

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4242590号
(P4242590)

(45) 発行日 平成21年3月25日(2009.3.25)

(24) 登録日 平成21年1月9日(2009.1.9)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 Z

C O 7 K 14/47 (2006.01)

C O 7 K 14/47

G O 1 N 33/50 (2006.01)

G O 1 N 33/50

P

請求項の数 3 (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願2002-5326 (P2002-5326)
 (22) 出願日 平成14年1月11日(2002.1.11)
 (65) 公開番号 特開2003-204790 (P2003-204790A)
 (43) 公開日 平成15年7月22日(2003.7.22)
 審査請求日 平成16年12月1日(2004.12.1)

(73) 特許権者 596109826
 塩澤 俊一
 兵庫県神戸市西区竹の台2丁目11-6
 (73) 特許権者 800000057
 財団法人新産業創造研究機構
 兵庫県神戸市中央区港島南町1丁目5-2
 (74) 代理人 100080034
 弁理士 原 謙三
 (72) 発明者 塩澤 俊一
 兵庫県神戸市西区竹の台2丁目11-6
 (72) 発明者 駒井 浩一郎
 兵庫県神戸市須磨区清水台1-9-3-2
 -1912

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子、及びその利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験者から分離したゲノム、mRNA及びcDNAのいずれかを用いて行う方法であって、

下記(1)又は(2)に記載の遺伝子の変異の有無を検出することを特徴とする慢性関節リウマチの発症またはその発症可能性の判定方法。

(1) 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなり、その配列中第269番目のアミノ酸としてグリシン挿入変異を持ったタンパク質をコードする慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子。

(2) 配列番号2に示される塩基配列からなり、その配列中第805～807番目の塩基として「GGT」の3塩基挿入変異を持った遺伝子。

【請求項2】

被験者から分離したタンパク質を用いて行う方法であって、

配列番号1に示されるアミノ酸配列からなり、その配列中第269番目のアミノ酸としてグリシン挿入変異を持ったタンパク質の変異の有無を検出することを特徴とする慢性関節リウマチの発症またはその発症可能性の判定方法。

【請求項3】

請求項1または2に記載の変異の有無を検出する方法を利用した慢性関節リウマチの発症またはその発症可能性の判定キット。

【発明の詳細な説明】

10

20

【 0 0 0 1 】

【 発明の属する技術分野 】

本発明は、慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子、及びその利用に関し、具体的には、当該遺伝子またはその翻訳産物たるタンパク質の変異の有無を検出することを特徴とした慢性関節リウマチの発症またはその発症可能性の新たな判定方法および判定キット等を提供するものである。

【 0 0 0 2 】

【 従来技術 】

慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis、以下「R A」ともいう) は、多発するびらん性関節炎を主徴とするが、同時に多臓器を障害する原因不明の全身性炎症疾患である。R Aは寛解と増悪とを繰り返しながら慢性に進行し、無治療で放置すると関節の破壊や変形を来し、やがて運動器の機能障害を呈してくる。時には生命をも脅かす。したがって、R A患者は身体的にも精神的にも大きな苦痛を生涯に亘って背負うことになる。

【 0 0 0 3 】

R Aは、その発症の仕方も多種多様であり、その診断には、アメリカリウマチ学会の診断基準が広く利用されている。しかしながら、R Aの発症は、通常、緩徐で数週間から数ヶ月にわたり、アメリカリウマチ学会の診断基準における客観的な指標としてのリウマトイド因子の存在は、その陽性率が3ヶ月以内で33%、12ヶ月以上においても88%程度 (治療、第73巻、第3号、第23~27頁、1991年) であり、R Aと確実に診断するには至っていない。そこで、組換え抗原と反応する患者血清中のリウマチ性関節炎関連抗体IgM抗体を検出し、リウマチ性関節炎を診断しようとする試みなどがなされている (特開平10-513257号参照)。

【 0 0 0 4 】

また、R Aの治療は、R A病態の病状の進行過程によって選択すべき治療手段は異なるのが通常である。一般的に確定診断が下せない初期では、非ステロイド抗炎症薬 (N S A I D) を投与し、確定診断が下せた場合は、N S A I Dに加えて疾患修飾性リウマチ薬 (D M A R D) を投与する。特にR A発症の初期には、確定診断を下すことは困難であり、現状では、N S A I Dを投与し、経過を慎重に観察しながら膠原病を含む他のリウマチ疾患との鑑別を同時に行っている。さらに症状が進行した場合は、ステロイド薬の投与を行う場合もあり、疼痛のための薬物療法と共に関節機能の維持・回復に対して理学療法・装具療法を行う。また、関節破壊により日常生活が不自由になった場合には、手術療法を行う場合もある。

【 0 0 0 5 】

R Aの原因である関節炎と関節破壊の様相、特にそれらの病理過程は、種々の研究を通じて次第に明らかになりつつあるが、R Aは生活環境を含めた多数の原因因子が重なり合っではじめて疾患へと発展・増悪する疾患である。そのため、疾患の正しい解明と適切な治療とを行うには、多因子相互作用の本体そのものが明らかにされなければならない。R Aは、世界的には罹患率1%以下の疾患であるが (ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン (N.Engl.J.Med.)、第322巻、第1277~1289頁、1990年)、患者の同胞では約8%以上が発症する (セル (Cell)、第85巻、第311~318頁、1996年) ことから、その原因因子として何らかの遺伝的要因が想定されている。また、環境が原因因子の1つと考えられていることから、あらかじめ発症可能性を知ることにより、日常生活において、例えば、食餌、ウイルス感染およびストレス等に注意することにより発症を遅らせたり防ぐことが可能である。さらに、診断を早め、早期に適切な治療を行うことによってR Aの進行を遅らせることが可能であり、予後の改善が期待される。

【 0 0 0 6 】

国際公開W098/51791号の開示内容によれば、マイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析をR A患者およびその血縁者に対して実施することにより、慢性関節リウマチの疾患遺伝子が位置する3カ所の遺伝子座を特定し、以下の疾患遺伝子を同定している。

(1) ヒト第1染色体の、マイクロサテライトマーカーD1S214および/またはDIS253がハ

10

20

30

40

50

イブリダイズするDNA配列から±1センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。

(2) ヒト第8染色体の、マイクロサテライトマーカーD8S556がハイブリダイズするDNA配列から±1センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。

(3) ヒトX染色体の、マイクロサテライトマーカーDXS1001、DXS1047、DXS1205、DXS1227および/またはDXS1232がハイブリダイズするDNA配列から±1センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

このように、慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子座は第1、第8、およびX染色体上に存在することが明らかにされている。このうち、第1染色体およびX染色体についてはこれまでにRAの疾患感受性遺伝子が同定されているものの、第8染色体においてはRAの疾患感受性遺伝子は未だ同定されていない。

【0008】

そこで、本発明は、ヒト第8染色体上に存在する慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子を同定し、その遺伝子またはその翻訳産物であるタンパク質の変異の有無を検出することにより、RAの発症またはその発症可能性を高精度に判定(診断)する方法、およびその判定(診断)キットを提供することを課題とするものである。さらに、本発明は、上記慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子に変異を持つRA患者に対する有効な治療方法および治療薬剤を提供することを課題とするものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本願発明者は、上記課題に鑑み、ヒト第8染色体について複数のマイクロサテライトマーカーを用いた詳細な遺伝子マッピングを行い、RA関連遺伝子座を決定した。さらに、その近傍に位置するAngiopoietin-1遺伝子についてRA疾患感受性遺伝子としての可能性を検討したところ、当該遺伝子に3塩基挿入型および3塩基欠失型の2種類が存在すること、3塩基欠失型ホモを変異なし、ヘテロおよび3塩基挿入型ホモを変異ありとしたときRA患者と健常者との間で有意差が認められたこと、および、RA患者では健常者に比べ有意にmRNA発現量が低いこと、を各実験により明らかにした。

【0010】

これらの知見より、被験者から得られた細胞における上記遺伝子およびその翻訳産物たるタンパク質の変異の有無を指標としたRAの発症またはその発症可能性の判定(診断)方法、および判定(診断)キットが有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。さらに、本発明は、慢性関節リウマチの新たな治療方法および治療薬剤としても有用である。

【0011】

以下、本発明について詳述するが、本明細書において、特に断らない限り、A、C、GおよびTは、アデニン、シトシン、グアニンおよびチミンの各塩基を示す。また、アミノ酸およびアミノ酸残基は、IUPACおよびIUBの定める1文字表記または3文字表記を使用する。

【0012】

本発明に係る遺伝子は、配列番号1に示されるアミノ酸配列からなり、その配列中第269番目のアミノ酸としてグリシン挿入変異を持ったタンパク質をコードする慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子である。本発明に係る遺伝子としては、具体的には、配列番号2に示される塩基配列を有し、その配列中第805～807番目の塩基として「GGT」の3塩基挿入変異を持ったAngiopoietin-1遺伝子を例に挙げることができる。上記第805～807番目の塩基は、Angiopoietin-1遺伝子のcDNAとしてジェンバンクに登録されている塩基配列(アクセッション番号U83508)の第1114～1116番目の塩基に相当する。

【0013】

10

20

30

40

50

上記「遺伝子」とは、少なくともゲノムDNA、cDNA、mRNA等のポリヌクレオチドを含む意味であり、本発明に係る遺伝子としては、上記Angiopoietin-1遺伝子のcDNAのほか、このcDNAの塩基配列に対応する塩基配列を有するmRNAや、このmRNAの転写元のゲノムDNAなどが含まれる。また、上記「遺伝子」とは、2本鎖DNAのみならず、それを構成するセンス鎖およびアンチセンス鎖といった各1本鎖DNAやRNAを包含する。さらに、上記「遺伝子」は、翻訳領域以外に、非翻訳領域(UTR)の配列やプロモーター配列、ベクター配列(発現ベクター配列を含む)などの配列を含むものであってもよい。

【0014】

本発明に係るタンパク質は、配列番号1に示されるアミノ酸配列からなり、その配列中第269番目のアミノ酸としてグリシン挿入変異を持ったタンパク質である。このタンパク質は、上記Angiopoietin-1遺伝子の翻訳産物であり、さらに付加的なポリペプチドを含むものであってもよい。このようなポリペプチドが付加される場合としては、例えば、Hisタグ等によって当タンパク質がエピトープ標識されるような場合が挙げられる。

【0015】

上記Angiopoietin-1は、Angiopoietin・Familyに属する因子であり、血管の形成に重要な役割を果たすとされている。血管新生関連tyrosine kinase型レセプターにはVEGF receptor familyとTIE receptor familyとがあり、RA患者においてVEGF過剰産生が報告されている(Ann Rheum Dis: 59: i65-71, 2000参照)。Angiopoietin-1は、TIE2 receptorのリガンドであり、VEGFと相補的に機能して血管損傷および出血を抑制する効果をもつことが知られている(Nature Medicine:Vol.6:460-463:2000参照)が、病態との関連は不明な部分が多かった。

【0016】

本願発明者は、前述のように詳細な遺伝子マッピングを行った結果、マイクロサテライトマーカーD8S556に連鎖性を見出し、これが以前行った連鎖解析の結果と一致したことより当位置がヒト第8染色体上RA疾患感受性遺伝子座位であると考えた。

【0017】

上記D8S556はヒト第8染色体上長腕領域にマップされるが、この領域のマウスでの相同領域に当たる第15染色体上の領域には関節炎感受性遺伝子Paam1が存在することが報告されている(リウマチ 40(5):833-848,2000参照)。また、上記D8S556は584.52-584.72cRに位置することが明らかになっており(リウマチ vol.39:P445,1999参照)、Angiopoietin-1はGB4 Mapで589.07cRにマップされることから、Angiopoietin-1は、疾患感受性遺伝子候補として染色体上位置からも妥当であると考えられる。

【0018】

さらに、RA患者の滑膜および末梢血から単離した遺伝子解析の結果、上記Angiopoietin-1遺伝子に3塩基挿入型および3塩基欠失型の2種類が存在することを見出した。以下、遺伝子配列上のこの3塩基挿入位置および3塩基欠失位置を、単に「変異位置」という。同様に、この遺伝子配列上の変異位置に対応するアミノ酸配列上のグリシン挿入位置およびグリシン欠落位置を、単に「変異位置」という。

【0019】

なお、上記3塩基欠失については、human cell line T98Gにおいても報告されている(Cell. Vol.87:1161-1169,1996参照)。

【0020】

Angiopoietin-1は、VEGFと相補的に作用して血管網の形成を増強する。具体的には、VEGFは血管新生における重要な促進因子であり内皮細胞の遊走と増殖とを促す。一方、この内皮細胞の遊走と増殖とはAngiopoietin-1により調節される因子によって停止し、新しい血管基底膜が形成されることにより成熟した血管が構築される。事実VEGFのみによって実験的に誘導された血管は未熟で出血しやすく、RAではVEGF過剰産生が報告されている(Ann Rheum Dis: 59: i65-71, 2000参照)がAngiopoietin-1についての知見はない。本願発明者は、Angiopoietin-1のmRNA発現量をRA患者と健常者とで比較したところ、RA患者の

10

20

30

40

50

末梢血中mRNA発現量が有意に低いことが明らかになった。これより、R Aでは未熟な血管の増殖が起こることによって、血中からの免疫細胞の漏出による慢性炎症展開に参与している可能性が考えられる。

【0021】

本発明に係る遺伝子およびタンパク質は、以下詳述するように、R Aの発症またはその発症可能性を判定する新たな判定方法および判定キットに有用である。

【0022】

(1) R Aの発症またはその発症可能性の判定方法

本発明に係るR Aの発症またはその発症可能性の判定方法(換言すれば、R Aの診断方法)において、本発明に係る遺伝子として、▲1▼ゲノムDNAを用いた場合、▲2▼mRNA(cDNA)を用いた場合を順番に説明し、その後、▲3▼本発明に係るタンパク質を用いた場合について説明する。

【0023】

▲1▼ゲノムDNAを用いた場合

ゲノムDNAを用いた本判定方法は、例えば次のようにして実施できる。

【0024】

被験者のゲノムは、常法により人体の全ての細胞より得ることが可能であるが、例えば、毛髪、各臓器、末梢リンパ球、滑膜細胞などから得ることができる。また、得られた細胞を培養し、増殖したものから得ることもできる。さらに、得られたゲノムは、例えば、PCR(Polymerase Chain Reaction)法、NASBA(Nucleic acid sequence based amplification)法、TMA(Transcription-mediated amplification)法およびSDA(Strand Displacement Amplification)法などの通常行われる遺伝子増幅法により増幅して使用することができる。

【0025】

ゲノム上の変異の有無の検出方法としては、特に限定されるものではないが、例えば、アリル特異的オリゴヌクレオチドプローブ法、オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ(Oligonucleotide Ligation Assay)法、PCR-SSCP法、PCR-CFLP法、PCR-PHFA法、インベダー法、RCA(Rolling Circle Amplification)法、プライマーオリゴベースエクステンション(Primer Oligo Base Extension)法などが挙げられる。

【0026】

例えば、ゲノムから、遺伝子上の上記変異位置を含む領域を増幅後、得られるPCR産物をサブクロニングし、これをダイレクトシーケンシングすることによってゲノム上の変異の有無を検出できる。

【0027】

また、遺伝子上の上記変異位置を含む領域をオリゴヌクレオチドプローブに用いることによって、ゲノム上の変異の有無を検出できる。このようにプローブに用いる場合としては、例えば、上記変異位置を含む塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをチップ上に固定してDNAチップを構成し、当該DNAチップを上記変異の有無の検出用に用いるような場合が挙げられる。この場合、オリゴヌクレオチドプローブの長さとしては、上記変異位置を含む7~50ヌクレオチド、あるいは10~30ヌクレオチドが好ましく、15~25ヌクレオチドがより好ましい。

【0028】

また、ゲノム上の変異の有無は、適当な制限酵素を使用し、切断されるゲノム断片のサイズの違いをサザンブロットティングなどで検出することによっても検出することができる。

【0029】

このように、ゲノム上の変異を検出することにより、被験者のR Aの診断(発症またはその発症可能性の判定)を高精度に行うことができる。具体的には、後述するように、3塩基欠失型ホモを変異なし、ヘテロおよび3塩基挿入型ホモを変異ありとしたときR A患者と健常者との間で有意差が認められたことから、3塩基欠失型ホモが検出された場合は、

R Aを発症している可能性または将来発症する可能性は低く、一方、ヘテロおよび特に3塩基挿入型ホモが検出された場合は、R Aを発症している可能性または将来発症する可能性は高いと判定することができる。

【0030】

尚、上記判定方法により使用されるプライマーおよびプローブは、常法により、DNAシンセサイザーなどにより作製することができる。

【0031】

▲2▼mRNA(cDNA)を用いた場合

mRNAを利用する場合、例えば、被験者の細胞より抽出したmRNAから逆転写反応によってcDNAを作製し、上記変異位置を含む領域を増幅後、上記と同様、増幅断片の塩基配列を直接シーケンスすることにより、またはDNAチップを用いることにより、あるいはRFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)法を用いることにより、上記変異の有無を検出できる。

10

【0032】

上記変異位置を含む領域の増幅に用いるプライマーとしては、特に限定されるものではないが、例えば、以下のプライマーの組み合わせによりcDNAを鋳型とした増幅反応が可能である。

センスプライマー：5'-GCTGGCAGTACAATGACAG-3'(配列番号3)

アンチセンスプライマー：5'-TCAAAAATCTAAAGGTGGAAT-3(配列番号4)

このように、mRNA(cDNA)上の変異を検出することにより、上記と同様、被験者のRAの診断(発症またはその発症可能性の判定)を高精度に行うことができる。

20

【0033】

▲3▼タンパク質を用いた場合

被験者の細胞より調製したタンパク質を利用する場合、配列番号1のアミノ酸配列において上記変異位置におけるグリシン挿入の有無を検出する方法が挙げられる。このグリシン挿入の有無の検出は、通常のタンパク質のシーケンス方法に準ずればよいが、例えば、グリシン挿入型タンパク質のみを認識する抗体を作製し、ELISA法で検出する方法、タンパク質を単離し、直接または必要に応じ、酵素等で切断し、プロテインシーケンサーを利用して変異を検出する方法、アミノ酸の等電点の変異を検出する方法および質量分析により質量の差を検出する方法が挙げられ、好ましくは、グリシン挿入型タンパク質のみを認識する抗体を作製し、ELISA法で検出する方法が挙げられる。

30

【0034】

このように、上記変異位置におけるグリシン挿入の有無を検出することにより、被験者のRAの診断(発症またはその発症可能性の判定)を高精度に行うことができる。具体的には、後述するように、3塩基欠失型ホモを変異なし、ヘテロおよび3塩基挿入型ホモを変異ありとしたときRA患者と健常者との間で有意差が認められたことから、グリシン挿入型タンパク質が検出されなかった場合(換言すれば、グリシン欠落型タンパク質しか検出されなかった場合)は、RAを発症している可能性または将来発症する可能性は低く、一方、両方のタンパク質が検出された場合および特にグリシン挿入型タンパク質のみが検出された場合は、RAを発症している可能性または将来発症する可能性は高いと判定することができる。

40

【0035】

(2)RAの発症またはその発症可能性の判定キット

本発明に係るRAの発症またはその発症可能性の判定キット(換言すれば、RAの診断キット)は、上記の変異を検出できる試薬、例えば、プライマー、プローブ、抗体などを含むものであれば特に限定されず、さらにその他の試薬を組み合わせることにより得ることができる。

【0036】

例えば、ゲノム上およびmRNA(cDNA)上の変異の有無を検出するキットとしては、上記変異位置を含む領域を増幅できるように設計されたプライマーを含み、さらに、上

50

記変異の有無を検出できるように設計されたプローブ、制限酵素、マクサムギルバート法およびサンガー法などの塩基配列決定法に利用される試薬など、変異を検出するために必要な試薬を1つ以上組み合わせたキットが挙げられる。なお、かかる試薬は、採用される検出方法に応じて適宜選択採用されるが、例えば、d A T P、d U T P、d T T P、d G T P、DNA合成酵素、RNA合成酵素等を挙げることができる。さらに、変異の検出の妨げとならない適当な緩衝液および洗浄液等が含まれていてもよい。

【0037】

プライマーを含むキットの場合、プライマーは、上記変異位置を含む領域を増幅できるものであれば特に限定されるものではなく、例えば上記配列番号3および4に示される一組のプライマーセットを挙げることができる。

10

【0038】

また、タンパク質上の変異の有無を検出するキットとしては、例えばグリシン挿入型タンパク質のみを認識する抗体を含むキットなどが挙げられる。

【0039】

これらの判定キットを使用することにより、前記したように、RAの診断（発症またはその発症可能性の判定）を高精度に行うことができる。

【0040】

（3）RAの治療方法および治療薬剤への正常型タンパク質などの利用

このように、Angiopoietin-1遺伝子上の3塩基挿入変異（および、これに対応するアミノ酸配列上のグリシン挿入変異）は、RAの発症原因の一つと考えられ、したがって、Angiopoietin-1に上記グリシン挿入変異を持つRA患者に正常型タンパク質（即ち、グリシン欠落型タンパク質）を補完することは、RAの治療法として有効であると考えられる。そこで、本発明は、以下のRAの治療方法および治療薬剤を提供するものである。

20

・上記グリシン挿入変異を持ったタンパク質を有する慢性関節リウマチ患者に、その変異を持たない正常型タンパク質または当該正常型タンパク質をコードするDNA、あるいは、当該正常型タンパク質がリガンドとなるレセプタータンパク質のアゴニストとしての低分子化合物を補完することを特徴とする慢性関節リウマチの治療方法。

・上記グリシン挿入変異を持ったタンパク質を有する慢性関節リウマチ患者の治療に用いられる治療薬剤であって、その変異を持たない正常型タンパク質または当該正常型タンパク質をコードするDNA、あるいは、当該正常型タンパク質がリガンドとなるレセプタータンパク質のアゴニストとしての低分子化合物を主成分とする慢性関節リウマチの治療薬剤。

30

【0041】

正常型タンパク質の補完方法は特に限定されるものではなく、例えば、公知のタンパク質発現系や遺伝子導入方法などを用いることができ、具体的には、哺乳細胞にタンパク質を発現させる場合に用いる発現ベクターやウイルスベクターなどを用いた方法が挙げられる。また、前述のように、Angiopoietin-1は、TIE2 receptorのリガンドであることから、このTIE2 receptorのアゴニストとして作用する低分子化合物を経口または静注などによって体内に投与することもRAの治療法として有効であると考えられる。なお、ここでいう低分子化合物とは、ペプチドなどのタンパク質を含む。

40

【0042】

また、上記正常型タンパク質または当該正常型タンパク質をコードするDNAと、上記TIE2 receptorのアゴニストとしての低分子化合物とは、治療薬剤として択一的に使用されるだけでなく、組み合わせて使用することも可能である。

【0043】

【発明の実施の形態】

本発明の実施の一形態について、図1～図5に基づいて説明すれば以下のとおりである。なお、本発明はこの記載に限定されるものではない。

【0044】

（1）マイクロサテライトマーカーによる遺伝解析

50

患者2名、健常者1名を1家系とした33家系において鎖長分析を行った。末梢血から抽出したDNAから、第8染色体上の上記マイクロサテライトマーカーD8S556近傍10.8cM中にあるヘテロ接合度0.7以上のD8S176、D8S521、D8S1738、D8S556、D8S1830およびD8S539の各マイクロサテライトマーカーを、蛍光ラベルプライマーを用いたPCR法によって増幅し、ABI377型シーケンサーで3000V、2時間電気泳動した。そして、GeneScan(ver.2.0.2)を用いてマーカーのサイズを決定し、MAPMAKER/SIBS(ver.2.1) (Complete multipoint sib-pair analysis of quantitative and qualitative traits. Am. J. Hum. Genet. 57:439, 1995参照)を用いて、罹患同胞対検索法にもとづいた2点解析によって最大連鎖性尤度(Maximum Lod Score)を算出した。

10

【0045】

結果を図1の表に示す。同図に示すように、D8S556においてLod値は最大単独頂値1.35を示した。この結果より、本発明に係るRA関連遺伝子は、マイクロサテライトマーカーD8S556との連鎖性が見出された。また、D8S556の近傍には、血管新生に関与する遺伝子Angiopoietin-1が位置すること等から、上記Angiopoietin-1がRA疾患感受性遺伝子の候補遺伝子であると考えられた。

【0046】

(2) Angiopoietin-1 cDNAのシーケンス解析

RA患者の滑膜細胞および末梢血単核球分画より調製したトータルRNAからOligo dTプライマーを用いた逆転写反応(GeneAmp RNA PCR Kit)(アプライドバイオシステムズ)によりcDNAを合成した。そして、Angiopoietin-1遺伝子領域1508bpを増幅後、ダイターミネーター法によりシーケンス解析を行った。なお、上記の反応に使用したプライマーは、以下に示すとおりである。

20

センスプライマーAngF1.5: 5'-GCTGGCAGTACAATGACAG-3' (配列番号3)

アンチセンスプライマーAngR1.5: 5'-TCAAAAATCTAAAGGTGAAT-3' (配列番号4)

また、上記センスプライマーAngF1.5および上記アンチセンスプライマーAngR1.5の設定位置については、図2中のA.に示すとおりである。なお、Angiopoietin-1分子内には、図2に示されるように、coiled-coilドメインおよびフィブリノーゲン様ドメインが存在する。

【0047】

30

シーケンスにより決定したcDNA配列は、Angiopoietin-1遺伝子の既報配列(アクセッション番号U83508)と比較された。その結果、Angiopoietin-1遺伝子においては、前述のとおり、3塩基挿入型および3塩基欠失型の2種類が存在することが見出された。配列番号2には、このうち3塩基挿入型の遺伝子配列が示される。この3塩基挿入型では、配列番号2に示されるように、その配列中第805~807番目の塩基として「GGT」の3塩基が挿入されている。

【0048】

図3には、変異位置を含む領域のシーケンス解析結果が示される。同図(a)は3塩基挿入型の解析結果であり、同図(b)は3塩基欠失型の解析結果である。なお、図3は、各遺伝子配列の相補配列をシーケンス解析した結果を示すものである。したがって、同図(a)より、3塩基挿入型では、「GGT」の3塩基挿入(相補配列では「ACC」の3塩基挿入)が生じていることが確認でき、同図(b)より、3塩基欠失型では、この3塩基が欠落していることが確認できる。

40

【0049】

上記3塩基挿入型遺伝子の翻訳産物であるタンパク質は、配列番号1に示されるように、そのアミノ酸配列中第269番目のアミノ酸としてグリシンが挿入されている。一方、上記3塩基欠失型遺伝子の翻訳産物であるタンパク質においては、この第269番目のグリシンが欠落している。

【0050】

(3) RA患者および健常者(RA未発症者)における上記変異の有無の検出患者本人以

50

外の親族に R A 患者がいる家系（以下 R A 家系と称する）の R A 患者および R A 家系の健常者、患者本人以外の親族に R A 患者がいない家系（以下孤発家系と称する）の R A 患者および孤発家系の健常者それぞれについて、上記 3 塩基挿入変異の有無の検出を行った。

【 0 0 5 1 】

上記の検出は、各被験者よりゲノム D N A を抽出し、上記変異位置を含む領域を適当なプライマーを用いた P C R 反応により増幅し、得られた P C R 産物をシーケンス解析することにより実施した。なお、上記適当なプライマーとしては、上記 3 塩基挿入変異を含む領域を増幅することが可能なセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーを任意に使用することができる。また、上記適当なプライマーの長さは、ミスマッチによる標的領域以外の増幅が起こらない限りにおいて特に限定されない。一般には、15 から 25 ヌクレオチドの範囲内の長さプライマーが用いられる。その一例として、上記センスプライマーおよび上記アンチセンスプライマーには、以下に示すオリゴヌクレオチドが挙げられる。

センスプライマー：5'-CAACCTTGTCATCTTTGC-3'（配列番号 5）

アンチセンスプライマー：5'-ACACCTTTTTGGGTCTTGGC-3'（配列番号 6）

上記の方法による変異の検出結果を、図 4 に示す。なお、図 4 の表中において、Familial RA は R A 家系の R A 患者、Familial not RA は R A 家系の健常者、Sporadic RA は孤発家系の R A 患者、Sporadic not RA は孤発家系の健常者を示す。また、n は各種被験者の全体数を示し、正常型遺伝子をホモで有する者（図中では「nt805 (del 3) ホモ」と示す）、変異型遺伝子をヘテロで有する者（図中では「nt805 (del 3) ヘテロ」と示す）、変異型遺伝子をホモで有する者（図中では「nt805 ホモ」と示す）の数をそれぞれの欄に示している。さらに、括弧内には、各種被験者における上記それぞれの者の割合を示す。

【 0 0 5 2 】

図 4 に示すように、R A 家系および孤発家系ともに、R A 患者のみが上記 3 塩基挿入型遺伝子をホモで有することが確認された。また、3 塩基欠失型ホモを変異なし、ヘテロおよび 3 塩基挿入型ホモを変異ありとしたとき、孤発家系 R A 患者と孤発家系健常者との間、および、孤発家系 R A 患者と R A 家系健常者との間でそれぞれ有意差が認められた。このことから、上記変異の有無は、R A 発症に関係することが確認された。

【 0 0 5 3 】

したがって、上記の方法を利用して上記 R A 関連遺伝子に 3 塩基挿入変異が生じているか否かの判定を行うことにより、R A を発症しているか、あるいは、R A の発症可能性を有しているかの判定を行うことができる。具体的には、例えば、ある被験者について上記のような方法により上記 3 塩基挿入変異の検出を行い、変異型遺伝子のみが検出された場合（すなわち、変異型遺伝子をホモで有する場合）および変異型遺伝子および正常型遺伝子の両方が検出された場合は、R A を発症している可能性が高いと判定することができる。また、上記の検出の結果、変異型遺伝子が検出されなかった場合（すなわち、正常型遺伝子をホモで有する場合）は、R A を発症している可能性または将来発症する可能性は低いと判定することができる。なお、本発明に係る判定方法は、上述の方法に限定されるものではなく、上記の検出データに基づいて適宜選択することができる。

【 0 0 5 4 】

（ 4 ）上記 R A 関連遺伝子の m R N A の定量

R A 患者 21 名、健常者 18 名を対象にして TaqMan EZ RT-PCR キット（アプライドバイオシステムズ）を用い、ABI7700 で定量 RT-PCR を行って、末梢血中における Angiopoietin-1 m R N A の発現量を測定した。プライマーおよびプローブには以下のものを使用し、GAPDH を内部標準とした。なお、下記プライマーおよびプローブの設定位置は、図 2 中の B. に示すとおりである。

センスプライマー AngF272：5'-TTTGCGAGAGGCACGGAA-3'（配列番号 7）

アンチセンスプライマー AngR389：5'-TATATCTTCTCCCACTGTTT-3'（配列番号 8）

プローブ Taq Man Probe：5'-TTCCTCGCTGCCATTCTGACTCACATA-3'（配列番号 9）

定量結果は、対内部標準比の相対量として算出し、Welch's t test により統計処理した。

図 5 は、健常者（control）および R A 患者の末梢血より抽出され、定量された m R N A

10

20

30

40

50

の発現量の平均値および標準偏差を示すグラフである。この結果を平均値 ± 標準偏差として以下に示す。

健常者 : 0.3372 ± 0.2421

R A 患者 : 0.0986 ± 0.0937

上記の結果より、R A 患者は、健常者と比較してAngiopoietin-1 mRNAの発現量が有意に低いということが確認された。

【 0 0 5 5 】

したがって、上記の方法を用いてmRNAの発現量を測定することにより、R Aを発症しているか否かの判定を行うことができる。具体的には、例えば、上記mRNAの発現量に対して2つの閾値（閾値1・閾値2）を設け、上記mRNAの発現量が上記閾値1以下であれば、R Aを発症している可能性が高い、または将来発症する可能性が高いと判定し、上記閾値2以上であれば、R Aを発症している可能性は低い、または将来発症する可能性は低いと判定することができる。なお、上記閾値1の値は、R A患者における平均値以下（すなわち0.0986以下）の値に設定されることが好ましい。また上記閾値2の値は、健常者における平均値以上（すなわち0.3372以上）の値に設定されることが好ましい。

10

【 0 0 5 6 】

【発明の効果】

以上のように、本発明によれば、変異を有する遺伝子またはタンパク質を利用して、その変異の有無を検出することにより、慢性関節リウマチの発病またはその発症可能性を高精度に簡便かつ確実に判定することができ、有用である。さらに、本発明は、慢性関節リウマチの新たな予防法、治療法および治療薬剤としても有用である。

20

【 0 0 5 7 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> The New Industry Research Organization

<110> Shiozawa, Shunich

<120> DNA structure responsible for the pathogenesis
of rheumatoid arthritis and use thereof

10

<130>

<140>

<141>

20

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 498

<212> PRT

30

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Thr Val Phe Leu Ser Phe Ala Phe Leu Ala Ala Ile Leu Thr His

1

5

10

15

Ile Gly Cys Ser Asn Gln Arg Arg Ser Pro Glu Asn Ser Gly Arg Arg

20

25

30

40

Tyr Asn Arg Ile Gln His Gly Gln Cys Ala Tyr Thr Phe Ile Leu Pro

35	40	45	
Glu His Asp Gly Asn Cys Arg Glu Ser Thr Thr Asp Gln Tyr Asn Thr			
50	55	60	
Asn Ala Leu Gln Arg Asp Ala Pro His Val Glu Pro Asp Phe Ser Ser			
65	70	75	80
Gln Lys Leu Gln His Leu Glu His Val Met Glu Asn Tyr Thr Gln Trp			
85	90	95	10
Leu Gln Lys Leu Glu Asn Tyr Ile Val Glu Asn Met Lys Ser Glu Met			
100	105	110	
Ala Gln Ile Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn His Thr Ala Thr Met Leu			
115	120	125	
Glu Ile Gly Thr Ser Leu Leu Ser Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys			
130	135	140	
Leu Thr Asp Val Glu Thr Gln Val Leu Asn Gln Thr Ser Arg Leu Glu			20
145	150	155	160
Ile Gln Leu Leu Glu Asn Ser Leu Ser Thr Tyr Lys Leu Glu Lys Gln			
165	170	175	
Leu Leu Gln Gln Thr Asn Glu Ile Leu Lys Ile His Glu Lys Asn Ser			
180	185	190	
Leu Leu Glu His Lys Ile Leu Glu Met Glu Gly Lys His Lys Glu Glu			
195	200	205	30
Leu Asp Thr Leu Lys Glu Glu Lys Glu Asn Leu Gln Gly Leu Val Thr			
210	215	220	
Arg Gln Thr Tyr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Lys Gln Leu Asn Arg Ala			
225	230	235	240
Thr Thr Asn Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln Leu Glu Leu Met Asp			
245	250	255	
Thr Val His Asn Leu Val Asn Leu Cys Thr Lys Glu Gly Val Leu Leu			40
260	265	270	

Lys Gly Gly Lys Arg Glu Glu Glu Lys Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp
 275 280 285
 Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile
 290 295 300
 Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn
 305 310 315 320
 Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp
 325 330 335
 Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser
 340 345 350
 Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln
 355 360 365
 Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg
 370 375 380
 Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn
 385 390 395 400
 Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser
 405 410 415
 Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn
 420 425 430
 Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp
 435 440 445
 Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe Tyr Thr Ala
 450 455 460
 Gly Gln Asn His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr Phe Lys
 465 470 475 480
 Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Leu
 485 490 495
 Asp Phe

10

20

30

40

<210> 2

<211> 1497

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

<400> 2

```

atgacagitt tcttttcttt tgcctttctc gcctgccatt tgactcacat aggggtgcagc 60
aatcagcgcc gaagtcacaga aaacagtgagg agaagatata accggattca acatgggcaa 120
tgtgcctaca ctctcattct tccagaacac gatggcaact gtcgtgagag tacgacagac 180
cagtacaaca caaacgctct gcagagagat gctccacacg tggaaaccgga ttctctcttc 240
cagaaacttc aacatctgga acatgtgatg gaaaattata ctgagtggtc gcaaaaactt 300
gagaattaca ttgtggaaaa catgaagtcg gagatggccc agatacagca gaatgcagtt 360
cagaaccaca cggctacat gctggagata ggaaccagcc tctctctca gactgcagag 420
cagaccagaa agctgacaga tgttgagacc caggctactaa atcaaaactt tgcacttgag 480
atacagctgc tggagaattc attatccacc tacaagctag agaagcaact tcttcaacag 540
acaaatgaaa tcttgaagat ccatgaaaaa aacagtttat tagaacataa aatcttagaa 600
atggaaggaa aacacaagga agagtggac acctaaagg aagagaaaga gaaccttcaa 660
ggcttggtta ctgctcaaac atatataatc caggagctgg aaaagcaatt aaacagagct 720
accaccaaca acagcttctt tcagaagcag caactggagc tgaatggacac agtccacaac 780
ctgttcaatc ttgctactaa agaagggtgt ttactaaagg gaggaaaaag agaggaagag 840
aaaccattta gagactgtgc agatgtatat caagctgggt ttaataaaaag tggaatctac 900
actatttata ttaataatat gccagaaccc aaaaagggtt ttgcaatat ggatgtcaat 960
gggggagggt ggactgtaat acaacatcgt gaagatggaa gcttagattt ccaaagaggc 1020
tggaaaggaat ataaaatggg ttttggaaat ccttccggtg aatatggctt ggggaatgag 1080
tttatttttg ccattaccag tcagaggcag tacatgctaa gaattgagtt aatggactgg 1140
gaagggaacc gagcctattc acagtatgac agattccaca taggaaatga aaagcaaac 1200
tatagggtgt attttaaagg tcacactggg acagcaggaa aacagagcag cctgatctta 1260

```

20

30

40

cacggtgctg attcagcac taaagatgct gataatgaca actgtatgtg caaatgtgcc 1320
 ctcatgttaa caggaggatg gtggtttgat gcttgtggcc cctccaatct aaatggaaatg 1380
 ttctatactg cgggacaaaa ccatggaaaa ctgaatggga taaagtggca ctacttcaaa 1440
 gggcccagtt actccttacg ttccacaact atgatgattc gacctitaga titttga 1497

<210> 3

10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized
 oligonucleotide

20

<400> 3

gctggcagta caatgacag

19

<210> 4

<211> 21

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized
 oligonucleotide

40

<400> 4

tcaaaaatct aaaggtcgaa t

21

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized
oligonucleotide

<400> 5

caaccttgtc aatctttgc

19

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized
oligonucleotide

<400> 6

acaccttttt gggttctggc

20

40

〈210〉 7	
〈211〉 18	
〈212〉 DNA	
〈213〉 Artificial Sequence	
〈220〉	
〈223〉 Description of Artificial Sequence:Synthesized oligonucleotide	10
〈400〉 7	
tttgcgagag gcacggaa	18
〈210〉 8	20
〈211〉 20	
〈212〉 DNA	
〈213〉 Artificial Sequence	
〈220〉	
〈223〉 Description of Artificial Sequence:Synthesized oligonucleotide	30
〈400〉 8	
tatatcttct cccactgttt	20
〈210〉 9	
〈211〉 27	40
〈212〉 DNA	

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:Synthesized
oligonucleotide

〈400〉 9

10

ttcctcgctg ccattctgac tcacata

27

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、本実施例において、6 種のマイクロサテライトマーカを用いて行った遺伝解析の結果を示す表である。

【図 2】図 2 は、本発明に係る R A 関連遺伝子を模式的に示した概略図である。また、図 2 A . および図 2 B . には、本実施例において使用されるプライマーおよびプローブの設定位置を示す。

20

【図 3】図 3 は、本実施例において、R A 関連遺伝子の 3 塩基挿入変異位置を含む領域のシーケンス解析を行った結果を示す図である。図 3 (a) は、3 塩基挿入型のシーケンス解析結果であり、図 3 (b) は、3 塩基欠失型のシーケンス解析結果である。

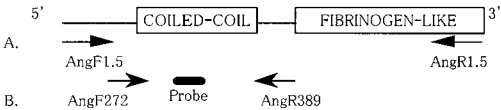
【図 4】図 4 は、本実施例において、R A 患者および健常者において、3 塩基挿入変異の有無の検出を行った結果を示す表である。

【図 5】図 5 は、本実施例における m R N A の発現量の定量結果を示すグラフである。

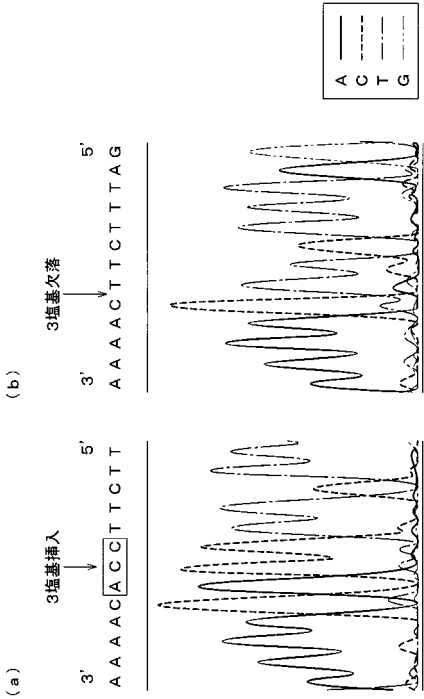
【図 1】

marker	Z0	Z1	Z2	Lod 値
D8S1762	0.25	0.50	0.25	0.00
D8S521	0.18	0.36	0.46	0.54
D8S1738	0.25	0.50	0.25	0.00
D8S556	0.13	0.26	0.61	1.35
D8S1830	0.16	0.31	0.53	0.84
D8S539	0.23	0.45	0.32	0.07

【図 2】



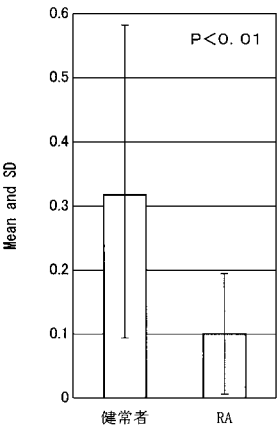
【図 3】



【図 4】

	n	nt805 (del13) 未発	nt805 (del13) 発	nt805 未発
Familial RA	69	53 (76.8%)	15 (21.7%)	1 (1.5%)
Familial not RA	28	20 (71.4%)	8 (28.6%)	0 (0%)
Sporadic RA	225	170 (75.5%)	51 (22.7%)	4 (1.8%)
Sporadic not RA	383	353 (92.2%)	30 (7.8%)	0 (0%)

【図 5】



フロントページの続き

(72)発明者 中務 美紀子

岡山県浅口郡里庄町大字新庄2 8 6 9 番地

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 国際公開第00 / 0 6 4 9 4 6 (WO , A 1)

国際公開第9 6 / 0 3 1 5 9 8 (WO , A 1)

国際公開第00 / 0 0 2 5 8 7 (WO , A 1)

Ann. Rheum. Dis., (2000), Vol. 59, p. 607-614

Arthritis & Rheumatism, (2001), Vol. 44, No. 4, p. 794-801

Cell, (1996), Vol. 87, p. 1161-1169

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00

C07K 14/00

C12Q 1/00

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

CAPLUS(STN)

PubMed

JSTPlus(JDreamII)

JMEDPlus(JDreamII)