

(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
2013 年 2 月 14 日(14.02.2013)



(10) 国際公開番号

WO 2013/022014 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/070152
- (22) 国際出願日: 2012 年 8 月 8 日(08.08.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-175356 2011 年 8 月 10 日(10.08.2011) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所(RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 安形 高志 (ANGATA Takashi) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 岡 律子 (OKA Ritsuko) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 川口 しのぶ (KAWAGUCHI Shinobu) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 谷口 直之 (TANIGUCHI Naoyuki) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP).

uki) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 木田 厚瑞(KIDA Kozui) [JP/JP]; 〒1020074 東京都千代田区九段南 4-7-15 JPR市ヶ谷ビル 8 階 日本医科大学呼吸ケアクリニック内 Tokyo (JP). 石井 健男(ISHII Takeo) [JP/JP]; 〒1020074 東京都千代田区九段南 4-7-15 JPR市ヶ谷ビル 8 階 日本医科大学呼吸ケアクリニック内 Tokyo (JP). 茂木 孝(MOTEGI Takeshi) [JP/JP]; 〒1020074 東京都千代田区九段南 4-7-15 JPR市ヶ谷ビル 8 階 日本医科大学呼吸ケアクリニック内 Tokyo (JP).

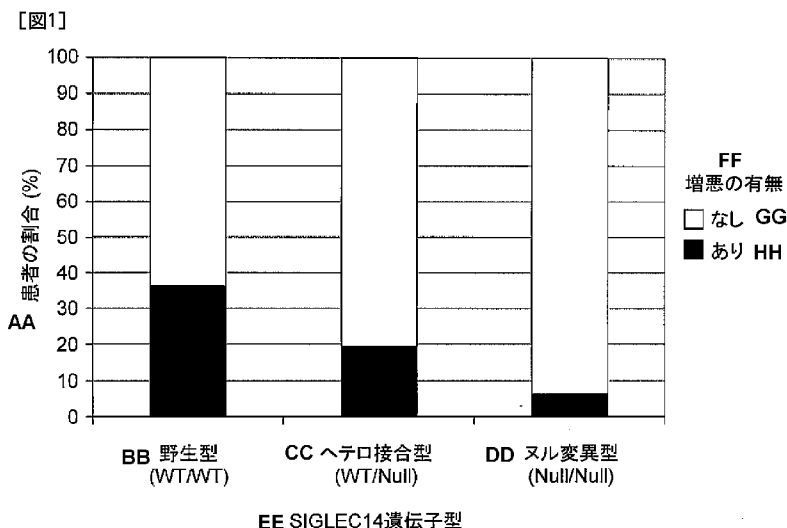
(74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕 2 丁目 5 番 1 号 愛宕グリーンヒルズMORIタワー 32 階 Tokyo (JP).

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

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR TESTING ON SENSITIVITY TO EXACERBATION OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

(54) 発明の名称: 慢性閉塞性肺疾患増悪感受性の検査法



(57) Abstract: The present invention provides a method for testing on the sensitivity to exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease in a human subject, which involves determining the genotype of SIGLEC 14 in the subject using a biological sample from the human subject, and using the genotype as a measure for the sensitivity to exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease.

(57) 要約: 本発明は、ヒト被験体由来の生物学的試料を用いて該被験体のシグレック14の遺伝子型を決定し、慢性閉塞性肺疾患の増悪感受性の指標とすることを含む、ヒト被験体における慢性閉塞性肺疾患の増悪感受性を検査する方法を提供する。

AA Percentage of patients (%)
BB Wild type
CC Heterozygous type
DD Null mutant type

EE Genotypes of SIGLEC 14
FF Presence of exacerbation
GG None
HH Exacerbated



QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロピア (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,

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称 : 慢性閉塞性肺疾患増悪感受性の検査法

技術分野

[0001] 本発明は、慢性閉塞性肺疾患（COPD）増悪感受性の検査法に関する。

背景技術

[0002] 慢性閉塞性肺疾患（COPD）とは、タバコ煙を主とする有害物質を長期に吸入曝露することで生じる肺の炎症性疾患である。この疾患の患者は、呼吸機能検査で正常に復すことのない気流閉塞を示す。気流閉塞は末梢気道病変と気腫性病変が様々な割合で複合的に作用することにより起こり、進行性である（日本呼吸器学会ガイドライン、2009）。COPDは2020年には全世界の死亡原因の第三位を占めると予測されている（WHO World Health Statistics, 2008）。COPDの増悪とは、COPDを発症した患者において、呼吸困難、咳、喀痰などの症状が日常の生理的変動を超えて急激に悪化し、安定期の治療内容の変更を要する状態をいう（日本呼吸器学会ガイドライン、2009）。COPD患者が入院治療を必要とする場合、そのほとんどは急性増悪が原因であると考えられている。

[0003] COPDの増悪感受性と関連する遺伝的多型はいくつか報告されている（非特許文献1～3）が、その遺伝的多型のCOPDの増悪の予防と治療における診断的価値は確立されていない。これらの遺伝的多型は当該遺伝子がコードするタンパク質の質的又は量的な変動をもたらすが、欠損を来すものではないため増悪の指標としては利用しづらく、これらの遺伝的多型と増悪との相関をもとに臨床的に有用な検査法を生み出すには至っていない。

[0004] シグレック14（Siglec-14）は自然免疫系の細胞（顆粒球、単球など）に発現する免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜タンパク質である（非特許文献4及び特許文献1）。シグレック14は細胞外領域でシアル酸を含む糖鎖を認識し、膜貫通領域でアダプタータンパク質DAP12と会合する（非特許文献4）。またシグレック14は免疫細胞の活性化に関わることも報告

されている（特許文献2の図3A、非特許文献5）。シグレック14とシグレック5（Siglec-5）の1～2番目の免疫グロブリン様ドメインは互いに99%以上のアミノ酸配列相同性を示すことが知られている（非特許文献4）。一方、遺伝的多型によりシグレック14を発現しないヒト個体が比較的高い頻度で存在する（非特許文献5）。この遺伝的多型は、シグレック14遺伝子（SIGLEC14）由来の5'部分と、当該遺伝子に隣接するシグレック5遺伝子（SIGLEC5）由来の3'部分とからなる融合遺伝子シグレック14／5（SIGLEC14/5）（そのタンパク質産物のアミノ酸配列はシグレック5と同一である）が形成され、シグレック14タンパク質をコードする配列領域が失われたものである。この遺伝子多型をホモ接合性で有するヒト個体はシグレック14を発現しない。このような遺伝子多型を検出できる検出用試薬も開発されている（特許文献2）。

[0005] シグレック14に対するアロ抗体が輸血副作用に関連する可能性が示唆されている（特許文献2、非特許文献6）。しかし、シグレック14の生体における機能は明らかではなく、その発現の有無とヒトの疾患との明確な関連性は知られていない。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2006-345786号公報

特許文献2：特開2010-35551号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Lin CL et al., "Mannose-binding lectin gene polymorphism contributes to recurrence of infective exacerbation in patients with COPD." Chest., (2011) 139(1):43-51

非特許文献2：Foreman MG., et al., "Polymorphic variation in surfactant protein B is associated with COPD exacerbations." Eur. Respir. J., (2008) 32(4):938-944

非特許文献3：Muller B and Tamm M., "Biomarkers in acute exacerbation

of chronic obstructive pulmonary disease: among the blind, the one-eyed is king." Am. J. Respir. Crit. Care Med., (2006) 174(8):848-849

非特許文献4: Angata T., et al., "Discovery of Siglec-14, a novel sialic acid receptor undergoing concerted evolution with Siglec-5 in primates." FASEB J., (2006) 20(12):1964-73

非特許文献5: Yamanaka M, et. al., "Deletion polymorphism of SIGLEC14 and its functional implications." Glycobiology. (2009) 19(8):841-846

非特許文献6: Yasui K, et al., "Detection of anti-Siglec-14 alloantibodies in blood components implicated in nonhaemolytic transfusion reactions." Br. J. Haematol., (2011) 153(6):794-796

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、COPD増悪感受性の検査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] 本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、シグレック14の遺伝子型がCOPD増悪感受性と強く相関することを見出し、本発明を完成するに至った。

[0010] すなわち、本発明は以下を包含する。

[0011] [1] ヒト被験体由来の生物学的試料を用いて該被験体のシグレック14の遺伝子型を決定し、慢性閉塞性肺疾患の増悪感受性の指標とすることを含む、ヒト被験体における慢性閉塞性肺疾患の増悪感受性を検査する方法。

[0012] [2] 前記生物学的試料が、血液由来試料である、上記[1]の方法。

[0013] [3] 前記生物学的試料中のシグレック14タンパク質を検出することにより、シグレック14の遺伝子型を決定する、上記[1]又は[2]の方法。

[0014] [4] 血液由来試料中の可溶性シグレック14タンパク質を検出することにより、シグレック14の遺伝子型を決定する、上記[2]の方法。

[0015] [5] 前記生物学的試料中のゲノムDNA配列に基づいて、シグレック14の遺伝子型を決定する、上記[1]又は[2]の方法。

[0016] [6] 決定されたシグレック 1 4 の遺伝子型の野生型アレルの数を、増悪感受性の指標とする、上記[1]～[5]の方法。

[0017] [7] 前記ヒト被験体が慢性閉塞性肺疾患を発症した患者である、上記[1]～[6]の方法。

[0018] 本明細書は本願の優先権主張の基礎となる日本国特許出願2011-175356号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0019] 本発明の方法を用いればCOPD患者の増悪感受性を早期に検査することができる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]シグレック 1 4 遺伝子型とAnthonisenらの定義によるCOPD細菌性増悪の有無との関係を示す図である。各バーの上部（白色）が増悪なし、下部（黒色）が増悪ありを示す。野生型の増悪ありの95%信頼区間は22.2～53.4%、ヘテロ接合型の増悪ありの95%信頼区間は12.1～30.4%、ヌル変異型の増悪ありの95%信頼区間は1.8～20.7%である。

[図2]シグレック 1 4 遺伝子型とRodriguez-Roisinの定義によるCOPD増悪の頻度との関係を示す図である。各バーの最上部から最下部（白色、網掛け（細線）、網掛け（太線）、黒色）までのそれぞれの部分は、順番に、0回、1回、2回、3回の増悪頻度（回数／年）を示す。

[図3]シグレック 1 4 タンパク質特異的ELISAの結果を示す図である。横軸は検出した各Siglec-Fc（Siglec-14-Fc及びSiglec-5-Fc）の添加濃度を示す。黒塗り丸がSiglec-14-Fc、白抜き丸がSiglec-5-Fcを表す。

[図4]シグレック 1 4 遺伝子多型と可溶性シグレック 1 4 の血中濃度との関係を示す図である。白抜きバーは、シグレック 5 と 1 4 をともに検出する抗体によって検出された、シグレック 5 及び 1 4 の血清中の総濃度を示す。黒塗りバーは、シグレック 1 4 を特異的に認識する抗体を用いたELISAによって検出された、シグレック 1 4 の血清中濃度を示す。

発明を実施するための形態

[0021] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0022] 本発明では、慢性閉塞性肺疾患（COPD）患者の増悪感受性と強く相関する遺伝的マーカー及び血清マーカーを検出することにより、増悪感受性に基づく患者の層別化を可能とする。

[0023] 本発明は、被験体（好ましくはヒト被験体）のシグレック 14 の遺伝子型を指標としてその被験体における慢性閉塞性肺疾患の増悪感受性を検査する方法に関する。より具体的には、本発明は、ヒト被験体由来の生物学的試料を用いて該被験体のシグレック 14 の遺伝子型を決定し、それを慢性閉塞性肺疾患の増悪感受性の指標とすることを含む、ヒト被験体における慢性閉塞性肺疾患の増悪感受性を検査する方法に関する。

[0024] 本発明は、ヒト被験体由来の生物学的試料を用いて該被験体のシグレック 14 の遺伝子型を決定し、それを慢性閉塞性肺疾患の増悪感受性の指標とすることを含む、ヒト被験体における慢性閉塞性肺疾患の増悪感受性を判定するための指標となるデータを収集する方法も提供する。

[0025] 本発明において、シグレック 14 の遺伝子型の決定とは、検査対象のヒト被験体（被験ヒト個体）のゲノム上のシグレック 14 遺伝子座が有するアレル（対立遺伝子）の組み合わせを決定することを意味する。シグレック 14 遺伝子には遺伝的多型が存在することが知られており、一部のヒトでは、シグレック 14 遺伝子とシグレック 5 遺伝子が融合してシグレック 14 / 5 融合遺伝子を形成し、その結果、シグレック 14 タンパク質は産生されない（ヌル変異型アレルへの変異）ことが分かっている。すなわち本発明において、シグレック 14 の遺伝子型の決定とは、具体的には、シグレック 14 遺伝子（野生型アレル）をホモ接合で有する遺伝子型（野生型；WT/WT）、シグレック 14 の野生型アレルとヌル変異型アレルとのヘテロ接合である遺伝子型（ヘテロ接合型；WT/Null）、シグレック 14 のヌル変異型アレルのホモ接合である遺伝子型（ヌル変異型；Null /Null）のいずれであるかを決定することをいう。

[0026] ここで、ゲノム上のシグレック 14 遺伝子（野生型アレル）は、例えば、

配列番号 1 に示す塩基配列を有する。配列番号 1 の1001～4405番目が野生型シグレック 1 4 タンパク質をコードするORFに対応するゲノム領域であり、そこにコードされている野生型シグレック 1 4 タンパク質のアミノ酸配列を配列番号 2 に示す。シグレック 1 4 の配列情報はGenBank等のデータベースでも公開されており、例えばヒトシグレック 1 4 の配列情報はGenBankアクセッション番号AAX47338、NP_001092082等で入手することができる。配列番号 2 に示すシグレック 1 4 タンパク質は、シグナルペプチド（配列番号 2 の1～17番目）と成熟タンパク質（配列番号 2 の18～396番目）からなり、成熟タンパク質は、免疫グロブリン様ドメイン 1（配列番号 2 の26～140番目）、免疫グロブリン様ドメイン 2（配列番号 2 の149～233番目）、リンカー（配列番号 2 の234～251番目）、免疫グロブリン様ドメイン 3（配列番号 2 の265～326番目）、膜貫通ドメイン（配列番号 2 の359～381番目）及びサイトゾル尾部（配列番号 2 の382～396番目）を含む。免疫グロブリン様ドメイン 1～3を含む細胞外領域又はその部分断片は可溶性である。

[0027] ゲノム上のシグレック 5 遺伝子の塩基配列の例を、配列番号 3 に示す。配列番号 3 の1001～19105番目がシグレック 5 タンパク質をコードするORFに対応するゲノム領域である。そこにコードされているシグレック 5 タンパク質のアミノ酸配列を配列番号 4 に示す。なおシグレック 5 タンパク質のアミノ酸配列は、シグレック 1 4 / 5 融合タンパク質のアミノ酸配列と同一である。

[0028] ゲノム上のシグレック 1 4 / 5 融合遺伝子の塩基配列の例を、配列番号 5 に示す。配列番号 5 の1001～19105番目がシグレック 1 4 / 5 融合タンパク質をコードするORFに対応するゲノム領域である。シグレック 1 4 / 5 融合タンパク質のアミノ酸配列は、シグレック 5 タンパク質のアミノ酸配列と同一であり、両者は同一のタンパク質であるため、シグレック 1 4 / 5 融合タンパク質のアミノ酸配列も配列番号 4 に示すものである。

[0029] 本発明の方法で検出されるゲノム上のシグレック 1 4 遺伝子（野生型アレル）は、配列番号 1 に示す塩基配列を有するものであってよいが、配列番号

2のアミノ酸配列をコードする限り異なる塩基配列を有していてもよい。さらに、ゲノム上のシグレック14遺伝子（野生型アレル）は、配列番号2のアミノ酸配列において1～数个（例えば2～5個）のアミノ酸の欠失、置換又は付加の変異を引き起こす塩基変異を含むものであってもよい。

[0030] 本発明で検査に供する生物学的試料は、基本的には、慢性閉塞性肺疾患の増悪感受性について検査しようとするヒト被験体から採取する。検査対象のヒト被験体は、健康であっても健康でなくてもよい。一実施形態では、検査対象となるヒト被験体は、肺疾患を有する者、特に、慢性閉塞性肺疾患（COPD）を発症した者が好適である。別の実施形態では、検査対象となるヒト被験体は、喫煙者であるか又は喫煙歴がある者が好適である。検査対象となるヒト被験体はまた、粉塵や大気汚染条件に長期間曝露されたか又はされている者が好適である。被験体が慢性閉塞性肺疾患を発症しているか否かは、臨床現場で用いられている通常の基準に基づいて判断すればよいが、例えば、気流制限（気管支の狭窄・閉塞などによって生じた、呼吸をする際の空気の流れの制限）が認められ、かつ気管支拡張剤投与後に行った肺機能検査で1秒率（ FEV_1/FVC ）が0.7以下の場合に、慢性閉塞性肺疾患に罹患していると判断することができる。ここで、 FEV_1 は、一秒量、すなわち、息をできるだけ速く吐き出したときに1秒間で吐き出すことのできる呼気量である。またFVCは、努力肺活量、すなわち、息を大きく吸い込みできるだけ速く吐き出したときの肺活量である。

[0031] 生物学的試料は、例えば、血液（例えば、末梢血）、血清、血漿、又は血液中の白血球等の、血液由来試料であってよいし、皮膚、粘膜（口腔粘膜、鼻内粘膜等）、骨髓、脂肪等の単離組織試料（例えば、口腔擦過試料、手術切除組織等）及びそこに含まれる細胞を含む試料、又は他の生体試料（例えば、気道洗浄液、口内洗浄液等の体内洗浄液、若しくは喀痰等）であってもよいが、これらに限定されない。本発明の検査方法に用いる生物学的試料は、一実施形態では、血液由来試料が好ましい。

[0032] 生物学的試料を用いて被験体のシグレック14の遺伝子型を決定する方法

の一例として、生物学的試料中のDNAについてシグレック 1 4 遺伝子とシグレック 1 4 / 5 融合遺伝子の有無を検出する方法が挙げられる。生物学的試料は上記のような任意のものであってよいが、血液由来試料、例えば血液又は血液中の白血球等が好ましい。

[0033] 生物学的試料中のDNAについて検出実験を行う場合、当該生物学的試料を直接実験に供してもよいが、予め、溶血処理や、DNA抽出及び精製処理を行っておくことがより好ましい。溶血処理や、生物学的試料からのDNA抽出・精製は、常法により行うことができるが、例えば、溶血試薬を用いた溶血処理の後、遠心分離によって白血球等の細胞を分離し、それを市販のDNA抽出・精製キットを用いて処理することにより、簡便にゲノムDNAを精製することができる。

[0034] 一実施形態では、生物学的試料中のゲノムDNA配列に基づくシグレック 1 4 の遺伝子型決定は、シグレック 1 4 遺伝子を特異的に増幅するプライマーセット（シグレック 1 4 遺伝子特異的プライマーセット）と、シグレック 1 4 / 5 融合遺伝子の特異的に増幅するプライマーセット及び場合によりシグレック 5 遺伝子の特異的に増幅するプライマーセットを用いたPCRによって行うことができる。この遺伝子型決定は、例えば、特許文献 2 に記載のシグレック 1 4 遺伝子のアレル検出方法に基づいて行うことができる。

[0035] シグレック 1 4 遺伝子特異的プライマーセットは、シグレック 1 4 遺伝子中の塩基配列に基づき、シグレック 1 4 / 5 融合遺伝子又はシグレック 5 遺伝子を増幅させないように設計する。その各プライマーは、シグレック 1 4 遺伝子とシグレック 5 遺伝子における保存領域の外側（保存領域より 5' 側及び 3' 側）に設計することが好ましい。シグレック 1 4 遺伝子とシグレック 5 遺伝子の保存領域は、配列番号 1 の塩基配列中では 753 番目～2110 番目に相当する。通常は、シグレック 1 4 遺伝子特異的プライマーセットのフォワードプライマーは 753 番目より 5' 末端側の領域に、リバープライマーは 2110 番目より 3' 末端側の領域に設計する。好ましい具体的なプライマーとしては、フォワードプライマーとしては配列番号 6 に示す塩基配列を含むプライマー、

リバースプライマーとしては配列番号7に示す塩基配列を含むプライマーが挙げられる。

[0036] シグレック5遺伝子の特異的に増幅するプライマーセット（シグレック5遺伝子特異的プライマーセット）の各プライマーも、シグレック14遺伝子とシグレック5遺伝子における保存領域の外側（保存領域より5'側及び3'側）に設計することが好ましい。シグレック14遺伝子とシグレック5遺伝子の保存領域は、配列番号1の塩基配列中では753番目～2110番目に相当し、配列番号3の塩基配列中では753番目～2114番目に相当する。好ましい具体的なプライマーとしては、フォワードプライマーとしては配列番号8に示す塩基配列を含むプライマー、リバースプライマーとしては配列番号9に示す塩基配列を含むプライマーが挙げられる。

[0037] シグレック14／5融合遺伝子の特異的に増幅するプライマーセットの各プライマーも同様に設計することができるが、好ましい実施形態では、シグレック14遺伝子特異的プライマーセットのフォワードプライマーと、シグレック5遺伝子特異的プライマーセットのリバースプライマーから構成されるプライマーセットを、シグレック14／5融合遺伝子特異的プライマーセットとして用いることができる。

[0038] これら各プライマーの塩基長については特に制限はないが、アニーリング温度及びアニーリングの特異性等の点から、15～40塩基、好ましくは20～35塩基である。

[0039] PCRは、例えば、鋳型となる生物学的試料由来のゲノムDNA、耐熱性DNAポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオシド三リン酸混合物、PCR適合バッファー、上記プライマーセットを混合して反応液を調製し、変性工程、アニーリング工程、及びDNA伸長工程を含む核酸増幅工程を複数サイクル行うことにより実施する。

[0040] PCR反応完了後、生成したPCR反応産物（核酸増幅産物）を検出する。PCR反応液に二本鎖DNA検出試薬（例えばSYBR Greenやエチジウムブロマイドなど）を添加し、適当な光源の存在下で反応産物を検出するか、反応産物をアガロ

ースゲル電気泳動やキャピラリー電気泳動などで分離し、二本鎖DNA検出試薬（例えばSYBR Greenやエチジウムブロマイドなど）を用いてPCR反応産物を検出することができる。

[0041] その結果、シグレック 1 4 遺伝子特異的プライマーセットによる増幅産物が検出されない場合は、シグレック 1 4 遺伝子の双方の野生型アレルを欠失していることが示される。さらに、シグレック 1 4 / 5 遺伝子特異的プライマーセットによる増幅産物が検出されるが、シグレック 5 遺伝子特異的プライマーセットによる増幅産物が検出されない場合、シグレック 1 4 遺伝子とシグレック 5 遺伝子とが融合したシグレック 1 4 / 5 融合遺伝子をホモ接合性で有することが示される。この場合、遺伝子型をヌル変異型と決定できる。

[0042] 一方、シグレック 1 4 遺伝子特異的プライマーセットによる増幅産物が検出される場合、シグレック 1 4 遺伝子の少なくとも一方の野生型アレルを有していることが示される。さらに、シグレック 1 4 / 5 遺伝子特異的プライマーセットによる増幅産物とシグレック 5 遺伝子特異的プライマーセットによる増幅産物の双方が検出される場合、シグレック 1 4 遺伝子の野生型アレルをヘテロ接合性で有し、シグレック 1 4 遺伝子はヌル変異型アレル（シグレック 1 4 / 5 融合遺伝子）となっていることが示される。この場合、遺伝子型は野生型アレルについてヘテロ接合型と決定できる。

[0043] また、シグレック 1 4 遺伝子特異的プライマーセットによる増幅産物が検出され、かつ、シグレック 5 遺伝子特異的プライマーセットによる増幅産物も検出されるが、シグレック 1 4 / 5 遺伝子特異的プライマーセットによる増幅産物は検出されない場合は、シグレック 1 4 遺伝子の野生型アレルをホモ接合性で有し、シグレック 1 4 / 5 融合遺伝子は存在しないことが示される。この場合、遺伝子型は野生型と決定できる。

[0044] なおシグレック 1 4 遺伝子特異的プライマーセットによる増幅産物とシグレック 1 4 / 5 遺伝子特異的プライマーセットによる増幅産物の検出結果だけで、シグレック 1 4 の各遺伝子型を識別することができるが、シグレック

5 遺伝子特異的プライマーセットによる増幅産物の検出結果を検討することで、さらにその遺伝子型の決定結果を裏付けることができる。

[0045] 別の実施形態では、生物学的試料中のゲノムDNA配列に基づくシグレック 1 4 の遺伝子型決定は、シグレック 1 4 遺伝子に特異的なプローブを用いたサザンブロット法によって行ってもよい。

[0046] シグレック 1 4 遺伝子に特異的な核酸プローブは、シグレック 1 4 遺伝子中の塩基配列に基づき、シグレック 1 4 / 5 融合遺伝子又はシグレック 5 遺伝子にアニールしないように設計することが好ましい。具体的には、シグレック 1 4 遺伝子とシグレック 5 遺伝子の保存領域（配列番号 1 の753番目～2110番目）を避け、かつシグレック 1 4 遺伝子に特異的な領域に設計すればよい。シグレック 1 4 遺伝子に特異的な核酸プローブは、例えば、配列番号 1 の2110番目より3'末端側の領域を選択して設計することができる。

[0047] またシグレック 5 遺伝子又はシグレック 1 4 / 5 融合遺伝子に特異的な核酸プローブを設計・作製して、シグレック 1 4 遺伝子に特異的な核酸プローブに加えて、サザンブロット法に用いることがさらに好ましい。

[0048] 核酸プローブの塩基長については特に制限はないが、アニーリング温度やアニーリングの特異性等を考慮すると、通常は20～10,000塩基対程度、好ましくは20～1,000塩基対程度である。

[0049] かかる核酸プローブを用いたサザンブロッティングでは、まず、例えば、ヒト被験体由来の生物学的試料から抽出したゲノムDNAを直接ナイロン膜などの薄膜に固相化するか、又は適当な方法（制限酵素等による消化など）で断片化しアガロースゲル電気泳動などにより分離した後、ナイロン膜などの薄膜に転写し固相化する。次いで、上記のシグレック 1 4 遺伝子に特異的な核酸プローブを調製し、ラベルを導入し、薄膜上のゲノムDNAとハイブリダイズさせればよい。ラベルとしては、放射性同位元素（³²P、³³P、³⁵S等）、蛍光色素（Cy3やCy5等）、又はビオチンやジゴキシゲニンなどのエピトープを用いることができる。ビオチンやジゴキシゲニンなどのエピトープを導入した場合は、核酸プローブの検出に二次検出試薬（蛍光色素を結合したストレプト

アビジンや抗ジゴキシゲニン抗体など）を必要とする。ハイブリダイズしなかったプローブを洗浄操作により除いた後、ハイブリダイズした核酸プローブをラベル法に応じた方法で検出すればよい。

[0050] 別法では、シグレック 14 遺伝子特異的な核酸プローブを薄膜又はガラス面などに固相化し、そこに、適当な方法（機械的剪断、制限酵素等による消化など）で断片化しラベルを導入したゲノムDNAをハイブリダイズさせてもよい。ラベルとしては放射性同位元素（ ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 等）、蛍光色素（Cy3やCy5等）、或いはビオチンやジゴキシゲニンなどのエピトープを用いることができる。ビオチンやジゴキシゲニンなどのエピトープを導入した場合は、核酸プローブの検出に二次検出試薬（蛍光色素を結合したストレプトアビジンや抗ジゴキシゲニン抗体）を必要とする。ハイブリダイズしなかったプローブを洗浄操作により除いた後、ハイブリダイズしたゲノムDNAをラベル法に応じた方法で検出することができる。

[0051] サザンブロット法では、シグレック 14 遺伝子特異的な核酸プローブとゲノムDNAとのハイブリダイゼーションシグナルが検出できる場合、シグレック 14 の遺伝子型は野生型（ホモ接合）又はヘテロ接合型であることが示される。この場合、シグレック 14 / 5 融合遺伝子特異的な核酸プローブとゲノムDNAとのハイブリダイゼーションシグナルが検出されれば、シグレック 14 の遺伝子型はヘテロ接合型であると決定され、該シグナルが検出されなければ、野生型（ホモ接合）であると決定される。一方、シグレック 14 遺伝子特異的な核酸プローブとゲノムDNAとのハイブリダイゼーションシグナルが検出できない場合、シグレック 14 遺伝子の野生型アレルの双方が欠失し、シグレック 14 / 5 融合遺伝子がホモ接合性で存在することが示され、すなわちシグレック 14 の遺伝子型はヌル変異型と決定される。

[0052] またシグレック 14 の遺伝子型は、生物学的試料中のシグレック 14 タンパク質を検出することによっても決定できる。シグレック 14 タンパク質は、シグレック 14 を特異的に認識する抗体を用いて検出することができる。

「シグレック 14 を特異的に認識する抗体」とは、シグレック 14 タンパク

質に特異的に結合し、かつシグレック 5 タンパク質には結合しない抗体を用いる。この実施形態では、シグレック 1 4 を特異的に認識する抗体を用いて、生物学的試料中のシグレック 1 4 タンパク質を検出すればよい。本発明において検出対象となる「シグレック 1 4 タンパク質」は、シグレック 1 4 遺伝子によってコードされた配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質だけでなく、当該タンパク質からシグナルペプチドが除去されたもの、配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 ～数個のアミノ酸残基の欠失、置換又は付加を含む配列からなるタンパク質、配列番号 2 に示すアミノ酸配列の細胞外領域又はその一部である可溶性シグレック 1 4 タンパク質等を包含する。本発明において検出対象となる好ましい「シグレック 1 4 タンパク質」は、シグレック 1 4 タンパク質に特有の免疫グロブリン様ドメイン 3 を有する。シグレック 1 4 タンパク質は、例えば配列番号 2 に示すアミノ酸配列又はその一部をコードする塩基配列を有する DNA を用いて遺伝子工学的に組換え產生することができる。

[0053] シグレック 1 4 について野生型 (WT/WT) の遺伝子型を有する被験体、及びヘテロ接合型 (WT/Null) の遺伝子型を有する被験体は、シグレック 1 4 タンパク質を発現する。一方、ヌル変異型 (Null /Null) の遺伝子型を有する被験体は、シグレック 1 4 の野生型アレルを欠損しておりシグレック 1 4 / 5 融合遺伝子のみを有するため、シグレック 1 4 タンパク質を発現しない。なおシグレック 1 4 / 5 融合遺伝子から発現されるシグレック 1 4 / 5 融合タンパク質は、シグレック 5 タンパク質と同一のタンパク質である。したがって生物学的試料中のシグレック 1 4 タンパク質を検出することにより、シグレック 1 4 の遺伝子型を決定することができる。

[0054] シグレック 1 4 を特異的に認識する抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよく、従来公知の方法で取得することができる。例えば、シグレック 1 4 に対するポリクローナル抗体は、シグレック 1 4 タンパク質を用いて、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ロバ等の動物を免疫感作し、一定期間経過後血清を採取し、プロテイン A、プロテ

シグレック 14 タンパク質、抗原ペプチドなどを固相化したカラムなどで精製することで得ることができる。シグレック 14 タンパク質の一部又は全体を抗原として用いて抗体を作成した後、シグレック 5 タンパク質の一部（シグレック 14 タンパク質と高い配列相同性を示す部分を含む）又は全部と交差反応する画分を吸着などにより除去した画分を、シグレック 14 タンパク質を特異的に認識する抗体として調製することができる。あるいは、免疫に用いる抗原としてシグレック 14 タンパク質に特異的な領域を用いることにより、シグレック 5 タンパク質を含む他のシグレックタンパク質と交差反応しない抗体を得ることもできる。シグレック 14 タンパク質に特異的な領域としては、例えば、シグレック 14 タンパク質の細胞外領域に含まれるがシグレック 5 タンパク質の細胞外領域には含まれない領域が挙げられ、具体例では、配列番号 2 の 238 番～358 番の領域がシグレック 14 タンパク質に特異的な領域に相当する。本発明では、シグレック 14 タンパク質に特異的な領域、好ましくはリンカー及び／又は免疫グロブリン様ドメイン 3、例えば配列番号 2 の 238 番～358 番の領域、を特異的に認識する抗体を、シグレック 14 を特異的に認識する抗体として好適に用いることができる。

[0055] また、シグレック 14 に対するモノクローナル抗体は、上記ポリクローナル抗体と同様の免疫感作を行い、一定期間経過後、例えば脾臓細胞を採取し、該細胞とミエローマ細胞とを細胞融合し、得られたハイブリドーマをスクリーニングし、シグレック 14 タンパク質に対する抗体産生ハイブリドーマを取得して、その培養物又は培養上清から調製することができる。

[0056] さらに、上記抗体の抗原結合性フラグメント（Fab、F(ab')₂など）も同様に使用することができる。

[0057] ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体いずれの場合も、ヒト由来の他のシグレックタンパク質（例えば、シグレック 5、シグレック 6）に交差反応しないことを確認することが望ましい。使用する抗体は、ラベルされたものでも、ラベルされていないものでもよい。抗体は、例えば、蛍光色素（フルオレセイン、R-フィコエリスリン、アロフィコシアニン等の検出可能な蛍

光色素)やビオチン等でラベルすることができる。

[0058] ラベルなしの抗シグレック 1 4 抗体を用いる場合は、抗体作製に用いた動物の免疫グロブリンのFc等を認識する二次抗体（蛍光色素又はビオチンなどでラベルしたもの）、ビオチンなどでラベルした抗体を用いる場合はこのラベルと特異的に結合するプローブ（蛍光色素ラベルしたストレプトアビジンなど）を二次試薬に用いて検出することができる。

[0059] シグレック 1 4 を特異的に認識する抗体の好適な具体例は、後述の参考例に記載された、clone 40-1として規定されるシグレック 1 4 特異的モノクローナル抗体である。本抗体及びその作製については、Yamanaka M et al., *Glycobiology*, 2009, 19(8):841-846に開示されている。このclone 40-1のモノクローナル抗体は、シグレック 1 4 の細胞外領域と結合することができ、可溶性シグレック 1 4 タンパク質を認識することができる。

[0060] シグレック 1 4 を特異的に認識する抗体を使用した生物学的試料中のシグレック 1 4 タンパク質の検出は、例えば、ELISA法や、フローサイトメトリーによる解析により行うことができる。

[0061] 本発明の方法の好適な一実施形態では、例えばシグレック 1 4 を特異的に認識する抗体を用いて、生物学的試料、特に血液由来試料中の可溶性シグレック 1 4 タンパク質を検出することにより、試料中の可溶性シグレック 1 4 タンパク質の有無又は量を決定し、それによりシグレック 1 4 の遺伝子型を決定することができる。血液由来試料としては、全血、血清、血漿等が挙げられ、血清がより好ましい。可溶性シグレック 1 4 タンパク質とは、膜貫通ドメインよりC末端側の領域を欠損した、シグレック 1 4 タンパク質の細胞外領域又はその一部を含むタンパク質である。すなわち可溶性シグレック 1 4 タンパク質は、全長シグレック 1 4 タンパク質の免疫グロブリン様ドメイン 1、2 及び 3 並びにリンカーのうち少なくとも 1 つを含み、膜貫通ドメイン及びサイトゾル尾部を含まない部分タンパク質である。この可溶性シグレック 1 4 タンパク質は、生体内で、細胞膜等の生体膜に結合しておらず、血液等の生体液中に遊離形態で存在する。理論により限定されることは意図しな

いが、可溶性シグレック 14 タンパク質は、生体内で、シグレック 14 遺伝子からスプライシングバリエーションとして又は全長シグレック 14 タンパク質の分解により生成されるものと考えられる。

[0062] 血液由来試料中の可溶性シグレック 14 タンパク質の検出は、例えば、以下のようにして行うことができる。まず、試験プレートのウェルに、シグレック 5 とシグレック 14 をともに認識する抗体を添加し、PBS等のバッファ溶液中、室温で終夜静置して抗体を固相に結合させる（固相化）。なお抗シグレック 5 抗体の多くは、シグレック 14 と交差反応し、シグレック 5 とシグレック 14 をともに認識する抗体である（Angata T et al., FASEB J. 2006, 20(12):1964-1973）。固相化後、溶液を除去し、洗浄バッファ（例えば、0.05% Tween 20等の界面活性剤含有PBS）で各ウェルを洗浄し、希釈液（例えば、1% BSA含有PBS）を添加して室温にてブロッキングを行う。溶液を除去し、を添加し、室温で2時間静置した。洗浄バッファで各ウェルを3回洗浄（400 μ l/ウェル）し、血液由来試料（好ましくは、血清）又はその希釈サンプルを添加し、室温で数時間（例えば2時間）静置する。洗浄バッファで各ウェルを洗浄した後、可溶性シグレック 14 を認識可能でありビオチン化等のラベリングがされている、シグレック 14 を特異的に認識する抗体（好ましくはモノクローナル抗体、例えばclone 40-1の抗体）をそこに添加し、室温で数時間（例えば、2時間）静置する。溶液を除去し、洗浄バッファでウェルを洗浄し、ラベルの検出を行う。例えば、抗体をビオチン化した場合は、ストレプトアビジン-コンジュゲート化ホースラディッシュペルオキシダーゼと基質を添加して反応させ、反応産物を450 nmの吸光度で測定すればよい。このELISA法では、シグレック 5 を検出することなく、可溶性シグレック 14 を特異的に検出することができる。

[0063] 従来、ヒト血中の可溶性シグレック 14 の存在は明らかになっていなかった。しかし本発明により、シグレック 14 遺伝子（野生型アレル）を有するヒト被験体の血中にはシグレック 14 が可溶性形態（可溶性シグレック 14）で存在すること、一方、シグレック 5 は血中に可溶性形態ではほとんど存

在しないことが示された。このため、生物学的試料中の可溶性シグレック 14 の検出には、シグレック 14 を特異的に認識する抗体だけでなくシグレック 5 とシグレック 14 をともに認識する抗体も使用することができる。なお可溶性シグレック 14 の検出に用いる、シグレック 14 を特異的に認識する抗体は、可溶性シグレック 14 タンパク質、すなわちシグレック 14 の細胞外領域又はその一部と結合（認識）することができるものであり、例えば免疫グロブリン様ドメイン 3 と結合（認識）することが好ましい。

[0064] したがって生物学的試料（好ましくは、血清等の血液由来試料）中に可溶性シグレック 14 タンパク質が検出される場合、その試料を採取したヒト被験体は、シグレック 14 遺伝子をホモ接合で有する野生型又はヘテロ接合で有するヘテロ接合型である。特に、可溶性シグレック 14 タンパク質がより高濃度（例えば、おおむね 180ng/ml 血清以上）で検出される場合は、シグレック 14 遺伝子について野生型であると決定でき、逆に、可溶性シグレック 14 タンパク質がより低濃度（例えば、おおむね 1~80ng/ml 血清）で検出される場合はヘテロ接合型であると決定できる。可溶性シグレック 14 タンパク質が中間的な濃度（例えば、おおむね 80ng/ml 超、180ng/ml 血清未満）である場合は、さらにゲノム DNA 上のシグレック 14 遺伝子の検出を行うなどして、シグレック 14 の遺伝子型を決定することが望ましい。一方、調べた生物学的試料中にシグレック 14 タンパク質が検出されない場合、シグレック 14 の野生型アレルを両方とも欠損したヌル変異型（シグレック 14 / 5 融合遺伝子をホモ接合で有する）と決定できる。

[0065] 別の実施形態では、フローサイトメトリーにより白血球上に発現したシグレック 14 タンパク質を検出することにより、シグレック 14 の遺伝子型を決定することもできる。例えば、被験体の血液を血液凝固を防ぐ試薬（EDTA、クエン酸、ヘパリンなど）を含む採血管に採取してそれを生物学的試料とする。必要に応じて、その血液から塩化アンモニウムなどを用いた赤血球の溶血により白血球を単離するか、又はフィコールなどを用いた密度勾配遠心法などにより白血球を単離する。さらに、ヒト白血球又は全血試料にシグレ

ック14 特異的な抗体を添加し、一定時間保温した後、洗浄により結合しなかった抗体を除き、フローサイトメーターを用いて白血球上のシグレック14 タンパク質の有無を検出する。この際、顆粒球又は単球上でのシグレック14 タンパク質の発現を検出することが望ましい。白血球上のシグレック14 タンパク質が検出される場合、その試料を採取したヒト被験体は、シグレック14 遺伝子をホモ接合で有する野生型又はヘテロ接合で有するヘテロ接合型である。一方、白血球上のシグレック14 タンパク質が検出されない場合、シグレック14 の野生型アレルを両方とも欠損したヌル変異型（シグレック14 / 5 融合遺伝子をホモ接合で有する）である。

[0066] 本発明では、以上のようにして決定されたヒト被験体のシグレック14 の遺伝子型を指標として、該被験体における慢性閉塞性肺疾患の増悪感受性を検査することができる。すなわち、本発明による慢性閉塞性肺疾患（COPD）の増悪感受性の検査は、COPDと強く相関するバイオマーカー（遺伝的マーカー又は血清マーカー等）としてのシグレック14 の遺伝子型に基づいて行われる。

[0067] ここで慢性閉塞性肺疾患の増悪感受性とは、慢性閉塞性肺疾患（COPD）を発症した後の増悪の生じやすさ（素因）を意味する。慢性閉塞性肺疾患の増悪感受性は、限定するものではないが、例えば、慢性閉塞性肺疾患患者が1年以内に増悪を生じる割合として表すこともできる。慢性閉塞性肺疾患の増悪（急性増悪）とは、呼吸困難、咳、喀痰などの慢性閉塞性肺疾患の症状が日常の生理的変動を超えて急激に悪化し、安定期の治療内容の変更を要する状態をいう（日本呼吸器学会ガイドライン、2009）。慢性閉塞性肺疾患の増悪は、Anthonisenらの定義（Anthonisen NR et al., Ann Intern Med. 1987, 106:196-204）や、Rodriguez-Roisinの定義（Rodriguez-Roisin, R. Chest 2000, 117:398S-401S）に従って判別することができる。本発明において、「慢性閉塞性肺疾患の増悪感受性が高い」ことは、慢性閉塞性肺疾患を発症した場合に増悪を生じる確率が高いことを意味する。

[0068] 本発明では、ヒト被験体がシグレック14 遺伝子の野生型アレルを有する

と決定された場合、このバイオマーカーと慢性閉塞性肺疾患の増悪感受性との相関に基づいて、慢性閉塞性肺疾患の増悪感受性がより高いものと検査される。

[0069] 具体的には、あるヒト被験体のシグレック 14 の遺伝子型が野生型であり、すなわちシグレック 14 遺伝子の野生型アレルをホモ接合で有していると決定された場合、その被験体における慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の増悪感受性は高いことが示される。本発明の方法において、野生型の場合の COPD の増悪感受性 (COPD 増悪は Anthonisen の定義による) は、限定するものではないが、およそ 22%~53% の増悪率、好ましくはおよそ 34%~39% の増悪率である。一方、ヒト被験体のシグレック 14 の遺伝子型がヘテロ接合型であり、すなわちシグレック 14 遺伝子の野生型アレルをヘテロ接合性で有し、ヌル変異型アレル (シグレック 14 / 5 融合遺伝子) を 1 つ有していると決定された場合、その被験体における COPD の増悪感受性は野生型と比較すれば相対的に低い。ヌル変異型と比較すると相対的に高いことが示される。ヘテロ接合型の場合の COPD の増悪感受性 (同様に Anthonisen の定義による) は、限定するものではないが、およそ 12%~35% の増悪率、好ましくはおよそ 18%~21% の増悪率である。さらに、ヒト被験体のシグレック 14 の遺伝子型がヌル変異型であり、すなわちヌル変異型アレル (シグレック 14 / 5 融合遺伝子) をホモ接合で有すると決定された場合、その被験体における COPD の増悪感受性は低いことが示される。ヌル変異型の場合の COPD の増悪感受性 (同様に Anthonisen の定義による) は、限定するものではないが、およそ 2%~20% の増悪率、好ましくはおよそ 6%~7% 未満の増悪率である。ここで増悪率とは、慢性閉塞性肺疾患患者が 1 年以内に増悪を引き起こす割合 (%) をいう。

[0070] また上記のように、シグレック 14 の遺伝子型の野生型アレルの数が多いほど、COPD の増悪感受性は増加する。すなわち、シグレック 14 の野生型アレルを有しないヌル変異型よりも、野生型アレルを 1 つ有するヘテロ接合型の方が、COPD が増悪しやすく、シグレック 14 の野生型アレルを 1 つ有するヘテロ接合型よりも、野生型アレルをホモ接合で 2 つ有する野生型の方が、C

OPDが増悪しやすい。したがって本発明の方法によれば、決定されたシグレック14の遺伝子型の野生型アレルの数の多さに基づいて、増悪感受性の高さが検査される。すなわち本発明では、決定されたシグレック14の遺伝子型の野生型アレルの数を増悪感受性の指標とすることができる。

[0071] さらに、決定したシグレック14の遺伝子型においてシグレック14の野生型アレルを有する場合には、高頻度の増悪を生じるリスクがあるものとして検査される。すなわち、シグレック14の野生型アレルをヘテロ接合で有するヘテロ接合型、及びその野生型アレルをホモ接合で有する野生型では、例えば、年間に2回以上、とりわけ年間に3回以上の高頻度の増悪を起こすリスクが高いものとして検査される。

[0072] COPDの増悪は回復に時間を要し、また増悪を繰り返すほど肺機能が急激に低下して生活の質（QOL）や予後が悪化することが知られている。本発明の方法によれば、予めヒト被験体のCOPDの増悪感受性を検査しておくことができるため、増悪を重点的に予防することが望ましいCOPD患者を選択することができて有利である。

実施例

[0073] 以下、実施例を用いて本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

[0074] [参考例] シグレックタンパク質及び抗シグレック抗体の製造

（1）シグレックタンパク質の製造

ヒトシグレック14タンパク質の細胞外領域（3つの免疫グロブリン（Ig）様ドメインを含む）とヒトIgG Fc領域との融合タンパク質を既報に従って調製した（Angata T et al., FASEB J. 2006, 20(12):1964-1973、特開2006-345786号公報）。具体的には、まず、ヒトシグレック14タンパク質の完全長cDNA（GenBankアクセッション番号AY854038）をプラスミド中にクローニングし、それを鋳型DNAとして、シグレック14の細胞外領域に相当する核酸配列をPCRによりPfu DNAポリメラーゼを用いて増幅した。このPCRには以下のプライマーを使用した：HsSig5/14 Expr F（5'-ccctctagagccaccATGCTGCCCCTGC

TGCTGCTGCCC-3' (配列番号 10) ; "tctaga"はXbaI部位である) 及びHsSig14 Fc R (5'-atcGGAAGAGGAGCTTCTCTGCACA-3' (配列番号 11) ; 5'末端の配列"atc"はEcoR V部位の半配列である) (両プライマー配列中、大文字はシグレック 14 のcDNA配列に一致する塩基を表す)。得られたPCR産物をXbaIで切断し、ヒトIgG Fc領域コード配列を含むプラスミドEK-Fc/pcDNA3.1(-)のXbaI-EcoR V部位にクローニングし、インサートの配列を確認した。EK-Fc/pcDNA3.1(-)は、pcDNA3.1(-) (Invitrogen社) のEcoRVとEcoRIサイトの間にFLAGタグ／エンテロキナーゼ認識配列をコードする領域及びヒトIgG1のヒンジ領域からC末端 (Fc) までをコードするゲノム由来DNA断片を挿入したベクターである。FLAGタグ／エンテロキナーゼ認識配列をコードする領域の5'上流に読み枠が合うようにEK-Fc/pcDNA3.1(-)にcDNA断片を挿入する事により、挿入したcDNA断片 (ここではシグレック 14 の上記細胞外領域をコードするインサート) 由来のポリペプチドとFLAGタグ／エンテロキナーゼ認識配列、ヒトIgGのヒンジ領域及びFc領域が融合された可溶性タンパク質を発現するための組換え発現ベクターを得ることができる。

[0075] 得られた組換え発現ベクターを、リポフェクトアミン2000を用いて293細胞に導入した。次いで培地を、2%低IgG-FBS (HyClone, Logan, UT, USA) を含むOpti-MEM (Invitrogen) に交換し、6日間培養した。回収した培地を遠心分離して培養上清を採取し、産生した組換えタンパク質 (上記シグレック 14 細胞外領域+Fcの融合タンパク質 ; Siglec-14-Fc) を、プロテインAセファロースへの吸着、0.1 Mグリシン-HClバッファー (pH 3.0) による抽出及び1/10量の1M Tris-HClバッファー (pH 8.0) での中和により、培養上清から精製した。

[0076] また上記と同様の方法で、ヒトシグレック 5 タンパク質の細胞外領域 (3つの免疫グロブリン (Ig) 様ドメインを含む、ヒトシグレック 14 の上記細胞外領域と対応する領域) とヒトIgG Fc領域との融合タンパク質 (Siglec-5-Fc) を作製し、精製した。

[0077] (2) 抗シグレック 14 抗体の作成

次いで、このようにして得られた、シグレック 14 の細胞外領域と IgG Fc 領域との融合タンパク質 (Siglec-14-Fc) を用いて、シグレック 14 を特異的に認識する抗体を既報に従って作製した (Yamanaka M et al., Glycobiology. 2009, 19(8):841-846)。

[0078] 具体的には、BALB/cマウスを、上記で精製した組換え融合タンパク質Siglec-14-Fcを用いて繰り返し免疫した後、その脾臓を採取し、ポリエチレングリコールを用いて脾細胞とマウス由来ミエローマ細胞を常法により融合した。得られたハイブリドーマクローンを、シグレック 14 又はシグレック 5 完全長タンパク質発現ベクターを導入したCOS-7細胞を用いたフローサイトメトリーにより、シグレック 14 又はシグレック 5 に対する反応性についてスクリーニングした。次いで、シグレック 14 又はシグレック 5 を安定的に発現するTHP-1細胞を用いたフローサイトメトリーにより、さらにシグレック 14 又はシグレック 5 に対する反応性についてスクリーニングした。このようにして、シグレック 14 を特異的に認識しシグレック 5 を認識しない抗体を産生するハイブリドーマクローン (Clone 40-1) を作製した。このハイブリドーマクローンclone 40-1の無血清培養上清をプロテインGセファロース (登録商標) (GE Healthcare) への吸着に供することによって、シグレック 14 特異的モノクローナル抗体を精製した。このシグレック 14 特異的モノクローナル抗体 (clone 40-1) は、シグレック 14 の細胞外領域の免疫グロブリン様ドメイン 3 に結合する抗体である。

[0079] なお、シグレック 14 とシグレック 5 の両方を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体 (Clone 194128) は、R&D Systems社 (Minneapolis, MN, USA) から市販品を購入して後述の実施例で用いた。

[0080] [実施例 1] シグレック 14 遺伝子 (SIGLEC14) の遺伝的多型とCOPD増悪の相関

日本医科大学呼吸ケアクリニックに来院した外来患者のうち、以下の条件を満たす方に研究への参加意思の有無を訊ねた：(1) 現在又は過去に喫煙歴があること、(2) 咳嗽、喀痰、呼吸困難があること。研究参加の意志表

示をした患者からはインフォームドコンセントを得た。肺機能検査は肺機能検査システムCHESTAC（Chest株式会社）を用いて行い、常法に従って気管支拡張薬投与後の1秒率（FEV₁/FVC）が0.7以下の患者を慢性閉塞性肺疾患（COPD）患者と診断した。COPD患者に対しては1年間にわたり毎月フォローアップを行い、増悪に関する質問を含む問診を行った。問診では、Anthonisenらの定義（Anthonisen NR et al., Ann Intern Med. 1987, 106:196-204）による細菌性の増悪の有無、及びRodriguez-Roisinの定義（Rodriguez-Roisin, R. Chest 2000, 117:398S-401S）によるより軽度な増悪を含む増悪の頻度の両方について質問した。

[0081] 一方、患者の末梢血より常法に従いDNAを採取し、シグレック14遺伝的多型の解析を既報に準じて行った（Yamanaka M et al., Glycobiology. 2009, 19(8):841-6；特開2010-35551号公報）。具体的には、患者から同意のもと末梢血約10 mlを採取し、ACK溶血液（150 mM塩化アンモニウム、10 mM炭酸水素カリウム、0.1 mMエチレンジアミン四酢酸）を用いて赤血球を溶血させた。この液から遠心操作により白血球を得た。得られた白血球（5 × 10⁶細胞）からDNeasy Blood & Tissue Kit（QIAGEN社）を用いてゲノムDNAを精製した。このゲノムDNAを鋳型として、PCRを実施した。PCRに用いた反応液（20 μl）の組成は以下の通り：ゲノムDNA 100 ng、プライマー各0.3 μM、デオキシリボヌクレオシド三リン酸（dATP、dCTP、dGTP、dTTP）各0.2 mM、耐熱性DNAポリメラーゼExpand High Fidelity enzyme（ロシュ・ダイアグノスティクス）0.5ユニット、塩化マグネシウム1.5 mM、1 × Expand High Fidelity Buffer（ロシュ・ダイアグノスティクス）。

[0082] PCRの反応サイクルは、94℃で2分の後、（94℃で15秒；56℃で30秒；72℃で90秒）を10サイクル、続いて（94℃で15秒；56℃で30秒；72℃で90秒＋各サイクル5秒ずつ延長）を20サイクル、続いて72℃で7分とした。

[0083] PCRには、シグレック14遺伝子、シグレック5遺伝子及びシグレック14／5融合遺伝子を、それぞれ特異的に増幅する以下に示すプライマーセットを用いた。

シグレック 1 4 遺伝子増幅用プライマーセット

フォワードプライマー (14F) : 5'-AGGATTTATTCTCCCATCTCGCT-3' (配列番号 6)

リバースプライマー (14R) : 5'-GATGCTGATGGCGAGGTTCTG-3' (配列番号 7)

シグレック 5 遺伝子増幅用プライマーセット

フォワードプライマー (5F) : 5'-GTGGTTCTGACATCTCACCTCATC-3' (配列番号 8)

リバースプライマー (5R) : 5'-CCTGAAGATGGTGATGGTCTG-3' (配列番号 9)

シグレック 1 4 / 5 融合遺伝子増幅用プライマーセット

フォワードプライマー (14F) : 5'-AGGATTTATTCTCCCATCTCGCT-3' (配列番号 6)

リバースプライマー (5R) : 5'-CCTGAAGATGGTGATGGTCTG-3' (配列番号 9)

続いて、上記で得られたPCR反応産物を、1%アガロースゲルを用いてTAEバッファー (40 mMトリス、40 mM酢酸、0.1 mMエチレンジアミン四酢酸) 中で電気泳動し (各レーン10 μ l)、増幅産物を分離した。エチジウムブロマイドでゲルを染色し、紫外線ランプで照射してDNAを検出し、撮影した。

[0084] プライマー対5F+5Rはシグレック 5 遺伝子の一部を、プライマー対14F+14Rはシグレック 1 4 遺伝子の一部を特異的に増幅する。プライマー対14F+5Rはシグレック 1 4 / 5 融合遺伝子が存在する場合にはこの遺伝子の約1.7 kbの領域を増幅する。同じプライマー対を用いて野生型アレルから、本実験で用いた反応条件下でこの産物は生じない。

[0085] この結果、プライマー対5F+5Rによるシグレック 5 遺伝子の増幅とプライマー対14F+14Rによるシグレック 1 4 遺伝子の増幅の双方が検出されたがプライマー対14F+5Rによるシグレック 1 4 / 5 融合遺伝子の増幅が検出されなかった患者を野生型 (WT/WT) と決定した。またプライマー対5F+5Rによるシ

グレック 5 遺伝子の増幅とプライマー対14F+14Rによるシグレック 1 4 遺伝子の増幅の双方が検出されず、プライマー対14F+5Rによるシグレック 1 4 / 5 融合遺伝子の増幅が検出された患者をヌル変異型 (SIGLEC14 null ; Null/Null) と決定した。さらに、プライマー対5F+5Rによるシグレック 5 遺伝子の増幅、プライマー対14F+14Rによるシグレック 1 4 遺伝子の増幅、及びプライマー対14F+5Rによるシグレック 1 4 / 5 融合遺伝子の増幅の全てが検出された患者をヘテロ接合型 (WT/Null) と決定した。

[0086] さらに、シグレック 1 4 遺伝子多型とCOPD増悪との相関を調べるため、JMP genomics software ver 3.1を使用して統計的解析を行った。Anthonisenらの定義による増悪の有無にシグレック 1 4 の遺伝子型が及ぼす影響の解析にはロジスティック回帰分析を用いた。Rodriguez-Roisinの定義による増悪の頻度にシグレック 1 4 の遺伝子型が及ぼす影響の解析にはポアソン回帰分析を用いた。尤度を最大化する一般化線形モデルを採用した。年齢と性別を共変数とし、増悪頻度に影響があるとされる喫煙状況、吸入ステロイドの使用の有無、気管支拡張薬投与後の1秒量対予測値 (FEV1 % predicted) を共変数として解析を行った。

[0087] 結果を図 1 ～ 2 及び表 1 ～ 2 に示す。図 1 にはシグレック 1 4 の遺伝子型毎の、Anthonisenらの定義によるCOPDの細菌性増悪の有無の割合を示した。また図 2 には、シグレック 1 4 の遺伝子型毎の、Rodriguez-Roisinの定義によるCOPD増悪の各頻度の割合を示した。

[表1]

Anthonisenらの定義による増悪の有無

	野生型 (WT/WT)	ヘテロ接合型 (WT/Null)	ヌル変異型 (Null/Null)
増悪あり (%)	36.4	19.7	6.5
増悪なし (%)	63.6	80.3	93.5

[表2]

増悪頻度/年	野生型 (WT/WT)	ヘテロ接合型 (WT/Null)	ヌル変異型 (Null/Null)
3回 (%)	3.0	1.4	0
2回 (%)	9.1	5.6	3.2
1回 (%)	30.3	23.9	3.2
なし (%)	57.6	69.0	93.5

[0088] シグレック 1 4 の野生型アリルの数と、増悪の有無（図 1）、増悪の頻度（図 2）との間にはいずれも正の相関が認められ（ヌル変異型〔野生型アリル数：0〕＜ヘテロ接合型〔野生型アリル数：1〕＜野生型〔野生型アリル数：2〕）、いずれも統計的に有意であった（それぞれ $p = 0.0015$ および $p = 0.0002$ ）。この結果から、シグレック 1 4 遺伝子の野生型アリルの数が多くなるほど、増悪感受性が高くなることが示された（図 1 及び 2）。例えば、野生型アリルをホモ接合で有する野生型（WT/WT）の患者は 35～45% 程度の割合で増悪を経験したのに対し、野生型アリルを持たず SIGLEC14-null アリルのホモ接合であるヌル変異型（Null/Null）の患者での COPD 増悪割合は 10% 未満と低く、増悪感受性は顕著に低かった。さらに、野生型アリルの数が多いほど、増悪頻度が特に高い（2 回以上、とりわけ 3 回以上）患者が出現し、すなわち野生型アリルの数が多い場合には COPD 増悪頻度が特に高くなるリスクがあることも示された（図 2）。

[0089] この結果から、シグレック 1 4 遺伝子型を解析することにより、COPD 患者の増悪感受性を予測し、患者を層別化できることが示された。

[0090] [実施例 2] シグレック 1 4 を特異的に検出する ELISA の開発

参考例で作製したシグレック 1 4 を特異的に認識する抗体（clone 40-1）1 mg を、市販のタンパク質ビオチン化キット（Biotin Protein Labeling Kit, ロシュ・ダイアグノスティクス）を用いてビオチン化し、検出用抗体とした。

[0091] 96 ウェルプレート各ウェルに、シグレック 5 とシグレック 1 4 をともに認識する抗体（clone 194128, R&D Systems）を添加（0.1 μ g 抗体/100 μ l PBS/ウェル）し、室温で終夜静置して抗体を固相化した。この溶液を除去し

、洗浄バッファー（0.05% Tween 20含有PBS）で各ウェルを3回洗浄（400 μ l/ウェル）し、希釈液（1% BSA含有PBS, 300 μ l/ウェル）を添加して室温にて1時間ブロッキングを行った。この溶液を除去し、希釈液で段階希釈した標準試料（Siglec-14-Fc及びSiglec-5-Fc）を添加し、室温で2時間静置した。洗浄バッファーで各ウェルを3回洗浄（400 μ l/ウェル）し、上記で調製したビオチン化抗シグレック14抗体を添加（0.05 μ g抗体/100 μ l 1% BSA含有PBS/ウェル）し、室温で2時間静置した。この溶液を除去し、洗浄バッファーで各ウェルを3回洗浄（400 μ l/ウェル）し、ストレプトアビジン-コンジュゲート化ホースラディッシュペルオキシダーゼ（希釈液で1:1000希釈、100 μ l/ウェル）を添加し、室温で20分静置した。この溶液を除き、洗浄バッファーで各ウェルを3回洗浄（400 μ l/ウェル）し、基質（SureBlue Reserve, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.）を添加（100 μ l/ウェル）し、10～15分インキュベートし、1N塩酸を添加（100 μ l/ウェル）して反応を止め、450 nmの吸光度を測定した。

[0092] 結果を図3に示す。このELISAにおいて、Siglec-14-Fcは1.56～100 ng/mlの範囲で定量的に測定できたのに対し、Siglec-5-Fcは検出されなかった。すなわち、このELISAを用いることにより、類似するシグレック5を検出することなく、シグレック14を特異的に検出し定量することができることが示された。なお基質添加後のインキュベーション時間を変えることにより、増感及び減感が可能であった。

[0093] [実施例3] シグレック14の遺伝的多型と可溶性シグレック14の血中濃度の相関

上記実施例と同様にインフォームドコンセントを得た患者から採血を行い、血清及びゲノムDNAを得た。各患者のシグレック14の遺伝的多型（遺伝子型）の解析を実施例1と同様の手順で行った。

[0094] 血清は希釈液（1% BSA含有PBS）を用いて20倍に希釈し、これを被験サンプルとして、実施例2に記載したシグレック14を特異的に検出するELISAを実施した。また、同血清を希釈液を用いて200倍に希釈し、市販のシグレック5

と14をとともに検出できる抗体を用いたELISAキット（R&D Systems）を使用してシグレック5及びシグレック14の総濃度も測定した。

[0095] 結果を図4に示す。黒い棒グラフはシグレック14特異的に検出するELISA、白い棒グラフはシグレック5と14をとともに検出するELISAを用いて、同一セットの試料を測定した結果である。試料1～19はシグレック14の遺伝子型がヌル変異型（Null/Null）の患者、試料20～37はヘテロ接合型（WT/Null）の患者、試料38～53は野生型（WT/WT）の患者に由来する血清である。

[0096] 図4に示すように、シグレック14特異的に検出するELISAを用いて測定した結果、シグレック14遺伝子型がWT/WT及びWT/Nullの患者からは、可溶性シグレック14が検出されたが、Null/Nullの患者からは検出されなかった。したがってNull/Nullとそれ以外の遺伝子型を血清中の可溶性シグレック14タンパク質の有無に基づいて鑑別することが可能である。さらに、シグレック14遺伝子型がWT/WTの患者の血清中可溶性シグレック14濃度はWT/Nullのそれと比較して高い傾向が認められ、シグレック14の野生型アレルの数に応じて血中の可溶性シグレック14濃度が高くなることが示された。

[0097] なお、シグレック5とシグレック14をとともに検出するELISAを用いて測定した結果、Null/Nullの患者の血清からは可溶性シグレック5/シグレック14はごく微量しか検出されなかった。すなわち、血中に可溶性形態で存在するのはほとんどシグレック14であり、シグレック5は血中に存在しないか、存在してもごく微量であることが示された。

産業上の利用可能性

[0098] 本発明は、慢性閉塞性肺疾患（COPD）患者の増悪感受性と強く相関する遺伝的マーカー及び血清マーカー等を検出することにより、増悪感受性に基づく患者の層別化と個別化治療を可能とすることができる。増悪感受性の検査・判定結果に基づいてCOPD患者の適切な層別化やモニタリングを行うことにより、患者のQOL及び予後の改善、並びに医療資源の有効利用につなげることができる。

[0099] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考と

して本明細書にとり入れるものとする。

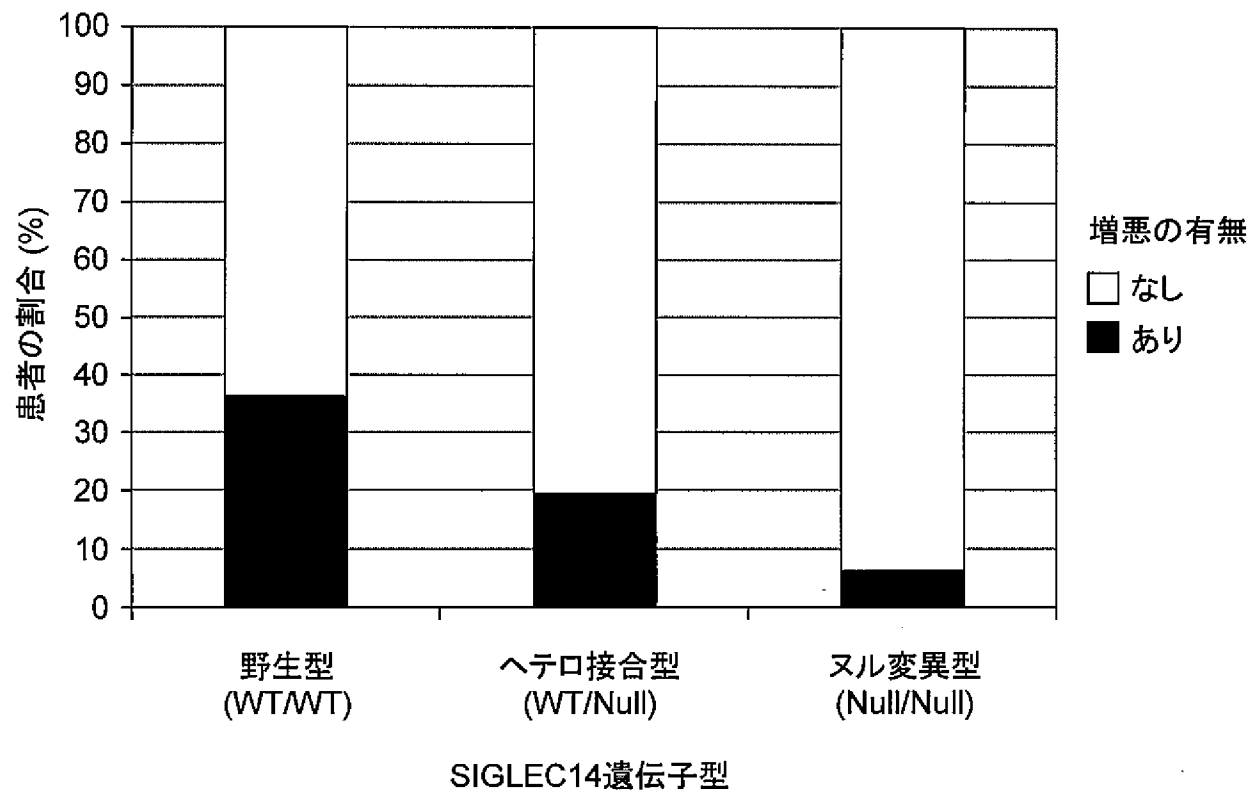
配列表フリーテキスト

[0100] 配列番号 6 ～ 1 1 : プライマー

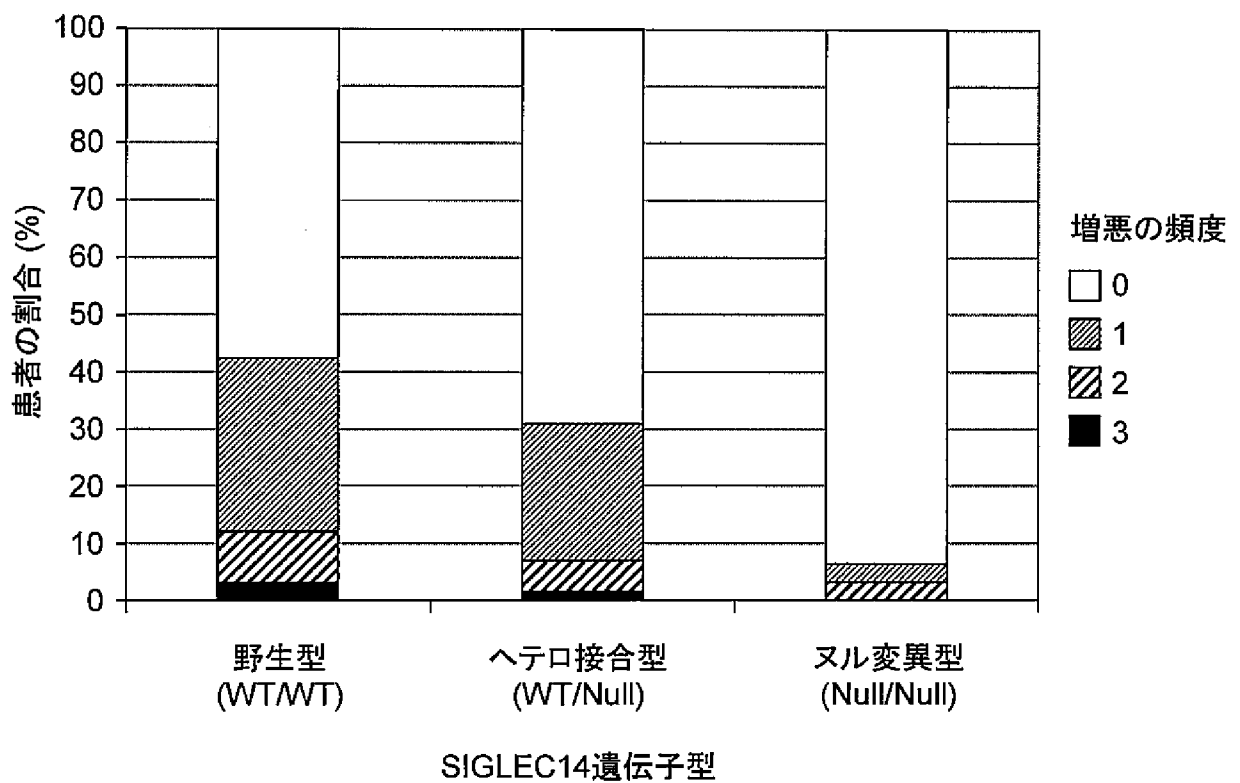
請求の範囲

- [請求項1] ヒト被験体由来の生物学的試料を用いて、該被験体のシグレック 1 4 の遺伝子型を決定し、慢性閉塞性肺疾患の増悪感受性の指標とすることを含む、ヒト被験体における慢性閉塞性肺疾患の増悪感受性を検査する方法。
- [請求項2] 前記生物学的試料が、血液由来試料である、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項3] 前記生物学的試料中のシグレック 1 4 タンパク質を検出することにより、シグレック 1 4 の遺伝子型を決定する、請求項 1 又は 2 記載の方法。
- [請求項4] 血液由来試料中の可溶性シグレック 1 4 タンパク質を検出することにより、シグレック 1 4 の遺伝子型を決定する、請求項 2 記載の方法。
- [請求項5] 前記生物学的試料中のゲノムDNA配列に基づいて、シグレック 1 4 の遺伝子型を決定する、請求項 1 又は 2 記載の方法。
- [請求項6] 決定されたシグレック 1 4 の遺伝子型の野生型アレルの数を、増悪感受性の指標とする、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項7] 前記ヒト被験体が慢性閉塞性肺疾患を発症した患者である、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項記載の方法。

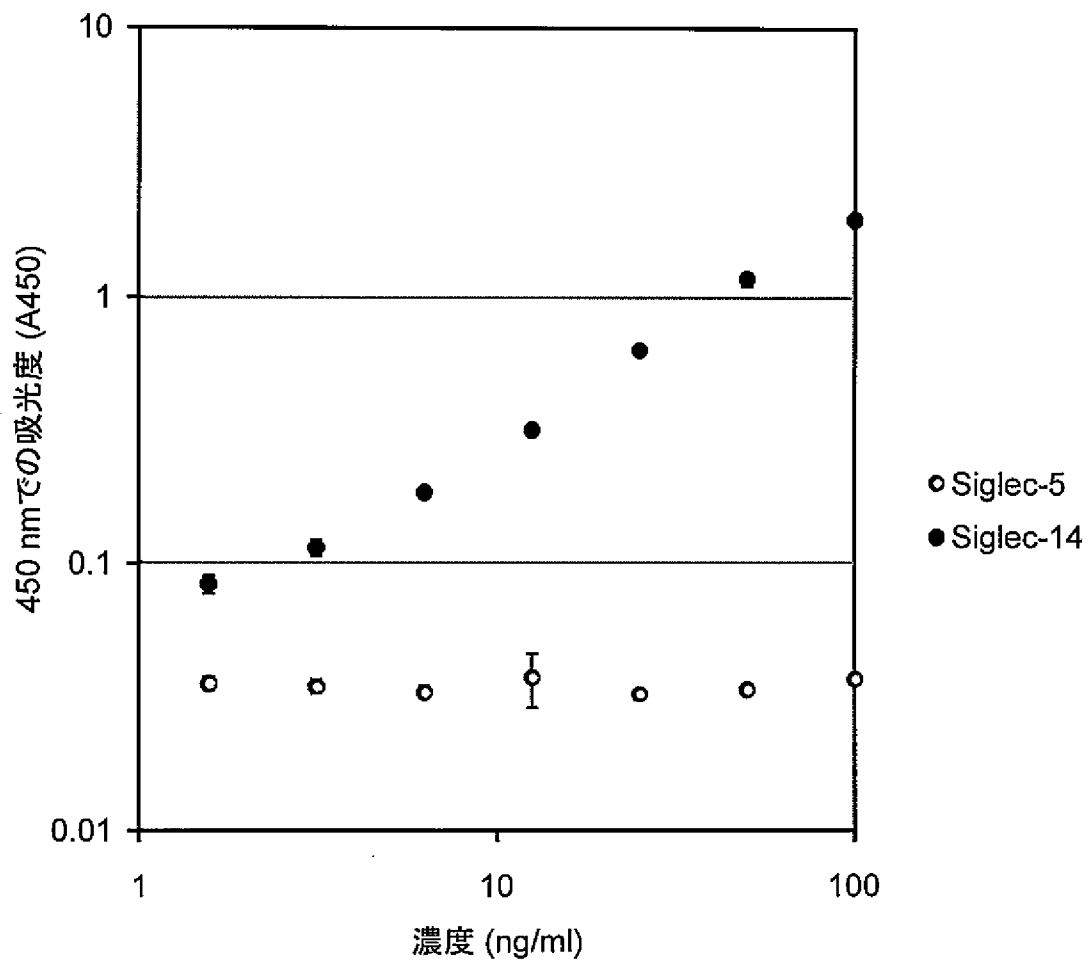
[図1]



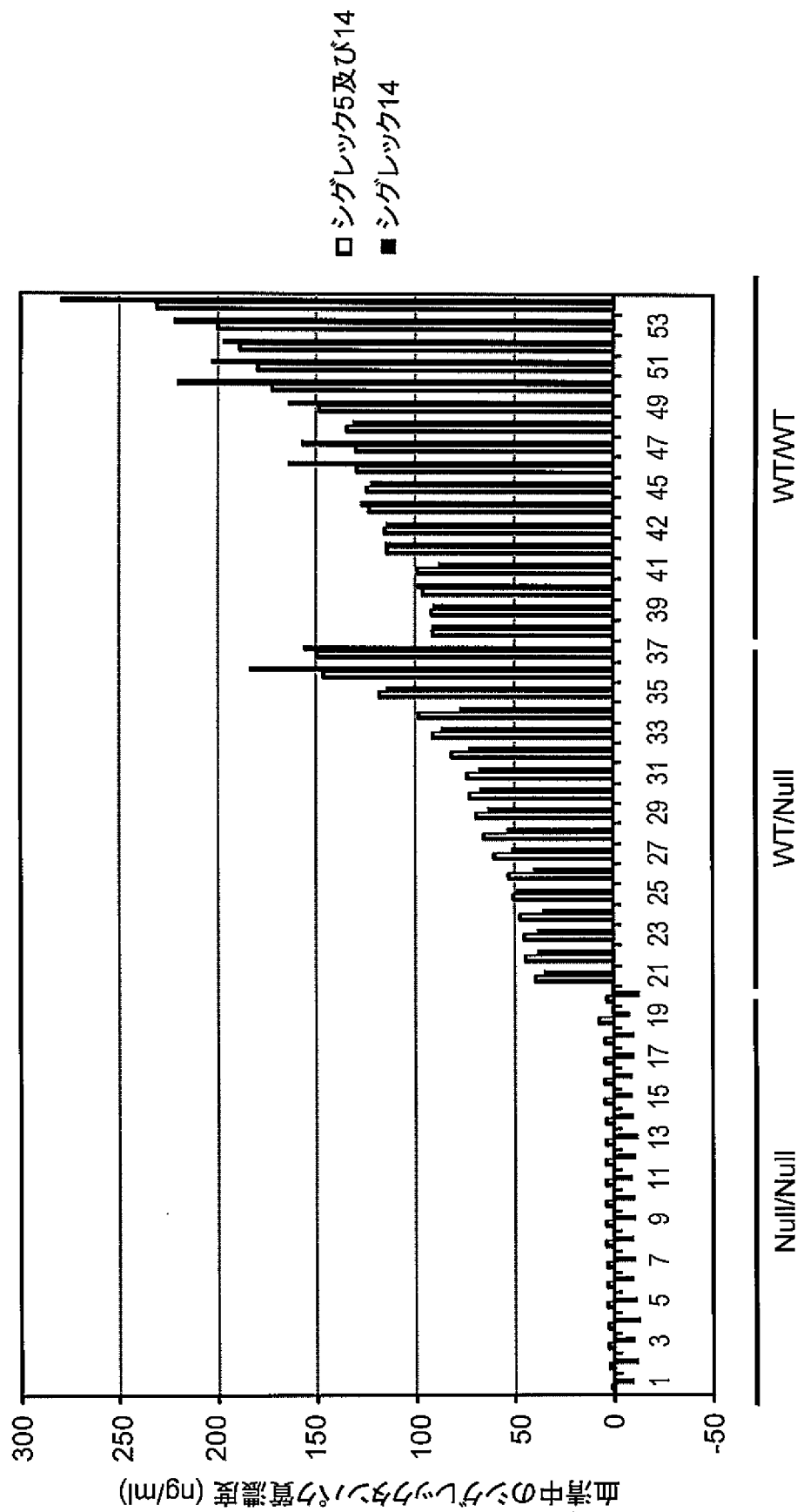
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/070152

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C12Q1/68

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Sumito INOUE et al., "COPD Zoaku to Idenshi Takei", Kokyu, 2009, vol.28, no.4, pages 361 to 365	1-7
A	Yoko SHIBATA et al., "Arata na Tenkai no Sen'isho Kenkyu COPD Zoaku Inshi to shite no CCL1 Idenshi Takei: Kido Kansen ni yoru IPF no Akka ni Kankei suruka", Respiratory Molecular Medicine, 2007, vol.11, no.4, pages 330 to 334	1-7
A	LIN, C.L., et al., Mannose-binding lectin gene polymorphism contributes to recurrence of infective exacerbation in patients with COPD., Chest, 2011.01, Vol.139, No.1, p.43-51	1-7

☒ 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
14 September, 2012 (14.09.12)

Date of mailing of the international search report
25 September, 2012 (25.09.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/070152

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FOREMAN, M.G., et al., Polymorphic variation in surfactant protein B is associated with COPD exacerbations., Eur. Respir. J., 2008.10, Vol.32, No.4, p.938-944	1-7
A	MUELLER, B., et al., Biomarkers in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: among the blind, the one-eyed is king., Am. J. Respir. Crit. Care. Med., 2006.10, Vol.174, No.8, p.848-849	1-7
A	ANGATA, T., et al., Discovery of Siglec-14, a novel sialic acid receptor undergoing concerted evolution with Siglec-5 in primates., FASEB J., 2006.10, Vol.20, No.12, p.1964-1973	1-7
A	JP 2010-035551 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 18 February 2010 (18.02.2010), & WO 2010/005067 A1	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

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

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

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

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

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	井上純人, 他, COPD 増悪と遺伝子多型., 呼吸, 2009, Vol. 28, No. 4, p. 361-365	1 - 7
A	柴田陽光, 他, 新たな展開の線維症研究 COPD 増悪因子としての CCL1 遺伝子多型: 気道感染による IPF の悪化に関係するか., 分子呼吸器病, 2007, Vol. 11, No. 4, p. 330-334	1 - 7

☒ 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

1 4 . 0 9 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

2 5 . 0 9 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4 B

9 3 5 8

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

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	LIN, C.L., et al., Mannose-binding lectin gene polymorphism contributes to recurrence of infective exacerbation in patients with COPD., Chest, 2011.01, Vol.139, No.1, p.43-51	1 - 7
A	FOREMAN, M.G., et al., Polymorphic variation in surfactant protein B is associated with COPD exacerbations., Eur. Respir. J., 2008.10, Vol.32, No.4, p.938-944	1 - 7
A	MUELLER, B., et al., Biomarkers in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: among the blind, the one-eyed is king., Am. J. Respir. Crit. Care. Med., 2006.10, Vol.174, No.8, p.848-849	1 - 7
A	ANGATA, T., et al., Discovery of Siglec-14, a novel sialic acid receptor undergoing concerted evolution with Siglec-5 in primates., FASEB J., 2006.10, Vol.20, No.12, p.1964-1973	1 - 7
A	JP 2010-035551 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2010.02.18, & WO 2010/005067 A1	1 - 7