

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5918732号

(P5918732)

(45) 発行日 平成28年5月18日(2016.5.18)

(24) 登録日 平成28年4月15日(2016.4.15)

(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

請求項の数 12 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2013-181779 (P2013-181779)	(73) 特許権者	304039548
(22) 出願日	平成25年9月3日(2013.9.3)		コリア・インスティテュート・オブ・サイ
(65) 公開番号	特開2014-212787 (P2014-212787A)		エンス・アンド・テクノロジー
(43) 公開日	平成26年11月17日(2014.11.17)		大韓民国, ソウル 136-791, ソン
審査請求日	平成25年9月3日(2013.9.3)		ブックーク, ファランノ 14-ギル 5
(31) 優先権主張番号	10-2013-0044966	(74) 代理人	100091096
(32) 優先日	平成25年4月23日(2013.4.23)		弁理士 平木 祐輔
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)	(74) 代理人	100118773
前置審査			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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 2. 5マイクロメートル以下の微小粒子状物質特異的曝露有無確認用バイオマーカー及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遺伝子の核酸配列またはその相補鎖分子が集積された、2.5マイクロメートル(μm)以下の微小粒子状物質への特異的曝露の有無を確認するためのDNAマイクロアレイチップ：配列番号17の塩基配列からなるC6(Homo sapiens complement component 6)、配列番号18の塩基配列からなるCCL11(Homo sapiens chemokine(C-C motif)ligand 11)、配列番号20の塩基配列からなるIL8RBP(Homo sapiens interleukin 8 receptor, beta pseudogene)。

【請求項2】

1) 2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質への曝露が疑われる実験群及び正常対照群の体細胞から各々のRNAを分離する工程と、

2) 前記工程1)の実験群及び対照群のRNAからcDNAを合成した後、合成したcDNAに対して実験群と対照群を各々異なる蛍光物質で標識する工程と、

3) 前記工程2)の各々異なる蛍光物質で標識されたcDNAを請求項1のDNAマイクロアレイチップとハイブリダイゼーションする工程と、

4) 前記工程3)の反応したDNAマイクロアレイチップの結果を分析する工程、及び

5) 前記工程4)の分析したデータで請求項1のDNAマイクロアレイチップに集積された遺伝子の発現程度を対照群と比較して分析する工程とを含む、2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認方法。

【請求項3】

10

20

工程 1) の体細胞が、ヒト肺細胞またはヒト肺癌組織由来細胞であることを特徴とする請求項 2 に記載の 2. 5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認方法。

【請求項 4】

前記ヒト肺癌組織由来細胞が、A 5 4 9であることを特徴とする請求項 3 に記載の 2. 5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認方法。

【請求項 5】

工程 3) の蛍光物質が、Cy 3、Cy 5、ポリ-L-リジン-フルオロセインイソチオシアネート (poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate; FITC)、R I T C (rhodamine-B-isothiocyanate) 及びローダミン (rhodamine) からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 2 に記載の 2. 5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認方法。

10

【請求項 6】

1) 2. 5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質曝露が疑われる実験群及び正常対照群の体細胞で各々の RNA を分離する工程と、

2) 前記工程 1) の RNA を下記の遺伝子に相補的で下記の遺伝子を増幅することができるプライマー対を用いてリアルタイム RT-PCR (Real-time reverse transcript polymerase chain reaction) を遂行する工程と；

配列番号 17 の塩基配列からなる C6 (Homo sapiens complement component 6)、配列番号 18 の塩基配列からなる CCL11 (Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 11)、配列番号 20 の塩基配列からなる IL8RBP (Homo sapiens interleukin 8 receptor, beta pseudogene)；及び

20

3) 前記工程 2) の増幅された遺伝子産物の量を対照群と比較して発現程度を分析する工程とを含む 2. 5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認方法。

【請求項 7】

工程 2) のプライマー対が、下記のプライマー対 2、3 および 5 からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 6 に記載の 2. 5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認方法；

プライマー対 2：配列番号 3 で表される正方向プライマー及び配列番号 4 で表される逆方向プライマー；

30

プライマー対 3：配列番号 5 で表される正方向プライマー及び配列番号 6 で表される逆方向プライマー；及び

プライマー対 5：配列番号 9 で表される正方向プライマー及び配列番号 10 で表される逆方向プライマー。

【請求項 8】

請求項 1 に記載の DNA マイクロアレイチップを含む 2. 5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認用キット。

【請求項 9】

ヒト体細胞を追加的に含むことを特徴とする、請求項 8 に記載の 2. 5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認用キット。

40

【請求項 10】

ヒト体細胞が、ヒト肺細胞またはヒト肺癌組織由来細胞であることを特徴とする、請求項 9 に記載の 2. 5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認用キット。

【請求項 11】

下記の各々の遺伝子に相補的で、下記の各々の遺伝子を増幅することができるプライマー対を含む 2. 5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認用キット；

配列番号 17 の塩基配列からなる C6 (Homo sapiens complement component 6)、配列番号 18 の塩基配列からなる CCL11 (Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 11)、配列番号 20

50

の塩基配列からなるIL8RBP(Homo sapiens interleukin 8 receptor,beta pseudogene)。

【請求項 1 2】

前記プライマー対が、下記のプライマー対 2、3 および 5 からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 1 1 に記載の 2. 5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認用キット：

プライマー対 2：配列番号 3 で表される正方向プライマー及び配列番号 4 で表される逆方向プライマー；

プライマー対 3：配列番号 5 で表される正方向プライマー及び配列番号 6 で表される逆方向プライマー；及び

プライマー対 5：配列番号 9 で表される正方向プライマー及び配列番号 1 0 で表される逆方向プライマー。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、2. 5 マイクロメートル (μm) 以下の微小粒子状物質特異的曝露(露出)有無確認用バイオマーカー及びそれを用いた確認方法に関するもので、より詳細には2. 5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質によって特異的に遺伝子発現量が増加または減少するバイオマーカー、及び、それを用いた2. 5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質の特異的曝露有無を確認する方法に関するものである。

20

【背景技術】

【0 0 0 2】

粒子状物質は、その大きさによって大きく3種類に分類される。具体的に、1 0 マイクロメートル (μm) 以下の粒子状物質 (particulate matter 10, PM10)、2. 5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質 (particulate matter 2.5, PM2.5)、及び超微小粒子 (ultra fine particle, UFP) に分けられる (非特許文献 1)。このように区分される主な原因は、大きさによって粒子状物質の物理化学的性質が変わり、特に2. 5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質の場合は、主に自動車、発電所、工場などのヒトの人工的な活動によって発生するものであると知られている。また、1 0 マイクロメートル以下の粒子状物質の中で2. 5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質の占める割合は、8 0 %前後と報告されていて (非特許文献 2)、実際にヒトの喉頭と気管支でろ過されないで肺胞まで到達し得る大きさの粒子状物質は、2. 5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質であると知られている。また、粒子状物質の不溶性物質は肺の粘液を通じて排出されるので、実際に人体の血管に浸透してヒトに危害性を及ぼす要因は2. 5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質の溶解性化学物質である (非特許文献 3、非特許文献 4)。前記2. 5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質は、塩素、硝酸塩、硫酸塩、アンモニウム、及び反応性が高い金属等を含む水溶性溶解物質、主に多核芳香族炭化水素 (Polynuclear aromatic hydrocarbons, PAHs) からなる有機性溶解物質、その他微量のタンパク質、及び微生物などが含まれた混合物の形態で大気中に存在している。

30

【0 0 0 3】

40

一方、2. 5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する先行技術として、2. 5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質の肺疾患との関連性を明らかにした疫学的研究結果、その相関性がかなり前から認められてきている (非特許文献 5)。呼吸器、気管支、及び肺胞に影響を及ぼす微小粒子状物質は、人体の免疫機能を低下させて、喘息、呼吸困難、及び慢性閉塞性肺疾患 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD) などを含む疾患を誘発する。このような疫学的な相関性を証明した多くの研究において、試験管内 (インビトロ) 及び生体内 (インビボ) 実験が行なわれていて、特に2. 5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質による遺伝子指標を用いた研究が進行中である。2. 5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質に特異的なバイオマーカーの発掘は、肺疾患及び2. 5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質の環境中への露出 (曝露) をスクリーニングするこ

50

とに活用することができる。しかし、前記で明示したように2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質のヒトに対する危害性が明らかであるにもかかわらず、人体における危害度評価データが十分ではなく、微小粒子状物質の曝露程度を早くかつ簡便に知ることができる方法は開発されていないのが実情である。したがって、より早くより簡便にスクリーニングする方法、例えば特定遺伝子に対するプライマーを用いるリアルタイムPCR (Real-time reverse transcript polymerase chain reaction) または、DNAマイクロアレイチップなどを用いて、迅速な危害性評価を通じて人体での毒性作用及び遺伝子発現の有無を探索することができるバイオマーカーを発掘して、それを活用した2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質の曝露に対する適切な対策及び能率的な管理を行なうことが重要な課題であると言える。

10

【0004】

哺乳類6種、微生物292種などを含んだ多くの種の遺伝体塩基配列プロジェクトが完成し、そのデータはすべてNCBI (National Center for Biotechnology Information) に公開して報告されている。このように得られた莫大な量のデータを基に遺伝子の機能を明らかにするために、遺伝体全般の発現 (genome-wide expression) に対する研究が行なわれている。一般的に、一回の実験結果で数千個の遺伝子発現を分析することができるDNAマイクロアレイ実験が行なわれている (非特許文献6)。マイクロアレイは、cDNA (complementary DNA) や20ないし25bp長のオリゴヌクレオチドのセットをガラスに集積化したものである。cDNAマイクロアレイは、学内研究室またはAgilent、Genomic Solutionsなどの企業で、チップ上にcDNA収集物を機械的に固定化したりイン

20

【0005】

遺伝子の発現分析のために組織、細胞などの試料からRNAを抽出して、DNAマイクロアレイにあるオリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーション (混成化) 反応を行なう。オリゴヌクレオチドマイクロアレイは、主にCy3及びCy5のような二つの異なる蛍光物質で対照群と実験群を各々異なるように標識化して、同じチップ上で同時にハイブリダイゼーションした後、光学的イメージをスキャンして蛍光の強さを分析する。二つの蛍

30

【先行技術文献】

40

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】 Toxicology, 2003年, 第183巻, p.243-254

【非特許文献2】 Atmospheric Environment, 2001年, 第35巻, p.6407-6419

【非特許文献3】 Nature Reviews Drug Discovery, 2007年, 第6巻, p.67-74

【非特許文献4】 Molecular and cellular biochemistry, 2004年, 第255巻, p.257-265

【非特許文献5】 Chemosphere, 2010年, 第78巻, p.1368-1377

【非特許文献6】 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996年, 第93巻, p.10614-10619

【非特許文献7】 J. Am. Acad. Dermatol., 2004年, 第51巻, p.681-692

【非特許文献8】 Genomics Proteomics, 2002年, 第1巻, p.1-10

50

【発明の概要】

【0007】

そこで、本発明者らはヒト遺伝子4万2千余个が集積されたオリゴヌクレオチドマイクロアレイ研究を基に、2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質による遺伝子発現相変化をヒトの肺癌組織由来細胞であるA549細胞株で観察及び分析した結果、2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質によってのみ特異的に過発現または低発現する遺伝子を発掘して、2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質のみを特異的に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することによって本発明を完成した。

【0008】

本発明の目的は、2.5マイクロメートル(μm)以下の微小粒子状物質への曝露によって特異的に過発現または低発現するバイオマーカー及び前記バイオマーカーを用いて2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質特異的曝露有無を確認する方法を提供することである。

【0009】

前記目的を達成するために、本発明は2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質への曝露によって特異的に発現変化を起こす2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質特異的曝露有無確認用バイオマーカーを提供する。

【0010】

また、本発明は下記の群から選択されるいずれか一つ以上の遺伝子の核酸配列またはその相補鎖分子が集積された2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質特異的曝露有無確認用DNAマイクロアレイチップを提供する：

遺伝子登録番号(Genebank)NM_002457(MUC2,Homo sapiens mucin 2,oligomeric mucus/gel-forming)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_000065(C6,Homo sapiens complement component 6)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002986(CCL11,Homo sapiens chemokine (C-C motif)ligand 11)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002006(FGF2,Homo sapiens fibroblast growth factor 2)、遺伝子登録番号(Genebank)NR_002712(IL8RBP,Homo sapiens interleukin 8 receptor,beta pseudogene)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_000204(CFI,Homo sapiens complement factor I)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002747(MAPK4,Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 4)及び遺伝子登録番号(Genebank)NM_013955(NOX1,Homo sapiens NADPH oxidase 1)。

【0011】

また、本発明は、1)2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質曝露が疑われる実験群及び正常対照群の体細胞から各々のRNAを分離する工程と、

2)前記工程1)の実験群及び対照群のRNAをcDNAで合成しながら実験群と対照群を各々異なる蛍光物質で標識する工程と、

3)前記工程2)の各々異なる蛍光物質で標識されたcDNAを本発明のDNAマイクロアレイチップとハイブリダイゼーションする工程と、

4)前記工程3)の反応したDNAマイクロアレイチップの結果を分析する工程、及び

5)前記工程4)の分析したデータで本発明のDNAマイクロアレイチップに集積された遺伝子の発現程度を対照群と比較して分析する工程とを含む、2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無を確認方法を提供する。

【0012】

また、本発明は、1)2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質曝露が疑われる実験群及び正常対照群の体細胞から各々のRNAを分離する工程と、

2)前記工程1)のRNAを下記の遺伝子に相補的で下記の遺伝子を増幅することができるプライマー対を使用してリアルタイムRT-PCR(Real-time reverse transcript polymerase chain reaction)を遂行する工程：

遺伝子登録番号(Genebank)NM_002457(MUC2, Homo sapiens mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_000065(C6, Homo sapiens complement com

10

20

30

40

50

ponent 6)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002986(CCL11, Homo sapiens chemokine (C-C motif)ligand 11)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002006(FGF2, Homo sapiens fibroblast growth factor 2)、遺伝子登録番号(Genebank)NR_002712(IL8RBP, Homo sapiens interleukin 8 receptor, beta pseudogene)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_000204(CFI, Homo sapiens complement factor I)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002747(MAPK4, Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 4)及び遺伝子登録番号(Genebank)NM_013955(NOX1, Homo sapiens NADPH oxidase 1)、及び

3) 前記工程2)の増幅された遺伝子産物の量を対照群と比較して発現程度を分析する工程とを含む、2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認方法を提供する。

10

【0013】

また、本発明は本発明のDNAマイクロアレイチップを含む2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認用キット(kit)を提供する。

【0014】

同時に、本発明は下記の各々の遺伝子に相補的で、下記の各々の遺伝子を増幅することができるプライマー対を含む2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認用キットを提供する：

遺伝子登録番号(Genebank)NM_002457(MUC2, Homo sapiens mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_000065(C6, Homo sapiens complement component 6)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002986(CCL11, Homo sapiens chemokine (C-C motif)ligand 11)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002006(FGF2, Homo sapiens fibroblast growth factor 2)及び遺伝子登録番号(Genebank)NR_002712(IL8RBP, Homo sapiens interleukin 8 receptor, beta pseudogene)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_000204(CFI, Homo sapiens complement factor I)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002747(MAPK4, Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 4)及び遺伝子登録番号(Genebank)NM_013955(NOX1, Homo sapiens NADPH oxidase 1)。

20

【発明の効果】

【0015】

本発明の2.5マイクロメートル(μm)以下の微小粒子状物質特異的曝露有無確認用バイオマーカー及びそれを用いた確認方法は、DNAマイクロアレイチップを通じて選別された反応遺伝子をバイオマーカーに用いて、2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質のモニタリング及びその危害性を判定するのに有用であり、2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質によって惹起される特異的な毒性作用機序を解明する道具として有用に用いることができる。

30

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】2.5マイクロメートル(μm)以下の微小粒子状物質処理群でその水溶性抽出液及び有機性抽出液の抽出工程経路に関する図である。

【図2】2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質の水溶性抽出液及び有機性抽出液処理によるヒト肺癌組織由来細胞株での細胞毒性実験結果を各々示した図である。

40

【図3】マイクロアレイチップを用いて2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質を処理したヒト肺癌組織由来細胞株の遺伝子発現様相を分析した結果を、有機性抽出液及び水溶性抽出液を比較して示した図である。

【図4】2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質を処理した条件で、共通的に増加または減少した遺伝子8種に対して各遺伝子別マイクロアレイチップ結果とリアルタイムRT-PCR(Real-time reverse transcript polymerase chain reaction)の結果を対照群と対比し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】

【0017】

以下、本発明を詳しく説明する。

50

【0018】

本発明は、2.5マイクロメートル（ μm ）以下の微小粒子状物質への曝露によって特異的に発現変化を起こす遺伝子を用いて、2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質特異的曝露有無確認用バイオマーカーを提供する。

【0019】

前記粒子状物質は、超微小粒子（UFP）を含む2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質（PM2.5）であることが好ましくて、0.1ないし2.5マイクロメートルの粒子状物質であることが最も好ましいがそれに限定されない。

【0020】

前記バイオマーカーは、1.5倍以上発現が増加または減少した遺伝子であって、2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質特異的に発現量が変化する8種の遺伝子で構成されている（表3参照）。

【0021】

前記2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質への曝露の程度によって特異的に発現量の変化を伴うバイオマーカーは、下記のように構成された群から選択することが好ましいが、これに限定されない：

遺伝子登録番号(Genebank)NM_002457(MUC2, Homo sapiens mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_000065(C6, Homo sapiens complement component 6)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002986(CCL11, Homo sapiens chemokine (C-C motif)ligand 11)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002006(FGF2, Homo sapiens fibroblast growth factor 2)及び遺伝子登録番号(Genebank)NR_002712(IL8RBP, Homo sapiens interleukin 8 receptor, beta pseudogene)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_000204(CFI, Homo sapiens complement factor I)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002747(MAPK4, Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 4)及び遺伝子登録番号(Genebank)NM_013955(NOX1, Homo sapiens NADPH oxidase 1)。

【0022】

本発明の具体的な実施例で、本発明者らは2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質特異的曝露有無確認用バイオマーカーを発掘するために、2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質を1個のテフロン（登録商標）コーティンググラスファイバーフィルターを24時間±30分間捕集した。捕集した10個のフィルターは、各々半分の大きさに分けて水溶性抽出液及び有機性抽出液に分けて各々150ml精製水とジクロロメタンを用いて30分間超音波粉碎機に入れて抽出工程を行なった。このような実験を50個のフィルターを用いて5回実施し、各々の水溶性抽出液及び有機性抽出液を製作した（図1参照）。前記水溶性抽出液及び有機性抽出液をヒト肺癌組織由来細胞株であるA549細胞株に処理して細胞毒性を確認した（ENVIRON. MOL. MUTAGEN.2006年,第47巻,P.199-211）。その結果、前記2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質は、ヒト肺癌組織由来細胞株に毒性を有していることを確認することができ（図2参照）、前記実験を基に2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質の濃度を決定した。

【0023】

本発明では前記決定した濃度で2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質水溶性抽出液及び有機性抽出液をヒト肺癌組織由来細胞株に処理して、前記物質を処理した細胞株からmRNAを分離してcDNAを合成しながら蛍光物質であるCy5で標識し、前記物質を処理しない対照群の場合はCy3で標識した。前記蛍光標識されたcDNAをAgilent Human GE V2 4X44K (Agilent,米国)を用いてハイブリダイゼーション反応を実施し、そのマイクロアレイチップ実験結果である蛍光イメージをスキャンして遺伝子発現様相の差を分析した（図3参照）。分析した結果、Cy5/Cy3の比率が1.5倍以上の場合を発現増加した遺伝子に分類し、0.66倍以下の場合が発現減少した遺伝子に分類した。分析の結果、共通的に発現量が増加した遺伝子は0.33%（42, 405個の遺伝子中で144個）で、共通的に発現量が減少した遺伝子は0.24%（42, 405個の遺伝子中で102個）であることを確認した。それらの中でリアルタイム定量PCRを用い

10

20

30

40

50

て2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質水溶性抽出液及び有機性抽出液で共通的に特異的に発現が変化した遺伝子8種を選別した(図4及び表3参照)。前記遺伝子は、既存の発明において他の化学物質等による肺毒性と係わる疾病を誘発させることに関与するという報告があるが、本発明で使用した2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質水溶性抽出液及び有機性抽出液を処理した時、ヒト肺癌組織由来細胞において毒性と関連があるという報告は存在しない。

【0024】

また、本発明は下記の群から選択されるいずれか一つ以上の遺伝子の核酸配列またはその相補鎖分子が集積された2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質特異的曝露有無確認用DNAマイクロアレイチップを提供する：

遺伝子登録番号(Genebank)NM_002457(MUC2, Homo sapiens mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_000065(C6, Homo sapiens complement component 6)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002986(CCL11, Homo sapiens chemokine (C-C motif)ligand 11)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002006(FGF2, Homo sapiens fibroblast growth factor 2)、遺伝子登録番号(Genebank)NR_002712(IL8RBP, Homo sapiens interleukin 8 receptor, beta pseudogene)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_000204(CFI, Homo sapiens complement factor 1)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002747(MAPK4, Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 4)及び遺伝子登録番号(Genebank)NM_013955(NOX1, Homo sapiens NADPH oxidase 1)。

【0025】

本発明の2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質曝露有無確認用DNAマイクロアレイチップは、当業者に公知の方法で製作することができる。前記マイクロアレイチップを製作する方法は、下記のとおりである。前記探索されたバイオマーカーを探针DNA分子に用いてDNAチップの基板上に固定化させるため、ピエゾエレクトリック(piezoelectric)方式を用いたマイクロピペット(micropipetting)法またはピン(pin)形態のスポッター(spotter)を用いた方法などを用いることが好ましいが、それに限定されるのではなく、本発明の好ましい実施例では、ピン形態のスポッターを用いてDNA分子を固定したマイクロアレイを使用した。前記DNAマイクロアレイチップの基板は、アミノシラン、ポリーL-リジン及びアルデヒドからなる群から選択される一つの活性基がコーティングされたものが好ましいが、それに限定されるのではない。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、及びニトロセルロース膜からなる群から選択することができるが、それに制限されるのではなく、本発明の好ましい実施例ではアミノシランがコーティングされたスライドガラスを用いた。

【0026】

また、本発明は前記バイオマーカーを用いた2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質特異的曝露有無確認方法を提供する。

【0027】

本発明は、下記のような過程を含む2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質特異的曝露有無確認方法を提供する：

1) 2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質曝露が疑われる実験群及び正常対照群の体細胞から各々のRNAを分離する工程と、

2) 前記工程1)の実験群及び対照群のRNAをcDNAで合成しながら実験群と対照群を各々異なる蛍光物質で標識する工程と、

3) 前記工程2)の各々異なる蛍光物質で標識されたcDNAを本発明のDNAマイクロアレイチップとハイブリダイゼーションする工程と、

4) 前記工程3)の反応したDNAマイクロアレイチップの結果を分析する工程、及び

5) 前記工程4)の分析したデータで本発明のDNAマイクロアレイチップに集積された遺伝子の発現程度を対照群と比較して分析する工程。

【0028】

前記曝露有無確認方法において、工程1)の体細胞はヒト肺癌組織由来細胞であるA5

10

20

30

40

50

49細胞株を用いることが好ましいがそれに限定されるのではなく、ヒト肺細胞またはヒト肺癌組織に由来した細胞ならすべて使用可能である。

【0029】

前記曝露有無確認方法において、工程3)の蛍光物質は、Cy3、Cy5、ポリ-L-リジン-フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、RITC(rhodamine-B-isothiocyanate)及びローダミン(rhodamine)からなる群から選択されることが好ましいがそれに限定されるのではなく、当業者に公知の蛍光物質はすべて使用可能である。

【0030】

本発明は前記曝露有無確認方法において、工程4)のDNAマイクロアレイチップは、Whole Human Genome Oligo Microarray(Agilent, 米国)などを使用することが好ましいがそれに限定されるのではなく、ヒト遺伝体の中で本発明において前記過発現あるいは低発現した遺伝子(表3参照)が搭載されたマイクロアレイチップなら使用可能であり、前記本発明者が製作したDNAマイクロアレイチップを用いることが最も好ましい。また、工程4)の分析方法は、Agilent Feature Extraction 10.7.3.1(Agilent technologies, 米国)、及びAgilent GeneSpring GX 11.5.1(Agilent technologies, 米国)を用いることが好ましいがそれに限定されるのではなく、当業者に公知の分析ソフトウェアを使用しても構わない。

【0031】

また、本発明は、

1) 2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質曝露が疑われる実験群及び正常対照群の体細胞から各々のRNAを分離する工程と、

2) 前記工程1)のRNAを下記の遺伝子に相補的で下記の遺伝子を増幅することができるプライマー対を使用してリアルタイムRT-PCR(Real-time reverse transcript polymerase chain reaction)を遂行する工程：

遺伝子登録番号(Genebank)NM_002457(MUC2, Homo sapiens mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_000065(C6, Homo sapiens complement component 6)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002986(CCL11, Homo sapiens chemokine (C-C motif)ligand 11)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002006(FGF2, Homo sapiens fibroblast growth factor 2)、遺伝子登録番号(Genebank)NR_002712(IL8RBP, Homo sapiens interleukin 8 receptor, beta pseudogene)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_000204(CFI, Homo sapiens complement factor I)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002747(MAPK4, Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 4)及び遺伝子登録番号(Genebank)NM_013955(NOX1, Homo sapiens NADPH oxidase 1)、及び

3) 前記工程2)の増幅された遺伝子産物の量を対照群と比較して発現程度を分析する工程とを含む、2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認方法を提供する。

【0032】

前記工程2)のプライマー対は、工程2)の遺伝子を増幅することができる、18ないし30bp長の正方向(フォワード)及び逆方向(リバース)プライマー対であることが好ましく、下記のプライマー対1ないし8からなる群から選択されることがより好ましいがそれに限定されない：

プライマー対1：配列番号1で表される正方向プライマー及び配列番号2で表される逆方向プライマー、

プライマー対2：配列番号3で表される正方向プライマー及び配列番号4で表される逆方向プライマー、

プライマー対3：配列番号5で表される正方向プライマー及び配列番号6で表される逆方向プライマー、

プライマー対4：配列番号7で表される正方向プライマー及び配列番号8で表される逆方向プライマー、

プライマー対5：配列番号9で表される正方向プライマー及び配列番号10で表される

逆方向プライマー、

プライマー対6：配列番号11で表される正方向プライマー及び配列番号12で表される逆方向プライマー、

プライマー対7：配列番号13で表される正方向プライマー及び配列番号14で表される逆方向プライマー、及び

プライマー対8：配列番号15で表される正方向プライマー及び配列番号16で表される逆方向プライマー。

【0033】

したがって、本発明のバイオマーカーは、2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質に特異的に遺伝子発現が増加または減少するので、環境試料において2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質の汚染をモニタリング及び判定するのに有用に用いることができる。

10

【0034】

また、本発明は本発明で製作した前記DNAマイクロアレイチップを含む2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質特異的曝露有無確認用キット(kit)を提供する。

【0035】

前記キットは、ヒト体細胞を追加的に含むことが好ましいがそれに限定されない。

【0036】

前記ヒト体細胞は、A549であることが好ましいがそれに限定されるのではなく、ヒト肺細胞またはヒト肺癌細胞及び組織に由来した細胞ならすべて使用可能である。

20

【0037】

前記キットに追加的に蛍光物質を含むことができ、その蛍光物質はストレプトアビジンアルカリフォスファターゼコンジュゲート(streptavidin-alkaline phosphatase conjugate)、化学蛍光物質(chemifluorescence)及び化学発光物質(chemiluminescent)からなる群から選択されることが好ましいがそれに限定されるのではなくて、本発明の好ましい実施例ではCy3とCy5を使用した。

【0038】

前記キットに追加的に反応試薬を含ませることができ、前記反応試薬はハイブリダイゼーションに使用される緩衝溶液、RNAからcDNAを合成するための逆転写酵素、cNTPs及びrNTP(事前混合型または分離供給型)、蛍光染色剤の化学的誘導剤のような標識試薬、洗浄緩衝溶液などで構成することができるがそれに限定されるのではなく、当業者に公知のDNAマイクロアレイチップのハイブリダイゼーション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

【0039】

本発明のバイオマーカーは、2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質に特異的に遺伝子発現が増加または減少するので、環境試料で2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質の汚染をモニタリング及び判定するのに有用に用いることができ、2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質によって特異的に誘発される毒性作用機序を解明する道具として用いることができる。

【0040】

40

また、本発明は、

下記の各々の遺伝子に相補的で、下記の各々の遺伝子を増幅することができるプライマー対を含む2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認用キットを提供する：

遺伝子登録番号(Genebank)NM_002457(MUC2, Homo sapiens mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_000065(C6, Homo sapiens complement component 6)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002986(CCL11, Homo sapiens chemokine (C-C motif)ligand 11)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002006(FGF2, Homo sapiens fibroblast growth factor 2)及び遺伝子登録番号(Genebank)NR_002712(IL8RBP, Homo sapiens interleukin 8 receptor, beta pseudogene)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_000204(CFI, Ho

50

mo sapiens complement factor I)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002747(MAPK4, Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 4)及び遺伝子登録番号(Genebank)NM_013955(NOX1, Homo sapiens NADPH oxidase 1)。

【0041】

前記確認用キットのプライマー対は、下記のプライマー対1ないし8で構成された群から選択して用いることが好ましいがそれに限定されるのではなく、前記バイオマーカー遺伝子の増幅産物が100ないし300bpになるように設計された15ないし50bp長さの、好ましくは15ないし30bp長さの、さらに好ましくは18ないし25bp長さの正方向及び逆方向プライマー対はすべて使用可能である。

【0042】

プライマー対1：配列番号1で表される正方向プライマー及び配列番号2で表される逆方向プライマー、

プライマー対2：配列番号3で表される正方向プライマー及び配列番号4で表される逆方向プライマー、

プライマー対3：配列番号5で表される正方向プライマー及び配列番号6で表される逆方向プライマー、

プライマー対4：配列番号7で表される正方向プライマー及び配列番号8で表される逆方向プライマー、

プライマー対5：配列番号9で表される正方向プライマー及び配列番号10で表される逆方向プライマー、

プライマー対6：配列番号11で表される正方向プライマー及び配列番号12で表される逆方向プライマー、

プライマー対7：配列番号13で表される正方向プライマー及び配列番号14で表される逆方向プライマー、及び

プライマー対8：配列番号15で表される正方向プライマー及び配列番号16で表される逆方向プライマー。

【0043】

前記確認用キットに追加的にヒト体細胞を含むことが好ましいが、それに限定されない。

【0044】

前記ヒト体細胞は、ヒト肺癌組織由来細胞であるA549細胞株を用いることが好ましいがそれに限定されるのではなく、ヒト肺細胞またはヒト肺癌細胞及び組織に由来した細胞ならすべて使用可能である。

【0045】

併せて、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RNAからcDNAを合成するための逆転写酵素、cNTPs及びrNTP（事前混合型または分離供給型）、蛍光染色剤の化学的誘導剤のような標識試薬、及び洗浄緩衝溶液などで構成することができるがそれに限定されるのではなく、当業者に公知のRT-PCR反応に必要な反応試薬はすべて含むことができる。

【実施例】

【0046】

以下、本発明を実施例によって詳しく説明する。

【0047】

但し、下記の実施例は本発明を例示するだけのものであって、本発明の内容が下記の実施例によって限定されるのではない。

【0048】

<実施例1> 2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質捕集及び抽出

<1-1> 捕集場所選定

一日平均7万台余の車が通るソウル特別市内部循環道路から直線距離で240メートル離れている韓国科学技術研究院の体育館屋上で2.5マイクロメートル以下の微小粒子状

10

20

30

40

50

物質を捕集した。また、重量濃度測定法の中で米国 EPA が 2.5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質測定方法として唯一公認した方法であるハイボリュームエアーサンプラー (High Volume Air Sampler) を使用して 2.5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質を捕集した。2.5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質の試験管内 (インビトロ) 検査を実施するためには、多量の 2.5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質が必要である。ローボリュームエアーサンプラー (Low Volume Air Sampler) は、24 時間稼動時に得ることができる 2.5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質の量が数ミリグラムに過ぎず、実験試験管内検査のための 2.5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質捕集に相応しくないため、一日に多量を捕集することができるハイボリュームエアーサンプラーを選択して実験を行なった。2.5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質専用 Inlet (Tisch Instrument Company) は、流体力学的大きさ (Aerodynamic Size) が 2.5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質よりそれ以上のものは、その重さの慣性に勝つことができずに油膜 (oil) にぶつかって停止し、この過程を経た 2.5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質はテフロン (登録商標) コーティンググラスファイバーフィルターを用いて捕集される。

10

【0049】

<1-2> 捕集フィルター

ハイボリュームエアーサンプラー使用時、ろ過工程で 8×10 インチの大きさの成分が抽出される可能性がない長所を有したテフロン (登録商標) コーティンググラスファイバーフィルターを採択し、抽出溶媒には精製水 ($18.2 \text{ M}\Omega$) とジクロロメタンを用いた。水分による誤差を最小化するために乾燥器で 48 時間フィルターの水分を完全に除去した後、 0.1 mg まで測定することができる超精密秤 (Mettler Toledo Company) を用いてフィルターの重さを秤量した。フィルターの内側面が互いに合うように折った後、暗室及び密閉効果があるジッパーバック (Zipper bag) に入れて試料を使用する前まで -80°C で保管して、捕集場所まで移動時にはアイスボックスを用いて移動した。2.5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質捕集のためには適正流量速度 ($1.13 \text{ m}^3/\text{分} \pm 10\%$) を維持した。

20

【0050】

<1-3> 捕集期間

2.5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質は、5 ヶ月にわたってハイボリュームエアーサンプラーを用いて捕集した。2011 年 11 月 1 日に最初の捕集を皮切りに、2013 年 3 月 28 日に最後の 30 回目の捕集を終了した。雨が降った場合の測定値が基準値 $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下の低い粒子状物質大気濃度を示すフィルター値は除外し、各 10 枚のフィルターにグループ化して総 5 個グループを構成した。

30

【0051】

<1-4> 粒子状物質捕集試料抽出工程

捕集した 2.5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質の成分分析のために一枚のフィルターを 1/2 に分けて使用し、各々のフィルターは互いに異なる二つの抽出溶媒として水溶性成分抽出のための超純粋精製水及び有機性成分抽出のためのジクロロメタンを用いた。図 1 の抽出工程経路によって 2.5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質水溶性及び 2.5 有機性抽出液を各々製作した (図 1)。

40

【0052】

<実施例 2> 細胞培養及び化学物質処理

<2-1> 細胞培養

100 ミリメートルディッシュに 10% FBS が添加された RPMI 培地 (Gibco-BRL、米国) 条件下で、ヒト肺癌細胞株である A549 細胞 (韓国細胞株銀行) を 80% 程度成長するまで培養した。

【0053】

<2-2> 細胞毒性実験 (MTT assay) 及び化学物質処理

Mossman 等 (J. Immunol. Methods, 1983 年, 第 65 巻, P.55-63) の方法にしたがって A54

50

9細胞株を用いたMTT実験を行なった。具体的に、24ウェルプレートを使用してRPMI培地（Gibco-BRL, 米国）で 2.5×10^5 /ウェル細胞数の条件で、前記＜実施例1＞の方法によって製造した、精製水に溶解した2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質水溶性抽出液及びDMSOに溶解した2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質有機性抽出液を処理して48時間培養した後、MTT（3-(4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyl)tetrazolium bromide）5mg/mlを混合して37℃で3時間追加培養した。その後、培地を除去して形成されたホルマザンクリスタル（formazan crystal）をDMSO 500μlに溶解した。その溶解物を96ウェルプレートに移して分注（aliquot）して吸光度540nmでOD値を測定した。

【0054】

10

その結果、図2に示したようにA549細胞株で2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質抽出液による細胞毒性に対して80%生存率を示す濃度（ IC_{20} ）値は、2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質水溶性抽出液426.91μg/ml及び2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質有機性抽出液1962.80μg/mlであり、前記結果を基にして下記のマイクロアレイ実験を行なった（図2）。

【0055】

＜実施例3＞マイクロアレイ実験

＜3-1＞標的RNA分離及び蛍光物質標識

6ウェルプレートにA549細胞を 2.5×10^5 cell/ml濃度で分注した後、前記＜実施例1＞によって製造した2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質水溶性抽出液及び有機性抽出液を48時間処理した。以後、前記粒子状物質が処理された細胞でトリゾール（trizol, Invitrogen life technologies, 米国）を使用して製造社の方法にしたがって全体RNAを抽出して、RNeasy mini kit（Qiagen, 米国）を使用して精製した。RNAを精製する間にRNase-free DNase set（Qiagen, 米国）を使用してDNA遺伝体を完全に除去した。全体RNA試料の量は、分光光度計で測定し、その濃度はND-1000分光光度計（Thermo Fisher Scientific Inc., 米国）とAgilent 2100バイオアナライザー（Agilent Technologies, 米国）で確認した。

20

【0056】

＜3-2＞蛍光物質で標識されたcDNA製造

DNAマイクロアレイ分析のために、前記＜実施例1＞で得た2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質水溶性抽出液及び有機性抽出液処理群の全体RNAからcDNAを製造した。前記得た全体RNA30μgとオリゴ（dT）プライマー2μg（1μg/μl）を混合して、65℃で10分間反応後、直ちに氷に入れてアニーリングさせた。前記アニーリングされたRNAの逆転写酵素反応のために、下記の〔表1〕のように試薬を混合して準備した。無処理の対照群は、Cy3-dUTP（緑）で標識し、2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質水溶性抽出液及び有機性抽出液で処理した実験群はCy5-dUTP（赤色）で標識した。ここで、前記二つの試料は、Microcon YM-30カラム（Millipore, 米国）を使用して混合及び精製した。

30

【0057】

【表1】

40

構成	体積（μl）
5x first strand 合成用緩衝溶液	6.0
dNTPs	0.6
0.1M DDT	3.0
SuperScript II 酵素	3.0
Cy3-またはCy5-dUTP	2.0

【0058】

＜3-3＞ハイブリダイゼーション反応

50

ハイブリダイゼーション反応及び洗浄過程は、(株)イバイオゼンの指示方法によって行なった。具体的に、下記の〔表2〕のような転写用試薬 (Transcription Master Mix) を製造して混合した後、40℃で2時間反応させた後、標識されたcDNAを精製して、前記Cy3またはCy5で標識されたcDNA 600ngを60℃で30分間反応させて断片化 (fragmentation) 過程を遂行した。前記cDNAを2x GEx Hybridization Buffer HI-RPMと混合した後、マイクロアレイチップ (chip) に位置させて65℃で17時間オープンでハイブリダイゼーション反応を進行した。以後、マイクロアレイチップを2回洗浄 (GE Wash Buffer 1で1分、GE Wash Buffer 2で1分) した後、3分間800rpmで遠心分離して乾燥した。

【0059】

10

【表2】

構成	体積 (μl)
Nuclease-free water	0.75
5x Transcription 緩衝溶液	3.20
0.1M DTT	0.60
TP mix	1.00
T7 RNA Polymerase Blend	0.21
Cy3-CTP	0.24

20

【0060】

<3-4>蛍光イメージの獲得

マイクロアレイチップスライド上のハイブリダイゼーション結果である蛍光イメージは、Agilent Cスキャナー (Agilent technologies, 米国) でスキャンした。ここで、緑蛍光イメージは対照群で、赤色蛍光イメージは実験群で特異的に発現する遺伝子の活性程度を意味し、黄色い蛍光イメージは緑色と赤色の補色であり、前記二つの群で遺伝子の発現量に大きな差がないことを意味する。スキャンしたイメージから遺伝子発現の割合に対する数値を得るためにAgilent Feature Extraction 10.7.3.1 (Agilent technologies, 米国) で分析した。抽出されたデータは、Agilent GeneSpring GX 11.5.1 (Agilent technologies, 米国) を用いて正規化 (normalization) 工程を経て各遺伝子の発現様相を分析した。このデータから2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認用バイオマーカーに使用する遺伝子を選別した。

30

【0061】

その結果、図3に示したように表示されたオリゴチップ上に存在する約4万2千個余りの遺伝子の中で、2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質水溶性抽出液及び有機性抽出液によってCy5/Cy3値の比率が1.5倍以上で、共通的に発現量の増加した遺伝子は0.33% (42, 405個の遺伝子の中で144個)、共通的に発現が減少した遺伝子は0.24% (42, 405個の遺伝子の中で102個) であることを確認した (表3及び図3)。

【0062】

40

【表 3】

登録番号	遺伝子の略語	遺伝子名	マイクロアレイ 中間値の比	
			2.5マイクロメートル以下 粒子状物質 水溶性抽出液	2.5マイクロメートル以下 粒子状物質 有機性抽出液
NM_002457	MUC2	Homo sapiens mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming (MUC2)	1.96	1.59
NM_000065	C6	Homo sapiens complement component 6 (C6), transcript variant 1	5.50	9.94
NM_002986	CCL11	Homo sapiens chemokine (C-C motif)ligand 11 (CCL11)	9.61	14.36
NM_002006	FGF2	Homo sapiens fibroblast growth factor 2 (basic) (FGF2)	1.55	1.66
NR_002712	IL8RBP	Homo sapiens interleukin 8 receptor, beta pseudogene (IL8RBP)	9.05	6.54
NM_000204	CFI	Homo sapiens complement factor I (CFI)	0.49	0.36
NM_002747	MAPK4	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 4 (MAPK4)	0.08	0.22
NM_013955	NOX1	Homo sapiens NADPH oxidase 1 (NOX1), transcript variant NOH-1Lv	0.51	0.56

【0063】

<実施例 4>リアルタイム R T - P C R 定量

前記<実施例 3>のマイクロアレイ実験結果から 2.5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質によって特異的に発現が変化した遺伝子の中で 2.5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質によって共通的に特異的に発現する下記の 8 種の遺伝子：

遺伝子登録番号(Genebank)NM_002457(MUC2, Homo sapiens mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_000065(C6, Homo sapiens complement component 6)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002986(CCL11, Homo sapiens chemokine (C-C motif)ligand 11)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002006(FGF2, Homo sapiens fibroblast growth factor 2)、遺伝子登録番号(Genebank)NR_002712(IL8RBP, Homo sapiens interleukin 8 receptor, beta pseudogene)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_000204(CFI, Homo sapiens complement factor I)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002747(MAPK4, Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 4)及び遺伝子登録番号(Genebank)NM_013955(NOX1, Homo sapiens NADPH oxidase 1)の発現量変化程度を調査及び定量するために、My IQ リアルタイム PCR(My IQ Real-time PCR, Bio-rad, 米国)機械を用いてリアルタイム R T - P C R 定量を実施した。

【0064】

具体的に、オリゴ d T プライマーと Superscript kit (Omniscipt™ kit, Qiagen, Co., 米国)を用いて逆転写反応を遂行して c D N A を合成した。前記合成した c D N A 0.2 μ l と蒸留水 3.8 μ l、正方向プライマー 0.5 μ l、逆方向プライマー 0.5 μ l、及びサイバークリーン (SYBR Green) I 染色スーパーミックス (Bio-rad, 米国) 5 μ l を P C R チューブ内で混合して、下記のようにリアルタイム P C R 反応を進行した。工程 1：95℃、3分；工程 2（45 回反復）：工程 2-1：95℃で 10 秒；工程 2-2：遺伝子 K I F 1 A に対する反応は 57℃で 45 秒、及び遺伝子 B 3 G A L T 4、遺伝子 D H R S 9、遺伝子 E M R 2、及び遺伝子 K I A A 1 1 9 9 に対する反応は 65℃で 45

秒；工程3：95℃で1分；工程4：55℃で1分；工程5（80回反復）：55℃で10秒間My IQリアルタイムPCR機械で反応させた。PCR産物を定量するために、サイバーグリーンI染色（Bio-rad, 米国）で染色した。サイバーグリーンI染色は、二重螺旋DNAに結合する染色法であり、PCR過程間で二重螺旋DNAが生成されるほど蛍光強度（fluorescence intensity）が増加するようになる。まず、PCRに用いた標的遺伝子と内在性（endogenous）対照群（RPLPO）に対するプライマーをサイバーグリーンマスターミックス（Master mix）に添加して、PCR反応を実施した後、適切な濃度を選択するプライマー適合化（primer optimization）過程を遂行した。合成されたcDNAと下記の〔表4〕に記載した各々のプライマーを混合して、サイバーグリーンマスターミックスを添加した後、PCR反応を遂行し、定量ソフトウェアを使用して分析した。

10

【0065】

その結果、図4に示したように前記遺伝子登録番号(Genebank)NM_002457(MUC2, Homo sapiens mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_000065(C6, Homo sapiens complement component 6)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002986(CCL11, Homo sapiens chemokine (C-C motif)ligand 11)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002006(FGF2, Homo sapiens fibroblast growth factor 2)及び遺伝子登録番号(Genebank)NR_002712(IL8RBP, Homo sapiens interleukin 8 receptor, beta pseudogene)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_000204(CFI, Homo sapiens complement factor I)、遺伝子登録番号(Genebank)NM_002747(MAPK4, Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 4)及び遺伝子登録番号(Genebank)NM_013955(NOX1, Homo sapiens NADPH oxidase 1)の8種遺伝子からなる群の発現様相は、前記<実施例3>のマイクロアレイチップ実験結果と類似の様相を示すことを確認及び証明した。

20

【0066】

【表 4】

登録番号	遺伝子略語	PCRプライマー配列 (5' → 3')	
NM_002457	MUC2	正方向 (配列番号 1)	GAAGGTGCTGTCCTTTC TACTG
		逆方向 (配列番号 2)	CCTGGCACTTGGAGGAA TAAA
NM_000065	C6	正方向 (配列番号 3)	TGACACAGACTCCAACG ATTAC
		逆方向 (配列番号 4)	CGTCTTGGCAGGAACCA ATA
NM_002986	CCL11	正方向 (配列番号 5)	TTCAGCGACTAGAGAGC TACA
		逆方向 (配列番号 6)	GAATCCTGCACCCACTT CTT
NM_002006	FGF2	正方向 (配列番号 7)	GCTGGTGATGGGAGTTG TATTT
		逆方向 (配列番号 8)	CTGCCGCCTAAAGCCAT ATT
NR_002712	IL8RBP	正方向 (配列番号 9)	CTCATGTCCACTAGCTC TTCTTG
		逆方向 (配列番号 10)	CCAGGGCAGGCTTTCTA AAT
NM_000204	CFI	正方向 (配列番号 11)	TACTCACCTCTCCTGCG ATAA
		逆方向 (配列番号 12)	GGGCACTGATACGGTAG TTTAC
NM_002747	MAPK4	正方向 (配列番号 13)	AGGGTCTGTCCACCATA GAA
		逆方向 (配列番号 14)	TGGTAATGGACAGGGAA GAAAC
NM_013955	NOX1	正方向 (配列番号 15)	GAATCTTCCCTGTTGCC TAGAA
		逆方向 (配列番号 16)	CCCTAACCACCAACCA GAAAC

【産業上の利用可能性】

【0067】

2. 5マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対して特異的な発現変化をバイオマーカーを含むマイクロアレイチップまたはキットを、2. 5マイクロメートル以下の微小粒子状物質のモニタリング及び危害性を判定するのに有用に用いることができる。

【1】 下記の群から選択されるいずれか一つ以上の遺伝子の核酸配列またはその相補鎖分子が集積された、2. 5マイクロメートル (μm) 以下の微小粒子状物質への特異的曝露の有無を確認するためのDNAマイクロアレイチップ：

遺伝子登録番号(Genebank)NM 002457(MUC2, Homo sapiens mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming)、遺伝子登録番号(Genebank)NM 000065(C6, Homo sapiens complement component 6)、遺伝子登録番号 (Genebank)NM 002986(CCL11, Homo sapiens chemokine (C-C motif)ligand 11)、遺伝子登録番号(Genebank)NM 002006(FGF2, Homo sapiens fibroblast growth factor 2)、遺伝子登録番号(Genebank)NR 002712(IL8RBP, Homo sapiens interleukin 8 receptor, beta pseudogene)、遺伝子登録番号(Genebank)NM 000204(CFI, Hom

o sapiens complement factor I)、遺伝子登録番号(Genebank)NM 002747(MAPK4, Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 4)及び遺伝子登録番号(Genebank)NM 013955(NOX1, Homo sapiens NADPH oxidase 1)。

[2] 1) 2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質への曝露が疑われる実験群及び正常対照群の体細胞から各々のRNAを分離する工程と、

2) 前記工程1)の実験群及び対照群のRNAをcDNAで合成しながら実験群と対照群を各々異なる蛍光物質で標識する工程と、

3) 前記工程2)の各々異なる蛍光物質で標識されたcDNAを請求項1のDNAマイクロアレイチップとハイブリダイゼーションする工程と、

4) 前記工程3)の反応したDNAマイクロアレイチップの結果を分析する工程、及び

5) 前記工程4)の分析したデータで請求項1のDNAマイクロアレイチップに集積された遺伝子の発現程度を対照群と比較して分析する工程とを含む、2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認方法。

10

[3] 工程1)の体細胞が、ヒト肺細胞またはヒト肺癌組織由来細胞であることを特徴とする請求項2に記載の2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認方法。

[4] 前記ヒト肺癌組織由来細胞が、A549であることを特徴とする請求項3に記載の2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認方法。

[5] 工程3)の蛍光物質が、Cy3、Cy5、ポリ-L-リジン-フルオロセインイソチオシアネート(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate; FITC)、RITC(rhodamine-B-isothiocyanate)及びローダミン(rhodamine)からなる群から選択されることを特徴とする、請求項2に記載の2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認方法。

20

[6] 1) 2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質曝露が疑われる実験群及び正常対照群の体細胞で各々のRNAを分離する工程と、

2) 前記工程1)のRNAを下記の遺伝子に相補的で下記の遺伝子を増幅することができるプライマー対を用いてリアルタイムRT-PCR(Real-time reverse transcript polymerase chain reaction)を遂行する工程と；

遺伝子登録番号(Genebank)NM 002457(MUC2, Homo sapiens mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming)、遺伝子登録番号(Genebank)NM 000065(C6, Homo sapiens complement component 6)、遺伝子登録番号(Genebank)NM 002986(CCL11, Homo sapiens chemokine (C-C motif)ligand 11)、遺伝子登録番号(Genebank)NM 002006(FGF2, Homo sapiens fibroblast growth factor 2)、遺伝子登録番号(Genebank)NR 002712(IL8RBP, Homo sapiens interleukin 8 receptor, beta pseudogene)、遺伝子登録番号(Genebank)NM 000204(CFI, Homo sapiens complement factor I)、遺伝子登録番号(Genebank)NM 002747(MAPK4, Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 4)及び遺伝子登録番号(Genebank)NM 013955(NOX1, Homo sapiens NADPH oxidase 1)、及び

30

3) 前記工程2)の増幅された遺伝子産物の量を対照群と比較して発現程度を分析する工程とを含む2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認方法。

40

[7] 工程2)のプライマー対が、下記のプライマー対1～8からなる群から選択されることを特徴とする、請求項6に記載の2.5マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認方法；

プライマー対1：配列番号1で表される正方向プライマー及び配列番号2で表される逆方向プライマー；

プライマー対2：配列番号3で表される正方向プライマー及び配列番号4で表される逆方向プライマー；

プライマー対3：配列番号5で表される正方向プライマー及び配列番号6で表される逆方向プライマー；

プライマー対4：配列番号7で表される正方向プライマー及び配列番号8で表される逆

50

方向プライマー；

プライマー対 5：配列番号 9 で表される正方向プライマー及び配列番号 10 で表される逆方向プライマー；

プライマー対 6：配列番号 11 で表される正方向プライマー及び配列番号 12 で表される逆方向プライマー；

プライマー対 7：配列番号 13 で表される正方向プライマー及び配列番号 14 で表される逆方向プライマー；及び

プライマー対 8：配列番号 15 で表される正方向プライマー及び配列番号 16 で表される逆方向プライマー。

[8] 請求項 1 に記載の DNA マイクロアレイチップを含む 2.5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認用キット (kit)。

[9] ヒト体細胞を追加的に含むことを特徴とする、請求項 8 に記載の 2.5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認用キット。

[10] ヒト体細胞が、ヒト肺細胞またはヒト肺癌組織由来細胞であることを特徴とする、請求項 9 に記載の 2.5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認用キット。

[11] 下記の各々の遺伝子に相補的で、下記の各々の遺伝子を増幅することができるプライマー対を含む 2.5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認用キット；

遺伝子登録番号 (Genbank) NM 002457 (MUC2, Homo sapiens mucin 2, oligomeric mucus /gel-forming)、遺伝子登録番号 (Genbank) NM 000065 (C6, Homo sapiens complement component 6)、遺伝子登録番号 (Genbank) NM 002986 (CCL11, Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 11)、遺伝子登録番号 (Genbank) NM 002006 (FGF2, Homo sapiens fibroblast growth factor 2) 及び遺伝子登録番号 (Genbank) NR 002712 (IL8RBP, Homo sapiens interleukin 8 receptor, beta pseudogene)、遺伝子登録番号 (Genbank) NM 000204 (CFI, Homo sapiens complement factor I)、遺伝子登録番号 (Genbank) NM 002747 (MAPK4, Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 4) 及び遺伝子登録番号 (Genbank) NM 013955 (NOX1, Homo sapiens NADPH oxidase 1)。

[12] 前記プライマー対が、下記のプライマー対 1 ～ 8 からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 11 に記載の 2.5 マイクロメートル以下の微小粒子状物質に対する曝露有無確認用キット；

プライマー対 1：配列番号 1 で表される正方向プライマー及び配列番号 2 で表される逆方向プライマー；

プライマー対 2：配列番号 3 で表される正方向プライマー及び配列番号 4 で表される逆方向プライマー；

プライマー対 3：配列番号 5 で表される正方向プライマー及び配列番号 6 で表される逆方向プライマー；

プライマー対 4：配列番号 7 で表される正方向プライマー及び配列番号 8 で表される逆方向プライマー；

プライマー対 5：配列番号 9 で表される正方向プライマー及び配列番号 10 で表される逆方向プライマー；

プライマー対 6：配列番号 11 で表される正方向プライマー及び配列番号 12 で表される逆方向プライマー；

プライマー対 7：配列番号 13 で表される正方向プライマー及び配列番号 14 で表される逆方向プライマー；及び

プライマー対 8：配列番号 15 で表される正方向プライマー及び配列番号 16 で表される逆方向プライマー。

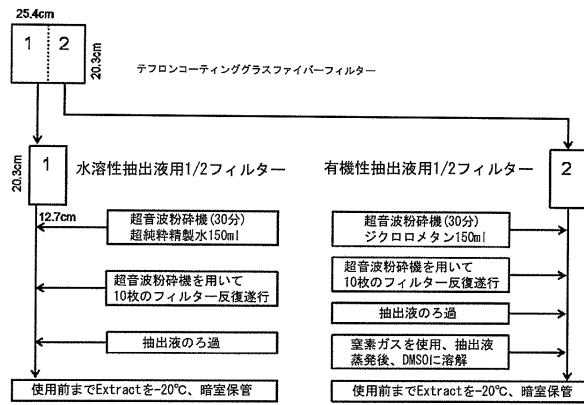
10

20

30

40

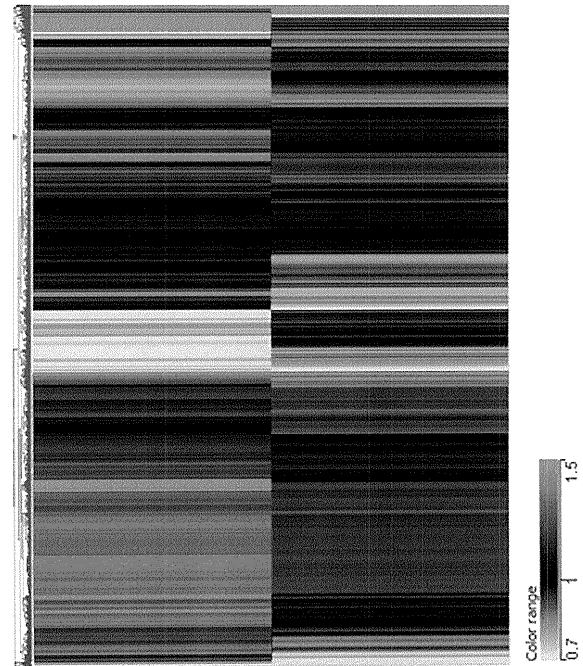
【図 1】



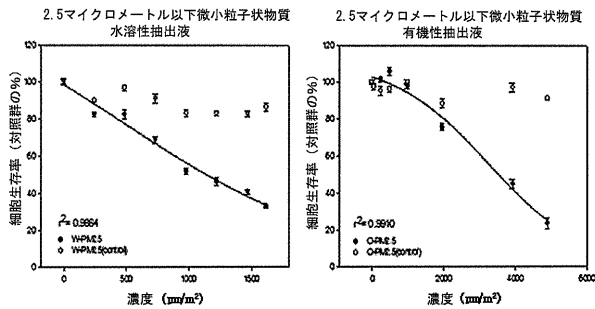
【図 3】

2.5マイクロメートル
以下微小粒子状物質
有機性抽出液

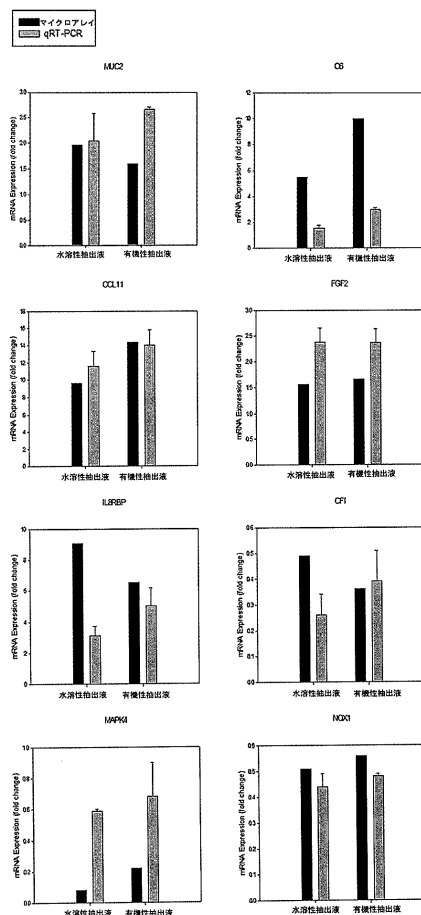
2.5マイクロメートル
以下微小粒子状物質
水溶性抽出液



【図 2】



【図 4】



【配列表】

0005918732000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 リュ, ジェーチュン
大韓民国 110-877 ソウル, チョンノーク, ムアクードン 60, インワン エムティー
. アイパーク アpartment ナンバー107-203
- (72)発明者 シン, チャン ヨン
大韓民国 138-842 ソウル, ソンパーク, ソクチョンドン 17-17, ナンバー20
2
- (72)発明者 ソン, ミーキョン
大韓民国 680-840 ウルサン, ナムーク, ヤウム3ードン, 868-1, ハラ ジョンウ
ォン アpartment ナンバー107-201
- (72)発明者 チョイ, ハンセム
大韓民国 330-882, チュンチョンナムード, チョナンーシ, スシンーミョン, シンブン
1ーリ ナンバー106-10

審査官 長谷川 茜

- (56)参考文献 Toxicology Letters, 2012年, Vol.209, pp.136-145
Particle and Fibre Toxicology, 2012年, Vol.9, pp.1-16
Mutation Research, 2011年, Vol.713, pp.18-31
Toxicology in Vitro, 2009年, Vol.23, pp.37-46

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
C12Q 1/68
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS (STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq