

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5555846号  
(P5555846)

(45) 発行日 平成26年7月23日(2014.7.23)

(24) 登録日 平成26年6月13日(2014.6.13)

(51) Int.Cl.	F I	
<b>GO 1 N 33/53</b> (2006.01)	GO 1 N 33/53	Z N A D
<b>CO 7 K 16/18</b> (2006.01)	CO 7 K 16/18	
<b>C 1 2 N 15/02</b> (2006.01)	C 1 2 N 15/00	C
<b>A 6 1 K 45/00</b> (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
<b>A 6 1 P 43/00</b> (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
請求項の数 6 (全 13 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-507500 (P2009-507500)	(73) 特許権者	304020177 国立大学法人山口大学 山口県山口市吉田 1 6 7 7 - 1
(86) (22) 出願日	平成20年3月27日 (2008.3.27)	(72) 発明者	前川 剛志 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
(86) 国際出願番号	PCT/JP2008/055930	(72) 発明者	泉 友則 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
(87) 国際公開番号	W02008/120684	(72) 発明者	小田 泰崇 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
(87) 国際公開日	平成20年10月9日 (2008.10.9)		
審査請求日	平成23年3月3日 (2011.3.3)		
(31) 優先権主張番号	特願2007-91600 (P2007-91600)		
(32) 優先日	平成19年3月30日 (2007.3.30)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 急性中枢神経障害の予後判定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

急性中枢神経障害の予後を判定する方法であって、心肺停止蘇生後 4 8 時間以内に採取した患者の生体液中の SH 3 B G R L 3 発現量を測定することを特徴とする、予後判定方法。

【請求項 2】

生体液中の SH 3 B G R L 3 発現量を、SH 3 B G R L 3 と特異的に結合する抗体を用いて測定することを特徴とする、請求項 1 に記載の予後判定方法。

【請求項 3】

生体液中の SH 3 B G R L 3 発現量を、5 段階に分類して、G l a s g o w Outcome Scale ( G O S ) に基づき、障害の予後を 5 段階に予測することを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の予後判定方法。

【請求項 4】

生体液が脳脊髄液である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の予後判定方法。

【請求項 5】

G O S における、good recovery ( G R ) または moderate disability ( M D ) を予後良好とし、G O S における、severe disability ( S D )、persistent vegetative state ( P V S ) または death ( D ) を予後不良であるとする、心肺停止蘇生 3 ~ 6 ヶ月後の神経学的予後を

、心肺停止蘇生1週間以内の急性期に判定することを特徴とする、請求項3に記載の予後判定方法。

【請求項6】

請求項1～5のいずれかに記載の予後の判定方法に用いるためのキットであって、SH3BGR L3抗体が含まれていることを特徴とする、心肺停止蘇生後を含む急性中枢神経障害患者の予後判定用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、急性中枢神経障害の予後を判定する方法に関し、急性中枢神経障害患者の血液や脳脊髄液などの生体液中に発現しているSH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 3 (SH3BGR L3)を測定するための特異抗体、該抗体を用いた急性中枢神経障害の予後を判定する方法、さらに判定のために利用するキットに関する。

10

【背景技術】

【0002】

近年、急性中枢神経障害患者の増加と、臓器移植の問題が絡まって、急性中枢神経障害患者の予後の判断を科学的に証明できるシステムが切望されてきている。ヒトの死の定義は、生存に最も重要な機能を持つ、心(循環)、肺(呼吸)、脳(中枢)の不可逆的停止とされており、日本では、従来から特に心停止を重視していたが、生命維持装置の発達により心臓が停止していても生きられるようになり、現在は、脳の停止(死)をヒトの死とする考えが一般化しつつある。しかしながら、脳死判定も難しく、深昏睡、瞳孔散大、脳幹反射の消失、脳波の平坦化、自発呼吸停止を脳死としているが、これだけで脳機能が全て不可逆的停止と確認できるかなど問題が多い。

20

【0003】

急性中枢神経障害とは、心肺停止に伴う脳虚血や、心拍再開後の虚血再灌流に伴う急性期の脳障害で、心臓疾患患者に起る心原性のほか、くも膜下出血、低酸素、窒息中毒、溺水、外傷などによる心肺停止が原因としてあげられる。重症急性中枢神経障害では、社会復帰できる患者は数%～30%程度しかなく、これは、早期に病態を把握し、適切な治療を提供することが重要な意味を持つことを表している。従来、頭部画像検査や電気生理学的検査における異常所見、脳血流量や酸素飽和度の低下などから中枢神経障害の診断が行われている。しかしながら、これらの判定方法は、病態や予後を必ずしも反映していない。意識障害に関しては、Glasgow Coma Scale (GCS)という、開眼、言語反応、運動反応の3つについて点数化して表し、点数が低いものほど、意識障害が重いことを示す判定基準はあるが、予後を判定するものではない。また6ヵ月後の患者を対象に予後判定を行うGlasgow Outcome Scale (GOS)は、発症急性期のものでなく、現実的には遅すぎる状況である。

30

【0004】

心筋梗塞の患者について、高危険度あるいは予後不良を判定して、より適切に処置するための方法として、神経ホルモンマーカーであるNT-ProBNP(プロBNPのN末端断片)、虚血マーカーであるトロポニンT、炎症マーカーであるCRP(C-反応性タンパク質)の3種類のマーカーを測定し解析する方法が開示されている(特許文献1)。

40

【0005】

SH3BGR L3は、腫瘍壊死因子感受性細胞に対する腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor : TNF)の細胞溶解活性や細胞増殖抑制活性を阻害するタンパク質として、ヒト線維芽細胞内より見出された(特許文献2)。このタンパク質は、SH3BGR L3として、第1染色体上のp34.3-35に位置する遺伝子であることが明らかにされ、93個のアミノ酸を有することも明らかにされている(非特許文献1)。

【特許文献1】特許第3783002号公報

50

【特許文献2】特開平6 - 256397号公報

【非特許文献1】Mazzocco, M. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 285: 540 - 545, 2001

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

従来、急性中枢神経障害患者の脳障害の予後判定は、6ヶ月後に行われている。しかしながら、適切な治療を行うためには、早期に病態を把握することが必要である。このような状況から、急性中枢神経障害患者の神経学的予後予測のための早期マーカーを検索し、科学的に予後を判定する方法を提供することをその主な課題とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者等は、TNFの細胞溶解活性や細胞増殖抑制活性を阻害するタンパク質として、ヒト線維芽細胞より見出されたSH3BGR L3が、急性中枢神経障害患者の神経学的予後予測のための早期マーカーになり得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明は以下の(1)~(6)を提供する。

【0009】

(1)急性中枢神経障害の予後を判定する方法であって、心肺停止蘇生後48時間以内に採取した患者の生体液中のSH3BGR L3発現量を測定することを特徴とする、予後判定方法。

20

【0010】

(2)生体液中のSH3BGR L3発現量を、SH3BGR L3と特異的に結合する抗体を用いて測定することを特徴とする、上記(1)に記載の予後判定方法。

【0011】

(3)生体液中のSH3BGR L3発現量を、5段階に分類して、GOSに基づき、障害の予後を5段階に予測することを特徴とする、上記(1)または(2)に記載の予後判定方法。

【0012】

(4)生体液が脳脊髄液である、上記(1)~(3)のいずれかに記載の予後判定方法。

30

【0013】

(5)GOSにおけるgood recovery (GR)またはmoderate disability (MD)を予後良好とし、GOSにおけるsevere disability (SD)、persistent vegetative state (PVS)またはdeath (D)を予後不良であるとする、心肺停止蘇生3~6ヶ月後の神経学的予後を、心肺停止蘇生1週間以内の急性期に判定することを特徴とする、上記(3)に記載の予後判定方法。

【0018】

(6)上記(1)~(5)のいずれかに記載の予後の判定方法に用いるためのキットであって、SH3BGR L3抗体が含まれていることを特徴とする、心肺停止蘇生後を含む急性中枢神経障害患者の予後判定用キット。

40

【発明の効果】

【0020】

本発明により、急性中枢神経障害患者のその後の日常生活での介助の必要性や社会復帰の可能性を含めた神経学的予後予測が早期に可能となるため、予後良好な患者には適切な治療を行うことができ、早期の社会復帰が可能となる。あるいは、移植医療が抱える問題点であるドナーの脳死判定の科学的根拠の1つとなり得るため、今後の臓器移植問題の解決に大きな貢献をすることができる。

【0021】

〔発明の実施の形態〕

50

本発明は、急性中枢神経障害の予後を判定する方法であって、心肺停止蘇生後48時間以内に採取した患者の生体液中のSH3BGR L3発現量を測定することを特徴とする、予後判定方法を提供する。

SH3BGR L3の遺伝子に関する情報は、ヒトSH3BGR L3として公知であり、米国国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI: National Center for Biotechnology Information)の遺伝子データベースにおいて、アクセッションナンバーNM\_031286として塩基配列が登録されており、そのアミノ酸配列は、アクセッションナンバーNP\_112576として登録されている。ヒトSH3BGR L3は、第1染色体上のp34.3-35に位置する遺伝子であり、グルタレドキシン(GRX)ファミリーに属する配列番号1に示す93個のアミノ酸からなる低分子量のタンパク質である。そして、tumor necrosis factor inhibitory protein (TIP-B1)と同じアミノ酸配列を有する(Xu, C. et al. FEBS Letters 579: 2788-2794, 2005)。

10

#### 【0022】

本発明者らは、生命現象に関するプロテオーム研究を行っており、その中で、心肺停止蘇生後の急性中枢神経障害患者の生体液中に存在するタンパク質を見出した。

#### 【0023】

プロテオーム研究では、大規模タンパク質の解析が重要な課題である。その解決のために、ナノフロー液体クロマトグラフィーと質量分析装置が直結された機器が良く用いられている。本発明に関する特異タンパク質も、前記機器による分離・解析手法により見出したものである。ナノフロー液体クロマトグラフィーは、微小なカラム(例えば、内径100~200 $\mu$ mで、かつ出口の内径が0.2~0.5 $\mu$ mと細くなっているもの)に、1~5 $\mu$ mのビーズを充填したものを使用することが望ましい。例えば市販されている装置として、全自動ナノフロー液体クロマトグラフィー(ナノ・ソリューション社製)がある。カラムから溶出させる速度は、10~200nl/minが好ましいが、より好ましくは、30~100nl/minである。この流速は、目的とするタンパク質や、カラムに充填するビーズの種類、また溶出液により最適な条件にすることが望ましい。

20

#### 【0024】

溶出したペプチドは、直結した質量分析装置により逐次連続的に検出する。質量分析装置では、タンパク質の種類と各タンパク質の発現量を、試料ごとに比較することができる。例えば、急性中枢神経障害患者と健常者の生体液中のタンパク質のパターンを比較して、患者にしか見られないタンパク質や、発現量に大きな差があるタンパク質を検出することが可能である。

30

#### 【0025】

急性中枢神経障害患者の生体液中に特異的に発現するタンパク質群からは、予後予測のバイオマーカーを選択することができる。バイオマーカーの生体液中の発現量の測定は、該バイオマーカーに特異的に結合する抗体を用いる免疫学的手法が望ましいと考えられる。バイオマーカーのひとつであるSH3BGR L3の生体液中の発現量は、SH3BGR L3の抗原決定部位のアミノ酸配列を基に作製したペプチドを用い、当該ペプチドに特異的に結合する抗体を作製し、当該抗体と生体液中のSH3BGR L3の結合体を、免疫学的手法により測定することにより行うことができる。免疫原とするペプチドは、少なくとも8アミノ酸以上、好ましくは10アミノ酸以上のアミノ酸配列からなる。

40

#### 【0026】

抗体を作製するためのペプチドは、例えば、配列番号2のアミノ酸配列、あるいは配列番号3のアミノ酸配列を有する。前記配列において、1又は複数個のアミノ酸残基が欠失、置換または付加されたペプチドであってもよい。このような変異体は、配列表の配列番号2または配列番号3に記載のアミノ酸配列と、少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する。

#### 【0027】

50

本発明の抗体は、上記ペプチドを認識する抗体であり、生体液中のSH3BGR L3と特異的に結合し、SH3BGR L3を測定することができる抗体である。

【0028】

本発明の抗体は、公知の方法を用いて作製することができる。かかる抗体は、一般的な抗血清から得られるポリクローナル抗体、ハイブリドーマを利用して作製されるモノクローナル抗体、あるいは、遺伝子組み換え技術やタンパク質発現技術を利用して得た抗体のいずれであってもよい。遺伝子組み換え技術やタンパク質発現技術を利用して得る抗体は、以下の方法で作製することができる。すなわち、免疫した動物からリンパ球を得て、リンパ球中のmRNAを鋳型としてcDNAを調製し、該cDNAを増幅して適切なベクターに挿入したものを、大腸菌などに組み込んで抗体タンパク質を発現させて作製する方法である。また、SH3BGR L3を認識する特性を失わない限り、低分子化抗体や、修飾された抗体などの抗体フラグメント、ファージディスプレイなどの遺伝子組み換え技術や試験管内での無細胞系タンパク質発現技術などを利用して人工的に作製した抗体であってもよい。

10

【0029】

本発明の抗体は、上記ペプチドを、必要に応じて適当なアジュバントを用いて、動物の皮下あるいは腹腔内に投与して感作し、感作した動物から血液を採取し、この血液から公知の方法により血清を分離して得られる。免疫に使用する動物としては、ウサギ、ラット、マウス、サル、ヒツジ、ニワトリなどの哺乳類や鳥類等が例示されるが、その他の動物を用いても良く、特に限定されるものではない。抗体として、分離した血清をそのまま抗SH3BGR L3血清として使用することができるが、さらに、分離した血清を、SH3BGR L3の抗原決定部位を含むペプチドを固定化したカラムに、特異抗体を吸着させ単離するAffinity法で精製して得ることもできる。

20

【0030】

本発明は、SH3BGR L3に特異的に結合する抗体を用いて、生体液中のSH3BGR L3発現量を測定するものであるが、測定方法は、公知のタンパク質の測定方法に従って行うことができる。例えば、ウェスタンブロッティング法、ドットブロット法や、免疫沈降法、酵素免疫測定法（EIA：enzyme-immuno assay、ELISA：enzyme-linked immunosorbent assay）、放射線免疫測定法（RIA：radio-immuno assay）、蛍光抗体法（FIA：fluorescent immuno assay）、免疫細胞染色等の免疫学的測定法が挙げられる。

30

【0031】

上記測定法においては、SH3BGR L3と特異的に結合する抗体やそれを認識する二次抗体を検出可能な物質で標識して行う。直接的に検出が可能な標識としては、放射性同位体やFITC、ローダミン等の蛍光標識、間接的に検出を行う標識としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ（POD）、アルカリホスファターゼ（ALP）等の酵素標識、ビオチン、アビジン等のアフィニティー標識、オリゴヌクレオチド等があげられる。標識の間接的検出には標識酵素の反応を利用した発色法、Enhanced Chemi Luminescence（ECL）による化学発光法、ポリメラーゼ連鎖反応などの核酸増幅法などがあげられる。そのような標識法、および検出法は組み合わせても良く、標識、および検出を行う方法は、すでによく知られている方法で行うことができる。

40

【0032】

本発明の方法は、急性中枢神経障害患者から採取された試料においてSH3BGR L3発現量を測定する工程を含む。試料として用いる生体液は、血液、尿、脳脊髄液、リンパ液、唾液、汗等があげられる。採取した試料は、早急に冷凍あるいは低温保存することが望ましい。

本発明において「予後を判定する」とは、「心肺停止蘇生後から患者治療計画における所定の期間の予後を示す」と言い換えることもできる。

【0033】

50

急性中枢神経障害患者の神経学的予後判定は、心肺停止蘇生1週間以内、好ましくは48時間以内の生体液を採取して、該採取試料中のSH3BGR L3発現量を測定した結果をもとに行う。本発明の予後判定方法においては、心肺停止蘇生1週間以内、好ましくは48時間以内に採取された生体液をもとに判定が行われれば、最終的な神経学的予後判定結果を出すまでの期間は特に限定されないが、心肺停止蘇生後1週間以内の急性期に行われることが好ましい。

本発明の方法によって判定される予後とは、心肺停止蘇生後の3～12ヵ月後の患者の状態をいい、最も適切には6ヶ月後の患者の状態である。本発明において患者の状態とは、脳障害の後遺症の状態を示す。

本発明の予後判定は、本発明のSH3BGR L3発現量の測定に加え、医師が他の臨床所見を含め総合的に予後判定結果を出すことを含んでもよい。

#### 【0034】

判定のための評価は、生体液中のSH3BGR L3発現量で行う。SH3BGR L3発現量をGOSという脳障害の後遺症分類に対応させて、予後判定を行うことが有効である。GOSとは脳障害の後遺症を簡潔に表現する方法として、1975年、Jennett, B.ら(Jennett, B., Lancet 1:480, 1975)によって提唱された。脳障害の後遺症を客観的に評価するには、身体的、精神的、リハビリテーション、家庭および社会の受け入れなど多くの要素が関連するため、詳細な分け方ではなく、実行可能な評価の方法がとられていることが特徴である。表1のごとく5段階に分類されるが、本発明では、急性中枢神経障害患者について、GOSがGRとMDの状態を予後良好とし、GOSがSD、PVS、Dの状態を予後不良としている。

本発明の方法において具体的には、患者生体液中のSH3BGR L3発現量を1～5段階に分類し、発現量に応じてGOSの各分類と対応させることができる。本発明においては、SH3BGR L3発現量が多い場合には急性中枢神経障害の後遺症がより重症であり、予後が不良であると判定できる。本発明の判定においてより好ましくは、SH3BGR L3発現量の測定において、SH3BGR L3が検出される場合には予後不良、SH3BGR L3が検出されない場合には予後良好であると判定することができる。

#### 【0035】

##### 【表1】

分 類		定 義
death (D)	死亡	急性期の他の臓器障害による死亡は除外
persistent vegetative state (PVS)	植物状態	開眼、覚醒・睡眠周期は残存、大脳皮質機能の喪失
severe disability (SD)	高度障害	意識はあるが日常生活を他人に依存
moderate disability (MD)	中等度障害	他人に依存しない生活。ある程度の片麻痺、運動失調、知力障害、記憶障害、人格の変化は許容
good recovery (GR)	予後良好	軽度の神経学的、精神的障害は許容

被験者がヒトである場合、疾患の診断は、通常、医師（医師の指示を受けた者も含む。以下同じ。）によって行われるが、本発明の検査方法によって得られるSH3BGR L3

発現量に関するデータは、医師による診断に役立つものである。よって、本発明の検査方法は、医師による診断に役立つデータを収集し、提示する方法とも表現しうる。

【0036】

本発明は、SH3BGR L3発現量を測定するための試薬を含む、急性中枢神経障害の予後を判定するための検出試薬に関する。このような検出試薬には、上記に記載のSH3BGR L3量の測定工程に使用されるものを含みうる。例えば、SH3BGR L3量の測定に必要とされる抗体、染色液等を挙げることができる。

さらに、本発明の判定方法の基準となるSH3BGR L3発現量測定のための試薬を、その他の要素と予め組み合わせることもできる。該キットには、特異抗体のほか、固定化担体、標識物質、標識の検出に用いられる基質化合物、その他、蒸留水、塩、緩衝液、タンパク質安定剤、保存剤等を含めることもできる。さらに、測定操作を説明するための指示書をキットに添付することもできる。

10

【0037】

本発明者らは、SH3BGR L3などのタンパク質が、予後不良の急性中枢神経障害患者の生体液中に特異的に発現することを明らかにしている。これらの知見から、特異タンパク質の発現を抑制する物質など、治療・創薬のターゲットとすることも可能である。

【0038】

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

20

【0039】

【図1】SH3BGR L3タンパク質由来ペプチドの質量スペクトルを示す図面である。

【図2】cDNA配列より予想されるSH3BGR L3タンパク質のアミノ酸配列と2ヶ所の抗原部位を示す図面である。なお、ヒト配列(NP\_\_112576, NM\_\_031286、配列番号：1)、マウス配列(NP\_\_542126, NM\_\_080559、配列番号：4)、ラット配列(NP\_\_001100158, NM\_\_001106688、配列番号：5)である。

【図3】免疫後のウサギ由来抗血清の抗体価のグラフを示す図面である。

【図4】アフィニティー精製後の抗SH3BGR L3 IgGの抗体価のグラフを示す図面である。

30

【図5】抗SH3BGR L3抗血清を使用した患者脳脊髄液試料のウエスタンブロッティングを示した図面に代わる写真である。分子量24kDaのSH3BGR L3タンパク質(矢印)が予後不良患者検体にのみ特異的に検出されていることを表す。

【実施例1】

【0040】

以下、本発明を更に詳しく説明するため、実施例を挙げるが本発明はこれに限定されない。

【0041】

<急性中枢神経障害患者検体のタンパク質解析>

【0042】

40

試料：心肺蘇生患者脳脊髄液検体は、蘇生後48時間に採取されたものを用いた。コントロール脳脊髄液検体は、神経学的健常者の腰椎麻酔時に採取されたものを用いた。

【0043】

試料調製：脳脊髄液に4倍量の冷アセトンを加え、沈殿したタンパク質を遠心分離により回収した。減圧乾燥後、沈殿を、8M尿素を含む0.1Mトリス-塩酸緩衝液に溶解し、2mMジチオトレイトールにより室温で1時間還元、さらに5mMヨードアセトアミドにより室温で1時間アルキル化した。反応液を水で4倍に希釈し、ブタ由来トリプシン(酵素-基質比1対50)にて37度で16時間消化した。

【0044】

ナノフロー液体クロマトグラフィー・質量分析：酵素消化物中のペプチドの分離と精密質

50

量測定は全自動ナノフロー液体クロマトグラフィー（ナノ・ソリューション社製）とQ-t o f 質量分析装置（マイクロマス社製）よりなるタンパク質解析システムにより行った。ペプチドの分離は内径150 μm、長さ50 mmのフューズドシリカキャピラリーにオクタドシルシリカビーズ（M i g h t y s i l - C 1 8、関東化学）を充填した逆相カラムを使用し、試料を負荷後、0.1%ギ酸を含む溶離液（流速100 n l / m i n）にてアセトニトリル濃度を0%から80%まで上昇させて行った。溶出されたペプチドはオンラインでQ-t o f 質量分析装置に導入され、親イオンおよび内部断片イオンの精密質量を測定した。

【0045】

配列データベース検索およびタンパク質同定：得られた質量データは配列検索ソフトウェアM A S C O T（マトリックスサイエンス社製）を利用してアミノ酸配列データベース（R e f S e q h u m a n、米国N C B I）に対して検索を行い、95%以上の信頼性をともなってペプチド配列が決定された検索結果のみをタンパク質へ帰属し同定リストを作成した。コントロール、予後良好、および予後不良患者試料からのリストを比較し、同定タンパク質を三者に共通して同定されたタンパク質群（グループI）、いずれかの二者で共通して同定されたタンパク質群（グループII）、各者に特異的に同定されたタンパク質群（グループIII）の3つに分類し、グループIIIで予後不良患者に特異的な同定タンパク質を中枢神経障害マーカー候補タンパク質とした。

【0046】

<結果1>

質量分析を利用した脳脊髄液試料のタンパク質解析から、予後不良特異的タンパク質のひとつとして、配列番号1に示すアミノ酸配列を有するS H 3 B G R L 3タンパク質が同定された（図1）。

【実施例2】

【0047】

<SH3BGR L3抗血清の作製>

【0048】

抗原作製：遺伝子配列（M a z z o c c o , M . e t a l . B i o c h e m . B i o p h y s . R e s . C o m m u n . 2 8 5 : 5 4 0 - 5 4 5 , 2 0 0 1 : 非特許文献1）から予想されるヒトS H 3 B G R L 3タンパク質（全長93アミノ酸残基：配列番号1）の部分配列（A r g <sub>51</sub> - I l e <sub>64</sub>：配列番号2、およびS e r <sub>8</sub> - G l n <sub>21</sub>：配列番号3）を含む以下の2種類のペプチドを合成、リンカーを介してキャリアタンパク質K L H（K e y h o l e l i m p e t h e m o c y a n i n）に共有結合後、混合し免疫原とした（図2）。

ペプチド1：（C y s）- S e r <sub>8</sub> - T h r - S e r - V a l - T h r - G l y - S e r - A r g - G l u - I l e - L y s - S e r - G l n - G l n <sub>21</sub>

ペプチド2：A r g <sub>51</sub> - A l a - L e u - A l a - G l y - A s n - P r o - L y s - A l a - T h r - P r o - P r o - G l n - I l e <sub>64</sub> -（C y s）

上記（C y s）は、キャリア結合用システインを表す。

【0049】

免疫方法：K L H結合ペプチド（各ペプチド200 μg相当、合計400 μg / 回1羽）400 μlとアジュバント400 μl（初回；F r e u n d c o m p l e t e a d j u v a n t , 2回目以降；F r e u n d i n c o m p l e t e a d j u v a n t）をまぜ、エマルジョンにして、ウサギ（J a p a n e s e W h i t e（日本白色種）14~20週齢（3kg前後）雌2羽）の背部皮内に20~30箇所免疫した。免疫スケジュールは、第1週に免疫前チェック採血を行い1回目の免疫、次いで、第3週に2回目の免疫、第4週に3回目の免疫、第6週に4回目の免疫、第7週に5回目の免疫、第8週にチェック採血、力価確認後、6回目の免疫を行った。第10週に、血清分離剤の入ったカルチャーチューブに全採血を行い、遠心分離して血清を得た。

【0050】

10

20

30

40

50



抗血清力価確認：ELISA法による（5回免疫後チェック採血時、および全採血時に実施）。ペプチドをリン酸緩衝液（PBS）で $1\mu\text{g}/\text{ml}$ （各 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ ）に希釈後、感作用プレートに $100\mu\text{l}/\text{well}$ で分注し、4 一晚静置した。感作後、抗原溶液を除去し、PBSで1回洗浄後、ブロッキング溶液（MBL製）を $200\mu\text{l}/\text{well}$ で分注し、4 一晚静置する。免疫前ウサギ血清と免疫後のウサギ抗血清の希釈系列を100倍、500倍、2500倍、12500倍、62500倍、blankとし、PBSで希釈したものを $100\mu\text{l}/\text{well}$ で加え、25 で60分間反応させた。洗浄後、抗ウサギIgG-POD標識（MBL製品）を希釈緩衝液（MBL製）で8,000倍希釈したものを $100\mu\text{l}/\text{well}$ で加え、25 で60分間反応させた。洗浄後、発色液（MBL製）を $100\mu\text{l}/\text{well}$ で加え3～10分間発色させ、2N硫酸を1000 $\mu\text{l}/\text{well}$ で加え、反応を停止した。反応停止後、測定波長450nm、参照波長620nmで吸光度を測定した。

【0051】

<結果2>

2羽のウサギ由来抗血清の抗体価のグラフを図3に示したが、免疫前のウサギ血清と比較して十分に高い抗体価を有する抗体であることが分かる。

【実施例3】

【0052】

<抗SH3BGR L3特異抗体の作製>

【0053】

抗原ペプチド固定化カラムの作製：SulfoLink Kit（PIERCE社製）を使用した。ゲル2mlをカラムに充填し、8mlのカップリング緩衝液で洗浄した。抗原ペプチド各1mg、計2mgをカップリング緩衝液2mlに溶解後、カラムへ負荷し、室温で15分間、ローテーターで攪拌した。さらに室温で30分間の静置後、カラムを8mlのカップリング緩衝液にて洗浄した。続いて2mlのシステイン（ $7.9\text{mg}/\text{ml}$ ）をカラムに負荷し、室温で15分間、ローテーターで攪拌した。さらにカラムを室温で30分間静置し、6mlの洗浄用緩衝液にて洗浄後、アフィニティー吸着用緩衝液に置換し、4 で保存した。固定化反応効率は反応前後のペプチド溶液中のSH基をエルマン試薬により定量し確認した。

【0054】

特異抗体の精製：カラムをPBSで平衡化し、ウサギNo.02の抗血清10mlを負荷した。カラムをPBSで洗浄後、カラム体積の4倍量の0.1Mグリシン-塩酸（pH2.3）により抗体を溶出した。溶出した抗体は、氷上で速やかに1Mトリス-塩酸（pH8.0）で中和した。抗体を含む画分を50% グリセロール/PBSに対して透析し、抗SH3BGR L3特異抗体とした。

【0055】

精製特異抗体の力価確認：ELISA法による。すなわち、ペプチドをPBSで $1\mu\text{g}/\text{ml}$ （各 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ ）に希釈後、感作用プレートに $100\mu\text{l}/\text{well}$ で分注し、4 一晚静置した。感作後、抗原溶液を除去し、PBSで1回洗浄後、Blocking Buffer（MBL製）を $200\mu\text{l}/\text{well}$ で分注し、4 一晚静置した。正常ウサギIgGと精製ウサギIgGの希釈系列を $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.4\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.08\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.016\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ブランクとし、PBSで希釈したものを $100\mu\text{l}/\text{well}$ で加え、25 で60分間反応させた。洗浄後、抗ウサギIgG-POD標識（MBL製品）を希釈緩衝液（MBL製）で8,000倍希釈したものを $100\mu\text{l}/\text{well}$ で加え、25 で60分間反応させた。洗浄後、発色液（MBL製）を $100\mu\text{l}/\text{well}$ で加え3～10分間発色させ、2N硫酸を $100\mu\text{l}/\text{well}$ で加え、反応を停止した。反応停止後、測定波長450nm、参照波長620nmで吸光度を測定した。

【0056】

<結果3>

アフィニティー精製により、高い抗体価を有する I g G の抗体が得られたことが、図 4 のグラフから明らかである。

【実施例 4】

【0057】

<患者脳脊髄液のウエスタンブロッティング>

【0058】

ウエスタンブロッティング：脳脊髄液試料は等量の試料調製液（4% SDS, 10% 2-メルカプトエタノール、20%グリセロール、0.2% プロモフェノールブルー）と混合し、100、3分間加熱処理をした。分離には10%ポリアクリルアミドゲルを使用し、1検体あたり、2~5μlの試料を負荷後、0.1% SDSを含む25mMトリス-192mMグリシン緩衝液（pH 8.3）中で20mAで90分間電気泳動した。泳動後のゲルを転写装置に移し、20%メタノールを含む25mMトリス-192mMグリシン緩衝液（pH 8.3）で平衡化したポリビニリデンジフルオライド（PVDF）膜に50mAで90分間電気泳動的に転写した。

10

【0059】

抗体染色：転写後のPVDF膜は5%スキムミルクを含む緩衝液（TBS-T：10mM トリス-塩酸（pH 7.4）、150mM塩化ナトリウム、0.1% Tween 20）中で4〜晩ブロッッキングした。膜をTBS-Tで洗浄後、1/500に希釈した抗SH3BGR L3抗血清あるいは特異抗体を添加し、室温で1時間インキュベーション、さらにTBS-Tで洗浄後、1/2000に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体を添加し、室温で1時間インキュベーションした。SH3BGR L3タンパク質の視覚化は化学発光試薬（ECL Plus、GEヘルスサイエンス社製）を膜に添加し、X線フィルムに感光することで行った。

20

【0060】

<結果 4>

抗SH3BGR L3抗血清を使用した患者脳脊髄液試料のウエスタンブロッティングで分子量24kDa（未特定の翻訳後修飾を含む）のSH3BGR L3タンパク質が予後不良患者検体にのみに特異的に検出された（図5）。

SH3BGR L3発現と各患者の症状との関係は以下の通りである。

正常コントロール患者脳脊髄液	ウエスタンプロット陽性	0例 / 9例中
予後良好群患者脳脊髄液	ウエスタンプロット陽性	1例 / 5例中
予後不良群患者脳脊髄液	ウエスタンプロット陽性	6例 / 7例中

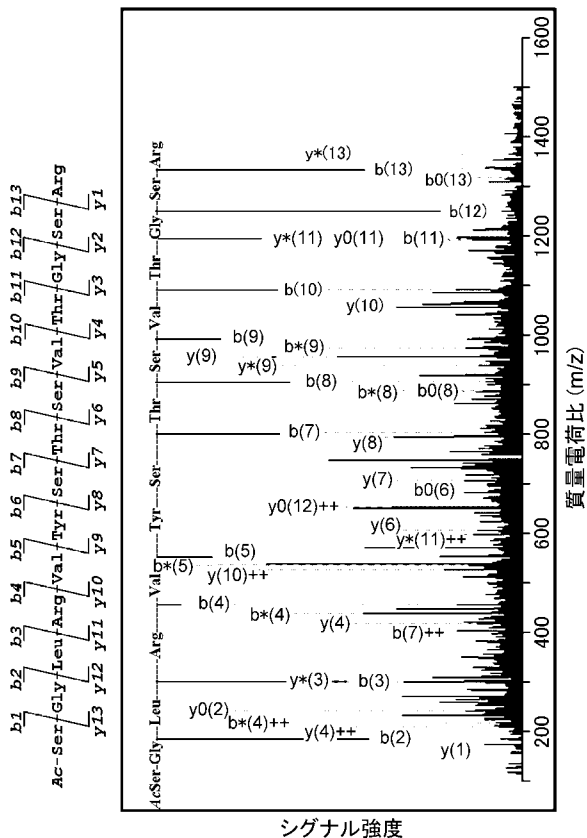
30

【産業上の利用可能性】

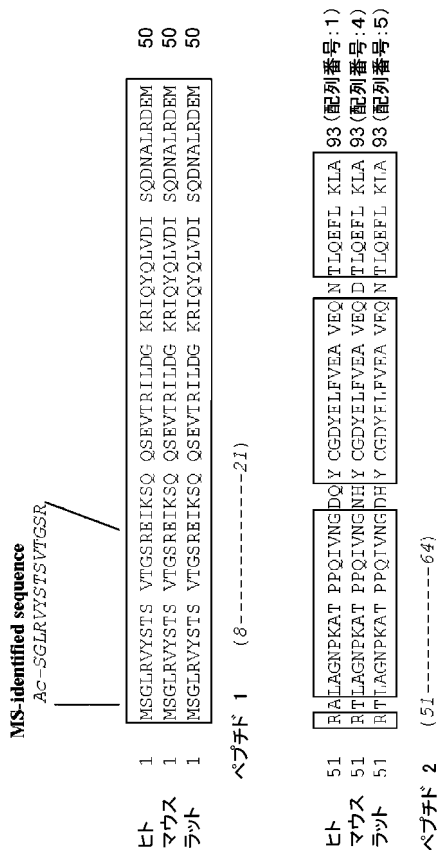
【0061】

本発明により、早期に、急性中枢神経障害患者の神経学的予後予測が可能となり、予後良好の判定が得られた患者には適切な治療を行うことにより、社会復帰の可能を高めることができる。あるいは、予後不良の判定となった患者については、移植医療が抱える問題点であるドナーの脳死判定の科学的根拠の1つとなり得るため、臓器移植提供の協力要請を早期に行うことができる。

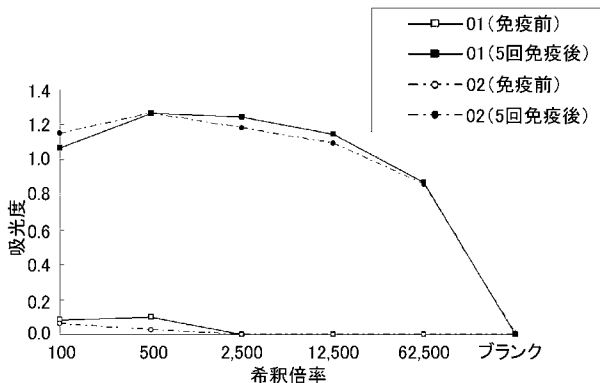
【 図 1 】



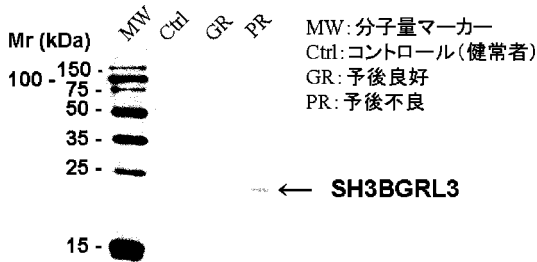
【 図 2 】



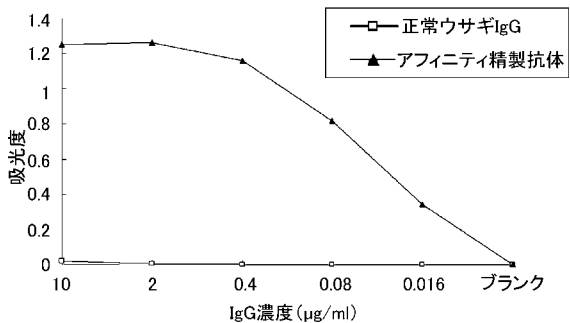
【 図 3 】



【 図 5 】



【 図 4 】



【配列表】

000555846000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
A 6 1 P 25/28 (2006.01) A 6 1 P 25/28  
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08

(72)発明者 秋吉 祐樹  
東京都中央区明石町 8 番 1 号 聖路加タワー 1 2 階 株式会社ナノ・ソリューション内

審査官 三木 隆

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 5 / 0 1 4 6 2 2 ( W O , A 1 )  
XU Chao, NMR structure and regulated expression in APL cell of humanSH3BGRL3, FEBS Lett, 2005, Vol.579, No.13, Page.2788-2794  
小田泰崇, 心肺停止蘇生後患者における脳脊髄液の病態プロテオーム解析:神経学的予後予測マーカー群の同定, 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,Page.3P-0113 3T8-2

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G 0 1 N 3 3 / 5 3  
A 6 1 K 4 5 / 0 0  
A 6 1 P 2 5 / 2 8  
A 6 1 P 4 3 / 0 0  
C 0 7 K 1 6 / 1 8  
C 1 2 N 1 5 / 0 2  
C 1 2 P 2 1 / 0 8  
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S ( S T N )  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )