

(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  
2014年8月28日(28.08.2014)



(10) 国際公開番号  
WO 2014/129437 A1

- (51) 国際特許分類:  
*C12Q 1/68* (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)  
*G01N 33/15* (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/053710
- (22) 国際出願日: 2014年2月18日(18.02.2014)
- (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 2013-029643 2013年2月19日(19.02.2013) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人 富山大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION UNIVERSITY OF TOYAMA) [JP/JP]; 〒9308555 富山県富山市五福3190 Toyama (JP).
- (72) 発明者: 新田 淳美(NITA ATSUMI); 〒9300194 富山県富山市杉谷2630 富山大学杉谷キャンパス内 Toyama (JP). 宇野 恭介(UNO Kyosuke); 〒9300194 富山県富山市杉谷2630 富山大学杉谷キャンパス内 Toyama (JP).
- (74) 代理人: 大谷 嘉一(OTANI Kaichi); 〒9330023 富山県高岡市末広町14-45 Toyama (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, 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, 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.

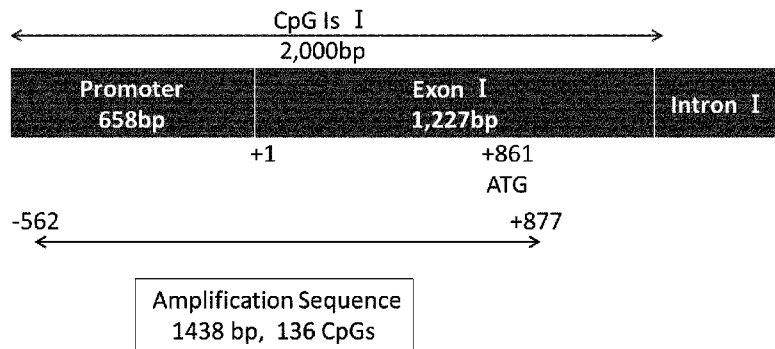
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, 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))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: MENTAL DISORDER INSPECTION METHOD AND INSPECTION KIT

(54) 発明の名称: 精神障害の検査方法および検査キット



(57) Abstract: [Problem] To provide: an inspection method for external examination of mental disorders such as drug dependency, schizophrenia, and depression; and an inspection kit used in said inspections. [Solution] An inspection method and an inspection kit for mental disorders, whereby whether or not a human or mouse subject has a mental health disease such as drug dependency, schizophrenia, or depression and the progression of disease pathology can be known by investigating the methylation state of Shati genes of the subject. Accordingly, the present invention is useful for the treatment of mental health disorders such as drug dependency, schizophrenia, and depression and for the development of therapeutic drugs therefor.

(57) 要約: 【課題】薬物依存症、統合失調症、鬱病などの精神障害を体外診断するための検査方法および該検査に使用する検査キットの提供。【解決手段】被験体であるヒトまたはマウスなどで、Shati遺伝子のメチル化状態を調べることにより、被験体が薬物依存症、統合失調症、鬱病など精神関連疾患に罹患しているか否か、それら疾患の病状の進行状況などを知ることができる。従って、薬物依存症、統合失調症、鬱病など精神関連疾患の治療や治療薬開発に有用である。

WO 2014/129437 A1

## 明 細 書

発明の名称：精神障害の検査方法および検査キット

### 技術分野

[0001] 本発明は、精神障害関連タンパク質 *Shat1* 遺伝子に係る CpG アイランドのメチル化状態に基づく精神障害の検査方法および検査キットに関する。

### 背景技術

[0002] 精神が障害された疾患の多く、例えば、統合失調症や鬱病などは、思春期などの人生の早い時期に発症し、患者は薬物や行動療法などと共に一生その疾患と共に生きていかなければならず、日常生活や職業選択に制限が生じている。

このような疾患は、少しでも早い時期から治療を開始することが出来れば、疾病の悪化を食い止め、さらには回復の可能性を見出すこともできる。

鬱病や統合失調症の検査方法として、例えば、BDNF 遺伝子のエクソン I 上流の CpG アイランドにおけるメチル化状態を指標とする検査方法が知られている（特許文献 1）といった報告がなされている。

[0003] 一方、覚醒剤や麻薬による薬物依存症は大きな社会問題となっており、治療法の確立を目指して、依存形成に係わる機能分子の探索が行われた。

その結果、覚醒剤精神病モデルマウスの脳側坐核において高い発現量を示す *Shat1*（NCBI アクセスナンバー ABA54615）が見出された（非特許文献 1）。

また、*Shat1* の核酸の検出による精神障害の診断が提案されている（特許文献 2）。

[0004] 特許文献 1：W02012/017867

特許文献 2：W02006/093034

非特許文献 1：J. Neurosci., 27, 7604-7615, 2007

非特許文献 2：PLoS One, 6(8), e23881, 2011.

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0005] エピジェネティクスは、遺伝子と環境の両方の要因によって初めて現れる症状を追究する分野であり、鬱病や統合失調症のような精神疾患との関連が注目されている（非特許文献2）。

本発明は、薬物依存症、統合失調症、鬱病などの精神障害を体外診断するための検査方法および該検査に使用する検査キットを提供し、簡便にかつ早期に精神障害を発見する方法・ツール提供することを課題としている。

### 課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、エピジェネティクスの観点から、Shatiの発現制御機構の解明を行い、ShatiにおけるCpGアイランドのメチル化状態を指標とする精神障害の検査方法を確立し、本発明を完成するに至った。

以下、本発明を詳細に説明する。

[0007] 本発明の第1の発明は、以下の検出工程（1）および検査工程（2）を含むことを特徴とする精神障害の検査方法である。

（1）検出工程：被験体から採取した試料のShati遺伝子のCpGアイランドにおけるメチル化状態の検出。

（2）検査工程：被験体から採取した試料のメチル化状態を、精神障害の個体および非精神障害の個体から採取した試料のShati遺伝子のCpGアイランドにおけるメチル化状態と比較して、被験体が精神障害か否かの検査。

ここで、精神障害は、薬物依存症、統合失調症、鬱病のいずれかにより生じたものであり、試料が、哺乳動物から採取した生体試料である。

[0008] 本発明の第2の発明は、被験体から採取した試料のShati遺伝子のCpGアイランドにおけるメチル化状態検出用の特定のプライマーセットを含むことを特徴とする精神障害疾患用の検査キットである。

[0009] 本発明の第3の発明は、以下の検出工程（3）および評価工程（4）を含むことを特徴とする精神障害治療剤および／または予防剤の評価方法である

。

(3) 被験化合物の非存在下および存在下において、被験体から採取した試料の S h a t i 遺伝子の C p G アイランドにおけるメチル化状態を検出する検出工程。

(4) 精神障害の個体および非精神障害の個体から採取した試料の S h a t i 遺伝子の C p G アイランドにおけるメチル化状態を指標として、被験化合物の非存在下における被験体から採取した試料のメチル化状態と被験化合物の存在下における被験体から採取した試料の前記メチル化状態とを比較して、被験化合物が精神障害の治療剤および／または予防剤となるか否かを評価する評価工程。

ここで、精神障害は、薬物依存症、統合失調症、鬱病のいずれかにより生じたものであり、試料が、哺乳動物から採取した生体試料である。

## 発明の効果

[0010] S h a t i 遺伝子のメチル化を指標とすることで、精神障害の状態を客観的判斷することができる。

また、S h a t i 遺伝子のメチル化の指標とすることで、被験化合物が精神障害治療剤および／または予防剤となるか否かを評価することができる。

すなわち、臨床医等の主観的な判断によらずに精神障害治療剤および／または予防剤の評価ができるため、より正確な評価を行うことが可能となる。

S h a t i 遺伝子の C p G アイランドにおける個別の C p G メチル化状態は、被検体が精神障害のときや、統合失調症の病態が進行すると、C p G のメチル化率が減少するので、その減少の程度を評価指標に用いることができる。

## 図面の簡単な説明

[0011] [図1] ターゲットマウスの S h a t i DNA 領域の概要である。

[図2] ゲル電気泳動によるマウスゲノム DNA の検出を示す図である。

[図3] ゲル電気泳動による PCR 産物の検出を示す図である。

[図4] シーケンススキャナによる配列解析の一例を示す図である。

[図5]血中におけるShatiのメチル化解析を示す図である。

[図6]側坐核におけるShatiのメチル化解析を示す図である。

[図7]ヒトのShati DNA領域の概要である。

[図8]ゲル電気泳動によるPCR産物の検出を示す図である。

[図9]ヒト血中におけるShatiメチル化解析を示す図である。

### 発明を実施するための最良の形態

[0012] 本発明の検出工程(1)または(3)において、被験体は、哺乳動物であれば、特に限定されないが、マウス、ラットなどげっ歯類；ウサギ；ネコ；イヌ；ヒトなどが挙げられる。好ましい、被験体は、げっ歯類またはヒトである。

[0013] 試料は、生体から採取された組織・血液であればよく、特に血液が好ましい。血液は、全血または血小板など特定の血液成分を使用すればよい。

[0014] Shati遺伝子のCpGアイランドは、Shati遺伝子のプロモーター領域におけるCpGアイランドのメチル化DNAの割合を見ることができれば、特に限定されないが、例えば、mouseのShati CpG islandである配列番号1又はhumanのShati CpG islandである配列番号4の塩基配列を含むことが好ましい。

[0015] Shati DNAのメチル化状態の検出に用いる方法は、メチル化DNAを濃縮する方法、バイサルファイト処理による塩基置換を利用する方法、メチル化感受性の制限酵素を利用する方法など、特に限定されないがバイサルファイト処理による塩基置換を利用する方法が好ましい。

バイサルファイト処理には、例えば、EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research)などの市販のキット品を用いればよい。

[0016] メチル化状態の解析には、公知の方法を利用すればよいが、例えば、バイサルファイト処理後に、目的のDNA領域をPCR増幅し、クローニングしてシーケンス解析を行えばよい。

[0017] 目的のDNA領域をPCR増幅に使用するメチル化検出用および非メチル

化検出用のプライマーの設計は、例えば、「Methyl Primer Express (アプライドバイオシステムズ)」などを使用すればよい。

具体的なプライマーとしては、以下のものが挙げられる。

[0018] 配列番号1を目的のDNA領域する場合にバイサルファイト処理後に下記のプライマーセットを用いる

<Shati BSP up>

配列：5' -gggatttaggagaagttaatgtg-3' (配列番号2)

<Shati BSP down>

配列：5' -aaaaaccacacaatacacacacc-3' (配列番号3)

配列番号4のhumanのShati CpG islandを目的のDNA領域する場合に、バイサルファイト処理後の配列番号5のDNAを解析領域として、下記のプライマーセットを用いるとよい。

Up15' -ttatgtgggatttttaaaga-3' (配列番号6)

Down25' -acctaacccttcaattctac-3' (配列番号7)

又は

Up45' -ggggtggtgttgggagg-3' (配列番号8)

Down15' -aaaaaccacacaatacacacacc-3' (配列番号9)

[0019] 上記のプライマーを使用したPCR増幅は、公知の方法で行えばよく、例えば、「Epi Taq HS (タカラバイオ)」および「カスタムプライマー (invitrogen)」を用いて「PCR Thermal Cycler Dice Gradient (タカラバイオ)」でPCRを行えばよい。さらにPCR産物をゲル電気泳動に供し、「QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン)」などを用いて目的のバ

ンドからDNAを抽出すればよい。

[0020] DNAのベクターへの組み込みと増幅は、公知の方法で行えばよく、例えば、「pGEM-T Easy Vector System (Promega)」を用いてDNAをベクターにライゲーションし、「E. coli DH5 $\alpha$  Competent Cells (タカラバイオ)に形質転換し、LB/Amp液体培地中などで培養すればよい。

さらに、ポイリング法に準じて形質転換E. coliからプラスミドDNAを抽出し、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿により目的とするDNAを精製すればよい。

[0021] シークエンスの決定は、公知の方法で行えばよく、例えば、「BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems)」を用い、T7またはSP6プライマーを用いてPCRを行い、Sequence Scanner (Applied Biosystems)によりシークエンス解析を行えばよい。

[0022] 本発明の検査工程(2)は、被験体から採取した試料のメチル化状態を、精神障害の個体および非精神障害の個体から採取した試料のShati遺伝子のCpGアイランドにおけるメチル化状態と比較して、被験体が精神障害か否かの検査を行う。

具体的には、例えば、被験体がヒトである場合、予め複数の精神障害の患者および健常者のメチル化状態のデータを収集しておき、当該平均データと比較することによって被験体が精神障害か否かを検査することができる。

さらには、例えば、複数種の精神障害毎の患者の平均データと比較し、いずれの精神障害に該当するか検査してもよい。

好ましくは、健常者、薬物依存患者、統合失調症患者、鬱病患者の平均データと比較することにより、被験体(対象者)がいずれに該当するかを検査する。

または、平均データでなくとも、多変量解析を用いることにより、いずれ

に該当するか検査することも可能である。

[0023] 本発明の評価工程（４）は、精神障害治療剤および／または予防剤の評価方法に関する。

具体的には、精神疾患の個体および非精神疾患の個体から採取した試料の *Shati* 遺伝子の CpG アイランドにおけるメチル化状態を指標として、被験化合物非存在下の試料のメチル化状態と被験化合物存在下の試料のメチル化状態を比較し、被験化合物が精神障害治療剤および／または予防剤となるか否かを評価する工程である。

[0024] ここで、「被験化合物」とは、精神障害治療剤および／または予防剤となるか否かの評価（精神障害治療剤および／または予防剤のスクリーニングも含む）の対象となりうる、あらゆる物質を意味する。

例えば、低分子化合物、核酸またはポリペプチド等が挙げられる。低分子化合物、核酸またはポリペプチド等は、天然物から抽出および精製されたものであってもよく、人工的に合成されたものであってもよい。

また、精製されたものに限らず、未精製のものでも被験化合物として使用することができる。

また、新規な物質に限らず、公知の物質またはその改良物であってもよい。例えば、既存の治療薬もしくは予防薬またはその誘導体につき、評価をすることも可能である。

[0025] 評価工程（４）に先立って、まず、検出工程（３）を行う。被験化合物の非存在下および存在下において、被験体から採取した試料の *Shati* 遺伝子の CpG アイランドにおけるメチル化状態を検出する。

試料の採取、およびメチル化状態の検出手段などについては、検出工程（１）と同様である。

[0026] 精神障害のマウスやヒトの個体および非精神障害のマウスやヒトの個体から採取した当該 CpG アイランドにおけるメチル化状態を指標とし、このように検出した被験化合物の非存在下および存在下における試料のメチル化状態を比較する。



その結果から、被験化合物が精神障害治療剤および／または予防剤となるか否かを評価する。

具体的には、例えば、予め複数の精神障害のマウス・ヒトおよび健常のマウス・ヒトのメチル化状態のデータを収集しておき、当該平均データ等を指標とし、被験化合物の投与前後の試料のメチル化状態を比較する。

これにより、被験化合物が精神障害の治療剤および／または予防剤となるか否かを評価することができる。

好ましくは、精神障害治療剤および／または予防剤は、薬物依存症、統合失調症および鬱病の治療剤または予防剤である。

なお、平均データでなくとも、多変量解析により評価を行うことも可能である。

[0027] 上記の Shati 遺伝子の CpG アイランドを検出するためのプライマーセットは、精神障害の検査用キットとすることができる。

キットには、プライマーセットの他、各メチル化状態の検出手段に合わせた、各種試薬、酵素、緩衝液、反応器材および／または説明書等が含まれてもよい。

## 実施例 1

[0028] 以下、本発明を参考例、実施例で説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。

[0029] <目的領域の決定とプライマー設計>

(1) マウス Shati DNA の塩基配列は、「Ensemble Genome Browser (<http://asia.ensembl.org/index.html>)」の配列データを用いた。

[0030] (2) バイサルファイト処理最適化のため、マウス Shati DNA 領域を切断しない制限酵素を「ApE (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>)」を用いて検索した。

その結果、DraI (タカラバイオ) を見出した。

DraIの(切断配列は、「TTT/AAA」である。

[0031] (3) バイサルファイト処理を受けたDNAに対するプライマーの設計を行った。設計には、「Methyl Primer Express (アプライドバイオシステムズ)」を使用した。設計したプライマー以下のとおりである。

[0032] <Shati BSP up>

配列: 5' -GGGATTTAGGAGAAGTTAATGTG-3'

位置: -562~-539

Tm値: 53~55℃

[0033] <Shati BSP down>

配列: 5' -AAAAACCCACAATACATACACC-3'

位置: +854~+877

Tm値: 53~55℃

[0034] (4) CpGアイランドの定義は、以下のとおりとした。

・%GC>50

・長さ: 300~2000bp

・Observed/Expected CpG>0.6

この条件の解析の結果、プロモーターにあたる-648からイントロン1である+1342までがCpGアイランドとなった(図1)。

[0035] <モデルマウスの作成とDNA採取>

C57BL/6Jマウス(雄、8週齢、日本SLC)に0.9%食塩液に溶解し100μg/mLとしたメタンフェタミンを10mL/kgで、一日一回、6日間皮下投与した。

対象群に対しては、0.9%食塩液(10mL/kg)を同様に投与した。

6日目の投与から2時間後にネブタール10mL/kgを腹腔内投与で麻酔を施し、心臓から血液を採取してヘパリンと混合して氷中で保存した。

。

この全血から「Gentra Puregene Blood Kit (キアゲン)」を用いてDNAを抽出した。

全血から精製したマウスのDNAは、ゲル電気泳動によってフラッシュされ、紫外線によって検出された(図2)。

また、側坐核の組織サンプルは、同マウスの全脳を摘出後、ブレインマトリックス(ニューロサイエンス社)を用いて分取し、「REDExtract-N-Amp Tissue PCR Kit (シグマ)」を用いてDNAを抽出した。

なお、これらの実験は、富山大学動物実験取扱規則に沿って行った。

[0036] <目的配列の増幅>

(1) フェノール/クロロホルム抽出

マウス全血200 $\mu$ Lに、トリス・フェノール/クロロホルム混合液200 $\mu$ Lを加えて転倒混和し、4 $^{\circ}$ C、20000gで5分間遠心した。上澄みを新たなチューブに採取し、クロロホルムを等量加えて攪拌混合し、再度4 $^{\circ}$ C、20000gで5分間遠心し、上澄みを新たなチューブを採取した。

[0037] (2) エタノール沈殿

上記の上澄み液200 $\mu$ Lに、イソプロパノール200 $\mu$ L、3M酢酸ナトリウム20 $\mu$ Lを加えて転倒混和し、4 $^{\circ}$ Cで30分間、または-20 $^{\circ}$ Cで10分間以上インキュベートした後、4 $^{\circ}$ C、20000gで20分間遠心した。

上澄みをデカンテーションで捨て、70%エタノールを1mL加えて攪拌混合し、4 $^{\circ}$ C、20000gで5分間遠心した。

上澄みをデカンテーションで捨て、逆さのままキムワイプ上で風乾した。

沈殿を長期保存の場合には、トリス/EDTA溶液(TE Buffer)にて溶解し、シークエンスを行う場合は蒸留水で溶解した。

[0038] (3) 目的配列の増幅

バイサルファイト処理の最適化のため、DraI(タカラバイオ)でDNAを分割し、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿によりDNAを

精製した。精製DNAを「EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research)」を用いてバイサルファイト処理を行い、「Epi Taq HS (タカラバイオ)」および「カスタムプライマー (Invitrogen)」を用いて「PCR Thermal Cycler Dice Gradient (タカラバイオ)」でPCRを行った。

反応条件は、以下のとおり。

- ・ 94℃で5分
- ・ (98℃で30秒、56.8℃で1分、72℃で2分) を35サイクル
- ・ 72℃で7分

PCR産物を1.5%TBE (トリス・ホウ酸・EDTA) 緩衝液ゲルで泳動した。PCR産物が検出され、ターゲットを絞ったPCR産物の長さは1438bpであった (図3)。

「QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン)」を用いて目的のバンドからDNAを抽出した。

#### [0039] <DNAのベクターへの組み込みと増幅>

(1) 「pGEM-T Easy Vector System (Promega)」を用いてDNAをベクターにライゲーションし、「E. coli DH5α Competent Cells (タカラバイオ)」に形質転換した。

LB/Ampプレートに塗布して37℃で一晩インキュベートした後、コロニーをピックアップし、LB/Amp液体培地中で培養した。ボーリング法に準じて形質転換E. coliからプラスミドDNAを抽出し、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製した。

#### [0040] <シーケンス>

「BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems)」を用い、T7またはSP6プライマーを用いてPCRを行った。

反応条件は、以下のとおり。

- ・ 96°Cで1分

- ・ (96°Cで10秒、50°Cで5秒、60°Cで4分)を25サイクル

PCR産物はエタノール沈殿を行った後、HiDiーホルムアミドに溶解し、3130ジェネティックアナライザ (Applied Biosystems) によりシーケンス反応を行った。

Sequence Scanner (Applied Biosystems) によりシーケンスを解析し、メチル化シトシンと非メチル化シトシン (チミン) を判別した (図4)。

メチル化パターンは、生理食塩水投与群 (図4下) とメタンフェタミン投与群 (図4上) で差が認められた。

#### [0041] <結果>

転写開始点から-533~-159の領域のCpGメチル化を検索した。多くの位置でCpGのメチル化が観察された。食塩液群とメタンフェタミン群での有意な差は、2番目のCpG (-525) でのみあった。

また、食塩液群 (SALINE) の方がメタンフェタミン投与群 (MAP) より高いメチル化割合を示した (図5、図6)。

なお、メチル化を100%、非メチル化を0%と示した。

#### 実施例 2

[0042] マウスの場合と同様にヒトでの目的領域の決定とプライマー設計を行い、ヒトのDNAの配列番号4からなる塩基配列を目的領域として、バイサイルフアイト処理し配列番号5からなる塩基配列を解析領域とした。

この結果、プロモーターにあたる-1726からイントロン2である+2010までがCpGアイランドとなった (図7)。

[0043] プライマー配列番号6, 7又は8, 9の組み合わせにてPCRを行った (図8)。

さらにマウスの場合と同様にメチル化パターンの解析した結果を図9に示す。

Schizophreniaの方が明らかに Normolの被検体よりも

ほぼ全てのメチル化可能部位においてメチル化が少なかった。

### 産業上の利用可能性

[0044] 被験体であるヒトまたはマウスなど動物の血液で、Shati遺伝子のメチル化状態を調べることにより、被験体が薬物依存症、統合失調症、鬱病など精神関連疾患に罹患しているか否か、それら疾患の病状の進行状況などを  
知ることができる。

従って、薬物依存症、統合失調症、鬱病など精神関連疾患の治療や治療薬開発に有用である。

## 請求の範囲

- [請求項1] (1) 被験体から採取した試料の S h a t i 遺伝子の C p G アイランドにおけるメチル化状態を検出する検出工程、
- (2) 被験体から採取した試料のメチル化状態を、精神障害の個体および非精神障害の個体から採取した試料の S h a t i 遺伝子の C p G アイランドにおけるメチル化状態と比較して、被験体が精神障害か否かを検査する検査工程、
- を含むことを特徴とする精神障害の検査方法。
- [請求項2] 精神障害が、薬物依存症、統合失調症、鬱病のいずれかにより生じたものである請求項1の精神障害の検査方法。
- [請求項3] 試料が、哺乳動物から採取した生体試料であることを特徴とする請求項1または2に記載の精神障害の検査方法。
- [請求項4] 生体試料が、げっ歯類またはヒトから採取した血液であることを特徴とする請求項3に記載の精神障害の検査方法。
- [請求項5] C p G アイランドは、配列番号1又は4に記載の塩基配列を含むことを特徴とする請求項1～4のいずれかの項に記載の精神障害の検査方法。
- [請求項6] 被験体から採取した試料の S h a t i 遺伝子の C p G アイランドにおけるメチル化状態検出用の、配列番号2, 3、配列番号6, 7、又は配列番号8, 9のプライマーセットを含むことを特徴とする精神障害の検査用キット。
- [請求項7] 被験化合物の非存在下および存在下において、被験体から採取した試料の S h a t i 遺伝子の C p G アイランドにおけるメチル化状態を検出する検出工程と、
- 精神障害の個体および非精神障害の個体から採取した試料の S h a t i 遺伝子の C p G アイランドにおけるメチル化状態を指標として、被験化合物の非存在下における被験体から採取した試料のメチル化状態と被験化合物の存在下における被験体から採取した試料の前記メチル

化状態とを比較して、被験化合物が精神障害の治療剤および／または予防剤となるか否かを評価する評価工程と、を含むことを特徴とする精神障害治療剤および／または予防剤の評価方法。

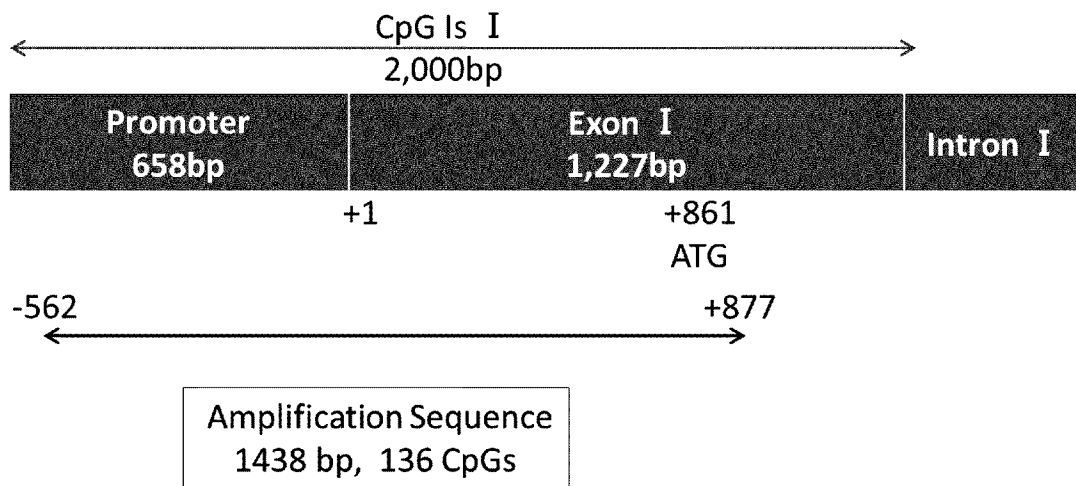
[請求項8] 精神障害が、薬物依存症、統合失調症、鬱病のいずれかにより生じたものである請求項7の精神障害治療剤および／または予防剤の評価方法。

[請求項9] 試料が、動物から採取した生体試料であることを特徴とする請求項7または8に記載の精神障害治療剤および／または予防剤の評価方法。

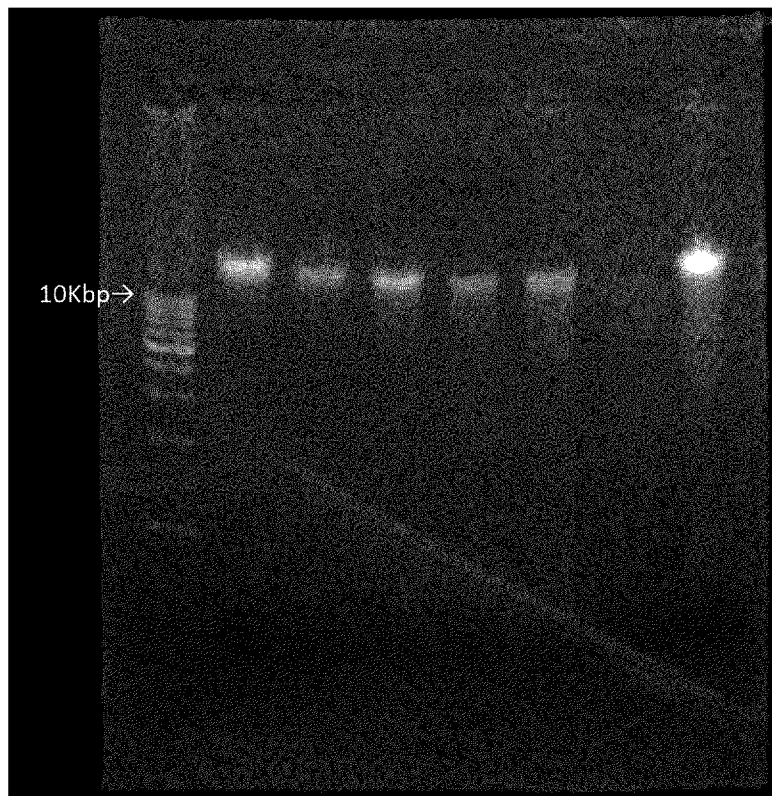
[請求項10] CpGアイランドは、配列番号1又は4に記載の塩基配列を含むことを特徴とする請求項7～9のいずれかの項に記載の精神障害治療剤および／または予防剤の評価方法。



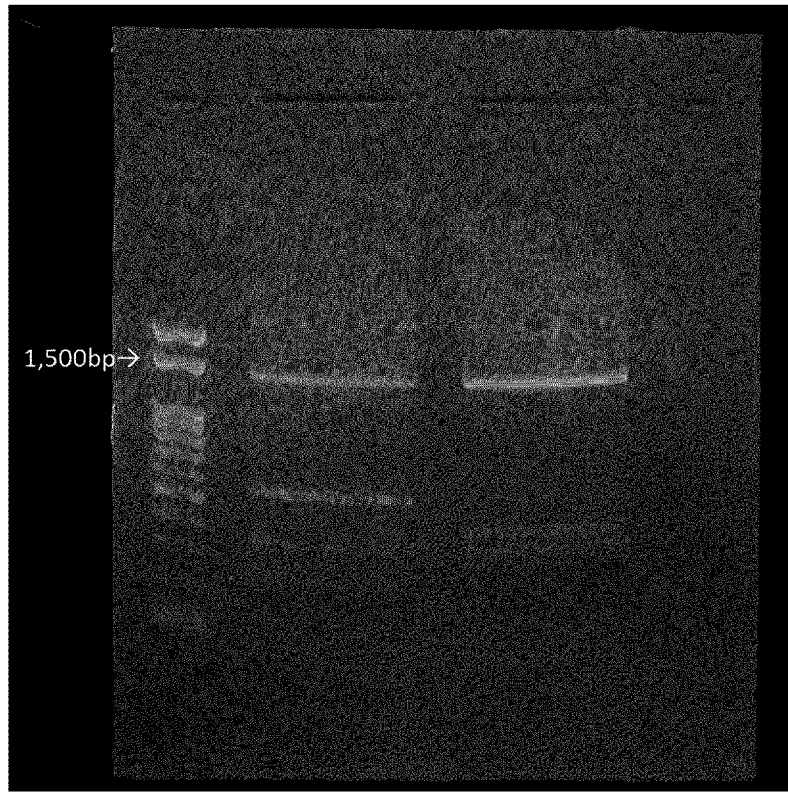
[圖1]



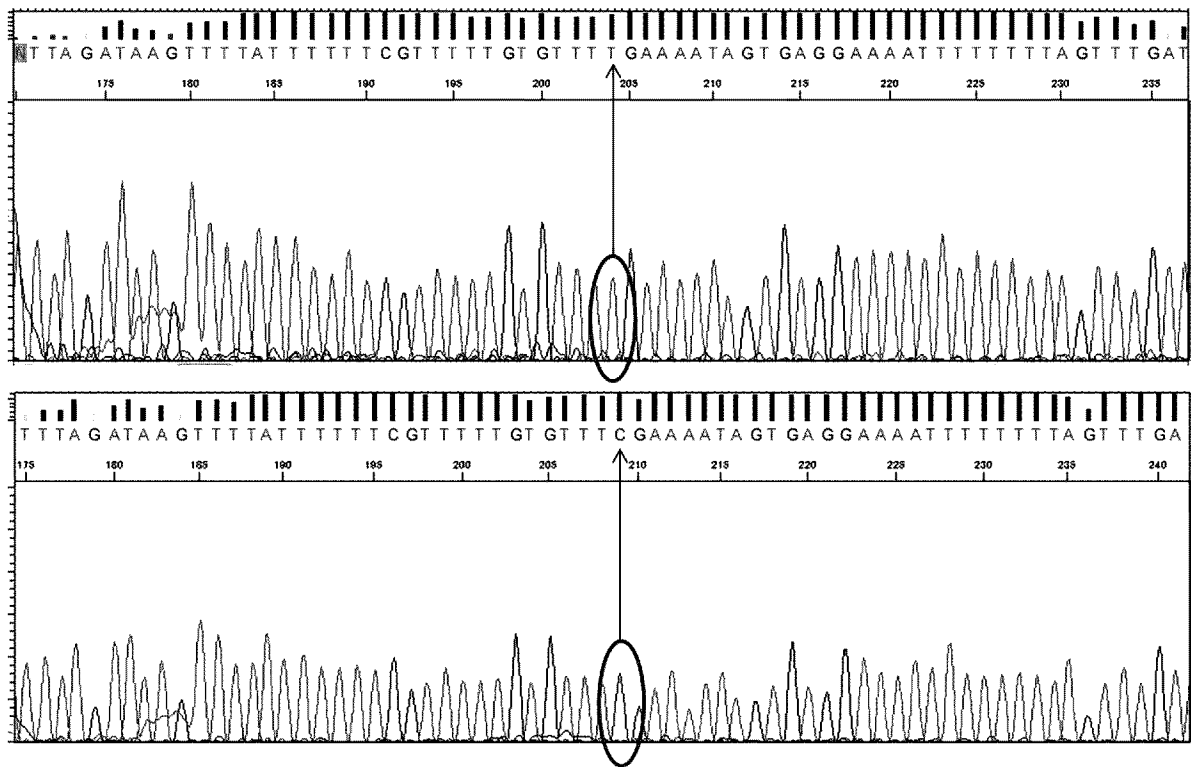
[圖2]



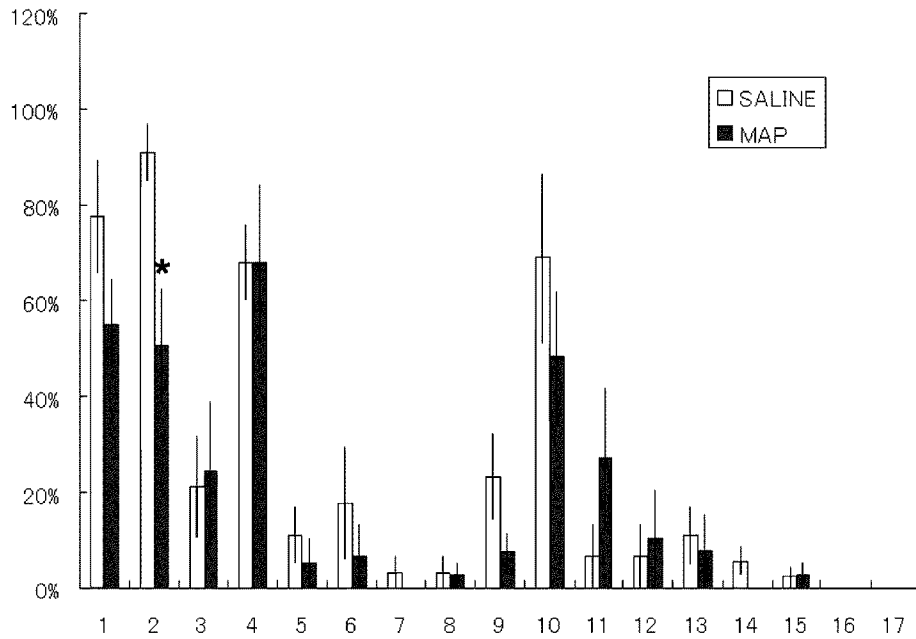
[3]



[4]



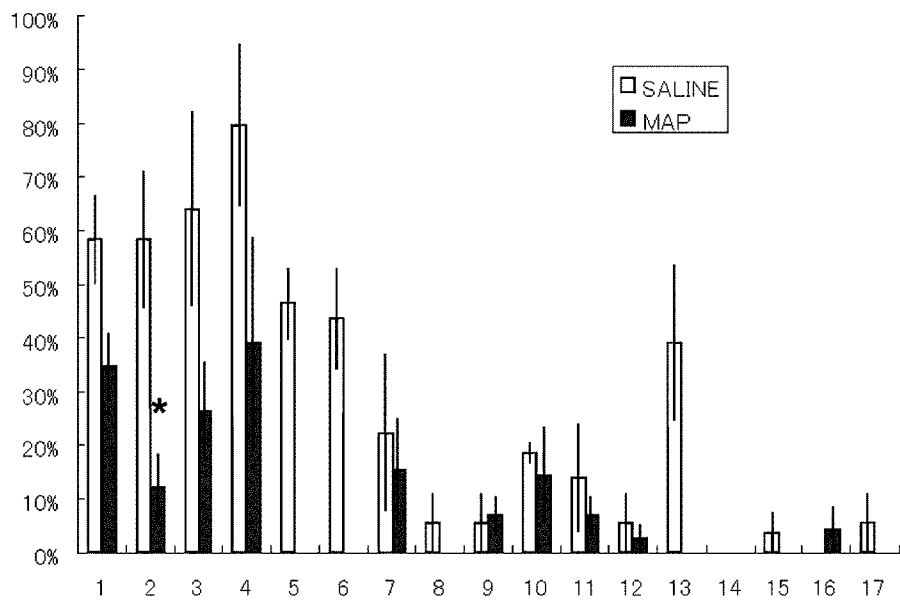
[図5]



転写開始点 上流

- 1 -533
- 2 -525
- 3 -454
- 4 -422
- 5 -416
- 6 -409
- 7 -305
- 8 -269
- 9 -244
- 10 -236
- 11 -218
- 12 -213
- 13 -200
- 14 -198
- 15 -192
- 16 -181
- 17 -159

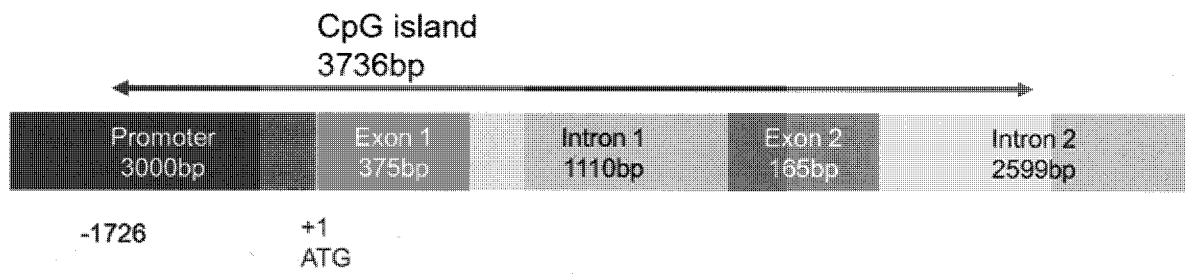
[図6]



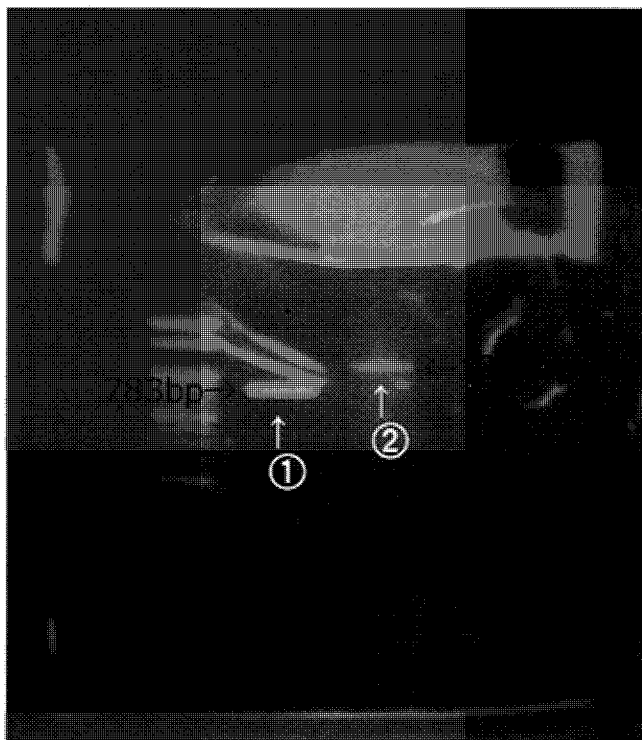
転写開始点 上流

- 1 -533
- 2 -525
- 3 -454
- 4 -422
- 5 -416
- 6 -409
- 7 -305
- 8 -269
- 9 -244
- 10 -236
- 11 -218
- 12 -213
- 13 -200
- 14 -198
- 15 -192
- 16 -181
- 17 -159

[図7]



[図8]

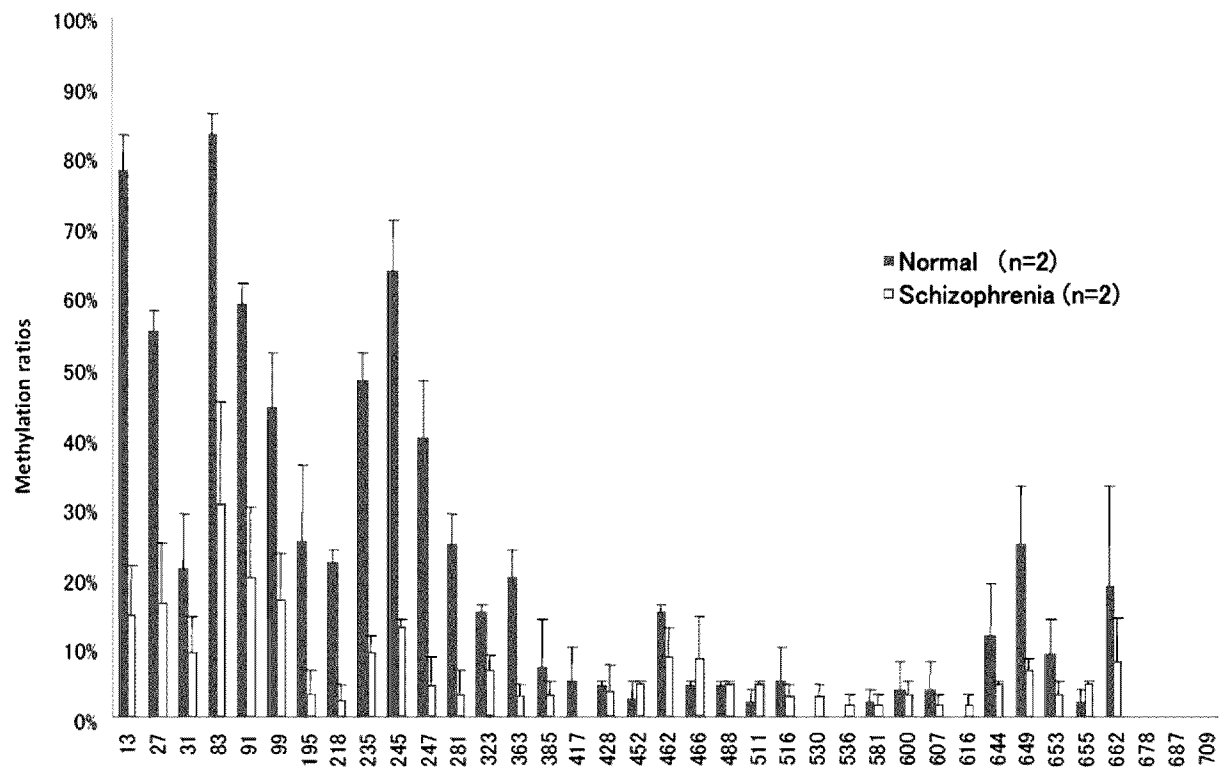


目的配列

①up1-down2・・・783bp

②up4-down1・・・1054bp

[ 9 ]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2014/053710

<p><b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>  <i>C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n</i></p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>											
<p><b>B. FIELDS SEARCHED</b></p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  <i>C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, C12N15/09</i></p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <table style="width:100%; border:none;"> <tr> <td style="width:33%;"><i>Jitsuyo Shinan Koho</i></td> <td style="width:33%;"><i>1922-1996</i></td> <td style="width:33%;"><i>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</i></td> <td style="width:33%;"><i>1996-2014</i></td> </tr> <tr> <td><i>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</i></td> <td><i>1971-2014</i></td> <td><i>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</i></td> <td><i>1994-2014</i></td> </tr> </table> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  <i>CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)</i></p>			<i>Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1922-1996</i>	<i>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</i>	<i>1996-2014</i>	<i>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1971-2014</i>	<i>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1994-2014</i>	
<i>Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1922-1996</i>	<i>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</i>	<i>1996-2014</i>								
<i>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1971-2014</i>	<i>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1994-2014</i>								
<p><b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b></p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:15%;">Category*</th> <th style="width:65%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width:20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td align="center">X</td> <td><i>Kyosuke UNO, "DNA Methyl-ka ni yoru Nanjisei Togo Shicchosho no Gen'in Kaimei Oyobi Shindan eno Oyo", Kenkyu Kadai Bango: 23890067, 2011 Nendo Kenkyu Jisseki Hokokusho, KAKEN: Database of Grants-in-Aid for Scientific Research, [online], 2012, [retrieved on 01 May 2014 (01.05.2014)], Retrieved from the Internet: &lt;URL:http://kaken.nii.ac.jp/d/p/23890067/2011/3/ja.ja.html&gt;</i></td> <td align="center">1-10</td> </tr> <tr> <td align="center">P,X</td> <td><i>MIYAZAKI, T. et al., The reduction of methylation on the upstream reagon of shati/nat8l transcription start site is induced by repeated administration of methamphetamine, Journal of Pharmacological Sciences, 2014.02.15, Vol.124, No.Supplement 1, p.183P, P2-4-6</i></td> <td align="center">1-10</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	<i>Kyosuke UNO, "DNA Methyl-ka ni yoru Nanjisei Togo Shicchosho no Gen'in Kaimei Oyobi Shindan eno Oyo", Kenkyu Kadai Bango: 23890067, 2011 Nendo Kenkyu Jisseki Hokokusho, KAKEN: Database of Grants-in-Aid for Scientific Research, [online], 2012, [retrieved on 01 May 2014 (01.05.2014)], Retrieved from the Internet: &lt;URL:http://kaken.nii.ac.jp/d/p/23890067/2011/3/ja.ja.html&gt;</i>	1-10	P,X	<i>MIYAZAKI, T. et al., The reduction of methylation on the upstream reagon of shati/nat8l transcription start site is induced by repeated administration of methamphetamine, Journal of Pharmacological Sciences, 2014.02.15, Vol.124, No.Supplement 1, p.183P, P2-4-6</i>	1-10
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	<i>Kyosuke UNO, "DNA Methyl-ka ni yoru Nanjisei Togo Shicchosho no Gen'in Kaimei Oyobi Shindan eno Oyo", Kenkyu Kadai Bango: 23890067, 2011 Nendo Kenkyu Jisseki Hokokusho, KAKEN: Database of Grants-in-Aid for Scientific Research, [online], 2012, [retrieved on 01 May 2014 (01.05.2014)], Retrieved from the Internet: &lt;URL:http://kaken.nii.ac.jp/d/p/23890067/2011/3/ja.ja.html&gt;</i>	1-10									
P,X	<i>MIYAZAKI, T. et al., The reduction of methylation on the upstream reagon of shati/nat8l transcription start site is induced by repeated administration of methamphetamine, Journal of Pharmacological Sciences, 2014.02.15, Vol.124, No.Supplement 1, p.183P, P2-4-6</i>	1-10									
<p><input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.      <input type="checkbox"/> See patent family annex.</p>											
<table style="width:100%; border:none;"> <tr> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </td> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </td> </tr> </table>			<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>							
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>										
<p>Date of the actual completion of the international search 02 May, 2014 (02.05.14)</p>		<p>Date of mailing of the international search report 20 May, 2014 (20.05.14)</p>									
<p>Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office</p>		<p>Authorized officer</p>									
<p>Facsimile No.</p>		<p>Telephone No.</p>									

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, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(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, G01N33/15, G01N33/50, 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 1971-2014年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2014年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2014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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

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
X	宇野恭介, DNA メチル化による難治性統合失調症の原因解明および診断への応用, 研究課題番号:23890067, 2011年度 研究実績報告書, KAKEN: 科学研究費助成事業データベース, [online], 2012, [retrieved on 2014.05.01], Retrieved from the Internet: <URL: http://kaken.nii.ac.jp/d/p/23890067/2011/3/ja.ja.html>	1-10

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 02.05.2014	国際調査報告の発送日 20.05.2014
--------------------------	--------------------------

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） 木原 啓一郎 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B	4867
--	--	----	------

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
P, X	MIYAZAKI, T. et al., The reduction of methylation on the upstream reagon of shati/nat8l transcription start site is induced by repeated administration of methamphetamine, Journal of Pharmacological Sciences, 2014. 02. 15, Vol. 124, No. Supplement 1, p. 183P, P2-4-6	1-10