

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02017/142055

発行日 平成30年12月20日 (2018.12.20)

(43) 国際公開日 平成29年8月24日 (2017.8.24)

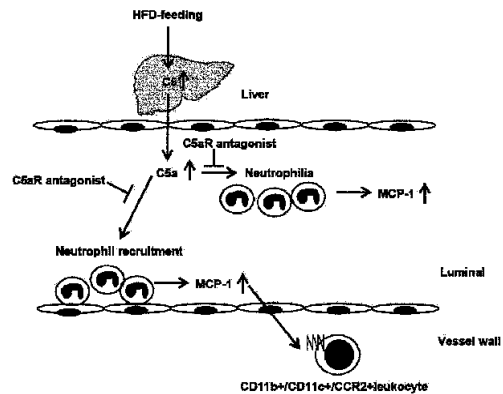
(51) Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	Z N A R 2 G O 4 5
GO 1 N 33/68	(2006.01)	GO 1 N 33/68	4 C O 8 4
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁)			

出願番号 特願2018-500219 (P2018-500219)	(71) 出願人 504179255 国立大学法人 東京医科歯科大学 東京都文京区湯島 1-5-4 5
(21) 国際出願番号 PCT/JP2017/005836	(74) 代理人 100106297 弁理士 伊藤 克博
(22) 国際出願日 平成29年2月17日 (2017.2.17)	(74) 代理人 100130845 弁理士 渡邊 伸一
(31) 優先権主張番号 特願2016-27867 (P2016-27867)	(72) 発明者 吉田 雅幸 東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立 大学法人東京医科歯科大学内
(32) 優先日 平成28年2月17日 (2016.2.17)	(72) 発明者 大坂 瑞子 東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立 大学法人東京医科歯科大学内
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	Fターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 DA36 FB03
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 動脈硬化性疾患の発症の予測因子および検査方法

(57) 【要約】

本発明は、動脈硬化性疾患の診断マーカーおよび発症リスクの評価方法を提供する。より具体的には、動脈硬化性疾患の診断マーカーとして、血液試料中におけるC5aタンパク質を採用し、被検者から得た血液試料中におけるC5aタンパク質の量をインビトロで測定する工程、およびC5aタンパク質の量を指標にして被検者における動脈硬化症または血管炎症の発症リスクを評価する工程を含む、動脈硬化性疾患の発症リスクを評価する方法を提供する。この方法は、動脈硬化性疾患の発症リスクを極めて早期の段階で評価する上で有用である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

動脈硬化性疾患の発症リスクを評価する方法であって、
被検者から得た血液試料中における C 5 a タンパク質の量をインビトロで測定する工程、および

C 5 a タンパク質の量を指標にして被検者における動脈硬化性疾患の発症リスクを評価する工程

を含み、

前記被検者が、基準値と比較して統計学的に有意に増加していない血中濃度の 1 または複数の因子を有し、該因子が TNF - α 、IL - 1 α 、IL - 1 β 、IL - 7 および IL - 11 から成る群より選択される 1 または複数の因子であり、

前記 C 5 a タンパク質の量の測定値が基準値と比較して統計学的に有意に大きいとき、前記被検者における動脈硬化性疾患の発症リスクが高いと決定する、方法。

【請求項 2】

前記被検者が 75 歳以上である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記被検者においてプラークが未形成または未発達である、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

動脈硬化性疾患が、アテローム性動脈硬化症、閉塞性動脈硬化症、心筋梗塞、脳梗塞、脳卒中、狭心症、脳血栓、脳出血、または腎不全である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記 C 5 a タンパク質が配列番号 1 に示される配列を有するポリペプチドまたはその変異体もしくは断片である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記測定が C 5 a タンパク質と特異的に結合可能な物質を用いて行われる、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記結合可能な物質が抗体である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記血液試料が血清、血漿、または全血である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

抗 C 5 a 抗体、その断片、および / またはそれらの化学修飾誘導体を含む、動脈硬化性疾患の発症リスクの評価用キット。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法に使用するためのものである、請求項 9 に記載のキット。

【請求項 11】

前記抗体、断片または化学修飾誘導体が固相担体に結合されている、請求項 9 または 10 に記載のキット。

【請求項 12】

前記固相担体が検査用ストリップ、プラスチックチューブ、マイクロプレート、またはガラスビーズである、請求項 11 に記載のキット。

【請求項 13】

動脈硬化性疾患の治療または予防に用いるための組成物であって、有効成分として C 5 a タンパク質と C 5 a 受容体との結合を阻害する物質を含む、組成物。

【請求項 14】

前記 C 5 a タンパク質と C 5 a 受容体との結合を阻害する物質が C 5 a 受容体アンタゴ

10

20

30

40

50

ニストである、請求項 1 3 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本願は、特願 2016 - 27867 号（出願日：2016 年 2 月 17 日）の優先権の利益を享受する出願であり、これは引用することによりその全体が本明細書に取り込まれる。

【技術分野】

【0002】

本発明は、動脈硬化性疾患の発症リスクを評価するための方法およびキットに関する。より具体的には、血液中における C5 a タンパク質の量を測定することにより、動脈硬化性疾患の発症リスクを評価するための方法およびキットに関する。また、本発明は、C5 a タンパク質の活性を抑制する物質を含有する、動脈硬化性疾患の治療または予防に用いるための組成物にも関する。

10

【背景技術】

【0003】

動脈硬化症は、致命的な心筋梗塞や脳梗塞の原因ともなる重大な疾患である。動脈硬化症は、高血圧・脂質異常症・糖尿病といった生活習慣病の基盤病態であり、生活の質を損ない、しばしば致命的となる。全身における動脈硬化のモニター方法として、MRI（大脳白質病変）、血管エコー（頸動脈内膜中膜複合体肥厚）、脈波伝播速度（PWV）測定等が知られているが、これらから動脈硬化性疾患の発症を初期に予測することは難しい（非特許文献 1）。

20

【0004】

従来、血中の LDL や HDL 等のリポタンパク質がアテローム性動脈硬化の発症に関連することが知られている（非特許文献 2）。また、炎症マーカーである CRP、IL-5 やその他の分子が閉塞性動脈硬化症や冠状動脈硬化症と関連することが報告されている（特許文献 1、非特許文献 3）。また、過剰な脂質摂取は動脈硬化症の発症に関与するといわれ、血中のコレステロール値が高いと動脈硬化症・心筋梗塞のリスクが高まることが知られている（非特許文献 4）。しかしながら、現在のところ信頼性の高い動脈硬化症の初期マーカーは存在しておらず、そのような病初期マーカーに対するニーズが存在している。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献 1】W02012/067165

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】London GM et al., Arterial functions: how to interpret the complex physiology. *Nephrol Dial Transplant*. 25(12):3815-23. 2010.

【非特許文献 2】Babiak J. et al., Lipoproteins and atherosclerosis. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1(3):515-50. 1987.

40

【非特許文献 3】Ait-Oufella H et al., Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 31(5):969-79. 2011.

【非特許文献 4】Martin SS et al., Dyslipidemia, coronary artery calcium, and incident atherosclerotic cardiovascular disease: implications for statin therapy from the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circulation*. 129(1):77-86. 2014.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、動脈硬化性疾患の発症リスクを評価するための方法およびキットを提供する

50

ことを目的の一つとする。また、本発明の別の目的としては、動脈硬化性疾患の治療または予防に用いるための組成物を提供することが含まれる。

【課題を解決するための手段】

【0008】

発明者らは、補体成分 C5a が動脈硬化症発症前の血管炎症が起こる前より血液中で上昇することを見出した。C5a の上昇により好中球が活性化し、血管内膜への好中球接着と白血球集積が誘導され、さらに、ほかの炎症性因子 (MCP-1 など) の増加が招かれる。また、C5a を抑制することで好中球接着と白血球集積、炎症性因子の発現は減弱することが確認された。この C5a の上昇は他の炎症性因子やマーカーの上昇に先んじて起こり、発症前に特異的であることから、従来の検査法に比べ、より早期の段階において利用可能な、動脈硬化症および血管炎症発症リスクの予測因子として有用となることが当業者には理解される。また、動脈硬化症の発症前またはその極めて初期の時点で血中に存在する C5a の活性を抑制することで、動脈硬化症を治療または予防しうることにも当業者には理解される。本発明は、これらの知見を基礎とするものであり、より具体的には、以下の事項に関する。

10

【0009】

[1] 動脈硬化性疾患の発症リスクを評価する方法であって、被検者から得た血液試料中における C5a タンパク質の量をインビトロで測定する工程、および C5a タンパク質の量を指標にして被検者における動脈硬化性疾患の発症リスクを評価する工程を含む、方法。

20

[2] 前記 C5a タンパク質の量の測定値が基準値と比較して統計学的に有意に大きいとき、前記被検者における動脈硬化性疾患の発症リスクが高いと決定する、[1]に記載の方法。

[3] 前記被検者が、基準値と比較して統計学的に有意に増加していない血中濃度の 1 または複数の因子を有し、該因子が TNF- α 、IL-1 β 、IL-1 α 、IL-7 および IL-11 から成る群より選択される 1 または複数の因子である、[1] または [2] に記載の方法。

[4] 動脈硬化性疾患が、アテローム性動脈硬化症、閉塞性動脈硬化症、心筋梗塞、脳梗塞、脳卒中、狭心症、脳血栓、脳出血、または腎不全である、[1] ~ [3] のいずれか一項に記載の方法。

30

[5] 前記 C5a タンパク質が配列番号 1 に示される配列を有するポリペプチドまたはその変異体もしくは断片である、[1] ~ [4] のいずれか一項に記載の方法。

[6] 前記測定が C5a タンパク質と特異的に結合可能な物質を用いて行われる、[1] ~ [5] のいずれか一項に記載の方法。

[7] 前記結合可能な物質が抗体である、[6] に記載の方法。

[8] 前記血液試料が血清、血漿、または全血である、[1] ~ [7] のいずれか一項に記載の方法。

[9] 抗 C5a 抗体、その断片、および / またはそれらの化学修飾誘導体を含む、動脈硬化性疾患の発症リスクの評価用キット。

[10] [1] ~ [8] のいずれか一項に記載の方法に使用するためのものである、[9] に記載のキット。

40

[11] 前記抗体、断片または化学修飾誘導体が固相担体に結合されている、[9] または [10] に記載のキット。

[12] 前記固相担体が検査用ストリップ、プラスチックチューブ、マイクロプレート、またはガラスビーズである、[11] に記載のキット。

[13] 動脈硬化性疾患の治療または予防に用いるための組成物であって、有効成分として C5a タンパク質と C5a 受容体との結合を阻害する物質を含む、組成物。

[14] 前記 C5a タンパク質と C5a 受容体との結合を阻害する物質が C5a 受容体アンタゴニストである、[13] に記載の組成物。

[15] 前記被検者が 75 歳以上である、[1] ~ [8] のいずれか一項に記載の方法。

50

[1 6] 前記被検者においてブランクが未形成または未発達である、[1] ~ [8] のいずれか一項または [1 5] に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 0 】

【図 1 a】H F D が大腿動脈における白血球遊走を誘導することを示す画像およびグラフである。左の画像の上段は、通常の食餌 (N C) を 1 週間 (1 w) から 8 週間 (8 w) 与えたマウスの大腿動脈中の血流を示している。左の画像の下段は、高脂肪食 (H F D) を 1 週間 (1 w) から 8 週間 (8 w) 与えたマウスの大腿動脈中の血流を示している。矢印は内皮に接着した白血球、ローリングしている白血球を示している。右のグラフは、大腿動脈における接着性の白血球 (adhesion) とローリングしている白血球 (rolling) の数を表している。 10

【図 1 b】N C と H F D との間で循環白血球 (Circulating leukocytes)、好中球 (Neutrophil)、単球 (Monocyte)、リンパ球 (Lymphocytes) の数を比較したグラフである。好中球が有意に増加していることが示されている。

【図 2 a】好中球枯渇実験のタイムスケジュールとフローサイトメトリー分析について示した図である。H F D 開始から 2 2 日後と 2 4 日後に野生型マウスを好中球枯渇抗体 1 A 8 または対照の I g G で処置した。これらのマウスにおいて、白血球の遊走が H F D 開始の 2 8 日後に観察された。1 A 8 は対照の I g G に比べて、末梢血における好中球を明らかに減少させた。

【図 2 b】1 A 8 (右の画像) または I g G (左の画像) で処置した H F D 給餌野生型マウスの大腿動脈における白血球遊走について示した画像およびグラフである。グラフは、白血球の遊走が好中球の枯渇によって有意に阻害されることを示している (それぞれ n = 4)。 20

【図 2 c】クロドロン酸リポソームを用いた L y s M - e G F P マウスの血液における単球枯渇について示した画像およびグラフである。末梢白血球における G F P の最も高い発現は好中球において観察されたが、単球も中間的に陽性であった。そこで、クロドロン酸リポソームを用いて単球を除去した。クロドロン酸リポソーム処理は、末梢血において単球としての G F P + L y - 6 C ^{h i} 白血球を枯渇させたが、好中球としての G F P + L y 6 G + 白血球は除去しない。画像は、単球を除去するためにクロドロン酸リポソームで処置した H F D 給餌 L y s M - e G F P マウスにおける白血球動員について示している。クロドロン酸リポソームが観察の 2 4 時間前に投与された。左の画像は溶媒のみで処置した場合の大腿動脈を示し、右の画像はクロドロン酸リポソームで処置した場合の大腿動脈を示している。白血球の遊走は、単球の枯渇によって変化を示さなかった (グラフ) (それぞれ n = 4)。 30

【図 3 a】H F D を 4 週間与えたマウスの血清をサイトカインアレイで分析した結果を示すグラフである。各種サイトカインの中で C 5 a の発現が最も大きく増加していることが示された。

【図 3 b】H F D を 4 週間与えると血清の C 5 a レベルが上昇することを示すグラフである。E L I S A の結果が示されている (左)。同様に、肝臓における C 5 (C 5 a の前駆体) の m R N A レベルも上昇する (右)。 40

【図 3 c】通常の食餌を与えたマウスに C 5 a タンパク質を投与すると、白血球遊走が観察されることを示す画像およびグラフである。v e h : 対照。C 5 a : C 5 a 投与。

【図 3 d】マウス C 5 a を投与すると好中球が誘導されることを示すグラフである。v e h : 対照。C 5 a : C 5 a 投与。

【図 3 e】C 5 a R アンタゴニスト (C 5 a の C 末端ペプチド) を投与すると H F D 誘導性の白血球遊走が生じなくなることを示す画像およびグラフである。v e h : 対照。anta gonist : アンタゴニスト投与。

【図 4 a】H F D が M C P - 1 発現を増加させることを示すグラフである。H F D を 4 週間与えると、マウスの血清中の M C P - 1 レベルが有意に上昇した。N C : 通常の食餌。H F D : 高脂肪食。 50

【図4b】さまざまな組織におけるMCP-1 mRNAレベルの分析結果を示すグラフである。HFDは、循環白血球におけるMCP-1 mRNAを有意に増加させた。

【図4c】HFDが末梢血白血球である好中球においてMCP-1のmRNAレベルを増加させることを示すグラフである。

【図4d】C5aRアンタゴニストを投与した際の血清中のMCP-1量を測定した結果を示すグラフである。C5aRアンタゴニストは、HFDにより増加する血清MCP-1レベルを有意に減少させた。

【図4e】3nMのリコンビナントC5aで処理した好中球様HL-60におけるMCP-1 mRNAレベルを示すグラフである。C5aは、対照に比べてMCP-1発現レベルを増加させた(各々N=5)。

【図5a】NCまたはHFDを給餌した野生型マウスまたはCCR2^{-/-}マウスの大腿動脈における白血球のフローサイトメトリー分析について示した図とグラフである。CD45⁺細胞を囲みの部分でゲーティングした(上段)。HFDを与えた野生型マウスではNC群と比べて、内膜の白血球が有意に増加していたが、CCR2^{-/-}マウスでは、HFDとNCの間でCD45陽性細胞に変化はなかった(各群n=7)。これらの白血球はCD11b、CD11c、およびCCR2について陽性であった(8回の独立した実験を実施)。ネガティブコントロールとして、アイソタイプコントロール抗体が用いられた(灰色部分)。

【図5b】末梢血の好中球を特異的抗体(1A8)によって枯渇させた場合における、HFDを4週間与えた野生型マウスの大腿動脈の単一細胞懸濁液のフローサイトメトリー分析について示したグラフである。好中球の枯渇は、大腿動脈の内膜白血球を対照(IgG)に比べて有意に減少させた(それぞれn=6)。

【図5c】C5aで4週間処置した野生型マウスの大腿動脈の単一細胞懸濁液のフローサイトメトリー分析について示したグラフである。C5aは大腿動脈の白血球を有意に増加させた。veh:対照。

【図6】HFDによる血管炎症について提唱されるメカニズムを示した図である。HFDの給餌(HFD-feeding)は肝臓(Liver)におけるC5発現レベルと血清C5aレベルを増加させる。C5aは好中球の増加(Neutrophilia)と、大腿動脈における好中球遊走(Neutrophil recruitment)を誘導する。好中球の遊走は、大腿動脈内膜におけるCD11c⁺白血球(CD11c⁺ leukocyte)の集積に寄与する。

【図7】冠動脈疾患(CAD(+))と非患者(CAD(-))における血中C5a濃度の分析結果を示した図である。グラフは左から、75歳未満の非患者(CAD(-))、75歳未満の冠動脈疾患患者(CAD(+))、75歳以上の非患者(CAD(-))、75歳以上の冠動脈疾患患者(CAD(+))。縦軸はC5aの濃度。75歳以上の冠動脈に狭窄のある群において、血中C5a濃度が有意に上昇している。データは平均±SD。

* p < 0.05。

【発明を実施するための形態】

【0011】

以下に、本発明を詳細に説明する。なお、本明細書中において参照している特許および特許出願書類を含む、全ての刊行物に記載の内容は、その引用によって、本明細書中に明記された内容と同様に組み込まれていると解釈すべきである。

【0012】

動脈硬化性疾患の発症リスクの評価方法

本発明の態様の一つは、動脈硬化性疾患の発症リスクを評価する方法に関する。このような評価方法は、例えば、(i)被検者から得た血液試料中におけるC5aタンパク質の量をインビトロで測定する工程、および(ii)C5aタンパク質の量を指標にして被検者における動脈硬化症または血管炎症の発症リスクを評価する工程を含みうる。

【0013】

動脈硬化性疾患

動脈硬化性疾患には、アテローム性動脈硬化症、閉塞性動脈硬化症、心筋梗塞、脳梗塞

10

20

30

40

50

、脳卒中、狭心症、脳血栓、脳出血、腎不全が含まれる。動脈硬化とは、動脈壁の肥厚化、硬化および弾力性の喪失をいう。動脈硬化が進行すると徐々に臓器、組織への血流が徐々に制限される。アテローム性動脈硬化症は、動脈壁における脂肪プラーク、コレステロール、および他の物質の蓄積により引き起こされる動脈硬化の一形態であり、脳梗塞、心筋梗塞などの重篤な病の原因となりうる。本発明によれば、被検者から得た血液試料中におけるC5 aタンパク質の量を指標にして被検者における動脈硬化性疾患の発症リスクを評価することができる。本発明の方法は特に、アテローム性動脈硬化症の発症リスクを評価において好適に利用することができる。

【0014】

血管炎症

動脈硬化と血管炎症の間には密接なかわりがあると考えられる。本発明者らは、高脂肪食が急性炎症を誘発し、それがさらに慢性炎症を誘発することを見出した。本発明によれば、被検者から得た血液試料中におけるC5 aタンパク質の量を指標にして被検者における動脈硬化症の前段階としての血管炎症の発症リスクを評価することもできる。

【0015】

血液試料

本発明の方法においては、被検者から得た血液試料を測定に使用する。本明細書において「被検者」は哺乳動物であり、好ましくはヒトである。ヒト被検者から血液を採取する工程は、本発明の方法の工程からは除外されうる。被検者由来の血液は、被検者から採取されたものを直ちに本発明の方法に供してもよいし、採取後、直接、または適当な処理を施した後に、冷蔵または凍結したものを本発明の方法に供する前に、室温に戻して使用してもよい。冷蔵または凍結前の適当な処理としては、例えば、全血にヘパリン等を添加して抗凝固処理を施した後、または血漿若しくは血清として分離すること等が含まれる。これらの処理は、当該分野で公知の技術に基づいて行なえばよい。

【0016】

C5 aタンパク質

C5 aは、補体成分C5がC5転換プロテアーゼによってC5 aとC5 b断片へと切断されることによって放出されるタンパク質断片である。C5 bは補体カスケードの後期のイベントにおいて重要となる一方、C5 aは炎症性の高いペプチドとして作用する。C5の起源は肝細胞であるが、その合成はマクロファージにおいても見られ、これはC5 aの局所的な増加を引き起こしうる。C5 aは走化性とアナフィラトキシン性を有し、自然免疫に不可欠であるが、適応免疫にも関係している。C5 aの産生増加は多くの炎症性疾患と関連づけられている。

【0017】

ヒトC5およびC5 aの遺伝子配列は既知であり、例えば、GenBankなどのデータベースから入手することができる：

C5 complement component 5 [Homo sapiens (human)]

Gene ID: 727

mRNA: NM_001317163.1

Protein: NP_001304092.1

【0018】

C5 aはC5のアミノ酸678～751位の74アミノ酸残基に対応する。C5 aはさらに、カルボキシペプチダーゼBによって迅速に代謝されて、C末端のアルギニンを欠いた73アミノ酸のC5a des-Argとなる。よって、本願において「C5 aタンパク質の量」と言う際には、C5 aとC5a des-Argとの総量を意味すると解することもできる。例えば、C5 aタンパク質量の測定に抗体を利用する場合、C5 aのN末端側を認識する抗体であれば、C5 aとC5a des-Argの両者を認識することが当業者には理解される。C5 aのC末端を認識する抗体であれば、C5 aまたはC5a des-Argのいずれか一方のみを特異的に認識しうるが、本発明においては、これらを区別して認識する必要は無い。また、C5a des-Argの量を測定することで、C5 aタンパク質の量を間接的に評価することもできる

10

20

30

40

50

。

【0019】

抗C5a抗体

本発明の方法において、C5aタンパク質の測定に利用する抗C5a抗体は、ポリクローナル抗体でも、モノクローナル抗体でも良い。抗C5a抗体は、当業者に公知の方法を用いて作製することができる。また、抗C5a抗体は、市販されている抗体を購入して利用してもよい。抗体のアイソタイプには限定は無く、IgG、IgM、IgA、IgE、IgDのいずれを用いてもよい。抗体の由来する動物種にも限定は無い。また、これらの抗体の断片（例えば、Fab、F(ab')₂、Fab、Fv、Fabc、Fd）を用いることもできる。これらの抗体および抗体断片は、検出に有用な標識などによる修飾を含んでいてもよい。なお、本発明において使用する抗C5a抗体は、C5タンパク質、C5a des-Arg、C5aタンパク質の断片、および/または、一部に変異を有するC5aタンパク質変異体も同様に認識するものであってもよい。

10

20

30

40

50

【0020】

C5aタンパク質の変異体

本明細書においてC5aタンパク質の「変異体」とは、C5aタンパク質の、好ましくは配列番号1に示されるヒト由来の野生型C5aタンパク質を構成するアミノ酸配列またはその部分配列において、1以上、好ましくは1～数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入を含む変異体、あるいは該アミノ酸配列またはその部分配列と、約80%以上、例えば約85%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上、例えば約97%以上、約98%以上もしくは約99%以上の%同一性を示す変異体を意味する。本明細書中、「数個」とは、約10以下、例えば9、8、7、6、5、4、3または2個の整数を指す。また、「%同一性」とは、配列番号1のタンパク質のアミノ酸配列と、その変異体のアミノ酸配列との一致度が最大となるように、またこのときギャップを導入するか若しくはギャップを導入しないで、好ましくはギャップを導入して、この2つのアミノ酸配列のアラインメントを行ったとき、総アミノ酸残基数（ギャップを導入する場合、ギャップ数を含む）に対する一致したアミノ酸残基数の割合（%）を指し、BLASTやFASTAによるタンパク質の検索システムを用いて、ギャップを導入してまたはギャップを導入しないで、決定することができる。C5aタンパク質の変異体の具体例として、被検者の人種や個体に基づく多型（SNPsを含む）、スプライス変異等が挙げられる。すなわち、本発明の方法における被検者のC5aタンパク質は、必ずしも配列番号1に示されるアミノ酸配列を有している必要はなく、その変異体であってもよい。

【0021】

C5aタンパク質の断片

本明細書においてC5aタンパク質の「断片」とは、野生型C5aタンパク質、好ましくは配列番号1で示されるヒト由来の野生型C5aタンパク質、またはその変異体を構成するアミノ酸の少なくとも5個以上全数未満、少なくとも7個以上全数未満、好ましくは少なくとも8個以上全数未満、例えば、少なくとも10個以上全数未満、少なくとも15個以上全数未満、より好ましくは少なくとも20個以上全数未満、少なくとも25個以上全数未満、さらにより好ましくは少なくとも35個以上全数未満、少なくとも40個以上全数未満、少なくとも50個以上全数未満の連続するアミノ酸残基からなり、1個または複数のエピトープを保持するポリペプチド断片をいう。このような断片は、本発明において使用される抗体またはその断片と免疫特異的に結合することができる。このようなペプチド断片をC5aタンパク質に包含する理由は、たとえ断片化されていても血液中のC5aタンパク質を定量できれば、本発明の目的を達し得るし、また、血液中の上記野生型C5aタンパク質（好ましくは配列番号1で示されるヒト由来の野生型C5aタンパク質）またはその変異体の全長ポリペプチドが、例えば、血液中に存在するプロテアーゼ、ペプチダーゼ等の加水分解酵素によって断片化されて存在する場合があるからである。すなわち、本発明の方法において測定の対象となるC5aタンパク質は、必ずしも全長配列を有している必要はなく、その断片であってもよい。

【 0 0 2 2 】

C 5 a タンパク質の量

本明細書において「C 5 a タンパク質の量」とは、被検者由来の血液（全血、血清、または血漿）中に存在するC 5 a タンパク質の分量をいう。本発明において、血液試料は好ましくは血清である。分量は、絶対量または相対量のいずれであってもよい。絶対量の場合、所定の血液量中に含まれるC 5 a タンパク質の質量または容量が該当する。相対量の場合、特定の測定値に対する被検者由来のC 5 a タンパク質の測定値によって表わされる相対的な値をいい、例えば、濃度、蛍光強度、吸光度が挙げられる。C 5 a タンパク質の量は、公知のインビトロ測定方法を用いて測定することができ、例えば、抗体などのC 5 a タンパク質と特異的に結合可能な物質を用いて測定する方法が挙げられる。

10

【 0 0 2 3 】

インビトロ測定

C 5 a タンパク質の量をインビトロで測定する方法としては、当業者に公知の任意の方法、例えば、酵素免疫測定法（E L I S A、E I A）、蛍光免疫測定法、発光免疫測定法、放射免疫測定法（R I A）、免疫比濁法、ラテックス凝集反応、ラテックス比濁法、赤血球凝集反応、粒子凝集反応またはウエスタンブロット法などを用いることができる（例えば、特開 2 0 1 5 - 1 5 5 7 9 5 に記載の測定方法を参照）。一連の測定工程は、例えば、全自動 E L I S A システムを利用して行うこともできる。

【 0 0 2 4 】

酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法または発光免疫測定法等の標識を用いた免疫測定法を用いて本発明の方法を実施する場合には、抗 C 5 a 抗体を固相化するか、または試料中の成分を固相化して、それらの免疫学的反応を行うことが好ましい。固相担体としては、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリビニルトルエン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリメタクリレート、ラテックス、ゼラチン、アガロース、セルロース、セファロース、ガラス、金属、セラミックまたは磁性体等の材質よりなるビーズ、マイクロプレート、試験管、スティックまたは試験片等の形状の不溶性担体を用いることができる。固相化は、固相担体と前記抗 C 5 a 抗体または試料成分とを物理的吸着法、化学的結合法またはこれらの併用等の公知の方法に従って結合させることにより行うことができる。

20

【 0 0 2 5 】

本発明においては、前記抗 C 5 a 抗体を標識することにより反応を直接検出するか、または標識二次抗体を用いることにより間接的に検出する。感度の点からは、後者の間接的検出（例えばサンドイッチ法等）を本発明の方法において利用することが好ましい。

30

【 0 0 2 6 】

標識物質としては、酵素免疫測定法の場合には、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ（P O D）、 α -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコースオキシダーゼ、乳酸脱水素酵素、アミラーゼまたはビオチン - アビジン複合体等を用いることができる。蛍光免疫測定法の場合には、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、置換ローダミンイソチオシアネート、ジクロロトリアジンイソチオシアネート、A l e x a または A l e x a F l u o r o 等を用いることができる。放射免疫測定法の場合には、トリチウム、ヨウ素 1 2 5 またはヨウ素 1 3 1 等を用いることができる。また、発光免疫測定法は、N A D H、F M N H₂、ルシフェラーゼ系、ルミノール - 過酸化水素 - P O D 系、アクリジニウムエステル系またはジオキセタン化合物系等を用いることができる。

40

【 0 0 2 7 】

標識物質と抗体との結合には、酵素免疫測定法の場合にはグルタルアルデヒド法、マレイミド法、ピリジルジスルフィド法または過ヨウ素酸法等の公知の方法を、放射免疫測定法の場合にはクロラミン T 法、ボルトンハンター法等の公知の方法を用いることができる。測定の操作法は、公知の方法に従えばよい。例えば、前記抗 C 5 a 抗体を直接標識した場合には、血液中の成分を固相化し、標識した前記抗 C 5 a 抗体と接触させて、C 5 a タ

50

ンパク質 - 抗 C 5 a 抗体複合体を形成させる。そして未結合の標識抗体を洗浄分離して、結合標識抗体量または未結合標識抗体量より血液中の C 5 a タンパク質の量を測定することができる。

【 0 0 2 8 】

また、例えば、標識二次抗体を用いる場合には、本発明の抗体を一次抗体として試料と反応させ（一次反応）、さらに標識二次抗体を一次抗体に反応させる（二次反応）。一次反応と二次反応は逆の順序で行ってもよいし、同時に行ってもよいし、または時間をずらして行ってもよい。一次反応および二次反応により、固相化した C 5 a - 抗 C 5 a 抗体 - 標識二次抗体の複合体が、または固相化した抗 C 5 a 抗体 - C 5 a - 標識二次抗体の複合体が形成される。そして未結合の標識二次抗体を洗浄分離して、結合標識二次抗体量または未結合標識二次抗体量より試料中の C 5 a の質量を測定することができる。

10

【 0 0 2 9 】

具体的には、酵素免疫測定法の場合は標識酵素にその至適条件下で基質を反応させ、その反応生成物の量を光学的方法により測定すればよい。蛍光免疫測定法の場合は蛍光物質標識による蛍光強度を、放射免疫測定法の場合は放射性物質標識による放射エネルギーを測定する。発光免疫測定法の場合は発光反応系による発光量を測定すればよい。

【 0 0 3 0 】

また、免疫比濁法、ラテックス凝集反応、ラテックス比濁法、赤血球凝集反応または粒子凝集反応の免疫複合体凝集物の生成を、その透過光や散乱光を光学的方法により測るか、目視的に測る測定法により実施することもできる。この場合、溶媒としてリン酸緩衝液、グリシン緩衝液、トリス緩衝液またはグッド緩衝液等を用いることができ、更にポリエチレングリコール等の反応促進剤や非特異的反応抑制剤を反応系に含ませてもよい。

20

【 0 0 3 1 】

本発明の測定法の実施形態の一例は、以下の手順を含む。最初に、本発明の抗体を一次抗体として不溶性担体に固定する。そして、好ましくは抗原が吸着していない固相表面を、抗原とは無関係のタンパク質（仔ウシ血清、ウシ血清アルブミン、ゼラチン等）によりブロッキングする。続いて、固定化された一次抗体と被検試料とを接触させる。次いで、上記一次抗体と異なる部位で C 5 a と反応する標識二次抗体とを接触させ、該標識からの信号を検出する。ここで用いる「一次抗体と異なる部位で C 5 a と反応する二次抗体」は、一次抗体と C 5 a タンパク質との結合部位以外の部位を認識する抗体であれば特に制限はなく、免疫原の種類を問わず、ポリクローナル抗体、抗血清、モノクローナル抗体のいずれでもよく、またこれらの抗体の断片（フラグメントともいう）（例えば、F a b、F (a b ')₂、F a b、F v、F a c b、F d 等）を用いることもできる。更に、二次抗体として複数種のモノクローナル抗体を用いてもよい。

30

【 0 0 3 2 】

また、これとは逆に、本発明の抗体に標識を付して二次抗体とし、本発明の抗体と異なる部位で、C 5 a と反応する抗体を一次抗体として不溶性担体に固定し、この固定化された一次抗体と被検試料とを接触させ、次いで、二次抗体として標識を付した本発明の抗体とを接触させ、前記標識からのシグナルを検出してもよい。

【 0 0 3 3 】

また、本発明の方法においては、当技術分野で公知の免疫クロマト用テストストリップ（例えば、特開 2 0 1 5 - 1 5 5 7 9 5 等の記載を参照。この文献の記載は参照により本明細書に明示的に取り込まれる）を利用してもよい。免疫クロマト用テストストリップ（検査用ストリップともいう）とは、例えば、試料を吸収しやすい材料からなる試料受容部、抗体を含有する試薬部、試料と抗体との反応物が移動する展開部、展開してきた反応物を呈色する標識部、呈色された反応物が展開してくる提示部等から構成されるものであり、妊娠診断薬と同様の形態とすることができる。まず、試料受容部に試料を与えると、試料受容部は試料を吸収して試料を試薬部にまで到達させる。続いて、試薬部において、試料中の C 5 a と抗 C 5 a 抗体との反応が起こり、反応した複合体が展開部を移動して標識部に到達する。標識部においては、上記反応複合体と標識二次抗体との反応が起こって、

40

50

その標識二次抗体との反応物が提示部にまで展開すると呈色が認められることになる。

【0034】

C5aタンパク質と特異的に結合可能な物質

上記のインビトロ測定においては、抗C5a抗体に限らず、C5aタンパク質と特異的に結合可能な物質であれば、他の物質を使用することもできる。本明細書において「特異的に結合可能」とは、ある物質が実質的にC5aタンパク質のみと結合し得ることを意味する。この場合、C5aタンパク質の検出に影響を与えない程度 of 非特異的な結合が存在してもよい。なお、本発明において使用する「C5aタンパク質と特異的に結合可能な物質」は、C5タンパク質、C5a des-Arg、C5aタンパク質の断片、および/または、一部に変異を有するC5aタンパク質も同様に認識するものであってもよい。

10

【0035】

「特異的に結合可能な物質」としては、例えば、C5a結合タンパク質が挙げられ、より具体的には、上記の抗C5a抗体に加えて、例えば、C5a受容体タンパク質またはその断片、ファージディスプレイ法などのスクリーニングによって得られたC5a結合ポリペプチド、あるいは、それらの化学修飾誘導体であってもよい。ここで、「化学修飾誘導体」とは、前記物質のC5aタンパク質との特異的な結合活性を獲得または保持する上で必要な機能上の修飾、または前記物質を検出する上で必要な標識のための修飾のいずれをも含む。

【0036】

機能上の修飾には、例えば、グリコシル化、脱グリコシル化、PEG化が挙げられる。標識上の修飾には、例えば、蛍光色素（FITC、ローダミン、テキサスレッド、Cy3、Cy5）、蛍光タンパク質（例えば、GFP、EGFP、RFP、YFP、CFP、PE、APC、）、酵素（例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ）、またはビオチン、アビジン、ストレプトアビジンによる標識が挙げられる。

20

【0037】

他のマーカーの併用

本発明の態様の一つは、被検者から得た血液試料中において、C5a以外の他のマーカー（例えば他の公知の炎症マーカー）の量をインビトロで測定する工程をさらに含んでいてもよい。

30

【0038】

基準値

基準値としては、例えば、健常者の対応する測定値を用いることができる。「健常者」とは、少なくとも明らかな動脈硬化症に罹患していない個体、好ましくは健康な個体をいう。さらに、健常者は、被検者と同一の生物種であることを要する。例えば、検出に供する被検者がヒト被検者の場合には、健常者もヒトでなければならぬ。健常者の身体的条件は、被検者と同一または近似することが好ましい。身体的条件とは、例えば、ヒトの場合であれば、人種、性別、年齢、身長、体重等が該当する。あるいは、被検者の過去における測定値を用いることもできる。過去における測定値は、例えば、定期的または不定期的な健康診断時に測定されたものを使用することができる。測定値の経時的な評価は、動脈硬化性疾患の発症リスクを評価する上で有用となりうる。

40

【0039】

統計学的有意性

「統計学的に有意」とは、例えば、得られた値の危険率（有意水準）が5%、1%または0.1%より小さい場合が挙げられる。それ故、測定値について「統計学的に有意に大きい」とは、例えば、被検者と健常者のそれぞれから得られたC5aタンパク質の量的差異を統計学的に処理したときに両者間に有意差があり、かつ被検者の前記タンパク質の量が健常者のそれと比較して相対的に多いことをいう。例えば、血液中のC5aタンパク質の量に関して、被検者が健常者の2倍以上、好ましくは3倍以上、より好ましくは4倍以上、最も好ましくは5倍以上多い場合が該当する。量的差異が3倍以上であれば信頼度は

50

高く、統計学的にも有意に多いといえる。統計学的処理の検定方法は、有意性の有無を判断可能な公知の検定方法を適宜使用すればよく、特に限定はされず、例えば、スチューデントt検定法、多重比較検定法、Kruskal-Wallis検定、Dunnの多重解析を用いることができる。

【0040】

健常者の血液中におけるC5aタンパク質の量は、上述した被検者の血液中におけるC5aタンパク質の量の測定方法と同様の方法で測定することが好ましい。健常者の血液中におけるC5aタンパク質の量は、被検者の血液中におけるC5aタンパク質の量を測定する都度、測定することもできるが、予め測定しておいたC5aタンパク質の量を利用することもできる。特に、健常者の様々な身体的条件におけるC5aタンパク質量を予め測定しておき、その値をコンピューターに入力してデータベース化しておけば、被検者の身体的条件を当該コンピューターに入力することで、その被検者との比較に最適な身体的条件を有する健常者のC5aタンパク質の量を即座に利用できるのもので便利であろう。

10

【0041】

発症リスクの評価

被検者の血液中のC5aタンパク質の量が健常者の血液中のC5aタンパク質の量よりも統計学的に有意に多い場合、その被検者は動脈硬化性疾患の発症リスクが高いと評価する。特に、早期の動脈硬化性疾患であっても、評価が可能である点において、本発明の実益がある。早期の動脈硬化性疾患とは、例えば、プラークが未形成または未発達のものと言う。また、マーカータンパク質の観点からは、CRPやIL-1などが検出されないものと言う。特に、本発明の方法によれば、TNF- α 、IL-1 β 、IL-1 α 、IL-7およびIL-11の一部または全部の増加が検出されない被検者においても、動脈硬化性疾患の発症リスクを評価することができる。また、対象となる被験者は、IMT（血管エコー）、PWV（脈波伝播速度）などの血管パラメータが正常範囲であることを指標として特定することもできる。

20

【0042】

キット

本発明の態様の一つは、動脈硬化性疾患の発症リスクを評価に使用するキットに関する。本発明に係るキットは、被検者から得た血液試料中におけるC5aタンパク質の量をインピットで測定するためにC5aタンパク質と特異的に結合可能な物質、例えば、抗C5a抗体、その断片、および/またはそれらの化学修飾誘導体を含むことができる。このような抗体、断片または化学修飾誘導体は固相担体に結合されていてもよい。固相担体としては、検査用ストリップ、プラスチックチューブ、マイクロプレート、またはガラスビーズなどを使用できる。上記の要素に加え、本キットには、例えば、標識二次抗体、さらには標識の検出に必要な基質、担体、洗浄バッファー、試料希釈液、酵素基質、反応停止液、精製された標準物質としてのC5aタンパク質、使用説明書なども含まれる。

30

【0043】

動脈硬化性疾患の治療用または予防用組成物

本発明の態様の一つは、有効成分としてC5aタンパク質とC5a受容体（C5aR）との結合を阻害する物質を含む、動脈硬化性疾患の治療または予防に用いるための組成物に関する。C5aタンパク質とC5a受容体との結合を阻害する物質は、例えば、C5a受容体アンタゴニスト、抗C5a抗体、抗C5aR抗体、可溶性C5aR断片でありうる。C5a受容体アンタゴニストとしては、例えば、C5aのC末端ペプチドを利用することができる。そのほか、CCX168（Avacopan）、W-54011、PMX-53なども利用される。補体成分C5aは動脈硬化症発症前の血管炎症が起こる前より血液中で上昇することから、本発明に係る医薬組成物は、プラークが未形成または未発達な段階の潜在的な動脈硬化性疾患の予防に特に有用であると考えられる。

40

【0044】

以下に、実施例を示して本発明を具体的に説明するが、これらにより本発明は何ら制限を受けるものではない。

50

【実施例】

【0045】

実施例1：高脂肪食は野生型マウスの大腿動脈における白血球遊走を増加させる

生体顕微鏡 (I V M) を使用して、高脂肪食 (H F D) または通常の食餌 (N C) を与えた野生型マウスの大腿動脈における白血球遊走を観察した。野生型マウス (C 5 1 B L / 6 J、雄、7週令) は Charles river Labo より購入したものを使用した。7週令の野生型マウスに高脂肪食 (H F D : 1 . 2 5 % コレステロール、20% 脂質含有) あるいは普通食 (N C) を与えた。その後、野生型マウスについては 1 , 2 , 4 , 8 週間後に大腿動脈での白血球遊走を I V M によって観察した。ペントバルビタールをマウスに腹腔内投与して麻酔し、観察中は正常な血液 pH を維持するために機械的換気を行い、体温を 3 6 ~ 3 7 に維持するために保温パッドと赤外線ランプの照射を行った。大腿部の皮膚を切開して大腿動脈と静脈を露出し、右大腿静脈よりローダミン 6 G (0.3 mg/kg in 300 ul PB S (-)) を投与して左大腿動脈分岐上腹側を 20 倍水浸対物レンズを装備した蛍光顕微鏡 (B X 5 1 W I) で観察した (ローダミン 6 G は赤血球以外の血球を細胞内に取り込むことで蛍光を発光する)。5 フレーム / 秒のフレームレートで録画し、解析ソフト (M e t a M o r p h) を使って接着あるいはローリングする白血球数を算出した。接着は 3 秒間以上静置している白血球とし、ローリングは次のフレームで移動したものとした。

10

【0046】

図 1 a に示されているように、H F D を与えたマウスにおける時間依存的な白血球の遊走を 1 ~ 8 週間から観察したところ、4 週間目と 8 週間目において、血管接着性の白血球の数が N C に比較して有意に増加していることが画像解析から示された (図 1 a)。マウスに H F D を与えると、特に末梢好中球 (C D 1 1 b ⁺ L y - 6 G ⁺) の数が増加しており (H F D : 2 2 . 7 ± 1 . 0 % , n = 1 1 ; N C : 7 . 7 ± 0 . 7 0 % , n = 1 0 ; P < 0 . 0 0 1)、白血球の総数は変化していなかった (図 1 b)。単球やリンパ球などの他の型の細胞数には、顕著な変化は示されなかった。

20

【0047】

なお、末梢血のフローサイトメトリーと白血球数のカウントは以下のようにして行った。血液を心臓から回収し、以下の抗体を含む 1 . 8 m l の Lysing buffer に 2 0 0 μ l の血液を加えて室温で 1 5 分反応させた。

Rat anti-mouse CD11b-FITC

Rat anti-mouse CD45 PerPC

Rat anti-mouse Ly-6G-APC

Rat anti-mouse Ly-6C-APC

Rat anti-mouse CD3-PE

Rat anti-mouse CD19-PE

30

蛍光染色した白血球は 1 % パラホルムアルデヒドで固定し、解析した。BD FACS Calibur を使って 1 0 0 0 0 個の白血球についてフローサイトメトリーを行い、そのデータは F l o w J o 7 . 6 で解析した。解析の際、好中球は C D 4 5 ⁺ L y 6 G ⁺ C D 1 1 b ⁺ , 単球は C D 4 5 ⁺ L y 6 C ^{h i} C D 1 1 b ⁺ , リンパ球は C D 4 5 ⁺ C D 3 ⁺ と C D 4 5 ⁺ C D 1 9 ⁺ とした。白血球数は X T - 2 0 0 0 i V を使ってカウントした。

40

【0048】

実施例2：大腿動脈の H F D 誘発性白血球遊走における好中球の役割

H F D 誘導性の白血球遊走における好中球の関与を確認するため、L y - 6 G 特異的抗体である 1 A 8 の注射によって好中球を枯渇させた後に I V M 分析を行った。なお、好中球除去 (枯渇) 実験は以下のようにして行った。末梢血中の好中球を除去するために、野生型マウスに高脂肪食負荷後 2 2 日目と 2 4 日目に 2 5 0 μ g のラット抗 L y 6 G 抗体を腹腔内投与した。正常ラット I g G 2 a 投与群をコントロール群とした。高脂肪食負荷後 2 8 日目に I V M を行い、末梢血のフローサイトメトリーと血漿中の M C P - 1 レベルの測定を E L I S A 法にて行った。

【0049】

50

末梢血のフローサイトメトリ解析により、好中球の枯渇（除去）が確認された（図 2 a）。好中球を枯渇させると、HFD誘導性の白血球遊走が有意に減少した（図 2 b）。好中球が GFP を豊富に発現しているリゾチーム M (Lys M) - e GFP マウスにおいて、クロドロン酸リボソームの腹腔内注射により単球の枯渇を誘導した場合には、リボソームは明らかに末梢血における単球の枯渇を引き起こしていたが、大腿動脈における白血球遊走に変化は見られなかった（図 2 c および図 2 d）。これらの結果は、HFD では 4 週間目までに、単球ではなく、好中球が大腿動脈に動員されたことを示している。

【 0 0 5 0 】

なお、単球除去（枯渇）実験は以下のようにして行った。高脂肪食によって遊走する白血球分画を同定するために高脂肪食を与えた Lys M - e GFP (Lys M はリゾチーム M というタンパク質を指し、好中球、単球、マクロファージに発現している。Lys M の遺伝子に e GFP 遺伝子を組みこむことで Lys M タンパクが蛍光標識される) マウスでの IVM を行った。Lys M - e GFP マウスは Dr. Y. Inomata より譲渡されたものを使用した。このマウスは白血球の中で e GFP を最も高発現しているのも、もし接着やローリングがみられたら、それは好中球であるといえる。しかし、単球もその 1 / 10 ほど発現しているのも、単球の可能性を除くために高脂肪食を与えた Lys M - e GFP マウスの IVM を単球除去下で行うために 200 μ l のクロドロン酸リボソームを IVM の 24 時間前に尾静脈より投与した（クロドロン酸リボソームは、単球やマクロファージが貪食することでそれらを死滅させる）。

【 0 0 5 1 】

実施例 3 : HFD は肝臓における C5 a レベルを増加させて好中球を動員し、活性化する

HFD がどのように好中球を誘導して MCP - 1 を産生するのかを理解するため、HFD または NC を 4 週間与えたマウスにおいて、種々のサイトカインの血清レベルを測定した。4 週間高脂肪食あるいは普通食を与えたマウスから血清を採取し、それぞれの群について 8 匹分を混合してサイトカインアレイに使用した。使用したサイトカインアレイは膜に 20 種類ほどのサイトカインに対する特異的抗体がスポットされており、そこに血清を反応させると血清中の濃度に応じてスポットが化学発光する。LAS - 1000 イメージアナライザーでそのスポットの濃さを定量し、普通食群を 1 . 00 として高脂肪食群の発光量の相対値を算出した。

【 0 0 5 2 】

図 3 a に示されているように、HFD を与えたマウスでは、血清中の C5 a の相対的発現レベルが最も高くなっていた (NC : 1 . 00、HFD : 2 . 81)。この結果は、図 3 b に示されているように、C5 a の ELISA によっても確認された (HFD : 18 . 15 \pm 1 . 53 ng / ml , n = 4 ; NC : 11 . 95 \pm 0 . 52 ng / ml , n = 4 ; P < 0 . 01)。C5 の活性化型である C5 a は、肝臓において産生される強力な好中球の化学誘引物質である。続いて行った定量的 RT - PCR は、肝臓における C5 レベルが HFD によって増加することを明らかにした (HFD : 2 . 57 \pm 0 . 52 , n = 8 ; NC : 1 . 00 \pm 0 . 13 , n = 8 ; P < 0 . 05 ; 図 3 b)。

【 0 0 5 3 】

なお、ELISA による分析は以下のようにして行った。高脂肪食負荷後 4 週の時点で心臓から採血し、その血清について MCP - 1 と C5 a の濃度を ELISA 法で定量した。96 ウェルプラスチックマイクロプレートに 1 次抗体を加えて一晚室温で静置する。その後 0 . 02 % Tween 20 含有 PBS (-) で 3 回洗浄し、1 % BSA 含有 PBS (-) を加える。30 分静置し、0 . 02 % Tween 20 含有 PBS (-) で 3 回洗浄して血清あるいは基準液を添加する。室温で 1 . 5 時間静置後 0 . 02 % Tween 20 含有 PBS (-) で 3 回洗浄して、ビオチンラベルされた 2 次抗体を加え、1 . 5 時間静置する。0 . 02 % Tween 20 含有 PBS (-) で 3 回洗浄して HRP - ストレプトアビジンを加えて 30 分静置する。0 . 02 % Tween 20 含有 PBS (-) で 3 回洗浄して TMB 基質を加えて 15 分後に 0 . 6 N 硫酸を加えて反応を停止させる。吸光度 450 nm を測定して検量線からサンプル中の MCP - 1 あるいは C5 a 濃度を算出する。

【0054】

定量的RT-PCRは以下のようにして行った。高脂肪食あるいは普通食を4週間与えた野生型マウスの左心室からPBS(-)を還流して脱血し、大動脈、肝臓、脾臓、骨髓、内臓脂肪を採取した。末梢血白血球は採血して溶血し、4匹分を1つにまとめ、好中球は3匹分を1つにまとめてそれぞれの組織からRNAを採取した。採取したRNAからcDNAを合成してリアルタイムPCRを行った。その相対的発現量は内在性コントロールを18SリボソームRNAとし、標準曲線法あるいはCt法で算出した。

【0055】

実施例4：HFD誘導性の好中球遊走におけるC5aの重要な役割

C5aは好中球を活性化することができるため、HFDを与えずにC5aで処置したマウスにおいてIVM分析を行った。2 μ g/kgのマウスC5aを尾静脈より投与し、90分後にIVMによる白血球遊走の観察と末梢血白血球に対するフローサイトメトリーを行った。C5aを投与すると、マウスの大腿動脈における白血球の遊走が顕著に誘導された(図3c)。また、C5aによる処置は、野生型マウスにおける末梢好中球の数を有意に増加させた(溶媒のみ:7.38 \pm 0.17%, n=4; C5a:12.41 \pm 1.55%, n=4; P<0.05; 図3d)。これらのデータは、大腿動脈におけるHFD誘導性好中球遊走においてC5aが果たす役割の重要性を示している。さらに、C5a受容体アンタゴニスト(C5aR)の注入は、HFD誘導性白血球遊走を有意に減少させた(図3e)。野生型マウスに高脂肪食を与えて0.3mg/kg/dayのC5aRアンタゴニストあるいはコントロールを毎日腹腔内投与した。4週間後にIVMによる白血球遊走の観察を行った。

10

20

【0056】

実施例5：HFDによる好中球におけるMCP-1発現の増加

HFDの持続は、血清MCP-1レベルを増加させる。HFDを与えたマウスでは、血清MCP-1レベルが4週間の時点で早くも、NCを与えたマウスに比べて有意に増加していた(HFD:268.1 \pm 40.6 pg/ml, n=8; NC:115.1 \pm 10.43 pg/ml, n=8; P<0.01; 図4a)。様々な組織におけるMCP-1の発現レベルを測定したところ、HFDを4週間与えた後にはMCP-1レベルが白血球において非常に高くなっていた(図4b)。好中球はMCP-1の受容体と推定されるCCR2を発現していなかったため、発明者らは、好中球がHFDに反応してMCP-1を産生したという仮説を立てた。この仮説を確認するために、好中球(Ly6g⁺)と単球/リンパ球(Ly-6G⁻)において別々にMCP-1の発現レベルが測定された。図4cに示されているように、HFDは好中球ではMCP-1の発現を有意にアップレギュレートしたが、単球/リンパ球ではそうしなかった(Ly-6G⁻, NC:1.00 \pm 0.15, HFD:1.21 \pm 0.71; Ly-6G⁺, NC:1.49 \pm 0.73, HFD:5.01 \pm 1.10, n=3; P<0.05)。また、C5aRアンタゴニストは、HFD給餌マウスの血清中におけるMCP-1レベルを有意に低下させた(溶媒のみ:330.4 \pm 49.92 pg/ml, n=4; C5aR:189.8 \pm 11.72 pg/ml, n=4; P<0.05; 図4d)。野生型マウスに高脂肪食を与えて0.3mg/kg/dayのC5aRアンタゴニストあるいはコントロールを毎日腹腔内投与した。4週間後に血中MCP-1濃度の測定をELISA法により行った。

30

40

【0057】

好中球におけるMCP-1発現に対するC5aの直接的な影響を示すために、発明者らは、好中球へ分化したHL60におけるC5a処理下でのMCP-1発現を調べた。HL-60細胞を好中球様に分化させるために10%牛胎児血清1.3%DMSO含有RPMI1640で5日間培養した。分化した細胞に3nMのC5aを添加して1時間後に回収し、mRNAを分離した。MCP-1発現を検討するためにリアルタイムPCRを行った。C5a処理下におけるMCP-1の発現は、好中球へ分化したHL60では、対照と比較して有意に増加していた(対照:1.00 \pm 0.24, n=5; C5a:2.58 \pm 1.15, n=5; P<0.05; 図4e)。これとは対照的に、未分化のHL-60にお

50

けるMCP-1の発現レベルは、C5a処理と対照との間で異なっておらず（対照：1.00 ± 0.24, n = 5; C5a: 0.62 ± 0.27, n = 4）、これは、C5aが分化した好中球に作用することを示している。これらの結果は、C5aが好中球におけるMCP-1の発現を誘導することを示している。

【0058】

実施例6：内膜白血球のHFD誘導性の増加には好中球由来のMCP-1が必要とされる

血管の内膜および内側の領域における炎症をモニターするため、大腿動脈試料の単一細胞懸濁液のフローサイトメトリー分析を行った。血管内膜に集積する白血球と接着した白血球について解析を行った。野生型マウスあるいはCCR2^{-/-}マウスに高脂肪食あるいは普通食を4週間与えて左心室からPBS(-)を還流して脱血した。CCR2^{-/-}マウスはDr. K. Egashiraより譲渡されたものを使用した。大腿動脈を採取して2匹分を1つにまとめて1サンプルとした。採取した血管をコラゲナーゼ処理によって単一細胞懸濁液にし、ナイロンメッシュに通して遠心した。得られた細胞に下記の抗体を反応させて染色し、フローサイトメトリーを行った。

Anti-mouse CD11b-FITC

Anti-mouse CD11c-PE

Anti-mouse CD45-PerPC

Anti-mouse/rat CCR2-APC

【0059】

HFDを4週間与えると、NCを与えた場合に比べて、大腿動脈におけるCD45陽性細胞の数が有意に増加していた（HFD: 7.21 ± 0.67%, n = 7; NC: 3.47 ± 0.50%, n = 7; P < 0.0001; 図5a）。CCR2欠損（CCR2^{-/-}）マウスを使用してMCP-1/CCR2シグナルを阻害すると、HFDに関連するCD45陽性細胞の減少が大腿動脈において見られた（HFD: 2.40 ± 0.38%, n = 7; NC: 2.62 ± 0.51%, n = 7; 図5a）。図5aに示されているように、CD45陽性細胞の大部分はCD11bとCD11cについて陽性であった。これらの内膜白血球における好中球の重要性を確認するために、好中球の枯渇がHFDを4週間与えた野生型マウスにおいて行われた。図5bに示されているように、好中球の枯渇は、大腿動脈におけるHFD誘発性の内膜CD45陽性細胞を有意に減少させた（対照IGG: 11.38 ± 0.82%, n = 6; 1A8: 8.96 ± 0.69%, n = 6; P < 0.05）。

さらに、野生型マウスにマウスC5aを28日間投与したところ、大腿動脈における内膜CD45陽性細胞の数が対照に比べて有意に増加していた（溶媒のみ: 5.38 ± 0.69%, n = 7; C5a: 8.41 ± 1.04%, n = 8; P < 0.05; 図5c）。これらの結果は、血清MCP-1のアプレギュレーション、末梢好中球、および血清C5aが、HFDによる内膜CD45陽性細胞の増加において重要な役割を果たすことを示している。

【0060】

実施例7：被検者由来の血液試料の分析

抗凝固剤としてEDTA、クエン酸ナトリウムあるいはヘパリンを使用して被検者より採血し、血漿あるいは血清を分離する。1次抗体を吸着させた96ウェルプラスチックマイクロプレートに0.02% Tween 20含有PBS(-)で3回洗浄し、1% BSA含有PBS(-)を加える。30分静置し、0.02% Tween 20含有PBS(-)で3回洗浄してサンプルあるいは基準液を添加する。室温で1.5時間静置後0.02% Tween 20含有PBS(-)で3回洗浄して、ビオチンラベルされた2次抗体を加え、1.5時間静置する。0.02% Tween 20含有PBS(-)で3回洗浄してHRP-ストレプトアビジンを加えて30分静置する。0.02% Tween 20含有PBS(-)で3回洗浄してTMB基質を加えて15分後に0.6N硫酸を加えて反応を停止させる。吸光度450nmを測定して検量線からサンプル中のC5a濃度を算出する。

【0061】

実施例8：冠動脈疾患患者と非患者における血中C5a濃度の分析

心臓カテーテル検査施行者99名(男性88名、女性11名;平均年齢67.2±0.8歳)を対象として、血中C5a濃度を測定した。対象者から得られた血漿について、ELISA法を用いて血中C5a濃度を測定した。96ウェルプレートに抗C5a抗体を加えて一晚静置し、プレート底面に抗体を吸着させて洗浄後5%BSA入りPBS(-)溶液を添加してブロッキングを行った。続いて調整したC5a基準溶液と血漿を各ウェルに添加し、反応させた。その後プレートを洗浄してビオチン結合した抗C5a抗体を加えて反応させ、洗浄後アビジン-HRPを添加した。洗浄後、発色基質である3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)溶液を加えて発色させてH₂SO₄溶液によって反応停止した。その後マイクロプレートリーダーを用いて450nmの吸光度を測定し、標準物質より標準曲線を作成して各サンプルのC5a濃度を算出した。

10

【0062】

血中C5a濃度の測定終了後、統計処理を行った。心臓カテーテル検査施行者について、75歳未満とそれ以上の2群分け、それぞれの群において冠動脈に狭窄のあった群となかった群での血中C5a濃度の比較検定を行った。Kruskal-Wallis検定を行い、その後の結果によりDunnの多重解析を行った。P値が0.05未満を有意差ありとした。結果として、75歳以上の冠動脈に狭窄のあった群において、血中C5a濃度が有意に上昇していることが判明した。

【0063】

本明細書には、本発明の好ましい実施態様を示してあるが、そのような実施態様が単に例示の目的で提供されていることは、当業者には明らかであり、当業者であれば、本発明から逸脱することなく、様々な変形、変更、置換を加えることが可能であろう。本明細書に記載されている発明の様々な代替的实施形態が、本発明を実施する際に使用されることが理解されるべきである。

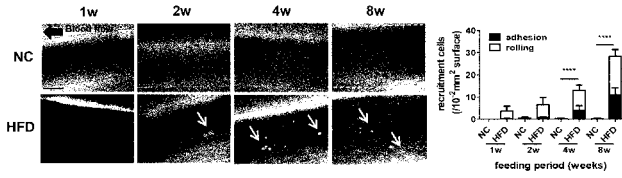
20

【産業上の利用可能性】**【0064】**

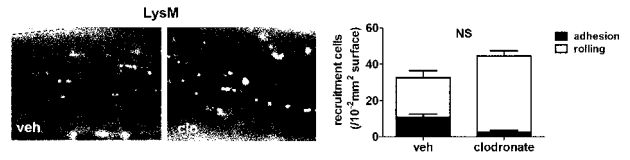
上記のとおり、発明者らは、補体成分C5aが動脈硬化症発症前の血管炎症が起こる前より血液中で上昇することを見出した。C5aの上昇により好中球が活性化し、血管内膜への好中球接着と白血球集積が誘導され、さらに、ほかの炎症性因子(MCP-1)の増加が招かれる。また、C5aを抑制することで好中球接着と白血球集積、炎症性因子の発現は減弱することが確認された。このC5aの上昇は他の炎症性因子やマーカーの上昇に先じて起こり、発症前に特異的であることから、従来検査法に比べ、より早期の段階において利用可能な、動脈硬化性疾患発症リスクの予測因子として有用である。また、当業者には、動脈硬化性疾患の発症前またはその極めて初期の時点で血中に存在するC5aの活性を抑制することで、動脈硬化性疾患を治療または予防することも可能であると理解される。

30

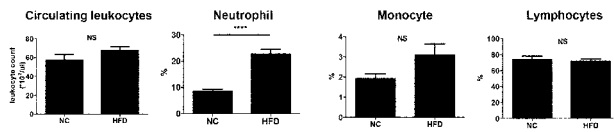
【 1 a 】



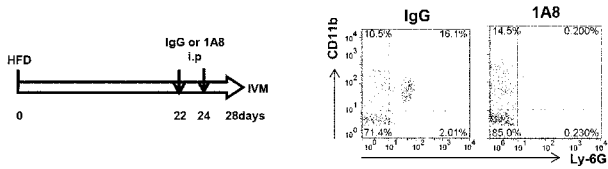
【 2 c 】



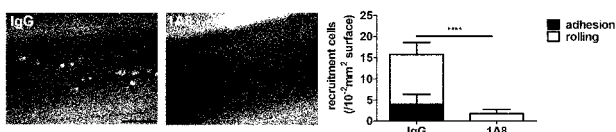
【 1 b 】



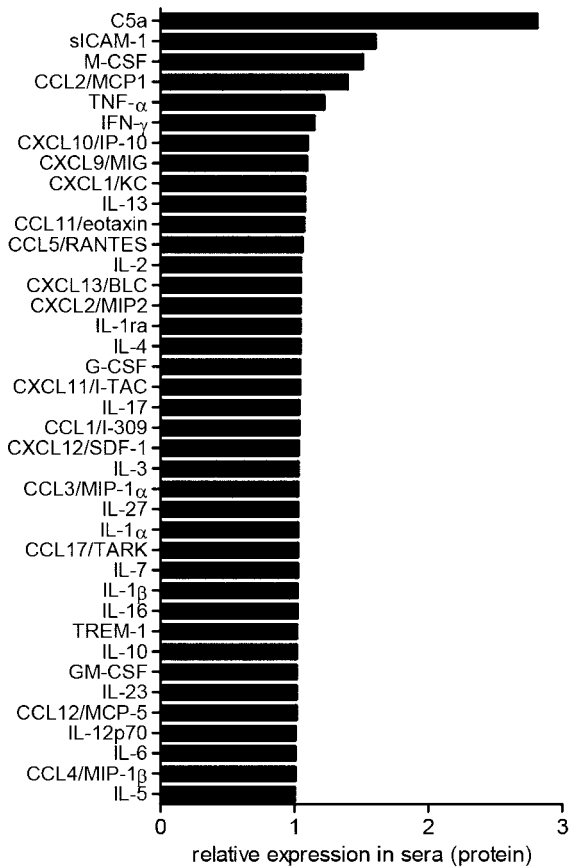
【 2 a 】



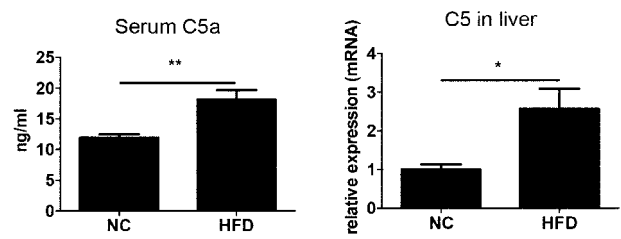
【 2 b 】



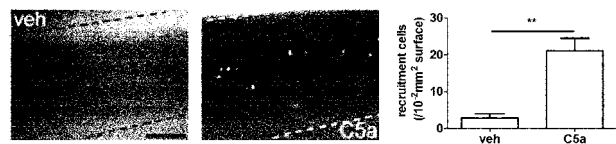
【 3 a 】



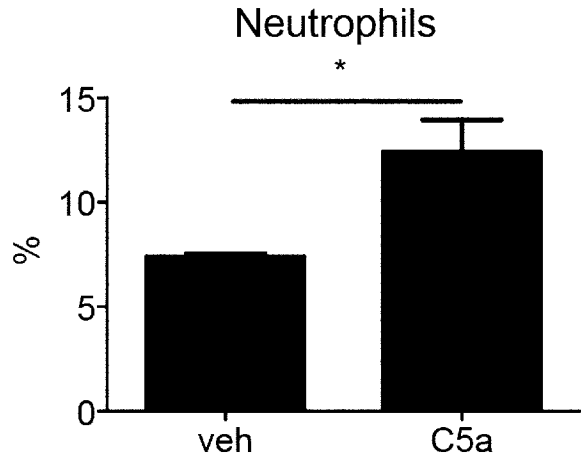
【 3 b 】



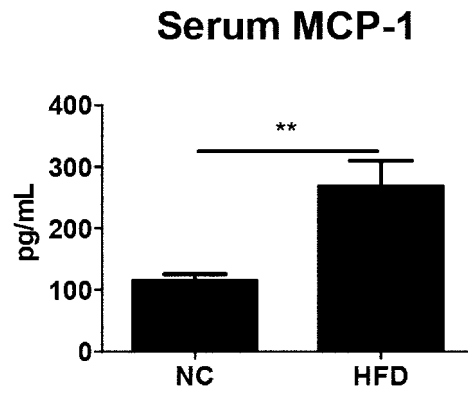
【 3 c 】



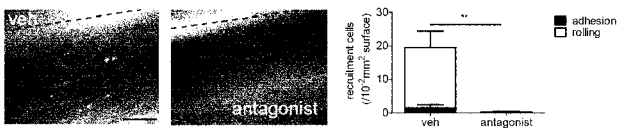
【 3 d 】



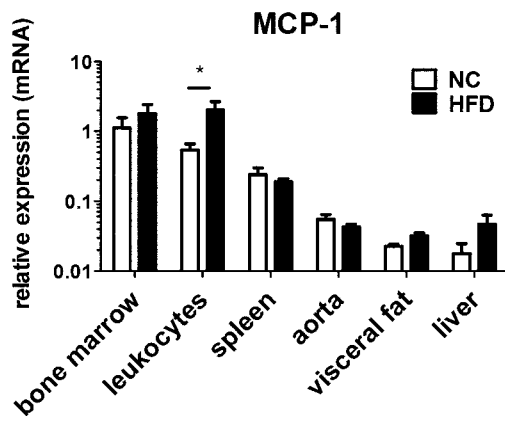
【 4 a 】



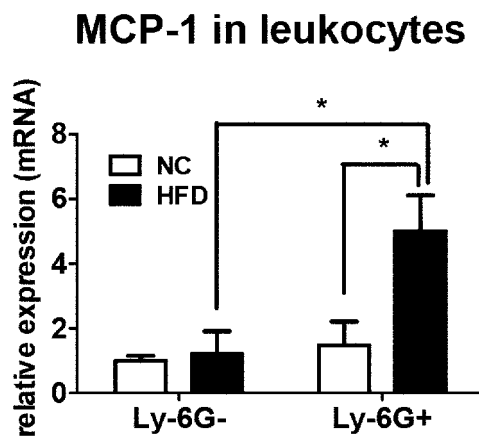
【 3 e 】



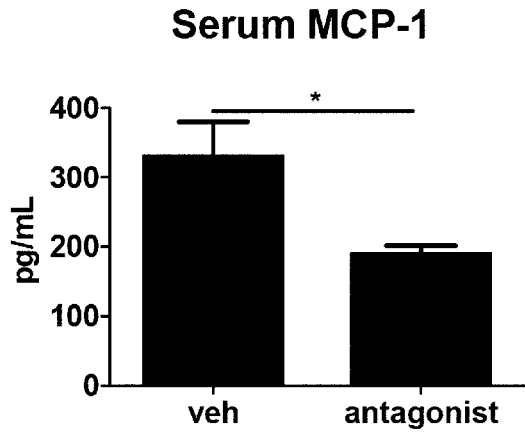
【 4 b 】



【 4 c 】

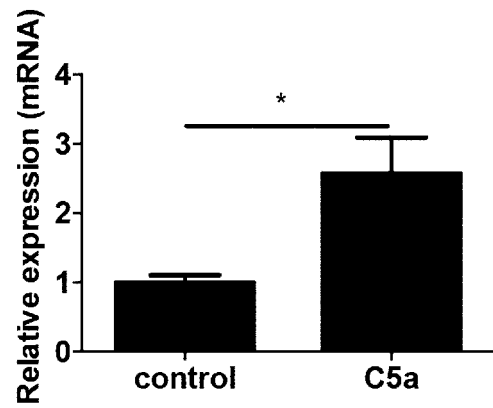


【 図 4 d 】

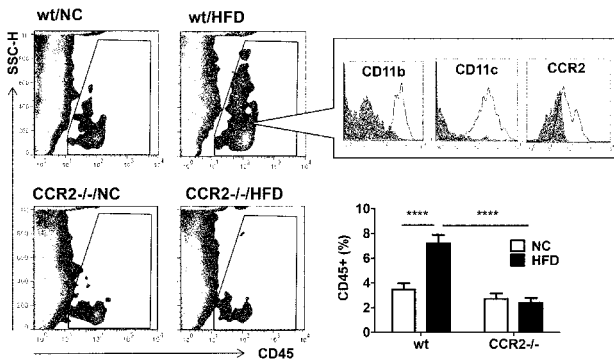


【 図 4 e 】

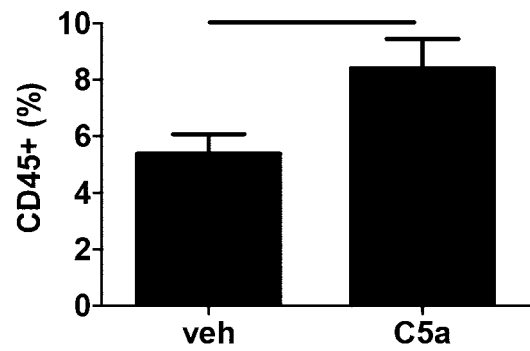
MCP-1 in neutrophil-like HL60



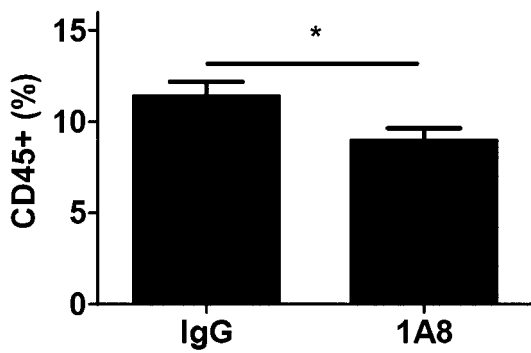
【 図 5 a 】



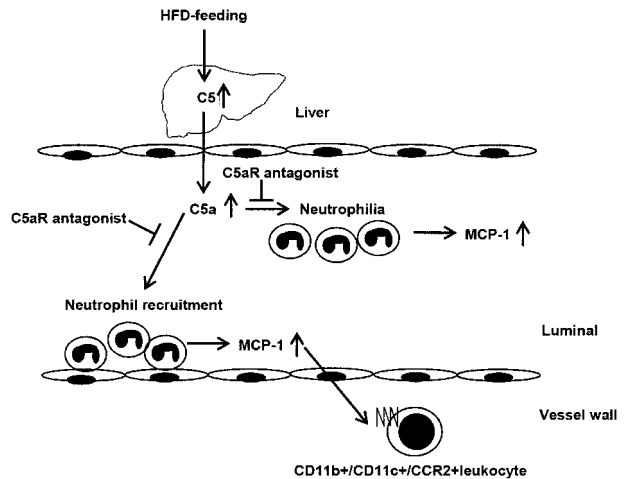
【 図 5 c 】



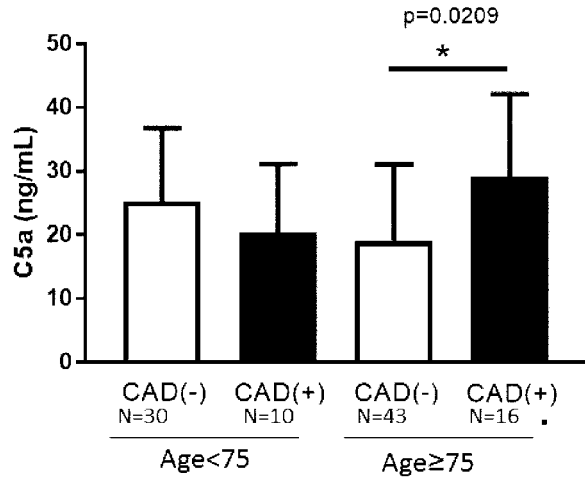
【 図 5 b 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 配列表 】

2017142055000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2017/005836
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/53(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)n 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) G01N33/53, A61K45/00, A61P9/10, G01N33/543, C07K14/47 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 1996-2017 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 8-109200 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 30 April 1996 (30.04.1996), paragraph [0002] (Family: none)	9-12
Y	JP 10-130167 A (Cetus Oncology Corp.), 19 May 1998 (19.05.1998), claims & JP 62-269699 A & EP 245993 A2 claims	9-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "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		"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 "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 "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 "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 24 April 2017 (24.04.17)		Date of mailing of the international search report 16 May 2017 (16.05.17)
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/JP2017/005836

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2010-501164 A (G2 Inflammation Pty Ltd.), 21 January 2010 (21.01.2010), claims; paragraph [0154] & JP 5162587 B2 & WO 2008/022390 A1 page 31, lines 20 to 36 & EP 2051997 A1 & KR 10-2009-0053899 A & CN 101506237 A	13-14
X	JP 2013-6879 A (Mitsubishi Tanabe Pharma Corp.), 10 January 2013 (10.01.2013), claims 5, 6 & JP 5203696 B2 & EP 1852431 A1 claims 28, 29 & US 2008/0194640 A1 & WO 2006/082975 A1 & CN 101119986 A & KR 10-2008-0004460 A	1-14
A	JP 2015-518852 A (Affiris AG), 06 July 2015 (06.07.2015), paragraph [0056] & WO 2013/174920 A1 page 15, lines 5 to 10 & US 2015/0166620 A1 & EP 2666785 A1 & CN 104507966 A	1-14
A	WO 2015/178237 A1 (Iwate Medical University), 26 November 2015 (26.11.2015), (Family: none)	1-14
A	JP 2011-232218 A (Hitachi, Ltd.), 17 November 2011 (17.11.2011), & US 2013/0040851 A1 & WO 2011/136080 A1	1-14
A	WO 2013/147123 A1 (Osaka University), 03 October 2013 (03.10.2013), & US 2015/0050675 A1 & EP 2837938 A1	1-14
A	WO 2005/007087 A2 (NEUROGEN CORP.), 27 January 2005 (27.01.2005), & US 2006/0154917 A1	1-14
P,X	Mizuko OSAKA, "Atheroma-sei Domyakukokasho no Shinten ni Okeru Hotai Seibun C5a no Yakuwari", Annual Scientific Meeting of the Japan Atherosclerosis Society Program Shorokushu, 30 June 2016 (30.06.2016), vol.48th, page 229, 2P-103	1-14
A	PATEL S, ApoE-/- Mice Develop Atherosclerosis in the Absence of Complement Component C5, Biochem Biophys Res Commun, 2001.08.10, Vol.286 No.1, Page.164-170, Abstract, page 164, right column, DISCUSSION	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/005836

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TANHEHCO E J, Sublytic complement attack reduces infarct size in rabbit isolated hearts: evidence for C5a-mediated cardioprotection, Immunopharmacology, 2000.09, Vol.49 No.3, Page.391-399, page 396, right column	1-14
A	Emi MITSUI, "Effect of anticomplementary agent (K-76 COONa) on experimental atherosclerosis in rabbits", Journal of Nihon University Medical Association, 1990.04, vol.49, no.4, pages 357 to 366, summary, I.6., page 363, left column	1-14
A	Masanobu KAWAKAMI, "Cytokine and complication of dialysis patient. Centering on its mechanism. Cytokine and long-term dialysis syndrome. Cytokine and arteriosclerosis", The Japanese journal of clinical dialysis, 1996.06, vol.12, no.6, pages 715 to 722, V.1.	1-14
A	SHAGDARSUREN Erdenechimeg, C5a Receptor Targeting in Neointima Formation After Arterial Injury in Atherosclerosis-Prone Mice, Circulation, 2010.09.07, Vol.122 No.10, Page.1026-1036, Abstract, Introduction	1-14
A	HOVLAND, A, LDL APHERESIS AND INFLAMMATION - IMPLICATIONS FOR ATHEROSCLEROSIS, SCAND J IMMUNOL, 2012.09, VOL.76 NO.3, PAGE.229-236, Complement in LDL atheresis	1-14
A	SPEIDL, WALTER S, ATHEROSCLEROSIS AND COMPLEMENT: ANAPHYLATOXIN C5A AS A NEW RISK MARKER AND THERAPEUTIC TARGET, CLINICAL LIPIDOLOGY, 2011, VOL.6 NO.2, PAGE.123-126	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/005836

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Document 1 (JP 8-109200 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 30 April 1996 (30.04.1996), paragraph [0002] (Family: none)) describes that C5a relates to arteriosclerosis. Thus, correlating C5a to arteriosclerosis cannot be considered as a special technical feature of the invention.

Therefore, it appears that claims 1-14 of the present application have two inventions including a first invention according to claims 1-12 that relates to the prediction of the onset risk of an arteriosclerotic disease and a second invention according to claims 13 and 14 that relates to a composition to be used for treating or preventing an arteriosclerotic disease, said composition comprising a substance inhibiting the binding of C5a protein to C5a receptor.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 0 5 8 3 6													
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)n															
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. G01N33/53, A61K45/00, A61P9/10, G01N33/543, C07K14/47															
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2017年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2017年	日本国実用新案登録公報	1996-2017年	日本国登録実用新案公報	1994-2017年				
日本国実用新案公報	1922-1996年														
日本国公開実用新案公報	1971-2017年														
日本国実用新案登録公報	1996-2017年														
日本国登録実用新案公報	1994-2017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) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/BIOSIS (STN)															
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													
Y	JP 8-109200 A (武田薬品工業株式会社) 1996.04.30, [0002] (ファミリーなし)	9-12													
Y	JP 10-130167 A (シータス オンコロジー コーポレーション) 1998.05.19, 特許請求の範囲 & JP 62-269699 A & EP 245993 A2 (Claims)	9-12													
X	JP 2010-501164 A (ジーツー インフラメイション プロプライエ タリー リミテッド) 2010.01.21, [特許請求範囲] [0154] &	13-14													
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。															
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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)</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>				* 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、一般的な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	
* 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、一般的な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 24.04.2017		国際調査報告の発送日 16.05.2017													
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) 三木 隆	2 J 3312												
		電話番号 03-3581-1101 内線 3252													

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 0 5 8 3 6
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
	JP 5162587 B2 & WO 2008/022390 A1 (page.31 lines20-36) & EP 2051997 A1 & KR 10-2009-0053899 A & CN 101506237 A	
X	JP 2013-6879 A (田辺三菱製薬株式会社) 2013.01.10, [請求項5] [請求項6] & JP 5203696 B2 & EP 1852431 A1 (Claim28, 29) & US 2008/0194640 A1 & WO 2006/082975 A1 & CN 101119986 A & KR 10-2008-0004460 A	1-14
A	JP 2015-518852 A (アフィリス・アクチェンゲゼルシャフト) 2015.07.06, [0056] & WO 2013/174920 A1 (page.15 lines5-10) & US 2015/0166620 A1 & EP 2666785 A1 & CN 104507966 A	1-14
A	WO 2015/178237 A1 (学校法人岩手医科大学) 2015.11.26, (ファミリーなし)	1-14
A	JP 2011-232218 A (株式会社日立製作所) 2011.11.17, & US 2013/0040851 A1 & WO 2011/136080 A1	1-14
A	WO 2013/147123 A1 (国立大学法人大阪大学) 2013.10.03, & US 2015/0050675 A1 & EP 2837938 A1	1-14
A	WO 2005/007087 A2 (NEUROGEN CORPORATION) 2005.01.27, & US 2006/0154917 A1	1-14
PX	大坂瑞子, アテローム性動脈硬化症の進展における補体成分 C5a の役割, 日本動脈硬化学会総会・学術集会プログラム・抄録集, 2016.06.30, Vol.48th, Page.229 2P-103	1-14
A	PATEL S, ApoE-/- Mice Develop Atherosclerosis in the Absence of Complement Component C5, Biochem Biophys Res Commun, 2001.08.10, Vol.286 No.1, Page.164-170, Abstract, 164 ページ右欄, DISCUSSION	1-14
A	TANHEHCO E J, Sublytic complement attack reduces infarct size in rabbit isolated hearts: evidence for C5a-mediated cardioprotection, Immunopharmacology, 2000.09, Vol.49 No.3, Page.391-399, 396 ページ右欄	1-14
A	三井重美, ウサギの実験的動脈硬化に及ぼす K-76 COONa の影響, 日大医学雑誌, 1990.04, Vol.49 No.4, Page.357-366, 要旨, I.6., 363 ページ左欄	1-14

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2017/005836
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	川上正のぶ, サイトカインと透析患者の合併症 そのメカニズムを中心に サイトカインと長期透析症候群 サイトカインと動脈硬化, 臨床透析, 1996.06, Vol.12 No.6, Page.715-722, V.1.	1-14
A	SHAGDARSUREN Erdenechimeg, C5a Receptor Targeting in Neointima Formation After Arterial Injury in Atherosclerosis-Prone Mice, Circulation, 2010.09.07, Vol.122 No.10, Page.1026-1036, Abstract, Introduction	1-14
A	HOWLAND, A, LDL APHERESIS AND INFLAMMATION - IMPLICATIONS FOR ATHEROSCLEROSIS, SCAND J IMMUNOL, 2012.09, VOL. 76 NO. 3, PAGE. 229-236, Complement in LDL atheresis	1-14
A	SPEIDL, WALTER S, ATHEROSCLEROSIS AND COMPLEMENT: ANAPHYLATOXIN C5A AS A NEW RISK MARKER AND THERAPEUTIC TARGET, CLINICAL LIPIDOLOGY, 2011, VOL. 6 NO. 2, PAGE. 123-126	1-14

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 0 5 8 3 6

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

文献1：JP 8-109200 A (武田薬品工業株式会社) 1996.04.30, [0002] (ファミリーなし)には、C5aが動脈硬化症に関与していることが記載されているので、C5aと動脈硬化症とを関連付けることは発明の特別な技術的特徴とはならない。

してみると、本願請求項1～14には、動脈硬化性疾患の発症リスクを予測する請求項1～12に係る第1発明と、C5aタンパク質とC5a受容体との結合を阻害する物質を含む脈硬化性疾患の治療または予防に用いるための組成物である請求項13、14に係る第2発明の2つの発明が含まれていることになる。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2015年1月)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, KH, 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

Fターム(参考) 4C084 AA17 NA14 ZA451 ZA452 ZC421 ZC422

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。