

(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
2011 年 8 月 25 日(25.08.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/102476 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/053542
- (22) 国際出願日: 2011 年 2 月 18 日(18.02.2011)
- (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 2010-033913 2010 年 2 月 18 日(18.02.2010) 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). 学校法人日本大学(NIHON UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 Tokyo (JP). 一般社団法人徳洲会(TOKUSHUKAI) [JP/JP]; 〒1020083 東京都千代田区麹町四丁目 6 番 8 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 尾崎 浩一(OZAKI, Kouichi) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7 番 2 2 号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 田中 敏博(TANAKA, Toshihiro) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7 番 2 2 号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 中村 祐輔(NAKAMURA, Yusuke) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7 番 2 2 号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋 3 丁目 4 番 1 0 号 アクロポリス 2 1 ビル 6 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, 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, RO, RS, RU, 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.
- (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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 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))

(54) Title: METHOD FOR DETECTING ATHEROSCLEROTIC DISEASES ON THE BASIS OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM AT HUMAN CHROMOSOME 5P15.3

(54) 発明の名称: ヒト染色体 5p15.3 上の一塩基多型に基づく動脈硬化性疾患の検査方法

(57) Abstract: Atherosclerotic diseases such as myocardial infarction and angina pectoris are detected by analyzing the single nucleotide polymorphism on human chromosome 5p15.3, and by associating said analysis result with onset risks. Examples of the single nucleotide polymorphism on human chromosome 5p15.3 include a nucleotide corresponding to the nucleotide at nucleotide position 61 of one of the nucleotide sequences represented by SEQ ID NO: 1 to 3, and a polymorphism at a nucleotide which is in linkage disequilibrium with the aforementioned nucleotide.

(57) 要約: ヒト染色体 5p15.3 領域上に存在する一塩基多型を分析し、該分析結果を発症リスクと関連付けることにより、心筋梗塞や狭心症などの動脈硬化性疾患を検査する。ヒト染色体 5p15.3 領域上に存在する一塩基多型としては、配列番号 1～3 のいずれかの塩基配列の塩基番号 61 番目の塩基に相当する塩基、または該塩基と連鎖不平衡の関係にある塩基における多型が例示される。



WO 2011/102476 A1

明 細 書

発明の名称：

ヒト染色体5p15.3上の一塩基多型に基づく動脈硬化性疾患の検査方法

技術分野

[0001] 本発明は心筋梗塞や狭心症などの動脈硬化性疾患のリスクを検査するための方法及び該検査方法に用いられる試薬に関する。

背景技術

[0002] 欧米型ライフスタイルの多くの先進国において、心筋梗塞（MI）を含む冠動脈疾患などの動脈硬化性疾患は、遅発性疾患の中で死亡率および罹病率の主因となっている（非特許文献1及び2）。心筋梗塞の発症は、臨床徴候が先行することなく重度の合併症（特に、突然死の原因となり得る心室細動及び心破裂突）が続発する場合が多い。心筋梗塞の診断及び治療における最近の進展により、心筋梗塞の治療及び診断の質は大幅に向上したが、心筋梗塞の罹病率は依然として高い。

[0003] 疫学的研究により、動脈硬化性疾患の様々な危険因子（2型糖尿病、高コレステロール血症、高血圧、および肥満など）が明らかにされている。心筋梗塞の遺伝的要因についての報告もある。例えば、55歳未満で急性心筋梗塞を発症した患者の一親等の親族では心筋梗塞のリスクが2～7倍高いことが報告されている（非特許文献3）。また、双生児の研究では、双生児の一方が55歳未満で心筋梗塞により死亡すると、他方も心筋梗塞で死亡するリスクが8倍増加することが示されている（非特許文献4）。

[0004] また、これまでに、連鎖解析または一塩基多型（SNP）の相関性を検討する症例対照研究により、心筋梗塞感受性を高める幾つかの遺伝子多型が複数の遺伝子座で同定されている（特許文献1～8および非特許文献5～11）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2008-072947号公報

特許文献2：特開2008-048627号公報

特許文献3：特開2007-330166号公報

特許文献4：再表2006/075626号公報

特許文献5：再表2006/073183号公報

特許文献6：再表2006/068239号公報

特許文献7：再表2005/017200号公報

特許文献8：再表2004/015100号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Breslow J.W. (1997) Nat. Med. 3: 600-601

非特許文献2：Braunwald E (1997) N. Engl. J. Med. 337:1360-136

非特許文献3：Lusis AJ et al. (2004) Annu Rev Genomics Hum Genet 5:189-218

非特許文献4：Marenberg ME et al. (1994) N Engl J Med 330: 1041-1046

非特許文献5：Topol EJ et al. (2001) Circulation 104:2641-2644

非特許文献6：Yamada Y et al. (2002) N. Engl. J. Med. 347: 1916-1923

非特許文献7：Ozaki K et al. (2002) Nat. Genet. 32: 650-654

非特許文献8：Ozaki K et al. (2004) Nature 429: 72-75

非特許文献9：Ozaki K et al. (2006) Nat. Genet. 38: 921-925

非特許文献10：Stenina Ol et al. (2003) Circulation 108 (12): 1514-1519

非特許文献11：Helgadóttir A et al (2004) Nat. Genet. 36:233-239

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、心筋梗塞や狭心症などの動脈硬化性疾患の発症リスクを高精度で予測するための検査方法、及び該方法に用いられる検査試薬を提供することを課題とする。

[0008] 本発明者らは上記課題の解決のために鋭意検討した結果、ヒト第5染色体短腕領域p15.3上に存在する一塩基多型（SNPs）が心筋梗塞や狭心症等の動脈

硬化性疾患の発症に関連することを同定した。そして、これらの多型を調べることにより心筋梗塞や狭心症などの動脈硬化性疾患の発症のしやすさの推定を正確に実施することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0009] すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) ヒト染色体5p15.3領域上に存在する一塩基多型を分析する工程、および該分析結果を動脈硬化性疾患の発症リスクと関連付ける工程を含む、動脈硬化性疾患の検査方法

(2) 前記一塩基多型が、配列番号1～3のいずれかの塩基配列の塩基番号61番目の塩基に相当する塩基、または該塩基と連鎖不平衡の関係にある塩基における多型である、(1)に記載の方法。

(3) 前記動脈硬化性疾患が冠動脈疾患である、(1)または(2)に記載の方法。

(4) 前記冠動脈疾患が心筋梗塞または狭心症である、(3)に記載の方法。

(5) 配列番号1～3のいずれかの塩基配列において、塩基番号61番目の塩基を含む10塩基以上の配列、又はその相補配列を有する動脈硬化性疾患検査用プローブ。

(6) 配列番号1～3のいずれかの塩基配列において、塩基番号61番目の塩基を含む領域を増幅することのできる動脈硬化性疾患検査用プライマー。

図面の簡単な説明

[0010] [図1] ヒト染色体5p15.3上のrs11748327の位置とその周囲の連鎖不平衡(LD)ブロックを示す図。

発明を実施するための形態

[0011] <1> 本発明の検査方法

本発明の検査方法は、ヒト第5染色体短腕領域p15.3上の一塩基多型を分析し、該分析結果(当該塩基が疾患感受性アレルか否か)に基づいて動脈硬化性疾患の発症を検査する方法である。動脈硬化性疾患としては、脳梗塞、脳

出血などの脳動脈における動脈硬化性疾患；心筋梗塞や狭心症などの冠動脈における動脈硬化性疾患（冠動脈疾患：CAD）；大動脈瘤、大動脈解離などの大動脈における動脈硬化性疾患；腎硬化症やそれによる腎不全などの腎動脈における動脈硬化性疾患；閉塞性動脈硬化症などの末梢動脈における動脈硬化性疾患が挙げられる。一塩基多型の分析結果を動脈硬化性疾患の発症リスクと関連付ける。

[0012] ヒト染色体5p15.3領域としては、例えば、GenBank Accession No. NT_006576.15の3900000～4100000あたりの領域を挙げることができる。なお、ヒト染色体5p15.3領域上の塩基配列は人種の違いなどにより動脈硬化性疾患に関連する塩基以外の塩基において置換や欠失等が存在する可能性があるため、上記配列の遺伝子に限定されない。

[0013] 動脈硬化性疾患に関連するヒト染色体5p15.3領域上の一塩基多型は、rs11748327、rs490556、rs521660などが挙げられる。このrs番号は、National Center for Biotechnology InformationのdbSNPデータベース（[//www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/)）の登録番号を示す。

[0014] rs11748327はGenBank Accession No. NT_006576.15の4019789番目の塩基におけるシトシン（C）／チミン（T）の多型を意味し、この塩基がCである場合は動脈硬化性疾患発症リスクが高いことを示す。また、対立遺伝子を考慮して解析した場合は、CC>CT>TTの順で動脈硬化性疾患発症リスクが高いことを示す。

rs490556はGenBank Accession No. NT_006576.15の4012650番目の塩基におけるチミン（T）／シトシン（C）の多型を意味し、この塩基がTである場合は動脈硬化性疾患発症リスクが高いことを示す。また、対立遺伝子を考慮して解析した場合は、TT>TC>CCの順で動脈硬化性疾患発症リスクが高いことを示す。

rs521660はGenBank Accession No. NT_006576.15の4025932番目の塩基におけるグアニン（G）／アデニン（A）の多型を意味し、この塩基がGである場合は動脈硬化性疾患発症リスクが高いことを示す。また、対立遺伝子を考慮し

て解析した場合は、GG>GA>AAの順で動脈硬化性疾患発症リスクが高いことを示す。

[0015] なお、rs11748327、rs490556、rs521660について、SNP塩基及びその前後60bpの領域を含む合計121bpの長さの配列を、それぞれ配列番号1～3に示した。それぞれ61番目の塩基が多型を有する。

[0016] これらの塩基に相当する塩基を本発明においては解析する。ここで、「相当する」とは、ヒト染色体5p15.3領域上の上記配列を有する領域中の該当塩基を意味し、仮に、人種の違いなどによって上記配列がSNP以外の位置で若干変化したとしても、その中の該当塩基を解析することも含む。

[0017] 上記SNPの塩基の種類を調べ、上記のような基準に基づいて動脈硬化性疾患との関連付けを行うことにより動脈硬化性疾患を検査することができる。検査するSNPの数は、一種類でもよいし、複数（ハプロタイプ解析）でもよい。なお、塩基配列はセンス鎖を解析してもよいし、アンチセンス鎖を解析してもよい。例えば、rs11748327の場合、アンチセンス鎖を解析するとG/A多型でGが疾患感受性アレルということになる。

[0018] また、本発明において分析する塩基は上記のものに限定されず、上記の塩基と連鎖不平衡にある塩基の多型を分析してもよい。ここで「上記の塩基と連鎖不平衡にある塩基」とは、上記の塩基と $r^2 > 0.5$ 、好ましくは $r^2 > 0.8$ の関係を満たす塩基をいう。具体的には、表1に記載のものが例示される。これらの配列と多型の種類は上記dbSNPデータベースにより参照が可能である。

[0019]

- [0020] ヒト染色体5p15.3上の遺伝子多型の解析に用いる試料としては、染色体DNAを含む試料であれば特に制限されないが、例えば、血液、尿等の体液サンプル、肝細胞などの細胞、毛髪等の体毛などが挙げられる。遺伝子多型の解析にはこれらの試料を直接使用することもできるが、これらの試料から染色体DNAを常法により単離し、これを用いて解析することが好ましい。
- [0021] ヒト染色体5p15.3上の遺伝子多型の解析は、通常の遺伝子多型解析方法によって行うことができる。例えば、シーケンス解析、PCR、ハイブリダイゼーションなどが挙げられるが、これらに限定されない。
- [0022] シーケンスは通常の方法により行うことができる。具体的には、多型を示す塩基の5'側 数十塩基の位置に設定したプライマーを使用してシーケンス反応を行い、その解析結果から、該当する位置がどの種類の塩基であるかを決定することができる。なお、シーケンスを行う場合、あらかじめ多型を含む断片をPCRなどによって増幅しておくことが好ましい。
- [0023] また、PCRによる増幅の有無を調べることによって解析することができる。例えば、多型を示す塩基を含む領域に対応する配列を有し、かつ、各多型に対応するプライマーをそれぞれ用意する。それぞれのプライマーを使用してPCRを行い、増幅産物の有無によってどのタイプの多型であるかを決定することができる。
- また、LAMP法（特許第3313358号明細書）、NASBA法(Nucleic Acid Sequence-Based Amplification；特許2843586号明細書)、ICAN法（特開2002-233379号公報）などによって増幅の有無を調べることもできる。その他、単鎖増幅法を用いてもよい。
- [0024] また、多型を含むDNA断片を増幅し、増幅産物の電気泳動における移動度の違いによってどのタイプの多型であるかを決定することもできる。このような方法としては、例えば、PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism) 法 (Genomics, 1992 Jan 1; 12 (1) : 139-146.) が挙げられる。具体的には、まず、ヒト染色体5p15.3上の多型部位を含むDNAを増幅

し、増幅したDNAを一本鎖DNAに解離させる。次いで、解離させた一本鎖DNAを非変性ゲル上で分離し、分離した一本鎖DNAのゲル上での移動度の違いによってどのタイプの多型であるかを決定することができる。

[0025] さらに、多型を示す塩基が制限酵素認識配列に含まれる場合は、制限酵素による切断の有無によって解析することもできる（RFLP法）。この場合、まず、DNA試料を制限酵素により切断する。次いで、DNA断片を分離し、検出されたDNA断片の大きさによってどのタイプの多型であるかを決定することができる。

ハイブリダイゼーションの有無を調べることによって多型の種類を解析することも可能である。すなわち、各塩基に対応するプローブを用意し、いずれのプローブにハイブリダイズするかを調べることによってSNPがいずれの塩基であるかを調べることもできる。

このようにしてSNPがいずれの塩基であるかを決定することで、動脈硬化性疾患を検査するためのデータを得ることができる。

[0026] < 2 > 本発明の検査用試薬

本発明はまた、動脈硬化性疾患発症リスクを検査するためのプライマーやプローブなどの検査試薬を提供する。このようなプローブとしては、ヒト染色体5p15.3上の上記多型部位を含み、ハイブリダイズの有無によって多型部位の塩基の種類を判定できるプローブが挙げられる。具体的には、配列番号1～3において塩基配列の61番目の塩基を含む配列、又はその相補配列を有する10塩基以上の長さのプローブが挙げられる。プローブの長さはより好ましくは、15～35塩基であり、さらに好ましくは20～35塩基である。

[0027] また、プライマーとしては、ヒト染色体5p15.3上の上記多型部位を増幅するためのPCRに用いることのできるプライマー、又は上記多型部位を配列解析（シーケンシング）するために用いることのできるプライマーが挙げられる。具体的には、配列番号1～3の塩基配列の61番目の塩基を含む領域を増幅したりシーケンシングしたりすることのできるプライマーが挙げられ

る。このようなプライマーの長さは10～50塩基が好ましく、15～35塩基がより好ましく、20～35塩基がさらに好ましい。

上記多型部位をシーケンシングするためのプライマーとしては、上記塩基の5'側領域、好ましくは30～100塩基上流の配列を有するプライマーや、上記塩基の3'側領域、好ましくは30～100塩基下流の領域に相補的な配列を有するプライマーが例示される。PCRによる増幅の有無で多型を判定するために用いるプライマーとしては、上記塩基を含む配列を有し、上記塩基を3'末端側に含むプライマーや、上記塩基を含む配列の相補配列を有し、上記塩基の相補塩基を3'末端側に含むプライマーなどが例示される。

なお、本発明の検査用試薬はこれらのプライマーやプローブに加えて、PCR用のポリメラーゼやバッファー、ハイブリダイゼーション用試薬などを含むものであってもよい。

実施例

[0028] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれらの実施例に限定されない。

[0029] 実施例1：心筋梗塞（MI）との相関性を検討する大規模SNP研究

（1）材料および方法

（1-1）DNA試料

ゲノムワイド相関解析とそれに続く2次解析のためには、Bio-Bank Japan プロジェクト ([//biobank.jp.org/](http://biobank.jp.org/)) に登録された心筋梗塞患者と対照者のサンプルを用いた。3次および4次の集団の特徴は、対照サンプルとしてさらにHealth Science Research Resource Bankから購入した1235サンプルを用いたこと以外は、Nat Genet. 38, 921-925 (2006)およびNat Genet. 41, 329-333 (2009)に記載されたとおりである。

なお、解析された心筋梗塞患者は、(i) 30分以上の胸部圧迫感、痛み、胸苦しさなどの病歴を持つ、(ii) 少なくとも1の標準誘導又は2の胸部誘導において0.1mVより大きいSTセグメントの上昇を示す、(iii) 血清クレアチンキナーゼ濃度が標準値の2倍以上に上昇する、の3つの条件 (Nat Genet.

32 (4):650-4. 2002) のうち2つ以上を満たすことによって心筋梗塞であると診断された患者である。

狭心症のサンプルもまた、Bio-Bank Japanに登録されたものを用いた。狭心症は、J Am Coll Cardiol 36, 970-1062 (2000) に記載の基準に従って診断した。

被験者はすべて日本人であり、独立行政法人理化学研究所（理研）ゲノム医科学研究センターの当該倫理委員会によって承認された手順に従い、被験者本人または被験者の親（被験者が20歳未満の場合）が本試験に参加するための同意文書を提出した。

[0030] (1-2) SNPの発見および遺伝子型解析

ゲノムワイド相関解析および2次スクリーニングのジェノタイピング法はNat Genet. 40(9):1098-1102 (2008) に記載された方法に従った。3次及び4次スクリーニングにおいては、J Hum Genet 46: 471-477 (2001) およびNat Genet. 32 (4):650-654. (2002) に記載のマルチプレックス-PCRインベーターアッセイによりジェノタイピングを行った。

[0031] (1-3) 統計解析

ハプロタイプブロックとハプロタイプ頻度は、Haploview v4.0 (Bioinformatics 21, 263-265 (2005)) により解析した。そして、Haploviewソフトウェア (Bioinformatics 21, 263-265 (2005)) を用い、ペアワイズタギングモードでタグSNPを選択し、ハプロタイプ解析の並べ替え検定に適用した。

また、THESIASプログラム (Tregouet et al. 2007) と、赤池の情報量基準(AIC): $AIC = -2 \times (\text{条件付き対数尤度の最大値}) + 2 \times (\text{パラメータの数})$ を用いた条件付き対数尤度を使い、ハプロタイプ分析を行った。パラメータの数として、各々のモデルで用いられた、頻度>0.01であるアレル／ハプロタイプの数を用いた。SNPのロジスティック回帰分析において、まず、自由度1 (1-d.f.) の相乗的アレル効果モデル (multiplicative allelic effect model) と自由度2 (2-d.f.) の全遺伝子型モデル (full genotype model) のどちらが妥当かどうかを決定するために、自由度1 (1-d.f.) の尤

度比検定を行った (Bioinformatics 23(8), 1038-1039 (2007))。全遺伝子型モデルからは有意差が見られなかったため ($P > 0.05$)、我々は相乗的アレル効果モデルを前提とした。次に、forwardロジスティック回帰分析を行い、最も有意な SNP が SNP セット間における関連性のモデルとして十分であるかを分析することから始めた。このため、追加の SNPs に対する相乗的アレル効果を前提として、残りの各々の SNPs をモデルに加えるため、自由度 1 の (1-d. f.) 尤度検定を用いた。患者の臨床プロフィールと遺伝子型情報の関係は一方 ANOVA 及び χ^2 検定を用い評価した。

[0032] (2) 結果

＜ゲノムワイド相関解析＞

まず、Bio-bank Japan に登録されている 194 人の心筋梗塞患者 (Cases) と 1,539 人の対照者 (Controls) につき、268,068 個の SNPs を解析した (ゲノムワイド相関解析: 1 次解析)。その結果、210,785 個の SNPs についてジェノタイプ情報が得られ、その中から、 $P < 0.02$ の 8,740 個の SNPs について 2 次スクリーニングを行った。

2 次スクリーニングでは、1,394 人の心筋梗塞患者と 1,388 人の対照者を解析し、7,374 個の SNPs についてデータを得ることができた。そして、その中で、Bonferroni 補正後の統計的有意性 (カットオフ $P < 0.0000068$) を示す 2 つの SNPs を同定した。その中の 1 つは Nat Genet. 41, 329-333 (2009) において既報の SNP であった。もう一つは、 $P = 1.8 \times 10^{-6}$ を示す染色体 5p15.3 の SNP (rs11748327) であった。この SNP につき、3 次 (心筋梗塞患者 1,500 人、対照 1,356 人) および 4 次 (心筋梗塞患者 2,283 人、対照 3,439 人) スクリーニングを行った。

結果を表 2 に示す。

[0033]

[表2]

Association of rs11748327 SNP with MI													
db SNP ID	Stage	Cases				Controls				Comparison of allele frequency			
		11 (%)	12 (%)	22 (%)	SUM (%)	11 (%)	12 (%)	22 (%)	SUM (%)	χ^2	P value	OR	95% CI
rs11748327 C>T	1st	130	67.0	52	26.8	12	6.2	194	866	5.5	1.9×10^{-2}	1.37	1.05-1.78
	2nd	896	64.4	436	31.3	60	4.3	1392	758	22.8	1.8×10^{-6}	1.36	1.20-1.54
	3rd	938	62.8	480	32.1	76	5.1	1494	770	10.2	1.4×10^{-3}	1.22	1.08-1.38
	4th	1437	62.9	740	32.4	106	4.6	2283	1964	16.7	4.4×10^{-5}	1.21	1.10-1.32
	combined	3401	63.4	1708	31.8	254	4.7	5363	4358	56.0	5.3×10^{-13}	1.25	1.18-1.33
*, P value was calculated by Mantel-Haenszel test													

[0034] Mantel-haenszelテストにより全てのステージのデータを合わせたところ、 $\chi^2=56.0$ ($P=5.3 \times 10^{-13}$)、オッズ比1.25 (95%信頼区間 (CI) 1.18-1.33) となり、このSNPは心筋梗塞と強い相関を示すことがわかった。

[0035] <連鎖不平衡解析>

rs11748327は、HapMap JPTデータ (<http://www.hapmap.org>; The International HapMap Consortium 2005) によれば、マイナーアレル頻度20%以上のSNPsによって構成される約250kbの連鎖不平衡(LD)ブロックに位置する(図1)。このブロックに心筋梗塞に相関する別のSNPが存在するかを調べるため、rs11748327に加えて、マイナーアレル頻度が5%より大きく、 r^2 の閾値0.8の15個のSNPsを選択した。上記3次クリーニングのサンプルを用いてこれらのSNPsを解析したところ、rs490556とrs521660が、Bonferroni補正後、心筋梗塞と有意な相関を示すことがわかった(表3)。

[0036]

[表3]

Association analysis of the fifteen tag SNPs with MI																
dbSNP ID	cases						Controls						P value*	r ² with rs1174832		
	11 (%)	12 (%)	22 (%)	SUM	11 (%)	12 (%)	22 (%)	SUM								
rs1511684 C>T	1232	86.0	193	13.5	8	0.6	1433	1150	88.3	143	11.0	9	0.7	1302	1.6 x 10 ⁻¹	0.03
rs505800 A>G	763	51.4	599	40.3	123	8.3	1485	666	49.6	551	41.1	125	9.3	1342	4.0 x 10 ⁻¹	0.3
rs2008927 C>T	700	47.3	614	41.5	166	11.2	1480	650	49.2	524	39.6	148	11.2	1322	7.2 x 10 ⁻¹	0.18
rs631942 G>A	795	53.9	558	37.8	122	8.3	1475	660	48.9	569	42.1	121	9.0	1350	2.9 x 10 ⁻¹	0.4
rs10060583 C>T	566	38.1	686	46.2	233	15.7	1485	547	40.9	611	45.6	181	13.5	1339	9.1 x 10 ⁻¹	0.12
rs490556 T>C	863	58.1	521	35.1	102	6.9	1486	681	50.7	549	40.9	113	8.4	1343	2.4 x 10 ⁻³	0.59
rs521660 G>A	762	55.3	515	37.3	102	7.4	1379	627	49.1	530	41.5	120	9.4	1277	1.5 x 10 ⁻²	0.79
rs1187466 T>A	630	44.3	630	44.3	162	11.4	1422	579	46.9	540	43.8	115	9.3	1234	1.1 x 10 ⁻¹	0.11
rs1187463 C>A	743	50.4	600	40.7	130	8.8	1473	607	46.0	563	42.7	150	11.4	1320	7.5 x 10 ⁻²	0.65
rs903083 C>T	1334	89.4	155	10.5	2	0.1	1492	1180	88.0	155	11.6	6	0.4	1341	2.6 x 10 ⁻¹	0.02
rs10512709 G>A	607	41.3	682	46.5	179	12.2	1468	559	42.3	611	46.3	151	11.4	1321	8.0 x 10 ⁻¹	0.17
rs1187477 C>T	1169	77.9	308	20.5	23	1.5	1500	1025	75.6	311	22.9	20	1.5	1356	3.0 x 10 ⁻¹	0.04
rs1209069 C>T	816	58.6	496	35.6	81	5.8	1393	779	61.2	435	34.2	58	4.6	1272	1.4 x 10 ⁻¹	0.04
rs1493470 G>A	827	55.9	566	38.3	86	5.8	1479	729	54.5	504	37.7	104	7.8	1337	2.4 x 10 ⁻¹	0.78
rs1187483 T>C	578	39.6	663	45.4	220	15.1	1461	478	36.0	635	47.8	215	16.2	1328	1.2 x 10 ⁻¹	0.41

*. Comparison of allelic frequency and adjusted for Bonferroni's correction.

*: Comparison of allelic frequency and adjusted for Bonferroni's correction.

[0037] rs490556とrs521660はそれぞれ $r^2=0.59$ 及び 0.79 でrs11748327に対して連鎖不平衡であった。

さらに上記4次クリーニングのサンプルを用いてこれらのSNPsを解析したところ、これらのSNPsは心筋梗塞と有意な相関を示すことが確認された(表4)。

[0038]

[表4]

表 4

Association of the three SNPs with CAD

dbSNP ID	Samples	Cases			Controls			Comparison of allele frequency			
		11	12	22	11	12	22	χ^2	P value	OR	95% CI
rs490556 T>C	MI 3rd	863	521	102	681	549	113	14.4	1.5×10^{-4}	1.26	1.12-1.42
	MI 4th	1324	802	141	1786	1399	254	20.6	5.7×10^{-6}	1.22	1.12-1.33
	combind	2187	1323	243	2467	1948	367	33.8	4.0×10^{-9}	1.23	1.15-1.32
	UA vs combind CO	1563	1015	187				14.8	1.1×10^{-4}	1.16	1.08-1.25
rs11748327 C>T	MI 3rd	938	480	76	770	490	88	10.1	1.4×10^{-3}	1.22	1.08-1.38
	MI 4th	1437	740	106	1964	1254	197	16.7	4.4×10^{-5}	1.21	1.10-1.30
	combind	2375	1220	182	2734	1744	285	26.4	2.5×10^{-7}	1.21	1.13-1.31
	UA vs combind CO	1724	920	129				17.2	3.4×10^{-5}	1.18	1.09-1.28
rs521660 G>A	MI 3rd	762	515	102	627	530	120	10.9	9.4×10^{-4}	1.22	1.09-1.38
	MI 4th	1197	781	162	1597	1342	299	21.8	3.1×10^{-6}	1.23	1.13-1.34
	combind	1959	1296	264	2224	1872	419	32.7	1.2×10^{-8}	1.23	1.14-1.32
	UA vs combind CO	1413	989	205				15.4	8.7×10^{-5}	1.16	1.08-1.25

* P values were calculated by Mantel-Haenszel test.

[0039] <ハプロタイプ解析>

次に、これら3つのSNPsのハプロタイプと心筋梗塞の相関をTHESIAS (Bioinformatics 23(8), 1038-1039 (2007)) によって調べた。その結果、1番目と2番目に頻度の高いハプロタイプが心筋梗塞と強い相関を示すことがわかった (表5)。

[0040] [表5]

表 5

Haplotype analysis							
Haplotype	SNPs ID			Haplotype frequency		Comparison of haplotype frequency	
	rs490556	rs11748327	rs521660	Case	Control	χ^2	P value
	T	C	G				
Haplotype1	T	C	G	0.727	0.688	30.7	3.0×10^{-8}
Haplotype2	C	T	A	0.176	0.213	37.1	1.1×10^{-9}
Haplotype3	C	C	A	0.053	0.058	1.4	2.3×10^{-1}
Haplotype4	T	T	A	0.031	0.030	0.3	6.0×10^{-1}

[0041] なお、一方向ANOVAおよび χ^2 テストを用いて年齢、性別、および糖尿病、高血圧、喫煙、高脂血症等の危険因子の影響を調べたところ、上記SNPsはこれらの因子には関係なく心筋梗塞に相関を示すことがわかった。

[0042] <狭心症との相関解析>

次に、上記3つのSNP sについて、2773人の不安定狭心症（重度の臨床症状を示す狭心症）患者のサンプルを解析し、上記3次および4次スクリーニングで用いた対照者サンプルと比較した。

その結果、表4（UA vs Combined C0：狭心症vsコントロール）に示すように、いずれのSNP sも狭心症と有意な相関を示すことがわかった（rs490556 $P=1.1 \times 10^{-4}$ 、rs11748327 $P=3.4 \times 10^{-5}$ 、rs521660 $P=8.7 \times 10^{-5}$ ）。

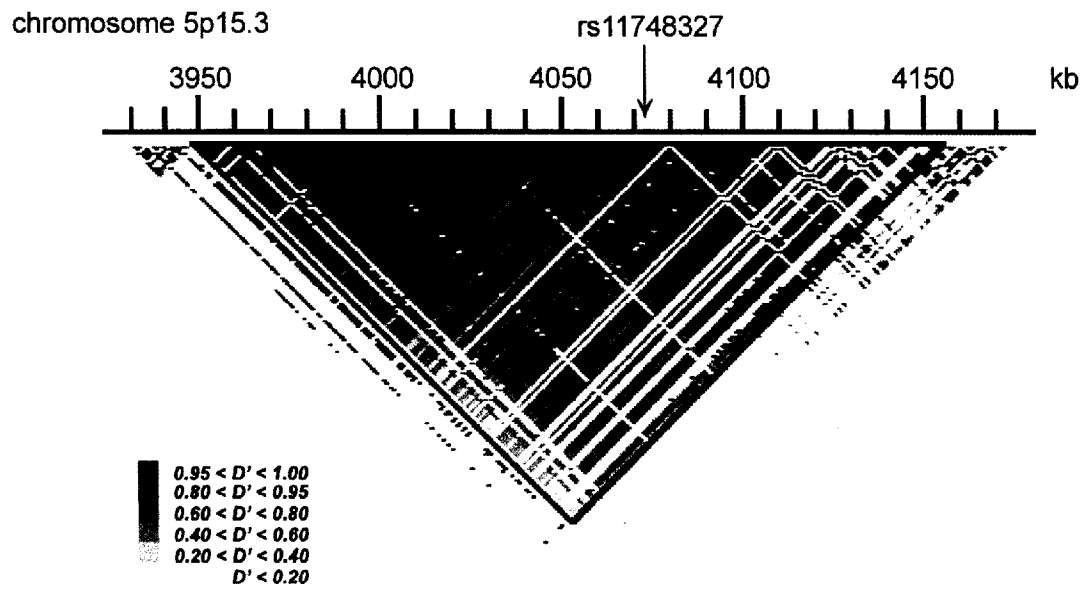
産業上の利用可能性

[0043] 本発明により、心筋梗塞や狭心症などの動脈硬化性疾患の発症を正確かつ簡便に予測することができるようになった。このことは、患者の生命に関わる危険な状態を避けることができるようになるばかりか、今後の治療薬開発や、動脈硬化性疾患発症の予防に寄与すると考えられる。

請求の範囲

- [請求項1] ヒト染色体5p15.3領域上に存在する一塩基多型を分析する工程、および該分析結果を動脈硬化性疾患の発症リスクと関連付ける工程を含む、動脈硬化性疾患の検査方法。
- [請求項2] 前記一塩基多型が、配列番号1～3のいずれかの塩基配列の塩基番号61番目の塩基に相当する塩基、または該塩基と連鎖不平衡の関係にある塩基における多型である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記動脈硬化性疾患が冠動脈疾患である、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 前記冠動脈疾患が心筋梗塞または狭心症である、請求項3に記載の方法。
- [請求項5] 配列番号1～3のいずれかの塩基配列において、塩基番号61番目の塩基を含む10塩基以上の配列、又はその相補配列を有する動脈硬化性疾患検査用プローブ。
- [請求項6] 配列番号1～3のいずれかの塩基配列において、塩基番号61番目の塩基を含む領域を増幅することのできる動脈硬化性疾患検査用プライマー。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/053542

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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

C12Q1/68, C12N15/09

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	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/ (STN) , GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI,
JSTPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2008-072947 A (Riken, Japan, Shoji TSUTSUMI), 03 April 2008 (03.04.2008), examples; claims 1 to 4 (Family: none)	1-6
Y	JP 2008-048627 A (Riken, Japan, Shoji TSUTSUMI), 06 March 2008 (06.03.2008), examples; claims 1 to 4 (Family: none)	1-6
Y	WO 2006/073183 A1 (Riken, Japan et al.), 13 July 2006 (13.07.2006), examples; claims 1 to 4 (Family: none)	1-6

☒ 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
09 March, 2011 (09.03.11)

Date of mailing of the international search report
22 March, 2011 (22.03.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/053542

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Koichi OZAKI, Toshihiro TANAKA, "Wagakuni no Kandomyakushikkan no SNPs no Evidence", Vascular Biology & Medicine, 2006, vol.7, no.1, pages 17 to 24, page 18, left column, line 8 to page 20, right column, line 16	1-6
Y	Koichi OZAKI, Toshihiro TANAKA, "Shinkin Kosoku no Identeki Risk Factor", Molecular Cardiovascular Medicine, 2009, vol.10, no.6, pages 51(611) to 57(617), page 52(612), left column, line 9 to page 53(613), left column, line 5	1-6
Y	MYOCARDIAL INFARCTION GENETICS CONSORTIUM, Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants., Nat. Genet., 2009, Vol. 41, No. 3, p. 334-341, entire text	1-6
Y	HELGADOTTIR, Anna et al., A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction., SCIENCE, 2007, Vol.316, p. 1491-1493, entire text	1-6

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

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

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 1 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 1 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 1 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/(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI, JSTPlus(JDreamII)

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
Y	JP 2008-072947 A（独立行政法人理化学研究所、堤正二）2008.04.03, 実施例、請求項1-4（ファミリーなし）	1-6
Y	JP 2008-048627 A（独立行政法人理化学研究所、堤 正二）2008.03.06, 実施例、請求項1-4（ファミリーなし）	1-6
Y	WO 2006/073183 A1（独立行政法人理化学研究所他）2006.07.13, 実施例、請求の範囲1-4（ファミリーなし）	1-6

☒ 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

0 9 . 0 3 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

2 2 . 0 3 . 2 0 1 1

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）

小倉 梢

4 B

4 5 0 4

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
Y	尾崎浩一、田中敏博, わが国の冠動脈疾患の S N P s のエビデンス, 血管医学, 2006, Vol. 7, No. 1, p. 17-24, 第 18 頁左欄第 8 行－第 20 頁右欄第 16 行	1－6
Y	尾崎浩一、田中敏博, 心筋梗塞の遺伝的リスクファクター, 分子心血管病, 2009, Vol. 10, No. 6, p. 51(611)-57(617), 第 52(612) 頁左欄第 9 行－第 53(613) 頁左欄第 5 行	1－6
Y	MYOCARDIAL INFARCTION GENETICS CONSORTIUM, Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants., Nat. Genet., 2009, Vol. 41, No. 3, p. 334-341, 全文	1－6
Y	HELGADOTTIR, Anna et al., A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction., SCIENCE, 2007, Vol. 316, p. 1491-1493, 全文	1－6