

(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
2013年5月16日(16.05.2013)



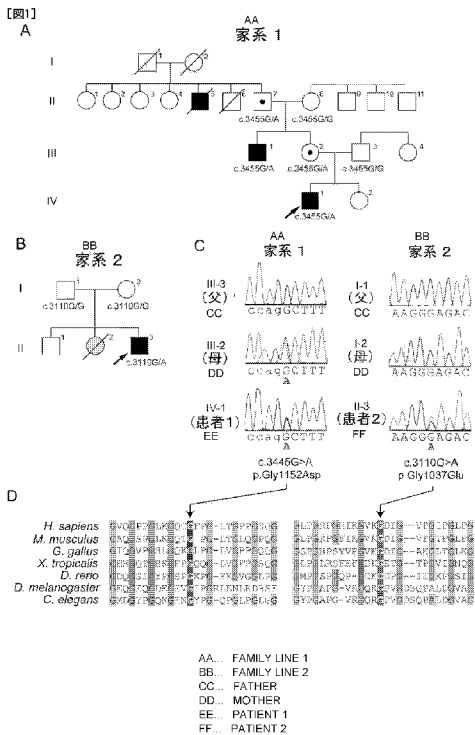
(10) 国際公開番号
WO 2013/069495 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/077903
- (22) 国際出願日: 2012年10月29日(29.10.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-247457 2011年11月11日(11.11.2011) JP
- (71) 出願人: 公立大学法人横浜市立大学(PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION YOKOHAMA CITY UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒2360027 神奈川県横浜市金沢区瀬戸2番2号 Kanagawa (JP).
- (72) 発明者: 松本 直通(MATSUMOTO, Naomichi); 〒2360004 神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目9番の1 公立大学法人横浜市立大学内 Kanagawa (JP). 才津 浩智(SAITSU, Hirotomo); 〒2360004 神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目9番の1 公立大学法人横浜市立大学内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 谷川 英次郎(TANIGAWA, Hidejiro); 〒1020072 東京都千代田区飯田橋一丁目7番10号 山京別館801 谷川国際特許事務所内 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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, 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

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR PREDICTING RISK OF PORENCEPHALY OR CEREBRAL HEMORRHAGE

(54) 発明の名称: 孔脳症又は脳出血のリスクを予測する方法



(57) Abstract: A screening was made intensively on the mutation of COL4A2 gene in 35 Japanese porencephaly patients. As a result, it was found that COL4A2 gene is a causal gene for familial and sporadic porencephaly. An identical hetero mutation of COL4A2 gene was observed in both porencephaly patients and normal persons, and the pathogenic mutation is considered as a dominant inheritance with incomplete penetrance. It can be predicted that a living organism having a COL4A2 gene mutation has a high risk of the occurrence of porencephaly or cerebral hemorrhage.

(57) 要約: 日本人孔脳症患者 35名において COL4A2 遺伝子変異を鋭意スクリーニングした結果、COL4A2 遺伝子が家族性及び孤発性の孔脳症の原因遺伝子であることが明らかとなった。孔脳症患者及び健常者の双方で同一の COL4A2 遺伝子ヘテロ変異が発見され、該病因変異は不完全浸透度の優性遺伝と考えられる。COL4A2 遺伝子変異を有する生体は孔脳症又は脳出血が生じるリスクが高いと予測することができる。

WO 2013/069495 A1

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, — 明細書の別個の部分として表した配列リスト
NE, SN, TD, TG). (規則 5.2(a))

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：孔脳症又は脳出血のリスクを予測する方法

技術分野

[0001] 本発明は、孔脳症又は脳出血のリスクを予測する方法に関する。

背景技術

[0002] 孔脳症は、大脳半球内に脳室との交通を有する嚢胞又は空洞がみられる先天異常であり（非特許文献1）、胎生期における梗塞や出血といった脳循環障害により発生すると推測されている（非特許文献2、3）。孔脳症は、臨床的には半身麻痺（もっとも多く見られる）、四肢麻痺、てんかん、及び精神遅滞を生じる（非特許文献4、5）。一卵性双生児の出産、母体の心拍停止ないしは腹部外傷、プロテインCによる抗凝血経路の不全、及びサイトメガロウイルス感染は、孤発性孔脳症のリスクファクターである（非特許文献2、6）。

[0003] 近年、IV型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖をコードする遺伝子（COL4A1, MIM 120130）における変異が家族性孔脳症の原因であることが報告された（非特許文献7）。その後、孤発例においてもCOL4A1遺伝子のde novo変異が報告され（非特許文献8～10）、COL4A1遺伝子の異常が孤発性・家族性双方の孔脳症に関与することが確認された。しかしながら、COL4A1遺伝子変異が同定できない症例が数多く残されていた。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Berg, R.A., Aleck, K.A., and Kaplan, A.M. (1983). Familial porencephaly. Arch. Neurol. 40, 567-569.

非特許文献2：Govaert, P. (2009). Prenatal stroke. Semin Fetal Neonatal Med 14, 250-266.

非特許文献3：Hunter, A. (2006). Porencephaly. In Human Malformations and related Anomalies, S. RE and H. JG, eds. (New York, Oxford Univer

sity Press), pp 645-654.

非特許文献4 : Mancini, G.M., de Coo, I.F., Lequin, M.H., and Arts, W.F. (2004). Hereditary porencephaly: clinical and MRI findings in two Dutch families. *Eur J Paediatr Neurol* 8, 45-54.

非特許文献5 : Vilain, C., Van Regemorter, N., Verloes, A., David, P., and Van Bogaert, P. (2002). Neuroimaging fails to identify asymptomatic carriers of familial porencephaly. *Am J Med Genet* 112, 198-202.

非特許文献6 : Moinuddin, A., McKinstry, R.C., Martin, K.A., and Neil, J.J. (2003). Intracranial hemorrhage progressing to porencephaly as a result of congenitally acquired cytomegalovirus infection--an illustrative report. *Prenat Diagn* 23, 797-800.

非特許文献7 : Gould, D.B., Phalan, F.C., Breedveld, G.J., van Mil, S.E., Smith, R.S., Schimenti, J.C., Aguglia, U., van der Knaap, M.S., Heutink, P., and John, S.W. (2005). Mutations in *Col4a1* cause perinatal cerebral hemorrhage and porencephaly. *Science* 308, 1167-1171.

非特許文献8 : Breedveld, G., de Coo, I.F., Lequin, M.H., Arts, W.F., Heutink, P., Gould, D.B., John, S.W., Oostra, B., and Mancini, G.M. (2006). Novel mutations in three families confirm a major role of *COL4A1* in hereditary porencephaly. *J Med Genet* 43, 490-495.

非特許文献9 : Lanfranconi, S., and Markus, H.S. (2010). *COL4A1* mutations as a monogenic cause of cerebral small vessel disease: a systematic review. *Stroke* 41, e513-518.

非特許文献10 : Meuwissen, M.E., de Vries, L.S., Verbeek, H.A., Lequin, M.H., Govaert, P.P., Schot, R., Cowan, F.M., Hennekam, R., Rizzu, P., Verheijen, F.W., et al. (2011). Sporadic *COL4A1* mutations with extensive prenatal porencephaly resembling hydranencephaly. *Neurology* 76, 844-846.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、孔脳症の新規原因遺伝子を同定し、胎児期～周産期の脳出血の予防に役立てることができる新規な手段を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0006] 本願発明者らは、COL4A1蛋白質とヘテロトリマーを形成するCOL4A2蛋白質に着目し、日本人孔脳症患者35名においてCOL4A2遺伝子変異を鋭意スクリーニングした結果、2名の患者において、日本人健常者集団には見出されず、病原性予測ツールを用いた評価により病原性であることが強く示唆されるヘテロ変異を同定することに成功した。2名のうちの一方は孤発例であり、もう一方は家族例であった。つまり、COL4A2遺伝子が家族性及び孤発性の孔脳症の原因遺伝子であることを見出し、本願発明を完成した。

[0007] すなわち、本発明は、生体から分離された試料に対して実施する方法であって、対象生体のCOL4A2遺伝子に少なくとも1つの変異が存在するか否かを調べることを含み、COL4A2遺伝子の少なくとも一方のアレルに少なくとも1つの変異がある場合に孔脳症又は脳出血のリスクが高いと予測される、孔脳症又は脳出血のリスクを予測する方法を提供する。

発明の効果

[0008] 本発明により、孔脳症の原因遺伝子として初めてCOL4A2遺伝子が同定され、孔脳症又は脳出血、特に孔脳症又は胎児期～周産期脳出血のリスクを予測する新規方法が提供された。孔脳症患者及び健常者の双方で同一のCOL4A2遺伝子ヘテロ変異が発見され、該病因変異は不完全浸透度の優性遺伝と考えられる。胎児の両親の少なくとも一方にCOL4A2変異が発見された場合、胎児に該COL4A2変異が遺伝している可能性がある。また、出生前診断により胎児自身にCOL4A2遺伝子変異が存在するか否かを調べることもできる。胎児が孔脳症又は胎児期～周産期脳出血を生じるリスクが懸念される場合には、経膈分娩を避け、胎児への物理的ダメージが少ない帝王切開を積極的に選択することで、周産期脳出血の発生を防止することができる。また、COL4A2遺伝子は血管の脆弱性に関与する遺伝子であるため、健常保因者は出血性の脳血管疾

患のリスクが健常非保因者よりも高いと考えられる。従って、健常保因者では出血性脳血管疾患の予防を重視すべきである。このように、本発明は、成人の脳出血予防にも貢献できる。

図面の簡単な説明

- [0009] [図1](A) COL4A2遺伝子にc.3455G>A (p.G1152D) 変異が同定された孔脳症患者1の家系図である。矢印が患者1。患者の母方のおじ (III-1) に先天性の左片麻痺あり。患者の母親 (III-2) 及び母方の祖父 (II-7) はいずれも健常。大伯父 (II-5) にも先天性の片麻痺があり、60代で死亡。(B) COL4A2遺伝子にc.3110G>A (p.G1037E) 変異が同定された孔脳症患者2の家系図である。矢印が患者2。両親には当該変異がなく、de novoで生じた変異であった。(C) 変異部位のゲノム配列の波形データである。左が患者1及びその両親、右が患者2及びその両親のデータである。(D) COL4A2タンパク質のアミノ酸配列のアラインメントである。進化的に保存されたアミノ酸を图中グレー又は黒のボックスで示す。黒のボックスは変異が生じていたGly残基。各アミノ酸配列はNCBI protein databaseから得た; NP_001837.2 (Homo sapiens), NP_034062.3 (Mus musculus), NP_001155862.1 (Gallus gallus), XP_002933063.1 (Xenopus tropicalis), XP_687811.5 (Danio rerio), AAB64082.1 (Drosophila melanogaster), 及びCAA80537.1 (Caenorhabditis elegans)。アラインメントはCLUSTALW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>) により実行した。
- [図2](A-C) 患者1の6歳齢での脳MRI。(A)がT2強調横断像、(B)が冠状断像。(A)及び(B)では右脳室の拡大と右前頭部白質の容積低下が認められる。(C) 脳梁体の萎縮(矢頭)を認めるT1強調正中矢状断。左脚不全麻痺の原因となる病変はこれらの画像中では明らかでない。(D-F) 患者2の2ヶ月齢でのCT画像。(D)横断像、(E)冠状断像、(F)矢状断像。(D)、(E)及び(F)では左右対称性の側脳室の拡大と前頭部白質の左右対称性の極度の容積低下が認められる。右側脳室にはV-Pシャントも視認できる。橋小脳構造は正常。
- [図3]COL4A2遺伝子がコードするIV型コラーゲン α 2鎖のアミノ酸配列である。下線部がGly-Xaa-Yaaリピートの領域である。黒いボックスは、実施例で同

定された2種類のアミノ酸置換変異が生じたGly残基を示す。

発明を実施するための形態

[0010] 本願発明者らが同定した孔脳症の新規な原因遺伝子であるCOL4A2遺伝子 (MIM 120090) は、IV型コラーゲン α 2鎖をコードする遺伝子である。IV型コラーゲンは脈管構造を含む全ての組織で発現している基底膜タンパク質である。タイプIVコラーゲンのうち、COL4A1 (α 1鎖) 及びCOL4A2 (α 2鎖) が最も豊富なコラーゲンであり、2:1の比率でヘテロトリマー (α 1 α 1 α 2) を形成することが知られている (Khoshnoodi, J., Pedchenko, V., and Hudson, B. G. (2008). Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech* 71, 357-370.)。ヘテロトリマーを形成するドメインにはGly-Xaa-Yaaリピート (Xaa及びYaaは同一又は異なる任意のアミノ酸を示す) が存在し、このリピート領域で3重らせん構造を形成する。Gly-Xaa-Yaaリピートの位置を図3中に下線で示す。配列表の配列番号1及び2は、COL4A2遺伝子のcDNAのコード領域の配列及びCOL4A2タンパク質のアミノ酸配列であり、配列番号3はGenBankに登録 (accession番号NM_001846) されているmRNA配列である。配列番号4~38には、各エクソン及びその近傍のイントロンの配列を表1の通りに示した。

[0011]

[表1-1]

	配列番号	エクソン
Ex1	4	101-345nt (UTR 101-345nt)
Ex2	4	677-764nt (UTR 677-720nt)
Ex3	4	886-940nt
Ex4	5	301-381nt
Ex5	6	301-435nt
Ex6	6	520-564nt
Ex7	7	301-417nt
Ex8	8	301-372nt
Ex9	8	817-852nt
Ex10	8	961-1023nt
Ex11	9	301-336nt
Ex12	10	301-342nt
Ex13	11	301-399nt
Ex14	12	301-336nt
Ex15	12	917-967nt
Ex16	13	301-345nt
Ex17	14	301-354nt
Ex18	15	301-367nt
Ex19	16	301-411nt
Ex20	16	927-1076nt
Ex21	17	301-393nt
Ex22	18	301-464nt
Ex23	19	301-373nt
Ex24	19	465-571nt
Ex25	20	301-502nt
Ex26	20	899-958nt
Ex27	21	301-357nt
Ex28	22	301-408nt
Ex29	23	301-522nt
Ex30	24	301-462nt
Ex31	25	301-471nt
Ex32	26	301-444nt
Ex33	27	301-423nt
Ex34	28	301-482nt
Ex35	29	301-364nt
Ex36	29	567-641nt
Ex37	30	301-408nt
Ex38	31	301-408nt
Ex39	32	301-372nt
Ex40	33	301-426nt

[0012] [表1-2]

	配列番号	エクソン
Ex41	34	301-417nt
Ex42	35	301-462nt
Ex43	35	563-661nt
Ex44	35	1027-1173nt
Ex45	35	1328-1444nt
Ex46	36	301-492nt
Ex47	37	301-587nt
Ex48	38	301-1163nt (UTR 329-1163nt)

[0013] 本発明では、COL4A2遺伝子の変異を指標として対象生体に孔脳症又は脳出血が生じるリスクを予測する。対象生体は、好ましくは出生後のヒト（例えばヒト成人）又はヒト胎児である。脳出血には、胎児期～周産期脳出血、及び成人期（老年期まで含む）に生じる出血性の脳血管疾患が包含される。COL4A2遺伝子の少なくともいずれか一方のアレルに少なくとも1つの変異があれば、孔脳症及び脳出血のリスクが高いと予測することができる。遺伝様式は不完全浸透度の優性遺伝と考えられ、孔脳症患者にも健常保因者にもヘテロ変異が発見されている。

[0014] 本発明で指標とするCOL4A2遺伝子中の変異には、COL4A2遺伝子がコードするIV型コラーゲン α 2鎖のごく少数のアミノ酸の変化の他、 α 2鎖の少なくとも一部の領域を欠失するような変化をもたらす塩基配列の変化が包含され、COL4A2遺伝子領域の全体又は一部を欠失する変異も包含される。そのような塩基配列の変異の具体例としては、エクソン又はイントロン領域内での塩基の置換、欠失、挿入、重複等によるミスセンス変異、ナンセンス変異、フレームシフト変異、インフレーム欠失又は挿入変異（1個以上のアミノ酸の欠失若しくは挿入をもたらす）、スプライシング異常を生じる変異、及びCOL4A2遺伝子を含む染色体領域の微細欠失等が挙げられる。

[0015] COL4A2遺伝子の変異は、ゲノムDNAやRNA等の核酸試料を用いて塩基配列を解析することで検出可能である。とりわけ、ゲノムDNA試料を用いてゲノム配列の解析を行なうことが最も確実で望ましい。ゲノムDNA等の核酸試料は、末梢血や口腔粘膜スワブ等から常法により容易に調製することができる。また

、種々の出生前遺伝子検査法が公知であり、胎児にCOL4A2遺伝子変異が存在するかどうかを調べることも可能である。例えば、胎児から細胞を採取して検査する方法（羊水、絨毛、臍帯血を使用）、母体血中に混在している胎児細胞を用いて胎児の遺伝子変異を検査する非侵襲の検査方法、体外受精した受精卵の1細胞を用いる方法（着床前診断）など、種々の手法が公知である。上記非侵襲の検査方法では、胎児細胞を含有する母体血試料が「生体から分離された試料」に該当し、胎児が「対象生体」に該当する。

[0016] タンパク質のアミノ酸配列は、エクソン領域だけではなくイントロン領域における変異によっても影響され得るが、遺伝子検査では通常、エクソン及びその近傍数十～数百塩基程度、例えば30～50塩基程度のイントロン領域を含めて検査するのが一般的である。本発明でもエクソン及びその近傍のイントロンを対象に配列解析を行えばよい。ゲノム配列の解析により変異を検出する場合には、本願配列表の配列番号4～38や公知のデータベースから入手可能なCOL4A2遺伝子のゲノム配列を参照して適宜プライマーを設計し、ゲノムDNA試料を用いて常法によりシーケンシングを行えばよい。対象生体ゲノムDNA上のCOL4A2遺伝子の塩基配列を決定し、これを野生型配列と比較することにより、変異を詳細に同定できる。決定した塩基配列は、例えばSeqScap e（登録商標）等の公知のソフトウェアを用いて解析することにより、変異の検出やプロファイリングを容易に行うことができる。

[0017] 変異がホモかヘテロかは、シーケンスの波形データから確認できる。ヘテロ変異がある場合、同一部位に2種類のシグナルが重なることになる。

[0018] 本発明で対象となるCOL4A2遺伝子変異は主としてヘテロ変異であるため、ヘテロ二本鎖の検出によりCOL4A2遺伝子変異のスクリーニングを行なうことが有効である。ヘテロ変異が存在する場合、ゲノムDNA試料を熱変性後に再会合させることにより、正常型DNAと変異DNAとがハイブリダイズしたヘテロ二本鎖が生じる。ヘテロ二本鎖は、(1)非変性ポリアクリルアミドゲル中で異なる移動度を示す、(2)ミスマッチ部分の塩基は化学物質や酵素による切断を受けやすい、(3)変性の際に異なる変性温度を示す、といった特性を有する。こ

これらの特性を利用してヘテロ二本鎖を検出する方法がこの分野において公知であり、変異の検査方法として実用化もされている。具体的には、例えば、変性高速液体クロマトグラフィー（dHPLC）を用いてヘテロ二本鎖を検出する方法や、High Resolution Melt法が知られている。

[0019] High Resolution Melt法とは、二本鎖DNAに高密度で結合する蛍光色素（SYTO(登録商標)9, LC Green(登録商標), EvaGreen(商標)等）を用いて、二本鎖DNAの融解（熱変性）の過程を蛍光強度の変化としてとらえ、ヘテロ二本鎖を検出する方法である。すなわち、二本鎖DNAに高密度で結合する蛍光色素を用いて二本鎖DNAを染色すると、該二本鎖DNAを融解（熱変性）させたとき、二本鎖が解離した部位から蛍光色素が脱落するため、二本鎖DNAからの蛍光シグナルの量が減少する。従って、そのような蛍光色素を用いることで、二本鎖DNAの熱変性の過程を蛍光強度の変化として視覚的にとらえることができる。温度－蛍光のデータを高密度で取得し解析することで、ヘテロ二本鎖の検出を迅速に高感度で行うことができる。市販の機器類及びキット等を用いて容易に実施可能である。使用するプライマーは、本願配列表に記載したCOL4A2遺伝子のエクソン+近傍イントロン領域の配列に基づいて適宜設計可能である。下記実施例には、High Resolution Melt法によるCOL4A2遺伝子変異のスクリーニングに使用できるプライマー及び反応条件の一例を示す。

[0020] 本発明では、COL4A2遺伝子のエクソン+近傍イントロン領域の全ての塩基配列を決定し、変異の有無を調べてもよい。また、例えば、ヘテロ二本鎖の検出により塩基配列を決定すべき領域を絞り込み、その後に対象領域の塩基配列を決定することで、検査をより効率的に実施することができる。

[0021] 配列表に示されたCOL4A2遺伝子のcDNA配列、ゲノム配列、及びコードするCOL4A2タンパク質のアミノ酸配列は、正常なCOL4A2配列の典型例である。本発明では、変異の有無は、配列表に示されたCOL4A2遺伝子の配列を基準とし、この基準配列との対比により判断され得る。アミノ酸配列に変化を生じるCOL4A2遺伝子の変異であれば、孔脳症及び脳出血の病因変異であると考えられることができるが、中でも、進化的に保存性の高いアミノ酸を変化させる遺伝子変

異は、正常な機能が損なわれたCOL4A2タンパク質、例えば $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ ヘテロトリマーを質的ないし量的に正常に形成できないCOL4A2タンパク質を生じる蓋然性が高く、孔脳症及び脳出血の病因変異の典型例である。種々の動物のCOL4A2タンパク質（IV型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖）の配列が公知であり、GenBank等の各種データベースに登録されているので、当業者であれば容易に配列情報を入手して常法により各アミノ酸の進化的保存性を調べることができる。進化的に保存されたアミノ酸残基の変異の代表例としては、ヘテロトリマーの三重らせんドメインであるGly-Xaa-Yaaリピート（Xaa, Yaaは同一又は異なる任意のアミノ酸残基）中のGlyを置換させる変異が挙げられる。あるいはまた、検出された塩基の変異が、多数の健常者集団には認められない変異であったり、NCBIのdbSNPや1000 Genomes Project等の塩基配列の多様性に関する周知のデータベースに登録されていないまれな塩基変異である場合も、本発明で指標となる病因変異と考えると差し支えない。

[0022] ある遺伝子中の変異が病原性変異であるか否かを調べることができる各種の予測ツールが知られている。例えば、SIFT (<http://sift.jcvi.org/>)、PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>)、PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)、Mutation Taster (<http://neurocore.charite.de/MutationTaster/index.html>)、Align GVGD (http://agvgd.iarc.fr/agvgd_input.php)などが知られている。本発明の方法を実施し、COL4A2遺伝子の変異が検出された場合において、その変異が病原性変異であるかどうかに疑義があるときは、このような公知の予測ツールを用いて病原性変異であるかどうかを判断してもよい。SIFTでは、スコア0.05未満の場合、置換はintolerant（タンパク質機能変化に影響あり）と予測される。PolyPhenでは、スコア2.0を超えた場合、病原性と予測される。PolyPhen-2では、スコア0.000（良性の可能性が最も大）～0.999（有害の可能性が最も大）でスコア付けされ、スコアをもとにした判定がpossiblyあるいはprobably damagingであるときに、病原性変異が強く示唆される。Align GVGDでは、Class C0（可能性小）～Class C65（可能性大）の範囲でクラススコア評価され、クラススコアC55以上

のCOL4A2変異であれば病原性変異が示唆される。

[0023] 表2に示した変異は、実施例において血縁関係のない2家系からそれぞれ同定された2種の孔脳症及び脳出血の病因変異である。これらの変異は、いずれもGly-Xaa-Yaaリピート中の進化的に保存されたGly残基における置換変異であり、多数の日本人健常者集団には発見されず、上記予測ツールを用いた評価で病原性の変異であることが強く示唆された変異であった。もっとも、これら2種の変異は本発明で指標となるCOL4A2遺伝子変異の一例であり、当該2家系以外の家系には当然ながら異なる病原性変異が存在し得るので、本発明の範囲はこれらの具体例に限定されるものではない。

[0024] [表2]

COL4A2遺伝子の変異

DNA変異	アミノ酸変異	エクソン	配列表における変異部位の特定
c.3455G>A	1152位のG→D	38	配列番号1中の第3455位 配列番号31中の第301位
c.3110G>A	1037位のG→E	34	配列番号1中の第3110位 配列番号28中の第385位

[0025] 両親の少なくとも一方に1又は複数のCOL4A2遺伝子変異が発見された場合、その胎児に該変異が遺伝している可能性があるため、胎児が孔脳症又は胎児期～周産期脳出血を生じるリスクが通常よりも高いと予測することができる。胎児の遺伝子を調べる出生前診断法も公知であり既に実用化されているため、所望により、胎児自身が実際に親から遺伝した又はde novoで生じたCOL4A2遺伝子変異を有するかどうかを調べてもよい。孔脳症又は胎児期～周産期脳出血のリスクが懸念される場合、経膈分娩は胎児に物理的ダメージを与え脳出血を惹起し得るので、周産期脳出血の回避のために帝王切開を積極的に選択することが有効である。このように、本発明は安全な出産法の選択に活用することができる。

[0026] また、出生後の健常な対象生体にCOL4A2遺伝子変異が発見された場合、COL4A2遺伝子は血管の脆弱性に関わる遺伝子であるため、その対象生体はCOL4A2遺伝子変異を有しない健常者よりも脳出血のリスクが高いと考えられる。こ

の場合は、生活習慣や食生活に十分に留意する等、出血性の脳血管疾患の予防を重視すべきである。本発明は、成人の脳出血予防にも活用することができる。

実施例

[0027] 以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

[0028] 日本人孔脳症患者35名において、COL4A2遺伝子変異をスクリーニングした結果、2名の患者（患者1、2）において、Gly-Xaa-Yaaリピート中のGly残基の置換が同定された。臨床情報及び末梢血サンプルは、書面によるインフォームドコンセントを得た後に患者家族員より得た。実験プロトコルは横浜市立大学医学部の施設内審査委員会に承認された。

[0029] 患者1は7歳齢であり、近親婚ではない健常な両親から生まれた（図1A、矢印）。妊娠31週時点で出生前超音波検査により右側脳室の拡大が確認されたため、妊娠36週で計画的な帝王切開により出生。アプガースコアは、1分後9点、5分後10点。体重2,900 g (+1.09 SD)、頭囲32.5 cm (+0.05 SD)。初期発達は遅延し、左手が不自由、脚の動きに異常があった。6ヶ月齢での脳MRIにより、右側脳室の拡大を認めた。突発的な嘔吐・悪心及びこれに続く動作停止が生後10ヶ月で発生。脳波（EEG）は右前頭部に焦点性棘波を認め、12ヶ月でカルバマゼピン治療を開始。リハビリテーションは10ヶ月で開始。寝返り12ヶ月、這い這い18ヶ月、独歩3歳。痙性三肢麻痺（両麻痺及び左片麻痺）あり、片側・両側麻痺歩行を呈する。発語は流暢で言語理解は正常。5歳時に痙性不全麻痺に起因する足部変形の整形手術。EEGは右後頭部～後側頭葉部及び中間中心部に棘波を認めた。6歳時の脳MRIにより、右側脳室の拡大、右前頭部白質の容量低下、及び右大脳脚と脳梁体の萎縮を認めた（図2A～C）。6歳時にWISC-IIIで評価したIQ値は74であった（動作性IQ69、言語性IQ82）。現在患者1は7歳齢であり、地元の学校に通学している。短下肢装具及びハンドアシストを用いて歩行可能。カルバマゼピンとクロバザムによりてんかんを良好にコントロールしている。なお、母方の伯父には歩行に補助具を要

する先天性の左片麻痺があり、また母方の大おじにも先天性の片麻痺があった。このことは、家系内に遺伝的素因が存在することを示唆している（図1A）。

[0030] 患者2は1歳4ヶ月であり、近親婚ではない健常な両親から生まれた（図1B、矢印）。妊娠35週で出生。出生時の体重1,694g (-2.36 SD)、頭囲29 cm (-1.77 SD)。軽度の仮死状態であり、アプガースコアは1分後3点、5分後7点。生後6時間の超音波検査により、左側脳室の拡大とともに右大脳半球に実質性出血を認めた。血液検査の結果、Dダイマーの上昇はなかったがプロトロンビン時間（29.3秒）と活性化部分トロンボプラスチン時間（104.3秒）の有意な増大が確認されたため、新鮮凍結血漿を12日間連日投与した。側脳室の拡大が進行するため、生後37日で脳室-腹腔シャント（V-Pシャント）手術を行なった。2ヶ月齢でのCTにより、側脳室の左右対称性の拡大と前頭部白質の左右対称性の極度の容積低下を認めた（図2D-F）。血液凝固は7ヶ月齢で正常化した。7ヶ月で頸定・寝返りいずれも見られず、異常姿位と左優位の痙性四肢麻痺を呈した。リハビリテーションの結果、全視野における追視、あやし笑い、不完全な頸定あり。痙縮は改善したが、四肢遠位の共同随意運動とともに深部腱反射亢進を認めた。1歳時のEEGではてんかん発射を認めず。現在の発達指数は20未満。患者2の姉は生後2日に脳室内出血が発見され、V-Pシャントを施行した。姉の発達はほぼ正常であり、内斜視を認めた。不運にも4歳で事故死したため、姉のDNAサンプルは入手不能であった（図1B）。

[0031] ゲノムDNAは常法により末梢血白血球から分離した。変異スクリーニングのためのDNAは、illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare, 英国バッキンガムシャー州)により増幅した。患者1の家族員のDNAは、Oragene (DNA Genotek Inc., カナダ国オンタリオ州)を用いて唾液サンプルより分離した。

[0032] まず、COL4A2遺伝子コード領域全長（GenBankアクセッション番号NM_001846.2）をカバーするエクソン2～48を、High resolution melting曲線（HRM）解析又はダイレクトシーケンシング（エクソン46について）により調

べた。リアルタイムPCR及びそれに続くHigh resolution melting解析はRoter Gene-6000 (Corbett Life Science) を用いて12 μ Lの反応系で行なった。反応液の組成は、エクソン2/3/7/13/24/42/46/47/48については30 ng DNA, 0.3 μ M each primer, 0.4 mM each dNTP, 1.5 μ M SYT09, 1 \times PCR Buffer for KOD FX and 0.3 U KOD FX polymerase、その他のエクソンについては30 ng DNA, 0.25 μ M each primer, 1.5 μ M SYT09, 1 \times HotStarTaq-plus mastermixの組成とした。HRM及びシーケンシングの際に使用したPCRプライマー及び反応条件を表3に示す。

[0033]

[表3-1]

エクソン	プライマー配列 (5'>3') 上段: フォワード、下段: リバース	配列 番号	増幅サイズ (bp)	PCR条件**
Ex2	ATGGGCTGCCTCCCTCATCCT GAGAGTTACACCGAAGGGTCCATGC	39 40	202	KOD-FX 2step
Ex3	GCATGGACCCTTCGGTGTAACTCTC CCACTCAAACGTCCAACCACTCTC	41 42	198	KOD-FX 2step
Ex4	TTGGAAGGATTCTCAACAGATG AGCGAGGCATGACTGTATGA	43 44	230	HotStar
Ex5&6	TCGTGGAAATTGAACCTTTG CCTAGGATGCACGCAATGTT	45 46	344	HotStar
Ex7	GCCGGGAACATGGCTTATGAGAATA GTTATGCTTCCGTTCTGGCCACAGT	47 48	332	KOD-FX 2step
Ex8	CTGCACCGAATGTTAATGGA GATTATGCCGCCATTCTAGG	49 50	269	HotStar
Ex9&10	GGGCTGATCTGTTTGATATGC CCAGAGTGGGCACCTGTGT	51 52	343	HotStar
Ex11	CAGAAACCTCCATGCATCCT CAAACAAACCCACAAACACCT	53 54	230	HotStar
Ex12	TTGCCGATAAATAGGCCTTG TTTCCTGGCTGAGAAATGCT	55 56	201	HotStar
Ex13	TTTCCTTTCGATTTAAAGACAACCTGC TGGAATGTGGTTGAATACAATTGAAGA	57 58	233	KOD-FX 3step
Ex14	CATGTCATGAACCCTGATTGA ATGAGAGACTGGCGGTGTG	59 60	231	HotStar
Ex15	AGTCCTGGAGCAGAGGATGA AAACCAAACCAAACCGACAA	61 62	186	HotStar
Ex16	CGTAGTCAAGCCCTCTGGAA TGAGATGCCAAGGCCTATTT	63 64	197	HotStar
Ex17	TTTGGAGTTATACATCAGAGACAAAA GTGGGCGAGACACCATAAGT	65 66	192	HotStar
Ex18	CTCGGGTTTCTTCTTTGGAA GCTCTGTGTCCCTAACAGGAG	67 68	223	HotStar
Ex19	CTCATCAGGCCGCATACAG GACCTGAGTGCAAGGTGCTTT	69 70	288	HotStar
Ex20	TCTGGACACGAACAGAAAGG CGGGCTTCATCTGAACATTA	71 72	277	HotStar
Ex21	CCTGCATCTGTGGTTGTCTC GGGGATGGATTTACCTTCT	73 74	199	HotStar
Ex22	GCTAAGAGGAATGCGGAACA GGAGGCCTCAGAGTGTCTTG	75 76	260	HotStar
Ex23	GCCAGCTGTGTGAGATGAAA GTCCCGCTCACCTAGAAAAG	77 78	270	HotStar

[0034] [表3-2]

エクソン	プライマー配列 (5'>3') 上段:フォワード、下段:リバース	配列 番号	増幅サイズ (bp)	PCR条件**
Ex24	TCCAGAACAATCACAACCAAAGGTGA GGGTGTTTGGAGAACCTGAAGGATG	79 80	286	KOD-FX 2step
Ex25	GGAAGTCGAGGCGATCTTTA CAAAGGAAAGCGTGGAATGT	81 82	325	HotStar
Ex26	CCCAGACGAGCCAGTAACTC TTATCCCACGCATACTGCAA	83 84	215	HotStar
Ex27	TAGGATTGCTTGGGCTCATC TTTGTGCTGAGATGCTGGAC	85 86	235	HotStar
Ex28	TTATCCTCGTGGAGCCTGAT CTCCCAAGGACAAATGCAA	87 88	300	HotStar
Ex29	CCATGCTAACTTGTGGTTTGG CACTGTGCATCTGGGATGG	89 90	314	HotStar
Ex30	AGTGTGTGGAGGGAGATGCT GTGAGGACCCCACTCGTTTA	91 92	279	HotStar
Ex31	TGTTTGTCCACCCTGTTTGA CCAGCAGAGCTGTCTCAGGT	93 94	291	HotStar
Ex32	CGAAATGTTACGGAGACGTG TGCCACCAAGAAAGGGTAAG	95 96	297	HotStar
Ex33	CAGGCCTTCACCTGTGTTCT GTCTCTGGGGACGGAGAAG	97 98	280	HotStar Step down
Ex34	CAGCACGTAGGACAGCAAAA GCTCACAGAACAAGGGGAGT	99 100	321	HotStar
Ex35	ACAGCTAAGCAAACCGCCTA TCTGAATTGTGGACTCCCTGT	101 102	287	HotStar
Ex36	TCCCAGTGGAAAGTCCTGTT TTGATCTGTTTGGCAAGTCG	103 104	205	HotStar
Ex37	GAAGGAGCAGCAGTGTGGTT AATGTTGACCGCCTTTGTTC	105 106	285	HotStar
Ex38	CCAGGACCTCACCACACAG ACTCTGGGTCTGGGTGACCA	107 108	216	HotStar
Ex39	GCTGTCCCACACATGAAATAA ACACCTCTGCGTGGGACTC	109 110	314	HotStar
Ex40	GCTGCCTCTGTTTCTTTGCT CTCTGGGTGGGTTCTGGTTA	111 112	295	HotStar
Ex41	GCACCTCCCATCACTGTCTC CTACATTAAGCGGGCCATTG	113 114	316	HotStar
Ex42	AGAGACTGTGCGCTGAATGGGTGAC GACGTTAGGGACACGAAAGTCTGTGG	115 116	343	KOD-FX 2step
Ex43	CTGGCCACAGTGAGAGGAG GACCCATGCCAGAGAGGAT	117 118	272	HotStar Step down

[0035] [表3-3]

エクソン	プライマー配列(5'>3') 上段:フォワード、下段:リバース	配列 番号	増幅サイズ (bp)	PCR条件**
Ex44	ACTCGGAGCAAGAGAGTGGA GAACACAAGAGGACGCAATG	119 120	293	HotStar
Ex45	CATTGCGTCCTCTTGTGTTC AGCACTAGGACCTGGGAAGG	121 122	248	HotStar
Ex46	GGGCTGCTCTCTCTCTTT AACTTACCAGCCGTGGAGGGTTTG	123 124	586	KOD-FX 2step
Ex47-1*	GGCCCTCCAGTAGGTGGCTAAACTC GGCTGATGTAGGGCTTGATCTCGTC	125 126	310	KOD-FX 2step
Ex47-2*	TCCTGTAAGCAACCCTGGTGTGT CAAAGGCAGCTGTTCTTGCTGTGTC	127 128	317	KOD-FX 2step
Ex48	CAGGCTGTGATTCTAACCCCTGTCC GAATAAGCACCAAATGGCCCTTCC	129 130	341	KOD-FX Step down

*エクソン47は2箇所に分けてHRMとシークエンシングを行なった。

**PCRサイクルは35回とし、以下の反応条件で行なった:

HotStar; 94°C 30秒-55又は57°C(エクソン38) 30秒-72°C 60秒

HotStar Step down; 始めの5サイクルでアニーリング温度を-1°C/サイクル(58°C→54°C)

KOD-FX 2step; 98°C 10秒-68°C 30秒

KOD-FX 3step; 98°C 10秒-64°C 30秒-68°C 30秒

KOD-FX Step down; 5ステップごとに2°Cずつアニーリング温度を低下(72°C→68°C)

使用したPCR増幅用酵素:

「KOD-FX」ではKOD-Fx DNA polymerase (東洋紡、日本国大阪)、「HotStar」ではHotStar Taq (Qiagen) を使用。

[0036] HRM解析で異常な融解曲線パターンを示したサンプルについて配列決定を行なった。PCR産物をExoSAP-IT (GE healthcare)で精製後、BigDye Terminator chemistry version 3 (Applied Biosystems)を用いてサイクルシークエンス反応を行なった。反応物はSephadex G-50 (GE healthcare) とMultiscreen-96 (Millipore)を用いてゲル濾過にて精製し、ABI Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems)でシークエンスを得た。得られたシークエンスは、SeqScape version 2.1.1 software (Applied Biosystems)を用いて変異の有無について解析を行なった。変異が認められたサンプルに関しては、ゲノムDNAを鋳型として用いて再度配列解析を行ない、ゲノムDNA上での変異を確認した。

[0037] その結果、患者1でc.3455G>A (p.G1152D)、患者2でc.3110G>A (p.G1037E) という2種類のヘテロ接合変異が同定された。いずれの変異もGly-Xaa-Yaa

リピート中の進化的に保存されたGly残基で生じており（図1D）、この2種の変異がコラーゲンIV $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ ヘテロトリマーを変化させ得ることが示唆された。これらの変異は日本人健常コントロール200例には発見されず、インターネットの予測ツールを用いた評価によると、これらの置換変異が病原性であることが強く示唆された（表4）。

[0038] [表4]

患者	変異	SIFT	PolyPhen	PolyPhen-2	Mutation taster	Align GVDG
1	c.3455G>A p.G1152D	0.00	probably damaging 2.142	probably damaging 1.00	Disease causing	C65
2	c.3110G>A p.G1037E	0.00	probably damaging 2.367	probably damaging 1.00	Disease causing	C65

予測には以下のツールを使用

(1) SIFT (<http://sift.jcvi.org/>)

スコア0.05未満の場合、置換はintolerant(タンパク質機能変化に影響あり)。

(2) PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>)

スコア2.0を超えた場合、病原性と判断。

(3) PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)

スコア0.000(良性の可能性が最も大)~0.999(有害の可能性が最も大)

(4) Mutation Taster (<http://neurocore.charite.de/MutationTaster/index.html>)

(5) Align GVDG (http://agvgd.iarc.fr/agvgd_input.php)

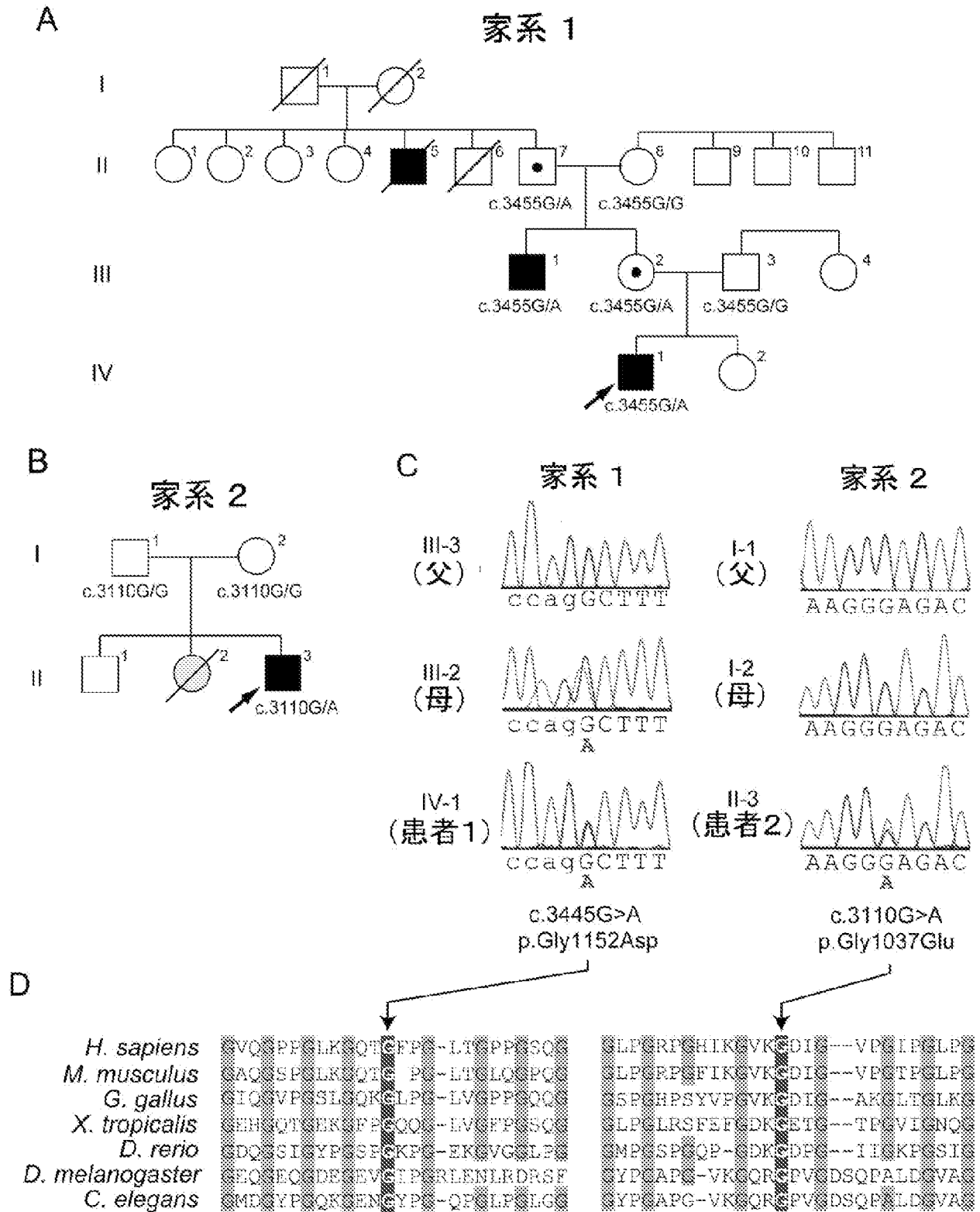
Class C0(可能性小)~Class C65(可能性大)

[0039] 患者1のc.3455G>A変異は、無症候の患者母及び母方の祖父、並びに先天性の左片麻痺のある母方のおじにも認められた（図1A及びB）。従って、c.3455G>A変異は不完全浸透度の優性病原性変異であると考えられる。患者2のc.3110G>A変異は両親には認められず、de novo変異であった（図1C）。

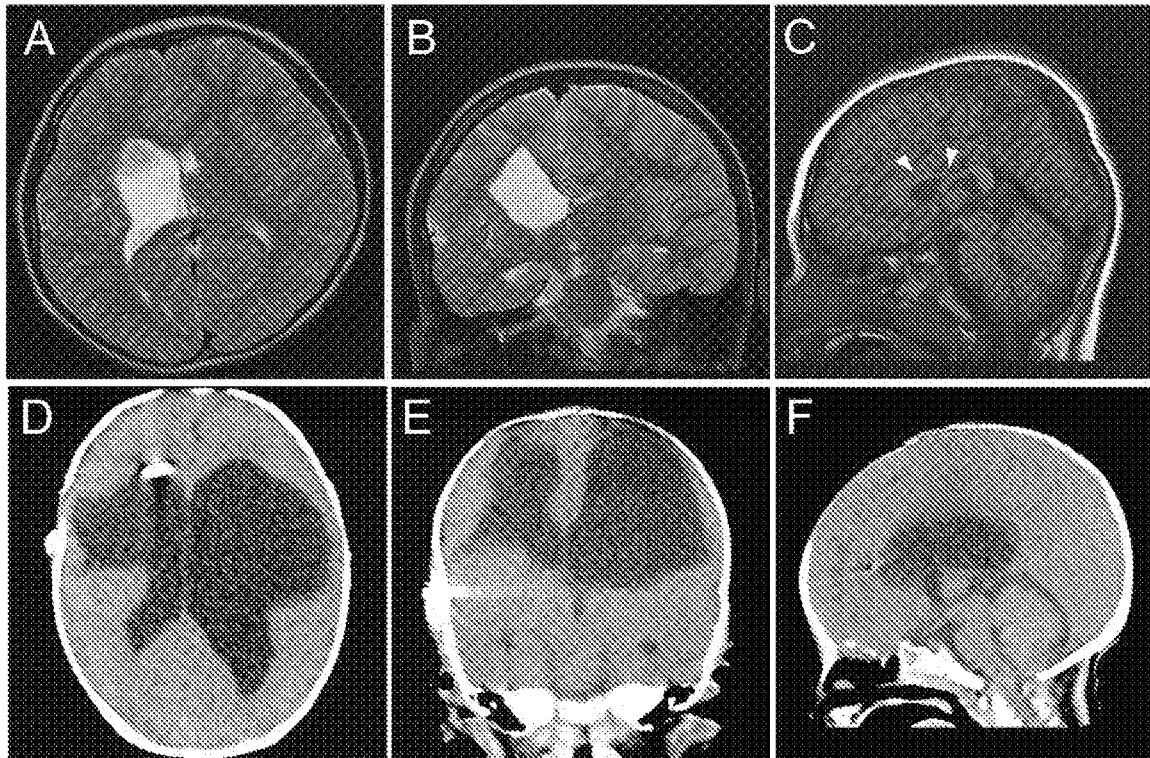
請求の範囲

- [請求項1] 生体から分離された試料に対して実施する方法であって、対象生体のCOL4A2遺伝子に少なくとも1つの変異が存在するか否かを調べることを含み、COL4A2遺伝子の少なくとも一方のアレルに少なくとも1つの変異がある場合に孔脳症又は脳出血のリスクが高いと予測される、孔脳症又は脳出血のリスクを予測する方法。
- [請求項2] 前記対象生体が出生後のヒト又はヒト胎児である請求項1記載の方法。
- [請求項3] ヒト胎児が孔脳症又は胎児期～周産期脳出血を生じるリスクを予測する方法である請求項2記載の方法。
- [請求項4] ゲノムDNA試料を用いてゲノム配列を調べることにより行なわれる請求項1ないし3のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項5] 前記少なくとも1つの変異は、ミスセンス変異、ナンセンス変異、フレームシフト変異、インフレーム欠失及び挿入変異、スプライシング異常を生じる変異、並びにCOL4A2遺伝子領域の全体若しくは一部を欠失する変異からなる群より選択される少なくとも1つである請求項1ないし4のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項6] 前記少なくとも1つの変異は、COL4A2タンパク質中のGly-Xaa-Yaaリピート（ここで、Xaa及びYaaは同一又は異なる任意のアミノ酸を示す）中のグリシンの置換を生じる変異である請求項5記載の方法。
- [請求項7] 前記少なくとも1つの変異が、下記(1)及び(2)からなる群より選択される少なくとも1つである請求項6記載の方法。
- (1) COL4A2遺伝子コード領域の第3455位のG（配列番号31中の第301位）がAになる変異
 - (2) COL4A2遺伝子コード領域の第3110位G（配列番号28中の第385位）がAになる変異

[図1]



[図2]



[図3]

COL4A2: NP_001837.2, 1712aa

MGRDQRAVAGPALRRWLLLGTVTVGFLAQSVLAGVKKFDVPCGGRDCSGGCQCYPEKGGRGOPG
PVGPOGYNGPPGLOGFPGLQGRKGDKGERGAPGVTGPKGDVGARGVSGFPGADGIPGHPGOGGP
RGRPGYDGCNGTOGDSGPOGPPGSEGFTGPPGPOGPKGOKGEPYALPKEERDRYRGEPEGPGLV
GFOGPPGRPHVGMGPVGPAPGRPGPPGPPGPKGOOGRGLGFYGVKGEKGDVGOPGPNGIPSD
TLHPIIAPTGVTFHPDQYKGEKGSSEGEPIRGISLKGEEGTMGFPLRGYPGLSSEKGS PGQKG
SRGLDGYOGPDGPRGPKGEAGDPGPPGLPAYS PPHSLAKGARGDPGFPGAQGEPPGSOGE PGDPG
LPGPPGLSISGDGQRRGLPGEMGPKGFIDGPGIPALYGGPPGPDGKRGPPGPPGLPGPPGPDGF
LFGLKGAKGRAGEPGLPGSPGARGPKGWKGDAGECRCTEGDEAIKGLPGLPGPKGFAGINGEPG
RKGDRGDPGOHGLPGFPGLKGVPGNIGAPGPKGAKGDSRTITTKGERGQPGVPGVPMKGDGDS
PGRDGLDGFPLPGPPGDGIKGPDPGYPGIPGTKTGTPGEMGPPGLGLPGLKGORGFPGDAGL
PGPPGFLGPPGAGTPOIDCDTVDKRAVGGDRQEAIQPGCIGGPKGLPGLPGPPGPTGAKGLR
GIPGFAGADGGPGPRGLPGDAGREGFPFPFGFIGPRGSKGAVGLPGPDGSPGPIGLPGPDGPPG
ERGLPGEVLGAQPGPRGDAGVPGOPGLKGLPGDRGPPGFRGSQGMGMPGLKGOPGLPGPSGOP
GLYGPPLHGFPGAPGOEPLGLPGIPGREGLPGDRGDPGDTGAPGPVGMKGLSGDRGDAGFTG
EQHPPGSPGFKGIDGMPGTPGLKGDGRSPGMDGFOGMPGLKGRPGFPGSKGEAGFFGI PGLKGL
AGEPGFKGSRGDPGPPGPPVILPGMKDIKGEKGDGPMGLKGYLGAKGIOGMPGIPGLSGIPG
LPGRPGHIKGVKGDIGVPGIPGLPGFPVAGPPGITGFPFGIGSRGDKGAPGRAGLYGEIGATG
DFGDIGDTINLPGRPGLKGERGTTGIPGLKGFGEKGTGDI GFPGITGVTGVOGPPGLKGTG
FPGLTGPPGSOGELGRIGLPGGKGGDDGWPAGPLPGFPGLRGIRGLHGLPGTKGFPGSPGSDIH
GDPGFPGPPGERGDPGEANTLPGPVGVPGOKGDOGAPGERGPPGSPGLOGFPGITPPSNISGAP
GDKGAPGIFGLKGYRGPPGPPGSAALPGSKGDTGNPGAPGTPGTKGWAGDSGPOGRPGVFGPLG
EKGPRGEOGFMGNTGPTGAVGDRGPKGPKGDPGFPGAPGTVGAPGIAGIPOKIAVQPGTVGPOG
RRGPPGAPGEMGPOGPPGEPGFRGAPGKAGPOGRGGVSAVPGFRGDEGPIGHOGPIGOEGAPGR
PGSPGLPGMPGRSVSIGYLLVKHSQTDQEP MCPVGMNKLWSGYSLLYFEGQEKAHNQDLGLAGS
CLARFSTMPFLYCNPGDVCYYASRNDKSYWLSTTAPLPMPVAEDEIKPYISRCVCEAPAIAI
AVHSQDVSI PHCPAGWRSLWIGYSFLMHTAAGDEGGGQSLVSPGSCLEDFRATPFIECNGGRGT
CHYYANKYSFWLTTIPEQSFQGSPSADTLKAGLIRTHISRCQVCMKNL

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/077903

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01) i, C12N15/09(2006.01) n

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

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	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

CAPlus/BIOSIS/MEDLINE (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	Gould DB et al., Mutations in Col4a1 cause perinatal cerebral hemorrhage and porencephaly., Science, 2005, 308(5725), p.1167-1171	1-6/7
Y/A	Jack Favor et al., Type IV Procollagen Missense Mutations Associated With Defects of the Eye, Vascular Stability, the Brain, Kidney Function and Embryonic or Postnatal Viability in the Mouse, Mus musculus: An Extension of the Col4a1 Allelic Series and the Identification of the First Two Col4a2 Mutant Alleles., Genetics, 2007, 175(2), p.725-736	1-6/7
A	G. Breedveld et al., Novel mutations in three families confirm a major role of COL4A1 in hereditary porencephaly., J. Med. Genet., 2006, 43(6), p.490-495	1-7

 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
08 November, 2012 (08.11.12)Date of mailing of the international search report
20 November, 2012 (20.11.12)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/077903

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Zhang KW et al., Do mutations in COL4A1 or COL4A2 cause thin basement membrane nephropathy (TBMN)?, <i>Pediatr Nephrol.</i> , 2007, 22(5), p.645-651	1-7
P,X	Yuriko Yoneda et al., De Novo and Inherited Mutations in COL4A2, Encoding the Type IV Collagen α 2 Chain Cause Porencephaly., <i>Am. J. Hum. Genet.</i> , 2012, 90, p.86-90	1-7
P,X/P,A	Elly Verbeek et al., COL4A2 mutation associated with familial porencephaly and small-vessel disease, <i>European Journal of Human Genetics</i> , 2012, 20, p.844-851	1-6/7
P,A	Marion Jeanne et al., COL4A2 Mutations Impair COL4A1 and COL4A2 Secretion and Cause Hemorrhagic Stroke., <i>Am. J. Hum. Genet.</i> , 2012, 90, p.91-101	1-7
P,X	Debbie S. Kuo et al., COL4A1 and COL4A2 mutations and disease: insights into pathogenic mechanisms and potential therapeutic targets., <i>Human molecular genetics</i> , 2012, 21, Review Issue 1, p.R97-R110	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

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

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 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/68, C12N15/09

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	1971-2012年
日本国実用新案登録公報	1996-2012年
日本国登録実用新案公報	1994-2012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)

CAplus/BIOSIS/MEDLINE(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), WPI

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/ A	Gould DB et al., Mutations in Col4a1 cause perinatal cerebral hemorrhage and porencephaly., Science, 2005, 308(5725), p.1167-1171	1-6/ 7

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

08.11.2012

国際調査報告の発送日

20.11.2012

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/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)

伊藤 佑一

4 N

3 8 4 6

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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/ A	Jack Favor et al., Type IV Procollagen Missense Mutations Associated With Defects of the Eye, Vascular Stability, the Brain, Kidney Function and Embryonic or Postnatal Viability in the Mouse, <i>Mus musculus: An Extension of the Col4a1 Allelic Series and the Identification of the First Two Col4a2 Mutant Alleles.</i> , <i>Genetics</i> , 2007, 175(2), p.725-736	1-6/ 7
A	G. Breedveld et al., Novel mutations in three families confirm a major role of COL4A1 in hereditary porencephaly., <i>J. Med. Genet.</i> , 2006, 43(6), p.490-495	1-7
A	Zhang KW et al., Do mutations in COL4A1 or COL4A2 cause thin basement membrane nephropathy (TBMN)?, <i>Pediatr Nephrol.</i> , 2007, 22(5), p.645-651	1-7
P, X	Yuriko Yoneda et al., De Novo and Inherited Mutations in COL4A2, Encoding the Type IV Collagen $\alpha 2$ Chain Cause Porencephaly., <i>Am. J. Hum. Genet.</i> , 2012, 90, p.86-90	1-7
P, X/ P, A	Elly Verbeek et al., COL4A2 mutation associated with familial porencephaly and small-vessel disease, <i>European Journal of Human Genetics</i> , 2012, 20, p.844-851	1-6/ 7
P, A	Marion Jeanne et al., COL4A2 Mutations Impair COL4A1 and COL4A2 Secretion and Cause Hemorrhagic Stroke., <i>Am. J. Hum. Genet.</i> , 2012, 90, p.91-101	1-7
P, X	Debbie S. Kuo et al., COL4A1 and COL4A2 mutations and disease:insights into pathogenic mechanisms and potential therapeutic targets., <i>Human molecular genetics</i> , 2012, 21, Review Issue 1, p.R97-R110	1-7