

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6285972号
(P6285972)

(45) 発行日 平成30年2月28日(2018.2.28)

(24) 登録日 平成30年2月9日(2018.2.9)

(51) Int.Cl.	F 1
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 P
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 33/573 (2006.01)	GO 1 N 33/573 A
C 12 Q 1/68 (2018.01)	C 12 Q 1/68 Z N A A

請求項の数 10 (全 44 頁)

(21) 出願番号	特願2015-562318 (P2015-562318)
(86) (22) 出願日	平成26年3月13日(2014.3.13)
(65) 公表番号	特表2016-512325 (P2016-512325A)
(43) 公表日	平成28年4月25日(2016.4.25)
(86) 國際出願番号	PCT/GB2014/050768
(87) 國際公開番号	W02014/140595
(87) 國際公開日	平成26年9月18日(2014.9.18)
審査請求日	平成29年3月13日(2017.3.13)
(31) 優先権主張番号	1304460.7
(32) 優先日	平成25年3月13日(2013.3.13)
(33) 優先権主張国	英國(GB)

(73) 特許権者	508091030 ユニバーシティ オブ リーズ イギリス国 エルエス2 9ジェイティー リーズ
(74) 代理人	100060759 弁理士 竹沢 荘一
(74) 代理人	100087893 弁理士 中馬 典嗣
(72) 発明者	ロザモンド エリザベス バンクス イギリス国 エルエス9 7ティーエフ ヨークシャー リーズ セント ジェーム ズ ユニバーシティ ホスピタル キャン サー リサーチ ビルディング

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 A C Y - 1 の虚血／再灌流、移植片機能発現遅延及び移植片バイオアビリティーのマーカーとしての使用及びその方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

A C Y - 1 からなることを特徴とする、虚血再灌流障害を判定するためのバイオマーカー。

【請求項 2】

虚血再灌流障害が、脳、心臓、腎臓、肺及び肝臓から選ばれる少なくとも 1 つの組織において生じたものである、請求項 1 に記載のバイオマーカー。

【請求項 3】

虚血再灌流障害が、心筋梗塞、脳卒中又は臓器移植によって生じたものである、請求項 1 又は 2 に記載のバイオマーカー。

【請求項 4】

虚血再灌流障害が、手術後の臓器移植患者において、移植片機能発現遅延に至る、請求項 1 に記載のバイオマーカー。

【請求項 5】

手術後の臓器移植患者が、腎臓移植手術後の患者である、請求項 4 に記載のバイオマーカー。

【請求項 6】

A C Y - 1 からなることを特徴とする、移植片機能発現遅延を判定するためのバイオマーカー。

【請求項 7】

10

20

患者における虚血再灌流障害を診断するためのキットであって、

- i) A C Y - 1 ポリペプチドに特異的に結合する検出可能にラベル化された試薬、又は A C Y - 1 核酸に特異的に結合する検出可能にラベル化された試薬；及び
i i) 診断アッセイを実施するための試薬
を含んでなる、キット。

【請求項 8】

患者における移植片機能発現遅延を診断するためのキットであって、

- i) A C Y - 1 ポリペプチドに特異的に結合する検出可能にラベル化された試薬、又は A C Y - 1 核酸に特異的に結合する検出可能にラベル化された試薬；及び
i i) 診断アッセイを実施するための試薬
を含んでなる、キット。

10

【請求項 9】

A C Y - 1 からなることを特徴とする、移植前にドナー腎臓の生存率を評価するためのバイオマーカー。

【請求項 10】

虚血再灌流障害を診断するため、又は移植片機能発現遅延を診断するため、もしくは患者における腎障害、腎疾患もしくは腎不全を診断するためのキットであって、A C Y - 1 ポリペプチドに特異的に結合する第1の抗体及びA C Y - 1 ポリペプチド又は前記第1の抗 A C Y - 1 抗体のいずれかと結合し、検出可能な試薬と結合されている第2の別の抗体を含んでなるアッセイ装置を含んでなる、キット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、虚血再灌流障害又は移植片機能発現遅延のためのバイオマーカーに係る。具体的には、本発明は、アミノアシラーゼ - 1 及びアミノアシラーゼ - 1 を使用する診断及び予後の方法に係る。

【背景技術】

【0002】

腎臓移植は、末期腎疾患の患者にとっては明確なメリットを提供し^{1,2}、透析と比べて顕著な費用の節約を提供する^{3,4}。2010年において、米国では、16,151件の腎移植が行われ（<http://optn.transplant.hrsa.gov>）、これに対して、英国での対応する数値は2,687件である（<http://www.uktransplant.org.uk>）。しかし、患者の一部は、早期に、移植片機能発現遅延（DGF）⁵のような、臨床転帰及び健康上の医療経済学的成果に顕著に影響を及ぼす合併症を経験している。

30

【0003】

DGFについて多数の定義が提案されている⁶⁻⁸が、一般的に使用されている1つは、単独の高カリウム血症のため以外に、腎移植後第1週において透析が必要とされることである。他の臨床状況において見られる急性腎障害との類似性があるが、DGFの根本的病理は、ドナーの年齢及び虚血の期間のようなドナーに由来の要因、及び再灌流障害、免疫応答、及び免疫抑制剤⁹のようなレシピエントの要因の関与と複雑に絡み合っている。虚血再灌流障害（IRI）に続く急性細尿管壊死（ATN）は、DGFの患者における主な組織所見であるが、しかし、急性の細胞性又は体液性の拒絶反応が同時に生ずることがあり、組織学的には、他の病理、例えば、カルシニューリン阻害剤毒性が、しばしば、認められる。循環死後に提供された（DCD）臓器及び境界領域ドナーから提供された臓器の使用が増大しているが¹⁰、これは、DGFの発生の増大（米国において、最近では、移植レシピエントの～20%に及んでいる）に一致している。DGFは、移植片生着不全、患者の死亡、死打ち切り移植片生着不全のリスクを2～3倍増大させ^{11,12}、乏しい1年時移植機能、動脈性高血圧、及び急性の拒絶反応のような、移植片の長期生着を低減させる多数の合併症と関連する¹³。総合的には、DGFは、正に3年経過時の移植片機能損失の

40

50

リスクを41%増大させることと関連している¹⁴。

【0004】

DGFの早期の識別及び基礎病理学の理解の増大は、体液量状態の最適化、時宜を得た適切な透析、及び不必要な検査及び治療の回避を可能にする即時の患者管理を改善する顕著な可能性を有する¹⁵。患者を階級化する機会及び初期時点での目的に合わせた特別な治療介入は、改善された長期転帰を生ずる。プロテオミック技術の開発とともに、臨床的影響を有する新規のバイオマーカーを同定すること（ゲノムに基づく研究から出現する有望なマーカーを補完する）における臨床プロテオミクスの可能性に関する興奮が増大している¹⁶。

【0005】

移植後の透析及び移植片回復に関する要求の潜在的な予測因子として現在調査中の尿中のマーカーとしては、インターロイキン18（IL-18）及び好中球ゼラチナーゼリボカリン（NGAL）が含まれ¹⁷、組織関連マーカーとしては、ICAM-1及びVCAMが含まれている^{15,18}。残念ながら、DGFのケースの多くでは、尿が生成されないか、又は多くの結果の解析を混乱させる残留する本来の腎性アウトプットと混合され、DGFが一旦発症すると、生検組織は、しばしば、比較的遅い時期にのみ入手可能である。NGAL及びIL-18は、血清中において分析される際、確約を示してはいないが¹⁹、血液由来のバイオマーカーは、病院検査室での利便性及び日常的な使用のため、移植後を監視する理想的な方法であろう。しかし、血清又は血漿によるバイオマーカーの発見は、総患者数の~99%からなるわずか22人の患者によって行われており、タンパク質存在量の広いダイナミックレンジは>10桁に及ぶ²⁰。

【0006】

上述のとおり、NGAL、IL-18、KIM-1、L-FABP、ネトリン-1、及びケラチノサイト由来ケモカインのような多数の有望なバイオマーカーが腎虚血再灌流障害と関連しているが、これらの多くは、尿中、及びDGFの状況における移植後よりもむしろ本来の急性腎障害（AKI）において研究されている。DGFにおいて尿中のNGAL及びIL-18が検査され、移植後18時間において、AUCs0.78及び0.77であった。これらの結果を通して奨励されるようになっているが、それらは、DGFにおいて、尿排出量が移植後の全ての時点で生ずるかどうか、及びこの尿排出量が、本来の腎臓から生成される現在の尿によって、どこで混同されるかについての障害の対象である。さらに、尿中NGALは、AKIにおいて、内因性腎不全から腎前性腎不全を区別するためのマーカーとして提案されており、移植患者における同様の使用も想像されるが、その真の識別能力は疑わしい。NGAL及びIL-18は、DGF及びSGFにおいて血清中で研究されているが、群間の識別は認められておらず、一方、シスタチンC（血清クレアチニンよりも優れている）は識別した。ドナーの尿中NGAL（血清NGALではない）は、長期のDGFと関連している。IRIにおけるバイオマーカーについての多数の候補及び現在までのNGAL及びIL-18のような有望なマーカーの調査にもかかわらず、明確な臨床上の有益性を有する血清中のマーカーの候補は、今のところ出現していない。

【0007】

移植片機能発現遅延は、患者の入院の長さ及びこれに関連する費用についての影響の理由だけでなく、患者の体液状態、及び最少の腎臓機能を示している「ウエットの」移植後患者からの過剰な体液除去により起こり得る可及的な更なる臨床上の合併症を回避するための時宜を得た適切な透析の使用の管理における困難性の理由のため、腎移植においては、なお、重大な臨床的事象である。さらに、DGFを経験した患者に対する公知のマイナスの長期間の影響は、これが腎移植を行う臨床医にとって極めて重要であることを意味する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

10

20

30

40

50

従って、DGFのような虚血再灌流障害を予測する血液由来のバイオマーカーに関する要求がなお存在している。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明によれば、ACY-1の虚血再灌流障害のためのバイオマーカーとしての使用が提供される。好ましくは、前記虚血再灌流障害は、脳、心臓、腎臓、肺及び肝臓から選ばれる少なくとも1つの組織におけるものである。

【0010】

好ましくは、前記虚血再灌流障害は、心筋梗塞、卒中、手術、損傷又は臓器移植によって生じたものである。

10

【0011】

好ましくは、前記虚血再灌流障害は、移植手術後の患者において、移植片機能発現遅延に至る。好ましくは、前記移植手術後の患者は、腎移植手術後の患者である。

【0012】

他の態様では、本発明は、ACY-1の移植片機能発現遅延のためのバイオマーカーとしての使用を提供する。

【0013】

さらに他の態様では、本発明は、患者における虚血再灌流障害を診断する方法を提供し、該方法は、i) 患者から採取したサンプルにおけるACY-1のレベルを測定し；ii) 患者のサンプルにおけるACY-1のレベルを、コントロールサンプルにおけるACY-1のレベル又は予め決定したACY-1についての対照レベルと対比することを含んでおり、コントロールサンプルと対比して又は予め決定した対照レベルと対比して、患者サンプルにおけるACY-1のレベルが増大している場合に、患者が虚血再灌流障害を有していると認定する。

20

【0014】

好ましくは、前記虚血再灌流障害は、脳、心臓、腎臓、肺及び肝臓から選ばれる少なくとも1つの組織におけるものである。好ましくは、前記虚血再灌流障害は、心筋梗塞、卒中、又は臓器移植によって生じたものである。

【0015】

好ましくは、前記患者は腎移植手術後の患者である。

30

【0016】

更なる態様では、本発明は、患者における移植片機能発現遅延を診断する方法を提供し、該方法は、i) 患者から採取したサンプルにおけるACY-1のレベルを測定し；ii) 患者のサンプルにおけるACY-1のレベルを、コントロールサンプルにおけるACY-1のレベル又は予め決定したACY-1についての対照レベルと対比することを含んでおり、コントロールサンプルと対比して又は予め決定した対照レベルと対比して、患者サンプルにおけるACY-1のレベルが増大している場合に、患者が移植片機能発現遅延を有していると認定する。

【0017】

好ましくは、前記患者は腎移植手術後の患者である。

40

【0018】

さらに他の態様では、本発明は、術後の腎移植患者について透析管理戦略を決定する方法を提供し、該方法は、i) 患者から採取したサンプルにおけるACY-1のレベルを測定し；ii) 患者のサンプルにおけるACY-1のレベルを、コントロールサンプルにおけるACY-1のレベル又は予め決定したACY-1についての対照レベルと対比することを含んでおり、コントロールサンプルと対比して又は予め決定した対照レベルと対比して、患者サンプルにおけるACY-1のレベルが増大している場合に、患者が移植後1～7日内に透析を必要としていると認定する、又はコントロールサンプルと対比して又は予め決定した対照レベルと対比して、患者サンプルにおけるACY-1のレベルが低下している場合に、患者が移植後1～7日内には透析を必要としないと認定する。

50

【0019】

さらに他の態様では、本発明は、術後の腎移植患者について体液管理戦略を決定する方法を提供し、該方法は、i) 患者から単離したサンプルにおけるACY-1のレベルを測定し；ii) 患者のサンプルにおけるACY-1のレベルを、コントロールサンプルにおけるACY-1のレベル又は予め決定したACY-1に関する対照レベルと対比することを含んでなり、コントロールサンプルと対比して又は予め決定した対照レベルと対比して、患者サンプルにおけるACY-1のレベルが増大している場合に、患者が、腎移植手術後10の患者に通常投与される液体の量と比べて低減された量の液体を必要としていると認定する、又はコントロールサンプルと対比して又は予め決定した対照レベルと対比して、患者サンプルにおけるACY-1のレベルが低下している場合に、透析することが余り必要ではないため、患者にとっては、腎臓移植手術後の患者に通常投与される液体の量と比べて増大された量の液体がためになるであろうと認定する。

【0020】

さらに他の態様では、本発明は、患者における腎移植の術後の臨床転帰を予測する方法を提供し、該方法は、i) 患者から採取したサンプルにおけるACY-1のレベルを測定し；ii) 患者のサンプルにおけるACY-1のレベルを、コントロールサンプルにおけるACY-1のレベル又は予め決定したACY-1についての対照レベルと対比することを含んでなり、コントロールサンプルと対比して又は予め決定した対照レベルと対比して増大している患者サンプルにおけるACY-1のレベルは、移植後1、2、3、4又は5年の時点における前記患者の死亡フリー及び/又は透析フリー生存率の増大を予知するものであるとする。

【0021】

好ましくは、サンプルは血液サンプル、さらに好ましくは血清サンプルである。

【0022】

好ましくは、前記サンプルが、移植後の患者から得たものである。

【0023】

好ましくは、前記患者から、移植後第1、2、3又は4日の時点で得たものである。

【0024】

好ましくは、前記患者はヒトである。

【0025】

好ましくは、前記ACY-1はヒトACY-1である。好ましくは、前記ACY-1はポリペプチドである。好ましくは、前記ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列を有する。或いは、前記ACY-1は、mRNAのような核酸分子である。好ましくは、前記核酸分子は、配列番号1のヌクレオチド配列を有する。

【0026】

好ましくは、前記予め決定された対照レベルは、コントロール患者におけるACY-1の平均レベルである。

【0027】

好ましくは、本発明の方法は、さらに、i) 患者から単離したサンプルにおける、NAGL、KIM-1、IL-18、RBP、FABP4、シスタチンC及びクレアチニンから選ばれる少なく1個のバイオマーカーのレベルを測定し；ii) 患者のサンプルにおけるNAGL、KIM-1、IL-18、RBP、FABP4、シスタチンC又はクレアチニンのレベルを、コントロールサンプルにおけるNAGL、KIM-1、IL-18、RBP、FABP4、シスタチンC又はクレアチニンのレベル又は予め決定したNAGL、KIM-1、IL-18、RBP、FABP4、シスタチンC又はクレアチニンに関する予め決定した対照レベルと対比することを含んでなる。

【0028】

さらに他の態様では、本発明は、患者における虚血再灌流障害を診断するためのキットを提供し、該キットは、i) ACY-1ポリペプチドに特異的に結合する検出可能にラベル化された試剤、又はACY-1核酸に特異的に結合する検出可能にラベル化された試剤

10

20

30

40

50

; 及び i i) 診断アッセイを実施するための試薬を含んでなる。

【 0 0 2 9 】

さらに他の態様では、本発明は、患者における移植片機能発現遅延を診断するためのキットを提供し、該キットは、 i) A C Y - 1 ポリペプチドに特異的に結合する検出可能にラベル化された試剤、又は A C Y - 1 核酸に特異的に結合する検出可能にラベル化された試剤 ; 及び i i) 診断アッセイを実施するための試薬を含んでなる。

【 0 0 3 0 】

さらに他の態様では、本発明は、 A C Y - 1 ポリペプチドを検出できる化合物又は試剤を含んでなるアッセイ装置を提供する。

【 0 0 3 1 】

10

さらに他の態様では、本発明は、患者における虚血再灌流障害を診断するため、又は移植片機能発現遅延を診断するため、又は患者における腎障害、腎疾患又は腎不全を診断するためのキットを提供し、該キットは、 A C Y - 1 ポリペプチドに特異的に結合する第 1 の抗体を含んでなるアッセイ装置 ; 及び (2) A C Y - 1 ポリペプチド又は第 1 の抗 - A C Y - 1 抗体に特異的に結合し及び検出可能な試剤に結合される第 2 の異なる抗体を含んでなる。

【 0 0 3 2 】

以下に、添付図面を参照して、本発明の具体例を例示する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 3 】

20

【 図 1 】 患者群及び研究デザインを示す。

【 図 2 】 a) 質量分析ラベル - フリー強度によって測定した、及び b) 同じサンプルについての続く E L I S A によって測定した、初期バイオマーカー発見のために使用した移植片機能発現遅延 (D G F) 群及び非 D G F 群における術前及び術後第 2 日における血清アミノアシラーゼ - 1 (A C Y - 1) の濃度 (1 群当たり患者 5 人) を示す。

【 図 3 】 異なる臨床経過、すなわち、 a) 無併発性の移植、 b) 移植片機能発現遅延 (著しい A C Y - 1 の上昇を示すサブクラスからの患者) 及び、 c) 急性の拒絶反応 (*) 、続く 2 回の尿路感染症 () を有する 3 人の患者における腎移植から長期間経過後の血清アミノアシラーゼ - 1 (A C Y - 1) 、クレアチニン及びシスタチン C に関するプロファイルの例を示す。移植前の濃度を第 0 日として示す。

30

【 図 4 】 a ~ d) に、コホート 1 及びコホート 2 について、移植片機能発現遅延 (D G F) 群及び非移植片機能発現遅延群における移植後第 1 日及び第 3 日における血清アミノアシラーゼ - 1 (A C Y - 1) 濃度を示し、 e ~ f) に、移植片機能発現遅延 (D G F) 、緩慢な移植片機能発現 (S G F) 及び早期移植片機能発現 (I G F) を有するコホート 2 における患者の移植後第 1 日及び第 3 日における血清アミノアシラーゼ - 1 (A C Y - 1) 濃度を示す。 Tukey ボックスプロットは、マン・ホイットニー検定による測定で示された群間の有意差を有する中央値及び四分位範囲を意味する。

【 図 5 】 移植片機能発現遅延 (D G F) の予測に関する R O C 曲線であり、それぞれ、血清 A C Y - 1 、クレアチニン (S C r) 、シスタチン C (C y s t C) 、及びシスタチン C と組み合わせた A C Y - 1 を示す。 a) は、コホート 1 の、移植後第 1 / 2 日の結果 (n = 4 7 、ただし、 A C Y - 1 及びシスタチン C については n = 3 5) であり、 b) は、コホート 2 の、移植後第 1 日の結果 (n = 1 9 4 、ただし、 A C Y - 1 については、 n = 1 3 8 及びシスタチン C については n = 1 2 8) である。

40

【 図 6 - 1 】 ヒト A C Y - 1 のヌクレオチド配列 (配列番号 1) を示す。

【 図 6 - 2 】 ヒト A C Y - 1 のヌクレオチド配列 (配列番号 1) を示す。

【 図 6 - 3 】 ヒト A C Y - 1 のヌクレオチド配列 (配列番号 1) を示す。

【 図 6 - 4 】 ヒト A C Y - 1 のヌクレオチド配列 (配列番号 1) を示す。

【 図 7 】 ヒト A C Y - 1 のアミノ酸配列 (配列番号 2) を示す。

【 図 8 】 対照の多変量モデルに添加される際の A C Y - 1 についてのリスクアセスメントプロットを示す。

50

【図9】ドナーのタイプによって分離したコホート2におけるDGF患者及び非DGF患者についての移植後第1日及び第3日における血清ACY-1濃度(1ogスケール)を示す。中央値は水平バーによって表わされる。非DGF群内では、各ドナーのタイプ間で有意差が見られ($p < 0.001$)、それぞれ、DBD、DCD及びLDについて、中央値35.2、107及び15.6ng/mLであり、及びDGF群内では、DBD及びDCDの間は同様であり、中央値は70.3及び483.2ng/mLである。DGF群と非DGF群とを比較すると、移植を受けた患者において、DBD($p = 0.023$)及びDCD($p < 0.001$)の両方から、有意に高いACY-1濃度が認められた。

【図10】顕著な特性によって分離されたコホート2における腎移植後の透析フリー生存率(DiFS)についての生存時間関数のカプラン・マイヤー(KM)推定値を示す(追跡期間中央値は、0.02~7.90年の範囲内で、5.93年である)。a)DGF患者及びb)非DGF患者を、それぞれ、移植後第1日のACY-1の血清濃度によって分離している(第1日の測定値がない場合には、第3日の測定値を使用できる)。事象の数は、DFG患者について、ACY-1<200で1/28(3.6%)及びACY-1<200で9/24(37.5%)であり、非DFG患者について、ACY-1<200で2/16(12.5%)及びACY-1<200で5/89(5.6%)であった。c)DGF患者及びd)非DGF患者を、それぞれ、ドナーのタイプ(DCD及びDBD)によって分離した。事象の数は、DFG患者において、DCDについて1/21(4.8%)及びDBDについて9/31(29%)であり、非DFG群において、DCDについて1/19(5.3%)及びDBDについて6/86(7%)であった。e)ドナータイプDBDを有するDGF患者を、ACY-1濃度(上述のとおり)によって分離した。事象の数は、DBD/ACY-1<200について0/9(0%)及びDBD/ACY-1<200について9/22(40.9%)であった。透析への戻りの理由には、再発FSGF、血管拒絶及び生検における慢性の瘢痕が含まれる。

【発明を実施するための形態】

【0034】

発明者らは、良好な再現性を有するプロテオミック適用範囲の中等度の深度を作成するために既に示された、高質量精度TLQ-Orbitrap Velosラベルフリー分析と組み合わせた最も豊富なタンパク質の14個の免疫除去を使用して²¹、DGFを有する又はDGFを有していない腎移植を受けた患者から術前及び術後に採取した血清タンパク質を比較した。発明者らは、驚くべきことには、アミノアシラーゼ-1(ACY-1)を重要な候補として同定した。アッセイに統一して、初めて血清中のACY-1の測定を可能にする開発、早くも移植後第1日のサンプルにおけるIRI及びDGFのためのバイオマーカーとしてのACY-1の有望な臨床上の利用性を確認する患者のより大きいコホートにおける検証、及び重要なことには、有意な転帰との関連が認められた。

【0035】

さらに、血清系バイオマーカーの同定及び血清の使用は、IRI、特にDGFとの関連では明白な利点を有する。DGF患者は尿排出量が全くない(これは、尿マーカーの有用性に対して劇的に影響を及ぼす)。余剰の本来の尿排出量は、さらに、この臨床状況において、尿マーカーのアセスメント及び使用を複雑にする。

【0036】

血清のプロテオミック分析から、ACY-1をDGF用のバイオマーカーと特定した。バイオマーカーは、臨上有用な様式で、腎移植後の患者群の早期の描写を提供し、しっかりと開発されたプロテオミック法、候補の選択及び臨床テスト開発システムを開発を通して、注意深く集めた及び注釈が付けられた臨床サンプルセットにより、臨床での使用の瀬戸際で、明確に定義された臨床上の疑問を持つ可能性を証明している。

【0037】

発明者らは、1)再現性の免疫除去と、Orbitrap Velos質量分析計を使用する高質量精度タンデム質量分析との組み合わせにおける必要な方法論²¹、及び2)バイオマーカーパイプラインの発見及び初期検証段階、及び付随する臨床データとともに、

10

20

30

40

50

将来を見越して集められたサンプルの高品質バンクに至る臨床医及び科学者の一体的なチームの使用の両方の開発を通して、血清のプロテオミック分析から、潜在的に臨床上の有用性を有するマーカーを誘導することができた。

【0038】

アミノアシラーゼ - 1 (A C Y - 1)

アミノアシラーゼ - 1 (A C Y - 1) (N - アシル - L - アミノ酸アミドヒドロラーゼとも呼ばれる)は、ペプチダーゼ M 2 0 A ファミリーに属し、N - アシル化又はN - アセチル化アミノ酸 (L - アスパラギン酸を除く) の加水分解に関与し、カルボン酸エステル及び L - アミノ酸を生成すると考えられる。 A C Y - 1 は、予測された単量体質量 4 5 . 3 k D a を有する亜鉛結合ホモ二量体細胞質タンパク質である²²。真核性細胞では、全細胞タンパク質の 5 0 ~ 8 0 % が N 末端でアシル化されている (タンパク質の機能及び安定性に影響を及ぼし得る翻訳時又は翻訳後の修飾である)。 A C Y - 1 は、N - アシル化ペプチド、特に N - アセチル化された中性脂肪族アミノ酸の加水分解において触媒作用を発揮して、タンパク質合成のための遊離のアミノ酸を放出する²³。発現及び活性の最も高いレベルは、腎臓において見られ、続いて、肝臓、脳、骨格筋及び脾臓であり、いくつかの他の臓器において低いレベルの発現が認められる^{22, 24-27}。パン細管 A C Y - 1 発現は、アミノ酸回収における提案された役割²⁸を有するブタ腎臓において示されたが²⁶、ヒト腎臓では、主に近位細管発現である²⁶。可変性の神経学的特徴を有する代謝の先天異常は、 A C Y - 1 の突然変異と関連し (突然変異に応じて、 A C Y - 1 の発現及び活性に対する影響を有する)、尿性の N - アセチル化アミノ酸を増大させる²⁵。染色体 3 p 2 1 . 1 上に配置された場合、腎臓ガン及び肺ガンの両方において、ガン抑制遺伝子としての役割が提案されている^{22, 30, 31}。

【0039】

移植前の低い又は検出不能な血清 A C Y - 1 濃度及び肝臓ドナーにおける感染による又は手術後の各種増大の不在は、 D G F における A C Y - 1 の移植後の上昇が、単に、障害性の腎クリアランス又は炎症によるものではないことを示唆している。 D G F は、プレ - 獲得から手術後の期間を通して、複数のリスク要因及び細管を含む各種の細胞及び脈環構造に関わる根底にある機構と複合している^{9, 32}。腎細尿管源を仮定すると、 D G F の多くのケースにおける増大した血清 A C Y - 1 は、細管のダメージの程度を反映するものであり、これは、 A T N (生検の数は少ないが) との連合及び血清 A C Y - 1 濃度の、緩慢な移植片機能発現による非併合性の移植から D G F までの傾向によって支持される。逆に、より高い A C Y - 1 と D G F に続くより良好な転帰との間の関係は、潜在的にタンパク質合成についてのアミノ酸の利用性に対する影響を介して、増大された合成及び修復プロセスにおける役割を表示できる。

【0040】

A C Y - 1 は、シクロスボリンで処置したラット又はシロリムス (ただし、タクロリムスではない) で処置したラット³³では、顕著に変化する 7 5 個の尿タンパク質の 1 つであり、 A C Y - 1 は、臓器毒性に関与すると提唱されるミコフェノール酸モフェチル (M M F) から腎臓において産生された生物学的に活性な代謝物と付加物を形成する³⁴。しかし、発明者らは、 C N I 毒性又は M M F とのリンクを見出していない。興味深いことには、 A K I 患者 2 2 人からの血清サンプルの分析 (その内の 1 0 は、診断 3 日以内である) は、血清 A C Y - 1 濃度が全て < 6 0 n g / m L であること示し (データは示されていない)、これは、恐らく、損傷又は修復又はどんな根本的な I R I を反映するかどうかは、特定の移植状況において主として遭遇した及び / 又はその際に、より極端且つ広範囲の虚血 / 病低酸素状態下においてのみ生ずる病理過程に非常に特異的であることを示している。これは、 D B D 、 D C D 及び L D 移植の間の血清 A C Y - 1 における著しい差異によっても支持される。

【0041】

D G F のためのマーカーに関して、死亡した又は生存するドナーからの移植片から 0 時間の生検における遺伝子の発現 (特に、ケモカイン C C L 1 9 及び 2 1 及びプロテアソ-

10

20

30

40

50

ムサブユニット P S M B 8 及び 10 において)を、関連する臨床因子と組み合わせた結果、A U C 値は、D G F について 0.74 及び急性拒絶反応について 0.93 であった³⁵。D G F 患者からの生検における R A N T E S 及び C C R 1 / C C R 2 の発現は、移植後 1 年の時点及びそれ以降の移植片の機能と関連することも報告されている³⁶。A K I における使用について、いくつかの既存のマーカーも検討されている^{37, 38}が、例えば、組織 K I M - 1 は D G F とは相関せず³⁹、一方、尿中 N G A L 及び I L - 18 は、D G F について、いくらかの的中率を有する^{17, 40}が、長期間の機能との相関はない⁴¹。第 1 日の血清 N G A L 濃度は、D G F についての的中率を有していないが、発明者らの研究と同様に、血清シスタチン C は A U C 0.83 を有する。D G F に関連する A C Y - 1 のについての発明者らの特異度 (88.5%) 及び陰性的中率 (81.7%) は非常に高く、潜在的にバイオマーカーパネルに貢献できる。直接的に腎機能を反映する血清シスタチン C は、各種の臨床現場において A K I を予測することにおける使用のメタ分析でみられる 0.96 と同様の A U C により、D G F を早期に予測することにおいては、A C Y - 1 よりも優れている⁴²。しかし、A C Y - 1 及びシスタチン C を併用することは、第 1 日では、より高い特異度を有する A C Y - 1 より、わずかに良好であり、より高感度の A C Y - 1 アッセイが開発された場合には、A C Y - 1 による更なる識別化が可能であろう。

【 0042 】

I R I のマウスモデルにおける遺伝子発現研究から、更なる推測機構が明らかであろう⁴³。スフィンゴシンキナーゼ - 1 (SphK1) は、スフィンゴシン - 1 - ホスフェート (腎臓 I R I の保護 / 修復に関与する) の形成において触媒として機能し⁴⁴⁻⁴⁶、機能によって分類される移植片の間で異なり⁴⁷、A C Y - 1 と相互作用することが報告されている^{30, 48}。ドナーの生検における炎症及び免疫 - 応答遺伝子は、圧倒的に、I R I 及び D G F と関連付けられており、更なる見識を提供するために、総合システムによる生物学的分析アプローチが提案されている¹⁵。最近の D G F 及び非 D G F 移植前生検の比較では、D G F 群が、第 1 年の間に、腎機能に基づいてサブ分類されるまで、何らの顕著な経路のクラスタリングが見出されておらず、遺伝子が T 細胞の活性化に関与する際、抗原提示及び細胞接着が、その後の乏しい機能と関連付けられている⁴⁷。D G F 患者のサブ分類は、当該の研究 (この研究では、移植後の血清 A C Y - 1 における明確な上昇が、D G F の患者の約 2/3 においてのみ認められる) における A C Y - 1 による状況と類似している。これは、異なる根本の病態生理学的サブグループを含むことができ、また、D G F 患者群内における A C Y - 1 の予後の値を証明する。

【 0043 】

尿細管細胞のアポトーシス及び再生は、腎移植における腎移植片によって経験される虚血再灌流障害 (I R I) の基本的な部分であるため、及び上述のように A C Y - 1 の管内局在化があるとすれば、移植片機能発現遅延 (D G F) のような顕著な I R I に至るプロセスに関連する A C Y - 1 の可能性は、生物学的には真実味がある。W i s t e r ラットに関する単独の研究において、A C Y - 1 に対するカルシニューリン阻害剤及びシロリムスの影響が認められている一方、腎移植の上で A C Y - 1 のバイオロジーの確固とした理解は欠けている。

【 0044 】

ここで使用するように、用語「A C Y - 1」は、アミノアシラーゼ - 1 のポリペプチド及び核酸分子の両方を意味するものとして使用する。

【 0045 】

好ましくは、A C Y - 1 は、ヒト A C Y - 1 ポリペプチド又は核酸分子である。

【 0046 】

ここで使用するように、用語「核酸分子」は、D N A 分子 (例えば、c D N A 又はゲノム D N A) 及び R N A 分子 (例えば、m R N A) 及び例えば、ヌクレオチドアナログの使用によって產生された D N A 又は R N A のアナログを含む。核酸分子は一本鎖又は二本鎖であるが、好ましくは二本鎖 D N A である。

【 0047 】

10

20

30

40

50

1 具体例では、A C Y - 1 核酸分子は、配列番号 1 において示されるヌクレオチド配列、又はこのヌクレオチド配列のいずれかのフラグメントを含んでなる。1 具体例では、核酸分子は、配列番号 1 のヌクレオチド配列又はこのヌクレオチド配列のいずれかのフラグメントからなる。

【 0 0 4 8 】

他の具体例では、単離された A C Y - 1 核酸分子は、配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列、又はこのヌクレオチド配列のいずれかのフラグメントの補体である核酸分子である。他の具体例では、本発明の核酸分子は、ハイブリダイゼーション条件下において、配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列にハイブリダイズできるように、配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列に対して十分に補足性であり、これにより、安定したディープレックスを形成できる。好ましくは、ハイブリダイゼーション条件は、高ストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件である。

【 0 0 4 9 】

ここで使用するように、用語「高ストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件」は、ハイブリダイゼーション及び洗浄のための条件を記述する。ストリンジエントな条件とは、当業者には公知であり、入手できる文献（例えば、「分子生物学における最新のプロトコル」, John Wiley & Sons, ニューヨーク, 1989, 6.3.1 - 6.3.6）に見られる。ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件の好適な例は、6 × 塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム (SSC) 中、約 45 におけるハイブリダイゼーション、続く、0.2 × SSC、0.1% (w/v) SDS 中、約 50 における 1 回又はそれ以上の洗浄である。ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件の好適な他の例は、6 × SSC 中、約 45 におけるハイブリダイゼーション、続く、0.2 × SSC、0.1% (w/v) SDS 中、約 55 における 1 回又はそれ以上の洗浄である。ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件のさらに他の例は、6 × SSC 中、約 45 におけるハイブリダイゼーション、続く、0.2 × SSC、0.1% (w/v) SDS 中、約 60 における 1 回又はそれ以上の洗浄である。好ましくは、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件は、6 × SSC 中、約 45 におけるハイブリダイゼーション、続く、0.2 × SSC、0.1% (w/v) SDS 中、約 65 における 1 回又はそれ以上の洗浄である。特に好ましいストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件（及び実務家が、分子が本発明のハイブリダイゼーションの制限内にあるかどうかを決定するために、いかなる条件を適用すべきか確信できない場合に使用されるべき条件）は、0.5 モルリン酸ナトリウム、7% (w/v) SDS 中、65、続く、0.2 × SSC、1% (w/v) SDS 中、約 65 における 1 回又はそれ以上の洗浄である。

【 0 0 5 0 】

1 具体例では、本発明の A C Y - 1 核酸分子は、配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列の全長と、少なくとも約 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又はそれ以上同一であるヌクレオチド配列を含んでなるか又はからなる。

【 0 0 5 1 】

ここで使用するように、用語「相同性」及び「同一性」は、相互に交換可能なものとして使用される。配列間の配列の相同性又は同一性の算定は、下記のようにして行われる。

【 0 0 5 2 】

2 つのアミノ酸配列、又は 2 つの核酸配列の同一性（%）を決定するために、最適な対比を目的として、配列を整列する（例えば、最適な整列のために、第 1 及び第 2 のアミノ酸又は核酸配列の一方又は両方にギャップを導入でき、比較のため、非相同配列を無視できる）。好適な具体例では、比較のために整列した対照配列の長さは、対照配列の長さの少なくとも 30%、好ましくは少なくとも 40%、さらに好ましくは少なくとも 50%、さらに好ましくは少なくとも 60%、さらに好ましくは少なくとも 70%、75%、80%、82%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% である。つ

10

20

30

40

50

いで、対応するアミノ酸の位置又はヌクレオチドの位置におけるアミノ酸残基又はヌクレオチドを比較する。第1の配列における位置が、第2の配列における対応する位置と同じアミノ酸残基又はヌクレオチドによって占有されていれば、配列はその位置において同一である（ここで使用するように、アミノ酸又は核酸の「同一性」は、アミノ酸又は核酸の「相同性」と等しい）。2つの配列間の同一性（%）は、ギャップの数及び各ギャップの長さ（2つの配列の最適な整列のために導入することが要求される）を考慮して、配列によって分けられた同一の位置の数の関数である。

【0053】

配列の対比及び2つの配列間の同一性（%）の決定は、数学的アルゴリズムを使用して行われる。好適な具体例では、2つのアミノ酸配列の間の同一性（%）は、GCGソフトウェアパッケージ（<http://www.gcg.com>にて入手可能）におけるGAPプログラムを組み込んだNeedlemanらアルゴリズム（J. Mol. Biol. 1. (1970), 48: 444-453）（BLOSUM62マトリックス又はPAM250マトリックスのいずれか及びギャップウェイト16、14、12、10、8、6、又は4及び長さウェイト1、2、3、4、5、又は6を使用する）を使用して決定される。さらに他の好適な具体例では、2つのアミノ酸配列の間の同一性（%）は、GCGソフトウェアパッケージ（<http://www.gcg.com>にて入手可能）におけるGAPプログラム（NWGapDNA.CMPマトリックス及びギャップウェイト40、50、60、70、又は80及び長さウェイト1、2、3、4、5、又は6を使用する）を使用して決定される。特に好適な因子のセット（及び実務家が、分子が本発明の配列同一性及び配列相同性の制限内にあるかどうかを決定するために、いかなる因子を適用すべきか確信できない場合に使用されるべきもの）は、ギャップペナルティー12、ギャップエクステンションペナルティー4及びフレームシフトギャップペナルティー5を有するBLOSUM62スコアマトリックスである。

【0054】

或いは、2つのアミノ酸又はヌクレオチドの配列間の同一性（%）は、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれたMeyersらのアルゴリズム（(1989)、CABIOS 4: 11-17）（PMA120加重残余表、ギャップレンジングスペナルティー12及びギャップペナルティー4を使用する）を使用して決定される。

【0055】

1具体例では、核酸フラグメントは、ACY-1のドメイン、領域、又は機能的部位に相当する配列を含んでなるか又はからなる。或いは、ACY-1の核酸フラグメントは、ACY-1ポリペプチドのエピトープ保有領域をコードする。

【0056】

好適な具体例では、核酸フラグメントは、配列番号1の300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600個又はそれ以上の連続するヌクレオチドを含んでなるか又はからなる。

【0057】

1具体例では、ACY-1核酸分子は、ACY-1ポリペプチド、好ましくは、配列番号2のアミノ酸配列を含んでなる又はからなるACY-1ポリペプチド、好ましくは機能的対立遺伝子変異体をコードする核酸配列を含んでなるか又はからなる。或いは、ACY-1核酸分子は、ACY-1ポリペプチドの対立遺伝子変異体、好ましくは機能的対立遺伝子変異体をコードする核酸配列を含んでなるか又はからなる。

【0058】

ここで使用するように、用語「ACY-1ポリペプチドの対立遺伝子変異体」は、機能タンパク質及び非-機能タンパク質の両方を含む。機能的対立遺伝子変異体は、ACY-1活性を維持する、集団内のACY-1ポリペプチドの天然のアミノ酸配列変異体である。機能的対立遺伝子変異体は、一般的には、配列番号2の1又はそれ以上のアミノ酸の保存的な置換、又はポリペプチドの重大でない領域における重大でない残基の置換、欠失又は挿入のみを含有する。

10

20

30

40

50

【0059】

「重大でない」アミノ酸残基は、ACY-1の生物活性を無効にする又は実質的に変更することなく、ACY-1の野生型の配列（例えば、配列番号2の配列）から変更される残基であり、一方、「必須の」アミノ酸残基は、このような変更を生ずる。

【0060】

「保存的な置換」は、アミノ酸残基が、同様の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられる置換である。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当分野において定義されている。これらのファミリーは、塩基性の側鎖を有するアミノ酸（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性の側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、不变の極性の側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性の側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、- 分枝状の側鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族の側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含む。

10

【0061】

1具体例では、ACY-1ポリペプチド分子は、配列番号2において示されるアミノ酸配列、又はこのアミノ酸配列のいずれかのフラグメントを含んでなる。1具体例では、ポリペプチド分子は、配列番号2のアミノ酸配列、又はこのアミノ酸配列のいずれかのフラグメントからなる。

20

【0062】

1具体例では、ACY-1ポリペプチドは、配列番号2と少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%又はそれ以上同一であるアミノ酸配列を含んでなるか又はからなる。好ましくは、このようなポリペプチドは、ACY-1生物活性を保持する。

【0063】

1具体例では、ACY-1ポリペプチドは、配列番号2のポリペプチドの対立遺伝子変異体、又はこのアミノ酸配列のフラグメントである。

【0064】

1具体例では、ペプチドフラグメントは、ACY-1ポリペプチド、例えば、配列番号2のポリペプチドのエピトープ保有領域をコードする。

30

【0065】

1具体例では、ACY-1フラグメントは、配列番号2のポリペプチド生物学的に活性なフラグメントを含んでなる又はからなる。

【0066】

ここで使用するように、ACY-1ポリペプチドの「生物学的に活性なフラグメント」は、ACY-1ポリペプチドのアミノ酸配列（例えば、配列番号2において示されるアミノ酸配列）と十分に相同性であるか又は前記アミノ酸配列から誘導されたアミノ酸配列を含んでなるペプチド（全長ACY-1ポリペプチドよりも少ないアミノ酸を含み、ACY-1ポリペプチドの少なくとも1つの活性を発揮する）を含む。ACY-1ポリペプチドの生物学的に活性なフラグメントは、配列番号2の10、25、50、100、200個又は以上の連続するアミノ酸を含んでなるか又はからなる。

40

【0067】

好ましくは、ACY-1ポリペプチドは、配列番号2のポリペプチドの対立遺伝子変異体である。

【0068】

ここで使用するように、用語「ACY-1の活性」及び「ACY-1の生物活性」は、ACY-1の活性に関する。このような活性としては、アシル化L-アミノ酸のL-アミノ酸及びアシル基への加水分解に触媒作用を発揮する能力が含まれる。他の活性としては、亜鉛を結合する能力が含まれる。

50

【0069】

診断及び予後アッセイ

発明者らは、A C Y - 1 が、全ての患者において、移植前では、低いか又は検知不能であり、生体ドナーにおける濃度が、検知不能であるか又は一貫して非常に低いままであることを確認した。さらに、A C Y - 1 の濃度は、C R P の変化と並行しては変化しなかった。これらの知見は、A C Y - 1 が腎機能の尺度として単純に機能しないし（すなわち、移植前の末期腎疾患患者ではA C Y - 1 は産生されない）、炎症又は術後のマーカーとしても機能しないことを示唆している。むしろ、主に、移植片が術後に機能する速度に影響を及ぼすに十分な程度の虚血再灌流障害又は他の損傷／修復プロセスの面では、ピークとなるように思われる（S G F 及びD G F の両方において無併発性の移植片と比べて明らかに上昇されている）。A C Y - 1 は尿細管に位置していることと調和して、唯1人の患者において、十分なタクロリムス毒性が生ずる場合（それ自体、尿細管の損傷の原因となる）、発明者らは、並行しては、A C Y - 1 における比較的小さい増大を観察した。しかし、A C Y - 1 は、臨床上見られるタクロリムスレベルにおけるより小さい、より一般的な変動によっては影響されないし、陽性の中流尿培養によっては影響されない（これらが、高C R P 濃度及び入院患者の静脈内抗生物質治療の必要性によって証明された臨床上の顕著な病態生理学と関連する場合でさえも）。

10

【0070】

第1日のA C Y - 1 血清濃度は顕著にD G F と関連したが、多変量分析では、統計学的有意性には達し得なかった。マーカーが移植後第1日のような早期に臨床的対応を知らせる可能性は、明らかに有利である。D G F に関連するA C Y - 1 についての特異度及び陰性的中率は非常に高く、臨床的に有用であることは注目される（感度及び陽性的中率は、一方では、コホート1においては適正であるのに、コホート2では非常に高いのに反して、低いA C Y - 1 濃度は、透析を必要とするようにはならない患者群を、より正確に限定できることを意味する）。それにもかかわらず、R O C 分析で見られるA U C s も十分に高く、臨床的に有用である（コホート1及び2において、それぞれ、0.74及び0.77）。有望な新規のバイオマーカーを、血清クレアチニンのような不完全なゴールドスタンダードと比べることの困難性にもかかわらず、現在の移植後の臨床環境におけるA C Y - 1 の有用性は、シスタチンCとの組合せにおけるA U C s（コホート1及び2において0.94及び0.93）から見られる。

20

【0071】

発明者らは、A C Y - 1 濃度と、D G F の期間（血清クレアチニンのプラトーに対する日によって定義される）の又は1年、3年又は5年の時点での、より長い期間の腎機能因子（クレアチニン、e G F R 、u P C R ）との相関関係は観察されなかった。しかし、発明者らは、驚くべきことには、D G F 患者の中でも、より高いA C Y - 1 濃度の患者は、カプラン・マイヤー分析によって、群として、5年の時点で、より高い透析フリーの生存率を有することが認められた。これは、移植後のI R I の間における高A C Y - 1 濃度は、実際に、移植片が、I R I が不利益を被らない程度までI R I を改善するためには保護性である（必要でさえある）ことを示唆しており、これは、更なる調査のための創造力に富む領域を提供する。

30

【0072】

従って、発明者らは、A C Y - 1 を、予測医学（例えば、診断アッセイ及び予後アッセイ）における特別な用途のバイオマーカーとして確認した。

40

【0073】

発明者らによって提供されるデータは、A C Y - 1 が、虚血再灌流障害についてのバイオマーカーとして有用であることを確認する（A C Y - 1 のレベルが、虚血再灌流障害に罹っている又は発症する危険がある患者を特定できる）。

【0074】

ここで使用するように、「虚血再灌流障害」は、虚血又は酸素不足の状態の後、組織へ血液が供給される際に生ずる組織の損傷を言う。虚血期間における血液からの酸素及び栄

50

養の欠如は、血行の回復により、酸化ストレスの誘導を介して、炎症及び酸化的損傷を生ずる状態を創成する。いずれの組織も虚血再灌流障害を受け得る。特に、感受性の組織としては、脳、心臓、腎臓、肺、肝臓及び骨格筋が含まれる。

【0075】

虚血及びそれによる虚血再灌流障害は、心筋梗塞、敗血症、卒中及び臓器及び組織の獲得及び移植において生ずることがある。移植の際に虚血及び続く虚血再灌流障害に至り得る臓器としては、心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓、腸、及び胸腺が含まれる。

【0076】

虚血再灌流障害は、移植を受けた患者において、移植片機能発現遅延を生ずることが知られている。ここで使用するように、「移植片機能発現遅延」は、移植後における透析の必要性（いくつかの理由による）又は血清クレアチニン（又はいくつかの他の腎臓機能のマーカー（クレアチニンクリアランスのような算定因子を含む））の期待したような改善の達成不能を含む（ただし、これらに限定されない）いくつかの臨床的定義によって決定されるように、腎移植片の術後の適切な機能発現の不能／遅延を言う。例えば、移植片機能発現遅延は、a) 腎移植後第1週における透析の要求；b) 単独の高カリウム血症のため以外に、腎移植後第1週における透析の必要性；c) 移植後第1週における、増大、現状維持、連続する3日間における1日当たり10%未満の減少のいずれかの術後血清クレアチニンレベルの観察；及びd) Cockcroft算定クレアチニンクリアランス（ $\text{CCR} < 10 \text{ ml/min}$ (DGFは、ついで、この値が $> 10 \text{ ml/min}$ になった際に終わったと言われる)）によって決定される。

10

20

【0077】

ここに提供されるデータは、ACY-1が、移植片機能発現遅延についてのバイオマーカーとして有用であることを確認する（ACY-1のレベルが、移植片機能発現遅延に罹っている又は発症する危険がある患者を特定できる）。

【0078】

ここに記載する診断法は、虚血再灌流障害又は移植片機能発現遅延に罹っている又は発症する危険がある患者を特定できる。

【0079】

1態様では、本発明は、患者における虚血再灌流障害を診断する方法を提供し、該方法は、i) 患者から採取したサンプルにおけるACY-1レベルを測定し；及びii) 患者サンプルにおけるACY-1レベルを、コントロールサンプルにおけるACY-1レベル又はACY-1について予め決定した対照レベルと対比することを含んでなり、コントロールサンプルと対比して又は予め決定した対照レベルと対比して患者サンプルにおけるACY-1のレベルが増大している場合に、患者が虚血再灌流障害を有していると認定する。

30

【0080】

更なる態様では、本発明は、移植患者における移植片機能発現遅延を診断する方法を提供し、該方法は、i) 患者から採取したサンプルにおけるACY-1のレベルを測定し；ii) 患者のサンプルにおけるACY-1のレベルを、コントロールサンプルにおけるACY-1のレベル又は予め決定したACY-1についての対照レベルと対比することを含んでなり、コントロールサンプルと対比して又は予め決定した対照レベルと対比して、患者サンプルにおけるACY-1のレベルが増大している場合に、患者が移植片機能発現遅延を有していると認定する。本発明は、また、移植患者における移植片機能発現遅延を診断する方法を提供し、該方法は、i) 移植前の腎移植組織から採取したサンプル又は腎移植組織の灌流後の灌流体液のサンプルにおけるACY-1のレベルを測定し；ii) 腎移植組織から採取したサンプルにおけるACY-1のレベルを、コントロールサンプルにおけるACY-1のレベル又は予め決定したACY-1についての対照レベルと対比することを含んでなり、コントロールサンプルと対比して又は予め決定した対照レベルと対比して、患者サンプルにおけるACY-1のレベルが増大している場合に、患者が移植片機能発現遅延を有していると認定する。

40

50

【 0 0 8 1 】

実施例に記載するように、発明者らは、虚血再灌流障害を有する患者、及び特に移植片機能発現遅延を有する患者における A C Y - 1 レベルは、虚血再灌流障害を有していない患者と比較して増大することを確認した。とりわけ、発明者らは、 A C Y - 1 レベルの増大が、移植後第 1 日、 2 日、 3 日及び 4 日において、術後の腎移植患者における移植片機能発現遅延の診断を可能にすることを確認した。

【 0 0 8 2 】

ここに記載する予後アッセイは、患者のサンプルにおける A C Y - 1 レベルに基づき、術後の腎移植患者についての透析管理戦略のような好適な体液管理戦略を決定するために使用される。

10

【 0 0 8 3 】

1 様様では、本発明は、術後の腎移植患者について体液管理戦略を決定する方法を提供し、該方法は、 i) 患者から採取したサンプルにおける A C Y - 1 のレベルを測定し； i i) 患者のサンプルにおける A C Y - 1 のレベルを、コントロールサンプルにおける A C Y - 1 のレベル又は予め決定した A C Y - 1 についての対照レベルと対比することを含んでなり、コントロールサンプルと対比して又は予め決定した対照レベルと対比して、患者サンプルにおける A C Y - 1 のレベルが増大している場合に、患者が、術後の腎移植患者に通常投与される液体の量と比べて低減された量の液体を必要としていると認定する、又はコントロールサンプルと対比して又は予め決定した対照レベルと対比して、患者サンプルにおける A C Y - 1 のレベルが低下している場合に、透析することが余り必要ではないため、患者にとっては、術後の腎移植患者に通常投与される液体の量と比べて増大された量の液体がためになるであろうと認定する。

20

【 0 0 8 4 】

ここで使用するように、「術後の腎移植患者についての体液管理戦略」は、患者の臨床状態 / 要求によって決定されるように、患者への経口又は静脈内へのいずれか又は両方による投与又は投与を控えることを言う。例えば、 D G F 患者では、尿排出量は低減するか、しばしば、 0 となる。このような患者（排出手段を持たないもの）に多量の液体を投与することは、浮腫（肺浮腫による呼吸器合併症を含む）として証明されるように、水分過負荷を（最終的に）生ずるであろう。よって、 D G F では、低減された液体の投与（機能している移植片を有する患者について要求されるものと比べて）が好ましい。

30

【 0 0 8 5 】

さらに、透析患者は、しばしば、わずかな量の尿を排出するか、全く排出しない。移植後では、患者が D G F を有していないければ、このような患者は多量の尿を排出する。このような状況では、前記患者に少なくとも同等（しばしば、より多く）の液体を投与することが必要である。これに関連して、十分に液体を投与することができなければ、患者は脱水状態になり、移植片の機能に影響を及ぼす。

【 0 0 8 6 】

移植後の患者にどれだけの液体を投与するかを決定する基準法は存在していない。個人的に、患者の尿排出量、及び臨床状態（例えば、それらを調査する肺浮腫の兆候がある）を検査することによって行われている。しかし、良好に機能している移植片では、十分な量の液体を投与することが要求される。 D G F を有する移植片では、同様の量の液体を投与することは有害となりがちである。

40

【 0 0 8 7 】

更なる様様では、本発明は、術後の腎移植患者について透析管理戦略を決定する方法を提供し、該方法は、 i) 患者から採取したサンプルにおける A C Y - 1 のレベルを測定し； i i) 患者のサンプルにおける A C Y - 1 のレベルを、コントロールサンプルにおける A C Y - 1 のレベル又は予め決定した A C Y - 1 についての対照レベルと対比することを含んでなり、コントロールサンプルと対比して又は予め決定した対照レベルと対比して、患者サンプルにおける A C Y - 1 のレベルが増大している場合に、患者が移植後 1 ~ 7 日内に透析を必要としていると認定する、又はコントロールサンプルと対比して又は予め決

50

定した対照レベルと対比して、患者サンプルにおける A C Y - 1 のレベルが低下している場合に、患者が移植後 1 ~ 7 日内には透析を必要としないと認定する。

【 0 0 8 8 】

ここで使用するように、「術後の腎移植患者についての透析管理戦略」とは、術後の腎移植患者が透析を必要としているかどうかの決定を言う。このような戦略は、腎移植患者において、術後毎日、更新及び評価され、体液状態、及び患者の臨床状態の他の態様とともに、高カリウム血症、血清クレアチニン及び血清尿素のような生物化学的因素に基づく。時には、透析の決定は、例えば、D G F を有する患者が過剰の液体を摂取し、肺水腫により呼吸器の合併症を発症した場合（緊急の透析が必要となりがちである）のように、迅速に行わなければならない。

10

【 0 0 8 9 】

本発明は、また、患者における腎移植片の術後の臨床転帰を予測する方法を提供し、該方法は、i) 患者から採取したサンプルにおける A C Y - 1 のレベルを測定し；ii) 患者のサンプルにおける A C Y - 1 のレベルを、コントロールサンプルにおける A C Y - 1 のレベル又は予め決定した A C Y - 1 についての対照レベルと対比することを含んでなり、コントロールサンプルと対比して又は予め決定した対照レベルと対比して増大している患者サンプルにおける A C Y - 1 のレベルは、前記患者の死亡フリー生存率及び / 又は透析フリー生存率の増大を予知するものであるとする。

【 0 0 9 0 】

ここで使用するように、「腎移植の術後の臨床転帰」とは、移植患者が、移植後、生存する又は透析フリーでいられる見込みを言う。転帰は、血清クレアチニンレベルを尺度としてアッセイされるが、e G F R レベル、尿タンパクのレベル、高血圧症の有無、生存率又は透析フリー生存率の全てが、転帰の尺度として使用される。術後の臨床転帰は、移植後 3 か月、6 か月、12 か月又は 1 年、2 年、3 年、4 年又は 5 年の時点における転帰であってもよい。

20

【 0 0 9 1 】

生物学的サンプルにおける A C Y - 1 ポリペプチド又は核酸分子の存在、レベル又は不存在は、患者から生物学的サンプルを採取し、該生物学的サンプルを A C Y - 1 ポリペプチド又は核酸分子を検出することができる化合物又は試剤と接触させることによって測定される。

30

【 0 0 9 2 】

ここで使用するように、用語「生物学的サンプル」及び「患者から採取したサンプル」は、患者内に存在する組織、細胞及び体液と同様に、患者から採取した組織、細胞及び体液を示すものとして交換可能で使用される。サンプルは、尿サンプル、血液サンプル、血清サンプル、痰サンプル、糞便サンプル、体組織の生検、例えば、移植した腎組織の生検、脳脊髄液サンプル、精液サンプル、又はスマアサンプルである。好適なサンプルは血清又は血漿である。或いは、サンプルは灌流液サンプルである。1 具体例では、サンプルは移植前又は移植後に採取される。

【 0 0 9 3 】

ここで使用するように、「患者」とは、個人、例えば、移植片機能発現遅延のような虚血再灌流障害を有する又は有する危険があるヒトを言う。1 具体例では、患者は、心筋梗塞、卒中に罹っている又は罹ったことがある、或いは、臓器移植を受けたことがある個人である。1 具体例では、患者は、腎臓、心臓、肺又は肝臓の移植患者のような、術後の臓器移植患者である。

40

【 0 0 9 4 】

ここで使用するように、「術後の臓器移植患者」とは、ドナー臓器を受容した患者を言う。

【 0 0 9 5 】

サンプルが術後の臓器移植患者からのものである場合、サンプルは、移植後第 1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日又は 7 日の時点で患者から得られたものである。

50

【0096】

ここで使用するように、「D C D」は、用語「循環死後に提供された」と交換可能で使用される。

【0097】

ここで使用するように、「D B D」は、用語「脳死後に提供された」と交換可能で使用される。

【0098】

A C Y - 1 核酸分子の発現レベルは、A C Y - 1 核酸分子によってコードされるm R N Aを測定すること；A C Y - 1 核酸分子によってコードされるポリペプチドの量を測定すること；又はA C Y - 1 核酸分子によってコードされるポリペプチドの活性を測定することを含む多数の方法で測定される。

10

【0099】

サンプルにおけるA C Y - 1 m R N Aのレベルを測定するために、各種の公知のm R N A検出法が使用される。

【0100】

例えば、サンプルにおけるA C Y - 1 核酸分子に相当するm R N Aのレベルは、インサイチュ方式及びインビトロ方式の両方で検出される。A C Y - 1 m R N Aは、サウザン又はノーザンプロット分析、ポリメラーゼ連鎖反応又はプローブアレイを使用して検出される。1具体例では、サンプルを、A C Y - 1 核酸分子によってコードされるm R N Aとハイブリダイズできる核酸分子（すなわち、ラベル化プローブのようなプローブ）と接触させる。例えば、プローブは、配列番号1の核酸分子のような全長A C Y - 1 核酸分子、又は少なくとも10個、15個、30個、50個、100個、250個又は500個ヌクレオチドの長さの核酸分子のような、配列番号1の核酸分子の部分（ストリンジェントな条件下でA C Y - 1 核酸分子とハイブリダイズする）でもよい。

20

【0101】

或いは、サンプルにおけるA C Y - 1 m R N Aのレベルは、核酸增幅によって、例えば、r t P C R、リガーゼ連鎖反応、自家持続配列複製、転写增幅、又は他の各種の核酸增幅法及び続いて、当分野において知られた技術を使用して、増幅された分子を検出することによって評価される。

30

【0102】

サンプルにおけるA C Y - 1 ポリペプチドのレベルを検出するために、各種の公知のタンパク質検出法が使用される。

【0103】

一般に、タンパク質検出法は、A C Y - 1 ポリペプチドに選択的に結合する試剤、例えば、抗 - A C Y - 1 抗体を患者のサンプルと接触させて、サンプルにおけるA C Y - 1 ポリペプチドのレベルを測定することを含んでなる。好ましくは、試剤又は抗体は、例えば、検出可能なラベルにてラベル化される。好適な抗 - A C Y - 1 抗体は、ポリクローナル又はモノクローナルである。F a b 又はF (a b ')₂のような抗体フラグメントを使用できる。

40

【0104】

ここで使用するように、用語「ラベル化された」とは、検出可能な物質との反応性によるプローブ又は抗体の間接的ラベル化とともに、検出可能な物質のプローブ又は抗体へのカップリング（すなわち、物理的結合）によるプローブ又は抗体の直接的ラベル化を言う。

【0105】

サンプルにおけるA C Y - 1 ポリペプチドのレベルは、酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A s）、免疫沈降、免疫蛍光、酵素免疫アッセイ（E I A）、ラジオイムノアッセイ（R I A）、及びウエスタンプロットアッセイのような当分野において知られた技術によって測定される。A C Y - 1 ポリペプチドのインビオ検出について、ラベル化抗 - A C Y - 1 抗体を患者に導入できる。このような抗体は、対象における存在及び位置が、標準

50

的な画像技術によって検出される放射性マーカーによってラベル化される。

【0106】

サンプルにおけるACY-1ポリペプチドのレベルは、サンプルにおけるACY-1ポリペプチドの活性レベル測定することによっても検出される。

【0107】

本発明の方法は、さらに、患者のサンプルにおけるACY-1の活性のレベルを、コントロールサンプルにおけるACY-1の活性レベル又はACY-1について予め定めた対照レベルと比較することを含んでなる。

【0108】

1具体例では、本発明の方法は、コントロールサンプルを、mRNA又はゲノムDNAのようなACY-1核酸分子を検出できる化合物又は医薬と接触させること、及びコントロールサンプルにおけるACY-1核酸分子のレベルを、患者サンプルにおけるACY-1核酸分子のレベルと比較することを含んでなる。 10

【0109】

他の具体例では、さらに、本発明の方法は、コントロールサンプルを、ACY-1ポリペプチドを検出できる化合物又は試剤と接触させること、及びコントロールサンプルにおけるACY-1タンパク質のレベルを、テストサンプルにおけるACY-1タンパク質の存在と比較することを含んでなる。

【0110】

ここで使用するように、「対照レベル」又は「コントロール」とは、ACY-1発現の正常なレベルを有するサンプル、例えば、虚血再灌流障害を有していない又は有することが疑われない健常な対象からのサンプル、或いは、生物学的テストサンプルが得られた同じ対象からのサンプル、例えば、臓器移植前に得られたサンプルを言う。或いは、対照レベルは、予め定められたカットオフ値、すなわち、症状又は病気又はその欠乏を統計学的に予測する診断スコアを創成するために使用される対照データベースからのACY-1発現レベルを含んでなるか、又は標準の母集団サンプルに基づく予め定められた対照レベル、或いは、対象の発現のベースラインレベル、すなわち、臓器移植前の対象の発現レベルに基づく予め定められた対照レベルである。 20

【0111】

或いは、予測は、ACY-1の正規化された発現レベルに基づくものでもよい。発現レベルは、サンプルにおけるACY-1の絶対発現レベルを、その発現を、恒常的に発現されるmRNAのようなマーカー（例えば、mRNA）ではない対照核酸の発現と比較することにより補正することによって正規化される。この正規化により、1サンプルにおける発現レベルを他のサンプルと比較すること又は異なった源からのサンプル間で比較することが可能になる。この正規化された発現は、ついで、任意に、対照レベル又はコントロールと比較される。 30

【0112】

例えば、尿におけるバイオマーカーを測定する際、バイオマーカーは、絶対濃度として発現されるか、或いは、尿クレアチニンレベル又は尿タンパク質レベルのような公知の尿バイオマーカーに対して正規化される。 40

【0113】

1具体例では、診断又は予後方法は、サンプルにおけるACY-1のレベルを測定すること及び少なくとも1の更なるバイオマーカー、例えば、虚血再灌流障害又は移植片機能発現遅延を予測又は表示するバイオマーカーのレベルを測定することを含む。好ましくは、少なくとも1の更なるバイオマーカーは、NGAL、KIM-1、IL-18、RBP、FABP4、シスタチンC及びクレアチニンから選ばれ、方法は、さらに、生物学的テストサンプルにおけるNGAL、KIM-1、IL-18、RBP、FABP4、シスタチンC及びクレアチニン核酸分子、又はポリペプチドのレベルを検出することを含んでなる。好ましくは、少なくとも1の更なるバイオマーカーのレベルは、上述の方法のいずれか1つを使用して測定される。 50

【0114】

少なくとも1の更なるバイオマーカーのレベルは、同じ生物学的サンプル又は異なる生物学的サンプルにおけるACY-1のレベルについて測定される。

【0115】

或いは、サンプルにおけるACY-1のレベルは、質量分析を使用して検出及び定量される。

【0116】

1態様では、本発明は、アッセイ装置、例えは、チップアレイのような、その表面にACY-1ポリペプチド又は核酸を検出できる化合物又は試剤が付着した固体支持体を含む。好ましくは、ACY-1ポリペプチドを検出できる化合物又は試剤は、抗-ACY-1抗体、さらに好ましくは、ACY-1捕捉抗体である。1具体例では、アッセイ装置は、さらに、更なるバイオマーカー、好ましくは、腎臓の損傷、疾患又は障害のためのバイオマーカーを検出するための少なくとも1の追加の化合物又は試剤を含んでなる。10

【0117】

発明者らは、ACY-1を、虚血再灌流障害又はDGFのマーカーとして同定した。本発明の方法は、当業者がACY-1レベルに基づき知らされた治療を決定することを可能にする。例えば、ここに記載の診断及び予後方法は、さらに、診断及び予後にに基づき患者又は臓器を治療する工程を含んでなる。患者又は臓器を治療する工程は、i)移植後、患者を透析処置する、例えは、腎移植後第1週に患者を透析処置する工程；ii)患者に静脈注射を投与する、例えは、投与される静脈注射を調整する（すなわち、患者に投与されるIVI流体の速度及び容量を増減する）工程；iii)患者に免疫抑制剤（例えは、カルシニューリン阻害剤又はシロリムスのようなTOR阻害剤）を投与する、例えは、ACY-1レベルに基づいて免疫抑制剤を増減する又は免疫抑制治療の種類を変更する工程から選ばれる（これらは例示を目的とするものである）。20

【0118】

加えて、腎移植後の初期期間におけるACY-1の測定は、DGFを寛解させるように各種の可能性のある介入をガイドするために使用される。

【0119】

キット

本発明は、生物学的サンプルにおけるACY-1の存在を検出するためのキットも含む。例えは、キットは、生物学的サンプルにおけるACY-1ポリペプチド又は核酸を検出できる化合物又は試剤を含む。化合物又は試剤は、好適な容器に梱包される。キットは、さらに、ACY-1タンパク質又は核酸分子を検出するためにキットを使用するための説明書を含んでなる。30

【0120】

1態様では、本発明は、患者における虚血再灌流障害を診断する又は移植片機能発現遅延を診断するためのキットを提供し、該キットは、ACY-1ポリペプチドに特異的に結合する検出可能にラベル化された試剤又はACY-1核酸に特異的に結合する検出可能にラベル化された試剤；及びii)診断を実施するための試薬を含んでなる。

【0121】

試剤は抗体又は核酸分子である。

【0122】

抗体系キットについて、該キットは、(1)本発明のマーカーに相当するACY-1ポリペプチドに特異的に結合する第1の抗体（例えは、固体支持体に付着している）；及び任意に、(2)ACY-1ポリペプチド又は第1の抗-ACY-1抗体に結合し、検出可能な試剤に共役した第2の異なる抗体を含むことができる。

【0123】

オリゴヌクレオチド系キットについては、該キットは、(1)ACY-1核酸分子にハイブリダイズするヌクレオチドプローブ、例えは、検出可能にラベル化されたプライマー又は(2)ACY-1核酸分子を增幅するためのプライマー対を含むことができる。40

【0124】

1 態様では、本発明は、患者における虚血再灌流障害又は移植片機能発現遅延を診断するためのキットを提供し、該キットは、本発明のマーカーに相当する A C Y - 1 ポリペプチドに特異的に結合する第 1 の抗体（例えば、固体支持体に付着されている）；及び（2） A C Y - 1 ポリペプチド又は第 1 の抗 - A C Y - 1 抗体に結合し、検出可能な試剤に共役した第 2 の異なる抗体を含んでなるアッセイ装置を含んでなる。

【0125】

キットは、検出可能な試剤を検出するために必要な成分（例えば、酵素又は基質）も含むことができる。キットは、アッセイされ、収容されたテストサンプルと比較されるコントロールサンプル又は一連のコントロールサンプルを含有することもできる。

10

【0126】

この明細書の記載及び請求の範囲を通して、用語「含んでなる」及び「含有する」及びこれらの変形は、「含むが、これらに限定されない」を意味するものであり、他の部分、添加剤、成分、整数又は工程を除外することを意図するものではない（意図しない）。この明細書の記載及び請求の範囲を通して、単数形は、他に前後関係が要求しない限り、複数形を含むものである。特に、不定冠詞が使用される場合、明細書は、他に前後関係が要求しない限り、単数形とともに、複数形を含むものとして理解されなければならない。

【0127】

本発明の特別な態様、具体例又は実施例に関連して記載する特徴、整数、特性、化合物、化学部分又は基は、矛盾しない限り、ここに記載のいかなる他の態様、具体例又は実施例にも適用可能であると理解されなければならない。この明細書（添付する請求の範囲、要約及び図面を含む）に開示する特徴の全て、及び / 又は開示するいかなる方法又はプロセスの工程の全ては、このような特徴及び / 又は工程の少なくともいくつかが相互に排他的である組み合わせを除き、いかなる組み合わせとしても組み合わされる。本発明は、いかなる上述の具体例の詳細にも限定されない。本発明は、この明細書（添付の請求の範囲、要約及び図面）に開示する特徴のいずれかの新規な 1 つ、又はいずれかの新規な組み合わせに、又はここに開示されたいかなる方法又はプロセスの工程のいずれかの新規な 1 つ、又はいずれかの新規な組み合わせに拡張される。

20

【0128】

読者は、本願に関連してこの明細書と同時に又は以前に出願され、この明細書とともに公開された全ての論文及び文献の全てに注目されたい。このような全ての論文及び文献の内容を、参照して、ここに組み込む。

30

【0129】

[実施例]

1. 方法

1.1 患者群及び研究デザイン

腎移植を受ける前に、患者の承諾を得た（図 1）。将来を見越して移植前に、及び移植後に、長期的に 1 週当たり少なくとも 3 回、静脈血を採取した（平均 14 サンプル / 患者）。Z / Serum Clot Activator Tubes (Greiner) (25) において 2000 g で 10 分間遠心分離する前に、室温において 45 分から 2 時間凝固させ、血清を分取し、-80° で保存することを可能にする）を使用して、血液を集めた。患者コホート 1 は、2008 年 9 月 ~ 2011 年 7 月の期間に集めた患者 55 人を含み（サンプル 665 個；腎移植患者 47 人及び生体ドナー 8 人）、そのうちの 15 人は DGF を有し（単独の高カリウム血症のため以外に、腎移植後第 1 週において透析を必要とするとの定義に基づく）、及びコホート 2 は、2003 年 12 月 ~ 2006 年 3 月の期間に集めた患者 194 人（第 1 日のサンプル 138 個及び第 3 日のサンプル 177 個）を含み、その内の 55 人は DGF を有していた。できる限り臨床的にマッチする、コホート 1 における DGF を有する患者 5 人及び合併症のない患者 5 人からの血清サンプル、移植前及び移植後第 2 日の時点で採取した比較用サンプル（サンプル計 20 個）を使用して初期バイオマーカーの発見を実施した。ついで、初めにコホート 1 からのサンプル、続いて

40

50

コホート2からのサンプルを使用して(数は統計的検出力に基づき決定される)、初期知見の検証に着手した。例えば、DGF患者10人及び非DGF患者25人の第1/2日ににおけるACY-1測定は、Bonferroni法が、2群比較について、5%有意性検定を補正する際にAUC > 0.8を検出するために、検定力80%を与える。

【0130】

1.2 血清の免疫除去及びサンプルの調製

発見セットにおける血清サンプル20個を、既に記載されたように²¹、Multi-Affinity Regent System 14カラム(Agilent)を使用して、免疫除去に供した。免疫除去されたフラクションを脱塩し、得られた物質を、フィルター-補助サンプル調製法(FASP)⁹の変法²¹を使用して、トリプシンにて消化した。

10

【0131】

1.3 ラベルフリー質量分析

0.1%TFAの最終濃度への酸性化の後、ペプチドサンプルを患者によってブロックランダム化し、Proxeonナノエレクトロスプレイイオン源を備えたLTQ Orbitrap Velos質量分析計に接続したDionex UltiMate 3000 RSLCnanoシステムを使用して分析した(サンプル当たり3×2μg注入)。3.5μm Kromasil C18媒体が充填されたインハウス25mmキャピラリーエミッターカラムに、サンプルを直接注入した。総捕捉時間は300分であり、勾配の大部分は、流速0.4μl/分において、0.1%ギ酸中ACN 3~25%であった。サーベイMSスキャンは、60,000にセットされた解像度のOrbitrap内で獲得された。スキャン当たり最強イオン20個以下を断片化し、リニアトラップにおいて分析した。

20

【0132】

1.4 データの解析及び統計学的方法

MaxQuant(v1.1.1.25)⁵¹を使用して、ラベルフリー質量分析データの解析を行った。Andromeda⁵²及び2ペプチドの判定基準を有するIP-Iヒトデータベース(v3.75, 19/08/2010)を使用してタンパク質を同定し、及びDecoyデータベースから同定したタンパク質及び公知の混入物を除去した。LFQ強度に関するノンパラメトリック(Wilcoxon)有意性検定を使用して、患者群間及び患者群内の示差的発現をアッセイした。q値法⁵³を使用して偽発見率を推定した。

30

【0133】

検証テストでは、血清ACY-1及び他のマーカー⁵⁴の予知能力をアッセイするために、受信者動作特性(ROC)曲線を作成した。受信者動作特性曲線下の面積(AUC)を見積もり、95%CIsがブートストラップサンプルから推定された。ブートストラップ有意性検定を使用して、AUCを、標準の近似を使用してアッセイしたブートストラップAUC間の差異の有意性を比較した。突出した予測変数を含有するモデルにおけるDGFに関するACY-1の非依存性予知能力をアッセイするために、多変量ロジスティクス回帰分析を使用した。Cox比例ハザード回帰、カプラン・マイヤー生存時間関数及びロングランク検定を使用して、ACY-1及び他のマーカーの濃度と透析フリー生存率との関係を査定した。全ての統計学的検定は両側性であり、全ての分析を、統計学的計算のためのR環境で行った(R Development Core Team, ウィーン、オーストリア)。

40

【0134】

1.5 他の分析物との比較

血清クレアチニン、CPR、タクロリムス、及び尿タンパク質/クレアチニン比を、臨床プロトコル/指示通りに測定し、さらに、血清クレアチニン及びシスタチンCを、研究で使用した同じ時点で、コホート1において測定した。

【0135】

1.6 ELSA展開

50

両コホートにおける血清サンプル 980 個について、サンプルをロックランダム化し、インハウス開発したサンドイッチ E L I S A を使用して、 A C Y - 1 濃度を測定した。手短に言えば、96 穴 Nunc MaxiSorp プレート (Nalge Nunc International ; ロチェスター、ニューヨーク州) を、ラット抗 - ヒト A C Y - 1 モノクローナル抗体 (クローン 475626 ; R & D Systems ; ミネアポリス) 及び A C Y - 1 標準 (0.31 - 15.0 ng / mL, His タグ組み換え A C Y - 1 - R & D Systems) にて被覆し、希釈したサンプルを塗布した。2 時間のインキュベートの後、ヤギ抗 - A C Y - 1 抗体 (R & D Systems) 、続いて、連続して、ビオチン化ウサギ抗 - ヤギ IgG 抗体 (Sigma - Aldrich ; ブール、英国) 、ストレプトアビシン - HRP 及びテトラメチルベンズアジン (Sigma - Aldrich) を使用して、結合した A C Y - 1 を検出した。2 N 硫酸 (Sigma - Aldrich) を添加した後、450 nm (570 nm にて補正) において吸光度を測定し、 A C Y - 1 濃度を算定した。 10

【 0136 】

2. 結果

2.1 患者群

患者群の検査 (表 1) は、 D C D 移植片の割合及び誘導レジメン (診療の変更を招く) を除き、コホート 1 (発見及び初期検証群) 及び 2 (長期間転帰データを有するより大きい検証群) の同様の特性を示す。コホート 1 における患者の 31.9 % 及びコホート 2 における患者の 28.4 % において D G F と診断された。平均年齢及び冷虚血時間 (CIT) は、各コホートにおいて D G F 群において有意に高く、温虚血時間 (WIT) はコホート 2 において同様であった。初期プロテオミック発見のための使用した D G F 患者 5 人及び非 D G F 患者 5 人は、 C N I 毒性又は急性拒絶反応の証拠を有しておらず、平均年齢、民族性ミックス、 C I T 、 W I T 、 A 、 B 及び D R 坐位における平均 H L A ミスマッチ、及び免疫抑制レジメン、ドナータイプにおけるわずかな相違 (非 D G F 群において D C D 3 人 / D B D 2 人と比べて、 D G F 群では D C D 5 人) の点では、極めて密接にマッチしていた。初期発見セットにおいて使用した患者 10 人をコホート 1 から抽出した。 D G F 5 人及び非 D G F 5 人は、平均年齢、民族性ミックス、 C I T 、 W I T 、 A 、 B 及び D R 坐位における平均 H L A ミスマッチ、誘導及び維持免疫抑制レジメンの点では同様であり、 C N I 毒性又は急性拒絶反応の証拠を有している患者はいない。 20 30

【 0137 】

2.2 質量分析及び候補バイオマーカーの選択

初期質量分析スクリーンのために使用したサンプル 20 個 (患者 10 人、 2 つの時点) の中で、少なくとも 2 つのペプチド (その内の少なくとも 1 つは独特である) を有する患者 553 人が特定され、相対量を測定した。統計学的有意性 (p < 0.05) に基づき、 34 個の候補 (原理証明としてシスタチン C を含む) が、術前、術後又は変化パターンによって、 D G F 群及び非 D G F 群の間を区別した。アミノアシラーゼ - 1 は、全ての患者において術前では検出不能であるが、術後では、特に D G F 群において顕著に増加したため (図 2a) 、優先的に更なる調査に供した。 40

【 0138 】

2.3 コホート 1 における A C Y - 1 の血清濃度及び臨床事象との関係

発明者らが新たに開発し、検証したインハウス E L I S A を使用することにより、血清 A C Y - 1 に関するデータは、発見サンプルに関する質量分析データを広く支持した (図 2)。 A C Y - 1 は、このセットにおける移植前のサンプル全てにおいて検出不能であり (< 15.6 ng / mL) 、全体としてコホート 1 では、患者 47 人中の 43 人が術前で検出不能の A C Y - 1 を有し、残りは < 5.0 ng / mL であり、移植前における D G F 群及び非 D G F 群の間の有意差はなかった。分析した長期的サンプル 636 個の内、 A C Y - 1 は、 230 個のサンプル、主に、移植後第 5 日のサンプルにおいてのみ検出された。全体的には、 D G F 患者における長期的サンプル 207 個の内 138 個が検出の A C Y - 1 を有しており、これらの大部分は移植前及び移植後第 5 日より前のものである。非 D 50

G F 群では、長期的サンプル 429 個の内の 268 個が A C Y - 1 の検出不能の濃度を有していた。同様に、肝臓ドナーは、術後では、A C Y - 1 濃度 $> 50 \text{ ng / mL}$ を示すものはおらず、術後サンプルの大部分 (10 / 12) は検出不能の A C Y - 1 濃度を有していた。

【 0139 】

異なった臨床経過を有する血清 A C Y - 1 プロフィールの例を図 3 に示す。D G F を有する患者 15 人の内の 10 人において、移植後第 4 日以降の時点で、A C Y - 1 濃度 $> 200 \text{ ng / mL}$ におけるピークが観察されたが、非 D G F 移植片では 6 / 32 (18.8%) のみであり、この内の 3 人は移植直後に、無併発性の臨床経過を有していた。A C Y - 1 濃度の長期プロフィールは、血清クレアチニン、シスタチン C、C R P、タクロリムス又は尿 P C R のいずれかにおいて見られる傾向に従っておらず、ただし、非常に高いタクロリムス濃度 (トラフレベル 33 ng / mL、意図する範囲 9 ~ 14 ng / mL) によるタクロリムス毒性に罹った患者 1 人において A C Y - 1 のピークが認められた。重要なことに、生検前 4 日間 A C Y - 1 濃度が 260 ng / mL でピークを示したが、生検の時点では検出不能となった患者 1 人を除き、陽性の中流尿培養 (n = 19; A C Y - 1 < 15.6 ~ 88.3 ng / mL)、術後透析のエピソードの時点、又は生検によって証明された拒絶反応の時点では、患者における血清 A C Y - 1 における明瞭なピークは存在しなかった。

【 0140 】

2.4 コホート 1 と比較したコホート 2 における移植後の A C Y - 1 の血清濃度 20
コホート 2 (より大きい最終検証セット) では、第 1 日サンプル 138 個の内、患者 30 人が検出不能の A C Y - 1 濃度を有し (D G F 患者 4 / 42 (9.5%)、非 D G F 26 / 96 (27.1%))、第 3 日の値について同様のパターンが認められた (それぞれ、18.8% 対 42.6%)。両コホートにおいて、第 1 日の濃度は、オーバーラップするものの、D G F 群及び非 D G F 群の間で顕著に異なっていた (図 4 a、b)。より大きいコホート 2 からの非 D G F 患者を、クレアチニン減少比 (C R R = (0 日のクレアチニン - 第 7 日のクレアチニン) / 0 日のクレアチニン) に基づいてカテゴリーに分類する場合、緩慢な移植片機能発現 (S G F; C R R < 0.7) として分類される患者及び早期移植片機能発現 (I G F; C R R 0.7) として分類される患者の間における第 1 日の血清 A C Y - 1 における顕著な差異 (図 4 c) は、I G F から S G F、D G F への増大傾向とともに認められ、これは移植片機能の改善率及び A C Y - 1 の関係を証明している。第 3 日の血清 A C Y - 1 濃度についても、同様に結果が認められた。

【 0141 】

2.5 血清 A C Y - 1 の関連性及び D G F に関する予知の有用性
コホート 1 における予知の有用性の初期探索検査のために、第 1 日又は第 2 日の A C Y - 1 濃度及びシスタチン C 濃度を、第 3 日又は第 4 日のもののように、1 つの時点として組み合わせた (それについて n = 35、患者 24 人は両時点におけるサンプルを有する)。コホート 1 では、D G F を予測する第 1 / 2 日の A C Y - 1 についての受信者動作特性曲線下の面積 (A U C) は 0.74 であり、これは、それぞれ、0.79 及び 0.92 のクレアチニン及びシスタチン C についての数値に相当する。組み合わされた A C Y - 1 及びシスタチン C は、A U C を 0.94 にわずかに改善した (図 5 a)。コホート 2 では、第 1 日の A C Y - 1 についての A U C は 0.77 であり、それぞれ、0.75 及び 0.9 のクレアチニン及びシスタチン C についての数値に相当し、後者は、A C Y - 1 と組み合わされる場合、0.93 に改善した (図 5 b)。クレアチニンについての A U C は、より遅い時点では、より高いが (図 5 c、d)、コホート 1 及び 2 における第 3 / 4 日及び第 3 日の値については、同様の結果が見られた。コホート 2 (表 2) における第 1 日の血清 A C Y - 1 及びシスタチン C についてのデータ誘導最適カットポイントは、それぞれ、高い特異性及び感度を示し、ロジスティクス回帰を介する両方の組み合わせからの最適カットポイントは、増大した Y o u d e n インデックス⁵⁶を介して明らかのように、より高い感度及び同様の特異性を提供する (0.71 対 0.43 及び 0.64) (表 2)。

10

20

30

40

50

【0142】

より大きい最終検証コホート2を使用することによって、血清ACY-1濃度と、生検によって証明された急性尿細管壊死(ATN)、移植片のタイプ、移植時の年齢、CIT、総WIT、第1日の血清クレアチニン及びシスタチンCとの顕著な関連性が観察された(表3)。単変量解析では、第1日及び第3日の血清ACY-1濃度、シスタチンC濃度及びクレアチニン濃度、移植片のタイプ、WIT及び総HLAミスマッチは、全て、DGFの発生と顕著に関連していた(表4)。DGFの予知に関する多変量ロジスティクス回帰モデルが、第1日の血清ACY-1濃度、クレアチニン濃度及びシスタチンC濃度、患者の年齢及び性別、移植片のタイプ(DBD, DCD)、HLAミスマッチ、CIT、WIT及び初期ステロイドの使用を組み込んで開発された。第1日の血清ACY-1は、尤度比検定(LRT $p = 0.013$; 別表4)を使用する際に重要であり、減少する場合、単変量解析と比べて高いオッズ比を維持した。シスタチンCは、このモデルにおけるDGFの唯一の他の独立した予測因子である($p < 0.0001$)。

【0143】

この完全な多変量モデル(新しいモデル)及びACY-1なしのモデル(対照モデル)に関するリスクアセスメントプロットを、DGFを有する又はDGFなしの患者について、図8に示す。モデルは適合度の証拠を示さないし(別表1)、ブートストラップCIs($p = 0.345$)から予想されるように、AUCは顕著には異なる。DGFを有している患者(患者の47.4%(95%CI 24.5~70.2%))が新しいモデルに従って低減されたリスクを有する)にとっては、最大の予測的利益である(表2における高NPVと一致する)。DGFを有する患者にとってもリスクの低減があり、この結果、0を含むCIを有する全体の総再分類改善度(NRI)が生じた。DGFを有していない患者に関する統合判別改善度(IDI)も0.0196(95%CI 0.004~0.036)に低減し、さらに、これはACY-1の陰性的中率の増大を証明する。

【0144】

2.6 血清ACY-1及び転帰

移植後第1日の血清ACY-1濃度は、DGFの長さ、血清クレアチニン、eGFR(修飾MDRD)、及び1年時点におけるuPCR(コホート1及び2)との相関を示さなかった。コホート2における長期間の追跡データの同様の解析は、移植後第1日のACY-1濃度と全体の又は透析フリー生存率との間の有意な関連性を示さなかった。

【0145】

DGFとのACY-1の有意な関連性及びDGFを有するDBD及びDCD移植片タイプの両方において見られる血清濃度の有意な増大(図9)を考えて、DGF群のみを使用する($n = 54$)サブグループ解析を行ったところ、DGF患者において、第1/3日(第1日の値が利用できなければ第3日)の血清ACY-1と透析フリー生存率との関連性を示した(第1日のHR = 0.993, 95%CI (0.988, 0.999), $p = 0.0174$)。HRS < 1を反映させると、生存曲線は、DGFを有する患者において第1/3日の血清ACY-1と、移植から5年内に透析に戻る危険(非DGF群では見られなかった)との間に顕著な負の関連性($p < 0.001$)を示した(図10a, b)。移植後第1日の血清ACY-1濃度に基づき、DGFを有する患者を2つの群にサブ分割して、より小さいサイズの群を作成し、事象の数は小さい($n = 10$ 透析に戻る)が、差異は著しいままであった。DGFに至る患者における血清シスタチンC又はクレアチニンについて、転帰との同様の関連性は観察されなかった。正式の多変量解析は、少ない事象の数及び変量の数を考えると、統計学的には有効ではなかったが、臨床データの広範囲な検討では、DGF患者の高及び低ACY-1サブグループの間で異なる因子(可及的にドナータイプを除く転帰における差異にリンクする)が検出されなかった。DGF患者のみの中では、9/10の事象を説明するDBDタイプの移植片とともに、透析フリー生存率における明白な差異が見られ(図10c, d)、DGF群におけるDBDタイプ移植患者内では、移植後第1/3日のACY-1血清濃度に基づく転帰における明瞭な差異が見られた(図10e)。

10

20

30

40

50

【0146】

コホート1におけるDGFを有する患者15人の遡及的解析も、転帰とのACY-1の関連性を示唆した。移植失敗及び透析への戻りは何ら生じなかつたが、3人の患者が、eGFR 10.08、16.1及び13.6で、移植片が不全へ進行しつつあることが明らかになった。これらを転帰不良群と定義し、転帰及びACY-1によって患者を分類する分割表を作成する場合(別表2)、有意の関連性($p = 0.056$)の証拠は見られなかつた。しかし、ACY-1 < 200については、転帰不良のオッズは1:8であり、一方、ACY-1 < 200の場合は、転帰不良のオッズは2:3である。条件的なMLEは0.215と算定され(95%0.003~5.545)(これは、コホート2において見られるものと類似する転帰との関連性を示唆する)及び有意のテスト結果の欠落は、恐らく、小さいサンプルにおける低い能力及びより限られた追跡時間の量の組み合わせによるものである。10

【0147】

2.7 総括論議

いくつかの研究では、DCDドナータイプのDGFのより高い頻度が報告されているが、ドナータイプの重要な調査では、長期間の温虚血にもかかわらず、DCD移植片レシピエントにおいては、転帰に対するDGFの影響はない⁵⁷⁻⁵⁹が、DBD患者においては、転帰に対してDGFの有害な影響があることが確認されている^{59,60}。動物モデルからは、カテコールアミン分泌及び低血圧のような脳死の大きいシステム効果、及び続く、ドナーオ rgansにおける炎症誘発メディエーター/サイトカインの活性化(ついで、移植に至る更なる宿主応答を誘発する)が提起された⁶¹。異なったドナータイプを有するDGFの要因である根底にある異なった病理が、既存条件又は前終端条件(DCDドナーにおいて遭遇するATN(温虚血に至る)よりも、DBD臓器によるより少ない可逆変化を生ずる)の可能性とともに考察された。これは、移植直後より低いACY-1濃度を有するDBDドナータイプ移植患者のサブグループにおいて見られるように、ACY-1は、本質的に、乏しい転帰を有するより低い応答を示す患者による損傷の修復又は応答のマーカーであるとの当該知見と合致する。20

【0148】

腎移植を必要とする末期の腎臓疾患を有する患者の数が増加するにつれて、循環死後に提供された(DCD)臓器及び境界領域ドナーからの臓器の使用が拡大している。しかし、これは、臨床転帰及び医療経済学的転帰に重大な影響を有する初期非機能性又は移植片機能発現遅延のような合併症のより高い発生率と関連する。このようなドナーからの著しい数の移植片が、質が不十分であるとの認定のために、移植以前に廃棄(回収に至る)される。廃棄についての判断は、多くは、主観的評価及び臨床経験に基づくものであり、より客観的な尺度が必要である。減少するドナー(脳死ドナー(DBD)及びDCDの両方)からの腎臓は、摘出前に、その場で、冷たい保全溶液にてフラッシュされ、保存容器内において氷上に保存される。4~12時間の腎動脈を通る保存液の再循環を伴う体温低下装置による灌流は、ますます使用されるようになっており、証拠は相克的であるが、良好な転帰を生ずることが報告されている。流れ抵抗のような灌流動力学及びグルタチオンS-トランスフェラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、及び心臓由来脂肪酸結合タンパク質のような因子の灌流液濃度の尺度が、移植片のバイアビリティーの強力な指標として検討されているが、研究は少なく、このようなマーカーは転帰の信頼できる予知であることは明らかになってはいない。30

【0149】

予備調査結果は、ACY-1が、移植後の血清において検出可能であり特にDGFを有する幾人かの患者に関連することに加えて、移植以前に、腎臓からの機械的灌流液において測定されることを示している。予備調査結果は、血清における濃度と同様の濃度を示し、DBD移植片よりもDCD移植片において潜在的に高いレベルであることを示している。従って、これは、移植における臓器の使用前に、灌流液においてACY-1を測定できる可能性を提供し、他のマーカーと一緒に、移植片の質及び/又は移植の転帰を測定4050

することにおいて重要である損傷 / 修復プロセスのいくつかの表示を提供できる。

【 0 1 5 0 】

ACY - 1 に加えて、ACY - 2 及びACY - 3 に由来する、トリプシン消化物灌流液の質量分析におけるペプチドの知見は、これらACY - 2 及びACY - 3 も潜在的なバイオマーカーとして価値があることを意味する。

【 0 1 5 1 】

【表 1 - 1】

表1 コホート1及び2における移植片機能発現遅延(DGF)患者及び非DGF患者に関する詳細
実施した生検及び他の術後の事象(例えは、尿路感染(UTIs)の詳細を、血清クリレアシン(SCR)、タクリムス濃度、C反応性タンパク質(CRP)濃度、
及び尿タンパク質/クレアチニン比(uPCR)とともに収集した。加えて、手術の影響を確認するため、研究では、生体ドナー8人を含む
(平均年齢44.0±12.3 男性37.5%)。

	コホート1		コホート2				
	DGF	非 DGF	p 値	DGF	非 DGF	p 値	
n=計15人 生検した患者6人: 急性拒絶反応4人 ATN2人 患者及びサブグループの数 生検しない患者9人: カリシニユーリン 阻害剤毒性5人 想定上のANT4人	n=計32人 生検した患者8人: 急性拒絶反応6人 軽度の尿細管の損傷2人 生検しない患者24人: 非合併症12人 移植後UTIs4人 カリシニユーリン 阻害剤毒性8人	n=計55人 生検した患者40人: ATN26人 N/A	n=計139人 生検した患者16人: ATN11人 拒絶反応8人 ATN及び急性拒絶反応 の両方6人 生検しない患者15人: 非合併移植 想定上のANT全員	n=計11人 ATN及び急性拒絶反応 の両方5人 生検しない患者123人: 非合併移植	N/A	N/A	
ESRDの原因(%) 遺伝 その他 不明	慢性腎孟腎炎 糖尿病 糸球体腎炎 高血圧症 遺伝 その他 不明	0.0 6.7 33.3 6.7 26.7 20.0 6.7	18.8 3.1 31.3 12.5 12.5 15.6 6.3	14.5 12.7 32.7 5.5 14.5 7.3 12.7	12.2 10.1 30.9 10.8 10.8 5.0 20.1	0.719	
民族性(%) 不明	アジア人 黒人/アフリカ人/カナダ人 コーカサス人 不明	6.7 6.7 86.7 0.0	6.3 6.3 87.5 0.0	0.997 0.997 58.2 18.2	20.0 1.8 58.2 28.1	8.6 1.4 61.9 28.1	0.113

【表1-2】

移植の数(%)	1	86.7	78.1	80.0	90.6	
2-4	13.3	21.9	0.807	18.2	7.9	0.247
不明	0	0		1.8	1.4	
N	100.0	78.1		96.4	92.8	
Y	0.0	21.9	0.128	1.8	6.5	0.338
不明	0	0		1.8	0.7	
移植時における透析についての平均時間(月)±sd*	32.8 ± 20.7	32.2 ± 25.0	0.941	54.6 ± 40.4	36.5 ± 36.4	<0.001
平均年齢(才)±sd	52.4 ± 12.1	40.6 ± 14.1	0.007	50 ± 13.9	46.2 ± 14.9	0.046
性別 男性(%)	73.3	59.3	0.547	37.0	62.6	0.002
DBD(%)	20.0	28.1		57.4	61.9	
DCD(%)	80.0	34.3	0.006 (0.123)†	38.9	13.7	<0.001
LD(%)	0.0	37.5		3.7	24.5	
アレムツマブ	26.7	31.2		0	0	
バシリキシマブ	73.3	68.7	0.983	100	100	N/A
使用した維持ステロイド(%)	26.7	21.9	0.994	14.8	10.1	0.527
平均虚血時間±sd	16:06 ± 03:11	10:24 ± 06:08	0.002	16:42 ± 04:48	13:48 ± 08:18	0.019
冷虚血(時:分)						
温虚血(分)	40 ± 13	39 ± 9	0.782	49.2 ± 19.1	36.9 ± 13.6	<0.001
平均総HLAミスマッチ±sd	3.3 ± 1.0	2.6 ± 1.8	0.127	2.4 ± 1.3	2.0 ± 1.4	0.096

DBD:脳死後の提供、DCD:循環死後の提供、LD:生体ドナー、ATN:急性尿細管壞死、p値:各コホートにおけるDGFグループ及び非DGFグループの間の差異のために提供される。

*:繰り返される透析について、予防的移植(秒)及び繰く移植(総時間)を除く

#:LDの場合、DGFではまれであるためp値は除外される

【0152】

【表2】

表2 第1日の測定値に関するコホート2データにおいて測定した、最適カットオフのためのACY-1、シスタチンC、血清クレアチニン、及び組合せ血清ACY-1及びシスタチンCについての診断精度の尺度に関する推定値及び95%信頼区間

ACY-1				
(カットオフ200 ng/ml)	推定値	LCI	UCI	
感度	54.76	39.71	69.81	
特異度	88.54	82.17	94.91	
PPV*	67.65	51.92	83.37	10
NPV**	81.73	74.30	89.16	
OR***	9.35	3.90	22.40	
Youden index	0.43			
<hr/>				
シスタチンC				
(カットオフ3.3 μ g/ml)	推定値	LCI	UCI	
感度	87.18	76.69	97.67	
特異度	76.40	67.58	85.23	
PPV	61.82	48.98	74.66	20
NPV	93.15	87.36	98.95	
OR	22.02	7.64	63.47	
Youden index	0.64			
<hr/>				
血清クレアチニン				
(カットオフ550 μ モル/L)	推定値	LCI	UCI	
感度	79.63	68.89	90.37	
特異度	55.56	46.88	64.23	
PPV	43.43	33.67	53.20	30
NPV	86.42	78.96	93.88	
OR	4.89	2.31	10.35	
Youden index	0.35			
<hr/>				
ACY-1 + シスタチンC				
(カットオフ確率0.2)	推定値	LCI	UCI	
感度	92.31	83.94	100	
特異度	78.65	70.14	87.16	
PPV	65.45	52.89	78.02	40
NPV	95.89	91.34	100	
OR	44.21	12.26	100	
Youden index	0.71			

* :陽性的中率

** :陰性的中率

*** :オッズ比

【表3】

表3 コホート2における第1日血清ACY-1濃度と変数との関連性(n=138第1日サンプルによる)
 移植片のタイプ:DBD:脳死後の提供、DCD:心臓死後の提供、LD:生体ドナー、CIT:冷虚血時間、WIT:温虚血時間、
 HLA:ヒト白血球抗原、「初期ステロイドの使用」:初期毎日の免疫抑制剤管理の一部として、患者が
 経口維持プレドニゾロンを受けたかどうかを示す、DGF:移植片機能発現遅延、
 生検の結果:これら患者138人の内計32人が生検を受け、及びそのため生検結果についての
 Nカテゴリーは、生検を受けなかった患者を含む。

特性	サブグループ	N	中央値(範囲)	P値*	
性別	M	90	43.4 (15.6, 7324.5)	0.1277	10
	F	48	74.5 (15.6, 7207.2)		
移植時の年齢(才)	-	138	0.30	0.0003	
移植片のタイプ	DBD	79	48.3 (15.6, 5905.3)		
	DCD	29	365.6 (29.3, 7324.5)		
	LD	30	15.6 (15.6, 156.1)	<0.0001	
CIT(分)	-	138	0.25	0.0033	
総WIT(分)	-	138	0.53	<0.0001	20
総HLAミスマッチ	0, 1 & 2	82	50.7 (15.6, 5905.3)		
	3, 4, 5 & 6	56	76.2 (15.6, 7324.5)	0.1261	
初期ステロイドの使用	Y	15	72.3 (15.6, 1094.2)		
	N	123	53.2 (15.6, 7324.5)	0.9397	
DGF	Y	42	253.7 (15.6, 7324.5)	<0.0001	30
	N	96	33.6 (15.6, 864.1)		
生検により確認された拒絶反応(AR)	Y	11	66.3 (15.6, 1094.2)		
	N	127	53.4 (15.6, 7324.5)	0.6354	
生検によって確認された急性細尿管壊死(ATN)	Y	29	143.9 (15.6, 7324.5)		
	N	109	44.0 (15.6, 1225.1)	0.0007	
生検における両ATN及びAR	Y	4	140.8 (18.8, 511.1)	0.5965	40
	N	134	53.7 (15.6, 7324.5)		
第1日の血清クレアチニン(μモル/L)	-	130	0.25	0.0050	
第1日の血清シスタチンC(μg/mL)	-	128	0.41	<0.0001	

*: 単一変数である場合、スピアマンの順位相関係数／p値、又は独立グループ2又は3を比較する場合、
 それぞれ、ウイルコクソン・マン・ホイットニー検定又はクラスカル・ウォリス検定からのp値

表4 ロジスティック回帰によって測定した、コホート2における移植片機能発現遅延に関する因子の単変量及び多変量解析

因子	レベル	单変量			多変量		
		オッズ比	95% CI	P値	オッズ比	95% CI	P値
性別							
男性	1				1		
女性	0.901	(0.456,1.780)	0.7645	0.888	(0.223,3.377)	0.8612	
移植片の年齢(才)	-	1.015	(0.992,1.039)	0.2085	1.000	(0.959,1.043)	0.9871
移植片のタイプ							
DBD	1				1		
DCD	3.066	(1.457, 6.453)	0.0032	0.730	(0.086, 6.181)	0.7724	
CIT(分)	-	1	(0.998,1.001)	0.5720	1.000	(0.997,1.003)	0.8496
総WIT(分)	-	1.040	(1.017,1.064)	0.0007	1.043	(0.991,1.097)	0.1040
総HLAミスマッチ	0,1 & 2	1			1		
3, 4, 5 & 6	2.500	(1.255,4.979)	0.0091	1.679	(0.415,6.798)	0.4676	
初期ステロイドの使用							
N	1				1		
Y	1.239	(0.424,3.618)	0.6949	2.465	(0.290, 20.99)	0.4089	

【表4-2】

第1日の血清ACY-1(増加1 μ g/mL当たり)	-	31.17	(3.400, 285.7)	0.0023	13.82	(1.321, 434.9)	0.0115
第1日の血清クレアチニン(増加1 μ モル/L当たり)	-	1.004	(1.002, 1.006)	<0.0001	1.001	(0.997, 1.004)	0.7526
第1日の血清シスタチンC(増加1 μ g/mL当たり)	-	5.536	(2.775, 11.05)	<0.0001	6.865	(2.678, 17.60)	<0.0001

移植片のタイプ:DBD-脳死後の提供、DCD-心臓死後の提供、CIT-冷虚血時間、WIT-温虚血時間、HLA-ヒト白血球抗原、「初期ステロイドの使用」は、初期毎日の免疫抑制剤管理の一部として、患者が経口維持ブレニソロンを受けたかどうかを示す。より大きい相対オッズ比のため、LRTp値がより適切である

第1日の多変量ACY-1以外の全ての変数に関するワルド検定からのp値

【0155】

3. 心臓サンプル及び肺サンプルにおける血清 A C Y - 1 レベル
 心臓又は肺移植に至る患者において、血清アミノアシラーゼ - 1 が、術後の各種の時間間隔で、多くの患者（ただし、全てではない）において上昇すること（少なくとも 3 人の患者では、レベルは、非常に顕著に上昇している）が観察された（表 5 及び 6）。これは、転帰に関する有意性はこれまで明白でなく、更なる長期間の研究を必要とするが、このような患者における有意な虚血時間により、移植組織において、虚血再灌流障害のような特定の損傷を表示できる。

【 0 1 5 6 】

【表 5】

表5

10

心臓移植		
サンプル	移植後の日数	血清A濃度 (ng/mL)
T20778	7	67.52
T20761	5	35.68
T20279	7	55.70
T19748	8	17.41
T19598	7	104.37
T19325	7	56.49
T18340	8	<7.8
T17068	7	28.38
T16946	8	104.57
T16414	8	24.58
T15575	8	>750.0
T15259	2	42.66
T14440	5	109.83

20

30

40

【 0 1 5 7 】

【表6】
表6

肺移植		
サンプル	移植後の日数	血清A濃度 (ng/mL)
T19537	2	29.03
T19134	8	46.97
T2863	4	25.77
T1659	6	<7.8
T1206	2	<7.8
Y94-00488	3	>750.0
Y92-03624	3	138.10
C60192	3	336.84
Y93-02141	7	44.29

【0158】

【表7】

[別表1] ACY-1が対照ロジスティック回帰モデルに付加される場合、モデル改良測定基準に関する要約統計量
測定基準:事象、すなわち、DGFを有する患者及び有さない患者に関する適合の良好性、カテゴリーフリーの
総再分類改善度(NRI)及び統合判別改善度(IDI)のデビアンス系検定 IS及びIPは、一体化された感度
及び1-特異度である AUCは、受信者動作特性曲線下の面積であり、曲線を比較するために、
DeLong検定を使用する。ポートストラップサンプル2000個を使用捨て全てのCIsを測定した

合計(n)	95	
事象(n)	38	
非一事象(n)	57	10
適合の良好性		
適合の良好性(ヌルモデルP)	0.7648	
適合の良好性(altモデルP)	0.8828	
NRI及び要約統計量		
NRI事象	-0.3158 (-0.6236, -0.008)	
NRI非一事象	0.4737 (0.2451, 0.7022)	
NRI	0.1579 (-0.2237, 0.5395)	20
IDI及び要約統計量		
IDI事象	0.0294 (-0.0183, 0.0772)	
IDI非一事象	0.0196 (0.0037, 0.0355)	
IDI	0.0098 (-0.0407, 0.0604)	
IS(ヌルモデル)	0.6778 (0.5899, 0.7657)	
IS(altモデル)	0.7055 (0.6180, 0.7930)	
IP(ヌルモデル)	0.2072 (0.1504, 0.2641)	30
IP(altモデル)	0.1884 (0.1311, 0.2458)	
AUC		
AUC(ヌルモデル)	0.8984 (0.8375, 0.9594)	
AUC(altモデル)	0.9109 (0.8544, 0.9674)	
差異(P)	0.3450	

【表8】

[別表2] コホート1におけるDGFを有する患者における第1日の血清ACY-1濃度に対する移植片回帰を分類する分割表

コホート1におけるDGFを有する患者15人について、移植片生着不全及び透析への戻りの事象はこれまで生じなかったが、患者3人については、eGFRが10.8、16.1及び13.6であり、移植片の不全を生じつつあることが明らかになり。その内の2人については、二次移植を準備しつつある。これらを乏しい転帰グループと定義し、コホートにおける残りの患者については、全員が、最も遅い測定においてeGFR > 30を有し、良好は転帰として分類した。転帰及び第1～3日内のピークACY-1測定値によって患者を分類する分割表を示す。ただし、患者の1人は第1～3日内にACY-1の測定値がなかったため、患者14人のみが含まれることに注意。フィッシャー直接検定は、ACY-1濃度と転帰との間における有意な関連性の証拠がないことを示唆している($p=0.506$)。しかし、ACY-1 ≥ 200 である場合、乏しい転帰を有するオッズは1/8であり、一方、ACY-1 < 200である場合、乏しい転帰のオッズは2/3である。これは、(無条件のMLE)オッズ比2/16と同等である。しかし、小さいサンプルサイズでは、条件付きMLEがより好適であり、0.215と算定される(95%CI 0.003～5.545)。これは、このデータが、コホート2において見られるものに類似する転帰と関連性を示し、有意なテスト結果の欠乏は、恐らく、小さいサンプルにおける低い力及び経過観察時間の限られた量との組み合わせによるものである。

10

	良好な転帰	乏しい転帰
ACY-1 < 200	3	2
ACY-1 ≥ 200	8	1

【0160】

参考文献

1. Port, F. K., Wolfe, R. A., Mauger, E. A., Berlin, D. P. & Jiang, K, 「透析患者対死体腎移植の被移植者の生存確率の比較」 JAMA. 270, 1339-1343 (1993) 20
2. Wolfe, R. A. ら, 「全透析患者における、移植待機透析患者と初回死体腎移植の被移植者との生存確率の比較」 N. Engl. J. Med. 341, 1725-1730 (1999)
3. de Wit, G. A., Ramsteijn, P. G. および de Charro, F. T., 「末期腎疾患治療の経済的評価」 Health Policy 44, 215-232 (1998)
4. Kontodimopoulos, N. 及び Niakas, D., 「患者の平均余命に基づく移植治療における生涯コストとQALYsの見積もり」 Health Policy 86, 85-96 (2008) 30
5. Tapiawala, S. N. ら, 「移植片機能発現遅延及び移植腎が機能したままの死亡のリスク」 J. Am. Soc. Nephrol. 21, 153-161 (2010)
6. Akkina, S. K. ら, 「様々な速度の移植片機能発現遅延を伴う同様の成績が、センター・パフォーマンスを反映する、センター・パフォーマンスを反映しない」 Am. J. Transplant. 9, 1460-1466 (2009)
7. Roels, L. ら, 「ヒスチジン-トリプトファン-ケトグルタル酸溶液中に24時間以上保存した死体腎の成績不良」 ルーベン学際的移植グループ Transplantation 66, 1660-1664 (1998) 40
8. Chang, S. H., Russ, G. R., Chadban, S. J., Campbell, S. B. 及び McDonald, S. P., 「オーストラリア及びニュージーランドにおける腎移植の動向 1993-2004」 Transplantation 84, 611-618 (2007)
9. Siedlecki, A., Irish, W. & Brennan, D. C., 「腎臓移植における移植片機能発現遅延」 Am. J. Transplant. 11, 2279-2296 (2011)。
10. Keitel, E. ら, 「拡大された死体ドナー基準を用いた腎移植」 Ann. Transplant. 9, 23-24 (2004)
11. Halloran, P. F. ら, 「移植片生着の主要な相関として早期機能発現 抗 50

リンパ球グロブリン及びシクロスボリンを組み込んだプロトコルで処理された200の死体腎移植患者の多变量解析」 *Transplantation* 46, 223-228 (1988)

12. Snyder, J. J., Kasiske, B. L., Gilbertson, D. T. & Collins, A. J., 「腹膜及び血液透析患者における移植成績の比較」 *Kidney Int.* 62, 1423-1430 (2002)

13. Sola, R., Alarcon, A., Jimenez, C. 及びOsuna, A. , 「移植片機能発現遅延の影響」 *Nephrol. Dial. Transplant.* 19 Suppl 3, iii 32-37 (2004)

14. Yarlagadda, S. G., Coca, S. G., Formica, R. N., Jr., Poggio, E. D. 及びParikh, C. R., 「移植片機能発現遅延及び同種移植及び患者生存率の関連づけ：系統的レビューとメタアナリシス」 *Nephrol. Dial. Transplant.* 24, 1039-1047 (2009) 10

15. Mühlberger, I., Perco, P., Fechete, R., Mayer, B. 及びOberbauer, R., 「腎移植の虚血再灌流障害におけるバイオマーカー」 *Transplantation* 88, S14-19 (2009)

16. Smith, M. P., Banks, R. E., Wood, S. L., Lewington, A. J. 及びSelby, P. J., 「腎疾患の研究へのプロテオーム解析の応用」 *Nat. Rev. Nephrol.* 5, 701-712 (2009)。

17. Hall, I. E. ら, 「IL-18 及び尿中NGALは、透析及び腎移植後の移植片の回復を予測する」 *J. Am. Soc. Nephrol.* 21, 189-197 (2010) 20

18. Schwarz, C ら, 「早期同種移植臓器機能低下に対するドナー腎生検における接着分子発現の寄与」 *Transplantation* 71, 1666-1670 (2001)

19. Hall, I. E., Doshi, M. D., Poggio, E. D. 及びParikh, C. R., 「腎移植後の同種移植片の機能を予測するためのクレアチニンと代替血清バイオマーカーとの比較」 *Transplantation* 91, 48-56 (2011)

20. Anderson, N. L. 及びAnderson, N. G., 「ヒト血漿プロテオーム：歴史、性質、及び診断の展望」 *Mol. Cell. Proteomics* 1, 845-867 (2002) 30

21. Smith, M. P. ら, 「トップダウンプロテオーム解析及びボトムアッププロテオーム解析におけるカバレッジの深さ及び他の重要な側面の観点からの、血清免疫除去の程度を増加させる効果の体系的な分析」 *Proteomics Clin. Appl.* 5, 561 (2011)

22. Cook, R. M., Burke, B. J., Buchhagen, D. L., Minna, J. D. 及びMiller, Y. E., 「ヒトアミノアシラーゼ1 小細胞肺癌において不活性化された染色体3p21遺伝子のクローニング、配列、及び発現解析」 *J. Biol. Chem.* 268, 17010-17017 (1993) 40

23. Perrier, J., Durand, A., Giardina, T. 及びPuigserver, A., 「細胞内N末端アセチル化タンパク質の異化：アシルペプチド加水分解酵素及びアシラーゼの関与」 *Biochimie* 87, 673-685 (2005)

24. Lindner, H. ら, 「哺乳動物種におけるアミノアシラーゼIの分布及びブタ腎臓における当該酵素の局在化」 *Biochimie* 82, 129-137 (2000)

25. Sass, J. O. ら, 「アミノアシラーゼ1をコードする遺伝子、ACY1の変異は、代謝の新規先天異常を引き起こす」 *Am. J. Hum. Genet.* 78, 401-409 (2006) 50

26. Yamauchi, A.ら, 「N-アセチル-L-システインの脱アセチル化における、組織分布及び種の相違並びにアシラーゼ1の靈長類の腎臓における免疫組織化学的局在化」 *J. Pharmacy Pharmacol.* 54, 205-212 (2002)
27. Miller, Y. E. 及び Kao, B, 「ヒトアミノアシラーゼ1のためのモノクローナル抗体に基づくイムノアッセイ」 *J. Immunoassay* 10, 129-152 (1989)
28. Lindner, H. A., Tafler-Naumann, M. 及び Rohm, K. H, 「腎臓アミノアシラーゼによるN-アセチルアミノ酸の利用」 *Biochimie* 90, 773-780 (2008)
29. Sommer, A.ら, 「アミノアシラーゼ1欠損症の分子学的基礎」 *Biochim. Biophys. Acta* 1812, 685-690 (2011) 10
30. Zhong, Y.ら, 「ゲノムワイドな解析によって、鉄により誘発されたラット腎細胞癌におけるアミノアシラーゼ1の腫瘍抑制遺伝子の役割を同定する」 *Carcinogenesis* 30, 158-164 (2009)
31. Miller, Y. E., Minna, J. D. 及び Gazdar, A. F., 「肺小細胞癌におけるアミノアシラーゼ1の発現の欠損 クロモソーム3pによってコードされる遺伝子の不活性化の証拠」 *J. Clin. Invest.* 83, 2120-2124 (1989)
32. Abu Jawdeh, B. G. 及び Rabb, H., 「同種移植片機能発現遅延-急性腎臓損傷に関して何を知らせているか?」 *Contrib. Nephrol.* 174, 173-181 (2011) 20
33. Klawitter, J. ら, 「尿代謝物パターンの変化とラットの腎臓において免疫抑制剤により誘導されるタンパク質の変化との関連: プロテオメタボローム研究」 *J. Proteome Res.* 9, 865-875 (2010)
34. Asif, A. R. ら, 「ミコフェノール酸モフェチルを投与したラットからの腎臓組織におけるミコフェノール酸のアシルグルクロニド代謝産物の標的として同定されたタンパク質」 *Biochimie* 89, 393-402 (2007)
35. Kotsch, K. ら, 「ゼロ時間腎生検における新規マーカーは、移植片の質と臨床転帰を示す」 *Transplantation* 90, 958-965 (2010)
36. Dikow R, Becker L E, Schaeier M ら, 「移植片機能発現遅延の腎移植患者において、ケモカイン及びケモカイン受容体の発現は、長期的な同種移植片機能発現を予測する」 *Transplantation* 2010; 90: 771-776 30
37. Halawa, A. ら, 「急性腎移植片機能不全の早期診断: 私たちが直面する課題 新規なバイオマーカーの役割」 *Ann. Transplant.* 16, 90-98 (2011)
38. Malyaszko, J. ら, 「様々な臨床設定における急性腎障害のバイオマーカー: パラダイムを変更する時が来た?」 *Kidney and Blood Pressure Research* 33, 368-382 (2010)
39. Schroppel, B. ら, 「KIM-1の管状の発現は、移植後機能発現遅延を予測するものではない」 *J. Am. Soc. Nephrol.* 21, 536-542 (2010) 40
40. Parikh, C. R. ら, 「尿N G A L 及び I L - 18 は、腎臓移植後の移植片機能発現遅延の予測バイオマーカーである」 *Am. J. Transplant.* 6, 1639-1645 (2006)
41. Hollmen, M. E., Kyllonen, L. E., Inkinen, K. A. , Lallala, M. L. 及び Saalmeila, K. T, 「尿中好中球ゼラチナーゼ関連リポカリンは、腎移植後の移植片回復のマーカーである」 *Kidney Int.* 79, 89-98 (2011)
42. Zhang, Z. , Lu, B. , Sheng, X. 及び Jin, N. , 「急性腎障害 50

- の予測におけるシスタチンC：体系的レビューとメタ分析」 Am. J. Kidney Dis. 58, 356-365 (2011)
43. Supavekin, S. ら, 「早期腎虚血/再灌流後の差次遺伝子発現」 Kidney Int. 63, 1714-1724 (2003)
44. Park SW, Kim M, Kim M ら, 「スフィンゴシンキナーゼ1は、スフィンゴシン-1-リン酸1受容体の活性化によって、マウスの腎虚血/再灌流傷害から保護する」 Kidney Int 2011; 2011: 1315-1327
45. Bajwa A, Jo SK, Ye H ら, 「近位尿細管におけるスフィンゴシン-1-リン酸1受容体の活性化が虚血/再灌流傷害から保護する」 J. Am. Soc. Nephrol 2010; 21: 955-965 10
46. Sola A, Weigert A, Jung M ら, 「スフィンゴシン-1-リン酸のシグナル伝達は、腎臓の再生を促進するマクロファージによるLCN-2の産生を誘導する」 Journal of Pathology 2011; 225: 597-608
47. Mas, V. R. ら, 「移植前トランスクリプトームプロファイルが、移植片機能発現遅延を起こした腎臓の中で品質が低下した転帰不良の腎臓を識別する」 Mol. Med. 17, 1311-1322 (2011)
48. Maceyka, M., Nava, V. E., Milstien, S. 及びSpiegel, S. ら, 「アミノアシラーゼ1はスフィンゴシンキナーゼ1相互作用タンパク質である」 EBS Lett. 568, 30-34 (2004) 20
49. Ziolkowski, P., Gamiak, E., Osiecka, B., Zougman, A. 及びWisniewski, J. R. ら, 「核ユビキタスカゼイン及びサイクリン依存性キナーゼ基質の、乳房の浸潤性乳管癌における免疫組織化学的及びプロテオミクス評価」 J. Biomed. Biotechnol. 2009, 919645 (2009)
50. Zougman, A., Ziolkowski, P., Mann, M. 及びWisniewski, J. R. ら, 「ヒトにおける挿入RNAの編集の証拠」 Curr. Biol. 18, 1760-1765 (2008)。
51. Cox, J. ら, 「SILACに基づく定量プロテオミクス用MaxQuant計算プラットフォームへの実用的なガイド」 Nat. Protoc. 4, 698-705 (2009) 30
52. Cox, J. ら, 「Andromeda: MaxQuant 環境に統合されたペプチド検索エンジン」 J. Proteome Res. 10, 1794-1805 (2011)
53. Storey, J. D. ら, 「偽発見率に対する直接的アプローチ」 J. Royal Stats. Soc. Series B - Stat. Methodol. 64, 479-498 (2002)
54. Robin, X. ら, 「pROC: ROC曲線を分析し、比較する、RとS+のためのオープンソースパッケージ」 BMC Bioinformatics 12, 77 (2011) 40
55. Johnston, O. ら, 「低減された移植片機能発現遅延(透析の有無にかかわらず) vs 即時の移植片機能発現 - 長期間同種移植片生着の比較」 Nephrol. Dial. Transplant. 21, 2270-2274 (2006)
56. Youden, W. J. ら, 「評価診断テストのための指針」 Cancer 3, 32-35 (1950)
57. Le Dinh H, Weekers L, Bonvoisin C ら, 「移植片機能発現遅延は、腎臓移植における心臓死後の臓器提供を害するものではない」 Transplantation Proceedings 2012; 44: 2795-2802
58. Nagaraja P, Roberts GW, Stephens M ら「心臓死後 50

のドナーからの腎臓移植後の転帰における移植片機能発現遅延及び急性拒絶反応の影響」

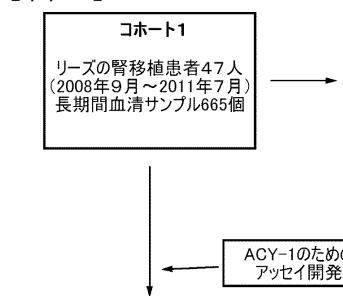
Transplantation 2012; 94: 1218 - 1223

59. Singh RP, Farney AC, Rogers Jら, 「心臓死後の臓器提供からの腎臓移植: 移植後の転帰における移植片機能発現遅延の影響の欠如」 Clinical Transplantation 2011; 25: 255 - 264

60. Brook NR, White SA, Waller JRら, 「移植片機能発現遅延を伴う心停止ドナーの腎臓は、移植片機能発現遅延を発現する従来の生体ドナーの腎臓と比較して優れた移植片生着率を有する」 Am. J. Transplant 2003; 3: 614 - 618

61. Kusaka M, Pratschke J, Wilhelm MJら, 「ドナー脳死によるラット腎臓の同系移植片における炎症性メディエーターの活性化」 Transplantation 2000; 69: 405 - 410 10

【図1】



血清クレアチニン及びシタチント
比較するDGFについての臨床関連
及び予測的有用性の初期検証、
長期プロファイルリング及び探索分析

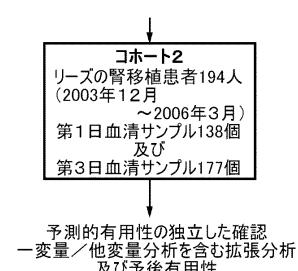


図1

【図2】

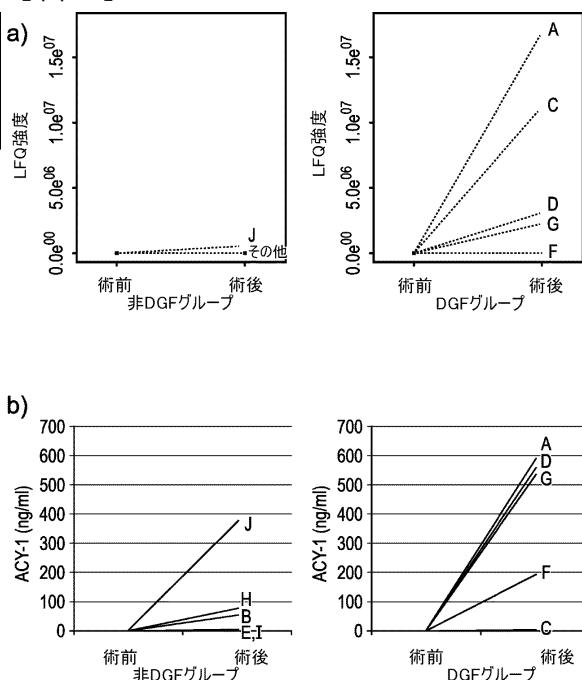
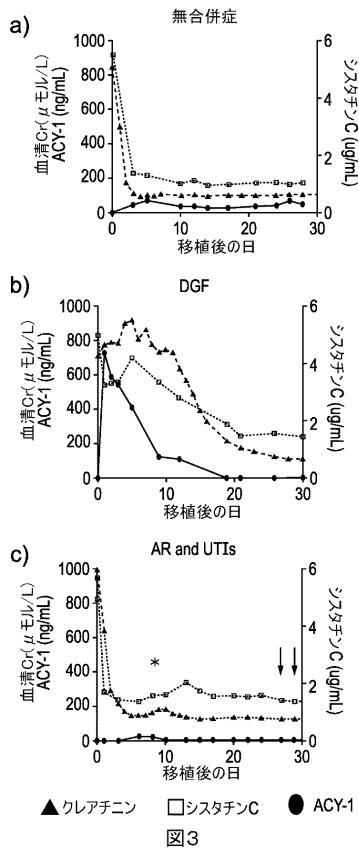
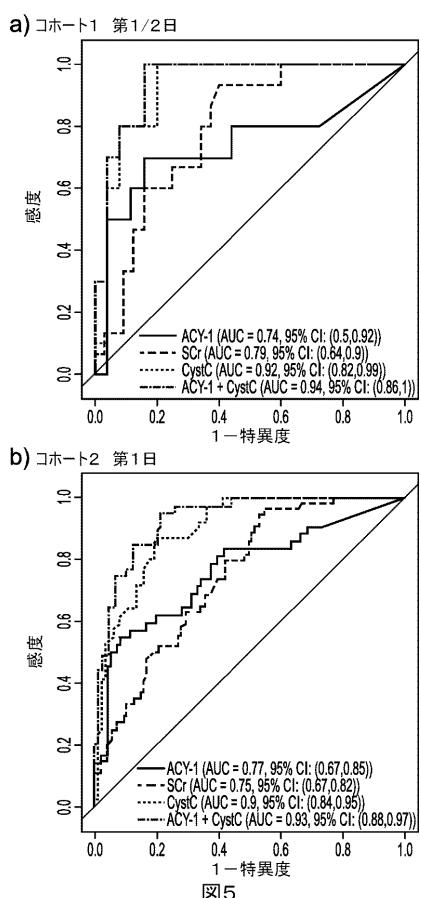


図2

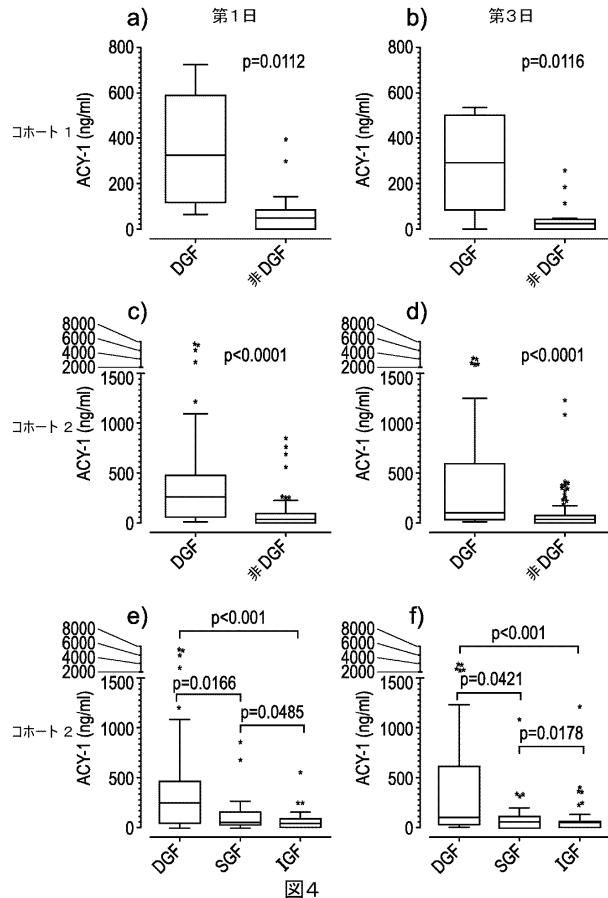
〔 四 3 〕



〔図 5〕



【圖 4】



【図 6 - 1】

6

【図 6 - 2】

図6(続き)

【図 6 - 4】

4921 ccccttgac tctgaaaacc tgtaactgg a gtatcca ct agtctg agag gtc tggggga
4981 gccatctg a ggaaggggca ctgggctag gatctg aagg atggac agga ggt aatgtaga
5041 cggagggttgg gaaggttcca gacccatggac atttggggg ctgaaaggagg accttggct
5101 ggactgcttca cccagatgtc tgggttaggt aaggagttggg ggttggggagg tttttatgtac
5161 taggcacagc ccactctatg ggaaataggg caagatgccc agggccatgt cctgatcttgc
5221 ccattcttcc tgccttc tggatgtc accccaaatg gacacccatct gatgactcaa
5281 acccttggtt ggcagctttt agccgggttca gcaaggatat gtgagcacgc tggccagctc
5341 tccctcacagc ccaggccctt ac tcccttcc ttcctgtcgc cccctccctt ctcccttcc
5401 ctccccatc ttccccatc tcccttgccc ctcaaaatct tccgttcc tccctccatt
5461 catcaggatc ttcttccatc aggaacatca ctctggagcc tgagatcatg cctgtgc
5521 ctgacaaccg ctatatccgc ggggtgagcc acttgcataat agtgcctggg cagtggactg
5581 ggccgttggg ctggccccc cttaacggctt ctcccttacc cctgtggatgg ggggtccca
5641 ctcttaggtt ctcacccatg aaccgcacac ctgtgtctgc gcacgaccac gatgaacggc
5701 tgcatgggc tggatgttcc ctgggggtgg acatataatac acgcctgtc cttgtcccttgc
5761 ccagtgtggc tggatgttcc agtgcacatgc gggccctggaa acgttccaaac cttgtcccttgc
5821 ggggttcca tcccaaccatc tgccaaaggac ctcccttcc ccctccaaa taataaaatgc
5881 tatggacagg gctgttctgt aatgtactaa cacaaggaca

図6(続き)

〔 図 6 - 3 〕

3241 aatggcgcgc caggcaggga gltagggact gctatgggg actgagctgc tccacccct
3301 gaacccctt tcccttcata ggcatacgcca atcccaacta tgccctact gcitttata
3361 gtgagcggag tccctgggtl aaglatgagc ttggaggagg ggctactctt acaggcggga
3421 ggctaggcca gaaaggccac ggtccatgc agggttgcac agcaaaatgg aggccttgaa
3481 aggccttga cccaggccctt claccccttca gcttcttccatc tgagctt cttctggggc
3541 aagcccttga tggccagaaaa ccacgtgtat gctacggggcc ctgtatgggg acaggaccc
3601 gccagaggag ctggaaatga gggggagaccc ttggggccacc ccaggctgtat tggtctcca
3661 gcccccttccatc ctggaaagacat tgcccttccatc ccaccccttcc aggggggtcc gggtttttccatgg
3721 cactggggagg ccaggccatgt ctccacgtt catggggac acacggcggc agaaatgtgg
3781 acgtggcacc ccaggaggga gtcgtggggat tcaggaggctt ctatccgtt gccaactgttcc
3841 catttaaacctt catatccatca tagccaaagg ttgtttaaaatc catccgttccatccggggaaa
3901 aggaatggca gagggtgggg agccgtgggg gcagtggggat ggctctggggaa ggccgtttcc
3961 cagaggatag agtctgtggcc acccttttta tctgttgcgtt ccgttacccctt gccccccacac
4021 cacaggctgttcc agtccaaaccc ccacccgtt ggggggttccatccgtt gaaatctgtt
4081 aagcttaggg ttggccgttccatccgtt ataccatccatc ccatggggccatccgtt
4141 ttccgttggg caccggatgtt ggacttcaag gtggccatccatc caccctgggtt tggtgggggg
4201 atccctgggttccatccgtt cccttggggccatccgtt gggggggccatccgtt
4261 cccttccatccgtt aggttttttttggggatgttccatccgtt gggggggccatccgtt
4321 gtccatccgtt agttttgttccatccgtt gggggatgttccatccgtt gggggggccatccgtt
4381 gggggggccatccgtt cccttggggccatccgtt gggggggccatccgtt
4441 cattttttttccatccgtt cccttggggccatccgtt gggggggccatccgtt
4501 ttggggatgttccatccgtt gggggggccatccgtt gggggggccatccgtt
4561 gaaacccgggaa gatataaaatc aaacatttat gatataatccatccgtt gggggggccatccgtt
4621 ctccgttccatccgtt cccttggggccatccgtt gggggggccatccgtt
4681 caagcaatccatccgtt cccttggggccatccgtt gggggggccatccgtt
4741 cccatccgtt cccttggggccatccgtt gggggggccatccgtt
4801 tccatccgtt cccttggggccatccgtt gggggggccatccgtt
4861 ocatatccgtt cccttggggccatccgtt gggggggccatccgtt

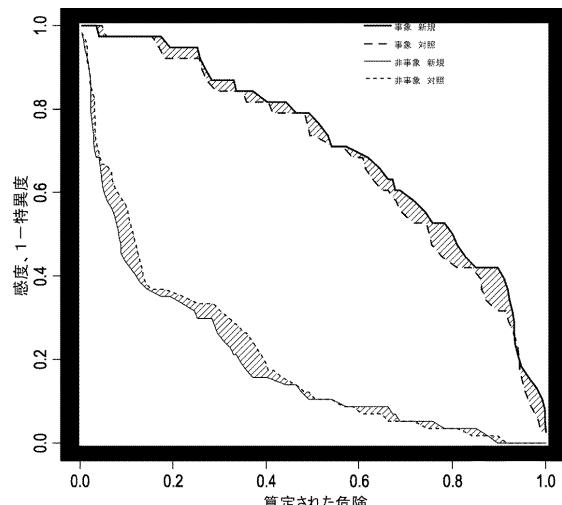
図6(続き)

【 义 7 】

SEQ ID NO:2
MTSKQCPPEEEH PSVTLFRQYL RIRTVPQKPD YGAAVAFEE TAROLCLGCQ KVEVAPCYVV
TTLTLPWQH TLSSLLNLSH TDVVPVQKPD DSEGYIYARG KQWVQHCVS1Q
YLEAVRRVKY EGHFRPRTIY MVTDPDEEVG GHQCMELFVQ PFERHALARQ FALDEGIANI
TDAFTVYFSE RSPMVWRVTS TGRPHGASRF MEDIAAELKH KVUNSLILAFR EKEWQRQLSQ
PLHKGCVTSV VNLTKLEGGV AYNVIPATMS ASFDFRVAPD VDFKAFFELQ QSWQOAAGRQ
VTLFEAKPQH HPOVPTTDS NWWAAEFSRVY DMGNDLTLER EIPIAATDNR YIRAVGVPAL
GESPBMNTPYQH LIHDFDEELPQF EPLAEGLVDQY TMBLPLALAS VVAPLPSDS

図7

【 四 8 】



8

【図9】

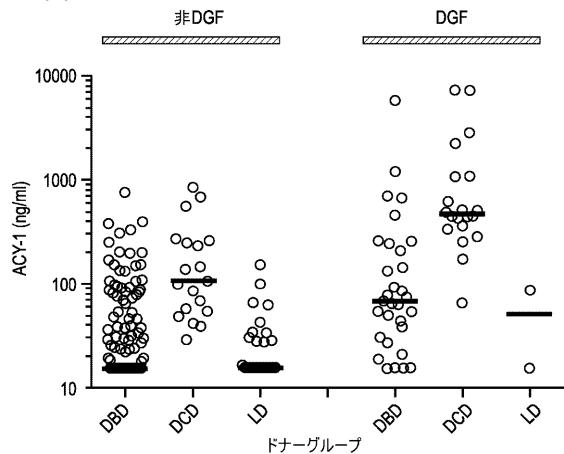


図9

【図10】

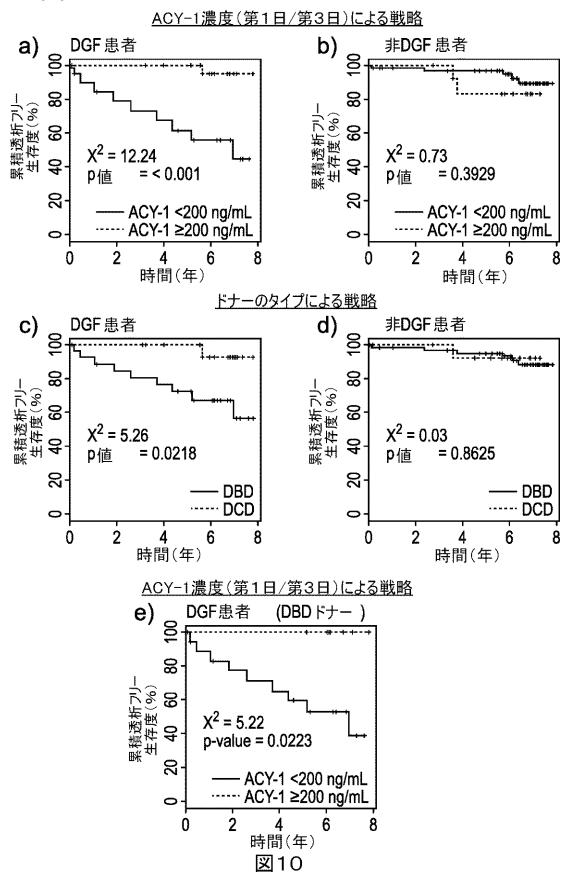


図10

【配列表】

0006285972000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 マシュー ピーター ウェルベリー スミス
イギリス国 エルエス9 7ティーエフ ヨークシャー リーズ ベケット ストリート セント
ジェームズ ユニバーシティ ホスピタル リンカーン ウイング デパートメント オブ リ
ナル メディスン

(72)発明者 ピーター ジョン セルビー
イギリス国 エルエス9 7ティーエフ ヨークシャー リーズ セント ジェームズ ユニバー
シティ ホスピタル キャンサー リサーチ ビルディング

(72)発明者 アンドリュー ルイントン
イギリス国 エルエス9 7ティーエフ ヨークシャー リーズ ベケット ストリート セント
ジェームズ ユニバーシティ ホスピタル リンカーン ウイング デパートメント オブ リ
ナル メディスン

審査官 黒田 浩一

(56)参考文献 国際公開第2004/074815 (WO, A1)
国際公開第2008/032868 (WO, A1)
特開平04-330279 (JP, A)
特表2011-527429 (JP, A)
KUSAKA, M et al., Up-Regulation of Osteopontin, Chemokines, Adhesion Molecule, and Hea
t Shock Proteins in 1-Hour Biopsy From Cardiac Death Donor Kidneys, Transplantation Pr
oceedings, 2005年, Vol. 38, No. 10, pp. 3347-3350

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 01 N 33/48 - 33/98
Caplus、WPIIDS、MEDLINE、BIOSIS、EMBASE(STN)