

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-143810

(P2017-143810A)

(43) 公開日 平成29年8月24日(2017.8.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 F	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	4 B O 2 9
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	4 B O 6 3
G O 1 N 33/50 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 14 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-30020 (P2016-30020)

(22) 出願日 平成28年2月19日 (2016.2.19)

特許法第30条第2項適用申請有り 発行者：一般社団法人日本結核病学会、刊行物名：第91回日本結核学会総会、講演要旨集（オンライン）、発行年月日：平成28年2月11日

(71) 出願人 899000079

学校法人慶應義塾

東京都港区三田2丁目15番45号

(71) 出願人 000004112

株式会社ニコン

東京都港区港南二丁目15番3号

(74) 代理人 100064908

弁理士 志賀 正武

(74) 代理人 100108578

弁理士 高橋 詔男

(72) 発明者 長谷川 直樹

東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗酸菌症又は抗酸菌感染のバイオマーカー

(57) 【要約】

【課題】簡便且つ正確に抗酸菌症の疾患活動性又は抗酸菌感染の有無を評価できる抗酸菌症のバイオマーカーを提供する。

【解決手段】本発明の抗酸菌症又は抗酸菌感染のバイオマーカーは、配列番号1で表される塩基配列と85%以上の同一性を有する塩基配列からなるmicroRNA(miRNA)であることを特徴とする。本発明の抗酸菌症又は抗酸菌感染検出用固相担体は、表面上に、配列番号1で表される塩基配列と85%以上の同一性を有する塩基配列の全部又は一部と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むプローブが少なくとも一つ固定されたことを特徴とする。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 1 で表される塩基配列と 85 % 以上の同一性を有する塩基配列からなる *miRNA* (*miRNA*) であることを特徴とする抗酸菌症又は抗酸菌感染のバイオマーカー。

【請求項 2】

配列番号 1 で表される塩基配列からなる *miRNA* である、請求項 1 に記載のバイオマーカー。

【請求項 3】

前記抗酸菌症が非結核性抗酸菌 (*nontuberculous mycobacterial* ; *NTM*) 症である、請求項 1 又は 2 に記載のバイオマーカー。

【請求項 4】

被検者における抗酸菌症の疾患活動性又は抗酸菌感染の有無を評価するための方法であって、

被検者の試料中の請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のバイオマーカーの濃度を測定する工程を備えることを特徴とする方法。

【請求項 5】

前記被検者が、抗酸菌症を有する疑いがある、又は抗酸菌に感染している疑いがある、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

表面に、配列番号 1 で表される塩基配列と 85 % 以上の同一性を有する塩基配列の全部又は一部と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むプローブが少なくとも一つ固定されたことを特徴とする抗酸菌症又は抗酸菌感染検出用固相担体。

【請求項 7】

配列番号 1 で表される塩基配列と 85 % 以上の同一性を有する塩基配列の 3' 末端側の部分配列と相補的な塩基配列を含む逆転写プライマーと、

配列番号 1 で表される塩基配列と 85 % 以上の同一性を有する塩基配列からなる *miRNA* 及び前記逆転写プライマーを用いた逆転写反応で得られる逆転写産物を増幅するためのフォワードプライマー及びリバープライマーと、

配列番号 1 で表される塩基配列と 85 % 以上の同一性を有する塩基配列の 3' 末端側の少なくとも 3 塩基と同一の塩基配列を含む、標識されたオリゴヌクレオチドプローブと、を備えることを特徴とする抗酸菌症又は抗酸菌感染検出キット。

【請求項 8】

前記逆転写プライマーが、配列番号 1 で表される塩基配列と 85 % 以上の同一性を有する塩基配列の 3' 末端側の部分配列と相補的な塩基配列に加えて、ループ構造を形成し得る塩基配列を含む、請求項 7 に記載の抗酸菌症又は抗酸菌検出キット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、抗酸菌症又は抗酸菌感染のバイオマーカーに関する。

【背景技術】**【0002】**

臨床的に問題となる抗酸菌症としては、例えば、結核症、ハンセン病、非結核性抗酸菌 (*nontuberculous mycobacterial infection* ; *NTM*) 症等が挙げられる。結核症、ハンセン病は、治癒可能な感染症となったが、*NTM* 症は、未だ病態が不明であり、有効な治療法も確立されていない。2014 年度厚生労働省全国調査によると、*NTM* 症の推定罹患率は 14.7 人 / 10 万人で、新登録結核年換算罹患率の 12.9 人 / 10 万人を越え、今後、難治性感染症として *NTM* 症はさらに問題になっていくと考えられる。

【0003】

10

20

30

40

50

NTM症において、肺 *Mycobacterium avium complex* (MAC) 症は、日本におけるNTM症の約90%を占めている。原因菌であるMACは、水や土壌等の生活環境中に偏在するが、ヒトからヒトへは感染せず、発症者に喫煙歴及び基礎疾患のない中高年女性が多いという非常に特徴的な傾向があること以外に、感染成立に至る機序についてはほとんど解明されていない。治療方法としては、例えば、多剤併用抗菌化学療法等が行なわれるが、治療開始時期、治療期間、治療終了時期を判断する基準がないため、再発又は再燃を繰り返す症例が多い。また、長期間無治療で経過観察が可能な症例もあれば、急激に病状が悪化し治療抵抗性で死に至る症例もある。しかし現時点では、肺MAC症の疾患活動性を評価するバイオマーカーはなく、そのため、肺MAC症の疾患活動性の評価、予後の予測は極めて困難である。

10

【0004】

近年、様々な疾患のバイオマーカーとして注目されているのが *microRNA* (*miRNA*) である。*miRNA* は21~25bpのノンコーディングRNAで、翻訳抑制、mRNA分解、脱アデニル化等様々な方法で遺伝子発現の下方制御を行なうことが知られている。2002年に初めて疾患との関連が示唆されて以降、特に腫瘍領域で研究が進み、*miRNA* が発ガンの指標として利用しうる可能性が示された。2007年には、エキソソーム内に*miRNA* やmRNAが存在し、エキソソームが*miRNA* の細胞間輸送に利用されている可能性が報告された。さらに、2008年には病変組織から血中に放出された腫瘍特異的 *miRNA* を測定することによって具体的にバイオマーカー利用への可能性が示唆され、侵襲性の少ない検査法への応用としてさらに*miRNA* に注目が集まっている。

20

【0005】

特許文献1には、患者における肺疾患を特徴づけるための血清バイオマーカーまたは血漿バイオマーカーとして使用することができる*miRNA* が記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特表2013-502931号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0007】

特許文献1に記載の*miRNA* は、肺腫瘍又は肺病変のマーカーとして使用できることについて開示されているが、抗酸菌症のバイオマーカーとして使用可能な*miRNA* は開示されていない。

【0008】

本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであって、簡便且つ正確に抗酸菌症の疾患活動性又は抗酸菌感染の有無を評価できる抗酸菌症のバイオマーカーを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、抗酸菌症患者の血清中において高発現している*miRNA* の存在に着目し、本発明を完成させるに至った。

40

【0010】

すなわち、本発明は以下の態様を含む。

本発明の一態様は、配列番号1で表される塩基配列と85%以上の同一性を有する塩基配列からなる*microRNA* (*miRNA*) であることを特徴とする抗酸菌症又は抗酸菌感染のバイオマーカーである。

【0011】

また、本発明の一態様は、表面に、配列番号1で表される塩基配列と85%以上の同一性を有する塩基配列の全部又は一部と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含む

50

プローブが少なくとも一つ固定化されたことを特徴とする抗酸菌症又は抗酸菌感染検出用固相担体である。

【0012】

また、本発明の一態様は、配列番号1で表される塩基配列と85%以上の同一性を有する塩基配列の3'末端側の部分配列と相補的な塩基配列を含む逆転写プライマーと、配列番号1で表される塩基配列と85%以上の同一性を有する塩基配列からなるmiRNA及び前記逆転写プライマーを用いた逆転写反応で得られる逆転写産物を増幅するためのフォワードプライマー及びリバースプライマーと、配列番号1で表される塩基配列と85%以上の同一性を有する塩基配列の3'末端側の少なくとも3塩基と同一の塩基配列を含む、標識されたオリゴヌクレオチドプローブと、を備えることを特徴とする抗酸菌症又は抗酸菌感染検出キットである。

10

【発明の効果】

【0013】

本発明のバイオマーカーによれば、簡便且つ正確に抗酸菌症の疾患活動性の評価又は抗酸菌感染の有無の評価をすることができる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】(A)～(E)実施例1におけるMAC症患者及び健常者の血清中の各miRNAの濃度を測定した結果を表すグラフである。

【図2】実施例2における結核患者及び健常者の血清中のhsa-miR-346濃度を測定した結果を表すグラフである。

20

【図3】実施例3におけるMAC感染及び未感染のマクロファージの細胞上清中のhsa-miR-346濃度を測定した結果を表すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0015】

<<抗酸菌症又は抗酸菌感染のバイオマーカー>>

一実施形態として、本発明は、配列番号1で表される塩基配列と85%以上の同一性を有する塩基配列からなるmicroRNA(miRNA)である、抗酸菌症又は抗酸菌感染のバイオマーカーを提供する。

【0016】

30

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、抗酸菌症患者の血清中において高発現しているmiRNAの存在に着目し、中でもmiR-346が抗酸菌症に深く関与していることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0017】

本実施形態の抗酸菌症又は抗酸菌感染のバイオマーカーによれば、簡便且つ正確に抗酸菌症の疾患活動性の評価又は抗酸菌感染の有無の評価をすることができる。

【0018】

通常、「抗酸菌症」とは、グラム陽性桿菌である結核菌を含むマイコバクテリウム属に属する細菌が原因で発症する感染症のことを意味する。抗酸菌症としては、例えば、結核症、ハンセン病、非結核性抗酸菌(nontuberculous mycobacterial infection; NTM)症等が挙げられる。さらに、NTM症としては、例えば、Mycobacterium avium(マイコバクテリウム・アビウム)とMycobacterium intracellulare(マイコバクテリウム・イントラセルラーエ)の2菌種を区別しないMycobacterium avium complex(マイコバクテリウム・アビウム・コンプレックス、MAC)症、Mycobacterium kansasii(マイコバクテリウム・カンサシ)による感染症等が挙げられ、この3菌種でNTM症の91%以上を占めている。

40

【0019】

<miRNA>

本実施形態の抗酸菌症又は抗酸菌感染のバイオマーカーは、ヒトから採取した試料(例

50

例えば、血液、唾液、涙液、汗、尿等の生体試料も含む。) 中で、配列番号 1 で表される塩基配列と 85 % 以上の同一性を有する塩基配列からなる miRNA であり、該 miRNA の発現レベルを測定することによって、抗酸菌症の疾患活動性の評価又は抗酸菌感染の有無の評価に使用することができる。

【0020】

通常、「miRNA」とは、成熟 miRNA と呼ばれているものを意味する。成熟 miRNA は、ゲノム上にコードされた内在性の 20 ~ 25 塩基程度の非コード (non-coding) RNA である。miRNA は、ゲノム DNA 上の miRNA 遺伝子から、まず数百 ~ 数千塩基程度の長さの一次転写物 (Primary miRNA、以下、「Pri-miRNA」と呼ぶ。) として転写され、次にプロセッシングを受けて約 60 ~ 70 塩基程度のヘアピン構造を有する pre-miRNA (precursor miRNA) となる。その後、核から細胞質内へ移動し、さらにプロセッシングを受けて 20 ~ 25 塩基程度の二本鎖成熟 miRNA となる。二本鎖成熟 miRNA は、そのうちの一本鎖が RISC と呼ばれるタンパク質と複合体を形成し、標的遺伝子の mRNA に作用することで、標的遺伝子の翻訳を阻害する働きをすることが知られている。

【0021】

本実施形態における miRNA は、配列番号 1 (5' - UGUCUGCCCCGCAUGCCUGCCUCU - 3') で表される塩基配列と 85 % 以上、例えば 90 % 以上、例えば 95 % 以上、例えば 99 % 以上、例えば 100 % の同一性を有する塩基配列からなる miRNA である。本実施形態における miRNA の一例は、配列番号 1 で表される塩基配列と 100 % の同一性を有する miRNA である。すなわち、本実施形態における miRNA は、miR-346 である。

配列番号 1 で表される塩基配列と 85 % 以上の同一性を有する塩基配列からなる miRNA には、配列番号 1 で表される塩基配列において、1 又は 2 の塩基が付加、置換又は欠失した塩基配列からなる miRNA も含まれる。

【0022】

<<被検者における抗酸菌症の疾患活動性又は抗酸菌感染の有無を評価するための方法>>

一実施形態として、本発明は、被検者における抗酸菌症の疾患活動性を評価するための方法であって、被検者の試料中の上述のバイオマーカーの濃度を測定する工程を備える、方法を提供する。

【0023】

本実施形態の評価方法によれば、簡便且つ正確に抗酸菌症の疾患活動性又は抗酸菌感染の有無の評価することができる。さらに、評価結果に基づいて、抗酸菌症の治療方針を明確に決定することができる。

【0024】

通常、「疾患活動性」とは、病気の進行度や症状、患者の機能障害の程度などを総合して表す際に用いられる用語である。本明細書においては、特に抗酸菌症の進行度、感染の有無や度合、症状の度合等を意味する。また、本明細書における疾患活動性の評価は、抗酸菌症の予後の予測も包含する。

【0025】

<測定工程>

以下に、本実施形態の評価方法について、詳細に述べる。

まず、被検者から採取した試料中の上述のバイオマーカーの濃度を測定する。被検者から採取する試料としては、上述の <miRNA> と同様のものが挙げられる。例えば、血液試料を用いることができる。血液試料としては、例えば、血液、血清、血漿等が挙げられる。また、被検者としては、すでに抗酸菌症を発症している患者に限らず、抗酸菌症を有する疑いがある、抗酸菌症を発症する危険性がある者 (例えば、以前、抗酸菌症を発症し、完治したと診断された者等)、又は抗酸菌に感染している疑いのある者も含む。

試料中に含まれる miRNA は、当業者に周知の方法を用いて、あるいは市販の miR

10

20

30

40

50

NAのキットを用いて、抽出及び精製することができる。そして、miRNAの発現レベルは、例えばマイクロアレイや、定量RT-PCR法により測定することができる。

【0026】

次に、測定したmiRNAの発現レベルを健常者のmiRNAの発現レベルと比較する。健常者から採取した試料中のmiRNAの発現レベルは、あらかじめ測定することもできるが、被検者から採取した試料中のmiRNAの発現レベルと同時に測定することもできる。miRNAの発現レベルは、例えば、マイクロアレイを用いる場合はトータルRNAを揃えて標準化したり、定量RT-PCR法を用いる場合は内在性コントロールに基づき標準化したりすることにより、比較することができる。内在性コントロールとしては、例えば、miR-16-5p、miR-39-3p等を用いることができる。ここで、健常者とは、抗酸菌に感染していない者のことであって、被検者と同一の性別であってもよい。調べる健常者は、複数人としてすることができる。被検者と比較するmiRNAの発現レベルは、範囲で表されてもよい。被検者と比較するmiRNAの発現レベルの範囲は、例えば、各健常者に対する複数回の測定値の平均値に標準偏差を減じた値から平均値に標準偏差を加えた値までの範囲としてもよく、平均値の下限値から上限値までの範囲としてもよく、特に限定されるものではない。健常者の発現レベルが範囲で表されている時、その上限より高い場合を、健常者の発現レベルより高いと判断し、下限より低い場合を、健常者の発現レベルより低いと判断する。

【0027】

測定工程において、被検者から採取した試料中のmiRNAの発現レベルを、健常者から採取した試料中のmiRNAの発現レベルと比較した結果、被検者から採取した試料中のmiRNAの発現レベルが、健常者から採取した試料中のmiRNAの発現レベルよりも高い場合は、前記被検者が抗酸菌症である、又は抗酸菌に感染している可能性が高いと判断することができる。逆に、被検体から採取した試料中のmiRNAの発現レベルが、健常者から採取した試料中のmiRNAの発現レベルと同じか、より低い場合は、前記被検者が抗酸菌症でない、又は抗酸菌に感染していない可能性が高いと判断することができる。

【0028】

また、測定工程において、被検者から採取した試料中のmiRNAの発現レベルを、予め決めた特定の数値と比較して、被検者から採取した試料中のmiRNAの発現レベルが、その数値より高い場合には、前記被検者が抗酸菌症である、又は抗酸菌に感染している可能性が高く、その数値より低い場合には、前記被検者が抗酸菌症でない、又は抗酸菌に感染していない可能性が高いと判断してもよい。この数値は、複数の抗酸菌症患者及び健常者から採取した試料中のmiRNAの発現レベルを測定してその分布を調べることにより、当業者が適宜決定することができる。

【0029】

本実施形態の評価方法において、既存の評価方法と組み合わせて抗酸菌症の疾患活動性を評価してもよい。

【0030】

<<抗酸菌症又は抗酸菌感染検出用固相担体>>

一実施形態として、本発明は、表面に、配列番号1で表される塩基配列と85%以上の同一性を有する塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むプローブが少なくとも一つ固定化されている、抗酸菌症又は抗酸菌感染検出用固相担体を提供する。

【0031】

本実施形態の抗酸菌症又は抗酸菌感染検出用固相担体は、マイクロアレイを用いた方法により上述のmiRNAを測定する場合に用いることができる。本実施形態の抗酸菌症又は抗酸菌感染検出用固相担体によれば、簡便且つ正確に抗酸菌症の疾患活動性の評価又は抗酸菌感染の有無の評価をすることができる。

【0032】

本実施形態の抗酸菌症又は抗酸菌感染検出用固相担体に用いられるプローブは、上述の

m i R N A の全部又は一部と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含む。プローブが、上述の m i R N A の一部と相補的な塩基配列である場合、該 m i R N A を特異的に捕捉できる限り、該 m i R N A の全長に対する「一部」の長さ（例えば、塩基数）は特に限定されず、例えば、該 m i R N A の全長の 50 % 以上、60 % 以上、70 % 以上、80 % 以上、90 % 以上、又は 95 % 以上とすることができる。プローブは、m i R N A を高精度に検出する観点から、m i R N A と相補的ではない配列をさらに含んでもよい。

【0033】

通常、「ポリヌクレオチド」とは、複数個のヌクレオシドがリン酸等の連結部を介して相互に結合した構成を有するものを意味し、通常は、複数個のヌクレオチドが相互に結合した構成を有するものを意味し、構成しているヌクレオシドの数は特に限定されない。したがって、例えば、10 個以下のヌクレオシド又はヌクレオチドが結合した構成を有するもののよう、通常「オリゴヌクレオチド」と称されるものも、本明細書においては「ポリヌクレオチド」と称する。

10

【0034】

本実施形態におけるプローブは、m i R N A とハイブリダイゼーションするために、分子的な自由度が必要であることから、固相担体と結合する末端にスペーサーを有していてもよい。

【0035】

スペーサーの長さ（例えば、塩基数を意味する。）としては、特に限定されないが、例えば 3 ~ 50 塩基であってよく、例えば 5 ~ 25 塩基であってよい。ただし、スペーサーに用いられる塩基は、同程度の長さで柔軟性を持った P E G 等のリンカーで代替可能である。かかる場合には、スペーサーに用いられる塩基数は 0 塩基でもよい。

20

【0036】

本実施形態の抗酸菌症又は抗酸菌感染検出用固相担体を用いて行う検出に用いられる m i R N A を含む試料としては、特に限定されないが、例えば、上述の < 被検者における抗酸菌症の疾患活動性又は抗酸菌感染の有無を評価するための方法 > に用いる場合には、上述の < 測定工程 > で挙げたものと同様のもの等が挙げられる。

【0037】

また、試料中の m i R N A 量は、全 R N A 中、0.01 質量 % と極めて少ないため、サンプルから抽出された全 R N A から分画により濃縮した m i R N A を試料として用いてもよく、分画操作をしていないものを試料として用いてもよい。

30

【0038】

本実施形態の抗酸菌症又は抗酸菌感染検出用固相担体の一態様として、抗酸菌症検出基板が挙げられる。抗酸菌症又は抗酸菌感染検出用基板に用いられる、プローブを固定する基板としては、例えば、ガラス基板、シリコン基板、プラスチック基板、金属基板等が挙げられる。プローブを基板上に固定する方法としては、例えば、光リソグラフ技術を利用して、基板上に高密度でプローブを固定する方法やガラス基板等にスポットティングによりプローブを固定する方法等が挙げられる。

光リソグラフ技術を利用する場合には、基板上でプローブを合成してもよい。

スポットティングによりプローブを固定する場合には、プローブに固相結合部位を設け、基板に固相結合部位認識部位を設けておくことができる。

40

このような固相結合部位 / 固相結合部位認識部位の組み合わせとしては、プローブを例えば、アミノ基、ホルミル基、S H 基、スクシミジルエステル基等の官能基で修飾して設けられた固相結合部位と、基板を例えば、アミノ基、ホルミル基、エポキシ基、マレイミド基等を有するシランカップリング剤で表面処理して設けられた固相結合部位認識部位との組み合わせや、金 - チオール結合を利用した組合せ等が挙げられる。

また、スポットティングによりプローブを固定する他の方法としては、例えば、シラノール基を有するプローブを、ガラス基板に吐出し、配列させ、シランカップリング反応により共有結合させる方法等も挙げられる。

【0039】

50

本実施形態の抗酸菌症又は抗酸菌感染検出用固相担体の他の態様として、例えば、金属製、ガラス製、又は樹脂製ビーズや、各種メンブレン等が挙げられ、これらの固相担体には、公知の方法でプローブを固定することができる。

【0040】

本実施形態におけるプローブを構成するポリヌクレオチドは、miRNAとハイブリダイズし得るものであればよく、特別な限定はない。ポリヌクレオチドは、RNAであっても、DNAであってもよく、2'-O-methyl RNA、LNA (Locked Nucleic Acid)、BNA (Bridged Nucleic Acid) 等の人工核酸を含むものであってもよい。

【0041】

本明細書において、「ハイブリダイズし得る」とは、miRNAの少なくとも一部がプローブにハイブリダイズし、相補的に複合体を形成することを意味する。また、「ストリントナ条件」としては、例えば、Molecular Cloning - A LABORATORY MANUAL SECOND EDITION (Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press) に記載の条件等が挙げられ、より具体的には、30程度の温度条件(プローブの配列のTmより5 ~ 10 程高い温度条件)、1M未満の塩濃度条件等が挙げられる。

【0042】

本実施形態の抗酸菌症又は抗酸菌感染検出用固相担体を用いる場合、miRNAを検出するために、固相担体に固定化されているプローブ(以下、「固定化プローブ」と呼ぶ場合もある。)の他に、検出プローブを用いてもよい。検出プローブを用いる場合は、固定化プローブは、miRNAと相補的な配列に加えて、miRNAと相補的ではない塩基配列であって、検出プローブとハイブリダイズし得る配列を有していてもよい。検出プローブは標識物質により標識することができる。検出プローブにおける標識物質の配置は、miRNAと隣接する端には結合していなければよく、特に制限されない。

【0043】

標識物質としては、例えば、蛍光色素、蛍光ビーズ、量子ドット、ビオチン、抗体、抗原、エネルギー吸収性物質、ラジオアイソトープ、化学発光体、酵素等が挙げられる。

蛍光色素としては、FAM (カルボキシフルオレセイン)、JOE (6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ2',7'-ジメトキシフルオレセイン)、FITC (フルオレセインイソチオシアネート)、TET (テトラクロロフルオレセイン)、HEX (5'-ヘキサクロロ-フルオレセイン-CEホスホロアミダイト)、Cy3、Cy5、Alexa 568、Alexa 647等が挙げられる。

【0044】

上述したように、全RNAに含まれる、miRNAはごく微量しか存在しないため、miRNAを高効率に標識することは困難である。一方、標識した検出プローブを用いる場合は、高感度に、ごく微量のmiRNAを検出することができる。

【0045】

さらに、固定化プローブが標識物質により標識されていてもよい。この場合、固定化プローブを標識する標識物質と検出プローブを標識する標識物質との組合せは、FRET (蛍光共鳴エネルギー移動; Fluorescence (Foerster) Resonance Energy Transfer) が起こり得ない組合せであっても、FRETが起こり得る組合せでもあってもよい。

miRNAの有する配列や長さによって、FRET効率が異なるという観点からは、FRETが起こり得ない組合せが好ましい。FRETが起こり得る標識物質の組合せを用いる場合であっても、例えば、固定化プローブの固相担体に近い末端をFAMで標識し、検出プローブの固相担体から最も遠い部分をAlexa 647で標識する等、両者間でFRETが起きないように設計することもできる。

一方、検出プローブが固定化プローブに連結された場合と固相担体に吸着した場合とを区別することができるという観点からは、FRETが起こり得る組合せが好ましい。

10

20

30

40

50

FRETが起こりうる標識物質の組合せとしては、例えば、励起波長が490nm付近の蛍光色素（例えば、FITC、ローダミングリン、Alexa（登録商標）fluor 488、BODIPY FL等）と励起波長が540nm付近の蛍光色素（例えば、TAMRA、テトラメチルローダミン、Cy3）、または、励起波長が540nm付近の蛍光色素と励起波長が630nm付近の蛍光色素（例えば、Cy5等）の組合せ等が挙げられる。

【0046】

<<抗酸菌症又は抗酸菌感染検出キット>>

一実施形態として、本発明は、配列番号1で表される塩基配列と85%以上の同一性を有する塩基配列の3'末端側の部分配列と相補的な塩基配列を含む逆転写プライマーと、配列番号1で表される塩基配列と85%以上の同一性を有する塩基配列からなるmiRNA及び前記逆転写プライマーを用いた逆転写反応で得られる逆転写産物を増幅するためのフォワードプライマー及びリバースプライマーと、配列番号1で表される塩基配列と85%以上の同一性を有する塩基配列の3'末端側の少なくとも3塩基と同一の塩基配列を含む、標識されたオリゴヌクレオチドプローブと、を備えることを特徴とする抗酸菌症又は抗酸菌感染検出キットを提供する。

10

【0047】

本実施形態の抗酸菌症又は抗酸菌感染検出キットは定量RT-PCR法により上述のmiRNAを測定する場合に用いることができる。本実施形態の抗酸菌症又は抗酸菌感染検出キットによれば、簡便且つ正確に抗酸菌症の疾患活動性の評価又は抗酸菌感染の有無の評価をすることができる。

20

【0048】

本実施形態における逆転写プライマーは、配列番号1で表される塩基配列と85%以上の同一性を有する塩基配列の3'末端側の部分配列と相補的な塩基配列を含む。3'末端側の部分配列は、例えば、標的miRNAの3'末端から1個、2個、3個、4個、又は5個の塩基の配列とすることができる。前記塩基配列が標的であるmiRNAにアニーリングすることにより、逆転写酵素により伸長反応を進めて、cDNAを合成することができる。

【0049】

本実施形態における逆転写プライマーは、配列番号1で表される塩基配列と85%以上の同一性を有する塩基配列の3'末端側の部分配列と相補的な塩基配列に加えて、さらに、ループ構造を形成し得る塩基配列を含んでいてもよい。本実施形態における逆転写プライマーがループ構造を有する場合、逆転写プライマーと、逆転写酵素により合成されたcDNAとが連結されたポリヌクレオチドを逆転写産物として得ることができ、後に続くリアルタイムPCR反応の際に、逆転写プライマーのループ構造部分の塩基配列に対して特異的なリバースプライマーを使用することにより、より特異性を高く、miRNAを検出することができる。

30

【0050】

本実施形態におけるフォワードプライマーは、前記逆転写プライマーにより得られた逆転写産物のうち、配列番号1で表される塩基配列と85%以上の同一性を有する塩基配列からなるmiRNAに由来するcDNAの3'末端領域の塩基配列に対して特異的な配列とすることができる。また、本実施形態におけるリバースプライマーは逆転写プライマーの5'末端領域の塩基配列に対して特異的な配列とすることができる。フォワードプライマー及びリバースプライマーが上記配列を有することにより、リアルタイムPCR反応において、逆転写産物をより特異的に増幅することができる。

40

【0051】

本実施形態における標識されたオリゴヌクレオチドプローブは、配列番号1で表される塩基配列と85%以上の同一性を有する塩基配列の3'末端側の少なくとも3塩基と同一の塩基配列を含む。前記塩基配列を含むことにより、プローブは逆転写産物に特異的にハイブリダイゼーションすることができる。本実施形態における標識されたプローブとして

50

は、例えば、5'末端にクエンチャーが、3'末端に標識物質が結合しているものを用いることができる。5'末端にクエンチャー、3'末端に標識物質を備えることにより、リアルタイムPCR反応のDNAポリメラーゼによる伸長反応の際に、ポリメラーゼの持つ5'-3'exonuclease活性により、逆転写産物にハイブリダイズしたプローブが分解され、クエンチャーによる抑制が解除されて標識物質を検出することができる。

【0052】

プローブの3'末端に結合した標識物質としては、上述の<<抗酸菌症又は抗酸菌感染検出用固相担体>>の検出プローブの標識物質と同様のものが挙げられ、例えば、蛍光色素とすることができる。プローブの3'末端に結合した標識物質が蛍光色素である場合、プローブの3'末端に結合した標識物質とプローブの5'末端に結合したクエンチャーとの組み合わせとしては、上述の<<抗酸菌症又は抗酸菌感染検出用固相担体>>の検出プローブ及び固定化プローブのFRETが起こりうる標識物質の組合せ等が挙げられる。

10

【0053】

本実施形態の抗酸菌症又は抗酸菌感染検出キットは、使用する核酸増幅方法によって異なるが、この他に、基質としてのヌクレオチド三リン酸、核酸合成酵素、増幅反応用緩衝液の1つ以上を含んでいてもよい。ヌクレオチド三リン酸は、核酸合成酵素に応じた基質(dNTP、rNTP等)である。核酸合成酵素は、使用する核酸増幅方法に応じた酵素であり、例えば、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、逆転写酵素等が挙げられる。増幅反応用緩衝液としては、例えば、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、ペロナル緩衝液、ホウ酸緩衝液、グッド緩衝液等が挙げられ、pHは特に限定されない。

20

【0054】

以下、実施例により本発明を説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【0055】

[実施例1]

(1) 検体の選定

診断が確定した無治療肺MAC症の女性患者(患者群:MAC)及び女性健常者(健常者群:CON)を各16名選定し、両群間で統計学的な差がなく、年齢及びBMIがマッチしていることを確認した。

30

【0056】

(2) 血清からのmiRNAの抽出

(1)で選定したMAC群及びCON群から採血し、血清を得た。得られた血清から、NucleoSpin(登録商標) miRNA Plasma(Macherey-Nagel社製)を用いて、miRNAを抽出した。外部コントロールとして、cel-miR-39(100fmol)を添加した。300μLの血清から35μLのRNase-free waterで溶出したmiRNA抽出液を得た。

【0057】

(3) cDNAの合成

(2)で得られたmiRNA抽出液を用いて、TaqMan(登録商標) MicroRNA reverse Transcription Kit(Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific社製)により、逆転写反応を行い、cDNAを合成した。具体的な反応条件としては、総量15μL中に3μLのmiRNA抽出液、1×ステムループ逆転写プライマー(TaqMan(登録商標) MicroRNA Assays(Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific社製)に含まれている)、3.33U/μLの逆転写酵素、0.25U/μLのRNase Inhibitor、0.25mMのdNTPs、1×反応バッファーを含む反応液を調製し、サーマルサイクラ Gene Amp PCR System 9700(Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific社製)を用いて、16

40

50

で30分、42 で30分、85 で5分の反応を行った。

【0058】

(4) リアルタイムPCR

TaqMan (登録商標) プローブを用いて、hsa-miR-346の定量を行った。具体的には、1.33 μ Lの(3)で得られた逆転写反応液に、1 μ LのTaqMan (登録商標) MicroRNA Assays (Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific社製) (20 \times フォワードプライマー、20 \times リバースプライマー及び20 \times プローブ含有)、10 μ LのTaqMan (登録商標) Universal Master Mix II (UNG含有) (Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific社製)を加えて、総量20 μ Lの定量反応液を調製した。続いて、StepOnePlus (登録商標) リアルタイムPCRシステム (Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific社製)を用いて、50 で2分、95 で10分の加熱後、95 で15秒、60 で60秒の反応を45サイクル行い、リアルタイムPCR反応を行った。各反応は2重測定で行った。各測定毎に、miRNA mimic (Bioneer社)を用いた検量線作成用の測定を行い、また実験間のばらつきを補正するために、外部コントロールとして添加したcel-miR-39量と、血清中の発現量が一定であるとされている内在性hsa-miR-16-5p量の測定も同時に行った。結果を図1(A)~(E)に示す。図1(A)~(E)では、事前に行った網羅的解析により抗酸菌症のバイオマーカーの候補として挙げられた5種類のmiRNAの血清中濃度を示している。

【0059】

図1(A)~(E)から、5種類のmiRNAのうち、hsa-miR-346の血清中の濃度が健常者群に比べて、患者群で統計学的に有意に高い($p < 0.05$)ことが明らかとなった。

【0060】

[実施例2]

(1) 検体の選定

診断が確定した無治療結核症患者(患者群:TB)及び健常者(健常者群:CON)を各10名選定し、両群間で統計学的な差がなく、年齢及びBMIがマッチしていることを確認した。

【0061】

(2) 血清からのmiRNAの抽出

(1)で選定したTB群及びCON群から採血し、血清を得た。得られた血清から、実施例1の(2)と同様の方法を用いて、miRNA抽出液を得た。

【0062】

(3) cDNAの合成

(2)で得られたmiRNA抽出液を用いて、実施例1の(3)と同様の方法を用いて、cDNAを合成した。

【0063】

(4) リアルタイムPCR

1.33 μ Lの(3)で得られた逆転写反応液を用いて、実施例1の(4)と同様の方法で、hsa-miR-346の定量を行った。結果を図2に示す。

【0064】

図2から、血清中のhsa-miR-346濃度が健常者群に比べて、TB群で統計学的に有意に高い($p < 0.0015$)ことが明らかとなった。

【0065】

[実施例3]

(1) 細胞の培養

ヒト末梢血単核球(peripheral blood mononuclear c 50

e11; PBMC)由来のマクロファージを、6ウェルプレートにコンフルエントになるように培養した。培地としては、Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM)培地(サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製)を用いた。

【0066】

(2) MACの感染

(1)で培養したマクロファージに、MAC104を多重感染度50で感染させ、37で4時間培養した。コントロールとして、感染させていない細胞も準備した。

【0067】

(3) miRNAの定量

続いて、細胞をPBSで3回洗浄し、IMDM培地(血清不含)600 μ Lに置き換えて、37で培養した。24時間後の細胞上清300 μ L中のhsa-miR-346の定量を行った。定量方法は、実施例1の(2)~(4)と同様の方法を用いて、miRNAの抽出、cDNAの合成及びリアルタイムPCRを行った。結果を図3に示す。

【0068】

図3から、血清中のhsa-miR-346濃度がMAC未感染のマクロファージに比べて、MAC感染のマクロファージで統計学的に有意に高いことが明らかとなった。

【0069】

以上の結果から、miR-346が抗酸菌症のバイオマーカーとして有用であることが明らかとなった。

【産業上の利用可能性】

【0070】

本発明のバイオマーカーによれば、簡便且つ正確に抗酸菌症の疾患活動性の評価又は抗酸菌感染の有無の評価をすることができる。

【図1】

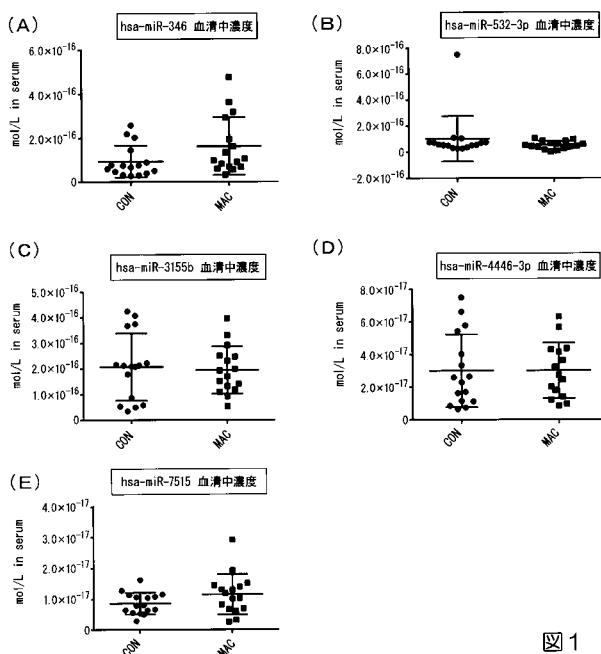


図1

【図2】

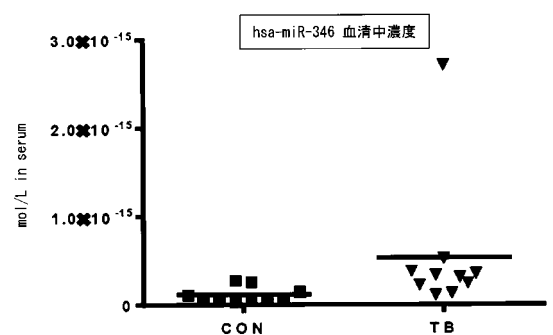


図2

【図3】

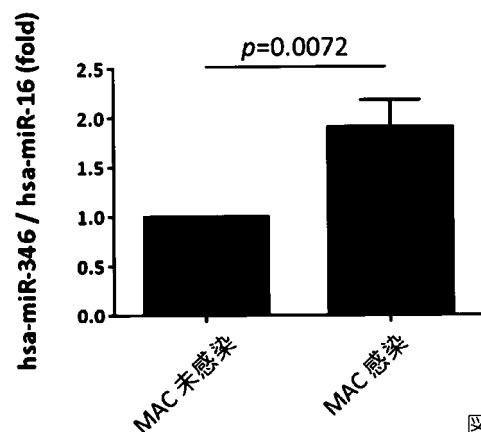


図3

【配列表】

2017143810000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	P
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/569	F

(72)発明者 西村 知泰

神奈川県横浜市港北区日吉4丁目1番1号 慶應義塾大学日吉キャンパス内

Fターム(参考) 2G045 AA25 DA14

4B024 AA01 AA11 CA04 CA09 CA11 CA20 DA03 HA08 HA11

4B029 AA07 BB11 CC01 FA05 GA03

4B063 QA18 QA19 QQ52 QR08 QS25 QS34 QX02