

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6008743号
(P6008743)

(45) 発行日 平成28年10月19日(2016.10.19)

(24) 登録日 平成28年9月23日(2016.9.23)

(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 A

請求項の数 28 (全 33 頁)

(21) 出願番号	特願2012-555266 (P2012-555266)	(73) 特許権者	516116448
(86) (22) 出願日	平成23年3月1日(2011.3.1)		エムディーエヌエー ライフ サイエンス
(65) 公表番号	特表2013-520965 (P2013-520965A)		ズ インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成25年6月10日(2013.6.10)		アメリカ合衆国, 19801 デラウェア
(86) 国際出願番号	PCT/CA2011/050120		州, ウィルミントン, オレンジ ストリ
(87) 国際公開番号	W02011/106892		ート 1209, コーポレイション トラ
(87) 国際公開日	平成23年9月9日(2011.9.9)		スト センター
審査請求日	平成26年2月28日(2014.2.28)	(74) 代理人	110000338
(31) 優先権主張番号	61/309, 216		特許業務法人HARAKENZO WOR
(32) 優先日	平成22年3月1日(2010.3.1)		LD PATENT & TRADEMA
(33) 優先権主張国	米国 (US)		RK

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 UVに関連するmtDNAの融合転写物ならびにその方法および使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

紫外線(UV)曝露に関連した、単離されたミトコンドリア融合転写物であって、当該転写物は、配列番号39に対応する核酸配列を有する、ミトコンドリア融合転写物。

【請求項 2】

請求項1に記載のミトコンドリア融合転写物の少なくとも一部に対応する核酸配列の一部に対して実質的に相補的な配列を有するプローブの、生物学的サンプルにおけるUVの曝露を検出またはモニタリングするためのキットの製造における使用。

【請求項 3】

上記生物学的サンプルが被験体から得られた皮膚サンプルである、請求項2に記載の使用。 10

【請求項 4】

上記生物学的サンプルが組織培養サンプルである、請求項2に記載の使用。

【請求項 5】

上記皮膚サンプルが上記被験体の表皮層から得られる、請求項3に記載の使用。

【請求項 6】

上記生物学的サンプルが、致死線量よりも低い線量のUVに少なくとも1回曝露される、請求項2に記載の使用。

【請求項 7】

上記生物学的サンプルが、一連の反復性の、致死線量よりも低い線量のUVに曝露され 20

る、請求項 6 に記載の使用。

【請求項 8】

上記生物学的サンプルが、毎日の UV 照射に曝露される、請求項 6 に記載の使用。

【請求項 9】

上記 UV が、疑似太陽の UV 光源に由来する、請求項 6 に記載の使用。

【請求項 10】

上記 UV が UV A、UV B または UV A / UV B を含む、請求項 6 に記載の使用。

【請求項 11】

請求項 1 に記載のミトコンドリア融合転写物の少なくとも一部に対応する核酸配列の一部に対して実質的に相補的な配列を有するプローブの、被験体から得られた生物学的サンプルにおける累積の UV 曝露を一定期間にわたって測定するためのキットの製造における、使用。

10

【請求項 12】

上記生物学的サンプルは、太陽にまれに曝露される皮膚、太陽に時折曝露される皮膚、または太陽にたいいてい曝露される皮膚に由来する、請求項 11 に記載の使用。

【請求項 13】

UV 曝露の検出のための、または UV 曝露に対するバイオマーカーとしての、配列番号 39 に対応する核酸配列を有する融合転写物の核酸配列の一部に対して相補的な配列を有するプローブまたはプライマーの使用。

【請求項 14】

UV 曝露を検出するためのキットであって、上記キットは、配列番号 39 に対応する核酸配列の一部に対して実質的に相補的な配列を有するプローブを備えている、キット。

20

【請求項 15】

配列番号 3、配列番号 4、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 19、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 31、配列番号 32 または配列番号 38 に対応する核酸配列の一部に対して実質的に相補的な配列を有する第 2 のプローブをさらに備えている、請求項 14 に記載のキット。

【請求項 16】

サンプリング手段、

診断アッセイにおける使用のための 1 つ以上の試薬、

生物学的サンプルの単離および / または処理のための 1 つ以上の溶液、

1 つ以上の容器、および

上記キットを使用するための指示書

からなる群より選択される 1 つ以上をさらに備えている、請求項 14 に記載のキット。

30

【請求項 17】

上記 1 つ以上の試薬は、緩衝液、塩および検出試薬からなる群より選択される 1 つ以上である、請求項 16 に記載のキット。

【請求項 18】

上記キットの 1 つ以上の試薬、または、1 つ以上の溶液が凍結乾燥されている、請求項 14 に記載のキット。

40

【請求項 19】

凍結乾燥されている 1 つ以上の構成要素を再構成するための 1 つ以上の試薬をさらに備えている、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 20】

請求項 1 に記載のミトコンドリア融合転写物の少なくとも一部に対応する核酸配列の一部に対して実質的に相補的な配列を有するプローブの、UV 曝露、UV 損傷、皮膚の加齢、または皮膚もしくは皮膚等価物における光老化に対する防止、最小化、回復または保護におけるスキンケア製品の能力を試験またはスクリーニングするためのキットの製造における使用。

【請求項 21】

50

上記皮膚または皮膚等価物が、致死線量よりも低い線量のUVに少なくとも1回曝露される、請求項20に記載の使用。

【請求項22】

上記皮膚または皮膚等価物が、一連の反復性の、致死線量よりも低い線量のUVに曝露される、請求項21に記載の使用。

【請求項23】

上記皮膚または皮膚等価物が、毎日のUVに曝露される、請求項21に記載の使用。

【請求項24】

上記UVが、疑似太陽のUV光源に由来する、請求項21に記載の使用。

【請求項25】

上記UVがUVA、UVBまたはUVA/UVBを含む、請求項21に記載の使用。

【請求項26】

生物学的サンプルにおける紫外線（UV）の曝露を検出またはモニタリングするための方法であって、上記生物学的サンプルにおけるミトコンドリア融合転写物の存在を検出する工程を含み、上記転写物は配列番号39に対応する核酸配列を有する、方法。

【請求項27】

被験体から得られた生物学的サンプルにおける配列番号39に対応する核酸配列を有するミトコンドリア融合転写物の存在を一定期間にわたって検出する工程を含む、被験体における累積のUV曝露を測定するための方法。

【請求項28】

UV曝露、UV損傷、皮膚の加齢または光老化に対する防止、最小化、回復または保護におけるスキンケア製品の能力を試験またはスクリーニングするための方法であって、上記方法は以下の工程：

（a）上記スキンケア製品を試験サンプルに適用する工程であって、上記試験サンプルが皮膚または皮膚等価物を含む、工程；

（b）上記試験サンプルを紫外線（UV）に曝露する工程；

（c）上記試験サンプルにおける配列番号39に対応する核酸配列を有するミトコンドリア融合転写物の存在を検出する工程；

（d）上記検出する工程の結果を参照値と比較する工程を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

〔関連出願に対する相互参照〕

本発明は、米国特許出願第61/309,216号（2010年3月1日出願）から優先権を主張する。上記特許出願の内容の全体が、参考として本明細書にて援用される。

【0002】

〔技術分野〕

本発明は、ミトコンドリアゲノミクスの分野に関する。より詳細には、本発明は、UV曝露と関連するミトコンドリア融合転写物および関連する欠失分子、ならびに生物学的サンプルにおけるそれらの検出およびモニタリングに関する。

【0003】

〔背景技術〕

〔ミトコンドリアのゲノム〕

ミトコンドリアのゲノムは、コンパクトであるが重要な核酸配列である。ミトコンドリアのDNAすなわち「mtDNA」は、33億bp（一倍体）の巨大な核ゲノムとは対照的に、16,569核酸塩基対（bp）の小さいゲノムを包含する（Anderson et al., 1981; Andrews et al., 1999）。上記mtDNAの遺伝的相補性は、核細胞メイト（nuclear cell mate）の相補性よりも実質的に小さい（0.0005%）。しかし、個々の細胞は、特定の細胞機能に依存して、概して 10^3 個から 10^4 個のミトコ

10

20

30

40

50

ンドリアを有している(Singh and Modica-Napolitano, 2002)。伝達すなわち化学的シグナリングは、核ゲノムとミトコンドリアゲノムとの間で通常生じる(Sherratt et al., 1997)。さらに、核の特定の構成成分は、ミトコンドリア配列の維持および保全を担っている(Croteau et al., 1999)。受精が生じるとすぐに卵子内でミトコンドリアがクローン増殖することに起因して、所定の個体における全てのmtDNAゲノムは同一である。しかし、変異原性の事象は、体細胞変異として反映される配列多様性を誘発し得る。これらの変異は、ヘテロプラズミー(heteroplasmy)として知られる状態において体中の種々の組織にて蓄積し得る。

【0004】

〔ミトコンドリア融合トランスクリプトーム〕

ミトコンドリアのゲノムは、通常と異なっており、環状の、イントロンが存在しないDNA分子である。このゲノムにおいては、特定の長さの配列に隣接する繰返しモチーフが散在している。これらの繰返しの間の配列は、あまりよく理解されていない環境下において欠失する傾向がある。ミトコンドリアゲノムにいくつかの繰返しがある場合、多くの欠失が存在する。最もよく知られている例示は、4977の「共通の欠失(common deletion)」である。この欠失は、意図されたいくつかの状態および病気と関連している。この欠失は、加齢に伴って頻度が増加すると考えられている(Dai et al., 2004; Ro et al., 2003; Barron et al., 2001; Lewis et al., 2000; Muller-Hocker, 1998; Porteous et al., 1998)。

【0005】

種々の他のミトコンドリアの欠失は、前立腺癌、皮膚癌および肺癌の初期の発症、ならびに、加齢(e.g. Polyak et al., 1998)、早期老化、および発癌性物質に対する曝露(Lee et al., 1998)と関連している。さらに、研究者は、非黒色腫皮膚癌(NMSC)の発生および病因に紫外線が重要であること(Weinstock 1998; Rees, 1998)、ならびに、ヒト皮膚において紫外線がmtDNA損傷を誘発すること、を見出している(Birch-Machin, 2000a)。例えば、カナダ国特許出願番号第2,480,184号において、ミトコンドリアゲノムのマイナーアーク(minor arc)における3895bpの欠失が、UV誘発性のDNA損傷のバイオマーカーとして同定された。以来、上記3895bpの欠失もまた、皮膚癌と関連している(PCT出願番号第PCT/CA2006/000652号)。

【0006】

出願人の同時係属の国際特許出願第PCT/CA2009/000351号にて論じられているように、ヒトミトコンドリアゲノムの大規模な欠失をマッピングすることから得られる知識は、病気と関連する欠失の同定に有用である。例えば、ミトコンドリアゲノムのコンピュータ解析は、出願人が欠失サイトを同定することを可能にする。DNA分子における欠失事象の開始の際に、上記欠失サイトは、オープンリーディングフレーム(ORF)を有する融合DNA配列を生成するために、再閉鎖(re-close)または再連結(re-ligate)する。これらの研究から、出願人は、欠失分子および関連した融合転写物のサブセットを同定した。上記欠失分子および関連した融合転写物は悪性腫瘍に関連性を示す。

【0007】

出願人は、ミトコンドリアの欠失、およびUV曝露と関連する融合転写物の、さらなるサブセットを同定している。これらの研究からの結果およびUV損傷の検出へのその適用を本明細書中に記載する。

【0008】

〔発明の概要〕

一態様において、本発明は、ミトコンドリア融合転写物を検出するための方法を提供する。

【0009】

別の態様において、本発明は、ミトコンドリア融合転写物を検出するための方法を提供

10

20

30

40

50

し、ここで、上記転写物はUV曝露に関連する。上記方法は以下の工程を含む：(a)生物学的サンプルを提供する工程；および(b)上記サンプルにおけるミトコンドリア融合転写物の存在を検出する工程。

【0010】

本発明の別の態様によると、被験体における累積のUV曝露を測定するための方法が提供される。上記方法は以下の工程を含む：(a)被験体からの生物学的サンプルを提供する工程；および(b)UV曝露に関連するミトコンドリア融合転写物の存在を検出する工程。

【0011】

本発明の別の態様によると、UV曝露に関連した、単離されたミトコンドリア融合転写物が提供される。

10

【0012】

本発明の別の態様によると、UV曝露の検出のための融合転写物の使用が提供される。

【0013】

本発明の別の態様によると、UV曝露に対するバイオマーカーとしての融合転写物の使用が提供される。

【0014】

本発明の別の態様によると、UV曝露を検出するためのキットが提供され、上記キットは、(a)本発明の単離された融合配列の一部に対して実質的に相補的な配列を有するプローブを備える。

20

【0015】

本発明の別の態様によると、ヒトmtDNAゲノムにおいて欠失を検出するための方法が提供され、上記欠失は、UV曝露に関連しており、上記方法は、(a)生物学的サンプルを提供する工程；(b)上記生物学的サンプルからmtDNAを抽出する工程；および(c)mtDNA欠失分子の存在を検出する工程を含む。

【0016】

本発明の別の態様によると、被験体における累積のUV曝露を測定するための方法が提供され、上記方法は、(a)生物学的サンプルを提供する工程；(b)上記生物学的サンプルからmtDNAを抽出する工程；および(c)UV曝露に関連したmtDNAでの欠失の存在を検出する工程を含む。

30

【0017】

本発明の別の態様によると、UV曝露に関連した、単離されたmtDNA欠失分子が提供される。

【0018】

本発明の別の態様によると、UV曝露を検出するためのmtDNA欠失体の使用が提供される。

【0019】

本発明の別の態様によると、UV曝露に対するバイオマーカーとしてのmtDNA欠失体の使用が提供される。

【0020】

40

本発明の別の態様によると、UV曝露またはUV損傷を防止、最小化、回復または保護するためのスキンケア製品の効力を試験するための方法が提供され、上記方法は以下の工程を含む：(a)所望の特徴を有するスキンケア製品を調製する工程；(b)上記スキンケア製品を患者の皮膚または皮膚等価物に適用する工程；(c)上記皮膚または皮膚等価物をUVRに曝露する工程；(d)上記曝露された患者の皮膚または皮膚等価物のサンプルにおいてUV曝露に関連したミトコンドリア融合転写物の存在を検出する工程；および(e)上記転写物の存在を参照値と比較する工程。

【0021】

本発明の別の態様によると、UV曝露またはUV損傷を防止、最小化、回復または保護するための新たなスキンケア製品または処方物の効力を試験するための方法が提供され、

50

上記方法は以下の工程を含む：（a）所望の特徴を有するスキンケア製品を調製する工程；（b）上記スキンケア製品を患者の皮膚または皮膚等価物に適用する工程；（c）上記皮膚または皮膚等価物をUVRに曝露する工程；（d）上記曝露された患者の皮膚または皮膚等価物のサンプルにおいてUV曝露と関連したmtDNA欠失分子の存在を検出する工程；および（e）上記分子の存在を参照値と比較する工程。

【0022】

本発明の別の態様によると、UV曝露またはUV損傷を防止、最小化、回復または保護するための能力についてスキンケア製品をスクリーニングするための方法が提供され、上記方法は以下の工程を含む：（a）上記スキンケア製品を患者の皮膚または皮膚等価物に適用する工程；（b）上記皮膚または皮膚等価物をUVRに曝露する工程；（c）上記曝露された患者の皮膚または皮膚等価物においてUV曝露と関連したミトコンドリア融合転写物の存在を検出する工程；ならびに（e）試験したスキンケア製品の各々に対する上記融合転写物の存在を参照値と比較するおよび／または互いに比較する工程。

10

【0023】

本発明の別の態様によると、UV曝露またはUV損傷を防止、最小化、回復または保護するための能力についてスキンケア製品をスクリーニングするための方法が提供され、上記方法は以下の工程を含む：（a）上記スキンケア製品を患者の皮膚または皮膚等価物に適用する工程；（b）上記皮膚または皮膚等価物をUVRに曝露する工程；（c）上記曝露された患者の皮膚または皮膚等価物においてUV曝露と関連したmtDNA欠失分子の存在を検出する工程；ならびに（e）試験したスキンケア製品の各々について上記欠失分子の存在を参照値と比較するおよび／または互いに比較する工程。

20

【0024】

本発明の別の態様によると、皮膚の加齢または光老化を防止、回復または保護するためのスキンケア製品の効力を試験するための方法が提供され、上記方法は以下の工程を含む：（a）所望の特徴を有するスキンケア製品を調製する工程；（b）上記スキンケア製品を患者の皮膚または皮膚等価物に適用する工程；（c）上記皮膚または皮膚等価物をUVRに曝露する工程；（d）上記曝露された患者の皮膚または皮膚等価物のサンプルにおいてUV曝露と関連したミトコンドリア融合転写物の存在を検出する工程；および（e）上記転写物の存在を参照値と比較する工程。

【0025】

30

本発明の別の態様によると、皮膚の加齢または光老化を防止、回復または保護するための新しいスキンケア製品または処方物の効力を試験するための方法が提供され、上記方法は以下の工程を含む：（a）所望の特徴を有するスキンケア製品を調製する工程；（b）上記スキンケア製品を患者の皮膚または皮膚等価物に適用する工程；（c）上記皮膚または皮膚等価物をUVRに曝露する工程；（d）上記曝露された患者の皮膚または皮膚等価物のサンプルにおいてUV曝露に関連したmtDNA欠失分子の存在を検出する工程；および（e）上記分子の存在を参照値と比較する工程。

【0026】

本発明の別の態様によると、皮膚の加齢または光老化を防止、回復または保護するための能力についてスキンケア製品をスクリーニングするための方法が提供され、上記方法は以下の工程を含む：（a）上記スキンケア製品を患者の皮膚または皮膚等価物に適用する工程；（b）上記皮膚または皮膚等価物をUVRに曝露する工程；（c）上記曝露された患者の皮膚または皮膚等価物においてUV曝露に関連したミトコンドリア融合転写物の存在を検出する工程；ならびに（e）試験したスキンケア製品の各々に対する上記融合転写物の存在を参照値と比較するおよび／または互いに比較する工程。

40

【0027】

本発明の別の態様によると、皮膚の加齢または光老化に対する防止、回復または保護するための能力についてスキンケア製品をスクリーニングするための方法が提供され、上記方法は以下の工程を含む：（a）上記スキンケア製品を患者の皮膚または皮膚等価物に適用する工程；（b）上記皮膚または皮膚等価物をUVRに曝露する工程；（c）上記曝露

50

された患者の皮膚または皮膚等価物においてUV曝露に関連したmtDNA欠失分子の存在を検出する工程；ならびに(e)試験したスキンケア製品の各々に対する上記欠失分子の存在を参照値と比較するおよび/または互いに比較する工程。

【0028】

〔図面の簡単な説明〕

本発明のこれらおよび他の特徴は、添付の図面を参照してなされる以下の詳細な説明においてより明確になる。

【0029】

図1は、ヌクレオチド548～4442位の除去後における、386～547位：4443～5511位からのフレーム2のアミノ酸配列を示す。

10

【0030】

図2は、ヌクレオチド548～4442位の除去後に生成される読み枠を示す図である。ヌクレオチド382は赤い四角によって示されている。上記赤い四角は、ミトコンドリアゲノムの1位に関する読み枠2の開始を特定している。

【0031】

図3は、ヌクレオチド548～4442位の除去によって形成されるフレーム2融合転写物の寄与配列を示す。

【0032】

図4は、ヌクレオチド548～4442位の欠失による融合転写物形態の最終アミノ酸配列を示す。上記配列は、ミトコンドリアゲノムの、再結合したヌクレオチド470～547位および4443～5511位を含む。

20

【0033】

図5Aは、mtDNA欠失体解析を使用したインピボでのUVR線量応答を示す。

【0034】

図5Bは、UV損傷を測定するためのサンプルの計算を示す。

【0035】

図6～9は、皮膚等価物における、UV照射に続く本発明の融合転写物2、3、11、12、20および32の発現を示す。

【0036】

図10～12は、3つのUV処方物のインピボ実験およびインピトロ試験を示す。

30

【0037】

図13および14は、UV曝露に続く種々の日焼け止めおよび抗加齢銘柄のスクリーニングを示す。

【0038】

図15は、実施例3の疑似太陽照射のために使用されるUVスペクトルを示す。

【0039】

図16は実施例4の疑似太陽照射のために使用されるUVスペクトルを示す。

【0040】

〔発明の詳細な説明〕

本発明は、UV曝露と関連している、新規のミトコンドリア融合転写物および関連するmtDNA分子を提供する。本発明はまた、生物学的サンプルにおいて融合転写物および関連するmtDNA分子の検出およびモニタリングを提供する。本発明はさらに、スキンケア製品のスクリーニングおよび試験における、融合転写物および関連するmtDNAの欠失体の使用を提供する。

40

【0041】

本発明の技術および手順は、概して、当該分野における慣用的方法および種々の一般的な参考文献（例えば、Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., and Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, New York: Plenum Press (1983)参照）に従って行われる。

50

【 0 0 4 2 】

〔 定義 〕

他で規定されない限り、本明細書中で使用される全ての技術的用語および科学的用語は、本発明が属する技術分野における当業者によって広く理解されるものと同一の意味を有する。以下の用語は、他で指示されない限り、以下の意味を有することが理解されるべきである。

【 0 0 4 3 】

本明細書で用いられる場合、「約」という用語は、一定の値および係数からの変動をいうことが意図される。このことが特に言及されているか否かにかかわらず、上記用語が特に参照されるか否かにかかわらず、本明細書中にて提供されている任意の所定の値および係数に常に含まれることが理解されるべきである。例として、上記変動は、およそ + / - 10 % であってもよい。測定に必然的に関連するある程度の誤差が存在することまた、全ての当業者に周知である。上記誤差の程度は、記録を取得するために使用される機器の精度に依存して変動する。出願人は、本発明を行う者によって使用される機器の精度を知り得ないので、測定誤差の程度を必然的に規定し得ない。同様に、本明細書中にて提示されているヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の精度は、使用される装置およびプロセスの精度に依存する。したがって、配列の些細な変異は、本願の教示の範囲外とみなされない。

10

【 0 0 4 4 】

本明細書で用いられる場合、「ミトコンドリア融合転写物」または「融合転写物」という表現は、変異したミトコンドリア DNA 配列の転写の結果として生成される RNA 転写産物をいう。ここで、上記変異は、ミトコンドリア欠失および他の大規模なミトコンドリア DNA の再編成を含み得る。

20

【 0 0 4 5 】

本明細書で用いられる場合、核酸の「ハイブリダイズする (h y b r i d i z e) 」という用語は、検出可能にかつ特異的に第 2 の核酸に結合する能力をいう。ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチドおよびこれらの断片は、非特異的な核酸に検出可能に結合するかなりの量を最小化するハイブリダイゼーション条件下および洗浄条件下において直接的な標的核酸鎖にハイブリダイズする。高ストリンジェンシーの条件は、当該分野において公知の選択的ハイブリダイゼーション条件を達成するために使用され得る。典型的には、ハイブリダイゼーション条件および洗浄条件は、慣用的なハイブリダイゼーション手順に従って高ストリンジェンシーにおいて行われる。洗浄条件は、一般に、1 ~ 3 × S S C、0 . 1 ~ 1 % S D S、50 ~ 70 であり、約 5 ~ 30 分間の後に洗浄溶液を交換する。

30

【 0 0 4 6 】

「回復する」という用語は、UV 損傷の一つ以上の症状、徴候または特徴において、一過性および長期間の両方の停止、防止、低減または改善を含む。

【 0 0 4 7 】

本明細書で用いられる場合、「異常」または「変異」は、野生型ミトコンドリアの DNA 配列における改変を含む。上記改変は、融合転写物を生じ、そして、限定されることなく実質的な m t DNA 欠失体または大規模な m t DNA 欠失体を含む。

40

【 0 0 4 8 】

本明細書で用いられる場合、「ミトコンドリア DNA」または「m t DNA」は、ミトコンドリアに存在するか、またはミトコンドリアにおいて生じている。

【 0 0 4 9 】

本明細書で用いられる場合、「被験体」または「患者」という用語は、治療が必要な動物または試験される動物をいう。

【 0 0 5 0 】

本明細書で用いられる場合、「動物」という用語は、ヒトおよび非ヒト動物の両方をいい、制限されないが、哺乳類、鳥類および魚類を含む。

【 0 0 5 1 】

50

本明細書で用いられる場合、物体に適用されるような「由来する」という用語は、その物体が特定の供給源から得られることを示し、その供給源から直接的に得られることを必ずしも必要としない。

【0052】

本明細書で用いられる場合、「診断の (diagnostic)」または「診断すること (diagnosing)」は、UV曝露の診断またはUV曝露の管理における因子として、変異、または変異の組合せの存在または非存在あるいは変異の組合せの量を使用することを意味する。

【0053】

「皮膚」という用語は、体の外部を保護的に覆うことをいう。皮膚は、真皮および表皮からなり、汗、皮脂腺および毛嚢構造を含むことが理解される。一実施態様において、皮膚は哺乳類の皮膚であり、ヒトであることが好ましい。

【0054】

本明細書で用いられる場合、「生物学的サンプル」は、細胞を含む組織または体液をいう。上記細胞からは、目的の分子が得られ得る。例えば、生物学的サンプルは、皮膚細胞または組織に由来し得る。上記組織は、真皮もしくは表皮、またはこれら両方の組合せから採取され得る。生物学的サンプルは、その供給源から得られた状態で直接的に使用されても、サンプルの特性を改変させる前処理に続いて、使用されてもよい。サンプルは、種々の方法によって得られ得る。上記方法は、制限されないが、以下が含まれる：皮膚組織の微小核 (micro-cores) を採集するための、パンチ生検法、外科的切除法および非侵襲的または最小限に侵襲性の皮膚の採集方法 (例えば、ウェットスピング (wet swabbing)、テープリフト (tape lift)、コットンチップスワビング、滅菌したメスを用いた皮膚のかきとり、木製のスクレーパーを用いた皮膚のかきとり、粘着パッドの接着面 (CapSureTM Clean-up Pad、Arcturus)、LCM MacroCapTM (Arcturus) からのフィルム、LCM MacroCapTM (Arcturus) からの加熱フィルムおよび小さなゲージ (例えば、28ゲージ) の針の使用)。これらの方法は、当該分野において周知である (例えば、出願人の同時係属出願第PCT/CA2007/001790およびPCT/CA2008/001801 (上記同時係属出願は、皮膚を採集するための種々の方法を開示している。) 参照)。

【0055】

〔ゲノムの変異〕

mtDNAは、危険因子、または崩壊性の細胞プロセスを同定するに有用なバイオマーカーである。上記危険因子または細胞プロセスは、疾患の開始、ならびに因子 (例えば、毒素、発癌性物質または有害な放射線) への環境的な曝露に関連するものである。本発明によると、ミトコンドリアゲノムにおける大規模な再構成の変異が、UV曝露に関連した融合転写物を同定する。したがって、UV曝露の検出、診断およびモニタリングのための、上記の転写物をコードするmtDNAおよびこのmtDNAを指向するプローブの使用が、本明細書中に提供される。

【0056】

本発明の方法論はまた、mtDNA欠失体またはそれらに関連する融合転写物のいずれを介しても、スキンケア製品の同定において有効である。したがって、本願は、生物学的サンプルにおけるUVに関連した損傷の量を検出 (および計測) するための種々の方法、ならびに上記損傷を低減または防止し得る製品をスクリーニングおよび試験するための種々の方法を提供する。

【0057】

当業者は、本発明の方法における使用のためのmtDNA分子が、天然に存在する変異体の単離を介して得られても、本明細書中に記載された融合転写物の何れかの相補配列に基づいてもよい、ということを正しく認識する。例示的なmtDNA配列および融合転写物は、出願人の同時係属のPCT出願 (PCT/CA2009/000351) に開示さ

10

20

30

40

50

れており、この同時係属のPCT出願は、参考として本明細書にて援用される。

【0058】

〔変異ゲノム配列の検出〕

本発明による、UV曝露と関連した変異配列は、融合転写物を生成するmtDNA欠失体を含む。その改変または変化は、わずか数ベースから数千ベースまで、サイズを顕著に変更し得るで、好ましくは、上記改変が、実質的または大規模なmtDNA欠失(ゲノム異常とも呼ばれる。)を生じる。

【0059】

異常なmtDNA分子を抽出および単離するための技術は、出願人の同時係属の特許出願(PCT/CA2009/000351号)に開示されている。上記方法は、適切なプライマー、プローブおよびゲノム配列(例えば、それらは新規のmtDNA結合ポイントを有する)を選択するための技術も含んでおり、参考として本明細書に参照にて援用される。

【0060】

本発明の一態様によると、候補ゲノム配列を決定するために、配列欠失の結合ポイントが初めに同定される。配列の欠失は5'末端および3'末端にて欠失されるべき配列に隣接する直接的および間接的な繰返しエレメントによって、最初に同定される。ゲノムからの一区切りのヌクレオチドを除去し、次いでゲノムをライゲーションすることによって、オープンリーディングフレーム(ORF)および新規の結合ポイントを有する融合DNA配列が生じる。

【0061】

本発明の方法における使用のための例示的なmtDNA分子が、以下に提供される。以前に述べられてるように(PCT/CA2009/000351参照)、これらのmtDNAは、公知のミトコンドリアゲノム(配列番号1)の改変に基づいており、融合または「FUS」の呼称が割り当てられている。ここで、A:Bは第一のスプライシングされた遺伝子の最後のミトコンドリアヌクレオチドと第二のスプライシングされた遺伝子の最初のミトコンドリアヌクレオチドとの間の結合ポイントを示す。スプライシングされた遺伝子の同定が、対応する配列の識別子に続く括弧書きにて提供される。以下に提供される場合、(AltMet)および(OrigMet)はそれぞれ、代替の翻訳開始部位および元々の翻訳開始部位をいう。

【0062】

FUS 469:13447(AltMet)(ATPシンターゼF0サブユニット8(ATPase8)-NADHデヒドロゲナーゼサブユニット5(ND5))(配列番号2)

FUS 0744:14124(NADHデヒドロゲナーゼサブユニット4L(ND4L)-NADHデヒドロゲナーゼサブユニット5(ND5))(配列番号3)

FUS7974:15496(シトクロムcオキシダーゼサブユニットI1(COI1)-シトクロムb(Cytb))(配列番号4)

FUS 992:15730(シトクロムcオキシダーゼサブユニットI1(COM)-シトクロムb(Cytb))(配列番号5)

FUS 210:15339(シトクロムcオキシダーゼサブユニットI1(COM)-シトクロムb(Cytb))(配列番号6)

FUS 828:14896(ATPシンターゼF0サブユニット6(ATPase6)-シトクロムb(Cytb))(配列番号7)

FUS10665:14856(NADHデヒドロゲナーゼサブユニット4L(ND4L)-シトクロムb(Cytb))(配列番号8)

FUS 075:13799(シトクロムcオキシダーゼサブユニットI(COI)-NADHデヒドロゲナーゼサブユニット5(ND5))(配列番号9)

FUS 325:13989(シトクロムcオキシダーゼサブユニットI(COI)-NADHデヒドロゲナーゼサブユニット5(ND5))(配列番号10)

F U S 7 4 3 8 : 1 3 4 7 6 (シトクロム c オキシダーゼサブユニット I (C O I)
 - N A D H デヒドロゲナーゼサブユニット 5 (N D 5)) (配列番号 1 1)
 F U S 7 7 5 : 1 3 5 3 2 (シトクロム c オキシダーゼサブユニット I 1 (C O M)
 - N A D H デヒドロゲナーゼサブユニット 5 (N D 5)) (配列番号 1 2)
 F U S 2 1 3 : 1 3 9 9 1 (シトクロム c オキシダーゼサブユニット I 1 (C O M)
) - N A D H デヒドロゲナーゼサブユニット 5 (N D 5)) (配列番号 1 3)
 F U S 1 4 4 : 1 3 8 1 6 (A T P シンターゼ F O サブユニット 6 (A T P アーゼ 6)
) - N A D H デヒドロゲナーゼサブユニット 5 (N D 5)) (配列番号 1 4)
 F U S 1 9 1 : 1 2 9 0 9 (A T P シンターゼ F O サブユニット 6 (A T P アーゼ 6)
) - N A D H デヒドロゲナーゼサブユニット 5 (N D 5)) (配列番号 1 5)
 F U S 5 7 4 : 1 2 9 7 2 (シトクロム c オキシダーゼサブユニット I I I (C O I
 I I) - N A D H デヒドロゲナーゼサブユニット 5 (N D 5)) (配列番号 1 6)
 F U S 0 3 6 7 : 1 2 8 2 9 (N A D H デヒドロゲナーゼサブユニット 3 (N D 3)
 - N A D H デヒドロゲナーゼサブユニット 5 (N D 5)) (配列番号 1 7)
 F U S 1 1 2 3 2 : 1 3 9 8 0 (N A D H デヒドロゲナーゼサブユニット 4 (N D 4)
) - N A D H デヒドロゲナーゼサブユニット 5 (N D 5)) (配列番号 1 8)
 F U S 8 4 6 9 : 1 3 4 4 7 (O r i g M e t) (A T P シンターゼ F O サブユニッ
 ト 8 (A T P a s e 8) - N A D H デヒドロゲナーゼサブユニット 5 (N D 5)) (配列
 番号 1 9)
 F U S 5 4 7 : 4 4 4 3 (M e t - N A D H デヒドロゲナーゼサブユニット 2 (N D
 2)) (配列番号 2 0) 。

【 0 0 6 3 】

以下の実施例に記載されているように、一旦配列が同定されると、それらの配列の U V
 曝露との関連性が解析される。このような試験が、被験体または患者においてインビボで
 行われてもよく（実施例 5 参照）、増殖されそして種々のレベルの U V R が照射される皮
 膚培養物の試験を介して行われてもよい（実施例 3 および 4 参照）。これらの配列の発現
 はまた、1 時間またはそれより長い時間にわたってハウスキーピング（k e e p e r）遺
 伝子についてモニタリングされてもよい、上記ハウスキーピング遺伝子としては、限定さ
 れないが、ヒト P P I B、ヒト P G K - 1、ヒト A C T B（ベータアクチン）、ヒト G U
 S B（ベータグルクロニダーゼ）、ヒト B 2 M（ベータ - 2 - ミクログロブリン）、ヒト
 P P I A（ペプチジルプロリルイソメラーゼ A（シクロフィリン A））、ヒト G A P D（
 グリセルアルデヒド（g l y e r a l d e h y d e）- 3 - ホスフェートデヒドロゲナー
 ゼ）、ヒト H P R T 1（ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ 1）、ヒト R
 P L P O = L R P（リボソームタンパク質、ラージ（l a r g e）、P O）、ヒト H M B
 S = P B G D（ヒドロキシメチルピランシンターゼ）、ヒト T B P（T A T A ボックス結
 合タンパク質）、ヒト T R F C（トランスフェリン受容体（p 9 0、C D 7 1）、および
 、ヒト A B C C 1 3（染色体 1 3 偽遺伝子）が挙げられる。

【 0 0 6 4 】

本発明の一実施形態において、以下の m t D N A 配列が、U V 損傷を予測、診断または
 モニタリングすること、ならびに、U V 損傷の防止または回復に効果的なスキンケア製品
 を試験およびスクリーニングすること、に対して有用であると判断される。：

配列番号 3 (F U S 1 0 7 4 4 : 1 4 1 2 4)

配列番号 4 (F U S 7 9 7 4 : 1 5 4 9 6)

配列番号 1 2 (F U S 7 7 7 5 : 1 3 5 3 2)

配列番号 1 3 (F U S 8 2 1 3 : 1 3 9 9 1)

配列番号 1 9 (F U S 8 4 6 9 : 1 3 4 4 7 ; O r i g M e t)

配列番号 2 0 (F U S 5 4 7 : 4 4 4 3)。

【 0 0 6 5 】

本発明の他の実施形態において、配列番号 1 9 および 2 0 を有する m t D N A 配列が、
 本発明の方法を行う際に、好ましく使用される。

【 0 0 6 6 】

上記配列に加えて、本発明はまた、UV損傷またはUV曝露を予測、診断および/またはモニタリングするための、これらの配列の改変体または断片の使用を提供する。

【 0 0 6 7 】

本明細書で用いられる場合、「改変体」は本発明のmtDNA配列とは異なる核酸をいうが、その本質的な特性を保持している。一般に、改変体は、選んだmtDNA配列に対して、全体的に密接に類似しており、そして、多くの領域において同一である。詳細には、本発明の改変体は、スプライシングされた遺伝子の結合ポイントのヌクレオチドを少なくとも一つ含む。上記改変体は、上記結合ポイントに隣接した一つ以上のヌクレオチドをさらに含んでもよい。本発明の一実施形態において、改変体配列は、本発明のmtDNA配列のいずれか一つまたはそれらの相補鎖に対して、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である。

10

【 0 0 6 8 】

本発明において、「断片」は、開示されたゲノム配列またはその相補鎖に含まれている核酸配列の一部である短い核酸配列をいう。この一部は、スプライシングされた遺伝子の結合ポイントを含むヌクレオチドの少なくとも一つを含む。この一部はさらに、隣接する一つ以上のヌクレオチドを含んでもよい。本発明の断片は、少なくとも約15ntの長さであることが好ましく、より好ましくは少なくとも約20ntの長さであり、なおより好ましくは少なくとも約30ntの長さであり、さらにより好ましくは、少なくとも約40ntの長さ、少なくとも約50ntの長さ、少なくとも約75ntの長さまたは少なくとも約150ntの長さである。「少なくとも20ntの長さ」の断片は、例えば、上記に挙げられたmtDNA配列のいずれか一つの20個以上連続する塩基を含むことが意図される。この内容において、「約」は、詳細に記載されている値、および数個(5、4、3、2、または1)のヌクレオチドだけ大きい値または小さい値を、どちらか一方の末端または両方の末端に含む。これらの断片は、用途を有し、上記用途としては、限定されないが、本明細書中に記載されるような診断プローブおよびプライマーが挙げられる。もちろん、より大きな断片(例えば、50、150、500、600、2000ヌクレオチド)もまた企図される。

20

【 0 0 6 9 】

〔プライマーおよびプローブ〕

30

本発明の他の態様は、本発明のmtDNA配列を認識し得るプライマーおよびプローブを提供することである。本発明に用いられる場合、「プライマー」および「プローブ」という用語は、上記プライマーおよびプローブにおける少なくとも一つの配列の上記標的領域との相補性に起因して標的核酸における配列と二重鎖構造を形成するオリゴヌクレオチドをいう。当該分野において公知の方法によると、上記プローブは標識化されてもよい。

【 0 0 7 0 】

一旦UV曝露に関連した異常型のmtDNAが同定されると、例えば、オリゴヌクレオチドのアレイに対するmtDNAのハイブリダイゼーションが、特定の変異の同定のために使用され得るが、公知の任意のハイブリダイゼーション法が使用され得る。

【 0 0 7 1 】

40

本発明にて使用するために好適なプライマーおよびプローブの調製が、出願人の同時係属のPCT出願に記載されているように生成され得る。この点において、プローブは、本発明の例示的なmtDNA融合分子に対して、またはそれらの断片もしくは改変体に対して、直接的に生成され得る。例えば、配列番号3、4、12、13、19および20に記載の配列は、目的の融合配列を含む核酸配列を検出するプライマーまたはプローブの設計のために使用され得る。当業者に理解されるように、これらの核酸分子にハイブリダイズするプライマーまたはプローブは、高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下またはより低いストリンジェンシーの条件下で、ハイブリダイズしてもよい。上記条件は当業者に公知であり、例えば、Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, New York (1989)), 6.3.1-6.3.6.において見出される。本発明のプライマーおよ

50

びプローブはまた、標的配列のDNAスリッページが存在する箇所または類似の配列変更事象が生じた箇所にハイブリダイズし得る。

【0072】

本発明の特定の実施形態において、本発明のプローブは、スプライシングされた遺伝子の結合ポイントを含む異常型mtDNAの少なくとも一部に対して相補的な配列を含む。この一部は、結合ポイントA：Bに含まれる少なくとも一つのヌクレオチドを含み、隣接する1個以上のヌクレオチドをさらに含んでもよい。この点について、本発明は、任意の好適な標的化メカニズムを含む。上記メカニズムは、結合ポイントA：Bに含まれているおおよび/または隣接しているヌクレオチドを使用してmtDNA分子を選択する。

【0073】

種々のタイプのプローブ（出願人の同時係属のPCT出願において記載されているような）が、本発明によって企図される。本発明のプローブは、好ましくは少なくとも約15ntの長さであり、より好ましくは少なくとも約20ntの長さであり、なおより好ましくは少なくとも約30ntの長さであり、さらにより好ましくは、少なくとも約40ntの長さ、少なくとも約50ntの長さ、少なくとも約75ntの長さまたは少なくとも約150ntの長さである。「少なくとも20ntの長さ」のプローブは、例えば、20個以上の連続する塩基を含むことが意図される。上記連続する塩基は、本発明のmtDNA配列に対して相補的である。もちろん、より大きなプローブ（例えば、50、150、500、600、2000ヌクレオチド）もまた好ましい。

【0074】

本発明のプローブはまた、生物学的サンプル中の核酸分子にハイブリダイズし、これにより、本発明の方法を可能にする。よって、本発明の一態様において、UV損傷またはUV曝露の検出、診断および/またはモニタリングに使用するためのハイブリダイゼーションプローブが提供される。ここで、上記プローブは、異常型mtDNA分子の少なくとも一部に対して相補的である。他の態様において、本発明は、プローブおよび上記プローブの使用（または使用方法）を提供し、上記使用は、UV損傷またはUV曝露を防止または回復することに効果的なスキンケア製品をスクリーニングまたは検証するための、上記プローブの使用である。

【0075】

〔アッセイ〕

生物学的サンプルにおいて異常型のmtDNAのレベルを測定することは、被験体におけるUV曝露のレベルを決定し得る。したがって、本発明は、UV損傷およびUV曝露を検出、診断またはモニタリングするための方法を含み、上記方法は一つ以上の生物学的サンプルを得る工程、上記サンプルからmtDNAを抽出する工程、および上記サンプルにおける一つ以上の異常型mtDNA配列の量を定量し、検出された量を参照値と比較することによって異常型mtDNAについて上記サンプルをアッセイする工程を含む。

【0076】

当業者に理解されるように、上記参照値は、上記方法が、UV損傷およびUV曝露の検出、診断またはモニタリングを要求するか否かに基づく。よって、上記参照値は、一つ以上の公知のUV曝露された生物学的サンプルから、一つ以上の公知のUV曝露されていない生物学的サンプルから、および/または一つ以上の生物学的サンプルから、一定の期間にわたって収集されたmtDNAデータに関してもよい。上記サンプルは、太陽にまれに曝露される皮膚、太陽に時折曝露される皮膚、または太陽にたいいてい曝露される皮膚または血液に由来し得る。上記サンプルは、限定されないが、以下の方法を含む種々の方法によって採集され得る：皮膚組織の微小核を採集するための、パンチ生検法、外科的切除法、および非侵襲的または最小限に侵襲性の皮膚の採集方法（例えば、ウェットスワビング、テープリフト、コットンチップスワビング、滅菌したメスを用いた皮膚のかきとり、木製のスクレーパーを用いた皮膚のかきとり、粘着パッドの接着面（CapSureTM Clean-up Pad、Arcturus）、LCM MacroCapTM（Arcturus）からのフィルム、LCM MacroCapTM（Arcturus）から

の加熱フィルム、および小さなゲージ（例えば、28ゲージ）の針の使用）。

【0077】

m t D N Aにおける変異の存在を検出する工程は、当業者に公知の任意の技術から選択され得る。例えば、m t D N Aを解析することは、m t D N Aの配列決定、P C Rによるm t D N Aの増幅、サザンブロットハイブリダイゼーション、ノザンブロットハイブリダイゼーション、ウエスタンサウス-ウエスタンブロットハイブリダイゼーション、変性H P L C、マイクロアレイ、バイオチップまたはジーンチップに対するハイブリダイゼーション、分子マーカー解析、バイオセンサー、融点プロファイリング、または上述した解析のいずれかの組合せを含み得る。

【0078】

一態様において、本発明は、哺乳類におけるU V曝露を検出するための方法を提供する。上記方法は、上記の異常型ミトコンドリアD N Aの存在について哺乳類からの組織サンプルをアッセイする工程を含む。本発明はまた、哺乳類からの組織サンプルを少なくとも一つのハイブリダイゼーションプローブとハイブリダイズすることによって、上記サンプルをアッセイする工程を含む方法を提供する。上記プローブは、本明細書中に記載されたような本発明の変異ミトコンドリアD N A配列に対して生成され得る。

【0079】

他の態様において、本発明は、上述したような方法を提供する。上記アッセイは、以下を含む：a) 少なくとも一つのプローブが相補的な異常型ミトコンドリアD N A配列にハイブリダイズすることを可能にするために本発明の少なくとも一つのプローブを使用するハイブリダイゼーション反応を行う工程；b) 上記サンプルにおける上記少なくとも一つの異常型ミトコンドリアD N A配列の量を、上記少なくとも一つのプローブにハイブリダイズしたミトコンドリアD N Aの量を定量することによって定量する工程；およびc) 上記サンプルにおけるミトコンドリアD N Aの量を少なくとも一つの既知の参照値と比較する工程。

【0080】

当業者に公知のような画像診断アッセイを含む、U V損傷またはU V曝露を検出、診断またはモニタリングするための方法もまた本発明に含まれる。本発明の診断アッセイは、高スループットに容易に適合され得る。高スループットアッセイは、多くのサンプルを同時に処理するという利点を提供し、多数のサンプルをスクリーニングするために必要な時間を顕著に減少させる。よって、本発明は、複数の試験サンプルにおける標的ヌクレオチド配列の検出および/または定量のための、高スループットスクリーニングまたは高スループットアッセイにおける本発明のヌクレオチドの使用を企図する。

【0081】

〔融合転写物〕

本発明の他の態様は、U V損傷またはU V曝露を予測、診断および/またはモニタリングするための方法に有用な、融合転写物および関連するハイブリダイゼーションプローブの同定である。出願人の同時係属のP C T出願において開示されているように、上記分子は、天然の転写物の単離を介して、あるいは、本発明の方法に従って単離されるm t D N A sのリコンビナント発現によって、生成され得る。これらのm t D N A sは、典型的には、スプライシングされた遺伝子を含む。上記スプライシングされた遺伝子は、第一の遺伝子に由来する開始コドンおよび第二の遺伝子の終止コドンを有する。よって、スプライシングされた遺伝子から得られた融合転写物は、スプライシングされた遺伝子と関連する結合ポイントを含む。

【0082】

〔融合転写物の検出〕

天然の融合転写物は、任意の好適な当該分野にて公知の方法に従って、生物学的サンプルから抽出され得、そして同定され得る。または、出願人の同時係属のP C T出願に記載されている方法に従って処理されてもよい。本発明の一実施形態において、ポリAテイルを有する転写物を標的化するオリゴ(d t)プライマーを使用し、続いて標的転写物に対

10

20

30

40

50

して設計されたプライマー対を使用した R T - P C R によって、安定的なポリアデニル化した融合転写物が同定される。

【 0 0 8 3 】

以下の例示的な融合転写物が、これらの方法を使用して検出された：

配列番号 2 2 (転写物 2 ; 1 0 7 4 4 : 1 4 1 2 4)

配列番号 3 8 (転写物 2 0 ; 8 4 6 9 : 1 3 4 4 7 ; O r i g M e t) 。

【 0 0 8 4 】

融合転写物はまた、当該分野にて公知のリコンビナント技術によって生成され得る。典型的には、上記リコンビナント技術は、目的の m t D N A 配列を含む発現ベクターを用いる好適な宿主細胞の形質転換 (トランスフェクション、形質導入または感染を含む。) を含む。

10

【 0 0 8 5 】

〔 予期しない融合転写物の検出 〕

予期しない特性の融合転写物もまた出願人によって同定されており、本発明の方法に有用であることが証明されている。現在までに、同定された融合転写物の各々が、ミトコンドリアゲノムにおける欠失事象の結果として生じており、新規配列を形成するための 2 つの遺伝子の融合体を生じ、次いでミトコンドリアによって転写される。対照的に、以下に詳しく記載されている 3 8 9 5 b p の欠失は、D - l o o p の融合体を生じる。上記融合体は m t D N A の非コード領域に位置している。

【 0 0 8 6 】

20

〔 融合転写物と関連した 3 8 9 5 b p の欠失の検出が予期されない理由 〕

ミトコンドリア融合転写物は、その大多数が、隣接している 2 つの遺伝子または隣接していない 2 つの遺伝子の間に含まれているヌクレオチドが欠失することによって形成される (上述したゲノムの変異の項および出願人の同時係属の P C T 出願参照) 。欠失した D N A の除去の後、ミトコンドリアゲノムの残余物が、次いで、再結合され、新しい遺伝子すなわち転写物を生じる。これまでに記載したように、このスプライシングされた遺伝子は、5 ' 末端側 (m o s t) の元々の遺伝子の開始コドン、元々の 2 つの遺伝子からの遺伝物質の種々の貢献、および 3 ' 末端側の遺伝子の元々の終止コドンから構成される。

【 0 0 8 7 】

対照的に、ヌクレオチド 5 4 7 - 4 4 4 3 位の間の遺伝物質の欠失からの融合転写物 (転写物 3 2 ; 配列番号 3 9) は、予期されない。なぜなら、5 ' 部分が、ミトコンドリアゲノムの非コード置換ループ (D i s p l a c e m e n t L o o p) (D - L o o p) (1 6 0 2 4 - 5 7 6) 内に位置しているからである。この事実にもかかわらず、5 4 8 - 4 4 4 位が除去される場合、フレーム 2 におけるインタクトな読み枠は、3 8 6 - 5 4 7 位 : 4 4 4 3 - 5 5 1 1 位から観察される (図 1 および 2 参照) 。フレーム 1 および 3 は、多くの末端コドンを有し、よって、読み枠を生成し損なう (図 2) 。

30

【 0 0 8 8 】

フレーム 2 の融合転写物の 5 ' 部分 (c o n t e n t) は、超可変セグメント 3 (4 3 8 - 5 7 4) 内に位置する 4 7 0 位の最初のメチオニンにて開始するのでなく、3 8 6 位のプロリンで開始する。上記融合転写物の 3 ' 部分は、t R N A のメチオニン (4 4 0 2 - 5 5 1 1) 内の 4 4 4 3 位で開始し、N A D H デヒドロゲナーゼサブユニット 2 (4 4 7 0 - 5 5 1 1) の 5 5 1 1 位にて終止する (図 3) 。図 4 は、ミトコンドリアゲノムの 5 4 8 - 4 4 4 2 位の欠失によって形成される、4 7 0 位にて開始する融合転写物が生じたことを示す。

40

【 0 0 8 9 】

よって、本発明は、種々の内容物を含む融合転写物を含み、すなわち、上記融合転写物が、2 つのコード領域のスプライシングされた配列を含み、そして上記融合転写物がスプライシングされたコード領域および非コード領域を含む。

【 0 0 9 0 】

〔 U V R と関連した融合転写物 〕

50

一旦ミトコンドリア融合転写物が同定されると、その配列は、次いで、以下の実施例に記載されるように、UV Rとの関連について試験される。このような試験は、インビボで、すなわち培養された皮膚等価物にて実行され得る。上記皮膚等価物は、増殖され、そして種々のレベルのUV Rを照射される（実施例 6 参照）。これらの配列の発現がまた、一つ以上のハウスキーピング遺伝子に関してモニタリングされ得る、上記ハウスキーピング遺伝子としては、限定されないが、ヒト P P I B、ヒト P G K - 1、ヒト A C T B（ベータアクチン）、ヒト G U S B（ベータグルクロニダーゼ）、ヒト B 2 M（ベータ - 2 - ミクログロブリン）、ヒト P P I A（ペプチジルプロリルイソメラーゼ A（シクロフィリン A））、ヒト G A P D（グリセルアルデヒド（g l y e r a l d e h y d e）- 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ）、ヒト H P R T 1（ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ 1）、ヒト R P L P O = L R P（リボソームタンパク質、ラージ（l a r g e）、P O）、ヒト H M B S = P B G D（ヒドロキシメチルピランシターゼ）、ヒト T B P（T A T Aボックス結合タンパク質）、ヒト T R F C（トランスフェリン受容体（p 9 0、C D 7 1）、および、ヒト A B C C 1 3（染色体 1 3 偽遺伝子）が挙げられる。

【 0 0 9 1 】

本発明の一実施形態において、以下のミトコンドリア融合転写物が、UV 損傷を予測、診断およびモニタリングすることに有用であること、ならびに、UV 損傷の防止または回復に効果的なスキンケア製品を試験およびスクリーニングすることに有用であることが同定されている：

配列番号 2 2（転写物 2；1 0 7 4 4：1 4 1 2 4）

配列番号 2 3（転写物 3；7 9 7 4：1 5 4 9 6）

配列番号 3 1（転写物 1 1；7 7 7 5：1 3 5 3 2）

配列番号 3 2（転写物 1 2；8 2 1 3：1 3 9 9 1）

配列番号 3 8（転写物 2 0；8 4 6 9：1 3 4 4 7；O r i g M e t）

配列番号 3 9（転写物 3 2；5 4 7：4 4 4 3）

上記配列に加えて、本発明は、UV 曝露を予測、診断およびモニタリングするための上記配列の改変体または断片の使用を提供する。本明細書中にて同定された融合転写物の改変体または断片は、ゲノム改変体および断片に関して上述されたサイズ制限および同一性パーセントに、または当業者によって好適に決定されるようなサイズ制限および同一性パーセントに、従う。

【 0 0 9 2 】

さらに、本発明の転写物 2、3、1 1、1 2、2 0 および 3 2 に対応する推定のタンパク質配列が、以下に挙げられる。これらの配列は、仮定の融合タンパク質をコードしており、本発明のさらなる実施形態として提供され、そして本発明の方法に有用であるとみなされるべきである。

配列番号 4 0（転写物 2）

配列番号 4 1（転写物 3）

配列番号 4 2（転写物 1 1）

配列番号 4 3（転写物 1 2）

配列番号 4 4（転写物 2 0）

配列番号 4 5（転写物 3 2）。

【 0 0 9 3 】

〔プライマーおよびプローブ〕

一旦融合転写物を特徴付けると、プライマーまたはプローブが、生物学的サンプル中の上記転写物を標的化するように開発され得る。このようなプライマーおよびプローブは、（上述したような）任意の公知の方法を用いて調製されても、または出願人の同時係属の P C T 出願に提供される実施例に示されるように、調製されてもよい。プローブは、例えば、融合転写物に対して作製され得、そして、サンプル中の転写物の存在を検出するために検出技術（例えば、P a n o m i c s ^{T M} による Q u a n t i G e n e 2 . 0 ^{T M}）が使用され得る。プライマーおよびプローブは、本発明の例示的な融合転写物、または、

それらの断片もしくは改変体に対して直接に生成され得る。例えば、配列番号 22、23、31、32、38 および 39 に示される配列を使用して、目的の融合配列を含む核酸配列を検出するプローブを設計し得る。

【0094】

当業者によって理解されるように、本発明の融合転写物にハイブリダイズするために設計されたプローブは、上記転写物の少なくとも一部に相補的な配列を含み、好ましくは、上記一部は、スプライシングされた遺伝子の結合ポイントを発現する。この部分は、上記発現される結合ポイントに対して相補的なヌクレオチドの少なくとも一つを含み、上記一部は、隣接する 1 個以上の相補的なヌクレオチドをさらに含み得る。この点において、本発明は、任意の好適な標的化メカニズムを含み、上記メカニズムは、スプライシングされ

10

【0095】

種々のタイプのプローブ、および当該分野において公知の標識化方法が、転写物プローブの調製のために企図される。このようなタイプおよび方法は、ゲノム配列の検出に関して上述されている。本発明の転写プローブは、少なくとも約 15 nt の長さであるが好ましく、より好ましくは少なくとも約 20 nt の長さであり、なお好ましくは、少なくとも約 30 nt の長さであり、皿により好ましくは、少なくとも約 40 nt の長さ、少なくとも約 50 nt の長さ、少なくとも約 75 nt の長さまたは少なくとも約 150 nt の長さである。「少なくとも 20 nt の長さ」のプローブは、例えば、20 個以上の連続する塩基を含むことが意図される。上記隣接する塩基は、本発明の mtDNA 配列に対して相補的である。もちろん、より大きなプローブ（例えば、50、150、500、600、2000 ヌクレオチド）もまた好ましい。

20

【0096】

本発明のプローブは、生物学的サンプルにおける核酸分子にもまたハイブリダイズする。したがって、本発明の方法を可能にする。よって、本発明の一態様において、UV 損傷または曝露を検出すること、診断することおよび/またはモニタリングすることにおいての使用のための提供されたハイブリダイゼーションプローブが存在する。上記プローブは、本発明融合転写物の少なくとも一部に対して相補的である。他の一態様において、提供されるプローブおよびその利用方法（または使用の方法）が存在する。上記プローブは UV 損または曝露の防止または改善において効果的なスキンケア製品の試験およびスクリーニングのためのものである。

30

【0097】

〔アッセイ〕

本発明に従って、疑似太陽光を用いた照射に対して曝露することに続いて新規融合転写物が多量に増加することが実証された（例えば、図 6 参照）。これらの新規転写物のインビトロおよびインビボの両方での検出は、UV 照射（UVB および UVA の両方）に対する曝露の定量化を可能にする。よって、本発明は、UV 損傷および UV 曝露を検出、診断またはモニタリングするための方法を含み、上記方法は、一つ以上の生物学的サンプルを得る工程、上記サンプルからミトコンドリア RNA を抽出する工程、および上記サンプルにおける一つ以上の融合転写物の量を定量し、検出された量を参照値と比較することによって融合転写物について上記サンプルをアッセイする工程を含む。

40

【0098】

当業者に理解されるように、上記参照値は、上記方法が、UV 損傷および UV 曝露の検出、診断またはモニタリングを要求するか否かに基づく。よって、上記参照値は、一つ以上の既知の UV 曝露された生物学的サンプルから、一つ以上の公知の UV 曝露されていない生物学的サンプルから、および/または一つ以上の生物学的サンプルから一定の期間にわたって収集された転写物データに関してもよい。上記サンプルは、太陽にまれに曝露される皮膚、太陽に時折曝露される皮膚、または太陽にたいいてい曝露される皮膚または血液に由来し得る。上記サンプルは、上述した種々の方法によって採集され得る。

50

【 0 0 9 9 】

一態様において、本発明は、哺乳類におけるUV曝露を検出するための方法を提供する。上記方法は、上記の融合転写物の存在について哺乳類からの組織サンプルをアッセイする工程を含む。本発明はまた、哺乳類からの組織サンプルを少なくとも一つのハイブリダイゼーションプローブとハイブリダイズすることによって、上記サンプルをアッセイする工程を含む方法を提供する。上記プローブは、本明細書中に記載されたような本発明の融合転写物に対して生成され得る。

【 0 1 0 0 】

他の態様において、本発明は、上述したような方法を提供する。上記アッセイは、以下を含む：a) 少なくとも一つのプローブが相補的な融合転写物の配列にハイブリダイズすることを可能にするために少なくとも一つのプローブを使用するハイブリダイゼーション反応を行う工程；b) 上記サンプルにおける上記少なくとも一つの融合転写物の配列の量を、上記少なくとも一つのプローブにハイブリダイズした融合転写物の配列量を定量することによって定量する工程；およびc) 上記サンプルにおける上記転写物の量を少なくとも一つの既知の参照値と比較する工程。

10

【 0 1 0 1 】

上述したように、本発明の診断アッセイはまた、本明細書中に記載されたような診断方法およびスクリーニングツールを含み得、高スループットに対し容易に適合され得る。よって、本発明は、複数の試験サンプルにおける標的ヌクレオチド配列の検出および/または定量のための、高スループットスクリーニングまたは高スループットアッセイにおける本発明の融合転写物および関連するプローブの使用を企図する。

20

【 0 1 0 2 】

〔スキンケア製品の試験およびスクリーニング〕

〔新しい処方物〕

特定の活性物質または処方物（例えば、日焼け止め、抗酸化物質または抗加齢の製品）の適用を介した、多くの新規のUV関連融合転写物および関連するmtDNA分子における変化の調節は、UV照射による損傷から皮膚を保護する際の製品の効力を評価するために使用され得る。このような評価は、皮膚等価物モデルを使用した、新しい処方物のインビトロでの試験の形式（図10および11参照）を採用しても、生物学的サンプルを使用した、製品のインビボでの試験（図12参照）を介した形式を採用してもよい。

30

【 0 1 0 3 】

よって、本発明は、以下の工程を実行することによって、UV曝露またはUV損傷に対して防止、最小化、回復または保護するスキンケア製品の効力を調製および試験する方法を企図する：所望の特徴（例えば、UV A フィルターおよび/またはUV B フィルター）を有する製品を調製する工程；スキンケア製品を、患者の皮膚または皮膚等価物モデルに適用する工程；上記皮膚または皮膚等価物モデルをUV R に曝露する工程；太陽にまれに曝露される皮膚、太陽に時折曝露される皮膚、または太陽にたいいてい曝露される皮膚から採取したサンプルにおける少なくとも一つのミトコンドリア欠失分子および/または融合転写物の存在を検出する工程；ならびに、上記欠失体すなわち転写物の存在を参照値（例えば、コントロール遺伝子および/または転写物）と比較する工程。コントロール患者または皮膚等価物モデル（スキン製品を受けていないもの）がまた、参照値として使用されてもよい。

40

【 0 1 0 4 】

UV損傷の一つ以上の症状、徴候または特徴において、一過性および長期間の両方における停止、防止、減少または改善は、UV曝露またはUV損傷に対する防止、最小化、改善または保護のための新しい製品（処方物）の能力を示す、ということを当業者は理解する。本発明の一実施形態において、以下に提供される実施例にて示されるような製品解析が行われる。

【 0 1 0 5 】

本発明の好ましい実施形態において、新しい製品を試験するための方法は、mtDNA

50

欠失体または融合転写物の存在を検出する工程の前に、被験体の皮膚または皮膚等価物モデルを致死線量よりも低い線量の紫外線（UVR）に少なくとも1回曝露する工程を含む。さらに、試験する前に、皮膚および皮膚等価物は、一連の反復性の、致死線量よりも低い線量のUVR（例えば、毎日のUVR照射）に曝露され得る。概して、上記UVRは、疑似太陽のUVR光源に由来する。ここで、上記UVRは、UVA、UVBまたはUVA/UVBを含む。しかし、本明細書において太陽曝露がまた企図される。コントロール配列（上述したハウスキーピング遺伝子および転写物が挙げられるが、これらに限定されない。）がまた企図される。mtDNA欠失体および融合転写物マーカに関する限りでは、記載された方法の最後においてそれらを単独またはタンデムのどちらかによって挿入し得る。

10

【0106】

〔皮膚サンプル〕

患者の皮膚サンプルが、皮膚の真皮層または表皮層から採集され得、以下の方法によって得られてもよい：皮膚組織の微小核を採集するための、パンチ生検法、外科的切除法、および非侵襲的または最小限に侵襲性の皮膚の採集方法（例えば、ウェットスワビング、テプリフト、コットンチップスワビング、滅菌したメスを用いた皮膚のかきとり、木製のスクレーパーを用いた皮膚のかきとり、粘着パッドの接着面（CapSureTM Clean-up Pad、Arcturus）、LCM MacroCapTM（Arcturus）からのフィルム、LCM MacroCapTM（Arcturus）からの加熱フィルム、および小さなゲージ（例えば、28ゲージ）の針の使用）。サンプルは、供給源から得られたまま直接的に用いられても、サンプルの特性を改変させる前処理に続いて用いられてもよい。よって、皮膚サンプルは、使用する前に、例えば、保存薬、試薬などを用いて前処理され得る。

20

【0107】

一つよりも多い採集技術が同時に使用され得ることは当業者に明らかである。さらに、採集の経過が、例えば、一定の期間にわたって製品のモニタリングに必要とされる場合、同一または異なる技術が、試験期間を通して単独または一緒に使用され得る。これに関して、皮膚の採集が、一度だけ、または規則的な間隔にて（例えば、1日毎、1週毎または1月毎に）行われ得る。

【0108】

〔皮膚等価物モデル〕

出願人はまた、皮膚等価物モデルを使用した、スキンケア製品をインビトロで試験するための新規システムを開発している。これらのモデルは、例えば、実施例2に記載されるように生成され、そして増殖され、続いて、上記モデルは、スキンケア製品を用いて処理され、種々の変化量のUVRによって照射される。試験されるべき製品は、皮膚等価物の表面に単純にアプライされ（例えば、2mg/cm²の濃度にて）、そして細胞の表面にわたって均一に広げられる。皮膚等価物は、疑似太陽の下に配置され、一つ以上のUV光の照射に曝露される。照射は、個々の実験設定および試験されるべき製品に依存する。しかし、典型的な照射レジメンのいくつかの例が、以下の表1および2に提供される。

【0109】

〔製品のスクリーニングおよび個別のスキンケア〕

融合転写物および関連mtDNA欠失体の発生に対して保護するためのスキンケア製品の能力に対するデータの収集を介して、日焼け防止および抗加齢に関してより効果的な製品が開発され得る。なお、つい最近まで、太陽への曝露の間に個人によって定期的に適用される日焼け止めおよび日焼け止めクリーム（sunblock）は、概して、UVBの変異誘発効果に対して保護されるが、UVA照射の有害な効果に指向される因子を含んでいなかった。よって、スキンケア製品の標的になるスクリーニングは、それらのUVA照射およびUVB照射の両方に対して保護し得る製品を同定する際に役立つ。

40

【0110】

これらの要素はとりわけ、市場に入る新しい製品の効力を測定すること、ならびに、研

50

究の経過を介して、皮膚に対するUVR損傷を防止するための現行の測定成功および適合性をモニタリングすることの両方を目的としたツールの利用可能性を必要とする。製品を適用し規則的な間隔でUVRを照射した後に皮膚サンプルを採取することによって、患者の皮膚および皮膚等価物モデルにおいてミトコンドリアDNA欠失体のレベルを測定することは、DNAおよび皮膚損傷の防止に対する上記製品の効力を決定することを補助し得る。上記DNAおよび皮膚の損傷は、関連する光老化および皮膚癌を含む。

【0111】

本発明の方法はまた、医療目的および化粧目的の両方のための、広く行きわたった皮膚スクリーニングに使用され得る。例えば、任意の時点での、外側の解剖学的な任意の位置からのUV照射に起因する、被験体の皮膚におけるDNA損傷のレベルを評価するための能力は、現存するスキンケア製品および新しいスキンケア製品、ならびに所定の被験体に対するスキンケアレジメンの、安全性および効力を評価するために、独特かつ有益なスクリーニング試験のための基礎を提供する。さらに、UV曝露と関連した特定の遺伝子変化を同定することによって、特定のスキンケア製品またはレジメンが提供されるべきか否か、そしてどの程度提供されるべきかが、容易に決定され得る。

10

【0112】

すでに市場にあるスキンケア製品について、本発明の方法は、UV曝露またはUV損傷に対して防止、最小化、回復または保護するための、それらのスキンケア製品の能力を測定するための因子をスクリーニングすることを助ける。これは、熟練者または消費者が、それらの特定のスキンケアにおける要求性にどの商品が最も適しているのかを評価することを可能にする。本発明の方法によってスクリーニングされる製品としては、限定されないが、日焼け止め、ならびに、抗加齢の血清およびクリームが挙げられ、ペアにて、あるいは3つ以上の製品のバッチにて評価され得る。新しい処方物、または以下の実施例に詳述されているようなものを試験するためのスクリーニング方法が、上述されるように実行され得る。

20

【0113】

〔キット〕

本発明は、被験体のUV曝露を検出またはモニタリングするための診断キットを提供する。本発明に従う一つ以上のプライマーもしくはプローブの組合せにおいて、上記キットは、一つ以上のサンプリング手段を備えてもよい。このようなキットはまた、その内容物を使用するための指示書を備え得る。

30

【0114】

上記キットは、必要に応じて、診断アッセイを行うために必要な試薬（例えば、緩衝液、塩、検出試薬など）を備える。他の構成要素（例えば、生物学的サンプルの単離および/または処理のための溶液）がまた、上記キットに備えられ得る。上記キットの一つ以上の構成要素は、凍結乾燥されていてもよく、凍結乾燥された構成要素の再構築に好適な試薬をさらに備えていてもよい。

【0115】

場合によっては、上記キットはまた、反応容器、混合容器、および試験サンプルの調製を容易にする他の構成要素を備えていてもよい。上記キットはまた、必要に応じて、使用のための指示書を備えていてもよく、上記指示書は、紙形態で提供されても、コンピュータ読取り可能な形態（例えば、ディスク、CD、DVDなど）で提供されてもよい。

40

【0116】

本発明の一実施形態において、UV曝露を診断するためのキットが提供される。上記キットは、サンプリング手段および本発明のプローブまたはプライマーを備える。

【0117】

本明細書中に記載された本発明をより良く理解するために、以下の実施例が示される。これらの実施例は、本発明の例示的な実施形態を記載することが意図され、本発明の範囲を限定することが決して意図されていない、ということが理解される。

【0118】

50

〔実施例〕

〔実施例 1：H p E K p 細胞の増殖〕

〔材料〕

- 1．H p E K p 細胞 < 15 継代 (C e l l n T e c)
- 2．T 7 5 組織培養フラスコ (I W A K I)
- 3．T r y p L E ^{T M} S e l e c t (1 2 5 6 3 - 0 1 1、I n v i t r o g e n)
- 4．10 ml 滅菌 S t r i p e t t e s (S t a r L a b s)
- 5．自動ピペッター
- 6．倒立 T C 顕微鏡
- 7．滅菌 15 ml ファルコンチューブ (F a l c o n)
- 8．クラス 2 組織培養キャビネット (37℃、5%CO₂) (B i n d e r)
- 9．ウォーターバス (37℃)
- 10．滅菌リン酸緩衝化生理食塩水
- 11．PCM 完全培地 (C n T - 5 7) (C e l l n T e c)。

10

【0119】

〔プロトコル〕

- 1．H p E K p 細胞 (90%コンフルエンス) のフラスコから C n T - 5 7 培地を除去する
- 2．滅菌 P B S (2 ml) を用いて細胞を洗浄する。吸引オフ
- 3．細胞を覆うために、T r y p L E ^{T M} S e l e c t を 1 フラスコ当たり 1 . 5 ml 加える
- 4．細胞が剥離するまで、2～3 分間インキュベーターに戻して静置する (顕微鏡を用いて確認する。)
- 5．細胞を再懸濁するために、5 ml の C n T - 5 7 培地中で細胞を再懸濁する。2、3 回激しくピペティングする
- 6．160 × g で 5 分間細胞をスピンする
- 7．培地を除去し、新鮮な C n T - 5 7 培地 5 ml 中で再懸濁する。2、3 回激しくピペティングする
- 8．細胞を計数するために 20 μ l の細胞懸濁液を移す
- 9．細胞を希釈し、4 × 10³ 細胞 / c m² の濃度にて播種する
- 10．37℃ および 5%CO₂ の加湿されたインキュベーターの中にフラスコを置く
- 11．2～3 日毎に 15 ml の C n T - 5 7 培地を用いて給餌することによって細胞を維持する
- 12．90%コンフルエントまで増殖させ、次いで再び継代する。

20

30

【0120】

〔実施例 2：表皮性の皮膚等価物の生成〕

〔材料〕

- 1．90%コンフルエントにまで増殖させた H p E K p 細胞 < 15 継代 (C e l l n T e c) (実施例 1 参照)
- 2．T 7 5 組織培養フラスコ (I W A K I)
- 3．T r y p L E ^{T M} S e l e c t (1 2 5 6 3 - 0 1 1、I n v i t r o g e n)
- 4．10 ml 滅菌 S t r i p e t t e s (S t a r L a b s)
- 5．自動ピペッター
- 6．倒立 T C 顕微鏡
- 7．滅菌 15 ml ファルコンチューブ (F a l c o n)
- 8．6 ウエル培養プレート (M i l l i p o r e)
- 9．M i l l i c e l l P C F 0 . 4 μ m I n s e r t s (M i l l i p o r e)
- 10．R a p i D i f f I I s t a i n P a c k (B i o S t a i n)
- 11．24 ウエル培養プレート (M i l l i p o r e)

40

50

12. クラス2組織培養キャビネット(37、5%CO₂)(Binder)
13. ウォーターバス(37)
14. 滅菌リン酸緩衝化生理食塩水
15. 滅菌ピンセット
16. PCM完全培地(CnT-57)(CellnTec)
17. 3D-Prime完全培地(CNT-02-3DP)(CellnTec)。

【0121】

〔プロトコル〕

1. 4つのMillicell PCF 0.4µm 12mm インサート(Millicellipore Cat:PIHP01250)を、6ウエル培養プレートの各ウエル内に置き、実験に必要な数をプレートアウト(plating out)する。予備インサートを2つ準備する(コンフルエンスをモニタリングするため-ステップ15)
2. HpEKp細胞のフラスコからCnT-57培地を除去する
3. 滅菌PBS(2ml)を用いて細胞を洗浄する。吸引オフ
4. 細胞を覆うために、TrypLETMSelectを1フラスコ当たり1.5ml加える
5. 細胞が剥離するまで、2~3分間インキュベーターに戻して静置する(顕微鏡を用いて確認する。)
6. 細胞を再懸濁するために、5mlのCnT-57培地中で細胞を再懸濁する。2、3回激しくピペティングする
7. 160×gで5分間細胞をスピンする
8. 培地を除去し、新鮮なCnT-57培地5ml中で再懸濁する。2、3回激しくピペティングする
9. 細胞を計数するために20µlの細胞懸濁液を移す
10. 5×10⁵細胞/mlの濃度に細胞を希釈する
11. インサート1つ당に、400µlのCnT-57(またはCnT-07)中にて2×10⁵個の細胞を添加する
12. インサートの内側および外側の培地のレベルが等しくなりかつ細胞を埋もれるように、インサートの外側(プレートのウエル内)に適量(約2ml)のCnT-57を添加する; 上記膜の底部に、気泡が閉じ込められていないことを確認する
13. 37 および5%CO₂の加湿されたインキュベーターの中にインサートを置く
14. 2~3日間細胞を増殖させる
15. RAPI-DIFF II染色を用いて一つの予備インサートを染色する
16. 単層がコンフルエントの場合、ステップ17に進む。そうでなければ、残存しているインサートにおいて培地を交換し、さらに1日間培養し、次いで、第2の予備インサートを用いて別の染色を行う
17. インサートの内側および外側の培養培地を3D 培地(CnT-02-3DP)に取り換える(播種した時と同量、ステップ12)
18. 細胞が細胞間接着構造を形成することを可能にするために、インキュベーターの中にインサートを一晩(15-16h)置く。

【0122】

19. インサートの内側から全ての培地を吸引することによって3D培養を開始し、24ウエルプレートの個々のウエルに置く。(CNT-02-3DP)外側培地を加える(250µl)
20. 経時的な検討を行う場合、インサートを同一プレートに残して、おいて2~3日毎に培地交換をしてもよい。放射線照射処理を開始する前に、乾燥雰囲気下において14日間細胞を増殖させる。

【0123】

〔実施例3: 表皮性の皮膚等価物の放射線照射-UVA照射〕

〔材料〕

10

20

30

40

50

1. Oriol 1000W UV Solar Simulator (Newport Corp.)
2. Atmospheric Attenuationフィルター (Newport Corp. - 81017)
3. Vis IRフィルター (Newport corp - 87066)
4. PETGフィルター (RVI Medical Physics)
5. International Light UVA 光線療法放射計 (Able Instruments - IL1402)
6. 表皮性の皮膚等価物 (実施例2参照)
7. 3D-Prime 完全培地 (CNT-02-3DP) (CellnTec)
8. 24ウエル培養プレート (Millipore)
9. 滅菌リン酸緩衝化生理食塩水
10. 滅菌ピンセットおよびメス。

10

【0124】

〔使用したUVスペクトル (疑似太陽)〕

Atmospheric Attenuationフィルター + Vis IRフィルター + PETGフィルター : 図15に示すように。

【0125】

〔手順〕

1. 実施例2に示したように、皮膚等価物を作製しそして増殖させる。

20

【0126】

2. 14日間の乾燥雰囲気下での増殖の後に、上記SEを放射線照射 / 処理するために準備する

3. 皮膚等価物を増殖培地から移し、新しい24ウエルプレート内に配置する。上記24ウエルプレートは200 μ lの滅菌PBSを含む

4. 必要であれば、試験されるべき製品を、2mg/cm²の濃度 (または任意の特定の濃度) にて上記皮膚等価物の表面にアプライする。上記製品を曲がった200 μ lの滅菌ピペットチップを用いてアプライし、表面にわたって均等に広げる

5. 皮膚等価物を準備したら直ちに、UV光に対する曝露の前に、それら皮膚等価物をインキュベーター内へ戻して、20分間静置する

30

6. 疑似太陽を点灯し、処理の前に10分間暖めておく。放射計を用いてUV出力を測定し、上記強度を用いて曝露に必要な時間を算出する

7. 上記皮膚等価物を疑似太陽下に置き、(実験上の要求に応じて上記6にて計算されるような) X SEDのUV光に曝露する

8. 曝露に続いて、上記皮膚等価物を3D培地中に再度配置し、インキュベーター内へ戻す

9. 放射線照射は個々の実験の設定に依存する。いくつかの例を表1に示す

10. SEへの放射線照射に続いて、SEを3D培地から移し、抽出の前に-80 にて保存する。

【0127】

40

【表1】

表 1

実験の設定
線量応答 0.04 SED, 複数回の照射
線量応答 0.08 SED, 複数回の照射
SPF 15 製品 0.08 SED, 複数回の照射
抗加齢製品 0.08 SED, 複数回の照射

【0128】

50

〔実施例 4：表皮性の皮膚等価物の放射線照射 - 疑似太陽光〕

〔材料〕

1. 1. Oriel 1000W UV Solar Simulator (Newport Corp.)
2. Atmospheric Attenuation フィルター (Newport Corp. - 81017)
3. Vis IR フィルター (Newport corp - 87066)
4. International Light UVA 光線療法放射計 (Able Instruments - IL1402)
5. 表皮性の皮膚等価物 (実施例 2 参照)
6. 3D - Prime 完全培地 (CNT - 02 - 3DP) (CellnTec)
7. 24 ウエル培養プレート (Millipore)
8. 滅菌リン酸緩衝化生理食塩水
9. 滅菌ピンセットおよびメス。

10

【0129】

〔使用した UV スペクトル (疑似太陽)〕

Atmospheric Attenuation フィルター + Vis IR フィルター：図 16 に示すように。

【0130】

〔手順〕

20

1. 実施例 2 に示したように、皮膚等価物を作製しそして増殖させる
2. 14 日間の乾燥雰囲気下での増殖の後に、上記 SE を放射線照射 / 処理するために準備する
3. 皮膚等価物を増殖培地から移し、新しい 24 ウエルプレート内に配置する。上記 24 ウエルプレートは 200 μ l の滅菌 PBS を含む
4. 必要であれば、試験されるべき製品を、2 mg / cm² の濃度 (または任意の特定の濃度) にて上記皮膚等価物の表面にアプライする。上記製品を曲がった 200 μ l の滅菌ピペットチップを用いてアプライし、表面にわたって均等に広げる
5. 皮膚等価物を準備したら直ちに、UV 光に対する曝露の前に、それら皮膚等価物をインキュベーター内へ戻して、20 分間静置する
6. 疑似太陽を点灯し、処理の前に 10 分間暖めておく。放射計を用いて UV 出力を測定し、上記強度を用いて曝露に必要な時間を算出する
7. 上記皮膚等価物を疑似太陽下に置き、(実験上の要求に応じて上記 6 にて計算されるような) X SED の UV 光に曝露する
8. 曝露に続いて、上記皮膚等価物を 3D 培地中に再度配置し、インキュベーター内へ戻す
9. 放射線照射は個々の実験の設定に依存する。いくつかの例を表 1 に示す
10. SE への放射線線量に続いて、SE を 3D 培地から移し、抽出の前に - 80 にて保存する。

30

【0131】

40

【表 2】

表 2

実験の設定
線量応答 0.5 SED, 複数回の照射
線量応答 1 SED, 複数回の照射
SPF 15 製品 1 SED, 複数回の照射
抗加齢製品 0.5 SED, 複数回の照射

【0132】

50

〔実施例 5：インビボでの UVR 線量応答〕

種々のレベルの UVR を用いて放射線照射を行い、次いで、拭き取って皮膚サンプルを収集することによって、個体に対するインビボでの試験を行った。図 5 を参照して、SED は標準的な紅斑線量 (erythema l dose) をいう。上記線量は、紅斑 (または皮膚の発赤) を生じさせるために必要とされる UVR の量である。図 5 A は、3.0

SED までの UVR 照射に続く皮膚拭取りサンプルにおける定量的リアルタイム PCR によって行われた、mtDNA 欠失体の解析についての線量応答の結果を示す。この実験は、紅斑が生じ始める時点まで、漸増量の UVR の線量を用いて、UVR 誘導性の mtDNA 損傷が増加することを実証する。紅斑が生じ始める時点で、おそらく紅斑組織における増加したレベルのアポトーシスに起因して、サンプルにおける mtDNA 損傷は低下する。このことは、皮膚に対する長期間にわたる損傷の観点で、それが紅斑線量よりも低い線量であることを示し、この線量は、皮膚において観察される mtDNA の長期間にわたる損傷を生成する。図 5 B に示すように、損傷における変化度 (fold change) を算出する。

【0133】

〔実施例 6：UV 曝露と関連した融合転写物の同定〕

培養した皮膚等価物を増殖させ、上記の実施例に記載したような疑似太陽を使用した種々のレベルの UVR を用いて照射した。

【0134】

Quant i Gene Sample Processing Kit : Cultured Cells (Panomics QS0100) および the Quant i Gene 2.0 Reagent System (Panomics QS0008) の製造業者のプロトコルに従いサンプルを処理した。詳細には、300 μ l の希釈した溶解混合液を皮膚等価物の各々に加え、その後、上記皮膚等価物を 50 にて 1.5 時間または細胞の膜が完全に溶解されている外観を細胞が呈するまで、インキュベートした。各々を 1:10 に希釈し、プロトコルの残りを実行し、ハウスキーパーとして ACBT ベータアクチンを用いて融合転写物 2、3、11、12、20 および 32 を標的化した。全ての転写物について、各サンプルを三連にてアッセイし、各サンプル / 転写物のペアについて、テンプレートのないバックグラウンドを設けた。

【0135】

図 6 ~ 9 を参照して、0.5 SED および 1.0 SED を、種々の回数の反復性の照射 (0x、15x、18x、21x、24x、27x) での本実験の目的のために使用した。明確に記載すると、1.0 SED 27x に曝露されたこれらの皮膚等価物が、最大のレベルの UVR を受けた。

【0136】

これらの結果は、試験された融合転写物の各々が、反復性の放射線照射を増やす場合および UVR 曝露との関連を示す 0.5 SED ~ 1.0 SED の場合の両方にて、量的に増加したことを実証する。

【0137】

〔実施例 7：製品の処方および試験〕

異なるレベルの UV A フィルターの 3 つのブラインド処方物を 2 mg / cm² にて試験した。各処方物のサンプルを、14 日間経過した皮膚等価物に対して、UV A および疑似太陽光源の両方を用いて試験した。同時に、上記サンプルを in vivo において試験した。サイバークリーン (sybr green) 定量的リアルタイム PCR によって欠失解析を行った。

【0138】

実験に用いる所望物を、標準的な化粧用成分から構成される化粧用の化粧用ローションエマルジョンにて、調製した。各製品は、一定のレベルの UV B フィルターを含むが、UV A フィルターのレベルを以下のように変化させた。

【0139】

【表 3】

表 3: 新しい処方物の内容

サンプル No.	UVB フィルター	UVA フィルター	星評価
1 (図における B)	3.8%	0%	星 1 つ
2 (図における A)	3.8%	1.75%	星 3 つ
3 (図における C)	3.8%	4.5%	星 5 つ

10

【0140】

図 10 は、処方物 (A、B または C) の適用に続く、UVA (図 10) および疑似太陽光 (図 11) に曝露したインビトロのサンプルに対する PCR 解析の結果を示す。図 12 に、処方物のインビボ試験に続く結果を提供する。これらのデータは、疑似太陽光からの UVB 損傷の多因子性の性質を示し、UVA のみの曝露を用いて分離した時、損傷レベルは、日焼け止めによって与えられた UVA 保護の割合に追従する。しかしながら、疑似太陽光において曝露が UVA の UVB および UVB の UVB の両方を結合させた場合、サンプル間の損傷率は変化する。サンプル A および B については、UVA フィルターの欠如および疑似太陽光における UVB の併用は、紅斑の閾値を超える損傷を受けているので (前出の 00121)、A が予想よりも高いというよりもむしろ、B が予想よりも低いのかも

20

【0141】

これらの結果はまた、この化合物において、欠失のレベルによって示されているような損傷のレベルと UVA フィルターの量との間に逆相関関係が存在していることを実証する。明確に記載すると、化合物 B のような UVA フィルターの欠失は、より高いレベルの欠失を生じる。

【0142】

〔実施例 8：日焼け止めおよび抗加齢の商品のスクリーニング〕

30

UVA 光に対する反復性の曝露の前に、種々の日焼け止めおよび抗加齢の製品のサンプルを 2 mg/cm^2 にてアプライした。日焼け止め剤のパネルは、UK / 北アメリカのトップブランドからの SPF 15 の製品を含んでいた。抗加齢の製品は、多くのトップブランドからの広範なナイトクリーム / 血清を含んでいた (図 13)。上記結果は、全ての製品が同じ SPF 規格を有するにもかかわらず (15)、UVA および疑似太陽 UVB の両方を用いた放射線照射に続く、これらの製品によって与えられる保護レベルがかなり変動したことを示す。これは、mtDNA 損傷において (SPF 規格によって測定される) UVB 曝露の要素 (例えば、UVA 保護および抗酸化活性) が重要であるので、日焼け止めによって与えられた UVB 保護の効力を評価するためには SPF 単独では不十分であることを示唆する。抗加齢の製品は、多くのトップブランドからの広範なナイトクリーム / 血清を含んでいた (図 14)。これらのデータは、高加齢型の製品によって与えられる保護において、mtDNA に関するかぎり、顕著な変量が存在することを示す。これらの製品の多くは、これらの主な活性成分として抗酸化化合物を含み、このことは、mtDNA 損傷の測定が、上述した処方物、さらに、個々の活性成分を効果的であるものと、保護をほとんどもしくは全く示さないものとの間で差別化し得ることを示す。

40

【0143】

本発明は、いくつかの特定の実施形態を参照して記載されているが、本発明の目的および範囲を逸脱することなく、本明細書に添付の特許請求の範囲で述べるような上記実施形態の種々改変が、当業者に明白である。本明細書中に提供される任意の実施例は、単に本発明を例示する目的のために含まれており、本発明を限定することを決して意図するもの

50

でない。本明細書とともに提供される任意の図面は、単に本発明の種々の態様を例示するための目的であり、本発明を縮小するまたは限定することを決して意図するものでない。本明細書中に挙げられた全ての先行技術の開示は、それらの全てが参考として本明細書にて援用される。

【 0 1 4 4 】

〔引用文献〕

以下の参考文献が、他にも文献は存在するが、これまでの記載の中で引用された。これらの参考文献の内容の全体が、本明細書に対する参照の目的で、本明細書にて援用される。

【 0 1 4 5 】

【表 4】

著者	雑誌名	タイトル	巻	公開年
Anderson et al	Nature	Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome	290(5806):457-65	1981
Andrews et al	Nat Genet	Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA.	23(2):147	1999
Modica-Napolitano et al	Expert Rev Mol Med	Mitochondria as targets for detection and treatment of cancer	4:1-19	2002
Sherratt et al	Clin Sci (Lond)	Mitochondrial DNA defects: a widening clinical spectrum of disorders.	92(3):225-35	1997
Croteau et al	Mutat Res	Mitochondrial DNA repair pathways.	434(3):137-48	1999
Dai et al	Acta Otolaryngol	Correlation of cochlear blood supply with mitochondrial DNA common deletion in presbycusis.	24(2):130-6	2004
Ro et al	Muscle Nerve	Deleted 4977-bp mitochondrial DNA mutation is associated with sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a hospital-based case-control study.	28(6):737-43	2003
Barron et al	Invest Ophthalmol Vis Sci	Mitochondrial abnormalities in ageing macular photoreceptors.	42(12):3016-22	2001
Lewis et al	J Pathol	Detection of damage to the mitochondrial genome in the oncocytic cells of Warthin's tumour.	191(3):274-81	2000
Muller-Hocker et al	Mod Pathol	The common 4977 base pair deletion of mitochondrial DNA preferentially accumulates in the cardiac conduction system of patients with Kearns-Sayre syndrome.	11(3):295-301.	1998
Porteous et al	Eur J Biochem	Bioenergetic consequences of accumulating the common 4977-bp mitochondrial DNA deletion.	257(1):192-201	1998
Birch-Machin MA	Online Conference Report (Sunburnt DNA)	International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, New Scientist		2000(a)
Lee HC et al.	Federation of European Biochemical Societies	Aging-and smoking-associated alteration in the relative content of mitochondrial DNA in human lung	441:292-296	1998
Polyak Y. et al.	Nature Genetics	Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours	20 (3):291-293	1998
Rees JL	The Genetic Basis of Human Cancer	Skin Cancer	pp. 527-536	1998
Weinstock MA	Epidemiology	Epidemiology of Ultraviolet Radiation	pp. 121-128	1998

【図面の簡単な説明】

【 0 1 4 6 】

【図 1】ヌクレオチド 5 4 8 ~ 4 4 4 2 位の除去後の、3 8 6 ~ 5 4 7 位：4 4 4 3 ~ 5 1 1 位からのフレーム 2 のアミノ酸配列を示す図である。

【図 2】ヌクレオチド 5 4 8 ~ 4 4 4 2 位の除去後に生成される読み枠を示す図である。

ヌクレオチド 3 8 2 は赤い四角によって示されている。上記赤い四角は、ミトコンドリアゲノムの 1 位に関する読み枠 2 の開始を特定している。

【図 3】ヌクレオチド 5 4 8 ~ 4 4 4 2 位の除去によって形成されるフレーム 2 融合転写物の寄与配列を示す図である。

【図 4】ヌクレオチド 5 4 8 ~ 4 4 4 2 位の欠失による融合転写物形態の最終アミノ酸配列を示す図である。上記配列は、ミトコンドリアゲノムの、再結合したヌクレオチド 4 7 0 ~ 5 4 7 位および 4 4 4 3 ~ 5 5 1 1 位を含む。

【図 5 A】は、m t D N A 欠失体解析を使用したインビボでの U V R 線量応答を示す図である。

【図 5 B】は、U V 損傷を測定するためのサンプルの計算を示す図である。

10

【図 6】皮膚等価物における、U V 照射に続く本発明の融合転写物 2、3、1 1、1 2、2 0 および 3 2 の発現を示す図である。

【図 7】皮膚等価物における、U V 照射に続く本発明の融合転写物 2、3、1 1、1 2、2 0 および 3 2 の発現を示す図である。

【図 8】皮膚等価物における、U V 照射に続く本発明の融合転写物 2、3、1 1、1 2、2 0 および 3 2 の発現を示す図である。

【図 9】皮膚等価物における、U V 照射に続く本発明の融合転写物 2、3、1 1、1 2、2 0 および 3 2 の発現を示す図である。

【図 1 0】3 つの U V 処方物のインビボ実験およびインビトロ試験を示す図である。

【図 1 1】3 つの U V 処方物のインビボ実験およびインビトロ試験を示す図である。

20

【図 1 2】3 つの U V 処方物のインビボ実験およびインビトロ試験を示す図である。

【図 1 3】U V 曝露に続く種々の日焼け止めおよび抗加齢銘柄のスクリーニングを示す図である。

【図 1 4】種々の日焼け止め商品および抗加齢商品の、U V 曝露に続くスクリーニングを示す図である。

【図 1 5】実施例 3 の疑似太陽照射のために使用される U V スペクトルを示す図である。

【図 1 6】実施例 4 の疑似太陽照射のために使用される U V スペクトルを示す図である。

【図 1】

FOKFFVLANCTFNSHFFVTLFSPFTMLLSMQPPFPLSTHTLITFTFENVOYTL
PVLNPLAQFVYSTIFAGTLLTALSSWFFVWGLMMMLAFIPLVKKMMSPSTAAAL
KYFLTQATSMILIMAILFNNMISGQWTFNTNTQYSSIMMMAMKLGMAPHFVWPE
VYQTFITSGLLLTWQKLAPISIMYQISFVSJVSLLTSLISINAGSWGLNQTLQK
FLAYSSITHMGWMAVLPYNNMTILNFIYLLITTTAPLLANASFTLLSLKRWKLI
TWLPLIPSTLSLGLPPLGFLPKWALIEPTKNSLIPTINATITLNLVYFLRLI
YSTSLTLLPMNNVRSQGFHTKPTFFPLTLLTLLPLSPFMILIX

FIGURE 1

【図 2】

nt386
381 ACAAGAACC CTAACACGAG CTAACACGAG TTTCAAATT
T K N P N T S L T . F Q I フレーム 1
Q . T L T P A . P D F K F フレーム 2
N K E P . H Q P N Q I S N F フレーム 3
401 TATCTTTTGG CGGTATGCAC TTTTAAACAT CACCCCCCAA
L S F G G M H F . Q S P P N フレーム 1
Y L L A V C T F N S H P P フレーム 2
I F M R Y A L L T V T P Q フレーム 3
441 CTAACACATT ATTITCCCTT CCACTCCCA TACTACTAAT
H I I F P S H S H T T N フレーム 1
T N T L F S P P T P M L L I フレーム 2
L T H Y F P L P L P Y Y . フレーム 3
481 CTCATCAATA CAACCCCGC CCACTCCTAC CAGCACACAC
L I N T T P A H F T Q H T フレーム 1
S S M Q P P P I L P S T H フレーム 2
S H Q Y N P R P S Y P A H T フレーム 3
521 ACACCGCTGC TAACCCGATA CCGCGAAAT GTTGGTATA
H T A A N P M P R K C U L Y フレーム 1
T P L L T P Y P E N V G Y フレーム 2
H R C . P H T P K M L V M フレーム 3

【図 3】

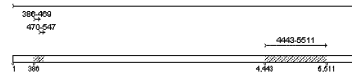
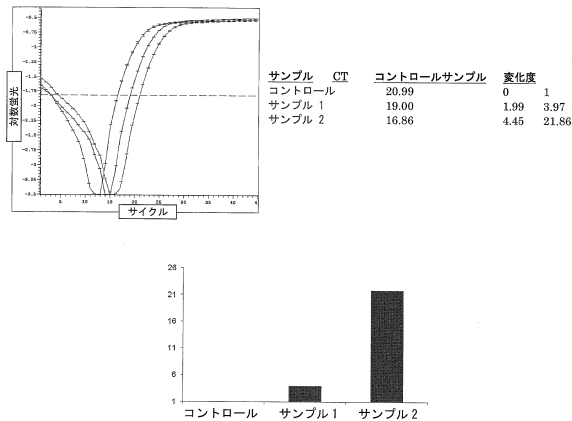


FIGURE 3

【図 5 B】

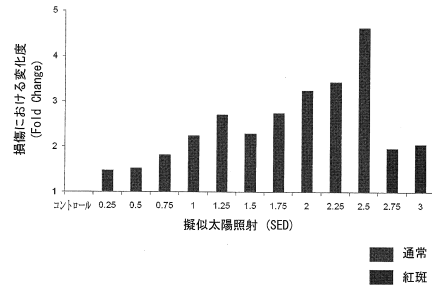


【図 4】

MLLISSMQPPPLPSTHTPLLTYPENGVYTLVPLINPLAQFVYSTIFAGTLLTALSSH
WFTTWVGLMMMLAFIPLVTKMMNPRSTAAIKYFLTQATSMILIMAILFNNMISGQWT
MTWTTNQYSSIMMMAMKLGMAPHFVWPEVTQGTPLTSGLLLTQWKLAPISIMYQI
SPSLNLSGLLLTSLISIMAGSWGGLNQTLQKILAYSSITHMGWMAVLPYNNMTILNLI
TYIILITTTAPLLANASFTLLSLKRWKLI
IIEEFTKNSLIPTINATITLNLVYFLRLIYSTSLTLLPMNNVRSQGFHTKPTFF
LPTLIALTLLPLSPFMILIX

X は部分アミノ酸を示す

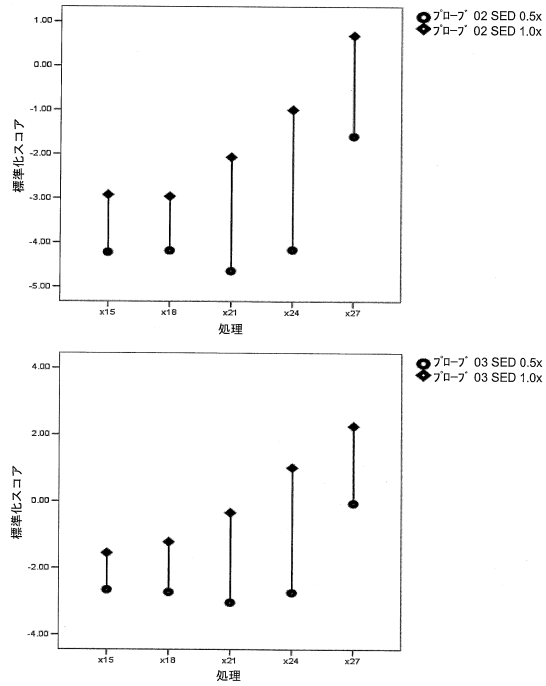
【図 5 A】



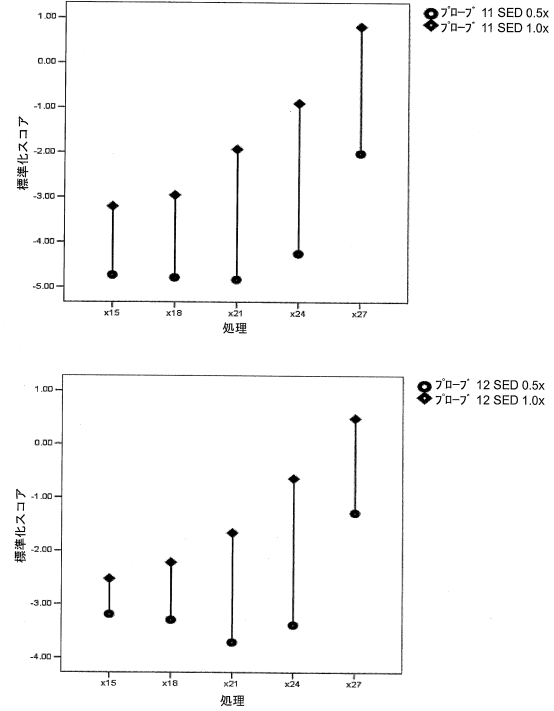
【図 6】

照射によるブローブベアサンプル			
ブローブ 11 および 20 における有意な相関性			
平均値の有意差			
すべてのブローブにおける差			
ベアサンプルの統計			
ベア	ブローブ	平均	N
1	ブローブ 02 SED 0.5x	-3.7644	5
1	ブローブ 02 SED 1.0x	-1.6561	5
2	ブローブ 03 SED 0.5x	-2.2467	5
2	ブローブ 03 SED 1.0x	-0.277	5
3	ブローブ 11 SED 0.5x	-4.1290	5
3	ブローブ 11 SED 1.0x	-1.6432	5
4	ブローブ 12 SED 0.5x	-2.9769	5
4	ブローブ 12 SED 1.0x	-1.3159	5
5	ブローブ 20 SED 0.5x	-2.5718	5
5	ブローブ 20 SED 1.0x	-1.1857	5
6	ブローブ 32 SED 0.5x	-5.7997	5
6	ブローブ 32 SED 1.0x	-3.9153	5
ベアサンプルの相関性			
ベア	ブローブ	相関性	Sig.
1	ブローブ 02 SED 0.5x & 02 SED 1.0x	.838	.076
2	ブローブ 03 SED 0.5x & 03 SED 1.0x	.758	.138
3	ブローブ 11 SED 0.5x & 11 SED 1.0x	.898	.038
4	ブローブ 12 SED 0.5x & 12 SED 1.0x	.750	.144
5	ブローブ 20 SED 0.5x & 20 SED 1.0x	.911	.032
6	ブローブ 32 SED 0.5x & 32 SED 1.0x	.785	.116
対応のあるサンプル検定			
ベア差			
ベア	ブローブ	平均	標準偏差
1	ブローブ 02 SED 0.5x	-2.10828	.83770
1	ブローブ 02 SED 1.0x	-3.7483	-3.14840
2	ブローブ 03 SED 0.5x	-2.27441	1.03860
2	ブローブ 03 SED 1.0x	-0.4648	-3.56401
3	ブローブ 11 SED 0.5x	-2.48083	.77057
3	ブローブ 11 SED 1.0x	-4.12903	-3.44282
4	ブローブ 12 SED 0.5x	-1.66103	.81633
4	ブローブ 12 SED 1.0x	-2.97694	-2.67484
5	ブローブ 20 SED 0.5x	-2.38318	.66727
5	ブローブ 20 SED 1.0x	-1.18571	-3.21170
6	ブローブ 32 SED 0.5x	-1.88441	1.28225
6	ブローブ 32 SED 1.0x	-5.7791	-3.48886
差の 95%信頼区間			
ベア	ブローブ	下側	上側
1	ブローブ 02 SED 0.5x	-5.628	-1.06812
1	ブローブ 02 SED 1.0x	-4.897	-2.618
2	ブローブ 03 SED 0.5x	-7.214	-1.52005
2	ブローブ 03 SED 1.0x	-4.500	-0.440
3	ブローブ 11 SED 0.5x	-7.985	-1.55465
3	ブローブ 11 SED 1.0x	-3.261	-0.989
4	ブローブ 12 SED 0.5x	-4.500	-0.440
4	ブローブ 12 SED 1.0x	-3.261	-0.989
5	ブローブ 20 SED 0.5x	-3.261	-0.989
5	ブローブ 20 SED 1.0x	-3.261	-0.989
6	ブローブ 32 SED 0.5x	-3.261	-0.989
6	ブローブ 32 SED 1.0x	-3.261	-0.989

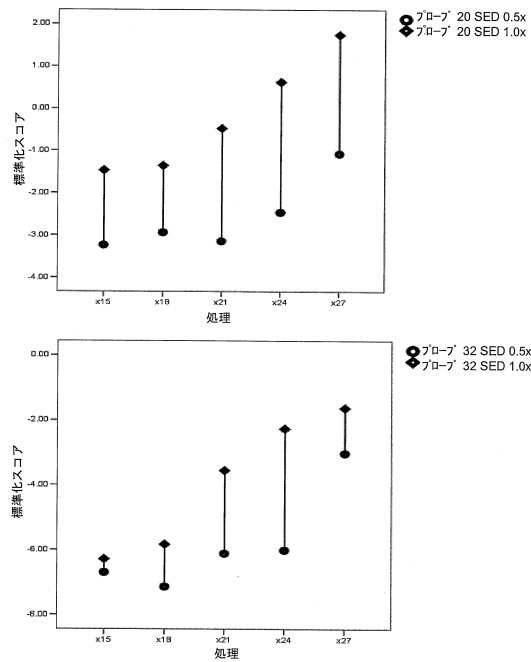
【図 7】



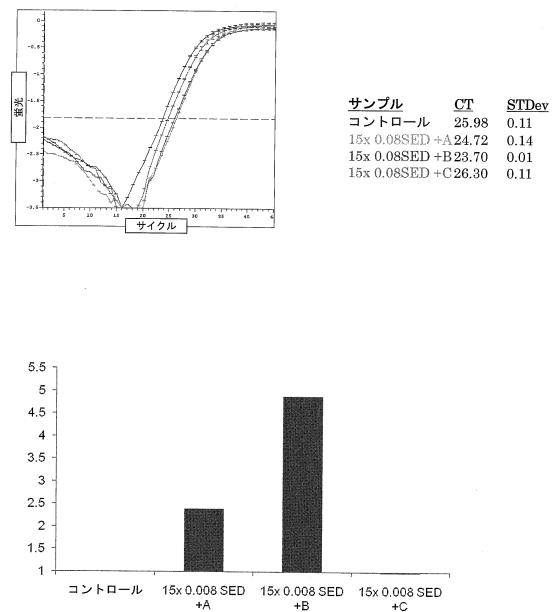
【図 8】



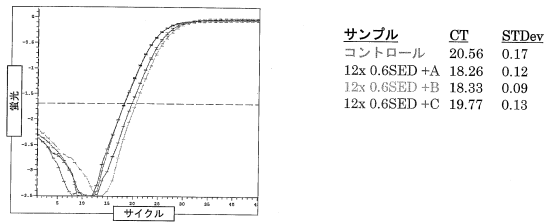
【図 9】



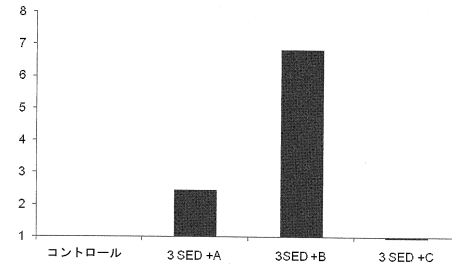
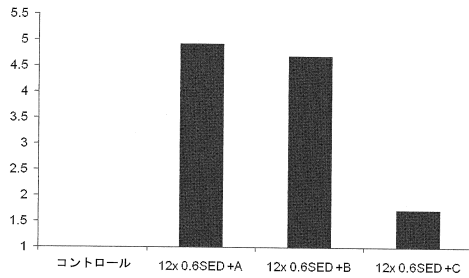
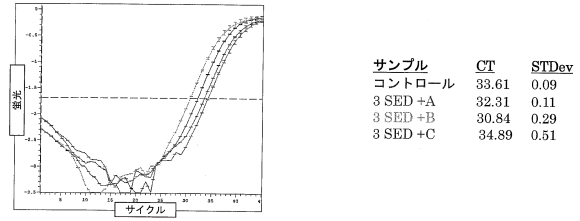
【図 10】



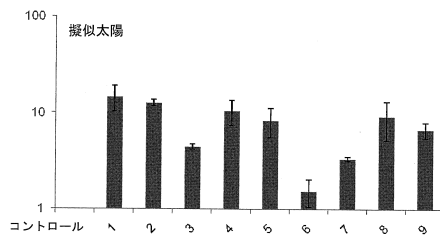
【図 1 1】



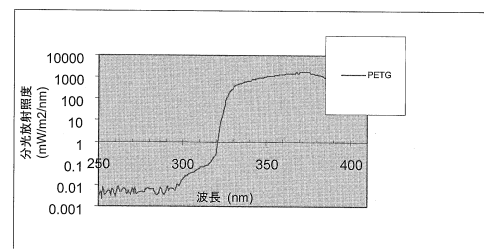
【図 1 2】



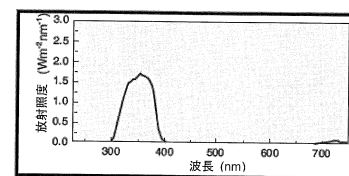
【図 1 3】



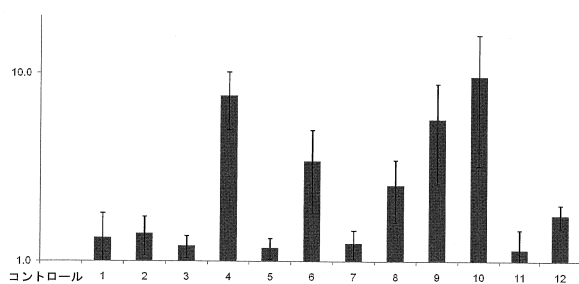
【図 1 5】



【図 1 6】



【図 1 4】



【配列表】

0006008743000001.app

 フロントページの続き

- (72)発明者 ハーボトル, アンドリュー
イギリス, エヌイー1 3ディーダブリュー, タイン アンド ウィアー, ニューカッスル アポ
ン タイン, ラブ レーン 19
- (72)発明者 ダクボ, ガブリエル
カナダ, ピー7ジェイ 1エイチ7, オンタリオ, サンダー ベイ, ブランナン レーン 101
6
- (72)発明者 パー, ライアン エル.
カナダ, ピー7ジー 1ジェイ4, オンタリオ, サンダー ベイ, ハトン パーク ドライブ 1
282
- (72)発明者 クリード, ジェニファー
アメリカ合衆国, 80023 コロラド, ブルームフィールド, ジェミニ ループ 2950
- (72)発明者 レギュリ, ブライアン
カナダ, ヴィー5ゼッド 1アール3, プリティッシュ コロンビア, バンクーバー, ウエスト
フォーティーンズ アヴェニュー 937, アpartment 403
- (72)発明者 ロビンソン, ケリー
カナダ, ピー7エー 3エス9, オンタリオ, サンダー ベイ, エルギン ストリート 215

審査官 森井 文緒

- (56)参考文献 国際公開第2009/046535 (WO, A1)
国際公開第2006/111029 (WO, A1)
国際公開第2009/117811 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90
PubMed
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
WPIDS/WPIX(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq