

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7197755号
(P7197755)

(45)発行日 令和4年12月28日(2022.12.28)

(24)登録日 令和4年12月20日(2022.12.20)

(51)国際特許分類

C 1 2 Q	1/6813(2018.01)	F I	C 1 2 Q	1/6813	Z Z N A
G 0 1 N	33/50 (2006.01)		G 0 1 N	33/50	P
G 0 1 N	33/53 (2006.01)		G 0 1 N	33/53	M
G 0 1 N	37/00 (2006.01)		G 0 1 N	37/00	1 0 2
C 1 2 Q	1/6851(2018.01)		G 0 1 N	37/00	1 0 3

請求項の数 7 (全23頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-560445(P2018-560445)
 (86)(22)出願日 平成29年2月3日(2017.2.3)
 (65)公表番号 特表2019-506183(P2019-506183)
 A)
 (43)公表日 平成31年3月7日(2019.3.7)
 (86)国際出願番号 PCT/US2017/016412
 (87)国際公開番号 WO2017/136662
 (87)国際公開日 平成29年8月10日(2017.8.10)
 審査請求日 令和1年12月4日(2019.12.4)
 (31)優先権主張番号 62/291,619
 (32)優先日 平成28年2月5日(2016.2.5)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(73)特許権者 518277099
 セント・ジョーンズ・ユニバーシティ
 S T . J O H N S U N I V E R S I T Y
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 114
 39 ユートピア パークウェイ クイー
 ナズ 8000
 8000 Utopia Parkway
 , Queens, New York 1
 1439 US
 (74)代理人 100186750
 弁理士 藤本 健司
 (72)発明者 サイモン・ガイア・モラー
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 114
 39 ユートピア パークウェイ クイー
 ナズ 8000 セント・ジョーンズ・ユ
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 循環血清マイクロRNAバイオマーカー及び方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

体液のサンプルにおけるパーキンソン病疾患の判定を補助する方法であって、前記サンプル中において配列番号2~86からなる群から選択される少なくとも3つのmiRNAの存在を示すレベルを判定するステップであって、前記3つのmiRNAのうち少なくとも2つは配列番号22,25および77からなる群から選択されるステップと、前記少なくとも2つのmiRNAのうち少なくとも1つのmiRNAの存在を示す前記レベルが健常な対照と比較して1.2倍以上である場合にパーキンソン疾患のリスクが高いと判定するステップと、を含む、方法。

【請求項2】

体液のサンプルにおけるパーキンソン病疾患の判定を補助する方法であって、前記サンプル中において配列番号22,25および77からなる群から選択される少なくとも2つのmiRNAの存在を示すレベルを判定するステップと、前記少なくとも2つのmiRNAのうち少なくとも1つのmiRNAの存在を示す前記レベルが健常な対照と比較して1.2倍以上である場合にパーキンソン疾患のリスクが高いと判定するステップと、を含む、方法。

【請求項3】

前記サンプルが血清、血漿または全血である、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記miRNAの存在がqRT-PCRを用いて判定される、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 5】

前記miRNAの存在が、標識されたアンチセンススクレオチド配列を用いて判定される、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 6】

前記miRNAの存在が、マイクロアレイプロファイリングを使用して判定される、請求項2に記載の方法。

【請求項 7】

前記miRNAの存在が、ハイスループットNGS配列決定を用いて決定される、請求項2に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】**【0001】**

本発明は、一般に、血清に基づくマイクロRNA、およびパーキンソン病に罹患している患者を識別するための方法、ならびに臨床医がこのような患者の処置プロトコルを決定するのを支援する方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

パーキンソン病(PD)は、中脳の黒質のドーパミン含有細胞の非常に特異的な変性であり、線条体においてドーパミン欠乏を引き起こす。PDは現在、世界中で約1,000万人の人々が罹患している。初期の5~7年間はPD患者への効果的な処理が可能であるが、その後は、患者をしばしば衰弱させる一連の合併症(併せて後期運動変動(Late Motor Fluctuations)(LMF)と呼ばれる)が発生する。最も効果的な抗パーキンソン薬であるレボドーパ((-)-L-アミノ-(3,4-ジヒドロキシベンゼン)プロパン酸)またはL-ドーパでの治療は、LMFの出現を許容または促進させてしまう可能性があると考えられている。ドーパミンアゴニスト(ドーパミン作用薬)は治療選択肢として使用されるが、Lドーパと同じ程度の患者の症候緩和は得られない。

20

【0003】

対症療法は、根底にある病状に影響を与える徴候および症状を改善する。レボドーパは、特にその末梢代謝が末梢デカルボキシラーゼ阻害剤(PDI)によって阻害される場合に、線条体におけるドーパミン濃度を増加させる。レボドーパ/PDI治療は、パーキンソン病の対症療法として広く用いられ、例えば、レボドーパ、カルビドーパ((-)-L-ヒドラジノ-メチル-(3,4-ジヒドロキシベンゼン)プロパン酸-水和物)、レボドーパと放出抑制カルビドーパ、レボドーパとベンゼラジド、又は、レボドーパと放出抑制ベンゼラジド(2-アミノ-3-ヒドロキシ-プロピオン酸N'-(2,3,4-トリヒドロキシ-ベンジル)-ヒドラジド)と併用される。

30

【0004】

カテコール-O-メチルトランスフェラーゼ(COMT)阻害剤は、レボドーパの代謝を抑制し、そのバイオアベイラビリティーを増強し、それにより、より多くの薬物がシナプス間隙でより長期間利用できるようになるので、レボドーパ治療を強化する。COMT阻害剤の例としては、トルカポン(3,4-ジヒドロキシ-4'-メチル-5-ニトロベンゾフェノン)およびエンタカポン((E)-2-シアノ-3-(3,4-ジヒドロキシ-5-ニトロフェニル)-N,N-ジエチル-2-プロペニアミド)が挙げられる。

40

【0005】

ドーパミンアゴニストは、シナプス後線条体ドーパミン受容体を直接刺激することにより症状の改善をもたらす。ドーパミンアゴニストの例としては、プロモクリブチン((5a)-2-プロモ-12'-ヒドロキシ-2'-(1-メチルエチル)-5'-(2-メチルプロピル)エルゴタマン-3',6',18-トリオン)、ペルゴリド(8B-[メチルチオ]メチル]-6-プロピルエルゴリン)、ロピニロール(4-[2-(ジプロピルアミノ)エチル]-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン)、プラミペキソール((S)-4,5,6,7-テトラヒドロ-N⁶-プロピル-2,6-ベンゾチアゾールジアミン)、リスリド(N'-(8a)-9,10-ジデヒドロ-6-メチルエルゴリン-

50

8-イル]-N,N-ジメチル-尿素)、カベルゴリン((8)-N-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-N-[エチルアミノ]カルボニル]-6-(2-プロペニル)エルゴリン-8-カルボキサミド)、アポモルヒネ((6aR)-5,6,6a,7-テトラヒドロ-6-メチル-4H-ジベンゾ[de,g]キノリン-10,11-ジオール)、スマニロール(5-(メチルアミノ)-5,6-ジヒドロ-4H-イミダゾ{4,5,1-ij}キノリン-2(1H)-オン)、ロチゴチン((-)(S)-5,6,7,8-テトラヒドロ-6-[プロピル[2-(2-チエニル)エチル]アミノ]-1-ナフトール-)、タリベキソール(5,6,7,8-テトラヒドロ-6-(2-プロペニル)-4H-チアゾロ[4,5-d]アゼピン-2-アミン)、及びジヒドロエルゴクリプチン(エルゴタマン-3',6',18-トリオン,9,10-ジヒドロ-12'-ヒドロキシ-2'-メチル-5'-(フェニルメチル)(5'cc))が挙げられる。ドーパミンアゴニストは、パーキンソン病の早期における単剤療法として、および、より進行した段階でのレボドーパへの補助剤として有効である。レボドーパとは異なり、ドーパミンアゴニストは、シナプス後のドーパミン受容体を直接刺激する。これらは酸化的代謝を受けず、病気の進行を加速させないと考えられている。

【0006】

アマンチジン(1-アミノトリシクロ(3,3,1,1^{3,7})デカン)は、抗パーキンソン病活性を有することが偶然発見された抗ウイルス剤である。PDにおけるその作用メカニズムは立証されていないが、ドーパミン放出を増加させることによって作用すると考えられている。アマンチジンを単剤療法またはレボドーパと併用して投与された患者は、無動、硬直および振戦の改善を示す。

【0007】

パーキンソン病の治療に用いられる他の薬剤としては、MAO-B阻害剤が挙げられる。モノアミノオキシダーゼタイプB(MAO-B)の不活性化によるL-ドーパ代謝の抑制は、内因性残留ドーパミンおよびその前駆体であるL-ドーパ由来の外因性ドーパミンの両方の有効性を高める有効な手段である。セレギリン(メチル-(1-メチル-2-フェニル-エチル)-プロピ-2-イニル-アミン)はMAO-B阻害剤である。セレギリンによる治療が、ドーパミンの酸化的代謝に由来するフリーラジカルの形成を阻止することにより、PDにおける疾患の進行を遅らせる可能性があるという証拠がある。MAO-B阻害剤の他の例としては、ラザベミド(N-(2-アミノエチル)-5-クロロ-2-ピリジンカルボキサミド)、ラサジリン(N-プロパルギル-1-(R)アミノインダンおよびカロキサゾン(2-オキソ-2H-1,3-ベンゾキサジン-3(4H)-アセトアミド)が挙げられる。

【0008】

治療薬の有効性を高めるためには、PDに罹患した個人を早期に診断することが不可欠である。しかし、PDを診断するための客観的試験も確立されたバイオマーカーも存在しない。さらに、疾患の異種性、サブタイプおよび進行は、具体的な治療法候補の開発を困難にしている。

【0009】

マイクロRNA(「miRNA」)は、遺伝子発現の調節において重要な役割を果たす非コードRNAのクラスである。miRNAは転写後レベルで作用し、哺乳類のタンパク質をコード化する遺伝子の最大30%までの発現を微調整する。成熟したmiRNAは長さ約22ヌクレオチドの短い一本鎖RNA分子である。miRNAは複数の遺伝子座でコード化されたものである場合があり、転写された複数のクラスターを縦列に組織したものである場合がある。miRNAの遺伝子はRNAポリメラーゼIIによって大きな一次転写物(pre-microRNA)として転写され、RNaseIII酵素Drosha、DGC8および他の補因子を含むタンパク質複合体によって処理されて、約70ヌクレオチド前駆体マイクロRNA(pre-miRNA)を形成する(Cathew RW, Cell, 2009; Kim VN, Nat Rev Mol Cel Biol, 2009; Siomi H, Mol Cel, 2010; Bartel DP, Cell, 2004; Lee Y, Nature 2003; Han J, Genes Dev, 2004)。

Pre-miRNAは、Exportin-5によって細胞質に輸送され、RNA誘導型サイレンシング複合体中のTRBP、PACTおよびAgo2とともに第2のRNaseIII酵素であるDICERによって処理され、2本鎖のmiRNAを生じる(Kim VN, Nat Rev Mol Cel Biol, 2009; Gregory RI, Nature 2004; MacRae IJ, PNAS, 2008)。2本鎖のmiRNAのガイド鎖は、分離

10

20

30

40

50

して Ago2 と結合し、リボ核粒子へ取り込まれて遺伝子サイレンシングを媒介する RNA 誘導型サイレンシング複合体 RISC を形成する。miRNA のメカニズムは、mRNA の直接分解またはサイレンシングと翻訳の抑制から転写後の上方調節に及ぶ。（MacRae IJ, PNAS, 2008.）

【0010】

miRNA は、血液、脳脊髄液（CSF）、血漿、血清および唾液を含む体液中で検出可能なレベルで存在することが報告されている。miRNA の組織特異性は、様々な生理学的プロセスにおけるそれらの必要かつ不可欠な役割を示唆している。組織濃縮は、診断バイオマーカーおよび潜在的な治療標的として新規であるがあまり探索されていない役割を果たすことが期待される。

循環 miRNA は、細胞溶解またはアポトーシス（細胞自然死）の結果としての損傷組織からの受動的漏出、エキソソームなどの微小胞を介した細胞からの能動輸送、または RISC タンパク質複合体内での結合に由来すると理解される（Etheridge ら, 2011）。小型 RNA 分子の脳および CNS へのエキソソームおよび浸透圧ポンプ媒介送達は、miRNA に基づく療法の限界を克服する解決策を提供する（Alvarez-Erviti ら, 2011; Koval ら, 2013, Hum. Mol. Gen.）。miRNA は、きわめて安定であることが実証されたので、潜在的バイオマーカーである有力な候補として存在する（Chen ら, 2008; Grasso, 2014）。

【文献】 Etheridge ら, 2011

Alvarez-Erviti ら, 2011

Koval ら, 2013, Hum. Mol. Gen

Chen ら, 2008

Grasso, 2014 発明の概要

【0011】

本発明の 1 つの目的は、パーキンソン病に罹患している患者に関連する miRNA を同定することである。

本発明の他の目的は、パーキンソン病に罹患している患者を判定する方法を提供することである。

これらの 1 つの目的および他の目的は、パーキンソン病に罹患している患者を判定するために、単独で、対で、または組み合わせて使用され得る miRNA バイオマーカーを提供する本発明によって達成される。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図 1】PD 患者と健常対照との間の 3 つの PARK miRNA の平均比率（mean fold change）を示す図である。

【図 2 A】モデルから予測された確率に基づき真の疾患状態と比較した ROC 分析を示す図である。

【図 2 B】モデルから予測された禁止に基づく ROC 分析を示す図である。

【図 3】モデルから予測された確率に基づき真の疾患状態と比較した ROC 分析を示す図である。

【図 4】モデルから予測された確率に基づき真の疾患状態と比較した ROC 分析を示す図である。

【図 5】モデルから予測された確率に基づき真の疾患状態と比較した ROC 分析を示す図である。

【図 6 A】パーキンソン病タンパク質を標的とするマイクロ RNA を説明する図である。

【図 6 B】パーキンソン病タンパク質を標的とするマイクロ RNA を説明する図である。

【図 6 C】パーキンソン病タンパク質を標的とするマイクロ RNA を説明する図である。

【図 6 D】パーキンソン病タンパク質を標的とするマイクロ RNA を説明する図である。

【図 6 E】パーキンソン病タンパク質を標的とするマイクロ RNA を説明する図である。

【図 6 F】パーキンソン病タンパク質を標的とするマイクロ RNA を説明する図である。

【図 6 G】パーキンソン病タンパク質を標的とするマイクロ RNA を説明する図である。

10

20

30

40

50

【図6 H】パーキンソン病タンパク質を標的とするマイクロRNAを説明する図である。

【図7】モデルから予測された確率に基づき真の疾患状態と比較したROC分析を示す図である。

【図8】モデルから予測された確率に基づき真の疾患状態と比較したROC分析を示す図である。

【図9】モデルから予測された確率に基づき真の疾患状態と比較したROC分析を示す図である。

【図10】モデルから予測された確率に基づき真の疾患状態と比較したROC分析を示す図である。発明の詳細な説明方法 血清サンプルの取り扱いと分類 すべての患者および対照は、PDの発生率、神経生物学および予後を調べる、進行中の有望な人口ベースの縦断コホート研究である、ノルウェーのPark WestプロジェクトまたはスウェーデンのNYPUM研究に参加した。ノルウェーのPark West研究は、有望な縦断マルチセンターコホート研究であり、西部と南部のノルウェーからのインシデントパーキンソン病（PD）の患者を対象としている。2004年11月1日から2006年8月31日の間に、研究領域内のすべての新規パーキンソン病患者を募集するよう努めた。研究の開始以来、これらの患者の265人のうち212人（80%）および年齢/性別に一致した対照群が追跡されている。このプロジェクトの詳細については、<http://www.parkvest.no>を参照されたい。NYPUM研究は2004年に始まり、Umea集水地域内の特発性パーキンソニズムを有するすべての新規症例を同定し、それらの疾患の進行を少なくとも5年間追跡するよう努めている。この研究の詳細については、<http://www.ufbi.umu.se/english/collaborations/current-projects/nypum/>をご覧頂きたい。10
20

【0013】

任意抽出の集団の代表的な（population-representative）PDに罹患した患者のコホート（群）を確立するために、すべての可能な努力が行われた。試験参加時に血清を提供し、遅くとも追跡調査までに国立神経学的疾患および脳卒中研究所（http://www.ninds.nih.gov/disorders/parkinsons_disease/parkinsons_disease.htm）および英国脳バンク（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gap/cgi-bin/GetPdf.cgi?id=phd00042>）のPDの診断基準を満たしていた者は、患者に含めた。研究エントリーで二次パーキンソニズムを有する患者は、本研究から除外した。対照被験者は、友人、配偶者、および高齢者の公的機関を含む複数の出所から募集され、血清を提供していればこの研究に含まれていた。すべての患者および対照は白人であった。30

PDのための可能なバイオマーカーについてのこの研究では、2段階手順を適用した。最初の発見段階では、16人の患者および8人の対照からの血清をランダムに選択した。残りの164人のPD患者およびこの研究に適格であった182人の対照が、確認のために選択された。

血清サンプルを臨床検査と同じ日に採取し、ドライアイスにより摂氏-70度で凍結保存し、ニューヨークの施設に輸送した。

【0014】

実施例1：差異的に発現したヒトmiRNAのqPCRによる分析

血清サンプルからのRNA単離およびQC

氷上で解凍した後、24個の血清サンプル（8個の対照、16個のPDサンプル）を3000×gで5分間スピンドウンして破片を除去した。上清を用い、miRCURY RNA Isolation Kit - Biofluids（Exiqon, MA）を使用して小さなRNAの単離を行った。RNA単離の前に、溶解緩衝液を0.267fmol/ulのスパイクインコントロールcel-miR-39-3p（Qiagen, CA）でスパイクした。RNA単離工程の残りの部分は、メーカーのプロトコルに従って実施し、単離したRNAをNanodrop 2000（Thermo Scientific, MA）で定量した。このRNAを用いて、Affymetrix v4マイクロRNAマイクロアレイチップを実施し、その後のcDNA合成およびqPCRも行った。上記のように434の血清サンプル（NYPUM研究の22の対照および42のPD、Park Westプロジェクトの190の対照および180のWD）由来のRNAを単離したが、これらはNanodropによって定量化されなかったが、これらの試料から得られ40
50

たqPCRデータは、参照用小RNAであるscaRNA17により正規化された。

【 0 0 1 5 】

miRNAマイクロアレイとデータ解析

24の患者の血清サンプルから単離されたRNAを定量し、ゲイルム分析のためのYale Center (<http://medicine.y3le.edu/keci/ycgaindex.aspx>) によってAffymetrix Gene Chip (登録商標) miRNA 4.0アレイに供した。Affymetrix Expression Consoleソフトウェアから得られた正規化されたCELファイルは、Partek Genomics Suiteバージョン6.6 Copyright 2012 (Partek, MO) にインポートされ、分析された。「マイクロRNA発現ワークフロー」を用い、ANOVAを用いて差異的に発現したmiRNAを検出し、対照との比較でPDコホートにおいて有意に($p < 0.05$)発現したmiRNAのリストを示した。検出されたmiRNAをさらなるqPCR検証に使用した。10

【 0 0 1 6 】

定量的ポリメラーゼ連鎖反応

miRNA特異的qPCRのためのcDNAは、qScript (商標) microRNA cDNA Synthesisキット (Quanta Biosciences, MD) を用いてメーカーのプロトコルに従って合成し、次いで各qPCRを、miRNA特異的フォワードプライマー(表#)およびPerfeCTa (登録商標) ユニバーサルPCRプライマー (Quanta Biosciences, MD) を用いて行った。sca RNA17およびU6は、qPCR Cq値を正規化するための参照用小RNAとして使用したが、cel-miR-39-3pはスパイクインコントロールとして使用した。

PerfeCTa (登録商標) SYBR (登録商標) GREEN SuperMix for IQ (商標) (Quanta Biosciences, MD) を、MyiQ (商標) 単色リアルタイムPCR検出システム (Bio-Rad, CA) のすべてのqPCRに使用した。cel-miR-39-3pの標準曲線を、 $R^2=0.97882$ およびPCR効率92.96%の条件でMS Excelで分析した。必要に応じて、テンプレート制御なし(NTC)が暗示された。20

【 0 0 1 7 】

PDモデルに基づくデータ解析

PD診断に関する各miRNAの識別能力は、IBM SPSS Statistics、バージョン21を用いたROC分析から評価した。miRNAの組み合わせについて、試験変数は、結果としてのPD診断(yes/no)へのロジスティック回帰から予測された確率とした。適合(fit)に及ぼす異常値の影響を最小限に抑えるために、対数変換したmiRNA値を用いてロジスティック回帰を行った。30

【 0 0 1 8 】

ノルウェーのPark West研究からのパーキンソン病患者血清試料における特異的に発現したヒトmiRNAを、miRNAマイクロアレイを用いて判定した。1.2倍の差異発現を有するmiRNAとして、以下のものがある。

【 0 0 1 9 】

85個の差異的に発現したヒトの未成熟及び成熟miRNA (比率 1.2倍)

hsa-miR-548ac, hsa-miR-335-5p, hsa-miR-548x-3p, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-548ae, hsa-miR-3910-1, hsa-miR-4708-3p, hsa-miR-16-2-3p, hsa-miR-603, hsa-miR-3613-3p, hsa-miR-4797-5p, hsa-miR-548aj-3p, hsa-miR-450b-5p, hsa-miR-548ap-3p, hsa-miR-1184, hsa-miR-2277-5p, hsa-miR-1323, hsa-miR-548aa, hsa-miR-548t-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-190a-3p, hsa-miR-6873-5p, hsa-miR-155-3p, hsa-miR-510-5p, hsa-miR-4313, hsa-miR-3616, hsa-miR-8075, hsa-miR-4306, hsa-miR-6776, hsa-miR-6075, hsa-miR-8052, hsa-miR-532, hsa-miR-4791, hsa-miR-320b-1, hsa-miR-548y, hsa-miR-7973, hsa-miR-3136-5p, hsa-miR-606, hsa-miR-500a-3p, hsa-miR-4788, hsa-miR-4769-3p, hsa-miR-299-5p, hsa-miR-4431, hsa-miR-6749-5p, hsa-miR-138-2-3p, hsa-miR-1289-2, hsa-miR-548au, hsa-miR-6850, hsa-miR-561, hsa-miR-34b-5p, hsa-miR-3934-5p, hsa-miR-6739-5p, hsa-miR-4325, hsa-miR-4672, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-4685-5p, hsa-miR-3160-1, hsa-miR-3160-2, hsa-miR-6793-5p, hsa-mi40

R-8089, hsa-miR-6081, hsa-miR-892b, hsa-miR-936, hsa-miR-548ag, hsa-miR-345, hsa-miR-548k, hsa-miR-3188, hsa-miR-181b-5p, hsa-let-7e, hsa-miR-4487, hsa-miR-509-3p, hsa-miR-3689a-3p, hsa-miR-4771, hsa-miR-520a-5p, hsa-miR-3150b, hsa-miR-6782-5p, hsa-miR-937-5p, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-6865-3p, hsa-miR-4749-5p, hsa-miR-378b, hsa-miR-7706, hsa-miR-4445 及び hsa-miR-2355-5p

【 0 0 2 0 】

57個の差異的に発現した成熟miRNA (比率 1.2)

hsa-miR-548ac, hsa-miR-335-5p, hsa-miR-548x-3p, hsa-miR-548ae, hsa-miR-4708-3p, hsa-miR-16-2-3p, hsa-miR-603, hsa-miR-3613-3p, hsa-miR-4797-5p, hsa-miR-548aj-3p, hsa-miR-450b-5p, hsa-miR-548ap-3p, hsa-miR-1184, hsa-miR-2277-5p, hsa-miR-1323, hsa-miR-548aa, hsa-miR-548t-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-190a-3p, hsa-miR-6873-5p, hsa-miR-155-3p, hsa-miR-510-5p, hsa-miR-4313, hsa-miR-4306, hsa-miR-8052, hsa-miR-4791, hsa-miR-7973, hsa-miR-3136-5p, hsa-miR-606, hsa-miR-500a-3p, hsa-miR-4769-3p, hsa-miR-299-5p, hsa-miR-6749-5p, hsa-miR-138-2-3p, hsa-miR-34b-5p, hsa-miR-3934-5p, hsa-miR-6739-5p, hsa-miR-4325, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-4685-5p, hsa-miR-6793-5p, hsa-miR-936, hsa-miR-548ag, hsa-miR-548k, hsa-miR-181b-5p, hsa-let-7e, hsa-miR-509-3p, hsa-miR-3689a-3p, hsa-miR-4771, hsa-miR-520a-5p, hsa-miR-6782-5p, hsa-miR-937-5p, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-6865-3p, hsa-miR-4749-5p, hsa-miR-378b 及び hsa-miR-2355-5p

【 0 0 2 1 】

28個の差異的に発現した未成熟miRNA (比率 1.2)

hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-3910-1, hsa-miR-3616, hsa-miR-8075, hsa-miR-6776, hsa-miR-6075, hsa-miR-532, hsa-miR-320b-1, hsa-miR-548y, hsa-miR-4788, hsa-miR-4431, hsa-miR-1289-2, hsa-miR-548au, hsa-miR-6850, hsa-miR-561, hsa-miR-4672, hsa-miR-3160-1, hsa-miR-3160-2, hsa-miR-8089, hsa-miR-6081, hsa-miR-892b, hsa-miR-345, hsa-miR-3188, hsa-miR-4487, hsa-miR-3150b, hsa-miR-7706 及び hsa-miR-4445

これらの差異的に発現した各miRNAの配列を、対照として用いた参照/ハウスキーピング小RNAであるcel-miR-39-3p U6およびScaRNA17とともに、以下の表1 - 1から1 - 5に示す。Cel-miR-39-3pはスパイクイン対照で、RNA試料の安定性を実証する。U6およびScaRNA17は、残りのmiRNA又は候補miRNAの読み取り値を正規化するための内部対照として用いられる。

【 0 0 2 2 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1 - 1

マイクロ RNA/小 RNA 名	マイクロ RNA 配列
cel-miR-39-3p	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG (SEQ ID NO:1)
hsa-let-7e	UGAGGUAGGAGGUUGUUAAGUU (SEQ ID NO:2)
hsa-miR-1184	CCUGCAGCGACUUGAUGGCUUCC (SEQ ID NO:3)
hsa-miR-1289-2	CCACGGUCCUAGUUAAAAAGGCACAUUCCUAGACCC UGCCUCAGAACUACUGAACAGAGUCACUGGGUGGG AGUCCAGGAUCUGCAUUUUACCCCUAUCGCC (SEQ ID NO:4)
hsa-miR-1323	UCAAAACUGAGGGGCAUUUUCU (SEQ ID NO:5)
hsa-miR-138-2-3p	GCUAUUCACGACACCAGGGUU (SEQ ID NO:6)
hsa-miR-155-3p	CUCCUACAUAAUAGCAUUAACA (SEQ ID NO:7)
hsa-miR-16-2-3p	CCAAUAAUACUGUGCUGCUUUA (SEQ ID NO:8)
hsa-miR-181b-5p	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU (SEQ ID NO:9)
hsa-miR-190a-3p	CUAAUAUCAAACAAUAAUCCU (SEQ ID NO:10)
hsa-miR-215-5p	AUGACCUAUGAAUUGACAGAC (SEQ ID NO:11)
hsa-miR-221-5p	ACCUGGGCAUACAAUGUAGAUUU (SEQ ID NO:12)
hsa-miR-2277-5p	AGCGCGGGCUGAGCGCUGCCAGUC (SEQ ID NO:13)
hsa-miR-2355-5p	AUCCCCAGAUACAAUGGACAA (SEQ ID NO:14)
hsa-miR-299-5p	UGGUUUACCGUCCCACAUACAU (SEQ ID NO:15)
hsa-miR-3136-5p	CUGACUGAAUAGGUAGGGUCAUU (SEQ ID NO:16)
hsa-miR-3150b	GAGGGAAAGCAGGCCAACCUUCGAGGAUCUCCCCAGC CUUGGCGUUUCAGGUGCUGAGGAGAUUCGUCGAGGUUG GCCUGCUUCCCC (SEQ ID NO:17)
hsa-miR-3160-1	GGACCUGCCCUGGGCUUUCUAGUCUCAGCUCUCCUC CAGCUCAGCUGGUACAGGAGAGCUGAGACUAGAAAGC CCAGGGCAGGUUC (SEQ ID NO:18)
hsa-miR-3160-2	ACCUGCCCUGGGCUUUCUAGUCUCAGCUCUCCUGAC CAGCUGAGCUGGAGGGAGAGCUGAGACUAGAAAGCCC AGGGCAGGU (SEQ ID NO:19)
hsa-miR-3188	GGCGCCUCCUGCUCUGCUGUGGCCGCCAGGGCCUCC CUAGCGGCCUUCUGGAGAGGCUUUGUGCGGAUACG GGGCUGGAGGCCU (SEQ ID NO:20)
hsa-miR-320b-1	AAUUAUCCCCUCUUCUAGUUCUUCUAGAGUGA GGAAAAGCUGGGUUGAGAGGGCAAACAAUUAACUA AUUAAU (SEQ ID NO:21)
hsa-miR-335-5p	UCAAGAGCAUAACGAAAAAUGU (SEQ ID NO:22)

10

20

30

40

50

【表1 - 2】

表1 - 2

マイクロ RNA/小 RNA 名	マイクロ RNA 配列
hsa-miR-345	ACCCAAACCCUAGGUCUGCUGACUCCUAGGUCCAGGG CUCGUGAUGGCUGGUCCCCUGAACGAGGGGUCUG GAGGCCUGGGUUUUGAAUAUCGACAGC (SEQ ID NO: 23)
hsa-miR-34b-5p	UAGGCAGUGUCAUUAGCUGAUUG (SEQ ID NO: 24)
hsa-miR-3613-3p	ACAAAAAAAAGCCCACCCUUC (SEQ ID NO: 25)
hsa-miR-3616	UGUCACUCCGCCAGCAUCAUGAAGUGCACUCAUGAU AUGUUUGCCCCAUCAGCGUGUCACGAGGGCAUUUCA UGAUGCAGGCAGGGUUGGCA (SEQ ID NO: 26)
hsa-miR-3689a-3p	CUGGGAGGUGUGUAAUCGUGGU (SEQ ID NO: 27)
hsa-miR-378b	ACUGGACUUGGAGGCAGAA (SEQ ID NO: 28)
hsa-miR-3910-1	CUUUUGCUGUCAGUUUUUCUGUUGCUUGUCUUGGUU UUAUGCCUUUUUAUCAAGGCACAUAAAAGGCAUAA AACCAAGACAAGCAACAAAAAAAGGAUUGAUCACAG AAG (SEQ ID NO: 29)
hsa-miR-3934-5p	UCAGGUGUGGAAACUGAGGCAG (SEQ ID NO: 30)
hsa-miR-4306	UGGAGAGAAAGGCAGUA (SEQ ID NO: 31)
hsa-miR-4313	AGCCCCCUGGCCAAACCC (SEQ ID NO: 32)
hsa-miR-4325	UUGCACUUGUCUCAGUGA (SEQ ID NO: 33)
hsa-miR-4431	UGGUUUGCGACUCUGAAAACUAGAAGGUUUAUGACU GGGCAUUUCUCACCCAAUGCCAUAUUGAACUUUC UAGUUGUCAGAGUCAUUAACCC (SEQ ID NO: 34)
hsa-miR-4445	UUCCUGCAGAUUGUUUCUUUUGCCGUGCAAGUUAA GUUUUUGCACGGCAAAGAAACAAUCCAGAGGGU (SEQ ID NO: 35)
hsa-miR-4487	ACUGUCCUUCAGCCAGAGCUGGCUGAAGGGCAGAAG GGAACUGGUCCUUCAGCCAGAGCUGGCUGAAGGGCAG A (SEQ ID NO: 36)
hsa-miR-450b-5p	UUUUGCAAAUAGUUCCUGAAUA (SEQ ID NO: 37)
hsa-miR-455-3p	GCAGUCCAUGGGCAUAUACAC (SEQ ID NO: 38)
hsa-miR-4672	GGCUGCUUCUCGCCUCUGUCCAGCUGUGUGGCCUUG GACAAGCCUCUUGGUUACACAGCUGGACAGAGGCAC GAAACAGCC (SEQ ID NO: 39)
hsa-miR-4685-5p	CCCAGGGCUUGGAGUGGGCAAGGUU (SEQ ID NO: 40)

10

20

30

40

50

【表1-3】

表1-3

マイクロ RNA/小 RNA 名	マイクロ RNA 配列
hsa-miR-4708-3p	AGCAAGGCGGCAUCUCUCUGAU (SEQ ID NO: 41)
hsa-miR-4749-5p	UGC GGGGACAGGCCAGGGCAUC (SEQ ID NO: 42)
hsa-miR-4769-3p	UCUGCCAUCCUCCCCUCCUAC (SEQ ID NO: 43)
hsa-miR-4771	AGCAGACUUGACCACAAUUA (SEQ ID NO: 44)
hsa-miR-4788	AAUGAAGGAUUACGGACCAGCUAAGGGAGGC AUUAG GAUCCUUAAUUCUUGCCUCCCUAAGUUGGUCCC UAAU CCUUCGUU (SEQ ID NO: 45)
hsa-miR-4791	UGGAU AUGAUGACUGAAA (SEQ ID NO: 46)
hsa-miR-4797-5p	GACAGAGUGCCACUACUGAA (SEQ ID NO: 47)
hsa-miR-500a-3p	AUGCACCUGGGCAAGGAUUCUG (SEQ ID NO: 48)
hsa-miR-509-3p	UGAUUGGUACGUCUGUGGUAG (SEQ ID NO: 49)
hsa-miR-510-5p	UACUCAGGAGAGUGGCAAUCAC (SEQ ID NO: 50)
hsa-miR-520a-5p	CUCCAGAGGGAAAGUACUUUCU (SEQ ID NO: 51)
hsa-miR-520g	UCCCAUGCUGUGACCCUCUAGAGGAAGCACUUUCUG UUUGUUGUCUGAGAAAAAACAAAGUGCUUCCCUUA GAGUGUUACCGUUUGGGA (SEQ ID NO: 52)
hsa-miR-520h	UCCCAUGCUGUGACCCUCUAGAGGAAGCACUUUCUG UUUGUUGUCUGAGAAAAAACAAAGUGCUUCCCUUA GAGUUACUGUUUGGGA (SEQ ID NO: 53)
hsa-miR-532	CGACUUGC CUUUCUCUCCUCCAU GCUUGAGGUAGG ACCGUUGGCAUCUUAUUACCCUCCCACACCC AAGG CUUGCAGAAGAGCGAGCCU (SEQ ID NO: 54)
hsa-miR-548aa	AAAAACCAAAUACUUUUGCACCA (SEQ ID NO: 55)
hsa-miR-548ac	AAAAAACCGGCAAUUACUUUUG (SEQ ID NO: 56)
hsa-miR-548ae	AAAAAACUGCAAUUACUUUCA (SEQ ID NO: 57)
hsa-miR-548ag	AAAGGUAAUUGUGGUUUCUGC (SEQ ID NO: 58)
hsa-miR-548aj-3p	AAAAAACUGCAAUUACUUUUA (SEQ ID NO: 59)
hsa-miR-548ap-3p	AAAAACCAAAUACUUUU (SEQ ID NO: 60)
hsa-miR-548au	AAAAGUAAUUGC GGUUUUUGCUAUUGGUUUUAUGG CAGUUACUUUUGCACCA (SEQ ID NO: 61)
hsa-miR-548k	AAAAGUACUUGCGGAUUUUGCU (SEQ ID NO: 62)

10

20

30

40

50

【表1-4】

表1-4

マイクロ RNA/小 RNA 名	マイクロ RNA 配列
hsa-miR-548t-3p	AAAAAACACAAUUACUUUUGCACCA (SEQ ID NO: 63)
hsa-miR-548x-3p	AAAAAACUGCAAUUACUUUC (SEQ ID NO: 64)
hsa-miR-548y	GCCUAAACUAUUAGGUUGGUGCAAAGUAUCACUG UUUUUGCCAUUACUCUCAGUGGCACCGUGAU ACUUUUGCACCAACCUAAGUAACACCUUACUGUGGG GG (SEQ ID NO: 65)
hsa-miR-561	CUUCAUCCACCAGUCCUCAGGAACAUCAGGAUCU UAAAACUUUUGCCAGAGCUACAAAGGCAAAGUUUAAGA UCCUUGAAGUUCUCCUGGGGGAACCAU (SEQ ID NO: 66)
hsa-miR-603	CACACACUGCAAUUACUUUUGC (SEQ ID NO: 67)
hsa-miR-606	AAACUACUGAAAAUCAAAGAU (SEQ ID NO: 68)
hsa-miR-6075	GACACCACAUGCUCCUCAGGCCUGCCUGCCCCUCCA GGUCAUGUUCUCCAGUGUCCCACAGAUGCAGCACACG GCCCAAGGGGGCAUUGGUGUCACC (SEQ ID NO: 69)
hsa-miR-6081	CCACCACGGUGCUGGCACCAGGGCCUCUGCCCCGUA GGACACCGAGGCUUUAUGAAUAGGAGCAGUGCCCCGG AAGGCGCCGGCACCAUCUUGGUGAU (SEQ ID NO: 70)
hsa-miR-6739-5p	UGGGAAAGAGAAAGAACAGUA (SEQ ID NO: 71)
hsa-miR-6749-5p	UCGGGCCUGGGGUUGGGGGAGC (SEQ ID NO: 72)
hsa-miR-6776	CGGGCUCUGGGUGCAGUGGGGGUUCCCACGCCGG CAACCACACUGUCUCUCCCCAG (SEQ ID NO: 73)
hsa-miR-6782-5p	UAGGGGUGGGGGAAUUCAGGGGUGU (SEQ ID NO: 74)
hsa-miR-6793-5p	UCCCCAACCCUGCCCGCAG (SEQ ID NO: 75)
hsa-miR-6850	GUGCGGAACGCUGGCCGGGGGGAGGGGAAGGGAC GCCCGGCCGGAACGCCGCACUCACG (SEQ ID NO: 76)
hsa-miR-6865-3p	ACACCCUCUUUCCUACCGCC (SEQ ID NO: 77)
hsa-miR-6873-5p	CAGAGGGAAUACAGAGGGCAAU (SEQ ID NO: 78)
hsa-miR-7706	UGGAGCUGUGUGCAGGGCCAGCGCGGAGCCCAGCA GCCCGGCCUGUGCUCUGCCGAGA (SEQ ID NO: 79)

10

20

30

40

50

【表1-5】

表1-5

マイクロRNA/小RNA名	マイクロRNA配列
hsa-miR-7973	UGUGACCCUAGAAUAAUAC (SEQ ID NO:80)
hsa-miR-8052	CGGGACUGUAGAGGGCAUGAGC (SEQ ID NO:81)
hsa-miR-8075	CCUUGCUGAUGGCAGAUGUCGGAUCUGCCUCGUUA UACGUGCCUUGCUGAUGGCAGAUGUCGGGUCUGCC UCGUUAU (SEQ ID NO:82)
hsa-miR-8089	AAGGAGCACUCACUCCAAUUUCCCUGGACUGGGGC AGGCUGCCACCUCCUGGGGACAGGGGAUUGGGGCAG GAUGUCCAG (SEQ ID NO:83)
hsa-miR-892b	UGCAAUGCCCCUACUCAGAAAGGUGCCAUUUAUGUAG AUUUUAUGUCACUGGCUCUUCUGGUAGAGCAAG GCUCA (SEQ ID NO:84)
hsa-miR-936	ACAGUAGAGGGAGGAUUCGCAG (SEQ ID NO:85)
hsa-miR-937-5p	GUGAGUCAGGGUGGGCUGG (SEQ ID NO:86)
scaRNA17	AGAGGCCUUGGGCCGGCGAGCUGGACCCGGACCGGUU UUGGGUACUGUACUGGGGGCAGGGCAGAGAGGG (SEQ ID NO:87)
U6	GUGCUCGCUUCGGCAGCACAUUAACUAAAUGGAA CGAUACAGAGAAGAUUAGCAUGGCCCCUGCGCAAGG AUGACACGCAAAUUCGUGAAGCGUUCUCAAUUUU (SEQ ID NO:88)

10

20

30

【0023】

実施例2：16人の患者と8人の対照のサンプルコホートについての、qPCRによるヒトの成熟miRNAの検証

hsa-miR-335-5p、hsa-miR-3613-3pおよびhsa-miR-6865-3pの各PARKmiRについて、PD患者と健常対照との間の平均比率（mean fold change）を下記の表2に示し、図1に示す。

【表2】

40

表2

PARKmiR	比率(fold change)	優位性(significance)
hsa-miR-335-5p	1.64	0.02
hsa-miR-3613-3p	2.16	0.004
hsa-miR-6865-3p	1.65	0.03

【0024】

実施例3：ノルウェーのPark West調査からの346個体（182個の対照および164個のPD血清試料）のコホートについての、hsa-miR-335-5pおよびhsa-miR-6865-3pの分析
実施例2のqPCR技術を用いて潜在的な診断バイオマーカーを同定した。hsa-miR-335-5pとhsa-miR-6865-3pの組み合わせはPD診断の予測可能性が高いことが、判明した。hsa-miR-335-5pおよびhsa-miR-6865-3pを有するモデルの、アウトカム=PD (YES/NO)、n=(164の患者+182の対照)における結果を、以下の表3に示す。

50

【表 3】

表 3 : 164 人の PD 患者および 182 人の対照についての、PARKmiR の個体および組合せの統計的分析

miRNA	患者 (n=164) 中央値 (IQR)	対照 (n=182) 中央値 (IQR)	P ¹	曲線下側の面積 (95% CI)	P ²
335	1.4 (0.5~ 2.7)	0.12 (0.06~ 0.22)	<0.001	0.90 (0.87~ 0.93)	<0.001
6865	2.7 (1.1~ 6.8)	1.0 (0.8~ 1.5)	<0.001	0.74 (0.69~ 0.80)	<0.001
3613	0.41 (0.19~ 0.92)	0.21 (0.09~ 0.49)	<0.001	0.65 (0.59~ 0.71)	<0.001
335/6865	該当なし	該当なし	該当なし	0.90 (0.87~ 0.93)	<0.001
335/3613	該当なし	該当なし	該当なし	0.90 (0.87~ 0.94)	<0.001

10

【0025】

真の疾患状態と比較した予測確率に基づくROC分析は、図2aに示すように、強い識別能力を示す。図2aの曲線の下の面積を上記の表3に示す。

【0026】

実施例4：346人のコホート（182の対照および164のPD血清サンプル）におけるhsa-miR-335-5pおよびhsa-miR-3613-3pの分析

実施例3のプロトコルに従って分析し、hsa-miR-335-5pおよびhsa-miR-3613-3pの組み合わせもPD診断の高い予測可能性を示すことが判明した。hsa-miR-335-5pおよびhsa-miR-3613-3pのモデルの、アウトカム=PD (YES/NO)、n= (164の患者+182の対照)における結果を、上記の表3に示す。

20

【0027】

モデルから予測された確率に基づくROC分析は、強い識別能力を示すことが、図2bに示される。図2bの曲線下側の面積を上記の表3に示す。

【0028】

前述の実施例1～4から、同定された85のmiRNAのリストに由来する2つ以上のマイクロRNAの任意の組み合わせが、患者におけるPDの発生を診断するために使用され得ることが立証される。

30

【0029】**実施例5：hsa-miR-335-5p**

上記の表3は、hsa-miR-335-5pが、アウトカム=PD (YES/NO)、n= (164の患者+182の対照)においてPD診断の高い予測可能性を示すことを示している。

【0030】

モデルからの確率と真の疾患状態との比較に基づくROC分析は、強い識別能力を示すことが図3に示される。図3の曲線下側の面積を上記の表3に示す。

【0031】**実施例6：hsa-miR-3613-3p**

hsa-miR-3613-3pもまた、上記の表3に示すように、PD診断の高い予測可能性を示す。モデルからの確率と真の疾患状態との比較に基づくROC分析は、図4に示すように強い識別能力を示す。図4の曲線下側の面積を上記表3に示す。

40

【0032】**実施例7：hsa-miR-6865-3p**

同様に、hsa-miR-6865-3pはまた、上記の表3に示すように、PD診断の高い予測可能性を示す。モデルからの確率に基づくROC分析および強い識別能力を示す真の疾患状態との比較を図5に示す。図5の曲線下側の面積を表3に示す。

【0033】

上記の実施例5～7から、hsa-miR-335-5p、hsa-miR-3613-3pおよびhsa-miR-6865-3pが、PDの正確な診断のために個別に使用され得ることが立証される。

50

【 0 0 3 4 】

実施例 8：スウェーデンのNYPUM研究からの64人のコホート（22の対照および42のPDの血清サンプル）におけるhsa-miR-335-5pおよびhsa-miR-6865-3pの分析

実施例 2 の qPCR 技術を用いて、実施例 2 の診断バイオマーカーを検証した。hsa-miR-335-5p および hsa-miR-6865-3p の組み合わせは、PD 診断の予測可能性が高いことが判明した。hsa-miR-335-5p および hsa-miR-6865-3p のモデルについて、アウトカム=PD (YES/NO)、n= (42 の患者+22 の対照) の場合の結果を、以下の表 4 に示す。

【表 4】

表 4：NYPUM 研究の 42 人の PD 患者および 22 人の対照からの PARKmiR の個別および組合せの統計分析。

miRNA(s)	患者 (n=42) 中間値 (IQR)	対照 (n=22) 中間値 (IQR)	P ¹	曲線下側の面積 (95% CI)	P ²
335	1.3 (0.79 to 2.2)	1.1 (0.71 to 1.4)	0.125	0.62 (0.48 to 0.75)	0.127
3613	2.1 (1.2 to 3.3)	1.2 (1.0 to 1.6)	0.012	0.74 (0.62 to 0.86)	0.002
6865	1.5 (1.2 to 2.2)	1.2 (1.0 to 1.4)	0.002	0.69 (0.56 to 0.82)	0.012
335/3613	該当なし	該当なし	該当なし	0.75 (0.63 to 0.87)	0.001
335/6865	該当なし	該当なし	該当なし	0.71 (0.59 to 0.84)	0.006
3613/6865	該当なし	該当なし	該当なし	0.75 (0.63 to 0.87)	0.001
335/3613/6865	該当なし	該当なし	該当なし	0.76 (0.64 to 0.87)	0.001

【 0 0 3 5 】

真の疾患状態と比較した予測確率に基づくROC分析は、図 7 に示すように、高い識別能力を示す。図 7 の曲線の下側の面積を、上記の表 4 に示す。

【 0 0 3 6 】

実施例 9：64人（22個の対照および42個のPD血清サンプル）のコホートにおけるhsa-miR-335-5pおよびhsa-miR-3613-3pの分析

実施例 3 のプロトコルに従って分析し、hsa-miR-335-5p と hsa-miR-3613-3p の組み合わせも PD 診断の高い予測可能性を示すことが判明した。hsa-miR-335-5p および hsa-miR-3613-3p のモデルの、アウトカム=PD (YES/NO)、n= (42 の患者+22 の対照) における結果を表 4 に示す。

【 0 0 3 7 】

モデルから予測された確率に基づくROC分析は、図 8 に示すように、高い識別能力を示す。図 8 の曲線下側の面積を上記の表 4 に示す。

【 0 0 3 8 】

実施例 10：64人（22の対照および42のPD患者の血清サンプル）のコホートにおけるhsa-miR-3613-3pおよびhsa-miR-6865-5pの分析

実施例 3 のプロトコルに従って分析し、hsa-miR-3613-3p および hsa-miR-6865-5p の組み合わせも PD 診断の高い予測可能性を示すことが判明した。hsa-miR-3613-3p および hsa-miR-6865-5p のモデルの、アウトカム=PD (YES/NO)、n= (42 の患者+22 の対照) における結果を表 4 に示す。

【 0 0 3 9 】

モデルから予測された確率に基づくROC分析は、図 9 に示すように、高い識別能力を示す。図 9 の曲線下側の面積を上記の表 4 に示す。

【 0 0 4 0 】

実施例 11：64人（22個の対照および42個のPD血清サンプル）のコホートにおけるhs

10

20

30

40

50

a-miR-335-5p、hsa-miR-3613-3pおよびhsa-miR-6865-5pの分析

実施例3のプロトコルに従って分析し、hsa-miR-hsa-miR-335-5p、hsa-miR-3613-3pおよびhsa-miR-6865-5pの組合せもPD診断の高い予測可能性を示すことが判明した。hsa-miR-335-5p、hsa-miR-3613-3pおよびhsa-miR-6865-5pのモデルの、アウトカム=PD (YES/NO) 、n= (42の患者+22の対照) における結果を、上記の表4に示す。

【 0 0 4 1 】

モデルから予測された確率に基づくROC分析は、図10に示すように、高い識別能力を示す。図10の曲線下側の面積を上記の表4に示す。

【 0 0 4 2 】

上記の実施例10から、同定された85のmiRNAのリストからの3つ以上のマイクロRNAの任意の組み合わせが、患者におけるPDの発生を診断するために使用できることが立証される。10

【 0 0 4 3 】

実施例12

複数の生物情報学ツールを用いたhsa-miR-335-5p、hsa-miR-3613-3pおよびhsa-miR-6865-3p標的の分析から、とりわけ、LRRK2およびParkinがhsa-miR-335-5pの予測標的であり、SNCAがhsa-miR-3613-3pの予測標的であることが示される。hsa-miR-335-5pレベルの調節の結果としてのSHSY-5Y細胞におけるLRRK2発現の調節は、ウェスタンプロット分析によって確認された。hsa-miR-335-5pを、神経芽腫細胞に導入 (transfect) されたhsa-miR-335-5pの模倣物およびアンタゴニルを用いて過剰発現させ (図6 A) 、阻害した (図6 A) 。導入 (transfection) の48時間後に細胞を溶解し、ウェスタンプロット分析に使用した。hsa-miR-335-5p模倣物はLRRK2の下方調節を示し、hsa-miR-335-5pアンタゴニアはLRRK2の上方調節を示した (図6 B , C) 。hsa-miR-3613-3pは、適度にSH-SY5Y細胞におけるSNCA発現を調節した。hsa-miR-335-5pと同様の実験的アプローチがhsa-miR-3613-3p (図6 D) に適用され、その結果、タンパク質レベル (図6 E , F) および転写レベル (図6 G) において、hsa-miR-3613-3p模倣物で中程度のSNCA上方調節を示し、miR-3613-3pアンタゴニルで中程度のSNCA下方調節を示した。20

【 0 0 4 4 】

LC-MSを用いた標的発見は、hsa-miR-335-5p、hsa-miR-3613-3pおよびhsa-miR-6865-3pの新規標的を見出すために行つた。30

a . hsa-miR-335-5p調節の結果としての異なる発現パターンを有するタンパク質としては、acadsb , slc4a7 , lnp/kiaa1715 , supt5h , sdhd , Wdr1 , cmpk1 , slc25a1 , hmgcs1 , twf2 , ppp1r18 , exoc8 , tm9sf4 , kif16b , dnajc2 , selli , hectd1 , gmppbなどがある。

b . hsa-miR-3613-3p調節の結果としての異なる発現パターンを有するタンパク質としては、wdr1 , gmppb , hmbs , eml4 , hebp1 , apmap/c20orf3 , sord , pcyt2 , stat3 , top2a , skiv212 , cdc20 , myo1e , ttll12 , atad2 , carm1 , arfgap1 , ppp4r1 , nde1/nde11などがある。

c . hsa-miR-6865-3p調節の結果としての異なる発現パターンを有するタンパク質としては、wdr1 , ppplr18 , ppp4r1 , ube2h , ube3c , stx16 , ube4h , gtf2f1 , map1b , ube2a , dusp3 , argap1 , nsun2 , acox1 , fkbp10 , fam107b , pofut1 , tomm22 , hspb8 , sbdsなどがある。40

【 0 0 4 5 】

実施例13

患者からの血清中の2つ以上のmiRNAの組み合わせのレベルの測定は、潜在的なPD患者と健常者とを明確に区別するのを助けることができる。PDの疑いのある患者から採取した血液から血清サンプルを得る。血清は、全マイクロRNA単離および濃縮のために使用される。次いで、このRNAをqPCRを用いて試験して、実施例1に記載の85個のmiRNAのいずれか2個以上、または実施例5～7に記載の3個のmiRNAのいずれか1個のレベルを測定す50

る。85種のmiRNAのうちの2種以上、または3種のmiRNAのいずれか1種が検出可能なレベルである場合、患者がPDを有することを確認する。必要に応じて、血漿、静脈または動脈血、または腰椎穿刺によって採取されたCSF試料を含む他の試料液を利用することができる。そのような血漿、血液またはCSF試料は上記のように処理される。2つ以上のmiRNAを組み合わせて、または試験マトリックスで使用される組み合わせのセットを測定することにより、望ましくはPD診断の精度が向上することが理解されよう。

【0046】

実施例14

診断のためにmiRNAの組み合わせを使用することができるので、コホートに基づく変異を排除するために全ての候補を試験することが望ましい場合がある。関連miRNAのいずれかが検出可能な量存在する場合、PD病理を示すことが理解される。しかしながら、当業者であれば、診断のための人工的閾値を設定するために164v 182サンプルの値を使用することが臨床的に有用であり得ることを認識している。特異的miRNAレベルは、診断および臨床試験で臨床医が使用できる診断バイオマーカーキットを開発するために使用できる。この研究では、血清からのmiRNAの存在および定量は、RNAを增幅および定量するqRT-PCRによって判定された。当業者に公知の他の適切な技術、例えば標識されたアンチセンス配列および標識された抗体の使用など、を代替的に利用してもよい。適切な抗体は、2つの分子間の結合反応、典型的には測定条件下でバックグラウンド分子会合の10~100倍を超える、を参照して優先的に選択可能である。したがって、所定の免疫学的測定条件で、指定された抗体は特定のmiRNA配列に結合し、それによってその存在を同定する。そのような条件下での抗体への特異的結合は、特定のmiRNAに対するその特異性のために選択される抗体を必要とする。例えば、特定のmiRNAに対して産生された抗体は、他の分子と交差反応する抗体を差し引くことによって選択することができる。様々な免疫学的フォーマットを使用して、特定のmiRNAと特異的に免疫反応する抗体を選択することができ、例えば、固相ELISA免疫学的検定が用いられる（特定の免疫反応を判定するために用いられる免疫学的フォーマットと条件についての記載は、例えば、Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988) を参照のこと）。2つの分子が特異的に相互作用するかどうかを判定する方法がここに開示されており、結合親和性および特異性を判定する方法は、当技術分野で周知である（例えば、Harlow and Lane, *Antibodies : A laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988); Friedelder, "Physical Biochemistry : Applications to biochemistry and molecular biology" (W.H. Freeman and co. 1976) 参照）。用語「抗体」は、本明細書では、天然に存在する抗体ならびに天然に存在しない抗体、例えば、一本鎖抗体、キメラ、二官能性及びヒト化抗体、ならびに、これらの抗原結合フラグメント（例えば、Fab'、F(ab')₂、Fab、FvおよびrIgG）を含む。Pierceカタログおよびハンドブック、1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) も参照されたい。また、Kuby, J., *Immunology*, 3rd Ed., W.H. Freeman & Co., New York (1998) も参照されたい。このような天然に存在しない抗体は、固相ペプチド合成を用いて構築することができ、組換えにより産生することができ、または、例えばHuseら, *Science*, Vol. 246 (1989) 1275-81に記載のように、様々な重鎖と様々な軽鎖からなる組み換えライブラリをスクリーニングすることによって得ることができる。例えば、キメラ、ヒト化、CDR移植、一本鎖および二官能性抗体を作製するためのこれらおよび他の方法は、当業者に周知である (Winter and Harris, *Immuno. Today*, Vol. 14 (1993) 243-46; Wardら, *Nature*, Vol. 341 (1989) 544-46、HarlowおよびLane, *supra*, 1988; Hilyardら, *Protein Engineering : A practical approach* (IRL Press 1992); Borrebeck, *Antibody Engineering*, 第2版 (Oxford University Press 1995))。同定されたRNA配列から単クローナル性抗体および多クローナル性抗体の両方を産生する方法は、当技術分野で周知である。

【0047】

実施例15

多くの神経変性疾患は、症状および病理学的マーカーに関して、互いに密接に関連して

10

20

30

40

50

いる。1つの神経変性疾患の循環診断マーカーは、他の疾患の診断に有用であり得る。レビュイ 小体認知症 (DLB) 、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 、アルツハイマー病 (AD) 、多系統萎縮症 (MSA) 、大脳皮質基底核変性症 (CBD) 、進行性核上麻痺 (PSP) などの他の神経変性疾患を診断する方法も、上記の候補の類似のmiRNA測定を用いて開発することができる。疾患特異的キットは、[0037]に列挙されたものと同様に、[0019]に列挙されたmiRNAの様々な組み合わせを用いて開発することができる。

【0048】

実施例 16

1つまたは複数の組み合わせで検出されたmiRNAは、細胞内のいくつかのタンパク質を調節することができる。これらのマイクロRNAおよびその組み合わせを使用して、PDの新規タンパク質標的を見出すことができる。PD病因におけるこれらのタンパク質の関与をさらに確証して、治療のためにそれらを標的とすることができる。

10

【0049】

実施例 17

本発明者らは、ドーパミン作動性ニューロン細胞系におけるhsa-miR-335-5pによるLRK2の予測される調節およびhsa-miR-3613-3pによるSNCAの予測される調節を、実験により確認した。言及された新規標的を調節するための治療的介入は、RNA干渉技術によって達成することができる。

【0050】

実施例 18

[0019]に記載されたmiRNAに由来する小さな核酸分子は、PD脳における遺伝子を特異的に標的化することによって治療的に介入して、完全または部分的治療を達成するよう設計される。[0040]に示される効果は、脳細胞における正確な標的化のために達成されるであろう。

20

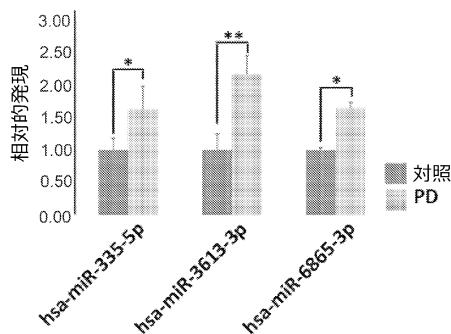
30

40

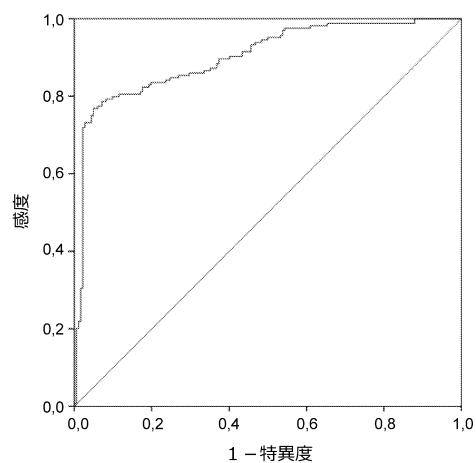
50

【図面】

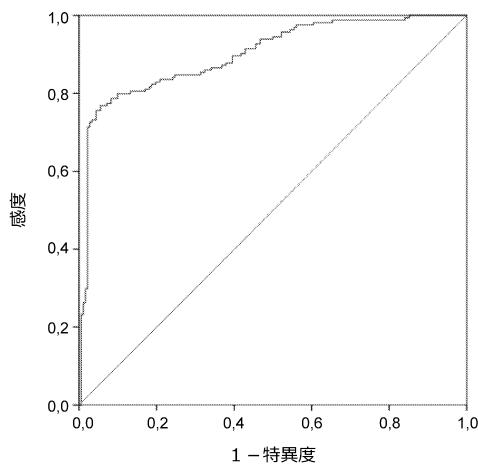
【図 1】



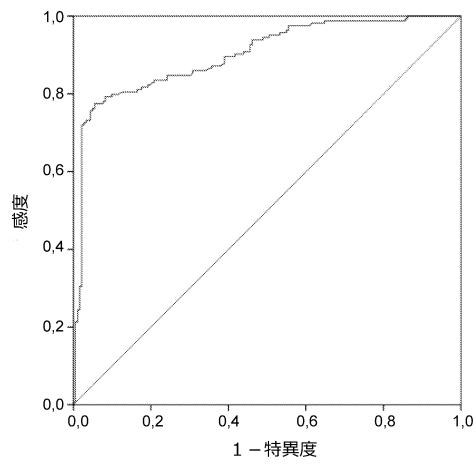
【図 2 A】



【図 2 B】



【図 3】



10

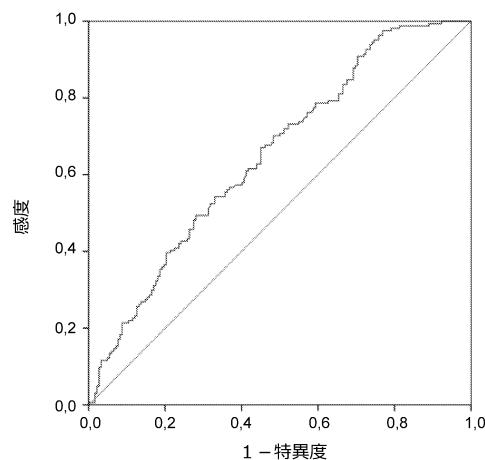
20

30

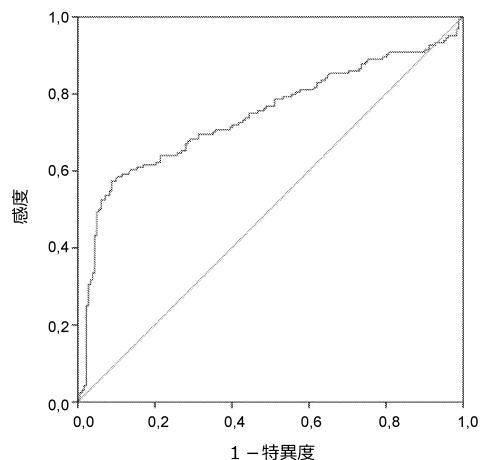
40

50

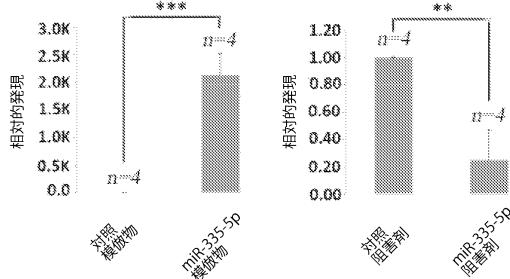
【図4】



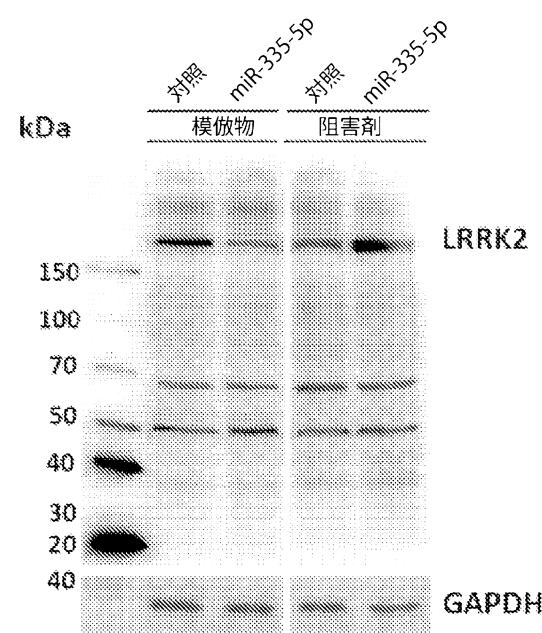
【図5】



【図6 A】



【図6 B】



10

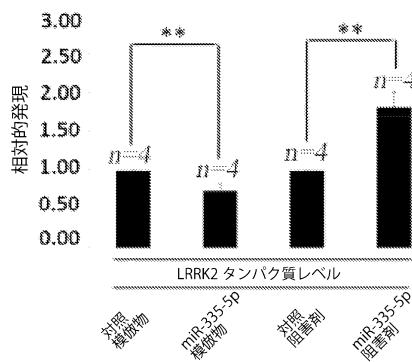
20

30

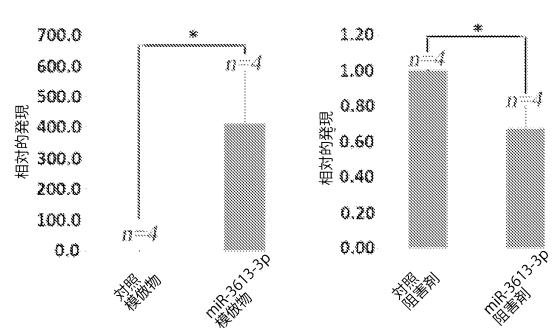
40

50

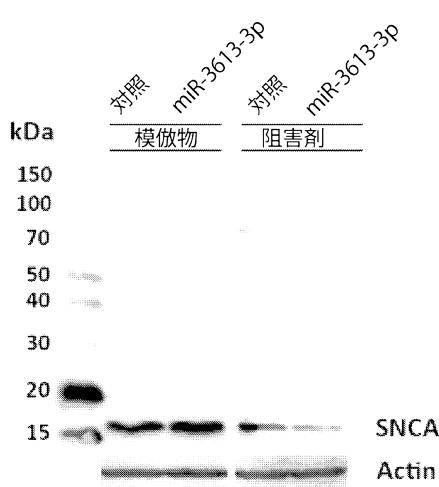
【図 6 C】



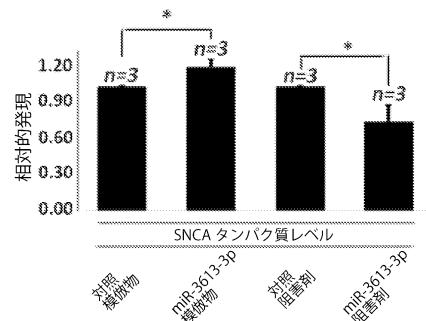
【図 6 D】



【図 6 E】



【図 6 F】



10

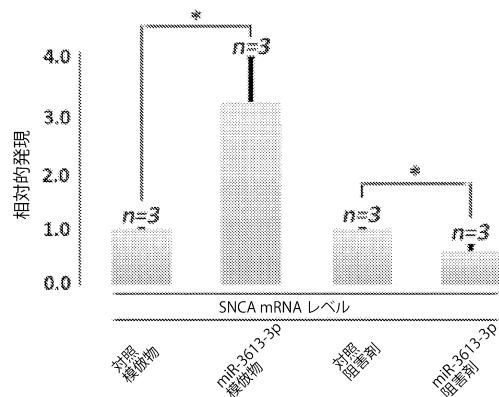
20

30

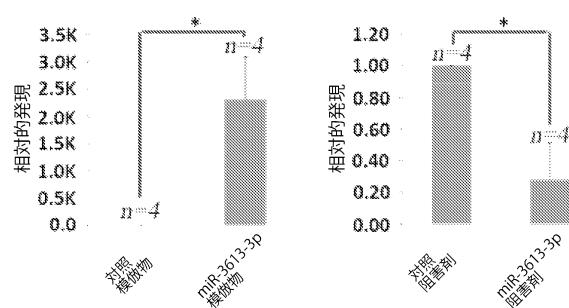
40

50

【図 6 G】

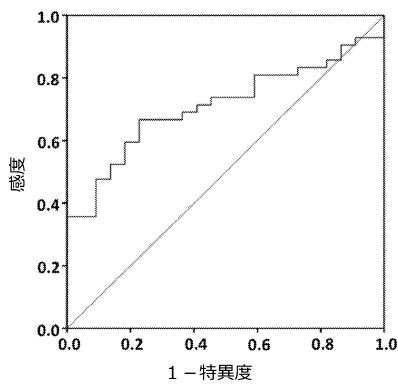


【図 6 H】

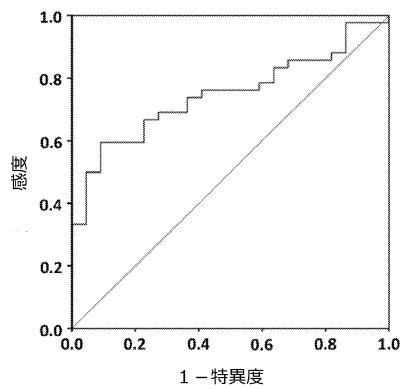


10

【図 7】



【図 8】



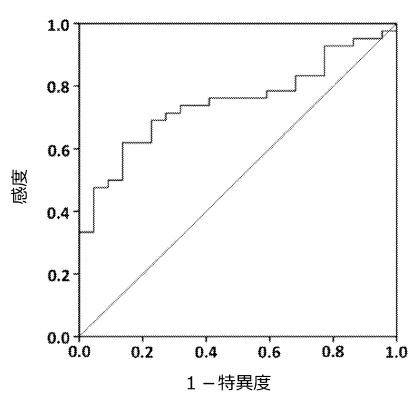
20

30

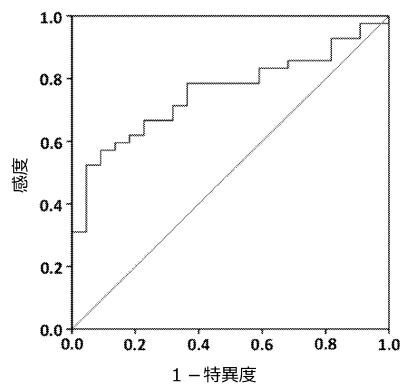
40

50

【図 9】



【図 10】



【配列表】

0007197755000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F I		
C 1 2 Q	1/686(2018.01)	C 1 2 Q	1/6851
C 1 2 Q	1/6837(2018.01)	C 1 2 Q	1/686
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 Q	1/6837
		C 1 2 N	15/113

ニバーシティ内

(72)発明者 インドラニル・バサク

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 11439 ユートピア パークウェイ クイーンズ 8000 セント・ジョーンズ・ユニバーシティ内

(72)発明者 ケタン・パティル

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 11439 ユートピア パークウェイ クイーンズ 8000 セント・ジョーンズ・ユニバーシティ内

(72)発明者 ジャン・ピーター・ラーセン

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 11439 ユートピア パークウェイ クイーンズ 8000 セント・ジョーンズ・ユニバーシティ内

審査官 中野 あい

(56)参考文献 国際公開第2014/018650 (WO , A1)

国際公開第2013/036936 (WO , A1)

SAPANA SHINDE , BIOFLUID-BASED MICRORNA BIOMARKERS FOR PARKINSON'S DISEASE: AN OVERVIEW AND UPDATE , AIMS MEDICAL SCIENCE , 2015年01月01日 , VOL:2, NR:1 , PAGE(S):15-25 , http://scholarworks.gvsu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1003&context=bms_articlesAMENE SAGHAZADEH , MICRORNA MACHINERY IN PARKINSON'S DISEASE: A PLATFORM FOR NEURODEGENERATIVE DISEASES , EXPERT REVIEW OF NEUROTHERAPEUTICS , 英国 , 2015年11月17日 , PAGE(S): 1 - 27 , <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26574782>

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 15 / 00 - 15 / 90

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)

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