

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6475853号
(P6475853)

(45) 発行日 平成31年2月27日(2019.2.27)

(24) 登録日 平成31年2月8日(2019.2.8)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/50 (2006.01)
 GO 1 N 33/50 Z N A P
 GO 1 N 33/50 R

請求項の数 3 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2017-544611 (P2017-544611)	(73) 特許権者	516348577
(86) (22) 出願日	平成28年2月19日 (2016.2.19)		エムディー ヘルスケア インコーポレイ テッド
(65) 公表番号	特表2018-508510 (P2018-508510A)		MD HEALTHCARE INC.
(43) 公表日	平成30年3月29日 (2018.3.29)		大韓民国 ソウル 03923、マボーグ 、ワールド カップ ブクーロ 56ーギ ル、9、#1303、(サンアムードン、 ウリィ テクノロジー ビルディング)
(86) 国際出願番号	PCT/KR2016/001665		
(87) 国際公開番号	W02016/137164	(74) 代理人	110000729
(87) 国際公開日	平成28年9月1日 (2016.9.1)		特許業務法人 ユニアス国際特許事務所
審査請求日	平成29年12月22日 (2017.12.22)	(72) 発明者	キム、ユンークン
(31) 優先権主張番号	10-2015-0025381		大韓民国 キョンギード 10895、パ チューシ、カラムーロ、70、413-2 01、(ワトントン、カラムマウル 4 ータンチ ハニャン スチェン)
(32) 優先日	平成27年2月23日 (2015.2.23)		最終頁に続く
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		

(54) 【発明の名称】 バシラス属細菌由来の細胞外ベシクルを含む妊娠関連疾患の治療用の組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記のステップを含む、早産の判定をする為の方法：

- (A) 妊産婦の尿から分離した細胞外ベシクルから 16 s rDNA を抽出するステップ；
- (B) 前記 16 s rDNA に対して配列番号 1 および配列番号 2 のプライマーペアを用いて PCR を行うステップ；および
- (C) 前記 PCR 産物の配列解析を通して、バシラス属細菌由来の細胞外ベシクルの分布が正常妊産婦に比べて 2 倍以上低い場合、早産の危険性が高いと判定するステップ。

【請求項 2】

前記 (A) ステップで細胞外ベシクルの分離は下記のステップを含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

- (a) 尿を 10 分ないし 30 分の間、沸かした後、冷却するステップ；
- (b) 前記冷却した産物を遠心分離して上澄み液を得るステップ；および
- (c) 前記上澄み液を 0.45 μm フィルターと 0.22 μm フィルターで順に濾過するステップ。

【請求項 3】

前記細胞外ベシクルは平均直径が 20 ~ 300 nm であることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

20

【技術分野】

【0001】

本発明は妊娠関連疾患の治療用の組成物に関するもので、より詳しくはバシラス属細菌から由来する細胞外ベシクルを有効成分として含む早産または乳がんの予防または治療用の薬学的組成物、および早産を診断するための方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

細菌は細胞の間の情報交換のためにナノメートルサイズの細胞外ベシクル (extracellular vesicles; EVs) を細胞外の環境に分泌する。グラム陰性菌 (gram-negative bacteria) 由来の細胞外ベシクル、または外膜小胞 (outer membrane vesicles; OMVs) は球形の二重膜構造のたんぱく質脂質で、よくナノベシクル (nanovesicles) とも呼ばれて、内毒素 (lipopolysaccharide) だけではなく、毒性たんぱく質と細菌の核酸である DNA と RNA も有している。グラム陽性菌 (gram-positive bacteria) 由来の細胞外ベシクルは毒性たんぱく質と核酸以外にも細菌の細胞壁の構成成分であるペプチドグリカン (peptidoglycan) およびリポテイコ酸 (lipoteichoic acid) も含有している。最近の研究によると、このような細菌由来の細胞外ベシクルが、以前に非感染性と信じていた炎症性疾患の発生に重要な役割をすることが報告された。

【0003】

一方、全世界的に毎年一千五百万の新生児が早熟児で生まれて、これは全世界の新生児の 1/10 以上を占めることと知られている。このような早産は、感染 (尿路感染症、膣感染症)、子宮と子宮頸部の奇形、体外受精、母親の栄養、遺伝学的因子が原因として知られている。また、多くの研究者は、子宮内感染が早産の 25 ~ 40 % を説明する重要な機転と提示している。妊産婦はホルモンと物理的な変化による大きな解剖学的、生理学的、生化学的な変化を経験することになる。例えば、乳酸菌 (Lactobacillus acidophilus) が増加した結果で膣の分泌物が増加し、質の pH が減少することになる。したがって、妊娠関連の微生物の研究を通じ、妊産婦と非妊産婦の膣と羊水のサイトカインの程度、pH の変化、感染への脆弱性の違いなどについての情報を得ることができる。

【0004】

女性の乳がんは韓国女性に二番目に多く発生するがんであり、1999 年から 2002 年まで年平均がん発生の中、乳がんが約 15 % で 2 位を占めていた。全世界的にはアメリカ、ヨーロッパ、オーストラリアを中心とした西洋人での発生が東洋人に比べて非常に高い特徴を示している。韓国女性の乳がんは、西洋人に比べて、はるかに低いレベルにあるが、大都市のいわゆる西洋化された環境の中で居住している女性の発生率が高いという事実と乳がんの発生が過去に比べて増加し続けている傾向にあるという力学的な現象は、韓国女性の人口集団内に乳がんの発生を誘発する要因が継続的に内在していて、がんの発生を加速させていることを意味すると見ることができる。初経年齢 (age at menarche) が早い場合、または閉経年齢 (age at menopause) が遅ければ遅いほど、規則的な生理周期に伴う血中のエストロゲン濃度が高く維持されるため、乳がんの危険性が高いと知られている。また、最初の臨月分娩の年齢が早い女性の場合、出産の 10 年以降から乳がん発生の危険は減少することが知られており、出産力が高い女性も乳がんの危険が低くなる。一方、出産の機会を一度も有していない女性の場合、乳がんの危険が最も高いと知られているが、妊娠の乳がんの予防効果に対する正確な機転は知られていない。乳がんの発生そのものを防止するための一次予防は、発がん環境の抑制、個人の健康行態および習慣の変化を含んでいる。例えば、肥満を抑制し初経が始まる年齢を可能な限り遅らせる方案またはホルモンなどの薬物による積極的な予防法も考慮されることができる。

【0005】

環境ゲノミクスとも呼ばれるメタゲノム学は、環境から採取したサンプルから得られたメタゲノム資料に関する解析学ということができる。最近 16 s リボソーム RNA (16 s rRNA) の塩基配列をベースにした方法で、人間の微生物叢の細菌構成をリスト化することができるようになり、16 s リボソーム RNA は 454 FLX titanium platform を用いて配列を解析する。これまで妊産婦から便、膣分泌物、羊水で解析したメタゲノムに関するの研究があったが、尿は無菌とされてきたため、尿では、妊娠中の細菌のメタゲノム解析研究がなかった。

【0006】

また、これまで細菌由来の細胞外ベシクルを用いて、妊娠誘導あるいは早産の予防を目的に用いる場合、また、乳がんの予防または治療のために用いた場合は、一度もないのが実情である。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明者は、上記のような従来の問題点の解決のために妊娠していない女性と妊産婦女性の尿から細胞外ベシクルの DNA を用いて、メタゲノム解析を行った結果、妊産婦女性、特に正常的に分娩した女性にバシラス属細菌由来の細胞外ベシクルが確実に増加されていることを確認することによって本発明を完成した。

それで、本発明はバシラス属細菌由来の細胞外ベシクルを有効成分として含む、早産または乳がんのような妊娠関連疾患の予防または治療用の薬学的組成物を提供することを目的にする。

20

【0008】

また、本発明は早産の診断方法を提供することを目的にする。
しかし、本発明が解決しようとする技術的な課題は以上で言及した課題に制限されなく、言及されていない他の課題は以下の記載から当業者に明確に理解されることができるだろう。

【課題を解決するための手段】

【0009】

上記のような本発明の目的を達成するために、本発明はバシラス属細菌由来の細胞外ベシクルを有効成分として含む、妊娠関連疾患の予防または治療用の薬学的組成物を提供する。

30

【0010】

本発明の一具現例で、上記の細胞外ベシクルはバシラス属細菌の培養液または醗酵食品から分離されることができる。

【0011】

本発明の他の具現例で、上記の細胞外ベシクルはバシラス属細菌から自然的にまたは人工的に分泌されることを特徴とする。

【0012】

本発明の他の具現例で、上記の細胞外ベシクルは平均直径が 20 ~ 300 nm であることを特徴とする。

40

【0013】

本発明の他の具現例で、上記の妊娠関連疾患は早産であることができる。

【0014】

本発明の他の具現例で、上記の妊娠関連疾患は乳がんであることができる。
また、本発明はバシラス属細菌由来の細胞外ベシクルを有効成分として含む、正常妊娠誘導用の組成物を提供する。

【0015】

本発明の一具現例で、上記の細胞外ベシクルはバシラス属細菌の培養液または醗酵食品から分離されることができる。

【0016】

50

本発明の他の具現例として、上記の細胞外ベシクルはバシラス属細菌から自然的にまた人工的に分泌されることを特徴とする。

【0017】

本発明の他の具現例で、上記の細胞外ベシクルは平均直径が20～300nmであることを特徴とする。

【0018】

また、本発明は下記のステップを含む、早産の診断方法を提供する。

(A) 妊産婦の尿から分離した細胞外ベシクルから16srDNAを抽出するステップ；

(B) 上記の16srDNAに対して配列番号1および配列番号2のプライマーペアを用いてPCRを行うステップ；および

(C) 上記のPCR産物の配列解析を通して、バシラス属細菌由来の細胞外ベシクルの分布が正常妊産婦に比べて2倍以上低い場合、早産の危険性が高いと判定するステップ。

本発明の一具現例として、上記の(A)ステップで細胞外ベシクルの分離は下記のステップを含むことができる。

(a) 尿を10分ないし30分の間、沸かした後、冷却するステップ；

(b) 上記の冷却した産物を遠心分離して上澄み液を得るステップ；および

(c) 上記の上澄み液を0.45μmフィルターと0.22μmフィルターで順に濾過するステップ。

本発明の他の具現例で、上記の細胞外ベシクルは平均直径が20～300nmであることを特徴とする。

また、本発明はバシラス属細菌由来の細胞外ベシクルを有効成分として含む組成物を個体に投与するステップを含む、妊娠関連疾患の予防または治療方法を提供する。

また、本発明はバシラス属細菌由来の細胞外ベシクルの妊娠関連疾患の予防または治療用途を提供する。

また、本発明はバシラス属細菌由来の細胞外ベシクルの早産診断用途を提供する。

【発明の効果】

【0019】

本発明のバシラス属細菌由来の細胞外ベシクルを有効成分として含む薬学的組成物は妊娠を誘導したり妊産婦の早産を予防することができ、乳がんのような妊娠関連疾患を予防または治療するのに用いることができ、妊産婦でバシラス属細菌由来の細胞外ベシクルの量を測定することにより、早産の危険性を診断するのに有用に用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1a】図1aおよび図1bはグラム陰性菌である大腸菌(*Escherichia coli*)とグラム陽性菌である黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)由来の細胞外ベシクルをマウスに筋肉注射で注入した後、尿に排泄されるかを確認するためのものであり、図1aは全身体内の蛍光イメージ、図1bはベシクルの投与の21時間以後に摘出したマウス臓器の特異的な体内の蛍光イメージを撮影した写真である。

【図1b】図1aおよび図1bはグラム陰性菌である大腸菌(*Escherichia coli*)とグラム陽性菌である黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)由来の細胞外ベシクルをマウスに筋肉注射で注入した後、尿に排泄されるかを確認するためのものであり、図1aは全身体内の蛍光イメージ、図1bはベシクルの投与の21時間以後に摘出したマウス臓器の特異的な体内の蛍光イメージを撮影した写真である。

【図2】図2は妊産婦(左側)と正常対照群である非妊産婦(右側)の尿から分離した細菌由来の細胞外ベシクルの様々な分類群を示す結果である。

【図3a】図3aないし図3dは正常対照群である非妊産婦(青い下線、右側)と妊産婦(赤い下線、左側)の尿から分離した細菌由来の細胞外ベシクルの構成成分を解析した結

10

20

30

40

50

果であり、門 (p h y l u m) (図 3 a)、綱 (c l a s s) (図 3 b)、目 (o r d e r) (図 3 c)、および科 (f a m i l y) (図 3 d) の階級で解析した結果である。

【図 3 b】図 3 a ないし図 3 d は正常対照群である非妊産婦 (青い下線、右側) と妊産婦 (赤い下線、左側) の尿から分離した細菌由来の細胞外ベシクルの構成成分を解析した結果であり、門 (p h y l u m) (図 3 a)、綱 (c l a s s) (図 3 b)、目 (o r d e r) (図 3 c)、および科 (f a m i l y) (図 3 d) の階級で解析した結果である。

【図 3 c】図 3 a ないし図 3 d は正常対照群である非妊産婦 (青い下線、右側) と妊産婦 (赤い下線、左側) の尿から分離した細菌由来の細胞外ベシクルの構成成分を解析した結果であり、門 (p h y l u m) (図 3 a)、綱 (c l a s s) (図 3 b)、目 (o r d e r) (図 3 c)、および科 (f a m i l y) (図 3 d) の階級で解析した結果である。

10

【図 3 d】図 3 a ないし図 3 d は正常対照群である非妊産婦 (青い下線、右側) と妊産婦 (赤い下線、左側) の尿から分離した細菌由来の細胞外ベシクルの構成成分を解析した結果であり、門 (p h y l u m) (図 3 a)、綱 (c l a s s) (図 3 b)、目 (o r d e r) (図 3 c)、および科 (f a m i l y) (図 3 d) の階級で解析した結果である。

【図 4】図 4 は正常分娩群と早産分娩群の妊産婦の尿から分離した細菌由来の細胞外ベシクルの分布を示す結果である。

【図 5】図 5 は正常分娩群と早産分娩群の妊産婦の尿から分離した細菌由来の細胞外ベシクルの分布を要約した結果である。

【図 6 a】図 6 a ないし図 6 d は早産分娩群 (緑下線、左側) と正常分娩群 (紫下線、右側) 妊産婦の尿から分離した細菌由来の細胞外ベシクルの分布を解析した結果であり、門 (p h y l u m) (図 6 a)、綱 (c l a s s) (図 6 b)、目 (o r d e r) (図 6 c)、および科 (f a m i l y) (図 6 d) の階級で解析した結果である。

20

【図 6 b】図 6 a ないし図 6 d は早産分娩群 (緑下線、左側) と正常分娩群 (紫下線、右側) 妊産婦の尿から分離した細菌由来の細胞外ベシクルの分布を解析した結果であり、門 (p h y l u m) (図 6 a)、綱 (c l a s s) (図 6 b)、目 (o r d e r) (図 6 c)、および科 (f a m i l y) (図 6 d) の階級で解析した結果である。

【図 6 c】図 6 a ないし図 6 d は早産分娩群 (緑下線、左側) と正常分娩群 (紫下線、右側) 妊産婦の尿から分離した細菌由来の細胞外ベシクルの分布を解析した結果であり、門 (p h y l u m) (図 6 a)、綱 (c l a s s) (図 6 b)、目 (o r d e r) (図 6 c)、および科 (f a m i l y) (図 6 d) の階級で解析した結果である。

30

【図 6 d】図 6 a ないし図 6 d は早産分娩群 (緑下線、左側) と正常分娩群 (紫下線、右側) 妊産婦の尿から分離した細菌由来の細胞外ベシクルの分布を解析した結果であり、門 (p h y l u m) (図 6 a)、綱 (c l a s s) (図 6 b)、目 (o r d e r) (図 6 c)、および科 (f a m i l y) (図 6 d) の階級で解析した結果である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 1 】

本発明はバシラス属細菌由来の細胞外ベシクルを有効成分として含む妊娠関連疾患の予防または治療用の薬学的組成物を提供する。

本発明で用いられる用語、「予防」とは本発明による薬学的組成物の投与による妊娠関連疾患を抑制させたり、発病を遅延されるすべての行為を意味する。

40

本発明で用いられる用語、「治療」とは、本発明による薬学的組成物の投与によって妊娠関連疾患による症状が好転したり有利に変更されるすべての行為を意味する。

本発明の上記のバシラス属細菌由来の細胞外ベシクルは自然的に分泌されたり、または人工的に分泌される細胞外ベシクルを含めて、バシラス属細菌の培養液から分離されたり、またはバシラス属細菌で醗酵させた食品から分離されることができる。上記の細菌培養液または上記の細菌添加醗酵食品から細胞外ベシクルを分離する方法は、細胞外ベシクルを含めば、特に制限されなく、たとえば、培養液や醗酵食品から、遠心分離、超高速遠心分離、フィルターによる濾過、ゲルろ過クロマトグラフィー、フリーフロー電気泳動、キャピラリー電気泳動などの方法およびこれらの組み合わせを用いて細胞外ベシクルを分離することができる。または、不純物の除去のための洗浄、得られた細胞外ベシクルの濃縮な

50

どの過程を追加に含むことができる。

【0022】

上記の方法により分離された細胞外ベシクルは平均直径20～300nmであることができ、望ましくは50～200nmであることができるが、これに制限されるものではない。

【0023】

本発明の上記の妊娠関連疾患は妊娠と関連されて妊娠中あるいは妊娠後に発生されたり、または妊娠の結果として抑制される疾患を総称する。妊娠中に発生する代表的な例では早産があり、妊娠により発生が抑制される疾患として乳がんを挙げられるが、これに制限されるものではない。

10

【0024】

また、本発明はバシラス属細菌由来の細胞外ベシクルを有効成分として含む正常妊娠誘導用の組成物を提供する。

【0025】

本発明では正常分娩をした妊産婦と早産をした妊産婦、および正常対照群である非妊産婦を研究対照群にして、一般的な特徴を調査して統計的な有意性を解析した。本発明の一実施例では、研究対照群の特徴調査結果、正常分娩群と早産分娩群で妊娠週数が有意な違いを示したし、早産群でアプガー指数 (apgar score) が有意に低いことを確認した (実施例1参考)。

【0026】

20

本発明で用いられた用語、「アプガー指数 (apgar score)」とは、1952年、麻酔科医者であるヴァージニア・アプガーにより考案されたもので、生まれたばかりの新生児の健康状態を迅速に評価するために作成されたスコアシステムを意味する。つまり、分娩時の麻酔が新生児にどのような影響があるか調べるためのスコアとして、一般的に出産の1分後と5分後に行われて、肌の色、脈拍、反射と過敏性、筋の緊張度、および呼吸の5つの基準を有してスコアを付ける。出生の1分後に検査する際に低い点数を受ける場合、新生児は、医学的に助けが必要であるが、長期的な問題が生じることを意味することではない。

【0027】

本発明の他の実施例では、尿に細菌由来の細胞外ベシクルが排泄されるかどうかを確認するためにグラム陰性菌である大腸菌 (*Escherichia coli*) とグラム陽性菌である黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) から分離した細胞外ベシクルをマウスに筋肉注射で注入した。注入の3、6時間の後、マウスの尿を通して細胞外ベシクルが排泄されることを確認したし、臓器を摘出して解析した結果、二つの細菌由来の細胞外ベシクルが肝と腎臓に存在することを確認した (実施例2参考)。

30

【0028】

本発明の他の実施例では、実施例2の結果を基に、上記の正常分娩群および早産分娩群の妊産婦と非妊産婦の尿を採取して尿内の細胞外ベシクルからDNAを抽出した後メタゲノム解析を行った (実施例3参考)。

【0029】

40

その結果、非妊産婦からなる正常対照群と妊産婦の尿から分離した細胞外ベシクルの分布の差を解析した場合、正常対照群にはシュドモナス (*Pseudomonas*) 属細菌由来の細胞外ベシクルが多く分布したし、バシラス (*Bacillus*) 属細菌由来のベシクルは正常対照群に比べて妊産婦に非常に高く分布することを確認した (実施例4参考)。

【0030】

本発明の他の実施例では、妊産婦の中で正常分娩群と早産分娩群の尿から分離した細胞外ベシクルの分布の差を解析した。その結果、早産をした妊産婦の尿でメチロバクテリウム (*Methylobacterium*)、ウレアプラズマ (*Ureaplasma*)、およびベイロネラ (*Veillonella*) 菌から由来した細胞外ベシクルが増加され

50

ている一方、正常分娩をした妊産婦の尿にはバシラス (*B a c i l l u s*) 属細菌由来の細胞外ベシクルが多量に分布していることを確認した (実施例 5 参考)。

【 0 0 3 1 】

本発明による薬学的な組成物はバシラス属細菌由来の細胞外ベシクルを有効成分として含めて、薬学的に許容可能な担体を含むことができる。上記の薬学的に許容可能な担体は製剤の際に通常的に用いられることで、食塩水、滅菌水、リンゲル液、緩衝食塩水、シクロデキストリン、デキストロース溶液、マルトデキストリン溶液、グリセロール、エタノール、リボソームなどを含むが、これに限定されず、必要に応じて抗酸化剤、緩衝液などの他の通常の添加剤をさらに含むことができる。また、希釈剤、分散剤、界面活性剤、結合剤、潤滑剤などを付加的に添加して水溶液、懸濁液、乳濁液などの注射用剤形、丸薬、カプセル、顆粒または錠剤に製剤化することができる。適切な薬学的に許容される担体と製剤化に関しては、レミントンの文献 (*Remington's Pharmaceutical Science*, Mack Publishing Company, Easton PA) に開示されている方法を用いて各成分に基づいて望ましく製剤化することができる。本発明の薬学的組成物は、剤形に特別な制限はないが、注射剤、吸入剤、皮膚外用剤などに製剤化することができる。

10

【 0 0 3 2 】

本発明の薬学的組成物は目的にする方法により経口投与したり、非経口投与 (例えば、静脈内、皮下、腹腔内または局所に適用) することができ、投与量は患者の状態および体重、疾病の程度、薬物の形態、投与の経路および時間により異なるが、当業者により適切に選択されることができる。

20

【 0 0 3 3 】

本発明による組成物は薬学的に有効な量で投与する。本発明において、「薬学的に有効な量」は医学的な治療に適用可能な合理的な恩恵 / 危険の比率で疾患を治療するのに十分な量を意味して、有効容量のレベルは患者の疾患の種類、重症度、薬物の活性、薬物に対する敏感度、投与の時間、投与の経路および排出の比率、治療期間、同時に用いられる薬物を含む要素および他の医学分野でよく知られている要素により決定されることができる。本発明による組成物は個別の治療剤で投与したり、他の治療剤と併用して投与されることができ、従来の治療剤とは順次に、または同時に投与されることができ、単一または多重投与されることができる。上記した要素をすべて考慮して副作用なしの最小限の量で最大の効果を得ることができる量を投与することが重要であり、これは当業者により容易に決定されることができる。

30

【 0 0 3 4 】

詳しくは、本発明による組成物の有効量は患者の年齢、性別、体重により異なることができ、一般的には体重 1 k g 当たり 0 . 0 0 1 ないし 1 5 0 m g、望ましくは 0 . 0 1 ないし 1 0 0 m g を毎日または隔日投与したり、1 日 1 ないし 3 回に分けて投与することができる。しかし、投与経路、肥満の重症度、性別、体重、年齢などにより増減されることができるので、上記の投与量がどのような方法でも本発明の範囲を限定するものではない。

【 0 0 3 5 】

本発明の他の様態として、本発明はバシラス属細菌由来の細胞外ベシクルを有効成分として含む薬学的組成物を個体に投与するステップを含む妊娠関連疾患の予防または治療方法を提供する。

40

【 0 0 3 6 】

本発明で「個体」とは疾病の治療を必要とする対象を意味し、より詳しくは、ヒトまたは非 - ヒトである霊長類、マウス (*m o u s e*)、ラット (*r a t*)、犬、猫、馬および牛などの哺乳類を意味する。

【 0 0 3 7 】

本発明の他の様態として、本発明は妊産婦の尿から分離した細胞外ベシクルから 1 6 s r D N A を抽出するステップ ; 上記の 1 6 s r D N A に対して配列番号 1 および配列

50

番号2のプライマーペアを用いてPCRを行うステップ；および上記のPCR産物の配列解析を通して、バシラス属細菌由来の細胞外ベシクルの分布が正常妊産婦に比べて2倍以上低い場合、早産の危険性が高いと判定するステップを含む早産の診断方法を提供する。

【0038】

本発明で上記の妊産婦の尿から分離した細胞外ベシクルからDNAを抽出する方法は尿を10分ないし30分の間、沸かした後、冷却するステップ；上記の冷却した産物を遠心分離して上澄み液を得るステップ；および上記の上澄み液を0.45μmフィルターと0.22μmフィルターで順に濾過するステップを含むが、これに制限されるものではない。

【0039】

以下、本発明の理解を助けるために、望ましい実施例を提示する。しかし、下記の実施例は本発明をよりわかりやすくするために提供されるものに過ぎず、下記の実施例により本発明の内容が限定されるものではない。

【実施例】

【0040】

実施例1．研究対象群の一般的な特徴

本発明の実施例では2006年から2008年まで檀国大学校と梨花女子大学校の梨花医療院に登録された73人の非妊産婦と74人の妊産婦（正常分娩39人、早産分娩35人）を対象に研究を行った。檀国大学校の病院で健康診断を受けた非妊産婦を正常対照群に設定し、実験群である74人の妊産婦の中、正常分娩と早産分娩は37週を基準に分類した。病院で分娩した37週末満の早産妊産婦を集め、正常分娩は病院で産前検診を受けた37週以上の妊娠期間を経て分娩した母親を対象にした。妊産婦の登録基準は、単生児であり、妊娠週数が25週間以上42週間未満の場合にし、登録の除外の基準は多生児、死産児、先天性奇形、慢性高血圧、前置胎盤、胎盤早期剥離である場合とした。

【0041】

上記の非妊産婦および妊産婦は研究に参加する前、同意書に署名したし、熟練された調査者らが参加者らの力学的、臨床的な情報を収集した。体重、身長、血液は標準化された手順に従って収集し、ボディマス指数は体重を身長の二乗で割り算して計算した（ kg/m^2 ）。また、血液は夜間空腹状態で肘の内側の中間静脈から採血してEDTAチューブや血清チューブ（serum tube）に入れて、自動分析装置（automatic analyzer、Model 7180；Hitachi、Tokyo、Japan）を用いて、コレステロール、白血球、ヘモグロビン、アスパラギン酸アミノ基転移酵素、アラニンアミノ基転移酵素、高密度リポタンパク質、空腹時の血糖、クレアチニンを測定した。尿サンプルは、きれいな中間尿を用いており、無菌の尿容器に入れて保管した。妊産婦で妊娠週数の測定は最後の生理周期または最後の生理周期が明確ではない場合、最初の超音波測定を基準にしており、出産の情報はカルテを解析した。

【0042】

下記の表1に研究対象者である非妊産婦および妊産婦の一般的な特徴を示した。妊産婦で正常分娩群と早産分娩群を比べると、妊娠週数で有意な差を見せて（39.73 vs 33.57 weeks、 $p = 0.000$ ）、新生児の出生時の体重も早産群で有意に低かった（3342.13g vs 2179.17g、 $p = 0.000$ ）。または、早産群で正常対照群よりアプガー指数（apgar score）が有意に低いことを確認した（ $p < 0.05$ ）。しかし、二つの群の間に妊産婦の年齢（歳）は有意な違いを見せていなかった（ $p > 0.05$ ）。

【0043】

10

20

30

40

【表 1】

	正 常 対 照 群 (n = 7 2)	妊産婦		p v a l u e
		正常分娩 (n = 4 7)	早産分娩 (n = 3 6)	
妊産婦の特徴				
年齢 (歳)	3 2 . 2 (1 2 . 3)	3 1 . 9 6 (3 . 9 9)	3 3 . 1 1 (3 . 7 5)	0 . 7 9 7
妊 娠 週 数 (n、%)		3 9 . 7 3 (1 . 8 8)	3 3 . 5 7 (2 . 7 6)	0 . 0 0 0
未分娩婦		2 8 (5 9 . 5 7)	1 5 (4 1 . 6 7)	0 . 1 0 6
出産の結果				
出 生 体 重 (g)		3 3 4 2 . 1 3 (3 1 4 . 8 0)	2 1 7 9 . 1 7 (6 2 4 . 2 1)	0 . 0 0 0
アプガー指数、1分		9 . 6 6 (0 . 7 0 0)	7 . 6 7 (2 . 1 2)	0 . 0 0 0
アプガー指数、5分		9 . 9 8 (0 . 1 5)	8 . 8 6 (1 . 5 7)	0 . 0 0 0
子宮内成長遅延 (n、%)		0 (0 . 0 0)	4 (2 . 7 8)	—

【 0 0 4 4 】

実施例 2 . 細菌由来の細胞外ベシクルの排泄の確認

尿から細菌由来の細胞外ベシクルが排泄されるかを確認するためにグラム陰性菌である大腸菌 (*Escherichia coli*)、グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) から由来する細胞外ベシクルをマウスに筋肉注射で注入して、毎時間ごとに映像を撮影した。

【 0 0 4 5 】

上記の細菌の培養液から細胞外ベシクルを分離するために、まず、大腸菌 (*Escherichia coli*) と黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) を *Luria - Bertani* 培地の上に 30 で培養した。その後、培養液を 30 分間 5 , 0 0 0 g で遠心分離して、上澄み液は 0 . 4 5 μ m フィルターを用いて濾過して、*QuixStand™* (GE Healthcare Bio-Sciences AB) で濃縮した。濃縮されたサンプルは 0 . 2 2 μ m フィルターで再び 1 回濾過して細胞外ベシクルを分離した後、細胞外ベシクルのたんぱく質の濃度を *BCA assay* (Thermo Scientific) 方法で測定した。大腸菌と黄色ブドウ球菌由来の細胞外ベシクルは *cy7* (GE Healthcare) で 1 時間室温で表示した後、20 μ g / mouse でマウスに筋肉注射で注入した。定められた時間に *IVIS ϕ c spectrum CT* (*Select Science ϕ c*) を用いて 7 8 0 ~ 8 0 0 nm の波長でマウスをスクリーニングした。臓器は摘出して *IVIS ϕ c spectrum CT* を用いて蛍光を測定した。

【 0 0 4 6 】

その結果、図 1 a に示すように、上記の二つの細菌由来の細胞外ベシクル、すべて注入 3、6 時間以後、尿で排泄された。また、図 1 b に示すように、注入 12 時間の後、臓器を摘出した際に、大腸菌と黄色ブドウ球菌由来の二つの細胞外ベシクル、すべて肝と腎臓に存在することを確認した。結論的に、上記の結果を通して、細菌由来の細胞外ベシクル

が部分的には尿で排泄されることを分けることができる。

【 0 0 4 7 】

実施例 3 . 尿サンプル内の細胞外ベシクルで DNA メタゲノム解析

3 - 1 . 尿から DNA の分離

正常分娩の妊産婦と早産分娩の妊産婦、非妊産婦の女性の尿内に存在する細胞外ベシクルから DNA を分離した。

各正常対照群および実験群の女性の尿 1 ml を採取して 1 0 0 で 1 5 分間沸かした。沸かした尿サンプルを氷に 5 分間置いてから、1 0 , 0 0 0 g で 4 に 2 0 分間遠心分離した。上澄み液は 4 に保管して、分離した DNA はメタゲノム解析を行う前に nano - drop で分離された DNA の量と質を測定した。

10

【 0 0 4 8 】

3 - 2 . 尿内のベシクルから分離した DNA メタゲノム解析

実施例 3 - 1 の尿から分離した細胞外ベシクルの DNA でメタゲノム解析を実施した。

【 0 0 4 9 】

まず、それぞれのクローンを V 1 - V 3 region 増幅のため 1 6 s rDNA fusion primer と Fast Start High Fidelity PCR System (Roche , Basel , Switzerland) を用いて、DNA 解析のためにポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction ; PCR) を行った。上記の 1 6 s rDNA fusion primer の配列は下記の表 2 に示した。

20

【 0 0 5 0 】

【表 2】

プライマー		配列	配列番号
2 7 F	F o r w a r d	5' - G A G T T T G A T C M T G G C T C A G - 3'	1
5 1 8 R	R e v e r s e	5' - W T T A C C G C G G C T G C T G G - 3'	2

* M : A または C

30

* W : A または T

【 0 0 5 1 】

PCR を通した増幅反応はエマルジョン状態 (オイルと amplicon が混合された状態) で行われて、GS - FLX plus emPCR Kit (4 5 4 Life Sciences) を用いた Tissue Lyser II (Qiagen) で増幅混合物と単独粒子を含むマイクロリアクター (「 micro - reactors 」) を作るために実施した。エマルジョンは 9 6 - well プレートに分けて盛って、メーカーから提案されたプロトコルに従い PCR を行った (9 4 で 3 分間、次に 9 4 で 1 5 秒間 3 5 サイクル、5 5 で 4 5 秒間、そして 7 2 で 1 分間、最後のステップは 7 2 で 8 分間実施) 。それぞれの DNA サンプル 2 0 ng を 5 0 μ l PCR 反応に用いた。エマルジョン PCR (emulsion PCR ; emPCR) を行って、各 DNA を増幅の後、amplicon は AMPure Bead kit (Beckman Coulter 、 Brea 、 CA 、 USA) を用いて精製して、Picogreen method (Invitrogen 、 Carlsbad 、 CA 、 USA) を用いて定量化した。その後、amplicon を希釈して GS - FLX Titanium sequencer (Roche 、 Basel 、 Switzerland) を用いて解析した。PCR 増幅の後、エマルジョンは化学的に分解されて、amplified DNA library を有するビーズ (bead) は濾過を通して洗浄した。陽性であるビーズ (bead) は biotinylated primer A (complementary to adaptor A) を用いて精製したし、streptavidin - coated mag

40

50

netic beadsに付けるようにした。その後、magnetic beadsに付いたDNA library beadsを二重螺旋構造を溶かしてmagnetic beadsから分離して一本鎖DNAは流れるようにした。塩基は列primerは再び増幅された一本鎖DNAに作った。最後に、増幅された一本鎖DNAを有しているビーズはParticle Counter (Beckman Coulter)を用いて個数を数えた。塩基配列の解析はGenome Sequencer FLX titanium (454 Life Sciences)にして、それぞれのサンプルは70mm - 75mm PicoTiter plate (454 Life Sciences)のそれぞれにロードした。

【0052】

生物情報学を通じたメタゲノム解析のために品質点数(平均Phred点数>20)とread length(>300bp)をチェックして高品質の配列を集めた。UC LUSTとUSEARCH(Edgar、2010)を用いてOperational Taxonomy Unit(OUT)を解析したし、系統学的な分類はQIIME(Lozupone、et al.、2006)を用いて解析した。類似性に基づいて、すべて16s RNAの配列は次の系統学的な階級により分類した:種(species)>97%の類似性;属(genus)>94%の類似性;科(family)>90%の類似性;目(order)>85%の類似性;綱(class)>80%の類似性;門(phyllum)>75%の類似性。属(genus)の階級の細菌構成は妊産婦と正常対照群の間に2倍以上の有意な構成の差が見える場合、heatmapを画いた。階層的なクラスタリングは属(genus)の階級で妊産婦と正常対照群の間に2倍以上の有意な構成の差が見せたり、1%以上の平均構成を見せる場合、実施した。

【0053】

実施例4.メタゲノム解析を通じた細菌由来の細胞外ベシクルの分布差の解析

実施例3-2の方法で正常対象群である非妊産婦および実験群である正常分娩群と早産分娩群の妊産婦の尿から細胞外ベシクルからDNAを分離してメタゲノム解析を行った。

【0054】

その結果、図2に示すように、サンプルは二つの群に分類することができたが、一番目の群は妊産婦の尿サンプル群(左側)であって、二番目の群はほとんど正常対照群の尿サンプル群(右側)であった。図の右側には妊産婦と正常対照群で2倍以上の差を見せた分類群であり、1%以上の平均構成を見せた群である。また、属名のない分類の場合、科(family、f)または目(order、o)の名前を用いた。また、下記の表3に示すように、細菌構成で13個の分類の差が観察された。一番目の群(妊産婦)は二つのクラスターを、二番目の群(正常対照群)は三つのクラスターを作った。一番目の群は主にバシラス(Bacillus)細菌とその細胞外ベシクルで構成された。

【0055】

【表 3】

Taxon	mean of control	mean of pregnancy	fold change	p-value
Bacillus	0.1218%	45.6146%	374.3878	1.21E-36
Erythrobacteraceae (f)	0.9847%	2.8276%	2.8716	8.47E-05
Acinetobacter	2.8650%	1.1649%	0.4066	1.05E-04
Sphingomonas	1.5396%	0.6007%	0.3902	1.57E-03
Pseudomonas	14.2252%	4.0889%	0.2874	1.21E-16
Bradyrhizobiaceae (f)	1.5951%	0.4560%	0.2859	4.14E-03
Methylobacterium	7.2819%	1.5022%	0.2063	6.79E-11
Lactobacillus	8.4385%	1.6068%	0.1904	3.11E-03
Herbaspirillum	1.9899%	0.1409%	0.0708	1.77E-07
Pseudomonadaceae (f)	15.4593%	0.6549%	0.0424	9.58E-10
Atopobium	3.8597%	0.1017%	0.0264	4.39E-03
Allicyclobacillus	3.1655%	0.0325%	0.0103	7.55E-11
Alteromonadales (o)	5.4748%	0.0022%	0.0004	1.16E-08

【0056】

上記の表3の結果を通して、バシラス属細菌由来のベシクルは正常対照群（平均構成 = 0.12%）に比べて妊産婦（平均構成 = 45.61%）で最も多い細菌由来の細胞外ベシクルであって、逆にシュードモナス（*Pseudomonas*）属細菌由来の細胞外ベシクルは妊産婦（平均構成 = 4.09%）に比べて非妊産婦（平均構成 = 14.23%）で最も多い細菌由来の細胞外ベシクルであることを確認した。

【0057】

図3aないし図3dには、門（*phylum*）、綱（*class*）、目（*order*）、および科（*family*）の階級で妊産婦（赤い下線）と正常対照群（青い下線）の尿から分離した細菌由来の細胞外ベシクルの分布解析結果を示した。

【0058】

実施例5．メタゲノム解析を通じた正常分娩群と早産分娩群の妊産婦の尿からの細菌由来の細胞外ベシクルの分布差の解析

実施例3-1で正常分娩群と早産分娩群の妊産婦の尿から分離した細菌由来の細胞外ベ

シクルDNAを実施例3-2の方法でメタゲノム解析を行った。図4に正常分娩群と早産分娩群の妊産婦の尿から分離した細菌由来の細胞外ベシクルの分布を示したし、図5に上記の細胞外ベシクルの分布を要約して示した。また、図6aないし図6dに早産分娩群（緑下線、左側）と正常分娩群（紫下線、右側）の妊産婦の尿から分離した細菌由来の細胞外ベシクルの分布を門（*phylum*）、綱（*class*）、目（*order*）、および科（*family*）の階級で解析して示した。

【0059】

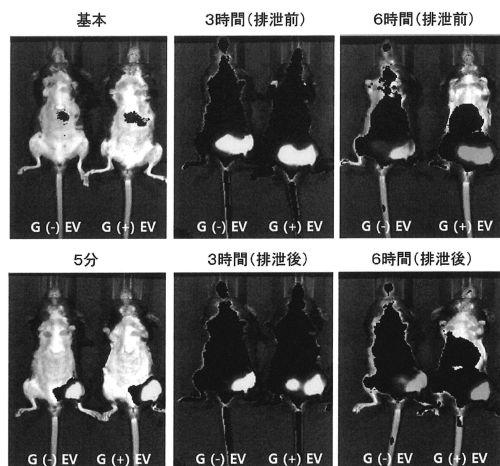
図4ないし図6の結果を総合して解析した結果、様々な細菌由来の細胞外ベシクルが正常分娩群と早産分娩群の尿に存在することを分かることができた。メチロバクテリウム（*Methylobacterium*）属由来の細胞外ベシクルは非妊産婦と早産をした妊産婦の尿に多かったし、代わりにバシラス（*Bacillus*）属細菌由来の細胞外ベシクルが減った。一方、正常分娩をした妊産婦ではメチロバクテリウム属由来の細胞外ベシクルがほとんど発見されなかった。また、ウレアプラズマ（*Ureaplasma*）とベイロネラ（*Veillonella*）由来の細胞外ベシクルである場合も正常分娩の母親より早産分娩の母親でよく発見された。

上記の結果を通して、早産分娩をした妊産婦より正常分娩をした妊産婦で他の細菌由来の細胞外ベシクルと異なりバシラス細菌由来の細胞外ベシクルが多いことを分かることができた。

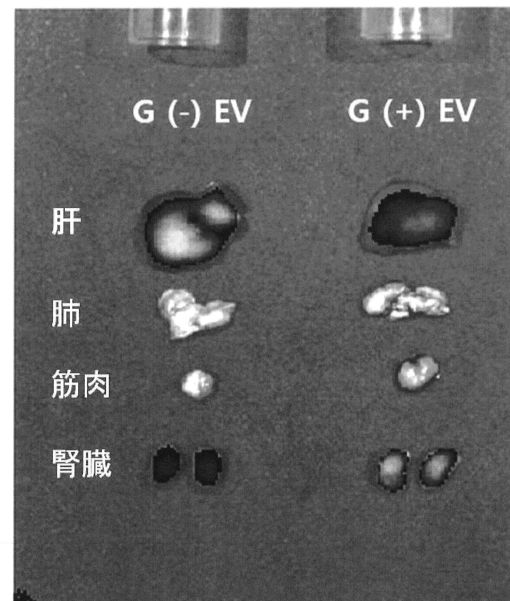
【0060】

上記のような本発明の説明は例示のためのものであり、本発明が属する技術分野の通常の知識を有するものは本発明の技術的思想や必須的な特徴を変更しなく、他の具体的な形態に容易に変形することができることを理解することができるだろう。したがって、上で技術した実施例はすべての点において例示的なものであり、限定的ではないものと理解するべきである。

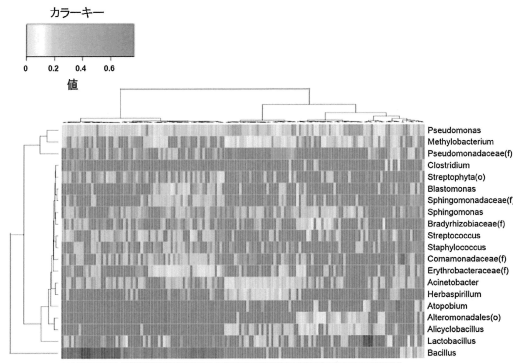
【図1a】



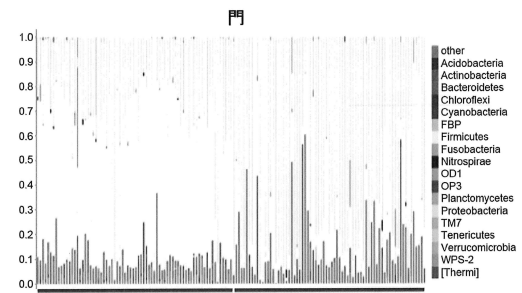
【図1b】



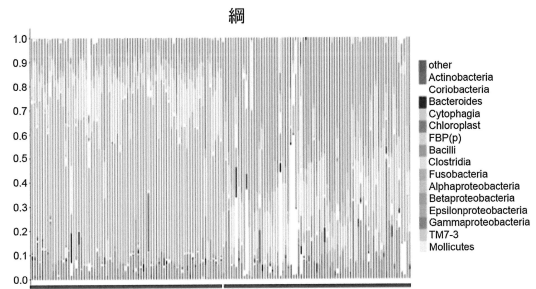
【図 2】



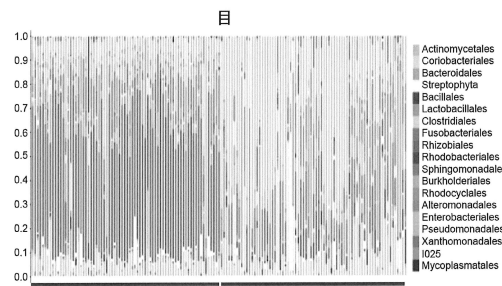
【図 3 a】



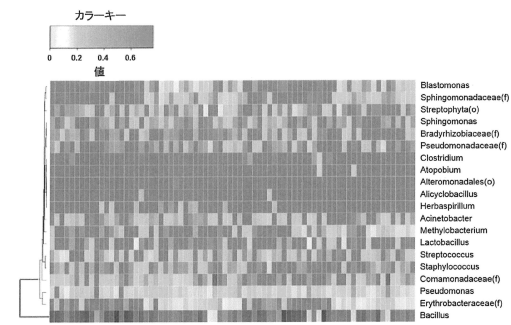
【図 3 b】



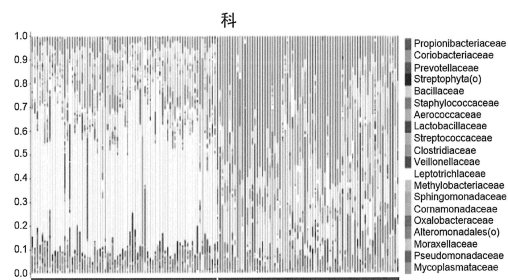
【図 3 c】



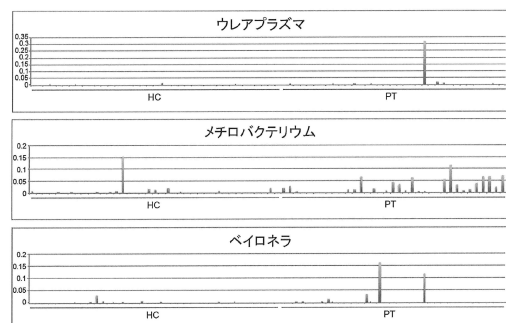
【図 4】



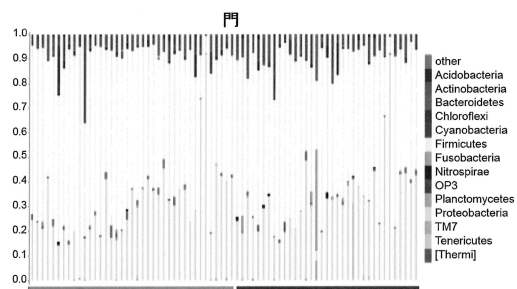
【図 3 d】



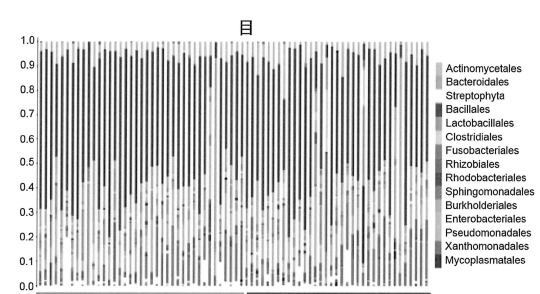
【図 5】



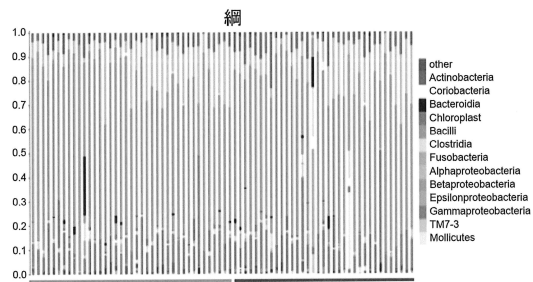
【図 6 a】



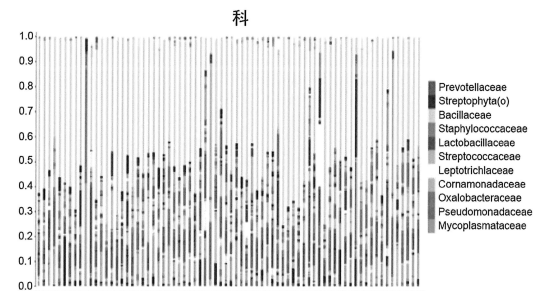
【図 6 c】



【図 6 b】



【図 6 d】



【配列表】

0006475853000001.app

 フロントページの続き

- (72)発明者 キム、ヨン - チュ
大韓民国 ソウル 07980、ヤンチョン - グ、モクトンソ - ロ、38、120 - 902、(モク - トン、モクトン 1 タンチ アパートメント)
- (72)発明者 チ、ヨン ク
大韓民国 キョンギ - ド 13608、ソンナム - シ、ブンタン - グ、チョンチャ - ロ、143、208 - 1702、(チョンチャ - トン、ハンソル マウル エルジー アパートメント)
- (72)発明者 ロ、ミナ
大韓民国 ソウル 06276、カンナム - グ、ソリョン - ロ、221、201 - 1003、(トコク - トン、トコク リグル アパートメント)
- (72)発明者 ムン、ビョン - イン
大韓民国 ソウル 07979、ヤンチョン - グ、モクトンソ - ロ 2 - ギル、22、106 - 207、(モク - トン、ハンシン チョング アパートメント)
- (72)発明者 キム、ミンヘ
大韓民国 ソウル 07986、ヤンチョン - グ、モクトントン - ロ、430、611 - 1107、(モク - トン、モク - トン シンシカチ アパートメント 6 タンチ)

審査官 伊藤 基章

(56)参考文献 特表2013 - 503857 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/00

A61K 35/00

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