

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6281111号
(P6281111)

(45) 発行日 平成30年2月21日 (2018. 2. 21)

(24) 登録日 平成30年2月2日 (2018. 2. 2)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/68 (2018. 01)

G O 1 N 33/53 (2006. 01)

G O 1 N 37/00 (2006. 01)

G O 1 N 33/50 (2006. 01)

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

G O 1 N 33/53 M

G O 1 N 33/53 D

G O 1 N 37/00 1 O 2

G O 1 N 33/50 Z

請求項の数 11 外国語出願 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-148615 (P2016-148615)

(22) 出願日 平成28年7月28日 (2016. 7. 28)

(65) 公開番号 特開2018-14933 (P2018-14933A)

(43) 公開日 平成30年2月1日 (2018. 2. 1)

審査請求日 平成28年8月26日 (2016. 8. 26)

(31) 優先権主張番号 10-2016-0094644

(32) 優先日 平成28年7月26日 (2016. 7. 26)

(33) 優先権主張国 韓国 (KR)

特許法第30条第2項適用 Journal of S
troke 第18巻第1号 (2016年 1月29日
) 第12-20ページに発表

(73) 特許権者 512196600

サムソン ライフ パブリック ウェルフ

ェア ファウンデーション

大韓民国 140-893 ソウル、ヨンサン

グ、イテウォンロ 55ギル 48番

(74) 代理人 100079049

弁理士 中島 淳

(74) 代理人 100084995

弁理士 加藤 和詳

(72) 発明者 バン、 オ ヨン

大韓民国 135-537 ソウル カン

ナム-ク トゴク 2-ドン サムスン

レミアン アパート 105-601

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 もやもや病診断用バイオマーカー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

カベオリン - 1 (c a v e o l i n - 1) m R N A またはタンパク質の発現水準を測定する製剤を含む、もやもや病の診断用組成物。

【請求項 2】

前記 m R N A 発現水準を測定する製剤は、カベオリン - 1 遺伝子に特異的に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチド、プライマーまたはプローブを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の診断用組成物。

【請求項 3】

前記タンパク質発現水準を測定する製剤は、カベオリン - 1 タンパク質に特異的に結合する抗体を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の診断用組成物。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の組成物を含む、もやもや病の診断用キット。

【請求項 5】

前記キットは、DNA マイクロアレイチップまたはタンパク質チップであることを特徴とする請求項 4 に記載の診断用キット。

【請求項 6】

個体の試料からカベオリン - 1 (c a v e o l i n - 1) m R N A またはタンパク質の発現水準を測定する段階を含む、もやもや病診断のための情報提供方法。

【請求項 7】

10

20

前記個体の試料からカベオリン - 1 発現水準を測定した結果、正常対照群より減少した場合、もやもや病であると判定する段階をさらに含むことを特徴とする請求項 6 に記載の情報提供方法。

【請求項 8】

前記カベオリン - 1 の mRNA 発現水準を測定する段階は、逆転写重合酵素反応 (RT-PCR)、競争的逆転写重合酵素反応 (Competitive RT-PCR)、リアルタイム逆転写重合酵素反応 (Realtime RT-PCR)、RNase 保護分析法 (RPA; RNase protection assay)、またはノーザンブロッティング (Northern blotting) を利用することを特徴とする請求項 6 に記載の情報提供方法。

10

【請求項 9】

前記カベオリン - 1 のタンパク質発現水準を測定する段階は、抗原 - 抗体反応を利用することを特徴とする請求項 6 に記載の情報提供方法。

【請求項 10】

前記抗原 - 抗体反応は、ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)、ウェスタンブロット、放射線免疫分析 (RIA: Radioimmunoassay)、放射免疫拡散法 (radioimmunodiffusion)、オクタロニー (Ouchterlony) 免疫拡散法、ロケット (rocket) 免疫電気泳動、組織免疫染色、免疫沈降分析法 (Immunoprecipitation assay)、補体固定分析法 (Complement Fixation Assay)、FACS (Fluorescence activated cell sorter) またはマイクロアレイ (microarray) 分析法で行うことを特徴とする請求項 9 に記載の情報提供方法。

20

【請求項 11】

前記試料は、血液、血清、血漿、唾液、リンパ液または小便であることを特徴とする請求項 6 に記載の情報提供方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、カベオリン - 1 (caveolin - 1) を含む、もやもや病の診断用バイオマーカー組成物、診断用組成物、診断キット、診断情報提供方法、及び治療剤スクリーニング方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

もやもや病 (moyamoya disease) は、原因不明の脳血管疾患であって、大脳に入る両側の内頸動脈の末端部及び主要分岐 (中大脳動脈、前大脳動脈) の漸進的な狭窄と狭くなった動脈の隣接部位である脳基底部分で細い異常血管が成長して集まっている血管網 (基底の側部循環血管; もやもや血管) が脳血管造影上で現われることを特徴とする (図 1 参照)。主として、韓国を含めて、中国、日本国等極東アジアで好発する比較的珍しい稀な疾患であって、小児の場合、繰り返しの一過性脳虚血発作の形態で現われ、大人では、脳出血がよく現われる。

40

【0003】

もやもや病の診断と関連して、その発病原因が明らかにされていないため、現在としては、侵襲的な血管撮影術を用いた診断が唯一の方法である。しかし、血管撮影上、特徴的なもやもや血管 (moyamoya vessel) は、特異的な所見であるが、すべての患者において観察されるものではなく、特に大人のもやもや病では、小児とは異なって、このようなもやもや血管が観察されない場合が有り勝ちであるため、動脈硬化症による狭窄と鑑別しにくい場合が多い。また、もやもや血管は、疾病の経過によって、初期には観察されない場合が多いため、順次的な血管撮影術が必要なことがある。

50

【 0 0 0 4 】

もやもや病を動脈硬化症のような血管狭窄を起こす他の疾患と鑑別して診断することは、患者の治療において非常に重要である。すなわち、動脈硬化症の場合、抗血小板剤であるスタチン (s t a t i n) の使用が狭窄の進行や脳梗塞の発病を効果的に予防し、ステント挿入術が役に立つが、もやもや病の場合、薬物治療が疾病の経過に役に立たず、ステント挿入術後にも、大部分ステントの閉塞が起きるからである。反対に、もやもや病の治療法において現在まで知られたバイパス手術 (b y p a s s s u r g e r y) は、動脈硬化症による閉塞患者には勧告されないことが現況である。

【 0 0 0 5 】

なお、カベオラ (C a v e o l a e) は、細胞内エンドサイトーシス (e n d o c y t o s i s) において重要な機能をする 5 0 ~ 1 0 0 n m サイズのフラスコ状溝であって、内皮細胞 (e n d o t h e l i a l c e l l) に豊かであり、内皮細胞の小胞輸送 (v e s i c u l a r t r a f f i c k i n g) と信号伝達において重要な役目をするものと知られている (図 2 参照)。

10

【 0 0 0 6 】

この際、カベオラ (C a v e o l a e) を形成 / 維持するのに必須な膜タンパク質であるカベオリン - 1 (c a v e o l i n - 1) は、単純にカベオラ骨格タンパク質としての機能を超えて、骨髄から血管前駆細胞の動員において重要な役目をするだけでなく、腫瘍等疾患の発病に関与するという報告があるが (F r a n k P G 等、A r t e r i o s c l e r T h r o m b V a s c B i o l 2 0 0 3 ; 2 3 : 1 1 6 1 - 8)、未だ、もやもや病との関連性については、報告されたことがない。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 7 】

これより、本発明者は、正常人及び動脈硬化症患者に比べて、もやもや病の患者の血液試料では、カベオリン - 1 の水準が特異的に減少するという事実を確認することによって、本発明を完成するように至った。

【 0 0 0 8 】

したがって、本発明の目的は、カベオリン - 1 (c a v e o l i n - 1) を含む、もやもや病の診断用バイオマーカー組成物、診断用組成物、診断キット、診断情報提供方法、及び治療剤スクリーニング方法を提供することにある。

30

【 0 0 0 9 】

しかし、本発明が解決しようとする技術的課題は、以上で言及した課題に制限されず、言及されない他の課題は、下記の記載から当業者に明確に理解され得る。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 0 】

本発明は、カベオリン - 1 (c a v e o l i n - 1) を含む、もやもや病の診断用バイオマーカー組成物を提供する。

【 0 0 1 1 】

本発明の一具現例において、前記カベオリン - 1 は、もやもや病の個体において m R N A またはタンパク質水準が減少していることを特徴とする。

40

【 0 0 1 2 】

本発明は、カベオリン - 1 (c a v e o l i n - 1) m R N A またはタンパク質の発現水準を測定する製剤を含む、もやもや病の診断用組成物を提供する。

【 0 0 1 3 】

本発明の一具現例において、前記 m R N A 発現水準を測定する製剤は、カベオリン - 1 遺伝子に特異的に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチド、プライマーまたはプローブを含むことを特徴とする。

【 0 0 1 4 】

本発明の他の具現例において、前記タンパク質発現水準を測定する製剤は、カベオリン -

50

1 タンパク質に特異的に結合する抗体を含むことを特徴とする。

【0015】

本発明は、前記診断用組成物を含む、もやもや病の診断用キットを提供する。

【0016】

本発明の一具現例において、前記キットは、DNAマイクロアレイチップまたはタンパク質チップであることを特徴とする。

【0017】

本発明は、個体の試料からカベオリン - 1 (caveolin - 1) mRNA またはタンパク質の発現水準を測定する段階を含む、もやもや病診断のための情報を提供する方法を提供する。

10

【0018】

本発明の一具現例において、前記個体の試料からカベオリン - 1 発現水準を測定した結果、正常対照群より減少した場合、もやもや病であると判定する段階をさらに含むことを特徴とする。

【0019】

本発明の他の具現例において、前記カベオリン - 1 の mRNA 発現水準を測定する段階は、逆転写重合酵素反応 (RT - PCR)、競争的逆転写重合酵素反応 (Competitive RT - PCR)、リアルタイム逆転写重合酵素反応 (Realtime RT - PCR)、RNase 保護分析法 (RPA; RNase protection assay)、またはノーザンブロッティング (Northern blotting) を利用

20

【0020】

本発明のさらに他の具現例において、前記カベオリン - 1 のタンパク質発現水準を測定する段階は、抗原 - 抗体反応を利用することを特徴とする。

【0021】

本発明のさらに他の具現例において、前記抗原 - 抗体反応は、ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)、ウェスタンブロット、放射線免疫分析 (RIA: Radioimmuno assay)、放射免疫拡散法 (radioimmunodiffusion)、オクタロニー (Ouchterlony) 免疫拡散法、ロケット (rocket) 免疫電気泳動、組織免疫染色、免疫沈降分析法 (Immunoprecipitation assay)、補体固定分析法 (Complement Fixation Assay)、FACS (Fluorescence activated cell sorter) またはマイクロアレイ (microarray) 分析法で行うことを特徴とする。

30

【0022】

本発明のさらに他の具現例において、前記試料は、血液、血清、血漿、唾液、リンパ液または小便であることを特徴とする。

【0023】

本発明は、(a) 個体から得られた試料に候補薬物を処理する段階と; (b) カベオリン - 1 (caveolin - 1) の発現プロファイルを検出する段階とを含む、もやもや病治療剤のスクリーニング方法を提供する。

40

【0024】

本発明の一具現例において、前記試料は、血液、血清、血漿、唾液、リンパ液または小便であることを特徴とする。

【発明の効果】

【0025】

本発明のもやもや病の診断方法による場合、類似脳血管狭窄疾患である動脈硬化症と区別され、もやもや病に特異的な治療が可能であるため、不要であるかまたは副作用が同伴され得る危険要素を回避できるので、効果的なもやもや病の治療療法に適用できる。

【0026】

50

また、本発明は、もやもや病の患者の血液試料で特異的に変化するかベオリン - 1 の量を測定して診断する方法であって、簡便で、非侵襲的であり、且つ正確度が高いという長所を持っている。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】正常人ともやもや病の患者の脳血管造影写真である。

【図2】カベオラ (Caveolae) とカベオリン - 1 (caveolin - 1) を示す写真及び模式図である。

【図3】もやもや病の患者 (MMD) においてカベオリン - 1 血清水準が正常群 (Control) と動脈硬化性狭窄患者群 (ICAS) に比べて減少していることを示す結果である。

10

【図4】血管撮影術で診断したもやもや病の患者においてカベオリン - 1 がバイオマーカーとして有用であることを示すROC curveである。

【図5】遺伝的に診断したもやもや病の患者においてカベオリン - 1 がバイオマーカーとして有用であることを示すROC curveである。

【図6】もやもや病発病においてカベオリン - 1 と、もやもや病関連遺伝型、血管生成関連成長因子等との関連性を分析したpath analysis結果である。

【発明を実施するための形態】

【0028】

本発明は、カベオリン - 1 がもやもや病 (MMD) 患者の試料で特異的に減少するという知見に基づくものであって、前記カベオリン - 1 をバイオマーカーとして利用してもやもや病を診断する技術を提供する。

20

【0029】

本発明においては、もやもや病の患者 (MMD)、頭蓋内動脈硬化性狭窄患者 (ICAS; intracranial atherosclerotic stroke)、正常群 (control) から血清を採取し、多様なタンパク質の発現水準を測定して比較評価することによって、動脈硬化症と区別されるもやもや病だけの特異的なバイオマーカーであるカベオリン - 1 を選定した。

【0030】

また、従来、もやもや病の患者の一部が家族歴 (遺伝歴) を示したため、もやもや病と関連した遺伝子として明らかにされたRNF213 (Ring finger 213) (GenBank accession number NM_001256071.1) 変異群とカベオリン - 1 水準との関連性を調査して、遺伝的素因との相関関係を評価した。

30

【0031】

また、caveolin - 1 水準変化が、もやもや病の発病において、angiogenesis因子 (VEGF、VEGFR2、endostatin)、endothelial dysfunction因子 (ADMA、NO、nitrite、nitrate) の作用を媒介するかを評価するために、path analysisを行った。

【0032】

40

本発明において、カベオリン - 1 タンパク質は、公知されたデータベースでその配列情報を確認できる。例えば、ヒトカベオリン - 1 タンパク質のアミノ酸配列は、Genbank accession number Q03135で確認できる。このようなカベオリン - 1 は、もやもや病の患者群の試料で特異的な / 有意性ある発現変化を示すため、もやもや病を診断する診断マーカーとして活用できる。

【0033】

本発明において用語「診断」は、病理状態の存在または特徴を確認することを意味する。本発明の目的上、診断は、もやもや病の発病有無を確認するか、ひいては、疾患の進行可否または深化可否を確認するものである。

【0034】

50

本発明において「マーカー」とは、もやもや病を診断できる物質であって、もやもや病と関連したポリペプチド、核酸（例：mRNA等）、脂質、糖脂質、糖蛋白質、糖（単糖類、二糖類、オリゴ糖類等）等のような有機生体分子等を含む。本発明の目的上、マーカーは、カベオリン - 1 であって、もやもや病の患者において著しく発現が減少するカベオリン - 1 mRNA またはタンパク質である。

【0035】

また、本発明は、カベオリン - 1 (caveolin - 1) mRNA またはタンパク質の発現水準を測定する製剤を含む、もやもや病の診断用組成物を提供する。

【0036】

本発明において mRNA 発現水準測定というのは、もやもや病を診断するために、生物学的試料でもやもや病関連遺伝子 caveolin - 1 の mRNA 存在有無と発現程度を確認する過程であって、mRNA の量を測定して行われる。このための分析方法としては、例えば、逆転写重合酵素反応 (RT - PCR)、競争的逆転写重合酵素反応 (Competitive RT - PCR)、リアルタイム逆転写重合酵素反応 (Realtime RT - PCR)、RNase 保護分析法 (RPA; RNase protection assay)、ノーザンブロッティング (Northern blotting)、DNA チップ等があるが、これに制限されるものではない。本発明において遺伝子の mRNA 水準を測定する製剤は、好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチド、プライマー対またはプローブである。

【0037】

本発明において「アンチセンス」は、アンチセンスオリゴマーがワトソン - クリック塩基対の形成によって RNA 内の標的配列と混成化され、標的配列内で、典型的に mRNA と RNA : オリゴマーヘテロ二量体の形成を許容する、ヌクレオチド塩基の配列及びサブユニット間のバックボーンを有するオリゴマーを指称する。オリゴマーは、標的配列に対する正確な配列相補性または近似相補性を有することができる。このアンチセンスオリゴマーは、mRNA の翻訳を遮断または阻害し、mRNA のスプライス変異体を生産する mRNA のプロセッシング過程を変化させることができる。

【0038】

本発明において「プライマー」は、短い自由 3 末端水酸化基を有する核酸配列であって、相補的な鋳型 (template) と塩基対を形成でき、鋳型鎖コピーのための開始地点として機能をする短い核酸配列を意味する。プライマーは、適切な緩衝溶液及び温度で重合反応 (すなわち、DNA 重合酵素または逆転写酵素) のための試薬及び異なる 4 種のヌクレオシドトリホスフェートの存在の下で DNA 合成が開始できる。

【0039】

本発明において「プローブ」とは、mRNA と特異的結合を達成できる、短くは数塩基乃至長くは数百塩基に該当する RNA または DNA 等の核酸断片を意味し、標識 (Labeling) されていて、特定の mRNA の存在有無を確認できる。プローブは、オリゴヌクレオチドプローブ、単鎖 DNA (single stranded DNA) プローブ、二重鎖 DNA (double stranded DNA) プローブ、RNA プローブ等の形態で製作され得る。適当なプローブの選択及び混成化の条件は、当業界に公知されたものを基に変形できる。

【0040】

本発明のもやもや病関連 caveolin - 1 の核酸配列は、遺伝子銀行に Genbank accession number NC_000007.14、NC_018918.2、NT_007933.16 として登録されているので、当業者は、前記配列に基づいてこれら遺伝子の特定領域を特異的に増幅するアンチセンスオリゴヌクレオチド、プライマー対またはプローブをデザインできる。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド、プライマーまたはプローブは、ホスホロアミダイト固体支持体方法、またはその他広く公知された方法を使用して化学的に合成できる。

【0041】

本発明において「タンパク質発現水準測定」というのは、もやもや病を診断するために、生物学的試料で発現されたタンパク質の存在有無と発現程度を確認する過程であって、タンパク質の量を測定して行われる。このための分析方法としては、ウェスタンブロット、ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)、放射線免疫分析 (RIA: Radioimmunoassay)、放射免疫拡散法 (radioimmunodiffusion)、オクタロニー (Ouchterlony) 免疫拡散法、ロケット (rocket) 免疫電気泳動、組織免疫染色、免疫沈降分析法 (Immunoprecipitation Assay)、補体固定分析法 (Complement Fixation Assay)、蛍光活性化セルソーター (Fluorescence Activated Cell Sorter、FACS)、タンパク質チップ (protein chip) 等があるが、これに制限されるものではない。本発明においてタンパク質発現水準を測定する製剤は、好ましくは、抗体である。

【0042】

ここで、「抗体」とは、当該分野で公知された用語であって、抗原性部位に対して指示される特異的なタンパク質分子を意味する。本発明の目的上、抗体は、本発明のカベオリン-1 マーカーに対して特異的に結合する抗体を意味し、本発明の抗体の形態は、特に制限されず、ポリクロナール抗体、モノクロナール抗体または抗原結合性を有するものであれば、その一部も本発明の抗体に含まれることができる。しかも、本発明の抗体には、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体等の特殊抗体をも含まれる。本発明に使用される抗体は、2 個の全長の軽鎖及び 2 個の全長の重鎖を有する完全な形態だけでなく、抗体分子の機能的な断片を含む。抗体分子の機能的な断片というのは、少なくとも抗原結合機能を保有している断片を意味し、Fab、F(ab')、F(ab')₂ 及び Fv 等がある。

【0043】

また、本発明は、前記診断用組成物を含む、もやもや病の診断用キットを提供する。本発明のキットは、カベオリン-1 の定量手段 (プライマー、プローブ、抗体等) だけでなく、分析方法に適した一種類以上の他の構成成分組成物、溶液または装置がさらに含まれることができ、好ましくは、RT-PCR キット、マイクロアレイチップキット、DNA チップキット、タンパク質チップキット、ELISA キットの形態であることができるが、これに制限されない。

【0044】

例えば、RT-PCR キットは、マーカー遺伝子に対する特異的なそれぞれのプライマー対以外にも、テストチューブまたは他の適切なコンテナ、反応緩衝液、デオキシヌクレオチド (dNTPs)、Taq-重合酵素及び逆転写酵素のような酵素、DNase、RNase 抑制剤、DEPC-水 (DEPC-water)、滅菌水等を含むことができる。ELISA キットの場合、抗原-抗体複合体の免疫学的検出のために、基質、適当な緩衝溶液、発色酵素または蛍光物質で標識された 2 次抗体、及び発色基質等を含むことができる。

【0045】

また、本発明は、個体の試料からカベオリン-1 (caveolin-1) mRNA またはタンパク質の発現水準を測定する段階を含む、もやもや病診断のための情報提供方法を提供する。本発明においては、前記個体の試料からカベオリン-1 の発現水準を測定した結果、正常対照群より減少した場合、もやもや病であると判定する段階をさらに含むことができる。

【0046】

本発明において mRNA 発現水準を測定する方法は、逆転写重合酵素反応 (RT-PCR)、競争的逆転写重合酵素反応 (Competitive RT-PCR)、リアルタイム逆転写重合酵素反応 (Realtime RT-PCR)、RNase 保護分析法 (RPA; RNase protection assay)、ノーザンブロットング (Northern blotting)、DNA チップ等があるが、これに制限されない。

【0047】

本発明においてタンパク質の発現水準を測定する方法は、ウェスタンブロット、ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)、放射線免疫分析 (RIA: Radioimmunoassay)、放射免疫拡散法 (radioimmunodiffusion)、オクタロニー (Ouchterlony) 免疫拡散法、ロケット (rocket) 免疫電気泳動、組織免疫染色、免疫沈降分析法 (Immunoprecipitation Assay)、補体固定分析法 (Complement Fixation Assay)、蛍光活性化セルソーター (Fluorescence Activated Cell Sorter、FACS)、タンパク質チップ (protein chip) 等があるが、これに制限されない。

【0048】

10

また、本発明は、(a) 個体から得られた試料に候補薬物を処理する段階と；(b) カベオリン - 1 (caveolin - 1) の発現プロファイルを検出する段階とを含む、もやもや病治療剤のスクリーニング方法を提供する。

【0049】

本発明において用語「試料」とは、もやもや病によってカベオリン - 1 の水準が異なる組織、細胞、全血、血清、血漿、唾液、喀痰、または小便のような試料等を含むが、これに制限されない。好ましい例としては、血液、血清、血漿試料であることができる。

【0050】

本発明において用語「個体」とは、被検体を意味するものであって、すべての動物、好ましくは、哺乳類、さらに好ましくは、ヒトであることができる。

20

【0051】

以下、本発明の理解を助けるために実施例を提示する。しかし、下記の実施例は、本発明をより容易に理解するために提供されるものに過ぎず、実施例によって本発明の内容が限定されるものではない。

【実施例】

【0052】

実施例 1：もやもや病バイオマーカー選別

1 - 1 . タンパク質発現水準測定

動脈硬化症と区別されるもやもや病だけの特異的なバイオマーカーを選別するために、血管撮影術によって区分されたもやもや病 (MMD) の患者 139 人、頭蓋内動脈硬化性狭窄患者 (ICAS) 61 人、正常群 (control) 68 人からそれぞれ血清を採取した後、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) キットを使用して下記のタンパク質の発現水準を測定した。

30

【0053】

caveoline - 1 ELISA kit (catalog # E0214h; EIAab)、

ADMA ELISA kit (catalog # K7828; Immundiagnostik)、

humans E-selectin ELISA kit (catalog # BEK-2089-2P; Biosensis)、

40

human Endostatin ELISA (catalog # DNST0; R&D systems)、

human lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) ELISA kit (cat # SEA867Hu; Cloud-Clone Corp.)

【0054】

この際、ELISA は、製造社のプロトコルによって行い、SpectraMax 340PC384 Microplate Reader 及び SoftMax (登録商標) Pro Data Analysis Software (Molecular Devices) を利用して分析した。

50

【0055】

その結果、図3から確認できるように、caveolin-1の血中水準は、もやもや病の患者において統計的に有意に減少し、もやもやの類型（虚血性、出血性）と関係なく、また、症状発病の時期と関係なく、このような特徴は維持していることが分かった。

【0056】

1-2. ROC curve

ROC (receiver operating characteristic) カーブは、特定検査の性能を評価するためのモデルであって、敏感度と特異度の相関関係を表現したグラフである。グラフのX軸は、False positive rateを示し、Y軸は、True positive rateを示し、ROCカーブが左側の頂点に近く描かれるほど、classification性能に優れていることを意味する。

10

【0057】

AUC (Area Under Curve) は、classifierの合理性を示す指標であって、ROCカーブの下部の面積を意味する。AUCの最大値は、1であり、1に近い値であるほど、敏感度 (sensitivity) と特異度 (specificity) がすべて高いことを意味するので、優れたclassificationを示す。

【0058】

ROCカーブで、MMDとICASのcaveolin-1 levelの差異を示す最も適合な濃度は、Optimal criterion 0.79 (Sensitivity [95% CI], 81.95 [74.4 - 88.1], Specificity [95% CI], 60.66 [47.3 - 72.9]) である。

20

【0059】

具体的に、ROCカーブ作成のために、STATA、version 13.1; Stata Corp、College Station、TX、USAプログラムを使用し、optimal criterion選定と敏感度、特異度計算のために、ロジスティック回帰分析技法を活用した。

【0060】

その結果、図4に示されたように、血管撮影術で鑑別診断されるもやもや病と動脈硬化性狭窄において、カベオリン-1がこれらを区分できるバイオマーカーとして有用であることが確認できた。

30

【0061】

実施例2：もやもや病と関連した遺伝型RNF213 polymorphism分析

2-1. RNF213変異とcaveolin-1水準の相関関係評価

前記実施例1のように、血管撮影術によって区分されたもやもや病と動脈硬化性狭窄をカベオリン-1の血中水準で鑑別する以外に、もやもや病の遺伝的素因によってカベオリン-1の血中水準に差異があるかを確認するために、頭蓋内狭窄がある患者及び正常人から血清を採取し、カベオリン-1水準を確認した。すなわち、もやもや病と関連した遺伝子として明らかにされたRNF213 (Ring finger 213) (GenBank accession number NM_001256071.1) 変異群とカベオリン-1水準との関連性を調査した。

40

【0062】

このために、まず、末梢血液白血球 (leukocytes) からWizard Genomic DNA Purification kit (Promega) を利用してゲノムDNAを抽出した後、下記のプライマー対を利用して、RNF213 gene (GenBank accession number NM_001256071.1) のc.14429G>A (p.Arg4810Lys) mutationをPCR (thermal cycler model 9700; Applied Biosystems) 増幅した。

Forward primer: 5' - GCTGCATCACAGGAAATGAC - 3'

50

Reverse primer : 5' - AAGGAGTGAGCCGAGTTTGA - 3',

【0063】

その後、PCR増幅産物は、Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems) on an ABI Prism 3730xl genetic analyzer (Applied Biosystems) を利用してシーケンシングし、RNF213変異体を検証した。

【0064】

検証されたRNF213変異群（遺伝的に診断したもやもや病の患者）で血中カベオリン-1の発現水準を測定（caveoline-1 ELISA kit; catalog #E0214h、EIAab）した結果、カベオリン-1の水準が顕著に減少していることを確認した。

【0065】

2-2. ROC curve

実施例2-1の検査性能を評価するために、STATA ver. 13.1プログラムのロジスティック回帰分析（code: lroc, nograph）方法でROC curveを作成した。

【0066】

その結果、図5に示されたように、本発明のカベオリン-1バイオマーカーは、個体がもやもや病関連遺伝型を有しているかを鑑別診断するにあたって有用であることが分かった。このような結果は、遺伝的に診断したもやもや病の患者においてカベオリン-1がバイオマーカーとして有用であることを意味する。

【0067】

2-3. path analysis

カベオリン-1水準変化が、もやもや病の発病において、angiogenesis因子（VEGF、VEGFR2、endostatin）、endothelial dysfunction因子（ADMA、NO、nitrite、nitrate）の作用を媒介するかを評価するために、path analysisを行った。

【0068】

すなわち、もやもや病の患者（MMD）、頭蓋内動脈硬化性狭窄患者（ICAS; intracranial atherosclerotic stroke）、正常群（control）の間に、遺伝的マーカー（RNF213変異）と；タンパク質バイオマーカーとしてcaveolae因子（caveolin-1）、angiogenesis因子（VEGF、VEGFR2、endostatin）、endothelial dysfunction因子（ADMA、NO、nitrite、nitrate）間の相関関係を評価した。

【0069】

具体的に、path analysisは、STATA ver. 13.1プログラムを活用して分析し、2個以上の回帰分析の複合形態である。STATA ver. 13.1プログラムの「pathreg」コードを利用した詳しい事項は、<http://www.ats.ucla.edu/stat/stata/fdq/pathreg.htm> に記述されている。

【0070】

その結果、図6に示されたように、カベオリン-1水準変化は、もやもや病遺伝型（RNF213）と血管生成と関連した成長因子であるVEGF（vascular endothelial growth factor）水準と連関性があることを確認した（ $P\text{ value} < 0.001$ ）。また、もやもや病は、RNF213遺伝型とカベオリン-1水準が同時に連関性があることを確認した（ $P\text{ value} < 0.001$ ）。

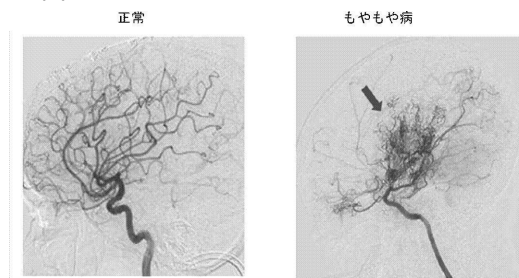
【0071】

したがって、本発明によれば、血液内カベオリン - 1 水準を測定することによって、高い感度 / 特異度でもやもや病を診断できることが分かる。

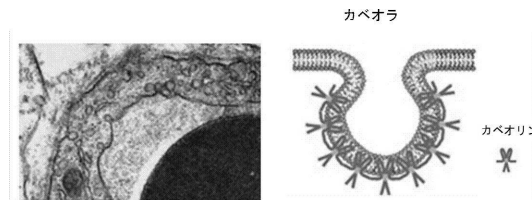
【 0 0 7 2 】

前述した本発明の説明は、例示のためのものであり、本発明の属する技術分野における通常の知識を有する者は、本発明の技術的思想や必須な特徴を変更することなく、他の具体的な形態で容易に変形可能であることを理解できる。したがって、以上で記述した実施例は、すべての面で例示的なものであって、限定的ではないものと理解すべきである。

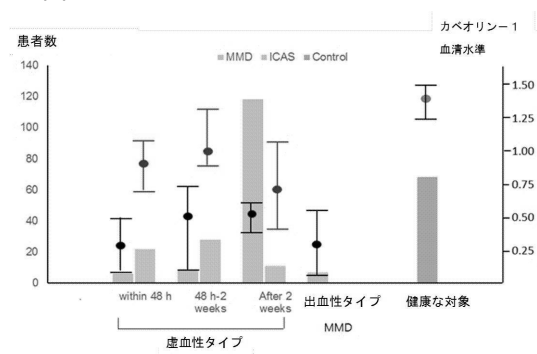
【 図 1 】



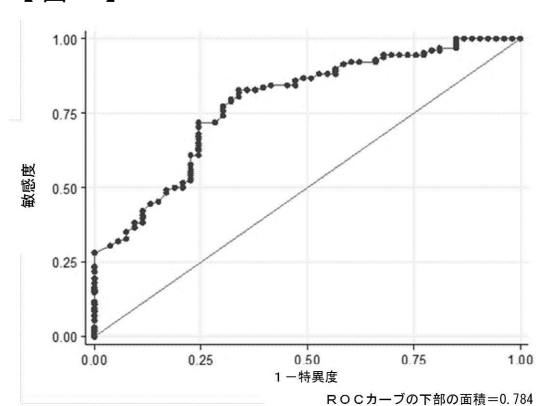
【 図 2 】



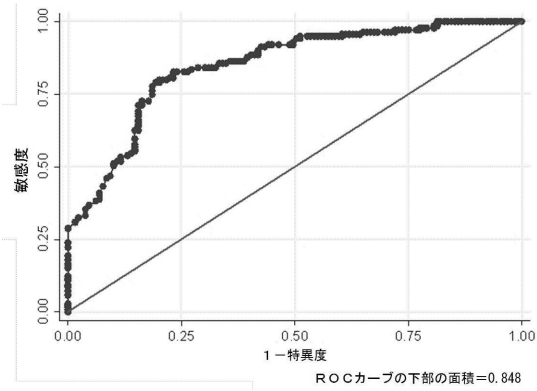
【 図 3 】



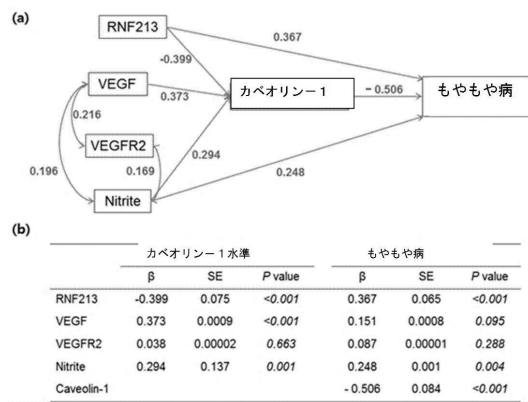
【 図 4 】



【図 5】



【図 6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)		C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 M 1/00 (2006.01)		C 1 2 N 15/00	F
		C 1 2 N 15/00	G
		C 1 2 M 1/00	A

特許法第30条第2項適用 2016年 International Stroke Conference
Poster Abstracts (2016年 2月17日) WP280番に発表

特許法第30条第2項適用 PLOS ONE 第11巻第6号(2016年 6月 2日) e0156607
番(DOI:10.1371/journal.pone.0156607)に発表

(72)発明者 モン、 ギョン ジョン

大韓民国 13643 キョンギ-ド ソンナム-シ スジョン-ク ウィリエスンファン-ロ
220 ブヨン アパート 5502-303

(72)発明者 チュン、 ジョン-ウォン

大韓民国 135-506 ソウル カンナム-ク トゴク 2-ドン トゴク レクセル アパ
ート 101-2206

(72)発明者 オ、 ミ ジョン

大韓民国 01761 ソウル ノウォン-ク トンギル-ロ 215-ギル 48 サンギエ
ジュゴン アパート 305-504

(72)発明者 キム、 ドン ヘ

大韓民国 06339 ソウル カンナム-ク イルウォン-ドン 638-12 ナンバー20
2

(72)発明者 キム、 ソ ヨン

大韓民国 13915 キョンギ-ド アンヤン-シ トンアン-ク ピョンチョン-デロ 44
2 38-13

(72)発明者 チョ、 ヨン ヘ

大韓民国 06370 ソウル カンナム-ク ジャゴク-ロ 260 カンナム ハンヤン ス
ジャイン アパート 406-303

審査官 藤井 美穂

(56)参考文献 Korean J. Urol., 2011年, Vol.52, pp.96-103

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)分担研究報告書, 2007年, 平成18年
度, pp.35-36

BRAIN and NERVE, 2008年, Vol.60, No.11, pp.1261-1269

日本脳循環代謝学会総会プログラム・抄録号, 2012年, Vol.24, No.1, #03-2

Journal of Stroke, 2016年 1月29日, Vol.18, No.1, pp.12-20

International Stroke Conference Poster Abstracts, 2016年 2月17日, Vol.2016th
, #WP280

PLOS ONE, 2016年 6月 2日, Vol.11, No.6, #e0156607

分子脳血管病, 2014年, Vol.13, No.2, pp.54-56

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

P u b M e d

C A p l u s / W P I D S / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)