

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 8 月 9 日(09.08.2012)



(10) 国際公開番号

WO 2012/105590 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/53 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/052216
- (22) 国際出願日: 2012 年 2 月 1 日(01.02.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-019895 2011 年 2 月 1 日(01.02.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): アステラス製薬株式会社(ASTELLAS PHARMA INC.) [JP/JP]; 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目 3 番 1 1 号 Tokyo (JP). 学校法人慶應義塾(KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田 2 丁目 1 5 番 4 5 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 荻野 淳(OGINO Makoto) [JP/JP]; 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目 3 番 1 1 号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP). 安永 邦夫(YASUNAGA

Kunio) [JP/JP]; 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目 3 番 1 1 号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP). 松田 喬(MATSUDA Takashi) [JP/JP]; 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目 3 番 1 1 号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP). 富田 謙吾(TOMITA Kengo) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 寺谷 俊昭(TERATANI Toshiaki) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 日比 紀文(HIBI Toshifumi) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 森田 憲一, 外(MORITA Kenichi et al.); 〒1730004 東京都板橋区板橋二丁目 6 7 番 8 号 板橋中央ビル 5 階 Tokyo (JP).

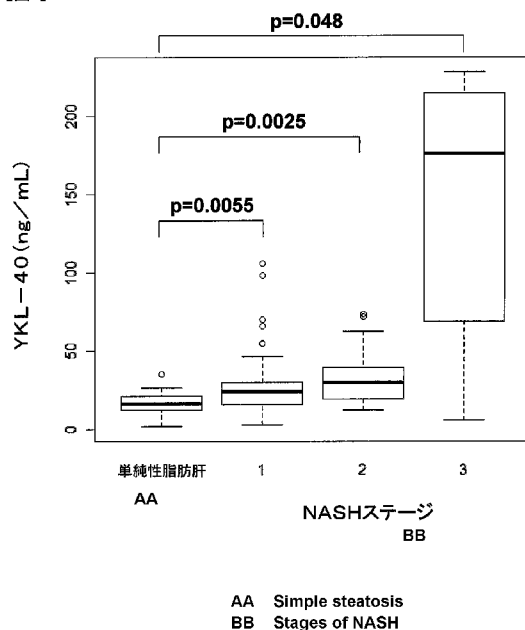
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,

[続葉有]

(54) Title: DETERMINATION MARKER FOR NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS, AND METHOD FOR DIAGNOSING NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS USING THE MARKER AS MEASURE

(54) 発明の名称: 非アルコール性脂肪肝炎の鑑別マーカー及び当該マーカーを指標とした非アルコール性脂肪肝炎の診断方法

【図2】



(57) Abstract: Provided is a determination marker which can be used for distinguishing between simple steatosis and NASH, particularly between simple steatosis and the initial stage of NASH, in an NAFLD patient. The determination marker comprises YKL-40.

(57) 要約: NAFLD患者において、単純性脂肪肝とNASHとの鑑別、更には、単純性脂肪肝と初期のNASHとの鑑別に使用できる鑑別マーカーを提供する。前記鑑別マーカーはYKL-40を含む。



MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨー

ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

非アルコール性脂肪肝炎の鑑別マーカー及び当該マーカーを指標とした非アルコール性脂肪肝炎の診断方法

技術分野

[0001] 本発明は、非アルコール性脂肪肝炎の鑑別マーカー（診断マーカー）及び当該マーカーを指標とした非アルコール性脂肪肝炎の診断方法（検出方法）に関する。

背景技術

[0002] 脂肪性肝疾患（fatty liver disease）は、肝細胞に中性脂肪が沈着して肝疾患をきたす疾患の総称である。脂肪性肝疾患は以前はアルコールによる肝障害が多かったが、糖尿病や肥満によっても同様な肝障害が生ずることがわかり、明らかな飲酒歴がないにもかかわらず、肝組織所見はアルコール性肝障害に類似した主に大滴性の肝脂肪沈着を特徴とする肝障害を、非アルコール性脂肪性肝疾患（nonalcoholic fatty liver disease；NAFLD）と呼ぶ。

[0003] NAFLDは、さらに単純性脂肪肝（simple steatosis）と非アルコール性脂肪肝炎（nonalcoholic steatohepatitis；NASH）に分類されるが、疾患の予後は大きく異なる。単純性脂肪肝は病態が進行することはほとんどないが、NASHは5～10年で5～20％が肝硬変に進行すると考えられている。従来、患者が単純性脂肪肝であるか、NASHであるかの診断は肝生検組織診断により行われているが、これは極めて侵襲的であり患者の負担が大きく、また、肝臓の出血を伴うなど危険性もあることから施行に際しては施設的な要件も伴う。一般的に簡便な検査方法としては血液生化学的な方法が挙げられるが、NASHは血液生化学的な肝機能検査、例えばトランスアミナーゼやγGTPの検査では軽度な上昇しか認めず、単純性脂肪肝とNASHの鑑別は困難である。また、腹部超音波、CTおよびMRIと言った

画像診断法は単純性脂肪肝の診断には有用であるが、NASHを鑑別することは困難である。このように、NASHは進行性の疾患であるため早期発見が望まれるものの、鑑別診断においては肝生検に代わる手段が無いのが現状である。

[0004] YKL-40は1988年に発見された分子量約40 kDaのタンパク質で、glycoprotein-39 (gp-39)、chitinase 3-like-protein-1 (CHL3L1) 等とも呼ばれている（例えば、非特許文献1参照）。炎症性の疾患や癌の患者で血中YKL-40量が亢進することが報告されており、喘息や関節リウマチ、線維症などのバイオマーカーとなりうることが示唆されている。

[0005] 例えば、特許文献1には、YKL-40は、炎症性又は退行性の関節疾患（例えば、関節リウマチ）、臓器の結合組織及び／又は他の組織の損失に関する疾患（例えば、肝硬変）、転移性癌などを診断するのに有用であることが記載されている。

また、特許文献2には、C型肝炎ウイルス（HCV）に感染した患者の線維症段階F2、F3及びF4を、F0及びF1と区別しうることを、YKL-40単独よりもYKL-40、HA、及び $\alpha 2$ -MGの3種マーカーの組合せが有用であることが記載されている。非特許文献2には、腎障害後期のHCV感染患者における肝線維化スコアと血清中YKL-40量の間に相関関係が見られた（Fig. 1a）が、他の指標と比べて相関は高くなかったこと（Fig. 2）が記載されている。

更に、非特許文献3には、アルコール性肝疾患患者の血清中のYKL-40濃度は患者の重症度に比例して上昇していたことが記載されている。非特許文献4には、アルコール性肝疾患患者の血清中YKL-40量は、健常人に比べて有意に上昇していたこと（181頁左欄下から16～14行）、また、単純性脂肪肝と線維化のない患者は、健常人と比べて血清中YKL-40量が高いが、線維化のある肝硬変又はアルコール性肝炎の患者と比べて低いレベルであったこと（182頁左欄下から19～12行）が記載されてい

る。

- [0006] このように、ウイルス性肝疾患又はアルコール性肝疾患では、線維化等の重症度とYKL-40との関連性が報告されていたが、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の鑑別マーカーとして有用であるとの知見は全くなかった。例えば、非特許文献5には、単純性脂肪肝患者（NAS score 1-3）とNASH患者（NAS score 4-8）との間で、血清中のYKL-40量に違いは見られなかったこと（566頁Fig. 1c及び同頁左欄4～6行）、また、線維化マーカー（YKL-40等）単独では、単純性脂肪肝とNASHを識別できないこと（567頁右欄3～5行）が記載されている。

先行技術文献

特許文献

- [0007] 特許文献1：WO95/01995（特表平9-500209）
特許文献2：WO2003/73822（特表2005-519271）

非特許文献

- [0008] 非特許文献1：World Journal of Gastroenterology, 2009, 15, p5249-5259
非特許文献2：Journal of Viral Hepatitis, 2008, 15, p666-674
非特許文献3：European Journal of Gastroenterology & Hepatology, 2000, 12(9), p989-993
非特許文献4：Journal of Hepatology, 2003, 39, p179-186
非特許文献5：Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2009, 24, p564-568

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0009] 非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）の診断は、脂肪肝、軽度肝障害が認められる患者から、血液検査によりウイルス性肝炎や自己免疫性肝疾患を除外し、更に飲酒歴の有無に基づいてアルコール性脂肪肝、肝障害を除

外するというスクリーニングで行われる。NAFLDが単純性脂肪肝であるか、NASHであるかを鑑別するには、侵襲を伴う肝生検組織診断が必要とされる（日本肝臓学会編、「NASH・NAFLDの診療ガイド」、文光堂、2006年、30～31頁）。肝生検は甚だ侵襲的な検査であるため、その施行には慎重な判断が求められる。このため、事前の血液生化学的な肝機能検査、例えばトランスアミナーゼや γ -GTPなどの検査で異常が認められなければ、肝生検の施行を判断することはより難しくなる。一方で、先述のように初期のNASHは血液生化学的な肝機能検査では軽度な異常しか認められないことから、進行性の疾患として早期の発見が望まれるにもかかわらず特に初期のNASHでは肝生検を施行する機会を逸する可能性が高く、結果として確定診断、治療介入が遅れることとなる。従って、非侵襲的にNASHを鑑別できる方法の開発は、早期の治療介入を可能にし生命予後の改善に大きく寄与するものと考えられる。また、肝生検は患者への負担が大きいために短期間のうちに複数回施行することができない。このため、NASHが疑われる経過観察中の患者に対してその病勢の変化をタイミング良くとらえるためや、NASH患者への治療介入の効果を判定する際に肝生検を多用することは極めて難しい。このようなことから、負担の少ない血液検査マーカーの開発が急務である。

従って、本発明の課題は、肝生検のように患者への負担が大きい診断方法に代わる、NAFLD患者において、単純性脂肪肝とNASHとの鑑別、更には、単純性脂肪肝と初期のNASHとの鑑別に使用できる鑑別マーカーを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明は、

[1] YKL-40を含むことを特徴とする、患者が罹患している疾患が単純性脂肪肝であるか、又は非アルコール性脂肪肝炎であるかを判別することができる鑑別マーカー；

[2] 被検試料中のYKL-40の濃度を測定することを特徴とする、非ア

ルコール性脂肪肝炎の検出方法；

〔３〕被検試料中のＹＫＬ－４０の濃度を測定することを特徴とする、単純性脂肪肝と非アルコール性脂肪肝炎とを判別する方法；

〔４〕被検試料中のＹＫＬ－４０の濃度を測定することを特徴とする、非アルコール性脂肪肝炎に対する治療効果の確認方法；

〔５〕非アルコール性脂肪肝炎への罹患が疑われる患者から被検試料を採取する工程、及び該被検試料中のＹＫＬ－４０の濃度を測定する工程を含む、非アルコール性脂肪肝炎の検出方法；

〔６〕前記患者が非アルコール性脂肪性肝疾患患者である、〔５〕の方法；

〔７〕患者が罹患している疾患が単純性脂肪肝であるか、又は非アルコール性脂肪肝炎であるかを判別する方法であって、該患者から被検試料を採取する工程、及び該被検試料中のＹＫＬ－４０の濃度を測定する工程を含む、方法；

〔８〕前記患者が非アルコール性脂肪性肝疾患患者である、〔７〕の方法；

〔９〕非アルコール性脂肪肝炎の治療を受けた患者から被検試料を採取する工程、及び該被検試料中のＹＫＬ－４０の濃度を測定する工程を含む、非アルコール性脂肪肝炎に対する治療効果の確認方法；

に関する。

[0011] また、本発明は、

単純性脂肪肝又は非アルコール性脂肪肝炎への罹患が疑われる患者から被検試料（例えば、血液、血清、血漿）を採取する工程、前記被検試料中のＹＫＬ－４０の濃度を測定する工程を含む、非アルコール性脂肪肝炎の診断方法；

被検試料中のＹＫＬ－４０の濃度を測定することを特徴とする、非アルコール性脂肪肝炎の体外（*in vitro* or *ex vivo*）診断方法；

被検試料中のＹＫＬ－４０の濃度を測定することを特徴とする、単純性脂肪肝と非アルコール性脂肪肝炎との体外（*in vitro* or *ex vivo*）判別方法；

被検試料中のＹＫＬ－４０の濃度を測定することを特徴とする、非アルコー

ル性脂肪肝炎に対する治療効果の体外 (in vitro or ex vivo) 確認方法；
抗YKL-40抗体、又はYKL-40 mRNAの測定用プローブ若しくは
プライマー、及びYKL-40と非アルコール性脂肪肝炎との関連性を記載
した取扱説明書を含む、非アルコール性脂肪肝炎の診断キット；

抗YKL-40抗体、又はYKL-40 mRNAの測定用プローブ若しくは
プライマー、及びYKL-40と非アルコール性脂肪肝炎との関連性を記載
した取扱説明書を含む、単純性脂肪肝と非アルコール性脂肪肝炎との判別用
キット；

抗YKL-40抗体、又はYKL-40 mRNAの測定用プローブ若しくは
プライマー、及びYKL-40と非アルコール性脂肪肝炎との関連性を記載
した取扱説明書を含む、非アルコール性脂肪肝炎に対する治療効果の確認用
キット；

抗YKL-40抗体、又はYKL-40 mRNAの測定用プローブ若しくは
プライマーの、非アルコール性脂肪肝炎の診断薬の製造における使用；

抗YKL-40抗体、又はYKL-40 mRNAの測定用プローブ若しくは
プライマーの、単純性脂肪肝と非アルコール性脂肪肝炎の判別薬の製造にお
ける使用；

抗YKL-40抗体、又はYKL-40 mRNAの測定用プローブ若しくは
プライマーの、非アルコール性脂肪肝炎の治療効果の確認薬の製造における
使用；

に関する。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、NAFLD患者において、単純性脂肪肝とNASHとの
鑑別、更には、単純性脂肪肝と初期のNASHとの鑑別を行うことができる
。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]肝生検サンプルを用いたマイクロアレイの結果をジョン・テューキーの
方式による箱髭図を用いてNASHのステージ別にまとめたものである。有

意差検定はウェルチの t 検定 (Welch' s t-test) による。

[図2]血清中 Y K L - 4 O 量を測定した結果をジョン・テューキーの方式による箱髭図を用いて N A S H のステージ別にまとめたものである。有意差検定はウェルチの t 検定による。

[図3]肝生検サンプルを用いたマイクロアレイの結果と血清中 Y K L - 4 O の量の相関を示したものである。

[図4]血清中 Y K L - 4 O 量を用いた単純性脂肪肝と N A S H の鑑別に関する R O C 解析の結果を示すものである。

[図5]血清中 Y K L - 4 O 量を用いた単純性脂肪肝とステージ I N A S H の鑑別に関する R O C 解析の結果を示すものである。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明は、非アルコール性脂肪肝炎 (N A S H) の鑑別マーカー、より具体的には、非アルコール性脂肪性肝疾患 (N A F L D) における単純性脂肪肝と N A S H とを鑑別する鑑別マーカー、更には、単純性脂肪肝と初期の N A S H とを鑑別する鑑別マーカーとして、Y K L - 4 O を使用することを特徴とする。

[0015] N A F L D は、明らかな飲酒歴がないにもかかわらず、肝組織所見はアルコール性肝障害に類似した主に大滴性の肝脂肪沈着を特徴とする肝障害であり、更に単純性脂肪肝と N A S H に分類される。

単純性脂肪肝は、脂肪滴を伴う肝細胞が 30% 以上に認められる症例であり、画像診断でも脂肪沈着症が疑われるものである。しかし、脂肪沈着のみを認めるものであることからしばしば経過観察となる。

N A S H は、肝組織で壊死・炎症・線維化を伴う脂肪性肝炎を認める症例であり、N A F L D の重症型と考えられている。N A S H は進行性であり、しばしば肝硬変、肝癌という転帰を辿る。従って、N A F L D から N A S H を鑑別することは重要である。N A S H の病態や予後を考察する上で、最も重要な指標は線維化である。N A S H の中でも軽度線維化例では急速にその病勢が進行することは稀であるが、高度線維化例では肝不全、肝癌へと進行

する症例が存在する。線維化の程度が軽度であれば、線維化の進行を遅延させ、改善するための方策を選択できる可能性が高いが、高度線維化で肝不全や肝癌となると最終的には肝移植の適用となる。従って、線維化の程度（ステージ）を明らかにすることは治療予後の考察に重要であり、特に線維化の程度が軽度なうちに発見し治療介入することは予後を改善させる上で重要である。Bruntらは、NASHの進展経過を線維化の程度により、ステージ1：小葉中心部（Zone 3）、ステージ2：小葉中心部+門脈域、ステージ3：架橋形成、ステージ4：肝硬変の4段階に分類する（American Journal of Gastroenterology, 1999, 94, p2467-2474）。

[0016] 本発明を実施するために必要とする被検試料は、例えば、NASHの罹患が疑われる患者から採取する。被検試料としては、例えば、血液（例えば、全血、血清、血漿）、唾液、尿及び肝臓組織を用いることができ、特に血漿、血清が好ましい。

[0017] YKL-40は、glycoprotein-39（gp-39）、chitinase 3-like-protein-1（CHI3L1）等とも呼ばれる分子量約40kDaのタンパク質である。YKL-40はキチン分解酵素と相同性が高いにもかかわらず、キチン分解活性は無いとされている。また、活性化した好中球やマクロファージから放出され細胞外基質のリモデリングに関与しているとされているが、詳細な機能はまだ十分に解明されていない。慢性関節リウマチ、喘息、Crohn病など慢性炎症を主体とする疾患で発現亢進することが知られている。近年では様々な癌においても発現亢進していることが明らかになっている。肝臓疾患との関連性についても、アルコール性肝炎やウイルス性肝炎において報告がある。

[0018] 被検試料中のYKL-40の濃度又は量を測定する方法は、特に限定されるものではなく、例えば、抗YKL-40抗体を用いる免疫学的手法（例えば、酵素免疫測定法、ラテックス凝集免疫測定法、化学発光免疫測定法、蛍光抗体法、放射免疫測定法、免疫沈降法、免疫組織染色、又はウェスタンブロット等）、又はmRNA量を測定する分子生物学的手法などを挙げるこ

ができる。前記抗YKL-40抗体としては、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を問わず、抗体それ自体、あるいは、反応特異性を維持した抗体断片〔例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、又はFv〕を用いることができる。

[0019] 後述の実施例に具体的な実験データで示すように、単純性脂肪肝に比して、線維化が惹起されているNASHにおいては、線維化のステージに相関して被検試料中のYKL-40量が亢進する。従って、被検試料中のYKL-40濃度又は量の上昇が認められた患者は、NASHであると判断することができる。この判定は、被検患者と健常者からそれぞれ検体を採取し、それらを比較することにより、あるいは、予め決定した健常者の正常値と、患者検体の測定値とを比較することにより、実施することもできるが、後述の実施例3に示すように、判定用閾値を予め決定しておくことが好ましい。

[0020] 本発明では、単純性脂肪肝とNASHとを鑑別することができるが、単純性脂肪肝と初期のNASH（すなわち、ステージ1）とを鑑別することもできる。背景技術欄で先述したとおり、ウイルス性肝疾患またはアルコール性肝疾患においても、YKL-40との相関性が報告されていたが、いずれも、重症例において有意なYKL-40上昇が認められるものの、初期段階のウイルス性肝疾患またはアルコール性肝疾患の患者では健常者と区別することができなかった。本発明ではNASHの肝臓組織中ではYKL-40遺伝子の発現が亢進しており、かつ血液中でのYKL-40量がこれと高い相関を示すことを明らかにし、血液中でのYKL-40量の亢進が単なる偶発的なものではなく肝臓組織の状態を反映したものであることを見出した。よって、本発明者らが見出した本知見は、極めて意外性があり、早期段階でNASHの鑑別が可能である点で、極めて顕著な有用性を示すものである。

[0021] また、本発明によれば、NASH患者に対して適当な治療を行った後、YKL-40量を測定することにより、NASHに対する治療効果を確認することができる。NASH患者に対する治療法としては、例えば、食事療法、運動療法、薬物療法、抗酸化療法および外科的療法（胃内留置バルーン療法

、腹腔鏡下胃バンディング、肝移植等）等を挙げることができ、これらの治療を施した患者から採取した被検試料中のYKL-40量が、治療前と比較して減少していれば、治療効果があったものと判断することができる。一方、治療前と比較して同程度、または上昇していれば、治療効果がないものと判断することができ、例えば、別の治療法を新たに選択するとの対応が可能である。

実施例

[0022] 以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。また、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って実施可能である。

[0023] 《実施例1》NAFLDおよびNASHの肝生検サンプルの網羅的遺伝子発現変動解析

(1) 肝生検およびNASHの診断

研究から独立した医療行為の一環として、NAFLD患者の診断確定のために肝生検及び採血を行い、文書にてインフォームドコンセントが得られた患者に関してさらに以下の試験を実施した。Brunet等によるスコアリングシステムを利用してNASH肝病理組織診断をおこなった。その結果、対象者122名のうち、単純性脂肪肝が23名、NASHが99名であると判明した。NASHと判定されたもののうち線維化のスコア別にはステージIが61名、ステージIIが28名およびステージIIIが10名であることが明らかとなった。

[0024] (2) 肝生検サンプルからの全RNAの抽出

上述の実施例1(1)で採取された肝生検サンプルの一部から、アレイ解析可能であったもの(対象98名、うち単純性脂肪肝16名、NASH82名。NASHと判定されたうち線維化のスコア別にはステージI 53名、ステージII 21名およびステージIII 8名)について、RNeasy mini kit (Qiagen社)を用いて全RNAを調製した。調製した全RNAは分光光度計ND-1000 (NanoDrop Technologies)にて定量し、その1ngを用いて2100 Bio

analyzer及びRNA 6000 pico kit (Agilent technologies社、以下アジレント社) にて品質確認を行い、すべてのサンプルがマイクロアレイ解析が可能な品質であることを確認した。

[0025] (3) 網羅的遺伝子発現変動解析

上述の実施例1(2)で作成した全RNA 200 ngをQuick Amp Labeling kit (アジレント社) を用いてCy-3ラベル化し、DNAマイクロアレイ (G4845A Human Whole Genome Ver.2.0、アジレント社) とハイブリダイズさせた。数値化はマイクロアレイスキャナ (G2565BA、アジレント社) および数値化アプリケーション (Feature Extraction、アジレント社) を用いてプロトコールに従って行った。アレイ間の補正にはグローバルノーマライゼーションを行った。その結果、図1に示すとおり、単純性脂肪肝のサンプルにおけるYKL-40のmRNA発現量の平均値を1.0とすると、ステージI NASHのサンプルの平均値は2.6であり、ステージIIでは3.4であった。このことから、YKL-40はNASHの肝臓において発現亢進しており、線維化のステージに伴って発現亢進していることが明らかとなった。

[0026] 《実施例2》NAFLDおよびNASHの血清サンプル中のYKL-40量の測定

(1) 採血および血清の調製

上述の実施例1(1)で採血されたものを室温下で凝固させ、遠心分離して血清を調製した。このうちELISA解析可能であったものは76名分であり、内訳は単純性脂肪肝20名分、NASH56名分であった。NASHと判定されたもののうち線維化のスコア別にはステージI 35名分、ステージII 16名分およびステージIII 5名分であった。

[0027] (2) YKL-40量のELISAによる測定

上述の実施例2(1)で調製した血清サンプル中のYKL-40量をELISAキット (Human Chitinase 3-like 1 Quantikine ELISA Kit、R&D Systems社) を用いて測定した。その結果、図2に示すとおり、血清中YKL-40

0は単純性脂肪肝では $17.1 \pm 1.9 \text{ ng/mL}$ （平均値 $\pm$ 標準誤差、以下同様）であったのに対し、ステージIでは $29.9 \pm 4.0 \text{ ng/mL}$ 、ステージIIでは $34.8 \pm 4.8 \text{ ng/mL}$ 、ステージIIIでは $138.8 \pm 43.3 \text{ ng/mL}$ であった。単純性脂肪肝との有意差を統計学的に検定（ウェルチのt検定）したところ、ステージIとは $p < 0.01$ 、ステージIIとは $p < 0.01$ 、ステージIIIとは $p < 0.05$ であり、共に有意差をもって発現亢進していることが明らかとなった。

[0028] （3）肝臓中のYKL-40 mRNA発現量と血中YKL-40量の相関解析

上述の実施例1（3）および実施例2（2）で得られたデータの相関解析を行ったところ、図3に示すとおりであり、相関係数は $r = 0.87$ と計算された。このことから、血中YKL-40量の亢進は肝臓でのmRNAレベルでの発現亢進に由来すると考えられ、NASHの状態を反映していることが明らかになった。従って、血中YKL-40量を測定することでNASHを鑑別することができる。

[0029] 《実施例3》NAFLDおよびNASHの血清サンプル中のYKL-40量を用いたROC解析

ROC解析により単純性脂肪肝とNASHとの判別に際しては、AUCは 0.74 と計算された。このとき最大効率を示すカットオフ値は 21.8 ng/mL と計算された。このカットオフ値を用いて今回のサンプル群を診断すると感度 67% 、特異性 80% と計算された（図4）。

また、単純性脂肪肝と初期のNASHであるステージIとの判別に際しても同様に計算すると、AUCは 0.69 、最大効率を示すカットオフ値は 21.8 ng/mL と計算された。このカットオフ値を用いて今回のサンプル群を診断すると感度 63% 、特異性 80% と計算された（図5）。

[0030] 従来の方法では単純性脂肪肝とNASHのステージIを簡便に鑑別することが難しく、また、客観的にその診断を支持するような臨床指示物質についてはこれまで明らかではなかった。NASHは肝生検され病理組織学的によ

って確定診断されるが、本発明者らは、単純性脂肪肝に比して線維化が惹起されているNASHにおいて血中YKL-40量が亢進することを見出し、血中YKL-40量が単独の指標としてNASH診断に有用であることを明らかにした。

本発明のYKL-40血中濃度測定により、単純性脂肪肝とNASH、さらには線維化の程度が初期のNASHを鑑別できることを見出した。

産業上の利用可能性

[0031] 本発明は、NAFLD患者において、単純性脂肪肝とNASHとの鑑別、更には、単純性脂肪肝と初期のNASHとの鑑別に使用することができる。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

請求の範囲

- [請求項1] Y K L - 4 O を含むことを特徴とする、患者が罹患している疾患が単純性脂肪肝であるか、又は非アルコール性脂肪肝炎であるかを判別することができる鑑別マーカー。
- [請求項2] 被検試料中の Y K L - 4 O の濃度を測定することを特徴とする、非アルコール性脂肪肝炎の検出方法。
- [請求項3] 被検試料中の Y K L - 4 O の濃度を測定することを特徴とする、単純性脂肪肝と非アルコール性脂肪肝炎とを判別する方法。
- [請求項4] 被検試料中の Y K L - 4 O の濃度を測定することを特徴とする、非アルコール性脂肪肝炎に対する治療効果の確認方法。
- [請求項5] 非アルコール性脂肪肝炎への罹患が疑われる患者から被検試料を採取する工程、及び該被検試料中の Y K L - 4 O の濃度を測定する工程を含む、非アルコール性脂肪肝炎の検出方法。
- [請求項6] 前記患者が非アルコール性脂肪性肝疾患患者である、請求項 5 に記載の方法。
- [請求項7] 患者が罹患している疾患が単純性脂肪肝であるか、又は非アルコール性脂肪肝炎であるかを判別する方法であって、該患者から被検試料を採取する工程、及び該被検試料中の Y K L - 4 O の濃度を測定する工程を含む、方法。
- [請求項8] 前記患者が非アルコール性脂肪性肝疾患患者である、請求項 7 に記載の方法。
- [請求項9] 非アルコール性脂肪肝炎の治療を受けた患者から被検試料を採取する工程、及び該被検試料中の Y K L - 4 O の濃度を測定する工程を含む、非アルコール性脂肪肝炎に対する治療効果の確認方法。
- [請求項10] 被検試料中の Y K L - 4 O の濃度を測定することを特徴とする、非アルコール性脂肪肝炎の体外 (in vitro or ex vivo) 診断方法。
- [請求項11] 被検試料中の Y K L - 4 O の濃度を測定することを特徴とする、単純性脂肪肝と非アルコール性脂肪肝炎との体外 (in vitro or ex viv

o) 判別方法。

[請求項12] 被検試料中のYKL-40の濃度を測定することを特徴とする、非アルコール性脂肪肝炎に対する治療効果の体外 (in vitro or ex vivo)

o) 確認方法。

[請求項13] 抗YKL-40抗体、又はYKL-40 mRNAの測定用プローブ若しくはプライマー、及びYKL-40と非アルコール性脂肪肝炎との関連性を記載した取扱説明書を含む、非アルコール性脂肪肝炎の診断キット。

[請求項14] 抗YKL-40抗体、又はYKL-40 mRNAの測定用プローブ若しくはプライマー、及びYKL-40と非アルコール性脂肪肝炎との関連性を記載した取扱説明書を含む、単純性脂肪肝と非アルコール性脂肪肝炎との判別用キット。

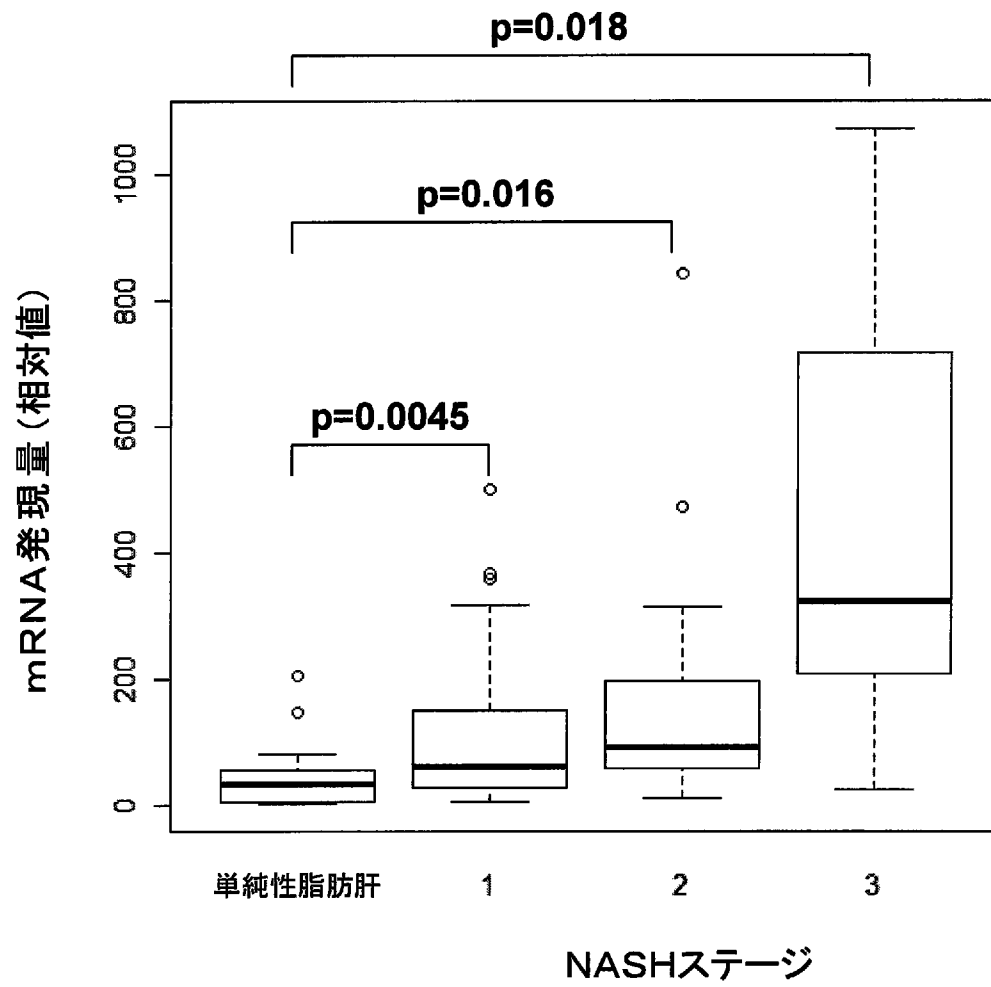
[請求項15] 抗YKL-40抗体、又はYKL-40 mRNAの測定用プローブ若しくはプライマー、及びYKL-40と非アルコール性脂肪肝炎との関連性を記載した取扱説明書を含む、非アルコール性脂肪肝炎に対する治療効果の確認用キット。

[請求項16] 抗YKL-40抗体、又はYKL-40 mRNAの測定用プローブ若しくはプライマーの、非アルコール性脂肪肝炎の診断薬の製造における使用。

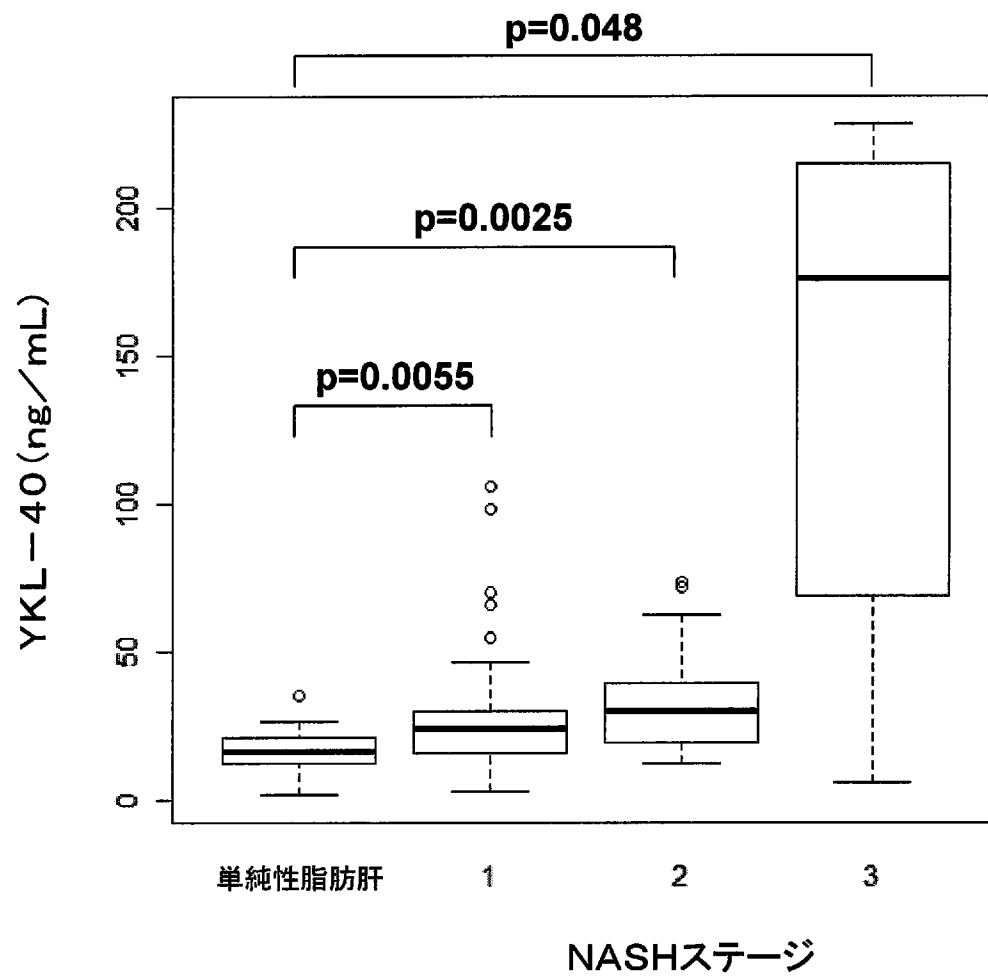
[請求項17] 抗YKL-40抗体、又はYKL-40 mRNAの測定用プローブ若しくはプライマーの、単純性脂肪肝と非アルコール性脂肪肝炎の判別薬の製造における使用。

[請求項18] 抗YKL-40抗体、又はYKL-40 mRNAの測定用プローブ若しくはプライマーの、非アルコール性脂肪肝炎の治療効果の確認薬の製造における使用。

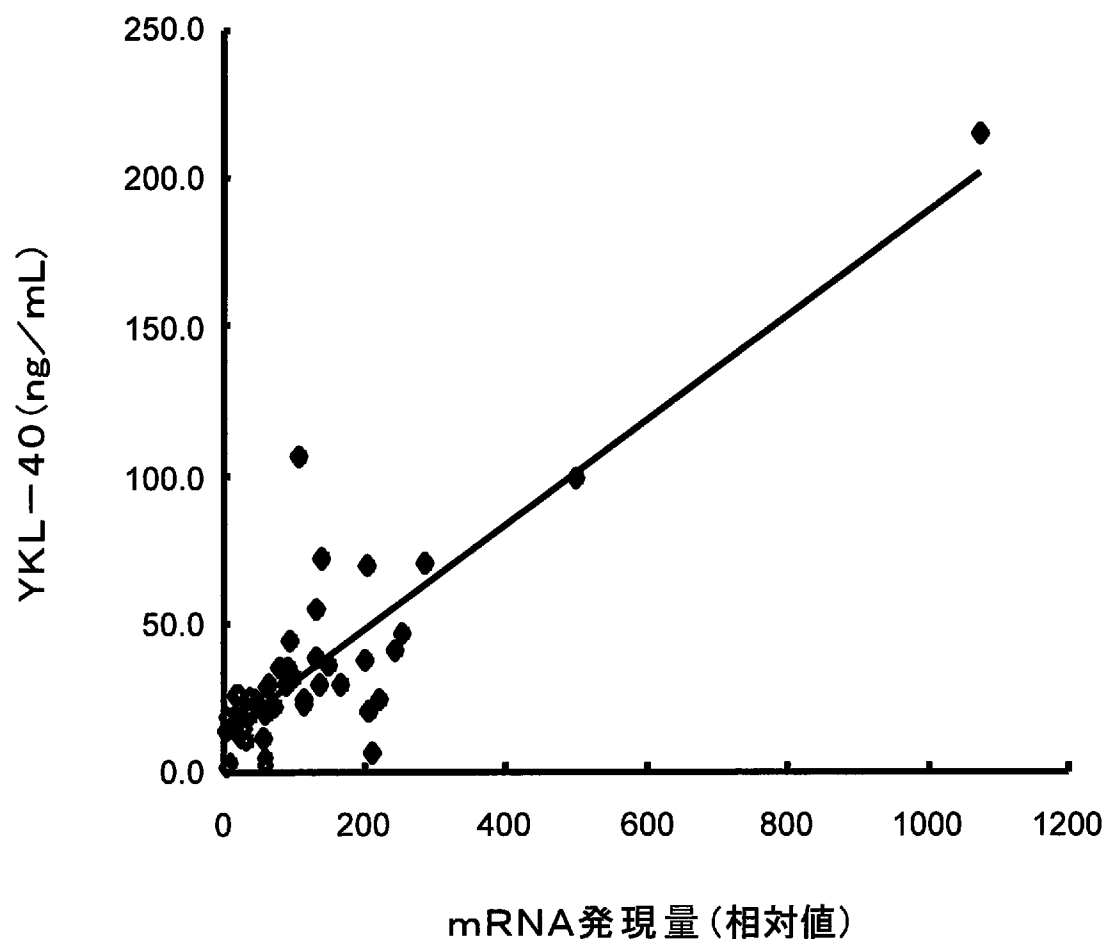
[図1]



[図2]

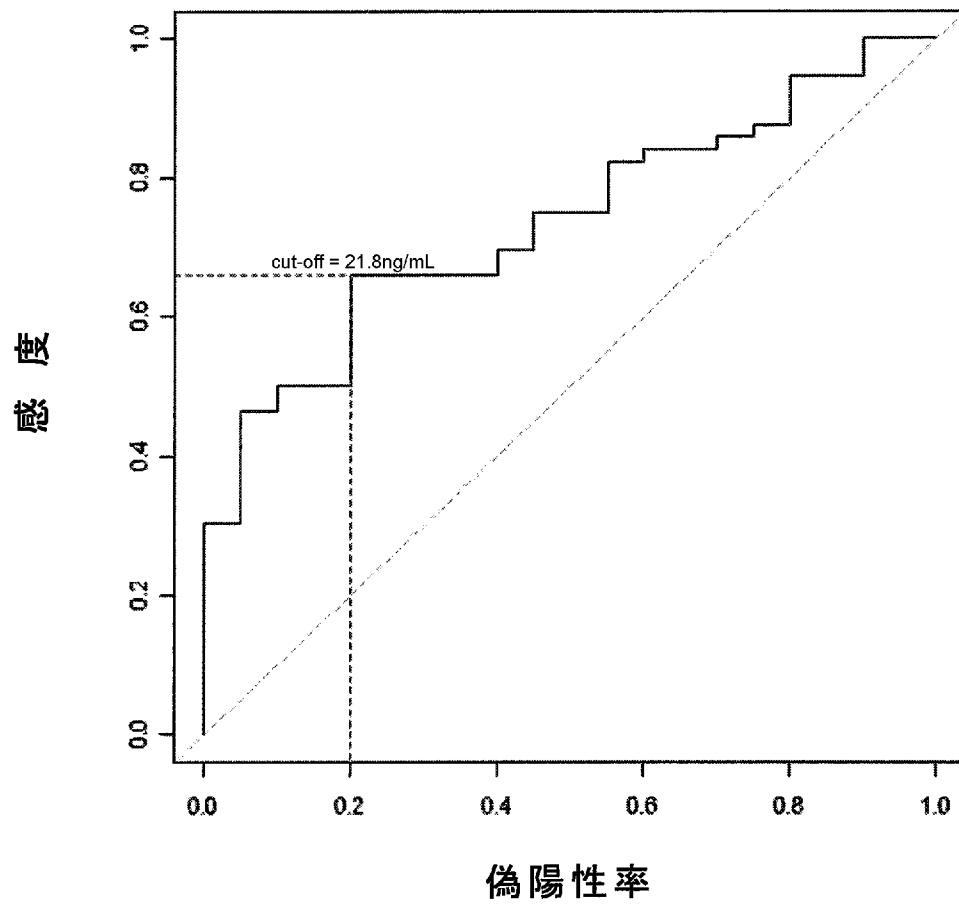


[図3]



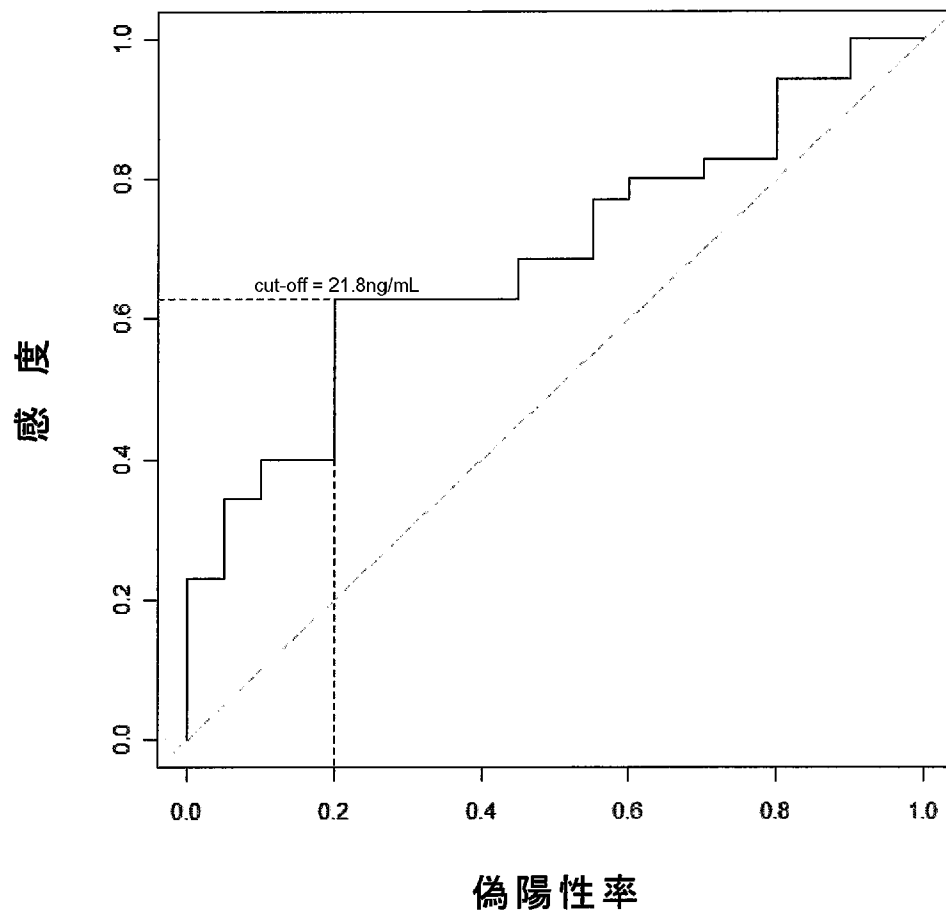
[図4]

単純性脂肪肝 vs NASH



[図5]

単純性脂肪肝 vs ステージ I NASH



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/052216

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

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

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

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2012

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Oh, Sangik, NON-INVASIVE MARKERS OF FIBROTIC NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS, Digestive Disease Week Abstracts and Itinerary Planner, 2003, Vol. 2003, pp. A-743 Abstract No. M1376	1-9, 11-18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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

21 February, 2012 (21.02.12)

Date of mailing of the international search report

13 March, 2012 (13.03.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/052216

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.: 10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The invention set forth in claim 10 pertains to a diagnostic method to be practiced on the human body.
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:

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.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N33/53, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 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）

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	Oh, Sangik, NON-INVASIVE MARKERS OF FIBROTIC NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS, Digestive Disease Week Abstracts and Itinerary Planner, 2003, Vol. 2003, pp. A-743 Abstract No. M1376	1 - 9、1 1 - 1 8

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「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
「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）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「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
「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
「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
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 1 . 0 2 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

1 3 . 0 3 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
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）

加々美 一恵

2 J

9 4 0 8

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2

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（P C T 17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 1 0 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、
請求項 1 0 は、人体の診断方法に係る発明である。
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P C T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ろの国際調査機関は認めた。

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。