017	20
tBil	830	-0.0576	0.0972	-0.1024	0.0031	
CHE	646	-0.0895	0.0230	-0.0982	0.0125	
γ-GTP	795	0.0334	0.3474	-0.0028	0.9381	
TP	823	-0.0971	0.0053	-0.1084	0.0018	
ALB	832	-0.0757	0.0289	-0.1358	< 0.0001	
BUN	846	0.0179	0.6038	-0.0381	0.2686	
Creatinin	842	-0.0090	0.7946	-0.0341	0.3233	
eGFR	758	0.0176	0.6284	0.0230	0.5282	30
UA	622	0.0336	0.4023	0.0050	0.9006	
AMY	527	-0.0780	0.0735	-0.0391	0.3701	
T-CHO	744	-0.0520	0.1568	-0.1207	0.0010	
HDL-c	550	-0.0458	0.2840	0.0553	0.1952	
TG	589	0.0199	0.6303	-0.0405	0.3261	
Na	833	0.0200	0.5635	0.0005	0.9881	
K	832	-0.0275	0.4280	-0.0072	0.8359	
Cl	833	0.0056	0.8708	0.0269	0.4376	40
Ca	495	-0.0210	0.6408	-0.0405	0.3682	
IP	388	-0.0023	0.9639	0.0546	0.2836	
Fe	400	-0.0406	0.4185	-0.0472	0.3465	
CRP	617	0.1172	0.0035	0.1041	0.0096	

【 0 0 8 2 】

【表 6 - 2】

Parameter	Data number of XY Pairs	DIDO1pep-Ab		CPSF2pep-Ab	
		Spearman <i>r</i>	<i>P</i> value	Spearman <i>r</i>	<i>P</i> value
LDL-C	440	-0.0513	0.2831	-0.1180	0.0133
WBC	846	0.1036	0.0026	0.0417	0.2262
RBC	846	-0.0426	0.2155	-0.0711	0.0386
HGB	846	-0.0113	0.7420	-0.0672	0.0508
HCT	846	-0.0078	0.8214	-0.0528	0.1249
MCV	846	0.0683	0.0472	0.0510	0.1387
MCH	846	0.0474	0.1681	0.0081	0.8136
MCHC	846	-0.0149	0.6659	-0.0617	0.0728
RDW	846	0.0489	0.1551	0.0529	0.1245
PLT	846	-0.0047	0.8919	0.0128	0.7097
MPV	846	-0.0201	0.5589	-0.0012	0.9716
PCT	846	-0.0030	0.9312	0.0188	0.5853
PDW	846	-0.0151	0.6611	-0.0109	0.7512
BS	783	0.0834	0.0195	0.0644	0.0718
HbA1c	655	-0.0204	0.6031	-0.0277	0.4789
BP	824	0.1106	0.0015	0.0593	0.0889
Smoking period (year)	842	0.1836	< 0.0001	0.1486	< 0.0001

10

20

30

## 【 0 0 8 3 】

表 6 - 1、表 6 - 2 に示す通り、Spearman 相関解析の結果、DIDO1 血清抗体レベルと CPSF2 血清抗体レベルはいずれも、年齢、max IMT、CRP、喫煙期間と相関し、身長、体重、ALB、TP とは逆相関していることがわかった。また、DIDO1 血清抗体レベルは BP に相関していた、一方で、CPSF2 血清抗体レベルは A/G、ALT、tBIL、T-CHO、LDL-C に逆相関を示した。これらの結果から、DIDO1 と CPSF2 の血清抗体バイオマーカーはいずれも、年齢、IMT、喫煙習慣に関係し、動脈硬化を反映していると考えられるが、一方で、DIDO1 血清抗体バイオマーカーは高血圧に、また CPSF2 血清抗体バイオマーカーは血中蛋白質の減少やコレステロールの減少を反映しているとも考えられる。

40

## 【 0 0 8 4 】

## [ 実施例 6 ] 多目的コホートサンプル解析

対象は、1990年、及び1993年に岩手県二戸、秋田県横手、長野県佐久、沖縄県中部、茨城県水戸、新潟県長岡、高知県中央東、長崎県上五島、沖縄県宮古の9保健所管内在住であった40-69歳の男女のうち、多目的コホート(JPHC: Japan Public Health Center-based Cohort Study)研究に参加し、血漿が保存されている約3万人である。

## 【 0 0 8 5 】

追跡開始から2008年までの間に急性期脳梗塞(aCI)の発症があった症例を「症例群」、その時点で脳梗塞を発症していない生存者を「対照群」として、各症例について

50

性別、年齢、地域をマッチさせ、無作為に1例の対照を選び出し、症例202人、対照202人の合計404人を同定した。DIDO1抗原(DIDO1蛋白質とDIDO1ペプチド)と、CPSF2抗原(CPSF2ペプチド)のそれぞれに対する血漿抗体レベルをAlphalisa法により測定し、四分位とaCI発症との関連を、条件付きロジスティックモデルにより分析した。

【0086】

結果を表7に表す。

【0087】

【表7】

		DIDO1 vs aCI	DIDO1-pep vs aCI	CPSF2 vs aCI
2nd	Matched OR	3.99	1.92	1.19
	95% CI	1.93 – 8.23	1.03 – 3.58	0.63 – 2.23
3rd	Matched OR	3.40	2.40	1.66
	95% CI	1.62 – 7.13	1.29 – 4.46	0.89 – 3.09
Max	Matched OR	4.02	2.66	2.41
	95% CI	1.94 – 8.35	1.43 – 4.95	1.33 – 4.37

10

【0088】

その結果、DIDO1蛋白質に対する血漿抗体レベルはaCI発症と強い関連を示した。血漿抗体レベルの最も低い群に対し、第2四分位でのaCI発症の条件付オッズ比(95% confidence intervals)は3.99(1.93-8.23)、第3四分位では3.40(1.62-7.13)、最も高い群では4.02(1.94-8.35)であった。DIDO1ペプチドに対する血漿抗体レベルもDIDO1蛋白質抗原と同様の結果を示したが、オッズ比はやや低かった。また、CPSF2ペプチドに対する血漿抗体レベルもaCI発症と関連を示し、条件付きオッズ比はそれぞれ1.19(0.63-2.23)、1.66(0.89-3.09)、2.41(1.33-4.37)であった。この結果は、DIDO1体液抗体レベルとCPSF2体液抗体レベルはaCIの発症予測に有用なバイオマーカーであることを意味している。

20

30

【0089】

[実施例のまとめ]

DIDO1体液(血清又は血漿)抗体レベルは、TIA、aCI及びCKDの患者体液において高値を示し、AMIとDMの患者体液においては有意な上昇は認められなかった。

【0090】

特に、DIDO1体液抗体レベルはCKDにおいて0.8を越す高いAUC値を示したことから、腎不全と高血圧によく対応するバイオマーカーである。DIDO1体液抗体レベルは、脳梗塞では、cCIやTIAよりaCIに大きな差を示したことから、腎不全からaCIを発症する人を識別している。さらにDIDO1体液抗体レベルは、asympt-CIには反応しないことから、急性期脳梗塞発症の直前で急増するバイオマーカーである。このバイオマーカーが高値の人は、脳梗塞発症が極めて差し迫っていると推定されるので、腎臓病の治療や血圧管理により早急な予防対策が必要である。

40

【0091】

また、cCIではDIDO1体液抗体レベルが下がることから、これを治療後のモニタリングにも適用できる。

【0092】

一方、CPSF2体液抗体レベルは、CKDにはあまり関係せず、AMI、DM、aCI及びTIAに良く反応しており、特にDMの原因によるaCIとAMIを識別している。CPSF2体液抗体レベルは、DMバイオマーカーであるHbA1cやBSには相関が

50

認められない。これは、多くの患者は治療を受けているためにこれらのバイオマーカ―値が減少している故と考えられる。従って、他のDMバイオマーカ―値が下がっていても、このCPSF2体液抗体レベルが高値であれば、脳梗塞発症のリスクは依然として下がっていないと推定される。さらに、血中総蛋白質やアルブミンの減少が見られ、コレステロール値の低下が観察される場合にも、このバイオマーカ―が高値であれば、脳梗塞発症のリスクは下がっていないと推定される。

【0093】

aCIの患者体液サンプルは、脳梗塞の発症後2週間以内に採取したものであり、発症後に新しく自己抗体が出現する可能性は低いことから、DIDO1体液抗体とCPSF2体液抗体は、脳梗塞の発症前から存在していたと考えられる。従って、このバイオマーカ―は動脈硬化症の発症予測にも適用可能である。

10

【0094】

より実際的なJPHCコホートサンプルの解析においても、DIDO1体液抗体レベルとCPSF2体液抗体レベルは、aCIの発症者において有意に高く、脳梗塞予測に有用なバイオマーカ―となることが示された。

【0095】

上述したように、DIDO1体液抗体レベルとCPSF2体液抗体レベルは、それぞれ腎臓病と糖尿病という異なる基礎疾患に対応している。即ち、これらのバイオマーカ―は腎臓病や糖尿病等の基礎疾患を持つ人の中において、脳梗塞を発症する人を識別できる。さらに、これらのDIDO1体液抗体バイオマーカ―とCPSF2体液抗体バイオマーカ―を併用することにより、広範囲の脳梗塞発症の高リスク者を前もって検出することが可能となる。

20

【0096】

例えば、aCIの前段階と言われるAsympt-CIやTIAの段階からaCIが近づくに従って、徐々に上昇するCPSF2体液抗体バイオマーカ―と、aCIの直前になって急増するDIDO1体液抗体バイオマーカ―を合わせて評価すれば、どの程度の危険が差し迫っているかを推定することが可能である。さらにこれらのバイオマーカ―測定により、糖尿病や腎臓病等の原因をも予測することが可能で、ハイリスクの人はそれぞれの原因に対応した早急な予防措置が必要となるであろう。

【産業上の利用可能性】

30

【0097】

脳梗塞は将来寝たきりになる原因の第一位であり、そ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。本発明のデータ取得方法とこれを具現化する本発明キットの使用により、脳梗塞の発症リスクを、病態個別的に、又は、総合的に検出することが可能であり、それぞれの状況に応じた予防措置や治療措置を講じることができるので、その産業上の利用価値は非常に大きい。

【 図 1 】

配列番号 2 : D I D O 1 variant 4 遺伝子産物 (NM\_033081.2) のアミノ酸配列

MDDKGFDSNEEAFKAIKPTKSEFRKTWGFRRITIAKREGAGDAEADPLEPPPPQQQLGLSLRRSGRQPKR
TRFRVQFLLTARRRGRSRMPVSI.FDSGFPPTSCPATDAEAFSAFSGVFSASFTRSGPQASATAVKFRPASSF
KVGKGDHDDTSDSDSGLTLKELQNRLLRRRQEPTEPLKGIQSRLLKRRRREGEPAETVGSSEASDTVE
GVLPSKQEPENDQGVVQAGKDDRESKLEGAAQDIKDEEPLDGRPKPECEGYDPNALYICRQPIINNR
FMTCCDRCFWFHGDVCGVIFSEARGRIJ.FRNGFDYICPNCTTILQVQDFTHSRITADQRAKWRPGDADGTDC
TSIGTIEQKSSDEQGIKGRIEKAANFSGKKKIKIFQVPVIEAPGASKICPGGCHVAQPDVSYCSNDICLK
HAAATMKFLSSGKEQKPKFKPKMKMKPEKPSLPCGCAQAGIKISSVHKRPAPEKKEITVKKAVVVPARSE
ALGKEAANCESSTPSWASDHNYNAVKEKTAAPSPLLYKSTKEDRRSEKAAAMAASKKTAPPGSAVGKQ
EAPFNLVPPKSSFANVAATPAIKKFPSPGFKCTIKRPLWLSATPSSGASAAAGAPAPAAATAASKKFFG
SAALVGAVRKPVVPSVDMASDPGRLGMSAAPSQNSQIRQNTRRSLKEILWKRNVNDDLLIMTENEVG
KIALHLKEMFNLPQVINDRKYKYSRIMPFLKDPKNQGLFHRVLRSEISLAKLVRLKPELVLASDLSLV
KERFARVMSRKTLMHESKKTAPKLEALPDLEDSPPVSDSEEQESARAVPEKSTAPLLDVFSSMLKDT
TSQIHAHLFDLNCIKCTCGVPSAEDEPAFKQKLSASVKEDLKSKHDSAPDPAPOSADAEVMPFEAVPEV
ASEPGLSASHPNVDRTYFPFGPDGHPPEPSLLEDLPCPCASCGSGVVTTVTVSGRDPRTAPSSCTAVA
SAASRFDSTHMVEARQDVFPKVLTSVMVKYSLAKPSSSPQRYLSVPPSPNISTSESRSPEEGDTTLFL
SRLSTIWKGFINMQSVAKFVTKAYPVSGCFDYLSEDLPTDTHIGGRIAPKTVWDYVVKLKSYSVKELCLI
RPHPATVEEVYIISLYSYFSSRGRFVVANNRHKVLDLYLPLSAQDPVPSKLLPFEGPGLSESPRNI
LGLVICQKIKRPNANGSELDKMDKRRTRLQPEEADVPAYPKVATVPQSEKPKSKYPLCSADAAVSTTPGGS
PPFPPLPEFVPLKVLSSLKPAAPSPATAATTAASSTASSASKTASPLEHLQTLFGKKSFD
SAREPPGSTAGLPQEPKTTAEDGVAPPPLLDPIVQFGQFSKDKALEEEDDRPYDPEEYDPERAFDTQ
LVEGRGRHEVERAEAAAAREEVADPEDETEILEAKVTVDLLPNRMCAVDRNSVERPAEPVAGAADP
SLVEQQRMLEELNKQLEEQKQLLEEQEALLRQRAAVGVSMHFSVSDALMSPPKSSLPKALFPQEQEQ
SADKPAFLPFAQSNIRDPQARLATEGEGEGEPLSLSARGAQALPERDASRGLVGGQAMPVPE
RKFAPASSPWASGFKPAGSFQDGRKAFPGFGRPRATVGDSSARPARVILPTPPCGAIQPGFIQHDGR
DPFTCGFASQDKALGSAQYEDFRNLHSAGRSSPAGETEGDREPOARPEGTAPLPPGQKVGGSQPPF
GQQRPEGFHALGMSGLHGNFPGRGPAPFPPEENIASNDGFRGPPPARFGAKGPIPSLPSGQHGPPPY
GDSRGPSPSYLGGPRGVAPSQFERRKDPHGKRRFQDAPYNFVTGAPAQFRGTQAPFTGSRGGA.PFGG
QRRPRLSQLKGRPGRQPPSPQFCGQRPFPCHVFCRPHPSQFETARGPHNPFEGFRQAPNEMPCPR
GIQPPQFEDQRVHSPPRFTNQRAPALQFGGLRGSAPFSEKNEQTPSRFHFQQAQVQMPGPRPLEL
SHFYQHRKDWEEAGPPSALSSSAPGQPEADGQWASADFRKGGHEYHNQTFYEGRQRERPDVGGPKKPL
EEFDAQGRASEDRRERERGRNWSRERDWRPREWDRHRDKDSSRDWDRNRERSANRDREREADRGKEWD
RSRERSRNRERERDRDRDRSRSRERDRDKARDRERGRDRKDRSKESARDPKPEASRSDAGTASQA
計: 2,240 アミノ酸
注: 下線部はペプチド抗原に用いられた配列を示す。

【 図 2 】

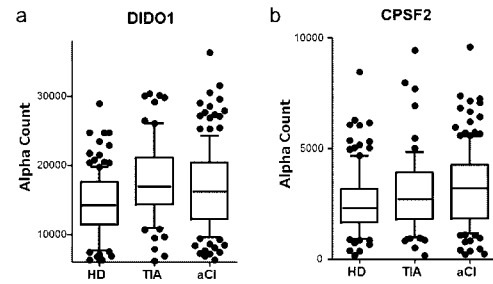
配列番号 6 : C P S F 2 蛋白質のアミノ酸配列

MTSIIKTLTSLGQVEESALCYLLQVDFRFLDDOGWDEHFSMDIIDSRLKHHVQIDAVLLSHPPDLHLGA
LPYAVGKLGLENCAIYATIPVYKMGQMFMYDLYQSRHNTEDFTLFLDLDVDAAPDKIQQLKFSQIVNLKKG
GHGLSITPLPAGHMIGGTIWKIVKDGEEIVYAVDFNHKREIHLNGCSLEMLSRPSSLITDSFNATYVQP
RRKQREDEQLLTVLETLRQDGNVLIADVDTAGRLELAQLLDDQIWRTKDAGLVYS.LALLNVSYNVVEFS
KSQVFWMSDKI.MRCFFDKRNNPFQFRHLSICHGFS.DIARVPSPKVVI.ASQPDI.FCGFSRDI.FTQWCDDPK
NSIILTYRTT.PGT.LARFLI.ONPSEKI.TE.IELRKRVKLEGELEEYLEKEKLEKKAALKLEQSEADIDSS
DESQIEIEDIQPSAHKTKHDLMMKGEGRKGSFFKQAKKSYPMFPAPERIKWDEYGEIIPKEDFLVPEL
QATEEESKLESGLTNGDEPMDDLSVDFTKISTTESIEIKARVYIDYEGRSDGDSIKKLIINQMKPRQ
I.IVHGPFFASQDI.ARCRCRAFGGKDIKVYMPKI.HFTVQATSETHYVQVRLKDSLVSSLQPCAKADARJ.AW
IDGVLDMRVSKVDTVGLEEGELKDDGDESEMQVEAPSDSVIAQQKAMKSLFCDDDEKETEESSELIPTL
EPLDPHEVPHGQSVFMNEPRLSDFKQVLLREGIQAEEVGGVGLVNNQAVARRTETRIGLEGCLCQDFYR
1RDLLEYEQYAIIV

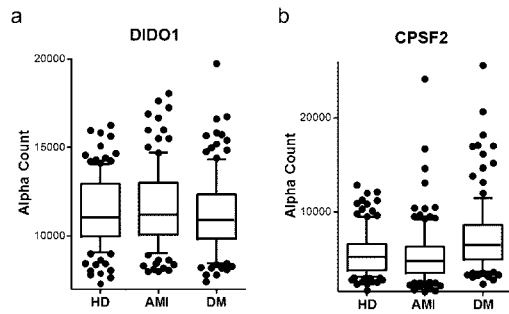
計: 782 アミノ酸

注: 下線部はペプチド抗原に用いられた配列を示す。

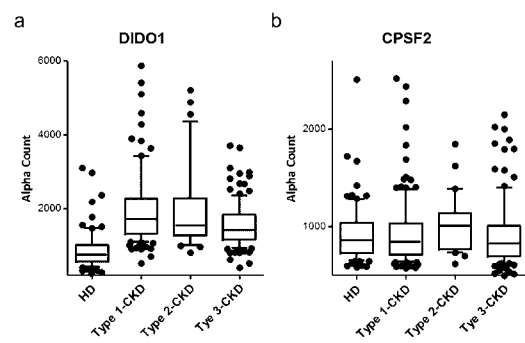
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【配列表】

2019100811000001.app

## フロントページの続き

- (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
- (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
- (72)発明者 山岸 良匡  
茨城県つくば市天王台一丁目1番1号 国立大学法人筑波大学内
- (72)発明者 津金 昌一郎  
東京都中央区築地五丁目1番1号 国立研究開発法人国立がん研究センター内
- (72)発明者 澤田 典絵  
東京都中央区築地五丁目1番1号 国立研究開発法人国立がん研究センター内
- (72)発明者 磯 博康  
大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内
- Fターム(参考) 4H045 BA10 CA40 DA75 DA86 EA50

专利名称(译)	体液抗体生物标志物，用于敏感地检测发生脑梗塞的风险		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019100811A</a>	公开(公告)日	2019-06-24
申请号	JP2017230639	申请日	2017-11-30
[标]申请(专利权)人(译)	藤仓化成株式会社 NAT癌症CENT 国立大学法人筑波 国立大学法人大阪大学		
申请(专利权)人(译)	藤仓化成株式会社 国家研究与发展研究所国家癌症研究中心 国立大学法人筑波 国立大学法人千叶大学 国立大学法人大阪大学		
[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 山岸 良匡 津金 昌一郎 澤田 典絵 磯 博康		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/47 C12N15/09		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.N G01N33/53.D C07K14/47 C12N15/00.A G01N33/53.NZN.A		
F-TERM分类号	4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA50		
代理人(译)	志村光晴		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)  
 本发明的一个目的是提供一种准确地掌握导致脑梗塞发作的症状的装置。解决方案：脑梗塞发作时的数据采集的特征在于测量从活体分离的体液样品中抗DIDO1蛋白或其部分和/或CPSF2蛋白或其部分的抗体水平。方法。【选择图表】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2019-100811 (P2019-100811A) 令和1年6月24日(2019.6.24)	
				(43) 公開日	
(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)	
G 0 1 N 3 3 / 5 3	(2006.01)	G O 1 N 3 3 / 5 3	Z N A N	4 H 0 4 5	
C 0 7 K 1 4 / 4 7	(2006.01)	G O 1 N 3 3 / 5 3	D		
C 1 2 N 1 5 / 0 9	(2006.01)	C 0 7 K 1 4 / 4 7			
		C 1 2 N 1 5 / 0 0	A		
審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 30 頁)					
(21) 出願番号	特願2017-230639 (P2017-230639)	(71) 出願人	000224123		
(22) 出願日	平成29年11月30日 (2017.11.30)	(71) 出願人	藤倉化成株式会社 東京都板橋区蓮根三丁目20番7号 510097747		
		(71) 出願人	国立研究開発法人国立がん研究センター 東京都中央区築地五丁目1番1号 504171134		
		(71) 出願人	国立大学法人 筑波大学 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 304021831		
		(71) 出願人	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 504176911		
		(71) 出願人	国立大学法人大阪大学 大阪府吹田市山田丘1番1号 最終頁に続く		

(54) 【発明の名称】 脳梗塞の発症リスクを高感度に検出する体液抗体バイオマーカー