

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5360922号
(P5360922)

(45) 発行日 平成25年12月4日(2013.12.4)

(24) 登録日 平成25年9月13日(2013.9.13)

(51) Int.Cl. F I
G O I N 33/68 (2006.01) G O I N 33/68

請求項の数 1 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2011-170237 (P2011-170237)	(73) 特許権者	304020177
(22) 出願日	平成23年8月3日(2011.8.3)		国立大学法人山口大学
(62) 分割の表示	特願2007-167761 (P2007-167761) の分割		山口県山口市吉田1677-1
原出願日	平成19年6月26日(2007.6.26)	(74) 代理人	100107984 弁理士 廣田 雅紀
(65) 公開番号	特開2011-242402 (P2011-242402A)	(74) 代理人	100102255 弁理士 小澤 誠次
(43) 公開日	平成23年12月1日(2011.12.1)	(74) 代理人	100096482 弁理士 東海 裕作
審査請求日	平成23年8月18日(2011.8.18)	(74) 代理人	100123168 弁理士 大▲高▼ とし子
		(74) 代理人	100120086 弁理士 ▲高▼津 一也
		(74) 代理人	100131093 弁理士 堀内 真

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規虚血マーカー及びこれを用いた虚血状態の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

哺乳動物から採取した試料中に含まれるテネイシンC (Tn C) のタンパク質量を測定することを特徴とする、哺乳動物組織における虚血状態の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、哺乳動物組織における虚血状態を効果的に検出可能なマーカーに関し、より詳しくは、虚血 - 再灌流時に特異的に放出され、特異的なマーカーとして利用可能なタンパク質及びこれを用いた虚血状態の検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

虚血 - 再灌流 (Ischemic hypoxia and reoxygenation; I H / R) は、例えば心筋梗塞や心臓バイパス手術、心臓移植などで発生する心臓の主要な疾患状態である。心臓冠動脈の虚血 - 再灌流が発生した場合、心臓は肥大したり、虚血周囲で細胞死が観察されたり、また、心筋の繊維化が見られる。これらの現象はリモデリングと呼ばれており、これは虚血にさらされた心筋細胞ばかりでなく虚血周囲の組織においてもよく観察されている。幾つかのケースでは、虚血にさらされた心筋細胞に対する隣接する血管からの血管新生が観察されている。これらのことは、虚血 - 再灌流時に何らかのシグナルを伝達するための様々な因子が放出されていることを示唆している (非特許文献 1, 2)。

【 0 0 0 3 】

実際、心臓は全身に血液を送るポンプの役割ばかりでなく、ホルモン性因子を放出する内分泌系の組織として働いていることもよく知られている。一酸化窒素やプロスタグランジン、アデノシンといった低分子物質が心臓から放出され、心臓血管系の制御に参与している。これらの低分子に加え、骨形成因子 (Bone morphogenetic protein; BMP) の刺激により心筋細胞から放出されるトランスフォーミング成長因子 - (Transforming growth factor-) が線維芽細胞から心筋繊維細胞への転換を促している。一方、心臓虚血時には、炎症性サイトカインもまた心臓から放出されている (非特許文献 6 - 8)。腫瘍壊死因子は虚血心筋において産生され、リアナジン受容体阻害を介して心臓の収縮抑制に参与している。炎症性サイトカインであるインターロイキン 1 (IL - 1) やインターロイキン 6 (IL - 6) も虚血後の心臓から放出されている。IL - 1 は心筋の直接的な阻害に加え、カルシウムを制御する遺伝子のダウンレギュレーションを介して心臓の収縮を抑制している。IL - 6 は、L 型タイプのカルシウムチャネルを阻害することによってカルシウムの細胞内流入や心臓収縮の抑制に働いている。線維芽細胞成長因子 (Fibroblast growth factor; FGF) やヘパリン結合性成長因子 (Heparin-binding growth factor; HBGF) は心筋虚血時に放出され防護因子として働くことも報告されている (非特許文献 9 - 15)。この様に虚血 - 再灌流時には様々なシグナル伝達機構が機能を果たしていることが明らかになってきており、これらのペプチド性因子を心臓虚血を捕捉するためのマーカーとして利用する動きも広がってきている。

10

【 0 0 0 4 】

ペプチド性の虚血マーカー、特に心臓虚血のマーカーとしては、これまでに PEP - 19, IgA 結合性アルカリ性ホスファターゼ、心房性 / 脳性ナトリウム利尿ペプチド、虚血変成アルブミン、酸素調節タンパク質、トロポニン、カルシトニン、ウロテンシン、ミオグロビン、ミオシン、アネキシン、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)、リボタンパク質やクレアチンキナーゼ、エノラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼなどの酵素などが開示されている (特許文献 1 - 18)。しかしながら、従来虚血マーカーは、虚血状態にありながらも簡便な検出可能な程度には十分に放出されないものや、逆に虚血状態とは無関係な要因により放出されるケースなどがあり、更に従来マーカーでは検出が困難な虚血の症例も見出されている。一方で、虚血が複数の複雑な反応の集積であることが明らかにされ、単独のマーカーだけではなく複数のマーカーを組み合わせることによって虚血状態の判定がなされてきたというこれまでの経緯からも、虚血 - 再灌流イベントと生理的・機能的に結びついた、特異性や再現性の高い新規な虚血マーカーの開発が待たれていた。

20

30

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 5 】

【 特許文献 1 】 特開 2007 - 056008 m - カルパインおよび / または μ - カルパインによる PEP - 19 の分解を阻害することを特徴とする虚血性脳疾患の治療方法

【 特許文献 2 】 特開 2006 - 132946 IgA 結合性アルカリ性ホスファターゼ 6 の測定方法およびそれに用いるキット

40

【 特許文献 3 】 特開 2004 - 037455 マーカーの組み合わせを用いた心臓疾患症例の予後判定

【 特許文献 4 】 特開 2003 - 270250 血液中の心不全マーカー定量方法

【 特許文献 5 】 特表 2007 - 505726 心臓由来が疑われる胸部痛を有する患者のリスク階層化のための装置および方法

【 特許文献 6 】 特表 2007 - 510146 マーカーの組合せによる急性心筋虚血性疾患の診断

【 特許文献 7 】 特表 2006 - 507510 組織低酸素症の体液マーカー

【 特許文献 8 】 特表 2006 - 526140 鑑別診断のためのマーカーおよびその使用方法

50

【特許文献 9】特表 2005-522669 卒中および脳損傷の診断マーカーおよびその使用方法

【特許文献 10】特表 2004-520598 急性冠状動脈症候群の診断マーカーおよびその使用方法

【特許文献 11】特表 2004-529351 急性心筋梗塞および他の臨床的状態の診断への改良

【特許文献 12】特表 2003-532685 アテローム性動脈硬化症の治療および / または予防のための IL-18 阻害剤の用途

【特許文献 13】特表 2002-538463 脳卒中を診断しそして区別するための方法

10

【特許文献 14】特表平 10-504097 臓器拒絶反応のマーカー

【特許文献 15】特表平 10-511185 胸痛の発症初期に診断し鑑別するための方法ならびに装置

【特許文献 16】再公表 04-065961 酸化度の定量法

【特許文献 17】特許第 3860605 号 補体活性化をブロックするキメラタンパク質

【特許文献 18】特許第 3666866 号 神経保護治療をモニターする方法

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】Sutton M.G. & Sharpe N. 2000. *Circulation* 101:2981-2988.

【非特許文献 2】Eefting F. et al. 2004. *Cardiovasc.Res.* 61:414-426.

20

【非特許文献 3】Sabbah H.N. 2000. *Cardiovasc.Res.* 45:704-712.

【非特許文献 4】Kang P.M. & Izumo S. 2000. *Circ.Res.* 86:1107-1113.

【非特許文献 5】Lijnen P.Petrov V. 2000. *J.Mol.Cell Cardiol.* 32:865-879.

【非特許文献 6】Fragogiannis N.G. et al. 2002. *Cardiovasc.Res.* 53:31-47.

【非特許文献 7】Thaik C.M. et al. 1995. *J.Clin.Invest.* 96:1093-1099.

【非特許文献 8】Neumann F.J. et al. 1995. *Circulation* 92:748-755.

【非特許文献 9】Li Y. et al. 2003. *Circulation* 107:2499-2506.

【非特許文献 10】Jayasankar V. et al. 2003. *Circulation* 108 Suppl. 1:11230-236.

【非特許文献 11】Jiang Z.S. et al. 2002. *Am.J.Physiol.Heart.Circ.Physiol.* 282:H1071-1080.

30

【非特許文献 12】House S.L. et al. 2003. *Circulation* 108:3140-3148.

【非特許文献 13】Tanaka N. et al. 2002. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 297:375-381

【非特許文献 14】Detillieux K.A. et al. 2003. *Cardiovasc.Res.* 57:8-19.

【非特許文献 15】Zisch et al. 2003. *Cardiovasc.Pathol.* 12:295-310.

【非特許文献 16】Mizukami Y. et al. 2000. *J.Biol.Chem.* 275:19921-19927.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

上記の現状に鑑み、本発明は、虚血 - 再灌流時に虚血組織から特異的に放出され、虚血状態を感度良く識別可能なマーカータンパク質及びこれを用いた虚血状態の検出方法を提供することを目的とする。

40

【課題を解決するための手段】

【0008】

前記課題の解決のため、特に、これまでに知られていない新規な虚血マーカーを見出すために、本発明者は、細胞・組織がある状態に置かれたときに特異的に発現するタンパク質を網羅的に解析するというプロテオーム解析の手法に着目した。すなわち培養心筋細胞の系を用いてここに虚血 - 再灌流刺激を与え、培養液中に放出されるタンパク質を網羅的に解析した。具体的には、虚血刺激なしで培養液中に放出されるタンパク質と虚血刺激により放出されるタンパク質のプロファイルを比較し (Subtractive Proteomics)、虚血 -

50

再灌流刺激によって特異的に放出されるタンパク質を同定して、刺激時に発現が亢進（Up-regulated）及び減少（Down-regulated）するマーカー候補となるタンパク質群を明らかにし、このうち発現が大幅に亢進するタンパク質数種については人工心肺による心臓手術を受ける患者さん（一時的に心臓本体は虚血状態になる）の血液中における発現の検証を行って、これらのマーカー候補が確かに虚血 - 再灌流時に特異的に発現亢進していることを確認し、本発明を完成させた。

【0009】

本発明は、哺乳動物細胞における虚血状態を検出する方法であって、前記哺乳動物細胞から採取した試料中に含まれる下記の虚血マーカー、

Arpc3, Pfn2, Sgce, Actr3, H3f3b, Hist1h2bm, Hist1h2bp, Hist1h3a, Hist2h2aa1, Postn, Fbln5, Col18a1, Lamb1-1, Lamc1, Pros1, Col6a2, Ctnnb1, Dcbl2, Itga3, Copb2, Copa, Cops3, Itm2b, Aifm1, Trap1, Anxa4, Anxa6, Pla2g7, Aspn, Lox, Crk, Fbln1, Gpr52, Ppp2ca, Ppp2r2b, Lphn3, Ptprf, Rbbp9, Prrc1, Creg1, Npm1, Rps4x, Plrg1, Rnase4, Ugp2, Yars, Galnt10, Nudt21, Ube2l3, Ufd1l, Serpine1, Uba52, Ube2v2, Psm2, Psmb1, Psmb4, Psmb6, Psmb7, Try10, Cct4, Fkbp4, Bmp1, Hexb, Glb1, Aldh3a1, Man2b2, Ngly1, Fuca1, Oxct1, Nit2, Loxl1, Man1c1, Crabp2, Ctbs, Gsta4, Gstm2, Hdhd2, Sgsh, Hyi, Vasn, Tfrc, Lcn2, Ap1m1, Clqt6, Vps26b, Sec24d, Slc44a2, Cd14, Anpep (CD13), Fkbp9, Alcam, C3, Tnc, Nudc, Sema4b, Agrin, Plxnb2, 1110007L15Rik, 2700085E05Rik, 3110003A17Rik, 4931406C07Rik, 6530401N04Rik, EG54509

のうち少なくとも1つより選択されるタンパク質の発現レベルを測定することを特徴とする、虚血状態の検出方法を提供する。

【0010】

なかでも、本発明の態様は、哺乳動物組織における虚血状態を検出する方法であって、前記哺乳動物から採取した試料中に含まれるテネイシンC（Tnc）タンパク質の発現レベルを測定することを特徴とする、虚血状態の検出方法を提供する。

【0011】

本発明は、試料がヒト血清である、前記態様に記載の虚血状態検出方法を提供する。

【0012】

本発明は、マーカータンパク質の発現レベルの測定が、抗原抗体反応を用いた測定である、前記態様のうちいずれか1つに記載の虚血状態検出方法を提供する。

【0013】

本発明は、マーカータンパク質の発現レベルの測定が、予め測定された非虚血状態の試料中に含まれる前記マーカータンパク質の発現レベルとの比較工程を含む、前記態様に記載の虚血状態検出方法を提供する。

【0014】

本発明は、虚血が心臓虚血である、前記態様のうちいずれか1つに記載の虚血状態検出方法を提供する。

【発明の効果】

【0015】

本発明の提供する虚血マーカー並びに同虚血マーカーを利用した虚血状態の検出方法を利用することにより、組織の虚血状態、特に心臓組織の虚血 - 再灌流状態を迅速かつ効果的に検出することが可能となる。また本発明に係るマーカーはその発現亢進または減少を

10

20

30

40

50

指標とした虚血治療のための創薬のターゲットとしても利用可能であり、更にこれらマーカー自体も機能的に虚血からの回復に関連したものは虚血治療薬となりうるなど、今後新たなマーカーや治療薬を開発するための優れた基礎を提供するものである。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】培養心筋細胞において、虚血 - 再灌流刺激によって特異的に発現するタンパク質群を、その機能により分類・模式化して示す。

【図2】本発明における、虚血 - 再灌流刺激特異的に発現するタンパク質群の網羅的な解析手法を模式化して示す。

【図3】虚血 - 再灌流刺激を与えた培養心筋細胞における、A I F、B M P - 1（発現亢進）、H S P 9 0（発現変化無し）、及び - エノラーゼ（発現減少）の刺激前後における発現量の経時変化を比較して示す。

【図4】人工心肺を用いた開胸手術時における血液中の各マーカータンパク質の発現量の経時変化を、手術前（B S）、手術中（D S）及び手術後（0, 3, 24, 48, 72時間後）のそれぞれの時点で比較して示す。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明は、虚血後の再灌流時に、特異的かつ再現性よく放出される酵素等のタンパク質をマーカーとして、これを検出することを提案するものである。これらのマーカー物質は、例えば、ヒトを含む哺乳動物の心筋梗塞、脳梗塞、心臓手術、外傷時の止血等の後の再灌流時に、これらの虚血状態におかれた細胞またはその周辺細胞から放出されるものであると考えられる。そこで、本発明の態様は、哺乳動物細胞における虚血状態を検出する方法であって、前記哺乳動物細胞から採取した試料中に含まれる下記の虚血マーカー（略称で示す；括弧内が正式名）、

A r p c 3 (actin related protein 2/3 complex, subunit 3), P f n 2 (profilin 2), S g c e (sarcoglycan, epsilon), A c t r 3 (ARP3 actin-related protein 3 homolog), H 3 f 3 b (H3 histone, family 3B), H i s t 1 h 2 b m (histone cluster 1, H 2 b m), H i s t 1 h 2 b p (histone cluster 1, H 2 b p), H i s t 1 h 3 a (histone cluster 1, H 3 a), H i s t 2 h 2 a a 1 (histone cluster 2, H 2 a a 1), P o s t n (periostin, osteoblast specific factor), F b l n 5 (fibulin 5), C o l 1 8 a 1 (procollagen, type XVIII, alpha 1), L a m b 1 - 1 (laminin B1 subunit 1), L a m c 1 (laminin, gamma 1), P r o s 1 (protein S alpha), C o l 6 a 2 (procollagen, type VI, alpha 2), C t n n b 1 (catenin [cadherin associated protein], beta 1), D c b 1 d 2 (discoidin, CUB and LCCL domain containing 2), I t g a 3 (integrin alpha 3), C o p b 2 (coatamer protein complex, subunit beta 2 [beta prime]), C o p a (coatamer protein complex subunit alpha), C o p s 3 (C O P 9 [constitutive photomorphogenic] homolog, subunit 3), I t m 2 b (integral membrane protein 2B), A i f m 1 (apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 1), T r a p 1 (TNF receptor-associated protein 1), A n x a 4 (annexin A4), A n x a 6 (annexin A6), P l a 2 g 7 (phospholipase A2, group VII [platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma]), A s p n (asporin), L o x (lysyl oxidase), C r k (v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog [avian]), F b l n 1 (fibulin 1), G p r 5 2 (G protein-coupled receptor 52), P p p 2 c a (protein phosphatase 2 [formerly 2A], catalytic subunit, alpha isoform), P p p 2 r 2 b (protein phosphatase 2 [formerly 2A], regulatory subunit B [PR52], beta isoform), L p h n 3 (latrophilin 3), P t p r f (protein tyrosine phosphatase, receptor type, F), R b b p 9 (retinoblastoma binding protein 9), P r r c 1 (proline-rich coiled-coil 1), C r e g 1 (cellular repressor of E1A stimulated genes 1), N p m 1 (nucleophosmin 1), R p s 4 x (ribosomal protein S4, X-linked), P l r g 1 (pleiotropic regulator 1, PRL1 homolog [

10

20

30

40

50

Arabidopsis]) , R n a s e 4 (ribonuclease,RNase A family 4) , U g p 2 (UDP-glucose pyrophosphorylase 2) , Y a r s (tyrosyl-tRNA synthetase) , G a l n t 1 0 (UDP-N-acetyl-alpha-Dgalactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase 10) , N u d t 2 1 (nudix [nucleoside diphosphate linked moiety X] -type motif 21) , U b e 2 l 3 (ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3) , U f d 1 l (ubiquitin fusion degradation 1 like) , S e r p i n e 1 (serine [or cysteine] peptidase inhibitor,clade E,member 1 [plasminogen activator inhibitor-1]) , U b a 5 2 (ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1) , U b e 2 v 2 (ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2) , P s m a 2 (proteasome [prosome,macropain] subunit,alpha type 2) , P s m b 1 (proteasome [prosome,macropain] Subunit , beta type 1) , P s m b 4 (proteasome [prosome,macropain] Subunit , beta type 4) , P s m b 6 (proteasome [prosome,macropain] Subunit,beta type 6) , P s m b 7 (proteasome [prosome,macropain] Subunit,beta type 7) , T r y 1 0 (trypsin 10) , C c t 4 (chaperonin subunit 4 [delta]) , F k b p 4 (FK506 binding protein 4) , B m p 1 (bone morphogenetic protein 1) , H e x b (hexosaminidase B) , G l b 1 (Galactosidase,beta 1) , A l d h 3 a 1 (aldehyde dehydrogenase family 3,subfamily A1) , M a n 2 b 2 (mannosidase 2,alpha B2) , N g l y 1 (N-glycanase 1) , F u c a 1 (fucosidase,alpha-L-1,tissue) , O x c t 1 (3-oxoacid CoA transferase 1) , N i t 2 (nitrilase family,member 2) , L o x l 1 (lysyl oxidase-like 1) , M a n 1 c 1 (mannosidase,alpha,class 1C,member 1) , C r a b p 2 (cellular retinoic acid binding protein II) , C t b s (chitinase,di-N-acetyl-) , G s t a 4 (glutathione S-transferase,alpha 4) , G s t m 2 (glutathione S-transferase,mu 2) , H d h d 2 (haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 2) , S g s h (N-sulfoglucosamine sulfohydrolase [sulfamidase]) , H y i (hydroxypyruvate isomerase homolog [E.coli]) , V a s n (vasorin) , T f r c (transferrin receptor) , L c n 2 (lipocalin 2) , A p 1 m 1 (adaptor-related protein complex AP-1,mu subunit 1) , C 1 q t n f 6 (C1q and tumor necrosis factor related protein 6) , V p s 2 6 b (vacuolar protein sorting 26 homolog B [yeast]) , S e c 2 4 d (SEC24 related gene family,member D [S.cerevisiae]) , S l c 4 4 a 2 (solute carrier family 44,member 2) , C d 1 4 (CD14 antigen) , A n p e p (alanyl [membrane] aminopeptidase ; C D 1 3) , F k b p 9 (FK506 binding protein 9) , A l c a m (activated leukocyte cell adhesion molecule) , C 3 (complement component 3) , T n C (tenascin C) , N u d c (nuclear distribution gene C homolog [Aspergillus]) , S e m a 4 b (sema domain,immunoglobulin domain [I g] ,transmembrane domain [T M] and short cytoplasmic domain , [semaphorin] 4B) , A g r i n , P l x n b 2 (plexin B2) , 1 1 1 0 0 0 7 L 1 5 R i k (RIKEN cDNA 1110007L15 gene) , 2 7 0 0 0 8 5 E 0 5 R i k (RIKEN cDNA 2700085E05 gene) , 3 1 1 0 0 0 3 A 1 7 R i k (RIKEN cDNA 3110003A17 gene) , 4 9 3 1 4 0 6 C 0 7 R i k (RIKEN cDNA 4931406C07 gene) , 6 5 3 0 4 0 1 N 0 4 R i k (RIKEN cDNA 6530401N04 gene) , E G 5 4 5 0 9 (predicted gene , EG545091)

のうち少なくとも1つより選択されるタンパク質の発現レベル、好ましくはアポトーシス誘導因子 (A I F) の、骨形成タンパク質 - 1 (B M P - 1)、C D 1 3、C D 1 4、テネascin C (T n C)、アグリンのうち少なくとも1つ、中でもT n C からなる虚血マーカータンパク質のタンパク質量を測定することを特徴とする、虚血状態の検出方法を提供する。組織が虚血 - 再灌流刺激を受けた際、それに対する応答としてこれまでに知られていなかった種々のタンパク質が細胞外・組織外に放出されることが、本発明者による培養心筋細胞での虚血 / 非虚血時発現タンパク質の網羅的解析から明らかとなった (図 1)。これらのタンパク質を既存のデータベースと比較したところ、これまでに虚血マーカーとして報告のあるタンパク質とは異なり、アポトーシス、炎症反応、血管新生、細胞増殖、細胞接着や神経細胞再生などに関連する様々な機能を持ったタンパク質が特異的に発現し

10

20

30

40

50

ていることが明らかとなった。虚血と結びついたそれぞれの反応において特異的に組織外に放出されるこれらのタンパク質の発現レベル、好ましくはこれらのタンパク質の試料中に含まれる量を測定することにより、虚血マーカーとして利用可能である。上記のマーカーは、これまでに機能が明らかにされてきたものの虚血との関連については明らかではないが、虚血後の再灌流時に放出されるものである。哺乳動物組織から採集される試料の種類、その採集方法、マーカータンパク質の検出方法などは当該分野で利用されるもののうちから適宜選択すればよいが、一般に再灌流後の血液を試料として採取するのが好ましい。また検出方法は何ら本発明を限定するものではないが、例えばヒト血液試料を採取し、血清中に含まれるタンパク質に対して上記マーカーに対する特異的抗体を用いたイムノアッセイ（簡便には蛍光イムノアッセイなど）やウェスタンブロッティングを行い、マーカータンパク質の存在を検出するといった方法があげられる。

10

【0018】

上記マーカーのうち、従来アポトーシス誘導に係るタンパク質として知られていたAIFは、新規な虚血マーカーとして特に適している。ここでいうAIF（またはProgrammed cell death 8）には、AIFそのものの他、そのプリカーサーまたはアイソフォームといった、AIFとアミノ酸配列の相同性が高いタンパク質、好ましくは80%以上の相同性を持つタンパク質や、また80%以下の相同性であってもアポトーシス誘導という機能的な相同性を持ちかつ50%程度の相同性を持つ哺乳動物のタンパク質群、更に好ましくはヒトでその存在が確認されているタンパク質群を含んでも良い。

【0019】

上記マーカーのうち、従来骨細胞増殖に係るタンパク質として知られていたBMP-1は、新規な虚血マーカーとして特に適している。ここでいうBMP-1（またはProcollagen C proteinase）には、そのプリカーサーまたはアイソフォーム、BMP、BMP1-5、BMP1-6、Tollloid-likeタンパク質、そのプリカーサーまたはアイソフォーム、Tollloid-like1、Tollloid-like2などといった、BMP-1とアミノ酸配列の相同性が高いタンパク質、好ましくは80%以上の相同性を持つタンパク質や、また80%以下の相同性であっても骨細胞増殖という機能的な相同性を持ちかつ50%程度の相同性を持つ哺乳動物のタンパク質群、更に好ましくはヒトでその存在が確認されているタンパク質群を含んでも良い。従来技術欄でも述べた通り、BMP-1は心筋細胞に対するホルモン様作用が知られていたが、虚血時に虚血組織から放出されるという現象はまったく知られておらず、虚血マーカーとしてのBMP-1は新規なマーカーである。

20

30

【0020】

上記マーカーのうち、血管新生に係るタンパク質として知られていたCD13は、新規な虚血マーカーとして特に適している。ここでいうCD13（またはAmino peptidase N）には、そのプリカーサーまたはアイソフォーム、Amino peptidase A、Laeverin、TRH-DE（Thyrotropin-releasing hormone degrading enzyme）などといった、CD13とアミノ酸配列の相同性が高いタンパク質、好ましくは80%以上の相同性を持つタンパク質や、また80%以下の相同性であっても血管新生という機能的な相同性を持ちかつ50%程度の相同性を持つ哺乳動物のタンパク質群、更に好ましくはヒトでその存在が確認されているタンパク質群を含んでも良い。

40

【0021】

上記マーカーのうち、炎症反応に係るタンパク質として知られていたCD14は、新規な虚血マーカーとして特に適している。ここでいうCD14には、そのプリカーサーまたはアイソフォームなどといった、CD14とアミノ酸配列の相同性が高いタンパク質、好ましくは80%以上の相同性を持つタンパク質や、また80%以下の相同性であっても炎症反応という機能的な相同性を持ちかつ50%程度の相同性を持つ哺乳動物のタンパク質群、更に好ましくはヒトでその存在が確認されているタンパク質群を含んでも良い。

【0022】

上記マーカーのうち、細胞増殖に係るタンパク質として知られていたテネイシンCは、

50

新規な虚血マーカーとして特に適している。ここでいうテネインCには、テネイン、そのプリカーサー、サイトタクチン(Cytotactin)及びそのプリカーサー、テネインX B、テネインX及びそのプリカーサー、テネインR、テネインNなど、テネインCとアミノ酸配列の相同性が高いタンパク質、好ましくは80%以上の相同性を持つタンパク質や、また80%以下の相同性であっても細胞増殖という機能的な相同性を持ちかつ50%程度の相同性を持つ哺乳動物のタンパク質群、更に好ましくはヒトでその存在が確認されているタンパク質群を含んでも良い。

【0023】

上記マーカーのうち、神経細胞再生に係るタンパク質として知られていたアグリンは、新規な虚血マーカーとして特に適している。ここでいうアグリンとは、アグリンのプリカーサーまたはアイソフォーム、Perlecan(Heparan sulfate proteoglycan)1、2、またはそのアイソフォームなど、アグリンとアミノ酸配列の相同性が高いタンパク質、好ましくは80%以上の相同性を持つタンパク質や、また80%以下の相同性であっても細胞増殖という機能的な相同性を持ちかつ50%程度の相同性を持つ哺乳動物のタンパク質群、更に好ましくはヒトでその存在が確認されているタンパク質群を含んでも良い。

10

【0024】

本発明の虚血状態検出方法を適用する試料としては、虚血が疑われる組織から放出されるマーカーを含む体液であればどのようなものでも良く、その種類が本発明を限定するものではないが、採集の容易さや既存のマーカーとの比較に供することの容易性の観点、及び疾患の早期発見のため臨床現場で用いられることが想定されることから、ヒト血液、特に血球成分を予め除いたヒト血清が好ましい。試料の採集方法や保存方法などについては、タンパク質である上記マーカーが分解されない条件を満たせば、臨床の現場等で用いられている手法を適宜応用すれば良く、これらが本発明を限定するものではない。

20

【0025】

本発明におけるマーカータンパク質の発現レベルの測定手法に関しては、タンパク質の定性/定量的測定方法として用いられている手法を適宜応用すれば良く、本発明を限定するものではないが、プロトコルが確立され、また検出感度にすぐれた抗原抗体反応、すなわち前記マーカータンパク質に対する特異的抗体を用いた検出方法が好適である。前記の特異的抗体を1次抗体として例えばメンブレン転写やフローインジェクション法を用いて試料中のタンパク質に反応させ、これの検出系としては1次抗体を直接標識する方法の他、2次抗体や抗体と反応する試薬を用いた発光、発色による検出などを適宜利用すればよい。

30

【0026】

本発明におけるマーカータンパク質の発現レベルを解析するに際し、より正確な虚血状態の検出のためには非虚血状態の試料、好適には非虚血状態のヒト血清中に含まれる前記マーカータンパク質の発現レベルを予め測定しておき、これと虚血が疑われる状態の試料中での同マーカータンパク質の発現レベルとを比較することが有効である。この際には、例えば多人数より採取した試料中における非虚血状態のヒトマーカー発現量を測定しこの平均値を標準としておき、これに対して虚血が疑われる試料中のマーカータンパク量を比較等すれば良い。比較工程においては、例えばマーカーの発現量を示す発色・発光を目視にて定性的に比較する他、画像処理技術などを用いて定量的・半定量的に両者の発現量を比較する方法など、分子生物学分野で採用されている比較手法を適宜用いれば良く、比較方法そのものが本発明を限定するものではない。

40

【0027】

本発明の虚血マーカー及びこれを用いた虚血状態の検出方法は、哺乳動物組織における虚血状態を検出する方法として広く利用可能であると考えられるが、臨床的な必要性の高い心臓虚血が主たる対象疾患である。以下に本発明の実施例を示すが、本発明は実施例のみ限定されるものではない。

【実施例】

【0028】

50

(心筋細胞の培養) 本実施例に係る心筋細胞の培養、及び虚血 - 再灌流刺激の与え方については、非特許文献 16 に記載の方法に従った。具体的には、ラット胎児心臓由来の培養細胞株である H9c2 細胞を 100 - mm 培養プレートに 5×10^4 細胞の密度で蒔き、10%ウシ胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) で 72 時間培養した。その後細胞を無血清 DMEM 培地に移し、60 - 72 時間培養した。虚血刺激を与えるために、細胞を Slightly hypotonic Hank's balanced saline solution (1.3 mM CaCl_2 , 5 mM KCl , $0.3 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, 0.5 mM MgCl_2 , 0.4 mM MgSO_4 , 6.9 mM NaCl , 4 mM NaHCO_3 , $0.3 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, glucose or serum free) 中で 2 時間、37 にてインキュベートした。インキュベーター中の酸素を窒素で置き換えることで虚血状態とし、このときの酸素濃度は 1% であった。虚血刺激後、細胞を無血清 DMEM 培地に移し、酸素濃度 20%、二酸化炭素濃度 5% の通常の培養条件に戻して、37 にてインキュベートし再灌流状態とした。

10

【0029】

(IH/R 刺激により分泌されるタンパク質の精製) 2 時間の虚血刺激を与えた H9c2 細胞を 24 時間再灌流し、細胞培養液の上清 1 L (リットル) を試料としてプロテオーム解析用に供した。試料を 5 ml HiTrap 陰イオン交換カラム (GE HealthCare, USA) につけ、カラムにトラップされたタンパク質を 500 mM NaCl で 1 ml / 分の流速にて溶出させた。溶出した分画を、遠心フィルターカラム (MILLIPORE, USA) を通して脱塩及び濃縮した。

20

【0030】

(トリプシンによるタンパク質のゲル中分解) 濃縮した試料を SDS-PAGE につけ、泳動後のゲルを CBB で染色した。IH/R 試料と対照試料を泳動したレーンをそれぞれゲルから切り出し、各レーンを均等にスライスして 24 個の断片とした。更にこの断片を細かく刻み、25 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ を含む 30% アセトニトリルで脱染色した。脱染色したゲル断片を 100% アセトニトリルで脱水し、その後室温にて 30 分間乾燥させた。ゲル中に含まれるタンパク質を、10 mM ジチオトレイトール / 25 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ を用い 56 で 1 時間還元処理し、その後 55 mM ヨードアセトアミド / 25 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ を用い室温・暗黒条件下でアルキル化した。処理後のゲルを 50% アセトニトリル / 25 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 25 mM で 30 分間 \times 2 回、100% アセトニトリルで 5 分間 \times 1 回の計 3 回、脱水した。脱水したゲルを室温にて 30 分間乾燥させ、トリプシン溶液 (PROMEGA, 10 ng/ml in 25 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) で 30 分間、氷上にて再膨潤させた。ゲル外の溶液を取り除き、ゲル中に含まれるタンパク質を 37 に一晩おいて分解した。分解産物であるペプチドを 50% アセトニトリル / 0.1% トリフルオロ酢酸で 30 分 \times 2 回、抽出し、抽出物を吸引乾燥して質量分析用に 0.1% ギ酸に溶解させた。図 2 に、培養心筋細胞を用い虚血 (IH/R) / 非虚血 (Control) 時に放出されるタンパク質を質量分析にかけるまでの上記手順を模式化して示した。

30

【0031】

(ペプチド断片の質量分析) トリプシン処理によって得られたペプチド断片を、Q-ToF 2 (MICROMASS, UK) を用いその用法に従って LC-MS/MS を用いた質量分析に供した。LC カラムは PepMap C18 カラム (LC PACKINGS, HOL) を用い、MS/MS 分析には MassLynx, ProteinLynx (MICROMASS) の各ソフトウェアを用いて解析を行った。ペプチド断片の配列データを NCB I データベースのデータと比較し、タンパク質を同定するため、Mascot MS/MS Ions Search (MATRIX SCIENCE) を用いた。こうして得られたペプチド断片から推定される発現タンパク質のプロファイルを、虚血 - 再灌流刺激あり、刺激無しのそれぞれについて比較した。表 1 はその結果から一部分を抜粋したものであり、表中 NCB I ID はペプチド断片の配列から推測されるタンパク質の NCB I データベースでの対応物を、Gene は遺伝子名を、Control Score は対照サンプル中の同遺伝子産物の Mascot MS/MS Ions Search による “確からしさ”

40

50

の指標（値が大きいほど確からしく、同時に発現量の大小も反映している）を、IH/R scoreは虚血 - 再灌流刺激を与えたサンプル中での同遺伝子産物のスコアをそれぞれ表している。更に、個々のタンパク質はその発現量がそれぞれ異なっていることを考慮して、Control scoreとIH/R scoreの比をRatio欄で示した。表1のうち、No. 1 - 5の様に对照では発現が見られず虚血 - 再灌流刺激時にのみ特異的に現れるもの、No. 6 - 10の様に虚血 - 再灌流刺激時に発現量が増大するもの、No. 11 - 15の様に刺激前後で発現量に変化が見られないもの、No. 16 - 20の様に虚血 - 再灌流刺激時に発現量が減少するものがそれぞれ確認された。虚血 - 再灌流刺激時に特異的に発現するタンパク質のうちには、過去に虚血マーカーとして報告のあるミオシン等が含まれており、今回の発現解析が有効であることが示された。

【0032】

【表1】

表1 虚血-再灌流時におけるタンパク質発現プロファイルの比較結果の一部

No.	NCBI ID	Gene	Control score	IH/R score	Ratio*
IH/R specific					
1	gi 979041	Arpc3 (actin related protein 2/3 complex, subunit 3)	0	81	--
2	gi 9506971	pfn2 (profilin 2)	0	60	--
3	gi 6650539	Sgce (sarcoglycan, epsilon)	0	53	--
4	gi 33620739	My16 (myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non muscle)	0	42	--
5	gi 13384736	Dync1h1 (dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1)	0	58	--
Up-regulated in IH/R					
6	gi 111074529	procollagen, type XII, alpha 1	93	1770	19.032
7	gi 122891114	perlecan (heparan sulfate proteoglycan 2)	449	7288	16.232
8	gi 74188660	fibronectin 1	2870	40804	14.217
9	gi 25020120	laminin, alpha 5	42	462	11.000
10	gi 19526826	vacuolar protein sorting 26 homolog A (yeast)	47	259	5.511
Stasis					
11	gi 6753618	D-dopachrome tautomerase	62	57	0.919
12	gi 400402	neural cell adhesion molecule 1	340	310	0.912
13	gi 14714615	heat shock protein 90 kDa beta (Grp94), member 1	259	236	0.911
14	gi 6671666	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)	119	108	0.908
15	gi 112293264	protein disulfide isomerase associated 3	541	487	0.900
Down-regulated in IH/R					
16	gi 6678077	secreted acidic cysteine rich glycoprotein	1038	116	0.112
17	gi 112293266	heat shock protein 4	536	50	0.093
18	gi 551295	pyruvate kinase, muscle	2785	179	0.064
19	gi 6755809	talin 1	985	44	0.045
20	gi 12963491	enolase 1, alpha non-neuron	4097	54	0.013

*IH/R score/ control score

【0033】

上記結果のうち、虚血マーカーとしては虚血 - 再灌流刺激時に特異的に発現するものが最も望ましいと考えられた。網羅的な比較分析の結果、109種類のIH/R特異的発現タンパク質が同定された（表2）。表中NCBI IDはペプチド断片の配列から推測されるタンパク質のNCBIデータベースでの対応物を、MWは分子量を、Official symbolは正式略称を、Official nameは遺伝子産物の正式名を、Scoreは虚血 - 再灌流時のMass cotスコアを、Localizationはこれまでに報告のあるそれぞれのタンパク質の細胞内での局在を、Functionはこれまでに報告のあるそれぞれのタンパク質の機能を表している。すなわち表2に記載されたタンパク質のうち、これまでに虚血マーカーとして報告のあるものを除いたタンパク質群は、虚血マーカー、好ましくは心臓虚血のマーカーとして利用可能なタンパク質である。この中には、アポトーシス関連タンパク質群、シグナル伝達系タンパク質群、成長因子及びその関連タンパク質群、プロテアーゼ、細胞接着因子、シャペロン、代謝酵素、リンパ細胞シグナルタンパク質群、神経細胞成長関連タンパク質群、トランスポーター、細胞骨格タンパク質、転写制御因子、コートマータンパク質などが含まれていた。下記表7に、それらのうち代表的なものを示す。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 4 】

【 表 2 】

(表 2 - 1)

Subtractive proteomics 解析により明らかにされた虚血-再灌流時特異的に発現するタンパク質のリスト

NCBI ID	MW	Official Symbol	Official Name	Score	Localiza tion	Function	
structure proteins							
gi 9790141	20511	Arpc3	actin related protein 2/3 complex, subunit 3	81	CyS	cell motility	10
gi 9506971	15022	Pfn2	profilin 2	60	CyS	cytoskeletal biogenesis, actin cytoskeleton organization	
gi 6650539	50448	Sgce	sarcoglycan, epsilon	53		lung, adult, alternative splice product	
gi 33620739	16950	Myl6	myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle	42	CyS	muscle development, cytoskeleton organization and biogenesis	
gi 13384736	531690	Dync1h1	dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1	58	Cyt	microtubule-based movement, proteolysis	
gi 23956222	47327	Actr3	ARP3 actin-related protein 3 homolog (yeast)	94	CyS	cell motility	20
gi 56205559	232329	Myh10	myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle	78	Cyt	exocytosis; neuron migration	
gi 13123947	103588	Actn2	actinin alpha 2	237		muscle contraction	
gi 62204741	15274	H3f3b	H3 histone, family 3B	86	N	chromosome organization and biogenesis	
gi 30061385	13928	Hist1h2bm	histone cluster 1, H2bm	915	N	chromosome organization and biogenesis	
gi 26345578	16297	Hist1h2bp	histone cluster 1, H2bp	111	N	chromosome organization and biogenesis	
gi 78070549	15263	Hist1h3a	histone cluster 1, H3a	166	N	chromosome organization and biogenesis	
gi 28174908	14993	Hist2h2aa1	histone cluster 2, H2aa1	108	N	chromosome organization and biogenesis	30
cell adhesions							
gi 7657429	90198	Postn	periostin, osteoblast specific factor	174	Ex	cell adhesion	
gi 6753824	50160	Fbln5	fibulin 5	171	Ex	adhesion	
gi 467517	115085	Col18a1	procollagen, type XVIII, alpha 1	75	CyS, Ex	cell adhesion, angiogenesis	
gi 114326497	202309	Lamb1-1	laminin B1 subunit 1	86		precursor	
gi 31791057	177185	Lamc1	laminin, gamma 1	540	M, Ex	cell adhesion	
gi 15072454	44709	Vwa1	von Willebrand factor A domain containing 1	189			
gi 46309455	74886	Prosl	protein S (alpha)	66		associated with the extracellular matrix, cell adhesion, cell migration,	40
gi 22203747	110266	Col6a2	procollagen, type VI, alpha 2	157	Cyt	cell adhesion; phosphate transport	
gi 2781314	49365	Ctnnb1	catenin (cadherin associated protein), beta 1	130	CyS, Cyt, M	bone resorption; cell adhesion; cell differentiation	
gi 27476057	83721	Dcbl2	discoidin, CUB and LCCL domain containing 2	39	M	cell adhesion; intracellular receptor-mediated signaling pathway	

【 0 0 3 5 】

【表3】

(表2-2)							
gi 7305189	116671	Itga3	integrin alpha 3	38	M	cell adhesion	
coatomer proteins							
gi 29789080	102384	Copb2	coatomer protein complex, subunit beta 2 (beta prime)	160		WD domain, G-beta repeat, Coatomer WDAD	
gi 31981828	138434	Copa	coatomer protein complex subunit alpha	84	V, Ex	pancreatic juice secretion	
gi 6753488	47801	Cops3	COP9 (constitutive photomorphogenic) homolog, subunit 3 (Arabidopsis thaliana)	53	Cyt	embryonic development	10
apoptosis							
gi 6680502	30240	Itm2b	integral membrane protein 2B	73	M	ATP binding	
gi 6755004	66724	Aifm1	apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 1	132	Cyt, Mt, N	DNA fragmentation during apoptosis	
gi 13385998	80159	Trap1	TNF receptor-associated protein 1	250	Ex, Mt	receptor activity; regulation of apoptosis	
signal intermediates							
gi 5714370	21914	Anxa4	annexin A4	45	M	kidney development	20
gi 13542782	75213	Anxa6	annexin A6	51		calcium ion transport, regulation of muscle contraction	
gi 31980752	49927	Pla2g7	phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)	49	Ex	lipid catabolism, inflammatory response	
gi 27754118	42545	Aspn	asporin	104			
gi 126638	46671	Lox	lysyl oxidase	61		transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	
gi 15126567	33771	Crk	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)	64		cellular physiological process; intracellular signaling cascade	30
gi 6753822	78005	Fbln1	fibulin 1	128	Ex	calcium ion binding; protease activator activity	
gi 82881808	41316	Gpr52	G protein-coupled receptor 52	60	M	G-protein coupled receptor protein signaling pathway; signal transduction	
gi 3342500	35611	Ppp2ca	protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, alpha isoform	85	CyS, Cyt, Mt, N	protein amino acid dephosphorylation	
gi 21312161	51984	Ppp2r2b	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), beta isoform	46	CyS, Cyt, Mt, N	signal transduction	40
gi 58037543	171745	Lphn3	latrophilin 3	66	M	neuropeptide signaling pathway; signal transduction	
gi 115648048	211356	Ptprf	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	74	M	transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase signaling	

【0036】

【表4】

(表2-3)

gi 29747833	20899	Rbbp9	retinoblastoma binding protein 9	52	N	regulation of cell proliferation	
gi 110625811	46268	Prrc1	proline-rich coiled-coil 1	48		identical protein binding	
transcriptional regulators							
gi 6753520	24436	Creg1	cellular repressor of E1A-stimulated genes 1	73	N	regulation of transcription, DNA-dependent	
gi 6679108	32540	Npm1	nucleophosmin 1	201	N		10
gi 12851918	29597	Rps4x	ribosomal protein S4, X-linked	44	Cyt	ribosome biogenesis protein biosynthesis, regulation of cell cycle	
gi 2832298	56928	Plrg1	pleiotropic regulator 1, PRL1 homolog (Arabidopsis)	56	N	nuclear mRNA splicing via spliceosome	
gi 54289372	16910	Rnase4	ribonuclease, RNase A family 4	43		pancreatic ribonuclease activity	
gi 21314832	56944	Ugp2	UDP-glucose pyrophosphorylase 2	76		metabolism, regulation of transcription	
gi 31981647	59225	Yars	tyrosyl-tRNA synthetase	59		protein biosynthesis; tyrosyl-tRNA aminoacylation	
gi 56206984	15152	Galnt10	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 10	60	M	protein amino acid O-linked glycosylation	20
gi 12848967	20941	Nudt21	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 21	40	N	mRNA cleavage; mRNA processing	
proteases							
gi 6678481	17850	Ube2l3	ubiquitin-conjugating enzyme E2L3	54		ubiquitin cycle, ubiquitin-dependent protein catabolism	
gi 31981443	34460	Ufd1l	ubiquitin fusion degradation 1 like	160		ubiquitin cycle, ubiquitin-dependent protein catabolism	
gi 6679373	45141	Serpine1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1 (plasminogen activator inhibitor-1)	274	Ex	regulation of angiogenesis, serine-type endopeptidase inhibitor activity	30
gi 9845265	14719	Uba52	ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	138	N	protein biosynthesis; protein modification	
gi 31543918	16356	Ube2v2	ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	44		protein modification; ubiquitin cycle	
gi 6679497	25909	Psm2	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 2	177	Cyt	ubiquitin-dependent protein catabolism	
gi 7242197	26355	Psm1	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 1	173	Cyt	ubiquitin-dependent protein catabolism	40
gi 14198355	29113	Psm4	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 4	208	Cyt, N	ubiquitin-dependent protein catabolism	
gi 984938	21668	Psm6	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 6	112	Cyt, N	ubiquitin-dependent protein catabolism	

【0037】

【表 5】

(表 2 - 4)

gi 6755206	29872	Psmb7	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 7	67	Cyt	ubiquitin-dependent protein catabolism	
gi 84781771	26204	Try10	trypsin 10	54		protease	
chaperons							
gi 6753322	58030	Cct4	chaperonin subunit 4 (delta)	88		prote in folding	
gi 6753882	51540	Fkbp4	FK506 binding protein 4	66	N	protein folding	
growth factor							
gi 42734447	111595	Bmp1	bone morphogenetic protein 1	194		Cleaves the C-terminal propeptides of procollagen I, II, Induces cartilage and bone formation	10
metabolic enzymes							
gi 6754186	61077	Hexb	hexosaminidase B	89	Ly, M, Ex	carbohydrate metabolism, calcium ion homeostasis	
gi 6753190	73074	Glb1	galactosidase, beta 1	148	Ly, Ex	carbohydrate metabolism	
gi 6680676	50435	Aldh3a1	aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A1	72		metabolism	
gi 6678792	115551	Man2b2	mannosidase 2, alpha B2	44	Ex	carbohydrate metabolism	
gi 31981178	74229	Ngly1	N-glycanase 1	74	N, Cyt	peptide-N4-(N-acetyl-beta glucosaminyl)asparagine amidase activity	20
gi 31541781	52277	Fucal	fucosidase, alpha-L- 1, tissuc	56		alpha-L-fucosidase activity	
gi 18266680	55953	Oxct1	3-oxoacid CoA transferase 1	116	Mt, Ex	metabolism, succinyl-CoA metabolism	
gi 12963555	30483	Nit2	nitrilase family, member 2	107	Mt	nitrogen metabolism	
gi 45598390	66455	Loxl1	lysyl oxidase-like 1	71		lysyl oxidase-like 1	
gi 46402229	70679	Man1c1	mannosidase, alpha, class IC, member 1	37	G, M	mannose metabolism; proteoglycan biosynthesis	
gi 33469075	15736	Crabp2	cellular retinoic acid binding protein II	48	Cyt, N	embryonic forelimb morphogenesis; retinoic acid metabolism	30
gi 27229204	35284	Ctbs	chitinase, di-N-acetyl-	68	Ly	carbohydrate metabolism; chitin catabolism	
gi 6754082	25559	Gsta4	glutathione S-transferase, alpha 4	131		metabolism	
gi 6680121	25700	Gstm2	glutathione S-transferase, mu 2	61		metabolism	
gi 114794442	28596	Hdhd2	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 2	56		metabolism	
gi 6851181	56803	Sgsh	N-sulfoglucosamine sulfohydrolase (sulfamidase)	37	Ly	heparan sulfate proteoglycan metabolism	
gi 55742868	30430	Hyi	hydroxypyruvate isomerase homolog (E. coli)	82		isomerase activity	
gi 31981693	72216	Vasn	vasorin	47	M	transferase activity	40
transporters							
gi 11596855	85677	Tfrc	transferrin receptor	117	M	endocytosis, iron ion homeostasis	
gi 34328049	22861	Lcn2	lipocalin 2	44		transporters for small hydrophobic molecules, lipids, steroid hormones, bilins, retinoids	

【表 6】

(表 2 - 5)							
gi 6671557	48512	Ap1m1	adaptor-related protein complex AP-1, mu subunit 1	57	G	intracellular protein transport; protein transport	
gi 27754003	29043	C1qtnf6	C1q and tumor necrosis factor related protein 6	53	Cyt	phosphate transport	
gi 29825827	39100	Vps26b	vacuolar protein sorting 26 homolog B (yeast)	49	M	intracellular protein transport	
gi 46560565	112603	Sec24d	SEC24 related gene family, member D (<i>S. cerevisiae</i>)	54	V	ER to Golgi vesicle-mediated transport	
gi 22779895	80057	Slc44a2	solute carrier family 44, member 2	67	M	transport	10
gi 33859686	68704	Pgm1	phosphoglucosyltransferase 1	123		phosphoglucosyltransferase activity; transport	
lymphocyte signaling							
gi 15822862	37789	Cd14	CD14 antigen	47	M, Ex	immune response, inflammatory response	
gi 31077182	109582	Anpep	alanyl aminopeptidase (CD13)	467		Broad specificity aminopeptidase., May have a role in angiogenesis	
gi 29144947	62928	Fkbp9	FK506 binding protein 9	59		mammary tumor metastatized to lung., peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	20
gi 2982192	65120	Alcam	activated leukocyte cell adhesion molecule	182	M	cell adhesion, signal transduction	
gi 23956044	186364	C3	complement component 3	403	Ex	inflammatory response, phagocytosis, complement activation	
neuron biology							
gi 220610	221737	Tnc	tenascin C	49	Ex	orchestrate growth factor	
gi 83754781	13418	Nudc	nuclear distribution gene C homolog (<i>Aspergillus</i>)	80			
gi 26326325	91427	Sema4b	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4B	49		Sema domain, repellent signals during axon guidance. Sema domains also occur, hepatocyte growth factor receptor	30
gi 42490751	198119	Agrin	agrin	303	Ex	neurotransmitter receptor metabolism	
gi 94398836	203362	Plxnb2	plexin B2	41		axogenesis	
unknown							
gi 18043415	30540	1110007L15Rik	RIKEN cDNA 1110007L15 gene	48			
gi 12840311	30765	2700085E05Rik	RIKEN cDNA 2700085E05 gene	104			
gi 24980968	11368	3110003A17Rik	RIKEN cDNA 3110003A17 gene	45			
gi 19526926	34973	4931406C07Rik	RIKEN cDNA 4931406C07 gene	47			
gi 31324532	18224	6530401N04Rik	RIKEN cDNA 6530401N04 gene	46			40
gi 82956586	34373	EG54509	predicted gene, EG545091	68			

Cyt, cytoskeleton; M, membrane; Ex, extracellular space; V, vesicle coat; N, nucleus; Cyt, cytoplasm; G, Golgi apparatus; Mt, mitochondrion; Ly, lysosome; ER, endoplasmic reticulum

【表 7】

(表 3)

虚血-再灌流刺激特異的に発現するタンパク質の代表例リスト

分類 (配列から推定)	タンパク質	バリエーション	機能
アポトーシス	AIF (Apoptosis inducing factor)	AIF (programmed cell death 8), AIF precursor, AIF isoform	DNA fragmentation during apoptosis
炎症反応	BMP-1 (Bone morphology protein-1)	BMP-1 (procollagen C proteinase) BMP-1 precursor, BMP-1 isoform, BMP, BMP1-5, BMP1-6, Tolloid-like protein, Tolloid-like 1, Tolloid-like 2	Cleaves the C-terminal propeptides of procollagen I, II, Induces cartilage and bone formation metabolic enzymes
細胞接着	CD13 (Amino peptidase N)	CD13 (amino peptidase N), CD13 precursor, CD13 isoform, amino peptidase A, laeverin, TRH-DE	Broad specificity aminopeptidase., May have a role in angiogenesis
細胞増殖	CD14	CD14, CD14 precursor, CD14 isoform	immune response, inflammatory response
神経細胞成長	Tenascin-C	tenascin-C, tenascin-C precursor, cytotactin, cytotactin precursor, tenascin XB, tenascin X, tenascin X precursor, tenascin R, tenascin N	orchestrate growth factor
血管新生	Agrin	agrin, agrin precursor, agrin isoform, perlecan 1, perlecan 2, perlecan isoform	neurotransmitter receptor metabolism

10

20

【 0 0 4 0 】

(イムノプロットング) データベースとの比較から同定された 109 種類のタンパク質のうち、アポトーシス、炎症反応、細胞接着、細胞増殖、神経細胞成長、血管新生、とそれぞれ異なった機能を有するタンパク質であると推測された 6 種類のタンパク質、すなわち A I F、B M P - 1、C D 1 3、C D 1 4、テネイシン C、アグリンについて、培養細胞系における虚血 - 再灌流刺激前後のタンパク質発現量の比較、及び人工心肺による心臓手術を受ける患者さん(一時的に心臓本体は虚血状態になる)の血液中における発現の検証として、培養細胞上清及び血液からの試料調整とその試料を用いた電気泳動、並びにイムノプロットングを行った。培養細胞系における虚血 - 再灌流刺激前後のタンパク質発現量の比較には、発現亢進がみられた A I F と B M P - 1 の他、表 1 にあげたタンパク質のうち刺激前後で発現量が同等と推測されたストレス応答タンパク質の一種 H S P 9 0、及び刺激後に発現量が減少すると推測された - エノラーゼについても、検出の有効性を確認するために検証した。血液試料の採取は山口大学病院にて人工心肺を用いた開胸手術を受ける 5 4 - 7 5 歳の患者さん 6 名につき、インフォームドコンセント及び関連法令・規則に則って、血清中の A I F、B M P - 1、C D 1 3、C D 1 4、テネイシン C、アグリンの発現量を手術前後で比較した。採取した試料(血清)は Lysis buffer [1 % T r i t o n X - 1 0 0, 2 0 m M T r i s (p H 7 . 5), 1 5 0 m M N a C l, 1 m M E D T A, 2 . 5 m M ピロリン酸 N a, 1 m M - グリセロールリン酸, 1 m M オルソバナジウム酸 N a, 1 μ g / m l ロイペプチン, 1 m M フェニルメタンスルホニルフルオリド] で溶解し、溶液を 1 0 % ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、泳動物をニトロセルロース膜に転写した。転写後に膜を 5 % 脱脂粉乳または 1 0 % B S A (B o v i n e serum albumin) / 0 . 0 5 % (w / v) T w e e n 2 0 含有 T B S buffer でプロットキングし、上記の各タンパク質に対する特異的抗体を反応させ、結合しなかった抗体を洗い流した後に蛍光試薬で標的タンパク質の存在を定量的に可視化した。抗アグリン抗体、抗テネイシン C 抗体、抗 B M P - 1 抗体、抗 C D 1 3 抗体、抗 C D 1 4 抗体、抗 A I F 抗体及び抗 H S P 9 0 抗体、抗 - エノラーゼ抗体はそれぞれ SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY (U S A) から購入したものを、抗原抗体反応は用法に従って行った。

30

40

【 0 0 4 1 】

培養細胞系における虚血 - 再灌流刺激前後のタンパク質発現量の比較を目的としたイムノプロットングの結果を、図 3 に示す。図 3 A は A I F、B は B M P - 1、C は H S P

50

90、Dは - エノラーゼの結果を示し、IH/R 0, 2, ...の数字はそれぞれ虚血 - 再灌流刺激後の経過時間(0は刺激無し)を表している。AIF(A)の発現量は、虚血刺激を与える前にはほとんどみられないのに対して、刺激を与えた2時間後には急激に増加し、24時間後にもこの増加は継続、48時間後にはやや減少するという傾向が見られた。BMP-1(B)についても、刺激前には発現がみられず、刺激後2時間後にもそれほど増加はみられないが、24時間後には明瞭な発現の亢進が観察された。HSP90(C)については、虚血刺激前に一定量の発現があり、刺激後2時間では一時的に発現量が減少するものの24時間後には刺激前と同程度にまで発現量が回復しており、0時間と24時間後の比較では発現量が同等という先の推測が裏付けられた。反対に - エノラーゼ(D)では、刺激前に発現が観察されたが刺激後2時間でその発現が消失し、24 - 48時間後にわずかな回復がみられるもののその発現量は刺激前に比べてはるかに減少しており、こちらも上記の推測を裏付ける結果となった。虚血 - 再灌流刺激後に発現の亢進するタンパク質、同等なタンパク質、減少するタンパク質それぞれについて、網羅的なりスタップと個々のタンパク質に対するイムノプロットの結果が一致したことから、本発明の網羅的解析で得られたマーカー候補となるタンパク質の情報が有効であることが確認された。

10

【0042】

人工心肺による心臓手術時(一時的虚血状態)の血液中における各マーカータンパク質の発現の比較結果を、図4に示す。図4AはAIF、BはBMP-1、CはCD13、DはCD14、EはテネイシンC、Fはアグリンの発現量を、蛍光の強度(結合した抗体量 = 標的のタンパク質量を反映)でそれぞれ表したものであり、またBS(Before Surgery)は手術前に採集した試料、DS(During Surgery)は手術中に採集した試料、0, 3, ...は手術後の各時間における試料をそれぞれ表している。A-Fは代表的なもの1例を挙げたが、6例いずれも同様の傾向を示した。AIF、BMP-1、CD13、テネイシンC及びアグリンでは、手術前にはほとんど発現がみられないのと比較して、手術後24 - 48時間で血清中に含まれる各タンパク質量が増加することがイムノプロットの結果より示された(図中 で示す)。CD14については、手術前・手術中の血清に既に放出されていたが、手術後にその発現量が増大することが示された。培養細胞系での結果と臨床検体での結果に良い一致が見られたことから、本発明におけるマーカータンパク質は、虚血マーカー、好ましくは心臓虚血マーカーとしてきわめて有効であることが示された。

20

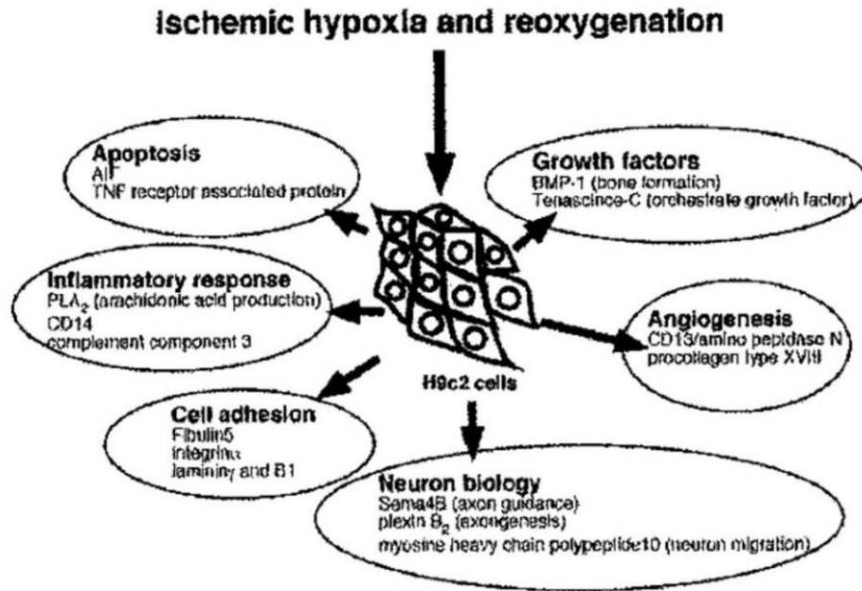
30

【産業上の利用可能性】

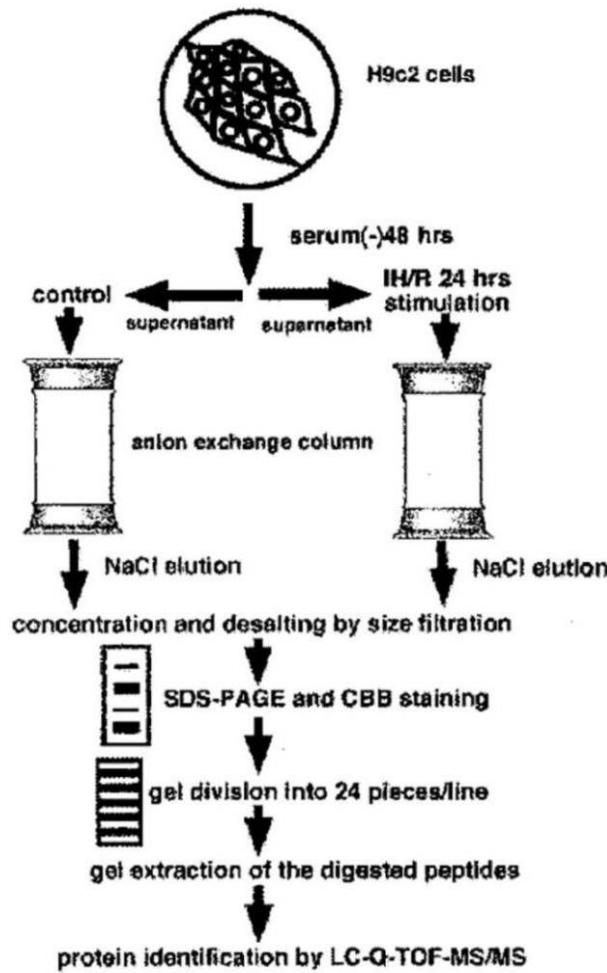
【0043】

本発明は、虚血マーカー、虚血の検査の分野などに好適に利用することができる。

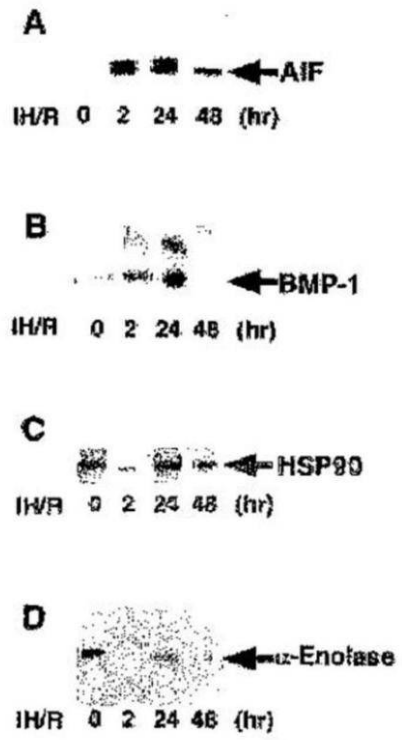
【 図 1 】



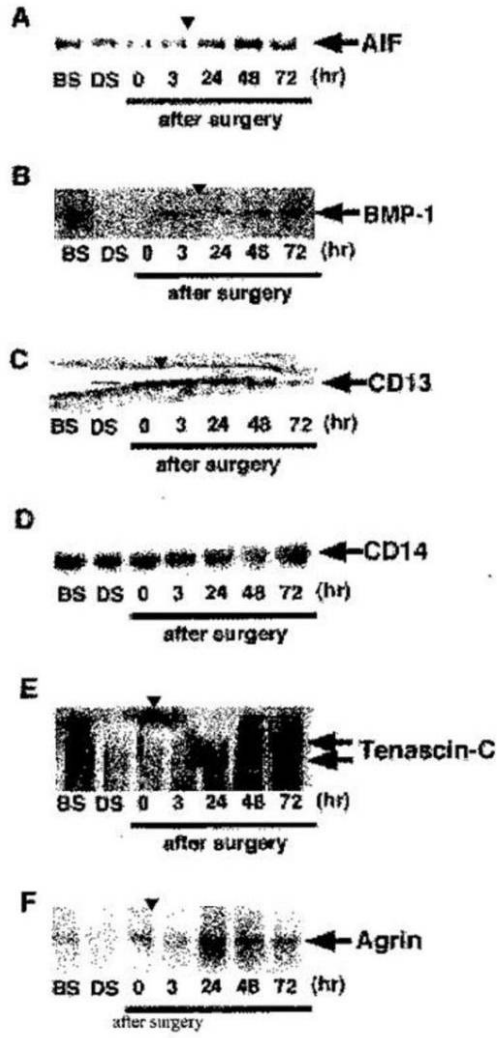
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



フロントページの続き

(72)発明者 水上 洋一
山口県宇部市南小串1丁目1-1 国立大学法人山口大学内

審査官 海野 佳子

(56)参考文献 特開2002-234900(JP,A)
水上洋一 ほか, 低酸素刺激によって胎児心臓由来株化細胞H9c2細胞から放出される分泌蛋白質の proteオミクス解析, 第80回日本生化学会大会第30回日本分子生物学会年会合同大会講演要旨集, 2007年12月, 3P-0111
水上洋一 ほか, 心筋虚血時に分泌される生存因子の精製とその生理活性, 第27回 日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集, 2004年11月25日, P.568, 1PB-302

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