

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4801930号
(P4801930)

(45) 発行日 平成23年10月26日(2011.10.26)

(24) 登録日 平成23年8月12日(2011.8.12)

(51) Int. Cl.		F I	
GO 1 N 33/574 (2006.01)		GO 1 N 33/574	A
GO 1 N 27/62 (2006.01)		GO 1 N 27/62	V
GO 1 N 33/50 (2006.01)		GO 1 N 33/50	Z N A F
CO 7 K 14/47 (2006.01)		CO 7 K 14/47	
CO 7 K 14/75 (2006.01)		CO 7 K 14/75	

請求項の数 10 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2005-134627 (P2005-134627)
 (22) 出願日 平成17年5月2日(2005.5.2)
 (65) 公開番号 特開2006-308533 (P2006-308533A)
 (43) 公開日 平成18年11月9日(2006.11.9)
 審査請求日 平成20年5月1日(2008.5.1)

(73) 特許権者 504019456
 株式会社MCBI
 茨城県つくば市松代4-9-29
 (73) 特許権者 000001993
 株式会社島津製作所
 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100111741
 弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規肝がんバイオマーカーおよび該バイオマーカーを用いた肝がんの検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号17で表されるアミノ酸配列からなるインター トリプシンインヒビター重鎖H4前駆体の部分ペプチドの糖鎖付加体、配列番号17で表されるアミノ酸配列からなるインター トリプシンインヒビター重鎖H4前駆体の部分ペプチド及び配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるインター トリプシンインヒビターの部分ペプチドからなる群から選択される少なくとも一つのインター トリプシンインヒビターの部分ペプチドからなる肝がん検出のための肝がんバイオマーカー。

【請求項2】

肝がん患者生体試料中において、正常人生体試料中と比較し出現または増加する、請求項1記載の肝がんバイオマーカー。

【請求項3】

生体試料中の請求項1 または2 に記載の少なくとも一つの肝がんバイオマーカーを測定することを含む、肝がんの検出方法。

【請求項4】

生体試料中の請求項1 または2 に記載の少なくとも一つの肝がんバイオマーカーを測定し、該バイオマーカーが正常人と比較して多く存在する場合に、肝がん罹患していると判断する肝がんの検出方法。

【請求項5】

検出が酵素もしくは蛍光標識抗体法または質量分析法により行われる請求項3 または4

に記載の肝がんの検出方法。

【請求項 6】

配列番号 17 で表されるアミノ酸配列からなるインター トリプシンインヒビター重鎖 H4前駆体の部分ペプチドの糖鎖付加体、配列番号 17 で表されるアミノ酸配列からなるインター トリプシンインヒビター重鎖 H4前駆体の部分ペプチド及び配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなるインター トリプシンインヒビターの部分ペプチドからなる群から選択される少なくとも一つのインター トリプシンインヒビターの部分ペプチドを測定するための肝がんの検出キット。

【請求項 7】

配列番号 17 で表されるアミノ酸配列からなるインター トリプシンインヒビター重鎖 H4前駆体の部分ペプチドの糖鎖付加体、配列番号 17 で表されるアミノ酸配列からなるインター トリプシンインヒビター重鎖 H4前駆体の部分ペプチド及び配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなるインター トリプシンインヒビターの部分ペプチドからなる群から選択される少なくとも一つのインター トリプシンインヒビターの部分ペプチドに対する抗体もしくはアプタマーを含む肝がんの検出キット。

10

【請求項 8】

抗体またはアプタマーが基板上に固相化されている請求項 7 記載の検出キット。

【請求項 9】

配列番号 17 で表されるアミノ酸配列からなるインター トリプシンインヒビター重鎖 H4前駆体の部分ペプチドの糖鎖付加体、配列番号 17 で表されるアミノ酸配列からなるインター トリプシンインヒビター重鎖 H4前駆体の部分ペプチド及び配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなるインター トリプシンインヒビターの部分ペプチドからなる群から選択される少なくとも一つのインター トリプシンインヒビターの部分ペプチドをバイオマーカーとして用いる肝がんの検出方法であって、生体試料中の該部分ペプチドの種類、存在量および/または存在比を測定し、部分ペプチドプロファイルを得ることを含む、肝がんの検出方法。

20

【請求項 10】

検出が酵素もしくは蛍光標識抗体法または質量分析法により行われる請求項 9 記載の肝がんの検出方法。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本発明は、肝がんの検出に用い得る新規なペプチドバイオマーカーおよび該ペプチドバイオマーカーを用いた肝がんの検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

生体の正常と正常以外の状態を呈する試料を用いてその差違を判別する手段としては、一般的には体外診断薬において用いられてきた技術が主たる従来技術である。体外診断薬のうち最も多いのが、血液中の成分をバイオマーカーとして分析することで診断検査を行うものである。本分野における従来技術では、血液中の単独の特定のタンパク質または分子量 1 万以下のいわゆるペプチドの存在量、あるいは酵素タンパク質の場合は活性の測定を行って、正常（健常人）試料と疾患試料との明らかな差をもって診断の一助としてきた。すなわちあらかじめ一定数の健常人と疾患患者由来の試料における単独もしくは複数の特定のタンパク質またはペプチドの量もしくは活性量を計測し、異常値と正常値の範囲を決め、評価する試料を同様の方法で測定し、異常値と正常値のどちらの範囲に属するかによって検査評価を行うものである。

40

【0003】

具体的な計測方法としては、試料をそのまま、またはあらかじめ希釈しておき、単独または複数の特定のタンパク質またはペプチドの量を、基質と反応させると発色する酵素によって標識された特異的 1 次抗体または 2 次抗体を用いて、試料の発色量で計測する酵素

50

結合免疫吸着測定法 (ELISA; enzyme linked immunosorbent assay) や化学発光測定法 (CLIA; chemiluminescent immunoassay) と 1 次抗体または 2 次抗体に結合させたラジオアイソトープを用いて計測する放射性免疫測定法 (RIA; radioimmunoassay)、タンパク質が酵素の場合は直接基質を与えて産物を発色などで計測する酵素活性測定法などがある。また酵素の基質分解産物を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析する方法もある。

【 0 0 0 4 】

肝がん検出 (診断) のためのマーカーとして、従来より AFP (フェトプロテイン)、PIVKA II (非特許文献 1 参照)、KM-2 (非特許文献 2 参照)、CA125 (非特許文献 3 参照) 等が用いられていた。しかしながら、これらのマーカーは肝がんの特異性や陽性率が十分でなく、信頼できるマーカーとはいえなかった。

10

【 0 0 0 5 】

また、これらの肝がんに対するマーカーも含めて従来のバイオマーカーの計測ターゲットは分解などを受けていないタンパク質 (以下インタクトなタンパク質) であった。

【 0 0 0 6 】

分解産物を計測する検査方法として、唯一アルツハイマー病におけるアミロイドベータタンパク質の難溶性分解産物である A_β42 がある。これはアルツハイマー病の発症要因のひとつと考えられている難溶性 A_β42 を髄液や血液中で計測する検査方法 (特許文献 1 参照) である。ここでタンパク質の分解とは細胞内で起こるプロセッシングやタンパク質の寿命による分解を主とするペプチド断片生成を伴うタンパク質の構造変化とし、タンパク質の消化分解とはこれに加えて細胞外でおこるペプチド断片を生ずるタンパク質分解を含めたものと定義する。

20

【 0 0 0 7 】

臨床における体外診断薬として質量分析を用いた計測はまだ行われていないが、研究レベルでは国内外でタンパク質のディファレンシャル解析技術としてタンパク質の質量分析が広く用いられている。もともと従来のタンパク質発現解析技術として二次元電気泳動法が広く用いられてきた。しかしタンパク質や 1 万以下の分子量のペプチドは検出感度が十分でないため、最近では生体試料をカラムクロマトグラフィーによって分画し、その画分に含まれるタンパク質とペプチドを質量分析によって分析する手法がある。またカラムクロマトグラフィーではなく、前処理としてプロテインチップを用いて質量分析する方法や、前処理として磁気ビーズを用いて質量分析する方法がある。またインタクトなタンパク質の解析を目的としてトリプシンなどで分解した後、上記の方法で質量分析まで行う方法も報告されている (特許文献 2 参照)。しかしいづれもインタクトなタンパク質の性質を利用して、そのまま分画し、または特異的に吸着するタンパク質分子を選別して質量分析で解析するものである。

30

【 0 0 0 8 】

【特許文献 1】特開平 07-51096 号公報

【特許文献 2】特開 2004-333274 号公報

【非特許文献 1】Fujiyama S.ら、Cancer 61、pp1621-1628 (1988)

【非特許文献 2】Kumagai Y.等、Cancer Res. 52、pp4987-4994 (1992)

【非特許文献 3】Elias J.等、Int. J. Cancer 46、pp805-807 (1990)

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 9 】

本発明は、正常人と肝がん患者において存在の有無、存在量が異なるタンパク質およびその部分ペプチドを用いて肝がんを検出する方法を提供し、さらに該部分ペプチドからなる肝がん検出のためのバイオマーカーの提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 0 】

本発明者は、肝がんを検出する方法について鋭意検討を行い、正常人においてインタク

50

トなタンパク質として存在するタンパク質が肝がん患者において、転写または翻訳合成の低下を引き起こすように制御され、または消化分解され種々の消化分解産物ペプチドとして部分ペプチドを生成し、またはタンパク質の翻訳合成においてスプライシング異常等により、部分ペプチドとして翻訳合成されることを見出した。さらに、本発明者は、肝がんの進行とともに消化分解または翻訳合成されるタンパク質の種類や生成する部分ペプチドの種類や量が変動することを見出した。特に本発明者は、特定のタンパク質の部分ペプチドが正常人では検出されず肝がん患者において特異的に検出され、また正常人のみで検出され肝がん患者では検出されないことを見出した。本発明者らは、生体から得た生体試料中のこれらのタンパク質および部分ペプチドの種類および量を測定することにより、肝がんを正確に検出（診断）することができ、肝がんの進行度等を評価することができることを見出した。

10

【0011】

具体的には、本発明者は、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるフィブリノーゲン鎖、配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるフィブリノペプチドA like、配列番号5で表されるアミノ酸配列からなる補体C4A、配列番号7で表されるアミノ酸配列からなるインタートリプシンインヒビター、配列番号9で表されるアミノ酸配列からなるゲルソリン、配列番号11で表されるアミノ酸配列からなるアポリポプロテインA1、配列番号13で表されるアミノ酸配列からなる2マクログロブリン、配列番号15で表されるアミノ酸配列からなる1アンチトリプシン、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるフィブリノーゲン鎖の部分ペプチド、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるフィブリノペプチドA likeの部分ペプチド、配列番号6で表されるアミノ酸配列からなる補体C4Aの部分ペプチド、配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるインタートリプシンインヒビターの部分ペプチド、配列番号10で表されるアミノ酸配列からなるゲルソリンの部分ペプチド、配列番号12で表されるアミノ酸配列からなるアポリポプロテインA1の部分ペプチド、配列番号14で表されるアミノ酸配列からなる2マクログロブリンの部分ペプチド、配列番号16で表されるアミノ酸配列からなる1アンチトリプシンの部分ペプチド、配列番号17で表されるアミノ酸配列からなるインタートリプシンインヒビター重鎖H4前駆体の部分ペプチドが肝がん検出のためのバイオマーカーとして用い得ることを見出した。

20

【0012】

本発明者らは、さらに、これらのタンパク質や消化分解産物ペプチド等の部分ペプチドを酵素免疫吸着測定法や質量分析法を用いることにより、一度に多数のタンパク質および消化分解産物ペプチド等の部分ペプチドを測定することに成功し、本発明を完成させるに至った。

30

【0013】

すなわち、本発明の態様は以下のとおりである。

[1] 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるフィブリノーゲン鎖、配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるフィブリノペプチドA like、配列番号5で表されるアミノ酸配列からなる補体C4A、配列番号7で表されるアミノ酸配列からなるインタートリプシンインヒビター、配列番号9で表されるアミノ酸配列からなるゲルソリン、配列番号11で表されるアミノ酸配列からなるアポリポプロテインA1、配列番号13で表されるアミノ酸配列からなる2マクログロブリン、配列番号15で表されるアミノ酸配列からなる1アンチトリプシン、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるフィブリノーゲン鎖の部分ペプチド、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるフィブリノペプチドA likeの部分ペプチド、配列番号6で表されるアミノ酸配列からなる補体C4Aの部分ペプチド、配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるインタートリプシンインヒビターの部分ペプチド、配列番号10で表されるアミノ酸配列からなるゲルソリンの部分ペプチド、配列番号12で表されるアミノ酸配列からなるアポリポプロテインA1の部分ペプチド、配列番号14で表されるアミノ酸配列からなる2マクログロブリンの部分ペプチド、配列番号16で表されるアミノ酸配列からなる1アンチトリプシンの部分ペプチド、配列番号

40

50

17で表されるアミノ酸配列からなるインター トリプシンインヒビター重鎖H4前駆体の部分ペプチドからなる群から選択される少なくとも1つのタンパク質またはペプチドからなる肝がん検出のための肝がんバイオマーカー。

【0014】

[2] 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるフィブリノーゲン鎖、配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるフィブリノペプチドA like、配列番号5で表されるアミノ酸配列からなる補体C4A、配列番号7で表されるアミノ酸配列からなるインター トリプシンインヒビター、配列番号9で表されるアミノ酸配列からなるゲルソリン、配列番号11で表されるアミノ酸配列からなるアポリポプロテインA1、配列番号13で表されるアミノ酸配列からなる 2マクログロブリン、配列番号15で表されるアミノ酸配列からなる 1アンチトリプシンからなる群から選択されるタンパク質である、肝がん患者生体試料中において、正常人生体試料中と比較し減少または消失する肝がんバイオマーカー。

10

【0015】

[3] 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16および17からなる群から選択される配列番号で表されるアミノ酸配列からなるペプチドである肝がんバイオマーカー。

[4] 配列番号2、6、8、14、16および17からなる群から選択される配列番号で表されるアミノ酸配列からなるペプチドである、肝がん患者生体試料中において、正常人生体試料中と比較し出現または増加する肝がんバイオマーカー。

【0016】

[5] 配列番号4、10および12からなる群から選択される配列番号で表されるアミノ酸配列からなるペプチドである、肝がん患者生体試料中において、正常人生体試料中と比較し減少または消失する肝がんバイオマーカー。

20

[6] 生体試料中の[1]~[5]のいずれかの少なくとも1つの肝がんバイオマーカーを測定することを含み、肝がんの検出方法。

【0017】

[7] 生体試料中の[4]の少なくとも1つの肝がんバイオマーカーを測定し、該バイオマーカーが正常人と比較して多く存在する場合に、肝がん罹患していると判断する肝がんの検出方法。

[8] 生体試料中の[5]の少なくとも1つの肝がんバイオマーカーを測定し、該バイオマーカーが正常人と比較して少なく存在する場合に、肝がん罹患していると判断する肝がんの検出方法。

30

【0018】

[9] 検出が酵素もしくは蛍光標識抗体法または質量分析法により行われる[6]~[8]のいずれかの肝がんの検出方法。

[10] 配列番号1~17からなる群から選択される配列番号で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質およびペプチド群の少なくとも1つを測定するための肝がんの検出キット。

【0019】

[11] 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16および17からなる群から選択される配列番号で表されるアミノ酸配列からなるペプチド群の少なくとも1つを測定するための肝がんの検出キット。

40

[12] 配列番号1~17からなる群から選択される配列番号で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質およびペプチド群の少なくとも1つに対する抗体もしくはアプタマーを含む肝がんの検出キット。

【0020】

[13] 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16および17からなる群から選択される配列番号で表されるアミノ酸配列からなるペプチド群の少なくとも1つに対する抗体もしくはアプタマーを含む肝がんの検出キット。

[14] 抗体またはアプタマーが基板上に固相化されている[12]または[13]の検出キット。

50

【0021】

[15] 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるフィブリノーゲン鎖、配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるフィブリノペプチドA like、配列番号5で表されるアミノ酸配列からなる補体C4A、配列番号7で表されるアミノ酸配列からなるインタートリプシンインヒビター、配列番号9で表されるアミノ酸配列からなるゲルソリン、配列番号11で表されるアミノ酸配列からなるアポリポプロテインA1、配列番号13で表されるアミノ酸配列からなる2マクログロブリン、配列番号15で表されるアミノ酸配列からなる1アンチトリプシン、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるフィブリノーゲン鎖の部分ペプチド、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるフィブリノペプチドA likeの部分ペプチド、配列番号6で表されるアミノ酸配列からなる補体C4Aの部分ペプチド、配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるインタートリプシンインヒビターの部分ペプチド、配列番号10で表されるアミノ酸配列からなるゲルソリンの部分ペプチド、配列番号12で表されるアミノ酸配列からなるアポリポプロテインA1の部分ペプチド、配列番号14で表されるアミノ酸配列からなる2マクログロブリンの部分ペプチド、配列番号16で表されるアミノ酸配列からなる1アンチトリプシンの部分ペプチド、配列番号17で表されるアミノ酸配列からなるインタートリプシンインヒビター重鎖H4前駆体の部分ペプチドの少なくとも1つをバイオマーカーとして用いる肝がんの検出方法であって、生体試料中の該タンパク質および/または部分ペプチドの種類、存在量および/または存在比を測定し、タンパク質/部分ペプチドプロファイルを得ることを含む、肝がんの検出方法。

10

20

【0022】

[16] 2種類以上のタンパク質および部分ペプチドをバイオマーカーとして用いる[15]の方法。

[17] 検出が酵素もしくは蛍光標識抗体法または質量分析法により行われる[15]または[16]の肝がんの検出方法。

【発明の効果】

【0023】

本発明によれば、被験体由来の生体試料中の配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるフィブリノーゲン鎖、配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるフィブリノペプチドA like、配列番号5で表されるアミノ酸配列からなる補体C4A、配列番号7で表されるアミノ酸配列からなるインタートリプシンインヒビター、配列番号9で表されるアミノ酸配列からなるゲルソリン、配列番号11で表されるアミノ酸配列からなるアポリポプロテインA1、配列番号13で表されるアミノ酸配列からなる2マクログロブリン、配列番号15で表されるアミノ酸配列からなる1アンチトリプシンからなる群から選択される少なくとも1つのインタクトなタンパク質および/または配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるフィブリノーゲン鎖の部分ペプチド、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるフィブリノペプチドA likeの部分ペプチド、配列番号6で表されるアミノ酸配列からなる補体C4Aの部分ペプチド、配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるインタートリプシンインヒビターの部分ペプチド、配列番号10で表されるアミノ酸配列からなるゲルソリンの部分ペプチド、配列番号12で表されるアミノ酸配列からなるアポリポプロテインA1の部分ペプチド、配列番号14で表されるアミノ酸配列からなる2マクログロブリンの部分ペプチド、配列番号16で表されるアミノ酸配列からなる1アンチトリプシンの部分ペプチド、配列番号17で表されるアミノ酸配列からなるインタートリプシンインヒビター重鎖H4前駆体の部分ペプチドからなる群から選択される該タンパク質の少なくとも1つの消化分解産物ペプチド等の部分ペプチドの種類および量を計測することにより、被験体が肝がん罹患しているかを診断することができる。また、肝がんの進行度がどの程度かも診断することができる。

30

40

【0024】

本発明は、また精度および特異性の両方が極めて高い診断システムを提供する。本発明によって精度の高い診断がはじめて可能になる。また、本発明によって、肝がんの早期診

50

断が可能になる。さらに、本発明のバイオマーカーは、薬剤効果判定においても有用性が高い。

【発明を実施するための最良の形態】

【0025】

本発明は、被験体の生体内において正常状態ではインタクトなタンパク質として存在するが、生体が肝がんに罹患している状態では該インタクトなタンパク質の部分ペプチドが生じるとき、インタクトなタンパク質および/またはその部分ペプチドの種類および量を検出すると同時に、インタクトなタンパク質とその部分ペプチドの種類と量の変動を測定することにより被験体が肝がんに罹患しているか、肝がんに罹患している場合の肝がんの進行度を診断する方法である。ここで、ペプチドは、一般的には分子量1万以下のアミノ酸が連結したものをいい、あるいはアミノ酸残基の数としては数個から50個以下程度のものをいう。本発明においては、インタクトなタンパク質の部分ペプチドを肝がん検出のためのバイオマーカーとして用い得るが、部分ペプチドという場合、インタクトなタンパク質の有するアミノ酸配列の一部の部分的アミノ酸配列を有するペプチドであって分子量1万以下のものをいう。本発明において、インタクトなタンパク質の部分ペプチドとは、インタクトなタンパク質の有するアミノ酸配列の一部の部分的アミノ酸配列を有するペプチドをいい、転写・翻訳による発現合成過程で部分ペプチドとして生成する場合と、インタクトなタンパク質として合成された後に、生体内で消化分解を受けて消化分解産物ペプチドとして生成する場合がある。この原因としては、生体が肝がん等の正常以外の状態にあるときに、タンパク質の合成および制御機構が脱制御されることが挙げられる。すなわち、本発明は、生体内のタンパク質の発現合成および/または消化分解を指標として被験体が正常状態であるか肝がんに罹患しているかを判別し、また肝がんに罹患している場合の肝がんの進行度をも評価判別する方法でもある。本発明において、肝がんの検出とは、被験体が肝がんに罹患しているかどうかの評価判別、すなわち診断を行うことをいう。また、被験体が肝がんに罹患するリスクの決定等も含む。

【0026】

本発明の方法において、肝がん検出のためのバイオマーカーとして用い得るインタクトなタンパク質として、具体的には、フィブリノーゲン鎖(配列番号1)、フィブリノペプチドA like(配列番号3)、補体C4A(配列番号5)、インタートリプシンインヒビター(配列番号7)、ゲルソリン(Gelsolin)(配列番号9)、アポリポプロテインA1(配列番号11)、 α 2マクログロブリン(配列番号13)および1-アンチトリプシン(配列番号15)が挙げられる。

【0027】

また、肝がん検出のためのバイオマーカーとして用い得るこれらの部分ペプチドとして、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16および17で表されるアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。配列番号2、4、6、8、10、12、14、16および17で表されるペプチドは、それぞれフィブリノーゲン鎖(配列番号1)、フィブリノペプチドA like(配列番号3)、補体C4A(配列番号5)、インタートリプシンインヒビター(配列番号7)、ゲルソリン(Gelsolin)(配列番号9)、アポリポプロテインA1(配列番号11)、 α 2マクログロブリン(配列番号13)および1-アンチトリプシン(配列番号15)の部分ペプチドである。本発明においては、上記のインタクトなタンパク質および部分ペプチドをマーカーとして用いるが、配列番号1~17に表されるアミノ酸配列において、1個または数個のアミノ酸が欠失、置換、付加したアミノ酸配列からなるタンパク質およびペプチドも含み、これらのタンパク質またはペプチドも本発明の方法においてバイオマーカーとして用いることができる。ここで、「1個または数個」とは「1個または3個」、「1個または2個」または「1個」をいう。

【0028】

なお、上記ペプチド中、配列番号2、6、8、14、16または17で表されるアミノ酸配列からなるペプチドは、正常人には検出可能なレベルで存在しないが、肝がん患者では検出可能なレベルで存在するペプチドである。一方、配列番号4、10または12で表

10

20

30

40

50

されるアミノ酸配列からなるペプチドは、正常人には検出可能なレベルで存在するが、肝がん患者では検出可能なレベルで存在しないペプチドである。前者のペプチドについては、存在を指標に肝がんを検出することができ、後者のペプチドについては、非存在を指標に肝がんを検出することができる。

【 0 0 2 9 】

なお、インタクトなタンパク質またはその部分ペプチドに糖鎖が付加されることがある。本発明は、これらの糖鎖の付加を指標に肝がんを検出する方法も包含し、これらの糖鎖が付加したタンパク質および部分ペプチドも肝がん検出のためのバイオマーカーとして用い得る。このような部分ペプチドとして、例えば配列番号 17 で表されるペプチドが挙げられる。

10

【 0 0 3 0 】

ある被験体から血清等の生体試料を採取し、試料中のタンパク質および部分ペプチドの種類とそれぞれの種類の量を測定した場合、タンパク質および部分ペプチドの種類およびそれぞれの量についての情報を含む該試料の特徴あるタンパク質 / 部分ペプチドプロファイルが得られる。ここで、タンパク質 / 部分ペプチドプロファイルとは、インタクトなタンパク質およびその部分ペプチドの種類および存在量で示されるタンパク質およびその部分ペプチドの存在パターンをいう。部分ペプチドがインタクトなタンパク質の分解産物である場合、タンパク質 / 消化分解産物ペプチドプロファイルという。このタンパク質 / 部分ペプチドプロファイルを上記のインタクトなタンパク質およびその部分ペプチドについて分析することにより、被験体が正常か、または肝がん罹患しているか、さらに肝がんの進行度を知ることができる。

20

【 0 0 3 1 】

本発明において、バイオマーカーとして上記タンパク質および部分ペプチドのうち少なくとも一つのタンパク質および / または部分ペプチドを用いることができるが、好ましくは 2 種類以上、さらに好ましくは 3 種類以上、4 種類以上、5 種類以上、6 種類以上、7 種類以上、8 種類以上、9 種類以上または 10 種類以上のタンパク質または部分ペプチドを用いるとより高精度で肝がんを検出することができる。この場合、異なるタンパク質の組み合わせでもよいし、あるタンパク質とそのタンパク質以外のタンパク質の部分ペプチドあるいは部分ペプチドの組み合わせであってもよい。また、複数のインタクトなタンパク質のみをバイオマーカーとしてもよい。このように、複数のタンパク質または部分ペプチドをバイオマーカーとして用いることにより、肝がんをより正確に検出ことができ、また肝がんの進行状態を的確に判断することができる。

30

【 0 0 3 2 】

なお、本発明において、バイオマーカーを定量してもよいし、定性により存在、非存在を決定してもよい。同じ種類のタンパク質または部分ペプチドをバイオマーカーとして用いる場合、各バイオマーカーを定量し、正確な濃度を得た上で、タンパク質 / 部分ペプチドプロファイルを得た方が正確な判断をし得るが、バイオマーカーの種類が増える場合、それぞれのバイオマーカーの存在または非存在を定性的に測定し、存在または非存在に関するタンパク質 / 部分ペプチドプロファイルを得れば正確な判断が可能になる。

【 0 0 3 3 】

配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるフィブリノーゲン 鎖、配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるフィブリノペプチド A like、配列番号 5 で表されるアミノ酸配列からなる補体 C4A、配列番号 7 で表されるアミノ酸配列からなるインター トリプシンインヒビター、配列番号 9 で表されるアミノ酸配列からなるゲルソリン、配列番号 11 で表されるアミノ酸配列からなるアポリポプロテイン A1、配列番号 13 で表されるアミノ酸配列からなる 2 マクログロブリン、配列番号 15 で表されるアミノ酸配列からなる 1 アンチトリプシン、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるフィブリノーゲン 鎖の部分ペプチド、配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなるフィブリノペプチド A like の部分ペプチド、配列番号 6 で表されるアミノ酸配列からなる補体 C4A の部分ペプチド、配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなるインター トリプシンインヒビターの部分ペプ

40

50

チド、配列番号10で表されるアミノ酸配列からなるゲルソリンの部分ペプチド、配列番号12で表されるアミノ酸配列からなるアポリポプロテインA1の部分ペプチド、配列番号14で表されるアミノ酸配列からなる2マクログロブリンの部分ペプチド、配列番号16で表されるアミノ酸配列からなる1アンチトリプシンの部分ペプチド、配列番号17で表されるアミノ酸配列からなるインタートリプシンインヒビター重鎖H4前駆体の部分ペプチドの少なくとも1つをマーカーとして用いる肝がんの検出方法であって、生体試料中の該タンパク質および/または部分ペプチドの種類、存在量および/または存在比を測定し、タンパク質/部分ペプチドプロファイルを得て、該プロファイルを解析することにより肝がんを検出することができる。

【0034】

例えば、フィブリノゲン鎖(配列番号1)、フィブリノペプチドA like(配列番号3)、補体C4A(配列番号5)、インタートリプシンインヒビター(配列番号7)、ゲルソリン(Gelsolin)(配列番号9)、アポリポプロテインA1(配列番号11)、2マクログロブリン(配列番号13)および1-アンチトリプシン(配列番号15)は肝がん患者において、消化分解を受け得るので、これらのタンパク質の少なくとも1つのタンパク質の量の減少または消失は、肝がんへの罹患を示し得る。また、配列番号2、6、8、14、16または17で表されるアミノ酸配列からなるペプチドは、正常人には検出可能なレベルで存在しないが、肝がん患者では検出可能なレベルで存在するペプチドである。一方、配列番号4、10または12で表されるアミノ酸配列からなるペプチドは、正常人には検出可能なレベルで存在するが、肝がん患者では検出可能なレベルで存在しないペプチドである。従って、配列番号2、6、8、14、16または17で表されるアミノ酸配列からなるペプチドの量の出現または増加は、肝がんへの罹患を示し得る。また、配列番号4、10または12で表されるアミノ酸配列からなるペプチドの量の減少または消失は、肝がんへの罹患を示し得る。すなわち、上記プロファイルを解析し、フィブリノゲン鎖(配列番号1)、フィブリノペプチドA like(配列番号3)、補体C4A(配列番号5)、インタートリプシンインヒビター(配列番号7)、ゲルソリン(Gelsolin)(配列番号9)、アポリポプロテインA1(配列番号11)、2マクログロブリン(配列番号13)および1-アンチトリプシン(配列番号15)のうちの少なくとも1種類の量が正常人に比較して減少するかまたは消失し、配列番号2、6、8、14、16または17で表されるアミノ酸配列からなるペプチドのうちの少なくとも1種類の量が正常人に比較して出現または増加し、配列番号4、10または12で表されるアミノ酸配列からなるペプチドの量が正常人に比較して減少または消失している場合、肝がん罹患していると判断することができる。

【0035】

本発明でバイオマーカーとして用いるタンパク質は、例えば正常である被験体の血清等の生体試料および肝がん患者である被験体の血清等の生体試料を等電点電気泳動およびSDS-PAGEを組み合わせた二次元電気泳動に同時につけ、電気泳動により移動したタンパク質を適当な方法で染色しスポットとして顕在化させた場合に、正常人において存在し、肝がん患者において消失または薄くなるスポットのタンパク質が挙げられる。従って、正常人から得た生体試料と肝がん患者から得た生体試料について二次元電気泳動を行ったときは、後者で消失または薄くなったスポットのタンパク質を選択することができる。二次元電気泳動は公知の方法で行うことができ、また市販の電気泳動装置を用いて行うことができる。また、二次元電気泳動の代わりに、例えば2種類のクロマトグラフィーを用いた、二次元HPLCを用いてもよい。この場合の2種類のクロマトグラフィーは、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等の公知のクロマトグラフィーから選択すればよい。この際、二次元HPLCを自動的にを行い各画分について自動的に質量分析を行う自動装置を用いることにより、一度の大量の試料を迅速に調べることができる。

【0036】

本発明の方法によれば、被験体の肝がん罹患するリスクの大きさも評価することがで

10

20

30

40

50

き、予防医学にも有用である。さらに、肝がんに罹患した患者に投薬治療を行った場合、肝がんは治癒する方向に進み、それに応じてタンパク質/部分ペプチドプロファイルも変動する。これを測定することにより、投薬効果の評価判定を行うこともできる。従って、本発明の部分ペプチドは、薬剤効果判定エンドポイントのためのバイオマーカーとなり得る。また、肝がんの予後を予測することも可能である。さらに、本発明の方法により、創薬ターゲット生体分子をスクリーニングすることができる。生体内のインタクトなタンパク質の多くは生理活性タンパク質として作用している。生体が正常状態にあるときは、該タンパク質の生理活性は、発現合成量の制御、酵素によるプロセッシング、酵素による活性化等により制御されている。生理活性を有するインタクトなタンパク質は、その活性を制御する制御部位と活性を發揮する活性部位を有する場合があり、インタクトなタンパク質全体として、生体の状態により活性が制御されている。しかしながら、生体が正常以外の状態にある場合、インタクトなタンパク質の発現が影響を受け、または消化分解されて部分ペプチドが生じた場合、部分ペプチド自体が活性部位を有しているが、制御部位を有していない場合、生体の状態による活性の制御を受けなくなる場合がある。この場合、部分ペプチドは、生体の状態に拘わらず作用し、結果として生体を正常以外の状態、例えば疾患状態に誘導してしまう。また、部分ペプチド自体が制御部位を有している場合もあり、この場合は、本来インタクトなタンパク質が受けるべき制御を部分ペプチドが受け、ドミナントネガティブ効果により、インタクトなタンパク質が活性の制御から逸脱してしまう。この場合も、部分ペプチドの影響で生体を正常以外の状態、例えば疾患状態に誘導してしまう。このように、部分ペプチドが疾患等の正常以外の状態の原因物質となっている場合、この部分ペプチドの活性を抑えることにより、正常以外の状態を正常状態に回復させることができる。本発明の方法においては、正常以外の状態におけるタンパク質/部分ペプチドプロファイルを得ることができ、部分ペプチドの活性を分析することにより、疾患等の原因となる部分ペプチドを決定することができる。すなわち、本発明の方法により、創薬ターゲット生体分子をスクリーニングすることができる。

10

20

【0037】

本発明の方法において、生体試料中のタンパク質/部分ペプチドプロファイルを調べるが、用いる生体試料は限定されない。例えば、生体から採取し得る液体試料、例えば全血、血清、血しょう、尿、唾液等の体液が挙げられる。なお、生体試料の保存状態によっては、生体試料中のタンパク質および部分ペプチドがさらに分解を受けることもあるので、生体試料は凍結融解を繰り返さずに用いるのが好ましい。また、生体試料中にプロテアーゼインヒビター等を添加してもよい。

30

【0038】

生体試料中のタンパク質の種類および量は種々の方法で測定することができる。以下に例示するが、それらには限定されない。

1. 酵素免疫吸着測定法 (ELISA)

特定のインタクトなタンパク質とその部分ペプチドに対する抗体をあらかじめ特殊な化学修飾をしたマイクロタイタープレート等の担体に結合させる。結合は、物理的吸着、官能基を利用した共有結合等、公知の方法で行うことができる。使用する抗体は(1)特定のタンパク質の完全長のみを認識する抗体、(2)部分ペプチドのみを認識する抗体、(3)特定のタンパク質とその部分ペプチドの両方を認識する抗体のすべて、または上記(1)と(2)、(1)と(3)、もしくは(2)と(3)の組み合わせでもよい。試料を原液または緩衝液で段階希釈後、抗体を結合させたマイクロタイタープレートにこれを適当量加え、インキュベーションする。その後洗浄し、捕捉されなかったタンパク質および部分ペプチドを除く。次に蛍光もしくは化学発光物質または酵素を結合させた2次抗体を加えインキュベーションする。検出はそれぞれの基質を加えた後、蛍光もしくは化学発光物質または酵素反応による可視光を計測することによって評価判定を行う。

40

【0039】

また、部分ペプチドがより多くなる場合は、用いる抗体の種類を多くし、あるいは組み合わせを多くすればよい。

50

【0040】

この例は、抗体を用いた方法であるが、抗体の代わりにインタクトなタンパク質またはその部分ペプチドに結合し得る物質を用いてもよい。例えば、アプタマー等を用いることができる。

【0041】

本発明は、酵素免疫吸着測定法により、肝がんを検出するための装置をも包含する。該装置は、少なくとも抗体もしくはアプタマー固定部（捕捉部）ならびに測定部を含む。抗体またはアプタマー固定部は、抗体またはアプタマーを固相化したスライドガラス、96ウェルタイタープレート等の固相担体からなる。また、測定部は、分光光度計、蛍光分光光度計等の光検出手段からなる。さらに、本発明の装置は、得られたデータを解析する解析部を含んでいてもよく、解析部はデータ処理装置および解析用ソフトウェアを含む。

10

【0042】

2. マイクロアレイ（マイクロチップ）を用いた方法

マイクロアレイとは、担体（基板）上に測定しようとする物質に結合し得る物質を整列（アレイ）固定化させたデバイスを総称していう。本発明の場合、上記1のように、インタクトなタンパク質および部分ペプチドに対する抗体またはアプタマーを整列固定化させて用いればよい。マイクロアレイの担体としては、スライドガラス、ニトロセルロース膜等種々のものを用いることができる。固定化は、上記1の場合と同様に行うこともできるが、市販のマイクロアレイヤーやスポッターを用いることにより容易に行うことができる。マイクロアレイ法においては、固相化量は少なくてもすみ、測定しようとするタンパク質濃度もフェクトモルオーダーで足りる。また、一枚の担体の上に数百から数万の物質を整列固定化することが可能であるので、測定しようとするタンパク質および部分ペプチドの種類および量が多い場合に適している。測定は、上記1と同様に、固相化した抗体等に、生体試料を添加し、マイクロアレイ上に測定しようとするタンパク質または部分ペプチドを結合させ、次に蛍光もしくは化学発光物質または酵素を結合させた2次抗体を加えインキュベーションする。検出はそれぞれの基質を加えた後、蛍光もしくは化学発光物質または酵素反応による可視光を計測すればよい。

20

【0043】

本発明は、マイクロアレイを用いた方法により、肝がんを検出するための装置をも包含する。該装置の構成は、上記1に記載の装置の構成と同様である。

30

【0044】

3. 質量分析法

タンパク質および分解産物ペプチド等の部分ペプチドを質量分析計を用いた質量分析法により解析することもできる。質量分析計は、試料導入部、イオン化室、分析部、検出部、記録部等を含む。イオン化法としては電子衝撃イオン化（EI）法、化学イオン化（CI）法、フィールドデソープション（FD）法、二次イオン化（SIMS）法、高速原子衝突（FAB）法、matrix-assisted laser desorption ionization（MALDI）法、エレクトロスプレーイオン化（ESI）法等を用いればよい。また、分析部は、二重収束質量分析計、四重極型質量分析計、飛行時間型質量分析計、フーリエ変換質量分析計、イオンサイクロトロン質量分析計等が用いられる。

40

【0045】

例えば、特定のタンパク質とその部分ペプチドに対する抗体をあらかじめ特殊な化学修飾をしたマイクロビーズもしくは基板（プロテインチップ）に結合させる。マイクロビーズは磁気ビーズであってもよい。基板の素材は問わない。使用する抗体は（1）特定のタンパク質の完全長のみを認識する抗体、（2）部分ペプチドのみを認識する抗体、（3）特定のタンパク質とその部分ペプチドの両方を認識する抗体のすべて、または上記（1）と（2）、（1）と（3）、もしくは（2）と（3）の組み合わせでもよい。試料を原液または緩衝液で段階希釈後、抗体を結合させたマイクロビーズまたは基板にこれを適量加え、インキュベーションする。その後洗浄し、捕捉されなかったタンパク質および部分ペプチドを除く。その後、マイクロビーズまたは基板上に捕捉されたタンパク質および部

50

分ペプチドをMALDI-TOF-MS、SELDI-TOF-MSなどを用いた質量分析によって分析し、各タンパク質および部分ペプチドのピークの質量数とピーク強度を計測する。SELDIとはチップ表面の化学官能基や固定化された分子を利用して、試料中から特定の性質を有する分子をチップ上に捕捉し、その後レーザーを照射することにより捕捉された分子の脱離・イオン化を行う方法をいう。SELDI-TOF-MSは、例えば特表2005-509173に記載の方法に従って行うことができる。質量分析の前にトリプシンなどの特定のタンパク質分解酵素によってすべてペプチドに分解してもよい。これらの計測から得られたタンパク質および部分ペプチドの質量分析ピーク（質量スペクトル）とピークパターン（質量スペクトルパターン）をソフトウェアによって解析し、試料の評価判定を行う。質量分析による質量スペクトルおよび質量スペクトルパターンからインタクトなタンパク質およびその部分ペプチドの生体試料中での存在パターンがわかり、タンパク質/部分ペプチドプロファイルを得ることができる。

10

【0046】

本発明は、質量分析を用いた方法により、肝がんを検出するための装置をも包含する。該装置は、少なくとも抗体もしくはアプタマー固定部（捕捉部）ならびに質量分析計（測定部）を含む。さらに、本発明の装置は、得られたデータを解析する解析部を含んでいてもよく、解析部はデータ処理装置および解析用ソフトウェアを含む。

【0047】

さらに、上記の方法の他、二次元電気泳動を用いた方法、表面プラズモン共鳴を用いた方法等によっても、タンパク質および部分ペプチドを解析することが可能である。

20

【0048】

従来の技術では、体の正常と正常以外の状態におけるインタクトなタンパク質だけを計測しており、その合成過程において生成する部分タンパク質およびその分解過程で生ずる消化分解産物のペプチドを計測することはできなかった。またインタクトなタンパク質とその合成過程において生成する部分ペプチドおよびその分解過程で生ずる消化分解産物のペプチドの両方を計測できる装置も存在しなかった。

【0049】

本発明の方法により従来達成できなかった病態特異的バイオマーカーを診断に利用できるようになる。本発明で提供する手段と方法は、生体の正常と正常以外の状態におけるインタクトなタンパク質および/またはその合成過程または分解過程で生ずるペプチドの計測を可能にする。

30

【0050】

計測対象物のインタクトなタンパク質とその合成過程または分解過程で生ずる消化分解産物のペプチドに対して作製したそれぞれの抗体を使用することで、計測対象物を選択的に捕捉することができ、従来技術のELISA、RIA、CLIAなどを使用してそれぞれの捕捉量を計測することで、体の正常と正常以外の状態におけるインタクトなタンパク質とその合成過程または分解過程で生ずる消化分解産物のペプチド量もしくは存在比が計測できるようになった。

【0051】

また質量分析法を用いるシステムでは、計測対象物のインタクトなタンパク質その合成過程または分解過程で生ずる消化分解産物のペプチドに対して作製したそれぞれの抗体をマイクロビーズやプロテインチップに結合させることで、感度に優れスループットの高い計測が可能になった。MALDI-TOF-MSなどを用いた質量分析の感度は通常attoモルからzeptoモルレベルであり、ELISA、RIA、CLIAなどよりも優れている。

40

【0052】

本発明は、正常状態にある被験体（正常人）および肝がん罹患している被験体から採取した検体試料を二次元電気泳動に供し、両方の検体試料の電気泳動パターンを比較し、正常人で検出されるが肝がん患者で消失または減少するタンパク質または部分ペプチド、あるいは正常人では検出されないが肝がん患者で検出されるタンパク質または部分ペプチドを同定し、肝がんを検出するためのバイオマーカーをスクリーニングする方法も包含す

50

る。ここで、二次元電気泳動は、等電点電気泳動およびSDS-PAGEを組み合わせた二次元電気泳動が好ましい。また、被験体から採取した生体試料を二次元電気泳動に供し、前記バイオマーカーの有無を指標に肝がんを検出する方法をも包含する。

【実施例】

【0053】

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0054】

実施例1 肝がん患者および健常人由来血清タンパク質の二次元電気泳動解析

(1) 方法

肝がん患者および健常人から得た血清タンパク質100 μgをそれぞれ以下のような二次元電気泳動にて解析した。

【0055】

一次元目の等電点電気泳動は、血清タンパク質を、8M尿素を含む緩衝液に溶解し、13 cmの固定化pH勾配(pH4~7)ストリップ上で80,000 volt 時間泳動した。泳動後のタンパク質を還元アルキル化した後に、二次元目のSDS電気泳動(ゲル濃度15%、ゲル長 16 cm)を行い、ゲル中のタンパク質を銀染色(Silver Staining)した。

【0056】

(2) 結果

本方法において、およそ500のタンパク質由来スポットが検出された。図1が肝がん患者(HCC)由来の血清タンパク質のパターンであり、図2が健常人由来のものである。図中丸で囲んだものは肝がん患者において検出されなかった血清タンパク質である。そのうち、Aは -1 アンチトリプシンであり、Bはハプトグロビンである。この結果は -1 アンチトリプシンならびにハプトグロビンが肝がん患者血清において消失していることを示している。

【0057】

実施例2 二次元液体クロマトグラフィー(2D-LC)MALDI-TOF/MSによる肝がん診断マーカーペプチドの探索

(1) 方法

健常人および肝がん患者の血清25 μlの各々に475 μlの0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)を加え、100 で15分間煮沸した。その後、分子量1万以下のペプチドを回収するためにミリポア社YM-10を用いて限外ろ過をおこなった。回収サンプルを二次元HPLC(SCX陽イオン交換ならびにC18逆相カラム)を用いて1サンプルあたり1,140に分画した。分画されたすべてのサンプルはオンラインで接続されたスポットティングロボット(AccuSpotと命名)を用いて質量分析機(AXIMA CFR plus)サンプル台上にスポットし、マトリックス溶液(-シアノ-ヒドロキシケイ皮酸, CHCA)を混合して共結晶化後にレーザーを照射しリフレクトロンモードで質量を自動測定した。健常人コントロールと肝がん患者サンプルとの発現差異ペプチドの検出は、我々が開発したソフト、ディファレンシャルディスプレイビューワー(Differential Display Viewer)を用いておこなった。発現量に差異の認められたペプチドは、そのまま質量分析機AXIMA QITでMS/MSならびにMSのn乗解析にてアミノ酸配列を決定し、由来タンパク質を同定した。

【0058】

(2) 結果

上記2D-LC MALDI-TOF/MS法を用いて、健常人および肝がん患者血清由来ペプチドを網羅的に差異解析した結果、疾患特異的に検出された、あるいは検出されなかったペプチド断片が以下のように同定された。

【0059】

下のアミノ酸配列は2つの配列のセットを示しているが、1番目の配列の配列全体はインタクトなペプチドもしくはタンパク質の構成アミノ酸の配列を示す。1番目の配列の下線部およびそれぞれの2番目の配列からなるペプチドが検出されたペプチド断片である。

1 はN末端であることを表す。

【 0 0 6 0 】

〔 1 〕 フィブリノーゲン 鎖 配列番号 2 のフィブリノーゲン 鎖由来ペプチドが肝がん患者に特異的に検出された
インタクトタンパク質

001 MFSMRIVCLV LSVVGTAWTA DSGEGDFLAE GGGVRGPRVV ERHQSACKDS
051 DWPFCSEDEDW NYKPCPSGCRM KGLIDEVNQD FTNRINKLKN SLFEYQKNNK
101 DSHSLTTNIM EILRGDFSSA NNRDNTYNRV SEDLRSRIEV LKRKVIEKVQ
151 HIQLLQKNVR AQLVDMKRLE VDIDIKIRSC RGSCSRALAR EVDLKDYEDQ
201 QKQLEQVIAK DLLPSRDRQH LPLIKMKPVP DLVPGNFKSQ LQKVPPEWKA 10
251 LTDMPQMRME LERPGGNEIT RGGSTSYGTG SETESPRNPS SAGSWNSGSS
301 GPGSTGNRNP GSSGTGGTAT WKPSSGPGS TGSWNSGSSG TGSTGNQNP
351 SPRPGSTGTW NPGSSERGA GHWTSESSVS GSTGQWHSES GSFRPDSPGS
401 GNARPNPDW GTFEEVSGNV SPGTRREYHT EKLVTSGDK ELRTGKEKVT
451 SGSTTTTTRS CSKTVTKTVI GPDGHKEVTK EVVTSEDGSD CPEAMDGLTL
501 SGIGTLDGFR HRHPDEAAFF DTASTGKTFP GFFSPMLGEF VSETESRGSE
551 SGIFTNTKES SSHHPGIAEF PSRGKSSSYS KQFTSSTSYN RGDSTFESKS
601 YKMADEAGSE ADHEGTHSTK RGHAKSRPVR GIHTSPLGKP SLSP (配列番号 1)

【 0 0 6 1 】

フィブリノーゲン 鎖由来ペプチド 20

GSESGIFTNTKESSSHHPGIAEFPSRG (配列番号 2)

【 0 0 6 2 】

〔 2 〕 フィブリノペプチドA like 配列番号 4 のフィブリノペプチドA like由来ペプチドが肝がん患者で検出できなかった
インタクトタンパク質

001 MFSMRIVCLV LSVVGTAWTA DSGEGDFLAE GGGVRGPRVV ERHQSACKDS
051 DWPFCSEDEDW NYKPCPSGCRM KGLIDEVNQD FTNRINKLKN SLFEYQKNNK
101 DSHSLTTNIM EILRGDFSSA NNRDNTYNRV SEDLRSRIEV LKRKVIEKVQ
151 HIQLLQKNVR AQLVDMKRLE VDIDIKIRSC RGSCSRALAR EVDLKDYEDQ
201 QKQLEQVIAK DLLPSRDRQH LPLIKMKPVP DLVPGNFKSQ LQKVPPEWKA 30
251 LTDMPQMRME LERPGGNEIT RGGSTSYGTG SETESPRNPS SAGSWNSGSS
301 GPGSTGNRNP GSSGTGGTAT WKPSSGPGS TGSWNSGSSG TGSTGNQNP
351 SPRPGSTGTW NPGSSERGA GHWTSESSVS GSTGQWHSES GSFRPDSPGS
401 GNARPNPDW GTFEEVSGNV SPGTRREYHT EKLVTSGDK ELRTGKEKVT
451 SGSTTTTTRS CSKTVTKTVI GPDGHKEVTK EVVTSEDGSD CPEAMDGLTL
501 SGIGTLDGFR HRHPDEAAFF DTASTGKTFP GFFSPMLGEF VSETESRGSE
551 SGIFTNTKES SSHHPGIAEF PSRGKSSSYS KQFTSSTSYN RGDSTFESKS
601 YKMADEAGSE ADHEGTHSTK RGHAKSRPVR GIHTSPLGKP SLSP (配列番号 3)

【 0 0 6 3 】

フィブリノペプチドA like由来ペプチド 40

DSGEGFLAEGGGV (配列番号 4)

【 0 0 6 4 】

〔 3 〕 補体C4A 配列番号 6 の補体C4A由来ペプチドが肝がん患者で検出された
インタクトタンパク質

0001 MRLLWGLIWA SSFFTL~~SL~~QK PRL~~LL~~FSPSV VHLGVPLSVG VQLQDVPRGQ
0051 VVKG~~S~~VFLRN PSRNNVPCSP KVDFTLSSER DFALLSLQVP LKDAKSCGLH
0101 QLLRGPEVQL VAHSPWLKDS LSRTTNIQGI NLLFSSRRGH LFLQTDQPIY
0151 NPGQRVRYRV FALDQKMRPS TDTITVMVEN SHGLRVRKKE VYMPSSIFQD
0201 DFVIPDISEP GTWKISARFS DGLESNSSTQ FEVKKYVLPN FEVKITPGKP
0251 YILTVPGHLD EMQLDIQARY IYGKPVQGVA YVRFGLLDED GKKTFFRGLE 50

0301 SQTKLVNGQS HISLSKAEFQ DALEKLNMG I TDLQGLRLYV AAAIIEYPPG
 0351 EMEEAELTSW YFVSSPFLSD LSKTKRHLVP GAPFLLQALV REMSGSPASG
 0401 IPVKVSATVS SPGSVPEVQD IQQNTDGSQ VSIP I I I PQT ISELQLSVSA
 0451 GSPHPA IARL TVAAPPSGGP GFLSIERPDS RPPRVGDTLN LNLRAVGSGA
 0501 TFSHYYYMIL SRGQIVFMNR EPKRTLTSVS VFDHHLAPS FYFVAFYYHG
 0551 DHPVANSLRV DVQAGACEGK LELSVDGAKQ YRNGESVKLH LETDSLALVA
 0601 LGALDTALYA AGSKSHKPLN MGKVFEAMNS YDLGCGPGGG DSALQVFQAA
 0651 GLAFSDGDQW TLRKRLSCP KEKTRKRKN VNFQKAI NEK LGQYASPTAK
 0701 RCCQDGVTRL PMMRSCEQRA ARVQQLDCRE PFLSCCQFAE SLRKKSRDKG
 0751 QAGLQRALEI LQEEDLIDED DIPVRSFFPE NWLWRVETVD RFQILTLWLP
 0801 DSLTTWEIHG LSLSKTKGLC VATPVQLRVF REFHLHLRLP MSVRRFEQLE
 0851 LRPVLYNYLD KNLTVSVHVS PVEGLCLAGG GGLAQQLVLP AGSARPVAFS
 0901 VVPTAAAVS LKVVARGSFE FPGDAVSKV LQIEKEGA I H REELVYELNP
 0951 LDHRGR TLEI PGNSDPNMIP DGDFNSYVRV T ASDPLDTLG SEGALSPGGV
 1001 ASLLRLPRGC GEQTM IYLAP TLAASRYLDK TEQWSTLPPE TKDHAVDLIQ
 1051 KGYMRIQQFR KADGSYAOWL SRDSSTWLTA FVLKVLSLAQ EQVGG SPEKL
 1101 QETSNWLLSQ QQADGSFQDP CPVLDRSMQG GLVGNDETVA LTAFTVIALH
 1151 HGLAVFQDEG AEPLKQRVEA SISKANSFLG EKASAGLLGA HAAAITAYAL
 1201 TLTAKAPVDLL GVAHNNLMAM AQETGDNLW GSVTGSQSNA VSPTAPRNP
 1251 SDPMPQAPAL WIETTAYALL HLLLHEGKAE MADQAAAWLT RQGSFQGGFR
 1301 STQDTVIALD ALSAYW IASH TTEERGLNVT LSSTGRNGFK SHALQLNNRQ
 1351 IRGLEEELQF SLGSKINVKV GGNSKGT LKV LRTYNV LDMK NTTCCDLQIE
 1401 VTKVGHVEYT MEANEDYEDY EYDELPAKDD PDAPLQPVTP LQLFEGRRNR
 1451 RRREAPKVVE EQESRVHYTV CIWRNGKVGL SGMAIADVTL LSGFHALRAD
 1501 LEKLTSLSDR YVSHFETEGP HVLLYFDSVP TSRECVGFEA VQEV PVGLVQ
 1551 PASATLYDYY NPERRCSVFY GAPSKSRLLA TLCSAEVCQC AEGKCPRQRR
 1601 ALERGLQDED GYRMKFACY PRVEYGFQVK VLREDSRAAF RLFETKITQV
 1651 LHFTKDVKAA ANQMRNFLVR ASCRLRLEPG KEYLIMGLDG ATYDLEGHPQ
 1701 YLLDSNSWIE EMPSERLCRS TRQRAACAQL NDFLQEYGTQ GCQV

10

20

(配列番号5)

【0065】

補体C4A由来ペプチド

TLEIPGNSDPNMIPDGDFNSYVRVTASD (配列番号6)

【0066】

〔4〕インター トリプシンインヒビター 配列番号8のインター トリプシンインヒビター由来ペプチドが肝がん患者で検出された
 インタクトタンパク質

001 MKPPRPVRTC SKVLVLLSLL AIHQTTTAEK NGIDIYSLTV DSRVSSRFAH
 051 TVVTSRVVNR ANTVQEATFQ MELPKKAFIT NFSMNIDGMT YPGI I KEKAE
 101 AQAQYSAAVA KGKSAGLVKA TGRNMEQFQV SVSVAPNAKI TFELVYEELL
 151 KRRLG VYELL LKVRPQQLVK HLQMDIHIFE PQGISFLETE STFMTNQLVD
 201 ALTTWQNKTK AHIRFKPTLS QQKKSPEQQE TVLDGNLIIR YVDRAISGG
 251 SIQIENGYFV HYFAPEGLTT MPKNVVFVID KSGSMSGRKI QQTREALIKI
 301 LDDLSPRDQF NLIVFSTEAT QWRPSLVPAS AENVNKARSF AAGIQALGGT
 351 NINDAMLMAV QLLDSSNQEE RLPEGSVSLI ILLTDGDPTV GETNPRSIQN
 401 NVREAVSGRY SLFCLGFGFD VSYAFLEKLA LDNGGLARRI HEDSDSALQL
 451 QDFYQEVANP LLTAVTFEYF SNAVEEVTQN NFRLLFKGSE MVVAGKLQDR
 501 GPDVLTATVS GKLPTQNI TF QTESSVAEQE AEFQSPKYIF HNFMERLWAY
 551 LTIQQLLEQT VSASDADQQA LRNQALNLSL AYSFVTPLTS MVVTKPDDQE
 601 QSQVAEKPME GESRNRNVHS GSTFFKYLLQ GAKIPKPEAS FSPRRGWNRQ

40

50

651 AGAAGSRMNF R^{PG}V^{LSS}R^{QL} G^{LP}G^{PPD}V^{PD} H^{AA}Y^{HP}F^{RRL} A^{IL}P^{AS}A^{PPA}
 701 TSNPDP^{AVSR} VM^{NMK}IE^{EET} M^{TTQ}T^{PAP}I^Q A^{PSA}I^{LPL}P^G Q^{SVER}L^{CVDP}
 751 RHRQGP^{VNLL} SD^{PEQ}G^{VEVT} G^{QYER}E^{KAGF} S^{WIE}V^{TFKNP} L^{VVW}H^{ASPEH}
 801 VV^{TRN}R^{RRSS} A^{YKWK}E^{TLFS} V^{MPGL}K^MT^MD K^{TGL}L^LL^LS^{DP} D^{KVT}I^GL^LF^W
 851 DGR^GE^LR^{LL} LRDT^{DR}F^{SSH} V^{GGT}L^GQ^{FYQ} E^{VL}W^GS^{PAAS} D^{DGR}R^TL^{RVQ}
 901 G^{NDH}S^{ATRER} R^{LDY}Q^{EGPPG} V^{EIS}C^{WS}V^{EL} (配列番号7)

【0067】

インター トリプシンインヒビター由来ペプチド

VPD^{HAA}Y^{HPF} (配列番号8)

【0068】

〔5〕ゲルソリン(Gelsolin) 配列番号10のゲルソリン由来ペプチドが肝がん患者で検出できなかった。

インタクトタンパク質

001 M^{APHR}P^{APAL} L^{CAL}S^{LAL}C^A L^{SLP}V^{RAATA} S^{RGAS}Q^{AGAP} Q^{GRV}P^{EARPN}
 051 S^{MV}V^{EHP}E^{FL} K^{AGK}E^{PGLQI} W^{RVE}K^FD^{LVP} V^{PTN}L^{YG}D^{FF} T^{GDAY}V^IL^{KT}
 101 V^{QLR}N^{GNL}Q^Y D^{LHY}W^LG^{NEC} S^{QDES}G^{AAAI} F^{TVQ}L^{DDY}L^N G^{RAV}Q^{HREVQ}
 151 G^{FES}A^{TFL}G^Y F^{KSG}L^{KY}K^{KG} G^{VAS}G^FK^{HVV} P^{NEV}V^VQ^RL^F Q^{VK}G^RR^VV^RA
 201 T^{EV}P^VS^{WESF} N^{NGDC}F^IL^{DL} G^{NNI}H^QW^{CGS} N^{SNR}Y^{ERLKA} T^{QV}S^KG^IR^{DN}
 251 E^{RS}G^{RAR}V^{HV} S^{EEG}T^EP^{EAM} L^{QVL}G^{PK}P^{AL} P^{AGTE}D^{TAKE} D^{AA}N^RK^LA^LK^L
 301 Y^{KV}S^{NG}A^{GTM} S^{VSL}V^AD^{ENP} F^{AQG}A^LK^{SED} C^{FIL}D^HG^{KDG} K^{IFV}W^KG^{KQA}
 351 N^{TEER}K^{AALK} T^{ASDF}I^TK^MD Y^{PKQ}T^QV^SV^L P^{EGG}E^TP^LF^K Q^{FFK}N^{WR}D^{PD}
 401 Q^TD^GL^GL^SY^L S^{SHI}A^NV^{ERV} P^{FDA}A^TL^HT^S T^{AMAA}Q^HG^MD D^{DGT}G^QK^QI^W
 451 R^{IEG}S^{NK}V^{PV} D^{PATY}G^QF^{YG} G^{DSY}I^IL^{YNY} R^{HGG}R^QG^QI^I Y^{NW}Q^GA^QS^{TQ}
 501 D^{EVA}A^{SAI}L^T A^{QL}D^{EEL}G^{GT} P^{VQ}S^RV^VQ^{GK} E^{PAH}L^MS^LF^G G^{KPM}I^IY^{KGG}
 551 T^{SREG}Q^{TAP} A^{STR}L^FQ^{VRA} N^{SAG}A^TR^AV^E V^{LPK}A^GA^{LNS} N^{DAF}V^LK^TP^S
 601 A^{AYL}W^VG^{TGA} S^{EAE}K^TG^{AQE} L^{LRV}L^RA^{QP}V Q^{VAE}G^SE^PD^G F^{WEAL}G^GK^{AA}
 651 Y^RT^SP^RL^{KDK} K^{MDA}H^PP^RL^F A^{CSN}K^IG^RF^V I^{EEV}P^GE^LM^Q E^DL^AT^DD^VM^L
 701 L^DT^WD^QV^FV^W V^{GK}D^SQ^EE^EE^K T^{EAL}T^SA^KR^Y I^{ETD}P^AN^RD^R R^{TPI}T^VV^KQ^G
 751 F^{EP}P^SF^VG^{WF} L^{GW}D^DD^YW^{SV} D^{PL}D^RA^MA^EL A^A (配列番号9)

【0069】

ゲルソリン由来ペプチド

GL^GL^SY^LSS^HI^AN^VE^RV^PF^D (配列番号10)

【0070】

〔6〕アポリポプロテインA1 配列番号12のアポリポプロテインA1由来ペプチドが肝がん患者で検出できなかった

インタクトタンパク質

1 DE^{PPQ}S^PW^{DR} V^{KDL}A^TV^YV^D V^{LK}D^SG (配列番号11)

アポリポプロテインA1由来ペプチド

DE^{PPQ}S^PW^{DR}V^{KDL}A^TV^YV^D (配列番号12)

【0071】

〔7〕2マクログロブリン 配列番号14の2マクログロブリン由来ペプチドが肝がん患者で検出できた

インタクトタンパク質

0001 M^GL^LM^SR^VQ^Y R^{LES}I^WS^PP^A P^SF^CN^MG^KN^K L^LH^PS^LV^LL^L L^VL^LP^TD^AS^V
 0051 S^{GK}P^QY^MV^LV P^SL^LH^TE^TT^E K^GC^VL^LS^YL^N E^TV^TV^SA^SL^E S^VR^GN^RS^LF^T
 0101 D^{LEA}E^NV^VL^H C^{VAF}A^VP^KS^S S^NE^EV^MF^LT^V Q^{VK}G^PT^QE^FK K^RT^TV^MV^KN^E
 0151 D^{SL}V^FV^QT^DK S^{IY}K^PG^QT^VK F^RV^VS^MD^EN^F H^PL^NE^LI^PL^V Y^IQ^DP^KG^NR^I
 0201 A^{QW}Q^SF^QL^EG G^{LK}Q^SF^PL^S S^EP^FQ^GS^YK^V V^{VQ}K^KS^GG^RT E^HP^FT^VE^EF^V
 0251 L^{PK}F^EV^QV^TV P^{KI}I^TI^LE^EE M^NV^SV^CG^LY^T Y^{GK}P^VP^GH^VT V^SI^CR^KY^SD^A
 0301 S^DC^HG^ED^SQ^A F^{CEK}F^SG^QL^N S^{HG}C^FY^QQ^VK T^{KV}F^QL^KR^KE Y^EM^KL^HT^EA^Q

10

20

30

40

50

0351 IQEEGTVVEL TGRQSSE ITR TITKLSFVKV DSHFRQG I PF FGQVRLVDGK
0401 GVP I PNKVIF IRGNEANYYS NATTDEHGLV QFS INTTNVM GTSLTVRVNY
0451 KDRSPCYGYQ WVSEEHEEAH HTAYLVFSPS KSFVHLEPMS HELPCGHTQT
0501 VQAHYILNGG TLLGLKKLSF YYLIMAKGGI VRTGTHGLLV KQEDMKGHFS
0551 ISIPVKSDIA PVARLLIYAV LPTGDVIGDS AKYDVENCLA NKVDLSFSPS
0601 QSLPASHAHL RVTAAPQSVL ALRAVDQSVL LMKPDAELSA SSVYNLLPEK
0651 DLTGFPGPLN DQDDEDC I NR HNVYINGITY TPVSSTNEKD MYSFLEDMGL
0701 KAFTNSKIRK PKMCPQLQQY EMHGPEGLRV GFYESDVMGR GHARLVHVEE
0751 PHTETVRKYF PETWIWDLVV VNSAGVAEVG VTPDITTEW KAGAFCLSED
0801 AGLGISSTAS LRAFQPFVE LTMPYSVIRG EAFTLKATVL NYLPKCI RVS
0851 VQLEASPAFL AVPVEKEQAP HCICANGRQT VSWAVTPKSL GNVNFTVSAE
0901 ALESQELCGT EVPSVPEHGR KDTV I KPLL V EPEGLEKETT FNSLLCPSGG
0951 EVSEELSLKL PPNVVEESAR ASVSVLGDIL GSAMQNTQNL LQMPYGCGEQ
1001 NMVLFAPNIY VLDYLNQTTQ LTPEVKSKAI GYLNTGYQRQ LNYKHYDGSY
1051 STFGERYGRN QGNTWLTAFV LKTFAQARAY IFIDEAHITQ ALIWL SQRQK
1101 DNGCFRSSGS LLNNAIKGGV EDEVTL SAYI TIALLEIPLT VTHPVVRNAL
1151 FCLESAWKTA QEGDHGSHVY TKALLAYAFA LAGNQDKRKE VLKSLNEEAV
1201 KKDNSVHWER PQKPKAPVGH FYEPQAPSAE VEMTSYVLLA YLTAQPAPTS
1251 EDLTSATNIV KWITKQNAQ GGFSSQTDTV VALHALSKYG AATFTRTGKA
1301 AQVTIQSSGT FSSKFQVDNN NRLLLQVSL PELPGEYSMK VTGEGCVYLQ
1351 TSLKYNILPE KEEFPFALGV QTLPTQCDP KAHTSFQISL SVSYTGSRSA
1401 SNMAIVDVKM VSGFIPLKPT VKMLERSNHV SRTEVSSNHV LIYLDKVSNQ
1451 TSLFFTVLQ DVPVRDLKPA IVKVYDYET DEFAIAEYNA PCSKDLGNA

10

20

(配列番号 1 3)

【 0 0 7 2 】

2 マクログロブリン由来ペプチド

VPVRDLKPAIVKVYD (配列番号 1 4)

【 0 0 7 3 】

〔 8 〕 1 アンチトリプシン 配列番号 1 6 の 1 アンチトリプシン由来ペプチドが肝がん患者で特異的に検出された

30

インタクトタンパク質

001 FNK ITPNLAE FAFSLYRQLA HQSNSTNIFF SPVSIATAFA MLSLGTKADT
051 HDE ILEGLNF NLTEIPEAQI HEGFQELLRT LNQPDSQLQL TTGNGLFLSE
101 GLKLVDK FLE DVKKLYHSEA FTVNFGDTEE AKKQINDYVE KGTQGKIVDL
151 VKELDRD TVF ALVNYIFFKG KWERPFEVKD TEEEDFHVDQ VTTVKVPMMK
201 RLGMFNIQHC KKLSSWVLLM KYLGNATAIF FLPDEGKLQH LENELTHDII
251 TKFLENERRR SASLHLPKLS ITGTYDLKSV LGQLGITKVF SNGADLSGVT
301 EEAPLKLSKA VHKAVLTIDE KGTEAAGAMF LEAIPMSIPP EVKFNKPFVF
351 LMIEQNTKSP LFMGKVVNPT QK (配列番号 1 5)

【 0 0 7 4 】

40

1 アンチトリプシン由来ペプチド

VKKLYHSEAFTVNFGD (配列番号 1 6)

【 0 0 7 5 】

〔 9 〕 インター トリプシンインヒビター重鎖H4前駆体 配列番号 1 7 のインター トリプシンインヒビター重鎖H4前駆体由来ペプチドが肝がん患者で特異的に検出された
インタクトタンパク質

001 MKPPRPVRTC SKVLVLLSLL AIHQTTTAEK NGIDIYSLTV DSRVSSRFAH
051 TVVTSRVVNR ANTVQEATFQ MELPKKAFIT NFSMNIDGMT YPGI I KEKAE
101 AQAQYSAAVA KGKSAGLVKA TGRNMEQFQV SVSVAPNAKI TFELVYEELL
151 KRRLGVYELL LKVRPQQLVK HLQMDIHIFE PQGISFLETE STFMTNQLVD

50

201 ALTTWQNKTK AHIRFKPTLS QQQKSPEQQE TVLDGNLIIR YDVDRAISGG
 251 SIQIENGYFV HYFAPEGLTT MPKNVVFVID KSGSMSGRKI QQTREALIKI
 301 LDDLSPRDQF NLIVFSTEAT QWRPSLVPAS AENVNKARSF AAGIQALGGT
 351 NINDAMLMAV QLLDSSNQEE RLPEGSVSLI ILLTDGDPTV GETNPRS IQN
 401 NVREAVSGRY SLFCLGFGFD VSYAFLEKLA LDNGGLARRI HEDSDSALQL
 451 QDFYQEVANP LLTAVTFEYP SNAVEEVTON NFRLLFKGSE MVVAGKLQDR
 501 GPDVLTATVS GKLPTQNI TF QTESSVAEQE AEFQSPKYIF HNFMERLWAY
 551 LTIQQLLEQT VSASDADQQA LRNQAALNLSL AYSFVTPLTS MVVTKPDDQE
 601 QSQVAEKPME GESRNRNVHS GSTFFKYLLQ GAKIPKPEAS FSPRRGWNRQ
 651 AGAAGSRMNF RPGVLSSRQL GLPGPPDVPD HAAYHPFRRL AILPASAPPA
 701 TSNPDPAVSR VMNMKIEETT MTTQTPAPIQ APSA ILPLPG QSVERLCVDP
 751 RHRQGPVNLL SDPEQGVEVT GQYEREKAGF SWIEVTFKNP LVVWHASPEH
 801 VVVTNRNRSS AYKWKETLFS VMPGLKMTMD KTGLLLSDP DKVTIGLLFW
 851 DGRGEGRLRL LRDTDRFSSH VGGTLGQFYQ EVLWGSPAAS DDGRRTL RVQ
 901 GNDHSATRER RLDYQEGPPG VEISCWSVEL (配列番号7)

【0076】

インター トリプシンインヒビター重鎖H4前駆体由来ペプチド

RLAILPASAPPATSNPD (配列番号17)

【0077】

なお、上記部分ペプチドは下に示すように糖鎖が付加された状態で存在した。

RLAILPASAPPATSNPD + -GlcNAc-Hex-GlcNAc-Hex

【0078】

本実験において、本発明者が独自に開発した二次元液体クロマトグラフィー(2D-LC)M ALDI-TOF/MS 法を用いて、健常人および肝がん患者血清由来のペプチドを網羅的に解析することによって、肝がん特異的に出現あるいは消失するペプチドを同定することができた。これらはすべて、タンパク質がそれぞれに特異的なタンパク質分解酵素によって切断されたと思われる断片ペプチドであった。すなわち本実験によって、患者血清中に存在する、疾患特異的に活性化されたタンパク質分解酵素によって生じた断片ペプチドが肝がん特異的なバイオマーカーとなりうることを示された。また、本発明者が新たに開発した解析システムがこうしたペプチドを検出できることも明らかになった。

【0079】

実施例3 SELDI-TOF-MSを用いた解析

(1)方法

SELDI-TOF-MS(サイファージェンバイオシステムズ)を用いて、肝細胞がん患者の血清と正常人の血清を測定し、正常サンプル対その他の疾患サンプルとして比較解析を行った。

【0080】

前処理として、Biomek200(BECKMAN COULTER)を使用し、血清を9 M 尿素と1:1.5の割合で、4、20分混合し変性させた。このサンプルと1 M 尿素バッファー 1:1の割合で混合し、陰イオン交換レジン(Q CERAMIC HYPER DF)にアプライした。4、30分攪拌した後、pH9,7,5,4,3,有機溶媒の順にそれぞれのバッファーで分画した。(pH9:50mM Tris-HCl/0.1%OGP⁺, pH7:50mM HEPES/0.1%OGP, pH 5:100 mM 酢酸ナトリウム/0.1%OGP, pH4:100mM 酢酸ナトリウム/0.1%OGP pH3:50mM クエン酸ナトリウム/0.1%OGP, 有機溶媒:33.3% イソプロパノール/16.7% アセトニトリル/0.1%TFA)⁺OGP:1-0-n-オクチル-D-グルコピラノシド。この分画サンプルと結合バッファー(0.1M 酢酸ナトリウムpH4)を1:9の割合でプロテインチップのCM10にアッセイした。洗浄バッファー150 μl(0.1M 酢酸バッファーpH4)を用いて洗浄を3回行い、ミリQ200 μlでリンスを2回行い、自然乾燥させたところに50%SPAを1 μl、2回アプライした。

【0081】

使用したプロテインチップはCM10で、測定する基盤の表面が陽イオン交換の性質を持つ

10

20

30

40

50

官能基（カルボキシメチル）で修飾されている。

【0082】

（2）結果

図3に質量ピークをゲル表示で可視化する方法であるゲルビューアによる血清タンパク質プロファイリングを示す。図3は、SELDI-TOF-MS法を用いて正常健康人、肝細胞がん患者からの血清をデュプリケートで解析した結果を示している。正常コントロール対疾患をCM10で解析した結果である。図3は、正常4サンプルおよび肝細胞がん（HCC）3サンプルについて示す。図3において、表示は質量分析装置で得られたピークの強さintensityをヒートマップに変換したものである。矢印で示すように正常では認められなかったペプチドが、肝細胞がん患者に認められる。

10

【0083】

矢印で示してある8000～9000 Daの間の3つのピークが、肝細胞がん検出されているが、正常では検出されていない。以上のことから、3つのピークは肝がんのバイオマーカー候補の1つとなる。

【0084】

ゲルビューアによる血清タンパク質プロファイリングを図4に示す。正常コントロール対疾患をCM10で解析した結果である。図4も同様に、1つのサンプルを2重検定で実験した結果を示している。図4は、正常4サンプル、肝細胞がん（HCC）4サンプルについて示す。

【0085】

実施例4 酵素免疫法(ELISA)による肝がん患者および健康人血清中の -1 トリプシンインヒビター量の測定

20

（1）方法

市販のキットおよび自作の抗体を用いてELISAをおこなった。96穴（ウエル）の培養プレートに抗 -1 トリプシンインヒビター抗体（1次抗体）希釈液を添加して室温で1時間放置して抗体をプレートに吸着させた。溶液除去後、プレートへの抗原の非特異的結合を防ぐために3%血清アルブミン溶液を添加し1時間室温で放置した。溶液除去後に、適当に段階希釈した標準血清、がん患者血清、および健康人血清をそれぞれ別のウエルに入れて、室温1時間放置した。0.1%の界面活性剤を含むバッファーを用いて各ウエルを4回洗浄した。更にそこに酵素（ペルオキシダーゼ）で標識された2次抗体希釈液を添加し、1時間放置後に各ウエルを4回洗浄した。最後に、酵素作用を受けて発色する酵素基質の溶液を加えて30分放置した。各ウエルの吸光度を光度計を用いて測定した。測定結果を標準血清中の -1 トリプシンインヒビター量を100ユニットとして、それと比較して計算することで、それぞれのがん患者血清ならびに健康人血清中の -1 トリプシンインヒビター量をユニットで表した。

30

【0086】

図5はその結果をグラフで示したものである。3通りの方法すなわち3通りの1次抗体と2次抗体の組み合わせA、B、Cで実験をおこなった結果をまとめたものである。

【0087】

Aは市販のELISAキットの1次抗体と2次抗体、Bは -1 トリプシンインヒビターのN末端に特異的な抗体を1次抗体に、C末端に特異的な抗体を2次抗体に使用した。Cでは肝がん患者に特異的に認められる -1 トリプシンインヒビターのペプチド断片に特異的な抗体を1次および2次抗体として使用した。上記ペプチド断片は、肝がんのバイオマーカー候補として本発明者が独自の方法で見出したものである。また、標準血清としては、AならびにBでは、市販のプールした正常人血清を、また、Cでは、本発明者が入手したプールした肝がん患者由来血清を用いた。

40

【0088】

（2）結果

本実験では、本発明者が見出した二つの現象、すなわち、(i)二次元電気泳動法では肝がん患者において正常人で観察される（生の、分解を受けていない） -1 アンチトリプ

50

シンがほとんど検出されない(消失している)。(ii)一方、本発明者独自の2D-HPLC-MALDI-TOF/MS法では、肝がん患者に特異的に特定の -1 アンチトリプシンペプチド(配列番号16)が検出される。

【0089】

これらの現象をELISA法にて再現するために、一次および二次抗体を作成することによって上述したBおよびCの方法を考案した。

【0090】

図5に見られるように、Aの市販のキットを用いた方法では、肝がん患者と正常人との間に差異は認められない(112.6 units vs 105.7 units)が、Bの方法では、二次元電気泳動の結果を反映した結果、すなわち、正常人に比べて肝がん患者の血清中の -1 アンチトリプシン量は顕著に減少している(25.7 units vs 101.5 units)。一方、Cの方法では、肝がん患者においては正常人と比較して顕著に、 -1 アンチトリプシン由来のペプチドの量が増加していた(99.1 units vs 24.4 units)。以上のように本発明者は、独自の抗体を作成することによって、肝がん患者血清において本発明者が別の実験で見出した、分解を受けていない生の -1 アンチトリプシンタンパク質が減少し、そのタンパク質由来の特定のペプチドが増加しているという現象、を反映できる独自のELISAシステムを確立することに成功した。

【図面の簡単な説明】

【0091】

【図1】肝がん患者由来血清タンパク質の二次元電気泳動解析の結果を示す図である。

【図2】正常人由来血清タンパク質の二次元電気泳動解析の結果を示す図である。

【図3】質量分析により測定した肝細胞がん患者の血清と正常人の血清のタンパク質/部分ペプチドプロファイルを示す図である。

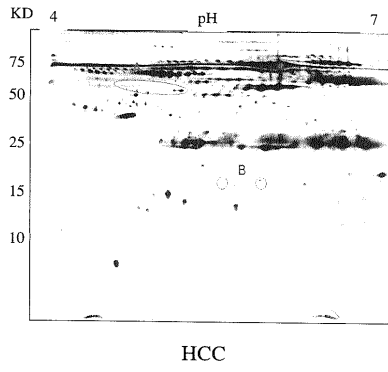
【図4】質量分析により測定した肝細胞がん患者の血清と正常人の血清のタンパク質/部分ペプチドプロファイルを示す図である(その2)。

【図5】酵素免疫法(ELISA)による肝がん患者および正常人血清中の -1 トリプシンインヒビター量の測定の結果を示す図である。

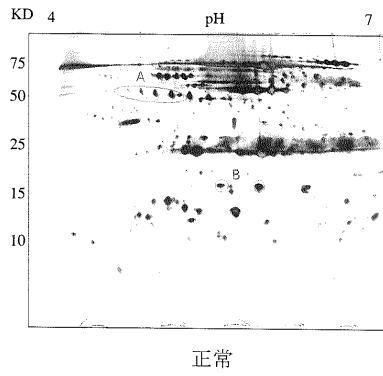
10

20

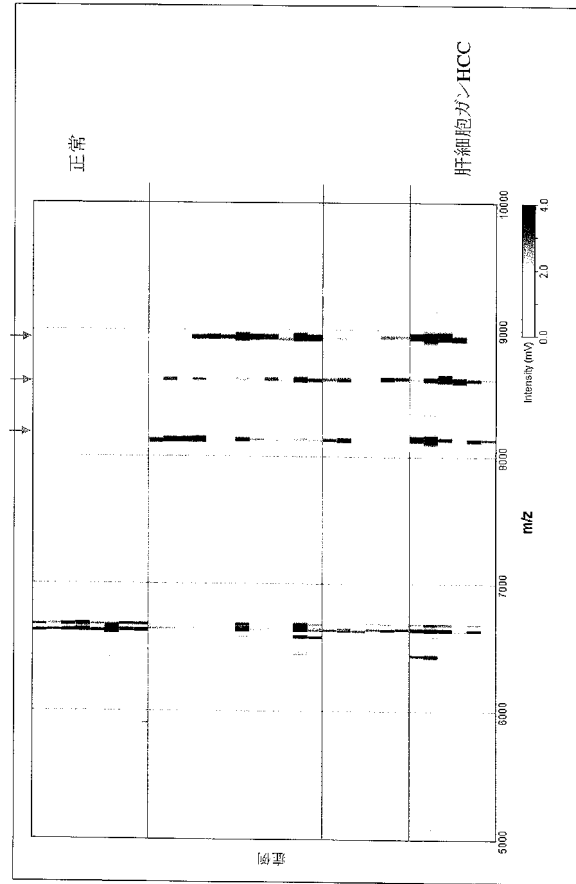
【 図 1 】



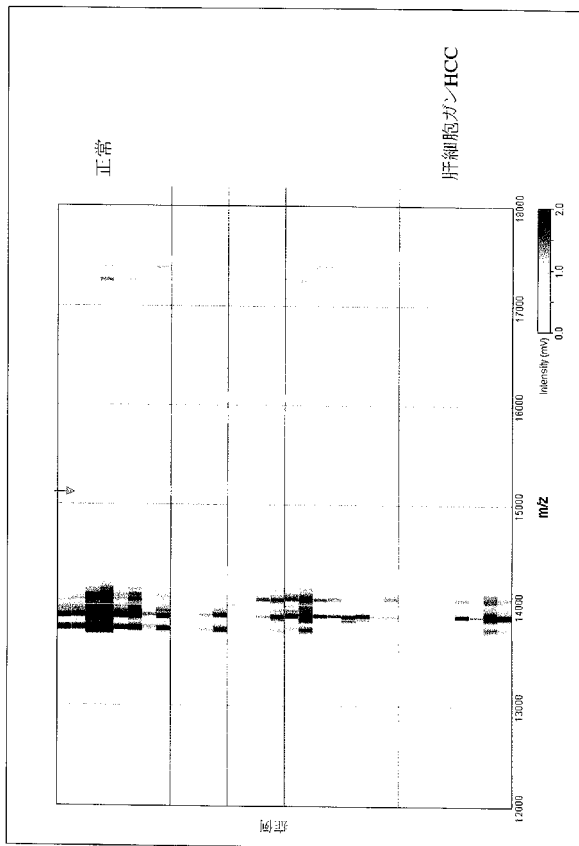
【 図 2 】



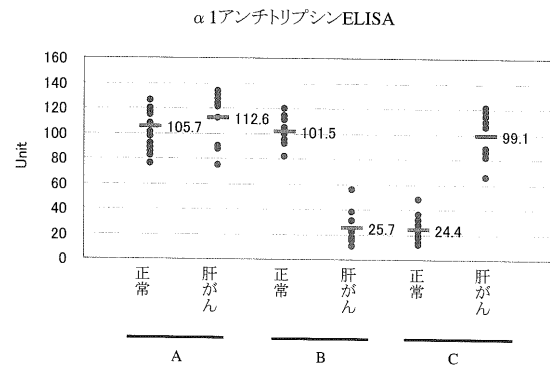
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【配列表】

0004801930000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 9/99 (2006.01) C 1 2 N 9/99
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

(72)発明者 内田 和彦
茨城県つくば市二の宮1 - 2 3 - 6 関彰ビル2 F 株式会社 M C B I 内
(72)発明者 片桐 拓也
茨城県つくば市二の宮1 - 2 3 - 6 関彰ビル2 F 株式会社 M C B I 内
(72)発明者 佐藤 優美
茨城県つくば市二の宮1 - 2 3 - 6 関彰ビル2 F 株式会社 M C B I 内
(72)発明者 藤本 宏隆
京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社 島津製作所内

審査官 赤坂 祐樹

(56)参考文献 国際公開第03/010336(WO, A1)
国際公開第2006/099126(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G 0 1 N 3 3 / 5 0 - 3 3 / 6 8