

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第5985676号
(P5985676)

(45) 発行日 平成28年9月6日 (2016.9.6)

(24) 登録日 平成28年8月12日 (2016.8.12)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A F
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M
G O 1 N 37/00 (2006.01)	G O 1 N 37/00 1 O 2

請求項の数 10 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2015-30239 (P2015-30239)	(73) 特許権者	304039548
(22) 出願日	平成27年2月19日 (2015.2.19)		コリア・インスティテュート・オブ・サイ
(65) 公開番号	特開2016-101153 (P2016-101153A)		エンス・アンド・テクノロジー
(43) 公開日	平成28年6月2日 (2016.6.2)		大韓民国, ソウル 136-791, ソン
審査請求日	平成27年2月19日 (2015.2.19)		ブックーク, ファランノ 14-ギル 5
(31) 優先権主張番号	10-2014-0168698	(74) 代理人	100091096
(32) 優先日	平成26年11月28日 (2014.11.28)		弁理士 平木 祐輔
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)	(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100122389
			弁理士 新井 栄一
		(74) 代理人	100111741
			弁理士 田中 夏夫
		(74) 代理人	100169971
			弁理士 菊田 尚子
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ヘキサナール曝露有無確認用マイクロRNAおよびそれを用いた確認方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記の群から選択されるいずれか一つ以上のマイクロRNAまたはその相補鎖分子のみが
集積された、ラットにおけるヘキサナール曝露有無確認用マイクロアレイチップ：
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000838(rno-miR-132-3p, Rattus norvegicus miR 1
32-3p, 配列番号1)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017369(rno-miR-667-5p, Rattus norvegicus miR66
7-5p, 配列番号2)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0003119(rno-miR-224-5p, Rattus norvegicus miR 2
24-5p, 配列番号3)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017878(rno-miR-3585-5p, Rattus norvegicus miR
3585-5p, 配列番号4)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0004726(rno-miR-101a-5p, Rattus norvegicus miR
101a-5p, 配列番号5)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0003201(rno-miR-382-5p, Rattus norvegicus miR 3
82-5p, 配列番号6)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000861(rno-miR-184, Rattus norvegicus miR184,
配列番号7)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017139(rno-miR-181b-1-3p, Rattus norvegicus mi
R 181b-1-3p, 配列番号8)、

マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0012846(rno-miR-201-5p, Rattus norvegicus miR 201-5p, 配列番号9)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0003198(rno-miR-376a-3p, Rattus norvegicus miR 376a-3p, 配列番号10)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000855(rno-miR-153-3p, Rattus norvegicus miR 153-3p, 配列番号11)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0024851(rno-miR-1306-5p, Rattus norvegicus miR 1306-5p, 配列番号12)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000901(rno-miR-299a-5p, Rattus norvegicus miR 299a-5p, 配列番号13)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000561(rno-miR-327, Rattus norvegicus miR327, 配列番号14)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017872(rno-miR-3582, Rattus norvegicus miR3582, 配列番号15)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0024845(rno-miR-3068-5p, Rattus norvegicus miR 3068-5p, 配列番号16)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017028(rno-miR-326-5p, Rattus norvegicus miR 326-5p, 配列番号17)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017892(rno-miR-1249, Rattus norvegicus miR1249, 配列番号18)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0005312(rno-miR-411-5p, Rattus norvegicus miR 411-5p, 配列番号19)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000896(rno-miR-292-5p, Rattus norvegicus miR 292-5p, 配列番号20)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017848(rno-miR-3568, Rattus norvegicus miR3568, 配列番号21)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0003177 (rno-miR-541-5p, Rattus norvegicus miR 541-5p, 配列番号22)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000587(rno-miR-341, Rattus norvegicus miR341, 配列番号23)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017175(rno-miR-421-3p, Rattus norvegicus miR 421-3p, 配列番号24)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017304(rno-miR-411-3p, Rattus norvegicus miR 411-3p, 配列番号25)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000865(rno-miR-190a-5p, Rattus norvegicus miR 190a-5p, 配列番号26)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017229(rno-miR-664-2-5p, Rattus norvegicus miR 664-2-5p, 配列番号27)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0001626(rno-miR-431, Rattus norvegicus miR431, 配列番号28)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0003199(rno-miR-381-3p, Rattus norvegicus miR 381-3p, 配列番号29)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017898(rno-miR-3594-5p, Rattus norvegicus miR 3594-5p, 配列番号30)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017855(rno-miR-1188-3p, Rattus norvegicus miR 1188-3p, 配列番号31)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0003194(rno-miR-376c-3p, Rattus norvegicus miR 376c-3p, 配列番号32)、
マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000577(rno-miR-337-3p, Rattus norvegicus miR 337-3p, 配列番号33)、

10

20

30

40

50

マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0012857(rno-miR-678, Rattus norvegicus miR678, 配列番号34)、
 マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0012827(rno-miR-1224, Rattus norvegicus miR1224, 配列番号35)、
 マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0025054(rno-miR-6317, Rattus norvegicus miR6317, 配列番号36)、
 マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0024848(rno-miR-1843-3p, Rattus norvegicus miR 1843-3p, 配列番号37)、
 マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017151(rno-miR-200a-5p, Rattus norvegicus miR 200a-5p, 配列番号38)、
 マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017192(rno-miR-433-5p, Rattus norvegicus miR 433-5p, 配列番号39)、
 マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0004717(rno-miR-29b-2-5p, Rattus norvegicus miR 29b-2-5p, 配列番号40)、
 マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0005301(rno-miR-188-5p, Rattus norvegicus miR 188-5p, 配列番号41)、
 マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017306(rno-miR-425-3p, Rattus norvegicus miR 425-3p, 配列番号42)、
 マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0003121(rno-miR-483-3p, Rattus norvegicus miR 483-3p, 配列番号43)、
 マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0025073(rno-miR-6332, Rattus norvegicus miR6332, 配列番号44)、
 マイクロRNA登録番号(miRbase) MIMAT0000780(rno-miR-7b, Rattus norvegicus miR 7b, 配列番号45)、
 マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017163(rno-miR-221-5p, Rattus norvegicus miR 221-5p, 配列番号46)、
 マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017904(rno-miR-328b-3p, Rattus norvegicus miR 328b-3p, 配列番号47)、
 マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017131(rno-miR-145-3p, Rattus norvegicus miR 145-3p, 配列番号48)、
 マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017807(rno-miR-3549, Rattus norvegicus miR3549, 配列番号49)、
 マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017089(rno-let-7f-1-3p, Rattus norvegicus let 7f-1-3p, 配列番号50)、
 マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0004733(rno-miR-136-3p, Rattus norvegicus miR136-3p, 配列番号51)、
 マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017201 (rno-miR-483-5p, Rattus norvegicus miR 483-5p, 配列番号52)、
 マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0025051(rno-miR-3102, Rattus norvegicus miR3102, 配列番号53)、
 マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0025050(rno-miR-6315, Rattus norvegicus miR6315, 配列番号54)、
 マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000887(rno-miR-217-5p, Rattus norvegicus miR 217-5p, 配列番号55)、
 マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0025057(rno-miR-3075, Rattus norvegicus miR3075, 配列番号56)。

【請求項 2】

- 1) ヘキサナールを曝露させた実験群と正常対照群のラットの体細胞からマイクロRNAを含むtotal RNAを分離する工程と、
- 2) 工程1) の実験群と対照群のRNAをそれぞれ異なる蛍光物質で標識する工程と、

- 3) 工程2) の蛍光物質で標識されたRNAを、請求項1のマイクロRNAマイクロアレイチップと混成化させる工程と、
- 4) 工程3) の反応したマイクロRNAマイクロアレイチップを分析する工程と
- 5) 工程4) の分析したデータから、請求項1のマイクロアレイチップに集積されたマイクロRNAの発現程度を対照群と比較して確認する工程とを含むヘキサナール曝露に対するマイクロRNA発現有無を確認する方法。

【請求項3】

工程1) の体細胞が、ラット肺細胞またはラット肺癌細胞、または肺組織であることを特徴とする、請求項2に記載のヘキサナール曝露に対するマイクロRNA発現有無を確認する方法。

10

【請求項4】

前記肺組織が、Fischer344 (SD系) ラット肺組織であることを特徴とする、請求項3に記載のヘキサナール曝露に対するマイクロRNA発現有無を確認する方法。

【請求項5】

工程3) の蛍光物質が、Cy3 (Cyanine 3)、Cy5 (Cyanine 5)、FITC (poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate)、RITC (rhodamine-B-isothiocyanate) とローダミン (rhodamine) からなる群から選択して用いることを特徴とする、請求項2に記載のヘキサナール曝露に対するマイクロRNA発現有無を確認する方法。

【請求項6】

1) ヘキサナールを曝露させた実験群と正常対照群のラットの体細胞からマイクロRNAを含むtotal RNAを分離する工程と、

20

2) 前記の実験群および対照群のRNAをcDNAに合成する工程と、

3) 工程2) の実験群と対照群のcDNAを、それぞれ下記の群から選択されるいずれか一つ以上のマイクロRNAを増幅することができるプライマーを用いて、リアルタイムPCRを行なう工程：

マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0000861 (rno-miR-184, Rattus norvegicus miR184, 配列番号7)、

マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0000561 (rno-miR-327, Rattus norvegicus miR327, 配列番号14)、

マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0017892 (rno-miR-1249, Rattus norvegicus miR1249, 配列番号18)、

30

マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0017848 (rno-miR-3568, Rattus norvegicus miR3568, 配列番号21)、

マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0001626 (rno-miR-431, Rattus norvegicus miR431, 配列番号28)、

マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0017898 (rno-miR-3594-5p, Rattus norvegicus miR 3594-5p, 配列番号30)、

マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0017855 (rno-miR-1188-3p, Rattus norvegicus miR 1188-3p, 配列番号31)、

マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0012857 (rno-miR-678, Rattus norvegicus miR678, 配列番号34)、

40

マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0012827 (rno-miR-1224, Rattus norvegicus miR1224, 配列番号35)、および

マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0017807 (rno-miR-3549, Rattus norvegicus miR3549, 配列番号49) ;および

4) 工程3) の遺伝子産物を対照群と比較して発現の程度を確認する工程とを含むヘキサナールに対する曝露有無を確認する方法。

【請求項7】

請求項1のマイクロRNAマイクロアレイチップを含む、ラットにおけるヘキサナール曝露に対するマイクロRNA発現有無確認用キット。

50

【請求項 8】

ラットの肺組織をさらに含むことを特徴とする、請求項 7 に記載のヘキサナールに対する曝露有無確認用キット。

【請求項 9】

ラットの肺組織が、Fischer344 (SD系) ラットであることを特徴とする、請求項 8 に記載のヘキサナールに対する曝露有無確認用キット。

【請求項 10】

下記のマイクロRNAに相補的でマイクロRNAを増幅することができるプライマーを含む、ラットにおけるヘキサナール曝露有無確認用キット：

マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0000861 (rno-miR-184, Rattus norvegicus miR184, 配列番号7)、
マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0000561 (rno-miR-327, Rattus norvegicus miR327, 配列番号14)、
マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0017892 (rno-miR-1249, Rattus norvegicus miR1249, 配列番号18)、
マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0017848 (rno-miR-3568, Rattus norvegicus miR3568, 配列番号21)、
マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0001626 (rno-miR-431, Rattus norvegicus miR431, 配列番号28)、
マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0017898 (rno-miR-3594-5p, Rattus norvegicus miR 3594-5p, 配列番号30)、
マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0017855 (rno-miR-1188-3p, Rattus norvegicus miR 1188-3p, 配列番号31)、
マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0012857 (rno-miR-678, Rattus norvegicus miR678, 配列番号34)、
マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0012827 (rno-miR-1224, Rattus norvegicus miR1224, 配列番号35)、
マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0017807 (rno-miR-3549, Rattus norvegicus miR3549, 配列番号49)。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヘキサナール曝露有無確認用マイクロRNAおよびそれを用いた確認方法に関するもので、より詳細には、ヘキサナール曝露によって特異的に発現が変化するマイクロRNAおよびそれを用いたヘキサナールに対する曝露有無を確認する方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

最近になって、遺伝子発現を調節する新しい調節性RNAの一部類としてマイクロRNA (miR, miRNA) が台頭している。これらの小型 (典型的にヌクレオチド18-24個の長さ) 非暗号化RNA分子は、RNA分解の促進、mRNAの翻訳阻害、および遺伝子転写への影響を通じてタンパク質の発現パターンを調節することができる。マイクロRNAは、標的遺伝子の発現を抑制することにより、発達および分化、細胞増殖制御、ストレス応答、細胞死滅 (apoptosis) など、様々な生物学的過程を調節する。現在、約1800個以上のヒトのマイクロRNAが知られており、国内外で活発に研究が進められている。

【0003】

マイクロRNAは、RNAポリメラーゼII (pol II) 又はRNAポリメラーゼIII (pol III; 非特許文献1参照) によって転写され、転写された個々のマイクロRNA遺伝子、タンパク質、暗号化遺伝子のイントロンまたは複数の密接に関連したマイクロRNAを主に暗号化するポリシストロン転写物から誘導することができる。RNA pol IIまたはpol IIIによるmiRNA

遺伝子の転写は、一般的に数千塩基長のプライマリmiRNA転写物（pri-miRNAs）と呼ばれる最初の転写物を生産する。核では、pri-miRNAsは、RNase、ドロシャ（Drosha）により加工されて、70ないし100ヌクレオチドヘアピン型前駆体（pre-miRNAs）を生産する。細胞に運ばれた後、ヘアピンpre-miRNAは、二重鎖miRNAを生産するためにダイサーによって追加で加工される。成熟したmiRNA鎖は、RNA-誘導沈黙複合体（RISC）の中に混合されて、ここで成熟したmiRNAは、塩基対の相補性によってその標的mRNAsと結合する。miRNA塩基対がmRNA標的と完全に一致する比較的にまれな場合には、これがmRNAの分解を促進する。さらに一般的に、miRNAsは標的mRNAsと不完全な異形二重鎖を形成してmRNA翻訳に影響を与える。

【0004】

10

マイクロRNAのメカニズムは、癌の発症、細胞の老化、臓器の成長などに重要な影響を及ぼしており、それにより、マイクロRNA関連の研究は、癌の発生、老化などの生命現象の因果関係の究明に中枢的な役割をするだけでなく、将来、発生および分化や幹細胞を用いた細胞治療剤の開発などの研究にも適用することができる韓国のバイオ研究の核心的分野としての地位を得ることができると予想される。したがって、マイクロRNAマーカーの発掘は、癌を含む疾病の早期診断の可能性を予測することに大きく役立つところに意義がある。

【0005】

のみならず、マイクロRNAマーカーは、環境性疾患が急激に増加している状況下で、特定の環境有害物質の曝露予測にも有用に用いられると考えられる。今までは、環境有害物質の曝露に伴う遺伝子（mRNA）変化の様相とそれに伴う疾病との関連性に関する研究が主に進行されてきたが、最近、マイクロRNAとの関連性に対する関心が増加するにつれて、ベンゼン、ヒ素またはRDXのような有害物質の曝露に伴うマイクロRNAの発現変化を観察し、特異的に発現が変化するマイクロRNAとその標的遺伝子を、有害物質に対するマーカーとして提示した（非特許文献2参照）。また、発掘されたマイクロRNAは、曝露予測のためのマーカーとしてだけでなく、標的遺伝子の発現を調節する調節子として環境有害物質による毒性機序予測のためのマーカーとしても有用に用いることができる。このように、マイクロRNAマーカーの環境有害物質曝露と毒性機序予測における役割が非常に重要であるにもかかわらず、現在、マイクロRNA関連の研究は、主に疾病診断用マーカーの発掘に限られており、多様な環境中に曝露する可能性が非常に大きい揮発性有機化合物類のような有害物質曝露によるマイクロRNAの発現変化に関する研究は不足している。また、後天的遺伝学的変化は、遺伝子発現のような遺伝的变化の多様性に比べてその程度がひどくないので、多数のマーカーが必要な遺伝子発現プロファイリングに比べて、わずか一つのマイクロRNAやDNAメチレーションのようなエピジェネティックマーカーでも、疾病や有害物質の曝露を初期に診断することができるという利点だけでなく、非侵襲的方法で診断することができるという利点がある。各マイクロRNAが多様な標的遺伝子を調節して、高等真核生物では、千個余りのマイクロRNAが存在するので、マイクロRNAによって調節することができる潜在的な回路が非常に多いと予想されている。

20

30

【0006】

ヘキサナールは、代表的な揮発性有機化合物類であるアルデヒド類の一つである。アルデヒドは大部分呼吸を通じて曝露され、呼吸による曝露は、血管を通じて急速に全身に伝えられるようになる。アルデヒド類の中でもヘキサナールは、呼吸器の上部気道および粘膜はもちろん、目や皮膚組織に影響を与えることが報告されており、慢性閉塞性肺疾患（Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD）および肺癌患者の診断のためのマーカーとして用いられるほど、肺疾患と密接な関連がある物質として報告されている。血流に乗って流れる揮発性有機化合物は、肺胞膜の拡散現象によって肺に影響を及ぼすようになり、ヘキサン（hexane）、メチルペンタン（methylpentan）、イソプロペン（isopropene）、ベンゼン（benzene）などは、疾患のマーカーとして使用されていて（非特許文献3）、最近、吸気ガス分析（exhaled breath analysis）を通じて捕集された物質の揮発性有機化合物類分析結果から、簡単な肺がん診断法が開発され用いられている。揮発性有機化

40

50

合物類中のアルデヒド類 (Aldehydes) は、肺癌疾患に表れる代表的な物質として報告されている (非特許文献 4)。したがって、ヘキサナールなどのアルデヒド類特異的バイオマーカーの発掘は、肺疾患およびヘキサナールの環境への曝露をスクリーニングするために用いることができる。

【0007】

また、揮発性有機化合物類であるアルデヒド類の人体毒性程度と遺伝子発現の変化に対する研究は、一部報告されているが、代表的なアルデヒドとして知られているホルムアルデヒド、アセトアルデヒド (Formaldehyde, Acetaldehyde) などの研究にほぼ限定されている。このようにヘキサナールのヒトに対する潜在的な危害性にもかかわらず、人体での危害度評価データが十分ではなく、曝露に対する検索方法も GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometer) または HPLC (High Performance Liquid Chromatography) などの古典的な方法に限られている。GC-MS または HPLC 方法などを用いると定量は可能であるが、分析のための適正条件を設定しなければならず、高価の装備などが必要である。それで、DNA マイクロアレイチップまたはプライマー (primer) を用いるリアルタイム (real time) PCR (Real-time reverse transcript polymerase chain reaction) などによって、より速くより簡便なスクリーニング (screening) 方法が可能となった。このような分析手法を用いた迅速な危害性評価を通じて人体での毒性作用、特に癌をはじめとする様々な疾患誘発に關与するマイクロRNA 発現の変化有無などを探索することができる分子的指標を発掘して活用し、ヘキサナールの人体への曝露に対する適切な対策と管理を行なうことが重要な課題といえる。

【0008】

1997年に初めてマイクロRNAが明らかにされて以来、哺乳類、微生物など複数種のマイクロRNAが急速に明らかにされて、Sanger miRBASE database、miRDB、miRNA Target database など、さまざまな種類のデータベースに登録されている。このように明らかになったマイクロRNAのデータを基に、遺伝子の機能を研究するためにオミックス (Omics) 基盤の研究が活発に行われている。一回の実験で数千個の遺伝子の発現を分析するために、マイクロアレイ (microarray) 分析を行なう (非特許文献 5)。

【0009】

マイクロアレイは、cDNA (complementary DNA) や 20~25塩基対 (base pair) の長さのオリゴヌクレオチド (oligonucleotide) のセットをガラス上に集積化したものである。cDNA マイクロアレイは、学校内の研究室や Agilent 社、Genomic Solutions 社などの会社で、チップ上に cDNA 収集物を機械的に固定化するか、またはインクジェット (ink jetting) 方法を用いて製造している (非特許文献 6)。オリゴヌクレオチドマイクロアレイは、Affymetrix 社で フォトリソグラフィ (photolithography) 工程を用いて、チップ上で直接合成する方法で作られており、Agilent 社などは、合成したオリゴヌクレオチドを固定化する方法で生産している (非特許文献 6)。

【0010】

遺伝子の発現分析のためには、組織などの試料からマイクロRNAを得て、マイクロアレイにあるオリゴヌクレオチドと交雑反応を行なう。得られたマイクロRNAは、蛍光または同位元素で標識化する。

【0011】

マイクロアレイを通じて遺伝子発現を測定する方法としては、大きく分けて two-dye 方式と one-dye 方式がある。相補結合反応を測定する時、対照群試料と実験群の試料に、それぞれ 2つの異なる蛍光 (例えば、Cye3 と Cye5) で標識した後、マイクロアレイで反応させて測定する方法を two-dye マイクロアレイといい、両方の試料に同じ蛍光を処理した後、2つの異なるマイクロアレイで反応させて測定する方法を one-dye マイクロアレイという (非特許文献 7)。

【0012】

最近 DNA マイクロアレイ技術を用いた先端技術である毒性ゲノミクス (Toxicogenomics) 研究などと組み合わせて、大量 (high throughput) に医薬品および新医薬の候補物質は

、もちろん、代表的な環境汚染物質をはじめ、すべての化学物質による特定の組織や細胞株で発現するマイクロRNAの発現パターンの分析、量的な分析が可能となった。これにより、特定細胞内の特定マイクロRNAの発現頻度を解析することにより、環境汚染物質の有害作用と関連した遺伝子の発掘が可能であり、これにより、環境汚染物質の有害作用と分子メカニズムを理解することになり、さらに毒性を誘発する物質の検索と確認が可能になるだろう。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】 Qi, P. ら. Cell. Mol. Immunol. 2006年, 第3巻, p.411-419

10

【非特許文献2】 A. Baccarelli & V. Bollati, Curr Opin Pediatr. 2009年, 第21巻, p.243-251

【非特許文献3】 Vet Sci, 2004年, 第5(1)巻, p.11-18

【非特許文献4】 J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2010年, 第878 (27) 巻, p.2643-2651

【非特許文献5】 Schena, M. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. 米国, 1996年, 第93巻, p.10614-10619

【非特許文献6】 Sellheyer, K. ら, J. Am. Acad. Dermatol. 2004年, 第51巻, p.681-692

【非特許文献7】 Vivian, G. ら, Nature, 1999年, 第21巻, p.15-19

20

【発明の概要】

【0014】

そこで、本発明者らは、ラットのマイクロRNA約719個が集積されたオリゴマイクロアレイを用いてヘキサナールのマイクロRNA発現プロファイルを、実際にヘキサナールを曝露させたラットの肺組織からヘキサナールの曝露によって特異的に発現が変化するマイクロRNAを発掘し、ヘキサナール曝露時にマイクロRNAの発現有無を検出することができるバイオマーカー及びそれを用いた曝露有無を確認する方法を確立して、本発明を完成した。

【0015】

本発明の目的は、ヘキサナールの曝露によって特異的に発現が変化するマイクロRNA及び前記バイオマーカーを用いたヘキサナールに対する曝露有無を確認する方法を提供することである。

30

【0016】

前記目的を達成するために、本発明は、ヘキサナール曝露によって特異的に発現変化を起こすことを特徴とするヘキサナール曝露有無確認用マイクロRNAバイオマーカーを提供する。

【0017】

また、本発明は、前記バイオマーカー遺伝子配列の全部または一部を含むオリゴヌクレオチドまたはその相補鎖分子が集積されたヘキサナールに対する曝露有無確認用マイクロRNAマイクロアレイチップを提供する。

【0018】

また、本発明は、前記バイオマーカーを用いたヘキサナールに対するマイクロRNA発現有無を確認する方法を提供する。

40

【0019】

さらに、本発明は、ヘキサナールに対するマイクロRNA発現有無確認用検索キットを提供する。

【発明の効果】

【0020】

本発明のヘキサナール (Hexanal) 曝露に対するマイクロRNA発現有無確認用バイオマーカーおよびそれを用いた確認方法は、マイクロRNAマイクロアレイチップを通じて選別された反応マイクロRNAをバイオマーカーとして用いてヘキサナールのモニタリングおよび

50

危害性を判定するのに有用であり、ヘキサナールによって惹起される毒性作用機序を究明するためのツールとして用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】 マイクロアレイチップを用いて、ヘキサナールを曝露させたFischer344 (SD系) ラットの肺組織の全体マイクロRNA発現様相を分析した結果を示す図である。

【図2】 3種のヘキサナール曝露濃度によって、共通して発現が変化する56種のマイクロRNAの発現様相を分析した結果を示す図である。

【図3a】 ヘキサナール曝露によって発現が変化したマイクロRNAをマイクロアレイチップとリアルタイムRT-PCR (Real-time reverse transcript polymerase chain reaction) を用いて、対照群と比べて発現の増減を比較した図である。

10

【図3b】 ヘキサナール曝露によって発現が変化したマイクロRNAをマイクロアレイチップとリアルタイムRT-PCR (Real-time reverse transcript polymerase chain reaction) を用いて、対照群と比べて発現の増減を比較した図である。

【発明を実施するための形態】

【0022】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0023】

本発明は、ヘキサナール (Hexanal) の曝露によって特異的に発現変化を起こすヘキサナール特異的曝露有無確認用マイクロRNAバイオマーカーを提供する。

20

【0024】

前記バイオマーカーは、ヘキサナール曝露によって1.3倍以上発現が増加または減少したマイクロRNAで構成されている。

【0025】

本発明は、下記のように構成された群から選択されることを特徴とするバイオマーカーを提供する：

マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000838(rno-miR-132-3p, Rattus norvegicus miR 132-3p, 配列番号1)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017369(rno-miR-667-5p, Rattus norvegicus miR667-5p, 配列番号2)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0003119(rno-miR-224-5p, Rattus norvegicus miR 224-5p, 配列番号3)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017878(rno-miR-3585-5p, Rattus norvegicus miR 3585-5p, 配列番号4)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0004726(rno-miR-101a-5p, Rattus norvegicus miR 101a-5p, 配列番号5)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0003201(rno-miR-382-5p, Rattus norvegicus miR 382-5p, 配列番号6)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000861(rno-miR-184, Rattus norvegicus miR184, 配列番号7)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017139(rno-miR-181b-1-3p, Rattus norvegicus miR 181b-1-3p, 配列番号8)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0012846(rno-miR-201-5p, Rattus norvegicus miR 201-5p, 配列番号9)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0003198(rno-miR-376a-3p, Rattus norvegicus miR 376a-3p, 配列番号10)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000855(rno-miR-153-3p, Rattus norvegicus miR 153-3p, 配列番号11)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0024851(rno-miR-1306-5p, Rattus norvegicus miR 1306-5p, 配列番号12)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000901(rno-miR-299a-5p, Rattus norvegicus miR 299a-5p, 配列番号13)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000561(rno-miR-327, Rattus norvegicus miR327, 配列番号14)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017872(rno-miR-3582, Rattus norvegicus miR3582, 配列番号15)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0024845(rno-miR-3068-5p, Rattus norvegicus miR 3068-5p, 配列番号16)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017028(rno-miR-326-5p, Rattus norvegicus miR 326-5p, 配列番号17)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017892(rno-miR-1249, Rattus norvegicus miR1249, 配列番号18)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0005312(rno-miR-411-5p, Rattus norvegicus miR 411-5p, 配列番号19)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0

30

40

50

000896(rno-miR-292-5p, Rattus norvegicus miR 292-5p, 配列番号20)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017848(rno-miR-3568, Rattus norvegicus miR3568, 配列番号21)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0003177 (rno-miR-541-5p, Rattus norvegicus miR 541-5p, 配列番号22)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000587(rno-miR-341, Rattus norvegicus miR341, 配列番号23)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017175(rno-miR-421-3p, Rattus norvegicus miR 421-3p, 配列番号24)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017304(rno-miR-411-3p, Rattus norvegicus miR 411-3p, 配列番号25)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000865(rno-miR-190a-5p, Rattus norvegicus miR 190a-5p, 配列番号26)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017229(rno-miR-664-2-5p, Rattus norvegicus miR 664-2-5p, 配列番号27)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0001626(rno-miR-431, Rattus norvegicus miR431, 配列番号28)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0003199(rno-miR-381-3p, Rattus norvegicus miR 381-3p, 配列番号29)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017898(rno-miR-3594-5p, Rattus norvegicus miR 3594-5p, 配列番号30)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017855(rno-miR-1188-3p, Rattus norvegicus miR 1188-3p, 配列番号31)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0003194(rno-miR-376c-3p, Rattus norvegicus miR 376c-3p, 配列番号32)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000577(rno-miR-337-3p, Rattus norvegicus miR 337-3p, 配列番号33)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0012857(rno-miR-678, Rattus norvegicus miR678, 配列番号34)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0012827(rno-miR-1224, Rattus norvegicus miR1224, 配列番号35)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0025054(rno-miR-6317, Rattus norvegicus miR6317, 配列番号36)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0024848(rno-miR-1843-3p, Rattus norvegicus miR 1843-3p, 配列番号37)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017151(rno-miR-200a-5p, Rattus norvegicus miR 200a-5p, 配列番号38)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017192(rno-miR-433-5p, Rattus norvegicus miR 433-5p, 配列番号39)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0004717(rno-miR-29b-2-5p, Rattus norvegicus miR 29b-2-5p, 配列番号40)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0005301(rno-miR-188-5p, Rattus norvegicus miR 188-5p, 配列番号41)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017306(rno-miR-425-3p, Rattus norvegicus miR 425-3p, 配列番号42)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0003121(rno-miR-483-3p, Rattus norvegicus miR 483-3p, 配列番号43)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0025073(rno-miR-6332, Rattus norvegicus miR6332, 配列番号44)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000780(rno-miR-7b, Rattus norvegicus miR 7b, 配列番号45)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017163(rno-miR-221-5p, Rattus norvegicus miR 221-5p, 配列番号46)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017904(rno-miR-328b-3p, Rattus norvegicus miR 328b-3p, 配列番号47)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017131(rno-miR-145-3p, Rattus norvegicus miR 145-3p, 配列番号48)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017807(rno-miR-3549, Rattus norvegicus miR3549, 配列番号49)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017089(rno-let-7f-1-3p, Rattus norvegicus let 7f-1-3p, 配列番号50)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0004733(rno-miR-136-3p, Rattus norvegicus miR136-3p, 配列番号51)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017201 (rno-miR-483-5p, Rattus norvegicus miR 483-5p, 配列番号52)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0025051(rno-miR-3102, Rattus norvegicus miR3102, 配列番号53)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0025050(rno-miR-6315, Rattus norvegicus miR6315, 配列番号54)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000887(rno-miR-217-5p, Rattus norvegicus miR 217-5p, 配列番号55)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0025057(rno-miR-3075, Rattus norvegicus miR3075, 配列番号56)。

【0026】

本発明者らは、ヘキサナールの曝露に対するマイクロRNA発現有無確認用バイオマーカーを発掘するために、既存に確立されたインビボ実験手法に基づいてヘキサナールの吸入曝露実験を行なった。ヘキサナール曝露濃度は、既存の文献で報告されたアルデヒドを用

10

20

30

40

50

いたラットモデルの曝露実験結果とヘキサナールの物理化学的特性による飽和濃度、ガス発生器の特徴などを考慮して選定し（表1）、曝露方法は、鼻部曝露吸引装置（Nose-only inhalation chamber）を用いて、1日1回、1回当たり約4時間、5週間吸入させた。対照群の物質は、フィルター透過クリーンエアを使用した。

【0027】

【表1】

物質名	グループ名	曝露濃度 (ppm)
ヘキサナール (Hexanal)	対照群	0
	実験群（低濃度）	600
	実験群（中濃度）	1000
	実験群（高濃度）	1500

10

【0028】

以後、前記の濃度でヘキサナールを曝露させて対照群と実験群ラットの肺組織からマイクロRNAを含むtotal RNAを分離して、蛍光物質（Cy3）で標識した。前記蛍光標識されたマイクロRNAをAgilent社のRat miRNA array v19.0（8 x 15k）（Agilent、米国）と混成化し、蛍光画像をスキャンして、マイクロRNA発現様相の違いを分析した（図1参照）。マイクロRNA発現様相を分析した結果、発現が1.3倍以上変化したマイクロRNA338種を選別した。これらのうち、発現が1.3倍以上に増加したマイクロRNAが22種、減少したマイクロRNAが316種で、総338種であり曝露濃度別に発現が変化したマイクロRNAは、下記の表のとおりである（表2）。低濃度処理群では、86種（1種が発現増加、85種が発現減少）のマイクロRNA、中濃度処理群では、86種（18種が発現増加、68種が発現減少）のマイクロRNA、高濃度処理群では、166種（3種が発現増加、163種が発現減少）のマイクロRNAが、ヘキサナール曝露によって発現が変化したことを確認できた。これらのマイクロRNAは、ヘキサナールの曝露時に毒性と関連しているとの報告はない。

20

【0029】

【表2】

ラットモデルでヘキサナール曝露によって発現が変化したマイクロRNA数

30

	発現が増加した マイクロRNA	発現が減少した マイクロRNA	マイクロRNA 総数
低濃度	1	85	86
中濃度	18	68	86
高濃度	3	163	166

【0030】

また、本発明は、前記バイオマーカーマイクロRNA配列の全部または一部を含むオリゴヌクレオチドまたはその相補鎖分子が合成/集積されたヘキサナールに特異的な曝露有無確認用マイクロRNAマイクロアレイチップを提供する。

40

【0031】

マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000838(rno-miR-132-3p, Rattus norvegicus miR 132-3p, 配列番号1)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017369(rno-miR-667-5p, Rattus norvegicus miR667-5p, 配列番号2)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0003119(rno-miR-224-5p, Rattus norvegicus miR 224-5p, 配列番号3)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017878(rno-miR-3585-5p, Rattus norvegicus miR 3585-5p, 配列番号4)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0004726(rno-miR-101a-5p, Rattus norvegicus miR 101a-5p, 配列番号5)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0003201(rno-miR-382-5p, Rattus norvegicus miR 382-5p, 配列番号6)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000861

50

(rno-miR-184, *Rattus norvegicus* miR184, 配列番号7)、マイクロRNA登録番号(miRbase) MIMAT0017139(rno-miR-181b-1-3p, *Rattus norvegicus* miR 181b-1-3p, 配列番号8)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0012846(rno-miR-201-5p, *Rattus norvegicus* miR 201-5p, 配列番号9)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0003198(rno-miR-376a-3p, *Rattus norvegicus* miR 376a-3p, 配列番号10)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000855(rno-miR-153-3p, *Rattus norvegicus* miR 153-3p, 配列番号11)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0024851(rno-miR-1306-5p, *Rattus norvegicus* miR 1306-5p, 配列番号12)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000901(rno-miR-299a-5p, *Rattus norvegicus* miR 299a-5p, 配列番号13)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000561(rno-miR-327, *Rattus norvegicus* miR327, 配列番号14)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017872(rno-miR-3582, *Rattus norvegicus* miR3582, 配列番号15)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0024845(rno-miR-3068-5p, *Rattus norvegicus* miR 3068-5p, 配列番号16)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017028(rno-miR-326-5p, *Rattus norvegicus* miR 326-5p, 配列番号17)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017892(rno-miR-1249, *Rattus norvegicus* miR1249, 配列番号18)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0005312(rno-miR-411-5p, *Rattus norvegicus* miR 411-5p, 配列番号19)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000896(rno-miR-292-5p, *Rattus norvegicus* miR 292-5p, 配列番号20)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017848(rno-miR-3568, *Rattus norvegicus* miR3568, 配列番号21)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0003177 (rno-miR-541-5p, *Rattus norvegicus* miR 541-5p, 配列番号22)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000587(rno-miR-341, *Rattus norvegicus* miR341, 配列番号23)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017175(rno-miR-421-3p, *Rattus norvegicus* miR 421-3p, 配列番号24)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017304(rno-miR-411-3p, *Rattus norvegicus* miR 411-3p, 配列番号25)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000865(rno-miR-190a-5p, *Rattus norvegicus* miR 190a-5p, 配列番号26)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017229(rno-miR-664-2-5p, *Rattus norvegicus* miR 664-2-5p, 配列番号27)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0001626(rno-miR-431, *Rattus norvegicus* miR431, 配列番号28)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0003199(rno-miR-381-3p, *Rattus norvegicus* miR 381-3p, 配列番号29)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017898(rno-miR-3594-5p, *Rattus norvegicus* miR 3594-5p, 配列番号30)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017855(rno-miR-1188-3p, *Rattus norvegicus* miR 1188-3p, 配列番号31)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0003194(rno-miR-376c-3p, *Rattus norvegicus* miR 376c-3p, 配列番号32)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000577(rno-miR-337-3p, *Rattus norvegicus* miR 337-3p, 配列番号33)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0012857(rno-miR-678, *Rattus norvegicus* miR 678, 配列番号34)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0012827(rno-miR-1224, *Rattus norvegicus* miR1224, 配列番号35)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0025054(rno-miR-6317, *Rattus norvegicus* miR6317, 配列番号36)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0024848(rno-miR-1843-3p, *Rattus norvegicus* miR 1843-3p, 配列番号37)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017151(rno-miR-200a-5p, *Rattus norvegicus* miR 200a-5p, 配列番号38)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017192(rno-miR-433-5p, *Rattus norvegicus* miR 433-5p, 配列番号39)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0004717(rno-miR-29b-2-5p, *Rattus norvegicus* miR 29b-2-5p, 配列番号40)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0005301(rno-miR-188-5p, *Rattus norvegicus* miR 188-5p, 配列番号41)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017306(rno-miR-425-3p, *Rattus norvegicus* miR 425-3p, 配列番号42)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0003121(rno-miR-483-3p, *Rattus norvegicus* miR 483-3p, 配列番号43)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0025073(rno-miR-6332, *Rattus norvegicus* miR6332, 配列番号44)、マイクロRNA登録番号(miRbase) MIMAT0000780(rno-miR-7b, *Rattus norvegicus* miR 7b, 配列番号45)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017163(rno-miR-221-5p, *Rattus norvegicus* miR 221-5p, 配列番号46)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017904(rno-miR-328b-3p, *Rattus norvegicus* miR 328b-3p, 配列番号47)

us miR 328b-3p, 配列番号47)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017131(rno-miR-145-3p, Rattus norvegicus miR 145-3p, 配列番号48)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017807(rno-miR-3549, Rattus norvegicus miR3549, 配列番号49)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017089(rno-let-7f-1-3p, Rattus norvegicus let 7f-1-3p, 配列番号50)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0004733(rno-miR-136-3p, Rattus norvegicus miR136-3p, 配列番号51)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0017201 (rno-miR-483-5p, Rattus norvegicus miR 483-5p, 配列番号52)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0025051(rno-miR-3102, Rattus norvegicus miR3102, 配列番号53)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0025050(rno-miR-6315, Rattus norvegicus miR6315, 配列番号54)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0000887(rno-miR-217-5p, Rattus norvegicus miR 217-5p, 配列番号55)、マイクロRNA登録番号(miRbase)MIMAT0025057(rno-miR-3075, Rattus norvegicus miR3075, 配列番号56)。

10

【0032】

本発明のヘキサナール検索用マイクロRNAマイクロアレイチップは、当業者に公知の方法で作製することができる。前記マイクロアレイチップを作製する方法は、下記のとおりである。前記探索されたバイオマーカーをプローブマイクロRNA分子として用いて、チップの基板上に固定化させるためにインクジェット方式などを用いることが好ましいが、これに限定されるものではなく、本発明の好ましい実施例では、SurePrint inkjet micro droppingマイクロアレイを用いた。前記DNAマイクロアレイチップの基板は、エポキシ(epoxy)、アミノシラン(amino-silane)、ポリ-L-リジン(poly-L-lysine)およびアルデヒド(aldehyde)からなる群から選択される1つの活性基がコーティングされたものが好ましいが、これに限定されるものではない。また、前記基板は、スライドガラス、プラスチック、金属、シリコン、ナイロン膜、およびニトロセルロース膜からなる群から選択され得るが、これに限定されるものではなく、本発明の好ましい実施例では、エポキシがコーティングされたスライドガラスを用いた。

20

【0033】

また、本発明は、前記バイオマーカーを用いたヘキサナールの曝露に対するマイクロRNA発現有無を確認する方法を提供する。

【0034】

本発明は、下記のような過程を含むヘキサナールの曝露に対するマイクロRNA発現有無を確認する方法を提供する：

30

- 1) ヘキサナールを曝露させた実験群と正常対照群の体細胞からマイクロRNAを含むtotal RNAを分離する工程；
- 2) 工程1)の実験群と対照群のRNAをそれぞれ異なる蛍光物質で標識する工程；
- 3) 工程2)の蛍光物質で標識されたRNAを前記マイクロRNAマイクロアレイチップと混成化させる工程；
- 4) 工程3)の反応したマイクロRNAマイクロアレイチップを分析する工程；および
- 5) 工程4)で分析したデータから、本発明のバイオマーカーの発現レベルを、対照群と比較して確認する工程を含むヘキサナールに対する曝露有無を確認する方法を提供する。

【0035】

40

前記曝露有無を確認する方法において、前記工程1)の体細胞は、ヒト肺細胞またはヒト肺癌細胞、または肺組織であることが好ましく、前記肺組織は、Fischer344(SD系)ラットを使用することが好ましいが、これに限定されるものではなく、ラット肺組織であれば、すべて使用可能である。

【0036】

前記曝露有無を確認する方法において、工程2)の蛍光物質は、Cy3、Cy5、FITC(poly-L-lysine-fluorescein isothiocyanate)、RITC(rhodamine-B-isothiocyanate)およびローダミン(rhodamine)からなる群から選択されることが好ましいが、これに限定されるものではなく、当業者に公知の蛍光物質はすべて使用可能である。

【0037】

50

前記曝露有無を確認する方法において、工程3)のマイクロRNAマイクロアレイチップは、Agilent社のRat miRNA array v19.0 (8 x 15k) (Agilent, 米国)等を用いることが好ましいが、これに限定されるものではなく、ラットマイクロRNAのうち、本発明において、前記の共通して発現が変化したマイクロRNA (表3参照)が搭載されたマイクロアレイチップであれば使用可能で、前記本発明者が作製したマイクロRNAマイクロアレイチップを使用することが最も好ましい。また、工程4)の分析方法は、GeneSpring GX12.6.1ソフトウェア (Agilent, 米国)を用いることが好ましいが、これに限定されるものではなく、当業者に公知の分析ソフトウェアを用いてもよい。

【0038】

また、本発明は、

- 1) ヘキサナールを曝露させた実験群と正常対照群の肺組織からマイクロRNAを含むtotal RNAを分離する工程と、
- 2) 前記の実験群と対照群のRNAをcDNAに合成する工程と、
- 3) 工程2)の実験群と対照群のcDNAをそれぞれ前記マイクロアレイチップに集積されたマイクロRNAを増幅することができるプライマーを用いて、リアルタイムRT-PCR (Real-time reverse transcript polymerase chain reaction) を実行する工程；
マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0000861 (rno-miR-184, Rattus norvegicus miR184, 配列番号7)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0000561 (rno-miR-327, Rattus norvegicus miR327, 配列番号14)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0017892 (rno-miR-1249, Rattus norvegicus miR1249, 配列番号18)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0017848 (rno-miR-3568, Rattus norvegicus miR3568, 配列番号21)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0001626 (rno-miR-431, Rattus norvegicus miR431, 配列番号28)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0017898 (rno-miR-3594-5p, Rattus norvegicus miR 3594-5p, 配列番号30)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0017855 (rno-miR-1188-3p, Rattus norvegicus miR 1188-3p, 配列番号31)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0012857 (rno-miR-678, Rattus norvegicus miR678, 配列番号34)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0012827 (rno-miR-1224, Rattus norvegicus miR1224, 配列番号35)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0017807 (rno-miR-3549, Rattus norvegicus miR3549, 配列番号49) ; および
- 4) 前記の工程3)の遺伝子産物を対照群と比較して発現の程度を確認する工程を含むヘキサナールへの曝露有無を確認する方法を提供する。

【0039】

前記の工程2)のプライマーは、マイクロRNAを増幅することができるプライマーであることが好ましいが、これに限定されない。

【0040】

したがって、本発明のバイオマーカーは、ヘキサナールに特異的に遺伝子発現が増加または減少するので、ヘキサナールの曝露をモニタリングおよび判定するのに有用に用いることができる。

【0041】

【表 3】

ラットモデルでの3種の濃度（低濃度、中濃度、高濃度）のヘキサナール曝露によって
共通に発現変化を示すマイクロRNA

アクセッション 番号	組織名	濃度		
		低濃度	中濃度	高濃度
MIMAT0000838	rno-miR-132-3p	2.26	3.02	1.85
MIMAT0017369	rno-miR-667-5p	0.13	0.3	0.13
MIMAT0003119	rno-miR-224-5p	0.33	0.27	0.08
MIMAT0017878	rno-miR-3585-5p	0.56	0.43	0.25
MIMAT0004726	rno-miR-101a-5p	0.41	0.49	0.39
MIMAT0003201	rno-miR-382-5p	0.5	0.5	0.5
MIMAT0000861	rno-miR-184	0.34	0.34	0.34
MIMAT0017139	rno-miR-181b-1-3p	0.43	0.43	0.43
MIMAT0012846	rno-miR-201-5p	0.46	0.35	0.24

MIMAT0003198	rno-miR-376a-3p	0.28	0.28	0.28
MIMAT0000855	rno-miR-153-3p	0.32	0.32	0.32
MIMAT0024851	rno-miR-1306-5p	0.64	0.64	0.64
MIMAT0000901	rno-miR-299a-5p	0.54	0.54	0.54
MIMAT0000561	rno-miR-327	0.47	0.47	0.32
MIMAT0017872	rno-miR-3582	0.24	0.24	0.24
MIMAT0024845	rno-miR-3068-5p	0.28	0.28	0.28
MIMAT0017028	rno-miR-326-5p	0.51	0.51	0.51
MIMAT0017892	rno-miR-1249	0.29	0.26	0.25
MIMAT0005312	rno-miR-411-5p	0.3	0.3	0.3
MIMAT0000896	rno-miR-292-5p	0.73	0.73	0.73
MIMAT0017848	rno-miR-3568	0.72	0.72	0.72
MIMAT0003177	rno-miR-541-5p	0.62	0.62	0.62
MIMAT0000587	rno-miR-341	0.34	0.34	0.34
MIMAT0017175	rno-miR-421-3p	0.48	0.48	0.48
MIMAT0017304	rno-miR-411-3p	0.36	0.36	0.36
MIMAT0000865	rno-miR-190a-5p	0.34	0.11	0.11
MIMAT0017229	rno-miR-664-2-5p	0.25	0.25	0.25
MIMAT0001626	rno-miR-431	0.64	0.64	0.64
MIMAT0003199	rno-miR-381-3p	0.24	0.24	0.24
MIMAT0017898	rno-miR-3594-5p	0.62	0.62	0.62
MIMAT0017855	rno-miR-1188-3p	0.48	0.48	0.48
MIMAT0003194	rno-miR-376c-3p	0.62	0.62	0.62
MIMAT0000577	rno-miR-337-3p	0.29	0.29	0.29
MIMAT0012857	rno-miR-678	0.23	0.33	0.18
MIMAT0012827	rno-miR-1224	0.64	0.63	0.66
MIMAT0025054	rno-miR-6317	0.74	0.74	0.74
MIMAT0024848	rno-miR-1843-3p	0.22	0.2	0.12
MIMAT0017151	rno-miR-200a-5p	0.36	0.36	0.36
MIMAT0017192	rno-miR-433-5p	0.65	0.65	0.65
MIMAT0004717	rno-miR-29b-2-5p	0.68	0.68	0.68
MIMAT0005301	rno-miR-188-5p	0.62	0.6	0.63
MIMAT0017306	rno-miR-425-3p	0.47	0.47	0.47
MIMAT0003121	rno-miR-483-3p	0.44	0.44	0.44
MIMAT0025073	rno-miR-6332	0.35	0.39	0.15
MIMAT0000780	rno-miR-7b	0.44	0.44	0.44
MIMAT0017163	rno-miR-221-5p	0.41	0.41	0.41
MIMAT0017904	rno-miR-328b-3p	0.7	0.7	0.7
MIMAT0017131	rno-miR-145-3p	0.23	0.3	0.11
MIMAT0017807	rno-miR-3549	0.72	0.72	0.72

10

20

30

40

MIMAT0017089	rno-let-7f-1-3p	0.75	0.75	0.75
MIMAT0004733	rno-miR-136-3p	0.27	0.27	0.27
MIMAT0017201	rno-miR-483-5p	0.63	0.58	0.54
MIMAT0025051	rno-miR-3102	0.39	0.44	0.3
MIMAT0025050	rno-miR-6315	0.23	0.23	0.23
MIMAT0000887	rno-miR-217-5p	0.68	0.68	0.68
MIMAT0025057	rno-miR-3075	0.45	0.45	0.45

【0042】

10

また、本発明は、ヘキサナール曝露に対するマイクロRNA発現有無確認用キットを提供する。

【0043】

本発明は、前記本発明で作製したマイクロRNAマイクロアレイチップを含むヘキサナール曝露に対するマイクロRNA発現有無確認用キットを提供する。

【0044】

前記確認用キットにラット肺組織を追加的に含むヘキサナール曝露に対するマイクロRNA発現有無確認用キットを提供する。前記ラット肺組織は、Fischer344 (SD系) ラットの肺組織であり、対照群と実験群のグループから得られるものを使用することが好ましい。

【0045】

20

前記キットに追加的に蛍光物質を含むことができ、前記蛍光物質は、ストレプトアビジンコンジュゲートアルカリ性ホスファターゼ (streptavidin-like phosphatase conjugate)、化学蛍光物質 (chemifluorescence) と化学発光物質 (chemiluminescent) からなる群から選択されることが好ましいが、これに限定されるものではなく、本発明の好ましい実施例では、Cy3を用いた。

【0046】

前記キットに追加的に反応試薬を含むことができ、前記反応試薬は、混成化に用いる緩衝溶液、蛍光染料の化学的誘導剤のような標識試薬、洗浄緩衝液などで構成することができるが、これに限定されるものではなく、当業者に公知のマイクロRNAマイクロアレイチップの混成化反応に必要な反応試薬はすべて含ませることができる。

30

【実施例】

【0047】

以下、本発明を実施例に詳細に説明する。

【0048】

ただし、下記の実施例は、本発明を例示するものに過ぎず、本発明の内容が下記の実施例に限定されるものではない。

【0049】

<実施例1>動物モデル選定と化学物質曝露

<1-1>ラットモデル選定および化学物質の処理

本発明者らは、既存の研究と報告を通じてヘキサナール曝露実験のための適正な動物モデルとしてFischer344 (SD系) ラットを選定し、既存の文献で報告されたアルデヒドを用いたラットモデルの曝露実験結果とヘキサナールの物理化学的特性による飽和濃度、ガス発生器の特徴を考慮して、曝露濃度を600ppm、1000ppm、1,500ppmに選定した。曝露方法は、鼻部曝露吸引装置 (Nose-only inhalation chamber) を用いた反復吸入方式を選択して、5週間吸入させた。対照物質には、フィルター透過クリーンエアを用いて、1日1回、1回当たり約4時間曝露して、試験物質であるヘキサナールもまた、1日1回、1回当たり約4時間、合計20回曝露させた。

40

【0050】

<1-2>肺組織試料

ラットから摘出した肺組織を重量測定した後、RNA抽出に適切な量にカットしてクライ

50

オチューブ (cryo tube) に入れた。得られた肺組織は、液体窒素を用いてスナップフローズン (snap frozen) した後、 -80°C で保管した。

【0051】

<実施例2>マイクロアレイ実験

<2-1>標的マイクロRNAの分離と蛍光物質標識

ヘキサナール曝露群と非曝露群の肺組織からのRNA抽出は、トリゾール (trizol) 試薬 (Invitrogen life technologies, 米国) を用い、製造社の方法にしたがってマイクロRNAを含む全体RNAを分離した。ゲノムDNAは、RNA精製中にRNase-free DNase set (Qiagen, 米国) を用いて除去した。各全体RNA試料の濃度は、分光光度計であるNanoDrop ND1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., 米国) を用いて測定し、純度はExperion (Automated Electrophoresis station, Bio-Rad) で確認した。

10

【0052】

<2-2>標識されたマイクロRNAの製造

オリゴマイクロアレイ分析のために、前記実施例<2-1>で得られたヘキサナール曝露群全体RNAに蛍光物質を標識した。蛍光標識は、Agilent社のmiRNA complete labeling and Hybridization kitを用いて製造社の方法にしたがって行った。前記の得られた全体RNA $2\mu\text{l}$ (100ng) に $0.4\mu\text{l}$ の10X CIPバッファー、 $1.1\mu\text{l}$ のヌクレアーゼ・フリー水、 $0.5\mu\text{l}$ のCalf Intestinalホスファターゼを入れて 37°C で30分間反応させた後、 $2.8\mu\text{l}$ の100%DM SOを添加して100%で5~10分間反応させ、すぐに氷に移した。染料 (Dye) を標識させるために $1\mu\text{l}$ の10X T4 RNAリガーゼバッファー、 $3\mu\text{l}$ のCyanine3-pCp、 $0.5\mu\text{l}$ のT4 RNA ligaseを入れて 16°C で2時間反応させた。前記ラベリング (labeling) された試料は、Micro Bio-Spin6 columnを使用して精製した。精製したRNAは、 55°C のvacuum concentratorで完全に乾燥させて $18\mu\text{l}$ のヌクレアーゼ・フリー水で溶解した後、 $4.5\mu\text{l}$ の10X GE Blocking Agentを入れて $22.5\mu\text{l}$ の2X Hi-RPMハイブリダイゼーションバッファーを入れた。準備された試料は、 100°C で5分間反応させてすぐに氷に移し、5分間反応させた後、混成化反応に用いた。

20

【0053】

<2-3>混成化反応

混成化及び洗浄過程は、(株) イバイオジェンの指示方法にしたがって行なった。混成化は、20時間 55°C のオープンで行った。DNAマイクロアレイチップには、Rat miRNA array v19.0 (8 x 15k) (Agilent, 米国) を用いた。

30

【0054】

<2-4>蛍光画像の取得と遺伝子スクリーニング

スライド上の混成化画像は、Agilent C scanner (Agilent technologies, 米国) でスキャンし、抽出されたデータは、Agilent GeneSpring GX12.6.1 (Agilent technologies) を用いてnormalizationを経て、各マイクロRNAの発現様相を分析した。

【0055】

その結果、オリゴチップ上に存在する約719個のマイクロRNAの中で対照群に比べてヘキサナール曝露群のグループで有意に発現変化を示したマイクロRNAを、GeneSpring GX12.6.1 softwareを用いて対照群と実験群のマイクロRNA発現様相を分析した結果、発現が1.3倍以上に増加したマイクロRNAが22種、減少したマイクロRNAが316種で総338種であった (表2及び図1)。これらのマイクロRNAは、ヘキサナールの人体曝露時、毒性与関連しているという報告はない。低濃度処理群では、86種 (1種が発現増加、85種が発現減少) のマイクロRNA、中濃度処理群では、86種 (18種が発現増加、68種が発現減少) のマイクロRNA、高濃度処理群では、166種 (3種が発現増加、163種が発現減少) のマイクロRNAが、ヘキサナール曝露によって発現が変化したことを確認することができた (表2)。

40

【0056】

前記のマイクロRNA発現データを用いて、3種類の濃度のヘキサナール処理群で共通して発現変化を示す56種 (1種が発現増加、55種が発現減少) のマイクロRNAを選別した (図2および表3)。併せて、前記遺伝子は、本発明で使用したヘキサナールを処理した時、ラ

50

ットの肺組織で毒性と関連があるという報告はなかった。

【0057】

<実施例3>リアルタイムRT-PCR (Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction) 定量確認

前記マイクロアレイの結果からヘキサナールの3種類の曝露濃度によって共通して発現が変化した前記<実施例2>遺伝子のうち、10種の遺伝子[マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0000861 (rno-miR-184, Rattus norvegicus miR 184, 配列番号7)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0000561 (rno-miR-327, Rattus norvegicus miR327, 配列番号14)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0017892 (rno-miR-1249, Rattus norvegicus miR 1249, 配列番号18)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0017848 (rno-miR-3568, Rattus norvegicus miR3568, 配列番号21)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT001626 (rno-miR-431, Rattus norvegicus miR 431, 配列番号28)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0017898 (rno-miR-3594-5p, Rattus norvegicus miR 3594-5p, 配列番号30)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0017855 (rno-miR-1188-3p, Rattus norvegicus miR 1188-3p, 配列番号31)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0012857 (rno-miR-678, Rattus norvegicus miR678, 配列番号34)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0012827 (rno-miR-1224, Rattus norvegicus miR1224, 配列番号35)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0017807 (rno-miR-3549, Rattus norvegicus miR3549, 配列番号49)]の発現変化の程度を調査し、定量するために、My IQリアルタイムPCR (My IQ Real-time PCR) (Bio-rad, 米国) を用いて、定量的リアルタイムRT-PCRを実施した。

【0058】

具体的には、前記実施例<2-1>で得られた全体RNAとmiScript RT kit (Qiagen, 米国) を用いて製造社の方法にしたがってcDNAを合成した。前記cDNAをmiScript SYBR Green PCR kit (Qiagen, 米国) を用いて下記の<表4>のように試薬を混合した後、PCRチューブに入れて、工程1: 95℃、15分; 工程2 (40回反復): 工程2-1: 94℃、15秒; 工程2-2: 55℃、30秒; 工程2-3: 70℃、30秒のプログラムを設計したMy IQリアルタイムPCR機械で反応を行った。PCR産物を定量するために、サイバークリーン (SYBR Green) で染色した。サイバークリーン染色は、二重らせんDNAに結合する染色法で、PCR過程中に二重らせんDNAが生成されるほど蛍光強度 (fluorescence intensity) が増加することになる。まず、PCRに用いた標的遺伝子と内在性 (endogenous) 対照群 (RNU6B) のプライマーをサイバークリーンマスターミックス (Master mix) に添加してPCRを実施した後、適切な濃度を選択するプライマー適合理化 (primer optimization) 過程を行なった。合成されたcDNA試料と、それぞれのプライマー (表5) を混合して、サイバークリーンマスターミックスを添加した後、PCRを行ない、定量ソフトウェアを用いて分析した。

【0059】

【表4】

構成	反応当りの体積 (μ l)
cDNA	0.2
ヌクレアーゼ・フリー水	3.8
10 X miScript ユニバーサルプライマー	1
miScript プライマー (ターゲットプライマー)	1
SYBR PCRマスターミックス	5

【0060】

その結果、図3に示すように、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0000861 (rno-miR-184, Rattus norvegicus miR184, 配列番号7)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT

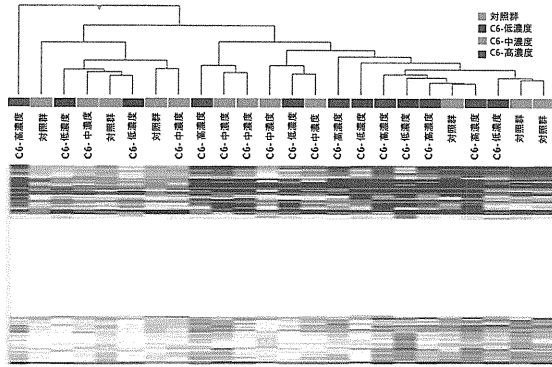
0000561 (rno-miR-327, Rattusnorvegicus miR327, 配列番号14)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0017892 (rno-miR-1249, Rattus norvegicus miR1249, 配列番号18)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0017848 (rno-miR-3568, Rattusnorvegicus miR3568, 配列番号21)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0001626 (rno-miR-431, Rattus norvegicus miR431, 配列番号28)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0017898 (rno-miR-3594-5p, Rattus norvegicus miR 3594-5p, 配列番号30)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0017855 (rno-miR-1188-3p, Rattus norvegicus miR 1188-3p, 配列番号31)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0012857 (rno-miR-678, Rattus norvegicus miR678, 配列番号34)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0012827 (rno-miR-1224, Rattus norvegicus miR1224, 配列番号35)、マイクロRNA登録番号 (miRbase) MIMAT0017807 (rno-miR-3549, Rattus norvegicus miR3549, 配列番号49) の発現は、前記実施例<2-4>のマイクロアレイチップの結果と非常に類似して表れることを確認した (図3)。

【0061】

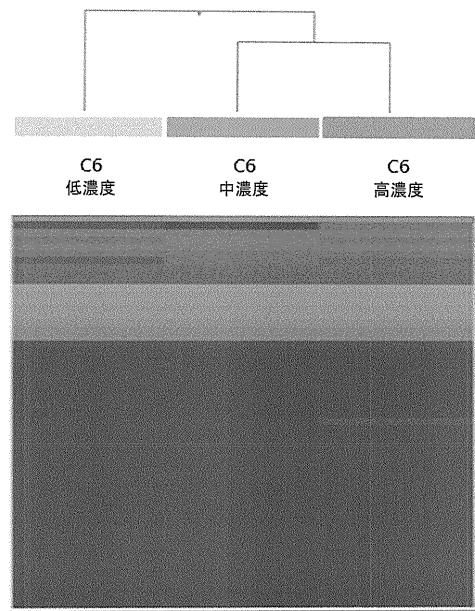
【表5】

アクセッション番号	組織名	成熟マイクロRNAプライマー配列 (5' ->3')
MIMAT0000861	rno-miR-184	UGGACGGAGAACUGAUAAGGGU
MIMAT0000561	rno-miR-327	CCUUGAGGGGCAUGAGGGU
MIMAT0017892	rno-miR-1249	ACGCCCUCUUUUUUUUUUUUA
MIMAT0017848	rno-miR-3568	UGUUCUUCCCGUGCAGAAGCAG
MIMAT0001626	rno-miR-431	UGUCUUGCAGGCCGUCAUGCA
MIMAT0017898	rno-miR-3594-5p	CCCAGGGCAGAGCAGUGUGAA
MIMAT0017855	rno-miR-1188-3p	CGAGGCUUUUUACCACA
MIMAT0012857	rno-miR-678	GUCUCGGGGCAAGGACUGGAGG
MIMAT0012827	rno-miR-1224	GUGAGGACUGGGGAGGUGGAG
MIMAT0017807	rno-miR-3549	AUCUUGCCCGCAAAGACCC

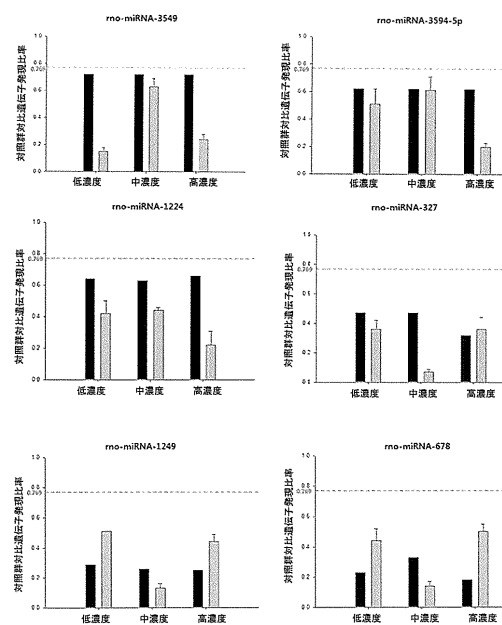
【図 1】



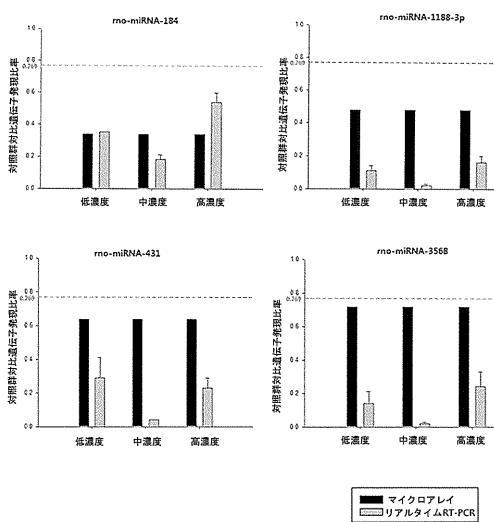
【図 2】



【図 3 a】



【図 3 b】



【配列表】

0005985676000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100188271

弁理士 塚原 優子

(72)発明者 リュ, ジェーチュン

大韓民国, 110-809 ソウル, チョンノーク, ドンスン 3-ギル, カンミョン ガーデン
レジデンス 8, エードン ナンバー 3

(72)発明者 チョ, ユン

大韓民国, 136-791 ソウル, ソンブクーク, ファランーロ 14-ギル, 5

(72)発明者 ソン, ミーキョン

大韓民国, 136-791 ソウル, ソンブクーク, ファランーロ 14-ギル, 5

(72)発明者 チョン, スン チャン

大韓民国, 136-791 ソウル, ソンブクーク, ファランーロ 14-ギル, 5

(72)発明者 リ, キュホン

大韓民国, 580-185 チョルラブクード, チョンウプーシ, ベカク 1-ギル, 30

審査官 西 賢二

(56)参考文献 米国特許出願公開第2013/0324429 (US, A1)

Agilent Human, Mouse, Rat, and Custom miRNA Microarrays, Agilent Technologies, Inc.,
2014年10月 8日, pp. 1-4

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C12Q 1/00-3/00

MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)