

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6942036号
(P6942036)

(45) 発行日 令和3年9月29日(2021.9.29)

(24) 登録日 令和3年9月9日(2021.9.9)

(51) Int. Cl. F I
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 Z N A N
 C O 7 K 14/47 (2006.01) GO 1 N 33/53 D
 C O 7 K 14/47

請求項の数 11 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2017-230639 (P2017-230639)	(73) 特許権者	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)	(73) 特許権者	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
(65) 公開番号	特開2019-100811 (P2019-100811A)	(73) 特許権者	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
(43) 公開日	令和1年6月24日(2019.6.24)	(73) 特許権者	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
審査請求日	令和2年10月30日(2020.10.30)	(73) 特許権者	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) 【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血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血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。

【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血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。

【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 - 30 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 5 に記載のデータ取得方法。

10

【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、10% 以下の個数（小数点以下切り捨て）のアミノ酸残基が、欠失、置換、又は、追加されていることを特徴とする、請求項 1 - 8 のいずれか 1 項に記載のデータ取得方法。

【請求項 10】

抗体レベル測定法は、ELISA 法、AlphaLISA 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、CLEIA 法であることを特徴とする、請求項 1 - 9 のいずれか 1 項に記載のデータ取得方法。

20

【請求項 11】

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 - 10 のいずれか 1 項に記載のデータ取得方法。

【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。

30

【背景技術】

【0002】

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】

40

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）、A T P 2 B 4（非特許文献 7）、B M P - 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

50

献12)、heat shock proteins (Hsps) (非特許文献13)、糖尿病のinsulin (非特許文献14)、glycohemoglobin (HbA1c) (非特許文献15)、glutamic acid decarboxylase (GAD) (非特許文献16)、protein tyrosine phosphatase IA-2 (非特許文献17)等が知られている。

【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. 10

【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.

【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 Diagn* 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. 20

【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.

【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. 30

【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. 40

【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. 50

【非特許文献 1 3】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 1 4】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 1 5】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 1 6】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 1 7】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 1 8】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。

【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-obliterators 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

10

20

30

40

50

ト4遺伝子の塩基配列は、配列番号1に示す通りである。D I D O 1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。D I D O 1の最長のスプライシングバリエーション4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D I D O 1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D I D O 1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D I D O 1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D I D O 1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。D I D O 1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D I D O 1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D I D O 1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。

10

【0010】

C P S F 2蛋白質は、別名cleavage and polyadenylation specific factor 2、又はC P S F 100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。C P S F 2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。

【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、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」が挙げられる。

20

【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。

30

【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。

40

【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(HD)、一過性脳虚血発作(TIA)患者及び急性脳梗塞(aCI)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AlphaLISAにより定量した結果を示す。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、それぞれ箱髴図で示している。これらの箱髴図の縦軸は抗体レベルを示すアルファカウントであり、各箱髴に示された境界は、下から、

50

10番目(最下段の横バー)、20番目(箱の底辺)、50番目(箱の中心線)、80番目(箱の上辺)、90番目(最上段の横バー)のパーセントイルを示す。

【図4】HD、急性心筋梗塞(AMI)及び糖尿病(DM)患者における、DIDO1血清抗体及びCPSF2血清抗体レベルを、Alphalisa法により測定した結果を示す。DIDO1蛋白質抗原を用いた場合の結果をaに、CPSF2ペプチド抗原を用いた時の結果をbに、それぞれ箱髴図で示している。箱髴図は図3の説明に記載したとおりである。

【図5】HDと慢性腎臓病(CKD)患者における、DIDO1血清抗体及びCPSF2血清抗体レベルを、Alphalisa法により測定した結果を示す。DIDO1蛋白質抗原を用いた場合の結果をaに、CPSF2ペプチド抗原を用いた時の結果をbに、それぞれ箱髴図で示している。箱髴図は図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DIDO1蛋白質のア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。

【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

10

20

30

40

50

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。

【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、D I D O 1蛋白質由来としては、例えば、配列番号4（A M A A S K K T A P P G S A V G K Q）が挙げられ、C P S F蛋白質由来としては、例えば、配列番号7（C P S F 2 - 6 0 7 : Q V R L K D S L V S S L Q F C）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。

10

【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D I D O 1遺伝子の塩基配列、又は配列番号6に示すC P S F 2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、D I D O 1遺伝子、又はC P S F 2遺伝子の全部若しくは一部として得て、これを用いてp G E X - 4 T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（i s o p r o p y l - - D - t h i o g a l a c t o s i d e）等の薬物を添加することにより所定のD I D O 1遺伝子、又はC P S F 2遺伝子の全部若しくは一部の発現を誘導し、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、g l u t a t h i o n e - S e p h a r o s e（G E H e a l t h c a r e L i f e S c i e n c e s）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。

20

【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、B o c固相法又はF m o c固相法を用いることが可能である。

30

【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。

40

【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、A l p h a L I S A（A m p l i f i e d L u m i n e s c e n c e P r o x i m i t y H o m o g e n e o u s A s s a y - L i n k e d I m m u n o S o r b e n t A s s a y）法において用いられる、G S T（g l u t a t h i o n e S - t r a n s f e r a s e）-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。

【0025】

（c）脳梗塞の発症に関するデータ取得方法について

50

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。

【 0 0 2 6 】

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。

【 0 0 2 7 】

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 M R I 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。

【 0 0 2 8 】

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、行うことができる。具体的には、A l p h a L I S A 法、E 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、C L E I A 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。

【 0 0 2 9 】

例えば、A l p h a L I S A 法では、G S T - 融合 D I D O 1 抗原又は G S T - 融合 C P S F 2 抗原（蛋白質）を体液抗体捕捉抗原とする場合は、g l u t a t h i o n e - 結合ドナービーズを用い、b i o t i n 化 D I D O 1 ペプチド又は b i o t i n 化 C P S F 2 ペプチドを体液抗体捕捉抗原とする場合は s t r e p t a v i d i n - 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 I g G 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 6 8 0 n m の光を照射し、発生した 5 2 0 - 6 2 0 n m 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 D I D O 1 体液抗体複合体、又は C P S F 2 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、D I D O 1 蛋白質、又は C P S F 2 蛋白質に対する体液抗体を定量することができる。E L I S A 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 S D S - ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後に、ゲルからニトロセルロース膜等の担体に転写させ、生体から分離された体液サンプルを接触させて、生じた体液抗体捕捉抗原 - 抗 D I D O 1 体液抗体複合体、又は同 C P S F 2 体液抗体複合体を、二次抗体を用いて検出することにより定量測定を行うことができる。比濁法や比濁法では、生体から分離された体液サンプルと体液抗体捕捉抗原を接触させることにより形成された体液抗体捕捉抗原 - 抗 D I D O 1 体液抗体複合体、又は同 C P S F 2 体液抗体複合体を、濁度（比濁法）や、散乱光

強度の変化（比濁法）で検出することにより定量を行うことができる。ラテックス凝集比濁法では、体液抗体捕捉抗原を結合させたラテックス粒子と生体から分離された体液サンプルとを接触させることにより、当該ラテックス粒子の凝集体をラテックス粒子に結合した体液抗体同士の相互作用により形成させて、これを検出することにより定量を行うことができる。C L E I A法では、体液抗体捕捉抗原の結合磁性粒子と生体から分離された体液サンプルを接触させて、磁性粒子上に体液抗体捕捉抗原 - 抗C P S F 2抗体複合体、又は同D I D O 1抗体複合体を形成させて集磁を行い、未反応物を除去して、適切な蛍光処理等を施して当該複合体を検出することにより定量測定を行うことができる。

【0030】

ここに「D I D O 1抗原」と「C P S F 2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ことができる。

10

【0031】

第1に、「D I D O 1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を行うことができる。「慢性腎臓病（C K D）」は、腎障害が3ヶ月以上持続した腎疾患であり、罹患者は、脳卒中や心筋梗塞等の心血管病のリスクが高いことが知られている。さらに、急性期脳梗塞発症の直前で抗D I D O 1体液抗体レベルは急上昇する反面、慢性期脳梗塞では当該抗体レベルは低下する特徴を有している。

20

【0032】

すなわち、慢性腎臓病患者に対して定期的に「D I D O 1抗原」に対する体内抗体レベ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。

30

【0033】

第2に、「C P S F 2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C P S F 2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「D I D O 1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「C P S F 2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。

40

【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て用いることにより、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。

【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、G S T - 融合D I D O 1抗原又はG S T - 融合C

50

P S F 2 抗原（蛋白質）、g l u t a t h i o n e - 結合ドナービーズ、及び抗ヒト I g G - 結合アクセプタービーズの組、あるいは、b i o t i n 化 D I D O 1 抗原又は b i o t i n 化 C P S F 2 抗原（ペプチド）、s t r e p t a v i d i n - 結合ドナービーズ、及び抗ヒト I g G - 結合アクセプタービーズの組を、A l p h a L I S A 法を定量測定手段として行うための構成として挙げるができる。

【 0 0 3 6 】

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、E L I S A 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ができる。

【 0 0 3 7 】

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ができる。

【 0 0 3 8 】

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、C L E I A 法を行うためのキット構成として挙げるができる。

【 0 0 3 9 】

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】

【 0 0 4 0 】

以下、本発明の実施例を開示する。

【 0 0 4 1 】

[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。

【 0 0 4 2 】

(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 2 7 5 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 末端がピオチン化修飾された 5 4 3 - 5 6 0 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。

【 0 0 4 3 】

(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 D N A (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 末端がピオチン化修飾された 6 0 7 - 6 2 0 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。

【 0 0 4 4 】

(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) DIDO1蛋白質の発現と精製

ヒトU2OS骨肉腫細胞からHigh Pure RNA Isolation Kit (Roche, Basel, Switzerland)を用いて全RNAを単離し、Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Thermo Fisher Scientific)を用いてcDNAを合成した。それを鋳型として、Pyrobest DNA polymerase (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)を用いたPCR法により、DIDO1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) 遺伝子部位がクローニングサイトの上流に設けられているプラスミドベクターpGEX-4T-1 (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA)のEcoRI/SalI部位に挿入して、遺伝子発現用の組換えプラスミドであるpGEX-4T-1-DIDO1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-DIDO1を大腸菌BL-21に導入して形質転換を行い、0.1mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside)による、25、4時間処理により、DIDO1cDNA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-DIDO1蛋白質は、glutathione-Sepharose (GE Healthcare Life Sciences)カラムクロマトグラフィーにより精製し、緩衝液をPBSに交換し、これを上記の「DIDO1蛋白質」とした。対照としてGSTを同様に精製した。

【0046】

(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。

【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。

【0049】

bDIDO1-543: biotin-AMAAASKKTAPPGS AVGKQ (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

10

20

30

40

50

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。

10

20

【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

急性期脳梗塞 (aCI) 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 (TIA) 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。

【0053】

健常者 (HD)、TIA患者、及びaCI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MRI検査で異常の認められない被験者から得た。TIAとaCIの患者血清は千葉県立佐原病院、千葉労災病院、千葉市立青葉病院、及び千葉メディカルセンターにおいて入手した。

30

【0054】

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AlphaLISA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、SD、カットオフ値 (平均値 + 2SD)、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、TIA患者とaCI患者サンプルの平均値、SD、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0.05以下、又は陽性率が10%以上の値を太字で示した。

40

【0055】

【表 1】

Sample information	HD	TIA	aCI
Total sample number	123	77	158
Male/Female	85/38	49/28	120/38
Age (Average \pm SD)	51.9 \pm 8.7	69.6 \pm 11.7	57.7 \pm 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 (%)	11.7%	6.5%
<i>P</i> value (vs HD)	3.1.E-06	0.086
aCI Average	16,471	3,210
SD	5,914	1,733
Positive No.	15	15
Positive (%)	9.5%	9.5%
<i>P</i> value (vs HD)	2.0.E-04	0.0013

10

20

【0056】

30

表 1 において、カットオフ値を健常者サンプルの平均値 + 2SD に設定した時の DIDO1 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

40

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。

【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 ± SD)		58.3 ± 5.6	58.2 ± 8.5	58.4 ± 9.1
Alpha analysis (antibody level)		DIDO1-Ab	CPSF2-Ab	
HD	Average	11,373	5,571	10
	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	20
	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	30
	SD	2,252	3,798	
	Positive No.	7	17	
	Positive (%)	5.5%	13.3%	
	P (aCI vs HD)	0.508	4.1.E-05	

【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。

【0063】

【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 \pm SD)	44.1 \pm 11.2	66.0 \pm 10.4	76.0 \pm 9.8	62.0 \pm 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 (%)	33.8%	4.8%
	<i>P</i> (vs HD)	8.8.E-14	0.579
Type 2-CKD	Average	1,982	1,020
	SD	1,140	281
	Positive No.	10	2
	Positive rate (%)	31.3%	6.3%
	<i>P</i> (vs HD)	4.5.E-06	0.081
Type 3-CKD	Average	1,536	936
	SD	603	421
	Positive No.	21	10
	Positive rate (%)	17.1%	8.1%
	<i>P</i> (vs HD)	3.7.E-14	0.656

20

30

【0064】

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)。

40

【0065】

[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(表4-1: DIDO1、表4-2: CPSF2)に示した。表4-1と表4-2におい

50

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、「DIDO1 vs TIA」と記載されている場合には、「DIDO1蛋白質に対するTIA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、「DIDO1-pep vs TIA」と記載されている場合には、「DIDO1ペプチドに対するTIA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。

【0066】

【表4-1】

	DIDO1 vs TIA	DIDO1 vs aCI	
AUC	0.6819	0.6476	10
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	0.00028	< 0.0001	

	DIDO1 vs AMI	DIDO1 vs DM	
AUC	0.5163	0.5347	20
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	

	DIDO1 vs Type-1 CKD	DIDO1 vs Type-2 CKD	DIDO1 vs Type-3 CKD	
AUC	0.9046	0.8956	0.8517	30
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	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	

	DIDO1-pep vs TIA	DIDO1-pep vs aCI	
AUC	0.6503	0.6611	40
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	0.0003	< 0.0001	

【0067】

50

【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	0.0002	< 0.0001	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	< 0.0001	20

	CPSF2 vs Type-1 CKD	CPSF2 vs Type-2 CKD	CPSF2 vs Type-3 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	0.022	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だけであった。

【 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 】

具体的には、千葉県立佐原病院において採取された 8 5 1 血清サンプルについて、D I 50

DO1ペプチドとCPSF2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AlphaLISA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(ccCI)、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、DIDO1ペプチド抗原と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)の平均値とSD、そして各群と対照群におけるMann-Whitney 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	0.0024	1.64 E-11	0.0156
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	0.0220	0.0024	< 0.0001	< 0.0001
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-)			0.0153				
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-)			0.0212				
CPSF2-Ab level	Average	7,699	9,065				
	SD	6,095	5,804				
<i>P</i> value (vs HT-)			< 0.0001				

10

20

30

【 0 0 7 5 】

【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-)			0.0148	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-)			0.0292	
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)		1.33E-05	
CPSF2-Ab level	Average	8,214	8,901
	SD	6,086	5,801
<i>P</i> value (vs non-smoker)		0.0019	

10

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	

20

【0077】

表5 - 1、表5 - 2、表5 - 3に示す通りに、DIDO1ペプチド抗原に対する血清抗体レベルは、DIDO1蛋白質抗原に対する血清抗体レベルと同様に、aCIに対して最も高値を示した。また、TIAやcCI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、CPSF2ペプチド抗原に対する抗体レベルは、aCIのみならず、cCIでも高度に有意な差を示した。さらにTIAやasympt-CIでも有意差を示した。このことは、CPSF2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DM、HTには対応していたが、LipidemiaやCVD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。

【0079】

40

(2) Spearmanの相関解析

次に、DIDO1ペプチドとCPSF2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 amino transferase (ALT)、alkaline phosphatase (AL

50

P)、lactate dehydrogenase(LDH)、total bilirubin(tBil)、cholinesterase(CHE)、 γ -glutamyl transpeptidase(γ -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)、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。

【0081】

30

【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	10
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	20
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	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。

【 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

10

20

30

40

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】

より実際の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 : DIDO1 variant 4 遺伝子産物 (NM_033081. 2) のアミノ酸配列

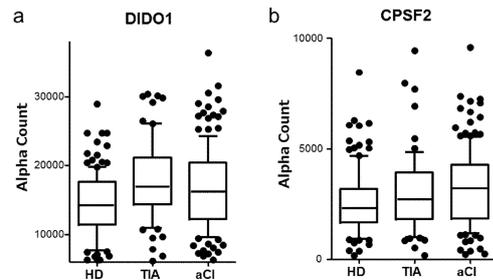
MDDKGDPSNEEAPKAIKPTSEFRKTWGFRRTTIKAKREGAGDAEADPLEPPPPQQQLGLSLRRSGRQPKR
TERVEQFLTIARRRGRSMFVLESDSEPTSCPATDAETASEGVSSEASSTRSGPQSASTAVKERPASSE
KVKGGDDHDDTSDSDGLTLKELQNLRLRKRQEPTERPLKGIQSRLLKRRRREEGPAETVGEASDTEV
GVLPSKQEPENDQGVVSGAGKDDRESKLEGKAAQDKDEEPPDLGRPKPECEGYDPNALYICIRQPHNNR
FMICCDRCEEWFHGDCVGISEARGLLERNQEDYICPNCTILQVQDETHSETADQQAERWPGDADGTDC
TSIGTIEQKSSDQIGKRIEKAANPSGKKLKIQVPIEAPGASKCIGPGCCHVAQPDVSVYSCNDCILK
HAAATMKFLSSGKEQKPKPEKMKMKPEKPSLPCGGAQAGIKISSVHKRPAPEKETTVMKAVVVPARSE
ALGKAAACESSTPSWADHNYNAVKPEKTAAPSLSLYKSTKEDRRSEKAAAMAASKTAPPGSVAGKQ
PAPRNLVPKKSSFANVAATPAIKKPPSGFKGTIPKRFWLSATPSSGASAAQAGAPAAAATAASKKFPF
SAALVAVRKPVPVSPVMPASAPGRGLGMSAAPSQNSQIRNIRRSKELIWKRVNDSDDLIMTENEVQ
KIALHIEKMFNLQVTDNRYKSKYRSIMFNLDKPKNQGLFHRVLRREIISLAKLVRKPEELVSKELSTW
KERPARSVMSRKLHNSKKTAPRQEAIPDLEDSPPVSDSEEQESARAVPEKSTAPLLDVFSSMLKDT
TSQHRALFDLNCIKCTGQVPSAEDEPAKPKQLSASVKKEDLKSCHDSAPDPAPDSADEVMPEAVEV
ASEPGLSEASHPNVDRTYFFPGPDGHPEPSPLEDLSPCASCSSGVVTVTVSGRDPRTAPSSSCTAVA
SAASRDPDTHMVEARQDVPKVLTVSMVVKSLAKPSSSPDPRYLSVPPSPNISSTESRSPPEGDTTLFL
SRLSTIWKGFIMQSVAKFVTKAYPVSGCFDYLSEDLPTIHHGRIAPKTVWDYVYVGLKLSVSKELCLI
RFHPATEEEVAYISLYSYFSSRGRFVVAANNRHVKDLVLIPLSAQDVPVSKLLPFEGPGLSEPRPNI
LGLVICQKIKRPANSGELDKMDEKTRTLQPEEADVPAKVPATVPQSEKPKSKYPLCSADAAVSTPPGS
PPPPPEPPEPVLKVLKLSLPAAPSPATAATTAATAAASSTASSASTASPLEHILQTLFGKKSFD
SAREPPGSTAGLQPEKTTAEDGVFAPPLLDPIVQFGQSKDKALEEEDDRPYDPEEYDPERAFDTQ
LVERGRHEVERAPEAAAAAREEVAYDPEDETILLEAKVTVDLNNRMCADVRRNSVERPAEPVAGAATP
SLVEQQMLEELNKQIEEQKRLQEEQEBALRQRAAVGVSMHFSVSDALMSPPKSSLPKAEIQQEQEQ
SADKPASLPPASQASNRDPRQARRLATETGEGEGEPLSRLSARGAQALPERDASRGLVQAPMPVPE
EKEPASSPWASGEKPPAGSEQDQWKAEPGEGTRPATVGDSSARPARVLLPTPPCGALQPGPFLQHDGER
DPTTCPGFASQDKALGSAQYEDPRNLHNSAGRSSPAGETEGDREPQARPGEGTAPLPPGQVGGSPFP
GQREPGPHALGMSGLHGPNFPGRGPAPPPPEENIASNDGPRGPPPARFGAQKGIPLSFGQHGPPPY
GDSRGPSPSYLGGPRGVAPSQFEERKDPHGEKREFQDAPYNEVTGAPAQFEGTEQAPLGSRRGAPPFQF
GQRRLLSQLKGRGPPPPSPQFGQGRGPPPGHVFVGRGPHSPQFETARGPHPNQFEGPRQAPNFMFGPR
GIQPPQFEDQRVHSPRPTNQAPAPLQFGGLRGSAPFSEKNEQTPSRHFQGGAPQVMKPGRPLLELP
SHPQHRKDRWEAGPPSALSAPQGEADQWASADFREGKGHEYRNQTFEGRQRERFDVGPKEKPL
EPPDAQGRASEDRRRERERGRNWSRERDWRPREWDRHRDKDSRDWDRNRERSANRDRERADRGKEWD
RSRERSRNERERDRRRDRDRSRERDRDKARDRERGRDRKRSKESARDPKPEASRASDAGTASQA
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 】

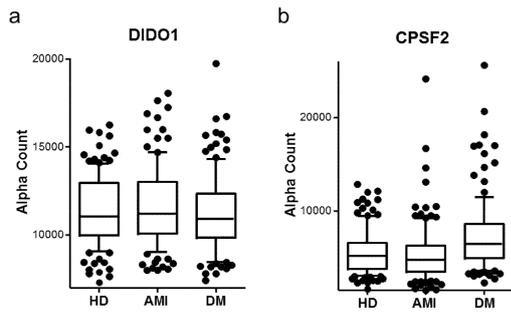
配列番号6 : CPSF2 蛋白質のアミノ酸配列

MTSIIKLTTLISGVQEEESALCYLLQVDFEFLDCGWDEHFSMDIIDSLRKHVHQIDAVLLSHPDPLHLGA
LPYAVGKLGLNCAIYATIPVYKMGQMFMYDLYQSRHNTDFTLFLDDVDAAFDKIQQLKFSQIVNLKKG
GHGLSITPLPAGHMIGGTIWKIVKDGEEIIVYAVDFNKHREIHLNGCSLEMLSRPSSLITDSFNATYVQP
RRKQRDEQLLNVLETLRDGNVLIADVDTAGRVLELAQLLQIWRTKDAGLGVSYLALLNNVSYNVVFS
KSQVEMMSDKLMRCFEDKRNPFQFRHLSLCHGLSDLARVSPKVVLASQPDLECGFSRDLFIQWQDQPK
NSIILTYRTTPTGLARFLIDNPSEKIIEILRKRKVLGKLEEYLEKEKLEKAAKLEQSEADIDSS
DESDIEEDIDQPSAHTKHDLMMKGEGRKGSFFKQAKKSYPMFPAPERIKWDEYGEIIPKEDFLVPEL
QATEEEKSLSEGLTNGDEPMDQDLSVPTKISTTESIEIKARVYIDYEGRSDDGSIKKIINQMPPRO
LIIVHGPEASQDLAECRAFGGKDIKVMYMKLHETVDATSETHIYQVRLKDSLVSLSLQFCAKAKDAELAW
IDGVLDMRVSKVDTGVILEBEGEKDDGDESEMQVEAPSDSVIAQQKAMKSLFGDDEKETGESEIIPTL
EPLPPEHVPGHQVSMNEPRLSDFKQVLLREGIQAEFVGGVGLVNNQVAVRRTETGRIGLEGCLCQDFYR
IRDLLYEQYAIIV
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。

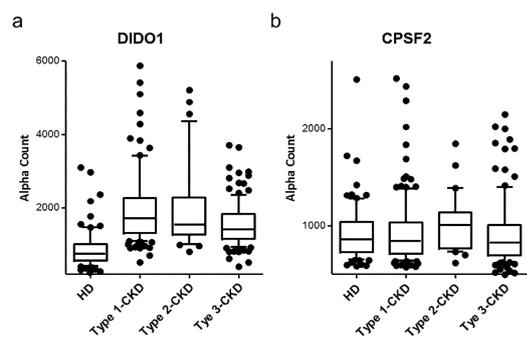
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【配列表】

0006942036000001.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 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

審査官 赤坂 祐樹

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2009/0047689 (US, A1)
特開2011-045334 (JP, A)
特開2017-143745 (JP, A)
特表2012-511895 (JP, A)
特開2011-211989 (JP, A)
CHA, J ET AL., Electro-hyperthermia inhibits glioma tumorigenicity through the induction of E2F1-mediated apoptosis, INT J HYPERTHERMIA., 2015年09月14日, vol. 31, no. 7, pages 784 - 792

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - 33/98
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)