

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2002 - 107363

(P2002 - 107363A)

(43)公開日 平成14年4月10日(2002.4.10)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D 4 H 0 4 5
C 0 7 K 7/08	ZNA	C 0 7 K 7/08	ZNA
16/18		16/18	

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 8 数)

(21)出願番号 特願2000 - 303888(P2000 - 303888)

(22)出願日 平成12年10月3日(2000.10.3)

(71)出願人 000158208

旭テクノグラス株式会社

千葉県船橋市行田一丁目50番1号

(72)発明者 藤井 紀子

大阪府和泉市いぶき野2 - 2 - 8

(72)発明者 多島 新吾

東京都練馬区上石神井2 - 23 - 17 - 301

(72)発明者 下岡 正志

千葉県船橋市行田一丁目50番1号 旭テクノ

グラス株式会社中山工場内

(74)代理人 100088904

弁理士 庄司 隆

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒト老化マーカー及びストレスマーカーの検定方法

(57)【要約】

【課題】新規な人の老化又は人のストレスのマーカーを検出するための方法及び検出試薬を提供すること。

【課題解決手段】Asp¹⁵¹が D体である Aクリスタリンに対する抗体を用いることで達成した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】下記の群より選ばれるポリペプチド又は該ポリペプチドを有するタンパク質を免疫学的に認識する抗体を用いることを特徴とする、ヒト老化マーカー及びストレスマーカーの検出方法；

N末端より151番目のアスパラギン酸がD- -アスパラギン酸(D- -Asp)であるaAクリスタリン、

N末端より151番目のアスパラギン酸がD- -アスパラギン酸であるaAクリスタリン由来であるポリペプチド断片、

アミノ酸配列がGly-X₁-D- -Asp-Alaを含むポリペプチド(X₁は疎水性アミノ酸を示す)、

アミノ酸配列がGly-X₁-D- -Asp-Alaを含むポリペプチド(X₁はLeuあるいはValを示す)

前記 ~ のポリペプチドと少なくとも約50%のアミノ酸配列上の相同性を有するポリペプチド、

前記 ~ のアミノ酸配列において、1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有するポリペプチド。

【請求項2】請求項1に記載のいずれかに記載された20 検出方法に用いることを特徴とするヒトの老化マーカー又はストレスマーカーの検出用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ヒト老化マーカー及びストレスマーカーを認識する抗体を用いるそれらマーカーの検出方法及び検出用試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、老化マーカーあるいはストレスマーカーに対する抗体、およびそれら抗体を利用したマーカーの検出方法は存在する。例えば、ヒト老化マーカータンパク質SMP30に対する抗体及び抗体を用いるヒトSMP30の測定方法は、特開平7-97399及び特開平8-319298に示されている。その場合、老化するほどSMP30の血中濃度が下がることを利用した老化モニタリング、あるいは肝障害や腎障害でSMP30の血中濃度が増大することを利用した肝細胞障害モニタリング及び腎細尿管の破壊モニタリングに使用される。

【0003】また特開平7-181180に示されるように、骨格筋由来のストレスタンパク質p20に対する抗20 体は、例えば、患者血清あるいは血漿中のストレスタンパク質p20の濃度測定を可能にし、生体の受けたストレスの程度を測定することができる。さらには、Biochem. J. (2000) 345, 473-480及びBiochem. J. (2000) 345, 481-485に示されるように、I型コラーゲン1鎖C末端テロペプチド由来の4種類の異性体ペプチド断片(Asp¹²¹¹がそれぞれ、aL体、aD体、L体、及びD体)に対する抗体は、尿中の各ペプチド断片の定量を可能にし、コラーゲン分子の老化、コラーゲン代謝、骨代謝の測定、及び骨代謝異常の診断に有効である。

【0004】本発明者らは、ヒトのレンズに含まれるAクリスタリンにおいて、老化とともに鎖中Aspの異性体が蓄積することを報告してきた。さらに本発明者らは、Molecular Vision (2000) 6, 1-5に示されるように、Asp¹⁵¹がD体であるAクリスタリンに対して特異的な抗体を用いて、その異性体タンパク質が老化したレンズのコア部分に局在することを明らかにした。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、ヒト10 老化マーカー及びストレスマーカーを認識するAsp¹⁵¹がD体であるAクリスタリンに対して特異的な抗体を提供し、この抗体を組織・細胞に適用して、人の老化又は人のストレスのマーカーを検出するための方法及び検出試薬を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは鋭意研究した結果、Asp¹⁵¹がD体であるAクリスタリンに対して特異的な抗体が、レンズ以外の組織中に存在する老化マーカーあるいはストレスマーカーに成り得る物質と反応20 することを見出した。例えば、老人顔面皮膚内のエラスチン繊維、顔面脂漏性角化症の皮下組織、さらには老人皮膚組織の血管内皮が、本発明の抗体と際立った反応を示すことを明らかにした。さらにこれら抗体を用いた免疫学的検定法、及び免疫学的試薬を開発し本発明を完成した。

【0007】すなわち本発明はAsp¹⁵¹がD体であるAクリスタリンに対する抗体を用いて、ヒト組織の老化マーカーあるいはストレスマーカーを検出し、組織の老化の度合、ストレス度、及び病的変化をモニターすることが20 できる。

【0008】本発明は、

1. 下記の群より選ばれるポリペプチド又は該ポリペプチドを有するタンパク質を免疫学的に認識する抗体を用いることを特徴とする、ヒト老化マーカー及びストレスマーカーの検出方法；

N末端より151番目のアスパラギン酸がD- -アスパラギン酸(D- -Asp)であるaAクリスタリン、

N末端より151番目のアスパラギン酸がD- -アスパラギン酸であるaAクリスタリン由来であるポリペプチド断片、

アミノ酸配列がGly-X₁-D- -Asp-Alaを含むポリペプチド(X₁は疎水性アミノ酸を示す)、

アミノ酸配列がGly-X₁-D- -Asp-Alaを含むポリペプチド(X₁はLeuあるいはValを示す)

前記 ~ のポリペプチドと少なくとも約50%のアミノ酸配列上の相同性を有するポリペプチド、

前記 ~ のアミノ酸配列において、1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有するポリペプチド。

2. 前項1に記載のいずれかに記載された検出方法に

用いることを特徴とするヒトの老化マーカー又はストレスマーカーの検出用試薬。に関するものである。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明の抗体は、以下のタンパク質又はポリペプチドを免疫原として常法により調製される。Asp¹⁵¹がD体であるAクリスタリン、このAクリスタリン由来のポリペプチド断片、アミノ酸配列がGly-X₁-D-Asp-Alaを含むポリペプチド(X₁は疎水性アミノ酸を示し、好ましくはLeuまたはValが例示される)、これらポリペプチドと少なくとも約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するポリペプチド、のアミノ酸配列上の相同性を有するポリペプチド、これらポリペプチドのアミノ酸配列において、1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有するポリペプチドが免疫原として例示される。

【0010】免疫原として、利用されるポリペプチドは、その最小単位としては少なくともD体のAsp¹⁵¹部位を保持し、3個以上のアミノ酸、好ましくは4個以上のアミノ酸、より好ましくは6個以上、さらに好ましくは8個以上の連続するアミノ酸で構成されるアミノ酸配列からなり、好ましくは免疫学的に同定しうるポリペプチド又はペプチドを本発明の対象とする。これらのペプチドは、単独又はキャリア(例えば、キーホールリンペイトヘモシアニン又は卵白アルブミン)と結合して使用できるが、これらのように別種のタンパク質又は物質を結合したのも本発明の範囲に包含される。

【0011】さらに、このように特定されたポリペプチドは、1以上、例えば1~100個、好ましくは1~300個、より好ましくは1~200個、さらに好ましくは1~100個で特に好ましくは1ないし数個のアミノ酸の欠失・置換・付加あるいは挿入といった変異を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド又はペプチドも利用可能である。欠失・置換・付加あるいは挿入の手段は自体公知であり、例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法又はポリメラーゼ連鎖増幅法(PCR)を単独又は適宜組み合わせ、例えば、Molecular Cloning; A Laboratory Manual、第2版、Sambrookら編、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク、1989年; [ラボマニュアル遺伝子工学]、村松正實編、丸善株式会社、1988年; [PCRテクノロジー、DNA増幅の原理と応用]、Ehrlich, H.E. 編、ストックトンプレス、1989年等の成書に記載の方法に準じて、あるいはそれらの方法を改変して実施することができ、例えばUlmerの技術(Science(1983)219:666)を利用することが出来る。

【0012】上記のような免疫原に用いるポリペプチドは、例えば常法に従ったペプチドの化学合成で分量得

ることができる。このうち、より簡単には、固相法による市販のペプチド合成機を用いる方法がある。すなわち、ポリマー性の支持体にペプチド断片のC末端側から、そのアミノ酸残基に対応した保護アミノ酸を縮合させペプチド結合を形成させる。縮合方法としては、例えば、DCC法、酸無水物法、活性エステル法等の方法を使用することができる。アミノ基の保護基としてはBoc基又はFmoc基が使用できる。例えば、ペプチド自動合成機を用いて合成する時には、その装置のマニュアルに従い適宜アミノ酸の性質を考慮して合成方法を選択するのが好ましい。

【0013】抗体を産生するためには、上記ポリペプチドからなる免疫原を、アジュバントの存在又は非存在下で、単独又は担体に結合して、動物に対して体液性応答及び/又は細胞性応答等の免疫誘導をおこなうことによって行われる。担体は、それ自体が宿主に対して有害作用をおこさなければ、特に限定されず例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が例示される。免疫される動物は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等が好適に用いられる。ポリクローナル抗体は、自体公知の血清からの抗体回収法によって取得される。好ましい手段としては、免疫アフィニティークロマトグラフィー法である。

【0014】モノクローナル抗体を生産するためには、上記の免疫手段が施された動物から抗体産生細胞(例えば、脾臓又はリンパ節由来)を回収し、自体公知の永続増殖性細胞(例えば、P3X63Ag8株等のミエローマ株)への形質転換手段を導入することによって行われる。例えば、ペプチド断片をアジュバントと共にマウス、ラット等に注射し、抗体価が高くなった状態で脾臓を摘出し、その脾細胞をポリエチレングリコール等のような融合剤を用いてミエローマ細胞と融合させ、その融合細胞群より当該抗体を産生するクローンを選択し増殖させ、腹腔中あるいは培養液中で大量細胞培養することにより、製造することができる。実例としては、ハイブリドーマ法(Kohler, G. and Milstein, C., Nature(1975)256:495-497); トリオーマ法(Kozbor et al., Immunology Today(1983)4:72); 及びEBV-ハイブリドーマ法(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss, Inc., (1985):77-96)に記載されるような種々の技法がある。

【0015】このようにして得られた抗体又はその抗原結合性フラグメントは、そのまま、あるいは酵素標識、放射標識、蛍光標識等を結合させて、組織中及び体液中に存在する該抗原を検出することに用いることができる。本発明の抗体を用いることにより、ヒト組織の老化マーカーあるいはストレスマーカーを検出し、組織の老化の度合、ストレス度、及び病的変化をモニターすることができる。さらに、本発明の抗体を用いることにより、ヒト組織の老化マーカーあるいはストレスマーカー

を検出し、組織の老化の度合、ストレス度、及び病的変化をモニターする免疫学的試薬を得ることができる。

【0016】本発明の試薬の検体としては、ヒトの臓器、組織、血液、尿、髄液等を挙げるができるがこれらに限定されるものではない。組織等の抗原を検出する場合は、常法に従って免疫組織化学の手法が用いられる。すなわちオートプシーされた組織をスライドに固定した後、この抗体を反応させ、さらに例えばパーオキシダーゼ等で標識した抗IgG抗体を反応させる。そして基質液を反応させることにより抗原の存在部位を染色することができる。

【0017】また本発明の抗体は、体液中の抗原を検出するために、常法に従って免疫測定法に広く利用することができる。この免疫測定法としては、例えば酵素免疫測定法、放射免疫測定法、蛍光免疫測定法、凝集免疫測定法、免疫比濁測定法、ウェスタンブロット法等を挙げることができる。これらのいずれの測定法を採用しても、該抗原の測定を十分行なうことができる。

【0018】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0019】

【実施例1】免疫原の作製

1) Gly-Leu-D-Asp-Ala-Thr-Gly-Leu-D-Asp-Ala-Thr-Gly-Leu-D-Asp-Ala-Thrの合成。市販のFmoc-Thr(tBu)-Wang樹脂0.2gをジメチルホルムアミド(DMF)で膨潤させた後、ペプチド合成機の反応器に入れた。樹脂を20%ピペリジン/DMFで処理しFmoc基を除去してアミノ基を遊離させ、DMFで洗浄した。このアミノ基に次のアミノ酸Fmoc-AlaをHOBt/PyBop法で縮合した。

【0020】以後同様に、Fmoc-D-Asp-OtBu, Fmoc-Leu, Fmoc-Gly, Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-Ala, Fmoc-D-Asp-OtBu, Fmoc-Leu, Fmoc-Gly, Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-Ala, Fmoc-D-Asp-OtBu, Fmoc-Leu, Fmoc-Glyを順次縮合し、反応を完了した。

【0021】樹脂を乾燥した後、94%トリフルオロ酢酸(TFA)/5%アニソール/1%エタンジチオールで2時間処理し、ペプチドを樹脂から切り離すとともにペプチドの保護基を除去した。この脱保護ペプチドをジエチルエーテルで洗浄し乾燥した。これを20%アセトニトリル/0.1%TFAに溶解し、C18マイクロボンドスフェアカラム(ウォーターズ社)を装着したHPLC装置にてグラジエント溶出し精製した。この精製ペプチド分画を集め凍結乾燥し、白色粉末10.1mgを得た。

【0022】2) 上記の合成ペプチドとキーホール・リンペット・ヘモシアニン(KLH)との複合体を作製し、免疫原とした。すなわち、KLH 5mgとペプチド5mgを各々2.5mlの0.1M Na₂CO₃溶液に溶解し、両者を混合した。次にジメチルアジピミデート(DMA) 10mgを冷

やした純水1mlに溶かし、その内の0.25mlを直ちに上記混合物に添加した。室温で3時間振とう反応した後、免疫原とした。

【0023】

【実施例2】抗体の作製

実施例1で調製した免疫原を完全フロイントアジュバントと1:1の割合で混合し、ウサギ背部皮内10カ所に注射した(0.4mg/ウサギ)。2週間後に、免疫原を不完全フロイントアジュバントと1:1の割合で混合し、ウサギ背部皮下10カ所に注射した(0.2mg/ウサギ)。以降2週間隔で繰り返し、5回目の免疫終了1週間後に採血し抗血清を得た。抗血清中のペプチド特異抗体(ポリクローナル抗体)は、この抗血清5mlをペプチド5mgを結合させた1mlのアガロースビーズカラム(Aff-Gel 10; Bio-Rad社)に通すことにより精製した。収量は1mgであった。安定化のためにウシ血清アルブミンを10mg/mlになるように添加し、-20℃に保存した。

【0024】

【実施例3】免疫組織染色

バイオプシーされたヒト皮膚を常法に従ってパラフィン切片にした。脱パラフィンの後、次の手順にて組織免疫染色を実施した。すなわち、1) TBS(0.05Mトリス塩酸, pH7.6/0.15M NaCl)で5分間インキュベーションする、2) 0.025%プロナーゼ/0.05Mトリス塩酸, pH7.6中で20分間インキュベーションする、3) 3%過酸化水素水/TBS中で5分間を3回インキュベーションする、4) 2%正常ブタ血清/TBS中で20分間インキュベーションする、5) 本発明のウサギポリクローナル抗体(約5µg/ml; 2%正常ブタ血清/TBS中)と4)で一晩インキュベーションする、6) 0.2%ツイーン/TBS中で5分間を3回インキュベーションする、7) ビオチン化ブタ抗ウサギIgG(DAKO社製、コード番号E353、500倍希釈で使用)と30分間インキュベーションする、8) 0.2%ツイーン/TBS中で5分間を3回インキュベーションする、9) StreptABCComplex/HRP(DAKO社、コード番号K377)を用いて30分間インキュベーションする、10) 0.2%ツイーン/TBS中で5分間を3回インキュベーションする、11) ペルオキシダーゼ基質液と5-15分間インキュベーションする、12) 純水で洗浄する、13) ヘマトキシリンで対比染色した後、観察する。この実験の結果を図1~5に示した。

【0025】皮膚の場合、普段露出している顔面では老人で強い染色がみられた。一方、普段被覆されている胸部では染色がみられなかった。また、若齢者では顔面でも全く染色がみられなかった。老人の血管内皮、あるいは顔面脂漏性角化症の皮下組織でも強い染色がみられた。

【0026】

【実施例4】ウェスタンブロットティング

バイオプシーにて得られたヒト老人皮膚を純水で抽出

後、残査に6Mグアニジン塩酸を加え、抽出されたタンパク質をウェスタンブロットリングに供した。すなわち、抽出サンプルを12.5%ゲルを用いたSDS-PAGEにかけ、分離されたタンパク質をPVDF膜にプロットした。このPVDF膜と本発明のウサギポリクローナル抗体(約1µg/ml; 1%ウシ血清アルブミン/0.05%ツイーン20/PBS中)を室温で1時間反応させた後、PBSで3回洗浄した。次にヤギ抗ウサギIgG-HPR複合体と室温で30分間反応させた後、PBSで3回洗浄し、0.6mg 3-アミノ-9-エチルカルバゾール/0.03% H₂O₂/0.2M酢酸緩衝液(pH5.2)と反応させた。この実験により分子量50kDa付近の染色バンドが検出された(図6)。

【0027】

【発明の効果】以上のように、本発明は、Asp¹⁵¹がD体であるAクリスタリンに対して特異的な抗体が、レンズ以外の組織中に存在する老化マーカーあるいはストレスマーカーと反応することを見出した。これにより、ヒト組織中又は体液中に存在するそれらマーカーを検出及び定量することができるようになった。従って、本発明は、老化の度合、ストレス度、及び病的変化の観察に大いに寄与するものと考えられる。

*【0028】

【図面の簡単な説明】

【図1】82歳女性の顔面皮膚の免疫組織染色を示しており、いろいろな部位に染色がみられる。

【図2】72歳男性の胸部皮膚の免疫組織染色を示しており、染色はみられない。

【図3】9歳男性の顔面皮膚の免疫組織染色を示しており、染色はみられない。

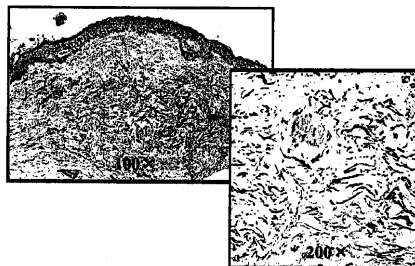
【図4】69歳男性の顔面脂漏性角化症皮下の免疫組織染色を示しており、エラスチン繊維に強い染色がみられる。

【図5】69歳男性の顔面脂漏性角化症皮下の免疫組織染色を示しており、血管内皮に強い染色がみられる。

【図6】老人顔面皮膚由来タンパク質のウェスタンブロットリングを示しており、分子量50kDa付近の染色バンドが検出された。レーン1は標準マーカー、レーン2は老人皮膚のクーマシーブリリアントブルー染色、レーン3は老人皮膚の本発明ポリクローナル抗体によるウェスタンブロットリングであり、矢印は分子量50kDa付近の染色バンドを示す。

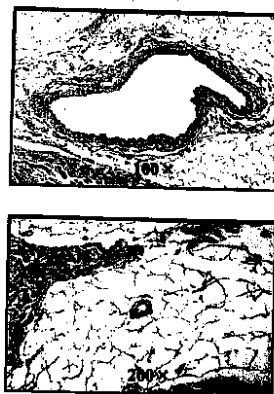
【図4】

69歳、男性
顔面脂漏性角化症(1)

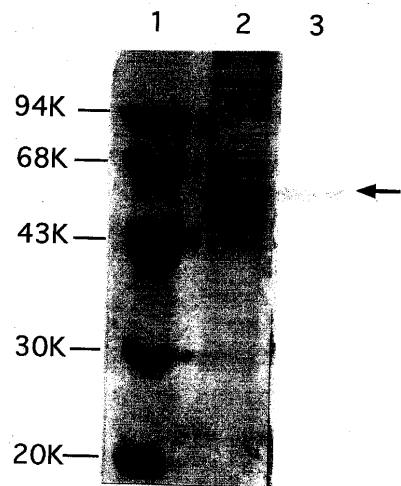


【図5】

69歳、男性
顔面脂漏性角化症(2)



【図6】

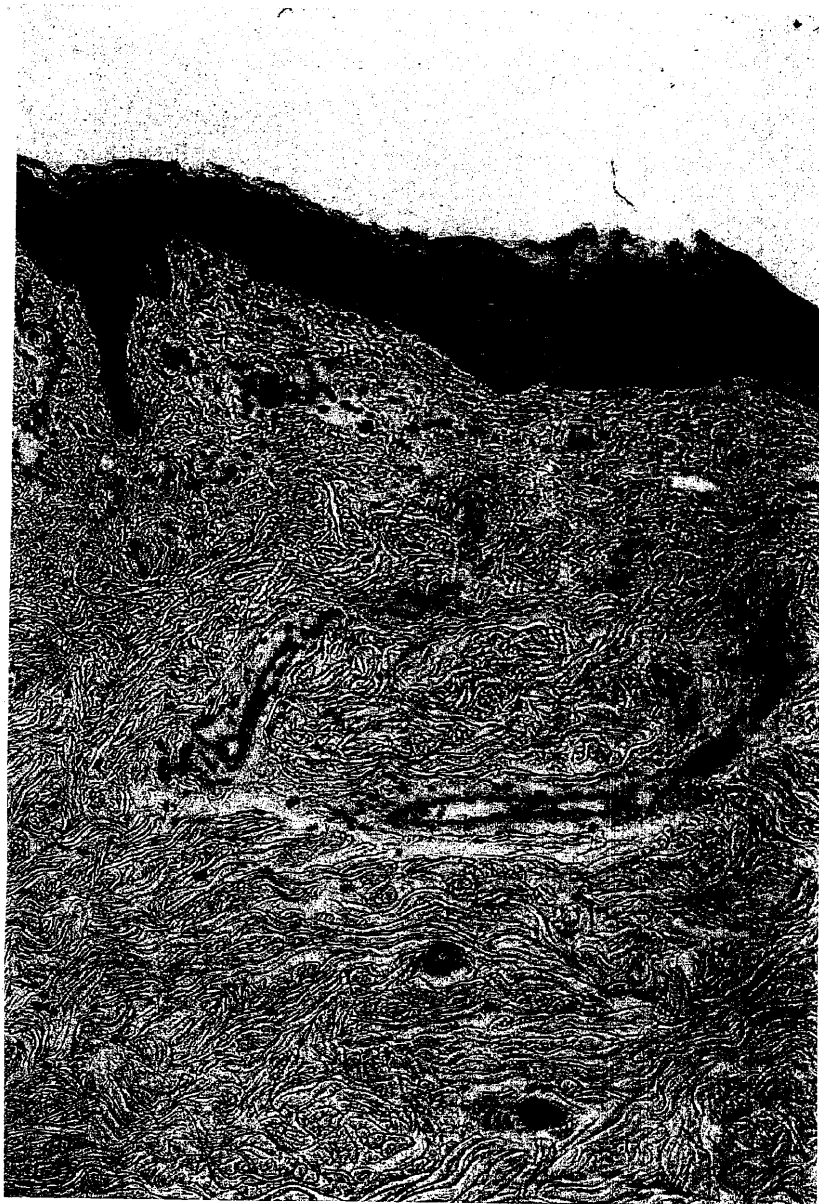


【図1】



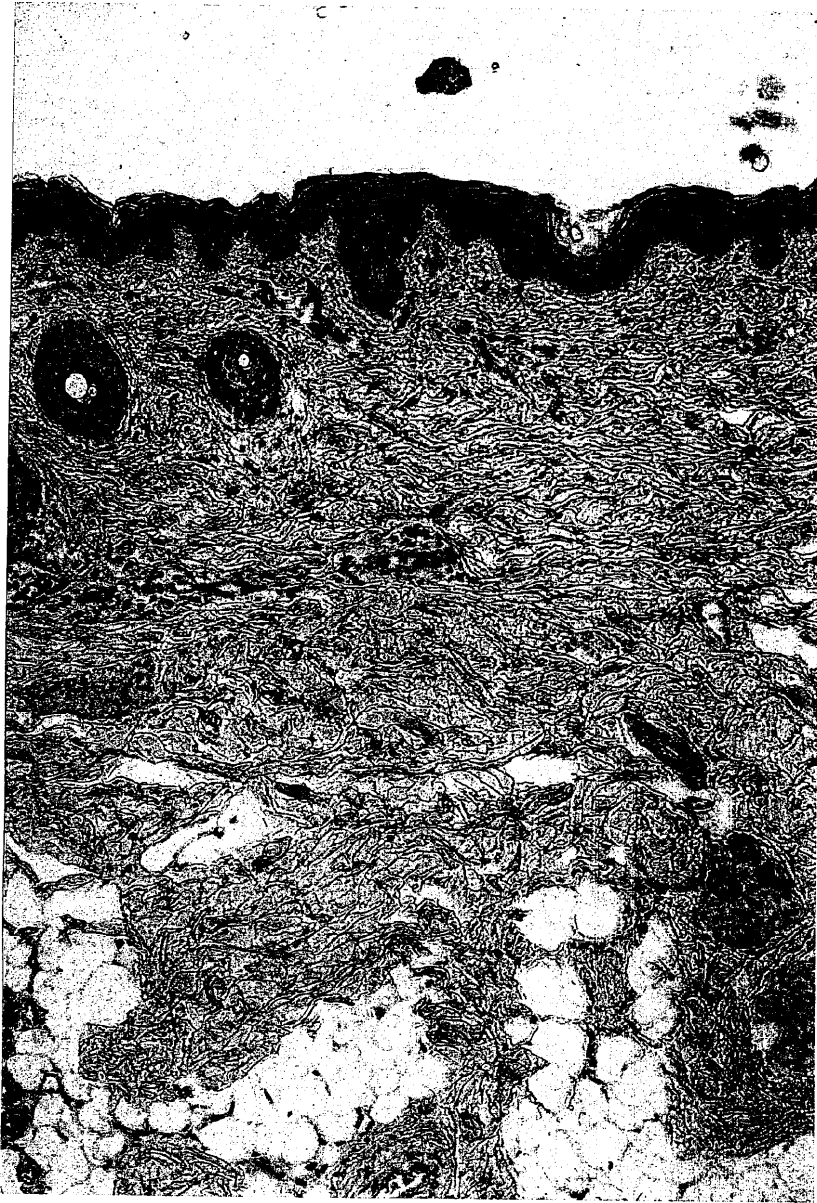
86/F face (100×)

【図2】



72/M chest (100 x)

【図3】



9/M face (100 ×)

专利名称(译)	测定人衰老标志物和应激标志物的方法		
公开(公告)号	JP2002107363A	公开(公告)日	2002-04-10
申请号	JP2000303888	申请日	2000-10-03
[标]申请(专利权)人(译)	旭科技玻璃股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	旭科技玻璃有限公司		
[标]发明人	藤井紀子 多島新吾 下岡正志		
发明人	藤井 紀子 多島 新吾 下岡 正志		
IPC分类号	G01N33/53 C07K7/08 C07K16/18		
FI分类号	G01N33/53.D C07K7/08.ZNA C07K16/18		
F-TERM分类号	4H045/AA30 4H045/BA17 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA34		
代理人(译)	庄司隆		
其他公开文献	JP3754611B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供检测人体衰老或检测人体应激标记的新方法和试剂。解决方案：针对 α - α 结晶的抗体，其中使用Asp151和 β D体。

【 図 5 】

69歳、男性
顔面脂漏性角化症(2)

