(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2009-168819
(P2009-168819A)
(43)公開日　平成21年7月30日(2009.7.30)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	ZNAD	2G045
G01N 33/50	(2006.01)	G01N	33/50	T	4B024
G01N 33/543	(2006.01)	G01N	33/543	545A	4C084
G01N 33/577	(2006.01)	G01N	33/577	B	4H045
C12N 15/02	(2006.01)	C12N	15/00	C	

審査請求 有　請求項の数 11　ＯＬ　（全 27 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2009-8028(P2009-8028)
(22)出願日　平成21年1月16日(2009.1.16)
(31)優先権主張番号　10-2008-0005162
(32)優先日　平成20年1月17日(2008.1.17)
(33)優先権主張国　韓国(KR)

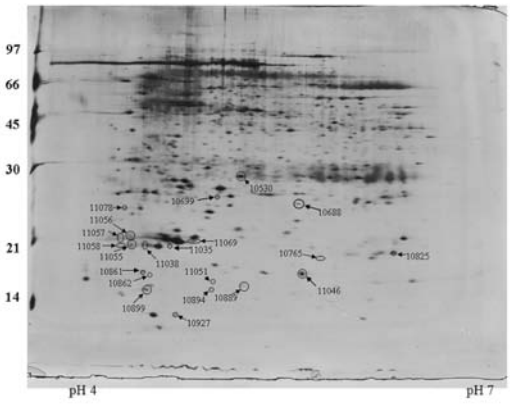
（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＷＩＮＤＯＷＳ

(71)出願人　509017561
コリア　ユニバーシティ　リサーチ　アンド　ビジネス　ファウンデーション
大韓民国　１３６－７１３　ソウル，ソンブッ－ク，アナム－ドン，コリア　ユニバーシティ，インダストリアル　アンド　アカデミック　コラボレーション　ビルディング　１階
(74)代理人　100077931
弁理士　前田　弘
(74)代理人　100110939
弁理士　竹内　宏
(74)代理人　100110940
弁理士　嶋田　高久

最終頁に続く

(54)【発明の名称】糖尿病性網膜症診断用のバイオマーカー

(57)【要約】
【課題】糖尿病性網膜症の早期診断用のバイオマーカーを提供する。
【解決手段】本発明は、特定タンパク質の糖尿病性網膜症診断用バイオマーカーとしての用途に関し、具体的に、糖尿病患者よりも糖尿病性網膜症患者の涙液からその発現量が減少又は増加するタンパク質の糖尿病性網膜症診断用バイオマーカーとしての用途並びに前記タンパク質に対する抗体を含む糖尿病性網膜症の診断キット用組成物及びキットに関する。
【選択図】図1c



【特許請求の範囲】
【請求項１】
下記タンパク質よりなる群から選ばれたタンパク質又はその免疫原性断片の糖尿病性網膜症診断用バイオマーカーとしての用途：
配列番号1及び2のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、24-26 kDaの分子量及び5.83-6.83のpIを有するDJ-1タンパク質(DJ-1 protein)、
配列番号3及び4のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、15-17 kDaの分子量及び5.27-6.27のpIを有するベータ2-マイクログロブリン(beta 2-microglobulin, B2M)、
配列番号5及び6のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、27-29 kDaの分子量及び6.5-7.5のpIを有するエンベロープタンパク質(envelope protein)、
配列番号7のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、19-21 kDaの分子量及び4.24-5.24のpIを有するタンパク質SAP1(protein SAP1)、
配列番号8のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、20-23 kDaの分子量及び4.13-5.43のpIを有するリポカリン1-ライク1(lipocalin 1-like 1)、
配列番号8のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、20-22 kDaの分子量及び4.3-5.3のpIを有するリポカリン(lipocalin(hCG201503), LCN-1)、
配列番号9, 10, 11, 12, 13及び14のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、20-22 kDaの分子量及び4.64-5.64のpIを有するサイトケラチン4(cytokeratin4)、
配列番号15のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、21-23 kDaの分子量及び6.01-7.01のpIを有するS100カルシウム結合タンパク質A8(S100 calcium-binding protein A8)、
配列番号8のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、21-23 kDaの分子量及び4.89-5.89のpIを有するリポカリン1の前駆体(lipocalin 1 precursor)、
配列番号16及び17のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、27-29 kDaの分子量及び4.34-5.34のpIを有するケラチン31(keratin 31)、
配列番号18, 19及び20のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、30-32 kDaの分子量及び7.53-8.53のpIを有する熱ショックタンパク質(heart shock protein 27, Hsp27)、
配列番号21のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、19-21 kDaの分子量及び5.28-6.28のpIを有するアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼアイソフォーム(adenine phosphoribosyltransferase isoform)、
配列番号22のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、19-22 kDaの分子量及び4.70-5.80のpIを有するリン酸化ヒスチジンリン酸加水分解酵素(phosphohistidine phosphatase)、
配列番号23, 24及び25のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、18-21 kDaの分子量及び5.96-6.96のpIを有するベータグロビン(beta globin)、
配列番号26及び27のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、18-20 kDaの分子量及び6.5-7.5のpIを有するリゾチーム前駆体(Lysozyme precursor)、
配列番号28, 29及び30のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、14-16 kDaの分子量及び5.21-6.21のpIを有するS100カルシウム結合タンパク質A9(S100 calcium-binding protein A9)、
配列番号31のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、13-15 kDaの分子量及び5.21-6.21のpIを有するクリスタル構造のカルプロテクチン(Crystal Structure Of Human Calprotectin)、及び
配列番号32のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、11-13 kDaの分子量及び6.28-7.28のpIを有するS100カルシウム結合タンパク質A4(S100 calcium-binding protein A4)。
【請求項２】
請求項1に記載の用途において、
前記タンパク質が、糖尿病患者の涙液よりも糖尿病性網膜症患者の涙液の方が発現が相

対的に増加する、DJ-1タンパク質及びベータ2-マイクログロブリン(B2M)よりなる群から選ばれたタンパク質である、用途。

【請求項３】

請求項1に記載の用途において、

前記タンパク質が、糖尿病患者の涙液よりも糖尿病性網膜症患者の涙液の方が発現が相対的に減少する、エンベロープタンパク質、SAP1、リポカリン1-ライク1、リポカリン(hCG201503)，LCN-1)、サイトケラチン4、S100カルシウム結合タンパク質A8、リポカリン1の前駆体、ケラチン31、熱ショックタンパク質(Hsp27)、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼアイソフォーム、リン酸化ヒスチジンリン酸加水分解酵素、ベータグロビン、リゾチーム前駆体、S100カルシウム結合タンパク質A9、クリスタル構造のカルプロテクチン、及びS100カルシウム結合タンパク質A4よりなる群から選ばれたタンパク質である、用途。

【請求項４】

下記タンパク質よりなる群から選ばれたタンパク質又はその免疫原性断片に特異的な抗体を有効成分として含んでいる、糖尿病性網膜症診断用の組成物：

配列番号1及び2のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、24-26 kDaの分子量及び5.83-6.83のpIを有するDJ-1タンパク質、

配列番号3及び4のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、15-17 kDaの分子量及び5.27-6.27のpIを有するベータ2-マイクログロブリン(B2M)、

配列番号5及び6のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、27-29 kDaの分子量及び6.5-7.5のpIを有するエンベロープタンパク質、

配列番号7のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、19-21 kDaの分子量及び4.24-5.24のpIを有するタンパク質SAP1、

配列番号8のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、20-23 kDaの分子量及び4.13-5.43のpIを有するリポカリン1-ライク1、

配列番号8のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、20-22 kDaの分子量及び4.3-5.3のpIを有するリポカリン(LCN-1)、

配列番号9，10，11，12，13及び14のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、20-22 kDaの分子量及び4.64-5.64のpIを有するサイトケラチン4、

配列番号15のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、21-23 kDaの分子量及び6.01-7.01のpIを有するS100カルシウム結合タンパク質A8、

配列番号8のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、21-23 kDaの分子量及び4.89-5.89のpIを有するリポカリン1の前駆体、

配列番号16及び17のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、27-29 kDaの分子量及び4.34-5.34のpIを有するケラチン31、

配列番号18，19及び20のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、30-32 kDaの分子量及び7.53-8.53のpIを有する熱ショックタンパク質(Hsp27)、

配列番号21のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、19-21 kDaの分子量及び5.28-6.28のpIを有するアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼアイソフォーム、

配列番号22のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、19-22 kDaの分子量及び4.70-5.80のpIを有するリン酸化ヒスチジンリン酸加水分解酵素、

配列番号23，24及び25のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、18-21 kDaの分子量及び5.96-6.96のpIを有するベータグロビン、

配列番号26及び27のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、18-20 kDaの分子量及び6.5-7.5のpIを有するリゾチーム前駆体、

配列番号28，29及び30のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、14-16 kDaの分子量及び5.21-6.21のpIを有するS100カルシウム結合タンパク質A9、

配列番号31のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、13-15 kDaの分子量及び5.21-6.21のpIを有するクリスタル構造のカルプロテクチン、及び

配列番号32のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、11-13 kDaの分子量及び6

.28-7.28のpIを有するS100カルシウム結合タンパク質A4。
【請求項５】
請求項4に記載の糖尿病性網膜症診断用の組成物において、
前記抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする、糖尿病性網膜症診断用の組成物。
【請求項６】
下記タンパク質よりなる群から選ばれたタンパク質又はその免疫原性断片に特異的な抗体を有効成分として含む、糖尿病性網膜症の診断キット：
配列番号1及び2のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、24-26 kDaの分子量及び5.83-6.83のpIを有するDJ-1タンパク質、
配列番号3及び4のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、15-17 kDaの分子量及び5.27-6.27のpIを有するベータ2-マイクログロブリン(B2M)、
配列番号5及び6のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、27-29 kDaの分子量及び6.5-7.5のpIを有するエンベロープタンパク質、
配列番号7のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、19-21 kDaの分子量及び4.24-5.24のpIを有するタンパク質SAP1、
配列番号8のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、20-23 kDaの分子量及び4.13-5.43のpIを有するリポカリン1-ライク1、
配列番号8のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、20-22 kDaの分子量及び4.3-5.3のpIを有するリポカリン(LCN-1)、
配列番号9，10，11，12，13及び14のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、20-22 kDaの分子量及び4.64-5.64のpIを有するサイトケラチン4、
配列番号15のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、21-23 kDaの分子量及び6.01-7.01のpIを有するS100カルシウム結合タンパク質A8、
配列番号8のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、21-23 kDaの分子量及び4.89-5.89のpIを有するリポカリン1の前駆体、
配列番号16及び17のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、27-29 kDaの分子量及び4.34-5.34のpIを有するケラチン31、
配列番号18，19及び20のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、30-32 kDaの分子量及び7.53-8.53のpIを有する熱ショックタンパク質(Hsp27)、
配列番号21のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、19-21 kDaの分子量及び5.28-6.28のpIを有するアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼアイソフォーム、
配列番号22のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、19-22 kDaの分子量及び4.70-5.80のpIを有するリン酸化ヒスチジンリン酸加水分解酵素、
配列番号23，24及び25のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、18-21 kDaの分子量及び5.96-6.96のpIを有するベータグロビン、
配列番号26及び27のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、18-20 kDaの分子量及び6.5-7.5のpIを有するリゾチーム前駆体、
配列番号28，29及び30のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、14-16 kDaの分子量及び5.21-6.21のpIを有するS100カルシウム結合タンパク質A9、
配列番号31のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、13-15 kDaの分子量及び5.21-6.21のpIを有するクリスタル構造のカルプロテクチン、及び
配列番号32のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、11-13 kDaの分子量及び6.28-7.28のpIを有するS100カルシウム結合タンパク質A4。
【請求項７】
請求項6に記載の診断キットにおいて、
1)前記タンパク質又はその免疫原性の断片に特異的な抗体、
2)基質との反応によって発色する標識体が接合されている2次抗体の接合体、
3)前記標識体と発色反応する発色基質の溶液、
4)各反応ステップに用いる洗浄液、及び

5)酵素反応の停止溶液を含むことを特徴とする、診断キット。

【請求項８】

糖尿病患者の涙液よりも糖尿病性網膜症患者の涙液の方が発現が減少する、下記タンパク質よりなる群から選ばれたタンパク質を有効成分として含む、糖尿病性網膜症の治療及び予防用の組成物：

配列番号5及び6のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、27-29 kDaの分子量及び6.5-7.5のpIを有するエンベロープタンパク質、

配列番号7のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、19-21 kDaの分子量及び4.24-5.24のpIを有するタンパク質SAP1、

配列番号8のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、20-23 kDaの分子量及び4.13-5.43のpIを有するリポカリン1-ライク1、

配列番号8のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、20-22 kDaの分子量及び4.3-5.3のpIを有するリポカリン(LCN-1)、

配列番号9，10，11，12，13及び14のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、20-22 kDaの分子量及び4.64-5.64のpIを有するサイトケラチン4、

配列番号15のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、21-23 kDaの分子量及び6.01-7.01のpIを有するS100カルシウム結合タンパク質A8、

配列番号8のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、21-23 kDaの分子量及び4.89-5.89のpIを有するリポカリン1の前駆体、

配列番号16及び17のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、27-29 kDaの分子量及び4.34-5.34のpIを有するケラチン31、

配列番号18，19及び20のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、30-32 kDaの分子量及び7.53-8.53のpIを有する熱ショックタンパク質(Hsp27)、

配列番号21のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、19-21 kDaの分子量及び5.28-6.28のpIを有するアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼアイソフォーム、

配列番号22のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、19-22 kDaの分子量及び4.70-5.80のpIを有するリン酸化ヒスチジンリン酸加水分解酵素、

配列番号23，24及び25のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、18-21 kDaの分子量及び5.96-6.96のpIを有するベータグロビン、

配列番号26及び27のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、18-20 kDaの分子量及び6.5-7.5のpIを有するリゾチーム前駆体、

配列番号28，29及び30のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、14-16 kDaの分子量及び5.21-6.21のpIを有するS100カルシウム結合タンパク質A9、

配列番号31のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、13-15 kDaの分子量及び5.21-6.21のpIを有するクリスタル構造のカルプロテクチン、及び

配列番号32のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、11-13 kDaの分子量及び6.28-7.28のpIを有するS100カルシウム結合タンパク質A4。

【請求項９】

被験者の涙液から、下記タンパク質よりなる群から選ばれたタンパク質又はその免疫原性断片の発現程度を測定し、健常者のものと比較することを含む、糖尿病性網膜症の診断方法：

配列番号1及び2のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、24-26 kDaの分子量及び5.83-6.83のpIを有するDJ-1タンパク質、

配列番号3及び4のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、15-17 kDaの分子量及び5.27-6.27のpIを有するベータ2-マイクログロブリン、

配列番号5及び6のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、27-29 kDaの分子量及び6.5-7.5のpIを有するエンベロープタンパク質、

配列番号7のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、19-21 kDaの分子量及び4.24-5.24のpIを有するタンパク質SAP1、

配列番号8のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、20-23 kDaの分子量及び4.

13-5.43のpIを有するリポカリン1-ライク1、
配列番号8のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、20-22 kDaの分子量及び4.3-5.3のpIを有するリポカリン(LCN-1)、
配列番号9，10，11，12，13及び14のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、20-22 kDaの分子量及び4.64-5.64のpIを有するサイトケラチン4、
配列番号15のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、21-23 kDaの分子量及び6.01-7.01のpIを有するS100カルシウム結合タンパク質A8、
配列番号8のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、21-23 kDaの分子量及び4.89-5.89のpIを有するリポカリン1の前駆体、
配列番号16及び17のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、27-29 kDaの分子量及び4.34-5.34のpIを有するケラチン31、
配列番号18，19及び20のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、30-32 kDaの分子量及び7.53-8.53のpIを有する熱ショックタンパク質(Hsp27)、
配列番号21のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、19-21 kDaの分子量及び5.28-6.28のpIを有するアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼアイソフォーム、
配列番号22のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、19-22 kDaの分子量及び4.70-5.80のpIを有するリン酸化ヒスチジンリン酸加水分解酵素、
配列番号23，24及び25のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、18-21 kDaの分子量及び5.96-6.96のpIを有するベータグロビン、
配列番号26及び27のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、18-20 kDaの分子量及び6.5-7.5のpIを有するリゾチーム前駆体、
配列番号28，29及び30のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、14-16 kDaの分子量及び5.21-6.21のpIを有するS100カルシウム結合タンパク質A9、
配列番号31のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、13-15 kDaの分子量及び5.21-6.21のpIを有するクリスタル構造のカルプロテクチン、及び
配列番号32のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、11-13 kDaの分子量及び6.28-7.28のpIを有するS100カルシウム結合タンパク質A4。

【請求項１０】
請求項9に記載の糖尿病性網膜症の診断方法において、
前記糖尿病性網膜症の診断方法が、
1)被験者及び健常者の涙液の試料が各々コーティング又は結合されている反応器に、前記タンパク質又はその免疫原性断片に特異的な抗体を加えて反応させるステップ、
2)前記反応を介して生成された抗原－抗体の反応物を、２次抗体-標識体の接合体(conjugate)及び標識体の発色基質溶液を用いて検出するステップ、及び
3)被験者と健常者とに対する検出結果を比較するステップを含むことを特徴とする、糖尿病性網膜症の診断方法。

【請求項１１】
下記タンパク質よりなる群から選ばれたタンパク質又はその免疫原性の断片を、それを必要とする対象の目に投与することを含む、糖尿病性網膜症の治療又は予防方法：
配列番号1及び2のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、24-26 kDaの分子量及び5.83-6.83のpIを有するDJ-1タンパク質、
配列番号3及び4のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、15-17 kDaの分子量及び5.27-6.27のpIを有するベータ2-マイクログロブリン、
配列番号5及び6のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、27-29 kDaの分子量及び6.5-7.5のpIを有するエンベロープタンパク質、
配列番号7のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、19-21 kDaの分子量及び4.24-5.24のpIを有するタンパク質SAP1、
配列番号8のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、20-23 kDaの分子量及び4.13-5.43のpIを有するリポカリン1-ライク1、
配列番号8のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、20-22 kDaの分子量及び4.

3-5.3のpIを有するリポカリン(LCN-1)、
配列番号9，10，11，12，13及び14のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、20-22 kDaの分子量及び4.64-5.64のpIを有するサイトケラチン4、
配列番号15のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、21-23 kDaの分子量及び6.01-7.01のpIを有するS100カルシウム結合タンパク質A8、
配列番号8のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、21-23 kDaの分子量及び4.89-5.89のpIを有するリポカリン1の前駆体、
配列番号16及び17のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、27-29 kDaの分子量及び4.34-5.34のpIを有するケラチン31、
配列番号18，19及び20のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、30-32 kDaの分子量及び7.53-8.53のpIを有する熱ショックタンパク質(Hsp27)、
配列番号21のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、19-21 kDaの分子量及び5.28-6.28のpIを有するアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼアイソフォーム、
配列番号22のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、19-22 kDaの分子量及び4.70-5.80のpIを有するリン酸化ヒスチジンリン酸加水分解酵素、
配列番号23，24及び25のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、18-21 kDaの分子量及び5.96-6.96のpIを有するベータグロビン、
配列番号26及び27のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、18-20 kDaの分子量及び6.5-7.5のpIを有するリゾチーム前駆体、
配列番号28，29及び30のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、14-16 kDaの分子量及び5.21-6.21のpIを有するS100カルシウム結合タンパク質A9、
配列番号31のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、13-15 kDaの分子量及び5.21-6.21のpIを有するクリスタル構造のカルプロテクチン、及び
配列番号32のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、11-13 kDaの分子量及び6.28-7.28のpIを有するS100カルシウム結合タンパク質A4。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、糖尿病性網膜症診断用のバイオマーカーに関し、より具体的には、糖尿病性網膜症患者の涙からその発現量が減少又は増加するタンパク質を指標とした糖尿病性網膜症診断用バイオマーカーとしての用途と、前記タンパク質に対する抗体を含む糖尿病性網膜症診断用の組成物及びキットに関する。

【背景技術】

【０００２】

一般的に、糖尿病(diabetes mellitus)とは、血液中にブドウ糖の濃度(糖分)が非正常的に増加し、長期間持続されて誘導される代表的な代謝異常であり、全身の非伝染性慢性疾病である。糖尿病は、自己免疫の機作によってすい臓のベータ細胞が破壊されて誘導されるインスリンの絶対的又は相対的産生欠乏の結果であるか又はインスリンが分泌されたとしても標的臓器におけるインスリンの効果的作用低下(インスリンの抵抗性)の結果によるもので、血糖は持続的な上昇状態を示し、体内のブドウ糖代謝を含む新陳代謝機能が円滑に行えなくなる。

【０００３】

糖尿病性網膜症(diabetic retinopathy)は、糖尿病の３大微小血管合併症(microvascular complications)の１つで、持続的な高血糖と、これによる代謝異常によって網膜の微小血管が次第に変形、閉鎖されて循環障害が起き、網膜への円滑な血液供給が行われなくなって発病する。このような糖尿病性網膜症は、糖尿病を患った期間が長いほどその頻度が増えるため、定期的に糖尿病性網膜の変化を検査しなければならない。

【０００４】

最近、このような糖尿病性網膜症の早期発見のための診断マーカーを見つけ出そうとする試みと、効果的なマススクリーニング（mass screening）法開発の要求とが増えている

。これに従い、エンドセリン－１（endothelin-1：ET-1),プロテインキナーゼＣ（protein kinase C：PKC）,Ｅ－セレクチン（E-selectin）を含む血管接着因子（vascular adhesion molecule），トロンビン切断型オステオポンチン（thrombin-cleaved osteopontin）とトロンビン切断型ホスホイノシチド（thrombin-cleaved phosphoinositides）,トロンビン刺激による血小板の凝集（thrombin-stimulated platelet aggregation）,硝子体ＶＥＧＦ（vitreous VEGF）,循環可溶性ＩＣＡＭ－１（circulating soluble ICAM-1：sICAM-1）,最終糖化産物（advanced glycation end products：AGEs），一酸化窒素（nitric oxide），インターロイキン－１（IL-1），インターロイキン－６（IL-6）,インターロイキン－８（IL-8）と腫瘍壊死因子－α（tumor necrosis factor-α）等のサイトカイン，HLA DRI，A9，B40アレル,グリコヘモグロビン(HbAlc),マイクロアルブミン,アルドース還元酵素（aldose reductase：AR）,Fas，PEDF等が糖尿病性網膜症マーカーとして提示されてきたが、これらは全て糖尿病性網膜症だけのための特異性を示すことができなかった。

【０００５】

従来、糖尿病性網膜症の早期発見のための診断バイオマーカーを、主に血清を用いて分析を行ってきた。しかし、このような研究の場合、血清内タンパク質のグリコシル化(glycosylation)と、アルブミン(albumin)及び免疫グロブリン(immunoglobulin)のような大量に存在するタンパク質のため、分析において多くの困難があった。

【０００６】

一般的に、涙は、ムチン(mucin)、脂質(lipid)、塩(salt)、糖タンパク質(glycoprotein)、及びその他多様なタンパク質によって構成されている。主な涙液タンパク質は、リゾチーム（lysozyme），ラクトフェリン（lactoferrin）,分泌型イムノグロブリン（secretory immunoglobulin A：sIgA）,リポカリン（lipocalin）,アルブミン（albumin）,リポフィリン（lipophilin）であり、これらの量又は質的変化は我々の多様な病理学的状態の変化によって解析することができる。しかし、このような涙液タンパク質は、持続的に研究されてきたにも拘らず、ほとんどの場合、単一タンパク質と特定疾患との相互の関連性を明らかにするのに限られていた。

【０００７】

これに対し、本発明では、２次元電気泳動技術(two-dimensional gel electrophoresis，2-DE)を用い、このような涙液タンパク質を分析することによって、構成タンパク質をより正確に且つ効率的に分析した。また、分析したタンパク質を用いて、糖尿病性網膜症の早期診断及び進行程度を予め予測可能な糖尿病性網膜症診断用の組成物及び診断キット、並びに糖尿病性網膜症の治療及び予防用の組成物を調製する事によって本発明を完成するに至った。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

本発明は、斯かる諸点に鑑みてなされたものであり、その目的とするところは、糖尿病性網膜症の早期診断用バイオマーカー又はその免疫原性断片を提供することにある。

【０００９】

本発明の他の目的は、前記バイオマーカーたんぱく質又はその免疫原性断片に対する抗体を有効成分として含有する糖尿病性網膜症診断用の組成物及び診断キットを提供することにある。

【００１０】

又、本発明の他の目的は、前記バイオマーカー又はその免疫原性断片を有効成分として含有する糖尿病性網膜症の治療及び予防用の組成物を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【００１１】

上記目的を達成するために、具体的に、本発明の一様態において、下記タンパク質よりなる群から選ばれたタンパク質又はその免疫原性断片の糖尿病性網膜症診断用バイオマーカーとしての用途を提供する：

配列番号1及び2のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、24-26 kDaの分子量及び5.83-6.83のpIを有するDJ-1タンパク質(DJ-1 protein)、
配列番号3及び4のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、15-17 kDaの分子量及び5.27-6.27のpIを有するベータ2-マイクログロブリン(beta 2-microglobulin, B2M)、
配列番号5及び6のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、27-29 kDaの分子量及び6.5-7.5のpIを有するエンベロープタンパク質(envelope protein)、
配列番号7のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、19-21 kDaの分子量及び4.24-5.24のpIを有するタンパク質SAP1(protein SAP1)、
配列番号8のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、20-23 kDaの分子量及び4.13-5.43のpIを有するリポカリン1-ライク1(lipocalin 1-like 1)、
配列番号8のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、20-22 kDaの分子量及び4.3-5.3のpIを有するリポカリン(lipocalin(hCG201503), LCN-1)、
配列番号9, 10, 11, 12, 13及び14のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、20-22 kDaの分子量及び4.64-5.64のpIを有するサイトケラチン4(cytokeratin4)、
配列番号15のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、21-23 kDaの分子量及び6.01-7.01のpIを有するS100カルシウム結合タンパク質A8(S100 calcium-binding protein A8)、
配列番号8のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、21-23 kDaの分子量及び4.89-5.89のpIを有するリポカリン1の前駆体(lipocalin 1 precursor)、
配列番号16及び17のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、27-29 kDaの分子量及び4.34-5.34のpIを有するケラチン31(keratin 31)、
配列番号18, 19及び20のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、30-32 kDaの分子量及び7.53-8.53のpIを有する熱ショックタンパク質(heart shock protein 27, Hsp27)、
配列番号21のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、19-21 kDaの分子量及び5.28-6.28のpIを有するアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼアイソフォーム(adenine phosphoribosyltransferase isoform)、
配列番号22のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、19-22 kDaの分子量及び4.70-5.80のpIを有するリン酸化ヒスチジンリン酸加水分解酵素(phosphohistidine phosphatase)、
配列番号23, 24及び25のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、18-21 kDaの分子量及び5.96-6.96のpIを有するベータグロビン(beta globin)、
配列番号26及び27のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、18-20 kDaの分子量及び6.5-7.5のpIを有するリゾチーム前駆体(Lysozyme precursor)、
配列番号28, 29及び30のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、14-16 kDaの分子量及び5.21-6.21のpIを有するS100カルシウム結合タンパク質A9(S100 calcium-binding protein A9)、
配列番号31のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、13-15 kDaの分子量及び5.21-6.21のpIを有するクリスタル構造のカルプロテクチン(Crystal Structure Of Human Calprotectin)、及び
配列番号32のトリプシン分解されているペプチド配列を含み、11-13 kDaの分子量及び6.28-7.28のpIを有するS100カルシウム結合タンパク質A4(S100 calcium-binding protein A4)。

【００１２】

本発明において、上記「トリプシン分解されているペプチド」とは、あるタンパク質をトリプシン(trypsin)によって分解したときに生成されるタンパク質のペプチドを意味する。又、上記タンパク質の分子量と等電点(pI)は、２次元電気泳動(Two-dimentional electrophoresis)上において確認された値として一般的に許容される実験上の誤差範囲を含む。

【００１３】

本発明において、「糖尿病患者」とは、網膜症症状がない2型の糖尿病患者を意味し、「糖尿病性網膜症患者」とは、非増殖性の糖尿病性網膜症症状がある2型の糖尿病患者を意味する。

【００１４】

本発明において、上記「免疫原性の断片」とは、本発明のバイオマーカーに対する抗体によって認識され得る一以上のエピトープ(epitope)を有するバイオマーカータンパク質の断片を意味する。

【００１５】

本発明の一様態によると、本発明は、糖尿病患者の涙より糖尿病性網膜症患者の涙から発現が相対的に増加する、DJ-1タンパク質及びベータ2-マイクログロブリン(B2M)よりなる群から選ばれたタンパク質又はその免疫原性断片の糖尿病性網膜症診断用の用途を提供する。

【００１６】

上記タンパク質又はその免疫原性断片は、糖尿病患者の涙よりも糖尿病性網膜症患者の涙の方がその発現が100%以上、好ましくは200%以上、より好ましくは300%以上増加する。

【００１７】

本発明の他の様態によると、本発明は、糖尿病患者の涙よりも糖尿病性網膜症患者の涙の方がその発現が相対的に減少する、エンベロープタンパク質、SAP1、リポカリン1-ライク1、リポカリン((hCG201503), Science 291 (5507), 1304-1351(2001))、サイトケラチン4、S100カルシウム結合タンパク質A8、リポカリン1の前駆体、ケラチン31、熱ショックタンパク質(Hsp27)、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼアイソフォーム、リン酸化ヒスチジンリン酸加水分解酵素、ベータグロビン、リゾチーム前駆体、S100カルシウム結合タンパク質A9、クリスタル構造のカルプロテクチン、及びS100カルシウム結合タンパク質A4よりなる群から選ばれた、タンパク質又はその免疫原性断片の糖尿病性網膜症診断用の用途を提供する。

【００１８】

上記タンパク質又はその免疫原性断片は、糖尿病患者の涙よりも糖尿病性網膜症患者の涙の方がその発現が30%以上、好ましくは50%以上減少する。

【００１９】

本発明の他の様態によると、本発明は、上記タンパク質又はその免疫原性断片に特異的な抗体を有効成分として含有する糖尿病性網膜症診断用の組成物を提供する。

【００２０】

本発明の糖尿病性網膜症診断用の組成物において、上記抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体であり、モノクローナル抗体が望ましい。

【００２１】

本発明において、上記ポリクローナル抗体は、当業者に公知の従来方法に従い、免疫源であるバイオマーカータンパク質又はその免疫原性断片を外部の宿主に注射することによって調製することができる。外部の宿主は、マウス、ラット, ヤギ、ウサギのような哺乳類を含む。免疫源は、筋内、腹腔内又は皮下注射の方法で注射され、一般的に抗原性を増加させるための補助剤(adjuvant)と共に投与される。外部宿主から定期的に血液を採取し、向上した力価及び抗原に対する特異性が見られる血清を回収するか又はこれらから抗体を分離及び精製する。

【００２２】

本発明において、上記モノクローナル抗体は、当業者に公知の従来方法によるハイブリドーマ生成技術(Koeher and Milstein(1975) Nature, 256:495)によって調製することができる。

【００２３】

又、本発明の他の様態によると、本発明は、上記タンパク質又はその免疫原性断片に特異的な抗体を有効成分として含有する、糖尿病性網膜症の診断キットを提供する。

【００２４】

上記の構成によると、本発明の診断キットは当業者に公知の調製方法によって調製され、典型的に、凍結乾燥形態の抗体とバッファ、安定化剤、不活性タンパク質等を含んでいる。上記抗体は、放射種(radionuclides)、蛍光源(fluorescors)、酵素(enzymes)等によって標識化することができる。

【００２５】

より具体的に、本発明の診断キットは、1)前記タンパク質又はその免疫原性の断片に特異的な抗体、2)基質との反応によって発色する標識体が接合されている2次抗体の接合体、3)前記標識体と発色反応する発色基質の溶液、4)各反応ステップに用いる洗浄液、及び5)酵素反応の停止溶液を含んでいる。

【００２６】

上記診断キットは、抗原-抗体の結合反応を介して上記タンパク質を定量分析又は定性分析することによって糖尿病性網膜症を診断することができ、上記抗原-抗体の結合反応は、当分野において公知の免疫学的方法、望ましくは酵素免疫吸着分析法(enzyme linked immunosorbent assay;ELISA)、放射線免疫測定法(radioimmunoassay; RIA)、サンドウィッチ免疫測定法(sandwich ELISA)、ポリアクリルアミドのゲル状のウエスタンブロット、免疫ドットブロット分析法(Immuno dot blotting assay)、免疫蛍光測定法(Immunofluorence Assay, IFA)、免疫発光測定法(Immunochemiluminescence Assay)、免疫組織化学染色法、又は免疫クロマトグラフィー測定法(Immunochromatograghy Rapid)等の方法によって測定することができる。例えば、上記抗体を表面にコートした96ウェルマイクロタイタープレート等を用いてELISAを行うように上記の診断キットを提供することができる。

【００２７】

上記二次抗体の標識体は、発色反応をする通常の発色剤が望ましく、HRP(horseradish peroxidase)、塩基性脱リン酸化酵素(alkaline phosphatase)、コロイドゴールド(coloid gold)、FITC(poly L-lysine-fluoresceinisothiocyanate)、RITC(rhodamine-B-isothiocyanate)等の蛍光物質(fluorescein)及び色素(dye)等の標識体を使用することができる。本発明では、例えば抗-ウサギのIgG-HRP接合体(anti-rabbit IgG-HRP conjugate)を用いる。

【００２８】

上記発色を誘導する基質は、発色反応をする標識体に応じて使用するのが好ましく、TMB(3,3`,5,5`-tetramethyl bezidine), ABTS[2,2`-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], OPD(ophenylenediamine)等を用いることができる。この際、発色剤の基質は緩衝溶液(0.1M NaAc, pH 5.5)に溶解している状態で提供されるのがより好ましい。TMBのような発色基質は、二次抗体接合体の標識体として使用されたHRPによって分解され発色浸漬体を生成し、その発色浸漬体の浸漬度を肉眼で確認することによって、試料内の上記タンパク質の濃度を測定する。

【００２９】

上記洗浄液は、リン酸塩緩衝溶液、NaCl及びツイン20を含んでいるのが好ましく、0.02Mのリン酸塩緩衝溶液(phosphate buffer)、0.13MのNaCl、及び0.05%のツイン20(Tween 20)により構成された緩衝溶液がより好ましい。洗浄液は、抗原-抗体結合反応後の抗原-抗体結合体に二次抗体を反応させ、次に適量を反応器に加えて3回乃至6回洗浄する。ブロッキング溶液は0.1%のBSAを含有する緩衝溶液が、反応停止溶液は2Nの硫酸溶液が好ましい。

【００３０】

又、本発明の他の様態によると、本発明は、糖尿病患者の涙よりも糖尿病性網膜症患者の涙の方が減少する、エンベロープタンパク質、SAP1、リポカリン1-ライク1、リポカリン((hCG201503), LCN-1)、サイトケラチン4、S100カルシウム結合タンパク質A8、リポカリン1の前駆体、ケラチン31、熱ショックタンパク質(Hsp27)、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼアイソフォーム、リン酸化ヒスチジン　リン酸加水分解酵素、ベータグロビン、リゾチーム前駆体、S100カルシウム結合タンパク質A9、クリスタル構造のカルプロテクチン、及びS100カルシウム結合タンパク質A4よりなる群から選ばれたタンパク質又

はその免疫原性断片を有効成分として含有する、糖尿病性網膜症の治療及び予防用の組成物を提供する。

【００３１】

本発明の糖尿病性網膜症の治療及び予防用の組成物は、眼薬組成物等の形態で患者の目に投与することによって、糖尿病性網膜症を予防及び治療することができる。

【００３２】

本発明において眼薬組成物は、医薬分野で公知の方法によって、薬学的に許容される担体、賦形剤、希釈剤等と混合し、点眼用液剤の剤形で調製することができる。これらは、目に直接点滴して投与することができる。

【００３３】

本発明における眼薬組成物の投与量は、患者の年齢、性別、状態、疾病の症状に応じて適切に選択することができ、好ましくは成人を基準として1日0.1-0.5mgのタンパク質を眼薬の形態で投与することができる。

【００３４】

又、本発明の他の様態によると、本発明は、被験者の涙液から、DJ-1タンパク質、ベータ2-マイクログロブリン、エンベロープタンパク質、SAP1、リポカリン1-ライク1、リポカリン((hCG201503),LCN-1)、サイトケラチン4、S100カルシウム結合タンパク質A8、リポカリン1の前駆体、ケラチン31、熱ショックタンパク質(Hsp27)、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼアイソフォーム、リン酸化ヒスチジンリン酸加水分解酵素、ベータグロビン、リゾチーム前駆体、S100カルシウム結合タンパク質A9、クリスタル構造のカルプロテクチン、及びS100カルシウム結合タンパク質A4よりなる群から選ばれたタンパク質又はその免疫原性断片の発現程度を測定し、健常者のものと比較することを含む、糖尿病性網膜症の診断方法を提供する。

【００３５】

具体的に、本発明の診断方法は、1)被験者及び健常者の涙液試料が各々コーティング又は結合されている反応器に、上記記タンパク質又はその免疫原性断片に特異的な抗体を加えて反応させるステップと、2)上記反応を介して生成された抗原－抗体の反応物を、２次抗体-標識体の接合体(conjugate)及び標識体の発色基質溶液を用いて検出するステップと、及び3)被験者と健常者とに対する検出結果を比較するステップとを含む、糖尿病性網膜症の診断方法を提供する。

【００３６】

上記反応器には、ニトロセルロース膜、ポリビニル(Polyvinyl)樹脂で合成された96ウェルプレート(96 well plate)、ポリスチレン(Polystyrene)樹脂で合成された96ウェルプレート及びガラスよりなるスライドグラス等を用いることができる。

【００３７】

被験者の涙液に、上記で述べたタンパク質の内DJ-1タンパク質、ベータ2-マイクログロブリン又はこれらの免疫原性断片の量が、糖尿病患者の涙液よりも100%以上、好ましくは200%以上、より好ましくは300%以上多い場合や、上記で述べたタンパク質の残りのタンパク質又はこれらの免疫原性断片の量が、糖尿病患者の涙液よりも30%以上、好ましくは50%以上減少した場合、糖尿病性網膜症と診断することができる。

【００３８】

又、本発明の他の様態によると、本発明は、DJ-1タンパク質、ベータ2-マイクログロブリン、エンベロープタンパク質、SAP1、リポカリン1-ライク1、リポカリン((hCG201503),LCN-1)、サイトケラチン4、S100カルシウム結合タンパク質A8、リポカリン1の前駆体、ケラチン31、熱ショックタンパク質(Hsp27)、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼアイソフォーム、リン酸化ヒスチジンリン酸加水分解酵素、ベータグロビン、リゾチーム前駆体、S100カルシウム結合タンパク質A9、クリスタル構造のカルプロテクチン、及びS100カルシウム結合タンパク質A4よりなる群から選ばれたタンパク質又はその免疫原性断片を、それを必要とする対象の眼に投与することを含む、糖尿病性網膜症の治療又は予防方法を提供する。

【発明の効果】
【００３９】
以上説明したように、本発明の結果によって得られる、糖尿病性網膜症において発現が増加した2個のタンパク質と、発現が減少した16個のタンパク質は、糖尿病性網膜症の早期診断のためのバイオマーカーとして用いることができる。本発明のバイオマーカータンパク質は、糖尿病性網膜症患者の涙液から測定することができる。
【００４０】
又、本発明のバイオマーカータンパク質を基に調製された単一クローン抗体は、糖尿病性網膜症の早期診断のためのイムノアッセイキットに用いることができるばかりではなく、より高い特異性と敏感性を示す抗体の開発を通じた多様な糖尿病性網膜症の早期診断のための検出スペクトラムを持つタンパク質チップの開発にも用いることができる。
【発明を実施するための最良の形態】
【００４１】
以下、本発明の最良の実施形態を図面に基づいて詳細に説明する。以下の好ましい実施形態の説明は、本質的に例示に過ぎず、本発明、その適用物或いはその用途を制限することを意図するものでは全くない。
【００４２】
次に、具体的に実施した実施例について説明する。
【００４３】
実施例1:二次元電気泳動を用いた涙液タンパク質の分析
ステップ1:試料の用意(Sample preparation)
韓国の中央大学病院から供給された、健常者14名、網膜症症状のない2型糖尿病患者(以下、糖尿病患者と記す) 10名、及び非増殖性の糖尿病網膜症症状がある2型糖尿病患者(以下、糖尿病性網膜症患者と記す)17名の涙液メニスカス(meniscus)から、ポリエステルの心棒(polyester wick)を用い涙液の試料(tear fluid)を得た。心棒を1.5mlチューブ内のマイクロピペットチップの端に置き、10,000rpmで5分間、遠心分離 (Union-55R centrifuge, ハニル科学、Korea)した。分離された涙液タンパク質をブラッドフォード法(Bradford method)により定量を行い、－70℃の冷凍庫に保管した。
【００４４】
ステップ2:二次元電気泳動(Two-Dimensional Electrophoresis)
(2-1)一次元電気泳動(Isoelectrofocusing, IEF)
上記ステップ1で得た涙液タンパク質の試料60μgを用い、一次元電気泳動を実施した。試料の総体積が450μLとなるように再水和緩衝液(8Mウレア, 2%CHAPS, 13mM DTT, 1%IPG緩衝液, ブロモフェノールブルー(Bromophenol Blue：BPB))を混合し、一次元電気泳動を行うことのできる2cm ストリップホルダ（strip holder）に加えた後、pH 4-7範囲のドライストリップ（Drystrip(Amerahsm Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden))をストリップホルダ（strip holder）に装着した。ストリップ（Strip）を電流無しで五時間、80Vの電流で五時間再水和した後、IPGphore IEF system(Amerahsm Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)を用い、総100,000Vhrで一次元電気泳動を行った。
【００４５】
(2-2)二次元電気泳動
二次元電気泳動(Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)を実施するため、(2-1)で一次元電気泳動が終了したストリップをキャップチューブに加え、一次平衡化溶液(6M ウレア, 50 mM Tris-Cl(pH8.8), 20% グリセロール, 2% SDS, 1% DTT)10mlを加えて15分間反応させた後、溶液を除去した。次いで、二次平衡化溶液(6M ウレア, 50 mM Tris-Cl(pH8.8), 30% グリセロール, 2% SDS, 1.5% IAA)10mlを加えて10分間再反応させた。11～16%のポリアクリルアミドゲル(グラジエントゲル, 25×30cm)上に、反応終了後のストリップを装着し、0.5%のアガロースでシーリングをした。2次元電気泳動は、Ettan Dalt(Amerahsm Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)に電気泳動緩衝液(24 mM Tris, 192 mM グリシン, 0.1% SDS)を加えて70Vで1時間、140Vで2時間、及び

320Vで5時間の条件で電気泳動を実施した。

【００４６】

(2-3)染色

(2-2)で二次元電気泳動が終了したゲルを可視化するため、銀染色を行った。銀染色過程は、次のように行った。ゲルを、50% メタノール，12% 酢酸及び0.05% ホルムアルデヒドよりなる溶液に入れ、2時間以上反応させて固定化(Fixation)し、50%のエタノールで20分間3回洗浄(Washing)した後、0.2%のチオ硫酸ナトリウム溶液で一分間反応させて敏感化(Sensitizing)させた。D.W.で洗浄(Washing)した後、0.1%の 硝酸銀，0.075%のホルムアルデヒド(37%)溶液と20分間反応させて反応化(Improving)し、D.W.で更に洗浄(Washing)した後、予め冷やした6% 炭酸ナトリウム，0.075% ホルムアルデヒド(37%)の溶液によって約7分間反応させて可視化(Developing)し、50% メタノール，12% 酢酸の溶液で処理し、反応を停止させた。

【００４７】

(2-4)イメージ分析(Image Analysis)

実験したゲルのイメージを分析するため、先ずイメージスキャナ(Amerahsm Pharmacia Biotech，Uppsala，Sweden)でスキャンした。タンパク質の発現に差異が認められる点等を分析するため、二次元電気泳動分析専用プログラムであるイメージマスター２Ｄプラチナムバージョン６．０（Image Master 2D Platinum version 6.0(GE Healthcare，UK)）によって分析を行った。

【００４８】

健常者の涙液から発現するタンパク質、糖尿病患者の涙液から発現するタンパク質及び糖尿病性網膜症患者の涙液から発現するタンパク質の二次元電気泳動イメージの結果を図1a，1b及び1cに示す。

【００４９】

又、図1a，1b及び1cに示すタンパク質のイメージを拡大して図2aに示し、上記タンパク質の相対的な強度を図2bに示す。上記の図面において、Healthyは健常者、No DMRは網膜症症状がない糖尿病患者、NPDRは非増殖性の糖尿病性網膜症症状がある糖尿病患者を意味する。

【００５０】

その結果、図1a乃至図2bに示すように、健常者及び糖尿病患者よりも糖尿病性網膜症患者の涙液から新たに発現するか又は発現量が減少及び増加するタンパク質が認められた。具体的に、糖尿病性網膜症患者群を対象に電気泳動を行った結果、糖尿病患者からよりも発現が減少した18個のタンパク質(#10699，#10861，#11035，#11038，#11055，#11056，#11057，#11069，#11078，#10530，#10765，#11051，#10825，#10852，#10889，#10894，#10927及び#11058)と、増加した2個のタンパク質(#10688及び#11046)とを見つけることができた。(図1a，1b，1c及び図2a，図2b参照)。発現が減少した18個のタンパク質は、健常者(Healthy)及び糖尿病患者(No DMR)の群よりも、糖尿病患者群のタンパク質から約50%以上減少し、増加した2個のタンパク質は約300%以上増加した。

【００５１】

又、糖尿病から糖尿病性網膜症へと進行する際、発現が減少及び増加したタンパク質スポットのおおよその分子量及び等電点pIを下記の［表1］に示す。

【００５２】

【表１】

糖尿病性網膜症患者の涙液において発現が変化したタンパク質

スポット番号	分子量（予想値/測定値）(kDa)	pI	Vol. 増減
10688	20/25	6.33	増
11046	13/16	5.77	増
10699	54/28	7	減
10861	14/20	4.74	減
11035	18/21	4.93	減
11038	19/21	4.8	減
11055	45/21	5.14	減
11056	21/22	4.63	減
11057	10/22	6.51	減
11069	19/22	5.39	減
11078	48/28	4.84	減
10530	22/31	7.83	減
10765	19/20	5.78	減
11051	14/20	5.3	減
10825	16/19	6.46	減
10852	16/19	7	減
10889	13/15	5.71	減
10894	13/14	5.71	減
10927	12/12	6.78	減
11058	14/21	5.2	減

【００５３】

実施例2：質量分析器を用いたタンパク質の同定(ESI-Q-TOF/MS/MS Analysis)

上記実施例1においてイメージ分析プログラムで見つけ出したタンパク質を同定するため、2次元電気泳動終了後のゲルからスポット(spot)を切り出した。先ず、銀を無くすため、30 mM フェリシアン化カリウムと100mM チオ硫酸ナトリウム溶液とが1：1で混合された脱染色溶液100μLをゲル片に五分間処理した。この後400μLの水で3回洗浄した。再び200mM 炭酸水素アンモニウムと10分間反応させた後、水で洗浄した。アセトニトリルを加えてゲルが白くなるするまで脱水した。このゲルを真空遠心分離機(Speed vacuum centrifuge)に入れ、完全に乾燥させた。乾燥したゲル片を、0.2μgのトリプシン(promega)が入っている50mMの炭酸水素アンモニウム 20μLで、氷の上で45分間再水和(hydration)させた。溶液を除去し、50mMの炭酸水素アンモニウムを30μL加えた後、37℃で夜通し反応させた。C18 ナノカラム(homemade)を用い、得られたペプチド溶液の塩分を除去した。

【００５４】

注文制作したクロマトグラフィカラムを、質量分析より前に、ペプチドを塩分除去して濃縮するために使用した。多孔質リバースＲ２材料（Porous reverse R2 material(20-30 umbead size, PerSeptive Biosystems)） 100-300nLで構成されたカラムを、堅く締められたＧＥローディングチップ（GELoader tip(Eppendorp, hamburg, Germany)）に詰めた。10mL シリンジを用い、空気圧でカラムを介して物質を通過させた。ペプチド溶液30μLを希釈してカラムにローディングした後、ギ酸溶液20μで洗浄した。MS/MS分析のため、ペプチドを50% メタノール/49% 水/1% ギ酸を用い、ホウケイ酸ナノエレクトロスプレーニードル（borosilicate nanoelectrospray needle(Micromass, Manchester, UK)）で溶出させた。

【００５５】

ペプチドのMS/MS分析は、Ｑ－ＴＯＦ２マス分光計（Q-TOF2 mass spectrometer(Micromass, Manchester, UK)）上でナノ-ESIにて行った。ソース(source)温度は80℃である。安定した流速(10-3- nL/min)を生成するため、0-5 psiの窒素背圧（nitrogen back-pressure）と共に1kVの電圧をイオンソース(ion source)にあるホウケイ酸ナノエレクトロスプレーニードル（borosilicate nanoelectrospray needle(Micromass, Manchester, UK)）に適用した。角(cone)電流は40Vにした。四極子型質量分析計（Quadrupole analyser）は、六極子衝突セル（hexapole collision cell）において断片化(fragmentation)するため、前駆イオン(precursor ion)を選択するのに使用された。衝突ガス(collision gas)は6-7×10^{-5}mbarのアルゴン(Ar)で、衝突エネルギー(collision energy)は20-30Vである。生成イオンを反射器(reflector)と、マイクロチャンネルプレート検出器(micro channel plate detector)、並びにタイムーデジタル変換器に合わせられるTOF分析気を用いて分析した。得られた資料をMass Lynx Windows NT PC systemを用いて分析した。

【００５６】

タンパク質を同定するため、全てのMS/MSスペクトラムをMASCOT search program(1232078647187_0
)を用い、NCBInrデータベース(http://222.ncbi.nlm.nih.gov/)でタンパク質配列を調べた。

【００５７】

下記の［表2］及び［表3］は各々糖尿病性網膜症患者から発現が増加及び減少したタンパク質の同定結果を示すものである。

【００５８】

【表２】

糖尿病性網膜症患者から発現が増加したタンパク質の同定結果

スポット No.	タンパク質名	分子量	トリプシン分解されているペプチド		NCBI Accession No.	配列番号
			配列	配列番号		
10688	DJ-1 タンパク質	20050	GAEEMETVIPVDVMR EGPYDVVVLPGGNLGAQNLSESAAVK	1 2	NP_009193	33
11046	ベータ-2 マイクログロブリン	12905	SNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLK DWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACR	3 4	CAA23830	34

【００５９】

【表３】

糖尿病性網膜症患者から発現が減少したタンパク質の同定結果

スポットNo.	タンパク質名	分子量	トリプシン分解されているペプチド 配列	配列番号	NCBI Accession no.	配列番号
10699	エンベロープタンパク質	54093	MINIEASQLAEVR	5	AAB05390	35
			SGLNTEAFYVMTVGSK	6		
10861	タンパク質 SAP1	13491	IIPGGIYDADLNDEWVQR	7	AAB19889	36
11035	リポカリン1-ライク 1	18078	GLSTESILIPR	8	CAH73781	37
11056	リポカリン1-ライク 1	18078	GLSTESILIPR	8	CAH73781	37
11038	リポカリン (hCG201503)	19488	GLSTESILIPR	8	EAW88053	38
11055	サイトケラチン 4	45593	FASFIDKVQFLEQQNK	9	CAA30534	39
			WNLLQQQTTTTSSK	10		
			NLEPLFETYLSVLR	11		
			VDSLNDEINFLK	12		
			NLDLDSIIAEVR	13		
			VQQLQISVDQHGDNLK	14		
11057	S100 カルシウム結合タンパク質 A8	10885	ELDINTDGAVNFQEFLILVIK	15	NP_002955	40
11069	リポカリン 1 前駆体	19409	GLSTESILIPR	8	NP_002288	41
11078	ケラチン 31	48633	QNQEYQVLLDVR	16	NP_002268	42
			LNVEVDAAPTVDLNR	17		
10530	熱ショックタンパク質 (Hsp27)	22427	LFDQAFGLPR	18	AAA62175	43
			VSLDVNHFAPDELTVK	19		
			LATQSNEITIPVTFESR	20		
10765	アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼアイソフォーム	19766	LQAEVLECVSLVELTSLK	21	NP_000476	44
11051	リン酸化ヒスチジンリン酸加水分解酵素	14000	ALIPDVDLDSD	22	BC024648	45
11058	リン酸化ヒスチジンリン酸加水分解酵素	14000	ALIPDVDLDSD	22	BC024648	45
10825	ベータグロビン	16101	LLVVYPWTQR	23	AAF00488	46
			EFTPPVQAAYQK	24		
			FFESFGDLSTPDAVMGNPK	25		
10852	リゾチーム前駆体	16885	GISLANWMCLAK	26	1LHM	47
			STDYGIFQINSR	27		
10889	S100 カルシウム結合タンパク質 A9	13291	QLSFEEFIMLMAR	28	NP_002956	48
			NIETIINTFHQYSVK	29		
			VIEHIMEDLDTNADKQLSFEEFIMLMAR	30		
10894	クリスタル構造のカルプロテクチン	13086	QLSFEEFIMLMAR	31	NP_002956	49
10927	S100 カルシウム結合タンパク質 A4	11949	ALDVMVSTFHK	32	AAB20971	50

【００６０】

実施例３：ウエスタンブロッティング

(3-1)SDS-PAGE電気泳動

糖尿病及び糖尿病性網膜症患者の涙液タンパク質試料40-50μgを用い、12% SDS-PAGEを実施した。涙液タンパク質の試料にSDS-PAGE ローディング緩衝液(60 mM Tris-Cl, 2% SDS, 25% グリセロール, 14.4 mM 2-メルカプトエタノール, 0.1% ブロモフェノールブルー, pH 6.8)を混合し、ミニゲル(6×8cm)において分子量別（セパレーティングゲル上で120Vにする）に分離した。この時使用したランニング緩衝液の組成は、0.025 M Tris-Cl, 0.192 M グリシン, 1% SDS(pH8.3)である。

【００６１】

(3-2)ブロッティング

SDS-PAGE終了後、ゲルのタンパク質をセミドライ形態のトランスファーキット(Bio-rad)を用い、ニトロセルロース膜に移し、50mAで1時間30分間ブロッティングを実施した。

【００６２】

(3-3)抗体反応

糖尿病性網膜症患者の涙液から同定されたLCN-1(lipocalin(hCG201503); #11038), Hsp27(heat shock protein 27; #10530), B2M(beta-2-microglobulin; #11046)タンパク質を対象に抗体反応を実施した。ニトロセルロース(Nitro Cellulose) メンブレンを5% w/v 脱脂粉乳によって1時間ブロッキングさせた。LCN-1(1:1000), Hsp27(1:1000), B2M(1:500)のための一次抗体をブロッキング溶液と共に使用し、4時間乃至24時間反応させた。一次抗体として、ウサギから、公知のハイブリドーマ生成技術(Koeher and Milstein(1975) Nature, 256:495)によって調製されたモノクローナル抗体を使用した。TBS/T(0.1%, Tris-buffered saline-tween 20)で洗浄後、二次抗体によって室温で1時間反応させた。二次抗体は、HRPで標識されている抗-ラビット(Santa Cruz) 抗体を使用し、希釈濃度は1/10,000である。二次抗体反応後にTBS/Tで洗浄した後、ECL(Pierce Biotechnology, Inc., USA.)によって可視化した。

【００６３】

上記LCN-1, Hsp27及びB2Mタンパク質をウエスタンブロットした結果を図3aに示し、上記タンパク質の相対的強度を各々図3b, 3c 及び3dに示す(この時、独立スチューデント t-テストによる各群との有意差が、＊はp<0.05; ＊＊はp<0.01; 及び＊＊＊はp<0.001であることを示す)。その結果、網膜症の進行程度に応じて、LCN-1とHsp27タンパク質の量が有意的に減少し、B2Mの量が増加することがわかった。このような結果は、二次電気泳動の結果と一致した。これらから、涙液のLCN-1, Hsp27及びB2Mは、網膜症の早期診断バイオマーカー及び糖尿病性網膜症の治療及び予防用組成物として極めて有用であると考えられる。

【産業上の利用可能性】

【００６４】

本発明は、糖尿病性網膜症の早期診断バイオマーカー及び糖尿病性網膜症の治療及び予防用の組成物として極めて有用であり、産業上の利用可能性が高い。

【図面の簡単な説明】

【００６５】

【図１ａ】健常者の涙液から発現するタンパク質を示す２次元電気泳動のイメージ図である。

【図１ｂ】糖尿病患者の涙液から減少及び増加するタンパク質を示す２次元電気泳動のイメージ図である。

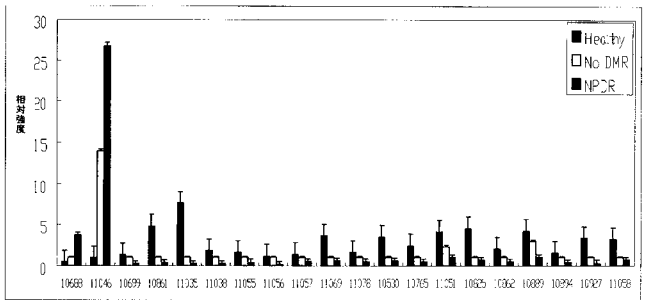
【図１ｃ】糖尿病性網膜症患者の涙液から減少及び増加するタンパク質を示す２次元電気泳動のイメージ図である。

【図２ａ】図1a, 1b及び1cで示したタンパク質を拡大したイメージ図であり、Healthyは健常者、No DMRは網膜症症状がない糖尿病患者、NPDRは非増殖性の糖尿病性網膜症症状がある糖尿病患者を示している。

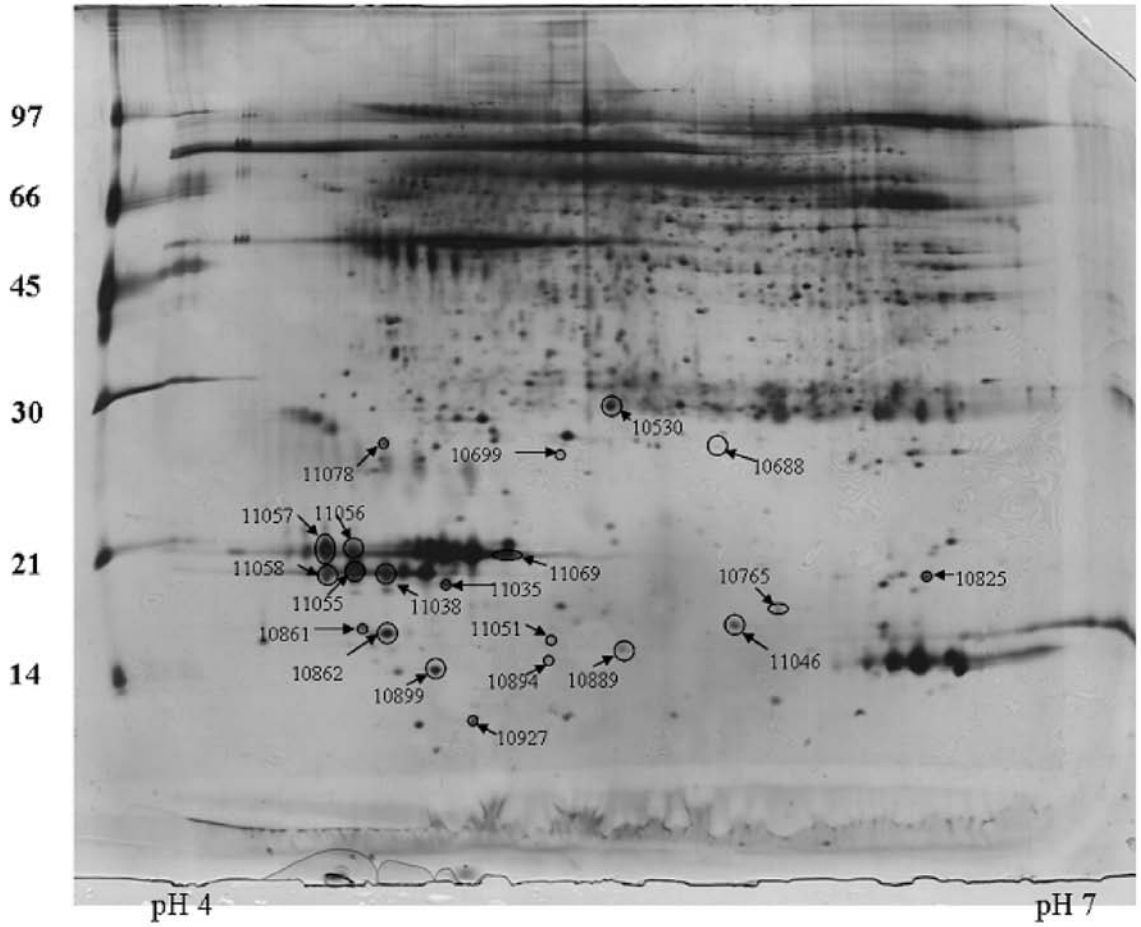
【図２ｂ】図1a, 1b及び1cのタンパク質の相対的な強度を示した結果図である。

【図３ａ】糖尿病性網膜症患者の涙液から同定されたLCN-1，Hsp27及びB2Mのタンパク質が確認されたウエスタンブロット法による結果図である。
【図３ｂ】LCN-1，Hsp27及びB2Mタンパク質の相対的強度を示す結果図である。
【図３ｃ】LCN-1，Hsp27及びB2Mタンパク質の相対的強度を示す結果図である。
【図３ｄ】LCN-1，Hsp27及びB2Mタンパク質の相対的強度を示す結果図である。

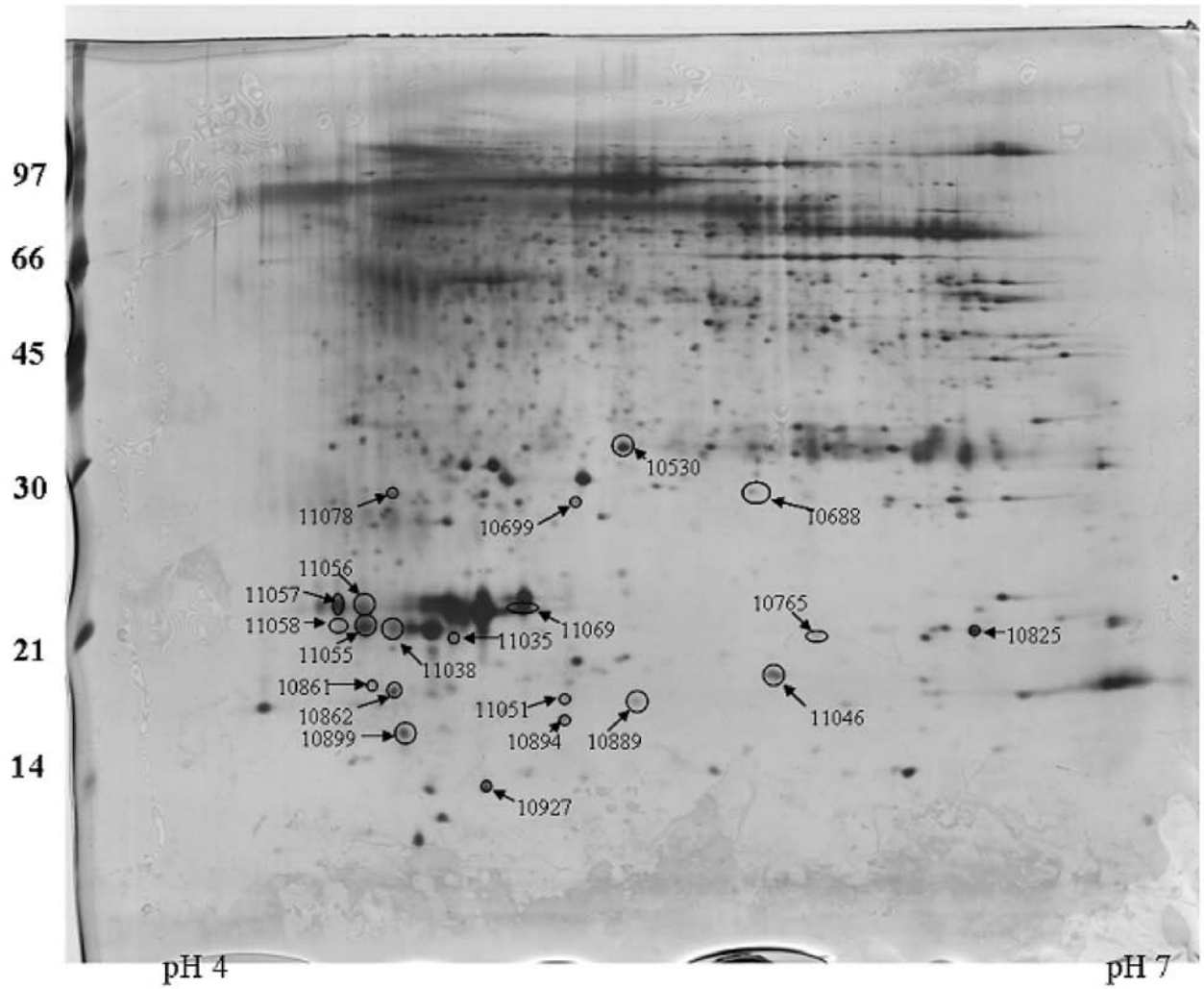
【図２ｂ】



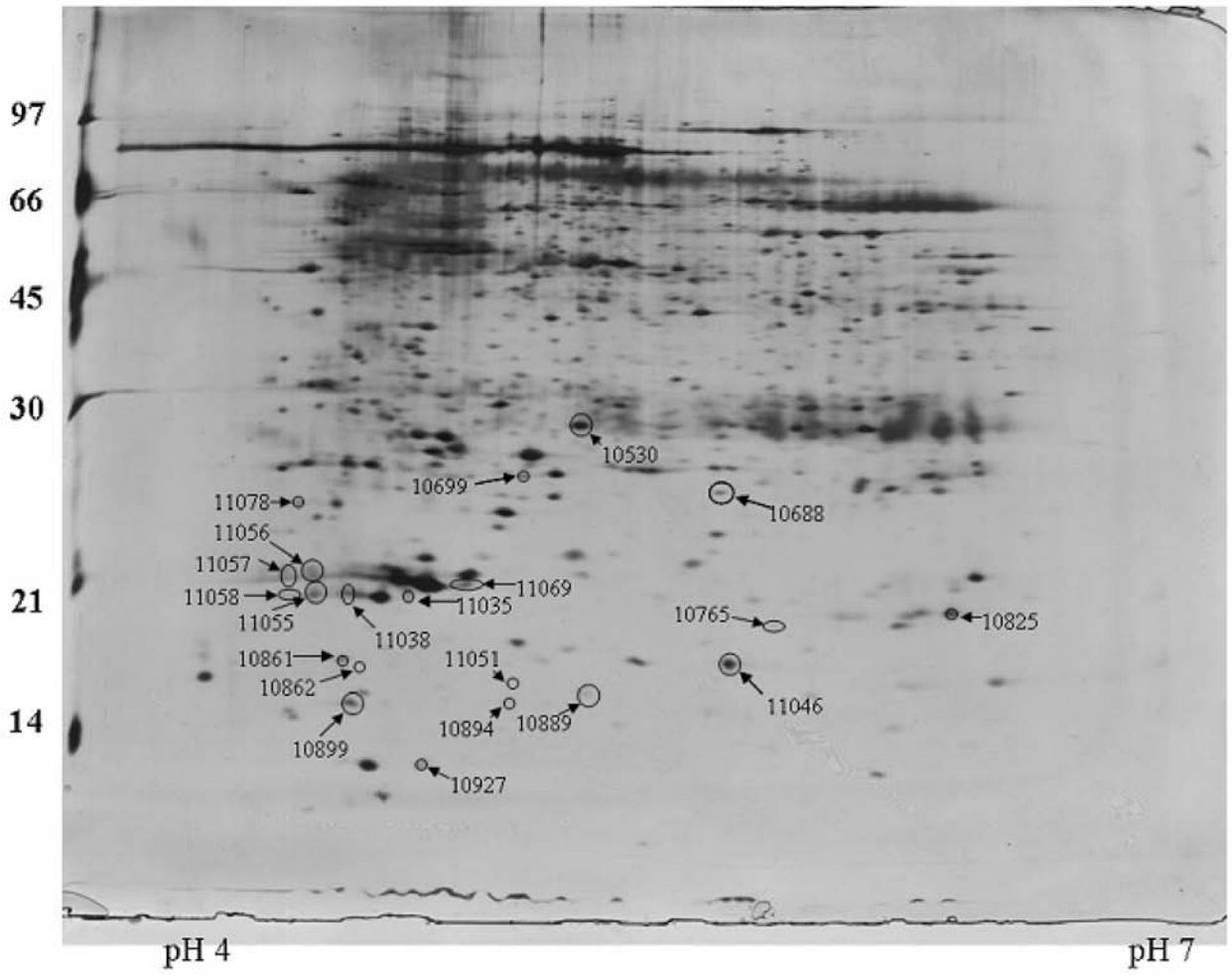
【図１ａ】


97
66
45
30
21
14
11078
10699
10530
10688
11057
11056
11058
11055
11038
11035
11069
10765
10825
10861
10862
10899
11051
10894
10889
11046
10927
pH 4
pH 7

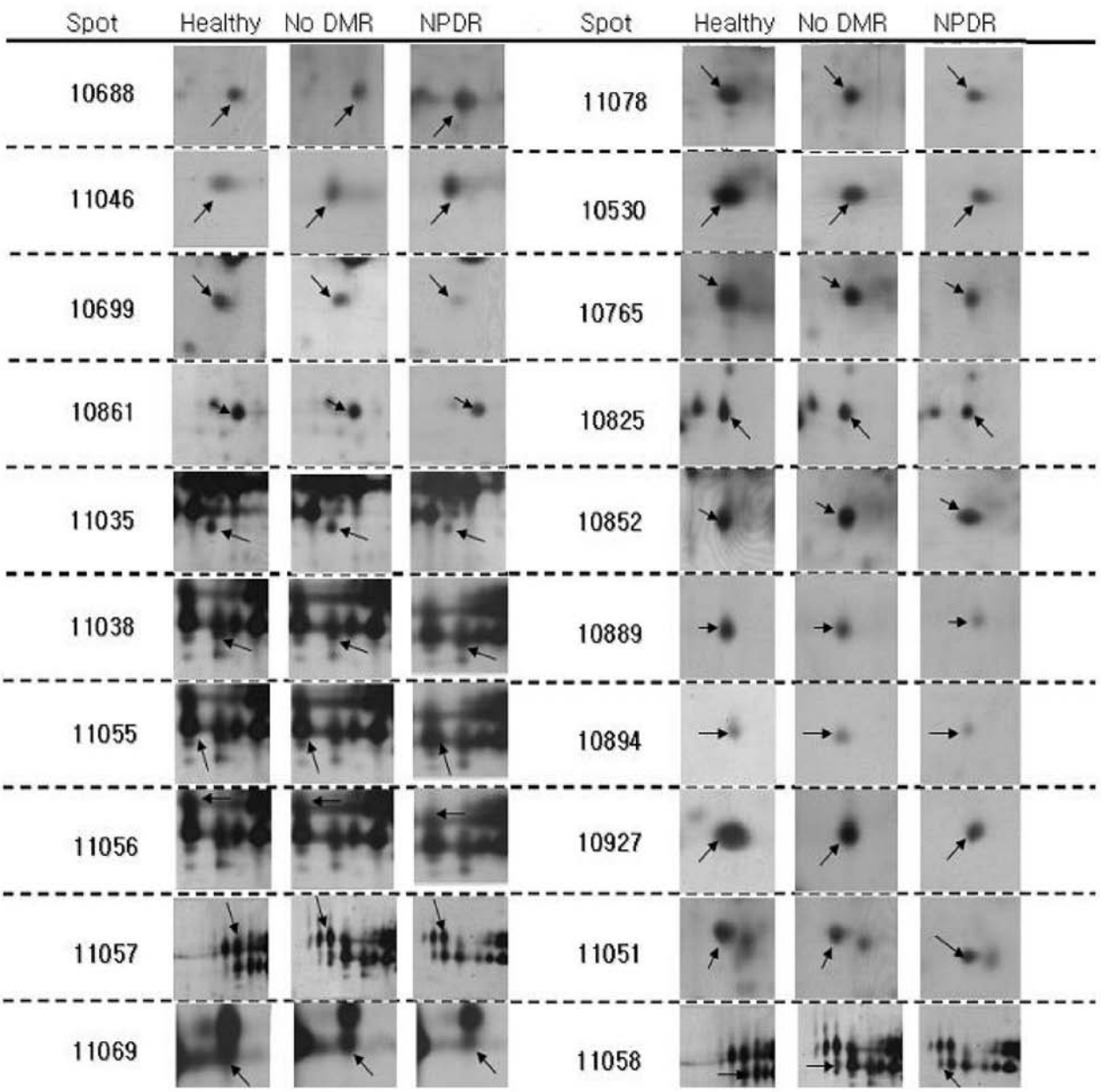
【図１ｂ】


97
66
45
30
21
14
pH 4
pH 7
10530
11078
10699
10688
11056
11057
11058
11055
11035
11069
11038
10765
10825
10861
10862
10899
11051
10894
10889
11046
10927

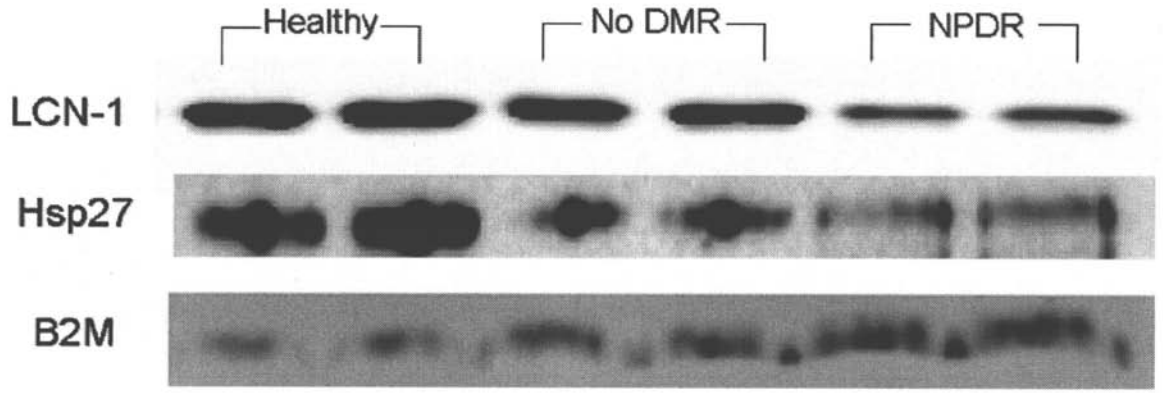
【図１ｃ】


97
66
45
30
21
14
pH 4
pH 7
10530
10699
11078
10688
11056
11057
11058
11055
11035
11069
11038
10765
10825
10861
10862
10899
11051
10894
10889
11046
10927

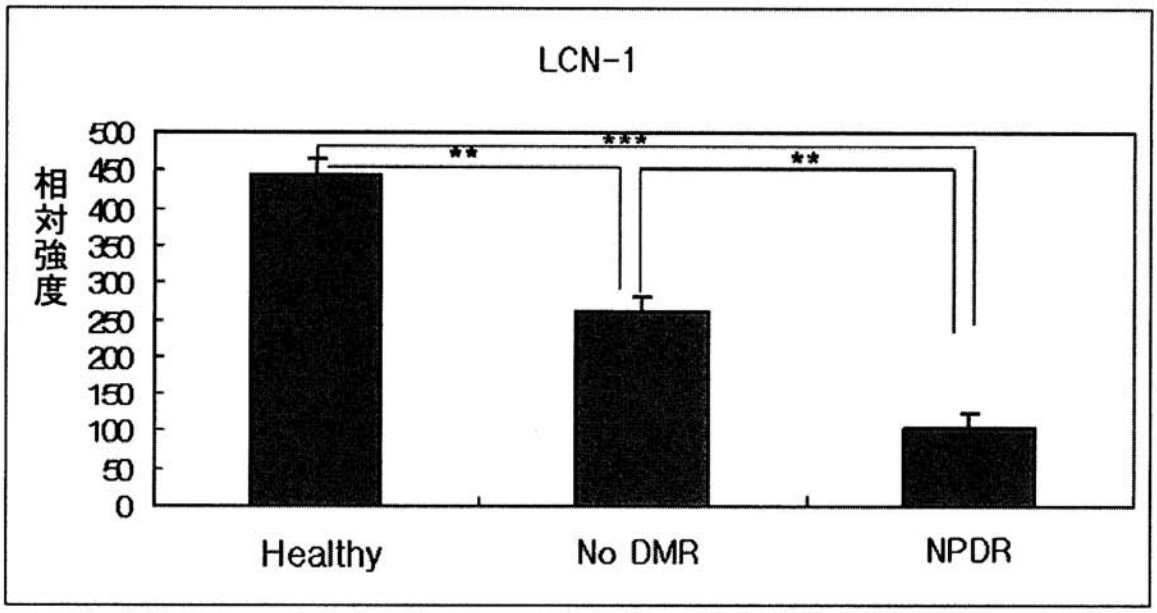
【図２ａ】


Spot
Healthy
No DMR
NPDR
Spot
Healthy
No DMR
NPDR
10688
11078
11046
10530
10699
10765
10861
10825
11035
10852
11038
10889
11055
10894
11056
10927
11057
11051
11069
11058

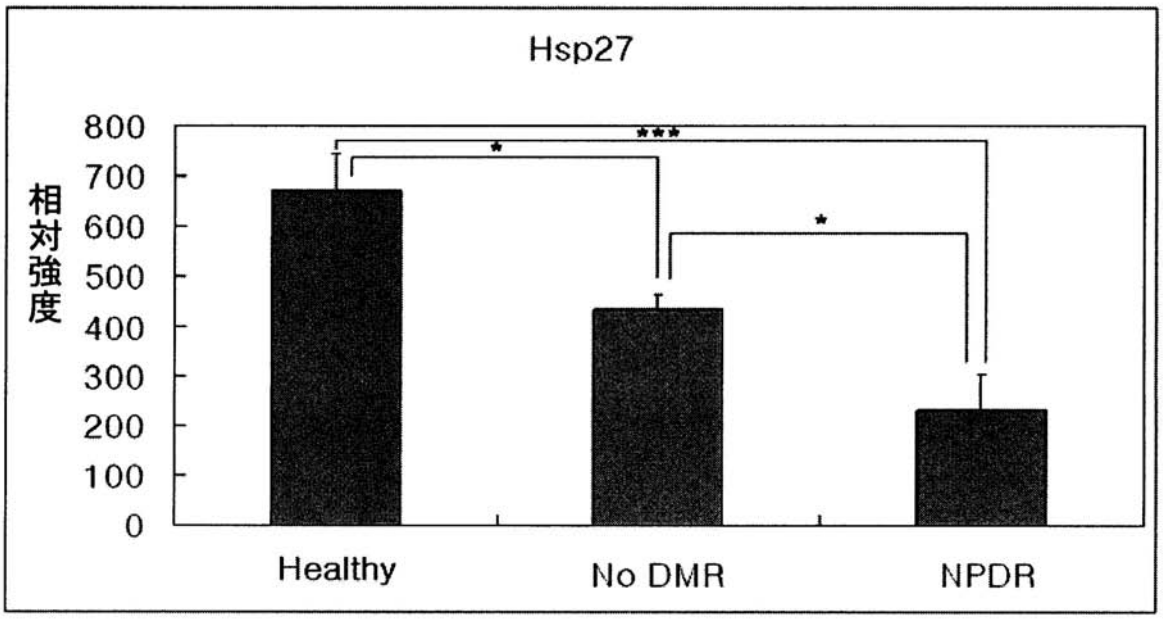
【図３ａ】


Healthy
No DMR
NPDR
LCN-1
Hsp27
B2M

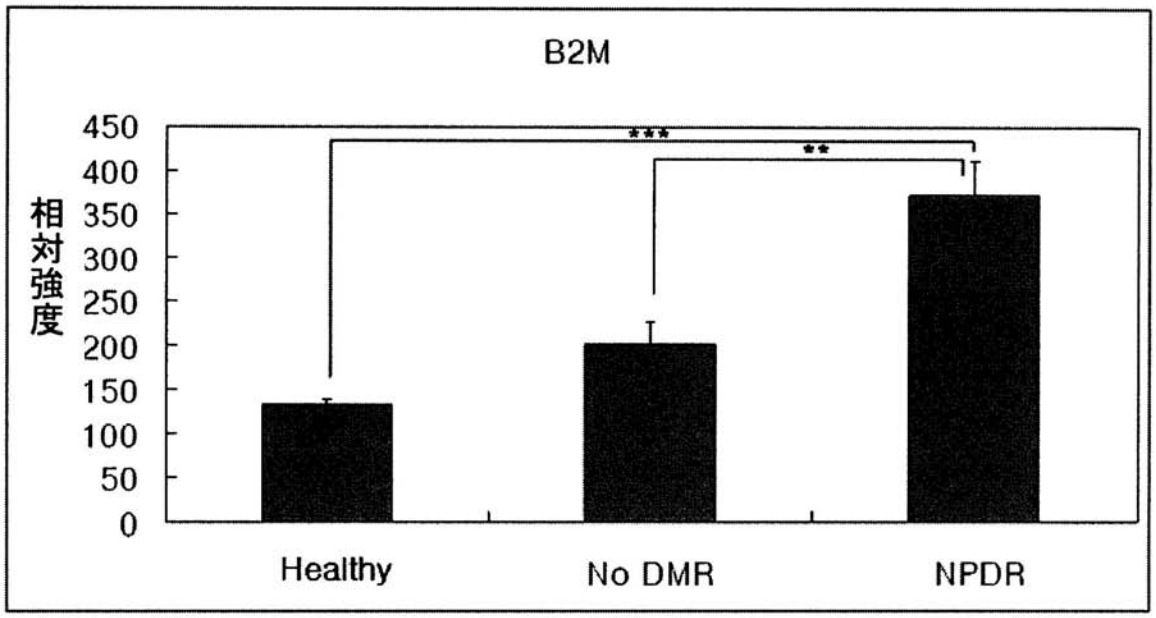
【図３ｂ】


LCN-1
相対強度
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
**
***
**
Healthy
No DMR
NPDR

【図３ｃ】


Hsp27
相対強度
800
700
600
500
400
300
200
100
0
*
***
*
Healthy
No DMR
NPDR

【図３ｄ】



【配列表】

2009168819000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード（参考）
A61K	***38/00***	***(2006.01)***	A61K 37/02		
A61P	***3/10***	***(2006.01)***	A61P 3/10		
A61P	***27/02***	***(2006.01)***	A61P 27/02		
G01N	*27/447*	*(2006.01)*	G01N 27/26	325A	
C07K	*7/04*	*(2006.01)*	G01N 27/26	315H	
C07K	*14/47*	*(2006.01)*	G01N 27/26	315G	
C07K	*16/18*	*(2006.01)*	C07K 7/04		
			C07K 14/47		
			C07K 16/18		

(74)代理人 100113262
弁理士 竹内 祐二
(74)代理人 100115059
弁理士 今江 克実
(74)代理人 100115691
弁理士 藤田 篤史
(74)代理人 100117581
弁理士 二宮 克也
(74)代理人 100117710
弁理士 原田 智雄
(74)代理人 100121728
弁理士 井関 勝守
(74)代理人 100124671
弁理士 関 啓
(74)代理人 100131060
弁理士 杉浦 靖也
(72)発明者 キム チャンファ
大韓民国 １４０－７４４ ソウル，ヨンサン－グ，イチョン－１－トン，イチョン コーロン アパート １０３－４０２
(72)発明者 ユ ヒョンスク
大韓民国 １５７－８４０ ソウル，ガンソ－グ，ドゥンチョン－ドン，６４２，コーロン アパート １０１－４０４
(72)発明者 キム ジェチャン
大韓民国 １３８－７６８ ソウル，ソンパ－グ，ムンジョン－ドン，ファミリー アパート ２０５－３０４
(72)発明者 キム パンギョム
大韓民国 １３６－７６６ ソウル，ソンブッ－ク，ジョンヌン－１－トン，ジョンヌン テヨン アパート １０１－２０８
(72)発明者 パク ヘウォン
大韓民国 １３８－７９６ ソウル，ソンパ－グ，ジャムシル－６－トン，ジャンミ アパート １２－２０７
(72)発明者 キム ミリョン
大韓民国 ４１０－７４２ キョンギ－ド，ゴヤン－シ，イルサンドン－グ，ジャンハン－２－ドン，ホスマウル アパート ５０４－１００３

Ｆターム(参考) 2G045 AA25 BA13 BB50 BB51 CB11 DA36 FA11 FB01 FB03 FB05 GC12
4B024 AA11 BA44 HA15

4C084 AA01 AA02 BA44 CA35 NA14 ZA33 ZC35
4H045 AA11 AA20 AA30 BA15 BA16 BA17 BA18 CA40 DA76 EA50