

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5940635号
(P5940635)

(45) 発行日 平成28年6月29日(2016.6.29)

(24) 登録日 平成28年5月27日(2016.5.27)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00

Z N A F

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68

A

請求項の数 12 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2014-235662 (P2014-235662)
 (22) 出願日 平成26年11月20日(2014.11.20)
 (65) 公開番号 特開2015-159809 (P2015-159809A)
 (43) 公開日 平成27年9月7日(2015.9.7)
 審査請求日 平成26年11月20日(2014.11.20)
 (31) 優先権主張番号 10-2014-0022322
 (32) 優先日 平成26年2月26日(2014.2.26)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(73) 特許権者 304039548
 コリア・インスティテュート・オブ・サイ
 エンス・アンド・テクノロジー
 大韓民国, ソウル 136-791, ソン
 ブックーク, ファランノ 14-ギル 5
 (74) 代理人 100102842
 弁理士 葛和 清司
 (72) 発明者 リュ, ジェーチョン
 大韓民国 110-877 ソウル, チョ
 ンローグ トンギルロー 18-ギル 9
 インワンサン アイパーク, 107-2
 03
 (72) 発明者 チェ, ハンセム
 大韓民国 136-791 ソウル, ソン
 ブックーク ファランノ 14-ギル 5
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 低級脂肪族飽和アルデヒド類特異的メチル化マーカー遺伝子およびそれを用いた低級脂肪族飽和アルデヒド類の曝露の有無を確認する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

低級脂肪族飽和アルデヒドによってメチル化されたDNAとハイブリダイズする、下記の遺伝子のプロモーター部位またはその相補鎖の分子がすべて集積された、低級脂肪族飽和アルデヒド類(Lower aliphatic saturated aldehydes)に対する曝露の有無の確認用マイクロアレイチップ:

遺伝子登録番号(Genebank)NM_199121(VWA1、von Willebrand factor A domain containing 1)のもとでの配列番号1の塩基配列からなるプロモーター部位; および遺伝子登録番号NM_194298(SLC16A9、solute carrier family16、member9(monocarboxylic acid transporter9))のもとでの配列番号2の塩基配列からなるプロモーター部位。

10

【請求項 2】

前記低級脂肪族飽和アルデヒド類が、プロパナール、ブタナール、ペントナール、ヘキサナール、ヘプタナール、オクタナールおよびノナナールからなる群から選択されるいずれか1つ以上であることを特徴とする、請求項1に記載の低級脂肪族飽和アルデヒド類に対する曝露の有無の確認用マイクロアレイチップ。

【請求項 3】

前記マイクロアレイチップが、DNAのメチル化レベルを測定することを特徴とする、請求項1に記載の低級脂肪族飽和アルデヒド類に対する曝露の有無の確認用マイクロアレイチップ。

【請求項 4】

20

1) 低級脂肪族飽和アルデヒド類に対する曝露が疑われる曝露群と非曝露群の体細胞からDNAを分離する工程；
2) 工程1)の曝露群および対照群のDNAを各々異なる蛍光物質で標識する工程；
3) 工程2)の各々異なる蛍光物質で標識されたDNAを、請求項1のマイクロアレイチップとハイブリダイズさせる工程；
4) 工程3)のハイブリダイズしたDNAのメチル化マイクロアレイチップを分析する工程；および
5) 工程4)の分析したデータから、請求項1のマイクロアレイチップに集積された遺伝子のメチル化の変化の程度を対照群と比較して確認する工程を含む、低級脂肪族飽和アルデヒド類に対する曝露の有無を確認する方法。

10

【請求項5】

前記工程1の体細胞が、ヒトの肺癌細胞またはヒト肺癌細胞由来の細胞であることを特徴とする、請求項4に記載の低級脂肪族飽和アルデヒド類に対する曝露の有無を確認する方法。

【請求項6】

前記ヒトの肺癌細胞が、A549であることを特徴とする、請求項5に記載の低級脂肪族飽和アルデヒド類に対する曝露の有無を確認する方法。

【請求項7】

前記工程3の蛍光物質が、Cy3、Cy5、FITC(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate)、RITC(rhodamine-B-isothiocyanate)およびローダミンからなる群から選択して用いることを特徴とする、請求項4に記載の低級脂肪族飽和アルデヒド類に対する曝露の有無を確認する方法。

20

【請求項8】

前記低級脂肪族飽和アルデヒド類が、プロパナール、ブタナール、ペントナール、ヘキサナール、ヘプタナール、オクタナールおよびノナナールからなる群から選択されるいずれか1つ以上であることを特徴とする、請求項4に記載の低級脂肪族飽和アルデヒド類に対する曝露の有無を確認する方法。

【請求項9】

請求項1に記載のDNAマイクロアレイチップを含む、低級脂肪族飽和アルデヒド類の曝露の有無の確認用キット。

30

【請求項10】

ヒトの体細胞をさらに含むことを特徴とする、請求項9に記載の低級脂肪族飽和アルデヒド類の曝露の有無の確認用キット。

【請求項11】

前記ヒトの体細胞が、A549であることを特徴とする、請求項9に記載の低級脂肪族飽和アルデヒド類に対する曝露の有無の確認用キット。

【請求項12】

前記低級脂肪族飽和アルデヒド類が、プロパナール、ブタナール、ペントナール、ヘキサナール、ヘプタナール、オクタナールおよびノナナールからなる群から選択されるいずれか1つ以上であることを特徴とする、請求項10に記載の低級脂肪族飽和アルデヒド類に対する曝露の有無の確認用キット。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、低級脂肪族飽和アルデヒド類(Lower aliphatic saturated aldehydes)の曝露に特異的なメチル化バイオマーカーおよびそれを用いた低級脂肪族飽和アルデヒド類に対する曝露の有無を確認する方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

生体遺伝子の蛋白質コード配列に変異がなくても、前記遺伝子の機能が損失して主要な

50

メカニズムが妨害を受けるようになる。DNAメチル化は、このような現象の1つであり、特定遺伝子のプロモーター部位が過メチル化されると、前記の遺伝子の発現が抑制され、逆に低メチル化されると、遺伝子の発現が増加する。DNAのメチル化は、原核生物では、外部遺伝子の侵入から保護する役割をし、真核生物では、発達過程で遺伝子の発現を調節してくれる重要な役割を果たしていることが知られている。最近の研究では、DNAのメチル化が、その他にもゲノムインプリンティングおよび安定化やX染色体の不活性化などにも関与し、組織特異的遺伝子の活性、疾病に関連した遺伝子発現の増加または抑制にも影響を与えることが明らかになっている。メチル化のメカニズムは、癌の発病、細胞の老化、臓器の成長などに大きな影響を与えており、これにより、メチル化に関連する研究は、癌の発生、老化などの生命現象との因果関係解明に極めて重要な役割をするだけでなく、今後、発生および分化や幹細胞を用いた細胞治療剤の開発などの研究にも適用させることができる韓国のバイオ研究の核心分野として定着することが予想される。したがって、メチル化マーカーの発掘は、癌を含む疾病の早期診断の可能性を予測するのに大きな助けとなるとともに意義がある。

10

【0003】

最近の急速な技術開発によって、ゲノム全体にわたるメチル化分析が試みられており、それを通じて、今まで知られていない新しいものを含め、全般的なメチル化の機能についての研究が可能になると考えられている。特に高分解能のマイクロアレイと超高速次世代塩基配列分析などの技術は、より多くの疾病においてメチル化全般にわたった研究を可能にし、疾病誘発過程に対する新たな知識を提供し、これを通じた新たな診断マーカーおよび治療ターゲット発掘を可能にするものである。

20

【0004】

そのみならず、メチル化マーカーは、特定の環境有害物質の曝露予測にも有用に用いることができると考えられている。今までは、主に環境有害物質の曝露による遺伝子(mRNA)の変化様相とそれに伴う疾病との関連性に関する研究が進行されたが、最近、DNAメチル化との関連性への関心が高まるにつれて、いくつかの研究において、ベンゼン、ヒ素またはRDX(cyclonite)などの有害物質の曝露によるメチル化の変化を観察し、特異的な変化を示すメチル化遺伝子を有害物質に対するマーカーとして提示した(非特許文献1を参照)。また、発掘されたメチル化遺伝子は、曝露を予測するためのマーカーとしてだけでなく、環境有害物質による毒性機序予測のためのマーカーとして有用に用いることができる。このようにメチル化マーカーの環境有害物質の曝露および毒性機序の予測における役割が非常に重要であるにもかかわらず、現在、DNAメチル化に関連する研究は、主に疾病診断用マーカーの発掘に限定されており、様々な環境中に曝露する可能性が大きな低級脂肪族飽和アルデヒド類のような有害物質の曝露による遺伝子のメチル化の変化に関する研究は不足している。また、後天的な遺伝学的変化は、遺伝子の発現のような遺伝的变化の多様性に比べて、その程度が大きくないために多数のマーカーが必要な遺伝子発現プロファイリングに比べて、ただ1つのDNAメチル化やマイクロRNAのような後天的ゲノムマーカーでも疾病や有害物質の曝露を早期に診断することができるという利点だけでなく、非侵襲的な方法で診断することができるという利点がある。

30

【0005】

アルデヒドは、炭化水素をはじめとする他の有機物の不完全燃焼によって生成される。また、アルデヒドは、窒素酸化物といくつかの炭化水素の光化学的な反応によっても生成され、これは、大気中の汚染物質によってもアルデヒドが生成されることを意味する。大気中に広がったアルデヒドは、自発的に光化学的な反応を通じてオゾン、過酸化物のような酸化剤と一酸化炭素を大気中で生成することができる。

40

【0006】

室内でのアルデヒド類の主な生成原因は、家具、カーペット、樹脂合板、織物、塗装塗料などから発生することが知られており、食べ物の調理時に発生する煙にも様々な種類のアルデヒドが含まれているといわれている。また、喫煙の過程で発生する煙には、様々なアルデヒド類が含まれており、これは主要な室内アルデヒド類の生成原因となる(非特許

50

文献 2)。

【 0 0 0 7 】

アルデヒド類の中でも低級脂肪族飽和アルデヒド類は、炭素鎖が 0 ~ 9 個の炭素であり、各物質ごとに刺激臭を有する気体または液体で、水に溶ける。これらの中で、炭素鎖の長さが 6 ~ 9 個のアルデヒドは主に香料として使用されており、食品添加物、香水産業などに活用されている。低級脂肪族飽和アルデヒド類の室内外濃度は、ホルムアルデヒド(Formaldehyde)、アセトアルデヒド(Acetaldehyde)を除いたプロパナル(Propanal)、ブタナル(Butanal)、ペンタナル(Pentanal)、ヘキサナル(Hexanal)、ヘプタナル(Heptanal)、オクタナル(Octanal)、ノナナル(Nonanal)などのアルデヒドの濃度の場合、単一の規制対象あるいは危険物質に分類されていない地域が多く、調査されたところは珍しい。いくつかの調査によると、これらの低級脂肪族飽和アルデヒド類の曝露水準は一定ではなく、室内環境の場合は、建物の状態、環境条件に応じて差が非常に大きかった。ホルムアルデヒドとアセトアルデヒドを除く他の低級脂肪族飽和アルデヒドの単一物質規制の現状としては、世界的に日本と韓国だけが施行しており、単一物質としてはプロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド、バレルアルデヒドの 3 種の物質だけが規制されている。

10

【 0 0 0 8 】

低濃度の低級脂肪族飽和アルデヒドに曝露した場合、眼球刺激や呼吸器の刺激症状を示す。高濃度の低級脂肪族飽和アルデヒドを吸入した場合には、呼吸器刺激による焼けるような感じ、吐き気、めまい、咳、痰、喉頭炎、頭痛、呼吸数の増加、息苦しさなどを感じることがあり、長期的に吸入する環境に曝露した場合、痙攣、発作、気管支炎、肺炎、喉頭浮腫等を起こし得る (<http://toxnet.nlm.nih.gov>)。

20

【 0 0 0 9 】

血流に乗って流れる揮発性有機化合物は、肺胞膜の拡散現象によって肺に影響を与え、ヘキサン、メチルペンタン、イソプロペン(isopropene)、ベンゼンなどは、疾病のマーカーとして使用されており(非特許文献 3)、最近、呼気テスト(exhaled breath analysis)を通じて捕集された物質の揮発性有機化合物類の分析結果から、簡単な肺癌診断法が開発され利用されている。揮発性有機化合物類の中でアルデヒド類は、肺癌患者らに表われる代表的な物質として報告されている(非特許文献 4)。したがって、低級脂肪族飽和アルデヒド類に特異的なバイオマーカーの発掘は、肺疾病および低級脂肪族飽和アルデヒド類の環境中曝露をスクリーニングするのに活用することができる。

30

【 0 0 1 0 】

低級脂肪族飽和アルデヒド類に対する毒性研究は、他の環境汚染物質に比べて研究が非常に貧弱であるのが実情である。低級脂肪族飽和アルデヒド類は、毒性を引き起こす作用機序が明確でないだけでなく、用量反応関係もよく知られていないので体系的な危害性評価の確立のために、より多様な実験モデルと条件を用いたきめ細かな研究が必要とされており、低級脂肪族飽和アルデヒド類の毒性を評価することができる敏感な生体指標の発掘も急務となっている。

【 0 0 1 1 】

新たな有害物質の危害性に関する研究は、指標物質や環境媒質に蓄積された有害物質の濃度測定が中心となってきた。しかし、数千から数万種類を超える有害化学物質をすべて分析することはできず、新種の汚染物質の存在は、生物の危害性の有無を診断する過程を優先的に経てこそ、国家的次元の対応と管理が行われ得る。また、体内の濃度測定などの限られた結果だけでは、生物に及ぼす毒性影響を知ることができない。これらの理由から、有害物質の正確な毒性作用機序の確立とともに、低級脂肪族飽和アルデヒド類の曝露に最も先に反応する分子生物学的レベルの体系的な指標の開発研究が必要である。したがって、より速く、より簡単なスクリーニング方法、例えば、マイクロアレイチップまたはプライマーを用いるリアルタイム PCR などによって、迅速な危害性評価を通じて人体での毒性作用、特に癌をはじめとする多様な疾病誘発に関与するメチル化の有無などを探索することができる分子的指標を発掘し活用して、低級脂肪族飽和アルデヒド類の曝露に対する適切な対策と管理を実行することが重要な課題といえる。

40

50

【 0 0 1 2 】

DNAチップ技術の発達により、最近の研究は、癌やその他の疾病または特定の刺激によるDNAメチル化様相変化の特徴を分析する方向で行われている。これらの分析方法は、メチル化された配列とそうでない配列の差異を用いて、制限酵素を用いる方法（HELP）と抗5-メチルシトシン抗体を用いた免疫沈降方法（MIRA、MeDIP）と亜硫酸水素ナトリウム(sodium bisulfite)を用いた配列分析方法などの多様な方法が最近になって開発されて用いられている。これらのうち、一回の実験で何千個もの遺伝子のメチル化の様相を確認し、それらの機能を研究するためのゲノムワイドエクスペリメンテーション研究、すなわち、マイクロアレイ分析が主に行われている。

【 0 0 1 3 】

マイクロアレイは、cDNA(complementary DNA)や20-25塩基対長のオリゴヌクレオチドのセットをガラスに集積化したものである。cDNAマイクロアレイは、学校内の研究室やAgilent、Genomic Solutionsなどの会社で、チップ上にcDNA収集物を機械的に固定化したり、インクジェット方法を用いて生産している（非特許文献5）。オリゴヌクレオチドマイクロアレイは、Affymetrix社の写真エッチング工程を用いて、チップ上で直接合成する方法によって作られており、Agilent社などでは合成されたオリゴヌクレオチドを固定化する方法で生産している（非特許文献5）。

【 0 0 1 4 】

遺伝子のメチル化分析のためには、組織などの試料からメチル化されたDNAだけを得てマイクロアレイのオリゴヌクレオチドと交雑反応を行う。得られたDNAは、蛍光または同位体で標識化する。

【 0 0 1 5 】

最近のDNAマイクロアレイ技術を用いた先端的な技法である毒性ゲノム学の研究などと組み合わせ、大量に医薬品や新薬候補物質はもちろん、代表的な環境汚染物質をはじめ、すべての化学物質による特定組織や細胞株でのDNAメチル化変化パターンの分析、定量的な分析が可能となった。これにより、特定の細胞内で特定の遺伝子のメチル化の様相を分析することにより、薬物の副作用および環境汚染物質の有害作用と関連する遺伝子の発掘が可能で、これにより、環境汚染物質の有害作用と薬物の作用および副作用による分子メカニズムを理解できるようになり、さらに毒性および副作用を誘発する物質の検索および確認が可能になるだろう。

【 0 0 1 6 】

そこで、本発明者らは、ヒトの遺伝子のプロモーター部位41万余りが集積されたオリゴマイクロアレイを用い、低級脂肪族飽和アルデヒド類のDNAメチル化プロファイルを用いて、特異的に変化するメチル化DNAを発掘し、前記メチル化DNAを、低級脂肪族飽和アルデヒド類の曝露時のメチル化の変化の有無を検出することができるバイオマーカーとして用いて、低級脂肪族飽和アルデヒドの曝露の有無を確認する方法を確立して、本発明を完成した。

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 1 7 】

【 非特許文献 1 】 Baccarelli, A. & Bollati, V. Curr. Opin. Pediatr., 2009年, 第21巻, p. 243-251

【 非特許文献 2 】 Crit Rev Toxicol, 2005年, 第35(7)巻, p. 609-662

【 非特許文献 3 】 J Vet Sci. 2004年, 第5(1)巻, p. 11-18

【 非特許文献 4 】 J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2010年, 第878(27)巻, p. 2643-2651

【 非特許文献 5 】 Sellheyer K. ら, J. Am. Acad. Dermatol. 2004年, 第51巻, p. 681-692

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 8 】

本発明の目的は、低級脂肪族飽和アルデヒド類の曝露によって一般的にメチル化の程度が変化する遺伝子及び前記遺伝子をバイオマーカーとして用いて、低級脂肪族飽和アルデヒド類に対する曝露の有無を確認する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0019】

前記目的を達成するために、本発明は、
下記の群から選択される遺伝子のプロモーター部位またはその相補鎖の分子が1つ以上集積された、低級脂肪族飽和アルデヒド類に対する曝露の有無の確認用マイクロアレイチップ：

遺伝子登録番号(Genebank)NM_199121(VWA1、von Willebrand factor A domain containing 1);および

遺伝子登録番号NM_194298(SLC16A9、solute carrier family16、member9(monocarboxylic acid transporter9))

を提供する。

【0020】

また、本発明は、

1) 低級脂肪族飽和アルデヒド類に対する曝露が疑われる曝露群と非曝露群の体細胞からDNAを分離する工程；

2) 工程1)の曝露群と対照群のDNAを各々異なる蛍光物質で標識する工程；

3) 工程2)の各々異なる蛍光物質で標識されたDNAを本発明のマイクロアレイチップとハイブリダイズさせる工程；

4) 工程3)のハイブリダイズしたDNAのメチル化マイクロアレイチップを分析する工程；および

5) 工程4)の分析したデータから、本発明のマイクロアレイチップに集積された遺伝子のメチル化の変化程度を対照群と比較して確認する工程を含む、低級脂肪族飽和アルデヒド類に対する曝露の有無を確認する方法

を提供する。

【0021】

さらに、本発明は、前記DNAマイクロアレイチップを含む低級脂肪族飽和アルデヒド類の曝露の有無の確認用キットを提供する。

【発明の効果】

【0022】

本発明の低級脂肪族飽和アルデヒド類の曝露に共通してメチル化されるバイオマーカーおよびそれを用いた低級脂肪族飽和アルデヒド類の曝露の有無を確認する方法は、低級脂肪族飽和アルデヒド類の曝露を早期にモニタリングし、判定が可能であり、通常の方法に比べて正確に曝露をモニタリングすることができ、低級脂肪族飽和アルデヒド類によって惹起される毒性作用機序を解明するためのツールとして有用に用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】低級脂肪族飽和アルデヒド類のヒトの肺癌細胞株での細胞毒性を調べたグラフである；プロパナール、ブタナール、ペンタナール、ヘキサナール、ヘプタナール、オクタナールおよびノナールのヒトの肺癌細胞株に対する細胞毒性を示す。

【図2】DNAのメチル化マイクロアレイチップを用いた低級脂肪族飽和アルデヒド類に曝露した試料からのDNAメチル化変化の様相を分析した結果を示す図である。

【図3】低級脂肪族飽和アルデヒド類の曝露によって共通して4.0倍以上もしくは以下にメチル化様相が変化する2種の遺伝子プロンプのメチル化変化様相を分析した結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0024】

以下、本発明を詳細に説明する。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 5 】

本発明は、低級脂肪族飽和アルデヒド類の曝露によって特異的にDNAメチル化の程度が変化を起こす低級脂肪族飽和アルデヒド類に特異的な曝露の有無を確認するためDNAメチル化バイオマーカーを提供する。

【 0 0 2 6 】

前記の遺伝子は、下記の群から選択されることが好ましい：

遺伝子登録番号(Genebank)NM_199121(VWA1、von Willebrand factor A domain containing 1);および

遺伝子登録番号NM_194298(SLC16A9、solute carrier family16、member9(monocarboxylic acid transporter9))。

10

【 0 0 2 7 】

前記の遺伝子登録番号NM_199121のプロモーター部位は、配列番号1で表される塩基配列で記載されている塩基配列を有することが好ましく、前記の遺伝子登録番号NM_194298のプロモーター部位は、配列番号2で表される塩基配列を有することが好ましいが、これに限定されない。

【 0 0 2 8 】

前記の低級脂肪族飽和アルデヒド類は、アルデヒドの中でも、炭素鎖が0～9個の炭素を含むことが好ましく、具体的にはホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド(propionaldehyde)、ブチルアルデヒド(buthylaldehyde)、バレールアルデヒド(Valeraldehyde)、プロパナール、ブタナール、ペンタナール、ヘキサナール、ヘプタナール、オクタナールおよびノナナールのような当業界で一般的に知られている低級脂肪族飽和アルデヒド類であることがより好ましく、より具体的には、プロパナール、ブタナール、ペンタナール、ヘキサナール、ヘプタナール、オクタナールおよびノナナールからなる群から選択されるいずれか1つ以上であることを特徴とすることが好ましいが、これに限定されない。

20

【 0 0 2 9 】

本発明の具体的な実施形態において、本発明者らは低級脂肪族飽和アルデヒド類の曝露に対するDNAメチル化の有無の確認用バイオマーカーを発掘するために、低級脂肪族飽和アルデヒド類をヒトの肺癌細胞であるA549細胞株に処理して細胞毒性を確認した。その結果、前記の低級脂肪族飽和アルデヒド類は、ヒトの肺癌細胞株に毒性を有するが確認された(図1参照)、前記の実験では20%の生存率を示す濃度(IC₂₀)はそれぞれプロパナール2.5mM、ブタナール3.5mM、ペンタナール1.7mM、ヘキサナール0.5mM、ヘプタナール0.6mM、オクタナール0.58mM、ノナナール0.7mMであり、前記のように低級脂肪族飽和アルデヒド類の曝露濃度を決定した。以後、前記決定された濃度で低級脂肪族飽和アルデヒド類をヒトの肺癌細胞株に処理し、前記物質を処理した細胞株でメチル化DNAだけを特異的に分離して総ゲノム増幅(whole genome amplification)をしながら、蛍光物質(Cy5)で標識し、投入されたDNAの場合はCy3で標識した。前記蛍光標識されたDNAをAgilent SurePrint G3 Human Promoter 2x400K microarray(Agilent、米国)とハイブリダイズし、蛍光イメージをスキャンして、DNAのメチル化様相の差異を分析した(図2参照)。分析時に低級脂肪族飽和アルデヒド類を処理していない対照群に比べて低級脂肪族飽和アルデヒド類を処理した曝露群で共通して有意にメチル化変化を示したDNAに対して、メチル化の変化が4.0倍以上増加もしくは減少したプロモーター部位を有する遺伝子が2種であった(表2及び図3を参照)。前記の遺伝子は、低級脂肪族飽和アルデヒド類を処理した時、ヒトの肺癌細胞で毒性と関連があるという報告はない。

30

40

【 0 0 3 0 】

したがって、本発明の低級脂肪族飽和アルデヒド類に特異的なメチル化バイオマーカーは、低級脂肪族飽和アルデヒド類の曝露を早期にモニタリングおよび判定が可能であり、通常の方法に比べて正確に曝露をモニタリングすることができるので有用であり、低級脂肪族飽和アルデヒド類によって惹起される毒性作用機序を解明するためのツールとして用

50

いることができる。

【0031】

また、本発明は、
下記の群から選択される遺伝子のプロモーター部位またはその相補鎖の分子が1つ以上集積された低級脂肪族飽和アルデヒド類に対する曝露有無確認用マイクロアレイチップ：

遺伝子登録番号NM__199121、遺伝子登録番号NM__194298

を提供する。

【0032】

前記の遺伝子登録番号NM__199121のプロモーター部位は、配列番号1で表される塩基配列で記載されている塩基配列を有することが好ましく、前記の遺伝子登録番号NM__194298のプロモーター部位は、配列番号2で表される塩基配列を有することが好ましいが、これに限定されない。

10

【0033】

前記の低級脂肪族飽和アルデヒド類は、アルデヒドの中でも、炭素鎖が0～9個の炭素を含むことが好ましく、具体的にはホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド、バレルアルデヒド、プロパナール、ブタナール、ペンタナール、ヘキサナール、ヘプタナール、オクタナールおよびノナナールのような当業界で一般的に知られている低級脂肪族飽和アルデヒド類であることがより好ましく、より具体的には、プロパナール、ブタナール、ペンタナール、ヘキサナール、ヘプタナール、オクタナールおよびノナナールからなる群から選択されるいずれか1つ以上であることを特徴とすることが好ましいが、これに限定されない。

20

【0034】

前記マイクロアレイチップは、DNAのメチル化レベルを測定することを特徴とすることが好ましく、前記バイオマーカーは、低級脂肪族飽和アルデヒド類の曝露によって共通するメチル化の変化が4.0倍以上増加もしくは減少したプロモーター部位を有する遺伝子で構成されている。

【0035】

本発明の低級脂肪族飽和アルデヒド類検出のためのDNAのメチル化マイクロアレイチップは、当業者に既知の方法で製作することができる。前記マイクロアレイチップを作製する方法は下記のとおりである。前記探索されたバイオマーカーをプローブDNA分子として用いて、チップの基板上に固定化させるためにインクジェット方式などを用いることが好ましいが、これに限定されるものではなく、本発明の好ましい実施例では、SurePrint inkjet micro droppingマイクロアレイを用いた。前記DNAマイクロアレイチップの基板は、エポキシ、アミノシラン、ポリ-L-リジンおよびアルデヒドからなる群から選択される1つの活性基がコーティングされていることが好ましいが、これに限定されるものではない。また、前記基板は、スライドガラス、プラスチック、金属、シリコン、ナイロン膜、およびニトロセルロース膜からなる群から選択され得るが、これらに限定されるものではなく、本発明の好ましい実施例では、エポキシ樹脂がコーティングされたスライドガラスを用いた。

30

【0036】

また、本発明は、前記バイオマーカーを用いた低級脂肪族飽和アルデヒド類の曝露の有無を確認する方法を提供する。

40

【0037】

本発明は、下記のようなプロセスが含まれている低級脂肪族飽和アルデヒド類の曝露の有無を確認する方法：

- 1) 低級脂肪族飽和アルデヒド類に対する曝露が疑われる曝露群と非曝露群の体細胞からDNAを分離する工程；
- 2) 工程1)の曝露群と対照群のDNAを異なる蛍光物質で標識する工程；
- 3) 工程2)の異なる蛍光物質で標識されたDNAを本発明のマイクロアレイチップとハイブリダイズさせる工程；

50

4) 工程3) のハイブリダイズしたDNAのメチル化マイクロアレイチップを分析する工程; および

5) 工程4) の分析したデータから、本発明のマイクロアレイチップに集積された遺伝子のメチル化変化の程度を対照群と比較して確認する工程を提供する。

【0038】

前記の低級脂肪族飽和アルデヒド類は、アルデヒドの中でも、炭素鎖が0～9個の炭素を含むことが好ましく、具体的にはホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド、バレルアルデヒド、プロパナール、ブタナール、ペンタナール、ヘキサナール、ヘプタナール、オクタナールおよびノナナールのような当業界で一般的に知られている低級脂肪族飽和アルデヒド類であることがより好ましく、より具体的には、プロパナール、ブタナール、ペンタナール、ヘキサナール、ヘプタナール、オクタナールおよびノナナールからなる群から選択されるいずれか1つ以上であることを特徴とすることが好ましいが、これに限定されない。

10

【0039】

前記の工程1) の体細胞は、ヒトの肺癌細胞またはヒト肺癌細胞であるA549細胞株を用いることが好ましいが、これに限定されるものではなく、ヒトの肺細胞またはヒト肺癌細胞および組織に由来する細胞であればすべて使用可能である。

【0040】

前記の工程3) の蛍光物質は、Cy3、Cy5、FITC(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate)、RITC(rhodamine-B-isothiocyanate)とローダミンからなる群から選択されることが好ましいが、これに限定されるのではなく、当業者に知られている蛍光物質はすべて使用可能である。

20

【0041】

前記の工程5) のDNAメチル化マイクロアレイチップは、Agilent SurePrint G3 Human Promoter 2x400K microarray(Agilent、米国)などを用いることが好ましいが、これに限定されるものではなく、ヒトのDNAプロモーター部位のうち、本発明では、前記のメチル化の様相が変化したDNAプロモーター部位(表1および表2を参照)が搭載されたマイクロアレイチップであれば使用可能であり、本発明者が製作したDNAメチル化マイクロアレイチップを用いることが最も好ましい。

30

【0042】

また、工程5) の分析方法は、Genomic WorkbenchとGeneSpring GX12ソフトウェア(Agilent、米国)を用いることが好ましいが、これに限定されるものではなく、当業者に知られている分析ソフトウェアを用いてもよい。

【0043】

また、本発明は、低級脂肪族飽和アルデヒド類の曝露に対するDNAメチル化の変化の有無の確認用キットを提供する。

【0044】

本発明は、本発明で作製したDNAメチル化マイクロアレイチップを含む低級脂肪族飽和アルデヒド類の曝露に対するDNAメチル化の変化の有無の確認用キットを提供する。

40

【0045】

前記の確認用キットに加えて、ヒトの体細胞を含む低級脂肪族飽和アルデヒド類の曝露に対するDNAメチル化の変化の有無の確認用キットを提供する。前記のヒトの体細胞は、ヒトの肺細胞またはヒト肺癌細胞株であるA549を用いることが好ましいが、これに限定されるものではなく、ヒトの肺細胞またはヒト肺癌の細胞および組織に由来する細胞であればすべて使用可能である。

【0046】

前記の低級脂肪族飽和アルデヒド類は、アルデヒドの中でも、炭素鎖が0～9個の炭素を含むことが好ましく、具体的にはホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド、バレルアルデヒド、プロパナール、ブタナール、ペンタナ

50

ール、ヘキサナール、ヘプタナール、オクタナールおよびノナナールのような当業界で一般的に知られている低級脂肪族飽和アルデヒド類であることがより好ましく、より具体的には、プロパナール、ブタナール、ペントナール、ヘキサナール、ヘプタナール、オクタナールおよびノナナールからなる群から選択されるいずれか1つ以上であることを特徴とすることが好ましいが、これに限定されない。

【0047】

前記キットに追加的に、蛍光物質を含むことができ、前記蛍光物質は、ストレプトアビジン-アルカリ脱リン酵素接合物質(streptavidin-like phosphatase conjugate)、化学蛍光物質(chemifluorescence)および化学発光物質(chemiluminescent)からなる群から選択されることが好ましいが、これに限定されるものではなく、本発明の好ましい実施例では、Cy3とCy5を用いた。

10

【0048】

前記キットに追加して反応試薬を含むことができ、前記反応試薬は、ハイブリダイズに用いられる緩衝溶液、蛍光染色剤の化学的誘導剤のような標識試薬、洗浄緩衝溶液などで構成され得るが、これに限定されるものではなく、当業者に知られているDNAのメチル化マイクロアレイチップのハイブリダイズ反応に必要な反応試薬はすべて含ませることができる。

【0049】

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。

【0050】

20

但し、下記の実施例は本発明を例示するものであり、本発明の内容が下記の実施例に限定されるものではない。

【0051】

<実施例1>細胞培養および化学物質処理

<1-1>細胞培養

ヒト肺癌細胞株であるA549細胞(韓国細胞株銀行)を10%FBSが添加されたRPMI培地(Gibro-BRL、米国)を用いて、100mmディッシュで80%程度成長するまで培養した。本発明者らは、従来の研究と報告を通じて環境中に曝露される揮発性有機化合物に属する低級脂肪族飽和アルデヒド類中、プロパナール、ブタナール、ペントナール、ヘキサナール、ヘプタナール、オクタナール、ノナナールを選定し、DMSO(Dimethyl sulfoxide)に溶解させた。媒質の濃度は、すべての実験で、0.1%以下であった。

30

【0052】

<1-2>細胞毒性試験(MTT assay)および化学物質処理

Mossman等(J. Immunol. Methods, 1983年, 第65巻, p.55-63)の方法でA549細胞株を用いたMTT試験を実施した。前記細胞は、24ウェルプレートに 3.5×10^4 /ウェルの細胞数でRPMI培地(Gibro-BRL、米国)でDMSOに溶解した低級脂肪族飽和アルデヒド類を処理し、48時間後にMTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyl)tetrazolium bromide)5mg/mlを混合してプレートに加え、37℃で3時間培養した。その後、培地を除去し、形成されたホルマザン結晶をDMSO 500μlに溶解した。前記溶解物を96ウェルプレートに移して分注して吸光度540nmでOD値を測定した。

40

【0053】

その結果、図1に示すように、A549細胞株で低級脂肪族飽和アルデヒド類の細胞毒性を調べた結果、20%の生存率を示す濃度(IC₂₀)は、それぞれプロパナール2.5mM、ブタナール3.5mM、ペントナール1.7mM、ヘキサナール0.5mM、ヘプタナール0.6mM、オクタナール0.58mM、ノナナール0.7mMであり、前記濃度に決定して下記<実施例2>のマイクロアレイを実施した(図1)。

【0054】

<実施例2>マイクロアレイ実験

<2-1>ゲノム(Genomic)DNAの分離

50

低級脂肪族飽和アルデヒド類曝露群と対照群試料からのDNAの分離は、QIAamp DNA ミニキットを用いて精製した。各全体DNA試料の濃度は、分光光度計のNanoDrop ND1000分光光度計 (NanoDrop Technologies Inc., 米国) を用いて測定し、純度はアガロースゲル電気泳動で確認した。

【0055】

< 2 - 2 > ゲノム (Genomic) DNA の断片化

オリゴマイクロアレイ分析のために、前記実施例< 2 - 1 > で得られた低級脂肪族飽和アルデヒド類試料全体DNAからメチル化DNAのみを特異的に抽出しなければならない。ここで、ゲノムDNAのサイズが200bpから1000bp程度が適当であるので、超音波均質粉碎機 (Sonic Dismembrator) を用いて、20秒「ON」、20秒「OFF」4回を1サイクルとして、3サイクルを行なって、DNAを200bp～1000bpに切断後、DNAの大きさを確認するために、アガロースゲル電気泳動を行った。

【0056】

< 2 - 3 > メチル化DNA免疫沈降法

メチル化DNAのみを特異的に抽出するために免疫沈降法を用いた。Invitrogen社のメチルマイナーメチル化DNA濃縮キット (MethylMiner Methylated DNA Enrichment Kit) を用い、メーカーの指示方法にしたがって実験を行った。

【0057】

具体的には、免疫沈降法は、ビーズ (beads) の原理によって行なわれ、実施例< 2 - 2 > で得られた断片化DNAをビーズと混合して、室温で1時間反応させるか、4℃で一晩中反応させる。反応しない (non-captured) DNAは、洗浄過程を反復して、除去させてNaClでメチル化したDNAを溶出させた後、最終的にフェノールクロロホルムでDNAのみを抽出した。このように抽出されたメチル化DNAを、メチル化特異プライマーを用いてPCRした後、アガロースゲル電気泳動により、最適の状態であることを確認した。

【0058】

< 2 - 4 > 標識されたDNAの製造

総ゲノム増幅キット (Whole genome amplification kit) (SIGMA_WGA2) を用いて、DNAとメチル化DNA 40ngを増幅して用いた。前記増幅したDNAとメチル化DNA 1μgにランダムプライマー5μlを入れて95℃で3分間反応させ、氷で5分間維持してアニーリングさせた。前記のDNA標識をするために、[表1]のようなMaster mixを入れてよく混ぜた後、37℃で2時間反応させた後、酵素を非活性にさせるために65℃で10分間反応させた後、氷に移した。

【0059】

【表1】

DNA標識のためのMaster mixの組成

構成成分	容積 (μl)
5X バッファー	10
10X dNTPs	5
Cy-3またはCy-5 dUTP (1.0mM)	3
Exo-Klenow フラグメント	1

【0060】

< 2 - 5 > ハイブリダイゼーション反応

標識されたDNAとメチル化DNAを精製の過程を経て、2.5～5μg程度用いてAgilent 10x blockingとAgilent 2x hyb bufferを入れてよく混ぜた後、95℃で3分間変性した後、37℃で30分間反応させる。チップに入れて67℃で40時間 (2x formats) オープンでハイブリダイゼーション反応を行った。40時間後に洗浄工程 (Oligo aCGH / ChIP-on-chip1で5分、Oligo aCGH/ChIP-on-chip2で37℃、1分) を経た後、前記チップを3分間800rpmで遠心分離して乾燥した。メチル化DNAマイクロアレイチップに

は、Agilent SurePrint G3 Human Promoter 2x400K microarray (Agilent、米国)を用いた。

【 0 0 6 1 】

< 2 - 6 > 蛍光イメージの獲得

スライド上のハイブリダイゼーションイメージは、Agilent C scanner (Agilent technologies、米国)でスキャンし、抽出されたデータは、Agilent Genomic WorkbenchとGene Spring GX12 (Agilent technologies)を用いてnormalizationを経てそれぞれのDNAのプロモーター部位のメチル化変化の様相を分析した。

【 0 0 6 2 】

前記蛍光標識されたDNAをAgilent SurePrint G3 Human Promoter 2x400K microarray (Agilent、米国)とハイブリダイズし、蛍光イメージをスキャンして、DNAのメチル化様相の違いを分析した(図2)。

【 0 0 6 3 】

その結果、図3および下記の[表2]に示したように、前記オリゴチップ上に存在するおよそ41万余りの遺伝子プロモーター部位を含むプローブの中で、対照群に比べて有意にメチル化変化を示したDNAに対してメチル化変化が4.0倍以上増加もしくは減少したプロモーター部位を有する遺伝子が2種であることを確認し(図3及び表2)、これらの遺伝子は、低級脂肪族飽和アルデヒド類の曝露時に、ヒトの肺癌細胞で毒性と関連があるという報告はなかった。

【 0 0 6 4 】

【表2】

低級脂肪族飽和アルデヒド類処理によって共通してメチル化の程度が変化する遺伝子

登録番号	遺伝子の略称	遺伝子名	中間値の比							メチル化程度
			プロパナール	ブタナール	ペンタナール	ヘキサナール	ヘプタナール	オクタナール	ノナナール	
NM_199121	VWA1	von Willebrand factor A domain containing1	-4.94	-4.82	-4.94	-4.94	-4.94	-4.33	-4.94	低メチル化
NM_194298	SLC16A9	solute carrier family16,member9 (monocarboxylic acid transporter9)	-4.76	-6.37	-5.62	-6.93	-6.30	-6.93	-4.39	低メチル化

【 0 0 6 5 】

さらに、本発明において、前記2種の遺伝子のプロモーター部位を含む領域は、下記の[表3]に、配列番号1、配列番号2で表される配列であることを確認した(表3)。

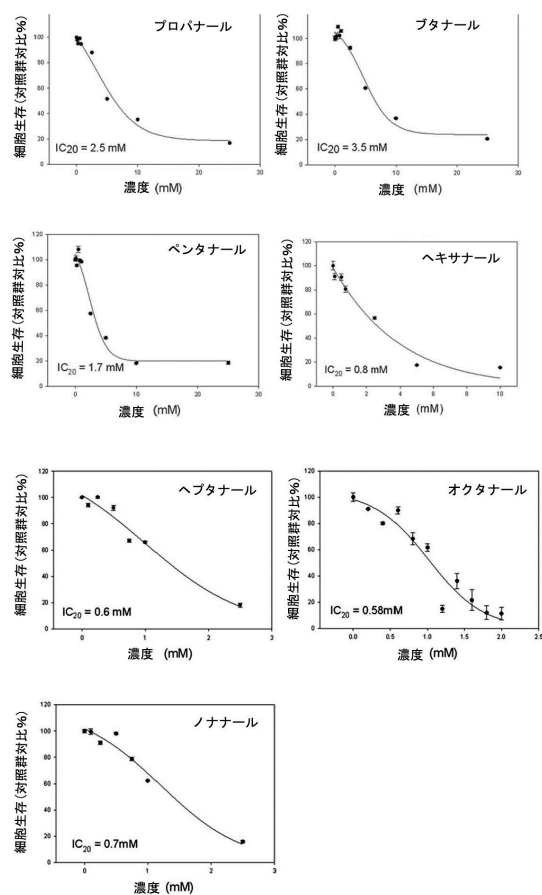
【 0 0 6 6 】

【表 3】

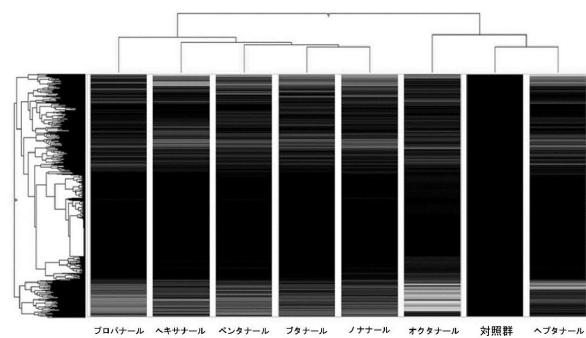
低級脂肪族飽和アルデヒド類の曝露によって共通してメチル化の程度が変化する遺伝子の配列

遺伝子	プローブ配列	配列番号
VWA 1	GAGGCCCTCGAAGTGGTACAGCTTGCACTCTG GGGACCCAAAGT	配列番号 1
SLC16A9	CAGGGAGACCAAGGAACACTCGCATTTCATTTGT ACACCCCGGCTC	配列番号 2

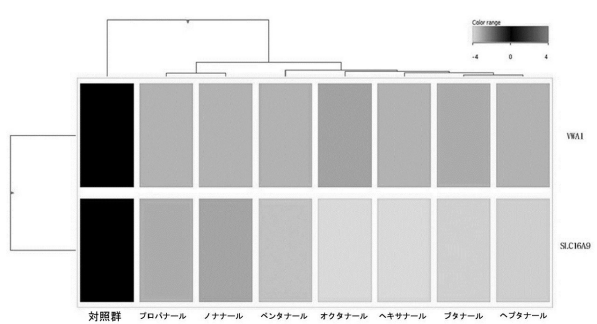
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【配列表】

0005940635000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ソン, ミ - ギョン

大韓民国 136 - 791 ソウル、ソンブック - グ ファランノ 14 - ギル 5

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 高感受性集団に於ける化学物質の有害性発現メカニズムの解明及び評価手法開発にかかる総合研究 平成19年度総括・分担研究報告書, 2008年, p.163-166

動物用医薬品等に関する畜水産食品の安全性確保に係る研究 平成20年度総括・分担研究報告書, 2009年, p.42-52

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00

C12Q 1/68

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)