

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年9月20日(20.09.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/168779 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 33/68 (2006.01) **G01N 33/15** (2006.01)
A61K 38/02 (2006.01) **G01N 33/50** (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/009529

(22) 国際出願日: 2018年3月12日(12.03.2018)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2017-048171 2017年3月14日(14.03.2017) JP

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人: 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(72) 発明者: 武田 吉人 (TAKEDA, Yoshito); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 熊ノ郷淳 (KUMANOGOH, Atsushi); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 木庭 太郎 (KOBA, Taro); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所 (SAEGUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜T N Kビル Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) Title: BIOMARKER FOR CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

(54) 発明の名称: 慢性閉塞性肺疾患バイオマーカー

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a biomarker for chronic obstructive pulmonary diseases, and a method for using the biomarker. The present invention involves an extracellular-vesicle protein group (A) which is in a body fluid collected from a subject.

(57) 要約: 慢性閉塞性肺疾患のバイオマーカー及びその利用方法を提供すること。被検体から採取された体液の細胞外小胞におけるタンパク質群 (A)。



WO 2018/168779 A1

明 細 書

発明の名称：慢性閉塞性肺疾患バイオマーカー

技術分野

[0001] 本発明は、慢性閉塞性肺疾患バイオマーカー、その利用等に関する。

背景技術

[0002] 慢性閉塞性肺疾患（COPD）は、喫煙や大気汚染が原因の気流閉塞を主体とする肺の炎症性疾患である。COPDは、2020年には世界死因の第3位になると推定されており、高齢化に伴い患者数の増加が予想されている。COPDは、多様な表現型を含む全身性疾患と考えられているものの、その診断は呼吸機能の評価のみに依存しており、このため、診断、鑑別、治療等に利用可能なバイオマーカーの開発が急務である。

[0003] また、COPD患者は、世界では2億人、日本では530万人の患者が推定されているものの、治療を受けている患者はわずかほんの5%に過ぎない（福地ら Nippon NICE study）。このような事態を受けて国が『次期国民健康づくり運動プラン』（続・健康日本21）を掲げて、癌、循環器疾患、糖尿病と並ぶ主要取組疾患にCOPDを挙げた。しかし有効なスクリーニングバイオマーカーが存在しないため、未診断、未治療患者が多いだけでなく、根本的かつ有効な治療薬が存在しないのが現状である。

[0004] ECLIPSE studyにおける検討では、COPDバイオマーカーとして、fibrinogen、CC16、SP-D、CCL-18、及びsRAGEが有用であると示されている。この検討においては、COPD患者において末梢血液中のCRP、fibrinogen、IL-6、IL-8等の炎症性バイオマーカーが増加するだけでなく、慢性炎症を示すCOPD患者群（表現型）は、急性増悪が多く予後不良であることが示されている。また、fibrinogen高値はCOPDの病態を反映するだけでなく、症状や増悪と相関することが示されており、さらに急性増悪時にもfibrinogenが増加することが示されている。これらのことから、COPDにおいて急性炎症を捉えることは、予後に影響を与える急性増悪の予測に、慢性炎症を捉えることは予後不良群の予測

に役立つ可能性があることが示唆された。しかし、COPDを含む多くの生活習慣病の発症基盤には慢性炎症が関与するものの、慢性炎症を捉える手法は確立されていない。

[0005] 血清は、非侵襲的に繰り返し採取可能であるので理想的な検査試料と考えられるものの、そこに含まれる99%以上のタンパク質はバイオマーカーの観点から夾雑物とされる多量タンパク（アルブミン等）であるため、プロテオミクスの観点からは、検査資料としての有用性は低い。例えば、COPDと喘息を鑑別可能なバイオマーカーに関する最近の論文（非特許文献1）では、患者数十人の解析を試みるも、解析が2次元電気泳動法による古い質量分析(MS)技術によるものであっただけでなく、大量夾雑物を含む血清を用いたものであったため、見出されたバイオマーカーはプロトロンビンを含む血清夾雑物のみで、COPD特異的バイオマーカーとは程遠いものであった。

[0006] 細胞外小胞は、細胞から分泌される膜小胞であり、細胞内のタンパク質や遺伝情報（mRNA, microRNA等）を細胞外に運搬することにより、局所や全身における細胞間の情報伝達を担っている。近年、がんの検査試料として細胞外小胞が注目を集めているものの、呼吸器疾患、さらにはCOPD慢性閉塞性肺疾患の検査試料としての有用性については知られていない。

先行技術文献

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Am J Respir Crit Care Med. 2011 Jun 15;183(12):1633-43.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、慢性閉塞性肺疾患のバイオマーカー及びその利用方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者は上記課題に鑑みて鋭意研究した結果、被検体から採取された体液の細胞外小胞における特定のタンパク質群が、慢性閉塞性肺疾患のバイオ

マーカーとして有用であることを見出した。この知見に基づいてさらに研究を進めた結果、本発明が完成した。即ち、本発明は、下記の態様を包含する。

[0010] 項 1.

慢性閉塞性肺疾患を検査する方法であって、

(1) 被検体から採取された体液の細胞外小胞における、タンパク質群 (A)

:

(A) Apolipoprotein(a)、Elongation factor 1-alpha 2、Apolipoprotein D、Apolipoprotein M、Prostaglandin G/H synthase 1、Apolipoprotein C-I、Apolipoprotein C-III、Apolipoprotein C-II、Complement factor H-related protein 5、Cytochrome b-245 heavy chain、Oncoprotein-induced transcript 3 protein、EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1、Zinc finger protein basophilin-2、Apolipoprotein E、HLA class I histocompatibility antigen, B-38 alpha chain、CD99 antigen、Complement factor H-related protein 1、Apolipoprotein A-II、Kininogen-1、Serum paraoxonase/arylesterase 1、Fibulin-1、Integrin beta-2、Alpha-lactalbumin、Clusterin、Soluble scavenger receptor cysteine-rich domain-containing protein SSC5D、60S ribosomal protein L8、Ras-related protein Rab-5C、Peroxiredoxin-2、Vesicle-associated membrane protein 3、CD81 antigen、Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1、及びCalmodulinからなるタンパク質群より選択される少なくとも1種のタンパク質を検出する工程を含む、検査方法。

[0011] 項 2.

さらに、(2) 前記工程 (1) で検出されたタンパク質の量又は濃度がカットオフ値以上である場合に、前記被検体が慢性閉塞性肺疾患に罹患していると判定する工程を含む、項 1 に記載の検査方法。

[0012] 項 3.

前記カットオフ値が、慢性閉塞性肺疾患に罹患していない被検体から採取さ

れた体液の細胞外小胞における対応タンパク質の量又は濃度の値の、1～1.5倍の値である、項2に記載の検査方法。

[0013] 項4.

前記体液が全血、血漿、及び血清からなる群より選択される少なくとも1種である、項1～3のいずれかに記載の検査方法。

[0014] 項5.

前記タンパク質(A)群が(A1) Apolipoprotein(a)、Elongation factor 1-alpha 2、Apolipoprotein D、Apolipoprotein M、Prostaglandin G/H synthase 1、Apolipoprotein C-I、Apolipoprotein C-III、Apolipoprotein C-II、Complement factor H-related protein 5、及びCytochrome b-245 heavy chainからなる群である、項1～4のいずれかに記載の検査方法。

[0015] 項6.

前記タンパク質(A)群が(A2) Fibulin-1、Integrin beta-2、CD99 antigen、Peroxisome oxidoreductase 2、Clusterin、Prostaglandin G/H synthase 1、Vesicle-associated membrane protein 3、Ras-related protein Rab-5C、及びEGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1からなる群である、項1～4のいずれかに記載の検査方法。

[0016] 項7.

前記被検体がヒトである、項1～6のいずれかに記載の検査方法。

[0017] 項8.

タンパク質群(A) :

(A) Apolipoprotein(a)、Elongation factor 1-alpha 2、Apolipoprotein D、Apolipoprotein M、Prostaglandin G/H synthase 1、Apolipoprotein C-I、Apolipoprotein C-III、Apolipoprotein C-II、Complement factor H-related protein 5、Cytochrome b-245 heavy chain、Oncoprotein-induced transcript 3 protein、EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1、Zinc finger protein basophilin-2、Apolipoprotein E、HLA class I histocompatibility antigen、B-28 alpha chain、CD99 antigen、Compl

ement factor H-related protein 1、Apolipoprotein A-II、Kininogen-1、Serum paraoxonase/arylesterase 1、Fibulin-1、Integrin beta-2、Alpha-lactalbumin、Clusterin、Soluble scavenger receptor cysteine-rich domain-containing protein SSC5D、60S ribosomal protein L8、Ras-related protein Rab-5C、Peroxisome oxidoreductin-2、Vesicle-associated membrane protein 3、CD81 antigen、Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1、及びCalmodulinからなるタンパク質群より選択される少なくとも1種のタンパク質の検出剤を含む、慢性閉塞性肺疾患の検査薬。

[0018] 項 9.

タンパク質群 (A) :

(A) Apolipoprotein(a)、Elongation factor 1-alpha 2、Apolipoprotein D、Apolipoprotein M、Prostaglandin G/H synthase 1、Apolipoprotein C-I、Apolipoprotein C-III、Apolipoprotein C-II、Complement factor H-related protein 5、Cytochrome b-245 heavy chain、Oncoprotein-induced transcript 3 protein、EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1、Zinc finger protein basophilin-2、Apolipoprotein E、HLA class I histocompatibility antigen、B-28 alpha chain、CD99 antigen、Complement factor H-related protein 1、Apolipoprotein A-II、Kininogen-1、Serum paraoxonase/arylesterase 1、Fibulin-1、Integrin beta-2、Alpha-lactalbumin、Clusterin、Soluble scavenger receptor cysteine-rich domain-containing protein SSC5D、60S ribosomal protein L8、Ras-related protein Rab-5C、Peroxisome oxidoreductin-2、Vesicle-associated membrane protein 3、CD81 antigen、Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1、及びCalmodulinからなるタンパク質群より選択される少なくとも1種のタンパク質の抑制剤を含有する、慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療剤。

[0019] 項 10.

被検物質で処理された動物から採取された体液の細胞外小胞における、タンパク質群 (A) :

(A) Apolipoprotein(a)、Elongation factor 1- α 2、Apolipoprotein D、Apolipoprotein M、Prostaglandin G/H synthase 1、Apolipoprotein C-I、Apolipoprotein C-III、Apolipoprotein C-II、Complement factor H-related protein 5、Cytochrome b-245 heavy chain、Oncoprotein-induced transcript 3 protein、EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1、Zinc finger protein basonuclin-2、Apolipoprotein E、HLA class I histocompatibility antigen, B-38 α chain、CD99 antigen、Complement factor H-related protein 1、Apolipoprotein A-II、Kininogen-1、Serum paraoxonase/arylesterase 1、Fibulin-1、Integrin β -2、Alpha-lactalbumin、Clusterin、Soluble scavenger receptor cysteine-rich domain-containing protein SSC5D、60S ribosomal protein L8、Ras-related protein Rab-5C、Peroxiredoxin-2、Vesicle-associated membrane protein 3、CD81 antigen、Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit β -1、及びCalmodulinからなるタンパク質群より選択される少なくとも1種のタンパク質の量又は濃度を指標とする、慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療剤の有効成分のスクリーニング方法。

[0020] 項 1 1.

前記指標の値が、被検物質で処理されていない動物から採取された体液の細胞外小胞における対応タンパク質の量又は濃度よりも低い場合に、前記被検物質を慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療剤の有効成分として選択する工程を含む、項 1 0 に記載のスクリーニング方法。

[0021] 項 1 2.

被検物質で処理された動物から採取された体液の細胞外小胞における、タンパク質群 (A) :

(A) Apolipoprotein(a)、Elongation factor 1- α 2、Apolipoprotein D、Apolipoprotein M、Prostaglandin G/H synthase 1、Apolipoprotein C-I、Apolipoprotein C-III、Apolipoprotein C-II、Complement factor H-related protein 5、Cytochrome b-245 heavy chain、Oncoprotein-induced tran

script 3 protein、EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1、Zinc finger protein basophilin-2、Apolipoprotein E、HLA class I histocompatibility antigen, B-2-microglobulin chain、CD99 antigen、Complement factor H-related protein 1、Apolipoprotein A-II、Kininogen-1、Serum paraoxonase/arylesterase 1、Fibulin-1、Integrin beta-2、Alpha-lactalbumin、Clusterin、Soluble scavenger receptor cysteine-rich domain-containing protein SSC5D、60S ribosomal protein L8、Ras-related protein Rab-5C、Peroxiredoxin-2、Vesicle-associated membrane protein 3、CD81 antigen、Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1、及びCalmodulinからなるタンパク質群より選択される少なくとも1種のタンパク質の量又は濃度を指標とする、慢性閉塞性肺疾患の誘発性又は増悪性の評価方法。

発明の効果

[0022] 本発明によれば、慢性閉塞性肺疾患のバイオマーカーを提供することができる。該バイオマーカーを利用することにより、慢性閉塞性肺疾患の検査等を、より簡便、より効率的、且つより低コストで行うことができる。さらに、該バイオマーカーを利用することにより、慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療、慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療剤の有効成分のスクリーニング等も可能になり得る。

図面の簡単な説明

[0023] [図1]細胞外小胞画分の粒子数及び粒子径を示す（試験例1）。Normalは健常被検体から得られた細胞外小胞画分の結果を示し、COPDは慢性閉塞性肺疾患被検体から得られた細胞外小胞画分の結果を示す。

[図2]細胞外小胞画分の電子顕微鏡観察像を示す（試験例1）。Normalは健常被検体から得られた細胞外小胞画分の結果を示し、COPDは慢性閉塞性肺疾患被検体から得られた細胞外小胞画分の結果を示す。

[図3]細胞外小胞画分のウェスタンブロットの結果を示す（試験例1）。Normalは健常被検体から得られた細胞外小胞画分の結果を示し、COPDは慢性閉塞性

肺疾患被検体から得られた細胞外小胞画分の結果を示す。バンドの写真の左側に、使用した一次抗体の抗原を示す。

[図4]細胞外小胞画分のウェスタンブロットの結果を示す（試験例3）。健常は健常被検体から得られた細胞外小胞画分の結果を示し、COPDは慢性閉塞性肺疾患被検体から得られた細胞外小胞画分の結果を示す。バンドの写真の左側に、使用した一次抗体の抗原を示す。

[図5]Tissue arrayの免疫染色の結果を示す（試験例4）。Controlは健常被検体由来のTissue arrayの結果を示し、COPDは慢性閉塞性肺疾患被検体由来のTissue arrayの結果を示し、肺線維症は肺線維症被検体由来のTissue arrayの結果を示す。染色写真の左側に、使用した一次抗体の抗原を示す。

発明を実施するための形態

[0024] 本明細書中において、「含有」及び「含む」なる表現については、「含有」、「含む」、「実質的にからなる」及び「のみからなる」という概念を含む。

[0025] 1. 慢性閉塞性肺疾患の検査方法

本発明は、その一態様において、慢性閉塞性肺疾患を検査する方法であって、

(1) 被検体から採取された体液の細胞外小胞における、タンパク質群 (A) より選択される少なくとも1種のタンパク質を検出する工程（工程1）を含む、検査方法（本明細書において、「本発明の慢性閉塞性肺疾患検査方法」と示すこともある。）に関する。以下、これについて説明する。

[0026] 1-1. 工程 (1)

検査対象である「慢性閉塞性肺疾患」は、特に制限されず、気腫型、非気腫型のいずれでもよい。

[0027] 被検体は、本発明の検査方法の対象生物であり、その生物種は特に制限されない。被検体の生物種としては、例えばヒト、サル、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウサギなどの種々の哺乳類動物が挙げられ、好ましくはマウスが挙げられる。

[0028] 被検体の状態は、特に制限されない。被検体としては、例えば慢性閉塞性肺疾患に罹患しているかどうか不明な検体、急性肺炎症性疾患に罹患していると既に別の方法により判定されているが、慢性閉塞性肺疾患及び急性肺炎症性疾患に罹患していると既に別の方法により判定されている検体、慢性閉塞性肺疾患に罹患していないと既に別の方法により判定されている検体、慢性閉塞性肺疾患の治療中の検体等が挙げられる。

[0029] 体液は、特に制限されない。体液としては、例えば全血、血清、血漿、髄液、唾液、関節液、尿、組織液（気管支肺胞洗浄液を含む）、汗、涙、喀痰、鼻汁などが挙げられ、好ましくは全血、血清、血漿、髄液が挙げられ、より好ましくは全血、血清、血漿が挙げられる。体液は、1種単独で採用してもよいし、2種以上を組み合わせることで採用してもよい。

[0030] 体液は、当業者に公知の方法で被検体から採取することができる。例えば、全血は、注射器などを用いた採血によって採取することができる。血清は、全血から血球及び特定の血液凝固因子を除去した部分であり、例えば、全血を凝固させた後の上澄みとして得ることができる。血漿は、全血から血球を除去した部分であり、例えば、全血を凝固させない条件下で遠心分離に供した際の上澄みとして得ることができる。

[0031] 細胞外小胞は、細胞から分泌、放出等される膜小胞である限り特に制限されない。細胞外小胞は、通常は、細胞内のタンパク質や遺伝情報（mRNA, microRNA等）を細胞外に運搬することにより、局所や全身における細胞間の情報伝達を担っている膜小胞として定義される。細胞外小胞としては、例えばエクソソーム、微小小胞体、アポトーシス小体、エクトソーム、マイクロパーティクル、分泌マイクロベシクル等が挙げられる。

[0032] 細胞外小胞は、体液から、公知の方法に従って又は準じて、精製、分離、濃縮等することができる。細胞外小胞を精製、分離、濃縮等する方法としては、例えば超遠心法（例えばペレットダウン法、スクロースクッション法、密度勾配遠心法等）、イムノアフィニティー担体を用いる方法、ゲルろ過法、フィールド・フロー分画法、FACS法等が挙げられる。また、細胞外小胞の

精製、分離、濃縮等は、市販のキットを用いて行うことも可能である。これらの方法は、1種単独で採用してもよいし、2種以上を組み合わせ採用してもよい。

[0033] 工程 (1) の検出対象は、タンパク質群 (A) より選択される少なくとも1種のタンパク質 (本明細書において、これらをまとめて「対象タンパク質」と示すこともある。) である。

[0034] タンパク質群 (A) は、(A) Apolipoprotein(a)、Elongation factor 1-alpha 2、Apolipoprotein D、Apolipoprotein M、Prostaglandin G/H synthase 1、Apolipoprotein C-I、Apolipoprotein C-III、Apolipoprotein C-II、Complement factor H-related protein 5、Cytochrome b-245 heavy chain、Oncoprotein-induced transcript 3 protein、EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1、Zinc finger protein basonuclin-2、Apolipoprotein E、HLA class I histocompatibility antigen, B-38 alpha chain、CD99 antigen、Complement factor H-related protein 1、Apolipoprotein A-II、Kininogen-1、Serum paraoxonase/arylesterase 1、Fibulin-1、Integrin beta-2、Alpha-lactalbumin、Clusterin、Soluble scavenger receptor cysteine-rich domain-containing protein SSC5D、60S ribosomal protein L8、Ras-related protein Rab-5C、Peroxiredoxin-2、Vesicle-associated membrane protein 3、CD81 antigen、Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1、及びCalmodulinからなるタンパク質群である。

[0035] タンパク質群 (A) は、慢性閉塞性肺疾患特異的なバイオマーカーであり、これを指標とすることにより慢性閉塞性肺疾患を鑑別可能である。

[0036] タンパク質群 (A) の中でも、正常検体に対する量比がより高いという観点からは、好ましくはApolipoprotein(a)、Elongation factor 1-alpha 2、Apolipoprotein D、Apolipoprotein M、Prostaglandin G/H synthase 1、Apolipoprotein C-I、Apolipoprotein C-III、Apolipoprotein C-II、Complement factor H-related protein 5、Cytochrome b-245 heavy chain等が挙げられ、

より好ましくはApolipoprotein(a)、Elongation factor 1- α 2、Apolipoprotein D、Apolipoprotein M、Prostaglandin G/H synthase 1等が挙げられる。

[0037] タンパク質群 (A) の中でも、炎症との関連性や膜タンパク質であること等の観点からは、好ましくはFibulin-1、Integrin beta-2、CD99 antigen、Peroxiredoxin-2、Clusterin、Prostaglandin G/H synthase 1、Vesicle-associated membrane protein 3、Ras-related protein Rab-5C、EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1等が挙げられる。

[0038] タンパク質群 (A) の中でも、マウスとヒトとの共通バイオマーカーとしてより有望であるという観点から、好ましくはEGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1が挙げられる。

[0039] タンパク質群 (A) のタンパク質は、ヒトの場合であれば、後述の実施例における表1に示されるUniProtKBアクセッション番号によって特定されるタンパク質である。他の生物種の場合であれば、表1に示されるUniProtKBアクセッション番号によって特定されるタンパク質のオースログである。

[0040] 工程 (1) における対象タンパク質の数は、1種のみでもよいが、2種以上の組み合わせであってもよい。より多く（例えば2種、5種、10種、20種、30種以上）の検出対象を組み合わせることにより、慢性閉塞性肺疾患の検査等を、より正確に行うことが可能になる。

[0041] 検出は、通常は、対象タンパク質の量又は濃度を測定することによって行われる。「濃度」とは、絶対濃度に限らず、相対濃度や、単位体積辺りの重量や、絶対濃度を知らるために測定した生データなどでもよい。

[0042] 対象タンパク質を検出する方法としては、対象タンパク質の一部又は全部を特異的に検出できる方法であれば特に制限されない。検出方法としては、具体的には、例えば、対象タンパク質を構成するペプチドを検出する質量分析法、対象タンパク質を特異的に認識する抗体を用いた免疫学的測定法等を挙げることができる。なお、対象タンパク質のアミノ酸配列情報は、UniProt KBアクセッション番号を基に、EBI (<http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhelp.htm>)

l) のデータベースで検索することにより得ることができる。

[0043] 免疫学的測定法としては、免疫組織化学染色法、ELISA法、サンドイッチELISA法、EIA法、RIA法、ウェスタンブロッティング法等を好適に例示することができる。

[0044] 質量分析法とは、ペプチド試料を、イオン源を用いて気体状のイオンとし（イオン化）、分析部において、真空中で運動させ電磁気力を用いて、あるいは飛行時間差によりイオン化したペプチド試料を質量電荷比に応じて分離し、検出できる質量分析計を用いた測定方法のことをいい、イオン源を用いてイオン化する方法としては、EI法、CI法、FD法、FAB法、MALDI法、ESI法などの方法を適宜選択することができ、また、分析部において、イオン化したペプチド試料を分離する方法としては、磁場偏向型、四重極型、イオントラップ型、飛行時間（TOF）型、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型などの分離方法を適宜選択することができる。また、2以上の質量分析法を組み合わせたタンデム型質量分析（MS/MS）やトリプル四重極型質量分析を利用することができる。また、サンプルがリン酸化したペプチドを含む試料の場合、質量分析計へのサンプル導入前に、サンプルを鉄イオン固定化アフィニティークロマトグラフィー（Fe-IMAC）を用いて濃縮することができる。また、液体クロマトグラフ（LC）やHPLCにより、対象タンパク質を構成するペプチドを分離・精製してサンプルとすることができる。また、検出部やデータ処理方法も適宜選択することができる。なお、質量分析法を用いて対象タンパク質を構成するペプチドを質量分析法で検出・定量する場合、かかるペプチドと同一のアミノ酸配列からなる、濃度が既知の安定同位体で標識したペプチドを内部標準とすることができる。かかる安定同位体標識ペプチドとしては、検出する対象タンパク質を構成するペプチドにおけるアミノ酸の1個以上が、 ^{15}N 、 ^{13}C 、 ^{18}O 、及び ^2H のいずれか1以上を含む安定同位体標識ペプチドであれば、アミノ酸の種類、位置、数などは適宜選択することができ、かかる安定同位体標識ペプチドは、安定同位元素により標識されたアミノ酸を用いてFmoc法（Amblard., et al. Methods Mol Biol.298:3-24(2005))等の適当な

手段で化学合成することができるが、iTRAQ（登録商標）試薬、ICAT（登録商標）試薬、ICPL（登録商標）試薬、NBS（登録商標）試薬などの標識試薬を用いて作製することもできる。

[0045] 工程（１）を含む本発明の検査方法によれば、慢性閉塞性肺疾患の検出指標である対象タンパク質の量及び／又は濃度を提供することができ、これにより慢性閉塞性肺疾患の検出などを補助することができる。

[0046] 工程（１）を含む本発明の検査方法による検査結果は、治療効果判定、慢性閉塞性肺疾患の病態解明、慢性閉塞性肺疾患の予後予測（呼吸機能低下群、急性増悪）、患者層別化、治療方法の選択（個別化医療、治療反応性）、慢性閉塞性肺疾患における難治化や、リモデリングの評価、慢性閉塞性肺疾患の組織型や表現型等の鑑別等に利用し得る。

[0047] 1-2. 工程（２）

本発明の検査方法は、一態様として、さらに、

（２）前記工程（１）で検出されたタンパク質の量又は濃度がカットオフ値以上である場合に、前記被検体が慢性閉塞性肺疾患に罹患していると判定する工程（工程２）を含むことが好ましい。該工程２を含む本発明の検査方法によれば、慢性閉塞性肺疾患を判定することが可能となる。

[0048] カットオフ値は、感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率などの観点から当業者が適宜設定することができ、例えば、慢性閉塞性肺疾患に罹患していない被検体から採取された体液の細胞外小胞における対象タンパク質の量及び／又は濃度に基づいて、その都度定められた値、或いは予め定められた値とすることができる。カットオフ値は、例えば、慢性閉塞性肺疾患に罹患していない被検体から採取された体液の細胞外小胞における対象タンパク質の量及び／又は濃度（被検体が複数の場合は、平均値、中央値など）の、例えば１～１.５倍の値とすることができる。

[0049] 工程（２）の好ましい一態様においては、被検体が慢性閉塞性肺疾患の治療中の検体である場合、カットオフ値を、例えば同一検体についての過去の試料における対象タンパク質の量及び／又は濃度に基づいた値とすることによ

り、治療効果を判定することができる。

[0050] 2. 慢性閉塞性肺疾患のより高い精度での診断

工程（2）を含む本発明の検査方法により、被検体が慢性閉塞性肺疾患に罹患していると判定された場合、本発明の検査方法に、さらに慢性閉塞性肺疾患の医師による診断を適用する工程を組み合わせることによって、より高い精度で慢性閉塞性肺疾患を診断することができる。また、本発明の検査方法はより正確に慢性閉塞性肺疾患を検出できるので、本発明の検査方法に上記工程を組み合わせることによって、より効率的且つより正確に「慢性閉塞性肺疾患に罹患している」と診断できる。

[0051] 3. 慢性閉塞性肺疾患の治療

工程（2）を含む本発明の検査方法により被検体が慢性閉塞性肺疾患に罹患していると判定された場合は本発明の検査方法に対してさらに、或いは上記「2. 慢性閉塞性肺疾患のより高い精度での診断」に記載の様に慢性閉塞性肺疾患に罹患していると診断された場合は本発明の検査方法と医師による診断を適用する工程との組合せに対してさらに、（3）慢性閉塞性肺疾患に罹患していると判定又は診断された被検体に対して、該疾患の治療を行う工程を行うことによって、被検体の該疾患を治療することが可能となる。また、本発明の検査方法はより正確に慢性閉塞性肺疾患を検出できるので、本発明の検査方法に対して、或いは本発明の検査方法と医師による診断を適用する工程との組合せに対して工程3を組み合わせることによって、慢性閉塞性肺疾患に罹患している被検体をより効率的に、より確実に治療できる。

[0052] 慢性閉塞性肺疾患の治療方法は、特に制限されないが、代表的には投薬治療が挙げられる。投薬治療に用いる医薬としては、特に制限されないが、例えばスピリーバ、シーブリ、エンクラッセ、エクリラ、アトロベント、テルシガン等の抗コリン薬； セレベント、オンブレス、オーキシス、サルタノール、メプチン等の β 2刺激薬； ウルティブロ、アノーロ、スピオルト等の抗コリン薬・ β 2刺激薬配合剤； キュバール、フルタイド、パルミコート、オルベスコ、アズマネックス等のステロイド薬； アドエア、シムビコート

、レルベア等のステロイド薬・ β 2刺激薬配合剤等が挙げられる。医薬は、1種、2種、又は3種以上を組み合わせる用いることができる。

[0053] 4. 慢性閉塞性肺疾患の検査薬

本発明は、その一態様において、タンパク質群 (A) より選択される少なくとも1種のタンパク質の検出剤を含む、慢性閉塞性肺疾患の検査薬（本明細書において、「本発明の検査薬」と示すこともある。）に関する。以下、これについて説明する。

[0054] タンパク質群 (A)、慢性閉塞性肺疾患等については、上記「1. 慢性閉塞性肺疾患の検査方法」における定義と同様である。

[0055] 検出剤は、対象タンパク質を特異的に検出できるものである限り特に制限されない。該検出剤としては、例えば対象タンパク質に対する抗体が挙げられる。検出剤は、標識されたものであってもよい。標識としては、例えば蛍光物質、発光物質、色素、酵素、金コロイド、放射性同位体などが挙げられる。また、検出剤（特に抗体）は、基材（例えばマイクロウェルプレート等のプラスチック基材）に吸着した状態であってもよい。

[0056] 抗体は、対象タンパク質を選択的に（特異的に）認識するものであれば、特に限定されない。ここで、「選択的に（特異的に）認識する」とは、例えばウェスタンブロット法やELISA法において、対象タンパク質が特異的に検出できることを意味するが、それに限定されることなく、当業者が上記検出物が対象タンパク質に由来するものであると判断できるものであればよい。

[0057] 抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、またはFabフラグメントやFab発現ライブラリーによって生成されるフラグメントなどのように抗原結合性を有する上記抗体の一部が包含される。対象タンパク質のアミノ酸配列のうち少なくとも連続する、通常8アミノ酸、好ましくは15アミノ酸、より好ましくは20アミノ酸からなるポリペプチドに対して抗原結合性を有する抗体も、本発明の抗体に含まれる。

[0058] これらの抗体の製造方法は、すでに周知であり、本発明の抗体もこれらの常法に従って製造することができる（Current protocols in Molecular Biol

ogy, Chapter 11.12~11.13(2000))。具体的には、本発明の抗体がポリクローナル抗体の場合には、常法に従って大腸菌等で発現し精製した対象タンパク質を用いて、あるいは常法に従って当該対象タンパク質の部分アミノ酸配列を有するオリゴペプチドを合成して、家兎等の非ヒト動物に免疫し、該免疫動物の血清から常法に従って得ることが可能である。一方、モノクローナル抗体の場合には、常法に従って大腸菌等で発現し精製した対象タンパク質、あるいは対象タンパク質の部分アミノ酸配列を有するオリゴペプチドをマウス等の非ヒト動物に免疫し、得られた脾臓細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合させて調製したハイブリドーマ細胞の中から得ることができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4~11.11)。

[0059] 抗体の作製に免疫抗原として使用される対象タンパク質は、公知の遺伝子配列情報に基づいて、DNAクローニング、各プラスミドの構築、宿主へのトランスフェクション、形質転換体の培養および培養物からのタンパク質の回収の操作により得ることができる。これらの操作は、当業者に既知の方法、あるいは文献記載の方法 (Molecular Cloning, T.Maniatis et al., CSH Laboratory (1983), DNA Cloning, DM. Glover, IRL PRESS (1985)) などに準じて行うことができる。

[0060] 具体的には、対象タンパク質をコードする遺伝子が所望の宿主細胞中で発現できる組み換えDNA (発現ベクター) を作製し、これを宿主細胞に導入して形質転換し、該形質転換体を培養して、得られる培養物から、目的タンパク質を回収することによって、本発明抗体の製造のための免疫抗原としてのタンパク質を得ることができる。また対象タンパク質の部分ペプチドは、公知の遺伝子配列情報に従って、一般的な化学合成法 (ペプチド合成) によって製造することもできる。

[0061] また本発明の抗体は、対象タンパク質の部分アミノ酸配列を有するオリゴペプチドを用いて調製されるものであってよい。かかる抗体の製造のために用いられるオリゴ (ポリ) ペプチドは、機能的な生物活性を有することは要

しないが、対象タンパク質と同様な免疫原特性を有するものであることが望ましい。好ましくはこの免疫原特性を有し、且つ対象タンパク質のアミノ酸配列において少なくとも連続する8アミノ酸、好ましくは15アミノ酸、より好ましくは20アミノ酸からなるオリゴ（ポリ）ペプチドを例示することができる。

[0062] かかるオリゴ（ポリ）ペプチドに対する抗体の製造は、宿主に応じて種々のアジュバントを用いて免疫学的反応を高めることによって行うこともできる。限定はされないが、そのようなアジュバントには、フロイントアジュバント、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、並びにリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシアニン及びジニトロフェノールのような表面活性物質、BCG（カルメットーグラン桿菌）やコリネバクテリウム・パルヴムなどのヒトアジュバントが含まれる。

[0063] 本発明の検査薬は、組成物の形態であってもよい。該組成物には、必要に応じて他の成分が含まれていてもよい。他の成分としては、例えば基剤、担体、溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、増粘剤、保湿剤、着色料、香料、キレート剤等が挙げられる。

[0064] 本発明の検査薬は、キットの形態であってもよい。該キットには、上記検出剤或いはこれを含む上記組成物のほかに、被検体の体液の細胞外小胞における対象タンパク質の検出に使用し得るものを含んでいてもよい。このようなものの具体例としては、各種試薬（例えば二次抗体、緩衝液等）、器具（例えば細胞外小胞の精製、分離、濃縮用器具（例えばカラム等））等が挙げられる。

[0065] 5. 慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療剤

本発明は、その一態様において、タンパク質群（A）より選択される少なくとも1種のタンパク質の抑制剤を含有する、慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療剤（本明細書において、「本発明の剤」と示すこともある。）に関する。以下、これについて説明する。

[0066] タンパク質群 (A) 等については、上記「1. 慢性閉塞性肺疾患の検査方法」における定義と同様である。

[0067] 抑制剤としては、好ましくは対象タンパク質の発現抑制剤が挙げられる。

[0068] 対象タンパク質の発現抑制剤としては、対象タンパク質、そのmRNAなどの発現量を抑制し得るものである限り特に制限されず、例えば対象タンパク質の遺伝子特異的small interfering RNA (siRNA)、対象タンパク質の遺伝子特異的microRNA (miRNA)、対象タンパク質の遺伝子特異的アンチセンス核酸、これらの発現ベクター；対象タンパク質の遺伝子特異的リボザイム；CRISPR/Casシステムによる対象タンパク質の遺伝子遺伝子編集剤などが挙げられる。

[0069] なお、発現抑制とは、対象タンパク質、そのmRNAなどの発現量を、例えば1/2、1/3、1/5、1/10、1/20、1/30、1/50、1/100、1/200、1/300、1/500、1/1000、1/10000以下に抑制することを意味し、これらの発現量を0とすることをも包含する。

[0070] 対象タンパク質の遺伝子siRNAは、対象タンパク質をコードする遺伝子の発現を特異的に抑制する二本鎖RNA分子である限り特に制限されない。一実施形態において、siRNAは、例えば、18塩基以上、19塩基以上、20塩基以上、又は21塩基以上の長さであることが好ましい。また、siRNAは、例えば、25塩基以下、24塩基以下、23塩基以下、又は22塩基以下の長さであることが好ましい。ここに記載するsiRNAの長さの上限値及び下限値は任意に組み合わせることが想定される。例えば、下限が18塩基であり、上限が25塩基、24塩基、23塩基、又は22塩基である長さ；下限が19塩基であり、上限が25塩基、24塩基、23塩基、又は22塩基である長さ；下限が20塩基であり、上限が25塩基、24塩基、23塩基、又は22塩基である長さ；下限が21塩基であり、上限が25塩基、24塩基、23塩基、又は22塩基である長さの組み合わせが想定される。

[0071] siRNAは、shRNA(small hairpin RNA)であっても良い。shRNAは、その一部がステムループ構造を形成するように設計することができる。例えば、shRNAは、ある領域の配列を配列aとし、配列aに対する相補鎖を配列bとすると、配

列a、スペーサー、配列bの順になるようにこれらの配列が一本のRNA鎖に存在するようにし、全体で45～60塩基の長さとなるように設計することができる。配列aは、標的となる対象タンパク質をコードする塩基配列の一部の領域の配列であり、標的領域は特に限定されず、任意の領域を候補にすることが可能である。そして配列aの長さは19～25塩基、好ましくは19～21塩基である。

[0072] 対象タンパク質の遺伝子特異的siRNAは、5'又は3'末端に、付加的な塩基を有していてもよい。該付加的塩基の長さは、通常2～4塩基程度である。該付加的塩基は、DNAでもRNAでもよいが、DNAを用いると核酸の安定性を向上させることができる場合がある。このような付加的塩基の配列としては、例えばug-3'、uu-3'、tg-3'、tt-3'、ggg-3'、guuu-3'、gttt-3'、ttttt-3'、uuuuu-3'などの配列が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0073] siRNAは、3'末端に突出部配列（オーバーハング）を有していてもよく、具体的には、dTdT（dTはデオキシチミジンを表わす）を付加したものが挙げられる。また、末端付加がない平滑末端（ブラントエンド）であってもよい。siRNAは、センス鎖とアンチセンス鎖が異なる塩基数であってもよく、例えば、アンチセンス鎖が3'末端及び5'末端に突出部配列（オーバーハング）を有している「asymmetrical interfering RNA (aiRNA)」を挙げることができる。典型的なaiRNAは、アンチセンス鎖が21塩基からなり、センス鎖が15塩基からなり、アンチセンス鎖の両端で各々3塩基のオーバーハング構造をとる。

[0074] 対象タンパク質の遺伝子特異的siRNAの標的配列の位置は特に制限されるわけではないが、一実施形態において、5' -UTR及び開始コドンから約50塩基まで、並びに3' -UTR以外の領域から標的配列を選択することが望ましい。選択された標的配列の候補群について、標的以外のmRNAにおいて16-17塩基の連続した配列に相同性がないかどうかを、BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) などのホモロジー検索ソフトを用いて調べ、選択した標的配列の特異性を確認することが好ましい。特異性が確認された標的配列について、AA（もしくはNA）以降の19-21塩基にTTもしくはUUの3'末端オーバーハングを

有するセンス鎖と、該19-21塩基に相補的な配列及びTTもしくはUUの3' 末端オーバーハングを有するアンチセンス鎖とからなる2本鎖RNAをsiRNAとして設計してもよい。また、siRNAの前駆体であるshRNAは、ループ構造を形成する任意のリンカー配列（例えば、5-25塩基程度）を適宜選択し、上記センス鎖とアンチセンス鎖とを該リンカー配列を介して連結することにより設計することができる。

[0075] siRNA及び／又はshRNAの配列は、種々のwebサイト上に無料で提供される検索ソフトを用いて検索が可能である。このようなサイトとしては、例えば、以下を挙げることができる。

Ambionが提供するsiRNA Target Finder (http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/siRNA_finder.html) pSilencer（登録商標）Expression Vector用インサートデザインツール (http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/psilencer_converter.html) RNAi Codexが提供するGeneSeer (<http://codex.cshl.edu/scripts/newsearchhairpin.cgi>)。

[0076] siRNAは、mRNA上の標的配列のセンス鎖及びアンチセンス鎖をDNA/RNA自動合成機でそれぞれ合成し、適当なアニーリング緩衝液中、約90～約95℃で約1分程度変性させた後、約30～約70℃で約1～約8時間アニーリングさせることにより調製することができる。また、siRNAの前駆体となるshRNAを合成し、これを、RNA切断タンパク質ダイサー（dicer）を用いて切断することにより調製することもできる。

[0077] 対象タンパク質の遺伝子特異的miRNAは、対象タンパク質をコードする遺伝子の翻訳を阻害する限り任意である。例えば、miRNAは、siRNAのように標的mRNAを切断するのではなく、標的の3' 非翻訳領域（UTR）に対合してその翻訳を阻害してもよい。miRNAは、pri-miRNA（primary miRNA）、pre-miRNA（precursor miRNA）、及び成熟miRNAのいずれでもよい。miRNAの長さは特に制限されず、pri-miRNAの長さは通常数百～数千塩基であり、pre-miRNAの長さは通常50～80塩基であり、成熟miRNAの長さは通常18～30塩基である。一実施形態において、対象タンパク質の遺伝子特異的miRNAは、好ましくはpre-miRNA

又は成熟miRNAであり、より好ましくは成熟miRNAである。このような対象タンパク質の遺伝子特異的miRNAは、公知の手法で合成してもよく、合成RNAを提供する会社から購入してもよい。

[0078] 対象タンパク質の遺伝子特異的アンチセンス核酸とは、対象タンパク質をコードする遺伝子のmRNAの塩基配列と相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列又はその一部を含む核酸であって、該mRNAと特異的かつ安定した二重鎖を形成して結合することにより、対象タンパク質合成を抑制する機能を有する核酸である。アンチセンス核酸はDNA、RNA、DNA/RNAキメラのいずれでもよい。アンチセンス核酸がDNAの場合、標的RNAとアンチセンスDNAとによって形成されるRNA:DNAハイブリッドは、内在性リボヌクレアーゼH (RNase H) に認識されて標的RNAの選択的な分解を引き起こす。したがって、RNase Hによる分解を指向するアンチセンスDNAの場合、標的配列は、mRNA中の配列だけでなく、対象タンパク質の遺伝子の初期翻訳産物におけるイントロン領域の配列であってもよい。イントロン配列は、ゲノム配列と、対象タンパク質の遺伝子のcDNA塩基配列とをBLAST、FASTAなどのホモロジー検索プログラムを用いて比較することにより、決定することができる。

[0079] 対象タンパク質の遺伝子特異的アンチセンス核酸の標的領域は、該アンチセンス核酸がハイブリダイズすることにより、結果として対象タンパク質への翻訳が阻害されるものであればその長さは制限されない。対象タンパク質の遺伝子特異的アンチセンス核酸は、対象タンパク質をコードするmRNAの全配列であっても部分配列であってもよい。合成の容易さや抗原性、細胞内移行性の問題などを考慮すれば、約10～約40塩基、特に約15～約30塩基からなるオリゴヌクレオチドが好ましいが、これらに限定されるものではない。より具体的には、対象タンパク質の遺伝子の5' 端ヘアピンループ、5' 端非翻訳領域、翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3' 端非翻訳領域、3' 端パリンドローム領域又は3' 端ヘアピンループなどをアンチセンス核酸の好ましい標的領域として選択しうるが、それらに限定されるものではない。

[0080] 対象タンパク質の遺伝子特異的アンチセンス核酸は、対象タンパク質の遺伝子のmRNAや初期転写産物とハイブリダイズしてタンパク質への翻訳を阻害するだけでなく、二本鎖DNAであるこれらの遺伝子と結合して三重鎖（トリプレックス）を形成し、RNAへの転写を阻害し得るもの（アンチジーン（antigene））であってもよい。

[0081] 上記した対象タンパク質の遺伝子特異的siRNA、対象タンパク質の遺伝子特異的miRNA、及び対象タンパク質の遺伝子特異的アンチセンス核酸を構成するヌクレオチド分子は、安定性（化学的及び／又は対酵素）や比活性（RNAとの親和性）を向上させるために、種々の化学修飾を含んでもよい。例えば、ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンス核酸を構成する各ヌクレオチドのリン酸残基（ホスフェート）を、例えば、ホスホロチオエート（phosphorothioate; PS）、メチルホスホネート（methylphosphonate）、ホスホロジチオネート（phosphorodithioate）などの化学修飾リン酸残基に置換することができる。また、各ヌクレオチドの糖（リボース）の2' 位の水酸基を、 $-OR$ ($R=CH_3$ (2' $-O-Me$)、 $CH_2CH_2OCH_3$ (2' $-O-MOE$)、 $CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$ 、 $CH_2CONHCH_3$ 、又は CH_2CH_2CN など) に置換してもよい。さらに、塩基部分（ピリミジン、プリン）に化学修飾を施してもよく、例えば、ピリミジン塩基の5位へのメチル基やカチオン性官能基の導入、あるいは2位のカルボニル基のチオカルボニルへの置換などを施してもよい。また、siRNAやmiRNAを構成するヌクレオチド分子の一部は、天然型のDNAに置換されていてもよい。

[0082] 対象タンパク質の遺伝子特異的siRNA、対象タンパク質の遺伝子特異的miRNA、及び対象タンパク質の遺伝子特異的アンチセンス核酸などは、対象タンパク質の遺伝子のcDNA配列もしくはゲノミックDNA配列に基づいてmRNAもしくは初期転写産物の標的配列を決定し、市販のDNA/RNA自動合成機を用いて、これに相補的な配列を合成することにより調製することができる。また、上記した各種修飾を含むアンチセンス核酸も、いずれも公知の手法により、化学的に合成することができる。

[0083] 対象タンパク質の遺伝子特異的siRNA、対象タンパク質の遺伝子特異的miRNA、又は対象タンパク質の遺伝子特異的アンチセンス核酸の発現ベクターについては、対象タンパク質の遺伝子特異的siRNA、対象タンパク質の遺伝子特異的miRNA、又は対象タンパク質の遺伝子特異的アンチセンス核酸が発現可能な状態で組み込まれている限りにおいて特に限定されない。典型的には、該発現ベクターは、プロモーター配列、及び対象タンパク質の遺伝子特異的siRNA、対象タンパク質の遺伝子特異的miRNA、又は対象タンパク質の遺伝子特異的アンチセンス核酸のコード配列（必要に応じて、さらに転写終結シグナル配列）を含むポリヌクレオチド、必要に応じて他の配列を含む。プロモーターは、特に制限されず、例えばCMVプロモーター、EF1プロモーター、SV40プロモーター、MSCVプロモーター、hTERTプロモーター、 β アクトチンプロモーター、CAGプロモーターなどのRNA polymerase II (polII) 系プロモーター；マウス及びヒトのU6-snRNAプロモーター、ヒトH1-RNase P RNAプロモーター、ヒトバリン-tRNAプロモーターなどのRNA polymerase III (polIII) 系プロモーターなどが挙げられ、これらの中でも、短いRNAの転写を正確に行うことができるという観点から、polIII系プロモーターが好ましい。他の配列としては、特に制限されず、発現ベクターが含み得る公知の配列を各種採用することができる。このような配列の一例としては、例えば複製起点、薬剤耐性遺伝子などが挙げられる。また、薬剤耐性遺伝子の種類及びベクターの種類は上述のものを例示できる。

[0084] 対象タンパク質の遺伝子発現抑制剤の別の例としては、対象タンパク質の遺伝子特異的リボザイムなどが挙げられる。「リボザイム」とは、狭義には、核酸を切断する酵素活性を有するRNAを意味するが、本願では配列特異的な核酸切断活性を有する限りDNAをも包含する。リボザイム核酸として最も汎用性の高いものは、ウイロイドやウイルソイドなどの感染性RNAに見られるセルフプライミングRNAがあり、ハンマーヘッド型やヘアピン型などが知られている。ハンマーヘッド型は約40塩基程度で酵素活性を発揮し、ハンマーヘッド構造をとる部分に隣接する両端の数塩基ずつ（合わせて約10塩基程度）をm

RNAの所望の切断部位と相補的な配列にすることにより、標的mRNAのみを特異的に切断することが可能である。このタイプのリボザイム核酸は、RNAのみを基質とするので、ゲノムDNAを攻撃することがないという利点を有する。対象タンパク質の遺伝子のmRNAが自身で二本鎖構造をとる場合には、RNAヘリカーゼと特異的に結合し得るウイルス核酸由来のRNAモチーフを連結したハイブリッドリボザイムを用いることにより、標的配列を一本鎖にすることができる [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(10): 5572-5577 (2001)]。さらに、リボザイムを、それをコードするDNAを含む発現ベクターの形態で使用する場合には、転写産物の細胞質への移行を促進するために、tRNAを改変した配列をさらに連結したハイブリッドリボザイムとすることもできる [Nucleic Acids Res., 29(13): 2780-2788 (2001)]。

- [0085] 本発明の剤の適用対象は特に限定されず、例えば、ヒト、サル、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウサギ、ブタ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、シカなどの種々の哺乳類動物などが挙げられる。
- [0086] 本発明の剤の形態は、特に限定されず、本発明の剤の用途に応じて、各用途において通常使用される形態をとることができる。
- [0087] 形態としては、用途が医薬、健康増進剤、栄養補助剤（サプリメントなど）などである場合は、例えば錠剤（口腔内側崩壊錠、咀嚼可能錠、発泡錠、トローチ剤、ゼリー状ドロップ剤などを含む）、丸剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、硬カプセル剤、軟カプセル剤、ドライシロップ剤、液剤（ドリンク剤、懸濁剤、シロップ剤を含む）、ゼリー剤などの経口摂取に適した製剤形態（経口製剤形態）、点鼻剤、吸入剤、肛門坐剤、挿入剤、浣腸剤、ゼリー剤、注射剤、貼付剤、ローション剤、クリーム剤などの非経口摂取に適した製剤形態（非経口製剤形態）が挙げられる。
- [0088] 形態としては、用途が食品組成物の場合は、液状、ゲル状あるいは固形状の食品、例えばジュース、清涼飲料、茶、スープ、豆乳、サラダ油、ドレッシング、ヨーグルト、ゼリー、プリン、ふりかけ、育児用粉乳、ケーキミックス、粉末状または液状の乳製品、パン、クッキーなどが挙げられる。

[0089] 形態としては、用途が口腔用組成物である場合は、例えば液体（溶液、乳液、懸濁液など）、半固体（ゲル、クリーム、ペーストなど）、固体（錠剤、粒子状剤、カプセル剤、フィルム剤、混練物、溶融固体、ロウ状固体、弾性固体など）などの任意の形態、より具体的には、歯磨剤（練歯磨、液体歯磨、液状歯磨、粉歯磨など）、洗口剤、塗布剤、貼付剤、口中清涼剤、食品（例えば、チューインガム、錠菓、キャンディ、グミ、フィルム、トローチなど）などが挙げられる。

[0090] 本発明の剤は、必要に応じてさらに他の成分を含んでいてもよい。他の成分としては、例えば医薬、食品組成物、口腔用組成物、健康増進剤、栄養補助剤（サプリメントなど）などに配合され得る成分である限り特に限定されるものではないが、例えば基剤、担体、溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、増粘剤、保湿剤、着色料、香料、キレート剤などが挙げられる。

[0091] 本発明の剤の対象タンパク質の抑制剤の含有量は、抑制剤の種類、用途、使用態様、適用対象、適用対象の状態などに左右されるものであり、限定はされないが、例えば0.0001～100重量%、好ましくは0.001～50重量%とすることができる。

[0092] 本発明の組成物の適用（例えば、投与、摂取、接種など）量は、薬効を発現する有効量であれば特に限定されず、通常は、有効成分の重量として、一般に一日あたり0.1～1000 mg/kg体重である。上記投与量は1日1回又は2～3回に分けて投与するのが好ましく、年齢、病態、症状により適宜増減することもできる。

[0093] 6. 慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療剤の有効成分のスクリーニング方法

本発明は、その一態様において、被検物質で処理された動物から採取された体液の細胞外小胞における、タンパク質群（A）より選択される少なくとも1種のタンパク質の量又は濃度を指標とする、慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療剤の有効成分のスクリーニング方法（本明細書において、「本発明の有効成分スクリーニング方法」と示すこともある。）に関する。以下、これにつ

いて説明する。

[0094] 体液、細胞外小胞、タンパク質群 (A)、慢性閉塞性肺疾患、対象タンパク質の量又は濃度の測定等については、上記「1. 慢性閉塞性肺疾患の検査方法」における定義と同様である。

[0095] 動物の生物種は特に制限されない。動物の生物種としては、例えばヒト、サル、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウサギなどの種々の哺乳類動物が挙げられ、好ましくはマウスが挙げられる。

[0096] 被検物質としては、天然に存在する化合物又は人工に作られた化合物を問わず広く使用することができる。また、精製された化合物に限らず、多種の化合物を混合した組成物や、動植物の抽出液も使用することができる。化合物には、低分子化合物に限らず、タンパク質、核酸、多糖類等の高分子化合物も包含される。

[0097] 本発明の有効成分スクリーニング方法は、より具体的には、上記指標の値が、被検物質で処理されていない動物から採取された体液の細胞外小胞における対応タンパク質の量又は濃度（対照値）よりも低い場合に、前記被検物質を慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療剤の有効成分（或いは、慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療剤の有効成分の候補物質）として選択する工程を含む。

[0098] 対応タンパク質とは、指標としている対象タンパク質と同じタンパク質を意味する。

[0099] 「低い」とは、例えば指標の値が、対照値の1/2、1/5、1/10、1/20、1/50、1/100であることを意味する。

[0100] 7. 慢性閉塞性肺疾患の誘発性又は増悪性の評価方法

本発明は、その一態様において、被検物質で処理された動物から採取された体液の細胞外小胞における、タンパク質群 (A) より選択される少なくとも1種のタンパク質の量又は濃度を指標とする、慢性閉塞性肺疾患の誘発性又は増悪性の評価方法（本明細書において、「本発明の毒性評価方法」と示すこともある。）に関する。以下、これについて説明する。

[0101] 体液、細胞外小胞、タンパク質群 (A)、慢性閉塞性肺疾患、対象タンパク

質の量又は濃度の測定、動物の生物種、被検物質等については、上記「1. 慢性閉塞性肺疾患の検査方法」及び「6. 慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療剤の有効成分のスクリーニング方法」における定義と同様である。

[0102] 本発明の毒性評価方法は、より具体的には、上記指標の値が、被検物質で処理されていない動物から採取された体液の細胞外小胞における対応タンパク質の量又は濃度（対照値）よりも高い場合に、前記被検物質を慢性閉塞性肺疾患の誘発性又は増悪性があると判定する工程を含む。

[0103] 対応タンパク質とは、指標としている対象タンパク質と同じタンパク質を意味する。

[0104] 「高い」とは、例えば指標の値が、対照値の2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍であることを意味する。

実施例

[0105] 以下に、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

[0106] 試験例1. 細胞外小胞画分の調製

慢性閉塞性肺疾患（COPD）であると診断されたヒト被検体（10名）それぞれの血清、及び健常ヒト被検体（6名）それぞれの血清から、細胞外小胞画分の調製した。細胞外小胞画分の調製は段階的超遠心法により行った。具体的には次のようにして行った。試験例1及び2で得られた血清、並びに正常マウス（11週齢のC57BL6/J雄マウス）の血清をPBSで希釈して、遠心（2000 g、4℃、30分間）した。上清を0.22 μ mのフィルターに通して、超遠心（100000 g、4℃、90分間）した。ペレットをPBSで洗浄した後、さらに同条件で超遠心した。この洗浄－超遠心工程を計2回繰り返して行った。最終的に得られたペレットをPBSで懸濁して、細胞外小胞画分を得た。

[0107] 続いて、得られた細胞外小胞画分について、細胞外小胞の粒子数及び粒子径を測定した。具体的には、ナノサイト（日本カンタム・デザイン株式会社、Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) Version 2.3 Build 0025）を使用して測定した。これは、粒子径ごとのブラウン運動速度の違いをもとに解析

するものであり、画面に映る散乱光1つ1つの動きを追尾（トラッキング）し、各々の移動速度（拡散係数）から液中における粒子径（流体力学径）を算出することができる。結果を図1に示す。

[0108] さらに、細胞外小胞を免疫電子顕微鏡法によって観察した。具体的には、次のようにして行った。固定済み細胞外小胞溶液を5~8 μ Lずつグリッドへ載せ15分静置して、グリッドのフォルムバルへ細胞外小胞を定着させた。PBSで3回洗浄した後、ブロッッキング反応（1%BSA/PBS、10分）を行い、続いて一次抗体反応（Invitrogen AHS0902 Mouse (monoclonal) Anti-Human Leukemia and Platelet Associated Antigen CD9 Clone: MM2/57、100倍希釈、2時間半、室温）を行った。PBSで6回洗浄した後、二次抗体反応（CRL EMGMHL10 Anti-IgG (H+L), Mouse, Goat-Poly, Gold 10 nm, EM、200倍希釈、1時間、室温）を行った。PBSで6回洗浄した後、1%GA/PBSで15分間処理し、さらにPBSで3回洗浄した。水洗し、0.5% UA（酢酸ウラニル）で処理して、乾燥させて、電子顕微鏡で観察した。得られた結果を図2に示す。

[0109] またさらに、細胞外小胞画分について、エクソソームマーカーに対する抗体（抗Flotillin-1抗体（BD Bioscience、610821）、抗HSP70抗体（Santa Cruz, clone=W27）、及び抗CD9抗体（Invitrogen, clone=MM2/57）を用いて、ウェスタンブロットした。結果を図3に示す。

[0110] 図1~3に示されるように、得られた画分にはエクソソームが存在しており、その粒子数及び粒子径は、健常被検体と慢性閉塞性肺疾患被検体とではほぼ差が見られないことが分かった。

[0111] 試験例2. プロテオミクス解析（TMTラベル、LC-MS/MS）

既報の文献（Journal of Proteome Research., 2017, 16 (2), pp 1077-1086.）に従って、TMTラベル-LC-MS/MSプロテオミクス解析を行った。概要は次のとおりである。試験例1で得られた細胞外小胞画分中のタンパク質をトリプシン消化して得られたペプチドサンプルを、TMT 10-plex試薬でラベルした。ラベル化サンプルをSCXカラムで分画し、質量分析計（LTQ-Orbitrap XL、Thermo Fisher Scientific社製）を用いてLC-MS/MS解析した。得られた生データ

を、解析プログラム（UniProt/SwissProtに対するMascot v2.3.1（Matrix Science社製）を備える、Proteome Discoverer ver.1.3（Thermo Fisher Scientific社製））を用いて解析し、各種タンパク質の定量データを得た。

[0112] COPD患者の細胞外小胞画分における量（COPD群）が、健常被検者の細胞外小胞画分における量（コントロール群）よりも有意に高かったタンパク質を、慢性閉塞性肺疾患のバイオマーカーとして一定程度の有効性があると判定し、選択した。選択されたタンパク質、及びコントロール群に対する量比を表1に示す。

[0113]

[表1]

UniProtKB アクセッション 番号	タンパク質名	遺伝子名	p値	COPD群 /コントロール群
P08519	Apolipoprotein(a)	LPA	0.01366	2.107
Q05639	Elongation factor 1- α 2	EEF1A2	0.03079	1.977
P05090	Apolipoprotein D	APOD	0.03426	1.941
Q95445	Apolipoprotein M	APOM	0.03601	1.916
P23219	Prostaglandin G/H synthase 1	PTGS1	0.03744	1.841
P02654	Apolipoprotein C-I	APOC1	0.00050	1.750
P02656	Apolipoprotein C-III	APOC3	0.02048	1.687
P02655	Apolipoprotein C-II	APOC2	0.00466	1.678
Q9BXR6	Complement factor H-related protein 5	CFHR5	0.00644	1.635
P04839	Cytochrome b-245 heavy chain	CYBB	0.03217	1.604
Q8WWZ8	Oncoprotein-induced transcript 3 protein	OIT3	0.02863	1.538
Q12805	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	EFEMP1	0.04676	1.516
Q6ZN30	Zinc finger protein basophilin-2	BNC2	0.01843	1.508
P02649	Apolipoprotein E	APOE	0.02028	1.491
Q95365	HLA class I histocompatibility antigen, B-38 α chain	HLA-B	0.00884	1.475
P14209	CD99 antigen	CD99	0.02073	1.442
Q03591	Complement factor H-related protein 1	CFHR1	0.00321	1.431
P02652	Apolipoprotein A-II	APOA2	0.03328	1.425
P01042	Kininogen-1	KNG1	0.02065	1.411
P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1	PON1	0.02850	1.396
P23142	Fibulin-1	FBLN1	0.00957	1.386
P05107	Integrin β -2	ITGB2	0.01046	1.369
P00709	α -lactalbumin	LALBA	0.03096	1.357
P10909	Clusterin	CLU	0.04180	1.336
A1L4H1	Soluble scavenger receptor cysteine-rich domain-containing protein SSC5D	SSC5D	0.02145	1.325
P62917	60S ribosomal protein L8	RPL8	0.04477	1.325
P51148	Ras-related protein Rab-5C	RAB5C	0.04797	1.267
P32119	Peroxiredoxin-2	PRDX2	0.02482	1.261
Q15836	Vesicle-associated membrane protein 3	VAMP3	0.04776	1.251
P60033	CD81 antigen	CD81	0.01889	1.185
P62873	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit β -1	GNB1	0.03063	1.167
P62158	Calmodulin	CALM1	0.02905	1.145

[0114] 試験例3. ウェスタンブロットによる細胞外小胞画分における慢性閉塞性肺疾患バイオマーカーの検出

細胞外小胞画分（試験例1）について、慢性閉塞性肺疾患バイオマーカー（試験例2）に対する抗体を用いてウェスタンブロットした。使用した一次抗体は、抗Fibulin-1抗体（アブカム、ab211536）、抗EFEMP-1抗体（GeneTex、GT X111657）、抗CD99抗体（アブカム、ab108297）、抗CD18抗体（アブカム、ab 185723）、抗OIT 3抗体（MyBioSource、MBS2028378）、抗VAMP3(Cellubrevin

)抗体 (アブカム、ab181749)、及び抗CD81(TAPA-1)抗体 (アブカム、ab155760) である。さらに、コントロールとして、エクソソームマーカーに対する抗体 (抗Flotillin-1抗体 (BD Bioscience、610821) 及び抗CD63抗体 (Proteintech、12632-1-AP)) も使用した。結果を図4に示す。

[0115] 図4に示されるように、慢性閉塞性肺疾患バイオマーカーは、ウェスタンブロットでも検出可能であり且つ健常被検体と慢性閉塞性肺疾患被検体との間で発現量の差を確認できることが分かった。

[0116] 試験例4. 免疫染色による肺組織における慢性閉塞性肺疾患バイオマーカーの検出

Tissue array (BMX、Lung disease and normal tissue array, 16 cases/48 cores; Lung disease spectrum tissue array, including TNM and pathology grade, 24 cases/48 cores) を、慢性閉塞性肺疾患バイオマーカー (試験例2) に対する抗体を用いて免疫染色した。使用した一次抗体は、抗Fibulin-1抗体 (アブカム、ab211536)、抗EFEMP-1抗体 (GeneTex、GTX111657)、抗CD99抗体 (アブカム、ab108297)、抗CD18抗体 (アブカム、ab185723)、及び抗CD81(TAPA-1)抗体 (アブカム、ab155760) である。結果を図5に示す。

[0117] 図5に示されるように、調べた慢性閉塞性肺疾患バイオマーカーは、肺組織内でも発現しており、且つ慢性閉塞性肺疾患被検体の肺組織内で特異的に高発現していることが分かった。健常被検体及び肺線維症被検体の肺組織内では発現増加がみられなかった。

[0118] 試験例5. 慢性閉塞性肺疾患バイオマーカーの評価

慢性閉塞性肺疾患バイオマーカー (試験例2) について、AUC、カットオフ値、感度、及び特異度を算出した。具体的には、次のとおりである。JMP v. 8.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いた。感度を縦軸、(1-特異度)を横軸にプロットした。マルチマーカーのROCカーブは、Fibulin-1とSSC5Dに関してロジスティック回帰分析を行い、予測確率を算出し、その予測確率から同様にROC曲線を描画した。結果を表2に示す。

[0119] [表2]

Protein	AUC	Cut off	Sensitivity (%)	Specificity (%)
<i>Integrin beta-2</i>	0.92	0.92	80	100
<i>Soluble scavenger receptor cysteine-rich domain-containing protein SSC5D</i>	0.85	0.97	90	83
<i>Clusterin</i>	0.85	0.97	70	100
<i>Fibulin-1</i>	0.83	0.91	80	83
<i>Serum paraoxonase/arylesterase 1</i>	0.83	0.85	90	67
<i>Zinc finger protein basonuclin-2</i>	0.82	1.1	60	100
<i>CD99 antigen</i>	0.82	1.01	80	83
<i>Vesicle-associated membrane protein 3</i>	0.8	1.2	60	100
<i>Oncoprotein-induced transcript 3 protein</i>	0.78	0.97	60	100
<i>Peroxiredoxin-2</i>	0.63	0.98	50	100
<i>Elongation factor 1-alpha 2</i>	0.63	0.78	50	50
<i>EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1</i>	0.61	1.12	40	100
<i>Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-2</i>	0.58	1.02	80	50
<i>CD81 antigen</i>	0.55	1.2	100	33
<i>Calmodulin</i>	0.55	1.03	70	67
<i>Prostaglandin G/H synthase 1</i>	0.53	1.2	30	100

[0120] 試験例6. 慢性閉塞性肺疾患バイオマーカーと呼吸機能との関連性の解析

まず、被検体の呼吸機能をスパイロメーターで測定した。測定内容は以下のとおりである。

肺活量…空気を胸いっぱいに取り込んで、それを全て吐き出したとき、どれだけの量の空気を吐き出したかを調べた。

%肺活量 (VC) …年齢や性別から算出された予測肺活量 (基準値) に対しての、実測肺活量の比率を調べた。

努力性肺活量(FVC)…胸いっぱい息を吸い込み、一気に吐き出した空気の量を調べた。

1秒量…努力性肺活量のうちの最初の1秒間に吐き出された空気の量を調べた。

1秒率…努力性肺活量に対する1秒量の比率を調べた。

[0121] 呼吸機能の測定結果と試験例2の生データに基づいて、慢性閉塞性肺疾患バイオマーカーの血清細胞外小胞中の量と呼吸機能とが負に相関すること（つまり、バイオマーカー量が高い程、呼吸機能が低いこと、或いはバイオマーカー量が高い程、呼吸機能が低いこと）の有意差を、t検定によって算出した。

。結果を表3～6に示す。

[0122] [表3]

Oncoprotein-induced transcript 3 protein	
	p値
TLC (%)	0.049678091

[0123] [表4]

CD99 antigen	
	p値
FVC (%)	0.003741132

[0124] [表5]

Integrin beta-2	
	p値
FEV1.0 (%)	0.014438448
FVC (%)	0.003247007
FEV1.0/FVC	0.032236933

[0125] [表6]

Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	
	p値
FEV1.0 (%)	0.006672619
FVC (%)	0.003009507
DLCO (%)	0.048251449

請求の範囲

- [請求項1] 慢性閉塞性肺疾患を検査する方法であって、
- (1) 被検体から採取された体液の細胞外小胞における、タンパク質群 (A) :
- (A) Apolipoprotein(a)、Elongation factor 1- α 2、Apolipoprotein D、Apolipoprotein M、Prostaglandin G/H synthase 1、Apolipoprotein C-I、Apolipoprotein C-III、Apolipoprotein C-II、Complement factor H-related protein 5、Cytochrome b-245 heavy chain、Oncoprotein-induced transcript 3 protein、EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1、Zinc finger protein basoon-2、Apolipoprotein E、HLA class I histocompatibility antigen, B-38 α chain、CD99 antigen、Complement factor H-related protein 1、Apolipoprotein A-II、Kininogen-1、Serum paraoxonase/arylesterase 1、Fibulin-1、Integrin beta-2、Alpha-lactalbumin、Clusterin、Soluble scavenger receptor cysteine-rich domain-containing protein SSC5D、60S ribosomal protein L8、Ras-related protein Rab-5C、Peroxiredoxin-2、Vesicle-associated membrane protein 3、CD81 antigen、Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1、及びCalmodulinからなるタンパク質群より選択される少なくとも1種のタンパク質を検出する工程を含む、検査方法。
- [請求項2] さらに、(2) 前記工程 (1) で検出されたタンパク質の量又は濃度がカットオフ値以上である場合に、前記被検体が慢性閉塞性肺疾患に罹患していると判定する工程を含む、請求項 1 に記載の検査方法。
- [請求項3] 前記カットオフ値が、慢性閉塞性肺疾患に罹患していない被検体から採取された体液の細胞外小胞における対応タンパク質の量又は濃度の値の、1～1.5倍の値である、請求項 2 に記載の検査方法。
- [請求項4] 前記体液が全血、血漿、及び血清からなる群より選択される少なくとも

も1種である、請求項1～3のいずれかに記載の検査方法。

[請求項5] 前記タンパク質 (A) 群が (A1) Apolipoprotein(a)、Elongation factor 1-alpha 2、Apolipoprotein D、Apolipoprotein M、Prostaglandin G/H synthase 1、Apolipoprotein C-I、Apolipoprotein C-III、Apolipoprotein C-II、Complement factor H-related protein 5、及びCytochrome b-245 heavy chainからなる群である、請求項1～4のいずれかに記載の検査方法。

[請求項6] 前記タンパク質 (A) 群が (A2) Fibulin-1、Integrin beta-2、CD99 antigen、Peroxisome oxidoreductase 2、Clusterin、Prostaglandin G/H synthase 1、Vesicle-associated membrane protein 3、Ras-related protein Rab-5C、及びEGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1からなる群である、
請求項1～4のいずれかに記載の検査方法。

[請求項7] 前記被検体がヒトである、請求項1～6のいずれかに記載の検査方法。

[請求項8] タンパク質群 (A) :

(A) Apolipoprotein(a)、Elongation factor 1-alpha 2、Apolipoprotein D、Apolipoprotein M、Prostaglandin G/H synthase 1、Apolipoprotein C-I、Apolipoprotein C-III、Apolipoprotein C-II、Complement factor H-related protein 5、Cytochrome b-245 heavy chain、Oncoprotein-induced transcript 3 protein、EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1、Zinc finger protein basigin-2、Apolipoprotein E、HLA class I histocompatibility antigen, B-38 alpha chain、CD99 antigen、Complement factor H-related protein 1、Apolipoprotein A-II、Kininogen-1、Serum paraoxonase/arylesterase 1、Fibulin-1、Integrin beta-2、Alpha-lactalbumin、Clusterin、Soluble scavenger receptor cysteine-rich domain-containing protein SSC5D、60S ribosomal protein L8、Ra

s-related protein Rab-5C、Peroxisome oxidoreductase-2、Vesicle-associated membrane protein 3、CD81 antigen、Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1、及びCalmodulinからなるタンパク質群より選択される少なくとも1種のタンパク質の検出剤を含む、慢性閉塞性肺疾患の検査薬。

[請求項9]

タンパク質群 (A) :

(A) Apolipoprotein(a)、Elongation factor 1-alpha 2、Apolipoprotein D、Apolipoprotein M、Prostaglandin G/H synthase 1、Apolipoprotein C-I、Apolipoprotein C-III、Apolipoprotein C-II、Complement factor H-related protein 5、Cytochrome b-245 heavy chain、Oncoprotein-induced transcript 3 protein、EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1、Zinc finger protein basophilin-2、Apolipoprotein E、HLA class I histocompatibility antigen, B-38 alpha chain、CD99 antigen、Complement factor H-related protein 1、Apolipoprotein A-II、Kininogen-1、Serum paraoxonase/arylesterase 1、Fibulin-1、Integrin beta-2、Alpha-lactalbumin、Clusterin、Soluble scavenger receptor cysteine-rich domain-containing protein SSC5D、60S ribosomal protein L8、Ras-related protein Rab-5C、Peroxisome oxidoreductase-2、Vesicle-associated membrane protein 3、CD81 antigen、Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1、及びCalmodulinからなるタンパク質群より選択される少なくとも1種のタンパク質の抑制剤を含む、慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療剤。

[請求項10]

被検物質で処理された動物から採取された体液の細胞外小胞における、タンパク質群 (A) :

(A) Apolipoprotein(a)、Elongation factor 1-alpha 2、Apolipoprotein D、Apolipoprotein M、Prostaglandin G/H synthase 1、Apolipoprotein C-I、Apolipoprotein C-III、Apolipoprotein C-II、Comp

lement factor H-related protein 5、Cytochrome b-245 heavy chain、Oncoprotein-induced transcript 3 protein、EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1、Zinc finger protein basoon-2、Apolipoprotein E、HLA class I histocompatibility antigen、B-38 alpha chain、CD99 antigen、Complement factor H-related protein 1、Apolipoprotein A-II、Kininogen-1、Serum paraoxonase/arylesterase 1、Fibulin-1、Integrin beta-2、Alpha-lactalbumin、Clusterin、Soluble scavenger receptor cysteine-rich domain-containing protein SSC5D、60S ribosomal protein L8、Ras-related protein Rab-5C、Peroxiredoxin-2、Vesicle-associated membrane protein 3、CD81 antigen、Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1、及びCalmodulinからなるタンパク質群より選択される少なくとも1種のタンパク質の量又は濃度を指標とする、慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療剤の有効成分のスクリーニング方法。

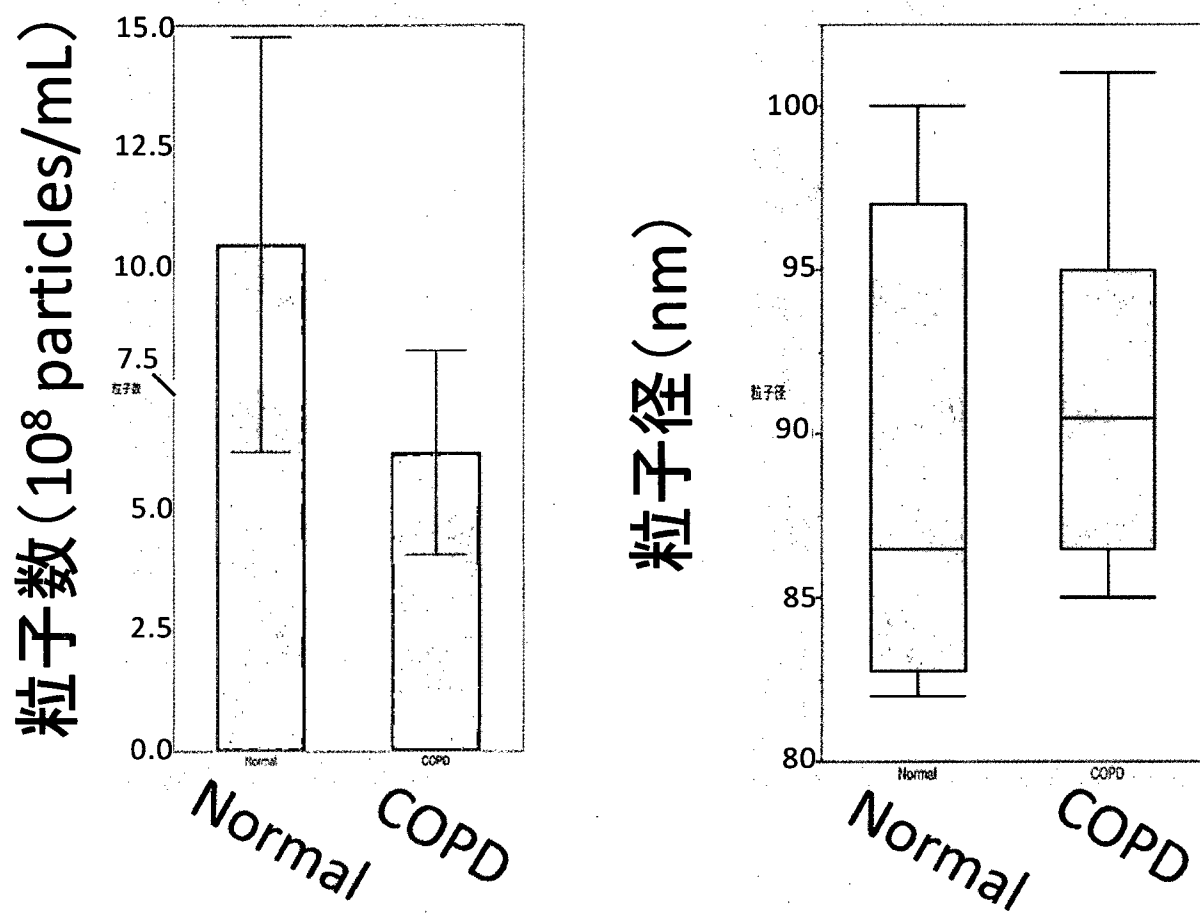
[請求項11] 前記指標の値が、被検物質で処理されていない動物から採取された体液の細胞外小胞における対応タンパク質の量又は濃度よりも低い場合に、前記被検物質を慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療剤の有効成分として選択する工程を含む、請求項10に記載のスクリーニング方法。

[請求項12] 被検物質で処理された動物から採取された体液の細胞外小胞における、タンパク質群 (A) :

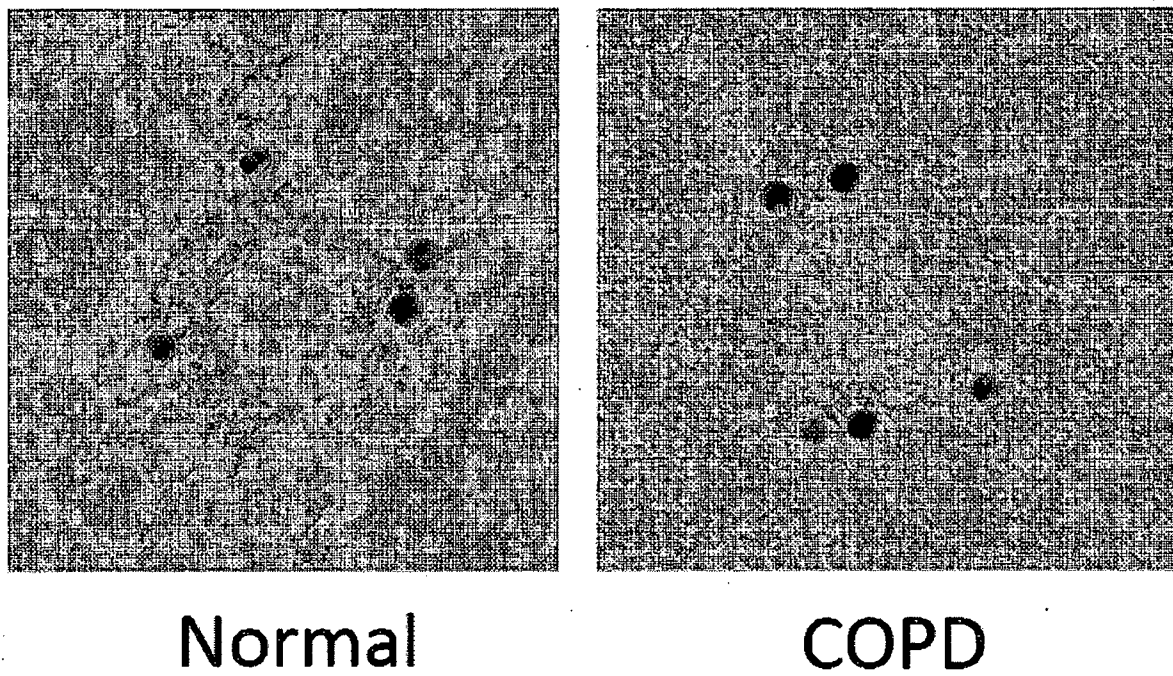
(A) Apolipoprotein(a)、Elongation factor 1-alpha 2、Apolipoprotein D、Apolipoprotein M、Prostaglandin G/H synthase 1、Apolipoprotein C-I、Apolipoprotein C-III、Apolipoprotein C-II、Complement factor H-related protein 5、Cytochrome b-245 heavy chain、Oncoprotein-induced transcript 3 protein、EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1、Zinc finger protein basoon-2、Apolipoprotein E、HLA class I histocompatibility

y antigen, B-38 alpha chain, CD99 antigen, Complement factor H-related protein 1, Apolipoprotein A-II, Kininogen-1, Serum paraoxonase/arylesterase 1, Fibulin-1, Integrin beta-2, Alpha-lactalbumin, Clusterin, Soluble scavenger receptor cysteine-rich domain-containing protein SSC5D, 60S ribosomal protein L8, Ras-related protein Rab-5C, Peroxiredoxin-2, Vesicle-associated membrane protein 3, CD81 antigen, Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1, 及びCalmodulinからなるタンパク質群より選択される少なくとも1種のタンパク質の量又は濃度を指標とする、慢性閉塞性肺疾患の誘発性又は増悪性の評価方法。

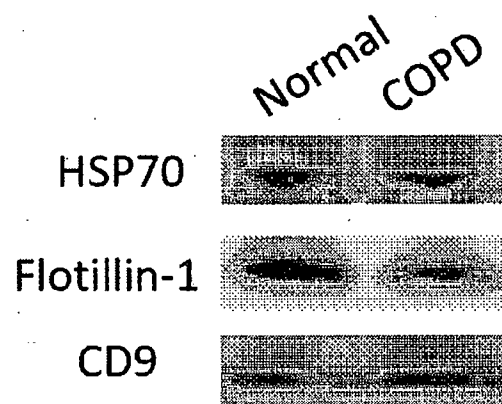
[図 1]



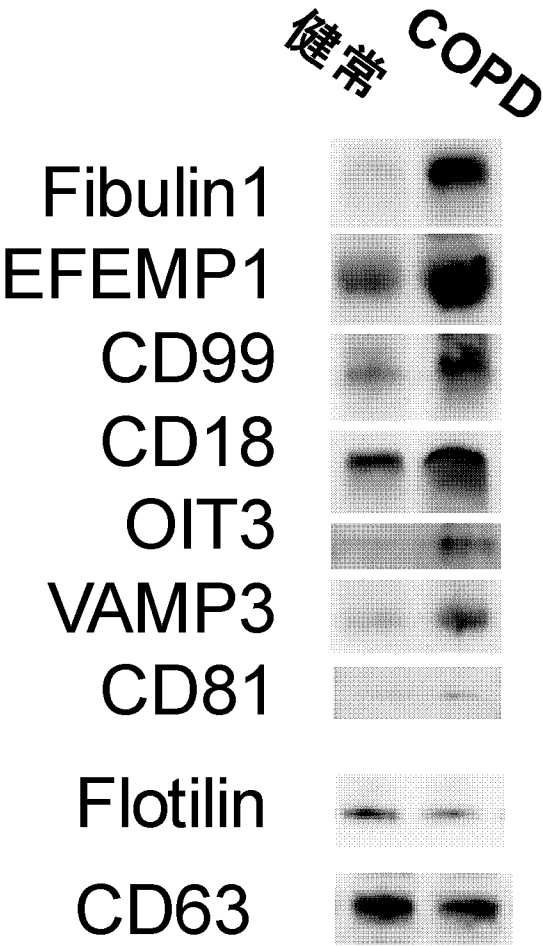
[図 2]



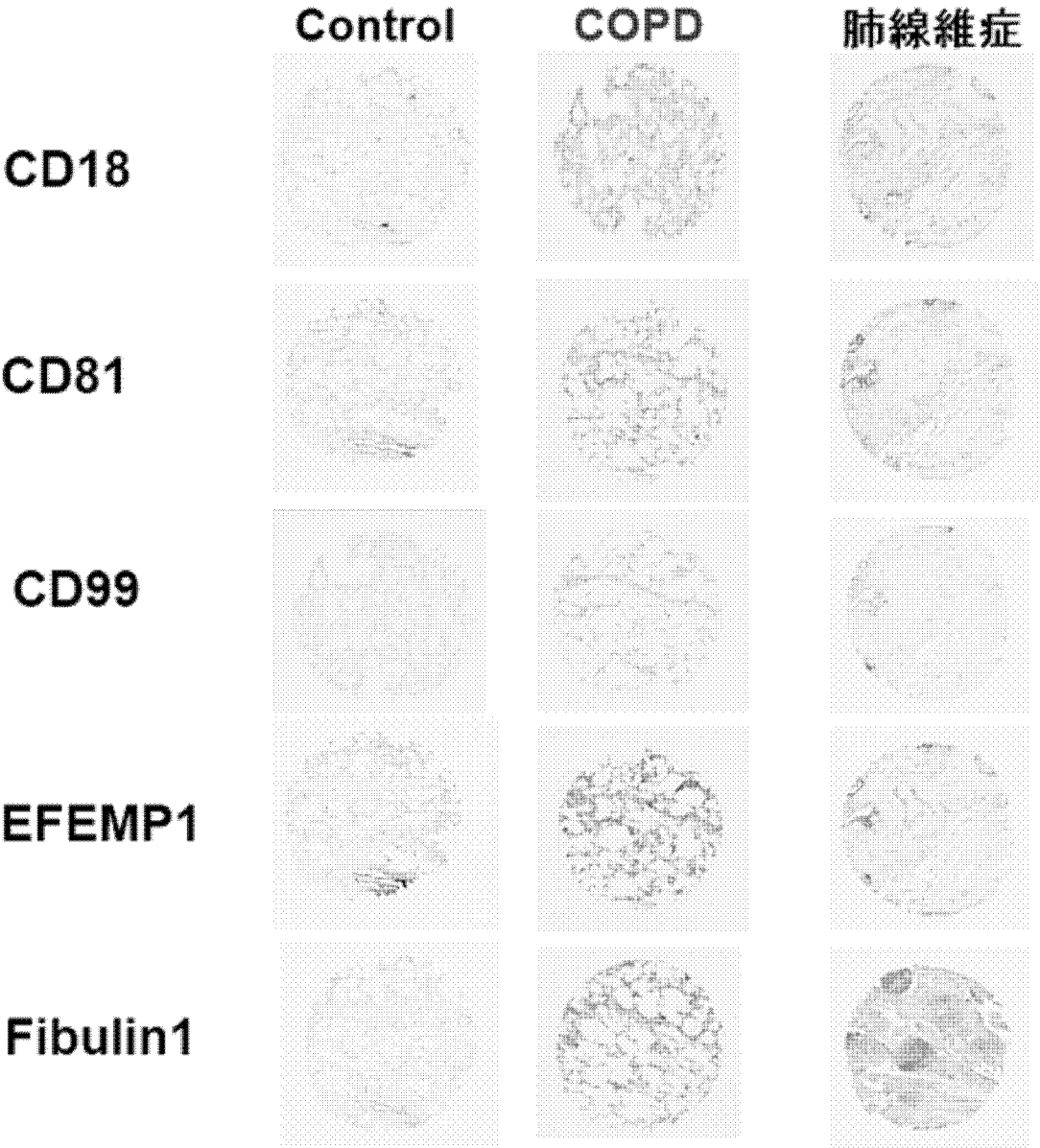
[図 3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/009529

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. G01N33/68(2006.01)i, A61K38/02(2006.01)i, A61P11/00(2006.01)i,
G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. G01N33/68, A61K38/02, A61P11/00, G01N33/15, G01N33/50

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KADOTA, T. et al., "EXTRACELLULAR VESICLES IN CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE", INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, 27 October 2016, 17(11), pii: E1801	1-12
A	US 2010/0184046 A1 (CARIS MPI, INC.) 22 July 2010, paragraph [0765], fig. 2f & JP 2012-507300 A & WO 2010/056337 A2 & EP 2350320 A2	1-12
A	山田充啓, 血管炎症におけるエクソソームを用いたバイオマーカー, 血管医学, June 2015, vol. 16, no. 2, 61-68, (Vascular biology & medicine), non-official translation (YAMADA, Mitsuhiro, "Biomarker using exosome for vascular inflammation")	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 May 2018 (18.05.2018)

Date of mailing of the international search report

29 May 2018 (29.05.2018)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/009529

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2016/185385 A1 (THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA) 24 November 2016, entire text & CA 2986097 A	1-12
A	WO 2015/168393 A1 (NORTHWESTERN UNIVERSITY) 05 November 2015, entire text & US 2017/0087094 A1	1-12
A	ANDREU, Z. et al., "Extracellular vesicles as a source for non-invasive biomarkers in bladder cancer progression", European journal of Pharmaceutical Sciences, 15 October 2016, 98, 70-79	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/009529

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Document 1: KADOTA, T. et al., "EXTRACELLULAR VESICLES IN CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE", INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, 27 October 2016, 17(11), pii: E1801

Document 2: US 2010/0184046 A1 (CARIS MPI, INC.) 22 July 2010, paragraph [0765], fig. 2f & JP 2012-507300 A & WO 2010/056337 A2 & EP 2350320 A2

Document 3: 山田充啓, 血管炎症におけるエクソソームを用いたバイオマーカー, 血管医学, June 2015, vol. 16, no. 2, 61-68, (Vascular biology & medicine), non-official translation (YAMADA, Mitsuhiro, "Biomarker using exosome for vascular inflammation")

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Portions in which Apolipoprotein(a) is selected as protein, in claims 1-12

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/009529

(Continuation of Box III)

Document 1 (particularly [7. EVs in COPD Exacerbation], document 2 (paragraph [0765]; fig. 2f), and document 3 (particularly page 63, right column) disclose chronic obstructive pulmonary disease (COPD) markers, including at least one type of protein, in an extracellular vesicle of a body fluid collected from a subject. Thus, said feature is not a special technical feature. Furthermore, the proteins set forth in claim 1 do not share a common chemical structure, and there is no single general inventive concept shared between the proteins. Thus, claims 1-15 are considered to be classified into the 33 inventions described below.

(Invention 1)

A method for examining COPD, an agent for examining COPD, a method for screening [model animal/preventive or therapeutic agent] of COPD, a preventive or therapeutic agent for COPD, and a method for evaluating inducibility or exacerbation, including [Apolipoprotein(a)] as a protein

(Inventions 2-33)

A method for examining COPD, an agent for examining COPD, a method for screening [model animal/preventive or therapeutic agent] of COPD, a preventive or therapeutic agent for COPD, and a method for evaluating inducibility or exacerbation, respectively including, as a protein, one of [Elongation factor 1-alpha 2, Apolipoprotein D, Apolipoprotein M, Prostaglandin G/H synthase 1, Apolipoprotein C-I, Apolipoprotein C-III, Apolipoprotein C-II, Complement factor H-related protein 5, Cytochrome b-245 heavy chain, Oncoprotein-induced transcript 3 protein, EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1, Zinc finger protein basophilin-2, Apolipoprotein E, HLA class I histocompatibility antigen, B-38 alpha chain, CD99 antigen, Complement factor H-related protein 1, Apolipoprotein A-II, Kininogen-1, Serum paraoxonase/arylesterase 1, Fibulin-1, Integrin beta-2, Alpha-lactalbumin N Clustering Soluble scavenger receptor cysteine-rich domain-containing protein SSC5D, 60S ribosomal protein L8, Ras-related protein Rab-5C, Peroxiredoxin-2, Vesicle-associated membrane protein 3, CD81 antigen, Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1, and Calmodulin]

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/68(2006.01)i, A61K38/02(2006.01)i, A61P11/00(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/68, A61K38/02, A61P11/00, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	KADOTA, T et al., EXTRACELLULAR VESICLES IN CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE, INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, 2016.10.27, 17(11), pii: E1801	1-12
A	US 2010/0184046 A1 (CARIS MPI, INC.) 2010.07.22, 段落 0765、FIG. 2f & JP 2012-507300 A & WO 2010/056337 A2 & EP 2350320 A2	1-12
A	山田充啓, 血管炎症におけるエクソソームを用いたバイオマーカー, 血管医学, 2015.06, Vol. 16, No. 2, 61-68	1-12

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.05.2018

国際調査報告の発送日

29.05.2018

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

赤坂 祐樹

2 J

3316

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2016/185385 A1 (THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA) 2016.11.24, 全文 & CA 2986097 A	1-12
A	WO 2015/168393 A1 (NORTHWESTERN UNIVERSITY) 2015.11.05, 全文 & US 2017/0087094 A1	1-12
A	ANDREU Z et al., Extracellular vesicles as a source for non-invasive biomarkers in bladder cancer progression, European journal of Pharmaceutical Sciences, 2016.10.15, 98, 70-79	1-12

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

文献1：KADOTA, T et al., EXTRACELLULAR VESICLES IN CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE, INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, 2016.10.27, 17(11), pii: E1801

文献2：US 2010/0184046 A1 (CARIS MPI, INC.) 2010.07.22, 段落0765、FIG. 2f & JP 2012-507300 A & WO 2010/056337 A2 & EP 2350320 A2

文献3：山田充啓, 血管炎症におけるエクソソームを用いたバイオマーカー, 血管医学, 2015.06, Vol. 16, No. 2, 61-68

(続葉有)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

請求項 1-12 のうち、タンパク質として Apolipoprotein(a) を選択した部分

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

(第 III 欄の続き)

文献 1 (特に、[7. EVs in COPD Exacerbation])、文献 2 (段落 0765、FIG. 2f) 及び文献 3 (特に、63 頁右欄) には、被検体から採取された体液の細胞外小胞における、少なくとも 1 種のタンパク質を含む、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) マーカーについて開示されているから、この点は特別な技術的特徴とはならない。また、請求項 1 に記載された一連のタンパク質は共通の化学構造を有しておらず、これらのタンパク質の間には単一の一般的発明概念は存在しない。よって、請求項 1 - 15 に係る発明は、以下に示す 33 の発明群から成るものと認められる。

(発明 1)

タンパク質として[Apolipoprotein(a)]を含む、COPD を検査する方法、COPD の検査薬、COPD の[モデル動物／予防又は治療剤]のスクリーニング方法、COPD の予防又は治療剤、COPD の誘発性又は増悪性の評価方法。

(発明 2 - 33)

タンパク質として、それぞれ[Elongation factor 1-alpha 2、Apolipoprotein D、Apolipoprotein M、Prostaglandin G/H synthase 1、Apolipoprotein C-I、Apolipoprotein C-III、Apolipoprotein C-II、Complement factor H-related protein 5、Cytochrome b-245 heavy chain、Oncoprotein-induced transcript 3 protein、EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1、Zinc finger protein basophilin-2、Apolipoprotein E、HLA class I histocompatibility antigen、B-28 alpha chain、CD99 antigen、Complement factor H-related protein 1、Apolipoprotein A-II、Kininogen-1、Serum paraoxonase/arylesterase 1、Fibulin-1、Integrin beta-2、Alpha-lactalbumin、Clusterin、Soluble scavenger receptor cysteine-rich domain-containing protein SSC5D、60S ribosomal protein L8、Ras-related protein Rab-5C、Peroxisome oxidoreductin-2、Vesicle-associated membrane protein 3、CD81 antigen、Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1、及び Calmodulin]のいずれか 1 つを含む、COPD を検査する方法、COPD の検査薬、COPD の[モデル動物／予防又は治療剤]のスクリーニング方法、COPD の予防又は治療剤、COPD の誘発性又は増悪性の評価方法。