

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年4月20日(20.04.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/065206 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/080346
- (22) 国際出願日: 2016年10月13日(13.10.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-202418 2015年10月13日(13.10.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人新潟大学(NIIGATA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9502181 新潟県新潟市西区五十嵐二の町8050番地 Niigata (JP).
- (72) 発明者: 南野 徹(MINAMINO Tohru); 〒9518510 新潟県新潟市中央区旭町通1番町757番地 国立大学法人新潟大学 大学院医歯学総合研究科(医科)内 Niigata (JP). 清水 逸平(SHIMIZU Ipppei); 〒9518510 新潟県新潟市中央区旭町通1番町757番地 国立大学法人新潟大学 大学院医歯学総合研究科(医科)内 Niigata (JP).
- (74) 代理人: 棚井 澄雄, 外(TANAI Sumio et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告(条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))



WO 2017/065206 A1

(54) Title: MARKER FOR NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 非アルコール性脂肪性肝炎マーカー及びその使用

(57) Abstract: Provided is a marker for non-alcoholic steatohepatitis, comprising a procollagen C-endopeptidase enhancer (PCPE-1) gene or a PCPE-1 protein.

(57) 要約: Procollagen C-endopeptidase enhancer (PCPE-1) 遺伝子又はPCPE-1タンパク質からなる、非アルコール性脂肪性肝炎マーカー。

明 細 書

発明の名称：非アルコール性脂肪性肝炎マーカー及びその使用 技術分野

[0001] 本発明は、非アルコール性脂肪性肝炎マーカー及びその使用に関する。本願は、2015年10月13日に、日本に出願された特願2015-202418号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 近年、食生活の欧米化と運動不足による肥満人口の増加に伴い、非アルコール性脂肪性肝疾患（non-alcoholic fatty liver disease、NAFLD）及び非アルコール性脂肪性肝炎（non-alcoholic steatohepatitis、NASH）の患者が増加している。

[0003] NAFLDとは、飲酒歴がないにもかかわらずアルコール性肝障害に類似した脂肪性肝障害が認められる疾患である。NAFLDの約90%は非進行で予後良好な単純性脂肪肝であるが、残りの約10%は、肝硬変、肝細胞癌へと進行し得るNASHに分類される（例えば、非特許文献1を参照）。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Khan F. Z., et al., Advances in hepatocellular carcinoma : Nonalcoholic steatohepatitis-related hepatocellular carcinoma., World J. Hepatol., 7 (18), 2155-2161, 2015.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] NASHの病態に陥ると、肝臓の線維化が進行し、肝硬変へと進展する。しかしながら、肝臓の線維化が進行する機序はほとんどわかっていない。現在、NASHの診断方法としては、肝臓生検による侵襲的手法しか存在しない。このため、NASHを容易に診断できるマーカーの開発が求められている。そこで、本発明は、新たなNASHマーカーを提供することを目的とす

る。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明は以下の態様を含む。

(1) Procollagen C-endopeptidase enhancer (PCPE-1) 遺伝子又はPCPE-1タンパク質からなる、NASHマーカー。

(2) PCPE-1タンパク質に対する特異的結合物質、PCPE-1遺伝子のcDNAを増幅するためのプライマーセット、又はPCPE-1遺伝子のmRNAに特異的にハイブリダイズするプローブ、を備える、NASH診断用キット。

(3) 生体試料中の、PCPE-1遺伝子又はPCPE-1タンパク質の発現量を定量する工程を備える、NASHの検出方法。

発明の効果

[0007] 本発明により、新たなNASHマーカーを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]実験例2のリアルタイムPCRの結果を示すグラフである。

[図2]実験例2のウエスタンブロットティングの結果を示す写真である。

[図3]実験例3のマウスPCPE-1タンパク質の定量結果を示すグラフである。

[図4]実験例4のウエスタンブロットティングの結果を示す写真である。

[図5]実験例5のPCPE-1タンパク質の定量結果を示すグラフである。

[図6]実験例6のI型コラーゲンの分泌量の定量結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0009] [NASHマーカー]

1 実施形態において、本発明は、PCPE-1遺伝子又はPCPE-1タンパク質からなる、NASH（非アルコール性脂肪性肝炎）マーカーを提供する。

[0010] PCPE-1 遺伝子は、PCOLCE 遺伝子とも呼ばれ、PCPE-1 タンパク質をコードする遺伝子である。ヒト PCPE-1 遺伝子の Genbank アクセション番号は NM_002593 であり、マウス PCPE-1 遺伝子の Genbank アクセション番号は NM_008788 である。配列番号 1 にヒト PCPE-1 遺伝子の cDNA の塩基配列を示し、配列番号 2 にヒト PCPE-1 タンパク質のアミノ酸配列を示す。また、配列番号 3 にマウス PCPE-1 遺伝子の cDNA の塩基配列を示し、配列番号 4 にマウス PCPE-1 タンパク質のアミノ酸配列を示す。

[0011] 実施例において後述するように、発明者らは、NASH 患者の血清中で PCPE-1 タンパク質の存在量が増加することを見出した。また、肥満ストレスにより、褐色脂肪組織特異的に PCPE-1 遺伝子の発現レベルが上昇することを明らかにした。

[0012] 係る知見から、PCPE-1 遺伝子又は PCPE-1 タンパク質を NASH マーカーとして用いることができる。本実施形態の NASH マーカーにより、NASH を簡便に診断することが可能になる。また、低侵襲に診断することが可能になる。

[0013] 本実施形態のマーカーにより、NASH に罹患していることが疑われる患者に対しては、運動療法や食餌療法を積極的に行うことにより、肝硬変、肝細胞癌への進行を抑制又は防止することができる。

[0014] [NASH 診断用キット]

1 実施形態において、本発明は、PCPE-1 タンパク質に対する特異的結合物質、PCPE-1 遺伝子の cDNA を増幅するためのプライマーセット、又は PCPE-1 遺伝子の mRNA に特異的にハイブリダイズするプローブ、を備える、NASH 診断用キットを提供する。

[0015] 特異的結合物質としては、例えば、抗体、抗体断片、アプタマー等が挙げられる。抗体は、例えば、マウス等の動物に PCPE-1 タンパク質又はその部分ペプチドを抗原として免疫することにより作製してもよい。あるいは、ファージライブラリー等の抗体ライブラリーのスクリーニング等により作

製することもできる。

- [0016] 抗体断片としては、Fv、Fab、scFv等が挙げられる。上記の抗体又は抗体断片は、ポリクローナルであってもよく、モノクローナルであってもよい。
- [0017] アプタマーとは、標識物質に対する特異的結合能を有する物質である。アプタマーとしては、核酸アプタマー、ペプチドアプタマー等が挙げられる。PCPE-1タンパク質に特異的結合能を有する核酸アプタマーは、例えば、systematic evolution of ligand by exponential enrichment (SELEX) 法等により選別することができる。また、PCPE-1タンパク質に対する特異的結合能を有するペプチドアプタマーは、例えば酵母を用いたTwo-hybrid法等により選別することができる。
- [0018] 特異的結合物質は、PCPE-1タンパク質に特異的に結合することができるれば特に制限されず、市販のものであってもよい。また、特異的結合物質は、担体上に固定されてプロテインチップ等を構成していてもよい。
- [0019] 本実施形態のNASH診断用キットを用いて、生体試料中のPCPE-1遺伝子の発現又はタンパク質の発現を検出することができる。PCPE-1遺伝子又はタンパク質の発現量が健常人と比較して上昇していた場合には、生体試料が由来する被検者がNASHに罹患している可能性が高い。
- [0020] プライマーセットとしては、診断対象の動物種のPCPE-1遺伝子のcDNAを増幅することができるものであれば特に限定されない。例えば、ヒトPCPE-1遺伝子のcDNAを増幅するプライマーとしては、配列番号5に示す塩基配列からなるセンスプライマー及び配列番号6に示す塩基配列からなるアンチセンスプライマーのセット等が挙げられる。
- [0021] mRNAに特異的にハイブリダイズするプローブとしては、PCPE-1遺伝子のmRNAに特異的にハイブリダイズするものであれば特に限定されない。プローブは、担体上に固定されてDNAマイクロアレイ等を構成していてもよい。
- [0022] 生体試料としては、血清、血漿、尿、組織等が挙げられる。組織としては

、褐色脂肪組織、肝臓生検等が挙げられる。生体試料が、血清、血漿、尿等である場合、本実施形態のNASH診断用キットは、上記の特異的結合物質であってもよい。この場合、低侵襲で簡便にNASHの診断を行うことができる。また、生体試料が組織等である場合、本実施形態のNASH診断用キットは、上記のプライマーセット又はプローブを備えるものであることが好ましい。

[0023] [NASHの検出方法]

1実施形態において、本発明は、生体試料中の、PCPE-1遺伝子又はPCPE-1タンパク質の発現量を定量する工程を備える、NASHの検出方法を提供する。本実施形態の検出方法は、NASHの診断方法であるということもできる。

[0024] 生体試料は、上述したものと同様である。PCPE-1遺伝子の発現量の定量方法としては、PCPE-1遺伝子のcDNAを増幅するためのプライマーセットを用いたリアルタイムPCR；PCPE-1遺伝子のmRNAに特異的にハイブリダイズするプローブを固定したマイクロアレイによる遺伝子発現解析；PCPE-1遺伝子のmRNAに特異的にハイブリダイズするプローブを用いたノーザンブロットング等が挙げられる。

[0025] また、PCPE-1タンパク質の発現量の定量方法としては、PCPE-1タンパク質に対する特異的結合物質を用いたウエスタンブロットング、ELISA、免疫染色、逆相タンパク質アレイを用いた検出等が挙げられる。なお、逆相タンパク質アレイを用いた検出とは、試料を固相にアレイ状に固定し、特定物質に対する特異的結合物質を反応させることにより、試料中の特定物質を検出する解析方法である。

[0026] 本実施形態の検出方法は、生検試料がNASH患者由来のものであるか否かを判定する方法であるということもできる。すなわち、生検試料中のPCPE-1遺伝子又はPCPE-1タンパク質の発現量が、健常人由来の生検試料中のPCPE-1遺伝子又はPCPE-1タンパク質の発現量と比較して高い場合、生検試料はNASH患者由来のものであると判定することがで

きる。

[0027] また、生体試料中のPCPE-1タンパク質の発現量は、生体試料中のPCPE-1タンパク質の存在量といい換えることもできる。実施例において後述するように、PCPE-1タンパク質は、褐色脂肪組織で転写、翻訳、分泌され、血流を通じて肝臓に到達するものと考えられる。

[0028] NASHを検出する場合には標準を設けてもよい。このような標準としては、例えば、健常人由来の生体試料等が挙げられる。健常人と比較して、PCPE-1遺伝子又はPCPE-1タンパク質の発現量が高い場合、被検者はNASHに罹患している可能性が高い。

実施例

[0029] 次に実施例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0030] [実験例1]

(褐色脂肪組織から分泌されるタンパク質の探索)

発明者らは、褐色脂肪組織から分泌されるタンパク質を解析した。その結果、NASHマーカーを見出した。本実験例の内容について、以下に、より詳細に説明する。

[0031] 脂肪組織には、褐色脂肪組織と白色脂肪組織が存在する。褐色脂肪組織は熱産生器官であることが知られているが、内分泌器官としての機能についてはほとんど知られていなかった。そこで、発明者らは、褐色脂肪組織の内分泌器官としての機能を検討するために、DNAマイクロアレイ解析により褐色脂肪組織が分泌するタンパク質を探索した。

[0032] 具体的には、4週齢のマウスに高脂肪食を8ヶ月間与えた肥満マウスモデルの褐色脂肪組織、及び脂肪組織特異的に低酸素状態にしたマウスの褐色脂肪組織において、共通に発現する分泌タンパク質を探索した。脂肪組織特異的に低酸素状態にしたマウスの褐色脂肪組織を用いたのは、肥満マウスの脂肪組織は低酸素状態になることが知られているためである。つまり、肥満させる以外の方法で脂肪組織を低酸素状態にしたマウスの褐色脂肪組織を用い

た。より具体的には、脂肪組織特異的にVascular Endothelial Growth Factor (VEGF) - Aをノックアウトしたマウスを用いた。

[0033] 肥満食を与えた肥満マウスモデルの褐色脂肪組織で発現が上方制御される遺伝子の情報としては、全米バイオテクノロジー情報センター (NCBI) の遺伝子発現情報データベース (Gene Expression Omnibus ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) にアクセス番号GSE28440として公開されている情報を使用した。

[0034] その結果、褐色脂肪組織が分泌するタンパク質として、23種類のタンパク質が同定された。それらのタンパク質のうちの1つがPCPE-1遺伝子であった。

[0035] [実験例2]

(肥満ストレスで褐色脂肪組織におけるPCPE-1の発現レベルが上昇した)

4週齢のマウスに高脂肪食を8週間与えた肥満マウスモデルの各臓器におけるPCPE-1遺伝子の発現量をリアルタイムPCRにより測定した。対照として通常食を与えたマウスを使用した。マウスPCPE-1遺伝子のcDNAを増幅するためのプライマーとしては、センスプライマー (配列番号7) 及びアンチセンスプライマー (配列番号8) を使用した。また、臓器としては、褐色脂肪組織、白色脂肪組織、肝臓、心臓、腎臓、肺、筋、脾臓を用いた。

[0036] 図1は、リアルタイムPCRの結果を示すグラフである。図中、「**」は、危険率1%未満で有意差があることを示す。その結果、肥満ストレスにより、褐色脂肪組織特異的にPCPE-1遺伝子の発現レベルが上昇することが明らかとなった。

[0037] 続いて、PCPE-1のタンパクレベルでの発現を検討した。4週齢のマウスに高脂肪食を8ヶ月間与えた肥満マウスモデル及び通常食を与えた対照のマウス由来の褐色脂肪組織からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロッティング法によりPCPE-1タンパク質を検出した。PCPE-1タンパク

質の検出には、抗PCPE-1抗体（型式「MAB2239」、R&Dシステムズ社）を使用した。また、ローディングコントロールとして、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素（GAPDH）タンパク質を検出した。GAPDHタンパク質の検出には、抗GAPDH抗体（型式「#3683S」、Cell Signaling Technology社）を使用した。

[0038] 図2は、ウエスタンブロッティングの結果を示す写真である。その結果、肥満ストレスにより、褐色脂肪組織特異的にPCPE-1タンパク質の発現レベルが上昇することが明らかとなった。

[0039] [実験例3]

（肥満ストレスで血漿中のPCPE-1レベルが上昇した）

4週齢のマウスに高脂肪食を8ヶ月間与えた肥満マウスモデル及び通常食を与えた対照のマウスの血漿中のPCPE-1タンパク質の量をELISA法により定量した。PCPE-1タンパク質の定量には、市販のキット（型式「DL-PCPE1-Mu」、DLDEVELOP社）を使用した。

[0040] 図3はマウスPCPE-1タンパク質の定量結果を示すグラフである。図中、「**」は、危険率1%未満で有意差があることを示す。その結果、肥満ストレスにより、血漿中のPCPE-1タンパク質の存在量が上昇することが明らかとなった。

[0041] [実験例4]

（肥満ストレスにより肝臓におけるPCPE-1レベルが上昇した）

4週齢のマウスに高脂肪食を8ヶ月間与えた肥満マウスモデルの肝臓における、PCPE-1タンパク質の存在を、ウエスタンブロッティング法により検出した。対照として通常食を与えたマウスの肝臓を使用した。PCPE-1タンパク質の検出には、抗PCPE-1抗体（型式「MAB2239」、R&Dシステムズ社）を使用した。また、ローディングコントロールとして、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素（GAPDH）タンパク質を検出した。GAPDHタンパク質の検出には、抗GAPDH抗体（型式「#3683S」、Cell Signaling Technology社）を

使用した。

[0042] 図4は、ウェスタンブロッティングの結果を示す写真である。その結果、肥満ストレスにより、肝臓におけるPCPE-1タンパク質の存在量が上昇することが明らかとなった。実験例2で示されたように、肥満ストレスを与えても肝臓におけるPCPE-1遺伝子の発現の上昇は認められない。したがって、本実験例で検出されたPCPE-1タンパク質は肝臓以外の場所で発現されたものであると考えられた。

[0043] [実験例5]

(NASH患者の血清中でPCPE-1レベルが上昇した)

NASH患者の血清中のPCPE-1タンパク質の量を定量した(n=46)。また、同時に、健常人(n=29)及び肥満患者(BMI25以上)(n=22)の血清中のPCPE-1タンパク質の量を定量した。PCPE-1タンパク質の定量には、市販のキット(型式「MBS722836」、MyBioSource社)を使用した。

[0044] 図5はPCPE-1タンパク質の定量結果を示すグラフである。図中、「*」は、危険率5%未満で有意差があることを示す。その結果、NASH患者の血清中では、PCPE-1タンパク質の存在量が上昇することが明らかとなった。この結果は、PCPE-1タンパク質がNASHマーカーであることを示す。

[0045] [実験例6]

(PCPE-1は肝星細胞によるI型コラーゲンの分泌を促進した)

NASH患者の肝臓においてTransforming growth factor (TGF)- β の発現が上昇することが知られている。そこで、ヒト肝星細胞株LX-2を、終濃度1.0 ng/mLのTGF- β (型式「240-B-002」、R&D社)の存在下で培養した。上記の細胞の培地に、リン酸緩衝液(PBS)(n=4)又は終濃度8.5 μ MのPCPE-1タンパク質(型式「2627-PE-020」、R&D社)(n=4)を添加して24時間培養し、I型コラーゲンの分泌量を定量した。対照とし

て、 $TGF-\beta$ の非存在下で培養したLX-2細胞の培地に、リン酸緩衝液(PBS)($n=6$)又は終濃度 $8.5\mu M$ のPCPE-1タンパク質($n=8$)を添加して24時間培養し、I型コラーゲンの分泌量をELISA法により定量した。I型コラーゲンの定量には市販のキット(型式「ACE-EC1-E205-EX」、コスモバイオ社)を使用した。

[0046] 図6は、I型コラーゲンの分泌量の定量結果を示すグラフである。図中、「*」は、危険率5%未満で有意差があることを示し、「**」は、危険率1%未満で有意差があることを示す。

[0047] その結果、PCPE-1タンパク質の添加により、LX-2細胞によるI型コラーゲンの分泌量が増加することが明らかとなった。この結果は、PCPE-1タンパク質が、肝臓の線維化に関与することを示す。

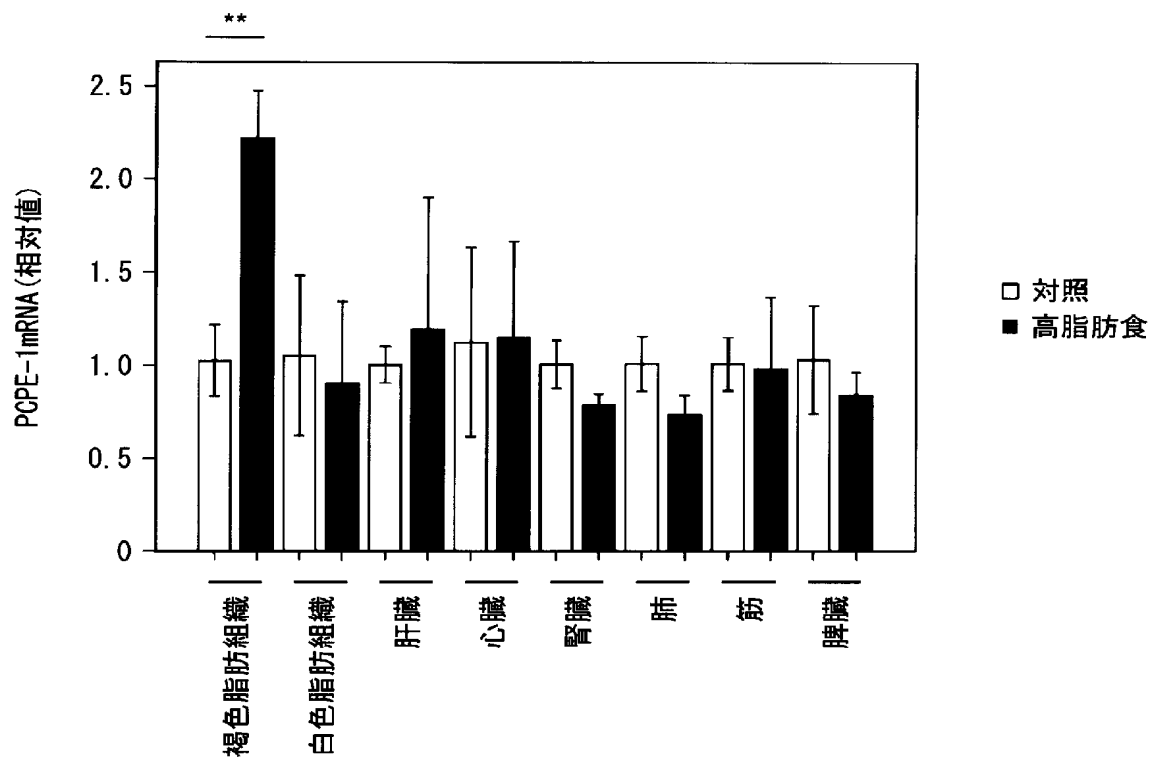
産業上の利用可能性

[0048] 本発明により、新たなNASHマーカーを提供することができる。

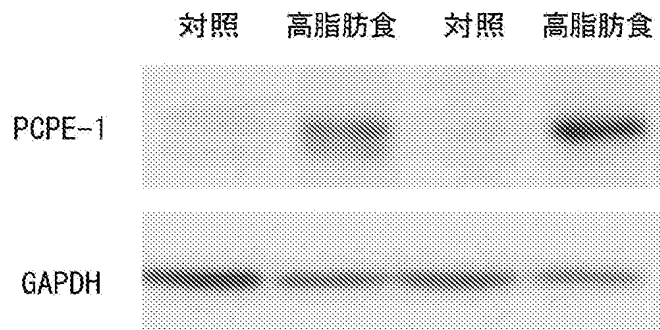
請求の範囲

- [請求項1] Procollagen C-endopeptidase enhancer (PCPE-1) 遺伝子又はPCPE-1タンパク質からなる、非アルコール性脂肪性肝炎マーカー。
- [請求項2] PCPE-1タンパク質に対する特異的結合物質、
PCPE-1遺伝子のcDNAを増幅するためのプライマーセット、又は
PCPE-1遺伝子のmRNAに特異的にハイブリダイズするプローブ、
を備える、非アルコール性脂肪性肝炎診断用キット。
- [請求項3] 生体試料中の、PCPE-1遺伝子又はPCPE-1タンパク質の発現量を定量する工程を備える、非アルコール性脂肪性肝炎の検出方法。

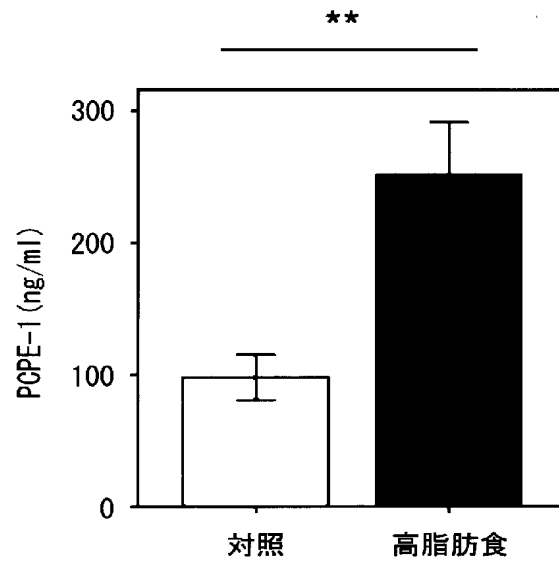
[图1]



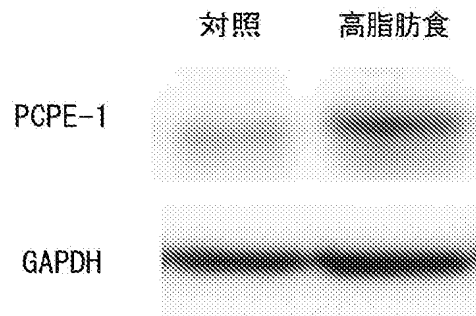
[图2]



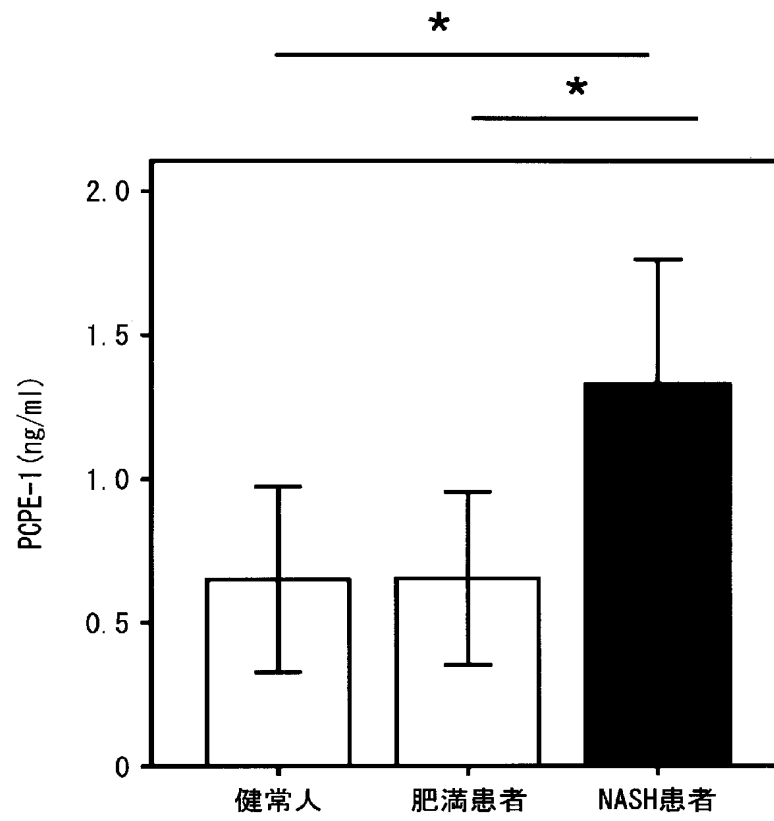
[图3]



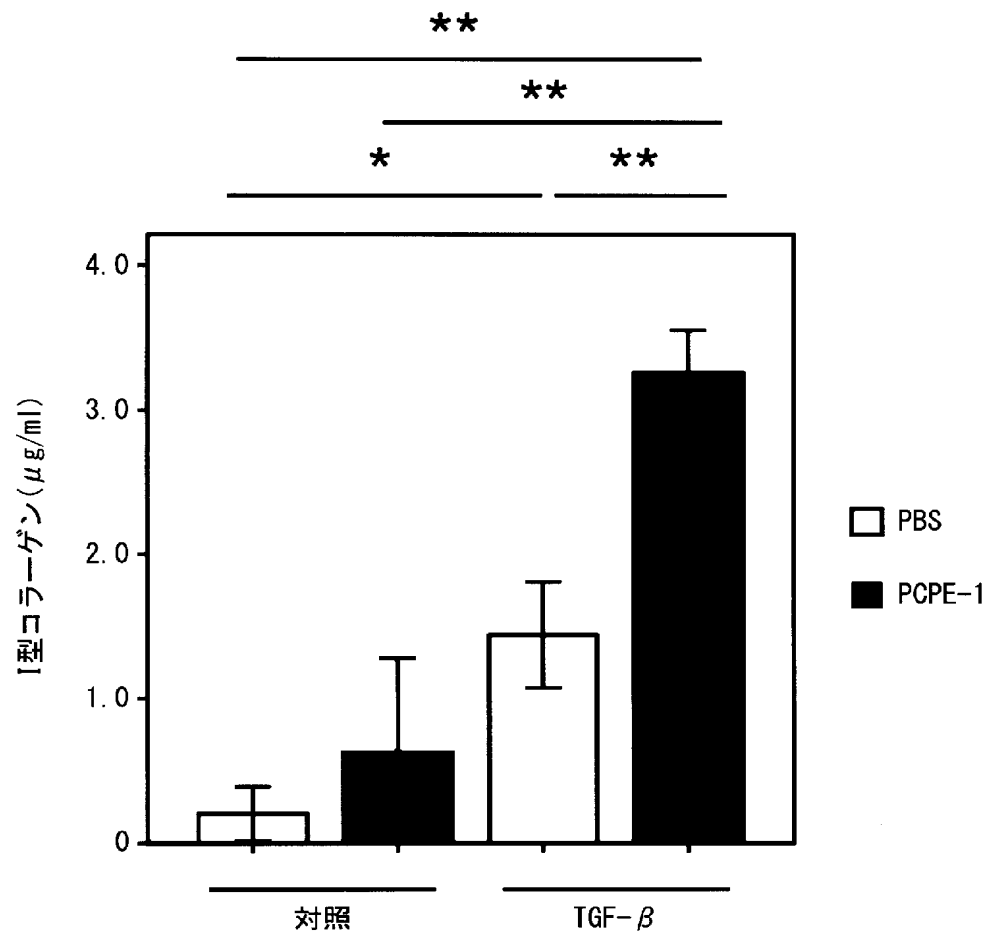
[图4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/080346

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C07K14/47, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	TAKAHARA, K. et al., Type I Procollagen COOH-terminal Proteinase Enhancer Protein: Identification, Primary Structure, and Chromosomal Localization of the Cognate Human Gene (PCOLCE), The Journal of Biological Chemistry, 1994, Vol.269, p.26280-26285, entire text	1 2-3
X A	WO 2009/122367 A2 (TEL HASHMORE MEDICAL RESEARCH INFRASTRUCTURE AND SERVICES LTD.), 08 October 2009 (08.10.2009), entire text & US 2011/0143371 A1 & US 2012/0270246 A1 & EP 2274620 A2 & IL 208421 A	1 2-3

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
21 December 2016 (21.12.16)

Date of mailing of the international search report
10 January 2017 (10.01.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/080346

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	STEFANO, J.T. et al., Decreased immunoexpression of survivin could be a potential marker in human non-alcoholic fatty liver disease progression?, Liver International, 2011, Vol.31, p.377-385, abstract	1-3
P,A	HASSOUN, E. et al., Procollagen C-Proteinase Enhancer 1 (PCPE-1) as a Plasma Marker of Muscle and Liver Fibrosis in Mice, PLOS ONE, July 2016, Vol.11, e0159606	1-3

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N15/09, C07K14/47, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2016年
 日本国実用新案登録公報 1996-2016年
 日本国登録実用新案公報 1994-2016年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	TAKAHARA, K. et al., Type I Procollagen COOH-terminal Proteinase Enhancer Protein: Identification, Primary Structure, and Chromosomal Localization of the Cognate Human Gene (PCOLCE), The Journal of Biological Chemistry, 1994, Vol.269, p.26280-26285, 全文	1 2-3
X A	WO 2009/122367 A2 (TEL HASHMORE MEDICAL RESEARCH INFRASTRUCTURE AND SERVICES LTD) 2009.10.08, 全文 & US 2011/0143371 A1 & US 2012/0270246 A1 & EP 2274620 A2 & IL 208421 A	1 2-3

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 21.12.2016	国際調査報告の発送日 10.01.2017
--------------------------	--------------------------

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 飯室 里美 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N	2936
---	--	----	------

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	STEFANO, J. T. et al., Decreased immunoexpression of survivin could be a potential marker in human non-alcoholic fatty liver disease progression?, Liver International, 2011, Vol.31, p. 377-385, 要約等	1-3
P, A	HASSOUN, E. et al., Procollagen C-Proteinase Enhancer 1 (PCPE-1) as a Plasma Marker of Muscle and Liver Fibrosis in Mice, PLOS ONE, July 2016, Vol.11, e0159606	1-3