

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年11月16日(16.11.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/195268 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/063846

(22) 国際出願日: 2016年5月10日(10.05.2016)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人: 株式会社アイシーエレクトロニクス(I.C.ELECTRONICS CO.,LTD) [JP/JP]; 〒9701144 福島県いわき市好間工業団地1-17 Fukushima (JP). 学校法人日本大学(NIHON UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 Tokyo (JP). 国立大学法人 東京大学(THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 大島 光宏(OHSHIMA Mitsuhiro); 〒9638611 福島県郡山市富田町字三角堂3-1-1 奥羽大学薬学部内 Fukushima (JP). 山口 洋子(YAMAGUCHI Yoko); 〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内 Tokyo (JP). 堀江 真史(HORIE Masafumi); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 齋藤 朗(SAITO Akira); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 長瀬 隆英(NAGASE Takahide); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 岩本 久美(IWAMOTO Hisami); 〒9701144 福島県いわき市好間工業団地1-17 株式会社アイシーエレクトロニクス内 Fukushima (JP).

(74) 代理人: 白形 由美子(SHIRAKATA Yumiko); 〒1410031 東京都品川区西五反田1丁目11番1号 アイオス五反田駅前ビル1001号 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,

BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告(条約第21条(3))

(54) Title: PERIODONTITIS TEST KIT USING MIRNA AS MARKER, AND TEST METHOD

(54) 発明の名称: m i R N Aをマーカーとする歯周炎検査キット、及び検査方法

(57) Abstract: Since a miRNA that serves as a diagnostic marker for periodontitis of the present invention displays a change specific to periodontitis, diagnosis of periodontitis can be performed accurately.

(57) 要約: 本発明の歯周炎の診断マーカーとなる m i R N A は、歯周炎に特異的に変化が見られるものである、正確に歯周炎の診断を行うことができる。



WO 2017/195268 A1

明 細 書

発明の名称：

m i R N A をマーカーとする歯周炎検査キット、及び検査方法

技術分野

[0001] 本発明は、新規の分子マーカーを用いた歯周炎検査キット、及び検査方法に関する。特に、歯肉溝滲出液（G i n g i v a l C r e v i c u l a r F l u i d、以下G C Fと記載することもある。）からm i R N Aを抽出し、m i R N Aをマーカーとする検査キット、及び検査方法に関する。

背景技術

[0002] 歯周病はう蝕とともに、歯の二大疾患である。歯周病は歯肉炎と歯周炎とに分けられるが、最終的な歯の喪失に至るのは、いわゆる歯槽膿漏といわれる歯周炎である。歯周病は世界で最も多い疾患の一つであるともいわれ、成人の約半数が罹患していると言われている（非特許文献1）。

[0003] 歯周炎は、歯根と歯槽骨間の歯根膜組織に影響を及ぼす慢性炎症性疾患である。進行した歯周炎では、歯と歯肉間の隙間である歯周ポケットが深くなり、歯を支持している結合組織である歯根膜線維や歯槽骨の破壊が生じ、歯がぐらつくようになり、最終的には歯が抜けてしまう。

[0004] 高齢者では、生活の質を損なうような重度の歯周炎に罹患する傾向がある。歯周炎は、メタボリック・シンドローム、冠動脈疾患、糖尿病のような全身性疾患と関連性があることも指摘されており（非特許文献2～4）、歯周炎の治療と予防は歯科分野だけではなく、一般的な健康状態に関わる問題ともなる。したがって、歯周炎の早期発見は、全身の健康状態を維持するうえでも重要である。

[0005] 現在のところ、歯周炎の検査は、プロービング、X線写真、歯肉炎指数、プラークの付着状態、動揺度の検査などによって行われている。これらの検査は、歯科医の主観が入り込みやすい非定量的な検査であり、歯科医の経験による部分が大きかった。そのため、歯周炎の治療法に関しても、プラーク

コントロールを中心とした画一的なものとなっていた。したがって、より客観的に歯周組織の状態を捉え、歯周炎の検査を行うことのできる方法が必要とされていた。

[0006] 従来から歯周炎を含む歯周病に関して客観的なデータを得ることができる検査方法として様々な方法が提案されている。特許文献1には、歯肉溝滲出液及び／又は唾液サンプル中のタンパク質バイオマーカーをプロテオーム分析により歯周疾患の状態を診断する方法が記載されている。特許文献2には、遺伝子多型を検出することにより侵襲性歯周炎を検査する方法が開示されている。特許文献3～5には、歯肉溝滲出液や唾液中のタンパク質を免疫学的に検出することにより歯周病を検査する方法が開示されている。

[0007] また、近年、様々な疾患においてmiRNAによって診断や治療を行う方法が開示されている。miRNAは、鎖長21～25ntの短いRNAであり、標的mRNAの3'-UTRに結合して遺伝子の発現を調節する機能を担っている。最近の研究によって、miRNAは、細胞の分化のような生物学的過程、あるいは癌化のような病理学的過程を調節することが明らかとなってきた（非特許文献5、6）。特に血液や尿などの体液からmiRNAを抽出し、検出することにより診断を行ったり、miRNAを治療に用いる方法が開示されている（例えば、特許文献6、7）。歯周疾患でもmiRNAを用いた検査、診断方法が開示されている（非特許文献7～9）。

先行技術文献

特許文献

- [0008] 特許文献1：特表2015-529333号公報
特許文献2：国際公開第2004/042054号
特許文献3：特開2016-031306号公報
特許文献4：特開2013-257312号公報
特許文献5：特開2009-052945号公報
特許文献6：特開2015-231376号公報
特許文献7：特表2014-527807号公報

非特許文献

- [0009] 非特許文献1 : Eke, P.I. et al., 2015, J Periodontol.Vol.86(5), pp.611-622.
- 非特許文献2 : Kaye, E.K. et al., 2016, J Dent Res.,. pii:0022034516641053.
- 非特許文献3 : Ryden, L., et al., 2016, Circulation. Vol.133(6),pp.576-583.
- 非特許文献4 : Gurav, A. & Jadhav, V. 2011, J.Diabetes. Vol.3(1), pp.21-28.
- 非特許文献5 : Gregory, P.A. et al., 2008, Nat. Cell Biol.Vol.10(5), pp.593-601.
- 非特許文献6 : Johnson, S.M. et al., 2005, Cell.Vol.120(5), pp.635-647.
- 非特許文献7 : Stoecklin-Wasmer C.et al., 2012, J. Dent. Res. Vol.91(10), pp.934-940.
- 非特許文献8 : Xie Y.F. et al., 2011, Int. J. Oral. Sci. Vol.3(3), pp.125-134.
- 非特許文献9 : Ogata Y. et al., 2014, J. Oral Sci. Vol.56(4), pp.253-260.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0010] しかしながら、特許文献1～5に記載のいずれの方法も、臨床的に実用化されていない。特許文献1に記載の方法は、正確な診断を行えると考えられるが、プロテオーム解析を行う必要があるため、大掛かりな機械と複雑な解析方法が必要である。特許文献2に記載の方法は、SNPs解析であることから、現在の歯周炎の状態を把握するものではない。特許文献3～5に記載の方法は、試験紙を用いる方法であることから歯科クリニックでも行うことが可能な方法ではあるが、従来から行われているプロービング等の診断方法に比べて、より正確に診断を行うことができるというわけではなく、さほど

普及していないのが現状である。また、非特許文献7～9に開示されている方法は、患者の歯周組織を用いて行う必要があるため、一般的な歯周炎の検査として普及するにはいたっていない。

[0011] 本発明は、歯周炎の客観的なデータが得られるだけではなく、歯肉滲出液（GCF）を用いた非侵襲的検査方法、及び検査キットを提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明は、以下の検査方法、バイオマーカー、及び検査キットに関する。

（1）歯毎に採取された歯肉溝滲出液からmiRNAを抽出し、得られた試料中のhsa-miR-223-3p、及びhsa-miR-200c-3pのmiRNA量と、hsa-miR-101-3p、hsa-miR-374a-5p、hsa-miR-582-5p、hsa-miR-145-5p、hsa-miR-20a-3p、hsa-miR-194-5p、hsa-miR-26b-5p、hsa-miR-301a-3p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-590-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-19a-3p、hsa-miR-338-3p、hsa-miR-126-5p、hsa-miR-144-5p、hsa-miR-144-3p、hsa-miR-30e-3p、hsa-miR-20a-5p、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-15a-5p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-143-3p、hsa-miR-106b-5pからなる群から選択される少なくとも1つ、及びhsa-miR-31-3p、hsa-miR-181b-5p、hsa-miR-203a、hsa-miR-200c-5p、hsa-miR-187-3p、hsa-miR-200b-5p、hsa-miR-99a-5p、hsa-miR-320a、hsa-miR-210-3p、hsa-miR-125a-5p、hsa-let-7i-5p、hsa-miR-100-5p、hsa-miR-155-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-200a

−5 p、hsa-miR-200b-3 p、hsa-let-7e-5 p、hsa-miR-222-3 p、hsa-miR-125b-5 p、hsa-miR-205-5 p、hsa-let-7b-5 p、hsa-miR-193b-3 p、hsa-miR-221-3 p、hsa-miR-365a-3 p、hsa-miR-22-3 pからなる群から選択される少なくとも1つのmiRNA量を検出し、参照標準に対して比較解析することを特徴とする歯周炎の検査方法。

(2) 歯毎に採取された歯肉溝滲出液からmiRNAを抽出し、hsa-miR-223-3 p、hsa-miR-101-3 p、hsa-miR-374a-5 p、hsa-miR-582-5 p、hsa-miR-145-5 p、hsa-miR-20a-3 p、hsa-miR-194-5 p、hsa-miR-26b-5 p、hsa-miR-301a-3 p、hsa-miR-140-5 p、hsa-miR-590-5 p、hsa-miR-30e-5 p、hsa-miR-19a-3 p、hsa-miR-338-3 p、hsa-miR-126-5 p、hsa-miR-144-5 p、hsa-miR-144-3 p、hsa-miR-30e-3 p、hsa-miR-20a-5 p、hsa-miR-200c-3 p、hsa-miR-31-3 p、hsa-miR-181b-5 p、hsa-miR-203a、hsa-miR-200c-5 p、hsa-miR-187-3 p、hsa-miR-200b-5 p、hsa-miR-99a-5 p、hsa-miR-320a、hsa-miR-210-3 p、hsa-miR-125a-5 p、hsa-let-7i-5 p、hsa-miR-100-5 p、hsa-miR-155-5 p、hsa-miR-21-3 p、hsa-miR-200a-5 p、hsa-miR-200b-3 p、hsa-let-7e-5 p、hsa-miR-222-3 p、hsa-miR-125b-5 p、hsa-miR-205-5 pからなるmiRNA量を検出し、参照標準に対して比較解析することを特徴とする歯周炎の検査方法。

(3) 前記参照標準として、hsa-miR-324-5 p、hsa-mi

R-29c-5p、hsa-miR-107、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-30d-5pの少なくとも1つ以上を用いることを特徴とする(1)又は(2)に記載の検査方法。

(4) hsa-miR-223-3p、hsa-miR-101-3p、hsa-miR-374a-5p、hsa-miR-582-5p、hsa-miR-145-5p、hsa-miR-20a-3p、hsa-miR-194-5p、hsa-miR-26b-5p、hsa-miR-301a-3p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-590-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-19a-3p、hsa-miR-338-3p、hsa-miR-126-5p、hsa-miR-144-5p、hsa-miR-144-3p、hsa-miR-30e-3p、hsa-miR-20a-5p、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-15a-5p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-143-3p、hsa-miR-106b-5pからなる群から選択される少なくとも1つ、及びhsa-miR-200c-3p、hsa-miR-31-3p、hsa-miR-181b-5p、hsa-miR-203a、hsa-miR-200c-5p、hsa-miR-187-3p、hsa-miR-200b-5p、hsa-miR-99a-5p、hsa-miR-320a、hsa-miR-210-3p、hsa-miR-125a-5p、hsa-let-7i-5p、hsa-miR-100-5p、hsa-miR-155-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-200a-5p、hsa-miR-200b-3p、hsa-let-7e-5p、hsa-miR-222-3p、hsa-miR-125b-5p、hsa-miR-205-5p、hsa-let-7b-5p、hsa-miR-193b-3p、hsa-miR-221-3p、hsa-miR-365a-3p、hsa-miR-22-3pからなる群から選択される少なくとも1つのmiRNAを含む歯周炎バイオマーカー。

(5) 少なくとも *hsa-miR-223-3p*、及び *hsa-miR-200c-3p* を含むことを特徴とする (4) 記載の歯周炎バイオマーカー。

(6) *hsa-miR-223-3p*、*hsa-miR-101-3p*、*hsa-miR-374a-5p*、*hsa-miR-582-5p*、*hsa-miR-145-5p*、*hsa-miR-20a-3p*、*hsa-miR-194-5p*、*hsa-miR-26b-5p*、*hsa-miR-301a-3p*、*hsa-miR-140-5p*、*hsa-miR-590-5p*、*hsa-miR-30e-5p*、*hsa-miR-19a-3p*、*hsa-miR-338-3p*、*hsa-miR-126-5p*、*hsa-miR-144-5p*、*hsa-miR-144-3p*、*hsa-miR-30e-3p*、*hsa-miR-20a-5p*、*hsa-miR-200c-3p*、*hsa-miR-31-3p*、*hsa-miR-181b-5p*、*hsa-miR-203a*、*hsa-miR-200c-5p*、*hsa-miR-187-3p*、*hsa-miR-200b-5p*、*hsa-miR-99a-5p*、*hsa-miR-320a*、*hsa-miR-210-3p*、*hsa-miR-125a-5p*、*hsa-let-7i-5p*、*hsa-miR-100-5p*、*hsa-miR-155-5p*、*hsa-miR-21-3p*、*hsa-miR-200a-5p*、*hsa-miR-200b-3p*、*hsa-let-7e-5p*、*hsa-miR-222-3p*、*hsa-miR-125b-5p*、*hsa-miR-205-5p* からなる *miRNA* であることを特徴とする (4) 又は (5) 記載の歯周炎バイオマーカー。

(7) 参照標準として、*hsa-miR-324-5p*、*hsa-miR-29c-5p*、*hsa-miR-107*、*hsa-miR-324-3p*、*hsa-miR-30d-5p* の少なくとも 1 つ以上を含むことを特徴とする (4) ~ (6) のいずれか 1 つ記載の歯周炎バイオマーカー。

(8) *hsa-miR-223-3p*、*hsa-miR-101-3p*、*hsa-miR-374a-5p*、*hsa-miR-582-5p*、*hsa-miR-145-5p*、*hsa-miR-20a-3p*、*hsa-miR-*

194-5 p、hsa-miR-26b-5 p、hsa-miR-301a-3 p、hsa-miR-140-5 p、hsa-miR-590-5 p、hsa-miR-30e-5 p、hsa-miR-19a-3 p、hsa-miR-338-3 p、hsa-miR-126-5 p、hsa-miR-144-5 p、hsa-miR-144-3 p、hsa-miR-30e-3 p、hsa-miR-20a-5 p、hsa-miR-16-5 p、hsa-miR-19b-3 p、hsa-miR-15a-5 p、hsa-miR-142-5 p、hsa-miR-143-3 p、hsa-miR-106b-5 pからなる群から選択される少なくとも1つ、及びhsa-miR-200c-3 p、hsa-miR-31-3 p、hsa-miR-181b-5 p、hsa-miR-203a、hsa-miR-200c-5 p、hsa-miR-187-3 p、hsa-miR-200b-5 p、hsa-miR-99a-5 p、hsa-miR-320a、hsa-miR-210-3 p、hsa-miR-125a-5 p、hsa-let-7i-5 p、hsa-miR-100-5 p、hsa-miR-155-5 p、hsa-miR-21-3 p、hsa-miR-200a-5 p、hsa-miR-200b-3 p、hsa-let-7e-5 p、hsa-miR-222-3 p、hsa-miR-125b-5 p、hsa-miR-205-5 p、hsa-let-7b-5 p、hsa-miR-193b-3 p、hsa-miR-221-3 p、hsa-miR-365a-3 p、hsa-miR-22-3 pからなる群から選択される少なくとも1つのmiRNAの発現量を検出するための配列を有する核酸を固定したアレイを含む歯周炎検査キット。

(9) 前記アレイが少なくともhsa-miR-223-3 p、及びhsa-miR-200c-3 pの発現量を検出するための配列を有する核酸を固定したものであることを特徴とする(8)記載の歯周炎検査キット。

(10) 前記アレイが、少なくともhsa-miR-223-3 p、hsa-miR-101-3 p、hsa-miR-374a-5 p、hsa-mi

R-582-5p、hsa-miR-145-5p、hsa-miR-20a-3p、hsa-miR-194-5p、hsa-miR-26b-5p、hsa-miR-301a-3p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-590-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-19a-3p、hsa-miR-338-3p、hsa-miR-126-5p、hsa-miR-144-5p、hsa-miR-144-3p、hsa-miR-30e-3p、hsa-miR-20a-5p、hsa-miR-200c-3p、hsa-miR-31-3p、hsa-miR-181b-5p、hsa-miR-203a、hsa-miR-200c-5p、hsa-miR-187-3p、hsa-miR-200b-5p、hsa-miR-99a-5p、hsa-miR-320a、hsa-miR-210-3p、hsa-miR-125a-5p、hsa-let-7i-5p、hsa-miR-100-5p、hsa-miR-155-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-200a-5p、hsa-miR-200b-3p、hsa-let-7e-5p、hsa-miR-222-3p、hsa-miR-125b-5p、hsa-miR-205-5pの発現量を検出するための配列を有する核酸を固定したアレイであることを特徴とする(8)又は(9)記載の歯周炎検査キット。

(11) 参照標準として、hsa-miR-324-5p、hsa-miR-29c-5p、hsa-miR-107、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-30d-5pの少なくとも1つ以上をアレイに含むことを特徴とする(8)～(10)のいずれか1つ記載の歯周炎検査キット。

(12) 歯肉溝滲出液採取用ペーパーストリップ、miRNA抽出試薬、miRNA検出試薬を含むことを特徴とする(8)～(11)のいずれか1項記載の歯周炎検査キット。

(13) 歯毎に採取された歯肉溝滲出液からmiRNAを抽出し、表3～表6に記載されるmiRNAの群から選択される少なくとも1つ以上のmiRNA量を検出することを特徴とする歯周炎の検査方法。

発明の効果

[0013] GCFを用い、正確に歯周炎の診断を行うことのできる検査方法、及び検査キットを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]歯肉溝滲出液から抽出したmiRNAの電気泳動図。

[図2]歯肉溝滲出液試料セット#1のmiRNA解析を示す図。図2Aは主成分分析結果を、図2Bは、Volcanoプロットを示す図。

[図3]歯肉溝滲出液試料セット#2のmiRNA解析を示す図。図3Aは、健康者、歯周炎患者のmiRNA発現の2D hierarchical clustering解析の結果を示す図。図3Bは、Volcanoプロットを示す図。図3Cは、各RNAの発現レベルをBoxプロットで表した図。

[図4]2つの異なる試料セットの比較を示した図。図4Aは、40個のmiRNAの発現の比($-\Delta\Delta C_q$ 値)の試料セット#1、セット#2間の相関を示した図。図4Bは、40個のmiRNAの発現レベルをBoxプロットで表した図。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明はGCFからRNAを単離して、miRNAを解析することの特徴としている。これまでのmiRNAによる歯周炎の検査は、歯肉組織を用いて行われていた。本発明の検査方法はGCFからmiRNAを単離して検査する非侵襲的な検査であり、患者の負担が少ない。また、歯周炎が疑われる歯ごとにGCFを採取することができるため、唾液を用いた検査では行うことができなかった、歯周炎に罹患している歯を特定し、歯毎に歯周炎の状態を客観的に判断することが可能となった。

[0016] 本発明では歯周炎患者で特異的に発現の変化が見られるmiRNAを開示し、特に40のmiRNAをパネルとして用いることにより、正確な検査が行えることを開示している。ただし、簡便な検査では、ここで示した歯周炎に特異的なmiRNAの発現量を求めることができればいいので、参照となるmiRNA量と、歯周炎で変化が見られたmiRNA量を1つ以上選択し

て測定すればよい。また、歯周炎患者で発現増強が確認された m i R N A と、減少が確認された m i R N A を組み合わせて検査に用いれば、より正確に診断を行うことができることから好ましい。

[0017] また、m i R N A の定量はここでは定量的 P C R 法によって行ったが、m i R N A 量を定量することができれば、どのような方法を用いてもよい。

[0018] また、以下で示すパネルとして用いる 40 の m i R N A は、そのうちのいくつかを選択して用いてもよいし、本発明で開示している他の m i R N A と入れ替えて検査に用いてもよい。以下、解析結果を挙げながら本発明を詳細に説明する。

[0019] 《対象者》

以下にデータを示す試料は、東京医科歯科大学の倫理委員会で承認された研究に基づき、インフォームドコンセントを得たうえで患者、及び健常者のボランティアから得られたものである。歯周炎の診断は、歯周ポケットの深さ、プロービングの際の出血によって行った。なお、G C F の採取は、診断に先立って行っている。また、歯周炎患者の一人が、軽度の糖尿病を併発していた他は、全身性疾患を伴っていたものはいない。なお、糖尿病を併発していた歯周炎患者の糖尿病も軽度であり投薬治療は受けてはいない。

[0020] 解析を行った対象は、以下の表 1、表 2 に示す健常者、歯周炎患者から得たものである。表 1 で示す 8 名の対象は、健常者 5 名、歯周炎患者 3 名であり、平均年齢は夫々 38 歳、53 歳である。また、表 2 で示す 12 名の対象者は、健常者 6 名、歯周炎患者 6 名であり、平均年齢は夫々 28 歳、65 歳であった。

[0021]

[表1]

試料	年齢	性別	診断	PD (mm)	喫煙の有無
H1	53	M	H	2	NS
H2	43	M	H	2-3	NS
H3	26	F	H	2-3	NS
H4	37	F	H	1-2	S
H5	31	M	H	2-3	NS
P1	45	F	CP	3-6	NS
P2	70	F	CP	5-8	NS
P3	41	M	AgP	5-7	S

[0022] [表2]

試料	年齢	性別	診断	PD (mm)	喫煙の有無
H6	27	M	H	2-3	NS
H7	27	M	H	2-3	NS
H8	27	F	H	2	NS
H9	30	F	H	2-3	NS
H10	28	M	H	2-3	NS
H11	28	F	H	2-3	NS
P4	67	F	CP	4-6	NS
P5	34	F	AgP	4-8	NS
P6	73	M	CP	5-8	NS
P7	82	F	CP	4-7	NS
P8	68	F	CP	4-8	NS
P9	68	F	CP	4	NS

[0023] 表中の符号は以下のとおりである。M：男性、F：女性、H：健常者、CP：慢性歯周炎（chronic periodontitis）、AgP：侵襲性歯周炎（aggressive periodontitis）、PD：歯周ポケット深さ（probing pocket depth）、NS：非喫煙者、S：喫煙者なお、以下に示すデータのH1～H11は上記表に示す健常者のサンプルであることを示し、P1～P9は同様に上記表に

示す歯周炎患者のサンプルであることを示す。

[0024] 《歯肉溝滲出液（GCF）の採取》

GCFを採取する前に、歯肉縁上の歯垢、及び歯の周辺の唾液は綿球で除去し、エアドライヤーによって、GCFを採取する歯の周辺を乾燥させた。コットンロールによって、周辺から隔離した後に、濾紙片（Oralflow社製）を歯周ポケットに穏やか挿入し、GCFを採取した。血液が付着している濾紙片は解析には用いなかった。

複数の濾紙片により、各対象者から約4.8 μ lのGCFを採取して解析に用いた。濾紙は60 μ lのリン酸緩衝液を含むチューブに集め、急速凍結し、RNAを単離するまで保存した。

[0025] 《RNAの単離》

以下のようにして、GCFからTrizol LS試薬（ライフテクノロジーズ社製）を用いてRNAを抽出した。GCFは、750 μ lのTrizol LS試薬に溶解し、RNase-free精製水により1mlになるように調整した。次に、0.2mlのクロロホルムを加え、水相を集め、イソプロパノールを加えた。遠心して沈殿を集め、乾燥してエタノールで洗浄後、50 μ lのnuclease-free精製水に溶解した。RNAの精製度と濃度はNanoDrop（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を用いて測定した。A260/A280の比が0.9~1.6、A260/A280の比が1.6~1.8の試料をmiRNA解析に用いた。

[0026] total RNA量は、eukaryotic total RNA nano assayを用い、Agilent 2100 BioAnalyzer（アジレント・テクノロジー社製）によって測定した。電気泳動図はいずれの試料もきれいなピークを示した。一例を図1に示す。図1の左パネルは健常者、右パネルは歯周炎患者から得られたRNA試料の電気泳動図を示している。どちらの試料も25~200 ntのsmall RNAのピークが観察される。

[0027] 《miRNAの発現解析》

miRNA発現解析は、miRCURY LNA（登録商標） Universal RT microRNA PCR System（Exiqon社製）を用いて解析した。一本鎖cDNAは8 μ lのRNAからuniversal cDNA Synthesis kit II（Exiqon社製）を用いて合成した。合成したcDNAは希釈し、ExiLET SYBR（登録商標）Green master mixと混合しHuman miRNome microRNA PCR panel（Exiqon社製）に分注し、定量的PCRをLightCycler 480 Real-Time PCR system（ロシュ社製）を用いて行った。

[0028] 参照プローブとして、GCFで発現が安定していたhsa-miR-324-5p、hsa-miR-29c-5p、hsa-miR-107、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-30d-5pを正規化に用いた。正規化した値は ΔC_q と表している。

[0029] 《解析結果》

表1に示す5名の健常者、3名の歯周炎患者から採取したGCFのmiRNA（試料セット#1）を解析した。健常者のGCFを採取した部位は、歯周ポケット深さが3mm以下であり、プロービングによる出血は見られなかった。一方、歯周炎患者は歯周ポケット深さが3mmより大きく（ほとんどの歯周ポケット深さは4～8mm）、多くの患者でプロービングによる出血が観察された。

[0030] 主成分解析（PCA）によるmiRNA発現パターンは健常者、歯周炎患者ではっきりと2つに分かれて分布していた（図2A）。表1に示す5名の健常者（H1～H5）、3名の歯周炎患者（P1～P3）から得られたRNA試料を解析した結果は、両者の発現パターンが異なることを示している。X軸は、PCA Component 1（PC1：46.9% variance）、Y軸はPCA Component 2（PC2：15.7% variance）を示す。

[0031] 751のヒトmiRNAのプライマーセットのうち、健常者、歯周炎患者

の各群の夫々少なくとも一人から619のmiRNAの発現データを得ることができた。それらのうち、歯周炎患者において332のmiRNAは発現増強が認められ、287のmiRNAは発現減少が認められた（図2B）。

X軸は、 $-\Delta\Delta C_q$ 値で表す相対的な発現比を示し、Y軸は2群間でのt-テストから得られた $-\log_{10}(p\text{-value})$ を表している。

[0032] 黒丸（●）で示したのは、 p 値が <0.05 、 $\Delta\Delta C_q > 1.0$ 、又は $\Delta\Delta C_q < -1.0$ （図2Bにカットオフとして線で示している。）のmiRNAであり、歯周炎患者で有意に発現増強、又は減少が見られるものを示す。

[0033] 歯周炎患者で、有意に発現減少、又は発現増強が観察されたmiRNAは、夫々63（表3）、55個（表4）あった。これらのmiRNAは歯周炎患者と健常者との間で発現に有意な差が見られたmiRNAであることから、単独で用いても、いくつかを組み合わせる検査に用いてもよい。また、正確な診断を行うためには、複数のmiRNAを組み合わせる検査に用いるのが好ましい。

[0034]

[表3]

	miRNA	ΔΔCt (rep- value)	
		ΔΔCt	value
発現減少	hsa-miR-511-5p	-3.3086	0.0001
	hsa-miR-382-3p	-3.2659	0.0233
	hsa-miR-1247-5p	-2.8425	0.0265
	hsa-miR-125b-1-3p	-2.5486	0.0008
	hsa-miR-548a	-2.4882	0.0262
	hsa-miR-155-3p	-2.4653	0.0061
	hsa-miR-30b-3p	-2.3773	0.0001
	hsa-miR-205-3p	-2.2626	0.0355
	hsa-miR-448a	-2.1993	0.0015
	hsa-miR-135b-3p	-2.1393	0.0035
	hsa-miR-100-5p	-2.1140	0.0027
	hsa-miR-222-5p	-2.1106	0.0026
	hsa-miR-641	-2.0585	0.0256
	hsa-miR-193b-5p	-2.0206	0.0010
	hsa-miR-1260a	-1.9883	0.0086
	hsa-miR-27b-5p	-1.8586	0.0142
	hsa-miR-335-3p	-1.8260	0.0116
	hsa-miR-193b-3p	-1.8046	0.0030
	hsa-miR-125b-2-3p	-1.7660	0.0073
	hsa-miR-125b-2-3p	-1.7060	0.0214
	hsa-miR-155-5p	-1.6540	0.0053
	hsa-miR-92a-1-5p	-1.6493	0.0018
	hsa-miR-99b-5p	-1.5800	0.0013
	hsa-miR-21-3p	-1.5746	0.0010
	hsa-miR-99b-3p	-1.5600	0.0011
	hsa-miR-99a-3p	-1.5460	0.0066
	hsa-miR-151a-5p	-1.5320	0.0041
	hsa-miR-152-3p	-1.4866	0.0023
	hsa-miR-99a-5p	-1.4773	0.0170
	hsa-miR-615-3p	-1.4553	0.0112
	hsa-let-7e-3p	-1.4213	0.0085
	hsa-miR-34c-3p	-1.4100	0.0056
	hsa-miR-22-3p	-1.3920	0.0000
	hsa-miR-210-3p	-1.3913	0.0031
	hsa-miR-181b-5p	-1.3880	0.0019
	hsa-miR-663a	-1.3833	0.0019
	hsa-miR-150-5p	-1.3726	0.0114
	hsa-miR-125a-5p	-1.3593	0.0123
	hsa-miR-671-3p	-1.3313	0.0005
	hsa-let-7e-5p	-1.3200	0.0227
	hsa-miR-31-3p	-1.3126	0.0067
	hsa-miR-205-5p	-1.3100	0.0120
	hsa-miR-1972	-1.3100	0.0021
	hsa-miR-200a-5p	-1.3060	0.0078
	hsa-miR-181a-3p	-1.2853	0.0105
	hsa-miR-187-3p	-1.2786	0.0032
	hsa-miR-125a-3p	-1.2726	0.0089
	hsa-miR-200c-5p	-1.2486	0.0058
	hsa-miR-200b-5p	-1.2326	0.0018
	hsa-miR-200b-3p	-1.2246	0.0061
	hsa-miR-34b-3p	-1.1913	0.0026
	hsa-miR-365a-3p	-1.1800	0.0035
	hsa-miR-30d-3p	-1.1713	0.0007
	hsa-miR-151a-3p	-1.1346	0.0040
	hsa-miR-320c	-1.1180	0.0000
	hsa-miR-320b	-1.1140	0.0004
	hsa-miR-455-5p	-1.0993	0.0247
	hsa-miR-593-3p	-1.0800	0.0042
	hsa-miR-95-3p	-1.0626	0.0094
	hsa-miR-193a-3p	-1.0586	0.0418
	hsa-miR-877-5p	-1.0566	0.0009
	hsa-miR-34c-5p	-1.0206	0.0093
	hsa-miR-342-5p	-1.0026	0.0075

[0035]

[表4]

miRNA	- $\Delta \Delta Cq$ (ratio)	p-value
hsa-miR-199b-5p	1.0294	0.0321
hsa-miR-106b-5p	1.0674	0.0031
hsa-miR-628-5p	1.0714	0.0030
hsa-miR-194-3p	1.0874	0.0363
hsa-miR-19b-3p	1.0927	0.0016
hsa-miR-30e-3p	1.1067	0.0012
hsa-miR-636	1.1074	0.0133
hsa-miR-450b-5p	1.1114	0.0305
hsa-miR-192-5p	1.1320	0.0034
hsa-miR-338-5p	1.1547	0.0150
hsa-miR-215-5p	1.1600	0.0045
hsa-miR-548e-3p	1.1600	0.0029
hsa-miR-16-1-3p	1.1800	0.0033
hsa-miR-26b-5p	1.1934	0.0007
hsa-miR-194-5p	1.2027	0.0017
hsa-miR-30c-5p	1.2114	0.0000
hsa-miR-20a-3p	1.2154	0.0006
hsa-miR-340-3p	1.2367	0.0001
hsa-miR-143-3p	1.2440	0.0027
hsa-miR-30a-5p	1.2567	0.0057
hsa-miR-126-5p	1.2700	0.0204
hsa-miR-140-5p	1.2954	0.0006
hsa-miR-374b-3p	1.2974	0.0295
hsa-miR-611	1.3024	0.0027
hsa-miR-582-5p	1.3187	0.0009
hsa-miR-454-3p	1.3240	0.0002
hsa-miR-142-5p	1.3514	0.0014
hsa-miR-340-5p	1.3560	0.0003
hsa-miR-616-3p	1.3694	0.0152
hsa-miR-590-3p	1.4100	0.0007
hsa-miR-338-3p	1.4434	0.0055
hsa-miR-374b-5p	1.4467	0.0001
hsa-miR-545-3p	1.4700	0.0245
hsa-miR-525-5p	1.5169	0.0082
hsa-miR-30e-5p	1.5420	0.0001
hsa-miR-301b	1.6094	0.0045
hsa-miR-646	1.6127	0.0353
hsa-miR-19a-3p	1.6887	0.0006
hsa-miR-374a-5p	1.7387	0.0001
hsa-miR-216b-5p	1.8094	0.0043
hsa-miR-582-3p	1.8340	0.0008
hsa-miR-590-5p	1.8414	0.0002
hsa-miR-1256	1.8620	0.0126
hsa-miR-518c-5p	1.8887	0.0067
hsa-miR-627-5p	1.9100	0.0015
hsa-miR-101-3p	1.9607	0.0007
hsa-miR-301a-3p	2.0947	0.0005
hsa-miR-144-5p	2.1474	0.0370
hsa-miR-142-3p	2.2720	0.0000
hsa-miR-144-3p	2.2727	0.0174
hsa-miR-124-3p	2.5159	0.0013
hsa-miR-934	2.5627	0.0345
hsa-miR-510-5p	3.1050	0.0329
hsa-miR-298	3.2266	0.0040
hsa-miR-1181	3.3094	0.0004

発現増強

[0036] さらに、上記の結果において、 ΔCq 値が低いほど miRNA の発現量が多く、検出感度が比較的良いと想定される。したがって $\Delta Cq < -2.5$ 、

p 値が <0.05 、 $\Delta\Delta C_q > 0.7$ 、又は $\Delta\Delta C_q < -0.7$ 、との基準を満たすmiRNAを歯肉溝滲出液試料セット#1の解析結果から抽出した(表5)。したがって、表5に示すmiRNAは単独、あるいはいくつかを組み合わせ歯周炎の診断マーカーとして好ましく用いることができる。特に、hsa-miR-223-3p、hsa-miR-200c-3p、hsa-miR-205-5p、hsa-miR-16-5pは、感度も再現性も良いことから、マーカーとして好ましく用いることができる。

[0037] [表5]

miRNA	Target mean	Control mean	Ratio	p value	q value
hsa-miR-223-3p	-13.9661	-13.1614	0.805	0.0142	0.0648
hsa-miR-205-5p	-9.5795	-10.8894	-1.310	0.0120	0.0584
hsa-miR-16-5p	-10.7995	-10.0054	0.794	0.0054	0.0370
hsa-miR-1260a	-5.9028	-7.8921	-1.989	0.0086	0.0480
hsa-miR-200c-3p	-6.7495	-7.6234	-0.874	0.0295	0.1091
hsa-miR-142-3p	-9.7895	-7.5174	2.272	0.0000	0.0024
hsa-let-7b-5p	-6.2761	-7.2034	-0.927	0.0083	0.0476
hsa-miR-125b-5p	-5.1795	-6.9454	-1.766	0.0073	0.0439
hsa-miR-125a-5p	-5.2761	-6.6354	-1.359	0.0123	0.0595
hsa-miR-200b-3p	-5.1528	-6.3774	-1.225	0.0061	0.0387
hsa-miR-19b-3p	-7.3061	-6.2134	1.093	0.0016	0.0217
hsa-miR-222-3p	-5.1861	-6.1734	-0.987	0.0024	0.0261
hsa-miR-193b-3p	-4.3528	-6.1574	-1.805	0.0030	0.0272
hsa-miR-15a-5p	-6.8328	-5.9234	0.909	0.0089	0.0483
hsa-miR-221-3p	-5.0295	-5.7674	-0.738	0.0396	0.1289
hsa-miR-26a-5p	-6.4761	-5.6334	0.843	0.0003	0.0104
hsa-miR-99a-5p	-3.7861	-5.2434	-1.477	0.0170	0.0751
hsa-miR-20a-5p	-6.0061	-5.0234	0.983	0.0036	0.0286
hsa-miR-30c-5p	-6.1228	-4.9114	1.211	0.0000	0.0024
hsa-miR-150-5p	-3.5328	-4.9054	-1.373	0.0114	0.0569
hsa-miR-145-5p	-5.6261	-4.8814	0.745	0.0085	0.0479
hsa-miR-320a	-3.7628	-4.7274	-0.965	0.0001	0.0063
hsa-miR-365a-3p	-3.3795	-4.5594	-1.180	0.0035	0.0282
hsa-miR-338-3p	-5.3828	-3.9394	1.443	0.0055	0.0375
hsa-miR-424-5p	-4.8195	-3.9374	0.882	0.0256	0.0998
hsa-miR-22-3p	-2.5295	-3.9214	-1.392	0.0000	0.0057
hsa-miR-19a-3p	-5.5761	-3.8874	1.689	0.0006	0.0152
hsa-miR-30e-5p	-5.2995	-3.7574	1.542	0.0001	0.0063
hsa-miR-142-5p	-5.0028	-3.6514	1.351	0.0014	0.0207
hsa-miR-26b-5p	-4.8328	-3.6394	1.193	0.0007	0.0152
hsa-miR-143-3p	-4.8695	-3.6254	1.244	0.0027	0.0261
hsa-miR-101-3p	-5.0061	-3.0454	1.961	0.0007	0.0152
hsa-miR-140-5p	-4.2428	-2.9474	1.295	0.0006	0.0152
hsa-miR-582-5p	-4.1561	-2.8374	1.319	0.0009	0.0166
hsa-miR-106b-5p	-3.8128	-2.7454	1.067	0.0031	0.0274

[0038] また、各miRNAの機能により着目して、次の5つの基準に基づいて発現量に変化が見られたmiRNAから40個のmiRNAを抽出した。

- (1) 健常者、歯周炎患者で有意に差が認められるもの（できればp値が0.05より小さいもの）
- (2) 初期の発現レベルが高いと考えられる ΔCq 値が比較的小さいもの
- (3) ΔCq 値の差（ $\Delta\Delta Cq$ ）が大きいもの
- (4) 標的遺伝子が機能的に重要であると示唆されているもの、又はこれまでの研究成果により確認されているもの
- (5) 歯周炎との関連が今までの研究により報告されているもの

[0039] 各miRNAについて上記5つの基準で評価し、表6に示す19の歯周炎患者で発現増強が認められるmiRNA、21の発現減少が認められるmiRNAを抽出した。また、上述のように、hsa-miR-324-5p、hsa-miR-29c-5p、hsa-miR-107、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-30d-5pの5つのmiRNAは、すべての試料で安定して発現していたことから、参照miRNA（reference miRNA）として、以後の実験解析に含め、正規化に用いた。なお、表6の分子のうち、表中ハイライトの付してあるhsa-miR-101-3p、hsa-miR-145-5p、hsa-miR-374a-5p、hsa-miR-582-5p、hsa-miR-181b-5p、hsa-miR-187-3p、hsa-miR-200c-3p、hsa-miR-200c-5p、hsa-miR-203a、hsa-miR-31-3pは、今までに歯周炎、歯周病との関連が全く知られていない分子である。

[0040] [表6]

	miRNA				
発 現 増 強	hsa-miR-101-3p	hsa-miR-126-5p	hsa-miR-140-5p	hsa-miR-144-3p	hsa-miR-144-5p
	hsa-miR-145-5p	hsa-miR-194-5p	hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-20a-3p	hsa-miR-20a-5p
	hsa-miR-223-3p	hsa-miR-26b-5p	hsa-miR-301a-3p	hsa-miR-30e-3p	hsa-miR-30e-5p
	hsa-miR-338-3p	hsa-miR-374a-5p	hsa-miR-582-5p	hsa-miR-590-5p	
発 現 減 少	hsa-let-7e-5p	hsa-let-7i-5p	hsa-miR-100-5p	hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-125b-5p
	hsa-miR-155-5p	hsa-miR-181b-5p	hsa-miR-187-3p	hsa-miR-200a-5p	hsa-miR-200b-3p
	hsa-miR-200b-5p	hsa-miR-200c-3p	hsa-miR-200c-5p	hsa-miR-203a	hsa-miR-205-5p
	hsa-miR-21-3p	hsa-miR-210-3p	hsa-miR-222-3p	hsa-miR-31-3p	hsa-miR-320a
	hsa-miR-99a-5p				

[0041] 表1の試料を用いて得られた結果を評価するために、次に表2で示した対象から得られた試料を用いて上記で選択した40のmiRNAの発現を測定した。健常者6名、歯周炎患者6名から得られた結果は、両者ではっきりとした差があることが示された(図3A)。なお、hsa-miR-20a-5pはP7の試料で増幅することができなかったため、図3Aでは、これを除いて表示している。

[0042] 選択した40のmiRNAの発現レベルをVolcanoプロットで示す(図3B)。図2Bと同様に、X軸は、 $-\Delta\Delta Cq$ 値で表す相対的な発現比を示し、Y軸は2群間でのt-テストから得られた $-\log_{10}(p\text{-value})$ を表している。黒丸(●)で示したのは、 p 値が <0.05 、 $|\Delta\Delta Cq| > 1.0$ のmiRNAを示す。34のmiRNAは発現レベルの p 値 <0.005 であり、17のmiRNAは $\Delta\Delta Cq > 1.0$ 、又は <-1.0 と有意差があった。

[0043] さらに、各miRNAの発現レベルをBoxプロットで表した(図3C)。白抜き四角は、健常者、灰色の四角は歯周炎患者の結果を示す。横棒は各中央値を示している。上段のパネルは19の歯周炎患者で発現増強の見られたmiRNA、下段は発現減少の見られたmiRNAの解析結果である。 ΔCq 値から判断すると、hsa-miR-223-3p、hsa-miR-203a、hsa-miR-205-5pがGCFでの発現レベルが高いことが明らかとなった。したがって、これらのmiRNAの少なくともいずれかを検出することにより、感度良く測定を行うことができる。

[0044] 次に、表1、表2で示した試料間で、40のmiRNAの発現の比($-\Delta\Delta Cq$ 値)に相関があるか解析を行った。図4Aは試料間の値を散布図で示したものである。Spearmanの相関係数(ρ)は0.95であり両者に強い相関があることが示された。

[0045] さらに、各対象において、歯周炎患者において発現増強が認められた19のmiRNA、発現減少が認められた21のmiRNAに関して、表1、表2の各対象において、 ΔCq 値の分布を比較した(図4B)。表1、表2、

どちらの試料であっても発現増強、発現減少を示すmiRNAの特徴的なパターンは同様であった。これらの結果は選択した40のmiRNAの発現が歯周炎患者の特徴を表す、再現性の良いものであることを示している。

[0046] 以上の結果から、歯周炎の診断を行う検査には、上記表6に選択した40のmiRNAをパネルとして用いれば正確な診断を行うことができる。しかし、これら40のmiRNAをすべて使用する必要はなく、必要に応じて選択して用いることもできる。また、表6の40のmiRNA以外にも、表3～5に示したmiRNAは歯周炎の患者で特異的に変化が見られることから好ましく用いることができる。特に、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-15a-5p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-143-3p、hsa-miR-106b-5p、hsa-let-7b-5p、hsa-miR-193b-3p、hsa-miR-221-3p、hsa-miR-365a-3p、hsa-miR-22-3pは感度も良く検出を行うことができるので、歯周炎の検査に好ましく用いることができる。

請求の範囲

[請求項1]

歯毎に採取された歯肉溝滲出液からmiRNAを抽出し、
得られた試料中のhsa-miR-223-3p、及びhsa-miR-200c-3pのmiRNA量と、
hsa-miR-101-3p、hsa-miR-374a-5p、
hsa-miR-582-5p、hsa-miR-145-5p、
hsa-miR-20a-3p、hsa-miR-194-5p、
hsa-miR-26b-5p、hsa-miR-301a-3p、
hsa-miR-140-5p、hsa-miR-590-5p、
hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-19a-3p、
hsa-miR-338-3p、hsa-miR-126-5p、
hsa-miR-144-5p、hsa-miR-144-3p、
hsa-miR-30e-3p、hsa-miR-20a-5p、
hsa-miR-16-5p、hsa-miR-19b-3p、
hsa-miR-15a-5p、hsa-miR-142-5p、
hsa-miR-143-3p、hsa-miR-106b-5pからなる群から選択される少なくとも1つ、
及びhsa-miR-31-3p、hsa-miR-181b-5p、
hsa-miR-203a、hsa-miR-200c-5p、
hsa-miR-187-3p、hsa-miR-200b-5p、
hsa-miR-99a-5p、hsa-miR-320a、
hsa-miR-210-3p、hsa-miR-125a-5p、
hsa-miR-let-7i-5p、hsa-miR-100-5p、
hsa-miR-155-5p、hsa-miR-21-3p、
hsa-miR-200a-5p、hsa-miR-200b-3p、
hsa-miR-let-7e-5p、hsa-miR-222-3p、
hsa-miR-125b-5p、hsa-miR-205-5p、
hsa-miR-let-7b-5p、hsa-miR-193b-3p、hsa-miR-2

21-3 p、hsa-miR-365a-3 p、hsa-miR-22-3 pからなる群から選択される少なくとも1つのmiRNA量を検出し、

参照標準に対して比較解析することを特徴とする歯周炎の検査方法

。

[請求項2]

歯毎に採取された歯肉溝滲出液からmiRNAを抽出し、

hsa-miR-223-3 p、hsa-miR-101-3 p、hsa-miR-374a-5 p、hsa-miR-582-5 p、hsa-miR-145-5 p、hsa-miR-20a-3 p、hsa-miR-194-5 p、hsa-miR-26b-5 p、hsa-miR-301a-3 p、hsa-miR-140-5 p、hsa-miR-590-5 p、hsa-miR-30e-5 p、hsa-miR-19a-3 p、hsa-miR-338-3 p、hsa-miR-126-5 p、hsa-miR-144-5 p、hsa-miR-144-3 p、hsa-miR-30e-3 p、hsa-miR-20a-5 p、hsa-miR-200c-3 p、hsa-miR-31-3 p、hsa-miR-181b-5 p、hsa-miR-203a、hsa-miR-200c-5 p、hsa-miR-187-3 p、hsa-miR-200b-5 p、hsa-miR-99a-5 p、hsa-miR-320a、hsa-miR-210-3 p、hsa-miR-125a-5 p、hsa-let-7i-5 p、hsa-miR-100-5 p、hsa-miR-155-5 p、hsa-miR-21-3 p、hsa-miR-200a-5 p、hsa-miR-200b-3 p、hsa-let-7e-5 p、hsa-miR-222-3 p、hsa-miR-125b-5 p、hsa-miR-205-5 pからなるmiRNA量を検出し、

参照標準に対して比較解析することを特徴とする歯周炎の検査方法

。

[請求項3] 前記参照標準として、hsa-miR-324-5p、hsa-miR-29c-5p、hsa-miR-107、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-30d-5pの少なくとも1つ以上を用いることを特徴とする請求項1又は2に記載の検査方法。

[請求項4] hsa-miR-223-3p、hsa-miR-101-3p、hsa-miR-374a-5p、hsa-miR-582-5p、hsa-miR-145-5p、hsa-miR-20a-3p、hsa-miR-194-5p、hsa-miR-26b-5p、hsa-miR-301a-3p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-590-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-19a-3p、hsa-miR-338-3p、hsa-miR-126-5p、hsa-miR-144-5p、hsa-miR-144-3p、hsa-miR-30e-3p、hsa-miR-20a-5p、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-15a-5p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-143-3p、hsa-miR-106b-5pからなる群から選択される少なくとも1つ、

及びhsa-miR-200c-3p、hsa-miR-31-3p、hsa-miR-181b-5p、hsa-miR-203a、hsa-miR-200c-5p、hsa-miR-187-3p、hsa-miR-200b-5p、hsa-miR-99a-5p、hsa-miR-320a、hsa-miR-210-3p、hsa-miR-125a-5p、hsa-let-7i-5p、hsa-miR-100-5p、hsa-miR-155-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-200a-5p、hsa-miR-200b-3p、hsa-let-7e-5p、hsa-miR-222-3p、hsa-miR-125b-5p、hsa-miR-205-5p、hsa-let-7b-5p、hsa-miR-1

93b-3p、hsa-miR-221-3p、hsa-miR-365a-3p、hsa-miR-22-3pからなる群から選択される少なくとも1つのmiRNAを含む歯周炎バイオマーカー。

[請求項5] 少なくともhsa-miR-223-3p、及びhsa-miR-200c-3pを含むことを特徴とする請求項4記載の歯周炎バイオマーカー。

[請求項6] hsa-miR-223-3p、hsa-miR-101-3p、hsa-miR-374a-5p、hsa-miR-582-5p、hsa-miR-145-5p、hsa-miR-20a-3p、hsa-miR-194-5p、hsa-miR-26b-5p、hsa-miR-301a-3p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-590-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-19a-3p、hsa-miR-338-3p、hsa-miR-126-5p、hsa-miR-144-5p、hsa-miR-144-3p、hsa-miR-30e-3p、hsa-miR-20a-5p、hsa-miR-200c-3p、hsa-miR-31-3p、hsa-miR-181b-5p、hsa-miR-203a、hsa-miR-200c-5p、hsa-miR-187-3p、hsa-miR-200b-5p、hsa-miR-99a-5p、hsa-miR-320a、hsa-miR-210-3p、hsa-miR-125a-5p、hsa-let-7i-5p、hsa-miR-100-5p、hsa-miR-155-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-200a-5p、hsa-miR-200b-3p、hsa-let-7e-5p、hsa-miR-222-3p、hsa-miR-125b-5p、hsa-miR-205-5pからなるmiRNAであることを特徴とする請求項4又は5記載の歯周炎バイオマーカー。

[請求項7] 参照標準として、hsa-miR-324-5p、hsa-miR

−29c−5p、hsa-miR-107、hsa-miR-324−3p、hsa-miR-30d−5pの少なくとも1つ以上を含むことを特徴とする請求項4〜6のいずれか1項記載の歯周炎バイオマーカー。

[請求項8]

hsa-miR-223−3p、hsa-miR-101−3p、hsa-miR-374a−5p、hsa-miR-582−5p、hsa-miR-145−5p、hsa-miR-20a−3p、hsa-miR-194−5p、hsa-miR-26b−5p、hsa-miR-301a−3p、hsa-miR-140−5p、hsa-miR-590−5p、hsa-miR-30e−5p、hsa-miR-19a−3p、hsa-miR-338−3p、hsa-miR-126−5p、hsa-miR-144−5p、hsa-miR-144−3p、hsa-miR-30e−3p、hsa-miR-20a−5p、hsa-miR-16−5p、hsa-miR-19b−3p、hsa-miR-15a−5p、hsa-miR-142−5p、hsa-miR-143−3p、hsa-miR-106b−5pからなる群から選択される少なくとも1つ、

及びhsa-miR-200c−3p、hsa-miR-31−3p、hsa-miR-181b−5p、hsa-miR-203a、hsa-miR-200c−5p、hsa-miR-187−3p、hsa-miR-200b−5p、hsa-miR-99a−5p、hsa-miR-320a、hsa-miR-210−3p、hsa-miR-125a−5p、hsa-let-7i−5p、hsa-miR-100−5p、hsa-miR-155−5p、hsa-miR-21−3p、hsa-miR-200a−5p、hsa-miR-200b−3p、hsa-let-7e−5p、hsa-miR-222−3p、hsa-miR-125b−5p、hsa-miR-205−5p、hsa-let-7b−5p、hsa-miR-1

93b-3p、hsa-miR-221-3p、hsa-miR-365a-3p、hsa-miR-22-3pからなる群から選択される少なくとも1つのmiRNAの発現量を検出するための配列を有する核酸を固定したアレイを含む歯周炎検査キット。

[請求項9] 前記アレイが少なくともhsa-miR-223-3p、及びhsa-miR-200c-3pの発現量を検出するための配列を有する核酸を固定したものであることを特徴とする請求項8記載の歯周炎検査キット。

[請求項10] 前記アレイが、
少なくともhsa-miR-223-3p、hsa-miR-101-3p、hsa-miR-374a-5p、hsa-miR-582-5p、hsa-miR-145-5p、hsa-miR-20a-3p、hsa-miR-194-5p、hsa-miR-26b-5p、hsa-miR-301a-3p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-590-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-19a-3p、hsa-miR-338-3p、hsa-miR-126-5p、hsa-miR-144-5p、hsa-miR-144-3p、hsa-miR-30e-3p、hsa-miR-20a-5p、hsa-miR-200c-3p、hsa-miR-31-3p、hsa-miR-181b-5p、hsa-miR-203a、hsa-miR-200c-5p、hsa-miR-187-3p、hsa-miR-200b-5p、hsa-miR-99a-5p、hsa-miR-320a、hsa-miR-210-3p、hsa-miR-125a-5p、hsa-let-7i-5p、hsa-miR-100-5p、hsa-miR-155-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-200a-5p、hsa-miR-200b-3p、hsa-let-7e-5p、hsa-miR-222-3p、hsa-miR-125b

－5 p、h s a－m i R－2 0 5－5 pの発現量を検出するための配列を有する核酸を固定したアレイであることを特徴とする請求項8又は9記載の歯周炎検査キット。

[請求項11] 参照標準として、h s a－m i R－3 2 4－5 p、h s a－m i R－2 9 c－5 p、h s a－m i R－1 0 7、h s a－m i R－3 2 4－3 p、h s a－m i R－3 0 d－5 pの少なくとも1つ以上をアレイに含むことを特徴とする請求項8～10のいずれか1項記載の歯周炎検査キット。

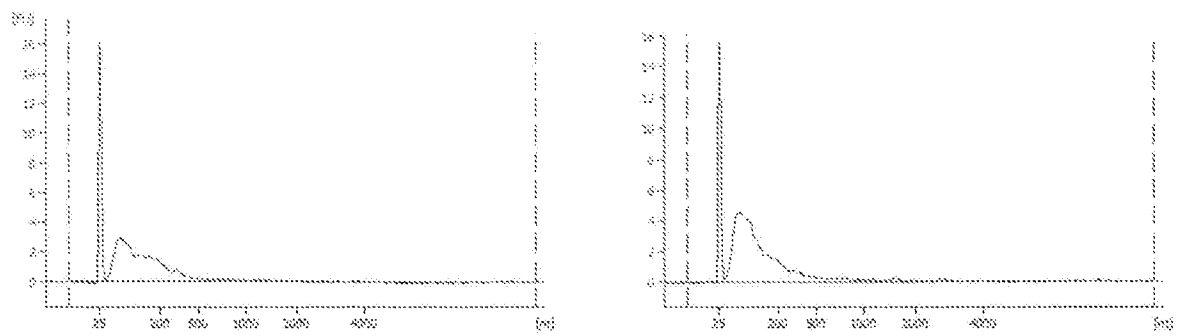
[請求項12] 歯肉溝滲出液採取用ペーパーストリップ、
m i R N A抽出試薬、
m i R N A検出試薬を含むことを特徴とする請求項8～11いずれか1項記載の歯周炎検査キット。

[請求項13] 歯毎に採取された歯肉溝滲出液からm i R N Aを抽出し、
h s a－m i R－2 2 3－3 p、h s a－m i R－2 0 0 c－3 p、
h s a－m i R－1 0 1－3 p、h s a－m i R－3 7 4 a－5 p、
h s a－m i R－5 8 2－5 p、h s a－m i R－1 4 5－5 p、
h s a－m i R－2 0 a－3 p、h s a－m i R－1 9 4－5 p、
h s a－m i R－2 6 b－5 p、h s a－m i R－3 0 1 a－3 p、
h s a－m i R－1 4 0－5 p、h s a－m i R－5 9 0－5 p、
h s a－m i R－3 0 e－5 p、h s a－m i R－1 9 a－3 p、
h s a－m i R－3 3 8－3 p、h s a－m i R－1 2 6－5 p、
h s a－m i R－1 4 4－5 p、h s a－m i R－1 4 4－3 p、
h s a－m i R－3 0 e－3 p、h s a－m i R－2 0 a－5 p、
h s a－m i R－1 6－5 p、h s a－m i R－1 9 b－3 p、
h s a－m i R－1 5 a－5 p、h s a－m i R－1 4 2－5 p、
h s a－m i R－1 4 3－3 p、h s a－m i R－1 0 6 b－5 p、
h s a－m i R－1 9 9 b－5 p、h s a－m i R－6 2 8－5 p、
h s a－m i R－1 9 4－3 p、h s a－m i R－6 3 6、h s a－m i R－4 5 0 b－

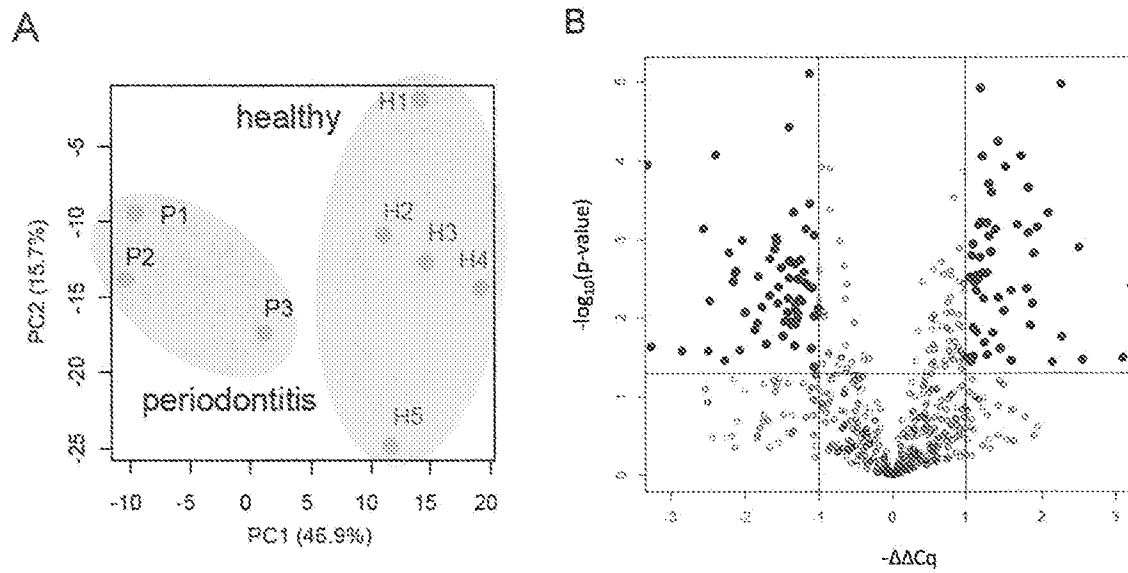
5 p、hsa-miR-192-5 p、hsa-miR-338-5 p、hsa-miR-215-5 p、hsa-miR-548e-3 p、hsa-miR-16-1-3 p、hsa-miR-30c-5 p、hsa-miR-340-3 p、hsa-miR-30a-5 p、hsa-miR-374b-3 p、hsa-miR-611、hsa-miR-454-3 p、hsa-miR-340-5 p、hsa-miR-616-3 p、hsa-miR-590-3 p、hsa-miR-374b-5 p、hsa-miR-545-3 p、hsa-miR-525-5 p、hsa-miR-301b、hsa-miR-646、hsa-miR-216b-5 p、hsa-miR-582-3 p、hsa-miR-1256、hsa-miR-518c-5 p、hsa-miR-627-5 p、hsa-miR-142-3 p、hsa-miR-124-3 p、hsa-miR-934、hsa-miR-510-5 p、hsa-miR-298、hsa-miR-1181、hsa-miR-31-3 p、hsa-miR-181b-5 p、hsa-miR-203a、hsa-miR-200c-5 p、hsa-miR-187-3 p、hsa-miR-200b-5 p、hsa-miR-99a-5 p、hsa-miR-320a、hsa-miR-210-3 p、hsa-miR-125a-5 p、hsa-let-7i-5 p、hsa-miR-100-5 p、hsa-miR-155-5 p、hsa-miR-21-3 p、hsa-miR-200a-5 p、hsa-miR-200b-3 p、hsa-let-7e-5 p、hsa-miR-222-3 p、hsa-miR-125b-5 p、hsa-miR-205-5 p、hsa-let-7b-5 p、hsa-miR-193b-3 p、hsa-miR-221-3 p、hsa-miR-365a-3 p、hsa-miR-22-3 p、hsa-miR-511-5 p、hsa-miR-382-3 p、hsa-miR-1247-5 p、hsa-miR-1

25b-1-3p、hsa-miR-549a、hsa-miR-155-3p、hsa-miR-30b-3p、hsa-miR-205-3p、hsa-miR-449a、hsa-miR-135-3p、hsa-miR-222-5p、hsa-miR-641、hsa-miR-193b-5p、hsa-miR-1260a、hsa-miR-27b-5p、hsa-miR-335-3p、hsa-miR-125-2-3p、hsa-miR-92a-1-5p、hsa-miR-99b-5p、hsa-miR-99b-3p、hsa-miR-99a-3p、hsa-miR-151a-5p、hsa-miR-152-3p、hsa-miR-615-3p、hsa-let-7e-3p、hsa-miR-34c-3p、hsa-miR-663a、hsa-miR-150-5p、hsa-miR-671-3p、hsa-miR-1972、hsa-miR-181a-3p、hsa-miR-34b-3p、hsa-miR-30d-3p、hsa-miR-151a-3p、hsa-miR-320c、hsa-miR-320b、hsa-miR-455-5p、hsa-miR-593-3p、hsa-miR-95-3p、hsa-miR-193a-3p、hsa-miR-877-5p、hsa-miR-34c-5p、hsa-miR-342-5p、hsa-miR-26a-5p、hsa-miR-424-5pからなる群から選択される少なくとも1つ以上のmiRNA量を検出することを特徴とする歯周炎の検査方法。

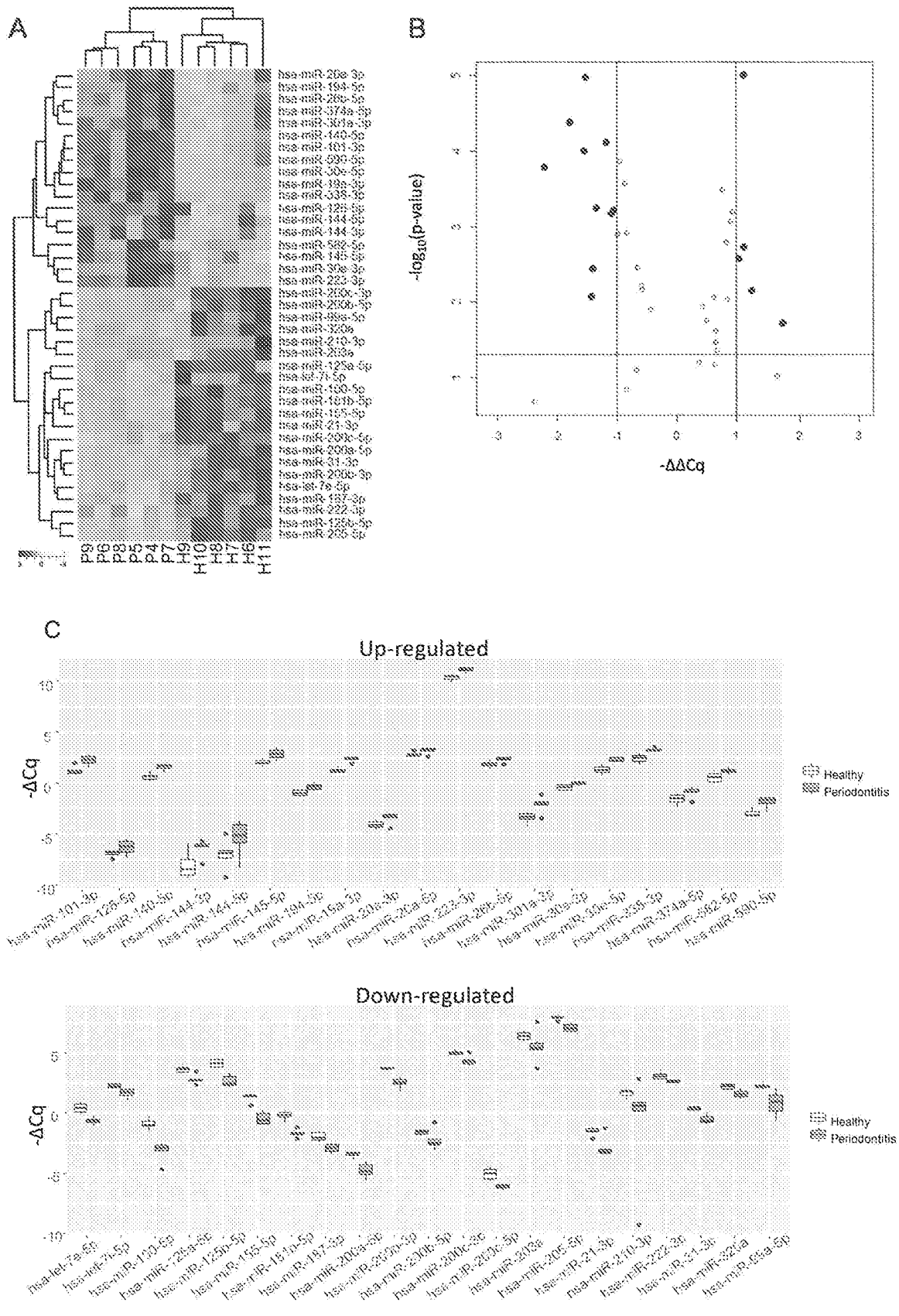
[図1]



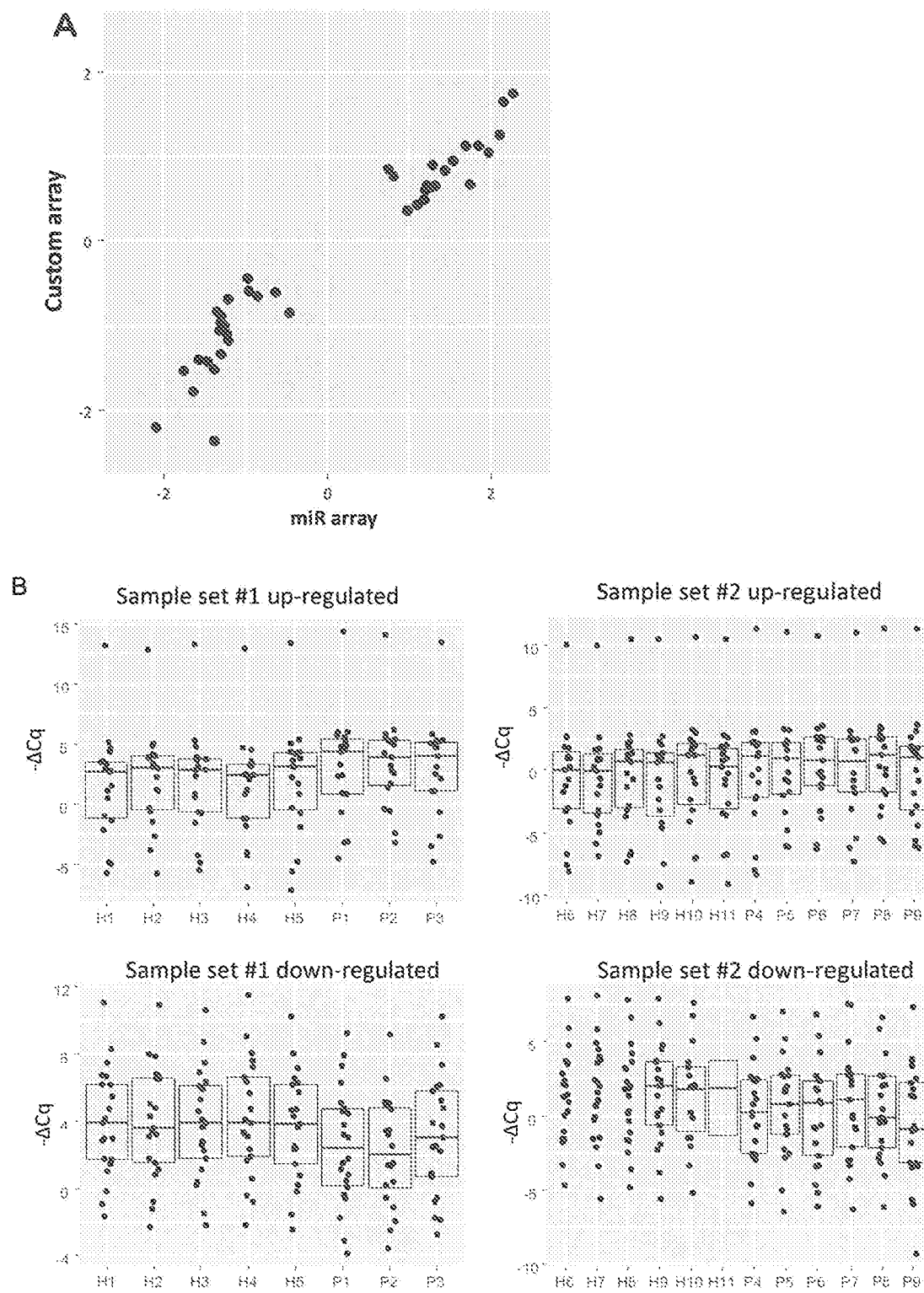
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/063846

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2008-206483 A (Hiroshima University), 11 September 2008 (11.09.2008), claims 1 to 7; paragraph [0028] (Family: none)	1-13
Y	OGATA, Y. et al., "MicroRNA expression in inflamed and noninflamed gingival tissues from Japanese patients.", J. ORAL SCI., 2014.12, Vol.56, No.4, pp.253-260, ISSN 1343-4934, particularly, abstract, fig. 1, table 1	1-13
Y	XIE, Y.F. et al., "Comparison of microRNA profiles of human periodontal diseased and healthy gingival tissues.", INT. J. ORAL SCI., 2011.07, Vol.3, No.3, pp.125-134, ISSN 1674- 2818, particularly, abstract, fig. 1 to 2, table 2	1-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 July 2016 (29.07.16)

Date of mailing of the international search report

09 August 2016 (09.08.16)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office

3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,

Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/063846

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	STOECKLIN-WASMER, C. et al., "MicroRNAs and their target genes in gingival tissues.", J. DENT. RES., 2012.10, Vol.91, No.10, pp.934-940, ISSN 0022-0345, particularly, abstract, tables 1 to 2	1-13
Y	PERRI, R. et al., "MicroRNA modulation in obesity and periodontitis.", J. DENT. RES., 2012.01, Vol.91, No.1, pp.33-38, ISSN 0022-0345, particularly, abstract, fig. 1 to 2, table 1	1-13
A	JP 2010-256190 A (Kao Corp.), 11 November 2010 (11.11.2010), claims 1 to 5 & US 2012/0015397 A1 claims 1 to 5 & WO 2010/122946 A1 & EP 2423683 A1	1-13
A	JP 2004-129584 A (Applied Cell Biotechnologies, Inc.), 30 April 2004 (30.04.2004), claims 1 to 2 & WO 2004/033716 A1	1-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), MEDLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2008-206483 A (国立大学法人広島大学) 2008.09.11, 請求項1-7、段落28 (ファミリーなし)	1-13
Y	OGATA, Y. et al., "MicroRNA expression in inflamed and noninflamed gingival tissues from Japanese patients.", J. ORAL SCI., 2014.12, Vol.56, No.4, pp.253-260, ISSN 1343-4934, 特に、アブストラクト、図1、表1	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.07.2016

国際調査報告の発送日

09.08.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

野村 英雄

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

4155

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	XIE, Y.F. et al., "Comparison of microRNA profiles of human periodontal diseased and healthy gingival tissues.", INT. J. ORAL SCI., 2011.07, Vol.3, No.3, pp.125-134, ISSN 1674-2818, 特に、アブストラクト、図1-2、表2	1-13
Y	STOECKLIN-WASMER, C. et al., "MicroRNAs and their target genes in gingival tissues.", J. DENT. RES., 2012.10, Vol.91, No.10, pp.934-940, ISSN 0022-0345, 特に、アブストラクト、表1-2	1-13
Y	PERRI, R. et al., "MicroRNA modulation in obesity and periodontitis.", J. DENT. RES., 2012.01, Vol.91, No.1, pp.33-38, ISSN 0022-0345, 特に、アブストラクト、図1-2、表1	1-13
A	JP 2010-256190 A (花王株式会社) 2010.11.11, 請求項1-5 & US 2012/0015397 A1, 請求項1-5 & WO 2010/122946 A1 & EP 2423683 A1	1-13
A	JP 2004-129584 A (株式会社エーシーバイオテクノロジー) 2004.04.30, 請求項1-2 & WO 2004/033716 A1	1-13