

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006 年 6 月 29 日 (29.06.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/068111 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/JP2005/023317
- (22) 国際出願日: 2005 年 12 月 20 日 (20.12.2005)
- (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 2004-371948
2004 年 12 月 22 日 (22.12.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立
大学法人東京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO)
[JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷 7 丁目 3 番
1 号 Tokyo (JP). 株式会社ハプロファーマ (HAPLO
PHARMA INC.) [JP/JP]; 〒7700037 徳島県徳島市南
佐古七番町 3 番 8 - 1 0 1 号 Tokushima (JP). シミツ
ク株式会社 (CMIC CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1410031 東
京都品川区西五反田 7 丁目 1 0 番 4 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): 油谷 浩幸
(ABURATANI, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文
京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内
Tokyo (JP). 石川 俊平 (ISHIKAWA, Shumpei) [JP/JP];
〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大
学法人東京大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒
1050001 東京都港区虎ノ門 4 丁目 3 番 2 0 号 神谷町
MT ビル 1 9 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, 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 (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部
分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF DETERMINING PHENOTYPE ASSOCIATED WITH GENETIC POLYMORPHISM OF PPAR γ GENE

(54) 発明の名称: P P A R γ 遺伝子の遺伝子多型に関連する表現型の判定方法

(57) Abstract: A genetic polymorphism for distinguishing alleles with different expression levels from each other in PPAR γ gene. Further, there is provided a method of determining a phenotype associated with a genetic polymorphism of PPAR γ gene.

(57) 要約: 本発明は、P P A R γ 遺伝子における発現量が異なるアレルを識別するための遺伝子多型、及び P P A R γ 遺伝子の遺伝子多型に関連する表現型の判定方法に関する。

WO 2006/068111 A1

明 細 書

PPAR γ 遺伝子の遺伝子多型に関連する表現型の判定方法

技術分野

- [0001] 本発明は、PPAR γ 遺伝子における発現量が異なるアレルを識別するための遺伝子多型、及びPPAR γ 遺伝子の遺伝子多型に関連する表現型の判定方法に関する。

背景技術

- [0002] ゲノムの同じ位置にある同じ遺伝子であっても、それが異なるアレル上にある場合にその遺伝子発現量に差が見られる現象は、近年報告されている比較的新しい概念である(非特許文献1:Knight JC. Allele-specific gene expression uncovered. Trends Genet. Mar;20(3):113-6. PMID: 15049300、2004年)。
- [0003] アレル間で異なる発現を示す遺伝子というのは大きく分けて刷り込みを受ける遺伝子(imprinted gene)と刷り込みを受けない遺伝子(non-imprinted gene)の2種類がある。前者は、刷り込み(imprinting)といって、ある細胞若しくは組織において、両親から片アレルずつ受け継いだ場合にどちらか一方が生理的にメチル化などの不活化を受けて発現が抑制されるという現象である。後者、すなわち刷り込みを受けない遺伝子(non-imprinted gene)においても、アレル間で異なる発現差が見られる場合がある。これは、遺伝子内若しくはそれに近接しているアレル間のゲノムの多型が、近傍の遺伝子の発現を調節するシス作用領域(cis-acting element)として働き、アレル間の遺伝子発現量の差を生み出すと考えられている。後者に見られる、ゲノムDNAの配列の違いに起因するアレルごとの発現の変化は、世代を超えて引き継がれる性質と考えられ、個体間の遺伝子発現量の差、ひいては個人の体質の差、病態とそのリスク、また薬剤の応答性の違いに影響することが考えられる。従って、このようなアレル間で発現量が異なる遺伝子は疾患又は障害などの表現型と関係する可能性がある。
- [0004] 一方、ヒトのペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR γ 又はPPARG) は、糖尿病、肥満、虚血性心疾患、炎症、脂質代謝に関わる疾患、腫瘍などの疾患

と関連していること、また薬剤アクトス(塩酸ピオグリタゾン)に対する薬剤応答性と関連していることが報告されている(非特許文献2:公共データベースOMIN(on-line mendelian inheritance in man) インターネット(URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=601487>))。従って、PPAR γ 遺伝子の多型又はその発現量と形質発現との関連性を調べることができれば、疾患の原因や有効な治療法などを検討することができると考えられる。

発明の開示

- [0005] そこで、本発明は、上述した実状に鑑み、PPAR γ 遺伝子の遺伝子多型又は発現量を利用してPPAR γ 遺伝子に関連した表現型を判定する方法を提供することを目的とする。
- [0006] 本発明者は、上記課題を解決するため、アレル間で発現量が異なる遺伝子を判定することができる遺伝子多型を検索するための方法を開発し、実際に当該方法を実施したところ、ヒトのペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ 遺伝子がアレル間で発現量が異なることを見出し、また、各アレルからの発現量の違いを判定することができる遺伝子多型を見つけることができ、本発明を完成するに至った。
- [0007] すなわち、本発明は、以下のいずれかのステップを含む、PPAR γ 遺伝子に関連した疾患の存在の可能性若しくは発症リスク、又はPPAR γ 遺伝子に関連した薬剤応答性の判定方法である：
- (a) 試料中のペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR γ) 遺伝子の核内RNA(一次転写産物)又はmRNAから増幅したcDNAを用いて、PPAR γ 遺伝子の遺伝子多型をタイピングするステップ、
 - (b) 試料中のペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR γ) 遺伝子のゲノムDNAを用いて、PPAR γ 遺伝子の遺伝子多型をタイピングするステップ、
 - (c) 試料中のペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR γ) 遺伝子の発現量を測定するステップ。
- [0008] 上記判定方法において、PPAR γ 遺伝子の遺伝子多型は、一塩基多型rs10510410、rs10510411及びrs10510410、並びに該一塩基多型の近傍に存在する遺伝子多型及び該一塩基多型と連鎖不均衡にある遺伝子多型からなる群より選択され

る少なくとも1つの多型とすることができる。

[0009] またタイピングしたrs10510410、rs10510411及びrs10510412の遺伝子多型がそれぞれCC、AA及びAAのホモ接合体である場合には、例えばPPAR γ 遺伝子の過剰発現に関連した疾患の存在の可能性若しくは発症リスク、又はPPAR γ 遺伝子の過剰発現に関連した薬剤応答性があると判定する。

[0010] ここで、PPAR γ 遺伝子に関連した疾患としては、限定されるものではないが、糖尿病、肥満、虚血性心疾患、炎症、脂質代謝にかかわる疾患、及び腫瘍などが挙げられる。

[0011] また、上記判定方法において、PPAR γ 遺伝子に関連した薬剤応答性は、例えばアクトス(塩酸ピオグリタゾン)に対する応答性である。

[0012] 本発明により、PPAR γ 遺伝子に関連した表現型を判定する方法が提供される。すなわち、PPAR γ 遺伝子に関連した疾患の存在の可能性や発症リスク、又はPPAR γ 遺伝子に関連した薬剤応答性を判定することが可能となる。本発明に従って疾患の存在や薬剤応答性を判定することによって、疾患の早期発見や有効な治療法の検討などを行うことができるため、本発明は医療及び薬学分野において有用である。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]PPAR γ 遺伝子上のSNPの位置を示す図である。

[図2]ダイレクト・シーケンス法を用いたSNPの確認の概要を示す図である。

[図3A]日本人30人の抹消血リンパ球のPPARG遺伝子の発現量と遺伝子多型のタイピングとの相関を示す図である。

[図3B]日本人30人の抹消血リンパ球のPPARG遺伝子の発現量と遺伝子多型のタイピングの度数分布を示す図である。

[図3C]PPARG遺伝子のハプロタイプMとmのアレルを示す図である。

発明を実施するための最良の形態

[0014] 以下、本発明を詳細に説明する。本願は、2004年12月22日に出願された日本国特許出願第2004-371948号の優先権を主張するものであり、上記特許出願の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

- [0015] 本発明者は、アレル間で発現量が異なる遺伝子を判定することができる遺伝子多型を検索するための方法を開発し、実際に当該方法を実施したところ、ヒトのペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR γ 又はPPARG) 遺伝子がアレル間で発現量が異なることを見出し、また、各アレルからの発現量の違いを判定することができる遺伝子多型を見つけることができた。そのため、PPAR γ 遺伝子の発現量、及びPPAR γ 遺伝子の遺伝子多型は、PPAR γ 遺伝子に関連する表現型、例えば疾患の存在や疾患の発症リスク、薬剤応答性に関係している可能性がある。
- [0016] ここで、PPAR γ 遺伝子は、公知の遺伝子であり、その転写産物(mRNA)の塩基配列はNM015869、NM005037、NM138711及びNM138712として登録されている。また、PPAR γ 遺伝子は、糖尿病、肥満、虚血性心疾患、炎症、脂質代謝にかかわる疾患、腫瘍(大腸癌、乳癌、前立腺癌、甲状腺癌、脳腫瘍、血液腫瘍、下垂体腫瘍等)などの疾患と関連していることが報告されている。またPPAR γ 遺伝子は、薬剤アクトス(塩酸ピオグリタゾン)に対する薬剤応答性と関連していることが報告されている。PPAR γ 遺伝子の機能及び性質については、公共データベースOMIM(on-line mendelian inheritance in man) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=601487>)を参照されたい。
- [0017] 従って、本発明に係る方法は、PPAR γ 遺伝子の発現量を測定するか、又はPPAR γ 遺伝子の遺伝子多型をタイピングし、その結果に基づいて、PPAR γ 遺伝子に関連する疾患の存在若しくは疾患の発症リスク、又は薬剤応答性を判定するものである。ここで、「疾患の存在」とは、すでに疾患に罹患していることを意味する。また、「発症リスク」とは、疾患への罹りやすさ(感受性)又は罹りにくさ(抵抗性)を意味し、「発症リスクが高い」とは、他の被験者と比較して、特定の多型を有する被験者が疾患を発症する確率が高いことを意味し、一方「発症リスクが低い」とは、他の被験者と比較して、特定の多型を有する被験者が疾患を発症する確率が低いことを意味する。また、「薬剤応答性」とは、薬剤に対する被験者の応答性を意味し、例えば、薬剤に対して顕著な効果を示す被験者(good responder)、薬剤の有効性が低い被験者(poor responder)及び薬剤の効果を全く示さない被験者(non responder)に分類することができる。

[0018] 本方法は、具体的には以下のいずれかのステップを含むものである：

- (a) 試料中のペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR γ) 遺伝子の核内RNA (一次転写産物) 又はmRNAから増幅したcDNAを用いて、PPAR γ 遺伝子の遺伝子多型をタイピングするステップ、
- (b) 試料中のペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR γ) 遺伝子のゲノムDNAを用いて、PPAR γ 遺伝子の遺伝子多型をタイピングするステップ、
- (c) 試料中のペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR γ) 遺伝子の発現量を測定するステップ。

[0019] 本方法において、試料は、ヒト被験者に由来する生物学的試料であれば特に限定されるものではなく、例えば血液、唾液、リンパ液、気道粘液、骨髄液、尿、腹腔液等の体液、細胞、組織等である。PPAR γ 遺伝子は血球系、脂肪細胞などで発現されることが多いため、そのような細胞が含まれる試料を用いることが好ましい。

[0020] 核内RNA又はmRNAからのcDNAの合成は、当技術分野で公知の方法に従って行うことができる。ここで「核内RNA」とは、ゲノムDNAから転写された後、スプライシングを受けておらず、そのため細胞質には移行せず、まだ核内に存在している一次転写産物 (primary transcript) をいう。すなわち、核内RNAは、ゲノム上のエキソン及びイントロンの両方を含み、長い鎖長を有するものが多い。例えば、試料から総RNA、細胞質RNA又は核内RNAを抽出した後、得られたRNAからPPAR γ 遺伝子に特異的なcDNA合成用プライマーを使用して選択的にcDNAを合成してもよいし、あるいは得られたRNAからランダムプライマー又はポリTプライマーを使用してcDNAを合成した後、PPAR γ 遺伝子に特異的な増幅用プライマーを使用して選択的にcDNAを増幅することができる。RNAの抽出は当技術分野で公知の方法、例えば、総RNAを抽出する場合には、AGPC (酸グアニジウム-フェノール-クロロホルム) 法などを用いて行うことができる。またPPAR γ 遺伝子の合成用プライマー又は増幅用プライマーの設計は、当技術分野で公知の一般的なプライマー設計法に従って行うことができる。

[0021] ゲノムDNAの抽出は、当技術分野で公知の方法 (フェノール・クロロホルム法など) 又は市販のキットを用いて行うことができる。

- [0022] cDNA又はゲノムDNAにおける遺伝子多型(SNP又はハプロタイプなど)のタイピング(検出)は、当技術分野で公知の手法を用いて行うことができる。例えば、遺伝子多型のタイピングは、一の遺伝子多型に特異的なプローブとのハイブリダイゼーションにより行うことができる。プローブは、必要に応じて、蛍光物質や放射性物質等の適当な手段により標識することができる。プローブは、遺伝子多型部位を含み、cDNAと特異的にハイブリダイズするものである限りいかなるものでもよく、具体的なプローブの設計は当技術分野で公知である。また、ハイブリダイゼーションの条件も、遺伝子多型を区別するのに十分な条件であればよく、例えば一の遺伝子多型の場合にはハイブリダイズするが、他の遺伝子多型の場合にはハイブリダイズしないような条件、例えばストリンジェントな条件であり、このような条件は当業者に公知である。
- [0023] プローブは、一端を基板に固定してDNAチップ(マイクロアレイ)として用いることもできる。この場合、DNAチップには、一の遺伝子多型に対応するプローブのみが固定されていても、両方の遺伝子多型に対応するプローブが固定されていてもよい。このようなDNAチップを用いた遺伝子多型の検出は、例えば「DNAマイクロアレイと最新PCR法」、村松正明及び那波宏之監修、秀潤社、2000年、第10章などに記載されている。
- [0024] DNAチップを用いた遺伝子多型の検出の具体的な例として、Affymetrix社製のGeneChip(登録商標) Human Mapping 100K arrayを用いる方法について説明する。GeneChip(登録商標) Human Mapping 100K arrayは、2枚のアレイを含み、ゲノム上に存在する100,000個を超えるSNPの検出を行うことができるアレイである。使用方法は、試料(ゲノム、cDNAなど)を制限酵素(XbaI若しくはHindIII)で切断し、アダプターをつけて、そのアダプターに特異的な1種類のプライマー(XbaI、HindIIIについてそれぞれ1種類ずつ)を用いてPCR反応により増幅し、ラベリングを行う。2枚のアレイは各SNPのアレルごとに相補的になるように設計されており、ハイブリダイゼーション後、シグナルに基づいて試料のSNPを判定し、また各アレルの発現量をシグナル強度又はシグナル比に基づいて比較することができる。このDNAチップの詳細については、<http://www.affymetrix.co.jp/products/arrays/specific/100k.>及びhttp://www.affymetrix.co.jp/pdf/Mapping_100K.pdfで公開されている製品情報及び

データシートを参照されたい。

- [0025] また、遺伝子多型は、上述した以外にも、当業者に公知のあらゆる方法によってタイピングすることができる。そのような方法としては、遺伝子多型に特異的なプライマーを用いる方法、制限断片長多型(RFLP)を利用する方法、直接配列決定法、変性勾配ゲル電気泳動法(DGGE)、ミスマッチ部位の化学的切断を利用した方法(CCM)、プライマー伸長法(PEX)、インベダー(Invader)法、定量的リアルタイムPCR検出法(TaqMan法)等を用いることができる。
- [0026] 本方法においては、簡便かつ迅速に遺伝子多型をタイピングすることができるDNAチップ(マイクロアレイ)を使用することが好ましい。
- [0027] 本方法において、タイピングすべきPPAR γ 遺伝子の遺伝子多型としては、一塩基多型rs10510410、rs10510411及びrs10510412、並びにそれらの近傍に存在する遺伝子多型及びそれらと連鎖不均衡にある遺伝子多型からなる群より選択される少なくとも1つの多型である。好ましくは、rs10510410、rs10510411及びrs10510412からなるハプロタイプをタイピングすることが好ましい。ここで、2004年4月に報告されたHuman Genome Build34(<http://genome.ucsc.edu/>)によるとrs10510410は染色体3番の12321738番目に位置するA/CのSNPであり、rs10510411は染色体3番の12321849番目に位置するG/AのSNPであり、rs10510412は染色体3番の12321962番目に位置するG/AのSNPである。
- [0028] PPAR γ 遺伝子の一塩基多型rs10510410、rs10510411、及びrs10510412をタイピングするには、例えば上述したGeneChip(登録商標) Human Mapping 100K array(Affimetrix社製)を用いることができる。具体的には、限定するものではないが、下記のプローブを用いることができる：
- rs10510410:
- tagataaaaatatacttcacttcca[G/T]attacactcagagacaaccaaaggc(配列番号1)
- rs10510411:
- gttgctctttatgagacgaaataaa[A/G]ttggatgtcacttataaatggattt(配列番号2)
- rs10510412:
- ttaggagttattcaacaagccatta[C/T]gcttacaaaaatttatgagtcaaag(配列番号3)

また、上記遺伝子多型の近傍に存在する遺伝子多型とは、上記遺伝子多型から、約30,000kb以内、好ましくは約10,000kb以内に位置する遺伝子多型である。このような近傍に存在する遺伝子多型は、染色体組換え時に一緒に組換わる確率が高い。また、上記遺伝子多型と連鎖不均衡にある遺伝子多型とは、上記遺伝子多型と関連性のある遺伝子多型であり、具体的には、上記遺伝子多型がXである場合には、常に別の遺伝子多型がYとなるという関係が成立するようなものである。

[0029] 上記rs10510410、rs10510411及びrs10510412の遺伝子多型がそれぞれC、AA及びAAのホモ接合体である場合には、PPAR γ 遺伝子の発現量が多いという結果が得られたため(実施例2)、当該ホモ接合体を有する被験者は、PPAR γ 遺伝子の過剰発現に起因する疾患の存在の可能性若しくは発症リスクがある、またPPAR γ 遺伝子の過剰発現に関連した薬剤応答性があると判定することができる。

[0030] また本方法においては、PPAR γ 遺伝子の発現量を測定することにより、PPAR γ 遺伝子と関連する表現型を判定することもできる。このPPAR γ 遺伝子の発現量の測定においては、PPAR γ 遺伝子の転写産物(核内RNA又はmRNA)を測定してもよいし、又はPPAR γ 遺伝子によりコードされるタンパク質を測定してもよい。このような遺伝子発現量の測定は、当技術分野で周知であり、任意の方法により行うことができる。

[0031] 上記判定方法は、PPAR γ 遺伝子上の上記遺伝子多型を検出することができる手段を含むキットを用いることにより簡便に行うことができる。従って、本発明は、かかるPPAR γ 遺伝子に関連する疾患又は薬剤応答性の判定キットも包含する。PPAR γ 遺伝子上の遺伝子多型を検出することができる手段としては、上記遺伝子多型を有する核酸と特異的にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドプローブ、上記遺伝子多型を有する核酸を鋳型として特異的な増幅反応を行うことができるプライマーセット、制限断片長多型(RFLP)を利用する方法、直接配列決定法、変性勾配ゲル電気泳動法(DGGE)、ミスマッチ部位の化学的切断を利用した方法(CCM)、プライマー伸長法(PEX)、インバーダー(Invader)法、定量的リアルタイムPCR検出法(TaqMan法)等などが挙げられる。そのほか、判定キットは、ポリメラーゼ、バッファー、dNTP、標識及び検出用試薬(蛍光など)、説明書などを含んでもよい。

実施例

[0032] 以下、実施例を用いて本方法をより詳細に説明するが、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。

[0033] [実施例1]

本実施例においては、アレル間で発現量に差異のある遺伝子の検索を行った。

[0034] EBウイルスにて株化したリンパ球BL1395(ATCC CRL-5957)及びBL2122(ATCC CRL-5967)の総RNAそれぞれ1 μ gをDNAase処理をした後に逆転写酵素(Invitrogen社SuperscriptIII RT enzyme)を用いて、添付プロトコルどおり逆転写して1本鎖cDNAを作製した。得られた反応液20 μ lより1 μ lを精製なしに、Amersham Bioscienceより発売されている商品名Genomiphiのプロトコルどおりのランダムプライマー及びphi29酵素の入った反応溶液に添加し、30℃にて16時間の反応を行い、それぞれ2.34 μ g及び2.27 μ gの収量のcDNAを得た。

[0035] 増幅したcDNAを用いて、100Kアレイのプロトコル(Affimetrix) (http://www.affymetrix.com/support/downloads/manuals/100k_manual.pdf)にしたがって250ngから反応をスタートした。具体的には、増幅したcDNAと、同様にphi29で増幅したゲノムDNAとを、通常の100Kのプロトコルにしたがって増幅した後、そのシグナル強度の比(cDNAのシグナル強度/ゲノムDNAのシグナル強度)を取り、その度数分布を調べた。このようにしてシグナル強度の比を求めることにより、配列の差異が生み出す二次構造の差によってphi29によって増えやすい配列と増えにくい配列がある(増幅のバイアス)が、cDNAのシグナル値をphi29で増幅したゲノムのシグナル値で割ることによって、こうした増幅のバイアスを除くことができた。

[0036] その結果、シグナル比の低いところにはノイズと思われる正規分布曲線に近い形があらわれ、そこでは遺伝子のない領域に存在する遺伝子多型に基づくシグナル(プローブセット)が多かった。この度数分布の形及びプローブセットとゲノム上の遺伝子との位置関係から、このアッセイによって遺伝子(cDNA)由来のシグナルとノイズが分離出来ており、cDNAとゲノムとのシグナル比の測定によって、シグナル比の高い部分を、発現遺伝子(主に核内RNA由来のcDNA)によるシグナルであると考えてよいことがわかった。

[0037] このようにして一方のアレルと他方のアレルとの間の発現量の差異を、cDNA／ゲノム比を利用して比較したところ、ヒトペルオキシソーム増殖活性化受容体 γ (PPARG) 遺伝子に存在する3つの一塩基多型(SNP)において有意差があった。そのため、PPARG遺伝子のアレル間で発現量に差がある遺伝子として選択した。

[0038] [実施例2]

本実施例においては、PPARG遺伝子のアレル間の発現差を調べた。

[0039] 100Kアレイに含まれる50K XbaIアレイにはゲノム上のPPARG遺伝子領域に合計7箇所のSNPの位置にプローブセットが設計されている。実施例2で行ったリンパ球BL1395の解析では、上流に近い300bp以内に近接したrs10510411、rs10510411及びrs10510412(NCBI dbSNPデータベースID)の3つのSNPがゲノムのタイピングで多型で(すなわち二つのアレルが区別可能で)あった。この3つのSNPのPPARG遺伝子上の位置を図1に示す。図1中、白抜きの星印が、PPARG遺伝子のアレル間の発現量の差異を判定することができるSNP(informative SNP)である。

[0040] いずれの位置のSNPについても両アレル間の発現比(アレルAとアレルBとのcDNA／ゲノム比の比)は、表1に示すとおり4倍以上であった。

[表1]

SNP id	アレル間発現比
rs10510410	4.55
rs10510411	4.85
rs10510412	6.75

[0041] この3つのSNPを含む領域をダイレクト・シーケンス法によりアレルの存在比を確認した。その概要は図2に示すが、例えばBL1395のサンプルにおけるrs10510410の場合には、図のようにゲノムDNA(c)においてはA／Cのヘテロであり、それはphi29で増幅されたゲノムDNA(a及びb)においても変化はなかった。一方、phi29で増幅されたcDNAにおいてはアレルAからのシグナルが低下しほぼアレルCのみの波形になっている。すなわち、ゲノム上でrs10510410はA／Cのヘテロであるが、

実際に発現される遺伝子においてはCのアレルからの発現量が多いことがわかる。この結果は50K XbaIアレイの結果と一致していた。BL2122のリンパ球ではPPARG遺伝子の発現は認められなかった。

- [0042] またこの3つのSNPについて、日本人30人をダイレクト・シーケンス法によってタイピングし、抹消血リンパ球のPPARG遺伝子の発現との相関を調べた。すなわち、上記3つのSNPのタイプとPPARG遺伝子の発現量との関係について分析した。PPARG遺伝子の発現解析にはAmersham Bioscience社発現解析用アレイCodeLinkを通常のプロトコールどおりに使用し、各アレイの総プローブのシグナルを中央値が1となるように平均化した。
- [0043] その結果、図3A及び3B(表と度数分布)に示すように、検体は、日本人30人における存在頻度に応じて、rs10510411、rs10510411及びrs10510412においてそれぞれC型、A型及びA型である存在頻度の低いアレル(m)のホモ型、rs10510411、rs10510411及びrs10510412においてそれぞれA型、G型及びG型である存在頻度の高いアレル(M)のホモ型、並びにこれらのヘテロ型に分類することができた。存在頻度の低いアレルのホモ型(mm型とする。図3A及び3Bで網掛けで表示)ではそれ以外(mM及びMM型とする)のものに比して発現値が高く(mmの平均値1.58に対しそれ以外0.80)、特に発現の特に高い上位3検体のうち2検体でmmであった。
- [0044] 以上の結果から、これらのSNP(ハプロタイプ)の存在がPPARG遺伝子の発現量と相関し、個人のPPARG活性、PPARGとの関連が示唆される病気の診断、スクリーニング及びPPARGを標的とする薬剤の応答性を調べるためにこれらのSNPタイピングが有効であることが示された。
- [0045] またこれらの30人の検体で3箇所のSNP(rs10510411、rs10510411及びrs10510412)においてメジャーアレルMとマイナーアレルmの組み合わせが全て一致すること(図3A)より、3つのSNPは完全に連鎖不均衡の状態にあってハプロタイプを形成し、図3Cに示すように二つのハプロタイプM及びmが存在しハプロタイプmがPPARGの発現量の高いほうであると考えられた(図3A)。このハプロタイプ内及びそれと連鎖不均衡にある周辺のSNPを調べることによっても上記の目的が達成できると

考えられた。

産業上の利用の可能性

- [0046] 本発明により、PPAR γ 遺伝子に関連した表現型を判定する方法が提供される。すなわち、PPAR γ 遺伝子に関連した疾患の存在の明確化やそれらの疾患の治療薬の開発、PPAR γ 遺伝子に関連する薬剤による適応症の拡大や薬剤評価、新たな治療薬の開発、発症リスク診断、又はPPAR γ 遺伝子に関連した薬剤応答性を判定することが可能となる。本発明に従って疾患の存在や薬剤応答性を判定することによって、疾患の早期発見や診断、有効な薬剤の選択や副作用の予測、それに基づく治療法の検討などを行うことができるため、本発明は診断、医療及び医薬品産業において有用である。

配列表フリーテキスト

- [0047] 配列番号1:26番目のkはg又はtを表す
配列番号2:26番目のrはa又はgを表す
配列番号3:26番目のyはc又はtを表す
配列番号4~6:ヒトペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ の部分配列(配列番号6におけるnはg又はtを表す)

請求の範囲

[1] 以下のステップ:

(a) 試料中のペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR γ) 遺伝子の核内RNA (一次転写産物) 又はmRNAから増幅したcDNAを用いて、PPAR γ 遺伝子の遺伝子多型をタイピングするステップ、

(b) 試料中のペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR γ) 遺伝子のゲノムDNAを用いて、PPAR γ 遺伝子の遺伝子多型をタイピングするステップ、

(c) 試料中のペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR γ) 遺伝子の発現量を測定するステップ、

のいずれかのステップを含む、PPAR γ 遺伝子に関連した疾患の存在の可能性若しくは発症リスク、又はPPAR γ 遺伝子に関連した薬剤応答性の判定方法。

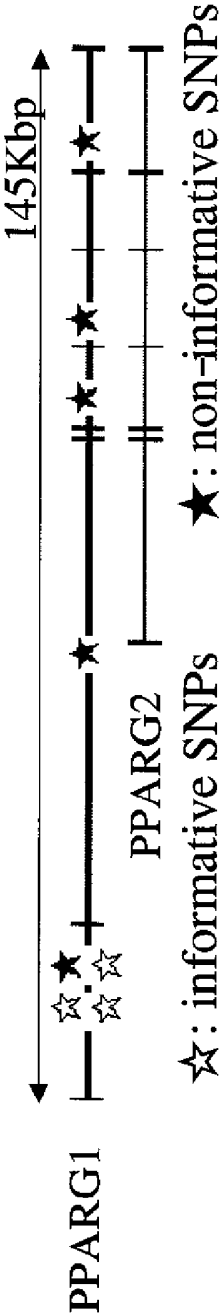
[2] PPAR γ 遺伝子の遺伝子多型が、一塩基多型rs10510410、rs10510411及びrs10510412、並びに該一塩基多型の近傍に存在する遺伝子多型及び該一塩基多型と連鎖不均衡にある遺伝子多型からなる群より選択される少なくとも1つの多型である、請求項1記載の方法。

[3] タイピングしたrs10510410、rs10510411及びrs10510412の遺伝子多型がそれぞれCC、AA及びAAのホモ接合体である場合に、PPAR γ 遺伝子の過剰発現に関連した疾患の存在の可能性若しくは発症リスク、又はPPAR γ 遺伝子の過剰発現に関連した薬剤応答性があると判定する、請求項2記載の方法。

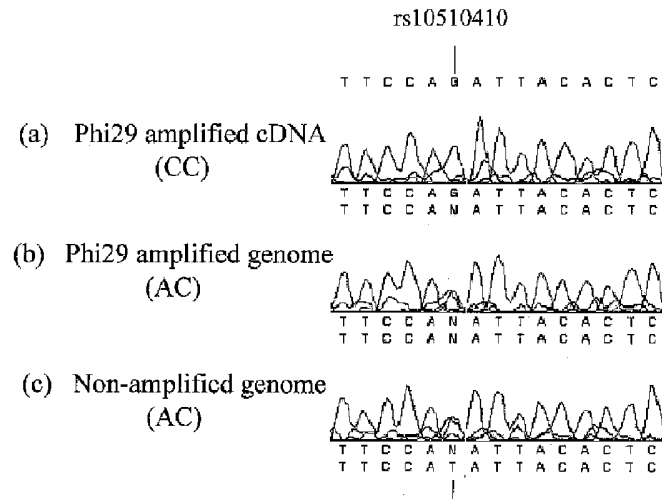
[4] PPAR γ 遺伝子に関連した疾患が、糖尿病、肥満、虚血性心疾患、炎症、脂質代謝にかかわる疾患、及び腫瘍からなる群より選択されるものである、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

[5] PPAR γ 遺伝子に関連した薬剤応答性がアクトス(塩酸ピオグリタゾン)に対する応答性である、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

[図1]



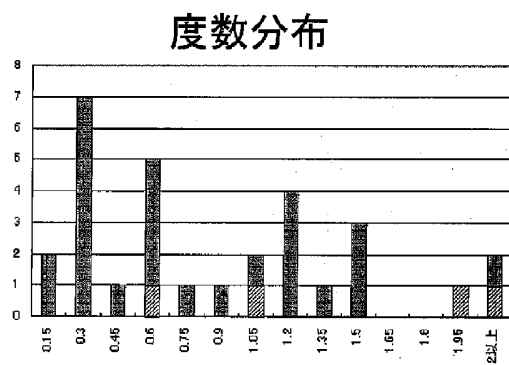
[図2]



[図3A]

	発現量	rs10510410	rs10510411	rs10510412
リンパ球1	3.87	AC	GA	GA
リンパ球2	2.89	AA	AA	AA
リンパ球3	1.95	CC	AA	AA
リンパ球4	1.49	AA	GG	GG
リンパ球5	1.47	AC	GA	GA
リンパ球6	1.39	AA	GG	GG
リンパ球7	1.24	AC	GA	GA
リンパ球8	1.19	AA	GG	GG
リンパ球9	1.10	AA	GG	GG
リンパ球10	1.10	AC	GA	GA
リンパ球11	1.09	AA	GG	GG
リンパ球12	1.00	CC	AA	AA
リンパ球13	0.97	AC	GA	GA
リンパ球14	0.80	AA	GG	GG
リンパ球15	0.63	AC	GA	GA
リンパ球16	0.60	AA	GG	GG
リンパ球17	0.54	AC	GA	GA
リンパ球18	0.53	AC	GA	GA
リンパ球19	0.52	AA	GG	GG
リンパ球20	0.48	CC	AA	AA
リンパ球21	0.37	AA	GG	GG
リンパ球22	0.28	AC	GA	GA
リンパ球23	0.28	AA	GG	GG
リンパ球24	0.27	AA	GG	GG
リンパ球25	0.21	AA	GG	GG
リンパ球26	0.20	AA	GG	GG
リンパ球27	0.18	AA	GG	GG
リンパ球28	0.16	AC	GA	GA
リンパ球29	0.15	AC	GA	GA
リンパ球30	0.10	AA	GG	GG

[図3B]



[図3C]

ハプロタイプm — C — A — A —
 ハプロタイプM — A — G — G —

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/023317

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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

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 (2006.01), *C12N15/00-15/00* (2006.01)

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

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

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	VALVE R. et al., Two polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene are associated with severe over weight among obese women, J.Clin.Endocrinol. Metab., 1999 October, 84(10), p.3708-12	1, 4 5 2, 3
X A	LIM S.Y. et al., Induction of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma during nitric oxide-induced apoptotic PC12 cell death, Ann.N.Y.Acad.Sci., 2003 December, 1010, p.648-58	1 2-5
X Y A	MULLER Y.L. et al., A functional variant in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 promoter is associated with predictors of obesity and type 2 diabetes in Pima Indians, Diabetes, 2003 July, 52(7), p.1864-71	1, 4 5 2, 3

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search
17 January, 2006 (17.01.06)Date of mailing of the international search report
24 January, 2006 (24.01.06)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/023317

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KOLEHMAINEN M. et al., Effect of the Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma2 gene on the expression of PPARGgamma target genes in adipose tissue of massively obese subjects, J.Clin.Endocrinol.Metab., 2003 April, 88(4), p.1717-22	1-5
Y	KNIGHT J.C. et al., Allele-specific gene expression uncovered, Trends Genet, 2004 March, 20(3), p.113-6	1-5
Y	ELBRECHT A. et al., Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2, Biochem.Biophys.Res. Commun., 16 July, 1996 (16.07.96), 224(2), p.431-7	1-5
Y	MOTOJIMA, K. et al., Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner, J.Biol.Chem., 03 July, 1998 (03.07.98), 273(27), p.16710-4	5

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

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

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/68(2006.01), C12N15/00-15/00(2006.01)

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

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)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus(JOIS)

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 請求の範囲の番号
X Y A	VALVE R et al., Two polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene are associated with severe overweight among obese women, J Clin Endocrinol Metab, 1999 Oct, 84(10), p. 3708-12	1, 4 5 2, 3
X A	LIM S Y et al., Induction of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma during nitric oxide-induced apoptotic PC12 cell death, Ann N Y Acad Sci, 2003 Dec, 1010, p. 648-58	1 2-5

☒ 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

17.01.2006

国際調査報告の発送日

24.01.2006

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伏見 邦彦

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

9838

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 請求の範囲の番号
X Y A	MULLER Y L et al., A functional variant in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 promoter is associated with predictors of obesity and type 2 diabetes in Pima Indians, Diabetes, 2003 Jul, 52(7), p. 1864-71	1, 4 5 2, 3
Y	KOLEHMAINEN M et al., Effect of the Prol2Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma2 gene on the expression of PPARgamma target genes in adipose tissue of massively obese subjects, J Clin Endocrinol Metab, 2003 Apr, 88(4), p. 1717-22	1-5
Y	KNIGHT J C et al., Allele-specific gene expression uncovered, Trends Genet, 2004 Mar, 20(3), p. 113-6	1-5
Y	ELBRECHT A et al., Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2, Biochem Biophys Res Commun, 1996 Jul 16, 224(2), p. 431-7	1-5
Y	MOTOJIMA K et al., Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner, J Biol Chem, 1998 Jul 3, 273(27), p. 16710-4	5