

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7179356号

(P7179356)

(45)発行日 令和4年11月29日(2022.11.29)

(24)登録日 令和4年11月18日(2022.11.18)

(51)国際特許分類

F I

G 0 1 N 27/62 (2021.01)

G 0 1 N 27/62 V

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 27/62 C

G 0 1 N 33/68 (2006.01)

G 0 1 N 33/50 D

G 0 1 N 30/72 (2006.01)

G 0 1 N 33/68

G 0 1 N 33/50 Z

請求項の数 2 (全20頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-557367(P2019-557367)

(86)(22)出願日 平成30年4月17日(2018.4.17)

(65)公表番号 特表2020-517935(P2020-517935
A)

(43)公表日 令和2年6月18日(2020.6.18)

(86)国際出願番号 PCT/KR2018/004417

(87)国際公開番号 WO2018/199530

(87)国際公開日 平成30年11月1日(2018.11.1)

審査請求日 令和1年10月21日(2019.10.21)

(31)優先権主張番号 10-2017-0052665

(32)優先日 平成29年4月25日(2017.4.25)

(33)優先権主張国・地域又は機関
韓国(KR)

(73)特許権者 314000442

高麗大学校産学協力団

KOREA UNIVERSITY RE
SEARCH AND BUSINESS
FOUNDATION大韓民国 02841 ソウル ソンブクク
アナムロ 145145, Anam-ro Seongb
uk-gu Seoul 02841,
Republic of Korea

(74)代理人 100145403

弁理士 山尾 憲人

(74)代理人 100150500

弁理士 森本 靖

(74)代理人 100176474

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 代謝物分析を利用したパーチェット病の診断方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

デカン酸(decanoic acid)、フルクトース(fructose)、タガトース(tagatose)、オレイン酸(oleic acid)、リノール酸(linoleic acid)、L-システイン(L-cysteine)、ソルビトール(sorbitol)、ウリジン(uridine)、イノシン(inosine)、ガラクトネート(galactonate)、グリコレート(glycolate)、パルミチン酸(palmitic acid)およびヒスチジン(histidine)よりなる群から選ばれた一つ以上の、GC/TOF MSで分析された血液代謝物の強度に対して

、
デカン酸(decanoic acid)、フルクトース(fructose)、タガトース(tagatose)、L-システイン(L-cysteine)、ソルビトール(sorbitol)、ウリジン(uridine)、イノシン(inosine)、ガラクトネート(galactonate)およびグリコレート(glycolate)よりなる群から選ばれた一つ以上の、GC/TOF MSで分析された血液代謝物の強度が健康な正常ヒトに比べて30%以上増加する場合に、

またはオレイン酸(oleic acid)、リノール酸(linoleic acid)、パルミチン酸(palmitic acid)、およびヒスチジン(histidine)よりなる群から選ばれた一つ以上の、GC/TOF MSで分析された血液代謝物の強度が健康な正常ヒトに比べて20%以上減少する場合に、

ベーチェット病を示す、代謝物差別性の分析方法。

【請求項 2】

前記血液代謝物のうちデカン酸 (decanoic acid)、フルクトース (fructose)、タガトース (tagatose)、オレイン酸 (oleic acid) およびリノール酸 (linoleic acid) よりなる群から選ばれた一つ以上を含む、請求項 1 に記載の代謝物差別性の分析方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、代謝物分析を利用してベーチェット病を診断する方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

ベーチェット病は、原因が明らかにされていない全身的な血管炎であって、口腔、性器および肛門の潰瘍、ブドウ膜炎、関節炎、胃腸管、血管および中枢神経系などの重要臓器の侵犯など多様な症状を特徴とする疾患である。ベーチェット病は、地中海沿岸から極東アジアに達する地域、特に韓国、中国、日本国、そしてトルコ地域で発病頻度が高いと報告されている。

【0003】

ベーチェット病の臨床様相は、非常に多様であり、反復的な口腔潰瘍のような軽微な症状から眼球、胃腸管、血管および中枢神経系などを侵して、失明、腸潰瘍および穿孔、動脈瘤による喀血、深部静脈血栓症、片側マヒのような致命的な後遺症を残すことがある。ベーチェット病の多様な症状は、20代から40代において最もひどい病気の活性度を示して、経済的、社会的損失が非常に大きいと予想される病気である。

20

【0004】

ベーチェット病は、多様な器官の侵犯による多様な臨床様相と予後を示すので、これに応じた診断および治療に相当な困難を経験している。したがって、ベーチェット病において合併症と障害を最小化するために、ベーチェット病を早期に正確に診断することは、非常に重要である。

【0005】

このようなベーチェット病の診断は、ベーチェット病患者と健康なヒトを区分できる客観的な診断的生体標識がないので、主に臨床的な症状に依存している。しかしながら、実際にベーチェット病は、遺伝的、環境的、免疫学的異常によって様々な臓器を侵して多様な臨床症状が現れることになり、このような理由から、従来知られた単一の生体標識は、低い敏感度および特異性を示す。したがって、多様な臨床症状と従来の生体標識の不正確性によって正確な診断が難しいので、発病後に確診まで長時間がかかるという問題点がある。これを克服するために、客観的な診断的生体標識を発明することは、非常に重要である。

30

【0006】

したがって、ベーチェット病を診断できる客観的な診断的生体標識を発掘することは、ベーチェット病を早期診断して、ベーチェット病の確診にかかる時間を減らし、発病に適切な治療をすることができるようにして、患者の症状悪化による合併症を最小化させることができる。また、これは、高価の不要な治療を避け、患者にオーダーメイド治療、そして疾患と関連した予後に関する正確な情報を提供することによって、さらに良好な治療成績を得ることができるものと考えられる。最近、関節リウマチ、骨関節炎、乾癬関節炎、全身性エリテマトーデスのようなリウマチ疾患において生体標識の発掘のためにメタボロミクス技術が大きな脚光を浴びている [Madsen RK et al. Diagnostic properties of metabolic perturbations in rheumatoid arthritis (2011) Arthritis Res Ther. 13(1): R19; Kapoor et al. Metabolic profiling predicts response to anti-tumor

40

50

necrosis factor therapy in patients with rheumatoid arthritis (2013) Arthritis Rheum 65:1448-65; Kim S et al. Global metabolite profiling of synovial fluid for the specific diagnosis of rheumatoid arthritis from other inflammatory arthritis. (2014) PLoS one 9:e97501]

【0007】

ベーチェット病において生体標識の発掘のために現在まで報告された技術は、主にゲノミクスまたはプロテオミクス接近であったが、その結果が明確でないか、または実際にベーチェット病の診断に使用されることが困難であり[Yuko et al. Proteomic surveillance of autoimmunity in Behcet's disease with uveitis: selenium binding protein is a novel autoantigen in Behcet's disease. (2007) Experimental Eye Research 84:823-831; Seido et al. Proteomic surveillance of autoantigens in patients with Behcet's disease by a proteomic approach. (2010) Microbiol Immunol 54:354-361]、ベーチェット病においてメタボロミクスを利用した診断および予後の予測に適切な生体標識の発掘のための研究は、報告されたことがない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

これより、本発明者らは、ベーチェット病の迅速かつ便利な診断のための血液サンプル内で特異的な生体標識を探すために、GC/TOF MS (gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry) 技法を適用して、検体多様な症状のベーチェット病患者と健康な対照群を鑑別できる血液内代謝物質の代謝物プロファイリングおよび特異的代謝物を探すために研究努力した結果、血液にメタボロミクス技法を適用して、ベーチェット病の正確な診断のための新しい生体標識を発掘することによって、本発明を完成することになった。

【0009】

したがって、本発明は、代謝物分析を利用してベーチェット病を診断するためのキットを提供することを目的とする。

【0010】

また、本発明は、ベーチェット病を診断するための代謝物差別性を分析する方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、デカン酸 (decanoic acid)、フルクトース (fructose)、タガトース (tagatose)、オレイン酸 (oleic acid)、リノール酸 (linoleic acid)、L-システイン (L-cysteine)、ソルビトール (sorbitol)、ウリジン (uridine)、イノシン (inosine)、ガラクトネート (galactonate)、グリコレート (glycolate)、パルミチン酸 (palmitic acid) およびヒスチジン (histidine) よりなる群から選ばれた一つ以上の血液代謝物に対する定量装置を含むベーチェット病の診断キットを提供する。

【0012】

また、本発明は、正常対照群とベーチェット病から得られた血液間の代謝物差別性を検出する方法であって、

10

20

30

40

50

(1) GC/TOF MS (gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry) を利用した代謝物分析段階；
 (2) GC/TOF MS で同定された代謝物に対して部分的最小二乗判別分析 (PLS-DA) を利用して代謝物プロファイルの差異を確認する段階；
 (3) PLS-DA で導き出された代謝物の VIP (Variable Importance for Projection) 値が 1.5 以上である値を代謝物バイオマーカーの候補物質として選定し、PLS-DA のローディング値を通じて代謝物バイオマーカーの候補物質の増減を確認する段階；
 (4) ROC 曲線 (Receiver Operating Characteristic curve) を利用して代謝物バイオマーカーを検証する段階

を順次に適用して、血液から代謝物バイオマーカーを分析することを含む正常対照群とベーチェット病から得られた血液間の代謝物差別性の分析方法を提供する。

10

【発明の効果】

【0013】

本発明は、ベーチェット病患者を特異的に鑑別診断するために、メタボロミクス接近を通じて迅速かつ正確にベーチェット病を診断できる生体標識を発掘した。GC/TOF MS を利用してベーチェット病患者と一般人の血液内代謝物分析を利用して 104 個の代謝物を検出した。部分的最小二乗回帰法 (PLS-DA) と VIP (variable importance for projection) 値、ROC (Receiver operating characteristic) 曲線の AUC (area under the curve) の値、倍率変化 (fold change)、p 値 (p-value) などを算出して、13 個の強力な代謝物質の生体標識を提示した。また、最終的に 5 個 (デカン酸、フルクトース、タガトース、オレイン酸、リノール酸) の生体標識を利用したベーチェット病の診断パネルを製作し、これを外部検体 (validation set) を利用して臨床的妥当性を検証した。本発明を通じてメタボロミクスを血液分析に利用してベーチェット病を特異的に診断できる生体標識を最初に糾明した。これは、いまだに完全に明らかにされていないベーチェット病の発病機序を明らかにする研究の基盤になり得る。また、多様な臨床症状に最適化された治療剤の開発にも応用され得る。ベーチェット病の診断を容易にする生体標識の発見は、ベーチェット病患者を迅速かつ正確に診断し、臨床的診断にかかる長い時間を大きく減らして、オーダーメイド治療を迅速に提供して、日常生活への復帰を迅速にするなどの社会経済的波及効果も相当であると期待される。

20

30

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図 1】PLS-DA を利用してベーチェット病患者と健康な対照群の血液内代謝物プロファイリングの差異を示す結果である [ベーチェット病患者と健康な対照群の代謝物が明確な差異を示して区分される。BD: ベーチェット病; HC: 健康な対照群]。

【図 2】ベーチェット病において有意に増加した上位 9 個の代謝物質 (A) と有意に減少した上位 4 個の代謝物質 (B) の水準比較グラフである [BD: ベーチェット病; HC: 健康な対照群]。

40

【図 3 a - 3 c】ベーチェット病患者内ステロイド、コルヒチン、アザチオプリンの投与グループと非投与グループ間の代謝物的差異を PLS-DA で示す結果である [それぞれの薬物投与グループと非投与グループ間の差異が、Q2 値が非常に低くて再現性がなく、統計学的にグループ間の代謝物的差異がないことを示す]。

【図 4】ベーチェット病において有意に増加した上位 3 個の代謝物質 (デカン酸、フルクトース、タガトース) と有意に減少した上位 2 個の代謝物質 (オレイン酸、リノール酸) を利用してベーチェット病を診断する代謝物的生体標識パネルを製作するために PCA を通じて生成した多変量分析モデルである [PC1 一つの軸を利用したとき、R2X 値が 0.721 と適切に区分されることを示し、Q2 値が 0.515 とモデルが再現性のあることを確認する、BD: ベーチェット病; HC: 健康な対照群]。

50

【図5】血液検体を利用したベーチェット病の診断のための代謝物的診断パネルのROC (receiver operating characteristic curve) 結果である[5個の代謝物の組合せを利用した生体標識パネルがベーチェット病の診断において敏感度100%、特異度97.1%、AUC 0.993の結果を示す]。

【図6】血液サンプルを利用したベーチェット病の診断のための代謝物的診断パネルの外部検体検証結果である[主成分の分析において10個のベーチェット病患者の血液および10個の健康な対照群のうち9個のベーチェット病患者および10個の健康な対照群を正確に予測することができることを示す、BD:ベーチェット病; HC:健康な対照群]。

【発明を実施するための形態】

【0015】

以下、本発明の構成を具体的に説明する。

【0016】

本発明は、デカン酸(decanoic acid)、フルクトース(fructose)、タガトース(tagatose)、オレイン酸(oleic acid)、リノール酸(linoleic acid)、L-システイン(L-cysteine)、ソルビトール(sorbitol)、ウリジン(uridine)、イノシン(inosine)、ガラクトネート(galactonate)、グリコレート(glycolate)、パルミチン酸(palmitic acid)およびヒスチジン(histidine)よりなる群から選ばれた一つ以上の血液代謝物に対する定量装置を含むベーチェット病の診断キットに関する。

【0017】

本発明者らは、ベーチェット病のバイオマーカーを探すために、患者の血液からサンプルを採取してメタノールを抽出し、GC/TOF MSを利用してベーチェット病患者と正常ヒトの代謝物プロファイルの差異を比較分析し、この差異を利用してベーチェット病患者を診断できるバイオマーカーの発掘研究を行った。

【0018】

その結果、アミン類、アミノ酸類、脂肪酸類、有機酸類、リン酸類、糖類などに区分できる104種の代謝物を同定した。このうち、アミノ酸類が最も多く検出され、その次に有機酸類、脂肪酸類、糖類、アミン類、リン酸類などの順に検出された。

【0019】

35人のベーチェット病患者(BD)と35人の健康な対照群(HC)の血液を比較したとき、部分的最小二乗判別分析(PLS-DA)を通じてベーチェット病患者と健康な対照群の血液内代謝物プロファイルの明確な差異を確認し、それぞれの代謝物質に対して、VIP値が1.5以上、倍率変化(fold change)が1.2、AUCが0.800以上、p値(p-values)が0.01未満を基準として選定し、13種の代謝物を新規バイオマーカー候補物質として選定した。それぞれの代謝物質は、ベーチェット病と健康な対照群において統計的に明確な差異を示して、適切な候補生体標識であることを確認した。また、ベーチェット病の特異的代謝物プロファイルと候補生体標識がベーチェット病の治療のために投与した薬物による影響でないことを確認するために、ベーチェット病で投与した薬物によってグループを分けてPLS-DA分析を施行した。その結果、ベーチェット病において投与した薬物による代謝物的差異がないことを確認した。

【0020】

また、候補生体標識に選定された13個の代謝物質のうちベーチェット病患者の血液において有意に増加した代謝物質3個(デカン酸、フルクトース、タガトース)と、ベーチェット病患者の血液において有意に減少した代謝物質2個(オレイン酸、リノール酸)を選定して、5個の代謝物質から構成されたベーチェット病を鑑別する代謝物的生体標識パネルを生成した。5個の代謝物の生体標識パネルがベーチェット病の診断的目的の利用可能性を確認するために、ROC曲線を利用して検証し、敏感度(sensitivity)が100%、特異度(specificity)が97.1%、AUC値が0.993とベーチェット病を診断するのに非常に優れた結果を示した。また、このモデルの適正性

10

20

30

40

50

を確認するために、さらに、外部から受けた10個のベーチェット病患者と10個の健康な対照群の血液を利用して主成分の分析を施行した。その結果、本発明者らが発見した5個の代謝物質を利用した生体標識パネルがベーチェット病の診断に適切であることを検証することができた。

【0021】

ひいては、本発明者らにより新しく糾明されたベーチェット病の指標代謝物であるデカン酸 (decanoic acid)、フルクトース (fructose)、タガトース (tagatose)、オレイン酸 (oleic acid) およびリノール酸 (linoleic acid) よりなる群から選ばれた一つ以上以外にも、L-システイン (L-cysteine)、ソルビトール (sorbitol)、ウリジン (uridine)、イノシン (inosine)、ガラクトネート (galactonate)、グリコレート (glycolate)、パルミチン酸 (palmitic acid) およびヒスチジン (histidine) よりなる群から選ばれた一つ以上に対する定量情報をさらに含むことによって、より一貫性あり、かつ信頼度の高い正確なベーチェット病の診断が可能である。

10

【0022】

本明細書において用語「診断」は、特定の病気または疾患に対する一つの客体の感受性 (susceptibility) を判定すること、一つの客体が特定の病気または疾患を現在持っているか否かを判定すること (例えば、ベーチェット病の同定)、特定の病気または疾患にかかった一つの客体の予後 (prognosis) を判定すること、または

20

【0023】

本発明の診断キットに含まれた定量装置は、クロマトグラフィー/質量分析器であり得る。

【0024】

本発明において利用されるクロマトグラフィーは、ガスクロマトグラフィー (Gas Chromatography)、液体-固体クロマトグラフィー (Liquid-Solid Chromatography, LSC)、紙クロマトグラフィー (Paper Chromatography, PC)、薄層クロマトグラフィー (Thin-Layer Chromatography, TLC)、気体-固体クロマトグラフィー (Gas-Solid Chromatography, GSC)、液体-液体クロマトグラフィー (Liquid-Liquid Chromatography, LLC)、泡沫クロマトグラフィー (Foam Chromatography, FC)、乳化クロマトグラフィー (Emulsion Chromatography, EC)、気体-液体クロマトグラフィー (Gas-Liquid Chromatography, GLC)、イオンクロマトグラフィー (Ion Chromatography, IC)、ゲル濾過クロマトグラフィー (Gel Filtration Chromatography, GFC) またはゲル浸透クロマトグラフィー (Gel Permeation Chromatography, GPC) を含むが、これに制限されず、当業界において通常使用されるすべての定量用クロマトグラフィーを使用することができる。好ましくは、本発明において利用されるクロマトグラフィーは、ガスクロマトグラフィーである。なお、本発明において利用される質量分析器は、MALDI-TOF MS または TOF MS であり、より好ましくは TOF MS である。

30

40

【0025】

本発明の血液代謝物は、ガスクロマトグラフィーで各成分が分離され、Q-TOF MS を経て得られた情報を利用して正確な分子量情報だけでなく、構造情報 (elemental composition) を通じて構成成分を確認する。

【0026】

本発明の好ましい具現例によれば、デカン酸 (decanoic acid)、フルク

50

トース (fructose)、タガトース (tagatose)、L-システイン (L-cysteine)、ソルビトール (sorbitol)、ウリジン (uridine)、イノシン (inosine)、ガラクトネート (galactonate) およびグリコレート (glycolate) よりなる群から選ばれた一つ以上の濃度が増加する場合、ベーチェット病を示し、オレイン酸 (oleic acid)、リノール酸 (linoleic acid)、パルミチン酸 (palmitic acid) およびヒスチジン (histidine) よりなる群から選ばれた一つ以上の濃度が減少する場合、ベーチェット病を示す。

【0027】

本明細書において、用語「血液代謝物濃度の増加」は、健康な正常ヒトに比べてベーチェット病患者の血液代謝物の濃度が測定可能な程度に有意に増加したことを意味し、好ましくは70%以上増加したことを意味し、より好ましくは30%以上増加したことを意味する。

10

【0028】

本明細書において、用語「血液代謝物の濃度の減少」は、健康な正常ヒトに比べてベーチェット病患者の血液代謝物の濃度が測定可能な程度に有意に減少したことを意味し、好ましくは40%以上減少したことを意味し、より好ましくは20%以上減少したことを意味する。

【0029】

本発明によれば、デカン酸 (decanoic acid)、フルクトース (fructose)、タガトース (tagatose)、L-システイン (L-cysteine)、ソルビトール (sorbitol)、ウリジン (uridine)、イノシン (inosine)、ガラクトネート (galactonate) およびグリコレート (glycolate) よりなる群から選ばれた一つ以上は、健康な正常ヒトに比べてベーチェット病患者において有意に増加した濃度を示し、オレイン酸 (oleic acid)、リノール酸 (linoleic acid)、パルミチン酸 (palmitic acid) およびヒスチジン (histidine) よりなる群から選ばれた一つ以上は、健康な正常ヒトに比べてベーチェット病患者において有意に減少した濃度を示す (第1表)。

20

【0030】

また、本発明は、正常対照群とベーチェット病から得られた血液間の代謝物差別性を検出する方法であって、

30

(1) GC/TOF MS (gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry) を利用した代謝物分析段階；

(2) GC/TOF MS で同定された代謝物に対して部分的最小二乗判別分析 (PLS-DA) を利用して代謝物プロファイルの差異を確認する段階；

(3) PLS-DA で導き出された代謝物のVIP (Variable Importance for Projection) 値が1.5以上である値を代謝物バイオマーカーの候補物質として選定し、PLS-DA のローディング値を通じて代謝物バイオマーカーの候補物質の増減を確認する段階；

(4) ROC 曲線 (Receiver Operating Characteristic curve) を利用して代謝物バイオマーカーを検証する段階

40

を順次に適用して、血液から代謝物バイオマーカーを分析することを含む正常対照群とベーチェット病から得られた血液間の代謝物差別性の分析方法に関する。

【0031】

本発明の二つの生体試料群間の代謝物差別性の分析方法は、ベーチェット病と正常群から得られた血液試料群間の代謝物差別性を分析する方法を例にあげて具体的に説明する。

【0032】

まず、正常ヒトとベーチェット病患者から採取した血液サンプルを100%メタノールで抽出した後、GC/TOF MS 分析に使用できるように公知の技術を利用して誘導体化過程を経る。

50

【0033】

前記GC/TOF MSを利用した血液の代謝物分析方法は、血液抽出物をGC/TOF MS機器で分析し、分析結果を統計処理可能な数値に変換した後、変換した数値を利用して統計学的に二つの生体試料群の差別性を検証することを含む。

【0034】

GC/TOF MS分析結果を統計処理可能な数値に変換することは、総分析時間を単位時間間隔に分けて単位時間の間に示されたクロマトグラムピークの面積または高さのうち最も大きい数値を単位時間の間の代表値に定めるものであり得る。

【0035】

本発明の一具現例によれば、GC/TOF MS分析結果、アミン類、アミノ酸類、脂肪酸類、有機酸類、リン酸類、糖類などに区分できる104種の代謝物を同定し、このうちアミノ酸類が最も多く検出され、その次に有機酸類、脂肪酸類、糖類、アミン類、リン酸類などの順に検出された。

10

【0036】

前記GC/TOF MS分析結果として出た代謝物の強度を総同定された代謝物の強度の合計で割って各代謝物を標準化し、PLS-DA分析を実施する。

【0037】

代謝物のPLS-DAローディング値とVIP値から構成されたV-plotを作成し、VIP値が1.5以上である値を代謝物バイオマーカーの候補物質として選定し、PLS-DAのローディング値の増減を確認し、この際、ローディング値が正数であることは、代謝物の増加傾向を、ローディング値が負数であることは、代謝物の減少傾向を示すことである。

20

【0038】

GC/TOF MSで分析された血液の代謝物の強度を利用して代謝物の増減を確認することができる。

【0039】

ROC曲線を通じて前記代謝物バイオマーカーを検証する。

【0040】

本発明の一具現例によれば、ベーチェット病を診断するためのバイオマーカーとして、デカン酸(decanoic acid)、フルクトース(fructose)、タガトース(tagatose)、オレイン酸(oleic acid)、リノール酸(linoleic acid)、L-システイン(L-cysteine)、ソルビトール(sorbitol)、ウリジン(uridine)、イノシン(inosine)、ガラクトネート(galactonate)、グリコレート(glycolate)、パルミチン酸(palmitic acid)およびヒスチジン(histidine)よりなる群から選ばれた一つ以上を使用することができる。

30

【0041】

本発明の正常群とベーチェット病から得られた血液試料群間の代謝物差別性の分析方法を通じてさらに一貫性のありかつ信頼度の高い正確なベーチェット病を診断することができる、これを治療剤の開発に適用することができる。

40

【0042】

以下、本発明による実施例を通じて本発明をより詳細に説明するが、本発明の範囲が下記提示された実施例により制限されるものではない。

【実施例】

【0043】

実施例1：GC/TOF MSを利用した代謝物の同定

ベーチェット病患者および健康な対照群それぞれの血液20μlに純粋メタノール980μlを混ぜ、遠心分離して、代謝物を抽出した。

【0044】

GC/TOF MS分析のための誘導体化過程は、次のとおりである。

50

抽出したサンプルをスピードバックで乾燥させた後に、 $5\mu\text{l}$ の40% (w/v) 濃度のO-メチルヒドロキシルアミン塩酸塩のピリジン溶液を入れ、30度で200rpmで90分間反応をさせた。そして、 $45\mu\text{l}$ のN-メチル-N-(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミドを入れ、37度で200rpmで30分間反応を実施した。

【0045】

GC/TOF MS分析のための機器条件は、次のとおりである。

分析するときに使用したカラムは、RTX-5Sil MS キャピラリーカラム (30m 長さ、0.25mm フィルム厚み、および 2.5mm 内径) であり、GCカラムの温度条件は、まず50度で5分間維持させた後、330度まで昇温させた後、1分間維持した。 $1\mu\text{l}$ のサンプルを非分割法 (splitless) で注入 (injection) した。移送ライン (Transfer line) の温度とイオン源 (Ion source) 温度は、それぞれ280度、250度に維持させた。GC/TOF MS結果を保有しているライブラリーで探して同定し、104個の代謝物を同定した (第1表)。

【0046】

下記第1表 (ベッチェット病患者と健康な対照群の血液検体を利用して代謝物分析結果として確認された104個の代謝物) のように、それぞれの代謝物群別に分類したとき、アミノ酸26%、有機酸19%、脂肪酸17%、糖15%、アミン11%、リン5%、その他7%であることが示された。

【0047】

第1表

【表1】

同定された代謝物		
アミン		
2-ヒドロキシピリジン	3-ヒドロキシピリジン	アデノシン
イノシン	メチルアミン	O-ホスホリルエタノールアミン
スベルミジン	チミン	尿酸
ウリジン	キサントシン	
アミノ酸		
アラニン	アスパラギン	脱水アスパラギン
シアノ-L-アラニン	グルタメート	グルタミン
グリシン	ヒスチジン	イソロイシン
イソトレオネート	L-シトルリン	L-システイン
ロイシン	L-ホモセリン	リシン
メチオニン	N-メチルアラニン	オルニチン
オキシプロリン	フェニルアラニン	プロリン
セリン	トレオニン	トリプトファン
チロシン	バリン	β -アラニン

10

30

40

50

【表 2】

脂肪酸		
1-モノパルミチン	アラキジン酸	アラキドン酸
デカン酸	ヘプタデカン酸	ラウリン酸
リグノセリン酸	リノール酸	リノレイン酸
パルミトレイン酸メチル	ミリスチン酸	オクタデカノール
オレイン酸	パルミチン酸	パルミトレイン酸
ペラルゴン酸	ペンタデカン酸	ステアリン酸
有機酸		
2-ヒドロキシヘキサノエート	2-ヒドロキシバレレート	2-ケトイソカプロン酸
アジペート	ベンゾエート	シトレート
フマレート	ガラクトネート	ガラクトツロネート
グリセレート	グリコレート	イソシトレート
ラクテート	マレート	オキサレート
ピロール-2-カルボキシレート	ピルベート	スクシネート
テレフタレート	α -ケトグルタレート	

10

20

【表 3】

糖類および糖アルコール		
1,5-アンヒドログルシトール	アラビトール	フルクトース
フコース	ガラクトース	グルコース
グリセロール	リキソース	マンニトール
マンノース	myo-イノシトール	ソルビトール
スクロース	タガトース	トレイトール
トレオース		
リン酸塩		
グルコース-6-ホスフェート	グリセロール-1-ホスフェート	マンノース-6-ホスフェート
ホスフェート	ホスホグルコネート	
その他		
インドール-3-ラクテート	サリチルアルデヒド	スクアレン
タウリン	ウラシル	ウレア
α -トコフェロール		

30

40

【0048】

実施例 2：PLS-D A を利用したベーチェット病患者と健康な対照群の血液内代謝物プロファイルの差異

50

実施例 1 から得られた代謝物の強度 (i n t e n s i t y) を総同定された代謝物の強度の合計で割って各代謝物を標準化した。その後、S I M C A - P + (v e r . 1 2 . 0) を利用して P L S - D A 分析を実施した。

【 0 0 4 9 】

図 1 に示されたように、パーチェット病患者と健康な対照群の血液内代謝物プロファイリングが明確に違いがあることを確認した。

【 0 0 5 0 】

下記第 2 表は、図 1 の P L S - D A モデルに使用された 1 0 4 個の代謝物がモデルに影響を及ぼす程度および方向性を示す V I P 値およびローディング (l o a d i n g) 値を示す結果である。

【 0 0 5 1 】

10

20

30

40

50

【表 4】

代謝物	ローディング_[t1]	ローディング_[t2]	VIP値
1,5-アンヒドログルシトール	0.033	0.071	0.364
1-モノパルミチン	-0.097	0.143	1.049
2-ヒドロキシヘキサネート	0.097	0.131	0.998
2-ヒドロキシピリジン	0.001	0.123	0.312
2-ヒドロキシバレレート	-0.019	0.153	0.438
2-ケトイソカプロン酸	0.100	0.134	1.024
3-ヒドロキシピリジン	0.004	-0.071	0.184
アデノシン	0.043	-0.051	0.454
アジペート	0.035	0.000	0.344
アラニン	0.063	-0.065	0.650
アラビトール	0.012	-0.017	0.124
アラキジン酸	0.000	0.044	0.112
アラキドン酸	-0.080	0.191	0.955
アスパラギン	0.070	-0.036	0.705
脱水アスパラギン	0.025	0.143	0.427
ベンゾエート	0.114	0.023	1.131
シトレート	0.026	0.062	0.292
シアノ-L-アラニン	0.054	-0.009	0.536
デカン酸	0.295	0.236	2.944
フルクトース	0.270	0.177	2.682
フコース	-0.024	0.057	0.286
フマレート	0.088	0.096	0.890
ガラクトネート	0.165	0.129	1.649
ガラクトース	-0.058	-0.134	0.652
ガラクトツロネート	0.008	-0.065	0.185
グルコース	-0.061	-0.151	0.697
グルコース-6-ホスフェート	-0.106	0.061	1.073

10

20

30

40

50

【表 5】

グルタメート	0.015	-0.002	0.153
グルタミン	0.085	-0.039	0.853
グリセレート	-0.057	-0.082	0.591
グリセロール	-0.100	0.066	1.009
グリセロール-1-ホスフェート	-0.047	0.045	0.480
グリシン	-0.018	-0.075	0.253
グリコレート	0.153	0.025	1.511
ヘプタデカン酸	-0.140	0.168	1.474
ヒスチジン	-0.160	-0.150	1.602
インドール-3-ラクテート	0.010	0.178	0.456
イノシン	0.171	0.113	1.699
イソシトレート	0.027	0.065	0.301
イソロイシン	0.055	0.069	0.565
イソトレオネート	0.063	0.139	0.697
ラクテート	-0.061	-0.107	0.646
ラウリン酸	0.033	0.148	0.486
L-シトルリン	-0.048	0.108	0.559
L-システイン	0.201	0.097	1.988
ロイシン	-0.034	-0.017	0.335
L-ホモセリン	0.025	0.054	0.277
リグノセリン酸	-0.001	0.054	0.138

10

20

30

40

50

【表 6】

リノール酸	-0.176	0.123	1.790
リノレイン酸	-0.110	0.082	1.122
リシン	-0.138	0.018	1.371
リキソース	-0.045	-0.108	0.511
マレート	0.064	0.041	0.635
マンニトール	0.118	0.001	1.169
マンノース	-0.050	-0.122	0.572
マンノース-6-ホスフェート	0.087	0.086	0.878
メチオニン	0.070	0.038	0.695
パルミトレイン酸メチル	-0.144	0.053	1.434
メチルアミン	0.039	-0.005	0.386
myo-イノシトール	-0.013	0.078	0.244
ミリスチン酸	-0.062	0.226	0.861
N-メチルアラニン	-0.075	-0.058	0.753
オクタデカノール	-0.047	0.154	0.626
オレイン酸	-0.180	0.109	1.820
O-ホスホリルエタノールアミン	0.034	0.112	0.430
オルニチン	-0.018	-0.036	0.198
オキサレート	0.040	0.085	0.439
オキソプロリン	-0.027	0.087	0.354
パルミチン酸	-0.159	0.101	1.605
パルミトレイン酸	-0.117	0.153	1.244
ペラルゴン酸	0.146	0.012	1.446
ペンタデカン酸	0.020	-0.065	0.263
フェニルアラニン	-0.114	0.006	1.131
ホスフェート	-0.057	0.021	0.572
ホスホグルコネート	0.063	0.169	0.738
プロリン	0.128	-0.039	1.281

10

20

30

40

50

【表 7】

ピロール-2-カルボキシレート	-0.085	0.122	0.913
ビルベート	0.057	0.041	0.569
サリチルアルデヒド	0.038	-0.053	0.403
セリン	-0.059	-0.100	0.626
ソルビトール	0.194	0.160	1.943
スペルミジン	0.148	0.098	1.469
スクアレン	0.076	0.086	0.766
ステアリン酸	-0.041	0.194	0.652
スクシネート	-0.021	-0.083	0.285
スクロース	0.101	0.008	0.996
タガトース	0.230	0.105	2.272
タウリン	0.055	-0.006	0.541
テレフタレート	-0.030	-0.104	0.386
トレイトール	0.101	0.067	1.002
トレオニン	0.098	0.045	0.967
トレオース	0.130	0.104	1.295
チミン	-0.126	-0.005	1.248
トリプトファン	-0.090	0.120	0.953
チロシン	-0.006	0.149	0.387
ウラシル	0.038	0.024	0.373
ウレア	0.054	-0.096	0.595
尿酸	-0.038	0.088	0.444
ウリジン	0.179	0.123	1.781
バリン	0.062	-0.014	0.612
キサンチン	-0.140	-0.003	1.385
α -ケトグルタレート	-0.007	0.062	0.173
α -トコフェロール	0.052	0.075	0.536
β -アラニン	-0.052	0.126	0.624

【0052】

実施例 3：ベーチェット病患者に特異的な生体標識代謝物質の選別
 ベーチェット病患者において特異的に増減した生体標識を探すために、それぞれの代謝物質から実施例 2 から導き出された代謝物プロファイリングの差異に影響を及ぼすVIP値、倍率変化(fold change)、AUC、p値(p-value)を求めた。VIP値が1.5以上、倍率変化が1.2、AUCが0.800以上、p値が0.01未満の基準をそれぞれの代謝物質に対して求め、13個の代謝物質がベーチェット病の診断に適切であることを示した(第3表)。また、この代謝物質の絶対的強度(intensity)をグループ別に比較した(図2)。

【0053】

下記第3表は、ベーチェット病の診断のための潜在的な生体標識に選ばれた13個の代謝物質のVIP、AUC、倍率変化、p値[BD、ベーチェット病患者；control、健康な対照群]を示すものである。

【0054】

第3表

【表8】

代謝物	VIP	倍	AUC	p値
対照群よりもBD群の方が豊富な代謝物				
デカン酸	2.94	16.26	1.000	< 0.001
フルクトース	2.68	17.84	0.971	< 0.001
タガトース	2.27	154.92	0.989	< 0.0001
L-システイン	1.99	1.58	0.912	< 0.0001
ソルビトール	1.94	3.71	0.877	< 0.0001
ウリジン	1.78	2.33	0.856	< 0.0001
イノシン	1.70	14.56	0.944	< 0.0001
ガラクトネート	1.65	1.43	0.857	< 0.0001
グリコレート	1.51	1.33	0.860	< 0.0001
BD群よりも対照群の方が豊富な代謝物				
オレイン酸	1.82	1.89	0.858	< 0.0001
リノール酸	1.79	1.67	0.851	< 0.0001
パルミチン酸	1.60	1.23	0.809	< 0.0001
ヒスチジン	1.60	1.36	0.805	< 0.0001

10

20

30

AUC, ROC曲線下面積; BD, ベーチェット病; VIP, 変数重要性

【0055】

実施例4：PLS-DAを利用したベーチェット病患者において増減した代謝物質に薬物効果存在有無の検証

ベーチェット病患者において特異的に増減した生体標識が薬物により増減した物質でないことを示すために、それぞれの薬物投与グループvs. 薬物非投与グループをPLS-DAを利用して比較した結果、分離水準が適切でなく、再現性のないことが示された。3個の投与された薬物グループであるステロイド、コルヒチン、アザチオプリンにおいてそれぞれ再現性のない結果を示し、薬物による差異が統計的に有意でなかった。

【0056】

したがって、実施例3に示されたベーチェット病において増減した代謝物質が病気自体による変化であるから、生体標識として適切であることを確認した(図3a~図3c)。

【0057】

実施例5：血液検体を通したベーチェット病の診断のために5個の代謝物質を利用した代謝物的診断パネルの生成

実施例3から選定されたベーチェット病の診断のための生体標識13個のうちベーチェット病において特異的に増加した物質上位3個(デカン酸、フルクトース、タガトース)、ベーチェット病において特異的に減少した物質上位2個(オレイン酸、リノール酸)を選定して、ベーチェット病を診断できる代謝物的診断パネルを製作しようとした。したがって、5個の代謝物質をベースにBDとHCを区分できる多変量区分モデルを主成分分析を

40

50

ベースに生成した。P C 1 の一つの軸を利用したとき、B D と H C が完全に区分されることを示すことができ、モデルの数値は、R 2 X 値が 0 . 7 2 1、Q 2 値が 0 . 5 1 5 であって、ベーチェット病患者と健康な対照群を適切にかつ再現性のあるように区分した（図 4 ）。

【 0 0 5 8 】

実施例 6：血液検体を利用したベーチェット病の診断のための代謝物的診断パネルの R O C および外部検体検証を通したモデル検証

実施例 5 を通じて生成された血液検体を通したベーチェット病の診断用代謝物的生体標識パネルが診断に適切であるか否かを調べるために、モデル内の各検体の P C 1 スコアを利用して R O C (r e c e i v e r o p e r a t i n g c h a r a c t e r i s t i c) 曲線を描いた。その結果、敏感度 (s e n s i t i v i t y) が 1 0 0 %、特異度 (s p e c i f i c i t y) が 9 7 . 1 %、A U C 値が 0 . 9 9 3 であって、モデルがベーチェット病の診断に非常に適していることを示した（図 5 ）。

また、このパネルが外部検体を利用してベーチェット疾患の診断を予測することができるか否かを調べるために、ベーチェット病患者および健康な対照群の血液検体を各 1 0 個ずつ、合計 2 0 個の検体を利用した。その結果、合計 2 0 個の検体のうち 1 9 個の検体を正確にベーチェット病患者あるいは健康な対照群と予測することができることを示して、5 個の代謝物生体標識パネルが外部検体のベーチェット病の診断にも適切であることを示した（図 6 ）。

10

20

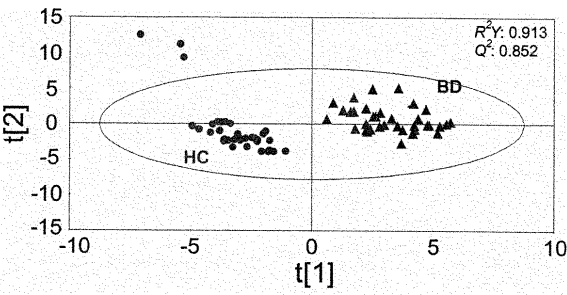
30

40

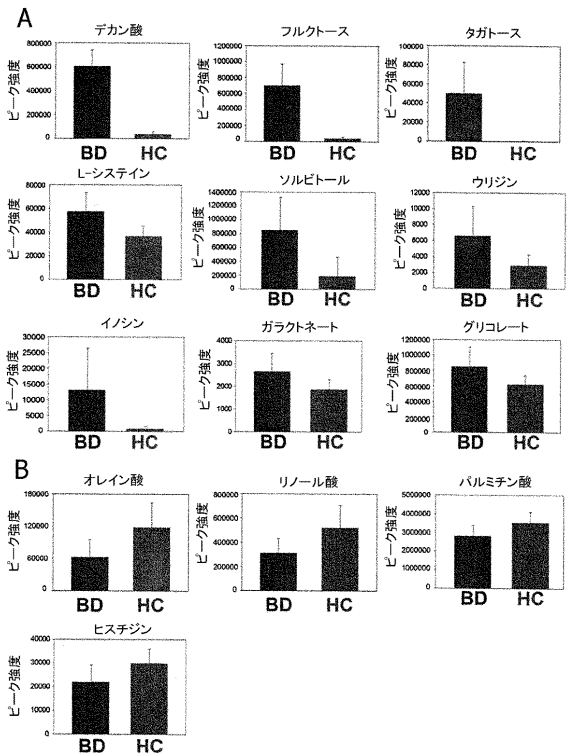
50

【図面】

【図 1】



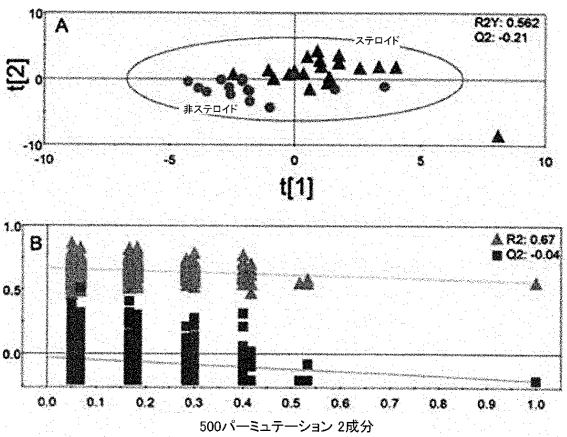
【図 2】



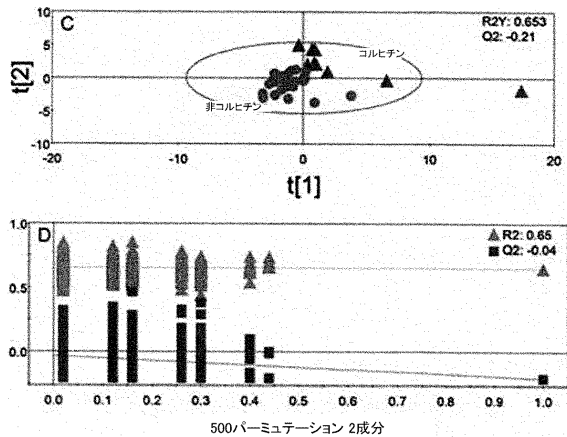
10

20

【図 3 a】



【図 3 b】

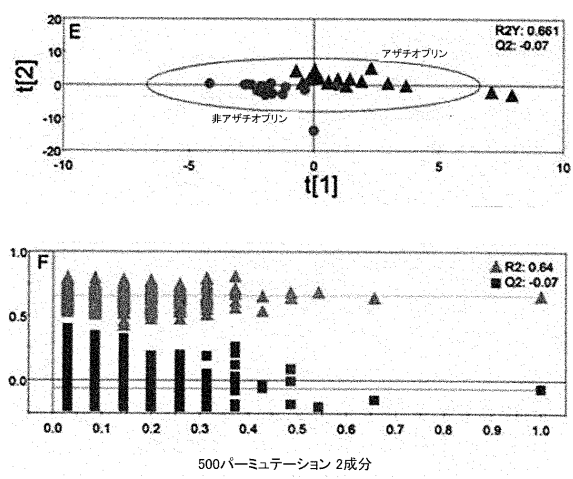


30

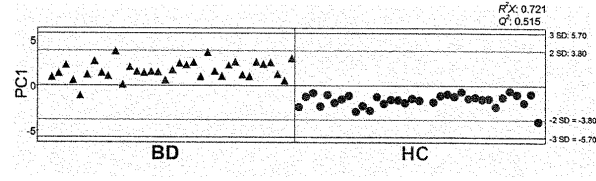
40

50

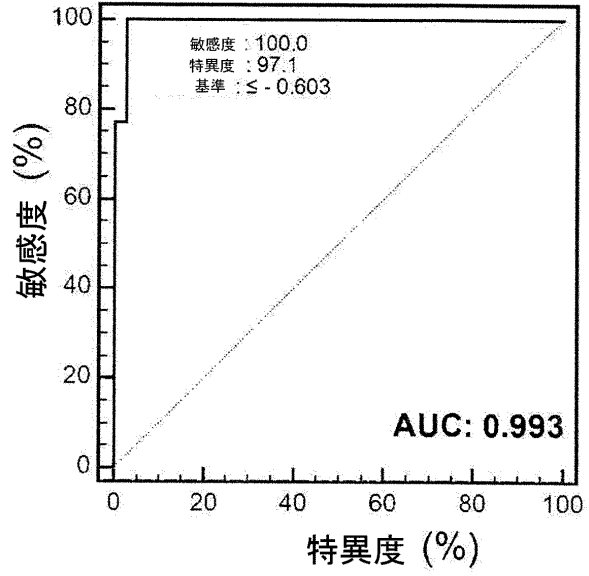
【 図 3 c 】



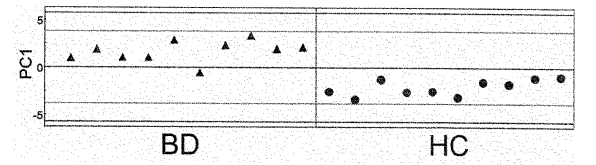
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I
G 0 1 N 30/72 A

弁理士 秋山 信彦

(72)発明者 キム・ギョンホン

大韓民国 0 6 6 0 1 ソウル、ソチョグ、ソチョジュンアンノ 2 0 0、1 8 - 8 0 5 (ソチョ 4 ドン、サンプン・アパートメント)

(72)発明者 チャ・フンソク

大韓民国 0 6 3 5 1 ソウル、カンナムグ、イルウォンロ 8 1、サムソン・ソウル・ホスピタル、ディビジョン・オブ・リウマトロジー (イルウォンドン)

(72)発明者 キム・ジョンヨン

大韓民国 0 2 4 1 2 ソウル、トンデムング、シニムンロ 8 ギル 4 4、セカンド・フロア (イムンドン)

(72)発明者 アン・ジュンギョン

大韓民国 0 3 1 8 1 ソウル、チョンノグ、セムナンロ 2 9、カンブク・サムソン・ホスピタル、ディビジョン・オブ・リウマトロジー (ピョンドン)

審査官 赤木 貴則

(56)参考文献

特開 2 0 1 5 - 0 9 6 5 1 1 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 7 / 0 4 0 4 6 4 (W O , A 1)

特開 2 0 1 5 - 2 2 1 7 9 8 (J P , A)

韓国公開特許第 1 0 - 2 0 1 6 - 0 1 4 1 1 4 0 (K R , A)

韓国公開特許第 1 0 - 2 0 1 5 - 0 0 7 1 6 8 7 (K R , A)

韓国公開特許第 2 0 0 3 - 0 0 2 0 2 0 9 (K R , A)

特開 2 0 1 6 - 0 7 0 7 9 8 (J P , A)

特開 2 0 0 6 - 1 8 0 7 0 4 (J P , A)

AHN, Joong Kyong et al. , A Comparative Metabolomic Evaluation of Behcet's Disease with Arthritis and Seronegative Arthritis Using Synovial Fluid , Plos One , 2015年08月13日 , Vol. 10, No. 8 , pp. 1-13 , <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135856>

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

G 0 1 N 2 7 / 6 2 - G 0 1 N 2 7 / 7 0

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - G 0 1 N 3 3 / 9 8

G 0 1 N 3 0 / 7 2

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)